



「免疫電極」による免疫反応の研究

坪村 宏*・山本直登**

1. 免疫反応とは

病原菌や毒物などの異物が体内に入りこむといわゆる抗原として働らき、これらを識別したり、排除する作用をもった免疫物質すなわち抗体が体内につくられる。抗体は抗原と特異的に結合し、これを無害のものとし、生命の維持に寄与する。免疫反応は実際の診断や治療法に広く利用されているが、今なお生物学や医学にとって、最も多くの謎を秘めた領域といえよう。

近年、X線解析などにより、抗体の構造が明らかにされ、抗原抗体反応部位の構造が解明されつつある。免疫反応の測定には沈降・凝集反応、ケイ光抗体法、ラジオアイソトープによる方法などが多く利用されているが、あるものは非常に操作が厄介であったり、またあるものは結果が容易に定量化しにくいなどの難点がある。

筆者らはこれまで興味をもって進めてきた界面電気現象の研究の一例として、免疫反応を直接電氣的測定によって調べることを考え、帝國臓器製薬KKの沢井政信氏らとの協同で、2、3年来研究を行ってきたが、一応の成功をみたので紹介する¹⁾。その原理は抗体などの免疫活性物質を金属の表面に化学結合により固定し、これを電極として対極との間の電位を測定するもので、電極表面で免疫反応がおこるとその電位が変化することを見出したのが要点である。また免疫反応に類似した反応としてよく知られている酵素と酵素阻害剤との錯体形成反応についても、これらの蛋白質で化学修飾した電極をもちいて電極測定を行い、電位変化がおこるこ

* 坪村 宏 (Hiroshi TSUBOMURA), 大阪大学基礎工学部, 合成化学科, 教授, 理学博士, 物理化学

** 山本直登 (Naoto YAMAMOTO), 大阪大学基礎工学部, 合成化学科, 助教授, 理学博士, 物理化学

とを明らかにした。

2. 免疫電極の作り方

長さ10cm余りの細いチタン線(直径1.0mm)の一端を約1000°Cで短時間加熱すると、その表面に薄い酸化被膜ができる。この表面にシアニ化臭素で処理することによってイミノ基をつけた後、抗体を溶かしたアルカリ性水溶液に浸すことによって、抗体(蛋白質)を金属線の端の部分に化学的に固定する。これにガラス管などを取りつけて免疫電極を作ることができる(図1)。抗体の代わりに抗原又は酵素を化学修飾した電極をつくることもできる。この反応は大略

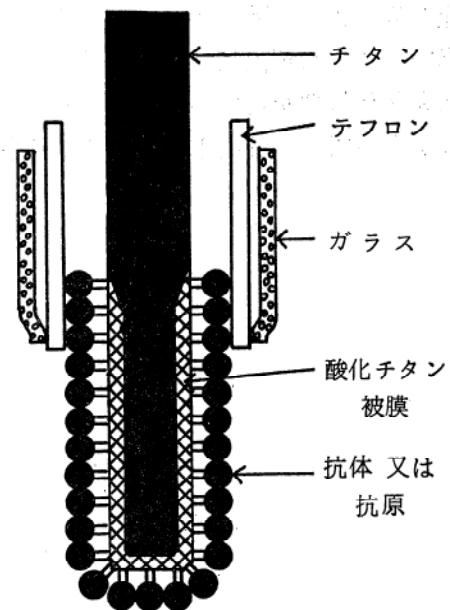
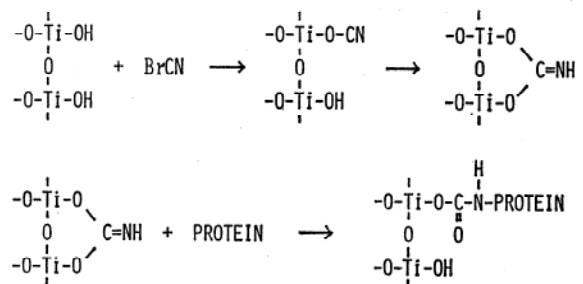


図1. 免疫電極



次式に示すように進行すると考えられる。

このような方法で固体表面に活性分子をつけることを化学修飾と呼び、最近、他の分野でいろいろと研究が進められている。

電気測定を行うための参照電極は、免疫反応に対して不活性であって、電氣的に応答しないものでなくてはならない。我々は主としてチタン線を同様に加熱し、シアン化臭素処理した後、尿素を化学修飾したものを参照電極とした。

3. 測定の方法

測定装置の概略を図2に示した。測定セル内に溶液を入れ、免疫電極と参照電極を取りつける。2本の電極間の電位を高い入力インピーダンスをもつ電圧計で測定する。

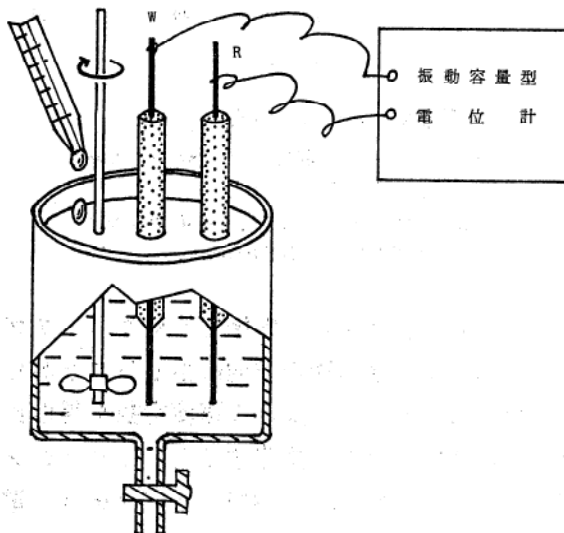


図2. 測定装置
W: 免疫電極, R: 参照電極

4. 測定結果

(i) 免疫反応の例として、抗原に hCG (human chorionic gonadotropin), 抗体としてネズミの抗血清より得られた anti-hCG をもちい測定した結果について述べる。hCG は胎盤から分泌されるホルモンの一種で、妊娠した場合尿中の hCG 濃度が高まることから、これをしらべることによって現在臨床的に妊娠の検査が行われているものである。

免疫電極として、anti-hCG 電極を用いた場合、測定セルにバルビタール緩衝液 (pH8.6)

を入れ電位測定を行う。この液に微量の hCG を滴下すると図3 a に示したように電位が変化しはじめる。変化の方向は anti-hCG 電極がプラス側にシフトする向きである。hCG を加えた後、適当な時間を置いてからその溶液を取り去り、hCG を含まぬバルビタール緩衝液を入れると、電位は液を取り換えた時点の値を保持している。電位の変化は滴下した hCG が多いと速くおこり、徐々に一定値に近づく。この値は加えた抗原濃度には関係しない。その最終到達値はほぼ7~8 mV にも及ぶ。電位変化の速度は加えた hCG 濃度にはほぼ比例する。

一方、hCG を化学修飾した電極を用いて、同電極がマイナス側にシフトすることがわかった(図3 b)。

電位変化の生じる原因は、電極表面に固定された抗体 (anti-hCG) と滴下された抗原 (hCG) とが電極表面で反応し抗原抗体の錯体が形成さ

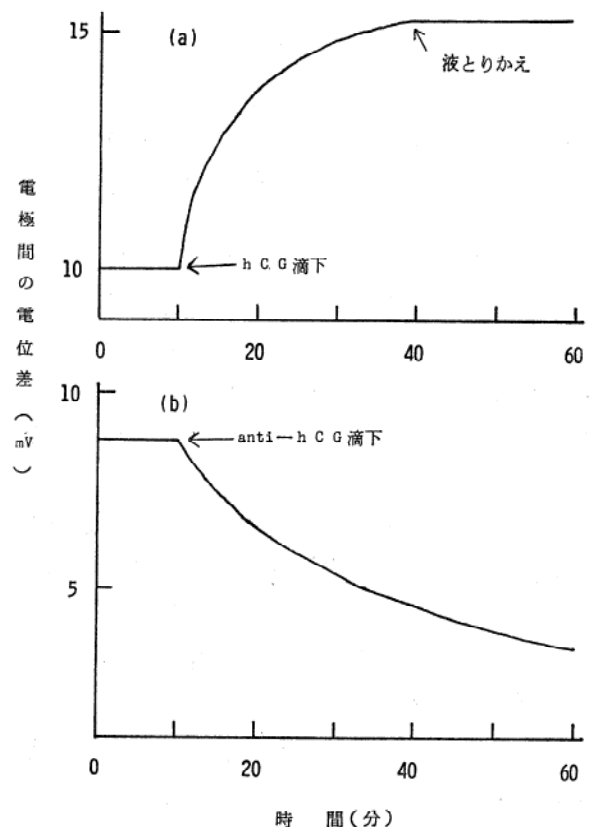


図3. 電極電位の変化

- (a) anti-hCG 電極, hCG の濃度:
 $5.4 \times 10^{-6} \text{ g/ml}$,
- (b) hCG 電極, anti-hCG 濃度:
 $6 \times 10^{-5} \text{ g/ml}$.

れたことによるものと思われる。図4にモデル的に示すように、抗原抗体反応によって錯体が生じると抗体が正に、抗原が負になるような電荷の偏りがおこり、このような反応が電極表面でおこると結果的には anti-hCG 電極の場合にはプラスに、hCG 電極ではマイナスの電位変化がみられることになる。電位の変化量は、電極表面に生じた抗原抗体の錯体の量に比例すると仮定し、その反応の速度定数を算出することができ、その値はほぼ $1 \times 10^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であった。

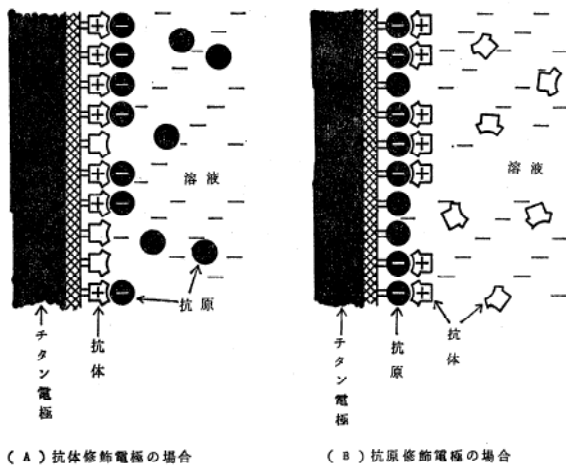


図4. 免疫電極表面でおこる反応のモデル

このほか電位変化の pH 依存性、反応の特異性、溶液の攪拌効果などについても測定を行っている。反応の結果電極表面に生じた錯体は弱酸性溶液中では容易に抗原と抗体とに解離することから、これらの電極は繰り返し利用できることも明らかになった。

反応に伴う電極電位の変化のほかに、電流測定も試みた。anti-hCG 電極で、hCG を $4.4 \mu\text{g/ml}$ 加えると、約 0.2 nA の電流が生じることがわかった。現在この電流発生の機構についての詳しい研究を行っている。

4 免疫反応に類似した生体反応として、酵素と酵素インヒビターとの結合体形成反応がある。トリプシンとその阻害剤の一つアプロチニンとの系について測定を試みた。免疫電極の場合と同じ手法でトリプシン電極をつくり、これにアプロチニンを加えたときについて測定を行うと図5 aのような結果がえられた。同様にこ

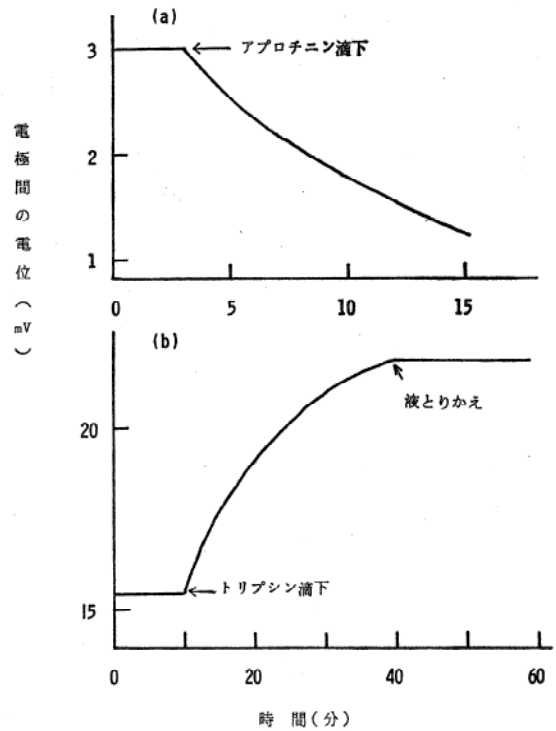


図5. 電極電位の時間の変化

- (a) トリプシン電極、アプロチニンの濃度： $1.7 \times 10^{-7} \text{ g/ml}$ 。
- (b) アプロチニン電極、トリプシンの濃度： $1.7 \times 10^{-6} \text{ g/ml}$ 。

の場合でもアプロチニン電極をつくり、トリプシンを加えたときは逆の方向に生じることがわかった(図5 b)。この反応の速度定数を得られた電位の時間変化から推定すると、トリプシン電極で $4.6 \times 10^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、アプロチニン電極で $1.8 \times 10^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ となった。この値は溶液中で測定された値約 $10^5 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ にくらべやや小さいが、筆者らの得た値は固・液界面で起る反応であることから必ずしも既存のデータとの一致を望む必要はないと思われる。

5. 結論

以上述べたように、我々の測定はまだごく限られた免疫物質や酵素についてえられたものではあるが、他の免疫反応や酵素の錯体形成などにも通用しうると期待される。

この方法の特長としては、まず比較的簡単な装置と操作により、生理活性物質の高感度の検出を行いうることがあげられる。先に述べた hCG に関しては、 10^{-8} g/ml 程度でも検出す

ることができる。これは従来臨床的に行われているラテックス法による結果よりもかなり高感度である。また、この方法は定量も可能である点が大いなる利点といえる。さらに可逆的な反応に対しては、生体内へプローブをさしこんで時々刻々に活物質の量をモニターすることも原理的に可能である。現在の課題としては電位変化の反応に対する特異性の問題がある。例えば、anti-hCG 電極で、hCG 以外の蛋白質などを加えた場合、これらの添加物に対して電位変化がおこることがある。しかし液を取り換えてこれを除去すると、もとの電位に戻る。このような可逆的な応答は hCG にくらべ 100 分の 1 程度であるが、尿のような多量の異物を含む検体をそのまま用いるときは、このような非特異的な応答を押える条件を捜し出すことは実用的見地からは重要な問題である。

この方法は免疫学や生化学分野での反応機構

の解析や生体物質の電気的性質を研究するうえでも有用なものと思われる。また生体物質の相互作用の結果生じる電気的変化を直接測定することができることは、生物の感覚、知覚、生体制御などの生理機能の解明とも関連し、興味をもたれる。

参考文献

- 1) N. Yamamoto, Y. Nagasawa, S. Shuto, M. Sawai, T. Sudo, and H. Tsubomura, *Chemistry Letters*, 245 (1978); N. Yamamoto, Y. Nagasawa, M. Sawai, T. Sudo, and H. Tsubomura, *J. Immunoeological Methods*, 22, 309 (1978).
- 2) W. R. Finkenstadt, M. A. Hamid, J. A. Mattis, J. Schrode, R. W. Sealock, D. Wang, and M. Laskowski, Jr., "Proteinase Inhibitors" Eds. H. Fritz, H. Jscheche, L. J. Greene, and E. Truscheit (Springer-Verlag, Berlin) p. 389 (1974).