

D. 測定法 III (invitroイムノアッセイ)

32 二抗体法によるヒト β_2 -Microglobulin Radioimmunoassay に関する研究
神戸大学医学部第2内科
○水野信彦, 岡田 究, 高瀬重暉, 馬場茂明

〔目的〕: 1968年 Berggårdらによって見出された β_2 -Microglobulin (以下 β_2 -M) はヒトの種々の体液中に微量存在し, 腎疾患, 各種悪性疾患, 自己免疫疾患および感染症で血中 β_2 -M濃度の上昇がみられ, また腎疾患で特に尿管障害時に尿中に多量の β_2 -Mが認められることから, 尿細管性蛋白尿と糸球体性蛋白尿の鑑別に有用であるとの報告がみられる。近年, β_2 -Mの微量測定法として, Evrinらにより固相法によるRadioimmunoassay (以下RIA)が開発されているが, 今回私共は β_2 -Mの精製を行ない, 二抗体法によるRIAを確立し, さらに本法と固相法によるRIAとを比較検討したので報告する。

〔方法および材料〕: β_2 -Mの精製: 腎尿管障害患者尿から, 硫酸分画, zone electrophoresis, Sephadex G-100 column chromatography, DEAE cellulose column chromatographyを用い行なった。抗 β_2 -M血清の作製: 精製 β_2 -M 200 μ gを家兎に免疫して得た。 125 I-標識 β_2 -Mの作製: 精製 β_2 -M 5 μ gに Na 125 I mCiをクロラミンT法により標識し, Free Na 125 I と 125 I- β_2 -M との分離は Sephadex G-50 column chromatographyにより行なった。RIA法: 125 I- β_2 -Mと抗 β_2 -M血清を用い, Morgan Lazarowらの二抗体法に準じ行なった。被検試料: 正常ヒト37名の空腹時血清および10名の24時間プール尿, 正常分娩婦人11名より得た臍帯血および初乳, 腎疾患患者および各種悪性疾患患者28名の空腹時血清および24時間プール尿

〔成績〕: 精製 β_2 -MはDISC電気泳動で単一帯を示し, さらに免疫学的にも高純度標品であった。 125 I- β_2 -Mは, 比放射能100-180 μ Ci/ μ gであった。RIAは希釈被検々体0.1mlを用いた1ml系で行ない, 125 I- β_2 -M量(0.5 m μ g) 0.1ml, 第1抗体(10,000倍希釈) 0.1ml, 第1反応時間4°C 48時間, 第2反応時間4°C 24時間が本法の最適条件と考えられた。この測定系において, 患者血清, 尿の希釈曲線と, 標準曲線とは良好な平行性を示し, また, ヒト Ig G, Bence Jones protein およびその他の血清成分との交叉性は認められなかった。本法による最少測定感度は, 0.49 μ g/L, intraassay C.V. は, 0.99-6.25%, interassay C.V. は, 1.42-8.6%であった。本法と固相法(Phadebas β_2 -micro Test キット)との比較では, 相関係数0.962と良好な相関が得られた。本法による正常ヒトの各種体液中の β_2 -M濃度は, 血清 1.71 ± 0.29 μ g/L (n=37), 尿 0.075 ± 0.036 μ g/24hr (n=10), 初乳 37.3 ± 14.3 μ g/L (n=11), 臍帯血 2.58 ± 0.28 μ g/L (n=11)であった。

〔結論〕: 本表によるヒト β_2 -M RIAは特異性, 感度, 精度, 再現性に極めて優れた測定法であった。また本法による正常ヒト体液中の β_2 -M濃度は, 従来の測定法によるそれとほぼ一致する成績を得た。

33 コチニンの radioimmunoassay (RIA) に関する検討

神戸大学第三内科
○松倉 茂, 阪本 登, 清野 裕
京都大学第二内科
井村裕夫
日本専売公社京都病院
村中日出夫, 松山 均

我々はこれ迄タバコの重要成分であるニコチンのRIAを確立し, 喫煙後の血中および尿中ニコチンの変動を検討してきた。しかしながら血中ニコチン値は喫煙後も著明な上昇がみられず, 尿中ニコチン排泄値も尿 pHに大きく影響され, いずれも喫煙効果の良い指標にならないことを明らかにした。今回はニコチンの主要体内代謝産物であり, しかもその尿中排泄が比較的尿 pHの影響をうけないと報告されているコチニンのRIAに関して検討したので報告する。

〔方法〕抗血清の作製: ℓ -コチニンの pyridine環に $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ 基を導入し, これと牛血清アルブミン(BSA)をCarbodiimideにより結合させた ℓ -コチニン [N^+]- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$ -BSAを免疫抗原として家兎で作製した。

標識コチニンの作製: ℓ -コチニンの誘導体 ℓ -コチニン [N^+]- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$ - O を作成し, これを標識用抗原とし Na 125 I を用いクロラミンT法により作成した。測定法の実際: すでに報告しているニコチンのRIA(Biochem. Biophys. Res. Comm. 64: 574, 1975)に準じて行った。

〔結果〕得られた2種類の抗血清とも 5×10^3 - 10^4 の最終希釈倍数で標識コチニン(約10000 cpm)の約70%が抗体に結合した。抗体結合(B)と非結合(F)標識コチニンの分離には, 硫酸法, タルク法, PEG法, デキストラン被覆炭末法を試みたが, 硫酸法で最も良好な分離がえられたため, 以下の測定系では本法を用いた。標準曲線は ℓ -コチニンの1 ng~1 μ gの濃度範囲で用量反応関係が得られた。インキュベーションは, 4°Cで行い one step法と two step法を比較したが感度に有意差がなかったため以後の測定は4°C overnightの one step法で行った。非喫煙者尿0.1mlを本測定系に加えたところ著明な標識コチニンの抗体への結合抑制がみられた。また各種のコチニン近縁物質の交叉反応性を検討したところ標識用抗原として用いた ℓ -コチニン [N^+]- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$ - O は母分子である ℓ -コチニンの約1,500倍の抗体結合親和性がみられた。その他本抗血清は d -ニコチン, ℓ -ニコチン, ノルニコチン, 6-(OH)ニコチン, ミオスミン, 6-(OH)ミオスミン, オキシニコチンにそれぞれ10.4, 4.09, 0.52, 0.16, 0.10, 0.10, 0.02, の交叉反応性を呈した。

〔考按および結語〕簡便なコチニンのRIAを確立したが尿中コチニンの測定には抽出操作が必要であることが明らかとなった。また本抗血清はコチニンの pyrrolidine環のみならず pyridine環の側鎖 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ に対しても極めて高い指向性を有していることが明らかとなった。