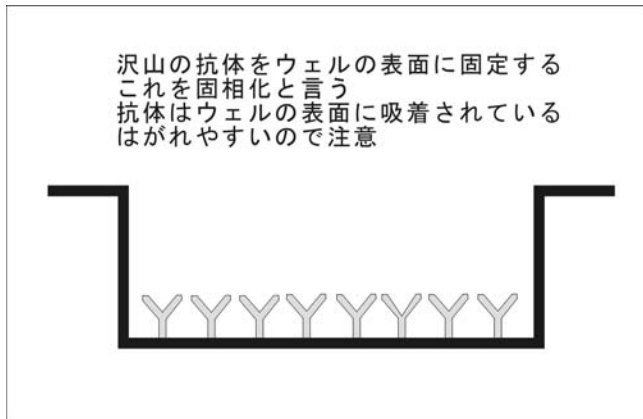


I. ELISA 入門

ELISA では抗体をどう利用するのか？

ELISA では通常 96 のウェルを持つマイクロプレートを使います。

まず、抗体をウェルの表面に吸着させて置きます（コーティング、**coating** とか固相化とも言います）。この抗体はキャプチャー抗体と言われ、測定対象物質である抗原を捉えるために使われます。抗体は大雑把に言って Y 字形をしていると考えられ、Y の先端の部分に抗原を認識し、結合する可変領域があり、抗体がウェルの底面に吸着するのは吸着しやすい柄の部分



(Fc) です。ウェルの材料はポリスチレンが主体で、もともとタンパク質を吸着し易いのですが、構造を色々考えて特に吸着しやすい素材になっています。これに抗体の溶液を加えると自動的に吸着が起きます。出来るだけ多くの抗体を吸着させることによってごく少量の

抗原でも捉えることが出来るようになります。

では、キャプチャー抗体をどのように使うのでしょうか。

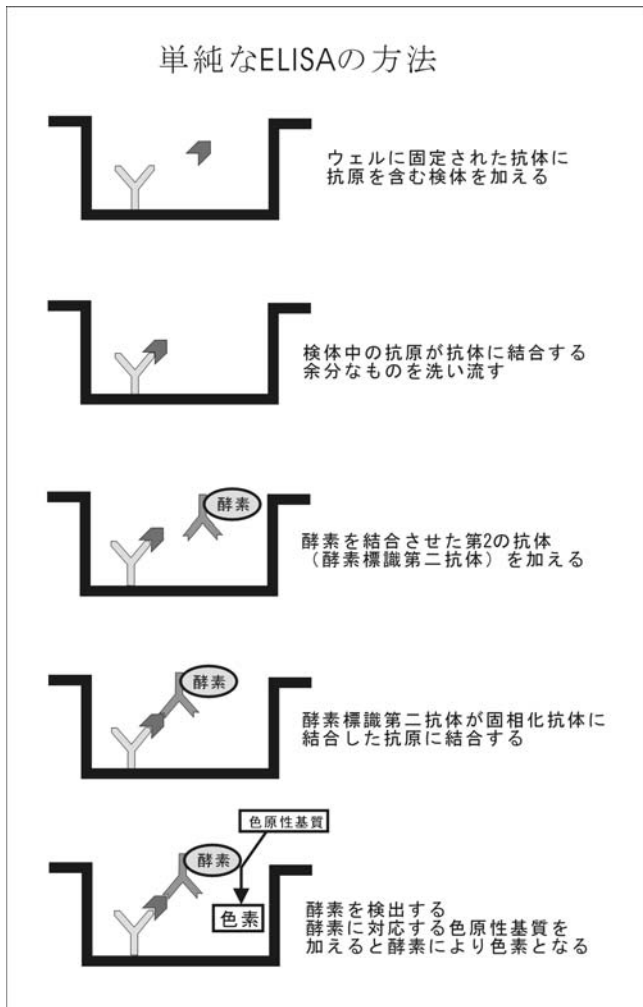
次のページの模式図で使って説明しましょう。

ここでは画面の都合上、抗体が 1 個しか付いていないように描かれていますが、実際は数多くの抗体が吸着されているのです。ウェルに固相化された抗体に抗原を含む溶液（標準液、または検体、測定試料）を加え、抗体に抗原が結合するまでの時間、通常は 1-2 時間、放置します。結合が終わったら、余分な液を捨て、ウェルを洗います。こうすると固相化抗体に結合した抗原だけがウェルに残ります。

次に、抗原のキャプチャー抗体が認識する場所（エピトープ）とは異なるエピトープを認識する抗体（第二抗体とか二次抗体と言う）を加えて、しばらく放置します。この第二抗体にはあらかじめ化学的に酵素を結合させてあります。

加えられた酵素標識第二抗体はキャプチャー抗体に結合した抗原を認識し、それに結合します。その後余分な酵素標識第二抗体を洗い流します。

次に、酵素の色原性基質の溶液を加え、酵素反応を行わせると、色原性基質は酵素の作用を受けて色素に変わります。



そこで反応停止液を加え酵素反応を止めてから、色素の呈色を 96 ウェルマイクロプレート用の比色計で測定します。こうしてキャプチャー抗体に結合した抗原の量が色素として測定できることになるのです。比色定量の結果は、吸光度（アブソーバンス、absorbance）として表現されるので、標準品の測定結果から横軸に抗原濃度、縦軸に吸光度をとることによって検量線が描かれ、測定試料の吸光度から試料中の抗原量が計算出来る訳です。図に示した ELISA の実施方法は、もともと単純な方法です。酵素の分子量はかなり大きいので、この方法の場合、抗体に酵素を標識すると抗体の結合能に立体障害などが生じる可能性があります。また 1 分子の抗体に多

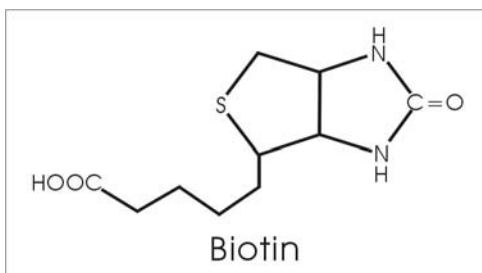
くの酵素を結合させることは困難です。

そこで別なタンパクに酵素を結合させて抗体に対する立体障害を少なくする方法が考えられました。図のように、第二抗体はビオチンで標識します。ビオチンは分子量が非常に小さい物質です。



物質です。

ビオチンとはもともと生体に存在する生理活性物質ですが、これと非常に強い親和力で結合するタンパク質が卵白の中に含まれていてアビジンと呼ばれています。このアビジン



に酵素を結合させ、抗原と結合したビオチン標識第二抗体と反応させれば、立体障害を克服できます。またアビジンに結合させる酵素を増やすことにより増幅効果も期待できるのです。ELISA ではこのような改善方法も用いられています。

ELISA は、抗体-抗原-抗体の形になるので、サンドイッチ法とも呼ばれています。つまり抗体がパンで抗原をハムと考えるわけです。

シバヤギキットで使用している酵素と色原性基質

シバヤギのキットでは通常ペルオキシダーゼと言う過酸化水素を分解する酵素を使用しています。ペルオキシダーゼにはいくつかありますが、ここでは HRP と呼ばれる西洋わさび(Horseradish)由来のペルオキシダーゼです。その主な性質を次の表に要約しておきます。

ペルオキシダーゼ(Hydrogen peroxidase, Horseradish peroxidase, HRP)	
反応	色原性基質 + H ₂ O ₂ ⇌ 酸化型色素 + 2H ₂ O
起源	西洋わさび(Horseradish)
分子量、至適 pH	40,000、pH 6.5
基質特異性	色原性基質(水素供与体)については特異性はない。過酸化物としては H ₂ O ₂ 、CH ₃ OOH、C ₂ H ₅ OOH のみ
阻害剤と活性化剤	阻害剤: CN ⁻ 、S ²⁻ 、F ⁻ 、N ₃ ⁻ (抗凝固剤として用いられるフッ素イオンと保存料として用いられる NaN ₃ に注意!)
安定性	乾燥、冷蔵状態で数年間、水溶液で冷蔵 1 年間安定

ここでひとつご注意願いたいのは、検体に存在する可能性のある阻害剤です。ペルオキシダーゼの阻害剤は、表にあるように CN⁻、S²⁻、F⁻、N₃⁻ でなどです。特に血液試料を採取するときに採血管がフッ素や NaN₃ でコーティングされているものを使用することがあります。

ELISA では検体を抗体と反応させた後で洗浄するので、阻害剤が決定的な酵素活性抑制を起すほどではありませんが、洗浄後僅かに残存しているものが酵素をいくらかでも抑制すれば、発色の低下となって現れる可能性があります。これらの採血管は使用しないことが望ましいのは言うまでもないことです。抗凝固剤としては一応ヘパリンをお勧めしますが、キットによってはヘパリンが測定系に影響を与えることもあり、そのような場合には取扱説明書に明記されているので、その指示に従い、例えば EDTA-2Na やクエン酸ナトリウムを使用するか、何も加えず血清として測定するべきです。

シバヤギキットで HRP の色原性基質として使用されているのは、TMB と呼ばれる、3,3',5,5'-テトラメチルベンチジン(3,3',5,5'-Tetramethyl benzidine)です。

前表にあるように、HRP によって過酸化水素が分解され、生じた活性酸素が TMB を酸化します。この結果できた青紫の色素は反応を停止するために加えられる硫酸酸性下では黄色になり、450nm に吸収を持つようになります。

最後のステップー吸光度の測定

そこで吸光度を測るには、TMB 由来色素の吸収波長の 450nm での吸収を測定します。

ウェルの均一性や、キズなどの影響をキャンセルするために、副波長として 620nm の吸光度も求め、450nm の吸光度との差を真の吸光度として扱います。

吸光度とは、比色定量の基盤となる光の透過と溶液中の物質濃度との関係を示すランベルトとベールの法則(Lambert-Beer's law)によって決められる数値でのことです。

$$\text{吸光度} = \log_{10}(I_0/I) = \epsilon l c$$

I_0 : 入射光、 I : 透過光、 ϵ : モル吸光係数、 l : 吸収層(cm)、 c : 濃度(M)

つまり、入射光に対する透過光の割合、即ち透過率の逆数の対数が吸光度(absorbance)です。

例えば光が 10%しか透過しないときには、吸光度は $100/10 = 10$ 、 $\log_{10} = 1$ となります。

50%の透過率では、 $100/50 = 2$ 、 $\log_{10} = 0.301$ となります。

ランベルトとベールの法則では、この吸光度が溶解している物質特有のモル吸光係数と光の通路(光路)の長さ即ち吸収層、及び物質のモル濃度の積となることを示しています。従って特定の物質を同じ長さの吸収層で測定すれば、吸光度はその物質の濃度に比例する、ということになります。ELISA での物質(色素)の濃度は抗体に結合した抗原の量に比例した酵素の作用の結果ですから、前に述べましたように、横軸に標準品濃度、縦軸に吸光度を採って検量線とすることが出来るのです。

序論ーイムノアッセイについてーで述べましたように、ELISA の場合縦軸、横軸のスケールのとり方によって検量線の形は大きく変わります。コンピュータ計算をする場合はどのとり方でもあまり違いはないのですが、回帰曲線のフィットネス、つまり回帰曲線が各標準点をどれだけ近く通るかは、回帰曲線が直線に近い緩やかなカーブとして得られるほうが良好です。ELISA の場合には縦、横共に対数変換を行う事をお勧めします、つまり両対数方眼紙を使う訳です。

以上でざっと ELISA についての大筋を記しましたが、施行上の手技については次項「ELISA の実技」を参照して下さい。また更に ELISA についての詳細は、別項「もっと ELISA」をお読み下さい。