The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	エンザイムイムノアッセイのDexamethasone, Kallikrein及びRicinへの応用と標準化
Author(s)	柴田, 正
Citation	大阪大学, 1983, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33638
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【10】

氏名・(本籍)	柴田　正（しばた　ただし）
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第 6251 号
学位授与の日付	昭和 58 年 12 月 13 日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	**エンザイムイムノアッセイの Dexamethasone, Kallikrein 及び Ricin への応用と標準化**
論文審査委員	(主査) 教授 青沼　繁 (副査) 教授 近藤 雅臣　教授 鎌田　皎　教授 三浦 喜温

論文内容の要旨

(緒　言)

Immunoassay は Barson と Yallow が生体中の Insulin の超微量分析を確立して以来，生理活性をもつ多くのたん白質，ペプチドなどに広く応用されている。

更に Erlanger らが Steroid をたん白質に結合させる手法を開発して，種々の Steroid，薬物など低分子 Hapten にも繁用されつつある。

Enzyme Immunoassay は用いられる抗原の種類によって適合する Type が異なり，一例として高分子多価抗原は1分子に複数個の酵素標識抗体が反応し，結合するため感度が高くなり，又固相法を用いると結合型と遊離型の分離が容易に行える利点があることから，Sandwich 法が適している。一方低分子 Hapten 抗原と酵素標識抗原との競合反応による competitive 法が多く用いられ，結合型と遊離型の分離は第二抗体法が用いられている。

Immunoassay において交叉反応性の低い抗体を得るために，高分子多価抗原では抗原の高純化によって夾雑物との交叉反応性を低く，低分子抗原では carrier たん白質と結合させる架橋化剤の Hapten 上の位置を選択して，特異的な抗体の産生を試みた。

Sandwich 法では抗体－酵素複合体に Fab′ を用いて非特異的吸着を減少させ，ブランク値を小さくし，感度の上昇を図った。又 competitive 法では affinity chromatography を用いて抗体 IgG を精製することで，特異性及び advidity に顕著な改善が認められた。

この条件を考慮して Enzyme Immunoassay を合成 Corticoid の Dexamethasone，Kinin 遊離酵素 Kallikrein 及び細胞毒 Lectin の Ricin に適用し，感度，精度並びに特異性において生体

試料中の微量定量に適用可能であることを認め，更に夾雑物を多く含有した試料においても定量値と生物学的力価は良好な相関性がみられ，化学的分析法並びに生物学的検定法に代わる標準化の一方法として有力であった。

（本　　論）

第一章　Dexamethasone の Enzyme Immunoassay

低分子 Hapten の免疫定量法において，殊に特異性の高い抗血清が必要となる。それは低分子化合物では抗体の認識が官能基の分子上の位置及び構造上の差異にまで至り，一般に抗体の特異性を高めるには，Hapten 分子上の抗原決定基から離れた位置に架橋化剤を導入した Hapten－たん白質複合体を用いて免疫する方法，更に特異抗体を affinity chromatography を用いて精製する方法で交叉反応率の低い抗体が得られた。

抗原として用いた Dexamethasone の C－21 位，C－3 位及び C－6 位に carboxyl 基を導入し，それぞれ carrier たん白質と結合し，家兎に免疫して抗血清を得た。このうち C－3 位，C－6 位抗体を affinity chromatography を用いて精製し，交叉反応率の低い抗体を得ることによって Dexamethasone の高感度且つ特異性の高い定量法が確立された。

第二章　Kallikrein の Enzyme Immunoassay

高分子多価抗原に対する抗体の特異性を高めるため，抗原の高純化を行い，夾雑物を減少させることで交叉反応率を低く抑えた。

ブタ膵 Kallikrein は A 及び B の混合物であり，両者の生物活性は同等とされている。そこで A，B を分離精製し，それぞれ免疫して得られた抗血清から，抗原抗体反応においても差異がないことを確認した。又 assay は Kallikrein が高分子多価抗原であることから，感度が高く，操作上利点の多い Sandwich 法を採用し，標識化合物には Fab′－β－D－galactosidase 複合体を用いた。

Kallikrein の各種試料の生物学的力価（血流増加法）と Enzyme Immunoassay の結果はよく一致し，標準化の一方法として有力であった。

第三章　Ricin の Enzyme Immunoassay

糖たん白質多価抗原の Ricin は起炎性 Lectin の一種であり，生体内標的臓器への分布を検討するために Sandwich 法を適用した Immunoassay を行った。

得られた抗血清は Ricin－A 鎖，B 鎖及び Ricinus Hemagglutinin に対し，低い交叉反応性を示した。又血清及び脳脊髄液（CSF）では緩衝液中におけるよりも低い値を示したが，試料と同量の血清又は CSF を添加した検量線を用いて測定することが可能となった。

（結　　論）

Immunoassay に適した抗体は抗体価と特異性が高く，avidity がよく，生物活性部分への指向性を有し，ブランク値の低いものという諸条件を満たす必要がある。とりわけ特異性が重要であり，低分子抗原の場合には carrier たん白質との最適な結合位置を選択すること，及び特異抗体の精製法の採用によって，又抗原の高純化によって交叉反応率を低くすることが可能となった。

1）合成 Corticoid の Dexamethasone の精製特異抗体を用いた Immunoassay は 16 位 methyl

基の epimer である Betamethasone 共存下で Dexamethasone の微量定量が可能となった。

2）高分子抗原である精製ブタ膵 Kallikrein から得られた抗体を用いた Enzyme Immunoassay（Sandwich 法）の結果は生物学的検定法による力価とよく一致し，本法が標準化の一方法であることが認められた。

3）炎症作用をもつ Ricin の生体内分布測定を目的として，糖たん白質多価抗原 Ricin の Immunoassay（Sandwich 法）を開発し，生体試料の微量定量が可能となった。

この結果は抗体のもつ分子構造を認識する特性と抗原抗体反応の化学量論的性質を適用した Enzyme Immunoassay が高分子及び低分子物質の微量定量に有用な手法であることを明らかにした。

論文の審査結果の要旨

Immunoassay に適した抗体は，抗体価と特異性が高く，advidity がよく，生物活性部分への指向性を有し，ブランク値の低いものという諸条件を満たす必要がある。とりわけ特異性が必要であり，低分子抗原の場合には，carrier たんぱく質との最適な結合位置を選択すること，及び特異抗体の精製法の採用によって，又抗原の高純化によって交叉反応率を低くすることが重要である。この論文はこれらのことを考察し，例えば合成 Corticoid の Dexamethasone の精製特異抗体を用いた Immunoassay で 16 位 methyl 基の立体異性体 Betamethasone 共存下で Dexamethasone の微量定量を可能にし，一方高分子抗原である精製ブタ膵 Kallikrein から得られた抗体では柴田法が標準化の有力な一方法であることが認められ，さらに糖たん白質多価抗原 Ricin の Immunoassay（Sandwich 法）を開発し，生体試料の微量定量を可能にするなど，いろいろな物質の微量定量に有用な手法を開発した。

従って，本論文は薬学博士の価値があるものと認める。