Radioimmunoassay of ACTH in Human Plasma

Shigeyoshi YUJI and Toshiro NAKAJIMA

Department of Internal Medicine, Kyushu Dental College, Kitakyushu, Japan
(Director : Professor Nobuhiko Okabe, M.D.)

Akira WATANABE

Second Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine Kyushu University,
Fukuoka, Japan (Director : Professor Shibanosuke Katsuki, M.D.)

Adrenocorticotrophic hormone is a relatively poor antigen, and difficulties in obtaining antisera which are sufficiently sensitive for radioimmunoassay of plasma ACTH have been reported by several workers.

In the present study, guinea pigs were immunized by subcutaneous injections at biweekly intervals with 20 U of commercial porcine ACTH emulsified in complete Freund's adjuvant or acetylated wax D (AD) which contained less competing antigens than bacillary bodies of *Mycobacteria*. Antisera obtained by 8 injections were not sensitive for the measurement of plasma ACTH, though animals injected with acetylated wax D induced slightly increased production of the antibody.

Guinea pigs in another immunization schedule were given 30 U of commercial porcine ACTH mixed with metyrapone and complete Freund's adjuvant by monthly subcutaneous injections. The antiserum used for assay was obtained from one guinea pig after 14 months.

Highly purified porcine ACTH supplied by Mann Laboratories was iodinated by the chloramine T method and purified with QUSO G32. Specific activities ranged from 300 to 400 mc/mg. The reference standard used was highly purified human ACTH supplied by Dr. Lee.

The assay was performed by a modified method of Berson & Yalow. ¹²⁵I-porcine ACTH of 1 μ g, antiserum at a final dilution of 1: 50,000 and unknown plasma of 0.2 ml were added to a final incubation volume of 1.0 ml. The mixtures were incubated at 4°C for 7 days. Talc was used for separation of antibody bound and free labeled hormone.

A minimum of 16 μ g/ml of ACTH was detected in the assay. Therefore, 80 μ g ACTH/ml of whole plasma was measurable in plasmas assayed at 1: 5 dilutions. Plasma concentrations in normal subjects ranged from less than 80 to 160 μ g/ml at 9 a.m.. Increased concentrations were observed in patients with Addison's disease and Cushing's syndrome associated with bilateral adrenal hyperplasia. Plasma ACTH levels were undetectable in normal subjects pretreated with dexamethasone and patients with Cushing's syndrome associated with adrenal adenoma. The administration of metyrapone in patients with Cushing's syndrome produced an increase in plasma ACTH concentration in those with bilateral adrenal hyperplasia, whereas no significant change in those with adrenal adenoma.

(See pp. 110~114)

ACTH の Radioimmunoassay に関する研究

九州歯科大学内科学教室（主任 岡部信彦教授）

湯 地 重 壬, 中 島 敏 郎

九州大学医学部第二内科学教室（主任 勝木司馬之助教授）

渡 辺 斌

（昭和45年12月28日受付）

豚 ACTH を metyrapone と complete Freund's adjuvant に加えてモルモットに1月1回の免疫を行ない、14ヶ月目に得られた抗血清を用い、血漿を1:5に希釈して assay を行なった。正常人の血漿 ACTH 値は80以下～160 $\mu\text{g/ml}$ 、副腎腺腫による Cushing 症候群では検出不能で、過形成によるものおよび Addison 病では高値を示した。metyrapone 投与により Cushing 症候群の腺腫例では反応がみられなかったが、過形成例では血中 ACTH は上昇し、両者の鑑別に有用と考えられた。

緒 言

人の血中 ACTH を radioimmunoassay によつて測定するに当つては、他の peptide hormone にくらべて ACTH の血中濃度が低いこと、ACTH に対する抗体産生が困難であること、また抗体が多様性を示すことなどが問題点とされている¹⁾²⁾。我々はこれらの点を検討し、あわせて臨床例の血中 ACTH 値について若干の知見を得たので報告する。

方 法

ACTH 抗血清を作製するためにモルモットを次のごとく2群に分けて免疫を行なった。1群は1匹あたり市販の Organon NH ACTH plain または ACTH-Z の20単位 (0.5ml) を等量の complete Freund's adjuvant と混和し、2週間に1回、大腿内側に皮下注射し、その1週後に心穿刺により採血して抗体産生の経過を検討した。他の群には結核菌成分であるロウDの水酸基をアセチル化したもの、すなわち acetylated wax D (AD) を adjuvant として同様の免疫を行なった³⁾。この AD 10 mg と Durakeol No. 6 0.4 ml と Arlacel A 0.1 ml を混和したものを1匹あたりに使用した。

上記の方法で得られた抗血清の他にさらに著者の1人湯地が Los Angeles Veterans Administration Center で作製した抗血清を血中 ACTH の測定に使用した。これはモルモットに1匹あたり、Duracton 豚 ACTH 30単位と metyrapone 75mg を等量の complete Freund's adjuvant に混和して、1月に1回、大腿内側に皮下注射し、14回目の免疫後10日目に採血した抗血清 VA(1)1-14 である。

標識 ACTH は Iso-Serve の高比放射能の ^{125}I を用いて、Mann Laboratories の highly purified 豚 ACTH を chloramine T 法で iodination し⁴⁾、purification は QUSO G32 法によつて行なった⁵⁾。得られた ^{125}I -ACTH の比放射能は 300～400 mc/mg であつた。標準 ACTH は Dr. Lee の highly purified 人 ACTH (25 U/mg) を使用した。

assay は Berson & Yalow の方法¹⁾に準じて行ない、standard diluent は 2.5% 人血清アルブミン、1% 正常モルモット血漿、0.4% mercaptoethanol および 375 KIU/ml の Trasylol を含む 0.05M phosphate buffer (pH 7.5) を用い、標準 ACTH、標識 ACTH および抗血清は全てこれにて希釈した。incubation

は siliconize した試験管を使用して全量を 1.0 ml とし、4℃で7日間行なつた。

抗血清の希釈曲線作製に用いた ^{125}I -ACTH は最終濃度が $4\mu\text{g/ml}$ であり、incubation 終了後 0.2 ml の正常人血漿と 1.5 ml の standard diluent および 50 mg Talc 錠を加えて Vortex 振盪器で振盪して遠沈し、Talc(F) と上清(B)をそれぞれ automatic well-type scintillation counter にて放射能を測定し、B/F を算定した。検体の血漿 ACTH 測定には incubation 溶液は血漿 0.2 ml を含む 1.0 ml とし、 ^{125}I -ACTH の最終濃度を $1\mu\text{g/ml}$ とし、抗血清は 1 : 50,000 の最終希釈度で使用した。標準 ACTH の incubation 溶液には 0.2 ml の dexamethasone 処理正常人血漿を含ませ、両者とも incubation 後、1.5 ml の standard diluent と Talc 50 mg を抗血清希釈曲線の場合と同様に加え、遠沈して B と F を分離した。血中 ACTH を測定したのは正常人 5 例および九大第二内科入院患者 8 例と福岡赤十字病院内科入院中の副腎腺腫による Cushing 症候群の 1 例である。尿 17-OHCS は西風らの方法により定量を行なつた⁶⁾。

結 果

Fig. 1 は complete Freund's adjuvant を用いて、NH ACTH plain で免疫した 3 匹および ACTH-Z による 1 匹の計 4 匹と、AD adjuvant を用いて NH ACTH plain で免疫した 2 匹および Z による 1 匹の計 3 匹の抗体産生の経過を示したものである。抗血清の 1 : 500 の最終希釈度における抗体の結合度 B/T はいずれも最高 50% にとどまり、十分な抗体価の上昇はどの例にも認められなかつたが、4 回の免疫までは AD adjuvant の方が結合度の上昇が高い傾向がうかがわれた。

Fig. 2 は complete Freund's adjuvant を用いた動物番号 2 と AD adjuvant を用いた動物番号 3 のそれぞれの各 ACTH 注射後の抗血清の希釈曲線の経過を示したものである。両者とも 5 回目免疫以後は

Fig. 1. Production of anti-porcine ACTH antibody by guinea pigs.

Fig. 2. Titration curves of antiserum to porcine ACTH with ^{125}I -porcine ACTH ($4\mu\text{g}/\text{ml}$)

Fig. 3. ACTH standard curve.

Fig. 4. Plasma ACTH concentrations in normal subjects and patients with Cushing's syndrome and Addison's disease.

B/F が 1.0~2.0 より下降する曲線が得られたが、B/F が 1.0 前後を示す 1:125 および 1:250 の最終希釈度を用いて前述の方法で標準 ACTH ならびに Addison 病患者血漿について assay を行なつたが、いずれも十分な感度を得るに至らなかった。

VA(1)1-14 を用いて作製した標準曲線を Fig.3 に、血中 ACTH の測定値を Fig.4 に示した。この標準 ACTH の感度は $16\mu\text{g}/\text{ml}$ 、血漿では 5 倍希釈を用いているので $80\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。正常人 5 例では午前 9 時の値は 80 以下~160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、dexamethasone 1 mg を午後 11 時に投与して翌朝午前 9 時に採血したものはいずれも 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下となった。副腎腺腫による Cushing 症候群の 2 例は $80\mu\text{g}/\text{ml}$ 以

下, 過形成による6例は80以下~620 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であつた。過形成例の6例ともすでに下垂体の ^{60}Co 照射, 経鼻的定位手術による下垂体高周波凝固術, 一側副腎摘出等の治療を受けた患者であつたが, 現在なお臨床症状, 臨床成績が Cushing 症候群の所見を呈するものが4例あり, その血中 ACTH 値はそれぞれ 160, 160, 210, 620 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であつた。2例は現在 Cushing 症候群の所見は認められない例であり, その値は両例とも 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下であつた。Addison 病の1例は 1600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の高値を示し, hydrocortisone 25 mg 投与2日目に200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となつた。この血漿の25, 50, 100および200 μl の量を用いて assay を行なつて得た値はそれぞれ1600, 2550, 1930 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と 1600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上であり, 血漿の希釈度にはば一致した測定値が得られた。

過形成による Cushing 症候群の1例と腺腫による2例の metyrapone に対する血中 ACTH および尿 17-OHCS の反応をみた成績が Fig. 5 である。metyrapone は1日3g を4時間おきに内服させ, 血中 ACTH は投与直前の午前9時, 投与後の午後3時, 午後9時, 翌日午前9時に測定したが, 過形成例では尿 17-OHCS, 血中 ACTH とも metyrapone に対して増加が認められた。この例は経鼻的定位手術による下垂体高周波凝固術を受けたが, その2週後も同様の反応がみられた。腺腫の2例では尿 17-OHCS, 血中 ACTH の metyrapone に対する反応は共に認められなかつた。

Fig. 5. Responses of plasma ACTH and urinary 17-OHCS to metyrapone in patients with Cushing's syndrome. Metyrapone (M) 500mg p.o. every 4hr $\times$ 6 from 9 a.m. day 4.

考 察

Radioimmunoassay によつて血中 ACTH を抽出操作なしに直接に測定し得た報告に Berson & Yalow¹⁾, Rayyis ら⁷⁾と, 過剰の抗体を用いて reverse portion を利用した松倉⁸⁾の論文がある。血中 ACTH を直接に測定するためにはその濃度が低いために, 少量の標識 ACTH を使用すること, high affinity を持つた抗血清を用いることが必要である¹⁾。標識 ACTH は高比放射能の ^{125}I または ^{131}I を用いて作製することが出来るが, ^{125}I -ACTH は ^{131}I にくらべてより微量を利用出来るので有利であり¹⁾, 今回の実験でも ^{125}I -ACTH を用いた。抗体の産生は困難であり, 諸家によつて種々の試みがなされている。

ACTH の分子量は小さく, そのため ACTH を牛アルブミン等の蛋白と coupling させて免疫する方法⁷⁾や, 副腎皮質よりの glucocorticoid 合成を阻害する metyrapone (11 β -hydroxylase inhibitor) とともに

投与して抗体産生を高める方法¹⁰⁾によつて優れた抗血清が作製されている。complete Freund's adjuvant はその中の結核菌体に含まれる蛋白成分が、免疫を行なう抗原と競合して抗体産生を阻害することが考えられ³⁾, AD adjuvant はこの競合する蛋白成分が少ないため、ACTH のように抗原作用の弱い場合は抗体産生が増強されることを予期して使用したが、十分な結果を得ることが出来なかつた。一方、metyrapone を使用し、1月1回の免疫で13ヶ月以降に assay に使用し得る抗血清を得た。ACTH の抗体産生は使用した動物の種類と個体差、ACTH 製剤の差、免疫方法さらに免疫期間などが関与していることがこれらの成績より推定された。

血漿 ACTH の radioimmunoassay による測定値は bioassay による値とほぼ一致し、正常人の午前8～9時の値は10～100 $\mu\text{g/ml}$ 程度とされている¹²⁾⁸⁾¹⁰⁾。その値を直接測定するだけの感度の得られない場合は血漿 ACTH の抽出操作が必要である¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾。この実験では血漿を1:5の希釈度で抽出することなく測定したが、標準曲線の感度は16 $\mu\text{g/ml}$ 、したがつて血漿の感度は80 $\mu\text{g/ml}$ であり、抽出操作を行なう必要が考えられた。この条件で測定した正常人の午前9時の値は80以下～160 $\mu\text{g/ml}$ であり、dexamethasone 投与により全例とも80 $\mu\text{g/ml}$ 以下となつた。副腎腺腫による Cushing 症候群では検出不能であり、過形成によるものは高値を示し、Addison 病の1例も著しく高値であつたが、これらの成績は従来の報告と一致するものであつた^{12)7)～13)}。

Cushing 症候群の副腎腺腫と過形成との鑑別は尿 17-OHCS を指標とする場合、必ずしも判然としない症例がある。Sparks らは metyrapone 投与による血中 ACTH の反応を bioassay により測定し、両者の鑑別に用いている¹⁴⁾。今回の実験でも過形成の1例では metyrapone 投与に対して尿 17-OHCS と血中 ACTH の増加がみられ、経鼻的定位手術による下垂体高周波凝固術の2週後も同様であつた。腺腫による2例では尿 17-OHCS と血中 ACTH の反応は共に認められなかつた。この成績は metyrapone に対する ACTH の反応をみることで、腺腫と過形成の鑑別あるいは過形成例に対する治療効果の判定に有用であることを示唆するものと考えられた。

本論文の要旨は第43回日本内分泌学会総会および第18回同西部部会総会にて発表した。acetylated wax D を提供いただいた九大胸部疾患研究所田中渥助教授、御校閲いただいた勝木司馬之助教授、岡部信彦教授に深謝する。

文 献

- 1) Berson, S.A. and R.S. Yalow : J. Clin. Invest., 47 : 2725, (1968).
- 2) Orth, D.N., D.P. Island, W.E. Nicholson, K. Abe and J.P. Woodham : Radioisotopes in Medicine : in vitro studies, AEC Symposium Series, 13 : 251, (1968).
- 3) Tanaka, A., K. Tanaka, D. Hagimoto and K. Sugiyama : Int. Arch. Allergy, 32 : 224, (1967).
- 4) Greenwood, F.C., W.M. Hunter and J.S. Glover : Biochem. J., 89 : 114, (1963).
- 5) Yalow, R.S. and S.A. Berson : Nature, 312 : 357, (1966).
- 6) 西風 脩, 古屋悦子 : 臨床病理, 15 : 694, (1967).
- 7) Rayyis, S.S. and J.E. Bethune : J. Clin. Endocr., 29 : 1231, (1969).
- 8) 松倉 茂 : 日本臨牀, 27 : 313, (1969).
- 9) Yalow, R.S., S.M. Glick, J. Roth and S.A. Berson : J. Clin. Endocr., 24 : 1219, (1964).
- 10) Landon, J. and F.C. Greenwood : Lancet, i : 273, (1968).
- 11) Demura, H., C.D. West, C.A. Nugent, K. Nakagawa and F.H. Tyler : J. Clin. Endocr., 26 : 1297, (1966).
- 12) 五味二郎, 本間光夫, 市川陽一, 吉田幸一郎 : 日本内分泌誌, 45 : 433, (1969).
- 13) Besser, G.M. and J. Landon : Brit. Med. J., 4 : 552, (1968).
- 14) Sparks, L.L., R.P. Smilo, F.C. Pavlatos and P.H. Forsham : Metabolism, 18 : 175, (1969).