The Determination of Oxytocin Levels in Posterior Pituitary and Plasma of Rats by a Radioimmunoassay

Shigeru AONUMA and Yasuhiro KOHAMA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Osaka, Japan

The method of a radioimmunoassay for oxytocin was developed. Antibody was produced in rabbits by the repeated injections of oxytocin-bovine serum albumin conjugate emulsified with Freund complete adjuvant, and ^{125}I -oxytocin was prepared by the modified chloramine T method and purified with two successive gel filtrations through the column of Sephadex G-15. The radioimmunoassay was carried out by incubation of a mixture of antibody, ^{125}I -oxytocin and oxytocin sample for 2 days at 4°C , using saline-0.01M phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.25% egg albumin as a diluent buffer, followed by separation of antibody-bound hormone (B) from free (F) by the dextran coated charcoal method (or ammonium sulfate precipitation method). The radioactivity of F (or B) and total reaction mixture was estimated, and the contents of oxytocin were calculated from the percentage of B. The sensitivity was $10\text{ }\mu\text{g}$ ($4\text{ }\mu\text{U}$). Crude oxytocin extracted from the posterior pituitary of cow according to Kamm's method equally cross-reacted to synthetic oxytocin used as a standard in this assay, without any interferences from any substances except oxytocin that was included in this extract. But the cross reactivity of synthetic lys-vasopressin to oxytocin was only 0.5%, and bovine serum albumin employed in the process of antibody production did not show any influences on the assay of oxytocin.

This radioimmunoassay method was applied for the determination of oxytocin contents in biological samples of rats. Pituitary samples were prepared by extracting with 0.25% acetic acid and by washing with ether. Plasma samples were prepared by extracting with cold acetone and 0.25% acetic acid, and by washing with ether. The reproducibility of oxytocin from plasma by this extraction method was 63%. The normal levels of oxytocin were ca $1.4\text{ }\mu\text{g}/\text{mg}$ in the posterior pituitary and ca $40\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ in plasma, but not detectable in the anterior pituitary of rats. The oxytocin levels decreased to ca $1.1\text{ }\mu\text{g}/\text{mg}$ in the posterior pituitary and to ca $30\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ in plasma 2 weeks after male and female rats were castrated. By this assay method it was confirmed that the plasma oxytocin levels during a reproductive cycle of female rats increase just before and after parturition and 1 minute after suckling. In the determination of rat biological samples a result of bioassay by a rat uterine muscle contraction method was about 10% higher than this radioimmunoassay.

(See pp. 1008~1017)

Oxytocin の Radioimmunoassay によるラット後葉、 血漿中 Oxytocin の測定

大阪大学薬学部

青 沼 繁, 小 浜 靖 弘

(昭和46年12月3日受付)

oxytocin の鋭敏な定量法として radioimmunoassay を試みた。抗体は oxytocin-BSA 結合物を用い、B と F の分離は dextran coated charcoal 法及び塩析法を使用した。感度は $10\mu\text{g}$, vasopressin との交叉反応性は約0.5%であった。本法によりラット後葉及び血漿中 oxytocin の測定が可能で、雌雄ラットにおいて去勢後それらの oxytocin 含量が減少すること及び雌性ラット血漿 oxytocin が分娩直前及び直後、哺乳直後に著明に増加することが認められた。

従来より oxytocin の検定法として用いられている生物学的方法は一般に操作が煩雑で、類似のペプチドや acetylcholine などにも反応性を示すなど特異性に欠け、また内在性の oxytocin を検定する場合にも予め複雑な抽出精製操作が必要という難点がある。近年多くの蛋白質及びペプチドにおいて免疫学的特異性を利用した radioimmunoassay が開発され、血中の微量ホルモンの定量に利用できるなど鋭敏なホルモン定量法として臨床面でも重要視されている。oxytocin についてもすでに Gilliland¹⁾, Glück²⁾ らにより radioimmunoassay が報告されているが、oxytocin が低分子ペプチドで、非常に不安定であるため抗体の作成や ^{131}I による標識操作などに困難さを併ない、内在性の oxytocin を定量できるまでには至っていない。そこで本報では oxytocin の鋭敏な radioimmunoassay を確立する目的で oxytocin-牛血清アルブミン結合物を抗原として用いることにより抗体を作成し、chloramine T を用いて調製した ^{131}I -oxytocin を用い oxytocin の定量化について検討を加えた。その結果 dextran coated charcoal 法あるいは塩析法による radioimmunoassay により oxytocin を定量でき、さらにラット後葉及び血漿中の oxytocin の測定にこの方法を適用し充分実用出来ることを認めたので報告する。

実 験 方 法

試料の調製

標準 Oxytocin : 合成 oxytocin を使用した。oxytocin は英局第11版記載のラット子宮収縮効力 400I.U./mg を有し、ブタノール：酢酸：水（4：1：5）による一次元上昇法パーパークロマトグラフィーにかけた後等分割した濾紙片からの溶出液の Folin 試薬による呈色反応及び子宮収縮効力の試験においてともに一致する Rf 値0.35の単一スポットを与えた。

Vasopressin : 合成 lysine vasopressin (Sigma 社製) はラット血圧上昇法で効力 20I.U./ml を有するものを用いた。

牛後葉抽出物 : 牛下垂体後葉アセトン乾燥末から Kamm 法³⁾に準じ0.25%酢酸抽出、硫酸分画後酢酸・エーテル処理により得られた粉末で、25I.U./mg のラット子宮収縮効力を有する。

ラットからの試料 : 体重 150~200g の正常雌雄ラットを撲殺後直ちに後葉及び前葉を剔出し、それぞれ 1,000倍量の 0.25% 酢酸でホモジナイズ後、100℃、5 分間加熱抽出し、遠心分離した上清をエーテルで洗い測定試料とした。血漿試料については体重 150~200g の正常雌雄ラット心臓から終濃度が 1 mg/dl となるようにヘパリンを加えた注射筒を用いて採血し、直ちに低温にて遠心分離して血漿を分離した。血漿に 9 倍量

の冷アセトンを加えよく攪拌した後遠心分離し、上清を減圧乾固し、残渣にもとの血漿の1/2量の0.25%酢酸を加え100℃、5分間加熱抽出後遠心分離した上清をエーテルで洗い、1N NaOHでpHを中性付近にもどし測定試料とした。

生理的狀態の変化に伴う生体中 oxytocin の変動を調べるため去勢後2週間目の雌雄ラットの後葉及び血漿、また雌ラットの生殖過程中すなわち交尾前12時間以内、妊娠10日目、分娩前6時間以内、分娩後1時間以内及び哺乳後1分以内に採血して得た血漿をそれぞれ上記の如く調製して測定試料とした。

Oxytocin—牛血清アルブミン (BSA) 結合物: Shick⁴⁾らの方法に従って BSA 20mg を含む 0.1M phosphate buffer (pH 7.5) 5ml に toluene-2, 4-diisocyanate 0.1ml を加え、25分間、0℃ではげしく攪拌後遠心分離した上清2mlをとり、この溶液に oxytocin 約5mgを含む0.1M borate buffer (pH 9.5) 2mlを加え、90分間37℃で incubation した。反応液を 0.1M (NH₄)₂CO₃ に対して4時間、さらに 0.9% NaCl-0.01M phosphate buffer (pH 7.4) (以下 PBS と略す) に対して20時間透析を行ない結合物を得た。

抗血清の作成

Oxytocin または牛後葉抽出物に対する抗血清: oxytocin 250 μ g (100I.U.) または牛後葉抽出物 4mg (100I.U.) を生理食塩水 1ml に溶解後等量の Freund complete adjuvant に懸濁させ、体重2kg前後の正常雄性家兎の皮下、筋肉内及び foot pad に注射した。さらに1週1回づつ3回同様な免疫を行ない、最初の注射から5週間目に耳静脈より採血後血清を分離し、-20℃にて保存し、使用に供した。

Oxytocin-BSA 結合物に対する抗血清: oxytocin-BSA 結合物溶液 0.8ml (oxytocin 400I.U. に相当) に等量の Freund complete adjuvant を加えて懸濁させたものを家兎の皮下、筋肉内及び foot pad に注射した。さらに3週及び6週間目に同様な抗原注射液を皮下及び筋肉内に注射、9週間目に 250 μ g (100I.U.) の oxytocin を adjuvant 法により皮下及び筋肉内に注射した。5週間目及び10週目に採血し血清を分離した。10週目の血清について56℃、30分間加熱して非働化し、血清1ml当り 160 μ g の BSA 及び0.25mlの正常ラット血清で吸収した後硫酸分画法⁵⁾により γ -グロブリン及び β -グロブリンを分離し、凍結乾燥品として得た。対照として BSA に対する抗血清を作成した。すなわち BSA を1回2mgの割合で adjuvant 法により家兎を1週1回づつ4週間免疫し、5週目に血清を得た。BSA 抗血清は BSA に対する沈降反応において oxytocin-BSA 抗血清とほぼ同等の力価を示した。BSA 抗血清からも oxytocin-BSA 抗血清の場合と同様にして γ -グロブリンを分画した。また対照として正常家兎からも血清を得た。

抗血清によるラット子宮収縮効力の中和試験

溶媒として PBS を使用し、非働化血清1mlあるいはグロブリン溶液 (血清1mlに相当) 1mlに oxytocin 100mU/1ml を加え、4℃、24時間 incubation した。反応後 3,000rpm で15分間遠心分離した上清について英局第11版記載のラット子宮収縮試験法に準じ残存効力を検定した。

抗血清中の L-Cystine Amino peptidase 活性の測定

和田法⁶⁾に準じ無処置血清あるいは非働化血清0.2mlに基質 L-cystine- β -dinaphthylamide 0.5ml を加え、37℃または4℃にて30分間反応させた。TCA により除蛋白し、濾過後濾液2mlに4g/mlの p-dimethylaminobenzaldehyde 液2mlを混合し、30分後分光光度計で 450m μ の波長の吸光度を測定した。標準として β -naphthylamine を用い、単位は血清100mlが1時間に基質から1mgの β -naphthylamine を分解する活性を1単位 (mg/dl/hr) とした。

¹³¹I-Oxytocin の調製

chloramine T 法⁷⁾に従い日本アイソトープ協会から購入した Na¹³¹I 2mC を含むバイアル中に 0.5M phosphate buffer (pH 7.5) 0.025ml, chloramine T 50 μ g/0.025ml を加え、さらに oxytocin 1.5 μ g/0.01ml を加えて1分間よく混合した後 sodium metabisulfite 100 μ g/0.05ml 次いで2.5mg 卵アルブミン (以下 EA と略す) を含む0.25%酢酸0.7mlを直ちに加え反応を止めた。この反応液をあらかじめ20mgの EA で前処置した Sephadex G-15 のカラム (1 $\times$ 15cm) により0.25%酢酸を用いて溶出し、¹³¹I-oxytocin を分離した。¹³¹I-oxytocin はブタノール:酢酸 水 (4:1:5) の溶媒系による一次元上昇法ペーパークロマトグラフ

ィー及び抗体との結合性から確認し, さらに Sephadex G-15 のカラムで再クロマトグラフィーを行なつて精製し, 0.25% EA を含む 0.25% 酢酸溶液として 4℃にて保存した. なお調製した ^{131}I -oxytocin は再クロマトグラフィー後 1 週間以内に使用した.

Radioimmunoassay の方法

抗原, 抗体及び試料などの希釈には全て 0.25% EA を含む PBS を用いた.

抗原抗体結合物 (B) と遊離の抗原 (F) の分離: dextran coated charcoal 法⁸⁾ (DCC 法と略す) と硫酸による塩析法を使用した. DCC は 0.25% EA を含む PBS で調製した 5% charcoal と 0.5% dextran (平均分子量約 77,000) を等量混合したものを原液とし, 50倍希釈した溶液 1 ml を抗原抗体反応液に加え混合した後 10 分間放置し, 遠心分離した上清 B と charcoal に吸着して沈殿した F とを分離した.

塩析法は反応液に牛血清 γ -グロブリン 1mg/0.1ml, 5.5M 硫酸 1 ml を加えて 30 分間放置後遠心分離した上清 F と沈殿 B を分離した. 両法ともあらかじめ反応液全体の放射能を well type scintillation counter で測定しておき, B と F を分離後沈殿物の放射能を測定し, B% ($B/(B+F) \times 100$) を算出した.

標準曲線及び試料の測定: 希釈した抗血清 0.2ml, ^{131}I -oxytocin 0.2ml 及び oxytocin 試料 0.2ml を混合し, さらに 0.4ml の 0.25% EA を含む PBS を加え 4℃にて incubation した. なお血漿試料の場合には抗血清 0.2ml, ^{131}I -oxytocin 0.2ml, 試料 0.5ml 及び 1% EA を含む PBS 0.1ml を混合して incubation した. 反応後 DCC 法により B と F を分離して B% を算出後 oxytocin の標準曲線より測定値を読みとつた. 測定値は 3 例以上の平均値として求め, 標準曲線は試料測定の度に作成した.

実験結果

抗血清による Oxytocin のラット子宮収縮効力の中和試験

Table I において 2) ~ 5) は免疫開始後 5 週間目に得られた血清であるが, oxytocin 単独, 牛後葉抽出物, oxytocin-BSA 結合物に対する抗血清によりそれぞれ oxytocin の効力が中和されることが認められた. しかし oxytocin 単独による免疫では中和効力は弱く, oxytocin 以外の物質が抗原中に共存する場合の方が oxytocin に対する抗体が容易に産生された. そこで radioimmunoassay に使用する抗血清として

Table I. Inhibition of biological activity of oxytocin by antiserum

Serum	Inhibitory activity* (mU./ml)
1) Normal	4.0 $\pm$ 1.3
2) Anti oxytocin	6.8 $\pm$ 0.6
3) Anti posterior pituitary extract	15.8 $\pm$ 1.0
4) Anti oxytocin-BSA (5 weeks)**	26.0 $\pm$ 3.0
5) Anti BSA	2.5 $\pm$ 1.0
6) Anti oxytocin-BSA (10 weeks)**	204.0 $\pm$ 30.1
7) 6) after absorbed with BSA and rat serum	192.0 $\pm$ 21.2
8) γ -Globulin from 1ml of 6) undiluted	70.9 $\pm$ 2.3
9) β -Globulin from 1ml of 6) undiluted	15.3 $\pm$ 0.8
10) γ -Globulin from 1ml of 5)	2.8 $\pm$ 0.1

*The mixture of 1ml of serum or globulin solution and 100mU./1ml of oxytocin in PBS (pH 7.4) was incubated for 24 hours at 4℃, followed to an assay on rat uterine muscle in vitro. In 4) and 6), serum diluted to 1/4 was used. Result was shown as the mean value of 3 experiments $\pm$ S.E. of inhibitory activity per ml of serum undiluted.

**4) was obtained 5 weeks and 6) was obtained 10 weeks after the first immunization.

Table II. L-Cystine aminopeptidase (CAP) activity in anti oxytocin serum

Serum	Incubation temperature (°C)	CAP activity (mg/dl/hr)*	
		Non treated†	After inactivated (56°C, 30min)
Normal	37	4.65	1.38
	4	0.83	0.13
Anti oxytocin	37	4.73	1.13
	4	0.98	0.12
Anti posterior pituitary extract	37	5.04	2.25
	4	0.95	0.30
Anti oxytocin-BSA (10weeks)	37	4.96	1.95
	4	1.00	0.26

*CAP activity was determined by Wada's method using L-cystine- β -dinaphthylamide as a substrate and β -naphthylamine as a standard.

Fig. 1. Separation of ^{131}I -oxytocin on SephadexG-15 column (1×15cm) using 0.25% acetic acid. The column was presaturated by 0.25% acetic acid containing 20mg of egg albumin before a sample applied.

最も中和効力の強い oxytocin-BSA 免疫家兎を選び, さらに追加免疫して10週目に抗血清を得た. この抗血清の中和効力は ml 当り 204mU. と強く, BSA 及びラット血清で吸収した後も効力の減少は見られなかった. しかし抗血清から分画された γ -グロブリンでは中和効力が約 1/3 に減少し, β -グロブリン分画にも多少抗体の分散が認められた. 従つて radioimmunoassay には oxytocin-BSA 抗血清を吸収操作及び γ -グロブリンなどへの分画操作を加えずそのまま使用した.

抗血清中の L-Cystine Aminopeptidase 活性

抗血清作成の際大量の oxytocin 投与により家兎血中 oxytocin 分解酵素活性が増加する可能性が考えられるので本活性と平行する L-cystine aminopeptidase 活性を各抗血清につき測定した. その結果 Table II に示す如くいずれの抗血清の活性も正常血清と同程度であつた. そして血清を非働化した後 4℃で反応を行なつた場合には本活性は無視できることが認められたので以下の実験では全て血清は56℃, 30分間加熱して非働化後4℃にて使用した.

^{131}I -Oxytocin の精製

chloramine T 法により標識された ^{131}I -oxytocin の Sephadex G-15 のカラムにおける溶出曲線は Fig. 1 に示す如くであつた. 各フラクションのペーパークロマトグラフィー (Fig. 2) 及び抗体との結合性 (Fig. 1) から ^{131}I -oxytocin は最後のフラクション III に溶出されてくることが認められた. フラクション I には EA に吸着した ^{131}I -oxytocin の分解物, 無機 ^{131}I が, II には無機 ^{131}I が溶出された. III には ^{131}I -oxytocin の他に少量の無機 ^{131}I などが含まれていたので Sephadex G-15 のカラムで更に精製を行なつたところ Fig. 1, 2 に示すようにペーパークロマトグラム上単一 (R_f : 0.5) で, 抗体との結合性の高い ^{131}I -oxytocin が得られた. 比放射能は Greenwood⁷⁾ らの方法により概算したところ約 $400\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ であつた. なお Greenwood⁷⁾ の原報通りヨウ素化反応後還元剤を添加し, ゲル透過を行なつた場合にはヨウ素化 oxytocin の抗体結合能力及び子宮収縮活性は完全に消失したが, 本実験の如く還元剤を加えた後直ちに EA を含む 0.25% 酢酸を添加し反応液を希釈することにより抗体との結合能力は約80%, 生物活性は約50%残存することを認めている. また ^{131}I -oxytocin の精製法として Sephadex G-10⁹⁾, G-25²⁾ 及び Amberlite IRA-400¹⁾ の使用はいずれも不適当であつた.

Radioimmunoassay に関する基礎的検討

B と F の分離: DCC 法及び塩析法による B と F の分離を Fig. 3 示した. B と F を分離するための DCC の最適濃度は50倍希釈であり, この濃度における DCC 法と塩析法の B 及び F の分離能はほぼ同程度であつた. 以下の実験には操作の簡単な DCC 法を用いて B と F の分離を行なつた.

抗血清の ^{131}I -oxytocin 結合能: $30\mu\text{g}$ の ^{131}I -oxytocin に倍数希釈した抗血清を加え, 4℃, 2日間 incubation した後 B% を求めたところ Fig. 4 に示すように200倍希釈の抗血清は約80%の ^{131}I -oxytocin を結合する能力を有し, 6400倍希釈においても約20%の結合能を示した. 実際の測定には50%前後の結合能を示す1000から3000倍希釈の抗血清を使用した.

反応時間: Fig. 5 に示す如く2日間の incubation で反応はほぼ平衡に達し, 7日目まで B% の値はほ

Fig. 2. Paper radiochromatogram of each fraction in Fig. 1 on Toyo filter paper No. 51 using the solvent of butanol : acetic acid : water (4 : 1 : 5) in ascending method.

Fig. 3. Separation of oxytocin bound to antibody from free.

In a) 1ml of various diluted DCC solutions or in b) 1mg/0.1ml of bovine serum γ -globulin and 1ml of 5.5M ammonium sulfate were used for 1ml of reaction mixture. (○) antiserum, (×) normal serum, (●) antiserum minus normal serum

Fig. 5. Effect of incubation time on binding of ^{131}I -oxytocin to antibody. Thirty μg of ^{131}I -oxytocin was incubated at 4°C with antiserum diluted to 1/3000.

とんど変化しないことが認められたので反応時間は2日間とした。

標準曲線

以上の如く基礎的条件について検討した上で oxytocin の radioimmunoassay の標準曲線を作成した。その結果 Fig. 6 に示すように 30 μg の ^{131}I -oxytocin, 3000倍希釈の抗血清を用いた場合約 10 μg から B% の低下がおこり, 250 μg までの範囲で oxytocin を定量することができた。また 100 μg の ^{131}I -oxytocin と 1000倍希釈の抗血清を用いると Fig. 7 の如く測定範囲は約 25 μg から 25m μg の間であつた。なお標準曲線は incubation 期間が2~7日目の間では Fig. 7 に示すように変化せず, 本法の条件下では incubation 中に oxytocin の分解などによる免疫学的活性への影響は認められなかつた。以上の如く本 radioimmunoassay により最高検出感度 10 μg (4 μU .) で oxytocin を定量的に測定できることが認められた。

Fig. 4. Titration curve of anti oxytocin-BSA serum.

Serial dilutions of antiserum were incubated for 2 days at 4°C with 30 μg of ^{131}I -oxytocin. Binding capacity was measured by DCC method.

Fig. 6. Standard curve for oxytocin radioimmunoassay. The mixture of 30 μg of ^{131}I -oxytocin and antiserum diluted to 1/3000 was incubated with various concentrations of standard oxytocin for 2 days at 4°C . Bound % was determined by DCC method.

Fig. 7. Effect of incubation time on standard curve.

One hundred μg of ^{125}I -oxytocin and antiserum diluted to 1/1000 were used. (x) 1 day, (○) 2 days, (△) 4 days, (●) 7 days

Fig. 8. Cross reaction of posterior pituitary extract, synthetic lys-vasopressin and BSA in oxytocin radioimmunoassay. (●) oxytocin, (○) posterior pituitary extract, (△) vasopressin, (□) BSA

Radioimmunoassay の特異性

本法の特異性を調べるため牛後葉抽出物, 合成 lysine vasopressin 及び抗体作成の際 oxytocin の結合蛋白として使用した BSA について測定を行なった. その結果 Fig. 8 から明らかなように 25I.U./mg の子宮収縮効力を示す牛後葉抽出物は oxytocin と交叉反応を示し, 子宮収縮効力に対する免疫学的活性に換算すると oxytocin と全く同じ活性を示した. すなわち牛後葉抽出物中に含まれる vasopressin などのペプチドや oxytocin 以外の物質に影響されることなく後葉中の oxytocin のみが特異的に測定された. 一方 vasopressin は oxytocin の約0.5%しか交叉反応性を示さず (vasopressin は 400I.U./mg の血圧上昇作用を有すると仮定した), 本法における vasopressin の交叉反応は無視することが出来た. また BSA も 250 μg までの量では交叉反応を示さず抗体として oxytocin-BSA 抗血清を用いた本法が BSA に妨害されることなく oxytocin を特異的に測定できることが認められた.

ラット生体内試料の測定

正常ラット後葉及び血漿中 Oxytocin: 後葉より0.25%酢酸抽出, 血漿よりアセトン抽出した抽出物中の oxytocin が本 radioimmunoassay により測定でき, 結果を Table III に示した. 後葉抽出物を子宮収縮試験により検定したところ雄ラットでは $1.56 \pm 0.32 \mu\text{g}/\text{mg}$ (0.70~2.82 $\mu\text{g}/\text{mg}$), 雌ラットでは $1.67 \pm 0.41 \mu\text{g}/\text{mg}$ (0.57~3.80 $\mu\text{g}/\text{mg}$) であり, radioimmunoassay の結果と同様各ラット間の個体差は大きい, radioi-

Table III. Determination of oxytocin levels in posterior pituitary and plasma of normal and castrated rats by radioimmunoassay

Group		Oxytocin level*	
		Posterior pituitary ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Plasma ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
Male	Normal	1.37 ± 0.45 (0.56~3.00)	35.1 ± 10.6 (<15.7~53.0)
	Castrated	1.09 ± 0.46 (0.13~2.86)	27.2 ± 11.8 (<15.7~57.6)
Female	Normal (esterus)	1.49 ± 0.38 (0.16~4.15)	49.0 ± 9.0 (<15.7~70.8)
	Castrated	1.13 ± 0.30 (0.58~2.25)	36.2 ± 5.3 (15.7~56.2)

*Mean value of 3 to 5 rats, in which oxytocin could be detected, $\pm$ S.E.
(range from minimum value to maximum.)

mmunoassay の結果の方が少し小さな値を与えた。なお前葉抽出物においても子宮収縮法で $0.57 \pm 0.10 \mu\text{g}/\text{mg}$ ($0 \sim 0.70 \mu\text{g}/\text{mg}$) の活性を示したにもかかわらず radioimmunoassay では使用した 5 匹のラットにおいていずれも oxytocin を検出することはできなかった。また血漿についても血漿に既知量の oxytocin 加えアセトン抽出による oxytocin の回収率を測定したところ radioimmunoassay では約 63%, 子宮収縮法では約 74% であり、後葉、前葉及び血漿においていずれも子宮収縮試験法による結果の方が radioimmunoassay の値よりも高いことが認められた。Table III に示した血漿中 oxytocin 含量は回収率 63% により補正したものであるが、後葉の場合と同様各個体間の差は大きく、各群 5 匹中の 0~2 匹において本法では oxytocin を検出することが出来なかったが、平均値において雌ラットの oxytocin 含量が雄よりも高い傾向を示した。なお血漿試料測定の際血漿そのままあるいは TCA 抽出¹³⁾ した後測定する方法はいずれも oxytocin の回収率が 10% 以下であり本法の測定試料として適当ではなかった。

去勢ラット後葉及び血漿中 Oxytocin: 去勢後 2 週間目の後葉中 oxytocin 含量は雌雄ラットとも Table III に示すとおり正常ラットに比較して減少する傾向を示した。血漿中 oxytocin も後葉の場合と同様去勢により減少することが認められた。

雌性ラット生殖期間中の血漿中 Oxytocin: 交尾、妊娠、分娩及び哺乳期間中のラット血漿 oxytocin は Fig. 9 にみられるように 3 例とも交尾、妊娠中期までは正常値を保っているが、分娩直前に増加し、分娩直後ではさらに著しく増加することが認められた。また哺乳期においても高濃度の oxytocin が放出されていることが認められた。

Fig. 9. Plasma oxytocin levels during reproductive cycle in rat.

Rat was bled from heart; a), within 12 hours before mating; b), within 6 hours before parturition; c), within 1 hour after parturition and d) within 1 minute after suckling.

*Minimum sensitivity

考 察

分子量数千以下の抗原性が極めて弱い angiotensin II¹⁰⁾, bradykinin¹⁰⁾, vasopressin¹¹⁾ など低分子物質の抗体を作成する場合、一般に免疫抗原として高分子蛋白などとの結合物を用いる方法がとられている。oxytocin については Gilliland¹¹⁾, Glick²⁾ また最近 Chald¹²⁾ らが oxytocin 単独あるいは炭素微末に吸着させたものを免疫に使用しているが、6~10ヶ月というかなり長い免疫期間を要している。著者らは oxytocin の免疫抗原として oxytocin 単独、牛後葉抽出物及び oxytocin-BSA 結合物について比較検討し、oxytocin 単独よりは oxytocin 以外の物質が共存の方が抗体の産生は容易であり、oxytocin-BSA を用いることにより約 3 ヶ月で 3000 倍希釈で使用できる抗血清を得ることができた。さらに BSA で吸収後も中和効力が減少しないこと及び oxytocin の抗原抗体反応系に BSA が影響しないことから oxytocin についても結合蛋白を使用する方が簡単な抗体作成法であると言える。

oxytocin の如き低分子ペプチドの抗原抗体反応を行なう場合血清中のペプチダーゼに注意せねばならない。そこで抗血清から抗体 γ -グロブリンの分画を試みたが、抗体活性が約 1/3 に減少し、 β -グロブリン分画へも活性が分散することが認められ適当ではなかった。一方 angiotensin II などにおいて angiotensinase を除くため EDTA¹³⁾, dimercaprol¹⁴⁾, edetic acid¹⁴⁾ などの添加が試みられているが、本実験に用いた抗血清中の CAP 活性は正常の場合と変わらず、非働化後 4℃にて反応を行えば CAP 活性はほとんど消失するが、抗体活性は失われなことが認められたので血清を非働化後 4℃にて使用し、特に分解酵素阻害剤などの添加は行なわなかった。著者らはすでに oxytocin の長期間投与による各種臓器及び体液中の

oxytocin 不活性化酵素の変動について検討し、子宮を除いて他の臓器及び体液中の酵素活性は影響を受けないことを認めており¹⁵⁾、今回の結果と一致している。

ICI 法による oxytocin のヨウ素化についてはすでに報告したが¹⁶⁾、調製の簡便さと比放射能の点で radioimmunoassay には chloramine T 法が適当であつた。chloramine T 法において特に還元剤 sodium metabisulfite は oxytocin の生物学的及び免疫学的活性を阻害するため、0.25% 酢酸による希釈と保護剤としての EA の添加は必須であり、EA の添加はヨウ素化反応物を Sephadex G-15 で溶出する際損傷を受けた ¹³¹I-oxytocin などが EA とともに溶出されるという利点があつた。得られた ¹³¹I-oxytocin はペーパークロマトグラフィーの Rf 値¹⁶⁾から oxytocin 1 分子当り 2 個の I 原子が導入されたものが主成分であると思われる。さらに ¹³¹I-oxytocin は抗体と約80%の結合能を有し、本 radioimmunoassay に充分使用することができた。

oxytocin の抗原抗体反応物の分離法としてすでに二抗体法²⁾、塩析法¹⁷⁾、透析法¹⁸⁾、電気泳動法¹⁾などが試みられているが、本実験で検討した DCC 法もほぼ塩析法と同じ分離能を示すことが認められた。最近 Chard らも DCC 法について同様な結果を報告している¹²⁾。DCC 法は低分子物質には有効な方法で、oxytocin おいても他の方法に比較して操作が簡便、安価、短時間内に結果が得られること及び多数の試料の測定に適しているなど多数の利点が認められた。

本法の検出感度は 10 μ g (4 μ U.) であり、種々の希釈段階の抗血清及び ¹³¹I-oxytocin を使用することにより比較的広い範囲において oxytocin の定量ができた。本法による牛後葉抽出物の測定結果から天然の oxytocin も合成品と全く同様な活性を示し、oxytocin と類似した vasopressin などとの反応性はほとんど無視することができ、oxytocin のみを特異的に測定することができた。

実用化の手がかりとして radioimmunoassay によりラット生体試料を測定し、oxytocin の主要な生理作用の1つである子宮収縮作用を利用した生物学的検定法による値と比較検討した結果、下垂体からの0.25% 酢酸抽出物、血漿からのアセトン抽出物では生物学的検定法による値の方が約10%高く出た。これは試料中に oxytocin 以外に子宮収縮作用物質が含まれているためと考えられる。本法において血漿をそのまま測定すると oxytocin は検出されなかつたが、血漿そのままでは血漿中の何らかの物質が免疫反応を阻害するか、B と F の分離の際に高濃度の蛋白などによる妨害があると考えられるが詳細は不明であつた。アセトン抽出法による oxytocin の回収率は約 63% であり、最近 Chard ら¹²⁾がヒト血漿中 oxytocin の測定に使用している fuller's earth 吸着法と同程度であつた。

血漿中 oxytocin 値についてはすでに生物学的検定法により牛、羊、ヤギ、ヒト及びラットにおいて正常時 0~400 μ U./ml、分娩及び射乳時には著明に増加することが報告されているが^{19)~23)}、動物、採血法及び抽出法などによりかなり異なつた値が出されている。本法で測定したラット血漿中 oxytocin 値はラット間の個体差は大きいが平均約 16 μ U./ml であり、使用した20匹のラットの内6匹について oxytocin を検出することが出来なかつたことから血漿中 oxytocin 値はかなり低いと推定される。

一方種々の生理的状態のラット後葉及び血漿中 oxytocin を測定した結果、去勢により雌雄とも後葉及び血漿中の濃度が低下し、oxytocin の分泌あるいは代謝が性ホルモンにより影響されていることが認められ、また妊娠後期、分娩、哺乳期間中には著明に血漿中 oxytocin が増加しており、著者らの尿中子宮収縮物質が妊娠後期に増加する²⁴⁾、雌雄ラットにおいて oxytocin が特に生殖器に貯留する¹⁶⁾及び oxytocin の生体内における不活性化が特に卵巣により強く影響される¹⁵⁾という報告と考え併わせると妊娠、分娩、乳汁のみならず雄性動物における生殖現象にも oxytocin が影響を及ぼしていることが推察される。

現在 oxytocin の生理学的意義についてはまだ不明点が多く、radioimmunoassay は血中 oxytocin の簡便な測定法として oxytocin の動的代謝のみならず分泌及び作用機序などの生理化学的研究並びに臨床検査への応用面において果す役割は大きいものである。

結 論

oxytocin-BSA 結合物に対する抗体と chloramine T 法で調製した ^{131}I -oxytocin を用い DCC 法または塩析法による radioimmunoassay により $10\mu\text{g}$ ($4\mu\text{U}$) の oxytocin, 及びラット後葉, 血漿からそれぞれ 0.25% 酢酸抽出, アセトン抽出された oxytocin を定量することができた. 測定値はラット子宮収縮法による値より約 10% 低く, lysine vasopressin との交叉反応性は約 0.5% であった.

本 radioimmunoassay により雌雄ラット後葉及び血漿中の oxytocin が去勢後減少することを認めた. また分娩前後及び哺乳期に血漿中 oxytocin が著明に増加することが免疫学的方法により認められた.

終りに本研究の試料の一部を提供された帝国臓器製薬株式会社に感謝するとともに実験の一部を担当された岡上伊都子修士, 瀬古はるみ学士に心から感謝する.

本論文の要旨は次の 2 つの学会において発表した. 「日本薬学会第 89 年会, 名古屋, 1969 年 4 月」「第 19 回日本薬学会近畿支部総会, 大阪, 1969 年 10 月」

文 献

- 1) P.F. Gilliland and T.E. Prout : Metabolism, 14 : 918 (1965).
- 2) S.M. Glick, M. Wheeler, A. Kagan and P. Kumaresan : Advan. Exp. Med. Biol., 2 : 93 (1968).
- 3) O. Kamm, T.B. Aldrich, I.W. Rowe and E.P. Bugbee : J. Am. Chem. Soc., 50 : 573 (1928).
- 4) A.F. Shick and S.J. Singer : J. Biol. Chem., 236 : 2477 (1961).
- 5) 中村 弘, 尾上 薫 : 蛋白質, 核酸, 酵素, 11 : 1587 (1966).
- 6) 和田 等 : 日産, 18 : 1077 (1966).
- 7) F.C. Greenwood, W.M. Hunter and J.S. Grover : Biochem. J., 89 : 114 (1963).
- 8) V. Hervert, K.S. Law, C.W. Gottlieb and S.J. Bleicher : J. Clin. Endocr., 25 : 1375 (1965).
- 9) W.N. Spellacy and K.L. Carson : Obstet. Gynec., 29 : 862 (1967).
- 10) T.L. Goodfriend, L. Levine and G.D. Fasman : Science, 144 : 1344 (1964).
- 11) M.A. Permutt, C.W. Parker and R.D. Utiger : Endocrinology, 78 : 809 (1966).
- 12) T. Chard, M.J. Kitau and J. Landon : J. Endocr., 46 : 269 (1970).
- 13) F.M. Dietrich : Immunochemistry, 4 : 65 (1967).
- 14) G.W. Boyd, J. Landon and W.S. Peart : Lancet, 2 : 1002 (1967).
- 15) 青沼 繁, 田中慶一, 谷口伊都子, 山元 弘 : 日内分泌誌, 46 : 789 (1970).
- 16) 青沼 繁, 田中慶一, 赤松弘子 : 日内分泌誌, 46 : 387 (1970).
- 17) T. Chard, M.L. Forsling and M.J. Kitau : J. Endocr., 43 : 1xi (1969).
- 18) M. Wheeler, A. Kagan and S.M. Glick : Clin. Res., 14 : 479 (1966).
- 19) T. Chard, N.R.H. Boyd, M.L. Forsling, A.S. McNeilly and J. Landon : J. Endocr., 48 : 223 (1970).
- 20) J.A. Coch, C. Fielitz, J. Brovetto, H.M. Cabot, H. Coda and A. Faga : J. Endocr., 40 : 137 (1968).
- 21) J.S. Robert and L. Share : Endocrinology, 84 : 1076 (1969).
- 22) 浜野 穆 : 横浜医学, 19 : 90 (1968).
- 23) R. Caldeyro-Barcia and H. Heller : Oxytocin, (1961), 358-377, 412-424, 425-436, Pergmon Press, Oxford.
- 24) 青沼 繁, 浜 一技, 菅田裕子, 住田幸子 : 薬学研究, 34 : 11 (1962).