

迅速簡便な T S H の新しい酵素免疫法

藤村有信¹ 土平一義¹ 川村正彦²

(¹名古屋市衛生研究所 ²名城病院)

研究目的

現在実施されている T S H の酵素免疫法のマス・スクリーニング法は反応時間、操作時間、労力、測定時間、コストなどの面で改善すべき点が残されている。我々はこれらの諸点を解決する方法として、マイクロプレート方式が非常に有利と考えたが、マイクロプレート容器による固相化は抗原抗体結合物がはがれやすい難点があるため、我々は第一の方法として、抗原や抗体蛋白を結合するニトロセルロース膜やゼータプローブ膜を利用して第 2 抗体を結合させ、第一抗体との反応後、酵素 T S H と試料を拮抗させて、洗滌後基質と反応させる方法を開発した。第二の方法は蛋白非吸着のメンブレンタイターを利用して、反応とビーズやガラス微粒子抗体との結合物の洗滌を膜上で同時に短時間に処理し、マイクロプレート用迅速蛍光光度計を用いて、わずか 1～2 分で 96 件を測定出来る新しいシステム開発した。

方法と原理

1. 蛍光光度計：コロナ電気マイクロプレート方式 M T P - F 1 2 とタイターテック社のフルオロスキャン及びコロナ電気試作の迅速試験管キュベット連続移動方式の前段階の超微量蛍光光度計 F P M - 1 1 (硫酸キニーネ、ウンベリフェロンで $10^{-12} \sim 10^{-14}$ M の最大測定感度)。
2. 固相法：蛋白結合能の高いニトロセルロース膜やゼータプローブ膜のマイクロタイター (ミリポア社の H A タイター) かバイオラド社の膜シートミリタイター装置を利用した。
3. 膜に結合させる対象：① T S H 抗原 ② 抗 T S H 抗体 (第一抗体) ③ 第二抗体の三種類。
4. 抗原-抗体反応の操作法のタイプ：① H A トレー、ニトロセルロース膜、ゼータプローブ膜のマイクロプレート方式、② 膜ディスクを使うディスク法 ③ 従来の試験管やマイクロプレート容器に第一抗体や第二抗体をコートする方法があるが、ここでは抗原-抗体結合物の離脱の少ない最初の①と②について行った。そして①②方式共に 4 つの方法がある。① T S H 抗原を膜に直接結合させ、膜上の非特異的結合部位を 4～10% B S A によってブロックし、酵素標識抗体と反応させ、洗滌後基質を添加し、反応液をそのままかあるいは別のマイクロプレ

ートの各ウェルに転送する直接法。⑫第一抗体を膜に結合させ、ブロック後試料を反応させ、以下①と同様の操作をする間接法。⑬上の⑫の方法のブロック後に試料TSHと酵素TSHを入れて拮抗させ、基質を反応させる方法。⑭第二抗体を膜に結合させ、ブロック後に第一抗体と試料TSHさらに酵素TSHで拮抗させるか酵素標識第一抗体を反応させ、以下上記と同様にする方法があり、また⑮の変法としてディスク法を使えば、辻、成瀬らの方法のビーズ抗体の代わりに膜ディスク抗体を使い、第二抗体を結合させておいて、以下⑬の方法と同様に操作する。この方法はビーズ法より、反応液の少量化とビーズの移行が不要であり、また洗滌液が残らないで省力化となる。もう一つの全く新しい方法は蛋白非吸着マイクロタイターメンブレン、ミリポア社のGVタイターを利用して、膜上で酵素標識第一抗体と試料TSHとガラス微粒子結合第一抗体(異種)との結合物を洗滌し、そのまま基質を加えて反応する方法である。

結果と考察

1. 膜固相法の利点：①非標識第一抗体を直接法では略くことも可能である。②反応時間の短縮化。③操作時間の短縮化。④同時に数100件の反応と洗滌が短時間に出来る。⑤試薬量の少量化により節約が可能。⑥洗滌液が残らない利点をもつ。⑦反応液の別のマイクロプレートへの転移捕集が数100件同時に、短時間の内に容易に出来る。

2. 新しい蛍光測定の利点：①96件の測定に1~2分の迅速性の測定である。②マイクロプレート方式で最少感度 $10^{-7} \sim 10^{-8}$ M, 試験管キュベット式装置では $10^{-12} \sim 10^{-14}$ Mという超微量測定が可能である。

3. ブロッキングの条件：固相膜に第一抗体を結合させ、その他の非結合部位を1~10% BSA-PBSや0.1% Tween 20-PBSでブロッキングし、酵素標識抗体を反応させ、洗滌後基質を反応させて、ブロッキングの程度を調べた。その結果10%と7.5% BSA-PBSが最も結果があった。

4. 方法：①, ⑫, ⑬の検量線が今一つ良好でない最大の理由は市販のTSH抗体(第一抗体)の中に、1% BSAがすべて安定化のために含まれていて、これが膜に優先的に結合し、微量の第一抗体が吸着出来ないためであった。

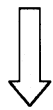
5. 山羊第二抗体の固相膜最適量の検討：BSAを含まないものとしてはカッペル社の山羊第二抗体があったので、これを用いて膜への結合量の最適条件を検討した。HAタイター(φ6 mm)には原液活性抗体 1 mg/ml の $1/200$ 稀釈液(0.01 MPB, pH 7.5-0.5M NaClを含む)50 μ lが最適であった。Bio Radの膜(φ2 mm)は $1/300$ 稀釈液, 50 μ lが最適

で、前者の膜には10% BSA-PBSによりブロックされているが、後者の膜ではブロックの必要がない有利さがある。これは膜の大きさが後者の方が小さく適量となっているため。

6. 検量線の比較：辻、成瀬法と比較するとHAタイターを用いて、ブロック処理した場合にはB/Boは同一TSH濃度で、辻、成瀬法と匹敵する良い検量線が得られた。ブロックしないと良い検量線が得られなかった。最も良いのはBio Rad社膜 $\phi 2\text{mm}$ の固相法で血液濾紙TSH $10\ \mu\text{U}/\text{ml}$ でB/Boが50%と低く、cut off 値の設定がしやすい。またCVも1~10%と低く、マス・スクリーニングに適している。しかしこの場合超微量蛍光測定装置が必要となり、現在試作の段階である。もう一つの新しい方法である蛋白非吸着膜のGVタイターを利用する方法は従来法より0と $10\ \mu\text{U}/\text{ml}$ の差が大きく、非常に良い検量線を得た。そして、CVも3~10%前後で、マス・スクリーニングに適する。この場合にはマイクロプレート用蛍光光度計が使用出来て、大変便利である。

文 献

- 1) Kato, N. et al. Anal. Letters, 13, 1555 (1980)
- 2) Miai, K. et al. Clin. Chem., 27, 1421 (1981)



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



研究目的

現在実施されている TSH の酵素免疫法のマス・スクリーニング法は反応時間, 操作時間, 労力, 測定時間, コストなどの面で改善すべき点が残されている。我々はこれらの諸点を解決する方法として, マイクロプレート方式が非常に有利と考えたが, マイクロプレート容器による固相化は抗原抗体結合物がはがれやすい難点があるため, 我々は第一の方法として, 抗原や抗体蛋白を結合するニトロセルロース膜やゼータプローブ膜を利用して第 2 抗体を結合させ, 第一抗体との反応後, 酵素 TSH と試料を拮抗させて, 洗條後基質と反応させる方法を開発した。第二の方法は蛋白非吸着のメンブレンタイターを利用して, 反応とビーズやガラス微粒子抗体との結合物の洗條を膜上で同時に短時間に処理し, マイクロプレート用迅速蛍光光度計を用いて, わづか 1~2 分で 96 件を測定出来る新しいシステム開発した。