

# コロイド粒子を用いたエネルギー トランスファーイムノアッセイ

池 田 賢 仁  
豊 田 和 久  
鈴 木 英 夫

## Energy Transfer Immunoassay with Colloid Particles

Kenji IKEDA  
Kazuhisa TOYODA  
Hideo SUZUKI

The new homogeneous immunoassay was developed by using the principle of energy transfer. Although the energy transfer immunoassay was reported by Ullman *et al.* in 1976, their method has not been available for practical use because of the poor sensitivity. The purpose of this investigation is to improve the sensitivity of energy transfer immunoassay. Fluorescent labeled albumin was adsorbed on the surface of colloid particles (i. e. latex, Pt) which were used as matrix for immobilizing antibodies. The fluorescent energy is transferred from donor fluorophore to acceptor one when labeled particles are close each other by antigen-antibody reaction. The fluorescent intensity of donor was decreased with increasing an amount of antigen-antibody complexes. The sigmoidal dose response curve provided the sensitivity on the order of  $10^{-15}$  mol. Furthermore, the assay needed less than 30 seconds.

### 1. 緒 言

免疫測定法は、抗体の高特異性と高感度な検出方法とを組み合わせた点に特徴を有し、極微量の物質を測定する目的で利用されている。例えば、内分泌代謝性疾患や感染症あるいはガン、心筋梗塞などの疾病時に血中濃度の変動する、いわゆる、疾病マーカーを測定する臨床検査や、大気中から極微量の物質を検出することなどに利用されている。近年、多くの種類の免疫測定法が開発されているが、その中で、ラテックス凝集法は操作の簡便さから多くの臨床検査に利用されている。しかしながら、現在では検査対象物質の種類も増えており、ラテックス凝集法では測定できない高感度性を必要とする項目が増

えてきている。一方、近年盛んに用いられている方法として放射免疫測定法 (RIA)<sup>1)</sup> や酵素免疫測定法 (EIA) などがあげられる。RIA においてはその高感度な性能にもかかわらず測定時の人体に及ぼす影響や廃棄物の問題から敬遠され、標識物質として酵素を用いた EIA が主流となりつつある。しかし、従来の RIA 及び EIA は、多くの工程を必要とし複雑であるとともに、抗原抗体反応を固相と液相の共存する不均一系で行い、最終的な検出に酵素反応等を用いているため、測定に長時間を要する。

こうした理由から、測定システムの簡便化及び測定時間の短縮化のために、従来用いられてきた不均一系 (ヘテロジニアスアッセイ系) にかわって、B/F 分離を必

要としない均一系（ホモニアスアッセイ系）の開発が望まれている。そのなかでエネルギー移動を利用したイムノアッセイ系や DNA ハイブリダイゼーションアッセイ系が多くの研究者によって検討されてきた<sup>2)10)</sup>。例えば、Ullman ら<sup>2)</sup> は次のような均一系免疫測定法を開発している。蛍光物質を標識した抗体と消光物質を標識した抗体を用いて、抗原抗体反応を行うと、サンドイッチ複合体が形成され、抗原を介して蛍光物質と消光物質が互いに近づく。その結果、蛍光物質の蛍光エネルギーが消光物質の励起エネルギーにシフトし、蛍光物質の蛍光強度が減少するため、サンドイッチ複合体の形成量に応じて蛍光強度が減少する。しかし、彼らの方法では、抗体に蛍光物質を直接標識するために抗体の性能を阻害する可能性があり、蛍光標識量に限界があった。この蛍光標識量の限界から感度を向上させることができなかつた。この問題を解決するために、我々は、コロイド粒子を介して抗体に蛍光標識することにより、抗体への蛍光物質及び消光物質の標識量を著しく増大させると同時に、抗体の失活を防ぐことを可能とした。このような手段をとることにより、均一系（ホモニアス系）で簡便かつ測定時間の著しく短い免疫測定法を確立した。

## 2. 原 理

2 サイトイムノアッセイ（サンドイッチ法）においては目的抗原と特異的に反応する抗体とドナー蛍光体（F）とをアルブミンを介して間接的に結合した微粒子（A）と、もう一種類の抗体とアクセプター蛍光体（Q）とをアルブミンを介して間接的に結合した微粒子（B）を用意する。抗原が抗体により挟まれたサンドイッチ複合体を形成したとき、微粒子に結合しているドナー蛍光体とアクセプター蛍光体の距離が近づき、ドナー側の蛍光がエネルギー移動によって消光される。その消光の程度に応じてあらかじめ測定された検量線をもとに抗原量を測定することができる（Fig. 1(a)）。また、競合法では測定される抗原とドナー蛍光体標識された抗原が、アクセプター蛍光体が固相化担体としての微粒子に同時に吸着された抗体へ競合的に反応させる。抗原抗体反応で微粒子に結合しているアクセプター蛍光体と抗原に結合しているドナー蛍光体の距離が近づき、ドナー側の蛍光がエネルギー移動によって消光される（Fig. 1(b)）。

Forster<sup>11)</sup> らは、エネルギー移動の速度定数を双極子（ドナー）-双極子（アクセプター）相互作用によるエ

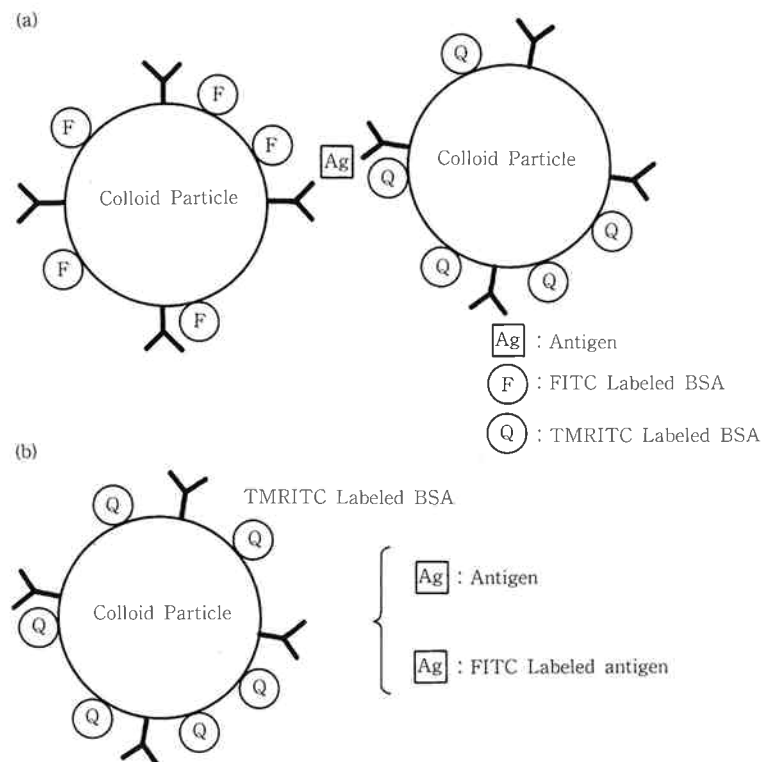


Fig. 1(a) Schematic Procedure on the Energy Transfer Sandwich Assay  
 (b) Schematic Procedure on the Energy Transfer Competitive Assay

エネルギー移動の関係式から計算した。

$$k_T = 8.79 \times 10^{-25} \kappa^2 \phi_D k_D \eta^{-4} R^{-6} \int_0^\infty \epsilon_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (1)$$

ここで  $\kappa$  は配向パラメーター、 $\phi_D$  はドナー蛍光量子収率、 $k_D$  はエネルギー移動がない場合のドナーの一次消光速度定数、 $\eta$  は媒体の屈折率、 $R$  はエネルギードナーとアクセプターの距離、 $\epsilon_D(\lambda)$  はドナーの標準化された蛍光励起スペクトル、 $\epsilon_A(\lambda)$  は光吸収のアクセプターの吸光スペクトルである。 $\kappa^2$  はドナーとアクセプターがランダムに配向した場合の平均  $\kappa^2=2/3$  である。この式によりドナーとアクセプターの距離が近付けば、それだけ有効にエネルギー移動が進行することが期待できる。

### 3. 実 験

#### (1) 材 料

抗原の異なった部位を認識する抗体：抗 FSH (Follicle stimulating hormone) モノクローナル抗体(二種類)と抗 IgE (Immunoglobulin E) モノクローナル抗体(二種類)は東ソー製のものを使用した。Fluorescein isothiocyanate (FITC) は、同仁化学研究所社製 DOTITE FITC (349-03661) を Tetramethyl rhodamine isothiocyanate (TMRITC) はシグマ社製 R-1755 を使用した。ラテックス作成のために使われた界面活性剤 (Sodium dodecyl sulfate: SDS), スチレンモノマー, 重合開始剤 (過硫酸カリウム) は和光純薬工業社製 (特級) を使用した。競合法で使われたラテックスは積水化学工業社製 N-500 (0.525  $\mu\text{m}$ ) をそのまま使用した。白金超微粒子作成のために使われた塩化白金酸, クエン酸は和光純薬工業社製 (特級) を使用した。ウシ血清アルブミンはシグマ社製 A-7888 を使用した。アッセイのために使用した抗原 FSH, IgE はスクリプス社製を使用した。アビジンはナカライテスク社製を, また FITC ラベル化アビジンはカッペル社製 #1000-0470 を使用した。抗アビジン抗体は, EY Laboratory 社製 AT-000 を使用した。

#### (2) 方 法

微粒子としてポリスチレンラテックスと白金超微粒子, 同一抗原の異なった部位を認識する抗体として抗 FSH モノクローナル抗体(一組)と抗 IgE モノクローナル抗体(一組), ドナー蛍光体として FITC とアクセプター蛍光体として TMRITC をそれぞれウシ血清アルブミン (BSA) に化学結合させたものを使用した。競合法については, アビジンとアビジン FITC が抗アビジン抗体と TMRITC 修飾された BSA が吸着したコロ

イド粒子へ競争する系で検討した。比較対照法として大日本製薬製 (IgE, FSH) RIA キットを用いた。

#### (1) ラテックス粒子の作成

スチレンモノマー 100 g, 水 500 g, SDS 10 g を攪拌, 懸濁させ, 系全体の温度を上げ, 60°C になった段階で, 重合開始剤 (0.4 g を水 100 ml) を添加した。6 時間攪拌の後, 氷浴で冷却, 純水にて 1 日透析を行った。

#### (2) 白金超微粒子の作成

960 ml の水 (100°C) 中に 1% クエン酸 120 ml と塩化白金酸 ( $\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 60 mg を加えて 3 時間還流, 攪拌した。氷浴で冷却後, イオン交換カラム (Amberlite MB-1) を通して遊離の塩類を除いた。カラム通過後の電気電導度が 5 ms/cm 以下であることを確認した。

#### (3) 蛍光体標識 BSA の作成

FITC 20 mg を 0.1% BSA 100 ml PBS buffer (pH 8.0) に入れ, 24 時間攪拌し, 吸着させた。PBS buffer で 24 時間透析を行い, 未反応の FITC を分離し, FITC 標識化 BSA を準備した。Rhodamine isothiocyanate (TMRITC) 20 mg を 0.1% BSA 100 ml PBS buffer (pH 8.0) に入れ, 24 時間攪拌した。PBS buffer で 24 時間透析を行い, 未反応の TMRITC を分離し, TMRITC 標識化 BSA を調製した。透析後吸収スペクトルから BSA への標識率を計算した。

#### (4) 蛍光体標識 BSA 及び抗体固定化コロイド粒子の作成

##### 1) サンドイッチ系で用いた抗体固定化コロイド粒子

0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) 500  $\mu\text{l}$  と上記の方法によって合成したポリスチレンラテックス (100 倍水希釈) 500  $\mu\text{l}$  を混ぜ, さらに純水を 4 ml 加えた。その後, 50  $\mu\text{l}$  の二種類の抗 IgE モノクローナル抗体 (抗体濃度 0.1 mg/ml) をおのおのラテックス溶液に加え攪拌後, 24 時間吸着のために 4°C で放置した。別々に用意された FITC 固定化 BSA 及び TMRITC 固定化 BSA をそれぞれ 50  $\mu\text{l}$  加え, 2 時間放置して吸着させた。さらに, 500  $\mu\text{l}$  の 10% ポリエチレングリコール (分子量: 20000) を加え, 1 時間放置してブロッキングした。蛍光体標識 BSA 抗体固定化白金超微粒子の作成においては, ポリスチレンラテックスの代わりに上記の白金超微粒子原液を 500  $\mu\text{l}$  加えること以外はラテックスの場合と同様である。

##### 2) 競合法で用いた抗体固定化コロイド粒子

積水化学試薬用ラテックス 1/100 希釈したもの 100  $\mu\text{l}$  (粒子径 0.525  $\mu\text{m}$ , 固型分 10%) を 0.1 M Tris-HCl

(pH 8.0) 4.9 ml 中に加えた溶液に抗アビジン抗体 (7.5 mg/ml) を 50  $\mu$ l 加えラテックス粒子に固定化した。白金超粒子の場合、白金超微粒子原液 1 ml に 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) 4 ml 加えた溶液に抗アビジン抗体 (7.5 mg/ml) を 50  $\mu$ l を加え白金超微粒子に固定化させた。抗体固定化された白金超微粒子は、TMRITC 標識された BSA 50  $\mu$ l で 2 時間ブロッキングされた後、500  $\mu$ l の 10% ポリエチレングリコール (分子量: 20000) を加え、1 時間ブロッキングした。

### (3) アッセイ方法

#### (1) サンドイッチ系

抗体と BSA を介した FITC を結合したラテックス (A) と抗体 BSA を介した TMRITC を結合したラテックス (B) をそれぞれ 75  $\mu$ l にサンプル (FSH 抗原を含む標準血清: 0.1-1000 mIU/ml, IgE 抗原を含む標準血清: 1-2000 IU/ml) を 50  $\mu$ l 蛍光測定用マイクロタイタープレートに加えた。0.5-60 分間インキュベーション後、コロナ社製マイクロプレート蛍光リーダー MTP-100F (励起波長 495 nm, 蛍光波長 530 nm) で蛍光強度を測定した。

#### (2) 競合法系

アビジン (0.1  $\mu$ g/ml-1000  $\mu$ g/ml) 50  $\mu$ l と FITC 標識化アビジン 50  $\mu$ l と TMRITC 結合 BSA, 抗体固相化ラテックス (または白金超微粒子) 溶液 100  $\mu$ l を蛍光測定用マイクロタイタープレートに加えた。0.5-60 分間インキュベーション後、マイクロタイター蛍光リーダーで蛍光強度を測定した。

## 4. 結果および考察

### (1) DOSE RESPONSE

#### (1) サンドイッチ系

##### 1) FSH (Follicle stimulating hormone)

Fig. 2 は、添加 FSH 濃度に対するドナー (FITC) の

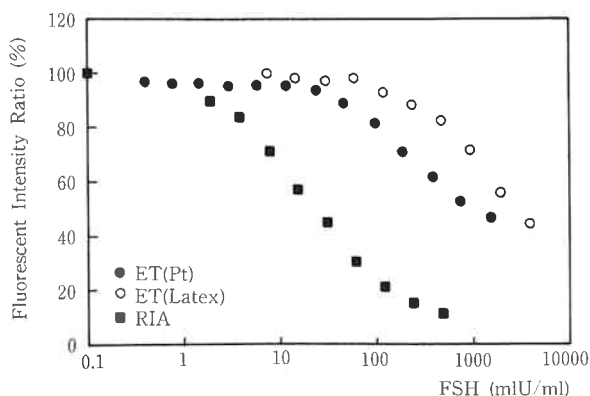


Fig. 2 Dose Response Curve for FSH

蛍光強度の変化を示している。ラテックスと白金をコロイド担体として用いたエネルギートランスファーイムノアッセイの成績を RIA と比較した。比較のために用いた RIA のアッセイは今回検討したエネルギートランスファーイムノアッセイとは原理的に異なるが、実際測定すべき FSH の検量域を示すものとして加えた。RIA の検量線と比べてエネルギートランスによる検量線は 10 倍程度高い濃度で検量線の落ちが見られた。また、担体として用いたラテックス系と白金コロイド系を比較した場合、5 倍程度白金系の方が濃度に対する応答がよかった。これはドナーからアクセプターへエネルギー移動を起こす際、固定化担体の粒子径がラテックスの場合、56 nm (動的光散乱で測定された。) であるのに対して白金の場合、15 nm (透過型電子顕微鏡で測定された。) であるため抗原-抗体反応によるコンプレックスをつくった場合、ドナーとアクセプター間の距離がラテックスに比べて白金コロイドの方がより近づけるからだと考えられる。RIA の検量域に到達できなかった理由として、コロイド粒子に吸着させた蛍光標識された BSA の量に限界があるためにたとえコロイド粒子 1 個に抗体が 1 個ついた場合でも蛍光検出感度が装置の性能に依存してしまふこと。また、アッセイ原理がドナー側の蛍光量の減少率で見ているために、サンプル濃度ゼロでの蛍光量を最低蛍光検出感度の少なくとも 100 倍くらいの濃度に設定しなければならずノイズが大きくなったこと。アクセプター側の蛍光量の増加率で測定した方が高感度測定できる可能性がある。また、アッセイ系に固相化担体としてコロイド粒子を使っていることは、コロイド粒子の励起光散乱によるバックグラウンド増加を引き起こす。RIA の場合、検量線は、0% 近くまで達しているが、エネルギートランスの場合、RIA に比較して高い値 (30-40%) でプラトーに達した。バックグラウンドの増加の原因は、ひとつはドナー側の励起光の直接光による散乱による。またもうひとつの原因は、コロイド粒子を使ったこのアッセイ系自身がドナーからアクセプターへのエネルギー移動を有効に起こさないことによるのかもしれない。すなわち、たとえ抗原-抗体反応でコロイド粒子凝集体が形成されたとしても、コロイド粒子についている蛍光体のうち有効にドナーからアクセプターへエネルギー移動をおこしている部分が限られているということである。凝集体についている蛍光体のうち、エネルギー移動にあずからなかった蛍光体 (ドナー) はバックグラウンドの増加に関与する。また、抗原抗体反応コンプレックスによる凝集体の蛍光の消光がエネルギー移

動以外の過程による部分が無視できないかもしれない。実際、蛍光感度を上げるためにコロイド粒子の数を増やすにしてもコロイド粒子自身の凝集により濁りを無視できない。今回の実験では、濁りによる誤差が5%以下でおさまるような比較的希薄な濃度領域で実験を行った。

2) IgE (Immunoglobulin E)

Fig. 3 は、添加 IgE 濃度に対するドナー (FITC) の蛍光強度の変化を示している。ラテックスと白金をコロイド担体として用いたエネルギー転スファーマノアッセイの成績を RIA と比較した。IgE の場合、実際の検量域を示す RIA の検量線と比較して約5倍程度高い濃度域で検量線の落ちが見られた。FSH と IgE の正確な分子量と分子量による慣性半径の違いを無視し、ユニット表示されている濃度をモル濃度換算し同じ添加モル濃度としてプロットしたところ、抗原分子が異なるにもかかわらず同等のモル濃度で検量線の落ちが見られた。検量線の変曲線の濃度から数 fmol オーダーの感度を示していることがわかった。

(2) 競合法

アビジン添加量に対して蛍光強度の変化を実験方法で示した競合法によって測定した (Fig. 4)。固相化担体としてラテックスと白金を用いたところ、添加アビジンの濃度が増加するにもなってドナー側の蛍光強度は増加した。サンドイッチ系が直接抗原を蛍光標識した抗体が挟み込んだときエネルギー転スが起るのに対して、競合法の場合は抗原と蛍光体標識抗原の競争により標識抗原がコンプレックスをつくった時エネルギー転スが起る。それ故、検量線はサンドイッチとは逆に抗原量に伴って蛍光が増加する。固相化担体の違いをラテックス系と白金コロイド系で比較したところ、サンドイッチ系とは逆にラテックス系の方が感度がよかった。ドナー側はラテックス系も白金コロイド系も同じ条件である。Forster によって示された理論式から推測できる

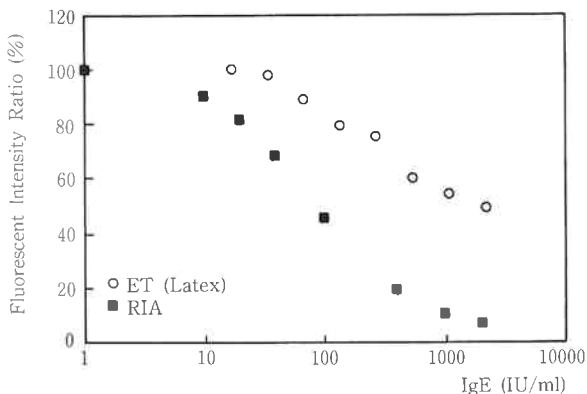


Fig. 3 Dose Response Curve for IgE

ように、アクセプター側のコロイド粒子が持つ消光剤の保有量が、粒子径の違いからラテックスの方が白金コロイド系に比べて大きいためによると考えられる。しかしながら、過剰のアクセプターはドナー励起のために使われる光が直接アクセプター励起にも使われる機会を増やすことになり、バックグラウンド上昇につながってしまう。

(2) 反応時間

IgE 測定系においてインキュベーション時間を (0.5分から60分) まで変えて抗原抗体反応を行い、その蛍光強度を比較したが、蛍光強度の顕著な違いはみられなかった。このことは、アッセイ時間が30秒程度で良いことを示している (Fig. 5)。

5. 結 論

抗原量の変動にもなっておこる抗原抗体コンプレックス内でのエネルギー移動による蛍光強度の増減から、

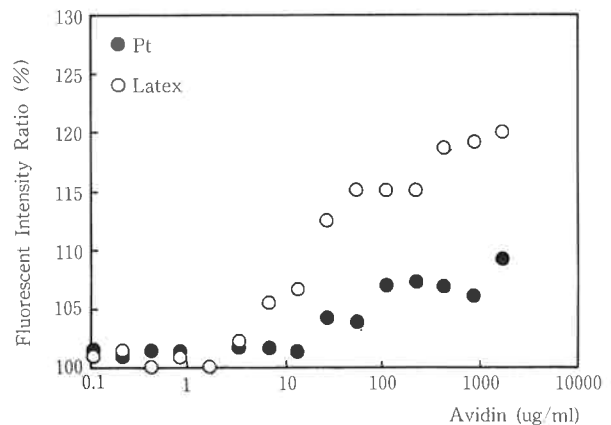


Fig. 4 Dose Response Curve for Avidin

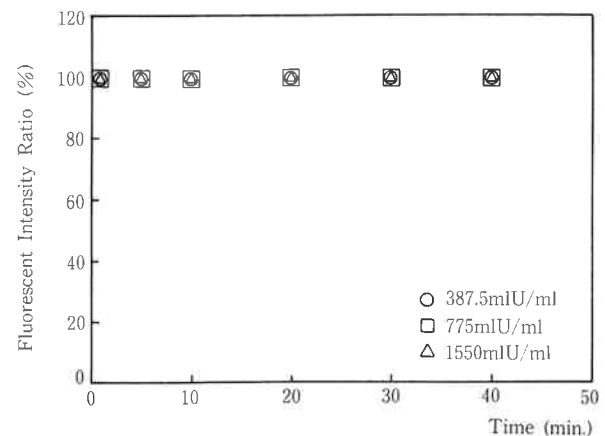


Fig. 5 Time Dependence of the Fluorescent Intensity for IgE. (Sample Concentration; 387.5, 775, 1550 mlU/ml)

煩雑な B/F 分離を必要としない均一系の免疫測定系を組むことができた。Dose response curve から数 fmol の測定感度が得られた。従来 1 時間程度要していた測定時間を 30 秒以内に短縮することが可能となった。今後、蛍光体の選択や蛍光測定条件の改良により高感度化が可能と思われる。

### 文 献

- 1) Berson, S. A., and Yalow, R. S.; *Adv. Biol. Med. Phys.*, **6**, 350 (1958)
- 2) Ullman, E. F., Schwarzberg, M., and Rubenstein, K. E.; *J. Biol. Chem.*, **251**, 4172-4178 (1976)
- 3) Khanna, P. L., and Ullman, E. F.; *Anal. Biochem.*, **108**, 156-161 (1980)
- 4) Werf, P., and Chang, C. H.; *J. Immuno. Methods*, **36**, 339-347 (1980)
- 5) Lim, C. S., Miller, J. N., and Bridges, J. W.; *Anal. Biochem.*, **108**, 176-184 (1980)
- 6) Miller, J. M., and Lim, L. S.; *Analyst*, **105**, 91-92 (1980)
- 7) Kronick, M. N. and Grossman, P. D.; *Clin. Chem.*, **29**, 1582-1586 (1983)
- 8) Heller, M. J. and Morrison, L. E. in *Chemiluminescent and Fluorescent Probes for DNA Hybridization Systems* (Kingsbury, D. T., and Falkow S., eds.), pp. 345-356, Academic Press, New York.
- 9) Patel, A., Davies, C. I., Anthony, K. C., and McCarra, F.; *Anal. Biochem.*, **129**, 162-169 (1983)
- 10) Morrison, L. E.; *Anal. Biochem.*, **174**, 101-120 (1988)
- 11) Forster, Th.; *Ann. Phys. (Leipzig)* **2**, 55-75 (1948)



著 者

氏名 池 田 賢 仁  
Kenji IKEDA

入社 平成元年 4 月 1 日  
所属 研究本部  
          生物工学研究所  
          第 3 研究室



著 者

氏名 豊 田 和 久  
Kazuhisa TOYODA

入社 昭和58年 4 月 1 日  
所属 研究本部  
          生物工学研究所  
          第 3 研究室



著 者

氏名 鈴 木 英 夫  
Hideo SUZUKI

入社 昭和60年 1 月 1 日  
所属 研究本部  
          生物工学研究所  
          第 3 研究室  
          第 3 研究室室長