

《使用経験》

ガストリンの radioimmunoassay に関する検討 —Dextran-coated charcoal 法と Polyethylene glycol 法の比較—

松 岡 徹* 福 地 稔** 南 本 正 篤**
尾 上 公 一** 木 戸 亮* 永 井 清 保*

I. はじめに

ガストリンの radioimmunoassay (以下 RIA と略す) は、1968 年 McGuigan^{1), 2)} が抗ガストリン抗体の作製に成功したことを端緒として、その後 McGuigan ら³⁾ や Yalow ら⁴⁾ によりその確立が報告された。ところがガストリンは分子量が比較的小小さく、RIA に供しうる良好な抗体を作製することが困難であったため、ガストリンの RIA が一般的に普及するには至らなかった。最近わが国においてガストリンの RIA キットが開発され、臨床的に応用されつつある^{5), 6)}。著者らもすでに、このキットにつき基礎的検討をおこない、十分臨床応用が可能であることを確かめ報告した^{7), 8)}。今回著者らはガストリン RIA の抗体結合型(bound, 以下 B と略す) と遊離型(free, 以下 F と略す) の分離法として、Dextran-coated charcoal(以下 DC と略す) 法と Polyethylene glycol (以下 PEG と略す) 法を用い、両者の比較をおこなったので、その成績につき報告する。

II. 材料及び方法

1) 材 料

* 兵庫医科大学第二内科
** 同 RI センター診療部
受付: 50 年 12 月 8 日
採用: 51 年 3 月 11 日
別刷請求先: 西宮市武庫川町 1-1 (〒663)
兵庫医科大学第二内科
松 岡 徹

RIA の材料はダイナボット RI 研究所より提供されたものを用いた。特異性の検討には、tetragastrin (日本化薬), pentagastrin (住友化学), cholecystokinin-pancreozymin (以下 CCK-PZ と略す—The Boots, Co.) および secretin (The Boots, Co.) を用いた。

2) ガストリン RIA の方法

① DC 法

0~800 pg/ml の濃度に調整した標準ガストリンまたは血清試料 0.1 ml に、¹²⁵I 標識ガストリンおよび抗ガストリン家兎血清を各 0.1 ml 加え、標準曲線用の tube には蛋白濃度を補正するため gastrin-free serum 0.1 ml を加え、さらに 0.02M barbital buffer, PH 8.0 (0.2% egg albumin 含有) にて全量 0.5 ml として 4°C にて 24 時間 incubate した。B・F 分離に際しては、あらかじめ 4°C としておいた DC 液 1.0 ml を加えて攪拌後 4°C にて 15 分間放置、その後 4°C にて 3,000 rpm 15 分間遠沈した。上清を吸引除去した後、charcoal に吸着した F の放射活性を測定した。

② PEG 法

0~800 pg/ml の濃度の標準ガストリンまたは血清試料 0.1 ml に、¹²⁵I 標識ガストリンおよび抗ガストリン家兎血清各 0.1 ml を加え、全量 0.3 ml にて 25°C の室温で 2 時間 incubate した。B・F 分離に際しては、25% PEG 液 1.0 ml を加え攪拌後室温で 3,000 rpm 15 分間遠沈した。上清を吸引除去した後、沈降物中に含まれる B の放射活性を測定した。

III. 成 績

1) incubation 条件の検討

① DC 法における incubation 時間の検討

DC 法の assay に際して、 4°C における incubation 時間を 10, 24, 48, 72 時間と種々変えた時の標準曲線につき検討した。Fig. 1 に示したごとく、10 時間の incubation ではガストリン濃度 0 における総放射活性 (total count, 以下 T と略す) に対する F の割合、すなわち F/T (%) が 47.8% で、ガストリン量の増加とともに標準曲線は比較的ゆるやかな勾配を示した。これに対し 24, 48, 72 時間の incubation ではガストリン濃度 0 における F/T (%) はそれぞれ 42.2, 39.1, 37.5% と低下傾向を示し、さらにその標準曲線は急峻な勾配を呈した。ところがこれら 3 者の標準曲線には明らかな差はない、従って incubation 時間はこれらのうちで最も短かい 24 時間が適当との結果であった。

② PEG 法における incubation 温度および時間の検討

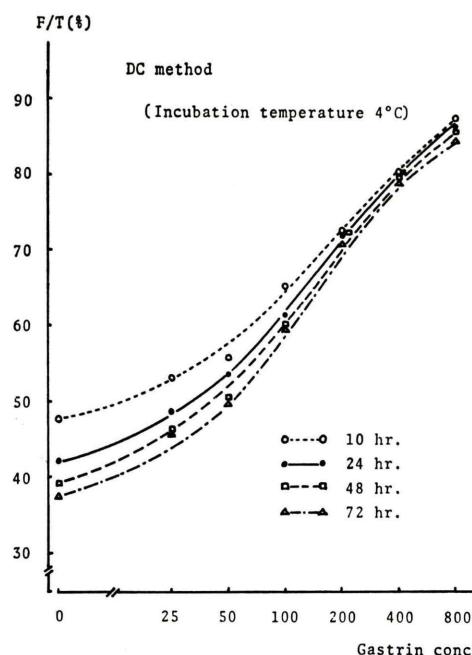


Fig. 1 Effect of incubation time on the standard curve of DC and PEG methods.

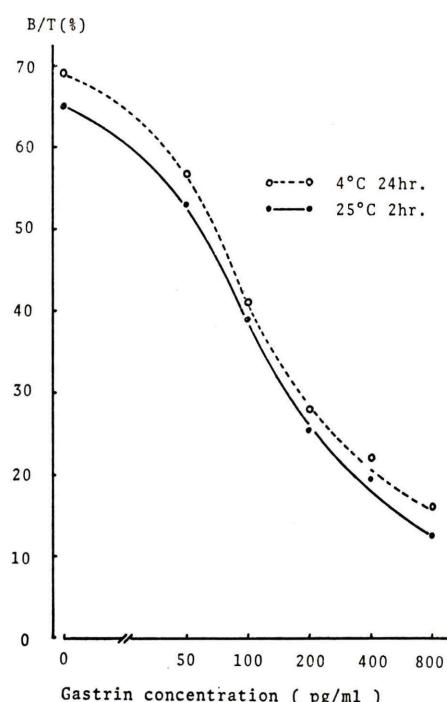
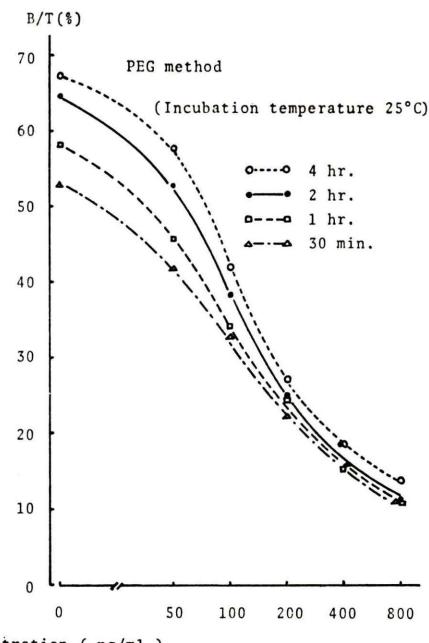


Fig. 2 Comparison of the standard curves of PEG method incubated at 4°C for 24 hours and at 25°C for 2 hours.



PEG 法における incubation 温度を検討するため、 25°C 2 時間あるいは 4°C 24 時間で incubate した際の標準曲線を作製し、その比較をおこなった。その結果 Fig. 2 に示すごとく、両者はほぼ一致することが認められた。

次に 25°C における incubation 時間を 30 分、1, 2, 4 時間と種々変えた時の標準曲線につき検討した。その結果 Fig. 1 に示したごとく、30 分あるいは 1 時間の incubation では、ガストリン濃度 0 における B/T (%) がそれぞれ 52.8, 58.1% で、ガストリン濃度の増加にともない比較的ゆるやかな勾配を示した。これに対して、2, 4 時間の incubation では、ガストリン濃度 0 における B/T (%) はそれぞれ 64.6, 67.1% で、その標準曲線は比較的急峻な勾配を示した。ところがこれら 2 者の標準曲線には大差なく、incubation 時間は 2 時間が適当との成績であった。

2) 標準曲線

標準曲線の assay ごとの再現性を検討するため

に、標準曲線各点の assay ごとの平均値と標準偏差を計算し、Fig. 3 に示した。DC 法では 7 回の assay の標準曲線各点の再現性は、変動係数 2.1~8.9% であった。一方 PEG 法では 5 回の assay におけるその再現性は、変動係数 1.6~5.8% と DC 法との比較でより良好な結果が得られた。

3) 回収率の検討

血清試料に既知量のガストリンを添加した際の回収率につき検討した。その結果回収率は、DC 法では、90.7~115.9%，平均およびその標準偏差は $102.8 \pm 8.1\%$ で、また PEG 法では 86.1~115.8%， $98.1 \pm 9.1\%$ との成績であり、理論値と実測値との比較では、相関係数は DC 法で 0.9918, PEG 法では 0.9988 との成績であった (Fig. 4)。

4) 血清稀釀曲線の検討

血中ガストリン値が比較的高値を示す血清につき、その稀釀曲線と標準曲線との平行性を検討したところ、DC 法・PEG 法いずれにおいても両者は良好な平行性を示した。

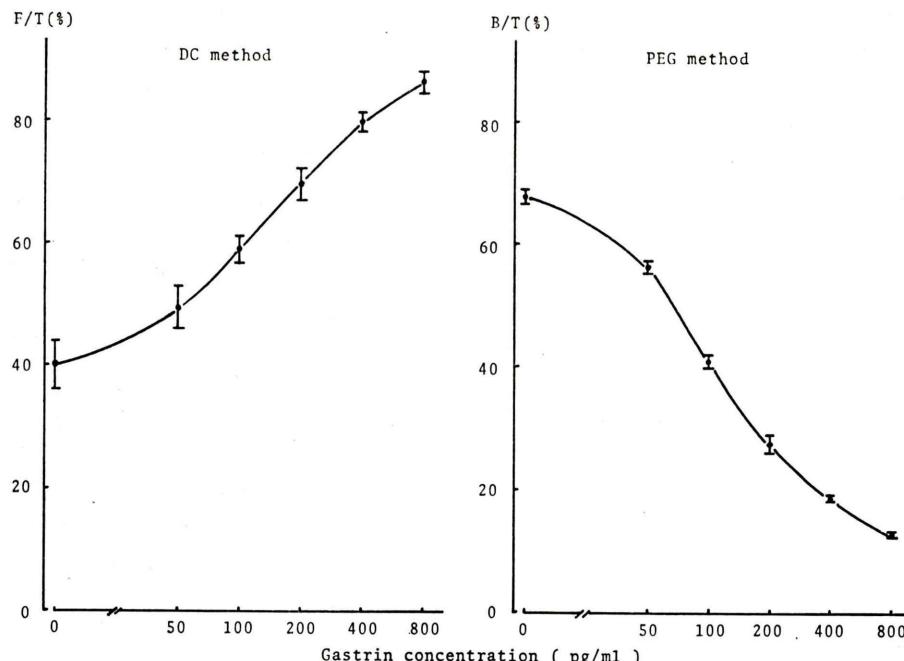


Fig. 3 Standard curves of DC and PEG method. Each points were expressed as mean \pm SD of the separate assays. 7 assays in DC method and 5 in PEG were performed.

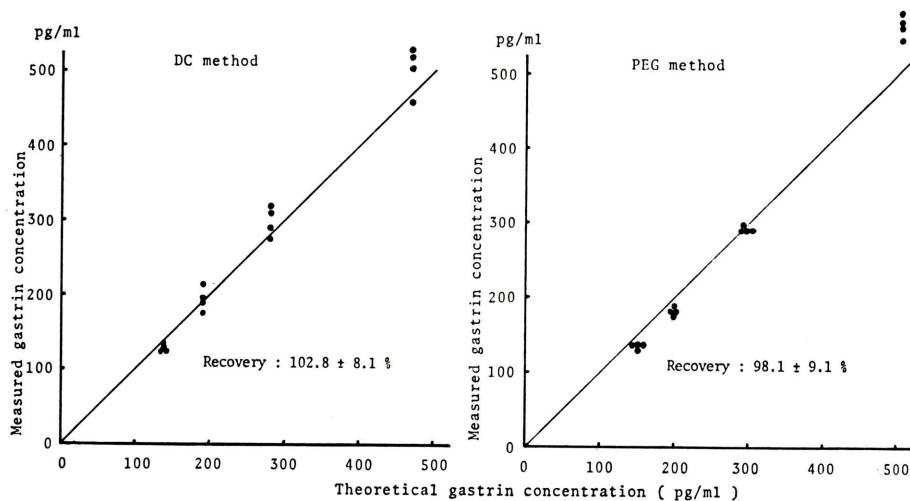


Fig. 4 Recovery experiment.

5) 再現性の検討

異なった2種類の血清試料を用いて、同一assay内における再現性と異なったassay間の再現性について検討した。まずDC法での検討では、同一assay内における再現性はガストリン値が平均137.3 pg/mlと比較的低濃度の血清試料を用いた際の変動係数は3.9%，ガストリン値が平均281.8 pg/mlと比較的高値を示す血清試料における変動係数は5.1%で、両者の平均値は4.5%であった。また2種類の血清をduplicateで異なった5回のassayにより測定した際の変動係数はそれぞれ10.5, 16.3%，平均13.4%であった。次にPEG法での検討では、同一assay内における再現性は、ガストリン値が平均95.4 pg/mlと正常範囲内にある血清試料を用いた際には変動係数3.0%で、ガストリン値が平均469.2 pg/mlと比較的高値を示す血清試料を用いた際の変動係数は5.4%で、両者の平均は4.2%であった。一方異なった5回のassayにおけるassay間の再現性についてみると、変動係数はそれぞれ11.1, 8.4%，平均9.8%であった(Table 1)。

6) 特異性の検討

本法の特異性につき、tetragastrin, pentagastrin, CCK-PZおよびsecretinを用いて検討した。その

結果Fig. 5に示したごとく、tetragastrinおよびpentagastrinではガストリンと交叉反応を示すことを認めたが、通常の測定範囲についてみるとその交叉性は僅少であった。さらにガストリン100 pgが標識ガストリンと抗体との結合を阻害するのと同等の効果を示すtetragastrinとpentagastrinの量をFig. 5から求めると、それぞれ6026, 7079 pgとなり、これら両者の本assay系におよぼす影響はガストリンの効果を100とすると、それぞれ1.7, 1.4%と計算され、その影響は小さいものと考えられた。CCK-PZでは、 $10^4 \mu\text{U}/\text{ml}$ 以上の濃度で明らかにガストリンと交叉反応を示すことを認めた。一方secretinについては、50 u/mlの濃度まで検討したが、検討範囲内ではガストリンとの交叉は認められなかった。

7) DC法とPEG法の測定値の比較

同一血清試料をDC法およびPEG法で測定し、測定値の比較検討をおこなった。その結果Fig. 6に示すように、両測定値は相関係数0.9586 ($p < 0.001$)と良好な相関関係を示した。

IV. 考 案

RIAは今日広く臨床的に応用され、欠くことのできない臨床検査法となっている。ガストリンに

Table 1 Reproducibility of the gastrin radioimmunoassay

DC method			PEG method		
Within the same assay			Within the same assay		
	Serum A	Serum B		Serum A	Serum B
1	138 pg/ml	280 pg/ml	1	93 pg/ml	428 pg/ml
2	142	266	2	95	482
3	143	260	3	94	466
4	133	298	4	94	464
5	140	295	5	101	505
6	128	292			
Mean ±SD	137.3±5.3 (pg/ml)	281.8±14.5 (pg/ml)	Mean ±SD	95.4±2.9 (pg/ml)	469.2±25.2 (pg/ml)
C.V.	3.9%	5.1%	C.V.	3.0%	5.4%
Between the different assays					
	Serum A	Serum B		Serum A	Serum B
1	193 pg/ml	116 pg/ml	1	95 pg/ml	469 pg/ml
2	253	170	2	117	375
3	193	190	3	122	404
4	230	150	4	130	401
5	220	143	5	114	410
Mean ±SD	217.8±22.9 (pg/ml)	153.8±25.8 (pg/ml)	Mean ±SD	116.2±12.9 (pg/ml)	412.1±34.8 (pg/ml)
C.V.	10.5%	16.3%	C.V.	11.1%	8.4%

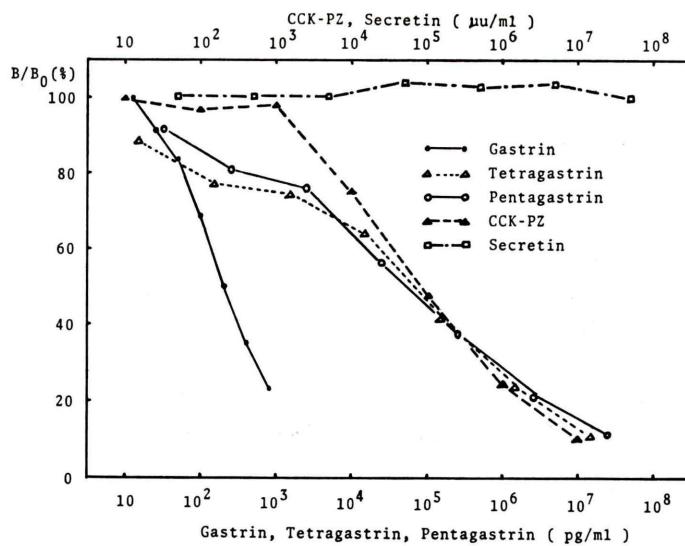


Fig. 5 Specificity of the gastrin radioimmunoassay.

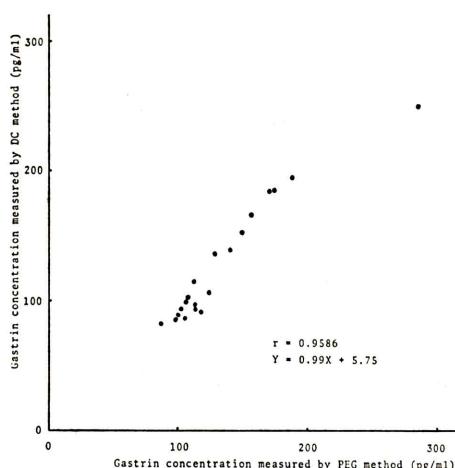


Fig. 6 Comparison of the serum gastrin concentrations measured by DC and PEG methods.

ついてもその RIA の開発に关心が向けられていたが、1970 年 McGuigan ら³⁾および Yalow ら⁴⁾がガストリン RIA 確立の成功を報告した。ところが、ガストリンは分子量約 2,000 と比較的小分子のペプタイドホルモンであるため、一般的には RIA に供しうる良好な抗体の作製は容易でなく、広く臨床的に応用しうる RIA の普及が待たれていた。最近わが国において、B·F 分離法として DC 法を用いたガストリンの RIA キットが、次いで PEG 法によるキットが提供されるようになり、その臨床応用に期待がかけられている。今回著者らは、B·F 分離法を中心としてガストリン RIA キットにつき検討をおこなった。

DC 法についてはその一部をすでに報告したが^{7), 8)}、PEG 法に関する今回の検討では、本法の標準曲線の assay ごとの再現性は 1.6~5.8% で、DC 法における 2.1~8.9% に比して一層良好な成績がえられた。さらに PEG 法では、とりわけガストリン高濃度領域である 400 および 800 pg/ml における assay ごとの標準偏差がそれぞれ 0.5, 0.7% と小さく、すぐれた再現性がえられることを確認した。また回収率・再現性についても両法ともに良好で、ほぼ同様の結果がえられ、ガストリン高濃度血清の稀釀曲線は DC·PEG いずれの

方法にも標準曲線と良好な平行性を示すことを認めた。これらの成績から、DC·PEG 法による測定値は血中ガストリン値をよく反映するものといえ、いずれも臨床検査として十分応用しうるものと考えられる。特異性に関する検討では、tetragastrin および pentagastrin で若干の交叉性を認めた。ところがこれらはいずれも化学的合成品で内因性ガストリンとは異なるため、実際の assay に際しては、その影響は問題とはならないと考えられる。

実際の測定についての両測定法の比較では、DC 法では 4°C 24 時間の incubation 後 DC 液を加えて B·F の分離をおこなったが、本法は非特異的な吸着現象を利用しているため温度の影響が大であり常に温度条件を一定に維持することが要求される。従ってこれら一連の操作を 4°C でおこなうことが必要で、温度管理が煩雑であるといえる。これに対して PEG 法では室温 25°C で incubation をおこない、B·F 分離の操作も室温 25°C にておこないうるため、本法は DC 法に比して温度管理がきわめて容易であるといえる。しかも PEG 法では、incubation 時間が 2 時間と短かく、一回の assay をその日のうちに完了できることが特長といえよう。

RIA における B·F の分離には今日種々の方法が知られており、ガストリン RIA においても、McGuigan ら³⁾は二抗体法を、Yalow ら⁴⁾はレジン法を、また Hansky ら⁹⁾は DC 法を用いている。DC 法は、dextran で処理した charcoal が F を吸着し B は吸着しないという現象を利用したもので、B·F 分離法としては操作が簡単であり、すぐれた方法といえる。ところがこの方法では蛋白濃度の影響が問題であり、すべての測定 tube 内の蛋白濃度を一定にすることが要求され、標準曲線用 tube における蛋白濃度の補正が問題となる。したがって DC 法では、標準曲線用 tube には gastrin-free serum を加えることが必要である。これに関する著者らの検討では、馬血清あるいは家兎血清を用いても標準曲線の作製は可能であるが、gastrin-free serum を用いた際もっとも良好な標

準曲線がえられた⁸⁾.

PEG は中性ないし弱アルカリ性の溶液中で γ -globulin を沈降させるが、albumin は上清中に残すことが知られている^{10)~12)}。その後 Desbuquois ら¹³⁾は、PEG はペプタイドホルモンを沈降させないことを認め、これを RIA における B・F 分離法として用いて、insulin, parathyroid hormone, growth hormone, vasopressin の RIA に応用した。本法は抗体である γ -globulin と結合した B を沈降させ遊離の F を上清中に残すもので、この沈降作用は比較的分子量の大きい蛋白の溶解度低下によるものと考えられている。また沈降した蛋白の変性をきたさぬために、B を沈降させても抗体と結合したホルモンの解離はないものと考えられており¹⁴⁾、すぐれた B・F 分離法といえる。ところが本法では γ -globulin の濃度が問題となり、すべての測定 tube 内の γ -globulin 濃度を一定にすることが要求される。このためにとくに標準曲線用 tube に γ -globulin を加えることが必要となる。従って PEG 法による市販キットでは、あらかじめ各濃度に分注された標準ガストリン溶液中にはほぼ人血清中の γ -globulin に相当する量が添加されており、操作がより簡便化されている。

DC 法および PEG 法で同一血清試料を測定し、両測定値を比較した成績では良好な相関関係がえられた。ガストリン RIA キットは測定法としての条件を十分満足するものであり、今後広く臨床的に応用されるものと考えられる。

ガストリン RIA キットの提供をいただいたダイナボット RI 研究所に感謝いたします。

なお、本論文の要旨は第 22 回日本臨床病理学会総会(1975 年 11 月、長崎)において発表した。

文 献

- 1) McGuigan JE: Immunological studies with synthetic human gastrin. *Gastroenterol* **54**: 1005-1011, 1968
- 2) McGuigan JE: Studies of the immunological specificity of some antibodies to human gastrin I. *Gastroenterol* **56**: 429-438, 1969
- 3) McGuigan JE, Trudeau WL: Studies with antibodies to gastrin—Radioimmunoassay in human serum and physiological studies. *Gastroenterol* **58**: 139-150, 1970
- 4) Yallow RS, Berson SA: Radioimmunoassay of gastrin. *Gastroenterol* **58**: 1-14, 1970
- 5) 松尾 裕, 石井喜代子: ガストリン・リアキットによる血中ガストリン測定. ホルモンと臨床 **22**: 1087-1090, 1974
- 6) 笠木寛治, 稲田満夫: ガストリンアキットの基礎的なならびに臨床的検討. 核医学 **12**: 415-421, 1975
- 7) 福地 稔, 松岡 徹, 木戸 亮他: Gastrin の Radioimmunoassay に関する検討. 臨床病理 **22** (補冊): 312, 1974
- 8) 松岡 徹, 福地 稔, 木戸 亮他: ガストリンの radioimmunoassay に関する検討. Radioisotopes **24**: 19-24, 1975
- 9) Hansky J, Cain MD: Radioimmunoassay of gastrin in human serum. *Lancet* **2**: 1388-1390, 1969
- 10) Polson A, Potgieter GM, Largier JF, et al: The fractionation of protein mixtures by linear polymers of high molecular weight. *Biochim Biophys Acta* **82**: 463-475, 1964
- 11) Zeppezauer M, Brishammar S: Protein precipitation by uncharged water-soluble polymers. *Biochim Biophys Acta* **94**: 581-583, 1965
- 12) Iverius PH, Laurent TC: Precipitation of some plasma proteins by the addition of dextran or polyethylene glycol. *Biochim Biophys Acta* **133**: 371-373, 1967
- 13) Desbuquois B, Aurbach GD: Use of polyethylene glycol to separate free and antibody-bound peptide hormones in radioimmunoassays. *J Clin Endocrinol* **33**: 732-738, 1971
- 14) 中川昌一, 中山秀隆, 佐々木蒿他: インスリン治療患者の血中遊離インスリン定量法—PEG 法, 糖尿病 **15**: 403-408, 1972