

〈使用経験〉

ACTH Radioimmunoassay-Kit の検討

吉 村 学* 越 智 幸 男* 間 島 崇 哉*

貝 増 眞 彦* 宮 崎 忠 芳* 八 谷 孝*

高 橋 伯 夫*

はじめに

ACTH の Radioimmunoassay(RIA) は Feller¹⁾ によって開発されて以来、種々の報告がある。しかし ACTH は分子量約4,500の比較的小さいポリペプタイドホルモンであるため、抗体価の十分な抗血清の作製が比較的困難なため RIA の普及は遅れていた。このたび英國の The Radiochemical Centre(RCC) より ACTH-RIA キットが作られ、科研化学株式会社を通して市販されることになった。我々は今回この ACTH-RIA キットの評価に関して種々の検討を行ったので報告する。

検査対象及び方法

1) 検査対象

当科に入院し、インスリン負荷テストを施行した正常人4名、甲状腺機能亢進症患者4名の血漿を用いた。

2) ACTH-RIA の方法

このキットによる ACTH-RIA の方法は血漿中の ACTH を抽出したのち RIA を行うものである。なお結合型と遊離型の分離に charcoal が用いられている。

① ACTH の抽出法：抽出操作は抽出用チューブに被検血漿2～8 ml、またはヒト ACTH ゼ

* 京都府立医科大学第二内科学教室

受付：48年11月21日

別刷請求先：京都市上京区河原町通広小路（〒602）

京都府立医科大学第二内科学教室

吉村 学

ロ血清5 ml、及び ACTH ゼロ血清（2～5 ml）に標準曲線用としてキットに付属した標準 ACTH 液0.4ml (4ng) を加えたものを対象として行った。ACTH 含有血漿および血清を回転混合器（中島商店製 Res-O-Mot ETR 用、直徑25cm）で1時間混和してチューブ内のガラス粒に ACTH を吸着させたのち、この ACTH 吸着ガラス粒を蒸留水2 ml 及び 1 N 塩酸2 ml で洗う。ついで50% (v/v) アセトン水溶液(1 ml) を加えて30分混和してガラス粒から ACTH を溶出させて遠心し、その沈渣に再度アセトン水(0.5ml) を加えて ACTH を再溶出させる。この ACTH 含有アセトン水溶液(上清) を 55°C 恒温槽で蒸発乾固させるか、または凍結乾燥器(Vertis 社製)で乾固させたのち、キット中の緩衝液0.2～0.7 ml を加えて RIA 用抽出液を調整した。

② RIA の方法：この抽出液または標準 ACTH 抽出液0.1ml に抗 ACTH 抗血清0.1ml 加え、16～20時間 4°C に保ち、ついで ¹²⁵I-ACTH 0.1 ml を加え再度 4°C で6～8時間保ったのち、charcoal 懸濁液にて結合型と遊離型を分離し、それぞれの放射能を測定した。測定は全て二重試験で行った。異常に高い ACTH の時には上記の緩衝液で抽出液を希釀して測定した。RIA の操作はキット付属のマイクロプラスチック・チューブと市販の採血用ガラス管とで行い標準曲線の差異を検討した。ガラス管の方が使い易い為に主に用いた。

3) 基礎的検討の方法

これらの抽出 ACTH-RIA の基礎的検討として

ACTHの抽出率、ACTH抽出操作中のACTH含有アセトン水溶液の乾燥状態、RIA操作での保生時間、抗ACTH抗血清の量、保生温度およびcharcoal懸濁液混和後遠心分離までの時間の諸問題につき検討した。ACTHの抽出率は正常ヒト血清(NHS)に¹²⁵I-ACTH 0.1mlを加えて、抽出操作前に4°Cで1時間保った場合と、この操作を行わず直接抽出した場合を比較した。この操作中に得た各溶液の全radio-activity(RA)を測定した。ついでこれらの抽出操作中に得た溶液のうち血清を含まぬ溶液ではNHS 0.5ml加えたのち、20%TCA(三塩化醋酸)を加えて蛋白を沈殿させたのち、その沈殿物に10%TCAを加えて再度沈殿させた。これらの上清分画と沈殿分画とのRAを測定した。

4) ¹²⁵I-ACTHの検討

標識¹²⁵I-ACTH化合物の検討については¹²⁵I-ACTH 0.1mlとリン酸緩衝液0.4mlを混和したのちcarrier proteinとしてNHS 0.5mlを加えた。これらに20%TCA 1.0ml(TCA最終濃度10%)を加えて蛋白を沈殿させたのち、この上清、沈渣の放射能を測定し、free¹²⁵Iの%(¹²⁵I-ACTHの分解の程度)を求めた。

5) 臨床的検討

インスリン負荷テスト(0.1U/kg体重)を施行した正常人4名、甲状腺機能亢進症患者4名の血漿ACTH、成長ホルモン(GH)及び血糖を測定した。成長ホルモンはダイナボット社製のGH測定用キットを用い、血糖はオートアナライザー法に従った。

成績

1) 抽出操作の検討

抽出操作の1時間前および直前に¹²⁵I-ACTHを加えたものについてNHS量を1~12mlと変えてその抽出率を求めた(図1)。図1に示すごとく添加血清の増加するに従って抽出率は逆に低下する。NHSを入れずに緩衝液2mlを用いて¹²⁵I-ACTHの抽出率を求めたものが最良であった。また抽出の1時間前または直前に¹²⁵I-ACTH

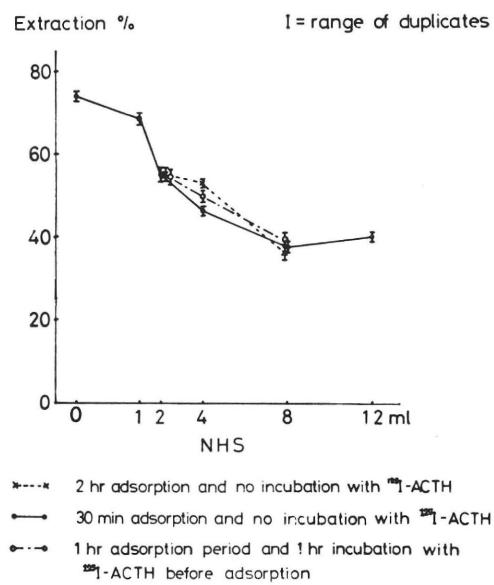


図1 血清量ならびに抽出前に¹²⁵I-ACTHと血清を保つ時間のおよぼす¹²⁵I-ACTH抽出率への影響。黒丸印は緩衝液(2ml)又はNHS(2~12ml)に¹²⁵I-ACTHを加えたのち直ちに30分間の回転抽出を行ったものを示す。×印は同様に120分間の回転抽出を行ったもの。また白丸印は抽出操作前に¹²⁵I-ACTHとNHSを1時間保ち、次で60分の回転抽出を行ったものを示す。

を血清に加えても抽出率に大差を示さなかった。また抽出時間を長くすると、即ち回転器を用いた場合吸着用ガラス粒と血清の混和が不十分とも思われたので、予定の4倍の時間にわたり混和したが良好な抽出率はえられなかった。上記の結果から実際測定時においては抽出率を一定にするため被検血漿の量と標準曲線用抽出操作でのACTHゼロ血清の量を同一にした。抽出操作過程での¹²⁵I-ACTHの分布状態を見たのが表1である。被検血清が多ければACTHは抽出されずに血清中に残る率も高まる。また予想に反して蒸留水と1N-HClによる洗浄により12~21%も¹²⁵I-ACTHが除去された。図2はACTHゼロ血清2mlまたは5mlに標準ACTHを加えて抽出し、その倍数希釈により描いた標準曲線(ガラス管使用)である。緩衝液に直接標準ACTHを加えて作った標準曲線は抽出操作をした系に比べbound%

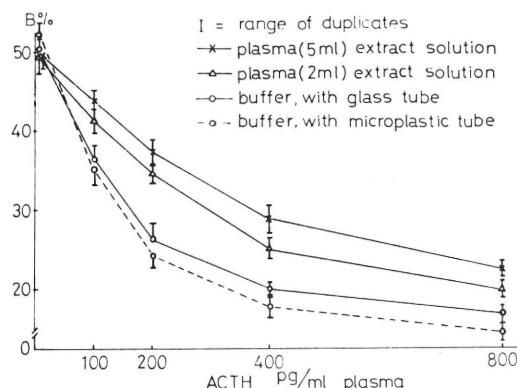


図 2 Plasma extract solution : Extract solution from plasma with standard ACTH solution-buffer : Buffer with standard ACTH and without extraction procedure.

抽出操作と使用試験管の標準曲線におよぼす影響。 \times 印及び三角印は血漿（2又は5ml）中に標準ACTHを加えたのち抽出し、その抽出液を用いて作った標準曲線を示す。白丸印は緩衝液中に直接標準ACTHを加えて作った標準曲線を示し、実線は採血用ガラス管を用い、点線はマイクロプラスチックチューブを用いてRIAをしたもの。

(B%)は低かった。また血清2mlと5mlと比べると5mlの系のB%が大になった。これらの場合の最小測定限界は30pg程度であった。なおRIAをガラス管で行ったものとマイクロプラスチックチューブを用いたものとでは、後者の方の標準曲線はやや良好であるが大差は認めなかつた。故に以下の測定は全てガラス管を用いてRIA

を行った。

つぎにACTH含有アセトン水溶液の蒸発操作に関して、55°C恒温槽中で空気を吹きつけ蒸発乾固させた場合と凍結乾燥器で乾燥させた場合を比較したが、空気を吹きつけると管壁に水溶液がとびちつたので回収率を良好にするために凍結乾燥させた。

2) RIA 操作の検討

有効期限最終日の ^{125}I -ACTH中のfree ^{125}I は25~32%であった。RIAの保生時間の影響を検討したのが図3である。図3の左はキット説明書に従って抗体と緩衝液とを入れ第一次保生をしたのち、 ^{125}I -ACTHを加え、ついで第二次保生（種々の時間）後にcharcoal液を加えて結合型と遊離型を分離した時のB%を示した。第二次保生時間は8~12時間においてB%は一定になったことを認めた。図右は一般的RIAの如く最初から ^{125}I -ACTHと抗体および緩衝液と共に加えた場合であるが、保生時間と共にB%は漸次上昇する傾向がある。96時間4°Cに保った方が最高であった。なお抽出せずに血漿を直接RIA系に入れたものでも同様の傾向を認めた。

RIAにおける保生温度の影響について検討したのが図4である。室温（28°C前後）に第二次保生時間のみを放置し第一次保全時間は4°Cに保った場合や、第一次および第二次保生時間とも室温で保ったものにおいてはB%は低下し測定精度

表1 血清量のACTH抽出率に及ぼす影響。

^{125}I -ACTHとNHS（1~12ml）又は緩衝液（2ml）を混和後キット説明書に従って抽出操作を行い、これより生じた上清及び沈渣のRAを測定し%で示した。

Effect of serum volume on extraction percentage

| Serum (ml) | 0 | 1 | 2 | 4 | 8 | 12 |
|--|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Buffer (ml) | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Serum after adsorption (RA %) | 9.0~7.6 | 10.7~10.5 | 19.4~19.3 | 34.4~31.8 | 40.0~39.8 | 37.3~39.8 |
| Water and HCl sol. after washing (RA %) | 12.9~12.4 | 16.9~15.9 | 18.1~21.4 | 15.7~17.8 | 20.7~15.9 | 15.9~16.4 |
| Glass particles after adsorption (RA %) | 4.6~4.8 | 5.4~4.1 | 5.9~5.7 | 4.0~4.3 | 3.9~4.9 | 4.9~4.9 |
| Extracted sol. (RA %) | 73.6~75.2 | 67.0~69.5 | 56.6~53.6 | 45.8~46.0 | 35.4~39.4 | 39.4~41.3 |

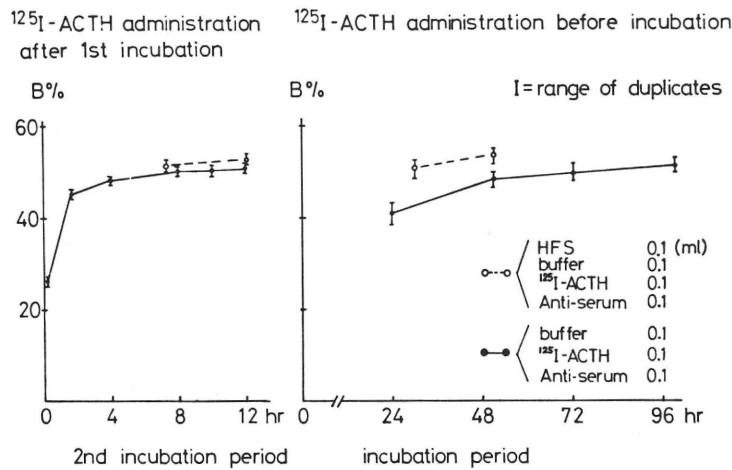


図3 保生時間のB%に及ぼす影響。

左図の黒丸印はキット使用書に従って18時間の第一保生のあと¹²⁵I-ACTHを加え各種時間での¹²⁵I-ACTHのB%を示す。白丸印はACTH free serum (HFS) 0.1mlを含むものを示した。右図の黒丸印は初めより緩衝液、¹²⁵I-ACTH、抗ACTH-抗血清を加えて各時間での¹²⁵I-ACTHのB%を示す。白丸印はHFS 0.1mlを含む。

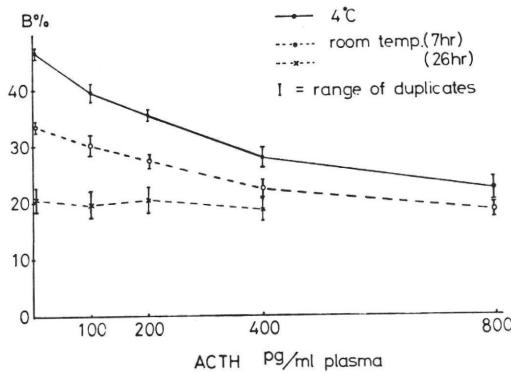


図4 保生温度の標準曲線に及ぼす影響。

黒丸印はRIAの全過程を4°Cで行ったもの。白丸印は第1次保生の18時間を4°Cで第2次保生の7時間を室温(28±3°C)で行ったもの。×印は全過程を室温で行ったものの標準曲線を示した。

も低かった。

抗ACTH抗血清の量について0.1ml又は0.05mlを用いて描いた標準曲線について検討を行ったが、キット説明指示のごとく抗体0.1mlを用いた方が0.05mlのに比べてB%は高かった(図5)。

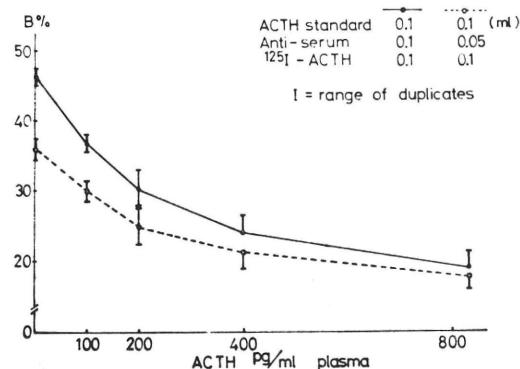


図5 抗ACTH-抗血清量の標準曲線に及ぼす影響。

黒丸印は抗体0.1ml、白丸印は抗体0.05mlでのACTH-RIAの標準曲線を示す。

つぎにcharcoalを加えて結合型と遊離型とに分ける場合、charcoal液添加後遠心までの時間について検討したのが図6である。charcoalを加えてから15分間までを検討したが、経時にB%が低下する傾向があった。全測定は出来るだけ一定時間後に遠心する必要があると考えられた。測定値の再現性を検討するため同一患者血漿を

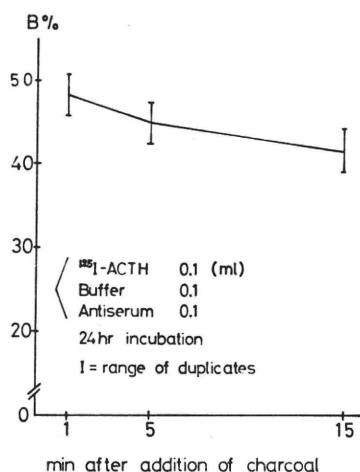


図 6 charcoal 溶液添加後遠心までの時間の ^{125}I -ACTH の B% におよぼす影響。

4 度、バッチナンバーの異なる同じ RCC 社製のキットを用い、異なる日に重複測定した。表 2 はその結果を示したもので変動を示している。また同一キットで 2 種の同一血漿を 20 回測定した ACTH 値の正常域の変動係数は 29 であり、高値においては 18 であった（表 3）。

表 2 同一検体を異なるバッチナンバーのキットを用い、異なる日に測定した際の測定値の変動。

| Kit | Subject's State | ACTH pg/ml in plasma | | | |
|-----|-----------------|----------------------|-----|-----|-----|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| A | basal | 5 | 5 | 10 | 15 |
| B | basal | 30 | 38 | 42 | 48 |
| C | ITT | 214 | 220 | 228 | 317 |
| D | ITT | 290 | 298 | 330 | 357 |

ITT : insulin tolerance test

3) 臨床的検討

正常人および甲状腺機能亢進症患者にインスリン負荷時の血中 ACTH 濃度を抽出法で測定した結果を図 7 で示した。低血糖の出現と共に逆に ACTH 値は上昇し成長ホルモン値とほぼ同様の反応パターンを示し、60 分に最高値を示し 2 時間後に負荷前値に復した。

考 案

血漿中の ACTH の測定をする場合、抽出せず

表 3 正常範囲内の ACTH 値を示す血漿と、高い ACTH 値を示す血漿を各々同一キットで同一日に 20 回測定したときの変動係数を示す。

| No. of tube | Normal value | high value |
|-------------|--------------|------------|
| 1 | 24 | 144 |
| 2 | 26 | 150 |
| 3 | 32 | 174 |
| 4 | 38 | 195 |
| 5 | 43 | 210 |
| 6 | 44 | 212 |
| 7 | 46 | 215 |
| 8 | 48 | 223 |
| 9 | 50 | 225 |
| 10 | 50 | 225 |
| 11 | 52 | 228 |
| 12 | 53 | 230 |
| 13 | 55 | 234 |
| 14 | 56 | 235 |
| 15 | 57 | 236 |
| 16 | 59 | 248 |
| 17 | 62 | 252 |
| 18 | 68 | 274 |
| 19 | 74 | 290 |
| 20 | 85 | 315 |
| mean | 51 | 226 |
| S.D. | 14.6 | 40.3 |
| C.V. | 29 | 18 |

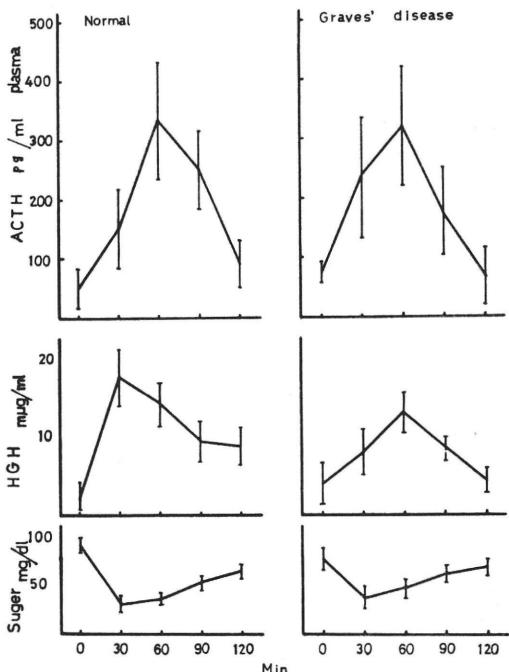


図 7 インスリン負荷テスト中における ACTH, 成長ホルモン, 血糖の動き。

に直接血漿を用いて RIA を行うと、標識 ACTH と血漿を4°Cに保つことにより変性し易くまた測定精度が悪いとされている。このため種々の抽出法が考案されているが^{2),3)}、操作の複雑さと回収率に問題がある。本キットの抽出用ガラス粒子に関しては説明書に明記していないため不明であるが、今回の使用経験からすると二・三問題点がある。しかし我々の抽出率検討は、¹²⁵I-ACTH を用いて行っているのでその解釈は注意を要すると思われる。例えば¹²⁵I-ACTH の変性の問題もあるので添加した¹²⁵I-ACTH の抽出率でもって内因性 ACTH の抽出率を決定することは困難である。また検体容量と抽出率との関係は血漿の増加に伴い抽出率が低下するので十分に注意を要すると思われる。

内因性 ACTH の血中存在様式に関しては遊離の型で存在し、蛋白と結合しないとされ、またかりに結合蛋白が存在しても微量であると考えられる⁴⁾。今回の経験でも血漿と¹²⁵I-ACTH の抽出率に差を認めなかった。また蒸留水や1N-HCl の洗浄が強すぎると¹²⁵I-ACTH の回収率が減少する傾向にあることと、50%アセトン水溶液での ACTH 溶出に十分な混和と時間をかけることが必要と思われた。つぎに ACTH 含有アセトン水溶液の乾固に関しては、加温による蒸発乾固に比べて凍結乾燥の方のB%が低いため、成長ホルモン等にみられる様な凍結乾燥操作による活性低下⁵⁾はないと考えられ、乾固操作による ACTH の損失を少なくするため凍結乾燥をすべきと思われる。

ACTH の RIA でも抗血清の力価が問題であるが、キットの抗血清を規定された量の半分使用した場合ではB%の低下及び測定精度の低下がみとめられた。しかし ACTH が低濃度の場合濃度が上ると共にB%が上る現象の paradoxical binding phenomenon⁶⁾はみとめられなかった。この現象は比較的血清抗体価の低い抗血清を用いた場合にみられるので、ACTH の抗体価が関与するものと考えられる⁷⁾。これらの報告を併せ考えた結果から本キットの抗体力価は満足すべきもので

ある。十分な精度をもって測定可能な ACTH の限界値はキット説明書によると 10pg/ml となっているが、我々の成績（抽出操作の後ガラス管使用の RIA）ではやや測定精度は低く 30pg/ml であった。この原因として ACTH の抽出率が低いことや、使用した¹²⁵I-ACTH の specific activity の低いことなど精度が良くない原因とも考えられる。キット入手後ただちに使用した場合でも¹²⁵I-ACTH(α^{1-24})0.5/ μ Ci/ml（キット使用説明書による）の希釈を説明書通りにして行うと auto-well-scintillation counter (Nuclear Chicago) で 3000CPM/0.1ml 程度の低値であり、¹²⁵I-AC TH 濃度をやや濃くして 4000—5000CPM/0.1ml で測定を行った。

インスリン負荷した場合の ACTH の動きは低血糖を介するもので、血糖の低下より遅れて ACTH の上昇が起ることはすでに報告され^{9),10)}、また今回我々もこれを確認した。また成長ホルモンにおいても同様の反応を示した。以上 ACTH RIA キットを用いて血中 ACTH の測定時の種々の問題点の検討を行ったので報告した。

ま と め

The Radiochemical Centre の ACTH-RIA キットを用いてその有用性を検討した。抽出操作においては、使用血漿量により回収率が異なるため標準曲線用の血漿量と被検血漿量を一定にする必要がある。また少量の血漿量を用いた方が回収率は良好であった。RIA では paradoxical phenomenon を認めない標準曲線をえて、各種被血漿の ACTH 値を測定しえるものと考える。再現性については測定値にかなりの変動があるため三重複測定が良いと思われる。

稿を終るにのぞみ、御指導御校閲を賜った伊地知浜夫教授に深謝しますとともに ACTH-RIA キットを提供していただいた科研化学株式会社に感謝致します。

本論文の要旨は、第13回日本核医学会総会（1973年8月）に発表した。

文 献

- 1) Felber, J.P : Experientia, **19** : 227, 1963.
- 2) 清水直容, 尾形悦郎 : 日本臨床, **23** : 926, 1965.
- 3) 井村裕夫 : 日本臨床, **23** : 918, 1965.
- 4) 井上裕夫, 松倉茂, 加藤謙 : 日本臨床, **27** : 1407, 1969.
- 5) Gorden, P., C.M. Hendricks, & J. Roth : J. Clin. Endocrinol & Metab, **36** : 178., 1973.
- 6) Matsukura, S., C.D. West, Y. Ichikawa, W. Jubiz &. Harada : J.Lab. Clin. Med., **77** : 490, 1971.
- 7) 中井義勝, 井村裕夫, 松倉茂 : 日内泌誌, **46** : 894, 1973.
- 8) 梅津幹夫, 藤生英夫, 諏訪城三 : 日内泌誌, **49** : 509, 1973.
- 9) 井村裕夫, 松倉茂, 中井義勝 : 日本臨床, **31** : 1584 1973.
- 10) Berson, S.A. & Yalow, R.S. : J.Clin. Invest, **47** : 2725, 1968.