

ELISA 法による肝疾患患者血清中の エンドトキシン抗体の測定法

岡山大学医学部第1内科学教室（主任：長島秀夫教授）

土 屋 正 夫

（昭和61年11月6日受稿）

Key words : エンドトキシン, エンドトキシン抗体,
LPS, ELISA, 肝疾患

緒 言

慢性活動性肝炎では、古くから多種にわたる細菌やウイルスに対する抗体、さらには自己抗体の出現が報告されている。とくに腸内細菌に関連しては、Protellら¹⁾により慢性活動性肝疾患においてサルモネラに対する抗体価が高いこと、Trigerら²⁾、Simjeeら³⁾、Prytzら⁴⁾によって各種肝疾患において腸管内E. coliに対する抗体価が上昇することが報告され、本邦でも太田ら⁵⁾、小林ら⁶⁾によって同様の報告がなされている。一方、肝障害とエンドトキシンとの関連が近年注目されているが、これに関してもNolanら⁷⁾、Greismanら⁸⁾、MacCabeら⁹⁾、Wilkinson¹⁰⁾などによって報告がある。そして、エンドトキシンに対する抗体の出現の理由としては、肝網内系機能に関連して論じられ、またエンドトキシンと免疫におけるトレランスについても論じられてはいるが、未だ不明な点が多く十分な研究がなされているとはいえない。今回著者は、エンドトキシンの肝疾患への関与について液性免疫の面から明らかにすることを目的として、エンドトキシン抗体のELISAによる測定方法を確立したので報告する。

方 法

1. 毛細管比色計の特性についての検討

今回使用する毛細管比色計 Photo-Elisa I型 (Organon Teknika 社) の特性につき、従来の Hitachi 102 比色計との比較を行った。すなわ

ち、試験管を用い peroxidase (Type VI, Sigma 社) の水溶液 $1\mu\text{g/ml}$ より作製した倍数希釈系列の溶液を各々 $100\mu\text{l}$ ずつ入れて、次いで、それぞれ 0.02M phosphate-citrate buffer, pH 5.0 に ortho-phenylene-diamin (Organon Teknika 社) (0.4mg/ml) と urea peroxide (Organon Teknika 社) (0.2mg/ml) を溶解した基質溶液を加え発色させる方法により行い、反応停止のために $50\mu\text{l}$ の 4N 硫酸を加えた後、2種類の比色計により 492nm における吸光度を測定し比較した。

2. LPSの固相化についての検討

固相化抗原を作製する方法として、Vosら¹¹⁾のメチル化 bovine serum albumin (BSA) (Sigma 社) と lipopolysaccharide (LPS) (Difco 社) とを予め結合させた後に、固相化する方法につき検討を行った。すなわち、LPS E. coli 026:B6 (Difco 社) の 0.1M 炭酸緩衝液 (pH 9.6) 1.0ml に対し、あらかじめ、各種濃度のメチル化 BSA 水溶液を作成しておき、それを $50\mu\text{l}$ ずつ加え室温により20分間混和して、すなわち LPS とメチル化 BSA の各濃度につき LPS—メチル化 BSA complex を作製して、それぞれ microplate U型 (Greiner 社) の各well に $100\mu\text{l}$ ずつ注入し、 37°C 、3時間 incubate 後、 0.04M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4, 0.01% Tween 20, 0.004% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ を含む) を用いて洗浄及び吸引排除をくり返し、最後に BSA 処理を加えて固相化を行った。次に、各well に一定の既知 LPS 抗体陽性血清を 0.2M Tris-HCl 緩衝液 (pH

7.4, 0.05% Tween 20: Tween-TBS, 2% BSA を含む) を用いて 50 倍希釈として各々 100 μ l 加え incubate 後洗浄した後に, peroxidase 標識抗ヒト IgG (Dako-Patts 社; 2% BSA を含む Tween-TBS を用いて 100 倍希釈) を各々 100 μ l 加え, 同様に incubate 後洗浄を行い, 最後にさきの条件で ortho-phenylene-diamin と urea-peroxidase による発色後直ちに, 毛細管比色計により 492nm の吸光度 (O. D.) を測定した.

上記のメチル化 BSA と LPS の濃度に関する検討に加えて, それらの固相化に用いる microplate の材質の違いについて, また glutaraldehyde や poly-L-lysine による microplate の前処置が固相化をし易くするか否かについて, 上記の方法と同様の手順により検討した.

3. 検体ならびに peroxidase 標識抗体希釈液へのチツ化ソーダならびに BSA 添加の可否と, 固相化抗原作製から発色反応までの各段階における時間的経過についての検討

一定濃度の既知陽性血清ならびに peroxidase 標識抗体希釈液において, チツ化ソーダ (NaN₃) と BSA の各種濃度を作製し, それぞれの発色への影響について検討した.

各々の反応段階における時間的経過については, 反応の時間差を作製することが microplate においては困難なことから, 各反応段階において polystyrene tube を用いて反応時間を設定し, 同様の手順に従って検討した.

4. 既知陽性血清における血清希釈曲線ならびに抗体測定の特異性の検索法

被検血清の希釈曲線については, 3 種類の既知陽性血清について希釈系列を作製し, それぞれ抗体の測定を行った. 抗体測定の特異性については, E. coli 026:B6 に対する抗体陽性の 2 種類の血清について E. coli 026:B6 ならびに E. coli 0111:B4 の LPS による抗体の抑制について検討した. すなわち, E. coli 026:B6 の LPS を固相化した microplate を使用し, 陽性血清に対し, あらかじめ E. coli 026:B6 ならびに E. coli 0111:B4 の LPS の希釈系列を作製して加え, それぞれ 37°C, 1 時間 incubate した後に抗体の測定を行った.

成 績

1. 比色計の特性についての成績

前述のごとく作製した標準液につき 2 種類の比色計を用いて測定し, 対数グラフ上における直線性を比較してみると (Fig. 1), 従来の比色計である Hitachi 102 においては吸光度 0.005 より 1.5 付近までは良好な直線性を示した. 一方, 毛細管比色計においては 0.01 以下の低い吸光度における直線性は不良であるが, 逆に吸光度 15

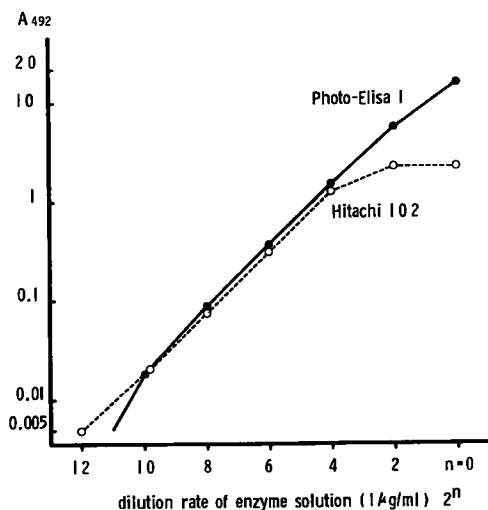


Fig. 1 毛細管比色計の特性についての成績

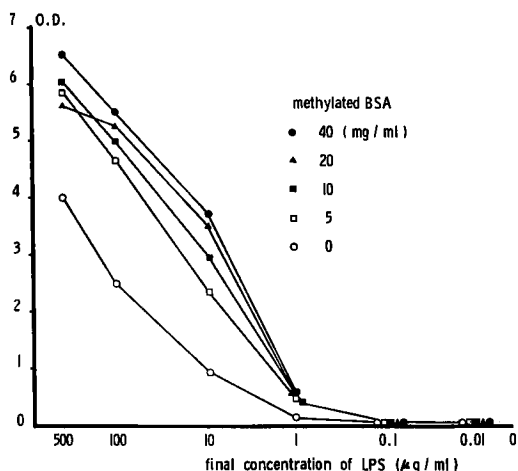


Fig. 2 固相化に必要とするメチル化 BSA の濃度と LPS の濃度との関係

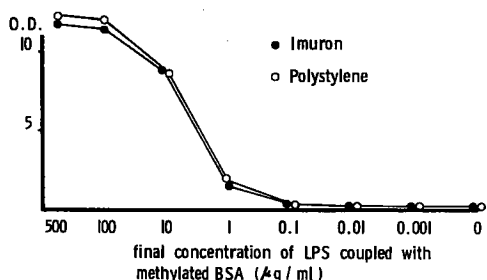


Fig. 3 固相化に用いるマイクロプレートの材質による違い

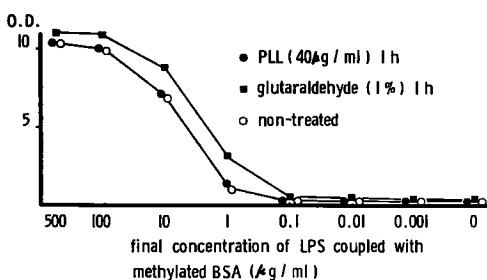


Fig. 4 マイクロプレートにおける前処置の有無による違い

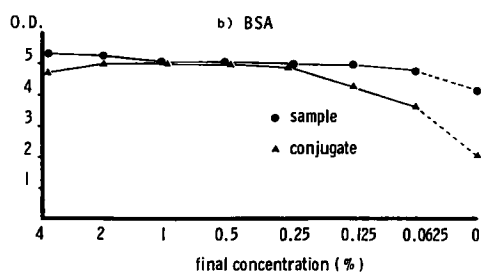
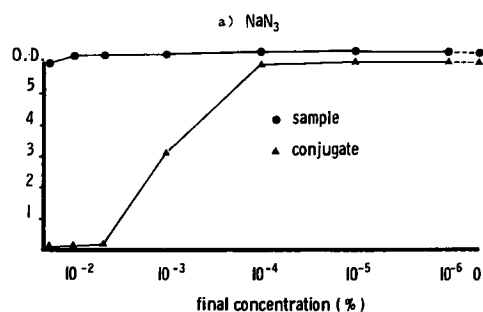


Fig. 5-a, 5-b 検体ならびに酵素抗体希釈液におけるチツ化ソーダならびに BSA 添加による影響

付近までの高い吸光度における測定も可能である事がわかった。

2. メチル化 BSA を用いた LPS の固相化に関する成績

固相化に用いたメチル化 BSA と LPS の濃度の関係については、Fig. 2 に示したが、LPS はメチル化 BSA の使用の有無に拘わらず 1µg/ml 付近からの固相化を示した。しかし、メチル化

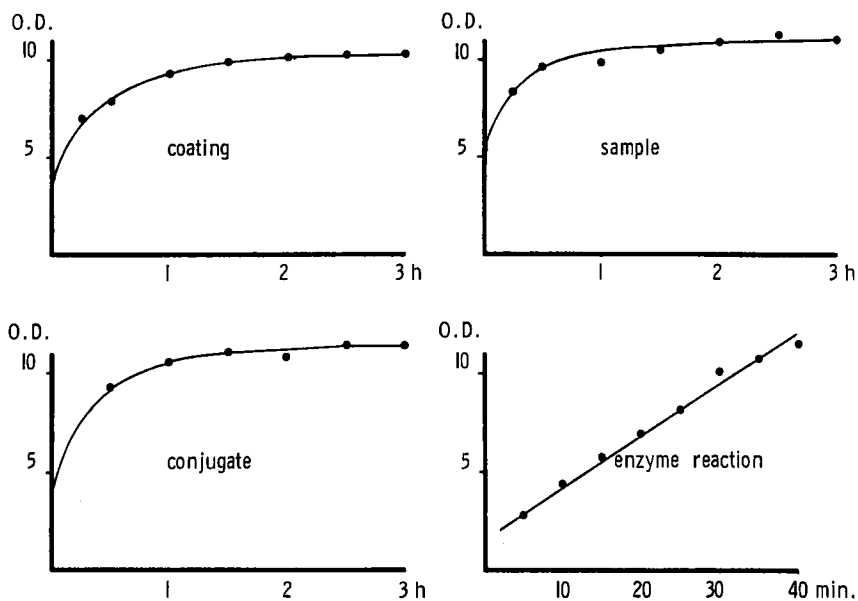


Fig. 6 各反応段階における時間的経過についての成績

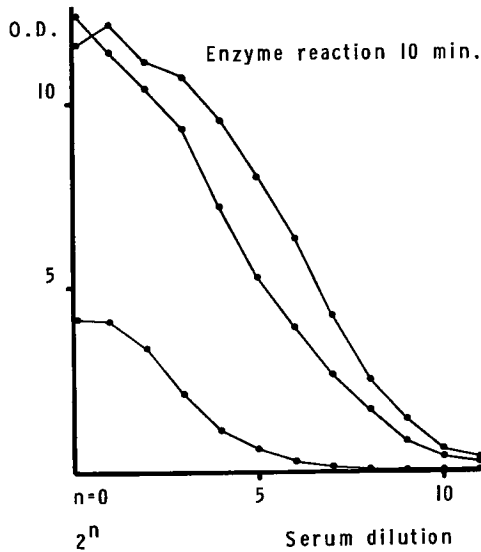


Fig. 7 既知陽性血清における血清希釈曲線

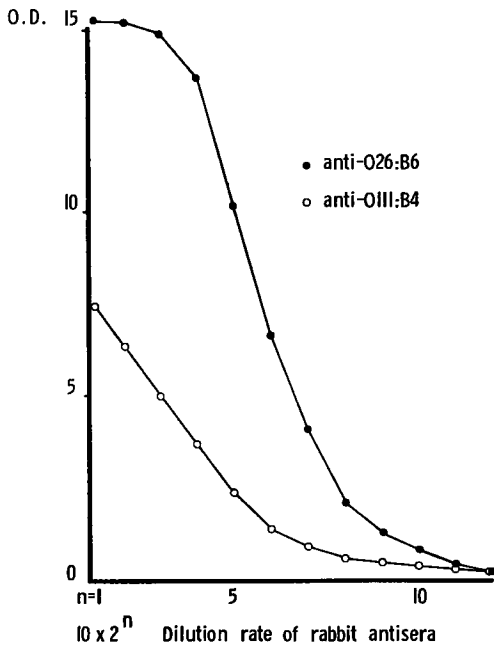


Fig. 8 ウサギ抗血清による希釈曲線

BSA の使用により濃度依存性に LPS が有効な固相化を示し、かつ低濃度の LPS の場合にも、十分な固相化抗原の作製が可能である事がわかった。

microplate の材質による固相化の違い、ならびに microplate に対する前処置の可否に関す

る成績は、microplate の材質についてはポリスチレンならびにイムロンとの比較を行い、Fig.3 に示すごとく両者ともほぼ同様であったが、わずかにポリスチレンにおいて高い吸光度を示した。一方、microplate に対する前処置については、glutaraldehyde ならびに poly-L-lysin について検討し、それら成績を Fig. 4 に示したが、いずれも前処置を加えない場合と比較して大差がなく無効であった。

3. 検体ならびに酵素抗体希釈液に対するチッ化ソーダならびに BSA 添加の可否と、各反応段階における時間的経過の成績

チッ化ソーダの添加に関しては (Fig. 5-a), 検体希釈液についてはチッ化ソーダの各濃度において、ほとんど添加による影響を受けなかった。しかし、酵素抗体希釈液についてはチッ化ソーダ 0.0001% ないし 0.001% の低濃度において既に発色の抑制を示し、0.01% においては完全な発色の抑制を示した。

BSA の添加に関しては (Fig. 5-b), 検体希釈液ならびに酵素抗体希釈液のいずれについても 0.25% ないし 1% の濃度の BSA 添加により安定

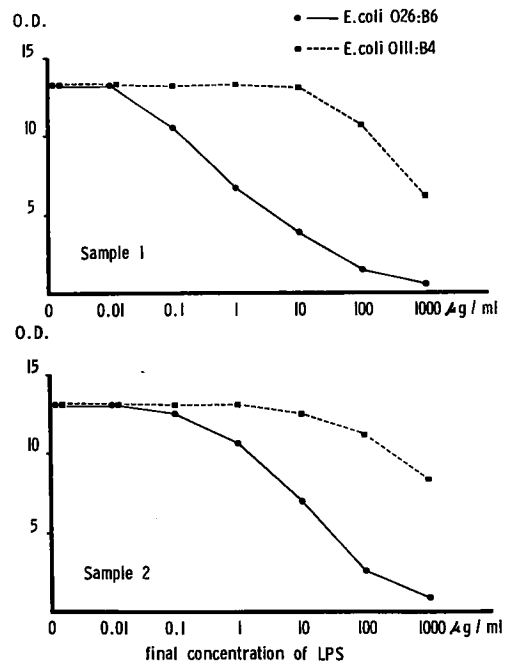


Fig. 9 2種類の既知陽性血清におけるLPSによる抗体価抑制

Method

E. coli 026:B6 (W) (Difco Lab.) 0.5 mg/ml in sodium carbonate buffer (0.1M; pH 9.6)

1 ml | ————— Methylated BSA (Sigma Lab.) 10mg/ml of water
0.05 ml
Stired at room temperature for 20 min.

Diluted with carbonate buffer (final concentration; 5 μ g/ml)

100 μ l
Microtiter plate, Imuron (Greiner Lab.)
3 h at 37 °C

Washed 3 times with tris-HCl buffer (0.04M; pH 7.4), containing 0.01% Tween 20 and 0.004% NaN₃
Dried over silicagel, and stored at 4 °C

100 μ l
Serum solution ($\times 100$) in tris-HCl buffer (0.2M; pH 7.4), containing 2% BSA, 0.05% Tween 20 and 0.02% NaN₃
2 h at 37 °C

Washed 3 times with tris-HCl buffer (0.2M; pH 7.4), containing 0.05% Tween 20

100 μ l
Conjugate solution ($\times 100$) in tris-HCl buffer (0.2M; pH 7.4) containing 2% BSA, 0.05% Tween 20
Conjugates; Peroxidase conjugated anti-human IgG, A, M, produced in rabbit (Dako-patts Lab.)
2 h at 37 °C

Washed 4 times with the same washing buffer

100 μ l
Substrate solution; o-phenylene diamin, urea peroxide in phosphate-citrate buffer (tablet from: Organon Teknika Lab.)
30 min. in the dark

The enzyme reaction was stopped by adding 100 μ l of 4 N H₂SO₄

O.D.₄₉₂ was measured with capillary photometer (Organon Teknika Lab.)

Fig. 10 エンドトキシン抗体の測定法

した吸光度が得られ、それ以下の濃度においては、特に酵素抗体希釈液において吸光度の低下が見られた。

固相化抗原作製の時間的経過およびそれらと既知陽性血清との反応ならびに酵素抗体希釈液の反応の時間的経過については、Fig. 6 に示したが、いずれの反応においても最初の2-3時間においてほとんど平衡に達した。しかし、酵素反応の時間的経過においては時間と共に直線的に吸光度の増加を示し時間依存性であった。

4. 既知陽性血清における血清希釈曲線ならびに抗体測定の特異性の成績

抗 *E. coli* 026:B6 抗体を測定するための血清希釈の必要性については、3種類の既知陽性血清について検討し、その結果を Fig. 7 に示したが、血清の 2^2 倍希釈から 2^8 倍希釈程度までが定量を可能とする範囲と考えられた。すなわち、被検血清について一定の希釈率を定めることにより、標準とする陽性血清に対する割合(% reference)として抗体価の測定が可能である事を示す成績であった。また、これら希釈系列に従った抗 *E. coli* 026:B6 抗体の測定結果を Fig. 8 に示した。*E. coli* 0111:B4 では低値で、*E. coli* 026:B6 が感度良く測定できた。一方、2種類の既知陽性血清における抗体抑制の成績は Fig. 9 に示した。すなわち、*E. coli* 026:B6 による抗体価抑制は、LPSの $0.1 \mu\text{g/ml}$ より見られ、 $1000 \mu\text{g/ml}$ 加えることにより、ほぼ完全に抗体価が抑制された。しかし、*E. coli* 0111:B4 による抑制は、 $100 \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度においても比較的軽度であった。

以上の成績から、血清中のエンドトキシン抗体測定のための ELISA 法の実際については、Fig. 10 の模式図にまとめられる条件が最適と考えられた。

考 案

ELISA を用いたエンドトキシン抗体の測定に関する報告には、Vos ら¹¹⁾、Ahlstedt ら¹²⁾、Carlsson ら¹³⁾、Bruin ら¹⁴⁾の報告があり、Ahlstedt ら、Carlsson ら、Bruin らはポリスチレンのチューブに LPS を直接 coat する方法を用い、又 Vos らはポリスチレンの microplate

にメチル化 BSA による前処置を加えた LPS を coat する方法により固相化抗原を作成している。この Vos らの方法に於いては、固相化に用いる LPS の濃度が他の方法と比較し極めて低濃度であること、microplate を用いて検体ならびに試薬の微量化を試みている点で優れている。著者は、測定に用いる毛細管比色計の測定範囲について従来の比色計と予め比較検討した後に、Vos らの用いたメチル化 BSA を利用する方法について、メチル化 BSA ならびに LPS の至適濃度を検討すると共に、microplate の材質による違い、microplate に対する他の前処置の可能性について、さらには、検体ならびに酵素標識抗体の希釈液における BSA およびチツ化ソーダの添加の可否ならびにその濃度、各反応段階における反応時間の設定への基礎的検討を行った。又、これらの検討により作成した測定法につき、同じ LPS ならびに類似した LPS による抗体の阻止効果についても検討し、この測定法の特異性と交差反応性につき研究を進めた。

その結果、1) Vos ら¹¹⁾の用いたメチル化 BSA を利用する方法においては、明らかに低濃度の LPS による固相化抗体の作成が可能であること、2) microplate の材質についてはポリスチレンとイムロンとでは差がないこと、3) 検体や酵素標識抗体の希釈液に一定の BSA を加えることは適切であるが、チツ化ソーダを酵素標識抗体の希釈液に加える場合は、 0.0001% 以下のごく低濃度に限られること、4) 各反応段階における反応時間の設定が可能であること、5) 既知陽性血清を用いた血清の希釈曲線により、血清の 2^2 倍希釈より 2^8 倍希釈において一定の希釈率を定める事により抗体の定量が可能であり、このことは別に検討した家兎の抗 LPS 抗体を用いた実験に於いても同様であった。6) *E. coli* 026:B6 ならびに *E. coli* 0111:B4 においては、共通抗原性があるとされているが、著者の行った阻止実験においても特異性と共通性の両者が認められ、抗体測定的面から観察することができた。すなわち、*E. coli* 026:B6 を固相化抗原として測定する場合に、それ以外に共通抗原性を持つ LPS に対する抗体も測定している可能性を示唆する成績であり、LPS の *E. coli* の型別特異的測定法に

については、今後の問題としてのこされた。しかし、以上のエンドトキシン抗体を ELISA 法を用いて測定化し得るとの基礎的研究の成績により、これらに基づいた ELISA 法は、直ちに臨床検査として有用であることが強調された。

結 論

エンドトキシンの肝疾患への関与について、液性免疫の面から明らかにする事を目的として、エンドトキシン抗体の ELISA による測定法における microplate 及び毛細管比色計を用いる微量測定法についての基礎的な検討を行い、定量法を開発した。この方法により、微量の血清

を用いての抗体の測定が可能であり、さらには酵素標識抗体の免疫グロブリン・クラスを変更することにより、免疫グロブリン・クラス別の抗体測定も可能であることから、今後の臨床研究に大いに役立つものと考えた。

尚、本論文の要旨は第8回日本臨床免疫学会総会、第3回エンドトキシン臨床研究会で発表した。

稿を終わるにあたり、御指導、御校閲を賜った岡山大学医学部第1内科学教室の長島秀夫教授と岡山大学保健管理センターの辻 孝夫助教授に深謝します。

文 献

1. Protell R L, Solowey R D, Martin W J, Schoenfield L J and Summerskill W H: Anti-Salmonella agglutinins in chronic active liver disease. *Lancet* (1971) ii, 330-331.
2. Triger D R, Alp M H and Wright R: Bacterial and dietary antibodies in liver disease. *Lancet* (1972) i, 60-63.
3. Simjee A E, Hamilton-Miller J M T, Thomas H C, Brumfitt W and Sherlock S: Antibodies to *Escherichia coli* in chronic liver diseases. *Gut* (1975) 16, 871-875.
4. Prytz H, Bjorneboe M, Christoffersen P, Poulsen H and Orskov F: Correlation between hepatic morphology and immunoglobulins and antibodies to *Escherichia coli* in cirrhosis. *Gut* (1977) 18, 28-32.
5. 太田 亘, 島田宜浩, 長島秀夫, 田井千秋: 肝疾患患者の血中エンドトキシンおよびその抗体価について; エンドトキシンの基礎と臨床, 第1回エンドトキシン研究会記録, 織田ら監修, 羊土社, 東京 (1979) pp 109-111.
6. 小林絢三, 北野厚生, 山口勝治, 田中吉之助, 村井雅巳, 片山昭義, 桑島士郎, 山本祐夫: Inflammatory bowel disease の免疫異常における腸内細菌の意義; 消化器と免疫, 第2回“消化器と免疫”研究会記録, 土屋編集, 医歯薬出版, 東京 (1979) pp 112-117.
7. Nolan J P: The role of endotoxin in liver injury. *Gastroenterology* (1975) 69, 1346-1356.
8. Greisman S E and Hornick R B: Mechanisms of endotoxin tolerance with special reference to man. *J Infect Dis* (1973) 128 (suppl), 265-276.
9. McCabe W R, Kreger B E and Jones M: Typespecific and cross-reactive antibodies in gram-negative bacteremia. *N Engl J Med* (1972) 287, 261-267.
10. Wilkinson S P: Review. Endotoxin and liver disease. *Scand J Gastroent* (1977) 12, 385-386.
11. Vos J G, Buys J, Hanstede J G and Hagenaaers A M: Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and passive hemagglutination method for quantification of antibodies to lipopolysaccharide and tetanus toxoid in rats. *Infect Immunity* (1979) 24, 798-803.
12. Ahlstedt S, Holmgren J and Hansen L A: Protective capacity of antibodies against *E. coli* O antigen with special reference to the avidity. *Int Arch Allergy* (1974) 46, 470-480.
13. Carlsson H E, Hurrell B and Lindberg A A: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for

- titration of antibodies against *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica*. *Acta Pathol Microbiol Scand* (1976) Sect C, **84**, 168–176.
14. Bruins S C, Inguwer I, Zeckel ML and White A C: Parameters affecting the enzyme-linked immunosorbent assay of immunoglobulin G antibody to rough mutant of *Salmonella minnesota*. *Infect Immunity* (1978) **21**, 721–728.

**Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of
antibody to endotoxin in sera from
patients with liver diseases**

Masao TSUCHIYA

The First Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School

(Director : Prof. H. Nagashima)

For the purpose of analyzing immune responses to endotoxin in liver diseases, an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) employing microplates and hematocrit tubes for spectrophotometry was developed. The new ELISA allowed the analysis of extremely small serum samples (e.g. 10 μ l ~ 100 μ l), and the assay had specificities for antibodies to various endotoxin antigens. The details of the method were presented. It was concluded that the new ELISA was useful clinically.