

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-283380

(P2005-283380A)

(43) 公開日 平成17年10月13日(2005. 10. 13)

(51) Int.Cl.⁷

G O 1 N 33/74

F I

G O 1 N 33/74

テーマコード (参考)

2 G O 4 5

審査請求 未請求 請求項の数 11 O L (全 14 頁)

| | | | |
|-----------|----------------------------|----------|-----------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2004-98637 (P2004-98637) | (71) 出願人 | 000002990 |
| (22) 出願日 | 平成16年3月30日 (2004. 3. 30) | | 帝国臓器製薬株式会社 |
| | | | 東京都港区芝浦二丁目5番1号 |
| | | (71) 出願人 | 504125458 |
| | | | 株式会社帝国臓器製薬メディカル |
| | | | 神奈川県川崎市高津区下作延1604番地 |
| | | (74) 代理人 | 100078662 |
| | | | 弁理士 津国 肇 |
| | | (74) 代理人 | 100075225 |
| | | | 弁理士 篠田 文雄 |
| | | (72) 発明者 | 本間 誠次郎 |
| | | | 神奈川県横浜市青葉区たちばな台2-4-19 |
| | | (72) 発明者 | 川辺 勝弘 |
| | | | 神奈川県川崎市多摩区長尾7-8-18 |
| | | | 最終頁に続く |

(54) 【発明の名称】 バイオアペイラブルステロイドホルモンの測定方法

(57) 【要約】

【解決課題】 簡便で精度の高いバイオアペイラブルステロイドホルモンの測定方法を提供すること。

【解決手段】 生体由来血清試料にレクチンを添加し、放置する工程を含むことを特徴とする、バイオアペイラブルステロイドホルモンの測定方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

生体由来血清試料にレクチンを添加し、放置する工程を含むことを特徴とする、バイオアベイラブルステロイドホルモンの測定方法。

【請求項 2】

レクチンを用いて、生体由来血清試料中の S H B G 結合型ステロイドホルモンを、レクチン結合性糖鎖構造を有するタンパク質と一緒に凝集及び / 又は沈殿させる工程を含むことを特徴とする、バイオアベイラブルステロイドホルモンの測定方法。

【請求項 3】

レクチンがコンカナバリン A である、請求項 1 又は 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 4】

バイオアベイラブルステロイドホルモンが、バイオアベイラブルテストステロンである、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

レクチンを含むことを特徴とする、バイオアベイラブルステロイドホルモン測定用試薬。

【請求項 6】

レクチンが、コンカナバリン A である、請求項 5 に記載の試薬。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法に用いるための、請求項 5 又は 6 に記載の試薬。

20

【請求項 8】

請求項 5 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の試薬を含む、バイオアベイラブルステロイドホルモンの測定キット。

【請求項 9】

請求項 5 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の試薬を含む、血中バイオアベイラブルステロイドホルモン値に顕著な影響を及ぼす疾患の鑑別キット。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法を用いることを特徴とする、血中バイオアベイラブルステロイドホルモン値に顕著な影響を及ぼす疾患の鑑別方法。

30

【請求項 11】

血中バイオアベイラブルステロイドホルモン値に顕著な影響を及ぼす疾患が、パダム (Partial Androgen Deficiency in Aging Male) である、請求項 10 に記載の鑑別方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、血中におけるバイオアベイラブルステロイドホルモンの測定方法に関するものである。本発明の方法は、血中に存在するステロイドホルモンの中で活性を示す状態で存在しているもの、すなわち、バイオアベイラブルな状態にあるステロイドホルモンの血中レベルを知るのに有用である。

40

【背景技術】**【0002】**

生体内循環血中のステロイドホルモンは、そのほとんどが性ホルモン結合蛋白やアルブミン等の蛋白と結合しており (蛋白結合型)、遊離した状態 (遊離型) にて存在するものはごくわずかである。

【0003】

例えば、テストステロンは、性ホルモン結合グロブリン (sex hormone binding globulin; SHBG) 結合型が約 30 %、アルブミン結合型が約 68 %、遊離型が約 2 % という割合で生体内に存在している。そして、SHBG が血中に増加すると、テストステロンが高親和性に SHBG に結合する結果、遊離型のテストステロンが減少し、生体内でのアンドロ

50

ゲン作用が減弱される。一方、アルブミンに対するテストステロンの親和性はSHBGに対するその1/1000ときわめて低く、また、血中におけるテストステロンの蛋白結合同型-遊離型は平衡状態にあるため、血中の遊離型テストステロンが減少すると、アルブミンに結合しているテストステロンが解離して遊離型となる。このようなことから、生物活性を有するとされる遊離型テストステロン及び親和性が低くて遊離しやすいために標的器官へテストステロンを提供する能力を有するとされるアルブミン結合同型のテストステロンの2者をまとめて、バイオアベイラブルテストステロンと呼ばれている。

【0004】

男性においては一般に、加齢に伴い、アンドロゲンの低下に基づく精神、身体及び性機能低下などのいわば男性更年期とも呼ぶべき症状が見られる。最近、これらの症状に対し、Partial Androgen Deficiency in Aging Male (PADAM) という診断名が付されるようになった。血中総テストステロンの量は、エストロゲンと異なり、加齢による低下は緩徐であるが、SHBGが加齢とともに増加するため、血中バイオアベイラブルテストステロンの量は加齢に伴って顕著に低下する(非特許文献2参照)。Nankinらは、健常高齢者の血中のテストステロン値、遊離型テストステロン値及び黄体ホルモン値は若年者と有意差を認めないものの、血中バイオアベイラブルテストステロン値は若年者に比べて有意に低く、さらに勃起不全を有する患者群においては血中バイオアベイラブルテストステロン値は有意に低下していることを報告している(非特許文献5参照)。また、男性のうつ状態及び意欲低下等が血中バイオアベイラブルテストステロン値の低下と相関することも報告されている(非特許文献6参照)。このようなことから、血中バイオアベイラブルテストステロン値は、PADAMの診断において重要な指標となるものと考えられる。

【0005】

血中バイオアベイラブルテストステロン値の測定には、これまで、硫酸沈殿法(非特許文献1乃至非特許文献4参照)及びISSAM法が用いられてきた。硫酸沈殿法は、血清に硫酸アンモニウムを加えてSHBG結合同型テストステロンを沈殿させて除去し、非SHBG画分中のテストステロンの量をラジオイムノアッセイ(RIA)等により測定するものである。しかし、この方法においては、アルブミンとグロブリンの分離が悪く、アルブミンのおよそ半量が沈殿してしまううえに沈殿しないSHBGが15%程度残るという欠点がある。

【0006】

ISSAM法は、血清中の総テストステロンをLC-MS/MSで、また、SHBG及びアルブミンをRIA及び比色法でそれぞれ定量し、それらの値をInternational Society for the Study of the Aging Male (ISSAM) の計算式に代入してバイオアベイラブルテストステロンの値を求めるものである(非特許文献7参照)。しかし、ISSAM法においては3つの化合物を測定しなければならないのでかなり煩雑である。

【0007】

また、ISSAM法においては総SHBGの値が用いられるため、SHBGの結合状態の違いは測定値に反映されない。例えば、SHBGはエストロゲンに対しても親和性が高いため、エストロゲンが増加した状態にある患者においてはSHBGがエストロゲンと多く結合する結果、その患者における遊離型テストステロンの値が高くなっている(非特許文献8参照)。しかし、ISSAM法において測定されるSHBGの値にはこのような状態は反映されない。さらに、SHBGの変異型とテストステロンとの結合は野生型のそれと異なり、変異型SHBGの量が遊離型テストステロンの量に影響を及ぼす(非特許文献9参照)のであるが、このことは、ISSAM法におけるSHBGの値には考慮されない。またさらに、SHBGとテストステロンとの結合は金属イオンやステロイド性薬物の存在により影響を受ける(非特許文献10及び非特許文献11参照)が、このこともISSAM法において測定されるSHBGの値には考慮されない。

【0008】

一方、グロブリン等のレクチン結合性糖鎖構造を有する蛋白質はコンカナバリンA等のレクチンによって凝集等することが一般的に知られており、特許文献1乃至特許文献4に

も、血清中のグロブリンがレクチンによって除去しうる旨が記載されている。

【0009】

しかし、レクチンによるレクチン結合性糖鎖構造を有する蛋白質の除去が選択的であるかどうか、また、上記凝集等の際にSHBG結合型ステロイドホルモンがSHBGに包含されたまま凝集等するかどうかは明らかにされていない。したがって、レクチンがSHBG結合型ステロイドホルモンの除去に適しているかどうかについては不明であり、また、レクチンを用いてSHBG結合型ステロイドホルモンを除去したという報告もなされていない。

【0010】

ところで、バイオアベイラブルステロイドホルモンの測定においては、血清中の含有量が微量であることから、内部標準物質を指標として作成した検量線等を用いてその量を求めるのが簡便である。しかし、その内部標準物質が測定対象物質の誘導体、例えば、重水素化テストステロンなどであるときは、添加した内部標準物質とSHBGに包含されているステロイドホルモンとの交換が起きてしまう。したがって、上記内部標準物質を指標とした検量線を作成するためには、この問題を解決する必要があった。

【0011】

上記のようなことから、これまでに、レクチンを用いてバイオアベイラブルステロイドホルモンを測定したという報告は全くなされていなかった。

【0012】

【特許文献1】特許公開2000-081434号公報

【特許文献2】特許公表2001-515788号公報

【特許文献3】特許公表2001-504686号公報

【特許文献4】再公表WO00/057191号公報

【非特許文献1】Clinica Chimica Acta; 132, 101-110(1983)

【非特許文献2】J.Clin.Endocrin.Metab.; 61(4), 705-710(1985)

【非特許文献3】J.Clin.Endocrin.Metab.; 71(4), 963-969(1990)

【非特許文献4】医学のあゆみ; 205(6), 407-410(2003)

【非特許文献5】J.Clin.Endocrin.Metab.; 63, 1418(1986)

【非特許文献6】J.Clin.Endocrin.Metab.; 84, 573-577(1999)

【非特許文献7】J. Clin. Endocrinol. Metab.; 84, 3666-3672(1999)

【非特許文献8】J.Biol.Chem.; 277, 45219-45225(2002)

【非特許文献9】J.Clin.Endocrin.Metab.; 75, 1066-1070(1992)

【非特許文献10】J.Steroid Biochem.; 17, 375-380(2002)

【非特許文献11】Steroids; 64, 328-334(1999)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

本発明の目的は、コンカナバリンA等のレクチンによりレクチン結合性糖鎖構造を有する蛋白質を凝集及び/又は沈殿させ、生体由来血清試料中のバイオアベイラブルステロイドホルモン、特にバイオアベイラブルテストステロンを測定する方法を提供することである。

【0014】

また、本発明の別の目的は、コンカナバリンA等のレクチンを含有してなる、生体由来血清試料中のバイオアベイラブルステロイドホルモン、特にバイオアベイラブルテストステロンの測定用試薬を提供することである。

【0015】

さらに、本発明の別の目的は、血中のステロイドホルモンの状態に基づいてPADAMを鑑別する方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0016】

10

20

30

40

50

本願発明者らは、鋭意研究した結果、生体由来血清試料にレクチンを添加すると、レクチン結合性糖鎖構造を有する蛋白質のみがステロイドホルモンを包含したまま凝集し、バイオアベイラブルステロイドホルモンを血清中に特異的且つ簡便に分離できることを見出した。そして、血清中のバイオアベイラブルステロイドホルモンの量を測定する方法を開発して、本願発明を完成させた。

【0017】

すなわち、本発明によれば、生体由来血清試料にレクチンを添加し、放置する工程を含むことを特徴とする、バイオアベイラブルステロイドホルモンの測定方法が提供される。

【0018】

また、本発明によれば、レクチンを用いて、生体由来血清試料中のSHBG結合型ステロイドホルモンを、レクチン結合性糖鎖構造を有するタンパク質と一緒に凝集及び/又は沈殿させる工程を含むことを特徴とする、バイオアベイラブルステロイドホルモンの測定方法が提供される。

【0019】

また、本発明によれば、レクチンを含むことを特徴とする、バイオアベイラブルステロイドホルモン測定用試薬が提供される。

【0020】

さらに、本発明によれば、上記本発明のバイオアベイラブルステロイドホルモンの測定方法を用いることを特徴とする、血中バイオアベイラブルステロイドホルモン値に顕著な影響を及ぼす疾患の鑑別方法が提供される。

【0021】

また、本発明によれば、上記本発明のバイオアベイラブルステロイドホルモン測定用試薬を含む、バイオアベイラブルステロイドホルモンの測定キット及び血中バイオアベイラブルステロイドホルモン値に顕著な影響を及ぼす疾患の鑑別キットも提供される。

【0022】

本明細書において、「レクチン結合性糖鎖構造を有する蛋白質」とは、水溶性の血清蛋白質であって、レクチンがその糖鎖結合部位を認識して結合するような糖鎖構造を有する蛋白質を意味し、具体的には、
- グロブリン、
- グロブリン及び
- グロブリンが挙げられる。

【0023】

また、本明細書において、「バイオアベイラブルステロイドホルモン」とは、血中に存在するステロイドホルモンの中で、遊離型で存在するステロイドホルモン及び蛋白結合型であるが標的器官へステロイドホルモンを提供する能力を有する状態で存在するステロイドホルモンを意味する。なお、本発明において測定対象となる「ステロイドホルモン」は、生体内に存在する天然型のステロイドホルモンであり、例えば、テストステロン、ジヒドロテストステロン、エストロン、エストラジオール、エストリオール、プロゲステロン、アンドロステンジオン、デハイドロエピアンドロステロン、アルドステロン等を挙げることができる。これらのステロイドホルモンの中でも、テストステロン、ジヒドロテストステロン及びエストラジオールが好ましく、特に、テストステロンが好適である。これらのステロイドホルモンの測定により、血中バイオアベイラブルステロイドホルモン値に顕著な影響を及ぼす疾患、すなわち、骨粗しょう症、更年期障害、副腎不全症、PADAMを鑑別することができる。

【0024】

さらに、本明細書において、「PADAM」とは、老若男女を問わず、生体内アンドロゲンの低下に由来する精神的、身体的及び性機能低下の症状を意味する。ここで、精神的症状としては、例えば、無気力、疲労倦怠感、抑うつ、不眠、イライラ、集中力低下等を挙げることができ、身体的症状としては、例えば、発汗、耳鳴り、頭痛、しびれ、動悸、めまい、肩こり、寝汗等を挙げることができる。また、性機能低下の症状としては、例えば、勃起障害、性欲低下等が挙げられる。

【0025】

10

20

30

40

50

本発明において用いることのできるレクチンとしては、ガレクチン、アネキシン、C - 型レクチン等の動物由来レクチン及び豆科レクチン等の植物由来レクチンを挙げることができるが、中でも、豆科レクチン、例えば、コンカナバリン A、ヒマレクチン、ピーナツレクチン、レンズマメレクチン等が好ましく、とりわけ、コンカナバリン A が好適である。

【0026】

本発明の測定方法の概略は次の通りである。

測定方法の概略：生体由来血清試料にレクチンのリン酸緩衝液（PBS）溶液を添加して混和し、室温にて放置する。その後、PBSでさらに希釈した後、凝集及び／又は沈殿物を除去し、溶液中に含まれる測定対象物を定量する。

10

【0027】

レクチンのPBS溶液の濃度は特に制限されるものではないが、0.5重量%以上、特に1重量%以上であることが好ましく、また、20重量%以下、特に10重量%以下であることが好ましい。また、その量は、生体由来血清試料に対して10分の1乃至10倍量とすることができ、中でも、5分の1乃至5倍量が好ましい。

【0028】

レクチンのPBS溶液を添加して混和した生体由来血清試料を室温にて放置する時間は、少なくとも15分、好ましくは30分以上必要であるが、多くとも6時間までとし、好ましくは3時間以下とするのが良い。

【0029】

上記の測定方法の概略において、室温放置が終了した後に希釈のために加えるPBSの量は、特に制限されるものではないが、生体由来血清試料に対して半量乃至20倍量、好ましくは等量乃至10倍量とすることができる。

20

【0030】

また、上記の測定方法の概略における凝集及び／又は沈殿物の除去は、一般的な方法、例えば、遠心分離、カラムクロマトグラフィー、HPLC等により行うことができる。中でも、遠心分離が簡便である。なお、上記の測定方法の概略において、生体由来血清試料にレクチンを加えてから凝集及び／又は沈殿物を除去するまでの操作は、更なる簡便な方法、例えば、レクチンを結合させたカラムに生体由来血清試料を通過させる、等をもって代用することができる。さらに、凝集及び／又は沈殿物を除去した溶液中より、必要に応じて、測定対象物を有機溶媒等により抽出したものを定量に供することもできる。測定対象物の抽出に用いる有機溶媒としては、例えば、エーテル、酢酸エチル、ジクロロメタン、トルエン等を挙げることができる。

30

【0031】

本発明における測定対象物質の定量には、例えば、LC-MS/MS等の分析機器、ラジオイムノアッセイ（RIA）法等による測定試薬等を用いることができる。

【発明の効果】

【0032】

本発明の方法は、血中に存在するバイオアベイラブルステロイドホルモンを測定するのに有用である。

40

【実施例】

【0033】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

実施例1：コンカナバリンAを用いたバイオアベイラブルテストステロンの測定

（1）測定条件、補正值等についての検討

（i）コンカナバリンAによる血清処理条件の検討

SHBGを凝集及び／又は沈殿させるためのコンカナバリンAの濃度及び反応時間について検討した。

まず、4本のプラスチックチューブそれぞれにボランティア健常男性の血清試料100 μ Lを加え、それに¹²⁵I-SHBG（セティカンパニーより購入、ヒト血清由来）をそれ

50

ぞれ添加した。さらに、2.5%、5%、10%及び20%の濃度に調製したコンカナバリンA（アマシャムバイオサイエンスより購入）のPBS（0.05 mol/Lリン酸緩衝液、0.9% NaCl含有、pH7.4。以下、「PBS-1」という。）溶液50 µLをそれぞれのチューブに加えて混和した。これらを室温にて1時間放置した後、PBS-1溶液500 µLを加えて希釈し、遠心分離（4、3000 rpm、10分）して、沈殿物に含まれる¹²⁵I-SHBGの量をβ-カウンター（ARC-1000M、アロカ社）にて測定した。そして、添加した¹²⁵I-SHBGの放射活性に対する測定値の割合を求めた。その結果を図1-A）に示す。

【0034】

また、6本のプラスチックチューブに、上記と同様に、ボランティア健常男性の血清試料100 µL及び¹²⁵I-SHBGをそれぞれ加え、さらに、コンカナバリンAの5% PBS-1溶液50 µLを加えて混和した。そして、一定時間経過するごとにPBS-1を500 µL加えて希釈し、直ちに遠心分離（4、3000 rpm、10分）した。上記と同様に、沈殿物に含まれる¹²⁵I-SHBGの量をβ-カウンターにて測定し、添加した¹²⁵I-SHBGの放射活性に対する測定値の割合を求めた。その結果を図1-B）に示す。

上記実験の結果、反応時間が1時間及び加えるコンカナバリンAのPBS-1溶液の濃度が5%のときに、SHBGの除去率が最大で約80%となることがわかった。

【0035】

(ii) ¹²⁵I-SHBGの凝集率の検討

¹²⁵I-SHBGを添加した後にコンカナバリンAにより処理した（血清試料100 µLにコンカナバリンAの5% PBS-1溶液50 µLを加えて混和し、室温にて1時間放置したもの。以下、単に「処理」という。）血清及び¹²⁵I-SHBGを添加しコンカナバリンAで処理しない血清を、それぞれSephadex G100（アマシャムバイオサイエンスより購入、PBS-1に懸濁して調製）のカラムクロマトグラフィー（0.5 × 60 cmのガラスカラム）に添加した。そして、移動相をPBS-1、流速を1 mL/分とし、溶出物を2 mLごとに分画してそれぞれの画分に含まれる¹²⁵I-SHBG及びテストステロンを、β-カウンター及び液体クロマトグラフィー/タンデム型質量分析装置（LC-MS/MS、Quattro II、マイクロマス社）により測定した。その結果を図2に示す。

【0036】

コンカナバリンA未処理の血清においては、¹²⁵I-SHBG及びテストステロンの殆んどが高分子画分に見られ、テストステロンは低分子画分にも一部見られた。一方、コンカナバリンAにより処理した血清においては、高分子画分におけるテストステロンが殆んど消失しており、また、¹²⁵I-SHBGはコンカナバリンA未処理に対し、面積比で20%程度に低下していた。

【0037】

¹²⁵I-SHBGを添加する代わりに¹⁴C-アルブミンを添加して上記と同様の操作を行ったところ、テストステロンについては同様の結果を示したが、¹⁴C-アルブミンについては、処理及び未処理の場合とも、測定された放射活性の強さはほぼ同じであった。このことより、アルブミンはコンカナバリンAにより殆んど影響を受けないと考えられる。

【0038】

コンカナバリンAによるSHBGの凝集及び/又は沈殿率が約80%であることから、SHBGの中にレクチン結合性糖鎖構造を有しないものが約20%含まれていることが予想される。また、コンカナバリンAにより処理した場合、高分子画分のテストステロンが殆んど消失していたことから、SHBGはテストステロンを包含したまま凝集及び/又は沈殿するものと推察される。

【0039】

(iii) 測定における補正值の検討

バイオアベイラブルテストステロンの測定における補正值を得るため、血清中のアルブミンの回収率を求めた。

10

20

30

40

50

まず、 ^{14}C -ヒトアルブミン（パーキンエルマーより購入）のPBS-1溶液（ ^{14}C -ヒトアルブミンを適量のPBS-1に溶解したもの）1mLと、コンカナバリンAの10%水溶液1mLを混合し、 ^{14}C -ヒトアルブミンを含有するコンカナバリンAの5%PBS溶液を調製した（以下、この溶液を「ConA 5%液」という）。そして、ConA 5%液50 μL の放射活性を測定したところ、3770.7 dpmであった。

【0040】

ヒトアルブミンのPBS-1溶液（9gのヒトアルブミンを10mLのPBS-1に溶解したもの）100 μL にConA 5%液50 μL を加え、室温にて1時間放置した後、遠心分離したところ、その沈殿物には放射活性（シンチレーションカウンターはアロカ社のLSC-5100を用いた）は見られなかった。このことより、上記ヒトアルブミンのPBS-1溶液はConA 5%液50 μL により凝集及び/又は沈殿しないことを確認した。

【0041】

次に、ボランティア健常男性の血清試料100 μL にConA 5%液50 μL を添加し、室温にて1時間放置した後、200 μL 又は500 μL のPBS-1にて希釈し遠心分離した。そして、沈殿物中の放射活性と添加した ^{14}C -アルブミンの放射活性とを比較することにより、 ^{14}C -アルブミンの回収率を求めた。希釈に用いたPBS-1の量とその場合の ^{14}C -アルブミンの回収率を下記表1に示す。下記表1に示すように、バイオアベイラブルテストステロンを測定する際の補正值について、例えば、500 μL のPBS-1で希釈した際の補正值を75%とするなどと設定した。

【0042】

【表1】

表1：コンカナバリンA処理後のバイオアベイラブルテストステロン測定値の

補正

| 検体番号 | 希釈量 | 測定値 (dpm) | 回収率 (%) | 平均 (%) | 標準偏差 |
|------|-------------------|-----------|---------|--------|------|
| 1 | 200 μL | 2585.7 | 68 | 68 | 1.8 |
| 2 | | 2707.8 | 71 | | |
| 3 | | 2559.4 | 67 | | |
| 4 | | 2645.5 | 69 | | |
| 5 | | 2544.8 | 67 | | |
| 6 | 500 μL | 2790.4 | 73 | 75 | 4.9 |
| 7 | | 2679.8 | 70 | | |
| 8 | | 3059.1 | 80 | | |
| 9 | | 3026.2 | 79 | | |
| 10 | | 2679.0 | 70 | | |

※3770.7 dpmの ^{14}C -アルブミンを添加した。

【0043】

(iv) コンカナバリンA処理によるSHBGとアルブミンとの分離の確認

ボランティア健常男性の血清試料100 μL に、 ^{14}C -ヒトアルブミン及び ^{125}I -SHBGを加え、これを、コンカナバリンAを結合させたSephadexカラム（アマシャムバイオサイエンスより購入、PBS-1溶液にて調製したもの）に添加した。そして、移動相をPBS-1、流速を1mL/分として、溶出画分に含まれる放射活性をシンチレーションカウンター及び β -カウンターにて測定したところ、 ^{14}C -ヒトアルブミンは殆んど溶出されたが、 ^{125}I -SHBGは約20%しか溶出されなかった。溶出した20%の ^{125}I -SHBGは、前記(ii)の実験にて確認されたレクチン結合性糖鎖構造を有しないSHBGであると推察される。

【0044】

この結果、血清をコンカナバリンAで処理することにより、レクチン結合性糖鎖構造を

有するSHBGとアルブミンが明確に分離されることが確認された。

【0045】

(2) 本発明の方法によるバイオアベイラブルテストステロンの測定(LC-MS/MS)

コンカナバリンAを用いて、血清中のバイオアベイラブルテストステロンをLC-MS/MSにより測定した(以後、下記の方法を「ConA法」と呼ぶ)。

ボランティア健常男性の血清試料100 μ LにコンカナバリンAの5%PBS-1溶液50 μ Lを加え、室温にて1時間放置した。その後、さらにPBS-1を500 μ L加え、遠心分離(4、3000rpm、10分)した。上清をエーテル5mLで抽出し、抽出物に2-フルオロ-N-メチルピリジニウム p-スルフォネート(2-FMS、東京化成より購入)の2%ジクロロメタン溶液200 μ L及びトリエチルアミンの10%ジクロロメタン溶液30 μ Lを加え、室温にて1.5時間放置した。次いで、溶媒を窒素ガスで留去した後、25%メタノール水溶液1mLに溶解し、これを、予めメタノール6mL及び精製水6mLで調製したBond Elut C18カラムに添加した。このカラムを、精製水1mL、0.3%アンモニア水3mL、メタノール2mL及び0.01%ギ酸：メタノール=1:1混合液3mLで順次洗浄した後、10%ギ酸：アセトニトリル=1:4混合液2.5mLにて溶出した。溶出液を減圧下にて留去後、0.05%ギ酸：メタノール=3:2混合液100 μ Lに溶解して、そのうちの10 μ LをLC-MS/MSに注入した。そして、観察された測定イオン(m/z)=253の強度より、 $^2\text{H}_3$ -テストステロン(シグマより購入)を内部標準としたテストステロンの強度と量の関係を示す検量線に基づき、試料中のテストステロンの量を求めた。その結果を、後で述べるRIAによるバイオアベイラブルテストステロンの測定における結果と合わせて、表2に示す。また、LS-MS/MSによる測定値とRIAによる測定値との相関を、図3に示す。図3より、LC-MS/MSによる測定値とRIAによる測定値とは良好な相関を示すことがわかる。

10

20

【0046】

なお、LC-MS/MSの測定条件は次の通りとした。まず、液体クロマトグラフィー(LC)の条件としては、ウォーターズ社製のカラムAtlantis dC18(50 \times 2.1mm、5 μ m)を用い、溶出溶媒を0.05%ギ酸：メタノール=3:2混合液とし、流速を0.2mL/分、カラム温度を40とした。タンデム型質量分析(MS/MS)の条件は、正イオンESI法にて、コーン電圧を30V、コリージョンエネルギーを20eVとした。

30

【0047】

ところで、Bond Elut C18カラムで精製する代わりに、Sephadex G100カラムを用いて分画した場合についても検討したところ、同様の定量値が得られた。

【0048】

(3) 本発明の方法によるバイオアベイラブルテストステロンの測定(RIA)

上記(2)で得られた上清を用い、そこに含まれるテストステロンの量をRIA測定キット(三菱ヤトロンより購入)を用いて測定した。その結果を、上記(2)における結果と合わせて、下記表2に示す。

40

【0049】

【表 2】

表 2：LC-MS/MSによる測定値とRIAによる測定値の比較

| 検体番号 | 年齢 | 血中バイオアベイラブルテストステロンの値 (pg/mL) | |
|------|----|------------------------------|------|
| | | LC-MS/MS | RIA |
| 1 | 28 | 1175 | 1347 |
| 2 | 37 | 1126 | 1240 |
| 3 | 30 | 1306 | 1320 |
| 4 | 41 | 827 | 947 |
| 5 | 25 | 1159 | 1613 |
| 6 | 25 | 2344 | 2333 |
| 7 | 27 | 1330 | 1253 |
| 8 | 26 | 1451 | 1667 |
| 9 | 35 | 2017 | 2507 |
| 10 | 30 | 880 | 987 |
| 11 | 41 | 1083 | 1213 |
| 12 | 46 | 959 | 1187 |
| 13 | 50 | 1011 | 1133 |
| 14 | 26 | 1621 | 1427 |
| 15 | 32 | 825 | 1000 |
| 16 | 33 | 1329 | 1267 |
| 17 | 31 | 1204 | 1040 |
| 18 | 48 | 843 | 827 |
| 19 | 49 | 684 | 813 |
| 20 | 59 | 874 | 1147 |
| 21 | 58 | 613 | 720 |
| 22 | 65 | 682 | 800 |
| 23 | 62 | 917 | 1133 |
| 24 | 59 | 1221 | 1387 |
| 25 | 64 | 623 | 613 |
| 26 | 69 | 893 | 827 |
| 27 | 62 | 444 | 267 |
| 28 | 62 | 470 | 427 |
| 平均 | | 1068 | 1159 |
| 標準偏差 | | 430 | 482 |

※LC-MS/MSによる測定値は、2回測定した平均値である。

【0050】

(4) 硫酸沈殿法によるバイオアベイラブルテストステロンの測定 (LC-MS/MS)

本実験においては、上記(2)及び(3)で使用したのと同じボランティア健康男性の血清試料を用いた。

血清試料300μLに飽和硫酸アンモニウム水溶液300μLを加えて混和し、4℃にて10分間放置した。その後、遠心分離(4℃、1100×g、30分)し、その上清に含まれるテストステロンを上記(2)と同様にして測定した。その結果を、後述するISSAM法との比較における項の表3において示す。

【0051】

なお、本実験では、遠心分離の条件を回転数(rpm)ではなく遠心力(g)で設定した。これは、同じ回転数でも機種により遠心力が異なり、遠心力が上記設定を上回るとアルブミンがより多く沈殿してしまうためである。

【0052】

(5) ConA法、硫酸沈殿法及びISSAM法による測定値の比較

上記(2)～(4)で使用したのと同じ血清試料を用いて、ISSAM法によりバイオアベイラブルテストステロンの値を測定した。すなわち、血清中の総テストステロンをLC-MS/MSにて、また、総SHBGをRIAにて定量し、それぞれの値をISSAM法の計算式(<http://www.issam.ch/freetesto.htm>を参照)に代入した。そして、アルブミンの量を4.3g/100mLとして、バイオアベイラブルテストステロンの値を算出した。その結果を、下記表3において、ConA法及び硫酸沈殿法における結果と合わせて示す。

【0053】

【表3】

表3：ConA法、硫酸沈殿法およびISSAM法による測定値

| 検体番号 | 年齢 | 血中バイオアベイラブルテストステロンの値 (pg/mL) | | |
|------|----|------------------------------|-------|--------|
| | | ConA法 (LC-MS/MS) | 硫酸沈殿法 | ISSAM法 |
| 1 | 28 | 1175 | 838 | 1131 |
| 2 | 37 | 1126 | 946 | 1160 |
| 3 | 30 | 1306 | 760 | 1040 |
| 4 | 41 | 827 | 806 | 924 |
| 5 | 25 | 1159 | 1188 | 1620 |
| 6 | 25 | 2344 | 2132 | 2690 |
| 7 | 27 | 1330 | 1272 | 1800 |
| 8 | 26 | 1451 | 1168 | 1250 |
| 9 | 35 | 2017 | 2220 | 2670 |
| 10 | 30 | 880 | 686 | 905 |
| 11 | 41 | 1083 | 728 | 1190 |
| 12 | 46 | 959 | 998 | 1270 |
| 13 | 50 | 1011 | 640 | 913 |
| 14 | 26 | 1621 | 1332 | 1530 |
| 15 | 32 | 825 | 496 | 695 |
| 16 | 33 | 1329 | 1104 | 1470 |
| 17 | 31 | 1204 | 1172 | 1500 |
| 18 | 48 | 843 | 514 | 666 |
| 19 | 49 | 684 | 358 | 588 |
| 20 | 59 | 874 | 300 | 643 |
| 21 | 58 | 613 | 418 | 695 |
| 22 | 65 | 682 | 232 | 500 |
| 23 | 62 | 917 | 508 | 544 |
| 24 | 59 | 1221 | 1204 | 1620 |
| 25 | 64 | 623 | 550 | 565 |
| 26 | 69 | 893 | 438 | 795 |
| 27 | 62 | 444 | 294 | 488 |
| 28 | 62 | 470 | 258 | 378 |
| 平均 | | 1068 | 841 | 1116 |

【0054】

また、図4に、硫酸沈殿法とISSAM法との相関及び本発明の方法とISSAM法との相関を示す。ISSAM法は現在、バイオアベイラブルテストステロンを測定するための基準的な方法とされているものである。グラフにおけるY切片の値が、図4-A)では負で、図4-B)では正であることから、同じサンプルを測定した場合、本発明の方法が最も高い値を示し、硫酸沈殿法が最も低い値を示す傾向にあることがわかる。

【 0 0 5 5 】

上記(2)の方法に従い、テストステロン以外のホルモン、例えば、ジヒドロテストステロン、エストロン、エストラジオール、エストリオール、プロゲステロン、アンドロステンジオン、デハイドロエピアンドロステロン、アルドステロン等についても、そのバイオアベイラブルな状態にあるものの血中レベルを同様に測定することができる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 5 6 】

【図1】図1-A)は、コンカナバリンAの濃度によるSHBGの除去率の変化を示す。

図1-B)は、コンカナバリンAの5%PBS-1溶液を用いてSHBGを除去する場合における、室温放置時間と除去率との関係を示す。

【図2】図2-A)は、コンカナバリンA未処理の血清に ^{125}I -SHBGを添加し、それをSephadexカラムクロマトグラフィーにかけ、溶出画分に含まれる放射活性及びテストステロンの濃度をβ-カウンター及びLC-MS/MSで測定した結果を示す。

図2-B)は、コンカナバリンAで処理した上清に ^{125}I -SHBGを添加し、それをSephadexカラムクロマトグラフィーにかけ、溶出画分に含まれる放射活性及びテストステロンの濃度をβ-カウンター及びLC-MS/MSで測定した結果を示す。

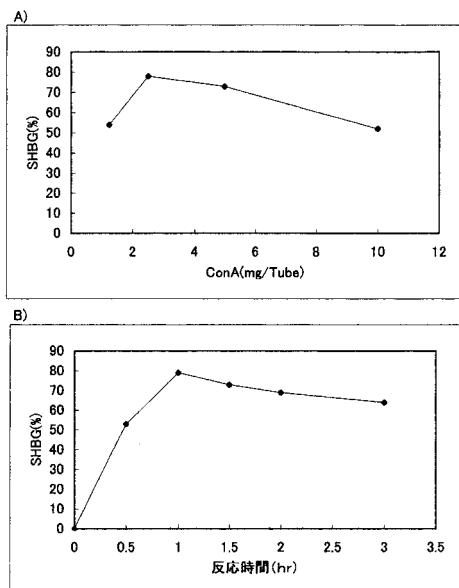
【図3】図3は、コンカナバリンAで処理した上清に含まれるテストステロンをLC-MS/MS及びRIA測定キットで測定した場合の、それぞれの測定値の相関を示す。

【図4】図4-A)は、ISSAM法とConA法(LC-MS/MS)による血清試料中のバイオアベイラブルテストステロンの、それぞれの測定値の相関を示す。図4-B)は、ISSAM法と硫酸沈殿法による血清試料中のバイオアベイラブルテストステロンの、それぞれの測定値の相関を示す。

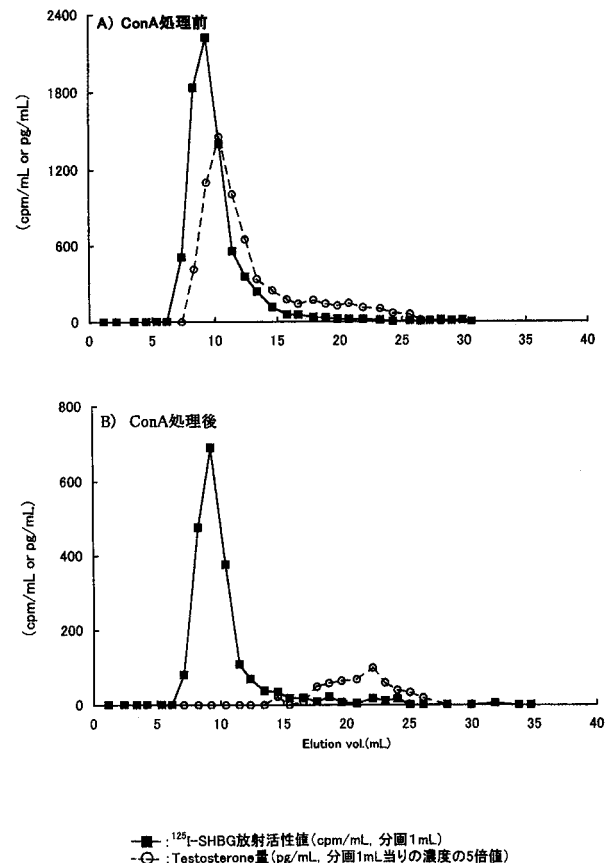
10

20

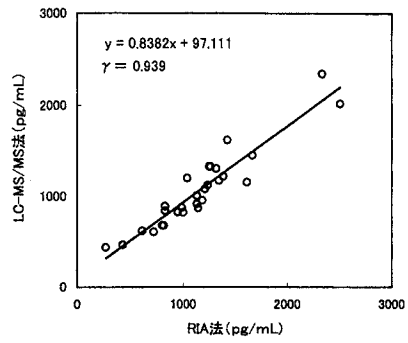
【 図 1 】



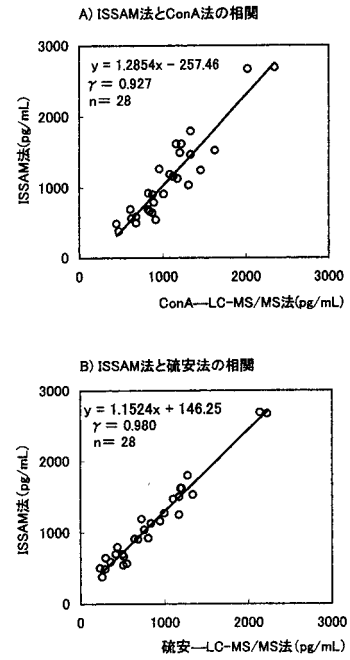
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



フロントページの続き

(72)発明者 岡崎 豊

神奈川県川崎市中原区下小田中 4 - 2 1 - 3 - 5 0 2

(72)発明者 熊谷 幸博

神奈川県川崎市宮前区野川 2 4 6 - 1

Fターム(参考) 2G045 AA13 BB08 BB10 BB41 BB50 BB51 CA26 DA54 FB08