

《総 説》

インビトロ検査の進歩と問題点

池 窪 勝 治*

要旨 RI を利用したインビトロ検査の開発の歴史をふりかえるとともに、現在日常検査として行われているインビトロ測定法の原理と測定意義について述べる。

精度・感度・特異性に優れ、迅速に正確な測定値を得ることがインビトロ検査の使命である。しかしながら検体中の種々の妨害因子により正しい測定値が得られないことがある。特に自己抗体と異好抗体の測定値への影響および生物活性と免疫活性の乖離の問題をとりあげて、自験例も含めて報告する。

(核医学 35: 357-366, 1998)

はじめに

RIA の開発にはじまる血中の微量物質の簡便かつ迅速な測定は医学に大きな貢献をしてきた。今やインビトロ検査が病気の診断や治療経過の観察には欠かせない重要な検査法であり、画像診断とは車の両輪のように大切である。

臨床上必要な測定はほぼ確立された。果たしてすべてのインビトロ検査で正確な測定がなされているのか、生物活性をもつものは矛盾しない測定値が得られているのか、より詳細に吟味する時期にあると思われる。

一方、研究面ではモノクローナル抗体の作製による、抗体標識イメージングや抗体標識制癌剤(あるいは RI)複合物質によるいわゆるミサイル療法の基礎研究としてインビトロ検査の研究はますます重要となり、インビトロ検査・治療とともに一体となって進歩する方向にあると思われる。

第 37 回日本核医学会総会教育講演の内容を総説として編集委員会が投稿をお願いした。

* 神戸市立中央市民病院核医学科

受付：10 年 5 月 27 日

別刷請求先：神戸市中央区港島中町 4-6 (〒 650-0046)

神戸市立中央市民病院核医学科

池 窪 勝 治

本稿では診療に大きな役割を果たしているインビトロ検査の発展の歴史をふりかえるとともに、インビトロ測定法の原理と意義について述べる。現時点での問題点として測定値への妨害物質につき自験例をmajie て提示し、生物活性と免疫活性の乖離の問題についてもふれ、測定者および判定者の参考に供し、より正しい診断が行える一助にしたいと思われる。

I. インビトロ検査開発の歴史

インビトロ検査の開発の歴史を Fig. 1 に示す。1955 年 Hamolsky¹⁾ は RI をはじめてインビトロ検査に使用し、1957 年には ¹³¹I 赤血球摂取率の測定²⁾ によって甲状腺機能を診断した。この方法は現在行われている T_3 摂取率の前身である。1959 年には Yalow と Berson³⁾ によって一定量の抗体に ¹³¹I-インスリンを加えて電気泳動するとその放射活性は抗体と結合した ¹³¹I(B) と遊離 ¹³¹I(F) の 2 つのピークとなり、ヒトインスリンを加えることにより B のピークが小さくなることからインスリン量を測定できる Competitive radioimmunoassay を開発した。この画期的な研究に対しノーベル賞を授与されたことはあまりにも有名である。RIA の開発により血中の微量物質が測定され、医学は長足の進歩を遂げた。1960 年には Ekins⁴⁾ が

RIAにおける抗体の代わりにT₄の特異的結合蛋白であるTBGを用いてT₄を、Murphyら⁵⁾も同様にCBGを利用してコルチコイドを測定する競合的蛋白結合測定法(CPBA)を開発した。1967年にはWideら⁶⁾により特異的IgE抗体の検出法RASTが考案された。1968年にはMilesら⁷⁾によって¹²⁵Iで標識した精製インスリン抗体に標準または検体中のインスリンを結合させる。次に未結合の¹²⁵I標識抗体にインスリン結合免疫吸着剤を加えて沈澱除去後に上清をカウントする。インスリン量とカウントが比例することからインスリン量を測定する新しい測定法immunoradiometric assay(IRMA)を開発した。この測定法はKöhlerとMilstein⁸⁾による細胞融合法なる画期的な手法によってモノクローナル抗体を作製することが容易となり、急速に進歩した。一方1973年頃より標識物質にRIを使用しない非放射免疫測定法(non-isotopic immunoassay)である酵素免疫測定法、化学発光免疫測定法、化学発光酵素免疫測定法および蛍光免疫測定法などによる測定が急速に進歩してきた。

II. インビトロ検査の測定法

1. 飽和分析法(saturation analysis)

血清にRI標識物質(トレーサー)を加えて結合蛋白と反応させ飽和させる。結合しなかった遊離のトレーサーを抗体または吸着剤に結合させて分離し、放射能を測定することにより結合蛋白の不飽和結合能の大きさを知ると同時に結合蛋白に結合している物質の濃度を推定する方法である。現在は¹²⁵I-T₃をトレーサーとして用いてTBGの不飽和結合能を知るT₃摂取率検査と⁵⁹Feを用いてトランスフェリンの不飽和鉄結合能(UIBC)を測定する方法がある。これらの値は結合蛋白自身の濃度の変動で変わるため、結合蛋白に結合している物質の濃度の推定には注意が必要である。

2. 競合的ラジオアッセイ(Competitive radioassay)

1) ラジオイムノアッセイ(RIA)

RIAの測定原理をFig.2に示す。一定量の抗体

1955	Hamolsky MW ^{1,2)} ¹³¹ I赤血球摂取率検査の開発
1959	Yalow RS & Berson SA ³⁾ インスリンのRIA開発
1960	Ekins RP ⁴⁾ , Murphy BP ⁵⁾ 競合的蛋白結合測定法(CPBA)の開発
1967	Wide L & Johansson SG ⁶⁾ RASTの開発
1968	Miles LEM ⁷⁾ IRMAの開発
1975	Köhler G & Milstein C ⁸⁾ 細胞融合法によるモノクローナル抗体の作製

Fig. 1 Development of in vitro assay.

と一定量の¹²⁵I標識抗原(トレーサー)に非標識抗原(標準物質)あるいは検体を加えて、抗原抗体反応をおこさせる。抗体と結合したもの(B)と遊離(F)のトレーサーを分離する。抗原とトレーサーは競合して抗体と結合するため、Bと加えた全トレーサーの放射能の比B/T(%)は抗原量が多くなればなるほど減少する。縦軸にB/T(%)、横軸に標準物質の濃度をプロットすると標準曲線が得られる。未知検体のB/T(%)を標準曲線から読み取り、抗原濃度が測定できる。

2) 競合的蛋白結合測定法(CPBA)

RIAにおける抗体の代わりに特異的結合蛋白を使用したものがCPBA法である。従来はTBGやCBGを結合蛋白として用いT₄やコルチゾールが測定されていたが、今はRIA法により測定されている。現在CPBA法により測定されているものはVB₁₂と葉酸のみである。結合蛋白としてブタ内因子、トレーサーに⁵⁷Co-VB₁₂を用いてVB₁₂を測定すると同時に、牛乳葉酸結合タンパクと¹²⁵I-葉酸を使用して葉酸も測定される。

3) ラジオレセプター・アッセイ(RRA)

RIAにおける抗体の代わりにレセプターを使用したものがRRAである。RRAはRIAやIRMAに比較して感度が低く、本法によって微量物質を測定する目的に用いられることは少ない。むしろRRAでは生物活性に関連した測定が行われる。すなわちレセプターの数や性状を調べて、その機能や解析の研究に用いられている。またレセプター抗体の検出にも用いられる。例えばバセドウ

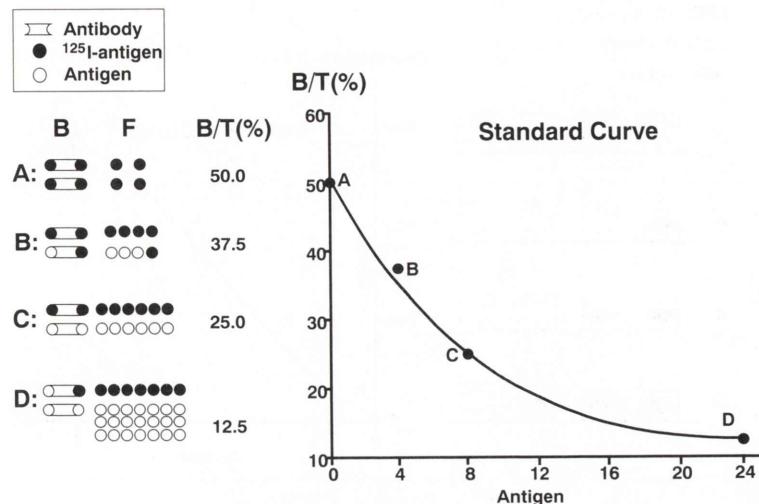


Fig. 2 Principle of RIA.

病における TSH レセプター抗体や重症筋無力症における抗アセチルコリンレセプター (AChR) 抗体がある。前者の検出には 2 種類ある。その 1 つは患者 IgG がウシ ^{125}I -TSH のブタ TSH レセプターへの結合を阻害する活性 TBII (thyrotropin binding inhibitor immunoglobulin) として検出され、TRAb (TSH receptor antibody) と呼ばれている。他の 1 つの検出法は生物学的活性を指標とするものである。パセドウ病患者 IgG は TSH レセプターと結合、刺激して cAMP を産生する。産生した cAMP を RIA で測定することによって、レセプター抗体の刺激活性すなわち TSAb (thyroid stimulating antibody) を知ることができる。また原発性甲状腺機能低下症の原因の一つであり TSH レセプターとは結合するが、TSAb 活性はなく TSH による cAMP の上昇を抑制する阻害型抗 TSH レセプター抗体 (thyroid stimulation blocking antibody: TSBAb) も検出できる。

抗 AChR 抗体の検出は重症筋無力症 (MG) の診断および治療経過の追跡に有用である。その検出には結合抗体および阻止抗体の 2 種類の抗体検出方法がある。結合抗体の検出方法はまずヒト骨格筋 AChR に不可逆的に結合する ^{125}I 標識蛇神経毒、 α -bungarotoxin (α -BuTx) を結合させ、次い

で MG 患者の IgG が α -BuTx 結合部位以外の AChR と結合することにより抗 AChR 抗体を検出する。阻止抗体の検出は AChR と ^{125}I α -BuTx との結合を阻害する活性として抗 AChR 抗体を検出する方法である。

その他の RRA には $1,25\text{-}(\text{OH})_2\text{D}_3$ の測定がある。この方法はウシ胸腺 (あるいは乳腺) レセプターに対する ^3H 標識 $1,25\text{-}(\text{OH})_2\text{D}$ と未知検体中の $1,25\text{-}(\text{OH})_2\text{D}$ の競合により測定する。

3. Immunoradiometric assay (IRMA)

IRMA の測定原理を Fig. 3 に示す。固相化抗体に抗原を結合させ、次に精製した標識抗体を加えて抗原に結合させてサンドイッチにし、遊離の標識抗体は洗滌により除去する。抗原と標識抗体を同時に加える one step 法と抗原を結合させて、洗滌後に標識抗体を加える two step 法がある。標準物質の濃度の増加につれてカウントが増加する標準曲線が得られる。本法はモノクローナル抗体作製の技術の進歩により均一なモノクローナル抗体を大量に作製できるようになり飛躍的に発展した。IRMA は RIA に比べて測定感度がよく特異性に優れ、測定法も簡便であるため、近年は RIA から IRMA への多くの移行が見られている。本法の唯一の欠点はしばしば高濃度で結合カウントが低

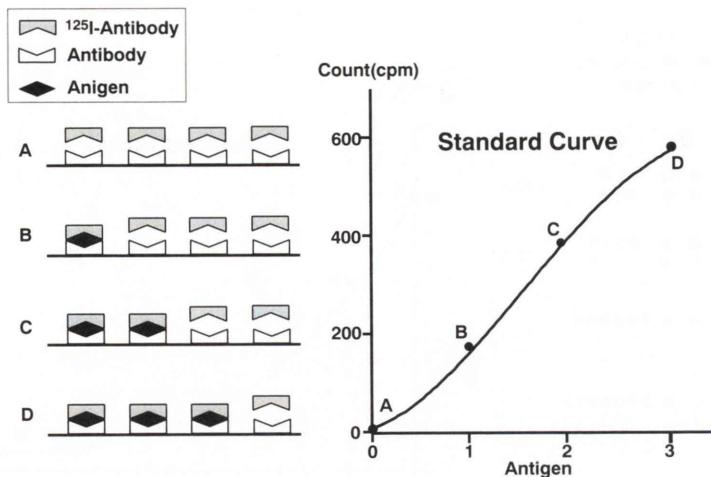


Fig. 3 Principle of IRMA.

下するフック(プロゾーン)現象が見られることがある。この現象は過剰の抗原下ではトレーサが遊離の抗原にも結合するためにおこる現象と考えられている。

III. 測定物質

1. 種類

RI インピトロ検査による測定物質は GH, IRIなどのタンパク性ホルモン、ステロイド、甲状腺ホルモンなどの非タンパク性ホルモンそしてホルモン以外の薬剤、ウイルス特異抗原、抗体、腫瘍抗原、腫瘍関連物質など多くの微量物質が測定される。

2. 腫瘍マーカー

腫瘍マーカーとは悪性腫瘍が産生する物質で、体液中の濃度、特に血液中の濃度を測定することにより、腫瘍の有無、治療効果の判定、治療経過の観察に役立つ物質である。

RI を用いた腫瘍マーカー測定キットは現在 19 種類が保険認可されている。抗原決定基(エピトープ)が蛋白であるものが 10 種類、糖鎖抗原が 6 種類、酵素が 3 種類である。

今のところ腫瘍だけに特異的に測定される物質はなく、健常者においても微量ながら検出される。したがって悪性腫瘍のスクリーニングにも用

いられるが、その早期診断には必ずしも役立つとは限らない。また悪性と良性の鑑別は腫瘍マーカーのみでは困難であることを銘記すべきである。

個々の腫瘍マーカーの特徴をよく熟知して利用することが必要である。例えば、甲状腺臓様癌においてはカルチトニンや CEA はきわめて有用である。甲状腺分化癌およびその転移では Tg は異常高値となる。Tg は健常者でも検出され、他の甲状腺疾患でも高値となるため決して甲状腺分化癌に特異的ではない。しかしながら、甲状腺分化癌に対する甲状腺全摘後に Tg が検出されれば異常であり、残存癌や転移の診断および RI 治療の効果を判定するうえでの良い腫瘍マーカーとなり得る。

異所性ホルモン産生腫瘍は、腫瘍が発生したもとの組織が本来は産生しないホルモンを多く産生する腫瘍で、悪性のことが多い。例えば肺癌が ACTH を産生する場合がある。一般に本腫瘍ではホルモンの生物活性と免疫活性は一致しないことが多い。したがって、ホルモン過剰の症状を示さないが、測定値は異常高値となるのでその診断や治療効果のマーカーとなる。

悪性腫瘍が複数の腫瘍マーカーを産生する場合がある。例えば肝細胞癌における PIVKA-II と AFP である。両側測定値は相関しないが同一腫瘍

から産生されるため、両者の測定により陽性率が上がる。このように腫瘍マーカーのコンビネーションアッセイも診断上重要である。

血中のみならず胸水や腹水中の腫瘍マーカーの測定も役立つ。ただし体液の測定においては、非特異的な測定に陥らないように体液の測定系を確立して測定する必要がある。

乳頭分泌液中の CEA は乳癌の検診に利用されている。

良性、悪性にかかわらず、胸膜、腹膜上皮細胞

の非特異的刺激により CA-125 が産生される。したがって胸水・腹水患者では体液中の CA-125 が高値となるので注意を要する。

AFP は肝細胞癌や卵巣原発卵黄嚢癌の良い腫瘍マーカーである。著者らは AFP が治療効果の観察に良い指標となった卵黄嚢癌(20 歳、女性)の一例を経験した。治療前の血中 AFP は 120,000 ng/ml と異常高値であった。腫瘍摘出手術および放射線照射、抗癌剤投与により AFP が減少し、治療開始後 8 か月で 4.5 ng/ml 以下となったが、再び 300 ng/ml に上昇した。馬抗 AFP 抗体に制癌剤 Doxorubicin (DXR) を結合させた複合体 (Anti-AFP-DXR) による治療を 2 回、続いてマウス AFP モノクローナル抗体と MMC 複合体 (Anti-AFP-MMC) による治療を施行した。

Fig. 4 はミサイル療法後の 2 抗体法 RIA およびサンドイッチ法を利用した EIA (AxSYM) による血中 AFP 値と ^{125}I -AFP 結合率の変化を示す。 ^{125}I -AFP 結合率は患者血清に ^{125}I -AFP を加え PEG 法により沈殿した放射能量の全放射能量に対する割合である。第 1, 2 回目のミサイル療法直後はいずれも AFP 両側定値とも急速に低下したが、再び上昇し治療 20 日目以後は徐々に低下した。第 3 回目のミサイル療法においては AFP は軽度低下した後徐々に上昇した。治療直後の AFP の急速な一過性低下は治療効果とは考えにくく、ミサイル抗体による測定値への影響であり、治療後 20 日以後のゆっくりした低下が治療効果によるものと推察されるが、詳細は不明である。なおミサイル治療後の患者血清には HAMA は検出されなかった。

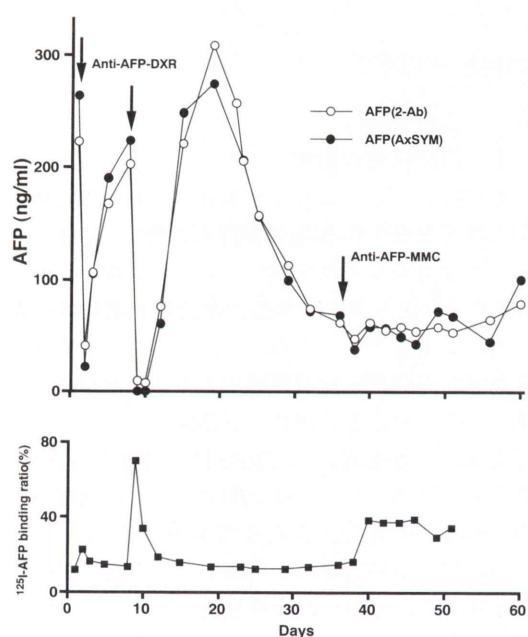


Fig. 4 Sequential changes of serum AFP and ^{125}I -AFP binding ratio after missile therapy in a patient with Yolk sac cancer.

Table 1 Autoantibodies which may interfere with the immunoassays and cause false results

Autoantibodies	Year	Author	Reference
Anti-Tg autoantibody	1956	Roitt IM, et al	9
Anti-insulin autoantibody	1970	Hirata Y, et al	10
Anti-T ₃ , T ₄ autoantibody	1975	Staeheli V, et al	11
Anti-T ₄ autoantibody	1975	Ikekubo K, et al	12
Anti-glucagon autoantibody	1976	Baba S, et al	13
Anti-TSH autoantibody	1984	Akamizu T, et al	14
Anti-PRL autoantibody	1992	Hattori N, et al	15

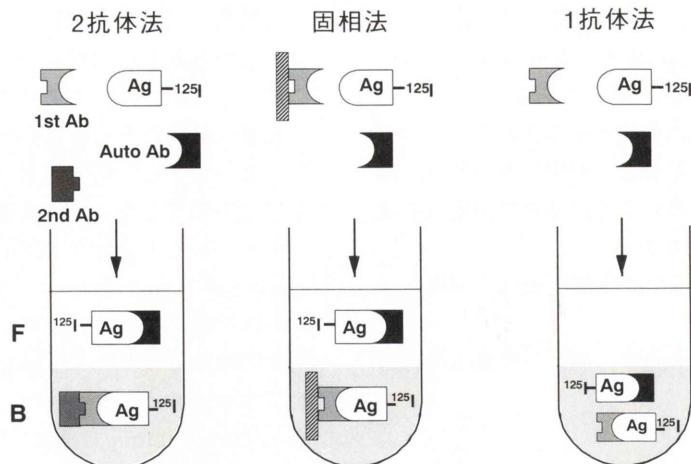


Fig. 5 Effect of autoantibody on RIA.

3. IgE、特異 IgE 抗体

アレルギー疾患において血中総 IgE、特異 IgE 抗体の測定は診断および治療に重要である。RIST (radioimmunosorbent test) は血中総 IgE を RIA により測定する。RAST は病因的抗原 (アレルゲン) に対する特異 IgE 抗体 (検体あるいはレファレンス) を加えて結合させ、これに ^{125}I 標識抗 IgE 抗体を添加して放射能を測定し、レファレンス血清と比較することにより検出する。アレルゲンとしては気管支喘息、アレルギー性鼻炎およびアトピー性皮膚炎などの原因となるアレルゲンが多種類 (約 200 種類) 用いられている。

IV. インビトロ検査の問題点

キットの基礎検討には反応条件、希釈・回収試験、再現性、交差試験、最小検出濃度の検討が行われる。特にイムノアッセイは抗原・抗体反応を利用した測定法であり、測定しようとする抗原に対する特異性の高い交差反応の少ない抗体が必要である。

検体中に自己抗体や異好抗体がある場合正しい測定値が得られないことがある。以下はこれらの抗体による測定値への影響について述べる。また生物活性と免疫活性の乖離の問題についても触れる。

1. 自己抗体の影響

検体中に測定しようとする物質に対する抗体が存在すると正しい測定値が得られない。GH 分泌不全性低身長症や糖尿病にたいする治療として、GH やインスリンを投与した場合に患者に抗体ができることがある。これらの抗体の存在は GH やインスリンの測定値に影響するため注意が必要である。投与歴がある場合は抗体陽性の推察は容易である。しかしながら Table 1^{9~15)} に示す自己抗体を含む検体においては予期せず正しい測定値が得られないため注意が必要である。

Fig. 5 は RIA において検体中に自己抗体が存在する場合の測定値への影響を模式的に示す。甲状腺ホルモン自己抗体では自己抗体とキット抗体が同じ antigenic site を認識するため、2 抗体法および固相法では標識抗原は自己抗体とも結合し、キット抗体との結合 (B) が減少するため異常に高値となる。一方、1 抗体法では B のカウントは高くなり、真の値より低くなる。

Tg のような大分子に対する自己抗体では甲状腺ホルモンのような小分子の場合とは異なる。2 抗体法 RIA による Tg の測定では自己抗体の存在により異常低値¹⁶⁾ となる。低値となる理由は標識 Tg が複数の antigenic site をもつ巨大分子であり、キット抗体および自己抗体と結合し沈殿しや

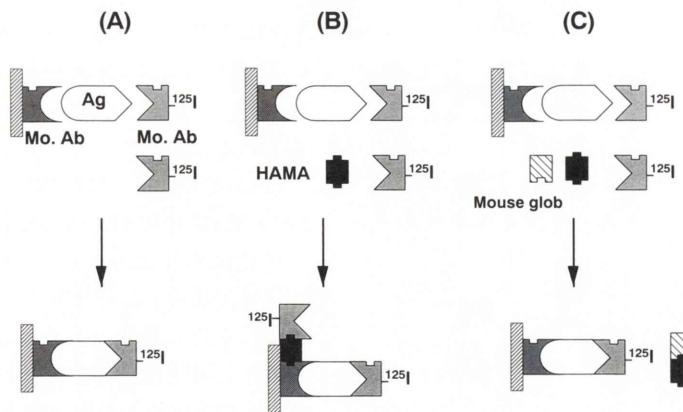


Fig. 6 Effect of HAMA on RIA.

すことや、第2抗体がヒト IgG と交差反応するか否かにより影響される^{16,17)}。

プロラクチン (PRL) の測定においても Tg 同様 2 抗体法および 1 抗体法では低値となる¹⁸⁾。

IRMA 法では理論的には測定物質の抗体認識部位がキット抗体と自己抗体で異なる場合は正しく測定できるが、同じ場合は影響され低値となる。IRMA 法による Tg の測定では Tg 抗体価が高いほど強く影響され低値となる¹⁹⁾。しかしながら PRL ではあまり影響を受けない¹⁸⁾。

1970 年平田ら¹⁰⁾は低血糖をくりかえすインスリン投与歴のない患者の血中にインスリン自己抗体を検出し、これが低血糖発作の原因であることを世界に先駆けて報告し、インスリン自己免疫症候群 (IAS) と命名した。これらの症例においては 2 抗体法により IRI 測定値が異常高値となる。著者ら²⁰⁾も tiopronin (α -mercaptopropionyl glycine) が原因と思われる 2 例の本症候群を経験した。本薬剤中止後約 6-7 か月で両症例の自己抗体は消失した。IAS の原因としては約 30% に薬剤の関与が考えられており、tiopronin をはじめ、メチマゾールなど SH 基の構造をもつ薬剤の関与が報告されている。

1975 年 Staeheli ら¹¹⁾は甲状腺疾患患者において T_3 , T_4 に対する自己抗体があることを実験的に証明した。同年著者らは RIA による T_4 測定法

を検討中に甲状腺機能がほぼ正常の橋本病の 1 例において CPBA 法では T_4 が正常であるが、RIA (1 抗体法) では異常低値になり両測定値が乖離することを発見し、 T_4 自己抗体が原因であることを臨床例として初めて報告^{12,21)}した。その後 T_3 , T_4 自己抗体の消長する症例²²⁾が認められ、これらの自己抗体産生の原因としては甲状腺剤投与などが考えられ、Tg 抗体と関連深いことが推察された。しかしながらこれらの症例にのみ見られる臨床的な特徴はなお明らかではない。

1976 年馬場ら¹³⁾によりインスリン治療歴のない糖尿病の患者で、はじめてグルカゴン自己抗体が報告された。

著者らは血漿グルカゴンが 3,170 pg/ml と異常高値の 1 例²³⁾を経験した。その理由についての詳細な検討の結果、グルカゴノーマは検出されず、グルカゴン自己抗体や異好抗体の存在は否定された。測定に使用したキットの抗体が患者の IgG を認識して結合するため、異常高値となったものとの結論が得られた。

1984 年赤水ら¹⁴⁾は TBII の測定において、¹²⁵I-TSH が患者 IgG と結合するため TBII 測定値が得られない 2 例のバセドウ病を認めた。その理由は患者血中にウシ TSH 抗体が存在するためであることを証明した。さらに 1987 年には甲状腺機能中毒症にもかかわらず 2 抗体法 RIA で TSH が正

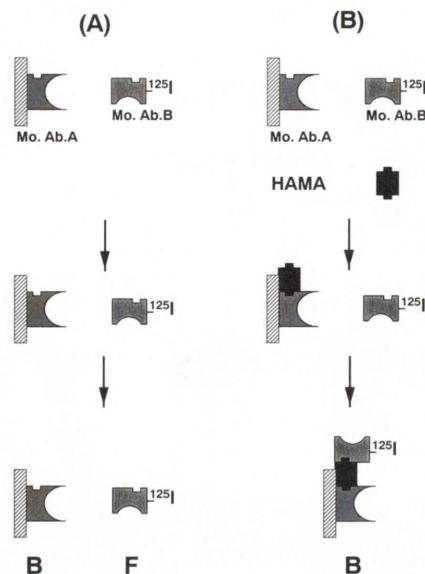


Fig. 7 Detection of HAMA.

常範囲であるバセドウ病の1例でヒトTSH自己抗体²⁴⁾を認め、TRAbのantiidiotype抗体と考えられた。

1992年服部ら¹⁵⁾は無症状の特発性高プロラクチン(PRL)血症5例の患者に抗プロラクチン自己抗体(抗PRL抗体)を認めた。その後の検討²⁵⁾では突発性高PRL血症の16%に抗PRL抗体が認められ、これらの患者の血中PRLは高値である。高値の理由の1つとしてPRLのクリアランスが遅くなるためではないと考察している。

2. 異好抗体の影響

ヒトの血中にあってマウスやウサギなどの動物の抗原と反応する抗体を異好(ヘテロフィリック)抗体という。マウスに対する抗体をHAMA(human anti-mouse antibody)という。これらの抗体のできる理由としては、診断や治療のためにモノクローナル抗体を投与されたとかワクチンの関与などが考えられているが、不明の場合が多い。

IRMAにおけるHAMAの影響をFig. 6に示す。固相化抗体および標識抗体ともにマウスにより作製されたモノクローナル抗体である。検体中に含まれるHAMAは両抗体と結合するために真の測

定値より高値となる。この影響を防ぐため、あらかじめマウスの血清やグロブリンを添加してHAMAを吸収して測定すれば、正しい測定値が得られる。

HAMAの検出には検体にマウス血清(IgG)を添加し添加前後の測定値の変化より予測できる。

HAMAの検出の1方法をFig. 7に示す。HAMAが陰性の場合(A)には固相化モノクローナル抗体には放射能は検出されないが、HAMAが存在する(B)と固相化抗体に結合したHAMAが標識抗体とも結合するため検出できる(架橋法)。市販のキットの固相化抗体と標識抗体を利用して検出できる。

3. 生物活性と免疫活性の乖離

イムノアッセイ測定法が抗原抗体反応に基づく測定法であるかぎり、生物活性と免疫活性が同じでなければ、臨床的意義が少ないと。ただし、生物活性が明瞭に判定できる物質ではない場合はそれが確認できない。

ACTH、PTHなどのペプチドホルモンはN端側に生物活性が、C端側に免疫活性が存在する。したがって用いる抗体によって認識部位が異なり両測定値に乖離が生ずる。

中枢性甲状腺機能低下症における血清TSH濃度は低値であるはずであるが、イムノアッセイによるTSH測定値が正常～若干高値の症例がしばしば認められる。現状のイムノアッセイでは正常のTSHと生物活性の乏しいTSHを完全には識別できない。

堀本ら²⁶⁾は血中TSHが正常～高値の中枢性甲状腺機能低下症においてインビトロでは生物活性は正常であるが、TRH負荷テストによる内因性TSHによる甲状腺の反応は弱く、インビボで生物的活性が低下していることを指摘している。

1978年Kowarskiら²⁷⁾は2例のDwarfismの男児において、GH分泌刺激試験でRIA-GHは正常反応であるが、ソマトメジンが低値である症例を報告した。本症例は外因性ヒトGH投与により正常レベルのソマトメジンが産生され成長が促進された。これらの血中GHはRRA/RIA比が低く、

免疫活性はあるが生物学的活性が乏しいGH 分泌によって惹き起こされる疾患であり、GH レセプター異常症である Laron 症候群とは異なる症候群である。

おわりに

インビトロ検査の開発の歴史を辿るとともに、現在日常検査として行われている測定法(飽和分析法、競合的ラジオアッセイ、IRMA)の原理と意義について述べた。

インビトロ検査の問題点として、検体中の妨害因子となる自己抗体と異好抗体の測定値への影響および生物活性と免疫活性の乖離の問題をとりあげ、自験例を提示するとともに文献的 review を試みた。

文 献

- 1) Hamolsky MW: The plasma protein-thyroid hormone complex in thyrotoxicosis vs euthyroidism in man. *J Clin Invest* **34**: 914, 1955 (abstract)
- 2) Hamolsky MW, Stein M, Freedberg AS: The thyroid hormone-plasma protein complex in man. II. A new in vitro method for study of "uptake" of labelled hormonal components by human erythrocytes. *J Clin Endocrinol Metab* **17**: 33-44, 1957
- 3) Yalow RS, Berson SA: Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature* **184**: 1648-1649, 1959
- 4) Ekins RP: The estimation of thyroxine in human plasma by an electrophoretic technique. *Clin Chim Acta* **5**: 453-459, 1960
- 5) Murphy BP, Engelberg W, Pattee CJ: Simple method for the determination of plasma corticoids. *J Clin Endocrinol Metab* **23**: 293-300, 1963
- 6) Wide L, Bennich H, Johansson SGO: Diagnosis of allergy by an in-vitro test for allergen antibodies. *Lancet* **25**: 1105-1107, 1967
- 7) Miles LEM, Hales CN: Labelled antibodies and immunological assay systems. *Nature* **219**: 186-189, 1968
- 8) Köhler G, Milstein C: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**: 495-497, 1975
- 9) Roitt IM, Doniach D, Campbell PN, Hudson RV: Autoantibodies in Hashimoto's disease (lymphadenoid goiter). *Lancet* **2**: 820, 1956
- 10) 平田幸正, 石津 汪, 大内伸夫, 本村正治, 安部宗顯, 原 泰寛, 他: インスリン自己免疫を示した自発性低血糖症の1例. *糖尿病* **13**: 312-320, 1970
- 11) Staeheli V, Vallotton MB, Burger A: Detection of human anti-thyroxine and anti-triiodothyronine antibodies in different thyroid conditions. *J Clin Endocrinol Metab* **41**: 669-675, 1975
- 12) 池窪勝治, 遠藤啓吾, 小西淳二, 中島言子, 鳥塚莞爾, 森 徹: Radioimmunoassay と competitive protein binding analysis における血中 thyroxine 濃度測定値の解離について. 第23回日本内分泌学会西部部会総会抄録; 85-86, 1975
- 13) Baba S, Morita S, Mizuno N, Okada K: Autoimmunity to glucagon in a diabetic not on insulin. *Lancet* **2**: 585, 1976
- 14) Akamizu T, Ishii H, Mori T, Ishihara T, Ikekubo K, Imura H: Abnormal thyrotropin-binding immunoglobulins in two patients with Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* **59**: 240-245, 1984
- 15) Hattori N, Ishihara T, Ikekubo K, Moridera K, Hino M, Kurahachi H: Autoantibody to human prolactin in patients with idiopathic hyperprolactinemia. *J Clin Endocrinol Metab* **75**: 1226-1229, 1992
- 16) 小西淳二, 御前 隆, 高坂唯子, 中島鉄夫, 飯田泰啓, 遠藤啓吾, 他: サイログロブリンの radioimmunoassay kit(栄研)に関する基礎的検討. 核医学 **20**: 1207-1214, 1983
- 17) Schneider AB, Pervos R: Radioimmunoassay of human thyroglobulin: effects of antithyroglobulin autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab* **47**: 126-137, 1978
- 18) Hattori N, Ikekubo K, Ishihara T, Moridera K, Hino M, Kurahachi H: Effects of anti-prolactin autoantibodies on serum prolactin measurements. *Eur J Endocrinol* **130**: 434-437, 1994
- 19) 池窪勝治, 太田圭子, 才木康彦, 中西昌子, 野沢浩子, 富永悦二, 他: サイログロブリン抗体陽性の患者における血中サイログロブリン濃度の測定. **41**: 111-121, 1993
- 20) 才木康彦, 石川昌子, 太田圭子, 富永悦二, 野沢浩子, 川井純一, 他: Tiopronin (α -mercaptopropionyl glycine)により発症したと思われるインスリン自己免疫症候群の2例. 核医学技術 **13**: 19-26, 1992
- 21) 池窪勝治, 小西淳二, 中島言子, 遠藤啓吾, 鳥塚莞爾, 森 徹: 抗サイロキシン自己抗体を認めた橋本病の1例について. 日内分泌会誌 **52**: 1020-1032, 1976
- 22) 池窪勝治, 日野 恵, 才木康彦, 梶川麻里子, 服部尚樹, 石原 隆, 他: 長期間治療中に甲状腺ホルモン自己抗体の消長を認めた甲状腺疾患の3例. 日内分泌会誌 **71**: 695-708, 1995
- 23) Hattori N, Saiki Y, Kajikawa M, Ishihara T, Moridera

- K, Hino M, et al: Immunoglobulin G can cross-react with glucagon antisera and cause a spuriously high plasma immunoreactive glucagon level. *Endocrine J* **42**: 455-460, 1995
- 24) Akamizu T, Mori T, Kasagi K, Kosugi S, Miyamoto M, Nishino K, et al: Anti-TSH antibody with high specificity to human TSH in sera from a patient with Graves' disease: Its isolation from, and interaction with, TSH receptor antibodies. *Clinical Endocrinology* **26**: 311-320, 1987
- 25) Hattori N, Ikekubo K, Ishihara T, Moridera K, Hino M, Kurahachi H: Correlation of the antibody titers with serum prolactin levels and their clinical course in patients with anti-prolactin Autoantibody. *Eur J Endocrinol* **130**: 438-445, 1994
- 26) Horimoto M, Nishikawa M, Ishihara T, Yoshikawa N, Yoshimura M, Inada M: Bioactivity of thyrotropin (TSH) in patients with central hypothyroidism: Comparison between in vivo 3,5,3'-triiodothyronine response to TSH and in vitro bioactivity of TSH. *J Clin Endocrinol Metab* **80**: 1124-1128, 1995
- 27) Kowarski AA, Schneider J, Ben-Galim E, Weldon VV, Daughaday WH: Growth failure with normal serum RIA-GH and low somatomedin activity: Somatomedin restoration and growth acceleration after exogenous GH. *J Clin Endocrinol Metab* **47**: 461-464, 1978

Summary

The Progress and Methodologic Problems of In Vitro Radioassay

Katsuji IKEKUBO

Department of Nuclear Medicine, Kobe City General Hospital

The history of development of in vitro radioassays is reviewed.

The basic principles and clinical uses of saturation analysis, competitive radioassay and immunoradiometric assay are described.

The more rapid, sensitive, specific and accurate assays are required at all times. However, it is well known that autoantibodies or heterophilic antibodies in serum interfere with radioassay and cause false

results. Here I present the technical problems of the assay in the presence of such interfering substances which need to be resolved and also discussed the discrepancy between bioactivity and immunoreactivity in the assay.

Key words: Radioimmunoassay, Immunoradiometric assay, Autoantibody, Heterophilic antibody, Bioactivity, Immunoreactivity.