Osaka University Knowledge Archive

Title	新しいホモジニアスエンザイムイムノアッセイ法の開発と，多項目同時スクリーニングシステムの構築に関する研究
Author(s)	星野，信広
Citation	大阪大学，1992，博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37845
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【89】

氏　　名	星　野　信　広（ほし の のぶ ひろ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医学）
学位記番号	第　10087　号
学位授与年月日	平成4年3月16日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	**新しいホモジニアスエンザイムイムノアッセイ法の開発と，多項目同時スクリーニングシステムの構築に関する研究**
論文審査委員	（主査）教授　宮井　潔 （副査）教授　谷口　直之　　教授　濱岡　利之

論文内容の要旨

（目　的）

エンザイムイムノアッセイは標識物質として酵素を用いた免疫学的測定法で，高感度，高特異性，無公害であるため広く用いられているが，臨床検査への応用のためには更に簡易化が望まれる。その一つとして注目されているホモジニアス法は，抗原抗体反応の結果起こる酵素活性の変化を指標とするもので，結合型と非結合型の分離（BF分離）操作を省略できる利点があるが，現在実用化されているものは反応の特質上，低分子ハプテンの測定に限られている。そこで本研究では新しい原理に基づく大分子タンパク質のホモジニアスエンゼイムイムノアッセイを開発し，更に本法の特徴を生かして一回の測定で二項目以上の検査の異常を検出するという新しい発想のスクリーニングシステム構築を試みた。

（方法ならびに成績）

本法の原理は，西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）活性が基質である過酸化水素（H_2O_2）の過剰下では基質阻害を受けるが，HRP同士が近づく凝集状態ではこの阻害が消失するという現象に基づくもので，この現象は本研究で見いだされたものである。

（A）HRPの性質

1．ポリマーHRP：HRPの糖鎖を過ヨウ素酸で酸化してアルデヒド化し，テトラメチレンジアミンをスペーサーとしてHRPのホモポリマーを調製した。HRPの活性は基質としてH_2O_2，水素供与体としてフェノール，カプラーとして4－アミノアンチピリンを加えて反応させ，500 nmの吸光度を測定して求めた。モノマーHRPではH_2O_2を過剰にすると基質阻害のため活性が減少をしたが，ポリマーHRPでは重合度が大きい程，阻害度が小となった。

次ぎに発色反応を起こさない組成である過剰のH_2O_2，フェノール，アスコルビン酸を含む基質溶液中で500 nmから700 nmまでのHRPに特有な吸収スペクトルの経時的変化を見たところ，モノマーHRPではフェノールとの反応性が非常に低い中間体（compⅡ）の蓄積が見られたがポリマーHRPでは反応性の高い中間体（compⅢ）を経由してH_2O_2の消費が行われた。このことからおそらく酵素同士が近づいているポリマーHRPでは，compⅢが素早く分解されることによって基質阻害が回避されているものと考えられた。

2．HRP－抗HRP複合体：HRPと抗HRPウサギ抗体を反応させた免疫複合体では，過剰H_2O_2による基質阻害が軽減され，複合体を形成しないHRPよりも活性が大となった。

（B）HRP標識抗原または抗体を用いたホモジニアスエンザイムイムノアッセイ

先の実験でHRPが凝集塊を形成すると過剰H_2O_2による基質阻害を受けにくくなることを示したが，この現象はHRP標識抗原または抗体が抗原抗体複合体を形成したときに同様に見られた。それを利用し，以下のようにα－フェトプロテイン（AFP）の測定系を開発した。

1．競合法：HRPの糖鎖を過ヨウ素酸で酸化し，生じたアルデヒド基とAFPのアミノ基を反応させてHRP標識AFPを調製した。この試薬と種々な濃度のAFPを含む標準物質を混合し，そこに一定量の抗AFPウサギ血清を加えて20分間反応させた後，この反応液にH_2O_2，フェノール，4－アミノアンチピリンを含む基質溶液を加え，5分後の500 nmに於ける吸光度を測定した。結果はAFP 0.5 μg／mlから10 μg／mlの範囲で吸光度が減少する下降型の検量線が得られた。

2．非競合法：HRPの糖鎖にSH基と反応性のあるマレイミド基を持った架橋剤を導入し，抗AFPウサギ特異抗体Fab' 分画のSH基と反応させた。HRP 1分子に抗体Fab' 分画3分子が結合したHRP標識抗体を調製した。これと標準AFPを反応後，基質溶液を加えて吸光度を測定したところ，AFP 10 ng／mlから800 ng／mlの範囲で上昇型の検量線が得られた。

両方法の添加回収試験，再現性試験の結果は良好であり，臨床検査として有用であることが示された。

（C）多項目同時スクリーニングシステム

一回の測定で多項目が正常か否かをスクリーニングできる方法を開発するため，AFPとフェリチン（FER）をモデルとして非競合法でシステムを構築した。

HRP標識AFP抗体と，更に同様の方法で調製したHRP標識FER抗体を混合し，これに非標識FER抗体を加えて感度を調整した。この方法で種々のAFPとFERが含まれる標準物質を測定したところ。(a) 吸光度0.015以下ならいずれもカットオフポイント（AFP 20 ng／ml，FER 200 ng／ml）以下（b）0.03以上なら，いずれか一方がカットオフポイント以上，（c）0.015～0.03なら（a）または（b）のいづれかであるとする判定基準を得た。(b)，（c）の場合は，さらにAFPとＦＥＲを個別に測定して正常か否かを決めなければならないが，スクリーニング検査ではほとんどの検体が（a）であるため，検査量は大幅に節約できる。この方法でAFP，FERの値が既に測定されている検体について本法を用いて判定した結果，理論値と良い相関が得られた。

（総　　括）

標識用酵素としてHRPを選び，その標識抗原を用いた競合法，及び標識抗体を用いた非競合法に於いて，測定対象物の分子量に制限を受けない，全く新しいエンザイムイムノアッセイ法を開発した。更にその判定操作の簡便さを生かし，多項目の検査を同時にスクリーニングできるシステムを構築し，AFPとFERをモデルとしてその有用性を示した。

論文審査の結果の要旨

西洋ワサビペオキシダーゼは基質である過酸化水素の過剰下で基質阻害を受けるが，化学的あるいは免疫学的に凝集した状態ではこの阻害が解消されるという現象を見出し，その機序として反応性の高い中間体を形成していることを分光学的実験で示した。次にこの現象を利用して結合，未結合の分離操作を省略できるホモジニアスエンザイムイムノアッセイを開発した。

更に，本法応用の一つとして，α－フェトプロテインとフェリチンそれぞれの標識抗体と，検体とを反応させた後酵素活性を測定して，これが一定のレベル以下なら両物質共正常であると判定できる新しいスクリーニング法を開発した。これらの一連の研究は新しい現象の発見から検査法へと発展させたものであり，学位論文としてふさわしいものと考えられる。