

〈原著〉

## ELISA法によるCEAおよびPSA測定試薬に 添加した超分子の効果

新井 智子<sup>1)</sup>、塚田 敏彦<sup>2)</sup>

### Effects of supermolecule additions to the enzyme-linked immunosorbent assay for the measurements of CEA and PSA

Tomoko Arai<sup>1)</sup> and Toshihiko Tsukada<sup>2)</sup>

**Summary** To investigate the effects of supermolecules on the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), different types of supermolecules (dendrimers, cyclodextrins, crown ethers, surfactants, and polyethylene glycols), and solid-phase sandwich ELISA kits for measurement of carcinoembryonic antigen (CEA) and prostate specific antigen (PSA) were used in this study.

In the one-step CEA ELISA, each supermolecule was added to the capture antibody immobilized well. Standard and antibody-enzyme conjugates were then dispensed into the well. The subsequent procedures were performed as described in the user manual. In the two-step PSA ELISA, each supermolecule was added to the well either before dispensation of a standard and assay buffer in the first reaction, or before dispensation of an antibody-enzyme conjugate in the second reaction. Except for above mentioned process procedures, were performed as described in the user manual. In all experiments, the absorbance of color development by adding an enzymatic substrate in each well was measured and compared with that of a control prepared with saline instead of supermolecules.

In the CEA measurement, absorbance was enhanced by the addition of Brij 35, Tween 20, PEG 6000, or PEG 4000. In the PSA measurement, absorbance was enhanced by the addition of PEG 6000 or PEG 4000 at the second reaction, whereas useful effects were not observed by the addition of supermolecules at the first reaction. Our results suggest that those supermolecules contributed to the enhancement of binding properties of antigen and enzyme-labeled antibody.

**Key words:** ELISA, Immunoassay, Supermolecules, Nonionic surfactants,  
Polyethylene glycol (PEG)

<sup>1)</sup>埼玉県立大学保健医療福祉学部健康開発学科  
〒343-8540 埼玉県越谷市三野宮820番地

<sup>2)</sup>東京電子専門学校  
〒170-8418 東京都豊島区東池袋3-6-1

受領日 平成24年4月2日  
受理日 平成24年4月16日

<sup>1)</sup>Department of Health Sciences, School of Health and  
Social Services, Saitama Prefectural University,  
820 Sannomiya, Koshigaya-shi, Saitama 343-8450, Japan

<sup>2)</sup>Department of Clinical Laboratory Medicine, Tokyo  
Electronics College, 3-6-1 Higashi-ikebukuro, Toshima-  
ku, Tokyo 170-8418, Japan

## I. 緒言

超分子の概念は19世紀半ば頃から既に化学に取り入れられていたものの、その姿が明確になったのは、フランスのLehnらによって超分子化学の定義づけがなされた1978年以降である<sup>1)</sup>。超分子とは、複数の分子が、ファンデルワールス力や水素結合のような非共有結合性の比較的弱い分子間相互作用を介して自己集合することにより、ある一定の構造と組成を生み出すようになった分子集合体の総称をいう<sup>2)</sup>。超分子は、分子が特定の分子を見分けてそれに働きかけ、独特の機能を発揮する分子認識にその起源をもち<sup>3)</sup>、1967年のクラウンエーテルの発見によるホスト・ゲストの化学を経て、現在では、人口化合物から天然化合物に至るまで「身のまわりであって凝集相をとるものはほとんどすべて分子集合体あるいは連続構造高分子であって、まさに超分子物質である」<sup>4)</sup>といわれるほど、その概念は広範囲に及ぶ<sup>5)</sup>。

一般的に超分子は大きく以下の5つのファミリーに分類されている<sup>6)</sup>。①小分子系超分子：受容体と基質、ホストとゲストのように数個の分子から構成される系。②多分子系超分子：数個以上の分子が集合したクラスターや、両親媒性分子が集合して形成されるミセルのように、数十～数百個の分子が集まって形成される高秩序性の集合体。③結晶性超分子：分子の会合が無限に進み、ゲル化や相分離が起こってゲルや結晶を形成したもの。④高分子系超分子：ポリペプチドのように、異なる構成単位が規則的に配列されて二次・三次の構造を形成する高分子。⑤超分子組織体：ポリペプチド鎖の会合によって形成された蛋白質のように、超分子を構成単位とする高次構造をもつ組織体。このように超分子には多くの種類が存在し、しかも個々の超分子では分子が組み合わさることで単独の分子からは想像もつかない性能や機能が発現するため、超分子の作用は多岐にわたり、化学・工学・医学のみならず、食品や化粧品などの様々な分野で応用されている。臨床検査においても、クラウンエーテルがNa<sup>+</sup>やK<sup>+</sup>測定用のイオン選択電極に<sup>6)</sup>、ポリエチレングリコールが高比重リポ蛋白中のコレステロール測定の前処理に<sup>7)</sup>、各々利用されてきた他、種々の測定試薬に界面活性

剤が添加されているのは周知のとおりである。こうした多様な機能と未知の可能性を有する超分子については、免疫学的測定系においても何らかの有用な作用を発揮することが期待されるが、これまでに広く「超分子」というカテゴリーを導入して、免疫学的測定系における有用性を検討した報告はない。そこで本研究では、種々の超分子を用いて、ELISA法による抗原抗体反応における超分子の効果を検討した。以下に検討に使用した超分子の種類とその基本的性質を示す。

①デンドリマー：核分子を出発点として分子が世代（generation：G）毎に放射状に枝分かれして成長した球状高分子で、核・分岐構造・表面基の三要素から構成される。分岐構造の構成と空間体積に応じたゲスト分子を取り込むが、ゲスト分子の出入りは表面基によって調節される<sup>8)</sup>。②シクロデキストリン（以下CD）：数個のグルコースが $\alpha$ -1,4結合で連結した環状オリゴ糖で、1分子中に含まれるグルコース単位数により、 $\alpha$ -(6量体)・ $\beta$ -(7量体)・ $\gamma$ -(8量体)CDと呼ばれる。上下に開口部をもつ円錐台形構造をとり、外側の開口部は親水性、内側の空洞内は親油性となっており、種々の有機分子をゲストとして空洞内に取り込む分子包接能をもつ<sup>9)</sup>。③クラウンエーテル：エーテルが数個つながった環状ポリエーテルで、王冠に似た分子構造をとる。最初に環の構成原子数（員数）、最後に環の中に存在するドナー原子数（酸素原子数）を表記する。内側が親水性、外側が親油性となっており、自身がホストとなって各種金属塩・アンモニウム塩・有機陽イオン等のゲストと錯体を形成する性質をもつ<sup>10)</sup>。④界面活性剤：分子中に親水基と親油基の双方をもつ両親媒性物質で、陽イオン性・両性・陰イオン性・非イオン性の4種に分類される。吸着・配向・ミセル形成などの基本的性質を有し、浸潤・起疱・可溶化・洗浄・潤滑などの効果を発揮することが知られている<sup>11)</sup>。⑤ポリエチレングリコール（以下PEG）：エチレングリコールが脱水重縮合して生成されるポリエーテルで、その重合度を示す数字と共に表記される。非イオン性・両親媒性で、経口摂取可能な数少ない合成高分子の一つである<sup>12)</sup>。

## II. 方法と材料

### 1. 超分子

本検討には以下の5種類・15個の超分子を使用した。

1) デンドリマー：エチレンジアミンを核とし、三級アミンの分岐構造をもつポリアミドアミン（以下PAMAM）デンドリマーのうち表面基に、①陽イオン性のアミノ基（NH-NH<sub>2</sub>）を有するもの（G5）、②両性のアミドエタノール基（NH-OH）を有するもの（G5）、③陰イオン性のカルボン酸基（COONa）を有するもの（G4.5）（全てシグマアルドリッチ）。

2) CD： $\alpha$ -CD（林原生物化学研究所）。

3) クラウンエーテル：18-クラウン-6、15-クラウン-5（いずれも和光純薬）。

4) 界面活性剤：①陽イオン性界面活性剤のQuartamin 24P（花王）、②両性界面活性剤のAmphitol 24B（花王）、3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]プロパンスルホン酸（以下CHAPS）（和光純薬）、③陰イオン性界面活性剤のドデシル硫酸ナトリウム（以下SDS）（和光純薬）、④非イオン性界面活性剤のポリオキシエチレン（23）ラウリルエーテル（以下Brij 35）（和光純薬）、ノニデットP-40（以下NP-40）（ナカライテスク）、ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート（以下Tween 20）（コスモバイオ）。

5) PEG：PEG 6000、PEG 4000（いずれも和光純薬）。

### 2. ELISA試薬と試料

ELISA測定試薬には、癌胎児性抗原（carcinoembryonic antigen、以下CEA）と前立腺特異抗原（prostate specific antigen、以下PSA）測定用のいずれもEnzyme Immunoassay Test Kit（IMMUNOSPEC Corp.）を使用した。

試料には上記測定キット添付の標準液を使用した。

### 3. 標準的測定方法と超分子の添加効果の検討

#### 1) CEA測定

CEA測定試薬は1ステップELISA法を原理としており、添付文書に記載された測定手順は、①抗CEA抗体が固相化されたマイクロプレート

に試料50  $\mu$ Lとペルオキシダーゼ（以下POD）標識抗体を添加混合して60分反応、②BF分離後にTMB基質100  $\mu$ Lを添加混合して20分反応、③反応停止液100  $\mu$ Lを添加混合後、15分以内に450 nmにおける吸光度を測定する、というものである。本検討では、超分子の効果を調べるために、試料50  $\mu$ L添加するところを、超分子と試料を各々25  $\mu$ Lずつ添加する方法へ変更した。試料には30 ng/mLの標準液を使用し、超分子は反応時の終濃度が3%となるように生理食塩水で調整して添加した。この際、全ての超分子添加試料について、標準液の代わりに生理食塩水を使用した試薬ブランクを同時測定した。結果は、超分子の代わりに生理食塩水を添加した試料を対照として比較検討した。

#### 2) PSA測定

PSA測定試薬は2ステップELISA法を原理としており、添付文書に記載された測定手順は、①抗PSA抗体が固相化されたマイクロプレートに試料50  $\mu$ Lと緩衝液100  $\mu$ Lを添加混合して60分反応（第1反応）、②BF分離後、POD標識抗体100  $\mu$ Lを添加混合して60分反応（第2反応）、③BF分離後、TMB基質100  $\mu$ Lを添加混合して20分反応、④反応停止液100  $\mu$ Lを添加混合後、15分以内に450 nmにおける吸光度を測定する、というものである。超分子の効果を調べるため、第1反応で試料50  $\mu$ L添加するところを、超分子と試料を各々25  $\mu$ Lずつ添加する方法と、第2反応でPOD標識抗体の分注前に超分子25  $\mu$ Lを添加する方法の両者の検討を行った。試料には25 ng/mL標準液を使用し、CEA測定の場合と同様に、超分子は反応時の終濃度が3%になるよう調整して添加した。全ての超分子添加試料について試薬ブランクをとり、超分子の代わりに生理食塩水を添加した対照試料を同時測定して評価することはCEA測定の場合と同様である。

#### 4. 反応時間の短縮化の検討

上記3の「超分子の添加効果の検討」の結果、効果を認めた超分子について、反応時間を60分から30分に半分へ短縮して同様に測定を行い、吸光度を比較した。

#### 5. 反応時間短縮プロトコールにおける検量線

超分子を添加して反応時間を半分にした場合

生物試料分析

でも、測定対象物質の濃度に比例した吸光度の上昇が認められなければ測定系としては成立しない。そこで、上記4の「反応時間の短縮化の検討」と同様の測定プロトコールでCEAおよびPSA測定キットに添付されている全ての標準液を測定し、超分子の代わりに生理食塩水を添加

して作成した検量線と比較した。

6. 超分子が発色系に及ぼす影響

超分子による試薬ブランク上昇のメカニズムを調べるため、以下の検討を行った。まず、上記3の「超分子の添加効果の検討」で試薬ブ

Table 1 Effects of supermolecules additions on the one-step ELISA for measurement of CEA

Additives (Final conc. 3.0%)		Standard (S) Abs.	Reagent blank (B) Abs.	S-B Δ Abs.
Control	Saline	0.751	0.016	0.735
Dendrimer	Cationic -NH-NH <sub>2</sub>	Scale out	Scale out	—
	Amphoteric -NH-OH	0.752	0.012	0.740
	Anionic -COONa	0.670	0.016	0.654
Cyclodextrin	α-CD	0.432	0.004	0.428
Crown ether	18-crown-6	0.215	0.040	0.175
	15-crown-5	0.448	0.007	0.441
Surfactant	Cationic Quartamin 24P	2.038	1.048	0.990
	Amphoteric Amphitol 24B	0.415	0.037	0.378
	CHAPS	0.183	0.041	0.142
Surfactant	Anionic SDS	0.049	0.041	0.008
	Brij 35	1.200	0.017	1.183
	Nonionic NP-40	0.575	0.059	0.516
	Tween 20	0.898	0.032	0.866
Polyethylene glycol	PEG 6000	1.360	0.038	1.322
	PEG 4000	0.932	0.017	0.915

To investigate the effects of supermolecules, 25 μL of supermolecules and 25 μL of standard containing 30 ng/mL of CEA instead of 50 μL of sample were dispensed into each antibody-coated well. The other procedures were performed as described in the user manual. Absorbance derived from these samples was compared with that of control prepared with saline instead of supermolecules. Reagent blank prepared with saline instead of standard was processed for each supermolecule.

Table 2 Effects of supermolecules added at the first reaction on the two-step ELISA for measurement of PSA

Additives (Final conc. 3.0%)		Standard (S) Abs.	Reagent blank (B) Abs.	S-B Δ Abs.
Control	Saline	0.786	0.016	0.770
Dendrimer	Cationic -NH-NH <sub>2</sub>	0.560	0.022	0.538
	Amphoteric -NH-OH	0.624	0.011	0.613
	Anionic -COONa	0.587	0.014	0.573
Cyclodextrin	α-CD	0.711	0.014	0.697
Crown ether	18-crown-6	0.859	0.016	0.843
	15-crown-5	0.617	0.014	0.603
Surfactant	Cationic Quartamin 24P	0.135	0.017	0.118
	Amphoteric Amphitol 24B	0.340	0.014	0.326
	CHAPS	0.563	0.014	0.549
Surfactant	Anionic SDS	0.025	0.016	0.009
	Brij 35	0.533	0.014	0.519
	Nonionic NP-40	0.045	0.010	0.035
	Tween 20	0.267	0.013	0.254
Polyethylene glycol	PEG 6000	0.655	0.011	0.644
	PEG 4000	0.709	0.015	0.694

To investigate the effect of supermolecules, 25 μL of supermolecules and 25 μL of standard containing 25 ng/mL of PSA instead of 50 μL of sample were dispensed into each antibody-coated well. The other procedures were performed as described in the user manual. Control and reagent blank were prepared in the same way as CEA measurement.

ンクの上昇を認めた超分子について、基質液400  $\mu$ Lに直接超分子12  $\mu$ Lを添加混合後、混合液の400~600 nmにおける吸収曲線を調べた。次いで上記混合液にさらに反応停止液400  $\mu$ Lを加えて再度吸収曲線を調べ、超分子による発色系への直接的作用の有無を確認した。

### Ⅲ. 結果

#### 1. 超分子の添加効果の検討

##### 1) CEA測定

30 ng/mLの標準液を使用して超分子の添加効果を調べた結果をTable 1に示した。超分子の代わりに生理食塩水を添加した対照試料の $\Delta$ Absは0.735であった。アミノ表面基をもつ陽イオン性デンドリマーと陽イオン性界面活性剤Quartamin 24Pを添加した場合には、いずれも吸光度の上昇を認めるものの、試薬ブランクも高く、有用性は認められなかった。試薬ブランクを考慮すると、非イオン性界面活性剤のBrij 35・Tween 20とPEG 6000・PEG 4000において $\Delta$ Absが0.866~1.322と対照試料よりも0.1以上高い吸光度が得られ、これらの超分子で測定感度を上昇させる作用が認められた。

##### 2) PSA測定

25ng/mLの標準液を使用し、第1反応時に超分子を添加して測定した結果をTable 2に示した。超分子の代わりに生理食塩水を添加した対照試料の $\Delta$ Absは0.770で、これよりも $\Delta$ Absが0.1以上高くなったものはなく、第1反応における超分子の有用な添加効果は認められなかった。

同様に第2反応時に超分子を添加して測定した結果をTable 3に示した。対照試料の $\Delta$ Absは1.135であった。CEAの場合と同様、アミノ表面基をもつ陽イオン性デンドリマーと陽イオン性界面活性剤Quartamin 24Pを添加した場合には、いずれも吸光度の上昇を認めるものの、試薬ブランクも上昇してしまう結果となった。試薬ブランクを考慮すると、第2反応でPEG6000とPEG4000を添加した場合に $\Delta$ Absが各々1.735と1.305と対照よりも高い吸光度が得られ、これらの超分子で測定感度を上昇させる作用が認められた。

##### 2. 反応時間短縮化の検討

添加によって吸光度の上昇作用を認めた超分子を使用して、測定時間（PSA測定では第2反応時間）を60分から30分に半分に短縮して測定

Table 3 Effects of supermolecules added at the second reaction on the two-step ELISA for measurement of PSA

Additives (Final conc. 3.0%)		Standard (S) Abs.	Reagent blank (B) Abs.	S-B $\Delta$ Abs.	
Control	Saline	1.145	0.010	1.135	
Dendrimer	Cationic -NH-NH <sub>2</sub>	Scale out	2.964	-	
	Amphoteric -NH-OH	1.158	0.007	1.151	
	Anionic -COONa	1.167	0.011	1.156	
Cyclodextrin	$\alpha$ -CD	0.903	0.017	0.886	
Crown ether	18-crown-6	0.709	0.013	0.696	
	15-crown-5	0.786	0.009	0.777	
Surfactant	Cationic Quartamin 24P	2.062	0.248	1.814	
	Amphoteric Amphitol 24B	0.856	0.007	0.849	
	CHAPS	0.478	0.017	0.461	
Surfactant	Anionic SDS	0.008	0.015	-0.007	
	Nonionic	Brij 35	0.642	0.023	0.619
		NP-40	1.201	0.010	1.191
Polyethylene glycol	Tween 20	1.158	0.015	1.143	
	PEG 6000	1.779	0.026	1.753	
	PEG 4000	1.319	0.014	1.305	

To investigate the effect of supermolecules, 25  $\mu$ L of supermolecules were dispensed into each well before dispensing of enzyme conjugate reagent. The other procedures were performed as described in the user manual. Control and reagent blank were prepared in the same way as CEA measurement.

した結果をFig. 1に示した。図は対照試料を正規の60分反応させた際の吸光度を100%として示している。CEAおよびPSA測定いずれにおいても、反応時間を半分にすると対照試料の吸光度は36%に減少した。これに対し、Brij 35とPEG 6000を添加してCEA測定を行った場合には、60分反応時の約70~80%の吸光度を維持し、Tween 20やPEG 4000を添加した場合でも60分反応時の50%と、対照と比べると高い吸光度を示した。PSA測定では、PEG 6000を添加した場合に60分反応時の82%の吸光度を示し、PEG 4000を添加した場合でも60分反応時の44%と、対照と比べると高い吸光度を示した。

3. 反応時間短縮プロトコルにおける検量線  
反応時間を半分に短縮し、全標準液を測定し

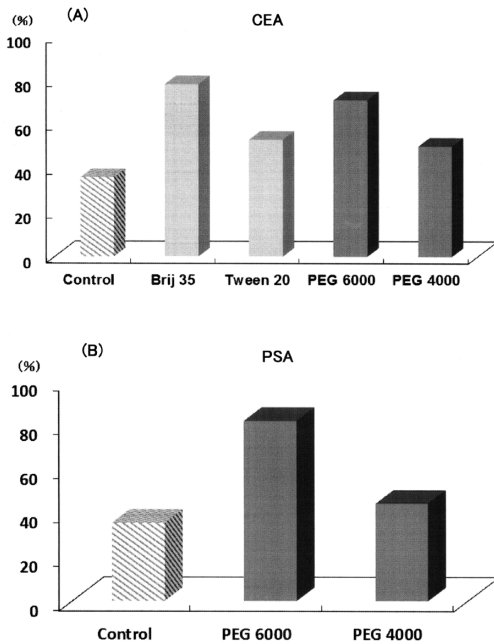


Fig. 1 Effects of supermolecules under the conditions of reduced incubation time. (A) Incubation time for measurement of CEA was reduced from 60 minutes to 30 minutes. (B) Second incubation time for measurement of PSA was reduced from 60 minutes to 30 minutes. Each graph shows the absorbance derived from control with regular incubation time (60 minutes) as 100%.

て作成した検量線をFig. 2に示した。CEA測定にBrij 35を添加した場合でも、対照と同様に濃度依存的な吸光度の上昇を示す検量線が得られた。PSA測定の第2反応にPEG 6000とPEG 4000を添加した場合も、CEAの場合と同様に、各々濃度依存的な吸光度の上昇が確認できた。

4. 超分子が発色系に及ぼす影響

結果1に示したように、アミノ表面基をもつ陽イオン性デンドリマーと陽イオン性界面活性剤Quartamin 24Pは、添加によって吸光度の上昇を認めたものの、試薬ブランクも上昇させてしまうことが明らかとなった。そこで、これらの超分子が試薬ブランクを上昇させるメカニズムを考察するため、基質に直接上記の超分子を添加

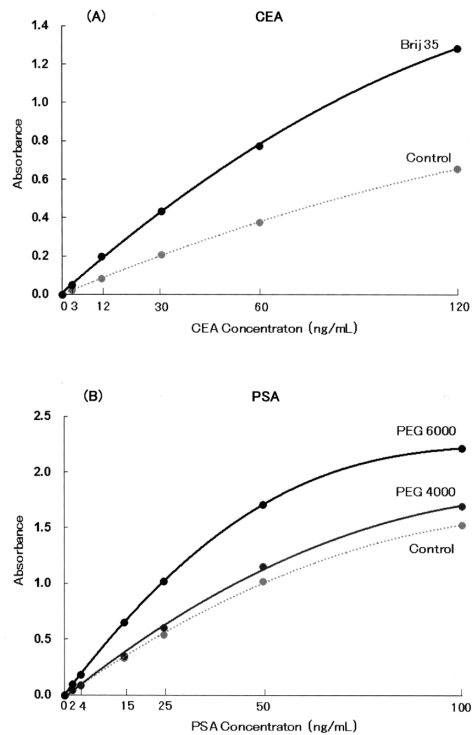


Fig. 2 Standard curve obtained under the conditions of reduced incubation time. (A) Each standard for CEA was measured in the presence or absence of supermolecules under the conditions of reduced incubation time. (B) Each standard for PSA was measured in the presence or absence of supermolecules under the conditions of reduced second incubation time.

し、次いで反応停止液を添加して吸収曲線を調べた。基質自体は400~600 nmにほとんど吸収スペクトルをもたず、そこへ酵素標識抗体を添加すると溶液は青色となり、480 nm付近を谷、400 nmと600 nmを山とするV字の吸収曲線を示した。さらに、反応停止液を添加すると溶液は黄色に変化して、400~500 nmにかけてほぼ一定の台形状の吸収スペクトルを示した。これに対し、基質にアミノ表面基をもつ陽イオン性デンドリマーと陽イオン性界面活性剤Quartamin 24Pを各々別々に添加した場合には、基質の吸収スペクトルに大きな変化は認められず、次いで反応停止液を添加しても同様で、400~600 nmに吸収は認められなかった。

#### IV 考察

最初にアミノ表面基をもつ陽イオン性デンドリマーと陽イオン性界面活性剤Quartamin 24Pによる試薬ブランクの上昇メカニズムについて考察する。仮にこれらの超分子がマイクロプレート上に吸着したり、固相化抗体と結合するなどしてBF分離後も反応の場に残留し、その後に添加された基質に直接的に作用して色原性基質を変性させることによって発色を起こしているのであれば、基質液に直接超分子を添加することにより発色を捉えることができるはずである。しかし、基質液に直接上記超分子を添加した場合や、さらに反応停止液を加えた場合のいずれにおいても、発色は認められず、実際にも400~600 nmにおける吸収スペクトルに変化はみられなかった。この結果は、試薬ブランクの上昇が、超分子による基質に対する直接的作用ではなく、あくまで酵素標識抗体の作用による通常反応と同様な基質の酸化による発色であることを示唆している。すなわち、アミノ表面基をもつ陽イオン性デンドリマーと陽イオン性界面活性剤Quartamin 24Pによる試薬ブランクの上昇は、これらの超分子が抗原非存在下で固相化抗体と酵素標識抗体との非特異的な結合を媒介することによるものと推測される。

1ステップ法のCEA測定では、非イオン性界面活性剤のBrij 35とTween 20、PEG 6000とPEG 4000の添加により、2ステップ法のPSA測定ではPEG 6000とPEG 4000の添加により、各々生理

食塩水を添加した対照試料よりも高い吸光度が得られ、さらにこの超分子添加による吸光度の上昇は、測定対象物質の濃度と比例関係にあることが確認された。これらの結果は、上記超分子が少なくとも本検討に使用したELISA法による測定試薬において、実質的に有用な測定感度の上昇作用を發揮することを示しており、広く免疫学的測定系において、測定感度の上昇や測定時間の短縮化などに貢献できる可能性が考えられる。

2ステップELISA法を原理とするPSA測定試薬における検討の結果、第1反応に超分子を添加した場合には効果を認めず、第2反応に添加した場合に吸光度の上昇を認めた。この結果は、超分子の添加による吸光度の上昇メカニズムに関して、超分子が固相化抗体と抗原の反応性を増強させる（より多くの抗原を結合させる）のではなく、標識抗体と抗原との反応性を増強させる（より多くの標識抗体を結合させる）作用を有していることを示唆するものと考えられる。そうであれば、なぜPEGやBrij 35、Tween 20などの超分子は2ステップ法ELISA試薬において、固相化抗体と抗原との反応性には効果的影響を及ぼさず、標識抗体と抗原との結合のみに促進的作用を示すのであろうか。超分子を第1反応と第2反応の各々に添加した場合には、いずれも反応の場に抗原・抗体・超分子の三者が共存する点においては違いがない。しかし、第1反応では抗体は固相化されていて自由度をもたないが、抗原は最初自由度を有した状態で反応の場に供されるのに対し、第2反応では抗原が固相化抗体と結合して自由度をもたない状態にあるが、抗体は反応液中を自由に移動できる状態にある点に相違がある。この相違が超分子の添加効果の違いに影響している可能性が考えられる。

添加効果を認めた超分子のなかでも、PEGはCEAとPSA測定の両者において効果を發揮したことから、超分子の添加による吸光度の上昇メカニズム解明の端緒として、PEGが抗原・抗体・免疫反応に及ぼす効果について考える。

PEGは古くから蛋白質やウイルスの沈殿剤として利用されており、比較的新しいところでは、HCVコア抗原測定の前処理操作にPEG 4000を使用した抗原濃縮法を導入することにより検出感

度が上昇したとの報告がある<sup>13)</sup>。これより古く、Harkissらは全身性エリテマトーデスに代表される自己免疫疾患の診断補助検査法としてPEG沈殿物補体消費試験<sup>14)</sup>を報告している。この試験は、自己免疫疾患患者の流血中に高率に存在する補体活性化能をもつ免疫複合体を検出する方法で、免疫複合体や凝集IgGを沈殿させるために低濃度のPEG 6000を使用する。PEG沈殿法は、PEGが他の水溶性高分子と比較して、①水との完全相溶性・高い溶媒親和性を示し、②水中で広がったコンフォメーションをとるために排除体積効果が高く、③高い運動性を有する特性をもつ<sup>15)</sup>ことを利用したものと考えられる。具体的には、分子内に多数の水酸基を持つPEGが水分子と水素結合を形成してよく溶ける一方、溶解していた蛋白質の水和水がPEGによって奪われ、代わりに蛋白質表面にPEGが水素結合で結合するために、蛋白質の水への溶解度が減少する。それに加え、PEGの排除体積効果によって蛋白質分子間にPEGが入り込めない空間が生じ、PEG溶解領域との間に浸透圧が作用して蛋白質分子が会合しようとすることによる溶解度の減少も生じて、結果として蛋白質が沈殿する<sup>16)</sup>。PEG沈殿がこのようなメカニズムによることを考えると、PEG濃度と沈殿する蛋白質の分子量の間には一定範囲で比例関係が成立することが予測される。PEG沈殿物補体消費試験では、血中に単独で存在するフリーの抗体はそのままに、自己免疫疾患患者に認められる免疫複合体や凝集塊を形成した抗体のみを沈殿させる必要があり、使用するPEGの濃度についてHarkissらは2.5%、安部らは4%<sup>17)</sup>、Digeonらは3.5%<sup>18)</sup>が最適終濃度であると報告している。今回検討したELISA法によるCEAやPSA測定ではPEGは終濃度3%で使用しており、上記報告に基づけば、フリーの抗原や抗体は可溶性を維持したままであるのに対し、抗原と結合した抗体についてはPEGの作用によって溶解度が低下して沈殿する結果、より多くの免疫複合体が固相化抗体に結合した可能性が考えられる。しかし、この理論は抗原と抗体が遊離状態で反応に供される1ステップ法におけるPEGの効果については説明できるものの、第2反応で既に抗原が固相化抗体と結合して標識抗体のみがフリーの状態にある2ステップ法の第2反応におけるPEGの効果は

説明できないように思われる。

森下らは免疫比濁法（TIA法）によるCRP測定における非特異反応の解析に関する報告のなかで、TIA法では抗原抗体反応の反応速度を速め、短時間に反応生成物の濁度を増加させることを目的として、通常は測定キットの第1試薬中にPEGが添加されていると報告している<sup>19)</sup>。この報告では、PEGの添加濃度や、TIA法において抗原抗体反応の速度を速めるメカニズムについては言及されていないため定かではないが、先のPEG沈殿物補体消費試験の場合と同様に、PEGの強力な水溶性と排除体積効果による蛋白質の溶解度の減少が関与している可能性が考えられる。CRPは分子量約110 kDa、IgGの分子量は約160 kDaであり、両者の分子量には大きな相違はなく、PEGの作用によって、沈殿まではしなくても水との親和性が低下してより会合しやすい状態になることにより、免疫反応性が高くなっている可能性は否定できない。これに対し、PSAは分子量34 kDaとCRPやIgGに比べて低分子であるためPEGによる排除効果が出にくく、従ってPSA測定の第1反応へのPEGの添加で効果が認められなかったことが考えられる。

長崎らはPEGの特性を利用し、ELISAやラテックス粒子表面に抗原や抗体を固定した後、鎖長の異なるPEGを用いたブロッキング処理を施すことによって、PEG鎖の密度上昇に伴って非特異吸着が減少するのみならず、その認識能が向上することを報告している<sup>20)</sup>。このPEGの共固定による抗体認識能の向上に関する分子機構はまだ明らかとなっておらず、PEGが抗体蛋白質の立体構造を安定化している可能性などが考えられている<sup>21)</sup>。こうした報告を総合して考えると、本検討において見出された超分子による測定感度の上昇効果は、PEGによる高い溶媒親和性と排除体積効果によって比較的分子量の大きい抗原抗体複合体や抗体の溶解度が減少することに加え、PEGが結合することで抗体の立体構造に変化が生じ、対応する固相化抗体や抗原との反応性が高まる可能性が考えられる。PEGの他にCEA測定において感度上昇効果を認めたBrij 35やTween 20については、いずれも親水基にエーテル型酸素を含むPEG型の非イオン性界面活性剤で、かつ親油基部分にフェニル環をもたないという共通項があり、親水基部分が水溶



液中でフリーのPEGと同様の作用を及ぼしていることが推測される。

文献

- 1) 有賀克彦, 国武豊喜: 超分子化学への展開. 岩波講座 現代化学への入門16, 1-6, 岩波書店, 東京, (2000)
- 2) Lehn JM: 竹内敬人訳: 超分子化学. 化学同人, 東京, (1997)
- 3) 岩本振武: 錯体化学と超分子: 歴史の綾. 化学と教育, 56(2): 56-59, 2008.
- 4) 上野昭彦: 超分子の科学. 化学と教育, 45(7): 374-376, 1997.
- 5) 妹尾 学, 荒木孝二, 大月 稔: 超分子化学. 1-16, 東京化学同人, 東京, (1998)
- 6) 柳 裕之, 榊 徹, 緒方隆之: クラウンエーテルおよび合成二分子膜の機能を基盤とした高性能イオン電極の開発. 日本化学会誌, 10: 629-636, 1999.
- 7) Allen JK, Hensley WJ, Nicholls AV, and Whitfield JB: An enzymic and centrifugal method for estimating high-density lipoprotein cholesterol. Clin Chem, 25(2): 325-327, 1979.
- 8) 張 祐銅, 相田卓三: 生体関連機能を有するデンドリマー. TCIメール, 112: 2-19, 2001.
- 9) 戸田不二緒監修, 上野昭彦編: シクロデキストリンー基礎と応用一. 産業図書, 東京, (1995)
- 10) 中村 博, 濱 弘哉: クラウンエーテルを用いる分子認識化学. 化学と教育, 56(2): 60-63, 2008.
- 11) 桑 克彦: 臨床化学分析における界面活性剤の利用. 検査と技術, 6(4): 279-287, 1978.
- 12) 高橋かより, 松山重倫, 斎藤 剛, 衣笠晋一: 合成高分子の分子量分布に関する認証標準物質開発. 分析化学, 60(3): 229-237, 2011.
- 13) 東本牧子, 高橋正彦, 上久律子, 春藤ひろみ, 斎藤英胤: ポリエチレングリコール濃縮法を用いた第2世代HCVコア抗原測定法の感度向上についての検討. 臨床病理, 55(11): 1008-1014, 2007.
- 14) Harkiss GD and Brown DL: Detection of immune complexes by a new assay, the polyethylene glycol precipitation-complement consumption test (PEG-CC). Clin exp Immunol, 36: 117-129, 1979.
- 15) 長崎幸夫: 生体適合性ポリエチレングリコール表面の構築. 高分子, 61: 1-6, 2012.
- 16) 岡田雅人, 宮崎香編: 宮崎 香: 有機溶媒によるタンパク質の沈殿濃縮. タンパク質実験ノート(上)抽出と精製, 79-80, 羊土社, 東京, (1996)
- 17) 安倍千之: polyethylene glycol(PEG)およびradial immunodiffusion (RID)による可溶性immune complexの検出. 実験医学, 33: 1360-1365, 1978.
- 18) Digeon M: Detection of circulating immune complexes in human sera by simplified assays with polyethylene glycol. J Immunol Methods, 16: 165-183, 1977.
- 19) 森下芳孝, 飯沼由嗣, 中島伸夫: TIA法における非特異反応の原因解析とその回避. 臨床病理, 48(8): 746-751, 2000.
- 20) Nagasaki Y, Kobayashi H, Katsuyama Y, Tomura T, and Sakura T: Enhanced immunoresponse of antibody/mixed-PEG co-immobilized surface construction of high-performance immunomagnetic ELISA system. J Colloid Interface Sci, 309(2): 524-530, 2007.
- 21) 前田瑞夫: プロジェクトレビュー プラズマ-バイオ融合科学への新展開 2. 生体高分子ソフトインターフェースの科学. J Plasma Fusion Res, 87(1): 691-695, 2011.