

原 著

## Immunoradiometric assay によるヒト成長ホルモンの測定

東京女子医科大学ラジオアッセイ検査科

イシワタリ ナオコ デムラ レイコ ジビキ カズコ  
石 渡 尚子・出村 黎子・地曳 和子・  
スズキ トモハル オダギリ エミ デムラ ヒロシ  
鈴木 智晴・小田桐恵美・出村 博

西山堂病院

サノ トモヒデ サノ ノリコ  
佐野 智英・佐野 典子

(受付 昭和61年7月1日)

## Measurement of Growth Hormone with Immunoradiometric Assay

Naoko ISHIWATARI, Reiko DEMURA, Kazuko JIBIKI, Tomoharu SUZUKI,  
Tomohide SANO\*, Noriko SANO\*, Emi ODAGIRI and Hiroshi DEMURA

Radioassay Center, Tokyo Women's Medical College and Nishiyamado Hospital\*

Two kinds of GH kit with immunoradiometric assay (IRMA) made by Nichols and Pharmacia were compared with conventional RIA kit (Eiken kit) as to the sensitivity and clinical usefulness. The sensitivities were 0.1, 0.3 and 1.0 ng/ml by Nichols, Pharmacia and Eiken kit, respectively. The basal hGH values for normal subjects were  $1.84 \pm 1.93$ ,  $1.09 \pm 1.14$  and  $2.68 \pm 1.23$  ng/ml, while those for hypopituitary subjects were  $0.480 \pm 0.600$ ,  $0.486 \pm 0.333$  and  $1.98 \pm 0.365$  ng/ml by Nichols, Pharmacia and Eiken kit, thus it was not possible to differentiate between normal and hypopituitary subjects by basal GH levels even by IRMA kits.

A suppression in plasma GH levels by a meal in normal subjects was clearly shown by all kits, but changes were clearer by IRMA kits. Plasma GH responses to GRF were clearly observed by Nichols kit in some of the patients with idiopathic pituitary dwarfism who were judged unresponsive by the other kits. These results demonstrated that IRMA kits were useful to detect minute changes of serum GH levels at low concentrations, but were not sensitive enough to differentiate between normal and GH deficient subjects by basal levels alone.

## 緒 言

成長ホルモン (GH) の測定は、末端肥大症、下垂体性小人症などの GH 分泌異常症や間脳下垂体疾患の診断、治療の重要な指標である。現在その測定法として、radioimmunoassay (RIA) が一般に行なわれているが、従来市販されているキットは、GH 分泌低下症と正常者の基礎値を区別しうる程の測定感度を持たない。分泌予備能を診断する目的で種々の刺激試験が行なわれているが、低反応例では変化を正確に把握できない場合もあり、より感度のよい測定が望まれてきた。

近年 Wide ら<sup>1)</sup>によって多価抗原の測定に 2-site immunoradiometric assay (IRMA) が開発され、高感度測定法として TSH などの測定にすでに臨床応用されている。GH については Miles ら<sup>2)</sup>がポリクローナル抗体を用いる 2-site IRMA を、また Sandra ら<sup>3)</sup>が 2 つのモノクローナル抗体を用いる 2-site IRMA を報告している。今回我々は、高感度 GH 測定キットとして、2-site IRMA を利用した Nichols Institute Diagnostics hGH キット (Nichols キット) および Pharmacia hGH キット (Pharmacia キット) を使用する機会を得

たので、従来法と比較しその成績を報告する。

### 方法および対象

#### 1. キットの操作手順 (図1)

Nichols キットは、2つのモノクローナル抗体を用いたサンドウィッチ法であり、スタンダードあるいはサンプル100 $\mu$ l に $^{125}$ I-抗体溶液100 $\mu$ lを加えて攪拌後、他の抗体を結合したビーズを加えて室温で90分、170rpmで水平振動させながらインキュベートし、2mlの洗浄液で2回洗浄、各々の試験管の放射能を測定する。Pharmacia キットは抗体結合セファロースを用い、2つのポリクローナル抗体による固相法であり、生成した複合物に沈殿安定剤を加えBF分離を行なう。スタンダードあるいはサンプル50 $\mu$ l に $^{125}$ I-抗体溶液50 $\mu$ l、セファロース結合抗体溶液50 $\mu$ lを加えて攪拌、室温

にて3時間インキュベート後、沈殿安定剤2mlを加えて10分間1,500Gで遠心、上清を吸引除去し、各試験管の放射能を測定する。従来法の栄研ICL社の二抗体法hGH 栄研キット(栄研キット)は、スタンダードあるいはサンプル100 $\mu$ lに抗体200 $\mu$ l、 $^{125}$ I-hGH 200 $\mu$ lを加えて攪拌、4℃で16~24時間インキュベート後、第2抗体200 $\mu$ lを加え室温で30分インキュベートし、4℃、3,000rpmで30分遠心、上清を吸引除去し、各試験管の放射能を測定する。

#### 2. 対象

20~40歳代の正常女子9例、男子10例、0~10歳の女子1例、男子1例、50~90歳代の女子9例、男子6例計36例、特発性下垂体性小人症9例、二次性下垂体性小人症6例、末端肥大症4例、下垂

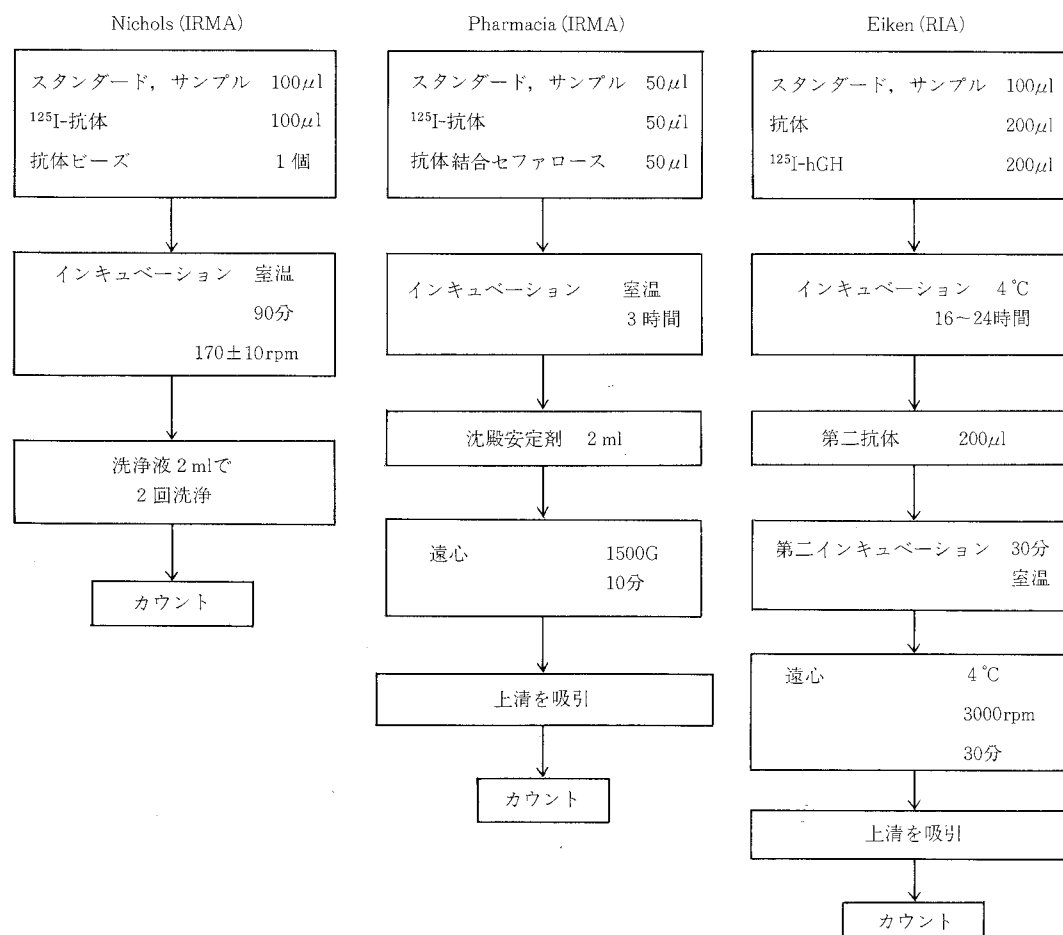


図1 キットの操作方法

体機能低下症22例を対象とした。下垂体機能低下症は、Cushing 病、末端肥大症を含む下垂体腺腫術後例、ACTH 単独欠損症、Sheehan 症候群などであった。これらの症例では、各種の補充療法、あるいはパーロデルによる内科的治療が行われていたが、下垂体性小人症では採血の48時間前から GH の投与は中止した。

正常者の採血は、午前中安静空腹時に、各種疾患患者は来院時に随時行なった。また正常女子8例、男子8例に対し約600kcalの同一の食事負荷を行ない、食前、食後30分に採血した。GRF 試験は、下垂体性小人症9例に hp-GRF 1 $\mu$ g/kg を静注し、0、15、30、45、60、90分に採血した。ソマトメジン-C の測定は、Nichols Institute 社の二抗体法 RIA キットによった。

## 結 果

### 1. 標準曲線 (図2)

各点は2点の平均値を表す。測定範囲は Nichols キット0.5~50, Pharmacia キット0.3~90, 栄研キット1~128ng/ml であり、検出感度は各々0.1, 0.3, 1ng/ml であった。以下感度以下の結果は0.1, 0.3, 1ng/ml として計算を行なった。

### 2. 正常者および各種疾患患者の血中 GH 基礎値 (図3)

20~40歳代の正常者19例の GH 基礎値の Mean $\pm$ SD は、Nichols キットで女性1.95 $\pm$ 1.92, 男性1.74 $\pm$ 2.02ng/ml, Pharmacia キットで女性1.21 $\pm$ 1.26, 男性0.988 $\pm$ 1.09ng/ml, 栄研キットで女性2.77 $\pm$ 1.40, 男性2.60 $\pm$ 1.12ng/ml であり、いずれのキットにおいても性差は認められなかった。Mean+2SD を正常範囲上限とすると、Nichols キット5.7, Pharmacia キット4.5, 栄研キット5.1ng/ml であり、3法とも従来の正常値5ng/ml とほぼ同様の結果であったが、下限は測定感度以下となった。各種疾患においては、Nichols キットでは下垂体機能低下症0.480 $\pm$ 0.600, 下垂体性小人症0.268 $\pm$ 0.243, 末端肥大症17.0 $\pm$ 16.7ng/ml であり、正常者と各種疾患の間に危険率5%以下で有意の差を認めた。Pharmacia キットでは、下垂体機能低下症0.486 $\pm$ 0.333, 下垂体性小人症0.401 $\pm$ 0.288, 末端肥大症

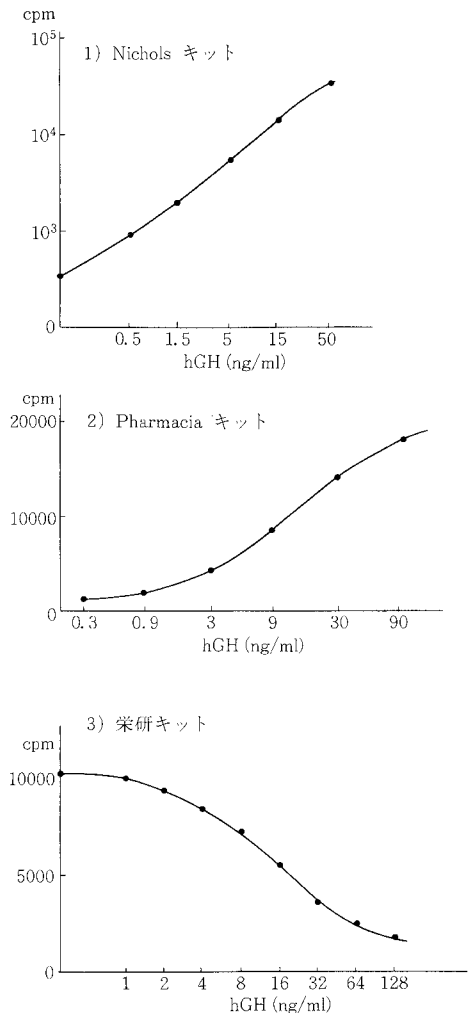


図2 標準曲線

12.7 $\pm$ 13.3ng/ml であり、正常者と各種疾患の間に有意の差を認めた。栄研キットでは、下垂体機能低下症1.98 $\pm$ 0.365, 下垂体性小人症2.08 $\pm$ 0.456, 末端肥大症13.0 $\pm$ 12.2ng/ml であり、正常者と GH 分泌低下例の間に有意の差はなかった。

### 3. 加齢の影響 (図4)

Nichols キットにより正常者36例の血中 GH 基礎値を測定したところ、各年代の間に有意の差はなく、加齢による GH 基礎値の低下は認められなかった。

### 4. 食事負荷 (図5)

正常女子8例、男子8例の食事負荷の結果は、Nichols, Pharmacia, 栄研キットのいずれによる



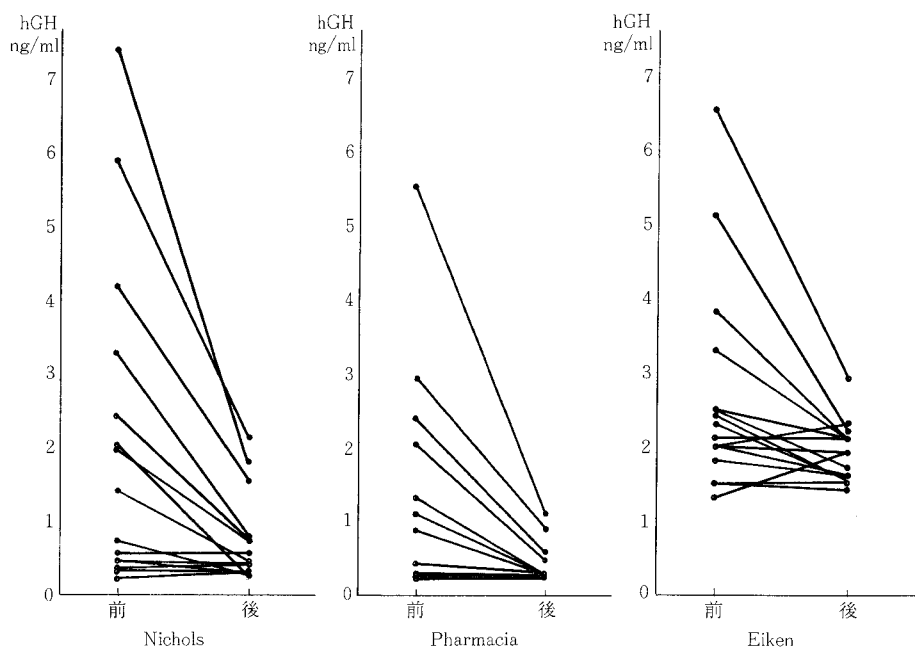


図5 正常者における食事負荷

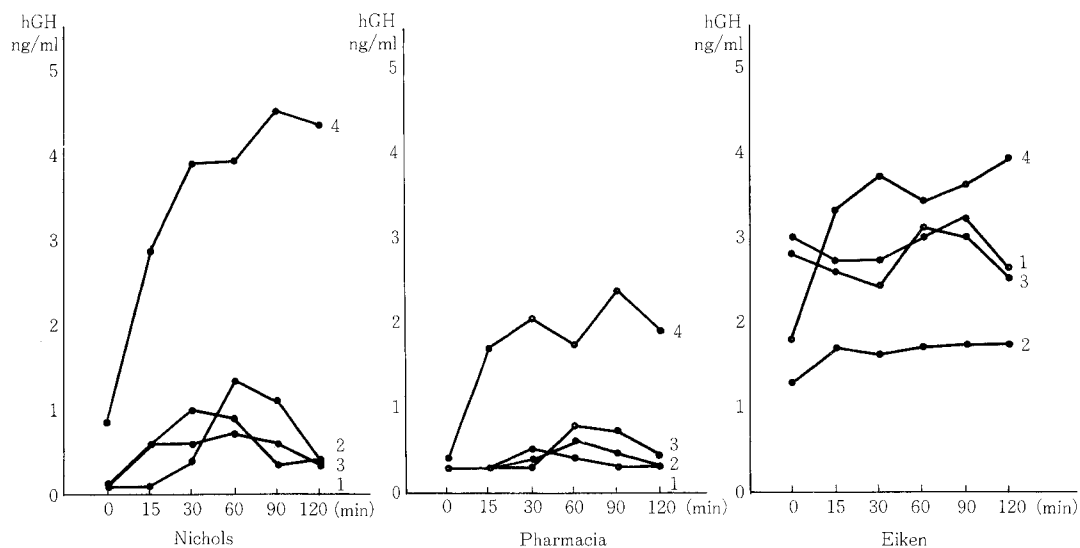


図6 特発性下垂体性小人症におけるGRF試験

1,4570X-2.2344, Pharmaciaと栄研キットは $r=0.9954$ ,  $Y=1,0997X-1.6153$ と、良好な相関を示した。

#### 7. ソマトメジン-C との相関 (図8)

末端肥大症3例, 下垂体機能低下症11例, 下垂体性小人症11例のソマトメジンC値を, Nichols

キットによるGH値と比較した。末端肥大症を含めると有意の相関が得られたが, これを除くと一定の傾向はみられなかった。

#### 考 察

IRMAはトレーサーとしてラベルした抗体を用い, これと結合した抗原をさらに抗原決定基の

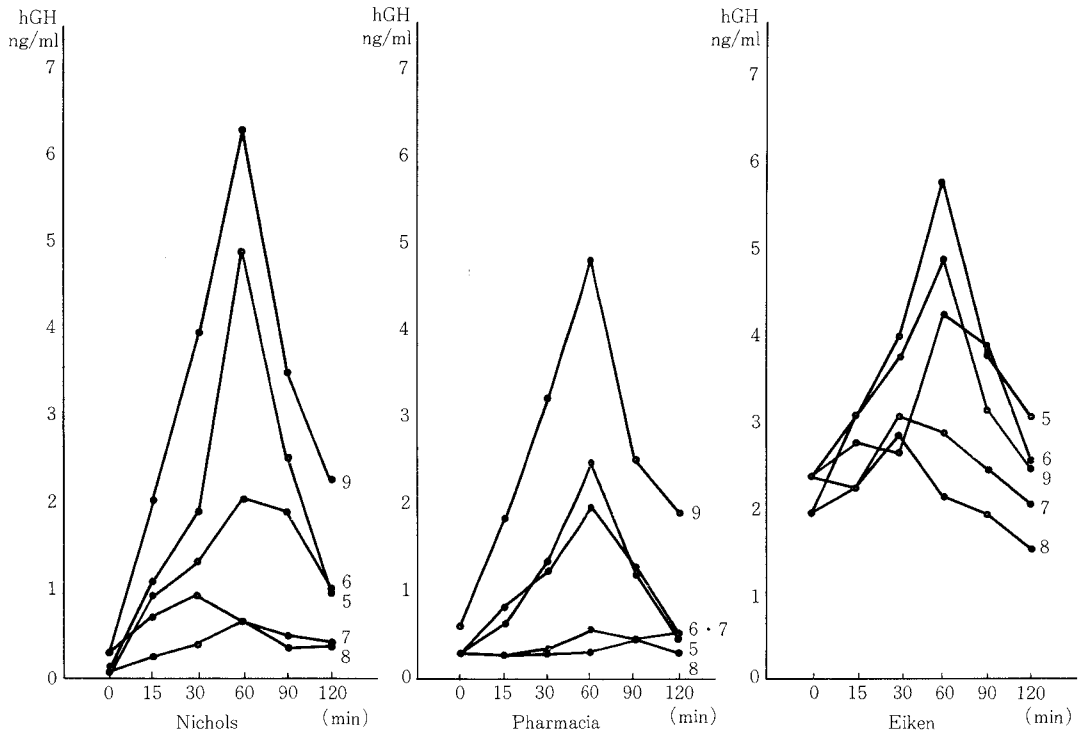


図7 二次性下垂性小人症における GRF 試験

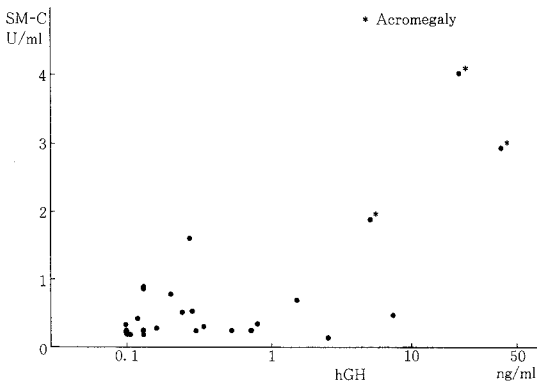


図8 hGH と SM-C の相関

異なるもう1つの抗体と結合させ、競合反応によらず直接微量の抗原を測定する方法である<sup>4)5)</sup>。これらの原理に基く Nichols, Pharmacia キットにより得られた最小検出感度は、95%信頼限界で各々0.1, 0.3ng/mlであり、ともに従来法の1.0 ng/ml と比べ有意の感度の上昇を認めた。高濃度領域における成績も従来法とよく相関し、測定時間も短く、簡便で臨床応用が容易であった。

従来血中 GH 値は、正常人でも測定感度以下の例も多いと報告されていたが、本検討においても同様の結果が得られた。両キットとも正常者と GH 分泌低下例の間で有意の差は認めたもののオーバーラップが大きく、基礎値の測定によって正常者と下垂体機能低下症、下垂体性小人症を区別することは不可能であった。正常者の GH 基礎値は報告者によって様々であり<sup>6)~10)</sup>、対象、例数、採血条件、測定法などの差によって異なると考えられた。性差についても同様で、性差はないとする報告や、安静空腹時の血中 GH 値は男性より女性が高いとする報告<sup>11)</sup>がある。今回の我々の検討では性差は認められず、これも対象の条件の差によるものと思われた。

血糖の低下により GH が分泌され、逆に血糖の上昇に伴い GH が低下することはよく知られているが、正常者への食事負荷の結果、食後で有意に低下した。これは主として血糖の上昇に伴い、視床下部の glucoreceptor が抑制され、ソマトスタチンの分泌増加や GRF 分泌低下などによって

GH 分泌が抑制される結果<sup>12)</sup>と考えられるが、高感度キットにより、抑制の状態をより明瞭にとらえることができた。従ってブドウ糖負荷試験など、抑制試験の結果の判定に有用であると思われた。

GRF は直接下垂体に作用し、特異的に GH 分泌を促すことが明らかにされている。これまで行われていた負荷試験は、いずれも主に視床下部を介する刺激試験であり、これらによって GH 分泌能低下と診断された症例の中にも、GRF 試験には反応する例が多く、下垂体に対する直接の刺激試験として病変部位の診断に優れている。下垂体性小人症への GRF 試験の結果、Pharmacia や栄研キットでは十分に反応パターンを追えない下垂体性の例でも Nichols キットでは低値域で明らかな増加反応が認められる例があった。視床下部性の症例では正常反応を示す例が多く、キットによる顕著な差はみられなかった。また高感度測定キットによる下垂体性小人症の GRF に対する頂値は、視床下部性、下垂体性共に60分以降にあり、下垂体の反応性が遅延していることを示す成績が得られた。

GH は直接骨格組織へ作用するのではなく、肝などでソマトメジンの生成を介し、骨格組織に作用して成長を促進する。ソマトメジンは GH の分泌状態を反映するとされているが、本検討では末端肥大症を除くと、GH 基礎値とソマトメジンの間に有意の相関はなかった。これは、GH の分泌が睡眠、ストレス、血糖の影響を受けているばかりでなく、GRF、ソマトスタチン、およびこれら視床下部ホルモンの放出に関与する種々の神経ペプチドの影響で変動しやすく<sup>13)</sup>、基礎値が必ずしも1日分泌量を反映しないことが原因ではないかと思われた。また血中ソマトメジン C 濃度は、GH 分泌のほか、栄養や年齢の影響を受けることも原因となろう。

#### まとめ

基礎検討の結果、両キットとも低濃度域の測定が可能で、高濃度域における従来法との相関もよく、迅速かつ簡便な測定法であると思われた。臨床検討の結果、両キットとも基礎値による正常者と下垂体機能低下症、下垂体性小人症の鑑別は不

可能であったが、GRF 試験に見えるように、従来法では全く反応を認めなかった症例中に、明らかな増加反応を認めた例があったことや、低濃度域内での反応をはっきりと見ることができるなど、機能低下例の GH 分泌動態を知るうえで有用な測定法であると思われた。

稿を終るにあたり、Nichols キット、Pharmacia キットを提供して下さった栄研 ICL 社、シオノギ製薬に感謝いたします。

#### 文 献

- 1) Wide, L., Bennich, H. and Johanson, S.G.: Diagnosis of allergy by an in vitro test for allergen antibodies. *Lancet* 2 1105 (1967)
- 2) Miles, L.E.M. and Hales, C.N.: Immunoradiometric assay of human growth hormone. *Lancet* 2 492 (1968)
- 3) Sandra, L.B. and Fred, I.C.: Use of a two-site immunoradiometric assay for growth hormone (GH) in identifying children with GH-dependent growth failure. *J Clin Endocrinol Metab* 57(5) 1031 (1983)
- 4) Miles, L.E.M. and Hales, C.N.: Labelled antibodies and immunological assay systems. *Nature* 219 186 (1968)
- 5) Hales, C.N. and Woodhead, J.S.: Labelled antibodies and their use in the immunoradiometric assay. *Method in Enzymology* 70 334 (1980)
- 6) 中村 譲・他: ヒト成長ホルモンの Radio-immuno assay kit による測定. *ホルモンと臨* 26(10) 1059 (1978)
- 7) 飯野史郎・他: Phadebas hGH PRIST kit を用いるヒト成長ホルモン測定の基礎的ならびに臨床的検討. *ホルモンと臨* 26(8) 795 (1978)
- 8) 入江 実・他: 固相法による HGH-RIA kit (S-8540) の基礎的検討. *ホルモンと臨* 26(6) 623 (1978)
- 9) 佐藤信行・他: 低濃度 GH 測定法 (IRMA) とその臨床的意義について. *日内分泌会誌* 62(4) 316 (1986)
- 10) 高野加寿恵・他: 高感度 hGH 測定法 (IRMA) の臨床的応用. *日内分泌会誌* 62(4) 316 (1986)
- 11) Greenwood, F.C., Hunter, W.M. and Marrian, V.J.: Growth hormone levels in children and adolescents. *Br Med J* 1 25 (1964)
- 12) 鎮目和夫・他: 内分泌機能検査. 下垂体前葉機能. ブドウ糖負荷試験. *日本臨床* 37 2473 (1979)
- 13) 加藤 譲: 下垂体ホルモン分泌調節における神経ペプチドの役割. *ホルモンと臨* 31(4) 265 (1983)