

Topics

1994年 トピックス委員

(投稿歓迎 各委員まで)

幹事	根来 誠司 (阪大・工・応生)		
微生物・生態	五十嵐泰夫 (東大・農・農化)	発酵生産・培養工学	早出 広司 (東農工大・工・物生)
遺伝	松岡 正佳 (熊工大・応微工)	酵素	喜多 恵子 (鳥取大・工・生応)
微生物代謝・生化学	片岡 道彦 (京大・農・農化)	廃液処理	高見澤一裕 (岐 阜 大・農)
醸造	近藤 正夫 (愛知食工セ)	単位操作・培養制御	大政 健史 (阪大・工・応生)
食品	浅野 行蔵 (北海道食加研)	細胞工学	関根 政実 (阪大・工・応生)

PCR を用いる高感度免疫測定法

創価大学工学部生物工学科 関 篤志

免疫測定法は、抗原あるいは抗体のどちらか一方を、ラジオアイソトープ (RI), 蛍光色素, 酵素などで標識し、これらを抗原-抗体反応の指標として抗原あるいは抗体を定量するものである。きわめて微量の抗原あるいは抗体を測定する手法として臨床検査において広く用いられている。なかでも、酵素を標識に用いる ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) は、RI のような半減期の心配がいらない、面倒な設備や装置が不要であるなどの利点を有しているため、臨床検査において広く用いられている。この検出感度は、標識として用いる酵素の検出感度に左右される。標識として用いられている酵素の活性測定法としては、比色定量法が用いられているが、さらに測定感度を上げるために蛍光基質や発光反応が用いられることもある。また、酵素的サイクリング、カスケード反応といった増幅反応を組み合わせて高感度化する試みもなされている。

最近、増幅反応として PCR (Polymerase Chain Reaction) を用いて高感度化をおこなった免疫測定法の報告が Sano らによってなされた。¹⁾ PCR とは、特定の塩基配列を挟む 2 種類のプライマーを用いて、DNA ポリメラーゼによる鋳型特異的な DNA 合成反応を繰り返すことにより微量な DNA 断片を数十万倍に増幅させる反応である。PCR を増幅反応に用いる免疫測定法 (イムノ PCR) では、マーカーとして DNA を用いている。抗原抗体結合反応後にマーカーを PCR により増幅して検出することにより、高感度な測定を行うことに特徴がある。また、抗体を DNA で標識するために、ストレプトアビジン-プロテイン A キメラを用いている。このキメラタンパク質のストレプトアビジン部分はビオチンと結合し、プロテイン A 部分は抗体の Fc 部分と結合する。これを用いてビオチン化 DNA を抗体に特異的に結合させている。また、このキメラタンパク質を用いることにより、抗体を化学的に標識することなしに免疫測定を行えるという利点も有している。測定法は ELISA と同様である。ウシ血清アルブミン (BSA) を抗原とし、固相に結合している BSA に、抗 BSA モノクローナル抗体を結合させる。次に、キメラタンパク質を介してビオチン化直鎖プラスミドを抗体に特異的に結合させる。この直鎖プラスミドの一断片を PCR により増幅する。PCR 産物をゲル電気泳動で分離し、エチジウムブロミドで染色した後にデンストメーターで定量する。この方法により、580 分子 (9.6×10^{-22} mol) の BSA 分子を検出している。また、アルカリホスファターゼで標識したストレプトアビジン-プロテイン A キメラタンパク質を用いて免疫測定を行い、その検出感度をイムノ PCR と比較すると、イムノ PCR は 10^5 倍も高感度であった。

一方、Ruzicka らは、Sano らの方法を改良してストレプトアビジン-プロテイン A キメラを用いずに市販されている試薬を用いるイムノ PCR を報告している。²⁾ すなわち、固相に結合している抗原に対してビオチン化抗体、次いでアビジン-ビオチン化 DNA 結合体を結合させ、固相に固定化された DNA を PCR により増幅して検出している。これにより、10 fg/ml の抗原を検出している。

このように、PCR の増幅能を利用するイムノ PCR は非常に高感度な測定が可能であり、臨床検査などにおいて大きな期待がもたれる。

1) Sano, T. *et al.*: *Science*, **258**, 120 (1992).2) Ruzicka, V. *et al.*: *Science*, **260**, 698 (1993).