Radioimmunoassay による牛血中 Progesterone の測定

百目鬼郁男・中原達夫・山内 亮*・牧野拓雄**

(農林省家畜衛生試験場・**帝国臓器製薬 K. K. 薬理研)

従来, Progesterone (P) の測定は double isotope derivative (DID) 法, gas chromatography (GC) 法, 蛍光法などにより行なわれていたが, これらの方法は, 一般に手技が煩雑である上に感度が低いために, 家畜の臨床繁殖分野では余り応用されていなかった。

1963 年, MURPHY¹⁾ はステロイドの測定法として competitive protein binding assay (CPBA) 法を開発した。なかでも妊娠モルモットの血清中に存在する P binding protein (PBP) を用いて P を測定する方法²⁾ は優れたものとされている。

いっぽう, 免疫化学の進歩につれて, 近年, 蛋白性ホルモンのをはじめとしてステロイドホルモンを radioimmunoassay (RIA 法) によって測定することが可能になった。RIA 法によるステロイドホルモンの測定については, 1969 年, ABRAHAM³⁾ が estradiol の測定を試みて以来, その他のホルモンの測定にも広く応用され, P についての報告⁴⁻⁶⁾ も少なくない。

本報告では P-3-oxime-bovine serum albumin (BSA) に対する家兎抗血清を使用した RIA 法について若干検討を加え, この方法と PBP を使用した CPBA 法¹⁰⁾ならびに著者らが先に報告した蛍光法¹¹⁾による P の測定感度ならびに精度を比較した。さらに, RIA 法により牛末梢血中の P 消長型を追求した。

実験材料および方法

1. RIA 法

1) 試薬および器具

回収率の補正ならびに測定に使用した放射性 P, P-1 α -2 β -³H(P-³H) は Radiochemical Center の製品で,

*現所属 東京大学農学部

Radioimmunoassay of blood plasma progesterone during estrous cycle in the cow.

DOMEKI, Ikuo, Tatsuo NAKAHABA, Makoto YAMAGUCHI* & Takuo MAKINO** (National Institute of Animal Health, Kodaira, Tokyo, 187 & **Research Laboratory of Teikoku Mfg. Co. Ltd. Kawasaki 213)

Jap. J. Animal Reprod. 20 (3), 1974.

specific activity が 53 Ci/mM のものである。非放射性 P ならびに他のステロイドはすべて帝国臓器製薬(株)から提供を受けたものである。P の分離, 精製には Sephadex LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals) を用いた。

抗血清の希釈液は 0.05 M 硼酸緩衝液 (pH 8.0) に牛血清アルブミン (BSA: Nutritional Biochemical Corporation) を 0.06%, 牛 γ -グロブリン (Nutritional Biochemical Corporation) を 0.05% の割合に溶解したものを使用した。また結合型 P-³H および遊離型 P-³H の分離には 50% (w/v) 硫酸アンモニウム溶液を使用した。

シンチレーターはジオキサン (POPOP 250 mg, PPO 10 g, ナフタリン 100 g をジオキサン 1,000 ml に溶解) ならびにトルエン (POPOP 100 mg, PPO 4 g, トルエン 1,000 ml に溶解) を使用した。アイソトープの測定は Beckman LS-230 型 liquid scintillation systems で行なった。溶媒は全て試薬特級, クロマト用あるいはシンチレーション用, 蒸留水は再蒸留したものを使用した。なお本実験に使用したガラス器具は全て予洗後クローム硫酸液に一夜以上浸漬し, 石けん洗浄, 水洗を繰り返したのち, 蒸留水, アルコールを通し, 自然乾燥させ, さらに使用直前メタノールにより洗浄した。

2) P-3-oxime-BSA の合成および抗血清

抗原とした P 蛋白結合物 P-3-oxime-BSA は P の oxo 基を利用して oxime 誘導体を作成し, これに BSA を結合して合成したものである⁸⁾。抗血清は P-3-oxime-BSA 1mg を complete Freund's adjuvant 0.5ml, 生理食塩液 0.5ml の混合液に加え, この乳化液を 1 回量として成熟家兎の背部皮下に注射して作成した。注射は最初の月は 2 回, 2 カ月以降は月 1 回行ない⁸⁾, 本実験に使用した抗血清は注射開始後 8 カ月目に採取したものである。

3) P の測定方法

牛血中 P の抽出, 分離精製および RIA 法は牧野の方法⁸⁾に準じて行なった。

a. 抽出, 分離精製: 回収率を求めるために, スピ

ツグラスに、あらかじめ 1×10^3 cpm の $P\text{-}^3\text{H}$ を加えて乾固させ、これに被検血漿を加え、その 10 倍量のエーテルで 1 回抽出を行なった。その下層を捨てた後、エーテル層に血漿と同量の蒸留水を加えて振盪、軽く遠心分離し、エーテル層を他のスピッツに移し、 N_2 ガス下で蒸発乾固させた。

P の分離精製は Sephadex LH-20 を用いたマイクロカラムクロマトグラフィーにより行なった。すなわちベンゼン：メタノール (85:15) で一夜膨潤させた Sephadex LH-20 を 2 ml のツベルクリン注射筒につめ溶媒でベットの安定させた後、抽出物をカラムにのせた。本法による P の溶出部位は 1.0~1.4 ml の範囲で大部分が回収された。

b. RIA 法： 溶出液を N_2 ガス下で乾固させたのち、一定量のメタノールを加え、その 1/2 量を回収率を求めるために用いた。残りの 1/2 量にはさらに $P\text{-}^3\text{H}$ 10,000 cpm を加え、 60°C 以下、 N_2 ガス下で乾固した。次いで適正な倍数に希釈した抗血清 0.25 ml を加え、充分振盪したのち室温で 30 分放置した。結合型および遊離型の $P\text{-}^3\text{H}$ の分離には硫酸塩析法を用いた。すなわち、50% 硫酸アンモニウム液 0.25 ml を加え、よく混和し室温で 10 分間放置したのち、3,000 rpm、10 分間遠沈し蛋白質を沈殿させた。その上層 0.2 ml を counting vial にとり、ジオキサシンシンチレーター 10 ml を加えて、液体シンチレーションカウンターにて放射能を測定した。測定値から $P\text{-}^3\text{H}$ の結合率 (% bound) を求め、標準曲線から P 量を算出した。

2. CPBA 法

CPBA 法による血中 P の測定は山本ら²⁾、鳥居ら¹¹⁾の方法に準じて行なった。

3. 螢光法

螢光法による血中 P の測定は著者らが先に報告した方法¹⁰⁾に従った。

4. 実験牛および測定材料

P 測定用の血液材料を採取した実験牛は正常性周期を営む黒毛和種 4 頭である。血液材料は延 9 性周期にわたり頸静脈から採取したヘパリン血で、血漿を分離した後、測定時まで -20°C の冷蔵庫に保存した。

実験成績

1. RIA 法の検討

1) 抗血清の力価

抗血清の力価は、希釈血清に一定量の $P\text{-}^3\text{H}$ ならびに 0~500 pg の P を添加し、各 P 量における $P\text{-}^3\text{H}$ と抗体

Fig. 1. Calibration curves at various concentrations.

との結合率を求め、これにより作成した標準曲線が、用量反応曲線として最も優れている抗血清の希釈倍数をもって表わした。図 1 は 2×10^4 、 4×10^4 、 6×10^4 倍に希釈した抗血清を用いて作成した標準曲線である。 2×10^4 倍では希釈が低く直線性が得られず、 6×10^4 倍では 0 pg における結合率が低く希釈過剰であった。 4×10^4 倍希釈では 0 pg における結合率が 70~80% の範囲にあり、かつ 0~400 pg の範囲においてほぼ直線性を示した。これらの成績から本抗血清の適正希釈倍数は 4×10^4 倍であることを認めた。

2) 抗血清の特異性 (交叉反応)

本抗血清の各種ステロイドに対する交叉反応をそれぞれのステロイドについて反応曲線を作成して検討した。すなわち結合率 50% における各ステロイドの量を求め、P 量との比率に 100 を乗じた数、すなわち交叉反応百分率を比較した (表 1)。その結果、P の交叉反応百分率を 100% とすると 5α -pregnanedione のそれは 42.6% でかなり高かったが、 20α -OH-P は 6.7%、DOC は 6.6%、 20β -OH-P は 1.9% で低く、さらに、この他のステロイドとの交叉反応はほとんど認められなかった。

3) 測定感度ならびに精度

血漿および蒸留水に一定量の純品の P を加えたものを使用して本法の精度を検討した結果、表 2 に示す通り、ほぼ満足すべき成績が得られた。なお 20 pg 以下では変

Table 1. Cross reaction of antiserum with various steroids (dilution of antiserum 1:40,000)

compounds	% cross reaction
Progesterone	100
5 α -Pregnanedione	42.6
20 α -Hydroxyprogesterone	6.73
11-Desoxycorticosterone	6.60
20 β -Hydroxyprogesterone	1.89
17 α -Hydroxyprogesterone	0.89
Pregnenolone	1.46
11-Desoxycortisol	0.06
Corticosterone	<.06
Cortisol	"
Cortisone	"
Aldosterone	"
5 β -Pregnanediol	"
Testosterone	0.17
Androst-4-ene-3, 17-dione	0.15
Dehydroepiandrosterone	0.06
Estrone	"
Estradiol-17 β	"
Estradiol-17 α	"
Estriol	"
Cholesterol	"

動係数が 20% を越えるため本法の測定下限は 20 pg であることが認められた。

4) クロマト法および直接法による測定値の比較

本実験で使用した抗血清は特異性が高いことから、血漿からの P 抽出操作においてエーテル抽出のみを行なった RIA 直接法と、エーテル抽出後 Sephadex LH-20

Table 2. Accuracy of the radioimmunoassay

vehicles	proges- terone added	values of progesterone	coefficient of variation
	pg	pg	%
distilled water (0.1 ml)	0	6.60 $\pm$ 2.81	42.5
	20	26.90 $\pm$ 5.12	18.9
	50	55.80 $\pm$ 6.84	12.2
	100	98.70 $\pm$ 7.32	7.4
bovine blood plasma (0.05 ml)	0	109.3 $\pm$ 25.3	23.1
	50	166.5 $\pm$ 24.5	14.7
	100	205.0 $\pm$ 26.5	12.9

*M $\pm$ S. D. (n=5)

マイクロカラムクロマトグラフィーによる分離精製を行なったクロマト法について、P 測定値を比較した (表 3)。その結果、直接法によっても、クロマト法によってもほぼ等しい測定値が得られることを認めた。

5) P 回収率

血漿に加えた P-³H の、全操作を通じての回収率はクロマト法では 81.9 $\pm$ 7.2% (M $\pm$ S. D. n=35)、直接法では 85.2 $\pm$ 4.9% (n=35) であった。

2. RIA 法、蛍光法および CPBA 法による測定値の比較

同一血漿を用い、RIA 法、蛍光法および CPBA 法による P 測定値をそれぞれ比較した (表 3)。その結果、これらの 3 方法による P 測定値は、ほぼ等しいことを認めた。しかし、蛍光法による測定値は CPBA 法によるそれより、また CPBA 法による測定値は RIA 法によるそれより若干高値を示すことを認めた。

Table 3. Comparison of plasma progesterone values determined by fluorometric assay, competitive protein binding assay and radioimmunoassay method

plasma samples	fluorometric assay	competitive protein binding assay	radioimmunoassay	
			chromatographic method	direct method
1*	0.33 $\pm$ 0.07**	0.31 $\pm$ 0.05**	0.21 $\pm$ 0.07**	0.25 $\pm$ 0.07**
5	1.76 $\pm$ 0.29	1.46 $\pm$ 0.14	1.40 $\pm$ 0.10	1.43 $\pm$ 0.14
10	4.05 $\pm$ 0.54	3.88 $\pm$ 0.31	3.53 $\pm$ 0.10	3.77 $\pm$ 0.50
15	3.41 $\pm$ 0.30	3.28 $\pm$ 0.26	3.07 $\pm$ 0.20	3.11 $\pm$ 0.26
19	0.99 $\pm$ 0.11	0.96 $\pm$ 0.24	0.68 $\pm$ 0.10	0.88 $\pm$ 0.10

* Day of estrous cycle of the cow (0: day of ovulation)

** M $\pm$ S. D. ng/ml blood plasma (n=7)

Fig. 2. Concentration of progesterone in peripheral plasma of the cow during estrous cycle.

3. 性周期における牛末梢血中 P の測定

RIA 直接法により、延 9 頭の牛について性周期における末梢血中 P の消長型を検討した (図 2)。その結果、P は発情期に最低値 $0.2 \sim 0.3 \text{ ng/ml}$ を示したのち、排卵後 3~4 日頃から増加しはじめ、11~16 日の黄体期に最高値 $3.2 \sim 5.8 \text{ ng/ml}$ に達し、この値を 16~21 日まで維持して、次の排卵前 4~6 日頃から急激に低下することを認めた。すなわち、血中 P の消長型は性周期の間に一峰性を示した。しかし、P の濃度水準ならびに最高値に達する時期、また減少の時期は個体によりかなりの差異があることを認めた。

考 察

RIA 法を成立させる最も重要な条件は使用する抗血清の力価ならびに特異性がともに高いことである。P に対する抗血清を作製するための抗原としていくつかのものがあるが⁴⁻⁷⁾、P-3-oxime-BSA を用いて作製した抗血清は特異性の点で優れたものと考えられている。本実験で使った P-3-oxime-BSA に対する抗血清は 4 万倍に希釈可能な高力価のものであった。また、本抗血清は 5α -pregnanedione にかかなり高い交叉反応を示したが、他のステロイドとの反応性は低く、特異性の高い優れたものであった。著者らのひとり牧野は別の実験において、本抗血清は P に対して高い特異性を有していることから、P 含有量の多い検体についてはクロマトグラフィーによる分離精製操作を省略できることを示している⁹⁾。本実験では、クロマト操作を省いた直接法によって測定

した牛血中 P の測定値は、クロマト法によるそれとよく一致していた。このことから牛の血中 P の測定には操作が簡単な直接法の応用を推奨することができる。なおクロマト法、直接法ともに測定下限はほぼ 20 pg であったが、より比放射能の高い P- ^3H を使用すれば測定感度をさらに高めることが可能であろうと考えられる。

同一血漿を用いた比較試験において、RIA 法による P の測定値は著者らが先に報告した蛍光法¹⁰⁾および鳥居ら¹¹⁾の CPBA 法によるそれとほぼ一致することを認めた。しかし、RIA 法は蛍光法に比べると操作が簡易で、かつ感度が著しく高く、また CPBA 法に比べると特異性、感度ともに高い点で優れている。従って P の測定法としては RIA 法が最も優れたものと考えられる。

性周期における牛末梢血中 P については、紫外外部測定法¹²⁾、DID 法¹³⁾、GC 法¹⁴⁻¹⁷⁾、蛍光法¹⁰⁾および CPBA 法^{18,19)}による報告がある。本実験で得た値は紫外外部測定法による GOMES¹²⁾、DID 法による PLOTKA¹³⁾の示している値より低かったが、他の方法^{10,14-19)}によるそれとほぼ一致することを認めた。性周期における血中 P の消長型は、発情期に最低値、黄体期 (排卵後 11~16 日) に最高値を示し、次の排卵前 4~6 日頃から急激に低下する一峰性を示した。DONALDSON¹⁸⁾らは性周期の 8 日以後、P 消長型の変動がはげしいことを報告しているが、本実験でもそのような例があることを認めた。

また、小笠ら²⁰⁾は HOOKER-FORBES 法により牛の血中遊離 progestin を測定して、排卵日に progestin 濃度が著明に増加することを報告している。KAZAMA ら¹⁶⁾は発情開始から排卵まで 6 時間ごとに採取した血液材料について P を測定し、この期間における P 濃度が低いことを報告している。本実験においても、発情期における一時的な P の増加は認められなかった。このことから、排卵時に見られる progestin の一時的増加は P 以外の HOOKER-FORBES 陽性物質と考えられる。

要 約

牛血中 P の測定法として P-3-oxime-BSA に対する家兎抗血清を使用した RIA 法ならびに CPBA 法、蛍光法について比較し、さらに、RIA 法により性周期における牛末梢血中 P の消長型を追求して次の成績を得た。

1. P-3-oxime-BSA を用いて作製した抗血清は適正希釈倍数 40,000 倍の高力価のものであった。本抗血清を用いて作成した標準曲線は、P が $0 \sim 400 \text{ pg}$ の範囲においてほぼ直線 (片対数目盛) を示し、 0 pg における結合率は 70% 以上であった。さらに、本抗血清の各種

ステロイドに対する交叉反応は 5α -pregnanedione を除いて低く、P に対する特異性はきわめて高いことを認めた。

2. P の抽出過程において、粗抽出物をクロマトを用いて精製する方法 (クロマト法) ならびに、この操作をばぶいた方法 (直接法) によって得られた材料について P の測定値を比較した結果、いずれの方法においてもほぼ等しい値が得られた。

3. 性周期の各時期の牛血漿について、RIA 法、蛍光法、および CPBA 法により測定した P の値はほぼ等しいことを認めた。

4. RIA 法により延 9 性周期の牛血中 P の消長型を検討したところ、P は発情期に最低値 $0.2 \sim 0.3 \text{ ng/ml}$ 、黄体期 (排卵後 11~16 日) に最高値 $3.2 \sim 5.8 \text{ ng/ml}$ を示し、次の排卵前 4~6 日頃から急激に低下することを認めた。

終わりに臨み、御指導を賜った帝国臓器製薬 (株) 薬理研究部神戸川明博士、ならびに多大の御協力を戴いた当場前川美禰子氏に厚く御礼申し上げます。

(1974. 3. 13 受付)

文 献

- MURPHY, B. E. P.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **23**, 293, 1963.
- 山本(慧)・大沢(伸): 日内分泌誌, **46**, 105, 1971.
- ABRAHAM, G. E.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **29**, 866, 1969.
- ABRAHAM, G. E., R. SWERDLOFF, D. TULCHINSKY & W. D. ODELL: *J. Clin. Endocr.*, **32**, 619, 1971.
- FURUYAMA, S. & C. A. NUGENT: *Steroids*, **17**, 663, 1971.
- SPIELER, J. M., R. L. WEBB, R. J. SALDARINI & J. A. COPPOLA: *Steroids*, **19**, 751, 1972.
- de VILLA, G. O., K. ROBERTS, W. G. WIEST, G. MIKHAIL & G. FLICKINGER: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **35**, 458, 1972.
- 牧野(拓): 日内分泌学誌, **49**, 629, 1973.
- 牧野(拓): 臨床病理, **21**, 930, 1973.
- 鳥居(隆)・中間(実)・藺守(竜): 日獣医学誌(学会号), **33**, 270, 1971.
- DOMÉKI I., T. NAKAHARA, M. YAMAUCHI & A. KANBEKAWA: *Nat. Inst. Anim. Hlth Quart.*, **12**, 102, 1972.
- GOMES, W. S., V. L. ESTERGREEN, O. L. FROST & R. E. ERB: *J. Dairy Sci.*, **46**, 553, 1963.
- PLOTKA, E. D., R. E. ERB, C. J. CALLAHAN & W. R. GOMES: *J. Dairy Sci.*, **50**, 1158, 1967.
- POPE, G. S., S. K. GUPTA & I. B. MUNRO: *J. Reprod. Fert.*, **20**, 369, 1969.
- STABENFELDT, G. H., L. L. EWING & L. E. McDONALD: *J. Reprod. Fert.*, **19**, 433, 1969.
- KAZAMA, N. & W. HANSEL: *Endocrinology*, **86**, 1252, 1970.
- SNOOK, R. B., R. R. SAATMAN & W. HANSEL: *Endocrinology*, **88**, 678, 1971.
- DONALDSON, L. E., J. M. BASSETT & G. D. THORBURN: *J. Endocrinol.*, **48**, 599, 1970.
- SHEMESH, M., H. R. LINDER & N. AYALON: *J. Reprod. Fert.*, **26**, 167, 1971.
- 小笠(晃)・山内(亮)・円山(八): 本誌, **3**, 123, 1958.

Summary

Radioimmunoassay method (RIA) was compared to competitive protein binding assay (CPBA) and fluorometric assay method for the determination of plasma progesterone of the cow. Peripheral blood progesterone of the cow during estrous cycle was determined by RIA.

High potent antiserum against progesterone-3-oxime-BSA (optimal dilution, 1:40,000) was prepared for RIA. Calibration curve made by the antiserum showed clear linearity between 0 and 400 μg of progesterone, and percent binding of ^3H -progesterone was 70% or higher at 0 μg . The antiserum also showed highly specificity against progesterone, and no significant cross reaction was found against other various steroids except 5α -pregnanedione.

In RIA method, values of progesterone determined on the crude samples which was extracted from blood samples with ether (direct method), were compared to those determined on the purified samples obtained by carrying out column chromatography (chromatographic method). There was a good correspondence in the values of progesterone between direct and chromatographic methods.

No significant differences were found between the direct method of RIA, CPBA and flu-

orometric assay method, in values of progesterone, determined on the same plasma samples collected from the cow at various stages of the estrous cycle.

Concentrations of plasma progesterone, determined by the direct method of RIA in 9 cows during estrous cycle, showed minimum level (0.2-0.3 ng/ml) at estrus and maximum level (3.2-5.8 ng/ml) during luteal stage of 11 to 16 days after ovulation. The concentration was rapidly decreased about 4 to 6 days before the next ovulation.