

《使用経験》

Radioimmunoassay Kit を用いた血漿 ACTH 測定法の検討

橋本 浩三* 細木 秀美** 大藤 真**

はじめに

ACTH の radioimmunoassay は ACTH の血中濃度が低く、感度のよい抗血清の作製が困難なため、まだ一般に普及しておらず、その他のペプチドホルモンに比較してキット化も遅れている。我々は英國の Radiochemical Center が開発し、わが国でも科研化学会から提供されている radioimmunoassay kit を入手し、若干の基礎的検討を行ったので、その成績について報告する。

測定方法

Kit の試薬調整

①緩衝液：凍結乾燥粉末を付属の A 液にて調整する。

②抗ヒト ACTH 血清：wellcome 社抗体 (AS 174/6) の凍結乾燥粉末を緩衝液 8 ml (kit の説明では 6 ml) にて溶解する。

③ヒト標準 ACTH：凍結乾燥粉末を緩衝液 1.2 ml にて溶解し、10ng/ml に調整する。

④¹²⁵I-α¹⁻²⁴ACTH (200 μCi/μg)：使用時に緩衝液にて 8 倍に希釈する (約 5000 cpm/0.1ml)。

⑤ヒト ACTH ゼロ血清：凍結乾燥粉末を蒸留水 12.5ml に希釈する。

⑥チャコール吸着剤：凍結乾燥粉末に 25ml の蒸留水を加え、10 分以上混和し、使用時まで 2~4°C に保存する。

測定操作

* 岡山大学医学部中央検査部

** 岡山大学医学部第三内科

受付：49年1月7日

別刷請求先：岡山市鹿田町2-5-1 (〒700)

岡山大学医学部中央検査部 橋本 浩三

kit の原法に多少の変更を加え、次のとく行った。

(1) ACTH の抽出

①吸着：サンプルはヘパリン加血にて採血後直ちに遠心分離し、血漿を凍結保存したもの 2 ml~5 ml を使用した。この血漿サンプル、及び ACTH ゼロ血清、又 ACTH ゼロ血清に標準 ACTH を 1600pg/ml となるように加えたものを、それぞれ吸着用ガラス粒 100mg の入ったポリエチレン遠沈管に入れ、mixing tower にて 30 分間混合し、ACTH をガラス粒に吸着させた。

②洗浄純化：1,000 g で 2 分間遠沈後、上清を吸引除去し、その後蒸留水 2 ml と 1N-HCl 2 ml で計 2 回ガラス粒を洗浄し、それぞれ遠沈して上清を除去した。

③溶出：50% acetone water 1 ml を加え、mixing tower で 20 分間混合し、ガラス粒より ACTH を溶出し、遠沈後上清を蒸発用チューブに移す。再度 acetone water 0.5ml を加え、ボルテックスミキサー上で混合し、上清を前回の溶出液と合わせる。

④乾固：溶出液を 50°C の恒温槽で窒素ガス下に蒸発乾固させた。

(2) radioimmunoassay

抽出乾固物に緩衝液 300 μl を加え、乾固物を溶解後遠沈し、上清を測定に使用した。なお標準 ACTH (1600pg/ml) の抽出物にはさらに 300 μl の緩衝液を加えて 2 倍に希釈し、上清 600 μl を 800pg/ml の standard とし、段階希釈して 25 pg/ml まで 6 段階の standard を作製した。ACTH ゼロ血清抽出液は ACTH 0 pg/ml の設定に用いた。この ACTH standard 100 μl、及びサ

ンプル抽出液 $100\mu\text{l}$ ずつを用い、duplicate でアッセイを行った。アッセイ用チューブに抽出液 $100\mu\text{l}$ と抗血清 $100\mu\text{l}$ を加え、混合後 $2\sim4^\circ\text{C}$ で 20時間、第一次インキュベーションを行った。その後、 $^{125}\text{I}-\alpha^{1-24}\text{ACTH}$ 溶液 $100\mu\text{l}$ を加え、充分混合した後、 $2\sim4^\circ\text{C}$ にて 10~12時間 (kit の説明では 6~8 時間) 第二次インキュベーションを行った。bound と free の分離には charcoal suspension $100\mu\text{l}$ を加えて混合後、10分放置し (kit では直後)、 $1,000\text{g}$ で 5 分間遠沈し、上清を吸引除去して沈査の $^{125}\text{I}-\text{ACTH}$ を well-type scintillation counter で測定した。各スタンダードの抗体結合パーセント (B/T) をグラフ用紙にプロットし、サンプルの B/T の読みより、サンプルの ACTH 濃度を算出した。duplicate で得た測定値の平均値を実測値とした。

結果

1. 抽出過程に於ける抽出率

図 1 は血清に $^{125}\text{I}-\text{ACTH}$ を添加した場合の $^{125}\text{I}-\text{ACTH}$ の回収率を示している。血漿量が 2.5ml , 1.25ml と減少すると、回収率は 5ml , 8ml の場合に比較し、多少上昇する傾向が認められる。又血漿に緩衝液を加え、すべて 5ml にした場合も、やはり血漿量が少ないと回収率が上昇する傾向を

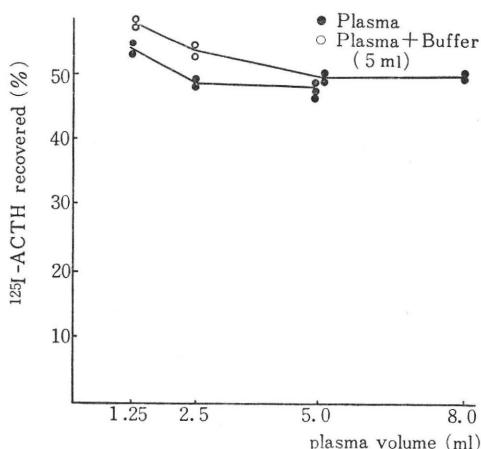


Fig. 1 Effect of Plasma Volume on The Recovery of $^{125}\text{I}-\text{ACTH}$ in Extraction with Glass Adsorbent

示した。又 5ml の血漿での回収率の再現性は $50.2 \pm 1.3\%$ ($n=6$) であり、かなり一定しているため、検体ごとの回収率による測定値の補正は省略し得るものと考えられる。LH, FSH, TSH, GH, Angiotensin 等の peptide hormone のこの抽出操作での回収率は $1.6\% \sim 9.2\%$ 程度であった。(図 2)

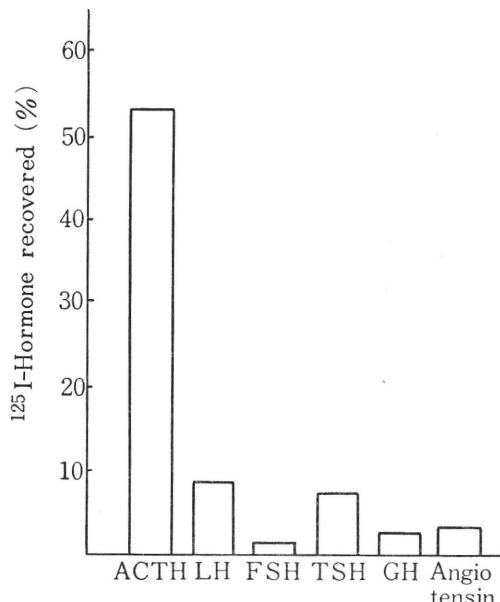


Fig. 2 Recovery of $^{125}\text{I}-\text{Hormones}$ in Extraction with Glass Adsorbent

2. インキュベーション時間

第一次インキュベーションの反応は 20 時間程度で平衡に達しており、その後は大体安定であったので 20 時間で行った。図 3 には $^{125}\text{I}-\alpha^{1-24}\text{ACTH}$ を加えてから bound と free を分離するまでの第二次インキュベーション時間の標準曲線に及ぼす影響を示している。7 時間程度より 9 時間半、12 時間と延長した方が落差が大きいので、インキュベーション時間は 10 時間~12 時間程度とした。

3. charcoal を加えてから分離までの時間

charcoal を加えてから 2 分、5 分、15 分、22 分、30 分後に bound と free を分離した場合の charcoal への結合率は 2 分後が低く、その後多少増加

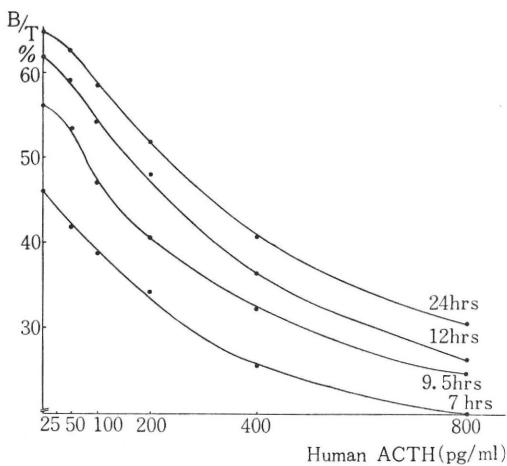


Fig. 3 Effect of The Second Incubation Time on The Standard Curve of ACTH

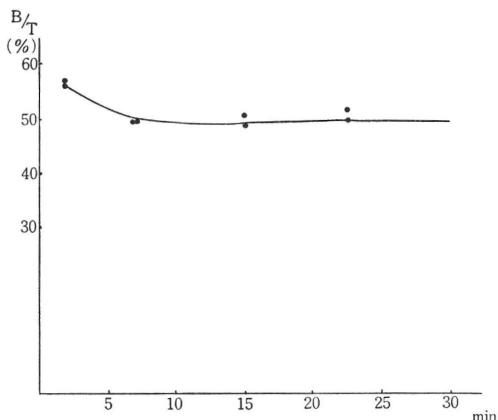


Fig. 4 Efctect of The Time After Adding Charcoal on The Bound Percent of ACTH

したため bound % は 2 分後が最も高かったが、7 分から 30 分までは、ほぼ安定していたので、charcoal を加えて 10 分放置後に bound と free を分離した(図 4)。

4. 標準曲線

図 5 に標準曲線を示している。kit の説明のごとく、5 ml の ACTH ゼロ血清にヒト標準 ACTH (800 pg/ml) を加えて抽出し、その乾固物を緩衝液 700 μl に溶かし、これを段階希釈したものそれぞれ 100 μl を用いて作成した標準曲線より、2.5 ml の血清にヒト ACTH (1600 pg/ml) を加えて

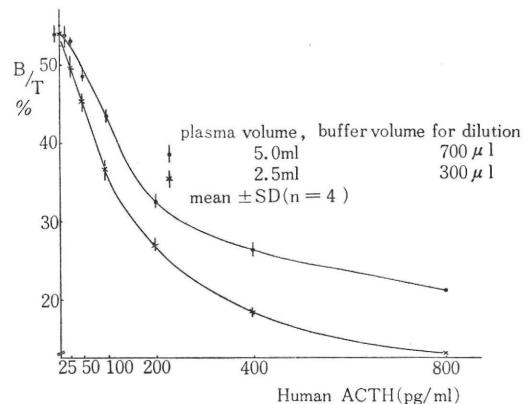


Fig. 5 Standard Curve of ACTH Radioimmunoassay

抽出し、300 μl の buffer に溶解して、段階希釈した standard のそれぞれ 100 μl を用いて作成した標準曲線の方が急峻で良好であった。そしてこの場合には 25 pg/ml 以下の検出感度を得ることができた。

5. 特異性

図 6 の左には各種ペプチドホルモンを ACTH ゼロ血清に加え、上記と同様の方法で抽出、アッセイした場合の $^{125}\text{I}-\alpha^{1-24}\text{ACTH}$ と抗血清の反応系に及ぼす影響をみているが、ヒト ACTH の他は反応系にほとんど影響を与えていない。又、右は、使用した抗血清と各種ペプチドホルモンとの cross reaction をみたものであるが、LVP が ACTH に対し 0.3% 程度の cross reaction を認めた他にはほとんど認められなかった。したがって、ACTH 以外のペプチドは、少なくとも通常の血中レベルでは ACTH の測定に干渉しないものと考えられる。

6. 血漿希釈曲線

血中 ACTH 値 648 pg/ml の Addison 氏病患者血漿を ACTH ゼロ血清にて 2 倍、4 倍、8 倍、16 倍に希釈した場合の測定値は、ほぼ直線的関係を示した(図 7)。

7. 回収試験

正常人プール血清にヒト ACTH を 25, 50, 100, 200, 400 pg/ml となるように加えた場合の

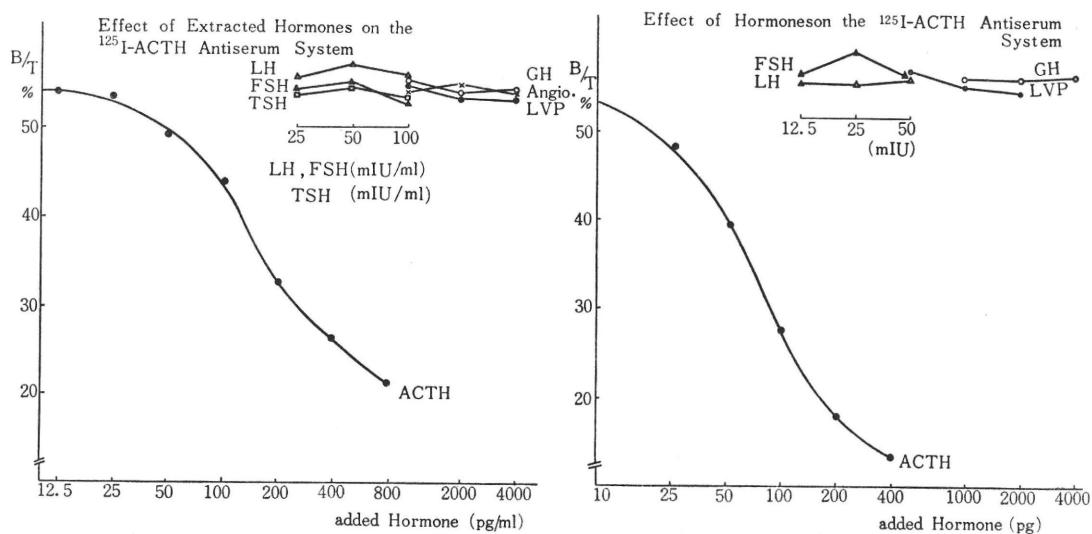


Fig. 6 Effect of LH, FSH, TSH, GH and LVP on the Assay System of ACTH

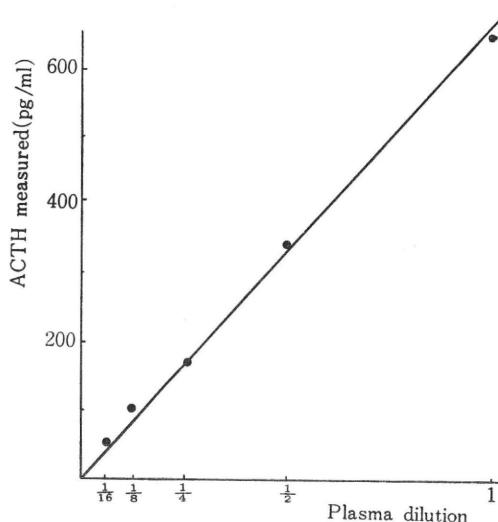


Fig. 7 Dilution of the Serum of a Patient with Addison's Disease

添加実験の回収率は平均 113.8 %で、高濃度領域で高めの値を示した（図 8）。

8. 再現性（表 1）

同一アッセイ内で正常人プール血清を 7 検体測定した場合の再現性は、 $50.2 \pm 4.8 \text{ pg/ml}$ で、変異係数 9.6% と比較的良好であった（表 1 上図）。

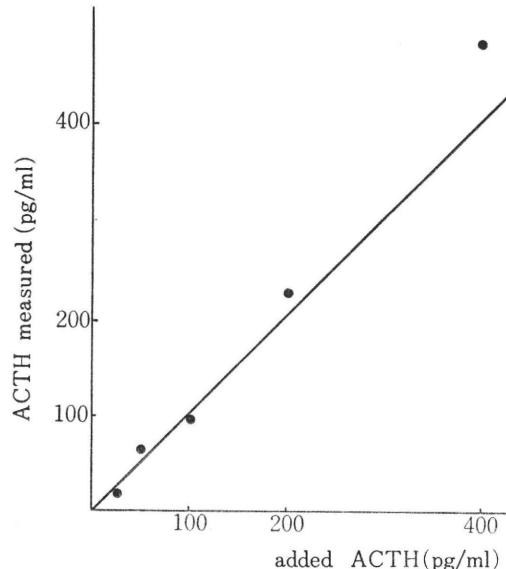


Fig. 8 Recovery of ACTH added to Pooled Serum

又、7種の血漿を日をかえて 2 回測定した場合の再現性を示しているが、平均誤差 $15.9 \pm 10.3\%$ とばらつきが認められ、日差再現性には多少問題があった。又アッセイは duplicate で行っているが、その 2 本間の平均誤差は $0.79 \pm 0.56\%$ ($n =$

Table 1 Repeatability

Within-assay

sample No.	ACTH (pg/ml)	Mean±SD	CV (%)
1	47.2		
2	53.6		
3	49.2	50.2±4.8	9.6
4	55.6		
5	57.8		
6	47.2		
7	45.0		

Between-assay

sample No.	ACTH (pg/ml)		Mean-(1st) %
	1 st	2 nd	
1	6	8	14.2
2	20	22	4.8
3	24	17	17.1
4	31	18	26.5
5	39	36	4.0
6	540	412	13.5
7	48	25	31.5
Mean±SD			15.9±10.3

17) 程度で、radioimmunoassay そのもののばらつきは小さかった。

9. 臨床応用

以上の方法により測定した正常人20名の午前9～10時の血漿 ACTH の値は15～100pg/mlに分布し、mean±SD は $45.5 \pm 19\text{pg/ml}$ であった。25 pg/ml未満の値は測定感度以下としたので、正常値は 85pg/ml 以下となった。過形成型の Cushing 症候群では正常の上界から 178.6pg/ml の値を示し、両側副腎摘出後は、248pg/ml～681pg/ml の値を認めた。又副腎腺腫による Cushing 症候群に於いては、測定感度以下の値を示した。Addison 病患者に於いては高値を示し、ステロイド治療により低下傾向を認めた。下垂体不全症や、ステロイド治療中患者では測定感度以下の値を示した(図9)。

又、Metyrapone 3 g投与(0.5g×6回)により、翌朝9時の血中 ACTH は正常人3名で 179, 219, 306 pg/ml に達した。又 Lysine-8-vasopressin(以下LVPと略す)試験(4U・iv)に於いて、腺腫による Cushing 症候群に於いては反応が認められないのに対し、過形成によるものでは前値179pg/mlから、20分後に272pg/ml、又

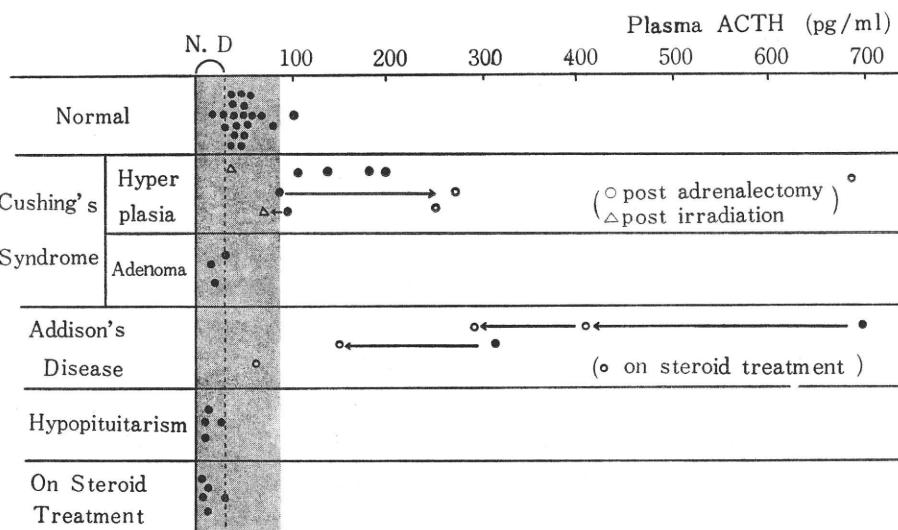


Fig.9 Plasma ACTH Levels in Normal Persons and Patients With Hypophyseoadrenocortical Disorders

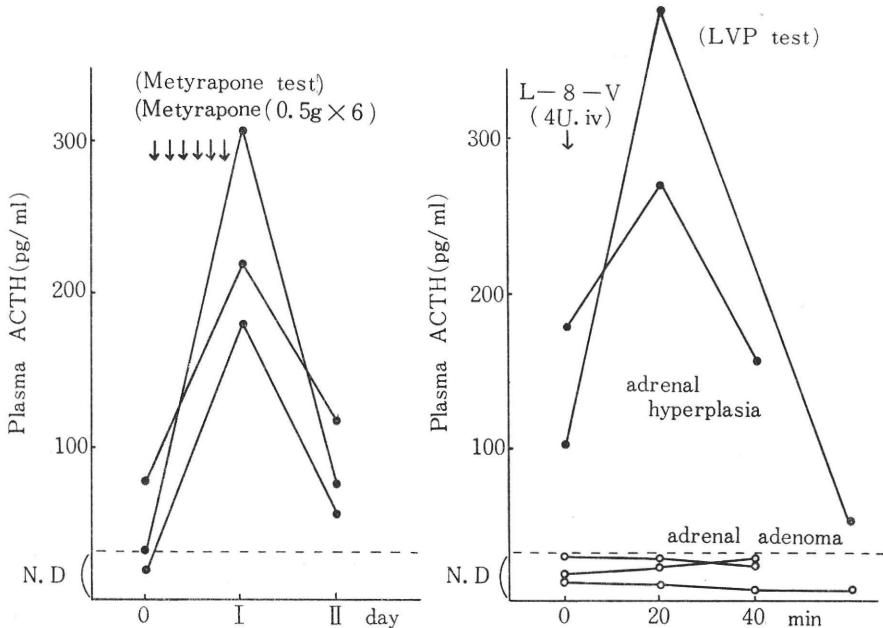


Fig.10 Plasma ACTH Levels in Normal Subjects in Metyrapone Test and in Patients with Cushing's Syndrome in LVP Test

100pg/mlから388pg/mlへと増加反応が認められた(図10)。

考案

血漿ACTHは他のホルモンに比較し微量であり、又感度のよい抗血清の作製が困難であるため、そのradioimmunoassayは、Felber¹⁾らが1963年に最初に発表してから10年になるにもかかわらず、その普及は他のペプチドホルモンに比較して遅れている。現在のInsulin, GH, TSH, LH, FSH, Angiotensin等はキットが充分普及し、これらは抽出操作なしに直接測定されている。ACTHの測定に於いて、BersonとYallow²⁾やRayyis³⁾らはACTHを抽出操作なしに測定しており、又、松倉⁴⁾らはreverse portionの現象を利用して、やはり抽出操作なくして感度の良い測定を行っている。しかし一般には感度の点でまだ問題があり、アッセイの前に血漿からのACTH

の抽出操作が必要である。ACTHの抽出には一般に、酸アセトン⁵⁾や酸アルコール⁶⁾による方法(complex silicate)やイオン交換樹脂⁷⁾(Amberlite), Fuller's earth⁸⁾, ケイ酸⁹⁾等を用いる吸着を利用した方法がある。酸アセトン法、酸アルコール法は抽出操作が煩雑であり、Amberliteを用いる方法は時間がかかりすぎる欠点がある。又、Fuller's earthによる吸着法では、バッチによる相違が著明であるとされている。又、ケイ酸は非特異的物質を抽出するとされている。又抽出操作を加えた場合は、一般にあらかじめトレーサー量の¹²⁵I-ACTHを加えて、回収率を補正する方法がとられているが、このkitではトレーサーによる回収率の補正を省略している。このkitでは特殊な吸着用ガラス粒(Vycor code¹⁰⁾ 7930)が抽出に用いられており、これによると抽出に用いる血漿量を一定にすればかなり安定した回収率が求められた。回収率そのものは50%程度でそれ

ほどよくないが、再現性が良好であり、又、トレーサーで回収率を補正すること自体に誤差を生じる可能性もあるので、トレーサーによる検体ごとの回収率の補正を省略してさしつかえないものと考えられる。又¹²⁵Iで標識した TSH, LH, FSH, GH, Angiotensin 等の回収率は 1.6~9.6 % であり、抽出過程に於いて他のペプチドがかなり除去されている。これは Vycor code 7930 に於ける吸着の過程以外に、1N-HClによる洗浄、アセトンによる溶出といった過程でも他のペプチドが除かれるものと考えられる。又、アッセイに影響する非特異的物質の除去も充分行われている¹⁰⁾。この抗血清との cross reaction は ACTH 以外のペプチドホルモンは低く、したがって ACTH と同様の操作で抽出した他のペプチドホルモンの radioimmunoassay に対する干渉は ACTH の測定感度以下のものであり、実際の測定には影響が認められなかった。又、この抗体は Wellcome 社の抗体であり、Glover¹¹⁾によると ACTH の fragment に対しては 1-24ACTH, 1-39ACTH, 11-24ACTH と反応するが、1-14ACTH, 20-24ACTH, 25-39ACTH とは交叉反応を示さないとされている。したがってこの抗体を用いる測定では生物学的活性のない ACTH fragment は測定されてないものと考えられる。

kit の説明では標準ヒト ACTH を 5 ml の ACTH ゼロ血清に加え、抽出乾固物を 700 μl の緩衝液に溶解し、これを段階希釈したものの 100 μl ずつを用いて標準曲線を作成している。血清量を 2.5 ml にしても、抽出乾固物を 300 μl の緩衝液に溶解し、それを段階希釈したものの 100 μl ずつを用いて標準曲線を作成し、これと同様の操作で未知の検体を測定すればより高い感度が得られた。血漿量 2.5 ml の場合で 25 pg/ml の感度が得られた。又、抗体の希釈を 8 ml の緩衝液で行ってもこの程度の感度を得ることができ、こうすれば測定可能検体数を 6~7 検体程度増やすことができた。標準ヒト ACTH を血清に加えて抽出し、倍数希釈して標準曲線を作成する場合、もし非特異的なものが抽出されていれば、これも希釈される

ため問題があるが、前述のごとく非特異的物質は抽出操作でほとんど除かれており、実際の測定に於いても問題はなかった。

インキュベーション時間は第一次インキュベーションを 20 時間とし、第二次インキュベーションを 12 時間程度とした場合に最も急峻で良好な標準曲線が得られた。最も安定したアッセイには第一次インキュベーションを延長した方が望ましいと考えられるが、実際の測定ではこの程度の時間で充分であった。

ACTH の正常値、85 pg/ml 以下という値は諸家の報告²⁾³⁾⁷⁾⁸⁾¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾ と比較し大差はなかったが、松倉⁴⁾らの 22~175 pg/ml に比較すると 1/2 程度である。又、下垂体副腎系に異常をきたす疾患での測定値、正常人の Metyrapone 試験に於ける反応、Cushing 症候群での LVP 試験の結果等からすれば、この kit は充分臨床応用可能と考えられた。ACTH 測定の国内での kit 化が遅れ、radioimmunoassay がまだ充分普及していない現状では、この kit は抽出操作が多少煩雑ではあるが、全操作は比較的簡単であり、その存在意義は大きい。しかし感度の点で血清量が 2 ml 以上必要な点や高価な点に問題があり、今後これらの点の改善が望まれる。

結論

英国の R.C.C. の radioimmunoassay kit を検討し次の結果を得た。

①抽出には特殊なガラス粒を用いており、抽出率の再現性が良好なので、トレーサーによる検体ごとの回収率の補正は省略し得た。

②第二次インキュベーションは 12 時間程度に延長した方が良好な標準曲線を得ることができた。

③又抗体の希釈を緩衝液 8 ml (kit では 6 ml) で行っても感度は変わらず、こうすれば測定可能検体数を増すことができた。

④2.5 ml の血漿を用いて測定を行った場合でも 25 pg/ml のレベルまで測定が可能であった。

⑤他のペプチドホルモンである、TSH, LH, FSH, GH, LVP, Angiotensin 等は ACTH の

測定に影響を与えたかった。

⑥Addison氏病患者の血清を ACTH ゼロ血清で希釈した場合の測定値は、ほぼ直線関係を示した。

⑦プール血清に ACTH を 25~400pg/ml 加えた場合の回収率の平均値は 113.8% であった。

⑧測定の同時再現性は変異係数 9.6 %と良好であったが、日をかえての再現性には多少問題があった。

⑨正常人の測定値は 15pg/ml~100pg/ml に分布し mean \pm SD は 45.5 \pm 19pg/ml で 85pg/ml 以下を正常値とした。又、下垂体副腎皮質系疾患や、Metyrapone 試験、LVP 試験の結果からすれば充分臨床応用可能と考えられた。

文 献

- 1) Felber, J.P.: Experientia, **19**: 227, 1963.
- 2) Berson, S. A. and Yallow, R. S. : J. Clin. Invest., **47**: 2725, 1968.
- 3) Rayyis, S. S. and Bethune, J. E. : J. Clin.

- Endocr., **29**: 1231, 1969.
- 4) 松倉 茂: 日本臨床, **27**: 313, 1969.
- 5) Yallow, R. S., Glick, S. M., Roth, J. and Berson, S. A. : J. Clin. Endocrinol., **24**: 1219, 1964.
- 6) 井村裕夫: 日本臨床, **23**: 198, 1965.
- 7) Orth, D.N., Island, D.P., Nicholson, W.E., Abe, K. and Woodham, J. P. : AEC Symposium Series, **13**: 251, 1968.
- 8) Landon, J. and Greenwood, F. C. : Lancet, I : 273, 1968.
- 9) Donald, R.A. : J. Endocrinol., **39**: 451, 1967.
- 10) Ratcliffe, J. G. and Edwards, C. R. W. : In Radioimmunoassay Methods, Edinburgh, Churchill Livingstone, England, 1971, p.502
- 11) Glover, J.S. : ACTH immunoassay : Endocrine Group Meeting, Osaka, October 6, 1972.
- 12) Demura, H., West, C. D., Nugent, C. A., Nakagawa, K. and Tyler, F. H. : J. Clin. Endocrinol., **26**: 1297, 1966.
- 13) Melbin, K. E., Tashjian, AlH., Jr., Clasidy, C. E. and Givens, J. R. : Metabolism, **19**: 831, 1970.
- 14) Lefkowitz, R. J., Roth, J. and Pastan, I. : Science **170**: 663, 1970.