

氏 名（本籍）	こ ばやし のり ひろ 小 林 典 裕
学 位 の 種 類	薬 学 博 士
学 位 記 番 号	薬 博 第 152 号
学位授与年月日	昭和 60 年 3 月 26 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
研究科専門課程	東北大学大学院薬学研究科 (博士課程) 薬学専攻
学 位 論 文 題 目	コルチコイドの免疫測定法に関する研究

(主 査)

論文審査委員 教授 南 原 利 夫 教授 橋 本 嘉 幸

教授 鈴 木 康 男

論文内容要旨

コルチゾール (F) ならびに 11-デオキシコルチゾール (S) のヒト血中, 尿中レベルは, 各種下垂体副腎系疾患, とりわけクッシング症候群の鑑別診断の指標として重要視される。

従来, これらコルチコイドの分析は, 主にラジオイムノアッセイ (RIA) により行われてきた。本法は, 抗原抗体反応を原理とするため高感度であり, 特異抗体の使用により, 構造上の微小差を識別できるなど, 優れた特長を有するが, 放射性物質の使用にもとづく欠点はさけ難い。

こうした観点から, 近年, 酵素免疫測定法 (EIA) が開発され, 多大の注目を浴びている。しかし, RIA に匹敵する感度, 特異性をもつコルチコイドの EIA 系の開発は, 必ずしも容易でない。この目的には, 特異性に優れる抗体の調製に加え, 適切な酵素標識抗原の使用が求められる。抗ステロイド抗体の調製には, ステロイドをキャリア蛋白に結合させハプテン化した免疫原を用いる必要がある。このとき産生される抗体の特異性は, 両者の結合様式に著しく影響される。このため, 特異抗体の調製には, ハプテンのデザイン, とくにキャリアと結合するステロイド核上の位置の選択が重要となる。一方, ハプテン-キャリアにより調製される抗血清は, 多くの場合, そのブリッジ部位にも親和性を示す抗体を含む。このため, 同一のハプテン化合物を用いて調製した酵素標識抗原を組み合わせる EIA 系 (homologous 系) では, 抗体が酵素-ステロイドのブリッジに親和性を示す結果, 十分な感度が得られない場合が多い。こうした場合, 一方の調製に異なるハプテン種 (ブリッジ構造, ブリッジのステロイド核上の位置あるいはハプテン自体を変える) を用いる heterologous 系の工夫により, 感度の向上を期待することができる。さらに, アッセイの特異性を考慮すると, これら heterology のうちブリッジ heterology の採択が望ましい。しかし, 各種ブリッジの組み合わせの感度あるいは特異性におよぼす影響については, 未だ十分な検討がなされておらず, その選択上指針となる知見に乏しい。

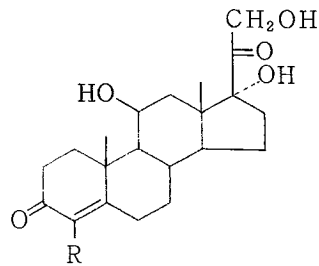
これらの問題点を考え合わせると, コルチコイドの EIA の開発上, ハプテンのブリッジ部位として 4⁴-3-ケト構造の 4 位が注目される。この位置は, 生体内で水酸化を受けず, しかも近縁化合物との識別上重要な 11 位, 17 位より十分離れるため, 特異抗体の産生が期待できる。さらに, 合成上種々のブリッジの導入が容易なため, 各種ブリッジ heterologous 系について系統的な検討が可能であり, EIA の開発上有用な知見が得られるものと期待される。

そこで, 4 位に種々のブリッジをもつ “[C-4] ハプテン” を用い, F ならびに S の EIA の確立を企てた。さらに, 近年多大の注目を浴びているモノクローナル抗体の免疫測定法における有用性に着目し, モノクローナル抗 S 抗体の調製を試みた。

1. コルチゾールの EIA F の EIA は, 従来, 3 位および 21 位をキャリア結合部位とする

ハプテンを用いて調製した抗血清により行われている。しかし、感度あるいは特異性の点で問題を残すものが少なくない。一方、Hosoda ら¹⁾は、〔C-4〕ハプテン (Chart 1) を用いて抗F抗血清、CMT、CET、HST、HS各2種を調製し、それらの多くがRIAで優れた特異性を示すことを報告した。そこで、これら抗血清を用い、EIAの確立を企てた。

まず、各〔C-4〕ハプテンを、N-ヒドロキシコハク酸イミド法によりそれぞれβ-ガラクトシダーゼと結合させ、酵素標識抗原を調製した。ついで、抗血清および酵素標識抗原の組み合わせ32通りのうち、良好な感度(約20 pg)を示した各種ブリッジ heterologous EIA系について、生体試料の測定により特異性を吟味した。EIAは2抗体法でB/F分離を行い、B画分の酵素活性を、



CMT : R = S CH₂ COOH
 CET : R = S CH₂ CH₂ COOH
 HST : R = S CH₂ CH₂ OCO (CH₂)₂ COOH
 HS : R = OCO (CH₂)₂ COOH

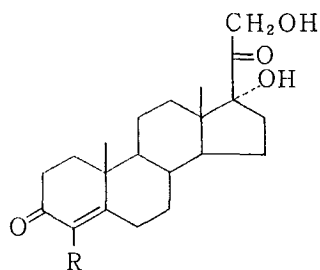
Chart 1

基質に o-nitrophenyl β-D-galactopyranoside を用い、吸光光度法で測定した。はじめに、血漿を加熱および塩化メチレン抽出で処理し、F測定値を比較した。その結果、抗血清CET-1に標識抗原CMTあるいはHSを組み合わせる系は、他の系にくらべて低く、かつ前処理法の違いによる差が見られず、検討した系のうち最も特異性に優れることが判明した。さらに、これら2種のEIA系は、血漿、尿いずれの試料についても先に確立したRIA¹⁾とよく一致する測定値を与え、血漿については簡便な加熱処理で、尿では塩化メチレン抽出により測定可能なことが示された。尿中Fの測定は、構造の酷似する各種代謝産物により妨害を受けやすく、とりわけ高い特異性を必要とする。このためEIAの適用は未だ報告されていない。

以上、従来の方方法にくらべ、感度、特異性に優れるFのEIAを確立することに成功した。また、コルチコイドのEIAにおいて、〔C-4〕ハプテンによるブリッジ heterology の有用性を実証することができた。

2. 11-デオキシコルチゾールのRIA ヒト血中Sの測定は、下垂体副腎系機能検査としてのメチラポン試験において有用である。しかし、従来用いられている抗S抗血清(C-3、C-6、C-7およびC-21をキャリア結合部位とするハプテンにより調製されている)は、特異性において必ずしも満足し得るものではない。そこで、臨床上有用なSのEIAの開発を究極の目標として〔C-4〕ハプテン (Chart 2) を用いて抗S抗血清を調製し、そのRIAにおける特異性を吟味した。

まず、4種ハプテンをN-ヒドロキシコハク酸イミド法でBSAと結合させ、免疫原を調製した。これらで家兎を隔週ごとに免疫し、約4カ月後に満足すべき力価の抗血清、CMT, CET, HST, HS各2種を得た。RIAに、標識抗原に[1,2-³H]-Sを用い、B/F分離はデキストラン炭末法で行った。用量作用曲線は、log-logit変換により20-600 pgの範囲で良好な直線性がみられた。Scatchardプロットにより親和定数(K_a)を求めたところ、いずれも10¹⁰オーダーの高い値を示した。抗血清の特異性は、交差反応性試験ならびに血漿試料の測定により吟味した。代表的な近縁ステロイド6種との交差反応性をTable 1に示す。いずれの抗血清もF, コルチゾン(E)との反応性は小さく、11位官能基の識別に優れていた。他の化合物についても全般に低



CMT: R = S CH₂ COOH
 CET: R = S CH₂ CH₂ COOH
 HST: R = S CH₂ CH₂ OCO(CH₂)₂ COOH
 HS : R = OCO(CH₂)₂ COOH

Chart 2

く、従来の抗血清とくらべ遜色ない結果であった。さらに健常人ならびにメチラポン投与患者血漿について測定したところ、前処理に塩化メチレン抽出を行うとき8種抗血清はいずれも満足すべき成績を与えた。なかでもCMT-2, CET-2はとりわけ優れた特異性を示し、これら抗血清を用いるRIAはメチラポン試験に十分適用可能なことが判明した。

Table 1. Per Cent Cross-Reaction of Antisera raised against 11-Deoxycortisol-[C-4]-BSA Conjugates with Selected Steroids

Steroid	% cross-reactivity (50%)							
	HS-1	HS-2	CMT-1	CMT-2	CET-1	CET-2	HST-1	HST-2
11-Deoxycortisol	100	100	100	100	100	100	100	100
Cortisol	1.5	0.35	0.59	0.58	0.75	0.32	0.45	0.34
Cortisone	0.85	0.77	0.26	0.86	0.005	1.3	0.36	2.1
Corticosterone	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
11-Deoxycorticosterone	9.4	4.8	2.2	6.4	8.7	11	11	2.6
17 α -Hydroxyprogesterone	12	3.9	5.3	4.1	0.90	15	7.7	5.1
Progesterone	1.4	0.31	0.13	0.33	0.24	0.75	1.2	0.62

3. 11-デオキシコルチゾールの E I A S の E I A はメチラポン試験の方法論として有用である。しかし、ステロイドの E I A の感度、特異性は種々の因子に左右され、両者ともに優れるアッセイ系の開発は必ずしも容易でない。そこで、先に調製した抗血清を用いて S の E I A を確立すべく、各種 E I A 系の感度、特異性を系統的に検討した。

S ハプテンの β -ガラクトシダーゼ標識体の調製ならびに E I A は、1 に述べた方法に準じて行った。まず、8 種抗血清および 4 種酵素標識抗原を組み合わせる 32 種の E I A 系について、検量線上 S 1 ng による酵素反応阻害率を求め、アッセイ感度を比較検討した (Table 2)。いずれの抗血清も対応する免疫原のハプテンにくらべ、より短いブリッジの酵素標識抗原を組み合わせ

Table 2. Effect of Combination between Antiserum and β -Galactosidase-labeled 11-Deoxycortisol on Sensitivity in Enzyme Immunoassay

Antiserum	Inhibition (%) ^{a)}			
	β -Galactosidase-labeled 11-deoxycortisol			
	CMT	CET	HST	HS
CMT 1	77	75	85	95
2	79	78	90	96
CET 1	74	43	55	93
2	90	73	82	93
HST 1	94	82	53	95
2	99	83	74	97
HS 1	99	95	96	94
2	99	96	98	97

a) Inhibition of bound enzymic activity of various conjugates by 1ng of 11-deoxycortisol. Coefficients of variation (n=3) were less than 5%.

せる場合に感度の大きな上昇がみられた。この知見は、F の E I A の結果²⁾とよく符合し、ステロイドの E I A において一般性をもつことが示唆された。また、すべての抗血清について、いずれかのアッセイ系で R I A に匹敵する高い感度 (阻害率 > 90%) が得られた。つぎに、良好な感度を示した 16 種の E I A 系で正常人およびメチラポン投与患者血漿を測定し、その特異性を吟味した (Table 3)。その結果、抗血清 CMT-2 を用いる系 II, CET-2 による系 VI, VII が他にくらべ良好であった。この成績は、先の R I A の結果とよく符合し、³H-R I A で特異性に劣る抗血清では、一般に、特異性に優れる E I A の確立は望めないことを示す。また、ブリッジ heterology の採用が時として特異性を低下させることが示された (例えば、homologous 系 VII の系 VIII の比較より)。系 II は、なかでも小さな測定値を示し、最も特異性に優れることが判明した。しかし、正常人血漿では、R I A にくらべて高値を与え、F による妨害が示唆された。そこで F 添加抗血清を用いる特異性の改善を検討した。さらに蛍光光度法による酵素活性測定法を採用し

てアッセイの高感度化を図り、感度（検出限界800 fg）、特異性ともに満足し得るE I A系の確立に成功した。本E I A系は、正確度、精度においても優れ、クッシング症候群におけるメチラポン試験（下垂体性副腎皮質過形成と副腎腺腫の鑑別）の判定に有用なことが判明した。その測定例をTable 4に示す。本研究で得られた感度、特異性に関する知見は合理的、能率的に優れたE I A系を開発するうえで有用と思われる。

Table 3. Assay Systems Used in Enzyme Immunoassay of 11-Deoxycortisol

Antiserum	β -Galactosidase-labeled 11-deoxycortisol			
	CMT	CET	HST	HS
CMT-1	I	-	-	-
2	II	-	-	III
CET-1	IV	-	-	V
2	VI	VII	-	VIII
HST-1	IX	-	-	X
2	XI	-	XII	-
HS-1	XIII	-	-	XIV
2	XV	-	-	XVI

Table 4. Plasma 11-Deoxycortisol Levels before and after Metyrapone Administration to Patients with Cushing's Syndrome

Patient	Time (h) ^{a)}					
	0	4	8	24	48	
Hyperplasia	1	1.6	58	58	88	62
	2	1.9	23	58	-	100
	3	8.4	84	96	97	120
Adenoma	1	3.2	6.2	8.6	5.7	6.0
	2	2.8	1.4	1.3	4.9	-
	3	9.8	16	16	18	14

a) After the initial administration of metyrapone.
Time 0 means before administration.

4. モノクローナル抗11-デオキシコルチゾール抗体 モノクローナル抗体は、一定品質のものが安定かつ継続的に供給され得るため、アッセイの標準化が可能となるなど、免疫測定法の開発上役立つところが大きい。そこでモノクローナル抗S抗体を調製し、そのRIAにおける特異性を吟味した。

ハプテンCET-BSA結合体でBALB/cマウスを隔週で免疫し、最終免疫後3日目の脾細胞を、45%ポリエチレングリコールによりP3-NS1/1-Ag4-1ミエローマと融合させた。ついで、抗S抗体産生ハイブリドーマを限界希釈法によりクローン化し、その培養上清にモノクローナル抗体S・CET-M8を得た。

H鎖サブクラス、L鎖タイプを間接ELISA法により調べたところ、それぞれ r_1 、 κ であった。

ついで本抗体を用い、RIAを先と同様に行った。用量作用曲線はlog-logit変換により、10-500 pgの範囲で良好な直線性を示した。

Scatchardプロットにより親和定数(Ka)を求めたところ、 $2 \times 10^{10} M^{-1}$ であった。

近縁化合物6種との交差反応性はいずれも小さく、従来の抗血清とくらべ遜色ない特異性をもつことが示された(Table 5)。とくに、F0.2%、E0.4%ときわめて小さいことから、メチラボン試験に適用し得る免疫測定法の開発が期待される。

以上、感度、特異性ともに優れるFおよびSのEIAの確立に成功し、〔C-4〕ハプテンの有用性を実証した。これらEIAは臨床上有用であり、他の Δ^4 -3-ケトステロイドについても同様〔C-4〕ハプテンの使用により優れたEIAの開発が可能と思われる。また、モノクローナル抗S抗体産生細胞株を樹立することができた。本抗体は優れた特異性を有し、アッセイ法の標準化に大きく役立つものと考えられる。モノクローナル抗体は、免疫測定法の開発上きわめて有望視されており、各種アッセイへの適用は今後急速に進展していくものと思われる。

参 考 文 献

- 1) H.Hosoda, S.Miyairi, N.Kobayashi, and T.Nambara, Chem.Pharm. Bull., 28, 3369 (1980).
- 2) H.Hosoda, N.Kawamura, and T.Nambara, Chem.Pharm.Bull., 29, 1968 (1981).

Table 5. Cross-Reaction of Monoclonal Antibody

Steroid	Cross-reaction
11-Deoxycortisol	100
Cortisol	0.2
Cortisone	0.4
Corticosterone	0.02
11-Deoxycorticosterone	7
17 α -Hydroxyprogesterone	7
Progesterone	0.2

審査結果の要旨

コルチゾール (F) ならびに11-デオキシコルチゾール (S) のヒト体液中レベルは、下垂体副腎系疾患とりわけクッシング症候群の鑑別診断の指標として重要視される。しかし、簡便かつ信頼度の高い測定法が未だ確立されるにはいたっていない。本研究は、酵素免疫測定法 (EIA) における抗体と標識抗原の組合せの感度、特異性におよぼす影響を検討し、その知見に基づいてすぐれたアッセイ系の開発を試みたものである。

従来、これらコルチコイドは、主にラジオイムノアッセイ (RIA) により測定されてきたが近年 EIA が開発され、多大の注目をあびている。しかし、RIA に匹敵する感度、特異性をもつ EIA の開発は必ずしも容易ではなく、この目的には特異性にすぐれる抗体および適切な酵素標識抗体の使用が求められる。特異抗体の産生には、ハプテンのデザイン、とくにステロイド核上のキャリア結合部位の選択が重要である。一方、同一のハプテンにより調製した酵素標識抗原を用いる EIA 系 (homologous 系) では、しばしば十分な感度が得られず、ブリッジが異なるハプテンにより抗体、標識抗原を調製する heterologous 系の工夫が求められる。しかし、これら組合せの選択上指針となる知見に乏しい。

EIA の開発上、ハプテンのブリッジ部位として 4^4 -3-ケト構造の4位が注目される。この位置は、生体内で水酸化をうけないうえ、近縁化合物との識別上重要な部位より離れるため特異抗体の産生に有利である。またブリッジの導入が容易なため各種ブリッジ heterologous 系について系統的な検討が可能である。そこで種々の [C-4] ハプテンを用い EIA の確立を試みた。まず F のブリッジ heterologous EIA を検討し、従来の EIA に比べ特異性にすぐれるアッセイ系を開発した。ついで各種抗 S 抗血清を調製したところ、RIA において従来のものと比べ遜色ないすぐれた特異性を示した。そこでこれら抗血清を用いる homologous ならびにブリッジ heterologous EIA 系を検討した。その結果、感度、特異性のいずれにもすぐれ、メチラボン試験の判定に有用な EIA 系を確立することができた。さらにモノクローナル抗体の免疫測定法開発上の有用性に着目してモノクローナル抗 S 抗体の調製を試み、RIA において従来の抗血清よりすぐれた特異性を示す抗 S 抗体産生細胞株の樹立に成功した。

以上、本論文は未開拓のまま残されていた EIA における酵素標識を感度、特異性の問題に系統的な考察を加え数々の新知見を得ると共にモノクローナル抗体を用いる実用的なアッセイ系の開発に成功したものであり、学位を授与するに十分値する内容と認める。