

ELISA法を利用した抗原 - 抗体反応

著者	大橋 和義
雑誌名	技術報告
巻	26
ページ	29-30
発行年	2021-03-30
出版者	静岡大学技術部
URL	http://doi.org/10.14945/00028127

ELISA 法を利用した抗原-抗体反応

大橋和義

(静岡大学技術部教育研究第一部門)

1. はじめに・目的

ELISA法は Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (固相抗体免疫測定法)の略で、昨今の新型コロナウイルス感染症に関連して〇〇検査という文言が頻繁に見られるようになった検査法の1つである。

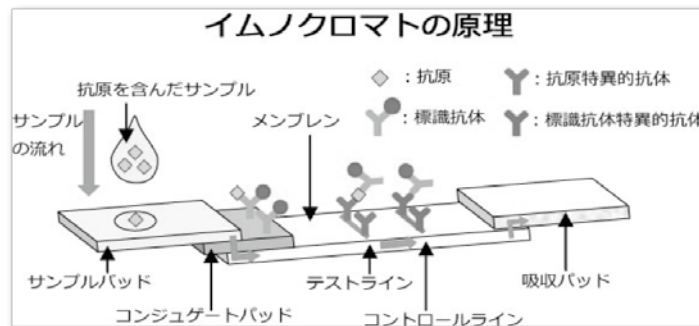
免疫の主な反応である抗原-抗体反応を利用した検査方法で、抗体あるいは抗原を特異的に検出・定量する方法である。

本研修では市販の ELISA キットを使用し①抗原検出、②抗体検出、③感染症の集団発生の追跡の実験を通じて感染症からの防衛手段である免疫について学ぶことを目的とした。

2. ELISA 法とは

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (固相抗体免疫測定法)の略で試料中に含まれる抗体あるいは抗原の濃度を抗原-抗体反応を利用して検出・定量する方法で 目的とする物質とだけ結合する「優れた特異的結合能」と「ごく微量の物質でも結合できる強い親和性」を持つ抗体 (抗原) を結合試薬として利用した測定法である。

ELISA法が最も応用されているのは、妊娠検査やインフルエンザの判定に利用されるイムノクロマトグラフだと思われます。以下にその原理を示す。



<http://www.hokudo.co.jp>

3. ELISA 法の種類 (メリット・デメリット)

3-1直接法

この方法は手順が少ないため他の方法よりも迅速。使用する試薬の種類やステップが少ないため、間違いが少ないなどメリットがあげられる。しかし目的とするタンパク質を含め、サンプル中のすべてのタンパク質がプレートに結合するためバックグラウンドが高くなる可能性がある。個々の抗原に対する酵素標識抗体が必要なため市販の標識抗体を入手するか自身で標識する必要がある。シグナルの増幅を行わないため感度が劣る等のデメリットがある。

3-2間接法

間接法ELISAでは標識した二次抗体を使って結合抗体を検出する。最初のステップは直接ELISAとほぼ同様、そして酵素で標識した二次抗体を加え最初の結合抗体を検出する。

二次抗体または二次/三次抗体を検出に用いることでシグナルが増幅するが、直接法に比べて行程が複雑で時間もかかる。一つの一次抗体に対して複数の二次抗体（ポリクローナル抗体の場合）が結合するため、シグナルが増幅され感度が高い。標識抗体を、抗原ごとに多種類用意する必要がないため経済的である。一種類の標識二次抗体を異なる一次抗体に使用できるためアッセイ系を構築しやすい等のメリットがあげられる。デメリットとしては二次抗体が交差反応する場合があります、バックグラウンドノイズがある場合がある。直接法と比べると、二次抗体のインキュベーションステップが加わるため、操作に時間を要する等があげられる。

3-3 サンドイッチ法

サンドイッチELISAでは、抗原ではなく捕捉抗体をELISAプレートに吸着させる。さらに抗原は、捕捉抗体と検出抗体の2つの抗体で認識させ、これにより「サンドイッチ」のような複合体ができる。そこに検出抗体を直接酵素標識するか、検出抗体に結合する酵素標識二次抗体をさらに加える。

直接法や間接法と比べて2-5倍高感度。抗原の捕捉と検出に二種類の抗体を使うため特異性が高い。目的とする抗原を測定前に精製する必要がないため混合物サンプルの解析に適している。

検出に直接標識法と間接標識法を用いることができるので、アッセイ系の構築がフレキシブルである等のメリットがあげられる。デメリットは抗体と検出抗体の間での交差性を減らすことが重要であり、標準化済みのELISA用のキットあるいは確認済みの抗体ペアを用いる必要がある。もしそうでない場合には、抗体の最適化を行う必要がある等があげられる。

3-4 競合法

競合ELISAは、ELISA法の中ではおそらく最も複雑な手法である。上述の各種の手法は競合法に改変することも可能。競合ELISAでは溶液中に抗原がない場合の反応シグナルと比べ、サンプル中に存在する抗原による競合反応を検出することで濃度測定を行う。つまり、サンプル中の抗原濃度が高いとシグナルは弱くなる。これはサンプル中の抗原量に応じてシグナルが逆相関することを意味している。

4. 結果



陽性で発色、陰性で発色しないことが確認できました。

謝辞

コロナ禍にもかかわらず参加された次の方々に感謝いたします。

中本順子、上田瑞恵、芦澤雅人、村野宏樹（敬称略）