



Title	A new highly sensitive immunoassay for cytokines by dissociation-enhanced lanthanide fluoroimmunoassay (DELFIA)
Author(s)	Ogata, Atsushi
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3065821">https://doi.org/10.11501/3065821</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏 名	緒 方 あつし
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 0 6 4 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 5 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科内科系専攻
学 位 論 文 名	A new highly sensitive immunoassay for cytokines by dissociation-enhanced lanthanide fluoroimmunoassay (DELFI A) (DELFI A による新しい高感度サイトカインの immunoassay)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 岸 本 忠 三 (副査) 教 授 平 野 俊 夫 教 授 綱 野 信 行

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### (目 的)

近年の分子生物学の進歩に伴い炎症の調節に関与すると考えられる様々なサイトカインが見いだされた。これらのサイトカインの機能は, in vitro において詳しく検討されているが in vivo の様々な炎症状態における動態は十分に解析されていない。サイトカインは  $10^{-12} \sim 10^{-13}$  mol オーダーで作用を示すため, 非常に微量であっても生理的意義を持つ可能性があり, pg/ml オーダーの微量のサイトカインの動きを把握できる高感度な assay が求められている。DELFI A (dissociation-enhanced lanthanide fluoroimmunoassay) システムはユウロピウム (Eu) キレートを用いた時間分解蛍光免疫測定法 (TR-FIA) である。Eu の発する蛍光は寿命が長く, 自然蛍光が消失したあとに蛍光が測定できることや Eu の蛍光波長と励起光の蛍光波長とのストークシフトが大きくこれらの影響を受けにくいことより, 従来の蛍光 ELISA に比べて著しくバックグラウンドを下げる事が可能である。したがって低濃度においても測定できるため, 従来の ELISA と同じ抗体を用いても感度を 10~100 倍高く, また広測定領域を実現することができる。この方法を用いて高感度な TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8 測定系を確立した。

#### (方 法)

TNF $\alpha$ -DELFI A は, Eu ラベル抗 TNF $\alpha$  (3D6) と抗 TNF $\alpha$  抗体 (mAb-5) を, IL-6-DELFI A は, Eu ラベル抗 IL-6 抗体 (2D5) とヤギ抗 IL-6 抗血清を, IL-8-DELFI A は, Eu ラベル抗 IL-8 抗体 (SW4) とラット抗 IL-8 抗体を, それぞれ 1 次抗体と 2 次抗体として用いてサッドイッチ法にて測定を行った。マイクロプレートに 1 次抗体を coating (4℃, 24 時間) し, つぎに 1% BSA で blocking (4℃, 24 時間) を行った後, 検体および標準試料を 4℃, 24 時間反応させた。さらに Eu 結合 2 次抗体を室温で 4 時間反応させた後よく洗浄し, 増強試薬を 15 分間反応させて蛍光の測定を行った。

#### (成 績)

##### 1) TNF $\alpha$ -DELFI A

Eu 標識 3D6 抗体を用いて 1 次抗体として 7 種類の抗体のスクリーニングを行った。このうち mAb-5 を 1 次抗体として選択し以後の検討を行った。他のサイトカインの影響を検討したところ, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IFN $\gamma$  との交叉反応は認められなかった。以上の条件で標準曲線を作製したところ, 測定限界の 100fg/ml より 1 ng/ml のあいだ測定可能な広測定領域, 高感度の測定系がえられた。本測定系

は、同じ抗体を用いた ELISA の系および L-M 細胞を用いた cytotoxicity assay の標準曲線と比較したところ、ELISA の 100 倍以上の感度を得られた。

#### 2) IL-6-DELFIA

TNF $\alpha$ と同様に1次抗体と2次抗体の至適濃度を決定及び特異性の検討を行った後、標準曲線を作製しMH60.BSF 2細胞によるハイブリドーマ増殖活性とSKW 6.CL 4細胞による免疫グロブリン産生活性によるIL-6測定系の標準曲線との比較を行った。本測定系は、測定限界の500fg/mlより1ng/mlのあいだ測定可能であり、SKW 6.CL 4細胞によるbioassayの約100倍の感度を有し、現在最も感度の良いIL-6測定法の1つであるMH60.BSF 2細胞によるbioassayとほぼ同等の感度を示した。

#### 3) IL-8-DELFIA

TNF $\alpha$ と同様に1次抗体と2次抗体の至適濃度の決定、及び特異性の検討を行った後、標準曲線を作製した。本測定系は、測定限界の1pg/mlより10ng/mlのあいだ測定可能であった。

#### 4) DELFIAによる各種検体の測定

末梢血単核細胞をLPSで刺激して得られた培養上清中のTNF $\alpha$ 、IL-6を、本測定系を用いて測定した。ともに8~10時間にピークに達するTNF $\alpha$ 、IL-6の産生がみられた。この実験系では、TNF $\alpha$ 、IL-6とも100倍以上の変動をみたが、広測定領域の本測定系を用いると同一希釈倍率にて一回で測定することが可能であった。IL-6測定値は、MH60.BSF 2細胞によるbioassayの測定値と良く相関した。IL-8測定では、血清においても10pg/mlより6ng/ml検体までも同一希釈倍率にて一回で測定することが可能であった。TNF $\alpha$ 、IL-6、IL-8、とも血清を10倍希釈して測定可能であった。ただしIL-6の場合のみ、血清IL-6が100pg/ml以下の検体を測定するときに限り一部の血清では希釈曲線と平行にならないものがあったが、IL-6高値の血清で50倍以上希釈可能な血清では問題とならなかった。

#### (総括)

DELFIAを用いて高感度のTNF $\alpha$ 、IL-6、IL-8の測定系を確立した。同じ抗体を用いたELISAに比べて10~100倍の感度であり、広測定領域の測定系が確立された。このことから、DELFIAシステムを用いることより、さらに現在測定不能な他の生体微量活性物質の測定も可能となる。

### 論文審査の結果の要旨

近年の分子生物学の進歩に伴い炎症の調節に関与すると考えられる様々なサイトカインが見いだされた。これらのサイトカインの機能はin vivoにおいて詳しく検討されているが、in vivoの様々な炎症状態における動態は十分に解析されていない。サイトカインは非常に微量であっても生理的意義を持つ可能性があり、pg/mlオーダーの微量のサイトカインの動きを把握できる高感度なassayが求められている。本研究は、DELFIAシステムを用いて高感度なTNF $\alpha$ 、IL-6、IL-8測定系を確立したものである。

これらの測定系を用いることにより、従来の測定系では測定の困難であったTNF $\alpha$ 、IL-6、IL-8のin vivoにおける動態を明らかにすることが可能であり、学位論文として価値あるものと認める。