ビーグル犬の血中遊離テストステロン濃度の動態

稲葉俊夫・松井 望・清水亮佑・高橋千太郎*

(大阪府立大学農学部家畜外科学教室 *放射線医学総合研究所内部被ばく研究部)

雄動物の性機能推定の指標として、古くから雄性ホルモンの測定が行われてきた¹⁾。最も強い雄性ホルモン作用を示すテストステロン (T) は、血中ではステロイド結合蛋白質 (TBG) とアルブミンに結合した「蛋白質結合型」、および結合していない「遊離型」として存在しているが²⁾、臨床的には両者を合わせた総Tが体内雄性ホルモン活性を示す指標として取り扱われてきた³⁾。近年、生体内において直接ホルモン作用発現に関与するのは遊離Tであることが明らかとなり、ヒトでは遊離Tの測定が臨床検査として行われ始めた⁴⁻⁶⁾。

一方、イヌを用いての毒性試験や感染試験等についての要求が近年急速に増えてきているが、イヌを実験動物として扱うための繁殖生理に関する基礎的研究はいまだに充分とは思われない。特に雄イヌの繁殖生理に関する基礎的研究は雌イヌのそれに比べるとあまり進んでおらず、例えば雄イヌの繁殖季節の有無、あるいは生殖年齢がいつまで続くのかといった問題を内分泌学的に検討した研究報告は極めて少ない⁷⁾。

本実験では、雄ビーグル犬の血中遊離T濃度の測定法を確立し、血中遊離Tの動態について基礎的データを得ることを試みた。

材料と方法

1. 実験動物

実験には年齢3カ月～10年のビーグル雄43頭、および雌13頭を用いた。血清材料は橈側皮静脈から採血後、ただちに遠沈により分離して、測定まで-20°Cに保存した。

Serum concentrations of free testosterone in beagle dogs.

INABA, Toshio, Nozomu MATSUI, Ryosuke SHIMIZU & Sentaro TAKAHASHI* (Department of Surgery and Obstetrics, School of Veterinary Science, College of Agriculture, University of Osaka Prefecture, Sakai 591, * Division of Comparative Radiotoxicology, National Institute of Radiological Sciences, Chiba 260)

Japan. J. Anim. Reprod., 31 (2), 1985.

2. 血中総テストステロンとテストステロン結合蛋白質量の測定法

血中総T量の測定は著者ら⁸⁾の報告したラジオイムノアッセイ法によった。

血中 TBG 量の測定は Wiest ら⁴⁾の報告したデキストラン吸着法 (DCC 法) に従い、[1,2-³H]-5 α -dihydrotestosterone ([³H]-DHT, 54 Ci/mmol) を用いた。

3. 血中遊離テストステロン量の計算法

血中遊離T量の計算は PEARLMAN⁹⁾の方法に準じた。すなわち、血中遊離Tと蛋白質結合T量との間には次の関係が成り立つ。

$$Sb/Su = K_1(n_1P_1 - S) + K_2n_2P_2 \quad \dots (1)$$

ここで、Sb: 蛋白質結合T量, Su: 遊離T量, K_1 : TBG に対するTの結合定数, n_1P_1 : 血中 TBG 量, S: 血中総T量, K_2 : アルブミンに対するTの結合定数, n_2P_2 : アルブミンに対するTの結合部位数である。S = Sb + Su より、血中遊離T量は次の式で与えられる。

$$Su = \left[\frac{1}{1 + \frac{Sb}{Su}} \right] S \quad \dots (2)$$

(1) 式を (2) 式に代入すると、

$$Su = \left[\frac{1}{K_1(n_1P_1 - S) + K_2n_2P_2 + 1} \right] S$$

となる。

上記の式において、37°Cにおけるイヌ血清の K_1 , K_2 および n_2P_2 については、VERMEULEN ら²⁾の平衡分析法により求めた。なお、イヌ血清については、成熟雄、雌、および未成熟雄、雌ビーグル犬の各3頭、計12頭から一定量ずつ採血し、それらの血清をプールしたものを用いた。イヌ血清アルブミンの標準品には Sigma 社製 Fraction V を用いた。イヌ TBG に対するTの結合量は、上記のプールした血清に結合したT量からアルブミンに結合したT量を差し引くことにより求めた。結果は5回の反復測定から得た平均値で表わした。

4. テストステロン結合蛋白質のステロイド親和性について

イヌ血中 TBG に対するTの親和性と他の種々のステ

ロイドホルモンの親和性とを比較検討した。すなわち、イヌ血清に一定量の $[^3\text{H}]\text{-DHT}$ (0.69 nM) と 0.5~500 nM の種々の非放射性ステロイドを加えて、室温で 15 分間、および 0°C で 15 分間インキュベートした。反応終了後、DCC 溶液 (0.2% 活性炭, 0.04% デキストラン, 0.1 M リン酸緩衝液, pH 7.0) を加えて、遊離のステロイドを吸着させ、上清の TBG に結合したステロイドの放射活性を測定した。

TBG に対する各種ステロイドの親和性は、 $[^3\text{H}]\text{-DHT}$ が TBG に結合するのを 50% 抑制するのに要した非放射性ステロイド量から算出した¹⁰⁾。

結果は平均値±標準誤差で表わし、Student の *t* 検定で有意性を調べた。

結 果

1. 遊離テストステロン量の測定について

イヌ血中遊離 T 量の測定時に必要な 37°C におけるイヌ TBG に対する T の結合定数 (K_1)、イヌ血清アルブミンに対する T の結合定数 (K_2)、および結合部位数 (n_2P_2) を測定した。その結果、図 1 と 2 に示したように、 $K_1 = 7.24 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $K_2 = 2.33 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, および $n_2P_2 = 9.30 \times 10^{-8} \text{ mol/mg protein}$ を得た。

2. テストステロン結合蛋白質のステロイド親和性について

イヌ TBG に対する種々のステロイドの特異性について検討した。その結果、表 1 に示したとおり、イヌ TBG

Fig. 1. Saturation analysis of $[^3\text{H}]\text{-testosterone}$ binding to canine TBG at 37°C by an equilibrium dialysis. Data are also expressed in the form of Scatchard plot. B, Specifically bound steroid; F., free steroid. Each point is the mean of 5 determinations. $K_a = 7.24 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, binding sites $= 6.37 \times 10^{-7} \text{ M serum}$.

Fig. 2. Saturation analysis of $[^3\text{H}]\text{-testosterone}$ binding to canine serum albumin at 37°C by an equilibrium dialysis. Data are also expressed in the form of Scatchard plot. B, bound steroid; F, free steroid. Each point is the mean of 3 determinations. $K_a = 2.33 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, binding sites $= 9.30 \times 10^{-8} \text{ mol/mg protein}$.

Table 1. Specificity of canine TBG

Steroids	Relative binding affinity ^{a)} (%)
Dihydrotestosterone	100.0
Testosterone	29.0
Dehydroepiandrosterone	13.0
5 α -Androstane-3 α ,17 β -diol	2.2
Progesterone	0.5
Cortisol	0.1
17 β -Estradiol	<0.1
Estrone	<0.1
4-Androstenedione	<0.1
Pregnenolone	<0.1
5-Androstene-3 β ,17 β -diol	<0.1
Estriol	<0.1

a) Calculated on the basis of the ratio of [DHT] to the [competitor] both of which inhibited the binding of $[^3\text{H}]\text{-DHT}$ by 50%. The data are mean values of two determinations.

は DHT に高い親和性を有していることが認められた。その他に、TBG は T と dehydroepiandrosterone とともに親和性を有することが認められたが、他のステロイドとは親和性をほとんど持たないことが示された。

3. 血中テストステロン値について

成犬 (年齢 2~8 年) の雄 22 頭、雌 7 頭、および未成熟犬 (年齢 3~7 カ月) の雄 6 頭、雌 6 頭の計 4 群における血中遊離 T, 総 T, および TBG 量を測定した。その結果、表 2 に示したとおり、雄成犬の血中遊離 T および総 T 値は他の 3 群の値に比べて有意に高い値 ($P <$

Table 2. Total testosterone, free testosterone and TBG levels in canine serum

Subjects (n)	Total testosterone (ng/ml)	Free testosterone (pg/ml)	TBG $\times 10^7$ (mol/l)
Male, adult (22)	$3.43 \pm 0.32^*$	$391 \pm 37^*$	1.81 ± 0.19
Female, adult (7)	0.42 ± 0.15	47 ± 16	2.48 ± 0.41
Male, immature (6)	0.50 ± 0.19	50 ± 18	2.19 ± 0.25
Female, immature (6)	0.22 ± 0.13	13 ± 4	2.12 ± 0.34

Each value represents mean $\pm$ SEM.

* $P < 0.001$ compared with other three groups.

Fig. 3. Annual variations in serum levels of total testosterone, free testosterone, and TBG in male dogs. Vertical lines indicate SEM ($n = 3$ or 4).

Fig. 4. Effect of age upon serum levels of total testosterone, free testosterone, and TBG in male dogs. Vertical lines indicate SEM ($n = 3$ to 7).

0.001)を示した。血中 TBG 値については、各群間で有意な差は認められなかった。

4. 雄イヌの血中テストステロン値の季節変動

4頭の雄成犬(開始時年齢3~4年)を用いて、1年間における血中T値の変化を調べた。採血は午前11時から30分間隔で3回連続して行ない、それぞれの血中T量を測定し、得られた3回の平均値を測定値とした。その結果、図3に示したように、血中遊離T、総T、およびTBG値のいずれにおいても年間を通して有意な変化は認められなかった。

5. 雄イヌの血中テストステロン値と加齢の関係

年齢3カ月~10年の雄イヌ35頭の血中T量を測定した。なお採血は午前11時より30分間隔で3回連続して行ない、それぞれの血中T量を測定し、それらの平均値を測定値とした。その結果、図4に示したとおり、血中遊離Tおよび総T値は幼若期には低値(それぞれ0.1 ng/ml以下、1 ng/ml以下)を示し、性成熟とともに増

Fig. 5. Relationship between serum levels of total testosterone and free testosterone in male dogs.

加し、性成熟に達した1年以降10年までは高値(それぞれ0.2~0.5 ng/ml, 2~4 ng/ml)を持続した。一方、血中TBG濃度には加齢による有意な差は認められな

った。

血中遊離Tと総T値との関係を調べたところ、図5に示したように、両者間に有意な相関関係の存在することが認められた ($r=0.99$, $P<0.001$)。

考 察

Tが結合する血中の蛋白質にはTBGとアルブミンが主として挙げられる¹¹⁾。これ以外に、Tはコルチコステロイド結合蛋白質(CBG)にも結合する可能性がある⁶⁾。しかしながら、CBGに対するTの親和性はTBGのそれと比べて著しく低く¹²⁾、量的にも多くないために¹³⁾、結合型Tの中でCBG結合Tが占める割合は非常に小さいものと言える。

本実験成績から、イヌTBGはTとDHTに特異的な結合を示し、他のステロイドホルモンとはほとんど結合を示さず、TおよびDHT以外にエストロゲンとも結合を示すと言われているヒトTBG¹⁴⁾とは異なる性状を有することが明らかとなった。

今回得たイヌ血中TBG値を今までに報告されたイヌTBG値と比較してみると、著者らの成績はDEAEセルロース過渡法を用いた報告値(雄: $2.14 \pm 0.28 \times 10^{-7}$ M, 雌: $3.10 \pm 0.23 \times 10^{-7}$ M)¹¹⁾、および二相液法を用いた報告値(雄: $1.34 \pm 0.23 \times 10^{-7}$ M)¹⁵⁾に近い値を示した。

本実験において、血中遊離T量の算出に必要なイヌTBGおよびアルブミンに対するTの結合定数を求めた。37°Cで得たTBGに対するTの結合定数($7.24 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$)は0°Cにおける報告値($1.8 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$)¹⁶⁾と比較して約1/3の値を示した。一方、ヒトでもTBGに対するTの結合定数は0°Cから37°Cになると約1/3に減少することが報告されている¹⁴⁾。イヌ血清アルブミンに対するTの結合定数については、本実験成績と比較できるイヌの報告値は見当たらない。

遊離T量の算出において、血中T結合蛋白質の結合定数は性別、年齢にかかわらず一定の値を示す²⁾という前提のもとで本実験を行なった。この仮定が正しいとするならば、遊離T量の測定値は意義あるものと言える。しかしながら、この結合定数が何らかの原因により変化した場合には本測定法は適用できない。

イヌ血中T値に関して総T値の報告はわずかながら見られる⁷⁾。しかし、遊離T値についてはまだ比較できる報告が見当たらない。そこで、本実験成績より得たイヌ血中Tの比率をヒトの場合⁵⁾(()で示す)と比較してみた。雄ではTBG結合T(%)は14.0(30.5)、アルブミン結合Tは74.5(67.6)、遊離Tは11.5(1.9)を示し、

雌ではそれぞれ16.7(27.8)、64.2(71.2)、19.1(1.0)を示した。遊離Tの比率はヒトの場合に比べて、イヌではかなり高い値を示しているが、これは蛋白質結合Tが少ないためと考えられる。

季節繁殖動物のヒツジでは雌の非繁殖期に雄の血中T値の減少が報告されている¹⁷⁾。最近、周年繁殖と考えられているラットの精巣内分泌機能も周年の変化を示すことが見出され¹⁸⁾、長期間一定条件で飼育された赤毛ザルでもその季節的变化が保たれていることが知られている¹⁹⁾。一方、雄イヌの血中T値の季節変動の有無については必ずしも見解が一致していない。すなわち、武石ら(1977)²⁰⁾は雄ビーグル犬の末梢血中総T値を測定し、春季および秋季では高値、夏季および冬季では低値を示したと報告した。FALVOら(1980)²¹⁾は雑種成犬の血中総T値は8~9月では他の月に比べて著しく高値を示したと報告している。一方、TAHAら(1981)²²⁾は雄ビーグル犬の血中総T値には季節変動は認められないと報告している。これらの血中T値の報告に不一致が生じた原因の一つとして、次に述べる血中T値に反復性の細かい周期の変動(律動的分泌)が存在することが挙げられる。すなわち、性腺刺激ホルモン(LH)の放出は繰り返し急速に起こり、その半減期はサルでは約90分と言われている²³⁾。雄成犬の末梢血中総T濃度もLHのように反復性の変動を示すことが報告されている²⁴⁾。そこで、本実験ではこの現象を考慮して、30分間隔で3回連続採血し、検討を行なったが、その結果は成績に示したように、雄ビーグル犬においては血中総T、遊離T、およびTBG値の季節変動が存在するという証拠は得られなかった。

雄イヌの血中T値と加齢の関係について今までに報告された成績^{25,26)}をみると、血中総T値は幼若期には低値を示し、性成熟とともに増加し、性成熟以降6年までは高値を持続することが示唆されている。本実験では生後10年に至るまでの雄イヌを用いて検討した結果、従来の成績^{25,26)}に加えて、血中総Tおよび遊離T値は性成熟以降10年まで高値を持続することが明らかとなった。ヒトにおいては、生殖年齢を過ぎ加齢が進むと、Tの生成率は低下するが、その代謝率も同時に低下し、生成率低下の割には血中総T濃度は大きく変化しないことが明らかになっている³⁾。一方、ヒトの血中TBG量は加齢とともに増加するために、生理的に活性な遊離T量は減少すると言われている³⁾。これらのヒトの成績と比較する上で、イヌにおける生殖年齢がいつまで続くのか、今後更に検討を進める必要があろう。

要 約

ビーグル犬における血中遊離テストステロン (T) 濃度の動態について検討し、以下の結果を得た。

1. 雄成犬の血中遊離T値 (平均 391 ± 37 pg/ml) は雌成犬の値 (平均 47 ± 16 pg/ml) よりも有意に高い値を示した。

2. 雄成犬の血中遊離T値は年間を通して有意な変化を示さなかった。

3. 雄イヌの血中遊離T値は幼若期では低値を示し、性成熟とともに増加し、性成熟に達した1年以降10年までは高値を持続することが明らかとなった。

稿を終るにあたり、本論文をまとめる上で有益な御助言をいただいた本学家畜臨床繁殖学教室の森純一教授に心から感謝の意を表する。(1985. 1. 24 受付)

文 献

- 1) WEST CD, VD HOLLANDER, TH KRIETCHEVSKY & K DOBRINER: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **12**, 915, 1952.
- 2) VERMEULEN A, L VERDONCK: *Steroids*, **11**, 609, 1968.
- 3) 大島 (博)・吉田 (謙)・東 (四)・後藤 (修)・横川 (正): 医学のあゆみ, **115**, 675, 1980.
- 4) WIEST WG, JD PAULSON, DW KELLER & JC WARREN: *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **130**, 321, 1978.
- 5) NISULA BC & JF DUNN: *Steroids*, **34**, 771, 1979.
- 6) WILLEMSSE PHB, DT SLEIJFER, JJ PRATT, WJ SLUITER & H DOORENBOS: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **58**, 1193, 1984.
- 7) 稲葉 (俊): 本誌, **28**, 32, 1982.
- 8) 稲葉 (俊)・清水 (亮)・藺守 (龍): 本誌, **23**, 63, 1977.
- 9) PEARLMAN WH: Measurement of testosterone binding sites. In: Steroid assay by protein binding (DICZFALUSY E ed.), p. 225, Karolinska Institute, Stockholm, 1970.
- 10) INABA T, N TAKAHASHI, H MATSUDA & T IMORI: *Jpn. J. Vet. Sci.*, **46**, 797, 1984.
- 11) TABEI T, KE MICKELSON, S NEUHAUS & PH PETRA: *J. Steroid Biochem.*, **9**, 983, 1978.
- 12) MURPHY BEP: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **27**, 973, 1967.
- 13) DUNN JF, BC NISULA & D RODBARD: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **53**, 58, 1981.
- 14) ROSNER W & RN SMITH: *Biochemistry*, **14**, 4813, 1975.
- 15) CARSTENSEN, H, I AMÉR, R SÖDERGÅRD & SO HIETALA: *J. Steroid Biochem.*, **5**, 757, 1974.
- 16) SUZUKI Y, Y OKUMURA & H SINOHARA: *J. Biochem.*, **85**, 1195, 1979.
- 17) KATONGOLE CB, F NAFTOLIN & RV SHORT: *J. Endocrinol.*, **60**, 101, 1974.
- 18) KHAMMAR F & R BRUDIEUX: *J. Reprod. Fert.*, **71**, 235, 1984.
- 19) PLANT TM, D ZUMPE, M SAULS & RP MICHAEL: *J. Endocrinol.*, **62**, 403, 1974.
- 20) 武石 (昌)・津曲 (茂)・小玉 (又)・今関 (修)・東 (英)・平野 (哲)・常包 (正)・秋山 (陽): 第 83 回日本獣医学会講演要旨, 1977.
- 21) FALVO RE, LR DEPALATIS, J MOORE, TA KEPIC & J MILLER: *J. Endocrinol.*, **86**, 425, 1980.
- 22) TAHA MB, DE NOAKES & WE ALLEN: *J. Small Anim. Pract.*, **22**, 177, 1981.
- 23) BERCU BB, BC LEE, JL PINEDA, BE SPILLOTIS, DW DENMAN III, HJ HOFFMAN, TJ BROWN & HC SACHS: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **56**, 1214, 1983.
- 24) BOULANGER P, M DESAULNIERS, GM DUPUY, G BLEAU, KD ROBERTS & A CHAPDELAIN: *J. Endocrinol.*, **93**, 109, 1982.
- 25) HART BL & J LADEWIG: *Neuroendocrinology*, **30**, 20, 1980.
- 26) TAHA MB & DE NOAKES: *J. Small Anim. Pract.*, **23**, 351, 1982.

Summary

Serum concentrations of free testosterone in beagle dogs were determined. Dextran-coated charcoal was used for separating testosterone-binding globulin (TBG)-bound steroid from the unbound fraction. Having a measure of TBG levels together with a knowledge of the total endogenous testosterone permitted the estimation of free testosterone based on the binding affinities of serum proteins. The concentrations of free testosterone (pg/ml, mean $\pm$ SEM) in mature males (391 ± 37) were significantly higher ($P < 0.001$) than those in mature females (47 ± 16). No annual variations of free testosterone concentrations were observed in mature male dogs. Serum concentrations of free testosterone were low (< 100 pg/ml) at 3 months of age, increased with days of age and appeared constantly from 1 year of age through 10 years in male dogs.