

《ノート》

DPC フリー テストステロン RIA キットによる 血中フリー テストステロン測定の基礎的検討

Basic Study on Measurement of Serum Free Testosterone
Concentration Using DPC Free Testosterone RIA Kit

富樫 和美* 梅田 誠司* 落合 武志* 鳥海 一浩*
須藤 芳正* 木平 孝治*

Kazuyoshi TOGASHI*, Seiji UMEDA*, Takeshi OCHIAI*, Kazuhiro TORIUMI*,
Yoshimasa SUDO* and Kouji KIHIRA*

*Kitasato Biochemical Laboratories

I. はじめに

血中テストステロンの測定は男性の性腺機能の把握、もしくは女性の男性化症状の解明に重要な意味を持つ。しかし、血中テストステロンの大部分は、性ホルモン結合グロブリン(SHBG)およびアルブミンと結合しており^{1,2)}、実際の生物活性を示すのは、これらタンパクと結合していない微量の遊離型テストステロン(FT)であると考えられている。このため、現在本邦で広く実施されている血中総テストステロン(TT)の測定は、妊娠、甲状腺機能亢進症などSHBGに変動が見られる場合、その影響を受け測定値は必ずしも患者の性腺機能を反映しているとは考えにくい例が見られることがある^{3,4)}。これに対し、FTはSHBGの変動による影響を受けず患者の性腺機能を十分反映するとされており^{5,6)}、その測定は大きな臨床的意義を持つ。しかし、これまでFTの測定は操作の煩雑な平衡透析法で行わざるを得ず、本邦

ではほとんど実施されていないのが現状である。今回、われわれは、FTをRIAにより容易に、かつ短時間で測定可能なキット“DPC フリー テストステロン”(日本DPC)を検討する機会を得たので、その成績を報告する。

II. 方 法

1. キットの内容

- 1) ^{125}I -テストステロン・アナログ溶液: 1 バイアル(105 ml 入り)調製済み
- 2) 抗テストステロン抗体コート・ポリプロビレン製試験管: 100 本
- 3) 標準フリー テストステロン溶液: A~F の 6 バイアル(Aのみ 2 ml, 他は 1 ml 入り)調製済み

2. FT の測定法

本キットは、SHBGに結合しないテストステロン・アナログをトレーサーに用いた試験管固相法である。測定操作は Fig. 1 に示したごとく簡便であり、わずか数時間で FT の測定が可能であった。

3. 他の測定法

- 1) TT: テストステロン・テストセット(Wien

Key words: RIA, Free testosterone.

* 北里バイオケミカルラボラトリーズ

受付: 62年4月24日

最終稿受付: 62年4月24日

別刷請求先: 神奈川県相模原市大沼 3392 (〒229)
北里バイオケミカルラボラトリーズ

富 横 和 美

- Laboratories) を用い RIA にて測定した。
- 2) SHBG : Sex hormone binding globulin [^{125}I] immunoradiometric assay kit (Farmos Diagnostica) を用い IRMA にて測定した。

III. 対象

当ラボラトリーズ職員 81 例 (男性 41 例, 女性 40 例), バセドウ病患者 8 例 (男性 4 例, 女性 4 例), 正常妊婦 40 例を用いた。

IV. 検討内容

1. インキュベーション時間

反応温度を 37°C として, インキュベーション時間を 1, 2, 4, 6 および 24 時間と変化させた時の, FT 標準液ならびにプール血清の B/T% の経時的变化を検討した。

2. 測定精度

2 種類のプール血清を用い, 同時再現性および日差再現性を検討した。

3. アルブミンの測定値に及ぼす影響

アナログ・トレーサーを用いたフリーホルモンの測定系にアルブミンが影響を及ぼす場合がある⁷⁾. そこで, 異なる 4 例の血清にチャコール処理したヒト血清アルブミンを添加し, アルブミンの測定値へ及ぼす影響を検討した。

4. 測定材料の違いが測定値に及ぼす影響

異なる 3 例を用い, 血清, ヘパリン血漿および EDTA 血漿を作成し, 測定材料の違いが測定値

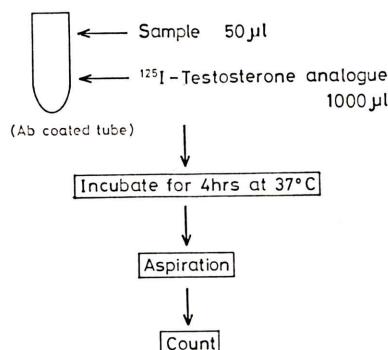


Fig. 1 Assay procedure of DPC free testosterone RIA.

に及ぼす影響を検討した。なお, ヘパリンは血液 1 ml あたり 10 単位, EDTA-2K は 1.2 mg 加えた。

5. フリーテストステロン指数 (FTI) との比較

50 例の血清について, TT と SHBG を測定し, TT/SHBG (FTI) を算出し, RIA による FT 測定値と比較した。

6. 健常成人の FT 値

当ラボラトリーズ職員 81 例 (男性 41 例: 年齢 20 歳~39 歳, 女性 40 例: 年齢 18 歳~42 歳) の FT を測定し, 本キットによる成人の FT 正常値を推定した。

7. バセドウ病患者の TT, SHBG および FT 動態

性腺機能に異常がみられないバセドウ病患者男女 4 例について, TT, SHBG および FT を測定し, その動態を検討した。

8. 正常妊婦の FT 動態

正常妊婦 40 例を妊娠期間をもとに 3 期に分類し, 妊娠期間と FT の関係を検討した。

V. 結果

反応温度を 37°C として, インキュベーション時間と FT 標準液ならびにプール血清の B/T% の関係を検討したところ, B/T% は 4 時間のインキュベーションでほぼプラトーに達していると考えられた (Fig. 2). したがって, 以下の検討ではキット添付指示書に示されている 4 時間のインキュベーションを採用した。

インキュベーション時間を 4 時間とした時の標準曲線を Fig. 3 に示したが, 異なる 4 回の測定における各 FT 標準液の B/T% の変動係数は 1.7~4.4% であり, 毎回安定した標準曲線が得られた。

Table 1 に本キットの測定精度を示した。同時再現性は変動係数 5.2~10.0%, 日差再現性は変動係数 8.4~13.5% であり, FT 測定系としては良好な成績を得た。

アナログ・トレーサーを用いた一抗体固相法フリーホルモン測定系では, トレーサーにアルブミ

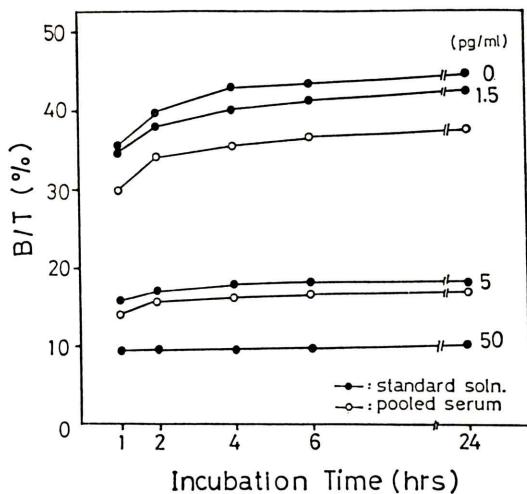


Fig. 2 Effect of incubation time on B/T%.

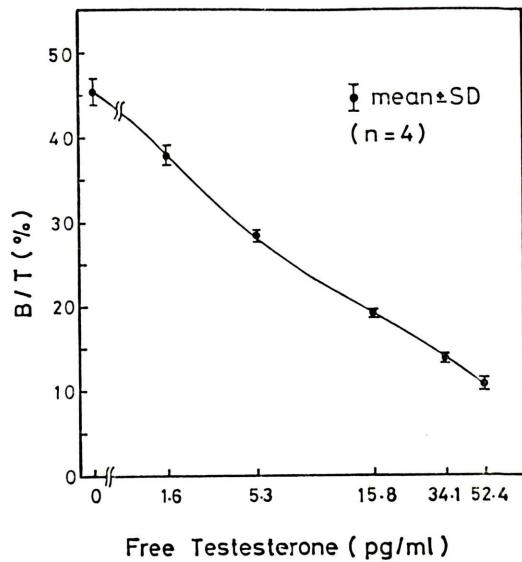


Fig. 3 Standard curve of DPC free testosterone RIA.

Table 1 Reproducibility in DPC free testosterone RIA

No.	Within assay variation			Between assay variation		
	mean ± SD (pg/ml)	CV (%)	n	mean ± SD (pg/ml)	CV (%)	n
1	1.6 ± 0.16	10.0	5	1.7 ± 0.23	13.5	5
2	20.4 ± 1.06	5.2	5	21.0 ± 1.76	8.4	5

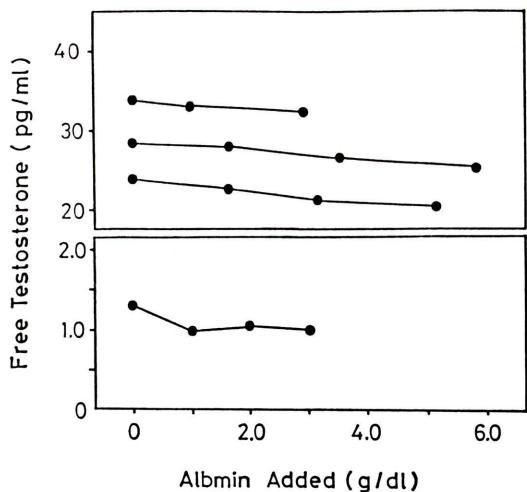


Fig. 4 Influence of albumin on DPC free testosterone RIA.

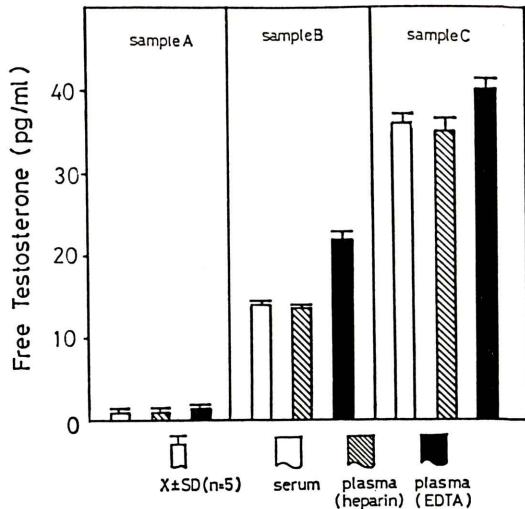


Fig. 5 Effect of anticoagulants.

ンが結合するため、血清へのアルブミン添加に対し、用量反応的に測定値の上昇が見られる場合がある。そこで、本測定系へのアルブミンの影響を検討した。アルブミン添加量の増加とともに、測定値のわずかな低下が見られたが、フリーサイロキシンのRIAで報告されている⁷⁾測定値の上昇は認められなかった(Fig. 4)。

測定材料の違いが測定値に及ぼす影響を検討したところ、Fig. 5に示すごとく血清およびヘパリン血漿のFT値に差は見られなかつたが、EDTA血漿のFT値は3例とも統計学的に有意に高値を示した。

50例の血清を用いTT/SHBGを算出することにより求めたFTIとFT測定値を比較したところ、両者の間には相関係数0.828の有意の正相関を認めた(Fig. 6)。

当ラボラトリーズ男性職員41例の血清FTは、17.2～34.6 pg/mlに対数正規型に分布した。そこで、測定値を対数変換した後、平均値±2×標準偏差範囲を求めたところ17.0～38.0 pg/mlであった。そこで、この値を成人男性の正常値とした。一方、女性職員40例のFTは1.1～5.0 pg/mlに分布した。測定値を対数変換後求めた平均値±2×

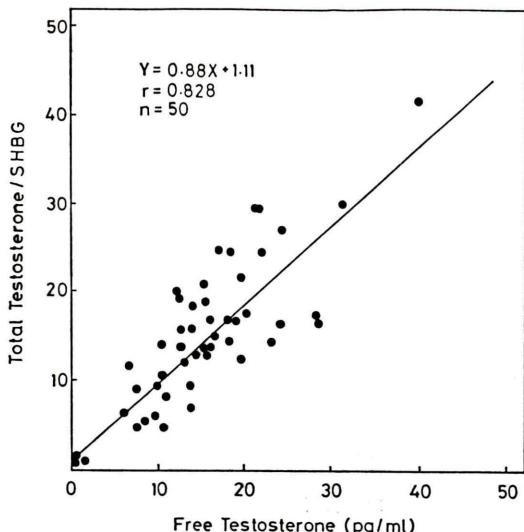


Fig. 6 Correlation between free testosterone values and total testosterone/SHBG ratio.

標準偏差範囲は1.0～5.5 pg/mlであり、この値を成人女性の正常値とした。

性腺機能に異常のみられないバセドウ病患者8例(男女それぞれ4例)のFTはすべて正常値内の値を示したが、TTは女性1例で正常値上限の値を示し、他の7例はすべて高値を示した。また、SHBGは8例すべてが正常値を超える高値を示した(Fig. 7)。

正常妊婦40例を用い妊娠期間とFTの関係を検討したところ、妊娠前期および中期のFTはage matchingした非妊娠のFTと有意差を認めなかつた。しかし、妊娠後期のFTは正常値を超える値を示した例が3例あり、非妊婦群のFTに比較し高値傾向を示した(Fig. 8)。

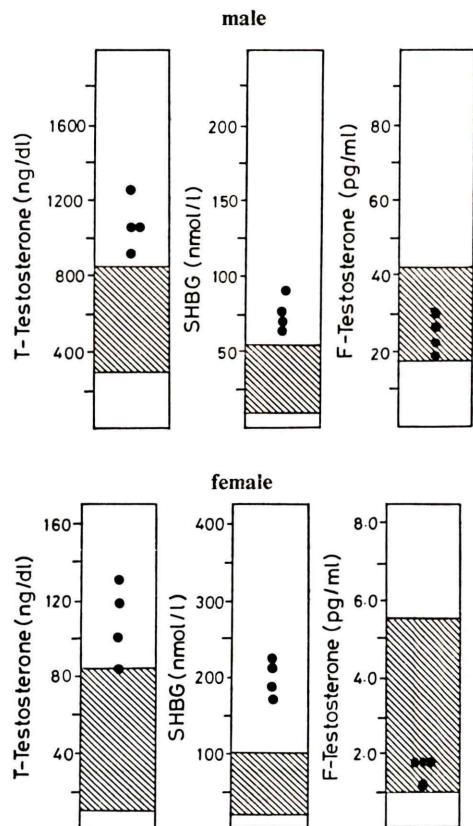


Fig. 7 Serum total (T) testosterone, SHBG and free (F) testosterone levels in patients with Graves' disease.

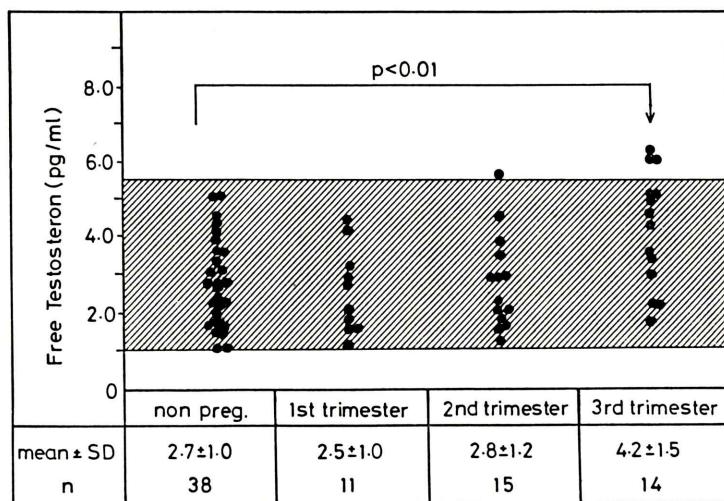


Fig. 8 Changes in serum free testosterone levels during pregnancy.

VI. 考 察

血中テストステロンの測定は、男性の性腺機能の把握などに重要な臨床的意味を持つ。しかし、血中テストステロンの大部分は、SHBG と結合しており、生理活性を示すのは SHBG と結合していない FT であることが知られている。また、現在本邦で広く実施されている TT の測定とは異なり、FT は SHBG の変動による影響を受けず、甲状腺機能亢進症など SHBG に変動が見られる場合でも、十分患者の性腺機能を反映していると考えられる。ところが、FT の測定は操作の煩雑な平衡透析法で行わざるを得ず、その臨床的有用性にもかかわらず、本邦ではほとんど実施されていないのが現状である。これに対し今回、われわれが検討した DPC フリーテストステロンは、FT を直接 RIA で測定するキットであり、煩雑な操作は不要であった。また、インキュベーション時間の FT 標準液およびプール血清の B/T% へ及ぼす影響の検討から本キットを用いることにより、FT をわずか数時間で測定できることも確認された。測定精度は、同時再現性、日差再現性ともにほぼ良好な成績を示し、本キットは十分臨床応用可能と思われた。また、本測定系へのアルブミン

の影響を検討するため、血清へのアルブミン添加実験を行ったところ、アナログ・トレーサーを用いたフリーサイロキシンの RIA で報告が見られる⁷⁾ 测定値の高値化は観察されなかった。このことは、本測定系で用いているアナログ・トレーサーがアルブミンと結合しないことを示しており、その測定値はアルブミンによる artifact な影響は受けていないと考えられた。また、今回の検討では、血清へのアルブミン添加量に用量反応的な FT 測定値の低下が見られたが、これはテストステロンとその結合タンパクの化学平衡により、FT の一部が添加したアルブミンと結合したためと考えられた。測定材料の違いが測定値に及ぼす影響を検討したところ、EDTA 血漿のみ測定値の高値化が見られた。この測定値の高値化はヘパリン血漿では観察されなかった。また、他の抗凝固剤であるクエン酸ナトリウムを用いた血漿でもこの現象は観察されず、逆に血清に EDTA を添加した場合に観察された(データ未提示)。したがって、この FT 測定値の上昇は EDTA に特有のものと考えられるが、その明確な機序は不明である。FTI と本 RIA 系による FT を比較したところ両者には有意の相関が認められた。また、性腺機能正常のバセドウ病患者の FT は正常値内の値を示し

た。これらの成績は、本RIA系によるFT測定値が十分血中FTレベルを反映し、また血中SHBG濃度の変動の影響を受けず患者の血中FTレベルを反映した結果と考えられた。妊娠のFTと妊娠期間の関係を検討したところ、妊娠前期、中期のFTは非妊娠のFTと同一のレベルを示したが、妊娠後期のFTはやや高値を示す例が見られた。この結果は、Bammanらの平衡透析法で妊娠のFTを測定した成績⁸⁾と一致した。彼らは、この理由を、妊娠後期にSHBGの増加によりテストステロン産生が促進されるためであるとしている。しかし、透析法を用いた検討により妊娠のFTは非妊娠のFTに比較し低値を示したとの報告も見られ⁹⁾、今後さらに検討の必要があると考えられた。

VII. 結語

FTを直接RIAで測定できるキット“DPCフリーテストステロン”の基礎的検討を行い下記の結果を得た。

- 1) インキュベーション時間は4時間で十分であり、数時間でFTの測定が可能であった。
- 2) 測定精度はほぼ良好であり、本キットは十分臨床応用可能と思われた。
- 3) アナログ法RIAで報告の見られるアルブミンとアナログ・トレーサーの結合は見られなかった。
- 4) EDTA血漿では、血清および他の抗凝固剤を用いた血漿では見られない測定値の高値化が観察され、測定を実施する際、注意を要すると考えられた。
- 5) FTIと本RIA系によるFT測定値間には有意の正相関を認めた。
- 6) TTおよびSHBG高値を示す性腺機能正常のバセドウ病患者のFTは正常値内の値を示し、本RIA系によるFT測定値はSHBGの影響を受けることなく、患者の性腺機能を反映していると

考えられた。

- 7) 本RIA系における妊娠のFT測定値は、妊娠前中期では非妊娠と同レベルの値を示し後期ではやや高値を示した。

DPCフリーテストステロンRIAキットを提供してくださいました日本DPCコーポレーションに深謝致します。

文献

- 1) Pearlman WH, Crepy O: Steroid-protein interactions with particular reference to testosterone bindings by human serum. *J Biol Chem* **242**: 182, 1967
- 2) Rosner W, Deakins SM: Testosterone-binding Globulins in human plasma: Studies on sex distribution and specificity. *J Clin Invest* **47**: 2109-2116, 1968
- 3) August GP, Tkachuk M, Grumbach MM: Plasma testosterone-binding affinity and testosterone in umbilical cord plasma, late pregnancy, prepubertal children and adults. *J Clin Endocrinol Metab* **29**: 891-899, 1969
- 4) Glass AR, Swerdloff RS, Bray GA, et al: Low serum testosterone and sex-hormone-binding-globulin in massively obese men. *J Clin Endocrinol Metab* **45**: 1211-1219, 1977
- 5) Harman SM, Danner RL: Rapid measurement of an index of testosterone binding to serum binding globulin using ion exchange columns. *J Clin Endocrinol Metab* **45**: 953-959, 1977
- 6) Hammond GL, Nisker JA, Jones LA, et al: Estimation the percentage of free steroid in undiluted serum by centrifugal ultrafiltration dialysis. *J Biol Chem* **225**: 5023-5026, 1980
- 7) Amino N, Nishi K, Nakatani K, et al: Effect of albumin concentration on the assay of serum free thyroxin by equilibrium radioimmunoassay with labeled thyroxin analog (Amerlex free T₄). *Clin Chem* **29**: 321-325, 1983
- 8) Bammann BL, Coulam CB, Jiang N: Total and free testosterone during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* **137**: 293-298, 1980
- 9) 森本勲夫, 和泉元衛, 長瀧重信, 他:透析法によるfree testosteroneの測定. 日内分泌会誌 **60**: 872-880, 1984