



Increased coating efficiency of antigen and preservation of original antigenic structure after coating in ELISA

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 実川, 友史 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1389

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 112号	学位授与年月日	平成 3年12月 6日
氏名	実川友史		
論文題目	Increased coating efficiency of antigen and preservation of original antigenic structure after coating in ELISA (ELISA を行う際の、抗原のコート効率の増強及びその本来の抗原構造の保持)		

医学博士 実川友史

論文題目

Increased coating efficiency of antigen and preservation of original antigenic structure after coating in ELISA

(ELISA を行う際の、抗原のコート効率の増強及びその本来の抗原構造の保持)

論文の内容の要旨

酵素抗体法 (ELISA) は、抗原抗体反応を測定するのに有効かつ簡便な方法である。しかしながら、抗原を ELISA プレートに直接コートする際、抗原は物理的に変化し、本来の抗原性を損なうことはよく知られている。その結果として、特異反応が減少し、非特異的の反応が生じてくると考えられる。今回、私は分子間相互作用を利用して、抗原構造を保持する方法を確立したので、ここに紹介する。

抗原の構造変化を知るマーカーとして主にモノクローナル抗体を用いた。使用した抗ヒトフェリチン (HLF)モノクローナル抗体(MA309、MA311)、抗ガンマイインターフェロン (IFN- γ)モノクローナル抗体 (B1、DIG2、DI3C8) 等の特異性は確認済みである (参考文献参照)。アッセイ方法は以下のとおりである。IFN- γ を抗原として用いた場合の一例を述べる。

まず、2 μ g/ml となるように IFN- γ をリン酸緩衝液 (PBS) にて希釈した。また、牛血清アルブミン (BSA) を 10mg/ml から PBS で順次希釈したものを調整した (\sim 0.5 μ g/ml)。次に、2 μ g/ml の IFN- γ と順次希釈した BSA を等量混合し、よく攪拌した。その結果、その混合液中には 1 μ g/ml の IFN- γ と様々な濃度の BSA が存在する。コントロールとしては PBS に IFN- γ を 1 μ g/ml となるように希釈したものを用意した。これらの抗原溶液を 50 μ l ずつ ELISA 用のプレートの各ウェルにコートしていき、1 時間室温で放置した。3 回 PBS で洗浄した後、IFN- γ に特異的な抗体 (10 μ g/ml) 50 μ l を 1 時間室温で反応させ、同様に 3 回洗浄後、酵素基質液にて発色させてその吸光度を測定した。

更に、抗体を用いずにセイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRPO) を抗原として用いて、直接的にそのコート効率も測定した。

その結果、IFN- γ を抗原として用いた場合は、通常の方法 (PBSのみ) でコートした場合にはポリクローナル抗体は反応したにも拘らず、モノクローナル抗体は殆ど反応しなかった。このことにより、一部の抗原性が失われていることが確かめられた。しかしながら、BSA を 100 μ g/ml 程度添加してコートした場合、モノクローナル抗体によっても十分な反応性が認められた。この抗体が IFN- γ と特異的に反応していることは、抗原あるいは抗体の競合反応試験により確かめた。

一方、同様なコートの実験を 125 I 標識 HRPO と BSA の相互作用を用いて行った。通常の方法でコートした場合に、抗原としての 125 I-HRPO はコートされているが、HRPO 活性は全く検出できなかった。このことにより、通常のコートの方法では HRPO 活性部位が失活したことが示唆された。この結果は、上記 IFN- γ の実験でポリクローナル抗体の反応性が認められるにも拘わらず、モノクローナル抗体が反応しなかった現象と一致した。上述した BSA のように、コートするときにこれらの抗原の構造を維持する補助蛋白質をエフェクター蛋白質と呼んだ。種々の蛋白質を組み合わせさせてエフェクター蛋白質を検索したところ、類似蛋白質では効果が認められないこと、あるいは低分子には働かないことなどから、エフェクター蛋白質としての効果を得る場合には、それらの分子構造が大切であろうことが示唆された。

これらの検討により、プレート上に抗原をコートするときにその構造が変化することが確かめられ、エフェクター蛋白質でその構造変化を抑えることにより、より感度の良い、かつ特異性の高いアッセイ系を組むことができた。更に、この方法は ELISA 法による抗原分子の構造解析に応用できるものと考えた。

論文審査の結果の要旨

本論文は酵素抗体法 (ELISA) における抗原タンパク質とエフェクタータンパク質 (エフェクター蛋白質) の関係について解析し、ELISA 法による抗原の特異的測定法の改善を試みようとしたものである。

その結果、両者の間には質的、量的に特別な関係があることを見だし、抗原タンパク質の微量測定への理論的アプローチが可能であることを示したものである。

「方法」

抗原としては、組換え体ガンマインターフェロン (rIFN- γ , 以下 INF- γ)、horseradish peroxidase(HRPO)などを用いた。それらに対する抗体としてはモノクローナル抗体を用いた。エフェクタータンパク質としては、ウシ血清アルブミン(BSA)、ヒト IgG、その他を用いた。ELISA を行うに当って、抗原とエフェクターの希釈には PBS バッファーを用いた。両者を等容積混合した後、一定量を ELISA プレートのウェルに採る。室温で一時間インキュベートしてから、PBS でウェルを洗浄し、加熱不活性化した FCS (ウシ胎仔血清) を加えて、さらに 30 分室温で放置する。モノクローナル抗体を加え、室温で 1 時間インキュベート後 HRPO 標識の抗マウス IgG ウサギ抗体を加え、PBS で洗浄後、*o*-フェニレンジアミンによる発色を測定した。

「結果」

抗原として $1 \mu\text{g/ml}$ の IFN- γ を用い、プレートウェルをコートして ELISA 法を実施した場合 BSA をエフェクタータンパク質として加えなければ検出できなかった。BSA を用いると最低 $0.125 \mu\text{g/ml}$ の IFN- γ まで検出することができた。BSA の至適濃度は $100 \mu\text{g/ml}$ であった。ポリクローナル抗体を用いた場合は BSA の添加を必要としなかった。HRPO を検出対象の抗原として用いた場合、 $2.5 \mu\text{g/ml}$ の濃度では BSA を要しなかったが、 $1.25 \mu\text{g/ml}$ 以下では BSA の添加がないと検出されなかった。そのさいの BSA の至適濃度は $5.6 \mu\text{g/ml}$ であった。 ^{125}I -HRPO を用いて調べると、 ^{125}I -HRPO のプレートへの固着量と ELISA 法による発色の BSA 依存度は平行していた。

他にヒト肝臓フェリチンを抗原としたときも BSA は有効であった。エフェクタータンパク質として BSA はおおむね有効であるが、抗原によっては BSA より IgG のほうが有効な場合 (ウサギ IgG、 α FP) もあった。

「結論」

ELISA で低濃度の抗原タンパク質を検出する場合 BSA の同時添加が有効である。BSA より他のタンパク質がより有効な場合もある。また、至適な BSA の濃度は抗原によって異なるようである。

「考察」

通常の ELISA 法によっては検出が困難である低濃度の抗原タンパク質が、今回の研究のような工夫を加えることによって測定可能になることが分かった。

更に、以下の諸点について試問が行われた。

1. ウェルに入れる抗原の量 (全量) と反応に関与する量
2. ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の反応における違い
3. 抗原タンパク質のヨード化の方法
4. 抗原タンパク質とエフェクタータンパク質の親和性とは
5. エピトープの立体構造について
6. 至適な抗原タンパク質とエフェクターのモル比は?
7. プラスチックウェルの材質とその影響
8. バッファーの影響
9. 抗原の種類とエフェクタータンパク質の間に法則性はないのか
10. タンパク質以外のエフェクターは?

これらの質疑に対する申請者の応答はおおむね適切であった。

以上から、本論文は博士 (医学) の学位論文としてふさわしいものであることを全員が一致して判定した。

論文審査担当者	主査	教授	藤田	道也			
	副査	教授	菅野	剛史	副査	教授	瀧川 雅浩
	副査	教授	山下	昭	副査	教授	吉田 孝人