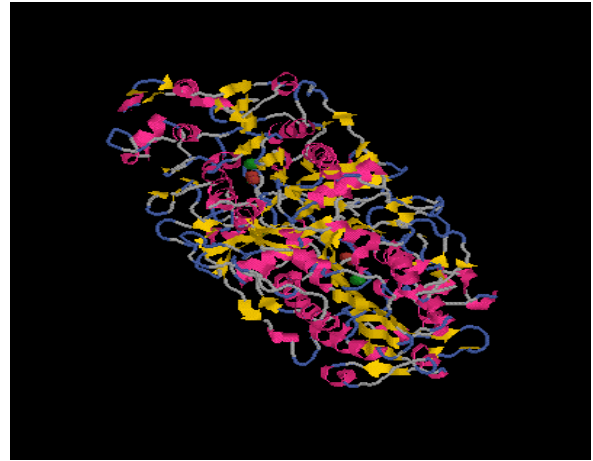


【緒言】

現在、医療機器ならびに外科的技術の向上により、早期発見することで多くの疾患を治療できるようになって来ている。それに伴い、今まで以上に臨床や定期的な健康診断における診断結果の迅速な提示が必要とされている。その検査対象として、生体を循環し多くの情報（タンパク質）を有している血液は、最も有効な診断材料である。その為、全血または血清を対象とした迅速かつ簡便な診断薬が多種多用に製品化されている。

血液検査において immunoassay(免疫分析)は、血中に含まれる特定タンパク質を抗体の結合特異性を利用して定量する分析手法である。その例として、抗原と放射性核種で標識した抗体とが競合的に結合することを利用、結合した複合物質の放射能を測定して微量物質を定量する放射性免疫分析法（RIA）、抗体または抗原をプレート上に固定化し対象物質と結合後、酵素で標識した二次抗体と反応させ酵素基質を添加、酵素による発色反応を定量する酵素免疫測定法(ELISA)、抗体または抗原を微粒子上に結合させ対象物中の標的物質との反応による凝集過程を濁度として定量する免疫比濁法（LPIA）などが挙げられる¹⁾。

そこで、本研究室では迅速かつ簡便な LPIA 法と、pg/ml のオーダーで高感度測定可能な ELISA 法の両者の特徴を兼ね備えた CLEIA 法 (Chemi-Luminescent Enzyme Immunoassay) に注目し、高感度・迅速診断法の確立を目的に酵素標識抗体作製法と、新たな測定系での高感度測定を検討したいと考えている。



Fig, 1 Alkaline phosphatase

【実験方法】

1) 還元 IgG の作製 ; IgG 2.5mg を 0.1mol/l リン酸 Na 緩衝液にて一晚透析。0.1mol/l 2-mercaptoethylamine(10mmol EDTA 含む) を 50 μ l 加え 37°C, 90 分間インキュベートした後、ゲル濾過にて分離した。

2) マレイミド・アルカリフォスファターゼの作製 ; ALP 2mg/50mmol/l 硼酸緩衝液 (1mmol MgCl₂, 0.1mmol ZnCl₂ を含む) (pH7.6) 1.5ml に N-(6-Maleimidocaproyloxy)-succinimide (EMCS) 0.1mg/0.01ml N,N-dimethylformamide を加え 37°C, 30 分間インキュベート、その後ゲル濾過、分画確認をした²⁾。

3) 酵素標識抗体の作製 ; マレイミド・アルカリフォスファターゼと還元 IgG 溶液を混合し 4°C, 20 時間インキュベートした。その後ゲル濾過にて分画した²⁾。

4) 酵素活性測定
基質である AMPPD 100 μ l (0.2mg/ml) に ALP

溶液を $0\sim 100\mu\text{ l}$ (2mg/ml)を添加し 37°C で 5 分間インキュベート後、マイクロプレートリーダーにて 477nm の発光を測定した。

【結果・考察】

Fig. 2 に各工程における物質の電気泳動の結果を示した。

1), 還元 IgG の作製

Fig 2 の D において分子量約 $70,000$ のところにバンドが見られた。これは分子量約 $150,000$ の IgG のジスルフィド結合部で切断されて還元 IgG が生成したことが確認できる。

2), マレイミド・ALP の作製

アルカリフォスファターゼにマレイミド基が導入された事を確認する為にマレイミドの定量を行なった結果を Table, 1 に示した。この結果から ALP 一分子当たり約 5 個の EMCS が結合したことが確認できた。

3), 酵素標識抗体の作製

今回作製した ALP 標識抗体を確認する為に SDS-PAGE を行なった。(Fig, 2, E 参照)

Fig, 2 の E には分子量 $669,000$ と $443,000$ の間にバンドが確認された。マレイミド基の定量により ALP 一分子当たり 5.55 個の EMCS が結合したことから、分子量約 $70,000$ の還元 IgG が 5.55 個結合したと考えると ALP 標識抗体に分子量は約 $560,000$ となり Fig, 2 の E のバンドと一致する。

4), 酵素活性測定

Fig. 3 に各酵素量における発光量の時間経過を示した。

各酵素添加量に対する基質の発光量はほぼ一定であった。さらに作製した標識抗体を用いて発光量を測定したところその発光量は native-ALP 発光量の 5%程度の活性しか示さなかった。

今後の課題として、ALP の活性の保持・各工程における収率の改善を検討する必要がある。さらに磁性粒子の感作方法の検討し測定系にて実検体を測定したいと考えている。

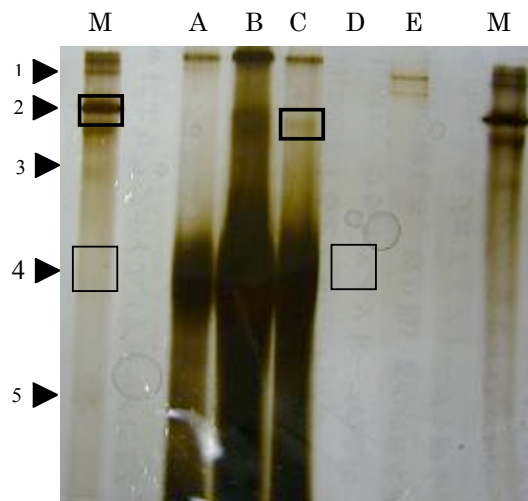


Fig. 2 各工程における SDS-PAGE の結果

M ; 分子量マーカー 1,Thyroglobulin $669,000$. 2, Ferritin $443,000$. 3, Lactate dehydrogenase $139,850$. 4, Albmin $66,267$. 5, Trypsin $20,100$ A; マレイミド ALP, B; ALP, C; IgG, D, 還元 IgG

Table, 1 マレイミド基の定量

ALP 濃度 [mol/ml]	3.33×10^{-8}
EMCS 濃度 [mol/ml]	18.5×10^{-8}

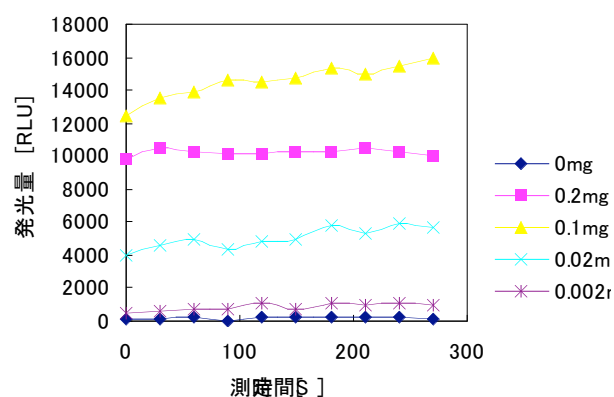


Fig. 3 酵素活性測定

【参考文献】

- 1) 浦山 修 臨床検査学講座 第二版 臨床化学検査学 医歯薬出版(株) 86-94
- 2) 石川 栄治 生物化学実験法 27 酵素標識抗体法 学会出版センター 118-121