Radioimmunoassay による Plasma Testosterone の測定と問題点

今 野 稔
穂 坂 正 彦
間 宮 紀 治
西 村 隆 一

横浜市立大学泌尿器科学教室
(主任: 高井修道教授)

STUDIES ON A RADIOIMMUNOASSAY FOR PLASMA TESTOSTERONE

Minoru Konno, Masahiko Hosaka, Toshiharu Mamiya and
Ryuichi Nishimura

Dept. of Urology, Yokohama City University, School of Medicine
(Director: Prof. Shudo Takai)

Using one step of Sephadex LH-20 micro column chromatography with the solvent system of hexane, benzene, methanol (90:5:5), complete separation of testosterone from 5 α -dihydrotestosterone (DHT) was developed. The antiserum against testosterone-3 oxime-bovine serum albumin was supplied by the Department of Pharmacological Research, Teikoku Hormone Mfg. Co., Ltd. and was used at a dilution of 1:20,000. The antiserum has high affinity for testosterone and DHT (Cross reaction: testosterone 100, DHT 117%). It is possible to determine simultaneously testosterone and DHT concentrations in plasma by this method.

Plasma of 0.05 ml from men and 0.5 ml from women was used for analysis. Following extraction with ether and chromatography on Sephadex LH-20, the dried purified extract was incubated with antiserum at room temperature for 30 min. (NH₄)₂SO₄ was used to separate free from bound testosterone.

Various factors affecting the method blank, accuracy, sensitivity, and precision were investigated. The mean blank was 9.0 ± 5.9 (M $\pm$ SD) pg per sample. The mean recovery of testosterone-³H added to 21 samples was $83.6 \pm 6.3\%$. The accuracy and precision of the method were satisfactory. The concentration of testosterone in plasma from men was 559 ± 170 ng/dl, and in the sample collected from women 32 ± 12 ng/dl, and in plasma from patients with carcinoma of the prostate who were treated by synthetic estrogenic agents for 1 to 7 years 19 ± 6 ng/dl. Our values for plasma testosterone concentration in women were lower than those reported previously. To determine plasma testosterone concentration by the use of radioimmunoassay, complete separation of testosterone from other steroids is quite essential.

緒 言

近年, plasma testosterone の測定法は目覚ましい発展を遂げ, 放射性同位元素の導入により微量測定が可能となつたばかりでなく, 測定手段の簡易化が多くの研究者により達成されつつある。測定方法の簡易化の意味では, double isotope dilution derivative method, gas

liquid chromatography 法に比較し, competitive protein binding assay (CPBA) の意義は否定できないが, 1957年 Erlanger ら¹⁾により, 各種ステロイドの抗体作製法が発表され, ついで1970年, Furuyama, Mayes & Nugent²⁾が初めて testosterone の radioimmunoassay (RIA) を報告して以来, RIA の時代が開かれ, より微量の testo-

sterone をより簡便に測定できるようになった。すなわち、CPBA に用いられる testosterone binding globulin 以上に特異性、感度、安定性に優れた testosterone の抗体が得られるようになり、testosterone の測定法に画期的な進歩をもたらした。

しかし、現在各所で作製されている testosterone の抗体もなお、testosterone のみに affinity をもっているわけではなく、他の androgen 特に 5α -dihydrotestosterone (DHT) との親和性はかなり強い。したがってこれらの androgen を分離して測定すべきかどうかが問題となる。一つには、androgen である以上個体の androgen 分泌の指標として総括して測定してもさしつかえないという考え方も成り立つが、われわれは、plasma testosterone の動態を論ずる以上は testosterone を完全に分離して測定すべきであると考えた。そのためには、簡便な分離法が考案されなければならない。また、測定の対象が微量であればある程、血中の脂質、その他ステロイド以外の物質または有機溶媒に含まれる物質等により強く干渉され測定値を大きくくるわす要因となる。

より正しい臨床判断を下すための全ての基準は正確な測定法に基づくものである。したがって、われわれは RIA における plasma testosterone 測定のこれらの諸問題を検討し、若干の考察を加えた。以下にその詳細を報告する。

実験材料および方法

使用した testosterone- $1,2\text{-}^3\text{H}$ (New England Nuclear Corp) の specific activity は 42.3Ci/mM である。testosterone の antiserum は牧野ら³⁾が testosterone-3-oxime-BSA を家兎に免疫して作製したものを用いた。antiserum の希釈用緩衝液には bovine crystalline albumin (Nutritional Biochemicals Co.) を 0.06% および bovine gamma globulin (Sigma) を 0.05% 含む 0.05M , pH 8.2 (20°C) の borate buffer を使用し、 $20,000$ 倍に希釈した。chromatography 用の column には内径 0.7cm 、長さ 12cm の注射筒型のものに先端に 23G の注射針をセットしたものを使用した。column には底に少量の脱脂綿をつめ、展開溶媒に膨潤させた Sephadex LH-20 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) を 2ml に充填し、数倍量の展開溶液で洗滌した後使用した。Sephadex LH-20 の前処理法は、

(1) 3 時間以上展開溶媒で充分膨潤させ、(2) 陰圧下で脱気した後、(3) 新しい展開溶媒で洗滌して使用する。

結合型と遊離型の分離は、 $50\text{ (w/v) \%}$ の硫酸溶液に

よる塩析法によった。

scintillator は dioxane scintillator を用いた。ガラス器具は使用前に、特級 MtOH で充分洗滌し干渉物質を除去した。

有機溶媒はすべて和光純薬の特級品を使用した。

各検体は、採血の後直ちに血清分離し、 -30°C で凍結保存しておき、随時測定した。

測定方法は穂坂ら⁴⁾の方法に従った。概略は下記の通りである (図 1)。

Fig. 1 Flow sheet of the method

測定に用いる血清量は成人男子の場合 0.05ml 、成人女子の場合 0.5ml であり、男子血清の場合には蒸留精製水を 0.2ml 加え希釈した。回収率測定のために約 $2,000\text{ dpm}$ の testosterone- $1,2\text{-}^3\text{H}$ を加え、抽出は 2ml の ether によった。抽出後、下層の血清を毛細管ピペットで除去し、ether 層に $0.2\text{ml} \sim 0.5\text{ml}$ の精製水を添加し ether 層を水洗する。次いで ether 層を移しとり、窒素ガス気流中で蒸発乾固した。各検体はそれぞれ 0.5ml の展開溶媒に溶解し、Sephadex LH-20 column に吸着した。solvent system は hexane (H): benzene (B): MtOH (M) = 80:15:5 を用いた。testosterone は展開液量 6.5ml から 9.5ml の 3ml 中に溶出される。そのうちの $1/2$ 量で回収率を測定し、残りの $1/2$ 量を radioimmuno-

assay に用いた。

radioimmunoassay のために新たに10,000 dpm の testosterone-1,2-³H を加え、蒸発乾固した後に antiserum 希釈溶液を0.25ml 加えゆるやかに振盪混和後、30分間室温下で incubation する。次いで、硫酸溶液を加えよく混和し、5分以上経過してから 3,500rpm 10分間遠心分離し上清 0.2ml を counting vial にとり、dioxane scintillator 12ml を加え数時間放置後、液体シンチレーションカウンターにて count する。

標準曲線は横軸に標準 testosterone pg 数、縦軸に結合率をとり作成したものを用いた。

結果

- 1) 標準曲線及び測定法の精度
標準曲線の有効定量範囲は0 pg から 200pg までである。また、標準曲線上の測定感度は5 pg であった (図 2)。

Fig. 2 Standard curve of testosterone

測定に使用した血清量は正常成人男子では0.05ml～0.025ml, 正常成人女子は 0.5ml である。chromatography 終了後の平均回収率は83.6%± 6.3 (S.D.) (n= 21) で、water blank 値は 9.0pg± 5.9 (S.D.)/sample であった。

また、本測定法の accuracy, precision は表 1 の通り満足すべき結果である。

- 2) 有機溶媒の blank 値について
各種有機溶媒 1 ml 中の blank 値を測定した。その結果、図 3 のように本法において使用している有機溶媒である ether, hexane, benzene, MtOH は blank 値が低い

Table 1 Accuracy and precision of the method

Accuracy	Authentic T (pg)	Measurement value (M ± SD pg)	No. of Samples
	0	9.0 ± 5.9	10
	200	203 ± 14	5
	400	411 ± 27	5
Precision	Mean ± SD (ng/dl)	Coefficient of variation (%)	No. of Samples
	Male 433 ± 31	7.2	5
	Female 14 ± 3	21.5	5

Fig. 3 Blank values of solvents

ことが確認された。これに対し、chloroform, methylene-chloride, acetone 類は blank 値が高く、RIA に使用することはできない。

- 3) Sephadex LH-20 column chromatography による testosterone と DHT の分離について

benzene: MtOH=85 : 15, hexane: benzene: MtOH =80 : 10 : 10, 同じく80 : 15 : 5, および90 : 5 : 5 の 4 種の solvent system を用い、testosterone と DHT の分離度を検討した。

すなわち、0.5ml の展開液に DHT-³H および testosterone-³H をそれぞれ 20,000dpm 溶解し column に吸着させ溶出分離した。そして、0.5ml ずつ fraction し、その radioactivity を測定した。

その結果、図 4 のように、benzene: MtOH=85 : 15 では testosterone と DHT のピークはまったく一致し両者は分離しない。さらに表 2 のように hexane: benzene: MtOH=80 : 10 : 10 では、testosterone fraction中にDHT の21.4± 3.2 (S.D.) %の混入が認められた。一方、hexane: benzene: MtOH=80 : 15 : 5 では80 : 10 : 10

Fig. 4 Chromatographic pattern of testosterone and dihydrotestosterone in the sephdex LH.20 column

Table 2 Separation of testosterone by the use of sephadex column chromatography

Solvent system Hexane: Benzene: MtOH	Fraction (ml)	T Recovery ($M \pm SD$) %	DHT Contamination ($M \pm SD$) %
80 : 10 : 10	5.0 ~ 7.0	94.0 ± 2.0	21.4 ± 3.2
80 : 15 : 5	6.5 ~ 9.5	89.1 ± 1.6	4.2 ± 0.8
	7.0 ~ 9.5	67.7 ± 4.7	1.5 ± 0.5
90 : 5 : 5	10.0 ~ 14.0	87.2 ± 1.5	0

の system より混入率は低下し、 4.2 ± 0.8 (SD) % に抑えることができる。この時の回収率は 89.1 ± 1.6 (SD) % である。さらに、DHT がオーバーラップする部分を避けて testosterone を分画採取すると回収率は 67.7 ± 4.7 (SD) % になるが、DHT の混入はわずか $1.5 \pm 0.5\%$ となり、ほぼ完全な分離が可能となる。また、hexane: benzene: MtOH = 90 : 5 : 5 では、DHT と testosterone とは完全に分離された。即ち、極性の強い MtOH の比率を減少させ、非極性の溶媒である hexane の比率を高めることにより testosterone の

溶出位置は遅れ DHT と分離することが判明した。しかし、分離性を良くするために testosterone の溶出位置を遅らせることは、chromatography に要する時間を長くし、ピークをブロードなものとし、そして、分画採取する液量を増加させる結果となる。従つて、testosterone fraction 中への DHT の混入率が少なく、時間的にも chromatography に要する時間が比較的短い hexane: benzene: MtOH = 80 : 15 : 5 の solvent system を用い、溶出液量 6.5ml から 9.5ml の間を分画採取する方法を最も実用的な方法として採用した。

4) With chromatography 法と Without chromatography 法の比較検討

正常成人男子16例、正常成人女子13例、長期 (1 ~ 7 年) estrogen 投与前立腺癌患者15例について、chromatography を用いた場合 (With chromatography 法) と chromatography を省略した方法 (Without chromatography 法) により同時に血中 testosterone 値を測定した。

その結果、表3のように3群とも Without chromatography 法による測定値の平均は With chromatography 法による測定値の平均よりも高値であつた。即ち、正常成人男子では平均23%、正常成人女子では平均35%、長期 estrogen 投与前例では平均48%高値を示し、血中 testosterone 濃度が低い女子例及び前立腺癌患者治療例では両方法の測定値の差の比率は大となる傾向にあつた。しかし、測定例中に without chromatography 法による測定値が with chromatography 法による測定値よりも低い例が44例中4例認められている。

一方、water blank 値は chromatography を採用することにより低下させることができることが認められた。即ち、chromatography により非ステロイド性の干渉物質も除去されることが示された。なお、使用する精製水は純度の高いものを使用すること、試験管等のガラス器具を使用前に MtOH 洗滌すること等により Without chromatography 法と With chromatography 法における water blank

Table 3 Comparison of With-chromatography and Without-chromatography

	No. of Samples	With chromatography ($M \pm SD$)	without chromatography ($M \pm SD$)	Mean of Difference (%) (Range)
Water blank	10	9.0 ± 5.9 per sample (pg)	21 ± 9.3 per sample (pg)	
Normal male	16	497 ± 174 ng/dl	610 ± 210 ng/dl	23 (−8 ~ +79)
Normal female	13	32.8 ± 9.4 ng/dl	38.8 ± 7.5 ng/dl	35 (−32 ~ +171)
Estragen treatment (1 to 7 years)	15	21.1 ± 9.2 ng/dl	29.4 ± 9.8 ng/dl	48 (−5 ~ +208)

値は同等になった。

5) 正常成人男女および estrogen 治療前立腺癌患者の血中 testosterone 濃度

a) 22才より46才までの正常成人男子26例の平均値は 559 ± 170 (SD) ng/dl であった。また、22才より46才までの正常成人女子22例の平均値は 32 ± 12 (SD) ng/dl であった。

b) 前立腺癌患者4例について、estrogen 治療前後の血中 testosterone の変動を追跡した。その結果、表4

Table 4 Effect of estrogen treatment of plasma testosterone levels

Duration of Estrogen Treatment (Weeks)	Patients			
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4
Pre	572	440	431	428
1	241	394	124	313
2	114	232	119	—
3	22	31	24	44
4	20	30	—	—
7	—	—	—	37
8	—	—	19	25

Table 5 Effect of estrogen treatment and castration on plasma testosterone levels

No.	Age	Testosterone Levels ng/dl	No.	Age	Testosterone Levels ng/dl
1	73	13	7	78	18
2	73	18	8	73	23
3	76	8	9	71	24
4	73	12	10	82	20
5	83	19	11	74	16
6	82	31	12	65	28

19 ± 6 (SD) ng/dl

のように血中 testosterone 濃度は約3週間後に女性値レベルまで下降し、その経過を明確に把握することができた。

c) 長期間(1年~7年) estrogen 治療を続け、除手術を受けている前立腺癌患者12例について測定した。そして表5のように、全例血中 testosterone 値は著しく減少し、その平均値は 19 ± 6 (SD) ng/dl と成人女子平均値より低値となっていた。

考 察

1957年, Erlanger et al¹⁾ は oxime, hemisuccinate, chlorocarbonate 誘導体によりステロイド蛋白結合物を合

成し、これを抗原として動物に免疫してステロイドホルモンの抗体を作製する方法を発表した。即ち, Erlanger et al によつてステロイドホルモンの RIA の時代が開かれた。しかし、各種ステロイドホルモンの RIA が実用化したのはそれから10年後である。

1969年, Abraham⁵⁾ は estradiol の抗体を作製し、RIAによる測定方法を報告した。ついで1970年, Mayes, Nugent 一派が aldosterone および testosterone を²⁾⁶⁾、さらに1971年 progesterone の RIA⁷⁾ の詳細を報告している。これらは各種ステロイドホルモンの RIA の初めての報告であり、ステロイドホルモン測定法に大きな進歩をもたらせたが、現在なお一般に普及した方法とはいえず、抗体の特異性、感度および測定方法において解決されなければならない多くの問題が残されている。

testosterone の測定法は放射性同位元素が導入されてから1964年以来急速な発展を遂げ、gas liquid chromatography 法⁸⁾、double isotope derivative 法⁹⁾をへて、

Table 6 Cross reaction of steroids with TBG and with T-antiserum

Steroids	TBG Vermeulen, Verdonck (1970)	T-antiserum	
		Nieschlag (1972)	Makino (1973)
Testosterone	100%	100 %	100 %
Dihydrotestosterone	300	100	117
Androstenediol	95	1.6	26.1
Androstenedione	1	0.3	1.23
Androsterone	5		0.14
Dehydroepiandrosterone		0.002	0.09
Estradiol	60	0.003	0.09
Estriol	5	0.001	0.09
Estrone		0.001	0.09
Progesterone	5	0.05	0.19
17 α -OH-progesterone	5	0.03	0.09
Deoxycorticosterone	5	0.001	0.09

Table 7 Factors which give influences on values determined by radioimmunoassay

	Elevating Factors	Lowering Factors
In Plasma	Other Steroids Non-Steroidal Substances	Lipid
In Analytical Process	Soiled Substances of Glassware Grade of Organic Solvents	Alteration of Steroid

Table 8 List of Radioimmunoassay of plasma

	Furuyama et al ²⁾ (1970)	Chen et al ³⁵⁾ (1971)	Ismail et al ¹³⁾ (1972)	Collins et al ¹⁶⁾ (1972)	Coyotupa et al ¹⁷⁾ (1972)
Antiserum against	T-3-BSA	T-3-BSA	T-3-BSA	T-3-BSA (T-17-BSA)	T-3-BSA
Antiserum dilution	×7,500	×3,200	×6,000	×5,000	×10,000
Assay buffer	Borate buffer	P B S	P B S	Tris buffer	P B S
Cross reaction of DHT (%)	42	81.7	77	Unknown	67
Plasma samples(ml)	Male 0.1 Female 0.5	Male 0.5 Female 2.0	Male 0.5 Female 1.0	Unknown	Male 0.2—0.5 Female
Extraction	Hexane-ether	Diethyl ether	Benzene-ether	Diethyl ether	Ether
Chromatography	Alumina column	Without chromat.	Without chromat.	Sephadex LH-20 column	Celite column
Solution system	0.95% EtOH, Hexane			Benzene: Hexane 95:5	10 and 20% Ethylacetate: Isooctane
Contamination of DHT (%)	23.1	100	100	50	Complete separation
Incubation time	2 hours at room temp.	30 min at room temp. and for 3 days at 4 °C	6 hours at 4 °C	30 min. at room temp.	Over night at 4 °C
Separation free from bound	(NH ₄) ₂ SO ₄		Double antibody	Dextran chacoal	Dextran chacoal
Standard curve Range(pg)	0—150	100—10,000	10—1,000	0—150	0—400
Water blank (pg)	2±2	Adding 0.5(T) ng 0.43 ng was found	2—14	2.8±0.9 25±6	Postmenopousal plasma 0
Normal levels Male Female (M±SD) ng/dl	590±149 32±7	667±248 69±18	596±202 46±21	573±190 53±10	490±160 22±7

competitive protein binding assay (CPBA)¹⁰⁾ および RIA に至っている。この発展の根本的な要因は血中濃度が極めて微量である testosterone を精度よく、しかも容易に測定したいという希望と目標にあり、以上の点から考えると CPBA と RIA は優れた方法であると言える。

CPBA は妊娠末期婦人または前立腺癌で estrogen 剤の投与を受けている患者の血中に多く含まれる testosterone binding globulin (TBG) を用い、testosterone と testosterone-³H の競合結合反応を応用した方法である。RIA の測定原理も CPBA と全く同等であり、TBG と抗体の testosterone に対する結合の特異性および抗体力価の差により測定方法が若干異なるのみである。

testosterone に対する結合の特異性について TBG と現在までに作製されている主な抗体とを比較してみると(表6)、TBG の場合は testosterone 以外に DHT に強い affinity を持っているばかりでなく、17β-hydroxy-5α-C₁₉ steroid を中心に多くのステロイドに対して親和

性を有している。一方、testosterone 抗体は全く testosterone のみに結合するわけではない。しかし、抗体の特異性は非常に高く testosterone 以外には、主として DHT に親和性を有するがその他のステロイドに対する cross reactivity は低い。

従って、CPBA では高精度の chromatography により testosterone を分離精製してから TBG と結合させ測定しなければならず測定法を複雑にする一因となっている。また、TBG を用いた時の測定感度は標準曲線の測定範囲からみると報告者により異なるが、500pg から 5,000pg 程度であり、testosterone の抗体では 5 pg から 500pg 程度¹¹⁾であり、RIA の測定感度は CPBA¹²⁾ と比較し約10~50倍高くなる。それ故、使用血漿量は CPBA では男子 0.5ml, 女子 2~3 ml 必要としたのに対し、RIA では男子 0.05ml, 女子 0.5ml のわずかな量で測定可能である。

以上のように、現在用いられている血漿 testosterone の測定法の中で、RIA は最も感度のよい有用な方法であ

testosterone previously reported

Nieschlag et al ¹⁸⁾ (1972)	Makino et al ¹¹⁾ (1973)	Hiller et al ³⁴⁾ (1973)	Kinouchi et al ²¹⁾ (1973)	Pirke et al ¹⁵⁾ (1973)	Hosaka et al ⁴⁾ (1973)
T-3-BSA (T-3-hemocyanin)	T-3-BSA	T-3-BSA and T-11-BSA	T-3-BSA	T-3-BSA	Supplied by Makino
×25,000	×20,000	×4,000 and 6,000	×20,000	×60,000	×20,000
0.9% Saline	Borate buffer	P B S	P B S	P B S	Borate buffer
100	117	T-3: 65 T-11: 15	60—79	71	117
Male 1.0 Female 1.0	Male 0.1 Female 1.0	Male 0.1 Female 0.5	Male 0.1 Female 0.5	Male 0.2	Male 0.05 Female 0.5
Diethyl ether	Ether	Diethyl ether	Diethyl ether	Ether	Ether
T L C	Sephadex LH-20 column	T L C	Celite column	TLC or Without chromat.	Sephadex LH-20 column
Chloroform: 50 Ethylacetate: 45 Petroleum ether: 5	Hexane: Benzene: MtOH (80:10:10)	Cyclohexane: Benzene: EtOH (100:95:5)	0.5 and 10% Ethylacetate Isooctane	Benzene: MtOH (93:7)	Hexane: Benzene: MtOH (80:15:5)
Complete separation	5.0	Complete separation	2.0	Complete separation or 100	1.5±0.5
18 hours at 4°C	30 min. at room temp.	2—24 hours at 4°C	1.0 hours at 4°C	Over night at 5°C	30 min. at room temp.
Dextran charcoal	(NH ₄) ₂ SO ₄	Dextran charcoal	(NH ₄) ₂ SO ₄	Dextran charcoal	(NH ₄) ₂ SO ₄
25—10,000	0—500	0—250	0—1,000	0—500	0—200
Unlabelled T Recovery 100±6 %	7.4±2.8	0	0	Reagent blank with TLC 7±3.1 without 5.0±5.2	9.0±5.0
637±188 57±20	510±198 49±21	582±28 18±0.8	706±187 33±15	545	568±200 30±14

る。

しかし、前述したようにこれまで報告されている抗体は全て、testosterone のみに affinity を有する完全な抗体ではなく、DHT のようなステロイド以外に非ステロイド性物質にも affinity を持つ。従って現在、RIA は CPBA に比較し数段進歩したとは言え、血中よりのステロイドホルモンの抽出、分離精製の操作はステロイドホルモンの RIA において欠かせない前処理の方法であることに変わりはない。

表7に示したようにステロイドホルモンの RIA に影響を及ぼす因子として、血中には類似の構造を有したステロイドは勿論のこと脂質や非ステロイド性の未知の物質が存在する。同時に血中からのステロイドホルモンの抽出、chromato. 等による分離精製の際使用する溶媒や器具、クロマト剤中に含まれる非ステロイド性干渉物質をも考慮しなければならない。このような測定値を高める外的因子は使用する溶媒の種類や純度を選択することにより、また器具器材は充分予備洗滌することにより最

小限の影響にとどめることが可能である。一方、血中に同時に存在する内的因子であるステロイド性干渉物質および非ステロイド性干渉物質は、抽出過程において目的とするステロイドホルモンと同時に抽出されてくることが多い。したがって、これらの干渉物質を排除する最も有効な手段として chromatography が考えられる(表3)。しかし、RIA における chromatography の必要性については、抗体の特異性と関係し研究者により意見が異なる。

testosterone の RIA に関し各研究者の考え方を分類すると主に3つの考え方に代表される(表8)。即ち、

(1) chromato. を省略した方法 (2) chromato. は行なっているが、testosterone を一部の DHT を含めて測定している方法 (3) chromato. により DHT をも完全に分離して testosterone のみを測定する方法である。

Ismail et al¹⁹⁾ は chromato を省略し、血漿より testosterone を抽出した後、TBG を加えこれに結合させ塩析により TBG を沈澱させ、沈澱物中より結合した testo-

sterone 等を抽出し RIA を行なう方法を述べている。そして、この方法による測定値は thin layer chromatography によつて testosterone を分離して測定した値と比較し約10%高値に測定され、その理由として構造的にも生理学的にも testosterone と類似している DHT や 5β -androstane $3\alpha,17\beta$ -diol を同時に測定しているためであると述べている。そして、この chromat. を省略した方法で測定した値と他の方法による測定値とよく合致することから測定方法の簡便化を考え、chromat. を省略した方法は有効な方法であるとしている。さらに、前処理することなく chromat. を全く省略した方法に岩動ら¹⁴⁾ および Pirke¹⁵⁾ の方法があり、両者共に男子血中 testosterone 測定に実用的であると述べている。

また、Collins et al¹⁶⁾ は Sephadex LH-20 column chromatography (solvent system; benzene: MtOH=95:5) を施行し、 5α -androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol と 5α -androstene- $3\beta,17\beta$ -diol を分離しているが、DHT はまったく分離されていない。一方、Furuyama et al²⁾ は Al_2O_3 column chromatography (system; 0.95% EtOH-hexane) を用い testosterone を分離しているが、testosterone の fraction に DHT の23.1%が混入している。以上の方法は共に血漿中の非ステロイド性干渉物質を排除しているものの DHT 等はある程度含めて測定しており、厳密な意味では testosterone のみを測定しているわけではない。

これに対し、Coyotupa et al¹⁷⁾ は celite column chromatography (system; Hexane: Benzene: MtOH=80:15:5) により、Nieschlag et al¹⁸⁾ は thin layer chromatography (system; chloroform: ethylacetate: Petroleum ether=50:45:5) により、testosterone を完全分離して測定している。牧野ら¹¹⁾ は Wu et al¹⁹⁾ の原法を testosterone 測定に応用し、Sephadex LH-20 column chromatography (system; hexane: benzene: MtOH=

80:10:10) を用いて分離し、DHT の混入率は5%であり、fraction する位置を調節することにより完全分離も可能であると報告している。穂坂ら⁴⁾ は Sephadex LH-20 column chromatography (system; hexane: benzene: MtOH=80:15:5) により DHT の混入率を 1.5 ± 0.5 (SD) % に抑え、正常男子の測定においては DHT が 0.3pg/sample 程度であり、ほぼ完全に分離している。これら Sephadex LH-20 を用いた micro column chromatography は blank 値が低く短時間でかつ多数の検体を容易に処理できる優れた特徴を持っている。著者らは Sephadex LH-20 column chromatography をさらに検討し、testosterone と DHT の分離条件としては hexane: benzene: MtOH=90:5:5 を用いれば完全に分離できることを確認している (図5)。そして、この方法を既に DHT の測定法に適用するとともに、testosterone と DHT の同時測定法に採用し同時測定が可能である。

ともかく、いずれの方法においても各研究者は何らかの方法、手段により非ステロイド性干渉物質を分離して測定しているが、血中に微量に存在し testosterone の抗体に対して testosterone と同等ないしはそれ以上の強い affinity を持つ DHT の評価が異なっており、その評価が測定法を左右していると推察する。それ故、DHT の生理的意義等について論ずる必要があろう。

testosterone は target organ においては prehormone であり、 5α -reductase により還元され DHT となり初めて active form となる androgen であると考えられており²⁰⁾、DHT はその androgen potency において testosterone と同等またはそれ以上であると言われている²⁴⁾

(表9)。そしてこのように強力な androgen である DHT の末梢血中の androgenic action は種々の動物により確認されており²²⁾²³⁾²⁴⁾²⁵⁾、個体の男性化作用を有している。一方、1970年 Ito, Horton²⁶⁾ は CPBA により末梢

Table 9 Weights of accessory organs in castrated rats treated with testosterone and dihydrotestosterone, and in intact controls W.J. Jeffcoate (1970)

Group	No. of Animals	Seminal Vesicle	Coagulating Gland	Ventral Prostate
Testosterone-treated castrates	6	104	23	62
Dihydrotestosterone-treated castrates	6	132	27	98
Intact controls	5	626	111	281

Average weight (mg)

Table 10 Plasma dihydrotestosterone concentration in adult male and female

Authors	Method	Plasma DHT (ng/dl)	
		Male (M±SD)	Female (M±SD)
Ito, Horton (1970)	Competitive protein binding	54±19	14.8±5.4
Tremblay et al. (1970)	Competitive protein binding	50±14	22±4
Saetz et al. (1972)	Double isotope dilution	56±13	18±7
Gupta et al. (1972)	Competitive protein binding	64.7±13.7	
Coyotupa et al. (1972)	Radioimmunoassay	130±80	34±17
Hosaka et al. (1973)	Radioimmunoassay	48±9	10±3

血中の DHT を測定し、男子 54±19 (SD) ng/dl、女子 12.5±3.5 (SD) ng/dl であったと報告している。同じく 1970 年、Tremblay et al.²⁷⁾ も CPBA により測定している。RIA によつて 1972 年 Coyotupa¹⁷⁾ が、また本邦においては 1973 年穂坂²⁸⁾ が初めて測定し、ヒト末梢血中に DHT が存在することを確認している (表 10)。しかしこの DHT の起源については、睪丸由来であるのか他のステロイドよりの peripheral interconversion が主体であるのか、なお不明である。Ito, Horton²⁹⁾ は peripheral interconversion が主体であろうと推定し、男子の DHT の²/₃は testosterone 由来であり、女子はその²/₃が 4^{androstenedione} 由来であると述べている。さらに、DHT と testosterone は正常状態においても病的状態においても常に一定の濃度比率で変動するものであるのかあるいは、ある種の疾患において DHT が異常値を示すことがあるのか不明である。

したがつて、DHT の生理学的意義を明らかにすべきであり、testosterone の測定においても、いまだその存在が解明されていない DHT を含めて測定することは正しい臨床的判断を誤らせる危険があると考ええる。以上より testosterone の RIA において testosterone を完全分離できる chromatography を採用すべきであると考ええる。

そして、著者らは Sephadex LH-20 column chromatography により、DHT と testosterone を完全分離した。この chromatography によつて、血中の非ステロイド性干渉物質も分離することができた。また、先に示したように (表 3) chromatography を施行した場合と省略した場合の測定値の比較から理解できるように、chromatography の意義は大きい。特に血中 testosterone 濃度の低い女子や estrogen 投与患者の例では DHT や非ステロイド性干渉物質 (特に脂質等) の影響が強く現われることは理論的にも当然のことと言えよう。

一方、上記のような測定値を高める因子ばかりでなく、測定値を低下させる因子についても考慮されなければならない。

Midgley, Niswender³⁰⁾ および Furuyama et al.²⁾ は測定操作中に testosterone は構造変化を起し、生成した新たなステロイド物質は抗体に対する親和性が変化するばかりでなく、testosterone の抗体に対する親和性を著しく阻害することを指摘するとともにこの構造変化により測定値が低下すると述べている。このような現象を防止するには有機溶媒を低温で N₂ ガス気流中で蒸発乾固させることが望ましいが、超微量状態でのステロイドおよび放射性同位元素標識ステロイドの化学構造的安定性に関しては今後の研究の成果が待たれる。

またクロマトを省略した場合、測定値を低下させる因子として注意を要するのは血漿中よりステロイドと同時に有機溶媒で抽出されてくる脂質の影響である。脂質含量は個人差が大きく、血漿使用量の多い女子の場合あるいは、特に estrogen 投与中の患者の血中脂質は異常な例が多い。そしてこの脂質は、時には干渉物質として測定値に加算されたり、反面ステロイドを吸収し抗体との結合を妨げ測定値を高める因子を相殺してあたかも chromatography を行なつた場合と同様な値、ないしはそれ以下の測定値が得られることもある。即ち、脂質が多量にステロイドと同時に抽出されてきた場合、有機溶媒を蒸発乾固した時脂質は試験管内壁に付着皮膜化して、抗体溶液を加えても抗体溶液と親和しにくい状態となつたり、あるいは硫酸による塩析の際表面に浮上し膜状をなしたり、また極端な例としては抗体の沈澱を妨害することもある。以上のようなさまざまな影響を与える脂質については、RIA をさらに発展させる段階で解決されなければならない問題であると考ええる。しかし現在著者らが行なっている chromatography においては、脂質はステロイドホルモンと完全に分離されている。

このように、RIAの測定に干渉し測定値を左右するさまざまな物質と testosterone を分離して測定することが真に正しい値により近づくものと確信する。

以上のような考えにもとづき測定法を検討し、実際の検体の測定を試みた。

正常成人男子26例について測定し、他の報告者のRIAによる測定値および CPBA¹²⁾ による測定値とよく一致することが判った。また正常成人女子22例の測定値も男子同様他の報告者の成績とよく一致している。

高井ら³¹⁾、間宮ら³²⁾は前立腺癌患者の estrogen 治療の効果判定の一助として血中 testosterone を CPBA により測定し各種 estrogen 剤および gestagen 剤の血中 testosterone 値に及ぼす影響について報告しているが、RIAによりさらに抗男性ホルモン剤投与時の動態を超微量値で論ずることも可能であろう。そこで、前立腺癌患者で除瘤術を施行せず各種 estrogen 治療を受けている4例について、治療開始より開始後の短期間中の血中 testosterone の変動の追跡を試みた。そして、約2週から3週後の間に血中 testosterone が30ng/dl 程度へ下降していく状態を明確に把握することができた。また同じく、前立腺癌患者で除瘤術を施行し約1年から7年間の長期にわたり estrogen 剤の投与を受けている12例について、血中 testosterone 値を測定し血中 testosterone のレベルが8 ng/dl から31ng/dl の間にあることを把握することができた。

このように高感度定量法である RIA により血中 testosterone の超微量変動の検索が可能であり女性値が安定して得られることは、思春期前の小児の血中 testosterone 濃度についての解明や、泌尿器科領域における原発性性腺機能不全、続発性性腺機能不全等、testosterone 分泌の低下していると考えられる疾患の男性ホルモン環境の解明等が容易であり、新たに多くの事実が究明されていくものと予想する。したがって、RIAは臨床的にも極めて有意義な検査手段の1つとなるものと考えられる。

RIAにより testosterone の測定は非常に進歩し簡易化されたが、しかし、さらに簡便化を計るため今後も努力が払われてしかるべきである。そしてその簡易化への1つの道は抗体の特異性をさらに高めることである。現在抗原として、testosterone-3-BSA が主として用いられている。その他に testosterone-6-BSA³³⁾ や testosterone-11-BSA³⁴⁾ 等も合成されているが、testosterone-3-BSA 以上に特異性を高めることはできていない。それ故、testosterone に対するより一層特異性の高い抗体が作製され

しかもより高感度のものが得られるならば、さらに微量の血漿で測定可能となり血中のステロイド、非ステロイド性干渉物質に対する対策は必要なくなり、chromatography を省略することが可能となろう。近い将来、必ずこのような測定法が完成される時が来るものと期待している。

結 論

testosterone の radioimmunoassay における諸問題を検討した結果、以下の結論を得た。

1) 現在作製されている testosterone の抗体の特異性、感度等から考え、testosterone の RIA においては chromatography は省略することはできない。

2) 特に testosterone の抗体と強い affinity を示す 5 α -dihydrotestosterone (DHT) は男性ホルモンとしての生理学的意義は重要であり、別個に測定すべきステロイドであると考えられる。

3) DHT と testosterone の分離法として sephadex LH-20 micro column chromatography を検討し、Solvent system に hexane: benzene: MtOH=80:15:5 を採用することによりほぼ完全に分離すること、そしてさらに、hexane: benzene: MtOH=90:5:5 によつて完全分離することが判明した。また testosterone の測定を目的とした場合、hexane: benzene: MtOH=80:15:5 が実用的な方法であることを認めた。

4) また chromatography により、ステロイドの分離のみならず非ステロイド性の干渉物質も除去することができた。

5) 本法により得られた正常値は、成人男子が 559 $\pm$ 170 (SD) ng/dl (N=26)、成人女子が 32 $\pm$ 12 (SD) ng/dl (N=22) であった。この成績は他の報告者の成績と良く一致している。

6) また、除瘤術を施行し長期間(1~7年)estrogen 治療中の前立腺癌患者について測定し、19 $\pm$ 6 (SD) ng/dl (N=12) という値を得ることができた。

7) このように微量の血中 testosterone を安定して正確に測定できる radioimmunoassay は超微量定量法として、価値ある方法と言えよう。

稿を終るに臨み、ご指導ご校閲を賜った高井修道教授、また抗血清を供与下さいました帝国臓器(株)薬理研究部神戸川明博士、牧野拓雄博士に深謝いたします。

文 献

- 1) Erlanger, B.F., Borek, F., Beiser, S.M. and

- Lieberman, S.: *J. Biol. Chem.*, **228**, 713, 1957.
- 2) Furuyama, S., Mayes, D.M. and Nugent, C.A.: *Steroids*, **16**, 415, 1970.
 - 3) 牧野拓雄: 日内分泌誌, 49, 629, 1973.
 - 4) 穂坂正彦, 今野 稔, 西村隆一: 横浜医学, **24**, 47, 1973.
 - 5) A. braah, mGE.: *J. Clin. Endocr. Metab.*, **29**, 866, 1969.
 - 6) Mayes, D., Furuyama, S., Ken, D.C., and Nugent, C.A.: *J. Clin. Endocr.*, **30**, 682, 1970.
 - 7) Furuyama, S. and Nugent, C.A.: *Steroids*, **17**, 663, 1971.
 - 8) Brownie, A.C., van der Molen, H.J., Nishizawa, E.E. and Eik-Nes, K.B.: *J. Clin. Endocr. Metab.*, **24**, 1091, 1964.
 - 9) Riondel, A., Tait[†] J.F., Gut, M., S.A., Joachim, E. and Little, B.: *J. Clin. Endocr.*, **23**, 620, 1963.
 - 10) Horton, R., Kato, T. and Sheins, R.: *Steroids*, **10**, 245, 1967.
 - 11) 牧野拓雄, 稲富頭二, 吉田孝雄, 田根 培, 高木繁夫, 神戸川明: ホと臨, **21**, 107, 1973.
 - 12) 穂坂正彦, 西村隆一, 長田尚夫, 牧野拓雄: ホと臨, **20**, 583, 1972.
 - 13) Ismail, A.A.A., Niswender, G.D. and Midgley, A.R., Jr.: *J. Clin. Endocr.*, **34**, 117, 1972.
 - 14) 岩動孝一郎, 福谷恵子, 若林克己: 核医学, **10**, 329, 1973.
 - 15) Pirke, K.M.: *Acta Endocrinol.*, **74**, 168, 1973.
 - 16) Collins, W.P., Mansfield, M.D., Allandina, N.S. and Sommerville, I.F.J.: *Steroids Biochem.*, **3**, 333, 1972.
 - 17) Coyotupa, T., Albert, F. and Abraham, G.E.: *Analytical Letters*, **5**, 329, 1972.
 - 18) Nieschlag, E. and Loriaux, D.L.: *z. Klin. Chem. u. klin. Biochem.*, **10**, 164, 1972.
 - 19) Wu, C.H. and Lundy, L.E.: *Steroids*, **18**, 91, 1971.
 - 20) Wilson, J.D.: *New Engl. J. Med.*, **287**, 1284, 1972.
 - 21) Kinouchi, T., Pages, L. and Horton, R.: *J. Lab. Clin. Med.*, **82**, 309, 1973.
 - 22) Gloyna, R.E. and Wilson, J.D.: *J. Clin. Endocrinol Metab.*, **29**, 970, 1968.
 - 23) Gloyna, R.E. and Wilson, T.D.: *J. Clin. Invest.*, **49**, 1764, 1970.
 - 24) Jeffcoate, W.J. and Short, R.V.: *J. Endocrinol*, **48**, 199, 1970.
 - 25) Beyer, C., Morali, G. and Gruz, M.L.: *J. Endocrinology*, **89**, 1158, 1971.
 - 26) Ito, T. and Horton, R.: *J. Clin. Endocr.*, **31**, 362, 1970.
 - 27) Trembley, R.R., Beitins, I.Z., Kowarski, A. and Migeon, C.J.: *Steroids*, **16**, 29, 1970.
 - 28) 穂坂正彦, 今野 稔, 間宮紀治, 西村隆一, 牧野拓雄: 日内分泌誌, **49**, 1391, 1973.
 - 29) Ito, T. and Horton, R.: *J. Clin. Invest.*, **50**, 1621, 1971.
 - 30) Midgley, A.R., Jr. and Niswender, G.D.: *Acta Endocrinol. Supp.*, **147**, 320, 1970.
 - 31) 高井修道, 西村隆一, 穂坂正彦, 間宮紀治, 公平昭男, 今野 稔, 河野宗浩: 癌の臨床, **19**, 451, 1973.
 - 32) 間宮紀治, 穂坂正彦, 今野稔, 西村隆一, 高井修道: 泌日尿会誌, **64**, 762, 1973.
 - 33) Riley, W.J., Smith, E.R., Robertson, D.M. and Kellie, A.E.: *J. Steroid Biochem.*, **3**, 357, 1972.
 - 34) Hiller, S.G., Brownsey, B.G. and Cameron, E.H.D.: *Steroids*, **21**, 735, 1973.
 - 35) Chen, J.C., Elinor, M.Z., Hallberg, M.C. and Wieland, R.G.: *Clin. Chem.*, **17**, 581, 1971.

(1974年3月26日受付)