A Method of Solid Phase Radioimmunoassay Utilizing Latex Particles

Taro TAMADA and Yoshiji TSUKUI

Department of Obstetrics and Gynecology, Gunma University, Maebashi, Japan
(Director : S. Matsumoto)

A new solid phase method of radioimmunoassay for LH has been developed utilizing easily obtainable inexpensive latex particles. Latex particles were coated with γ -globulin from anti-HCG rabbit serum according to the method described previously by us (J. Clin. Endocrinol. 27 : 379, 1967) and recently some anti-HCG coated latex is available commercially. For urinary LH, the linear range of this assay method is from 3.0 to 60 IU/L (2nd IRP-HMG) using a commercially available anti-HCG coated latex (Go-navislide). This degree of sensitivity is obtained after only 20hr incubation at 20°C or 3 hr at 37°C in contrast to around a week required for the double antibody method. The effect of nonspecific substance in urine on LH titre was eliminated after purification of antiserum by means of absorption with peduex and separation of antibody by conjugation with polymerized HCG. The coefficient of variation is less than 10% on the linear portion of standard curve. Recovery experiment revealed that extraction of LH from urine is not necessary, as far as the method described is concerned.

Assay of LH in urine from menstruating women, prepuberal girls, postmenopausal women and normal adult males yielded the results similar to those reported in the past, thus providing additional evidence for the specificity of the method.

(See pp. 174~180)

新しい Solid Phase Radioimmunoassay による 尿中 LH の測定

群馬大学医学部産婦人科学教室 (主任：松本清一教授)

玉田 太朗, 津久井 芳二

(昭和46年3月6日受付)

尿中 LH に対する Latex を利用した新しい Solid Phase Radioimmunoassay を報告した。本法は24時間以内に2抗体法に匹敵する感度と精度をそなえた測定値を得ることができる。また尿の非特異物質 (NaCl を含む) の影響を除去する方法を検討し、非抽出尿を用いて LH に特異的な測定法を確立した。正常周期・思春期前・閉経後婦人および正常男子の LH 排泄値を報告した。

Radioimmunoassay (以下 R. I) には2重抗体法がもつとも広く使われているが、インクベーションに長時間 (4~7日) を要し、第2抗体を常に大量に用意する必要がある、また第2抗体の関与する反応に補体の量が関係する (Burr et al 1969¹⁾) など問題が残っている。したがって Radioimmunoassay の長所である高感度・高精度をそのまま生かしながら、操作を簡単にし時間を短縮することにより臨床的に利用しやすさのための努力が抗原抗体複合物の分離法の改良に向けられている。

Solid Phase に抗体を結合させ、この分離を簡単に行なおうとする試みは Catt et al (1966)²⁾ が Protapol Disc を用いてはじめて成功して以来多数あり、Solid Phase としても Sephadex (Wide, L and J. Porat 1966)³⁾、赤血球 (三井ら⁴⁾, 1969), Polyplene Disc (Crosignoi ら⁵⁾ 1970) などがある。私ども (津久井・玉田⁶⁾, 1969) も Protapol Disc を追試しすぐれた結果を得たが、材料の高価なことから、Disc に吸着した抗体の安定性が問題であった。そこで安価且入手の容易な Latex の応用を検討し、その成績の一部は既に報告した (玉田・津久井⁷⁾)。その後、抗 HCG で感作した Latex が市販品として入手できるようになり、吸着した抗体の安定性も解決された。また各研究者が自家製の抗体を用いることは各研究室の成績の比較を不可能にしている⁸⁾ ので、Solid Phase に吸着された形で安定した抗体が大量に供給されれば、異なつた場所異なつた時期の成績を比較するのに好都合であり、以下にのべる私どもの成績はこのアプローチとしても有意義であろう。

一方尿中の Gonadotropin (以下 G) の測定は尿中干渉物質のため血中の G 測定より困難であるとされていて、抽出法が必要であるとするものもある。(Stevenson⁹⁾, Kulin ら¹⁰⁾)。私どもはこの点も検討し、抗血清の特異性を増すことにより、原尿を用いても測定可能なシステムを開発した。

材料ならびに方法

抗原と抗血清：ウサギの免疫には Primogonyl を、標識抗原には 5700IU/mg (帝臓・松島博士) または 12,000IU/mg (イタリア・セロノ社) の HCG を用いた。

アイソトープ標識：主として ¹²⁵I を使用し既報⁶⁾ の方法によつた。100~200 μ c/ μ g の比活性を持つ標識ホルモンが常に得られた。長期 (4 週まで) にわたつて使用する場合は、Sepnadex-G 200 によるレクロマトグラフィーを行なつた。放射能測定は日本光電製の automatic gamma-detector を用いた。

溶媒 ¹²⁵I-Na には pH 7.4, 0.5M リン酸緩衝液を、標識 HCG および標準品にはウシ albumin を 1% に含む 0.01M リン酸緩衝液 (以下 1% BSA-PBS) を、尿および感作 Latex の稀釈には 0.1% BSA-PBS を用いた。いずれも 0.1% の窒化ソーダおよび 0.8% の NaCl を加えた。

Latex: Latex 粒子として市販の Bacto Latex (Difco 社製) の直径 0.81μ のものを用いた. 抗 HCG ウサギ血清より硫酸塩折法¹¹⁾により γ -globulin を分離し最初の血清と同量の生食水に溶解する. Latex の感作には, この γ -globulin 溶液 2ml, Bacto Latex 原液 1 ml および pH 7.6, 0.1M Glycine 緩衝液 1 ml を 56°C で 30 分インキュベートした後, Latex を Glycine 緩衝液で 2 回洗滌した後, 0.5% BSA-PBS にとかし 4°C に保存した. 私共の感作 Latex (Latex-G) は約 2 週間で抗体の 50% が再遊離する欠点があった. 持田製薬小川博士に依頼, 製作されたもの (Latex-M) と Wampole Lab. の Dr. Atkins より DAP-Test として提供された感作 Latex (Latex-W) は 1 年たつても安定しているのでこれらの利用を検討した. Latex-W は尿中物質の干渉をうけることが明かになったのでルーティンには Latex-M を用いている. (これはその後 Gonavislide として市販されたものの Latex 液と本質的には同じである.)

尿の非特異物質の影響および Peduex による抗血清の吸収: 前述したように尿中に存在する非特異物質が RI による G 測定値に影響を及ぼすが, その原因としてまず尿中に G 以外の抗原性物質があり, G に対する抗血清中にこの物質に対する抗体があつて G-抗 G という抗原抗体反応のみならず, 非特異抗原-それに対する抗体という抗原抗体反応が同時に起つている可能性や, 尿の物理化学的性質が G-抗 G 反応を修飾し測定値に影響する場合などが考えられる. 前者が主な原因であれば, 抗血清を G を含まない尿で吸収することにより, 非特異反応を減少させられる筈である. そこで 3 才以下の小児尿カオリン抽出物 (Peduex¹²⁾) による吸収の効果を調べた. 10 倍に希釈した抗血清 10ml あたり, Peduex を 2 ないし 16mg 加え, 4°C にて時々振とうしながら 48 時間インキュベートした後, 遠沈, 上清を被吸収血清とした. 吸収効果を以下の 3 つの観点より検討した. (1) HCG を男子および小児からプールした尿および 0.1% BSA-PBS に溶解し, 容量反応曲線のスロープを比較. 両曲線が平行した時尿の干渉が除去されたと考えられる. (2) 尿を抽出し, 前後の LH 測定値を比較. 抽出には Kulin の方法¹⁰⁾を用いた. (3) LH 含有尿を 2, 4, 8 倍等に希釈して得られた測定値およびそのスロープと標準曲線の比較. これらの結果をそれぞれ Fig. 1, 2, Table 1, 2 に示した. Fig. 1 の実験に用いた抗血清は Cellulose Acetate Immunodiffusion 法¹³⁾では, 2 mg の Peduex で吸収後, 小児尿との間に反応線を見なかつたものであるが, 用量反応曲線は 0.1% BSA-PBS のそれと平行せず, Peduex の量をふやして行くと, だんだん 0.1% BSA-PBS の曲線に近づく 16mg でほぼ一致した. Latex-M を用いると HCG を 0.1% BSA-PBS で希釈して作った標準曲線と, 種々の尿を用いて作ったそれとがよ

Fig. 1. Effect of adsorption of anti-HCG with various amount of peduex on slope of liner portion of standard curve.

Fig. 2. Standard curve and dilution-response relation with two urines from the castrate.

Table 1. Comparison of LH activity between original and extracted urine and recovery rate

LH activity (IU/L) in				
No. of urine	original urine	extracted urine	Recovery rate	Note
1.	1.8	1.0	55.6%	One year old boy
2.	11	8.0	72.7	39 years old male
3.	1.2	1.0	83.4	7 years old girl
4.	11	15	136.2	5 years old girl
5.	63	54	85.8	Ovulatory peak of a cyclic woman

Table 2. Comparison of LH activity in urines with 50IU/L HCG added before and after extraction

LH activity (IU/L) in			
No. of urine*	Unextracted urine	Extracted urine	Recovery of added HCG
1.	57(55)**	54(53)	96.4%
2.	54(43)	52(44)	97.8
3.	48(46.8)	81(80)	170.7
4.	57(46)	69(54)	117.2
5.	118(55)	87(33)	60.0

* Same as in Table 1.

** Numerals in parenthesis indicates LH activity supposedly ascribed to added HCG which is figured out as the difference between LH activity in urine with HCG added and that in urine without HCG shown in Table 2.

く一致したが, Latex-W では, 尿を用いた標準曲線が常に 0.1% BSA-PBS を用いた標準曲線の下方を走った。このことから私共の Latex R.I 法に関する限り非特異性抗原抗体反応が尿の非特異反応の主体と考えられ, 抗血清を吸収することによりそれを減少させ得ることが明らかになった。

抽出および希釈実験は既報した計画 (日本内分泌誌 45: 1383, Fig. 4) に基づいて行なつた。すなわちもし尿中に測定値に影響するような非特異反応 X が存在しそれが抽出操作により除去できると仮定すれば原尿と抽出尿測定値の間に X だけの差が発見される筈である。また原尿に HCG 50mIU 添加した実験 (同図, 下段) は同時に抽出法の回収率を検討するためである。これらの結果を Table 1, 2 に示した。これから原尿と抽出尿の活性の比には一方向への偏りがみられず, このことから本測定系が尿中非特異物質の影響をうけることが少ないことが示された。回収率には 60~170% のバラツキが認められ, 抽出操作は不必要のみならず誤差の原因ともなり得ることが示された。希釈実験の結果も既報した (同上, Fig. 6) が活性の比は 1 に近かつた。また LH 含量が高い去勢婦人尿の希釈による用量反応曲線と標準曲線もよく平行した (Fig. 2)。

尿中 NaCl の影響: 最近 Stevens⁹⁾ は尿中 NaCl の濃度が増すと標識ホルモンと抗体との結合率が低下し, LH の場合, 尿中 NaCl が 2 Mol になると, 0.1 Mol の場合にくらべ約 60% しか結合しないと報告した。これは重大な報告であるが, 私共の測定系では, 標識 HCG, Latex および BSA の希釈液として生理食塩水を用いているので, 全反応液中の食塩の濃度は最低 0.128 Mol である。これより 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 Mol まで食塩の量を増し測定値におよぼす影響を検討したが全く影響がなく生理的に尿中に排泄される食塩の濃度は問題とならないことが明らかになった。

Rechromatography: 一旦標識した HCG は必要量のみを希釈使用し, 他は -20°C に冷凍保存するが時日の経過と共に ^{125}I を遊離する. 標識した日の比活性を100とすると1週間後には約90%, 3週間後は75%, 5週間後は60%, 8週間後は30%前後となる. これは Blank Control の結合率が低下し標準曲線のスロープが平らになる結果, 測定系の精度が落ちる原因となるので2週以上たつて用いる時は Sephadex-G 200 のカラム ($1 \times 20\text{cm}$) により Rechromatography を行なつた.

採尿方法 基礎的検討として起床時 (6時30分) 尿を 5 ml だけ別にとらせ, 残りは翌日の同時刻まで厳密に蓄尿させ, 两部分で LH を測定し, 起床時尿の 1 l 換算 LH 量と24時間尿 1 l 当り LH 量を無抽出尿および抽出尿について比較した. この結果両値は Fig. 3 に示したように大部分の場合, その比が 0.5 ないし 2 の間にあるが13例中2例はそれぞれ24時間値が早朝値の2倍以上および 1/2 以下である. したがって正確な測定には24時間尿の方がすぐれているが, 排卵時の LH のピークは卵胞期または黄体期の約6倍もあるので, 排卵時ピークを捕えそこなう程の差ではない. また早朝尿は必ずしも24時間尿にくらべ高値とは限らず, HCG の場合とは異なつて LH は早朝尿中に濃縮されているとはいえないようである. また24時間の尿量は 1 l をこえることが多いので1日 LH 排泄量は l 当りの量より高くなる.

Latex Radioimmunoassay 法の反応様式の検討: 反応液量としては, 検体 0.05 ml $\sim$ 4 ml, 標識 HCG 0.2 ml (3 $\sim$ 50,000 cpm), Latex 溶液 0.2 ml を加えた後, 0.1% BSA-PBS で全量が 1 ml になるようにした. Latex 濃度を变化させることにより Fig. 4 に示すように測定系の感度の変動が見られた. すなわち Latex-M 1:320 および Latex-G 1:80 では 400 IU/L ないし 25 IU/L の間で急峻なスロープが得られるが, 25 IU/L 以下では平坦となる. 両 Latex をそれぞれ更に4倍希釈して用いると曲線がややなだらかになる代りに最小検出量は 0.5 IU/L とすぐれている. 普通人尿を測定する時には最少検出可能量はほぼ 5 IU/L で十分なのでルティーンには 1:1000 に希釈した Latex-M を用いている.

反応温度として室温 ($20^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$) および 37°C 保温箱中静置, 反応時間として33時間まで検討した. その結果を Fig. 5 に示したが, 37°C では標識ホルモンと Latex の結合は30分, 1時間と急激に増加し1時間半で既に最高に達し, 5-6時間プラトーを持続しそれ以後再び低下しはじめる. 20°C では3時間から19時間

Fig. 3. Comparison of LH excretion per ml between first morning urine and 24 hours pool.

Fig. 4. Relation between concentration of Latex and sensitivity.

Fig. 5. Effect of time and temperature of incubation on binding rate of ^{125}I -HCG

0.1ml を 0.1% BSA-PBS 100ml で希釈し Latex 溶液とする。つぎに標識 HCG 原液を希釈し 0.2ml が 3-50,000cpm になるようにする (ふつう, 原液 1.5ml に 88.5ml の 0.1% BSA-PBS を加える)。この 2 つは測定ごとに新しく作る。試験管への分注には自動注入器を用いる。反応試験管は日本光電 KK 製のプラスチック試験管を用い, 検体 (または標準品) Latex 液, 標識 HCG という順に入れ最後に 0.1% BSA-PBS で全量を 1 ml にする。これらをよく混合した後, 管壁上部に反応液が滴状に残るのを防ぐため 1000 回転 30 秒遠沈する。アルミ箔で各試験管口をふさぎインクベートする。インクベート終了後, 約 5 ml の冷生食水を各試験管に注入する。これは一度に多数の検体を処理する時には, はじめと終りではカウントまでの時間が 3-4 時間も開くことがあるので反応を停止させすべての試験管の反応時間を一定にするためと, 上清をすてる際その少量が管壁などに残ることが多いが, 希釈してあればカウントに及ぼす影響が少ないからである。3000 回転 30 秒遠沈し上清を試験管を傾けて捨て, 濾紙上に到立して水を切り, 更に細かく切った濾紙などで試験管壁および管口近くに残った水滴を拭きとりカウントする。

正常値: 基礎体温により排卵を認め, 高温相日数が 12 日以上 of 成熟婦人 10 例 12 週期で連日尿中 LH を測定した。(うち 4 週期は 24 時間尿, 他は早朝尿) また 3 才以上 6 才迄の 10 例と 6 才以上 12 才迄の 12 例の少女および 19 才から 58 才迄の男子 11 例, 閉経後種々の期間 (8 カ月より 18 年) を経た婦人尿についても測定した。

結 果

正常排卵性周期の尿中 LH: 尿中 LH 排泄量の平均値 $\pm 2\text{SE}$ を Fig. 6 に示した。LH は月経中にやや高値を示すが月経終了後より LH ピークの 2 日前まできわめて変動の少ない低値を続ける。この期間の 12 週期の平均は 12.9 IU/L であった。排卵期 LH ピークは普通 2-3 日のひろがりを持つが希には 1 日だけ高値を認め前後は卵胞期あるいは黄体期の値を示した例もあつた。ピークの日 of LH の値は 83 ± 10 IU/L であるが範囲は 35-152 IU/L と広い。ピーク後 LH は徐々に下降し月経開始前日に最低値となる。黄体期 (LH ピーク 2 日後より月経開始まで) の平均値は 16.8 IU/L で卵胞期よりやや高い。

LH ピークと基礎体温最終低温日との時間的関係を見ると, 12 週期中最終低温日の前日に LH ピークがあるもの 4 週期, 同日 4 週期, 翌日 2 週期, 2 日後および 3 日後それぞれ 1 週期となつている。図 7 に基礎体温の推移, LH 最終低温日と林¹⁴⁾の卵巣を直接観察することにより得られた排卵率の関係をまとめた。これから LH の増加後 1-3 日たつて排卵の起る場合が多いことがわかるが, 少数では高温相に移行した後, すなわちおそらく排卵前卵胞から黄体ホルモンがある程度分泌されはじめた後に LH ピークが現われついで排卵が起る場合もあることが推定される。

Fig. 8 および Fig. 9 にそれぞれ早期尿および 24 時間尿を用いた LH の連日測定の例を示した。

各年代女性および男性の尿中 LH 排泄量 性機能が非周期性と考えられる初潮前ならびに閉経後婦人や男

Fig. 6. Urinary LH excretion in 12 cycles (Mean $\pm$ 2SE)

Fig. 7. Sequence of BBT rise, LH peak and ovulation.

Fig. 8. LH excretion through a normal cycle. (morning urine)

Fig. 9. LH excretion through a normal cycle (24 hours pooled urine)

Estrogen excretion is also illustrated.

Fig. 10.

子でも LH の尿中排泄量は逐日変動が著しいことがわかつたのですくなくとも連続3日以上採尿測定してその平均を取つた (Fig. 10). 12才以下の少女のなかには成熟婦人の卵胞期の値を示すものもある. 男子尿の平均値は卵胞期のそれより低い有意差はない. 閉経後婦人では平均 51.0IU/L と増量してはいるが, 成熟婦人の排卵時ピークより低い. 特に5日間の平均が 13IU/L であつた1例 (Fig. 10, Postmenopausal の最低の点) は閉経後12年経過した健康婦人(60才)である.

考 按

新しい定量法が認められるためには信頼性 (Reliability) と実用性 (Practicability) をそなえていなければならない. 上述した非抽出尿を用いる Latex Radioimmunoassay は Accuracy, Specificity および Sensitivity の点で従来報告されている LH の Radioimmunoassay にまさるとも劣らない. 特に回収実験および尿の非特異干渉物質の影響については十分に検討を加えた. すなわち LH 測定値に及ぼす尿の干渉は非特異物質の抗原抗体反応が主体であり抗血清を Peduex で十分吸収するとこの干渉を減少させ得ることがわかつた. Peduex 吸収効果の判定には Ouchterony 法だけでは感度が低く不十分であるので溶媒を変えた標準曲線を比較したり 抽出前後の測定値を比較する方法を用いた. また検体中の NaCl の濃度も 2Mol 迄増加してみたが, 本法に関する限り影響はみられなかつた. Precision については津久井¹⁵⁾が報告したように標識後一週間以内の標準曲線は全くよく一致し, Coefficient of Variation はスロープの急峻な 5~50 IU/L の範囲で10%以下, それ以外の部分でも常に20%以下にあつた. 一方実用性の点では speed, cost および skill と二重抗体法に比しはるかに有利であり, 特に既感作 Latex を用いればこの研究室でもすぐ応用できる方法である.

LH の正常周期中における排泄パターンについては生物および免疫測定とも一致しており多くの報告があるが, 私共の成績も同様であつた. LH ピークと基礎体温シフトおよび排卵の有無の時間的關係をみると, 12週期中2週期で高温相になつてから LH 分泌が証明された. これらの例では LH ピークすなわちおそろく排卵に先立つて黄体ホルモン分泌がはじまる場合もあることが推定される.

思春期前の少女の LH 排泄値および男子のそれが低いことも従来の報告にはほぼ一致する. ただ閉経後婦人の LH 排泄値は正常周期排卵ピークより低く, 特に閉経後年数を経るに従い低くなるようであるが, この点に関しては更に詳細に検討中である. 去勢後の LH 排泄推移をみると, 短期間に急激に上昇するが1カ月以後ではむしろやや低値に落着くもののようであり¹⁵⁾ 閉経後の LH 分泌にもこういう型があるのかも知れない.

松本清一教授の御指導, 御校閲に深謝します.

文 献

- 1) Burr, I.M., D.B. Grant, P.C. Sizonenko, S.L. Kaplan and M.M. Grumbach : J. Clin Endocr 29 : 948, (1969).
- 2) Catt, K.J., H.D. Niall and G.W. Tregar. : Biochem J. 100 : 31c, 1966
- 3) Wide, L. and Porath, J. : Biochim Biophys Acta 130 : 257, 1966
- 4) 三井 磐, 深田信之, 松尾 健, 谷沢 修 : 日産婦誌, 21 : 413, 1969.
- 5) Crosignani G.P., R.M. Nakamura, D.N. Hovland and D.R. Mishell. : J. Clin. Endocr 30 : 153, 1970
- 6) 津久井芳二, 玉田太朗 : 日本不妊学会誌, 15 : 75, 1970.
- 7) 玉田太朗, 津久井芳二, 松本清一 : 日内分泌誌, 45 : 1382, 1970
- 8) 松本清一, 玉田太朗, 江原洋一 : ホルモンと臨床, 17 : 623, 1969.
- 9) Stevense, V.C. : Gonadotropins 1968 Ed. by Rosemberg. (1968) 282, Geron-X.
- 10) Kulin, H.E., A.B. Rifkind and G.T. Ross : J. Clin Endocr 28 : 543, (1968)
- 11) 中村 弘, 尾上 薫 : 蛋白質・核酸・酵素, 11 : 1587, 1966.
- 12) Goss, D.A. : J. Clin Endocr., 24 : 408, (1964)
- 13) Tamada, T., M. Soper and M.L. Taymor. : J. Clin. Endocr. 27 : 379, (1967)
- 14) 林 基之 : 不妊症とその治療, 1964, 86, 南山堂.
- 15) 津久井芳二 : 北関東医学, 印刷中, 1971, 3月.