

第32回麻布環境科学研究会 一般演題8

ラテックス粒子を用いた可溶性抗原に対する 間接蛍光抗体法の開発

清田 哲郎, 栗林 尚志, 山本 静雄

麻布大学 生命・環境科学部 免疫学研究室

1. はじめに

1942年に開発された蛍光抗体法(FA)は有用な免疫学的手法として幅広く用いられている。間接蛍光抗体(IFA: indirect fluorescent antibody)法は、不溶性抗原に対する抗体価の測定、組織等に固定された可溶性抗原の検出・同定などに広く使用されている。他方、可溶性抗原に対する抗体価の測定としては、受身凝集反応、ラジオイムノアッセイ(RIA: Radio Immuno Assay)や酵素免疫測定法(ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)などが用いられている。IFAは高い特異性をもっており、抗体検出に有用な方法ではあるが、血清などの溶液中に遊離した可溶性抗原の抗体価測定には用いることが出来なかった。そこで演者らは、可溶性抗原であるウシのIgGをラテックス粒子へ結合させ、IFAによる抗体価測定の基礎的検討を行い、良好な結果を得た。

2. 材料ならびに方法

ラテックス: 粒径 $1.0\mu\text{m}$ ならびに $6.0\mu\text{m}$ のPolybead polystyrene microspheresを用いた。

ウシ・ヤギのIgG: ウシならびにヤギIgGは、ProteinGカラムを用いてそれぞれの血清から単離した。ウシのIgGはIFAに用いる可溶性抗原として、ヤギのIgGはラテックスの未結合部位のブロッキングに用いた。

ウシIgG感作ラテックスの調製: 粒径 $1.0\mu\text{m}$ ならびに $6.0\mu\text{m}$ の2.5%(w/v)のラテックス0.5mlに0.1Mホウ酸緩衝液(pH 8.5)の1mlを添加し、 $9200\times g$ で遠心分離した。沈殿したラテックスに、0.1Mホウ酸

緩衝液(pH 8.5)を1ml加え、ラテックスを再分散させて再度遠心洗浄を行った後、ラテックス1.25%の濃度になるように0.1Mホウ酸緩衝液(pH 8.5)に再分散させた。これらのラテックスにウシのIgG $400\mu\text{g}$ を混合させ、ラテックスへ吸着させるため、静かに混和をしながら室温で12時間反応させた。

IgG抗体を感作した後、ラテックスを $9200\times g$ で10分間遠心分離し、沈渣のラテックスを得た。ラテックスの表面の未吸着のタンパク質結合部位をブロックするために、感作ラテックスへ1%ヤギIgGを含む0.1Mホウ酸緩衝液(pH 8.5)を加えて室温で1時間反応させた。その後、IgG抗体感作ラテックスを $9200\times g$ で10分間遠心分離による洗浄を2回繰り返した。沈渣のIgG抗体感作ラテックスを5%グリセロールおよび0.1%アジ化ナトリウムを含むPBS(pH 7.4)に再分散し、使用時まで4°Cで保存した。

1次抗体: ウサギ抗ウシIgG抗血清を用いた。

標識抗体: FITCを標識したヤギ抗ウサギIgG抗体を用いた。

3. 結果

蛍光抗体法用スライドガラスに塗抹したIgG感作ラテックスは15、30、45分間PBSに浸漬しても、剥離が認められなかった。粒径 $1.0\mu\text{m}$ のラテックス粒子の吸着率はIgG抗原が $200\mu\text{g}$ 以下の濃度で100%であった。一方、粒径 $6.0\mu\text{m}$ のラテックス粒子の吸着率は、IgG抗原 $25\mu\text{g}$ を結合させた時に100%であった。粒径 $1.0\mu\text{m}$ のラテックス粒子は視覚的に小さ過ぎたが、粒径 $6.0\mu\text{m}$ のラテックス粒子は、適切な大

きさだった。

IFA で 1 次抗体を用いない陰性コントロールでは、すべて陰性の所見を示した。またウシ IgG の代わりにヒト血清、BSA を感作したラテックスでも IFA は全て陰性の所見を示した。

100 倍希釈した FITC 標識抗体は、粒径 $1.0\mu\text{m}$ の IgG 感作ラテックスを用いた IFA で強い発色 (3+) を示した。一方、粒径 $6.0\mu\text{m}$ の IgG 感作ラテックスでは FITC 標識抗体の 50 倍希釈まで強い発色 (3+) を示した。

4. 考察

ELISA や IFA は判定までに要する時間が長く、自動化されていない。しかしながら、現在においても IFA は診断や研究に重要な技術であり、梅毒検査や抗核抗体検査などでは確定診断として用いられている。

細菌由来の毒素、細菌の可溶性抗原成分、核抗原やウイルスなどの可溶性抗原の抗体価測定には、中和試験、受身凝集反応、赤血球凝集抑制試験、ELISA などが使用されている。今回、可溶性抗原の担体として使用したラテックス粒子は、45 分間の浸漬においてもスライドガラスから剥離することなく、30 分を 2

回、計 1 時間浸漬させても剥離することはなかった。ラテックス粒子の代わりに、セファロース 4B の粒子をスライドガラスへ塗抹した場合は、スライドガラスから剥離することを確認している。また、ラテックス粒子は、自家蛍光と非特異反応を示すことなく、高い特異性が認められた。

粒径の大きなラテックス粒子 ($6.0\mu\text{m}$) を用いた場合に比べて粒径の小さなラテックス粒子 ($1.0\mu\text{m}$) を用いた場合に高い感度を示したが、今回の IFA に用いる担体としては粒径が大きいラテックス粒子の方がより適していると判断した。粒径の大きなラテックス粒子では、小さなラテックス粒子と比較して、感作させる可溶性抗原の適当量が約 8 分の 1 であった。さらに、大きなラテックス粒子の方が、顕微鏡での観察時により容易に判別可能であった。

ELISA は感度は非常に高いが、夾雑物による非特異反応で測定が困難になる場合がある。

ラテックス粒子を用いることで、可溶性抗原に対しても IFA が容易に行えることが明らかとなり、この方法は他の可溶性抗原に対する抗体価測定にも応用可能であると考えられた。