性腺刺激ホルモン放出ホルモンの固相法 Enzyme Immunoassay 法 に関する検討

下司 雅也^{**}・春日 直樹^{*}・今川 健一^{*}・森 純一

(大阪府立大学農学部 ^{*}大塚製薬アッセイ研究所 ^{**}現所属 農林水産省東北農業試験場)

性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) は、視床下部で産生され、下垂体に作用して黄体形成ホルモン (LH) および卵胞刺激ホルモン (FSH) の放出を促し、性腺の機能発現に重要な役割を果たしている。従って、本ホルモンの測定によってその動態を明らかにすることができれば、生殖機能発現の機構解明や繁殖障害の防除のために大変有益であると考えられる。GnRH の測定法は、これまで bioassay 法¹⁻³⁾および radioimmunoassay (RIA) 法⁴⁻⁷⁾が開発されている。しかし、bioassay 法は測定値の信頼性が低く、測定感度も不十分である等の欠点があった。一方、RIA 法は一般に測定感度が極めて高く、また精度や信頼性も高いことから、各種ホルモンやその他の物質の微量定量に用いられているが、放射性同位元素 (RI) を用いるために、特殊な施設が必要であるなど実施上種々の障害がある。

近年、RI のかわりに酵素を標識物質とした enzyme immunoassay (EIA) 法が開発され、種々のホルモンの測定法に応用されつつある。EIA 法は、1971 年 ENGVALL⁸⁾により immunoglobulin G (IgG) の測定に、また WEEMEN & SCHUURS⁹⁾によりヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) の測定に初めて用いられた方法であるが、標識物質が安価で、長期間安定である、特別の施設を必要とせず測定が容易である、人体への悪影響がない、廃棄物処理が容易であるなどの利点があり、測定感度も RIA 法と同等か理論的にはそれ以上が可能であるとい

われている¹⁰⁾。しかし、これまでに GnRH の EIA に関する報告は見当たらない。

本研究では、GnRH の測定に EIA 法を導入するために、第 1 抗体固相法による EIA についての検討を行った。

材料と方法

Peroxidase 標識 GnRH の作製 BASSIRI & UTIGER¹¹⁾の方法により、bis-diazotized benzidine (BDB) を用いて合成 GnRH (蛋白質研究奨励会製) と peroxidase (POD: SIGMA Chemical 社製, Type VI) を結合させた。すなわち、GnRH 440 μ g, POD 4.1 mg をそれぞれ 0.13 M NaCl を含む 0.16 M ホウ酸緩衝液 (pH 9.0) 1 ml に溶解して混合した。この混合液に 2 ml の同緩衝液に溶解した BDB 280 μ g を滴下混合し、4℃ で 4 時間反応させた。次に反応溶液を、0.15 M NaCl を含む 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) で、4℃ で 5 日間透析した。透析後の溶液は、3,000 rpm (1,600 $\times$ g) 30 分間遠心分離を行なって不溶性物質を沈殿させた。この上清 1 ml を取って、Sephadex G-25 fine (Pharmacia Fine Chemical 社製) によるカラムクロマトグラフィー (10 $\times$ 270 mm) を行ない、未反応の GnRH と BDB を除去した。溶出液の各 1.3 ml を分画採取し、それぞれの分画を 280 および 403 nm の吸光度で測定した。吸光度の高い分画を希釈し、POD 標識 GnRH として使用した。

抗 GnRH 抗体吸着ポリスチレンボールの作製 抗 GnRH 血清は、森ら¹²⁾によって作製されたもので、免疫抗原として [Glu¹]-GnRH とウサギ血清アルブミン (RSA: Miles Laboratory 社製) をカルボジイミド法で結合させたものを用い、馬に免疫して作製したものである。この抗血清は 3,200 倍希釈で、RIA において GnRH と 22.5% の結合能を示し、2,000 倍希釈において 0.5~50.0 ng/ml の GnRH との間にほぼ直線的な用量反応曲線を示した¹²⁾。また、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (TRH)、黄体形成ホルモン (LH) および卵胞刺激ホルモン (FSH) など他の視床下部ホルモンあるいは下垂

An attempt of the development of solid-phase enzyme immunoassay of gonadotropin releasing hormone.

GESHI, Masaya^{*}, Naoki KASUGA^{*}, Kenichi IMAGAWA^{*} & Junichi MORI (Department of Animal Reproduction, College of Agriculture, University of Osaka Prefecture, Sakai, Osaka 591, Research Division, Otsuka Assay Laboratory, Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Tokushima 771-01, Present address: Tohoku National Agricultural Experiment Station, Morioka, Iwate 020-01)

Japan. J. Anim. Reprod., 32(4), 1986.

体ホルモンとは交叉反応の認められないものであった¹²⁾。さらに最近の 2 抗体法 EIA による検討結果では、GnRH の類緑物質のうち C 端が Gly-NH₂ であるものとは高率に反応したが、[Gly-OH¹⁰]-GnRH など C 端が Gly-NH₂ でないものとはほとんど反応しなかったことから、本抗血清は GnRH の C 端を認識すると考えられるものである¹³⁾。

この抗 GnRH 血清から硫酸塩析法によって抗体成分である γ -globulin を分別したのち、Sephacryl S-300 superfine (Pharmacia Fine Chemical 社製) によるカラムクロマトグラフィー (16×700mm) を行ない、IgG 分画を分離・精製した。

抗 GnRH 抗体吸着ポリスチレンボールは、この IgG をポリスチレンボール (直径 6.4 mm, Precision Plastic Ball 社製) に物理的に吸着させて作製した。すなわち、IgG を 0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) で希釈し、25, 50 および 100 μ g/ml の濃度の溶液を準備し、これにポリスチレンボールをつけて抜気後 4°C で 1 夜放置した。翌朝、ポリスチレンボールを生理食塩液で洗浄し、0.15 M NaCl, 0.5% ウシ血清アルブミン (BSA: 和光純薬社製), 0.01% チメロサル (SIGMA Chemical 社製) を含む 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) につけ、BSA でポリスチレンボールをブロックし、4°C で保存した。

第 1 抗体固相法 EIA の操作法 0.15 M NaCl, 0.5% BSA, 0.01% チメロサルを含む 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) 300 μ l を小試験管 (12×75mm, Corning Glass Work 社製) に取り、標準 GnRH 溶液または試料溶液 100 μ l および POD 標識 GnRH 希釈液 (×100) 100 μ l を加え、よく攪拌した。これに抗 GnRH 抗体吸着ポリスチレンボール 1 個を加え、4°C で 24 時間反応させた。その後溶液を吸引除去し、生理食塩液 2 ml による洗浄・吸引を 3 回繰り返したのち、ポリスチレンボールのみを別に用意した小試験管に移した。これに酵素基質溶液 [0.015% H₂O₂ を含む 0.03 M クエン酸 0.06 M リン酸緩衝液 (pH 5.0) に *o*-phenylenediamine (片山化学社製) を 2.5 mg/ml の割合で直前に溶解したもの] 500 μ l を加えた。25°C で 30 分間反応させたのち、1.5 N 硫酸 2 ml を加えて反応を停止させ、492 nm の吸光度を測定した。

結果は以下の式で求めた相対結合率 B/B_0 (%) で示した。

$$\frac{B}{B_0} (\%) = \frac{B-b}{B_0-b} \times 100$$

ここで B_0 は GnRH 濃度が 0 の吸光度、 B は各濃度の GnRH での吸光度、 b は BSA のみを吸着させて作製した固相ポリスチレンボールを用いたブランクの吸光度である。

標準曲線は、各 GnRH 濃度とその相対結合率をプロットして図示した。

牛臓器からの GnRH の抽出 牛の臓器材料としては、下垂体柄・下垂体前葉・肝臓および横紋筋を用い、Asai ら¹⁴⁾の報告に基づいて GnRH を抽出した。すなわち、各臓器を 0.1 N 塩酸でホモジナイズして凍結・融解を 2 回繰り返したのち、2,500 rpm (1,000×g) で 15 分間遠心分離を行なった。その上清を 1.0 N 水酸化ナトリウムで中和し、9,000 rpm (10,000×g) 15 分間遠心分離を行なったのち、上清を凍結乾燥して -20°C で保存した。

測定時には、0.15 M NaCl, 0.5% BSA, 0.01% チメロサルを含む 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) で溶解し、遠心分離後の上清を同緩衝液で希釈して試料溶液とした。

結 果

POD 標識 GnRH の作製 標識後、POD 標識 GnRH の精製のために、溶液 1 ml を Sephadex G-25 カラムにかけて分離した。その際の溶出パターンは Fig. 1 に示す通りであった。

溶出分画の No. 7, および 8 でピークを示し、この両分画を混合して POD 標識 GnRH 分画とした。この分画の吸光度測定結果から、溶液中の GnRH と POD の平均結

Fig. 1. Elution profiles from a Sephadex G-25 column of GnRH-POD conjugates prepared with bis-diazotized benzidine.

Fig. 2. Standard curve for GnRH enzyme immunoassay.

合比を求めると、約 3:1 であった。

POD 標識 GnRH 分画は、0.15 M NaCl, 1% BSA 0.02% チメロサルを含む 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) で 2 倍に希釈し、遮光して 4°C で保存した。この保存液を EIA 使用時に、0.15 M NaCl, 0.5% BSA, 0.01% チメロサルを含む 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) で希釈して用いた。この POD 標識 GnRH は、標識後適時 EIA における反応性を検討したが、標識 1 年後においても反応性に異常は認められなかった。

EIA 反応に使用する POD 標識 GnRH の適正濃度の検討 POD 標識 GnRH の 100 倍、200 倍および 400 倍希釈液を作製し、50 μ g/ml の IgG 濃度で作製した抗 GnRH 抗体吸着ポリスチレンボールを用いて、 B_0 での 492 nm の吸光度を測定した。吸光度はそれぞれ 0.989, 0.679, 0.384 であり、以後は適度の吸光度が得られる 100 倍希釈液を用いることとした。

抗 GnRH 抗体吸着ポリスチレンボール作製時の適正 IgG 濃度の検討 25, 50 および 100 μ g/ml の IgG 濃度の溶液に浸漬して作製した 3 種類の抗 GnRH 抗体吸着ポリスチレンボールを用いて EIA を行ない、最適 IgG 濃度の検討を行った。

ポリスチレンボールへ結合した POD 標識 GnRH 量は、IgG 濃度を高めるにつれてやや増加した。しかし、得られた用量反応曲線には差が認められず、以後の実験

Fig. 3. Specificity of GnRH enzyme immunoassay applied on extract of the bovine pituitary stalk, anterior lobe, liver and muscle.

では 50 μ g/ml の IgG 濃度を用いて抗 GnRH 抗体吸着ポリスチレンボールを作製することとした。

EIA 反応における標準曲線の検討 50 μ g/ml の IgG 濃度の溶液で作製した抗 GnRH 抗体吸着ポリスチレンボールと 100 倍希釈の POD 標識 GnRH 溶液を用いて作製した標準曲線は、Fig. 2 に示す通りであった。すなわち、GnRH の 1~1,000 ng/ml の濃度範囲で用量反応関係を示す標準曲線が得られ、その測定限界はほぼ 1 ng/ml であった。反応には試料 100 μ l を用いたことから、測定限界はほぼ 100 /tube であるといえる。

各種牛臓器酸性抽出物の反応 本 EIA 測定系の特異性を検討するため、各種牛臓器酸性抽出物を用いて EIA を行ない、GnRH 様物質の用量反応関係を検討した。Fig. 3 にその結果を示した。

すなわち、下垂体柄抽出物では希釈曲線が標準曲線と合致し、かつ下垂体前葉・肝臓および横紋筋抽出物ではいずれも反応が認められなかった。このことから、本 EIA 測定系は下垂体柄抽出物に特異的であるといえる。また、本実験の結果から下垂体柄中に含まれる GnRH 量は、湿重量 mg 当り 3.3 ng と算出された。

考 察

GnRH の固相法 EIA の開発を試みた結果、標準品 GnRH の 1~1,000 ng/ml の濃度範囲にわたって用量反応曲線が得られたことから、この EIA 系で GnRH の測定が可能であると考えられた。これまでに GnRH の EIA に関する報告は見当たらないので、感度その他について直接比較考察することはできないが、森ら¹²⁾がさきに同一抗血清を用いて行なった RIA の結果では、その測定限界はほぼ 0.1 ng/ml であったので、本 EIA は RIA に比べて若干感度が劣ることが考えられた。ただ、RIA におけるこれまでの報告の中には、仮屋ら⁹⁾の 12.5 pg/tube, NETT ら⁴⁾の 1~3.8 pg/tube, や TAKAHASHI ら⁷⁾の 0.2 pg/tube 等さらに高感度のものもみられるため、本法も抗血清を変えることによりさらに良好な結果が得られる可能性もある。いずれにしても、本実験は GnRH の EIA の初めての試みであり、ホルモンの標識法や標識ホルモンの精製法などにまだ検討すべき点があり、これらの改善によって感度向上の余地も残されている。

本実験で用いた BDB によるホルモンの標識法は、これまでも TRH の alkaline phosphatase による標識に用いられている¹⁵⁾が、BDB は水溶性で蛋白中のヒスチジンやチロシンと反応しやすく、多くの酵素でヒスチジンやチロシンが活性部位あるいはその近くに存在するために、BDB の結合によって酵素活性が著しく失われる可能性があるといわれている¹⁶⁾。また、BDB による結合は不安定で、分解しやすいともいわれている¹⁶⁾。今回の実験で、BDB の結合によって酵素活性の低下がおこったか否かは明らかでないが、今後他の標識法についても比較検討する必要があるだろう。

また、今回の実験における GnRH と POD との結合比は、吸光度から推定すると約 3:1 であった。ホルモンと酵素との結合比は EIA の感度に大きく影響することが知られている¹⁷⁾。本実験で得られた結合比が適切であったか否かは不明であり、この点についても今後の検討が必要である。

ホルモン標識後の精製については、透析と Sephadex G-25 カラムによって、標識後未反応の BDB と GnRH の除去を行った。しかし、この方法では精製後の標識ホルモン溶液中に遊離の POD が共存する可能性がある。遊離の酵素の共存はブランク値を高め、感度を低下させることがあり¹⁸⁾、本実験で測定限界が 1 ng/ml 程度にとどまった原因の 1 つはこの点にあるのかもしれない。今後共存 POD の除去のために、アフィニティクロマトグ

ラフィーなどの併用の検討も必要であろう。

本実験における各種牛臓器酸性抽出物の反応では、下垂体前葉・肝臓および横紋筋抽出物では反応が認められず、下垂体柄抽出物でのみ標準曲線と合致した希釈曲線が得られた。これらの結果は、下垂体柄部分に多量に含まれる GnRH が本測定系に特異的に反応したためと考えられ、これまでの GnRH の RIA についての報告^{5,14,19)}とも一致するものであった。また、下垂体柄中の GnRH 含量は湿重量 mg 当り 3.3 ng と算出された。これまで牛下垂体柄についての報告は見当たらないが、羊については Moss ら¹⁹⁾が湿重量 mg 当り 1.7 ng と報告しており、本実験の結果はこれと著しく異なるものではなかった。

前述のように、本実験に使用した抗血清は RIA において、TRH, LH および FSH とは交叉反応を示さず、2 抗体法 EIA において、各種 GnRH の類縁物質のうち C 端が Gly-NH₂ である数種のものと 40~60% の交叉反応を示したが、C 端が Gly-NH₂ でない類縁物質である [Gly-OH¹⁰⁾]-GnRH とは、交叉反応率は 0.5% 以下であった。したがって、本 EIA での測定結果には、試料中に共存する C 端が Gly-NH₂ の類縁物質が含まれる可能性が考えられるが、実際にこのような類縁物質が生体中に存在するか否かは不明であり、この点については今後の検討を要する。今後は上述の諸点について検討を行ない、感度の向上をはかるとともに、特異性についての検索も行なう予定である。

要 約

GnRH の測定に固相法 EIA の導入を検討した。

合成 GnRH と peroxidase を bis-diazotized benzidine を用いて結合させ、POD 標識 GnRH を作製した。標識後、Sephadex G-25 カラムにより精製したところ、単峰性の流出パターンが得られ、このピークの分画を POD 標識 GnRH 溶液として用いた。一方、カルボジイミド法によって作製した [Glu]-GnRH-RSA を馬に反復投与して作製した抗血清から、硫酸塩析法によって γ -globulin を分別し、Sephacryl S-300 カラムによって IgG を精製した、この IgG をポリスチレンボールに物理的に吸着させて抗 GnRH 抗体吸着ポリスチレンボールを作製した。

EIA は競合法によって行なった。酵素反応基質としては *o*-phenylenediamine-H₂O₂ を用い、反応後分光光度計で 492 nm の吸光度を測定した。その結果、1~1,000 ng/ml の範囲で用量反応曲線が得られ、測定限界はほぼ 1 ng/ml であった。

本 EIA 系に対し牛臓器酸性抽出物による抑制反応を行なったところ、下垂体柄抽出物のみ標準曲線と合致した希釈曲線が得られ、他の下垂体前葉・肝臓および横紋筋抽出物では、反応が認められなかった。

これらの結果から、本法によって GnRH の EIA が可能であると考えられた。

謝辞 本研究実施に当り、有益な御助言をいただいた東京大学農学部家畜生理学教室高橋迪雄教授に深謝します。

(1986. 6. 25. 受付)

文 献

- 1) RAMIREZ VD & SM MCCANN: *Endocrinology*, **73**, 193, 1963.
- 2) MITTLER JC & J MEITES: *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.*, **117**, 309, 1964.
- 3) SCHALLY AV, CY BOWERS, WF WHITE & AI COHEN: *Endocrinology*, **81**, 77, 1967.
- 4) NETT TM, AM AKBAR, GD NISWENDER, MT HEDLUND & WF WHITE: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **36**, 880, 1973.
- 5) ARIMURA A, H SAITO, T KUMASAKA, RB WOROBEK, L DEBELJUK, J DUNN & AV SCHALLY: *Endocrinology*, **93**, 1092, 1973.
- 6) 仮屋 (堯), 山内 (亮), 森 (純): 家畜繁殖誌, **22** (別輯), 61, 1977.
- 7) TAKAHASHI M, E HASHIMURA, S SHIN, K IMAGAWA & Y SUZUKI: *Endocrinol. Japon.*, **29**, 113, 1982.
- 8) ENGVALL E & P PERLMANN: *Immunochemistry*, **8**, 871, 1971.
- 9) VAN WEEMEN BK & AHWM SCHUURS: *FEBS Lett.*, **15**, 232, 1971.
- 10) ISHIKAWA E & K KATO: *Scand. J. Immunol.*, **8**, Suppl. 7, 43, 1978.
- 11) BASSIRI RM & RD UTIGER: *Endocrinology*, **90**, 722, 1972.
- 12) 森 (純), 富塚 (常), 正木 (淳), 仮屋 (堯), 辻村 (信), 鈴木 (修), 都司 (和), 矢内原 (昇): 日畜会報, **50**, 240, 1979.
- 13) 下司 (雅), 松田 (健), 春日 (直), 今川 (健), 森 (純): 投稿準備中.
- 14) ASAI T & K WAKABAYASHI: *Endocrinol. Japon.*, **22**, 319, 1975.
- 15) 大島 (一), 斎藤 (晴), 斎藤 (史): 臨床病理, **26**, 571, 1978.
- 16) AVRAMEAS S, T TERNYNCK & JL GUESDON: *Scand. J. Immunol.*, **8**, Suppl. 7, 7, 1978.
- 17) HOSODA H, H YOSHIDA, Y SAKAI, S MIYAIRI & T NAMBARA: *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 3035, 1980.
- 18) WISDOM GB: *Clin. Chem.*, **22**, 1243, 1976.
- 19) MOSS GE, TE ADAMS, GD NISWENDER & TM NETT: *J. Anim. Sci.*, **50**, 496, 1980.

Summary

A solid-phase competitive enzyme immunoassay of gonadotropin releasing hormone (GnRH) was examined. Enzyme-labeled antigens were prepared by coupling synthetic GnRH with peroxidase using bis-diazotized benzidine and purified by Sephadex G-25 column chromatography. Antiserum raised against [Glu¹]-GnRH-rabbit serum albumin conjugate in a male horse was used. Immunoglobulin G (IgG) fraction of the antiserum used for a solid-phase was prepared by an (NH₄)₂SO₄ precipitation method, purified by Sephacryl S-300 column chromatography, and adsorbed to a polystyrene ball.

Three-tenths ml of 0.05 M phosphate buffer (pH 7.5), 0.1 ml of standard or sample solution, 0.1 ml of peroxidase-labeled GnRH solution and a solid-phase polystyrene ball were added in a test tube. After incubation at 4°C for 24 hours, a polystyrene ball was washed three times with 2 ml of saline, and transferred to a new tube. The enzyme activity was measured with a spectrophotometer (absorbance at 492 nm).

A dose-response curve was obtained between 1 to 1000 ng/ml of GnRH when a solid-phase coated with 50 µg/ml IgG solution and peroxidase-labeled GnRH solution (×100) were used. Acid extract of bovine pituitary stalk produced dose-response curve indistinguishable from synthetic GnRH, but those of anterior lobe, liver and muscle didn't produced.

These results show that GnRH is assayed by this method.