

2種の異種抗体を用いた ELISA による α_2 -アンチプラスミン抗原量の測定

奈良県立医科大学小児科学教室

松岡 宏明, 橋本 憲治, 金廣 照美, 福井 弘

八尾市立病院小児科

高 瀬 俊 夫

済生会御所病院小児科

杉 本 充 彦

国立奈良病院小児科

三 上 貞 昭

α_2 -ANTIPLASMIN ANTIGEN ASSAY BY ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) USING TWO KINDS OF POLYCLONAL ANTIBODIES

HIROAKI MATSUOKA, KENJI HASHIMOTO

TERUMI KANEHIRO and HIROMU FUKUI

Department of Pediatrics, Nara Medical University

TOSHIO TAKASE

Department of Pediatrics, Yao City Hospital

MITSUHIKO SUGIMOTO

Department of Pediatrics, Saiseikai Gose Hospital

SADAAKI MIKAMI

Department of Pediatrics, Nara National Hospital

Received March 31, 1989

Summary: A new solid enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for human α_2 -antiplasmin (α_2 -AP) antigen was developed using two kinds of anti-human α_2 -AP antiserum. The procedure of α_2 -AP antigen assay is as follows: Step 1; a microtiter plate is coated with an anti-human α_2 -AP guineapig antiserum for 24 hrs at 4°C. Step 2; serially diluted plasma is added to the plate and incubated for 24 hrs at 4°C. Step 3; after washing with a phosphate buffered saline, an anti-human α_2 -AP rabbit antiserum is added to the plate and incubated for 3 hrs at 37°C. Then, a peroxidase conjugated anti-rabbit IgG goat antiserum is added and incubated for 1 hr at 37°C. After the 3rd step, the microtiter plate is washed extensively. Finally, the α_2 -AP antigen is determined by ELISA method using o-phenyldiamin as the substrate.

The lower limit of α_2 -AP antigen in this assay was 0.1 U/dl. In 25 healthy adult males and 25 adult females, the mean values of α_2 -AP were 96.8 ± 12.2 U/dl and $95.2 \pm$

10.7 U/dl, respectively. A good correlation was found between the α_2 -AP level determined by this ELISA method and by Laurell's method. There was also a good correlation between α_2 -AP activity by an amidolytic method and antigen level by the ELISA.

Index Terms

enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), α_2 -antiplasmin (α_2 -AP), α_2 -AP antigen, α_2 -AP activity, amidolytic assay

緒 言

α_2 -アンチプラスミン (α_2 -antiplasmin, α_2 -AP) あるいは α_2 -プラスミンインヒビター (α_2 -plasmin inhibitor, α_2 -PI) と呼ばれる抗プラスミン作用物質は α_2 グロブリン領域に存在する分子量 67,000 の 1 本鎖の糖蛋白である¹⁾。 α_2 -AP は肝で産生され²⁾, ヒト血漿中 50~70 μ g/ml 存在するが, その作用はプラスミンに対して即効的にプラスミンを阻害するのみならず, プラスミノゲンのフィブリンへの結合を阻害, 又フィブリンへ架橋結合することによりフィブリン溶解を阻害することが明らかにされ, 生理的に重要な線溶阻止物質として認識されている³⁾。

α_2 -AP 抗原量を測定する方法としては, これまで α_2 -AP 抗血清を使用して 1 次元免疫拡散法⁴⁾ や Electro Immuno Assay (EIA) 法⁵⁾ で測定が行われてきたが, これらの方法では正常血漿 1 u/ml の 1/8 量以下の抗原量を測定するのが困難である。また新生児では採血が困難でしかも極少量しか採取できないという特殊性が有る。

今回, 著者等は新生児期の血中 α_2 -AP 抗原量を微量資料で, 且つ比較的簡単に測定しうることを目的として, 家兎及びモルモットに対する抗ヒト α_2 -AP 血清を作成し, これら 2 種の抗 α_2 -AP 血清を用いサンドイッチ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法による α_2 -AP 微量抗原測定法を確立したので報告する。

検体及び方法

I) 正常血漿: 20~40歳の健康成人50検体(男25, 女25)の肘関節部静脈より 23G 注射針で採取した血液を直ちに 3.8%クエン酸ナトリウムが 1/10量になるように混和し, 3,000 rpm 15分間遠心分離し血漿を得た。各測定のコントロールとしては健康成人10検体を等量混和したプール血漿を用いた。

II) α_2 -AP の純化: 高瀬らの方法⁶⁾ に準じ, ヒト新鮮凍結 ACD 血漿 800 ml を出発材料として, リジンセファロースアフィニティクロマト法, 硫酸沈澱, DEAE-セ

ファロース CL-6B カラムクロマト法, プラスミノゲンセファロースアフィニティクロマト法およびコンカナバリン A セファロースアフィニティクロマト法を順次行って, 1,500 倍の純化物を得た。用に臨むまで -70°C で保存した。

III) 抗ヒト α_2 -AP 血清の作成: α_2 -AP 純化物 170 μ g/ml と Freund Complete Adjuvant を 1ml ずつ白濁するまで混合し, 家兎の皮下に数カ所に分けて注射し, その後前量の純化物と Freund Incomplete Adjuvant を等量混合し 2 週間毎に 3 回同様の皮下注射を追加した。また, モルモットには α_2 -AP 純化物 170 μ g/ml と Freund Complete Adjuvant を 0.3 ml ずつを混合し 2 週間毎に計 8 回皮下注射した。最終免疫より 1 週間後に静脈採血し 37°C 3 時間清置後 3,000 rpm 15 分間遠心分離し 2 種

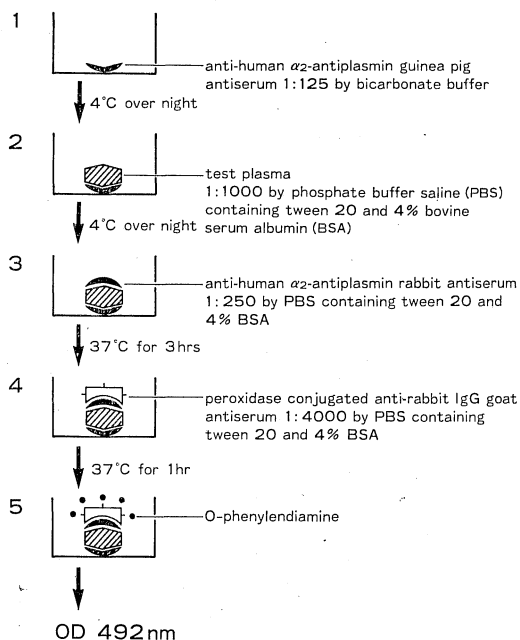


Fig. 1. A schema of enzyme-linked immunosorbent assay.

の異なるヒト α_2 -AP 血清を得た。これらの抗血清は56°C 30分間の加熱により非動化した後、BaSO₄ (100mg/ml) で吸着し3,000 rpm 15分間遠心分離後、更にその上清を プラスミノゲン-Sephrose カラム及び Concanavalin A-Sephrose カラムの素通り分画で吸収した。

VI) ELISA 法: 下記の順で行った。

1, 一次抗体 モルモット抗 α_2 -AP 血清 2 ml の50% 飽和硫酸沈澱分画を同量の 0.15 M 食塩加リン酸緩衝液 (pH 7.4) で溶解し、粗製の IgG 分画を得た。この IgG 分画を炭酸緩衝液 (pH 9.6) で125倍に希釈し、Nunk 社のポリプロピレン製の96穴マイクロプレートの各ウェルに 200 μ l づつ分注し 4°C に 1 昼夜置いた。次いで Tween 20 を含んだ 0.15 M 食塩加リン酸緩衝液 (pH 7.2) (以下 PBS tween にて 3 回洗浄後 4% BSA を含む炭酸緩衝液で 37°C 3 時間清置してブロックした。

2, 被検血漿の添加 4% BSA 加 PBS tween で 1,000 倍希釈した被検血漿を 100 μ l づつ各ウェルに入れ 4°C で 1 昼夜放置した。

3, 二次抗体の添加 上記反応物を PBS tween で 3 回洗浄後、4% BSA 加 PBS tween で 250 倍希釈した家兎抗 α_2 -AP 血清を 100 μ l づつ加え 37°C 3 時間反応させた。

4, ペルオキシダーゼ標識抗家兎 IgG ヤギ血清添加

3 の反応物を PBS tween で 3 回洗浄後、4% BSA 加 PBS tween で 4,000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗家兎 IgG ヤギ血清を 37°C 1 時間反応させ PBS tween で 4 回洗浄した。

5, 発色 終反応物を *o*-フェニレンジアミンで発色させ OD 492 nm で吸光度を測定した (Fig. 1)。

V) EIA 法: 自家製抗ヒト α_2 -AP 家兎血清を用いロケット免疫電気泳動法 (Laurell 法⁷⁾) を行った。アガロースゲル平板上に抗血清は 3%, 被検血漿は 8 μ l を添加し、0.8 mA/cm, 16 時間泳動した。泳動後、0.5% クマシーブリリアント青で染色、脱色乾燥して形成された被検血漿及び希釈正常血漿のロケット高より希釈直線を作成し被検血漿の値を求めた。

VI) α_2 -AP 活性の測定: 市販の発色性合性ペプチド基質の S-2251 (第一化学薬品社製) を用いた発色基質法にて測定した⁸⁾。

成 績

1, 抗ヒト α_2 -AP 家兎血清および抗ヒト α_2 -AP モルモット血清の免疫学的性状: ヒト ACD 血漿より高瀬らの法⁶⁾ で 1,500 倍に純化した α_2 -AP 因子を家兎およびモルモットに免疫して得られた 2 種の抗 α_2 -AP 抗血清は 1% アガロース平板上での Ouchterloney 法で正常血漿

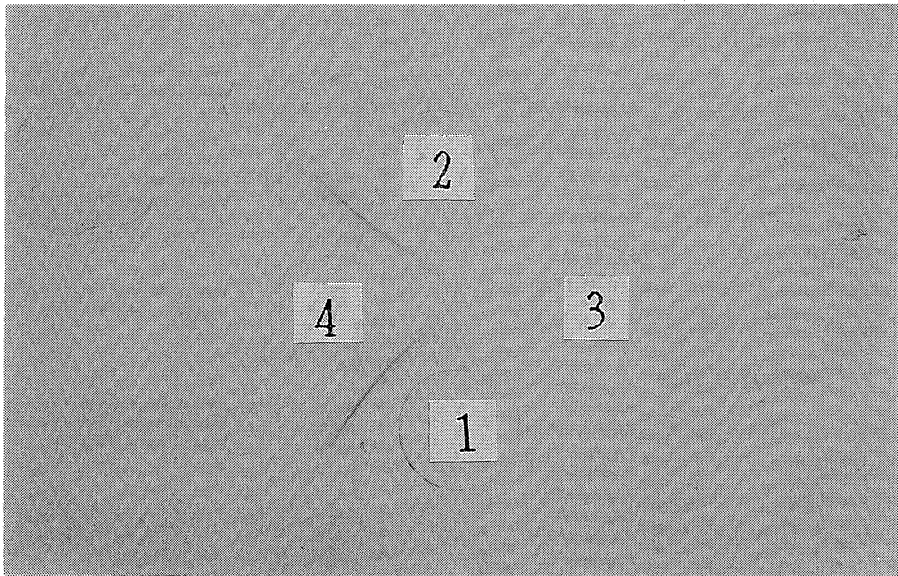


Fig. 2. Ouchterloney's immuno-diffusion in 1% agarose.

- 1: Rabbit anti-human α_2 -AP serum
- 2: Guinea pig anti-human α_2 -AP serum
- 3: The plasma of a patient with congenital α_2 -AP deficiency
- 4: Normal plasma

とそれぞれ1本の沈降線を形成して互いに fuse した。一方、両抗血清は先天性 α_2 -AP 欠乏患者血漿¹⁰⁾とは全く沈降線を形成しなかった (Fig. 2)。また家兎抗血清を3%含むアガロース平板上に正常血漿および先天性 α_2 -AP 欠乏患者血漿を添加し、Laurell 法を行ったところ、ロケット像は正常血漿にのみ形成された。

2, 二種の抗 α_2 -AP 抗血清を用いた ELISA 法の条件の検討: まず, 1次抗体としてモルモットの抗血清を, 2次抗体として家兎抗血清を用いたサンドイッチ ELISA で各抗血清の至適濃度を検討した。

125倍希釈モルモット抗血清を 200 μ l ずつ, 5つのウェルに分注し1昼夜放置后正常血漿の10, 100, 1,000, 10,000, 100,000倍希釈液を 100 μ l ずつ各ウェルに添加し, 4 $^{\circ}$ C 1昼夜反応せしめた。次いで, 2次抗体の家兎抗血清の250, 500, 1,000, 2,000および4,000倍希釈液

を各 100 μ l 添加し, 3時間反応後, ペルオキシダーゼ標識抗家兎 IgG ヤギ血清を反応せしめ, 最後に *o*-フェレンジアミンで発色させた。

OD 492 nm での吸光度は Fig. 3 (A) の如くで, 正常血漿 10^{-2} ~ 10^{-5} 希釈列の間で OD 差を判定しやすい2次抗体の濃度は250~500倍希釈液であった。

1次抗体のモルモット抗血清を1,000倍希釈にした場合と4,000倍希釈にした場合の2つの条件で, 上記と同様の検索をしたところ Fig. 3 (B) および (C) の如く, 正常血漿希釈曲線の OD 差は Fig. 3 (A) に比し漸次狭小となった。従って, 1次抗体はモルモットの抗血清を125倍に希釈し, 2次抗体は家兎抗血清を250倍に希釈して測定するのが最適条件と考えられた。

この条件で正常人血漿と先天性 α_2 -AP 欠乏患者血漿の ELISA 法による希釈曲線を観察したところ, Fig. 4 の如く, 片対数グラフで1,000倍~100,000倍の間で良好な直線関係が得られ, 先天性 α_2 -AP 欠乏患者血漿は域値以下の結果であった。

次に, 3次抗体に使用するペルオキシダーゼ標識抗家兎 IgG ヤギ血清の2,000倍希釈と4,000倍希釈について検討したが2,000倍希釈では吸光度が全体に高くなるだけであった。

反応時間について, 37 $^{\circ}$ C 3時間と4 $^{\circ}$ C 1昼夜と比較検討したがほぼ同程度の結果で余り差がなかった。

ELISA 法の再現性を見る目的で, 正常人血漿と α_2 -AP 欠乏患者血漿をそれぞれ混和し, 人工的に α_2 -AP 濃度が 5 u/dl, 25 u/dl, 50 u/dl, 100 u/dl, 130 u/dl の異なる5種の検体を作成し, 1週間に渡って繰り返し測定した coefficient variation (C. V.) は4.9%~7.5%で良好であった (Table 1)。

3, 健康成人の α_2 -AP 抗原量と α_2 -AP 活性: 男子25例, 女子25例の血漿サンプルについて, α_2 -AP 抗原量を ELISA 法および EIA 法で測定し, 又, α_2 -AP 活性は S-2251 を用いた発色基質法で測定した。

ELISA 法による α_2 -AP 抗原量の平均値 \pm SD は, 男子 96.8 ± 12.2 u/dl, 女子 95.2 ± 10.7 u/dl で, 男女合計では 96.0 ± 11.4 u/dl であった。EIA 法での α_2 -AP 抗原量値は男子 99.6 ± 9.2 u/dl, 女子 97.5 ± 6.9 u/dl, 男女合計で 98.6 ± 8.1 u/dl であった。両測定法で, 相関計数は $r=0.75$ と高い相関を示した (Fig. 5)。

また発色基質法による α_2 -AP 活性量は, 男子 98.9 ± 9.2 u/dl, 女子 98.0 ± 10.3 u/dl, 男女合計で 98.4 ± 9.8 u/dl であった。ELISA 法による α_2 -AP 抗原量と α_2 -AP 活性量は相関計数 $r=0.76$ で高い相関を示した (Fig. 6)。

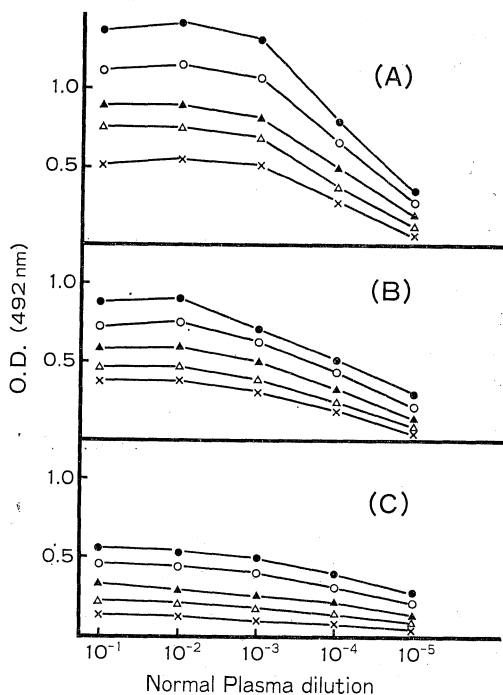


Fig. 3. Determination of optimal concentration of the first antibody (guinea pig) and second antibody (rabbit) for ELISA assay.

First antibody of anti-human α_2 -AP guinea pig serum was diluted in 1:125 (A), 1:1000 (B) and 1:4000 (C) with bicarbonate buffer. Second antibody of anti-human α_2 -AP rabbit serum was diluted in 1:250 (●-●), 1:500 (○-○), 1:1000 (▲-▲), 1:2000 (△-△) and 1:4000 (×-×) with PBS containing tween 20 and 4% BSA.

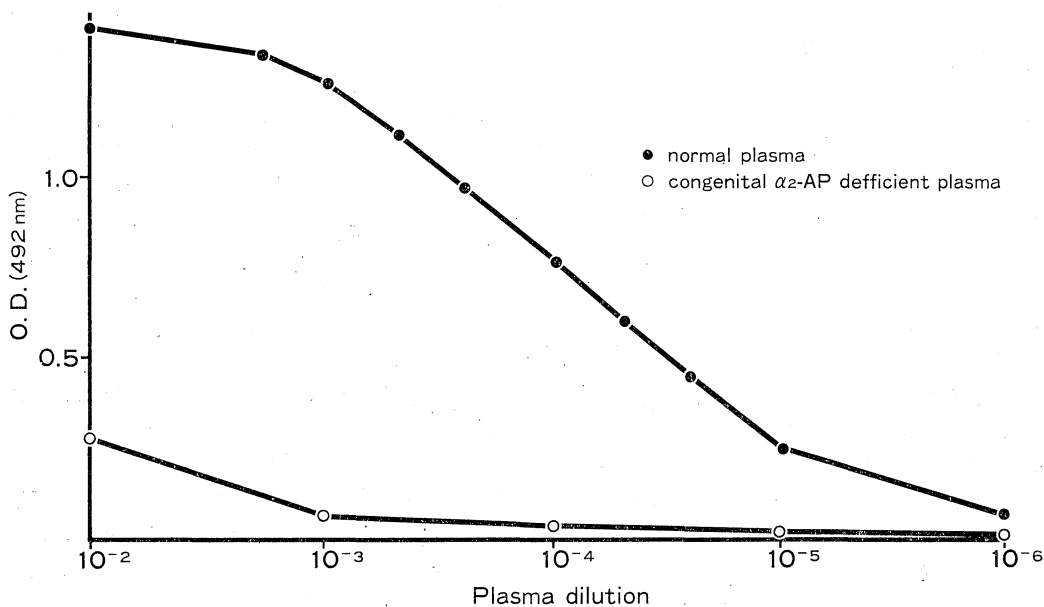


Fig. 4. Calibration curves for α_2 -AP antigen assayed by enzyme-linked immunosorbent assay.

Table 1. Reproducibility of α_2 -AP antigen assay (n=7)

Sample	Mean \pm S.D. (u/dl)	C.V. (%)
A	122.4 \pm 8.0	6.0
B	97.3 \pm 4.8	4.9
C	51.6 \pm 3.3	6.3
D	24.4 \pm 1.7	7.0
E	5.3 \pm 0.4	7.5

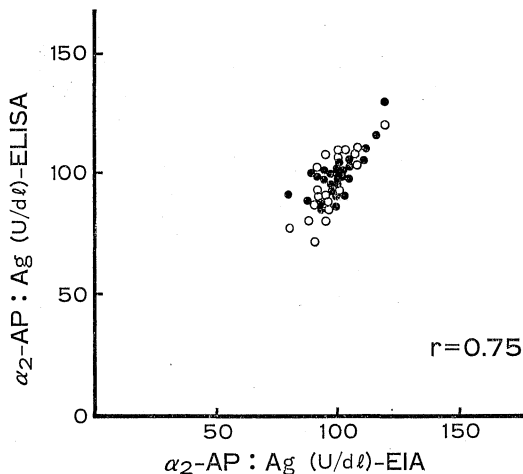


Fig. 5. Correlation between α_2 -AP antigen assayed by EIA and ELISA in 50 healthy adult blood. ● male ○ female

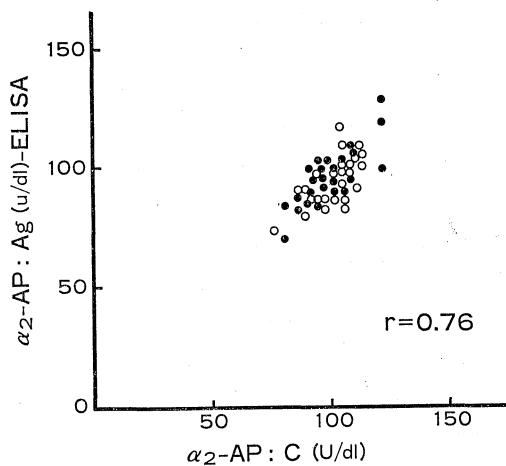


Fig. 6. Correlation between α_2 -AP activity and α_2 -AP antigen assayed by ELISA in 50 healthy adult blood. ● male ○ female

考案

諸井及び青木¹⁾, Müllertz¹¹⁾, Collen¹²⁾ らによりヒト血漿中の即効性の抗プラスミン物質, α_2 -AP が純化され, 抗血清が作成されるようになった当初, 血漿中の α_2 -AP 抗原量は一次元免疫拡散法, 次いで Laurell 法で測定が行われるようになった。

これらの方法では, 正常血漿の 8 倍希釈以上の低濃度

の測定は不能であった。青木ら¹³⁾は、抗ヒト α_2 -AP モノクローナル抗体を用い、高瀬ら¹⁴⁾は、抗ヒト α_2 -AP 家兎ポリクローナル抗体を用いそれぞれサンドイッチ ELISA 法による α_2 -AP 抗原測定法を開発した。

いずれも2次抗体である抗 α_2 -AP 血清に直接酵素を標識しており、この標識操作が比較的困難で、又、抗体標識する毎に結合する酵素量が異なるため、標準曲線の作成が難しい等の欠点があった。著者らは異なる2種の抗血清で抗原をサンドイッチし、更に2次抗体に対応する抗血清を酵素標識した第3次抗体と反応せしめることにより、従来の欠点をなくする方法を考案した。

即ち、第1次抗体として抗 α_2 -AP モルモット血清 IgG、第2次抗体として抗 α_2 -AP 家兎血清 IgG を、第3次抗体としては市販の抗家兎 IgG ヤギ血清を使用した。モルモット抗血清および家兎抗血清はヒト ACD 血漿より高瀬らの方法⁶⁾により得られた α_2 -AP 純化物をそれぞれモルモットおよび家兎に免疫して作成した。両抗血清は正常血漿と1本の沈降線を形成し互いに fuse したが先天性 α_2 -AP 欠乏症患者血漿とは沈降線を形成しないことを確かめた。

両抗血清 IgG を用いたサンドイッチ ELISA による α_2 -AP 抗原測定系を確立するため、1次抗体、2次抗体、3次抗体および加える検体の希釈濃度をそれぞれ変えて最適の条件を検討した。

1次抗体のモルモット抗血清を125倍に希釈し、これに対応して2次抗体の家兎抗血清を250~4,000倍に希釈して、正常血漿の 10^{-1} ~ 10^{-5} 希釈曲線を作成したところ、2次抗体の希釈度が増すに連れて、正常血漿希釈曲線の OD の傾斜は低くなり、この系では1,000倍以上の希釈での測定は無理があると判定した。

1次抗体として1,000倍及び4,000倍希釈液を用い上記同様の検討を行ったが正常血漿希釈曲線の OD の傾斜はより平低下した。従って1次抗体をモルモット抗血清の125倍希釈液、2次抗体を250倍希釈家兎抗血清を用いた場合、正常血漿の1,000倍~100,000倍希釈列まで急傾斜の直線を示した。なお、1次抗体、2次抗体をそれぞれ、前記以上の高濃度で行うと消費する抗血清量は多くなり日常検査として多数検体について実施するには難点がある。また、3次抗体の希釈度は系全体の吸光度に影響を与えるだけであった。

上記の測定条件で、先天性 α_2 -AP 欠乏血漿を1,000倍~1,000,000倍希釈液で吸光度を測定したところ、すべて正常血漿の1,000,000倍希釈による吸光度以下であった。

従って、本測定法では最低 $1\mu\text{l}$ の血漿量があれば理

論上 α_2 -AP 抗原量の測定が可能であり、正常血漿 1 ml 中の α_2 -AP 抗原量を 1 u とした場合、その測定感度は 0.1 u/dl であった。この測定感度は従来の EIA 法より数段良く、また測定系の確立も既報の ELISA 法より容易であった。

この測定法を用い検索した健康成人 50 例血漿中の α_2 -AP 抗原量は、 96.0 ± 11.4 u/dl でこれは青木、高瀬らの報告ともほぼ一致した。又、EIA 法で測定した α_2 -AP 抗原量との相関は $r=0.75$ 、S-2251 を用いて測定した α_2 -AP 活性との相関も $r=0.76$ といずれも良好でこの測定法の有効性が確かめられた。

結 論

モルモットおよび家兎に作成せしめた抗ヒト α_2 -AP 抗血清を用い、サンドイッチ ELISA による α_2 -AP 抗原測定法を開発した。

1、1次抗体として抗ヒト α_2 -AP モルモット血清、2次抗体として抗ヒト α_2 -AP 家兎血清を用い検体をサンドイッチせしめ、3次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗家兎 IgG ヤギ血清を用い、終反応物を o -フェニレンジアミンで発色し吸光度を測定した。

抗 α_2 -AP モルモット血清および抗 α_2 -AP 家兎血清の至適濃度はそれぞれ125倍希釈液、250倍希釈液であった。

2、本測定法の測定感度は 0.1 u/dl であった。

3、本測定法による健康成人 50 例 (男子 25 例、女子 25 例) の α_2 -AP 抗原量は男子 96.8 ± 12.2 u/dl、女子 95.2 ± 10.7 u/dl であった。

4、本測定法による α_2 -AP 抗原量と EIA 法による測定値との相関は $r=0.75$ で、又、本法による α_2 -AP 抗原量と α_2 -AP 活性の相関は $r=0.76$ といずれも良く相関した。

本論文要旨は第13回産婦人科・新生児血液研究会で発表した。

文 献

- 1) Moroi, M. and Aoki, N.: Isolation and characterization of α_2 -plasmin inhibitor from human plasma. *J. Biol. Chem.* 251: 5956-5965, 1976.
- 2) 山中恒夫, 青木延雄: 肝硬変における plasmin inhibitor の動きと t-AMGA. 第19回プラスミン研究会報告集. p. 64-71, 1979.
- 3) Aoki, N. and Harpel, P. C.: Inhibitors of the fibrinolytic enzyme system. *Sem Thrombo.*

- Hemost. 10: 24-41, 1984.
- 4) **Sakata, Y. and Aoki, N.:** Cross-linking of α_2 -plasmin inhibitor to fibrin by fibrin-stabilizing factor. *J. Clin. Invest.* 65: 290-297, 1980.
 - 5) **Aoki, N. and Yamanaka, T.:** The α_2 -plasmin inhibitor levels in liver diseases. *Clin. Chim. Acta* 84: 99-105, 1978.
 - 6) 高瀬俊夫, 岡本裕宏, 楠本清明, 飯田泰子, 安井資司, 藤村吉博, 上辻秀和: ヒト血漿よりの α_2 -プラスミンインヒビターの純化. *奈医誌.* 32: 518-525, 1981.
 - 7) **Laurell, C. B.:** Quantitative estimation of protein by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal. Biochem.* 15: 45-52, 1966.
 - 8) 浅井正樹, 遠藤 武, 佐藤久美子, 児玉隆成, 中島正三, 中野 茂, 高木 明, 浅井紀一: α_2 -プラスミンインヒビター測定用改良キットの検討. *臨床検査* 27: 933-937, 1983.
 - 9) **Ouchterloney, Ö.:** Diffusion-in-gel methods for immunological analysis II. *Progr. Allergy* 6: 30, 1962.
 - 10) 上辻秀和, 吉岡 章, 高瀬俊夫, 三上定昭, 飯田泰子, 塚田周平, 福井 弘: 先天性 α_2 -antiplasmin 欠乏症の1家系3症例. *臨床血液* 22: 1160-1167, 1981.
 - 11) **Müllertz, S. and Clemmensen, I.:** The primary inhibitor of plasmin in human plasma. *Biochemistry* 159: 545-553, 1976.
 - 12) **Collen, D.:** Identification and some properties of a new fast-reacting plasmin inhibitor in human plasma. *Eur. J. Biochem.* 69: 209-216, 1976.
 - 13) 三室 淳, 青木延雄: α_2 -plasmin inhibitor. *臨床病理*, 特集第61号: 97-105, 1985.
 - 14) **Takase, T., Yoshikawa, N., Okamoto, H., Yasui, M., Fujimura, Y., Fukui, H. and Katou, K.:** Enzyme immunoassay of α_2 -plasmin inhibitor. *Acta Haemat. Jap.* 47: 158-163, 1984.