簡便な唾液テストステロン酵素免疫測定

広島大学大学院医歯薬学総合研究科腎泌尿器科

三田 耕司 松原 昭郎 碓井 亜

MEASUREMENT OF SALIVARY TESTOSTERONE BY A SIMPLE ENZYME IMMUNOASSAY PROCEDURE

Koji Mita, Akio Matsubara and Tsuguru Usui

Department of Urology, Graduate school of Biomedical Sciences, Hiroshima University

(Purpose) The level of serum free testosterone (Se free T) is thought to affect personal emotion and behavior. On the other hand, salivary testosterone (Sa-T) exists mainly in an unbound state and its measurement is noninvasive and repeatable. The aim of this study was to evaluate whether Sa-T can be measured in a clinical setting using a simple enzyme immunoassay kit, and to evaluate whether the level of Sa-T obtained by a simple procedure can be used as a substitute for the level of Se free T by comparing the values obtained with those of Se free T.

(Patients and Methods) Seventy-six volunteers from among patients who visited our outpatient clinic. They were 74 male and 2 female patients between the ages of 28 and 90 (mean 67.2 ± 12.7 years, median 70 years). Sixteen of 74 male patients were treated with hormone therapy for prostate cancer. All of 76 patients were scheduled for blood examinations because of urological diseases, and gave full informed consent to participate in this study. Saliva and serum samples were collected between 06.00 and 11.00 h. Sa-T, Se free T and the concentration of transferrin in saliva was measured with a Salivary Testosterone Enzyme Immunoassay Kit, a Coat-A-Count Free Testosterone and a Blood Contamination Enzyme Immunoassay Kit, respectively. The average of duplicate values was used. Bioavailable testosterone (BT) was assayed by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry. Average intraassay coefficient of variations of all assays were within 15%.

(Results) Eleven out of 76 salivary samples were disqualified as unsuitable because of possible blood contamination or falling outside the range of the assay sensitivity. The ranges of Sa-T, Se free T and the transferrin concentration in saliva were 32 to 360 pg/ml ($n = 65$, mean 176.8 ± 96.6 pg/ml, median 168.0 pg/ml), 0.15 to 21.0 pg/ml ($n = 76$, mean 6.6 ± 4.2 pg/ml, median 7.0 pg/ml), and 0.08 to 6.0 mg/dl ($n = 76$, mean 0.66 ± 0.89 pg/ml median 0.42 mg/dl), respectively. In 10 participants randomized chosen out of all, there was significantly correlation between Se free T and BT ($r = 0.964$, $p < 0.01$). There was significant correlation between Se free T and Sa-T ($n = 65$, $r = 0.592$, $p < 0.01$) and estimated Se free T value can be calculated based on the Sa-T level.

(Conclusion) Though disqualified samples accounted for 14.5% of the total number of saliva samples, Sa-T can be used as a substitute parameter for biologically active testosterone.

Key words: Saliva, Testosterone, Enzyme immunoassay

要旨: (緒言) 近年, 血清フリーテストステロン (Serum Free Testosterone: Se free T) の変動による情緒や行動の変化が注目されている. 一方, 唾液中テストステロン (Salivary Testosterone: Sa-T) は, ほとんどが遊離した状態で存在することより Se free T との関連が示唆される. そこで今回, 我々は Sa-T を簡便な酵素免疫測定キットで測定し, その有用性を検討した.

(対象および方法) 対象は 2004 年 1 月から 6 月までに当科で加療中の患者でボランティアを募り, 午

前6時から午前11時までの間に血清と唾液の採取を同時に行った76例で男性74例、女性2例、年齢は28才から90才(平均67.2才 $\pm$ 12.7才)(以下、平均値 $\pm$ 標準偏差)で中央値は70才であった。基礎疾患は良性疾患28例と経過観察を含む悪性疾患48例で、このうち16例は前立腺癌に対しLH-RHアナログによるホルモン療法が施行されていた。Sa-T、Se free Tおよび唾液サンプル中の血液混入についての測定は、Salivary testosterone enzyme immunoassay kit(測定可能範囲:1.5~360pg/ml)、Coat-A-Count free testosterone(測定可能範囲:0.15~50.0pg/ml)、Blood contamination enzyme immunoassay kit(測定可能範囲:0.2~10.0mg/dl)を用い、これらの測定値は二回測定値の平均値とした。血清Bioavailable testosterone(BT)はLiquid Chromatography-Mass spectrometry/Mass spectrometry法(測定可能範囲:20.0pg/dl以上)による実測値の測定を行った。これらの測定系の平均Coefficient of variationは15%以下であった。

(結果)76例のSe free Tは0.15から21pg/ml(6.6 ± 4.2 pg/ml)で、その中央値は7.0pg/mlであり、76例中10例をランダムに抽出してBTとの相関を検討したが、Se free TとBTには高い相関関係($r = 0.964$, $P < 0.01$)を認めた。唾液76検体のうち血液の混入、測定限界値外であった11検体(14.5%)を除いた65検体のSa-Tは32から360pg/ml(176.8 ± 96.6 pg/ml)であり、その中央値は168.0pg/mlであった。

Se free TとSa-Tの65例の関連については有意な正の相関($r = 0.592$, $P < 0.01$)がみられ、唾液テストステロン測定値による血清フリーテストステロン値の予測が可能であった。

(結論)簡便な酵素免疫測定キットによるSa-Tの測定が可能であり、その値はSe free Tと相関しSa-Tが生体内活性型テストステロンの簡易的な指標となり得ることが示された。

キーワード:唾液, テストステロン, 酵素免疫測定

緒 言

血中トータルテストステロンのうち、その大部分はアルブミンやsex hormone binding globulin(SHBG)と結合し、残りの1~2%はこれらに結合しないフリーテストステロンとして存在している¹⁾。従来から血中フリーテストステロン値と男性の行動・日常生活の状態との関連^{2)~4)}、加齢や測定時間による値の変動が報告され⁵⁾⁶⁾、フリーテストステロンが生物学的活性を有するテストステロンとして考えられてきた。近年ではpartial androgen deficiency in aging male(PADAM)がテストステロン低値による病態として認知され⁷⁾、血中フリーテストステロンとの関連も示唆されている。さらに最近では体内テストステロン環境と前立腺癌発生との関連も散見されるなど⁸⁾、今後体内テストステロンの生物学的活性の評価はますます重要になることが予想される。

一方、テストステロンは唾液や精囊液中にも存在するが⁹⁾、唾液にはSHBGがなく、そのほとんどが遊離した状態で存在するため唾液中テストステロン値(Salivary Testosterone:Sa-T)は血中フリーテストステロン値を反映することが報告されており^{10)~13)}、これまでに小児領域における行動や成長について非侵襲的であり繰り返し採取が可能な測定法としてその有用性が散見されている¹⁴⁾¹⁵⁾。加えてSa-Tは血中フリーテストステロンと比較しBiohazardとしての危険性が少

ないという利点を持つ。本邦においても唾液中テストステロン測定の有用性は過去に散見されているが¹⁶⁾¹⁷⁾、テストステロンの抽出など比較的煩雑な過程が必要で現在までに日常の臨床に用いられることは少なかった。

今回我々はこれらの点に着目し、Sa-Tを簡便な酵素免疫測定キットで測定し、中高年齢を中心とした成人におけるSa-Tと血清フリーテストステロン(Se free T)との比較を行い、Sa-TによってSe free Tの予測が可能か否かを検討し、その有用性を明らかにすることを本稿の目的とした。

対象および方法

2004年1月から6月までに広島大学病院泌尿器科で加療中の患者でボランティアを募り、午前6時から午前11時までの間に血清と唾液の採取を同時に行った76例を対象とした。全ての症例は他疾患の評価のために採血が予定された症例で、検査終了後の血清の一部と唾液を本研究に供与することに同意された。症例の内訳は男性74例、女性2例で年齢は28から90才(平均67.2 $\pm$ 12.7才、中央値70才)(以下、平均値 $\pm$ 標準偏差、中央値)であり、その基礎疾患は良性疾患28例と経過観察を含む悪性疾患48例で、このうち16例は前立腺癌に対しLH-RHアナログによるホルモン療法が施行されていた。

唾液は採取直前に軽くうがい後、数分間口腔内に唾

Table 1 The results of all assays

	Sa-T	Se free T	Transferrin concentration in saliva	BT
No. of Pts.	65*	76	76	10*
Unit	pg/mL	pg/mL	mg/dL	pg/mL
Range	32-360	0.15-21.0	0.08-6.6	15.8-1,039.8
Median	168.0	7.0	0.42	623.0

Sa-T : Salivary testosterone

Se free T : Serum free testosterone

BT : Bioavailable testosterone

* : Eleven out of 76 salivary samples (14.5%) were disqualified as unsuitable.

* : Ten out of 76 serum samples were randomly chosen.

液をためて 50ml Conical Tube (Becton Dickinson Labware, NJ, USA) に採取後, 1.5ml Eppendorf tube (Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany) に分注, -30°C で保存した。Sa-T の測定は, Salivary testosterone enzyme immunoassay kit (測定可能範囲: 1.5~360pg/ml, Salimetrics Inc., PA, USA) を用い, Se free T の測定には RIA 法による Coat-A-Count free testosterone (測定可能範囲: 0.15~50.0pg/ml, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA) を用いた。唾液サンプル中の血液混入について, Blood contamination enzyme immunoassay kit (測定可能範囲: 0.2~10.0mg/dl, Salimetrics) を用いて唾液中トランスフェリン値を測定した。これらの測定値は二重測定の前平均値を採用した。血清 Bioavailable testosterone (BT) については, アルブミンと結合しているテストステロンとフリーテストステロンの総称と定義し, Liquid Chromatography-Mass spectrometry/Mass spectrometry 法 (測定可能範囲: 20.0pg/dl 以上) による実測値の測定を行った。それぞれの平均 coefficient of variation は 15% 以下であった。

結 果

1) 測定結果と唾液検体の選別 (Table 1)

唾液検体については測定値に唾液以外の血液や細菌などの口腔内環境が影響するため¹⁸⁾, 血液混入, 測定閾値外の検体に対する希釈系列における検討によって不適格検体の除外を行った。血液混入については唾液中トランスフェリン値を 76 検体すべて測定した結果は 0.08 から 6.6mg/dl (平均値 $0.66 \pm 0.89\text{mg/dl}$, 中央値 0.42mg/dl) であったが, 過去の報告¹⁰⁾から 1.2mg/dl 以上を血液の混入ありと規定し, 7 検体を今回の検討から除外した。また, 今回用いた測定キットでは Sa-T

の測定上限が 360pg/ml であり, 測定域値外の症例は希釈系列にて再検したが, 4 検体はその希釈系列における測定値に直線性が得られず計 11 検体 (14.5%) を今回の検討から除外した。Sa-T については 76 検体のうち, この 11 検体を除く 65 検体 (85.5%) を以後の検討に用いることとした。Sa-T は 32 から 360pg/ml (平均値 $176.8 \pm 96.6\text{pg/ml}$, 中央値 168.0pg/ml) であり, その 65 例の年齢は 40 から 86 才 (平均値 68.4 ± 10.9 才, 中央値 70 才) で, 65 例のうち男性は 64 例で, このうち 16 例には LH-RH 投与が施行されていた。

血液検体では Se free T については 76 症例すべての測定を行い, その測定値は 0.15 から 21pg/ml (平均値 $6.6 \pm 4.2\text{pg/ml}$, 中央値 7.0pg/ml) であった。BT については, 76 症例のうち 10 例を無作為に抽出し測定を行ったが, この中には女性 1 例および前立腺癌に対する内分泌療法施行例 2 例が含まれていた。

2) Se free T と BT の相関 (Fig. 1)

76 例中, BT を測定した 10 例を対象として Se free T と BT との相関を検討したが, Se free T と BT に強い相関 ($r=0.964$, $P<0.01$) を認めた。

3) 男性における加齢と Se free T および Sa-T の変動 (Fig. 2)

男性 74 例のうち 16 例は内分泌療法を受けており, ホルモン環境が治療によって修飾されているため, これらを除いた 58 例について加齢と Se free T (Fig. 2A) との相関を検討した。また, この 58 例の唾液検体のうち 11 例は前述の不適格例であったため 47 例を対象とし, 年齢と Sa-T (Fig. 2B) との相関を検討した。Se free T は加齢との負の相関 ($r=-0.622$, $P<0.01$) がみられ, Sa-T についても弱い負の相関 ($r=-0.330$, $P<0.05$) が見られた。

4) Se free T と Sa-T の相関 (Fig. 3)

不適格として除外した唾液 11 検体の症例を除く 65 例の Se free T と Sa-T について相関を検討した。65 例のうち男性は 64 例で、そのうち 16 例には内分泌療法が施行されていた。Se free T と Sa-T には有意な正の相関 ($r=0.592$, $P<0.01$) がみられたが、Se free

T と Sa-T には比例関係はみられなかった。

5) Sa-T による Se free T の予測 (Fig. 4)

Sa-T を濃度別に低値群 (120pg/ml 未満), 中間群 (120 以上 240pg/ml 未満), 高値群 (240pg/ml 以上 360 pg/ml 以下) の 3 群に分けて、各群における Se free T を 95% 信頼区間で示した。いずれの群間にも有意差がみられ、Sa-T による Se free T の予測が可能であった。

考 察

今回の結果より、酵素免疫測定キットによって Sa-T の簡便な測定が可能であり、その値は Se free T に相関し、Se free T の予測が可能であることが示された。

今回用いた酵素を標識する酵素免疫測定法は一般的にはラジオイムノアッセイ法に比べて標識物質が安定で、長期の保存が可能、アイソトープを使用しないため測定に特別な施設を必要としないなどの利点があり、抗原抗体反応に適した標識酵素の測定系を組みやすく、検出系の変化によって高感度化が比較的容易であるなどの特徴をもっている。

唾液検体における Sa-T の測定では検体の取り扱いが特に重要であり、その採取方法、血液混入、保存などがあげられる。唾液の採取に際し綿の使用による測定値の上昇¹¹⁾、ガムの咀嚼による唾液の分泌採取では、分泌開始からの時間によって濃度が変化すること

Fig. 1 Correlation between bioavailable testosterone (BT) and serum free testosterone (Se free T)

○: Male patients except for those receiving hormone therapy

●: Male patients receiving hormone therapy and females

Fig. 2 Correlation between age and testosterone level in males, excluding patients receiving hormone therapy

(A) : Age vs. serum free testosterone (Se free T)

(B) : Age vs. salivary testosterone (Sa-T)

Fig. 3 Correlation between serum free testosterone (Se free T) and salivary testosterone (Sa-T)
○: Male patients except for those receiving hormone therapy
●: Male patients receiving hormone therapy and females

が知られている¹⁰⁾。このためわれわれは、何の器具も用いず軽くうがいをした後に唾液を口腔内に貯留させ数分後に採取する方法を用いた。検体については肉眼的に明らかな血液混入はなかったが、今回の対象が他疾患の治療目的に来院したボランティアであり、高齢者が多い背景から義歯装着による微量な血液混入の可能性は高く、唾液中トランスフェリンの測定によって7例(9.2%)が除外された。保存では、採取した唾液は可及的早期に -80°C 以下の超低温での冷蔵が望ましいが^{8,18)}、これは一部の研究施設に限られる。われわれは、実践的な臨床研究としてこの研究を位置付け、冷凍保存は -30°C で行った。保存から測定までの期間はすべての検体で6カ月以内であったが、 -40°C 6カ月の検体保存により6.5%測定値が減少するとの報告¹⁸⁾もみられ、保存期間は可及的短期間にする必要がある。一方で、口腔内の細菌の状況によっては、Sa-Tの著しく高い測定値が検出され、 4°C での検体保存ではSa-Tは時間とともに指数関数的に増加することが報告されている¹⁸⁾。これは細菌増殖による抗体との結合阻害や加水分解されたテストステロンを免疫反応で捉えていることに起因すると考えられている。今回、Se free TとSa-Tとに完全な比例の関係が得られずSe free Tが低値にも関わらずSa-Tが比較的高値であった検体や、 360pg/ml を超えた検体で希釈系によってその測定値に再現性が得られず除外した検体が

Fig. 4 Estimated serum free testosterone (Se free T) value based on the salivary testosterone (Sa-T) level
*: Error bars show 95% confidence interval.

4検体(5.3%)みられたが、このような唾液中の細菌の存在が原因の一つかも知れない。これらの問題点の解決には、採取した唾液の可及的速やかな保存処理と測定が今後の課題である。

従来から血中フリーテストステロン値と、加齢や測定時間による値の変動が報告されているが^{23)~6)}、今回の検討においても同様に加齢とともに、Se free Tは有意に減少していた。一般的に加齢に伴うSe free Tの低下とこれに呼応するかのようなPADAMの病態出現はSe free Tが生物学的活性の役割を担うことを示唆する。現在、体内テストステロンの生物学的活性をより正確に示すものとして、bioavailable testosteroneが期待されているが¹⁹⁾、その実測値の測定については現時点では一部の研究施設でのみ可能であり²⁰⁾、今回は10検体のみを無作為に抽出しBTの測定を試みた。その結果Se free TとBTがよく相関したことから、Se free Tの測定値を生物学的な活性を有するテストステロンとして簡易的に用いることが可能ではないかと考えた。

一方、唾液中テストステロン値測定の有用性は小児において過去に散見されているが¹⁴⁾¹⁵⁾、今回の結果から中高年齢を中心とした成人においてもSa-Tが生体内活性型テストステロンの簡易な指標となり得る可能性を示唆する。しかしながら前述したように、唾液の分泌速度や細菌など口腔内の環境による測定値の影響は少なくないため、あくまでも大まかな指標として捉えることが必要であろう。本研究ではFig. 4に示したようにSa-TからSe free Tを予測するためにSa-Tを、低値群(120pg/ml 未満)、中間群(120 以上 240

pg/ml 未満), 高値群 (240pg/ml 以上) の3群に分類し検討を行ったが, 中間群における Se free T の予測値は近年報告された20歳代から70歳代の日本人の血清フリーテストステロン基準下限値の4.5~8.5pg/ml にほぼ一致しており²¹⁾, 今後PADAMの補助的診断や前立腺癌患者の予後予測として使用することも可能かもしれない。今回の検討での患者プロフィールは症例全員が泌尿器科に何らかの疾患で治療中の患者であり, 健常人とのバイアスが存在するが, これらのSa-Tが生体内活性型テストステロンの簡易な指標となり得る可能性が示されたことは, 今後唾液テストステロン測定の前臨床での応用が期待される。

(本稿の要旨は第23回日本アンドロロジー学会総会において発表した。)

謝辞:本研究に際し,多大な御助力を頂きました福山臨床検査センター研究開発部, 木本真史氏に深謝いたします。

文 献

- 1) Vermeulen, A.: Diagnosis of partial androgen deficiency in the aging male. *Ann. Endocrinol.*, **64**, 109—114, 2003.
- 2) Hirschenhauser, K., Frigerio, D., Grammer, K. and Manussons, M.S.: Monthly patterns of testosterone and behavior in prospective fathers. *Horm. Behav.*, **42**, 172—181, 2002.
- 3) Booth, A., Johnson, D.R. and Granger, D.A.: Testosterone and men's depression: the role of social behavior. *J. Health Soc. Behav.*, **40**, 130—140, 1999.
- 4) Krause, W., Mueller, U. and Mazur, A.: Measurement of steroid levels in saliva in a population-based survey of lifestyle, medical conditions, marriage, sex life and hormone status in aging men: a feasibility study. *Aging Male*, **5**, 203—215, 2002.
- 5) Ellison, P.T., Bribiescas, R.G., Bentley, G.R., Campbell, B.C., Lipson, S.F., Panter-Brick, C. and Hill, K.: Population variation in age-related decline in male salivary testosterone. *Hum. Reprod.*, **17**, 3251—3253, 2002.
- 6) Dabbs, J.M.: Salivary testosterone measurements: reliability across hours, days, and weeks. *Physiol. Behav.*, **48**, 83—86, 1990.
- 7) Morales, A. and Lunenfeld, B.: International Society for the Study of the Aging Male. Investigation, treatment and monitoring of late-onset hypogonadism in males. Official recommendation of ISSAM. International Society for the Study of the Aging Male. *Aging Male*, **5**, 74—86, 2002.
- 8) Thompson, I.M., Goodman, P.J., Tangen, C.M., Lucia, M.S., Miller, G.J., Ford, L.G., Lieber, M.M., Cespedes, R.D., Atkins, J.N., Lippman, S.M., Carlin, S.M., Ryan, A., Szczepanek, C.M., Crowley, J.J. and Coltman, C.A.: The Influence of Finasteride on the Development of Prostate Cancer. *N. Eng. J. Med.*, **349**, 215—224, 2003.
- 9) Sannikka, E., Terho, P., Suominen, J. and Santti, R.: Testosterone concentration in human seminal plasma and saliva and its correlation with non-protein-bound and total testosterone levels in serum. *Int. J. Androl.*, **6**, 319—330, 1983.
- 10) Shirtcliff, E.A., Granger, D.A. and Likos, A.: Gender differences in the validity of testosterone measured in saliva by immunoassay. *Horm. Behav.*, **42**, 62—69, 2002.
- 11) Shirtcliff, E.A., Granger, D.A., Schwartz, E. and Curren, M.J.: Use of salivary biomarkers in biobehavioral research: cotton-based sample collection methods can interfere with salivary immunoassay results. *Psychoneuroendocrinology*, **26**, 165—173, 2001.
- 12) Wang, C., Plymate, S., Nieschlag, E. and Paulsen, C.A.: Salivary testosterone in men: further evidence of a direct correlation with free serum testosterone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **53**, 1021—1024, 1981.
- 13) Johnson, S.G., Joplin, G.F. and Burrin, J.M.: Direct assay for testosterone in saliva: relationship with a direct serum free testosterone assay. *Clin. Chim. Acta.*, **163**, 309—318, 1987.
- 14) Granger, D.A., Schwartz, E.B., Booth, A. and Arnts, M.: Salivary testosterone determination in studies of child health and development. *Horm. Behav.*, **35**, 18—27, 1999.
- 15) Ohzeki, T., Manella, B., Gubelin-De Campo, C. and Zachmann, M.: Salivary testosterone concentrations in prepubertal and pubertal males: comparison with total and free plasma testosterone. *Horm. Res.*, **36**, 235—237, 1991.
- 16) 梅原次男, 熊本悦明, 三熊直人, 伊藤直樹, 南部明民, 新田俊一: 思春期男子に於ける唾液中 testosterone 値の検討. *日内分泌会誌*, **67**, 230—238, 1991.
- 17) 郝金瑞, 伊藤直樹, 新田俊一, 黒畑敏江, 塚本泰司, 熊本悦明, 梅原次男: 唾液中テストステロン濃度の加齢に伴う変化についての検討. *泌尿紀要*, **40**, 807—811, 1994.
- 18) Granger, D.A., Shirtcliff, E.A., Booth, A., Kivlighan, K.T. and Schwartz, E.B.: The "trouble" with salivary testosterone. *Psychoneuroendocrinology*, **26**, 165—173, 2004.
- 19) Tsujimura, A., Matsumiya, K., Matsuoka, Y.,

Yakahashi, T., Koga, M., Iwasa, A., Takeyama, M. and Okuyama, A. : Bioavailable testosterone with age and erectile dysfunction. *J. Urol.*, **170**, 2345—2347, 2003.

- 20) 本間誠次郎, 川辺勝弘, 見澤三枝子, 奥山光伸, 熊谷幸博, 岡崎 豊: 血中バイオアベイラブル Testosterone の測定法. *ホルモンと臨床*, **52**, 829—844, 2004.

- 21) 岩本晃明, 柳瀬敏彦, 高 栄哲, 堀江 均, 馬場 克幸, 並木幹夫, 名和田 新: 日本人成人男子の総テストステロン, 遊離テストステロンの基準値の設定. *日泌尿会誌*, **95**, 751—760, 2004.

(2004 年 10 月 4 日受付, 2005 年 2 月 15 日受理)