

《使用経験》

RCC-HPL Immunoassay Kit の検討

谷 沢 修* 山 地 建 二* 久 靖 男* 小 林 弥 仁*
三 宅 侃* 衣 笠 隆 之* 角 田 真 紀 子* 倉 智 敬 一*

I. 緒 言

Human Placental Lactogen : HPL (Human chorionic somatomammotropin ; HCS) は妊娠時に胎盤で産生，分泌され，特に妊娠後半期において母体血中に高濃度に存在することが知られている。

すでに母体血中 HPL の測定は胎盤機能検査として有用なことが Spellacy ら (1967)¹⁾，Sciarra ら (1968)²⁾ により報告された。著者らも (1970)³⁾ 自ら調製した HPL-radioimmunoassay 系を用い妊婦血中 HPL 動態などにつき報告を行ってきたが，今回 The Radiochemical Center(RCC)製の HPL-Immunoassay Kit の提供を受けたので基礎的，臨床的に検討した成績を報告する。

II. 測定方法および対象

1. 測定試薬

RCC HPL-Immunoassay Kit を使用した。本 Kit 中の試薬はすべて凍結乾燥されており入手後 2 カ月以内に使用した。

① ¹²⁵I 標識 HPL ; 約 10 μ Ci の ¹²⁵I-HPL 凍結乾燥品 (150 mg の Sodium Barbitone を含む) ; 1 バイアル，② 抗 HPL 家兎血清 ; 1 バイアル，③ HPL 標準品 ; 約 1, 3, 6, 10 μ g/ml (正確な数値は各バイアルに標示されている。) ; 4 バイアル

Table 1 Preparation of kit reagents.

Reagent	Volume of distilled water	Resulting preparation
¹²⁵ I-HPL	30 ml	¹²⁵ I-HPL solution
Anti-HPL	10 ml	Anti-HPL concentrate
HPL free serum	5 ml	HPL free serum
Buffer	30 ml	Buffer solution, pH7.4
4 standard HPL sera	500 μ l each	4HPL standards in serum (exact concentrations stated on bottles)

ル，④ HPL 非含有の血清 ; 1 バイアル，5) 緩衝液作製用試薬 ; 1 バイアルから構成された Kit は使用時まで 2~4°C に保存した。

2. 測定操作

本測定 Kit は抗 HPL 血清濃度と反応時間を変えることで，測定感度を 3 段階に調整されている。すなわち range A, B, C の順に高・中・低濃度測定用に用いられる。各試薬は従ってまず蒸留水で溶解したのち抗 HPL 血清，標準 HPL については各 range 別に後述の濃度に調製する。

1) 測定試薬の調製

Kit バイアル中の各凍結乾燥品は Table 1 に示した量の蒸留水で再溶解し溶液とする。バイアルにはゴムキャップを通して注射器で指定の蒸留水を注入攪拌し壁に付着した粉末をよく溶解する。標準 HPL バイアルは栓を取り外し 0.5ml の蒸留水を加え調製する。

2) 測定手技

《range A》

a) 試薬 ; i) 抗 HPL 血清は原液を 1 : 2 に蒸留水で希釈する。ii) 標準 HPL は原液 (1~10 μ g/

* 大阪大学医学部産婦人科学教室

受付 : 50 年 8 月 28 日

採用 : 50 年 12 月 4 日

別刷請求先 : 大阪市福島区福島 1 丁目 (〒553)

大阪大学付属病院産婦人科

谷 沢 修

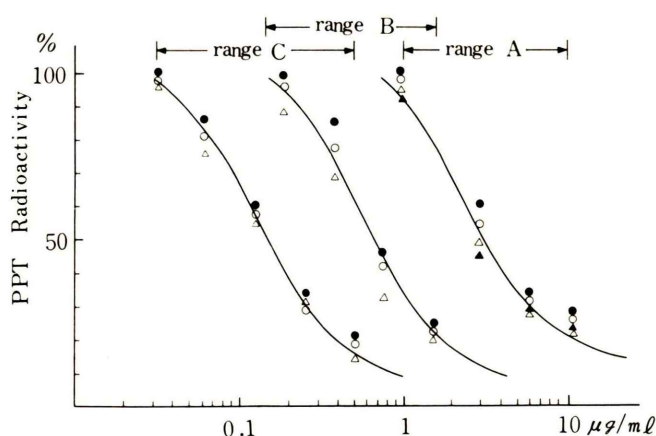


Fig. 1 Standard curves obtained with the RCC-HPL Kit.

ml) をそのまま使用する。

b) 定量法；測定はすべて duplicate して行った。i) No. 1～10 の試験管に HPL 非含有血清から始まり 4 水準の上記標準 HPL 50 μ l ずつ各 2 本宛入れる。操作はエツペンドルフ・パイペットを用いる。ii) No. 11 以下の試験管に被検血清を 50 μ l ずつ分注する。iii) 全試験管に 125 I-HPL 500 μ l ずつ分注し十分にボルテックス・ミキサーで攪拌する。iv) 次に抗 HPL 血清を全試験管に 500 μ l ずつ分注し十分に混合する。v) 室温に 30 分間置いたのち純エタノール 2.0 ml を全試験管に加える。vi) 施栓し 2～3 回反転し内容を十分に混合したのち 3000 rpm 5 分間遠心分離を行い、上清を傾斜し、ろ紙の上に試験管を倒立して残った水滴を除く。vii) Well type Scintillation Counter で放射能を計測する。viii) 結果の計算はグラフ用紙の横軸に標準 HPL 量を取り、縦軸に沈渣の放射能カウントまたは HPL 非含有血清を加えた試験管 (No. 1～2) の沈渣の放射能を 100% としたときの各試験管の沈渣の放射能% 値をとって標準曲線を作製し、被検血清におけるそれぞれの値を標準曲線から読みとった。

《range B》

a) 試薬；i) 抗 HPL 血清は原液を 1：10 に緩衝液で希釈する。ii) 標準 HPL は HPL 非含有血

清を 200 μ l ずつ 4 本の試験管に入れ 3 μ g/ml HPL 標準液を 200 μ l とり最初の試験管に加え順次倍数希釈する。1.5, 0.75, 0.375, 1.1875 μ g/ml の 4 段階標準液を用いる。

b) 定量法；i) No. 1～10 の試験管に HPL 非含有血清から始まり 4 水準の上記標準 HPL 50 μ l ずつ各 2 本宛入れる。ii) No. 11 以下の試験管に各被血清 50 μ l を入れる。iii) 抗 HPL 血清を 500 μ l ずつ全試験管に加え攪拌後室温に 1 時間置く。iv) 全試験管に 125 I-HPL 500 μ l ずつ分注し十分に攪拌する。v) 室温にさらに 1 時間置いたのち純エタノール 2.0 ml を加える。

vi) 施栓し 2～3 回反転し、内容を十分に混合したのち 3000 rpm 5 分間遠心分離を行い、上清を傾斜し濾紙上に試験管を倒立して残った水滴を除く。vii) Well type Scintillation Counter で放射能を計測する。viii) 結果の計算は range A と同様に行なう。

《range C》

a) 試薬；i) 抗 HPL 血清は原液を 1：45 に緩衝液で希釈する。ii) 標準 HPL は HPL 非含有血清を 200 μ l を 5 本の試験管に入れ、1 μ g/ml HPL 標準液 200 μ l をとり最初の試験管に加え順次倍数希釈する。0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125 μ g/ml の 5 段階標準液を用いる。

b) 定量法；上記試薬を用い range B と全く同様の方法で行う。

3. 測定対象

妊娠各時期の正常妊婦 162 検体、糖尿病合併妊婦 3 例、妊娠中毒症妊婦 6 例、S.F.D. 分娩例 1 例、切迫早産 2 例、双胎 1 例、無脳児 1 例、胎状奇胎 4 例、絨毛上皮腫 9 例、流産徴候を示した 43 例（流産におわった 18 例および妊娠継続例 25 例）について検査を行った。採血後ただちに血清を分離したのち測定まで -20°C に凍結保存した。

4. 他種の市販 HPL-RIA Kit

同一血清試料について他種の市販 HPL-RIA Kit による測定値と比較する目的で HCS Kit

Wellcome を使用した。

Ⅲ. 測定成績

1. 測定法の基礎的検討

1) 標準曲線

Fig. 1 に range A で 4 回, range B, C で各 3 回の異なる測定時における標準 HPL によるプロットを示した。(同一測定時のものをそれぞれ同じ記号であらわした) range A では $1.0 \sim 10.0 \mu\text{g/ml}$, range B では $0.15 \sim 1.5 \mu\text{g/ml}$, range C では $0.03 \sim 0.5 \mu\text{g/ml}$ の範囲で Sigmoid curve が画かれた。したがって実際の測定にあたっては妊娠 22~40 週は range A で, 11~21 週は range B で, 10 週以前は range C で主として測定することとした。

2) 測定値の再現性

range A, B, C に入る血清試料をそれぞれ 5 例ずつを選び試験管に分注し, 同一測定内および異なる測定間における偏異係数 (coefficient of variation) を算出した。

a) 同一測定内における偏異係数; range A で平均値 $7.8(5.4 \sim 10.3)\%$, range B で $6.3(4.6 \sim 7.8)\%$, range C で $8.1(5.6 \sim 12.2)\%$ であった。

b) 異なる測定間における偏異係数; range A で $11.7(3.3 \sim 16.1)\%$, range B で $15.0(9.8 \sim 19.5)\%$, range C で $17.6(12.8 \sim 21.1)\%$ であった。

2. 正常妊婦の血清中 HPL 値

正常妊娠各時間の血清 162 検体を測定した結果を Fig. 2 に示した。妊娠 6 週の 3 検体, 妊娠 8 週の 2 検体が $0.03 \mu\text{g/ml}$ の感度以下となった他はすべて測定域に入った。妊娠 5 カ月までは月別 (前記測定不能の 5 検体を除く) に, 妊娠 6 カ月以後は 2 週毎に平均値と標準偏差 (S.D.) を算出したのが Table 2 である。平均値では妊娠 9 カ月に $6 \mu\text{g/ml}$ 以上の最高値を示し, 10 カ月後半でやや下降傾向がみられた。

3. 合併症妊婦あるいは異常妊娠時における血

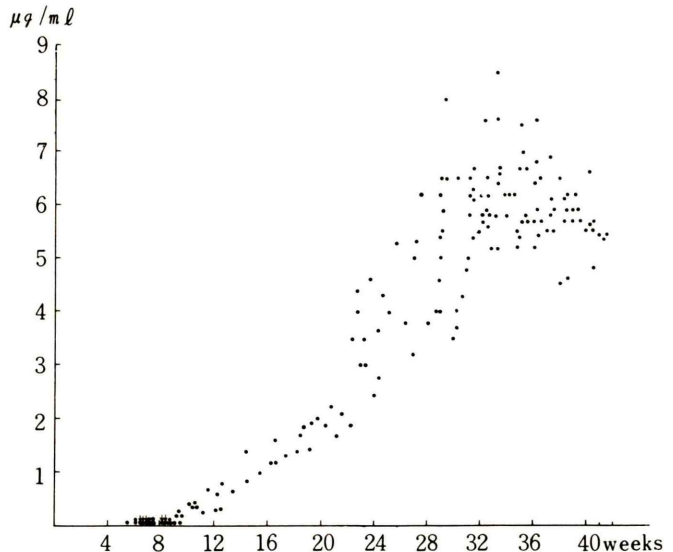


Fig. 2 HPL levels in 162 serum samples from women with normal pregnancies.

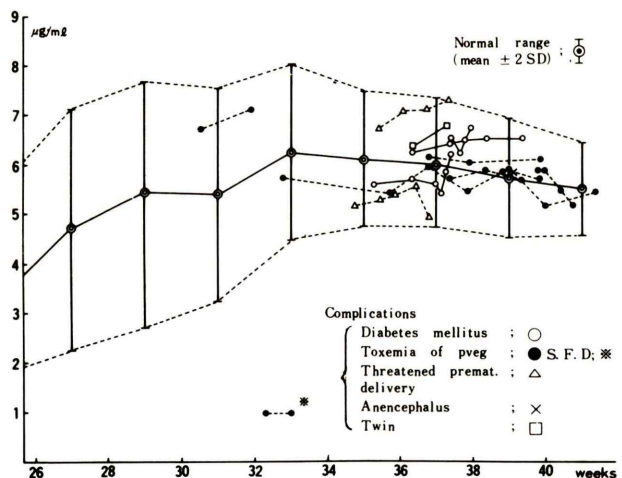


Fig. 3 Serum HPL levels in complicated pregnancies.

血清 HPL 値

1) 妊娠後半期

先に述べた種々な合併症妊婦の HPL 測定値を, 正常妊婦の正常値 $\pm 2 \text{ S.D.}$ と比較し記載したのが Fig. 3 である。SFD の症例を除けばすべて 2 S.D. の範囲内であり妊娠中毒症, 切迫早産例でやや低下傾向を示す例もあったが児には異常を認めなか

Table 2 Average levels of serum HPL throughout normal pregnancies

Gestation		n	m±SD (μg/ml)	Gestation		n	m±SD (μg/ml)
Mo	Wk			Mo	Wk		
II	4~7	8	0.04±0.01	VIII	28~29	12	5.45±1.25
III	8~11	14	0.23±0.19		30~31	14	5.40±1.10
IV	12~15	8	0.72±0.36	IX	32~33	18	6.26±0.88
V	16~19	10	1.55±0.30		34~35	14	6.11±0.66
VI	20~21	4	1.99±0.24	X	36~37	15	6.06±0.66
	22~23	8	3.48±0.87		38~39	12	5.74±0.60
VII	24~25	6	3.75±1.03	XI	40~41	9	5.52±0.47
	26~27	5	4.70±1.20				

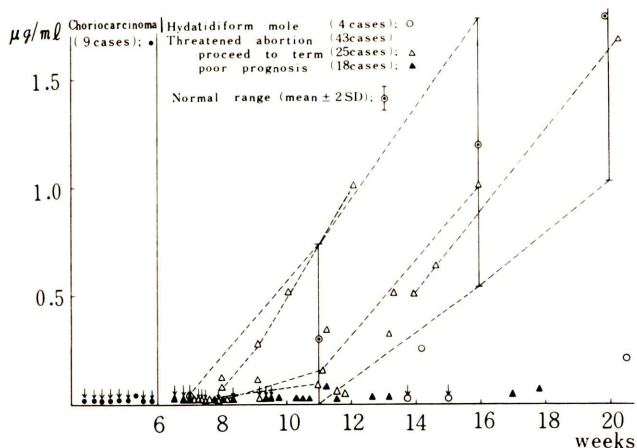


Fig. 4 Serum HPL levels in abnormal pregnancies

った。

2) 妊娠前半期

絨毛性疾患および流産徴候例の HPL 測定値を同時期の正常妊娠例の正常値と比較した成績を Fig. 4 に示した。胞状奇胎・絨毛上皮腫例は全例低値を示し、特に後者では 1 例を除き測定感度以下の値を示した。流産徴候を示した症例中の流産例は全例 0.03 μg/ml あるいは測定感度以下を示したが、妊娠継続例は妊娠 11 週以後において上昇し、全例正常妊娠例の平均値 ± 2 S.D. の範囲内の

値を示した。

4. 異なる HPL-RIA Kit による測定値との相関

上記の血清試料中 67 例について Wellcome 社の Kit による測定値を縦軸にとりプロットしたのが Fig. 5 である。その間の相関係数は $r=0.92$ 、回帰直線は $Y=1.23X+0.3$ であった。

N. 考 案

1) 測定法

本試薬は ^{125}I -HPL、抗血清、標準 HPL などすべて凍結乾燥してバイアルに封入されており、約 2 カ月にわたる保存後における使用の際にも安定した反応性を示した。

B・F の分離にはエタノール沈澱法を用いているためセットアップより反応終了までに要する時間は range A で 30 分間、range B, C で 2 時間であり、従来の二抗体法の数日間を要するのに比較し短縮された。したがって本法ではその日のうちに結果が出る点、臨床検査として更に有用性を高めたといえる。妊娠時の血清中 HPL はその時期によって 100 倍以上の濃度差を有するためこれまでの市販測定 Kit では 1 μg/ml 以上の高濃度域に測定範囲が限られ 1 μg/ml 以下の低濃度域すなわ

ち妊娠初期の血清中 HPL 測定が不可能なものが殆んどであった。本 Kit では抗血清濃度とインキュベーション時間を変えることで A, B, C の 3 range において分離測定し 0.03~10.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の広い範囲での測定が可能となった。しかし殆んどの場合は range A および C で測定できるので range B の必要性は少なかった。測定手技は非常に簡単で、エタノール添加後の沈澱も分離が容易であり、実際にそれぞれの range で同一血清試料を用いて行った intra および inter-assay 時の偏異係数(%)は intra よりも inter-assay で、また A, B, C の順にやや大きい値を示したが平均値はすべて 20% 以下であり臨床検査として充分満足できる値を得た。

2) 血清中 HPL 測定値

HPL は胎盤の Syncytium 細胞が産生し⁴⁾ 母体側に向かって分泌⁵⁾ される蛋白性ホルモンであり、妊娠後半に母体血中に高濃度に存在することが知られている。日内変動は無く、ストレスや代謝による変化が少ない上に血中からの半減期が約 20 分であり⁶⁾、従って半減期が約 24 時間かかる HCG と比較して血中 HPL 濃度の測定は胎盤機能をより迅速に反映するので臨床的により有用とする報告もみられる。

正常妊婦血中 HPL 濃度は現在国際標準品がないので、使用した標準品が異なるとその絶対値は多少異なってくる。しかし何れの報告^{6), 7), 8)} でも妊娠後半に上昇するパターンは一致している。

今回著者らの測定値も妊娠 5 カ月より 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上となり妊娠後半に更に上昇を続ける点これまでの諸家の報告とよく一致した。ただ妊娠末期において 36~38 週で最高値を示しその後やや下降するという説と plateau であるとの 2 説があるが、著者らの成績では妊娠 9 カ月から 10 カ月前半に最高値 (6 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を示したのちやや下降傾向を示した。

妊娠 6~9 カ月で血中 HPL レベルは胎盤機能検査として診断的意義のあることが Letchworth, Chard ら⁹⁾ により報告され、4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の値が

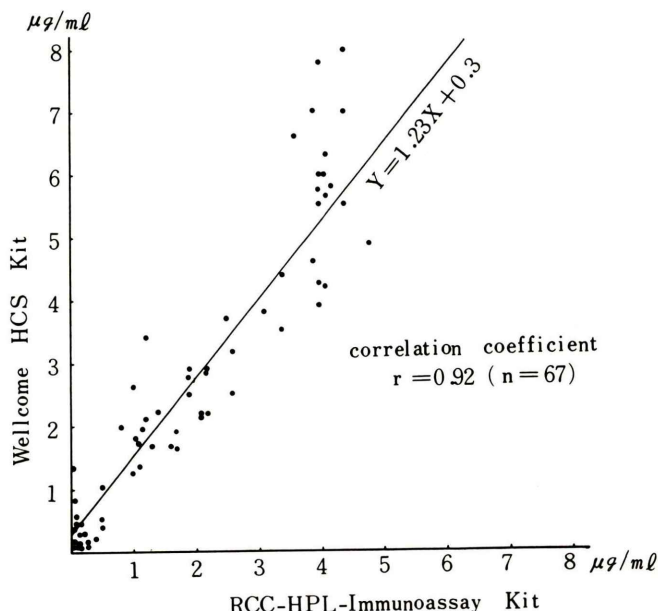


Fig. 5 Serum HPL levels with normal pregnancies as determined by the RCC-HPL kit and Wellcome HCS kit.

3 回連続すると胎児が障害される確率の高いことを述べている。また Spellacy ら⁶⁾ は HPL 測定値に FD zone (fetal distress) をもうけた。すなわち妊娠 30 週以後 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の測定域を想定し、high risk pregnancy (Rh 不適合妊娠、糖尿病合併妊婦、妊娠中毒症など) の多数例の測定値がこの FD zone に入る率を算定した結果、mild toxemia で 12.0%, severe toxemia で 34.4% が入ったとしている。著者らの成績でも 31 週以後では平均値 $-2\text{SD} > 4 \mu\text{g}/\text{ml}$ となり、この時期以後において 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の値をとることは異常であることを示唆しているが、今回の検討では症例数も少く殆んどが正常域の値を示したが、FD zone に入った 1 例は妊娠中毒症で SFD の児を分娩した症例であった。Chard らも指摘しているように妊娠後期の血中 HPL 濃度は正常例でもかなりの個体差があるので FD zone に入るような極端な低値を示すものは別とし、1 回の測定値により臨床的な意義を見出すことは困難である。従って各症例を経時的に測定し、その下降傾向を認めた場合

に胎盤機能の低下と判定する方がより合理的であろう。

妊娠初期の血中 HPL 濃度は低値であるが、range C を用いて測定を行ったところ、妊娠11週以後において平均値 $-2SD$ が $0.03 \mu\text{g/ml}$ の測定感度以上となった。そこで異常例として胎状奇胎・絨毛上皮腫例について測定を行ったところ全例低値を示した。従って絨毛性疾患において HCG のかわりに HPL でモニターするためには感度の高い測定法が必要となろう。

流産徴候を示した症例について予後の良好な例と流産に終わった例を比較すると妊娠11週以後において前者は上昇するのに反し後者では全例が平均値 $-2SD$ 以下の値を示したので、Chard らの報告^{10), 11)}と同様切迫流産の予後判定に役立つことを明らかにした。

同一血清試料について Wellcome 社の HCS-RIA Kit による測定値との比較成績では相関係数 $r=0.92$ と高い正の相関を示し、その測定値も近似した値を示した。

結 語

妊婦血清中 HPL レベルを正常ならびに種々な症例について RCC 製 HPL Immunoassay Kit により測定した。(1)本 Kit は測定手技は簡単で所要時間も比較的短時間である上に測定領域が $0.03 \sim 10.0 \mu\text{g/ml}$ と低濃度から高濃度まで可能な点が秀れている。(2)正常妊婦の各時期における平均値 $\pm 2SD$ の値から、妊娠31週以後において $4 \mu\text{g/ml}$ 以下を示せば異常と考えられるが、かなりの個人差を認めるので胎盤機能の判定には経時的観察の

必要なことを知った。(3)妊娠初期の血清中 HPL レベルは低値を示すが、本 Kit の range C で測定可能であり特に妊娠11週以後では平均値 $-2SD$ 値も $0.03 \mu\text{g/ml}$ 以上の値を示し流産例の予後判定に役立った。(4)絨毛性疾患では何れも低値を示した。(5)Wellcome 社の HCS-RIA Kit による同時測定の結果、両法による測定値は高い正の相関 ($r=0.92$) を示した。以上の結果から本 Kit は HPL 測定法として臨床応用性の広い方法と考える。

稿を終るにのぞみ RCC-HPL Immunoassay Kit を提供された科研化学に感謝する。

本論文の要旨は第50回近畿産婦人科学会および第14回日本核医学会総会において発表した。

文 献

- 1) Spellacy WN, et al: Am J Obst & Gynec 97: 560, 1967
- 2) Sciarra J J, et al: Am J Obst & Gynec, 101: 413, 1968
- 3) 谷沢修: 第22回日産婦総会宿題報告要旨, p. 49, 1970
- 4) Sciarra J J, et al: Nature, 199: 1005, 1963
- 5) Kaplan S L, et al: J Clin Endocr 24: 80, 1964
- 6) Teoh E S, Spellacy W N, et al: J Obst, Gynec. Brit Cwlth, 78: 673, 1971
- 7) Genazzani A R, et al: J Obst Gynec Brit Cwlth 78: 577, 1971
- 8) Letchworth A T, Chard T, et al: J Obst Gynec Brit Cwlth, 78: 542, 1971
- 9) Letchworth A T, Chard, T: Lancet, 1: 704, 1972
- 10) Niven, P A R, Chard, T, et al: Brit Med J, 30: 799, 1972
- 11) Gartside M W, et al: Brit J Obst & Gynec 82: 303, 1975