



|              |                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | 蛋白性ホルモンのImmunoassayに関する基礎的研究                                                                                                                    |
| Author(s)    | 小濱, 靖弘                                                                                                                                          |
| Citation     | 大阪大学, 1972, 博士論文                                                                                                                                |
| Version Type |                                                                                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/30789">https://hdl.handle.net/11094/30789</a>                                                             |
| rights       |                                                                                                                                                 |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

### [3]

|         |                                                                |
|---------|----------------------------------------------------------------|
| 氏名・(本籍) | 小 <sup>こ</sup> 濱 <sup>はま</sup> 靖 <sup>やす</sup> 弘 <sup>ひろ</sup> |
| 学位の種類   | 薬 学 博 士                                                        |
| 学位記番号   | 第 2 6 5 2 号                                                    |
| 学位授与の日付 | 昭和 47 年 10 月 16 日                                              |
| 学位授与の要件 | 薬学研究科応用薬学専攻<br>学位規則第 5 条第 1 項該当                                |
| 学位論文題目  | 蛋白性ホルモンの Immunoassay に関する基礎的研究                                 |
| 論文審査委員  | (主査)<br>教 授 青 沼 繁<br><br>(副査)<br>教 授 岩田平太郎 教 授 上原喜八郎 教 授 近藤 雅臣 |

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 緒 論

内分泌学の分野において鋭敏なホルモン測定法は重要な研究手段として、また内分泌疾患の診断に欠くことができない。従来より蛋白性ホルモンの測定法として用いられている bioassay は一般にホルモン製剤の検定には適するが、生体内に微量存在するホルモンを測定する場合には、特異性、感度、操作の簡便さなどの点で一長一短を有する。近年種々の蛋白性ホルモンの抗原性が見出され、免疫学的特異性を利用した immunoassay が新しいホルモンの鋭敏な測定法として注目されているが、著者はこれまで化学的方法の適用が困難で、もっぱら bioassay にのみ頼っていた蛋白性ホルモンの測定法において、immunoassay の導入は極めて有用と考え、この方法が現在知られている分子量 1,000 付近の低分子ペプチドから 100,000 を越える高分子蛋白質を含む蛋白性ホルモン全般に適用されるかどうか、また bioassay に対する利点、種属特異性等の面から高分子および低分子ホルモンをとりあげ、immunoassay に関する基礎的研究を行なった。

### 本 論

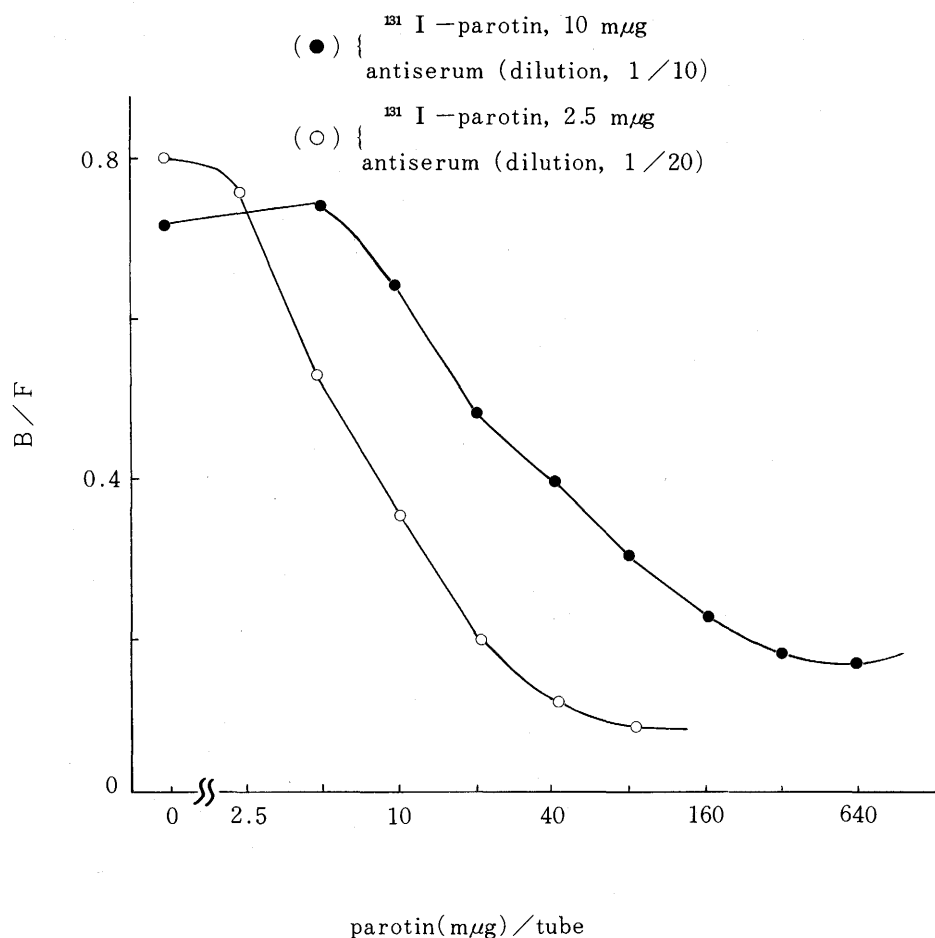
#### 第一章 高分子ホルモン parotin の immunoassay に関する基礎的検討

まず免疫学の対象としては扱いやすく、最も大きな分子量を示す蛋白性ホルモンの例として唾液線ホルモン parotin (分子量 132,000) を選び、検討した。

牛耳下腺から単離した純度約 98% の精製 parotin を用い、家兎に抗血清を作成し、まず比較的操作の簡単な沈降反応および血球凝集反応を試みたところ、immunoassay が可能であることを認めたので、さらに鋭敏な radioimmunoassay へと発展させた。chloramine T 法で調製した  $^{131}\text{I}$ -parotin

を用い radioimmunoassay の基礎的條件について種々検討した結果、抗体と結合した抗原 (B) と遊離の抗原 (F) の分離に chromatoelectrophoresis 法を用いることにより、Fig. 1に示すように最高検出感度  $2.5\mu\text{g}$  (約  $10^{-10}\text{M}$ ) で、 $320\mu\text{g}$  までの比較的広範囲で parotin を定量的に測定できることを認めた。本法の感度は parotin の bioassay に主として使用される家兎血清 Ca 低下効力および循環白血球一時減少後増加効力の約  $10^5$  倍鋭敏で、充分精度も高く、また 2 日間で約 50ヶという多数の検体を比較的簡便に処理できる利点を認めた。

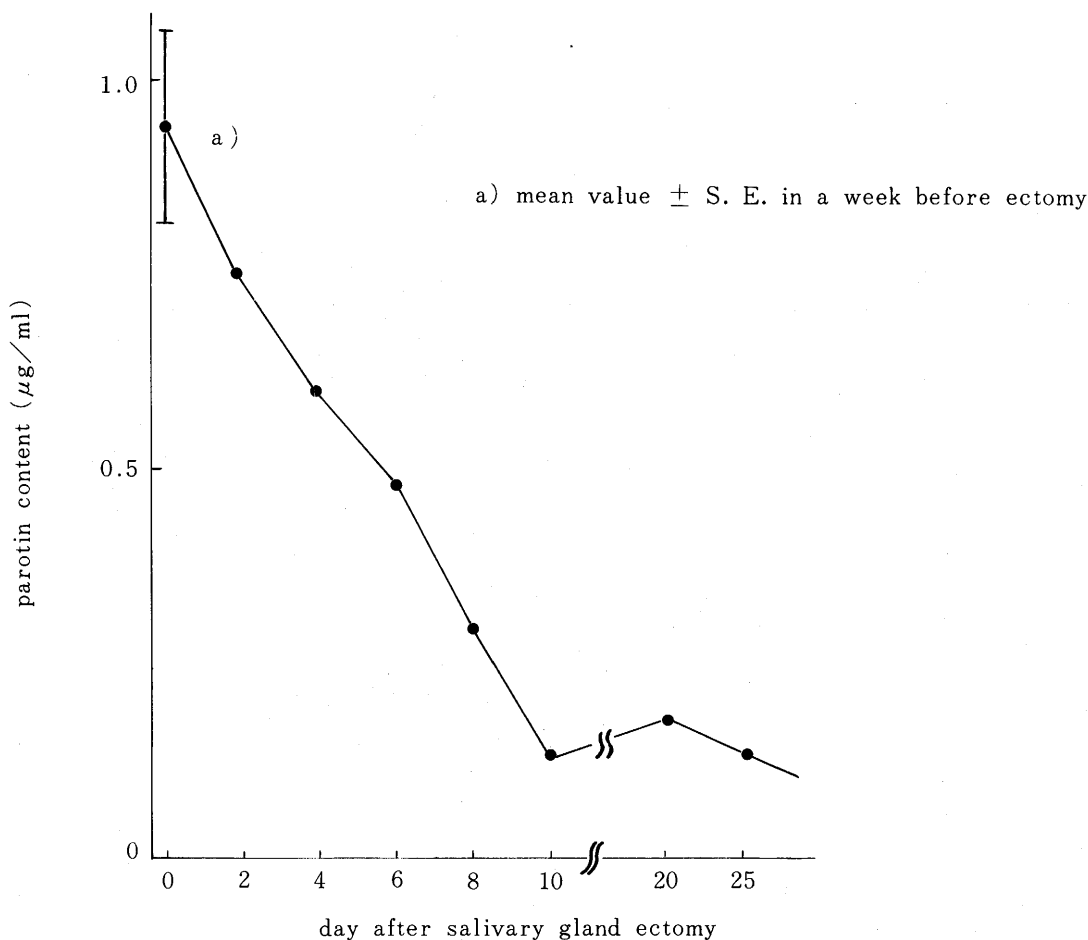
Fig. 1 Standard curve for parotin radioimmunoassay



次に本法と bioassay を比較する意味で、parotin の各精製段階における免疫活性を本法で測定するとともに、parotin 抗血清による parotin の Ca 低下抗力および白血球効力に対する影響を調べた結果、parotin の精製度に平行して免疫活性の増加を認めたが、抗血清により Ca 低下効力のみが中和され白血球効力には何ら変化がみられないことから、parotin の免疫および生物学的活性は部分的に共通の部位に由来していると考えられた。また特異性の面から種々の関連物質を測定したところ、耳下腺とともに分泌臓器と考えられている顎下腺から単離した精製 S-parotin が parotin と全く同一の反応性を示し、さらに牛以外のモルモットおよびラットから得た粗 S-parotin も弱いながら交叉反応をすることを見出し、これらの動物における parotin が免疫学的に共通の活性を示すことを認

めた。一方 Ca 低下効力などの bioassay では何ら parotin と区別できなかった *B. subtilis* k やヒト尿からの Ca 低下性物質、また牛血清  $\gamma$ -グロブリンや牛胆汁抽出物などは parotin と何ら交叉反応せず、はっきりと parotin 特異性を示し、高分子ホルモンにおける免疫学的特異性の有用性を認めた。

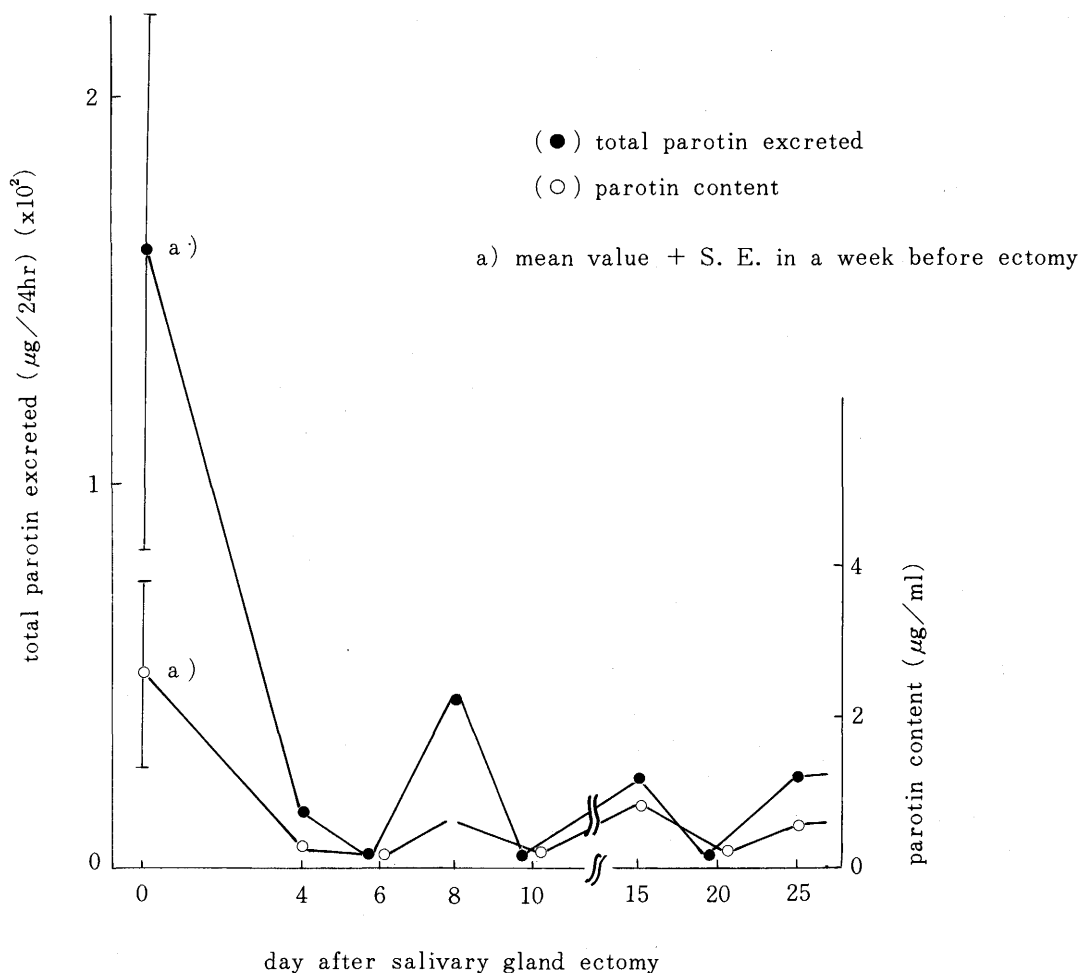
次に radioimmunoassay の実用化の第一歩として、bioassay では不可能であった内在性 parotin の測定について検討した。試料としてはモルモット由来の S-parotin が牛 parotin と交叉反応した事実に着目し、モルモット唾液腺および体液を用いた。唾液腺については 0.06 M veronal buffer (pH 8.6) による抽出液を、血清はそのまゝ、尿は pH 8 付近とした後濾過液を試料とし、まず各試料の希釈による parotin の標準曲線との平行性について調べた結果、耳下腺、顎下腺、血清および尿いずれの試料も標準とした牛 parotin と相関性を示し、モルモット内在性の parotin が本法により測定できることを認めた。体液についてはアセトン分画後、veronal buffer による抽出操作を行なった後も測定値に変化はなく、体液中の微量 parotin が複雑な抽出精製操作をすることなく極めて簡単に測定できた。なお血清中から parotin の回収率を測定したところ、ほぼ 100% であり、血清中の高濃度の蛋白質などによる測定系への障害はみられなかった。さらにモルモット耳下腺、顎下腺を剔除後、体液中のホルモン level を経日的に本法で測定したところ、Fig. 2, 3 に示す如く剔除後血清中



の parotin level および尿中の level と総排泄量が急激に減少し、明らかに内在性の parotin が測定されていることを確認するとともに、緒方らによって提唱された唾液腺内分泌学説を化学的に実証したものである。

臨床面への応用を考え、ヒト尿および唾液について測定を行なった結果、交叉性物質が認められ、将来ヒト parotin を radioimmunoassay により測定できる可能性を示唆した。

Fig. 3 Effect of salivary gland ectomy on parotin content in guinea pig urine



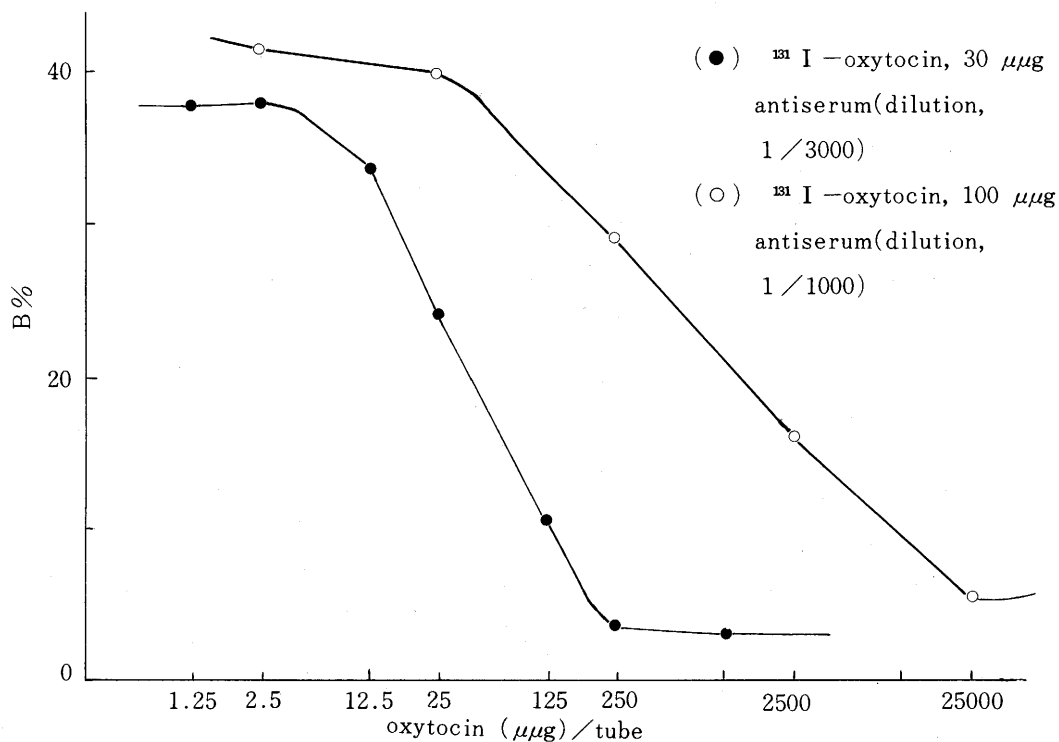
## 第二章 低分子ホルモン oxytocin の immunoassay に関する基礎的検討

高分子蛋白質とは異なり、免疫学の対象としてはかなり不利な面を有する低分子ホルモンとして後葉ホルモン oxytocin をとりあげた。oxytocin は 8 ケのアミノ酸からなる分子量 1,007 の極めて低分子のホルモンであることに加えて、生物学的、化学的にも非常に不安定であること、また哺乳動物では種属特異性がないから immunoassay を適用することは極めて難づかしく、1965 年の Gilliland ら以来 2、3 の immunoassay の試みが報告されているが、まだその方法は確立されていない。そこで

radioimmunoassay を実施する前に、まず抗原との結合性の高い抗体の作成、免疫活性を保持した  $^{125}\text{I}$ -oxytocin の調整について検討した。抗体作成について合成 oxytocin ( $400\text{IU}/\text{mg}$ )、Kamm 法に準じて抽出した牛後葉抽出物および oxytocin-牛血清アルブミン (BSA) 結合物を用いて家兎を免疫し、子宮収縮効力の中和反応および血球凝集反応を用いて実験した結果、oxytocin 単独よりも oxytocin 以外の物質が共存する方が抗体産生は容易であり、特に結合物抗血清は抗原との結合性、抗体価も充分高く、充分 radioimmunoassay に使用できることを認めた。なお抗体作成の際大量の oxytocin 投与による血中の oxytocin 分解酵素活性などの増加はみられなかった。 $^{125}\text{I}$ -oxytocin については chloramine T 法に若干の改良を加え、Sephadex G-15 のカラムで精製することにより、これまで報告されたなかでは最も抗体との反応性に富む標品を調整した。

このように調整した oxytocin-BSA 結合物抗血清と  $^{125}\text{I}$ -oxytocin を用い、radioimmunoassay を試み、dextran coated charcoal 法による oxytocin の測定法を確立した。Fig. 4 に標準曲線を示すが、最高検出度は  $10\mu\text{g}$  (約  $5 \times 10^{-11}\text{M}$ ,  $4\mu\text{U}$ ) で、 $25\text{m}\mu\text{g}$  までの範囲で、極めて簡単な操作により oxytocin を定量的に測定できた。特異性の面から最も問題となる同じ後葉ホルモンの vasopressin を測定したところ、oxytocin の約 1.5% の反応性しか示さず、ほとんど無視でき、また当然ながら後葉抽出物は oxytocin と同様の反応性を有することを認めた。なお BSA は oxytocin の  $10^6$  倍量においても交叉反応せず、抗体として BSA 結合物を用いた障害はみられなかった。このように oxytocin の如き低分子で、種属特異性を示さぬホルモンでも、適当な抗体あるいは標識ホルモンを作成すれば、高分子ホルモンと同様に比較的簡単に radioimmunoassay が適用できることが判明した。

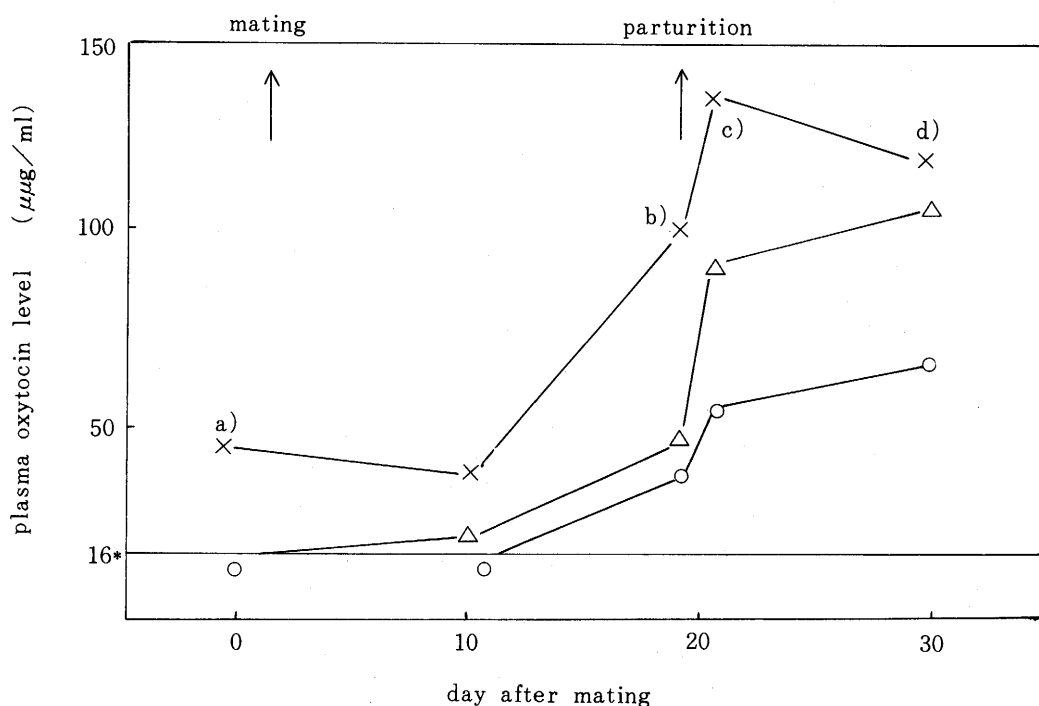
Fig. 4 Standard curve for oxytocin radioimmunoassay



本法の実用性について、ラット後葉および血漿試料について測定し、子宮収縮法による bioassay と比較検討した。その結果、後葉から希酢酸抽出、血漿から冷アセトン抽出することにより、後葉中では約 $1.5\mu\text{g}/\text{mg}$ 、血漿では約 $40\mu\text{g}/\text{ml}$ という極微量の oxytocin level を本法により測定できた。一方 bioassay で同じ試料を測定すると（血漿については回収率を測定）、radioimmunoassay の結果よりも約10%高い値を与え、また対照として用いた前葉では bioassay において後葉の約 $1/3000$ の level を示したにもかかわらず、radioimmunoassay では使用した5匹のラットでいずれも oxytocin を検出できなかった。これは bioassay では oxytocin 以外の子宮収縮作用を示す vasopressin, kinin 類あるいは acetylcholine などが約10%の活性をあらわしたものと思われる。

次に 2, 3 の生理的状態の変化にともなう後葉あるいは血漿中 oxytocin level の変動を本法により測定した結果、Table I に示す如く雌雄ラットにおいて去勢後後葉および血漿中 oxytocin level

Fig. 5 Plasma oxytocin levels during reproductive cycle of female rat



Rat was bled from heart: a) within 12 hours before mating, b) within 6 hours before parturition, c) within 1 hour after parturition and d) within 1 minuit after suckling.

\* minimum sensitivity

Table I Determination of oxytocin level in posterior pituitary and plasma of normal and castrated rats by radioimmunoassay

|        |           | oxytocin level a)           |                                |
|--------|-----------|-----------------------------|--------------------------------|
|        |           | posterior pituitary         | plasma                         |
|        |           | ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) | ( $\mu\mu\text{g}/\text{ml}$ ) |
| male   | normal    | $1.37 \pm 0.45$ (0.56~3.00) | $35.1 \pm 10.6$ (<15.7~53.0)   |
|        | castrated | $1.09 \pm 0.46$ (0.13~2.86) | $27.2 \pm 11.8$ (<15.7~57.6)   |
| female | normal b) | $1.49 \pm 0.38$ (0.16~4.15) | $49.0 \pm 9.0$ (<15.7~70.8)    |
|        | castrated | $1.13 \pm 0.30$ (0.58~2.25) | $36.2 \pm 5.3$ (15.7~56.2)     |

a) mean value of 3 to 5 rats, in which oxytocin could be detected,  $\pm$  s. e.  
(range from minimum value to maximum)

b) esterus

が減少すること、またFig. 5に示すように雌性ラット生殖過程中、分娩直前、直後および哺乳直後に血漿中 oxytocin level が著明に増加していることを確認した。

## 結 論

- 1) 分子量が100,000を越える高分子蛋白質および分子量1,000付近の低分子ホルモンを含む蛋白性ホルモンの測定法として immunoassay がそれぞれの免疫学的性質にかかわらず適用できることを明らかにした。
- 2) 高分子あるいは低分子ホルモンの例としてとりあげた parotin や oxytocin の radioimmunoassay が従来の bioassay に比較して高い特異性を有し、血中などの生体内試料中の約 $10^{-11}$  ~  $10^{-8}$  M という極微量のホルモン level を比較的簡便な操作により測定でき、さらに多数の試料を迅速に処理できる利点を認めた。
- 3) さらに radioimmunoassayを用いることにより初めて parotin については分泌臓器別出により末梢血中および尿中のホルモン level が減少すること oxytocinでは去勢により後葉および血漿中のホルモン level が減少することを見出し、両ホルモンの生体内動態などの研究に充分実用できることを認めた。

## 論文の審査結果の要旨

内分泌学の分野において鋭敏なホルモン測定法は主要な研究手段として、また内分泌疾患の診断に欠くことが出来ない。

そこで免疫学的特異性を利用した immunoassay を用い、これまで化学的方法の適用が困難で、もっぱら bioassay にのみ頼っていた蛋白性ホルモンの測定を研究し分子量1,000付近の低分子ペプチドから100,000を越える高分子蛋白質を含む蛋白性ホルモン全般に適用されうるかどうか、また bioassay に対する利点、種属特異性等の面からその基礎的研究を行い立派な業績をあげたので薬学博士の学位に値いすると認めた。