Chromatography を用いない血漿 Aldosterone の 測定法とその検討

東北大学第2内科

中嶋 凱夫, 竹内 孝彦, 西里 弘二, 福地 総逸

A New Modification of the Non-Chromatographic Radioimmunoassay for Plasma Aldosterone

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

Department of Internal Medicine, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan
(Director : Professor Kaoru Yoshinaga)

Recently, non-chromatographic methods for the radioimmunoassay of plasma aldosterone have been reported. In this paper, we describe a new modified method for the radioimmunoassay of plasma aldosterone using Fuller's earth, charcoal and anti-aldosterone serum to purify aldosterone in plasma.

^3H -aldosterone was added to 2ml of plasma samples. Then, the free steroid hormone in the plasma was absorbed on 50 mg of the Fuller's earth and extracted with dichloromethane. The dichloromethane was dried. For the purification of aldosterone, AbI (1 : 10,000 diluted antibody to aldosterone) was added to each of the tubes and incubated for 2 hours at room temperature. Separation of free from bound fractions was performed by dextran-coated charcoal. The supernatant containing the bound fraction was transferred into small test tubes and extracted with dichloromethane. The extract was used for calculating recovery and for assay. A standard curve was constructed by adding ^3H -aldosterone and various amounts of standard aldosterone. AbII (1 : 200,000 diluted antibody to aldosterone) was added to standard tubes and sample tubes, and these tubes were incubated. The free fraction was separated by the addition of saturated ammonium sulfate and counted.

In this method, the mean recovery of ^3H -aldosterone for 70 specimens was 28.6 ± 7.98 % (S.D.). While, the recovery of ^3H -hydrocortisone for 10 specimens was 0.03 ± 0.03 % (S.D.). The water blank was assayed 0 ng/dl ($n=4$). The sensitivity of the standard curve was 2 pg. Accuracy, intra-assay precision, and specificity were examined by comparing the results with a method using our radioimmunoassay containing a paper chromatographic purification step, and determining the aldosterone content of plasma from various patients and plasma to which had been added different amounts of standard aldosterone to pre-extracted plasma. The equation for the analysis of variance on 20 specimens was $Y=0.72X$

+1.874, $r=0.925$. The discrepancy between the two methods was not significant. In 9 normal subjects, the plasma aldosterone content ranged from 0 to 9.6 ng/dl. In 6 patients with primary aldosteronism, it ranged from 19.2 ng/dl to 50.3 ng/dl. Also, in 4 patients with primary aldosteronism and in 4 normal subjects, circadian rhythms of plasma aldosterone showed a higher content in the morning than in the evening.

This method eliminated chromatography and easily enabled one technician to process a great number of samples in 5~6 hours.

諸 言

aldosterone の測定は、古くは生物学的方法や、blue tetrazolium 法を用いる比色法により、最近 isotope を用いる double isotope derivative method により行なわれてきた。これらの方法は、いずれも aldosterone を他の steroid hormone から分離するため、頻回の paper chromatography を行わなければならない難点があった。

近年 steroid hormone の測定に radioimmunoassay が利用されるようになり、特異性の高い抗体の使用により、その抽出方法も簡便化され、少量の血漿中の含量を正確に測定することが可能となつた。血漿 aldosterone の radioimmunoassay 法もすでに数多く報告されている^{1),2),3),4)}。しかしこれらの方法も血漿中に大量に存在する steroid hormone から微量の aldosterone を分離するために、radioimmunoassay に先立って paper chromatography や column chromatography を行うことが必要である。そこで血漿 aldosterone の測定をさらに簡便化するために、chromatography を使用しないで、血漿 aldosterone を抽出純化し、radioimmunoassay を行おうという試みがなされている^{5),6),7),8)}。

これらの方法としては、Farmer⁷⁾、Varsano-Ahron⁸⁾が発表した化学的に抽出、純化し radioimmunoassay を行う方法と、Martin & Nugent⁵⁾、Gomez-Sanchez & Kaplan⁶⁾の発表した適当な吸着剤と高濃度 aldosterone 抗体を利用して抽出、純化し radioimmunoassay を行う方法とがある。

そこでわれわれは、aldosterone 抗体を使用する、Martin & Nugent⁵⁾および Gomez-Sanchez & Kaplan⁶⁾の方法を検討し、両者の利点を組み合わせることにより、簡便な方法を確立したので報告する。

＜実験材料＞

使用するガラス器具は、使用当日 methanol および dichloromethane で各々 2 回づつ洗浄して用いた。実験に使用した methanol および dichloromethane はすべて再蒸留して使用した。抗体の稀釈には 0.05M, pH 8.0 硼酸緩衝液に牛 albumin または γ -globulin を各種濃度に加えて使用した。

charcoal 液は、5 % protein-coated charcoal (albumin 0.25%, globulin 0.25% 含量) と 0.5% dextran-coated charcoal を用意した。

抗体は、われわれの作製した aldosterone 抗体⁴⁾を使用した。すなわち、血漿 aldosterone の抽出、純化に使用する第 1 抗体としては、 -20°C に保存している 1,000 倍稀釈抗体に 5 % protein-coated charcoal 1ml と 硼酸緩衝液 8 ml を加えて、 25°C 、4 時間インキュベートし、抗体中に含まれる steroid hormone を charcoal に吸着させて除去し、この上清すなわち、10,000 倍稀釈抗体を使用した。さらに radioimmunoassay に使用する第 2 抗体は、1,000 倍稀釈抗体を 0.1% γ -globulin 硼酸緩衝液で 20 万倍に稀釈して使用した。

^3H -aldosterone と ^3H -hydrocortisone は 4 週毎に paper chromatography にて純化し使用した。

＜実験方法＞

I. 測定方法

1) 血漿 aldosterone の抽出

蓋付遠沈管に血漿 2 ml, 蒸留水 10 ml, ^3H -aldosterone (約 10,000 cpm) を加えて混和, 4 °C に 30 分放置して, corticosteroid binding globulin (C.B.G.) と結合させた. Fuller's earth 50 mg をスプーンで遠沈管に加え, 4 °C 下にて約 2 分間手で振盪し, 血漿中の C.B.G. と結合していない steroid hormone を Fuller's earth に吸着させた. 3,000 rpm, 15 分間冷却遠心, 上清を捨て, Fuller's earth を蒸留水 2 ml で 2 回洗浄した. その後室温下で triethylamine 1 滴を加えアルカリ性とし, 10 ml, ついで 5 ml の dichloromethane で抽出し, dichloromethane 層を蓋付試験管にあげ, 0.25 % 酢酸 2 ml で 1 回, 蒸留水 2 ml で 2 回洗浄し, dichloromethane を減圧乾固した.

2) 抗体による純化

charcoal にて処理した第 1 抗体, すなわち 10,000 倍希釈の aldosterone 抗体 0.5 ml を乾固した各試験管に加え, 25 °C に 2 時間インキュベートした. その後 0.5 % dextran-coated charcoal を加え, 1 分間振盪し, 5 分間静置, 遠心し, 結合分画を含む上清を蓋付試験管にあげ, さらに硼酸緩衝液 1 ml で管壁を洗浄し, これを dichloromethane 5 ml にて抽出した. dichloromethane 層を硼酸緩衝液で 2 回洗浄し, 40 °C で減圧乾固した. 次に methanol 5 ml を加えて溶解し, これを 1 ml づつ 2 本の小試験管にとり 40 °C にて減圧乾固して radioimmunoassay に用い, 残り 1 ml づつを counting vial に分注し, 回収率の補正に用いた.

3) Radioimmunoassay

われわれがすでに発表した方法⁹⁾に従って行つた. すなわち標準曲線を作製するために, 標準 aldosterone をそれぞれ 0, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 pg 入れた試験管に ^3H -aldosterone の一定量 (約 2,000 cpm) を加え 40 °C で乾固した. 第 2 抗体, すなわち 0.1 % γ -globulin 硼酸緩衝液により 20 万倍に希釈したものに, 2 % の割合に methanol を加え, この 0.25 ml を, すでに乾固してある試料小試験管と標準曲線用小試験管に加え, vortex mixer を用いてよく混和し, 4 °C に 16 時間インキュベートした. 飽和硫酸 0.25 ml を加えてよく混和し, 30 分静置後, 遠心, 上清を counting vial にとり, Bray の溶液を 10 ml づつ加えた. 回収率補正のための試料を含む counting vial には, 半飽和硫酸 0.3 ml を加えて, 同様に Bray の溶液 10 ml を加えた. これらを液体シンチレーションカウンターにて count した. 試料中の aldosterone 含量は次の如く計算した. すなわち標準曲線用 counting vial の示す count 数より結合分画と遊離分画との比を計算し, 標準曲線を描き, 標準曲線より aldosterone 含量を計算した. 次いで回収率より実際の aldosterone 含量を補正算出した.

II. 測定方法の基礎的検討

1) 吸着剤

C.B.G. と大部分結合していない血液中の aldosterone を分離するために, Fuller's earth, Florisil, dextran-coated charcoal の各吸着剤のうち, いずれが最適の吸着剤であるかを検討した. すなわち血漿 2 ml を蒸留水 10 ml にて希釈し, ^3H -aldosterone または ^3H -hydrocortisone (約 10,000 cpm) を加え, 4 °C に 30 分間放置し, C.B.G. とこれらの標識 steroid hormone を結合させた. その後各吸着剤を加えて, 4 °C 下にて 2 分間手で振盪し, C.B.G. と結合していないこれらの標識 steroid hormone を吸着させた. 3,000 rpm, 15 分間冷却遠心し, 上清を分離し, その radioactivity を count して, 各吸着剤の両 steroid hormone に対する吸

Fig. 1. Flow sheet for measurement of aldosterone by this method.

着率を計算した。

さらにこれらの吸着剤に吸着された標識 steroid hormone を10ml, および 5 mlの dichloromethaneで 2 回抽出し, その抽出液を count し抽出率を計算した。

2) 第1抗体

まず第1抗体として, hydrocortisone 抗体が aldosterone との交叉反応が少く, 他の steroid hormone と交叉反応の多いことより, hydrocortisone 抗体を利用して hydrocortisone およびこれと交叉反応する steroid hormone を除去し, 血漿 aldosterone を分離, 純化する方法を検討した。われわれの作製した hydrocortisone 抗体を稀釈し, 血中含量と同じ程度の標準 hydrocortisone 0.2 μ gおよび aldosterone 0.2ngを含む試験管に0.5mlづつ加えた。25℃にて2時間インキュベートし, 飽和硫酸にて結合分画(B), 遊離分画(F)を分離し, 本目的に最適の抗体の稀釈濃度を求めた。

さらに aldosterone 抗体を使用して血漿 aldosterone を分離, 純化する方法について検討した。すなわち hydrocortisone 抗体の場合と同じように, 血中含量と同じ程度の濃度の標準 hydrocortisone 0.2 μ gおよび aldosterone 0.2ngを含む各試験管に aldosterone 抗体を稀釈し, 0.5mlづつ加えて25℃にて2時間インキュベートし, 飽和硫酸, および0.5% dextran-coated charcoal にてBとFを分離し, hydrocortisone との結合率が最少で, aldosterone との結合率が最大である抗体の稀釈濃度を求めた。

さらに飽和硫酸, または0.5% dextran-coated charcoal 0.1mlで, BとFを分離した場合の上清または, 沈査に残る aldosterone と hydrocortisone の含量を計算し, 両者のB, F分離法の本法における適用を検討した。

<実験結果>

1) 吸着剤

Table 1. Adsorption and extraction of steroid hormone with various adsorbents.

		³ H-aldosterone		³ H-hydrocortisone	
		adsorption	extraction	adsorption	extraction
Fuller's earth	10mg	54.2%	24.8%	32.1%	0.37%
	30	79.2	46.5	24.8	0.59
	50	90.0	68.6	28.0	2.70
	100	92.0	69.0	29.6	6.40
	140	92.8	57.5	29.5	4.80
	200	93.2	40.8	40.0	3.20
Florisil	100mg	88.4	45.5	36.6	4.40
	200	92.4	33.2	42.5	3.20
Dextran-coated charcoal (2ml)	0.01%	52.3	—	75.0	—
	0.04	63.5	57.2	52.7	4.80
	0.15	93.2	50.3	39.1	8.90
	0.5	95.5	—	20.0	—

50mg以上の Fuller's earth は aldosterone を90%以上, hydrocortisone を25%以上吸着した。0.15%以上の濃度の dextran-coated charcoal 2mlは aldosterone を93%以上, hydrocortisone を50%以上吸着した。また200mg Florisil は aldosterone を92.4%, hydrocortisone を42.5%を吸着した。すなわち各吸着剤は, いずれの種類も, 量が大となると aldosterone および hydrocortisone を多く吸着する傾向を示した。しか

し Fuller's earth が最も aldosterone と hydrocortisone の吸着率の差が大であつた。さらに各吸着剤に吸着された steroid hormone の dichloromethane による抽出率の検討では, Fuller's earth が他の吸着剤に比べて, aldosterone の抽出率が高く, hydrocortisone の抽出率が低かつた。さらに Fuller's earth の量について検討した。50mg では aldosterone を 90% 吸着し, 68.6% 溶出できた。hydrocortisone は 28.0% が吸着され, 2.7% が溶出された。一方 140mg の Fuller's earth では aldosterone を 92.8% hydrocortisone を 57.5% 吸着し, aldosterone を 57.5% hydrocortisone を 4.8% 溶出した。すなわち, Fuller's earth 50mg が aldosterone の吸着および溶出に最適であることが明らかになった。

2) 第1抗体

hydrocortisone 抗体の検討結果は Fig. 2 の如くである。すなわち, 50倍稀釈抗体では, 13% の aldosterone と 60% の hydrocortisone と結合した。一方 aldosterone 抗体の検討結果は Fig. 3 の如くである。すなわち 13,000~24,000 倍稀釈抗体では, 80% 以上の aldosterone と 10% 以下の hydrocortisone と結合した。

3) 第1抗体作用後の B, F の分離

Fig. 2. Bound percents of various concentration of anti-hydrocortisone serum to aldosterone and hydrocortisone in high concentration of steroid hormone.

Fig. 3. Bound percents of various concentration of anti-aldosterone serum to aldosterone and hydrocortisone in high concentration of steroid hormone.

- (A) Bound and free fractions separated by saturated ammonium sulfate.
 (B) Bound and free fractions separated by 0.5% dextran-coated charcoal.

aldosterone 抗体を反応させた後の B, F 分離を飽和硫酸法と dextran-coated charcoal 法で行った結果は Fig. 3 の如くである. すなわち 12,000~24,000 倍稀釈 aldosterone 抗体作用後, 飽和硫酸で B, F を分離すると沈査すなわち結合分画には, aldosterone 80~95% hydrocortisone 12~15% を見出した. 一方 dextran-coated charcoal 法では結合分画に含まれる aldosterone は, 62~78%, hydrocortisone 0.5~2.5% であった.

4) 回収率

本法による血漿 aldosterone の最終回収率は $28.6 \pm 7.98\%$ ($n = 70$) であった. 血漿 aldosterone 含量 100 ng/dl 以上の場合の回収率は幾分低値を示したが, 100 ng/dl 以下の含量の試料では差がなかった. 正常人血漿 2 ml に ^3H -hydrocortisone を加えて, 本抽出法での hydrocortisone の回収率の検討では, 最終回収率 $0.03 \pm 0.03\%$ ($n = 10$) であった. また各抽出段階における回収率は Table 2 の如くであった.

5) 盲検値及び感度

血漿の代りに蒸留水 2 ml を用いて, 同様の抽出操作を行った場合の測定値はすべて 0 ng/dl であった ($n = 4$). 標準曲線の測定感度は 2 pg であった.

6) 正確度及び再現性

1% dextran-coated charcoal

Table 2. Recoveries of ^3H -aldosterone and ^3H -hydrocortisone in various stages of plasma aldosterone extraction with this method.

	^3H -aldosterone	^3H -hydrocortisone
Bound to adsorbent after water washes	$94.6 \pm 3.5\%$	$24.3 \pm 10.1\%$
In CH_2Cl_2 extract from adsorbent	69.7 ± 4.6	6.09 ± 2.51
Supernatant after incubation with Ab-1	49.3 ± 7.54	0.30 ± 0.40
Final recovery	28.6 ± 7.98	0.03 ± 0.03

Table 3. Accuracy, precision and reproducibility determined by adding different amounts of standard aldosterone, to preextracted plasma.

Aldosterone added	Aldosterone assayed mean $\pm$ SD.	mean error	Coefficient of variation	Number
0 (pg)	0 (pg)	0 (%)	0 (%)	4
50	52.0 ± 18.3	4.0	35	4
100	106.8 ± 14.3	6.8	13	4
200	200.8 ± 47.2	0.4	23	4
500	492.4 ± 45.2	1.5	9	5
1000	1003.8 ± 114.0	0.4	11	5

により, 血漿中の steroid hormone を吸着除去後, さらに一昼夜透析して steroid hormone を除去した血漿に, 標準 aldosterone を加えて測定した. aldosterone を加えない血漿では 0 ng/dl ($n = 4$) であった. 50~1,000 pg の aldosterone を加えた血漿を 4~5 回測定した場合の mean error は 0.4~6.8%, coefficient of variation は 100~1,000 pg の aldosterone を含む血漿では 9~23%, 50 pg では 35% であった.

さらに 20 例の患者血漿について本法と paper chromatography 法とにより抽出した場合の測定値と比較した. Fig. 4 に示す如く $Y = 0.724X + 1.874$, $r = 0.925$ でかなりの一致を示した. しかし 5 ng/dl 以下の低い aldosterone 含量では必ずしも一致しなかったが, 4 例では共に 0 ng/dl を示した.

7) aldosterone 以外の steroid hormone の干渉

Cushing 症候群の患者 5 例の血漿について, 本法と paper chromatography 法にて測定した所 Table 4 の如く, ほば一致した値を示しており, 他の steroid hormone の干渉による影響は少いものと考えられた.

8) 本法による測定値

各種疾患について, 早朝安静時に肘静脈より採血し, 測定した血漿 aldosterone 含量の値は, Fig. 5 の如くであった. 正常者 0~9.6 ng/dl ($n = 9$), 原発性アルドステロン症 19.2~50.3 ng/dl と高値, 悪性高血圧症 21.2~26.6 ng/dl, 腎血管性高血圧症 3.5~20.8 ng/dl, 本態性高血圧症 1.1~12.0 ng/dl, Cushing 症候群 1.0~12.0 ng/dl, Addison 病 0 ng/dl であった. また正常人および原発性アルドステロン症, 各 4 例について測定した血漿 aldosterone 含量の日内変動の結果は, Fig. 6 の如くであった. すなわち, 早朝高値, 夕刻に低値の傾向を示した.

＜考 按＞

近年 chromatography を使用しないで, 血漿の steroid hormone を抽出し, 測定しようとする方法が報告されている. Robertson 等⁹⁾は estradiol の抽出純化に uterine binding protein を使用する方法を, Ismail 等¹⁰⁾は endogenous sex steroid binding protein を利用して, 血漿 testosterone の抽出, 純化をして後 radioimmunoassay を行う方法を発表している. 血漿 aldosterone の測定にも aldosterone 抗体を利用して, 血漿 aldosterone を抽出純化し radioimmunoassay を行うという方法が Martin & Nugent⁵⁾ および Gomez-Sanchez & Kaplan⁶⁾ 等により発表されている. Martin & Nugent⁵⁾の方法は, あらかじめ C.B.G. と結合率の低い aldosterone を Fuller's earth に吸着させ C.B.G. と結合率の高い aldosterone 以外の steroid hormone を除去, その後 aldosterone 抗体を作用させて, aldosterone を分離する方法である. 一方 Gomez-Sanchez & Kaplan⁶⁾ は aldosterone 抗体を作用させた後に charcoal を用いて, aldosterone 以外の steroid hormone を吸着除去することにより, aldosterone の純化を行っている. しかし両者の方法とも aldosterone 以外の steroid hormone を除去するためには不十分と考えられる. そこでわれわれは, 両者の方法を組み合わせることにより aldosterone をさらに高度に純化することを可能にした.

Fig. 4. Comparison of plasma aldosterone concentration determined by a paper chromatographic and this method.

Table 4. Comparison of plasma aldosterone concentration determined by this method and a paper chromatographic method in Cushing's syndrome.

case no.	non chromatographic method	paper chromatographic method
1	4.0 (ng/dl)	2.8 (ng/dl)
2	6.5	4.8
3	1.0	1.4
4	12.0	15.0
5	4.4	4.5

Fig. 5. Plasma aldosterone level assayed in various diseases.

本法で使用する吸着剤について、Martin & Nugent⁵⁾も述べているように、Fuller's earth が血漿中の aldosterone を最もよく吸着し、hydrocortisone を最も吸着しないので最適である。しかしわれわれの実験結果では、Martin & Nugent⁵⁾が使用している140mgの量はわれわれの50mgに比べて aldosterone および hydrocortisone の吸着は大であるが、吸着された Fuller's earth からの dichloromethane による溶出率は aldosterone については低く hydrocortisone については高かった。従つて50mgの Fuller's earth が血漿2mlに含まれる aldosterone を最大に溶出し hydrocortisone を溶出しないという本目的に最適であった。われわれは実際の測定にあつては、50mg 入るスプーンを使用して計量しており、本法の計量の誤差は10%以下で測定値には特に差を認めなかつた。

次に抽出純化のために使用する抗体について考案してみると、われわれはまず第一に hydrocortisone 抗体が aldosterone との結合が少く、hydrocortisone および他の steroid hormone との結合が多いので、この性質を利用して aldosterone 以外の steroid hormone を除去し、aldosterone を純化抽出しようと試みた。

しかし血漿の aldosterone 含量は hydrocortisone および他の steroid hormone 含量に比べて圧倒的に少ないため、かなりの aldosterone が hydrocortisone 抗体を結合してしまうので aldosterone を分離、純化することは不可能であつた。そこで aldosterone 抗体を使用して血漿 aldosterone を抽出純化する方法を試みた。本法で使用する aldosterone 抗体の濃度は使用する抗体の抗体価と他の steroid hormone に対する交叉反応性によつて決定される。われわれの抗体では12,000から24,000倍稀釈の場合に hydrocortisone との結合が少く、aldosterone との結合率が高値でありこれを使用することにした。この抗体の濃度は radioimmunoassay に使用する第Ⅱ抗体の約20倍の濃度であつた。しかし Gomez-Sanchez & Kaplan⁶⁾はこの濃度では血清中に含まれる steroid hormone が radioimmunoassay に影響するため盲検値が高くなると述べている。われわれも Gomez-Sanchez & Kaplan⁶⁾のように本抗体を dextran-coated charcoal で処理して、あらかじめ含まれる steroid hormone を除くことにより盲検値を0にすることが出来た。

また Martin & Nugent⁵⁾および Gomez-Sanchez & Kaplan⁶⁾は第1抗体作用後B/Fを分離するのに飽和硫酸を使用している。しかも Martin & Nugent⁵⁾はさらにもう一度分離した結合分画を溶解し、飽和硫酸にて再沈殿させて aldosterone を分離純化している。一方 Gomez-Sanchez & Kaplan⁶⁾は飽和硫酸で分離後、再溶解し、dextran-coated charcoal を加えて遊離分画を吸着して、aldosterone 以外の steroid hormone を除き aldosterone を分離純化している。われわれは初めに Fuller's earth にて、aldosterone 以外の steroid hormone を除去しているため、B/Fの分離に飽和硫酸を使用せず、直接 dextran-coated charcoal のみにて、aldosterone を純化して分離することが出来た。この方法では飽和硫酸で分離した場合よりも aldosterone を上清より dichloromethane にて抽出することになるので、操作が簡便で aldosterone の回収率が高くなるという利点もあつた。すなわち飽和硫酸を用いた Martin & Nugent⁵⁾の方法では、最終回収率が aldosterone 21%, hydrocortisone 0.1%であるのに対し、われわれの方法では、aldosterone $28.6 \pm 7.98\%$, hydrocortisone $0.03 \pm 0.03\%$ と優れた成績であつた。

本法による盲検値は0 ng/dlであつた。しかし aldosterone 100~1,000pg 含量の血漿で coefficient of

Fig. 6. Circadian rhythms of plasma aldosterone level assayed in primary aldosteronism and normal subjects.

variation 9~23%, 50pg含量の血漿では35%と高値を示した. Martin & Nugent⁵⁾の方法でも 100~1,000pgの含量では 4.4~11%, 50pg含量では 36% であり, ほぼわれわれと同一の成績であつた. 本法や Martin & Nugent の方法で, aldosterone 低値の血漿で coefficient of variation が高値なのは, 本法が chromatography 法に比して, 回収率が低値であることに起因するものと思われる. 従つて aldosterone 含量の低い場合は, 血漿を多くして抽出することが必要であらう.

Martin & Nugent⁵⁾の方法の測定値と paper chromatography による測定値との比較では, 幾分 Martin & Nugent⁵⁾の方法の値が paper chromatography 法の値よりも高値であると報告されている. これは aldosterone の抽出純化が不十分であるため, hydrocortisone およびその他の steroid hormone との交叉反応に起因するものと考えられる. われわれの方法では, 抽出純化の方法を改善した結果, 測定値は paper chromatography 法による測定値とかなり一致した値を示しており満足すべき結果であつた. また実際の患者血漿での測定値は臨床所見と一致した値であつた. しかも正常者および原発性 aldosterone 症の日内変動は, 朝高値, 夕刻低値であり, paper chromatography 法にて測定した. われわれ¹¹⁾および Nugent¹²⁾の報告と一致した成績がえられた.

本法は aldosterone の抽出に chromatography を用いないので, chromatography の設備のないところでも血漿 aldosterone の測定が出来, 抽出に要する時間も paper chromatography 法の場合約 2 日を要したのに対し, 5~6 時間で充分で, しかも 1 回の測定 sample 数に制限がないなどの利点がある. しかし本法は多量の aldosterone 抗体を使用すること, 回収率が幾分低いことが欠点であると考えられる.

＜結 語＞

chromatography 法を使用しないで, aldosterone と他の steroid hormone の C.B.G. との結合程度の差を利用し, Fuller's earth にて aldosterone 以外の steroid hormone を去除し, さらに高濃度 aldosterone 抗体と dextran-coated charcoal を利用して, 血漿 aldosterone を抽出純化し, radioimmunoassay 法により測定する方法を確立した. 本法は多量の aldosterone 抗体を必要とすること, 回収率が幾分低いこと, などの難点はあるが, 短時間で特殊な設備のないところでも多量の sample の血漿 aldosterone の測定を容易に出来る点ですぐれた方法と考えられる.

(稿を終えるに当り, 御校閲を戴いた, 吉永馨教授に深謝いたします.)

文 献

- 1) Mayes, D., S. Furuyama, D.C. Kem, and C.A. Nugent : J. Clin. Endocrinol. Metab. 30 : 682, (1970).
- 2) Bayard, F., I.Z. Beitins, A. Kowarski, and C.J. Migeon : J. Clin. Endocrinol. Metab. 31 : 1, (1970).
- 3) Ito, T., J. Woo, R. Haning, and R. Horton : J. Clin. Endocrinol. Metab. 34 : 106, (1972).
- 4) 福地総逸, 勝島一郎, 竹内孝彦 : ホルモンと臨床 19 : 945, (1971).
- 5) Martin, B.T., and C.A. Nugent : Steroids 31 : 169, (1973).
- 6) Gomez-Sanchez, C., D.C. Kem, and N.M. Kaplan : J. Clin. Endocrinol. Metab. 36 : 795, (1973).
- 7) Farmer, R.W., D.H. Brown, P.Y. Howard, and L.F. Fabre, Jr. : J. Clin. Endocrinol. Metab. 36 : 460, (1973).
- 8) Varsano-Aharon, N., and S. Ulick : J. Clin. Endocrinol. Metab. 37 : 372, (1973).
- 9) Robertson, D.M., Mester, J., and Kellie, A.E. : Acta Endocr. Kbh, 68 : 513, (1971).
- 10) Ismail, A.A.A., Niswender, G.D., and Midgley, A.R. : J. Clin. Endocrinol. Metab. 34 : 177, (1972).
- 11) 中嶋凱夫, 竹内孝彦, 西里弘二, 福地総逸 : 第46回日本内分泌学会総会口演.
- 12) Kem, D.C., M.H. Weinberger, C. Gomez-Sanchez, N. J. Kramer, R. Lerman, S. Furuyama, and C.A. Nugent : J. Clin. Invest. 52 : 2272, (1973).