

《原 著》

¹²⁵I-Cortisol, Polyethylene Glycol を用いた血漿 Cortisol Radioimmunoassay に関する研究

西 啓 子* 荻 原 俊 男** 宮 井 潔*

熊 原 雄 一** 石 橋 嘉 一 郎***

I. はじめに

1969年, Abraham¹⁾により報告されたestradiolのradioimmunoassay (RIA) は、その後、種々のステロイドホルモンの測定に応用され、感度、及び特異性の点ですぐれている為、従来の化学的な方法にとって代りつつある。

cortisolについても、螢光法やcompetitive protein binding analysis (CPBA) 法に加え、1972年 Ruder らにより、RIA が報告された²⁾。cortisol測定は、臨上重要な検査であり、その需要も多く、一般検査として、多数検体処理が必要であるが、³H-標識ステロイドによる、RIA は操作が煩雑であり普及し難かった。その点を解決すべく、¹²⁵I-標識ステロイドが最近開発された³⁾。さらに Bound-Free (B-F) 分離法として、簡便な polyethylene glycol (PEG) 法が Schiller らにより^{4), 5)}ステロイドホルモンに応用されている。そこで我々は、cortisol-21-hemisuccinate BSA conjugate を抗原として、自家製抗体を作製し、tracer に¹²⁵I-標識 cortisol を、B-F 分離に PEG を用いた、

cortisol の RIA の基礎的検討を行った。さらに本法に基づく測定キットを作製して臨床応用を行ない、種々な状態での血漿 cortisol を測定した。

II. 材 料

1) 試 薬

ethyl alcohol, methyl alcohol は吸収スペクトル分析用(片山化学), dichloromethane は螢光分析用(片山化学)。cortisol 及び特異性検討に用いた各種ステロイド(Sigma 社)は純化せずに使用した。disodium ethylenediaminetetraacetate dihydrate(同仁薬化学研究所), L-glutamic acid(和光純薬)は特級, human γ -globulin は人免疫グロブリン(ミドリ十字 γ -globulin 含量 150 mg/ml), polyethylene glycol 6,000(平均分子量 7,500, 和光純薬)は一級, ³H-cortisol(New England Nuclear 社)は、cortisol-1,2-³H 45 ci/m mol を純化せずに使用した。Bray's Reagent(片山化学)を液体シンチレーションカウンター用に用いた。

2) 器具及び装置

ガラス器具は硫酸に一夜浸した後、水道水にて洗浄、さらに脱イオン水にて洗浄し、熱風乾燥器にて乾燥したものを使用した。

¹²⁵I-cortisol 精製用カラムは 0.4M pH7.5 リン酸緩衝液で平衡にした Bio Gel P₁₀ カラム(1×20)を用い、溶出液として 0.4M pH 7.4 リン酸緩衝液を使用した。

3) cortisol-tyrosine methyl ester の作成

Midgley ら³⁾の方法に準じて行った。即ち cor-

* 大阪大学医学部中央臨床検査部

** 同 第4内科

*** 栄研イムノケミカル研究所

受付: 51年3月3日

採用: 51年5月20日

別刷請求先: 大阪市福島区福島1丁目1番50号

(〒553)

大阪大学医学部附属病院

中央臨床検査部

宮 井 潔

tisol-21-hemisuccinate 10 mg を tri-n-butylamine 5 μ l, dioxane 200 μ l に溶解, 10°C に冷却して isobutyl chloroformate 3 μ l を加えて, 10°C 20 分間放置, tyrosine methyl ester 0.28% (水: dioxane = 1 : 1 v/v) 0.9 μ l を加えた後, 4°C 2 時間 incubate を行った。これより 0.5 ml をとり, 蒸留水で 3 回水洗した後, これを蒸発乾固させた。

4) cortisol-21-hemisuccinate を用いた抗 cortisol 抗体の作成法

Cortisol-21-hemisuccinate を Erlanger ら⁶⁾の方法により牛血清アルブミン (Cohn Fraction V) (BSA) と結合させた。吸光度の変化により推定した cortisol と BSA のモル比は約 20:1 であった。その 1 mg を生理食塩水 1 ml に溶解し, Freund's complete adjuvant 1 ml と混和, 家兎 1 羽につき emulsion 1 ml を背部数ヶ所に注射し, 3 週間ごとに 2 回追加免疫し, 最終免疫後 9 日目に採血, 血清を 1 ml ずつ小試験管に分注し -20°C で保存した。

5) 125 I-cortisol の作成法

Hunter-Greenwood の方法⁷⁾に準じて行った。即ち cortisol-21-hemisuccinate tyrosine methyl ester (1 mg/ml methanol solution を 0.4M, pH 7.5 のリン酸緩衝液で 10 倍希釈したもの) 20 μ l, Na 125 I 1.8 mCi, chloramine T (12.5 mg/ml) 15 μ l の順に加えて 60 秒後, sodium metabisulfite (12.5 mg/ml) 35 μ l を加えて反応を止めた。未反応の

125 I を除く為, 反応液に 50 μ l の 10% 人血清アルブミンを加えた後, Bio Gel P₁₀ カラムを用い, 0.4M pH 7.5 リン酸緩衝液で分画した所, 2 峰を得たので, 最初の峰を RIA に用いた。

6) 標準 cortisol 溶液の調製法

cortisol 100 μ g/ml の ethyl alcohol 溶液を dexamethasone で内因性 cortisol を抑制した人血漿 (又は 10% 人血清アルブミン溶液で代用可能) で希釈し, 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 μ g/dl の標準 cortisol 溶液を調製した。

7) 抗 cortisol 体溶液の調製法

200 mg の EDTA 2Na, 600 mg の human γ -globulin を diluent buffer (0.25% BSA in 0.05M pH 8.0 リン酸緩衝液) 100 ml に溶解した溶液で抗血清を 1:4,000 に希釈した。

8) cortisol binding globulin (CBG) 不活化用 グルタミン酸緩衝液

0.6% グルタミン酸溶液に 0.002% になる様に KCN を加えて pH 3.3 に調製した。

III. 対象

正常対照者として健常人 101 名 (男子 50 名, 女子 51 名, 年齢 20 歳代~60 歳代)。

臨床例は阪大病院における外来及び入院患者を用いた。患者においては血清又はヘパリン採血による血漿を用いた。本法において測定した cortisol 値は血漿及び血清で差のないことをあらかじめ確

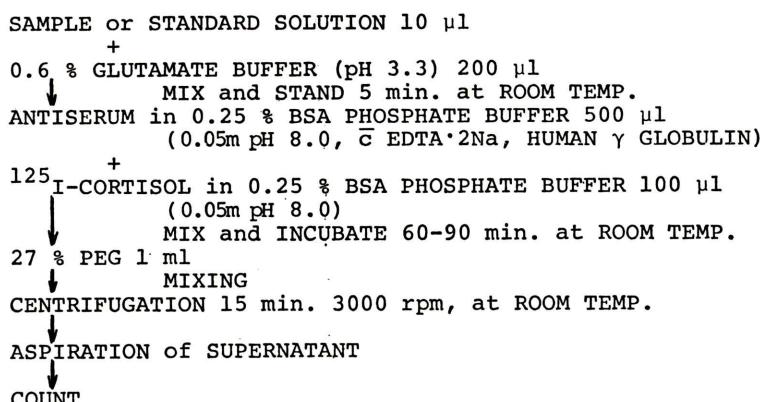


Fig. 1 Assay procedure of plasma cortisol radioimmunoassay.

認した。採血は 8:30~11:30 の間に行い、血漿及び血清は分離後、測定時まで -20°C で保存した。

IV. 方 法

1) Radioimmunoassay の手技

血漿又は血清検体及び標準 cortisol 溶液 10 μ l に 0.6% グルタミン酸緩衝液 200 μ l を加えて振盪混和し、室温に 5 分~10 分間放置後、抗 cortisol 抗体溶液 500 μ l, ¹²⁵I-cortisol 100 μ l を加えて振盪混和し、室温で 60 分~90 分 incubate 後、27% PEG 溶液 1 ml を加えて、均一に白濁させた後、3,000 回転、15 分間、遠心を行い上清を吸引することにより、B-F 分離し、沈殿の放射能を測定した。本測定法の概略を Fig. 1 に示した。なお本法はコルチゾール“栄研”に準じたもので、臨床例測定の大部分は本キットを用いて行った。

2) CPBA 法

Murphy の方法⁸⁾に準じ、妊娠血漿を結合蛋白、³H-cortisol を標識化合物として用い、血漿検体 50 μ l より、dichloromethane 1.5 ml 2 回抽出後、蒸発乾固したものを測定した。

3) コルチゾールキット“第一”による測定 キット使用説明書に従った。

V. 結 果

1. RIA に関する基礎的検討

1) incubation time

incubation time を検討するため、incubation mixture を室温に 30, 60, 90, 120, 180 分間放置後、B-F 分離を行い、B% の変化をみたところ、60 分以後ほぼ plateau に達した。従って以後の測定を 90 分とした。

2) PEG 濃度及び γ -globulin 濃度

B-F 分離における最適 PEG 濃度を検討するため、cortisol 濃度の異なる検体を用い、 γ -globulin 濃度を 3 mg/tube として、PEG 濃度を段階的に増加し、最終濃度が 5%~20% となる様に加えた場合の B% の変化は Fig. 2 に示す如くである。3 検体において 10% 以上で plateau に達したため、

以後最終濃度として 15% になる様に調製したものを用いた。

次に PEG を 15% と一定にしておき、incubation mixture 中の γ -globulin 濃度について検討したところ、Fig. 3 に示す如く、0~4.0 mg/tube の各濃度における B% は 1.5 mg/tube 以上で、plateau に達した(●印)。又抗体を添加しない場合の非特異的結合 % (▲印) は 0.5 mg/tube 以上で不変化

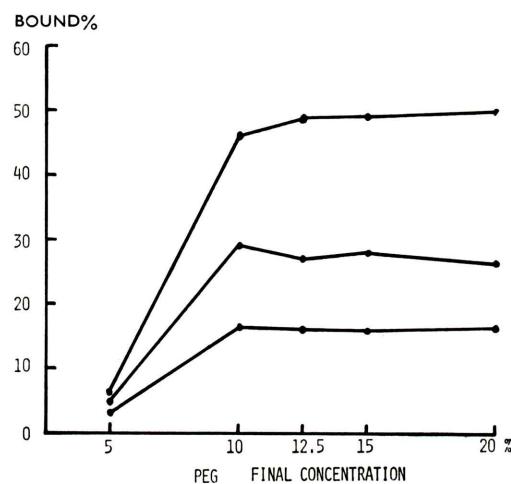


Fig. 2 Effect of PEG concentration to B-F separation.

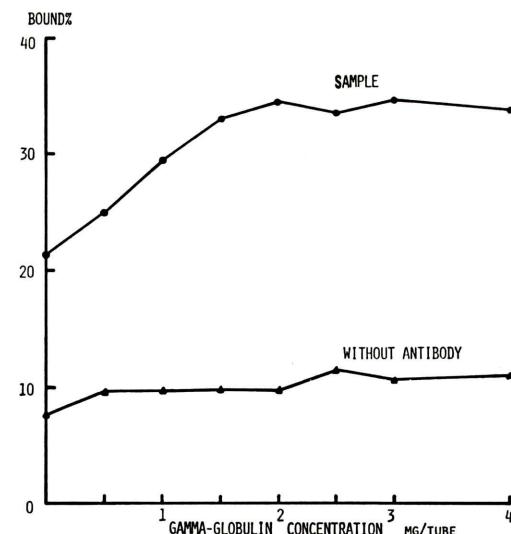


Fig. 3 Effect of γ -globulin concentration in incubation mixture to B-F separation.

であった。従って incubation mixture に加える γ -globulin 濃度を 3 mg/tube となる様に調製した。最終 PEG 濃度を 15% とし、 γ -globulin 濃度を 3.0 mg/tube として測定した場合の値は、二抗体法によって得られた値と良く一致した。

3) CBG 不活性に関する検討

CBG 不活性の操作を省略して検体の direct assay を行ったところ、測定値は異常に低く、後述の不活性を行って得た値のほぼ 1/2 であった。従って CBG の影響を無視できなかった。そこで Foster ら⁹⁾により用いられた、0.6% グルタミン酸緩衝液 (0.002% KCN を含む、pH 3.3) で検体を「方法」の項で述べた如く処理をした。この際ににおける処理時間 (即ち室温放置時間) を 5 分より 40 分まで検討したところ、Bo の値として 5 分以降、一定した値が得られた為、室温処理時間を 5~10 分間とした。さらに Fosters ら⁹⁾により報告されたグルタミン酸添加後煮沸する方法と、本法の如く煮沸を省略した場合を比較したところ Fig. 4 に示す如く、良好な相関を示し、個々の値は良く一致した。

4) 抗体の特異性

本抗体の特異性を検討したところ、Abraham¹⁾

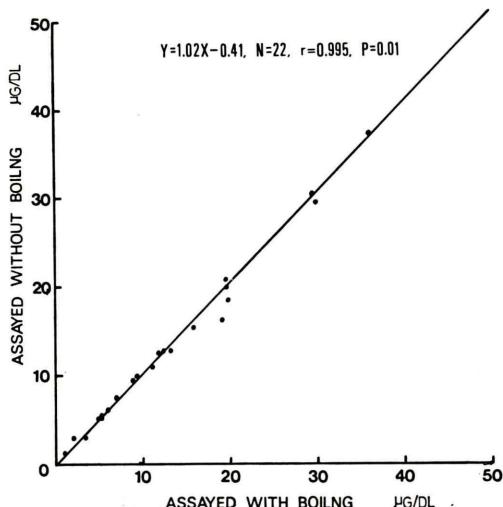


Fig. 4 Comparison of two assay methods with and without boiling step.

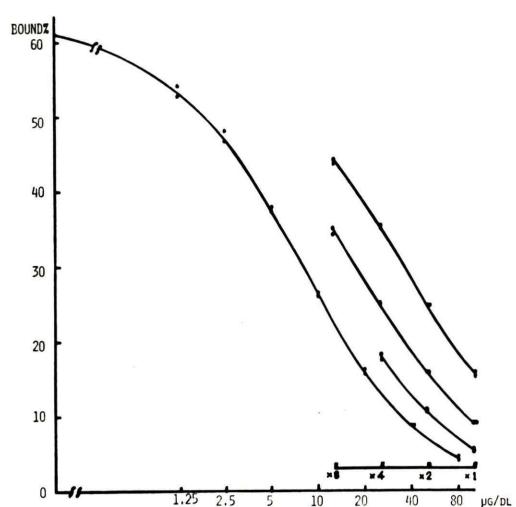


Fig. 5 Typical standard curve of cortisol RIA with dilution curve of three different samples.

の方法により算出した交叉性は Corticosterone 18%, Cortisone 13.3% を示した他は、11-Deoxy-corticosterone, 17 α -OH-progesterone, E₁, E₂, E₃, DHEA, Testosterone, Dexamethasone については 0.9% 以下であった。

5) 標準曲線ならびに希釈曲線

本抗体は 6,400 倍希釈 (最終濃度) で良好な標準曲線が得られ、最小測定濃度は 0.1 ng/tube で、血漿又は血清検体 10 μ l を用いた場合血中濃度として 1~80 μ g/dl の範囲で測定可能であった。検体の希釈曲線は Fig. 5 に示す如く、標準曲線とよく平行した。

2. RIA による血漿及び血清 cortisol 測定

1) accuracy

既知量の cortisol を血漿に添加し測定した場合の accuracy は Fig. 6 に示す如く良好な直線性を示し、2 検体での平均回収率は各々 99.5%, 97.2% であった。

本法による測定内変動係数 (intra-assay coefficient of variance) は 6.0% (mean=12.1 μ g/dl, n=11), 3.8% (mean=36.6 μ g/dl, n=10), 測定間変動係数 (interassay coefficient of variance) は 7.5% (mean=10.2 μ g/dl, n=15), 6.7% (mean=41.8 μ g/dl, n=14) であった。

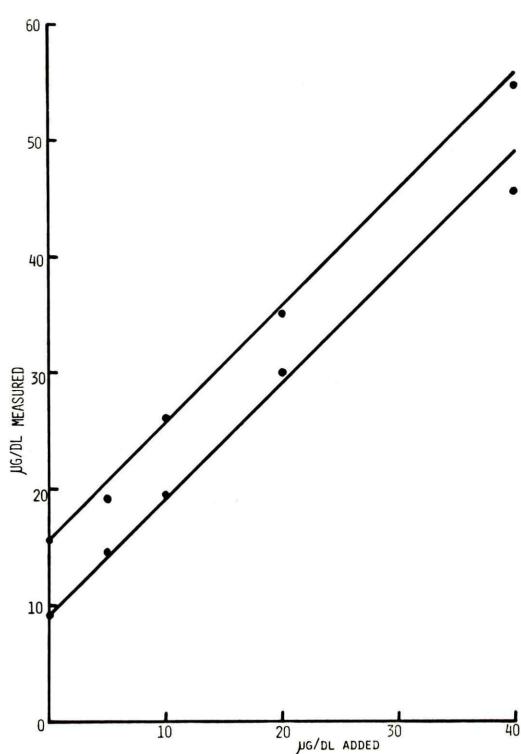


Fig. 6 Accuracy of method.

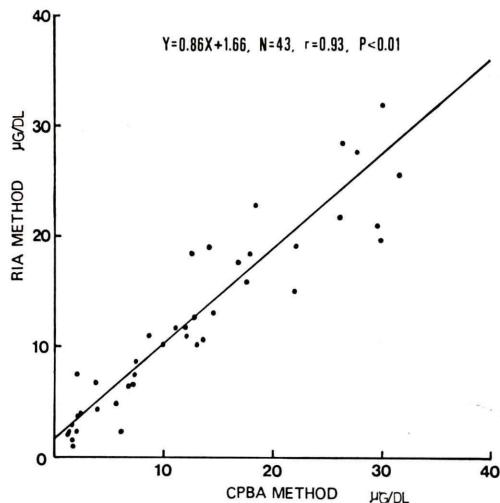


Fig. 7 Correlation between values assayed by present RIA method and Murphy's CPBA method.

2) CPBA 法との比較

各種検体を Murphy の方法⁸⁾による CPBA 法により測定した場合と比較したところ Fig. 7 に示す如く、個々の値では高値例にやや解離する例があったが、全体としては良好な相関を示し、とくに 14 μg/dl 以下の例では絶対値も比較的良好な一致 ($Y=0.86X+1.66, N=43, r=0.93, p<0.001$) を示した。

3) コルチゾールキット「第一」との比較

本法と第一 RI 研究所のコルチゾールキット「第一」による測定値の比較は Fig. 8 に示す如く、 $r=0.99, p<0.001$ と良好な相関を示した。個々の値においては「第一」による測定値の方法がやや高めであった。

4) 血漿及び血清 cortisol 測定値

健常人 101 名を対象とし、午前 8:30~11:30 の血漿及び血清 cortisol を本法で測定したところ、その測定値は 3.1~21.2 μg/dl、平均 $7.7 \pm 3.4 \mu\text{g}/\text{dl}$ (mean \pm S.D.) であった。年齢別に平均値にみた場合 Fig. 9 に示す如く 20 歳代をピークとして加齢とともに軽度ながらしかも推計学的には有意 (一

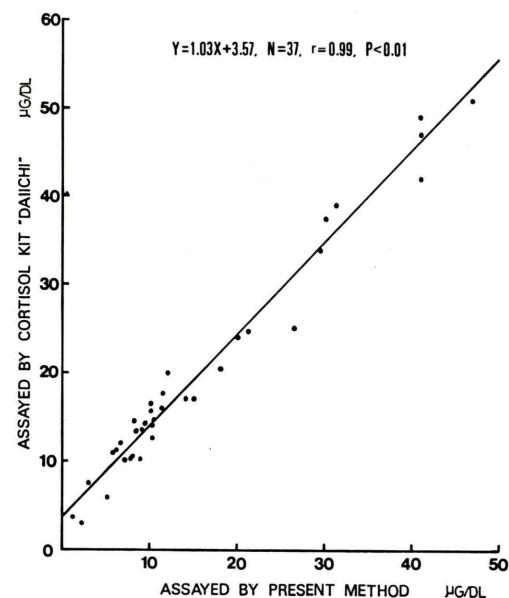


Fig. 8 Correlation between cortisol values assayed by two different RIA method.

元配置の分散 $F=3.085, p<0.01$ な減少傾向を示した。年齢別に男女差を検討したところ両者間に有意差はみれなかった。

5) 健常人と疾患例における血漿及び血清 cortisol 日内変動及び dexamethasone 抑制試験

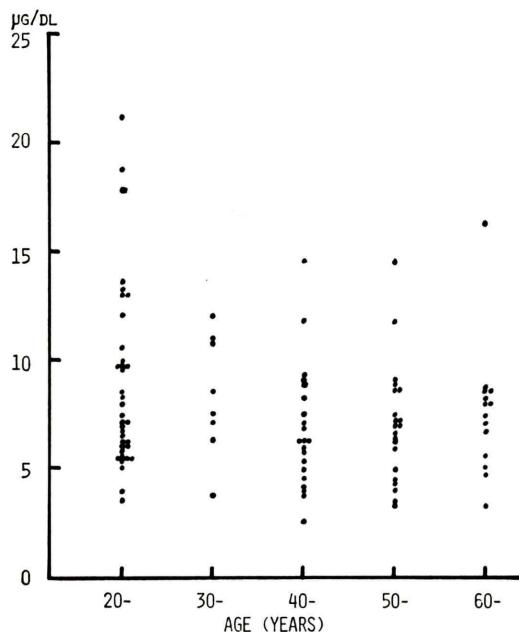


Fig. 9 Serum cortisol level of normals. Cortisol level was plotted as a function of age.

Fig. 10 に示す如く、異所性 ACTH 産生腫瘍では持続して高値であり、dexamethasone 1 mg では抑制されなかった。一方健常人及び高血圧を伴う肥満症では日内変動も正常であり dexamethasone 1 mg により感度以下に抑制された。

VI. 考 按

cortisol の RIA は、Ruder²⁾ らにより、報告されて以来、数多くの変法、改良法が報告されている。cortisol の RIA の利点については、Ruber らによりすでに指摘されているように CPBA 法に比して、抗体は親和性が大で、測定感度が高いこと、測定範囲が広いこと、B-F 分離が場合より RIA の方が完全にできること等により RIA の方がより優れていることである。

測定法の特異性については Porter Silber¹⁰⁾ 法においては、11-deoxycortisol, cortisone をも検出しておらず、CPBA 法においては、11-deoxycortisol, corticosterone の影響が大である¹¹⁾。ただ cortisol 以外の steroid はその血中濃度が cortisol に比し、低い為これらの方も実際上は cortisol assay に代用されてきた。

そこで RIA による cortisol の測定においては cortisol に特異性の高い抗体の開発、又は容易な

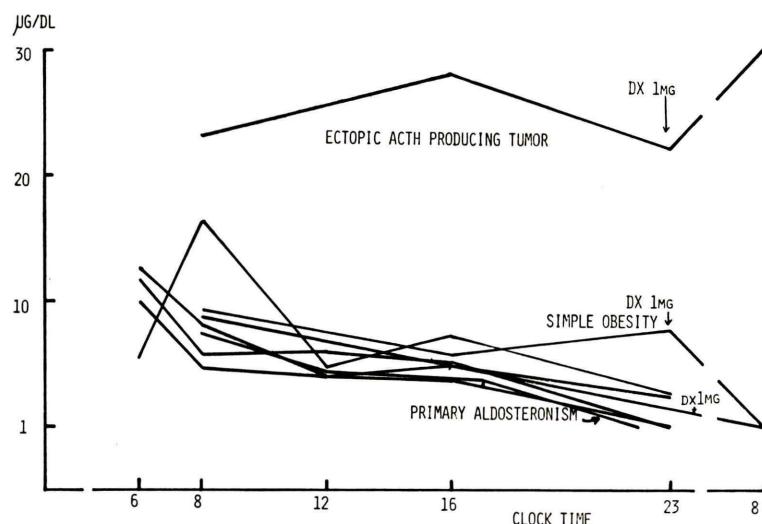


Fig. 10 Diurnal variation of cortisol level in normals and some patients.

solvent partition により cortisol のみ測定しようとする試み¹²⁾がなされている。牧野ら¹³⁾、吉見ら¹⁴⁾により報告された如く特異性の高い抗体を使用すれば血漿及び血清から直接的に測定する direct assay が可能となる。

我々の作成した抗 cortisol-21-hemisuccinate に対する抗体も corticosterone, cortisone には 13~18%と比較的高い交叉性を示したが、クッシング症候群等特殊病態を除けば direct assay が可能である。又、11-deoxycortisol との交叉性が低いことが特徴であり、従って Metopirone 投与中においても測定可能である。

多くのステロイド RIA は放射性標識抗原として、³H が用いられている。³H を扱うことは半減期や測定上の問題で、特殊な装置や注意が必要で、さらに、測定手順もより煩雑である。

これに対して、 γ -emitter である Se⁷⁵-cortisol や ¹²⁵I-cortisol を用いた CPBA 法又は RIA が開発されている。我々は日常検査として多数検体処理可能な RIA でより簡易な方法を目的として、1) ¹²⁵I-cortisol を用いること、2) direct assay 出来るのこと、3) CBG 不活化をより簡便にすること、4) B-F 分離も簡便にし、時間による影響が少ないことを目標として、このような方法を確立した。

direct assay にあたっては、内因性の CBG 不活化が問題であり、この為、吉見らはアルコールによる変性法を用いている¹⁴⁾。アルコール変性法では血漿タンパク質の変性による沈殿が生じこの沈殿に標識 cortisol が巻き込まれる可能性があるなど操作上、都合の悪い場合がある。グルタミン酸緩衝液及び加熱による内因性結合蛋白の変性は Wide ら¹⁵⁾により Vitamin B₁₂ 測定に、Dunn ら¹⁶⁾により thyroxine 測定に応用されており、さらに Foster ら⁹⁾により cortisol RIA に応用された。これらはいずれもグルタミン酸緩衝液により検体を希釈し pH を 3.3 に低下するとともに 15 分間の熱処理を加えている。

今回の我々の方法で単に室温において 5 分~10 分間放置するのみで熱処理は省略できることが判明した。これは抗体と CBG の親和性が異なる為、

一度解離した CBG は抗体存在下には、その影響が低下する可能性が考えられる。いずれにせよ熱処理の省略は cortisol RIA の操作をより容易にするものである。

従来ステロイドホルモンの CPBA 又は RIA の B-F 分離には dextran-coated charcoal 法、Florisil 法、硫酸塩析法などが好んで用いられてきたが、これらはいずれも処理時間や温度による影響が強く多数検体処理には注意を要する場合が多い。

PEG の B-F 分離への応用は Desbuguois らによりペプタイドホルモンの RIA に用いられたのが最初である¹⁷⁾。その後、PEG 法はステロイドホルモンの RIA にも応用され、吉見ら¹⁴⁾により cortisol, Schiller ら^{4), 5)}により estradiol, testosterone などの RIA の報告がある。その利点は PEG 添加後遠心分離操作を行うまでの時間が測定値に影響を与えることが少ない点にある。PEG の最終濃度は吉見ら¹⁴⁾、Schiller ら^{4), 5)}の方法も 14~15% であり、我々も 15% を用い安定した結果を得ている。

しかしながら、incubation mixture 中の蛋白濃度の影響をうけるので carrier protein が必要である。carrier protein の濃度として、中川ら¹⁸⁾は insulin RIA で 1.5 mg/ml を用い、Schiller らは estradiol RIA で 1 mg/1.45 ml を用いている⁴⁾。 γ -globulin の濃度は PEG 法において critical である為 assay 系ごとにその濃度を決めておく必要がある。

そこで我々は carrier protein として human γ -globulin を用い、3.0 mg/tube を選んだ。これは最終濃度として 1.67 mg/ml である。

さらに標準物質と検体測定用 incubation mixture 中の蛋白濃度も近いことが望ましく、この為、本法では標準 cortisol を cortisol free 血漿で希釈し凍結保存している。本法は測定にあたり、標準物質の希釈の操作が省かれ、一般検査としてより簡便である。PEG による B-F 分離の信頼性は PEG 法による測定値と二抗体法による測定値が良く一致したことからもうかがわれる。

本法と CPBA 法との比較では全体として良好

な相関が得られたが、測定値が高い部分で RIA 法がやや高値となる傾向がみられた。これら CBG と、我々の用いた抗体の特異性の相違によるものと考られる。同様な事実はコルチゾールキット「第一」を用いた細木らにより報告されている¹⁹⁾。さらに本法とコルチゾールキット「第一」による測定値の比較では、本法の方がやや低値であったが、この原因としては、抗体の特異性、CBG 不活化の方法の相違、標準物質の相違などが考えられる。しかしながら両者の相関は良好であった。

本法の accuracy, C.V. は満足すべきものであり、臨床応用上有用なものと考えられる。本法による健常人 101 例における午前 8:30~11:30 で、3.1~21.2 μg/dl、平均 $7.7 \pm 3.4 \mu\text{g}/\text{dl}$ であり、従来の報告とほぼ一致する。又、日内変動、dexamethasone 抑制試験の値も満足すべき結果である。多数例における年齢別の値の変化をみると加齢によりやや低下を示したことは加齢による下垂体-副腎皮質系の変化を示唆する。

VII. 結論

cortisol-21-hemisuccinate BSA を抗原とし作成した、抗 cortisol 抗体を用いた direct assay による RIA を確立した。本法は標識抗原として ^{125}I -cortisol を用い、B-F 分離には PEG 法を用いた。内因性 CBG の影響除去の為 0.6% グルタミン酸緩衝液 pH 3.3 を用いることにより、熱処理が省略出来ることを見い出した。本法は簡便性、多数検体処理能力から一般検査として有用な方法と考えられる。

文 献

- 1) Abraham GE: Solid-phaser radioimmunoassay of estradiol-17 β , J Clin Endocr Metab **29**: 866-870, 1969
- 2) Ruder HJ, Guy RL, Lipsett MB: A radioimmunoassay for cortisol in plasma and urine. J Clin Endocr Metab **35**: 219-224, 1972
- 3) Midgley AR, Niswender GD: Radioimmunoassay of steroids. Acta Endocr (Copenhagen) **147**, Suppl: 320-328, 1970
- 4) Schiller HS, Brammal MA: A radioimmunoassay of plasma estradiol-17 β with the use of polyethylene glycol to separate free and antibody-bound hormone. Steroids **24**: 665-678, 1974
- 5) Anderson PH, Fukushima K, Schiller HS: Radioimmunoassay of plasma testosterone, with use of polyethylene glycol to separate antibody-bound and free hormone. Clin Chem **21**: 708-714, 1975
- 6) Erlanger BF, Borek F, Beiser SM et al: Steroid-protein conjugates of bovine serum albumin with progesterone, deoxycorticosterone and estrone. J Biol Chem **234**: 1090-1094, 1959
- 7) Greenwood FC, Hunter WH, Glover JS: The preparation of ^{131}I -labelled, human growth hormone of high specific radioactivity. Biochem J **89**: 114-123, 1963
- 8) Murphy BEP: Some studies of the protein binding of steroids and their application to the routine micro and ultra micro measurement of various steroids in body fluids by competitive protein binding. J Clin Endocr **27**: 973-990, 1967
- 9) Foster LB, Dunn RT: Single-antibody technique for radioimmunoassay of cortisol in unextracted serum or plasma. Clin Chem **20**: 365-368, 1974
- 10) Silber RH, Porter CC: Determination of 17, 21-dihydroxy-20-ketosteroids in urine and plasma. J Biol Chem **210**: 923-932, 1954
- 11) Nugent CA, Mayes DM: Plasma corticosteroids determined by use of corticosteroids-binding globulin and dextran-coated charcoal. J Clin Endocr Metab **26**: 1161-1122, 1966
- 12) Jiang NS, Machacek D, Wadel OP: Comparison of clinical assay for serum corticosteroids. Clin Clin Chem **21**: 387-391, 1975
- 13) 牧野拓雄, 神戸川明: Radioimmunoassay による血中 Cortisol の測定. 日内誌 **49**: 1297-1305, 1973
- 14) 吉見輝也, 立花清司: ステロイドホルモン (コーチゾール, アルドステロン) 臨床化学 **3**: 53-61, 1974
- 15) Wide L, Killander A: radiosorbent technique for the assay of serum vitamin B₁₂. Scand J Clin Lab Invest **27**: 151-159, 1971
- 16) Dunn RT, Foster LB: Radioimmunoassay of thyroxine in unextracted serum, by a single- antibody technique. Clin Chem **19**: 1063-1066, 1973
- 17) Desbuquois B, Aurbach GD: Use of polyethylene glycol to separate free and antibody-bound peptide hormones in radioimmunoassay. J Clin Endocr Metab **33**: 732-738, 1971
- 18) 中川昌一, 中山秀隆, 佐々木蒿他: インスリン治療患者の血中遊離インスリン定量法, 糖尿病 **15**: 403-408, 1972
- 19) 細木秀美, 森 正彦, 高原二郎他: 各種血漿 corticosteroid 測定値の比較検討, ホルモンと臨床 **23**: 721-729, 1975

Summary

Plasma Cortisol Radioimmunoassay with ^{125}I -cortisol and Polyethylene glycol

Keiko NISHI, Toshio OGIHARA, Kiyoshi MIYAI, Yuichi KUMAHARA

The Central Laboratory for Clinical Investigation, Osaka University Hospital, Osaka, Japan

Kaichiro ISHIBASHI

Eiken Immunochemical Institute, Tokyo, Japan

A new, convenient and less time-consuming plasma cortisol radioimmunoassay was set up. Antibody raised to cortisol-21-hemisuccinate-BSA was used at 1:6400 dilution. Because of its relatively high specificity, direct assay was possible. Main improved points were as follows, i.e., i) ^{125}I -cortisol was used as labelled compound, ii) B-F separation was done by polyethylene glycol, iii) the effect of endogeneous corticosteroid binding globulin (CBG) was avoided by 0.6% glutamate buffer pH 3.3 treatment. It was found that the omission of heat treatment was possible to avoid this CBG effect.

Minimum detectable concentration was 0.1 ng/

tube, and the assay range was 1 to 80 $\mu\text{g}/\text{dl}$ plasma when 10 μl sample was used. Precision and accuracy were satisfactory. Coefficient of variance for intraassay and interassay were 6.0% at 12.1 $\mu\text{g}/\text{dl}$, 3.8% at 36.6 $\mu\text{g}/\text{dl}$ and 7.5% at 10.2 $\mu\text{g}/\text{dl}$, 6.7% at 41.8 $\mu\text{g}/\text{dl}$ respectively. Data obtained by this method were compared to those by Murphy's CPBA method and other commercial RIA method. They were quite comparable with each other. Mean value of serum cortisol level (8:30–11:30) in normal subjects was $7.7 \pm 3.4 \mu\text{g}/\text{dl}$ ($m \pm S.D.$, $n=102$). Mean value of serum cortisol was decreased slightly but significantly with age.