〔薬学雑誌〕
YAKUGAKU ZASSHI
100 (1) 56-60 (1980)

スピンイムノアッセイによる尿中テストステロンの定量

佐用博照, 細川幹夫

神戸学院大学薬学部¹⁾

Spin Immunoassay of Urinary Testosterone

HIROTERU SAYO and MIKIO HOSOKAWA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kobe-Gakuin University¹⁾

(Received June 20, 1979)

A spin-labeled derivative of testosterone was prepared by coupling testosterone-3-(O-carboxymethyl)oxime with 3-aminomethyl-2,2,5,5-tetramethyl-1-oxylpyrrolidine and used to develop a method for measuring testosterone glucuronide in human male urine. The samples were brought to pH 6.8 and incubated for 24 hr with β -glucuronidase. The released steroid was extracted by hexane-ethyl ether (4:1) and measured by spin immunoassay (SIA). With a 1 ml urine sample, the ultimate sensitivity of the assay was 18 ng of testosterone. Testosterone levels were determined in 8 normal male urine samples simultaneously by SIA and radioimmunoassay. The coefficient of correlation was 0.986. The method was found to be speedy and simple, but not sensitive enough to measure testosterone glucuronide in human female urine.

Keywords—spin immunoassay; testosterone; electron spin resonance; testosterone glucuronide; spin-labeled testosterone; urinary testosterone; nitroxide; binding of spin-label to antibody; adsorption of spin-label to glass-wall

スピンイムノアッセイ (SIA) は、これまで主として尿、だ液および血清中の薬物の検出に用いられてきた。²⁾ SIA は標識抗原が安定で長期間保存できる、放射線による障害がない、遊離の標識抗原と、抗体に結合した標識抗原を分離せずに測定できるので操作が簡便で、かつ迅速である等の長所を有している。しかし SIA の感度はラジオイムノアッセイ (RIA) やエンザイムイムノアッセイと比べて著しく低いため、ステロイドホルモンに対しては、わずかに血清中のプロゲステロンの定量が報告されているのみである。³⁾

テストステロンとニトロキシドラジカルとの結合に関しては、Dodd ら,⁴⁾ および Adackaparayil ら⁵⁾ によりテストステロンの 17 位の水酸基にニトロキシド誘導体がエステル結合した O¹⁷-(2,2,5,5-tetramethyl-3-carboxylpyrrolidine-1-oxyl)testosterone が報告されているが、3 位にニトロキシドが結合したスピンラベルの合成に関する報告はまだない。Testosterone-17-succinate-bovine serum albumin に対する抗体は、他の性ステロイドとの交差率が高く実用的でないので、testosterone-3-(O-carboxymethyl)oxime-bovine serum albumin (T-3-BSA) に対する抗体 (T-3 抗体) が今日最も広くテストステロンの RIA に用いられている。⁶⁾

著者らは、testosterone-3-(O-carboxymethyl)oxime (T-3-CMO) とニトロキシド誘導体を結合せしめたスピンラベル testosterone-3-(O-2',2',5',5'-tetramethylpyrrolidine-1'-oxyl-3'-methylenecarbamoylmethyl)oxime (T-3-SL) を合成し、T-3 抗体と組合せて成人男子尿中のテストステロンの定量を試み、ステロイドの SIA に付随する種々の問題について検討した。

1) Location: Ikawadani-cho, Tarumi-ku, Kobe 673, Japan.

2) a) R.K. Leute, E.F. Ullman, A. Goldstein, L.A. Herzenberg, *Nature* (London), *New Biol.*, **236**, 93 (1972); b) M. R. Montgomery, J.L. Holtzman, R.K. Leute, *Clin. Chem.*, **21**, 1323 (1975); c) M.R. Montgomery, J.L. Holtzman, R.K. Leute, J.S. Dewees, G. Boltz, *ibid.*, **21**, 221 (1975).

3) R. Wei, R. Almirez, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **62**, 510 (1975).

4) J.R. Dodd, A.J. Lewis, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1975**, 520.

5) M. Adackaparayil, J.H. Smith, *J. Org. Chem.*, **42**, 1655 (1977).

6) S. Furuyama, D.M. Mayes, C.A. Nugent, *Steroids*, **16**, 415 (1970).

実験の部

試薬 (O-Carboxymethyl)hydroxylamine Hemihydrochloride——文献記載の方法⁷⁾により合成した。

T-3-CMO および T-3-BSA——Erlanger らの方法⁸⁾により合成した。

T-3 抗体——Furuyama らの方法⁶⁾に準じて雄成熟家兎を免疫し、3 箇月後に採血してえた血清を硫酸ナトリウム法により免疫グロブリンを分画し、さらに DEAE-セルローズクロマトグラフィーにより IgG フラクションを調製した。⁹⁾ 結合部位の濃度は T-3-SL で滴定して求めた。防腐剤として 0.1% NaN_3 を加えて冷蔵保存した。

T-3-SL——3-Carbamoyl-2,2,5,5-tetramethyl-1-oxylpyrrolidine (Eastman Kodak Co. 製) をエーテル中 LiAlH_4 で還元し¹⁰⁾ えられた黄色油状物質 (3-aminomethyl-2,2,5,5-tetramethyl-1-oxylpyrrolidine) 0.6 g と T-3-CMO 1.26 g を無水エタノール 56 ml にとかし、これに N-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline 0.95 g を加え室温で 48 時間攪拌後、減圧乾固する。残渣をクロロホルムにとかし、5% 炭酸水素ナトリウム溶液、ついで水で洗い、硫酸マグネシウムで乾燥後、クロロホルム溶液を減圧乾固し、残渣をアルミナカラムクロマトグラフィーにより精製した (Merck 社製, Aluminiumoxid 90 aktiv, Art. 1077 100 g 使用。カラム直径 2 cm, 長さ 50 cm, 展開溶媒ベンゼン, 各フラクションの液量 10 ml)。フラクション番号 30—40 の溶出液を減圧乾固すると淡黄色無晶形固体がえられた。mp 73—74°。Anal. Calcd $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{N}_2\text{O}_4$: C, 70.00; H, 9.40; N, 8.16. Found: C, 69.81; H, 9.23; N, 8.33. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$ cm^{-1} : 3400 (OH), 1660 (C=O). MS m/e : 514 (M^+), 484 ($\text{M}^+ - \text{NO}$), 361, 287, 272, 197, 123 (base), 108.

その他の試薬は市販特級品を使用した。

試液 T-3-SL 標準液——T-3-SL 4.21 mg をエタノール 10 ml にとかす ($8.18 \times 10^{-4} \text{M}$)。

緩衝液 A——0.06M リン酸二ナトリウムおよび 0.01M エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム含有, pH 7.4.

緩衝液 B——緩衝液 A にトリトン X-100 を 0.002% 添加したもの。

緩衝液 C——緩衝液 A に BSA を 0.1% 添加したもの。

装置 電子スピン共鳴 (ESR) スペクトルは日本電子製 JES-FE1X を使用し、室温 ($24^\circ \pm 1^\circ$) で測定した。変調周波数 100 kHz, 変調幅 2.0 gauss, マイクロ波出力 50 mW, 掃引速度 100 gauss/32 min, 時定数 3 秒。反応液は内径約 1 mm のガラスキャピラリーに入れて測定した。キャピラリー内の液量は約 40 μl である。T-3-SL の 3 本の ESR シグナルの内、高磁場側の 1 本の peak-to-peak の振幅を測定に利用した。

質量スペクトルは日立製 M-60 を使用し、イオン化電圧 20 eV で測定した。

液体シンチレーションカウンターは Packard 社の Model-3320 を使用した。

尿中 Testosterone Glucuronide の定量 あらかじめ希塩酸または水酸化ナトリウム溶液 (10%) を加えて pH 約 6.8 に調節した尿 1 ml を 10 ml の尖形管にとり、これに pH 6.8 の 0.075M リン酸緩衝液 0.5 ml, クロロホルム 0.05 ml および β -glucuronidase (Sigma 社製, Bacterial Type I) 50 単位 (0.1 ml) を加えてよく混合し、37° で 24 時間 incubate する。冷後ヘキサン-エーテル (4:1) 3 ml を加えて 10 分間激しく振盪してから、尖形管を約 -40° の冷却液中につけて水層を凍らす。有機層を 5 ml の三角フラスコに移し、約 80° で蒸発乾固する。残渣に緩衝液 B 200 μl を加えボルテックスミキサーでよく混和する。次にあらかじめ T-3-SL ($8.18 \times 10^{-6} \text{M}$) と T-3 抗体 (結合部位濃度 $8.4 \times 10^{-6} \text{M}$) を等容積ずつ混合しておいた液 50 μl を加えよく混和し、室温で 30 分間放置する。この液を内径 1 mm のガラスキャピラリーに吸上げ、下部をパラフィルムで封じ、ESR キャピティーに固定した石英管に挿入し、ESR スペクトルの高磁場側のピークを記録する。別に尿 1 ml をとり、 β -glucuronidase を加えずに、それ以外は上と同様に操作してえた値を尿ブランク値とした。

結 果

T-3-SL の濃度と ESR シグナル強度との関係

T-3-SL 標準液を緩衝液 A を用いて希釈し、 2×10^{-7} — $2 \times 10^{-6} \text{M}$ 溶液を調製し、その ESR シグナルを測定したところ、希釈に用いたガラス容器への T-3-SL の吸着が甚だしく、 10^{-6}M 以下で急激にシグナル強度が低下し、濃度との間に直線関係がえられなかった。RIA の場合には緩衝液に牛血清アルブミン (BSA) を添加してテストステロンのガラス壁への吸着を防いでいるが、SIA の場合 BSA を添加すると T-3-SL と BSA が結合してシグナル強度が低下し、かつ後述するごとく良好な検量線がえられない。ガラス容器をシリル化すると、この吸着は幾分改善されるが充分ではない。そこでトリトン X-100 を 0.002% 添加した緩衝液 B を用いると、Fig.

7) H.S. Anker, H.T. Clarke, "Organic Syntheses," Coll. Vol. III, ed. by E.C. Horning, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1955, p. 172.

8) B.F. Erlanger, F. Borek, S.M. Beiser, S. Lieberman, *J. Biol. Chem.*, **228**, 713 (1957); *idem, ibid.*, **234**, 1090 (1959).

9) 加藤兼房, 石川栄治, 化学と生物, **14**, 737 (1976).

10) J.C. Hsia, L.H. Piette, *Arch. Biochem. Biophys.*, **129**, 296 (1969).

Fig. 1. Peak Amplitude of High Field Electron Spin Resonance Line as a Function of Testosterone Spin Label Concentration

In the presence (○) and absence (●) of testosterone antibody. ESR settings: scan rate, 3.125 G/min; time constant, 3 sec; modulation amplitude, 2 G; modulation frequency, 100 kHz; microwave power, 50 mW.

Fig. 2. Standard Curve for the Assay of Testosterone

200 μ l of testosterone calibrators, prepared in phosphate buffers of pH 7.4 containing 0.002% Triton X-100, were mixed with 50 μ l of antibody-spin label complex. Δ Peak to peak represents high field peak height minus blank resonance.

1 に示すごとく 4×10^{-7} — 2×10^{-6} M でシグナル強度と濃度の間に直線関係がえられたので、以後の SIA には緩衝液 B を使用した。しかしこの場合にも吸着の影響がまだ残っているため、この直線を延長すると原点の下側を通る。 2×10^{-7} M ではノイズのため直線からずれる。

T-3 抗体 25 μ l に対して種々の濃度の T-3-SL 溶液を 225 μ l 加えて ESR スペクトルを測定した。Fig. 1 に示すごとく抗体溶液の結合部位濃度は 8.4×10^{-6} M (希釈の補正をした値) であった。T-3-SL と T-3 抗体の間の結合定数は T-3-SL の全濃度が 1.22×10^{-6} M の時、 2.2×10^7 M $^{-1}$ であった。

テストステロンの検量線

緩衝液 B を用いてテストステロンの 4.3×10^{-7} — 1.7×10^{-5} M 溶液を調製し、この液 200 μ l に 8.18×10^{-6} M の T-3-SL 25 μ l と 8.4×10^{-6} M の T-3 抗体 25 μ l の混液を加えてよく混合し、室温で 30 分間放置後、ESR スペクトルを測定した。結果は Fig. 2 に示す。横軸にテストステロン濃度の対数を取り、縦軸に ESR シグナルの振幅 Δ P-P (ブランク値を差引いた値) をプロットすると直線がえられた。BSA を 0.1% 添加した緩衝液 C を用いて上と同様に操作してえられた検量線は S 字形を示し、かつ Fig. 2 の直線の下側にくるため感度が悪いので、緩衝液 C は使用できない。緩衝液 B を使用した場合、バックグラウンドノイズの 2 倍の Δ P-P を与える濃度を最小検出濃度とすると、18 ng/200 μ l (3×10^{-7} M) のテストステロンが検出できる。

T-3 抗体の特異性を調べるため、テストステロン 100 ng/200 μ l と等しい Δ P-P を与える類縁化合物の濃度 X ng/200 μ l を求め、 $10^4/X$ を計算した。その値は 5 α -dihydrotestosterone (DHT) について 35%, 4-androstene-3,17-dione について 1.1%, androsterone について 0.4%, corticosterone について 0.2%, estriol および cortisol についてはそれぞれ 0.1% 以下であった。上記以外の化合物については溶解度の関係でエタノールを 5% 添加して溶解した液を用いて測定したところ、 β -estradiol について 1.8%, estrone について 1.5%, dehydroisoandrosterone について 1.0%, d-aldoosterone について 0.1% 以下, cholesteryl について 0.1% 以下であった。テストステロンを用いてエタノールの添加が Δ P-P 値におよぼす影響を調べたところ、5% の添加では、ほとんど影響を与えないことを確認した。

尿成分の SIA におよぼす影響

成人男子随意尿 1 ml をエーテル 2 ml で 2 回抽出し、抽出液を集めて蒸発乾固し緩衝液 B にかして SIA を行なうと、約 8 mm の Δ P-P (テストステロン 25 ng に相当する) がみとめられる。成人男子尿中に存在する遊離のテストステロンは 76—1154 ng/day、遊離の DHT は 51—408 ng/day と報告されているので、¹¹⁾ 1 日

11) J.M. Kjeld, C.M. Puah, G.F. Joplin, *Clin. Chim. Acta*, **80**, 271 (1977).

Fig. 3. Recovery of Testosterone Added to 1 ml of Urine

The points represent the means of 7 replicates. The vertical bars indicate 2 SD on either side of the mean.
 $Y = 0.884X + 4.0$

Fig. 4. Comparison of Results for Urinary Testosterone obtained by Spin Immunoassay and Radioimmunoassay

$$Y = 1.13X - 0.75$$

$$r = 0.986$$

の尿量を 1.5 l とすると、遊離のテストステロンは 51—769 pg/ml, DHT は 34—272 pg/ml しか存在しないので、ESR シグナルの増大をもたらしている物質は遊離のテストステロンや DHT でないことは明らかである。Testosterone glucuronide および sulfate はエーテルでは抽出されない¹¹⁾ これらによる増大でもない。SIA に使用した T-3 抗体を 1000 倍に希釈して、RIA で尿ブランクを測定すると 200 pg/ml 程度の値がえられたので、使用した T-3 抗体が悪いのではない。この尿ブランクの値は抽出液にヘキサン-エーテル (4:1) を使用すると $\Delta P-P$ が 2 mm 程度に減少したので、以後尿の抽出にはヘキサン-エーテル (4:1) を使用した。

尿 1 ml にテストステロン 25, 50, 75, 100 ng を含む pH 6.8 のリン酸緩衝液 0.5 ml, クロロホルム 0.05 ml を加え、ヘキサン-エーテル 3 ml で 1 回抽出し、抽出液を蒸発乾固後、残渣を緩衝液 B 200 μ l にとかし SIA により定量した。結果は Fig. 3 に示す。それぞれ 7 回の実験値の標準偏差 (SD) と平均値を記入してある。この図より回収率の平均値は 88.4% であった。

尿中 Testosterone Glucuronide (TG) の β -Glucuronidase による加水分解と SIA による定量

成人男子随意尿 1 ml を β -glucuronidase で加水分解後、SIA により定量してえたテストステロンの値を Fig. 4 に示す。同じ尿について同様に抽出してえた残渣を緩衝液 C にとかし、更にこの液を 100 倍に希釈して RIA によりテストステロンを測定した。結果は Fig. 4 に示すごとく、RIA でえた値は SIA で求めた値より約 13% 高い値を示したが、両者の相関は良好であった。SIA の日内変動係数 C.V. ($n=6$) は、3.4% であった。

考 察

尿中テストステロンの定量に関しては、 β -glucuronidase で加水分解し、薄層クロマトグラフィー (TLC) で分離後、ガスクロマトグラフィー (GLC) で定量する方法¹²⁾ 硫酸で加水分解後、TLC でテストステロンを分離し RIA で定量する方法¹³⁾ TG に対する抗体を用いて直接尿中の TG を定量する方法¹⁴⁾ 等がある。TG を直接定量する方法は加水分解や抽出を行なう必要がなく簡単であるが、TG が高価なため余り用いられていない。他の 2 つの方法は TLC 併用して DHT を分離し、テストステロンのみを定量しているが、操作は非常に複雑である。本法では SIA の簡便迅速という長所をいかすため、TLC による分離を行なわなかったため、加水分解により遊

12) H. Ibayashi, M. Nakamura, S. Murakawa, T. Uchikawa, T. Tanioka, K. Nakano, *Steroids*, **3**, 559 (1964).

13) C.M. Puah, J.M. Kjeld, G.F. Joplin, *J. Chromatogr.*, **145**, 247 (1978).

14) J.F. Hennam, W.P. Collins, I.F. Sommerville, *Steroids*, **21**, 285 (1973); J.A.F. Tresguerres, B.P. Lisboa, J. Tamm, *ibid.*, **28**, 13 (1976).

離したテストステロンと DHT の合計を測定していることになる。しかし DHT-glucuronide の TG に対する割合は約 10% であり,¹⁵⁾ DHT の cross reactivity (35%) を考慮すると, DHT によるテストステロン量の増大は約 3.5% であるので, DHT の含有率の変動に伴う測定値の誤差は小さいと考えられる。

本法の感度は 18 ng/ml 尿であるので, 女子尿中の TG を測定することはできないが, 成人男子尿中の TG の測定には RIA や GLC による方法より簡便迅速な方法である。本法の場合, SIA の感度は測定装置の感度のみでなく, スピンラベルのガラス壁への吸着によっても制限されているため, 将来 ESR 装置の感度が上昇した場合には, この吸着を防ぐ方法の開発が必要となる。さらに SIA では, 遊離の標識抗原と抗体に結合した標識抗原を分離しなくてもよいという利点を有しているけれども, このことは RIA では遊離型画分に入る弱い結合物も, SIA では結合体としての応答シグナルを与えることになる。このために測定系中に, 抗体以外の蛋白質があると感度が悪くなる。また使用した抗体の抗体価が低いと, スピンラベルと抗体との間の非特異的結合の割合が大きくなり, この弱い結合は抗原以外の妨害物によってはずれ, ブランク値を大きくする可能性がある。以上のことから SIA の感度の向上には, 種々の問題点がある。現在のところ, SIA は一般に 4×10^{-7} M 以上存在する物質の定量に関しては有効な方法と考えられる。

15) J.M. Kjeld, C.M. Puah, G.F. Joplin, *Clin. Chim. Acta*, **86**, 235 (1978).