

《ノート》

Homogeneous Radioimmunoassay, Scintillation Proximity Assay による 6-keto-Prostaglandin $F_1\alpha$ および Insulin の測定

Measurement of 6-keto Prostaglandin $F_1\alpha$ and Insulin Using Scintillation Proximity Assay; Homogeneous Radioimmunoassay

鈴木 智子* 渡辺 幸彦* 塚田 裕*

Tomoko SUZUKI, Yukihiko WATANABE and Yutaka TSUKADA

SRL Inc.

I. はじめに

1959年, BersonとYalowによって, radioimmunoassay (RIA) が確立されて以来, 現在に至るまで, RIAはその操作法, 精度, 感度など, あらゆる面において, 格段の進歩をとげてきた. 操作法の中のB/F分離法においても最近では遠心分離を必要としない固相法が主流になりつつあるが, B/F分離の操作は不可欠であり, その点では heterogeneous assayである. B/F分離を必要としない homogeneous radioimmunoassayとしては, Udenfriend S.らにより, scintillation proximity assay (SPA)¹⁾が報告されているが, 今回, アマシャム社よりその原理に基づいた 6-keto-prostaglandin $F_1\alpha$ (6-keto-PG $F_1\alpha$) キットが開発された. SPA法による本キットの原理は, 飛程の短い³H標識体を用い, 第二抗体を固相化したシンチラントビーズと³H標識抗原抗体反応物が結合した場合のみを計測する, というものである.

われわれは, アマシャム社のSPAによる, 6-keto-PG $F_1\alpha$ 測定キットを入手する機会を得, 検討し, さらにより利用度の大きい¹²⁵I標識系RIAへの応用を目的とし, 本キットに含まれる第二抗体固相化ビーズを用いた insulin の測定を検討したので報告する.

II. 方法

1. 測定原理

1) 6-keto-PG $F_1\alpha$

³H標識 6-keto-PG $F_1\alpha$ と非標識 6-keto-PG $F_1\alpha$ が抗血清と競合反応した結果, 抗原抗体反応物が生成し, 第二抗体固相化ビーズに結合する. ここで, ビーズにはあらかじめシンチラントが含まれているため, ³H標識抗原抗体反応物のみにおいて, 飛程の短い³H標識物の β 線がシンチラントビーズに到達することができ, シンチラントが発光する. その結果, B/F分離をすることなく, ³H標識抗原抗体反応物の放射能のみを計測できる.

2) Insulin

¹²⁵I標識物を使用した場合, ¹²⁵I標識物から放出される飛程の短いオージェ電子¹⁾が, シンチラ

* 株式会社エスアールエル

受付: 2年8月9日

最終稿受付: 2年11月6日

別刷請求先: 東京都八王子市小宮 51 (☎ 192)

株式会社エスアールエル特殊検査部

鈴木 智子

Key words: Homogeneous assay, Scintillation Proximity Assay.

ントに到達して発光を促し、 ^3H 標識物と同様に B/F 分離を必要としない homogeneous assay 系が成り立つ。

2. 測定方法

1) SPA 法による 6-keto-PG $F_{1\alpha}$ 測定

血漿からの 6-keto-PG $F_{1\alpha}$ の抽出は、既報²⁾のごとく行った。すなわち、血漿 1 ml に 1 N 塩酸 0.1 ml を加え octadecylsilyl silica 粒子に 6-keto-PG $F_{1\alpha}$ を吸着させ、0.05 N 塩酸 15% を含むエタノール 2 ml、および石油エーテル 2 ml で洗浄後、酢酸エチル 2 ml で溶出した。これを N_2 ガス下で乾固後、アセトニトリル：クロロホルム：酢酸 (20: 80: 0.5) 混合溶媒に溶解し Silica ミニカラム; BOND ELUT Si (Analytichem International) にアプライし、前出の混合溶媒 7.5 ml で洗浄後、アセトニトリル・クロロホルム・酢酸 (80: 20: 0.5) 混合溶媒 10 ml で溶出した。 N_2 ガス下で

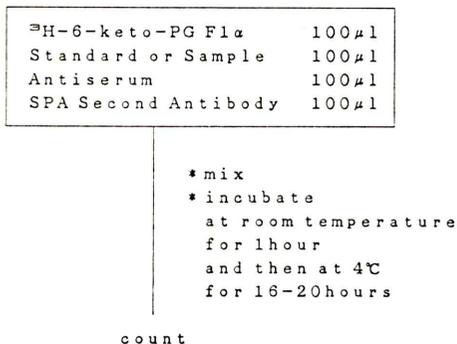


Fig. 1-1 Assay procedure of 6-keto-PG $F_{1\alpha}$.

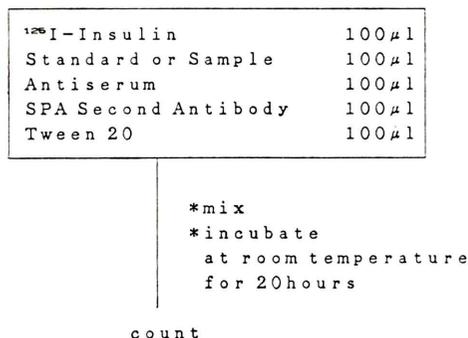


Fig. 1-2 Assay procedure of insulin.

乾固後、assay buffer にて溶解したものをサンプルとして、RIA に用いた。

RIA の測定方法を Fig. 1-1 に示した。サンプルまたは標準品 100 μl を液体シンチレーションバイアルに入れ、 ^3H 標識 6-keto-PG $F_{1\alpha}$ 溶液 100 μl 、6-keto-PG $F_{1\alpha}$ 抗血清 100 μl 、SPA 第二抗体ビーズ 100 μl を加え攪はんし、室温で 1 時間、つづいて 4°C で 16~20 時間反応し、液体シンチレーションカウンター (LKB β ラック ^3H チャンネルモード) にて放射能を計測した。

2) Dextran-coated charcoal (DCC) 法キットによる 6-keto-PG $F_{1\alpha}$ の測定

SPA 第二抗体を加えず、DCC を用いて B/F 分離を行った。

3) SPA 法による insulin 測定

測定方法を Fig. 1-2 に示した。液体シンチレーションバイアルに血清または標準品 100 μl を入れ、 ^{125}I 標識 insulin, insulin 抗血清, 0.25% tween 20 およびアマシャム社 SPA 第二抗体ビーズをそれぞれ 100 μl ずつ加え攪はんし、室温で 20 時間反応させた後、液体シンチレーションカウンターにて放射能を計測した。抗血清はモルモットにブタ insulin を免疫して作製した。標準品および ^{125}I 標識 insulin はダイナボット社製を用いた。

4) Beads 法による insulin 測定

インシュリンリアビーズキット (ダイナボット社) を用いて以下の方法にて測定した。

血清または標準品 100 μl に ^{125}I 標識インスリン 300 μl 、インスリン抗体ビーズを加え、攪はん後、15~30°C で 16~24 時間反応させた。反応液を除去し、脱イオン水でビーズを洗浄後、ビーズの放射能を γ -カウンターにて計測した。

3) 検討内容

6-keto-PG $F_{1\alpha}$ 測定キットの基礎的検討として、従来の DCC 法との標準曲線の比較、直線性、再現性および添加回収について検討した。インスリン測定への応用としてビーズへの ^{125}I 標識インスリンの吸着について調べ、基礎的検討として希釈、再現性および添加回収試験を行った。また、標準曲線と血清測定値についてビーズ法との比較を行

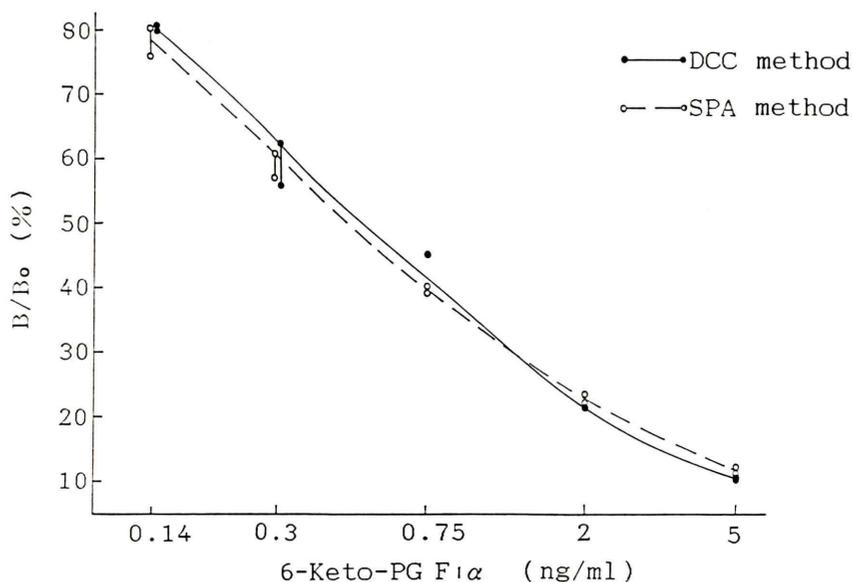


Fig. 2 Comparison of 6-keto-PG F₁α standard curve between DCC method (●) and SPA method (○).

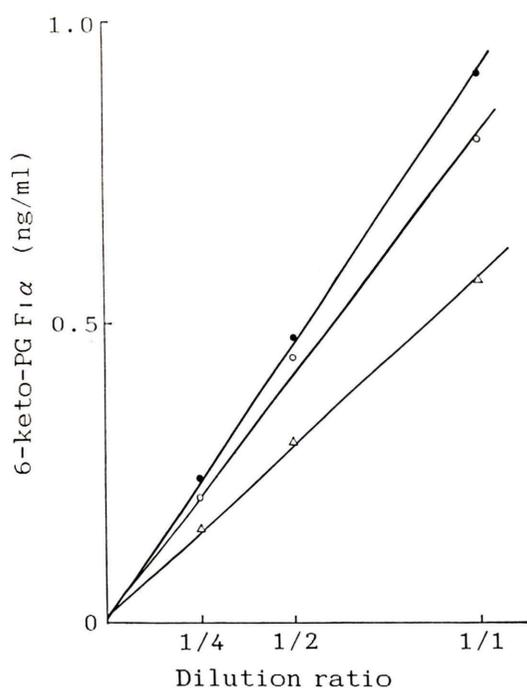


Fig. 3 Dilution test of 6-keto-PG F₁α.

Table 1-1 Intra-assay variation (6-keto-PG F₁α)

	Sample 1	Sample 2
n	6	6
mean (ng/ml)	0.508	0.868
S.D.	0.037	0.065
C.V. (%)	7.19	7.51

い、血清成分の影響について検討した。

III. 結 果

1. 6-keto-PG F₁α 測定キットの基礎的検討

1) DCC 法との比較

従来の DCC を用いて B/F 分離を行う方法と SPA 法とをおのおの 2 重測定で比較した結果、同様の標準曲線が得られた (Fig. 2).

2) 直線性、再現性、添加回収試験

異なる 3 種のサンプルを 1/1, 1/2, 1/4 にして測定した結果、いずれもほぼ原点を通る良好な直線が得られた (Fig. 3). 同時再現性の結果を Table 1-1 に示した. C.V.=7.19% および 7.51% であった. 添加回収試験の結果を Table 1-2 に示した.

Table 1-2 Recovery test (6-keto-PG F_{1α})

Sample	Added (ng/ml)	Measured (ng/ml)	Recovered (ng/ml)	Recovery (%)	Average (%)
3	0	0.50	—	—	107.4
	0.15	0.65	0.15	100.0	
	0.375	0.91	0.41	109.3	
	1.00	1.63	1.13	113.0	
4	0	0.20	—	—	106.1
	0.15	0.38	0.18	120.0	
	0.375	0.55	0.35	93.3	
	1.00	1.25	1.05	105.0	

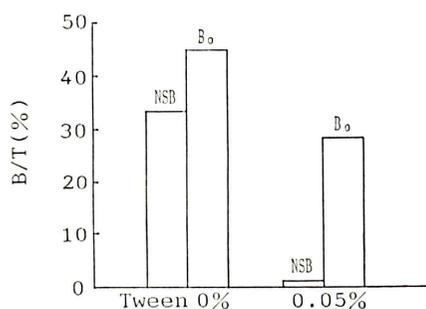
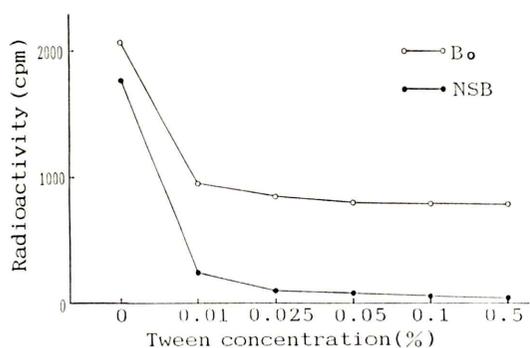
Fig. 4-1 Adsorption of ¹²⁵I-insulin to SPA beads with or without tween 20.

Fig. 4-2 Effect of tween 20 concentration on NSB (non-specific binding) reduction.

回収率は 93.3~120%, 平均回収率は 107.4% および 106.1% であった。

2. ¹²⁵I 標識系 RIA への応用

1) Tween 20 濃度の決定

SPA 第二抗体ビーズへの ¹²⁵I 標識 insulin の吸着を調べるために, tween 20 濃度を 0% および 0.05% として結合率 (B₀) および非特異的結合率

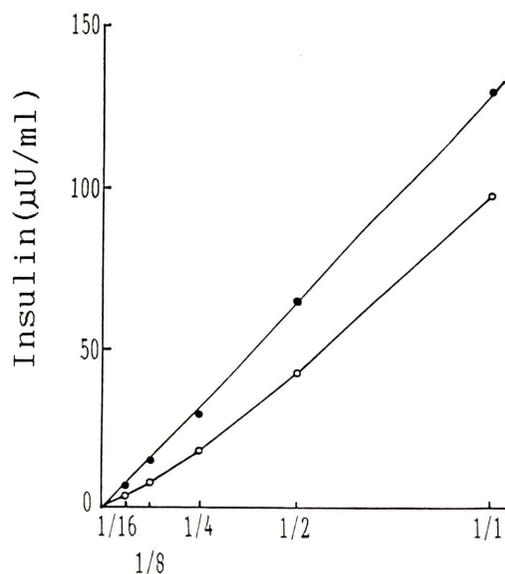


Fig. 5 Dilution test of insulin.

(NSB) を γ -カウンターを用いて測定した。すなわち, 反応終了後の内容物を上清とビーズに分離し, ビーズの放射能を γ -カウンターにて計測したときの結果を Fig. 4-1 に示した。Tween 20 が 0% の時の非特異的結合率 (NSB) は 33.3% と高く, ¹²⁵I 標識 insulin がビーズに吸着していることがわかった。Tween 20 が 0.05% の時は, NSB が 1.1% となり, tween 20 の添加により, 吸着がおさえられた。次に, tween 20 濃度を 0 から 0.5% まで変化させて結合率 (B₀) および NSB を測定した。Fig. 4-2 のごとく tween 20 濃度 0.025% 以上で

Table 2-1 Intra- and inter-assay variation (Insulin)

1) Intra-assay

	Sample A	Sample B
n	6	6
mean ($\mu\text{U/ml}$)	17.3	50.8
S.D.	1.63	2.86
C.V. (%)	9.42	5.63

2) Inter-assay

	Sample C	Sample D
n	5	5
mean ($\mu\text{U/ml}$)	8.54	59.6
S.D.	0.92	5.86
C.V. (%)	10.8	9.83

Table 2-2 Recovery test (Insulin)

Sample	Added ($\mu\text{U/ml}$)	Measured ($\mu\text{U/ml}$)	Recovered ($\mu\text{U/ml}$)	Recovery (%)	Average (%)
E	0	26	—	—	103.3
	2.0	28	2.0	100.0	
	5.9	31	5.0	84.7	
	17.8	46	20	112.4	
	53.5	88	62	115.9	
F	0	2.0	—	—	103.7
	2.0	4.0	2.0	100.0	
	5.9	8.2	6.2	105.1	
	17.8	19	17	95.5	
	53.5	63	61	114.0	

NSB は 100 cpm 以下となった。したがって tween 20 濃度は 0.05% とした。

2) 希釈試験

Buffer を用いて血清を 1/1~1/16 に希釈して測定したときの結果を Fig. 5 に示した。1 例において直線性を示さず、血清の割合が多いほど放射能計測値が低下する傾向がみられ、血清成分による影響が示唆された。

3) 再現性

再現性試験の結果を Table 2-1 に示した。同時再現性は C.V.=9.42% および 5.63%, 日差再現性は C.V.=10.8% および 9.83% であった。

4) 添加回収試験

添加回収試験の結果を Table 2-2 に示した。回

収率 84.7~115.9%, 平均回収率は 103.3% および 103.7% であった。

5) インシュリンリアビーズとの比較

おのおの 2 重測定した標準曲線はほぼ平行しており, SPA 法の方が低濃度での感度が良好であった (Fig. 6-1)。

Beads 法 (X) と SPA 法 (Y) との測定値の相関は, 回帰式 $Y=0.975X+8.02$, 相関係数 $r=0.927$ ($n=35$) であった (Fig. 6-2)。

6) 血清成分の影響

希釈試験において直線性を示さない例があったため, SPA 法における血清成分による影響を調べた。干渉チェック・A (ミドリ十字社) を血清 100 μl に添加し, 溶血・乳び・ビリルビンによる

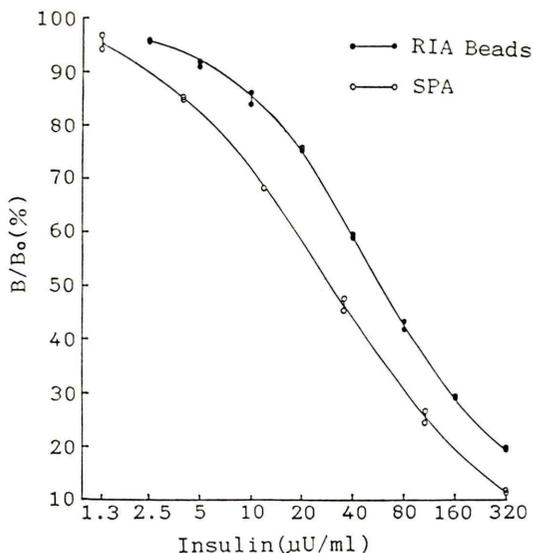


Fig. 6-1 Comparison of insulin standard curve between Insulin RIA Beads method (●) and SPA method (○).

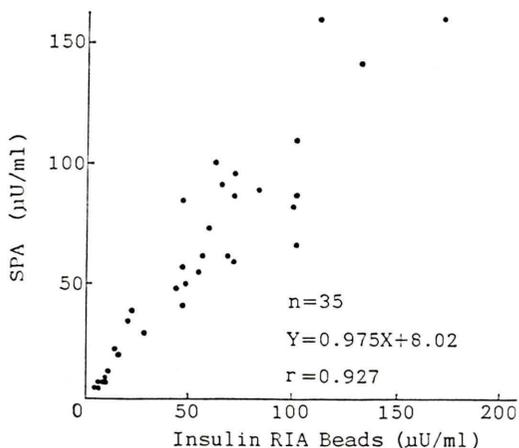


Fig. 6-2 Comparison of insulin value between Insulin RIA Beads method and SPA method.

放射能計測値への影響 (E) を以下の様に表示した。

$$E = \frac{\text{干渉チェック添加時の計測値}}{\text{干渉チェック無添加時の計測値}} \times 100$$

結果を Fig. 7 に示した。乳びは、ホルマジン濁度数 21,300 度の乳びサンプルを 10 μ l 添加した場合まで、影響はみられなかった。

溶血ヘモグロビン 18 mg/dl およびビリルビン 2.0 mg/dl 添加時において $E = 90\%$ 以下となり明らかに放射能計測値の低下が認められた。それ以上の濃度では濃度に依存して放射能計測値の低下がみられた。

IV. 考 察

Homogeneous assay は enzyme immunoassay (EIA) では EMIT³⁾ 法や enzyme enhanced immunoassay⁴⁾, enzyme channeling immunoassay⁵⁾ 等に利用されているが, RIA においては B/F 分離を必要とする heterogeneous assay が大多数である。

今回, B/F 分離を必要としない SPA 法による, ³H 標識系 RIA として 6-keto-PG F₁ α の基礎的検討を行ったところ, 従来法と同様の標準曲線が得られ, 直線性, 同時再現性, 添加回収試験において良好な結果が得られた。RIA の操作工程はサンプリングのみと非常に簡便であり, 他の項目への応用も可能と思われ, また検査の自動化にも有用であると思われた。

さらに, より利用度の大きい, ¹²⁵I 標識系 RIA への応用として insulin 測定を試みたところ, SPA 第二抗体ビーズへの ¹²⁵I 標識体の吸着が認められたが, tween 20 を添加することによって, 吸着を抑えることが可能であった。Insulin 測定における, 再現性, 添加回収試験など基礎的検討の結果は概ね良好であり, Beads 法との相関も良好であった。

しかしサンプルとして直接血清を用いて検査した場合, 溶血・ビリルビンの検体において放射能計測値の低下がみられた。この原因として, シンチラントの発光スペクトルは, 通常 300~500 nm であるのに対し, 溶血・ビリルビンは 400~500 nm 付近に吸収スペクトルを持ち, 重なる割合が大きいため, カラークエンチングを起こすものと考えられた。ビリルビンの当ラボラトリーでの正常値は, 間接ビリルビン 0.1~0.8 ng/dl, 直接ビリルビン 0.0~0.3 ng/dl であり, 通常の検体では影響を受けないと考えられたが, 溶血やビリルビンが

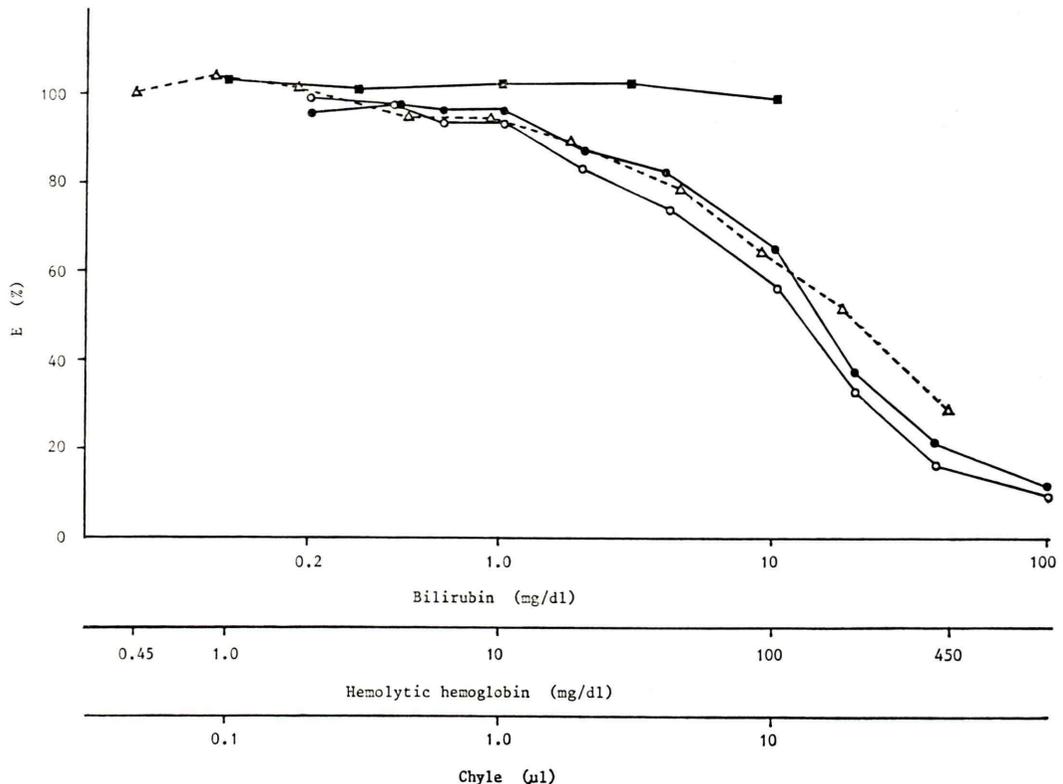


Fig. 7 Influence of bilirubin F (●), bilirubin C (○), hemolytic hemoglobin (Δ) and chyle (■) on measurable radioactivity count. Bilirubin F is free bilirubin and bilirubin C is conjugate bilirubin.

少しでも多く存在すると、カラークエンチングにより放射能計測値が低下することがあると予想された。この点において、血清のサンプリング量や、溶血・ビリルビンの影響を考慮する必要があり、直接測定には向いていないと思われた。

V. まとめ

- 1) SPA 法による、³H 標識系 RIA, 6-keto-PG F₁α の基礎的検討の結果は良好であった。
- 2) ¹²⁵I 標識系 RIA への応用として insulin の測定を試みたところ、ビーズへの ¹²⁵I 標識体の吸着を抑えるために、tween 20 の添加が必要であった。
- 3) SPA 法による insulin 測定は、基礎的検討結果および beads 法との相関は良好であり、¹²⁵I

標識系 RIA においても SPA 法は十分利用可能であった。

4) 直接測定において、血清成分によるカラークエンチングが認められた。

以上のように、SPA 法は ³H 標識系 RIA および ¹²⁵I 標識系 RIA での使用が可能であった。カラークエンチングがあることから、直接測定には問題があるものの、B/F 分離を必要としないため、操作が非常に簡便であり、検査の自動化にも有用であると思われた。

文献

- 1) Udenfriend S, Gerber LD, Brink L, et al: Scintillation proximity radioimmunoassay utilizing ¹²⁵I-labeled ligands. Proc Natl Acad Sci USA 82: 8672-8676, 1985

- 2) 川野克己, 杉田増夫, 岡 昌則, 他: Thromboxane B₂, 6-keto-prostaglandin F₁αおよび prostaglandin E₂の同時抽出法に関する検討・炎症 7: 511-515, 1987
- 3) Rubenstein KE, Schneider RS, Ullman EF: "Homogeneous" enzyme immunoassay. A new immunochemical technique. Biochem Biophys Res Commun 47: 846-851, 1972
- 4) Litman DJ, Hanlon TM, Ullman EF: Enzyme channeling immunoassay: A new homogeneous enzyme technique. Analyt Biochem 106: 223-229, 1980
- 5) Gibbons I, Hanlon TM, Skold CN, et al: Enzyme-enhancement immunoassay: A homogeneous assay for polyvalent ligands and antibodies. Clin Chem 27: 1602-1608, 1981