

사람 성장호르몬의 放射免疫測定에 관한 연구

제 I 편 사람 성장호르몬의 측정법에 관한 검토

서울대학교 의과대학 내과학교실

李玲雨 · 李弘揆 · 高昌舜 · 李文鎬

=Abstract=

Studies on the Radioimmunoassay of Human Growth Hormone

1. Evaluation of the method of determination

Young Woo Lee, M.D., Hong Kyu Lee, M.D., Chang-Soon Koh, M.D. and Munho Lee, M.D.

Department of Internal Medicine, College of Medicine, Seoul National University

Seoul, Korea

Utilizing the commercial radioimmunoassay kit, the author assayed HGH and evaluated the problems of the method. The method had the sensitivity of 0.5 mug/ml degree and could determine the plasma HGH concentration directly without the help of plasma extraction. Also it was specific for the HGH, when tested by a dilution method using test utilizing the plasma of the acromegalic patient.

The author also obtained the ¹²⁵I labelled HGH of specific activity of 156.3 μCi/μg, performing the chloramine-T method.

I. 緒 論

호르몬 放射免疫測定法은 Berson 과 Yalow¹⁾에 의하여 insulin 에 처음 使用된 以來 거의 모든 단백질호르몬에 적용되어 왔고²⁾, 近來 國內에서도 insulin 을 中心으로^{3,5)} 몇몇 업적이 進行되고 있는 단계이다. 成長호르몬 (human growth hormone, HGH)의 放射免疫測定法은 1962년경 Utiger 등⁶⁾, Hunter 등⁷⁾ 및 Hartog 등⁸⁾에 의하여 開發되기 始作하였으며, 그 技法도 初期의 paper electrophoresis 法⁷⁾ 또는 二重抗體法^{6,8)}에서 最近의 Solid phase 法⁹⁾에 이르기 까지 다양해지고 있다. 호르몬의 放射免疫測定法은 一種의 飽和分析法(saturation analysis)이며, 放射性 同位元素로 標識된 호르몬과 非標識호르몬이 特異性있게 제작된 抗體에 對하여 競合의 作用하는 것을 利用한 것으로, 그 原理에 關하여는 國內에

서도 소개된 바 있다.¹⁰⁾

한편 成長호르몬은 分子량이 21,500인 단일 사슬의 단백질로서, 抗原성이 좋기 때문에 抗體의 生産도 비교적 쉽고, 그 分子內에 7個의 tyrosine 을 가지고 있어서²⁾ 放射免疫測定의 限界過程(limiting step)으로 理解되고 있는 放射性沃素의 標識도 비교적 쉽다.

이러한 成長호르몬의 放射免疫測定이 開發된 以後, 이 때까지 成年期가 지나면 그 호르몬의 作用이 거의 없으리라 믿어지던 成長호르몬에 대한 인식이 달라지고 있을 뿐 아니라, 근래는 臨床의인 利用이 活潑해지면서, 成長호르몬의 放射免疫測定은 末端肥大症—巨人症 및 腦下垂體機能低下症의 診斷에 不可缺한 方法으로 까지 생각하게 되었다¹¹⁾.

著者は 近來 市販되고 있는 成長호르몬의 radioimmunoassay kit 를 使用하여 成長호르몬의 測定을 實施하였고,

특히 放射免疫測定의 限界과정이라 할 수 있는 成長홀몬의 放射性沃素標識를 實施하여 몇가지 成績을 얻었기에 報告하려 한다.

II. 方法 및 材料

1. 方法

A. 標準曲線의 作成

成長홀몬의 測定은 Utiger 등⁶⁾이 이용한 二重抗體法을 使用하였다. 二重抗體法은 放射免疫測定法의 마지막 단계에서, 第2의 抗體를 利用하여 標識홀몬의 結合型과 遊離型을 分離하는 데에서 이름지어진 것이며, insulin 등에서 이용되는 것과 同一한 것이다. 本實驗에서는 주로 日本 Dainabot社에서 供給된 成長홀몬의 radioimmunoassay kit를 이용하였고, 그 측정의 實際는 아래와 같다.

- ① 0.1 M borate buffer, pH 8.6 (with 0.5% bovine serum albumin) 0.4 ml
- ② HGH standard hormone* (0.78~80 mμg/ml) 0.1 ml
- ③ ¹²⁵I-HGH (≒10,000 cpm) 0.1 ml
- ④ Anti-HGH guinea-pig serum (1st antibody) 0.1 ml

* Wilhelmi Lot NIH-GH-HS 1147

이들은 시험관에 넣고 4°C에서 72시간 반응시킨후

- ⑤ Antiginea-pig γ globulin rabbit serum (2nd antibody) 0.1 ml
- ⑥ normal guinea-pig serum 0.1 ml

을 넣어 다시 24시간 반응시킨 다음, 總放射能을 Well type scintillation counter에서 計測하고, 3,000 rpm으로 30분 원침하여 上層液을 버린 다음 그 침전물을 計測하여 沈殿物의 cpm: 總 cpm을 計算하였다.

여기에서 沈殿物의 cpm: 總 cpm은 總 ¹²⁵I-HGH 중에서 ¹²⁵I-HGH가 第1 抗體와 結合되어 있는 比率, 즉 結合型의 比 (bound form %)를 의미하며, 이 比와 넣어진 標準홀몬의 量과의 관계에서 標準曲線을 作成하였다. 이때 試料들은 모두 각각 두개씩으로 하여 처리하였다.

B. 血中 成長홀몬의 測定

血中 成長홀몬의 測定은 모두 해파린이 들어있는 주사기에 처리한 혈액을 곧 원침하여 얻은 血漿을 試料로서 使用하였다. 이 試料는 채취한 후 -16°C에서 保存하였으며, 그 保存은 試料의 채취에서부터 測定時까지 1個月이 지나지 않게 하였다.

測定의 實際는 標準曲線의 作成時와 그 技法은 同一하였으며, 단 標準홀몬 대신 試料를 0.1 ml 넣어 反應시켰다. 이때 同時에 作成한 標準曲線을 利用하여, 試料의 結合型의 比 (bound form %)에 대한 成長홀몬의 量을 계산하였다.

C. 成長홀몬의 ¹²⁵I 標識

成長홀몬의 標識은 Greenwood 등¹²⁾의 chloramine-T 方法을 변형시켜 실시하였다.

즉, Na ¹²⁵I 2.0 mCi 를 5 μl 또는 그 以下가 되게 하여, 반응용기에 넣고, 0.4 M phosphate buffer pH 7.5 25 μl 및 HGH 2.5 μg/5 μl 를 넣은 후, 신선하게 만들어진 chloramine-T (25 mg/10 ml) 10 μl 를 넣어 약 30 초간 반응시킨 후 바로 만든 Na-metabisulfite (25 mg/10 ml) 25 μl 를 넣어 산화를 정지시킨다.

한편 이 반응물을 精製시키기 위한 Sephadex column 은 Sephadex G-75 1 gm 을 0.01 M phosphate-0.05 M saline buffer, pH 7.8에 24시간 두어 평행에 이르게 한 후, 10 ml 용량의 serologic pipette 를 잘라서 만든 column 에 넣어서 만들고, 20 mg/1 ml 의 bovine serum albumin (B.S.A.)을 통과시켜 Sephadex 와 column을 bovine serum albumin 으로 포화시켜 두었다. 이렇게 만들어 둔 column에 前記한 反應物을 옮겨 여과한 후, 여과물을 0.5 ml씩 나누어 받아 각 시험관을 scintillation counter에서 一定한 거리에 두고 계측하여 第1 및 第2의 分割을 얻을 수 있었다. 이 各 分割은 paper chromatography (0.01M phosphate-0.05M saline buffer

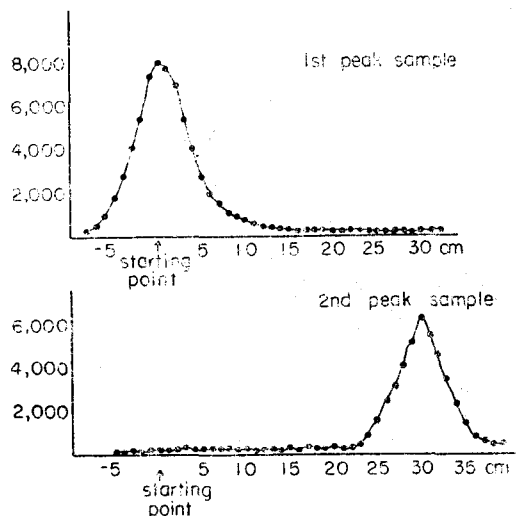


Fig. 1. The mobility of radioactivity on paper chromatography with 1st and 2nd peak samples (of Sephadex G-75 column eluate).

pH 7.8)를 시행한 후 사용한 여지를 말린 다음, 0.5 cm 씩 잘라 Well type sintillation counter에서 측정, 관찰하여 單一 peak가 나타나는 것을 확인하였다(圖 1).

單一 peak를 나타내어 標識가 일어난 것으로 인정된 ¹²⁵I-HGH는 다음 使用時까지 -16°C에 保存하고, 使用할 때는 다시 Sephadex column에 통과시켜 유리되는 ¹²⁵I를 제거시켰으며, 특히 第 1 peak의 첫 0.5 ml를 使用하여 이 peak의 後半에 나타날 수 있는 變性된 ¹²⁵I-HGH의 混入을 피하도록 하였다.

D. 末端肥大症患者 血漿에 依한 稀釋試驗

이 成長홀몬의 免疫測定法으로 얻어진 血中 成長홀몬 值의 신뢰도를 관찰하기 위하여, 血漿 成長홀몬 濃도가 높으리라 믿어지는 臨床적으로 確認된 末端肥大症 患者의 血漿을 稀釋하여 각각 측정하여 보았다.

이 測定法으로 얻어진 수치가 實際 血漿 成長홀몬 濃도를 反映하고 다른 血中 단백질에 依한 영향이 없다면, 稀釋測定한 數値는 그 稀釋倍數에 對하여 直線의 인 數値를 보여야 하기 때문이다. 여기에 使用된 血漿은 이미 보고된 例中 金○萬³²의 것을 使用하여 原血漿, 1:2, 1:4, 1:8의 稀釋血漿으로 測定하였다.

2. 材 料

本 實驗에서 使用한 材料로서 標準홀몬은 英國 National Institute for Biologic Standards, Mill Hill, London에서 제공된 Wilhelmi Lot. NIH-GH-HS 1147이었으며, 標識에 使用된 純粹成長홀몬은 美國 National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases에서 제공 받은 Wilhelmi Lot. NIH-GH-HS 1394이었다.

한편 成長홀몬의 標識에 使用한 Na ¹²⁵I는 英國 Radiochemical Center, Amersham에서 공급된 환원제가 포함되지 않은 carrier가 없는 제제이었다.

成長홀몬에 대한 抗血清, guinea-pig γ globulin에 대한 抗血清 및 ¹²⁵I-HGH는 日本 Dainabot社에서 공급된 kit의 것을 이용하였으며, 공급된 ¹²⁵I-HGH의 比放射能은 kit에 따라 80~120 μ Ci/ μ g이었다.

Ⅲ. 結 果

A. 표준곡선

Dainabot社의 成長홀몬의 radioimmunoassay kit를 使用하여 얻은 표준곡선의 하나는 圖 2와 같다. 또한 시료를 각각 두개씩으로 하여 測定한 標準曲線 作成時의 標準홀몬량에 對한 結合型의 比(bound form %)의 값은 表 1과 같다.

圖 2에 나타나 있는 바와 같이, 이 표준곡선의 感度

Table 1. The percentages of bound form for the standard curve preparation in duplicated samples

Amount of standard GHG	Bound form %	
	A	B
80 μ g/ml	4.05	1.46
40 "	6.37	4.48
20 "	8.70	9.16
10 "	18.06	16.84
5 "	31.83	30.78
2.5 "	36.07	39.98
1.25 "	43.48	45.39
0.65 "	48.71	47.67
0.23 "	51.36	50.41
Blank "	51.21	50.47

Mean of error: 4.4%,

S.D.: 2.9%

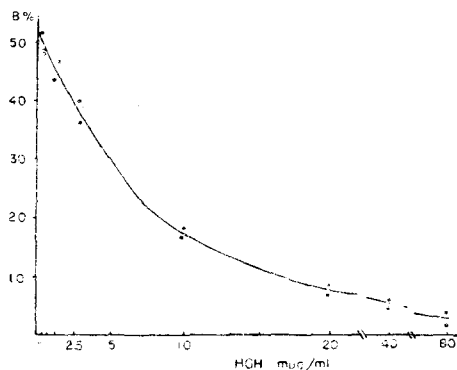


Fig. 2. A standard curve for GHG radioimmunoassay.

(sensitivity)는 약 0.5 μ g/ml 정도이었으며, 測定值사이의 오차는 表 1에서 보는 바와 같이 4.4±2.9%로서 보통 허용한도인 10%보다 훨씬 적었다.

B. 血中 成長홀몬의 測定

血漿에서의 測定値는 試料를 각각 두개씩으로 하여 測定하였을때, 임의로 추출한 20個의 試料에서 그 誤差가 9.5±6.4%이었고, 허용한도의 10% 이내에 포함 되어 있었다. 이 오차의 크기는 試料의 홀몬濃도가 높을수록 큰 경향을 나타내었고 이것은 標準曲線 作成時에도 同一하였다.

C. 成長홀몬의 ¹²⁵I 標識

Chloramine-T法에 따라 시행한 後, Sephadex G-75 column에 여과하여 얻은 여과물의 放射能의 分布는 圖

Table 2. The percentages of bound form for the plasma HGH determination in several duplicated samples

Sample No.	Bound form %		Sample No.	Bound form %	
	A	B		A	B
1	26.5	21.5	11	39.9	39.1
2	28.7	26.4	12	43.1	41.2
3	29.7	21.9	13	45.4	46.0
4	21.4	29.1	14	42.1	44.0
5	31.0	26.3	15	48.0	43.0
6	38.0	35.9	16	38.7	38.9
7	43.0	42.3	17	42.2	40.1
8	32.6	39.5	18	44.8	41.8
9	26.5	24.5	19	43.3	42.3
10	32.0	31.1	20	48.4	46.1

$$\text{Error} = \frac{A-B}{\text{mean}} \times 100$$

Mean of error: 9.5% S.D.: 6.42%

3에서 보는 것과 같다. 이 2개의 peak中, 第1 peak의 放射能은 圖 1에서 보는 바와 같이 paper chromatography를 시행한 결과 適點에서 移動하지 아니하였고, 第2 peak의 그것은 buffer를 따라 여지의 끝으로 이동하였다. 成長홀몬은 단백질로서 여지에 강하게 흡착되기 때문에 이러한 결과는 第1 peak에 標識된 成長홀몬이, 第2 peak에 標識되지 않고 여과되어 나온 ^{125}I 가 나타남을 의미하였다.

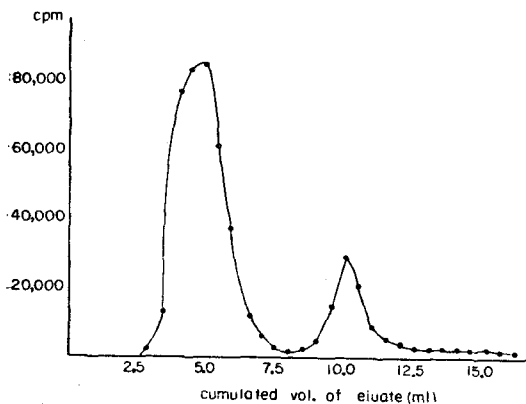


Fig. 3. The elution pattern of radioactivity on Sephadex G-75 column chromatography after ^{125}I labeling to HGH (Chloramine-T method).

圖 3에서 보는 바와 같이 여과물 中の 第1 peak內의 放射能과 第2 peak內의 放射能의 比는 약 4:1이

있으며, 이것으로서 여과되어 나오는 總 ^{125}I 의 75%이상이 成長홀몬에 표지되고 있음을 알 수 있었다.

제작된 ^{125}I -HGH의 比放射能은 1972. 1월 실시한 경우 다음과 같았다.

- 사용된 Na ^{125}I 의 量: 2 mCi.
 - 반응을 시킨 후 Sephadex column에 옮긴 후 반응용기에 남은 Na ^{125}I 의 量: 0.33 mCi.
 - 사용한 HGH의 量: 2.5 μg
 - 용출후 Sephadex column에 吸着되는 HGH의 量: column으로 들어간 HGH의 20%¹²⁾
 - 第1 peak에 포함된 ^{125}I 의 量: 0.25 mCi
- Sephadex column으로 옮길 때 Na ^{125}I 가 옮겨지는율과 成長홀몬의 그것과 同一하다고 생각하고 比放射能을 계산하면,

$$\text{比放射能} = \frac{0.25 \text{ mCi}}{2.5 \mu\text{g} \times \frac{1.67}{2.0}} \times 0.8 = 156.3 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$$

었다.

이때 시료의 계측은 scintillation counter에서 일정한 거리에 떨어지게 둔 곳에서 측정하고, 표준 ^{125}I 와의 비에서 그 放射能(mCi)을 추정하였다.

이 제작된 ^{125}I -HGH는 1週 및 2週後에 다시 Sephadex G-75 column에서 여과시켜 보았을 때, 圖 4 및 5에서 보는 바와 같이 2週後에는 總放射能이 약 1/8이 無機沃素 peak에 나타났으며, 1週後에는 거의 무시할만한 것이었다. 이로 보아 市販되는 成長홀몬의 radioimmunoassay kit는 1週以內에 使用하는 것이 좋을 것

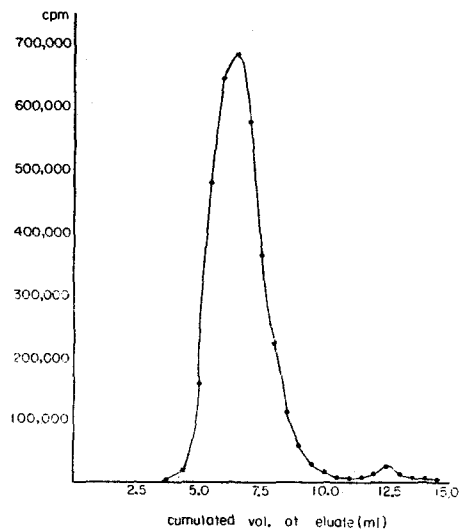


Fig. 4. The elution pattern of radioactivity on Sephadex G-75 column (1 week after the preparation of ^{125}I -HGH).

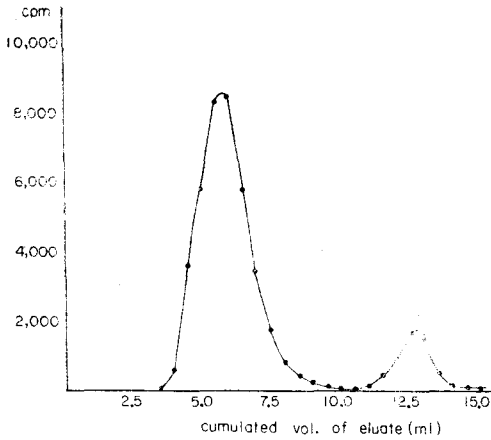


Fig. 5. The elution pattern of radioactivity on Sephadex G-75 column (2 weeks after the preparation of ^{125}I -HGH).

이 좋을 것 같다.

D. 末端肥大症 患者血漿의 稀釋시험

으로 여겨지며, 그 이상의 期間을 사용할 때는 다시 Sephadex column에서 精製한 ^{125}I -HGH를 사용하는 것 圖 6에서 보이는 바와 같이 稀釋배수와 測定値사이에는 直線的 關係를 나타내었으며, 이것은 著者が 사용한 成長호르몬의 測定方法이 信빙성이 있음을 證明하는 것으로 생각되었다.

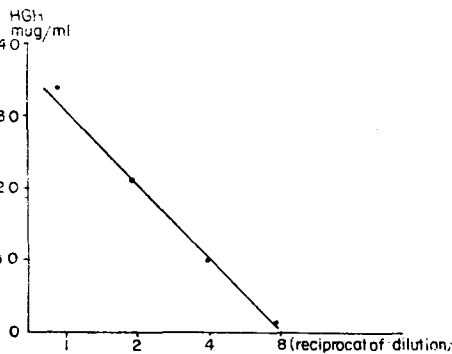


Fig. 6. The straightline relationship between reciprocal of dilution and the plasma HGH concentration in a acromegaly patient.

IV. 考 按

성장호르몬(HGH)의 放射免疫測定法에 대하여서는 많

은 方法들이 記述되고 또 發展되어 왔으나, 가장 많이 사용되는 것은 二重抗體法^{6,8)}, electrophoresis法^{7,13)} 및 Solid-phase法^{9,14)}들이며, 모두 좋은 결과를 보여 주고 있다. 成長호르몬의 測定은 오래 전부터 시도되어, 免疫學的 測定法의 發展以前에는 주로 Greenspan 등의 rat-tibia의 成長을 관찰하는 bioassay¹⁵⁾가 사용되어 왔으나, 시간이 많이 소모되고, 그 결과의 信빙성이 낮은 등 缺點이 많았다. 이러한 bioassay의 缺點을 해소하기 위하여 면역학적 方法이 成長호르몬에도 적용되어 hemagglutination inhibition¹⁶⁾ 등의 方法이 開發되었으나, 測定의 感度가 낮고, 血中 다른 物質들에 의한 非特異的反應 등이 문제가 되었다. 한편 Morris 등¹⁷⁾은 micro-ouchterlony 方法을 利用하여 血中 成長호르몬을 미량까지 쉽게 알아낼 수 있다고 보고 하였으나, 다량의 試料를 쉽고 예민하게 測定할 수 있는 放射免疫測定法의 發展으로 근래는 잘 利用되지 않고 있다.

放射免疫測定法은 抗原-抗體間的 反應을 利用한 것이므로 우선 사용하는 抗原으로서의 호르몬 및 生産된 抗體가 測定하려는 호르몬과 면역학적으로 同一하여야 하며, 抗體의 호르몬에 대한 特異性을 요구한다. 著者が 사용한 Dainabot社의 成長호르몬 및 抗成長호르몬 抗體는 Wilhelmi 등에 의하여 腦下垂體의 acetone-alcohol 抽出法에 의하여 製造된 극히 순수한 製品이나 成長호르몬活性外에 prolactin活性이 6 IU/mg이 포함되어 있고, 또 이에 의하여 製造된 抗體이기 때문에 prolactin과의 交叉반응은 不可避하다.¹⁸⁾

그러나 正常人의 경우 血中 prolactin活性은 무시할 만한 것이다. 또한, 순수한 標準호르몬과 標識호르몬을 放射免疫測定時에 사용할 경우, 抗體의 生産을 위해 抗原으로 사용하는 호르몬내에 미량이지만 포함된 prolactin 등에 의하여 생긴 非特異的 抗體에 의한 영향을 무시할 만한 것으로 알려지고 있다.¹⁹⁾ 한편 成長호르몬에 대한 抗體는 human placental lactogen과 상당한 交叉반응을 보이는 것이 알려져 있으나, 임신 末期를 제외하면 이러한 交叉반응은 무시할 만한 것으로 인정되고 있다.^{19,20)}

이밖에, 生産된 抗體와 血中 단백질과의 非特異的 交叉反應이, 특히 二重抗體法에 있어서 문제가 되고 있으나, 最近 극히 높은 力價의 抗體를 生産함으로써 극복되고 있다.

著者が 二重抗體法으로 測定한 血漿 成長호르몬의 濃度가 稀釋시험에서 直線關係를 보인 것은 이 方法에 이러한 非特異的反應이 關與하지 않았기 때문이다. 즉 非特異的 反應은 血中 단백질농도에 주로 지배되기 때문에 血

漿을 稀釋함으로써 그 영향이 급격히 저하하며, 非特異的 反應이 영향을 미치고 있었다면 稀釋試驗에서 直線關係를 表示할 수 없기 때문이다. 이러한 稀釋試驗은 特定홀몬에 대한 放射免疫測定法의 特異性(specificity)을 나타내는 判定基準으로 下可缺한 것으로 認識되고 있다²²⁾.

Yalow와 Berson^{21, 22)}은 또한 抗原의 特異성을 더욱 확실하게 하기 위하여는 2종 이상의 抗體를 使用하여 同一한 測定結果를 얻어야 한다고 主張하고, 부갑상선 홀몬²³⁾과 insulin²⁴⁾에서 이러한 시험결과 血中 홀몬에 면역학적 異型(Heterogeneity)이 있음을 例擧하고 있으나, 成長홀몬에서는 아직 이러한 면역학적 異型에 관한 보고는 없다.

放射免疫測定の 限界過程은 알려지고 있는 標識홀몬의 製造는 測定하려는 血中홀몬 濃도가 극히 미량이기 때문에 이에 비례하여 적은 양의 標識홀몬을 使用할 필요가 있고, 결과적으로 좋은 感度を 가진 放射免疫測定을 위하여는 극히 높은 比放射能을 가진 홀몬을 만드는 것이 가장 중요하다.

한편 標識홀몬은 非標識홀몬과 免疫學的으로 同一한 性質을 가질 필요가 있다. 그러므로 이론적으로 보아, 홀몬分子에 內的으로 標識된 것이 가장 바람직한 것이나, 가장 손쉬운 insulin의 경우에도 胄장의 조직절편을 Tritium 표지 아미노산에서 조직배양하여 얻은 insulin의 比放射能도 단지 數 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ 밖에 되지 못하기 때문에²⁵⁾ 放射免疫測定에 使用되기는 힘들었다. 한편 Kung 등²⁶⁾이 insulin에서 시도한 것으로, 홀몬을 ^{14}C -glycine을 포함하는 아미노산들에서 완전히 化學的으로 合成하는 內的標識法이 있으나, 실제로 使用하기에는 어려운 方法으로 여겨진다.

홀몬의 外的 標識法으로 Acetylation,²⁷⁾ Tritium 標識法²⁸⁾ Iodination 등^{12, 29, 33)}이 있으나 ^{131}I 또는 ^{125}I 를 이용한 옥소標識法이 가장 많이 이용되고 있다.

단백질과 沃素사이의 反應은 Hughes³⁰⁾에 의하여 잘 연구되어, 沃素가 단백질의 tyrosine 分子에 잘 附着함이 알려져 왔다. 여러 가지의 沃素標識法은 모두 iodide를 酸化시켜 iodine으로 전환시키고, 이를 단백질內의 tyrosine과 결합케 하는 것으로, 初期에는 질산³¹⁾ 또는 iodine monochloride^{32, 33)}를 이용하여 大量的의 放射性 沃素를 使用하여 실시하였다. 그러나 Greenwood 등¹²⁾이 chloramine-T로 산화시킨 옥소를 홀몬에 附着시키고, 餘分の 沃素를 $\text{Na}^-\text{metabisulfite}$ 로 환원시키는 方法을 報告한 이래, 높은 比放射能의 標識홀몬을 얻을 수 있을뿐 아니라²⁾, 沃素化合物을 gel-여과法¹²⁾,

silica precipitation^{3, 4)} 또는 strach gel electrophoresis³⁶⁾ 등의 方法으로 단시간에 無機沃素와 分離하여 放射能에 의한 홀몬의 파괴를 감소시킬 수 있는 長點을 지니고 있어서, 近來 모든 放射性 沃素의 標識法은 이러한 chloramine-T 方法을 使用하고 있는 실정이다³⁶⁾.

著者也 이러한 chloramine-T 方法으로 HGH의 표지를 실시함으로써 $156.3 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ 의 比放射能을 얻었는데, Greenwood 등이 얻은 평균 $200\sim 300 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ 의 比放射能에 비해¹²⁾ 약간 낮은 편에 속하나, 二重抗體法에서는 사용되는 比放射能이 electrophoresis 法의 경우보다 낮기 때문에 보통 $50 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ 이상이면 使用할 수 있는 것으로 인정되고 있다³⁶⁾. ^{125}I -HGH의 경우, Yalow와 Berson에 의하면³⁷⁾ 약 $115 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ 의 比放射能을 가지는 경우 $1,000 \text{ cpm}/\text{ml}$ 를 얻을 수 있는 成長홀몬의 量은 $6 \text{ pg}/\text{ml}$ 정도이며, 이것은 成長홀몬分子 1個當 하나의 沃素가 標識된 것을 의미한다고 하였다.

放射性 沃素로서 홀몬의 標識에 利用되는 것으로는 ^{131}I 과 ^{125}I 가 많이 이용되나, 근래는 Yalow 등³⁷⁾이 주의 하듯 標識홀몬의 放射能에 依한 파괴도(decay catastrophe)가 ^{125}I 의 낮은 에너지 때문에 비록 높기는 하나 ^{125}I 가 주로 이용되고 있다. 이것은 ^{125}I 의 반감기가 더 길기 때문에 한번 만든 標識홀몬을 약 1個月以上 계속 사용할 수 있을 뿐 아니라, ^{125}I 가 ^{131}I 의 경우보다 carrier iodine이 적은 순수한 제품을 얻기가 쉽기 때문이다. 물론, decay catastrophe의 비율은 ^{125}I 로 표지된 경우가 많으므로 결과적으로 생기는 파손부분은 著者の 경우와 같이 gel-여과법 등으로 측정시마다 제거하여 이용하게 되는 것이다.

표준곡선의 作成은 實際 試料의 測定을 위하여 필요하며, Tracer의 結合型—遊離型의 比(bound form/free form ratio, B/F ratio), 結合型百分比(bound form %, B%) 및 遊離型의 百分比(free form %, F%) 등을 표준홀몬濃도와 關係에서 얻고 있다. 이러한 비율을 그냥 이용하거나, semilog 紙에 옮기거나 또는 Logit 變換으로 하거나간에 그 결과는 同一하며, 최근에는 전자 계산기를 이용하는 方法도 있다. 일반적으로 試料는 각각 두개씩으로써 측정하며, 한 측정치 사이의 오차는 약 10% 以內가 되어야 믿을 만한 것으로 받아들여지고 있는데^{35, 37)} 著者の 성적은 4.4%~9.5%로 신빙성 있는 성적으로 보인다.

著者の 成績에서 보는 바와 같이 測定試料의 홀몬농도가 높아지면 점차적으로 오차는 增加하였는데, 이것은 標準曲線이 高濃度에 이르면 낮은 傾斜를 이루기 때문에 불가피한 것이다. 그러므로 홀몬의 농도가 높

오리타 생각되는 試料를 測定할때 試料를 미리 稀釋하여 測定하는 것이 좋다.

V. 結 論

1. 著者は 市販되는 成長ホル몬의 radioimmunoassay kit 를 사용하여 成長ホル몬의 測定을 실시함과 아울러 測定法이 가지는 문제점을 검토하였다. 이 kit 를 이용한 測定法은 약 0.5 mμg/ml 의 感度를 지니고 있기 때문에, 血清에서 成長ホル몬의 抽出을 시행하지 않고도 직접 血清 成長ホル몬의 측정에 이용할 수 있음을 확인하였다. 이 방법을 이용하여 末端肥大症患者에서 稀釋 試驗을 實施하여, 이 測定法이 成長ホル몬 測定에 特異함을 확인하였다.

2. 成長ホル몬의 ¹²⁵I 標識를 Chloramine-T 法에 따라 시행하고, 비교적 높은 156.3 μCi/μg 의 比放射能을 가진 ¹²⁵I-HGH 를 얻었다.

REFERENCES

1) Yalow, R.S. and S.A. Berson: *Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. J. Clin. Invest.* 39:1157, 1960.
 2) Wright, A.D. and K.W. Taylor: *Immunoassay of hormones, "Hormones in Blood" Gray, C.H. and A.L. Bacharach. (eds) 2nd ed. Acad. Press. London & N.Y. 1967.*
 3) 이홍규, 고창순, 이문호: 甲状腺機能亢進症에서의 經口的糖負荷試驗時 血漿 Insulin 의 變動. 大韓核醫學會雜誌 제5권 1호 (65) 1971.
 4) 김동준: 방사면역측정법에 의한 인슐린의 측정. 가톨릭대학 의학부 논문집 제21집 263, 1971.
 5) 김용수, 김제현, 박영훈, 송정석, 박호길, 이상용: 정상한국인의 경구 당부하시험과 혈청 Insulin 농도에 대한 고찰. 당뇨병 1:33, 1972.
 6) Utiger, R.D., Parker, M.L. and W.H. Daughaday: *Studies on human growth hormone. A radio-immunoassay for human growth hormone: J. Clin. Invest.* 41:254, 1962.
 7) Hunter, W.M. and F.C. Greenwood: *A radioimmuno-electrophoretic assay for human growth hormone. Biochem. J.* 91:43, 1964.
 8) Hartog, M., Gaafar, M.A., Meisser, B. and R. Fraser: *Effect of corticosteroids on serum growth hormone: Brit. Med. J.* ii:1229, 1964.
 9) Catt, K.J., Niall, H.D. and G.W. Tregear: *Solid-*

phase radioimmunoassay of human growth hormone. Biochem. J. 100:310, 1966.
 10) Kurata, K.: *The principles and the method of the radioimmunoassay.* 大韓核醫學會雜誌 第4卷 第一號(11) 1970.
 11) Catt, K.: *Growth hormone. Lancet* 1:933, 1970.
 12) Greenwood, F.C., Hunter, W.M. and J.S. Glover: *The preparation of ¹³¹I-labelled human growth hormone of high specific activity. Biochem. J.* 89:114, 1963.
 13) Glick, S.M., Roth, J., Yallow, R.S. and S.A. Berson: *Immunoassay of human growth hormone in plasma. Nature* 199:784, 1963.
 14) Catt, K., Niall, H.D. and G.W. Tregear: *A solid phase disc radioimmunoassay for human growth hormone. J. Lab. Clin. Med.* 70:820, 1967.
 15) Greenspan, F.S., Li, C.H., Simpson, M.E. and H.M. Evans: *Bioassay of hypophyseal growth hormone: Tibia test. Endocrinology* 45:455, 1949.
 16) Read, C.H. and G.I. Bryan: *The immunological assay of human growth hormone. Rec. Prog. in Hormone Res.* 16:187 Acad. Press. (London) 1960.
 17) Morris, H.G., Arai, Y., Hlad, C.J., Tompkins, R. and H. Erlick: *Rapid quantitative immunologic assay for human growth hormone. J. Clin. Endocr.* 24:417, 1964.
 18) *Personal communication with Dr. A.E. Wilhelmi.* 1971.
 19) Greenwood, F.C., Hunter, W.M. and A. Klopper: *Assay of human growth hormone in pregnancy at parturition and in lactation: Detection of a growth hormone like substance from the plasma. Brit. Med. J.* 1:22, 1964.
 20) Josmovich, J.B. and J.A. Maclaren: *Presence in the human placenta and term serum of a highly lactogenic substance immunologically related to pituitary growth hormone. Endocrinology* 71: 209, 1962.
 21) Berson, S.A. and R.S. Yalow: *General principles of radioimmunoassay. Clin. Chim. Acta.* 22:51, 1968.
 22) Yalow, R.S. and S.A. Berson: *"General principles*

- of radioimmunoassay." *Radioisotopes in Medicine: In vitro studies (11th A.E.C. Symp in Med. Oak. Ridge. Tenn. 1967)*
- 23) Berson, S.A. and R.S. Yalow: *Immunochemical heterogeneity of parathyroid hormone. J. Clin. Endocr. 28:1037, 1968.*
- 24) Roth, J., Gorden, P. and I. Pastan: "Big insulin"; *A new component of plasma insulin detected by immunoassay. Proc. Natn. Acad. Sci. 61:138, 1968.*
- 25) Parry, D.G. and K.W. Taylor: *Secretion of newly synthesized insulin in vitro. Biochem. J. 1966. 100, 20.*
- 26) Kung, Yuen-Ting, et al.: *Total synthesis of crystalline insulin. Scientia Sinica. 15:544, 1966.*
- 27) Sragg, J., Austen, K.F. and E. Haber: *Production of antibody against bradykinin. J. Immunol. 96:865, 1966.*
- 28) Collip, P.J., Kaplan, S.A., Boyle, D.C., Shimizu, C.S.N. and S.M. Ling: *Tritium-labelled peptide hormones with high specific radioactivity Nature (London) 207:876, 1965.*
- 29) Vaitukaitis, J., Hammond, J., Ross, G., Hickman, J. and G. Ashwell: *A new method of labelling human chorionic gonadotropin for physiologic studies. J. Clin. Endocr. 32:290, 1971.*
- 30) Hughes, W.L.: *The chemistry of iodination. Ann. N.Y. Acad. Sci. 70:3, 1957.*
- 31) Probst, G.W. and R.W. Colwell: *Glucagon immunoassay by tracer displacement. Biochemistry 5: 1209, 1966.*
- 32) Hales, C.N. and P.J. Randle: *Immunoassay of insulin with insulin antibody precipitation.: Biochem. J. 88:137, 1963.*
- 33) Izzo, J.L., Bale, W.F., Izzo, M.J., et al.: *High specific activity labelling of insulin with I-131, UR-637; US. AEC. Univ. Rochester. 1:22, 1964.*
- 34) Yalow, R.S. and S.A. Berson: *Purification of I-131 parathyroid hormone with microfine granules of precipitated silica; Nature (London) 212:357, 1966.*
- 35) Frantz, A.G., Rabkin, M.T. and H. Friesen: *Effect of estrogen and sex difference on secretion of human growth hormone: J. Clin. Endocr. 15: 1136, 1965.*
- 36) Eshkol, I.: *Labelling of antigens by various isotopes. Karolinskaya symposium on radioimmunoassay of gonadotropins, Diczfalusy. E.(ed). Stockholm. 1970.*
- 37) Yalow, R.S. and S.A. Berson: "General aspects of radioimmunoassay procedures." in *In vitro procedures with radioisotopes in Medicine. I.A. E.A. Vienna. 1970.*
- 38) 신순현, 김응진: 말단비대증에 併發한 당뇨병 2例. *당뇨병 1:55, 1972.*