

性ステロイドホルモン RIA キットの オナガガモ血漿ホルモンに対する感度と精度

佐藤 恵^{1,2} 酒井 秀嗣^{1,2}

The sensitivity and precision of commercially available sex steroid hormone radioimmunoassay kits in pintail

Megumi Sato^{1,2} and Hidetsugu Sakai^{1,2}

Abstract

Commercially available RIA kits have been employed for the measurement of avian sex steroid hormones because of its uniformity in the reaction regardless of the difference in the experimental species. This beneficial characteristic is sometimes hindered by the contents of the specimens. Using pintail (*Anas acuta*) the present author examined the specificity and accuracy of RIA testing kits (testosterone; T and estradiol-17 β : E₂) when the measurement of plasma neutral hormones was conducted. We also examined the accuracy of the new testosterone kits because of the manufacturer's change from double antibody method to the solid-phase method in comparison with the conventional kits so far employed. Using the plasma samples, dose-response lines were drawn to compare the standard curve and the analysis of covariance, which resulted in negating the non-parallelism thus proving that the samples from pintail can safely and specifically be measured with the new kits. Comparison of double antibody method and the solid-phase method for the measurement of T also showed that the latter (minimum detection range has changed from 9pg/ml to 27pg/ml) present no disadvantage, provided that the hormone dose of the samples is not extremely low. Yet, with the intra-assay coefficient of variation 2.25%, the solid method showed superior results to those in the instruction manual and even when compared to double antibody method where the intra-assay coefficient of variation 2.80%, the results of the solid method stood comparison.

Key words : radioimmunoassay, pintail, testosterone, estradiol, precision,

緒 言

放射免疫検定法 (radioimmunoassay : RIA) は強い親和性と良好な特異性を持つ抗体をリアクターとして結合の競合阻害を利用した測定法で、臨床や研究において生理活性物質の測定に広く用いられ、様々な測定キットが市販されて

いる。ステロイドホルモンはペプチドホルモンと異なって種による分子の違いはないため、ヒト以外の動物でのステロイドホルモンの測定に臨床用キットが応用可能である。しかし、試料によっては含まれる夾雑物のために非特異的な結合や標識化合物の結合阻害が起り、測定が妨害されることがある。そこで、野生のオナガ

¹ 日本大学歯学部生物学教室

² 日本大学歯学部総合歯学研究機関形態部門

〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台1-8-13

(受理: 2004年9月29日)

¹ Department of Biology, Nihon University School of Dentistry

² Division of Functional Morphology, Dental Research Center, Nihon University School of Dentistry

1-8-13 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-8310, Japan

ガモ (*Anas acuta*) の血漿試料を用いた場合、市販のテストステロン (T), エストラジオール-17 β (E₂) の RIA キットで測定が可能かどうかを調べた。また、当研究室で使用してきた市販 2 抗体法キットが固相法に変更されたため、それらの精度と感度を比較検討した。

材料と方法

1. RIA キット

T の測定に使用した RIA キットは固相法を用いたテストステロンキット「シエーリング」TESTO-CTK (P 3093) (DiaSorin s.r.l., Saluggia, Italy) で、添付説明書³⁾によると、測定範囲は 0.05-10 ng/ml であった。T に対する交差率は 5 α -dehydrotestosterone が 6.9%, E₂ および progesterone は 0.01% 未満であった。E₂ の RIA キットは DPC・エストラジオール 2 抗体キット Double Antibody Estradiol [¹²⁵I] RIA Kit (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles) で、添付説明書の方法を改変して使用した²⁾。この測定可能範囲は 1.4-500 pg/ml で、estrone の E₂ に対する交叉率は 4.6% で、progesterone および T との交叉は検出されていない。

2. 血液試料

2002 年の 2 月から 3 月にかけて宮内庁埼玉鴨場で捕獲したオナガガモの血漿を用いた。血液は翼下静脈より採取し、遠心分離して血漿を得、測定まで -80°C で保存した。

3. 平行性の検定

T および E₂ の両キットを用いて、4 個体の血漿を 1/2, 1/4 に希釈して原液とともに 3 重測定を行った。これにキットの標準品を含めて用量-反応直線の傾きが同一母集団に属しているか否かを共分散分析により検定した。RIA では抗体に結合した標識ホルモンの放射能を測定するが、それぞれの測定値から非特異的結合分を差し引いた値 (B) のホルモン 0 の測定値の値

(B₀) に対する割合である B/B₀ (%) 値を算出し、検定に用いた。この計算は石村³⁾に基づき Microsoft® Excel 2002 (Microsoft) の関数を組み合わせて計算した。

4. 精度と感度

測定内の変動係数 (CV) の算出は、標識ホルモンの結合阻害が約 50% になる濃度 (B/B₀ = 50) の標準品を試料として行った。6 重測定を行って得られた測定結果からホルモン濃度を算出し、これらの値の平均値に対する標準偏差の割合として求めた。

感度を表す値の 1 つである最小検出値は標準曲線の濃度 0 (B₀) の平均値からその標準偏差の 2 倍の結合阻害を起こすホルモンの濃度として求めた⁴⁾。

5. 回収率

回収率は血清などの試料に既知のホルモンを加えて測定した際、測定値に添加分がどれだけ正しく反映されるかによって与えられる。そこで、オナガガモの血漿と 3 種類の濃度の標準品を等量ずつ混ぜた溶液を試料として測定した。この際、オナガガモ血漿とそれぞれの標準品も同時に測定し、両者の値から混合液の測定値として期待される値を求めた。回収率はこの期待値に対する混合液の測定値の割合として算出した。

結 果

1. 平行性

平行性の検定の結果、キットに付属の標準品と 4 個体のオナガガモの血漿をそれぞれ段階希釈し、それらを試料として RIA によって測定した。試料の濃度の対数値と各試料の放射能の測定値から求めた B/B₀ 値を共分散分析によって検定した。この分析には標準品および試料から各 6 点計 30 点の測定値を用いた。この結果、T の RIA では F₀ = 0.42 となった。この値は F_{4,20} (0.05) = 2.89 よりも小さく、平行性は否定され

なかった。また、 E_2 -RIA においても $F_0=0.57$ で、これも $F_{4,20}(0.05)=2.89$ よりも小さく、同様に平行性は否定されなかった。また、分散分析の値から、各々の測定法の回帰係数 β の区間推定を行った結果、95%信頼区間は T-RIA では $-37.12 \leq \beta \leq -32.12$ 、 E_2 -RIA では $-51.86 \leq \beta \leq -40.71$ となった。

2. 感 度

T-RIA において標準品のホルモン 0 の試験管の放射能の測定値の平均 (B_0) は、9469 cpm で、それらの標準偏差 236.2 cpm の 2 倍を減じた値 8996.6 cpm が与える T 濃度は 27.55 pg/ml であった。同様に E_2 -RIA の B_0 の平均値 4888.25 cpm から標準偏差 153.18 cpm の 2 倍を減じた 4581.89 cpm が与える E_2 濃度は 0.854 pg/ml であった (表 1)。

3. 回 収 率

TRIA ではオナガガモ血漿に濃度の異なる 3 種類の標準品を加えて測定した結果、回収率の平均値および標準誤差は $100.46 \pm 2.49\%$ であった。また同様に、 E_2 -RIA においても、3 種類の標準品を用いて 8 試料を測定した。この回収率は $87.77 \pm 4.22\%$ であった (表 1)。

4. 精 度

1 回の測定において同一試料の 6 重測定を行い、測定内の変動係数 (CV) を求めた。T-RIA では 2.25%、 E_2 -RIA では 1.19% であった (表 1)。

考 察

市販の RIA キットはヒトを対象とした臨床用に調整されており、動物実験等で濃度の低い試料を測定するには何らかの措置が必要になることがあった。我々は、市販の性ステロイドホルモンおよび甲状腺ホルモンの測定キットを一部改変し、試料の用量を減らしたり検出限界値を低くすることを試みた^{5,6)}。その際、精度および感度の測定を行っている。いずれのキットでも、抗体と結合した標識ホルモンと結合していないホルモンとを分離する B-F 分離に第 2 抗体を用いる 2 抗体法が採用されていた。ところが、これらのうちテストステロンの RIA キットは簡便な固相法に変更され、従来の変法が適用できなくなってしまった。そのため、改めて精度および感度の確認を行う必要が生じた。また、ステロイドホルモンはペプチドホルモンと異なって分子の種差がないため、RIA においては種特異性は問題にならなかった。しかし、試料に含まれる夾雑物が抗原-抗体反応に関与して、測定値を誤らせる可能性は十分に考えられた。そこで、オナガガモの繁殖に関する研究を実施するにあたって、改めて感度、精度、特異性等を検証することにした。オナガガモ血漿を段階希釈して得られた用量-反応直線と標準直線は、共分散分析によって平行性が否定されず、結果的に平行性が認められた。2 抗体法の場合でも、脂質を多く含んだ試料では、測定が妨害される場合がある。また、抗体との親和性が低

表 1 本研究によって得られた TRIA および E_2 RIA の諸元値

	B-F 分離	試料容積 (μ l)	最小検出値 (pg/ml)	測定内の変動 係数 (%)	勾配の 95% 信頼区間	回収率 (%) 平均値 \pm SEA
T-RIA ^a	固相法	50	27.55	2.25	-37.12--32.12	100.46 \pm 2.49
E_2 -RIA ^b	2 抗体法	50	0.854	1.19	-51.86--40.71	87.77 \pm 4.22

a : 添付資料に基づく測定法

b : 佐藤・酒井 (1996) の変法

い妨害物質が夾雑している場合には、ホルモン濃度が低くなるとその影響が大きくなる。つまり、血清や血漿を希釈していくと平行性が得られなくなる可能性があるが、標準曲線が直線に回帰する範囲であればさほどの支障はないと言える。

血漿にホルモンを加えた場合の回収率は、T-RIA の場合には 100% に近い値が得られており、平行性とあわせて測定上⁵⁾の支障がないことが示された。一方 E₂-RIA では回収率の平均が 87.8% と低いことが判明した。一般にヘパリンを使用すると測定値が低くなることが知られており、添付説明書²⁾にもその旨が述べられている。後述のように精度が十分で標準品との平行性も確保されていることから、厳密に絶対値を必要とする場合には、測定値に係数を乗じることによって解決されるものと考えられる。

測定系の精度を表す数値には、測定内および測定間の変動係数と精度係数が用いられる。これらのうち精度係数は生物検定などで良く用いられ、RIA では主として変動係数が用いられる傾向にある。測定間の変動係数は、測定を繰り返すことによって得られる。TRIA キットの使用は今回が初めてであったため、測定内の変動係数のみを算出した。この係数 2.25% は、同じメーカーが製造していた 2 抗体法によるキットの添付資料に示された 9% 未満よりも優れ、同キットによる我々の実測値 2.35% とほぼ同じであった。また、E₂-RIA の変動係数 1.19% は、過去に同一キットで測定した 1.91% を凌いでいることが判明した。血漿にホルモンを加えた場合の回収率は、T-RIA の場合には 100% に近い値がえられており、平行性とあわせて測定上の支障がないことが示された。一方 E₂-RIA では回収率の平均が 87.8% と低いことが判明した。後述のように精度が十分で標準品との平行性も確保されていることから、厳密に絶対値を必要とする場合には、測定値に係数を乗じるこ

とによって問題は残らないと思われる。

測定系の精度を表す数値には、測定内および測定間の変動係数と精度係数が用いられる。これらのうち精度係数は生物検定などで良く用いられ、RIA では変動係数が用いられる傾向にある。測定間の変動係数は、測定を繰り返すことによって得られる。TRIA キットの使用は今回が初めてであったため、測定内の変動係数のみを算出した。

一方、感度はホルモン 0 の値 (B₀) に対して有意にホルモンの存在を示すことができる濃度 (最小検出値)、あるいは標識ホルモンの結合を 50% 阻害する濃度 (50% 阻害値) で示される。本研究では前者を採用した。従来は、B₀ の平均値からその標準偏差の 3 倍を減じた測定値が与えるホルモン量と規定されていた。しかし、最近では 3 倍が 2 倍に変更されている。そこで、本研究でも “2 倍” を採用した。その値は結果で報告したとおりである。2 抗体法キットとの比較のため⁵⁾、“3 倍” の値も求めてみると、T-RIA は 38 pg/ml で 2 抗体法での値 22 pg/ml よりも感度が低下したことになる。また、E₂-RIA は本研究では 2.7 pg/ml、同一キットでの過去の値は 3.2 pg/ml でほぼ同じ結果を再現したと言える。

本研究では、オナガガモ血漿のホルモン濃度が特異的にされていることが認められた。また、T-RIA は 2 抗体法から固相法に変更されたが、同一抗体を使用しているためにホルモン特異性に際立った変化はなく、従来のデータも継承されることが判明した。固相法の場合は、抗体が塗布されているために試料を減らしたり感度を上げる変法を取ることが難しい。しかし、十分な精度が得られ、感度も遜色ないことから、通常の試料であれば変法にこだわる必要もない。特に、最小検出値を小さくしても、低濃度の領域で血液試料を測定した場合には妨害物質の影響が現れる恐れがある。また、標準曲線の端で

は精度が低下するため、敢えてその領域で測定することは無意味である。現実的には固相法のキットにおいても、十分な感度と精度を備え、高い定量性が得られることが判明した。また、E₂-RIA キットにおいても、高い感度と精度が再確認され、血液試料の測定でも何ら問題が無いことが明らかになった。

謝 辞

本研究は平成 14 年日本大学学術研究助成金および平成 14 年度日本大学佐藤奨学金研究費によった。

文 献

- 1) ㈱三菱化学ヤトロン (2003) DPC・エストラジオール二抗体キット, 添付説明書
- 2) 日本シエーリング㈱ (2003) テストステロン測定用 RIA キットテストステロンキット「シエーリング」, 添付説明書
- 3) 石村貞夫 (1992) 共分散分析, 分散分析のはなし. pp 248-280 東京図書, 東京
- 4) 若林克己 (1977) コンペティティブアッセイ I 理論, 日本化学会編: 生化学実験講座 16 ホルモン上, pp 157-171, 東京化学同人, 東京
- 5) 佐藤恵, 酒井秀嗣 (1996) 市販の性ステロイドホルモン放射免疫検定法キットの応用, 日大歯紀要, 24, 49-55
- 6) 佐藤恵, 酒井秀嗣 (1997) 市販の甲状腺ホルモン放射免疫検定法キットの応用, 日大歯紀要, 25, 86-91