Determination of Plasma Progesterone, Estrone, and Estradiol-17 β by Radioimmunoassay

Takayoshi AOKI

The Center for Health Care of Aichi, Nagoya, Japan

An efficient radioimmunoassay system for simultaneous measurement of plasma progesterone, estrone, and estradiol-17 β has been developed using the antisera produced by the immunization of rabbits with progesterone-20-(0-carboxymethyl)-oxime BSA and estradiol-17 β -succinyl BSA. One ml aliquots of plasma from nonpregnant women were extracted once with 8 ml of ether and thin layer chromatographed (BAKER-FLEX Silica Gel IB) in the solvent system of chloroform/ethanol 19 : 1, and the fractions of progesterone, estrone, and estradiol-17 β , which were definitely separated from the cross-reacting steroids, were then radioimmunoassayed. Separation of the free from the antibody-bound radioactivity was achieved by ammonium sulfate precipitation. The sensitivity of the radioimmunoassay was 10 Pg/ml for all three steroids assayed. Only four hours are required for the determination of 5 plasma samples (15 fractions), and 50 samples (150 fractions) can be determined by a single worker in 16 hours. (See pp. 612~618)

Radioimmunoassay による血漿中 Progesterone, Estrone, Estradiol-17 β の 測 定

愛知県総合保健センター成人病診断部

青 木 孝 允

(昭和47年10月16日受付)

臨床に於て、非妊婦血中の progesterone, estrone, estradiol-17 β を比較的容易に測定せんとする目的で、3 ホルモンの radioimmunoassay (RIA) を試みた。progesterone-20-oxime BSA 及び estradiol-17 β -succinyl BSA をウサギに免疫して得た抗体は、目的とするステロイド以外とも交叉反応を示す為、検体を予め薄層クロマトグラフィーで1回精製した。RIA の感度は 10Pg/ml で極めてすぐれており、全操作を通じた能率面でも略々満足出来るものである。

緒 言

医学の進歩と共に、診断及び治療面に於けるステロイドホルモン測定的重要性は近年急速に高まってきた。1969年 estradiol-17 β の radioimmunoassay (RIA)¹⁾ が報告されて以来、此の RIA によるステロイド測定法は其の迅速性と高い感度が注目され、新しい臨床検査法として実用化が期待されている。

著者は産婦人科診療面で特に要望の多い血中 progesterone (P), estrone (E₁), estradiol-17 β (E₂) の測定を RIA で比較的能率よく行う方法を確立したので報告する。

実験方法並びに結果

1. 抗血清の作製

抗 estrogen 血清は estradiol-17 β -succinyl BSA conjugate (E₂-17 β -BSA) をウサギに免疫して得たが、其の詳細は既に報告した²⁾ので progesterone 抗血清の作製についてのみ記す。progesterone-20-(O-carboxymethyl) oxime BSA conjugate (P-20-BSA) を 0.01M phosphate buffer, pH 7.4 1ml 当り 2 mg の割合で溶解し、等量の Freund's complete adjuvant を加えて emulsion とし、2羽のウサギ(約3.5kg 成熟雌)の背部皮下数個所に分けて注射した。免疫の過程を Table 1. に示す。2週間隔で7回免疫した Rabbit A. から9,200 $\times$ の力価を有する抗 P-20-BSA を得た。力価の決定方法は、8 $\times$ 120mm の硝子製試験管(同じ規格の試験管を後述する RIA に使用した)に bovine γ -globulin を1%の割合で含有する 1/15M phos-

Table 1. Immunization of rabbits by multiple subcutaneous injections of progesterone-20-oxime-BSA. Rabbit A produced a satisfactory antiserum following 6 injections at 2 week intervals and a single booster.

Injection Animals	(1)	(2)	(3)	titration	(4)	(5)	titration	(6)	(7)	titration
Rabbit A	5 mg	5 mg	5 mg	32 $\times$	5 mg	3 mg	850 $\times$	3 mg	3 mg booster	9,200 $\times$
Rabbit B	5 mg	4 mg	2 mg	96 $\times$	2 mg	injured				

phate buffer, pH 7.4 (以下抗血清の稀釈には此の液を用いた) 0.1ml で抗 P-20-BSA を段階稀釈した系列を作り, これに2.5%エタノールを含む 1/15M phosphate buffer, pH 7.4 (放射性ステロイド, 標準ステロイド, 検体の溶解にはすべて此の液を用いた, 以下単に buffer と略) に溶解した progesterone-1, 2-³H (50.3Ci/mM) 0.02 μ Ci, 0.1ml と buffer 0.2ml を加え, 37°C 2時間インキュベートした. 次に飽和硫酸液 0.4 mlを加えてよく振盪し, 0°Cで20分間静置した後 2,000G 15分間遠沈し, 上清 0.5ml を Bray's scintillation solution 10ml の入った counting vial に入れ Aloka LSC-653 で放射能を測定した. 抗血清の稀釈倍数

Fig. 1. Progesterone standard curves with various dilutions of antiserum. The sensitivity was 0.01 Ng/ml, where a 1 : 12,800 diluted antiserum was employed.

Table 2. Cross-reaction of selected steroids with anti-progesterone-20-oxime-BSA antiserum

Steroids	% Cross-reaction
C₂₁ steroids	
Progesterone	100
11-Desoxycorticosterone	51.0
20 α -Hydroxy-4-pregnen-3-one	38.1
Pregnane-3, 20-dione	20.0
17 α -Hodroxy-4-pregnene-3, 20-dione	8.0
3 α -Hydroxypregnan-20-one	0.7
Pregnane-3 α , 20 α -diol	<0.1
3 β -Hydroxy-5-pregnen-20-one	<0.1
Cortisol	<0.1
C₁₉ steroids	
Testosterone	14.4
4-Androstene-3, 17-dione	7.7
3 β -Hydroxy-5-androsten-17-one	0.1
C₁₈ steroids	
Estradiol	<0.1
Estriol	<0.1

(対数目盛で表わす)を横軸に上清の放射能 (free 型)を縦軸にとり, 50% free に相当する稀釈倍数を以て抗血清の力価とした。

2. 標準曲線及び他のステロイドの干渉

P 測定の為の標準曲線 (Fig. 1.) の作成は抗体価の決定の場合と全く同様の条件で行った。即ち試験管に buffer にて 50Ng/ml から 0.01Ng/ml迄段階稀釈した standard P 0.2ml の系列を作り, 稀釈した抗 P-20-BSA 0.1 ml と P-1, 2-³H 0.02 μ Ci, 0.1ml を加え, 37°C 2時間インキュベートした後硫酸塩析法で free 型と bound 型を分離した。1 : 12,800 稀釈抗血清を使用した場合, P 10Pg/ml は 0Pg/ml と明らかに区別された。此の場合 P free での放射能結合率は48%であつた。一方抗 P-20-BSA に対する P 以外のステロ

Fig. 2. Estrogen standard curves using a 1 : 12,800 dilution of anti-estradiol-17 β -succinyl-BSA antiserum. Estrone had almost the same affinity for the antiserum as estradiol-17 β .

Table 3. Separation of progesterone, estrone, and estradiol-17 β from most markedly cross-reacting steroids by thin layer chromatography.

Steroids	n	R _F	S.D.
Pregnane-3, 20-dione	15	0.80	0.012
Progesterone		0.73	
4-Androstene-3, 17-dione		0.65	
11-Desoxycorticosterone		0.57	
17 α -Hydroxy-4-pregnene-3, 20-dione		0.55	
Estrone	15	0.54	0.009
20 α -Hydroxy-4-pregnen-3-one		0.53	
Testosterone		0.51	
Estradiol	15	0.34	0.013
Estriol	15	0.07	0.007

Solvent system : chloroform 19/ethanol 1

TLC plate : Baker-Flex Silica gel 1B, J.T. Baker Chemical Co.

イドの交叉反応を調べる為 C_{21} ステロイドを中心に各種ステロイドの反応曲線を作成し, Abraham¹⁾の方法に準じて % cross-reaction を求めた (Table 2). 其の結果抗 P-20-BSA 抗体は, P 以外に ⁴4-3-ketosteroids との間に程度は様々であるが可成り広汎な交叉反応を有する事が判つた. 次に estrogen 標準曲線及び抗 E_2 -17 β -BSA に対する諸種ステロイドの交叉反応であるが, 此れについては既に報告してあるので²⁾此処では簡単に要点のみを述べる. 抗 E_2 -17-BSA 抗体は, E_2 以外に E_1, E_3 等の estratrienes と交叉反応を示すが, 其の他のステロイドとは殆んど反応を示さなかつた. E_1 と E_2 の反応性は略々同等であり, 1 : 12,800 稀釈抗血清を用いた時の測定感度は両者共 15.6Pg/ml (但し現在は 10Pg/ml に調整)であつた (Fig. 2). 以上の事実から血漿中の P, E_1 , E_2 を此の RIA system で測定する為には, RIA に先立つて其れらを他の交叉反応を示すステロイドから分離する必要性を認めた.

3. Thin layer chromatography (TLC) による血漿中 P, E_1 , E_2 の精製

Table 4. Procedure of the radioimmunoassay for plasma progesterone, estrone, and estradiol-17 β .

1) Pre-treatment of plasma samples	
Plasma 1ml	
2,000dpm each of ³ H-labeled P, E_1 , and E_2 added	
Extracted with 10ml of ether	
Evaporated	
Dissolved in 2×20 μ l of methanol and spotted on a thin layer plate	
TLC (chloroform 19 : ethanol 1)	
P-, E_1 -, and E_2 -containing bands separately cut off and eluted with 2ml of acetone	
Evaporated	
Dissolved in 0.5ml of buffer* ¹	
0.2ml for calculating recovery	
0.2ml for radioimmunoassay	
2) Radioimmunoassay	
* ² { Pre-treated sample or standard steroid	
solution	0.2ml
Diluted antiserum	0.1ml
Tracer	0.1ml (0.02 μ Ci)
37°C, 60min.	
+ Saturated ammonium sulfate 0.4ml	
4°C, 20min.	
Centrifuged—2,000G, 4°C, 15min.	
Supernatant 0.5ml	
↓	
Radioactivity counted	

*¹ 0.15M phosphate buffer, pH 7.4, containing 2.5% ethanol

*² two different assay system—³H-P to anti-P system for measuring P and ³H- E_2 to anti- E_2 system for both E_1 and E_2

thin layer plate としては、展開後の elution に便利な plastic sheets (Baker-Flex SilicaGel IB, J.T. Baker chemical Co., Phillisburg, N.J.) を用いた。種々の溶媒の組合せを用いて繰り返し展開実験を行った結果、chloroform/ethanol 19:1 が最適と考えられた。此の溶媒系での各種ステロイドの R_F 値を (Table 3.) に示す。展開後、P, E₁, E₂ 分画に相当する部分を縦 0.8cm 横 2 cm に鋏で切り取り、アセトン 2 ml で溶出した。

4. 血漿中 P, E₁, E₂ の RIA

以上の基礎実験の結果に基づいて RIA の procedure を (Table 4.) の如く定めた。此の表について少し説明を加えると、測定に供する血漿の量は、非妊婦に於ては原則として 1 ml としたが、0.5ml でも可能である。incubation の時間は、1 時間と 2 時間で結果に余り差がなかった為臨床検査に際しては 1 時間を採用することとした。此の方法を用いて、pre-treatment に於ける回収率は約 45~80% であった。全操作に要する時間は、5 検体 (15 分画) 以下ならば約 4 時間、50 検体 (150 分画) で延べ約 16 時間であった。

5. TLC residue について

前項に述べた方法で実際に臨床検体を測定したところ、P, E₁, E₂ の何れについても測定値が可成り低い事に気付いた。此の free 型の radioactivity が予想以上に低くなる現象は、抗血清を入れない control に於ても同じように見られた。そこで pre-treatment の段階で検体中に混入した「何か」が RIA に於ける free 型と bound 型の分離比に影響を与えるのであらうと推定し、此の影響は謂ゆる processed standard curve (PSC) を作成することによって事実上殆んど除き得るであらうと考えた。しかしながら PSC の作成は実際の測定に当つて煩雑である為、空の TLC plate に展開操作のみ加え 0.8cm × 2 cm に切り取つてアセトン 2 ml で溶出し、此の TLC residue を含む試験管に標準ステロイド溶液を入れて RIA を行い標準曲線を作成したところ、PSC に一致した曲線を得た為、以後標準曲線の作成には此の方法を用いた。TLC residue を加えた標準曲線に基づいて読みとつた測定値は従来の報告と極めてよく一致した。TLC residue の P 標準曲線に及ぼす影響を (Fig. 3) に示す。

Fig. 3. Influence of TCL residue on progesterone standard curve. Remarkable decrease of the free radioactivity was observed.

Fig. 4. Pattern of plasma estrogen and progesterone (1).

Fig. 5. Pattern of plasma estrogen and progesterone (2).

6. 測定実例

非妊婦血漿中の P , E_1 , E_2 を経日的に測定したもののうち 2 例を示す. 第 1 例 (Fig. 4.) は 23 day cycle の婦人で, BBT は二相性である. E_2 は月経周期第 12 日目 (BBT の体温陥落日) に最高値 235Pg/ml となり, 其の後一旦低下し再び第 18 日目を中心に緩やかな上昇を示した. E_1 は E_2 に似た動きを示したが, 周期の後半に於て時に高い値となった. 此の婦人に於ては estrogen の分泌量が cycle を通じて比較的高値を示すようである. P 値は第 12 日目迄は 0.64Ng/ml 以下であつたが, 第 15 日目には 14.7Ng/ml と急速に増し第 16 日目に 22.5Ng/ml の最高値となった. 第 2 例 (Fig. 5.) は第 2 度無月経に対し HMG (Humegon)-HCG (Primogonyl) 療法を行つた例である. Humegon 2 vials $\times$ 6 日, 3 vials $\times$ 7 日投与した時点で E_2 は急速に上昇を示し, 631.3Pg/ml と極めて高値となった. HCG 3,000IU. $\times$ 2 日投与後 P 値は 23.0Ng/ml に達し, 排卵誘発に成功した事が推測された. 尚此の症例は次回周期も HMG-HCG 投与を受け, 其の際の排卵で妊娠し, 現在妊娠 4 ケ月である.

考 察

competitive protein binding radioassay の出現は, 従来のステロイド測定法に望み得なかつた高い測定感度と大量処理能力の両者を満足させる画期的方法として, 内分泌学臨床へのステロイド測定の実用化をもたらした. 最近に至り, ステロイドを蛋白質に結合させて動物に免疫しステロイドに対する抗体を得ることが可能となり, 此れを用いた RIA が報告されるようになった.^{1)~11)} RIA は competitive protein binding assay の一種とも見做されるが, 抗原抗体反応に基づくステロイドと抗体蛋白の結合は遙かに強力であり, 抗体の安定性と相俟つて routine の測定法には一層適していると考えられる. RIA が近い将来臨床に於けるステロイド測定法として中心的役割を果すであろうと推測される今一つの根拠は, 抗体の特異性を高める努力が最近の報告によれば少しづつ実を結びつつあることで^{12)~17)}, 一種類のステロイドに対し極めて特異性の高い抗体が出現すれば, RIA に先立つて精製操作を行う必要はなくなり至極簡単にステロイド測定が出来るようになるからである.

著者はかかる時期に於ける過渡的方法として, 抗血清の特異性の不十分な点を, 検体の TLC による前処理で補い, 現段階に於ける最も実用的な測定法の確立に意を注いだ. 其の結果, 非妊婦血漿 1 ml から 1 回

の TLC 前処理で P, E₁, E₂ を一括して測定することに成功し, 現在では 4 時間で 5 検体(15分画), 16 時間で 50 検体 (150分画) を処理することが可能となつた. 此の測定能力は臨床検査法としての条件を略々満足するものとする. 本法を臨床に応用して得た多くのデータについては稿を改めて発表する予定である.

謝辞 本研究の遂行に御協力いただきました名古屋大学医学部産婦人科学教室の諸先生に厚く感謝致します. 併せて progesterone-20-oxime BSA conjugate を提供下さいました NIH に謝意を表します.

文 献

- 1) Abraham, G.E. : J. Clin. Endocr., 29 : 866, (1969) 2) 青木孝允 : 日内分泌誌, 48 : 324, (1972)
- 3) Midgley, A.R., Jr., G.D. Niswender, and J. Sri Ram : Steroids, 13 : 731, (1969) 4) Mikhail, G., C.H. Wu, M. Ferin, and R.L. Vande Wiele : Steroids, 15 : 333, (1970)
- 5) Furuyama, S., D.M. Mayes, and C.A. Nugent : Steroids, 16 : 415, (1970) 6) Yoshizawa, I. and J. Fishman : J. Clin. Endocr., 32 : 3, (1971)
- 7) Abraham, G.E., R.S. Swerdloff, D. Tulchinsky, and W.D. Odell : J. Clin. Endocr., 32 : 619, (1971) 8) Furuyama, S. and C.A. Nugent : Steroids, 17 : 663, (1971)
- 9) Abraham, G.E., R.S. Swerdloff, D. Tulchinsky, K. Hopper, and W.D. Odell : J. Clin. Endocr., 33 : 42, (1971) 10) Aoki, T. and M.M. Hreshchyshyn : Am. J. Obstet. Gynecol., 111 : 382, (1971)
- 11) Tulchinsky, D., and G.E. Abraham : J. Clin. Endocr., 33 : 775, (1971)
- 12) Gross, S.J., J.D. Grant, R. Bennett, S.-L.R. Wong, and P. Lomax : Steroids, 18 : 555, (1971)
- 13) Exley, D., M.W. Johnson, and P.B.G. Dean : Steroids, 18 : 605, (1971) 14) Jeffcoate, S.L., and J.E. Searle : Steroids, 19 : 181, (1972)
- 15) Lindner, H.R., E. Perel, A. Friedlander, and A. Zeitlin : Steroids, 19 : 357, (1972) 16) Kuss, E. and R. Goebel : Steroids, 19 : 509, (1972)
- 17) Spieler, J.M., R.L. Webb, R.J. Saldarini, and J.A. Coppola : Steroids, 19 : 751, (1972)