ノート

アフィニティークロマトグラフィーによる ^{125}I 標識 PTH の精製法

産業医科大学病院放射線部

大浪 俊平・黒田 環

寺田 朋子・中野 秀一郎

(論文受理 1986年2月21日)

(最終論文受理 1986年10月17日)

(Code No. 541, 583)

Key words: Affinity chromatography Iodine-125 Labeled PTH, N-terminal PTH Assay

PURIFICATION OF IODINE-125 LABELED PTH USING AFFINITY
CHROMATOGRAPHY

SHUMPEI OHNAMI, TAMAKI KURODA, TOMOKO TERATA
and HIDEICHIROU NAKANO

Department of Radiology, University of Occupational and Environmental Health

(Article received; Fed., 21, 1986)

Summary

Iodine-125-PTH was purified using affinity gel column chromatography. The column was prepared with activated CH Sepharose 4B coupled to PTH antiserum.

Radioimmunoassay (RIA) using I-125-PTH (1-34) purified by affinity chromatography with anti-PTH (1-34) Sepharose was sharper than those purified by gel chromatography with Bio Gel P-4. The intra- and inter-assay coefficients of variation were 7.3% (n=5) and 11.5% (n=5), respectively, in the RIA system for PTH (1-34) in human serum. The minimal detectable concentration of PTH (1-34) was 5 pg/tube, and 50 pg/ml in serum was possible to assay.

These results indicate that the purification of iodine-125-PTH (1-34) using affinity chromatography with anti-PTH (1-34) Sepharose is a useful method for the establishment of the high sensitive RIA system.

1. はじめに

放射免疫学的純度の高い標識抗原を作製することは、
高感度の radioimmunoassay (RIA) 系を確立するため

に重要な要素と考えられている¹⁾。今回著者らは、アフィ
ニティークロマトグラフィーによる標識抗原の精製法につ
いて検討し、本法が放射免疫学的純度の高い標識抗原を
得るために、有用な手段であることを PTH(1-34) の

RIA系を用いて確認したのでその成績について報告する。

2. 材料ならびに方法

2.1 PTH (1-34)のヨウ素化およびその精製法

合成ヒト PTH (1-34) を用いてクロラミンT法²⁾にてヨウ素化を行った。標識抗原の精製は bio gel P-4 カラム (0.5×15 cm) を用い、0.1 M 酢酸により溶出した³⁾。

2.2 アフィニティクロマトグラフィーによる精製法

合成ヒト PTH (1-34) とフロイント完全アジュバントの混合物をモルモットに免疫して作製した抗血清⁴⁾ 0.1 ml を、activated CH Sepharose 4B に結合させアフィニティゲルを作製した⁵⁾。このゲル0.5 ml に 1 ml のリン酸緩衝液 (pH 7.4) と前項により精製した ¹²⁵I-PTH (1-34) を加え室温で10分間静かに攪拌した後、2000 rpm で2～3分間遠沈し、上清は除去した。この操作をさらに2回繰り返した後、沈渣に 1 ml の0.1 M 酢酸を加え室温で10分間静かに攪拌した後遠沈し、得られた上清を標識抗原に用いた。用いたゲルは1 M 酢酸、水、リン酸緩衝液の順序で洗浄後、pH を確認してからリン酸緩衝液 1 ml を加え冷蔵保存した。

2.3 PTH (1-34) の RIA

標識抗原に上記 ¹²⁵I-PTH (1-34) を、標準品に合成ヒト PTH (1-34) を用い、抗血清はアフィニティクロマトグラフィーに用いたものと同じものを最終希釈濃度 4 万倍で使用した。緩衝液は0.5% HSA を含む0.075 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) を用い、インキュベーションは24時間の標識抗原遅延添加法を採用し、B・F 分離は二抗体法で行った。

3. 結果と考察

ヨウ素化後の bio gel P-4 カラムからの放射活性の溶出は Fig. 1 に示すように 2 峰を示した。そのうち ¹²⁵I-PTH ピークの分画 (Fraction No. 5) をアフィニティクロマトグラフィーにより再精製し、これを標識抗原として用いた場合の PTH (1-34) の標準曲線を Fig. 2 に示した。標準曲線のゼロ濃度における B/T 比の -2 SD (標準偏差) で求めた最小検出限界は 5 pg/tube であり、標準曲線も急峻であった。これに対して、ゲル濾過法により再精製した ¹²⁵I-PTH を用いた場合の最小検出限界は 16 pg/tube であった。以上の成績から、本法による ¹²⁵I-PTH の精製法は高感度の RIA 系を確立する上に有用な方法であることが明らかとなった。

現在、ヨウ素化後の精製には sephadex や bio gel など

Fig. 1 Elution pattern of the iodinated mixture on a bio gel P-4 column (0.9×15 cm) eluted with 0.1 M acetic acid. Fraction of 1 ml were collected in polyethylene tubes containing 0.1 ml of 2% BSA in 0.1 M acetic acid and 0.01 ml aliquots from each fraction was counted using a gamma counter.

Fig. 2 Standard curves for PTH (1-34) RIA. Antiserum: anti-PTH (1-34) antiserum (final dilution 1: 40,000) Standard: synthetic PTH (1-34) Tracer: ¹²⁵I-PTH (1-34) repurified by affinity gel (●) and bio gel P-4 (○).

を用いたゲル濾過法が最も一般的な方法として用いられている。通常、これらの方法により得られた標識抗原は再精製することなく用いるが、何回かに分けて使用する場合、凍結保存中に変性物質や遊離アイソトープが増加するため、RIA ごとに精製をくり返すことが必要とされている。しかし標識によって分解物が多くできるような場合には、これらの操作を用いても高純度の安定な標識抗原を得られないことが多い⁶⁾。

今回著者らが検討したアフィニティクロマトグラフィー

一の原理は高濃度の抗血清を利用して標識抗原を特異的に吸着させて精製する、いわゆる免疫学的純化法で、操作が簡便で sephadex や bio gel などを用いたゲル濾過法あるいはイオン交換クロマトグラフィーに比して時間を短縮できる。また、RIA に用いたものと同じ抗体を用いるため抗体と結合する標識抗原だけをとり出せる利点がある。したがってこの方法は、PTH 以外の各種標識抗原の精製法においても十分役立ち得る可能性が考えられる。しかしながらこの方法も高濃度の抗血清が必要であることと、未反応の非標識抗原を吸着してしまう点が欠点でもある。

上記免疫学的精製法による ^{125}I -PTH (1-34) を用いた際の最小検出限界は 50 pg/ml で同一 assay 内の変動係数は平均 7.3% ($n=5$)、assay 間の変動係数は 11.5% ($n=5$) と良好な成績が得られた。なお使用した抗血清は Fig. 3 に示すように PTH フラグメントである PTH (39-84) とは全く交差反応を認めず、PTH (1-84) とは重量比で 8%、モル比で 18.3% の交差反応性を示した。すなわちこの系は PTH の N 端側を認識する測定系である。

また、本 RIA 系を用いた臨床的検討においても良好な成績を得ているが、別稿で報告の予定である。

Fig. 3 Cross-reactivities of PTH (39-84) and PTH (1-84) in PTH (1-34) RIA system.

4. 結 論

アフィニティークロマトグラフィーによる ^{125}I 標識 PTH の精製法は簡便かつ信頼性の高い方法であり、高感度の RIA 系を確立する上で有用な手段になるものと考えられる。

文 献

- 1) 矢内原千鶴子, 佐藤晴子, 矢内原昇, 他: セクレチン, セクレチン測定, 消化管ホルモン研究会編, p. 39-47, 中外医学社, 東京, (1979).
- 2) Hunter WM and Greenwood FC: Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specificactivity. *Nature.*, 194, 495-496, (1962).
- 3) 大浪俊平, 仲山 親, 寺田朋子, 他: I-125-DATA-secretin を標識抗原とする secretin の radioimmunoassay の基礎的検討. *日放技学誌*, 41, 22-28, (1985).
- 4) 田中雅博, 大浪俊平, 阿部 薫, 他: アフィニティークロマトグラフィーを用いたヒト血漿中 PTH の抽出およびヒト PTH の N 端側ラジオイムノアッセイ. *ホルモンと臨床*, 29, 342-344, (1984).
- 5) Pharmacia Fine Chemicals ハンドブック: Affinity chromatography, principles and methods.
- 6) 倉田邦夫: ラジオアイソトープによる標識, 新版ラジオイムノアッセイ, p. 45-56, 朝倉書店, 東京, (1977).