¹²⁵I 標識ホルモンを用いたコルチコステロンのラジオイムノアッセイ

金坂多恵子・田谷 一善¹⁾・笹本 修司¹⁾

山之内製薬株式会社安全性研究所 〒174 東京都板橋区小豆沢1-1-8

¹⁾ 東京農工大学農学部獣医学科家畜生理学教室 〒183 東京都府中市幸町3-5-8

要 約 ¹²⁵I 標識ホルモン (ICN Biomedicals) を用いてコルチコステロンのラジオイムノアッセイの設定を試み、エーテルでの1回抽出法による簡便で高感度なアッセイを安定して実施できることが判明した。

1) コルチコステロンの抽出：標準溶液および血液サンプル (0.1~1 μ l) を抽出用ガラス試験管 (13 $\times$ 100 mm) にとる。純水を加えて全量を400 μ l とし、これにジエチルエーテルを2 ml 加えて攪拌する。5分静置後、試験管をドライアイス・エタノール槽に浸して水槽を凍結させ、デカンテーションによりエーテル層を測定用ガラス試験管 (12 $\times$ 75 mm) に移した後、乾固させる。

2) ラジオイムノアッセイ：抽出物を乾固させた試験管に1% BSA・PBS 100 μ l, 第一抗体100 μ l および標識ホルモン100 μ l を加えて攪拌し、4°Cにて24時間インキュベートした後、第二抗体100 μ l を添加する。さらに4°Cにて24時間反応させ、4°C, 1700gで遠心分離し、得られた沈澱の放射活性を γ -カウンターにて測定する。標準溶液から得られた標準反応曲線を用い、サンプル中のコルチコステロン濃度を算出する。

キーワード：steroid radioimmunoassay, corticosterone, ¹²⁵I-labeled radioligand

(Journal of Reproduction and Development, 38 : j85-j89, 1992)

コルチコステロンのラジオイムノアッセイ (RIA) は従来から、³H 標識ホルモンを用いる方法が広く行われてきた [1-4]。しかし、一般に³Hを用いたRIAは操作が煩雑な上に、測定終了後の放射性有機廃液の処理も大きな問題となっている。このような理由から、感度も良く、操作も簡単でしかも後処理の容易な¹²⁵I 標識ホルモンを用いたコルチコステロンのRIA法を検討し、簡便で感度の良いアッセイ法を安定して実施できることが判明したのでその概要を報告する。

材料と方法

緩衝液：緩衝液として、0.1% NaN₃ を添加した0.05 M リン酸緩衝液 (PBS, pH7.5) を用いた。

標識ホルモン：標識ホルモンとしては米国 ICN Biomedicals 社製の¹²⁵I 標識コルチコステロンを用いた。本品

はステロイド核の3位に¹²⁵I-carboxymethyl-oxime-牛血清アルブミン (BSA) を結合させたものである。比放射能は55.5~74 MBq/ μ gで、0.37 MBq, 1.85 MBq および3.7 MBq 単位で、0.01 M PBS (pH 7.5) 中に溶解した状態のものを東宝バイオケミカル株式会社 (〒162 東京都新宿区市谷本村町3-17) を通じて入手が可能である。標識ホルモンはPBSにて適当な濃度に希釈、分注して、-20°Cで保存する。使用にあたっては、BSA (Biocell 社製 immunoassay grade protease free, Carson, U.S.A.) を1%含む0.05 M PBSで約50~100 Bq/100 μ l に希釈してアッセイに供した。

標準品：標準品としては、Sigma 社製の corticosterone (4-pregnen-11 β , 21-diol-3, 20-dione) を用いた。標準品はエタノールで溶解し、640 ng/ml に希釈したものを-50°Cにて保存し、使用時に純水にて0.625~1280 pg/100 μ l に段階希釈した。

第一抗体：第一抗体は、Dr. G. D. Niswender (Colorado State University, U.S.A.) から提供を受けた抗コルチコステロン家兔血清 (抗 4-pregnen-11 β , 21-diol-3, 20-dione 3-CMO : BSA, GDN 377) を用いた。使用に際しては、0.4% 正常家兔血清 (NRS) を含む 0.05 mM ethylenediamine tetraacetic acid, 2Na salt, dihydrate (EDTA) 添加 PBS にて 15,000 から 20,000 倍に希釈した。この抗血清は deoxycorticosterone および 11- β -hydroxyprogesterone と約 7% の交叉性があるが、他のステロイドホルモンとの交叉反応は 1% 未満であることが Gwosdow-Cohen ら [1] によって報告されている。

第二抗体：第二抗体は群馬大学内分泌研究所の若林克己博士から提供を受けた抗家兔 γ -グロブリン山羊血清 (HAC-RBA2-03GTP 86 [H-19]) を用いた。使用に際しては 3.5% の polyethylene glycol 6000 (和光, 一級) を含む PBS にて 150 倍に希釈した。

抽出操作：測定試料からのコルチコステロンの抽出はジエチルエーテルによる 1 回抽出法によった。抽出操作ならびに RIA 測定操作の概要を図 1 に示した。

純水で希釈した標準液および血液サンプル (血清あるいは血漿 0.1~1 μ l) を抽出用ガラス試験管 (13 $\times$ 100 mm) にとり、純水を加えて全量を 400 μ l とする。これにジエチルエーテル (特級, Dotite 社製) 2 ml を加えて攪拌し、ステロイド分画を抽出する。5 分間静置後、試験管をドライアイス・エタノール槽に浸して水層を凍結させ、デカンテーションによりエーテル層を測定用ガラス試験管 (12 $\times$ 75 mm) に移した後、Vortex-Evaporator (Buchler 社製) を用いて乾固させる。

ラジオイムノアッセイ：抽出物を乾固させた試験管に 1% BSA・PBS 100 μ l, 第一抗体 100 μ l および標識ホルモン 100 μ l を加えて約 2 分間攪拌し、4 $^{\circ}$ C にて 24 時間インキュベートした後、第二抗体 100 μ l を添加する。さらに 24 時間 4 $^{\circ}$ C にて反応させ、4 $^{\circ}$ C, 1,700 g で 30 分間遠心分離して、得られた沈澱の放射活性を γ -カウンターにて測定する。標準溶液から得られた標準反応曲線を用いて、サンプル中のコルチコステロン濃度を算出する。

添加回収試験：純水 400 μ l にコルチコステロンの標準品を 12.5, 50, 800 および 3,200 pg/tube 添加し、上記の抽出操作および測定操作を行って、添加したコルチコステロンの回収率を調べた。

結果および考察

標準曲線：本 RIA により得られた標準曲線を図 2 に示

図 1. コルチコステロンの抽出およびラジオイムノアッセイ操作の概要。

した。コルチコステロン標準品が 5~1,280 pg/tube の間で良好な用量反応性を示し、血液サンプルとして加えた雄ラット血清、卵巢摘出ラット血清と標準曲線との平行性はいずれも良好であった。コルチコステロン濃度が著しく少ないと考えられる副腎と卵巢を摘出したラットの血清を同様に加えた結果、用量依存的に標識ホルモンと第一抗体の結合を抑制した。ラットでは副々腎を有する個体が多いことが報告されていること [5] から本研究において用量依存的に反応した物質は副々腎から分泌されたコルチコステロンである可能性が推察される。コルチコステロン分泌は副腎皮質刺激ホルモンによって刺激され、ストレス負荷時には血中濃度が著しく増加することが知られている。本 RIA を用いて、各種生理状態下のラット血中コルチコステロン濃度を測定した結果、0.1 から 1.0 μ l の血清 (血漿) 量を用いて測定可能であることを確認した。

添加回収試験：添加したコルチコステロンと測定によって得られた測定値の相関を図 3 に示した。添加量 X および測定値 Y の回帰式は $Y = 1.01X - 37.24$, $r = 0.959$ ($n = 50$) となり、両者の間に良好な相関性が認められ

図2. ラジオイムノアッセイで得られたコルチコステロンの用量反応曲線および卵巣摘出ラット血清 (OVX; Δ), 卵巣および副腎摘出ラット血清 (AOX; $\circ$) および雄ラット血清 (male; $\blacktriangle$) の用量反応曲線. 標準曲線は6回のアッセイの平均値 $\pm$ 標準誤差, 血清サンプルは1回のアッセイにおける triplicate の平均値で示した.

図3. コルチコステロンの添加回収試験. X軸は添加したコルチコステロン量, Y軸はラジオイムノアッセイによる測定値を示す. 各点は測定値 ($n=10$) の平均および標準誤差を示した.

た.

^{125}I 標識ホルモンを用いた RIA 法 (^{125}I -RIA) と ^3H 標識ホルモンを用いた RIA 法 (^3H -RIA) との比較: 今回設定した ^{125}I -RIA 法と同一の抗血清 (GDN377) を用いた ^3H -RIA の報告を比較すると ^{125}I -RIA 法の特徴と

して以下の点が挙げられる.

- 1) 抗血清の希釈倍率: ^{125}I 標識ホルモンを用いた RIA の特徴として, 抗血清の希釈倍率が高いことが報告されている [6]. 本研究においても抗血清 (GDN377) は 15,000 から 20,000 倍の希釈で結合率 (B/B_0) 30~40% を示し, ^3H -RIA¹⁾ を用いた場合の 2,000 倍と比較して約 10 倍の高い希釈倍率で使用可能であることが明らかとなった.
- 2) 最小検出感度: 標識ホルモンが存在しないときのカウント (B_0) から B_0 の標準偏差の 2 倍を差し引いた時の最小量をもって最小検出感度とすると, 本研究においては 16.4 ± 3.5 pg/tube であり, ^3H -RIA を用いた報告 [1] と類似した値を示した.
- 3) アッセイ間およびアッセイ内変動: 本研究における ^{125}I -RIA のアッセイ内およびアッセイ間変動はそれぞれ 7.2%, 14.2% ($n=6$) であった. Gwosdow-Cohen らの ^3H -RIA [1] では $3.67 \pm 0.75\%$ および $6.98 \pm 1.01\%$ と報告されているが, いずれも RIA を行う場合に適切な範囲にあるものと判断された.
- 4) 測定操作: ^{125}I -RIA においては放射能の測定にあたり, シンチレーターが不要であり操作が簡便である. このため一度に多量のサンプルの測定が可能であることが利点として確認された.

謝 辞

本 RIA の設定にあたり, 抗コルチコステロン血清 (GDN 377) を分与された Dr. G. D. Niswender (Department of Physiology and Biophysics, Colorado State University) ならびに抗家兔 γ -グロブリン山羊血清 (H-19) を提供された若林克己博士 (群馬大学内分泌研究所ホルモン測定センター) に深謝する。また, 本研究の開始にあたり, 貴重なお助言を頂いた矢野喬史氏 (栄研化学株式会社) および前多敬一郎博士 (名古屋大学農学部) に深謝する。

文 献

- 1) Gwosdow-Cohen A, Chen CL, Besch EL. Radioimmunoassay (RIA) of serum corticosterone in rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1982; 170: 29-34.
- 2) Owens MJ, Bartolome J, Schanberg SM, Nemeroff CB. Corticotropin-releasing factor concentrations exhibit an apparent diurnal rhythm in hypothalamic and extrahypothalamic brain regions: Differential sensitivity to corticosterone. *Neuroendocrinology* 1990; 52: 626-631.
- 3) Thiagarajan AB, Mefford IN, Eskay RL. Single-dose ethanol administration activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: Exploration of the mechanism of action. *Neuroendocrinology* 1989; 50: 427-432.
- 4) Tassanawat T, Ota K, Yokoyama A. Changes in the responses of prolactin and corticosterone secretion to suckling at various stages of prolonged lactation in intact and ovariectomized rats. *Jpn J Anim Reprod* 1990; 36: 88-92.
- 5) Murakami N, Takahashi K. Circadian adrenocortical rhythm in the adrenalectomized rat with or without autotransplanted adrenal gland. *Neuroendocrinology* 1982; 34: 157-162.
- 6) 田谷一善・渡辺 元・笹本修司. ^{125}I 標識ホルモンを用いたプロジェステロン, テストステロンおよびエストラジオール- 17β のラジオイムノアッセイについて. *家畜繁殖学雑誌* 1985; 31: 186-197.

Radioimmunoassay of Corticosterone using ^{125}I -Labeled Radioligand

Taeko KANESAKA, Kazuyoshi TAYA¹⁾, and Shuji SASAMOTO¹⁾

Safety Research Laboratories, Yamanouchi Pharmaceutical Co., LTD. 1-1-8 Azusawa Itabashi-ku, Tokyo 174, Japan

¹⁾Laboratory of Veterinary Physiology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Tokyo 183, Japan

Summary. A radioimmunoassay (RIA) of corticosterone was developed and characterized using ^{125}I labeled radioligand (ICN Biomedicals, U.S.A.) and a single ether extraction procedure. The intra- and interassay coefficients of variation was 7.2% and 14.6% and assay sensitivity was 16.4 ± 3.5 pg per tube. Utilizing this assay, the antiserum for corticosterone (GDN377) made small samples (0.1–1.0 μl) use possible. The ease of this technique allows handling of large numbers of samples as compared with RIA using ^3H -corticosterone.

The specific steps in the procedure of assay were following: ^{125}I -corticosterone was diluted with 0.05M phosphate buffered saline (PBS) containing 1 % bovine serum albumin (BSA). Antiserum (GDN377) was diluted with 0.05M PBS containing 0.05mM ethylenediamine tetraacetic acid, 2Na salt, dihydrate (EDTA) and 0.4% normal rabbit serum (NRS) to 1 : 15000–1 : 20000 dilution. Goat anti-rabbit gamma globulin serum (ARGG) was diluted with 0.05M PBS containing 3.5% polyethylene glycol 6000 (PEG) to 1 : 150 dilution. Plasma or serum (0.1–1 μl) and standard were diluted to 400 μl with distilled water in 13 $\times$ 100mm culture tubes and extracted once with 2ml of diethyl ether. The samples were allowed to settle for 5 min to ensure separation of ether and aqueous phases. The tubes were then placed in dry ice-ethanol bath to freeze the aqueous phase. The ether phase was then decanted into 12 $\times$ 75mm culture tube and dried under reduced pressure with gentle mixing at 50C. One hundred μl of PBS containing 1% BSA, antiserum and labelled ligand (50–100 Bq/100 μl) were added to each tube and the extract was dissolved by agitation and incubated at 4C for 24 h. Then, 100 μl of ARGG was added to each tube. After further incubation for 24 h, the antibody bound hormone was separated from the free hormone by centrifugation at 4C 1700g for 30 min. The supernatant was carefully decanted and the precipitate was counted in automatic gammacounter. Plasma or serum concentrations of corticosterone were calculated using a standard curve.