薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
103 (5) 512-517 (1983)

スピニムノアッセイによる尿中遊離型コルチゾールの定量

佐用博照,* 細川幹夫

神戸学院大学薬学部

Spin Immunoassay of Urinary Free Cortisol

HIROTERU SAYO* and MIKIO HOSOKAWA

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kobe-Gakuin University,
Ikawadani-cho, Nishi-ku, Kobe, 673, Japan*

(Received October 20, 1982)

A spin-labeled derivative of cortisol was prepared by coupling cortisol-3-(*O*-carboxymethyl)oxime with 3-amino-2,2,5,5-tetramethyl-1-oxypyrrolidine and used to develop a method for measuring free cortisol in the human urine. The samples were extracted by ethyl ether and measured by spin immunoassay (SIA) both with and without a preceding thin-layer chromatography (TLC). Although the values obtained from SIA without TLC purification were higher than those with TLC, the relationship between them was fairly good ($r=0.980$). Cortisol levels were determined in eleven normal urine samples simultaneously by SIA and radioimmunoassay without TLC purification. The coefficient of correlation was 0.988. The method was found to be speedy and simple, and to be useful for the routine use.

Keywords—spin immunoassay; cortisol; electron spin resonance; spin-label; nitroxide; spin-labeled cortisol; urinary cortisol; spin-label; hydrocortisone

スピニムノアッセイ (SIA) は、主としてこれまで尿、だ液、および血清中の薬物の検出に用いられてきた。¹⁾ SIA はホモジニアスエンザイムイムノアッセイ (H-EIA) と同様に、ラジオイムノアッセイ (RIA) と比較して、1) BF 分離を必要としない、したがって操作が簡便で、かつ迅速である、2) ラジオアイソトープを使用しない、3) オートサンプラーの使用が可能等の長所がある。また H-EIA と比較して、1) 標識抗原の寿命が非常に長い、2) 酵素反応の妨害について考えなくてよい、3) 一部の薬物の SIA では抽出せずに尿そのまま測定できる等の長所がある。生体成分の SIA、特にステロイドについては血清中のプロゲステロンの定量²⁾と、著者らが報告した尿中テストステロンの定量³⁾があるのみである。

尿中遊離型コルチゾールは、Cushing 症候群では著明に増加するので、尿中遊離型コルチゾールを測定する診断的な意義は大きい。⁴⁾ そこで尿中遊離型コルチゾールを SIA で定量することを試みた。Cortisol-3-(*O*-carboxymethyl)oxime (F-3-CMO) を合成し、これに bovine serum albumin (BSA) または、thyroglobulin (TG) を結合させて F-3-BSA と F-3-TG を合成し、これらを用いて家兎を免疫してそれぞれ F-3B および F-3G 抗体をえた。標識抗原として cortisol-3-[*O*-(2,2,5,5-tetramethyl-1-oxy-3-pyrrolidinyl) carbamoylmethyl] oxime (F-3SL) を合成した。F-3SL と F-3B 抗体を組合せ、尿を薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いて分離精製した場合と、TLC 分離しない場合を比較し、尿中遊離型コルチゾールの SIA に付随する種々の問題について検討した。

実験の部

試薬 F-3-CMO は Janoski らの方法⁵⁾ に準じて合成した。えられた結晶は文献記載と異なり、結晶水を含まないものであった。mp 215—218°C (decomp.). Anal. Calcd C₂₃H₃₃NO₇: C, 63.43; H, 7.64; N, 3.22. Found: C, 63.16; H, 7.77; N, 3.40. F-3-BSA は Erlanger らの方法,⁶⁾ F-3-TG は Kao らの方法⁷⁾ により合成した。

F-3B および F-3G 抗体—F-3-BSA および F-3-TG をそれぞれ雄成熟家兎 (ニュージーランド種) に Furu-yama らの方法⁸⁾ に準じて免疫し、3箇月後に RIA で測定して 50% bound が F-3-BSA からえた抗体 (F-3B)

では約 6000 倍希釈, F-3-TG からえた抗体 (F-3G) では約 500 倍希釈の時に採血し, 血清を硫酸アンモニウム法で処理してグロブリン分画を得た。

F-3SL—F-3-CMO 0.7 g と 3-amino-2,2,5,5-tetramethyl-1-oxypyrrolidine 0.25 g を無水エタノール 32 ml にとかし, これに *N*-ethoxycarbonyl-1,2-dihydroquinoline 0.43 g を加え室温で 48 時間放置する。減圧乾固後, 残渣を酢酸エチルにとかし, 順次 5% HCl 10 ml, 水 10 ml, 飽和 NaHCO_3 10 ml, 最後に水 10 ml で洗い硫酸マグネシウムで乾燥後, 酢酸エチル溶液をシリカゲル H (Merck 社製) の薄層板 (厚さ 1 mm) 3 枚にスポットし酢酸エチルで展開する。黄色バンドをかきとりカラムにつめ酢酸エチルで溶出せしめる。溶離液を減圧乾固後, 再び酢酸エチルにとかし, 冷蔵庫中に一夜放置し, 生成した淡黄色沈殿をろ取り乾燥する。mp 184—186°C (decomp.). Anal. Calcd $\text{C}_{31}\text{H}_{48}\text{N}_3\text{O}_7$: C, 64.78; H, 8.42; N, 7.31. Found: C, 64.17; H, 8.53; N, 7.12. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3470 (OH), 1720 (C=O), 1690 (CONH), 1120 (C-O), 1060 (C-O).

その他の試薬は市販特級品を使用した。

緩衝液 A: 0.06 M リン酸二ナトリウムおよび 0.01 M エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム, トリトン X-100 0.002% 含有, pH 7.4.

緩衝液 B: 緩衝液 A のトリトン X-100 の代りにゼラチン 0.1% 含有。

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 ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) で測定した。変調周波数 100 kHz, 変調幅 2.0 G, マイクロ波出力 50 mW, 掃引速度 100 G/64 min, 時定数 10 秒, 感度 10×1000 。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。F-3SL の 3 本の ESR シグナルのうち, 高磁場側の 1 本の peak-to-peak (P-P) の振幅を測定に利用した。F-3SL のみの ESR シグナルと抗体を加えた時の ESR シグナル (ブランクシグナル) を Fig. 1 に示す。液体シンチレーションカウンタは Packard 社の Model-3320 を使用した。

尿中コルチゾールの定量 SIA—10 ml の尖形管に尿 1.5 ml をとり, エーテル 3 ml を加え激しく振盪後, 水層を凍らせエーテル層をシリル化した 5 ml のマイヤーに移し, エーテルを窒素気流で蒸発乾固させた。残渣に緩衝液 A 600 μl を加えて混合し, この液 100 μl ないし 200 μl をとり標識抗原 F-3SL (2.97×10^{-6} M) と適当な濃度に希釈した抗体溶液を等量混合した溶液 50 μl を加え全量を 250 μl とし, Vortex ミキサーで混合後, 10 分間室温で放置し, その 40 μl をキャピラリーにとり測定した。

RIA—SIA と同様に抽出, 蒸発乾固した残渣に緩衝液 B を 1.2 ml 加えて混合し, この液 100 μl をとり, コルチゾール- ^3H 溶液 (CEA 社製, Cortisol-1,2,6,7- ^3H , 80—90 Ci/mm を希釈したもの) 100 μl , 適当な濃度に希釈した抗体溶液 100 μl および緩衝液 B 700 μl を加え, 4°C で 18 時間放置する。低温室 (5°C) にて Dextran-Charcoal 錠 (Bio-Rad 社製) を 1 錠加え, Vortex ミキサーで 10 秒間攪拌後, 遠心分離し, 上澄液 500 μl をとり, カクテル溶液 4 ml (PPO 7 g, POPOP 0.3 g, ナフタリン 100 g, ジオキサン 1 l) に加え, 液体シンチレーションカウンタで測定した。

TLC によるコルチゾールの分離精製 尿 10 ml を Extrelut (Merck 社製) に加え, エーテル 60 ml で抽出し, エーテルを減圧濃縮後シリカゲル G の薄層板 (Merck 社製, 厚さ 0.75 mm) にスポットし, さらに両端に標品のコルチゾールをスポットして, クロロホルム-メタノール混液 (9:1) で展開し, コルチゾール部分をかきとりジクロルエタン-メタノール混液 (9:1) で抽出し, シリル化した 5 ml のマイヤーに移し窒素気流で蒸発乾固させた後, 残渣に緩衝液 A を 1 ml 加えてとかし, この液 100 μl ないし 50 μl をとり, 緩衝液 A を加えて全量を 200 μl とし, これに F-3SL—F-3B 混合液 50 μl を加えて混合し測定した。

なお, TLC 分離の回収率はコルチゾール- ^3H を添加して求め, データを補正した。

結 果

F-3-CMO の合成法については種々の報告があるが, コルチゾールはカルボニル基を 2 つ有しているために通

Fig. 1. ESR Spectra of Spin-labeled Cortisol (A) and Antibody/Spin-labeled Cortisol Complex (B)

常の方法では純粋な F-3-CMO をえるのが困難である。最近 Stalla らによりピリジンを触媒に用いる方法⁹⁾が報告されている。著者らはピロリジンを触媒に用いる Janoski らの方法⁵⁾により、充分に純粋な F-3-CMO を合成することができた。

コルチゾールの検量線

尿中遊離型コルチゾールの測定に対して十分な感度を有し、かつ ESR 測定装置のノイズによる妨害を受けないようなスピララベル剤の濃度として、 $2.97 \times 10^{-7} M$ (測定時の最後濃度)を選定した。抗体の cross reactivity は Table I に示す。F-3B 抗体は Nishina ら¹⁰⁾のえた抗体とほぼ同様の交叉性を示した。F-3G 抗体のほうが、F-3B 抗体より交叉性が低かったが、抗体価が低かったので以後 F-3B 抗体を使用した。

横軸にコルチゾールの濃度を対数にとり、縦軸に ESR シグナルの振幅 $\Delta P-P$ (ブランク値を差引いた値)を

TABLE I. Relative Cross-Reactivity of Selected Steroids to Antisera used for Spin Immunoassay, compared with Other Reported Data

Steroid	This paper		References		
	F-3B ^{a)}	F-3G ^{b)}	F-3B ¹⁰⁾	F-3B ¹¹⁾	F-3G ^{7a)}
Cortisol	100	100	100	100	100
11-Deoxycortisol	52	28	58	7.1	0.08
Corticosterone	16	4.1	23.4	4.0	0.4
Cortisone	33	9.8	54	0.7	<0.01
17-Hydroxyprogesterone	6.3	3.2	25	<0.01	<0.01
11-Deoxycorticosterone	6.5	1.2	2.8	0.2	<0.01
Progesterone	3.2	1.4	3.2	<0.01	0.8

a) Antigen: cortisol-3-oxime bovine serum albumin.

b) Antigen: cortisol-3-oxime thyroglobulin.

Fig. 2. Standard Curve for the Assay of Cortisol

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

Fig. 3. Relation of Urinary Free Cortisol Results measured by Spin Immunoassay with or without Inclusion of TLC Purification Step

$$y = 12.7 + 1.18x \quad r = 0.980$$

プロットすると、20 ng/200 μ l から 200 ng/200 μ l のあいだで直線がえられた。結果を Fig. 2 に示す。

尿成分の SIA におよぼす影響

尿中遊離型コルチゾールの測定において、尿を TLC 分離したものと TLC 分離していないものとの比較は、RIA を用いてすでに報告されているが、¹²⁾ それによると TLC 分離していないもののほうが、TLC 分離したものより高い値を示すけれども、両者の間に相関が存在する ($r=0.82$) としている。著者らが行った随意尿についての実験結果を Fig. 3 に示す。 $r=0.980$, $y=12.7+1.18x$ と非常によい相関がえられた。TLC 分離しない場合には全体に高い値を示す。TLC 分離のみではコルチゾールと R_f 値の近いステロイドは完全に除去されないが、尿成分の内イムノアッセイに影響をおよぼす所の何らかの物質が TLC により除かれたことを示している。いずれにせよよい相関がえられたことは、TLC 分離をしなくても実用上は問題がないと思われる。

尿からの遊離型コルチゾールの抽出溶媒について Hosoda ら¹³⁾ はエーテルがよいと報告している。テストステロンの SIA のとき、³⁾ 抽出溶媒をエーテルからヘキサン-エーテル (4:1) の混合液に替えたところ、ブランク値が減少した。遊離型コルチゾールについても同様に、抽出溶媒を替えることによりブランク値が低下し、TLC 分離と同じ結果がえられるのではないかと考え、ヘキサンとエーテルを種々の割合に混合し、コルチゾール 30 ng についてその回収率を検討した。その結果、ほぼ定量的に回収が可能であったエーテル-ヘキサン (3:1) の混合液を用いて随意尿について抽出を試みた。尿中遊離型コルチゾールが低い値のときは TLC 分離した場合とほぼ同じ値を示したが、尿中遊離型コルチゾールの含有量が大きくなると尿中遊離型コルチゾールの抽出効率が低下するために測定値が頭打ちとなった。このことよりヘキサン-エーテル混合液による抽出は不適当で、エーテルの使用が一番よい結果を与えた。以後抽出溶媒にエーテルを使用した。

尿 1.5 ml にコルチゾール 100 ng, 200 ng, 300 ng, 400 ng を添加し、エーテルを用いて同様の操作を行い回収率を測定した。えられた結果を Fig. 4 に示す。回収率は平均 81% であった。

RIA との比較

RIA は、SIA と同様に随意尿から遊離型コルチゾールをエーテルで抽出し、蒸発乾固後緩衝液 B を 1.2 ml 加え混合し、この液 100 μ l をとり測定した。結果は Fig. 5 に示すように SIA によりえられた値とよい相関を示しているが、SIA でえられた値の方が RIA でえられた値より、全体に大きい値を示した。

コルチゾール含有量 69 ng/ml のサンプル尿についての SIA の日内変動係数 CV ($n=6$) は 3.6%, 日差変動係

Fig. 4. Recovery of Cortisol added to 1.5 ml of Urine

$$y=3.60+0.81x$$

Fig. 5. Comparison of Results for Urinary Free Cortisol obtained by Spin Immunoassay and Radioimmunoassay

$$y=34.2+0.98x \quad r=0.988$$

数は 8.2% であった。同じ尿についての RIA の日内変動係数および日差変動係数は 4.8% と 7.6% であった。

考 察

尿中コルチゾールの定量に関しては、先にあげた文献^{4,12,13)}以外に、RIA では TLC との組合せ¹⁴⁾ カラムクロマトグラフィーとの組合せ¹⁵⁾ 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) との組合せ¹⁶⁾ HPLC およびマススペクトロメトリーとの比較¹⁷⁾等があり、RIA 以外では、けい光 HPLC¹⁸⁾ や EIA¹⁹⁾ などがある。以上どの方法にも共通していることは、操作が複雑であることである。単なる RIA だけでも BF 分離が必要であり、また incubate 時間が長くなる。EIA についても、H-EIA でないかぎり RIA と同じような欠点をもっている。

尿中遊離型コルチゾールの SIA による定量は、RIA を用いてえられた値とくらべて高い値を示す。前報の尿中テストステロンの定量の時には同様の現象が見られている。これは SIA にのみ特有のブランクがあるためと考えられる。

このブランク値を充分ふまえた上で、放置時間 10 分、測定時間 2 分という簡便迅速である長所を生かし、Cushing 症候群のように尿中遊離型コルチゾールの量が顕著に高い値を示す尿のスクリーニングには、SIA は他のどの方法よりも有効であると思われる。

今回の SIA は、尿中に比較的多く存在する遊離型コルチゾールの測定ということもあり、また尿の場合サンプル量はあまり問題にならないため、感度については問題がなかった。しかし血清中のステロイドの測定のように、サンプル量ができるだけ少ない方がよい場合に SIA を利用するには種々の問題がある。まず ESR 測定装置の感度の問題であるが、第 20 回 ESR 討論会での発表²⁰⁾によると、TM モードキャピティと定点積分法の併用により、感度が約 30 倍上昇したと報告されており、装置の感度の向上は今後期待できそうである。

しかし一方では、SIA の長所である BF 分離を必要としないということが、逆に RIA では F 型画分にはいる弱い結合物も、SIA では応答シグナルを与える可能性があり、感度の向上のためには BF 分離も必要となってくると思われる。また現在シリル化した容器を使用したり、トリトン X-100 を用いてスピンドラベル剤のガラス壁への吸着を押えているが、スピンドラベル剤の濃度を更に低くしていった場合、再び問題となる可能性がある。ESR 測定装置の感度の向上が現実性を帯びてきた現在、SIA の感度の向上をはばむ測定装置以外についての問題点の解決が重要な課題となっている。

謝辞 本研究に御協力頂いた藤原保晋氏に感謝致します。

引用文献および注

- 1) R.K. Leute, E.F. Ullman, A. Goldstein, L.A. Herzenberg, *Nature* (London), *New Biol.*, **236**, 93 (1972); M.R. Montgomery, J.L. Holtzman, R.K. Leute, *Clin. Chem.*, **21**, 1323 (1975); M.R. Montgomery, J.L. Holtzman, R.K. Leute, J.S. Dewees, G. Boltz, *ibid.*, **21**, 221 (1975).
- 2) R. Wei, R. Almirez, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **62**, 510 (1975).
- 3) 佐用博照, 細川幹夫, 薬誌, **100**, 56 (1980).
- 4) 出村 博, 古関千寿子, 小田桐恵美, 地曳和子, 前田忠雄, 出村黎子, 鎮目 和夫, 総合臨床, **27**, 2351 (1978); R.M. Gough, G. Ellis, *Clin. Biochem.*, **14**, 74 (1981).
- 5) A.H. Janoski, F.C. Shulman, G.E. Wright, *Steroids*, **23**, 49 (1974).
- 6) B.F. Erlanger, F. Borek, S.M. Beiser, S. Lieberman, *J. Biol. Chem.*, **228**, 713 (1957); *idem*, *ibid.*, **234**, 1090 (1959).
- 7) a) M. Kao, S. Voinea, A. Nichols, R. Horton, *Clin. Chem.*, **21**, 1644 (1975); b) T. Kinouchi, L. Pages, R.A. Horton, *J. Lab. Clin. Med.*, **82**, 309 (1973).
- 8) S. Furuyama, D.M. Mayes, C.A. Nugent, *Steroids*, **16**, 415 (1970).
- 9) G.K. Stalla, G. Giesemann, O.A. Muller, W.G. Wood, P.C. Scriba, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **19**, 427 (1981).
- 10) T. Nishina, A. Tsuji, D.K. Fukushima, *Steroids*, **24**, 861 (1974).
- 11) D. Fahmy, G.F. Read, S.G. Hillier, *Steroids*, **26**, 267 (1975).
- 12) R.E. Chambers, S.R. Willetts, G. Walters, *Ann. Clin. Biochem.*, **17**, 233 (1980).

- 13) H. Hosoda, S. Miyairi, N. Kobayashi, T. Nambara, *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 3369 (1980).
- 14) H.J. Ruder, R.L. Guy, M.B. Lipsett, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **35**, 219 (1972).
- 15) a) R.L. Sokoloff, R.L. Hilderbrand, *Health Lab. Sci.*, **14**, 133 (1977); b) B.E. Pearson Murphy, L.M. Okouneff, G.P. Klein, S.C. Ngo, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **53**, 91 (1981).
- 16) M. Schoneshofer, A. Fenner, G. Altinok, H.J. Dulce, *Clin. Chim. Acta*, **106**, 63 (1980); M. Schoneshofer, A. Fenner, H.J. Dulce, *ibid.*, **101**, 125 (1980).
- 17) O. Lantto, *Clin. Chem.*, **28**, 1129 (1982).
- 18) 河崎孝男, 前田昌子, 辻 章夫, 薬誌, **100**, 925 (1980).
- 19) H. Hosoda, N. Kobayashi, S. Miyairi, T. Nambara, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 3606 (1981).
- 20) 吉田栄久夫, 飯間義雄, 森井正孝, 河野雅弘, 藤井金苗, 第20回 ESR 討論会, 大阪, 1981年10月.