

ACTH のラジオイムノアッセイ

川崎医科大学 内分泌内科

松村 茂一, 尾山 秀樹

天工 厚子, 堀野 正治

山口大学 内科学第三講座

小林 勝昌, 末次 信昌

(昭和51年8月12日受付)

A Radioimmunoassay for Human ACTH

Shigeichi Matsumura, Hideki Oyama

Atsuko Tenku and Masaharu Horino

Div. Endocrinology, Department of Medicine,
Kawasaki Medical School

Katsumasa Kobayashi and Nobumasa Suetsugu

Third Department of Medicine, Yamaguchi
University School of Medicine

(Accepted on Aug. 12, 1976)

血中ヒト ACTH の radioimmunoassay 法を試みたので報告した。CM-cellulose で吸着したブタ ACTH 1 mg を Freund の complete adjuvant と共に multiple injection でモルモットに免疫し抗血清を得た。この研究には 10 回の免疫後にモルモットより得られた抗血清を 50,000 倍に稀釈して用いた。標準 ACTH および標識 ACTH としては高純度の天然ヒト ACTH (Li, α_1^{1-39} ACTH) を用いた。Bound と Free のホルモンの分離には dextran 被覆 charcoal を用いた。血漿サンプルからの ACTH の抽出は Donald の方法に準じ, silicic acid を用いた。

我々の得た抗血清は ACTH の C 末端側と反応するものと考えられ, ACTH 以外の下垂体ホルモン (GH, TSH, LH, FSH, HPr, oxytocin, arginine-vasopressin および lysine-vasopressin) とは交叉反応を認めなかった。

健常人 5 例の午前 9 時の血漿 ACTH 値は 32.0 ± 8.5 pg/ml (M \pm S. D.) であり, シーハン症候群および治療を中断した副腎性器症候群各 1 例では, それぞれ 20 pg/ml 以下および 194 pg/ml であった。両側副腎の結節性過形成を認めたクッシング症候群では血漿 ACTH 値は正常レベルを示し, 日内リズムは消失していた。また, クッシング病が考えられた 1 例では血漿 ACTH 値の上昇を認め, 日内リズムは消失していた。

A radioimmunoassay method for human adrenocorticotrophic hormone (ACTH) was described. The antiserum was raised in a guinea pig by multiple injections

of total 1 mg of porcine ACTH adsorbed with CM-cellulose and mixed with complete Freund's adjuvant. The antiserum used for this study at a final dilution of 1:500,000 was obtained from a guinea pig after 10 times immunizations. A highly purified native ACTH (Li, α_1^{1-39} ACTH) was used as an assay standard and a tracer hormone. Separation of free and bound hormone was achieved by dextran coated charcoal. Extraction of ACTH from plasma samples was performed by the modified Donald's method with silicic acid.

The antibody appeared to be directed against the C-terminal portion of the hormone molecule and showed no significant reaction with other pituitary hormones (GH, TSH, LH, FSH, Hpr, Oxytocin, Arginine-and Lysine-Vasopressin).

Plasma ACTH levels of 5 healthy subjects at nine o'clock averaged 32 ± 8.5 pg/ml ($M \pm SD$). Plasma ACTH concentrations of a Sheehan's syndrome and of an untreated adrenogenital syndrome at nine o'clock were less than 20 and 194 pg/ml, respectively. A case of Cushing's syndrome accompanied with bilateral nodular hyperplasia of adrenal cortex showed diminished diurnal variation and normal levels of plasma ACTH. In contrast, elevated plasma ACTH levels and lack of diurnal rhythm of ACTH secretion were observed in a suspected case of Cushing's disease.

はじめに

インスリンの radioimmunoassay 法¹⁾が初めて開発されて以来、この方法が諸種のホルモンの測定に応用され、現在では日常検査の一部になっている。ACTH については、その血中濃度が微量であること、力価の高い抗血清の作製が困難であること、ACTH の安定性の低いことなどのため、既に1963年²⁾に radioimmunoassay 法が導入されているにもかかわらず未だにその測定法に多くの問題点が残されている。

我々は今回、モルモットを免疫して特異性の高い抗血清を作製し、ACTH の radioimmunoassay 法を試み、その基礎的および臨床的検討を行った。

材料および方法

1) 抗血清の作製. Organon 社(オランダ)の highly purified porcine ACTH で免疫を開始し、後に同社の porcine ACTH-Z と前者の混合物(1:5)を CM-cellulose に吸着させ

た後、等量の Freund の complete adjuvant (Difco, U. S. A.) と良く混和し、multiple injection で総量 1 mg を4週間毎に成熟モルモットに注射した。最後(10回目)の免疫後10日目に心臓穿刺により採血し抗血清を得た。

2) 標準 ACTH. Dr. C. H. Li (Univ. of California at Berkeley, U. S. A.) より供与されたヒト ACTH (α_1^{1-39} ACTH) を用いた。

3) 標識 ACTH. Dr. C. H. Li より供与されたヒト ACTH を用い、Na ¹²⁵I にて Chloramine T³⁾ 法により標識した。標識 ACTH は Berson & Yallow の報告⁴⁾に従い、Quso G 32 (philadelphia Quartz Co., U. S. A.) で吸着し、蒸留水で洗滌後、1%酢酸—40%アセトン液で溶出して精製し、-20°C に保存した。使用に際しては Quso G 32 を用いて再精製を行った。

4) 血漿よりの ACTH の抽出. Donald の方法⁵⁾に準じ、表1に示す如く、血漿 2.0 ml に 0.02 M バルビタール緩衝液(pH 7.0) 0.5 ml に懸濁した silicic acid (100 mesh, Mallin-krodt, U. S. A) 20 mg を加え、10分間混和後

Table 1. Procedures for ACTH Radioimmunoassay

| Extraction | | Assay | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Plasma Sample | 2.0 ml | Supernate | 0.2 ml |
| or | | Antiserum (1 : 50,000)** | 0.1 ml |
| Standard Solution (0.1 ml) in ACTH Free Plasma (1.9 ml) | 2.0 ml | Barbital Buffer (0.02 M, pH 8.0, 0.5 % HSA, 0.5 % Mercaptoethanol, Trasylol 500 KIU/ml) | 0.6 ml |
| 4 % Silicic Acid* | 0.5 ml | | |
| ↓ mix and stand for 10 min. in ice water bath centrifuge off (20 min.) supernate | | ↓ incubate for 48 hr. at 4°C | |
| ↓ Wash twice with 1.0 ml of Barbital Buffer (0.02 M, pH 7.0, 0.5 % HSA) | | ↓ ¹²⁵ I-ACTH Solution*** | 0.1 ml |
| ↓ 1N HCL: Acetone: D. W. (1 : 5 : 94) | | ↓ 0.02 % Dextran Coated 0.2 % Charcoal**** | 0.5 ml |
| ↓ mix and stand for 10 min. in ice water bath centrifuge for 20 min. | | ↓ incubate for 20 min. centrifuge for 20 min. at 4°C | |
| ↓ Supernate | | ↓ Count Supernate (Bound) and Precipitate (Free) | |

* suspended with barbital buffer (0.02 M, pH 7.0)

** diluted with barbital buffer (0.02 M, pH 8.0, 0.5% HSA)

*** diluted with barbital buffer (0.02 M, pH 7.0, 0.5% HSA)

**** suspended with barbital buffer (0.02 M, pH 8.0)

遠沈し、上清を除去し、0.02 M バルビタール緩衝液 (pH 7.0, HSA) 1.0 ml による洗滌を2度行った後、塩酸-アセトン液(1N 塩酸:アセトン:蒸留水=1:5:94) 0.5 ml を加え10分間混和後遠沈し、上清 0.2 ml を測定に使用した。

抽出にはシリコン処理したガラス試験管を使用した。また標準曲線用には ACTH フリー血漿 1.9 ml に各濃度の ACTH 標準液を 0.1 ml 添加し上記の方法で抽出を行った。ACTH フリー血漿には午前9時にデキサメサゾン 4 mg を服用し4時間後に採血して得た血漿を用いた。

5) 操作. 表1に示す如く、栄研チュウブ(プラスチック製, 栄研化学)に0.02 M バルビタール緩衝液 (pH 8.0, 0.5 % HSA, 0.5 %メルカプトエタノール, トラジロール 500 KIU/ml) 0.6 ml に抽出液 0.2 ml, 50,000 倍に稀釈した抗血清 0.1 ml を加え混和後, 4°C に2日間静置し, 標識 ACTH 0.1 ml を加え更に4°C に3日間静置し, 0.02 % dextran (T-70,

Pharmacia, Sweden) 被覆 0.2 % charcoal (Norit A, carbon decolorizing, American Norit Co., U. S. A.) 懸濁液 0.5 ml を加え, 充分混和し20分間静置後, 3,000回転で20分間遠沈し, 上清及び沈澱の双方をカウントした。尚, 変性した ¹²⁵I-ACTH の補正を行うため, 抗血清を加えずに上記操作を行い上清をカウントし, これを各サンプルの上清のカウントから減じて補正を行った。

6) 血漿の採取. ヘパリン加注射筒で採血した後, 直ちに4°C で遠沈し, 分離した血漿は測定まで-20°C に凍結保存した。

成 績

1) 標準曲線. 図1に典型的な標準曲線を示した。Aは抽出操作を行わずに得られた標準曲線で, Bは抽出操作を加えて得られたものである。血漿サンプルの測定に際してはBの標準曲線を使用した, 12.5 pg から250 pg の範囲で急峻な曲線が得られた。

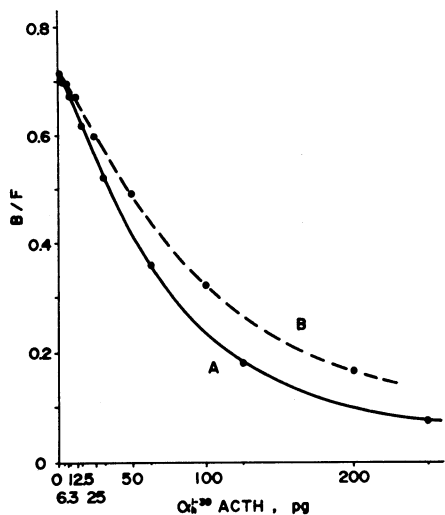


Fig. 1. Typical dose response lines for ACTH radioimmunoassay. Line A represents a typical dose response line with standard ACTH diluted with barbital buffer. Line B represents a typical dose response line with extracted standard ACTH from ACTH free plasma.

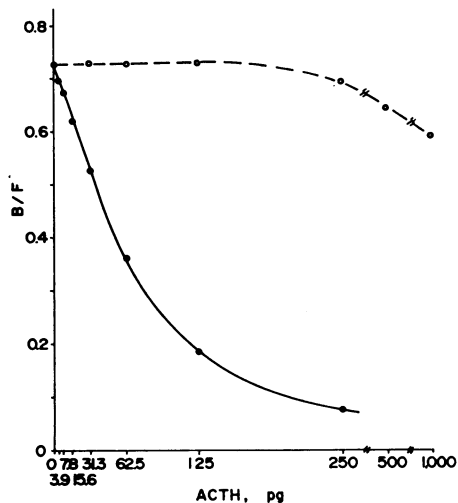


Fig. 2. Crossreactivities of natural α_{h1-39} ACTH(Li) and synthetic α^{1-24} ACTH with α_{p1-39} ACTH antiserum. Crossreactivity of α^{1-24} ACTH (o--o) was less than 3% of that of α_{h1-39} ACTH (•—•) when calculated on a weight basis.

2) 抗血清の特異性. GH (NIH, 1544 C), TSH (NIH), LH (NIH, LER 960), FSH (NIH, LER 1366), HPr (Friesen) 合成 lysine-vasopressin (Sigma, U. S. A.), 合成 arginine-vasopressin (Sigma), 合成 oxytocin (Sigma) および合成 α^{1-24} ACTH (Organon) について交叉反応を検討したが、図 2 に示す如く、合成 α^{1-24} ACTH とわずかに交叉反応を認めるのみで、他の下垂体ホルモンとの交叉反応は認められなかった。

3) 抽出操作の検討. 血漿 2.0 ml に精製した ^{125}I -ACTH を加え、silicic acid の添加量を変えて抽出操作を行ったところ、図 3 に示す如く、silicic acid 10 mg から 25 mg の範囲では silicic acid の量を増すに従い、 ^{125}I -ACTH の吸着量は増加していたが、酸—アセトン液 0.5 ml で溶出した場合の回収率は 20 mg 添加時が最も大で、74.5% であった。25 mg 添加時は吸着量は多いが溶出量が十分でない成績を得た。

4) 臨床成績. 本測定法で得られた健常人 5

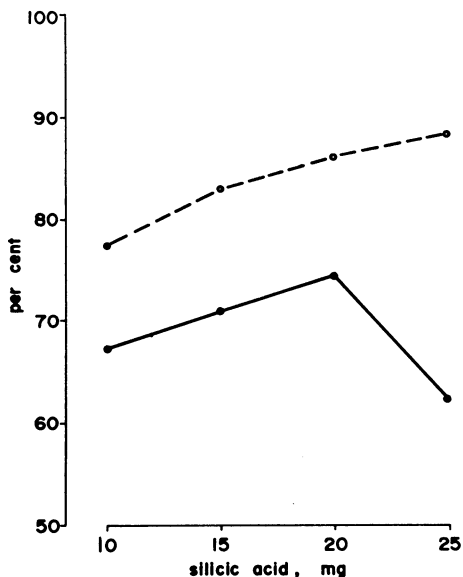


Fig. 3. The effect of silicic acid on the adsorption and extraction of ^{125}I -ACTH added to ACTH free plasma. o--o represents the percentage of ^{125}I -ACTH adsorbed to silicic acid. •—• represents the percentage of ^{125}I -ACTH extracted from plasma.

例の午前9時における血漿 ACTH 値は 32.0 ± 8.5 (mean \pm S. D.) pg/ml であり, シーハン症候群の1例では 20 pg/ml 以下であり, 副腎皮質ホルモン治療を中断した副腎性器症候群1例では午前9時の血中 ACTH 値は 194 pg/ml であった. クッシング症候群の2例については, 図4に ACTH 値の日内変動を示したが, 開腹により結節性過形成が確認された1例では, ACTH 値は上昇を示さず, その日内リズムの消失を認めた. 他の1例においては ACTH 値は健常人よりも高値を示し, 日内リズムは消失していた. この症例ではびまん性過形成が考えられた.

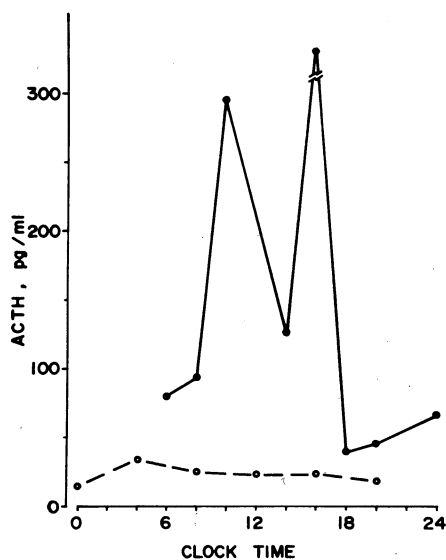


Fig. 4. Diurnal variation of plasma ACTH in patients with Cushing's syndrome and Cushing's disease.

—•— indicates ACTH levels in Cushing's disease. - - - indicates ACTH levels in Cushing's syndrome with nodular hyperplasia of adrenal cortex.

考 按

標準曲線は図1の如く抽出操作を加えたものとそうでないものとの間に相違を認めたが, これは抽出操作における回収率によって説明され, 抗原抗体反応への障害物質が抽出された可

能性は少ないと考えられた.

我々が得た抗血清は下垂体前葉ホルモンである GH, TSH, LH, FSH, HPr, 後葉ホルモンである vasopressin, oxytocin と全く交叉反応を認めず ACTH に特異性の強い抗血清である. また合成 α^{1-24} ACTH との交叉反応はわずかであり, この抗血清は主として ACTH の 25~39 の部と反応する抗体であると考えられ, N 末端側のフラグメントは我々の測定にほとんど影響を与えないと考えられた. また ACTH の 25~33 の部は種特異性のある部分であり, ブタ ACTH を抗原として得られた抗体であるのにヒト ACTH との反応性が良いのはブタ ACTH を抗原とした他の報告⁶⁾⁷⁾と同様であり, ブタ ACTH とヒト ACTH ではアミノ酸配列中の 31 位のみが異なり, 構造が良く似ている⁸⁾ためと考えられる.

これ迄に, 抽出操作を必要としない ACTH の radioimmunoassay^{4), 9), 10)} 法もわずかに報告されているが, 大部分の^{2), 6), 7), 11)~14)} 報告と同様に我々の radioimmunoassay 法も抽出操作を必要とした. 抽出は Donald⁵⁾ が溶出に酢酸:アセトン:蒸溜水=1:25:100 (容積比)を使用したのに対し, 我々は 1N 塩酸:アセトン:蒸溜水=1:5:94 の溶液を用い, 測定に及ぼすアセトンの影響を少なくしたが, silicic acid からの ACTH の溶出は良好であった.

本法により測定された健常人5例の午前9時の血漿 ACTH 値 (32.0 ± 8.5 pg/ml) は Berson 等⁴⁾ の 22 pg/ml (平均), Landon 等¹¹⁾ の 12~55 pg/ml, Besser 等¹²⁾ の 15~70 pg/ml, Donald 等¹³⁾ の 41.6 pg/ml (平均), 中川等¹⁴⁾ の 25.1~54.0 pg/ml 等とほぼ同様のものではあった.

また, シーハン症候群では ACTH は低値を示し, 副腎性器症候群では高値を示した. クッシング症候群では, 結節性過形成によるものは ACTH の上昇を認めず, びまん性過形成と思われる症例では ACTH の上昇を認め, 下垂体副腎系の病態を良く反映していた.

ま と め

特異性の高い ACTH の抗体を作製し, ACTH の radioimmunoassay を試み, 基礎的および臨床的検討を行った。

- 1) 我々の得た抗体は主として ACTH の C 末端側と反応する抗体であると考えられた。
- 2) 健常人の午前9時の血漿 ACTH 値は 32.0 ± 8.5 pg/ml (mean \pm S. D.) であった。

3) シーハン症候群, 副腎性器症候群, クッシング症候群において, 本法による ACTH 値は病態を良く反映し, 診断上有用であった。

稿を終るにあたり, 御指導を賜った山口大学第三内科, 三輪史朗教授に感謝いたします。また, ヒト ACTH を提供下さいました Dr. C. H. Li (Univ. of California at Berkeley) およびブタ ACTH を提供下さいました第一製薬に感謝いたします。

文 献

- 1) Yalow, R. S. and Berson, S. A.: Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature (London)*, 184 : 1648—1649, 1959.
- 2) Felber, J. P.: ACTH antibodies and their use for a radioimmunoassay for ACTH. *Experimentia*, 19 : 227—229, 1963.
- 3) Hunter, W. M. and Greenwood, F. C.: Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature (London)*, 194 : 495—496, 1962.
- 4) Berson, S. A. and Yalow, R. S.: Radioimmunoassay of ACTH in plasma. *J. Clin. Invest.*, 47 : 2725—2751, 1968.
- 5) Donald, R. A.: A rapid method for extracting corticotrophin from plasma. *J. Endocr.*, 39 : 451—452, 1967.
- 6) Demura, H., West, C. D., Nugent, C. A., Nakagawa, K. and Tyler, F. H.: A sensitive radioimmunoassay for plasma ACTH levels. *J. Clin. Invest.*, 26 : 1297—1302, 1966.
- 7) Imura, H., Sparks, L. L., Grodsky, G. M. and Forsham, P. H.: Immunologic studies of adrenocorticotrophic hormone (ACTH): Dissociation of biologic and immunologic activities. *J. Clin. Endocr.*, 25 : 1361—1369, 1965.
- 8) Riniker, B., Sieber, P., Rittel, W. and Zuber, H.: Revised amino-acid sequences for porcine and human adrenocorticotrophic hormone. *Nature New Biol.*, 235 : 114—115, 1972.
- 9) Rayyis, S. S. and Bethune, J. E.: Radioimmunoassayable ACTH in dexamethasone nonsuppressible Cushing's syndrome. *J. Clin. Endocr.*, 29 : 1231—1237, 1969.
- 10) Matsukura, S., Ichikawa, Y., Jubiz, W., West, C. D. and Tyler, F. H.: A new approach to the radioimmunoassay of plasma ACTH. *Clin. Research*, 17 : 145, 1969.
- 11) Landon, J. and Greenwood, F. G.: Homologous radioimmunoassay for plasma-levels of corticotrophin in man. *Lancet*, 1 : 273—276, 1968.
- 12) Besser, G. M., Curren, R. D., Irvine, W. J., Ratcliffe, J. G. and Landon, J.: Immunoreactive corticotrophin levels in adrenocortical insufficiency. *Brit. Med. J.*, 1 : 374—376, 1971.
- 13) Donald, R. A., Espiner, E. A. and Beaven, D. W.: The effect of metyrapone on corticotrophin secretion. *J. Endocr.*, 52 : 517—524, 1972.
- 14) 中川昌壯, 宮川勇生: ACTH Radioimmunoassay Kit (RCC) の臨床応用に関する検討. *核医学*, 13 : 145—149, 1976.