

《使用経験》

ACTH イムノアッセイキットによる 血中 ACTH 測定 of 検討

鈴木 進* 満 間 照 典*
仁 瓶 礼 之* 富 田 明 夫*

1964年 Berson, Yalow 等が, 血中 ACTH 測定に radioimmunoassay 法を導入して以来¹⁾, 血中 ACTH の動態について多くの研究が報告されてきた^{2)-7), 9)-11)}. しかし血中 ACTH 濃度は微量であり, それを検出するのに十分な親和性を有する良好な抗体が得られにくい事より, 未だ, 日常検査法として普及する段階には至っていない. 最近英国 R.C.C により ACTH イムノアッセイキットが開発された. 我々は, 本キット (科研化学より提供) の基礎的検討を行うと共に本キットを用いて人血中 ACTH を測定し, その臨床的意義について検討を加えた.

対 象

対象は, 名大病院第1内科入院患者のうち臨床症状及び所見, ならびに検査成績, さらに病理学的所見により診断した Cushing 症候群 (過形成2例, 腺腫3例), アジソン病1例, 長期にわたり steroid 剤投与をうけた患者5例, 甲状腺機能亢進症5例, 正常者12例, 計28例を対象とした.

方 法

[1] ACTH イムノアッセイキットの方法

1) キットの構成および調製法

* 名古屋大学医学部第1内科

受付: 50年4月23日

採用: 50年9月11日

別刷請求先: 名古屋市昭和区鶴舞町65 (〒466)

名古屋大学医学部第1内科教室

鈴木 進

A) キット中の試薬

- ① A液
- ② 緩衝液成分: A液で調製する.
- ③ ACTH free 人血清: 12ml 水で調製する.
- ④ 抗人 ACTH 抗体: 6 ml 緩衝液で調製する.
- ⑤ 標準人 ACTH
- ⑥ $^{125}\text{I}-\alpha^{1-24}$ ACTH (約 $200\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$)
- ⑦ チャコール吸着剤: 25ml 水で調製する.

B) キット付属器具

- ① 抽出用チューブ: 容量 10ml (吸着ガラス粒 0.1g を含む)
- ② 蒸発用チューブ: 容量 4 ml
- ③ アッセイ用チューブ: 容量 0.5ml

2) 測定操作

2 ~ 8 ml 血漿または 5 ml 標準 ACTH 添加血清を抽出用チューブに入れ, 30分間回転混和した後, $1000\times G$ 2分間で遠心分離して上清を除去, 7 ml の水で洗浄し, さらに 2 ml の 1 N 塩酸で洗浄した後, 1 ml の 50% アセトンを加えて20分間回転混和しガラス粒より ACTH を溶出し, さらに 50% アセトン 0.5ml を加え洗浄操作を行い 1.5ml アセトン溶出液を流出空気下で蒸発乾固する. この蒸発乾固したものを緩衝液で溶解した後, その 0.1ml に抗人 ACTH 抗体溶液 0.1ml を加え, 2 ~ 4°C, 16 ~ 20時間の第1回の incubation, 次いで ^{125}I -ACTH 溶液 0.1ml を加え 6 ~ 8時間の第2回の incubation をする. 第2回の incubation 後 charcoal adsorbent 0.1ml を添加し遠心分離を

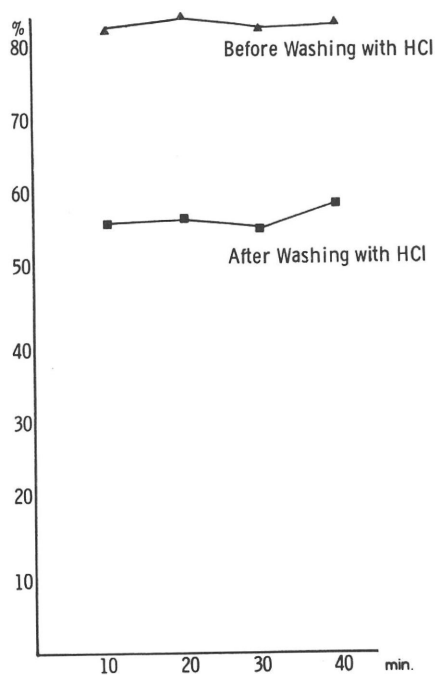


Fig. 1 Effects of mixing time by rotary mixer on adsorption rate of ^{125}I -ACTH to glass particles before and after washing with IN HCl.

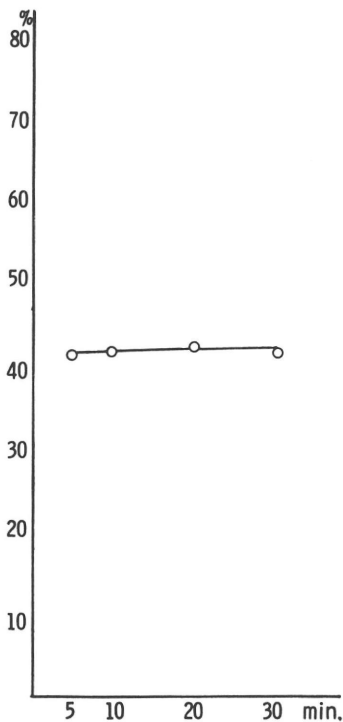


Fig. 2 Effects of disorption time by 50% acetone on disorption rate of ^{125}I -ACTH from glass particles.

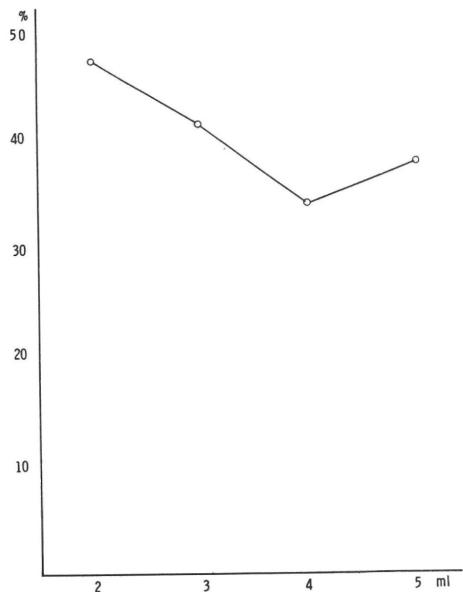


Fig. 3 Effects of extraction volume on the extraction efficiency of ^{125}I -ACTH. The extraction efficiency was affected by the extraction volume.

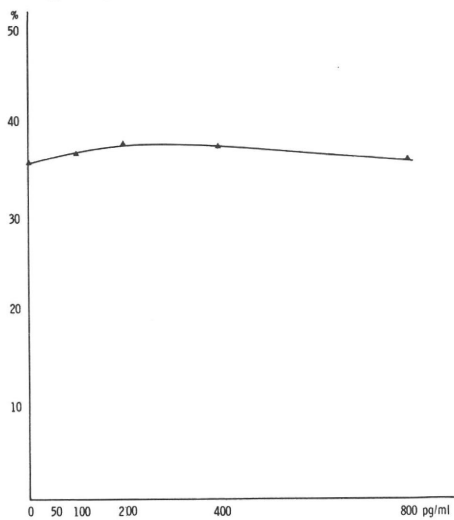


Fig. 4 The extraction efficiency at different concentration of human ACTH was examined by using tracer dosis of ^{125}I -ACTH. The efficiency was little affected by the concentration of ACTH.

行い charcoal adsorbent に吸着された free form の ^{125}I -ACTH の放射能より B/T を算出し、血漿 ACTH 値を求めらる。

〔Ⅱ〕血漿サンプルの採取

プラスチック注射器を用い、上腕正中静脈からヘパリン採血を行い、すみやかに血漿を分離、測定まで -20°C で保存した。

採血は午前 6 時に行った。

結 果

〔Ⅰ〕ACTH キットの基礎的検討

1) 血漿 ACTH の抽出操作の検討

抽出の際、標準曲線作製のために使用さ

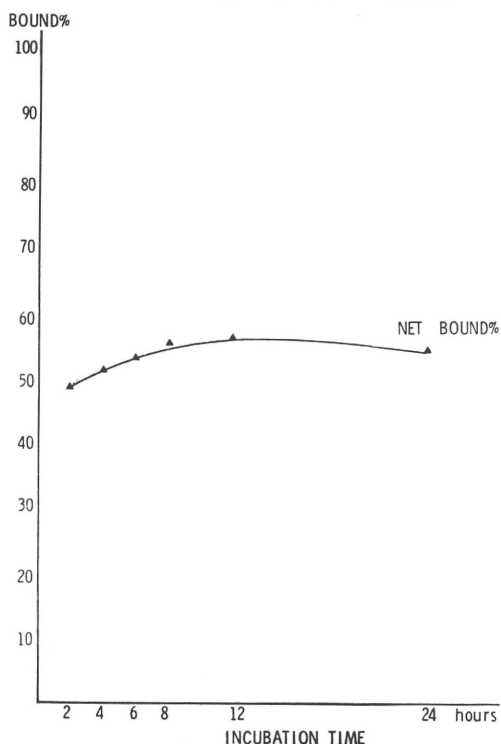


Fig. 6 The effects of incubation time of ^{125}I -ACTH and the antibody on the proportion of antibody-bound ACTH. The net bound percent increased gradually with the extension of incubation time upto six hours, and became almost constant from six to twelve hours.

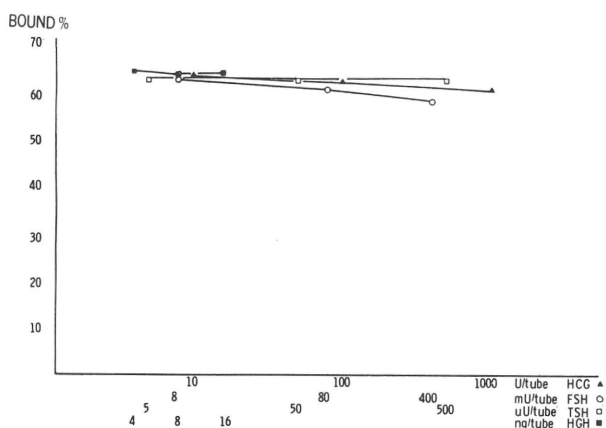


Fig. 5 The immunoreactivity of this anti-human-ACTH antibody with TSH, HGH, FSH and HCG. was examined. This antibody did not cross-react with these peptides.

れる無 ACTH 検体は、本法では、凍結乾燥された血清が使用されている。従って我々はガラス粒への吸着、ガラス粒からの溶出に要する時間の検討、抽出に用いる検体量の検討、ACTH 濃度による抽出率の検討には、プール血清を使用した。tracer としては、キット付属の ^{125}I -ACTH を用

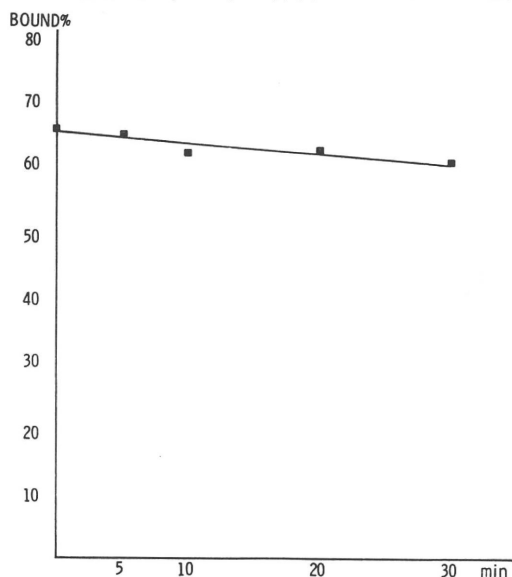


Fig. 7 The effects of incubation time with charcoal adsorbent on the separation of bound and free ACTH. The bound percent was not affected by the incubation time upto thirty minutes.

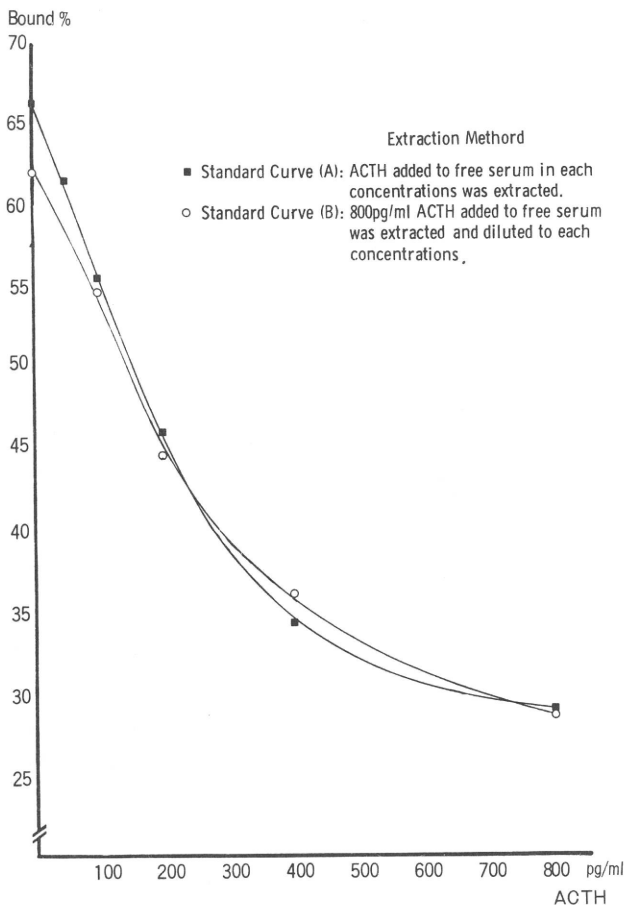


Fig. 8 Comparison of standard curve (A and B) made by different method.

いたが、蛋白分解酵素による ^{125}I -ACTH の失活を防ぐため、ACTH assay で一般的に使用される緩衝液に準じて、プール血清 1 ml に 500 KIU の Trasirol を添加した。

① ガラス粒への吸着 (Fig. 1)

Trasirol を添加した血清 3 ml 及び追跡量の ^{125}I -ACTH を抽出用チューブに入れ、rotary mixer 上で10分、20分、30分、40分と回転混和後、蒸留水及び 1N 塩酸でガラス粒を洗浄した。血清、洗浄水、塩酸そしてガラス粒は、各々放射能を計測し、添加 ^{125}I -ACTH に対する百分率よりガラス粒への吸着率を算出した。吸着率は10分で55.9%、20分で56.3%、30分で55.3%、40分で58.2%とほぼ一定値を示した。

② ガラス粒からの溶出 (Fig. 2)

前述のように、吸着、洗浄操作を行った後、50%アセトン 1 ml を各チューブに添加し、rotary mixer 上で5分、10分、20分、30分間の4段階の時間で混和後、遠心分離し、さらに 0.5 ml の50%アセトンでガラス粒を洗浄し、1.5 ml のアセトン溶出液の放射能を計測、添加 ^{125}I -ACTH に対する比放射能より抽出率を算出した。抽出率は5分で、40.8%、10分で41.3%、20分で42.1%、30分で41.8%とほぼ一定値を示した。

③ 抽出に用いる血清量の検討 (Fig. 3)

Trasirol を添加した血清 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml の各々に ^{125}I -ACTH を加え抽出操作を行い50%アセトン 1.5 ml の溶出液の放射能を計測し抽出率を算出した。抽出率は2 ml で47.1%、3 ml で41.4%、4 ml で35.1%、5 ml で37.9%と使用する血清量により異なる傾向を示した。

④ ACTH 濃度と抽出率の関係 (Fig. 4)

Trasirol を添加した血清 3 ml に、人 ACTH を添加して、最終濃度が 800 pg/ml, 400 pg/ml, 200 pg/ml, 100 pg/ml, 50 pg/ml, 0 pg/ml の6段階の ACTH 添加血清を作製し、さらに追跡量の ^{125}I -ACTH を加え抽出を行った。抽出率は、35.5%から37.6%に分布し、添加 ACTH 濃度に関係なく、ほぼ一定値を示した。

2) 抗体の特異性 (Fig. 5)

本キットの抗人 ACTH 抗体と HTSH, FSH, HGH, HCG との免疫交叉性について検討した。HTSH とは 500 $\mu\text{U}/\text{tube}$, FSH とは 400 mU/tube, HGH とは 16 ng/tube, HCG とは 1000 U/tube 以下の各濃度までは見るべき交叉反応は認められなかった。

3) incubation time の検討 (Fig. 6)

標識 ACTH, 抗 ACTH 抗体、緩衝液を2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間と2~4°C で incubation した後、各々 2°C で charcoal adsorbent を加え直ちに遠心分離し、bound form,

free form を分離した. damage を引いた net bound % は 2 時間から 8 時間まで漸増し, 8 時間より 24 時間まで 55% とほぼ一定値を示した.

4) charcoal adsorbent による分離の検討 (Fig. 7)

標識 ACTH, 抗 ACTH 抗体, 緩衝液を 6 時間 incubation した後, charcoal adsorbent を加えて氷水中 0~2°C で各々 0, 5分, 10分, 20分, 30分放置し, その後 1000×G 5 分で遠心分離し, B/T% の変動を検討した. damage を引いた net bound % は, 直後に分離した場合 56%, 30分放置後 54% とほぼ一定値を示した.

5) 抽出方法による標準曲線の差異 (Fig. 8)

下記 A), B) 2 種類の標準曲線を作製し A), B) を比較検討した.

A) キット付属の無 ACTH 血清 3 ml に, 標準 ACTH を添加し, 800pg/ml, 400pg/ml, 200pg/ml, 100pg/ml, 50pg/ml, 0 と 6 段階の濃度の ACTH 添加血清を作製し, 各々について抽出後緩衝液 0.6ml に溶解し, その 0.2ml を assay に使用し標準曲線を作製した.

B) キット付属の無 ACTH 血清 3 ml に標準 ACTH を添加し, 800pg/ml の ACTH 添加血清を作製し, これを抽出後, 緩衝液 0.6ml に溶解し, その倍数希釈により 6 段階の ACTH 濃度を調製し, その 0.2ml を使用して標準曲線を作製した.

同一 assay 内で作製した A), B) 2 つの標準曲線はほぼ一致した.

6) 回収率の検討 (Table 1)

正常者血漿 3 ml に, 各々血漿 1 ml 当り 800pg, 400pg, 200pg, 100pg, 50pg, 0 の標準 ACTH を添加し, 抽出した後 0.6ml 緩衝液に溶解し, その 0.2ml で radioimmunoassay を行い添加 ACTH の回収率を算出した. 回収率は 83.8% から 97.4% の値を示した.

7) Intraassay の再現性の検討

同一 8 検体の ACTH 値の平均値は 88.1 ± 7.9

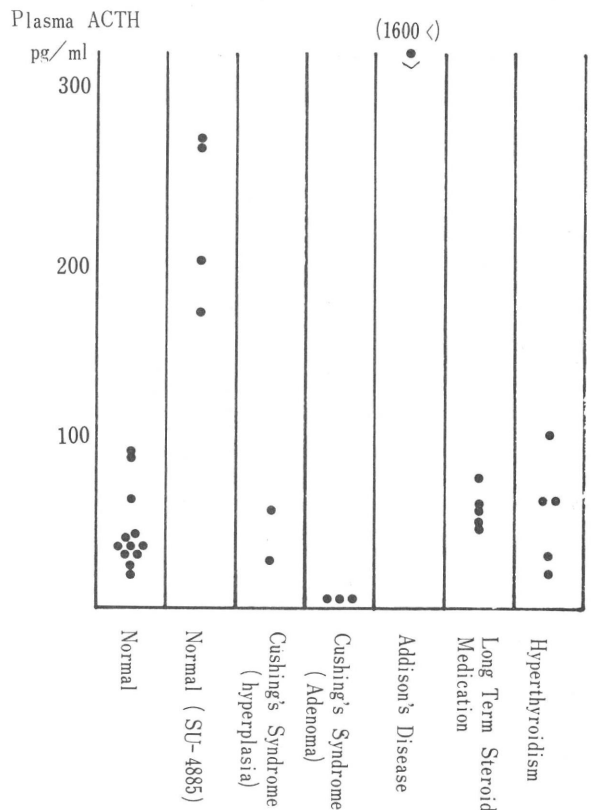


Fig. 9 Plasma ACTH levels in normal subjects and various endocrinopathy.

(S.E.) pg/ml であり, 変異係数は 0.253 であった.

以上より我々は, 測定方法として, 標準曲線の作製は B) の方法を取り, 血漿検体の測定は 3ml の血漿を抽出した後, 0.6ml 緩衝液に溶解し, その 0.2ml を assay する方法 (Table 2) を用いて, 以下の測定を行った. 測定感度は 20pg/ml であった.

〔Ⅱ〕人血漿中 ACTH 値

1) 午前 6 時の血漿 ACTH 値

正常者 12 例の午前 6 時の血漿 ACTH 値は 90pg/ml から 28pg/ml に分布した.

Cushing 症候群 (過形成) では 27pg/ml, 57pg/ml であり, Cushing 症候群 (腺腫) では 3 例共 20pg/ml 以下であった,

Addison 病の 1 例の血漿 ACTH 値は 1,600pg/ml 以上であった.

Table 1 The recovery percent of ACTH added to normal plasma at various concentration.

ACTH pg/tube	800	400	200	100	50
Recovery %	91.3	97.4	87.6	83.8	93.8

甲状腺機能亢進症では、血漿 ACTH 値は 100 pg/ml から 20pg/ml に分布した。

長期にわたり steroid 剤の投与をうけた 5 例の患者では、6 時の血漿 ACTH 値は 75pg/ml から 46pg/ml に分布した。

2) SU-4885 投与後翌日の血漿 ACTH

4 例の正常者に SU-4885 1 回 750mg ずつ 4 時間毎に 6 回投与した場合、投与翌日の血漿 ACTH 値は 270pg/ml から 170pg/ml に分布し著明な増加が認められた。

考 按

ACTH の radioimmunoassay において、抽出操作を行わず、血中 ACTH 測定が可能な抗体^{2), 7)}を得る事は極めて困難であり、多くの報告は抽出を必要としている^{1), 3) - 6), 8) - 10)}。

本法もガラス粒による抽出を行っているが、rotary mixer 上での混和時間はガラス粒への ACTH 吸着率、抽出率にほとんど影響を与えず、抽出に要する時間をさらに短縮しうるものと考えられた。しかし抽出に用いる血清の量によって抽出率が異なり、本法は個々に抽出率を求めない方式を採用している事から、抽出には一定量の検体を用いる必要があると考えられた。

標準曲線は、標準 ACTH の各濃度を各々抽出したものを用いて作製する方法 [A] と、高濃度 1 点を抽出し、その倍数希釈により得たものを用いて作製する方法 [B] の 2 つの方法を検討したが、2 つの標準曲線はほぼ一致した。個々に抽出した場合の各濃度の抽出率は ACTH 濃度 800pg/ml の抽出率とほぼ一致すると考えられ、抗原抗体反応への阻害物質が抽出される可能性は少ないと考えられた。

上の事から方法 [B] の標準曲線は、本測定法の標準曲線として充分使用し得るものであり、方

Table 2 Assay procedure.

Extraction	
Standard or Sample	3 ml
+	
Glass Absorbent	
↓	
Mix on Rotary Mixer	30min
↓	
Centrifugation	
↓	
Wash with H ₂ O	2 ml
↓	
Wash with HCl	2 ml
↓	
Desorb with 50% Acetone	1 ml
on Rotary Mixer	20min
↓	
Desorb with 50% Acetone	0.5ml
↓	
Evaporate	
Radioimmunoassay	
Standard or Sample	0.2ml
+	
Antibody	0.1ml
↓	
Incubation	16-20 hours
+	
¹²⁵ I-ACTH	0.1ml
↓	
Incubation	6-8 hours
+	
Charcoal Adsorbent	0.1ml
↓	
B/T	

法 [A] に比し、操作がより簡便である点で優れていると考えられた。

本法により測定した血漿 ACTH 値は、正常者では、6 時の値は 23pg/ml から 90pg/ml に分布した。正常者の血漿 ACTH 値として、Berson 等は 22pg/ml (平均)²⁾、Landon 等は 12pg/ml から 55pg/ml⁴⁾、Besser 等は 15pg/ml から 70pg/ml⁶⁾、Donald 等は 41.6pg/ml (平均)⁹⁾ の値を示している。我々の 12 例も従来の報告に近い値を示した。

Cushing 症候群 (過形成) の血漿 ACTH 値は、我々の 2 例では正常範囲内の値が示された。しかし従来の報告でも Cushing 症候群 (過形成) の血漿 ACTH は正常範囲内の値を示した例も多く^{5), 10), 12)} その血中 ACTH 値は必ずしも高値を示す必要はないと考える。

正常者に SU-4885 を投与した場合の血漿 AC

TH 値は投与翌日午前 6 時の値で 170pg/ml から 270pg/ml に分布した。SU-4885 投与時の血漿 ACTH に関する従来の報告には Berson 等²⁾, Jubiz 等¹¹⁾ そして Donald 等⁹⁾ の報告がある。我々の示した測定値も従来の報告に近似し, SU-4885 投与により血中 ACTH は著明に増加した。

以上のように本法を用いて測定した血中 ACTH 値は, 正常者では SU-4885 投与により著明な増加を認め, また Addison 病においては高値を示し, Cushing 症候群(腺腫)では全例測定感度以下であり, 各々下垂体副腎系機能を良く反映すると思われる。

ま と め

ACTH イムノアッセイキットを基礎的, 臨床的に検討した。

1) 本法の抽出方法は簡便な方法であるが, 抽出血漿量は一定量とする必要がある。

2) radioimmunoassay で標準曲線の作製は, 高濃度 1 点を抽出後, 緩衝液で倍数希釈する方法が適当である。

3) 本法により測定した血漿 ACTH 値は, 各各対象の下垂体副腎系機能を良く反映すると思われる。

文 献

1) Yalow R S, Gluck S M, Roth J & Berson S A :

- Radioimmunoassay of human plasma ACTH. *J Clin Endocrinol Metab* **24** : 1219, 1964
- 2) Berson S A & Yalow R S : Radioimmunoassay of ACTH in plasma. *J Clin Invest* **47** : 2725, 1968
- 3) Demura H, West C S, Nugent C D, Nakagawa K & Tyler F H : A sensitive radioimmunoassay for plasma ACTH levels. *J Clin Endocrinol Metab* **26** : 1297, 1966
- 4) Landon J & Greenwood F C : Homologous radioimmunoassay for plasma ACTH levels in man. *The Lancet* **10** : 273, 1968
- 5) Besser G M & Landon J : Plasma levels of immunoreactive corticotrophin in patients of Cushing's syndrome. *Brit Med J* **4** : 552, 1968
- 6) Besser G M, Curren R D, Irvine W J, Rafortiffe J G & Landon, J : Immunoreactive corticotrophin levels in adrenocortical insufficiency. *Brit Med J* **13** : 374, 1971
- 7) Rayyis S S & Bethune J E : Radioimmunoassayable ACTH in dexamethasone nonsuppressible Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **29** : 1231, 1969
- 8) Donald R A : A rapid method for extracting corticotrophin from plasma. *J Endocrinol* **39** : 451, 1967
- 9) Donald R A, Espiner E A & Beaven D W : The effect of metyrapone on corticotrophin secretion. *J Endocrinol* **52** : 517, 1972
- 10) Groughe R J, Tops C F & De Jong F H : Radioimmunoassay of plasma adrenocorticotrophin in Cushing's syndrome. *J Endocrinol* **59** : 439, 1973
- 11) Jubiz W, Matsukuru S, Meikle A E, Harada G, West C D & Tyler F H : Plasma metyrapone, ACTH, cortisol, and deoxycortisol levels. *Arch Intern Med* **125** : 468, 1970