

《使用経験》

⁷⁵Se-cortisol を用いた Competitive protein binding Analysis kit による血中 cortisol 測定法の検討

細 木 秀 美* 次 田 治 子*
森 正 彦* 高 原 二 郎*

はじめに

Cortisol は生命の維持に欠くべからざる重要な hormone の 1 つであり、その測定 of 臨床的意義は大きい。従来血中 cortisol の測定には、煩雑かつ精度、感度共にあまりすぐれない蛍光法^{1), 2)} による測定が行われてきたが、1967年、corticosteriod binding globulin (CBG) を利用した Competitive protein binding analysis が Murphy³⁾ によって報告されて以来、血中 cortisol は簡単、迅速にしかも 1 度に多数の検体を測定することができるようになり、また感度、精度でも一層すぐれた測定法として普及した。

しかし、Murphy³⁾ の原法、および、それ以後の研究者の報告はいずれも ³H でラベルした steroid を利用したものであったため、高価な液体シンチレーションカウンタを必要とし、広く一般に行われるには至らなかった、

今回、科研化学株式会社により発表された RCC 製 Cortipac はウェル型のシンチレーションカウンタで測定できる ⁷⁵Se-cortisol を用いた competitive protein binding analysis であり、我々は

同社の御好意により本測定 kit を使用する機会を得たので、その基礎的検討、ならびに他の測定法との比較について報告する。

実験材料および方法

I. kit の組成

1) standard cortisol : 2.5, 7.4, 19, 45 $\mu\text{g}/\text{dl}$ の cortisol 標準血清各 1 本 (凍結乾燥品)、使用前に各々、0.5ml の蒸留水を加えて溶解して用いる。

2) test vial : 25本

この test vial 中に CBG, ⁷⁵Se-cortisol および bound と free とを分離するための吸着剤が入っている。

3) 熱変性用試験管 : 25本 (kit 付属の試験管架あり。)

II. 器具

1) マイクロピペット : エクセルマイクロピペット 250-Ⅲ 及び 50-Ⅲ

2) ローテーター

3) 恒温槽

4) thermo mixer

5) ウェル型シンチレーションカウンタ

6) count 測定用プラスチック試験管

III. 方法

4°C に保存してあった kit の内容、および凍結保存してあった被験血漿を室温に戻す。ついで、standard cortisol に蒸留水 0.5ml を加え、約10分

* 岡山大学医学部第 3 内科学教室
(主任 : 大藤真教授)

受付 : 50年 5月16日

採用 : 50年 9月11日

別刷請求先 : 岡山市鹿田町 2-5-1 (〒700)

岡山大学医学部第 3 内科学教室

細 木 秀 美

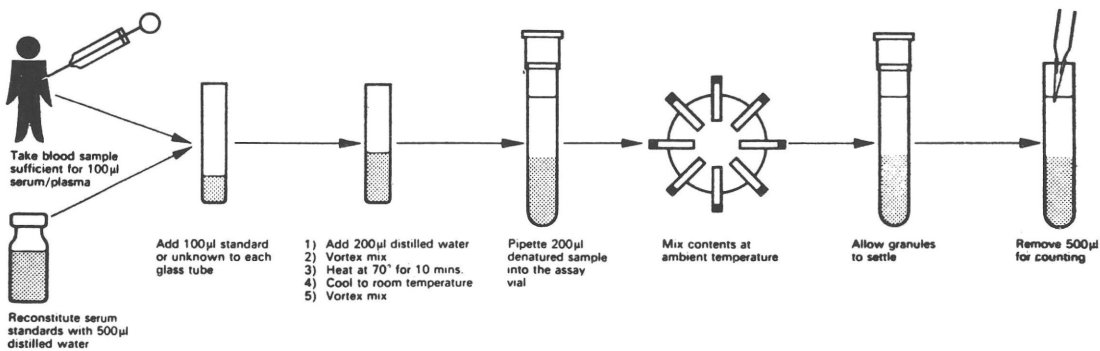


Fig. 1 The procedure of the method.

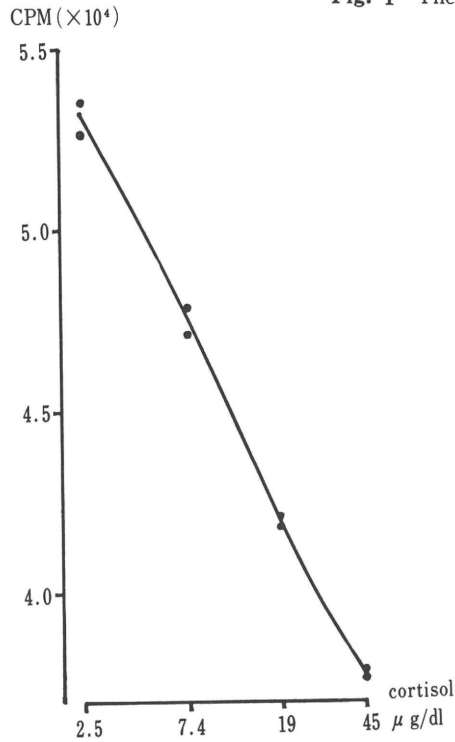


Fig. 2 Standard curve of cortisol.

間放置し、キャップをしてキャップに付着している粉末も十分に溶かす。

次に、この standard cortisol (duplicate), および、被験血漿の各々 0.1ml を熱変性用試験管に入れ、蒸留水 0.2ml を各試験管に加えたのち、thermo mixer で約10秒間振盪する。すべての試験管にパラフィルムで栓をして、70°C 恒温槽内で10分間加熱する。

Table 1 Accuracy

Sample	cortisol added µg/dl	0	3.7	9.5	22.5
cortisol free plasma 0.1ml	mean	<2.5*	4.7	10.9	21.1
	SD		0.4	0.8	3.0
	SE		0.2	0.4	1.3
	coefficient of variation %		9.1	7.3	14.2
	No.	5	5	5	5

* すべて測定感度 (2.5µg/dl) 以下であった。

Table 2 Within assay precision

Sample No.	Plasma Cortisol µg/dl
1	11.5
2	9.3
3	12.0
4	9.0
5	8.6
6	8.6
7	8.4
8	9.1
9	9.8
Mean	9.6
SD	1.3
Coefficient of variation %	13.0

加熱後、試験管架を恒温槽よりとり出し、室温にまで冷却し、その熱変性溶液 0.2ml を test vial

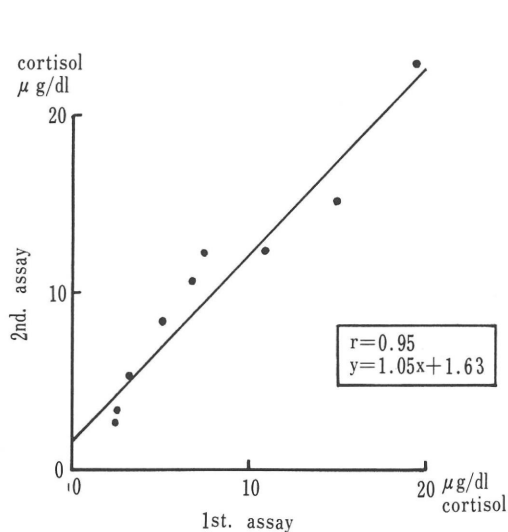


Fig. 3 Between assay precision

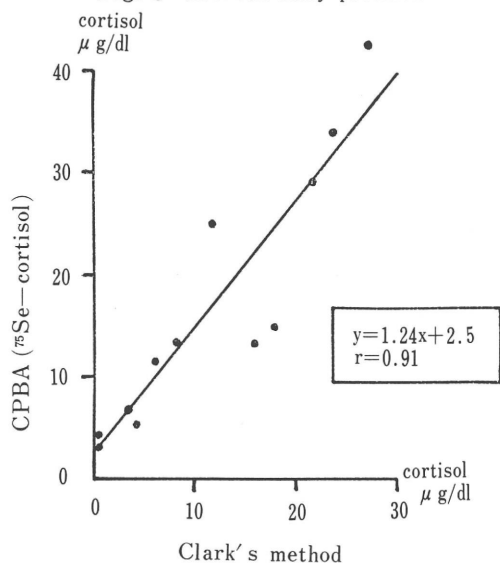


Fig. 5 Relationship between plasma cortisol levels measured by competitive protein binding analysis (using ^{75}Se -cortisol) and Clark's method.

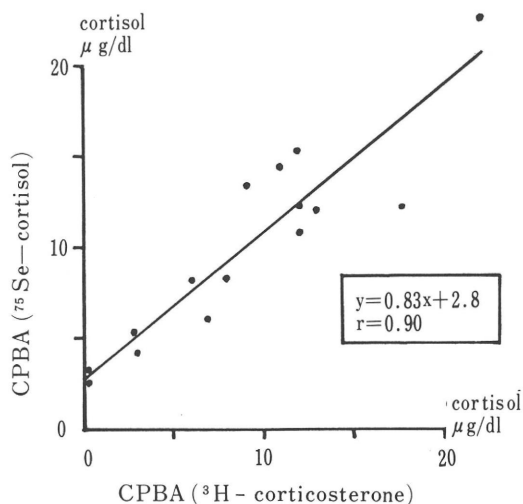


Fig. 4 Relationship between plasma cortisol levels measured by competitive protein binding analysis (using ^{75}Se -cortisol) and competitive protein binding analysis (using ^3H -corticosterone).

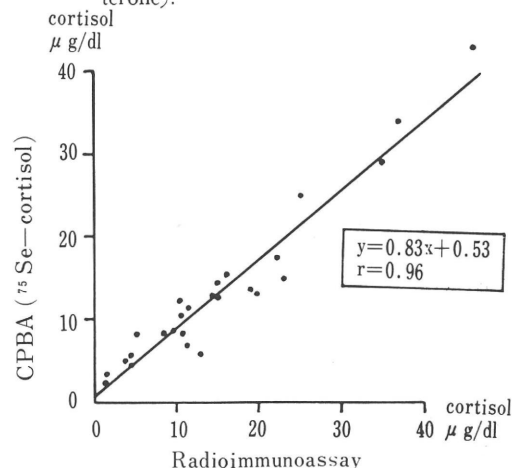


Fig. 6 Relationship between plasma cortisol levels measured by competitive protein binding analysis (using ^{75}Se -cortisol) and radioimmunoassay (using ^{125}I -cortisol).

中に入れ、室温でローテーターを用いて30分間以上 incubate する。incubate 終了後、ローテーターよりはずし、約2分間静置させ、顆粒が完全に沈んでから上清 0.5ml を count 用プラスチック試験管にとり、ウェル型シンチレーションカウンターで c.p.m. を測定した (Fig. 1)。

結果

本 kit の指示通りに操作して描いた standard curve の 1 例を示すと Fig. 2 のようになり、cortisol 2.5~45 μg/dl まで測定可能な急峻な curve を得ることができた。

本測定の accuracy は cortisol free plasma に標

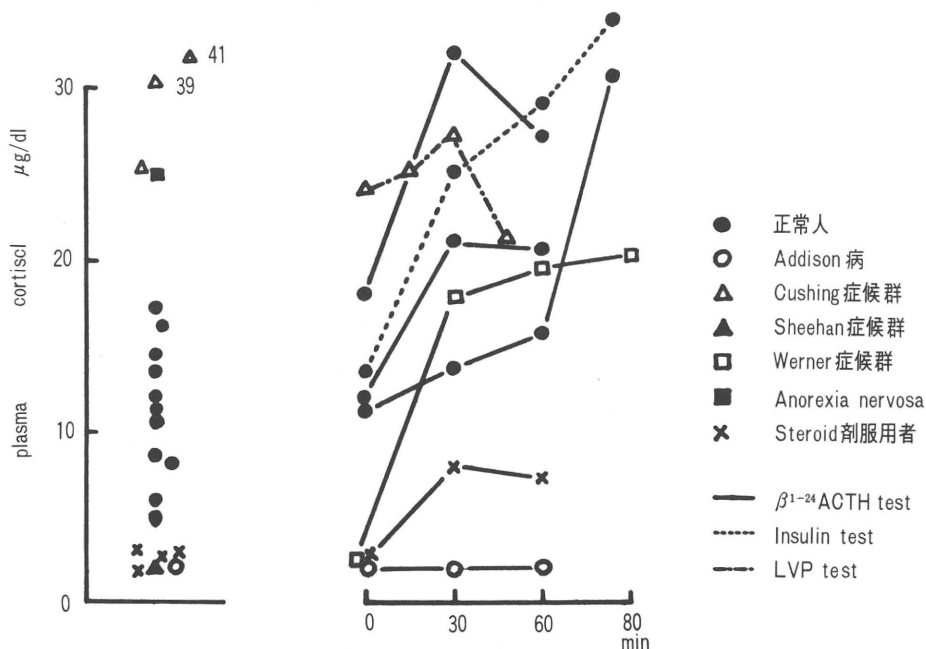


Fig. 7 Plasma cortisol levels in patients with various diseases and plasma cortisol response to β^{1-24} ACTH (0.25mg), regularinsulin (0.1U/kg) or LVP (4 U).

準 cortisol 3.7, 9.5, 22.5 μ g/dlを加えた時の回収率で見た所, cortisol free plasma 即ち plasma blank は常に 2.5 μ g/dl 以下であった。

また標準 cortisol を加えた時の変異係数は 3.5 μ g/dl では 9.1%, 9.5 μ g/dl では 7.3%, 22.5 μ g/dl では 14.2% と満足すべき accuracy を示した (Table 1). within assay precision をみるために, cortisol 10 μ g/dl 前後を含む血清を 9 検体に分けて同時に測定したところ, 平均 9.6 μ g/dl, 変異係数 13% と良好な値を示した (Table 2).

between assay precision をみるために, 種々の濃度の cortisol を含む血清を 2 度測定し, そのバラツキをみたところ, Fig. 3 のように, 回帰直線 $y=1.05x+1.63$, $r=0.95$ と満足すべき結果が得られた。

次に, 我々の教室で以前より行ってきた Murphy³⁾ の変法による competitive protein binding analysis (CPBA)⁴⁾ と本測定 kit によって測定した血漿 cortisol 値との間の相関をみたところ, 回帰直線 $y=0.83x+2.8$, $r=0.9$ となり, 本 kit で測定した cortisol 値が cortisol 低値部分で幾分高

値となる傾向がみられた。cortisol の高濃度部分では従来から行ってきた CPBA がやや高値をとる傾向があった (Fig. 4)。

また蛍光法として数年前より行ってきた Clark の方法⁵⁾ に準じた蛍光法⁶⁾ による血漿 cortisol 値との相関は $y=1.24x+2.5$, $r=0.91$ となり, 本法が蛍光法に比してやや高値となる傾向がみられた (Fig. 5)。

最近開発された ¹²⁵I-cortisol を用いた radioimmunoassay^{7), 8)} と本法との相関をみたところ, $y=0.83x+0.53$, $r=0.96$ となり, radioimmunoassay がやや高値となる傾向がみられた (Fig. 6)。

血漿 cortisol 測定法による血漿 cortisol の早朝空腹時の正常値は Rudd の方法²⁾ では 9.4 ± 2.5 μ g/dl (SD, N=19), Clark の方法⁶⁾ では 8.6 ± 2 μ g/dl (SD, N=15), Murphy に準じた CPBA⁴⁾ では 10.2 ± 3.1 μ g/dl (SD, N=22), ¹²⁵I-cortisol を用いた radioimmunoassay⁸⁾ では 10.5 ± 3.3 μ g/dl (SD, N=26), ⁷⁵Se-cortisol を用いる本法では 11.0 ± 4.1 μ g/dl (SD, N=11) であった。

本法を用いて測定した, 各種内分泌疾患およ

び、種々の負荷試験時の血漿 cortisol 値は、各種の疾患において臨床上考えられる妥当な値、および、反応を示した (Fig. 7)。

考 按

1967年 Murphy³⁾ によって corticosteroid binding globulin に対する hot の steroid と cold の steroid の競合反応を利用した competitive protein binding analysis (CPBA) が開発されて以来、血漿 cortisol の測定法は感度、特異性、測定操作、等に飛躍的な進歩が見られた。

しかし、本法にも測定操作時の温度や時間の少しのずれによって測定値にかなりのバラツキを生じ、また、ある程度の熟練を要する点、やや問題があり、1972年 Ruderら⁹⁾ によって報告された抗 cortisol 抗血清を用いた radioimmunoassay の出現により、CPBA は、その測定操作の測定値に与える影響の大きさ、また、測定感度で数段劣るため、将来は radioimmunoassay にとって代わられるべき運命にある様に考えられていた。

しかし、⁷⁵Se-cortisol を用いた本 CPBA-kit は CPBA に必ず付随して来る温度と時間の影響を最小限に押さえ、初心者でも比較的簡単に操作を行い得、また accuracy も良好で within assay および between assay での variation も共に満足すべきものであった。

試料より cortisol の抽出には本法では 70°C、10分間の熱処理を用いているが、Doughaday¹⁰⁾ は 60°C、10分間の熱処理で CBG の binding activity をほぼ完全に失なわせることができると報告している。このため本 kit の説明書通り 70°C 10分間で充分と考えられる。

また CBG への cortisol 以外の steroid hormone の binding は Murphy³⁾ によれば cortisol の結合率を100%とすると corticosterone 61%, 11-deoxycortisol 89%, progesterone 20% binding すると報告している。また Nugent ら¹¹⁾ は 11-deoxycortisol 98%, corticosterone 91%, DOC 58%, progesterone 32%, cortisone 12%, binding すると報告している。

故に本法で測定した血漿 cortisol 値は正確には cortisol のみとはいえず、むしろ血漿 11-OHCS というべきである、しかし、metopirone 投与時または steroid hormone 合成過程での酵素異常等を除いた大部分の人血漿を測定した時には本法による測定値を血漿 cortisol 値として差しつかえないものと考ええる。

本 kit の標準 cortisol には 0 μg/dl が付いておらず、最小濃度が 2.5 μg/dl であるため、dexamethasone 抑制試験時、また Addison 病、Sheehan 症候群では常に血漿 cortisol は 2.5 μg/dl 以下となり、測定感度以下であった、このため plasma blank は 2.5 μg/dl 以下と表示することになるが、これは Clark の方法、および従来からの CPBA では plasma blank は 0 に近く、また radioimmunoassay でも 1.2 μg/dl となり本 kit のそれがより高値をとることより、本 kit の cortisol standard にも 0 また 1.25 μg/dl を加えることにより一層低値を正確に把握することができると考える。

本法の利点は、⁷⁵Se-cortisol を用いている点、従来の様に高価な液体 scintillation counter を必要とせず、一般病院でも使用可能な well 型 *r-counter* を使用し得る点、および、試料中の CBG の変性時のみ温度に注意すれば、あとの操作に温度は何ら干渉せず、室温で充分であり、しかも、incubate 時間にさほど影響をうけない点である。しかし本法の B・F 分離に用いられている Sephadex 顆粒はややすると充分に管底に沈まず、上層 0.5ml を採取時に顆粒が混じる可能性が大きく、再考を要する。

また 1 assay 中に試験管を 2 回とりかえねばならない点も今後に残された簡易化への問題と思われる。

³H-corticosterone を用いる従来の CPBA と本法の血漿 cortisol 値の相関もほぼ満足すべきものであったが、低値では本 kit の値が高値となる傾向にあった。

Clark の方法と本法との血漿 cortisol 値の比較では Clark の方法が NaIO₄ で cortisol を酸化することによって特異的に cortisol のみを測定する

方法であるためか、全体に本 kit による血漿 cortisol 値が高値をとる傾向がみられた。

radioimmunoassay と本 kit との血漿 cortisol 値間には良好な関係がみられた。

以上の結果より、従来の CPBA, 蛍光法, および radioimmunoassay による測定値と本法のそれとは低値を除いて、ほぼ良好な関係が認められた。また実際に各種内分泌疾患 および, β^{1-24} ACTH 試験, insulin 負荷試験, LVP 試験に対する血漿 cortisol の反応を調べたところ, ほぼ臨床的に妥当な値を示したことよりも, 本 kit による血漿 cortisol 値は十分に臨床応用可能と考える。

まとめ

^{75}Se -cortisol を用いた CPBA kit につき基礎的検討を行い, また従来の CPBA, 蛍光法, および, radioimmunoassay で測定した血漿 cortisol 値と比較した結果, 充分臨床応用し得る kit と考えられた。

大藤真教授の御校閲を感謝します。

また kit を提供下さいました科研化学株式会社に感謝します。

文 献

- 1) De-Moore P, Steeno D, Raskin M and Hendrikx A : Acta Endocr 33 : 297, 1960
- 2) Rudd B P et al : J Endocr 27 : 317, 1963
- 3) Murphy B E P : J Clin Endocr Metab 27 : 973, 1967
- 4) 細木秀美 : 臨床病理 20 : 391, 1972
- 5) Clark B R and Rubin R T : Anal Biochem 29 : 31, 1969
- 6) 高原二郎, 青山克子 : ホルモンと臨床 19 : 781, 1971
- 7) 吉見輝也, 立花清司 : 臨床化学 3 : 53, 1974
- 8) 細木秀美, 森正彦, 高原二郎, 大藤真 : ホルモンと臨床 23 : 721, 1975
- 9) Ruder H J, Guy R L and Lipsett M B : J Clin Endocr, Metab 35 : 219, 1972
- 10) Doughaday W H : The Adrenal Cortex A B Eisenstein ed. Little, Brown and Company, Boston, 1967, p. 385.
- 11) Nugent C A and Mayes, D : J Clin Endocr and Metab 26 : 1116, 1966