

マイクロELISA法による抗体測定における 血清蛋白および標識抗体の影響について

内村真佐子¹⁾ 北山 秋雄¹⁾ 矢崎 廣久¹⁾ 市村 博¹⁾
堀内 喜信²⁾ 江下 倉重²⁾

The Influence of Serum Protein and Conjugate Antibody to the Micro Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of IgG Antibody

Masako UCHIMURA, Akio KITAYAMA, Hirohisa YAZAKI
Hiroshi ICHMURA, Yoshinobu HORIUCHI and Kurashige ESHITA

I はじめに

マイクロプレートを用いた酵素抗体測定法(以下マイクロELISA法と略)は、測定感度が優れていると共に、操作が簡単で特別な設備を必要としないため、臨床医学、基礎医学の分野で広く用いられている。感染症の診断においては、下痢患者便中に存在するウイルスや細菌毒素の検出及び血中抗体価の測定等に应用されている。ELISA法による抗体測定において、検体中の抗体濃度は吸光度値で表現される場合が多い。^{1,2)}従ってこの測定値は、抗体陰性か陽性かといった定性的な値であり、他の測定法で得られた抗体価との比較はできない。

近年、細菌毒素に対する抗体価の定量を行なう場合、既知力値の抗体を標準品として相対力価を求める方法が試みられている。しかし、測定で得られた吸光度値の取扱いは研究者によってさまざまである。吸光度値そのままを標準品と比較する方法³⁾、吸光度値そのままを用いて作成した用量反応曲線の下側の面積の対数値を比較する方法⁴⁾、吸光度値を対数変換して比較する方法⁵⁾などの手法がとられている。

著者らは、マイクロELISA法に関する基礎的な検討を行なっており、既報で、測定により得られる吸光度値は対数正規分布を示し、用量の対数値に対する吸光度の対数値は直線性を示すことを明らかにした⁶⁾。さらに今回は検体中の蛋白濃度及び標識抗体が測定値に及ぼす影響について検討を行った。

II 材料及び方法

1) マイクロELISA法: マイクロプレートはイミュロンI平ぞこプレート(ダイナテック社)を用いた。抗原は、S型百日咳菌培養上清から佐藤らの方法⁷⁾で精製したLPF-HAを用いた。マイクロプレートの感作は、500倍に希釈した抗原100 μ lで行ない、4 $^{\circ}$ Cで1晩放置した。標識抗体は市販アルカリフォスファターゼ結合抗ヒトIgGヤギIgGを用いた。被検血清は50 μ l、標識抗体は100 μ lを用いそれぞれ室温で30分間振とうした。基質はp-ニトロフェニルリン酸2ナトリウムを用い、1mg/ml溶液の200 μ lを30~120分間25 $^{\circ}$ C以上の室温で反応させた。吸光度は、マイクロELISAオートリーダーMR580(ダイナテック社)で測定した。それぞれの操作に拌なうプレートの洗滌は、4回ずつ行った。

2) 反応用緩衝液の調整: 抗原感作緩衝液は、炭酸ナトリウム緩衝液(Na₂CO₃ 1.59g, Na₂HCO₃ 2.93g, NaN₃ 0.2g, 蒸留水1,000ml)を用いた。血清の希釈及びプレートの洗滌は、PBST(NaCl 8.0g, Na₂HPO₄·12H₂O 2.92g, KH₂PO₄ 0.2g, KCl 0.2g, NaN₃ 0.2g, Tween20 0.5ml, 蒸留水1,000ml)を用いて行なった。基質希釈液はジエタノールアミン緩衝液(Diethanol amine 97ml, NaN₃ 0.2g, MgCl₂·6H₂O 0.1gを約700mlの蒸留水に溶解後、1~2NHClでpHを9.8に修正し、蒸留水を加えて1,000mlに調整)を用いた。

3) 被検血清: wst1は、抗LPF-HA抗体価の高い数名の健康児血清をプールし、PBSTで3倍希釈後、10,000rpmで30分間遠心分離し沈渣を除去した。抗LPF-HA抗体陰性血清及び5704, 5723血清は、健康児血清を特別の処理は行わずに使用した。

4) 被検血清の測定: 被検血清は1希釈用量につき4ウェルずつ測定を行い、吸光度値は対数変換して用い

1) 千葉県衛生研究所

2) 千葉県血清研究所

(1986年9月30日受理)

た。分散の検定はF検定を、また平均値の検定は t 検定を用いて行った。

5) 蛋白濃度の異なる wst 1 血清希釈液の調整: LPF-HA 抗体陰性血清を希釈して蛋白量 16mg/ml とし、さらにそれを倍々希釈して 0.5mg/ml まで 6 段階の血清希釈液を作成した。それぞれの溶液及び PBST のみを用い、wst 1 (蛋白量 30mg/ml) を 100 倍に希釈した。

6) 相対力価の測定: 5704 及び 5723 血清の 10 倍, 50 倍, 250 倍希釈液の吸光度を測定し, wst 1 100 倍希釈液に対する相対力価を求めた。相対力価は次式により算出した。
 : Relative titer = antilog (\bar{y} sample - \bar{y} wst 1)
 3 枚のプレートを用いて 3 回のくり返し実験を行い, 相対力価の平均値を求めた。(\bar{y} : 吸光度の平均値)

7) 蛋白質の定量: 蛋白量は Lowry らの方法⁸⁾で測定した。

III 結果

1) 血清蛋白濃度の影響: wst 1 の PBST 希釈液 (蛋白量 0.3mg/ml) は吸光度値 0.5 を示したが, 検体中

の蛋白濃度の増加に伴ない吸光度値の減少が認められた。検体中の蛋白含量が 2mg/ml をこえると, 蛋白量 0.3mg/ml の場合に比べ吸光度の差が明らかとなった。(Fig. 1)

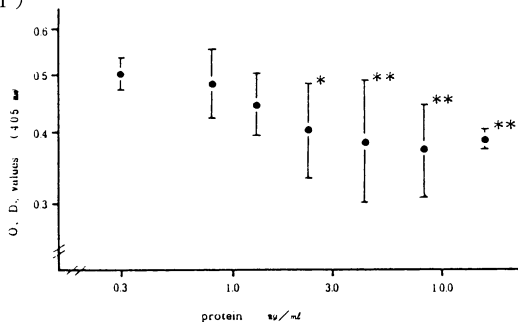


Fig 1. Influence of serum protein contents to optical density value.

* p<0.05 ** p<0.01

2) 標識抗体の影響: 被検血清 5704 の相対力価は, A 標識抗体を用いて測定した時に比べ B 標識抗体を用いた時に低い値が得られた。10 倍及び 250 倍希釈血清において, A 標識抗体を用いた場合, 実験回毎に得られる相対力価のばらつきは大きかった。(Fig. 2 a)

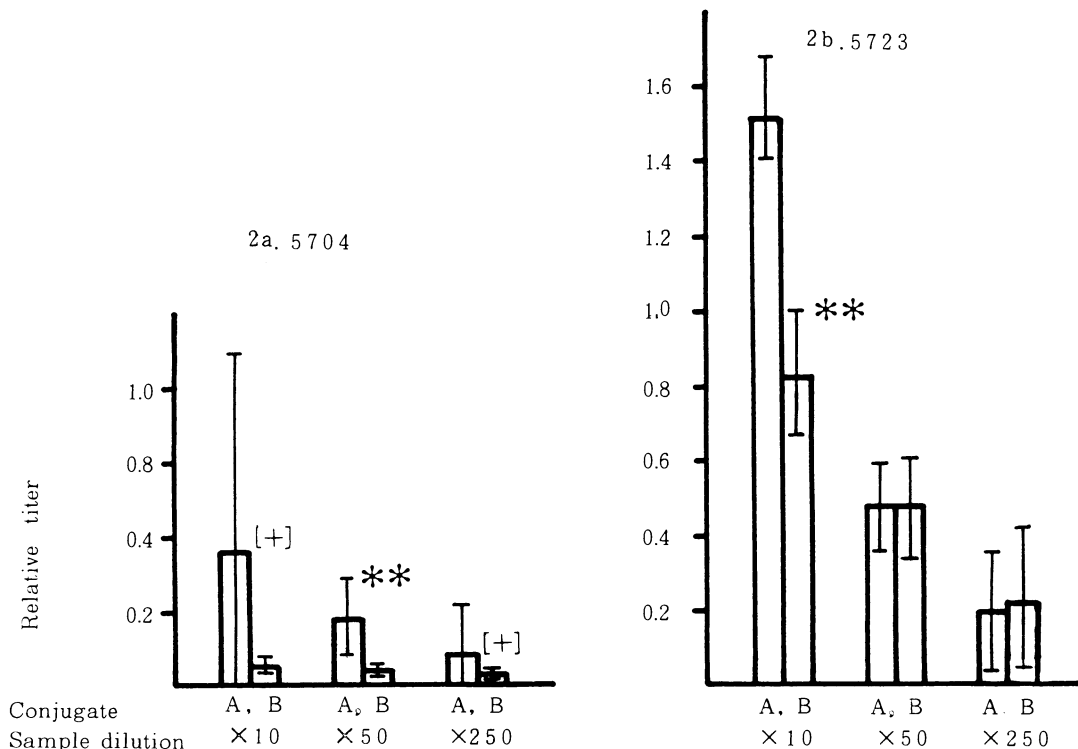


Fig. 2 Comparison of relative titer obtained by using A or B conjugate lqG.

[+]: Significant difference exists between variances of two groups ** P<0.01

被検血清5723において、 $10 \cdot 50 \cdot 250$ 倍希釈したいずれの検体においても、A・B標識抗体による相対力価のばらつきに差は認められなかった。10倍希釈血清の相対力価はAを用いた場合全に高かった。(Fig. 2 b)

IV 考察

簡便な抗原・抗体検出系であるマイクロELISA法は、すでにさまざまな分野で応用されているにもかかわらず、その測定値の解析方法は一様ではない。この原因として、ELISA法測定に基本的に含まれるプレート間の誤差・ウェル間の誤差等の変動因子及びそれに影響を与える検体の蛋白量・標識抗体の品質等に関する研究があまり行なわれていないことが掲げられる。マイクロELISA法で抗体測定を行なうと、各ウェルの吸光度間に 2.6×10^{-3} 程度のばらつきが生じる。さらに吸光度値が0.05以下となるような測定ではこのばらつきがさらに大きくなることは、すでに報告した⁸⁾。

ELISA法に影響を与える因子の一つとして、標識抗体のロット差が掲げられる。今回比較を行なった標識抗体のうち、どちらがより正確な抗体価を表わすかについては、LPF-HAの生物活性に対する中和抗体価とELISA法による相対力価を同一検体について比べなければ解明できない。しかし、百日咳体を保有しないと思われる0~1才児の抗体価を測定した結果からは、A標識抗体には非特異的の反応をおこす物質が含まれている可能性が示唆されている。

最近、細菌学の分野において、平行線定量法をマイクロELISA法に適用する試みがなされている^{5,9)}。Smithらは、破傷風毒素に対する抗体の測定について検討を行なっている。⁹⁾それによると、100倍以上に希釈して測定した抗体価の高い血清は、用量反応線が直線性を示し標準品に対し平行性を示すが、希釈倍数1倍から16倍で測定した力価の低い血清は直線性のない傾きの小さな曲線を示すと報告している。本稿では、検体中の血清蛋白濃度が高い場合に、吸光度は真の値より低くなることと明らかにした。この結果から、力価の低い血清の用量反応直線の傾きがゆるやかになり、直線性が得られない原因は、検体中の蛋白濃度が高いためであることが示唆される。

正常な血清中には特異抗体であるIgGのみならず、生体反応に関与している種々の活性物質が存在している。それらの活性物質の一種であるハプトグロビン及びセロプラスミンは、LPF-HAと親和性を有することが知られている^{10,11)}。血清濃度の高い検体を用いると、血清

中に微量に存在しているこれらの物質が抗原と結合をおこし、その結果立体障害等の二次的な作用で、抗原抗体反応に影響を与えることが十分考えられる。従って、マイクロELISA法で抗体測定を行なう場合、信頼性の高い測定結果を得るためには、検体の希釈倍率が50~100倍以上で実施する必要がある。

V まとめ

LPF-HAを抗原としてマイクロELISA法で測定した抗血清の吸光度値は、検体中の血清蛋白量が増大するに従い減少する傾向を示した。

市販標識抗体は品質が一様でなく、用いる標識抗体により測定値に変動が見られた。

VI 文献

- 1) 中村良子, 田沢節子, 沢田威男, 福田一郎, 奥村和夫, 青木良雄 (1982): マイクロELISA法によるリン菌感染症の迅速診断法について, 臨床と細菌, 9, 323-328.
- 2) 水谷智代 (1981): Enzymelinked Immunosorbent Assay (ELISA法) によるIgG・IgM分画別麻疹抗体測定法の研究, 臨床とウイルス, 9, 469-478.
- 3) Young, C. R., M. M. Levine, J. P. Craig, and R. R. Browne (1980): Microtiter enzyme-Linked immunosorbent assay for immunoglobulin G cholera antitoxin in human: Method and correlation with rabbit skin vascular permeability factor technique Infect. & Immun. 27, 492-496.
- 4) Sedgwick, A. K., M. Ballow, K. Sparks, and R. C. Tilton (198): Rapid quantitative microenzyme-linked immunosorbent assay for tetanus antibodies. J. Clin. Microbiol., 18, 104-109.
- 5) Smith-Melville, M. E., V. A. Seagroatt, and J. T. Watkins (1983): A comparison of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with the toxin neutralization test in mice as a method for the estimation of tetanus antitoxin in human sera. Journal of Biological Standardization, 11, 137-144.
- 6) Kitayama, A., M. Uchimura, Y. Horiuchi.

- Studies on the factors of variance measuring of relative potency by micro-ELISA. Journal of Biological Standardization. (投稿中)
- 7) Cowell, J. L., Y. Sato, H. Sato, Birgitham, C. R. Manclark (1982): In: Seminars Infectious Disease Volume IV. Bacterial Vaccines, Thieme-stratton Inc. N. Y.
- 8) Lowry, O. H., Roserbrough, N. T., Farr, A. I., and Randall, R. J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- 9) Sato, H., Y. Sato and A. Ito (1983): Affinity of pertussis toxin produced by Bordetella pertussis for human haptoglobin: application to the in vitro assay of the toxin. J. Microbiol Methods, 1, 99-109.
- 10) Irons, L. I., and A. P. Maclennan (1979): Isolation of the lymphocytosis promoting factor-haemagglutinin of Bordetella pertussis by affinity chromatography. Biochem. Biophys. Acta. 580, 175-185.
- 11) 作間普, 水上真砂代, 坂本国昭, 江藤晶, 北川久, 酒勾光郎 (1985) 百日咳毒素 (PT) の精製法の検討, 日本細菌学雑誌, 126.