資 料

ラジオイムノアッセイ

——遺伝子工学的手法を応用したアッセイ——†

ラジオイムノアッセイ研究会

113 東京都文京区本駒込 2-28-45 日本アイソトープ協会内

Key Words: radioimmunoassay, gene technology

はじめに

入江 実

東邦大学 医学部第一内科

第24回のラジオイムノアッセイ研究会は昭和60年11月30日(土)東京、虎の門パストラルにおいて行われた。主題は遺伝子工学的手法を応用したアッセイ(DNAプローブアッセイ, 抗体の作成, オンコジンプロダクトなど)であった。これは昭和59年, 仙台で開かれた時の世話人会で次年度の項目として決定したもので, 当番世話人は筆者であった。

ラジオイムノアッセイ研究会も昭和42年に第1回の「インスリンのラジオイムノアッセイ(RIA)」につき研究会を開いて以来今日まで約20年, 種々の主題をとりあげて活動を続けてきた。今回は少し視野を拡げて, 近年発達のめざましい遺伝子工学的手法を応用したアッセイをテーマとしたわけである。このテーマの下に公募したところ10題の演題の申込みを受けた。その内容については次章以下にみられる通りであるが, 午前中は虎の門病院の紫芝良昌博士の司会の下に, neurokinin 類のモノクローナル抗体, 甲状腺腫瘍がん血中 CGRP の RIA に関する検討, 乳がん関連抗原検出用 CA 15-3 RIA の基礎的検討, 抗ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)モノクローナル抗体を用いるhCGの immunoradiometric assay, 合成ペプチドを用いるがん遺伝子タンパク特異抗血清の作製とその RIA, セントコア AFP-II RIA の基礎的検討, 抗アルファフェトプロテイン(AFP)モノクローナル抗体による AFP の RIA, セントコアヒトインターフェロン RIA の基礎的検討, モノクローナル抗体を用いた HBs 抗原

検出用 セントコア 5D-3 RIA の基礎的検討, non isotopic DNA プローブによる測定法などの発表が行われた。つぎに例年アイソトープ協会医学・薬学部インビトロ委員会が中心となって行っているサーベいの「第6回ラジオアイソトープインビトロ検査全国コントロールサーベいの成績と分析」について東邦大学第一内科宮地幸隆助教授から報告がなされた。

午後はシンポジウムとして主題に「遺伝子工学的手法の基礎的, 臨床的応用」をとりあげ静岡薬科大学 矢内原 昇教授の司会により, 東邦大学医学部分子生物学 嶋武博之助教授に「概論」, 静岡薬科大学生物薬品化学 矢内原 昇教授に「ペプチドを中心に」, 東海大学医学部病理学 渡辺慶一教授に「免疫組織化学を中心に」, 東海大学医学部細胞生物学 中根一穂教授に「EIHISH(enzyme-immuno-histo-in situ hybridization)について」, 日本大学医学部病理学 志方俊夫教授に「肝炎ウイルスを中心に」を講演していただき総合討論を行った。このシンポジウムの内容を中心として「ホルモンと臨床」6月号に特集「遺伝子工学と内分泌・代謝」として上記の嶋武助教授, 矢内原教授, 渡辺教授, 中根教授の他に国立衛生試験所生物化学 早川堯夫博士に「遺伝子工学によって産生されるホルモン(臨床と安全性)」, 東北大学第二病理 笹野公伸教授に「遺伝子工学手法による副腎酵素欠損症の分析」, 名古屋大学脳外科 山本真人先生に「下垂体腫瘍におけるプロラクチン遺伝子の発現解析」を新たに執筆していただき, 現在編集が進行中である。なお, 本年度(昭和61年)は11月8日(土), 京都大学第二内科 井村裕夫教授が世話人となって「ホルモンのラジオイムノアッセイの進歩 (1) ACTH, (2) PTH, (3) atrial natriuretic polypeptide (ANP)」というテーマにて大阪市の佛三和化学研究所 大阪メディカルホールで行われることになった。これは現在とくに問題とされているアッセイ系についてとりあげられたもので, 多数

† Radioimmunoassay Using Genetical Technique. Radioimmunoassay Research Society of Japan: 28-45, Honkomagome 2-chome, Bunkyo-ku, Tokyo 113.

の演題の発表，討議が期待される。

ラジオイムノアッセイ研究会も本年度は第25回を迎えるわけで，RIAが日本で大きなテーマとしてとりあげられるようになって，四半世紀近くが経過したことになる。当事者として大変喜ばしいことと考えている。

最後にご協力を頂いた世話人各位，座長および演者の方々，会の運営に多大のご協力を頂いているアイソトープ協会の関係各位に深く感謝する。

1. Neurokinin 類のモノクローナル抗体

荻野晃一，山本栄仁，鈴木利光，
矢内原 昇

国立共同研究機構生理学研究所

荻野晃一，矢内原千鶴子，矢内原 昇
静岡薬科大学 生物薬品化学

各種構造類似のペプチドの発見，あるいはペプチドの自己免疫が見出されている現在，ポリクローナル抗体における問題点が，とくに免疫組織化学において観察されるようになった。本研究は，1983年 Tatemotoらにより単離された29アミノ酸残基よりなる galanin および neurokinin A, B を研究対象として選び，他の構造類似ペプチドと区別しうるモノクローナル抗体の作製を検討した。

合成ブタ galanin-アスカリスタンパク複合体を抗原として用い，8週齢，雌の BALB/c マウス20匹に対し，Freund の完全アジュバンドとともに皮下および腹腔内に注射免疫した。これらのうち，抗体価が高く，その上昇を認めたマウス3匹について抗原を腹腔内投与し，96時間後に脾臓を摘出し細胞融合に供した。また株細胞として BALB/c マウス由来のミエローマ P3-NSI/1-Ag-1 (NS-1) 株を用いた。マウス脾臓より得た脾臓細胞 3.3×10^8 個を， 6.7×10^7 個の NS-1 細胞と合わせ PEG-DMSO 溶液によって融合し，脾臓細胞として 2×10^5 個/well で96穴プレートに接種し，24時間後より HAT 培地にてハイブリドーマ細胞の選別を行った。つぎに RIA にて galanin 抗体産生ハイブリドーマの検索を行った。高い抗体価の4つのクローン 3A3, 6F7, 9D3, 17C6 について培養上清中の抗体の力価を RIA により検討した。またモノクローナル抗体を Protein A-Sepharose CL-4B による affinity chromatography により精製し検討した。その結果，高感度の RIA 系となり，その最小検出限界は 6F7 で 40 pg, 9D3 と 17C6 ではそれぞれ 10 pg であり，合成フラグメントおよび類似ペプチドの交差反応から，こ

れが galanin 15-29位内に抗原認識部位をもつ galanin に特異的であった。また，腹水中の本抗体は50万倍で使用可能であった。

2. 甲状腺髄様がん血中 CGRP の RIA に関する検討

浦 恭章，梶田芳弘，中嶋良行
南丹病院 内科

越智幸男

滋賀医科大学 中央検査部

八谷 孝，伊地知浜夫

京都府立医科大学 第二内科

宮崎忠芳

同大学 放射線科

甲状腺髄様がん (MC) 患者血中には，カルシトニン (CT) やがん胎児性抗原 (CEA) の増量が特徴であるが，CT の遺伝子中に発見された CGRP (calcitonin gene related peptide, 37個のアミノ酸) も本症腫瘍組織や血中に存在しているという報告もある。今回，本症患者血中の CGRP を RIA 法で測定した結果を報告する。

Amersham 社の ^{125}I -CGRP とウサギ抗血清を使用し，第2抗体法にて検討した。標準曲線は 1 fmol/tube から 1 000 fmol/tube まで測定可能であった。同時再現性の C.V. は 5.5-12% であったが，日差再現性の C.V. は 6.0-20% とややばらつきが認められた。回収率，希釈試験等はほぼ満足すべき結果が得られた。正常人30名の検討により，1 nmol/l 以下を正常範囲とした。各種腫瘍患者血清では，MC において高値を示し，46例中32例 (70%) が陽性であった。また，肺がんで5例中1例に陽性例を認めたが，胃がん，膵がん等はすべて陰性であった。MC において血中 CT 値や CEA 値とは有意の相関を認めなかった。MC 患者血清および組織抽出物を Sephadex G-200 でゲルろ過し，CGRP 量を測定した。CGRP は void volume 直後に溶出する大分子型 CGRP と思われるピークと，本来の CGRP に一致するピークに認められた。

このように，MC 患者では，CT と CGRP の相関はないが，いずれも高値を示し同時産生が認められた。Morris らは，甲状腺C細胞で CT 遺伝子より CT のみが産生されるのに対して，MC ではがん化に伴い CGRP も同時産生されることを報告しているが，われわれもこれを確認する結果を得た。CGRP は，MC 患者で高率かつ高値に認められ，有用な腫瘍マーカーと思われた。

3. 乳がん関連抗原検出用 CA15-3 RIA キットの基礎的検討

大西弘光, 木谷孔保,
藤岡修二, 斎藤嘉禎
トーレ・フジバイオニクス(株)

乳がんに関連した新しい腫瘍マーカーである CA15-3 抗原が見出された。この抗原はヒト乳汁脂肪球の膜成分として存在する糖タンパクであると推定される。したがって健康人であっても乳汁中に存在し、乳腺から体外に分泌される。乳がんの場合には組織破壊が起ることにより、毛細血管中に移行して全身に循環する。

1984年に Hilgers (オランダがん研) や Kafe (ダンファーマーがん研) らは、この抗原と反応する2種類のモノクローナル抗体 (115 D8, DF3) を開発した。115 D8 抗体はヒト乳汁脂肪球膜を、DF3 抗体は乳がん肝転移細胞の分画成分をおおののマウスの脾臓に免疫した後、マウス脾細胞とマウス骨髓腫細胞のハイブリドーマを作製して得られた。2つの抗体は IgG 2b (115 D8), IgG 1 (DF3) であることがわかっている。

本測定は2ステップサンドイッチ法に基づいている。すなわちビーズに 115 D8 抗体をコーティングして捕獲抗体とし、DF3 抗体を標識抗体として用いる。第1反応、第2反応とも室温で1時間ずつの反応であり、他の温度条件、反応時間に比べて精度が良い。再現性試験ではロット内・ロット間・測定者間・測定日間ともに C.V. で10%以下であった。血中のビリルビン、ヘモグロビンおよび腫瘍マーカーである CEA や糖鎖抗原 (CA 19-9) との交差反応は見られていない。患者血清とキット添付の標準液とを1:1に混合して測定した場合、理論値と実測値との間に差は見られず、ほぼ100%の回収率が得られた。

その他、いくつかの項目の検討から、本キットは基礎的に十分臨床検査薬として使用できるものと考えられる。今後、臨床面からのデータを豊富にし、転移性乳がんのモニタ用として評価・検討が一層推進されることを期待する。

4. 抗hCGモノクローナル抗体を用いるhCGの immunoradiometric assay

宮地幸隆, 入江 実
東邦大学 医学部第一内科
水智 彰
三井製薬生物研究所

数種類のモノクローナル抗hCG抗体を作製しhCGの immunoradiometric assay (IRMA) への応用を検討した。

作製した5種類のモノクローナル抗hCG抗体 (21 D6, 3 D1, 3 A3, 12A5, 24B6) では21 D6がhCGに対して最も親和性が高い (8.8×10^8 l/mol)。3 D1はhCG β -subunitと交差するが、21 D6はnativeなhCGのみを認識しhCG α -, β -subunitとは交差しない。各種モノクローナル抗体の組合せのうち3 D1と21 D6の組合せが ^{125}I -hCGの結合を著明に増加させた。そこで3 D1をポリスチレンビーズにコートし ^{125}I -21 D6を標識抗体として用いるhCGのtwo site IRMAを確立した。このIRMA法の感度は0.1ng, 測定範囲は0.1-100 ngであり各モノクローナル抗体を用いるhCGの競合RIAより感度がはるかに良好であり、hCG α -, β -subunit, 黄体化ホルモン (LH), 卵胞刺激ホルモン (FSH) などとの交差の認められない特異性の優れたアッセイである。two site IRMA法により高齢妊婦、前回までの妊娠にDown症候群、奇形児、染色体異常などの子供を出産した母親の羊水中のhCGを測定した。IRMA法とRIA法により測定した羊水中hCG値に良好な相関が認められたが、IRMA法による値は平均値 487.0 ± 376.5 (S.D.) ng/mlでポリクローナル抗体 (SB6) を用いるRIA法により測定した値の約65%と低値を示した。ポリクローナル抗体を用いるRIA法ではhCG subunitやフラグメントなども測定している可能性があるが今回開発したhCG IRMA法ではnativeなhCGのみを測定していることによると思われる。

5. 合成ペプチドを用いるがん遺伝子タンパク特異抗血清の作製とそのRIA

井口和明, 望月 徹,
矢内原千鶴子, 矢内原 昇
静岡薬科大学 生物薬品化学
N.S. Track, 阿部 薫
国立がんセンター

各種のがん細胞にがん遺伝子の存在が知られ、がん

遺伝子の塩基構造解析から数々のがん遺伝子産物タンパク質の構造が提出され、これらの情報に基づき、化学的なアプローチによる免疫化学的研究が可能となった。本研究ではまず、v-Ha-ras, v-Ki-ras および c-myc に関連するタンパク質について検討した。本研究のアプローチは第一にがん遺伝子タンパク質の抗原認識部位を Hopp と Woods の方法により検索し、さらに二次構造を Chou と Fasman の方法により検討することにより抗原認識部位として最も適当と考えられるタンパク質分子中のアミノ酸配列を選び、それらを化学合成することである。つぎにこの合成ペプチドを免疫抗原とし、特異抗血清の作製を行い、特異 RIA 系の確立を目ざし、最終的にはがんの分別および検索とその応用である。本研究では v-Ha-ras, v-Ki-ras, c-myc のタンパク質の抗原認識部位を推定、合成 v-Ha-ras 166-180位, v-Ki-ras 166-179位, c-myc 423-437 位を免疫抗原として用いた。合成ペプチドはクロラミン T 法にて標識抗原とし RIA 系を確立した。この結果、v-Ha-ras, v-Ki-ras, c-myc の 3 種類の RIA 系ともに組織中の免疫活性の測定に十分な感度であった。この Ki-ras および c-myc タンパク質フラグメントの RIA 系において、グルカゴノーマ組織抽出物およびラット肝臓抽出物ともに明らかに免疫活性を検出した。Ki-ras, c-myc 関連免疫活性はいずれも冷トリス塩酸抽出法が熱酢酸抽出法に比し高値で、とくに Ki-ras では 10-100 倍の高値を得ることができた。グルカゴノーマ組織抽出物について、ras および c-myc の存在様式を Sephadex G 150 によるゲルろ過にて検討した結果、冷トリス塩酸抽出物において分子量 67 000 のウシ血清アルブミン (BSA) にはば一致する主要免疫活性が検出され、myc がん遺伝子より推定されるタンパク質、約 65 000 の分子量にはば一致するものであった。

6. セントコア AFP-Ⅱ RIA キットの基礎的検討

池田弘子, 木谷孔保,
藤岡修二, 斎藤嘉禎

トーレ・フジバイオニクス(株)

今回われわれは血清 AFP を迅速に測定するための RIA キットを米国セントコア社より入手した。本キットの特徴は、抗原決定部位に強い親和性をもった 2 種類のモノクローナル抗体 (AF 01, AF 03) が使用されている。このモノクローナル抗体は直径 0.64 cm のポリスチレンビーズにコーティング (AF 01, 03),

また ^{125}I 標識抗体 (AF 01) として使用されている。測定に要する時間は第 1 反応室温 1 時間, 第 2 反応室温 1 時間である。本キットを用い若干の基礎的検討を行い知見を得たので報告する。

測定法はビーズを用いた前方 2 ステップサンドイッチ法を用いた。

検討事項は、(1)標準曲線を求めた。(2)高・中・低濃度 (3 種類) のブール血清を用いてのロット内再現性, ロット間再現性, 測定日間再現性, 測定者間の再現性は 10% 以下の良好な結果が得られた。(3)添加回収試験は 3 種のブール血清にキット添付の 0, 5, 60, 120 ng/ml の標準液を 1:1 の割合で添加し測定したところ, 理論値に対し, 総平均は 105% となった。(4)特異性試験はビリルビンおよびヘモグロビンを添加し測定を行ったところ, これらにより干渉を受ける可能性は少ないことがわかった。(5)Wands 法による「種々の疾患における AFP 濃度」は AF01, AF03 抗体は HBs 抗原陽性の肝細胞がんの特異性が高い, すなわち良性疾患との鑑別への可能性が示唆された。

7. 抗 α -フェトプロテインモノクローナル抗体による α -フェトプロテインのラジオイムノアッセイ

実石わか, 大石武雄

静岡県立総合病院 核医学部

水智 彰

三井製薬生物研究所

宮地幸隆

東邦大学医学部 第一内科

異なったモノクローナル抗体を用いる AFP の RIA 系を確立する目的で AFP の測定を行った。

Milstein と Kohler らの報告した方法でモノクローナル抗体 MCA-1, MCA-2 を作製した。2 つの抗体の単位 IgG あたりの AFP の結合能は高く, 確立した RIA 系の感度も 1-2 ng と良好であった。標準 AFP または試料 100 μl に MCA-1 または MCA-2 を 2 ng, ^{125}I AFP 約 10 000 cpm を加え, B/F 分離にポリエチレングリコール (PEG) を用いる RIA 系を確立した。この RIA 系を用いて羊水, 妊婦血清を測定すると AFP は両抗体を用いた場合はほぼ同様の値を示した。しかし, 肝がんおよび肝硬変患者血清, yolk sac 腫瘍患者血清を測定すると, MCA-2 を用いたとき肝疾患患者で高値となり, MCA-1 を用いたとき yolk sac 腫瘍で測定値が高値となった。

肝由来 AFP と yolk sac 由来 AFP はその糖鎖に違

いがあり、Con-A との親和性に差が生ずることが Ruoslahti らにより報告されている。今回の2種類のモノクローナル抗体を用いる RIA の結果、羊水、妊婦血清では AFP 値はほぼ同様の値であったが、肝炎患者血清では MCA-2 に、yolk sac 腫瘍患者血清では MCA-1 を用いた AFP 値が高値となった。これより MCA-1, MCA-2 がそれぞれ yolk sac 由来、肝由来 AFP を強く認識している可能性が示唆された。

肝由来、yolk sac 由来 AFP の種類の違い等に対し2種類のモノクローナル抗体が異なる認識をするかを今後検討してゆきたい。

8. セントコアヒト γ -インターフェロン RIA キットの基礎的検討

近藤浩子, 木谷孔保, 藤岡修二
トーレ・フジバイオニクス(株)

γ -インターフェロン (IFN) は免疫 IFN と呼ばれ、各種の抗原または非特異的なマイトゲンの刺激によって T リンパ球から分泌されるリンホカインの一種である。 α -および β -IFN と同様、ウイルス感染に対する細胞の抵抗性を誘発し、また NK 細胞がもつ抗腫瘍活性を高めるなど、*in vitro* および *in vivo* における幅広い免疫抑制能力を有することから、近年その働きに関心が高まりつつある。今回われわれは γ -IFN のみを測定するヒト γ -インターフェロン RIA キットを米国セントコア社より入手した。本キットは2種類のモノクローナル抗体 B 1, B 3 をそれぞれ捕獲抗体、標識抗体として使用しており、両抗体とも生物活性のある γ -IFN のみと特異的に結合し、また natural γ -IFN, recombinant γ -IFN どちらも同等によく反応することが知られている。本キットはビーズ固相法を用いた2ステップサンドイッチ法で、従来のバイオアッセイ法に比べて感度、再現性の面で非常に優れた測定法である。本キットを用いて若干の基礎的検討を行ったので報告する。

- (1) ロット内、ロット間再現性試験ではいずれも C.V. 値 5% 前後と良好な結果が得られた。
- (2) 希釈試験では、ほぼ直線性が認められた。
- (3) 添加回収試験では平均回収率 97.0% と、理論値とよく一致した。
- (4) 特異性試験では大過剰の β -IFN をまったく検出せず、 γ -IFN のみを測定できた。

本キットの用途としては、 γ -IFN の研究用や免疫疾患患者あるいは健康人の免疫機能のチェックなども考えられ、臨床的にも十分有用であると思われるので、

これらの検討が期待される。

9. モノクローナル抗体を用いた HBs 抗原検出用セントコア 5D-3 RIA キットの基礎的検討

図師京一, 木谷孔保,
藤岡修二, 斎藤嘉禎
トーレ・フジバイオニクス(株)

B 型肝炎ウイルス表面抗原 (HBs 抗原) の検出に現在広く利用されているものに RPHA 法や RIA 法等がある。今回われわれは、HBs 抗原を検出するために新しい検査試薬 “セントコア 5D-3 RIA キット” を入手した。1981 年、J.R. Wands らは、HBs 抗原をマウスに免疫しハイブリドーマにより IgM 性のモノクローナル免疫グロブリン (5D-3) を見出し、1983 年米国セントコア社が IgG 性モノクローナル免疫グロブリン (5C-11) と併用して開発したのが本キットである。

測定原理は、RIA 固相法に基づく1ステップサンドイッチ法である。反応は、45℃、4時間で行われ、陰性コントロールとの比較から間接的に被検血清中の HBs 抗原の存在を知ることが可能である。本キットを用いて若干の基礎的検討を行った。3種の異なる濃度のヒトプール血清を用い10回測定で再現性をみた。ロット内再現性の C.V. 1.5-2.0%, またロット間では 2.3-4.0% と良好な結果が得られ、測定者間再現性では、C.V. は最大のもので 2.5% であった。測定日間再現性では 8.2-8.8% と良好であった。添加回収試験では、平均回収率が 101% となり、またヒトプール血清による希釈試験でも $\times 1 - \times 32$ 倍までの範囲で原点を通る直線が得られたことから本法による反応系への干渉物質の影響は少ないものと思われた。さらに特異性については、通常の判定時に共存するビリルビン、ヘモグロビンについて交差反応の有無を検討したが、それぞれ 5 mg/dl, 50 mg/dl の添加では本法による測定に影響しないことを認めた。反応条件についても検討を行った。反応時間を4時間と固定すると 45℃ 以外では (25℃, 37℃, 50℃) 表示値より低値を示し、45℃ に固定して反応時間をみると 1, 2, 3 時間では低値を示し、18 時間ではばらつく傾向があった。

5D-3 RIA キットは、操作が簡便で反応も4時間ですみ、精度再現性にすぐれた検査試薬である。

10. Non-isotopic DNA プロープによる測定法

藤井信之, 小笠原正宜, 笠原 靖
富士レビオ 中央研究所

DNA プロープ法は、組換え DNA における重要な技術の一つである。現在ではこの技術は、ウイルスの検出、細菌の同定、遺伝病の診断等、広範囲に応用されている。一般には ^{32}P を標識したプロープが用いられている。しかし、non-isotopic な系の開発も進んでいる。今回、われわれはこのプロープ法による血清 HBV-DNA 測定法を開発したので報告する。

HBV-DNA プロープの作製は、まずクローン化した HBV ゲノム DNA を二つの部分に切断し、おのをおの MB フェージに組み込み、培養後、一本鎖 DNA を調整した。その後、リンカーを介して FITC の標識を行った。患者血清より、プロティナーゼ K 処理、続いてフェノール/クロロホルム抽出法により得た DNA 溶液を試料として用いた。この試料と標準 HBV-DNA

を、アルカリ変性後ニトロセルロースフィルタに固定 (80°C , 2 時間) し、プレハイブリダイゼーション後、プロープをおのおの $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 加えハイブリダイゼーションを 50%ホルムアミド存在下、 37°C で 2 時間行なった。洗浄後、conjugate (抗-FITC 抗体-アルカリホスファターゼ) と反応させ、再び洗浄し基質 NBT/BCIP により発色させた。

現法による測定感度は、標準 HBV-DNA を用いた場合 5-10 pg/spot であった。全測定操作は 2 日間で終了する。したがって ^{32}P の系よりかなり短いと思われる。さらに、ここで使用したプロープはすでに一本鎖であるため、使用時に熱処理等は不要である。また大量調製も容易であるので、ハイブリダイゼーション時に多量に使用でき時間の短縮が可能である。現在検体数を増して ^{32}P の系との比較を行っている。今後、ウイルス感染症、細菌の同定等において、この non-isotopic DNA プロープを用いた検査法の進展が期待される。