

<原著>

Australia 抗原・抗体の Radioimmunoassay の特異性

瀬戸淑子 稲垣真里子 島村芳之
豊島滋

Australia 抗原 (Au 抗原) および抗体 (Au 抗体) の検出への Radioimmunoassay の応用¹⁻⁶⁾ は、いくつのかの研究グループにより報告されている。中でも Solid phase radioimmunoassay (SP-RIA)^{5,6)} は鋭敏度、簡便さと共に優れて居り、今後一般に広く利用され得る方法である。そこで、本報では SP-RIA の特異性、"Yes or no" 反応により Au 抗原および Au 抗体を検出する場合の cutoff 値の取り方、および arbitrary RIA unit の算出の仕方の 3 つの点について記述する。

実験材料と方法

Au 抗原とその精製：

Au 抗原の精製は Au 抗原陽性血清より前報⁷⁾に述べたごとく行なった。他に精製抗原として、北研高橋博士より分与されたもの (精製 Au-K) と Abbott 社の Ling 博士によって精製されたもの (Au-A) を用いた。

Au 抗体：

用いた抗血清は、次のものである。人抗 Au 血清 (石黒 (I), およびミドリ十字 (M)), ウサギ抗 Au 血清 (ヘキスト) とモルモット抗 Au 血清 (コートランド)。

Radioimmunoassay (RIA) :

(a) Membrane filter RIA (MF-RIA).

前報^{5,7)}に詳細に述べているので参照されたい。

(b) Solid-phase RIA (SP-RIA)

方法は前報^{5,7)}に述べたごとくである。Au 抗原または抗体をコートした coated tube は大体において、Abbott

社の Kit, Ausria-125 を用いた。ある場合には Cutt⁸⁾ らの方法に準じて作成した coated tube を用いた。

実験結果

1. SS-RIA の特異性

(1) Au 抗体をコートした tube への ^{125}I -ラベル Au 抗原の結合

SP-RIA における抗原抗体反応が、真に抗原と tube にコートされた抗体との特異的反応であることを示すために、次の実験を行なった。Polyethylene tube に Au

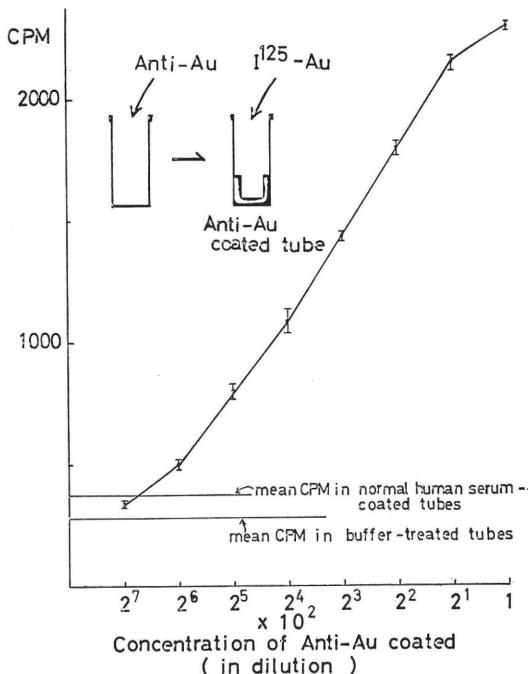


Fig. 1. Effect of concentration of anti-Au for coating on binding of ^{125}I -Au to the tubes

慶應義塾大学 医学部

薬化学研究所 化学療法部門

受付：47年 6月

別刷請求先：新宿区信濃町35 (〒160)

慶應義塾大学 医学部

薬化学研究所 化学療法部門

瀬戸淑子

抗体をコートし、これに対する¹²⁵IラベルAu抗原の反応を調べた。

図1に見られるごとく、Bufferまたは正常人血清をコートしたtubeでのcpmに比して、Au抗体をコートしたtubeにおいては、コートする抗体の濃度に比例して、結合する¹²⁵IラベルAu抗原のcpmが増加する。特にAu抗体濃度が200~6400倍希釈の範囲では、そのdose-responseは直線的である。以上のことからtubeにコートされる抗体は、定量的であり、それがAu抗原と定量的に反応するものといえる。

次にコートする抗体をAu抗体以外のウィルス抗体および動物血清に変え、¹²⁵IラベルAu抗原と反応するかどうかを検討した。

Materials used	Concentration used	CPM of Au- ¹²⁵ I bounded to coated tubes
Buffer control	—	275 ± 36
Normal human serum	1:100	341 ± 15
Normal guinea pig serum	1:100	335 ± 7
Anti-Au (guinea pig)	1:500	2849 ± 11
Anti-Au (rabbit)	1:500	4264 ± 8
Anti-Polio I (rabbit)	1:100	257 ± 18
Anti-Polio III (rabbit)	1:100	297 ± 35
Anti-Measles (monkey)	1:100	273 ± 11

Table. 1. Reaction of ¹³¹I-labeled Au-ag in tubes coated with several kinds of viral anti-sera

表1のごとく、¹²⁵IラベルAu抗原は、2種類のAu抗体とのみ反応し、polio, measlesの抗血清、正常人血清およびモルモット血清とは、全く反応しない。

従ってSP-RIAにおける抗原の反応は、対応する特異抗体がコートされているtubeにおいてのみ起ることが明らかである。

(2) SP-RIAのサンドイッチ型反応における¹²⁵IラベルAu抗体の結合に及ぼす非ラベルAu抗体の影響。

図2には、¹²⁵IラベルAu抗体と非ラベルAu抗体との競合反応の結果が示されている。図から明らかのように、非ラベルAu抗体により反応がブロックされて

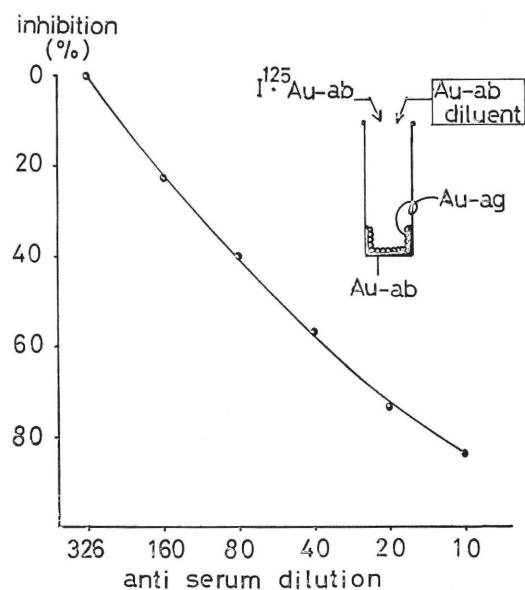


Fig. 2. Inhibition of non-labeled Au-ab against the reaction of Au-ag and labeled Au-ad in solid phase RIA

Serum No.	Bounded CPM	Serum No.	Bounded CPM
1	548 ± 53	16	496 ± 41
2	452 ± 35	17	270 ± 34
3	339 ± 26	18	251 ± 25
4	491 ± 39	19	495 ± 40
5	382 ± 27	20	501 ± 16
6	366 ± 35	21	596 ± 52
7	387 ± 31	22	451 ± 51
8	328 ± 53	23	367 ± 20
9	422 ± 33	24	303 ± 26
10	436 ± 53	25	371 ± 32
11	306 ± 44	Buffer	470 ± 20
12	365 ± 23		
13	363 ± 27		
14	431 ± 53	Buffer + 1% EPA	411 ± 18
15	603 ± 67		
		mean CPM	413 ± 93

Table. 2. Evidence for Specificity of RIA of Au-ag (I)

Several lots of normal human serum did not show high CPM,

おり, 従って, その特異性が示された。

(3) Au 抗体-coated tube における非特異的反応の関与の可能性。

Au 抗原の代りに, 被検体として Au 陰性の正常人血清を反応させた場合, どの位の cpm の変動があるかを検討した。用いた人血清は SP-RIA よりも 10~50 倍感度の高い MF-RIA によって Au 抗原陰性と判定されたものである。

表 2 に示したごとく, 平均 413 ± 93 cpm で, Buffer control と大差なかった。

さらに, 各種の動物血清, ウィルス, 酵素タンパクおよびホルモンとの反応を検討した。

表 3 に明らかにごとく, Au 抗原陽性血清および抗モルモット IgG との反応においてのみ cpm の著明な上昇が認められ, それ以外のものでは, 著しい上昇はなかった。

以上の実験結果から SP-RIA による Au 抗原測定の特異性は, 明らかであると思われる。

materials tested	cpm
control normal human serum	131 ± 18
mouse serum	155
rat serum	113
guinea pig serum	96
ox serum	78
fetal calf serum	76
horse serum	133
newcastle disease virus	165
crude influenza A ₂ /PR8	156
purified influenza A ₂ /adachi	144
purified influenza B/Lee	159
bovine plasma albumin	134
trypsin	128
chymotrypsin	139
insulin	180
rabbit anti-guinea pig Ig G	10062
Au-ag positive serum	3981

Table. 3. Evidence of specificity of RIA of Au-ag (II)

Several proteins different from Au-ag and anti-guinea pig IgG did not show high cpm.

2. Cut-off 値の決定

次の問題は, 本法を “yes or no” 反応で用いる場合の cut-off レベルの取り方である。

図 3 は, 精製 Au 抗原を用いて定量を行なったもので

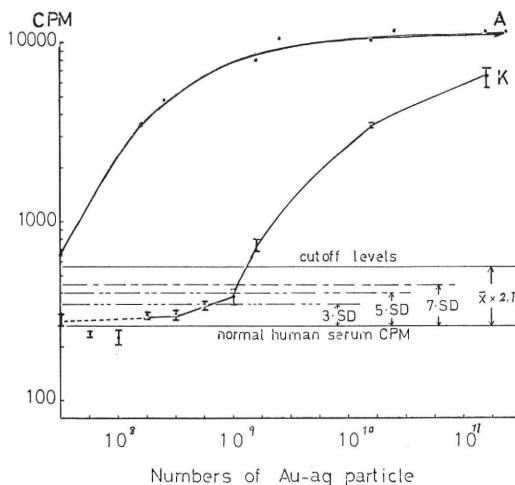


Fig. 3. Relation between CPM and Numbers of Au-ag Particle

ある。

control の cpm に比し, K の場合, 7.5×10^8 と 10^9 粒子以上のとき, 有意の cpm を示している ($P < 0.01$)。先に述べたように, 正常人血清の lot 間の cpm の変動が約 23% であり, 同一血清間の測定の変動が 10% 以下, 測定者による同一検体についての測定 cpm の変動が 100 cpm 以下であるとすると control の cpm の 5 SD ないし 7 SD を越えれば, Au 抗原陽性とみて差支えないと思われる。ゆえに, Au-K の場合 $1 \sim 2.5 \times 10^9$ 粒子迄本法で検出された訳である。

なお, Abbott 社の指定する $2.1 \times \bar{x}$ の cut-off 値は, 極めて厳しい cut-off point であるといえる。

A 一カーブ, すなわち Abbott 社の精製粒子を用いた場合は, さらに少ない Au 抗原粒子を検出出来る。この場合は, コートされている抗体も, ^{125}I ラベル抗体も, この抗原を源にして調製されているためであろう。このような条件では $2 \sim 5 \times 10^7$ 粒子迄検出可能である。

抗原の場合と同様に, Au 抗体測定の cut-off 値についてみると, 図 4 に示されたごとく, Human-I (石黒) の場合 2^7 倍希釈度, すなわち 12800 倍希釈までを陽性にとることが control cpm に対する有意差から妥当である。この値は control cpm の 7 SD を越えている。

Human-M (ミドリ十字) は, 各希釈度での cpm は Human-I の対応する希釈度における cpm よりも高いが, 最終陽性希釈倍数, すなわち力価は, 2 倍高いに過ぎな

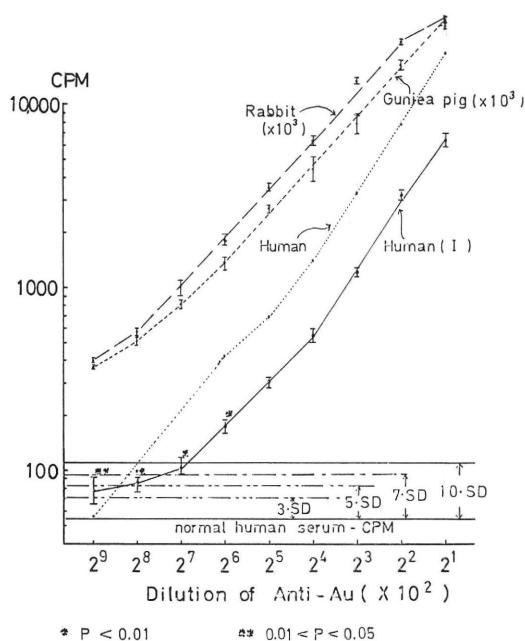


Fig. 4. Standard Curve of Anti-Au

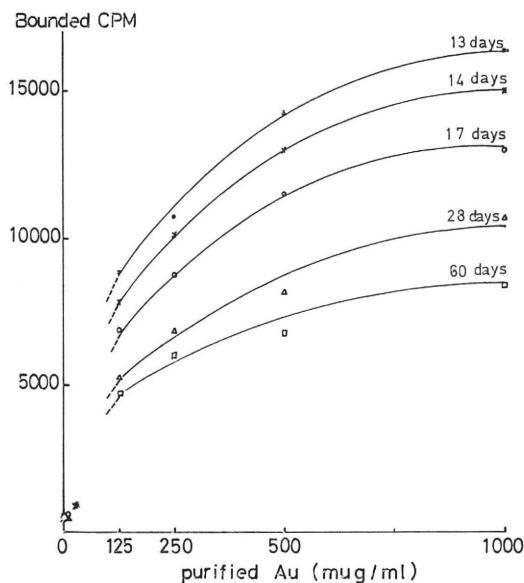
* $P < 0.01$ ** $0.01 < P < 0.05$ 

Fig. 5. Reproducibility of Sp-RIA

* CPM of negative control sera

い。このことは抗体に対する抗原側の immunoreactive site の数的差を示唆しているのではないかと思われる。

3. Arbitrary RIA unit

すでに、われわれによって報告されているが、SP-RIA は再現性においても極めてよい。

しかし、図 5 に示したごとく、 ^{125}I の崩壊と解離により、異なる実験日間の結果を cpm により比較することは出来ないが、"Yes or no" の判定、つまり最終力値には余り差がない。

従って、標準抗原あるいは抗体による標準曲線から arbitrary RIA unit を算出することが望ましい。

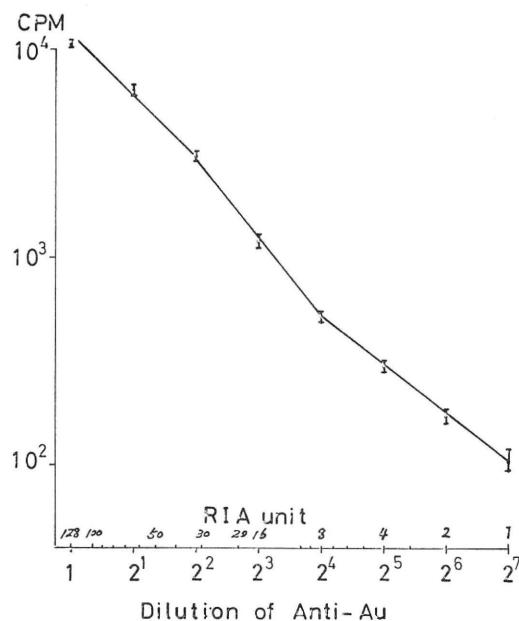


Fig. 6. Calculation of arbitrary RIA unit of Anti-Au in Solid phase Radioimmunoassay

図 6 のごとく、標準とする Au 抗体の限界希釈度 $2^7 \times 10^2$ を 1 SIA unit とし、各濃度における cpm を両対数グラフにプロットすることにより標準曲線を作成する。このグラフから被検体の cpm に対応する arbitrary unit を読む。

この方法は、そのまま Au 抗原にも用いることが出来る。この場合は、標準精製抗原の蛋白量として表わすことも可能である。

考察および結語

Au 抗原・抗体の SP-RIA は、現在最も鋭敏で且つ特異性の点でも充分なものであることが確認された。すなわち、

- 1) 抗体は Polyethylene tube に定量的にコートされる。
- 2) コートされた抗体は、¹²⁵I ラベル Au 抗原と定量的に反応する。
- 3) ¹²⁵I ラベル Au 抗原は polyethylene tube に Au 抗体がコートされた tube にのみ反応する。正常血清や他種抗体とは反応しない。
- 4) coated tube 上に形成された Au 抗原と Au 抗体の complex への ¹²⁵I ラベル Au 抗体の結合(サンドイッチ型反応)は、非ラベル Au 抗体によりブロックされる。
- 5) 正常人血清では、有意の cpm の上昇は認められない。
- 6) ウィルス、酵素タンパク、ホルモンおよび各種動物血清でも cpm の上昇はない。有意の cpm の上昇は Au 陽性血清と抗モルモット IgG のみに認められた。

以上その他に、すでにわれわれが報告^{9,10)}しているように、SP-RIA により血清肝炎および急性ウィルス性肝炎の経過と共に Au 抗原の検出率は減少すること、infectious hepatitis には、著明な検出はないことが明らかにされている。

Au 抗原と Au 抗体を “Yes or no” 反応でみる場合は control から 7 SD 以上の cpm の差を cut-off 値とすれば、まず間違いない。

また、測定値を、力価で表わす場合は標準の抗原および抗体を定め、その標準曲線から被検血清の arbitrary unit を求めることができる。

文 献

- 1) Waloh, J. H., et al., J. Infec. Dis., 121: 550~554, (1970)
- 2) Coller, J. A. and Millman, I., J. Clin. Invest., 49: 20a, (1970)
- 3) 豊島 滋, 他. 第19回日本輸血学会総会. パネルディスカッション, (1971)
- 4) Aach, R. D., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 68: 1056~1060, (1971)
- 5) 豊島 滋, 他. 小児科臨床. 24: 3044~3052, (1971)
- 6) Hollinger, F. B., et al., J. Immun., 107: 1099~1111, (1971)
- 7) 濑戸淑子, 慶應医学, 49: 35~42, (1971)
- 8) Cutt, K. and Tregeari, G. W., Science, 158: 1570~1572, (1967)
- 9) Toyoshima, S., et al., Hepatitis Scientific Memoranda Memo-H-1911, Oct. (1971)
- 10) 豊島 滋, 他, 第19回日本ウイルス学会総会, (1971)

* * *

* * *

*

* *

*

Summary

Specificity of Solid Phase Radioimmunoassay (SP-RIA) of Australia Antigen (Au-ag) and ANTI-Australia Antigen (Au-ab).

Yoshiko SETO, Mariko INAGAKI, Yoshiyuki SHIMAMURA
and Shigeshi TOYOSHIMA

*Division of Chemotherapy, Pharmaceutical Institute,
School of Medicine, keio University.*

The specificity of solid phase radioimmunoassay method for Au-ag and Au-ab was confirmed as follows:

- (1) Au-ab is coated quantitatively on the surface of polyethylene tubes.
- (2) The Au-ab coated reacts quantitatively with ^{125}I -labelled Au-ag.
- (3) ^{125}I -labelled Au-ag shows positive reaction by using a tube coated with Au-ab, but dose not by using tube coated with normal sera or any other kinds of antibody.
- (4) The combination of ^{125}I -labelled Au-ab complex

which has been formed on the surface of a coated tube is blocked with unlabelled Au-ab,

- (5) When normal human serum, several kinds animal sera, several viruses, enzymes and homon are estimated in SP-RIA, any increase of radioactivity is not observed.
- (6) When Au-ag or Au-ab is quantitatively detected by SP-RIA, the cutoff value to be accepted as a positive value is beyond.
- (7) From the estimation value in SP-RIA the arbitrary unit of Au-ag and An-ab is obtained.

* * * * *