

46. Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP) の定量法について

石原 静盛 元木 純子 本田 稔

友延 正弘 金尾 啓右

(住友病院・アイソトープ)

中野ひろみ 森井 浩世 (大阪市大・二内)

越智 宏暢 (同・放)

脳細胞から産生される calcitonin gene related peptide (CGRP) は甲状腺疾患の一部で血中濃度が上昇すると言われている。

今回われわれは、この CGRP の血中濃度の RIA による定量化を試みた。抗体(家兔)、トレーサー(ヒト CGRP のアミノ酸 16 番のロイシン [leu] をヒスチジン [his] に置き換えてラベルしたもの)は Amersham International から購入した。American Scientific products の CGRP をリン酸緩衝液 (50 mMol, pH 7.4, 0.3% BSA, 10 mMol EDTA, 0.1% NaNa₃) で希釈して用いた。BF 分離は二抗体法とした。

基準となる測定法は緩衝液 0.5 ml 中に CGRP 標準品または血清 0.1 ml, 抗体 0.1 ml, トレーサー 0.1 ml を加えて 4 日間静置し, 反応終了後 10 倍希釈第二抗体および 50 倍希釈 NRS を加えて 1 日後 BF 分離を行う。

3 回の測定を行った標準曲線から測定感度は、80 pg/ml であった。同一測定系内における変動率は 8.8%~9.6%と、やや大きい CV であった。日差再現性は、まだデータを出すに至っていない。回収率試験は、89.1~126.0%, 平均回収率 103.8% であった。第一反応の日数が 3 日間では、0 濃度での結合率が約 30%, 4 日間、5 日間では両者とも約 37% と大差ない反応曲線が得られた。トレーサーの添加量は 0.0018 μ Ci/tube, モル濃度で 10^{-6} fmol/tube 以下がよいと考えられた。抗体濃度は 1 バイアルで約 120~140 本までは使用できる。

約 15,000 pg/ml の濃度を有する MTC 患者血清の希釈曲線は標準曲線とほぼ平行性を示した。正常値は 20~40 歳で 78.8~276.5 pg/ml, 平均 173.1 \pm 63.9 pg/ml (n=15)。MTC 3 例中 2 例が正常値内にあった。1 例が 15,000 pg/ml を示した。肺癌 4 例は全例正常値内であった。今後も検討を続ける予定である。

47. CA 15-3 による癌の診断について

浜津 尚就 山崎 武 (滋賀医大・放)

芋川 実 越智 幸男 (同・中検)

最近開発された CA 15-3 は、MoAb (115D-8) と MoAb (DF-3) の二つの異なる抗体で認識される乳癌の腫瘍マーカーと言われている。CIS エルザ CA 15-3 キットの臨床的意義を検討した。

本測定の再現性は、intraassay で平均 6.9% であり Lot の異なる 5 回の interassay では、平均 12.1% と良好な結果を得た。回収率も平均 100.7% と良好であった。健康人の血中 CA 15-3 値は、mean \pm SD で 14.4 \pm 3.1 U/ml となり男女間に有意の差はなかった。Tobias らの報告している 30 U/ml を cut-off 値とすると、乳癌の良性疾患 6 例全例に陰性であり、他の良性疾患 66 例中 5 例 7.6% に陽性例があったが、いずれも婦人科領域の疾患であった。悪性疾患の陽性率は、乳癌 25.8%, 肺癌 23.8%, 肝癌 29.2%, 子宮癌 26.8% で特に卵巣癌 42.1% と高い陽性率であった。また肝癌、直腸癌、結腸癌および悪性リンパ腫、白血病を含むその他の癌で比較的低い陽性率であった。悪性疾患における陽性例の大部分は進行癌であり、特に遠隔転移で高い CA 15-3 値が検出された。乳癌の stage 別では、I~III 期で陽性率が低く、IV 期で 75.9% と高い陽性率を示し、肺癌でも I~III 期では低く IV 期で 52.8% と比較的高い陽性率であった。また肝癌、胃癌においても転移症例でおのおの 45.5%, 64.3% と高い陽性率を示している。CA 15-3 と CEA (Roche) との相関は、乳癌、肺癌で弱い正の相関を認められた。乳癌で転移確認時に陽性を呈した症例は、11 例中 9 例であり治療開始に従い 5 症例で急速な低下が認められ、4 症例で緩慢な低下を認めた。しかしいずれも IV 期の進行癌であるため治療に対し抵抗性を示し、臨床的に多少改善が認められたのは、4 症例のみであった。

48. ³H ラベル脂肪酸を用いた肝および小腸脂肪酸結合蛋白の解析

渡辺 茂弥 若月 芳雄 工藤 寛之

関 真理 村上 元康 稲田 雅美

三宅 健夫 (京都大・老)

脂肪酸結合蛋白 (FABP) は、lipogenesis やコレステ

ロール合成の栄養的調節, また小腸では脂肪酸の吸収・運搬・プーリングに関与すると考えられているが, その機能はまだ十分明らかではない. 今回, われわれは Rat 小腸, ヒト肝における FABP を分離し, 若干の知見を得た. [方法] 材料として, 小腸は Wistar 系雄 Rat を前夜絶食させ, 屠殺後小腸を摘出し粘膜剝離したものを, 肝はヒト胆管癌例手術時に得られた健常部を用いた 0.25 M Sucrose・0.2 M Tris-HCl Buffer, pH 7.4 にて洗浄後, homogenize し, Robinson-Hübscher らの方法を参考にして磨砕液を 105,000 G, 60 分にて超遠心し上清を Sap とした. 各処理はすべて 4°C にて行われた. Sample 0.5 cc を 4 倍希釈し, ^3H ラベル・オレイン酸を 25-75 μCi 加え飽和させ, 25°C 15 分 incubate 後, Sephadex G-75 を用いて Gell Filtration を行った. サイズは $2 \times 28 \text{ cm}$, 0.03 M Tris-HCl Buffer, pH 7.4-8.8 にて, 4°C にて溶出させた. 得られた各分画に対して放射性と OD₂₈₀ を計測した. また, 分離した FABP 分画を DEAE セルロース column chromatography による精製を試みた. [結果] (1) Gell Filtration にて, Rat 小腸粘膜 FABP は分子量約 12,000 を示したが, ヒト肝細胞中 FABP は約 8,000 とやや小さかった. Specific Activity はともに約 100 nmol O.A. / mg 蛋白程度であった. (2) FABP と ^3H -オレイン酸の結合は pH 8.0 付近の Buffer 中で比較的安定であった. (3) 小腸細胞ミクロソーム分画のゲル濾過の結果では, 同分画にも脂肪酸と強く結合する物質 (約 60 kdal) が存在する可能性が示唆された. (4) Radio active な脂肪酸は FABP の生理的役割の検索に有効と考えられる.

49. 血小板と Vasopressin の結合について

— ^3H -arginine vasopressin による基礎的検討—

稲葉 潔 梅田 幸久 山根 曜子
稲田 満夫 (関西医大・二内)

〔目的〕 血小板に Vasopressin (Vp) が高濃度に存在することが Preibisz らにより報告された. この血小板中の Vp の存在様式を知る目的で血小板と ^3H -arginine vasopressin (AVP) との結合について検討した.

〔対象〕 正常者 5 名を対象とした.

〔方法, 結果〕 血小板浮遊液を作製し, ^3H -AVP と混和し incubation した後, Whatman GF/C filter にて血小板 AVP (B) と遊離 AVP (F) に分離した. まず結合

反応の温度による影響を検討するために, 15, 25, 37°C にて incubation したが, 温度が低いほど平衡に達するのに時間を要し, 温度依存性であった. また飽和結合実験より, ^3H -AVP 濃度 3.1 nM で最大結合に達し, 飽和反応であった. 濃度による影響を検討するため, ^3H -AVP 濃度 0.2, 1, 10 nM にて incubation したが濃度の低いほど平衡に達するのに時間を要し, 濃度依存性であった. 次に血小板に ^3H -AVP を結合させた後, 過剰の非標識 AVP を添加したところ 2 時間で 22% の解離を示した. また非標識 AVP および LVP, OXY, dDAVP にて ^3H -AVP との競合結合実験を行ったが, その結合は非標識 AVP において最も強く阻害され, dDAVP において阻害は最も弱かった. 次にその receptor の性状を検討するために, 25°C ^3H -AVP 濃度 1 nM, 3 時間の incubation で行った競合結合実験の Scatchard analysis では, 直線性を示しその結合部位は一種類であることが示唆され, 結合部位数は $118.5 \pm 6.6 \text{ (M} \pm \text{SEM)}$, 親和性は $(6.6 \pm 0.9) \times 10^8 / \text{M}$ であった.

〔結語〕 血小板には AVP が高濃度に存在し, ^3H -AVP との結合実験より, AVP に特異的に結合する receptor が存在すると考えられた.

50. 閉塞性動脈硬化症 (ASO) における血小板シンチグラフィを用いた血栓性の検討について

北川 一夫 宮井 元伸 田中 健一
濱中 康彦 額田 忠篤 宇治 茂
(国立大阪南病院・循環器, 放)
恵谷 秀紀 井坂 吉成 米田正太郎
木村 和文 (大阪大・中放部, 一内)

目的: 下肢閉塞性動脈硬化症 (以下 ASO と略す) を対象に血小板シンチグラフィを用いて閉塞性血管病変部位での血小板集積の有無を評価した. 対象および方法: 健常者 8 例と下肢 ASO 8 例を対象とした. ASO 例は全例血管造影施行後, 血小板シンチグラフィを実施した. 血小板標識には ^{111}In -tropolone を用い採血, 血小板分離は Heaton らの方法を改変して行った. ^{111}In -血小板の静注 48 時間後にシンチカメラを前面から大動脈, 腸骨動脈, 大腿動脈を含むようにすて撮像し, その後 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HSA を静注し同部位の血液プールシンチグラムを撮像, 両シンチグラムを比較して血小板集積の有無を診断した. 結果: 健常者は全例血小板集積を認めなかつ