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

Radioimmunoassay of corticosterone using ¹²⁵I-labelled radioligand

金 坂 多恵子*・田 谷 一 善
Taeko Kaneasaka, Kazuyoshi Taya

コルチコステロンのラジオイムノアッセイ (RIA) は他のステロイドホルモンの場合と同様に, 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, 測定終了後には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ようになったのでその概要を紹介する。

1. 緩衝液

緩衝液として, 0.1% NaN₃ を添加した 0.05M リン酸緩衝液 (PBS, pH 7.5) を用いた。

2. 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 55.5~74MBq/μg で, 0.37MBq, 1.85MBq および 3.7MBq 単位で, 0.01M 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, TEL 03-3235-0218, FAX 03-3235-0304) を通じて入手できる。標識ホルモンは PBS で適当な濃度に希釈, 分注して, -20℃ で保存する。使用時には, BSA を 1% 含む 0.05M PBS で約 111~185MBq/100μl に希釈して使用する。

3. 標準品

標準品としては Sigma 社 (St. Louis, U.S.A) 製の Corticosterone (4-pregnen-11β, 21-diol-3, 20-dione) を用いた。標準品はエタノールで溶解し, 640ng/ml に希釈したものを -20~-50℃ で保存し, 使用時に純水にて 0.625~1280pg/100μl に段階希釈した。

4. 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-11β, 21-diol-3, 20-dione 3-CMO: BSA, GDN 377) を用いた。使用時に 0.4% 正常家兔血清 (NRS) を含む 0.05mM Ethylenediamine tetra acetic acid, 2 Na salt, dihydrate (EDTA) を加えた PBS で 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% の交叉性を示すが, 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。

5. 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。使用時に 3.5% の Polyethylene Glycol 6000 (和光, 一級) を含む PBS で 150 倍に希釈した。

6. 抽出操作

抽出操作および RIA 測定操作の概要を図 1

*山之内製薬株式会社 安全性研究所, 東京農工大学農学部獣医学科家畜生理学教室
〒174 東京都板橋区小豆沢 1-1-8

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

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 $\times$ 100mm)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: 質の良いエーテルを用いることが成功のポイントである)2mlを

加えて十分に攪拌し、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 $\times$ 75mm)に移し、Vortex-Evaporator (Buchler社製)を用いて吸引・加温・振動して乾固させる。エーテル層の乾固はどのような方法でも良く、各研究室で工夫すれば良い。これに1%BSA・PBS 100 μ lを加えて約2分間攪拌し、抽出物を溶解させる。

7. ラジオイムノアッセイ

抽出物を溶解させた試験管に第一抗体100 μ lと標識ホルモン100 μ lを加える。実際には、第一日目に抽出後、直ちにRIAを行うので、エーテル層を乾固した後、BSA(100 μ l)、第一抗体(100 μ l)および標識ホルモン(100 μ l)をすべて加えてから約2分間攪拌して抽出物を溶解するとともにRIAのスタートとしている。これを4℃で24時間インキュベートした後、第二抗体100 μ lを加えてさらに24時間、4℃で反応させ、4℃, 1,700gで30分間遠心分離して得られた沈澱の放射活性を γ -カウンターで測定する。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。

本RIAにより得られた標準曲線を図2に示した。コルチコステロン標準品が5~1,280pg/tubeの間で良好な用量反応性を示した。アッ

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。標準曲線は6回のアッセイの平均値 $\pm$ 標準誤差で示した

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。また、各種条件下にあるラットおよびハムスターの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。また、コルチコステロンの添加回収試験でも良好な結果が得られている。

8. 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, 200, 800および3200pg/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。

添加したコルチコステロン量Xおよび測定して得られた値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た。

今回紹介した 125 I-RIA法と同一の抗血清(GDN 377)を用いた 3 H-RIAの報告¹⁾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: 今回の 125 I-RIAでは抗血清(GDN377)は15,000から20,000倍の希釈で結合率(B/B0)30~40%を示し, 3 H-RIA¹⁾を用いた場合の約10倍の高希釈倍率で使用可能であった。
- 2) 測定感度: 3 H-RIA¹⁾と同レベルであった。
- 3) 測定操作: 125 I-RIAでは放射能の測定にシンチレーターが不要であり、操作が簡便であること、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、また測定終了後、放射性有機廃液の処理の必要がないことが利点として確認された。

最後に、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), 抗家兎 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), ならびに本研究の開始にあたり貴重なご助言をいただいた矢野喬史氏(栄研化学株式会社), 前田敬一郎博士(名古屋大学農学部)に深謝致します。

引用文献

- 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