

サイロキシシン(T_4)及び17-ヒドロキシプロゲステロン(17-OHP)の高感度ELISAの開発

辻 章夫, 前田昌子
(昭和大・薬学部)

序 論

先天性代謝異常症(クレチン症や副腎皮質過形成症)のマスキングにはラジオイムノアッセイ(RIA)を用いる方法が一般的であり、実用化されているが、高価な機器を必要とし、試薬には放射性物質を用いるため、その管理及び廃棄に問題が多い。RIAに代るものとして酵素免疫測定法(EIA)が開発され、実用化されつつあるが、乾燥濾紙血液ディスク(3mm ϕ)1枚を用いて測定する方法は酵素活性の測定に蛍光及び化学発光法を用いる方法が知られているのみである。^{1)~2)} マスキングにおいては多数の検体を処理するため、より簡便な方法が望ましい。そこで高感度で簡易かつ一度に多数検体を分析する方法としてマイクロタイタープレートを用いる T_4 及び17-OHPのELISAを開発した。

方 法

マイクロタイタープレートへの精製抗家兎IgGを固相化する方法と、アッセイ法をChart 1, 2に示した。

結 果

Fig 1及び2に T_4 及び17-OHPの検量線を示す。検量域は T_4 では5~1000 pg/disc, 17-OHPでは2.5~500 pg/discでこれらの測定範囲は蛍光法及び化学発光法と同じ測定域である。精度は T_4 で2.7~13.1%($n=6$), 17-OHPで3.7~10.5%($n=6$)であった。ルーチンに測定する場合は各ウエルに25~250 pg/discの範囲の標準ディスクをプレートの上下段におき、発色させ、検体と比較すると、1枚のプレートで約60検体の測定が可能である。ルーチンの検量域でのwithin, between assayのCV%をTable 1に示す。

T_4 について同一検体についてコーニング社のImmophase RIA(キット)と本ELISA法で比較した結果をFig 3に示す。 $n=62$ で相関係数 $r=0.90$, $y(\text{RIA})=0.99x(\text{ELISA})+9.9$ でよい相関を示した。17-OHPについては、昭和大学病院未熟児センターの検体について定量した結果をTable 2に示す。何れも高値(50 pg/disc以上)を示している。未熟児検体には 17α -ヒドロキシプレグネノロンサルフェートが多量に存在するといわれている。本ELISAに用いた抗17-OHP抗体は 17α -ヒドロキシプレグネノロンサルフェートに交差反応性を示すためと思われ、現在、更に特異性の高い抗体について検索中である。

結 論

マイクロタイタープレートを用いたELISAはコンパクトで1枚のプレートで最大60検体の測定が行え、しかも比色法なので視覚的ともある程度スクリーニングでき、全過程を通し、試験管等の副容器を必要とせず、操作性、経済性に優れたEIAでマスキングに適していると思われる。

文 献

1. Hidetoshi Arakawa, Masako Maeda and Akio Tsuji, Chem. pharm. Bull, 30 3036 (1982)
2. Hidetoshi Arakawa, Masako Maeda and Akio Tsuji, Chem. pharm. Bull, 31 2724 (1983)

PREPARATION OF DOUBLE ANTIBODY COATED PLATE

1. Affinity Purified Anti-Rabbit IgG (Goat)
20 µg/ml Na-Carbonate Buffer, pH 9.7 200 µl/well
 2. Standing at 4°C, Overnight
 3. Post Coating with 1% BSA 300 µl/well
Over 2 hrs at Room Temperature
and Stock at 4°C
 4. Washing with Assay Buffer (PBS-T)* 300 µl x 3
 5. Drying by Tapping on Paper Towel
(Do 4 and 5 before Use)
- * 0.01M PBS, pH 7.4 - 0.05% Tween 20

ASSAY PROCEDURE FOR THYROXINE(T₄) AND 17α-HYDROXYPROGESTERONE(17-OHP)

1. Dried Blood Spot Disc (3 mm φ, Standard or Sample Disc) one
2. Assay Buffer (Barbital Buffer for T₄, PBS Buffer for 17-OHP) 100 µl
3. Anti-T₄ Serum (x 30000) or Anti-17-OHP Serum (x 6 - 80000) 50 µl
4. T₄ - HRP (x 500) or 17-OHP - HRP (x 3000) 50 µl
5. Immune Reaction, 4°C Overnight
6. Washing with PBS - T 3 x 300 µl
7. Dry by Tapping on Paper Towel
8. ABTS - H₂O₂ (2.5 mM - 10 mM/40 mM Citrate Buffer, pH 4.0) 100 µl
9. Standing at Room Temperature (Over 2 hrs)
10. Stop Enzyme Reaction with 5% NaN₃ Solution 50 µl
11. Colorimetry, 405 nm (Titertek, Uniskan)

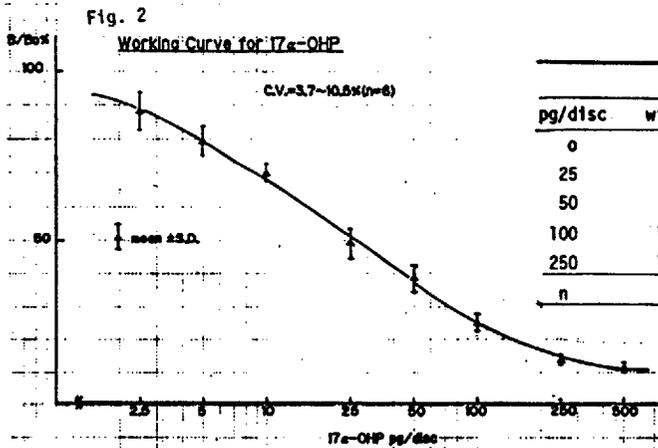
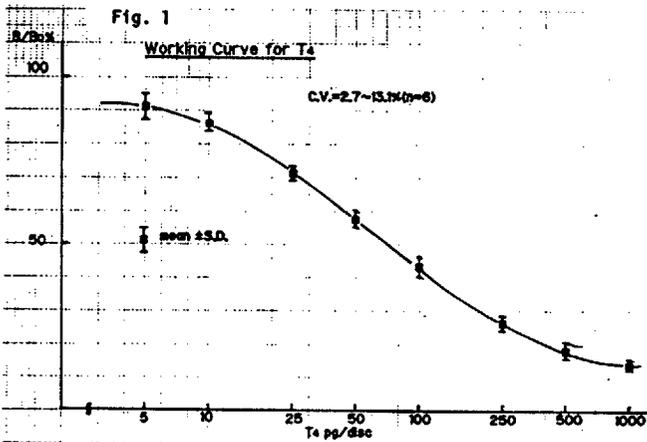


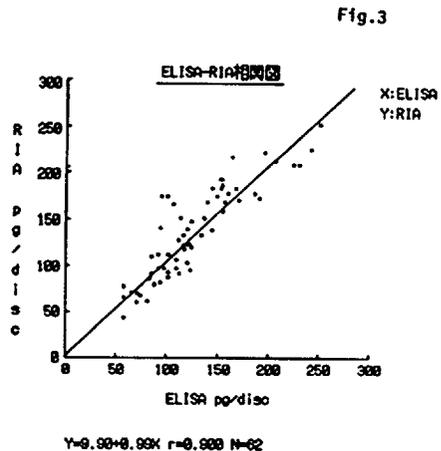
Table 1

pg/disc	17-OHP		T_4	
	within	between	within	between
0	6.5	-	6.9	-
25	5.9	10.0	4.2	5.9
50	8.0	9.4	2.4	10.8
100	10.7	16.7	3.8	13.5
250	13.7	17.6	9.0	17.5
n	7	6	4	9

Table 2 17α -OHP DATA

SAMPLE NUMBER	17α -OHP pg/disc	SAMPLE NUMBER	17α -OHP pg/disc	SAMPLE NUMBER	17α -OHP pg/disc
1-1	142	1-13	97	2-10	76
1-2	109	1-14	81-	2-11	97
1-3	81-	1-15	75	2-12	220
1-4	159	2-1	112	2-13	81-
1-5	81-	2-2	180	2-14	162
1-6	81-	2-3	67	2-15	123
1-7	84	2-4	135	2-16	119
1-8	115	2-5	81-	2-17	180
1-9	185	2-6	81-	2-18	83
1-10	81-	2-7	81-	2-19	103
1-11	109	2-8	81-	2-20	101
1-12	81-	2-9	81-		

81- = 220pg/disc ELISA





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



結論

マイクロタイタープレートを用いたELISAはコンパクトで1枚のプレートで最大60検体の測定が行え、しかも比色法なので視覚的ともある程度スクリーニングでき、全過程を通し、試験管等の副容器を必要とせず、操作性、経済性に優れたEIAでマススクリーニングに適していると思われる。