

エクルーシス試薬コルチゾール II を用いた 血中コルチゾール測定の基礎的検討

柿沢 圭亮・大川 雄太・大石 敏弘

Keisuke Kakizawa, Yuta Okawa, Toshihiro Oishi

山下 美保・佐々木 茂和・佐橋 徹

Miho Yamashita, Shigekazu Sasaki, Toru Sabashi

遠山 和成・沖 隆

Kazushige Tohyama, Yutaka Oki

73(1)

71-76, 2016

医学と薬学 別刷

第73巻 第1号

2016年 1月

Japanese Journal of Medicine and Pharmaceutical Science
Jpn J Med Pharm Sci

自然科学社

エクルーシス試薬コルチゾール II を用いた 血中コルチゾール測定の基礎的検討

73(1) | 71-76, 2016

柿沢 圭亮¹⁾・大川 雄太¹⁾・大石 敏弘¹⁾
山下 美保¹⁾・佐々木 茂和¹⁾・佐橋 徹²⁾
遠山 和成²⁾・沖 隆³⁾

Keisuke Kakizawa¹⁾, Yuta Okawa¹⁾, Toshihiro Oishi¹⁾
Miho Yamashita¹⁾, Shigekazu Sasaki¹⁾, Toru Sabashi²⁾
Kazushige Tohyama²⁾, Yutaka Oki³⁾

はじめに

コルチゾールは、副腎皮質から産生される代表的な糖質コルチコイドであり、血中コルチゾールや尿中遊離コルチゾールの測定は副腎皮質機能亢進症（副腎性クッシング症候群、クッシング病、異所性 ACTH 産生腫瘍など）や副腎皮質機能低下症（アジソン病、下垂体性・視床下部性副腎皮質機能低下症など）の診断に必要な不可欠な検査項目のひとつである¹⁾²⁾。このコルチゾールは副腎皮質束状層から分泌される分子量 362.5 の糖質コルチコイドで、血中では 90% 以上がコルチコステロイド結合蛋白 (CBG) と結合して存在している。通常の一日分泌量は 20mg 程度であるが、ストレス下では数倍に上昇する。肝でグルクロン酸抱合を受けたコルチゾールは腎から排泄されるが、一部は未代謝体としてそのまま尿中に排泄される。コルチゾールの分泌は、ACTH によりコントロー

ルされているため早朝に高く、夕方に低いという日内リズムを持つ。ストレスで敏感に変動するため十分な安静ののちに採血するのが望ましい。副腎皮質機能低下症やクッシング症候群の診断には、コルチゾール分泌刺激試験として CRH 試験やインスリン低血糖試験などの負荷試験が用いられる。続発性、原発性副腎皮質機能低下症の鑑別には ACTH 試験を行い、前者ではコルチゾール分泌の増加をみるが後者ではみられない。妊娠では CBG 増加により高値となり、また各種副腎皮質ホルモン剤の投与で高値となることがあるので病歴を十分に聴取すべきである。一方、各種コルチゾール測定法に用いられている抗体の特異性の違いから、測定法によっても、合成ステロイドに対する交差反応性は異なることが報告されているので、測定値の解釈には注意が必要である³⁾。

現在、国内において、血中コルチゾールを測定する体外診断用医薬品としては、数種類の測

Basic evaluation of blood cortisol measurement with Elecsys Cortisol II

- 1) 浜松医科大学第二内科 Second Division, Department of Medicine, Hamamatsu University School of Medicine
- 2) 公益財団法人 SBS 静岡健康増進センター SBS Shizuoka Health Promotion Center
- 3) 浜松医科大学地域家庭医療学

Department of Family and Community Medicine, Hamamatsu University School of Medicine

Key words : コルチゾール, cortisol, エクルーシス

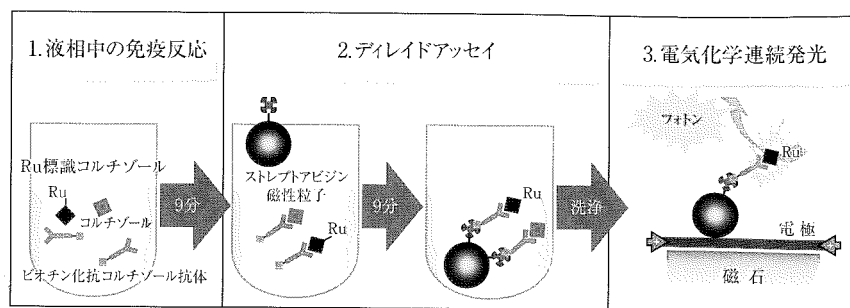


図1 電気化学発光免疫測定法によるコルチゾールの測定原理

定試薬が認可されている⁴⁾。今回、われわれはエクルーシス試薬コルチゾールの検出系にモノクローナル抗体を採用し、コルチゾール分子に対する特異性を高めた電気化学発光免疫測定法 (electrochemiluminescence immunoassay : ECLIA) を測定原理とする血中コルチゾール測定改良試薬「エクルーシス試薬 コルチゾール II」を検討する機会を得たので、その結果を報告する。本検討においては、「エクルーシス試薬 コルチゾール II」試薬が既存試薬と同等以上の試薬性能を有することを確認するため、エクルーシス試薬コルチゾールおよびEテスト「TOSOH」II (コルチゾール) を対照試薬として、「エクルーシス試薬 コルチゾール II」を用いて、各種疾患とコルチゾール値との関係、ならびに「エクルーシス試薬 コルチゾール II」の基本性能を評価した。

I. 対象と測定方法

図1に測定原理を示す。本法は競合法であり、第一反応は検体 10 μ L にビオチン化抗コルチゾールヒツジモノクローナル抗体および Ru (bpy)₃²⁺ 標識コルチゾールを加え、9分間インキュベーションする。第二反応は標識された抗原抗体複合物にストレプトアビジンコーティング磁性マイクロパーティクルを加え9分間インキュベーションする。その後、反応混合液をセル内に吸引し、セル内の電極に磁性粒子を吸着

させることによりB/F分離、電極への荷電による酸化とトリプロピルアミンでの還元反応により励起発光を繰り返す。所定時間での発光強度を光電子増倍管で測定し、同様に測定したキャリブレーションの発光強度から濃度換算を行う。測定機器はロシュ・ダイアグノスティックス社の Cobas 6000 を用いた。対照測定試薬は ECLIA 法であるエクルーシス試薬コルチゾール (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社) および蛍光試薬のEテスト「TOSOH」II (コルチゾール) (東ソー株式会社) を用いた。なお、本研究は浜松医科大学およびSBS 静岡健康増進センターのそれぞれの医学研究倫理審査の承認を得て実施した。

II. 検討方法と結果

はじめに、製造元 (Roche Diagnostics GmbH) データによるエクルーシス試薬コルチゾール II の基本性能としては、測定範囲: 0.054 ~ 63.4 μ g/dL, Limit of Blank (LoB) : 0.036 μ g/dL, Limit of Detection (LoD) : 0.054 μ g/dL および Limit of Quantitation (LoQ) : 0.109 μ g/dL (Total Error : 30%) と報告されている。これらのデータは CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) EP17-A に準拠して得られた。

1. 健常ボランティア検体による基準範囲の設定

浜松医科大学医学部附属病院および SBS 静

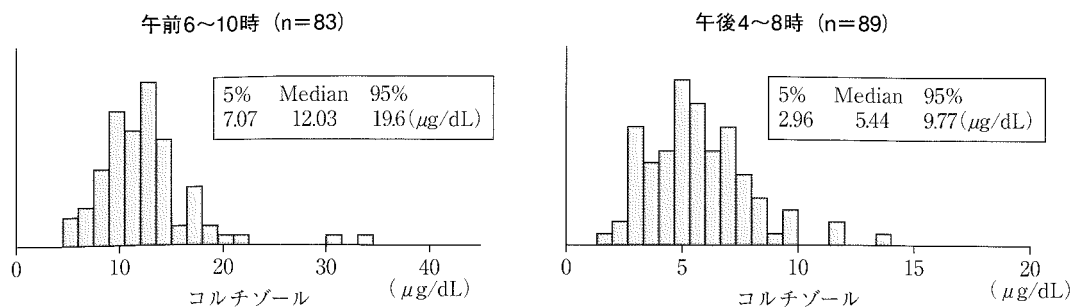


図2 基準範囲

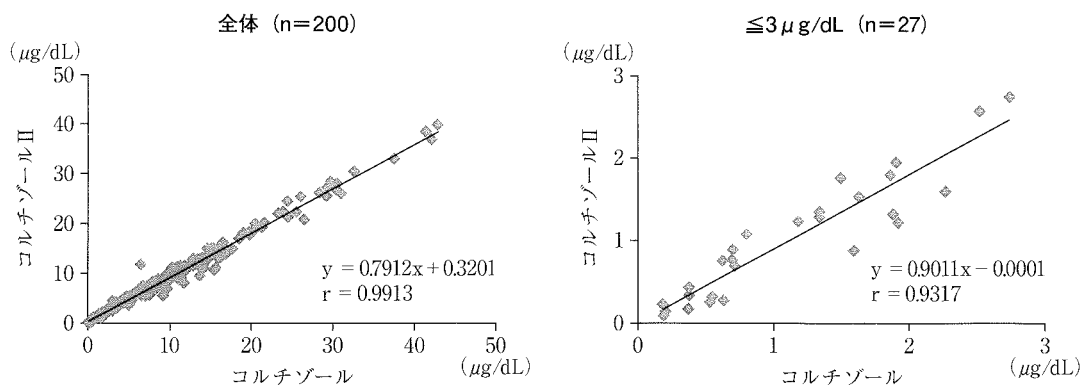


図3 エクルーシス試薬コルチゾールとの相関性評価

岡健康増進センターにて、2015年7月1日から2015年10月14日まで健常ボランティアを募り、同意の得られた健常ボランティアから採血し、分離後血清を得た。採血は2回（午前6～10時および午後4～8時）に分けて実施した。図2に結果を示す。

1) 午前

エクルーシス試薬コルチゾールII測定結果より83例の基準範囲を算出した。5～95パーセントイル値より、基準範囲は7.07～19.6µg/dLであった。

2) 午後

エクルーシス試薬コルチゾールII測定結果より89例の基準範囲を算出した。5～95パーセントイル値より、基準範囲は2.96～9.77µg/dL

dLであった。

2. 既存試薬との相関性評価

2015年6月1日から2015年8月31日まで当院中央検査部にコルチゾール測定依頼のあった患者検体を連結不可能匿名化し、分離した血清を用いた。また、方法間で乖離が認められた場合は、同位体希釈-液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法 (ID-LC/MS/MS) 測定を外部機関 (あすか製薬メディカル) に依頼した。

200名の血清検体を用い、エクルーシス試薬コルチゾールII法 (y軸) とエクルーシス試薬コルチゾール法 (x軸) との相関性を評価したところ、 $y=0.7912x+0.3201$, $r=0.9913$ であった。また、3µg/dL以下の低濃度域では、 $y=0.9011x-0.0001$, $r=0.9317$ であった (図3)。

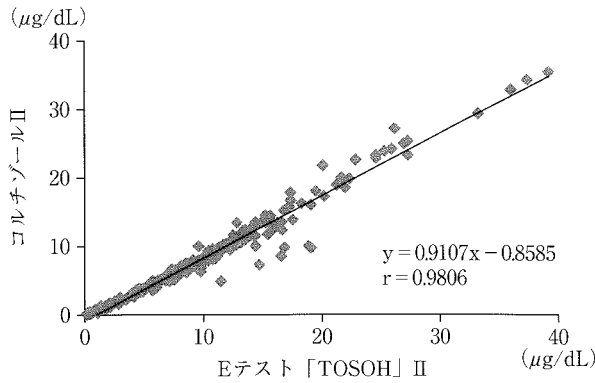


図4 Eテスト「TOSOH」IIとの相関性評価

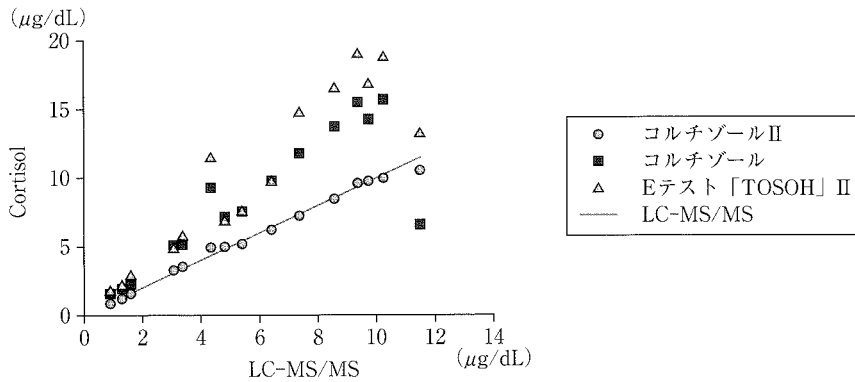


図5 乖離検体の評価

さらに、同血清検体を用い、他法としてエクルーシス試薬コルチゾールII法(y軸)とEテスト「TOSOH」II法(x軸)との相関性を評価したところ、 $y=0.9107x-0.8585$ 、 $r=0.9806$ であった(図4)。

前述の2法間の相関性評価において、乖離を認めた15検体につき、ID-LC/MS/MS法で測定を行った。ID-LC/MS/MS法の測定値は、15検体いずれもエクルーシス試薬コルチゾールII法の測定値と近似していた(図5)。

以上の結果より、エクルーシス試薬コルチゾールIIは既存の試薬との相関が良好であり、既存の試薬と比較してより正確な測定値が期待

できると思われた。

3. ステロイドホルモン交差反応性評価

ステロイドホルモン(progesterone, cortisone, 11-deoxycortisol, prednisone, dexamethasone, corticosterone, 6- α -methylprednisolone, prednisolone)を購入し、0.1~10 $\mu\text{g/dL}$ の濃度に溶解後、プール血清に添加した。

エクルーシス試薬コルチゾールIIにおける、それぞれのステロイドホルモンの交差反応性を表1に示す。既存のエクルーシス試薬コルチゾール法での交差反応性が高かった6- α -methylprednisoloneとprednisoloneにおいて、本試薬では交差反応性の低下を認めた。ま

表1 ステロイドホルモン交差反応性

No	ステロイドホルモン	$\mu\text{g/mL}$	コルチゾール II (%)	コルチゾール (%)	Eテスト「TOSOH」II (%)
1	Progesterone	10	0.029	0.96	0.54
2	Cortisone	10	5.48	0.74	1.10
3	11-Deoxy-Cortisol	10	5.03	3.03	8.40
4	Prednisone	10	2.13	0.64	0.95
5	Dexamethasone	10	n.d.	0.42	0.47
6	Corticosterone	10	3.04	5.22	5.30
7	6 α -Methyl-Prednisolone	0.1	9.1	149.5	51.0
8	Prednisolone	0.1	8.74	67.9	84.0

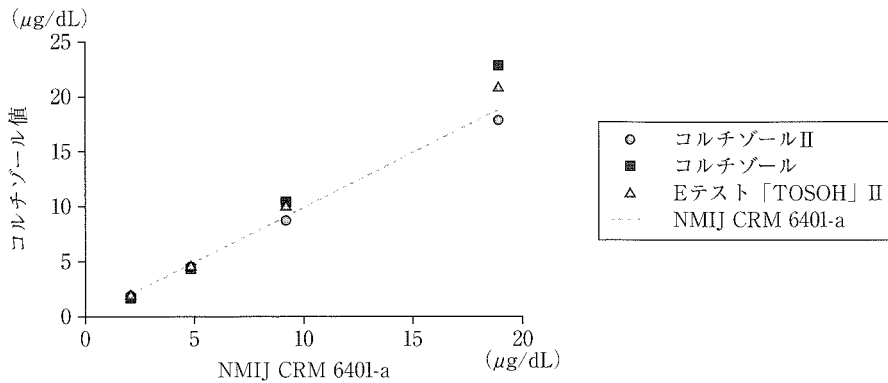


図6 標準物質の評価

た、負荷試験など診断時に問題となる dexamethasone に対する交差反応性は全く認めなかった。

4. コルチゾール分析用ヒト血清標準物質 (NMIJ CRM6401-a) の評価

コルチゾール分析用ヒト血清 (4 濃度レベル) NMIJ CRM6401-a (和光純薬) を購入し、各種コルチゾール試薬で測定した。

既存のエクルーシス試薬コルチゾール法と E テスト「TOSOH」II 法では、コルチゾール濃度が高くなるに従い、測定値が高値側に乖離する傾向を認めたが、エクルーシス試薬コルチ

ゾール II 法では、いずれの濃度レベルにおいても正確な測定値が得られた (図6)。

III. 考 察

エクルーシス試薬コルチゾール II では、抗体がモノクローナル抗体に変更されたことから、今回新しい基準範囲の設定を行った。健常ボランティア検体を用いた検討によって、午前 6~10 時の基準範囲は 7.07~19.6 $\mu\text{g/dL}$ 、午後 4~8 時の基準範囲は 2.96~9.77 $\mu\text{g/dL}$ となり、コルチゾールの日内変動を良好に反映した

結果が得られた。

新試薬であるエクルーシス試薬コルチゾールIIと従来品であるエクルーシス試薬コルチゾールとの相関性は、 $y=0.7912x+0.3201$, $r=0.9913$, また $3\mu\text{g/dL}$ 以下の低濃度域では、 $y=0.9011x-0.0001$, $r=0.9317$ であり、良好な相関性を認めた。しかしながら、血清コルチゾール値は新試薬では約20%程度（低濃度域では約10%程度）低値となることから、従来品からの切り替えの際はこの点に留意が必要である。一部の検体でエクルーシス試薬コルチゾールIIとエクルーシス試薬コルチゾールによる測定値に乖離を認めたが、ID-LC/MS/MS法の測定値はいずれもエクルーシス試薬コルチゾールII法の測定値と近似していた。また、コルチゾール分析用ヒト血清標準物質を用いた検討においても、新試薬では各濃度レベルで正確な測定値が得られており、新試薬は既存の試薬と比較してより正確な測定値が期待できると思われた。

今回検討したエクルーシス試薬コルチゾールIIでは、モノクローナル抗体を採用し、コルチゾール分子に対する特異性を高めることを試みた。本試薬における各種ステロイドホルモンの交差反応性は、既存の試薬と比較して低下しており、自己免疫疾患などでステロイド治療中の患者でも、内因性コルチゾールを比較的正確に反映すると考えられる。また、dexamethasone

に対する交差反応性を全く認めなかったことから、高コルチゾール血症診断時の標準法であるdexamethasone抑制試験において、コルチゾール値の解釈を正確に行えると考えられる。

ま と め

今回検討した新試薬であるエクルーシス試薬コルチゾールIIは、コルチゾール値の測定が正確に行なえ、他のステロイドホルモンとの交差性も低減された優れた試薬であり、間脳下垂体副腎系機能異常を診断する上で非常に有用であると考えられる。

文 献

- 1) Henry M. Kronenberg et al : Williams Textbook of Endocrinology, 11th edition, pp.445-503, Saunders Elsevier, Philadelphia, 2008.
- 2) 沖 隆 : コルチゾールの微量測定の問題点—なにをもって異常と決めるか? 医学のあゆみ 232 (9) : 892-896, 2010.
- 3) 阿部正樹, 俵本美幸 他 : non-RIA 法による4種の血中コルチゾール測定法の比較検討. 日本臨床検査自動化学会誌 32 (2) : 221-226, 2007.
- 4) 古屋 実, 友田雅巳 他 : 全自動電気化学発光免疫測定装置モジュラーアナリティクスを用いた血中コルチゾール測定の基礎的検討. 医学と薬学 70 (3) : 659-667, 2013.

* * *