

糞中ステロイドホルモン抽出方法の比較

佐藤 恵^{1,2} 柳沼 千春³ 塩谷 正勝³ 若林 修一^{1,2} 酒井 秀嗣^{1,2}

Comparison of extraction methods of steroid hormones in feces

Megumi Sato^{1,2}, Chiharu Yaginuma³, Masakatsu Shioya³,
Shuichi Wakabayashi^{1,2} and Hidetsugu Sakai^{1,2}

Abstract

The measurement of blood hormonal concentration is one of the indices used to evaluate endocrinal regulatory functions. Improvements in the sensitivity and accuracy of various measurement methods have enabled the precise measurement of hormones in feces, urine and saliva, as well as blood. In wildlife research, noninvasive methods developed in the 1990s are now widely accepted, and various hormonal extraction methods are now employed. We compared five different methods, all of which employed organic solvents as the means of extraction. Fecal specimens from the wild black-tailed gull were obtained and the corticosterone and testosterone levels in the specimens were measured. The results indicated that the Two-step Extraction Method (ethanol and methanol) was the most efficient.

Key words: Black-tailed gull, corticosterone, extraction methods, fecal steroid hormone, testosterone

緒 言

1950年代に放射性同位元素の利用と抗原抗体反応の応用とによって放射免疫検定法(RIA: radioimmunoassay)が考案され、インスリンの微量測定が報告された^{1,2)}。その後、RIAはホルモンの微量測定として普及するとともに、単クローン抗体の考案や酵素免疫検定法(EIA: enzyme immunoassay)の開発などによって技

術革新が進んだ。より高感度の測定が可能になったことで、血中のホルモン濃度が高いときには糞^{3,4,5)}、尿⁶⁾、唾液⁷⁾などからも検出されることが明らかになった。

特に、排泄物を試料として用いることができれば、野生動物であっても捕獲すること無しにホルモンの血中濃度の変動を推定することができる。こうした非侵襲的手法は繁殖期のデリケートな時期や捕獲が困難な個体に対しても応

¹ 日本大学歯学部生物学教室

² 日本大学歯学部総合歯学研究所機能形態部門
〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台1-8-13

³ 日本大学生物資源科学部動物資源科学教室
〒252-8510 神奈川県藤沢市亀井野1866
(受理: 2007年9月29日)

¹ Department of Biology, Nihon University School of Dentistry

² Division of Functional Morphology, Dental Research Center, Nihon University School of Dentistry
1-8-13 Kanda-surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-8310, Japan

³ Department of Animal Resource Science, College of Bioresource Science, Nihon University
1866 Kameino, Fujisawa, Kanagawa 252-8510, Japan

用が可能で、1990年代から次第に報告が増え、現在では野生動物の内分泌調節を知る上で重要な手法の1つと考えられている。

排泄物中のホルモンを測定するには、目的とするホルモン分画を抽出する必要があり、場合によっては精製が求められる。ステロイドホルモンにおいても抽出の必要性は変わらないが、研究者各々が試行錯誤した経緯を踏襲した様々な抽出手法が採用されており、最も優れた方法に統一されているわけではない。そこで、本研究では、それらの手法の一部について、どの様な違いがあるのかを比較してみた。

材料と方法

1. 材料

青森県八戸市の蕪島はウミネコ (*Larus crasirostris*) の国内の代表的な繁殖地の1つである。2006年4月15日から26日の間に同一の巣から成鳥の新しい糞を採取して試料とした。試料は1個ずつプラスチックバックに入れ、抽出まで-20°Cで冷凍保存した。解凍後試料を60°Cのオーブンで6時間乾燥させ抽出試料とした。乾燥中に経時的に重量を測定し、4時間以降は重量変化がほとんどないことを確認した。

2. 抽出方法

それぞれの乾燥試料を粉碎後、5つに分けて秤量し、表1の5つの方法によって抽出を行った。抽出物は溶媒を蒸発させて乾固後、150 mM NaCl を含むリン酸緩衝液 pH 7.5 (PBS) 0.5 ml に再溶解して測定試料とした (表1)。

抽出方法 1

蒸留水とジエチルエーテルを用いた抽出で、秤量後の試料をガラス試験管に移し、2 ml の蒸留水を加えてホモゲナイズした。その後20分間放置した懸濁液を4°C、3000 rpm で20分間遠心し、上清を新しい試験管に移した。沈殿には再度蒸留水2 ml を加えて同様にホモゲナイズと遠心分離を行い、上清を合一した。この上清に2 ml のジエチルエーテルを加え、よく攪拌した後に4°C、3000 rpm で20分間遠心し、エーテル層をガラス試験管に移した。残った水層には再びジエチルエーテルを加え攪拌の後、同様に遠心分離しエーテル層を合一し、ブロックヒーターを用いて、60°C で完全に蒸発乾固させた後、0.5 ml の PBS を加えて凝固物を再溶解させ、測定試料とした⁸⁾。

抽出方法 2

エタノールとメタノールを用いた抽出で、秤量後の糞を試験管に移し、そこに10 ml の90% エタノールを加えて20分間加熱し、3000 rpm で20分間遠心後、ガラス試験管に上清を移し、残った沈殿には再度90% エタノールを加えて振とうし、遠心分離して上清を合一した。窒素を吹き付けながら上清を完全に蒸発乾固させ、100%メタノールを1 ml 加えて振とうし、再溶解した。これにPBSを0.5 ml 加え、水を張った超音波洗浄機に浸して20分間振とうし、PBS で希釈して測定試料とした⁹⁾。

抽出方法 3

蒸留水とジエチルエーテルを用いた方法で、

表1 調整方法と抽出溶媒

方法	抽出溶媒	引用論文
1	蒸留水, ジエチルエーテル	Rogovin <i>et al.</i> ⁸⁾
2	エタノール, メタノール	Larson <i>et al.</i> ⁹⁾
3	蒸留水, ジエチルエーテル	Yamauchi <i>et al.</i> ¹⁰⁾
4	リン酸緩衝液, ジエチルエーテル	Takahashi <i>et al.</i> ¹¹⁾
5	エタノール・アセトン, ジクロロメタン, メタノール	Wasser <i>et al.</i> ¹²⁾

糞を秤量してガラス試験管に移し、2 ml の蒸留水を加えてホモゲナイズし、20 分間放置後に懸濁液を 4 °C、3000 rpm で 20 分間遠心分離し、上清を別のガラス試験管に移した。沈殿には再度蒸留水を加えて同様にホモゲナイズと遠心分離を行い、上清を合一した。この上清に 2 ml のジエチルエーテルを加えてよく攪拌した後、ドライアイス-エタノールバスによってエーテル層を取り出した。残った沈殿は溶解し同様に攪拌、再懸濁、遠心分離を経てエーテル層を取り出した。2 回分のエーテル層を合一し、ブロックヒーターを用いてエーテル層を完全に蒸発乾固させた後、PBS を 0.5 ml 加え、凝固物を再溶解させ、測定を試料とした¹⁰⁾。

抽出方法 4

リン酸緩衝液 (PBS) とジエチルエーテルを用いた方法で、糞を秤量してガラス試験管に移し、150 mM NaCl を含む 10 mM リン酸緩衝液 pH 7.5 を 2 ml 加え、ホモゲナイズした。その後 20 分間放置した懸濁液を 4 °C、3000 rpm で 20 分間遠心分離し、上清を別のガラス試験管に移した。沈殿には再度 PBS を加えて同様にホモゲナイズと遠心分離を行い、上清を合一した。この上清に 2 ml のジエチルエーテルを加え、よく攪拌した後、ドライアイス-エタノールバスによってエーテル層を取り出し、残った沈殿は溶解し同様に攪拌、再懸濁、遠心分離を経てエーテル層を取り出した。次に、取り出したエーテル層をブロックヒーターを用いて完全に蒸発乾固させた後、PBS を 0.5 ml 加えて凝固物を再溶解させ、測定を試料とした¹¹⁾。

抽出方法 5

エタノールとジクロロメタンを用いた方法で、糞を秤量してガラス試験管に移し、2 ml のエタノールと 1 ml のアセトンを加え良く攪拌した。その後、4 °C、3000 rpm で 20 分間遠心分離し、上清をガラス試験管に移した。一方、残った沈殿には 2 ml のエタノールを加え再懸濁し、

同様に遠心分離し、上清を合一した。窒素を使用して 50 °C のブロックヒーターで有機溶媒層を蒸発させ、そこに 1 ml の蒸留水を加えて良く攪拌した後、再度乾燥させた。乾燥中、試験管の溶液を約 1 ml 以下まで気化させた後、そこにジクロロメタンを約 2 ml 加え、4 °C、3000 rpm で 20 分遠心分離し、上清を分画した。残った沈殿に同様の 1 ml のジクロロメタンを加え同様に再懸濁、遠心分離し、上清を分画した。2 回の上清を併せ蒸発乾固させた後、1 ml のメタノールで再溶解し、PBS を 0.5 ml 加え、超音波で 20 分間振とうし、PBS で希釈して測定を試料とした¹²⁾。

3. ホルモンの測定

コルチコステロンは Rat Corticosterone (¹²⁵I) Biotrak Assay System With Magnetic Separation (Amersham Biosciences, Buckinghamshire) による RIA、テストステロンは Testosterone EIA Kit (Cayman Chemical, MI) による EIA を用いてそれぞれ測定した。

4. 統計処理

糞から調整した試料の測定値は、二元配置分散分析、対応のある *t*-検定、Kruskal-Wallis の検定法、Wilcoxon の符号順位検定法、符号検定法を用いて解析した。これらの検定には統計パッケージ SPSS ver. 8.0 J (エス・ピー・エス・エス、東京) あるいはエクセル統計 2004 (社会情報サービス、東京) を用いた。また、用量-反応直線の平行性の検定には共分散分析を用い、石村の式¹³⁾に基づいてコンピュータソフト Microsoft Office Excel 2003 SP 3 (マイクロソフト、東京) 上で行った。

結 果

1. 抽出試料のホルモン測定

ウミネコの糞を乾燥後、10 個の糞を各々 5 つに分けて試験管に入れ、分け取った糞の重量を秤量した。5 つに分けられた糞は、方法 1 から

方法5のそれぞれ異なる方法でステロイドホルモン分画を調整し、RIAによってコルチコステロンを、EIAによってテストステロンの定量を行った。

コルチコステロンの測定値は、試料8と試料10を除いて方法2によって調整された分画が最も高く、他の調整方法による分画の測定値とは大きな隔たりがあった。また、試料8と試料10で最も高い値を示したのは5番の調整方法であったが、2番の方法も2番目に高い値を示して、残りの3つの方法による分画の値とは大きく異なっていた(図1)。

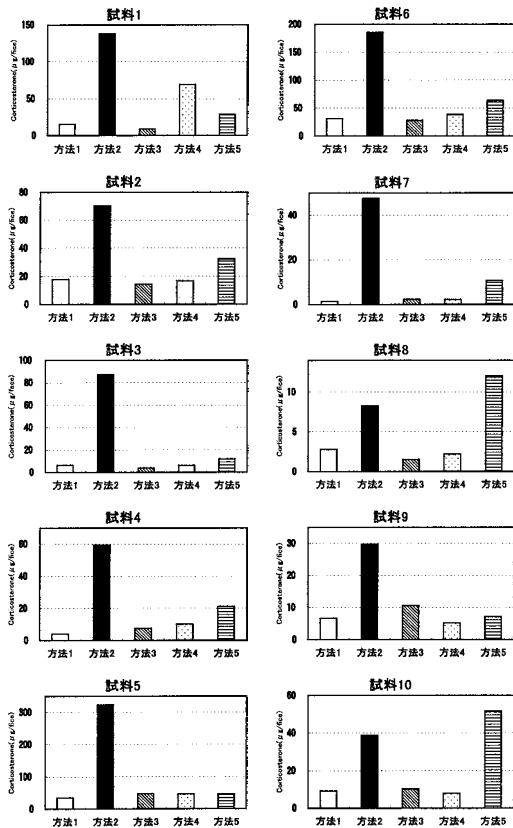


図1 ウミネコの10個の糞を試料として各々5つの方法でステロイド分画を調整し、RIAによってコルチコステロン量を測定した結果。ホルモン量は糞1g当たりの含有量で表した。

これらの測定値の違いは、二元配置分散分析($p < 0.001$)でもKruskal-Wallisの検定法($p = 0.001$)も非常に高度に有意であった。さらに、方法間での測定値の違いを検定した結果、対応のあるt検定とWilcoxonの符号順位検定法では全体を通して値が高かった方法2は他の4つの方法すべてよりも有意に高いことが明らかになった。また、符号検定法では、方法5とのみ有意差が認められなかった(表2)。

同様にテストステロンの測定結果は、方法2での測定値が最も高かったのは半分の5試料にとどまり、測定値が他の方法と大きく異なっていたわけでもなかった。また、方法による測定値の順位は試料によって異なり、方法による顕著な違いは認められなかった(図2)。しかし、試料ごとに測定の高い方法から順位をつけてその平均順位を求めると、方法2の値が最も小さく、1.7であった。

二元配置分散分析とKruskal-Wallisの検定

表2 コルチコステロン測定値による5つの調整方法の相互比較を3つの検定方法によって行った危険率(p)の一覧

調整方法	方法2	方法3	方法4	方法5
方法1	0.011	0.762	0.195	0.004
	0.005	0.959	0.333	0.005
	0.002	1.000	1.000	0.002
方法2		0.010	0.013	0.028
		0.005	0.005	0.013
		0.002	0.002	0.109
方法3			0.283	0.009
			0.333	0.013
			0.754	0.109
方法4				0.266
				0.059
				0.210

上段: 対応のあるt検定

中段: Wilcoxonの符号順位検定法

下段: 符号検定法

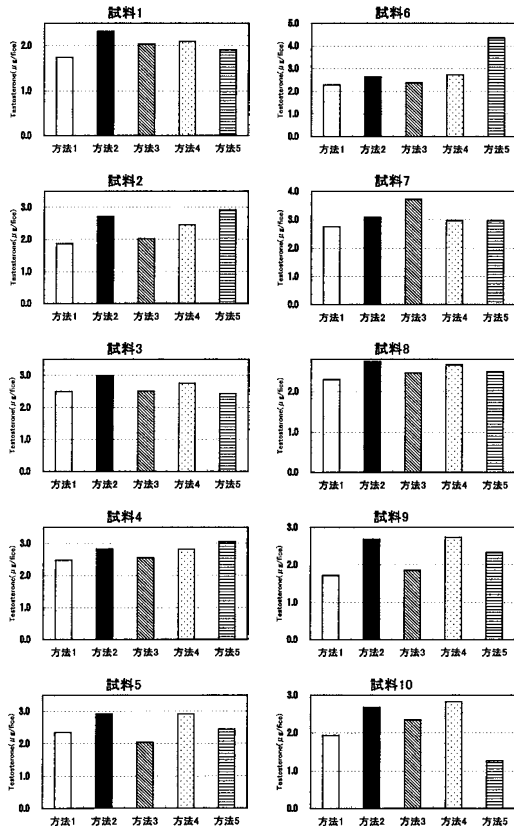


図2 ウミネコの10個の糞を試料として各々5つの方法でステロイド分画を調整し、EIAによってテストステロン量を測定した結果。ホルモン量は糞1g当たりの含有量で表した。

法で試料全体のばらつきを検定すると、両者ともばらつきが有意であると判定された ($p < 0.05$, $p < 0.01$)。さらに方法間の差を検定したところ、 t -検定と Wilcoxon, 符号順位検定法, 符号検定法のいずれでも、測定値が平均して最も高かった方法2は方法1および方法3との間に有意差があり、方法4および方法5との間には差がないことが判明した (表3)。

2. 用量-反応直線の平行性

コルチコステロン、テストステロンとも方法2で調整された分画が5つの方法の中で最も高い測定値を示したことから、改めて5つの糞を用いて方法2によってホルモン分画の調整を

表3 テストステロン測定値による5つの調整方法の相互比較を3つの検定方法で行った危険率 (p) の一覧

調整方法	方法2	方法3	方法4	方法5
方法1	<0.001	0.093	<0.001	0.101
	0.005	0.047	0.005	0.059
	0.002	0.021	0.002	0.109
方法2		0.022	0.181	0.583
		0.037	0.203	0.013
		0.021	0.344	0.344
方法3			0.065	0.425
			0.203	0.047
			0.021	0.754
方法4				0.765
				0.508
				0.344

上段：対応のある t -検定

中段：Wilcoxon の符号順位検定法

下段：符号検定法

行った。得られた分画を段階希釈して、コルチコステロンとテストステロンの定量を行った。この測定の際に得られた用量-反応直線の傾きが標準品と平行であるか否かを、共分散分析によって検定した。ただし、これらの調整された分画の1つはコルチコステロン値が低かったため、コルチコステロンのみ4試料の二重測定による検定になった (図3, 4)。

コルチコステロン RIA の結果では、 $F_0 = 2.05$ は $F_{(4,21)}(0.25) = 3.48$ よりも小さく、有意差は認められなかった。同様にテストステロン EIA における $F_0 = 2.81$ も $F_{(5,40)}(0.25) = 2.90$ よりも小さく、有意差は認められなかった。

考 察

排泄物を利用してホルモン分泌の変動を解明する研究手法は、捕獲が困難な野生動物やハンドリングによって繁殖を中断してしまう恐れのある状況の動物には非常に有効な手段であり、

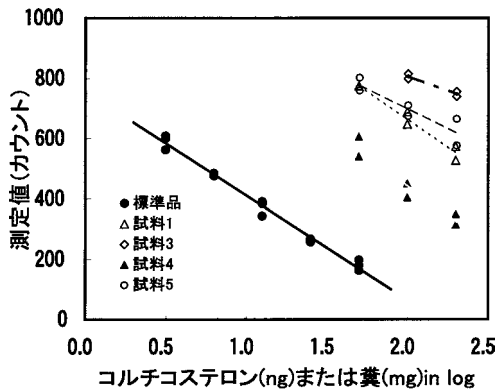


図3 方法2によって調整したホルモン分画のコルチコステロンRIAにおける競合阻害直線(用量-反応直線)。コルチコステロン標準品(●)および調整された4つのホルモン分画。

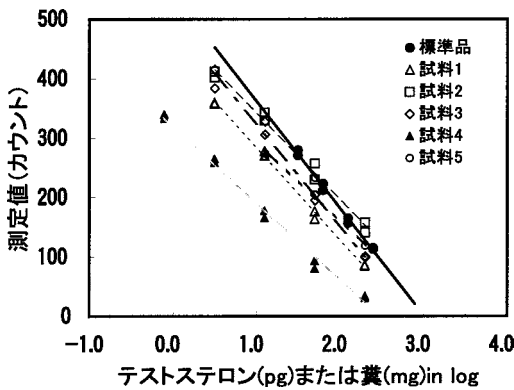


図4 方法2によって調整したホルモン分画のテストステロンEIAにおける競合阻害直線(用量-反応直線)。テストステロン標準品(●)および調整された5つのホルモン分画。

研究報告も年々増加傾向にある。我々も、1990年代前半から糞の利用を試みており¹⁴⁻¹⁹⁾、この手法の恩恵にあずかっている。特にヒメアマツバメにおいては平均重量が約150mgの糞で5種類のステロイドホルモンの定量を行った^{18,19)}。同様の情報を血中濃度の測定によって得ようとする、4m以上の高さに巣を構えている個体を仮に捕獲できたとしても、5試料で0.5ml以上の血液が必要になることから現実的には不可能である。

ホルモンとの親和性や特異性の高い抗体やこれらの抗体を用いた測定キットが市販されるようになったことも、排泄物の利用が普及した一因と言える。しかし、抗体の特異性が向上しても、糞そのものを試料に用いることは不可能であるため、ホルモン分画の適切な抽出を行う必要がある。それには、ホルモンを特異的に抽出することが一義的に求められるが、抽出効率に優れていることも重要な要素である。本研究では、現時点で論文に認められるすべての方法を検証したわけではないが、方法間にどの程度の差異があるかも含めて検証することができた。

コルチコステロン分画の調整にあたっては、メタノール抽出とジエチルエーテル抽出の2段階抽出を採用した方法2が、他の4つの方法に対して有意に高い測定値を示した。個々の試料について見ると、2つの試料では方法5によって調整された分画の方が高い値を示したが、方法2の分画の値も決して低かったわけではない。この結果から、抽出効率においては方法2が他の方法に比べて格段に優れていると判断される。また、テストステロンにおいても格別に高い値あるいは低い値を示す抽出方法はなかったが、順位の平均では方法2が最も優れており、方法1と方法3に対しては有意差が認められた。

2つのホルモンの測定結果から、抽出効率の上では方法2が両者に共通の5つの中では最も優れた調整方法と言える。方法2で調整したホルモン分画と標準品の用量-反応直線(競合阻害直線)の傾きを共分散分析で検定したところ、傾きの違いは有意ではなかった。つまり、「用量-反応直線の傾きは等しい」という帰無仮説が否定されなかったことにより、消極的ではあるが並行性が認められたことになる。RIAあるいはEIAで競合阻害直線の傾きが標準品と等しいということは、抗体に対して同じ親和性を持つ物質、延いては標準品と同じホルモンが測定

されていることを示している。これは、調整されたホルモン分画に測定を妨害するような夾雑物が含まれていないことを示唆し、この調整法が有効であることを意味している。

方法2によって調整したホルモン分画のコルチコステロンの測定値は2つの例外を除いて、他の方法で調整した分画の値と大きく隔たっていた。しかし、テストステロンの測定値は、全体的には5つの方法の中で最も高い値であったが、コルチコステロンで見られたほどの差は認められなかった。この結果は、同じ溶媒でもホルモンによって抽出効率が異なることを示しているが、ステロイドホルモンの溶解度に関する詳しいデータを得ることはできなかった。また、調整された分画の測定値の順位は10の試料で各々異なっており、抽出効率にばらつきがあることが示唆された。研究者によっては抽出前に排泄物に放射能で標識されたホルモンを加えて回収率を試料ごとに求めているが⁵⁾、試料中のホルモンと添加したホルモンとでは抽出過程における動態が完全に一致するとは考えにくい。また、トレーサーを使用することは、脱放射能の測定法であるEIAの趣旨にも反することになる。我々は、抽出効率による補正を行わず、十分に丁寧な操作を行うことによって常に同一の条件で調整された分画としてデータを評価する姿勢を採ってきた。方法2は、測定値の順位では他の方法を下回る試料があったが、極端に低い値を示すことはなかった。このことから、方法2はほぼ一定の効率でホルモンの抽出をしているのではないかと推測される。

本研究はウミネコの糞を試料として比較検討を行った。動物によっては餌の違いや消化の違いによって糞の組成が大きく異なる。脂溶性の物質を多く含む糞の場合、方法2による抽出では非常に多くの物質が抽出され、測定を妨害する恐れがあり、こうした試料では、抽出効率を犠牲にしても夾雑物が少ない方法の方が好まし

い。

謝 辞

本研究で用いたウミネコの糞の採集には大阪市立大学大学院理学研究科の富田直樹氏の協力を得た。本研究は平成18年度日本大学歯学部佐藤奨学金研究費の援助を受けた。

文 献

- 1) Berson SA, Yalow RS, Bauman A, Rothchild MA, Newerly K (1956) Insulin-I131 metabolism in human subjects: Demonstration of insulin binding globulin in the circulation of insulin treated subject. *J Clin Invest* 35, 170-190
- 2) Berson SA, Yalow RS (1959) Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody. *J Clin Invest* 38, 1996-2016
- 3) Rogovin K, Randall JA, Kolosova I, Moshkin M (2003) Social correlates of stress in adult males of the great gerbil, *Rhombomys opimus*, in years of high and low population densities. *Horm Behav* 43, 132-139
- 4) Sands J, Creel SR (2004) Social dominance, aggression and faecal glucocorticoid levels in a wild population of wolves, *Canis lupus*. *Anim Behav* 67, 387-396
- 5) Wasser SK, Hunt KE, Brown JL, Cooper K, Crockett CM, Bechert U, Millsbaugh JJ, Larson S, Monfort SL (2000) A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic mammalian and avian species. *Gen Comp Endocrinol* 120, 260-275
- 6) French JA, Koban T, Rukstalis M, Ramirez SM, Bardi M, Brent L (2004) Excretion of urinary steroids in pre- and postpartum female baboons. *Gen Comp Endocrinol* 137, 69-77

- 7) Rey F, Chiodoni G, Braillard K, Berthod C, Lemarchand-Be'raud T (1990) Free testosterone levels in plasma and saliva as determined by a direct solid-phase radioimmunoassay: a critical evaluation. *Clin Chim Acta.* 191, 21-3
- 8) Rogovin K, Randall JA, Kolosova I Moshkin M (2003) Social correlates of stress in adult males of the great gerbil, *Rhombomys opimus*, in years of high and low population densities. *Horm Behav*, 43, 132-139
- 9) Larson S, Casson CJ, Wasser S (2003) Noninvasive reproductive steroid hormone estimates from fecal samples of captive female sea otters (*Enhydra lutris*). *Gen Comp Endocrinol*, 134, 18-25
- 10) Yamaguchi K, Hamasaki S, Takeuchi Y, Mori Y (1997) Assessment of Reproductive status of Sika deer by fecal steroid analysis. 43, 221-226
- 11) Takahashi T, Hamanaka S, Imai I, Hashizume K (2002) Fecal Progesterone Analysis by Time-Resolved Fluoroimmunoassay (TR-FIA) for Monitoring of Luteal Function in the Sika Doe (*Cervus nippon centralis*). *J Vet Med Sci* 64, 565-569
- 12) Wasser SK, Monfort SL, Wildt DE (1991) Rapid extraction of faecal steroids for measuring reproductive cyclicity and early pregnancy in free-ranging yellow baboons (*Papio cynocephalus cynocephalus*). *J Reprod Fert* 92, 415-423
- 13) 石村貞夫 (1992) 共分散分析, 石村貞夫著「分散分析のはなし」, 東京図書, 東京, 247-285
- 14) 酒井秀嗣, 佐藤恵 (1995) ヒメアマツバメの糞中ステロイドホルモン測定に関する研究. *日大歯紀* 23, 57-62
- 15) 酒井秀嗣, 佐藤恵, 塩谷正勝 (1997) 糞中の性ホルモン比による鳥類の性別の推定. *日大歯紀* 25, 79-85
- 16) 佐藤恵, 竹脇千恵, 難波亜希子, 杉田平三, 清水勲, 林裕美, 酒井秀嗣, 塩谷正勝 (2000) 希少鳥類の繁殖に関する内分泌学的研究. *動物園研究* 4, 25-29
- 17) 酒井秀嗣, 佐藤恵, 難波亜希子, 津戸幸子, 塩谷正勝 (2001) ルリカケスの繁殖に伴う性ホルモン分泌の季節変動. *日大歯紀* 29, 55-61
- 18) Sakai H, Sato M, Wakabayashi S (1994) Annual changes in sex steroids in feces of *Apus affinis*. *J Ornithol* 135 (Sonder), 68-68
- 19) Sato M, Sakai H, Wakabayashi S (1994) Annual changes of corticosterone and aldosterone in feces of *Apus affinis*. *J Ornithol* 135 (Sonder), 69-69