血漿 cAMP の radioimmunoassay (直接測定法)に関する基礎的検討

東京大学第4内科

松本俊夫, 尾形悦郎

東北大学第2内科

孫孝義, 古川洋太郎

長崎大学第1内科

岡本純明, 長瀧重信

ヤマサ醤油研究所

山根良太, 竹沢順一, 飯島隆

Reevaluation of Direct Radioimmunoassay for Plasma cAMP Concentration

Toshio MATSUMOTO and Etsuro OGATA

The Fourth Department of Internal Medicine, Tokyo University School of Medicine,
Tokyo, Japan

Hyo Euy SHON and Yohtaro FURUKAWA

The Second Department of Internal Medicine, Tohoku University School of Medicine,
Sendai, Japan

Sumiaki OKAMOTO and Shigenobu NAGATAKI

The First Department of Internal Medicine, Nagasaki University School of Medicine,
Nagasaki, Japan

Ryota YAMANE, Junichi TAKEZAWA and Takashi IJIMA

Research Laboratories of YAMASA Shoyu Co. Ltd.,
Choshi, Chiba, Japan

In order to evaluate the validity of the direct radioimmunoassay of plasma cAMP level by using Yamasa cyclic AMP assay kit, we determined the cyclic AMP concentration of normal human plasma before and after purification through anion-exchange chromatography. We found that 1) the direct assay before purification gave almost the same values as the indirect assay after purification by anion-exchange chromatography, 2) hemolysis did not affect the results of the direct assay, 3) the plasma cAMP was stable for up to 12 weeks when 5 mM EDTA was added to the blood at the time of sampling and stored below -20°C

and 4) the cAMP concentration did not decrease by repeated freeze-thawing of the plasma samples for up to 10 times. These results indicate that the direct radioimmunoassay of plasma cAMP concentration in normal subjects can give the same values as those obtained after purification by anion-exchange chromatography. Although further investigation is needed to clarify whether these results can be equally applied to patient's plasma with various diseases, the direct assay offers a convenient and accurate method to determine plasma cAMP concentration.

緒 言

Cyclic AMP (cAMP) は、多くのペプチドホルモンの細胞内 2 次メッセンジャーとしてホルモン作用の発現上重要な役割を演じている。細胞内 cAMP 生産を高めるホルモンのうち、代表的なものとしては、グルカゴン、カテコールアミン (β 作用)、副甲状腺ホルモン (parathyroid hormone: PTH) などがあげられる。このうち PTH は腎尿細管に作用して、cAMP 産生を増加させると共にリン酸利尿をひき起す。また骨にも作用し、cAMP 産生を高める。これらの結果として、血中および尿中 cAMP が上昇する。⁵⁾ 一方血中 cAMP レベルは、他のホルモンによっても上昇するが、尿中に排泄される cAMP のうち腎由来のものの大部分は PTH 作用に基づくものと考えられている。¹⁾ 従って Broadus らにより提唱された腎原性 cAMP (Nephrogenous cAMP : NcAMP) が有用かつ簡便な指標として副甲状腺機能の評価に広く用いられている。¹⁾²⁾

現在、我国の多くの施設では、NcAMP の算出に必要な血中および尿中 cAMP レベルを、radioimmunoassay により直接測定している。しかし radioimmunoassay による直接測定法の普及にともない、とりわけ血漿 cAMP の測定値に関し、最近いくつかの問題点が提起された。すなわち 1) 血漿への EDTA 添加効果が認められず採血後 cAMP レベルが急速に低下する例があること、2) 正常人における血漿 cAMP レベルが従来の値に比べ最近低値を示す傾向があること、などである。⁴⁾ そこで我々は YAMASA cAMP Radioimmunoassay Kit を用いて各種条件下で、血漿 cAMP を直接測定した値とカラム精製後に測定した値を比較することにより、これらの問題点に対する基礎的検討を行った。

実 験 方 法

1. 検体の採取

採血後直ちに EDTA 添加試験管に血液を分注し、血漿を遠心分離した。採血から遠心分離までの時間は常に 15 分以内であった。

2. 血漿 cAMP の精製法

血漿 cAMP の直接測定法および陰イオン交換樹脂による精製後の測定法を Fig. 1 に示した。10 mM EDTA 添加血漿 1 ml に 20,000 dpm/200 μ l の [3 H] cAMP 液、(Amersham 社製 30 Ci/mmol) を添加・攪拌した。このうち 200 μ l を cAMP の直接測定に供した後、残り 1 ml に 10% トリクロル酢酸 (TCA) 1 ml を加えて遠心分離し、上清を採取した。上清中の TCA を、水飽和エーテルを加え抽出除去した後、この試料を Dowex AG 1 $\times$ 8 イオン交換カラム (10 mm ϕ $\times$ 5 cm) にかかけ、1.5 N ギ酸で cAMP をカラムから溶出した。cAMP 溶出分画を真空乾固し、蒸留水 1 ml により再構成後 cAMP の測定に供した。

Fig. 1. Purification of cAMP in plasma samples.

3. cAMP の radioimmunoassay 法

cAMP の測定法は、YAMASA cAMP Radioimmunoassay Kit の用法に従い、cAMP 標準液又は試料100 μ l をサクシニル化試薬100 μ l と反応させ、0.3M イミダゾール緩衝液800 μ l を加えて検体を調製した。このうち100 μ l をインキュベーション・チューブにとり、¹²⁵I-サクシニル cAMP (トレーサ) 100 μ l および抗血清100 μ l を加えて混合後、18時間氷水中に静置した。18時間後、分離用活性炭500 μ l を加えて遠心分離し (3000rpm, 5 分間, + 4°C), 上清500 μ l の放射活性を測定した。³⁾

実験結果

1. 溶血の影響

血漿 cAMP の基礎値に相違が出現する原因としてまず、溶血による可能性が考えられる。そこで

Fig. 2. Effect of hemolysis on the direct assay of plasma cAMP.

Several series of NaCl solutions were prepared. After mixing blood and NaCl solutions, they were incubated for 180 minutes at room temperature. The mixtures were then centrifuged, and the degree of hemolysis was determined by measuring optical density (540nm) of the supernatants.

採血時の溶血現象の影響を検討する目的で、0.10～0.85%のNaCl液で希釈し、室温で3時間放置後の溶血度とcAMPレベルを測定した。溶血度は希釈液の540nmの吸光度を計測することにより測定した。Fig. 2に示す如く、溶血度と血漿cAMP値の間に明らかな相関関係はなく、0.3%NaClで希釈し溶血度が90%以上に達した血漿中cAMP濃度も、0.85%NaClで希釈した対照検体中の濃度とほとんど同様であった。しかしながら、0.1%NaClで希釈した100%溶血検体では、血漿cAMPレベルは40pmol/mlと、対照の15.2pmol/mlに比べ、著明な高値を示した。このことは、100%溶血がもたらされるような条件下では、直接測定による血漿cAMP値が高値をとるものの、通常の採血条件下での溶血は血漿cAMP値にほとんど影響を及ぼさないことを示している。

2. 抗体の相異による影響

YAMASA cAMP Radioimmunoassay Kit は、昭和58年8月に、それまで使用した抗体から、現在の抗体に変更された。変更時に行われた比較検討では、新抗体の使用によりいずれも10%前後尿検体は高めに、血漿検体は低めに測定されるという結果が得られている。しかしながら今回、改めて旧抗体と新抗体を用いた血漿 cAMP の測定値を比較検討した。その結果、Fig. 3 に示す如く新抗体を用いた測定値は旧抗体を用いたものの3分の2以下の値を示すことが明らかになった。

Fig. 3. Correlation in plasma cAMP levels determined by using the previous and new antiserum.

この相違の原因を更に詳細に検討する為、陰イオン交換カラムを用いて cAMP を精製後測定した値と、直接測定値とを新・旧両抗体を用いた Kit の間で比較した。Fig. 4 に示す如く、新抗体を用いた測定では、直接測定値とカラム精製後の測定値がほぼ同様の値を示した。一方、旧抗体を用いた測定では、直接測定値は高値を示し、更にカラム精製によりその値は新抗体を用いた測定値と同レベルにまで低下した。

3. EDTA 添加の影響

cAMP の分解作用をもつ phosphodiesterase (PDE) 活性は Mg^{++} 依存性であることから、EDTA の添加により PDE による cAMP の分解は防止できるものと考えられている。しかしながら EDTA 血漿中の cAMP 濃度が放置によって低下する症例があることが報告されたことから、⁴⁾EDTA 濃度、採血後の検体処理、保存条件等に関する基礎的検討の必要性が生じてきた。そこで、採血後の検体処理方法の相違が、測定値に及ぼす影響について検討を加えた。以後の cAMP の測定は、全て新抗体を用いた Assay Kit を使用した。

その結果、Fig. 5 (A) に示す如く、EDTA を含まないヘパリン血漿を37°Cで放置することにより経時的に cAMP 濃度が低下し、16時間後には採血直後の50%以下にまで低下した。一方、2.5mM EDTA 添加血漿では3時間後から軽度ながら有意な低下が認められたが、5 mM 以上の EDTA 添加により血漿 cAMP 値には16時間後まで全く低下が認められなかった。

同様に Fig. 5 (B) に示す如く、EDTA 採血後未処理のまま37°Cで放置しても、血漿 cAMP 値に変化は認められなかった。

Fig. 4. Comparison of plasma cAMP measurements by using the previous and new antiserum before and after purification by Dowex AG column.

4. 検体保存の影響

検体を -20°C および -80°C で保存し、試験開始時点の cAMP 測定値に対する 2, 6 及び 12 週目の同一検体の cAMP 測定値の割合 (%) を Table 1 に示した。10mM EDTA 血漿を -20°C で保存した場合には、12週間後も cAMP レベルは有意の変化を示さなかった。一方、 4°C で保存した場合には採取直後の 80% 近くまで cAMP レベルが低下する例も認められた。更に凍結融解が測定値に及ぼす影響についても検討を加えた。その結果、Table 2 に示す如く凍結融解を 10 回まで繰り返した場合にも cAMP 値には殆ど変化は認められなかった。

なお、本キットを用いた血漿 cAMP 値の測定内再現性は変動係数 10% 以下及び測定間再現性は 15% 以下であった。

Fig. 5. Influence of EDTA addition on plasma cAMP levels after incubating the plasma (A) or the whole blood (B) at 37°C for 16 hours with heparin(●). 10 mM EDTA (◇), 5 mM EDTA(○) or 2.5 mM EDTA(△). Bars (I) indicate standard error. Basal cAMP level immediately after sampling from 10 subjects was 14.0 ± 1.2 pmol/ml (mean $\pm$ S.E., $n = 10$).

Table 1. Influence of stored temperature on plasma cAMP levels
2, 6 and 12 weeks after sampling.

Basal cAMP levels at the time of sampling before frozen or stored at 4°C were 18.0 ± 0.9 pmol/ml (mean $\pm$ S.E., n=10) and 17.4 ± 1.5 pmol/ml (mean $\pm$ S.E., n=3) respectively.

Temperature °C	Number	Stored 2	Period 6	(weeks) 12
		% of basal level		
-20	10	96.3 ± 0.9	92.6 ± 0.8	95.6 ± 1.3
-80	10	97.8 ± 0.6	93.0 ± 0.9	92.7 ± 1.3
4	3	76.3 ± 6.9	N.D.	85.9 ± 4.8
N.D.: not done			mean $\pm$ S.E.	

Table 2. Influence of freeze-thawing on plasma cAMP levels.

Basal cAMP level at the time of sampling was 16.4 ± 0.2 pmol/ml (mean $\pm$ S.E., n=3)

number of times of freeze-thawing	cAMP % of basal level
2	104.2 ± 1.1
5	107.1 ± 2.0
10	102.6 ± 2.7
mean $\pm$ S.E.	

考 察

今回の我々の検討により, 1) 軽度の溶血では cAMP の直接測定値には殆ど変化がないこと, 2) 過去の測定値が高値傾向を示した原因は, 用いられた抗体の差による可能性が強いこと, 3) 現在の YAMASA cAMP Radioimmunoassay Kit では, 直接測定法によっても精製後の測定値と殆ど差がなく, 4) 凍結融解を繰り返しても cAMP レベルに変化は認められないこと, 5) 5 mM 以上の EDTA 添加血漿では, 37°C で少なくとも 16 時間以内あるいは -20°C で少なくとも 12 週間以内であれば cAMP レベルに変化は認められないこと, が明らかになった。これらの検討結果から, 健康人の血漿 cAMP 測定においては, 採血後直ちに EDTA 試験管に, EDTA 濃度が 5 mM 以上になるように採取し, -20°C で保存すれば, カラム精製による値と同等の測定値が, 直接測定法により得られることが示された。以上の結果から健康人においては, 5 mM 以上の EDTA の添加により cAMP は長時間安定であることが明らかになった。しかしながら, 血漿 cAMP レベルが高値を示すような疾患や, 腎機能障害を示す症例などの一部で, EDTA 血漿分離後も cAMP 濃度が変化するような例が存在するか否か, また, これらの症例においても直接測定法により同様の結果が得られるか否かについては, 今回は明らかにし得なかった。従って, これらの症例については今後更に検討を加える必要があるものと考えられる。また, 旧抗体を用いた測定によっても, 血漿を 2 倍以上に希釈した後に測定することにより, 新抗体を用いた測定値に近い値が得られていたという報告⁷⁾もあることから, 各種の疾患においても, 検体を希釈後に測定することにより, 阻害物質などの影響を最小限におさえることができる可能性も考えられる。

血漿 cAMP の測定は、副甲状腺機能の有用かつ簡便な評価法として広く用いられている。NcAMP の算出上欠くことができないばかりでなく、グルカゴン負荷を用いた肝機能の評価法としてもその有用性が示されつつある。⁹⁾しかしながら、cAMP を精製後に測定する場合、多量の血液と、複雑な測定手技が問題となる。今回の検討により、直接測定法による血漿 cAMP 値が過去において高値傾向を示した原因は、Kit の抗血清の変化によるものであること、旧抗体では直接測定により cAMP 以外の何らかの物質が交叉反応することにより高値を示した可能性があること、新抗体を用いた現在の Assay Kit では、直接測定によってもこのような物質の影響をほとんど受けることはなく、精製後の測定値と同等の値が得られることが明らかになったことから、各種疾患の診断に更に広く応用され得るものと考えられる。

結 語

血漿 cAMP 濃度の YAMASA cAMP Radioimmunoassay Kit による直接測定法に関する基礎的検討を行い、以下の結論を得た。

1) 採血時の溶血による影響は殆ど無視し得る。2) 現在市販されている YAMASA cAMP Radioimmunoassay Kit では直接測定により、精製後の測定とほぼ同等の値が得られる。3) 5 mM 以上の EDTA 添加により、全血を 37°C で放置しても cAMP 濃度の低下は殆ど認められない。4) EDTA 血漿を -20°C で保存することにより、少なくとも 12 週間後までは cAMP 濃度に変化は見られない。5) 凍結融解により血漿 cAMP 濃度は明らかな変化を示さない。

謝 辞

本研究の一部は、厚生省特定疾患ホルモン受容体機能異常調査研究班(班長 尾形悦郎教授)の補助金によった。

文 献

- 1) Broadus, A.E.: Clinical cyclic nucleotide research, In *Advances in Cyclic Nucleotide Research*, 8: 509-548, Ed. by Greengard, P. and Robison, G.A., Raven Press, New York, 1977.
 - 2) Broadus, A.E., Mahaffey, J.E., Bartter, F.C. and Neer, R.M.: Nephrogenous cyclic adenosine monophosphate as a parathyroid function test. *J. Clin. Invest.*, 60: 771-783, 1977.
 - 3) Honma, M., Satoh, T., Takezawa, J. and Ui, M.: An ultra-sensitive method for the simultaneous determination of cyclic AMP and cyclic GMP in small-volume samples. *Biochem. Med.*, 18: 257-273, 1977.
 - 4) 掛園布美子, 岡本純明, 横山直方, 森田茂樹, 山下俊一, 大財 茂, 田辺 徹, 田浦紀子, 和泉元衛, 長瀧重信: 腎性 cyclic AMP の意義に関する問題点。日内泌会誌。60: 305, 1984.
 - 5) Kaminsky, N.I., Broadus, A.E., Hardman, J.G., Jones, Jr. D.J., Ball, J.H., Sutherland, E.W. and Liddle, G.W.: Effects of parathyroid hormone on plasma and urinary adenosine 3',5'-monophosphate in man. *J. Clin. Invest.*, 49: 2387-2395, 1970.
 - 6) 前久保博, 松嶋 喬, 大屋隆介, 柏木道彦, 大谷宜人, 田村康史, 山城雅明, 吉田隆男, 種田裕昭, 宮崎 保, 奥内 豊, 白井 修, 石崎忠文, 平井 堅博, 松家康裕, 岡田文彦, 本間美之, 宇井理生, 白石忠雄, 飯島 隆: グルカゴン負荷試験による肝疾患の診断。最新医学。36: 998-1005, 1981.
 - 7) 孫 孝義, 弓田 滋, 海 上寛, 古川洋太郎: 副甲状腺機能の指標としての nephrogenous cyclic AMP。医学のあゆみ。115: 876-878, 1980.
- (受付日; 86. 6. 23)