

Enzymeimmunoassay (EIA) 法を用いた human chorionic gonadotropin (hCG) 測定法の開発と臨床応用に関する研究

千葉大学医学部産科婦人科学教室

小林 治 城武 昇一 高見沢裕吉

Studies on Enzymeimmunoassay for Human Chorionic Gonadotropin and its Clinical Application

Osamu KOBAYASHI, Syoichi SHIROTAKE and Hiroyoshi TAKAMIZAWA

Department of Obstetrics and Gynecology, Chiba University School of Medicine, Chiba

概要 hCG に対する Enzymeimmunoassay (EIA) を開発し、絨毛性疾患の管理に応用した。

1. 抗 hCG β , HRP-抗 hCG 抗体によるサンドイッチ法(method I)では、測定範囲0.5~100ng/ml, hCG RIA (CIS hCG PR Kit) との相関は、相関係数 $r=0.99$, 回帰直線 $y=1.02X+2.3$ であつた。

変動係数は intraassay 1.8%, interassay 5.8%, 回収率は尿95.6%, 血清85.5%であつたが、0.5%ゼラチン溶液で血清を2倍に希釈することにより94%に上昇した。

2. 抗 hCG β , Biotin-抗 hCG 抗体, Avidin-HRP によるサンドイッチ法 (method II) では、測定範囲0.1~20ng/ml, hCG-RIA との相関は、相関係数 $r=0.98$, 回帰直線 $y=0.96X-0.38$, 変動係数は intraassay 5.2%, interassay 9.5%であつた。

3. 正常男女, LH surge, 更年期婦人の血清, 尿309検体を method I を用いて測定, 正常値は 2ng/ml 以下であつた。

4. HAR 法で LH レベルを示した時期の、絨毛性疾患外来 follow-up 患者血清320検体, 治療中患者血清91検体を method I で測定した。

follow-up 患者血清は全例 2ng/ml 以下の値であつたが、治療中患者血清91検体では、51検体56%が 2ng/ml 以下の値であり、40検体44%で hCG が検出され、最高15.8ng/ml であつた。

5. method I による血中 hCG 測定で HAR 法より約2ヵ月早く再発の診断が可能であつた症例があり、本法による絨毛性疾患の管理は、再発の診断、寛解の判定、化学療法打ち切りの時期の判断に HAR 法より有用であつた。

Synopsis Two enzyme immunoassays for hCG were developed and compared with HAR and RIA by using many urine and serum samples. The EIA was characterized by management of trophoblastic disease.

1. An EIA by hCG- β antibody immobilized on a microplate and hCG antibody conjugated with HRP enzyme quantified hCG from 0.5 to 100ng/ml, while the other by biotinyl hCG antibody and avidine-HRP conjugate quantified hCG from 0.1 to 20ng/ml. Both of them had a good correlation with RIA; $y=1.02x+2.3$, $r=0.99$ and $Y=0.96x-0.38$. The C.V.S. were 1.8 and 5.2% (intraassay), or 5.8 and 9.5% (interassay), respectively.

2. The EIA was carried out to test hCG patients whose urinary hCG by HAR was under the LH level. The values in 371 samples were under 2ng/ml, but those in 40 samples were higher than 2ng/ml (Max 15.8 ng/ml). Diagnosis by EIA distinguished recurrence from remission 2 month earlier than by HAR. The EIA was useful in the management of the disease.

Key words: Enzymeimmunoassay • Sandwich method • hCG • Trophoblastic disease

緒 言

Human chorionic gonadotropin (hCG) の測定は、妊娠の診断、絨毛性疾患の管理等に重要な検査法であり、赤血球凝集反応 (HAR), Radioim-

munoassay (RIA) 等で測定されている。HAR 法は低単位レベルで LH との交叉性が、RIA は設備、廃液処理、放射性同位元素の半減期が短いため、その有効期間が短い等の問題がある。

そこで放射性同位元素を使用せず、高価な設備の必要がない Enzymeimmunoassay (EIA) の開発が検討されている⁹⁾¹⁵⁾。EIA には競合法、非競合法があり、このうち競合法では分子量10万以下の物質の測定は困難であつたが⁶⁾、血清の汗渉作用を軽減させることにより、hCG EIA の競合法も報告されるようになり¹³⁾、サンドイッチ法、Biotin, Avidin を使用した低単位 hCG 測定法も検討されている⁷⁾。更に EIA が日常臨床の場に導入されるためには、操作の自動化が焦点の1つである¹⁾。

そこで今回、著者は Immunoplate, microplate photometer を利用し、操作の簡易化を試み、hCG EIA のサンドイッチ法を開発、臨床応用を行ない以下の成績を得たので報告する。

研究対象および研究方法

1. 妊娠 7～41週の正常妊婦血清40検体、正常非妊女性の血清61検体、尿50検体、LH surge の血清11検体、尿 7 検体、更年期婦人の血清、尿、各20検体、正常男性血清90検体、尿50検体および、尿中 hCG が HAR 法で LH レベルを示す絨毛性疾患治療中の患者血清18例、91検体、外来 follow up 患者血清320検体の計720検体を対象とした。

2. EIA の研究方法

(i) 抗体の microplate への吸着

33%, 50%硫酸分画より抗体の γ -分画を調整し、0.1M 炭酸ナトリウム緩衝液で透析後30 μ g/ml に希釈し、Nunc Immunoplate (96well) の各 well に150 μ l ずつ分注し、40℃ 3 時間恒温静置後、4℃ に一晚静置し、抗体を吸着させた。

(ii) Horse Raddish Peroxidase (HRP) 標識抗体、Avidin の作製

過ヨウ素酸架橋法により¹²⁾、HRP の抗体又は Avidin への標識を行なった。

(iii) Biotin N-hydroxysuccinimide ester (BNHS) と抗体の結合

BNHS を dimethyl formamide に溶解、これに 0.01M ホウ酸緩衝液で透析した抗体を加え攪拌後、リン酸緩衝液で透析をした。

(iv) hCG の測定

第一抗体に抗 hCG β 抗体、第二抗体に抗 hCG 抗体を使用したサンドイッチ法で行なった。

method I

microplate の抗体を吸引、0.05% Tween 20 添加生理食塩水で洗浄後、standard 又は sample を各 well に100 μ l 加え、40℃で2時間反応(第一反応)後、吸引洗浄し、HRP-抗 hCG 抗体溶液を100 μ l 加え、40℃で3時間反応させる(第二反応)。吸引洗浄後、Mc-Ilvein 溶液100ml に O-phenylene diamine 100mg, 30%過酸化水素100 μ l 加えた基質溶液を100 μ l 加え、室温で1時間反応後、1M メタ重亜硫酸ナトリウム 50 μ l 加え反応を停止させ 450nm における吸光度を corona 社の microplate photometer で測定した。

method II

第一反応終了後、吸引洗浄、10 μ g/ml に調整した抗 hCG-BNHS を100 μ l 加え、40℃で1時間反応後、吸引洗浄、Avidin-HRP 100 μ l 加え室温で10分反応後、吸引洗浄し、基質溶液を125 μ l 加え、室温で20分反応後、酵素反応を停止、450nm における吸光度を測定した。

3. EIA の hCG RIA との相関性、測定範囲、回収率、変動係数、交叉率、正常値についての検討

(i) 正常妊婦血清を RIA 用 Diluent で 100～1,000倍に希釈し、hCG RIA (CIS PR Kit) との相関性を求めた。standard hCG は 1mg 7520IU のものを使用した。

(ii) 回収率は hCG free の血清、尿に standard hCG を 1, 10ng/ml の濃度になるように加えた検体で検討した。変動係数は intraassay, interassay について求めた。

(iii) 交叉率は、LH, FSH, hCG α , hCG β について 1～100ng/ml の範囲で method I について検討した。

(iv) 正常非妊女性、LH surge, 更年期婦人、正常男性の血清、尿309検体を method I で測定しその正常値を設定した。また、LH surge, 更年期婦人の検体を LH RIA で測定、LH RIA と hCG EIA の値を比較した。

(v) 絨毛性疾患治療中、外来 follow up 患者の同一日の尿、血中の hCG を、それぞれ HAR, EIA で測定比較し、絨毛性疾患管理における EIA の有用性について検討した。

結 果

1. hCG RIA との相関性

method I の hCG RIA (CIS PR Kit) との相関性は, 相関係数 $r=0.99$, 回帰直線 $y=1.02x+2.3$ であった (図 1).

method II では相関係数 $r=0.98$, 回帰直線 $y=0.96x-0.38$ であった (図 2).

2. 測定範囲, 変動係数, 回収率

method I の測定範囲は $0.5 \sim 100 \text{ ng/ml}$ (図 3), 変動係数は intraassay 1.8%, interassay 5.8% で, 回収率は尿 95.6%, 血清 85.5% であったが, 血清

図 1 Correlation between RIA and EIA

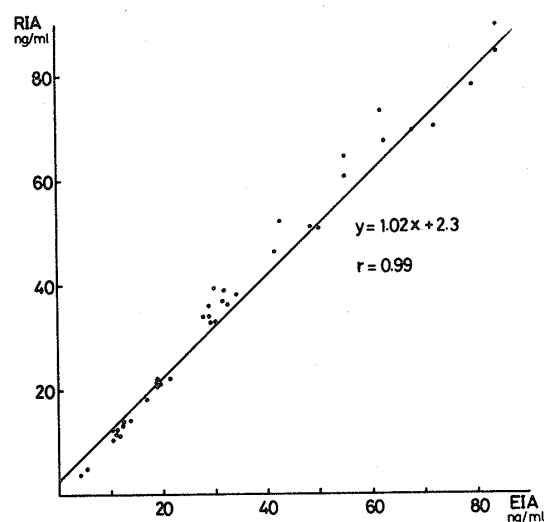


図 2 Correlation between RIA and EIA

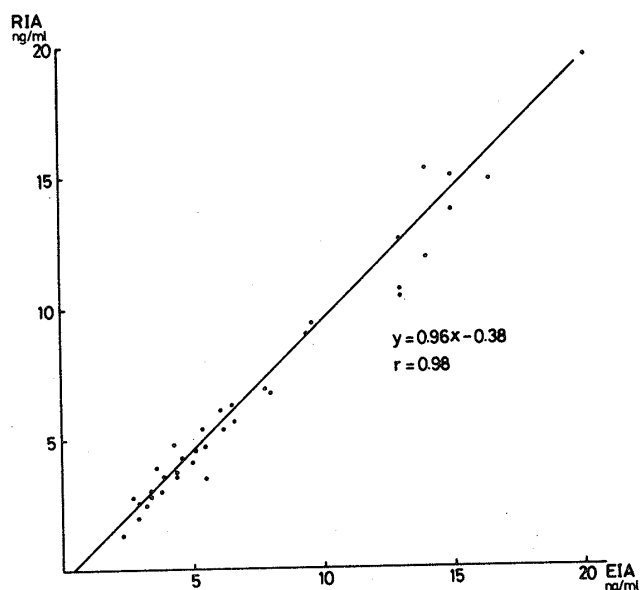


図 3 Standard curve and cross reactions

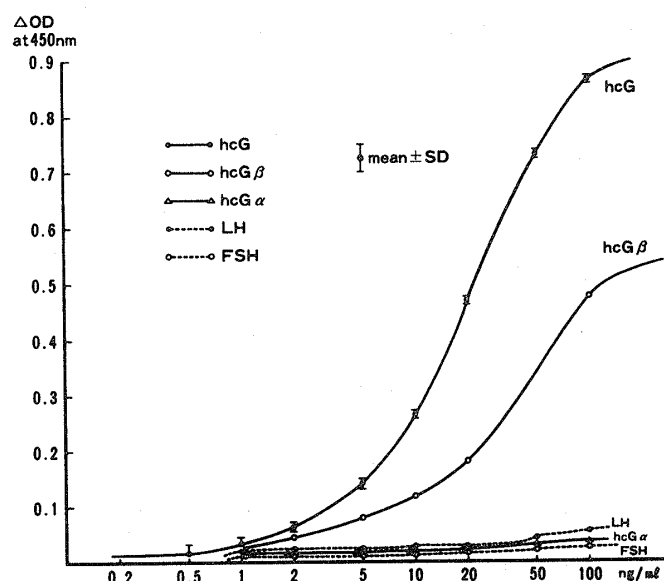
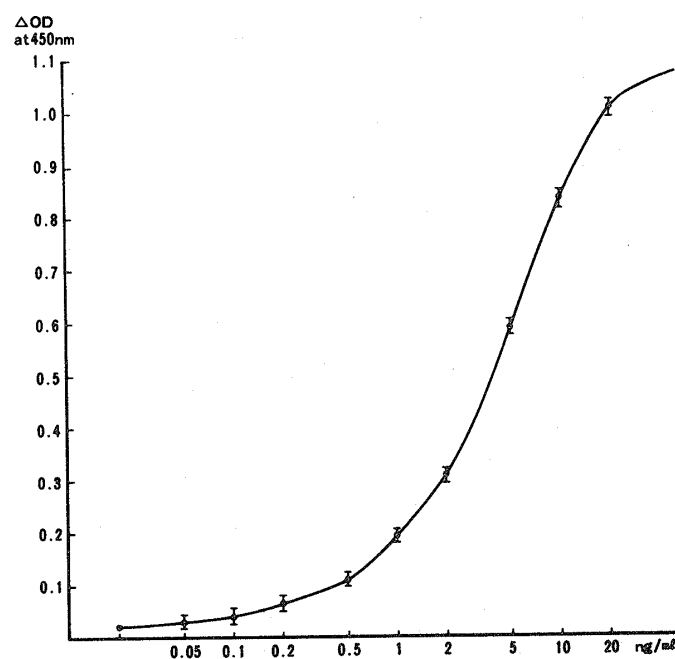


図 4 Standard curve

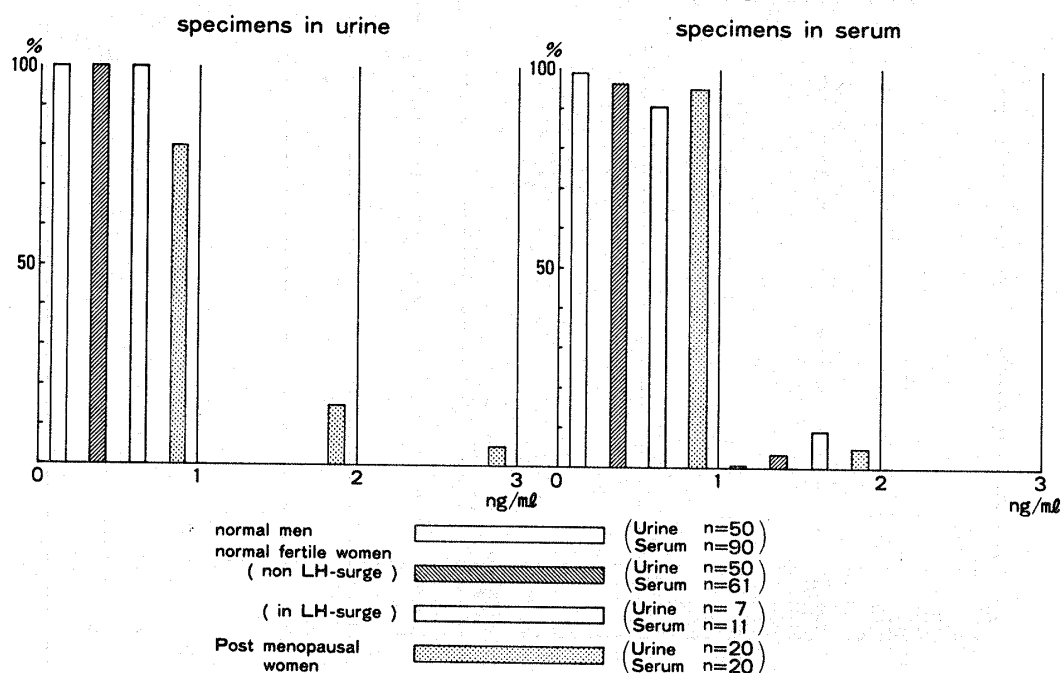


を 0.5%ゼラチン溶液で 2 倍に希釈することにより 94%に上昇した。

method II の測定範囲は $0.1 \sim 20 \text{ ng/ml}$ (図 4), 変動係数は intraassay 5.2%, interassay 9.5%, 回収率は尿 94%, 血清 83.2% であった。

3. method I の LH, FSH, $\text{hCG}\alpha$, $\text{hCG}\beta$ との交叉は, LH, FSH, $\text{hCG}\alpha$ 100 ng/ml 以下では hCG に換算し 2 ng/ml 以下, $\text{hCG}\beta$ は 100 ng が hCG 20 ng に相当し, 本測定系は hCG と $\text{hCG}\beta$ を

図5 Application of EIA to the hCG free specimens



主に認識する系である (図3)。

4. 正常人尿, 血清の EIA 値 (図5)

(i) 正常男性, 非妊女性, LH surge, 更年期婦人の尿127検体の値は, 更年期婦人の尿1検体が2.1ng/ml, 残りの126検体は2ng/ml以下であった。

(ii) 血清182検体では, 全例2ng/ml以下であった。

5. LH RIA, hCG EIA 値の比較

LH surge (図6), 更年期婦人 (図7) の尿, 血清を LH RIA, hCG EIA で同時に測定し, その値を比較したが, LH が180mIU/ml の更年期婦人尿が EIA で2.1ng/ml であつたが, LH 240mIU/ml の検体も EIA で2ng/ml 以下であり, 本法の正常値を2ng/ml 以下とした。

6. 絨毛性疾患における臨床応用

(i) 尿中hCG が LH レベルになつた時の血中 EIA 値 (図8)

図6 Comparison between LH-RIA and EIA (Specimens in LH surge)

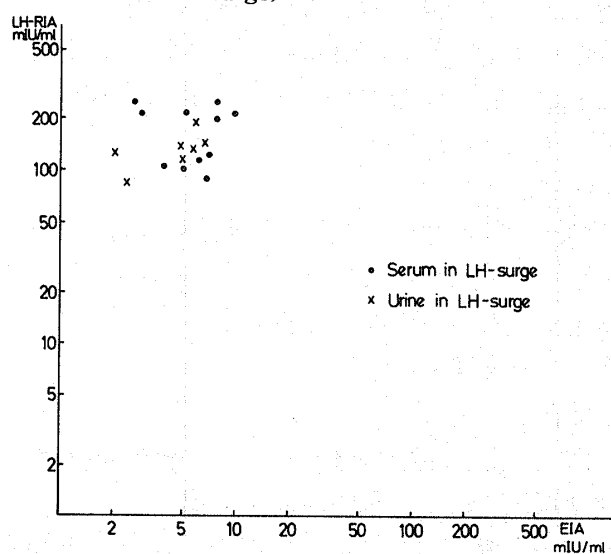


図7 Comparison between LH-RIA and EIA

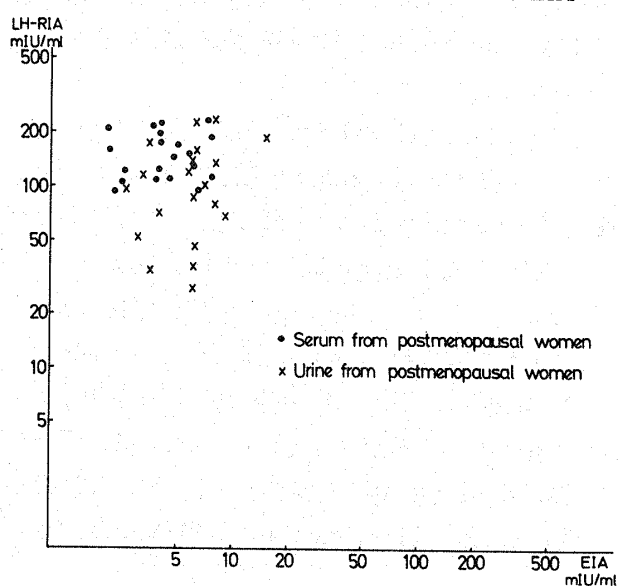
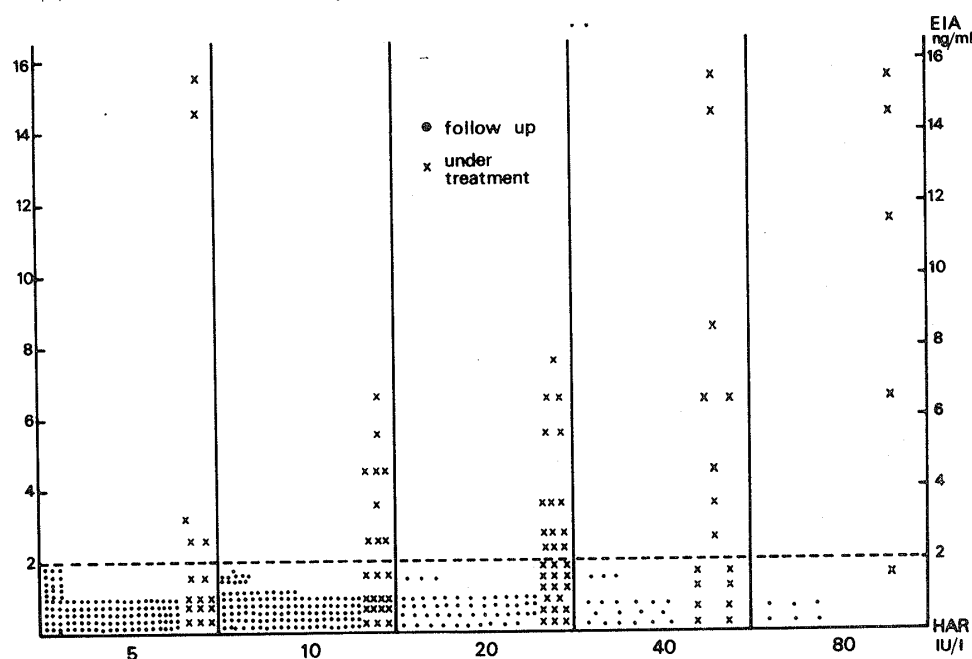


図8 Serum hCG value by EIA after U-hCG by HAR dropped to the LH level



外来 follow up 患者で HAR 法による尿中 hCG が 5~80IU/l の値を示した 320 検体の EIA による血中 hCG は、全例 2ng/ml 以下の値を示した。

治療中患者 18 例、91 検体のうち、HAR 法で 5IU/l を示す 16 検体では、2ng/ml 以下は 11 検体 68.8%，2ng/ml 以上は 5 検体 31.1%，最高 15.8 ng/ml であった。

HAR 法で 10IU/l を示す 23 検体では、2ng/ml 以下は 14 検体、60.9%，2ng/ml 以上は 9 検体 39.1%，最高 6.1ng/ml であった。HAR 法で 20IU/l を示す 31 検体では、2ng/ml 以下は 17 検体 54.8%，2ng/ml 以上は 14 検体 45.2% 最高 7.8ng/ml であった。

HAR 法で 40IU/l を示す 16 検体では 2ng/ml 以下は、8 検体 50%，2ng/ml 以上は 8 検体、50%，最高 15.6ng/ml であった。HAR 法で 80IU/l を示す 5 検体では、2ng/ml 以下は 1 検体 20%，2ng/ml 以上は 4 検体 80%，最高 15.7ng/ml であった。

91 検体全体では、2ng/ml 以下の正常値をとるものは 51 検体、56%，2~4ng/ml、18 検体 19.8%，4~6ng/ml、7 検体 7.7%，6~8ng/ml、7 検体 7.7%，8~10ng/ml、1 検体 1.1%，10~12ng/ml、1 検体 1.1%，14~16ng/ml、6 検体 6.6% であった。

次に症例を呈示する

症例 1 (図 9)

47 歳、絨毛癌再発症例。尿中 hCG が HAR 法で 80IU/l 以下の LH レベルを示している期間も EIA による血中 hCG は上昇を続け、15mIU (2 ng)/ml 以上の値をとりはじめて約 2 カ月後に HAR で LH レベルを越えた。

本例では、HAR 法より約 2 カ月早く、EIA で再発の診断が可能であった。

症例 2 (図 10)

39 歳、絨毛癌。子宮+両側付属器摘出、化学療法により、HAR 法による尿中 hCG はすみやかに下降、これに伴ない EIA による血中 hCG も正常に下降した。本例では HAR 法、EIA の値は、ほぼ平行であった。

症例 3 (図 11)

47 歳、破壊奇胎。子宮+両側付属器摘出、化学療法により、尿中 hCG はすみやかに 20IU/l 以下に下降したが、EIA による血中 hCG は約 2 カ月遅れて正常値をとった。

症例 4 (図 12)

33 歳、絨毛癌再発症例。子宮+両側付属器摘出、化学療法により、尿中 hCG は 80IU/l 以下の LH レベルを持続しているが、EIA による血中 hCG

図9 症例1

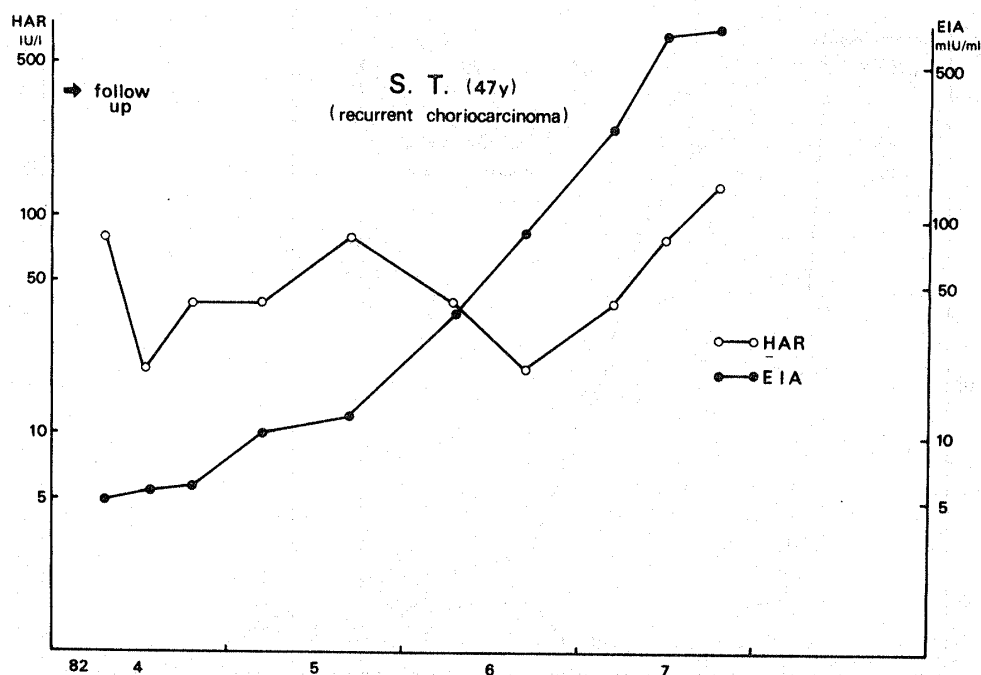
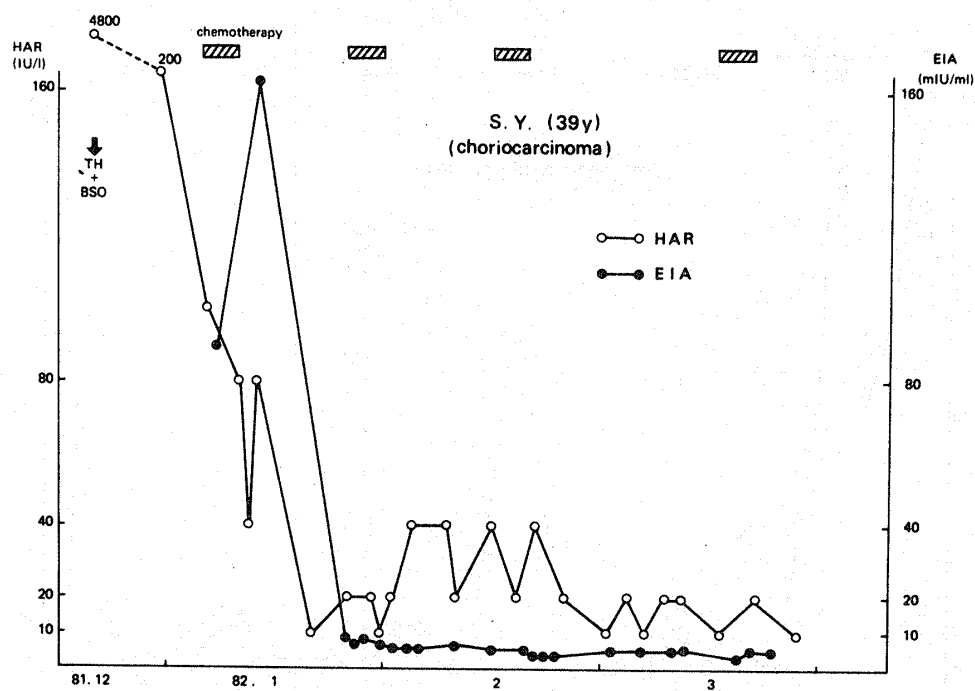


図10 症例2



は化学療法による一過性上昇, いわゆる細胞効果を示している。

考 案

血中 hCG の測定は主に RIA, 低単位尿中 hCG の測定は主に HAR 法で行なわれているが, RIA は放射性物質の廃棄問題, 半減期の短いこと, 又

HAR 法は LH との交叉が臨床上問題となり, 新しい測定法の開発が望まれている. 近年 RIA の欠点を補うため, 放射性同位元素標識を酵素標識で置換した方法である EIA が開発されてきた⁹⁾¹⁵⁾.

hCG の測定法は, 妊娠の診断等に必要な比較的高単位レベル, 絨毛性疾患の管理に必要な低単位

図11 症例 3

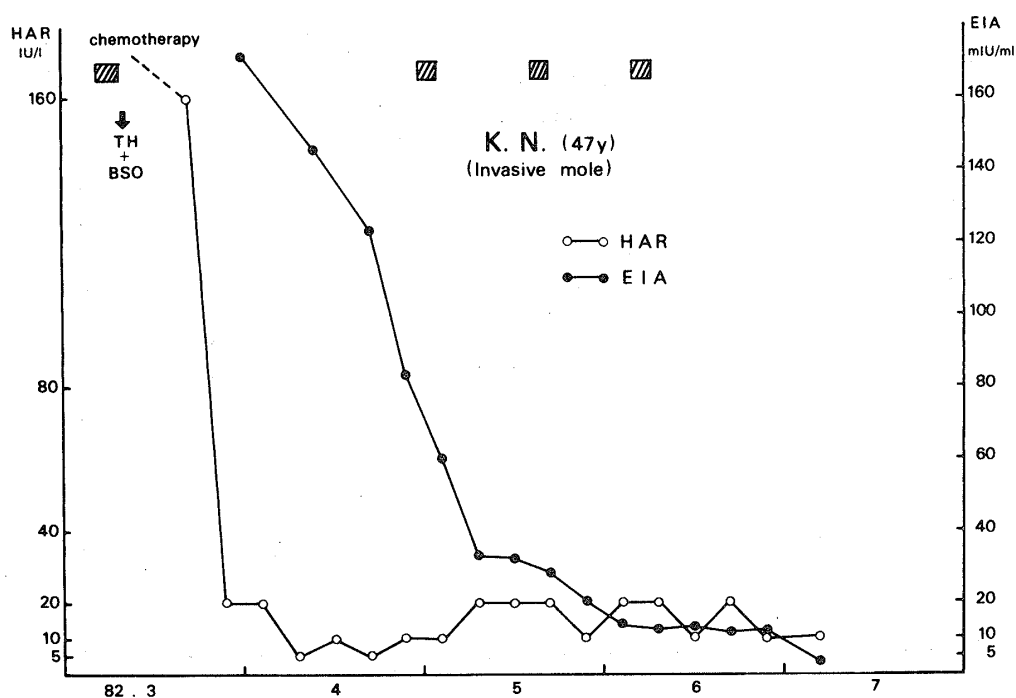
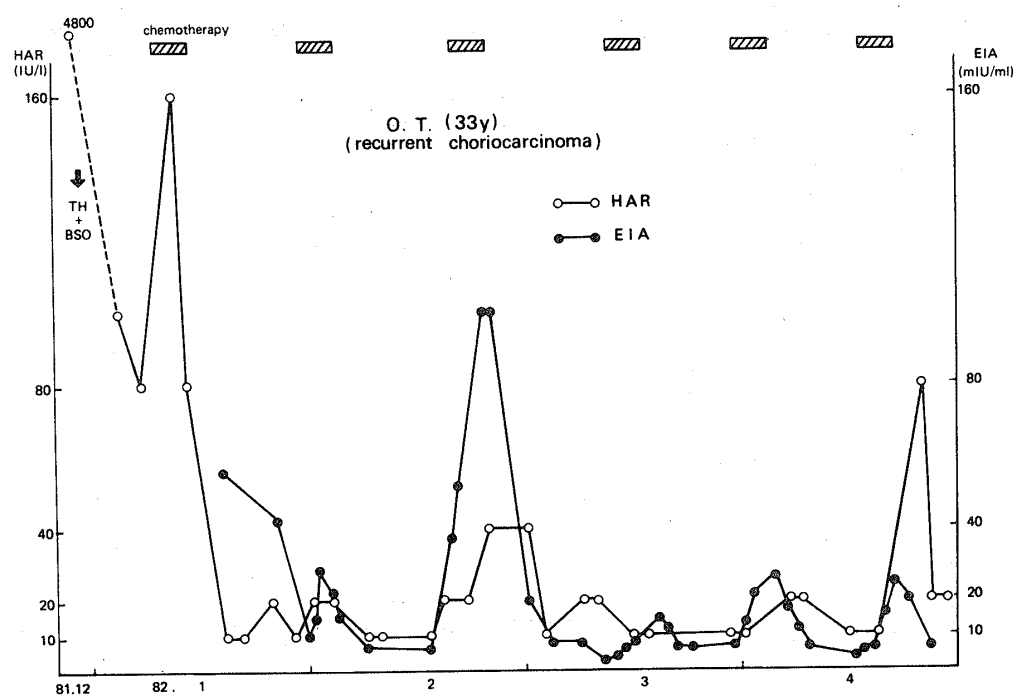


図12 症例 4



レベルの測定法があるが、前者に対しては、感度 500mIU/ml の尿中 hCG 測定用 EIA が開発されており¹⁴⁾、低単位 hCG 測定には 0.4mIU/ml¹¹⁾、0.5mIU/ml¹³⁾の感度の EIA が報告され、主に妊娠初期の低単位 hCG の測定に応用されている。

血中の hCG を測定する場合、血中の酵素阻害物

質のため標識化酵素活性の低下およびプロテアーゼのため酵素が消化失活する危険性があるが、本サンドイッチ法では、第一反応後、吸引洗浄することにより、検体中の酵素阻害物質、プロテアーゼ等が除去できるため、妨害が極めて少ないと考えられる。

本法はhCG RIA との相関係数 $r=0.99$, 感度 0.5ng/ml , 変動係数は intraassay 1.8% , interassay 5.8% , 回収率は尿 95.6% , 血清 85.5% で血清の回収率は尿に比べ低い, 0.5% セラチン溶液で検体を2倍に希釈することによつて, 血清中リポ蛋白質等の障害が除かれ¹⁰⁾, 94% に上昇し, 日常臨床に用いるアッセイ系としての必要条件を満たしている。

EIA を臨床に導入するためには自動化が焦点の1つである¹⁾。今回, 96穴 microplate を用い, 試薬は, マルチチャンネルピペットで12 well 同時に注入し, 吸引洗浄も8 well 同時に行なつた。さらに microplate 用 photometer により96 well の吸光度測定を2分間という短時間でこなえ, 半自動化することができたので, 臨床に導入することが十分可能となつた。

また Biotin, Avidin を用い, 0.1ng/ml まで感度が上がり, 変動係数も intraassay 5.2% interassay 9.5% と感度, 再現性の点優れているが, 正常人血中にも 0.1ng/ml 程度までの LH とは異なる hCG 様物質の存在が報告されており⁸⁾, 通常の hCG β 抗体を用いるアッセイ系では, 0.1ng/ml 程度の値は, 絨毛性疾患の管理において, 血中に trophoblast 由来の hCG が存在するか否か判断が困難であるため, 感度は 0.5ng/ml と劣るが, 抗 hCG β , hRP-抗 hCG によるサンドイッチ法を用いた。

正常人男女, LH surge, 更年期婦人の尿, 血清の EIA の測定値より, 2ng/ml を cut off point とした。

絨毛性疾患治療中患者の EIA による血中 hCG と HAR 法による尿中 hCG の変化を比較すると HAR 法で卵巣機能がある場合 40IU/l 以下, ない場合 80IU/l 以下のいわゆる LH レベル⁴⁾に下降する時期と, EIA の正常値 $2\text{ng}(15\text{mIU})/\text{ml}$ 以下に下降する時期は, 一般に前者が早かつた。とくに症例3では, 子宮+両側付属器摘出, 化学療法により, HAR 法による尿中 hCG はすみやかに LH レベルに下降したが, EIA による血中 hCG は約2カ月遅れて正常値になつた。本症例は, HAR 法で判断した場合, 3コースの追加化学療法を行

なつたことになるが, EIA の値からみると追加化学療法は行なつていないことになる。しかし本例は, 組織学的に破壊奇胎であることが確認されていること, 転移病巣が認められないこと, 化学療法の副作用が強いこと, 過去の再発症例の分析結果³⁾⁵⁾を考慮にいれ, 追加化学療法を行なわず外来で follow up しているが, 現在まで尿中, 血中 hCG とともに正常値を持続している。

症例4は絨毛癌再発症例であるが, HAR 法では3カ月以上 LH レベルを持続, HAR 法による寛解基準を満たしているが²⁾⁵⁾, 血中 hCG は治療による一過性上昇を示し, 寛解とは判定できない。このように, 治療中の絨毛性疾患患者の管理においては, EIA による血中 hCG の測定は, 寛解の判定, 治療の打ち切りの時期判定について HAR 法よりすぐれていると考えられる。

絨毛性疾患治療中患者の HAR 法で LH レベルを示す時期の血清, 91検体の EIA 値は, 51検体 56% が正常値を示すが, 40検体 44% は hCG が検出され, HAR 法で 5IU/l を示す時の血中 hCG 値は最高 15.8ng/ml であつた。

HAR 法で LH レベルを示す時の血中 EIA 値は follow up 患者では再発例を除くと正常値を示したが, 症例1の絨毛癌再発症例では, HAR 法で 80IU/l 以下の時期でも, EIA による血中 hCG は上昇を続け, 約2カ月遅れて HAR 法による尿中 hCG は LH レベルを越え上昇した。

このように絨毛性疾患治療中及び外来 follow up 患者の管理に本 EIA による血中 hCG の測定は有用な方法であると結論される。

文 献

1. 石川栄治, 河合 忠, 宮井 潔: 酵素免疫測定法, 医学書院, 3, 1978.
2. 加藤孝子, 工藤純考, 高見沢裕吉: 絨毛性腫瘍に対する治療基準設定に関する研究, 日産婦誌, 31: 1921, 1979.
3. 加藤孝子, 遠藤信夫, 菊地義公, 関谷宗英, 工藤純考, 高見沢裕吉: 絨毛性腫瘍寛解基準の検討—特に再発症例を中心として—, 日産婦誌, 31: 1204, 1979.
4. 加藤孝子, 遠藤信夫, 高見沢裕吉: 絨毛性疾患における HCG, HCG β 値による寛解判定基準に関する研究, 日産婦誌, 34: 511, 1982.
5. 高見沢裕吉, 小林 治, 加藤孝子, 城武昇一, 遠

- 藤信夫, 石毛英男: 絨毛性疾患再発に関する研究.
日産婦誌, 34: 63, 1982.
6. 友田昭二, 浜田和孝, 須川 佑, 高橋研一: 酵素免疫定量法 (EIA) による hCG 測定の臨床応用への一段階—血中 hCG の測定. 医学のあゆみ, 110: 357, 1979.
 7. 辻 芳之, 岩本成一, 高田喜嗣, 香山浩二, 磯島晋三: 単一クローン性抗 hCG 抗体とビオチン—アゼデン系を用いた高感度特異的 hCG 定量法の開発. 日産婦誌, 34: 809, 1982.
 8. Borkowski, A. and Muquarat: Human chorionic gonadotropin in the plasma of normal, nonpregnant subject. N. Engl. J. Med., 301: 298, 1979.
 9. Engvall, E. and Perlmann, P.: Enzymelinked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry, 8: 871, 1971.
 10. Kato, K., Umeda, Y., Suzuki, F. and Kodaka, A.: Improved reaction buffers for solid phase enzyme immunoassay without interference by serum factors. Clin. Chem. Acta, 120: 261, 1980.
 11. Kikutani, M., Isiguro, M., Kitagawa, T., Imamura, S. and Miura, S.: Enzymeimmunoassay of human chorionic gonadotropin employing—Galactosidase as label. J. Clin. Endocrinol. Metab., 47: 980, 1978.
 12. Nakane, D.K. and Kawaoi, A.: Peroxidase-labelled antibody. A new method of conjugation. J. Histochem. Cytochem., 22: 1084, 1974.
 13. Tomoda, S.: Enzyme immunoassay for human chorionic gonadotropin and its clinical application. Acta. Obstet. Gynec. Jpn., 33: 1085, 1981.
 14. Usha, M.J., Romi, R., Anil, R.S. and Haresh, P. S.: A simple and sensitive color test for the detection of human chorionic gonadotropin. Obstet. Gynecol., 57: 252, 1981.
 15. Van Weemen, B.K. and Schuurs, A.H.W.M.: Immunoassay using antigen-enzyme conjugates FEBS Lett, 15: 232, 1971.

(No. 5187 昭57・11・9 受付)