

-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 Mays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-dihemi succinate 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 Sphadex 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 $42.4 \pm 4.6\%$, 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 $51.5 \pm 6.91\%$ ($\text{cv} = 12.32\%$), Cis 84.06 ± 6.12 ($\text{cv} = 7.39$) であった。尿中 Aldo については, NEN 50.59 ± 10.41 ($\text{cv} = 20.57$), Cis 100% であった。(3) 再現性. Within assay は NEN において $\text{cv} 7.59\%$, Cis 3.72% , Between assay は NEN で $\text{cv} 23.15\%$ (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

齋藤 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。P-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 $100\mu\text{l}$ に ^{125}I -ald ($500\text{Ci}/\mu\text{M}$, 約 10000cpm) $100\mu\text{l}$ 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°C 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 $100\mu\text{l}$ に ^{125}I -ald (約 10000cpm) $100\mu\text{l}$ を加え, 更にメタノール 2ml を混じて遠心, 上清 $500\mu\text{l}$ を 4°C で減圧乾固後抗体 $250\mu\text{l}$ を入れ, 4°C で12時間 incubate した。B と F の分離は PEG を用いた。(III), 血漿 $2 \sim 3\text{ml}$ 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 $8.0 \pm 8.9\text{pg}/\text{dl}$, II 法 $6.4 \pm 8.1\text{pg}/\text{dl}$, III 法 $5.9 \pm 8.4\text{pg}/\text{dl}$ 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 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 $100\mu\text{l}$ 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。