

1 免疫学的測定法

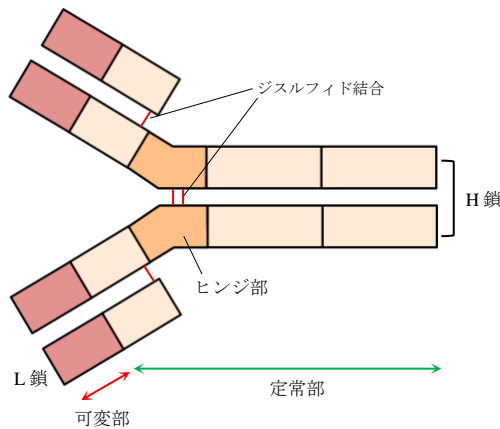
免疫反応を利用して物質を分析する方法として、免疫学的測定法（イムノアッセイ）がある。イムノアッセイは、抗体に抗原を認識させる（抗原抗体反応を利用する）ことにより、物質を定量する分析法であり、多成分一斉解析には不向きであるが、高感度な測定が可能である。また、合成医薬品やステロイドホルモンなどの低分子からタンパク質や核酸などの高分子までさまざまな物質の定量に用いられている。

1 抗体

1) 抗体の構造と機能

抗体は、免疫グロブリンといわれる一群のタンパク質であり、主に5つのクラスに分類（IgM、IgG、IgA、IgD、IgE）されており、その中でもイムノアッセイでは、主にIgGが用いられる。

IgGの構造を以下に示す。



IgGは、2本の重鎖（H鎖）と2本の軽鎖（L鎖）で構成されており、これらはジスルフィド結合で連結されている。H鎖とL鎖はそれぞれ定常部（C領域）、可変部（V領域）に区分される。

抗体は、化学構造上の微妙な違い（官能基の位置、立体配置、種類）を認識し、抗原と特異的に結合する。抗体と抗原が結合する際には、可変部を構成するアミノ酸の一部が特定の抗原との間に相互作用（水素結合、静電力、ファンデルワールス力、疎水性相互作用など）が働く。

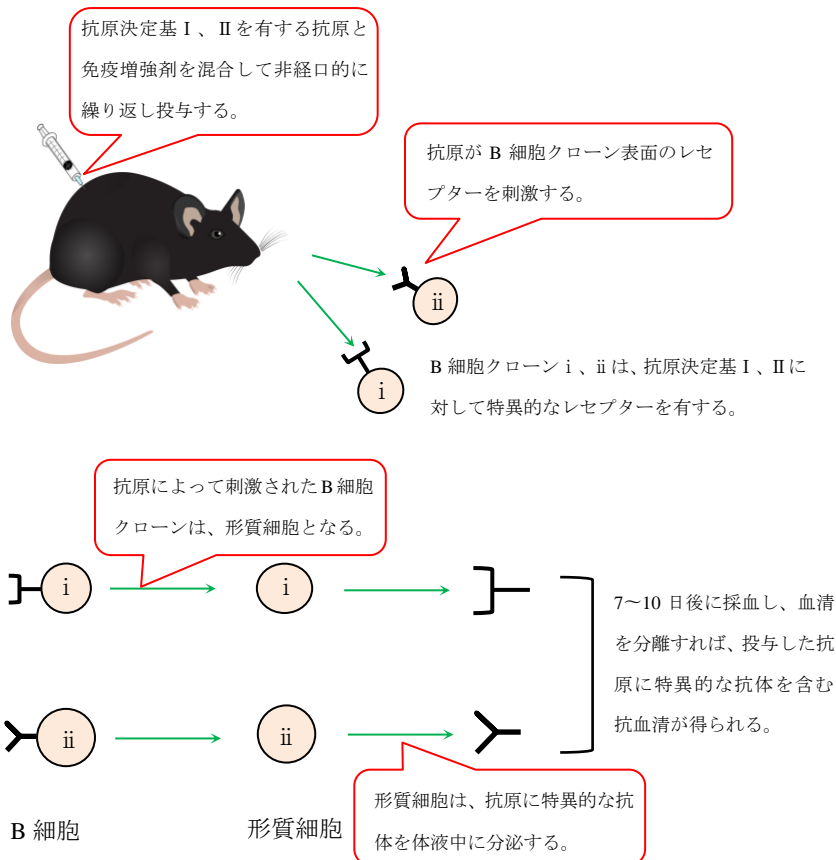
<参考：低分子の測定>

特異抗体と結合はするが、免疫反応を起こすことができない低分子をハプテンという。ハプテンに免疫原性を持たせるためには、タンパク質などの高分子と結合させる必要がある。このことから、低分子を免疫測定法により測定するためには、タンパク質などの高分子と結合させる必要がある。

2) 抗体の調製

イムノアッセイを行うに当たって、適切な抗体を調製する必要がある。イムノアッセイで用いる抗体の調製法を以下に示す。

例) 抗原に抗原決定基 I、II を有する場合



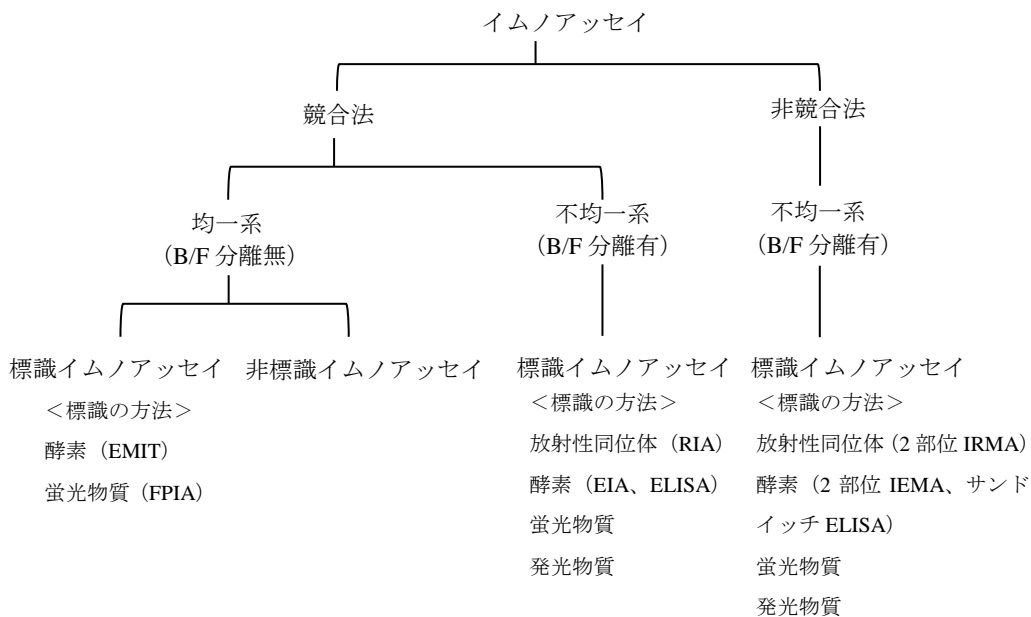
この方法により、得られた抗血清中の抗体は、抗原決定基 I、II に結合する抗体の混合物であるため、ポリクローナル抗体とよばれる。ポリクローナル抗体は、多くの抗原決定基を認識するため、特定の物質の定量には不向きである。そこで、現在では、細胞融合法により、特定の抗原決定基を認識するモノクローナル抗体を調製している。細胞融合法では、免疫反応させた形質細胞にミエローマ細胞（形質細胞を腫瘍化した細胞）を融合させ、ハイブリドーマ（抗体産生能と増殖能を併せもつ雑種細胞）を作製する。作成したハイブリドーマを、いったん単一のクローンに分離したのち大量に培養すると、モノクローナル抗体を調製することができる。

<参考：交差反応>

交差反応とは、抗体が目的抗原と類似する物質と反応することであり、反応特異性の高いモノクローナル抗体でも、交差反応は認められる。

2 イムノアッセイの分類

イムノアッセイは、抗原抗体反応の様式、B/F 分離の有無、標識の有無、標識の種類により分類される。

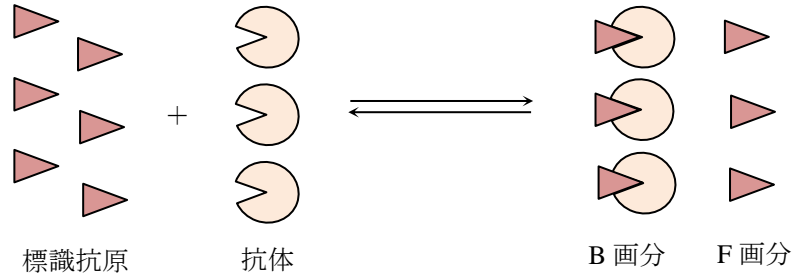


1) 競合法の原理

競合法では、一定量の抗体に対して、一定量の標識抗原（何らかのシグナルを発する物質を抗原に結合させたもの）と非標識抗原を競合的に反応させる。以下に競合法の概要を示す。

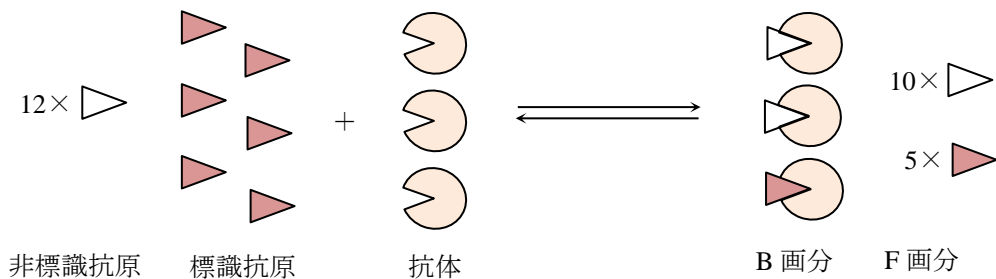
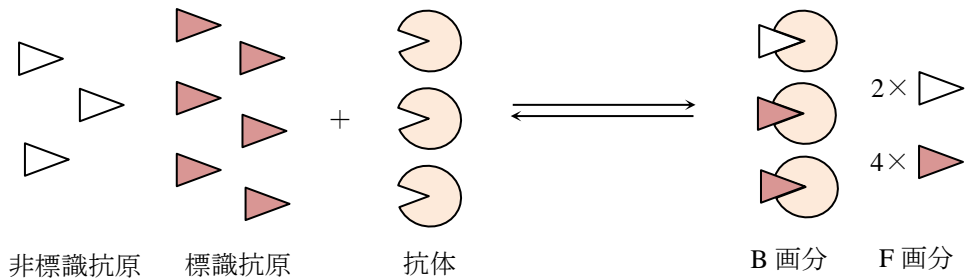
・手順 1

標識抗原のみと反応させたときに、その総量の 50%程度と結合する抗体を用意する。



・手順 2

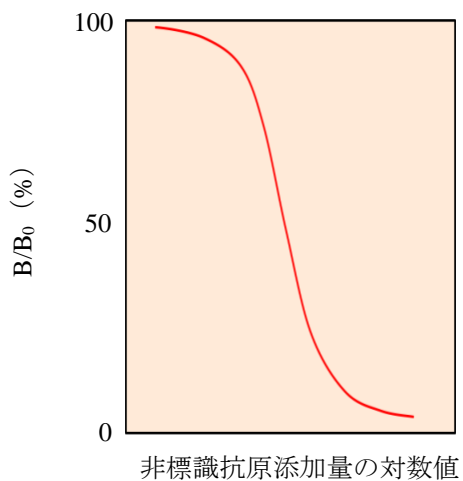
手順 1 で準備したものに、段階的に量を変化させた非標識抗原の添加する。



手順 1、2 で調製したものを B/F 分離し、その後、B 画分のシグナル強度を測定する。

・手順 3

手順 1、2 で得られたシグナル強度をもとに B/B_0 (B 画分のシグナル/非標識抗原 0 のときの B 画分のシグナル) を算出し、非標識抗原の添加量の対数値に対してプロットすると、標準曲線が得られる。



・手順 4

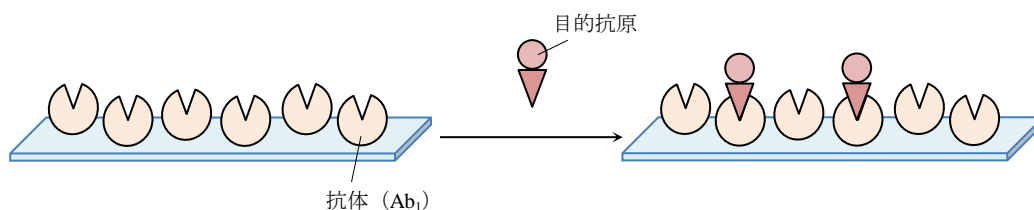
抗原の含量が不明な試料（定量したい試料）を手順 1 で調製したものに添加し、 B/B_0 を算出する。その値から標準曲線を用いて、試料に含まれる抗原の量を算出する。

2) 非競合法の原理

非競合法では、測定対象の抗原に過剰量の標識抗体を反応させて、形成される免疫複合体の量を標識シグナル強度から求める。以下に非競合法のひとつであるサンドイッチアッセイの概要を示す。

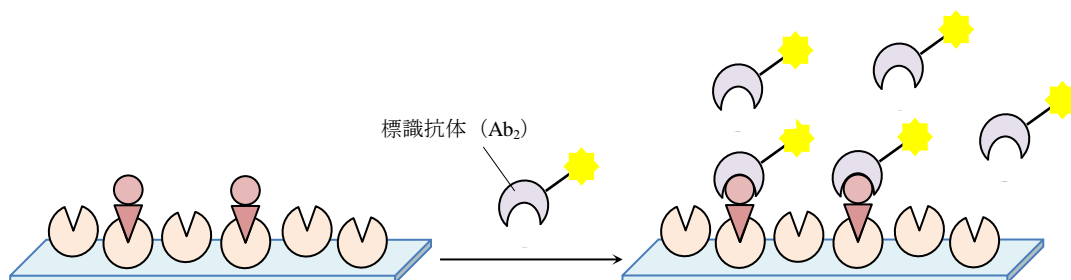
・手順 1

一定過剰量の抗体 (Ab_1) を固定化した固相に、目的抗原を添加し補足させる。



・手順 2

手順 1 で調整したものに、過量の標識抗体 (Ab_2) を添加する。

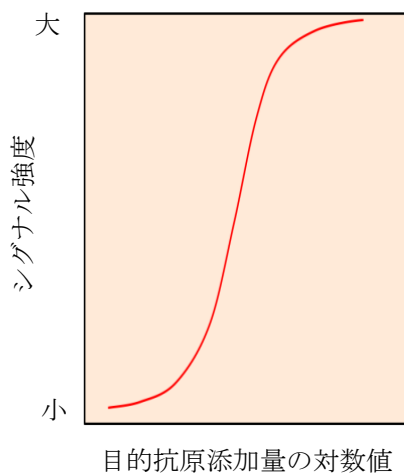


・手順 3

固相を洗浄して未反応の標識抗体 (Ab_2) を除去したあと (B/F 分離したあと)、固相上に残存する標識が発するシグナルを測定する。

・手順 4

手順 3 で得られたシグナル強度を目的抗原の添加量の対数値に対してプロットすると、標準曲線が得られる。



・手順 5

抗原の含量が不明な試料(定量したい試料)を一定過剰量の抗体(Ab₁)を固定化した固相に添加し、シグナル強度を測定する。その値から標準曲線を用いて、試料に含まれる抗原の量を算出する。

3 不均一系イムノアッセイ

B 画分と F 画分の分離を行った後、シグナル強度を測定する方法を不均一系イムノアッセイという。不均一系イムノアッセイでは、B/F 分離を行うため、操作が煩雑になるが、高い感度を得やすいため、広く利用されている。

1) 競合法に基づく不均一系イムノアッセイ

競合法に基づく不均一系イムノアッセイには、放射性同位元素で標識した抗原を用いるラジオイムノアッセイ (RIA) や酵素で標識した抗原を用いるエンザイムイムノアッセイ (EIA) がある。また、蛍光物質、発光物質で標識する蛍光イムノアッセイ、発光イムノアッセイがある。

・ ELISA

エンザイムイムノアッセイ (EIA) の中には、抗体 (抗原) をマイクロプレートに固定して行う ELISA (イライザ、エリザ) といわれる方法がある。ELISA については、プレート専用の洗浄装置があり、多くの試料を簡便にかつ迅速に分析することが可能であるため、臨床検査や基礎研究で幅広く利用されている。

2) 非競合法に基づく不均一系イムノアッセイ

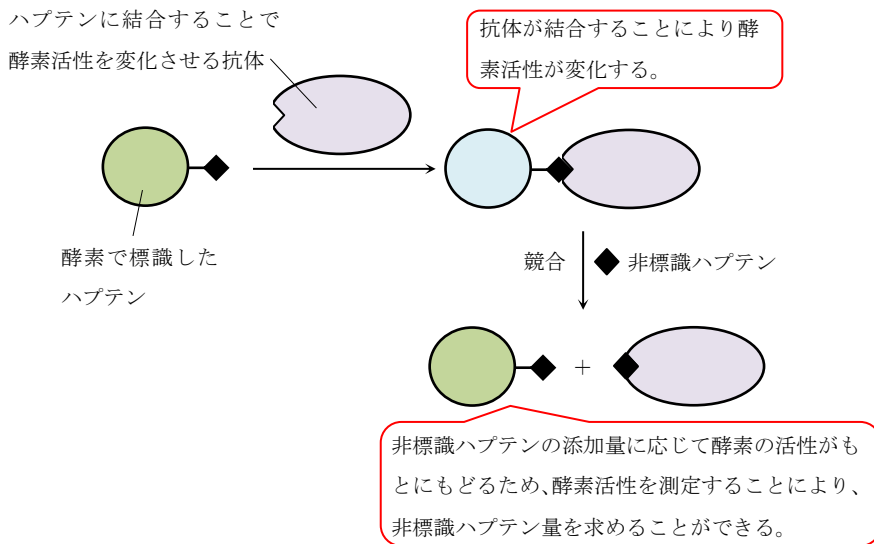
非競合法に基づく不均一系イムノアッセイには、放射性同位体標識抗体を用いる 2 部位イムノラジオメトリックアッセイ (別名: サンドイッチラジオイムノアッセイ) や酵素標識抗体を用いる 2 部位イムノエンザイモメトリックアッセイ (別名: サンドイッチエンザイムイムノアッセイ) がある。

4 均一系イムノアッセイ

B画分をF画分を分離せず、シグナル強度を測定する方法を均一系イムノアッセイという。均一系イムノアッセイでは、B/F分離を行わないため、不均一系に比べて感度は劣るが、操作が簡便で迅速性に優れている。均一系イムノアッセイは、血中薬物モニタリング (TDM) における血中薬物の測定などに利用されている。均一系イムノアッセイには、ホモジニアスエンザイムイムノアッセイ (EMIT) や蛍光偏光イムノアッセイ (FPIA) などがある。

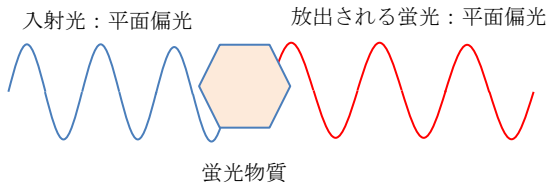
・ホモジニアスエンザイムイムノアッセイ (EMIT)

酵素で標識したハプテンに抗体が結合すると酵素活性が変化 (阻害または活性化) することがある。このことを利用して、免疫測定法を行う方法を EMIT という。



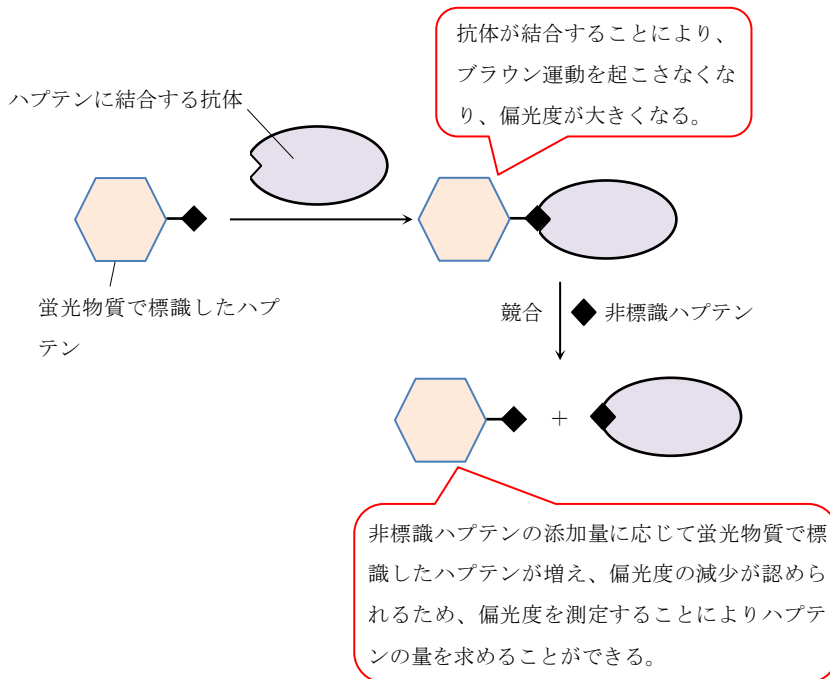
・ 蛍光偏光免疫アッセイ (FPIA)

蛍光物質に平面偏光を照射し励起させると、蛍光物質が励起され、放出される蛍光も平面偏光となる。



低分子量の蛍光物質で標識したハプテンは、ブラウン運動しており、放出される平面偏光があらゆる方向を示すようになるため、蛍光の偏光度が小さくなる（偏光が解消される）。それに対して、低分子量の蛍光物質で標識したハプテンに抗ハプテン抗体を結合した質量が大きな複合体では、ブラウン運動による偏光の解消が起りにくくなる。

蛍光偏光免疫アッセイでは、低分子量の蛍光物質で標識したハプテンに抗ハプテン抗体が結合しているものを準備しておき、そこに非標識ハプテンを添加することにより、非標識ハプテンの量を求めることができる。

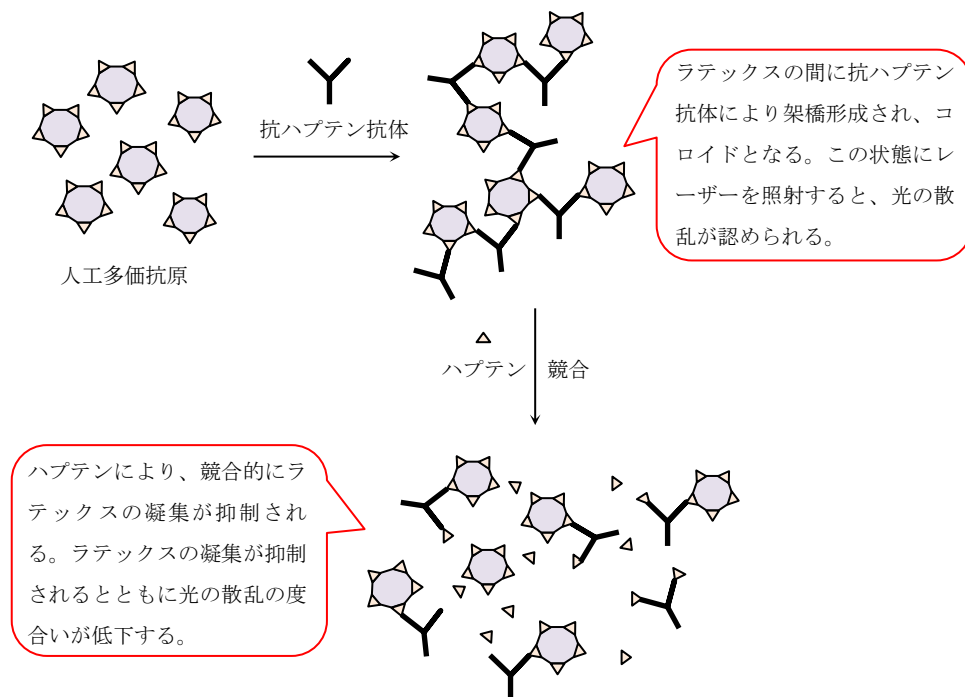


5 非標識イムノアッセイ

標識イムノアッセイでは、放射性同位元素や酵素、蛍光物質等で標識された抗原や抗体が用いられるが、非標識イムノアッセイでは、抗原や抗体のいずれも標識することなく、免疫複合体の生成量を直接測定する。非標識イムノアッセイの代表例として、ネフェロメトリックイムノアッセイ（免疫比濁法）がある。

・ネフェロメトリックイムノアッセイ（免疫比濁法）

ハプテン-タンパク質結合体をラテックス表面にコーティングした人工多価抗原に抗ハプテン抗体を添加すると、抗ハプテン抗体が人工多価抗原の間に架橋を形成し、ラテックスが凝集し、コロイド状の懸濁液となる。この懸濁液にレーザーを照射すると、チンダル現象により散乱光が認められる。この状態に遊離ハプテンを含む試料を添加すると、ラテックスの凝集は競合的に抑制され、散乱光の強度が低下する。この散乱光の強度の低下より試料に含まれるハプテン量を求める。



◇演習問題◇

問 1 免疫測定法は、多成分の一斉分析に適している。

問 2 低分子は抗原性を示さないので、抗体作製には、高分子と結合させる必要がある。

問 3 低分子は、サンドイッチ法により測定される。

問 4 通常用いられるのは、IgG クラスの抗体である。

問 5 モノクローナル抗体は、一般にポリクローナル抗体と比べて交差反応性が大きい。

問 6 均一系免疫測定法は、B (bound) /F (free) 分離を必要としない。

問 1 : 誤

免疫測定法は、抗原抗体反応を用いて、生体資料から目的とする測定対象物質を選択的かつ特異的に測定する方法である。よって、免疫測定法は、多成分の一斉分析には適していない。

問 2 : 正

問 3 : 誤

サンドイッチ法は複数の抗原決定因子を有する高分子化合物の測定に適している。

問 4 : 正

問 5 : 誤

モノクローナル抗体は、一般にポリクローナル抗体と比べ交差反応性（抗体が類似する別の物質と反応する性質）が小さい。

問 6 : 正

B (bound) /F (free) 分離とは、抗原抗体複合体（結合型 B）と、結合しなかった抗原又は抗体（遊離型 F）を分離することであり、不均一系測定法では、B/F 分離を必要とするが、均一系測定法では、B/F 分離を必要としない。

問7 化学発光イムノアッセイでは、標識物質に励起光を照射することで生じる発光を測定する。

問8 競合法では、測定対象物質の存在量に依存してシグナル強度が減少する用量依存曲線が得られる。

問9 ELISA では、抗原あるいは抗体を固定化した固相が用いられる。

問10 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) とは、酵素に特異的な抗原を検出・定量する方法である。

問11 Enzyme multiplied immunoassay technique (EMIT) は、均一系イムノアッセイの1種である。

問7：誤

化学発光イムノアッセイは、化学反応により生じたエネルギーより光が放出する現象を利用したイムノアッセイであり、標識物質に励起光を照射する必要はない。

問8：正

競合法では、一定量の抗体に対して非標識抗原(試料)と一定量の標識抗原を競合的に反応させるため、測定対象物質の存在量に依存してシグナル強度が減少する用量反応曲線が得られる。

問9：正

ELISA は、酵素免疫測定法の一つであり、抗原あるいは抗体を固定化した固相が用いられる。

10：誤

ELIS は、酵素イムノアッセイ(EIA)の一つであり、酵素標識した抗体に特異的に結合する抗原を検出・定量する方法である(酵素に特異的な抗原を検出する方法ではない)。

問11：正

問 12 蛍光偏光免疫アッセイでは、蛍光標識した抗原が抗体に結合すると抗原の回転運動が減少するため、蛍光偏光度は減少する。

問 13 免疫比濁法では、免疫複合体の形成により粒子が凝集する性質を利用している。

問 12：誤

蛍光偏光免疫アッセイにおいて、以下の現象が認められる。

- ・分子量の小さいものは、回転運動する→蛍光偏光度は減少する。
- ・分子量の大きいものは、回転運動が低下する→蛍光偏光度は増大する。

上記より、蛍光偏光免疫アッセイでは、蛍光標識した抗原が抗体に結合すると抗原の回転運動が減少するため、蛍光偏光度は増大する。

問 13：正

免疫比濁法では、抗原・抗体のいずれも標識することなく、抗原抗体複合体の形成により粒子が凝集し、濁度に変化することを測定することにより目的抗原又は目的抗体を検出・定量する方法である。