



Title	放射免疫測定のためのウシ血漿中エストロゲンの固相抽出法に関する研究
Author(s)	平子, 誠
Citation	北海道大学. 博士(獣医学) 乙第5327号
Issue Date	1998-03-25
DOI	10.11501/3137290
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/51519">http://hdl.handle.net/2115/51519</a>
Type	theses (doctoral)
File Information	000000322480.pdf



[Instructions for use](#)

①

放射免疫測定のための  
ウシ血漿中エストロゲンの  
固相抽出法に関する研究

平子 誠

# 目 次

第1章 緒 論	1
第2章 高速液体クロマトグラフィーによる性ステロイド溶出条件の 検討	3
緒 言	3
材料および方法	3
1. 試料	3
2. 試薬	3
3. 分析装置	3
4. 分析条件	4
5. 溶出方法	4
結 果	4
考 察	4
摘 要	6
第3章 固相抽出法によるウシ血漿中エストロゲンの抽出および分画	7
緒 言	7
材料および方法	7
1. 供試動物および血漿	7
2. 溶媒	8
3. <sup>3</sup> H標識エストロゲン	8
4. ウシ血漿への標識エストロゲンの添加	8
5. 簡易逆相カートリッジ	8
実験1. 簡易逆相カートリッジによるウシ血漿中エストロゲンの抽出	8
1) 活性型エストロゲン (エストロンおよびエストラジオール-17 $\beta$ ) の抽出	8
2) 抱合型エストロゲン (エストロンサルフェート) の抽出	9
実験2. エストロゲンの溶出至適メタノール濃度の検討	9
実験3. 簡易逆相カートリッジによるウシ血漿中エストロゲンの分画	9
1) 活性型エストロゲンの抽出・精製	9
2) 抱合型エストロゲンの抽出・精製	9
結 果	9
実験1. 簡易逆相カートリッジによるウシ血漿中エストロゲンの抽出	9
1) 活性型エストロゲン	9
2) 抱合型エストロゲン	11
実験2. エストロゲンの溶出至適メタノール濃度の検討	11

実験 3. 簡易逆相カートリッジによるウシ血漿中エストロゲンの分画	11
1) 活性型エストロゲン	11
2) 抱合型エストロゲン	11
考察	12
摘要	17
第 4 章 固相抽出法を利用したウシ血漿中エストロゲンの測定	18
緒言	18
材料および方法	18
1. 固相抽出	18
2. RIA	18
1) 標識化合物	18
2) 抗体	18
3) RIA操作	18
実験 1. 放射免疫測定における注入血漿量の影響	19
1) エストラジオール-17 $\beta$ の測定	19
2) エストロンサルフェートの測定	19
実験 2. エストラジオール-17 $\beta$ の測定に及ぼす夾雑物の影響	19
実験 3. 内因性エストラジオール-17 $\beta$ の溶出条件の検討	19
実験 4. 添加回収試験	20
1) エストロン	20
2) エストラジオール-17 $\beta$	20
3) エストロンサルフェート	20
実験 5. 固相抽出と液-液抽出・液体クロマト分配法との相関	20
1) 供試血漿	21
2) 固相抽出法	21
3) 液-液抽出・液体クロマト分配法	21
4) エストラジオール-17 $\beta$ の測定および濃度の比較	21
結果	21
実験 1. 放射免疫測定における注入血漿量の影響	21
1) エストラジオール-17 $\beta$ 濃度	21
2) エストロンサルフェート濃度	23
実験 2. エストラジオール-17 $\beta$ の測定に及ぼす夾雑物の影響	23
実験 3. 内因性エストラジオール-17 $\beta$ の溶出条件の検討	23
実験 4. 添加回収試験	23
実験 5. 固相抽出と液-液抽出・液体クロマト分配法との相関	25
考察	25
摘要	30

第5章 発情周期および妊娠初期におけるウシ末梢血中エストロゲンの動態	31
緒言	31
材料および方法	31
1. 固相抽出	31
2. RIA	31
実験1. 正常発情周期におけるウシ末梢血中エストロゲン濃度の推移	31
実験2. 妊娠初期におけるウシ末梢血中エストロゲン濃度の推移	32
結果	32
実験1. 正常発情周期におけるウシ末梢血中エストロゲン濃度の推移	32
実験2. 妊娠初期におけるウシ末梢血中エストロゲン濃度の推移	32
考察	35
摘要	40
第6章 総括	41
謝辞	43
引用文献	44
英文抄録	49

## 第1章 緒 論

エストロゲンは、雌の生殖において必須の役割を果たすホルモンである。成長過程においては、生殖腺の発育と春機発動の到来、性成熟後は、発情の発現、妊娠の維持および分娩の誘発等に関与している。哺乳動物の発情周期におけるエストロゲンは、脳の弓状核に作用して黄体形成ホルモン (LH) の分泌を抑制するが、末梢血中濃度が増加し、視索前野への刺激が閾値を超えると、性腺刺激ホルモン放出ホルモンを介して下垂体からのLHサージを惹起し、結果的に排卵を誘起する (Kesner et. al., 1981; 玉置ら, 1988)。一方、卵胞の発育とエストロゲン分泌は、黄体から分泌されるプロゲステロンによって抑制される。また、妊娠期のエストロゲンは、水分貯留や体重増加を引き起こす。このように、エストロゲンはあらゆる時期の雌の生殖機能と密接に関係しており、その血中濃度は、雌性動物の生殖機能を反映する指標として極めて重要である。

エストロゲンは、炭素原子を18個含むエストラン骨格を持つステロイドで、その特徴として分子内に芳香環を持ち (加藤・小野内, 1980)、血液中のコレステロールを基質とする一連の性ステロイド合成経路の最終産物として、ゲスターゲンおよびアンドロゲンを経て産成される (Gore-Langton and Armstrong, 1994)。エストロゲンの分子構造は、水酸基の数、二重結合の位置、光学異性等によって多くの種類に分かれており、その幾つかは動物種によって特異的に産生されている (玉置ら, 1988)。しかし、主要なエストロゲンは広く脊椎動物に共通して利用されており、全ての動物種を通じてエストラジオール-17 $\beta$  が最も生物活性が高く、エストロンがそれに次ぐ活性を示す (玉置ら, 1988)。また、エストラン骨格の分子構造は極性が低いため、それを核とするエストロゲンは本来脂溶性で水に難溶である。しかし、哺乳動物のエストロゲンは子宮、肝臓、腸管等の代謝作用により抱合型酸化を受けるため、血液中にはグルクロン酸抱合や硫酸抱合を受けた水溶性の代謝産物も存在している (荒井・加藤, 1977)。

ウシの場合、エストロゲンは主に卵巣と胎盤で産生されるが、卵巣と胎盤ではエストロゲンの主な合成経路が異なるため、その生成様式にも違いが認められる (Gore-Langton and Armstrong, 1994; Solomon, 1994)。卵巣では、成熟過程にある卵胞がエストロゲンの主な産生母体であり、内卵胞膜細胞でコレステロールを前駆物質としてアンドロステンジオンが合成され、顆粒膜細胞でテストステロンを経た芳香化酵素の働きによってエストラジオール-17 $\beta$  に転換される (玉置ら, 1988)。エストラジオール-17 $\beta$  は、脱水素酵素の作用によりエストロンと可逆的に相互変換する (Armstrong and Dorrington, 1979)。一方、胎盤では、アンドロステンジオンからテストステロンを経ずに直接エストロンが合成され、エストラジオール-17 $\beta$  はエストロンから副次的に産生されている (Hoedemaker et. al., 1990; Solomon, 1994)。エストロンの多くは硫酸基を付加されてエストロンサルフェートに転換される (Dwyer and Robertson, 1980)。そのため、発情周期のウシの血液中ではエストラジオール-17 $\beta$  が量的に優位であり、妊娠期にはエストロンとエストロンサルフェートが優位となる (Knickerbocker et. al., 1986)。発情周期における末梢血中エストロゲン、特に、エストラジオール-17 $\beta$  濃度は、卵胞の成熟度合いを示す指標として重要である (Hafez, 1987; 佐藤, 1984)。一方、妊娠期の母体末梢血中エストロゲン、特に、エストロンサルフェートは、胎盤機能を反映する指標

として重要である (Edqvist and Stabenfeldt, 1989; Jainudeen and Hafez, 1987)。

動物やヒトの血液中のエストロゲン濃度の測定は、放射性同位元素、酵素あるいは蛍光物質を標識とする競合免疫測定法によって行われている (Abraham, 1969; Tamamura et al., 1982; De Boever et al., 1986; Sjoblom et al., 1990)。これらの方法はいずれも高い検出感度を有し、ヒトやブタでは、血液を試料として直接エストロゲンの測定を行うことができる (Roda et al., 1986; Thomas et al., 1987)。しかし、ウシはエストロゲンの血中濃度が低く、妊娠後期以外はこれらの方法の測定感度を下回るため、血液を試料として直接エストロゲンを測定することができない。ウシの末梢血中のエストロゲン濃度を測定するためには、エストロゲンを血液から抽出し、濃縮・純化しなければならない。一般的な方法としては、有機溶媒を用いた液-液抽出の後、液体クロマトグラフィーによる精製・純化、あるいは分配脱脂法によって脂肪分を取り除く方法が用いられている (Mikhail et al., 1970; 鳥居・蘭守, 1975; Medina and Schwartz, 1986)。一方、抱合型のエストロゲンは極性が強く水溶性で有機溶媒に移行しないため、単純な液-液抽出法では血液から分離することができない。そのため、加水分解して非抱合型として測定するか、濃縮しないで直接測定する方法が広く用いられている (Holdsworth and Chaplin, 1982; Worsfold et al., 1989)。しかし、これらの方法では高い検出感度が得られないため、妊娠中後期以外のウシの末梢血中の抱合型エストロゲン濃度を測定することができない。ウシの生殖内分泌機構を解明する上で、エストロゲン、特に、抱合型エストロゲンのより簡便な抽出・精製法の開発が望まれている。

固相抽出法は、液体クロマトグラフィーによる分離法を充填済み簡易カラムを使って分取用に簡略化したもので、多くの物質の濃縮や純化に利用されている。特に、極性の違いによって分離を行う逆相分配法は、特殊な緩衝液を調製する必要がなく、分離する物質の分子量に関係なく広い用途に利用できるため、固相抽出法として最も広く利用されている (McDonald, 1991)。ステロイドの抽出に関しても、様々なマトリックスに対して逆相分配法を利用した報告がなされている (Axelson and Sahlberg, 1981; Shackleton, 1986)。しかし、ウシの血液中のステロイドに応用した報告はなく、その有効性は確認されていない。また、固相抽出用の簡易逆相カートリッジを活性型ステロイドの分画にまで利用した報告はない。

ステロイドは水に難溶であるため、血液中では大部分のステロイドが特異的なステロイド結合蛋白質や非特異的なアルブミンなどの血中蛋白質と疎水結合することによって輸送されている。輸送蛋白質の種類やステロイドとの親和性は動物種によって異なっており、固相分配法によって血液中のステロイドを抽出する場合、動物種によってそれぞれ相応しい抽出方法を選ばなければならない。

本研究では、ウシの血漿中エストロゲンの固相抽出法について基礎的な検討を行い、エストロン、エストラジオール- $17\beta$  およびエストロンサルフェートについて、放射免疫測定のための抽出法を確立した。さらに、固相抽出法を応用することにより、正常発情周期および妊娠初期におけるウシの末梢血中エストロンサルフェートの濃度推移を明らかにした。血液中のエストロゲンの簡便で確実な抽出精製法が開発されたことにより、エストロゲンの測定が容易になり、今後のウシの生殖内分泌研究での応用が期待される。

## 第2章 高速液体クロマトグラフィーによる性ステロイド 溶出条件の検討

### 緒言

逆相分配法は、分離能が高く再現性に優れていることに加え、対応できる極性範囲が広く、多数の類似構造物が存在するステロイドの分離手段として優れた方法である。そのため、逆相分配法を利用した高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は、ステロイドの分析に広く用いられている (Heftmann and Hunter, 1979)。エストロゲンの分析に関して、O'Hare et. al. (1976) により逆相カラムによる分画の有効性が示されている。その後、妊娠後期等エストロゲン濃度が高い時期に関しては、定性分析だけでなく、体液中濃度の定量にも応用されるようになった (Dolphin and Pergande, 1977)。一方、エストロゲン濃度の低い時期には、放射免疫測定のための前処理法として逆相HPLCが利用されている (Schöneshöfer and Dulce, 1979)。

エストロゲンが簡易逆相カートリッジに保持されることは、既に幾つかの報告によって明らかにされている (Shackleton and Whitney, 1980; Heikkinen et. al., 1981)。しかし、簡易逆相カラムを用いた際の他の性ステロイドとの分離能およびエストロゲン同士の分離能については調べられていない。そこで本章では、簡易カラムによるステロイドの溶出特性を推定するため、高耐圧逆相カラムを用いたHPLCにより、溶出溶媒としてのメタノールとアセトニトリルの比較および溶媒への酸添加効果の検討を行った。

### 材料および方法

#### 1. 試料

5種類の活性型性ステロイド (エストロン、エストラジオール-17 $\beta$ 、テストステロン、アンドロステンジオンおよびプロゲステロン) および1種類の抱合型性ステロイド (エストロンサルフェート) の分析を行った。エストロン、エストラジオール-17 $\beta$  およびプロゲステロンはSIGMA Chemical (米国) から購入した。テストステロン、アンドロステンジオンおよびエストロンサルフェートは帝国臓器製薬 (東京) 神戸川博士から提供されたものを使用した。各ステロイドは10%のメタノールを含む精製水に溶解し、注入時の濃度は、エストロゲンが100  $\mu$ g/ml、アンドロゲンが10  $\mu$ g/ml、プロゲステロンが20  $\mu$ g/mlとなるように調製した。

#### 2. 試薬

試薬類はすべて和光純薬工業 (大阪) から購入した。送液用精製水は、高速液体クロマトグラフ用蒸留水を用いた。ステロイド溶出用の有機溶媒は、残留農薬試験用メタノール1,000および高速液体クロマトグラフ用アセトニトリルを使用した。溶媒に添加した酸は、蛋白質一次構造分析装置用三フッ化酢酸 (TFA) を用いた。

#### 3. 分析装置

分析用カラムとしてデルタパックC<sub>18</sub> (日本ウォーターズ, 東京) を用いた。送液ポンプとUV検出器はウォーターズの625LCシステムおよび991フォトダイオードアレイ検出器を用い、流路には全てPEEK管を使用した。



## 4. 分析条件

インジェクションループの容量は100  $\mu$ lで、溶媒の流速は毎分1 ml、カラムの温度は30°Cとし、50~70kg/cm<sup>2</sup>の負荷圧力で分析を行った。エストロゲンは波長280nmにおける紫外部吸光度によって検出し、アンドロゲンおよびプロゲステロンは、波長240nmの紫外部吸収によって検出した。

## 5. 溶出方法

逆相カラムに保持されたステロイドは有機溶媒の濃度勾配を利用して溶出させた。試料注入後5分間精製水で流路とカラムを洗浄し、5分後から25分まで有機溶媒濃度を1分当たり5%の割合で直線的に増加させた。有機溶媒はメタノールとアセトニトリルの2種類を使用し、溶媒へのTFA添加の影響についても検討するため、以下に示す4種類の条件で実験を行った。なお、溶媒混合部から検出器までの容量は6.5mlであった。

条件1. 精製水 → メタノール

条件2. 精製水 → アセトニトリル

条件3. 0.1%TFA加精製水 → 0.1%TFA加メタノール

条件4. 0.1%TFA加精製水 → 0.1%TFA加アセトニトリル

## 結 果

6種類の性ステロイドを同時に注入した際の各々の条件における溶出パターンは図1に示した。いずれの場合も少量ではあるが複数の分解産物のピークが確認された。

メタノールを溶出溶媒として用いた場合、エストロンサルフェート、テストステロン、エストロンおよびエストラジオール-17 $\beta$ 、アンドロステンジオン、プロゲステロンの順に溶出し、エストロンとエストラジオール-17 $\beta$ は分離されなかった。それぞれの溶出時点における溶媒中のメタノール濃度は25、59、61、63および70%であった。

アセトニトリルを溶出溶媒として使用した場合、エストロンサルフェート、エストラジオール-17 $\beta$ 、テストステロン、エストロン、アンドロステンジオン、プロゲステロンの順に溶出した。メタノールを溶出溶媒に用いた場合と異なり、エストロンとエストラジオール-17 $\beta$ を分離することができた。それぞれの溶出時点における溶媒中のアセトニトリル濃度は18、41、43、44、45および56%であった。

溶媒にTFAを添加した場合、いずれの溶媒でもエストロンサルフェートの保持時間のみが延長し、他のステロイドの溶出時間に変化は認められなかった。

## 考 察

逆相クロマトグラフィーでは、移動相の極性が小さくなる程溶出力が強まることが知られている(辻, 1978)。本実験では、溶出溶媒としてメタノールとアセトニトリルを用いたが、アセトニトリルはメタノールより極性が低く、カラムに保持されたステロイドはメタノールより低濃度のアセトニトリルで溶出した。しかし、溶媒に対する試料の溶解度は極性だけでなく様々な要因によって変化するため、逆相分配法における分離特性は溶媒と試料双方の性質に依存する(辻, 1978)。本実験の結果では、エストロンサルフェートとプロゲステロンはどちらの溶媒でも他のステロイドと分離できたが、アンドロゲンの分離能はメタノールの方が高く、エストロゲンはアセトニトリルでしか分離できなかった。ま

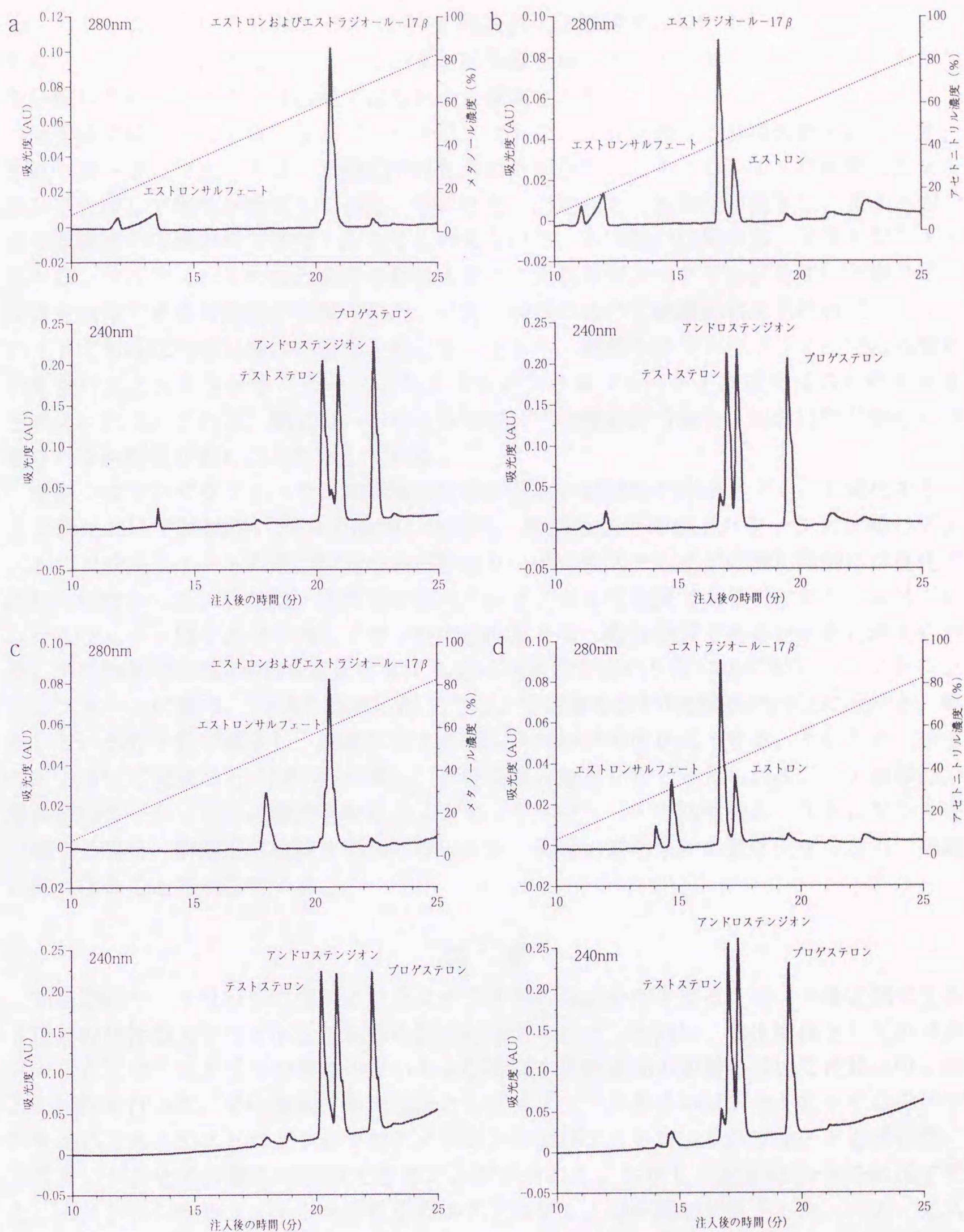


図1. 6種類の性ステロイドの逆相HPLCによる溶出パターン

- a、c：精製水→メタノールのリニアグラジエント
- b、d：精製水→アセトニトリルのリニアグラジエント
- c、d：溶媒に0.1%のTFAを添加

た、エストロゲンとアンドロゲンの分離ではメタノールが優れていた。しかし、簡易逆相カートリッジを用いる分画法では、HPLC程厳密に溶媒濃度の設定を行うことができないため、メタノール、アセトニトリルいずれの溶媒を用いてもエストロゲンとアンドロゲンを分離して回収することは困難ではないかと推察された。

本実験では、エストロンサルフェートはエストロンより低濃度の有機溶媒で溶出した。エストロンサルフェートは、硫酸基が付加された抱合型のエストロンで、活性型のエストロンと比較して極性が強まっている。そのため、固定相との親和性が低下し、エストロンより低濃度の有機溶媒で溶出したものと考えられる。本実験の結果から、エストロンとエストロンサルフェートの溶出条件の差は大きく、簡易逆相カートリッジを用いた場合でも両者を分画できる可能性が示唆された。一方、同様の条件で硫酸抱合を受ければ他のステロイドでもほぼ同様に極性の変化を起こすことから、逆相クロマトグラフィーでは硫酸抱合を受けたエストラジオール-17 $\beta$ もエストロンサルフェートとほぼ同様の挙動を示すと考えられる。これは、簡易カートリッジを用いて分離を行う場合、両者は同じ画分に分画される可能性が高いことを示している。

逆相クロマトグラフィーでは溶離液の組成が変われば試料の溶出パターンも変化する。本実験において移動相にTFAを添加した場合、酸無添加時の溶出パターンと比較してエストロンサルフェートの溶出時間のみが延長し、他の性ステロイドの溶出時間には変化が認められなかった。これは、活性型の性ステロイドが中性物質であるのに対し、エストロンサルフェートはその分子内にイオン性の硫酸基を持つ酸性物質であるためだと考えられる。中性物質は溶媒のpHを変化させてもその疎水性が変化しないのに対し、エストロンサルフェートの場合、TFAを添加したことにより溶媒のpHが硫酸基のpKaに近付き、解離している分子数が減少し、溶媒に対する相対的な極性強度が低下する。そのため、疎水性が上昇して充填剤との親和性が増し、保持時間が延長したと考えられる。この結果は、簡易逆相カートリッジに保持させたエストロンサルフェートと活性型のエストロゲンを分離する場合、溶離液には酸を添加しない方が、両者の溶出条件の差が大きくなり、分離し易くなることを示している。

## 摘 要

簡易逆相カートリッジに保持されたステロイドの溶出条件を探るため、生殖に参与する5種類の活性型ステロイドと1種類の抱合型エストロゲンをを用い、溶出溶媒としてのメタノールとアセトニトリルの特性の違いおよび溶媒への酸添加の影響について逆相HPLCによる検討を行った。その結果、溶出溶媒としてメタノールあるいはアセトニトリルのいずれを用いても、エストロゲンとプロゲステロンおよびエストロンサルフェートと活性型のエストロゲンを分離して回収できることが示された。しかし、溶媒にTFAを添加すると、エストロンサルフェートと活性型のエストロゲンとの分離能が低下した。一方、エストロンとエストラジオール-17 $\beta$ はメタノールで分離されず、アセトニトリルでのみ分離されたが、両者の溶出条件は近似しており、簡易逆相カートリッジによって両者を分離することは困難と思われた。また、エストロゲンとアンドロゲンの溶出条件も近似しており、簡易逆相カートリッジでは、いずれの溶媒を用いても両者の分離は困難ではないかと推察された。

## 第3章 固相抽出法によるウシ血漿中エストロゲンの抽出および分画

### 緒言

前章の実験により、逆相充填剤に保持された性ステロイドはそれぞれ異なる溶出特性を持つことが明らかになった。HPLCによるステロイドの分画法は精度が高く、構造の類似したステロイドを正確に分離することができる。しかし、HPLC装置は試料の並列処理ができないため、試料が多数に上る場合は多くの時間が必要となり、分離後のステロイドの安定性を考慮すれば、相応しい前処理方法とは言えない。一方、簡易カラムは類似したステロイドを分離するには精度が充分ではないが、特殊な装置を使用しないため、一度に多数の検体を処理することができるという利点がある。

簡易逆相カートリッジを用いたエストロゲンの抽出についても既に幾つかの報告がある(Shackleton and Whitney, 1980; Heikkinen et. al., 1981; Ciotti et. al., 1989)。しかし、これらはいずれもヒトの体液を試料としたもので、ウシの血液から性ステロイドを抽出した報告はない。前章の実験からも分かるように、注入する試料や溶離液の性質が異なれば保持および溶出の条件も変化する。また、血漿中には様々なステロイド結合蛋白質が存在しており(Baulieu, 1986)、血漿から直接ステロイドを固相抽出する場合、血漿中のステロイド結合蛋白質の影響についても検討を行う必要がある(Shackleton and Whitney, 1980)。特に、ウシは草食に適化した特殊な生理機構を有するため、血液成分が他の動物と大きく異なっており(Kaneko, 1989a; Kaneko, 1989b)、エストロゲンの固相抽出を行う場合も未知の影響があることが推察される。

本章では、まずウシの血液に含まれるエストロゲンが簡易逆相カートリッジにどの程度保持されるのか確認するため、放射性同位元素を標識したエストロゲンを添加したウシの血漿を用い、逆相カートリッジの各種エストロゲンに対する保持能の検討を行った。それによって、ウシの血漿に含まれる性ステロイド結合蛋白質がエストロゲンの固相抽出に及ぼす影響を捉えることができる。次に、溶離液中の有機溶媒濃度を段階的に上昇させることにより、各々のエストロゲンの至適溶出条件の検討を行った。逆相充填剤にはウシの血液に含まれる様々な物質が保持されるため、溶出条件を限定した方が夾雑物の混入を抑えることができる。そこで、先の実験から得られた成果を基に、溶出溶媒として特定の濃度の有機溶媒を用いてエストロゲンの分画および精製を試みた。

### 材料および方法

#### 1. 供試動物および血漿

供試動物は、農林水産省畜産試験場繋養のホルスタイン種雌ウシを使用した。50mlのポリプロピレン遠心管(国産遠心器, 東京)に凝血防止剤(ノボ・ヘパリン注1,000, ノボ・ノルディスクA/S, デンマーク)50単位を添加し、外径1.8mmの瀉血針(ディスポ採血針, 富士平工業, 東京)を用いて頸静脈より採血した。採血した遠心管は直ちに氷水に浸漬し、採血後30分以内に4℃、1,800xgで遠心分離を行った。遠心開始1時間以上経過した後血漿を分離し、50ml角型試薬瓶(ニプロン化成工業, 豊橋)に分取した。血

漿は実験に供試するまで $-20^{\circ}\text{C}$ あるいは $-35^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。

## 2. 溶媒

有機溶媒は全て和光純薬工業より購入した。標識エストロゲンの保存には高速液体クロマトグラフ用メタノールを、簡易逆相カートリッジの活性化には特級メタノールを用いた。溶出溶媒は、残留農薬試験用メタノール1,000、残留農薬試験用ジエチルエーテル1,000および高速液体クロマトグラフ用アセトンを使用した。精製水は、水道水を活性炭濾過、イオン交換、蒸留し、Milli-Q SP. TOC. Reagent Water System (日本ミリポアリミテッド, 東京) で精製したものをを用いた。

## 3. $^3\text{H}$ 標識エストロゲン

Dupont NEN Research Products (米国) より購入した標識化合物を使用した。活性型エストロゲンとして $[2,4,6,7-^3\text{H}(\text{N})]$ -エストロン ( $4.03\text{TBq}/\text{mmol}$ ) および $[2,4,6,7,16,17-^3\text{H}(\text{N})]$ -エストラジオール- $17\beta$  ( $6.25\text{TBq}/\text{mmol}$ )、抱合型エストロゲンとして $[6,7-^3\text{H}(\text{N})]$ -エストロンサルフェートアンモニウム塩 ( $1.77\text{TBq}/\text{mmol}$ ) を用いた。標識化合物の放射活性の測定は既報 (Hirako et. al., 1992) に従い、液体シンチレーション法で行った。

## 4. ウシ血漿への標識エストロゲンの添加

標識エストロゲンのメタノール溶液を50mlのガラス遠心管 (岩城硝子, 船橋) に分取し、 $45^{\circ}\text{C}$ 、窒素ガス送風下で蒸発乾固させた後、ウシの血漿を添加した。レシプロ振盪器 (SR-I, タイテック, 越谷) を用いて室温、100往復/分で30分間振盪し、さらに、 $4^{\circ}\text{C}$ で一晩静置した。血漿をミキサー (ボルテックスジェニー, MS機器, 大阪) で混和した後、 $4^{\circ}\text{C}$ 、 $1,800\times g$ で30分間遠心し、上澄み部分の血漿を実験に用いた。

## 5. 簡易逆相カートリッジ

固相抽出用の簡易逆相カートリッジは、セップパック $\text{C}_{18}$  (ウォーターズ) を用いた。逆相カートリッジは、まず5mlのメタノールで充填剤を活性化し、5mlの精製水で2回洗浄した後各々の実験に供した。活性化後5mlのプラスチック注射筒をカートリッジに接続してリザーバーとし、クロマトグラフィー用のスタンドに懸架してそれぞれの実験を行った。試料の注入、精製水による洗浄および溶離液による溶出は、いずれの場合も加圧あるいは吸引を行わず、自然落下による条件で分析を行った。カートリッジ通過時の流速はおよそ $0.2\sim 0.5\text{ml}/\text{分}$ であった。ただし、カートリッジと注射筒の接合部に気泡が混入し、溶液の滴下が滞った場合にはピペットで気泡を吸引除去した。

### 実験 1. 簡易逆相カートリッジによるウシ血漿中エストロゲンの抽出

#### 1) 活性型エストロゲン (エストロンおよびエストラジオール- $17\beta$ ) の抽出

ウシの血漿中に含まれる活性型エストロゲンが簡易逆相カートリッジにどの程度保持されるか検討するため、生理的に血液中のエストロゲン濃度が最も高くなる時期に当たる妊娠後期の血漿を試料として用いた。それぞれ分娩3、12、22、34および45日前のウシの血漿に各々 $130\text{Bq}/\text{ml}$  (約 $9\text{pg}/\text{ml}$ ) の $^3\text{H}$ 標識エストロンあるいは $250\text{Bq}/\text{ml}$  (約 $11\text{pg}/\text{ml}$ ) の $^3\text{H}$ 標識エストラジオール- $17\beta$ を添加した。既報 (Hirako et. al., 1992) に従い、5、10あるいは15mlの血漿を逆相カートリッジに注入した後、精製水5mlで2回洗浄し、保持されたエストロゲンを3mlのメタノールで溶出させた。カートリッジはさらにジエチルエーテル3mlで洗浄し、強親和性物質を溶出させた。

## 2) 抱合型エストロゲン (エストロンサルフェート) の抽出

正常な発情周期を営むウシ3頭、妊娠初期1頭 (人工授精後73日)、妊娠中期2頭 (146日および153日) および妊娠後期2頭 (共に204日) の血漿にそれぞれ650Bq/ml (約135pg/ml) の<sup>3</sup>H標識エストロンサルフェートを添加した。5mlの血漿を逆相カートリッジに注入した後、精製水5mlで2回洗浄し、保持されたエストロンサルフェートをメタノール3mlで溶出させた。カートリッジはさらに3mlのアセトンで洗浄し、強親和性物質を溶出させた。

## 実験2. エストロゲンの溶出至適メタノール濃度の検討

実験1で調製した<sup>3</sup>H標識エストロン、エストラジオール-17 $\beta$ およびエストロンサルフェート添加血漿10mlを予め活性化した逆相カートリッジに注入した後、5mlの精製水で2回洗浄し、各々3mlの10、20、30、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90 (V/V) %メタノールおよびメタノール原液を順次注入して<sup>3</sup>H標識エストロゲンの溶出を試みた。

## 実験3. 簡易逆相カートリッジによるウシ血漿中エストロゲンの分画

## 1) 活性型エストロゲンの抽出・精製

生殖周期による血漿中のステロイド結合蛋白質の影響を探るため、エストロゲンと結合する蛋白質の濃度が高くなると考えられる (Lermite and Terqui, 1991) 発情期のウシ血漿を試料として用いた。発情2日前1頭、前日2頭、当日2頭の計5頭のウシから採取した血漿各々50mlに100Bq/ml (約7pg/ml) の<sup>3</sup>H標識エストロンあるいは170Bq/ml (約8pg/ml) の<sup>3</sup>H標識エストラジオール-17 $\beta$ を添加した。血漿5mlを逆相カートリッジに注入した後、精製水5mlで2回洗浄し、3mlの40、70 (V/V) %メタノールおよびメタノール原液で順次カートリッジに保持された血漿成分を溶出させた。メタノールを通過させたカートリッジはさらにジエチルエーテル3mlで洗浄し、強親和性物質を溶出させた。

## 2) 抱合型エストロゲンの抽出・精製

抱合型エストロゲンの抽出は既報 (Hirako et. al., 1996) に従って行った。試料として、正常発情周期、妊娠初期 (74日および86日2頭の混合血)、妊娠中期 (158日) および妊娠後期 (278日) のウシ血漿を用いた。125Bq/ml (約26pg/ml) の<sup>3</sup>H標識エストロンサルフェートをそれぞれ25mlの血漿に添加した。注入する血漿の量によってウシの血漿中に含まれる抱合型エストロゲンの回収成績に影響が現われるかどうかについても検討するため、0.1、1.0および10mlの血漿を簡易逆相カートリッジに注入した。精製水5mlで2回カートリッジを洗浄した後、3mlの40、75 (V/V) %メタノールおよびメタノール原液で順次カートリッジに保持された血漿成分を溶出させた。

なお、それぞれの実験は各検体各容量につき2本ずつ並行して行った。

## 結 果

## 実験1. 簡易逆相カートリッジによるウシ血漿中エストロゲンの抽出

## 1) 活性型エストロゲン

各溶媒中に溶出した<sup>3</sup>H標識エストロンおよびエストラジオール-17 $\beta$ の5頭分の平均回収成績はそれぞれ表1および表2に示した。血漿に添加した標識エストロゲンの大

部分が逆相カートリッジに保持され、添加した標識物質のうち、エストロンの98%以上、エストラジオール-17 $\beta$ の97%以上がメタノール画分に溶出した。エストロン、エストラジオール-17 $\beta$ 共に、各画分における回収成績は、注入した血漿の量に関係なく安定しており、検体によるバラツキも少なかった。

表1. 妊娠末期のウシ血漿に添加した<sup>3</sup>H-標識エストロンの簡易逆相カートリッジを用いた固相抽出法による各溶出画分における回収成績

溶出画分	回収率 (%)		
	5 ml <sup>a)</sup>	10 ml	15 ml
通過血漿-1 <sup>b)</sup>	0.78±0.16 <sup>c)</sup>	0.38±0.07	0.28±0.06
通過血漿-2	—	0.50±0.07	0.35±0.10
通過血漿-3	—	—	0.36±0.06
洗浄水-1	0.17±0.07	0.10±0.02	0.07±0.02
洗浄水-2	0.04±0.03	0.03±0.04	0.04±0.03
メタノール	98.94±0.23	98.92±0.13	98.74±0.21
ジエチルエーテル	0.07±0.02	0.07±0.02	0.16±0.20

a) 注入血漿量

b) 血漿および洗浄水は各画分5 ml、有機溶媒は3 ml

c) 平均±標準偏差 (N=5)

表2. 妊娠末期のウシ血漿に添加した<sup>3</sup>H-標識エストラジオール-17 $\beta$ の簡易逆相カートリッジを用いた固相抽出法による各溶出画分における回収成績

溶出画分	回収率 (%)		
	5 ml <sup>a)</sup>	10 ml	15 ml
通過血漿-1 <sup>b)</sup>	1.06±0.22 <sup>c)</sup>	0.53±0.10	0.36±0.05
通過血漿-2	—	0.75±0.18	0.47±0.06
通過血漿-3	—	—	0.50±0.07
洗浄水-1	0.22±0.08	0.13±0.05	0.10±0.02
洗浄水-2	0.02±0.03	0.04±0.01	0.05±0.01
メタノール	98.62±0.23	98.46±0.32	98.42±0.17
ジエチルエーテル	0.08±0.02	0.08±0.02	0.10±0.02

a) 注入血漿量

b) 血漿および洗浄水は各画分5 ml、有機溶媒は3 ml

c) 平均±標準偏差 (N=5)

## 2) 抱合型エストロゲン

それぞれの溶媒に溶出した平均回収成績は表3に示した。血漿に添加した標識化合物の大部分は逆相カートリッジに保持され、保持されたエストロンサルフェートのうち、97%以上はメタノール画分に溶出した。また、いずれの画分での回収成績にも生殖周期の違いによる変動は認められなかった。

表3. 様々な時期のウシ血漿に添加した<sup>3</sup>H-標識エストロンサルフェートの簡易逆相カートリッジを用いた固相抽出法による各溶出画分における回収成績

試料	非妊娠 (N=3)	妊娠初期 (N=1)	妊娠中期 (N=2)	妊娠後期 (N=2)	平均±標準偏差 (N=8)
通過血漿 a)	0.62 b)	0.55	0.68	0.67	0.64±0.08 c)
洗浄水-1	0.30	0.24	0.23	0.25	0.26±0.06
洗浄水-2	0.43	0.39	0.38	0.47	0.42±0.06
メタノール	98.19	97.19	95.30	97.38	97.14±1.62
アセトン	0.47	1.62	3.41	1.23	1.54±1.66

a) 血漿および洗浄水の各画分は5 ml、有機溶媒は3 ml

b) 実験区毎の頭数(N)の平均回収率 (%)

c) 8頭の血漿を2本ずつ並行して測定した16例の結果から計算した回収率 (%)

## 実験2. エストロゲンの溶出至適メタノール濃度の検討

エストロンおよびエストラジオール-17βの溶出実験結果はそれぞれ図2-1および図2-2に示した。50~70%メタノールまでの画分に添加したエストロゲンの94%が溶出し、特に60および65%メタノール画分では、合計で平均86%のエストロンと83%のエストラジオール-17βが回収された。

溶離液中のメタノール濃度を段階的に上昇させた際のエストロンサルフェートの溶出パターンは図2-3に示した。各個体の生殖周期に関係なく40%メタノールで最大量のエストロンサルフェートが溶出し、30%と40%の合計で平均93%の標識物質が溶出した。

## 実験3. 簡易逆相カートリッジによるウシ血漿中エストロゲンの分画

## 1) 活性型エストロゲン

活性型エストロゲンの平均回収成績は表4に示した。70%メタノール画分にエストロンの92%とエストラジオール-17βの90%が溶出し、カートリッジ毎の回収成績のバラツキも少なく、定量的に回収された。しかし、70%メタノール通過後も一部はカートリッジに保持されたまま残り、メタノール原液で総量の6%のエストロンと7%のエストラジオール-17βが溶出した。

## 2) 抱合型エストロゲン

エストロンサルフェートは、注入血漿量および生殖周期の時期に関係なく40%メタノール画分に最も多く溶出し、75%メタノール以降の画分にはほとんど溶出しなかつ



(表5)。また、注入した血漿量が多くなると各画分における回収成績の偏差が小さくなった。素通り画分での回収率の変動係数は、注入量0.1mlで74%、1mlで51%、10mlで20%であり、40%メタノール画分での変動係数は、注入量0.1mlで6.3%、1mlで2.1%、10mlで1.3%であった。これらの回収成績のバラツキは各カートリッジ毎の差によるもので、個体の違いや生殖周期の違いによる差は認められなかった。

### 考 察

活性型のステロイドは疎水性であるため血液中ではその大部分が担体となる蛋白質と結合して輸送される (Baulieu, 1986)。そのため、血液を対象とする固相抽出では試料のカラム通過速度が早くなると充填剤のステロイド保持能が低下する。しかし、ステロイドと多くの担体蛋白質との結合は非特異的で親和性も低いため、試料を緩慢に通過させれば、血中総量のほとんどを逆相充填剤に保持させることができる。本研究において、ウシの血漿に添加したエストロンは、実験条件に関わらず逆相カートリッジに高率かつ定量的に保持されており、本章で設定した程度の流速であれば、固相への吸着に対する非特異的な結合蛋白質の影響はほとんど排除できると考えられる。

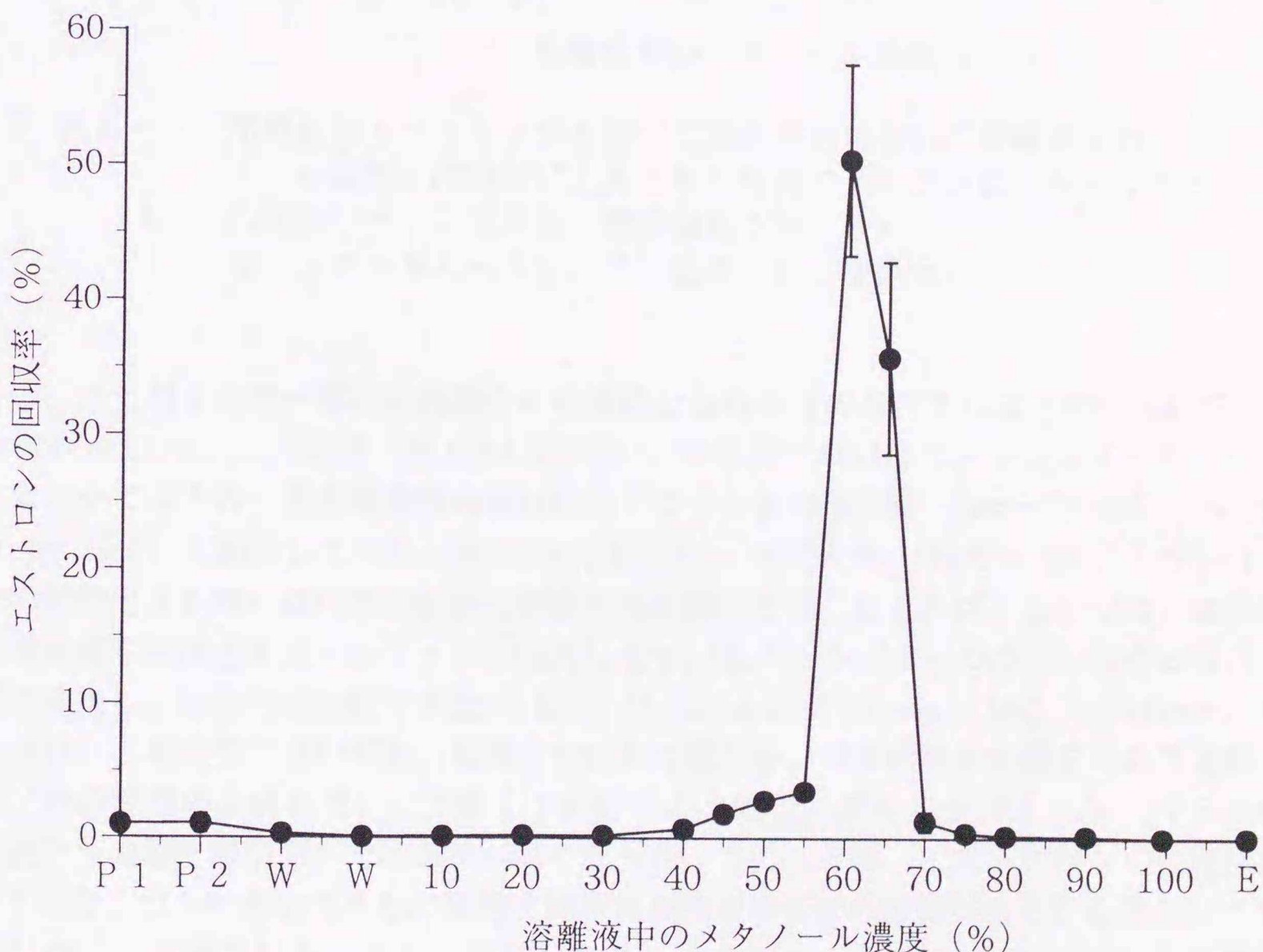


図2-1. 簡易逆相カートリッジを用いた固相抽出において溶離液中のメタノール濃度を段階的に上昇させた時のエストロンの溶出パターン (平均±標準偏差; N=5)  
E: ジエチルエーテル、P: 血漿、W: 洗浄水

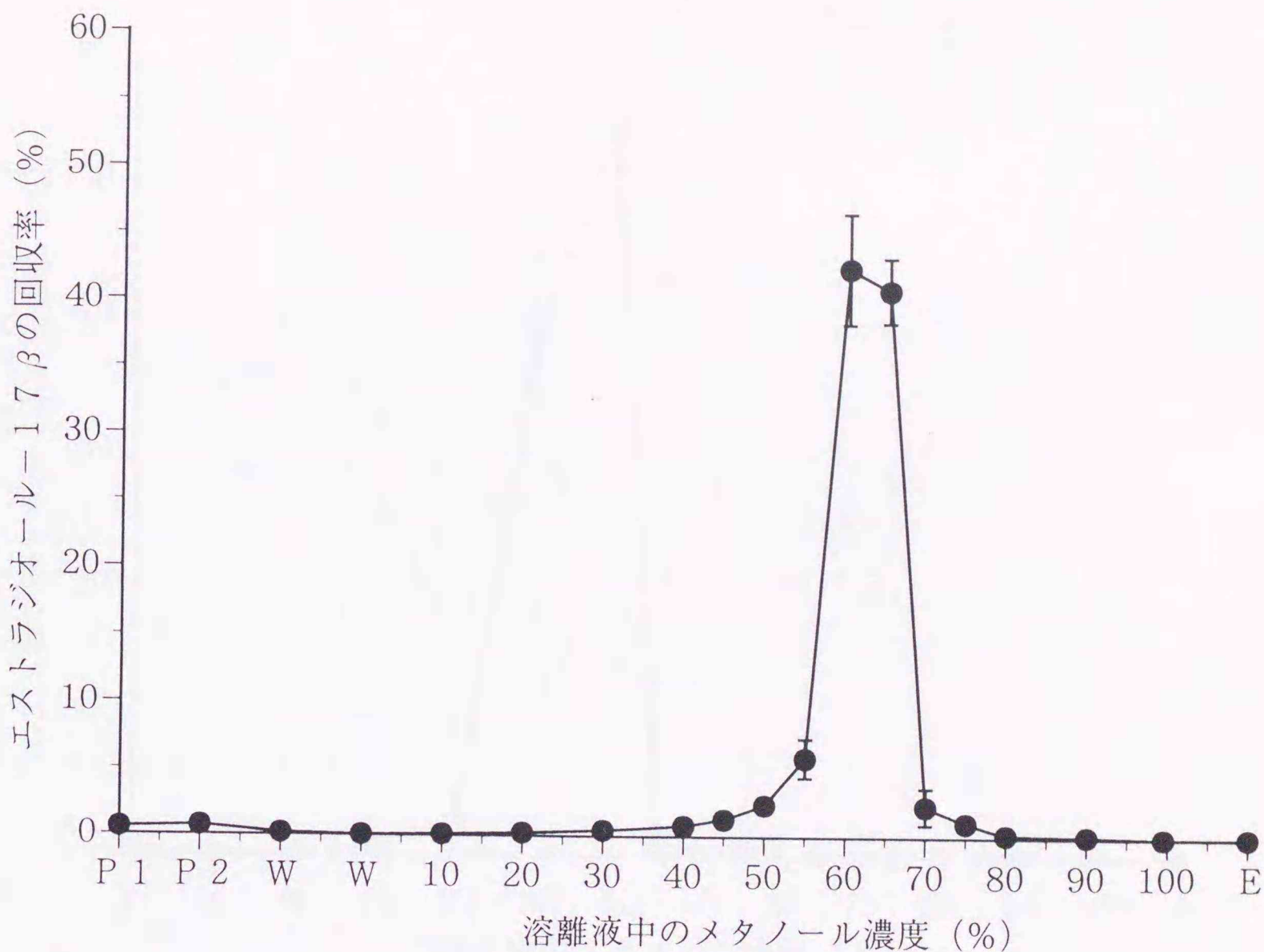


図2-2. 簡易逆相カートリッジを用いた固相抽出において溶離液中のメタノール濃度を段階的に上昇させた時のエストラジオール-17βの溶出パターン (平均±標準偏差; N=5)  
E: ジエチルエーテル、P: 血漿、W: 洗浄水

一方、ステロイドの一部には血液中に特異的な結合物質の存在することが知られている (Rosenbaum et. al., 1966; Baulieu, 1986)。本研究で用いたエストラジオール-17βも、血液中ではその一部が特異性の高い性ステロイド結合蛋白質 (Sex-steroid Binding Protein: SBP) と結合している (Murphy, 1968)。そのため、血液中のエストラジオールを固相抽出する際にはSBPの影響を考慮する必要がある。たとえば、ヒトでは、血漿あるいは血清を直接逆相カートリッジに注入しても、エストラジオールの半分程度が保持されずに通過し、定量的に回収できない (Shackleton and Whitney: 1980; Heikkinen et. al., 1981)。本研究においても、血液中のSBPの量が多い発情前後の血漿を用いた実験3では、妊娠後期の血漿を用いた実験1での結果と比較し、エストラジオール-17βの素通り画分への漏出率が僅かではあるが高くなった。このことは、エストロゲンの固相抽出を行う場合、ウシにおいても他の動物と同様に血液中のSBPの影響があることを示している。しかし、実験3においても、添加したエストラジオール-17βの96%以上が逆相カートリッジに保持されており、その影響は他の動物の場合と違って無視できる程度でしかないと考えられた。ただし、本研究で抽出したエストロゲンは外因性のものであり、結合物質の影響に関しては、内因性のエストロゲンでさらに確認する必要がある。

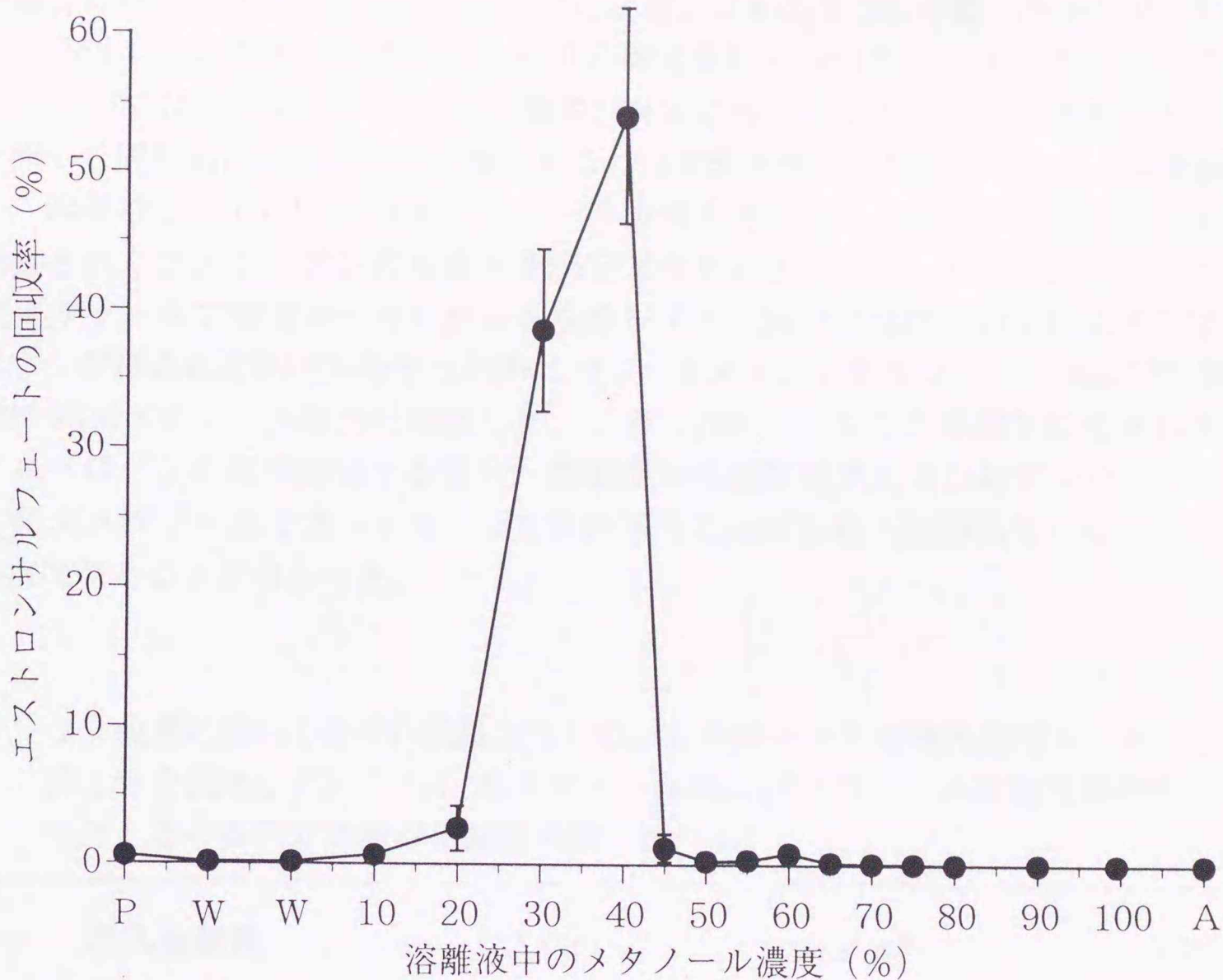


図2-3. 簡易逆相カートリッジを用いた固相抽出において溶離液中のメタノール濃度を段階的に上昇させた時のエストロンサルフェートの溶出パターン (平均±標準偏差; N=8×2)  
A: アセトン、P: 血漿、W: 洗浄水

表4. ウシ血漿に添加した3H-標識エストロゲンを簡易逆相カートリッジに保持させた後40、70 (v/v) %メタノールおよびメタノール原液で段階的に溶出させたときの各画分における回収成績

	エストロン (N=5)	エストラジオール-17β (N=5)
通過血漿 a)	0.97±0.08 b)	1.53±0.09
洗浄水-1	0.19±0.12	0.28±0.04
洗浄水-2	0.01±0.06	0.02±0.03
40%メタノール	1.08±0.03	1.06±0.12
70%メタノール	92.00±1.19	89.94±1.71
メタノール原液	5.73±1.13	7.15±1.72
ジエチルエーテル	0.02±0.01	0.02±0.01

a) 血漿および洗浄水の各画分は5 ml、有機溶媒は3 ml

b) 平均±標準偏差 (%)

実験2の結果、簡易逆相カートリッジによるエストロゲンの分離パターンについても前章でのHPLCによる溶出パターンと同様の傾向が認められた。エストロンとエストラジオール-17 $\beta$ はほぼ同じメタノール濃度の画分に溶出しており、両者を簡易カートリッジを用いた固相抽出法によって分離することは困難と考えられた。しかし、本実験の結果から、溶離液として70~80%のメタノール溶液を用いることにより、逆相カートリッジに保持されたエストロゲンの大部分を回収できることが分かった。また、実験3では、40%メタノールで逆相カートリッジを洗浄しても充填剤に保持されている活性型のエストロゲンがほとんど溶出しなかったのに対し、エストロンサルフェートおよび色素等の夾雑物は40%メタノール画分に溶出した。このことから、ウシの血漿中に含まれる活性型のエストロゲンを固相抽出する場合、高濃度の有機溶媒でエストロゲンを溶出させる前に、40%メタノールでカートリッジを洗浄することにより、洗浄しない場合より純化して回収できることが分かった。

表5. ウシ血漿に添加した<sup>3</sup>H-標識エストロンサルフェートを簡易逆相カートリッジに保持させた後40、75 (V/V) %メタノールおよびメタノール原液で段階的に溶出させたときの各画分における回収成績 (N=8)

注入血漿量	0.1 ml	1.0 ml	10 ml
通過血漿+洗浄水	7.5 $\pm$ 4.6 <sup>a)</sup>	3.3 $\pm$ 1.4	3.4 $\pm$ 0.5
40%メタノール	91.4 $\pm$ 4.8	94.0 $\pm$ 1.6	94.4 $\pm$ 1.1
75%メタノール	1.7 $\pm$ 0.8	2.5 $\pm$ 0.4	2.1 $\pm$ 0.6
メタノール原液	-0.6 $\pm$ 0.3	0.2 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.1

a)平均 $\pm$ 標準偏差 (%)

実験3では、カートリッジを40%メタノールで洗浄した後、70%メタノールで溶出させることにより、逆相充填剤に保持された活性型のエストロゲンを定量的に回収することができた。しかし、実験2の結果では40%メタノール通過後70%メタノールまでの間に添加総量の96%のエストロンと95%のエストラジオール-17 $\beta$ が溶出したのに対し、実験3における両者の回収率はそれより少なかった。回収率が低下した分はカートリッジに保持されたまま残っており、ほとんどはメタノール原液の画分に溶出した。逆相クロマトグラフィーでは、溶離液中の有機溶媒の濃度だけでなく、カラムを通過した溶媒の総量によっても溶出条件が変化する(辻, 1978)。つまり、濃度を段階的に上昇させて溶出させる場合、溶出条件付近での希釈段階数を減らせば、充填剤に保持されている物質が溶出する溶媒濃度は高濃度側に推移する。実験3において、70%メタノール画分の溶出量が実験2での等濃度のメタノールまでの溶出量より減少したのは、実験3で設定した濃度の段数が実験2より少なかったからだと考えられる。これらの結果から、40%メタノールで

カートリッジに保持された不純物を除去した後、より高濃度のメタノールでエストロゲンを溶出させる方法では、溶出溶媒として75%以上のメタノールを用いる方がより高い回収率を期待できると思われた。ただし、メタノール濃度が上がれば充填剤により強固に保持されている脂溶性物質も一緒に溶出するので、回収したエストロゲンの純度は低下することになる。また、本研究では3mlのメタノール溶液を使用した。カートリッジを通過する溶媒の容量が異なれば保持されている物質の溶出パターンも変化するため、溶離液の注入量を変える場合は再度溶媒濃度の検討を行う必要がある。

イオン性物質の場合、逆相充填剤への保持特性はマトリックスのpHに、また、回収溶媒への溶出特性は溶離液のpHに依存する。抱合型のステロイドはその分子内に酸性基を有するため、血漿のpHによって逆相充填剤への保持パターンが変化する。そのため、固相法によって抱合型ステロイドを抽出する際には血漿のpHを調整してからカラムに注入する方法が用いられる (Bradlow, 1968; Bradlow, 1977)。しかし、実験1では、血漿および洗浄液のpHを調節しなくても血漿に添加したエストロンサルフェートの98%が逆相カートリッジに保持されており、このことから、ウシ血漿中のエストロンサルフェートに関しては、注入時に試料のpHを調整しなくても固相抽出できると考えられる。

一方、実験2において、エストロンサルフェートは30%と40%のメタノール画分に分散して回収され、溶離液中のメタノール濃度は活性型のエストロゲンより広範囲に渡っていた。これは、エストロンサルフェートの溶出特性が硫酸基のイオン化の程度に依存しているからだと考えられる。本実験では溶離液のpHを調整していないため、硫酸基のイオン化程度にバラツキが生じ、結果的に溶出範囲が広がったと推察される。前章のHPLCによる分析でも、溶離液に酸を加えない実験区では、実験2での結果と同様に溶出範囲が広がる傾向が認められた。しかし、実験2では血漿に添加したエストロンサルフェートの95%以上が40%までのメタノールで回収されており、このことから、簡易逆相カートリッジに保持されたエストロンサルフェートは、溶離液のpHを調整しなくても、40%以上のメタノールで溶出させることにより、定量的に回収できると考えられる。

また、実験2におけるエストロンサルフェートの溶出結果を見ると、60%メタノールに前後の画分より多くの標識物質の溶出が認められる。この画分はエストロンの溶出画分と一致しており、操作中に硫酸基と解離したエストロンが溶出したものと推察される。エストロンサルフェートは活性型のエストロゲンより化学的に不安定で、実験操作によってはエストロンと硫酸塩とに解離する可能性がある。しかし、本実験において60%メタノール画分に溶出した放射活性は全体の0.8%と極微量であり、この結果は、エストロンサルフェートが一連の固相抽出操作によってほとんど解離せず、抱合物のまま安定的に回収できることを示している。

実験3におけるエストロンサルフェートの回収試験の結果、生殖周期の時期に関わらず1ml以上の血漿を注入すれば、逆相カートリッジに保持されたエストロンサルフェートを40%メタノールで定量的に回収できることが示された。一方、血漿0.1mlを注入した場合、40%メタノールでの回収成績は平均91%と概ね良好であったものの、素通り画分への漏出率が平均7.5%と他の実験区の2倍以上であった。この原因として、試料のカートリッジ通過時の流速の影響が考えられる。血漿は粘稠であるため自然落下条件では洗浄水と比較してカートリッジを通過する際の流速が遅い。本実験では精製水を満たしたカート

リッジに血漿を注入し、血漿注入後直ちに洗浄水を導入した。カートリッジのベッド容量は約1 mlであるため、血漿の注入量が0.1 mlの場合、カートリッジ内の大部分は洗浄水で占められることになる。そのため、0.1 ml注入区では試料の通過速度が他の区より早く、この流速の早さが回収率低下の原因ではないかと考えられる。

### 摘 要

ウシの血漿に添加した活性型および抱合型のエストロゲンが、固相抽出法により抽出・精製できるかどうかを検討した。まず、血漿中のエストロゲンが簡易逆相カートリッジに保持されるかどうか確かめるため、生殖周期の様々な時期にあるウシ血漿に<sup>3</sup>H標識エストロゲンを添加し、注入量を変えて固相抽出による回収試験を行った。次いで、エストロゲンの至適溶出メタノール濃度を調べるため、溶離液中のメタノール濃度を段階的に上昇させ、固相に保持された活性型および抱合型エストロゲンの溶出を試みた。さらに、メタノール濃度の異なる溶離液を段階的に注入することにより、活性型と抱合型のエストロゲンを分離して溶出させることができるかどうか検討した。

その結果、活性型のエストロゲンは、生殖周期の時期や血漿の注入量に関わらず、逆相カートリッジに高率かつ定量的に保持された。エストロンサルフェートは、1 ml以上の血漿を注入すれば、生殖周期の時期に関わらず高率かつ定量的に保持されることが分かった。溶離液中のメタノール濃度を段階的に上昇させた時の溶出パターンは前章でのHPLCの結果と良く一致していた。カートリッジに保持されたエストロゲンを40%と70%のメタノールで段階的に溶出させることにより、エストロンサルフェートは40%メタノールに、エストロンとエストラジオール-17 $\beta$ は70%メタノール画分に溶出した。

これらのことから、簡易逆相カートリッジを用いた固相抽出法によりウシ血漿中のエストロゲンを定量的に抽出できることが確認された。また、簡易逆相カートリッジに保持された活性型および抱合型エストロゲンを分離して回収できることが示された。

## 第4章 固相抽出法を利用したウシ血漿中 エストロゲンの測定

### 緒言

ウシの血液中エストロゲン濃度は低く、高感度の測定法でも多量の血漿からの抽出および濃縮が必要である(百目鬼・中原, 1977)。そのため、抽出方法によっては測定を阻害する夾雑物質も一緒に濃縮される可能性がある(永田ら, 1996)。一般に、ウシの血漿から抽出・濃縮されたエストロゲンの定量は、放射性同位元素、酵素、蛍光物質等を標識とする免疫測定法によって行われる(百目鬼・中原, 1977; Roda et. al., 1986; Sjoblom et. al., 1990)。免疫測定法は、感度が高い反面様々な夾雑物の影響を受け易いので、固相抽出が定量的に行われても抽出物を直接測定に供した時に正確に濃度を測定できるかどうかは分からない(Ciotti et. al., 1989)。

本章では、簡易逆相カートリッジを用いてウシの血液試料から内因性のエストロゲンを固相抽出し、得られた抽出物を直接放射免疫測定法(Radioimmunoassay: RIA)に供し、定量的に濃度を測定できるかどうか検討した。まず、注入血漿量によって測定値に変化があるかどうか調べ、測定に相応しい注入血漿量を決定した。加えて、エストロゲンの測定に影響を及ぼす夾雑物の特性について検討を行うと共に、血液成分が内因性エストロゲンの抽出に及ぼす影響についても検討した。次いで、測定値の信頼性を確かめるため、ウシ血漿に外因性のエストロゲンを添加し、固相抽出およびRIAによる回収試験を行った。さらに、抽出法が確立されているエストラジオール-17 $\beta$ について、信頼性の高い抽出・精製方法である液-液抽出・液体クロマト分配法および固相抽出法により同一試料からの抽出を行い、RIAによって測定された濃度の比較を行った。

### 材料および方法

#### 1. 固相抽出

固相抽出は、セップパックプラスC<sub>18</sub>(ウォーターズ)を用い、カートリッジの活性化および血漿注入後の洗浄は前章と同様の方法で行った。血漿の注入と充填剤に保持されたエストロゲンの溶出は実験毎にそれぞれの方法で行った。

#### 2. RIA

##### 1) 標識化合物

RIA用の標識化合物は前章と同じ物を用い、試験管当たりの添加量は、エストロンとエストラジオール-17 $\beta$ が約350Bq、エストロンサルフェートが約180Bqとした。

##### 2) 抗体

抗エストロン-6-カルボキシメチルオキシム(CMO)-BSAウサギ血清および抗エストラジオール-17 $\beta$ -6-CMO-BSAウサギ血清は帝国臓器製薬(東京)より購入した。抗エストロンサルフェート-6-CMO-BSAウサギ血清は帝国臓器製薬神戸川明博士より供与されたもの(神戸川ら, 1989)を用いた。

##### 3) RIA操作

活性型および抱合型エストロゲンのRIAは、抗原抗体反応を競合法、抗体との結合物

と非結合物の分離をデキストラン被覆活性炭法（中村ら, 1974）で行い、Log-logit曲線（赤木ら, 1974）により濃度を算出した。エストロン、エストラジオール-17 $\beta$ およびエストロンサルフェートのRIAによる測定感度は、それぞれ0.64~4.4、0.25~0.87および2.0~2.7pg/tubeであった。エストロン、エストラジオール-17 $\beta$ およびエストロンサルフェートについて、それぞれ平均濃度13、23および8.4pg/mlの血漿を用いて得られた測定内および測定間変動係数は、それぞれ9.2および14%、7.5および13%、12および18%であった（Hirako et. al., 1996）。

#### 実験1. 放射免疫測定における注入血漿量の影響

ウシの血漿中に含まれるエストラジオール-17 $\beta$ とエストロンサルフェートについて、注入血漿量を変えて固相抽出を行い、抽出物を直接RIAに供することにより、夾雑物の混入による測定への影響の有無を検討した。なお、各試料の抽出および測定は液量毎に2本ずつ並行して行った。

##### 1) エストラジオール-17 $\beta$ の測定

黒毛和種未経産牛6頭およびホルスタイン種経産牛4頭から発情期の血液を採取し、無作為に2頭分ずつ混和した5種類の混合血漿を作成し、予め活性化した簡易逆相カートリッジにそれぞれ1、2、3、4、6および8mlずつ注入した。各試料の抽出および測定は既報（Hirako et. al., 1995）に従って行った。

##### 2) エストロンサルフェートの測定

妊娠初期のホルスタイン種経産牛8頭から採取した血漿を無作為に4頭分ずつ混和して2種類の混合血漿を作成した。一方は、0.5、1、2、4、6、8および10mlをそれぞれ逆相カートリッジに注入し、もう一方は、0.5、1、2、3、4、6および8mlを注入した。また、発情期のホルスタイン種未経産牛の血漿1、2、3、4および5mlもそれぞれ注入した。カートリッジ洗浄後、充填材に保持されたエストロンサルフェートを40%メタノール3mlで溶出させRIAに供した。

#### 実験2. エストラジオール-17 $\beta$ の測定に及ぼす夾雑物の影響

脂溶性のエストラジオール-17 $\beta$ について、固相抽出で得られた抽出物を、さらにジエチルエーテルを用いて液-液抽出することにより、固相抽出で混入するRIAでの測定阻害物質が水溶性か脂溶性かを調べた。発情期の黒毛和種未経産牛5頭から得られた血漿を用い、実験1と同じ方法でエストラジオール-17 $\beta$ の固相抽出を行った。75%メタノール溶出画分を蒸発・乾固させた後、精製水0.2mlを添加し、ジエチルエーテル（試薬特級、和光純薬工業）1.6mlで2回液-液抽出を行った。溶媒の分離は、試験管をドライアイスアルコールに浸漬して水層を凍結させ、エーテル層のみを別の試験管に移して行った。回収した溶媒を45℃、窒素ガス下で蒸発させ、乾固物を測定用緩衝液0.2mlで再溶解してRIAを行った。

#### 実験3. 内因性エストラジオール-17 $\beta$ の溶出条件の検討

実験1の結果から逆相カートリッジに保持された内因性のエストラジオール-17 $\beta$ が40%メタノール画分中に漏出する可能性が疑われたことから、内因性のエストラジオール-17 $\beta$ について、溶出条件の検討を行った。黄体期の黒毛和種1頭、発情期の黒毛和種2頭、発情期のホルスタイン種1頭、妊娠末期（分娩22日前）のホルスタイン種1頭の計5頭の未経産牛から採取した血漿20mlをカートリッジに注入し、前章実験2の方法



に従い、メタノールの段階的な濃度勾配を利用して保持されたエストラジオール-17 $\beta$ を溶出させた。回収した溶媒を60℃、窒素ガス下で蒸発させた後、精製水0.2mlを添加して乾固物を再溶解させた。固相抽出時に混入した水溶性の夾雑物がRIAに及ぼす影響を排除するため、ジエチルエーテル1.5mlで2回エストラジオール-17 $\beta$ の液-液抽出を行った。回収した溶媒を45℃、窒素ガス下で蒸発させ、乾固物を0.2mlの測定用緩衝液で再溶解してRIAに供した。

#### 実験4. 添加回収試験

活性型および抱合型のエストロゲンについて、既定量をウシの血漿に添加し、固相抽出を行った後RIAにより回収量を測定し、本法の結果が正確に血中のエストロゲンの濃度を反映するかどうかを検討した。

##### 1) エストロン

黄体期の黒毛和種未経産牛2頭およびホルスタイン種経産牛2頭から採取した血漿を均等に混和し、エストロン濃度の低い試料を調製した。また、エストロン濃度の高い試料として分娩9日前のホルスタイン種経産牛から採取した血漿を用いた。低エストロン血漿20mlに4、8あるいは16pg/mlのエストロンを添加した。一方、高エストロン血漿6mlには1、2あるいは4ng/mlのエストロンを添加した。予め活性化したカートリッジに低エストロン試料は5ml、高エストロン試料は0.2mlずつ注入した(N=3)。エストロンの溶出は実験1のエストラジオール-17 $\beta$ と同様の方法で行い、測定は既報(Hirako et. al., 1996)に従って行った。

##### 2) エストラジオール-17 $\beta$

黄体期の黒毛和種未経産牛3頭から採取した血漿を均等に混和し、エストラジオール-17 $\beta$ 濃度の低い試料を作成した。また、発情期の黒毛和種未経産牛3頭の血漿を均等混和し、エストラジオール-17 $\beta$ 濃度の高い試料を作成した。各々の血漿15mlに4、8あるいは16pg/mlのエストラジオール-17 $\beta$ を添加し、2mlずつカートリッジに注入した(N=3)。エストラジオール-17 $\beta$ の溶出はエストロンと同じ方法で行い、RIAにより濃度を測定した。

##### 3) エストロンサルフェート

発情期のホルスタイン種経産牛から採取した血漿に10、20および40pg/mlのエストロンサルフェートを添加した。妊娠初期のホルスタイン種経産牛2頭の血漿を均等に混和し、50、100および200pg/mlのエストロンサルフェートを添加した。発情期血漿は2ml(N=4)、妊娠初期血漿は1ml(N=3)ずつカートリッジに注入し、精製水5mlで2回洗浄した。保持されたエストロンサルフェートを40%メタノールで回収し、RIAで濃度を測定した。

それぞれのエストロゲンについて、無添加の血漿の測定値に対する増加量を回収量とし、回収率を計算した。

#### 実験5. 固相抽出と液-液抽出・液体クロマト分配法との相関

エストラジオール-17 $\beta$ について、同一試料を用いて信頼性の高い前処理方法として確立されている液-液抽出・液体クロマト分配法と固相抽出法とを並行して行い、両方の抽出物のRIAによる測定値を比較し、固相抽出法がRIAの前処理法として信頼できるかどうか検討した。

## 1) 供試血漿

発情周期の様々な時期にある黒毛和種未経産牛10頭、褐毛和種経産牛3頭およびホルスタイン種経産牛9頭から採血して得られた血漿、計22検体を試料として用いた。

## 2) 固相抽出法

遠心してフィブリンを除いた血漿5mlを予め活性化した簡易逆相カートリッジに注入し、実験1と同様の方法で溶出させた。

## 3) 液-液抽出・液体クロマト分配法

エストラジオール-17 $\beta$ の液-液抽出は、血漿5mlを用い、百目鬼・中原(1977)の方法に従って行った。また、エストロゲンの分配は牧野(1973)の方法に準じて行った。移動相は、液体クロマトグラフ用ベンゼンおよびメタノール(和光純薬)を体積比で85:15に混合し、1日以上馴染ませた溶媒を脱気して用いた。23G $\times$ 1インチの注射針(テルモ, 東京)を装着し、底栓として濾紙(No.5A, 東洋濾紙, 東京)を挿入した2mlの注射筒(トップ, 東京)をカラム外筒として用い、溶媒で膨潤させた後脱気したゲル(Sephadex LH-20, Pharmacia)2mlを充填した。抽出物を60 $^{\circ}$ C、窒素ガス下で乾固させた後、溶媒0.1mlで再溶解してカラムに注入した。溶媒0.1mlで管壁を洗浄、再度注入した後、溶媒2.3mlを重層し、通過した溶媒を廃棄した。ベッド上の溶媒が無くなった後、溶媒1.7mlを添加し、滴下する溶媒を回収した。抽出および分配による回収率は約70%であった。

4) エストラジオール-17 $\beta$ の測定および濃度の比較

固相抽出および液-液抽出・液体クロマト分配法で回収した溶媒を60 $^{\circ}$ C、窒素ガス下で蒸発乾固させ、測定用緩衝液0.5mlを添加した。良く振盪した後4 $^{\circ}$ Cで一晩静置し、原血漿2mlに相当する0.2mlの再溶解液を測定用試験管に分取し、RIAに供した。抽出は方法毎に各検体2本ずつ重複して行い、RIAでの双方の結果を平均した値を抽出法毎の回収率で補正して濃度を算出し、回帰分析による比較を行った。回収率は、固相抽出法が75%、液-液抽出・液体クロマト分配法が70%として計算した。

## 結 果

## 実験1. 放射免疫測定における注入血漿量の影響

1) エストラジオール-17 $\beta$ 濃度

注入血漿量を変えて測定したエストラジオール-17 $\beta$ 濃度は表6に示した。注入量1mlでは試料毎の変動が大きかったものの、1mlと2mlでの測定値に差は認められなかった。しかし、注入量が2mlを越えると、RIAによる測定値は、血漿量に依存して低下した。2mlでの濃度を基準として1ml注入時を除く5種類の血漿の平均回収率で見ると、注入量と濃度との間に有意な負の相関( $R = -0.98$ ,  $P < 0.001$ )が認められ、注入量が1ml増加する毎に約10%ずつ見かけの濃度が低下した(図3)。

40%メタノール回収画分を用いて測定したエストラジオール-17 $\beta$ 濃度は表7に示した。40%メタノールでは75%での測定値に対して、注入量1、2、3、4、6および8ml毎にそれぞれ $27.0 \pm 7.9$ 、 $21.2 \pm 4.7$ 、 $20.7 \pm 5.9$ 、 $18.7 \pm 4.0$ 、 $21.8 \pm 4.4$ および $27.7 \pm 5.8\%$ (平均 $\pm$ 標準偏差)のエストラジオール-17 $\beta$ が回収された。一方、メタノール原液回収画分中にはほとんどエストラジオール-17 $\beta$ が検出されなかった。

表6. 注入血漿量がエストラジオール-17βの測定値に及ぼす影響<sup>a)</sup>  
40(v/v)%メタノールで洗浄し、75(v/v)%で溶出させた場合

注入血漿量 (ml)	エストラジオール-17β濃度 (pg/ml)				
	血漿 1 <sup>b)</sup>	血漿 2	血漿 3	血漿 4	血漿 5
1	9.4	11.2	27.0	15.3	15.3
2	12.2	11.8	25.2	13.5	13.3
3	11.1	10.0	24.4	11.3	12.2
4	10.7	10.1	20.1	11.4	11.1
6	8.2	6.8	13.9	9.0	8.3
8	5.7	4.7	9.5	6.4	5.8

a) ウシ血漿をカートリッジに注入し、3 mlの40(v/v)%メタノールで洗浄した後、3 mlの75(v/v)%メタノール溶出画分を乾固し、RIAで測定

b) 血漿は全て発情期のウシから採取

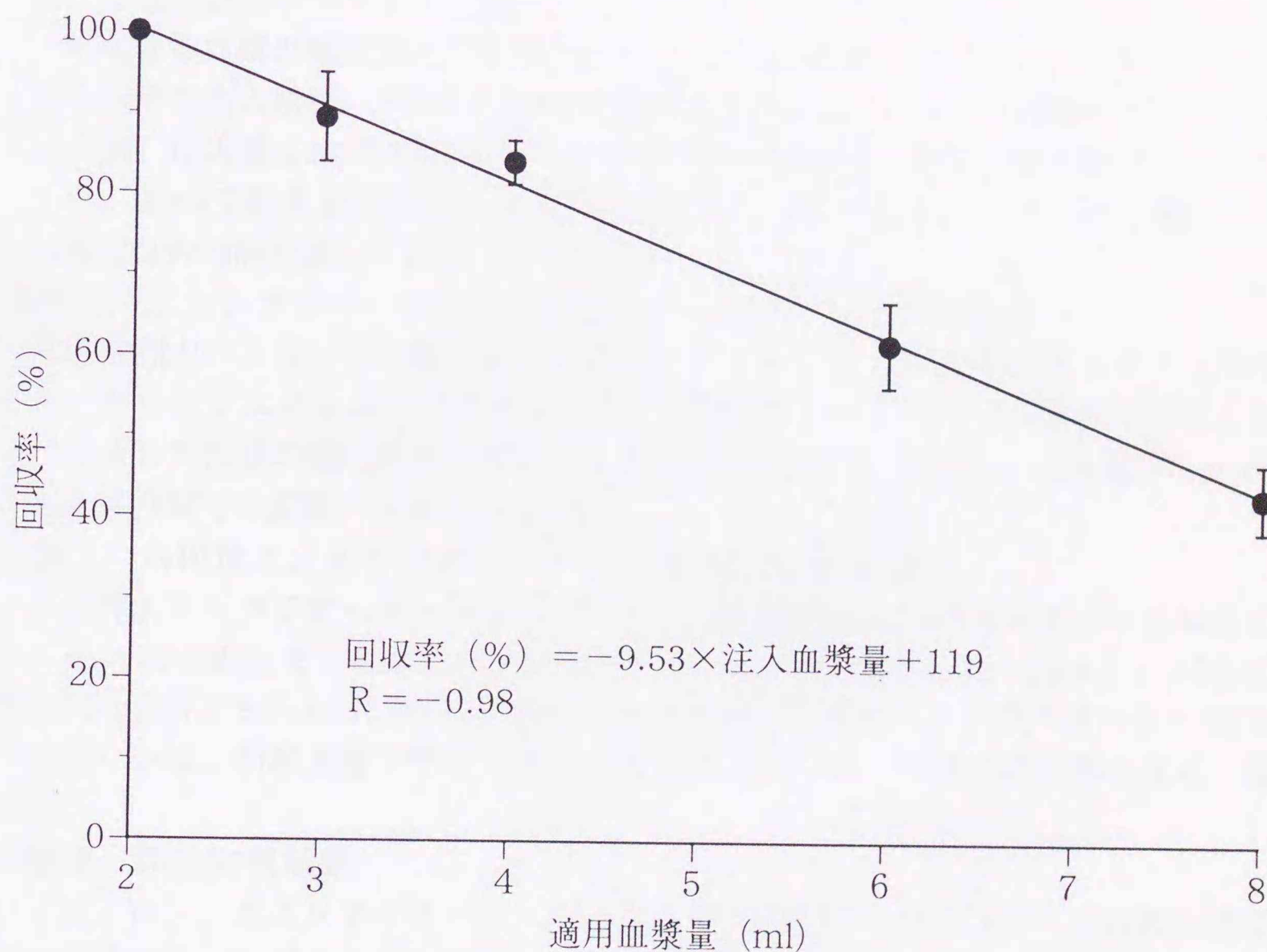


図3. 固相抽出物から直接RIAでエストラジオール-17βを測定した場合に  
注入量2 mlで測定した濃度を100%とした時の注入血漿量と濃度との  
関係 (平均±標準偏差; N=5)

表7. 注入血漿量がエストラジオール-17 $\beta$ の測定値に及ぼす影響<sup>a)</sup>  
40(v/v)%メタノールで溶出させた場合

注入血漿量 (ml)	エストラジオール-17 $\beta$ 濃度 (pg/ml)				
	血漿 1 <sup>b)</sup>	血漿 2	血漿 3	血漿 4	血漿 5
1	3.3	3.8	4.2	4.1	3.6
2	2.3	2.9	3.5	3.3	3.2
3	2.3	2.6	2.7	2.8	2.7
4	2.1	2.1	2.3	2.3	2.4
6	1.8	1.9	2.1	2.0	1.8
8	1.6	1.8	2.0	1.7	1.6

a) 種々の量のウシ血漿をカートリッジに注入し、精製水で洗浄した後3mlの40(v/v)%メタノールで溶出させた画分を乾固し、RIAで測定

b) 血漿は全て発情期のウシから採取

## 2) エストロンサルフェート濃度

注入する血漿の量を変えて固相抽出を行い、RIAによりエストロンサルフェートを測定した時の注入量毎に計算した血漿中の濃度は表8に示した。3検体いずれの試料においても、注入量2mlまでは注入する血漿の量に関係なく概ね一定の濃度を示した。しかし、2mlを越えると血漿の注入量に依存して濃度が低下し、注入量と濃度との間に有意な負の相関が認められた ( $R < -0.95$ ,  $P < 0.01$ )。

## 実験2. エストラジオール-17 $\beta$ の測定に及ぼす夾雑物の影響

簡易逆相カートリッジに保持させたエストラジオール-17 $\beta$ を75%メタノールで溶出させ、さらにジエチルエーテルによる液-液抽出を行ったところ、RIAで測定した濃度は、注入した血漿の量に関わらず安定していた(表9)。ただし、注入量が2ml以下になると試料間での変動が大きくなった。

## 実験3. 内因性エストラジオール-17 $\beta$ の溶出条件の検討

内因性エストラジオール-17 $\beta$ の75.1 $\pm$ 9.3%が60および65%メタノール画分に溶出し、45~70%画分までの間に回収総量の91.2 $\pm$ 5.1%が溶出した(図4)。40%以下の画分には合計でも6.3 $\pm$ 3.5%しか溶出しなかった。内因性エストラジオール-17 $\beta$ の溶出パターンは、前章実験2での外因性エストラジオール-17 $\beta$ での結果と良く一致していた。

## 実験4. 添加回収試験

エストロン、エストラジオール-17 $\beta$ およびエストロンサルフェートの添加回収成績はそれぞれ表10、11および12に示した。低濃度のエストロンを含む血漿に一定量のエストロンを添加した場合の回収率は平均81%で、高濃度試料は74%であった。各試料内での回収率の変動は小さく、測定値は安定していた。エストラジオール-17 $\beta$ では低濃度の平均が77%で、高濃度が78%であり、各試料内および添加量間での変動が小さく、安

定した回収成績を示した。エストロンサルフェートは低濃度の平均が101%、高濃度では87%であったが、各々の測定値間での変動が大きかった。

表8. 注入血漿量がエストロンサルフェートの測定値に及ぼす影響<sup>a)</sup>

注入血漿量 (ml)	エストロンサルフェート濃度 (pg/ml)		
	血漿 1 <sup>b)</sup>	血漿 2 <sup>b)</sup>	血漿 3 <sup>c)</sup>
Water blank	0.0	0.0	0.0
0.5	123.3	41.0	-
1.0	126.4	39.0	6.7
2.0	125.4	41.7	6.4
3.0	33.3	3.0	-
4.0	89.6	28.4	0.6
5.0	-	-	0.2
6.0	53.8	16.1	-
8.0	29.4	8.9	-
10.0	20.3	-	-

a) 注入血漿量を変えてエストロンサルフェートの固相抽出を行い、3mlの40(v/v)%メタノールで溶出させた後抽出物を乾固し、RIAで測定

b) 妊娠初期のウシから採取

c) 発情期のウシから採取

- : 未実施区

表9. 固相抽出法と液-液抽出法とを組み合わせた場合のRIAによるエストラジオール-17 $\beta$ の測定値<sup>a)</sup>

注入血漿量 (ml)	エストラジオール-17 $\beta$ 濃度 (pg/ml)				
	血漿 1 <sup>b)</sup>	血漿 2	血漿 3	血漿 4	血漿 5
1	5.1	5.4	8.5	6.7	10.8
2	7.5	7.1	7.8	7.5	11.0
3	7.4	11.9	7.6	7.7	10.9
4	8.2	11.8	8.4	8.5	11.2
6	7.7	11.3	8.0	8.3	11.5
8	6.3	11.2	7.7	8.3	11.0

a) ウシ血漿をカートリッジに注入し、40(v/v)%メタノール3mlで洗浄、75(v/v)%メタノール3mlで溶出、乾固物を精製水0.2mlで再溶解し、ジエチルエーテル1.6mlで2回抽出、RIAで測定

b) 血漿は全て発情期のウシから採取

## 実験5. 固相抽出と液-液抽出・液体クロマト分配法との相関

ウシの血漿から固相抽出法および液-液抽出・液体クロマト分配法によって得られた抽出物を用い、RIAで測定したエストラジオール-17 $\beta$ 濃度について比較したところ、両者の相関 ( $R=0.99$ ,  $P<0.0001$ ) は非常に良好であり、液-液抽出・液体クロマト分配法で得られた濃度に対する固相抽出後の測定値の回帰係数は1.07 ( $P<0.0001$ )、回帰定数は $-0.76\text{pg/ml}$ であった (図5)。

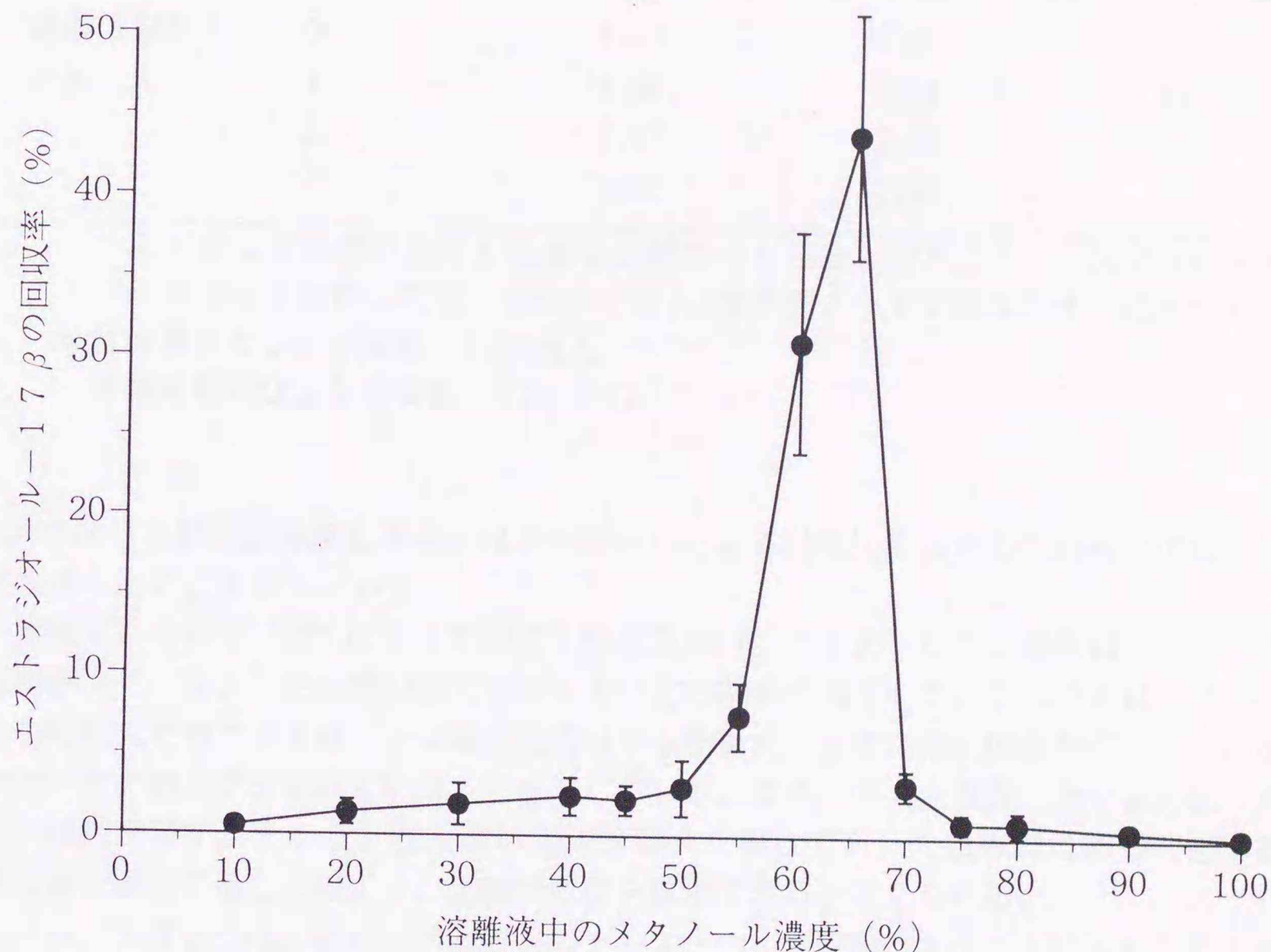


図4. 簡易逆相カートリッジを用いた固相抽出において溶離液中のメタノール濃度を段階的に上昇させた時の内因性エストラジオール-17 $\beta$ の溶出パターン (平均 $\pm$ 標準偏差;  $N=5$ )

## 考 察

実験1の結果から、注入する血漿の量が2 ml以下であれば、固相抽出物を直接RIAに供することにより、ウシ血漿中のエストロゲン濃度を定量的に測定できる可能性が示された。一方、注入した血漿の量が2 mlを越えた場合、RIAによって測定したエストロゲンの血中濃度が低下した。前章での結果から、注入血漿量が増加しても固相抽出におけるエストロゲンの回収率は低下しないことが分かっており、実験1におけるエストロゲン濃度の減少は、抽出物中に含まれていたエストロゲンの実量が少なかったからではないと考えられる。これは、固相抽出時にそれぞれのエストロゲンの回収画分に溶出する夾雑物が、

表10. 固相抽出法によるエストロンのウシ血漿への添加回収試験成績<sup>a)</sup>

	添加量	測定値	回収量	回収率(%)
低濃度試料 <sup>b)</sup> (pg/ml)	0	0.65	0.00	—
	4	3.89	3.24	81
	8	7.91	7.26	91
	16	11.91	11.26	70
高濃度試料 <sup>c)</sup> (ng/ml)	0	1.08	0.00	—
	1	1.89	0.81	81
	2	2.47	1.39	69
	4	4.00	2.92	73

a) エストロンを添加したウシ血漿を逆相カートリッジに注入し、40(v/v)%メタノール3mlで洗浄した後、3mlの75(v/v)%メタノールで溶出させ、RIAで測定

b) 黄体期のウシから採取、5ml注入

c) 妊娠末期のウシから採取、0.2ml注入

RIAにおける抗原抗体反応あるいはチャコールによる吸着反応に対して何らかの阻害作用を及ぼしたことを示している。

実験1において、RIAによって測定された見かけ上のエストロゲン濃度は、試料の違いに関係なく、注入した血漿の量に依存して一定の割合で低下した。このことは、固相抽出物中に混入するエストロゲンの測定を阻害する物質が、生殖周期に関係なく、ウシの血漿中に一定の割合で含まれていることを示している。また、注入血漿量と測定値の低下とは高い相関を示すことから、注入量が2mlを越えた場合でも、血漿の量に応じた低下率で測定値を補正することにより、正確な濃度を算出できると考えられる。

一方、実験2では、固相抽出物をジエチルエーテルで再抽出することにより、注入血漿量に関わらず一定の測定値を示し、実験1で観察された注入血漿量に依存した濃度の低下は認められなかった。液-液抽出法では、水溶性の成分が排除されるものの、ステロイドだけでなく全ての脂溶性物質が抽出溶媒中に移行する。その中にはステロイドの抗原抗体反応を阻害する物質も含まれており、免疫反応を利用した定量法による測定値に影響を及ぼすことが知られている(永田ら, 1996)。実験2の結果は、RIAによるエストロゲンの測定を阻害する固相抽出の夾雑物が水溶性であること、また、固相抽出法によってRIAの反応を阻害するほとんどの脂溶性物質が除去されていたことを示している。これらのことから、固相抽出法と液-液抽出法とを組み合わせた2段階抽出法は、水溶性・脂溶性いずれの免疫反応阻害物質も取り除くことが可能であり、ウシ血中の活性型エストロゲンを免疫測定法によって定量するための前処理法として優れた方法であると考えられる。

実験1の内因性エストラジオール-17 $\beta$ の抽出では、注入量によって変動が認められたものの、測定総量の約20%が40%メタノール画分で、約80%が75%メタノール画分で回収された。本実験における40%メタノール画分での相対的な回収率は、標識物質を用

表11. 固相抽出法によるエストラジオール-17 $\beta$ のウシ血漿への添加回収試験成績<sup>a)</sup>

	添加量 (pg/ml)	測定値 (pg/ml)	回収量 (pg/ml)	回収率 (%)
低濃度試料 <sup>b)</sup>	0	2.5	0.0	—
	4	5.4	2.9	72
	8	8.8	6.3	78
	16	15.7	13.2	82
高濃度試料 <sup>c)</sup>	0	8.1	0.0	—
	4	11.6	3.5	87
	8	14.0	5.8	73
	16	20.6	12.4	78

a) エストラジオール-17 $\beta$ を添加したウシ血漿を簡易逆相カートリッジに注入し、40(v/v)%メタノール3 mlで洗浄した後、3 mlの75(v/v)%メタノールで溶出させ、RIAで測定

b) 黄体期のウシから採取、2 ml注入

c) 発情期のウシから採取、2 ml注入

いて得られた前章での回収成績と比較して大幅に増加しており、この結果は、内因性と外因性のエストラジオール-17 $\beta$ では溶離条件が異なる可能性のあることを示している。そこで、実験3において、ウシの血漿中に含まれる内因性のエストラジオール-17 $\beta$ を固相抽出し、溶離液のメタノール濃度を順次上昇させて溶出を試みたところ、大部分のエストラジオール-17 $\beta$ は60および65%のメタノール画分に溶出し、40%以下の画分には回収総量の6%しか溶出しなかった。このことは、実験1で得られた40%メタノール回収画分におけるエストラジオール-17 $\beta$ 濃度は見かけ上の値であり、正しい血中濃度を反映していなかったことを示している。また、実験3では、ウシの血漿から固相抽出によって得られたエストラジオール-17 $\beta$ について、ジエチルエーテルで液-液抽出を行い、水溶性の夾雑物を排除してからRIAによる測定を行った。このことから、実験1における40%メタノール溶出画分での測定値が高かったのは、75%メタノール回収画分における注入血漿量に依存した見かけ上の濃度の低下と同様に、水溶性夾雑物がRIAの反応に影響を及ぼしたことによって生じたものと考えられる。

実験1において、75%メタノール溶出画分では注入血漿量に依存した濃度低下のみが認められたのに対し、40%メタノール画分では注入量に依存した濃度低下も認められたものの、当初の濃度自体が高く測定されていた。その原因の1つとして抱合型のエストラジオール-17 $\beta$ の溶出が考えられる。抱合型のエストロゲンは液-液抽出の際エーテル層に移行しないため、実験3の測定試料中には含まれていなかったと考えられるが、実験1の40%メタノール回収画分には含まれていたはずである。本研究に用いた抗体の抱合型エストロゲンに対する交差反応性は調べられていないが、抱合型と活性型のエストラジ



表12. エストロンサルフェートのウシ血漿への添加回収試験成績<sup>a)</sup>

添加量 (pg/ml)	測定値 (pg/ml)	回収量 (pg/ml)	回収率 (%)
0 <sup>b)</sup>	9.6	0.0	—
10	21.0	11.4	114
20	26.7	17.1	86
40	50.2	40.6	102
0 <sup>c)</sup>	172	0	—
50	211	39	78
100	256	84	84
200	370	198	99

a) ウシ血漿にエストロンサルフェートを添加した後固相抽出を行い、3 mlの40(v/v)%メタノールで溶出させ、RIAで測定

b) 発情期のウシから採取、2 ml注入

c) 妊娠初期のウシから採取、1 ml注入

オール-17 $\beta$ とはエストラン骨格部分が全く同じ構造なので、高い交差反応性を示すと考えられる。これらのことから、実験1では、40%メタノール画分に溶出した抱合型のエストラジオール-17 $\beta$ を測定していた可能性が考えられる。ウシの血中における抱合型のエストラジオール-17 $\beta$ の動態についてはほとんど分かっていないが、本法を用いることによりその動態を解明できるかもしれない。

エストロンの添加回収試験において、低濃度のエストロンを含む試料の場合、5 mlの血漿を注入したにも関わらず、平均80%以上の高い回収率が得られた。実験1でのエストラジオール-17 $\beta$ の測定では、注入量が5 mlの場合、2 mlの時と比較して約30%の濃度低下が観測された。エストロンでは注入量を変えた実験を行っていないが、これらの結果から、エストロンのRIAはエストラジオールよりも抽出時に混入する測定阻害物質の影響を受け難いのではないかと推察される。一方、高濃度のエストロンを含むウシ血漿にエストロンを添加した場合、回収率は低濃度試料の時よりも若干低下した。本実験における高濃度試料の注入量は0.2 mlであったことから、前章におけるエストロンサルフェートでの結果と同様に注入量が少な過ぎたため、カートリッジの通過速度が増し、抽出での回収率が低下したと考えられる。

エストラジオール-17 $\beta$ の添加回収試験では、低濃度・高濃度試料共に安定した回収成績を示した。これは、エストラジオール-17 $\beta$ の黄体期と発情期の濃度差が黄体期と妊娠期のエストロンの差より少なく、両試料の注入量も同じだったからだと考えられる。しかし、エストラジオール-17 $\beta$ の回収率は75%を若干上回る程度で、前章で得られた抽出のみの回収率より約15%低下した。また、測定精度を算出するために既知量のエストラジオール-17 $\beta$ を含む血漿の濃度を繰り返し測定したところ、その回収率は約75%で、本実験での回収成績とほぼ一致していた。これらのことは、注入量が2 mlの場合でも、RIAに対して測定阻害物質の影響が現われることを示している。しかし、測定の精度

を考慮すれば、エストラジオール-17 $\beta$ の回収率は充分安定しており、抽出および測定双方の要因を加味したエストラジオール-17 $\beta$ の回収率を75%とすることにより正確な濃度の算定が可能と考えられた。

エストロンサルフェートの回収率は、低濃度試料で約100%、高濃度試料で約90%であったが、いずれの場合も各試料内での変動が大きかった。本実験で使用した<sup>3</sup>H標識エストロンサルフェートの放射活性はエストロンの1/2、エストラジオール-17 $\beta$ の1/3であった。そのため、エストロンサルフェートのRIAの感度および同濃度での精度は他のエストロゲンより劣っており、結果的に測定値の変動が大きくなったと考えられる。しかし、前章の結果からエストロンサルフェートの抽出での回収率は90%を若干上回る程度であり、今回の結果から、エストロンサルフェートのRIAでは、抽出時に混入した測定阻害物質の影響はほとんど無かったと考えられる。

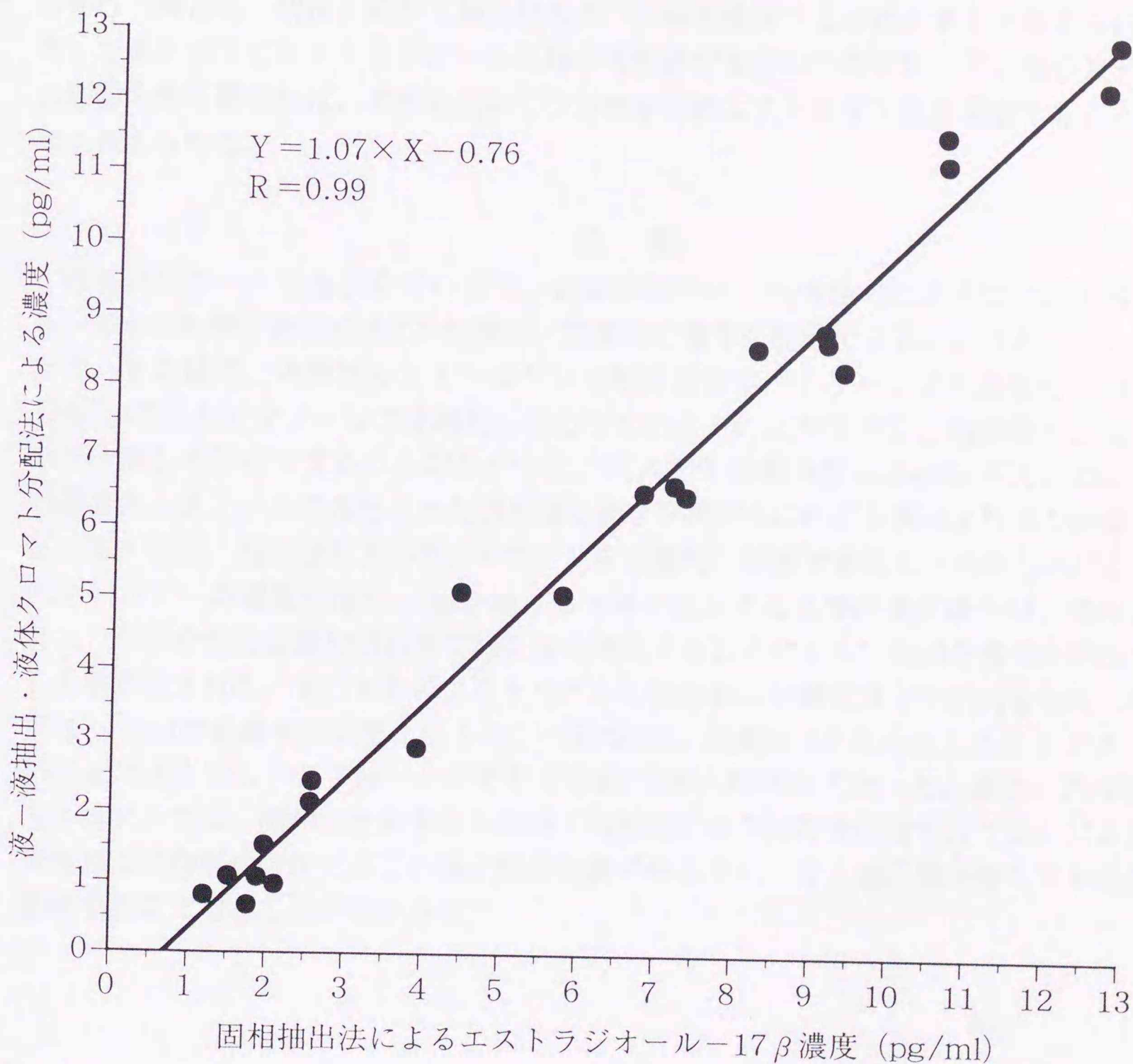


図5. ウシの血漿から固相抽出および液-液抽出・液体クロマト分配法によって得られた抽出物を用いてRIAで測定したエストラジオール-17 $\beta$ 濃度の相関 (N=22)

実験5の結果は、固相抽出法がウシ血漿中のエストラジオール-17 $\beta$ を測定するための前処理法として、液-液抽出・液体クロマト分配法同様に信頼性が高いことを示している。加えて、本法は既存の方法と比較して操作手順が単純であり、ウシの血中エストロゲン測定の前処理法として利用価値の高い方法であると考えられる。ただし、液-液抽出・液体クロマト分配法ではエストロンとエストラジオール-17 $\beta$ を分離して回収することができるが、固相抽出法では両者を分離することができない。そのため、固相抽出物を用いたRIAの測定値の信頼度は抗体の特異性に依存する。本実験で用いた抗エストラジオール抗体のエストロンとの交差反応性は約3%であるが、正常な発情周期を営むウシではエストロンの血中濃度はエストラジオール-17 $\beta$ より低いので、混入したエストロンによる測定値への影響はほとんど無いと考えられる。しかし、妊娠牛では、妊期によってエストロンの濃度がエストラジオール-17 $\beta$ の10倍程度まで上昇するため (Catchpole, 1977)、本実験で用いた抗体では固相抽出物から直接妊娠中の正確なエストラジオール濃度を測定することはできない。他の濃縮法同様、固相抽出物から特定のステロイドの測定を行う場合も、状況に応じて特異性の高い抗体を使用する必要があると考えられる。一方、エストロンとエストラジオールに対する抗体の交差反応性が等しく、他のステロイドの影響を受け難ければ、本法を用いてウシ血中の総エストロゲン量を測定することが可能だと考えられる。

### 摘 要

簡易逆相カートリッジを用いてウシの血液試料から内因性のエストロゲンを固相抽出し、得られた抽出物を直接RIAに供し、定量的に濃度を測定できるかどうかについて検討した。その結果、内因性のエストロゲンも簡易逆相カートリッジに定量的に保持され、40%と75%のメタノールで段階的に溶出させることにより活性型と抱合型のエストロゲンを分離して回収できることが分かった。注入する血漿の量が2 ml以下であれば、所定の濃度のメタノールで溶出させた固相抽出物を直接RIAに供する事によりウシ血漿中に含まれる活性型、抱合型双方のエストロゲンを定量的に測定できることが明らかになった。エストロゲンの濃度が低く2 mlを越える血漿を注入する必要がある場合は、既知量のエストロゲンを含む血漿の回収率で測定値を補正することにより、正確な濃度を算出できることが示唆された。それぞれのエストロゲンの抽出および測定双方の要因を加味した回収率は、5 mlの血漿を用いたエストロンで約80%、血漿2 mlを用いたエストラジオール-17 $\beta$ とエストロンサルフェートがそれぞれ約75%と約90%であった。また、活性型のエストロゲンでは、固相抽出物をさらに液-液抽出する2段階抽出法を行うことにより、水溶性および脂溶性のほとんどの測定阻害物質が除去され、注入血漿量が増えても定量的に濃度を測定できることが分かった。

## 第5章 発情周期および妊娠初期におけるウシ末梢血中 エストロゲンの動態

### 緒言

本章では、前章までに確立した抽出・分画方法を用いてウシの末梢血中エストロンサルフェート濃度の測定を試みた。多くの動物種において、血液中のエストロンサルフェート濃度は、卵胞の発育状態 (Lasley et. al., 1989; 大崎ら, 1991) や妊娠期の胎子-胎盤機能 (Edqvist and Stabenfeldt, 1989) を診断するための指標として利用することができる。しかし、低濃度のエストロンサルフェートに対応した抽出および測定法が開発されていなかったため、ウシにおける発情周期や妊娠初期の血中動態については未だ解明されていない。そこで、固相抽出法を用いてウシの末梢血中のエストロンサルフェートを抽出・精製し、特異性の高いRIAで測定することにより、正常発情周期および妊娠初期におけるウシの末梢血中のエストロンサルフェートの動態を明らかにした。さらに、その濃度推移について、生殖機能の診断的指標としての有効性を確かめるため、活性型のエストロゲンとの比較を行った。

### 材料および方法

#### 1. 固相抽出

セップパックプラス $tC_{18}$  (ウォーターズ) を用い、第3章と同様の活性化操作を行った後、血漿5mlを注入した。精製水5mlで2回カートリッジを洗浄した後、充填剤に保持されたステロイドをそれぞれ3mlの40、75 (v/v) %メタノールおよびメタノール原液で順次溶出させた。回収した溶媒を蒸発させた後、測定用緩衝液0.5mlを添加して再溶解させた。ただし、メタノール原液回収画分については0.5%のTriton X-100 (SIGMA) を含む溶液を用いた。40%メタノール回収画分の再溶解液0.2mlを用いてエストロンサルフェートのRIAを行い、75%画分再溶解液0.2mlずつを用いてエストロンおよびエストラジオール-17 $\beta$ のRIAを行った。また、メタノール原液で回収した画分の再溶解液4 $\mu$ lを用いてプロゲステロンのRIAを行った。

#### 2. RIA

活性型および抱合型エストロゲンのRIAは前章と同様の方法で行った。プロゲステロンのRIAは既報 (平子ら, 1987) に従って行い、測定感度は6.7~8.6pg/tubeで、平均濃度1.8ng/mlの血漿を用いた測定内および測定間変動係数は、それぞれ9.6および16%であった (Hirako et. al., 1996)。

抽出および測定の操作は、各検体についてそれぞれ2本ずつ並行して行い、両者の測定値の平均を各検体中のステロイド濃度とした。

#### 実験1. 正常発情周期におけるウシ末梢血中エストロゲン濃度の推移

正常な発情周期を繰り返す黒毛和種未經産牛2頭およびホルスタイン種経産牛2頭について、発情の数日前から次の発情の数日後まで毎日50mlの採血を行った。血液の処理は第3章と同様の方法で行い、分離された血漿を用いて、エストロンサルフェート、エストロン、エストラジオール-17 $\beta$ およびプロゲステロンの測定を行った。

### 実験2. 妊娠初期におけるウシ末梢血中エストロゲン濃度の推移

発情開始7日後のホルスタイン種経産牛に1個あるいは2個の黒毛和種体外受精胚を移植した。移植した胚は家畜改良事業団から提供されたもので、体外受精および移植までの培養はKuwayama et. al. (1992)の方法に従って行われた。直腸プローブを装着した超音波画像診断装置(SSD-650, アロカ, 東京)を用い、発情開始後30、45および60日に妊娠および胎子数の判定を行った。胎子数は、分娩時に最終的な確認を行った。移植日から妊娠59日(発情開始日が0日)まで隔日で採血を行い、単胎および双胎妊娠の確認されたウシそれぞれ6頭ずつの血漿を実験に供試し、固相抽出およびRIAにより、エストロンサルフェート、エストロンおよびエストラジオール-17 $\beta$ の濃度を測定した。

## 結 果

### 実験1. 正常発情周期におけるウシ末梢血中エストロゲン濃度の推移

各個体毎のエストロンサルフェート、エストロン、エストラジオール-17 $\beta$ およびプロゲステロン濃度の推移は図6に示した。また、排卵日を基準とする前後の日数毎の各ステロイドの平均濃度推移は図7に示した。発情周期のウシ末梢血中エストロンサルフェートの動態は、エストロンおよびエストラジオール-17 $\beta$ と良く似ており、発情期に高値となり、黄体期には1~4回の増減を繰り返した(図6)。しかし、黄体期と発情期の濃度差を比較すると、エストロンサルフェートの濃度範囲は活性型のエストロゲンより狭く、発情期の最高値もそれらのエストロゲンより低かった( $P<0.01$ , 図7)。また、各エストロゲン間の相関を比較すると、エストロンサルフェートとエストロンとの相関係数は0.56で、エストラジオール-17 $\beta$ との相関( $R=0.39$ )より有意に高かった( $P<0.05$ , 図8)。一方、プロゲステロンは、黄体開花期に4 ng/ml以上、発情期に0.5 ng/ml以下となり、液-液抽出とRIA(百目鬼ら, 1974)あるいは酵素免疫測定法による直接測定(平子ら, 1987)で得られたウシの末梢血中濃度と同様の水準で推移した。

### 実験2. 妊娠初期におけるウシ末梢血中エストロゲン濃度の推移

単胎および双胎妊娠牛各6頭の末梢血中におけるエストロンサルフェートの平均濃度推移は図9-1に示した。エストロンサルフェートは、単胎、双胎ともに妊娠50日頃までは発情周期と同様の傾向で推移し、妊娠に伴う濃度の変化が認められなかった。一方、50日以降は妊娠の経過に伴って濃度が上昇する傾向が認められ、双胎妊娠牛では、妊娠51日以降のエストロンサルフェート濃度は、妊娠21日から43日までの平均値より有意に高くなった( $P<0.05$ )。しかし、単胎妊娠牛では実験終了時まで有意な差は認められなかった( $0.05<P<0.2$ )。また、双胎妊娠牛では、妊娠49日以降、単胎妊娠牛よりエストロンサルフェート濃度が有意に高くなった( $P<0.05$ )。

エストロンサルフェートの濃度推移を個体毎に比較すると、単胎妊娠牛のうち3頭では、それぞれ妊娠55、57、59日までにエストロンサルフェート濃度が妊娠21日から43日までの平均値と比較して有意に高くなった( $P<0.05$ )。また、2頭では濃度の上昇傾向が認められたものの、実験期間内における上昇前後の濃度差は有意ではなく、残りの1頭では実験期間を通じて濃度の変動が激しく、妊娠に伴う変化は認められなかった。一方、双胎妊娠牛のうち5頭では、それぞれ妊娠51、51、53、55、57日以降、エストロンサルフェート濃度が妊娠21日から43日までの平均値より有意に高くなった( $P<0.05$ )。しか

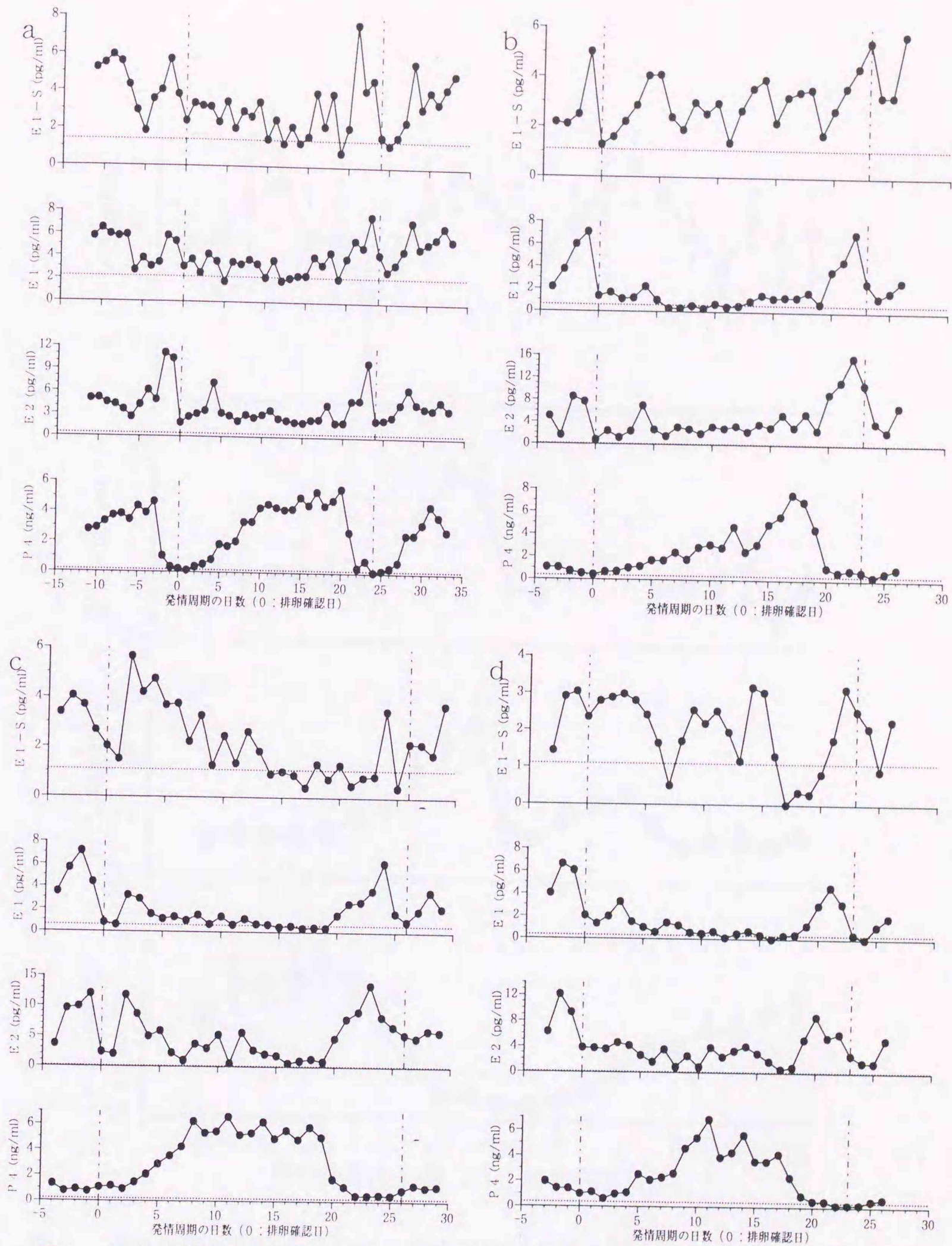


図6. 正常な発情周期を営むウシにおける末梢血中のエストロンサルフェート (E1-S)、エストロン (E1)、エストラジオール-17 $\beta$  (E2) およびプロゲステロン (P4) 濃度の推移

a、b: ホルスタイン種経産牛

c、d: 黒毛和種未経産牛

横の点線は各ステロイドの測定感度を、縦の鎖線は排卵日を示す。

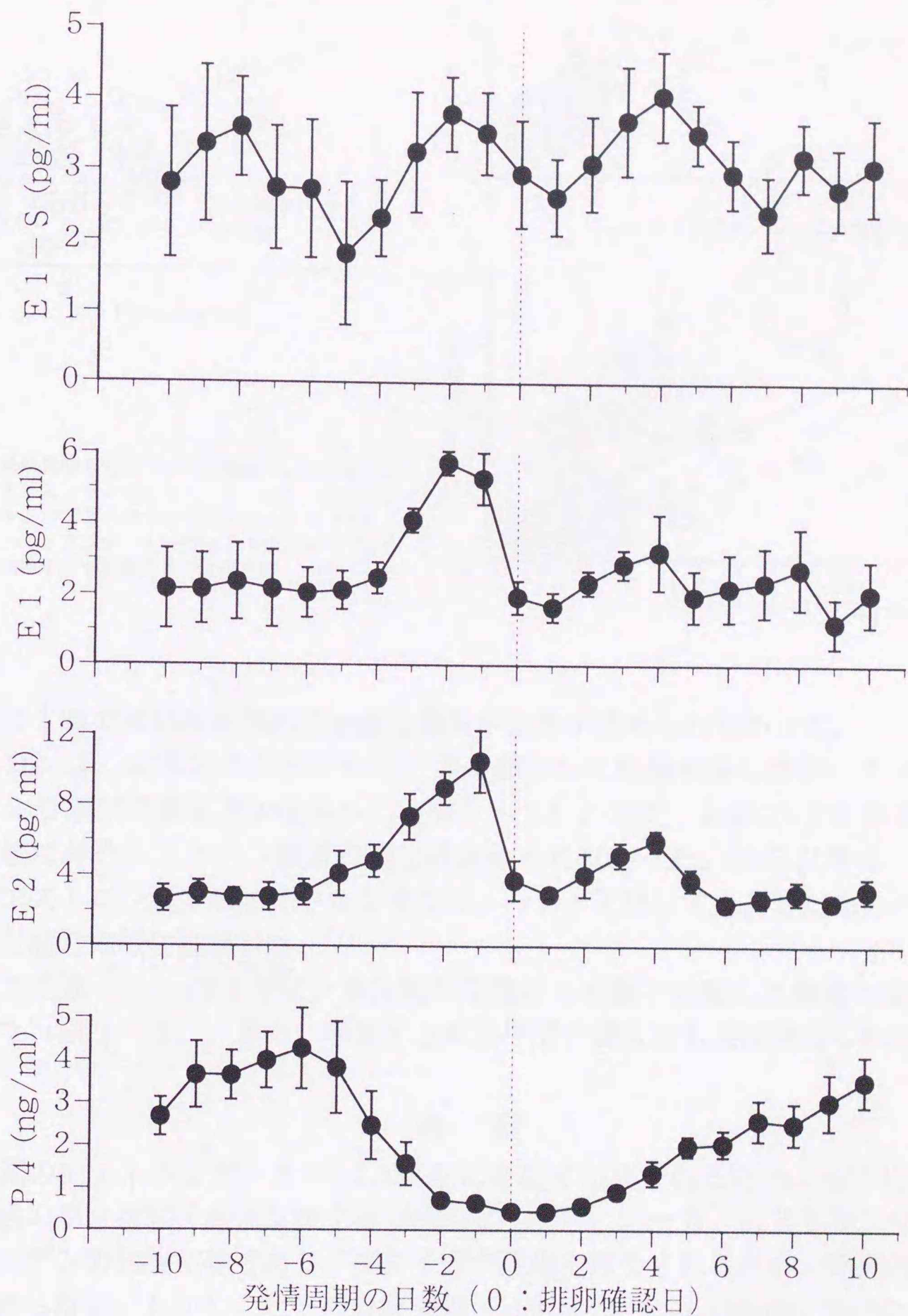


図7. 正常な発情周期を営むウシ末梢血中における性ステロイド濃度の推移  
(排卵日を基準とした前後の日数毎の平均±標準誤差; N=5~8)

E1-S: エストロンサルフェート  
 E1: エストロン  
 E2: エストラジオール-17β  
 P4: プロゲステロン

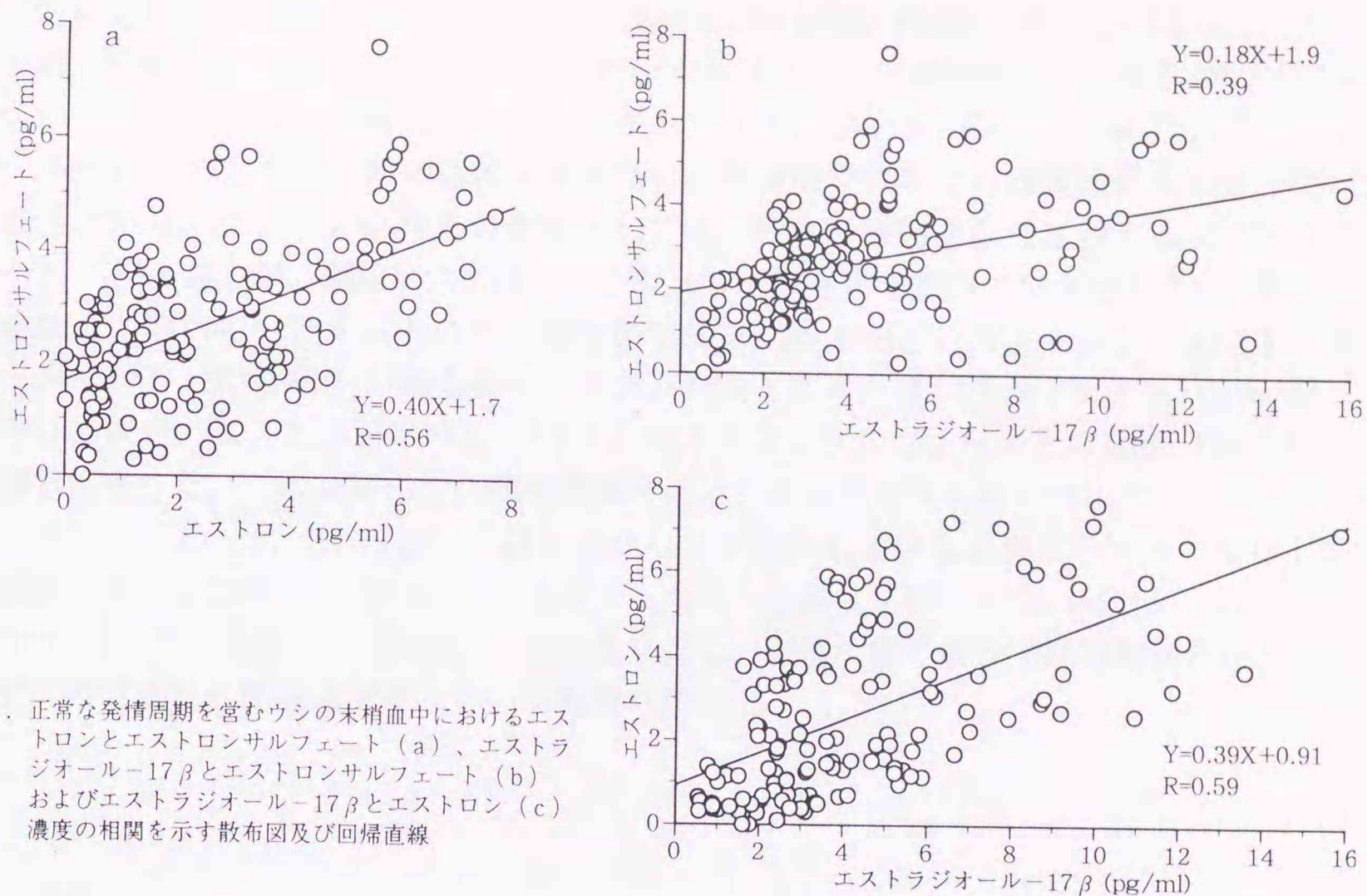


図8. 正常な発情周期を営むウシの末梢血中におけるエストロンとエストロンサルフェート (a)、エストラジオール-17βとエストロンサルフェート (b) およびエストラジオール-17βとエストロン (c) 濃度の相関を示す散布図及び回帰直線

し、残りの1頭では実験期間内に有意な濃度の上昇が認められなかった。

エストロンは、エストラジオール-17βと類似した動態を示したが、エストラジオール-17βより濃度の変化が少なかった(図9-2)。また、妊娠55日まではいずれの個体でも妊娠に伴うエストロン濃度の変化は認められなかった。55日以降は、単胎妊娠牛の1頭でエストロン濃度がエストロンサルフェートと平行して上昇したものの、他の個体ではそれ以前と同様に推移した。

エストラジオール-17βでは、実験期間を通じて妊娠に付随した濃度の変化が認められなかった(図9-3)。また、単胎牛と双胎牛での濃度にも差は認められなかった。

### 考 察

発情周期のエストラジオール-17βは主に卵胞で生産されるため、血中におけるその濃度は卵胞の発育状態を直接反映する(Hafez, 1987)。一方、エストロンサルフェートはエストロゲンの代謝産物であり、主に子宮や肝臓で産生されるため、直接的には卵胞の動態を反映しない。しかし、ヒトの月経周期(Hawkins and Oakey, 1974; Honjo et al., 1987)やウマの発情周期(大崎ら, 1991)における末梢血中のエストロンサルフェート濃度は、エストラジオール-17β濃度と高い相関を示し、その変化はどの活性型エストロゲンより大きく、最高時にはエストラジオール-17βの数倍に達することが知られている。免疫測定法では、測定対象となる物の濃度が高ければ試料の量を減らすことが可能であり、それに応じて抽出操作を簡略化できる。また、基底値と最高値の濃度差が大きければ、卵胞発育の判定を高精度に行うことができる。これらのことから、ヒトでは、末梢血中におけるエストロンサルフェートの濃度水準は、エストラジオール-17βよりも



優れた卵胞発育の指標と考えられている（神戸川ら, 1989; Lasley et. al., 1989）。

実験1の結果、ウシの末梢血中エストロンサルフェートの濃度推移は、活性型のエストロゲンとの間に有意な相関を示した。しかし、エストロンサルフェートよりエストラジオール-17βの方が発情期の濃度水準が高く、発情周期における濃度範囲も広がった。このことから、ウシの卵胞発育の指標としては、卵胞の機能を直接反映するエストラジオール-17βの方が、間接的なエストロンサルフェートより優れていると考えられた。

実験1において、各エストロゲン間での相関を比較すると、エストロンとエストラジオール-17β (R=0.59) が最も高く、エストロンとエストロンサルフェート (R=0.56) がそれに次ぎ、エストラジオール-17βとエストロンサルフェートとの相関 (R=0.39) が最も低かった。この結果から、発情周期におけるウシのエストロンサルフェートは、エストラジオール-17βからエストロンを介して生産されていると考えられる。しかし、活性型のエストロゲンとエストロンサルフェートとの濃度比は、ヒト (Honjo et. al., 1987) やウマ (大崎ら, 1991) よりかなり低く、発情周期のウシでは硫酸抱合がエストロゲンの主要な代謝経路ではないのかも知れない。

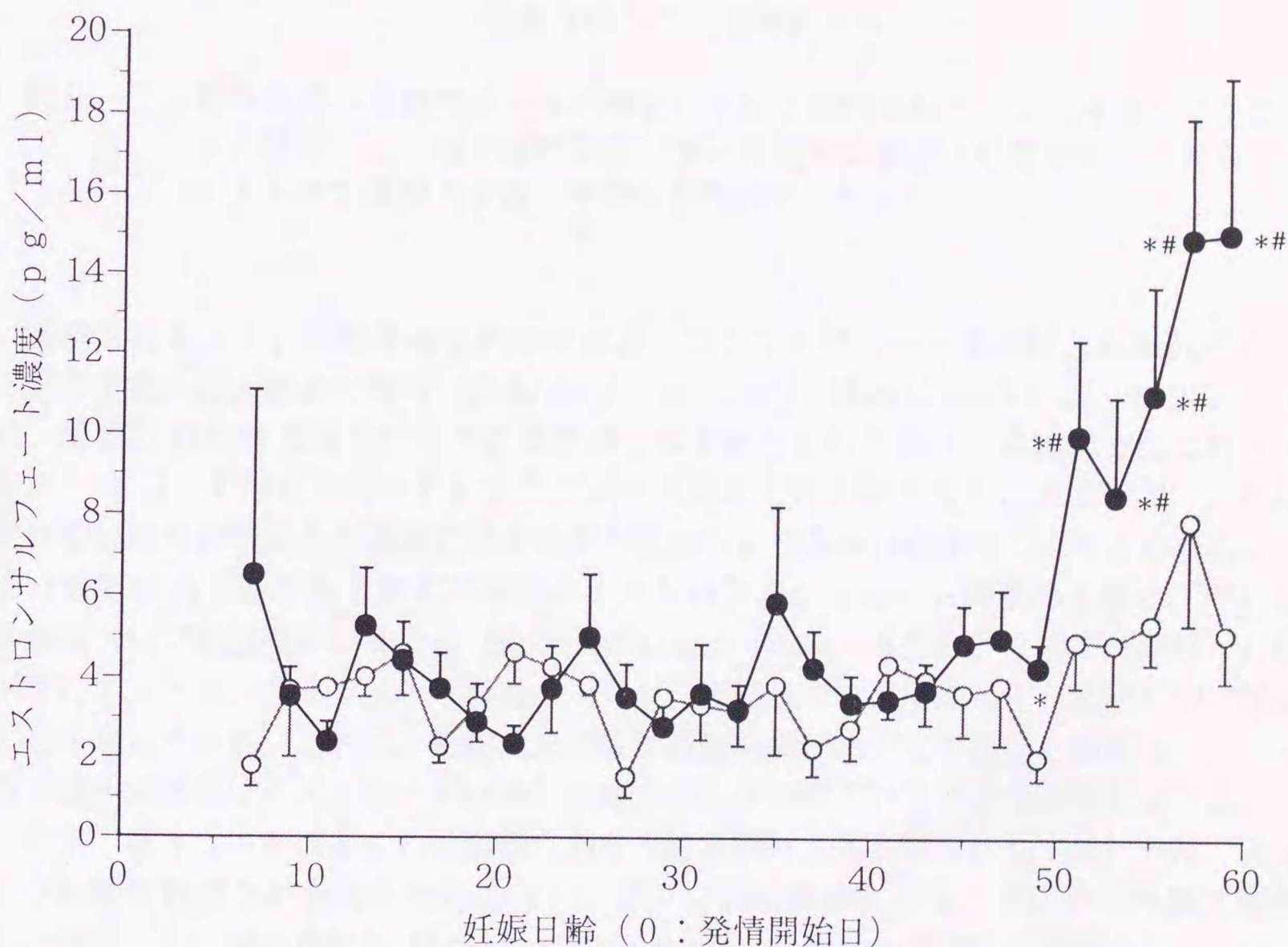


図9-1. 体外成熟-体外受精-体外培養した胚を発情周期の7日に移植して受胎した単胎 (○) および双胎 (●) 妊娠牛における妊娠初期の末梢血中エストロンサルフェート濃度の推移 (平均±標準誤差; N=6)

\* : 同じ日齢の単胎妊娠牛と比較して有意差 (P<0.05)

# : 妊娠21日から43日までの平均値と比較して有意差 (P<0.05)

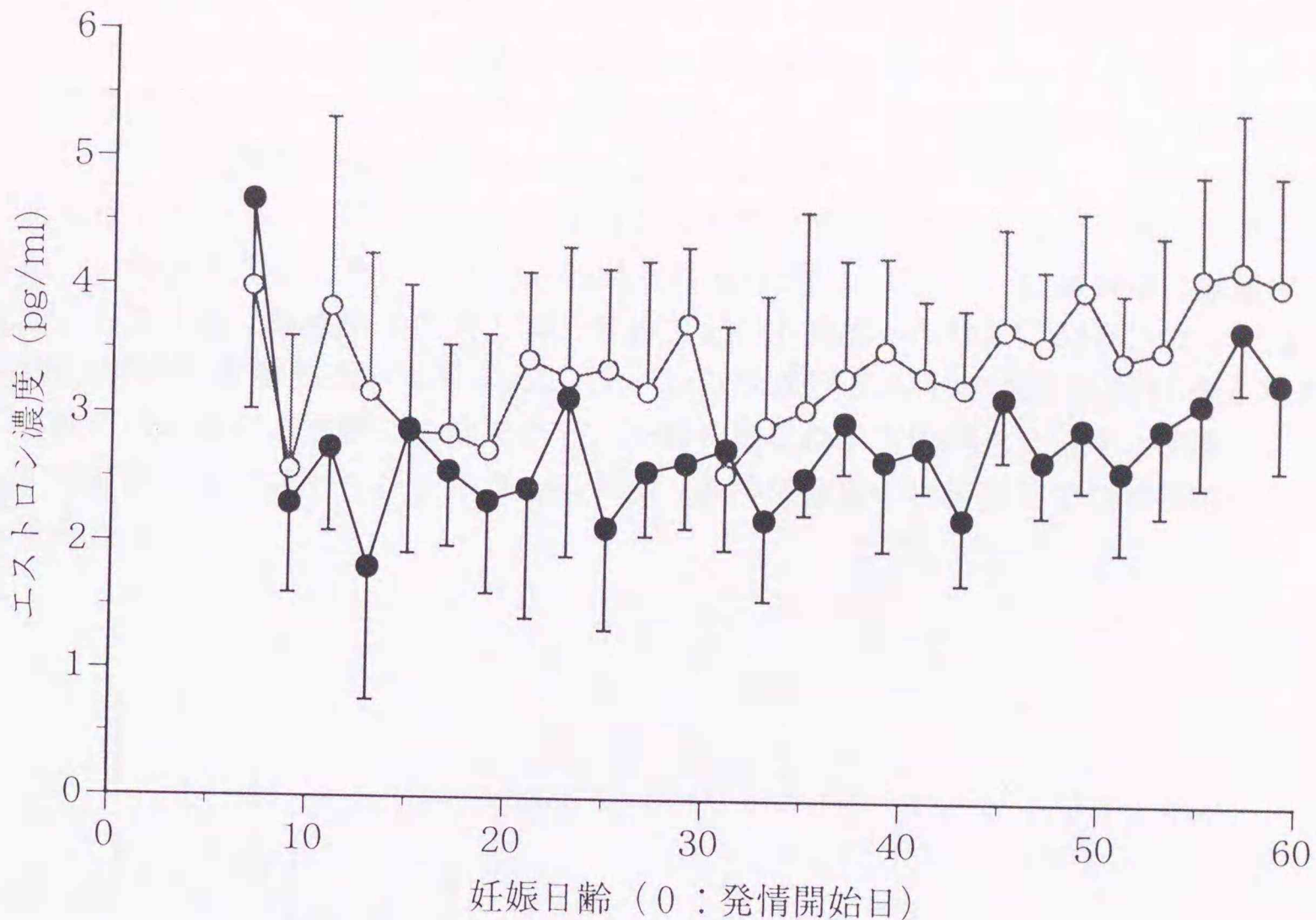


図9-2. 体外成熟-体外受精-体外培養した胚を発情周期の7日に移植して受胎した単胎 (○) および双胎 (●) 妊娠牛における妊娠初期の末梢血中エストロン濃度の推移 (平均±標準誤差; N=6)

実験2において、妊娠牛の末梢血中エストロンサルフェート濃度は、妊娠50日頃から上昇を開始した。過去の報告 (Dobson et. al., 1993; Hatzidakis et. al., 1993) によれば、妊娠70日以降に母体血中での濃度が上昇するとされており、本実験ではこれらの報告より10日以上早くエストロンサルフェート値の上昇を捉えることができた。これは、固相抽出法を利用した本実験の測定感度が従来法より高かったからだと考えられる。ウシでは妊娠50日を過ぎるとまず羊水中のエストロンサルフェート濃度が上昇し、少し遅れて尿膜水中での濃度が増加する (Robertson and King, 1979)。今回の結果は、母体血中でのエストロンサルフェート濃度の上昇が、尿膜水での濃度増加とほぼ同時期に始まることを示している。これは、胎盤が未完成な妊娠初期においても後期と同様に、胎子-胎盤-母体間におけるステロイドの移行が速やかに行われていることを示唆している。

ヒト、ウマ、ブタ等多くの動物種における妊娠期のエストロンサルフェートは、胎子および胎盤で合成された活性型のエストロゲンを前駆物質として、主に子宮内膜で産生され、母体血中に放出される (Solomon, 1994; Wooding and Flint, 1994)。一方、ウシは、子宮だけでなく胎盤にもエストロゲンの硫酸抱合化酵素を持っており、胎盤で産生したエストロンを直接硫酸抱合することもできる (Adams and Low, 1974)。また、母体および胎子の肝臓や副腎もエストロゲンに硫酸基を付加する酵素を持っていることから、妊娠牛におけるエストロンサルフェートの主要合成経路は妊期によって変化していると考

えられる。しかし、妊娠初期のウシにおけるエストロンサルフェートの合成経路についてはまだ良く分かっていない。実験2の結果、母体末梢血中のエストロンサルフェート濃度は、活性型のエストロゲンに先駆けて上昇した。このことは、前駆物質となる活性型のエストロゲンが母体の血流に放出されることなくエストロンサルフェートが合成されていることを示している。つまり、この時期のエストロンサルフェートは、子宮内部でのみ産生されていると考えられる。一方、Robertson and King (1979) によれば、尿膜水中の濃度が上昇する前に羊水中のエストロンサルフェート濃度が増加しており、ウシではまず妊娠50日頃に栄養膜あるいは胎子がエストロンサルフェートを産生し始めると考えられる。彼らの成績と本実験での結果から、妊娠初期には子宮内膜を介さず、栄養膜あるいは胎子が産生したエストロンサルフェートが、直接母体血中に移行している可能性が高いと考えられる。

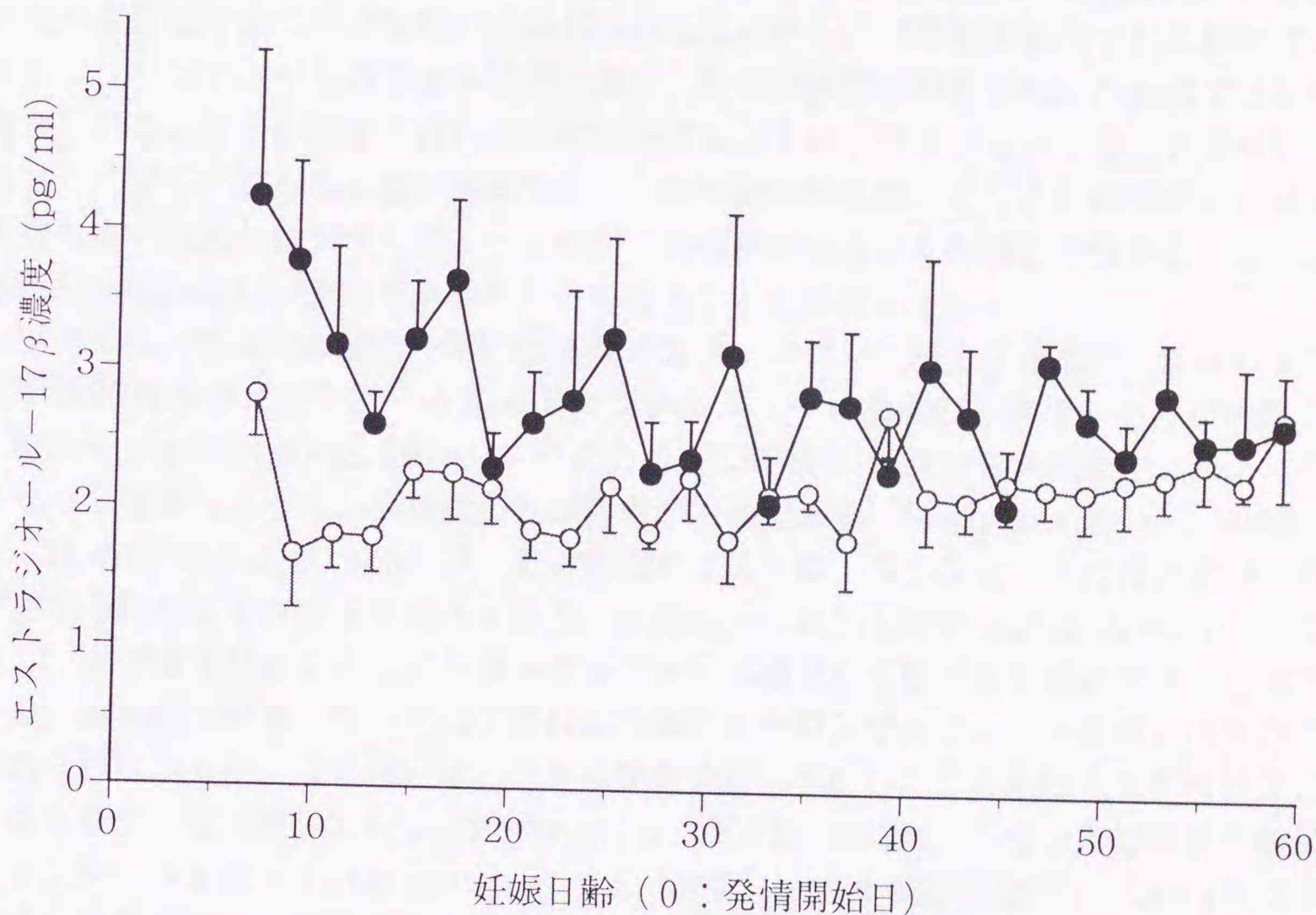


図9-3. 体外成熟-体外受精-体外培養した胚を発情周期の7日に移植して受胎した単胎(○)および双胎(●)妊娠牛における妊娠初期の末梢血中エストラジオール-17β濃度の推移(平均±標準誤差; N=6)

実験2では、体外成熟-体外受精-体外培養した胚を移植して得られた妊娠牛を用いた。体外で成熟させた卵子は体内で成熟した卵子より受精後の発育率が悪いことが知られており (Leibfried-Rutledge et. al., 1987)、本実験で移植した胚盤胞も同一日齢の体内受精胚より細胞数が少なかった。また、超音波診断でも人工授精によって受胎した胚と比較して子宮内における絨毛膜腔の成長が遅れていた。McDonald (1975) は、ウシの

発生段階について、妊娠45日までを胚子期、それ以降を胎子期と定義している。また、Robinson (1977) は、ウシにおける胚の着床が完成する時期は妊娠第6週以降としており、それ以前の胚の損耗率は以降より高いと述べている。本実験においてエストロンサルフェート値が上昇を開始した時期は、これらの時期より若干遅れていたものの、体外受精胚の成長の遅れを考慮すれば、正常な妊娠牛におけるエストロンサルフェート値の上昇時期はこれらの時期と概ね一致すると考えられる。自然交配あるいは人工授精によって正常に妊娠した牛のエストロンサルフェート濃度の推移については実際に確認する必要があるものの、これらのことは、妊娠45日前後にウシの胎盤機能が大きく変化することを示唆している。

実験2の結果では、エストロンサルフェート濃度が上昇を開始した時期が個体によって1週間以上も異なっていた。エストロンサルフェートの産生が開始される妊娠40~50日は、栄養膜外胚葉の絨毛叢と子宮小丘部の上皮絨毛が成長して両者の接着が強固となり、多核細胞が盛んに形成され始める時期に当たる (Wooding and Flint, 1994)。着床前後の胚の成長は胎盤の形成状態に依存していることから、本実験で観察された個体によるエストロンサルフェート値の上昇時期の差は、胚の成長度合いを反映したものではないかと考えられる。胎子の発育度合いと母体血中のエストロンサルフェート値との関係についてはさらに詳しく調べる必要があるものの、本実験の結果は、ウシの妊娠初期における母体末梢血中のエストロンサルフェート値が、胎盤形成の有効な指標となり得ること、さらには胎子の成長度合いを知る手掛かりともなることを示唆している。

ブタでは、着床期の胚が一時的に多量のエストロゲンを産生するため、母体の血中でも交配後25日頃をピークとするエストロンサルフェート濃度の一過性の上昇が観察される (Robertson and King, 1974)。そのため、交配後20~26日の末梢血中エストロンサルフェート濃度によって、高精度の妊娠診断が可能である (Sugiyama et. al., 1985)。また、Horne et. al. (1983) は、その時期のエストロンサルフェートの最高値が子宮内に存在する胚数に依存すると述べており、Stone et. al. (1986) とFrank et. al. (1987) は、ブタでは末梢血中のエストロンサルフェート濃度から胚の数を推定できると報告している。本実験の結果、ウシではブタのようなエストロンサルフェート値の一過性の上昇は認められなかった。この違いは、ブタは胚が子宮へ移行したことを伝える信号物質としてエストロゲンを利用している (Perry et. al., 1973) のに対し、ウシでは受胎の信号としてインターフェロン $\tau$  (Imakawa et. al., 1987)、血小板活性化因子 (O'Neill, 1987) 等他の物質が使われていることによると考えられる。一方、ウシにおいても、妊娠後期には胎子数と母体血中のエストロンサルフェート値との間に有意な相関のあることが示されている (Worsfold et. al., 1989)。また、本実験と同じ試料を用い、妊娠全期間にわたりエストロンサルフェートの直接測定を行ったところ、妊娠150日以降の単胎牛と双胎牛の末梢血中エストロンサルフェート濃度には有意な差が認められた (Takahashi et. al., 1997)。これまでの報告 (Worsfold et. al., 1989; Dobson et. al., 1993; Takahashi et. al., 1997) では、妊娠100日以前の単胎牛と双胎牛の血中エストロンサルフェート濃度に差は認められていないが、本実験の結果では、双胎妊娠牛の方が単胎牛よりもエストロンサルフェート濃度の上昇時期が早く、上昇率も高かった。本実験の結果と過去の報告との間に相違が見られたのは、過去の報告 (Holdsworth et. al., 1982; Kamonpatana et.

al., 1983; Hung et. al., 1990; Hatzidakis et. al., 1993) で用いられた測定法の感度が低く、この時期のウシ末梢血中のエストロンサルフェート濃度を正確に判定できなかつたからと考えられる。本実験の結果は、妊娠初期においてもエストロンサルフェート濃度の上昇の程度が胎子数に依存することを示しており、この時期の母体末梢血中のエストロンサルフェート値によって胎子数を判定できる可能性を示している。

### 摘 要

本章では、前章までに確立した抽出・分画方法を用い、正常発情周期および妊娠初期におけるウシの末梢血中のエストロンサルフェートの測定を試み、活性型のエストロゲンとの濃度比較を行った。その結果、発情周期におけるエストロンサルフェートの血中動態は活性型のエストロゲンと類似していたものの、黄体期と発情期における濃度の変動幅がエストラジオール-17 $\beta$ より狭く、優れた卵胞発育の指標とは成り得ないことが分かった。一方、妊娠初期のウシの末梢血中におけるエストロゲンの濃度推移について調べたところ、妊娠45日まではいずれのエストロゲンでも妊娠に伴う濃度の変化を認めなかったが、ほとんどのウシでは、妊娠50日頃から妊娠の経過に伴ってエストロンサルフェート濃度が上昇した。一方、活性型のエストロゲンは妊娠59日まで低値で推移した。エストロンサルフェート濃度が上昇し始めた時期は、個体毎に差があったものの、双胎妊娠の方が単胎牛よりも早くなる傾向が認められ、平均で見た濃度の上昇率も双胎妊娠の方が有意に高かった。これらのことから、この時期の母体末梢血中のエストロンサルフェート値によって胎子数を判定できる可能性が示された。また、妊娠40~50日は胎盤形成の時期に当たり、末梢血中のエストロンサルフェート値が胎盤形成の指標として利用価値の高いことが示唆された。

## 第6章 総括

本研究は、固相抽出法を利用して、ウシの末梢血中のエストロゲンを効率よく抽出、分画することを目的として行った。血液中のエストロゲンの簡便で確実な抽出精製法が開発され、容易に測定できれば、ウシの生殖機能研究への貢献が期待できる。

まず、簡易逆相カートリッジを用いた固相抽出法におけるステロイドの溶出パターンを推定するため、雌性動物の生殖機能において重要な役割を果たす5種類の活性型性ステロイド（エストロン、エストラジオール-17 $\beta$ 、テストステロン、アンドロステンジオンおよびプロゲステロン）および1種類の抱合型ステロイド（エストロンサルフェート）について、高耐圧逆相カラムを用いた液体クロマトグラフィーによる精密な分離パターンの検討を行った。その結果、簡易逆相カートリッジでもエストロゲンとプロゲステロンおよびエストロンサルフェートとその他のエストロゲンを分離して回収できる可能性が示唆された。しかし、エストロンとエストラジオール-17 $\beta$ およびエストロゲンとアンドロゲンの分離は困難と思われた。

次に、先の実験結果に基づき、溶離溶媒としてメタノールを用い、ウシの血漿に添加した活性型および抱合型のエストロゲンが、簡易逆相カートリッジを用いた固相抽出法により抽出・精製できるかどうか検討した。まず、ウシの血漿中に含まれるエストロゲンが簡易逆相カートリッジに保持されるかどうか確認するため、生殖周期の様々な時期にあるウシの血漿に<sup>3</sup>H標識エストロゲンを添加し、注入量を変えて固相抽出による回収試験を行った。次いで、エストロゲンがどの程度の濃度のメタノールで溶出するか調べるため、溶離液のメタノール濃度を段階的に上昇させ、カートリッジに保持された活性型および抱合型エストロゲンの溶出を試みた。さらに、メタノール濃度の異なる溶離液を段階的に注入することにより、活性型と抱合型のエストロゲンを分離して溶出させることができるかどうか検討した。その結果、いずれのエストロゲンについても、生殖周期の時期や血漿の注入量に関わらず、逆相カートリッジに高率かつ定量的に保持された。溶離液中のメタノール濃度を段階的に上昇させた時の溶出パターンは、先に行った高速液体クロマトグラフィーでの結果と良く一致しており、カートリッジに保持されたエストロゲンを40および70 (v/v) %メタノールで段階的に溶出させることにより、エストロンサルフェートは40%メタノールに、エストロンとエストラジオール-17 $\beta$ は70%メタノール画分に溶出した。これらのことから、簡易逆相カートリッジを用いた固相抽出法によりウシ血漿中のエストロゲンを定量的に抽出できることが確認された。また、逆相カートリッジに保持された活性型および抱合型エストロゲンを分離して回収できることが示唆された。

続いて、簡易逆相カートリッジを用いてウシの血液試料から内因性のエストロゲンを固相抽出し、得られた抽出物を直接RIAに供し、定量的に濃度を測定できるかどうか検討した。まず、注入血漿量によって測定値に影響があるかどうか調べ、測定に相応しい注入量を決定した。次いで、エストロゲンの測定に影響を及ぼす夾雑物の特性について検討を行うと共に、血液成分が内因性エストロゲンの抽出に及ぼす影響についても検討した。加えて、測定値の信頼性を確かめるため、ウシの血漿に外因性のエストロゲンを添加し、固相抽出およびRIAによる回収試験を行った。さらに、抽出法が確立されているエストラジオール-17 $\beta$ について、信頼性の高い抽出・精製方法である液-液抽出・液体クロマト

分配法および固相抽出法により同一試料からの抽出を行い、RIAによって測定された濃度の比較を行った。その結果、内因性のエストロゲンも簡易逆相カートリッジに定量的に保持され、40%と75%のメタノールで段階的に溶出させることにより活性型と抱合型のエストロゲンを分離して回収できることが分かった。RIAによる測定値は注入血漿量に依存して低下したが、注入する血漿の量が2ml以下であれば、所定の濃度のメタノールで溶出させた固相抽出物を直接RIAに供することにより、ウシ血漿中に含まれる活性型および抱合型双方のエストロゲンを定量的に測定できることが分かった。一方、エストロゲンの濃度が低く、2mlを越える血漿を注入する必要がある場合は、既知量のエストロゲンを含む血漿の回収率で測定値を補正することにより、正確な濃度を算出できることが示唆された。また、活性型のエストロゲンでは、固相抽出物をさらに液-液抽出する2段階抽出法を行うことにより、水溶性および脂溶性のほとんどの測定阻害物質を除去できるので、注入血漿量が増えても定量的に濃度を測定できることが示された。

さらに、固相抽出法と特異性の高いRIAを組み合わせることにより、これまで解明されていなかった発情周期および妊娠初期におけるウシの末梢血中エストロンサルフェートの測定を試み、正常発情周期および体外受精胚の移植によって受胎した単胎および双胎妊娠牛の妊娠初期における末梢血中エストロンサルフェート濃度の推移を明らかにした。ウシの発情周期における末梢血中のエストロンサルフェート濃度は、活性型のエストロゲン濃度との間に有意な相関を示したものの、エストラジオール-17 $\beta$ と比較して変動範囲が狭く、卵胞発育の指標としては相応しくないことが分かった。また、妊娠牛では、妊娠45日まではいずれのエストロゲンでも妊娠に伴う濃度の変化を認めなかったが、妊娠50日頃からエストロンサルフェート濃度が上昇した。一方、活性型のエストロゲンは妊娠59日まで低値で推移した。エストロンサルフェート濃度の上昇し始めた時期は、個体毎に差が観られたものの、双胎の方が単胎より早くなる傾向が認められた。また、エストロンサルフェート濃度の上昇率も双胎の方が単胎より大きかった。これらのことから、この時期の母体末梢血中のエストロンサルフェート値によって胎子数を判定できる可能性が示された。また、この時期は胎盤形成の時期と一致しており、末梢血中のエストロンサルフェート値が胎盤形成の指標として利用価値の高いことが示唆された。

以上、本研究によってウシ血液中エストロゲンの効率的な固相抽出法を確立することができた。さらに、本法を利用することにより発情周期および妊娠初期におけるウシの末梢血中エストロンサルフェートの動態を明らかにすることができた。

## 謝 辞

本研究論文をまとめるに当たり、終始御指導を賜りました北海道大学大学院獣医学研究科診断治療学講座繁殖学教室教授金川弘司博士に衷心から感謝致します。また、御校閲の労をお取り下さいました獣医学研究科比較形態機能学講座生化学教室教授齊藤昌之博士および環境獣医科学講座放射線学教室教授桑原幹典博士に感謝致します。論文作成に当たって多くの有益な御助言を賜りました獣医学研究科診断治療学講座繁殖学教室助教授高橋芳幸博士および同教室助手片桐成二博士に心から御礼申し上げます。

本研究を遂行するに当たり、共同研究者として終始御指導、御協力して下さいました前農林水産省畜産試験場繁殖部繁殖第2研究室長（現東京農業大学教授）百目鬼郁男博士、元繁殖部繁殖第2研究室主任研究官（現東京農工大学助教授）加茂前秀夫博士および農林水産省北海道農業試験場畜産部家畜繁殖研究室研究員（現畜産試験場繁殖部受胎機構研究室研究員）高橋ひとみ氏に深甚なる感謝の意を表します。各々の実験を行うに当たり、採血およびホルモン測定に協力して戴いた農林水産省中国農業試験場畜産部家畜育種繁殖研究室主任研究官竹之内直樹氏、デンカ製薬株式会社（現共立商事株式会社）岩間克美氏および学術振興会奨励研究員（現秋田県立農業短期大学助教授）小林正之博士に心から感謝致します。また、妊娠牛のホルモン測定を行うに当たり、体外受精胚を御提供戴いた家畜改良事業団東京バイテクセンター桑山正成博士、受胎牛の準備および体外受精胚の移植を行って戴いた前繁殖部生殖細胞移植研究室長（現帯広畜産大学）小栗紀彦博士ならびに前繁殖部生殖細胞移植研究室主任研究官（現家畜改良センター生産技術調整官）小島敏之博士、超音波診断装置による妊娠診断を行って戴いた前繁殖部生殖細胞移植研究室主任研究官富塚常夫氏に深く感謝いたします。

筆者に生殖内分泌に関する研究を開始する機会を与えて下さった元農林水産省畜産試験場繁殖部長（現東京農業大学教授）中原達夫博士、貴重なる御助言を賜ると共に本研究の遂行を暖かく見守って下さった前繁殖部長（現信州大学教授）花田章博士に深く感謝致します。研究を遂行し論文を執筆する上で多大なる便宜を図って戴いた畜産試験場繁殖部生殖内分泌研究室長橋爪一善博士および生殖内分泌研究室主任研究官高橋透博士に心から御礼申し上げます。また、研究論文をとりまとめるに当たり、貴重な御助言を賜った畜産試験場繁殖部長仮屋堯由博士および農林水産省東北農業試験場畜産部家畜繁殖研究室長永井卓博士に心から感謝致します。

筆者が群馬大学内分泌研究所ホルモン測定センターに1年間の国内留学を行った際、放射免疫測定法および固相抽出法の御指導を賜った群馬大学内分泌研究所教授若林克己博士に深謝いたします。また、エストロンサルフェートを測定するに当たり、エストロンサルフェートの標準品と特異性の高い抗エストロンサルフェート抗体を御提供戴いた帝国臓器製薬神戸川明博士に心から御礼申し上げます。

英文抄録の作成に当たり、御校閲戴いた米国アイオワ州立大学ジャック・アンビュエル博士およびザンビア共和国ザンビア大学オスマン・パテル博士に心から謝意を表します。

実験を進めるに当たり、器具の洗浄および試料の分注等をして戴いた農林水産省畜産試験場非常勤職員福本敬子氏、実験動物の使用に際して種々の便宜を図って戴いた畜産試験場育種部動物第1管理室（現企画調整部業務1科）の方々に心から御礼申し上げます。



## 引用文献

1. Abraham, G. E. (1969) Solid-phase radioimmunoassay of estradiol-17 $\beta$ . *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 29: 866-870.
2. Adams, J. B. and Low, J. (1974) Enzymic synthesis of steroid sulphates. X. Isolation of oestrogen sulphotransferase from bovine placenta and comparison of its properties with adrenal oestrogen sulphotransferase. *Biochim. Biophys. Acta*, 370: 189-96.
3. 赤木弘昭, 垂水泰敏, 末澤慶昭, 関本寔 (1974) データ処理—自動化と計数処理について. ラジオイムノアッセイ (入江實編), 講談社サイエンティフィック, 東京, pp116-141.
4. 荒井清, 加藤順三 (1977) エストロゲン. 新内分泌データブック (ホルモンと臨床'77増刊号), 医学の世界社, 東京, pp 308-316.
5. Armstrong, D. T. and Dorrington, J. H. (1979) Estrogen biosynthesis in the ovaries and testes. In *Regulatory Mechanisms Affecting Gonadal Hormone Action*. (J. A. Thomas and R. L. Singhal eds.) Vol. 2, University Park Press, Baltimore, pp 217-258.
6. Axelson, M. and Sahlberg, B. L. (1981) Solid extraction of steroid conjugates from plasma and milk. *Anal. Lett.*, 14: 771-782.
7. Baulieu, E. E. (1986) Steroid hormone binding plasma proteins and their intra- and extra-cellular congeners. In *Binding Proteins of Steroid Hormones*. (M. G. Forest and M. Pugeat eds.) Colloques INSERM Vol. 149, John Libbey Eurotext, Montrouge, pp 1-11.
8. Bradlow, H. L. (1968) Extraction of steroid conjugates with a natural resin. *Steroids*, 11: 265-272.
9. Bradlow, H. L. (1977) Modified technique for the elution of polar steroid conjugates from Amberlite XAD-2. *Steroids*, 30: 581-582.
10. Catchpole, H. R. (1977) Hormonal mechanisms in pregnancy and parturition. In *Reproduction in Domestic Animals.*, 3rd ed. (H. H. Cole and P. T. Cupps eds.), Academic Press, New York, pp341-368.
11. Ciotti, P. M., Franceschetti, F., Bulletti, C., Jasonni, V. M. and Bolelli, G. F. (1989) Rapid and specific RIA of serum estrone sulfate with selective solid phase extraction. *J. Steroid Biochem.*, 32: 473-474.
12. De Boever, J., Kohen, F., Usanachitt, C., Vandekerckhove, D., Leyseele, D. and Vandewalle, L. (1986) Direct chemiluminescence immunoassay for estradiol in serum. *Clin. Chem.*, 32: 1895-1900.
13. Dobson, H., Rowan, T. G., Kippax, I. S. and Humblot, P. (1993) Assessment of fetal number, and fetal and placental viability throughout pregnancy in cattle. *Theriogenology*, 40: 411-425.
14. Dolphin, R. J. and Pergande, P. J. (1977) Improved method for the analysis of estrogenic steroids in pregnancy urine by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 143: 267-274.
15. 百目鬼郁男, 中原達夫 (1977) 性周期及び妊娠初期の牛末梢血中Estrogen及びProgesteroneの動態. *家畜繁殖誌*, 23: 29-34.
16. 百目鬼郁男, 中原達夫, 山内亮, 牧野拓雄 (1974) Radioimmunoassayによる牛血中Progesteroneの測定. *家畜繁殖誌*, 20: 95-100.

17. Dwyer, R. J. and Robertson, H. A. (1980) Oestrogen sulphatase and sulphotransferase activities in the endometrium of the sow and ewe during pregnancy. *J. Reprod. Fertil.*, 60: 187-191.
18. Edqvist, L.-E. and Stabenfeldt, G. H. (1989) Clinical reproductive endocrinology. In *Clinical Biochemistry of Domestic Animals.*, 4th ed. (J. J. Kaneko ed.), Academic Press, San Diego, pp650-677.
19. Frank, G.R., Noble, R. C., Esch, M. W., Green, C. and Bahr, J. M. (1987) Direct estimation of estrone sulfate on serum and urine of pregnant swine as indicators of litter size at birth. *Anim. Reprod. Sci.*, 15: 121-129.
20. Gore-Langton, R. E. and Armstrong, D. T. (1994) Follicular steroidogenesis and its control. In *The Physiology of Reproduction.*, 2nd ed. (E. Knobil and J. D. Neill eds.) Vol. 1, Raven Press, New York, pp571-627.
21. Hafez, E. S. E. (1987) Folliculogenesis, egg maturation and ovulation. In *Reproduction in Farm Animals.*, 5th ed. (E. S. E. Hafez ed.), Lea & Febiger, Philadelphia, pp 130-167.
22. Hatzidakis, G., Katrakili, K. and Krambovitis, E. (1993) Development of a direct and specific enzymeimmunoassay for the measurement of oestrone sulfate in bovine milk. *J. Reprod. Fertil.*, 98: 235-240.
23. Hawkins, R. A. and Oakey, R. E. (1974) Estimation of oestrone sulphate, oestradiol-17 $\beta$  and oestrone in peripheral plasma: concentrations during the menstrual cycle and in men. *J. Endocrinol.*, 60: 3-17.
24. Heftmann, E. and Hunter, I. R. (1979) High-pressure liquid chromatography of steroids. *J. Chromatogr.*, 165: 283-299.
25. Heikkinen, R., Fotsis, T. and Adlercreutz, H. (1981) Reversed-phase C<sub>18</sub> cartridge for extraction of estrogens from urine and plasma. *Clin. Chem.*, 27: 1186-1189.
26. 平子誠, 仮屋堯由, 百目鬼郁男 (1987) マイクロプレートを用いた酵素免疫測定法キットによる牛血漿中プロゲステロンの直接測定. *家畜繁殖学雑誌*, 33: 134-139.
27. Hirako, M., Kamomae, H. and Domeki, I. (1992) Solid-phase extraction of estrogens from bovine blood plasma. *J. Vet. Med. Sci.*, 54: 399-402.
28. Hirako, M., Kamomae, H. and Domeki, I. (1995) Luteotropic effect of pregnant mare serum gonadotropin in cattle. *J. Vet. Med. Sci.*, 57: 317-321.
29. Hirako, M., Takahashi, H. and Domeki, I. (1996) Establishment of a reliable extraction method of estrone sulfate from bovine plasma for detection of the peripheral level during the regular estrous cycle by radioimmunoassay. *Domestic Anim. Endocrinol.*, 13: 187-195.
30. Hoedemaker, M., Weston, P. and Wagner, W. C. (1990) Influence of cortisol and different steroidogenic pathways on estrogen synthesis by the bovine placenta. *Am. J. Vet. Res.*, 51: 1012-1015.
31. Holdsworth, R. J. and Chaplin, V. M. (1982) A direct radioimmunoassay for oestrone sulphate in milk. *Br. Vet. J.*, 138: 455-457.
32. Holdsworth, R. J., Heap, R. B., Booth, J. M. and Hamon, M. (1982) A rapid direct radioimmunoassay for the measurement of oestrone sulphate in the milk of dairy cows and its use in pregnancy diagnosis. *J. Endocrinol.*, 95: 7-12.

33. Honjo, H., Kitawaki, J., Itoh, M., Yasuda, J., Iwasaku, K., Urabe, M., Naitoh, K., Yamamoto, T., Okada, H., Ohkubo, T. and Nambara, T. (1987) Serum and urinary estrone sulfate during the menstrual cycle, measured by a direct radioimmunoassay, and fate of exogenously injected estrone sulfate. *Hormone Res.*, 27: 61-68.
34. Horne, C., Chew, B. P., Wiseman, B. S. and Dziuk, P. J. (1983) Relationship between the level of estrone sulfate in the plasma and the number of fetuses during pregnancy in the gilt. *Biol. Reprod.*, 29: 56-62.
35. Hung, N.N. and Prakash, B. S. (1990) Influence of gestation on blood plasma concentrations of oestrone and oestrone sulphate in Karan Swiss cows and Murrah buffaloes. *Br. Vet. J.*, 146: 449-456.
36. Imakawa, K., Anthony, R. V., Kazemi, M., Marroti, K. R., Polites, H. G. and Roberts, R. M. (1987) Interferon-like sequence of ovine trophoblast protein secreted by embryonic trophoblast. *Nature*, 330: 377-379.
37. Jainudeen, M. R. and Hafez, E. S. E. (1987) Pregnancy Diagnosis. In *Reproduction in Farm Animals.*, 5th ed. (E. S. E. Hafez ed.), Lea & Febiger, Philadelphia, pp 517-527.
38. Kamonpatana, M., Parnpai, R., Ngramsuriyaroj, C. and Srisakwattana, K. (1983) Plasma progesterone, oestrone and oestrone sulfate levels during the first half of gestation in swamp buffaloes. *Br. Vet. J.*, 139: 256-261.
39. 神戸川明, 伊豫正人, 大川亮一, 吉村幸子, 小林美和子, 荒井清 (1989) 卵胞発育のモニター用簡易Estrone-3-sulfateのRIAについて. *日本不妊学会誌*, 34: 639 (要旨).
40. Kaneko, J. J. (1989a) Normal blood analyte values in large animals. In *Clinical Biochemistry of Domestic Animals.*, 4th ed. (J. J. Kaneko ed.), Academic Press, San Diego, pp886-891.
41. Kaneko, J. J. (1989b) Normal blood analyte values in small and some laboratory animals. In *Clinical Biochemistry of Domestic Animals.*, 4th ed. (J. J. Kaneko ed.), Academic Press, San Diego, pp892-897.
42. 加藤順三, 小野内常子 (1980) エストロゲン. *新図解ホルモンのすべて (ホルモンと臨床'80夏季増刊号)*, 医学の世界社, 東京, pp 216-221.
43. Kesner, J. S., Convey, E. M. and Anderson C. R. (1981) Evidence that estradiol induces the preovulatory LH surge in cattle by increasing pituitary sensitivity to LHRH and then increasing LHRH release. *Endocrinology*, 108: 1386-1391.
44. Knickerbocker, J. J., Drost, M. and Thatcher, W. W. (1986) Endocrine patterns during the initiation of puberty, the estrous cycle, pregnancy and parturition in cattle. In *Current Therapy in Theriogenology 2.* (D. A. Morrow ed.), W. B. Saunders Co., Philadelphia, pp117-125.
45. Kuwayama, M., Hamano, S. and Nagai, T. (1992) Vitrification of bovine blastocysts obtained by *in vitro* culture of oocytes matured and fertilized *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 96: 187-193.
46. Lasley, B. L., Troedsson, M., Bravo, W., Haggerty, M. A. (1989) Estrogen conjugate measurements to monitor ovarian activity. *Theriogenology*, 31: 127-139.
47. Leibfried-Rutledge, M. L., Critser, E. S., Eyestone, W. H., Northey, D. L. and First, N. L. (1987) Development potential of bovine oocytes matured *in vitro* or *in vivo*. *Biol. Reprod.*, 36: 376-383.
48. Lermite, V. and Terqui, M. (1991) Plasma sex steroid-binding protein in mature heifers: effects of reproductive status, nutritional level, and porcine growth hormone, and estradiol-17 $\beta$  treatments. *Biol. Reprod.*, 44: 864-870.

49. 牧野拓雄 (1973) 性ステロイドホルモンのRadioimmunoassay. 日内分泌会誌, 49: 629-645.
50. McDonald, L. E. (1975) Pregnancy and Parturition. In Veterinary Endocrinology and Reproduction., 2nd ed., Lea & Febiger, Philadelphia, pp424-442.
51. McDonald, P. D. (1991) Waters Sep-Pak applications bibliography, 5th ed., Waters, Milford.
52. Medina, M. B. and Schwartz, D. P. (1986) Isolation of estrogens in bovine plasma and tissue extracts using alumina and ion-exchange microcolumns. J. Agric. Food Chem., 34: 907-910.
53. Mikhail, G., Wu, C. H., Ferin, M. and Vande Wiele, R. L. (1970) Radioimmunoassay of plasma estrone and estradiol. Steroids, 15: 333-352.
54. Murphy, B. E. P. (1968) Binding of testosterone and estradiol in plasma. Canad. J. Biochem., 46: 299-309.
55. 永田俊一, 近藤昌弘, 金子浩之, 荒木一司, 南保泰雄, 及川正明, 渡辺元, 田谷一善 (1996) アセトニトリル・n-ヘキサン分配法を用いた低濃度の血中エストラジオール-17 $\beta$ 測定のための簡便な脱脂法. J. Reprod. Develop., 42: j43-j49.
56. 中村孝雄, 正殿誠秀, 田名部雄一 (1974) ラジオイムノアッセイによる動物組織および体液中のエストラジオールおよびプロゲステロンの微量定量法. 岐阜大農研報, 36: 319-328.
57. O'Hare, M. J., Nice, E. C., Magee-Brown, R. and Bullman, H. (1976) High-pressure liquid chromatography of steroids secreted by human adrenal and testis cells in monolayer culture. J. Chromatogr., 125: 357-367.
58. O'Neill, C. (1987) Embryo-derived platelet activation factor: A preimplantation embryo mediator of maternal recognition of pregnancy. Domestic Anim. Endocrinol., 4: 69-85.
59. 大崎和栄, 西岡俊和, 宮沢清志, 佐藤邦忠 (1991) 馬の卵胞発育の指標としての血中エストロンサルフェート測定. 日本獣医学会講演要旨集, 111: 254 (要旨).
60. Perry, J. S., Heap, R. B. and Amoroso, E. C. (1973) Steroid hormone production by pig blastocysts. Nature, 245: 45-47.
61. Robertson, H. A. and King, G. J. (1974) Plasma concentrations of progesterone, oestrone, oestradiol-17 $\beta$  and of oestrone sulphate in the pig at implantation, during pregnancy and at parturition. J. Reprod. Fertil., 40: 133-141.
62. Robertson, H. A. and King, G. J. (1979) Conjugated and unconjugated oestrogens in fetal and maternal fluids of the cow throughout pregnancy. J. Reprod. Fertil., 55: 463-470.
63. Robinson, T. J. (1977) Reproduction in Cattle. In Reproduction in Domestic Animals., 3rd ed. (H. H. Cole and P. T. Cupps eds.), Academic Press, New York, pp433-454.
64. Roda, A., Girotti, S., Piacentini, A. L., Preti, S. and Lodi, S. (1986) Development of a sensitive direct luminescent enzyme immunoassay for plasma estradiol-17-beta. Anal. Biochem., 156: 267-273.
65. Rosenbaum, W., Christy, N. P. and Kelly, W. G. (1966) Electrophoretic evidence for the presence of an estrogen-binding  $\beta$ -globulin in human plasma. J. Clin. Endocrinol. Metab., 26: 1399-1403.
66. 佐藤和雄 (1984) 性腺・胎盤系ホルモン (エストロゲン). ホルモン測定値の読み方 (産婦人科シリーズ 38), 南江堂, 東京, pp156-171.

67. Schöneshöfer, M. and Dulce, H. J. (1979) Comparison of different high-performance liquid chromatographic systems for the purification of adrenal and gonadal steroids prior to immunoassay. *J. Chromatogr.*, 164: 17-28.
68. Shackleton, C. H. L. (1986) Profiling steroid hormones and urinary steroids. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 379: 91-156.
69. Shackleton, C. H. L. and Whitney, J. O. (1980) Use of sep-pak cartridges for urinary steroid extraction: Evaluation of the method for use prior to gas chromatographic analysis. *Clin. Chim. Acta*, 107: 231-234.
70. Sjoblom, P., Wikland, M., Hahlin, M., Nilsson, L. and Lindblom, B. (1990) Evaluation of time-resolved fluoroimmunoassay for analysis of sex steroids in serum. *Hum. Reprod.*, 5: 396-401.
71. Solomon, S. (1994) The placenta as an endocrine organ: steroids. In *The Physiology of Reproduction.*, 2nd ed. (E. Knobil and J. D. Neill eds.) Vol. 2, Raven Press, New York, pp863-873.
72. Stone, B. A., Seamark, R. F., Godfrey, B. M., Quinn, P. and Lloyd, B. (1986) Oestrone sulphate levels in plasma of sows as a basis for prediction of litter size at term. *Anim. Reprod. Sci.*, 11: 51-62.
73. Sugiyama, S., Nakao, T., Tsunoda, N. and Kawata, K. (1985) An enzymeimmunoassay of serum oestrone sulphate and its application to early pregnancy diagnosis in pig. *Br. Vet. J.*, 141: 60-68.
74. Takahashi, T., Hirako, M., Takahashi, H., Patel, O. V., Takenouchi, N. and Domeki, I. (1997) Maternal plasma estrone sulfate profile during pregnancy in the cow; Comparison between singleton and twin pregnancies. *J. Vet. Med. Sci.*, 59: 287-288.
75. 玉置文一、稲野宏志、鈴木桂子 (1988) エストロゲン. ホルモンハンドブック (日本比較内分泌学会編), 南江堂, 東京, pp 318-322.
76. Tamamura, F., Nakao, T., Tsunoda, N. and Kawata, K. (1982) An enzyme immunoassay of estrone in swine serum. *Steroids*, 39: 657-666.
77. Thomas, C. M. G., Van Den Berg, R. J. and Segers, M. F. G. (1987) Measurement of serum estradiol comparison of three direct radioimmunoassays and effects of organic solvent extraction. *Clin. Chem.*, 33: 1946-1947.
78. 鳥居隆三、藺守龍雄 (1975) ウシの末梢血中Progesterone, Estrone, Estradiol, Estriol, Cortisol およびCorticosteroneの測定法. *家畜繁殖誌*, 20: 153-164.
79. 辻章夫 (1978) LL系クロマトグラフィー. 最新液体クロマトグラフィー 基礎と応用 (原昭二・辻章夫編), 南山堂, 東京, pp43-50.
80. Wooding, F. B. P. and Flint, A. P. F. (1994) Placentation. In *Marshall's Physiology of Reproduction.*, 4th ed. (G. E. Lamming ed.) Vol. 3, Chapman & Hall, London, pp233-460.
81. Worsfold, A. I., Williams, G. and Williams, D. O. (1989) Oestrone sulphate measurement in bovine serum during late pregnancy and its relationship with the number of calves born. *Br. Vet. J.*, 145: 46-49.

# SOLID-PHASE EXTRACTION OF ESTROGENS FROM BOVINE BLOOD PLASMA FOR THEIR PERIPHERAL DETECTION BY RADIOIMMUNOASSAY

*Makoto Hirako*

*Department of Grazing Animal Production  
National Grassland Research Institute*

A simple purification and separation method for estrogens in bovine peripheral blood with solid-phase extraction was established for potential contribution to research on reproductive physiology in cattle.

As a preliminary experiment on elution of steroids in the solid-phase extraction with a small reversed-phase cartridge, 5 unconjugated steroids (estrone, estradiol-17 $\beta$ , testosterone, androstenedione and progesterone) and 1 conjugated steroid (estrone sulfate), all important in female reproduction, were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) with a high pressure reversed-phase column. The elution patterns suggested the possibility of separately collecting unconjugated and conjugated estrogens as well as estrogens and progesterone with a small reversed-phase cartridge, although this would not be possible for estrone and estradiol-17 $\beta$ , and estrogens and androgens.

Whether unconjugated and conjugated estrogens added to bovine plasma can be extracted and purified by solid-phase extraction with a small reversed-phase cartridge has been investigated. According to results of HPLC, methanol was used as elution solvent in the following. First,  $^3\text{H}$ -labeled estrogens added to bovine plasma at various reproductive stages were recovered by solid-phase extraction with applied volume to ascertain whether estrogens in the plasma are quantitatively retained in the cartridge. Secondly, unconjugated and conjugated estrogens retained in the cartridge were eluted with a stepwise gradient of methanol concentration to determine an appropriate concentration of methanol for the elution of each estrogen. Thirdly, study was made as to whether unconjugated and conjugated estrogens are separately recovered with a stepwise gradient of methanol concentration. All estrogens were highly and quantitatively retained in the cartridge irrespective of the reproductive stage or applied plasma volume. The elution pattern of each estrogen with the stepwise gradient was consistent with that in HPLC. When estrogens retained in the cartridge were eluted by the stepwise gradient with 40 and 70%(v/v) methanol, estrone sulfate was eluted with 40% methanol, followed by estrone and estradiol-17 $\beta$  with 70% methanol. Thus, estrogens in bovine blood plasma can be quantitatively extracted by solid-phase extraction with a small reversed-phase cartridge. Unconjugated and conjugated estrogens retained in the cartridge appeared to be separately recovered.

Endogenous estrogens were extracted from bovine blood samples with a

reversed-phase cartridge and measured by radioimmunoassay (RIA) to demonstrate the reliability of the total assay system. First, the influence of applied plasma volume on the assayed value was examined and appropriate plasma volume for the assay was determined. Impurities affecting the reaction of estrogen on RIA were characterized and the influence of bovine plasma component on the extraction of endogenous estrogen was investigated. The recoveries of exogenous estrogens by solid-phase extraction and RIA were examined to verify assayed values. Estradiol-17 $\beta$  was isolated from the same blood samples by solid-phase extraction as well as liquid-liquid extraction followed by distribution by liquid chromatography as a validated extraction and purification method. Estradiol-17 $\beta$  in each extract was measured by RIA and the values were compared. Endogenous estrogen was found to be adsorbed quantitatively in the cartridge, and unconjugated and conjugated estrogens to be separately eluted by stepwise gradient with 40 and 75% methanol. Although RIA values declined with increase in applied plasma volume, unconjugated and conjugated estrogens included in the bovine plasma could be quantitatively measured for the applied plasma volume of 2 ml or less. Concentrations could be almost precisely determined by correcting the assayed values with recovery in known samples, even if estrogen levels were so low that more than 2 ml of plasma were necessary for the assay. For unconjugated estrogen, the blood level was quantitatively measured irrespective of applied plasma volume by 2 step extraction, since solid-phase extraction with liquid-liquid extraction eliminate water- and oil-soluble contaminants.

By coupling solid-phase extraction and a specific RIA system, changes in peripheral estrone sulfate were determined during the regular estrous cycle and early stages of singleton and twin pregnancies caused by transfer of IVF embryos. Estrone sulfate during regular estrous cycle showed significant correlation with the concentrations of unconjugated estrogens. Peripheral estrone sulfate is not an appropriate indicator for follicular development in cattle because its concentration has a smaller range compared to estradiol-17 $\beta$ . In pregnant cows, no significant changes due to pregnancy were observed until Day 45 at any concentration of estrogen. Since Day 50, estrone sulfate concentration is elevated with the advance of pregnancy. Peripheral concentrations of unconjugated estrogens were kept at basal levels until Day 59. The timing of increment in estrone sulfate concentration in twin pregnant cows is earlier than in cows with singleton pregnancy. The rate of increase in estrone sulfate concentration was higher in twin carrying cows than singleton cows. Peripheral estrone sulfate would thus appear a useful indicator of placental formation in cattle because increase in estrone sulfate production is accompanied by development of the placenta.

A reliable solid-phase extraction of estrogens from bovine blood was established. Changes in estrone sulfate concentration in bovine blood plasma during regular estrous cycle and early pregnancy were determined.

新編大藏經

卷之三

法苑珠林

法苑珠林卷之三

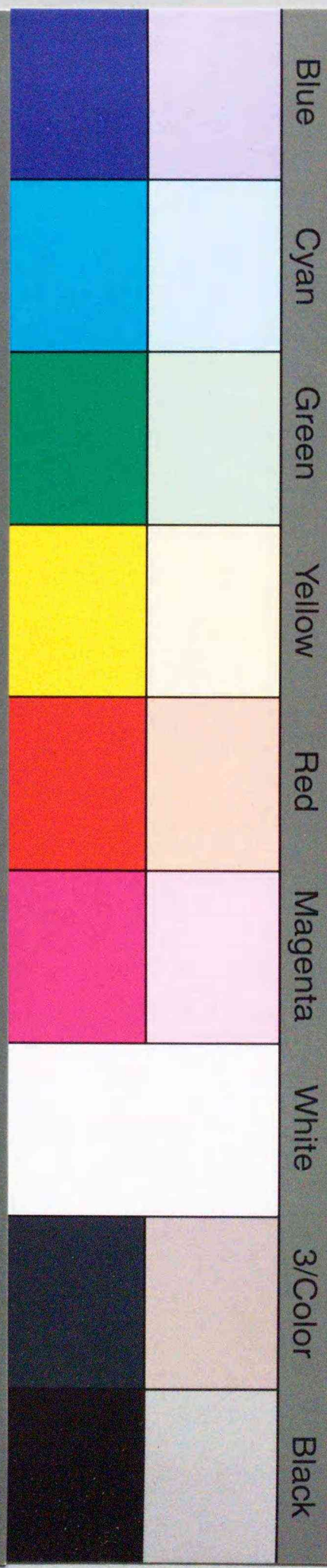
法苑珠林



inches 1 2 3 4 5 6 7 8  
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



# Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

