薬 学 雑 誌
YAKUGAKU ZASSHI
107 (10) 739-750 (1987)

イムノアッセイにおける最近の展開. 測定技術の進歩と臨床検査への応用

宮井 潔

大阪大学医学部, 〒553 大阪市福島区福島 1-1-50

Recent Advances in Immunoassay. Technical Progress and Its Application to Laboratory Medicine

KIYOSHI MIYAI

Osaka University Medical School, 1-1-50 Fukushima,
Fukushima-ku, Osaka, 553 Japan

The essential criteria for a useful analytical technique are specificity, sensitivity, accuracy, precision, simplicity, rapidity and economy. The sensitivity and specificity of immunoassays have been improved by utilizing sensitive marker, monoclonal or clonotypic antibodies and adequate conditions for antigen-antibody reaction. Applications of various immunoassays to laboratory medicine make it possible to elucidate etiology of various diseases and make early diagnosis and prevention of the diseases such as congenital hypothyroidism and subclinical prolactinoma. Since the immunoassay has many advantages, its application should result in remarkable progress in laboratory medicine.

Keywords—antigen antibody reaction; monoclonal antibody; clonotypic antibody; sensitive immunoassay; thyrotropin; prolactin; mass screening; preventive medicine

1. はじめに

“測定できるものはすべて測定し, 測定できないものは測定できるようにすべきである”という格言にもある通り, すぐれた測定法の開発は自然科学のうちでもとくに臨床検査の分野でははかりしれない進歩をもたらすものである. しかし一言ですぐれた測定法といっても, 生体試料を取扱う臨床検査では, ①特異性, ②感度, ③正確度 (絶対値の一致) ④精密度 (再現性), ⑤簡易性, ⑥迅速性, ⑦省力性, ⑧多目的性, ⑨普遍性 (互換性・規準化), ⑩経済性, ⑪無公害性など種々な条件が満たされなければならない. 特に生体試料中の物質濃度は 10^{-6} — 10^{-12} mol/l オーダーと低いものが多く, 検体量も 10—100 μ l と微量であり, 前処理などの操作も出来るだけ省きたいため, とくに高感度で特異性の高い測定法が望まれるのである. このような観点からみると, Berson と Yalow¹⁾ によって開発されたラジオイムノアッセイ (radioimmunoassay, RIA) は, 抗原抗体反応の特異性と, 放射性同位元素 (RI) の高感度検出能を組合わせた巧妙な方法であるため, 現在あらゆる分野で利用されているのは周知の通りである. 一方 Engvall²⁾ らによるエンザイムイムノアッセイ (enzyme immunoassay, EIA) の開発を契機として, RI を用いないイムノアッセイ, すなわち非放射性免疫測定法 (mon-isotopic immunoassay) (alternative immunoassay) も色々な方法が開発されつつある.

イムノアッセイ (広義) は, Table I のように分類される. すなわち検体が抗原か抗体か, 反応が液相か液・固相か, マーカーを標識するかしないか, 標識した場合, 標識抗原と非標識抗原を少量の抗体に対して競合させる狭義のイムノアッセイか, 大量の抗体を用いて競合させないイムノメトリックアッセイ (immunometric assay) か, 抗原抗体結合物 (bound B) と, 未結合物 (free F) を分離するヘテロジニアス (heterogeneous) 法か分離しないホモジニアス (homogeneous) 法かなどというように分類される. それぞれの方法の詳細は成書や総説に譲り,³⁻⁸⁾ 本稿では最近とくに進展の著しい高感度・高特異性イムノアッセイの開発と, 臨床検査への応用につき著者の成績を例にとりながら記述する.

本総説は昭和 62 年度日本薬学会年会特別講演者に薬誌編集委員会より執筆を依頼したものである.

2. 高感度、高特異性イムノアッセイの開発

イムノアッセイが他の測定法に比べ感度、特異性の点ですぐれているとはいえ、臨床応用に際しては更に感度・特異性を向上させる必要がある。その方法としては①高感度マーカーの選択、②高親和性・高特異性抗体の作製、③最適反応条件の設定などが考えられるであろう。

2.1. 高感度マーカーの選択 Table I に示した検出方法を比べると、一般的にいて、マーカー非標識法よりも標識法の方が感度がよい。そして標識法においては高感度マーカーを用いることにより感度をあげることができる。すなわち競合法ではマーカー標識抗原と、抗体量を減じることにより感度をあげることができるし、非競合法においても、たとえばサンドイッチ (sandwich) 法では、少量の被検抗原に結合した少量のマーカー標識抗体を検出することができるので感度が上昇する。

マーカーの検出感度の表現方法としては反応液中の濃度か絶対量か、あるいは理論的計算によるのか、実用的な条件を考慮するかによって異なるが、大体 酵素>発光物質>RI>蛍光物質>遊離基>粒子の順に検出感度がよい。最近開発されている(超)高感度イムノアッセイに専ら酵素が用いられているゆえんである。酵素サイクリングを用いれば 10^{-21} mol/l の検出も可能という。ただし、ここでいう検出感度はあくまでもマーカーそのものの検出感度であり、これを抗原や抗体に結合させた時、たとえば蛍光物質でのクエンチングのように検出感度が落ちたり、そうでなくても抗原抗体結合能が落ちてイムノアッセイそのものの感度が低下する場合があることに留意しなければならない。

2.2. 高親和性・高特異性抗体の作製 高親和性抗体を用いることにより競合法では抗体量を減じることが出来、非競合法では、たとえばサンドイッチ法の場合、固相化抗体、標識抗体共に、少量の抗原と有効に結合させることができる。これによって感度が向上する。一方特異性の高い抗体を用いれば、類似構造をもつ抗原との交差性を減じ、イムノアッセイの特異性を高めることができる。この目的のために従来は、抗血清を類似抗原で吸収したり、D-glutamate-D-lysine polymer-ハプテンであらかじめ感作して類似構造をもつハプテンに対するクロンを抑制する方法などが用いられて来たが、最近は専らモノクローナル抗体 (monoclonal antibody) が利用されるようになった。

2.2.1. モノクローナル抗体—モノクローナル抗体を用いたイムノアッセイの長所は、①特異性がある。②サンドイッチ法などのイムノメトリックアッセイが容易である。③一定品質の抗体が安定供給できる点にある。一方短所としては④必ずしも親和定数が高いとは限らない。⑤目標とするモノクローナル抗体を得るためのスクリーニングが煩雑であることなどであろう。

TABLE I. Classification of Immunoassay

Test sample	Reaction	Method	Detection
Antigen or antibody	Antigen antibody reaction		
	Liquid or solid phase method		
	Marker labeled method	Radioimmunoassay (RIA)	Radioactivity
	B/F separation (heterogeneous) or nonseparation (homogeneous) method	Nonisotopic (alternative) immunoassay	
	Competitive (immunoassay) or noncompetitive (immunometric assay) method	Enzyme immunoassay (EIA)	Enzyme activity
		Fluorescence immunoassay (FIA)	Fluorescent intensity polarization etc.
		Luminescence immunoassay (LIA)	Luminescence intensity
		Spin immunoassay (SIA)	Electron spin resonance by free radical
		Viroimmunoassay	Cytolysis by bacteriophage
		Metal immunoassay	Atomic absorption spectrometry
Marker nonlabeled method		Particle immunoassay	Turbidimetry, counting etc.
		Immunodiffusion method	Turbidity
		Mephelometry	Light scattering
		Immunosensor	Electric response

特異性についてみると、モノクローナル抗体は、抗原上にある特定の単一の抗原決定基 (エピトープ epitope) を認識するわけであるから、適当なモノクローナル抗体を選べば、類似構造を有する抗原との交差反応を避けることで特異性を高めることが出来る。

感度についてみるとイムノメトリックアッセイのうちとくにサンドイッチ法では、抗原の一部分が固相化抗体と、他の部分がマーカー標識抗原と結合しなければならない。したがってこの場合は、異なるエピトープを認識する2種のモノクローナル抗体を用いた方が感度がよくなる。

最近このような方法によって従来よりはるかに高感度のイムノアッセイが開発されている。ここでは甲状腺刺激ホルモン (thyroid stimulating hormone, TSH) を例にとってみよう。TSH は分子量約2万の糖タンパクホルモンであるが種々の性腺刺激ホルモン (卵胞刺激ホルモン follicle stimulating hormone, FSH; 黄体形成ホルモン luteinizing hormone, LH; 胎盤性ゴナドトロピン human chorionic gonadotropin, hCG) とは類似した構造を有している。すなわちいずれも α と β のサブユニットが非共有結合しており、 α 鎖は全く共通で、 β 鎖がそれぞれのホルモンに特有の構造を有している。したがってポリクローナル抗体を使った従来のイムノアッセイでは、 α 鎖の共通構造のためこれらのホルモン同士で交差反応を示したり、イムノメトリック法でも感度が低かった。そこで適当なポリクローナル抗体とモノクローナル抗体あるいは2種のモノクローナル抗体を組合せたサンドイッチ法によって高特異性、高感度の TSH アッセイが開発されている。Fig. 1 は著者の研究室の遠藤らが開発したヒト TSH (hTSH) の EIA (サンドイッチ法) である。この方法では、抗 hTSH- β 鎖を認識するモノクローナル抗体の F(ab)' 分画と、 β -D-ガラクトシダーゼ (β -D-galactosidase) とを、架橋剤として *N,N'*-1,2-phenylenedimaleimide を用いて結合させた結合物 (β GAL-抗 TSH) を標識抗体としている。実際には緩衝液と、標準 TSH 又は被検血清 50 μ l と、抗 TSH 固相化ポリスチレン球及び β GAL-抗 TSH を同時に入れ、反応後、ポリスチレン球を洗滌し、これに結合した β GAL 活性を、4-methyl-umbelliferyl- β -D-galactopyranoside を基質として測定する。Fig. 1 の標準曲線で見られるように最少測定感度は 0.16 mU/l で、従来の 1—2 mU/l に比べその感度は約 10 倍上昇している。

2.2.2. クロノタイプ抗体——前述したようにモノクローナル抗体は一般的に特異性は高い。しかし親和定数は必ずしも高くなく、目標とするクローンを得るスクリーニングが煩雑である。そこで我々の研究室の遠藤らは観点を改めて、ポリクローナル抗体を等電点 (pI) の差によって分画し、その中から目標とする抗体を得る試みを行った。^{9,10)} まず抗 hTSH 家兎 IgG を、常法に従ってアガロース平板ゲルを用いて等電点電気泳動 (isoelectric focusing, IEF) にかける。その1部を用いて蛋白染色したところ、pH 3—10の範囲で多数のバンドが得られた (Fig. 2)。なお F(ab)₂ でも同様多数のバンドがみられるが、Fc では2本のみなので IgG でのこの pI の違いは、おそ

Fig. 1. Procedure and Standard Curve of Sensitive Enzyme Immunoassay (Sandwich Method) Using Monoclonal Antibody for Measuring hTSH in Serum (Authors' data)

4 MU, 4-methylumbelliferone.

Fig. 2. Isoelectric Focusing (IEF) Profile of Rabbit (anti-hTSH) IgG in the pH Range 3–10⁹⁾

After IEF, two tracks were used for protein staining and the other four for recovery of the antibodies. The upper figure shows protein staining of anti-hTSH IgG (Track A) and marker proteins in a pI calibration kit (Track C). The lower figure shows the antibody titer of each fraction (○) and the pI calibration curve (△).

らく抗体の可変部位の差によるものと推定される。さて IEF で分けた残りのゲルを 2 mm 幅でスライスし、これから抗体を抽出した。各分画を RIA で解析し Scatchard plot を描いたのが Fig. 3 である。ポリクローナル抗体を含む原抗血清が曲線であるのに対し、各分画では直線に近いことから、これらの分画には少ないクローンの抗体が含まれていると考えられるので、これをクローンタイプ抗体 (clonotypic antibody) と名付けたのである。またその最大親和定数を求めると、pI 5–8 のクローンタイプ抗体では、 8.2×10^9 – $3.1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ までさまざま、原抗血清 ($1.4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$) の約 2 倍の高親和性抗体分画が得られた。

一方これらのクローンタイプ抗体を用いた RIA 系で、hCG との交差反応をみると、その交差の程度はさまざまであるが、Fig. 4 に示すように抗体の pI が高い程交差性が大で、逆に pI が低い程交差性が少ないことが分かった。ところで TSH や hCG に共通の α 鎖の pI はほぼ 4.4, TSH β 鎖のそれは 6.2 である。そこで更に TSH- α 鎖と β 鎖の別々の RIA 系を用いて検討したところ、予想通り、pI の高いクローンタイプ抗体は α 鎖 (pI が β 鎖より低い) とよく

Fig. 3. Scatchard Plots of hTSH-anti-hTSH Antibody Interactions⁹⁾

The antibody samples examined were the same as for Fig. 2. Symbols represent the fractions numbered 2 (○), 4 (△), 9 (□), 11 (▽), 14 (◇), 16 (●), 18 (▲), 21 (■), 25 (▼) (from higher pI to lower pI) and the initial antibody (⊙).

Fig. 4. Correlation between the pIs of Clonotypic anti hTSH and Their Cross-reactivities with hCG⁹⁾

The IgG fractions from rabbit (anti-hTSH) antisera were run on IEF in the pH range 3–10 (open symbols) or 5–8 (closed symbols). Numbers on regression lines represent the batches of antisera obtained from rabbits immunized with hTSH obtained from different sources.

Fig. 5. Effect of Varying the Incubation Time on the Dose-Response Curves in hTSH RIA¹¹⁾

Series of dose-response curves are shown for simultaneous addition of reagent (A) delayed addition of labeled antigen (B), and delayed addition of unlabeled antigen (C). Suffixes to letters A, B and C indicate incubation times in hours. The competitive double antibody RIAs were performed using polyclonal antibody (a), mixture of monoclonal antibodies [Mono- α and Mono- β] (b), monoclonal antibody [Mono- α] (c) and monoclonal antibody [Mono- β] (d).

反応し、 pI の低い抗体は β 鎖 (pI が高い) とよく反応した。このような現象、つまり pI の低い抗原に対しては pI の高い抗体が、逆に pI の高い抗原に対しては pI の低い抗体が生成され易いということは、既にハプテン抗原・抗体で知られており、今回、ペプチド抗原でも証明されたことになる。さて上述の pI の高い抗 hTSH 抗体の方が hCG との交差性が大であったのは、2つのホルモンの共通構成成分である α 鎖のためであると考えられる。いずれにしても等電点の差で分画することにより、hCG と交差性の低い高特異性抗体が得られたことになる。その収率は 4—20% と低い、高 titer で少量の抗体だけあればよいようなイムノアッセイでは後述するように他の抗原測定にも応用できる。

2.3. 最適反応条件の設定 イムノアッセイの感度を向上させるためには、その反応条件を最適にすることも非常に重要である。ここでは、我々が気付いた 2, 3 の点について述べる。

2.3.1. 反応順序——試薬の添加順序を変えることによって感度を向上させることが出来る場合がある。

競合法 RIA においては、標識抗原、非標識抗原、抗体の 3 者の添加順序が問題となる。著者の研究室の市原らはこの点を詳細に検討した。¹¹⁾ Fig. 5 は ④ TSH の RIA において、3 者を同時に反応させた場合、⑤ あらかじめ非標識抗原である TSH と抗体を反応させてから標識抗原である ^{125}I TSH を添加した場合、⑥ 逆にあらかじめ ^{125}I TSH と抗体を反応させてから TSH を添加した場合、それぞれ 48—168 時間インキュベートした場合の標準曲線である。Fig. 5 a はポリクローナル抗体を用いた場合で、従来はこれらの反応は可逆的であるから時

間と共に標準曲線は一致するとされていたが、実際は非可逆的に近く、この3者のうちでは、標識抗原遅延添加法⑧が最も高感度である。なお2種類のモノクローナル抗体を使った場合はこのような差はほとんど生じなかった (Fig. 5 c, d). そしてこの2種のモノクローナル抗体を混ぜるとポリクローナル抗体の場合のような差を生じた (Fig. 5 b). また他の抗原について検討してみると、トリヨードサイロニン (3,5,3'-triiodothyronine) のような低分子抗原では3者に差がなく、 α フェトプロテイン (α fetoprotein, AFP) のような大分子抗原では差が大となった。このような差を生じる機序はおそらく多くのエピトープを持つ大分子抗原が、ポリクローナル抗体や混合したモノクローナル抗体と結合した際、非可逆的な複合体を作るためであろうと考えられる。いずれにしても、大分子抗原の競合法RIAでは、標識抗原の遅延添加で感度が上昇することが多い。ただこの方法では、標準抗原と、被検血清中の抗原とで反応が異なる場合がある点に留意しなければならない。

さて非競合法であるサンドイッチ法でも抗原、固相化抗体、標識抗体の3者の反応順序を変えることによって感度が上昇する場合がある。すなわち固相化抗体に抗原を入れ、洗浄後に標識抗体を入れる通常の forward sandwich 法よりも、逆にまず抗原と標識抗体を反応させてから固相化抗体を入れる reverse sandwich 法や、3者を同時に反応させる simultaneous sandwich 法の方が感度がよいことがある。Fig. 6 に示した hTSH のサンドイッチ EIA で、同時法の方が高感度であることが示されている。

2.3.2. 至適 pH——抗原抗体反応に至適 pH で行うのがよいことはいまでもなく、従来からも経験的に至適 pH が検討されて来た。しかし著者の研究室の遠藤らは少なくともペプチド抗原については一定の法則があることを見出したので以下紹介する。¹²⁾ 前述の hTSH (pI 8) とこれに対するクロノタイプ抗体とを反応させて至適 pH をみると、たとえば pI 5.6 の抗体の場合の至適 pH は 6.4 である。抗体をサクシニル化して pI を下げると、至適 pH も低下する。そこで、ペプチド抗原として、hTSH のほかにヒトミオグロビン (human myoglobin, hMb), ヒト成長ホルモン (human growth hormone, hGH), α フェトプロテイン, ヒトサイログロブリン (human thyroglobulin, hTg) を用い、これらに対する家兎抗血清から、IgG 分画をとり、前述の等電点分画またはクロマトフォーカシングで分画してクロノタイプ抗体を得た。

クロマトフォーカシングは Pharmacia 社製 Mono P. column を用いた fast protein liquid chromatography

Fig. 6. Standard Curves of Enzyme Immunoassays of hTSH

The sensitivity of reverse sandwich method (○) (0.06 mU/l) is higher than that of conventional forward sandwich method (●) (0.5 mU/l).

Fig. 7. Correlation between pH Optima Observed and Those Estimated in Various RIA Systems¹²⁾

○, hMb; △, hGH; ▽, hAFP; ◇, hTg; □, hTSH, using IgG antibodies; ■, hTSH, using F(ab')₂ fragments.

The estimated pH optimum is expressed as functions of molecular weights and pIs of both antigen and antibody molecules.

$$\text{pH optimum} = \frac{[\text{pI}]_{\text{Ag}} \cdot [\text{Mr}]_{\text{Ag}} + [\text{pI}]_{\text{Ab}} \cdot [\text{Mr}]_{\text{Ab}}}{[\text{Mr}]_{\text{Ag}} + [\text{Mr}]_{\text{Ab}}}$$

where $[\text{pI}]_{\text{Ag}}$ and $[\text{pI}]_{\text{Ab}}$ are pIs of antigen and antibody molecules, respectively, and $[\text{Mr}]_{\text{Ag}}$ and $[\text{Mr}]_{\text{Ab}}$ are molecular weights of both molecules.

(EPLC)で行った。得られた各分画に、 ^{125}I 標識抗原を添加し、異なる pH の緩衝液で反応後、二抗体法で結合型と遊離型を分離し、その最大結合%を求めた。最大結合を得る反応液の pH は、用いたクロノタイプ抗体の pI, 抗原の pI, 及びその分子量によって異なる結果が得られた。そこでこれらの結果から、ペプチド抗原の至適 pH を計算する近似式として次のような式を考えた。

$$\text{至適 pH} = ([\text{PI}]_{\text{Ag}} \cdot [\text{Mr}]_{\text{Ag}} + [\text{pI}]_{\text{Ab}} \cdot [\text{Mr}]_{\text{Ab}}) / ([\text{Mr}]_{\text{Ag}} + [\text{Mr}]_{\text{Ab}}).$$

ここで $[\text{pI}]_{\text{Ag}}$ と $[\text{pI}]_{\text{Ab}}$ はそれぞれ抗原と抗体の pI を示し、 $[\text{Mr}]_{\text{Ag}}$ と $[\text{Mr}]_{\text{Ab}}$ はそれぞれの分子量を示す。上式は、①抗原と抗体が1対1で結合する、②抗原と抗体の総電荷が逆で、しかも等量の場合に、両者の結合が最大となる、③各分子の総電荷は、それぞれの pI と反応溶液の pH の差及び、分子量に比例するという3つの仮定のもとに導き出したものである。そこでこのような式で求めた至適 pH と、実測値との関係を示したのが、Fig. 7 で、比較的よい相関が得られた。すなわちペプチド抗原の RIA を行う場合、用いる抗原と抗体それぞれの pI と分子量から、反応の至適 pH を推定でき、その条件で行えば感度も上昇させることが可能となる。

3. イムノアッセイの臨床検査への応用

イムノアッセイは、測定したい物質に抗原性があり、それに対する特異抗体が得られ、抗原抗体反応の程度を検出する適当な方法さえあれば組立てることができる。したがって現在イムノアッセイで測定できる物質は数え切れない程多い。臨床検査の分野では測定する抗原としてホルモン（ペプチド性、非ペプチド性）、微量生理活性物質（サイクリックヌクレオチドなど）薬剤、腫瘍関連抗原、病原体（細菌成分、ウイルスなど）その他免疫グロブリン、血清タンパクなどがある。測定する抗体としても外来抗原に対する抗体（細菌、寄生虫、ウイルスなど）と自己抗体がある。ちなみに現在わが国で用いられている RIA は、年間 6000 万件にも達し、その相当な部分は臨床検査への応用といえる。

3.1. 高感度イムノアッセイの応用 最初にも述べたように、生体内物質は微量なものが多く、従来のイムノアッセイの感度でもまだ不十分な場合があった。そこで前項で述べた高感度イムノアッセイ法が開発され臨床検査の分野に導入、既に一部はキット化されている。

これら高感度イムノアッセイの臨床応用によりとくにホルモンの分野において次のような病態診断が可能となった。

第1は、従来、TSH, GH, 副腎皮質刺激ホルモン (adrenocorticotrophic hormone, ACTH) などの微量ホルモンレベルは健常人では測定できなかったが、高感度イムノアッセイにより可能となり、日内リズムなど生理的変動もとらえられるようになった。

第2は、正常より更に抑制されたホルモン分泌病態を把握できるようになった。Fig. 8 は我々が血清中 TSH を測定した成績で、従来、時として測定感度以下であった正常人のレベルがすべて検出でき、また Graves 病などでは、ネガティブフィードバック機構によって TSH 分泌が抑制されているのがよく分かる。

第3は、ホルモン分泌を抑制させる負荷試験が可能となった。たとえば前述の TSH についてみると、甲状腺ホルモンを投与して、TSH が抑制されるか否かということから、その分泌調節機能を診断することができる。

このように高感度イムノアッセイの開発は、今後とくに臨床検査診断の分野で大きなインパクトを与えるものと思われる。

3.2. イムノアッセイによる病因解明 (先天性 TSH 単独欠損症) イムノアッセイを駆使することによって、疾患の診断のみならず病態・病因解明も可能となっている。ここでは例として、我々が 1971 年に発見した先天性 TSH 単独欠損症 (Congenital isolated TSH deficiency)¹⁸⁾ について述べる。

症例は、近交係数 1/64 の近親結婚両親から出生した同胞 3 人 (長兄は幼時類似症状で死亡) 中の姉妹例でクレチン症 (先天性甲状腺機能低下症) の症状を示している。イムノアッセイによる血中甲状腺ホルモン測定の結果はいずれも低値で、甲状腺機能低下は間違いないことが分かった。ところが、イムノアッセイで TSH を測定してみると、通常のクレチン症ならネガティブフィードバックで著増する筈なのに、本症例では測定感度以下だったのである。その後、他の抗 TSH ポリクローナル抗体、あるいはモノクローナル抗体を用いた高感度イムノアッセイで測定しても TSH は検出できなかった (Fig. 8)。更に視床下部から分泌される TSH 放出ホルモン (thyrotropin releasing hormone, TRH) を投与してみると、健常人や、通常のクレチン症ではこれに反応して

Fig. 8. Concentrations of TSH in Serum Determined by Sensitive Immunoradiometric Assay (IRMA) in Patients with Various Thyroid Diseases (Authors' data)

TABLE II. Response of Pituitary Hormones to Hypothalamic Releasing Hormones in Patients with Isolated TSH Deficiency¹⁸⁻¹⁹⁾

	TSH	PRL	LH • FSH	ACTH	GH
TRH	⇒	↑	→	(→)	↑
LHRH	→	→	↑	(→)	↑
CRH	→	⇒	⇒	↑	↑
GRH	→	⇒	→	→	↑

⇒ abnormal → normal () cortisol.

血中 TSH は上昇するが、本症では検出できない。更に感度は低いバイオアッセイでも検出できなかった。これらの結果から本症を TSH 欠損症と診断した。

更に他の視床下部ホルモンを投与して、それぞれに対応する下垂体ホルモンをイムノアッセイで測定した。その結果 Table II に示すように、TRH によるプロラクチン (prolactin, PRL) の分泌、黄体形成ホルモン放出ホルモン (luteinizing hormone releasing hormone, LHRH) による LH 及び FSH の分泌、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (corticotropin releasing hormone, CRH) による ACTH の分泌、成長ホルモン放出ホルモン

(growth hormone releasing hormone, GRH) による GH の分泌はいずれも正常である。つまり本症ではこれら下垂体ホルモンのうち TSH 分泌のみが欠如していることから TSH “単独” 欠損症と診断したわけである。

ところで、ここで 2 つの興味ある事実が明らかとなった。

第 1 は、Table II に示すように、本症例では TRH, LHRH, CRH によって、健常人ではみられない GH の異常分泌が認められた。その機序は全く不明であるが、類似の GH 異常分泌は、GH 産生腫瘍などの他疾患でも認められることがあり興味深い。

第 2 は TSH 欠損の機序である。前述したように TSH, LH, FSH はいずれも糖タンパクホルモンの α 鎖と β 鎖の 2 つのサブユニットから成りその構造をみると、 α 鎖はアミノ酸配列や遺伝子解析の結果からこれら糖タンパクホルモンに共通で、同一であることが分かっている。そこで本症について考えてみると、TSH は欠損しているが、LH・FSH は正常であることから、 α 鎖遺伝子には異常はないと想定される。事実、最近 α 鎖に特異的なイムノアッセイにより、本症患者血中には、 α 鎖が単独でむしろ増量して存在することがわかった。したがって本症の異常は β 鎖にあると想像される。事実我々はその後 hTSH β 鎖の遺伝子をクローニング¹⁶⁾してその構造を決定し、更に本症例での解析から、点変異を発見し、それが本症の原因であることを明らかにした。このように特異的なイムノアッセイの活用は、病態・病因解明に大いに威力を発揮するものである。

4. イムノアッセイの予防医学への応用

以上述べたように、イムノアッセイは臨床検査分野で広く利用されている。ただ、現在の利用のほとんどは、既に発病した疾病を診断するためのものである。しかしながら、これからの医療は潜在性の病態や、疾病素因を発病前に診断してそれを予防することが大きな課題である。潜在性病態は自覚症状がないわけであるから、一見正常と思われる人々を対象にして、検査によってそれを見出す、すなわちマススクリーニング (mass screening) によらなければならない。そしてこの分野にもイムノアッセイが応用されるようになったのである。

4.1. プロラクチン産生腫瘍のマススクリーニング 脳下垂体前葉から分泌されるプロラクチン (PRL) は乳腺を刺激して乳汁分泌を促進すると共に性腺機能を抑制するホルモンの一つで、出産後の授乳期婦人にとって重要な役割りを果しているが、それ以外の時期あるいは男性での作用は明らかではない。下垂体の PRL 産生腫瘍は、小さいものを含めるとかなり頻度が高く、一般の病理解剖例で調べると、実に 8—23% に及ぶというが、良性であるため実際に症状を示すのは極くわずかしかなければならないと考えられている。それでも PRL 分泌が多くなれば女性では月経異常、不妊、乳汁漏出などの症状があるので比較的若年でみつかると、男性ではほとんど症状がなく、結局腫瘍が大きくなって視神経を圧迫し、視野狭小など視力障害で気づき、手術も困難になることが多い。そこで著者らは一般人を対象にして本症の頻度を知り、早期発見を期待して、血中 PRL をイムノアッセイで測定するマススクリーニングを試みたのである。¹⁷⁾

方法は血中 PRL を RIA で測定するわけであるが、スクリーニングを省力化するため、“組合せ法 (paired assay method)”を開発した。その原理は Table III の通りである。すなわち、健常人の血中 PRL は 7.5—28 $\mu\text{g/l}$ であるので、もし 2 人分の血清を混じてその PRL 濃度を測定した場合も、最大 28 $\mu\text{g/l}$ を越えることはない。一方、もし片方が PRL 産生腫瘍であり、その血中 PRL 濃度を 50 $\mu\text{g/l}$ 以上と仮定すると、健常人血清と混じた時の PRL 濃度は少なくとも $(7.5+50)/2=29$ $\mu\text{g/l}$ 以上にはなり、健常人 2 人の組合せ (28 $\mu\text{g/l}$) とは区別できる筈である。そしてもしこのような異常な組合せがあれば、今度は残った血清で 2 人を個別に測定し、異常例を特定すればよい。異常例の頻度は多くないから、アッセイ数は半数近くまで減じることができるわけである。モデル実験で PRL 濃度の異なる 2 種の血清を混じて RIA で測定した値 (y) と、別々に測定して計算から求めた値 (x) との間には、当然のことながら $y=1.0+0.9x$, $r=0.98$ という一致をみた。

実際のスクリーニングにあたっては、偽陽性例を少なくするため、カットオフポイントを 75 $\mu\text{g/l}$ と設定し、組合せ法でカットオフ以上の時、個別に測定して再びカットオフ以上であれば調査書を送り、

TABLE III. Principle of “Paired Assay Method” for Mass Screening for Prolactinoma¹⁷⁾

Subjects	Prolactin ($\mu\text{g/l}$)	
	Single	Paired
Normal	7.5—28	7.5—28
Normal	7.5—28	
Normal	7.5—28	
Prolactinoma	50—1000	29—514

TABLE IV. Summary of Results of Screening Tests for Hyperprolactinaemia by Paired Assay for Prolactin in Serum in General Population¹⁷⁾

	Male	Female	Total
Total subjects screened	8450	2100	10550
Hyperprolactinaemia ^{a)}	14	26	40
Diagnosis ^{b)}			
Prolactinoma	3 (1 : 2800)	2 (1 : 1050)	5
Empty sella syndrome	1	0	1
Pregnancy	—	7	7
Drugs	7	6	13
'Big' prolactinaemia	2	8	10
Normalized	1	3	4

Values in parentheses indicate prevalence.

a) Serum prolactin levels of over 75 $\mu\text{g/l}$ in the 2nd individual assay. b) Diagnosis was made by a questionnaire, a 3rd confirmatory assay and examination on recall.

TABLE V. Recommended Immunoassays for Neonatal Mass Screening⁴⁾

Disease	Test	Method
Hypothyroidism	TSH	RIA, EIA, FIA
	T ₄ +TBG	RIA, EIA, FIA
	Free T ₄	RIA, EIA
Congenital adrenal hyperplasia	17-OH-Progesterone	RIA, EIA, FIA
Cystic fibrosis	Trypsin	RIA
Atopic disease	IgE	RIA, EIA
Neural tube defect	α -Fetoprotein (mother)	RIA, EIA

妊娠、薬剤 (sulpiride, imipramine など) といった原因の明らかなものを除き、再度採血測定し、やはりカットオフ以上の時には呼出して頭部トルコ鞍 X 線, CT スキャンなどで精査した。

企業の健康診断で採血した 10550 人を対象に行ったスクリーニングの結果は Table IV に示す通りで、PRL 産生腫瘍が男性 3 例 (頻度 1 : 2800) 女性 2 例 (1 : 1050) が発見された。いずれもほとんど自覚症状はなかったが、男性 1 例では既に腫瘍が 1 cm 以上と大きく、骨の変形にまで及んでいたので摘出手術し、他の 1 人は薬剤 (bromocriptin) 療法を行った。女性 1 例も既婚ながら不妊で悩んでいたため、薬剤療法で無事妊娠、出産した。

結論として、このような一般人を対象とした血中 PRL イムノアッセイによる PRL 産生腫瘍のスクリーニングは、経済効率の面では問題はあるが、とくに男性では、視力障害に至るまでに早期発見、早期治療を行うことが出来る点が注目される。

4.2. クレチン症のマススクリーニング フェニールケトン尿症などの先天代謝異常疾患は、放置すると非可逆的な知能低下を伴う発育障害を来す悲劇的な疾患である。もし生後早期に発見して治療すれば予防することができるが、臨床症状からだけでは早期診断は困難なことが多い。そこで出生児全員から少量の血液を濾紙上に採取し、この“血液濾紙”を検査センターへ郵送し、ここで検査をして異常児を見出すシステム、すなわち新生児マススクリーニング (neonatal mass screening) がここ 20 年来各国で行われて来た。最近になってこの分野にもイムノアッセイが導入され、現在 Table V に示すような疾患のスクリーニングが実施あるいは検討されている。以下クレチン症のマススクリーニングについて述べる。

さてクレチン症は、先天的に甲状腺ホルモンが欠如し、前述したフェニールケトン尿などと同じく非可逆的な知能低下を来すが、生後 1—3 ケ月内に甲状腺ホルモンの投与を開始すれば予防できる。典型的な場合は特有の顔貌などの病状があるが、半数以上は明らかではない。本症の病型には障害部位によって視床下部性、下垂体性、甲状腺原発性に分類され、外国ではサイロキシン (thyroxine T₄) の減少を指標としている。しかし 90% 以上を占める原発性を目標とした効率のよい TSH を RIA で測定する方法がわが国で入江¹⁸⁾ 及び我々のグルー

る。したがって、経済面から考えても、マスキングは効果があるといえるのである。

5. おわりに

感度・特異性にすぐれたイムノアッセイの登場はとくに臨床検査の分野に画期的な進歩をもたらしている。技術面では更に高感度・高特異化が試みられ、測定法として改良されつつある。臨床応用面では、単なる疾病の診断のみならず、その病態・病因の解明に威力を発揮するとともに、一般人を対象としたマスキングによって潜在病態の発症前早期診断・予防といった分野にまで活用されるようになった。今後も技術面での進歩とあいまって、その応用の拡大は留るところを知らず、ますます発展するものと期待される。

終りに臨み、協同研究者の各位に深謝する。

引用文献

- 1) R. S. Yalow, S. A. Berson, *Nature* (London), **184**, 1648 (1959).
- 2) E. Engvall, P. Perlmann, *Immunochemistry*, **8**, 871 (1971).
- 3) E. Ishikawa, T. Kawai, K. Miyai, "Enzyme Immunoassay," Igakushoin, Tokyo, 1981, pp. 1—280.
- 4) K. Miyai, "Advances in Clinical Chemistry: Advances in Nonisotopic Immunoassay," Vol. 24, ed. by H. E. Spiegel, Academic Press, New York, 1985, pp. 61—110.
- 5) H. U. Bergmeyer, J. Bergmeyer, M. Grassl, "Methods of Enzymatic Analysis," 3rd ed. Vol. 9, Protein and Peptide, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1986, pp. 1—571.
- 6) 鎮目和夫, 熊原雄一, "ラジオイムノアッセイ," 朝倉書店, 東京, 1977, pp. 1—371.
- 7) 石川栄治, 河合 忠, 宮井 潔, "酸素免疫測定法," 第3版, 医学書院, 東京, 1987, pp. 1—410.
- 8) 宮井 潔, 辻 章夫, 渡辺富久子, "フルオロイムノアッセイ," 講談社サイエンティフィック, 東京, 1984, pp. 1—210.
- 9) Y. Endo, K. Miyai, N. Hata, K. Ichihara, *Anal. Biochem.*, **143**, 249 (1984).
- 10) Y. Endo, K. Miyai, N. Hata, K. Ichihara, *Anal. Biochem.*, **144**, 41 (1985).
- 11) K. Ichihara, T. Yamamoto, M. Azukizawa, K. Miyai, *Clin. Chim. Acta*, **98**, 87 (1979).
- 12) Y. Endo, K. Miyai, N. Hata, Y. Iijima, *Biotech. Appl. Biochem.*, **9**, 74 (1987).
- 13) K. Miyai, M. Azukizawa, Y. Kumahara, *New Eng. J. Med.*, **285**, 1043 (1971).
- 14) K. Miyai, M. Azukizawa, T. Onishi, T. Hashimoto, N. Sawazaki, K. Nishi, Y. Kumahara, "Excerpt. Medica. International Series," ed. by V. H. T. James Excerpta Medica, Amsterdam, 1976, pp. 345—349.
- 15) Y. Hayashizaki, K. Miyai, T. Onishi, Y. Kumahara, *Horm. Metab. Res.*, **18**, 849 (1986).
- 16) Y. Hayashizaki, K. Miyai, K. Kato, K. Matsubara, *FEBS Lett.*, **188**, 394 (1985).
- 17) K. Miyai, K. Ichihara, K. Kondo, S. Mori, *Clin. Endocrinol.*, **25**, 549 (1986).
- 18) M. Irie, K. Enomoto, H. Naruse, *Lancet*, **II**, 1233 (1975).
- 19) K. Miyai, K. Nishi, M. Kawashima, T. Oura, T. Tsuruhara, *Clin. Chim. Acta*, **73**, 241 (1976).
- 20) K. Miyai, T. Oura, M. Kawashima, T. Tsuruhara, Y. Hase, K. Ichihara, N. Amino, K. Nishi, T. Fujie, K. Nakatani, M. Azukizawa, O. Nose, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **47**, 1028 (1978).
- 21) K. Miyai, K. Ishibashi, Y. Kumahara, *Clin. Chim. Acta*, **67**, 263 (1976).
- 22) N. Kato, S. Ishii, H. Naruse, M. Irie, H. Arakawa, A. Tsuji, *Anal. Lett.*, **13**, 1555 (1980).
- 23) K. Miyai, K. Ishibashi, M. Kawashima, *Clin. Chem.*, **27**, 1421 (1981).
- 24) K. Miyai, T. Tsuruhara, S. Kusuda, K. Ishibashi, M. Kawashima, H. Mizuta, O. Nose, H. Yabuuchi, T. Oura, *Pediatr. Res.*, **18**, 1289 (1984).
- 25) J. H. Dussault, P. Coulombe, C. Laberge, J. Letarte, H. Guyda, K. Khoury, *J. Pediatr.*, **86**, 670 (1975).
- 26) K. Miyai, K. Ishibashi, M. Kawashima, *Endocrinol. Jpn.*, **27**, 375 (1980).
- 27) M. Maeda, K. Ito, H. Arakawa, A. Tsuji, *J. Immunol. Method.*, **82**, 83 (1985).
- 28) H. Mizuta, K. Miyai, K. Ichihara, N. Amino, T. Harada, O. Nose, O. Tanizawa, *Clin. Chem.*, **28**, 505 (1982).
- 29) N. Hata, K. Miyai, M. Ito, Y. Endo, Y. Iijima, H. Mizuta, N. Amino, O. Nose, T. Harada, *Clin. Chem.*, **31**, 750 (1985).
- 30) N. Hata, M. Ito, H. Mizuta, O. Nose, K. Miyai, *Clin. Chem.*, **29**, 1437 (1983).