

## 6. Radioimmunoassay の特徴

上述のように radioimmunoassay にはなお今後に残された問題点があるが、鋭敏で操作が簡単で、一般に特異性の点でもすぐれている。従って血中ホルモンの動態を連続的に追求したり、血中ホルモンの存在形成を研究するのに適している。また生物学的活性と免疫学的活性の解離を利用し、生物学的活性のみを有するホルモンを投与して内因性ホルモンへの影響を観察するという特殊な利用法もある。

以上ペプチドホルモンの radioimmunoassay の現況、問題点、特徴について述べた。

\*

## 2. Steroid hormone の radioimmunoassay

井林 博

(九州大学 第3内科)

関原忠彦 村上 匡 大沢伸昭

(東京大学 第3内科)

血中 steroid hormone 濃度は副腎 androgen の dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA sulfate) の  $3 \times 10^{-6}$  moles/L, cortisol の  $3 \times 10^{-7}$  moles/L, progesterone, testosterone のそれぞれ  $1 \times 10^{-9}$  moles/L, estradiol, aldosterone のそれぞれ  $3 \times 10^{-10}$  moles/L, と、下垂体前葉 peptide hormone 同様に極めて微量である。血中その他生体試料中の steroid hormone 超微量定量法として Murphy (1968) は(1) 彼女自身の開発した Competitive protein-binding analysis 法 (1963) と (2) 漸く近年北米において開発された Radioimmunoassay 法 (Abraham 1969, Nugent ら 1970) を Radiosteroassay method と命名している。ステロイドホルモンの radioimmunoassay (RIA) の歴史は1957年 Erlanger, Lieberman らによる steroid hormone と牛血清アルブミン (BSA) 結合体の作製と、これを抗原として兎に steroid hapten に対する抗血清の作成という報告に始まる。Abraham (1969) はこの知見に論拠して最少検出量 10 picogram という驚異的な高感度の estradiol の RIA 法を完成し、引続き Nugent ら (1970) は aldosterone, testosterone などの RIA 法を開発した。

われわれは人副腎 androgen である DHEA sulfate のガスクロマト定量法を考案し既に発表した<sup>1)</sup>が、今回 DHEA hapten に対する兎抗血清の作成に成功し、血清 0.01ml (ガスクロ法の 1/200 量) の少量試料で血中 DHEA sulfate の微量定量が可能な RIA 法を開発し

たのでその概略と、同じく Dr. Nugent より分与された aldosterone 抗血清を用いる血中 aldosterone の RIA 法の基礎検討とその臨床応用面の追試成績を紹介する。

われわれの作成した DHEA-17-oxime-BSA 誘導体は mixed anhydride 法を採用し、C17位の Ketone 基と BSA を結合せしめて  $4^3$ -3 $\beta$ -OH 基に対する抗体を作成した。先づ DHEA を O-carboxymethyl-hydroxylamine により DHEA-17-O-carboxymethyl-oxime とし、次いで isobutylchlorocarbonate により酸無水物とした後 BSA と作用せしめて DHEA-17-oxime-BSA を作成した。次いで DHEA-17-oxime-BSA は Thorncroft らの方法に準拠して complete Freund adjuvant と共に emulsion として家兎を免疫し約3カ月で DHEA の RIA に available な抗血清をえた。抗血清は BSA で吸収後、rivanol 処理を行なって RIA assay 系に適用した。

DHEA の標準曲線は 6000 倍稀釈抗血清で 0~300pg 間に良好な検出曲線を示し、DHEA 以外に 5-androstene-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol ( $4^3$ -A-diol) と pregnenolone とのみ有意の交叉反応を示し、これら  $4^3$ -3 $\beta$ -OH steroids の RIA にも適用可能であることを示唆する。本抗血清を用いる血中 DHEA sulfate 微量定量法は再現性即ち accuracy (精度), precision (精度) 共に良好で、臨床的に極めて有用な方法であることを確認した。次に Dr. Nugent より分与された aldosterone-3-oxime-BSA を抗原とする抗血清に関する基礎検討成績からその特異性と再現性が秀れており、10000 倍稀釈抗血清を用いて Conn 症候群 6 例を含む 2~3 疾患における臨床応用面の検討成績を報告する。生体試料中 steroid hormone 微量定量法は Murphy のいわゆる radiostereassay が今後変方法論的方向と考えられるが、Competitive protein-binding analysis 法と共に RIA に関しても臨床の実用化の立場からは更にその測定法の簡便性、迅速性の検討が今後に残された課題と考えられる。

\*

## 3. $\alpha$ -Fetoprotein の radioimmunoassay に よる肝癌の診断について

西 信三 平井秀松

(北海道大学 第1生化学教室)

$\alpha$ -Fetoprotein は肝細胞癌患者の血中に特異的に出現しこのタンパクを血中に検出することは極めて重要な診断的意義を有する。その検出および定量には通常はオク

タロニー法およびマンシニー法などのゲル内沈降反応が用いられているがその検出感度は  $10\mu\text{g/ml}$  程度である。これらの方法でわれわれは肝細胞癌患者74名中52名70%に  $\alpha$ -fetoprotein ( $\alpha\text{f}$ ) を証明した。

またその血中濃度は最高  $3,750\mu\text{g/ml}$  から検出限界の  $10\mu\text{g/ml}$  まで広く分布した (各患者における最高値)。そのうちかなりの症例ではその値は検出限界付近に存在した。血中濃度は一般に病状の進行に伴い増加した。

以上の事実よりより高感度な方法を用いることにより肝細胞癌患者における  $\alpha\text{f}$  検出率が向上する、より早期における診断が可能であると考え radio-immunoassay の検討を行なった。

$\alpha\text{f}$  は抗原抗体沈降物を pH1.8 で解離させ Sephadex G-150 column の gel filtration で抗原 ( $\alpha\text{f}$ ) と抗体に分画して精製した。精製  $\alpha\text{f}$  は硫酸溶液中で結晶化している。

標識は  $^{125}\text{I}$  を用いて Chloramine T 法により行なった。標識  $\alpha\text{f}$  と遊離  $^{125}\text{I}$  の分離は Sephadex G-75 column により行なった。標識物の比放射能は  $16.6\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$  であった。

radioimmunoassay は第1抗体としては精製  $\alpha\text{f}$  で家兎を免疫して得た抗  $\alpha\text{f}$  家兎血清を第2体としては抗家兎  $\gamma$ -グロブリン山羊血清を用いる2抗体法で行なった。

assay system は1%馬血清アルブミン加 phosphate buffered saline 0.5ml, 標識  $\alpha\text{f}$  c.  $10,000\text{cpm}$  0.1ml, 試料または標準血清 0.1ml, 抗  $\alpha\text{f}$  家兎血清 0.1ml および正常家兎血清 0.1ml を混合し  $4^\circ\text{C}$  24時間反応させた後抗家兎  $\gamma$ -グロブリン山羊血清 0.1ml を加え  $4^\circ\text{C}$  24時間反応させた。反応終了後遠心して沈降物の count を測定した。

抗  $\alpha\text{f}$  家兎血清の稀釈は標識  $\alpha\text{f}$  を40%沈降させる30,000倍とした。正常家兎血清は100倍稀釈したものをを用い抗家兎  $\gamma$ -グロブリン山羊血清はこれを十分沈降させ得る10倍稀釈したものをを用いている。

標準血清は健康人血清に精製  $\alpha\text{f}$  を  $500, 500 \times \frac{1}{2}, \dots, 500 \times \frac{1}{256} \text{ m}\mu\text{g/ml}$  になるように加えて作製した。なおこの健康人血清は抗  $\alpha\text{f}$  抗体を BrCN で活性化した Sepharose に結合させて作製した抗体カラムを通過させてもその測定値に変化は認められず  $\alpha\text{f}$  を含有していない。

得られた標準曲線は典型的なものであり  $2\text{m}\mu\text{g/ml}$  の  $\alpha\text{f}$  も十分に検出可能であった。

以上の方法で多数の血清につき検索を行なった。この測定の際には測定時間を1分間としました一部日時を経た標識  $\alpha\text{f}$  を使用したため  $20\text{m}\mu\text{g/ml}$  以上を  $\alpha\text{f}$  陽性とした。

健康人10例はいずれも  $\alpha\text{f}$  は  $20\text{m}\mu\text{g/ml}$  以下であった。

肝癌患者のうちゲル内沈降反応で陰性であった22例では  $500\text{m}\mu\text{g/ml}$  以上6例,  $200\sim 20\text{m}\mu\text{g/ml}$  9例,  $20\text{m}\mu\text{g/ml}$  以下7例であった。

肝炎39例では27例が  $20\text{m}\mu\text{g/ml}$  以上であり最高は  $350\text{m}\mu\text{g/ml}$  であった。

肝硬変26例では16例が  $20\text{m}\mu\text{g/ml}$  以上であり最高は  $160\text{m}\mu\text{g/ml}$  であったがその値一般に肝炎の値よりは低かった。

転移性肝癌9例では3例が  $20\text{m}\mu\text{g/ml}$  以上であった。その他の肝疾患19例では7例が  $20\text{m}\mu\text{g/ml}$  以上であった。

他の悪性疾患36例では3例が  $20\text{m}\mu\text{g/ml}$  以上であったが、心疾患10例, 呼吸器疾患9例はすべて  $20\text{m}\mu\text{g/ml}$  以下であった。

中期以降の妊婦14例はすべて  $20\text{m}\mu\text{g/ml}$  以上であり、最高  $430\text{m}\mu\text{g/ml}$  であったが初期の妊婦8例はすべて  $20\text{m}\mu\text{g/ml}$  以下であった。

以上の症例とは別に北大病院中検に肝機能検査のために提出された430の血清につき、測定した。 $\alpha\text{f}$  が  $20\text{m}\mu\text{g/ml}$  以上を示したものは55例でありその診断名は妊娠5, 新生児および乳児2, 肝炎15, 肝硬変4, 肝癌1, 他の肝疾患4, 他の悪性腫瘍8, その他7, 不明9であった。

結論: 1. radioimmunoassay により感度を5,000倍程度上昇させることが可能である。

2. 高感度な方法でもなお  $\alpha\text{f}$  の検出されない肝細胞癌患者が9%程度存在する。

3. 肝癌以外にも妊婦, 肝疾患患者などに  $\alpha\text{f}$  は検出された。しかしその血中濃度は肝癌に比しかなり低い。

4. 大部分の肝癌患者ではその疾患の極めて初期に  $\alpha\text{f}$  は検出可能でありその推移を観察することにより早期診断が可能と思われる。

\*