

シンポジウム III. in vitro test の最近の動向

S-III-1. Radioimmunoassay における放射能測定自動化への試み

小倉記念病院

松岡順之介

Radioimmunoassay による測定法が医学において大きい位置を占めてくるとともに、日常の臨床的要素も急激に増大し、その検体数も多くなり、自動化は重要な課題である。

1) 検体数については50, 100, 200検体用のものが、現在市販されているが、さらに多数検体用のものも必要になるかもしれない。前日の勤務終了時より、翌日の勤務開始まで16時間について、16時間/200検体=4.8分/検体となるが、2分測定でも差支えない。

2) Standard curveは現在 $y = \frac{c}{ax+b}$ なる双曲線をもって近似しているが、一般の臨床には利用し得るものである。しかし、電算機によりさらに高次の近似式をもったものを得るため、1例として、 $y = ax^5 + bx^4 + cx^3 + dx^2 + ex + f$ なる形の5次式について検討した。現在のところある少区域のものについては高次のものがより高い近似をもつが、それ以外の領域について大きい偏位をもった curve になる可能性もある。2~5次式の中より、最もその case に適する curve を選択し得る Program を検討中である。

3) 現在市販されている auto well counter は、1 st. count を一定にし、Standard curve の数点を manual に小型電卓に入れ、検体の測定および計算を行なわせている。我々は、1 st. count 全検体につき記憶させ、2 nd count 測定と同時に自動的に Standard curve を作製、さらに大きく外れた測定値は除去して妥当な curve と考えられるものに近似させ得る type のものを検討中であるので、これについて、報告する。

S-III-2. ラジオイムノアッセイデータの TSS 電算機処理

—Log-Logit 変換による—

東京大学 第二内科

佐々木康人 開原 成允

ラジオイムノアッセイ (RIA) の普及に伴い大量のデータを処理する必要が生じてきた。従来の手による解析では(1)長時間を要する (2)標準曲線の描き方に個人差があり誤差の原因となりうる などの問題がある。そこで各種 RIA データの電算機による解析の可能性について検討した。

検討した方式は TOSBAC 40/TSS による時分割方式のタイプライト端末を用いるものである。全体の流れは対話形式となっていて電算機の質問に答えていくと、最後に求める計算値とその標準偏差などがその場で自動的に印刷される。また測定法の違いなども自分の測定にあわせて自由に選択できる。

データの解析法はまず標準曲線を Log-Logit 変換し、各測定値のばらつきを考慮した重みづけをした上で回帰直線を求める。試料のデータはこの回帰直線に基いて計算される。

α フェトプロテイン (α -Feto.) 5回、ヒト成長ホルモン (HGH) 3回、インシュリン (Ins.) 3回の RIA 各10—20試料につき電算機による測定値と手で描いた標準曲線からえた値とを比較検討した。また α -Feto につき同一計数値を5人の検者に与えて独立に標準曲線を描いてえた試料測定値のばらつきを検討した。

標準試料とその測定値の Log, Logit 変換値は3種の RIA につきいずれもほぼ良好な直線性がみとめられた。電算機による試料測定値と手で算出した値とは極めてよい相関を示した。($r = 0.91 - 0.99$, $\bar{m} 0.97$). α -Feto 2回, HGH 3回, Ins 2回の測定について両者の値はよく一致したが α -Feto 2回, Ins 1回では標準曲線の高値と低値の部分にややずれがみられた。その原因は不明である。手による従来法の個人差は16試料につき検討したが相対標準偏差が3.1—18.1%, $\bar{m} 7.2\%$ であった。

以上の結果は本法が RIA データ処理法として実用に

供しうることを示している。さらにプログラムの改良、他種 RIA への応用の適切性の検討を続けている。

S-III-3. ステロイドホルモンの Radioimmunoassay

東京女子医科大学 内科

出村 博

ステロイドホルモンの radioimmunoassay (RIA) について以下の検討を加えた。

〔基礎的検討〕(1) Cortisol (F), Deoxycortisol (S) の抗体作製。F および S について、21-Succinate (21-Suc) および 3 (O-carboxymethyl) Oxime を合成した。それらを mixed anhydride 法によってヒト γ -globulin ($\text{h}\gamma\text{G}$) と縮合させてウサギに免疫して抗体を得た。これら抗体の特異性を調べたところ、抗 3-Oxime は抗 21-Suc に較べて必ずしも高くなかった。(2) F-21-Suc-TME- ^{131}I および T-3-O-TME- ^{131}I による血漿 F および T の RIA。F-21-Suc および Testosterone-3-Oxime (T-3-O) を mixed anhydride 法によって tyrosine methyl-ester (TME) と縮合させ、さらに chloramine T 法によって ^{131}I を標識し、これらを抗原として血漿 F および T の RIA を行なった。本法は抗原として ^3H を用いる方法に較べて簡便で安価である。(3) 血漿の抽出純化法。血漿 T や aldosterone (Ald) を column や paper chromatography なしに抽出純化する方法について検討した。本法は測定に要する時間と費用とを節減できる。次に LH-20 column を用いていくつかのホルモンを同時に分離精製して測定する方法を検討した。本法は estrogens の測定に有用である。

〔臨床的応用〕(1) F RIA による血漿 F の測定成績は蛍光比色法による血漿 11-OHCS 値と良く一致した。(2) S Metopirone 1.5 g を 9 AM に 1 回経口投与して血漿 S の反応を RIA によって調べることに、旧来の Metopirone 法よりも簡便に下垂体 ACTH の予備能を診断し得た。(3) T 正常者と各種内分泌疾患について対照時ならびに HCG や LH-RH 等を負荷した際の血漿 T 値を測定し、下垂体性腺系の病態生理を解明した。(4) P 正常者および各種内分泌疾患について、血中 progesterone (P) の動態を RIA によって測定した結果、血漿 P 値には明らかな ACTH 依存性のあることを認めた。(5) Ald 原発性アルドステロン症では高値を示

した。(6) その他のホルモン DHEA- SO_4 , DOC, E_1 , E_2 , E_3 の RIA による測定成績についても検討した。

S-III-4. ^{125}I 標識 Steroidhormone を用いた Testosterone および Cortisol の Radioimmunoassay

京都大学 第二内科

中検

第一 RI 研究所

吉見 輝也

遠藤 治郎

立花 清司

近年 ^3H 標識 Steroidhormone による Radioimmunoassay が報告されて Steroidhormone の微量測定が簡便化されたが、 β 線測定器のない施設でも測定出来るように ^{125}I 標識 Steroidhormone を作製し、これと ^3H 標識ホルモンによる測定法を比較検討した。

^{125}I 標識 Steroidhormone の作製: Testosterone の ^{125}I 標識はまず Testosterone-3 (O-carboxy methyl) Oxime-tyramide Conjugate を作り、この 5 μgr に約 1 mCi の Na^{125}I を Chloramine T で反応させ 85~99% の反応率で ^{125}I -Testosterone を製し、Chloroform で未反応の ^{125}I を除去した後 Sephad-x LH 20 column を用いて精製した。

^{125}I -Cortisol は Cortisol-21 Conjugate を用いて同様に作製した。

〔抗血清の作製〕Testosterone-3 oxime-BSA および Cortisol-21-BSA はそれぞれ Erlanger 法, mixed Anhydride 法により作り Complete freund adjuvant とともに 2 週毎 4~5 回家兎に注射して抗血清を得た。抗血清の特異性は Testosterone は dihydrotestosterone と 12.5%, Cortisol は 11 deoxycortisol と 32%, 21 deoxycortisol と 58% の交叉反応を認めたが他の血中 Steroid との間には測定値に影響する反応は認められなかった。またこれらの抗血清は非特異物質との結合も少なく、Testosterone では試料の Chromatography による精製操作も必要なく、Cortisol では methanol により CBG を不活化するだけで抽出操作とも省略することが出来た。

〔BF の分離〕分離法として Florisil, Dextrancoated charcoal 吸着法、および二抗体法を比較したが、 ^{125}I 標識 Steroidhormone は ^3H 標識物に比べ抗体との結合力が減少するため二抗体法あるいは稀釈した Dextrancoated charcoal 法により良好な Standard curve を得ることが出来た。