

Title	モノクローナル抗体を用いた Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) による血漿ならびに尿中 cyclic AMP および cyclic GMP の測定とその臨床応用
Author(s)	津川, 真美子
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37378
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について 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

氏名・(本籍)	津 川 真 美 子
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 9 5 6 7 号
学位授与の日付	平成 3 年 3 月 5 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	モノクローナル抗体を用いた Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) による血漿ならびに尿中 cyclic AMP および cyclic GMP の測定とその臨床応用
論文審査委員	(主査) 教 授 垂井清一郎 (副査) 教 授 宮井 潔 教 授 荻原 俊男

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

種々のホルモンの標的細胞における情報伝達物質である cyclic AMP (cAMP) ならびに cyclic GMP (cGMP) は、血漿、尿中にも存在し、その濃度は各種病態で変動する事が知られている。血漿ならびに尿中 cAMP 濃度より計算で求められる nephrogenous cAMP は、副甲状腺機能状態を知るための有用な指標である。また、種々の血管拡張薬や ANP に反応して血漿および尿中の cGMP 濃度が変化することが報告されている。生体試料中のこれらのサイクリックヌクレオチドの測定には RIA が従来用いられてきた。しかし、操作がより簡便で、放射性同位元素を扱う必要のない ELISA が臨床観察ならびに実験に有用であると考えた。本研究は、ヒト血漿ならびに尿中 cAMP および cGMP 濃度をモノクローナル抗体を用いた ELISA により測定しその特異性・精度・信頼性などの基礎的検討を行うとともに応用を試みたものである。

(方法ならびに成績)

(方 法)

a. モノクローナル抗体の作成と ELISA

サクシニル cAMP あるいは cGMP とヒト血清アルブミンの結合物を抗原とした。抗原で感作した BALB/c マウス脾細胞とマウス骨髓腫細胞株、P3U1、とのハイブリドーマにより、それぞれのサクシニルサイクリックヌクレオチドに対して高力価で特異性の高いモノクローナル抗体を得た。抗原を吸着させた ELISA 用 microtiter plate (96 穴) に抗体とサクシニル化した試料を添加し反応させた後、plate に吸着した抗体を酵素標識 protein-A で認識・定量する方法を用いた。

b. R I A

ELISAに用いたものと同じモノクローナル抗体を用いたRIAキットにより施行。

(成績)

1. 標準曲線

血漿ならびに尿中cAMPおよびcGMPの典型的な標準曲線が得られた。最小検出濃度はいずれも0.6pmol/mlであった。血漿中には、本測定に干渉する因子が存在する可能性が認められた。したがって、血漿検体測定に際してはcAMP-およびcGMP-free plasmaで標準溶液を作成した。

2. モノクローナル抗体の特異性

種々のヌクレオチドとの交差反応は、0.0014% (50% displacementにおいて計算) 以下であった。

3. 回収率

血漿ならびに尿検体でのcAMPおよびcGMPの回収率はそれぞれ、99-108%, 97-103% (血漿), 99-109%, 96-105% (尿) であった。

4. 精 度

4種類の濃度の検体の血漿ならびに尿中cAMPの同一測定内CV値は、5.2-6.1%, 3.3-7.0%であった。cGMPのそれは、3.2-7.0%, 2.8-7.1%, であった。5回測定した血漿ならびに尿中cAMPの測定間CV値は各々6.7-8.9%, 5.1-9.5%, cGMPのそれは4.0-9.9%, 2.0-9.5%であった。

5. R I Aとの相関

本法とRIAによる測定値の相関係数は血漿cAMP, 尿中cAMP およびnephrogenous cAMPそれぞれについて $r=0.94$ ($n=66$), $r=0.98$ ($n=64$), $r=0.96$ ($n=51$) であった。血漿および尿中cGMPのそれは $r=0.96$ ($n=50$), $r=0.98$ ($n=60$) であった。

6. 正常値

健常人30名 (年齢14-76才) の血漿および尿中cAMP濃度ならびにnephrogenous cAMP濃度の平均値は、各々 10.3 ± 3.8 pmol/ml, 5.5 ± 2.5 μ mol/g \cdot creatinine, 4.3 ± 3.4 nmol/l of GF (mean \pm SD) であった。また健常人43名 (年齢18-66才) の血漿および尿中cGMP濃度の平均は、各々 4.89 ± 1.73 pmol/ml, 1.06 ± 0.74 μ mol/g \cdot creatinine (mean \pm SD) であった。

7. 臨床応用

副甲状腺機能低下症の患者にPTH負荷試験 (Ellsworth-Howard test) を行い、尿中cAMPをELISAおよびRIAで測定、よく一致した値を得た。副甲状腺機能亢進症症例における、手術前後の血漿ならびに尿中cGMPをELISAで測定し、cGMP濃度の変化を観察した。この症例では、血漿cGMPは術前に7.0-17.8pmol/mlと高値であった。術後、18日目、血漿cGMPは12.7pmol/mlと依然高く、術後25日目に4.1pmol/mlと正常値に復した。

(総括)

1. 血漿ならびに尿中cAMP, cGMPのELISAを確立した。

2. 本法による健常人の血漿および尿中cAMP濃度ならびにnephrogenous cAMP濃度は、各々 10.3 ± 3.8 pmol/ml, 5.5 ± 2.5 μ mol/g \cdot creatinine, 4.3 ± 3.4 nmol/l of GF (mean \pm SD) であった。

3. 本法による健常人の血漿および尿中 cGMP 濃度は各々 $4.89 \pm 1.73 \text{ pmol/ml}$, $1.06 \pm 0.74 \mu\text{mol/g} \cdot \text{creatinine}$ であった。
4. nephrogenous cAMP の測定や Ellsworth-Howard test において本法の臨床応用が可能であることを示し得た。

論文審査の結果の要旨

本研究は、サイクリックヌクレオチドの測定に enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を応用し、測定方法の基礎的検討を行ったものである。すなわち、ヒト血漿中ならびに尿中 cyclic AMP および cyclic GMP 濃度をそれぞれのサイクリックヌクレオチドに対するモノクローナル抗体ならびに alkaline phosphatase 標識 protein A を用い測定し、その臨床応用を検討した。その結果、特異性・精度・信頼性の点で満足すべき成績が得られた。従来用いられてきたRIAに比し操作がより簡便で、放射性同位元素を扱う必要がなく、より少量の検体で測定できるELISAの有用性が示された。各種病態におけるこれらのサイクリックヌクレオチド濃度の変動は近年注目されている所であり、放射性同位元素を用いないサイクリックヌクレオチド測定法の確立は意義深い。新しいELISAの確立とその臨床応用の可能性を示した論文として、学位に価すると考えられる。