総 説

ホルモンの超高感度測定法

宮崎医科大学・第一生化学

石 川 榮 治

Ultrasensitive Immunoassay of Hormones

Eiji Ishikawa

Department of Biochemistry, Medical College of Miyazaki

Two methods for ultrasensitive immunoassay of peptide hormones are presented. One is to reduce the nonspecific binding of labeled reactants in two-site immunoassay by transfer of immune complexes containing labeled reactants from one solid phase to another. The other is a novel noncompetitive immunoassay method for small peptides, in which peptides are biotinylated and subsequently measured by two-site assay using anti-peptide antibody and avidin (streptavidin).

Key words : enzyme immunoassay, biotin, biotinylation, avidin, streptavidin

は じ め に

1959年ラジオイムノアッセイが開発されて以来、ホルモンの測定は主として競合ラジオイムノアッセイにより行われ、種々の条件下におけるホルモンの血中、尿中などの濃度、その変動が明らかになった。しかし、競合ラジオイムノアッセイの感度は femtomole (1×10^{-15} mol) レベルであり、あらゆる条件下でのすべてのホルモンの濃度が測定可能になったわけではない。バセドウ病における血中甲状腺刺激ホルモン、思春期以前の血中性腺刺激ホルモン、尿中成長ホルモンなどの濃度は、競合ラジオイムノアッセイでは測定できないよい例である。

これに対し、1976年非競合（サイドイッチ）エンザイムイムノアッセイにより 1 amol (1×10^{-18} mol) の抗原が測定できることがわかった¹⁾²⁾。以来、非競合エンザイムイムノアッセイにより低レベルのホルモンが測定されるようになった³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾。例えば、胎盤性性腺刺激ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、黄体化ホルモン、成長ホルモンなどである。28個のアミノ酸からなる α -心房性ナトリウム利尿ホルモンも、10 amol まで検出できるようになった⁷⁾。このような非競合エンザイムイムノアッセイの高度感度化につづいて、最近ではラジオイムノアッセイでも非競合法（イムノラジオメトリックアッセイ, IRMA）が普及してきた。

しかし、サンドイッチ法とも呼ばれる従来の非競合法には、いくつかの難点がある。その一つは、標識抗体の固相への非特異吸着が障害となって、その感度が attomole 以下になりにくい。また、

ホルモン分子の異なる2つ以上のエピトープに同時に結合しうる2種類以上の抗体を必要とする。小分子ペプチドの両端に同時に結合しうる、しかも高い親和性をもつ2つの抗体を用意することはそれ程容易ではない。さらに、10個以下のアミノ酸からなるペプチドホルモンは従来のサンドイッチ法では測定することはできない。

これらの難点を解消する方法を開発したので、概略を紹介する。

免疫複合体転移測定法 (immune complex transfer immunoassay)

著者の研究室では、抗原測定の高感度化と平行して、1978年以来抗体測定を高感度化する方法の開発を試みてきた。従来から抗原不溶化固相により血清中の抗体をトラップした後、酵素標識第二抗体(抗体に対する抗体)を反応させて測定されていた。この方法では、血清中に多量に存在する非特異抗体が抗原不溶化固相に非特異的に吸着してバックグラウンドを上昇させるため高感度とはならない。つまり、非特異抗体の非特異吸着を除去しなければ高感度とはならない。

ヒトIgGと動物IgGを共存させると、ヒトIgGの抗原不溶化固相への非特異吸着が減少するので、ある程度高感度化できることもわかったが、さらに抜本的に問題を解決する方法として、測定すべき抗体をトラップした固相から他の新しい固相へ移しかえて非特異的に吸着した非特異抗体を除去する方法を開発した。具体的には、2,4-ジニトロフェニル(DNP)化ビオチン化抗原と血清中の抗体とを反応させて形成された免疫複合体を抗DNP抗体不溶化固相によりトラップする。固相を洗浄して非特異抗体の大部分を除去した後、DNP-リジンにより免疫複合体を固相から溶出して、ストレプトアビジン不溶化固相に移しかえる。最後に、酵素標識第二抗体を反応させて固相に結合した酵素活性を測定する。これにより、最初の固相に非特異的に吸着した非特異抗体を一層完全に除去することができるようになり高感度化が達成された⁸⁾。

しかし、この最初に開発した免疫複合体転移測定法は操作が複雑であったので、種々の変法を試み、より簡便化と高感度化を達成することができた。DNP化抗原、血清中の抗体、酵素標識抗原の3者を同時に反応させて形成された免疫複合体を抗DNP抗体不溶化固相の上にトラップし、固相を洗浄した後、免疫複合体をDNP-リジンにより固相から溶出して第二抗体不溶化固相に移しかえて、固相に結合した酵素活性を測定する⁹⁾。

この免疫複合体転移測定法のなかで、抗原と抗体を入れ換えると、抗原の測定が可能である。つまり、DNP化ビオチン化抗体、抗原、酵素標識抗体の3者を反応させて形成される免疫複合体を抗DNP抗体不溶化固相の上にトラップし、固相を洗浄した後、免疫複合体をDNP-リジンにより固相から溶出してストレプトアビジン不溶化固相に移しかえる。最後に固相に結合した酵素活性を測定する(Fig. 1)。これにより、最初の固相に非特異的に結合していた酵素標識抗体を一層完全に除去することができるので、バックグラウンドが低下して高感度が可能となる。この方法によりフェリチンの1mamol (1×10^{-21} mol, 600分子)を検出することができる¹⁰⁾。ホルモンへの応用は、まだ充分でなく、10pUの甲状腺刺激ホルモン、10fgの成長ホルモンが検出できることがわかったに過ぎないが、今後さらに高感度化できる見通しである¹¹⁾。

Fig. 1 Schematic presentation of the conventional two-site enzyme immunoassay technique (left) and the immune complex transfer two-site enzyme immunoassay technique (right).

新しい非競合法 (hetero-two-site immunoassay)

前述の免疫複合体転移測定法では、10個以下のアミノ酸からなる小分子ペプチドは測定することはできない。また、10個以上のアミノ酸からなるペプチドでも、ペプチドの両端に同時に高い親和性と競合しうる2つの抗体を用意することは容易でないことが多い。こうした難点を解消するために新しい非競合法を開発した。

新しい非競合法の原理は、ペプチドを derivatization により抗ペプチド抗体1分子と他の結合物質1分子とが同時に結合しうるようにして、いわゆる2点結合法あるいはサンドイッチ法と類似の方法で測定しようとするものである¹²⁾。まず、ペプチドを derivatization により DNP、ビオチンなどと結合する。この際、有機化学反応を利用すると未反応の DNP、ビオチンなどが残り、また、他のペプチドやタンパクが DNP 化、ビオチン化されるので、これらを除去する。ついで、標識抗ペプチド抗体と抗 DNP 抗体不溶化固相あるいはアビジン（ストレプトアビジン）不溶化固相を用いて DNP 化ペプチドあるいはビオチン化ペプチドを測定する。これとは逆に抗 DNP 抗体あるいはアビジン（ストレプトアビジン）を標識して抗ペプチド抗体を不溶化しても測定が可能ないはいうまでもない。抗原を測定する際のサンドイッチ法（2点結合法）とは少し違うので、これをヘテロサンドイッチ法あるいはヘテロ2点結合法 (hetero-two-site assay) と呼んでいる。

実際に試みた例では、ペプチドを N-hydroxysuccinimidobiotin によりビオチン化する。ペプチドに結合したビオチン残基と抗ペプチド抗体の結合する部位とが充分離れている場合には、このような直接のビオチン化でよいが、両者が接近している場合には、ペプチドとビオチン残基との間にスペーサーを入れることが必要である。例えば、10個のアミノ酸からなるアンギオテンシン I は、

Fig. 2 Indirect biotinylation of arginine vasopressin (AVP).

Fig. 3 Hetero-two-site enzyme immunoassay for peptides.

C端に対する抗体を調製しやすいので、直接のビオチン化で測定が可能であり、また、28個のアミノ酸からなる α -心房性ナトリウム利尿ペプチドの場合もC端の抗体を用いれば、直接のビオチン化で充分測定が可能となる。しかし、9個のアミノ酸からなるアルギニン・バゾプレッシンの場合は、スペーサーを入れる必要がある。スペーサーは種々の方法で入れることができるが、Fig. 2に示すような方法は安価である。つまり、ペプチドのN端のアミノ基とN-succinimidyl-6-maleimido hexanoateを反応させ、ペプチドにマレイミド基を導し、これにグルタチオン、N-hydroxysuccinimidobiotinを反応させる。

ビオチン化ペプチドを他のビオチン化合物から分離するために、ビオチン化ペプチドを抗ペプチド抗体不溶化固相にトラップして固相を洗浄する。固相を酸性条件下でインキュベートしてビオチン化ペプチドを固相から溶出する。

溶出されたビオチン化ペプチドと酵素標識抗ペプチドFab', ストレプトアビジン不溶化ポリスチレンボールとをインキュベートした後、固相を洗浄して固相に結合した酵素活性を測定する。

このような実施例を模式的にFig. 3に示した。これにより、アンギオテンシンI、アルギニンバゾプレッシンの10amol, α -心房性ナトリウム利尿ペプチドの5amolを検出することができる(Fig. 4)¹²⁾。

Fig. 4 Dose-response curves of α -hANP [1-28] by hetero-two-site enzyme immunoassay. Open and closed circles indicate bound peroxidase activity (specifically bound peroxidase activity plus nonspecifically bound peroxidase activity) and specifically bound peroxidase activity, respectively. Vertical bars indicate standard deviations of 3-5 determinations.

Fig. 5 Hetero-two-site complex transfer enzyme immunoassay for arginine vasopressin (AVP). DNP, dinitrophenyl group; FL, fluorescein; SS, disulfide bond; BSA, bovine serum albumin; Gal, β -D-galactosidase.

さらに Fig. 5に示したような複雑な方法を用いるとアンギニンバゾプシン, α -心房性ナトリウム利尿ペプチドの1amolをも検出することができる (Fig. 6)¹³⁾。ビオチン化ペプチドを他のビオチン化物質から, 前述のようにして分離した後, DNP 化フルオレセイン化牛血清アルブミン-S-S 抗ペプチド IgG と反応させる。形成された複合体を抗 DNP 抗体不溶化ポリスチレンボールの上にトラップし, 固相を洗浄してから, β -D-ガラクトシダーゼ標識アビジンと反応させた後, 複合体を抗フルオレセイン抗体不溶化ポリスチレンボール, さらに抗 IgG 抗体不溶化ポリスチレンボールへと移しかえる。最後のポリスチレンボールに結合した酵素活性を測定する。つまり, 複合体を固相から固相へ2回移しかえて, 固相に非特異的に吸着した酵素活性をより完全に除去すると, バックグラウンドが格段に低下して, 高感度となり, 1amol のペプチドを測定することができる。

おわりに

高感度測定には, 特異シグナルの高感度検出法, 非特異シグナル (バックグラウンドあるいはノイズ) の除去方法, 高感度化を可能にする測定システムなどの開発が必要である。

今回は, 非特異シグナルを低下させる方法とハプテンの測定を高感度化するための方法を紹介した。いずれも, 開発から間もないので, 改良すべき点, 新たに開発すべき補助的方法などが, 多く残されている。したがって, こゝで紹介した方法が充分利用されるようになるまでには, しばらくの時間が必要であろう。

Fig. 6 Dose-response curves of arginine vasopressin by hetero-two-site complex transfer enzyme immunoassay. Open and closed circles indicate bound β -D-galactosidase activity (specifically bound β -D-galactosidase activity plus nonspecifically bound β -D-galactosidase activity) and specifically bound β -D-galactosidase activity, respectively. Vertical bars indicate standard deviations of 3-5 determinations.

これらに加えて、特異シグナルの超高感度検出法が組合わせられると、新しい世代の測定法が可能になると考えられる。例えば、核酸の断片はすでに1分子まで検出が可能であるので、これを組合せて、抗原、抗体、ハプテンの分子を数えることのできる日も近いように思われる。

紙面の都合で省略した部分も多いので、末尾の文献を参照して頂きたい¹⁴⁾¹⁵⁾。

文 献

- 1) Kato K, Hamaguchi Y, Okawa S, Ishikawa E, Kobayashi K, Katunuma N. Enzyme immunoassay in rapid progress. Lancet 1977; i: 40
- 2) Ishikawa E, Kato K. Ultrasensitive enzyme immunoassay. Scand J Immunol. 1978; 8(Suppl. 7): 43-55
- 3) Ishikawa E, Hashida S, Kato Y, Imura H. Sensitive enzyme immunoassay of human growth hormone for clinical application: A review. J Clin Lab Anal. 1987; 1: 238-42
- 4) Ishikawa E. Development and clinical application of sensitive enzyme immunoassay for macromolecular antigens-A review. Clin Biochem. 1987; 20: 375-85

- 5) Ishikawa E, Hashida S, Tanaka K, Kohno T. Ultrasensitive enzyme immunoassay for antigens: technology and applications-A review. Clin Chem Enzym Comms. 1989; 1: 199-215
- 6) Diamandis EP. Analytical methodology for immunoassays and DNA hybridization assays - Current status and selected systems-Critical Review. Clin Chim Acta. 1990; 194: 19-50
- 7) Hashida S, Ishikawa E, Mukoyama M, Nakao K, Imura H. Direct measurement of α -human atrial natriuretic polypeptide in plasma by sensitive enzyme immunoassay. J Clin Lab Anal. 1988; 2: 161-7
- 8) Kohno T, Ishikawa E. A novel enzyme immunoassay of anti-insulin IgG in guinea pig serum. Biochem Biophys Res Commun. 1987; 147: 644-9
- 9) Ishikawa E, Kohno T. Development and applications of sensitive enzyme immunoassay for antibodies: A review. J Clin Lab Anal. 1989; 3: 252-65
- 10) Hashida S, Ishikawa E. Detection of one milliattomole of ferritin by novel and ultrasensitive enzyme immunoassay. J Biochem. 1990; 108: 960-4
- 11) Hashida S, Tanaka K, Kohno T, Ishikawa E. Novel and ultrasensitive sandwich enzyme immunoassay (sandwich transfer enzyme immunoassay) for antigens. Anal Lett. 1988; 21: 1141-54
- 12) Ishikawa E, Tanaka K, Hashida S. Novel and sensitive noncompetitive (two-site) immunoassay for haptens with emphasis on peptides. Clin Biochem. 1990; 23: 445-53
- 13) Hashida S, Tanaka K, Yamamoto N, Uno T, Yamaguchi K, Ishikawa E. Detection of one attomole of [Arg8]-vasopressin by novel noncompetitive enzyme immunoassay (hetero-two-site complex transfer enzyme immunoassay). J Biochem. 1991; 110: 486-92
- 14) Ishikawa E, Hashida S, Kohno T, Hirota K. Ultrasensitive enzyme immunoassay. Clin Chim Acta. 1990; 194: 51-72
- 15) Ishikawa E, Hashida S, Kohno T. Development of ultrasensitive enzyme immunoassay reviewed with emphasis on factors which limit the sensitivity. Mol Cell Prob. 1991; 5: 81-95