

《ノート》

固相化抗体法による Cortisol RIA (AUTO PAK) の基礎的検討

Basic Evaluation of "Auto Pak" RIA with Solid Phase Method
for Cortisol Determination

日高 幸雄* 板津 武晴** 奥田 剛*** 来住 倫子***
前田 文子***

Yukio HIDAOKA*, Takeharu ITATSU**, Goh OKUDA***, Michiko KISHI***
and Fumiko MAEDA***

*Department of Radiology, Shinsei kai First Hospital, Nagoya

**Department of Internal Medicine, Nagoya Second Red Cross Hospital, Nagoya

***Department of Endocrinological Laboratory, Nagoya Second Red Cross Hospital, Nagoya, Japan

I. はじめに

血中コルチゾールは、従来血中 11-OHCS あるいは、17-OHCS として測定されてきたが、近年、Murphy らにより Competitive Protein Binding Assay (以下 CPBA と略す) が確立され^{1,2)}、比較的簡単に測定されるようになった。

最近、簡単で大量の検体を測定しうるコルチゾール Radioimmunoassay として開発された PEG 法によるコルチゾールキット「第1」が、ウェル型シンチレーションカウンタで測定できることから、一般病院にも広く用いられつつある^{3,4)}。今回、第1アイソトープ研究所より提供をうけ、固相化抗体法による「AUTO PAK」RIA キットについて検討を行なう機会を得たので、その基礎的検討を行ない、同時に PEG 法との比較も行ない、その結果について考察を加え報告する。

II. 方法ならびに対象

1. AUTO PAK RIA の方法

本キットは、固相化抗体法を利用した RIA である。すなわち、一定量の抗コルチゾール抗体で管壁がコーティングされている試験管に、血清または標準コルチゾール液と ¹²⁵I-コルチゾールを緩衝液と共に添加し、反応終了後、上清を吸引除去することにより、B-F 分離を行ない、¹²⁵I-コルチゾールの放射能比から血中総コルチゾール値を測定する方法である。

1) キットの内容および調製

(1) 抗コルチゾール抗体を管壁にコーティングした試験管 (200本/キット)

(2) 標準コルチゾール溶液(0, 2.5, 5, 10, 20, 40, 60 µg/dl)

(3) コントロール血清(Normal, Abnormal): 凍結乾燥品で使用に際し、蒸留水 5 ml にて溶解する。

(4) 緩衝液: 蒸留水にて溶解する。

(5) ¹²⁵I-コルチゾール: 使用に際し、緩衝液バイアルに加える。

2) 測定操作

Key words: Competitive protein binding assay, Radioimmunoassay, Cortisol, Solid phase method

* 新生会第一病院放射線科

** 名古屋第2赤十字病院内科

*** 名古屋第2赤十字病院内分泌検査科

受付: 54年7月24日

最終稿受付: 54年12月12日

別刷請求先: 名古屋市昭和区妙見町2-9 (☎466)

名古屋第2赤十字病院内科

板津 武晴

- (1) 標準液もしくは検体を、それぞれ蒸留水にて10倍希釈し、その20 μ lを試験管に添加する。
- (2) 緩衝液バイアルに 125 I コルチゾール溶液を加え、その1 mlを試験管に添加攪拌する。
- (3) 37°C、60分間インキュベーションした後、
- (4) 上清を吸引除去、1 ml 蒸留水にて洗浄する操作を2回繰り返す。
- (5) 上清を吸引除去後、管壁に残った放射能をウェル型シンチレーションカウンターにて測定し、 125 I コルチゾールの百分率 (B/T%) を算出する。

2. 対 象

名古屋第2赤十字病院の外来および入院患者の血清サンプルを用いた。いずれも午前6～8時、または午後4～6時に採血後血清分離し、-20°C下にて凍結保存したものを用いた。

III. 結 果

1-a. インキュベーション時間の検討

37°C下、0.5, 1, 1.5, 2, 4時間の各インキュベーション時間における各標準曲線を比較すると、インキュベーション時間の長さに比例して、standard「O」のBound% (B_0/T と略す)が上昇すると共に、その標準曲線の直線部分がより良好とな

る傾向が認められ、2ないし4時間ではほとんど差がみられなくなった (Fig. 1)。次に、 B_0/T 値と標準コルチゾール液 (40 μ g/dl) におけるB/T値の差を $\left(\frac{B_0-B(40 \mu\text{g/dl})}{T}\right)$ と略す) Fig. 2 左側に示す。

$B_0-B(40 \mu\text{g/dl})/T$ 値は、それぞれ2時間値 33.1%、4時間値 32.6% とほぼ同様の値であることから、これらの時間における反応が平衡状態にあると思

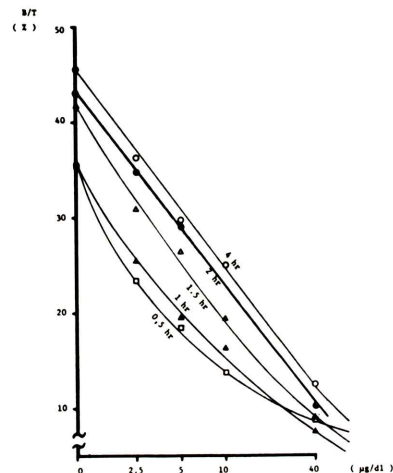


Fig. 1 Effect of incubation time on standard curve. The incubation times were from 0.5 hr to 4 hr at 37°C.

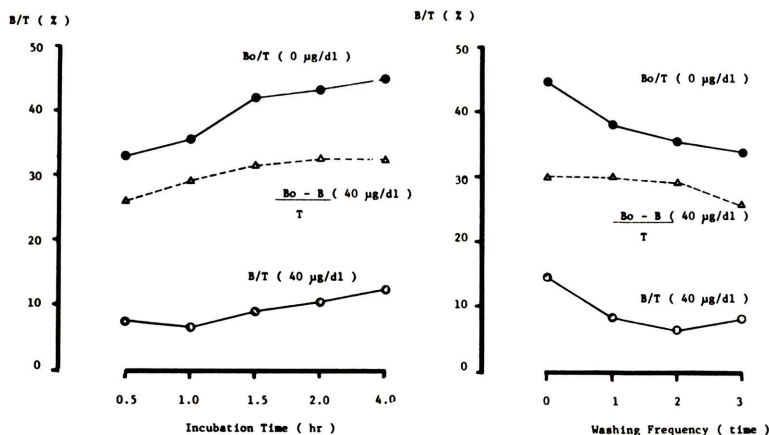


Fig. 2 Effects of incubation time (left panel) and washing frequency (right panel) on bound %.

The closed circles show the bound % (B_0/T) without standard cortisol solution and the open circles show the bound % (B/T : 40 μ g/dl) in 40 μ g/dl of standard cortisol concentration.

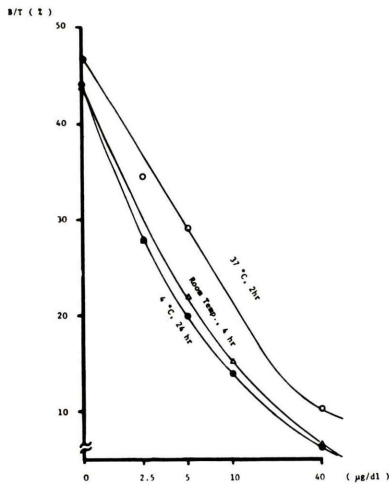


Fig. 3 Standard curves in various conditions of incubation. The incubations such as 2 hr at 37°C (open circle), 4 hr at room temperature (open triangle) and 24 hr at 4°C (closed circle) were studied.

われた。この結果から、本法ではインキュベーション時間には2時間以上が必要と考えられた。

1-b. 洗浄回数の検討

洗浄回数を検討した結果、各洗浄回数(0~3回)ごとの B_0/T , $B(40 \mu\text{g/dl})/T$, $B_0-B(40 \mu\text{g/dl})/T$ の各百分率を Fig. 2 右側に示す。洗浄回数が増すにつれ B_0/T 値は減少したが、 $B_0-B(40 \mu\text{g/dl})/T$ 値は2回洗浄までの範囲では29.8%, 29.6%, 29%とほぼ同様の値を示したのに対し、3回洗浄では25.7%と低下した。このことから、洗浄過剰による影響を防ぐ意味で、洗浄回数は1回または2回で十分であると考えられた。

2. インキュベーション温度と時間の検討

4°C 下 12, 24 時間, 室温下 2, 4 時間, 37°C 下 1, 2, 4 時間における各標準曲線を比較検討し, B_0/T 値のほぼ同一となる 4°C 下 24 時間, 室温下 4 時間, 37°C 下 2 時間において比較したのが Fig. 3 である。4°C 24 時間および室温 4 時間では, 37°C 2 時間のそれに比較して標準曲線の直線性が不良となる傾向が認められたので, 37°C 2 時間のインキュベーション温度が最適と思われた。

以上の結果から、37°C 2 時間インキュベシ

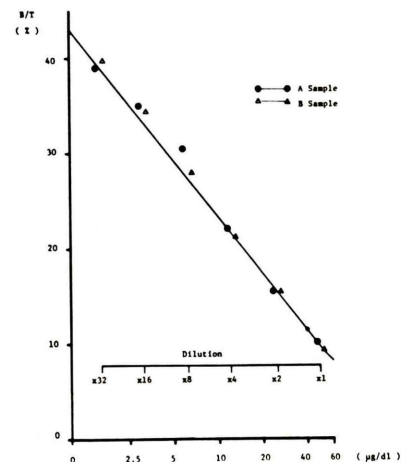


Fig. 4 Dilution curve. The dilution curves of high cortisol sera were parallel or consistent to the standard curve.

ョンと1回洗浄を採用し、本法の測定手技を確立した。この方法により、基礎的、臨床的検討を行った成績を以降に示す。

3. 高コルチゾール血清の希釈曲線 (Fig. 4)

高コルチゾール血清サンプルの32倍までの希釈曲線を示す。2つの血清のそれは、黒の実線で示す標準曲線との良好な平行関係を示した。

4. 抗体の特異性 (交叉性)

本抗体の交叉性をみた結果は (Fig. 5) に示すとおりである。標準コルチゾールを100%とすると, 11-Deoxycortisol (S) 3.2%, Corticosterone (B) 1.5%, Dehydroepiandrosterone (DHA) 1.2%, Deoxycorticosterone (DOC) 0.32%, 17-OH-progesterone (17-OH-prog) 0.021%, Testosterone (T) 0.016%, Estriol (E₃) 0.01% の交叉性がみられ, また, 治療薬である hemisuccinate 化されたプレドニンとは1.0%, デキサメサゾンとは0.005% の交叉性がみられた。

5. 再現性

1) Intra assay (Fig. 6 上段)

コルチゾール濃度が低~高値 (7.2~48.7 $\mu\text{g/dl}$) を示す6組の血清サンプルを選んで, 10回の同一キット内での再現性をみた。変動係数%14%を示す低コルチゾール血清Aサンプル以外の血清では

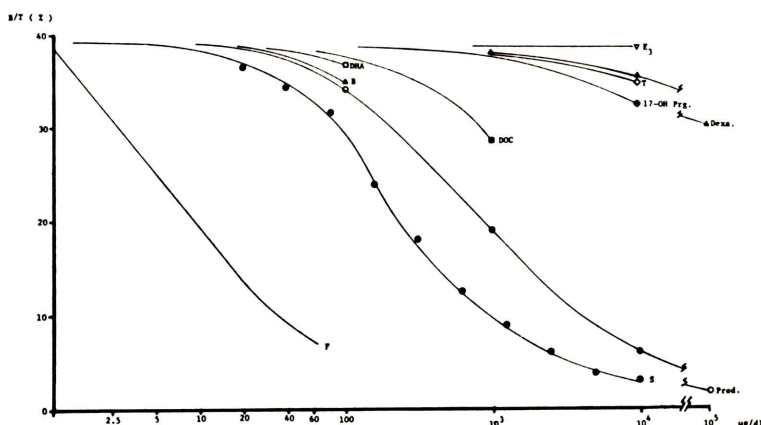


Fig. 5 Cross reaction.

The study was performed about various steroids such as 17-OH progesterone (17-OH Prg.), 11-deoxy cortisol (S), cortisol (F), deoxycorticosterone (DOC), corticosterone (B), estriol (E₃), testosterone (T), hemisuccinated prednisolone (Pred.) and dexamethasone (Dexa.).

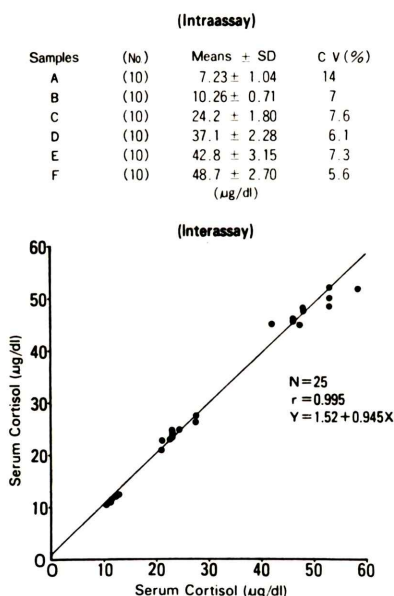


Fig. 6 Reproducibility. The upper panel shows a reproducibility (Intraassay) within the same assay system and the lower panel shows a correlation (Interassay) between the cortisol value-assayed by the different assay systems.

5.6, 7.6% の再現性が得られた。

2) Inter assay (Fig. 6 下段)

異なったキット間での同一サンプルの測定値に

おける再現性を、25サンプルについて検討した。

Fig. 6 下段に示すように、相関係数 $r=0.995$ ($n=25$, $p<0.01$) と良好な相関関係を認めた。

6. 回収率 (Table 1)

標準コルチゾール (低, 中, 高) の3濃度血清サンプルに 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g/dl}$ のコルチゾール標準液を添加して得られた回収率を Table 1 に示す。血清サンプルとコルチゾール標準液を混合し、その 20 μl を測定に供したことから、回収率は (混合サンプル測定値) - (血清サンプル値/2) を (添加標準コルチゾール値/2) の百分率により算出した。その結果、コルチゾール各濃度の血清サンプルの % recovery (Mean \pm SD) は、低濃度で 106 ± 12 , 中濃度で 109 ± 13 と比較的良好であるが、高濃度では 127 ± 21 とやや不良となる傾向を示した。

7. コルチゾールキット「第一」による測定との相関

測定し得た86サンプルについて検討した結果を Fig. 7 に示す。両測定値間において、相関係数 $r=0.97$ ($n=86$, $p<0.01$) と良好な相関関係を認めしたが、両者の直線関係から本法による測定値は、コルチゾールキット「第一」の測定値に比較して、やや低値を示す傾向が認められた。

Table 1 Recovery
Three sera with low (A), moderate (B) and high (C) cortisol levels were evaluated by addition of the known standard solution of cortisol

Added Cortisol ($\mu\text{g/dl}$)	Serum A		Serum B		Serum C	
	Assayed value ($\mu\text{g/dl}$)	%	Assayed value ($\mu\text{g/dl}$)	%	Assayed value ($\mu\text{g/dl}$)	%
none	2.7		15.0		23.0	
5	3.7	93	10.5	120	15.0	140
10	7.4	120	13.5	120	19.0	150
20	10.3	101	17.2	97	22.5	110
40	24.0	113	27.0	97	33.0	107
Percent Recovery (Mean \pm SD):						
		106 \pm 12			109 \pm 13	127 \pm 21

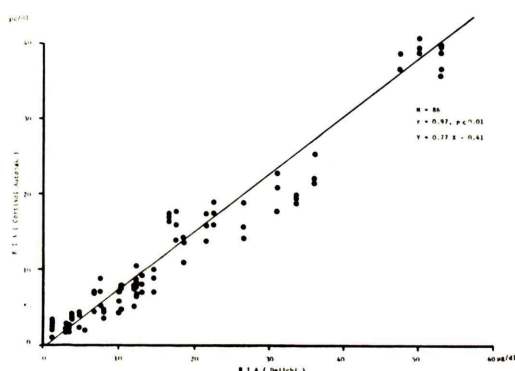


Fig. 7 Correlation between solid phase method (Cortisol Autopak) and PEG method (Daiichi). The linear correlation ($r=0.97$, $p<0.01$) is shown.

8. 正常値

下垂体副腎機能の正常と思われる患者、29例の空腹時（午前6°~9°）の血中コルチゾール値は、 14.2 ± 29 (Mean \pm SD) であり、一部（16°~18°）に採血し得た患者の血中コルチゾール値は 3.8 ± 1.5 (Mean \pm SD) で、日内変動を良好に反映すると思われる。

IV. 考 察

臨床的に下垂体副腎皮質機能検査として行なわれる ACTH テスト、メトピロンテスト、デキサメサゾン抑制試験の指標として、尿中 17 OHCS の 1 日定量が用いられているが、同様に血中コルチゾール値も有用な指標とされている。

今回、われわれが検討し得たコンスルコルチゾールキット「AUTOPAK」の Radioimmunoassay 法は、固相化抗体による分離法を特徴とし、従来の CPBA 法や PEG 法の場合のような血清の前処理（加熱、抽出、アルコール添加）の必要がなく、蒸留水で10倍希釈するだけで測定が可能である。B-F 分離に際しても、上清の吸引除去と洗浄操作のみで遠心分離操作がなく、ウェル型シンチレーションカウンタによる測定が可能である。

われわれは、今回、原法による測定操作に若干の改良を加えた。すなわち、37°C 下インキュベーションは2時間とし、洗浄回数は1回を採用した。また、キットの測定チューブはオートマチックシステム「コンセプト4」にセットされるため、手動操作には小さく扱いにくいことを認め、また、 ^{125}I -コルチゾールと緩衝液 1.02 ml を注入後、Vortex mixer で攪拌する上で十分な注意が必要であった。われわれは ^{125}I -コルチゾール緩衝液 0.52 ml を注入後攪拌し、さらに緩衝液 0.5 ml を追加注入する方法を選んだ。これにより、操作中の汚染を防ぐ比較的安全な方法に改良し得た。

以上の改良を加えた本法による測定値の再現性、回比率は共に良好であった。用いられる抗体は、高コルチゾール血清の良好な希釈曲線と、交叉性の結果から、コルチゾールに特異的と考えられた。本法の抗体は、11-Deoxycortisol とは 3.2%、Corticosterone とは 1.5%、Dehydroepiandrosterone とは 1.2% の交叉性が認められ、薬物の hemisuc-

cinate 化されたプレドニンとは1% %の交叉性を認めたにすぎない。鈴木らは、PEG 法における抗コルチゾール抗体は、11-Deoxycortisol との間に8%の交叉性を認めた⁴⁾が、本法では3.2%であった。この値は、本法のコルチゾール値として生理的濃度の範囲内では無視し得るものと考えられる。デキサメサゾンとはほとんど交叉しないことが考えられ、デキサメサゾン抑制試験時の血清コルチゾール値は、血中コルチゾールをほとんど反映したものと思われる。吉見ら³⁾は、PEG 法による測定値はCBGを用いたステロオアッセイによる測定値に比較してやや低い傾向を認めており、一方、鈴木ら⁴⁾はやや高い傾向を認めている。

本法による測定値は従来のPEG法であるコルチゾールキット「第一」の測定値とは良好な相関関係($r=0.97$)を示したが、比較的低値をとる傾向を示した。両者の測定方法における血清の前処理に差があり、PEG法ではアルコール添加による除蛋白操作が必要であるのに対し、本法では蒸留水にて10倍希釈することや、B-F分離法による差(PEGと固相化抗体)が両者の測定系による測定値の差異に関与する要因であったかもしれないが、その詳細は不明である。

以上、本測定法はその操作過程においてより簡便であり、その基礎的な測定条件を十分に満足すると考えられた。本法により測定される血清コルチゾール値は、臨床的に下垂体副腎皮質機能を知

る上で有用な示標となりうるものと考えられる。

V. まとめ

1) より簡便で安全な固相法によるコルチゾールRadioimmunoassayを2~3の改良を加えて確立した。

2) その基礎条件はほぼ満足され、用いられた抗体はコルチゾールに特異的と考えられた。

3) 本法による測定値はPEG法のそれとは良く相関したが、やや低値となる傾向を示した。

4) 本法による血清コルチゾール測定は簡便であり、血中コルチゾールの変動を良く反映し、臨床的に極めて有用であると考えられる。

本キットを提供して頂いた第一ラジオアイソトープ研究所に深謝致します。

文 献

- 1) Murphy BP, Engelberg, W, Patte, CJ: Simple method for the determination of plasma corticoids. J Clin Endocr Metab 23: 293, 1963
- 2) Murphy BP: Some studies of the protein-binding of steroids and their application to the routine micro and ultramicro measurement of various steroids in body fluids by competitive protein-binding radioassay. J Clin Endocr Metab 27: 973, 1967
- 3) 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, 1974
- 4) 鈴木 進, 仁瓶礼之, 板津武晴, 他: コーチゾルキット「第一」の検討. ホルモンと臨床 24: 1175, 1976