

酵素結合免疫吸着測定法

1 はじめに

抗体の抗原に対する特異的な認識を利用した分析法は、免疫測定（イムノアッセイ）法として実用化されている。感度に優れ、選択性が非常に高い手法である。イムノアッセイは大きく分けて、直接法と間接法に分類される。直接法では、一般的に、96 ウェルプレート上などに抗原を固定化し、その抗原を特異的に認識する抗体（一次抗体）を導入する。この時、抗原抗体反応をモニタリングするために、一次抗体に ^{125}I のような放射性同位元素や蛍光色素をラベル化し、放射能や蛍光強度を測定することにより、抗原の検出を行う（それぞれ、ラジオイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイと呼ばれる）。これ以外にも、酵素が修飾された一次抗体を利用した酵素結合免疫吸着測定法（enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA）もしばしば用いられる。また、間接法では一般的に、直接法で用いられる標識化一次抗体の代わりに、未修飾の一次抗体を用い、その一次抗体を特異的に認識する標識化抗体（二次抗体）を導入し、蛍光強度等の測定を行う。

ここでは、抗体の特徴やその作製方法について簡単に紹介する。また、ELISA 法において、頻繁に用いられる西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）に組み合わせられる発色試薬について簡単に紹介する。

2 抗体の特徴

生体内で産出される抗体は、免疫グロブリン（Ig）と呼ばれる Y 字型のユニットを持つタンパク質である。Ig の模式図を図 1 に示す。Ig をタンパク分解酵素の一種であるパパインで処理すると、二つの Fab（fragment

antigen binding）部位と一つの Fc（fragment crystallizable）部位に分かれる。Fab 部位は抗原に結合し、Fc 部位は抗体間のアミノ酸配列が類似しているため結晶化しやすい。可変領域のアミノ酸配列が抗原に対して特異的な配列をとることによって、抗原を認識する。Ig のポリペプチド鎖は 2 本の軽鎖と重鎖に分けられる。重鎖の種類や Y 字型ユニット数の違いによって Ig はクラス分けされており、G（IgG）、M（IgM）、A（IgA）、D（IgD）、E（IgE）、Y（IgY、鳥類が卵黄中に生産する）のクラスが存在する。分子量は IgG で 150 kDa 程度である。生体内では、B 細胞が抗体を生産する。ウイルス、細菌、高分子などの巨大な抗原では、抗体はその一部の表面構造（エピトープ、抗原決定基とも呼ばれる）を認識する。

3 ポリクロナール抗体およびモノクロナール抗体

3・1 ポリクロナール抗体

マウス、ウサギ、ヤギ、アルパカなどの免疫動物に、定期的に抗原を注射し、体内で免疫応答を起こす。数か月後に血液を採取し、抗体を捕集する。この血液中には、様々なエピトープを認識する抗体が含まれており、このある種の混合物はポリクロナール抗体と呼ばれる。ポリクロナール抗体の作製コストは比較的低いので、比較的安価で購入できる。また、抗体に酵素等を化学結合させ標識化する場合、標識化によって抗原に対する結合力の変化が小さい。一方で、複数のエピトープを認識するので、類似の構造を持つ抗原に対する交差反応性が高い場合（選択性の低減）があり、また、抗体作製ごとの抗体の特性にばらつき（バッチ間変動）がある。

3・2 モノクロナール抗体

抗原を定期的に注入した免疫動物の脾臓やリンパ節から B 細胞を取り出し、これをミエローマ細胞と融合させ、不死化した融合細胞であるハイブリドーマを作製する。このハイブリドーマから作製される抗体をスクリーニングし、抗原に対し高い認識能を示す抗体を作り出すハイブリドーマを選び出す。このようにして、同一のハイブリドーマから算出される、同一のエピトープを認識する抗体はモノクロナール抗体と呼ばれる。作製コストが高く、標識化によって抗原への結合能が変化する場合がある一方で、バッチ間再現性が高く、交差反応性が低い場合が多い。

市販の抗体には、IgA などのクラス、ウサギなどの免疫動物、ポリ（モノ）クロナールなどの情報が記載され

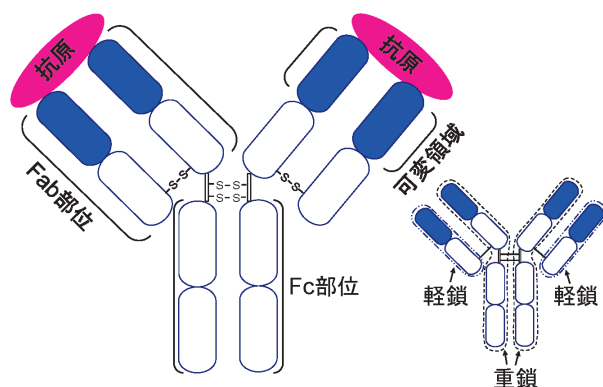


図1 免疫グロブリン（Ig）の模式図

ている。

4 ELISA

ELISA 法では、抗体に酵素（特に HRP やアルカリフォスファターゼ（ALP）がしばしば用いられる）を N-ヒドロキシスクシンイミド法などによって化学修飾し、酵素と反応する基質を導入し、結果として得られる吸光度、蛍光強度や電気化学応答変化から抗原の濃度を定量する。酵素反応であるので、これらの応答は時間とともに増加するが、通常 15～30 分程度反応させる。

5 HRP による発色反応

HRP は分子量 40 kDa 程度の酵素であり、その活性中心はヘムである。ヘムと過酸化水素が反応することによって酸化力の高い複合体が生成する（酸化電位は 1 V 程度¹⁾）。HRP の基質は過酸化水素であるが、複合体形成そのものを直接測定することはできないので、過酸化水素と発色試薬を同時に導入する。すると、HRP-過酸化水素複合体によって発色試薬が酸化されることにより呈色を示すので、その吸光度変化を測定することによって抗原の定量が可能である。

HRP を使った ELISA に一般的に用いられている発色試薬は 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) と α -phenylenediamine (OPD) である。可視部に光吸収を持たない TMB と OPD は、HRP と過酸化水素の複合体によって酸化され（図 2）、それぞれの生成物は 650 nm、450 nm 程度に吸収極大を持つ。酵素反応を完全に停止させるために硫酸を加えると、吸収極大は、450 nm と 490 nm にそれぞれシフトする。これらの試薬は空气中で酸化されやすいので、冷暗所に保存する。

HRP-過酸化水素複合体の酸化電位は 1 V 程度と比較的高いので、1 V より低い電位で酸化され、発色する試薬は ELISA に適用できると考えられる。例えば、筆者らは、最近、ドーパミンの酸化重合に着目し（ドーパミンは電気化学的に 0.6 V 程度で酸化され、重合が始ま

る）、HRP と過酸化水素の複合体で生成する黒色のポリドーパミンによる吸光度変化を ELISA に組み込んだ²⁾（図 2）。この場合の吸光度変化は OPD を用いた場合のものよりも低かったが、ポリアニリンの可視光領域でのブロードな光吸収は、検出波長を選択できるので色づいた夾雑物の影響を低減できることが示唆された。

6 おわりに

抗体の特徴や、その抗原に対する特異的な認識能を利用したイムノアッセイ法のうち、HRP を用いる ELISA 法について簡単に紹介した。HRP 以外にも、過酸化水素を基質とする酵素は ELISA 法に適応できる。また、HRP 酵素の活性中心だけを取り出し、これを抗体に修飾して ELISA を行うことも可能である。最近、ナノザイムと呼ばれる、過酸化水素の酸化反応を触媒するナノ粒子を抗体等に修飾してイムノアッセイを行う方法も提案されている³⁾。

ELISA で用いられる発色試薬は、TMB や OPD のように、なるべく反応しやすく（TMB⁴⁾や OPD⁵⁾は電気化学的に 0.2 V 程度で酸化される）、生成物のモル吸光係数が高いものが用いられる。反応性が高いので、熱や光で反応が進み、高いバックグラウンド応答の原因にもなる。ドーパミンの重合は、モノマーの酸化（0.6 V 程度の酸化電位）によって開始されるが、TMB や OPD の酸化電位よりも高く、比較的安定である。HRP-過酸化水素複合体の酸化電位はかなり高いので、より高い電位で酸化する発色試薬はバックグラウンドの低減につながるので ELISA にとって魅力的であり、このような試薬の探索が望まれる。

文 献

- 1) N. C. Boaz, S. R. Bell, J. T. Groves : *J. Am. Chem. Soc.*, **137**, 2875 (2015).
- 2) S. Yadoung, S. Shimizu, S. Hongsibsong, K. Nakano, R. Ishimatsu : *Heliyon*, **9**, e21722 (2023).
- 3) I. M. Khoris, T. Kenta, A. B. Ganganboina, E. Y. Park : *Biosens. Bioelectron.*, **215**, 114602 (2022).
- 4) J. J. Ezenarro, N. Párraga-Niño, M. Sabrià, F. Javier Del Campo, F.-X. Muñoz-Pascual, J. Mas, N. Uriá : *Biosensors*, **1**, 102 (2020).
- 5) 山口孝浩, 小村照寿, 高橋光信 : 電気化学, **64**, 836 (1996).

〔福井大学工学部 石松 亮一〕

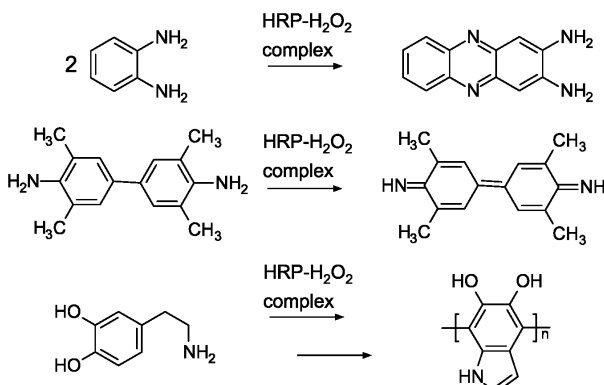


図 2 HRP-過酸化水素複合体の酸化能を利用した発色反応
上から OPD の 2 量体化、TMB の酸化、ドーパミンの重合反応