
研究報文

ヒト IgA に対するイムノクロマトグラフィーの開発

松永 安由¹, 木津 久美子², 井上 早姫¹,
浦田 采香¹, 貫洞 美穂¹, 成田 宏史¹

Development of Immunochromatography for Human IgA

Ayu Matsunaga, Kumiko Kizu, Saki Inoue,
Ayaka Urata, Miho Kandou, and Hiroshi Narita

Immunochromatography (ICG) strip test based on monoclonal antibodies (mAbs) conjugated with gold nanoparticles was developed and its application for primary screening of IgA in human saliva was evaluated.

Six mAbs were established against human secretory IgA. Nanocolloidal gold as the detection reagent was labelled with mAb ④. mAb ⑥ was immobilized on a nitrocellulose membrane as the capture reagent to prepare the ICG strip test. After reaction of mAb ④-nanocolloidal gold probe with IgA in saliva, resulting immune complex was vertically developed, captured by mAb ⑥ immobilized on the membrane and visualized as a gold band.

In the optimized investigational conditions, the ICG strip test could distinguish human secretory IgA in the range from 1 to 20 µg/mL and was sufficiently sensitive to find out incomplete IgA deficiency from salivary screening. It took only 10 minutes to accomplish a detection of salivary IgA in this assay, compared to 5 hours by sandwich ELISA.

(Received September 12, 2015)

1. 緒 言

腸管の粘膜固有層には全身に存在する形質細胞の約 70~80% を占める IgA 産生細胞が存在しており、その一部がホーミングによって遠隔の粘膜固有層や、乳腺、唾液腺、涙腺などの腺組織へも移行して IgA を産生する。IgA は全免疫グロブリン産生量の 60% 以上を占め、そのうちの 2/3 以上、1 日 3,000 mg にも及ぶ分泌型 IgA (secretory IgA : sIgA) が粘膜表層に分泌され、体内に侵入する抗原や異物に対する最前線の感染防御に重要な役割を果たしている¹⁻³⁾。血清中では多くが単量体 (160 kD) で存在するのにに対し、初乳・乳・唾液など外分泌液中では分泌型 (約 410 kD) で存在し、J 鎖と呼ばれる分子で結合された二量体に分泌成分 (secretory

component : SC) が結合した状態になっている^{1,2)}。

IgA には二つのサブクラス、IgA1 と IgA2 があり、IgA1 産生細胞と IgA2 産生細胞の分布には組織によって特徴がある。血清中では IgA1 が大部分を占めているのに対し (9 : 1)、分泌液中では IgA2 の割合が高くなる (6 : 4)⁴⁾。この二つのサブクラスを決定している H 鎖の $\alpha 1$ と $\alpha 2$ の遺伝子間の相同性は 95% 以上であるが、大きな違いは $\alpha 2$ 鎖のヒンジ領域では $\alpha 1$ 鎖と比較して 13 個のアミノ酸配列が欠如している点である。IgA はタンパク質分解酵素による分解に対して安定であるが、この構造の違いにより、IgA2 は IgA1 よりさらに細菌由来のタンパク質分解酵素に強くなっている⁵⁾。

本研究室では、これまでに食品タンパク質が特異的 IgA との免疫複合体 (IgA-Immune Complex : IgA-IC) を作って母乳中に存在していること⁶⁾、IgA-IC が食物アレルギーの発症予防因子として機能していることを明らかにしてきた^{7,8)}。さらに我々は、

¹ 京都女子大学家政学部食物栄養学科

² 大阪成蹊短期大学総合生活学科栄養コース

IgA-ICは母乳だけでなく唾液にも存在していることを見出した⁹⁾。唾液は年齢・性別・妊娠の有無にかかわらず、無痛無侵襲で誰でも簡単に採取できるといふ利点があり、IgA-ICを研究する上で有用な試料になり得る。本研究ではその第一歩として、血液や母乳ではなく唾液を用いたヒトIgAに対するイムノクロマトグラフィーの開発を試みた。通常IgAやICの定量にはサンドイッチELISAが用いられているが、イムノクロマトグラフィーはサンドイッチELISAとクロマトグラフィーの原理を組み合わせた方法で、検査溶液をテストストリップに滴下し、一定時間反応後に判定ラインを読むだけという半定量的検査法であり、特殊な機材や技術が不要で短時間に結果を得ることが可能な簡便法として、医薬食品分野で汎用されるようになってきている¹⁰⁾。

II. 材料および方法

1. 唾液の採取および処理

唾液採取は、食事残渣の混入を防ぐために食後2時間を避けて行った。さらに、唾液採取前には研磨剤を付けずに約3分間、舌下も含めて出血しないように歯を磨き、水道水で十分うがいをした。うがい後は水道水によって唾液が薄まっているので3分間待ち、きれいに洗った手で脱脂綿を折りたたんで舌下に入れた。5分後、唾液を吸収した脱脂綿を取り出して直ちに凍結し、 -20°C で保存した。測定時に試料を緩慢解凍した後、15 mL遠心チューブの蓋に脱脂綿をかませて落ちないようにした状態で蓋を閉め、 $10,000\text{ g}\times 10\text{分}$ 、 4°C で遠心し、沈殿した夾雑物を除いた上清を唾液試料とした。

以上の試料採取は、京都女子大学臨床研究倫理審査委員会の許可を得た上、協力者(19~23歳の健康な女性)に研究の趣旨を説明し、研究の理解と協力の同意を得て行った。

2. 唾液中IgAの定量とモノクローナル抗体の作製

唾液中のIgAの定量は木津らの方法にしたがい、標準物質としてヒトsIgA(Cappel社)を用いて行った⁹⁾。ヒトsIgAを抗原としたモノクローナル抗体の作製と純化、特異性の検討、サンドイッチELISAは基本的にHiroseらの方法にしたがって行った¹¹⁾。

なお、動物実験は、「研究機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年文部科学省告示第71号)」に基づき、京都女子大学動物実験規定にしたがって行った。

3. イムノクロマトグラフィー

1) 金コロイド標識抗体の調製

予備検討によって、あらかじめ各抗体と金コロイド溶液を結合させる際の最適抗体濃度とpHを決定した。その結果に基づき、粒径40 nm, Abs(at 520 nm)=1.0の金コロイド液(BBI Solutions社)0.9 mLとpH 6.5の50 mM NaPi 0.1 mLをよく攪拌しpHを調整した。この金コロイド液に、10 mM NaPi(pH 7)で0.2 mg/mLに調整した抗ヒトIgAモノクローナル抗体1 mLを攪拌しながらゆっくり滴下し、室温で15分間静置した。次に懸濁液(10 mM NaPi pH 7に1%牛血清アルブミン(BSA), 0.1% PEG20000を添加)を1 mL加えてよく攪拌し、 $2,500\times\text{g}$ 、5分、 4°C で遠心し、上清を捨てた。懸濁液2 mLを加え、30秒の超音波処理で分散させ、さらに2 mLの懸濁液を加えて攪拌した後、 $2,500\times\text{g}$ 、5分、 4°C で再度遠心し、上清を捨てた。金コロイド用保存液(10 mM NaPi, pH 6.5)1 mLを加え、10分の超音波処理で分散させ、金コロイド標識抗体とした。

2) テストストリップの作製

ニトロセルロースメンブレン(Hi-Flow plus:180, 60 mm \times 30 cm, メルク社)にイムノクロマトディスプレイ(DCI-210, ZETA Corporation社)を用いて、テストラインおよびコントロールラインとして下記のように各抗体を $1\mu\text{L}/\text{cm}$ ずつ塗布した。テストラインには、10 mM NaPi, pH 7に溶解した抗ヒトIgAモノクローナル抗体1 mg/mLを用い、メンブレンの下端から12 mmの位置に塗布した。コントロールラインには抗マウスIgG+IgM(H+L)(Jackson ImmunoResearch Laboratories社)を10 mM NaPi, pH 7で1 mg/mLに希釈して、テストラインより5 mm上端側に塗布した。 37°C 2時間乾燥させた後、1% BSA添加PBSにメンブレン全体を浸し、30分間振とうしてブロッキングした。純水で2回洗浄し、0.05% Tween20添加 Tris buffered saline(T-TBS)に10分間浸漬後再度純水で2回洗浄した。表面の水分を拭き取った後、室温で乾燥させ、コントロールラインに重ならないようにメンブレン上端に吸収パッド(ストリップ, 20 mm \times 30 cm, メルク社)を貼りつけた。使用時までデシケーターにシリカゲルと共にに入れて保存した。

3) テストストリップによるヒト唾液中IgAの検出

96穴プレート(住友ベークライト社)に、適当

に希釈した唾液と金コロイド標識抗体を1:3の容量で加え、よく攪拌して反応させた。そこにテストストリップの下端を浸し、唾液・金コロイド標識抗体溶液がテストストリップ上端の吸収パッドに到達するまで展開させ(展開時間約2分間)、テストラインに発色が見られた場合を陽性とした。さらに、すべてのテストストリップでコントロールラインの反応が見られることを確認した。

Ⅲ. 結果および考察

1. イムノクロマトグラフィーの原理 (図1)

イムノクロマトグラフィーの概略を図1に示した¹⁰⁾。イムノクロマトグラフィーは被検物質がセルロース膜上を毛細管現象でゆっくりと流れる性質を応用した免疫測定法である。まず検体に含まれる抗原と金コロイド標識抗体が結合して免疫複合体を形成し、それがセルロース膜上を流れていく。そしてあらかじめ抗原を認識する固相化抗体(キャプチャー抗体)を塗布してあるテストライン上に到達した時に免疫複合体がトラップされ、金コロイドによる発色が見られる仕組みになっている。さらにテストラインの上流に抗IgG抗体を塗布しておくことで、過剰の金コロイド標識抗体がトラップされてコントロールラインとして発色するため、展開の終了を確認できる。

なお、ポリクローナル抗体を用いるとモノクローナル抗体に比べロット間差が大きく出てしまうという問題や、金コロイド粒子の凝集が起こりやすいという欠点があるため、イムノクロマトグラフィーには再現性・特異性に優れ、凝集が起こりにくいモノクローナル抗体同士の組み合わせが適しているとされる。そこで、まずヒトIgAに対するモノクローナ

ル抗体の作製を試みた。

2. モノクローナル抗体の作製と純化

常法にしたがって市販のヒトsIgAを免疫したBALB/cマウスの脾臓細胞と骨髄腫細胞との融合細胞の中から特異的抗体産生細胞をスクリーニングした結果、2回のクローニングを経て最終的に①~⑥の計6抗体が得られた。IgA1, A2に対する抗原特異性を解析した結果、IgA1特異的なもの、両方に反応するものはあったが、IgA2特異的なものはなかった(図2)。これはIgA2がIgA1より基本的にはヒンジ領域で13残基小さいだけであること⁵⁾からも妥当である。抗体の大量調製のため、それぞれの抗体産生細胞を腹水がんと化し、6抗体をプロテインGカラムによるアフィニティークロマトグラフィーで純化した。

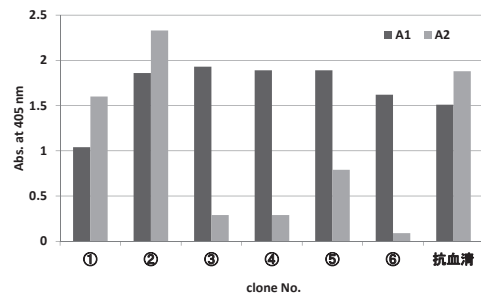


図2 モノクローナル抗体の反応性

ヒトIgA1, IgA2を固相化したELISAプレートにモノクローナル抗体①~⑥の培養上清あるいは免疫マウスから採取した抗血清を加えて反応させた後、アルカリホスファターゼ標識抗マウスIgGで発色させた。

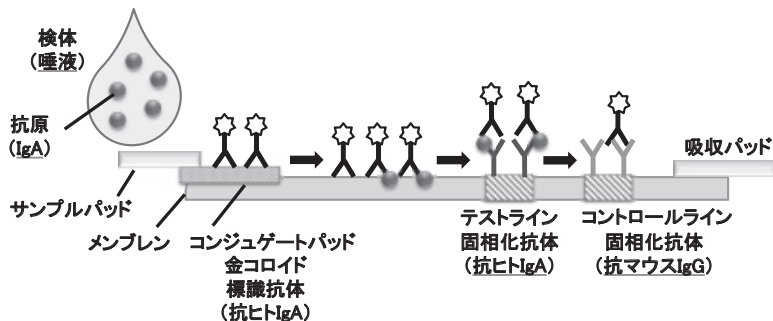


図1 イムノクロマトグラフィーの概略
本文参照

3. サンドイッチ ELISA による組み合わせの検討

イムノクロマトグラフィーを構築するためには、サンドイッチELISA同様に抗原認識部位(エピトープ)の異なる2つの抗体が必要となる。そこで、Ⅲ. 2.で純化した6抗体を用いてサンドイッチELISAが成立する抗体の組み合わせをスクリーニングした。IgAは2本の重鎖からなり、唾液中では2量体なので、ほとんどの組み合わせでサンドイッチが成立したが、バックグラウンドが低いこと、抗原濃度依存性が高いことから、表1に示す二重丸の組み合わせが適当であることが判明した。固相化抗体と標識抗体を逆にすると反応しにくくなる場合があるのは、抗体により固相化・ビオチン化の影響で失活する場合があるためである。

4. 唾液中のIgA評価のためのイムノクロマトグラフィーの検出感度設定

イムノクロマトグラフィーを構築する場合、条件

表1 サンドイッチELISAの組み合わせ

		標識抗体					
		①	②	③	④	⑤	⑥
固相化抗体	①	△	◎	△	△	△	△
	②	◎	△	◎	○	△	○
	③	○	○	△	△	△	△
	④	◎	○	△	△	△	○
	⑤	△	△	△	△	△	△
	⑥	△	△	○	◎	○	△

固相化抗体とビオチン標識抗体のサンドイッチ複合体をストレプトアビジン化アルカリホスファターゼで発色させてサンドイッチELISAの組み合わせを検討した。△, ○, ◎の順に良好な結果が得られたことを表す。

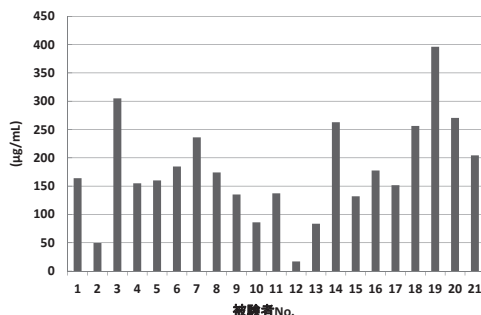


図3 ELISAによる唾液中のIgAの定量

によって感度(肉眼による陰性・陽性の判断の限界)が異なる。また、判定が陰陽の二者択一であるため、感度が良すぎても悪すぎても用をなさない。したがって、あらかじめ目標となる感度を決めておく必要がある。図3は20歳前後の健康な女性21名から採取した唾液中の総IgAをサンドイッチELISAで測定した結果であり、12番は17 µg/mLと特別低値を示した。この結果はサンプリングを繰り返しても再現性があり、これまでの当研究室における測定を通算すると、約500人中最も低値であった。

なお、血液検査における血清IgAの基準値は110~410 mg/dLで、この範囲に健康人の95%が入り、10 mg/dL以下の場合にIgA欠損症と判定される^{12,13)}。12番の血清IgAを委託測定したところ81 mg/dLであり、12番は欠損症ではないが不完全IgA欠損症(partial IgA deficiency)ではないかと思われる。IgA欠損症は無症候である場合が多いため欠損に気付いていないケースも多く、12番も現在は健康であるが、環境の変化や妊娠、加齢などの影響で後発的に免疫関連の疾患を発症することも考えられる。よって、自分自身に免疫異常がある可能性を事前に知っておくことが重要であると言える。

そこで本研究ではイムノクロマトグラフィー構築の第一段階として、唾液原液で不完全IgA欠損症と正常とを区別できる20 µg/mL程度を目標感度に設定することにした。

5. イムノクロマトグラフィーの構築

通常のイムノクロマトグラフィーでは何も器具を使わないようにするため、金コロイド標識抗体をしみ込ませたコンジュゲートパッドに試料を滴下しラテラルフロー(水平方向への展開)させる方法が採用されている。本研究では試料中の抗原と金コロイド標識抗体の一次反応の条件検討を容易にするため、96穴プレートで一次反応を行った後に、固相化抗体を塗布してあるメンブレンをウェルに差し込んで垂直に展開させるテストストリップ法を用いることにした(図4)。

開発に当たっては、平成25年7月24日(水)に京都高度技術研究所(講義)、京都バイオ計測センター(実習)で行われた京都バイオ計測センター人材育成セミナー「イムノアッセイ講座(2):イムノクロマト開発編」に参加し、そこで使われたニッポンエンジニアリング㈱のテキスト(非売品)を参考にした。

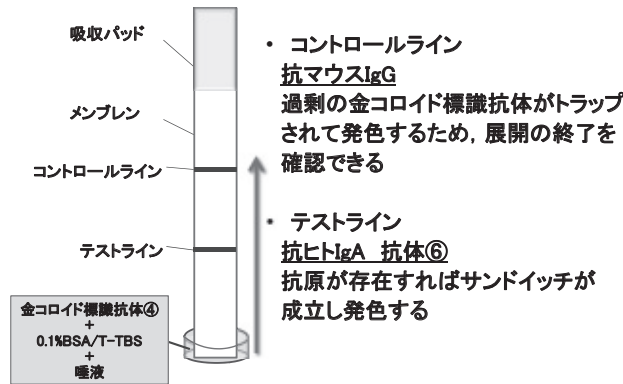


図 4 テストストリップ法の概略
本文参照

① 金コロイド標識抗体の作製

抗体に金コロイドを標識する工程は、イムノクロマト法の構築に際してもっとも鍵となるステップであり、金コロイド標識抗体を適切な条件で調製しなければ凝集を起こし、正しい結果が得られなくなる。この条件は主に粒子径・pH・抗体濃度の組み合わせで決定されるが、抗体ごとに条件が異なるためそれぞれで検討する必要がある。適切な条件で金コロイドを抗体に標識できた時、500～600 nmの吸光度を測ると520 nmに吸収極大ができる。反対に凝集してしまった時、吸光度はなだらかなカーブを描き、溶液は青みがかかる。520/580=1.5～2.0が適切な値であり、この値を下回ると凝集している確率が高い。

種々検討の結果、下記の条件が適当であることが判明し(520/580=1.5)、抗体の保有量と表1の結果から抗体④を用いた金コロイド標識抗体溶液を採用した。

- ・金コロイドの粒子径：もっとも一般的な40 nm
- ・抗体の種類とpH：抗体④はpH 6.5、⑤はpH 6.0
- ・抗体濃度：200 μg/mL

② テストストリップの作製

メンブレン(60 mm×30 cm)への固相化抗体の塗布は、細かい条件検討用にはマイクロピペットを用いて手製で行ったが、最終的には森永生科学研究所に委託してイムノクロマトディスペンサーを用いて行った。

- ・テストライン：メンブレンの下端から12 mmに、固相化抗体を塗布した。この部分に金コロイド標識抗体と抗原の免疫複合体が展開されてくると、

抗原が固相化抗体に結合してサンドイッチが成立するため、金コロイドのバンドが生じる。金コロイド標識抗体として④が適当であったため、表1の結果から、固相化抗体は抗体⑥1 mg/mLを用いることとした。

- ・コントロールライン：メンブレンのテストラインの5 mm上端側に、市販の抗マウス IgGを塗布した。
- ・吸収パッド：展開効率を上げるためメンブレンの上部に市販の吸収パッドを貼付けた。

完成したメンブレンの左右両端を切り落とし、5 mm巾の短冊(約7 cm)を切り出し、抗体がきれいに塗布できているものをテストストリップとして使用した。

③ 試料(唾液)の希釈

抗原(IgA)が過剰になると、一次反応で余った抗原が固相化抗体と金コロイド標識抗体の免疫複合体との結合時に競合して阻害する「プロゾーン現象」が起こる。上記系で検討した結果、唾液を0.1% BSA添加 T-TBSで40倍希釈すると適当であった。

6. 結 果

上述のように構築したイムノクロマトグラフィーに、図3の被験者のうち高値を示した19番、中央値であった1番、低値を示した2番および12番の唾液を供したところ、前3者ではバンドが出現(発色)し12番ではバンドが出現しないことが確認できた(図5)。また、ELISA法の結果をよく反映し、唾液原液で50～400 μg/mLのIgA濃度依存的なテストラインの発色が確認できた。唾液が40倍希釈さ

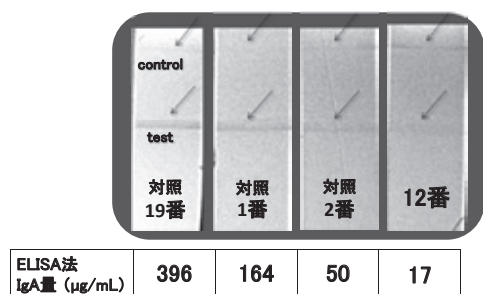


図5 イムノクロマトグラフィーによる唾液中のIgAの検出

ELISAで高, 中, 低値を示した被験者19, 4, 2番ならびに不完全欠損と思われる12番の唾液を40倍希釈後, イムノクロマトグラフィーに供した。

れていることを考慮すれば, 本イムノクロマトグラフィーにおけるsIgAの検出限界は1 μg/mLくらいと思われた。ELISA法では測定に半日は必要であるが, 本法ではわずか10分で判定が可能である。このように, 唾液中のIgAの簡易スクリーニング法として十分利用できるイムノクロマト試薬の開発に成功した。

IV. 今後に向けて

本法により唾液中の総IgAの簡易検査が可能となったが, さらに今後に向けて下記のような改良が期待される。

1. 高感度化

最近ではアレルギー治療法として寛容誘導が行われるようになってきた。しかし, 寛容の成立の確認を患者へのアレルギー投与で試すしかないことが大きな課題となっており, 新たなバイオマーカーとして唾液中の抗原特異的IgAが注目されている¹⁴⁾。我々はIgA-ICの測定を提唱しているが, イムノクロマトグラフィーを用いて測定するためにはさらに高感度化が必要である。また, 近年デンシトメトリーを用いた定量的イムノクロマトグラフィーも開発されつつあり, 導入が望まれる¹⁰⁾。

2. 競合法

今回検討したサンドイッチ法は, 検体中の抗原が多いほど強く反応する方法だが, 逆に, 検体中の抗原が少ないほど強く反応する競合法がある。サンドイッチ法は, 検体中の抗原と金コロイド標識抗体の複合体が固相化抗体に結合することで発色するが, 競合法では, 検体中の抗原と反応しなかった金コロ

イド標識抗体が固相抗原と結合することで発色する。競合法を用いるメリットは, サンドイッチ法では検体(唾液)の希釈が必要であるが, 競合法ではその必要がないという点である。また, 大量の反応したものの中から反応していない数本を探すよりも, 数本が反応する方がスクリーニングとしても適している。

現在, 本学食物栄養学科では食品学実験において簡便な遺伝子診断法として, アルバッチテスト, PTC味覚異常テストが, バイオサイエンス実験では食物アレルギーの特定原材料検出イムノクロマトグラフィーが取り入れられている。今後本法を学生実験に取り入れて唾液中のIgAスクリーニングをすることにより, IgA(不完全)欠損を未然に発見し, 将来生じるかもしれない様々な障害の予防に貢献できるかもしれない。

V. 引用文献

- 1) Mestecky J, et al.: "Mucosal Immunology", 4th ed., Elsevier/Academic Press, p 429-54 (2015)
- 2) 清野宏編:「臨床粘膜免疫学」, 株式会社シナジー, p 240-55 (2010)
- 3) Mestecky J, et al.: "Mucosal Immunology", 4th ed., Elsevier/Academic Press, p 287-324 (2015)
- 4) Kerr MA: *Biochem. J.*, **271**, 285-96 (1990)
- 5) Royle L, et al.: *J. Biol. Chem.* **278**, 20140-53 (2003)
- 6) Hirose J, et al.: *Biosci Biotechnol Biochem* **65**, 1438-40 (2001)
- 7) 木津久美子, 廣瀬潤子, 本庄勉, 成田宏史: 日本栄養・食糧学会誌, **65**, 13-9 (2010)
- 8) Kumiko Kizu, et al.: *Food and Nutrition Sciences*, **6**, 221-33 (2015)
- 9) 木津久美子, 廣瀬潤子, 山口(村上)友貴絵, 木村彰宏, 成田宏史: 本誌, **64**, 5-12 (2009)
- 10) 生物化学的測定研究会編(編集委員: 小林典裕, 上田宏, 三宅司郎, 荒川秀俊):「免疫測定法 基礎から先端まで」講談社, p 167-75 (2014)
- 11) Hirose J, et al.: *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **68**, 2490-97 (2004)
- 12) Brandtzaeg P: "Mucosal Immunology", 4th ed., Elsevier/Academic Press, p 623-81 (2015)
- 13) 金子英雄, 鈴木啓子, 近藤直実: 日本臨床免疫学会誌, **32(3)**, 142-8 (2009)
- 14) Kulis MJ, et al.: *Allergy Clin Immunol.*, **129(4)** 1159-62 (2012)