Radioimmunoassay による Androstenedione の測定

第1報 Testosterone との同時測定法について

札幌医科大学泌尿器科教室 (主任: 熊本悦明教授)

丹田 均, 藤田 征隆, 黄 朝松, 熊本 悦明

Estimation of Androstenedione in Human Peripheral Blood with Radioimmunoassay

Report 1: With simultaneous estimation of testosterone

H. TANDA, M. FUJITA, C. KO and Y. KUMAMOTO

Department of Urology, Sapporo Medical College (Director; Prof. Y. Kumamoto)

Radioimmunoassay using the antiserum of Δ^4 -Androstenedione-3-oxime-BSA for estimation of androstenedione is described. Assay of plasma volume is an adequate 0.2 ml in the adult male.

Radiochemical isolation of androstenedione and testosterone simultaneously was achieved with Sephadex LH-20 microcolumn chromatography.

With this method, water blank controls showed values of 7.7 ± 4.0 pg/sample (N=5) in androstenedione and 93.3 ± 9.4 pg/sample (N=5) in testosterone. Normal adult male plasma contain 858.8 ± 225.7 (N=5) pg/ml (N=5) in androstenedione and 6.94 ± 1.09 ng/ml (N=5) in testosterone.

緒 言

Δ^4 -Androstenedione (Δ^4 -Androstene-3, 17-dione, (以下 Δ^4 -A-dione と記す) は, testosterone の前駆物質であり, 副腎および性腺より分泌されている。しかし, その血中濃度が微量であり, その測定が極めて煩雑で困難であつた為, 血中での Δ^4 -A-dione の動態の詳細についてはいまだ明らかでない点が多々ある。

最近, Radioimmunoassay (以下 RIA と記す) の導入により, その微量測定が比較的容易になつて来た。我々も, その測定法について検討中であるが, Δ^4 -dione と共に testosterone も同時測定することが可能であつた。臨床的にも, 両者の data を同一 sample より同時に得ることがより意義あるものと考え, ここに両者の簡易同時測定法について検討した data を報告する。

測 定 方 法

1. 使用抗体

(i) Δ^4 -A-dione の抗体

1973年神戸川らの Δ^4 -A-dione 3-oxime-BSA を抗原として家兎に免疫を作製した抗血清である。4000 から8000倍稀釈範囲により良好な標準曲線が得られた。cross reaction は Table 1 に記した。

(ii) Testosterone の抗体

1972年大沢らの Testosterone-3-oxime-BSA を抗原として家兎で作製したもので, 25000倍稀釈にて使用

Table 1. Cross-reaction of selected steroids with anti- Δ^4 -A-dione-BSA antiserum

compounds	% cross reaction
Δ^4 -androstenedione	100
5 α -androstanedione	46.1
5 β -androstanedione	50.7
epiandrosterone	9.41
etiocholanolone	7.33
testosterone	5.43
androsterone	4.75
cortisone	1.71
progesterone	1.38
dehydroepiandrosterone	0.81
dihydrotestosterone	0.76
deoxycorticosterone	0.42
dehydroepiandrosterone sulfate	0.17
17 α -hydroxyprogesterone	0.12
cortisol	0.12
pregnenolone	<0.072
corticosterone	<0.072
estrone	<0.072
estradiol	<0.072
estriol	<0.072

(Teikoku zoki K.K., A. Kanbegawa make an offer)

Fig. 1. Radioimmunoassay of plasma Δ^4 -a-dione, and testosterone (T.)

した。

2. Radioactive steroids

Δ^4 -A-dione-1, 2- H^3 (New England Nuclear Corp. 製) : specific activity は 45.9Ci/mM, Testosterone-1, 2- H^3 (New England Nuclear Corp. 製) は, 56Ci/mM の specific activity をもつ。

3. 使用血漿量

男子 0.1~0.5ml で ethylether で抽出した。

4. 抽出, 分離

両 tracer (Δ^4 -A-dione:2000dpm, Testosterone:3000dpm) を入れ, それを N_2 下で乾固した抽出用試験管に, 検体とその当量の water を加えたものを ethylether 10ml で抽出する。下層の血漿を捨てた後 N_2 下で乾固, ついで n-hexane 1ml 及び methanol (70%) 1ml で defatting する。その抽出相を sephadex LH-20 (Phamacid Uppsala, Sweden) の micro-column で分離した。sephadex LH-20 を interchangeable のツベルクリン用注射筒 2 ml まで充填した column に約 20ml で飽和後, 上記抽出物を, 展開液 (n-hexane : benzen : methanol=85 : 10 : 5) 0.1ml を用いて溶解後 deposition した。以上により Fig. 1 に示した如く, RIA により Δ^4 -A-dione と testosterone の同時測定方法を行なった。

実験結果

1. 標準曲線

Fig. 2. Standard curve of Δ^4 -A-dione and testosterone

Δ^4 -A-dione, testosterone のそれぞれの curve を図示すると Fig. 2 の如くなる。有効測定範囲は 0~400pg であった。

2. micro column chromatography での Δ^4 -A-dione と Testosterone の分離検討

Fig. 3 (a) の如く, この展開系 (n-hexane : benzen : methanol=85 : 10 : 5) では, Δ^4 -A-dione は 3~7.5 ml, dihydrotestosterone (以下 DHT と記す) 6~9ml, testosterone は 8.5~15ml で溶出分離し得た。この data から recovery の問題があるが, Δ^4 -A-dione は 4~6.5ml, testosterone は 10~14.5ml の間を取り, DHT と testosterone との cross を最小限とした。

Fig. 3a) Column chromatography of steroids using sephadex LH-20 (solvent n-hexane ; benzen ; methnol, 85 ; 10 ; 5)

Carr ら²⁾ (1971) の展開系に従い, Δ^4 -A-dione と testosterone の分離が可能かどうか検討した結果を Fig. 3(b) にまとめた。いずれも DHT と testosterone との分離が clear にならない為, 我々は上記展開系を採用した。

3. recovery と blank 値

Δ^4 -A-dione の recovery は $71.94 \pm 14.06\%$ (N=49) で, testosterone の recovery は $61.04 \pm 13.16\%$ (N=49) であった。water blank は Δ^4 -A-dione の分割溶出範囲では, $7.7 \pm 4.0\text{pg/sample}$ (N=5) であり, testosterone は $93.3 \pm 9.4\text{pg/sample}$ (N=5) であった。

4. 再現性と精度

Fig. 3 b) Studies on chromatographic pattern of steroids in the sephadex LH-20 column with various solvents

(i) cold Δ^4 -A-dione の 100pg の測定結果は 111.8 ± 10.3 pg (N=5), 同様に 200pg の測定値は 198.6 ± 6.1 pg (N=3) であった.

また, interassay variation は, 各検体を duplication で測定して求めた所, 実測値 400~1400pg/ml の範囲内で, 13.2%であった.

(ii) cold testosterone の 200pg の測定結果は, 224.7 ± 15.6 pg (N=4), 同様に 300pg の実測値は, 336.0 ± 15.0 pg (N=5). であった.

また, interassay variation は, 各検体を duplication で測定して求めると, 2~10ng/ml 範囲内で, 17%であった.

5. 実測値

(i) 正常男子 (20~22才) の Δ^4 -A-dione 値は, 858.8 ± 225.7 pg/ml (N=5), 同一検体での testosterone 値は 6.94 ± 1.09 ng/ml (N=5) であった.

(ii) 泌尿器科的疾患を有する (肝, 腎機能正常) 老人群 (53~81才) の Δ^4 -A-dione 値は 449.8 ± 178.6 pg/ml (53才, 69才, 70才, 72才, 74才, 81才), 同一検体での testosterone 値は 3.6 ± 0.66 ng/ml (53才,

70才, 74才)であつた。

iii) それらの症例の血中 Δ^4 -A-dione と testosterone との関係を検討したのが Fig. 4 である。○印の正常成人男子では, testosterone : Δ^4 -A-dione = 10 : 1 の割合の関係があつた。しかし, ●印の老人例 (53~81才) では, Δ^4 -A-dione も testosterone も成人正常男子例に比し低く, 両者の関係は, 例数が少ないが, 血中 testosterone 値のバラツキが大きい為に, 一定の関係は見いだせなかつた。この問題については今後検討の予定である。

考 按

RIA による血中 testosterone の測定法は, 臨床検査法として, すでにかなり普及している。しかし, Δ^4 -A-dione の RIA による測定は, 欧米では, Thorneycroft ら (1973)⁹⁾ によつて, はじめて発表され, 本邦では, 第47回内分泌総会(昭和49年4月)に, 赤嶺ら¹⁾, 吉田ら¹⁰⁾, 神戸川ら¹⁰⁾によつて報告されたという状態で, RIA による Δ^4 -A-dione の測定は新しく³⁾, 開発されつつあるものといえるが, 従来の double isotope derivative method による測定法に代つてゆきべきものとする。

Δ^4 -A-dione の正常成人男子の血中値は, double isotope derivative method により, Horton (1965)⁶⁾ は, $65 \pm 16 \text{ ng}/100 \text{ ml}$, Rivarolla ら (1968)⁸⁾ は, $109 \text{ ng}/100 \text{ ml}$ (N=20) と報告している。Fraser ら (1969)⁴⁾⁵⁾ も同じ方法で, 4~15才の思春期前男子の血中値は, $63.0 \pm 6.9 \text{ ng}/100 \text{ ml}$ と報告している。Moshang ら (1969)⁷⁾ は, CPB 法で, $162 \text{ ng}/100 \text{ ml}$ であつたとしている。

一方, RIA 法による正常成人男子の血中値は, Thorneycroft ら (1973)⁹⁾ は, $1.15 \pm 0.35 \text{ ng/ml}$ (N=12), 吉田ら (1974)¹⁰⁾ は, $1.22 \pm 0.33 \text{ ng/ml}$ と報告している。我々の値は, 20~22才 (N=5) : $0.858 \pm 0.225 \text{ ng/ml}$, 50~81才 (N=6) : $0.449 \pm 0.178 \text{ ng/ml}$ で, はば, 従来の報告と一致し, 特に, 加齢により漸次減少を示すともいわれている¹⁾。

結 語

Sephadex LH-20 使用による microcolumn chromatography に於いて, その展開系 (n-Hexane ; Methanol=85 ; 10 ; 5) を用いて, Δ^4 -A-dione と testosterone との完全分離が出来た。

それによる Δ^4 -A-dione の正常男子 (20~22才) の値は, $858.8 \pm 225.7 \text{ pg/ml}$ (N=5) であり, testosterone の同時測定値は, $6.94 \pm 1.09 \text{ ng/ml}$ であつた。

なお, water blank は, Δ^4 -A-dione の分割溶出範囲で, $7.7 \pm 4.0 \text{ pg/sample}$, 同じく, testosterone では, $0.09 \pm 0.009 \text{ ng/sample}$ であつた。また, interassay variation は, Δ^4 -A-dione では 13.2%, testosterone では 17% であつた。

稿を終るにあたり, Δ^4 -A-dione の抗体を提供して頂きました神戸川明博士 (帝国臓器製薬), また testosterone の抗体を提供して頂きました大沢伸昭博士 (実中検, 東大第3内科) に深謝致します。

文 献

- 1) 赤嶺康夫, 名和田新, 合馬 紘, 植田太郎, 本松利治, 加藤堅一, 井林 博 : 日内会誌, 50 (2), 347,

Fig. 4. Comparison of plasma testosterone and Δ^4 -A-dione values

- (1974). 2) Carr, B.R., Mikhail, G. and Flickinger, G.L. ; J. Clin. Endocrinol. Metab. 33, 358, (1971). 3) Forest, M.G., Cathiard, A.M. and Bertrand, T.W. : J. Clin. Endo. Metab., 37, 148, (1973). 4) Frasier, S.D., and Horton, R. : Steroids, 8, 777, (1966). 5) Frasier, S.D., Gafford, F. and Horton, R. : J. Clin. Endo., 29, 1404, (1969). 6) Horton, R. : J. Clin. Endo., 25, 1237, (1965). 7) Moshang, T., Rudd, B.T., Eberlein, W.R., Bongiovanni, A.M. : Steroids, 15 : 2, 195, (1969). 8) Rivarola, M.A., Forest, M.G. and Migeon, C.J. : J. Clin. Endo., 28, 34, (1968). 9) Thorneycroft, I.H., Ribeiro, W.O., Stone, S.C. : Steroids, 21 : 1 111, (1973). 10) 吉田孝雄, 胤森和幸, 稲富頭二, 尾崎晴彦, 高木繁夫, 神戸川明, 牧野拓雄 : 日内会誌, 50(2), 189, (1974).