

《原著》

二抗体法 Radioimmunoassay における Bound percent に及ぼす諸因子について

吉 村 学* 越 智 幸 男* 八 谷 孝*
塩 見 勝 彦* 宮 崎 忠 芳* 岡 本 邦 雄**

はじめに

Radioimmunoassay (RIA) はすでに一般化して各種の assay kit が各社より発売されている。各 assay kit には測定操作法が指定され、また良好な標準曲線も例示されている。

しかし実際に assay kit を使用して標準曲線を作つてみるとその bound percent (B%) は低い場合もあり¹⁾、また必ずしも信頼できる値が得られないこともあるため²⁾、各測定者はおのれの工夫を加えねばならないこともある。このたびわれわれは市販されているダイナボット RI 研究所の成長ホルモン (HGH) 測定用キットと第一ラジオアイソトープ研究所の甲状腺刺激ホルモン (HTSH) 測定用キットを用いて被検血清による B% 低下因子の問題と二抗体法における第一抗体および第二抗体の量の問題につき検討したので報告する。

実験方法

RIA の標準曲線を作る場合にヒト血清を使用する系とヒト血清以外の bovine serum albumine (BSA)などを用いる系と比較検討した。HGH および HTSH 測定用キットは使用説明書に従つて HGH は 0.5% BSA buffer を、HTSH は 1%

BSA buffer を用いた。ヒト血清はプールした正常ヒト血清 (NHS), Skeehan 症候群で下垂体機能不全症を呈した患者血清 (PPS), dextran-coated charcoal 液 (20% charcoal と 2% dextran を含む生食水溶液) を NHS に等量加え 30 分間放置後 8000 r.p.m. で 30 分間遠心して、NHS 中の内因性の HGH および HTSH の 70% 以上を除去した血清 (DCC 処理血清)³⁾を用いた。この処理によつて血清 albumine が 10~20%程度除去されたので³⁾、ヒト albumine を加えて蛋白量を補正した。なお、DCC 処理血清の場合 NHS に等量の DCC 液を加えているため、血清量として NHS または PPS と同様にするため DCC 処理血清の量を NHS または PPS の量の倍量を加えた。

HGH の標準曲線はキット中の 0.5% BSA buffer 0.5 ml (diluent) に ¹²⁵I-HGH, HGH 第一抗体、第二抗体各 0.1 ml および標準 HGH (Wilhelmi HGH) を 0.5% BSA で倍数稀釀した液の 0.1 ml を加えたもの (説明書指定) を標準とし、0.5% BSA buffer 0.5 ml の代わりに 0.5% BSA buffer 0.4 ml と PPS 0.1 ml を混和したものの、また PPS を DCC 処理した血清 0.2 ml を 0.5% BSA buffer 0.3 ml に加えたものとを作り比較検討した。

次いで血清による B% の抑制作用の影響をみるためと、この抑制作用に及ぼす抗体の量の影響をみるために、血清を含まぬ系、血清 0.1 ml のもの、血清 0.3 ml のもの、の 3 つの系を作つた。すなわち 0.5% BSA buffer 液 0.6 ml のもの、NHS または PPS 0.1 ml または DCC 処理血清

* 京都府立医科大学 第二内科

** " 同位元素研究室

受付：48年5月

別刷請求先：京都市上京区河原町通リ広小路上ル
梶井町（〒602）

京都府立医科大学 第二内科

吉 村 学

0.2 ml と 0.5% BSA buffer 0.5 ml または 0.4 ml のもの、NHS または PPS 0.3 ml または DCC 处理血清 0.6 ml と 0.5% BSA buffer 0.3 ml のもので異なる血清容量のもとでの B% の影響を NHS, PPS および DCC 处理血清で検討した。なおすべての系において ^{125}I -HGH は 0.1 ml を加えた。第一抗体と第二抗体の量は第一抗体 0.1 ml (説明書の指示量) に第二抗体 0.1 ml または 0.2 ml の系を、また第一抗体 0.2 ml に第二抗体 0.1 ml または 0.2 ml のもの、の 4 つの異なる抗体量でもつて B% への影響をみた。

HTSH の標準曲線はキット中の 1% BSA buffer 0.5 ml のみを diluent として用いたもの、NHS または PPS 0.1 ml と 1% BSA buffer 0.4 ml を加えたもの、DCC 处理血清 0.2 ml と 1% BSA buffer 0.3 ml を加えたものを diluent として用いたものとの 4 つの標準曲線を作り検討した。

次いで補体の影響をみるために、NHS 0.1 ml を加えた標準曲線作成系に、未処理の NHS と非働化した NHS (56°C , 30 分間熱処理) 0.1 ml の標準曲線を作り比較検討した。

次いで HTSH の RIA に及ぼす血清および抗体の影響を検討した。血清による B% 低下作用の影響をみるために、HGH の RIA の場合と同様に血清を入れぬもの、NHS, PPS, を 0.1 ml 入れた場合 (DCC 处理血清では 0.2 ml), 0.3 ml 入れた場合 (DCC 处理血清では 0.6 ml) を作り、それぞれ 1% BSA buffer を全 diluent 量が 0.6 ml になるように加えた (DCC 处理血清 0.6 ml の場合のみ buffer 0.3 ml を加えた)。この場合第一抗体および第二抗体を 0.1 ml と 0.2 ml といろいろ組み変えて添加し、血清の B% への影響と、抗体量の B% に及ぼす影響について検討した。次いで第一抗体 0.1 ml と 0.2 ml の系につき HTSH の標準曲線を検討した。

成 績

1) HGH の場合。

HGH の標準曲線作成時において BSA のみの

ものと、PPS 0.1 ml (DCC 处理血清 0.2 ml) を含むものとを比較すると、PPS を含む標準曲線は PPS を含まぬ標準曲線に比べて B% が低くなり、B% を抑制する因子が PPS 中に存在していることが示唆された (図 1)。また DCC 处理によつても B% 抑制因子は完全に除去されないことがわかつた。

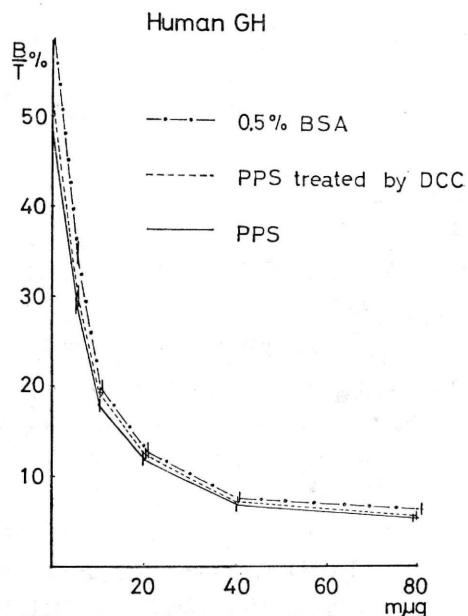


図 1 HGH の標準曲線

0.5% BSA: 0.5% BSA buffer 0.5 ml
PPS treated by DCC: DCC 处理した下垂体機能不全症患者血清 0.2 ml に buffer 0.3 ml を加えたもの。
PPS: PPS 0.1 ml に buffer 0.4 ml を加えたもの。
縦線は実測値 2 点とその平均値を示す。

血清の量と抗体の量との関係を図 2 に示した。キット説明書に記載通りの第一抗体と第二抗体を用いた assay において、血清量が増加すると HGH の B% が下降するが、この場合、HGH を含んでいない血清を用いているので、この B% の下降は血清中の何らかの抑制因子によるものと考えられる。

次に抗体の量に関しては、キットに指示された第一抗体、第二抗体の割合よりも第二抗体を多くしたもの (図 2 の中), 第一抗体を多くしたもの (図 2 の右) について検討した。第二抗体を多

くすると血清 0.1 ml における B % の低下は抑えられるが、血清 0.3 ml においては有意に B % は低下する。次に第一抗体の量を第二抗体に比し多くすると第一抗体に対する第二抗体量が不足するので、全般的に B % は低下すると考えられる。このような場合にも血清による B % 抑制効果が認められた。

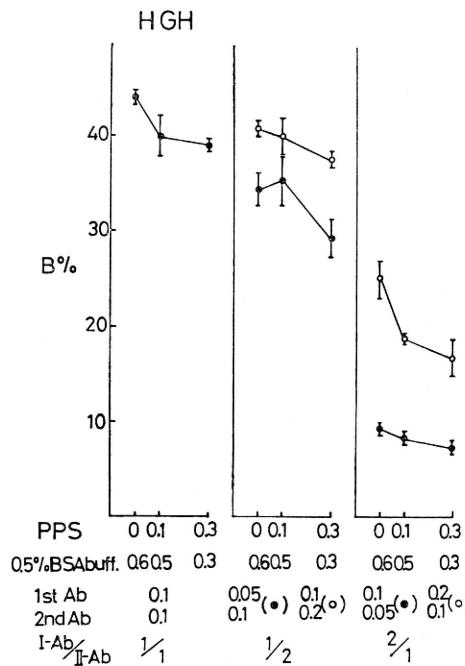


図 2 PPS を血清 0 の場合、血清量 0.1 ml または 0.3 ml のものを作り、第一抗体および第二抗体量を変えて、RIA を行つた時の B % を示す。各値は実測値 2 点とその平均値を示す。

Ab: Antibody

2) HTSH の場合。

HTSH の標準曲線作成においても血清を含む標準曲線は、1% BSA buffer のみの標準曲線に比べて低い B % を示し、DCC 处理血清、PPS、NHS の順に B % は低くなる(図 3)。NHS と PPS の差は TSH の含有量による差と推定されるが、PPS と DCC の差は血清中の抑制因子が DCC 处理で多少除去されたとも推定される。

未処理の NHS と 56°C 30 分非処理した NHS を 1% BSA buffer に加えた 2 つの標準曲線系を

図 4 に示した。双方の曲線は差異を認めぬため補体は B % の抑制因子として働いていないことがわかる。

HTSH Standard curve using four different diluents

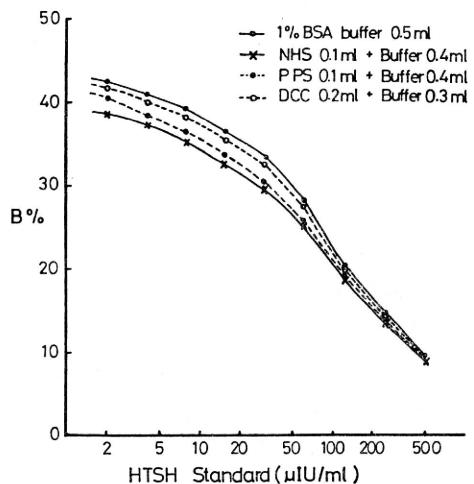


図 3 HTSH の標準曲線。1% BSA buffer のみを diluent として用いたもの、NHS, PPS および DCC 处理 NHS を血清量として 0.1 ml 加えたものの標準曲線を示す。

HTSH Standard curve

Effect of heat treatment 56°C, 30min

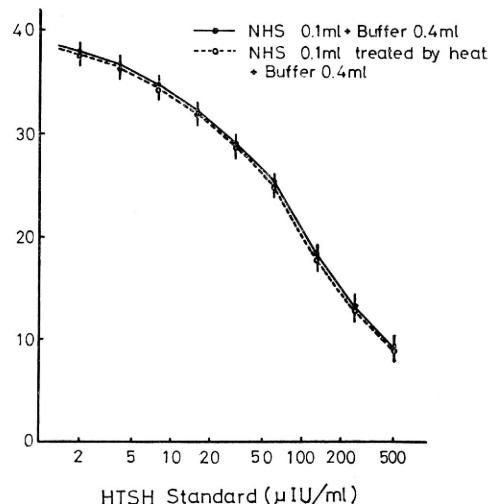


図 4 NHS を 56°C 30 分の熱処理した場合と未処理時に HTSH の RIA 系に加えて描いた標準曲線。縦線は実測値とその平均値を示す。

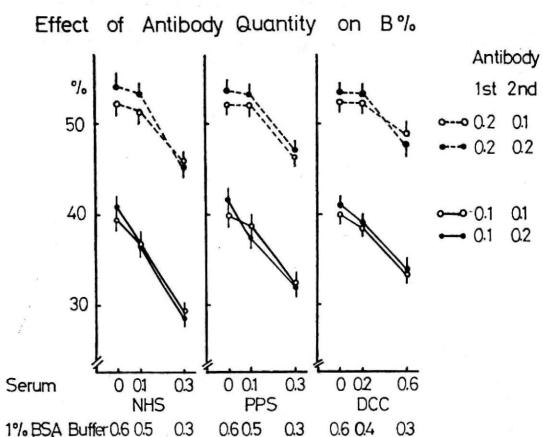


図 5 NHS, PPS および DCC 処理 NHS (DCC) を図のごとく血清 0 の場合、血清量 0.1 ml または 0.3 ml の場合 (DCC 処理 NHS は倍量となる) を作り、HTSH の RIA を行つた。第一抗体および第二抗体は図右に示すごとく種々組み変えた。縦線は実測値 2 点とその平均値を示す。

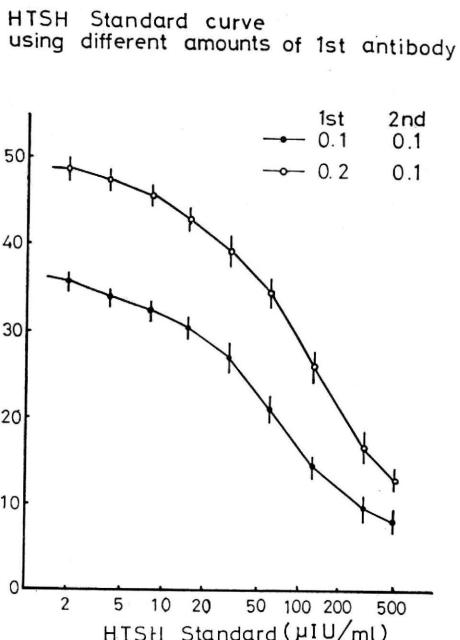


図 6 第一抗体 0.1 ml 加えた場合と、0.2 ml の場合との HTSH における RIA の標準曲線を示す。縦線は実測値 2 点とその平均値を示す。

血清の量と抗体の量との関係について NHS, PPS および DCC 処理血清について検討した(図 5)。血清のない系に比べて血清を添加した系の B% は下降の傾向を示すが、第一抗体をキット指示量の 2 倍 (0.2 ml) 加えた系では血清 0.1 ml (DCC 処理血清では 0.2 ml) における B% の下降を防ぐことができた。しかし血清 0.3 ml (DCC 処理血清では 0.6 ml) ではすべての系で B% は下降した。同一キットの第一抗体、第二抗体を用いて第一抗体量を 0.1 ml または 0.2 ml とし、第二抗体を同一にした標準曲線を図 6 に示した。第一抗体 0.1 ml (キット指示量) に比べて 0.2 ml にした方が標準曲線の B% が大であつたが、感度には著変はなかつた。

考 案

二抗体法を利用する peptide hormone の RIA では標識ホルモンと第一および第二抗体の性状ならびに量がその測定系において大きな因子となつてゐる。抗体に関しては抗体価の適否が RIA ではもつとも大切である。一般に抗体濃度が高いと B% が高いが、標準曲線の傾斜がゆるやかで、逆に抗体濃度が低いと B% は低いが、標準曲線の傾斜が強くなり感度は上昇する。ゆえに適當な濃度が大切であるとされている。このほか血清中に含まれる B% 抑制因子もあるとされており、この因子と用いる抗体濃度によって色々と影響を受けると推定される。前述のごとく血清のない系と、血清添加した系では B% に差違があり、この血清による non-specific inhibition といわれる現象は DCC 処理血清でも認められた。文献的にはこの non-specific inhibition は第一反応よりも第二反応に関与するものであるという報告もある⁴⁾。また補体がこの inhibition に関与すると報告されているが⁵⁾、前述のごとく補体を非働化しても差違を認めなかつた。これに対して第二抗体の量をじゅうぶんに入れるところのような抑制が起こらないという報告があり、この抑制はヒト血清中の γ -globulin と動物との間の交叉反応によるものとも考えられている⁶⁾。しかしモルモット (HGH の第一

抗体) やウサギ(HTSH の第一抗体)の γ -globulin に対する抗体をヤギに作った場合にはヒト γ -globulin とは通常沈降抗体は認められないので、もし交叉反応があつても僅微で、このような B% 抑制因子となるとは推定しがたい。

われわれの HGH キットを用いた実験においては、第二抗体を増すことにより B% の下降がある程度防ぐことは可能であるが、血清量が増えると B% は下降する。しかし第一抗体量を増した場合は B% の下降をおさえる効果は認められなかつた。

しかし HTSH キットを用いた実験において、第一抗体を增量すると血清による B% の抑制を防ぎえることを認めたが、これは HTSH の第一抗体の力価がじゅうぶんでないことを示しているのではないかとも推定される。なぜならば第一抗体の力価が弱い場合は第二抗体量をふやしても血清による B% の下降を防ぎえなかつた。以上より第二抗体だけでなく第一抗体の力価は標準曲線作成上においても、また血清による B% 抑制効果を防ぐ面からも大切であると考えられる。なお、HTSH の抗体の力価に関しては各キットで異なるものと考えられ、図 3～図 6 の成績は 1973 年 3 月に購入したキットによるもので、1973 年 5 月に購入したキットでは上記のごとき第一抗体の低力価を思わず所見は改善されていた。

以上要するに血清中に B% を抑制する因子がある以上、RIA の場合には被検血清と同量の HFS (Hormone Free Serum) を用いて標準曲線を描くべきで、被検血清を多量用いたときには血清中の B% 抑制因子により B% が低下し、測定されるホルモンの値が真の値より高値に測定される可能性がある。また標準曲線の diluent として BSA が繁用されているが、これを用いると被検血清中

の測定ホルモン量は高い目に出るので、これも正確な測定値が得られない因子の 1 つとも推定される。以上二抗体法による RIA 法に関する諸因子について改良されるべき諸点を述べた。

結 語

二抗体法 RIA における diluent と抗体の問題につき論じた。市販されている HGH や HTSH-RIA キットは BSA を diluent として標準曲線を描くよう企画されているが、検体として血清を用いる場合血清中の bound % 抑制因子により、実在するホルモン量以上の bound % の低下をきたす。このため抗体の量をいろいろと変えてみると抗体の量が関与することがわかつた。第二抗体を增量すると B% の下降は防げるが、この場合第一抗体量が適正であることが必要であるという結論を得た。また市販キットの RIA では、標準曲線作成系に HFS を血清検体量と同量加えることが正確なホルモン量を知る上で必要であると考えられる。

文 献

- 1) 梅津幹夫, 藤生英夫, 諏訪城三: 日内分泌誌, 49: 509, (1973).
- 2) 吉村 学, 八谷 孝, 塩見勝彦, 宮崎忠芳, 越智幸男: 第16回甲状腺研究同好会抄録, (1973).
- 3) Ochi, Y., K. Shiomi, T. Hachiya, M. Yoshimura and T. Miyazaki: Endocrinol. Japan, 20: 1, (1973).
- 4) 対馬敏夫: Radioimmunoassay, 142, 朝倉書店, 東京 (1970).
- 5) Morgan, C. R., R. L. Sorensen and A. Lazarow: Diabetes, 13: 579, (1964).
- 6) Kuzuya, T. and E. Samols: Metabolism, 13: 493, (1964).

Summary

Non-specific inhibition of serum for bound percent in double antibody radioimmunoassay

Manabu YOSHIMURA, Yukio OCHI, Takashi HACHIYA, Katsuhiko SHIOMI,
Tadayoshi MIYAZAKI and Kunio OKAMOTO

2nd Department of Internal Medicine, Kyoto Prefectural University
of Medicine, and Radioisotope Laboratory

By the development of radioimmunoassay (RIA) procedure, the assay procedure is established for clinical uses, and commercial Kits for HGH and HTSH RIA (double antibody method) have been supplied from Dainabot RI laboratory and Daiichi RI laboratory. Even following the instructions manual precisely, it is very hard to get the exact values of each hormones, because the standard curve of each hormones were constructed using BSA (bovine serum albumin) buffer solution instead of diluent consisting of hormone free serum.

In the present study, the effect of various human serum on the standard curve of HGH and HTSH RIA was analysed using pooled human serum as normal human serum (NHS), serum from the patient of panhypopituitarism (PPS) and the serum removed its hormone by dextran-coated charcoal (DCC) solution (20% charcoal and 2% dextran in saline). In figuring the standard curve of HGH and HTSH RIA, the bound percent (B%) of the standard curve using 0.5% BSA buffer solution (for HGH) or 1% BSA buffer solution (for HTSH) was higher than the B% of assay system containing with PPS, PPS treated with DCC, NHS and NHS treated with DCC. The above finding indicated that some factor to inhibit B% nonspecifically existed in serum, that the inhibiting factor of B% could not removed by DCC, and that the

hormone free serum (HFS) is necessary for figuring the standard curve of RIA.

In analysing the factor to inhibit B% in serum, the standard curves of HTSH with NHS or with NHS removed the complement by heat treatment with 56°C for 30 min was figured identically and it was found that complement did not act on inhibiting factor for B%. Regarding the amount of first antibody (antisera for HGH or HTSH) and of second antibody (anti-rabbit γ -globulin goat serum), different amounts of antibody, such as first antibody rich or second antibody rich, were given the three different assay system of serum free system, serum 0.1 ml and serum 0.3 ml using NHS, PPS and NHS treated with DCC. In this study it was found that B% in system containing serum was lower than that without serum. The B% in serum 0.3 ml was much lower than that in serum 0.1 ml. By applying larger amount of 2nd antibody than the amount of instruction manual, it is possible to prohibit the decrease of B% inducing by serum 0.1 ml. However it is impossible to prohibit the decrease of B% in serum 0.3 ml. On the contrary, the amount of 1st antibody is also important to prohibit the decrease of B% in serum and both antibodies in optimal amounts are necessary to get the better result. From these results, it is very important to use hormone free serum as diluent for double antibody RIA.