Competitive Protein Binding Assay による Testosterone の測定

第2報 測定方法に対する詳細な検討

水谷 修太郎
大阪大学医学部泌尿器科教室
(主任: 園田孝夫教授) 森 義 則

園 田 孝 夫
大阪大学医学部第2病理学教室
(主任: 岡野錦弥教授) 竹 安 晃 一

COMPETITIVE PROTEIN BINDING ASSAY OF TESTOSTERONE REPORT 2. FURTHER INVESTIGATIONS ON METHODOLOGY

Shutaro Mizutani, Yoshinori Mori and Takao Sonoda

Department of Urology, Osaka University Hospital

(Chairman: Prof. T. Sonoda)

Koichi Takeyasu

Department of Pathology, Osaka University Medical School

(Chairman: Prof. K. Okano)

Further studies were done on the method for determination of testosterone level in adult male plasma utilizing competitive protein binding. The non-specific blank of the method was largely due to substances in organic solvent which could be almost eliminated by redistilling, as well as to substances in chromatographic paper which could be eliminated by washing with distilled methanol and deionized water.

Total blank value revealed 0.3 m μ g per ml of water.

前回の論文で, 著者等(1969)は, Mayes & Nugent (1968) による血漿中 testosterone 濃度の測定方法に対して若干の改良を加えた結果, 正常成人男子レベルの臨床応用については, ほぼ満足すべき結果を得たことを報告した. 今回, その測定方法の詳細な部分についてさらに検討を加えたので, その結果を第2報として報告するとともに, 他の competitive protein binding assay による testosterone の測定方法とあわせて若干の考察を加えたい.

実験方法及び結果

試料および試薬については前回の報告と変わるところはない. 測定方法についても, 抽出と精製の段階についてはほとんど変更はない. 唯, 精製の際には, 最近の Rf 値が約0.45と一定値を保つ傾向にあるため, reference standard を用いていない. Testosterone binding protein (TeBP) 溶液を作用せしめる段階を第1図に再掲したが, それらの条件のうちの一点だけを種々に変更

第1図 Competitive Protein Binding

して実験した結果を次に示す.

1. TeBP 液の稀釈に関する検討

妊娠末期の婦人から採取した血漿を, borate buffer (0.1M, pH 9.0) で, それぞれ5倍, 15倍, 50倍およ

第1表 稀釈に関する検討：緩衝液で稀釈した場合の% unbound 値 (%)

標準テストステロン mμg	0	1	2	3	6
稀釈倍数					
× 5	2.8	...	...	4.6	14.7
× 15	4.8	...	...	27.7	53.7
× 50	10.9	42.7	59.5	...	...
× 100	22.6	77	81	...	...

...測定せず

第2図 稀釈に関する検討

び 100 倍に稀釈し、cold testosterone の 0 mμg, 3 mμg (あるいは 1 mμg または 2 mμg) および 6 mμg の 3 点について % unbound 値を求めると、第 1 表のごとくなり、これを第 2 図に示した。3 点しか plot しないために、曲線の詳細な部分については不明であるが、稀釈度が高い程曲線は上方へ押し上げられ、より微量な testosterone の測定に適するが、逆に測定の適応範囲が狭くなる。正常成人男子のレベルでは、15 倍前後の稀釈が最も適しており、1 mμg から 5 mμg までの間の比較的広い範囲に適していることを物語る。

2. 平衡時間および温度に関する検討

精製後乾固した試料に TeBP 溶液を加えて平衡に達せしめる条件として、時間と温度の問題が挙げられる。一般に低温程 binding capacity は上昇する (Vermeulen & Verdonck, 1968) が、平衡に達する時間を要

第2表 平衡時間に関する検討：室温で15倍稀釈の溶液を用いた場合の% unbound 値

平衡時間(分)	0	5	15	30	60	120
テストステロン						
0 mμg	5.8	6.1	4.9	5.3	5.0	6.0
3 mμg	33.5	33.5	38.7	32.5	33.5	32.0

第3表 平衡に対する温度の影響：15倍稀釈の溶液で30分平衡させた場合の% unbound 値

温度℃	5	22	36	45
テストステロン				
0 mμg	4.4%	4.1	2.8	6.6
3 mμg	22.0	26.7	22.5	28.1

第4表 結合の分離に関する検討：飽和硫安液を添加し、parafilm で封をして、攪拌してから遠沈を開始する迄の時間を変更した場合の% unbound 値

放置時間(分)	0	5	15	60	一夜
テストステロン					
0 mμg	4.6	4.8	3.9	4.7	5.3
3 mμg	27.7	27.7	24.8	25.6	31.0

し、逆に高温程 binding capacity は低下するが、平衡に要する時間は比較的に短かい。

諸条件を一定に保ちつつ、室温下に、平衡時間のみについて検討すると、第 2 表のごとくなる。すでに vortex mixer で攪拌した直後 (0 分) で、ほぼ平衡に達しているので、第 1 報に記述したごとく、120 分も平衡させる必要はなく、30 分で十分であると考えられる。

平衡時の温度条件については、第 3 表に示すように、5℃の低温室内や36℃の孵卵器内でも大差なく、したがって全操作を室温下に施行しても、binding capacity や平衡時間に影響を与えないと考えられる。

3. 飽和硫安添加後における testosterone 蛋白結合の分離についての検討

平衡後 0.1ml をとり除いたあとに、0.2ml の飽和硫安液を添加し、parafilm で封をし、攪拌してから、通常約 5 分間静置後に、遠心沈澱を施行するが、この平衡時間を種々に変更して検討したところ、第 4 表のように 5 分から 60 分の間では平衡時間による差はほとんど無

く、したがって大量試料の処理も可能である。しかし、一夜放置すると% unbound 値が、3 mμg の点においては31.0%と若干上昇する傾向にあり、分離現象を生じた結果であると考えられる。

4. 遠沈時間に対する検討

3,000 rpm の条件を保ちつつ、遠沈時間を5分から30分まで検討したところ、第5表のように10分と15分との間に若干の相違がみられる。また15分と30分との% unbound 値を比較すれば、0 mμg と3 mμg の2点ともに差がほとんどないので、今後は遠沈時間を15分にすることが望ましい。第1報では、3,000rpm, 10分間遠沈と記載したが、実測に際しては、つねに各条件について吟味することが肝要で、特に器具や器械が異なる際には注意を要する。

第5表 遠沈時間に関する検討

遠沈時間 (分)	5	10	15	30
テストステロン				
0 mμg	5.5	4.8	3.3	2.6
3 mμg	31.3	27.7	26.5	26.1

第3図 標準曲線：15倍希釈の TeBP 溶液を使用した場合

5. 検量曲線

第1報では20倍希釈について記載したが、今回は15倍に希釈した場合の検量曲線を第3図に示した。実測に供し得るのは1 mμg から5 mμg までの範囲であると言える。

6. ステロイド性の干渉

第6a および b 表に、ステロイド性の干渉について一括した。単位重量について、testosterone 相当重量 (testosterone を100とする) で表現したものである。

7. 非ステロイド性干渉物質

a. 有機溶媒による干渉

10ml の有機溶媒を乾燥してから、TeBP 溶液を作用せしめて得た% unbound 値を第7表に一括した。いずれも半井化学社製であるが、dichloromethane を除いて、ほとんどの有機溶媒がかなりの干渉をすることがわかる。特に methanol では、Lot. によつても差がはなはだしく、就中52%の干渉を呈した Lot. D が、再蒸溜後も高い干渉を示したことは特記すべきである。故に溶媒はよく吟味して、優良な Lot. を選択し、再蒸溜後使用すべきである。

b. Chromatograph の材質による干渉

Chromatograph に用いた paper (Whatman No. 1) も著しい干渉を示す。第8表に精製 methanol による洗滌前後の比較を示した。一般に paper は洗滌すればする程 blank が低くなる傾向があり、われわれは特級 methanol ・再蒸溜特級 methanol の順に浸透し、最後に再蒸溜 methanol で下降式に洗滌 (総計1週間) したものを用いた。また formamide をそのまま使用すると第8表のごとく25%の% unbound を呈したので、以後は、蒸溜 dichloromethane で抽出精製して加温処理後の formamide を用いた。

8. Blank 値に対する検討

脱イオン蒸溜水の 2.0ml について同様の測定をした際の% unbound 値を、その時の標準曲線の0値と併せて第9表に括げた。検量曲線より blank 値を推定すると、平均0.40mμg となる。回収率補正を平均66%とすれば、計算の上では、water blank は0.3mμg/ml of water となる。

9. 回収率に関する検討

同一試料からの反復測定および緩衝液に添加した際の回収試験については前報で既述したが、今回は低 testosterone 濃度の血漿に添加した回収試験を行なつた。結果は第10表に示すように、添加前濃度が0.3~0.9mμg/ml であるのに対し、おのおのに標準 testosterone の2.0mμg を添加した際の結果は2.8~3.4mμg/ml であり、2.0 mμg に対する理論上の回収は1.8~2.5 mμg となり、平均2.24 mμg を呈する。したがって+12%の高値を示したことになる。

10. 正常成人男合における血漿中 testosterone の濃度

第1報後、新たに9例の正常成人男子について測定し

第 6 a 表 C19型ステロイドによる干渉。Testosterone を 100として表示

#	Steroids	interference				
		(A)	(B)	(C)	(D)	(E)
1	17 β -Hydroxy-5 α -androstan-3-one	240	300	200	187	
2	5 α -Androstane-3 β , 17 β -diol	141	160		121	
3	5 α -Androstane-3 α , 17 β -diol	98	160	77	108	
4	17 β -Hydroxy-androst-4-en-3-one	100	100	100	100	100
5	Androst-4-ene-3 β , 17 β -diol		93	44		
6	Androst-5-ene-3 α , 17 β -diol	83				
7	Androst-5-ene-3 β , 17 β -diol		50	77	71	
8	17 α -Methyl-17 β -hydroxy-androst-4-en-3-one	65	38			
9	5 α -Androstan-17 β -ol	22				
10	17 β -Hydroxy-19-nor-androst-4-en-3-one	18	21.5			
11	5 β -Androstane-3 α , 17 β -diol		24	—	0.4	
12	17 β -Hydroxy-5 β -androstan-3-one		7	9	8.2	
13	17 α -Hydroxy-androst-4-en-3-one	*	4	—		
14	Androst-4-ene-3, 17-dione	*	5	—	0.3	4.5
15	1 α -Methyl-17 β -hydroxy-5 α -androst-1-en-3-one		37			
16	1 α -Methyl-17 β -hydroxy-19-nor-androst-4-en-3-one		80			
17	17 α -Methyl-5 α -androstane-3 β , 17 β -diol		33			
18	11 β -Hydroxy-androst-4-ene-3, 17-dione		0.5	—		
19	Androst-4-ene-3, 11, 17-trione		1			
20	3 β -Hydroxy-androst-5-en-17-one	*	4.5	5	3.7	
21	3 β -Hydroxy-5 α -androstan-17-one		3			
22	3 α -Hydroxy-5 α -androstan-17-one	*		—	1.6	
23	3 α -Hydroxy-5 β -androstan-17-one	*	0	—	0.2	
24	3 α , 11 β -Dihydroxy-5 α -androstan-17-one				0.1	
25	11 β -Hydroxy-5 α -androstane-3, 17-dione		1			
26	3 α -Hydroxy-5 α -androstane-11, 17-dione				0.2	
27	11 β -Hydroxy-5 β -androstan-3, 17-dione		0			
28	17 β -Hydroxy-5 β -androstan-3, 11-dione		0			
29	3 β , 17 β -Dihydroxy-androst-5-en-16-one				0.4	
30	17 β -Hydroxy-androst-4-ene-3, 16-dione				< 0.1	
31	17 α -Hydroxy-androst-4-en-3-one				1.4	
32	6 α -Methyl-17 β -hydroxy-5 α -androstan-3-one	189				
33	7 α -Methyl-17 β -hydroxy-androst-4-en-3-one	100				
34	17 β -Hydroxy-androsta-1, 4-dien-3-one	58		7		
35	3 β -Hydroxy-5 α -androstan-11, 17-dione		1			
36	3 α -Hydroxy-5 β -androstan-11, 17-dione			—		
37	Androst-4-ene-3, 11, 17-trione			—		
38	3 α , 11 β -Dihydroxy-5 β -androstan-17-one			—		
39	17 β -Hydroxy-5 α -androst-1-en-3-one			150		
40	17 β -Hydroxy androst-4-en-3-one-thiosemicarbazone	*				
41	17 β -Hydroxy-androst-4-en-3-one-17-acetate	*				
42	5 α -Androstan-3 β -ol	*				
43	5 α -Androstan-3 α -ol	*				

44	5 α -Androstane	*				
45	17 α -Methyl-11 α , 17 β -dihydroxy-androst-4-en-3-one	*				
46	5 α -Androstane-3, 17-dione	*				
47	5 α -Androstane-3 β , 11 β , 17 β -triol	11				
48	7 α -Methyl-17 β -hydroxy-androst-4-en-3-one	21				
49	9 β -Fluoro-11 β , 17 β -dihydroxy-androst-4-en-3-one	28				
50	17 α -Ethyl-17 β -hydroxy-androst-4-en-3-one	46				
51	6 α -Methyl-17 β -hydroxy-androst-4-en-3-one	46				
52	6 β -Methyl-17 β -hydroxy-5 α -androstan-3-one	48				
53	5 α -Androst-1-ene-3, 17-diol			—		

* 5 % 以下 (A) Kato & Horton (1968b)
 — 2 % 以下 (B) Vermeulen & Verdonck (1968)
 (C) Mayes & Nugent (1968)
 (D) Rosenfield et al. (1969)
 (E) 水 谷 他 (1970)

第 6 b 表 その他のステロイドによる干渉。Testosterone を 100 として表示

#	Steroids	Interference				
		(A)	(B)	(C)	(D)	(E)
1	Estradiol-17 β	28	62	30	10	40
2	Estrone	*	4	12		7
3	Estriol	*	3.5	—	0.5	
4	16-Epiestriol				1.2	
5	Aldosterone			—		
6	Cortisol	*	2	—		0.5
7	Cortisone		3	—		
8	Corticosterone	*	2	—		2
9	11-Deoxycorticosterone		6	—		
10	11-Deoxycortisol		3	—		
11	Progesterone	*	2.5	—		
12	17 α -Hydroxyprogesterone	*	2.5			
13	Pregnenolone		3.5			
14	17 α -Hydroxypregnenolone		1			

* 5 % 以下 (A) Kato & Horton (1968b)
 — 2 % 以下 (B) Vermeulen & Verdonck (1968)
 (C) Mayes & Nugent (1968)
 (D) Rosenfield et al. (1968)
 (E) 水 谷 他 (1970)

第7表 有機溶媒による干渉 (10ml 中)
a. 抽出及びクロマトグラフ用溶媒による干渉

	% unbound
control	7%
特級 dichloromethane (蒸溜前)	7
特級 benzene (蒸溜前)	13
特級 n-hexane(Lot. A) (蒸溜前)	31
特級 n-hexane(Lot. B) (蒸溜前)	23

b. Methanol ml による干渉 (10ml 中)

	% unbound
control	7%
特級 methanol(Lot. A) (蒸溜前)	18
特級 methanol(Lot. B) (蒸溜前)	16
特級 methanol(Lot. C) (蒸溜前)	16
特級 methanol(Lot. D) (蒸溜前)	52
特級 methanol(Lot. A) (蒸溜後)	6.5
特級 methanol(Lot. B) (蒸溜後)	8.7
特級 methanol(Lot. C) (蒸溜後)	7.9

第8表 chromatograph 材質による干渉 (3 cm)

材 質	洗滌前	洗滌後	洗滌後 crude formamide に浸透
テストステロン			
0 mμg	36%	10.7%	25%
3 mμg	57%	49 %	45%

第9表 総 blank 値に関する検討

#	脱イオン蒸溜水 2.0 ml の場合の % unbound	標準曲線上の cold 0 mμg に於ける % unbound	blank 値
1	6.7%	3.6%	0.34mμg
2	7.6	3.2	0.47
3	5.7	3.8	0.23
4	7.8	5.1	0.33
5	10.5	4.7	0.63
平均			0.40mμg

たところ、第11表の結果を得た。第1報の6例と合計して15例の平均値は6.96±2.01 (SD) mμg/ml である。

考 按

第1報では正常成人男子血漿中 testosterone 濃度測定について報告し、あわせて緩衝液に標準物質を添加した場合の accuracy と、同一検体の反復測定による precision について検討した結果を報告したが、今回さらに protein binding の各段階について検討した結果、

第10表 低 testosterone 血漿に 2.0mμg の testosterone を添加した際の回収率

#	(A)	(B)	(B)－(A)
	添加前の濃度	添加後の濃度	2.0 mμg に対する回収
1	0.9mμg/ml	3.4mμg/ml	2.5 mμg
2	0.8	3.1	2.3
3	0.3	2.8	2.5
4	0.7	2.8	2.1
5	0.7	2.5	1.8
平均			2.24mμg

第11表 正常成人男子血中 testosterone 濃度：
No. 1 より No. 6 までは第1報に記載した。

No.	testosterone 濃度 (mμg/ml plasma)
7	8.9
8	5.4
9	4.2
10	6.3
11	3.6
12	5.3
13	6.7
14	9.5
15	7.9
平均±SD	6.96±2.01

TeBP 溶液添加後の平衡条件は室温下に30分が十分であり、飽和硫酸添加振盪後は60分まで dissociation の危険性なく、また遠沈時間は15分が適当であることが確定した。第1報の実験条件とは、この遠沈時間を10分間として記載した以外に相違点はない。また、たとえ相違点があつても、標準物質を同一条件で併列実験して標準曲線を得ているので、危険性はないのであるが、以後は遠沈の条件を15分間として統一した。

ステロイド性の干渉については、第1報でも述べたように、精製の段階で除外し得るので危険はないと考える。第6表のaおよびbに示したように、干渉の大きな steroid の共通点として、17β-hydroxyl の側鎖が挙げられるが、臨床上問題にされるのは、estsadiol-17β, dihydro-testosterone および androstanediol である (Manvais-Jarvis et al., 1968)。Estradiol-17β は抽出の際に alkali 分画に入り、dihydrotestosterone と androstanediol とは精製の段階で除外することができる (Kato & Horton, 1968, Rosenfield et al., 1969)。そ

第12表 Competitive protein binding assay による血漿中 testosterone 濃度の測定

著者	Murphy (1968)	Horton et al. (1967)	Kato & Horton (1968)	Mayes & Nugent (1968)	Hallberg et al. (1968)	Rosenfield et al. (1969)	Maeda et al. (1969)	水谷他 (1970)
血漿試料 ml	0.3	4.0	0.5	0.2	1.0	5.0 (assay は 5%と10%)	0.5	0.5
抽出溶媒 容量, 回数	エチルエーテル 1 ml × 3	エチルエーテル 5 倍量 × 2	メチレンクロロイド 3 倍量 × 2	メチレンクロロイド 35ml × 1	メチレンクロロイド 1.5 倍量 × 3	エチルエーテル 50ml × 1	メチレンクロロイド 25ml × 1	メチレンクロロイド 15ml × 1
精製 第1段			Paper chromatography Bush B ₃ 石油エーテル 33 ベンゼン 17 メタノール 40 水 10	Paper chromatography リグロイン 100 メタノール 80 水 20 アルミナカララム 上で溶出	Paper chromatography 石油エーテル 10 メタノール 7 水 3	Thin layer chromatography メタノール 1.5 10 88.5 5.5% methanol in toluene で再走	Paper chromatography n-ヘキセン: ベンゼン: ホルムエン: 100 p-デイオキサン 25 メタノール 100 水 10	
精製 第2段				Thin layer chromatography クロロホルム 250 酢酸エチル 100 メタノール 5 上で溶出	Silicagel thin layer chromatography ベンゼン 3 酢酸エチル 2			
TeBP 溶液 % 緩衝液 容量 ml	妊婦血漿 0.5% 蒸溜水 1.0	妊婦血漿 1:6 ホウ酸緩衝液 1.0	妊婦血漿 2.0~5.0% ホウ酸緩衝液 1.0	妊婦血漿 2% ホウ酸緩衝液 0.15	妊婦血漿 0.25% 蒸溜水 1.0	妊婦血漿 1% リン酸緩衝液 1.0	Enovid + Dexamethasone 投与婦人血漿 1: 100~150 蒸溜水 0.5	妊婦血漿 1:15~20 ホウ酸緩衝液 0.3
平衡条件	45°C 5分 10°C 10分	室温 15分	室温 15分	室温 120分	室温 45分	室温 15分 水中 10分	室温 20分	室温 30分
分離条件	florisoril 40mg 10°C, 10分, 放置	coated charcoal 室温, 15分, 遠沈	Sephadexgel G-25 microcolumn titration	飽和硫安 0.1ml 室温, 5分, 遠沈	florisoril 80mg 室温, 10分, 放置	dextran/charcoal 水中, 10分	飽和硫安 1.5ml 室温, 10分, 遠沈	飽和硫安 0.2ml 室温, 5分, 遠沈
counting	上清 0.5ml 直接測定	メチレンクロロイドにて抽出	メチレンクロロイドにて抽出	上清 0.1ml 直接測定	上清 0.5ml 直接測定	上清 0.5ml 直接測定	上清 0.5ml 直接測定	上清 0.2ml 直接測定
標準曲線巾	0 ~ 2 mμg	0 ~ 50mμg	0 ~ 6 mμg	0 ~ 2 mμg	0 ~ 10mμg	0 ~ 2.1mμg	0 ~ 2 mμg	0 ~ 4 mμg
回収率	95.1 ± 4.3% 補正不要	98% 補正不要	80 ± 4.7% 補正	64.2 ± 4.4% 補正	66% (60~74) 補正	83 ± 8% 補正	不 明	66% (60~79) 補正
Blank 値	50 (0 ~ 100) mμg/dl 補正せず	0 mμg/dl 補正不要	5.1 ± 40mμg/dl 補正	0.4 ± 0.8 mμg/dl 補正せず	40mμg/dl 補正せず	7.1mμg/dl 補正せず	不 明	30mμg/dl 男子レベルでは補正せず
正常成人 男子平均	690 ± 190 mμg/dl	813 ± 71mμg/dl	691 ± 90mμg/dl	768 (580~890) mμg/dl	320 (200~400) mμg/dl	533 (238~1001) mμg/dl	273~1211 mμg/dl	696 (360~970) mμg/dl

れらはしかし、おのおの Bush B₂ system および薄層 chromatography であつて、われわれの Zaffaroni 法 (hexane: benzene: formamide) では、標準物質がないため確認していない。危険はむしろ非ステロイド性の干渉であつて、もしも 0 値 (標準曲線上、0 μg における % unbound 値) が上昇すれば、何らかの干渉が起つたものとして検討しなければならない。有機溶媒中、methylene chloride は特級製品であれば第 7a 表のように干渉を示さなかつたが、chromatograph の展開に用いる有機溶媒は、再蒸溜を施行して干渉の少ないことを確認してから使用することが望ましい。特に methanol については、試料の溶剤、paper の洗滌から展開と溶出など、干渉の起る機会が最も多く、吟味を厳しくしなければならない。最近に至つて、この methanol がゴム性の栓に触れると著しい干渉を起すことが認められた。器具そのものによる干渉の危険も考慮しなければならない。chromatograph の材質による干渉は第 8 表に示すように非常に高いが、上記の吟味した methanol によつて洗滌すれば、可及的に干渉を除外することができる。われわれの total blank 値は 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と計算されるが、この場合は 0.5 μg 以下の検討が困難な、低稀釈率 (1:15) の TeBP 液を用いたために信頼性が低い。正確に total blank を測定するには、第 1 表のように適応範囲に応じてさらに稀釈した TeBP 溶液を用いなければならない。また total blank は上記非ステロイド性干渉物質の除去によつてさらに低下するものと考えられ、したがつて正常成人女子レベルの測定の可能性も示される。

現在までに報告された、成人男子レベルにおける血漿中 testosterone 測定方法の概略 (Fritz & Knobil, 1967 を除く) を第 12 表に一括した。比較的多量の検体から出発すれば、含まれる testosterone の量も多くなり、したがつて標準曲線の範囲を広くし、TeBP 溶液も濃くしなければならない (Horton et al., 1967) が、一般に男子レベルの場合は 0.5 ml 前後から出発する報告が多い。Rosenfield et al. (1969) は男女とも 5.0 ml から出発しているが最終段階で、その 5%あるいは 10% のみを検定に供している。抽出には ethyl ether または dichloromethane を用いているが、これは第 7 表に示すように干渉が少ないこと、極性、あるいは沸点が低いことなどによつて選ばれたものである。

成人男子のレベルでは精製段階は不必要であると言われる (Murphy, 1968) が、値は検体に含まれる干渉物

質のために高値となり (Horton et al., 1967, Rosenfield et al. 1969), 少くとも一段階の精製が必要である。しかし、その際は精製の材質そのものによる干渉が起ることに留意しなければならない。Hallberg et al. (1968) が 2 段階の精製を行なつても、なお blank 値が高値を呈している。Mayes & Nugent (1968) は、thin layer chromatograph の材質による干渉を避けるため、同じ展開剤で一度 over run させたり、あるいは alumina column 上で溶出するという工夫をしているが、後者に対しては再び alumina による干渉の危険も生じる。男子の場合では、精製は 1 段階で十分である (Mayes & Nugent, 1968)。

Cortisol の competitive protein binding assay と異なり、TeBP 溶液による操作はだいたい室温で施行する報告が多い。これは testosterone binding globulin による binding capacity が低温との間に大差ないことに基く (第 3 表) である。しかし、その affinity は、cortisol と transcortin との affinity に比して低い。bound testosterone と TeBP との間の dissociation が生じる危険が高く、したがつて Fuller's earth, Lloyd's reagent, talc あるいは charcoal や florisol などの吸着剤による分離方法は testosterone の場合には応用し難い (Maeda et al., 1969)。Rosenfield et al. (1969) は、charcoal を用いる際、dextran で修飾する他、検体数を制限して、実験時間を統一することにより誤差を少なくしている。Kato & Horton (1968) は sephadex gel filtration を用いているが、操作法としては塩析の方が応用しやすい。われわれは第 4 表のように、dissociation について検討したが、60 分までは結合が分離する危険性がなく、多量の検体を処理することができる。

以上、われわれは TeBP 溶液による検定の段階、特に干渉物質について詳細に検討した結果を第 2 報として報告し、あわせて若干の文献の考察を加えた。今後さらに干渉物質の排除について検討を加え、女子レベルでの血漿中 testosterone 測定に応用したい。

結 語

塩析を利用した testosterone の competitive protein binding assay について、ひきつづき、TeBP 溶液を作用する段階について検討し、室温下 30 分平衡、飽和硫酸添加振盪後は 60 分まで dissociation の危険なく、遠沈は 3,000 rpm で 15 分間が適当な条件である。Total blank 値は 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であつた。

第2報の稿を終えるにあたり、終始御指導を賜った本学第2病理学教室、松本圭史助教授に深く感謝いたします。

本論文の要旨は、第5回 Radimmunoassay 研究会で発表した。

文 献

- 1) Fritz, G.R. and Knobil, E.: Fed. Proc., **26**, 757, 1967 (abstract).
- 2) Hallberg, M.C., Zorn, E.M. and Wieland, R.G.: Steroids, **12**, 241, 1968.
- 3) Horton, R., Kato, T. and Sherins, R.: Steroids, **10**, 245, 1967.
- 4) 加藤達雄: 医学のあゆみ, **67**: 488, 1968;
- 5) Kato, T. and Horton, R.: Steroids, **12**, 631, 1968a.
- 6) Kato, T. and Horton, R.: J. Clin. Endocr., **28**, 1160, 1968b.
- 7) Mauvais-Jarvis, P., Floch, H.H. and Bercovici, J.-P.: J. Clin. Endocr., **28**, 460, 1968.
- 8) Mayes, D.M. and Nugent, C.A.: J. Clin. Endocr., **28**, 1169, 1968.
- 9) 水谷修太郎, 森義則, 園田孝夫, 竹安晃一: 日泌尿会誌, **60**: 1101, 1969.
- 10) Murphy, B.E.P.: 3rd Int. Congress of Endocrinology. Mexico City, 1968.
- 11) Rosenfield, R.L., Eberlein, W.R. and Bongiovanni, A.M.: J. Clin. Endocr., **29**, 854, 1969.
- 12) Vermeulen, A. and Verdonck, L.: Steroids, **11**, 609, 1968.

(1970年3月6日受付)