The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	蛍光免疫測定法による血中コルチゾール定量法の開発に関する研究
Author(s)	小林, 吉晴
Citation	大阪大学, 1983, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33816
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【7】

氏名・（本籍）	小林吉晴（こばやしよしはる）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 6085 号
学位授与の日付	昭和58年5月11日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	**蛍光免疫測定法による血中コルチゾール定量法の開発に関する研究**
論文審査委員	（主査）教授 宮井 潔 （副査）教授 坂本 幸哉　教授 倉智 敬一

論文内容の要旨

（目　的）

血中コルチゾール（cortisol）の測定は，副腎皮質機能の指標として非常に重要であり臨床検査としても繁用されている。その定量法として，ラジオイムノアッセイ（RIA）が現在よく用いられているが，本法は標識物質としてラジオアイソトープ（RI）を用いるため放射線被爆や環境汚染，あるいは自己崩壊により長期使用ができないなど多くの欠点がある。そこでRIを用いない測定法の開発が望まれ，その一つとしてRIの代りに蛍光物質を標識するいわゆる蛍光免疫測定法 Fluorescence immunoassay が最近注目されるようになった。すなわち蛍光物質は蛋白質などのような巨大分子物質と結合すると，その蛍光偏光度や蛍光強度が変化するという物理化学的特性を有しており，これを利用することによって高感度でかつ簡便な免疫測定法を組立てることが可能である。そこでこれらの特性を利用した血中 cortisol の Fluorescence polarization immunoassay および Fluorescence quenching immunoassay の開発を試みた。

（方法ならびに成績）

蛍光物質 fluorescein isothiocyanate（FITC）と反応させるため，cortisol 21－amine* を合成した。すなわち Smith らの方法に従い cortisol に酢酸銅を加え，空気酸化を行って C－21位をアルデヒド体とし次いで塩酸 hydroxylamine を加えオキシム体とした後，これを亜鉛末の存在下で還元した。cortisol 21－amine と FITC とはアルカリ性の条件下で反応させ FITC－cortisol を得た。一方，抗 cortisol 抗体は cortisol－21－hemisuccinate とウシ血清アルブミンの結合物を用いてウサギを感作して得た。

(1) Fluorescence polarization immunoassay

血中の cortisol binding protein から cortisol を遊離させる方法としては，血清 100 μℓに methanol を添加後遠心分離して methanol 層を用いる抽出法と，血清10 μℓにラウリル硫酸ナトリウムを添加する直接法とを試みた。これらの処理を行った検体に FITC－cortisol 溶液を加え，まずその蛍光偏光度（A）を測定し，次いで cortisol 抗体（IgG 分画）を加え室温60分間放置後再び蛍光偏光度（B）を測定し，血清検体による若干の干渉を補正するためB－Aを求め，これによって検量線を作製した。本法の最少検出感度は 1 ng／tube（抽出法），0.1 ng／tube（直接法）であった。本法で血清中 cortisol を測定した際の測定内変動係数は 8.6 －19.9 %（抽出法），7.2 －11.6 %（直接法），測定間変動係数は13.3－20.8 %（抽出法），4.6 －10.6 %（直接法）であった。また本法で測定した血清 cortisol の値（y）と RIA によって得られた値（x）との関係をみると，$y = 1.10x - 2.15$, $r = 0.85$（$n = 20$）（抽出法），$y = 1.08x - 0.13$，$r = 0.95$（$n = 20$）（直接法）と良好な相関を得た。

（Ⅱ） Fluorescence quenching immunoassay

本法の操作はまず血清 100 μℓ に methanol を加え遠心分離後の上清をとり，これに FITC－cortisol を添加，まず蛍光強度（A）を測定し，次いで抗 cortisol 抗体（IgG 分画）を加え20～25℃で 60 分間放置後再び蛍光強度（B）を測定，これからA－B を求め検量線を作製した。本法の最少検出感度は3.1 ng／tube，変動係数は 7.7 －10.5 %（測定内），10.7 － 13.3%（測定間）であった。また本法によって測定した血中 cortisol 値（y）と RIA によって得られた値（x）との関係は $y = 0.81x + 0.85$, $r = 0.97$（$n = 33$）であった。

（Ⅲ） 臨床応用

ACTH 負荷試験，dexamethasone 負荷試験時，およびクッシング症候群，アジソン病患者血清中 cortisol を，本蛍光免疫測定法にて定量したところ，RIA による測定値と同様の結果を得た。

（総　　括）

蛍光免疫測定法として Fluorescence polarization immunoassay の直接法（FPI －D)と抽出法（FPI－E），および Fluorescence quenching immunoassay（FQI）を用いて血中 cortisol 定量法を開発し種々の基礎検討を行い次の結果を得た。

1. 最少検出感度は 0.1 ng／tube（FPI－D），1 ng／tube（FPI －E），3.1 ng／tube（FQI）であり少量血清検体（10～ 100 μℓ）を用いての血中 cortisol の定量が可能であった。
2. 測定間変動係数は 4.6 － 10.6 %（FPI －D），13.3 － 20.8%（FPI －E），10.7－13.3 %（FQI）で臨床検査として許容しうる範囲であった。そして，種々の状態での血中 cortisol の変化を本法で測定することが可能であった。
3. 同一血清検体を本法とRIAで測定した際の値はよく相関し，その相関係数は 0.95（FPI －D），0.85（FPI －E），0.91（FQI）であった。

以上の結果から本定量法は臨床検査として有用であると考えられる。

＊）cortisol 21－amine：21－amino－11β，17－dihydroxy－4－pregnene－3，20－dione

論文の審査結果の要旨

副腎皮質機能の指標として重要な血中コルチゾールは従来専らラジオイムノアッセイで測定されて来たが，アイソトープを用いない方法が望ましく，本研究はその一つとして蛍光免疫測定法を開発したものである。すなわちcortisol 21-amine を合成してこれにFITCを標識し，これと抗cortisol との結合に対する競合反応を利用し，種々な基礎検討の結果(A)蛍光偏光度または(B)蛍光消光度の変化を指標としてB／F分離の不要な簡便な定量法を確立した。 本法により種々な病態における血中cortisolの変動が測定でき，ラジオイムノアッセイ法の値ともよく一致した。本研究はステロイドホルモンの蛍光免疫測定法をはじめて開発したもので価値ある論文と考えられる。