

29-0335

ScFv-ALP 融合タンパク質をキーマテリアルとする 11-デオキシコルチゾールの高感度イムノメトリックアッセイ

○丹羽 俊文¹, 岩上 景一², 事柴 周平², 小林 典裕³, 後藤 順一^{4,2} (¹東北大医保, ²東北大院薬, ³神戸薬大, ⁴東北大病院薬)

【目的】 Single-antibody immunoenzymometric assay (SA-IEMA) は、ハプテンにも適用が可能な非競合型免疫測定法の一方法で、従来の競合法よりも高感度な測定が可能と期待される。しかし、一定品質で高純度の酵素標識抗体が必要なため、ハプテンへの適用については必ずしも十分に検討されていない。今回我々は、遺伝子工学的に調製される抗体一本鎖 Fv フラグメント(scFv)と酵素の融合タンパク質を標識抗体として採用し、11-デオキシコルチゾール(11-DC; Mr 347)の高感度 SA-IEMA の確立を検討した。

【方法・結果】 先にクローニングした抗 11-DC 抗体 scFv と大腸菌由来 ALP の融合遺伝子を大腸菌中で発現させて、野生型 scFv と同等の 11-DC 結合性を示す融合タンパク質(scFv-ALP)を得た。測定対象の 11-DC を過剰量の scFv-ALP で捕捉したのち、未反応の scFv-ALP をそのパラトープを認識するβ型抗イディオタイプ(Id)抗体を利用して除去した。11-DC と scFv-ALP の複合体を、scFv フレームワークに特異的なα型 Id 抗体を用いて固相上に捕捉したのち、その ALP 活性を AttoPhos を基質とする蛍光光度法で測定した。本アッセイ系は 10 fg-100 ng の範囲で測定が可能視される用量作用曲線を与え、検出限界は 20 amol であった。また実用的な特異性を有し、健常人血清中 11-DC の測定を試みたところ、良好な成績が得られた。

【考察】 今回構築した SA-IEMA システムは極めて高感度なウエワーキングレンジも広く、各種ハプテンの超微量分析への応用が期待される。