

《原 著》

人成長ホルモンの簡易超微量定量法の 開発とその臨床応用

小 川 紀 雄* 高 原 二 郎* 大 藤 真*

はじめに

Radioimmunoassay (RIA) の開発以来10余年の間に血漿人成長ホルモン (human growth hormone: HGH) 値測定のために種々の RIA の変法が工夫され、かつまた用いられてきた^{1), 2)}。現在用いられているすべての RIA は incubation 終了後に抗体結合型ホルモン (bound: B) と遊離型ホルモン (free: F) とを分離する必要があり、その目的のために2抗体法、クロマト電気泳動法、塩析法、デキストラン炭末法その他多くの方法が用いられている。

固相法 RIA は Catt ら³⁾により HGH の測定法として最初に報告されたが、水洗という簡単な手技のみでBとFの分離が可能な特異な方法であり、その後他のホルモンの血中濃度の測定に応用されている⁴⁾⁻⁷⁾。

本稿は、先に報告⁸⁾した plastic 製 microtiter tray を用いる固相法 RIA を一部改変した、血漿 HGH の超微量定量法の開発に関するものである。また、従来の RIA では基礎 HGH 値のみの測定では正常者と下垂体機能低下症患者とを区別し得ないとされてきた^{9), 10)}が、本法を用いれば基礎 HGH 値測定のみから両者の鑑別が可能であったので、本法の臨床応用による知見も併せ報告す

る。

原 理

RIA は一般に、抗血清を希釈すればするほど、測定可能な範囲は狭くなるものの、競合する抗原量は少なくなり、測定の感度をあげることができる^{11), 12)}という性質がある。著者らは先に、B・Fの分離方法の1つとして plastic 製 microtiter tray を用いる HGH 固相法 RIA を報告した^{8), 13)}が、本報告では最少測定感度の上昇を目的として、RIA の一般的性質に従って、抗血清をきわめて低濃度にまで希釈した固相法 RIA の測定系を設定した。

方 法

1) plastic 製 disposable microtiter tray

内容量 0.2ml の cup 96個を有する米国 Linbro 社製の microtiter tray (S-MRC 96) を70%エタノールに約10分間浸した後、水洗して固相として使用した。

2) 抗 HGH 抗体

抗 HGH 家兎血清はダイナボット RI 研究所より提供を受けたものを使用した。この抗血清は先に報告した通常の固相法 RIA^{8), 13)}や2抗体法 RIA では約2万倍希釈で用いられるが、本法においては牛血清アルブミンを含まない 0.05 M phosphate buffer (pH7.5) により8万倍に希釈して用いた。

3) ¹²⁵I-HGH

ダイナボット RI 研究所製の市販の ¹²⁵I-HGH

* 岡山大学医学部第三内科 (主任: 大藤 真教授)
受付: 50年1月8日

別刷請求先: 岡山市鹿田町 2-5-1 (〒700)

岡山大学医学部付属病院第三内科

小 川 紀 雄

(specific activity 109 mCi/mg) を使用した。

Table 1 Effect of scratching the surface of the antibody-coated microtiter tray on bound radioactivity.

	(No.)	B cpm (Mean±SE)
untreated	(4)	1221.8±19.9
scratched by the pipet tip	(4)	1216.3±8.5
scratched by the injection needle	(4)	1305.8±15.5

Table 2 Estimate of standard deviation(s) from determination of duplicate pairs in various concentration range of plasma HGH, and the fiducial limits for each range.

HGH concentration range (pg/ml)	No. of duplicate pairs	s	Fiducial limits (P=0.05) (pg/ml)
0—99	25	20.1	Mean±28.4
100—499	59	71.4	Mean±99.9
500—999	60	94.4	Mean±132.1
1000—4999	173	160.0	Mean±221.7

4) 標準 HGH

HGH (NIH-GH-HS 1147) を95%馬血清にて希釈して標準曲線作成に用いた。

5) 測定方法

Microtiter tray の各 cup に等量 (0.2ml) の希釈抗血清を入れ室温 (18°C) で24~48時間 coating する。抗血清を吸引除去した後、蒸留水で2回洗浄する。なお coating に使用して回収した希釈抗血清は少なくとも2回は再使用が可能である⁸⁾。次いで、0.1ml の標準 HGH 液または血漿サンプルと 0.1ml の ^{125}I -HGH (10^4 cpm/0.1ml) を各 cup に入れ、室温で48時間 incubate する。incubation 終了後 cup の内容を捨て、蒸留水で2回洗浄した後、各 cup をハサミで切り離し、well 型カウンターで cup ごと放射エネルギーを測定する。抗血清を coating していない cup への ^{125}I -HGH の非特異的吸着は添加放射エネルギーのわずか 0.5% にすぎなかった。

なお、すべての測定は duplicate で行った。

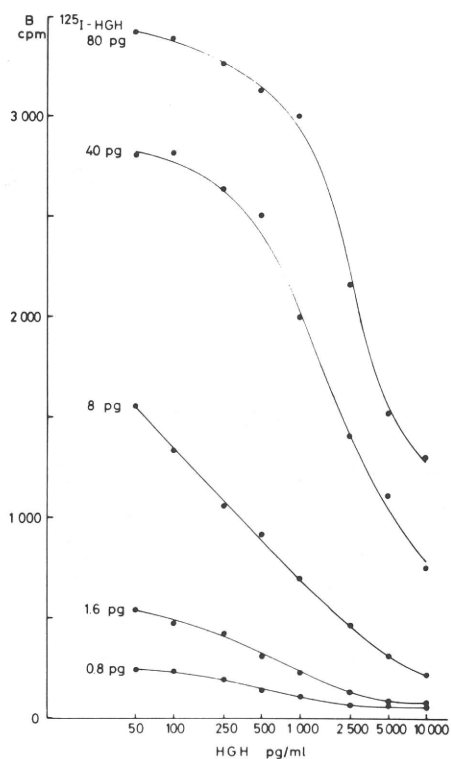


Fig. 1 Effect of added doses of ^{125}I -HGH on the standard curve.

6) 血漿 HGH 値の臨床的検討

基礎 HGH 値を求めるために、正常男子23名、正常女子23名および下垂体機能低下症患者21名をそれぞれ1夜絶食させて午前9時に採血した。

また、50g ブドウ糖経口負荷試験 (50g GTT) を正常男子13名および正常女子13名について施行し、経時的に採血して HGH を測定した。

結 果

1) HGH 超微量定量法の確立

まず基礎的検討では、抗 HGH 血清の coating 時間 24, 48, 72, 96時間について B% は時間とともにわずかながら上昇を示すものの大差なく、coating は24~48時間で十分であった。coating された抗血清の被膜は比較的丈夫で、自動マイクロピペットのチップあるいは注射針で2回 X 字状に scratch しても B カウントは不変であった (Table

1). B%は incubate 時間と共に上昇するが, 48時間を越えるとその上昇度は軽度となるため, 48時間の incubate 時間を採用した. 添加する ^{125}I -HGH の量による標準曲線の変化を Fig. 1 に示す. 中央の 8 pg/ml は通常の 2 抗体法の市販 kit で使用する濃度とほぼ同じであり, この量が最も B カウントの落差が大きく, かつ低濃度域まで測定が可能であった.

logit-log paper 上に記した標準曲線の一例を Fig. 2 に示すが 25~2000 pg/ml の間で直線関係が見られた. また, 各点 5 本ずつで測定した標準曲線の成績から, 0 と 25 pg/ml との間に 5% 以下の危険率で有意差があり, 最少検出感度は 25 pg/ml であることが確かめられた.

317 検体の血漿サンプルを各々 duplicate で測定し, Brown らの方法¹⁴⁾に従って本測定法の評価を行い, 各濃度における標準偏差と信頼限界を Table 2 に示す. この結果, 血漿サンプルの測定値より求めた最少検出量は 28.4 pg/ml で, 上述の標準曲線より求めた最少検出量とほぼ一致する. さらに maximum percentage error $\pm 50\%$ を見込むと実用面での最少検出濃度は 56.8 pg/ml である.

下垂体機能低下症患者血漿または正常人プール血漿に標準 HGH を添加して測定した場合の回収率は 83.2 ~ 114.5% であった.

正常人プール血漿および下垂体機能低下症一例の同一 assay における変動係数はそれぞれ 8.3%, 12.3% であり, 異なる assay における変動係数はそれぞれ 15.1%, 23.6% であった.

また ACTH 250 ng/ml, TSH 250 $\mu\text{U}/\text{ml}$, LH, FSH 各々 250 mU/ml まで添加しても測定値に影

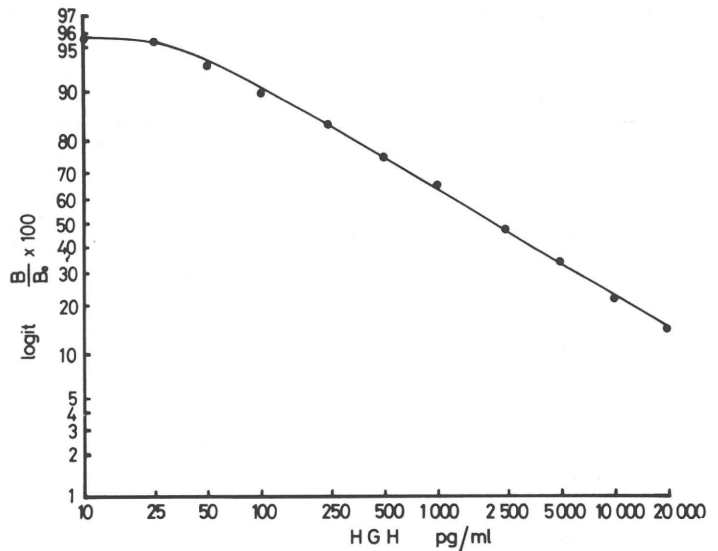


Fig. 2 Standard curve constructed by plotting on the logit-log paper.

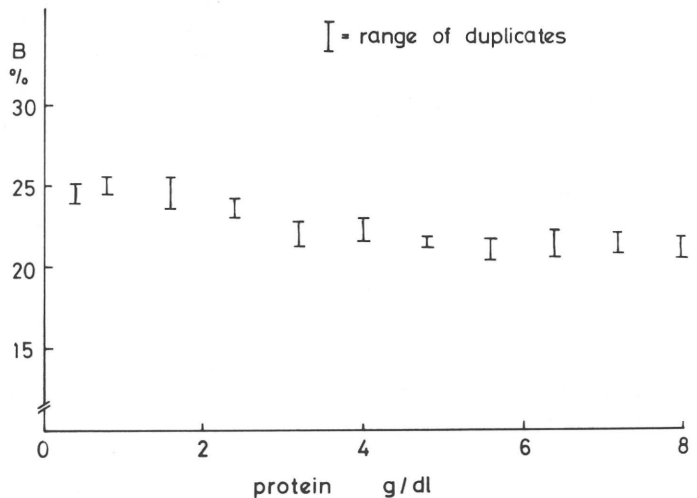


Fig. 3 Effect of the concentration of protein in samples on bound radioactivity.

響はみられなかった.

検体中の蛋白濃度の測定値におよぼす影響をみたが, 少なくとも生体の通常の血清蛋白濃度の範囲では測定値に大きな影響がみられなかった (Fig. 3).

Table 3 Basal plasma HGH levels after an overnight fasting in normal subjects and in patients with hypopituitarism; comparison between basal plasma HGH levels obtained with this solid-phase method' and that obtained with the double-antibody method in analysis of the same plasma samples.

basal plasma HGH (pg/ml)					
normal males		normal females		hypopituitary patients	
double antibody method	solid phase method	double antibody method	solid phase method	double antibody method	solid phase method
1,200	1,400	5,000	2,660	800	960
2,500	1,295	2,700	1,425	1,400	810
800	2,860	6,500	6,110	2,600	635
3,600	4,250	2,100	3,545	1,100	435
900	790	2,200	2,550	1,200	178
4,800	6,550	5,900	4,785	1,200	480
900	1,000	3,000	2,380	1,700	230
1,000	1,120	1,700	1,075	1,200	160
900	1,730	4,500	3,900	1,800	710
1,000	960	2,300	2,660	2,300	134
1,000	1,300	1,800	1,615	1,100	650
1,000	1,030	5,300	3,100	1,100	960
1,000	2,070	2,800	2,080	1,800	590
800	1,305	1,500	700	1,100	768
3,200	2,920	2,700	1,800	2,000	381
2,100	1,970	1,000	1,120	1,300	280
8,000	5,750	1,700	2,350	800	270
2,000	1,625	5,600	2,755	1,200	170
2,500	2,500	4,900	2,510	1,700	725
1,600	1,900	1,800	1,862	1,000	431
1,220	1,000	3,800	3,100	600	97
1,900	830	5,700	3,060		
2,900	2,145	1,400	2,400		
Mean 2,036	2,100	3,300	2,589	1,376	484
SD 1,643	1,491	1,690	1,189	498	282
_____ N.S. _____		_____ N.S. _____		_____ P<0.001 _____	

2) HGH 超微量定量法の臨床応用

正常男子23名, 正常女子23名, 下垂体機能低下症21名の基礎血漿サンプルを, 本法と通常の2抗体法(ダイナボットRI研究所製の市販のkitを用いた)とで測定した結果の比較が Table 3 である。正常男女ともに, 本法と2抗体法とによる測定値の間に有意差はみとめられず, 一方, 21例の下垂体機能低下症患者においては本法による測定値は

2抗体法による測定値に比較して有意に ($p<0.001$) 低く, Mean 484 ± 282 (SD) pg/ml であった。下垂体機能低下症患者の基礎 GH 値の Mean $+2$ SD は 1.047 pg/ml で, 正常人46例中この値以下に測定されたものはわずか6例にすぎず, 本測定法を用いれば負荷試験を行わなくとも, 安静空腹時の検体のみで下垂体機能低下症患者のスクリーニングが可能であることが示された。

次に 50g GTT 時にどの程度まで血漿 HGH が抑制されるかについて検討した。ブドウ糖負荷に対して血漿 HGH 値が subnanogram にまで抑制されたのは、正常男子13例中1例と正常女子13例中2例の合計3例のみであり (Fig. 4), このことは正常人ではブドウ糖を負荷しても血漿 HGH は完全には抑制されてしまわないことを示している。

考 按

現在まで広く使用されてきた radioimmunoassay (RIA), ことに2抗体法では正常人の基礎 HGH 値が時に測定感度以下になり、あるいは下垂体機能低下症患者血漿の測定値がクロマト電気泳動法による測定値より高い値が得られる²⁾ などして、基礎 HGH 値の測定のみで正常人と下垂体機能低下症患者とを区別するのは困難であるというのが従来の定説であった^{2), 9), 10)}。

ところで、固相法 RIA は最初 HGH 測定法として Catt ら³⁾ により報告されたが、B・F の分離が水洗という簡単な手技で可能であるという利点から、human placental lactogen⁵⁾, luteinizing hormone⁴⁾, insulin⁶⁾ および prolactin⁷⁾ の測定にも応用されている。固相としては粉末状³⁾, 小円板状^{4), 15)}, 試験管型^{5), 6), 7)} などが用いられていたが、disposable microtiter tray を用いる^{8), 13), 16), 17)} とさらに手技が簡単であり、また費用もプラスチック試験の1/10以下で済む。

固相法 RIA の感度としては、Catt ら³⁾ は推計学的な検討は加えていないが、粉末状固相法 RIA で血漿 HGH の最少感度を 0.4 ng/ml とし、しばしば 0.1 ng/ml まで測定できたと報告しており、従来の RIA の報告¹⁸⁾ より高感度である。これは、damaged hormone が固相法 RIA 測定系には関与しない^{3), 5)} ことと、抗体として固相の表面に固着した抗血清を使用するために、抗原抗体反応が2次元の限られた場で行われるので競合する抗原量が少なく、したがって感度が他の RIA より高くなる傾向にあるためと考えられる。

著者らは HGH の RIA の B・F 分離方法の一

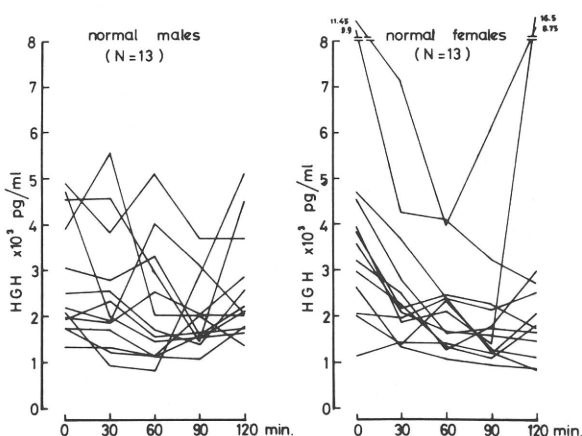


Fig. 4 Plasma HGH concentrations during a standard oral glucose tolerance test (50gm) in normal subjects.

つとして plastic 製 disposable microtiter tray を用いる固相法 RIA をすでに報告した^{8), 13)} が、本報告においては、先の原理の項で述べたごとく、RIA の一般的な性質^{11), 12)}, すなわち、同じ抗体では抗体濃度が低くなるにつれて競合する抗原量が少なくなり、標準曲線のスロープが急峻になり、測定感度は上昇するという性質を利用して、抗血清を先の著者らの報告において使用した濃度のさらに4倍に希釈して低濃度部分の測定感度を高めることに成功した。この場合、測定可能範囲は当然狭くなるが、著者らの基礎 HGH 値を測定する、という目的にとっては何らの不都合はない。2抗体法においても使用抗体量を減ずれば標準曲線のスロープを急峻にすることは可能であるが、2抗体法の場合は、tracer damage が測定系に大きく関与する²⁾ ので、必ずしも測定感度を著しく上昇させることはできない。本法の標準曲線上の最少検出感度は 25 pg/ml であり、血漿測定のそれは 56.8 pg/ml ときわめて高感度であった。このような標準物質の測定より得られた最少検出感度と血漿測定より得られた最少検出感度とに差異のあることはすでに Hunter and Greenwood¹⁰⁾ により報告されているが、その原因は必ずしも明らかでない。

本法を用いれば、Table 3 に示したように負荷

試験を行わなくとも基礎 HGH 値の測定のみで正常者と下垂体機能低下症患者の鑑別のスクリーニングが可能であった。しかも興味あることに、下垂体機能低下症患者の基礎 HGH 値は決して 0 でなく、 484 ± 282 pg/ml という微量ながらも HGH が検出された。最近の HGH radioreceptor assay (RRA) の進歩により血中での RRA と RIA によって得られる HGH 値に解離のみられることが報告されており^{19), 20)}、今回検出された HGH は免疫活性は有するものの、生物活性をもたない可能性も考えられるが、その詳細については今後解明されるべき課題と考えられる。

一方、ブドウ糖は正常な基礎 HGH 値を抑制することが知られている^{21), 22)} が、上述のように従来の RIA の感度の点から、どの程度にまで抑制されるのかは不明であった。正常人において 50g ブドウ糖負荷時の血中 HGH 値を本法を用いて測定したが、大部分の例では下垂体機能低下症患者の基礎 HGH 値の Mean+2 SD 以下までは低下せず、高血糖は正常人の HGH 分泌を低下せしめるものの、その最低値はなお下垂体機能低下症患者の基礎 HGH 値より大であることを明らかにした。

まとめ

抗体を coating した plastic 製 disposable microtiter tray を用いる固相法 radioimmunoassay を応用して、ルーチンに行いうる HGH 超微量定量法を開発し、本測定法を用いて安静空腹時 1 回採血検体の測定により、下垂体機能低下症患者検出のスクリーニングが可能であることを示した。

本論文要旨は第13回日本核医学会総会シンポジウム(名古屋)において発表した。

(謝辞: 抗 HGH 家兎血清の提供を受けたダイナボット RI 研究所に感謝します。)

文 献

- 1) 出村 博, 出村黎子, 飯野正典, 布川 喬, 三浦清 : Radioimmunoassay-GH. 日本臨床 27 : 319—325, 1969
- 2) 岡田義昭 : HGH 測定法の実際と問題点. 総合臨床 19 : 1126—1136, 1970
- 3) Catt KJ, Niall HD and Treagear GW : Solid-Phase Radioimmunoassay of Human Growth Hormone. Biochem J 100 : 31C—33C, 1966
- 4) Catt KJ Niall HD, Treagear GW and Burger HG : Disc Solid-Phase Radioimmunoassay of Human Luteinizing Hormone. J Clin Endocrinol 28 : 121—126, 1968
- 5) Catt KJ and Treagear GW : Solid-Phase Radioimmunoassay in Antibody-Coated Tubes. Science 158 : 1570—1572, 1967
- 6) Colt EWD, Becker KL and Quantrale AC W : A Rapid Radioimmunoassay for Insulin. Amer J Clin Pathol 55 : 40—42, 1971
- 7) Fell LR Beck C. Brown JM Catt KJ, Cumming IA and Goding JR : Solid-Phase Radioimmunoassay of Ovine Prolactin in Antibody-Coated Tubes. Endocrinol 91 : 1329—1336, 1972
- 8) 古野勝志, 小川紀雄, 高原二郎, 大藤 真 : 固相法 Radioimmunoassay による人成長ホルモンの測定法. ホと臨床 21 : 1285—1288, 1973
- 9) Glick SM, Roth J, Yalow RS and Berson SA : Hypoglycemia : A Potent Stimulus to Secretion of Growth Hormone. Nature 199 : 784—785, 1963
- 10) Hunter WM and Greenwood FC : A Radio-Immunoelectrophoretic Assay for Human Growth Hormone. Biochem J 91 : 43—56, 1964
- 11) 鎮目和夫, 齊藤十九子 : Radioimmunoassay (鎮目和夫, 熊原雄一編), 朝倉書店, 東京, 1970, p. 3.
- 12) 入江実 : ラジオイムノアッセイ (入江実編), 講談社, 東京, 1974, p. 3.
- 13) 小川紀雄, 古野勝志, 大藤真 : 固相法 radioimmunoassay によるヒト成長ホルモン測定法の基礎的検討. 医学のあゆみ 85 : 540—541, 1973
- 14) Brown JB, Bulbrook RD and Greenwood FC : An Evaluation of a Chemical Method for the Estimation of Oestriol, Oestrone and Oestradiol-17 β in Human Urine. J Endocrinol 16 : 41—48, 1957
- 15) Catt KJ : Radioimmunoassay with Antibody-Coated Discs and Tubes. Acta endocr. (Kbh) 63 (Suppl. 142) : 222—246, 1969
- 16) 竹田洋祐, 池窪勝治, 深瀬政市, 森徹, 鳥塚莞爾, 浜田哲 : 固相法ラジオイムノアッセイによるヒト TSH 測定に関する研究. 日内分泌誌 47 : 843, 1972 (抄録)
- 17) 永山洋一, 小林きみえ, 中野裕, 深瀬政市, 鳥塚莞爾 : Plastic の Microtiter Plate を用いる Human Luteinizing Hormone の Solid-Phase Radioimmunoassay. 日内分泌誌 47 : 918, 1972 (抄録)
- 18) 鎮目和夫 : 下垂体性こびと症, 末端肥大症, 巨人症, Cushing 病, 汎下垂体機能低下症. 内科 33 : 304—309, 1974

- 19) Jacobs LS and Herington AC : Human Growth Hormone in Acromegaly : Immunochemical Heterogeneity and Receptor Inactivity. Abstract #158, 56th Annual Meeting of the Endocrine Society, U.S.A., June, 1974
- 20) Gordon P, Lesniak MA and Hendricks CM : Radioreceptor and Gel Filtration Characterization of Plasma Growth Hormone in Disease States. Abstract #157, *ibid*, 1974
- 21) Roth J, Glick SM, Yalow RS and Berson, SA : Hypoglycemia, a Potent Stimulus to Secretion of Growth Hormone. *Science* **140** : 987—988, 1963
- 22) Hunter WM and Greenwood FC : Studies on the secretion of human-pituitary-growth hormone. *Brit Med J* **1** : 804—807, 1964

Summary

Routine Ultramicro-Measurement of Human Growth Hormone in Plasma by Solid-Phase Radioimmunoassay and its Clinical Application

Norio OGAWA, Jiro TAKAHARA and Tadashi OFUJI

*Third Department of Internal Medicine, Okayama
University Medical School, Okayama*

The development and application of the method for the ultramicro-measurement of human growth hormone (HGH) in plasma based on the solid-phase radioimmunoassay (RIA) by using antibody-coated disposable microtiter trays was reported. By further reduction in the amount of antibody with corresponding increase in the period of incubation, greater sensitivity has been achieved. 'This method' has adequate sensitivity and precision for routine ultramicro-measurements of plasma HGH concentration, and is relatively simple to perform. The lower limit of sensitivity for purified HGH was 25pg/ml ($P < 0.05$). The precision of the measurement of HGH in plasma has been calculated, and the quantitative sensitivity of the method derived from the results given by its routine use was 56.8pg/ml ($P < 0.05$).

There was no statistical significance between

the basal HGH level obtained from this method and that from double-antibody RIA in normal subjects. On the other hand, the mean basal plasma HGH level after an overnight fasting in 21 hypopituitary patients was 484pg/ml (± 282 ; 1 SD) by this method, and this was significantly lower ($P < 0.001$) than 1376 pg/ml (± 498 ; 1 SD) by double-antibody RIA. These data show that determination of basal plasma HGH levels by this method is of much value in the diagnosis of hypopituitarism.

Plasma HGH concentrations were determined by this method during standard oral 50g glucose tolerance tests in normal subjects, and there was a distinct decline but not reaching the sub-nanogram range. Thus high concentrations of blood glucose could not suppress completely HGH secretion in normal subjects.