Chromatography 不要の免疫学的純化・精製抽出法による血漿 Aldosterone の Radioimmunoassay の検討

岡山大学医学部第三内科 (指導: 大藤真教授)

横 山 久 光

Studies of Radioimmunoassay for Plasma Aldosterone Concentration by Immunologic Purification and Extraction Procedure without Chromatography

Hisamitsu YOKOYAMA

The Third Department of Internal Medicine, Okayama

University Medical School, Okayama, Japan

(Director : Professor Tadashi Ofuji)

Radioimmunoassay techniques for the measurement of plasma aldosterone concentration with the chromatographic procedure have been developed and reported by many investigators, but they necessitate at least one time-consuming chromatographic step as well as technical skillfulness. Therefore, the number of plasma samples treated with this method was restricted.

Recently a non-chromatographic radioimmunoassay technique for plasma aldosterone was reported from a few laboratories.

In this paper, the author has reported the non-chromatographic radioimmunoassay by immunologic purification and extraction procedures which has been attributed to Gomez-Sanchez and Kaplan et al, using the anti-aldosterone serum (lot # 088) provided by the NIAMDD, N I H.

After the aldosterone fraction in plasma was specifically absorbed using highly concentrated anti-aldosterone serum (i.e. Ab-II; diluted to 1: 50,000), it was applied to the radioimmunoassay; and the separation of free from bound fractions was performed by the saturated ammonium sulfate method.

Reasonable and satisfactory standard curves were obtained, but attention should be given to environmental factors at measurement, especially to the room temperature in summer.

According to our results the mean final recovery for 58 specimens was 41.8 ± 6.4 (SD)% through the overall extraction procedure, and the minimum detectable sensitivity of the standard curve was 10 pg.

The mean water blank value was 7.02 ± 2.62 (SD) pg/tube. Possible reasons for the higher blank value than others may have been the reagent or the solvent blank, and/or the insufficient process of immunologic purification by Ab-II for the tritium-labelled aldosterone which was used for recovery and immunoassay

The precision was from 9.4 to 25.3% in coefficient of variations; the accuracy and recovery rate were almost satisfactory.

In our clinical application, the plasma aldosterone concentration indicated high values in the peripheral and affected adrenal venous blood of patients with primary aldosteronism.

In a patient with Bartter's syndrome, hyperreninemia and secondary hyperaldosteronism were observed.

Almost all of the patients with Addison's disease and with total adrenalectomy indicated the lowest or undetectable levels.

A high level of plasma aldosterone concentration was measured in a patient with edema and chronic renal failure and one with juvenile hypertension associated with orbital tumor.

The method reported here is valuable because of its simplicity, rapidity and reproducibility of assay. Wide application of this assay method in daily clinical practice would be feasible

I. 緒 言

最近の内分泌学領域においては、特異的抗血清との抗原抗体反応を応用した radioimmunoassay (以下 RIA と省略する) の開発・進歩によつて、多数の蛋白性 hormone, polypeptide hormone の測定が可能となり、更に steroid hormone についても hapten 抗原蛋白を結合させて、特異性の高い抗体 (抗血清) が作製された結果、"hapten radioimmunoassay" が可能となつてきた。

aldosterone についても Mayes ら²⁵⁾ (1970), Bayard ら³⁾ (1970) を嚆矢として、その後も数多くの研究者^{2)4)~7)9)11)12)14)17)~21)23)28)29)31)~33)36)39)40)} により、その RIA が報告されてきたが、その血中含有濃度が他の steroid hormone と比較して相対的に低いため、抗 aldosterone 血清と交叉反応する他の steroid hormone など少なくとも一回の chromatography 操作によつて除去することを余儀なくされ、またその操作は比較的煩雑で、かつ熟練を要し、また高価な機器および設備を必要とし、検体試料の処理数も制限される結果、負荷試験などを行ない、他の hormone などと同時に測定するなどの如く、日常臨床への簡易応用を困難としてきた。

最近抽出操作に chromatography を用いない尿⁹⁾³⁷⁾及び血漿⁸⁾¹⁰⁾¹³⁾¹⁵⁾²²⁾²⁴⁾²⁶⁾²⁷⁾³⁰⁾³⁴⁾³⁵⁾³⁸⁾⁴²⁾ aldosterone の radioimmunoassay が報告されてきている。

著者も The National Institute of Arthritis, Metabolism and Digestive Diseases (以下 NIAMDD) から提供を受けた抗 aldosterone 血清 (Lot #088) を用いて、Gomez-Sanchez and Kaplan ら¹⁵⁾ (1973) の免疫学的純化精製抽出を用いた方法に準拠して血漿 aldosterone の RIA を試みて、ほぼ満足すべき結果を得たので、若干の考按を加えて以下報告する。

なお本法の原理は、高濃度の抗 aldosterone 血清を用いて血漿中の aldosterone をあらかじめ特異的に吸

着させた後に、その抽出物を RIA するもので、免疫学的純化 (immunologic purification) 法と称せられているものである。

II. 実験材料

1. 測定器具および機器

- (1) ガラス器具：すべて前日より methanol に浸漬し、洗滌の上、乾燥させ当日使用した。
 - i) 有蓋遠沈管 (15ml および 10ml)：抽出用。
 - ii) ガラス小試験管 (10×75mm)：RIA 用。
 - iii) ピペット (2 ml, 5 ml および 10ml)
 - iv) 駒込ピペット
 - v) ビーカー (100ml および 200ml)
- (2) マイクロ自動ピペット
 - i) Excell-micropipette 50-III および 250-III：硝英製作所製。
 - ii) Biopette automatic pipette および Biotips：Becton, Dickinson and Company 社製。
- (3) マグネチック・スターラーおよび攪拌子：東洋科学産業製。
- (4) サーモミキサー (thermomixer)：サーモニクス社。
- (5) 大容量冷却遠心機：久保田商事製。
- (6) 恒温水槽：サーモユニットミンダー (大洋科学工業製)。
- (7) 電気孵卵器 (自動温度調節器付き)：平沢製作所製。
- (8) 冷蔵庫 (4℃)
- (9) counting vial
- (10) 液体 scintillation counter：Aloka 社製。

2. 測定試薬

- (1) 再蒸留水
- (2) methanol (methyl alcohol)：試薬特級 (和光純薬製) を純化せずにそのまま使用した。
- (3) dichloromethane (methylene dichloride)：試薬特級 (石津製薬製) を純化せずにそのまま使用した。
- (4) dioxane scintillator
 - i) Dimethyl-POPOP (1,4-bis-(2-(4-methyl-5-phenyloxazolyl))-benzene) (Packard 社製)：300mg
 - ii) DOTITE-DPO (2,5-diphenyloxazole) (和光純薬製)：7 g
 - iii) naphthalene (和光純薬製)：100 g
 - iv) dioxane (特級) (石津製薬製) で 1 litre とした。
- (5) 硼酸緩衝溶液 (borate buffer；BB)：0.05M, pH8.0. 半井化学薬品製。
- (6) 飽和硫安溶液：硫酸アンモニウム (片山化学製：試薬特級) を再蒸留水に加えて飽和させて使用した。
- (7) 牛血清アルブミン (bovine serum albumin, Cohn Fraction V powder；BSA)：Armour 社製。
- (8) 牛ガンマー・グロブリン (bovine gamma globulin, Cohn Fraction II)：Armour 社製。
- (9) charcoal 溶液：いずれも assay の度に作製した。
 - i) protein-coated charcoal：5% Norit A (Sigma 社製) を、BSA 0.25% および γ -globulin 0.25% を含む borate buffer に溶解して作製した。
 - ii) dextran-coated charcoal：1.5% charcoal (Norit A) と Dextran T70 (Pharmacia, 生化学工業製) 0.15% を borate buffer に溶解して作製した。
- (10) 抗 aldosterone 血清：米国の National Institutes of Health (以下 NIH) の NIAMDD より提

供された Haning ら¹⁶⁾ の Lot # 088 抗体 (1:100) (−20°C 下凍結保存) を用いた。

本抗血清は aldosterone-18,21-dihemisuccinate と BSA の complex を sheep に免疫して得られたもので、 10^8 倍稀釈まで使用可能であった。また本抗血清の特異性および性格に関しては Haning ら¹⁶⁾により詳細に検討されているが、著者の検討し得た成績については後述する。

- i) Ab-I (1:500): BSA 0.5% および γ -globulin 0.1% を含む硼酸緩衝液 (BB) で #088 抗体を 500倍に稀釈し、分注して −15°C に貯蔵した。
 - ii) Ab-II (1:50,000) (抽出用): assay の度に作製した。Ab-I 0.1ml に BSA 0.5%, γ -globulin 0.1% を含む borate buffer 8ml および protein-coated charcoal 2ml を加えて混合し、室温にて 4 時間 incubate した後、1,500 g にて 30 分間遠心分離し、その上清部分を Ab-II として使用した。
 - iii) Ab-III (1:750,000) (RIA 用): assay の度に作製した。Ab-I を用いて、BSA 0.5% γ -globulin 0.1% を含む borate buffer で稀釈し、75 万倍とした。
- (11) 1,2-³H-aldosterone (49Ci/mM) (Code TRK-196; Batch 18) The Radiochemical Centre, Amersham, England.

使用前日に免疫学的純化精製を下記の如く行なった。

即ち、約 100,000cpm の 1,2-³H-aldosterone を Ab-II 1 ml と共に室温に 2 時間放置し平衡させ、その後飽和硫酸溶液 1 ml を添加し、1,500 g にて 20 分間遠心分離し、上清部分を吸引除去した。その沈渣を borate buffer 0.5ml に再溶解し、dextran-coated charcoal 0.3ml を加えて混和した後、1,500 g にて 15 分間遠心分離し、上清部分を dichloromethane で抽出し、40°C にて窒素ガス下で乾固し、ethanol にて最終濃度 1,000cpm/0.1ml に稀釈した。

- (12) d-aldosterone: 標準曲線用に使用した。800ng/ml-ethanol 溶液。Ikapham 社製 (Ramat-Gan, Israel)
- (13) 他の steroid hormone: cortisone, deoxycorticosterone (DOC), testosterone, progesterone, corticosterone, cortisol, cholesterol および estradiol-17 β は更には純化せずにそのまま使用した。

3. 血漿試料

今回の実験に使用した血漿試料は正常対照者、原発性 aldosterone 症 (術前)、Addison 病および副腎全別者、Bartter 症候群、本態性高血圧症、腎不全 (浮腫期) 患者および眼窩腫瘍を伴う若年性高血圧症患者から安静臥位時に主として肘静脈から heparin 加採血し、直ちに氷浴下に冷却遠心分離し、血漿を測定に供するまで −20°C 下に凍結保存して用いた。

III. 実験方法

1. 血漿 aldosterone の抽出 (extraction) (Fig. 1)

抽出操作は通常検体血漿 1 ml (0.5~2 ml) を有蓋遠沈管 (15ml 用) に採り、前述の如く免疫学的純化した 1,2-³H-aldosterone (約 1,000cpm/0.1ml ethanol 溶液) を回収率補正用に添加し、10 倍容量 (通常 10ml) の dichloromethane で抽出し、遠心分離した後、下層の 7~8 ml を他の遠沈管に移し、40°C にて窒素ガスを通じて乾固させた。

2. Ab-II による純化精製 (purification) (Fig. 1)

他の corticosteroid から前もって aldosterone を分離するために、乾固した各遠沈管に高濃度の Ab-II (5 万倍稀釈抗体) 0.5ml を加え、室温にて 2 時間、あるいは 4°C (冷蔵庫内) で overnight インキュベートして、血漿中の aldosterone を抗体と反応させた。

その後飽和硫酸溶液 0.5ml を加えて混和した後、1,500 g にて 20 分間遠心分離した。その上清部分を吸引除去し、沈殿物を borate buffer 0.2ml に再溶解し、次に dextran-coated charcoal 0.3ml ずつを添加した。その後 4°C 氷浴中に 5 分間インキュベートして、1,500 g にて 20 分間遠心分離した。

Fig. 1. Flow sheet for extraction and purification of plasma aldosterone

	Total Activity	Standard Curve		Samples
		Zero standard	Standards	
Tube No.	(1)~(2)	(3)~(4)	(5)~(20)	(21)~
Unknown samples	—	—	—	duplicates (dried extracts)
Standard aldosterone (ml)	—	0.1 (dried)	0.1 (dried)	—
1,2- ³ H-Aldosterone 2,000cpm (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1
Ab-III 1 : 750,000 (ml)	—	0.3	0.3	0.3
Borate buffer 0.05M PH 8.0 (ml)	0.6	—	—	—
Mixing and Incubation	Mixing (vortex mixer) →Incubation (4°C, overnight)			
Cold saturated ammonium sulfate solution	—	0.3	0.3	0.3
Mixing and Centriugation	—	Vortex-mixing →Centrifugation at 2,000g for 20 minutes		
Decantation and Counting	Transfer 0.3ml of supernatant (containing free aldosterone) into 10ml of scintillator →Liquid scintillation counting			

Fig. 2. Flow sheet of radioimmunoassay for plasma aldosterone by immunologic purification

3. aldosterone 部分の抽出 (extraction of aldosterone) (Fig. 1)

その上清部分 (bound aldosterone を含む) を有蓋遠沈管 (10ml 用) に移し, dichloromethane 4ml に抽出し, これを 1 ml ずつ 2 本のガラス小試験管 (10×75 mm) に分注し, 40℃ にて乾固し, duplicate として RIA に用い, 残り 1 ml を counting vial に分注し, 抽出時の回収率補正用に用いた。

4. radioimmunoassay (Fig. 2)

RIA の実際を Fig. 2 に示したが, 標準曲線の作成にあたっては, あらかじめ標準 aldosterone を各々 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 400, 800pg を duplicate で添加して乾固したガラス小試験管に, また既に前項に記した乾固してある試料用ガラス小試験管にも, 1,2-³H-aldosterone の一定量 (約 2,000cpm 相当) と Ab-III (75倍稀釈抗体) の混合物を加えた後, vortex mixer を用いてよく混合し, その後 4℃ に overnight でインキュベートした。

翌日, total activity 用以外の, 抗原・抗体反応物を含むガラス小試験管に冷却飽和硫酸溶液 0.3ml を加えて混和した後, 2,000 g にて20分間遠心分離して, bound と free 分画の分離を行ない, free aldosterone を含む上清部分のうち各 0.3ml を counting vial に移し, dioxane scintillator 10ml ずつを加え, これらを液体シンチレーションカウンターにより count した。

また total activity 用には ³H-aldosterone 0.1ml に borate buffer 0.6ml を加え振盪後, その 0.3ml を counting vial に移し, scintillator 10ml を加えて count した。

標準曲線用の count 数から〔F/T〕比, あるいは〔B/T〕比を計算し, 標準曲線を作成し, それに因つて各々の検体血漿に含まれる aldosterone 含量を計算し, 一方抽出時の回収率を求めて補正を加えて実際の血漿 aldosterone 濃度 (単位: ng/100ml) を算出した。

IV 実験結果

1. 標準曲線 (Fig. 3) (Table 1)

本法によつて得られた aldosterone の標準曲線を一括して Fig. 3 に示したが 5~200pg にかけて良好な曲線が得られた。

期日を変えて測定した標準曲線におけるいわゆる “between-assay variation” は Table 1 の如くであった。つまり 0~25pg までは変動係数 (coefficient of variation; CV) は9.64~19.27%と比較的高値を示したが, 50~800pg にかけては2.54~5.34%と良好であつた。なお〔Fo/T〕は 27.31±4.96 (SD) % であつた。

Table 1. Reproducibility of standard curves in this method

standard aldosterone	(Free/Total) × 100(%)				Mean	SD	coefficient of variation (%)
	assay 1	assay 2	assay 3	assay 4			
0 pg	31.51	31.09	21.05	25.60	27.31	4.96	18.16
5	32.41	34.69	21.56	31.07	29.93	5.77	19.27
10	34.77	36.46	27.06	34.11	33.10	4.14	12.50
25	49.22	45.20	38.79	44.71	44.48	4.29	9.64
50	54.49	55.11	50.57	54.34	53.62	2.06	3.84
100	67.91	69.88	67.79	71.50	69.27	1.76	2.54
200	76.64	79.53	78.48	84.03	79.67	3.14	3.94
400	83.80	85.80	85.77	89.84	86.30	2.53	2.93
800	85.14	91.41	95.45	95.64	91.91	4.91	5.34
Fo/T	31.51	31.09	21.05	25.60	27.31	4.96	18.16

しかし夏期においては標準曲線はやや平坦傾向を示し、測定環境、特に温度（室温など）の点に留意する必要が示唆された。

2. 抗血清の特異性・性格および交叉反応 (Fig. 4) (Fig. 5)

既述した如く、本実験に使用した抗 aldosterone 血清は NIAMDD から提供を受けた Lot # 088 抗体であり、同時に送付された説明書中の検討成績によれば、aldosterone 以外の主な steroid hormone 例えば cortisol, corticosterone, cortisone, testosterone, DHEA, progesterone, estradiol-17 β , 18-hydroxycorticosterone および DOC などとの交叉反応はいずれも 1% 以下とされているが、今回の著者の検討成績は Fig. 4 の如くであった。

つまり、Abraham¹⁾ の計算方法を用いると、50% bound の点において最大の阻害を示した cortisone では 1.24% であり、DOC では 0.60%, testosterone 0.34%, progesterone 0.30%, corticosterone 0.23% および cortisol 0.15% であった。

また今回使用した Lot # 088 抗体を種々の濃度に希釈した抗血清および CIS(CEA-IRE-SORIN)抗体を用いて、標準曲線を検討して、Fig. 5 に示した如き結果を得た。この結果より、本実験では実際の

Fig. 3. Standard curves of aldosterone in this method.

Fig. 4. Cross reaction with other steroids.

RIA に用いた Ab-III には750,000倍稀釈抗血清を
使用して、ほぼ満足すべき結果が得られた。

3. 抽出操作における回収率 (Table 2)

本法による血漿 aldosterone の免疫学的純化精製
抽出操作における全過程の最終回収率は 41.8 ± 6.4
(SD) % (N=58) であった。

また各抽出操作段階における回収率は Table 2
に示した通りであった。

4. 盲検値および測定感度

検体血漿の代りに再蒸留水 1 ml を用いて同一の
純化精製抽出の操作を行なった場合の water-blank
(盲検値) は 7.02 ± 2.62 (SD) pg/tube であった。

標準曲線から得られた測定感度は 10pg であった。

5. 再現性 (Table 3)

本法による precision を Table 3 に示したが、
変動係数 (CV) は9.4~25.3%を示した。

aldosterone の高レベルの方が低レベルを示したものより変動係数はやや低値を示した。

6. 正確度 (accuracy) および回収試験 (Table 4)

慢性腎不全患者の瀉血時の血漿試料を用いて、本法による測定法の正確度および添加回収試験を行ない、

Fig. 5. Effect of various diluted anti-aldosterone antisera on the standard curve.

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

	Procedure	Recovery of ^3H -aldosterone (M $\pm$ SD) %
Extraction	Extraction with dichloromethane	81.7 $\pm$ 0.6
Immunologic purification	After incubation with Ab-II	69.3 $\pm$ 4.5
	After separation with dextrancoated charcoal	47.6 $\pm$ 6.5
Extraction of aldosterone	Extraction with dichloromethane (Final recovery)	39.9 $\pm$ 4.3

Table 3. Reproducibility in this method (withinassay)

	sample 1	sample 2	sample 3
	10.1 ng/dl	55.4 ng/dl	221.5 ng/dl
	16.1	63.6	247.8
	10.3	57.1	213.2
	17.8	59.2	185.3
	15.6	47.4	276.5
		56.4	209.9
Mean	14.0	56.5	225.7
SD	3.5	5.3	32.0
CV (%)	25.3	9.4	14.2

Table 4 に示す如くほぼ良好な結果を得た. この場合にも前述した再現性の項と同様に, aldosterone の低レベルに比較して高レベルでの回収率が良好であった.

Table 4. Accuracy, precision and recovery rate determined by adding different amounts of standard aldosterone

sample	aldosterone added (ng/dl)	Mean (ng/dl)	SD	SE	CV (%)	Mean-49.4	Recovery (%)
human	0	49.4	5.6	2.3	12.1	—	—
plasma 1.0ml	5	56.5	4.9	2.0	8.8	7.1	142.0
(chronic renal failure)	10	61.9	11.9	5.3	18.7	12.5	125.0
	20	72.7	4.2	2.4	5.9	23.3	116.5
Regression equation		$Y = 1.14X + 50.08$ ($r = 0.99$)					

Y=aldosterone quantified

X=aldosterone added

Table 5. Plasma aldosterone concentration (PAC) in patients with various diseases measured with this method

Subjects		Sex	Age (yr)	Sample collection	PAC (ng/ml)
normal subject	Y.H.	M	30	supine	3.3
					9.4
				upright	15.5
primary aldosteronism (preoperative)	T.K.	F	36	supine	50.5
				supine**	66.5
	Y.C.	F	29	supine	225.7
	O.F.	F	38	supine	66.4
Addison's disease and the total adrenalectomized	S.T.	F	36	supine	0.6
					1.0
					0
	O.M.	M	55	upright	5.3
	K.T.	F	35	supine	0
Bartter's syndrome	N.H.	M	55	supine	0.6
					2.6
					20.2
essential hypertension	O.Y.	F	36	supine	33.8
chronic renal failure with edema	N.K.	F	22	supine	30.5
juvenile hypertension with orbital tumor	M.N.	F	15	supine	15.3
					36.6
					36.8

** : affected adrenal venous blood

なお倍数稀試験の結果もほぼ満足すべきものであつた。

7. 実際の測定値および臨床応用 (Table 5)

chromatography 不要の免疫学的純化精製抽出法を用いて実際に臨床的に応用して測定した血漿 aldosterone 濃度の実例は Table 5 に示した通りであつた。

すなわち原発性 aldosterone 症例の末梢血および患側副腎静脈血では血漿 aldosterone 濃度は高値を明らかに示した。特に Y.C. 例では、その副腎腺腫はクルミ大 ($3.0 \times 3.5 \times 2.5 \text{ cm}$; 15 g) の大きさであつた点を考え併せると興味深い。

また Bartter 症候群の N.H. 例では高 renin 血症と一致・符合する血漿 aldosterone 濃度の高値を示し、続発性 aldosteronism の病態がうかがわれ興味深く、現在カリウム剤の内服補給および spironolactone 治療を続行中である。

Addison 氏病および治療的副腎全別者ではほぼ全例で低値を示し、一例では hydrocortisone 補給によって血中 cortisol 値は正常低値を保持しているにもかかわらず、血漿 aldosterone 濃度はごく低値にとどまつていた。

浮腫・腎不全を伴う全身性エリテマトーデス症例 (N.K. 例) では血漿 aldosterone 濃度は中等度高値を、また眼窩腫瘍を伴う若年性高血圧症例 (M.N. 例) でも高値を示し、高 renin 血症に一致して続発性 aldosteronism を示していた。

V. 考 按

以上著者は抽出操作に chromatography を用いず、免疫学的純化精製抽出を用いて簡便な血漿 aldosterone の radioimmunoassay を試みてほぼ満足すべき結果を得た。

現在 (昭和49年12月末) までの報告・発表されている chromatography による抽出操作を要しない、いわゆる “non-chromatography” あるいは “without chromatography” による血漿あるいは尿中 aldosterone の radioimmunoassay を一括すれば著者の渉猟し得た範囲では、Table 6 および Table 7 の通りであり、海外文献 (Table 6) 9編、国内文献 (Table 7) 6編であつた。

さて non-chromatography による血漿 aldosterone の RIA の測定法における抽出純化精製操作法の原理については次の三方法に大別される。すなわち、(1)化学的純化法 (chemical purification) によるもの、(2)免疫学的純化法 (immunologic purification) によるもの、および(3) increased antibody specificity に基づく直接抽出法 (direct extraction) によるものである。

(1) 化学的純化法：これには Farmer and Fabre ら (1972)⁹⁾、(1973)¹⁰⁾ および Varsano-Aharon and Ulick³⁴⁾ (1973) の報告がある。

Farmer and Fabre ら⁹⁾ (1972) は aldosterone- γ -lactone-3-oxime を BSA と coupling させて、その conjugate を rabbit あるいは sheep に感作・免疫して、特異性の高い抗体を作製し、thin layer chromatography を抽出時に省略して RIA を行ない、尿中 aldosterone 排泄量を測定し、また1973年¹⁰⁾には更に高力価の15万~18万倍稀釈可能な特異抗体を γ -lactone 法により作製し、血中および尿中 aldosterone の測定に成功し報告している。なお抽出に際して彼らは benzene : water partition により neutral steroids は効果的に除去され、また過沃素酸酸化後に bicarbonate washing を行なつて、主要夾雑 steroid の cortisol を95%除去し得たとしている。しかし γ -lactone 転換化に際して一部問題を残していると指摘する報告もみられる。

aldosterone- γ -lactone 抗体は米国では市販されており (例えば Antibodies, Inc.; γ F laboratories など)、また本邦でも矢野・出村ら⁴¹⁾ (1974) は aldosterone- γ -lactone 抗体の作製に成功しており、その普及が期待される。

次に Varsano-Aharon and Ulick³⁴⁾ (1973) は化学的純化抽出操作にあつて、aldosterone のユニークな性質を基礎において、検体血漿を neutral etiolactone 化して、etiolactone と交叉反応する抗 aldosterone

Table 6. Summary of foreign literatures concerned with radioimmunoassay for plasma aldosterone without chromatography

References	Ref. No.)	Sample	Preparation and characteristics of anti-aldosterone serum							Extraction and purification procedure		Radioimmunoassay procedure						Remarks (treatable numbers of sample, etc.)	
			Aldosterone derivative	Hapten antigen protein	Immunized animal	Antibody dilution	% Cross reaction to other steroids				Method	Recovery	Incubation time	Separation of F from B	Sensitivity	Precision			Blank
							Cortisol	Corticosterone	DOC	Progesteron						withinassay	between-assay		
Farmer et al. (1972)	9)	urine (25ml)	ald.- γ -lactone-3-oxime	BSA	rabbit or sheep (goats)	1 : 500 ~ 1 : 5,000	0.07	0.02	<0.01	0.17	(1) chloroform extraction (2) benzene : water partition (3) periodate oxidation (4) sodium bicarbonate wash	40~50% (50~60%)	room temp. →2°C, 1hr	DCC	0.1ng (0.16 μ g/day)	C.V. 11.6%	C.V. 7.8%	not detectable	10samples/6~8hours (except for hydrolysis) treatable
Farmer et al. (1973)	10)	plasma (1~2ml) urine (1ml)	ald.- γ -lactone-3-oxime	BSA	sheep	1 : 150,000 ~ 1 : 80,000	0.024	0.015	0.0048	0.086	(1) partitioning between cyclohexane and water (2) periodate oxidation (3) sodium hydroxide wash	35~45%	23°C, 30min. → 4°C, 30min.	DCC	2~5pg	—	C.V. 11.5% 17.9% 10.6%	2~5pg	25samples/day treatable
Martin and Nugent (1973)	24)	plasma (2ml)	(1) 1st antibody ald.-3-oxime	BSA	rabbit	1 : 3,000	0.6	1.1	<0.1	<0.6	(1) adsorption of aldosterone with Fuller's earth (140mg)	5~6.5%	room temp. 1 hr	saturated ammonium sulfate	10pg	C.V. 4.4~11% (100~1000 pg) C.V. 36% (50pg)	C.V. 14.8% 10.9%	23 ± 16pg	24samples/1.5day treatable
			(2) 2nd antibody ald.-18,21-dihemisuccinate (NIH # 088)	BSA	sheep	1 : 1,000,000	0.02	0.2	0.69	<0.6	(2) incubation with 1st antibody (purification of ald.) (3) RIA used 2nd antibody								
Gomez-Sanchez et al. (1973)	15)	plasma (0.5~2ml)	ald.-18,21-dihemisuccinate (Ab-I) (NIH # 088)	BSA	sheep	1 : 1,000,000	0.02	0.2	0.69	<0.6	(1) dichloromethane extraction (2) addition of Ab-II ; after incubation, addition of ammonium sulfate (3) after addition of DCC, supernatant containing bound aldosterone was extracted with dichloromethane (4) RIA used Ab-III	63.8 ± 11.5%	4°C, overnight	cold saturated ammonium sulfate	± 4pg (2SD)	C.V. 12.8% 9.0% 6.4%	C.V. 16.3% 9.1%	0.19 ± 0.17 (SD) ng/100ml	80~120samples/week treatable
			(1) 1st antibody (Ab-II)			(1 : 50,000)													
			(2) 2nd antibody (Ab-III)			(1 : 750,000)													
Varsano-Aharon and Ulick (1973)	34)	plasma (2~4ml)	ald.-18,21-dihemisuccinate (NIH # 088) (NIH # 25)	BSA	sheep	1 : 320,000	0.02	0.2	0.69	<0.6	(1) neutral plasma extract (2) water : toluene partition (3) periodate oxidation (4) neutral etiolactone product (5) RIA utilizing ³ H-ald.- etiolactone	45 ± 7 %	7~10°C, >6 hours ~overnight	DCC	10pg	C.V. 4.2% 7.2%	C.V. 4.5% 6.0%	not detectable	—
Varsano-Aharon and Ulick (1974)	35)	plasma (2ml)	ald.-18,21-dihemisuccinate (NIH # 088)	BSA	sheep	1 : 1,200,000	0.02	0.2	0.69	<0.6	(1) addition of DCC (A) sol. for selective separation of CBG binding steroids from free ones (2) elution of ald. adsorbed with charcoal with dichloromethane ; Sodium hydroxide wash	45 ± 9 % (30~70%)	7~10°C, >6 hours ~ overnight	DCC(B)	3pg	C.V. 3.5% 8.3%	C.V. 7.8%	not detectable	more simplified and reliable method
Vetter et al. (1973)	37)	urine (10ml)	ald.-oxime antisera ①~⑥	BGG	rabbit	markedly higher specificity Antisera ① ② ③ ④ ⑤ ⑥	0.001 0.0005 <0.0003 <0.0001 0.0006 <0.0001	0.05 0.02 <0.0003 0.0014 0.0004 0.004	0.1 0.25 <0.0003 0.002 0.0001 0.0015	0.002 0.05 <0.0003 0.0007 0.0012 0.0024	(1) preextraction with dichloromethane (2) acid hydrolysis (3) second dichloromethane extraction	91.2 ± 4.2 (SD) %	4°C, 24hours	DCC	antiserum ① 0.44 μ g/day (1) antisera ①, ② and ⑤ →10pg (2) antisera ③, ④ and ⑥ →20pg	C.V. 4.7%	C.V. 13.6%	not detectable	20~30samples/day (except for hydrolysis) treatable
Vetter et al. (1973)	38)	plasma (2ml)	ald.-oxime antisera ①, ②	BGG	rabbit	antiserum ① (1 : 8000) antiserum ② (1 : 800)	0.001 0.0005	0.05 0.02	0.1 0.25	0.002 0.05	(1) only once extraction with dichloromethane (2) no further separation needed	92.4 ± 4.8%	4°C, 24 hours	DCC	5pg	C.V. 1) antiserum ① : 9.0% 2) antiserum ② : 15.0%	C.V. 1) antiserum ① : 13.5% 2) antiserum ② : 15.0%	not detectable	Simple, accurate and reliable method
McKensie and Clements (1974)	26)	serum (2ml)	ald.-3-oxime (Rabbit # 23)	RSA	rabbit	1 : 3,000	<0.00003	0.000038	<0.00003	<0.00003	(1) only once extraction with dichloromethane (2) no further separation procedure	84.9 ± 3.1 (SD) %	37°C, 5 min. → 4 °C, 1 hour → 4 °C, 2 hour	DCC	10pg (3ng ald/dl serum)	C.V. 9.2%	C.V. 22.3% 6.2% 12.2%	not detectable	20~40 samples/8 hours treatable

(Abbreviation)

ald.=aldosterone
BSA=bovine serum albumin
BGG=bovine gamma globulin
C.V.=coefficient of variation
DCC=dexran coated charcoal
RSA=rabbit serum albumin

Table 7. Summary of literatures in Japan concerned with radioimmunoassay for plasma aldosterone without chromatography

References	Ref. No.)	Sample	Anti-aldosterone-serum	Extraction and purification		Sensitivity	Radioimmunoassay procedure	
				Method	Recovery		Principle and results	
Fukuchi et al. (1973)	13)	plasma (2 ml)	homemade antibody prepared by immunization of conjugates ald-3-oxime with porcine gamma globulin to rabbit	separation of aldosterone from comp. F in plasma, utilizing differences of binding ability to CBG and anti-comp. F serum	—	—	(1) good correlation with a method using RIA containing a paper chromatographic purification step (2) more simplified and less equipment-consuming method	
Nakajima et al (1974)	27)	plasma (2 ml)	homemade antibody prepared by immunization of conjugates ald-3-oxime with porcine gamma globulin to rabbit (1) 1st antibody (1 : 10,000) (2) 2nd antibody (1 : 200,000)	a new modified method for the RIA of plasma aldosterone using Fuller's earth (50 mg), charcoal and anti-aldosterone serum to purify aldosterone in plasma	28.6±7.98 (%)	2pg	(1) compromising method with 24) and 15) one (2) incubation time : 4°C, 16 hours (3) separation of free (F) from bound (B) fractions : saturated ammonium sulfate method (4) blank : 0ng/dl (5) accuracy : C.V. 9~23% (100~1000 pg plasma), C.V. 35% (50pg plasma)	
Demura (1973)	8)	plasma (2 ml)	(1) 1st antibody (1 : 2,500) (used Nugent's antibody) (2) 2nd antibody (1 : 500,000) (used NIH antibody)	(1) adsorption aldosterone to Fuller's earth (140mg) (2) precipitation by 50% ammonium sulfate after elution with buffer (3) second purification with 1st antibody (4) RIA utilizing 2nd antibody	—	—	conformed method to 24)	
Yoshimi (1973)	42)	plasma (2 ml)	identical with 8)	almost identical with 8)	—	—	conformed method to 24)	
Kōno et al. (1974)	22)	plasma (1~2 ml)	NIH (# 088) antibody (1) S ₂ (1 : 50,000) (2) S ₃ (1 : 750,000)	immunologic purification	45~50%	—	(1) conformed method to 15) (2) incubation time : 4°C, lower night (3) separation of F from B : saturated ammonium sulfate method (4) blank : under 2pg (5) within assay : 11.3%, 9.8%, 8.1%	
Ojita et al. (1974)	30)	plasma (1 ml)	CIS-Kit antibody prepared by immunization of conjugates ald-3-oxime with RSA to rabbit	(1) direct extraction with dichloromethane (2) no further separation	88.2±11.6 (SD) (%)	(5pg)	(1) non-chromatographic and new CIS Kit was utilized (2) separation of F from B : DCC (3) within assay : 25.4%	

血清と共に assay を行なっている。

(2) 免疫学的純化法: 本法は血漿 aldosterone の純化精製抽出段階に特異性の異なる, または高濃度の aldosterone 抗体を利用して血漿中の aldosterone をあらかじめ特異的に吸着させた後に, その抽出物を他の, または稀釈抗 aldosterone 血清を利用して RIA を行なうものであり, 報告者によつては抽出の第1段階に aldosterone と他の steroid hormones の corticosteroids-binding globulin (CBG) との結合程度の差を利用し, unbound steroid (つまり aldosterone が相当する) を吸着分離するために Fuller's earth, Florisil あるいは dextran-coated charcoal などの吸着剤 (adsorbent) を用いている。

本法では操作がまだかなり繁雑で, 回収率が低値であるが, 多数の検体試料の処理が可能で, chromatography 使用のものに比して時間を短縮できる利点がある。

本原理を利用したものには, Martin and Nugent²⁴⁾ (1973), Gomez-Sanchez and Kaplan ら¹⁵⁾ (1973), Varsano-Aharon and Ulick³⁵⁾ (1974), 福地ら¹³⁾ (1973), 中嶋および福地ら²⁷⁾ (1974), 出村⁸⁾ (1973), 吉見⁴²⁾ (1973), 河野および吉見ら²²⁾ (1974) の報告がある。

Martin and Nugent²⁴⁾ (1973) は第1抽出段階で Fuller's earth 140mg を用いて aldosterone を吸着し, 他の corticoids を結合するために内因性血漿蛋白を用い, その後特異性の異なる二種の抗血清を用いている。つまり Nugent 抗体を第2抽出段階に, 他方 NIH (Lot #088) 抗体を RIA に応用している。本法に準じたものには, 出村⁸⁾ (1973), 吉見⁴²⁾ (1973) らの報告がある。

福地ら¹³⁾ (1973), 中嶋および福地ら²⁷⁾ (1974) はそれぞれ Fuller's earth 50mg に加えて, 前者では抗 hydrocortisone 血清を, また後者の報告では次に述べる Gomez-Sanchez and Kaplan ら¹⁵⁾ の高濃度抗 aldosterone 血清を併用して良好な結果を報告している。

次に Gomez-Sanchez and Kaplan ら¹⁵⁾ (1973) による方法は preliminary antibody exposure を利用した immunologic purification に基づいている。すなわち検体血漿を dichloromethane で抽出し, 高濃度の第一抗体 (5 万倍稀釈 NIH 抗体) を添加し, インキュベートした後, 硫酸溶液を添加・遠心分離し, 次に dextran-coated charcoal を加えて, 他の steroids を除去し, 結合 aldosterone を含む上清を乾固して, 引続いて第二抗体 (75 万倍稀釈 NIH 抗体) を利用して immunoassay を行なうものであり, その方法の詳細は著者の行なつた実験材料・実験方法の項に既述した通りである。

河野および吉見ら²²⁾ (1974) 並びに今回の著者の報告は本法に基づいたものである。また吉見ら⁴³⁾ (1974) は本法を estradiol-17 β の RIA に応用して良好な結果を報告している。

(3) 特異性抗体による直接的抽出法: これは最近の steroid hormone の抗血清の作製法の飛躍的な進歩による帰結であつて, 注意深く純化精製した抗原を用いて動物に感作免疫して特異性の著増した抗 aldosterone 血清が得られた結果, 血漿 aldosterone の前抽出 (preliminary extraction) 操作を省略して, 単に dichloromethane 抽出のみで, 直接に RIA が可能となつたものである。

これには Vetter and Siegenthaler ら (1973)³⁷⁾, (1974)³⁸⁾, McKenzie and Clements²⁶⁾ (1974), 小田田および木村ら³⁰⁾ (1974) の報告がある。

著者もフランス原子力庁 (CEA-IRE-SORIN) 製の chromatography を要しない Aldosterone-Radioimmunoassay-Kit を使用して良好な結果を得ているが, その詳細については稿を改めて報告の予定である。

次に今回著者の試みた方法は前述した Gomez-Sanchez and Kaplan ら¹⁵⁾ の方法に基づいたものであるが, 免疫学的純化精製抽出法による測定法の問題点としては次に列挙する諸点が考慮された。

標準曲線は 5~200pg にかけて長好な結果が得られたが, 夏期における測定では標準曲線はやや平坦傾向を示し, 測定環境特に室温に留意する必要があると思われた。

今回抗 aldosterone 血清は NIAMDD から提供を受けた Lot #088 抗体を用いたが, Ab-II の作製および 1,2-³H-aldosterone の免疫学的精製に際して比較的多量の抗 aldosterone 血清を必要とした。

抽出時回収率は 41.8 $\pm$ 6.4 (SD) % であつた。また emulsion 化した検体血漿の場合には, 時に異常に低い回収率を示し, その後の全 assay は棄却されたが, 問題点を残したと考えられる。

なお抽出時回収率について, **Martin and Nugent**²⁴⁾ は 5~6.5%, **Gomez-Sanchez and Kaplan** ら¹⁵⁾ は 64.8 ± 11.5%, 河野および吉見ら²²⁾ は 45~50%, 中嶋および福地ら²⁷⁾ は 28.6 ± 7.98% 報告している。

抽出時回収率の低値の原因については, ①抽出操作段階の多かつたこと, ② tritium label した aldosterone の Ab-II による免疫学的精製が不十分であつた可能性が著者の検討では考えられ, 特に後者に起因する要因が大であつたと考えられた。前者については Table 2 に示した如く, 抽出段階の進むにつれて回収率は漸次低下した。

後者について考察すれば, **Gomez-Sanchez and Kaplan** ら¹⁵⁾ は回収率補正に用いる 1,2-³H-aldosterone を免疫学的純化处理をしなかつた場合には回収率は低値を示し, 従つて最終的に得られた血漿 aldosterone 濃度の実測値は誤つて高値に出る可能性を指摘しているが, 著者の結果にもこの点に問題を含んでいたのかもしれない。

なお 1,2-³H-aldosterone の精製については, **Gomez-Sanchez and Kaplan** ら¹⁵⁾ は当初 celite chromatography を用いたが, のち 2 週毎あるいは必要時に Ab-II で免疫学的に精製しているが, その詳細は実験材料の項に既述した通りである。また中嶋および福地ら²⁷⁾ は 4 週毎に paper chromatography で純化して使用したと報告している。

本法による測定感度 (sensitivity) は自験結果では 10pg であつた。なお **Gomez-Sanchez and Kaplan** ら¹⁵⁾ は ± 4pg (2SD), 中嶋および福地ら²⁷⁾ は 2pg と報告している。

本法による盲検値は自験結果では 7.02 ± 2.62pg/tube とやや高値を示した。**Gomez-Sanchez and Kaplan** ら¹⁵⁾ は Ab-II 程度の高濃度の場合, 血漿中に含まれる corticoids が RIA に影響を与える結果, 盲検値が高くなるとして既述の如く Ab-II を protein-coated charcoal で処理している。その結果かれらは盲検値を 0.19 ± 0.17ng/100ml と報告している。盲検値について河野および吉見ら²²⁾ は 2pg 以下, 中嶋および福地ら²⁷⁾ は 0ng/dl, **Martin and Nugent**²⁴⁾ は 23 ± 16(SD) pg と報告している。

一般的に peptide hormone の場合と異なり, steroid hormone, 殊に aldosterone の RIA に際しての盲検値に関しては, ① reagent blank および solvent blank, ② 内因性 blank, ③ paper blank および ④ 抗体の力価の問題などの要因が指摘され重要視されてきた。

reagent blank (または solvent blank) の問題に関しては, **Farmer and Fabre** ら¹⁰⁾ はシリコン加工した disposable のガラス器具を用い, また干渉物質を含む溶媒は再蒸留により除去し, 更に assay の度に新品を用いることにより解決したと述べている。また **Gomez-Sanchez and Kaplan** ら¹⁵⁾, 中嶋および福地ら²⁷⁾ はすべて有機溶媒を再蒸留して使用しているが, 著者の場合再蒸留は行わずに assay 毎に新品をそのまま用いた点に問題点があると考えられた。

内因性 blank の問題は血中に存在する非特異的因子, つまり nonspecific competing ligands の除外にあると考えられるが, **Varsano-Aharon and Ulick**³⁴⁾ は結合・置換反応における blank の機序を巨分子間の反応における非特異性の ligands による結合部位への競合現象に関連している点に求めて考察を加え, また最近では peptide hormone の抗血清では絶対的な特異性の欠如が問題とされ, “immunoreactive peptide precursors and metabolites in plasma” が論議されていると述べている。

paper blank に関しては, 本法による限り論外であり, また抗体の力価の問題に関しては, 抗体の特異性を著増させることにより解決され得るものと思われる。

さらに著者の場合には抽出時回収率の項で前述したが, 回収率補正および実際の RIA に用いた tritium-label した aldosterone の Ab-II による免疫学的精製が不十分であつた可能性も考慮する必要があると考えられる。事実 1,2-³H-aldosterone の免疫学的精製にあつて著者の検討したところ, 本来 label されていたものが, 解離したのか, 1,2-³H-aldosterone 自体の失活あるいは変性したのかは不明であるが, Ab-II 処理の前後で radioisotope activity は 25~36% に低下した。またその際飽和硫酸溶液と Ab-II の添加混合比は 1:1 で処理した場合の方が回収率は高値を示した。

著者の本法による再現性, 精度, 正確度および回収試験の結果からみると, 低 aldosterone レベルのも

のより高 aldosterone レベルの方が変動係数は良好であつた。この点に関しては, Gomez-Sanchez and Kaplan ら¹⁵⁾, 河野および吉見ら²²⁾, 中嶋および福地ら²⁷⁾の報告でも同様であり, 回収率の低値などがその成因とも考えられた。

また accuracy の検討では自験例では, $Y = 1.14X + 50.08$ で良好であつた。ただし, ここで Y は実測 aldosterone 値を, X は添加 aldosterone 量を示す。しかし実際の検体血漿の測定にあたっては, replicate analysis を要すると考えられた。

chromatography 不要の免疫学的純化精製抽出法を応用した場合の利点としては, ①多数の検体試料を一度に処理できるので, 負荷試験などを施行して逐次採血等により, renin-angiotensin-aldosterone 系の profile を知ることができる, ②比較的少量の検体試料にて済むこと, ③高価な設備・機器を要さず, chromatography・恒温室などの設備のないところでも抗体があれば測定できる, ④ paper chromatography を使用した場合, 飽和・展開に10数時間~数10時間を要したのに比べて non-chromatography によるものでは数時間のうちに抽出過程を終了し得ること, ⑤再現性・精度などの基礎的検討でも, chromatography の使用の有無の間に本質的な差違は認められず, その相関は良好であること, および⑥比較的安価であることなどが挙げられる。

一方本法に伴う欠点としては, ①比較的多量の抗 aldosterone 血清を消費すること, また抗体の充分な供給が前提となること, ②回収率がやや低値であること, および③ ^3H -aldosterone の免疫学的精製, Ab-II の作製などの前準備に若干の時間を要することなどが挙げられる。

VI. 結 言

以上 Gomez-Sanchez and Kaplan ら¹⁵⁾の方法に準拠して, chromatography 不要の免疫学的純化精製抽出法による人血漿 aldosterone の radioimmunoassay に関して検討を加え, 次の結果を得た。

- (1) 5~200pg にかけて良好な aldosterone の標準曲線が得られた。また between-assay variation も良好であつた。
 - (2) radioimmunoassay に先立つ全抽出過程における最終回収率は 41.8 ± 6.4 (SD)% (N=58) であつた。
 - (3) 盲検値は 7.02 ± 2.62 (SD) pg/tube とやや高値を示し, その原因について若干の考察を加えた。また本法による測定感度は 10pg であつた。
 - (4) 本法による精度は変動係数 9.4~25.3% であつた。また正確度, 添加回収試験および倍数稀釈試験の結果はほぼ満足すべきものであつた。
 - (5) 各種内分泌, 腎, 高血圧, 浮腫性疾患における臨床的应用は充分可能であつた。
- また本法による血漿 aldosterone の測定は簡便で, 信頼性も高く, 短時間に済む諸点からみて, renin-angiotensin-aldosterone 系の病態把握に際して有意義な測定法と考えられ, 日常臨床への今後の応用が期待されるものと考えられる。

(なお, 本論文の要旨は日本内科学会中国四国地方会第31回総会(昭和49年9月21日; 米子市)において発表した)。

謝辞: 御指導・御校閲を戴いた大藤真教授および直接御指導戴いた高原二郎講師に深く感謝致します。

最後に貴重な抗 aldosterone 血清を提供して下さいた米国 NIH (NIAMDD) に深甚の謝意を表する。

文 献

- 1) Abraham, G.E.: Solid-phase radioimmunoassay of estradiol-17 β . J. Clin. Endocrinol. Metab. 29: 866-870, (1969).
- 2) Banks, P., Ekins, R.P. and Slater, J.D.H.: Development of a rapid, sensitive and specific method for the measurement of aldosterone by radioimmunoassay. Acta endocrinol. 67: Suppl. 155, 94, (1971). (Abstract)
- 3) Bayard, F., Beitins, I.Z., Kowarski, A. and Migeon, C.J.: Measurement of plasma aldosterone by radioimmunoassay. J. Clin. Endocrinol. Metab. 31: 1-6, (1970).

- 4) Bayard, F., Beitins, I.Z., Kowarski, A. and Migeon, C. J.: Measurement of aldosterone secretion rate by radioimmunoassay. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 31: 507-510, (1970). 5) Bühler, F.R., Sealey, J.E. and Laragh, J.H.: Radioimmunoassay of plasma aldosterone. 655-669. Ed. by J. H. Laragh, Hypertension Manual, Yorke medical books, New York, (1974). 6) Cyr, M.J. St., Sancho, J.M. and Melby, J.C.: Quantitation of plasma aldosterone by radioimmunoassay. *Clin. Chem.* 18: 1395-1402, (1972). 7) Deck, K.A. Champion, P.K. Jr. and Conn, J.W.: Urinary free aldosterone in healthy people and in patients with primary aldosteronism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 36: 756-760, (1973). 8) 出村 博: 第11回 Radioimmunoassay 研究会 (昭和48年5月; 東京) (追加発言). 最新医学, 28: 2068, (1973). 9) Farmer, R.W., Roup, W.G. Jr., Pellizzari, E.D. and Fabre, L.F. Jr.: A rapid aldosterone radioimmunoassay. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 34: 18-22, (1972). 10) Farmer, R.W., Brown, D.H., Howars, P.Y. and Fabre, L.F. Jr.: A radioimmunoassay for plasma aldosterone without chromatography. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 36: 461-465, (1973). 11) Fraser, R., Guest, S., and Young, J.: A comparison of double-isotope derivative and radioimmunological estimation of plasma aldosterone concentration in man. *Clin. Science and Mol. Med.* 45: 411-415, (1973). 12) 福地総逸, 勝島一郎, 竹内孝彦: Radioimmunoassay による血漿 Aldosterone 含量の測定, ホルモンと臨床, 19: 945-949, 1971. 13) 福地総逸, 竹内孝彦, 中嶋凱夫, 西里弘二: 抗アルドステロン血清の作製法とその比較, 第11回 Radioimmunoassay 研究会 (昭和48年5月; 東京) (抄録), 最新医学, 28: 2064-2065, (1973). 14) 古山俊介: アルドステロン, 最新医学, 26: 1143-1147, (1971). 15) Gomez-sanchez, C., Kem, D.C. and Kaplan, N.M.: A radioimmunoassay for plasma aldosterone by immunologic purification. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 36: 795-798, (1973). 16) Haning, R., McCracken, J., Cyr, M. J.St., Underwood, R., Williams, G. and Abraham, G.: The evolution of titer and specificity of aldosterone binding antibodies in hyperimmunized sheep. *Steroids.* 20: 73-88, (1972). 17) 伊東貞三, 日高 宏, 加藤達雄, 荒木嘉隆, 吉利 和: アルドステロンの Radioimmunoassay. 最新医学, 26: 2115-2123, (1971). 18) Ito, T., Woo, J., Haning, R. and Horton, R.: A radioimmunoassay for aldosterone in human peripheral plasma including a comparison of alternate techniques. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 34: 106-112, (1972). 19) Jowett, T.P. Slater, J.D.H., Piyasena, R.D. and Ekins, R.P.: Radioimmunoassay of aldosterone in plasma and urine: Variation of a novel separation technique a rapid urine assay. *Clin. Science and Mol. Med.* 45: 607-623, (1973). 20) 小島元子: 血漿 Aldosterone と 11-Deoxycorticosterone (DOC) の同時測定——測定法ならびに正常者および各種内分泌性高血圧症患者における成績——日本内分泌学会雑誌, 50: 1373-1385, (1974). 21) 河野 剛, 吉見輝也, 川口義広, 遠藤治郎, 坂井友吉: 各種腎, 高血圧, 内分泌, 神経疾患における血漿 renin 活性および血漿 aldosterone 濃度についての研究, 内科宝函, 20: 93-105, (1973). 22) 河野 剛, 吉見輝也, 遠藤治郎: 免疫学的純化法による人血漿アルドステロンのクロマトグラフィー不要ラジオイムノアッセイ, 第47回日本内分泌学会総会 (昭和49年4月; 東京) (口演), 日本内分泌学会雑誌, 50: 202, (1974). (抄録) 23) Langan, J., Jackson, R., Adlin, E.V. and Channick, B.J.: A simple radioimmunoassay for urinary aldosterone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 38: 139-193, (1974). 24) Martin, B.T. and Nugent, C.A.: A non-chromatographic radioimmunoassay for plasma aldosterone. *Steroids.* 21: 169-180, (1973). 25) Mayes, D., Furuyama, S., Kem, D.C. and Nugent, C.A.: A radioimmunoassay for plasma aldosterone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 30: 682-685, (1970). 26) McKenzie, J.K. and Clements, J.A.: Simplified radioimmunoassay for serum aldosterone utilizing increased antibody specificity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 38: 622-627, (1974). 27) 中嶋凱夫, 竹内孝彦, 西里弘二, 福地総逸: chromatography を用いない血漿 Aldosterone の測定法とその検討, 日本内分泌学会雑誌, 50: 1440-1448, (1974).

- 28) Nowaczynski, W., Sasaki, C. and Genest, J.: Radioimmunoassay for aldosterone and normal values under various physiological conditions. *J. Steroid Biochem.* 5: 123-131, (1974). 29) 萩原俊男, 山本智英, 熊原雄一: 血中アルドステロンの Radioimmunoassay とその臨床応用, 日本内分泌学会雑誌, 49: 619-628, (1973).
- 30) 小田宏, 菅原俊郎, 南沢俊郎, 松井元右, 木村 武: クロマトグラフィー不要の新しい Aldosterone-Radioimmunoassay-Kit (CIS) による人血漿アルドステロンの測定法と検討, ホルモンと臨床, 22: 1429-1433, (1974). 31) Sealey, J.E., Bühler, F.R., Laragh, J.H., Manning, E.L. and Brunner, H.R.: Aldosterone excretion—physiological variations in man measured by radioimmunoassay or double isotope dilution—. *Circ. Res.* 31: 367-378, (1972).
- 32) Sivakumaran, T., Galindo, F. and Teal, J.: Modified radioimmunoassay of urinary aldosterone. *Clin. Chem.* 19: 279-280, (1973). 33) Underwood, R.H. and Williams, G.H.: The simultaneous measurement of aldosterone, cortisol, and corticosterone in human peripheral plasma by displacement analysis. *J. Lab. Clin. Med.* 79: 848-862, (1972).
- 34) Varsano-Aharon, N. and Ulick, S.: A simplified radioimmunoassay of plasma aldosterone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 37: 372-379, (1973). 35) Varsano-Aharon, N. and Ulick, S.: Further simplifications in the immunoassay of plasma aldosterone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 39: 375-379, (1974).
- 36) Vecsei, P., Gless, K.H., Winter, M. and Hanka-Postozky, M.: "In vivo radioimmunoassay" of aldosterone. *Acta endocrinol.* 74: 307-315, (1973). 37) Vetter, W., Vetter, H. and Siegnethaler, W.: Radioimmunoassay for aldosterone without chromatography. 1. Determination of urinary 18-glucocorticoid excretion. *Acta endocrinol.* 74: 548-557, (1973).
- 38) Vetter, W., Vetter, H. and Siegnethaler, W.: Radioimmunoassay for aldosterone without chromatography. 2. Determination of plasma aldosterone. *Acta endocrinol.* 74: 558-567, (1973). 39) Wahlen, J.D., Tyler, F.H. and West, C.D.: A new radioimmunoassay for urinary aldosterone. *Clin. Res.* 18: 172, (1970). (Abstract)
- 40) Waldhäusl, W., Haydl, H. and Frischauf, H.: Determination of aldosterone by sephadex LH-20 chromatography and radioimmunoassay. *Steroids.* 30: 727-736, (1972). 41) 矢野喬史, 出村 博, 小田桐恵美, 須田俊宏, 前田忠雄, 市川敬子, 出村黎子, 鎮目和夫: Aldosterone- γ -lactone の抗体の作製, 第47回日本内分泌学会総会 (口演), 日本内分泌学会雑誌, 50: 201, (1974). (抄録)
- 42) 吉見輝也: ステロイドホルモンの Radioimmunoassay. 第2回“液体シンチレーション計測法”および“Radioimmunoassay”のシンポジウム (口演), (昭和48年10月; 大阪) 同講演要旨集, 70-71, (1973). 43) 吉見輝也, 南野正隆, 遠藤治郎: Chromatography を用いない Estradiol の Radioimmunoassay. 第47回日本内分泌学会総会 (口演), 日本内分泌学会雑誌, 50: 196, (1974). (抄録).

日本内分泌学会雑誌 第51巻 第7号

昭和50年7月15日印刷 昭和50年7月20日発行
(毎月1回発行) 1年金 6000 円

編集兼 佐 野 豊
発行人 前 田 政 昭
印刷人

発行所 日本内分泌学会 (振替京都12902番)
京都市上京区河原町通広小路上ル梶井町456
京都府立医科大学第一解剖学教室内

印刷所 株式会社前田進行堂印刷所
京都市中京区西ノ京南上合町81