

《ノート》

Amerlex 粒子を用いたコルチゾールキットの検討

Evaluation of a Cortisol Kit with the Amerlex Particles

真坂美智子* 大郷 勝三* 南野 正隆* 倉八 博之*
吉見 輝也*

Michiko MASAKA*, Shozo OHGO*, Masataka NANNO*, Hiroyuki KURAHACHI*
and Teruya YOSHIMI*

*The Second of Internal Medicine, Hamamatsu University School of Medicine

I. はじめに

血中コルチゾール濃度の測定は、副腎疾患の診断や間脳、下垂体、副腎系の機能検査として必要不可欠である。コルチゾールの ^{125}I 標識が可能になるまでは、蛍光法^{1,2)}や ^3H 標識コルチゾールを用いた competitive binding assay³⁾で測定されていたが、操作が煩雑であることや液体シンチレーションカウンターを用いることなどから、限られた施設でしか測定できないという欠点があった。その後、特異性の高い抗体や ^{125}I 標識抗原の作成⁴⁾が可能となり、さまざまな cortisol binding globulin (CBG) の不活性化方法⁵⁻⁷⁾が考案されるようになって、抽出なしに直接血漿を用いて RIA によって測定出来るようになり、広く普及してきた。

一方、RIA 検査の普及とともに操作方法の簡略化を目指して、固相化抗体を用いる方法が導入されてきた⁸⁾。その代表が試験管固相法である。Amersham (旧 RCC) 社製 Amerlex Cortisol RIA Kit も Amerlex 粒子に抗体を結合させた固相法の一つで、固相法の利点を生かして考案された測定

方法であると思われる。本キットは、コルチゾールの C_3 位置換誘導体を抗原として得られた抗体を用いている点で、従来の抗体の特異性と比較して興味ある成績が期待出来る。

最近、私達は科研化学より本キットの提供を受け、検討する機会を得たので報告する。

II. 方 法

1) Amerlex Cortisol RIA Kit の組成

1 キットは 100 テストより成り、6 種類濃度 (0, 1, 4, 10, 28, 60 $\mu\text{g}/\text{dl}$) の標準コルチゾールヒト血清、 ^{125}I -コルチゾール液 (22 ml, 赤色, 10 μCi 以下) 1 バイアルおよびアマレックス抗コルチゾール抗体懸濁液 (22 ml 青色), 1 バイアルより成っている。

2) 操作方法

Amerlex Cortisol RIA Kit は被検体 50 μl に ^{125}I -コルチゾール 200 μl とアマレックス抗コルチゾール抗体懸濁液 200 μl を分注し混合する。30°C にて 1 時間反応させ、遠心分離後、上清を除去して沈渣をウェル型シンチレーションカウンターにて計測する。スパックコルチゾールキットは試験管固相化抗体を用いて B-F 分離操作を省略した測定方法であり、コルチゾールキット「第一」

* 浜松医科大学病院第二内科
受付: 56 年 3 月 19 日
最終稿受付: 56 年 10 月 21 日
別刷請求先: 浜松市半田町 3600 番地 (☎ 431-31)
浜松医科大学病院第二内科
真坂 美智子

Key words: RIA, Solid phase method, Amerlex, Plasma cortisol, Urinary free cortisol

はCBGをアルコール溶液にて変性させ、抽出することなく抗コルチゾール抗体と反応させ、ポリエチレングリコール液を用いて抗原抗体複合物を沈殿させ、計測する方法である。尿中17-OHCSは西風法にて測定した。

III. 結 果

A. 結 果

1) 反応時間の検討

37°C, 15分から5時間までの添加総放射活性(Total)に対する結合率の変化を経時的に観察した(Fig. 1)。インキュベーション時間5時間でも反応は平衡に達していなかったが、0 $\mu\text{g/dl}$ における結合率と60.9 $\mu\text{g/dl}$ における結合率の差は1時間でも30~32%と充分大きく、5時間の36~38%と大差なかった。

2) 標準曲線の再現性

キット添付の標準品濃度はロットごとに異なっていたので、代表的な標準曲線とIntercept値による変動をFig. 2に示した。0濃度における結合率(Bo/T%)はおおよそ45~50%程度であり、Intercept値のばらつきや、同一ロットの各標準濃度にお

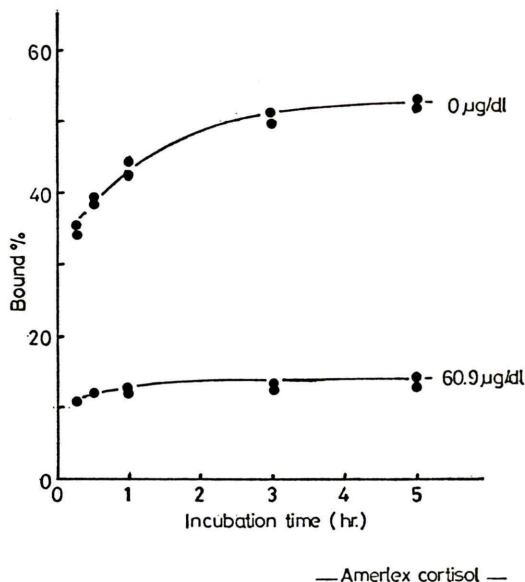


Fig. 1 Effect of incubation time on percent bound (at 37°C)

る結合率のばらつきは10%以内であった。また、Totalに対する0 $\mu\text{g/dl}$ の結合率が $47.2 \pm 0.33\%$ 、0.31 $\mu\text{g/dl}$ の結合率が $43.4 \pm 0.21\%$ 、0.625 $\mu\text{g/dl}$ で $39.8 \pm 0.40\%$ であり、ロットによって標準品濃度の表示値が異なるため一概に論ずることは出来ないが0.5 $\mu\text{g/dl}$ までは有意に測定可能と思われる。

3) 測定値の再現性

低濃度、正常濃度、高濃度領域における3種類の血清および尿の検体を同時に測定した場合のIntra-assay varianceと測定日ごとの変動。Inter-assay varianceをTable 1に示した。尿中値1 $\mu\text{g/dl}$ 付近ではややばらつきが大きい、他の濃度領域ではいずれも5~7%程度の安定した測定値が得られた。

4) 希釈試験と添加回収試験

測定法の正確性を検討する目的で、コルチゾール高値の血清および尿検査を蒸留水で希釈して測定した結果がFig. 3である。いずれも原点を通る直線が得られた。

また標準コルチゾールをプール血清(コルチゾール濃度15.2 $\mu\text{g/dl}$)に添加し、添加回収試験を行った結果をTable 2に示す。添加量30.4 $\mu\text{g/dl}$ の濃度では回収率がやや低下する傾向にあったが、他の濃度領域ではほぼ満足すべき成績が得られた。

5) スパックコルチゾールキットおよびコルチゾールキット「第一」との比較検討

本キットにて測定した検体をスパックコルチゾールキットおよびコルチゾールキット「第一」にて測定し、比較検討した。スパックコルチゾールキットとは相関係数0.956と良好な相関関係が得られた(Fig. 4)。コルチゾールキット「第一」の測定値とはややばらつきのある分布を示し、相関関係も0.863とスパックコルチゾールキットに比し、やや劣る成績であった(Fig. 5)。しかしジクロロメタンにて血清を抽出し、蒸発乾固の後緩衝液にて溶解してRIAを行い、コルチゾール「第一」と比較した結果では、 $y = 0.92x + 0.02$, $r = 0.987$ とよく相関する成績が得られた(Fig. 6)。

6) 各種ステロイドとの交叉反応試験

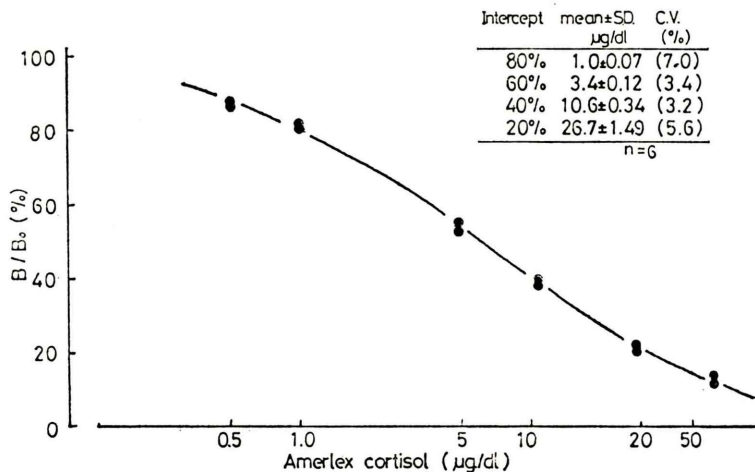


Fig. 2 Reproducibility of the standard curves.

Table 1 Reproducibility of the assay

Intraassay variance

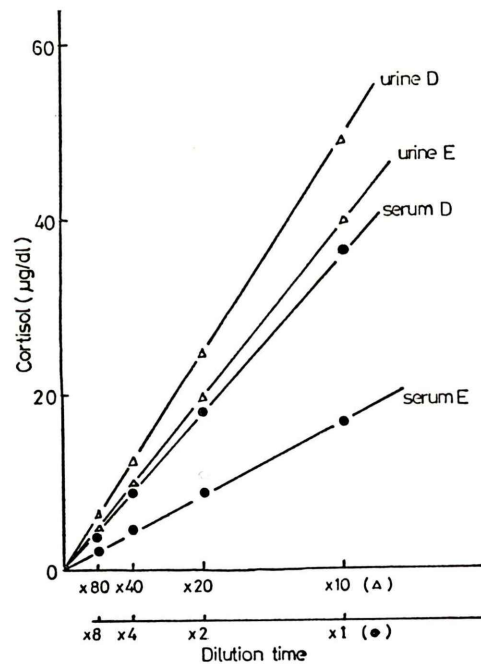
		μg/dl	%
Serum	A	2.0 ± 0.05	2.4
	B	10.6 ± 0.38	3.6
	C	25.6 ± 1.64	6.4
Urine	A	1.0 ± 0.08	8.0
	B	7.3 ± 0.42	5.9
	C	36.3 ± 0.35	1.0

n = 6

Interassay variance

	Serum			Urine		
	A	B	C	A	B	C
1	2.0	10.6	25.2	0.8	8.1	32.3
2	2.0	11.4	25.4	0.8	7.3	36.3
3	2.0	12.0	24.5	1.0	7.3	38.4
4	1.9	12.1	28.9	0.6	8.0	34.4
5	2.2	11.2	24.0	1.0	7.6	33.9
6	2.0	12.8	23.0	1.0	7.6	36.5
\bar{X}	2.0	11.7	25.2	0.9	7.7	35.3
S.D.	0.09	0.71	1.85	0.15	0.31	1.99
C.V. %	4.5	6.0	7.3	17.2	4.0	5.6

—Amerlex cortisol—



— Amerlex cortisol —

Fig. 3 Dilution test of the patient samples.

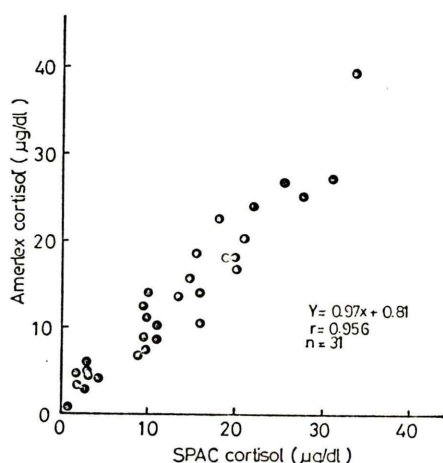
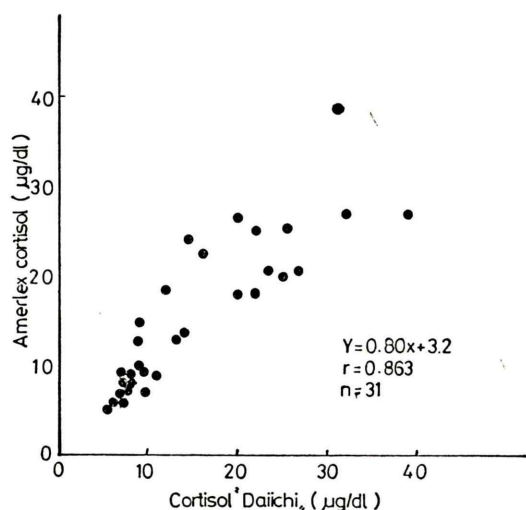
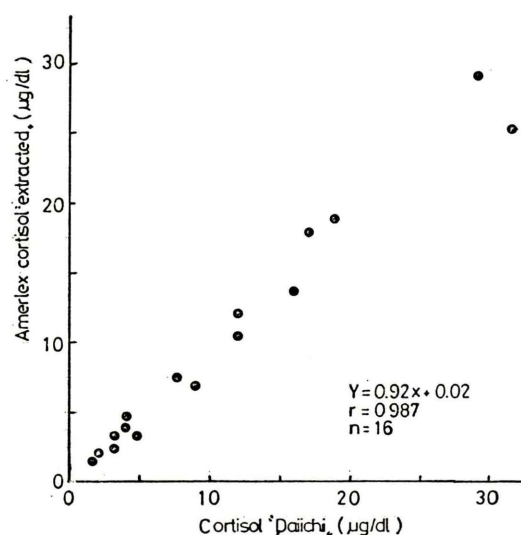
本キットに用いられている抗血清の特異性を確認する目的で、各種ステロイド水溶液を用いて ^{125}I -コルチゾールと抗血清の阻害曲線を描き、50%結合阻害に必要な濃度を算出した。コルチゾー

ルに対する親和性を100%とすると、prednisolone に対して39.8%そのメチル化誘導体である methylprednisone-21-sodium succinate に対して4.1%, cortisone に0.4%, corticosterone に0.5%, dexamethasone に0.1%の阻害を示した。

Table 2 Recovery test of additional cortisol in serum

Added μg/dl	Measured μg/dl	Recovery rate %
0	15.2	—
2.5	17.5	92.0
5.4	21.2	111.0
15.0	31.3	107.3
30.4	41.5	86.5

n=3

**Fig. 4** Comparison between SPAC Cortisol Kit and Amerlex Cortisol RIA Kit.**Fig. 5** Comparison between Cortisol Kit "Daiichi" and Amerlex Cortisol RIA Kit.**Fig. 6** Comparison between Cortisol Kit "Daiichi" and Amerlex Cortisol RIA Kit after dichloromethane extraction.**Table 3** Cross-reactivity of the anti-cortisol antibody to various steroids

Cortisol	100%
Prednisolone	39.8%
Methyl-prednisolone	4.1%
Corticosterone	0.5%
Cortisone	0.4%
Cortisol-21-phosphate	4.0%
THF	0.2% 以下
Dexamethasone	0.2% 以下

methasone に0.2%以下,そして tetrahydrocortisol に0.2%以下の交叉性を示した (Table 3).

B. 臨床的検討

1) 基礎分泌量

午前9時~10時,空腹安静時に健常人30例を採血し,その基礎値を測定した.その結果は $11.2 \pm 4.25 \mu\text{g/dl}$ (mean \pm S.D.) であった.

2) Rapid ACTH Test

正常人4例, Cushing 症候群 (副腎腺腫) 4例, 視床下部性汎下垂体機能低下症2例, ステロイド剤長期投与患者 (2次性副腎不全症) 2例について, 早期空腹時にコートロシン $250 \mu\text{g}$ を静注し, 投

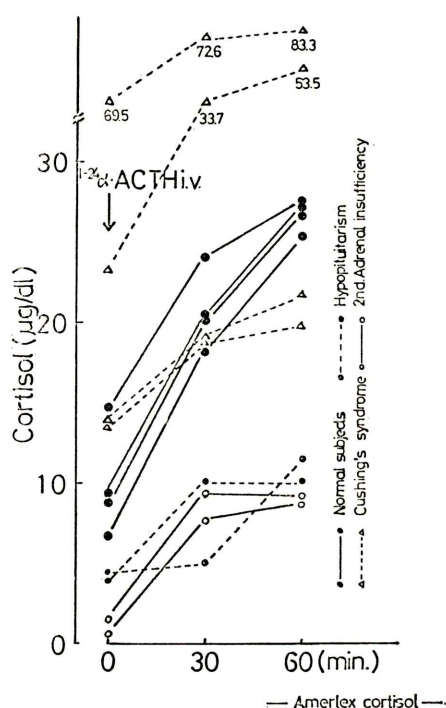


Fig. 7 Rapid ACTH Test.

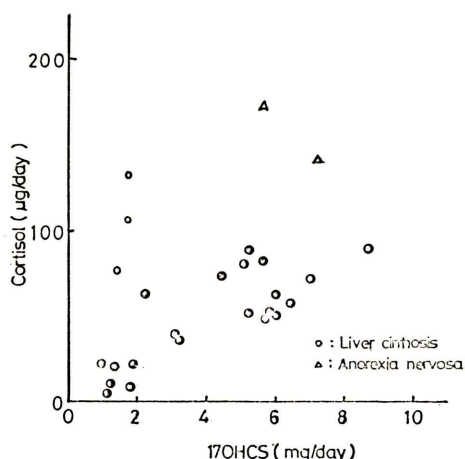


Fig. 8 Comparison between urinary excretion values of free cortisol and those of 17-OHCS.

与前、30分後、60分後に採血してコルチゾールを測定した。正常人では投与前 $9.9 \pm 2.87 \mu\text{g/dl}$ 、30分後に $20.7 \pm 2.07 \mu\text{g/dl}$ 、60分後には $26.2 \pm 0.69 \mu\text{g/dl}$ の反応性を示した。Cushing 症候群 4 例で

は前値が $14.1 \mu\text{g/dl}$ 、 $13.8 \mu\text{g/dl}$ 、 $23.5 \mu\text{g/dl}$ 、 $69.5 \mu\text{g/dl}$ と正常高値から高値をとり、ACTH にも反応した。2 次性副腎不全症、汎下垂体機能低下症のいずれも前値が低く、ACTH に対する反応性も乏しかった (Fig. 7)。

3) 尿中遊離コルチゾール排泄量と 17-OHCS 排泄量との比較

正常人、肝硬変症などを含む 26 例について、一日蓄尿中の一部 ($50 \mu\text{l}$) を直接検体として本キットによりコルチゾールを測定し、17-OHCS の測定値と比較検討した (Fig. 8)。26 例中 21 例については $y = 10.0x + 6.9$ 、 $r = 0.824$ とよい相関を示した。肝硬変症や肝硬変を伴う肝癌あるいは Anorexia nervosa では正常者と異なった動態を示した。図には示してはいないが血中コルチゾール高値であった Cushing 症候群 2 例 ($23.5 \mu\text{g/dl}$ 、 $69.5 \mu\text{g/dl}$) では尿中遊離コルチゾール値も $600 \mu\text{g/dl}$ 以上の高値であった。

IV. 考 案

血中コルチゾール値の測定は蛍光法、CPBA 法、RIA 法と簡便になるにつれて、測定時間の短縮化のためさまざまな工夫が試みられるようになり、近年では抗体を試験管に塗布したコーティング法が応用されるようになってきた⁸⁾。本キットも微細な Amerlex 粒子を用いた固相法であり、Bound 型と Free 型を分離する操作が簡便で、従来の RIA に必要であった分離剤を要しない点に特徴がある。また一般的にステロイドホルモンの RIA では抽出操作が必要であるため、他のホルモンに比して測定間のばらつきが大きくなり、均一な測定値が得られにくいことが指摘されていた。したがって抽出操作を省略することは、測定操作の簡略化とともに再現性の良い値を得る最大の利点となる。しかし、ヒト血漿中には CBG が存在するため、コルチゾール測定に影響を及ぼす CBG を除去する必要がある。この CBG 不活性化の方法にはアルコール添加法⁹⁾、pH 5 以下の緩衝液を用いる方法¹⁰⁾などが採用されているが、本キットではあらかじめ ^{125}I -コルチゾール液 (pH 6.0) に加えられ

たANSによって不活性化する方法が採用されている。本キット測定値とアルコール処理するコルチゾールキット「第一」の測定値とはよく相関していたが、ジクロロメタンにて抽出後測定した場合、より相関性が増すという成績が得られた。一方、pH 3.3の緩衝液を用いているスパックコルチゾールキットとは高い相関関係が得られており、これらの結果から考えて、それぞれの方法におけるCBG不活性の程度についてはより詳細な検討が必要であると思われる。

従来からRIAによる測定では、測定値は蛋白量に依存することが多く、希釈試験を実施した場合、蛋白量の減少とともに理論値より低値に測定されることがあるため、牛血清アルブミン溶液や γ -グロブリン溶液が希釈液として用いられている^{11,12)}。本測定でも高コルチゾールの検体について希釈試験を実施したが、蒸留水で希釈しても理論値と一致し、原点を通る直線が得られ、蛋白量に依存しない系であることが確認された。この結果は先に報告したAmerlex T3の成績¹³⁾とよく一致しており、回収試験の成績からも信頼性の高い測定系であると思われた。

種々の測定法と同様、RIAでも反応が平衡に達する状態でB-F分離操作を行うのが理想であるが、最近では測定時間の短縮化のため、十分な結合率が得られる時点を反応停止時間に設定しているキットが多くなりつつある。本キットも5時間で反応はゆるやかに進行しており、平衡には達していない。しかし0 $\mu\text{g/dl}$ の結合率($\text{Bo/T}\%$)が30分で40%程度に達している点や、測定間の変動係数も小さいことから、37°C、60分の反応条件でも充分と思われた。

RIAの最大の特徴は、特異性の高い抗体を用いて測定することであり、特に抽出を省略したステロイドホルモンの測定では、他の生体内ステロイドに反応せず、目的とするホルモンと結合する抗体が理想的である。コルチゾールキット「第一」に用いられていた¹⁴⁾抗cortisol-21-BSA抗体は、11-deoxycortisol 26%、17-OHprogesteroneに24%の交叉反応性を示し、特異性はあまり高くなか

った。最近、生体内ステロイドにあまり交叉性を示さない反面、よく治療の目的で投与されるprednisoloneに対して非常に高い親和性を示す抗cortisol-6-BSA抗体を用いたキットが市販されている¹⁵⁾。本キットに用いられている抗体もcortisone, corticosteroneに対しては5%以下の交叉性しか持たないが、prednisoloneに対して39.8%程度の反応性を示すことに注意を要する点で抗cortisol-6-BSA抗体と類似している。

一方、副腎皮質機能検査として尿中17-OHCS排泄量の測定が実施されているが、多量の有機溶媒を用いる点や、測定に2日間要する点など測定者の負担が大きい。尿中遊離コルチゾールは血中遊離コルチゾールの動態を反映すると考えられており^{16,17)}、血中と同時に測定可能であれば、精度的にも有利である。

従来、尿中コルチゾールの測定は、ジクロロメタンにて抽出後、薄層クロマトグラフィーにて分離する方法^{18,19)}や、LH-20カラムにて2分画測定する方法²⁰⁾が採用されていた。

本キットは、他のステロイドホルモンに対する交叉反応性が低い抗体を用いている点を考慮して、尿を抽出することなく直接測定したところ、17-OHCSとよく相関する成績が得られた。林らはスパックコルチゾールキットを先いて、尿をジクロロメタン抽出後、グリシン緩衝液に溶解し測定した結果、17-OHCSとよく相関したと報告している¹⁰⁾。また武良らも尿中遊離コルチゾールを栄研ICL製コルチゾールキットを用いて検討している²¹⁾。その報告によれば、isotope dilution methodによるコルチゾール分泌量と比較し、尿検体を直接測定する場合より、ジクロロメタン抽出後測定した方がよく相関することを指摘している。われわれの成績では抽出操作を省略しても17-OHCSとよく相関し、また添加回収試験や希釈試験の成績から、測定阻害因子の影響も少なく、再現性の点からも臨床応用は可能と思われた。Cushing症候群では17-OHCS、尿中遊離コルチゾール共に高値であり、肝硬変の3症例では17-OHCSが低値～正常値であるかにもかかわらず、

尿中遊離コルチゾールは高値傾向であった。また Anorexia nervosa の 2 例では 17-OHCS は正常範囲にあるにもかかわらず、コルチゾールは高値傾向であった。これらの事実から RIA を用いた尿中遊離コルチゾールの測定は、17-OHCS とは違った意味で臨床的価値があると思われた。Anorexia nervosa の例の解離については原因不明で肝機能などの check も含めて検討が必要と思われる。

V. ま と め

- 1) Amerlex Corisol RIA Kit は検体量 $50\mu\text{l}$ と少量で測定可能であり、しかも Amerlex 粒子が微細であるため自動分注器の使用も可能である。
- 2) 抗コルチゾール抗体の特異性も高く、ANS を用いているので抽出操作が省略され、簡便な方法である。
- 3) 添加回収試験や希釈試験、再現性の成績から、極めて信頼性の高い方法であり、他の方法で得られた値ともよく相関していた。
- 4) 臨床的にも本キットを用いた血中コルチゾールの基礎値ならびに ACTH 負荷に対する反応をしらべることは、Cushing 症候群の診断、視床下部、下垂体、副腎機能不全症の screening test として有効であった。
- 5) 尿中遊離コルチゾールの測定値も 2, 3 の疾

患以外では 17-OHCS 排泄量とよく相関し、臨床応用が可能であった。本キットでは尿を抽出せず、直接使用しても阻害因子の影響は受けず、この点でも簡便である。

文 献

- 1) De Moore P, et al: Acta Endocrinol **35**: 219, 1960
- 2) Rudd B.T, et al: J Endocrinol **27**: 317, 1963
- 3) Murphy B.E.P: J Clin Endocrinol Metab **27**: 973, 1967
- 4) Medgley A.R, et al: Acta Endocrinol Supple **147**: 320, 1970
- 5) Foster L.B, et al: Clin Chem **20**: 365, 1974
- 6) 吉見輝也, 他: 臨床化学, **3**: 53, 1974
- 7) 西啓子, 他: 核医学, **13**: 469, 1976
- 8) Catt K, et al: Biochem J **100**: 31c, 1966
- 9) Abraham G.E, et al: Analyt Letters **5**: 757, 1972
- 10) Seal V.S, et al: J Biol Chem **237**: 3136, 1962
- 11) 西啓子, 他: 核医学, **13**: 469, 1976
- 12) 真坂美智子, 他: Biochim J **4**: 375, 1980
- 13) 真坂美智子, 吉見輝也: ホルモンと臨床, **29**, 623 1981
- 14) 吉見輝也, 他: 最新医学, **30**: 774, 1975
- 15) 南野正隆, 他: ホルモンと臨床, **28**: 1415, 1980
- 16) Lindholm J: Scand J clin Lab Invest **31**: 115, 1973
- 17) Han T.H, et al: J Clin Endocri Metab **30**: 443, 1970
- 18) Rudder H.J, et al: J Clin Endocri Metab **35**: 219, 1972
- 19) 小田桐恵美: 東京女子医科大学雑誌, **45**: 494, 1975
- 20) 林恒司, 他: 現代の診療, **22**: 1249, 1980
- 21) 武良哲雄, 他: 臨床化学, **9**: 306, 1980