

Title	ゴナドトロピンのRadioimmunoassayに関する研究
Author(s)	谷澤, 修
Citation	大阪大学, 1967, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/29390
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	谷 澤 修 たに ざわ おさむ
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 1 2 1 3 号
学位授与の日付	昭 和 42 年 3 月 31 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	ゴナドトロピンの Radioimmunoassay に関する研究
論文審査委員	(主査) 教 授 足高 善雄 (副査) 教 授 天野 恒久 教 授 山村 雄一

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

絨毛性ゴナドトロピン(HCG),下垂体性黄体化ホルモン(LH)の測定は,従来の生物学的測定法に加え,1960年以降免疫学的測定法が導入され臨床にも妊娠反応として応用されることとなった。先に私は免疫学的妊娠反応を実用化する目的で市販 HCG 製剤を抗原とし,タンニン酸処理羊血球凝集反応による定性および半定量的 HCG 測定法の特異性と応用範囲等について基礎的・臨床的に検討を加えた結果数多くの利点を見出すことができた。しかしながら本反応を尿中又は血清中微量 HCG や LH の測定に利用する為には,なお鋭敏度が不充分で被験尿の濃縮を必要とし,血清では非特異的な凝集反応にさまたげられる等の理由から,更に鋭敏な抗原抗体反応の必要性を感じるに至った。そこで最近 Insulin をはじめ種々の蛋白ペプチッドホルモンの微量測定に利用されつつある ^{131}I 標識ホルモンによる Radioimmunoassay に着目し,微量測定の際条件を検討すると共に,この方法により実際に母体及び臍帯血中 HCG,正常月経周期婦人の尿中 LH の測定をこころみた。

〔方法ならびに成績〕

1. 抗原及び抗血清の調製

抗原 HCG は市販製剤(2630 iu/mg)を Ethanol 分画沈澱および DEAE-cellulose column chromatography により 8000 iu/mg 迄精製して使用した。抗 HCG 血清は上記抗原を complete Freund's adjuvant と共に反復家兔に注射して作製し,下垂体剔除婦人尿および小児血清蛋白で吸収後に使用した。抗家兔 γ -globulin 血清は同様の方法で羊を免疫して調製した。

2. ^{131}I による HCG の標識法

Greenwood らの Chloramin-T 法にもとづき,上記抗原 HCG 5 μg を 2 mCi の $^{131}\text{I}\text{Na}$ によって標識し 200~300 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ の specific activity を得た。 ^{131}I -HCG と (^{131}I) Iodide の分離は Bio-Gel P-60 の

ゲル濾過 (1×15 cm) により行なった。¹³¹I-HCG は 50 mg/cc の割合に牛血清アルブミンを含む 0.05 M 磷酸緩衝生理的食塩水中に採取した。

3. 抗原抗体反応と生物学的活性の関係

Radioimmunoassay において ¹³¹I-HCG との結合にあずかる抗体の消長と上清の生物学的活性との関係を明らかにする為、800 iu から 1.5 iu に至る倍数稀釈の cold HCG に一定量の抗 HCG 血清を加え、次いで ¹³¹I-HCG 約 1 m μ g (0.008 iu) を加えて更に incubate し、そのあと二重抗体法で全ての抗 HCG 血清を沈降せしめ、沈降物の放射能を測定した。その結果抗 HCG 血清が cold HCG で中和され、¹³¹I-HCG の沈降物への recovery が20%以下になる 100 iu の点から上清中に HCG の生物学的活性が急速に出現する事を幼若ラット卵巢重量法及び子宮重量法によって証明した。

4. Radioimmunoassay

¹³¹I-HCG 0.1 cc (500~1000 μ g) を標準 HCG (倍数稀釈系列) あるいは被験液 0.4 cc と混合し、1 : 15000 稀釈抗 HCG 血清 0.2 cc を加えて 37°C 1時間及び 4°C 12時間 incubate し、次に抗家兎 γ -globulin 羊血清 0.3 cc を加えて更に 2日間 4°C に incubate した後遠沈し沈渣の放射能を Well-type scintillation counter で測定した。標準曲線は、横軸に HCG 濃度の対数 log X (iu/cc)、縦軸に precipitable radioactivity Y (%) 即ち $(C_x - C_o) / C_{100} - C_o \times 100$ をとって画いた。〔但し C_x は cold HCG: X iu/cc の時、C_o は抗 HCG 血清を加えなかった時、C₁₀₀ は cold HCG を加えなかった時のそれぞれの沈降物中放射能 cpm をあらわす〕。この方法により市販 HCG 製剤 (2630 iu/mg)・精製 HCG (8000 iu/mg)・国際標準品 (1963年) について比較すると相互にきわめてよく一致し、0.0003~0.1 iu/cc の範囲で 100~0%迄下降する S 字状曲線を得た。測定域として標準曲線の中央部 0.001~0.02 iu/cc を使用した。

5. 臨床実験

分娩時に同時採血せる母体及び臍帯血中 HCG を26例について比較すると、それぞれの平均値 11.5 iu/cc 及び 0.025 iu/cc となり、濃度比の平均値は 1 : 678 と母体側に高くなった。従って胎盤に於ける HCG は母体側に向けて一方向性に分泌され且つ HCG の通過性に対し胎盤が barrier をなしている可能性が考えられた。次に正常月経周期婦人の早朝尿を2周期にわたり測定したところ排卵期に一致し 0.02~0.03 iu/cc 程度の急峻な peak を認めた。

〔総括〕

¹³¹I-HCG を用いる Radioimmunoassay により、HCG の微量測定法を考案検討した結果、8000 iu/mg の精製 HCG を抗原として用いた場合、種々の HCG について標準曲線は一致し、測定域として 0.001~0.02 iu/cc を得た。この方法により母体及び臍帯血中 HCG level を比較すると、母体側に著しく高い事を26例について証明した。又正常月経周期婦人の早朝尿を2周期にわたり測定し、排卵期に一致する peak を認めた。その感度は従来の Bioassay (Friedman 反応) に比し約 1000 倍であり、血清あるいは尿中の微量変動をも追跡することが可能であるので臨床的にもその利用価値が大であると考える。

論文の審査結果の要旨

絨毛性ゴナドトロピン (HCG), 下垂体性黄体化ホルモン (LH) の測定は, これまで Bioassay によって行なわれてきたが, 近年 Immunoassay すなわちタンニン酸処理 HCG 感作血球凝集反応等の導入があり, 妊婦尿中 HCG の測定に実用化されるに至った。しかしながらこの方法は尿中または血清中の微量 HCG や LH の測定には鋭敏度が不十分で, 被験尿や血清からの濃縮抽出が必要な為, 個々の回収率の問題や非特異的な凝集反応にさまたげられる等の理由からさらに鋭敏な抗原抗体反応系が望まれるに至った。

著者は抗原及び抗血清の精製純化に工夫を加え, 8000 iu/mg の精製 HCG を ^{131}I にて標識し高い Specific activity の ^{131}I -HCG を調製した後, 二重抗体法による Radioimmunoassay 法を考案し基礎的, 臨床的に検討を加えた結果, 種々の HCG により画いた標準曲線はよく一致し, 測定域として 0.001~0.02 iu/ml の微量を検出し得ることを明らかにした。これを臨床例に応用し同時に採血した母体及び臍帯血中 HCG レベルを比較し臍帯血に著しく低いことを証明した。

また正常月経周期婦人の尿中 LH を測定し排卵期に一致するピークを見出した。

以上の方法は Friedman 家兎排卵法に比し約1000倍, タンニン酸処理 HCG 感作血球凝集反応に比し約 500 倍の鋭敏度を有するので, 今後臨床応用に期待されるどころ多大であり, 学位論文として適当であると思われる。