

《ノート》

固相化 Avidin-Biotin 結合を利用した IRMA 法による血中 Intact ACTH (1-39) 測定に関する基礎的ならびに臨床的検討

Fundamental and Clinical Evaluation of IRMA for Plasma ACTH (1-39)

福地 稔* 松尾 優子** 村上 稔* 表 正宏**
河中 正裕* 松嶋 裕明**

Minoru FUKUCHI*, Yuko MATSUO**, Minoru MURAKAMI*,
Masahiro OMOTE**, Masahiro KAWANAKA* and Hiroaki MATSUSHIMA**

*Department of Nuclear Medicine, Hyogo College of Medicine
**Research and Development Department, Nihon Medi-Physics Co., Ltd.

I. はじめに

ACTH は下垂体前葉から分泌される 39 個のアミノ酸からなる分子量 4,500 のペプチドホルモンで、41 個のアミノ酸からなる視床下部からの Corticotropin releasing hormone (CRH) の支配を受け、副腎皮質からのステロイドホルモン分泌を調節するとともに、血中 Cortisol 値との間にフィードバック機構を形成する。

血中 ACTH 値の測定は、視床下部一下垂体-副腎皮質系の病態把握に重要であり、特にわが国でも CRH 負荷試験の臨床利用が可能となったことで、臨床的にも、より正確で簡便な血中 ACTH 測定法が求められている。

ACTH の Radioimmunoassay (RIA) は、1964 年 Yallow ら¹⁾の報告を契機とするが、その後臨床的に利用されてきた RIA は、実際の操作上の問題に加え、血清成分による非特異的干渉や ACTH フラグメントとの交叉などが指摘されて

きた。近年、抗体作製技術の進歩に相まって、Immunoradiometric assay (IRMA) が主流となるにつれ、ACTH についても、N 端抗体と C 端抗体を用い ACTH (1-39) を測定できる、いわゆる液相 two site immunoradiometric assay が知られるようになった²⁾。

今回、われわれは ACTH の C 端 (34-39) に特異的なポリクローナル抗体に Biotin を結合させ、N 端 (1-17) に特異的なモノクローナル抗体を ¹²⁵I で標識し、Avidin をビーズに固相化して Avidin-Biotin 結合を利用して³⁾ Intact ACTH (1-39) を特異的に測定する簡便な固相化 IRMA について基礎的ならびに臨床的検討を行ったので報告する。

II. 方法および対象

検討には、米国ニコルス研究所製の Allegro HS-ACTH キットの提供を受け、実際の測定手順は、Fig. 1 のごとく行った。

1. 基礎的検討

1) 標準曲線および最小検出濃度

異なる 3 回の測定で得られた標準曲線を平均 ± 標準偏差 (mean ± S.D.) で求め、安定性、再現性

* 兵庫医科大学核医学科

** 日本メディフィジックス株式会社研究開発部

受付：元年 9 月 22 日

最終稿受付：元年 11 月 6 日

別刷請求先：西宮市武庫川町 1-1 (〒663)

兵庫医科大学核医学科

福地 稔

Key words: ACTH (1-39), Immunoradiometric assay, Avidin-Biotin, Separation technique.

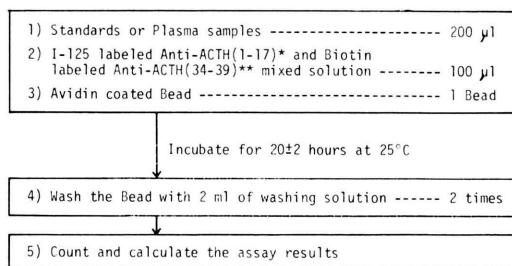


Fig. 1 Assay procedure of Allegro HS-ACTH kit.

および測定範囲につき検討した。また、最小検出感度は、標準 ACTH 溶液の最低濃度 (15 pg/ml) を、標準 ACTH 濃度 0 pg/ml 溶液でさらに 7.5 pg/ml, 3.0 pg/ml, 1 pg/ml, 0.75 pg/ml の濃度に希釈し、おのおの 5 重測定し、平均値間の有意差検定で求めた。

2) インキュベーション条件

インキュベーション時間と濃度が本測定系に及ぼす影響について、反応時間を 20 時間と一定にして、反応温度を 4°C, 室温 (25°C), 37°C とかえた際と、反応温度を 25°C と一定にして、反応時間を 14 時間、16 時間、18 時間、20 時間、22 時間とかえた際につき、おのおの標準曲線のカウント数 (cpm) を指標に検討した。

3) 精度再現性

血中 ACTH 濃度の異なる血漿試料 A, B を用い、同一測定内 (n=5) および異なる 5 回の測定間における再現性を検討した。

4) 希釈試験

血中 ACTH 濃度の異なる 3 種類の血漿試料を用い、キット添付の標準 ACTH 濃度 0 pg/ml 溶液を用い 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 と段階的に希釈し希釈試験を行った。

5) 回収試験

血中 ACTH 濃度の異なる 2 種類の血漿試料に濃度の異なる 5 種類の標準 ACTH 溶液を添加した際の回収率を検討した。

6) 交叉反応試験

本測定系の特異性を検討する目的で、ACTH

1-24, 11-24, 18-39, 1-10 の各フラグメント、および α -メラニン細胞刺激ホルモン (α -MSH), β -メラニン細胞刺激ホルモン (β -MSH), β -リポトロビン (β -LPH), β -エンドルフィンをおのおの 200 pg/ml から 100,000 pg/ml の濃度で添加測定し、ACTH (1-39) と比較した。

7) EDTA 血漿、ヘパリン血漿および血清試料の比較

本キットでは、測定試料として EDTA 血漿を用いることが指示されている。そこで 3 例の患者を用い測定試料としてヘパリン血漿、血清および EDTA 血漿を採取し測定値を比較した。

8) 検体の安定性

本測定法における測定試料の安定性を検討する目的で、3 つの EDTA 血漿試料をおのおのの -20°C, 4°C, 20°C で 1 日間、2 日間、3 日間および 6 日間保存後に測定に供した際の測定値の変動の有無とその程度につき検討した。

2. 臨床的検討

1) 健常人および患者血中 ACTH 値

健常人 12 名を対象にその血漿中の ACTH 値を本測定法で測定した。一方、本測定法による患者血中 ACTH 値の測定を目的に、クッシング症候群(副腎腺腫)4 例、アジソン病 5 例、先天性副腎皮質過形成症 3 例、下垂体腺腫 5 例およびメトビロン負荷試験中の患者 3 例の計 20 例の血漿 ACTH 値を本測定法で測定した。

2) 負荷試験

下垂体腺腫 1 例で術前、術後におのおの体重 kg 当たり 0.1 単位のレギュラーインスリン負荷を行い、負荷前、負荷後 30 分、60 分、90 分および 120 分におのおの採血し、各血漿試料につき本測定法で血中 ACTH 値を測定比較した。

3) 他の測定法との比較

従来、日常臨床検査法として利用してきた株ミドリ十字の RIA、すなわち ACTH-II (最小検出感度 10 pg/ml) との測定値の比較を目的に 77 例の血漿試料を用い本測定法と同時測定を用い得られた測定値を比較した。また、細部についての比較を目的に、下垂体腺腫 1 例に体重 kg 当たりレギュ

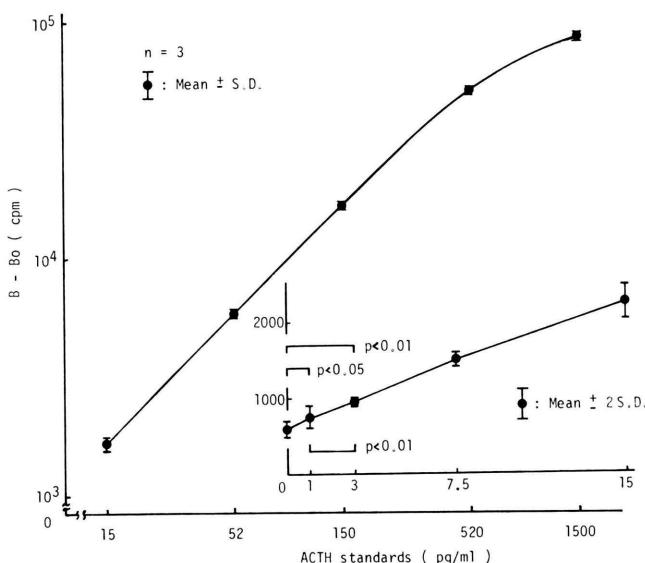


Fig. 2 Standard curve of Allegro HS-ACTH kit.

ラーアインスリン 0.1 単位を、また、Empty sella 症候群 1 例には CRH 100 μ g をおのおの負荷し、負荷前、負荷後 30 分、60 分、90 分および 120 分におのおの採血し、各血漿試料中の ACTH 濃度を ACTH-II と本測定法で同時測定比較した。

III. 結 果

1. 基礎的検討

1) 標準曲線および最小検出濃度

異なる測定で得られた標準曲線を $mean \pm S.D.$ で求め、Fig. 2 に示した。安定した再現性の良好な標準曲線が得られ、標準溶液 15 pg/ml から 520 pg/ml まで直線性を示し、以後 1,500 pg/ml までゆるやかな曲線を示した。最小検出濃度を求めたところ、標準 0 濃度と 1 pg/ml の間には統計学上有意 ($p < 0.05$) に差が認められた。2 S.D. の重なりで評価すると標準 0 濃度と 1 pg/ml の間には一部重複が認められたが、標準 0 濃度と 3 pg/ml の間には全く重複は認められなかった。以上の成績から IRMA 法の原理を考慮に入れると本測定法の最小検出濃度は 1 pg/ml と考えられた。

2) インキュベーション条件

インキュベーション温度は、4°C で全体に cpm

Table 1 Intraassay and interassay reproducibility of Allegro HS-ACTH kit

(1) Intraassay reproducibility

Samples	n	Mean (pg/ml)	S.D. (pg/ml)	C.V. (%)
Plasma A	5	42.4	0.83	2.0
Plasma B	5	376.3	14.48	3.9

(2) Interassay reproducibility

Samples	n	Mean (pg/ml)	S.D. (pg/ml)	C.V. (%)
Plasma A	5	42.5	1.52	3.6
Plasma B	5	369.0	15.76	4.3

の低下が認められたが、室温と 37°C の間には有意の差はなかった。インキュベーション時間は、標準 ACTH 濃度 410 pg/ml 以上の高濃度域では有意の差は認められなかったが、12 pg/ml から 410 pg/ml の低濃度域では反応時間が長くなるにつれ、cpm が若干上昇した。しかし、18 時間、20 時間、22 時間の間には有意の差はなかった。

3) 精度再現性

同一測定内および異なる測定間における再現性の検討成績は、Table 1 に一括した。C.V. で評価すると同一測定内 ($n=5$) が血漿試料 A で 2.0%、

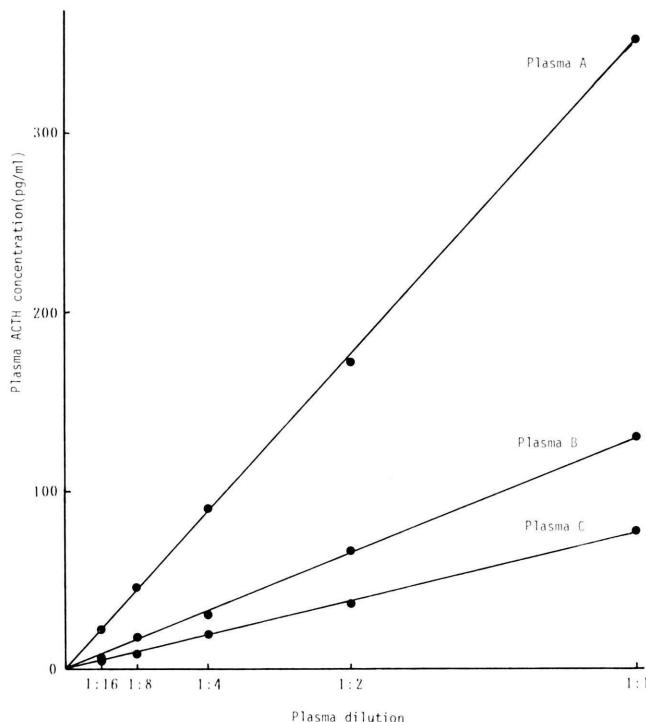


Fig. 3 Dilution test of plasma ACTH measured by Allegro HS-ACTH kit.

Table 2 Recovery test of ACTH added to plasma samples measured by Allegro HS-ACTH kit

	Added ACTH (pg/ml)							Mean recovery (%)
		0	7.0	24.0	70.0	230.0	725.0	
Plasma A	Measured (pg/ml)	47.9	55.1	68.7	111.5	255.8	889.0	
	Recovered (pg/ml)		7.2	20.8	63.6	207.9	841.1	
	Recovery (%)		102.9	86.7	90.9	90.4	116.0	97.4
Plasma B	Measured (pg/ml)	70.2	78.5	95.1	136.4	297.6	768.1	
	Recovered (pg/ml)		8.3	24.9	66.2	227.4	697.9	
	Recovery (%)		118.6	103.8	94.6	98.9	96.3	102.6

血漿試料 B で 3.9%，また異なる測定間 ($n=5$) が血漿試料 A で 3.6%，血漿試料 B で 4.3% であった。

4) 希釈試験

血中 ACTH 濃度の異なる 3 種類の血漿試料の希釈試験の結果を Fig. 3 に示した。いずれの血漿試料も 0 濃度に集束する直線が得られた。

5) 回収試験

回収試験の結果は Table 2 で示したごとく、血

漿 A で、97.4%，血漿 B で 102.6% であった。

6) 交叉反応試験

交叉反応試験の結果を Fig. 4 に一括した。 β -LPH で添加濃度が 100,000 pg/ml で初めて交叉性が認められた以外、他の添加物質では検討範囲内で有意の交叉反応を認めなかった。 β -LPH 100,000 pg/ml の交叉値を標準 ACTH (1-39) の値として算出すると 11.1 pg/ml となり、交叉率は 0.01% であった。

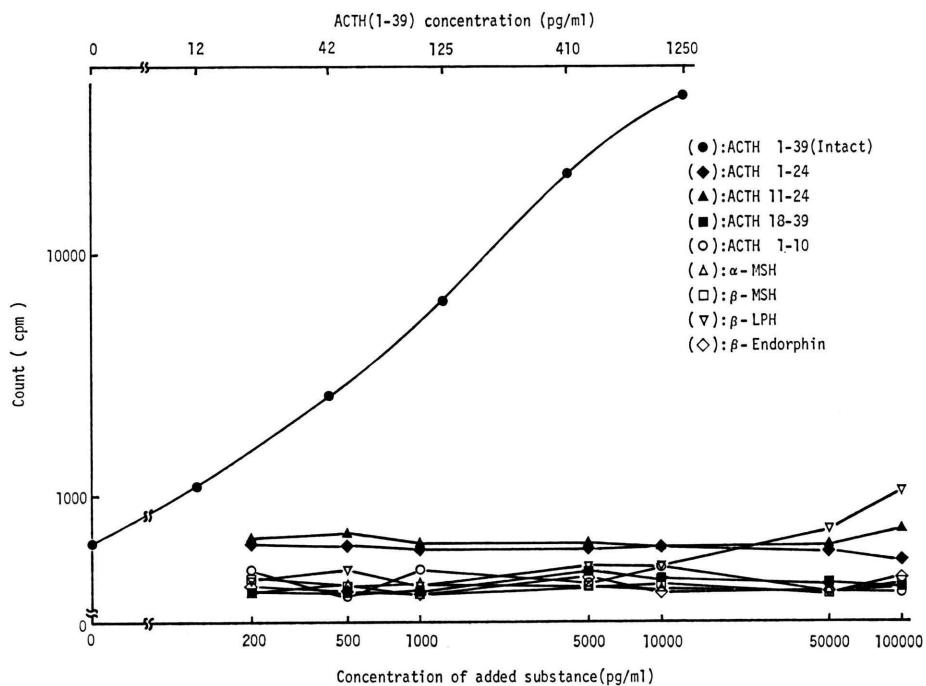


Fig. 4 Specificity of Allegro HS-ACTH kit.

Table 3 Comparison of assay results between EDTA plasma, heparinized plasma and serum samples

Samples	Mean assay results (pg/ml)		
	EDTA plasma	Heparinized plasma	Serum
A	38.3±1.39	4.6±1.0	7.7±0.29
B	37.4±1.42	5.4±1.1	7.4±0.29
C	10.7±4.97	1.7±0.5	5.1±1.28

7) EDTA 血漿、ヘパリン血漿および血清試料の比較

結果は Table 3 に示した。Table 3 でも明らかに EDTA 血漿に比べ、ヘパリン血漿および血清試料では ACTH 値が著しく低値を示した。

8) 検体の安定性

保存温度と保存時間が測定試料に及ぼす影響を検討した成績を Fig. 5 に示した。保存温度-20°C では 6 日間の保存で測定値に有意の影響が認められなかったが、4°C および 20°C では保存時間が長くなるにつれ影響が強く、特に 20°C でその影響は顕著であった。

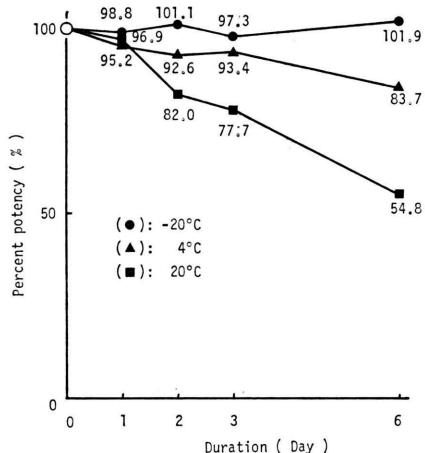


Fig. 5 Effect of storage temperature and duration of EDTA plasma sample on assay results.

2. 臨床的検討

1) 健常人および患者血中 ACTH 値

結果は Fig. 6 に示した。健常人の血中 ACTH 値は、6.5 pg/ml から 43.0 pg/ml の範囲に分布し、mean±S.D. は 17.2±11.0 pg/ml であった。これ

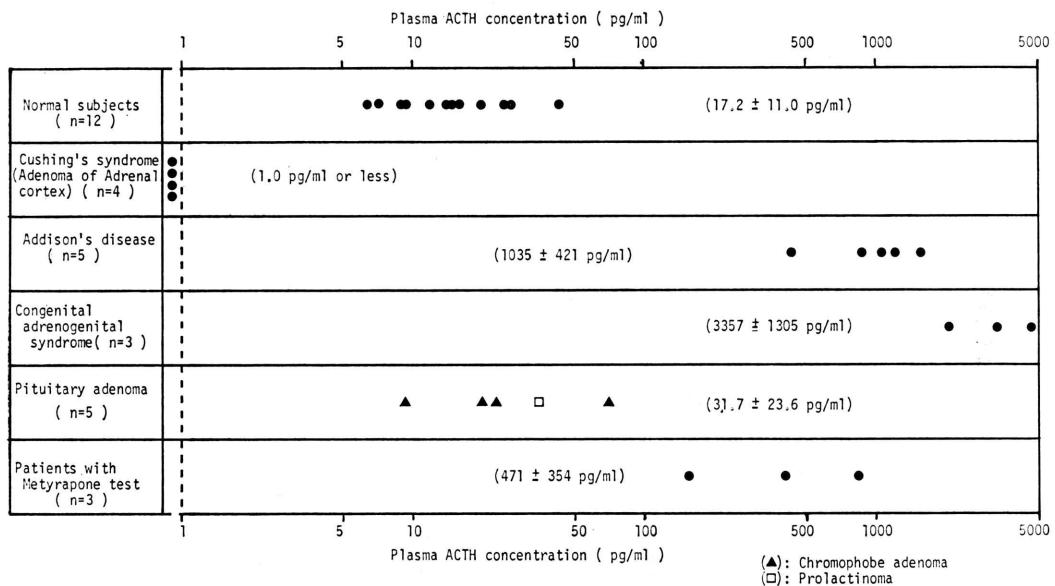


Fig. 6 Assay results of plasma ACTH (1-39) concentration in normal subjects and patients with various endocrine disorders.

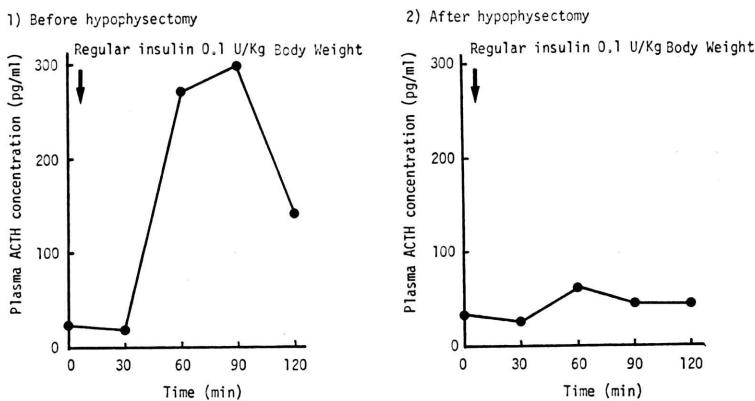


Fig. 7 Insulin tolerance test in patient with pituitary adenoma before and after hypophysectomy.

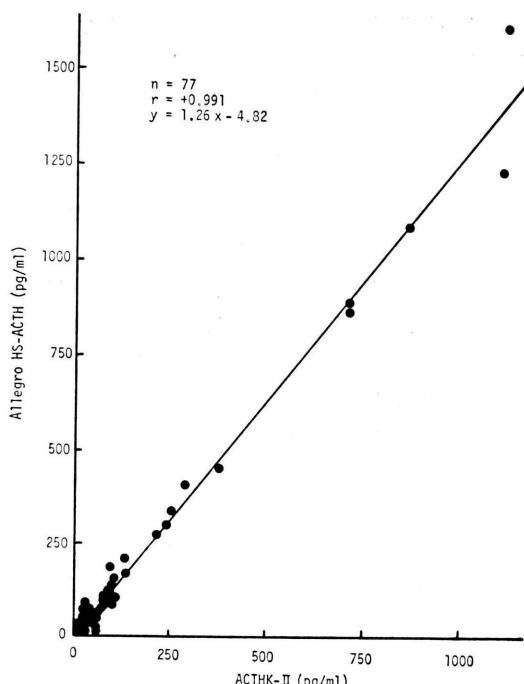
に対し、クッシング症候群(副腎腺腫)では全例が測定感度(1 pg/ml)以下に分布した。一方、アジソン病では439 pg/mlから1,580 pg/mlの範囲に分布し、平均1,035±421 pg/ml、先天性副腎皮質過形成症では2,060~4,670 pg/ml、平均3,357±1,305 pg/ml、メトピロン投与例では155 pg/mlから854 pg/mlに分布し、平均471±354 pg/mlと

いずれも高値であった。一方、下垂体腺腫では9.2 pg/mlから70.4 pg/mlに分布し、平均31.7±23.6 pg/mlであった。健常人の血漿ACTH値から幾何平均を基に、95%信頼限界値を求めたところ4.4 pg/mlから48.0 pg/mlの範囲であった。

2) 負荷試験

下垂体腺腫患者で術前および術後にインスリン

負荷試験を行い、血漿 ACTH 濃度を本測定法で測定した結果を Fig. 7 に示した。Fig. 7 でも明らかなごとく術前、術後の下垂体の病態を反映した結果が得られた。

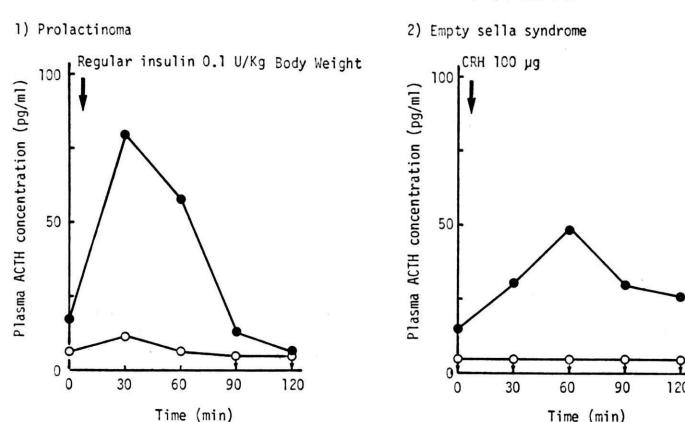


3) 他の測定法との比較

本測定法と ACTH-II との測定値の比較を 77 例で行い、その結果を Fig. 8 に示した。両測定値の間には、相関係数 $r = +0.991$ 、回帰直線 $y = 1.26x - 4.82$ と良好な相関が得られた。また、細部の比較を目的に、プロラクチン産生下垂体腺腫 1 例で術前、インスリン負荷試験を行い同一血清を両測定法で測定したところ本測定法では明らかな反応が確認できたのに対し、ACTH-II では僅かな反応を認めたにすぎなかった (Fig. 9)。一方、Empty sella 症候群が疑われた症例で CRH 負荷試験を行い、同様の検討を行ったところ、本測定法では僅かながら有意の反応が認められたのに対し、ACTH-II では無反応であった (Fig. 9)。

IV. 考 案

ACTH のラジオイムノアッセイ (RIA) に関する報告は比較的古い¹⁾。実際の臨床の場に提供されるようになつた RIA も、種々の問題点をかかえながらも広く活用されてきた。モノクローナル抗体産生技術の普及に伴い⁴⁾、IRMA 法に関心が向けられるようになった。すでに ACTH についても、液相 two site IRMA 法が利用可能となつてゐる²⁾。今回、われわれが検討した ACTH IRMA 法は、Avidin-Biotin 結合を利用した簡便



な two site IRMA 法で、比較的短時間に測定結果を得ることができるとともに、両抗体で認識される ACTH (1-39), すなわち Intact ACTH を測定できる特徴がある。最小検出濃度は、1.0 pg/ml とすぐれ、2 S.D. 法による重複で評価しても少なくとも 3.0 pg/ml までは、十分検出可能であった。標準 ACTH 濃度が 15 pg/ml から 520 pg/ml までは標準曲線は直線を示すが、520 pg/ml から 1,500 pg/ml までは、ゆるやかな曲線となり、IRMA 法でみられる、high dose hook effect の存在が示唆された。交叉反応試験の成績から、本測定法では従来の RIA でみられた ACTH フラグメントとの交叉はないと考えられた。ただ、 β -LPH で 0.01% の交叉が認められたが、これは β -LPH が 100,000 pg/ml という高濃度の添加で初めて認められたことから実際の臨床応用上では問題はないと考えた。回収試験や希釈試験の成績から血清成分による非特異的干渉の存在は否定的であった。精度再現性の成績から本測定法が安定したものであることを示す結果が得られた。ただ、測定試料に及ぼす日常臨床上の因子については、EDTA 血漿であること、また、採血後すみやかに測定に供するか、保存の必要のある時には必ず -20°C での保存が必要と考えられた。また、 -20°C での保存であれば、少なくとも 6 日間は全く安定であることが確かめられた。本測定法による健常人血漿 ACTH 値は 6.5 pg/ml から 43.0 pg/ml の範囲に分布し、mean \pm S.D. は 17.2 ± 11.0 pg/ml であった。これは米国ニコルス研究所の平均値 20 pg/ml と比較的類似した値であった。この値を基に幾何平均を求め 95% 信頼限界値を算出したところ 4.4 pg/ml から 48.0 pg/ml となり、この値が今回の検討で得られた基準値であった。クッシング症候群(副腎腺腫)では、全例測定感度以下に分布し、健常人との区別が容易であった。一方、アジソン病や先天性副腎皮質過形成症では血漿 ACTH 値は著しく高値で希釈測定の必要があった。希釈測定については、希釈試験の成績が特に問題がなかったことから臨床的対応上必要な症例については利用してよいと考えられた。他の測定法との比較では、

良好な相関が得られたが、細部についての評価では、インスリン負荷試験や CRH 負荷試験での反応パターンに差がみられ、結論的には本法がこれらの評価の指標として臨床的に有用との結果が得られた。本測定法が 20 \pm 2 時間と従来の測定法に比べ比較的短時間に測定結果が得られること、抽出操作等を必要とせずに Intact ACTH の測定が可能であることから臨床的意義は大きい。

V. 結 語

Allegro HS-ACTH に関する基礎的ならびに臨床的検討から以下の結論を得た。

(1) 標準曲線は標準溶液 520 pg/ml まで直線性を、また、520 pg/ml 以上 1,500 pg/ml まではゆるやかな曲線を示した。また、本測定法の最小検出濃度は 1 pg/ml であった。

(2) 同一測定内および異なる測定間の精度再現性は良好で、希釈試験も 0 点に集束する直線を示し、回収試験の成績も平均 100% であった。

(3) 交叉反応試験では β -LPH 100,000 pg/ml で 0.01% の交叉が認められたが、各種 ACTH フラグメントおよび α -MSH, β -MSH, β -Endorphin とは全く交叉性が認められなかった。

(4) 測定試料には EDTA 血漿が要求され、保存は -20°C であれば最低 6 日間は安定であった。

(5) 健常人の血漿 ACTH 値は 6.5 pg/ml から 43.0 pg/ml の範囲に分布し、平均 17.2 ± 11.0 pg/ml であった。95% 信頼限界値を幾何学平均を基に算出したところ 4.4 pg/ml から 48.0 pg/ml であった。

(6) クッシング症候群(副腎腺腫)では、全例測定感度以下を示し、健常人との区別が容易であった。一方、アジソン病、先天性副腎皮質過形成症、メトピロン投与例では著しく高値であった。

(7) インスリン負荷試験、CRH 負荷試験の併用で、ACTH 分泌予備能を反映した成績が得られ、ACTH-II と比べ鋭敏であった。

(8) ACTH-II との間で測定値の相関を求めたところ、相関係数 $r = +0.991$ 、回帰直線 $y = 1.26x - 4.82$ と良好な相関が得られた。

文 献

- 1) Yalow RS, Glick SM, Roth J, et al: J Clin Endocr **24**: 1219-1225, 1964
- 2) 宮地幸隆: Immunoradiometric assay と ACTH の immunoradiometric assay. ホルモンと臨床, **36**: 793-798, 1988
- 3) Zahradnik R, Brennan G, Hutchison JS, et al: Ultrasensitive and Precise Immunoradiometric Assay for Employing an Avidin-Biotin Separation Technique. Clin Chem **35** (5): 804-807, 1989
- 4) Kohler G, Milstein C: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature **256**: 495-497, 1975