

Title	A sensitive peroxidase staining immunoblotting method for measuring total protein S in human plasma
Author(s)	李, 祥安
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39270
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	李 祥 安
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 1 5 6 7 号
学位授与年月日	平成 6 年 1 0 月 5 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	A sensitive peroxidase staining immunoblotting method for measuring total protein S in human plasma (高感度酵素染色イムノブロッティング法による血漿中での総プロテインSの定量法)
論文審査委員	(主査) 教授 北村 幸彦 (副査) 教授 松沢 佑次 教授 青笹 克之

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

タンパク質の immunoblotting 法は 1979 年 Towbin らによって初めて開発されて以来、生物学や免疫学などの研究において広い範囲で応用されてきており、特に複雑混合液中でのタンパク質の検出によく用いられている。Howe らはこの immunoblotting 法を改良して、タンパク質の定量測定法を開発した。かくして、immunoblotting は同時に定性と定量両方に用いることができるようになった。しかし血漿中プロテインSのような低濃度タンパク質の測定には高感度の probe が必要であるので、¹²⁵I 標識の二次抗体を用いて行われている。ラジオアイソトープの使用はもちろん不便である。本研究の目的は非ラジオアイソトープ定量 immunoblotting 法の開発である。我々は初めて ABC 染色法による高感度定量 immunoblotting (ABC immunoblotting) 法を開発して、血漿中でのプロテインSを測定した。ABC immunoblotting 法は従来の¹²⁵I 標識 immunoblotting と比べて、同じ感度を得た。従来の sandwich 式測定法との比較も検討した。

(方 法)

試料は Laemmli の方法に従って非還元性 SDS-PAGE を用いて行った。電気泳動を終了したゲルからタンパク質をセミドライ方式の装置を用いて nitrocellulose 膜に転写した。次にブロッキングを行ったあと、膜と結合した抗原を一次抗体で処理した。抗原に結合した一次抗体を見いだすために、用いた一次抗体に対応する Vector 社の ABC キットで処理することにより、プロテインSの band は色素で発色された。発色された band を単反射光吸収法を用いて、クロマトスキャナにより測定した。

ヒト血漿中でのプロテインS量を定量するために、ヒトの標準血漿をプロテインS欠乏血漿と混合して、標準曲線を作成した。標準曲線から試料血漿中でのプロテインS量を求めた。

(成 績)

1. ABC immunoblotting によるプロテインSの同定

ABC immunoblotting によりヒト血漿中でのプロテインSを同定すると、明らかなプロテインS band および複

数の高分子 band が検出された。以下の実験結果は高分子 band が非特異的に染色した band であり、ヒトの血漿蛋白とヒツジ（あるいはマウス）の血清蛋白との交叉反応に起因することを示した：①ヒト血漿の代わりに、プロテインS欠乏血漿を使っても、これらの band がまだ検出された；②プロテインS欠乏血漿により予め吸収した一次抗体を用いた場合、これらの band の濃度が大幅に減少した；モノクローナル抗プロテイン S IgG を一次抗体として使っても、プロテインS以外の若干の band を観察した；④非免疫血清を一次抗体の代わりに使った場合、まだ若干の band を観察した；⑤一次抗体を使わない場合、これらの band が示されなかった；⑥ ^{125}I プロテインSをヒトの血漿と混合して SDS - PAGE により調べると、遊離プロテインSの位置に一つだけの band を観察した。これらの結果は非特異性交叉反応が ELISA 等 sandwich 式測定法に影響を与える危険性を示唆する。ペルオキシダーゼ標識二次抗体を用いた通常の immunoblotting 法を行った場合、プロテインSの band は認められなかった。これは通常の immunoblotting 法が低濃度のタンパク質に対して検出感度が不十分であることを示している。

2. ヒト血漿中での総量プロテインSの定量測定

^{125}I プロテインSとヒト血漿を混合して SDS - PAGE にかけたところ、単一 band が認められた。この結果は血漿中の C4b 結合蛋白-プロテインS複合体が電気泳動中に完全に解離されたことを示している。したがって、ABC immunoblotting 法による血漿中プロテインSの測定は総プロテインS量の測定である。測定の再現性がよく、変動係数が7%であった。1ng プロテインSまでも測定することが可能で、 ^{125}I 標識 immunoblotting と同じ感度を得た。

(総括)

本研究は初めて、高感度酵素染色 immunoblotting 定量法を開発して、血漿中での総プロテインSを測定した。この方法は次の長所がある：①放射線同位元素を使わなくても高感度である；② sandwich 式測定法に潜在する可能性のある非特異性染色を肉眼的に区別して除くことができる；③タンパク質の定性と定量の両方が同時に可能となる；④一次抗体が不純でも測定が可能である；⑤原理的に、混合液中での複数のタンパク質を同時に測定することができる。

論文審査の結果の要旨

ヒト血漿中において血液凝固抑制因子 protein S は遊離型と結合型の二つの形で存在する。補体系 classic pathway の中間代謝産物である C4b と結合し、その分解を促進する蛋白である C4b - binding protein (C4BP) がヒト血漿中で protein S とも結合しており、この複合体は protein S 活性を抑える。したがって、protein S 蛋白量を測定する場合に遊離型と結合型の両方を求めることが臨床的に必要である。更に現在では、protein S と C4BP の結合を抑制する物質が血清中に存在することが解っているが、その本体は不明である。本論文は、こういう不明物質の共存下での総 protein S 量を正確に測定するために immunoblotting 法を用いた総 protein S 量の定量法を開発したものである。同様の問題を含んだ対象に対しても応用の可能性があり、学位論文として価値あるものと認める。