

《使用経験》

Cortipac Kit の使用経験と Metyrapone Test への応用

塩之入 洋* 野田 和正* 近藤 潔*
 小野 慈** 氏家 盛通***

はじめに

血漿 cortisol は、従来 11-OHCS あるいは 17-OHCS として測定されて来たが、Murphy^{1,2)}らにより competitive protein binding assay (CPBA) が確立され、多数の検体を迅速に測定することができるになり、副腎皮質機能検査の簡易化が可能となった。

CPBA は corticosteroid binding globulin (CBG) の特異性³⁾に多少の問題を残しており、CBG の 11-deoxycortisol に対する交叉反応性は極めて大きく、ことに Metyrapone test 後の血漿 corticoid 測定は cortisol よりも 11-deoxycortisol level を表わしていると考えられる。しかし、平常の末梢血液や ACTH test 後の血漿中の cortisol は他の steroid hormone に比して量的に極めて多く存在することから CPBA による測定は、cortisol level を表わしていると考えられる。

一方、下垂体 ACTH 予備能検査としての、Metyrapone test はすでに確立されている⁴⁾が、24 時間の全尿を完全に集めなければならない難点がある。このため血漿 corticoids 測定による Metyrapone 投与後の下垂体予備能検査法の検討がな

されている⁵⁻⁸⁾。

われわれも、⁷⁵Se-cortisol を用いる CPBA による測定 Kit (Cortipac, 科研化学株式会社) を使用し、rapid ACTH test や Metyrapone test の血漿 corticoids 濃度を測定する機会を得たので、その成績を報告する。

実験材料および方法

1. キットの内容

Cortipac の 1 kit には standard cortisol 4 水準 (duplicate) と検体 17 本の合計 25 本の測定用試験管が含まれている。

1) 標準曲線用標準血清 (4 vial)

Dexamethasone 投与後の正常人血清を用いて cortisol 濃度が 2.9, 6.9, 19, 50 $\mu\text{g/dl}$ になるように調整した後、凍結乾燥したものであり使用前の蒸溜水 500 μl に溶解して用いる。

2) 測定用栓付試験管 (25本)

各試験管には ⁷⁵Se-cortisol (specific activity 25 mCi/mol), CBG (チャコール処理家兎血清) および Sephadex G-25 顆粒 (coarse) 0.3 g が 0.1% NaN₃ を含むリン酸緩衝液 (0.05 M, pH 7.0) 1.8 ml に溶解して含まれている⁹⁾。

3) 熱変性用試験管および試験管架

4) 標準曲線作製用片対数グラフ用紙

2. 実験器具

1) マイクロピペット、100, 200, 500 μl 用各 1 本

2) ボルテックスミキサー

3) 温浴加熱装置

* 横浜市立大学医学部 第2内科

** 同 上 放射線科

*** 同 上 中央放射線部

受付: 52年1月7日

最終稿受付: 52年3月9日

別刷請求先: 横浜市中区浦町2丁目33番 (〒232)

横浜市立大学医学部第2内科

塩之入 洋

- 4) ローテーター
- 5) 計測用試験管 25 本
- 6) Well 型 γ -scintillation counter

3. 測定操作 (Fig. 1)

凍結乾燥ヒト標準血清の各 vial に蒸留水 500 μ l を加え 10 分間室温に放置して十分に溶解する。つぎに、標準血清および被検血漿の各 100 μ l を熱変性用試験管に入れ、さらに蒸留水 200 μ l を加えた後ボルテックスミキサーで振盪する。ついで、70°C にて 10 分間加熱処理する。その熱変性溶液 200 μ l を測定用試験管に移し、室温でローテーターを用いて 30 分以上インキュベートして競合反応を起こさせ静置後、この上清 500 μ l を計測用試験管に取り、Well 型シンチレーションカウンターで計測する。

Standard Serum or Unknown Plasma (100 μ l)

↓ Add 200 μ l of distilled water
 ↓ Heated to denature the endogenous CBG at 70°C for 10 min.
 ↓ Cool to room temperature
 ↓ 200 μ l of the denatured sample to the assay vial
 ↓ Incubation at room temperature for 30 min. using rotator
 ↓ Allow Sephadex G-25 granules to settle
 ↓ 500 μ l of the supernatant for counting by γ -scintillation counter

Fig. 1 The Procedure of the Method (Cortipac).

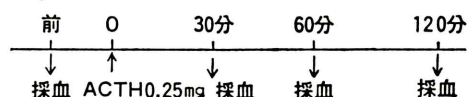
対象および血漿サンプルの採取

1) 横浜市大第 2 内科を受診し、臨床所見および検査成績から診断した下垂体機能低下症 2 例、副腎皮質機能低下症 6 例、原発性アルドステロン症 6 例および正常者 23 例の計 37 例。

2) rapid ACTH test¹⁰⁾: 合成 ACTH (コートロシン) 0.25mg の静注、前、30分、60分、120分後にそれぞれ血漿を採取した。(Fig. 2)

3) overnight Metyrapone test^{8,11)}: 第 1 日午後 8 時、午後 12 時、第 2 日午前 4 時の 3 回、Metyrapone 各 750mg を経口投与し、第 1 日午前 9 時と第 2 日午前 9 時にそれぞれ血漿を採取した。

Rapid ACTH test



Overnight Metyrapone test

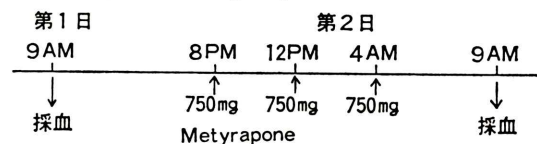


Fig. 2

4) 採取サンプルの一部は抗 cortisol 血清を用いる ^3H -cortisol-RIA Kit (ミドリ十字社) による測定も行なった。

結 果

CPBA に用いられる CBG と RIA に用いられる抗 cortisol 血清の特異性について検討を加え、Table 1 に一括して示した。cortisol に対する反応性を 100% としたとき、CBG は 11-deoxycortisol にも 100% の交叉性を示したが、抗 cortisol 血清では 43% であった。

Cortipac Kit による標準曲線は Fig. 3 に示したが、横軸に cortisol 濃度を対数目盛りで表わすと、2.9~50 μ g/dl の間では、ほぼ直線関係に近いものがえられた。標準曲線各点の within assay および between assay の coefficient variation はそれぞれ 0.92% と 3.6% であった。実際に検体を測定した際の within および between assay variation はそれぞれ 12.8% と 16.0% であった。

正常者 23 名の午前 9 時の採取サンプルを corti-

Table 1 CPBA: RIA における Cross Reaction.

	CBG (CPBA)	Antisera (RIA)
Cortisol	100%	100%
11-Deoxycortisol	100%	43%
Corticosterone	91%	15.5%
Aldosterone	1.2%	1.0%

(The Percent Cross Reaction was calculated at 50% Displacement of Cortisol.)

pac kit と ^3H -RIA kit で測定した結果, それぞれ (0.3 ± 2.5 , 9.7 ± 1.8 (mean \pm SD) $\mu\text{g/dl}$) であり, また正常者および諸疾患患者から得た検体を同様に測定した結果, その相関係数は $r=0.92$ で回帰直

線は $y=0.87x+1.98$ であった. (Fig. 4)

正常者および諸疾患症例の rapid ACTH test に対する反応を Fig. 5, Fig. 6 に示したが, cortipac kit の成績と ^3H -RIA kit の成績はほぼ同様であった.

次に, 正常者の overnight Metyrapone test における CPBA の corticoids 値は投与前 9.8 ± 2.0

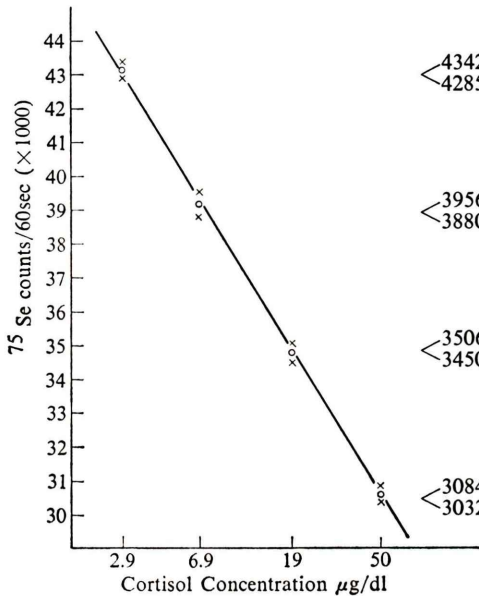


Fig. 3 A Typical Standard Curve for CPBA (^{75}Se) of Cortisol.

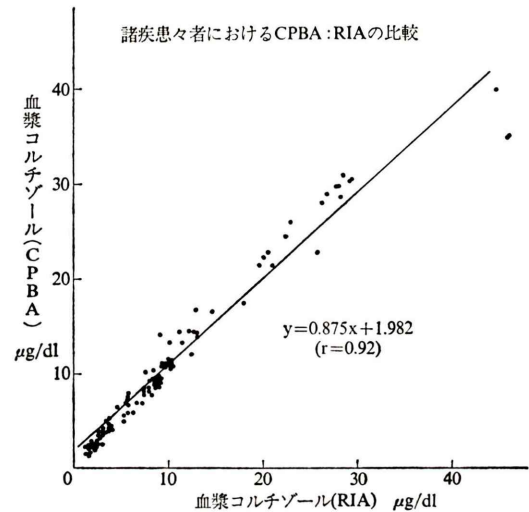


Fig. 4

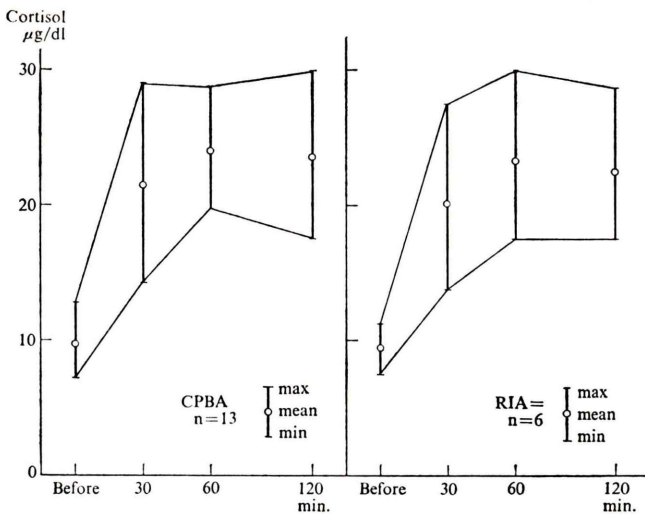


Fig. 5 Plasma Cortisol Response to Rapid ACTH Test in Patients with Non Endocrine Disorders.

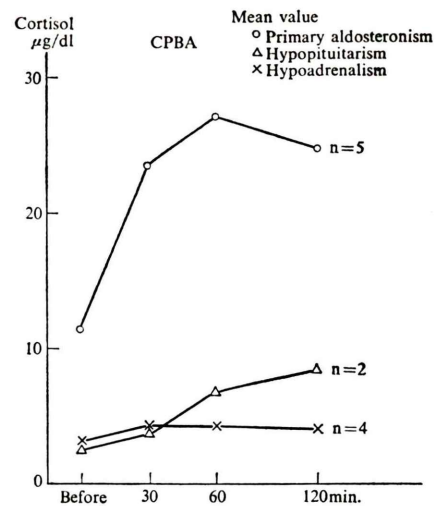


Fig. 6 Plasma Cortisol Response to Rapid ACTH Test in Patients with Endocrine Disorders.

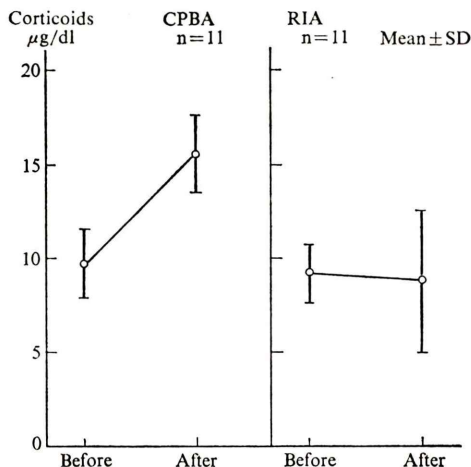


Fig. 7 Plasma Corticoids Response to Overnight Metyrapone Test in Patients with Non Endocrine Disorders.

から投与後 $15.6 \pm 2.0 \mu\text{g/dl}$ (mean \pm SD) となった。RIA による測定では投与前 9.6 ± 1.5 から $8.9 \pm 3.8 \mu\text{g/dl}$ であった。(Fig. 7)

下垂体機能低下症、副腎皮質機能低下症、原発性アルドステロン症に対する overnight Metyrapone test の CPBA による corticoids level の測定成績は Fig. 8 に示すごとく、原発性アルドステロン症では増加反応を認めたが、下垂体機能低下症、副腎皮質機能低下症では殆ど反応を認めない。

考 案

血中 cortisol の測定には、従来、精度、感度共にすぐれない蛍光法^{12,13)}が応用されてきた。その後、感度のすぐれた double isotope derivative assay¹⁴⁾が導入されたが、測定法の煩雑さゆえ広く利用されなかった。近年 Murphy ら^{1,2)}によって corticosteroid binding globulin (CBG) を用いる competitive protein binding assay (CPBA) が開発されて以来、血中 cortisol 測定法は感度測定操作等に著しい進歩が認められた。

cortipac kit は Murphy らの CPBA を応用して開発されたものであり、本キットは標識抗原として、cortisol の2位にセレンメチル基が導入され

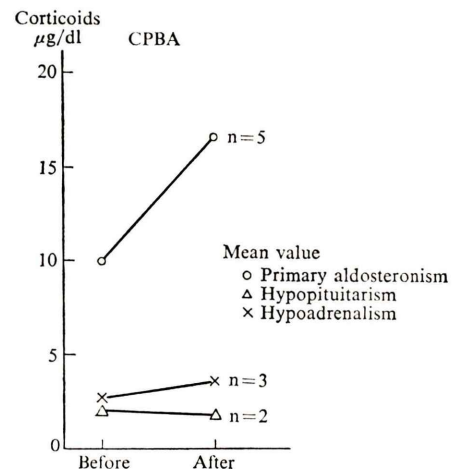


Fig. 8 Plasma Corticoids Response to Overnight Metyrapone Test in Patients with Endocrine Disorders.

た ^{75}Se -cortisol を用いており、 γ シンチレーションカウンターで計測できる。本キットの基礎的検討や CPBA としての臨床応用への検討はすでに他の報告者により述べられており¹⁵⁻²⁰⁾、その詳細はそれらに譲るが、今回の臨床的検討でもほぼ同様の結果が得られた。

われわれは、さらに CBG 11-deoxycortisol にほぼ 100% の binding affinity を有する点に注目し、本キットを Metyrapone test に応用してみた。

Metyrapone の効果は副腎の cortisol 合成の最終段階で 11-hydroxylase 酵素の作用阻害にあり、この結果血中 cortisol level は低下し、正常下垂体からは ACTH が多量に分泌され、その結果、正常副腎からは cortisol の前段階物質である deoxycortisol が多量に生成・分泌される、またこの代謝産物は尿中 17-OHCS として排泄される。

したがって、Metyrapone test ではこれらの指標として尿中 17-OHCS が現在一般に測定されているが、この場合には24時間の完全蓄尿を必要とする難点がある。また、その指標として血中 ACTH の測定は最も望ましいが、一般には未だ容易には行われていない。そこで、CBG が 11-deoxycortisol に 100% の binding affinity を有することを

利用すれば、Metyrapone test の評価判定も容易になると考えられる。この点に関して加藤ら⁸⁾は Metyrapone test 後の corticoids level の測定による下垂体 ACTH 予備能の検査は有用、可能であるとしており、overnight metyrapone test 後の血中 corticoids level が $10 \mu\text{g/dl}$ 以上は正常反応で、 $6 \mu\text{g/dl}$ 以下は反応低下と判定している。本 kit による overnight Methyrapone test の成績でも正常者の corticoids level は、 $9.8 \pm 2.0 \mu\text{g/dl}$ (mean \pm SD) から投与後 $15.6 \pm 2.1 \mu\text{g/dl}$ ($11.8 \sim 19.0$) と増加を示し、原発性アルドステロン症でも同様に増加反応を認めたが、下垂体機能不全症や副腎皮質機能低下症では増加反応を認めない。

副腎皮質機能低下症では、下垂体 ACTH 予備能が正常であっても corticoids level は増加を示さないことは注意すべきで、Metyrapone test のみでは下垂体 ACTH 分泌不全とは鑑別されない。

一方、Metyrapone test に抗 cortisol 血清 RIA を応用する場合は、11-deoxycortisol に対する binding affinity は弱いので注意しなければならない。

以上、cortipac kit (CPBA) は測定操作が簡単で再現性も良好であり、³H-RIA による cortisol 測定値とは良好な相関を認め、臨床的に十分応用可能と考えられる。さらに、本キットは CBG による CPBA であることを利用すれば、Metyrapone test に応用可能であると考えられる。

ま と め

⁷⁵Se-cortisol を用いた CPBA kit (cortipac) は測定操作が簡単で、精度・再現性も優れ、RIA による測定値と良好な相関を示した。

さらに、本キットは CBG による測定法であることを利用すれば Metyrapone test に臨床応用可能であることが示唆された。

最後に Cortipac Kit を提供して頂きました科研化学株式会社に感謝致します。さらに御校閲を賜りました恩師金子好宏教授（横浜市大医学部第2内科）に深く感謝いたします。

なお、本論文の一部は第24回日本内分泌学会東部部会総会（昭和51年10月2日、東京）において発表した。

文 献

- 1) Murphy BP, Engellerg W, Chauncey JP, et al: Simple Method for the Determination of Plasma Corticoids. *J Clin Endocr Metab*, **23**: 293-300, 1963
- 2) Murphy BP: Some Studies of the Protein-Binding of Steroid and their Application to the Routin Micro and Ultramicro Measurement of Various Steroids in Body Fluids by Competitive Protein-Binding Radioassay. *J Clin Endocr Metab*, **27**: 973-990, 1967
- 3) Murphy BP: Protein Binding and the Assay of Nonantigenic Hormones. *Rec Progr Hormone Res*, **25**: 563-610, 1969
- 4) Liddle CW, Estep HL Kendall JW et al: Clinical Application of A New Test of Pituitary Reserve. *J Clin Endocr Metab* **19**: 875-984, 1959
- 5) Kliman B: Rapid SU4885 Test by Plasma 11-Deoxycortisol Assay. *Clin Res*, **15**: 261-273, 1967
- 6) Meikle AW: Effect of Diphenylhydantoin on the Metabolism of Metyrapone and Release of ACTH in Man. *J Clin Endocr Metab*, **29**: 1,553-1,558, 1969
- 7) Strott CA, West CD, Kondo T et al: Plasma 11-Deoxycorticosteroid and ACTH Response to Metyrapone (Plasma Metirapone Test). *J Clin Endocr. Metab* **29**: 6-11, 1969
- 8) Kato T, Kashima M et al: The Method for the Determination of Total Corticosteroid and 11-Deoxycorticoid in Plasma by Competitive Protein Binding Analysis and Its Application to the Overnight Metirapone Test. *Endocrinol Jap*, **17**: 37-44, 1974
- 9) Baum CK, and Tudor R Landon: A Simple Competitive Protein Binding Assay for Plasma Cortisol. *Clin Chim Acta*, **55**: 147-154, 1974
- 10) Wood JB, James VHT, Frankland AW, et al: A Rapid Test of Adrenocortical Function. *Lancet*, **1**: 242-245, 1965
- 11) 加藤達雄, 田中孝司, 荒木嘉隆他: Radiostereosasy による血中 Total Corticoid, Deoxycorticoid の測定法, とくに Overnight Methyrapone Test に対する応用. *最新医学*, **30**: 627-632, 1975
- 12) De Moor P, Steeno O and Raskin M, et al: Fluorimetric Determination of Free Plasma 11-Hydroxycorticosteroids in Man. *Acta Endocr*, **33**: 297-307, 1960
- 13) Rudd BP, Sampson P and Brook BN: A New Floorimetric Method of Plasma Cortisol Assay

- with A Study of Pituitary-Adrenal Function Using Methyrapone. *J Endocr*, **27**: 317-325, 1963
- 14) Bojesen E: Determination of 17-Hydroxycorticosterone in Peripheral Plasma from Dogs and Humans with Radioactive P-Iodophenylsulfonylic Acid Anhydride(pipsan). *Scandian J Clin Lab Invest*, **8**: 55-66, 1956
- 15) Daughaday WH: Steroid Protein Interaction. *Physiol Rev*, **39**: 885-902, 1959
- 16) Daughaday WH, Adler RE, and Marig IK: Measurement of the Binding Capacity of Corticosteroid-Binding Globulin in Human Plasma. *J Clin Endocr Metab*, **22**: 704-710, 1962
- 17) 吉見輝也, 南野正隆, 遠藤治郎: コルチコイド, ホルモンと臨床, **22**: 1289-1294, 1974
- 18) 細木秀美, 沢田治子, 森正彦他: ^{75}Se -cortisol を用いた Competitive Protein Binding Analysis Kit による血中 cortisol 測定法の検討. *核医学*, **12**: 661-666, 1975
- 19) 阪本 登, 松倉 茂, 坪井誠吉他: コーチパックキットによる血漿コーチゾール測定法の検討. *ホルモンと臨床*, **24**: 171-176, 1976
- 20) 二宮哲博, 石飛和幸, 引田 亨他: Competitive Protein Binding Analysis による血中 Cortisol 測定キットの基礎検討. *ホルモンと臨床*, **24**: 1,055-1,058, 1976
- 21) Nugent CA and Mayes DM: Plasma Corticosteroids Determined by Use of Corticosteroid-Binding Globulin and Dextran-Coated Charcoal. *J Clin Endocr Metab*, **26**: 1,116-1,122, 1966