

## 技術ノート

## 酵素免疫定量 (ELISA) 法を用いた植物二次代謝物の微量分析法

吉松嘉代\*・下村講一郎\*・澤田純一\*\*

## 1. はじめに

植物バイオテクノロジーの主要課題の一つである植物組織培養法による有用二次代謝物の生産は、わが国のような天然資源の乏しい国において、特にその開発が望まれている。三井石油化学が、ムラサキの細胞培養による色素成分シコニン誘導体の効率的な生産に成功し、それを商業化したことは広く知られているが、その秘訣は培地培養条件の詳細な検討とともにシコニン高生産細胞、すなわちエリート細胞の選抜にあった<sup>1)</sup>。シコニンは紫色の色素であるから、肉眼で容易に選抜することができるが、一般の化合物となるとそうはいかない。標的とする成分の高生産細胞を選抜するには、簡便でかつ感度よく分析を行う必要がある。

抗原-抗体反応を利用して成分の分析を行う放射性同位元素免疫定量 (RIA) 法は、以上の条件を満たす有効な手段であり、HPLC 法では分析が不可能な nM レベルでの分析が可能である。しかし、放射性同位元素を用いるための施設とその管理、また放射性同位元素でラベルした標識化合物が必要である。

そこで筆者らは、ELISA 法で培養液中の成分の微量分析を行い RIA 法とほぼ同じ感度での分析が可能であることを確認した<sup>2)</sup>。この方法は通常の実験室で行うことができ、また、複雑な成分の抽出を必要としないため、簡便かつ迅速な成分分析が可能である。本稿では我々が行っている 96 穴マイクロタイタープレートを用いた ELISA 法による微量定量法を紹介する。

## 2. ELISA 法の原理および手順

固相を用いた ELISA 法は応用範囲が広く、目的に応じて種々の方法が用いられている。例えば、Idetek から発売されている植物ホルモン定量キット PHYTODE-TEK™ は、植物ホルモンに対する抗体を固相に吸着し、酵素標識の植物ホルモンと試料を固相中の抗体と反応させて定量する方式を用いている。われわれが用いているのは抗原を固相とする競合法で、その原理および手順を第 1 図に示す。抗原を吸着させたウェル(1)に一次抗体 (特異抗体) と試料溶液を加え反応させる(3)と抗体の一部は試料中の標的物質と結合し、また一部は固相中の抗原と反応する。反応後よく洗浄することで固相に結合した特異抗体だけが残る。これに酵素標識した二次抗体を加え反応させると一次抗体と二次抗体が結合し(4)、洗浄後基質を加えると固相に結合した酵素の量に対応した発色が得られる(5)。

ここで、ウェルに結合した特異抗体の量は、試料溶液中の標的物質の量と負の相関があり、また、固相に結合した二次抗体の量すなわち発色の強さと比例関係にある。そこで、あらかじめ調製した種々の濃度の標準溶液を(3)で試料溶液の代わりに加え、標的物質の濃度と発色強度の標準曲線を作製し、実際に試料溶液で得られた発色強度を標準曲線に外挿することにより試料溶液中の標的物質濃度が判る。第 2 図に ELISA の標準曲線の例を示す。

ところで ELISA 法では、用いる ELISA プレートごとに測定感度の変動があるので、プレートごとの測定値を直接比較できないことが多い。そこで、各プレートごとに標準曲線を描き、これに対しての各検体の濃度を得る。

## 3. ELISA 法の実際

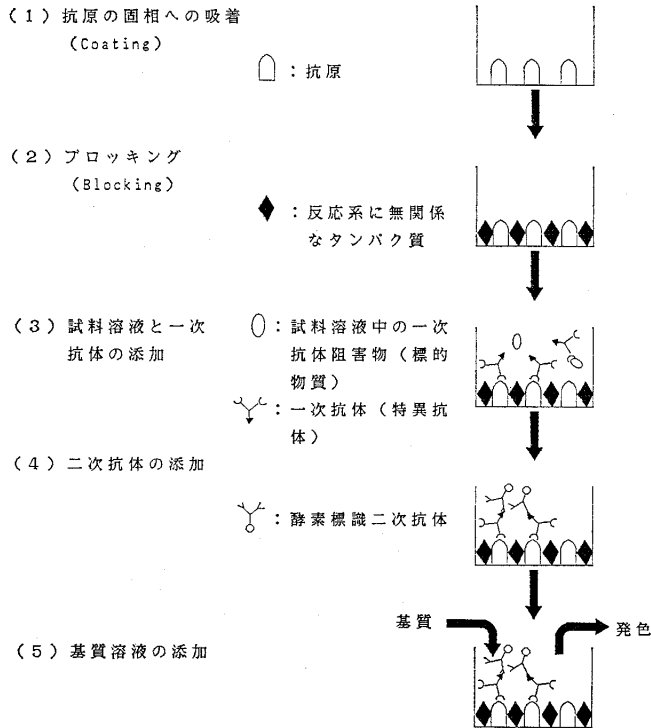
## (1) 器具および試薬

ELISA 法に用いる器具および試薬を第 1 表に示す。ELISA 法の各ステップにおいては、次の試薬を添加する前に、アスピレーターで吸引しながらウォシャーを用いて洗浄液でよく洗浄し、水分を切り、次のステップに持込みがないようにすることが大切である。酵素標識

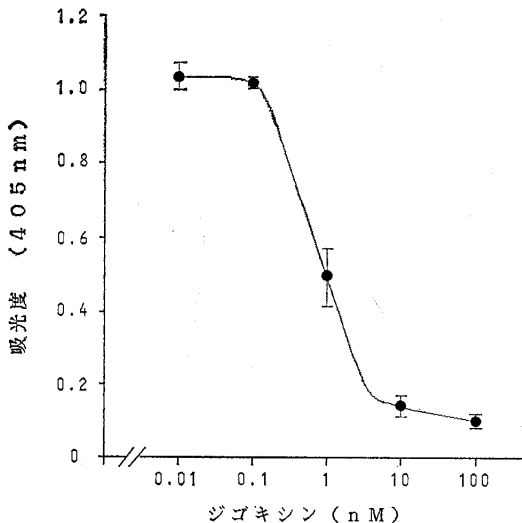
\* Kayo YOSHIMATSU, \*\* Koichiro SHIMOMURA and  
\*\* Jun-ichi SAWADA: Determination of Plant Secondary Metabolites by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

\* 国立衛生試験所筑波薬用植物栽培試験場 (〒305 つくば市八幡台 1)  
Tsukuba Medicinal Plant Research Station, National Institute of Hygienic Sciences, 1 Hachimandai, Tsukuba, Ibaraki, 305 Japan.

\*\* 国立衛生試験所機能生化学部 (〒158 東京都世田谷区上用賀 1-18-1)  
Division of Biochemistry and Immunochemistry, National Institute of Hygienic Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158, Japan.



第1図 ELISA 法の原理および手順



第2図 ELISA 法によるジゴキシンの標準曲線

二次抗体を反応させた後の洗浄は特に念入りに行う。

(2) 抗原および一次抗体の調製

ある物質に対する特異抗体を作製するには、動物を抗原で免疫しその抗血清をそのまま用いるか、その脾臓細胞 (抗体産生細胞) を腫瘍細胞と融合させてモノクロー

第1表 ELISA 法に必要な器具および試薬

(a) 器具

- 1) 96 穴マイクロタイタープレート (平底)
- 2) マイクロピペット
- 3) 8 チャンネルマイクロピペット
- 4) マイクロピペット用チップ
- 5) 8 チャンネルマイクロピペット用バット
- 6) マイクロプレートウォッシャー
- 7) マイクロプレートリーダー

(b) 試薬

- 1) 0.05 M 炭酸塩緩衝液 (pH 9.6)
- 2) 0.15 M NaCl を含む 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) (PBS)
- 3) ブロッキングおよび抗体、試料希釈溶液: 0.1% (w/v) カゼインを含む PBS
- 4) 洗浄液: 0.05% (w/w) Tween 20 を含む PBS
- 5) 抗原 (固相吸着用)
- 6) 一次抗体 (特異抗体)
- 7) 二次抗体 (酵素標識動物種特異イムノグロブリン抗体)
- 8) 基質溶液
- 9) 反応停止液

(a)2) 3) とともに 5~50  $\mu$ l, 50~200  $\mu$ l ぐらいのものが 2 種あると便利である。

(b)7) 8) 9) は市販されており、添付書に使用方法が記載されている。

ン抗体を作製する方法が一般的である。しかし、一般の二次代謝物は分子量が小さく抗原として認識されにくい。ため、ハプテン-タンパク結合体を作製する必要がある。タンパクの結合する位置は、抗体の特異性と大きく関わっており、また、その化学反応が標的とする物質の構造を大きく変化させることもあるので、その物質に応じた抗原の調製法を検討しなければならない。たとえば、ジゴキシンは過ヨウ素酸化<sup>9)</sup>、*Ailanthus altissima* のカシノイド、アイラントンやケシのモルヒネは、ヘミサクシネート誘導体を合成後、カルボジイミド法や混合酸無水物法<sup>4,5)</sup>、スコポラミンは、ノルスコポラミン-N- $\beta$ -プロピオン酸を合成後、活性エステル法を用いて<sup>6)</sup> タンパク結合体を作製している。

免疫する動物は、マウス、ウサギ、ヒツジ等がよく用いられている。抗血清は免疫した動物からの全採血で容易に得られるが、実験の再現性や特異性あるいは抗体の保存を考慮するとモノクローン抗体を作製する方が、より有益性が高い。モノクローン抗体調製の詳細な手法は、成書を参照されたい<sup>7,8)</sup>。

### (3) 二次抗体および基質

二次抗体は酵素標識動物種特異イムノグロブリン抗体、すなわち一次抗体の作製に用いた動物種に特異的な抗体を用いる。標識酵素は、アルカリフォスファターゼと西洋ワサビペルオキシダーゼがよく使われている。酵素標識動物種特異イムノグロブリン抗体は市販されており、容易に入手できる。基質は、それぞれの酵素に応じたものがキットとして市販されており、基質により検出方法が異なる。どの酵素と基質を選ぶかは、マイクロプレートリーダーの種類や、実験の内容により決める。

## 4. ELISA 法の操作

### (1) 抗原の吸着

固相に吸着させる抗原は、非特異的結合を避けるため、原則として動物の免疫に用いた抗原とは異なるハプテン-タンパク結合体を用いる。ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリプロピレン、ポリビニール製のマイクロプレートは、抗原や抗体を受動的によく吸着し、ELISA 用として市販されているものもある。われわれは、ポリスチレン製の ELISA 用マイクロタイタープレート（平底）を用いている。固相の表面は結果を左右する重要な因子であり、製品ごとに抗原の吸着性をチェックする必要がある。ELISA 固相への抗原の吸着は、用いる緩衝液の pH とイオン強度に左右され、アルカリ pH で比較的イオン強度の低い条件でよく吸着されることが多い。0.05 M 炭酸塩緩衝液 pH 9.6 が一般に使用されている。われわれは、上記の緩衝液で 2  $\mu$ g/ml の

抗原溶液を調製して吸着に用いている。これは後に述べる特異抗体（一次抗体）の濃度とともに最適条件を決定した方がよい。抗原の吸着は、抗原溶液 50  $\mu$ l を各ウェルに分注してラップ等で包み、4°C で一晩あるいは室温で 2 時間放置して行う。

### (2) ブロッキング

抗体が抗原以外の固相と結合するのを防ぐための操作で、反応系に無関係なタンパクでウェルをおおう。ウシ血清アルブミン溶液等がブロッキング試薬として市販されているが、高価である。われわれは 0.1% カゼインを含む PBS 200  $\mu$ l をウェルに分注し、30 分間放置してブロッキングを行っているが、良好な結果を得ている。カゼインは、少量の PBS を 60°C に加熱して溶かしメスアップする。

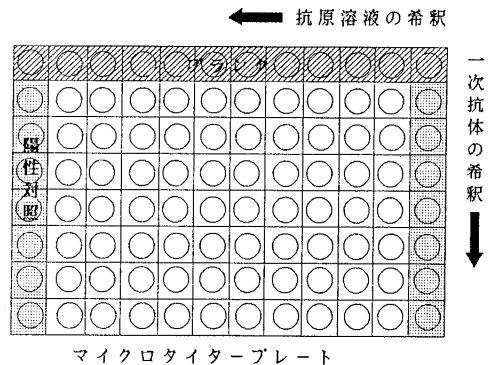
### (3) 抗原および一次抗体の希釈

吸着させる抗原と一次抗体の濃度は、第 3 図のようにそれぞれを順次希釈し、適当な吸光度が得られるところを選び決定する。

種々の濃度の抗原溶液 50  $\mu$ l で吸着を行ったプレート上にブロッキング後、種々濃度の一次抗体 50  $\mu$ l と 0.1% カゼインを含む PBS 溶液を添加し 30 分間室温で反応させる。洗浄後、メーカー指定の濃度に希釈した二次抗体溶液 50  $\mu$ l を添加して 30 分間反応させよく洗浄した後、基質溶液（調製法はメーカーの添付書を参照）50  $\mu$ l を加え室温で放置する。30 分後、反応停止液 50  $\mu$ l を添加（反応後すみやかに測定を行うときは添加しなくてもよい）し、マイクロプレートリーダーで吸光度を測定する。なお、一次抗体および二次抗体の希釈には 0.1% カゼインを含む PBS を用いる。

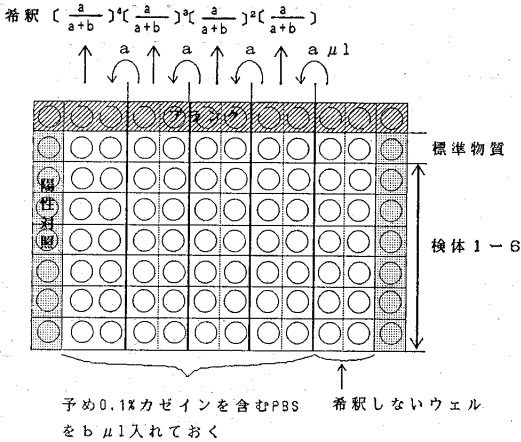
### (4) 検体の希釈

ELISA 法で検出できる試料の濃度範囲は第 2 図に示



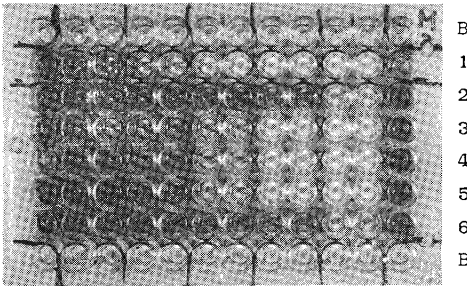
第 3 図 抗原および一次抗体の希釈濃度決定

1) 同列は、同濃度の抗原溶液で吸着を行う。2) 同行は、同濃度の一次抗体溶液を添加する。



第4図 検体の希釈

\* 8チャンネルピペットを用いて  $a \mu\text{l}$  ずつの列に添加し、ピペット操作でよく混合する。上図は、2つのウェルが同じ濃度の測定試料溶液になる様に5段階希釈を行う例である。プレート上で希釈した試料溶液は、8チャンネルピペットを用いて、測定用プレート上の同じ位置に  $50 \mu\text{l}$  ずつ添加する。



第5図 ELISA 法での測定例

B: ブランク, 1: ジゴキシン, 2~6: ケジギタリス (*Digitalis lanata*) の毛状根

すように狭い範囲に限られているので、一つの検体につき3~5段階の希釈を行う。検体は、新鮮試料をそのままホモジナイズ後遠心してその上清をもちいるか、エキスを少量のメタノール等の溶媒で溶かして用いる。希釈は、0.1% カゼインを含む PBS を用いる。標準試料や測定試料の調製は、第4図に示すように別の未使用のプレートを用いると便利である。また、ある一定の濃度以上のものだけを検体の中から選抜したいときには段階希釈は必要ない

(5) 成分の定量

最適濃度に調製した抗原溶液で吸着が完了したプレ

ートをブロッキング後、試料溶液と最適濃度に希釈した一次抗体をそれぞれ  $50 \mu\text{l}$  加え 30 分間反応させる。後の操作は 4. (3) で述べた抗原、一次抗体の濃度決定の操作と同様である。第5図に測定例を示す。また、定量値の信頼性を確認するために、一次抗体の特異性を調べておく必要がある。上記の操作において、試料溶液の代わりに標的物質と構造的に類似した物質の溶液を添加して同様の操作を行い、一次抗体の交叉反応性を調べておく。なお、ブランク (吸光度のベースライン) は第1図 (3) の操作で試料溶液と一次抗体の代わりに 0.1% カゼインを含む PBS を加えて同様に操作し、一方、陽性対照 (吸光度の最大値) は、(3) で試料溶液の代わりに 0.1% カゼインを含む PBS を一次抗体とともに加えて同様に操作する。

5. おわりに

以上述べてきた ELISA 法による微量定量法の手法はほんの一例であり、実験者各自がさらに方法を工夫することにより、応用が広がるものと期待される。ELISA を用いた植物二次代謝物の定量例はまだ少ないが、バイオテクノロジーの発達により様々な特性を持った植物細胞が多数得られるようになった現在、ますますその有効性が増加していくであろう。培養細胞の選抜に本稿が役に立てれば幸いである。(1990年6月1日受理)

文 献

- 1) 高橋 滋, 藤田泰宏, 1990. 最新・植物細胞培養とファインケミカルズ, p. 147-153, シーエムシー, 東京.
- 2) 池田嘉代, 下村謙一郎, 佐竹元吉, 石丸幹二, 澤田純一, 寺尾允男, 1989. 日本薬学会第 109 年会講演要旨集Ⅲ, p. 191.
- 3) Smith, T. W., Butler, V. P. Jr., Haber, E., 1970. Biochemistry, 9: 331-337.
- 4) Jaziri, M., 1990. Phytochemistry, 29: 829-835.
- 5) Wainer, B. H., Fitch, F. W., Rothberg, R. M., Fried, J., 1972. Science, 176: 1143-1145.
- 6) 菊池 裕, 入江昌親, 丹野雅幸, 末吉祥子, 神谷庄造, 石丸幹二, 下村謙一郎, 澤田純一, 寺尾允男, 1989. 日本薬学会第 109 年会講演要旨集 V, p. 81.
- 7) 青木邦夫, 齊藤 拓, 井手口隆司, 宮崎 香, 角野富三郎, 山下仁平, 堀尾武一, 1987. 蛋白質核酸 酵素, 別冊 No. 30, p. 171-185.
- 8) 岩崎辰夫, 安東民衛, 市川かおる, 保井孝太郎, 1988. 単クローン抗体: ハイブリドーマと ELISA, 講談社, 東京.