ミニチュアブタにおける 血漿中コルチゾールの酵素免疫測定法

金子悦史・菅原 豊・桑山岳人・門司恭典・神戸川明*・百目鬼郁男

東京農業大学農学部, 神奈川県厚木市船子 1737, 243-0034

* 神戸川研究所, 東京都狛江市市元和泉 3-8-5, 201-0013

(2002 年 11 月 7 日受付, 2003 年 3 月 25 日受理)

要 約 標識ホルモンとして peroxidase を用いた EIA により, ミニチュアブタ血漿中コルチゾール濃度の測定が可能であるか検討した。抗血清は Cortisol-3-CMO-BSA を自作し, 標識ホルモンとして Cortisol-3-CMO-HRP を用いた。抗血清の力価を検討した結果, 抗血清の適正希釈倍率は, 201,000~242,000 倍であり, 本 EIA においては, 200,000 倍にて使用した。標準曲線の作成が可能な範囲は 0.01~50 ng であり, 各濃度における結合率の変動係数 ($n=6$) は 2.32~11.67%, 測定感度は 0.012 ng/well であった。ミニチュアブタ血漿のコルチゾール添加回収実験では, 平均 $96.0 \pm 5.5\%$, 変動係数は 10.4% となった。コルチゾール濃度の異なる 3 種類の雄ミニチュアブタ血漿 ($n=6$) について再現性の検討を行った結果, 測定内変動係数は 5.4~8.8%, 平均 7.2% であった。また, 測定間変動係数は 6.7~11.4%, 平均 9.0% であった。本方法を用い, 妊娠末期から分娩後 5 日目までの血漿中コルチゾール濃度を測定した。分娩前までの変動は徐々に増加する傾向が見られ, 分娩日には 90.4 ng/ml の最高値を示し, 分娩後 3 日間は 25 ng/ml 前後で推移した。以上の結果から, 本方法を用いてミニチュアブタ血漿中コルチゾール濃度を測定できることが明らかとなった。

緒 言

家畜に種々のストレスが加わると, それに反応して視床下部から副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (corticotropin releasing hormone: CRH) 分泌が促進され, 下垂体から副腎皮質刺激ホルモン (adrenocorticotrophic hormone: ACTH), 次いで副腎皮質からコルチゾールが分泌される¹⁾。また, これら上記のホルモンは, 体内の恒常性の維持に関わる。ブタにおいて, 過剰に分泌された

コルチゾールは卵胞に作用し, エストロジェン産性能を低下させる^{2,3)}。また, 視床下部・下垂体に対し, コルチゾールのフィードバックとともに CRH, ACTH が直接的に LH-RH 分泌を抑制する¹⁾。すなわち家畜は, ストレスによる負荷がかかると, 発情周期に乱れが生じ, 卵胞腫大に至った個体においては治療する, あるいは廃用せざるを得なくなり, 畜産経営に支障をきたす。このように, 繁殖機能はストレスと密接な関係があり, またストレス負荷の指標として血中コルチゾール

Enzymeimmunoassay for determination of cortisol in miniature pig

E. KANEKO, Y. SUGAWARA, T. KUWAYAMA, Y. MONJI, A. KAMBEGAWA* and I. DOMEKI

Animal Reproduction Laboratory, Tokyo University of Agriculture, Atugi, Kanagawa-ken, 243-0034

*Kambegawa Laboratory, Komae, Tokyo, 201-0013

濃度の測定が行われている。

血中コルチゾール濃度測定は、標識ホルモンとして放射性同位元素 (Radioisotope : RI) を用いたラジオイムノアッセイ (Radioimmunoassay : RIA) 法が開発されて以来、広く応用されているが⁴⁻⁶⁾、その特性上特別な施設・測定機器を要する。現在では標識ホルモンの酵素を用いた酵素免疫測定法 (Enzymeimmunoassay : EIA) が開発、キット化され応用されつつある^{7,8)}。しかし、多数の検体を扱う動物実験への応用はコストの面において課題が多く、また標識酵素に peroxidase を用いた報告は少ない。

本実験では、抗 cortisol-3-carboxymethyl-oxime-BSA 抗体、標識ホルモンとして cortisol-3-carboxymethyl-oxime-peroxidase を用いた EIA によって豚血中コルチゾールの測定が可能であるか否か検討した。

材料および方法

1) 緩衝液

磷酸緩衝液 (PBS) は磷酸 1 ナトリウム二水和物 0.406 g, 磷酸 2 ナトリウム 12 水和物 2.65 g, 塩化ナトリウム 8.2g を 1 l の蒸留水に溶解し、pH 7.0 に調整し室温で保存した。ウシ血清アルブミン添加 PBS (1% BSA-PBS) は、BSA (Irvine Scientific, Fraction V) 10 g を PBS 1 l に溶解し、4℃で保存した。

炭酸緩衝液は炭酸ナトリウム 1.59 g, 炭酸水素ナトリウム 2.93 g を蒸留水 1 l に溶解し、pH 9.6 に調整後、室温で保存した。

クエン酸緩衝液は 0.1 M クエン酸溶液 470 ml と 0.1 M クエン酸ナトリウム溶液 530 ml とを混合して pH 4.56 に調整し、室温で保存した。

2) ステロイド

コルチゾール標準品 (Sigma-Aldrich Co.) は、特級エタノールで 1 mg/ml の濃度になるよう溶解し、-30℃で保存した。また、測定時には室温に戻し、1% BSA-PBS で希釈し、必要な濃度の標準液を調整した。酵素標識コルチゾールは cortisol-3-carboxymethyl-oxime-peroxidase (F-HRP) を用いた。F-HRP は我々の方法¹¹⁾により作成した。すなわちコルチゾールから F-3-CMO を作り、

HRP と結合させるために活性エステルである NHS エステルを作成。HRP と結合させたものをゲル濾過にて精製した。測定時には 1% BSA-PBS にて希釈して使用した。

3) 抗体

第一抗体には抗 cortisol-3-carboxymethyl-oxime-BSA 抗体 (anti-F) を用いた。また、抗体に用いる cortisol-3-carboxymethyl-oxime (F-3-CMO) は我々の方法¹¹⁾で作成し、BSA との結合は混合酸無水物法¹²⁾で行った。また、作成された F-3-CMO-BSA を 3 匹のウサギへ 1 ヶ月に一度、5 回背および趾に注射し anti-F を得た。また、抗体希釈曲線および交叉反応率を測定し、最も抗体価の高い rabbit No. 302 のものを本実験に使用し、測定時には 1% BSA-PBS で必要な濃度に希釈した。第二抗体として抗ウサギ、ヤギ IgG 抗体 (OEM, G5-RG15) を、炭酸緩衝液にて必要な倍率に希釈した。

4) その他の試薬および器具

免疫実験用ブロッキング剤 (ブロックエース、大日本製薬) は、脱イオン水にて 4 倍希釈後使用した。洗浄液には 1 l の PBS に 0.05% Tween80 添加 PBS を用い、室温で保存、使用した。酵素の基質液には、O-phenylene-diamine-dihydrochloride (OPD, Sigma-Aldrich Co.) を、クエン酸緩衝液にて 1 mg/ml に溶解・調整して -30℃で凍結保存した。測定時に OPD を融解し、クエン酸緩衝液にて 10 倍希釈したものに 0.012% の割合で過酸化水素水 (三菱瓦斯化学) を加え使用した。なお、発色停止液には 3N 硫酸溶液を用いた。マイクロプレートは 96 穴プレート (Corning, costar 9018) を、Immuno Wash (BIORAD, MODEL 1575) にて洗浄後使用した。吸光度の測定にはコロナマイクロプレートリーダー MTP 120 (コロナ電気) を用いて測定した。

5) コルチゾールの抽出と精製

被検血漿 0.2 ml を試験管 (10×90 mm) にとり、これに 1 ml のジエチルエーテルを添加、攪拌した。その後 -70℃ のドライアイスにより、血漿層を凍結させ、エーテル層を他の試験管に移し 50℃ ウォーターバスにて蒸発乾固させた。また、この抽出手順を再度行い、計 2 回の操作から得ら

れた乾固物を 0.25 ml の 1% BSA-PBS にて溶解、測定用試料とした。

6) コルチゾールの測定方法

マイクロプレートのウェル内に適正な倍率に希釈した第二抗体 50 μ l を分注し、4℃ で一夜静置、ウェルの管壁に第二抗体を吸着させた。緩衝液にて 3 回洗浄後ブロッキング剤 0.3 ml を分注し、室温にて 3 時間放置後再び 3 回洗浄、anti-F を 50 μ l 分注した。その後一夜静置したプレートを 3 回洗浄し、コルチゾール標準液および抽出した検体、F-HRP を各々 50 μ l ずつ添加、再び一夜静置した。5 回の洗浄により、抗体と結合していない遊離型の F-HRP を分離し、OPD 溶液 100 μ l を分注した。発色反応は 38℃ で 30 分静置し、充分に発色させた後 3N 硫酸 100 μ l を加え反応を停止した。その後 492 nm の波長にて吸光度を測定した。吸光度から F-HRP の抗体との結合率を求め、得

られた標準曲線よりコルチゾール濃度を算出した(図 1)。

7) コルチゾールの添加回収試験

雄ミニチュアブタ血漿に 10 ng, 25 ng, 50 ng, 100 ng のコルチゾール純品を添加したものを用い、コルチゾール濃度を測定し、その回収率を求めた。

8) 再現性試験

雄ミニチュアブタの前大静脈より採取、分離したミニチュアブタ血漿 3 種類を用い、コルチゾール濃度を反復測定し、得られた測定値より測定内変動係数および測定間変動係数を調べた。

9) ミニチュアブタにおける分娩前後の血中コルチゾール濃度の変動

本実験にて設定した手法を用い、12 カ月齢、妊娠末期のブタ 1 頭の血液を採取し、分娩前後の血漿中コルチゾール濃度を測定した。

図 1. ミニチュアブタ血漿中コルチゾールの EIA 操作手順

結 果

1) 抗血清の力価

抗血清の力価を Joyce ら⁹⁾ および竹之内ら¹⁰⁾の方法に準じて検討し、その結果を図 2 に示した。すなわち希釈血清に一定量の F-HRP を加え抗体との結合がほぼ飽和状態となる希釈倍率での結合率を便宜的に 100% とし、相対結合率 40~50% の範囲を適正希釈倍率とした。その結果、抗血清の適正希釈倍率は、201,000~242,000 倍であった。

2) 標準曲線

EIA による標準曲線を図 3 に示した。横軸には標準液濃度を、縦軸はコルチゾール濃度 0 ng の吸光度に対する相対結合率を示した。各濃度における結合率の変動係数 (n=6) は 2.32~11.67% で

あった。測定感度は 0 ng における平均吸光度から、その標準偏差の 2 倍の値を差し引いた吸光度に値する濃度を求めた。その結果 0.012 ng/well であった。以上のことから、本方法における標準曲線は 0.01~50 ng とした。

3) 回収率

ミニチュアブタ血漿に一定量のコルチゾール純品を加え、その回収率を表 1 に示した。全測定を通じて血漿中コルチゾールの回収率は 89.0~104.4% であり、平均 $96.0 \pm 5.5\%$ 、変動係数は 10.4% となった。

4) 再現性

コルチゾール濃度の異なる 3 種類の雄ミニチュアブタ血漿 (n=6) について再現性の検討を行った。3 種類の血清の測定内変動係数は 5.4~8.8% であり、平均 7.2% であった。また、測定間変動係

図 2. anti-F の力価曲線

*1 希釈倍率: $\times 201,000$

*2 希釈倍率: $\times 241,000$

図 3. EIA によるコルチゾールの標準曲線 (N=6)

表 1. コルチゾール測定における EIA の測定精度

試料	コルチゾール添加量 (pg)	平均±標準偏差 (ng/試料)	回収率 (%)	変動係数 (%)
2 ml シバヤキ血漿	0	23.8 ± 2.5	—	10.5
	10	34.2 ± 3.8	104.4	11.1
	25	47.3 ± 5.9	93.9	12.5
	50	72.1 ± 9.1	96.7	12.6
	100	112.8 ± 6.2	89.0	5.5

(n=6)

数は 6.7~11.4% であり, 平均 9.0% であった。

5) ミニチュアブタの分娩前後における血漿中 コルチゾール濃度の変動

ミニチュアブタにおける, 妊娠期末期から分娩後 5 日目までの血漿中コルチゾール濃度の推移を図 4 に示した。分娩前までの変動は徐々に増加する傾向が見られ, 分娩日には 90.4 ng/ml の最高値を示した。分娩後 3 日間は 25 ng/ml 程度の低値で推移した。

考 察

EIA の標識抗原に用いられる酵素において, peroxidase は酵素活性が強く最も微量まで測定でき, 酵素も安価で良いものが手に入るとされる¹¹⁾。本方法においても酵素標識ホルモンとして HRP を用いている。標準曲線の結果を検討し, 0.01~50 ng の範囲で良好な曲線が得られた。これは, ステロイドの標識酵素にアルカリフォスタファゼや¹³⁾, β -ガラクトシダーゼ¹⁴⁾を用いた方法に比較し, より低濃度かつ広範囲であった。

抗体の適正希釈倍率を検討した結果 201,000~242,000 倍となり, 血液検体の測定に使用する場合, 200,000 倍にして使用することとした。抗原が抗体に結合した結合物と, していない遊離物を分離する, いわゆる B/F 分離において, その方法は固相法と二抗体法に大別される。現在, EIA の操

作において, 手順の簡便さから固相法が用いられることが少なくないが, 本実験では測定感度の点でより良好な結果が得られるとされる二抗体法を用いている。また, 先に述べた, 標識に HRP を用いている点からも, 本実験に供試した anti-F の大幅な希釈が可能になったと考えられ, それに準じて測定感度の上昇, 測定にかかるコストの低減が望める結果となった。

コルチゾールの EIA に用いる被検血漿の量は 100 μ l 以下のものを多く見るが, 本実験ではミニチュアブタ血漿を 250 μ l 使用している。被検血漿量が多くなると, ジエチルエーテルによるデカンテーションでは, ステロイドとともに脂質をも多く抽出されることになり, 測定値ないしは回収率に支障が出る場合がある。しかしながら, 本方法における添加試験および再現性試験は良好な結果である。また, 本実験に用いた anti-F は高い特異性を有することなどから (表 2), クロマトグラフィーによる精製は不要であると考えられた。

妊娠末期から分娩前後における母体の前大静脈血漿中コルチゾール濃度は, 分娩 6 日前より約 20 ng/ml 以下から徐々に上昇, 分娩日には 80 ng/

表 2. anti-F における各種ステロイドの交叉反応

ステロイド	交叉反応 (%)
Cortisol (F)	100.0
11-Deoxycortisol (S)	11.5
Cortisone (E)	4.00
Corticosterone (B)	2.00
11-Dehydrocorticosterone (A)	0.20
17-Flydroxy-progesterone (17 α -OHP)	0.04
Progeterone	0.035
Testosterone	0.02
Androstenedione	0.006
Aldosterone	<0.01
Pregnenolone	<0.01
17 α -Hydroxy-pregnenolone	<0.01
Dehydroepiandrosterone	<0.01
Estradiol	<0.01

図 4. ミニチュアブタの分娩前後における血漿コルチゾール濃度の推移

ml 以上の値が見られた SILVER ら¹⁵⁾ の産業豚, TAVERNE ら¹⁶⁾ のウシによる報告と近似した推移が見られた。以上の結果から, 本 EIA はミニチュアブタ血漿中コルチゾール濃度の測定に応用し得ることが明らかとなった。また, 血液の採取が困難である場合, 非侵襲的に集められる尿や唾液中のコルチゾール濃度も, 本方法を応用し得ることが示唆された。

文 献

- 1) 小笠 晃: 豚の繁殖障害の実態とその防除対策, 日豚会誌, **32**, 34-39, 1995.
- 2) 田谷一善: ストレスと生殖機能, 臨床獣医, **8**, 27-37, 1990.
- 3) 小笠 晃・百目鬼郁男・伊東正吾・筒井敏彦・河上栄一: 外因性 ACTH による豚の卵胞腫の形成について, 日畜会報, **59**, 1004-1012, 1988.
- 4) 新井浩司・渡辺 元・藤本美和・永田俊一・竹村勇司・田谷一善・笹本修司: 125I 標識ホルモンを用いたコルチゾールのラジオイムノアッセイと各種動物の測定例, J. Reprod. Dev., **41**, j 15-j 20, 1995.
- 5) 遠藤 伸・手塚 堂・菅原辰雄・牧野拓雄: RIA による血中コルチゾンの測定, ホルモンと臨床, **45**, 707-713, 1997.
- 6) 吉岡光明・栗原愛一郎・武部和夫: Cortisol Radioimmunoassay Kit を用いた血漿 Cortisol 測定法の検討, ホルモンと臨床, **30**, 213-216, 1982.
- 7) 中村二郎・岩井 進・屋形 稔: 酵素免疫法による血中コルチゾール濃度の測定に関する検討, ホルモンと臨床, **30**, 639-643, 1982.
- 8) 西條秀樹・内田一也: EIA 法による血中コルチゾールの自動測定, 基礎と臨床, **16**, 637-644, 1982.
- 9) JOYCE, B.G., G.F. READ and D.R. FATMY: A specific enzymeimmunoassay for progesterone in human plasma, Steroids, **29**, 761-770, 1977.
- 10) 竹之内直樹・大島一修・島田和宏・高橋政義: マイクロプレートを用いた牛血漿中エストラジオール-17 β の酵素免疫測定法, J. Reprod. Dev., **43**, j 9-j 14, 1997.
- 11) 神戸川明: エンザイムイムノアッセイにおける酵素標識法の種類とその特性, 日本臨牀, **53**, 2160-2167, 1995.
- 12) MITSUMA, M. and A. KAMBEGAWA: A sensitive bridge heterologous enzymeimmunoassay of progesterone using geometrical isomers, J. Steroid. Biochem., **32**, 467-471, 1989.
- 13) 宇高千穂子・白方隆晴: 酵素免疫測定法による血清コルチゾール測定の検討, 岡山済生会総合病院雑誌, **18**, 177-181, 1986.
- 14) 菅野光俊・日高宏哉・山内一由・広仲英治・熊谷俊子・中林徹雄・戸塚 実: 日立 7170 型自動分析装置による血清中コルチゾール測定試薬の検討, 医学検査, **47**, 77-81, 1998.
- 15) SILVER, M., R.J. BARNES, R.S. COMLINE, A.L. DOWDEN, L. CLOVER and M.D. MITCHELL: Prostaglandins in the fetal pig and Prepartum endocrine changes in mother and fetus, Anim. Reprod. Sci., **2**, 305-322, 1979.
- 16) TAVERNE, M.A.M., M.M. BEVERS, G.C. VANDER WEYDEN, S.J. DIELEMAN and P. FONTIJNE: Concentration of growth hormone, Prolactin and cortisol in fetal and maternal blood and amniotic fluid during late pregnancy and parturition in cows with cannulated fetuses, Anim. Reprod. Sci., **17**, 51-59, 1988.

Enzymeimmunoassay for determination of cortisol in miniature pig

Etsushi KANEKO, Yutaka SUGAWARA, Takehito KUWAYAMA, Yasunori MONJI,
Akira KAMBEGAWA* and Ikuo DOMEKI

Animal Reproduction Laboratory, Tokyo University of Agriculture,
Atugi, Kanagawa-ken, 243-0034

* Kambegawa Laboratory, Komae, Tokyo, 201-0013

The measurement of cortisol in miniature pig blood plasma was examined with an enzymeimmunoassay where peroxidase was used as the enzyme labeling hormone. The antiserum used was Cortisol-3-CMO-HRP for the enzyme labeling hormone with respect to Cortisol-3-CMO-BSA. The proper dilution magnification of antiserum is 201,000-242,000 times, and 200,000 times was used. Standard curve was in the range of 0.01~50 ng, and coefficient of variation ($n=6$) of the combination rate was 2.32~11.67%. Measurement sensitivity was 0.012 ng/well. Recovery rates of cortisol in miniature pig blood plasma was $96.0 \pm 5.5\%$ of the averages and the coefficient of variation was 10.4%. Inter-assay coefficient of variation of 3 kinds of male miniature pig plasma ($n=6$) in which the concentration of cortisol was different from was 5.4-8.8%, which were 7.2% of the averages, and the intra-assay coefficient of variation was 6.7-11.4%, which were 9.0% of the averages. Cortisol concentration in miniature pig blood plasma until the fifth day was measured from the end of pregnancy to post partum by using this method. It tended to increase gradually the day as the delivery date approached, and the highest value was shown on the day of delivery at 90.4 ng/ml, and three days later decreased to about 25 ng/ml. From these results, it was possible that Cortisol concentration in miniature pig blood plasma by using this method.

Jpn. J. Swine Science, **40**, 2 : 48-54

Key words : cortisol, miniature pig, enzymeimmunoassay