Radioimmunoassay による血漿 11-deoxycorticosterone (DOC) 含量の測定法

東北大学医学部第2内科

福地 総逸, 中嶋 凱夫, 竹内 孝彦, 西里 弘二

Measurement of Plasma 11-Deoxycorticosterone Levels by Radioimmunoassay in Man

**Soitsu FUKUCHI, Katsuo NAKAJIMA, Takahiko TAKENOUCHI
and Koji NISHISATO**

Department of Internal Medicine, Tohoku University, School of Medicine

A radioimmunoassay procedure has been developed to measure 11-deoxycorticosterone (DOC) in human peripheral plasma. DOC-oxime was coupled with porcine gamma globulin and antibodies produced in rabbits. One to 3 ml of plasma, with 1, 2 ^3H -DOC added for recovery, was extracted with dichloromethane and purification achieved by a silica gel column and by one paper chromatograph. After overnight incubation of the antibody-steroid mixture at 4°C , bound and free fractions were separated using ammonium sulfate. The mean recovery of ^3H -DOC, after extraction and chromatography, was $84.6 \pm 7.4\%$. The method showed adequate specificity, precision and accuracy.

Normal plasma DOC levels were found to be 4.4 ± 2.5 ng/100 ml ($n=8$). Plasma DOC levels were almost normal (0.3–26.8 ng/100 ml) in fifteen patients with benign essential hypertension. The mean level of 8.1 ± 8.2 ng/100 ml obtained in hypertensive patients with suppressed plasma renin activity, was not significantly different from normal. Plasma DOC showed a high level, 3.0–30.5 (11.4 ± 7.5) ng/100 ml, in 9 patients with primary aldosteronism. Four out of 8 patients with Cushing's syndrome were found to have elevated plasma DOC levels. Higher levels of 21.2 ± 15.8 ng/100 ml were found in 5 patients with adrenal hyperplasia than those of 12.3 ± 8.0 ng/100 ml in 3 with adrenal adenoma. Plasma DOC levels were high levels of 113–176 ng/100 ml in 2 patients with 17α -hydroxylase deficiency. ACTH administered to 5 subjects produced a mean increase in plasma DOC from 4.8 to 25.8 ng/100 ml. Angiotensin II infused at a rate of 10 ng/kg/min for 30 min into 4 subjects did not increase mean plasma DOC. Similarly, dietary sodium restriction or postural change did not increase plasma DOC.

These results confirm that DOC secretion is primarily under anterior pituitary control. From the basal level of 4.4 ng/100 ml and from its biological activity compared to aldosterone, the major mineralocorticoid, it would seem that DOC plays a minor role in

electrolyte homeostasis in normal humans. However, the elevated levels seen in some cases of adrenal cortical hyperfunction may mean that DOC contributes significantly to the characteristic symptoms of hypertension and hypokalemia.

緒 言

Deoxycorticosterone (DOC) はアルドステロンに次いで強力な電解質作用を有するステロイドであるが、アルドステロンに関しては種々の知見が明らかにされたのに拘らず、DOC の分泌状態およびその調節機序に関しては不明の点が多く存在する。これは血漿中の DOC 含量が少ないために測定が困難であつたことも一つの原因と思われる。血漿 DOC 含量の測定は主として、煩雑な double isotope derivative dilution method¹⁾ により行なわれていたが、最近感度のよい radioimmunoassay が完成して始めて可能となつた。われわれは DOC oxime とブタ血清 γ -グロブリンとの結合物をウサギに投与することにより高単位の抗 DOC 血清をうる事が出来たので、これを利用して簡単に血漿の DOC 含量を正確に測定することに成功した。これを用いて各種疾患における血漿 DOC 含量を測定したので、併せて発表することとする。

実 験 方 法

1. 抗体の作製法

DOC oxime の作製は Erlanger ら²⁾ の方法に準じて行なつた。すなわち 20mg の DOC (Sigma) と 10mg の carboxymethoxylamine hemihydrochloride とを 4ml のエチルアルコールに溶解し、100 μ l の 5% NaOH を加えてアルカリ性とし、25℃に4時間 incubate することにより作製した。これを60℃で乾固、次いで5mlの蒸留水に溶解し、1N NaOH を透明になるまで加えた。次いで2mlの酢酸エチルを加えて1分間振盪、上清に含まれる遊離の DOC を除き、次いで水層を塩酸で pH 2.0 としてのち5mlの酢酸エチルで2回抽出を行なつた。酢酸エチル層を乾固、これに25 μ l の tri-n-butylamine と1mlの dioxane を加えて10℃に冷却後、10 μ l の isobutyl-chlorocarbonate を加えて4℃に20分間放置、1mlのブタ血清グロブリン溶液 (80mg/ml water : dioxane 1 : 1) を加えて4時間室温で振盪、18時間蒸留水で透析後、同量の complete Freund's adjuvant とともに3羽のウサギに2週ごとに筋注した。

2. 血漿 DOC 抽出法

使用するガラス器具は使用当日、メタノールで2回、dichloromethane で2回洗浄して用いた。silica gel はその 100g を 6N HCl で5回洗浄後、蒸留水で6回、メタノールで3回、dichloromethane で3回洗浄し、80℃で2日間乾燥して使用した。paper chromatography に用いる paper としては Whatman No. 1 を Soxlet 抽出器を用いて benzene : methanol 1 : 1 により5日間洗浄後乾固し、その後48時間再溜メタノールで洗浄して使用した。

1, 2-³H-DOC は 50C/mM の specific activity を有するものを New England Nuclear Corp. より購入して、4週ごとに paper chromatography (cyclohexane : dioxane : methanol : water 100 : 20 : 100 : 10) により純化して使用した。

まず2mlの血漿に0.1mlの1, 2-³H-DOC (約 10,000cpm) を加えて30mlの dichloromethane で抽出した。抽出した dichloromethane 層は silica gel column (8×30mm) によつてステロイド以外の不純物を除いた。すなわち抽出した dichloromethane を column に入れてのち、5mlの dichloromethane、次いで5mlの 10% methanol : dichloromethane で溶出した。溶出液を乾固後、cyclohexane : dioxane : methanol : water (100 : 20 : 100 : 10) の paper chromatography により30℃に3時間安定後、20時間展開した。

次に paper chromatogram scanner により 1, 2-³H-DOC の位置を確認してのち、DOC を含む部分を

切り, 5 ml のメタノールで溶出した. メタノール溶出液は 1 ml ずつに分け, うち 2 本は回収率の補正のため直ちに counting vial 中に入れ, 他の 2 ml は 2 本の小試験管にとり, いずれも 50°C 以下で乾固した.

3. radioimmunoassay の方法

標準曲線を作製するためには, DOC をそれぞれ, 0, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 pg を加えた試験管に 1, 2-³H-DOC の一定量 (約 2,000 cpm) を加え 40°C 以下で乾固した.

抗血清は 0.1% γ -グロブリン, pH 8.0, 0.05M 硼酸緩衝液により 5000 倍に希釈し, 2% の割合にメタノールを加えて使用した. この抗血清希釈液 1.25 ml を標準 DOC と測定すべき未知の試料を乾固した試験管に加え, vortex mixer を用いてよく振盪, 16 時間 4°C に incubate した. その後飽和硫酸アンモニウム 0.25 ml を加え, よく振盪, 10 分以上経過後, 遠心, 上清 0.3 ml を counting vial にとり, Bray の溶液を 10 ml ずつ加えた. 回収率補正のための試料を含む vial に対しては半飽和アンモニウム 0.3 ml を加えてのち, 同様に Bray の溶液を 10 ml ずつ加えた.

試料中の DOC 含量は次のごとく計算した. すなわち標準物質の示す count 数より, B/F 比を計算し, 標準曲線より DOC 含量を計算した (Fig. 1). 次いで回収率より実際の血漿中の DOC 含量を補正計算した.

4. 対象例

測定対象としたのは正常者 8 例, 本態性高血圧症 15 例, 原発性アルドステロン症 (すべて副腎腺腫例) 9 例, クッシング症候群 8 例 (うち両側副腎過形成 5 例, 副腎皮質腺腫 3 例), シーハン症候群 7 例, アジソン病 3 例, 17 α -hydroxylase 欠乏症 2 例のほか治療の目的で, 糖質代謝コルチコイドを 1 カ月以上投与していた 7 例, 慢性腎不全患者で両側腎を摘出した 5 例の計 64 例であつた. まず 1 週間以上 Na 摂取量を 1 日約 250 mEq, K 摂取量を約 75 mEq とし, 早朝空腹時安静臥床の上採血した 9 例については ¹⁻²⁴ACTH-Z 2 mg を筋注後 6 時間目に採血した. さらに本態性高血圧症 10 例に対し furosemide 40 mg 静注の上 2 時間立位とした場合の血漿 DOC 含量の変化を検討した. また 5 例についてアンギオテンシン II を 10 ng/kg/min の割合で 30 分間点滴静注した場合, また 3 例の本態性高血圧症において食塩摂取量を 1 日 30 mEq 以下とし, hydrochlorothiazide 75 mg と Spironolactone 400 mg とを 3 日間併用投与した場合の血漿 DOC 含量の変化も検討した.

Fig. 1. Standard curve of DOC.

実験結果

本法による抗体価は注射開始後 2 カ月目より上昇し始め, 3 カ月後には 500 倍, 6 カ月後には 5000 倍希釈抗体が使用可能となつた.

本抗体のハイドロコチゾン, 18-OH-DOC およびコルチコステロンに対する交叉反応性は, いずれも DOC に対する結合性の 0.1% 以下であつた.

血漿からの DOC 抽出法としては silica gel column 後, 1 回の paper chromatography を行なうことにより充分 DOC を分離出来た. DOC と類似の構造を有し血中に大量に存在するハイドロコチゾンとは paper chromatography により分離できた.

結合分画と遊離分画との分離には飽和硫酸アンモニウムを使用した. Florisil や dextran-coated charcoal

Fig. 3. Effect of ACTH on plasma DOC levels.

Fig. 4. Effect of upright posture after furosemide administration on plasma DOC levels.

考 按

DOC の測定は、アルドステロンの測定と同様、以前は double isotope derivative method により測定されていたが、最近 radioimmunoassay による測定法が幾つか発表されている。Rose & Newsome³⁾ は DOC-21-succinate とヒト γ グロブリンとを結合し、これを complete Freund's adjuvant と共にウサギの皮内に注射することにより抗体を作製した。彼等は3回の注射だけで radioimmunoassay に使用しうる抗体を作製出来たとのべている。われわれの抗体は DOC-oxime とブタ血清 γ グロブリンとの結合物をウサギに投与することによって作製したが、長期間注射を繰返したためか、5000倍稀釈抗体が radioimmunoassay に使用出来た。さらに本抗体の交叉反応性もハイドロコチゾン、18-OH-DOC、コルチコステロンなど DOC と同様の構造を有し、paper chromatography 上でも同様の Rf を示すステロイドとの間には認められなかった。従つて paper chromatography で分離することにより正確に血漿中の DOC 含量を測定出来た。

本法の感度は 5pg と高かつたので、血漿 1~3 ml 中の DOC を測定することが可能であつた。

radioimmunoassay 後の結合分画と遊離分画の分離法として、Newsome ら⁴⁾ は Florisil, Rose ら³⁾ は dextran-coated charcoal を用いている。われわれが飽和硫酸アンモニウムを使用して検討した所では、Florisil や dextran-coated charcoal を用いる方法は簡単であるが、誤差が大であつた。

DOC はヒトではアルドステロンに次いで強力な電解質代謝コルチコイドであるが、アルドステロンとことなり、レニン・アンギオテンシン系の支配をうけておらず、ACTH によつて調節されているといわれている¹⁾。すなわち本実験でも、アンギオテンシン II 点滴静注、立位負荷および食塩摂取制限に反応せず、ACTH 投与により著明に増加した。また 17 α -hydroxylase 欠乏症および副腎腺腫によるクッシング症候群の1例では ACTH 投与により軽度上昇したにすぎなかつたが、両側副腎過形成によるクッシング症候群では著明に上昇した。副腎腺腫によるクッシング症候群では腺腫からのハイドロコチゾン分泌過剰により

下垂体からの ACTH 分泌は抑制されており、その結果 ACTH を投与しても腺腫以外の副腎皮質は反応しないものと思われる。両側副腎過形成によるクッシング症候群では ACTH の増加が存在し、その刺激によりハイドロコルチゾンの分泌過剰を来す疾患であつて、ACTH 投与により血漿ハイドロコルチゾンの増加すると共に DOC 含量も増加した。また糖質代謝コルチコイド長期投与中の7例の血漿 DOC 含量は著明な低値を示した。これらの事実は DOC が生体の水電解質代謝の調節に主役を演じているとは考えられず、むしろ何等かの原因により DOC 分泌が亢進すると水電解質分布の異常を来とし、二次的にレニン・アンギオテンシン系が抑制されるものと考えられる。

最近、本態性高血圧症の中には約20%の割合に低レニン血を伴う症例の存在することが認められている。この様な低レニン性の本態性高血圧症の多くは、アルドステロン含量も低下していることが多いので、レニン抑制の原因としてアルドステロン以外の電解質代謝コルチコイド分泌過剰の存在が問題とされている。われわれの低レニン性本態性高血圧症の血漿 DOC 含量は、26.8ng/dl の軽度の高値を示した1例を除き、ほぼ正常値を示した。この様に DOC の分泌過剰によりレニンが抑制されている症例はそれ程多くないものと思われる。Brown ら⁹⁾も低レニン性本態性高血圧症21例中6例で血漿 DOC 含量が高値を示していたが、その病因との関連は明らかでないとのべている。現在、本態性高血圧症の中でこの様なレニン・アルドステロンの低下を来す症例の原因としては、mineralocorticoid とはことなる他の原因により水および Na の貯溜を来し、これによりレニンが抑制されたものと解釈されている⁶⁾。17 α -hydroxylase 欠乏症2例の血漿 DOC 含量は極めて高値を示したが、この2例は2年間に経験したもので、この様な先天性副腎酵素欠乏によつてレニンの抑制と高血圧を来す疾患はそれ程多く存在するとは思われなかつた。

総括ならびに結論

radioimmunoassay により簡単に血漿中の DOC 含量を測定する方法を開発し、臨床的に応用した。

1. 血漿 1～3 ml 中の DOC を dichloromethane で抽出、silica gel column と paper chromatography により DOC を分離後、radioimmunoassay により測定した。B と F の分離は硫酸アンモニウム法によつた。

2. 正常値は 4.4 ± 2.5 ng/dl、本態性高血圧症では 0.3～26.8 ng/dl、原発性アルドステロン症 3.0～30.5 ng/dl、クッシング症候群 1.2～41.5 ng/dl、シーハン症候群 0～11.7 ng/dl、アジソン病 3.0～11.9 ng/dl、17 α -hydroxylase 欠乏症 113～176 ng/dl であつた。

3. 血漿 DOC 含量は ACTH 投与により著明に上昇したが、アンギオテンシン II 投与、立位負荷および食塩摂取制限によつて殆ど変化がみられなかつた。

本法は簡単で充分臨床に応用出来、各種の高血圧症の診断に有用と思われる。

文 献

- 1) Oddie, C.J., J.P. Coghlan, and B.A. Scoggins : J. Clin. Endocrin. & Metab., 34 : 1039 (1972).
- 2) Erlanger, B.F., F. Borek, S.M. Beiser and S. Lieberman : J. Biol. Chem., 228 : 718 (1957). 3)
- Rose, J.C., and H.H. Newsome : J. Clin. Endocrin. & Metab., 35 : 469 (1972). 4)
- Newsome, H.H., A.S. Clements and E.H. Borum : J. Clin. Endocrin. & Metab., 34 : 473 (1972).
- 5) Brown, J.J., J.B. Ferris, R. Fraser, A.F. Lever, D.R. Love, J.I.S. Robertson and A. Wilson : Lancet, II : 243, (1972).
- 6) Dustan, H.P., and R.C. Tarazi : Ann. Int. Med., 74 : 831 (1971).