

《ノート》

プロスタグランдин E 及び $F_{2\alpha}$ の
ラジオイムノアッセイによる測定

Measurement of Prostaglandin E and $F_{2\alpha}$ in Human Serum and Burn Blister Fluid
by Radioimmunoassay Method

杉山 理* 乗松いづみ* 小林 正直* 小沢 高将*
青山 久** 井沢 洋平**

Satoru SUGIYAMA*, Izumi NORIMATSU*, Masanao KOBAYASHI*,
Takayuki OZAWA*, Hisashi AOYAMA**, and Yohei IZAWA**

**Department of Biomedical Chemistry, Faculty of Medicine, University of Nagoya
Tsuruma-cho, Showa-ku, Nagoya 466, Japan*

***Department of Plastic Surgery, Chukyo Hospital Sanjo, Minami-ku, Nagoya 457, Japan*

近年、プロスタグランдин (PG) の各種誘導体が報告され、各種臓器に対する作用が次第に明らかになってきた。PG は Goldblatt¹⁾ および von Euler²⁾ が報告した平滑筋刺激作用のみならず、各種の生理作用を有することが明らかになり、種々の臓器の機能の調節に重要な役割を果たしていることが報告されている^{3)~10)}。また、非ステロイド系抗炎症剤の多くが PG の合成阻害剤であることが明らかになり¹¹⁾、PG の炎症における役割も注目されてきている。PG の役割を考慮することが種々の疾患の症状、病態生理を理解するのに必要となってきた。それには、PG の体液中または組織中の濃度を知ることが大切である。今回、われわれはラジオイムノアッセイ (RIA) による PGE, $F_{2\alpha}$ の測定キット (Clinical Assay 社製) を使用し、PGE, $F_{2\alpha}$ を測定し、検討を加えたので報告する。

対象および方法

対象は健康成人男性 25 名（年齢 22~65 歳）の血清と受傷後 12 時間以内の火傷患者 10 名の水泡浸出液を用いた。なお測定用サンプルは採取後 -30°C の冷凍庫に保存し、測定時に室温にて溶解させ用いた。測定方法はおおむねキットに添付された使用説明書によったが、サンプルよりの PG の抽出は PGE, $F_{2\alpha}$ とも Collins & Hennam¹²⁾ の方法によった。すなわち 2 ml の血清に 1 N HCl を 0.2 ml 加え、微少 pH 電極を用いて正しく pH 3 とし、これにエチルエーテル 10 ml を加え約 30 秒よく振盪した。なおこのエチルエーテルを加え抽出する操作は 2 回行った。エチルエーテル層を別の試験管にうつし、50~60°C の温浴にてエチルエーテルを蒸発乾固させたあとキットに含まれている isogel tris buffer を 1 ml 加え試験管に乾固付着している抽出物を溶解させ、うち 0.5 ml は PGF $_{2\alpha}$ 測定用の試料とした。残り 0.5 ml は PGE 測定用とし、さらにアルカリ処理を加えた。すなわち、1 N NaOH を 0.05 ml 加え pH を 12.5~12.9 とし、5 分間沸騰水中に温浴した。次に冷水にて冷却し、0.1N CH₃COOH を 0.05 ml 加え、

* 名古屋大学医学部第二生化学教室

** 中京病院形成外科

受付：52 年 12 月 26 日

最終稿受付：53 年 3 月 17 日

名古屋市昭和区鶴舞町 65 (番 466)
杉 山 理

Key words: Prostaglandin E, $F_{2\alpha}$, Radioimmunoassay

Table 1 Assay conditions of PG by Gas/Mass spectrometry

Model	Shimazu GCMS-9000 MID-PM
Colum	L. 100 cm, ID. 3 mm, Temp. 270°C
Packing	OV-101 3 wt%
Support	Gaschrom Q 80/100 mesh
Carrier gas	N ₂
Flow rate	40 ml/min
Detector	ECD
Injection	320°C
Temp.	
Separation	320°C
Temp.	
Chart speed	20 mm/min

pH 7.4とした。この操作によって、PGEはPGBに変えられる。測定法はPGE, F_{2α}ともほぼ同様で、キットの指示通りに行ったのでここでは省略する。ただし、われわれは正常ウサギ血清とヒツジの抗ウサギ血清を加えてインキュベーションする時間はPGE, F_{2α}とも40時間とした。測定にはBeckman社製シンチレーションカウンターLS-335型を用いた。シンチレーション液としては、われわれは再現性を考慮して予め調整され市販されているボクスイ・プラウン社のPCSシンチラントをサンプル0.5mlに5ml加え測定しているが、シンチラント溶液としてはBray液でも差しつかえない。

前述の方法で抽出した3検体をRIA法によってPGF_{2α}を定量するとともに島津Gas-Chromatography-Mass spectrometry(GCMS-9000)を用いて定量した。なおGas-Massにかける前処理はPGをメチル化したのちシリル化する森の方法¹³⁾に準じた。測定条件はTable 1に示す通りである。

結果

1) 抽出効率について

前述した抽出法でのPGE, F_{2α}の抽出効率を検討するために、血清にあらかじめカウント数のわかっている一定量(おおむね2,000cpm/サンプル)の別に用意した³H-PGB₁またはF_{2α}をinternal standardとして加え、前述した抽出法で抽出し、得られた抽出物のカウント数と、添加した³H-

PGB₁, F_{2α}のカウント数の比から回収率を求めた。20検体について行ったところ、PGB₁では96.9±3.9% (平均±標準偏差)、PGF_{2α}では95.5±4.8%で、ほぼ両者とも100%に近い安定した抽出効率が得られた。

2) 標準曲線について

PGE, F_{2α}ともインキュベーション時間の異なる2組の標準曲線をFig. 1に示した。両者とも再現性のよい標準曲線が得られるが、キット添付の説明書の典型的標準曲線ほどは、低濃度における感度はよくない。

3) PGB₁ antiserum, PGF_{2α} antiserum の cross reactionについて

両者の間には、高濃度PGB₁(2μg)とPGF_{2α} antiserum間でも、またPGF_{2α}(2.4μg)とPGB₁ antiserum間でもcross reactionは認められなかった。

4) インキュベーション時間の影響

ヒツジ抗ウサギ血清(第2抗体)を入れてインキ

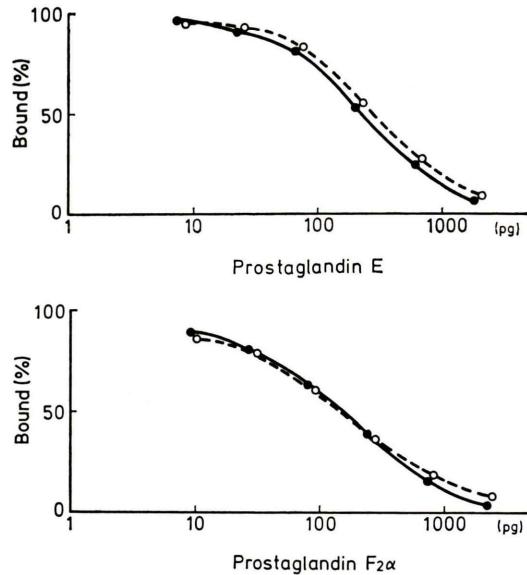


Fig. 1 The standard curve of PGE (upper) and PG F_{2α} (down).

The standard curve with open circle and interrupted line is made after 20 hours incubation with the second antibody. Solid circle and solid line is made after 40 hours incubation.

ュベーションし、ウサギ抗プロスタグランдин抗体を沈殿させるのであるが、このインキュベーション時間はキットの説明では 18~20 時間であり、さらにこの時間を延せば沈殿に回収される $^3\text{H-PG}$ 量が増量するある。われわれの検定では PGE では 20 時間で 42.7%, 40 時間で 40.3%とあまり変化しなかった。しかし PGF $_{2\alpha}$ では 35.6% が 40.4% になった。いずれの場合でも、標準曲線の形にはインキュベーション時間の長短はほとんど影響を与えたなかった。

5) 測定結果

測定値の再現性については、同一検体 10 組を 2 回測定して検討した。Table 2 に示すように、PGE, PGF $_{2\alpha}$ ともよい再現性が得られた。健康成人血清中、火傷水泡中(発症 12 時間以内)の PGE および PGF $_{2\alpha}$ の測定値をそれぞれ Fig. 2, 3 に示した。健康成人血清では PGE: $0.80 \pm 0.35 \text{ ng/ml}$, PGF $_{2\alpha}$: $0.38 \pm 0.24 \text{ ng/ml}$ であった。火傷水泡液では正常人血清よりはるかに高値を示した。当然のことであるが $^3\text{H-PG}$ の結合率(%)が標準曲線の中央部付近にくるように測定するのが望ましい。キットの説明書にあるように結合率が 95% 以上

または 10% 以下は測定をし直す必要がある。すなわち結合率が 95% 以上で PG が低いことが予想される例では、最初のサンプルの量をふやす、また 10% 以下で PG が高いことが予想される例では、サンプルの量をへらす必要がある。われわれの経験では結合率が 20~80% の間にくるように工夫するのがよいと思われる。

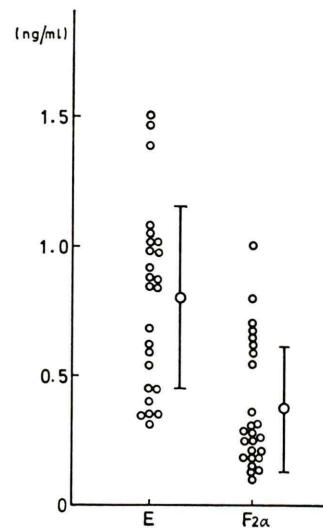


Fig. 2 PG E and PG F $_{2\alpha}$ levels in the normal human serum.

Table 2 The reproducibility of the measurements of PG E and PG F $_{2\alpha}$ by the radioimmunoassay method. Ratios of measurement a and b of PG E and PG F $_{2\alpha}$ with each 10 samples are shown in the table as an index of reproducibility of measurement.

Measurements	Prostaglandin E (ng/ml)			F $_{2\alpha}$ (ng/ml)		
	a	b	a/b	a	b	a/b
Samples						
No. 1	1.08	1.21	0.89	0.61	0.57	1.07
No. 2	0.86	1.02	0.84	0.55	0.65	0.85
No. 3	0.73	0.86	0.85	0.60	0.66	0.91
No. 4	0.97	1.04	0.93	0.24	0.26	0.92
No. 5	1.82	1.50	1.21	0.80	0.67	1.19
No. 6	0.97	0.96	1.01	0.30	0.32	0.94
No. 7	0.54	0.56	0.96	0.64	0.69	0.93
No. 8	1.00	0.84	1.19	0.19	0.15	1.27
No. 9	0.60	0.56	1.07	0.28	0.25	1.12
No. 10	0.32	0.35	0.91	0.23	0.25	0.92
Mean \pm S.D.	0.99 ± 0.13			1.01 ± 0.13		

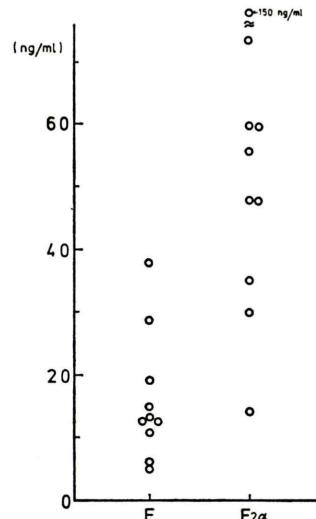


Fig. 3 PG E and PG F $_{2\alpha}$ in the burn blister fluid obtained within 12 hours after the burn injury.

6) Gas/Mass 法での測定値

3 検体について、RIA 法と Gas/Mass 法の両者で PGF_{2α} を測定した。その結果 RIA 法で 35.0 ng/ml, 17.8 ng/ml, 3.8 ng/ml の検体が Gas/Mass 法ではそれぞれ 18.3 ng/ml, 11.6 ng/ml, 2.4 ng/ml でその比は 1.9 倍, 1.5 倍, 1.6 倍であり、よい対応が得られた。

考 察

1962年に Bergström¹⁴⁾ が PG の構造を決定したのを契機として、PG に関する研究が盛んになり、PG の各種臓器に及ぼす作用が明らかになってきた。しかし正常および各種疾患の体液中または組織中の PG の量については未だ十分わかっていない。もっとも信頼し得るとされる Gas/Mass 法による測定は大変煩雑で多くの検体を処理するには RIA 法が優れている。RIA 法では交叉反応の少ない、特異性の大きい抗体を得ることが大切である。とりわけ PG のように、同じ PG 属でも PGE と F_{2α} では作用の違う場合にはそうである。Collins と Hennam¹²⁾ は、RIA 法によって PGF_{2α} が 1,000 pg ないし 10,000 pg 得られたサンプルを Gas/Mass 法によって分析したところ、40 pg であったことを報告しているが、これは RIA 法に用いる抗体に問題があったことを示している。今回使用した Clinical Assay 社のものは、Gas/Mass 法による測定値との対応はかなり良好である。また PGE についてはアルカリ処理して PGB として、PGB₁ antiserum と結合させている。この抗体では PGB₂ (アルカリ処理前の PGE₂) との交叉反応があり、PGE₁, PGE₂ をそれぞれ独立して測定できない難点はある。しかし何組かのキットを使用してもいつも一定の標準曲線が得られることから、抗体の性質は安定したものと考えられ、PGE 群として測定するには十分と考えられる。本キットを用いて測定した PGF_{2α} の値は Gas/Mass 法と比べてやや高値でているが、Gas/Mass 法で得られた値との比はほぼ一定であり、測定値の再現性も優れており、一応の相対値を知るには十分と考えられる。

また、PG の測定の難しいもう一つの理由は PG の抽出法の困難さである。本キットの説明書通りの抽出法はかなり煩雑であるが、今回我々が用いた方法は比較的簡単であり、ほぼ 100% に近い安定した抽出率が得られるよい方法と考えられる。しかし本キットの PGB₁ antiserum はキット説明書から PGA₁ との交叉反応が幾分あり、また本法では PGE を PGB に変換して測定しているが、PGE および B を分離して抽出していないため、アルカリ処理して PGB となった PGE と、もともと存在していた PGB を併せ測定していることになる。したがってより厳密には、PG を各 subgroup に分離してから測定する必要がある。しかし、簡単な分離法が確立していない現在では、Collins & Hennam 法は簡単な抽出法であり、一定の条件の下では安定した高い抽出効率が得られることから、日常臨床の多くの検体を処理するための PG 抽出法としては満足のいくものと考えられる。

測定結果について

健康成人の血清中の PGE, F_{2α} の値はやや幅があるが、これは PG が局所で作られ、血液中の PG はその遊出によるためと考えられる。また血清中の PGE と F_{2α} の値は Berger¹⁵⁾ らはほぼ同じと報告しているが、われわれの場合 PGE の方が高く出ているのは先に述べたように、PG を subgroup に分離しなかったために PGA₁ との交叉反応及びもともと血中に存在する PGB をも測定したことによると考えられる。火傷のごとき局所の炎症の水泡液では、PGE, F_{2α} とともにこれら健康成人の血清値よりもはるかに高値を示しており、これは PG が炎症と密接に関連していることを示している。

今後、さらに各種疾患での体液中、または浸出液中、組織中の PG が定量されることによって PG の真の作用がより明確になるとと考えられる。

ま と め

RIA 法による PGE, F_{2α} の測定を行った。PG

の抽出には、簡潔でかつ安定した抽出率の得られる Collins & Hennam の方法を用いた。また Gas/Mass 法との値の比較も検討した。この結果、Clinical Assay 社のキットは低濃度での感度がやや悪いものの、PGE, $F_{2\alpha}$ の測定には十分満足のいくものと考えられた。

(キットを提供して頂いたヘキストジャパン社に感謝します。)

文 献

- 1) Goldblatt MW: Properties of seminal plasma. *J Physiol* **84**: 208-218, 1935
- 2) von Euler US: Zur Kenntnis der pharmacologischen Wirkungen von Nativsekreten und Extrakten männlicher accessorischen Geschlechtsdrüsen. *Arch Exp Pathol Pharmacol* **175**: 78-84, 1934
- 3) Nakano J, and McCurdy JR: Cardiovascular effect of prostaglandin E₁. *J Pharmacol Exp Ther* **156**: 538-547, 1967
- 4) Horton EW, Main IHM, Thompson EJ, et al: Effect of orally administrated prostaglandin E₁ on gastric secretion and gastrointestinal motility in man. *Gut* **9**: 655-658, 1968
- 5) Misiewicz, JJ, Waller SL, Killey N, et al: Effect of oral prostaglandin E₁ on the intestinal transit in man. *Lancet* **1**: 648-651, 1969
- 6) Rosenthal ME, Dervinis A, and Kassarich J: Bronchodilator activity of the prostaglandin E₁ and E₂. *J Pharmacol Exp Ther* **178**: 541-548, 1971
- 7) Schooley JC, and Mahlmann CJ: Stimulation of erythropoiesis in plethoric mice by prostaglandins and its inhibition by antierthropoietin. *Proc Soc Exp Biol Med* **138**: 523-524, 1971
- 8) Banerjee AK, Phillips J, and Winning WM: E-type prostaglandins and gastric secretions in the rat. *Nature* **238**: 177-179, 1972
- 9) Stockman GD, and Munford DM: The effect of prostaglandins on the in vitro blastogenic response of human peripheral blood lymphocytes. *Exp Hemat* **20**: 65-72, 1974
- 10) 前川 正, 小林紀夫: 血小板とプロスタグラディン. ホルモンと臨床 **23**: 987-993, 1975
- 11) 鹿取 信: プロスタグランディンの拮抗薬とその合成阻害薬. 代謝 **12**: 1529-1541, 1975
- 12) Collins WP, and Hennam JF: Radioimmunoassay and reproductive endocrinology. *Mol. Aspects of Med* **1**: 107-128, 1976
- 13) 森 憲正: プロスタグラディンの測定. 代謝 **12**: 1519-1527, 1975
- 14) Bergström S: The structure of prostaglandin E, F₁ and F₂. *Acta Chem Scand* **16**: 501-528, 1962
- 15) Berger HJ, Zaret BL, Spernoff L, et al: Cardiac prostaglandin release during myocardial ischemia induced by atrial pacing in patients with coronary artery disease. *Amer J Cardiol* **39**: 481-486, 1971