

《使用経験》

ACTH Radioimmunoassay Kit (RCC) の臨床応用 に関する検討

中 川 昌 壮* 宮 川 勇 生**

I. はじめに

血中の脳下垂体副腎皮質刺激ホルモン(adrenocorticotrophic hormone: ACTH) はきわめて微量であるため、従来の bioassay では正確を期し難いものであったが、近年の radioimmunoassay 法の開発、普及にともなって ACTH の radioimmunoassay も可能となった。今回、著者らは英国 The Radiochemical Centre (RCC) 製の“ACTH immunoassay kit”を使用して若干の基礎的ならびに臨床的検討をおこなうことが出来たので、その結果を発表する。

II. 測定法

RCC 製“ACTH immunoassay kit”を用いた。

1. 測定法の概要

1) ACTH の抽出：検体の血清ならびに標準曲線作成用試料 2～8 ml を吸着ガラス粒 100 mg の入った抽出用ポリスチレン遠沈管に入れ、rotator にて 30 分間回転攪拌混和して ACTH を glass に吸着させる。遠沈して上清を除去したのち、その glass を蒸留水と IN 塩酸にて洗浄する。そののち 50% アセトン水を加え、再度混和することにより、glass から ACTH を溶出する。こ

の ACTH 含有アセトン水溶液を蒸発用チューブに移し、55°C 恒温槽中で窒素ガスを吹きつけながら蒸発乾固する。

2) radioimmunoassay：上記の乾固物に少量(200～700 μ l) の緩衝液を加えて溶解する。このようにして抽出 ACTH 含有試料 50～100 μ l をアッセイチューブ(容量 0.5 ml) に入れ、duplicate で測定した。このチューブに抗血清 100 μ l を加え、混合後第一次インキュベーション(2～4°C, 16～18時間)を行なう。さらに、 125 I-ACTH 溶液 100 μ l を加え、充分混合したのち第二次インキュベーション(2～4°C, 6～8時間)を行なう。charcoal 懸濁液を加えて混和すると、遊離型 ACTH を吸着する結果、結合型は遠沈後の上清液中に移り、両者の分離をおこなうことが出来る。上清液を吸引除去したあと、沈澱物の charcoal に含まれる放射能を計測し、同時に処理して求めた標準曲線より ACTH 濃度を算出する。

III. 検討対象ならびに成績

A. 標準曲線の再現性に関する検討

本 kit による standard curve の再現性について、6 回の測定を試み、検討した。

ACTH を 800 pg/ml, 400 pg/ml, 200 pg/ml, 100 pg/ml, 50 pg/ml, 0 pg/ml 含有する場合のそれぞれの bound radioactivity の total radioactivity に対する ratio $\left(\frac{B}{T} \times 100\right)$ は、それぞれ 17.79 \pm 1.24% (mean \pm S.D.), 25.78 \pm 1.00%, 32.98 \pm 2.21%, 37.67 \pm 1.12%, 42.10 \pm 1.13%, 45.70 \pm 1.21% であった。縦軸に B/T (%) を、横軸に ACTH 濃度をとってプロットしてみると、

* 熊本大学医学部第三内科

** 同産婦人科

受付：50年8月11日

採用：51年1月29日

別刷請求先：熊本市本荘1の1の1 (〒860)

熊本大学医学部第三内科

中 川 昌 壮

Table 1 Reproducibility of standard curve of ACTH determination.

No.	binding ratio (B/T×100)					
	pg/ml 800	400	200	100	50	0
1	16.25	24.74	31.80	37.65	42.25	47.79
2	16.58	25.57	32.52	37.76	43.64	46.10
3	18.34	26.78	33.86	37.97	41.82	45.25
4	17.39	27.19	34.71	39.53	43.07	44.25
5	19.01	25.51	35.53	36.85	40.64	45.02
6	19.19	24.90	29.43	36.26	41.20	45.80
mean	17.79	25.78	32.98	37.67	42.10	45.70
S.D.	1.24	0.996	2.21	1.12	1.13	1.21
C.V.	6.97	3.86	6.70	2.97	2.68	2.65

かなりよく一致し、6段階の濃度の各点におけるC.V.は4点において2ないし3%、残りの2点で6ないし7%であった。(Table 1, Fig.1)

B. 臨床応用

1. 内科的応用：

健康人をふくむ12例のべ16回の測定を行った。健康人および脳下垂体副腎皮質系に異常を認めない症例(control group)では25.1-54.0 pg/mlの範囲に分布した。副腎過形成型のCushing症候群の1例では経時的に3回測定してみると、10 pg/ml以下の低値から100pg/mlあるいは300 pg/ml以上とかなり大きい変動を示したが、その原因の1つとして経過中に投与したcorticosteroid剤の影響も考えられる。脳下垂体性(二次性)甲状腺機能低下症では10 pg/ml以下の低値から39.0 pg/mlまでに分布し、低下傾向を示した。corticosteroid剤の長期投与後のSLE症例では109.0pg/mlと多少高値を示したが、corticosteroid剤の再投与で54.0pg/mlと低下する傾向を示した。(Fig. 2)

2. 産科的応用

1) 研究対象および方法：正常妊娠15例、無脳児妊娠3例を対象とし、分娩前後の母体および新生児臍帯血より採血して試料とした。なお、陣痛発来前の採血は午前9時ないし10時におこなっ

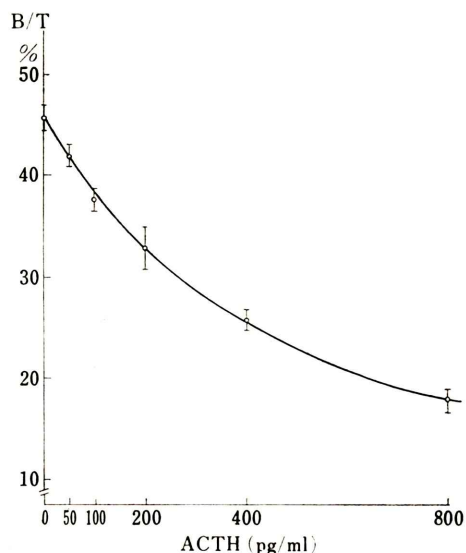
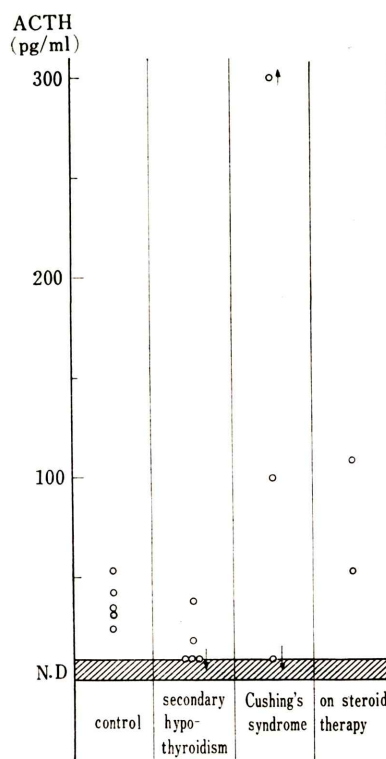
**Fig. 1** ACTH standard curve**Fig. 2** ACTH concentration in normal subjects and patients with hypophyseoadrenocortical disease

Table 2 ACTH concentration in the maternal plasma at the various stages of labour and in the cord plasma of healthy newborn infants.

maternal plasma				cord plasma
before onset of labor	during labor		after labor (2hrs)	
16.0	36.7	58.5	15.0 ↓	161.2
16.3	73.5	89.3	19.6	196.4
31.5	96.4	100.0	37.1	205.4
31.5	135.7	142.9	43.3	214.3
	192.6	203.6		321.4
	228.6	266.0		346.4
				388.8
* 23.8±8.8	* 135.3±72.7			* 262.0±88.2

*: mean±S.D.

Table 3 ACTH concentration in the maternal plasma at the various stages of labour and in the cord plasma of newborn anencephalic fetus

maternal plasma				cord plasma
before onset of labor	during labor		after labor (2hr)	
15.0 ↓	30.7	53.6	15.0 ↓	10.7
15.0 ↓	89.3	235.7	20.0 ↓	10.0 ↓
16.0 ↓	239.5	242.8		10.0 ↓
	242.9	356.4		
	*186.4±114.5			

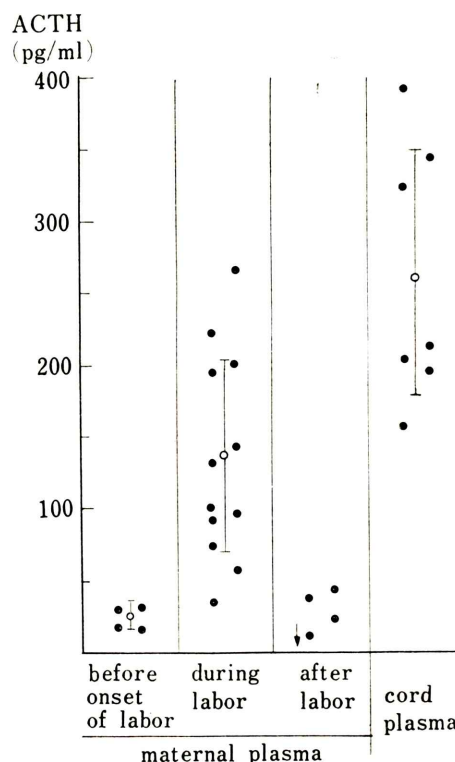
*: mean±S.D.

た.

2) 成績

① 正常妊娠の母体血および臍帯血 ACTH 濃度

正常妊娠 4 例の陣痛発来前の母体血 ACTH 濃度は 16.0 pg/ml ないし 31.5 pg/ml (23.8±8.8: mean±S.D.), 分娩前 2 時間 30 分から胎児娩出直前までの 7 例, 12 検体の分娩中の ACTH 濃度は 36.7 pg/ml ないし 266.0 pg/ml (135.0±72.7) と陣痛発来前より有意に高値 ($P<0.001$) であった。また, 分娩後 2 時間値の 4 例は, 43.3 pg/ml 以下で, ほぼ陣痛発来前の値であった。さらに, 7

**Fig. 3** ACTH concentration in the maternal and cord plasma in normal pregnancy

例の臍帯血 ACTH 濃度は, 161.2 pg/ml ないし 388.8 pg/ml (262.0 ± 88.2) で分娩中の母体血 ACTH 濃度より高値 ($P<0.005$) であった。

(Table 3, Fig. 3)

② 無脳児妊娠の母体血および臍帯血 ACTH 濃度

無脳児妊娠 3 例の陣痛発来前の母体血 ACTH 濃度は 16.0 pg/ml 以下, 分娩中のそれは 30.7 pg/ml ないし 356.4 pg/ml (186.4 ± 114.5), 分娩後 2 時間値は 20 pg/ml 以下と, ほぼ正常妊娠の分娩前後の ACTH 濃度とほぼ同じ値と pattern を示した。

しかし, 3 例の臍帯血 ACTH 濃度は, いずれも 10.7 pg/ml 以下と極めて低値を示した。(Table 4, Fig. 4)

IV. 考 按

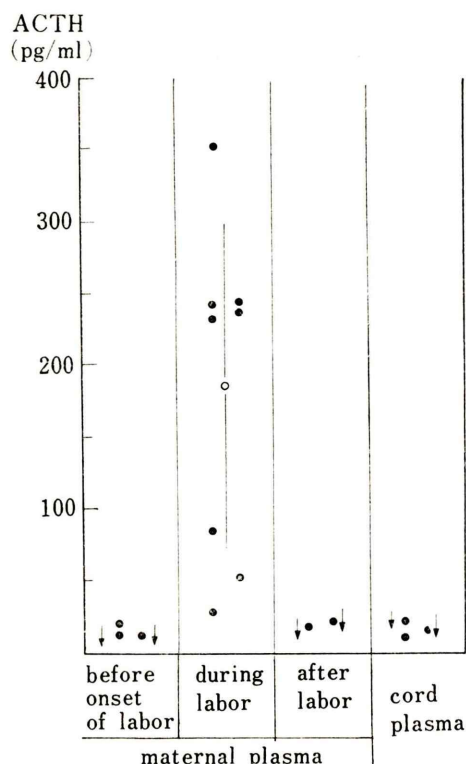


Fig. 4 ACTH concentration in the maternal and cord plasma in pregnancy with live anencephalic fetuses

ACTH は脳下垂体副腎皮質系を調節し、生体の防禦反応や適応現象などにおいてきわめて重要な役割を演ずる位置に存在しながら、血中濃度がきわめて微量である上に、ACTH が比較的小さいポリペプチドであるために titer の高い抗体を作りにくいという難点のために、すでに 1963 年 2 抗体法を用いる方法について発表¹⁾があったのに製品化されるのがおくれた。1972 年にいたり The Radiochemical Centre (Amersham, England) が血漿中 ACTH を glass にて抽出したのち radioimmunoassay する方法を用いる製品 “ACTH immunoassay kit” を初めて出した。我が国においても本 kit に関する基礎的ならびに臨床的検討がすでに報告されている²⁾⁻⁶⁾。著者らも本 kit を臨床的に応用し、その有用性について若干検討をこころみ、上記のような成績をえ

た。

前後 6 回にわたり作成された標準曲線の再現性は良く、B/T(%) で示した値ではその C.V. を大体 2~3% 以内に、多くて 6~7% 以内にとどめることが出来た。この結果から同一 kit を 2 回以上に分けて使用するような場合にそのつど標準曲線を作成することをあるいは省略出来る可能性も示唆されるが、現段階ではやはり同時に同一操作で標準曲線を作成の方が安全というべきであろう。

本 kit 使用上必要な血漿量が 2~8 ml と記載されているが、現実には 2 ml でも測定可能である。2 ml から 8 ml の間での抽出効率に差がなく⁷⁾、できるだけ多く用いた方が微量の所まで定量可能であるということである。しかし、この 2 ml は他の radioimmunoassay 法に比較してなお大きい量であるといわざるを得ない。

少数例であるが、健康人をふくめ内科疾患症例についての臨床応用をこころみ、一応諸家の報告^{2)-6), 9)}と同様の成績を得た。本 kit で得られる値は脳下垂体副腎皮質系機能に相関する良い指標となると考えられる。

また、臨床応用のひとつとして、妊娠・分娩時に母体血ならびに臍帯血中の ACTH 濃度を測定し、ACTH の母児間の移行に関する検討もこころみた。分娩というストレスに対し、母体副腎皮質ホルモンが増加することは、いくつかの報告により明らかにされている。しかし、その時母体および胎児下垂体 ACTH がどのような動態を示すかについて、また、ACTH が胎盤を通過し得るか否かについては不明の点が多い^{9), 10)}。今回の著者らの実験成績では、陣痛発来により、母体 ACTH は明らかに増量し、また新生児臍帯血 ACTH 濃度は母体のそれより高値を示した。さらに、無脳児の ACTH 濃度は 10.7 pg/ml 以下のきわめて低値であることより、胎児の ACTH は胎児下垂体から分泌されていることがうかがわれた。一方、陣痛発来により増量した母体 ACTH は胎盤を通過しえないものと推測された¹¹⁾。

胎盤性 estrogen の precursor 産生に胎児副腎

は主要な役割を演じているが、その胎児副腎機能の control mechanism の解明のいとぐちとして、母体および臍帯血 ACTH 動態はきわめて興味があり、今後の研究課題であろう¹²⁾。

V. 結 論

ACTH radioimmunoassay kit (RCC) について主として臨床的検討をこころみ、次の結論を得た。

1. 標準曲線の再現性は良好であった。
2. 健康人および脳下垂体副腎皮質系に異常がないと考えられた症例では血中 ACTH は 25.1–54.0 pg/ml の範囲内に分布した。
3. Cushing 症候群、二次性甲状腺機能低下症および corticosteroid 長期投与の症例での検討では、本 kit 測定値は病態をよく反映し、診断上有用であった。
4. 正常妊娠および無脳児妊娠母児の血漿 ACTH 動態の相異より、分娩時に見られる臍帯血中の濃度の上昇は胎児脳下垂体での生成によること、および、母体 ACTH は胎盤を通過しないことが推測された。

おわりに、ACTH immunoassay kit の提供と御協力をいただいた科研化学株式会社、および同社佐々木恭次氏に感謝いたします。

文 献

- 1) Felber, J. P.: ACTH antibodies and their use for a radioimmunoassay for ACTH. *Experientia* **19**: 227–229, 1963
- 2) 橋本浩三, 細木秀美, 大藤真: Radioimmunoassay Kit を用いた血漿 ACTH 測定法の検討. *核医学* **11**: 489–496, 1974
- 3) 吉村学, 越智幸男, 間島崇哉 他: ACTH Radioimmunoassay-Kit の検討. *核医学* **11**: 561–567, 1974
- 4) 須田俊宏, 出村博, 出村黎子, 他: ACTH. ホルモンと臨床 **22**: 17–23, 1974
- 5) 上條桂一, 鈴木三章, 大原弘通, 他: ACTH radioimmunoassay の基礎的検討とその臨床応用による研究. *ホルモンと臨床* **23**: 59–64, 1975
- 6) 上條桂一, 鈴木三章, 大原弘通, 他: 視床下部下垂体副腎系ホルモン分泌の日内リズムと feed back 機構に関する研究. *日内分泌会誌* **51**: 210–217, 1975
- 7) The Radiochemical Centre: ACTH immunoassay kit. p. 12.
- 8) Besser GM, Orth DN, Nicholson WE, et al: Dissociation of the disappearance of bioactive and radioimmunoreactive ACTH from plasma in man. *J Clin Endocrinol Metab* **32**: 595–603, 1971
- 9) Berson SA, Yalow RS: Radioimmunoassay of ACTH in plasma. *J Clin Invest* **47**: 2725–2751, 1968
- 10) Allen JP, Cook DM, Kendall JW, et al: Maternal-fetal ACTH relationship in man. *J Clin Endocrinol Metab* **37**: 230–234, 1973
- 11) Miyakawa I, Ikeda I, Maeyama M: Transport of ACTH across human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* **39**: 440–442, 1974
- 12) 宮川勇生, 池田 功, 前山昌男: 胎児副腎に対する ACTH の control mechanism に関する研究 一特に estriol 代謝への影響について一. *日産婦誌* **27**: 279–280, 1975