

^{125}I 標識を用いた $17\alpha\text{-OHP}$ の RIA について

神戸川 明
(帝京大・産婦人科)

【研究目的】

昨年まで本マスキリング研究会で ^3H 標識を用いた $17\alpha\text{-OHP}$ の RIA を報告してきた。 ^3H 標識ステロイドはステロイドの水素の代りに ^3H が標識されているためにステロイドの性質は同じであり、抗血清の特異性を検討するために便利である。しかし ^3H 標識を用いた RIA はシンチレーターを廃棄することが問題である。CAH のマスキリングの主流は EIA になっているが、沃素をする直前のハプテンを作っておけば、沃素化は簡単であり、 ^{125}I を用いた immunoassay 法は dextran coated charcol 法で B/F 分離し、そのカウントから自動的に計算され、数多くの検体を処理するのに適している。我々はこの RIA に適した抗血清と ^{125}I 標識した hapten の組合せを検討したので報告した。

【研究方法】

1. $17\alpha\text{-OHP}$ 抗血清の種類

昨年の本研究会で報告した 3 種類の hapten に牛血清アルブミンを結合されたものを抗原としたウサギ抗血清を用いた (図 1)。

2. ^{125}I 標識 $17\alpha\text{-OHP}$ の作製

$17\alpha\text{-OHP-}7\alpha\text{-CET-histamine-}^{125}\text{I}$: $17\alpha\text{-OHP-}7\alpha\text{-carboxyethyl thio ether}$ を isobutyl chloroformate で混合酸無水物を作り、これにヒスタミンを反応させて $17\alpha\text{-OHP-}7\alpha\text{-CET-histamine}$ を作製した。この $1\mu\text{g}$ に Na^{125}I $0.5\mu\text{C}$: とクロラミン T $10\mu\text{g}$ を加え室温 1 分でメタ次亜硫酸ナトリウム液で反応を止め、酢酸エチルで抽出後、TLC で精製して作った (図 2)。

$17\alpha\text{-OHP-}3\text{-CMO-histamin-}^{125}\text{I}$: Amersham のものを使用 (図 2)。

3. ^{125}I 標識を用いる RIA 法

汚紙血 3 mm disc 1 枚を生食 0.5 ml で一夜放置後、エーテル 2 ml 加えて vortex 後ドライアイス-アセトンでエーテル層を試験管に移し、 N_2 で乾固する。これに buffer (0.05M phosphate, gelatin 0.1%, NaCl 0.9%, NaN_3 0.1%) pH 7.3 $100\mu\text{l}$ を加えてとかし、ついで抗血清 $200\mu\text{l}$ と ^{125}I 標識 17-OHP $10.000\text{ CPM}/100\mu\text{l}$ の buffer 液を加え一夜 incubation し、dextran coated charcol 液 $400\mu\text{l}$ 加え、 4°C 20 分後遠沈し、上層を吸引して沈査の炭末を r カウンターで測定した。

【研究結果】

1. 抗 $3(\text{E})\text{CMO}$ 抗血清と $3(\text{mix})\text{-CMO-histamin-}^{125}\text{I}$ による各種ステロイドの標準曲線。

図 3 に示すように抗体濃度は 20.000 倍で $B_0/T = 66\%$ ^{125}I の結合を 50% 阻止する $17\alpha\text{-OHP}$ 量は 30pg で $17\alpha\text{-OH Pregnenolone}$ ($17\alpha\text{-OHP}_5$) は 35% とかなりの交叉反応があった。

2. 抗6 α -Succ血清と3(mix)CMO-histamin-¹²⁵Iによる標準曲線と交叉反応

昨年に³H標識で6 α -Succ抗血清の交叉反応を測った結果、3(E)や7 α の抗血清より良くなかった。3のbridgeに¹²⁵Iを標識したものをを用いたときは表1に示すように2000倍希釈でBo/T 50%で、感度も他の組合せより悪かった。

3. 抗7 α -CET血清と3(mix)CMO-histamin-¹²⁵Iによる標準曲線と交叉反応

7 α CETの抗血清は³H標識17 α -OHPを用いたとき17 α -OHP-3-CMOとのCrossは1%以下であり、7 α CETの抗血清は3-CMOのbridgeをもつものとの反応性が小さいため、抗血清の濃度は5000倍希釈(3H標識では500,000倍希釈)と濃い必要があり、この両者の結合を解離するには僅かの17 α -OHPでよかった。また17 α -OHP₅との交叉反応は8%と少なかった(図4)。

4. 抗3(E)·CMO血清と7 α -CET-histamin-¹²⁵Iの組合せによる特性

3(E)CMO抗血清は特異性が高く17 α -OHPの7 α にbridgeのある物との交叉反応性が少ないことから、抗血清濃度は5000倍と濃いが、¹²⁵Iの結合を50% displaceする17 α -OHPは15 pg, 0と有意の差で測定できる最少量1pg(感度)であり、17 α -OHP₅と35%交叉し、この成績はこの組合せの逆である7 α の抗血清と3-CMOの標識の組合せのデータと類似していた(図5)。

5. 抗6 α -Succ血清と7 α -CET-histamin-¹²⁵Iの組合せの特性

抗6 α -Succ血清は抗体価と特性も低いことから図6の如く7 α の¹²⁵Iを用いても標準曲線が寝ており、交叉反応も多かった。

6. 抗7 α -CET血清と7 α -CET-histamin-¹²⁵Iの組合せの特性

図のように15000倍で急峻なよい標準曲線が得られたが、17 α -OHP₅のCrossが14%であった。

【考按】

我々はすでに3(E)CMO-BSA抗血清と3(Z)CMOに¹²⁵Iを標識した組合せは、同じ3位の炭素に結合したbridgeであるが立体的異性体を用いたbridge heterology(抗体抗原E/標識抗原Z)であるため感度、特異性が高く、これはただbridgeの炭素の長さが異なるbridge heterologyよりも感度が高いことを証明した。これはステロイドについているbridgeまで抗原として認識するため同じ系のbridgeの組合せはこの抗原と抗体の結合が強すぎて測ろうとするステロイドの競合的反応が弱くなり、測定感度、特異性が悪くなるためである。ゆえに抗体と標識したステロイドとの結合能が測ろうとするステロイドよりも弱い方がよく、これを満たすような組合せは3の立体異性体のstereo heterologyの外には3と7とか6と7のようなsite heterologyがよいと考えられる。今回6の抗血清自身がよくなかったので、また6-succinateがなかったので6と7、または7と6の組合せはうまく行かなかったが、本来この組合せは立体的に6 α -equatorialと7 α -axialでありとくに7 α 抗体と6 α 標識の組合せは好結果を与えるものと推定できた。このCAHのマスクリーニングが標識に酵素を用いるEIAが主流になって来たが、これの抗体抗原と標識抗原の組合せは3, 4, 6, 7および11の炭素にbridgeをつけることができるため数多くの組合せが出来るが、酵素でこの組合せを検討するよりは¹²⁵I標識で簡単に特性を調べることができ、方法論を考える上で役立つものと考えられた。

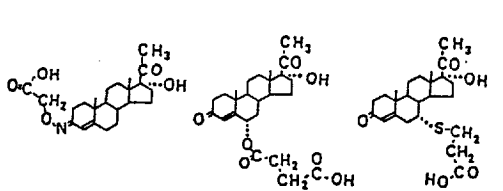


図1. 研究に用いた3種の抗17α-OHP血清のhaptenの構造

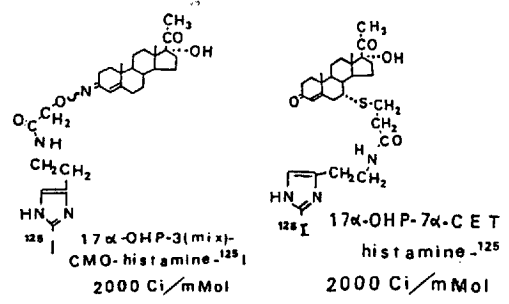


図2. 2種類の¹²⁵I標識した17α-OHPの構造

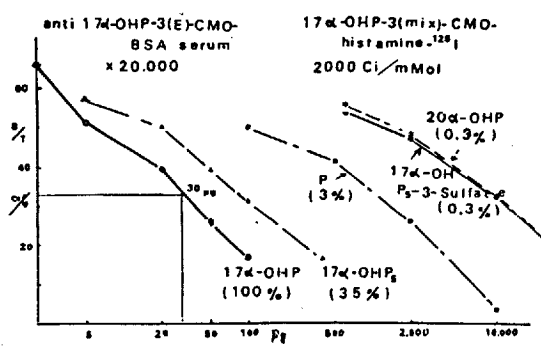


図3. 抗17α-OHP-3(E)-CMO-BSA血清と17α-OHP-3(mix)-CMO-histamin-¹²⁵Iの組合せ

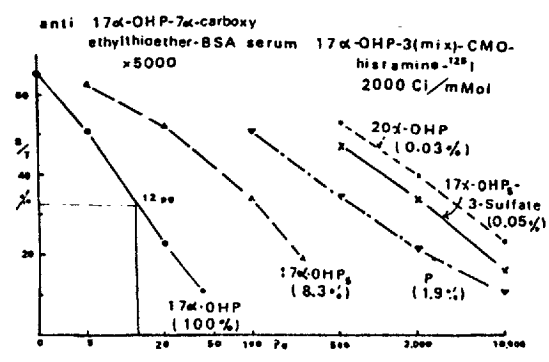


図4. 抗17α-OHP-7α-CET-BSA血清と17α-OHP-3(mix)-CMO-histamin-¹²⁵Iの組合せ

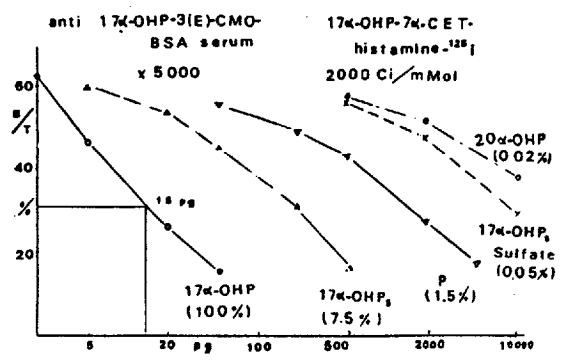


図5. 抗17α-OHP-3(E)-CMO-BSA血清と17α-OHP-7α-CET-histamin-¹²⁵Iの組合せ

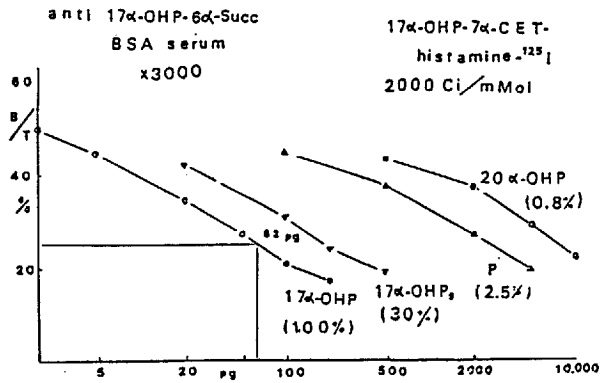


図6. 抗 17α -OHP- 6α -Succ-BSA血清と 17α -OHP- 7α -CET-histamin- ^{125}I の組合せ

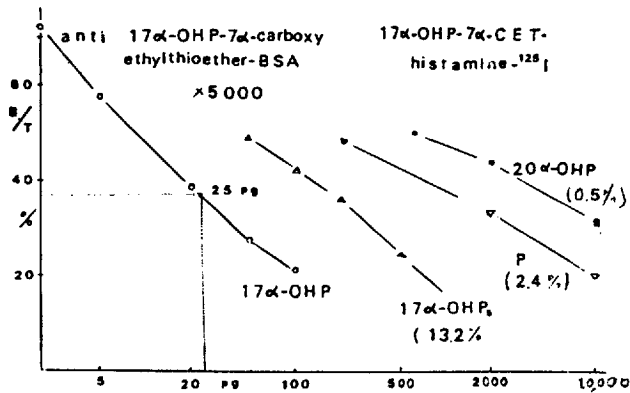


図7. 抗 17α -OHP- 7α -CET-BSA血清と 17α -OHP- 7α -CET-histamin- ^{125}I の組合せ

表1. ^{125}I を用いたときの各種 17α OHP抗血清の特性

要素	17α -OHP-3(mix)-CMO- histamine- ^{125}I			17α -OHP- 7α -CET- histamine- ^{125}I		
	17α -OHP-3 (E)-CMO	17α -OHP- 6 α -Succ	17α -OHP- 7 α -CET	17α -OHP-3 (E)-CMO	17α -OHP- 6 α -Succ	17α -OHP- 7 α -CET
RIA至適希釈倍 ($\times 10^4$)	20	2	5	5	3	15
B ₀ /T(%)	66	50	65	62	50	71
50% displace (pg)	30	50	12	15	62	25
感度 (pg)	2	10	1	1	20	2
交叉 反応 率 (%)	17α -OHP	100	100	100	100	100
	17α -OHP ₃	35	22	8	7.5	30
	17α -OHP ₃ - 3-5	0.5	0.5	0.05	1.5	—
	20 α -OHP	0.3	1.0	0.03	0.02	0.8
	P	3.0	2.5	1.9	1.5	2.5

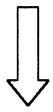
【文献】

- 1) 神戸川 明: 17α -hydroxyprogesterone の新しい抗血清について. 厚生省心身障害 マス・スクリーニングに関する研究班 269-271 昭和59年度.



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



【研究目的】

昨年まで本マススクリーニング研究会で3H標識を用いた17 β -OHPのRIAを報告してきた。3H標識ステロイドはステロイドの水素の代わりに3Hが標識されているためにステロイドの性質は同じであり、抗血清の特異性を検討するために便利である。しかし3H標識を用いたRIAはシンチレーターを廃棄することが問題である。CAHのマススクリーニングの主流はEIAになっているが、沃素をする直前のハプテンを作っておけば、沃素化は簡単であり、¹²⁵Iを用いた immunoassay 法は dextran coated charcoal 法でB/F分離し、そのカウントから自動的に計算され、数多くの検体を処理するのに適している。我々はこのRIAに適した抗血清と¹²⁵I標識した hapten の組合せを検討したので報告した。