Japan Society of Obstetrics and Gynecology

日本産科婦人科学会雑誌　26巻12号　1347～1354頁　1974年（昭49）12月

血中 progesterone 測定法に関する研究
— competitive protein binding assay と radioimmunoassay の比較 —

—Studies on a Comparison of the Competitive Protein Binding Assay and Radioimmunoassay for Plasma Progesterone—

熊本大学医学部産科婦人科学教室（主任：前山昌男教授）
宮川勇生 Isao Miyakawa　松尾　勇 Isamu Matsuo
池田　功 Isao Ikeda　森　憲正 Norimasa Mori

概要　血中 progesterone 測定法について competitive protein binding assay, radioimmunoassay を用いて比較検討し，臨床応用を目的とした測定法について論じた．

1）Progesterone-3-BSA で得られた抗血清を用いたＲＩＡの感度は，妊娠モルモット血清から得られたＰＢＰを用いたＣＰＢＡのそれよりすぐれていた．

2）ＣＰＢＡでは incubation 温度の影響を強く受け，4℃が最適で，37℃，45℃では測定できなかつた．ＲＩＡでは，4℃から45℃では温度の影響は認められなかつた．また incubation 時間もＲＩＡでは30分間で十分と考えられた．

3）ＰＢＰとの cross reaction は，内因性 steroid hormone である DOC, 20α-dihydroprogesterone, pregnenolone, testosterone, 17α-OH-progesterone とかなり認められたが，ＲＩＡでは，pregnenolone 以外は，強い cross reaction は認められなかつた．

4）ＣＰＢＡによる follicular phase の progesterone 値は，chromatography を省略したＲＩＡによるそれより２ないし３倍の高値を示したが，妊娠後半期では，平均1.15倍であつた．

5）Chromatography を省略したＲＩＡによる値は chromatography を行なつた場合の値より，平均で1.19倍を呈した．

6）Chromatography を省略したＲＩＡによる follicular phase の progesterone 値は 1.5ng/ml 以下，mid luteal phase は 4.5ng/ml 以上を示した．また妊娠では，妊娠20週より，その値は急に上昇し，妊娠末期で160～ 350ng/ml を呈した．

血中 progesterone 測定法としてはＲＩＡがすぐれているが，ＣＰＢＡではＰＢＰが妊娠モルモットから得られることより便利である．両測定法とも今後の臨床応用が期待される．

緒　言

血中 progesterone 値は，卵巣の黄体機能や，胎盤機能の重要な指標とされているが，血中の微量のホルモン測定は困難であり，臨床面で広く応用されるに至らなかつた．

近年 electron capture detector 付 gas liquid chromatography や，competitive protein binding assay (CPBA), radioimmunoassay(RIA) の導入により，血中 progesterone をはじめとする血中ホルモン測定法の発達はめざましく，種々の検討が加えられ，臨床応用を目的とした測定法が開発されつつある．

今回，妊娠モルモット血清から得られた progesterone binding protein (PBP) を用いたＣＰＢＡ

NII-Electronic Library Service

Japan Society of Obstetrics and Gynecology

と progesterone-3-bovine serum albumin で免疫して得られた抗血清を用いたＲＩＡとの比較を行ない，基礎的検討および臨床応用を目的とした血中 progesterone 測定法の検討を行なつたので報告する．

Ⅰ 実験対象

熊本大学附属病院産科婦人科の外来および入院中の妊婦を対象とし，採血は午前９時から11時に行ない遠心分離ののち，血清は−20℃に凍結保存した．

Ⅱ 実験試薬および器具

1) progesterone-1α,2α,-^{3}H(n): Radiochemical Centre (英国) specific activity 53ci/mM

2) ethyl acetate, petroleum ether, ammonium sulfate, benzene, ethyl alcohol: 特級(和光純薬)

3) 0.04M-phosphate buffer, pH 7.4

4) 0.05M-borate buffer, pH 8.0

5) Dextran coated charcol suspension の作製

Dextran T 40, 50mg (Pharmacia, Uppsala-Sweden) と Norit A 500mg (半井化学薬品) をpH 7.4の0.04M phosphate buffer 200ml に溶解した．

6) Dioxane scintillation mixture

dioxane (半井化学薬品) 500ml に液体シンチレーション用 naphthalene (和光純薬) 50ｇ，ＰＰＯ (半井化学薬品) 3ｇを加えて作製．

7) ＰＢＰの作製

妊娠後半期モルモットから心臓穿刺にて採血，血清を分離，4℃，24時間pH 7.4の0.04M phosphate buffer にて透析を行なつて作製．

8) Progesterone 抗血清：Progesterone-3-BSA で家兎を免疫して得られたもの (帝国臓器研究所より提供，牧野 (1973))

9) 栓つき10ml 用スピッツ試験管

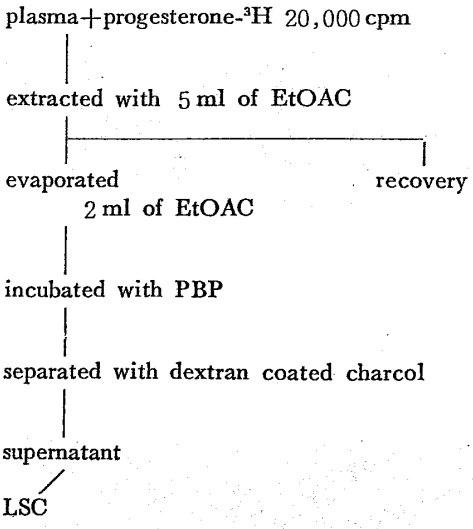
10) ALOKA Liquid Scintillation Counter 601

Ⅲ 測定方法

1) Competitive protein binding assay

10ml 栓つき試験管に約20,000cpm の ^{3}H-progesterone と０から25ng までの種々の濃度の標準 progesterone または，標準曲線にはいるような適当量の血清を加え，ethyl acetate 5 ml にて抽出した．その 0.5ml を回収率補正用に，また２ml は蒸発乾固させ assay に用いた．Competitive protein binding assay は蒸発乾固した検体にＰＢＰを加えて incubation を行なつた後，遊離の ^{3}H-progesterone を吸着するため，dextran coated charcol suspension を加え遠沈し，その上清の 0.5ml に dioxane scintillation mixture を加え ALOKA Liquid Scintillation Counter 601 にて測定した (表１)．

表１ Competitive protein binding assay



2) Radioimmunoassay

10ml 栓つき試験管に約 2,500cpm の ^{3}H-progesterone と０から 1,000pg までの種々の濃度の標準 progesterone または標準曲線にはいるような適当量の血清を加え ethyl acetate 5 ml にて抽出し ethyl acetate 層２ml を蒸発乾固させた．その乾固物を benzene: methanol (85 : 15) の溶液 0.2ml にて２回洗い Sephadex LH-20 2 ml をつめたツベルクリン注射筒を用いた micro column に入れ，benzene-methanol 溶液にて chromatography を行ない progesterone 分画を用いた．その分画量の$^1/_2$を回収率補正用に，また残り$^1/_2$をＲＩＡに用いた．ＲＩＡは progesterone 分画として得られた benzene-methanol 溶液に ^{3}H-progesterone 10,000cpm を加え蒸発乾固後，抗血清を加え incubation 後，抗血清と結合した ^{3}H-progesterone

NII-Electronic Library Service

Japan Society of Obstetrics and Gynecology

表2　Radioimmunoassay

plasma＋progesterone-^{3}H, Ca. 2500 cpm
↓
extracted with 5 ml EtOAC
↓
evaporated 2 ml of EtOAC
↓
Sephadex LH-20 column chromatography
↓
progesterone fraction
↓
$^1/_2$ ＋ progesterone-^{3}H, ca. 10000 cpm　　$^1/_2$ for recovery
↓
incubated with antiserum
↓
separated with $(NH_4)_2SO_4$
↓
supernatant
↓
LSC

(Bound) と遊離の ^{3}H-progesterone(Free) の分離には50%$(NH_4)_2SO_4$を用いた．遠沈後，その上清 0.2ml を用いて ALOKA Liquid Scintillation Counter 601にて測定した（表2）．

成　績

1)　ＰＢＰならびに progesterone antiserum 濃度の影響

妊娠モルモット血清を 300倍，600倍，900倍，1,800倍に稀釈して用いた．600倍稀釈血清で得られたＰＢＰを用いた場合がもつとも良い結果が得られた．

また，progesterone antiserumでは，5,000倍，10,000倍，20,000倍，40,000倍について検討を行ない，10,000倍稀釈溶液を測定に用いた．（図1，図2）

2)　Incubation 温度の影響

ＣＰＢＡでは，0から25ng の種々の濃度の progesterone を加えてＰＢＰとの結合率を，また

図1　Effect of PBP concentrations (CPBA)

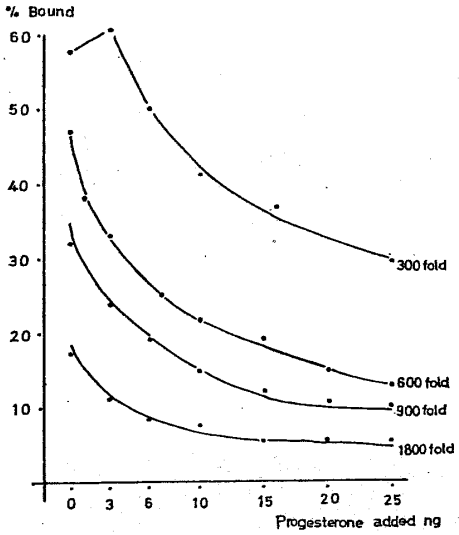
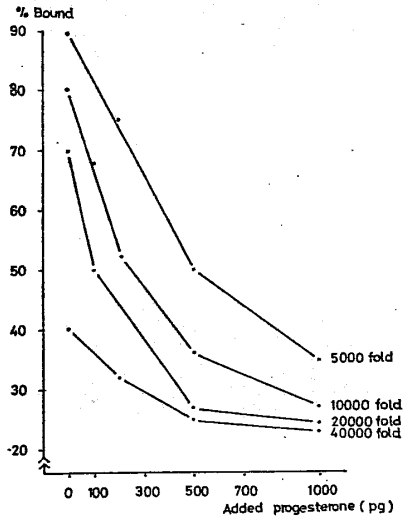


図2　Effect of anti-serum concentrations (RIA)



ＲＩＡでは，0から 1,000pg までの種々の濃度の progesterone を加えて antiserum との結合率を，4℃，18℃，37℃，45℃の incubation温度で検討した．ＣＰＢＡでは4℃で目的に適した曲線が得られたが，37℃，45℃では，progesterone 濃度の変化によつて結合率に変化が認められなかつた．一方，ＲＩＡでは，いずれの温度においても progesterone 濃度が増すにつれて結合率は低下し，測定に使用できる標準曲線が得られた．（図3，図4）

NII-Electronic Library Service

Japan Society of Obstetrics and Gynecology

図3 Effect of temperature (CPBA)

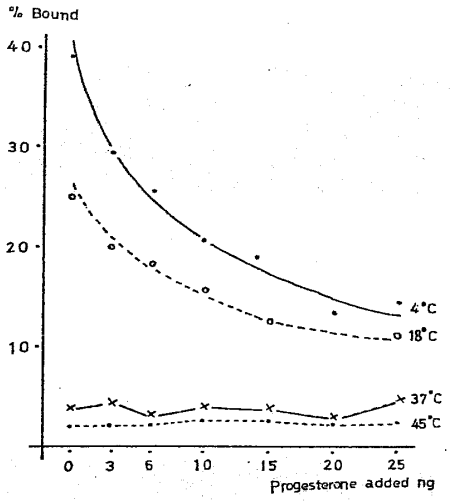
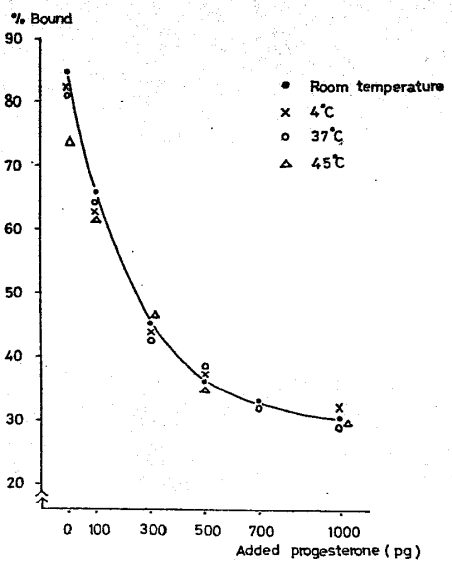


図4 Effect of temperature (RIA)



3) Incubation 時間の影響

CPBAでは，5分から120分までの incubation 時間による結合率の変化を観察した．15分までの結合状態は図5にみられるように，時間の経過とともに急速に結合率は上昇したが，その後はわずかづつ2時間まで上昇した．

添加した progesterone 3 ng および15ng の2時間後の結合率を 100%とすると，5分でのそれぞれの結合率の平均値は50.8%，15分で70.4%，30分では73.4%，そして60分では80.9%であった．（図5）

図5 Effect of incubation time (CPBA)

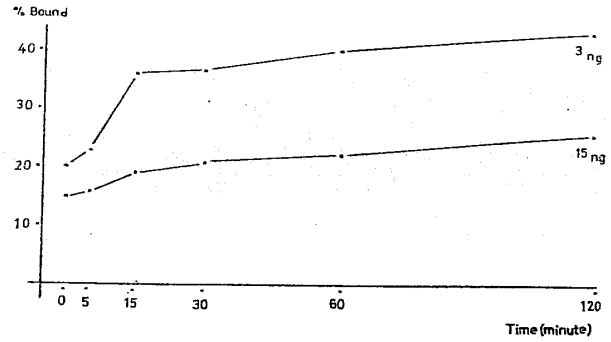
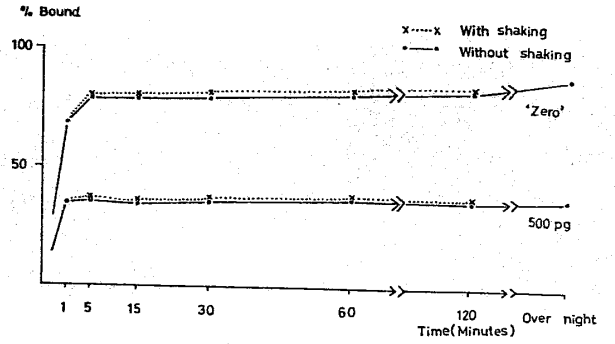


図6 Effect of incubation time (RIA)



RIAでは，0と 500pg の incubation 2時間後の結合率を 100%とすると，15分でのそれぞれの結合率の平均値はすでに88.9%，30分で91.8%，さらに over night の incubation を行なつても，その結合率は 108.0%と大きな結合率の上昇はみられなかつた．

また，incubation 中に振とうを行なつたものと，静置したものとの差は認められなかつた．（図6）

4) Cross reaction

CPBAでは progesterone 0における結合率（A）から各種 steroid hormone 10ng における結合率（B）の差と progesterone 0の結合率から progesterone 10ng の結合率（C）の差の比，すなわち$\frac{A-B}{A-C}\times 100$で表現したが，retroprogesterone（157.0%）がもつとも強くDOC (93.7%) 20α-dihydroprogesterone (81.5%)，19nor-testosterone (25.0%) pregnenolone (16.7%)，testosterone (12.5%)，17α-hydroxyprogesterone (10.8%) と表3に示すようである．一方，RIAでの

NII-Electronic Library Service

Japan Society of Obstetrics and Gynecology

表3　Cross reaction (CPBA)

Progesterone	100.0	Testosterone	12.5
Retroprogesterone	157.0	17α-OH progesterone	10.8
DOC	93.7	Androstenedione	7.5
20α-OH progesterone	81.5	Hydrocortisone	6.3
19nor-testosterone	25.0	Estradiol-17β	5.8
Pregnenolone	16.7	Estriol	< 5.0

表4　Cross reaction (RIA)

Progesterone	100.0	Androstenedione	0.5
Pregnenolone	30.0	19nor-testosterone	0.38
17α-OH progesterone	3.75	Testosterone	0.3
DOC	3.0	Hydrocortisone	<0.15
Retroprogesterone	1.5	Estrone	<0.15
20α-OH progesterone	1.0	Estradiol-17β	<0.15
		Estriol	<0.15

progesterone antiserum と各種 steroid hormone との cross reaction は progesterone 50%結合率を示す量（X）と各種 steroid hormone の50%結合率を示す量（Y）の比，すなわち$\frac{X}{Y}\times$ 100で求めた．cross reaction は pregnenolone (30.0%) 17α-hydroxyprogesterone (3.75%) DOC (3.0%) retroprogesterone (1.5%) 20α-dihydroprogesterone (1.0%)，estrone，estradiol-17β，estriol は0.15%以下でありPBPを用いたCPBAの displacement とは明らかに異なつていた．(表4)

5)　Precision

CPBAでは，黄体期，妊娠9週，32週および38週の症例の同一検体を4回測定して，またRIAでは，卵胞期，黄体期，妊娠11週，21週および36週の同一検体を6回測定して precision を求めた．

CPBAでは，S.E. は 6.9%以下であり，RIAでは，卵胞期で11.1%であつたが，その他では3.6%以下であつた．(表5，表6)

6)　回収率

血清からの progesteroneの抽出を ethyl acetate と petroleum ether を用いて検討した．前者による回収率 (Mean±S.E.) は 102.5± 0.8%であり，後者によるそれは55.2± 3.2%であつた．

表5　Precision (CPBA)

No.	1	2	3	4
week	luteal phase	9 w	32 w	38 w
estimated value (ng/ml)	16.0	24.0	135.0	218.0
	19.0	21.0	195.0	178.5
	17.0	28.0	187.5	185.0
	15.0	27.0	190.0	221.0
mean±S.E.	16.8 ±0.74	25.0 ±1.37	176.9 ±12.17	200.6 ±9.52

表6　Precision (RIA)

sample No.	1	2	3	4	5
	follicular phase	luteal phase	pregnancy 11w	21w	36w
estimated value (ng/ml)	0.80	5.20	13.5	117.5	210.0
	0.75	4.00	14.0	102.5	205.0
	0.70	4.50	14.5	105.0	190.0
	1.50	4.30	12.5	120.0	200.0
	1.10	4.10	12.0	125.0	190.0
	1.10	4.60	13.7	105.0	200.0
mean±S.E.	0.99 ±0.11	4.45 ±0.16	13.37 ±0.35	112.50 ±3.54	199.17 ±2.99

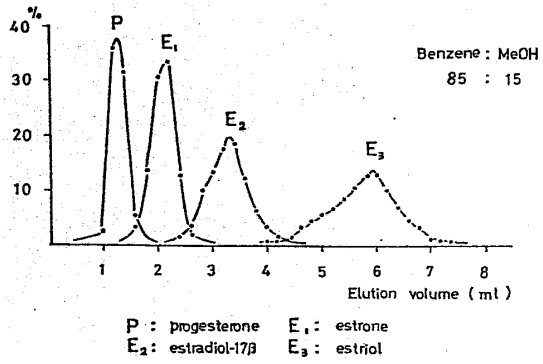
7)　Column chromatography

Progesterone の分離，精製には，Wu et al. (1971) の方法を用いた．Sephadex LH-20 microcolumn chromatographyを行なうと，図7に示すように progesterone 分画は，1.0ml から1.6 ml の benzene-methanol 溶液中に認められた．

8)　CPBAとRIAの値の比較

PBPを用いたCPBAと chromatography を

図7　Chromatographic behavior of steroid tracers in Sephadex LH-20 column



NII-Electronic Library Service

Japan Society of Obstetrics and Gynecology

表7 Radioimmunoassay without chromatography and competitive protein binding assay

progesterone ng/ml (1) RIA	progesterone ng/ml (2) CPBA	(2)/(1)	
1.0	3.2	3.20	follicular phase
1.6	3.5	2.18	
5.3	7.5	1.42	luteal phase
11.6	23.4	2.01	
17.5	28.0	1.60	
20.8	29.8	1.43	early pregnancy
28.0	51.2	1.83	
30.0	40.0	1.33	
80.0	99.2	1.12	mid pregnancy
125.0	127.0	1.01	
115.0	147.0	1.28	
205.0	224.0	1.09	late pregnancy
290.0	346.7	1.20	
220.0	266.7	1.21	

表8 Assay of plasma progesterone with and without chromatography

sample No.	progesterone ng/ml (1) direct assay	(1) column chromatography prior to assay	(1)/(2)
1	8.5	7.6	1.11
2	19.0	17.4	1.09
3	20.7	17.3	1.19
4	55.0	50.0	1.10
5	76.5	57.3	1.33
6	85.5	67.9	1.25
7	240.0	207.5	1.15
8	250.0	186.7	1.33
9	312.0	253.0	1.23
mean ±S.E.			1.197 ±0.030

省略したRIAによる値の比較を行なつた.

卵胞期ではCPBAによる値は，2～3倍の高値を示したが，妊娠後半期では平均1.15倍であつた（表7）.

9) Chromatography を用いた場合と省略した場合の値の比較

RIAにおいて chromatography を省略した場合の値は，chromatographyを行なつた値より平均で1.19倍を示した（表8）.

図8 FSH. LH and progesterone levels in menstrual cycle

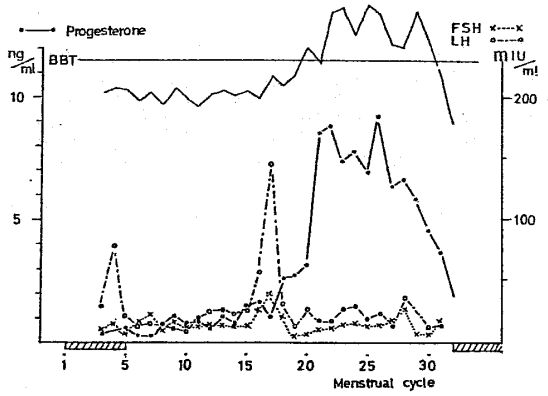
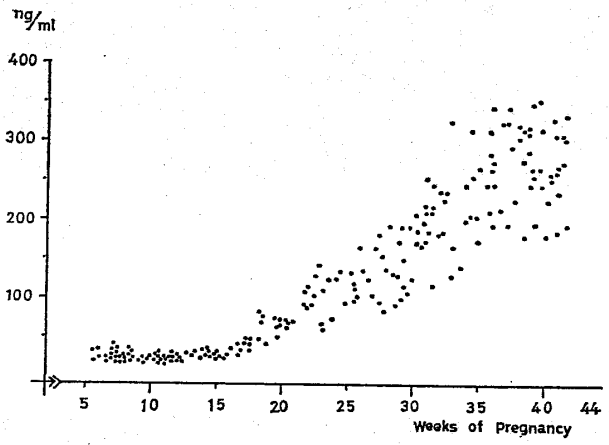


図9 Plasma progesterone levels during normal pregnancy



10) 臨床応用

Chromatography を省略したRIAによる正常月経周期の一症例と正常妊娠経過の血中progesterone 値の pattern を図示した（図8，図9）. 多くの症例で，follicular phase 1.5ng/ml 以下，mid luteal phaseで 4.5ng/ml 以上を示した. 妊娠では，妊娠20週をすぎると著明な増加が認められ，妊娠末期では，160～350ng/ml であり，その値は chromatography を行なつた値より約20%高値と考えられる.

考 案

血中 progesterone 測定法は，Hooker-Forbes (1947) の生物学的測定法をはじめ，Zander & Simme (1954) の比色による化学的測定法，

NII-Electronic Library Service

Japan Society of Obstetrics and Gynecology

Woolever & Goldfien (1963) の double isotopic dilution method, また Van der Molen & Groen (1965) の gas liquid chromatography による測定法など歴史的発達をとげてきたが多量の血清が必要であることや, 測定手技が煩雑であることが臨床応用のさまたげとなつていた.

しかし, Murphy et al. (1963) による corticosteroid binding globulin (CBG) を用いた competitive protein binding assay による corticosteroid 測定法は Neill (1967) によりＣＢＧの progesterone との cross reaction を利用することにより, chromatography を行ない血中 progesterone 測定法にも用いられるにいたつた. また, Johansson (1969) は抽出溶媒に petroleum ether を使用することにより chromatography の操作を省略しても臨床応用が可能であるとした.

さらに, Diamond et al. (1969) によつて妊娠モルモット血清中に発見された progesterone と特異的に結合する蛋白, すなわち progesterone binding protein (PBP) は, 他の内因性 steroid hormone との cross reaction が少いため chromatography を行なわずに測定に利用されている (宮川, 1973).

一方, steroid hormone のＲＩＡは bovine serum albumin を結合させて hapten を作製することにより, 一段と進歩をとげ, progesterone のＲＩＡも Abraham et al. (1971) によつて開発された.

現在, 臨床面での血中 progesterone 測定法は, ＣＰＢＡやＲＩＡが用いられているが, それぞれの特長について比較検討した報告は少ない (Morgan, 1972). ここではＰＢＰを用いたＣＰＢＡと progesterone-3-BSA を家兎に免疫して得られた progesterone antiserum を用いたＲＩＡについて比較検討した.

私達のＰＢＰを用いたＣＰＢＡでは, 妊娠モルモット血清 600倍稀釈のものが, もつともよい standard curve が得られ, incubation の適温は4℃であり, 37℃, 45℃では全く結合が認められなかつた. また, その incubation 時間は15分間おこなつている報告もあるが, われわれの成績では60分まで結合率は少しづつ増加の傾向がみられ, 60分が適当と考えられた.

一方, ＲＩＡでは, 4℃から45℃の incubation 温度ではその結合率はほとんど一定で, incubation 時間も30分で91.8%の結合率が得られ, 十分と考えられ, incubation 中の振とうの必要もなかつた.

臨床応用を目的とした測定法では, 測定操作上, もつとも煩雑である chromatography の過程を省略することであり, それには progesterone に特異的な, 他のsteroid hormoneとのcross reaction の少ないＰＢＰあるいは抗血清を得ることが望ましい. 妊娠モルモット血清から得られたＰＢＰの cross reaction から考慮して, 測定上問題となる内因性 steroid hormone は, DOC, 20α-dihydroprogesterone, testosterone, 17α-hydroxyprogesterone, hydrocortisone である. 妊娠では progesterone の著明な増加に対して, それらの増加は少ないことや, それらとＰＢＰの結合能からみて測定値の変動は progesterone の変化とみなしえるが, 月経周期では, 17α-hydroxyprogesterone, testosterone, hydrocortisoneの関与があり, 当然測定値が高値を示すので十分考慮しなければならない.

一方, ＲＩＡの cross reaction は progesterone 50%結合率の量と各種 steroid hormone 50%結合率の量の比で表現したため, ＰＢＰの場合のcross reaction の値とそのまま比較はできないが, その cross reaction は pregnenolone 30.0%, 17α-hydroxyprogesterone 3.75%, ＤＯＣ 3.0%であつた. 血中 pregnenolone 濃度はきわめて微量であることにより, 臨床的には, 月経周期の測定においても chromatography の過程を省略しても良いと考えられる.

また, precisionはＲＩＡの方がＣＰＢＡよりすぐれていることが示された.

回収率は血清からの progesterone の抽出について検討した. Johansson (1969) はpetroleum ether を用いることにより, progesterone のみが抽出されるとして, chromatographyを省略したＣＢＧに

NII-Electronic Library Service

Japan Society of Obstetrics and Gynecology

よる血中 progesterone 測定法の迅速化を試みている．我々の成績では，petroleum etherの場合は，55.2±3.2%と回収率も悪く，ばらつきも大きくstandard curve も満足すべきものが得られなかつた．

Chromatography の必要性は抗血清あるいは結合蛋白と内因性 steroid hormone との cross reaction の程度によつてきまるが，ＲＩＡでは chromatographyを行なわなかつた場合は，行なつた場合の約 1.2倍を示した．またchromatographyを省略したＲＩＡとＰＢＰを用いたＣＰＢＡで同一検体のそれぞれの測定値について検討した．Progesterone 値が低値を示す月経周期や Ist trimester では，ＣＰＢＡによる値は高値を示したが，mid pregnancy 以後では，平均1.15倍でほぼ同じような測定値を示した．

Chromatography を省略し，臨床応用を目的とした測定法は，他の steroid hormone との cross reactionを少くすることが重要であるが，妊娠モルモット血清から得られたＰＢＰには限界がある．しかし，ＲＩＡでは Progesterone-3-oxime-BSA, Progesterone-6-(carboxymethylene) thioether-BSA 11α-hydroxyprogesterone-hemisuccinate-BSA などの種々の hapten を作製し progesterone に対する specificity の高い抗血清を作り出す努力がなされている．したがつてＰＢＰによるＣＰＢＡとＲＩＡの比較は，得られたＰＢＰや抗血清によつて左右されるため一概にはのべられないが，specificity の高い抗血清の得られるＲＩＡは incubation 時間も短かくて，incubation 温度の考慮もせずに測定でき，また感度もよく cross reaction が少ないため chromatography を省略しても臨床応用には十分であり，利用しやすい．しかし，ＰＢＰによるＣＰＢＡも卵胞期ことに late follicular phase の高値を考慮すれば，目的によつては，血中 progesterone 動態を知る指標としては十分であり，妊娠モルモット血清であるため動物を免疫して抗血清を得る必要もなく便利である．

両測定法とも，血清量が少くてすみ，測定手技も比較的簡単であることより，今後の臨床応用が期待される．

恩師前山昌男教授の御校閲を感謝します．またＲＩＡの antiserum を提供された帝国臓器株式会社，神戸川明博士，牧野拓雄博士に深謝します．なお本研究の一部は第21回日本内分泌学会西部総会にて発表した．

文　献

牧野拓雄（1973）：日本内分泌学会雑誌，49，629.
宮川勇生，松尾　勇，池田　功，森　憲正，前山昌男（1973）：産婦人科の世界，25，401.
Abraham, G.E., Swerdloff, R., Tulchinsky, D. and Odell, W.D. (1971): J. Clin. Endocr. Metab., 32, 619.
Diamond, M., Rust, N. and Westphal, U. (1969): Endocrinology, 84, 1143.
Johansson, E.D.B. (1969): Acta Endocr., 61, 592.
Morgan, C.A. and Cooke, I.D. (1972): J. Endocr., 54, 445.
Murphy, B.E.P., Engelberg, W. and Pattee, C.J. (1963): J. Clin. Endocr., 23, 293.
Murphy, B.E.P. (1970): Acta Endocr., Copenh. 64, Suppl., 147, 37.
Neill, J.D., Johansson, E.D.B., Datta, J.K. and Knobil, E. (1967): J. Clin. Endocr., 27, 1167.
Wu, C.H. and Lundy, L.E. (1971): Steroids, 18, 91.

(No. 2814　昭49・8・19受付)

NII-Electronic Library Service