



Title	Testosteroneと5 $\alpha$ -Dihydrotestosteroneに対する低交叉反応性抗体の新作成法とラジオイムノアッセイへの応用
Author(s)	立石, カヨ子
Citation	大阪大学, 1980, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/32867">https://hdl.handle.net/11094/32867</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

氏 名・(本籍)	たて いし か よ こ 立 石 カヨ子
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	第 5 1 3 9 号
学位授与の日付	昭 和 55 年 12 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学 位 論 文 題 目	<b>Testosterone と 5<math>\alpha</math>-Dihydrotestosterone に対する低交叉反応性抗体の新作成法とラジオイムノアッセイへの応用</b>
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 宮 井 潔 (副査) 教 授 濱 岡 利 之 教 授 松 本 圭 史

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 〔目 的〕

イムノアッセイは抗原抗体反応を利用したすぐれた定量法として生体内微量物質の測定に広く利用されている。従って、本法で用いる抗体は検出物質に対して厳密な特異性を有する事が要求される。しかし、作成した抗体は目的とする検出物質と類似構造をもつ他の物質と交叉反応を示す場合がしばしばあり、これが本法の特異性を低下させる場合がある。そこで一般に交叉性の低い特異抗体を作成するために、従来いくつかの試みがなされてきたが、ある場合には、なお限界のある場合がみられた。ところが最近、浜岡らはハプテンとD-グルタミン酸-D-リジン重合体 (D-GL) の結合物を動物に投与するとそのハプテンに特異的なB細胞が不活性化され抗体産生が抑制されるという事実を見出した。そこで本研究では、これを利用して低交叉性抗体の作成を試みた。ところで、Testosterone (T) 及び 5 $\alpha$ -Dihydrotestosterone (DHT) はその構造が類似しているため、それぞれに対する抗体は DHT 及び T に対して交叉性が強く、この抗体を用いたラジオイムノアッセイではクロマトグラフィーによる前処置をしなければ、それぞれを分別定量することが不可能であった。そこで D-GL のもつ免疫寛容活性を利用して T 及び DHT に対する特異抗体の作成とこの抗体を用いた特異性の高いラジオイムノアッセイの開発を試みた。

### 〔方法ならびに成績〕

T 抗体の作成には、免疫動物にあらかじめ DHT-3-(O-carboxymethyl) oxime-D-GL (DHT-3-D-GL) を投与し、その個体における DHT に対する交叉性抗体産生を抑制した後、T-3-(O-carboxymethyl) oxime-keyhole limpet hemocyanin (T-3-KLH) で免疫を行った。他方、抗

DHT 抗体の作成には、あらかじめ T-3-(O-carboxymethyl) oxime-D-GL(T-3-D-GL) を投与した後、DHT-3-(O-carboxymethyl) oxime-KLH( DHT-3-KLH) で免疫を行った。対照動物には、このような D-GL 結合物による前処置を行わないで、それぞれの抗原で免疫を行った。得られた抗体の特異性は  $^3\text{H}$  標識 T 又は DHT を用いて Abraham の方法によって求めた。

(1) マウスにおける基礎実験：C57BL/6 雌マウスを DHT-3-D-GL で前処置後 T-3-KLH で免疫して得られた抗 T 抗体を用い T と DHT に対する反応性を比較して DHT との交叉反応性を求めると  $8.5 \pm 4.8\%$  であった。これは対照の前処置を行わなかったマウスより得た抗 T 抗体の DHT との交叉性 ( $40.1 \pm 17.9\%$ ) よりも明らかに低かった。また逆の関係で T-3-D-GL 前処置後 DHT-3-KLH で免疫して得られた抗 DHT 抗体の T との交叉反応性も  $38.2 \pm 14.6\%$  で対照の  $90.3 \pm 12.7\%$  よりも低かった。このように交叉反応性は交叉性物質と D-GL の結合物の投与によって著しく減少させることが出来た。なおこれらの場合、他のステロイドホルモン (5-Androstene-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol, Androstenedione, Epitestosterone, Dehydroepiandrosterone, 5 $\alpha$ -Androstan-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol) との交叉反応性は 4% 以下と無視出来る程度であった。

(2) ラジオイムノアッセイの確立：イムノアッセイに用いる多量の抗体を得るため、ウサギにおいても同様の実験を行った。その結果、本免疫法によって得られた抗 T 抗体の DHT との交叉反応性は 22.0% (対照 95.2%) であり、抗 DHT 抗体の T との交叉反応性は 11.9% (対照 100%) で、いずれも対照より交叉反応性が低かった。次にこれらの抗体を用いてラジオイムノアッセイを確立した。本法では、クロマトグラフィーによる T と DHT の分離操作過程を省き、血清の hexane: ether 抽出のみで成人女性血清中の T 及び DHT を分別定量することが可能となった。

#### 〔総括〕

交叉性物質と D-GL との結合物をあらかじめ免疫動物に投与することにより交叉性抗体の産生を抑制し、T と DHT に対する低交叉性で特異性の高い抗体を作成した。

本法によって得られた高特異性抗 T 及び抗 DHT 抗体を用いて、それぞれのラジオイムノアッセイを確立し、クロマトグラフィーによる前処置なしに成人女性血清中の T 及び DHT の分別定量を可能とした。

本法はここで示した T 及び DHT のみならず、特異性の点でいまだ不十分な抗体しか得られない種々の物質に対して、より特異性の高い抗体を得るための一般的な方法として広く応用出来るものと思われる。

### 論文の審査結果の要旨

本研究は、交叉性物質と D-glutamic acid-D-lysine 重合体 (D-GL) の結合物をあらかじめ免疫動物に投与することにより、低交叉性抗体を産生させる方法を開発したもので、高特異性抗 testosterone 及び抗 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone 抗体を作製して特異性の高い radioimmunoassay の確立に成功した。本法は将来他の物質にも応用できると思われ、その価値は高く評価される。