

1 序説

酵素は生体内反応の触媒であり、その基本的化学組成はポリペプチドである。酵素は温和な条件下（常温、常圧、中性 pH）、水溶液中で作用する点で、有機化学や無機化学で利用される触媒とは異なっている。酵素は高い基質特異性と反応特異性をもつ。細胞内では、多数の酵素により個々の酵素に特異的な反応が同時並行的かつ継起的に進行させられ、代謝系を形成している。われわれは、ポリペプチドが精巧に折りたたまれて、酵素としての絶妙な機能を発揮するための分子機構を解明しようとしてきた。また、酵素機能の応用を目的として、酵素機能の改良と新機能の開発に努力を傾けている。酵素は、食品工業や医薬品工業など生体物質に関連する領域で広く利用されており、さらに応用性の拡大が期待される。酵素は活性や安定性が低く、値段が高いなどの欠点もある。本講演では、「臨床診断への酵素の利用」における現状とその問題点を紹介し、酵素化学による高感度化と迅速化に対する試みについて報告する。

2 臨床診断と酵素免疫測定法

病気の診断（臨床診断）は、血液、尿、便、喀痰など体外に分泌された「病気に特有の化学物質（病態マーカー, PM）」の定量（臨床分析）により行われる。摘出された細胞表面に現われている物質が利用されることもある。PM は病気の原因や結果として発現される。臨床診断用試薬を体外診断薬とよぶ。現在、体外診断薬市場は 230 億ドルであり、その 50% を米国、10% を日本が占める。また、免疫科学的手法による診断法は 65 億ドルに達する。臨床診断への酵

素利用には、PM を酵素基質として利用し、反応生成物が発する電気化学信号や分光光学信号を測定し、PM（グルコースやコレステロールなど）を定量する方法がある。他方、目的の PM を特異的抗体で捕捉し、この情報を酵素活性に置き換える「酵素免疫測定法(EIA)」がある。血液中の PM は血中濃度と分子量から 4 つに分類される。血中濃度が nM - mM レベルで分子量 1 万以下 (I 群；尿酸、コレステロールなど) および 1 万以上 (II 群；C 反応性タンパク質、IgG、IgM など)、血中濃度が nM - pM レベルで分子量 1 万以下 (III 群；C ペプチド、ACTH、甲状腺ホルモンなど)、1 万以上 (IV 群；成長ホルモン、ガン胎児性抗原など) である。免疫測定法の対象になるのは II ないし IV 群である。II 群には直接的免疫測定法（比濁法）、III 群には競合型免疫測定法、IV 群にはサンドイッチ型免疫測定法が主として用いられている。われわれは、IV 群のペプチドホルモンやガンマーカーの測定を対象にサンドイッチ法の応用と改良を研究してきた。目的の PM を抗原 (Ag) として調製した抗体 (Ab₁) を固相に固定化し、これに血液試料を加え、試料中の Ag を固相に補足する。不要成分を洗浄除去したのち、酵素標識抗体 (Ab₂) を加えて、固相上で抗原が Ab₁ と Ab₂ とで挟まれたサンドイッチ複合体を形成させる。このとき、固相上に補足された Ag 分子数と酵素活性が比例することから、酵素活性から補足された Ag が定量できる。われわれは、サンドイッチ EIA の開発に際し、次の目標値を設定した：試料量、0.1 mL；分析時間、1 時間以内（酵素反応 1-2 分間）；検出感度、attomole 以下。免疫測定法の研究開発は、Berson と Yalow が放射性同位元素 (RI) を標識として用いた方

法 RIA (1958) が端緒である。その後、酵素標識法が開発されたが、Yalow は自らのノーベル賞受賞講演 (1977) で「EIA は RIA に勝ることはない」と述べた。われわれは、酵素は RI より高感度かつ安全であり、EIA は RIA に勝るとの考えで EIA 全自動装置の開発を開始した (1985)。今日では、ほとんどの体外診断薬は EIA で行われている。今後は、リアルタイム分析すなわち真の意味での臨床分析が期待される。

3 EIA の高感度化と迅速化のための方策

サンドイッチ法では、高感度化と迅速化は同義語であり、これは固相に補足された酵素活性の増強により達成される。検討すべき点として、a. 抗体作成 (高親和性、高 Ag 特異性、高生産性) ; b. 抗体固相化 (固相での配向性、密度、吸着性制御) ; c. 抗体の酵素標識 (抗体 - 酵素間架橋の選択性) ; d. 酵素反応 (酵素と基質の選択、反応条件の最適化、生成物検出法) などがある。本講演では b, c, d に関して検討した。

A. IgM 抗体の断片化による抗原特異性向上
ガンの PM (大腸ガンの CA199 や乳ガンの CA549 など) には糖鎖を含むものが多い。糖鎖に対して調製された mAb は全て IgM であり、IgG に比べ分子量 (100 万) が数倍大きく、溶解度も低いため取扱いが困難である。IgM を Ab₁ として用いると、Ab₂ が IgM の Fc 領域に非特異的に吸着し、高い偽陽性を示す。ペプシン消化による IgM の断片化を試みたところ、分子量 15 万の IgG 様断片 F(ab')_{2μ} が得られた。本断片を Ab₁ として用いた EIA では、Ab₂ の非特異的吸着は完全に消失し、測定精度が改善した [1]。

B. 二特異性抗体の調製と EIA の高感度化

われわれは標識用酵素としてウシアルカリホスファターゼ (ALP) を選び、グルタルアルデヒド (GA) で Ab₂ と架橋している。酵素標識抗体の ALP 活性は通常 2-3% に低下し、抗体力価も低減している。この問題を解決するために、Ab₂ の 2 個の Ag 結合部位の一方で PM を結合し、他方で ALP を結合する二特異性抗体 (bsAb) を開発し

た。PM を認識する F(ab')_{2μ} 型抗体 M と ALP を認識する抗体 E を調製し、H - L 鎖間 S-S 結合を保持したまま H 鎖間 S-S 結合を還元的に開裂する条件を見出した。半身 (Fab'_μ) となった M と E を混合後、SH 基を再酸化し、ALP と PM を同時に結合する bsAb を調製した。bsAb の利用により、EIA 感度は 30-50 倍増強した [2]。

C. 標識酵素の重合化による EIA の高感度化

ALP を GA で架橋することにより、三量体 ALP (ALP₃) を調製した。この活性は通常の ALP の 3 倍であり、これを上記の bsAb に対して適用することにより、EIA 感度は 3 倍増強した [3]。

4 結論

IgM 抗体の断片化による非特異的吸着の低減、bsAb による酵素標識抗体の調製の簡便化、酵素重合化による標識酵素の活性増強を紹介した。これらの工夫により、感度は 100 倍増強し、測定時間は 100 分の 1 に短縮された。今後は酵素の安定化、酵素活性のさらなる増強、生成物検出法の高感度化などが求められる。

5 参考文献

- 1) K. Inouye and K. Morimoto, Preparation of F(ab')_{2μ} fragments of rat monoclonal antibodies (IgM) and application of the fragments to the enzyme immunoassay of mouse interleukin-6. *J. Immunol. Methods* **171** (1994) 239-244.
- 2) K. Morimoto and K. Inouye, Method for the preparation of bispecific F(ab')_{2μ} fragments from mouse monoclonal antibodies of the immunoglobulin M class and characterization of the fragments. *J. Immunol. Methods* **224** (1999) 43-45.
- 3) K. Morimoto and K. Inouye, A sensitive enzyme immunoassay of human thyroid-stimulating hormone (TSH) using bispecific F(ab')_{2μ} fragments recognizing polymerized alkaline phosphatase and TSH. *J. Immunol. Methods* **205** (1997) 81-90.

