

-45- RIAによる血漿および尿中Aldosterone測定法の検討

都養育院附病 核放

○上田真智子, 末広牧子, 黒田 彰, 矢田部タミ,
桜井妙子, 山田英夫, 飯尾正宏

同 上 循環器

上田慶二, 桑島 巖

RIAによる血漿Aldosterone(以下Aldoと略す)が1970年にMayesら, Bayardsらにより試みられて以来今日では数種のKitが市販されている。我々は既にChromatographyにより分離抽出を行なう方法で約100例について尿中Aldoの測定を行ない, その結果を報告した。しかしこの方法は操作も複雑で, 長時間を要する。そこで日常検査化を目的としてChromatography法とdirect extractionによる方法とを比較し, その有用性を検討した。併せて若干の臨床的考察も行なった。

対象: 養育院附属病院入院の諸種疾患患者100例について尿中Aldoの測定を行なった。その内20例及び成人健常者7例について, 両方法による比較を行なった。更に20例の血漿検体についても, 同様な比較検討を行なった。使用した市販Kitは, NEN(Aldo-18, 21-dihemisuccinate抗体)及びCis(Aldo-3-oxime抗体)製のものであり, 標識抗原はいずれも ^3H -Aldoである。

方法: I. 血漿Aldo測定. NEN KitではRIAに先立ち CH_2Cl_2 により抽出し, sephadex LH-20にて分離を行なった。Cis Kitでは CH_2Cl_2 による抽出のみを行なった。II. 尿中Aldo測定. 両方法共に全尿の一部を用い, Aldo-18-glucuronideを酸加水分解して測定した。但し, NEN Kitでは CF_2Cl_2 で洗滌後の尿について酸加水分解を行ない, その後 CH_2Cl_2 にて抽出, アルカリ洗滌し, 更にSephadex LH-20 Chromatographyにより分離した。Cis Kitでは酸加水分解後直接RIAを行なった。

成績: (1) 標準曲線はB/F放射能比により表示し, BOはNEN $42.4 \pm 4.67\%$, Cis $44.6 \pm 4.24\%$ であった。両法共, 曲線は10pgから250pgまで急峻な下降を示した。(2) 抽出率. 血漿AldoについてはNEN $51.5 \pm 6.91\%$ (cv = 12.32%), Cis 84.06 ± 6.12 (cv = 7.39)であった。尿中Aldoについては, NEN 50.59 ± 10.41 (cv = 20.57), Cis 100%であった。(3) 再現性. Within assayはNENにおいてcv 7.59%, Cis 3.72%, Between assayはNENでcv 23.15% (8回), Cis 9.87% (2回)であった。(4) 特異性. 両抗体の諸steroidに対する交叉性は, Cortisolに対しNEN 0.01%, Cis $10^{-5}\%$, Cortisoneに対しNEN 0.12%, Cis 0.001%である。(5) 両測定法の相関. 血漿Aldoでは $Y = 0.708x + 0.737$, $r = 0.723$ ($P < 0.05$), 尿中Aldoでは $Y = 0.865x - 0.487$, $Y = 0.944$ ($P < 0.001$)の相関を得た。YはNEN, XはCisを示す。(6) 水ブランクは両法共常に感度以下であった。

まとめ: 直接抽出法は日常検査に有用と思われる。

-46- ^{125}I -aldosteroneを使用する血漿アルドステロン含量の簡易測定法

福島医大 第3内科

○春山和見, 中嶋凱夫, 福地総逸

同, RI研究室

斎藤 勝

^{125}I -aldosterone (^{125}I -ald)と極めて特異性の高い抗体を用いることにより, 簡単に血漿アルドステロン含量の測定する方法を開発した。〔方法〕抗体の作製にはまずaldosterone-3-oximeを作製し, これを薄層chromatographyで純化後, ブタ γ -globulinと結合させ, ウサギに3週間毎に注射して作製した。 ^{125}I -aldはaldosteroneの C_3 の位置にtyrosineを結合させ, これに ^{125}I を標識することにより作製した。 ^{125}I -aldの測定は同一試料を次の3法によって行い, すでに測定法として確立した第Ⅲ法を標準として他の2法の良否を検討した。(I), 血漿100 μL に ^{125}I -ald ($500\text{ Ci}/\mu\text{M}$, 約10000 cpm) 100 μL を加えて後, 三塩化酢酸を加えて除蛋白し, これに抗体を混じて20時間4℃でincubate後30%のポリエチレングリコール(PEG) 1mlを加え, 遊離分画(F)と結合分画(B)を分離した。(II), 血漿100 μL に ^{125}I -ald (約10000 cpm) 100 μL を加え, 更にメタノール2mlを混じて遠心, 上清500 μL を40℃で減圧乾固後抗体250 μL を入れ, 4℃で12時間incubateした。BとFの分離はPEGを用いた。(III), 血漿2~3mlに ^3H -aldosterone (^3H -ald)を加え, dichloromethaneで抽出後paper chromatographyによりalbを分離し, radioimmunoassayにより測定した。〔結果〕本抗体の特異性はaldosteroneとの反応性を100とした場合, cortisolとの交叉反応性は 3.1×10^{-7} , corticosteroneとは 4.2×10^{-5} , deoxycorticosteroneとは 5×10^{-5} , cortisoneとは 3.1×10^{-7} であった。回収率はI, II法共に90%以上, III法では65~90%。Water blankはI法 $1.8 \pm 1.6\text{ pg}$, II法 $0.08 \pm 0.13\text{ pg}$, III法1pg以下。測定感度はI, II法共に0.15pg以下, III法は2pg以下。intraassay-variabilityはI法 $3.8 \pm 6.72\%$, II法 $4.7 \pm 1.45\%$, intra assay variabilityはI法 $12.6 \pm 8.72\%$, II法 $3.8 \pm 0.47\%$ 。正常者21例の測定値はI法 $8.0 \pm 8.9\text{ ng/dL}$, II法 $6.4 \pm 8.1\text{ ng/dL}$, III法 $5.9 \pm 8.4\text{ ng/dL}$ とII法とIII法の測定結果が極めてよく一致した($r = 0.995$)。〔結論〕 ^{125}I -aldは ^3H -aldに比べ, 比活性が約10倍高く, 感度も約10倍となったので, 血漿100 μL で測定可能であった。しかしI法による測定値ならびにWater blank値は高値を示したのでII法が最良の方法と結論しうる。本法は更に以下の点で優れている。1) 特異性の高い抗体の使用により, 抽出純化を必要としない。2) ^{125}I の利用により液体scintillation counterを必要としない。3) 廃棄処分が容易。