

4 B/F 分離法

出村 黎子, 出村 博 (東京女子医大 RA科, 内科)

Berson, YalowによりRIAのB/F分離に濾紙電気泳動法が始めて用いられて以来, B/F分離の工夫がRIAを進歩させ簡便, 迅速, 正確な測定を可能にした。現在では二抗体法と固相法が主なもので他にゲル濾過やチャコール, PEG法がある。二抗体法は最も普遍的な方法で特異的な分離が可能であり, 長い反応時間を要する欠点も沈殿促進剤の添加で改善された。固相法は固相上で競合反応を行わせるためビベット操作や遠心なしに結合物の分離が可能で, 非競合的免疫反応に基くIRMAの基礎ともなった。固相としてはポリスチレンビーズ, セファローズ, マグネット等種々の担体に物理的, 化学的方法によって第一抗体や抗原を結合させて用い, インキュベーションとB/F分離を一段階で行うことも可能である。固相法の問題点は過剰な抗原, 抗体の干渉によるプロゾーン現象が起こり易いことである。固相法の普及はモノクローナル抗体の応用に負うところが大きく, RIAの自動化に貢献した。チャコールやPEGは非特異的な吸着を応用した方法で特異性に欠けるが, 迅速な分離が可能でquick RIAや分子量の小さいステロイド, 逆に抗体やリセプターの分離に応用性が高い。

5-i 高感度 assay 法の実際

(i) TSH

市原清志, 網野信行, 宮井 潔
(大阪大 臨床検査診断学)

血中TSHの測定は, 甲状腺疾患の診断に重要な役割を果たしてきたが, 測定感度上の制約からその生理的変動や, 分泌低下・抑制病態, 特に甲状腺機能亢進症の診断が困難であった。しかし測定系への種々の工夫により, 測定感度を大幅に高めることが可能となった。高感度化の基礎条件: 最も重要な条件は測定システムで, immunoradiometric assay法(IRMA)を用いることで, 従来の競合反応系のように抗TSH抗体を極端に希釈しなくとも測定感度を高めることができ, 反応時間も短縮できる。また抗体はポリクローナル抗体の方が親和力が強く感度は良いが, モノクローナル抗体もうまく組合せると親和力を増強させる。またポリクローナル抗体を分画化し, 感度・特異性の高い成分を抽出することも可能である。一方標識物の良否も重要で, 特にIRMAでは標識抗体の反応性を損なうことなくその比活性を高めることが高感度化の鍵をにぎっている。さらに原理は異なるが, 競合反応系の場合と同様に, IRMAでも試薬の添加順をかえるとその感度を高めることが可能である。

高感度測定系の問題点: これまで開発されてきた高感

度TSH測定キットは, いずれも十分臨床応用に耐えうるものであるが, 残された問題として, 低濃度域の計数値が低く精度管理を慎重に行う必要があること, 及び従来よりも多くの検体量を要することが挙げられる。これらはいずれも標識抗体の比活性を高めることで解決でき, 原理的に比活性を高めやすい酵素等の非放射性標識が, より高感度な測定系を開発するために必要な条件となろう。一方従来問題となった血清影響は改善されたが, 低濃度域でなお認められる。その結果, 標準血清の組成の違いで測定値が変化する可能性が考えられる。

臨床応用: (1)これまで調べることの困難であった細かい生理的変動の解明(妊娠・日内・季節変動), (2)TSH分泌低下の病態の把握, 特に甲状腺機能亢進症, 二次性・三次性甲状腺機能低下症の診断, (3)他の間脳・下垂体ホルモン異常症や関連薬物投与時におけるTSHの分泌動態の解析, (4)甲状腺ホルモン治療時の適量の判定やバセドウ病における治療効果の判定, などの幅広い臨床応用の可能性があり, その例を演者らの成績を中心に述べる。

5-ii 高感度 assay による血中ならびに尿中GH測定の臨床的意義

加藤 謙, 服部尚樹, 村上宣男(京大 二内)
橋田誠一, 石川栄治(宮崎医大 一生化)
毛利善一(住友製薬 研究所)

高感度EIA(Clin Chim Acta 135:263,1983)により血中ならびに尿中GHの微量測定が可能になった。本法の最小検出感度は60pg/tubeであり, 血清20μl, 尿150μlを用いてそれぞれ3pg/ml, 0.4pg/mlの特異的な測定が可能であった。RIAによる血中GHの測定限界は従来の方法では0.6ng/ml、新しい方法では50pg/mlであった。測定可能範囲ではこれらの血中GH測定値の間には良好な相関が認められた。血中GH基礎値は、正常成人の大部分の例に於いて500pg/ml以下を示し従来のRIAで測定不可能であった。下垂体機能低下症ではEIAによってのみ測定可能な低値を示す症例の存在が明らかにされた。ITTやGRF負荷試験に対する微細な血中GHの測定によって視床下部と下垂体障害をある程度鑑別することが可能になった。尿中GHの測定値は先行する血中GH分泌量をよく反映し、負荷試験前後尿や1日尿中GHの測定により下垂体機能の診断が可能と考えられた。また手術時に得られた下垂体細胞を用いるin vitroの灌流系に於いて僅かなGH分泌動態の変化の観察が可能であった。以上のように高感度GH測定の有用性が認められた。