

《ノート》

RIA キットのシステム化処理の有用性と問題点

—用手法処理との比較を中心として—

Usefulness and Problem on the Systematic Procedure with RIA Kit;
Comparison Test with Manual Procedure

長田 篤雄* 宮前 達也**

Atsuo NAGATA* and Tatsuya MIYAMAE**

*Radioisotope Laboratory, Saitama Medical School, Saitama, Japan

**Department of Radiology, Saitama Medical School, Saitama, Japan

はじめに

臨床内分泌学における Radioimmunoassay (以下 RIA) の必要性は加速的に増大しており、また最近になって各社から多種類の RIA キットが発売され、手順が簡便化されながら精度や感度も格段とすぐれたものになってきた。しかし当然のことながら、これらの結果検体数が急増していることも重要問題となってきている。

このような事情から RIA のさまざまな自動化処理の試みがなされてきたが、特にデータ処理においては、1968年に Rodbard¹⁾ が Logit-Plot を報告して以来、これに基づいて電子計算器あるいはコンピューターなどにより測定試料カウントから、試料濃度の結果までの自動化処理をしようとする報告が数多くなされ²⁾⁻⁵⁾、現在実用化も進められている。

しかし、自動試料分注調整装置 (Auto Pipetting System—以下 A.P.S.) はその機構の複雑なこと、精度や良好な再現性を要求されることなどにより、

なかなか実用的なものが実現しなかった。

1973年に、Micromedic 社は開発した A.P.S. とガンマーカウンター、遠心分離機、コンピューターのシステム化を行ない発表したが、このシステムはその後わが国でも販売されるようになった。

われわれの施設では、この Micromedic RIA System を導入し、使用する機会を得たので、RIA キットのシステム化処理の有用性について基礎的検討を行ない、また経験上考えられた問題点について考察を加えた。

システムおよび装置の概要

Micromedic RIA System による RIA 処理のフローチャートを Fig. 1 に示す。これは二抗体法のキットを例にとってシステムの流れを示すが、まず検体と標識抗原および抗体が A.P.S. で分注調整され、インキュベーションの後にまた A.P.S. で第二抗体の分注が行なわれ、インキュベーション、遠心分離の後、上清を計測する場合は A.P.S. で、沈殿であればデカンテーションを行ない、最終試料をガンマーカウンターにかける。ガンマーカウンターの結果は、穿孔紙テープでコンピューターに送られ、検体中の濃度が算出される。これ

* 埼玉医科大学 RI 研究施設

** 埼玉医科大学放射線医学教室

受付：52年7月8日

最終稿受付：52年11月24日

別刷請求先：埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷 38

(☎350-04) 埼玉医科大学 RI 研究施設

長田 篤雄

Key words: Systematic procedure of radioimmunoassay, Manual procedure, Comparison test, Time saving, More accuracy

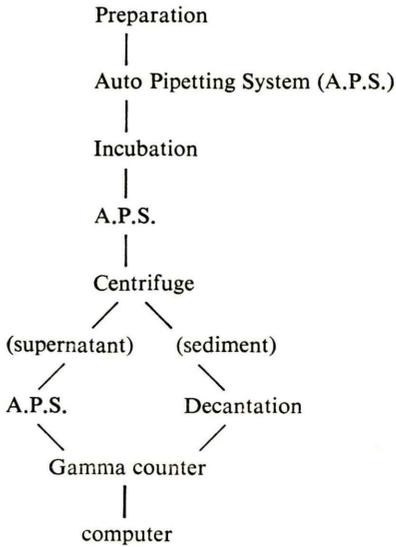


Fig. 1 Micromedic RIA System flow chart.

ら処理過程において、14本の試験管が立てられる“Rack”が検体の準備からガンマカウンターまで、そのまま使用できるところが、このシステムの特徴である。

以上がシステムの概要であるが、それぞれの機器は単独でも使用でき、われわれの施設を例にすると、A.P.S.あるいはコンピューター部分を人手で行ない、他の部分をシステムと共通で行なうなどが通常行なわれている。したがって用手法との比較はA.P.S.とコンピューターを中心として行なったので、機器概要はこれらだけに留める。

まずA.P.S.の概要と今回の実験に用いた組み合わせをFig. 2に示す。

A.P.S.はAuto Pipette Station(以下A.P.Station)と外部Dispenserより構成されA.P. StationはさらにDispenser, Sampler, Sample Changerお

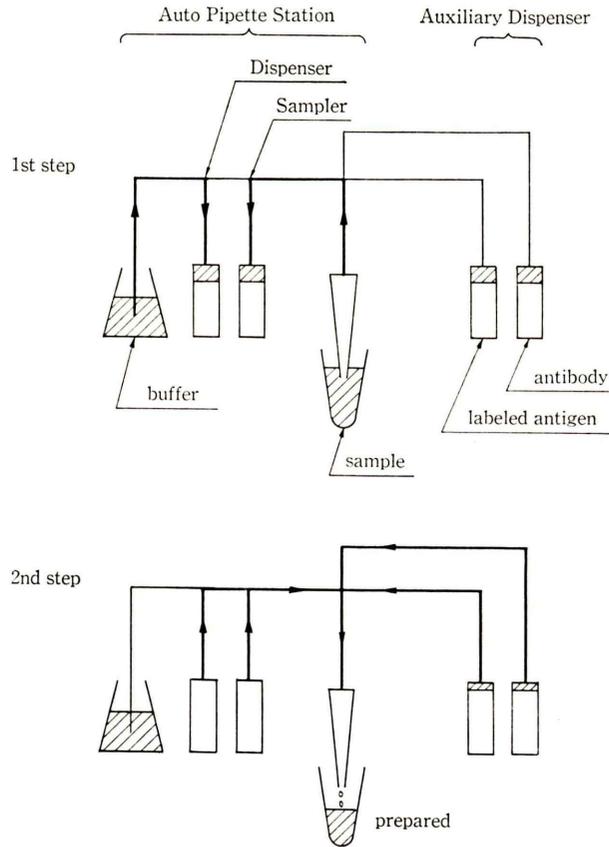


Fig. 2 The diagram of Auto Pipetting System. 2 steps of action are shown.

よびチップ駆動部が組み込まれている。また外部 Dispenser は A.P.Station と連動して同時に 2 台接続でき、全く独立しても使用することもできる。

この図は、A.P.Station に外部 Dispenser 2 台を接続したものを表わし、第 1 段階で検体とバッファを採取し、第 2 段階で検体、バッファ、標識抗原、抗体の同時分注が行なわれている。

次にデータ処理装置はコンピューターとテープリリーダー（いずれも Hewlett Packard 社製）より構成され、主としてガンマーカウンターより得られる穿孔紙テープを使ってデータ処理が行なわれる。

RIA プログラムは主として Run Assay プログラムと Protocol プログラムに別れてカセットテープに記録されており、Protocol に前もって Assay 条件を設定しておく、簡単な操作でくり返し使用できる。またこのプログラムによる標準曲線の直線近似法は Logit, Probit, Arcsine があり、さらに Raw Data がある。

コンピューターは標準試料の濃度と直線近似した B/T, B/BO あるいは B/F との相関係数を求め、最も 1 に近い近似法を使って未知検体の濃度を算出する。

実験方法

1) A.P.S. と用手法および外部 Dispenser と用手法分注の精度比較: A.P.S. 全体の分注精度については Fig. 2 と同様な A.P.Station と外部 Dispenser の組み合わせについて行なった。この場合、試薬、バッファ、検体のすべてにホウ酸バッファの均一溶液を使い、分注試料を微量天秤で測定する重量法で変動係数（以下 C.V.）を求めた。また分注量は外部 Dispenser がそれぞれ 100 μ L, A.P.Station の Dispenser は 500 μ L, Sampler は 100 μ L の合計 800 μ L 設定とした。

外部 Dispenser の場合は 50 μ L と 100 μ L の分注量について、A.P.S. と同様に重量法で C.V. を求める方法と、¹²⁵I 溶液 (12,000 cpm/100 μ L) を分注し、カウントから C.V. を求める方法について検討した。

これに対して用手法は、習熟した技師により Excel Pipette の 50 μ L, 100 μ L, 500 μ L を使って A.P.S. または Dispenser と同様な分注を行ない、C.V. を求めた。

いずれの場合も連続 20 本分注について検討した。

2) 同一検体のコンピューターによる結果と従来からの標準曲線より求める用手法での結果の比較: 異なる 5 回の Assay について、IRI (257 検体), T3-RIA (108 検体), T4-RIA (125 検体) の 3 項目の相関係数、一次回帰直線を求めた。

3) 標準検体カウントをコンピューターに入力した後、再度未知検体カウントとして入力処理した場合の結果と標準値との比較: コンピューターによる標準曲線の処理が完全であれば、理想的には両者の値は一致するはずであるから、これによってコンピューター処理の信頼性が判断できる。

T3-RIA, IRI, T4-RIA, α -feto protein (A.F.P.) の 4 項目について検討し、相関係数、1 次回帰直線を求めた。

また T4-RIA, A.F.P. の 2 項目についてはさらに近似プログラムを変化させて処理し、コンピューターによる近似法の選択が妥当かどうか比較するため、それぞれについて相関係数を求めた。

4) 本システム使用の場合と用手法処理による場合での同一検体の測定成績の比較⁶⁾: A.F.P. について異なる A, B の検体をそれぞれ 8 本ずつ測定し、平均値、標準偏差 (S.D.), C.V. を求めて比較した。

5) 本システム使用の場合と用手法処理における処理時間の比較: IRI の 100 検体の処理について、それぞれの処理段階における所要時間を求めた。

結果

A.P.S. および Dispenser と用手法処理との分注精度の比較を Table 1 に示す。

Dispenser は用手法より優れ、分注量が多いほど良い。また A.P.S. も C.V.=0.104 で用手法の C.V.=0.702 に対して大変良い結果であった。

コンピューターによる結果と標準曲線より求め

Table 1 Comparison of the dispensing precision between manual and auxiliary dispenser, and also between manual and Auto Pipetting System (A, P, S.). C. V. (%) of 20 samples.

	Manual	Dispenser
50 μ l count*	1.300	0.767
weight**	1.092	0.577
100 μ l count*	1.104	0.697
weight**	0.909	0.388
	Manual	A.P.S.
800 μ l weight**	0.702	0.104

* Gamma ray count of ^{125}I -solution.

** Weight of Borate buffer solution.

る用手法での結果の比較では、両者の相関図を Fig. 3 に示す。

IRI の場合にコンピューターでは低濃度で低めに、高濃度では高めの結果であり、また近似プログラムの違いによっては、高濃度部での解離が大きくおこることが経験された。しかし T3-RIA, T4-RIA については良い相関を示し、特に T4-RIA では $r=0.997$ と大変良く、従来からの同手法と差がない。

コンピューター処理による標準曲線用検体の値と標準値の比較を Table 2 に示すが、T3-RIA, T4-RIA, A.F.P. はいずれも $r=0.99$ 以上で良好で

あったが、IRI の場合は $r=0.973$ で特に高濃度部が良くない。ただしこの相関の場合、コンピューターはいずれの項目であっても対数濃度を使っているため、ゼロ濃度は 0 にならない。

また近似法の違いによる比較を Table 3 に示す。

T4-RIA では、どの近似法でも大差なく、コンピューターによって計算された標準値と B/T との相関係数は Logit の場合に $r=0.9999$ で、また標準検体を再度入力して求めた値と標準値の相関は $r=0.9979$ で、両者とも最も 1 に近く一致した。しかし A.F.P. の場合同様な比較を行なうと、コンピューターは Raw Data が $r=0.9985$ と最も良いが、後者の方法では Probit が $r=0.9971$ で最も良く、コンピューターによる近似法選択に疑問が残った。

全行程を本システムで行なった場合と、用手法で行なった場合の測定結果の比較を Table 4 に示す。

コンピューターによって処理した場合の結果は、用手法と必ずしも一致しないので、平均値は若干異なるが、S.D., C.V. はシステムによる場合にかなり小さくなっている。

全行程における処理時間の比較を Table 5 に示す。

Table 2 Correlation of the index standard values and the calculated concentrations by the computer. The data of the standards are put in the computer again in stead of the samples.

T3-RIA (ng/ml)	T4-RIA (μ g/dl)	IRI (μ U/ml)	A.F.P. (ng/ml)
0 -0.32	0 -1.37	0 -6.39	0 -3.80
0.5 -0.56	5 -5.01	5 -7.62	5 -5.27
1 -0.99	10 -9.84	10 -8.99	10 -8.45
2 -1.80	15 -15.33	20 -16.05	20 -15.92
4 -3.45	20 -19.97	40 -48.92	40 -65.10
8 -8.00		80 -114.91	80 -85.09
		160 -196.92	160 -174.18
		320 -270.50	320 -311.53
$r=0.9962$	$r=0.9979$	$r=0.9733$	$r=0.9953$
$y=0.965x+0.028$	$y=0.950x+0.800$	$y=0.887x+13.281$	$y=0.978x+5.999$
Logit*	Logit*	Probit*	Raw Data*

Left; The index standard values.

Right; the calculated concentrations.

* The approximate expression by the computer.

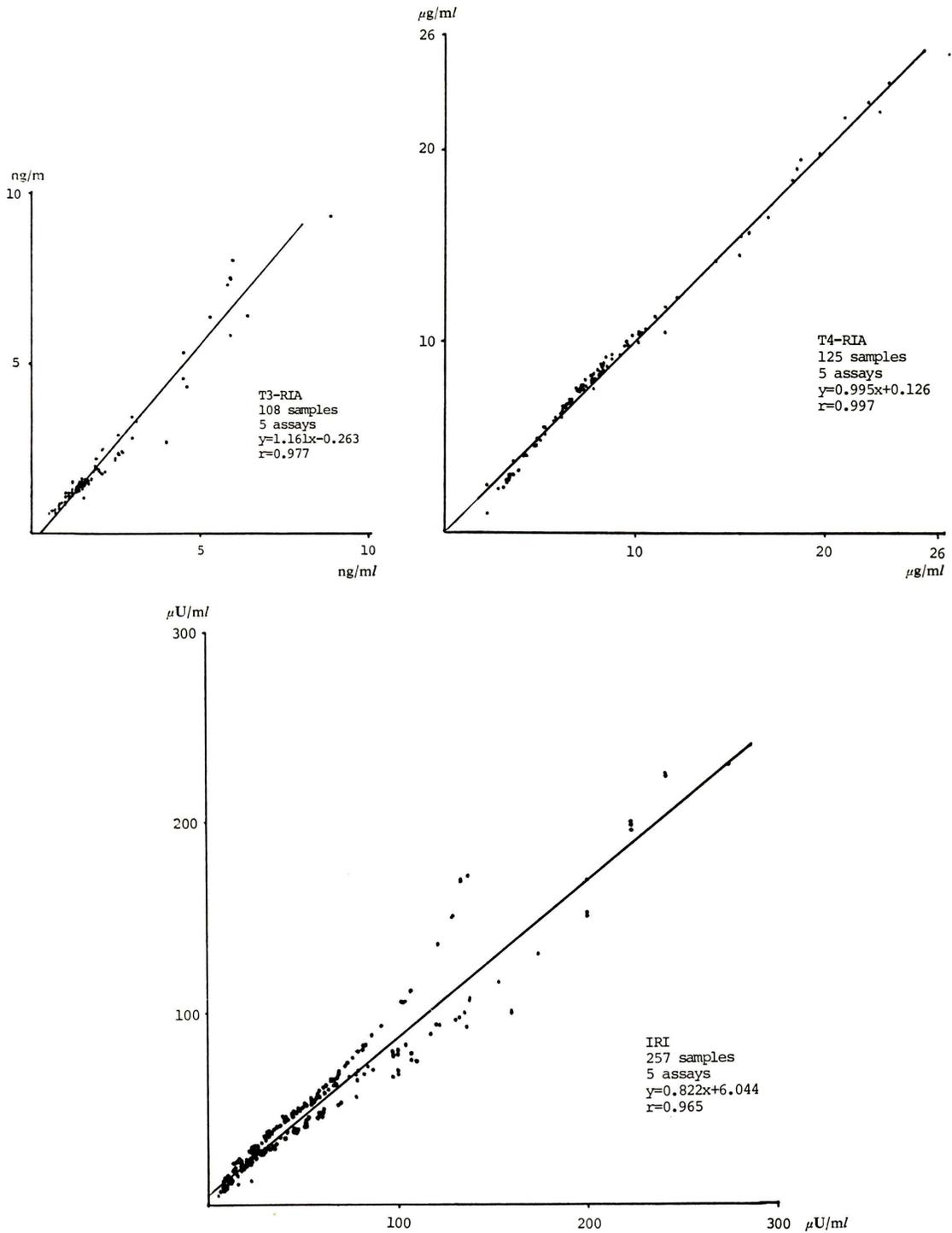


Fig. 3 Correlation of the results, between by the computer and manual.
Horizontal; by computer, Vertical; by manual

分注およびデータ処理行程時間は、用手法の1/3~1/4程度でシステムの場合行なわれるが、本例は100検体についての成績であるので、検体がさらに増加した場合には、検体当りの処理時間はさらに減少し、システム処理はより有利となる。しかし用手法では必要でなかった事前の設定準備や分注後のポンプ類の洗浄などが必要なので小数検体ではかえって非効率となる可能性がある。

考 察

RIAのシステム化処理の最大の利点は、多数検体の短時間処理であり、また個人差、施設差などの解消のためにも有用と思われる。したがって本システムにおいてもA.P.S.とコンピューターが重要な特徴である。

本システムのA.P.S.は時間的にも精度でも、用手法よりすぐれている⁶⁾。しかし実際の業務に効率良く繁用されるかという点必ずしもそうではない。使用経験からこの辺の事情を考えてみると

Table 3 Correlation of the calculated concentrations among the approximate expressions. The same A.F.P. and T4-RIA in the Table 2.

Index standard	Raw Data	Logit	Probit	Arcsine
A.F.P. (ng/ml)				
0	3.80	3.96	3.96	3.40
5	5.27	5.49	5.47	5.06
10	8.45	8.53	8.52	8.72
20	15.92	14.96	15.09	17.28
40	65.10	58.87	61.35	76.12
80	85.09	70.78	73.61	90.27
160	174.18	164.75	165.59	175.64
320	311.53	351.76	329.89	274.37
Correlation (By computer)	0.9985	0.9969	0.9973	0.9967
Correlation	0.9953	0.9968	0.9971	0.9830
T4-RIA ($\mu\text{g/ml}$)				
0	1.89	1.37	1.48	1.95
5	5.03	5.01	5.01	5.03
10	9.56	9.84	9.79	9.49
15	15.18	15.33	15.30	15.13
20	20.23	19.97	20.02	20.32
Correlation (By computer)	0.9995	0.9999	0.9998	0.9993
Correlation	0.9952	0.9979	0.9975	0.9945

Table 4 Comparison of the consequence in the complete manual and the Micromedic RIA System. In case of A.F.P., 8 samples of A and B.

	Manual		M. RIA System	
	A	B	A	B
Mean (ng/ml)	3.94	122.63	4.54	115.76
S.D.	1.06	7.99	0.41	1.89
C.V.	26.84	6.52	9.04	1.63

Table 5 Comparison of the procedure time between manual and Micromedic RIA System. In case of IRI, 100 samples.

	Manual	M. RIA System
Preparation	10-15 min.	15-20 min.
Pipetting	30-40 min.	12 min.
Incubation	} Same	
Centrifugalize		
Gamma count		
Data procedure	20-30 min.	7 min.

以下の数点が挙げられる。

- 1) 前処理(試薬、検体などの設定準備)に時間がかかる。
- 2) 操作が煩雑で熟練が必要とされ、限られた量の試薬を扱う作業であるから、操作ミスは多大な影響がある。
- 3) A.P.S.内のポンプやチップ、チューブなどに残留する試薬が無駄となる。経験では100検体キットで10%程度であった。
- 4) A.P.S.に適したキットが限定される。経験的に適さない、あるいはかえって非効率になると考えられる種類のキットは、例えば、検体、バッファー、標識抗原、抗体が同時に分注できないもの、あるいはシステムに合う試験管が使えないもの、また粘度の高い試薬のものや、標準曲線試料の調製が複雑なものなど幾つか列挙できる。

これらの問題点は必ずしもシステムだけの問題ではなく、多様化するキット類にも問題点がないとはいえない。

次にコンピューターによるデータ処理は人間にくらべ圧倒的な早さであり、また結果の様式が統一されるので、精度管理や記録保存などに有効に

使い得るなど利点は多い。しかし項目によっては用手法との相関が悪く、実用できないものもある。これらについてはすでに分校ら⁴⁾によって報告されているように、変曲点を境に別々に近似する2分割あるいは多分割近似プログラムを開発することで解決できると考える。

システム全体として総括すると、それぞれの機器間は共通“Rack”で能率良く連絡されており、処理能力も大きいのが、1 Assay 当りの検体数がある程度以上ないとその能力を十分発揮することはむずかしく、比較的大規模な施設向きではないかと考える。しかしシステムの構成要素がそれぞれ単独でも使えることから、規模に合った組み合わせをすることで、能率良く使用することも可能である。

まとめ

現在使われている RIA キットを使い、Micro-medic RIA System と、従来からの用手法処理の比較を行なった。

本システムの A.P.S. は分注精度がすぐれており、個人差、施設差などの解決に有用で、精度管理上すぐれた手段となり得る。また処理時間は A.P.S. およびコンピューター共に用手法処理の1/4程度であり、十分な能力がある。さらにシステムを構成する各機器間は共通“Rack”を使って能率良く結ばれている。

しかし、特に A.P.S. を十分に使うためには、検体数、適性キット、適性試験管などの条件が充

足される必要があり、またコンピューター処理においては RIA 項目の特定なものについて処理プログラムの改良が必要である。

また多様化するキット類が、システム化あるいは自動化処理に大きな障害となっており、今後システム化あるいは自動化を前提としたキット開発も必要と考える。

本論文の一部要旨は第33回放射線技術学会総会で発表した。

文 献

- 1) Rodbard D, Bridson W, Rayford PL: Rapid calculation of radioimmunoassay results. *J Lab & Clin Med* **74**: 770-781, 1969
- 2) Burger HG, Lee VWK, Rennie GC: A Generalized computer program for the treatment of data from competitive protein-binding assays including radioimmunoassays. *J Lab & Clin Med* **80**: 302-312, 1972
- 3) Hatch KF, Coles E, Busey H, et al: End-point parameter adjustment on a small desk-top programmable calculator for Logit-Log analysis of radioimmunoassay data. *Clin. Chem.* **22**: 1383-1387, 1976
- 4) 分校久志, 小林 真, 久田欣一: 甲状腺刺激ホルモンのラジオイムノアッセイ迅速計算法. *Radioisotopes* **23**: 557-561, 1974
- 5) 入江 實, 赤木弘昭, 垂水泰敏, 末澤慶昭, 関本 憲: ラジオイムノアッセイ, 第1版, 講談社, 1975, p. 116
- 6) Huckle D: Machine protocols for T4-RIA and T3-RIA assay Micromedic Pipetting Station. The Radiochemical Centre report, unpublished: 1977