

酵素免疫測定法における One-step 標識法の評価

天川雅夫¹⁾ * 亀子文子²⁾ 加藤亮二¹⁾

¹⁾ 香川県立医療短期大学臨床検査学科

²⁾ 信州大学医学部保健学科

Evaluation of one-step enzyme labeling methods for murine monoclonal antibodies in enzyme immunoassay

Masao Amakawa¹⁾ Fumiko Kameko²⁾ Ryoji Kato¹⁾

¹⁾ Department of Medical Technology, Kagawa Prefectural College of Health Sciences

²⁾ Department of Biomedical Laboratory Sciences, School of Health Sciences, Shinshu University

Abstract

We evaluated two different one-step enzyme labeling methods for murine monoclonal thyroglobulin(Tg) antibodies with horseradish peroxidase (HRP). In these methods, unlabeled Tg monoclonal antibodies were labeled with HRP-conjugated anti-mouse IgG or anti-mouse Fab. These procedures were compared with the conventional periodate labeling method with HRP. The one-step labeling methods gave excellent results in measuring serum Tg by enzyme immunoassay and by the enzyme inhibition test. In addition, the one-step enzyme labeling procedures are simple to perform and take only 15 minutes to complete, while the conventional periodate labeling procedure takes almost two full days. The one-step labeling method would be useful for characterization of monoclonal antibodies in enzyme immunoassay.

Key Words : 酵素免疫測定法 (Enzyme Immunoassay)

1 段階酵素標識法 (One-step enzyme labeling method)

モノクローナル抗体 (Monoclonal antibody)

* 連絡先 : 〒 761-0123 香川県木田郡牟礼町大字原 281-1 香川県立医療短期大学臨床検査学科

* Correspondence to: Department of Medical Technology, Kagawa Prefectural College of Health Sciences, 281-1 Hara, Mure-cho, kita-gun, kagawa, 761-0123, Japan

はじめに

血液中に存在する微量物質の定量法の一つに酵素免疫測定法 (ELISA) がある。この方法は、特異性に優れ、簡便で高感度測定ができることから腫瘍マーカー¹⁾、ホルモン²⁾、アレルギー³⁾、感染症⁴⁾、自己免疫疾患⁵⁾などの検査法に広く利用されている。

一方、この ELISA を構築する上で使用する抗体の性質を知ることは重要であり、特に、マウス由来のモノクローナル抗体の中から目的にかなう抗体を探し出すには抗体に酵素などを標識した標識抗体を使用するとより簡便に可能となる。

通常、酵素を抗体へ標識する方法としては、グルタルアルデヒド法⁶⁾、過ヨード酸法⁷⁾、マレイミド法⁸⁾、ピリジル・ジスルフィド法⁹⁾などがあるが、いずれも多種類のモノクローナル抗体を一度に標識することは容易ではない。

今回、我々は、血中サイログロブリン (Tg) 測定のために採取した幾つかのマウスモノクローナル抗体 (MAb) の性質を検討するため、簡便かつ短時間に標識可能な One-step 標識法を用い、その有用性を評価した。

方 法

1. 標識法

One-step 標識法は、図 1 に示す 2 つの方法を用いた。

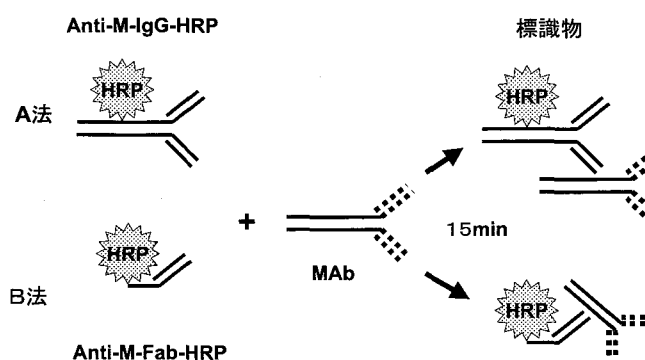


図 1 One-step 法 (A 法, B 法) の標識法
Anti-M-IgG-HRP: 抗マウス IgG 標識抗体
MAb: モノクローナル抗体

A 法は、5 種類の MAb (F1, F11, F37, F75, F92) をそれぞれ 1mg/ml の濃度に調整し、試験管に各 10 μ l を分注した。これに西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP: RZ3.0, Sigma) と抗マウス IgG を用いて予めマレイミド法⁸⁾で標識しておいた抗マウス IgG・HRP (1mg/ml) を各 10 μ l 加えて 15 分間反応させた後、正常マウス IgG (10mg/ml) を各 10 μ l 入れて反応停止させた。

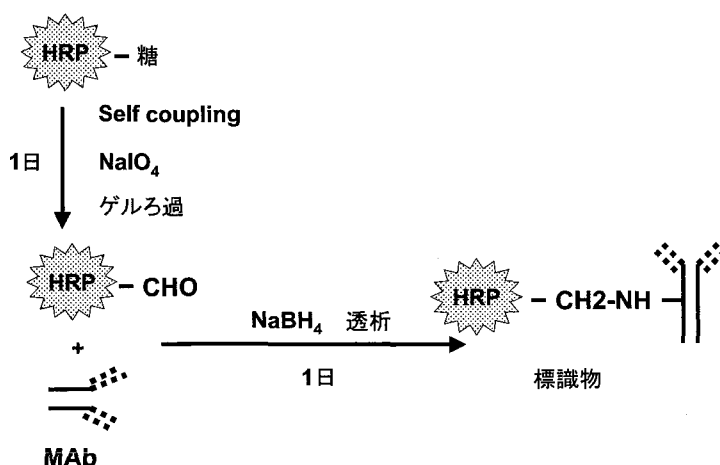


図 2 過ヨード酸法の標識法
HRP: ペルオキシダーゼ標識
MAb: モノクローナル抗体

B 法は、前法と同様の 5 種類の MAb を試験管に各 10 μ l 分注し、それに、HRP と IgG をペプシンで分解後、得た抗マウス Fab を同様にマレイミド法⁸⁾で標識した抗マウス Fab・HRP (1mg/ml) を各 10 μ l 加えて 15 分間反応させた後、正常マウス IgG (10mg/ml) を各 10 μ l 入れて反応停止させた。標識法の対照として、図 2 に示すような過ヨード酸法⁷⁾を用いて同様に 5 種類の MAb を標識した。標識後、それぞれの標識液は使用まで防腐剤 (0.02% チメロサル: Sigma) を添加して冷蔵で保存した。

2. MAb の性状

標識に使用した 5 種類の MAb の性状を表 1 に示した。この抗体は、バセドウ病患者の甲状腺組織 (信州大学医学部より供与) から Shulman¹⁰⁾の方法に準じて作製したサイログロブリン (Tg) をマウスに免疫後、そのマウスから採取した脾臓リンパ球とマウスミエローマ細胞 (P3U1: 和光純薬から供与) をポリエチレングリコール法で細胞融合後、スクリーニングして得た。抗体のサブクラスは、IgG1, k または IgG2b, k を示し、ELISA での抗体価はアフィニ

表1 MAbの性状

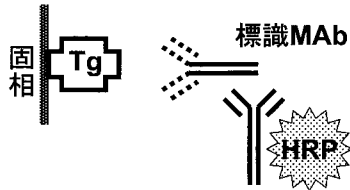
MAb	Subclass		抗体価
F1	IgG ₁	k	10 ⁶
F11	IgG ₁	k	10 ⁶
F37	IgG ₁	k	10 ⁶
F75	IgG ₁	k	10 ⁶
F92	IgG _{2b}	k	10 ⁶

ティカラムでの精製 IgG で 10⁶ 希釈まで認めた。

3. 標識液の検定法

1) ELISA による検定法

直接法



間接法

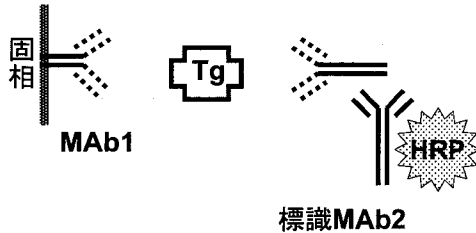


図3 ELISA (直接法, 間接法) の検定法の原理

Tg: サイログロブリン

HRP: ペルオキシダーゼ標識

MAb: モノクローナル抗体

MAb の検定は、図3に示す ELISA を用いた。使用抗原は、前述した甲状腺組織から得た Tg であり、この Tg を標準曲線の作成に使用した。標識液の検定は、標識液を希釈後そのまま Tg 抗原に反応させる直接法と、一度別の MAb と Tg 標準液を反応させておいて、その後に標識液を反応させる間接法の2法で行った。

直接法は、1 ウエル当たり 1 μ g/well の Tg を固相化した 96 穴マイクロプレート (Nunc 社) を使用して、それに、希釈した各標識抗体 100 μ l を加えて室温で 60 分間反応させた。これを洗浄後、基質

液 (テトラメチルベンチジン: TMB, 大日本製薬) を 100 μ l 入れて発色させた。反応停止後の吸光度測定は、波長 450/660nm で行った。

間接法は、96 穴マイクロプレートの 1 ウエル当たり 1 μ g/well の MAb と、マウスに前述の甲状腺組織由来の Tg を免疫して得た Polyclonal 抗体 (TgAb: Poly 法) をそれぞれ固相化し、それに、希釈した Tg 標準液 (0, 10, 100, 1000ng/ml) を 100 μ l 加えて室温で 60 分間反応させた。これを洗浄後、作製した希釈各標識抗体 100 μ l を加えて室温で 60 分間反応を行い、更にこれを洗浄して、前法と同様に基質液 100 μ l で発色、吸光度を波長 450/660nm で測定した。

2) イムノブロット法による検定法

精製 Tg (1mg/ml) を SDS 泳動用サンプルバッファーと等量混合後、8% ゲル 1 ウエル当たり 10 μ l 塗布し、20mA, 80 分の条件で電気泳動を行った。泳動ゲルからのニトロセルロース膜への転写は、ミニトランスブロット (BIO-RAD 社) を使用し、冷却 (4℃) しながら 150mA, 45 分間の条件で泳動した。分子量マーカーの転写を確認した後、リン酸緩衝液で 5 倍希釈したブロックエース (大日本製薬) 30 分間、膜をブロッキングした。これを、0.05% Tween20 添加リン酸緩衝液 (pH7.2, 以下洗浄液) で 3 回洗浄した。その後、膜をハサミで泳動パターンに沿って必要な数に切り、その一つ一つを試験管に入れ、各希釈した標識 MAb (1,000 ~ 2,000 倍希釈) 液に浸してそれぞれ 4℃ で一夜反応させた。翌日、洗浄液で 3 回洗浄し、40mg/dl のジアミノベンチジン (DAB: sigma) で発色させた。

結 果

1. 標識に要する時間の比較

表2 標識時間の検討

		標識物の希釈率	
標識時間		10 ³	10 ⁴
A法	5min	0.450	0.08
	15min	0.821	0.112
	30min	0.980	0.129
B法	5min	0.670	0.08
	15min	1.082	0.161
	30min	1.290	0.211

Tg未結合のBlank=0.035(A法)

Blank=0.048(B法)

数字は吸光度

One-step法のA法およびB法について、標識に要する時間を検討するため、MAbとHRP標識抗マウスIgG（またはFab）との反応時間を5分、15分、30分と変えELISAの直接法で結合率を比較したところ、表2に示すように反応時間が15分以上でA、B法ともに高い結合率が得られた。一方、過ヨード酸法に必要な標識時間は2日間であった。

2. 標識抗体の検討

ELISAの間接法を用いて、そのTg標準曲線の反応からOne-step法のA、B法および過ヨード酸法の3法を比較評価した。表3に示すように、固相化抗体にTgAb（Poly法）を用いた場合には、3法の標識法はすべて標準曲線の形状（吸光度）に差はなく良好な結果を示した。

表3 三法における標準曲線の比較

標識法	Tg標準液 ng/ml		
	0	100	1000
A法	0.038	0.67	1.68
B法	0.022	0.57	1.59
過ヨード酸法	0.040	0.70	1.75

数字は吸光度

考 察

一方、固相化抗体に標識抗体とは異なる別のMAbを使用した場合のOne-step法（A、B法）は、固相化MAbと標識抗体に結合しているMAbとの間で競合が生じ、測定できなかった（図4）。

3. イムノブロット法の比較

Tg抗原をニトロセルロース膜へブロットした後、3法の標識抗体を反応させて、比較した結果、それぞれの反応性には差がなかった。

ELISAに代表される酵素標識反応は、誰でも、どこでも、簡便にできる測定法で、最近では、免疫化学検査だけでなく、病理検査室でもAvidin Biotin Peroxidase complex法（ABC法）¹¹⁾やPeroxidase antiperoxidase complex法（PAP法）¹²⁾が使用されている。

この酵素免疫反応に使用する標識抗体や標識抗原の作成は、これまでグルタルアルデヒド法、過ヨード酸法、マレイミド法、ピリジル・ジスルフィド法が使用されてきた。しかし、これらの方法は、作成後の標識物の安定性や酵素結合率の高さなど多くの利点を有しているものの、標識時に時間や手間がかかるために新たに作成した多くのMAbの性質および反応性を一度に検索するにはかなりの労力と時間を要している。したがって、我々はMAbの評価を簡単に行うことができるOne-step標識法を導入し、血中Tg測定による甲状腺癌診断のために作成したMAbを使用してこの標識法の評価を行った。

One-step標識法の利点は、簡便でかつ短時間に標識ができる点である。それは、予め目的のMAbと標識させる標識物質（例えば酵素など）をMAbの抗体である抗マウスIgG抗体（またはFab抗体）にペルオキシダーゼなどの酵素を標識しておき、それを標識物として常に大量に持っておけば、目的のMAbの検定時にこの標識抗体と混ぜるだけで短時間に標識が可能となる。仮に、MAbのサブクラスが、IgG1やIgG2bと異なっている場合であってもそれとサブクラスと反応可能な抗体を準備していれば問題は生じない。

今回の検討で、最も重要な標識時間についてまず検討した。我々は、これまで抗体や抗原の酵素標識を行う場合には汎用法である過ヨード酸法やマレイミド法を用いてきたが、確かにこれらの標識法は、それほど煩雑な方法ではないものの、少なくとも使

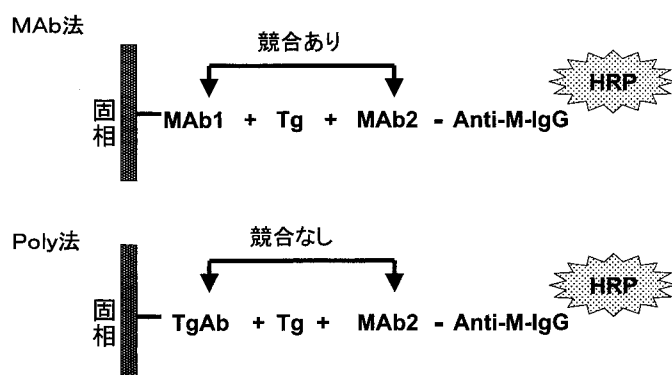


図4 One-step法の問題点

MAb法（MAb）と Polyclonal 抗体（Poly法：TgAb）使用の場合

Anti-M-IgG-HRP：抗マウスIgG標識抗体

MAb：モノクローナル抗体

用する酵素の前処理におよそ1日必要であり、さらに酵素と抗体の反応時間などを考慮すれば最低でも2日間を要していた。

一方、細胞融合などで大量に作製したMAbは、その抗体のすべてが目的にかなうか、あるいは不要であるかは、それぞれの抗体の性状を検討してみなければ分からないことが多い。その場合には、まず少量の標識物を作製し、検討することがある。

今回のOne-step標識法は、多くのMAbを短時間でかつ簡便に標識できることから、これらの点に適していた。

実際にELISA法を用いてこの標識液の良否を検討したところ、固相にTg抗原やTgAbおよびマウスとは異なる他種の抗体を使用した場合には、One-step標識法と従来法の過ヨード酸法には差がなく使用可能であった。特に抗体価の検索やMAbの性状を検査する通常の方法では問題ないといえた。

しかし、固相に標識MAbと同じマウスのMAbを使用した場合には標識MAbと固相のMAbが標識IgG（または標識Fab）と競合し、分別ができなかったことから、このOne-step標識法の利用はパーマネントの標識物として使用するのではなく、あくまでもMAbの性質を簡便に見分けるための簡便法に最適なものと考えられた。

結 論

従来から使用されてきた酵素標識法は、作成後の標識物の安定性や酵素結合率の高さなど、多くの利点を有しているものの、MAbの性状を一度に検索するにはかなりの労力と時間を要していたことから、それを解決するための簡易な標識法について評価した。①One-step標識法は、標識時間がわずか15分程度であった。②血中Tg測定のために作成した多種類のMAbを、One-step標識法で標識を行い、従来法の過ヨード酸法と比較したところ、何ら差はなく使用可能であった。このOne-step標識法は、MAbの性質を簡便に見分けるための有用な方法として考えられた。

文 献

- 1) Kato R, Noguchi S, Noguchi A (1987) A human serum thyroglobulin determination with monoclonal antibody one - step assay: minimum interference of autoantibody. *Endocrinol Jpn* 34: 171-178.
- 2) Ito M, Miyai k, Doi K, Mizuta H, Amino N (1984) Enzyme immunoassay of free thyroxine in serum. *Clin Chem* 30: 1682-1687.
- 3) 松村行雄 (1993) アレルギー検査の選択と実際. 日本内科学会雑誌 82: 1636 - 1640.
- 4) 矢野右人 (1995) B型肝炎ウイルスマーカー. 日本臨床増刊号 686: 324-327.
- 5) 青塚新一, 横張龍一 (1988) 酵素免疫法による抗2本鎖DNAおよび抗1本鎖DNA抗体の同時測定と臨床的意義. *リウマチ* 28: 96-101.
- 6) Avrameas S (1974) Coupling of enzyme to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugate for detection of antigens and antibodies. *Immunochemistry* 6: 43-52.
- 7) Nakane PK, Kawaoi A (1974) Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J Histochem Cytochem* 22: 1084-1091.
- 8) Isikawa E, Imagawa M, Hashida S, Yoshitake S, hamaguchi Y, Ueno T (1983) Enzyme-labelling of antibodies and their fragments for enzyme immunoassay and immunohistochemical staining. *J Immunoassay* 4: 209-327.
- 9) 石川栄治, 河合忠, 宮井潔 (1982) "酵素免疫測定法", 第2版, 医学書院, 東京, p1-410.
- 10) Shulman S, Armenia J (1963) Studies on thyroid proteins. The components of hog thyroid tissue, and the preparation of purified thyroglobulin by column chromatography. *Biol Chem* 238: 2723-2731.
- 11) Hsu SM, Raine L, Fanger H (1981) Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29: 577-580.
- 12) Taylor CR (1978) Immunoperoxidase techniques. *Arch Pathol Lab Med* 102: 113-121.

受付日 2003年10月30日