

《ノート》

2-サイトイムノラジオメトリックアッセイ (サンドイッチ法) における平衡論的取扱い(その2)

—平衡論的な標準曲線およびその感度について—

Mathematical Treatment of 2-site Immunoradiometric Assay
(Sandwich Assay) at Equilibrium-II
—Dose-response Curve and Its Sensitivity—池田 勲夫* 関口 潔* 飯沼 一茂* 高井 優*
武田 克道* 熊谷 保之* 倉田 邦夫*Isao IKEDA*, Kiyoshi SEKIGUCHI*, Kazushige INUMA*, Masaru TAKAI*,
Katsumichi TAKEDA*, Yasuyuki KUMAGAI* and Kunio KURATA*

*Dainabot Radioisotope Laboratories

I. 緒 言

ラジオイムノアッセイ (RIA) の平衡論的取扱いについては, Berson & Yalow をはじめとして¹⁾, Ekins²⁾, Rodbard³⁾ らによって詳細に解析されている。一方, 2-サイトイムノラジオメトリックアッセイ法 (サンドイッチ法) については, Rodbard & Feldman⁴⁾ らによって反応速度論的な解析がされているにすぎず, 平衡論的な観点からみた解析はほとんどない。

そこで著者らは, サンドイッチ法における種々の現象を解明することを目的として平衡論的な解析を行うことにし, まず平衡論的概念を簡略化するために, 固相化抗体と抗原との反応が完全に進行する, すなわちその平衡定数 $K_1 = \infty$ であるという条件下で解析を行い, その結果について前報

で報告した⁵⁾。そこで得られた平衡論的標準曲線は $K_1 = \infty$ という条件下であるため, 現実に描かれているそれとは若干異なるものではあったが, サンドイッチ法における標準曲線の骨子としては十分なものであった。今回は, その平衡論的解析をより現実的なものにするため, $K_1 \neq \infty$ の条件下で解析を行い, さらに α -フェトプロテインのサンドイッチ法を用いた測定において, 種々の条件での標準曲線を作成し, 平衡論的解析によって得られた標準曲線をもとに若干の考察を行ったので報告する。

II. 実験方法

1) ヒト AFP の精製

ヒト AFP は Ruoslahti らの方法⁶⁾に従い, ヒト原発性肝癌患者の腹水より, 固相化抗ヒト AFP 抗体カラムを用いたアフィニティクロマトグラフィーを用いて精製した。

* ダイナボットラジオアイソトープ研究所

受付: 58年1月11日

最終稿受付: 58年3月11日

別刷請求先: 松戸市稔台 344 (☎271)

ダイナボット RI 研究所

池田 勲夫

Key words: Radioimmunoassay, 2-site immunoradiometric assay, Equilibrium constant, Sensitivity.

2) 抗血清

抗ヒト AFP 抗血清は、精製ヒト AFP を生理食塩水に溶解し、Freund's complete adjuvant と混和してエマルジョンを作成し、ヤギおよびウサギの皮下に2週間隔で5回投与して作成した。その後、固相化ヒト AFP カラムを用いたアフィニティクロマトグラフィ法により抗ヒト AFP 特異抗体を作成した。

3) ヒト AFP 抗原および抗ヒト AFP ウサギ抗体の ^{125}I 標識

ヒト AFP に Na^{125}I を加えクロラミン T 法によって比放射能 $25 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ の標識抗原を調製した。この場合、抗原1分子あたりヨウ素原子平均0.75原子の割合で標識され、過剰抗体系での抗ヒト AFP 抗体との結合率は95%以上を示した。抗ヒト AFP ウサギ抗体を同様に標識し $8.8 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ の標識抗体を作成した。この場合、抗体1分子あたり平均0.61原子のヨウ素で標識され、過剰固相化抗原と80%以上の結合率を示した。

4) 固相化抗体ビーズの調製

直径 6.25 mm のポリスチレンビーズ (Precision Plastic Ball Co, Chicago, USA) に Catt らの方法⁷⁾に準じて、種々の濃度の抗 AFP ヤギ抗体を吸着させて固相化抗体ビーズを調製した。

5) 平衡定数および有効抗体量の算出

標識抗原 ($\text{AFP-}^{125}\text{I}$), 0.1 ml に、標準ヒト AFP 0.1 ml を加え、固相化抗体ビーズを1個加えて 25°C で3日間のインキュベーションを行った。インキュベーション後、固相化ビーズを洗浄しその放射能を測定した。得られた標準曲線より Scatchard plot を求め、平衡定数および有効抗体量を求めた。

6) 2-ステップ法による AFP 標準曲線の作成

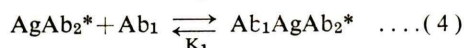
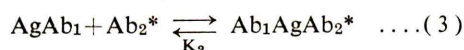
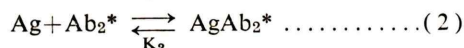
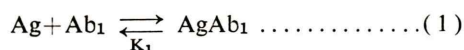
標準ヒト AFP 液 (0-3,500 ng/ml) を 0.02 ml に、ホウ酸緩衝液を 0.3 ml 加え、固相化抗体ビーズを1個加えて 25°C で2日間インキュベーションを行った。反応後、ビーズを洗浄し、さらに標識抗体液を 0.3 ml 加え、 25°C で2日間インキュベーションを行った。反応後、ビーズを洗浄し、ビーズ上の放射能を測定した。

III. 平衡論的解析

サンドイッチ法についての平衡論的考察を行う際、前報で報告したのと同じ反応モデルについての仮定をたてた。そして (1) 固相化抗体、抗原および標識抗体を同時に加え、反応終了後、固相上の放射能を測定する1ステップ法、(2) 固相化抗体と抗原とを反応させた後、未反応の抗原を洗い去り、ついで標識抗体を加えて反応させ、反応終了後、固相上の放射能を測定するステップ法のおおのの場合について解析を行った。

1. 1ステップサンドイッチ法

固相化抗体と抗原との反応における平衡定数を K_1 、標識抗体と抗原との反応における平衡定数を K_2 とした場合、1ステップサンドイッチ法では主として次にあげた反応を考えなければならない。



ここで Ta = 総抗原濃度, Tb_1 = 固相化抗体のみかけの総濃度, Tb_2 = 標識抗体総濃度とすれば

$$\begin{aligned} \text{Ta} = & [\text{Ag}] + [\text{AgAb}_1] + [\text{AgAb}_2^*] \\ & + [\text{Ab}_1\text{AgAb}_2^*] \dots\dots\dots (5) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Tb}_1 = & [\text{Ab}_1] + [\text{AgAb}_1] + [\text{Ab}_1\text{AgAb}_2^*] \\ & \dots\dots\dots (6) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Tb}_2 = & [\text{Ab}_2^*] + [\text{AgAb}_2^*] + [\text{Ab}_1\text{AgAb}_2^*] \\ & \dots\dots\dots (7) \end{aligned}$$

ただし、

$[\text{Ag}]$: 遊離抗原濃度

$[\text{Ab}_1]$: 遊離固相化抗体のみかけの濃度

$[\text{AgAb}_1]$: 固相化抗体-抗原結合物のみかけの濃度

$[\text{Ab}_2^*]$: 遊離標識抗体濃度

$[\text{AgAb}_2^*]$: 標識抗体-抗原結合物の濃度

$[\text{Ab}_1\text{AgAb}_2^*]$: 固相化抗体-抗原-標識抗体結合物のみかけの濃度

ここで(1)~(4)式より

$$K_1 = \frac{[AgAb_1]}{[Ag][Ab_1]} = \frac{[Ab_1AgAb_2^*]}{[AgAb_2^*][Ab_1]} \dots (8)$$

$$K_2 = \frac{[AgAb_2^*]}{[Ag][Ab_2^*]} = \frac{[Ab_1AgAb_2^*]}{[AgAb_1][Ab_2^*]} \dots (9)$$

となる。標識抗体の固相化抗体に結合した割合を $b(0 \leq b \leq 1)$ と置けば、 $b = [Ab_1AgAb_2^*]/Tb_2$ であるから、まず(5)式より、

$$Ta - bTb_2 = [Ag]\{K_1[Ab_1] + K_2[Ab_2^*] + 1\} \dots (10)$$

(6)式より

$$Tb_1 - bTb_2 = [Ab_1]\{K_1[Ag] + 1\} \dots (11)$$

(7)式より

$$Tb_2 - bTb_2 = [Ab_2^*]\{K_2[Ag] + 1\} \dots (12)$$

(8), (9)式より

$$bTb_2 = K_1K_2[Ag][Ab_1][Ab_2^*] \dots (13)$$

が得られ、(10)~(13)式を解いて

$$\begin{aligned} & K_1^2K_2^2TaTb_2^2b_4 \\ & - K_1K_2Tb_2\{K_1K_2Ta^2 + K_1K_2TaTb_2 \\ & + K_1K_2TaTb_1 + K_1K_2Tb_1Tb_2 + K_1Ta \\ & + K_2Ta + K_1Tb_1 + K_2Tb_2 + 1\}b^3 \\ & + \{2K_1^2K_2^2TaTb_1Tb_2 + K_1^2K_2^2Ta^2Tb_2 \\ & + K_1^2K_2^2Tb_1^2Tb_2 + K_1^2K_2^2Tb_1Tb_2^2 \\ & + K_1^2K_2^2Ta^2Tb_1 + 2K_1K_2^2TaTb_2 \\ & + 2K_1^2K_2TaTb_1 + 2K_1^2K_2Tb_1Tb_2 \\ & + 2K_1K_2^2Tb_1Tb_2 + K_1^2Tb_1 + K_2^2Tb_2\}b^2 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & - K_1K_2\{K_1K_2TaTb_1^2 + K_1Tb_1^2 \\ & + K_1K_2Tb_1^2Tb_2 + K_1K_2Ta^2Tb_1 \\ & + K_1TaTb_1 + K_1K_2TaTb_1Tb_2 + K_2TaTb_1 \\ & + Tb_1 + K_2Tb_1Tb_2\}b + K_1^2K_2^2TaTb_1^2 \\ & = 0 \dots (14) \end{aligned}$$

となり、4次曲線で示した標準曲線が得られる。

ここで $K_1 = K_2 = 1 \times 10^{10} \text{ l/mol}$, $Tb_2 = 1 \times 10^{-11} \text{ M}$ とした場合において、固相化抗体濃度 (Tb_1) を変化した場合の標準曲線の例を Fig. 1 に示した。ここでは、縦軸として b の代わりに結合率 (%) ($b \times 100$) を用いてある。 Tb_1 濃度に関係なく、1ステップ法に特有なプロゾーン効果がみられる。ただし、プロゾーン効果が生ずる領域は Tb_1 濃度の増加に伴って高濃度側に移行していくことがわかる。しかも本条件下では、 $Tb_1 \geq 1 \times 10^{-8} \text{ M}$ になると、結合率が減少しはじめる Ta 濃度が変化するだけで実際に Ta の測定可能な領域における標準曲線はほとんど変わらない。Fig. 2 に K_2 変化による標準曲線の例を示した。 K_2 を増加させることによって測定範囲は低濃度側に移行していくことがわかる。しかし、 K_2 を変化させることによってプロゾーン効果を Ta の高濃度側にシフトさせることはできない。

次に K_1 変化による標準曲線の例を Fig. 3 に示した。 K_1 を増加させることによって測定範囲は低濃度側に移行していくが $K_1 \geq 1 \times 10^{12}$ において

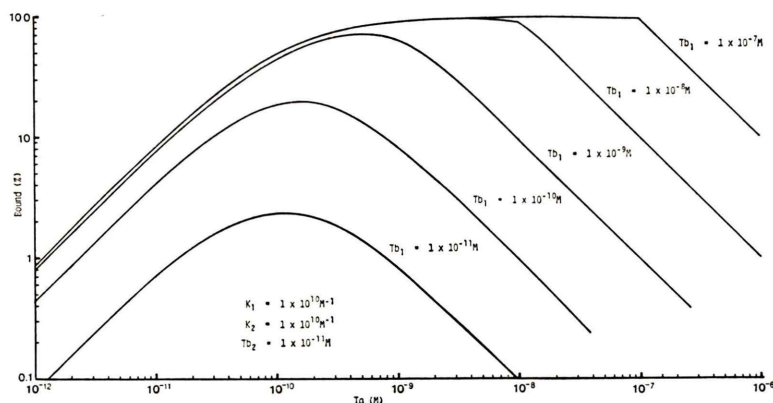


Fig. 1 Theoretical dose-response curves for 1-step sandwich assay with various Tb_1 . ($K_1 = K_2 = 1 \times 10^{10} \text{ l/mol}$, $Tb_2 = 1 \times 10^{-11} \text{ mol/l}$)

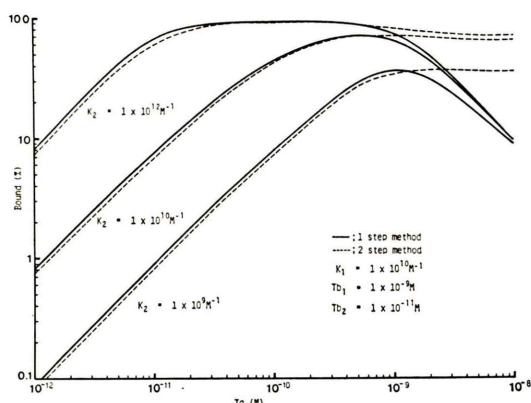


Fig. 2 Theoretical dose-response curves for sandwich assay with various K_2 values.

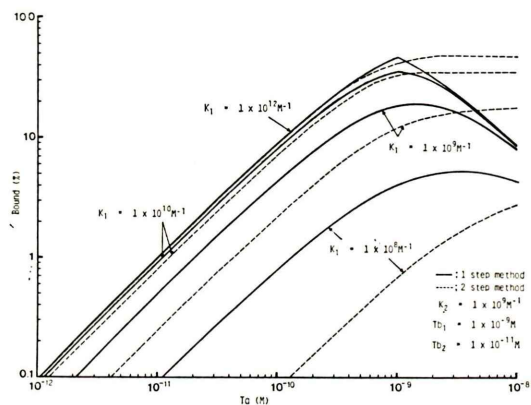
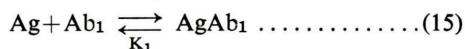


Fig. 3 Effect of K_1 values on theoretical dose-response curves of sandwich assay.

は K_1 値に関係なくほぼ同じ標準曲線を示すようになり、しかも、結合率 (b) は $Ta \geq 1 \times 10^{-9} M$, すなわち $Ta \geq Tt_1$ において急激に減少することがわかる。

2. 2ステップサンドイッチ法

2ステップサンドイッチ法では、第1反応終了後、未反応抗原を除去し、固相化抗体-抗原結合物を用いて、標識抗体と第2反応を行わせるものであるから、まず第1反応においては、



の反応に従って抗原が固相化抗体上に結合する。これにより、

$$Ta = [Ag] + [AgAb_1] \quad \dots\dots\dots(16)$$

$$Tb_1 = [Ab_1] + [AgAb_1] \quad \dots\dots\dots(17)$$

の関係式が得られる。2ステップ法においては、(15) 式において結合した $AgAb_1$ を用いて第2反応を行わせるのであるから、第2反応における総抗原濃度は第1反応で得られた $[AgAb_1]$ に相当する。そこで $Ta' = [AgAb_1]$ とおくと

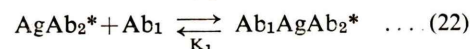
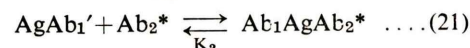
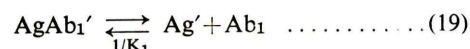
$$K_1 = \frac{[AgAb_1]}{[Ag][Ab_1]} = \frac{Ta'}{(Ta - Ta')(Tb_1 - Ta')}$$

が得られ、これを Ta' について解くと

$$K_1 Ta'^2 - \{(Ta + Tb_1)K_1 + 1\} Ta' + K_1 Ta Tb_1 = 0 \quad \dots\dots\dots(18)$$

となり、ここで得られた Ta' が第2反応における総抗原濃度になり、当然のこととして K_1 , Ta , Tb_1 の値によって大きく変動する。

次に第2反応においては、第2反応の最中に第1反応時において結合した $AgAb_1$ が解離する反応、あるいは解離した抗原がさらに標識抗体と反応する点についても考慮しなければならない。主な反応としては次のとおりになる。



ただし $Ta' = [Ag'] + [AgAb_1']$ である

(19)~(22) 式を用いて (1)~(4) 式と同様 b について解くと、(14) 式の Ta の代わりに Ta' となったものが得られ、この Ta' に (18) 式を代入すれば b と Ta との関係が得られる。

ここで Fig. 1 と同一の条件において Tb_1 を変化した場合の2ステップ法による標準曲線を Fig. 4 に示した。1ステップ法の標準曲線に見られた顕著なプロゾーン効果はみられず、 Ta 濃度の増加に伴って結合率は増加していく傾向にある。しかし、Fig. 4 の矢印で示したようにわずかではあるが極大値をもつ標準曲線になることがわかる。つまり2ステップ法でも Ta 濃度が増加するとわずかではあるがプロゾーン効果のあることがわかる。一方、 K_1 変化による2ステップ法の標準曲

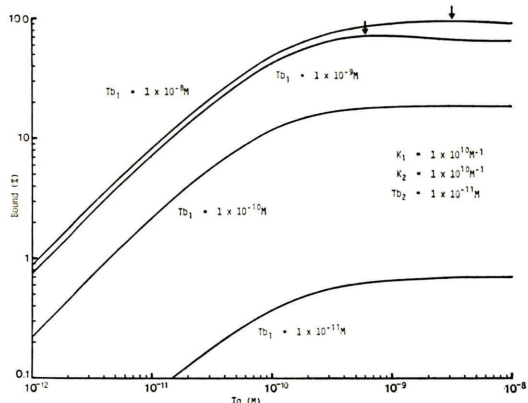


Fig. 4 Effect of Tb_1 concentrations on theoretical dose-response curves of sandwich assay. Maximum binding points are indicated by the arrows.

線を Fig. 3 の点線で示した。当然のことながら K_1 が低い場合には1ステップ法と2ステップ法とにおいて $B\%$ に大きな解離を認め、プロゾーン効果を起こす領域以下では1ステップ法の方が2ステップ法と比較して高い結合率を示した。しかし、 K_1 が大きくなるにつれて両方における結合率の解離は少なくなっていくのがわかる。

IV. 最小検出感度

サンドイッチ法における最小検出感度は、競合反応を利用したRIAの場合と異なり、測定上のバックグラウンドあるいはアッセイ上の非特異的結合(NSB)によって決まってくる。サンドイッチ法の感度を検出可能な最小抗原濃度であると定義すれば、バックグラウンドあるいはNSBを設定することによって感度を計算することができる。ここでは計算を簡単にするためバックグラウンドを100 cpmと置く。T分間測定した場合の計数誤差は、 $100 \pm \sqrt{100/T}$ である。T分間測定することによりバックグラウンドに対して有意となるカウントを平均値+2標準偏差とおけば $2 \times \sqrt{100/T} = 20/\sqrt{T}$ となる。このことは $20/\sqrt{T}$ cpm 以上になれば検出可能になることを示している。

一方NSBについてはNSB=0%の場合と、NSB=a%の場合に分けて考えてみる。

1. NSB=0% の場合

固相化抗体-抗原結合体と反応した標準抗体の1分間あたりのカウントをPとおけば

$$P = bTb_2SV\epsilon$$

ただし、S: 標準抗体の比放射能

V: 反応容量

ϵ : 測定効率

となる。

NSB=0% であるから $20/\sqrt{T}$ cpm 以上あれば検出可能となり、したがって標準曲線上の感度に相当する点においては、

$$20/\sqrt{T} = bTb_2SV\epsilon \dots \dots \dots (24)$$

が成立する。ここで $SV\epsilon T^{1/2} = 1 \times 10^{15}$ count·l/mol とおけば

$$bTb_2 = 2 \times 10^{-14} \text{ mol/l} \dots \dots \dots (25)$$

となり、この条件を満たすようにサンドイッチ法の標準曲線から Ta 濃度を求めればこれが感度になる。

2. NSB=a% の場合

標準抗体(Tb_2)のうちでa%が非特異的に固相化抗体上に結合するものとすれば、そのNSBに相当する1分間あたりのカウントは $aTb_2SV\epsilon/100$ cpm であるから、測定上のバックグラウンド(100 cpm)と合わせて標準曲線作成上反応に関与しないカウントは

$$(aTb_2SV\epsilon/100 + 100) \text{ cpm}$$

となる。これに対して有意となるカウントを同様にして+2標準偏差とおけば、

$$2\sqrt{(aTb_2SV\epsilon/100 + 100)/T}$$

となり、標準曲線上感度に相当する点においては

$$2\sqrt{\frac{aTb_2SV\epsilon}{100} + 100)/T} = bTb_2SV\epsilon \dots (26)$$

が成立する。ここで $T=1$ min, $SV\epsilon = 1 \times 10^{15}$ count·l/mol/min とおけば

$$2\sqrt{aTb_2 \times 10^{13} + 100} = bTb_2 \times 10^{15} \dots (27)$$

となり、この条件を満足するような Ta 濃度を求めれば、これが最小検出感度となる。

Figure 5に $SV\epsilon T^{1/2}$ 変化による標識抗体濃度(Tb_2)と感度との関係を示した。 Tb_2 を増加させるに従って感度は良くなり、例えば $SV\epsilon T^{1/2} =$

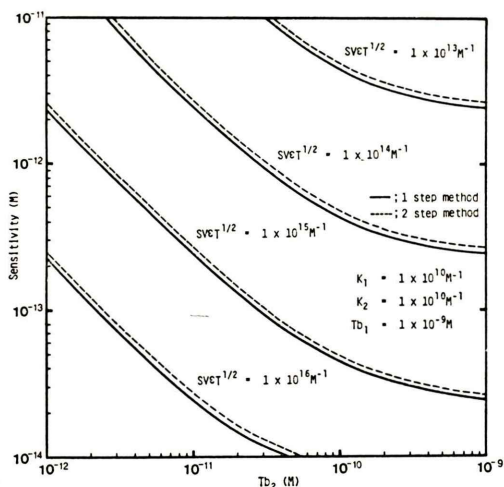


Fig. 5 Theoretical sensitivity curves for sandwich assay by varying Tb_2 concentrations.

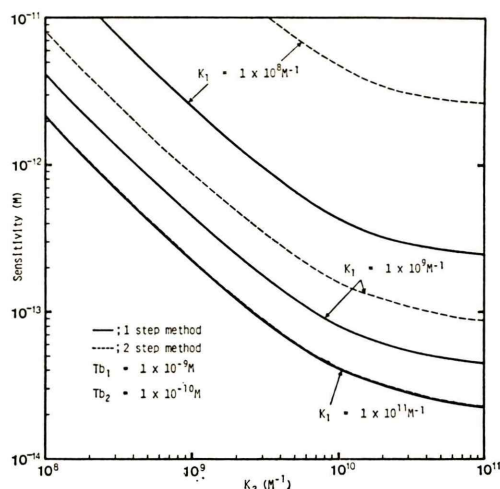


Fig. 7 The Relationships between sensitivity and K_2 values for sandwich assay.

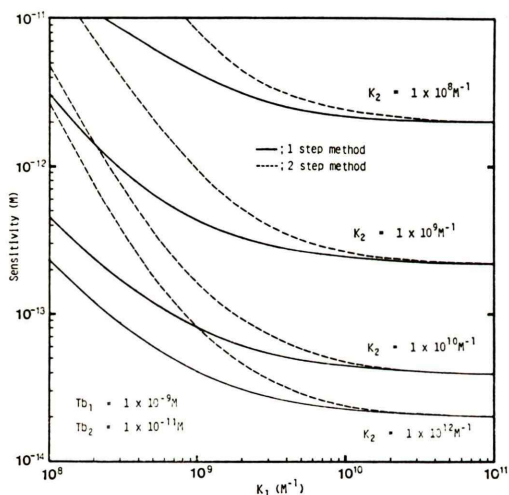


Fig. 6 The Relationships between sensitivity and K_1 values for sandwich assay.

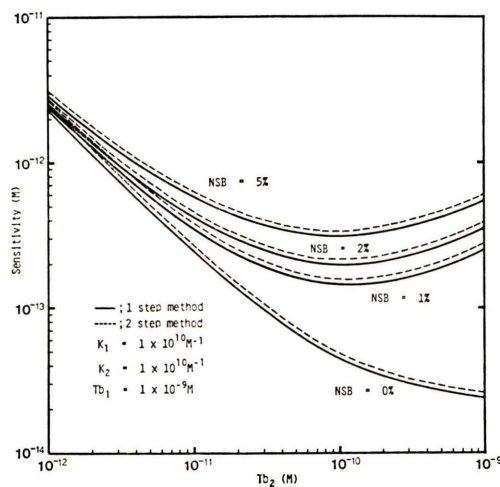


Fig. 8 Effect of NSB of sandwich assay on sensitivity.

1×10^{15} count \cdot l/mol の場合で 1 ステップ法においては $Tb_2 \rightarrow \infty$ とすることにより $Ta \rightarrow 2 \times 10^{-14}$ mol/l に近づいていくことがわかる。また $SVET^{1/2}$ を変化させることにより、感度もそれにほぼ比例して変動することがわかる。次に種々の K_2 による K_1 と感度との関係を Fig. 6 に示した。当然のことながら標識抗体の平衡定数 K_2 が増加すれば感度が良くなることがわかる。さらに K_1 を増加させることによっても感度は良くなり一定

値に近づいていく。すなわち、 $K_2 \rightarrow \infty$ になり、しかも $K_1 \rightarrow \infty$ にすることにより $Ta \rightarrow 2 \times 10^{-14}$ mol/l になる（これは $bTb_2 = 2 \times 10^{-14}$ mol/l としたことによる）ことがわかる。一方、1 ステップ法と 2 ステップ法との差については、 K_1 が小さければ 2 ステップ法の感度は 1 ステップ法のそれと比較して急激に悪くなるが、 K_1 が増加するに従って両法での感度に差はなくなってくる。Figure 7 に種々の K_1 による K_2 と感度との関係を示した。これは Fig. 6 の場合とほぼ同様の傾向

を示すが、1ステップ法と2ステップ法の差は K_2 を変化させても変わらないことがわかる。

Figures 5~7 に示した感度についての関係はすべて $NSB=0\%$ という理想的なサンドイッチ法の場合である。しかし現実には、どのような系においても、多少なりとも NSB は存在する。そこで $NSB=0\sim5\%$ の場合についての Tb_2 と感度との関係を Fig. 8 に示した。 K_1 と K_2 は一定であるため、1ステップ法および2ステップ法の差は Tb_2 には無関係である。しかし、 NSB が存在することによって感度曲線は全く異なったものになる。すなわち NSB が存在しない場合には、 Tb_2 濃度を増加させることにより感度は徐々に良くなっていくことがわかるが、 NSB が存在すると、感度曲線は下に凸の曲線を示す。すなわち標識抗体を増加させるに従って感度はよくなっていくが、ある濃度以上になるとかえって感度の低下を示すようになる。

V. 結果および考察

サンドイッチ法の測定範囲を論ずる場合、固相化抗体の Capacity がよく論議される。Figure 1 に示した条件下においては、 Tb_1 すなわち Capacity を増加させることによって測定範囲はある程度広がっている。しかし $Tb_1 \geq 1 \times 10^{-9} M$ になると、プロゾーン効果によって結合率 (b) の低下しはじめる Ta 濃度が濃 Tb_1 度の増加とともに高濃度側に移行していくことがわかる。このことは Tb_1 を増加させることにより、プロゾーン効果による結合率の低下をある程度避けることは可能であるが、測定領域を著しく増加させるということではない。実際には固相化抗体濃度を变化させた場合の標準曲線は Fig. 9 に示したとおりである。ここに示した2ステップ法による AFP の標準曲線において、固相化抗体濃度 (Tb_1) は Scatchard plot より求めた値である。Figure 4 に示した理論曲線と同様に Tb_1 の増加とともに結合率の上昇がみられる。2ステップ法であるから Fig. 9 に示した範囲内ではプロゾーン効果はみられていないが、いずれにしても 700 ng/ml 以上になるとプラ

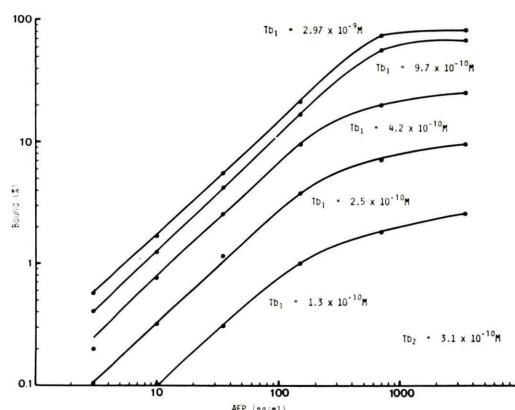


Fig. 9 Dose-response curves for AFP 2 step sandwich assay with various Tb_1 concentrations.

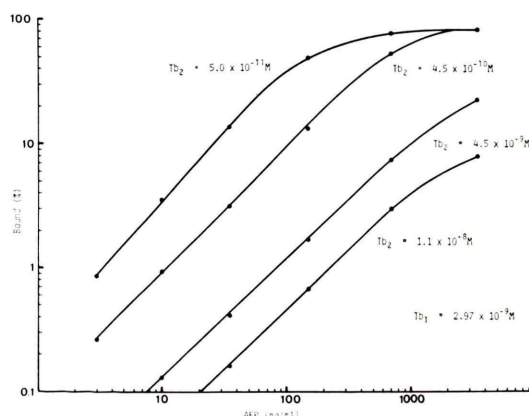


Fig. 10 Dose-response curves for AFP 2 step sandwich assay with various Tb_2 concentrations.

トーになっている。次に標識抗体濃度変化による2ステップ法 AFP の標準曲線を Fig. 10 に示した標識抗体濃度を減少させるに従って結合率が上昇していることがわかる。平衡式より求めた標準曲線 (今回は示していない) においても、 Tb_2 減少させることによって結合率が上昇する。

一方、 K_2 変化による測定範囲については、 K_2 を増加させることによって低濃度側にシフトし、測定領域を変えるためには、 K_2 を変えることが最適であることがわかる。 K_1 変化による測定範囲については、 K_1 を増加させることによってやはり低濃度側に移行していくが、 K_2 変化の場合と比較して顕著ではない。

一般的にサンドイッチ法においては、プロゾーン効果をなくすために1ステップ法よりも2ステップ法が良いと言われている。Figure 4にみられるとおり、2ステップ法とすることによって明らかに顕著なプロゾーン効果はなくなっているようにみえる。しかし、わずかではあるが、Fig. 4の矢印に示したように2ステップ法でも標準曲線は b_{\max} をもつ曲線になり、 Ta 濃度大過剰のもとで合率が低下することがわかる。このことは、第1反応で未反応の抗原を洗滌除去しているの、第2反応の最初においては未反応の抗原はない。しかし、第2反応中に K_1 の大小に応じて抗原が解離してくる。これが標識抗体と反応することによって1ステップ法ほど顕著ではないが、プロゾーン効果の生ずる原因となっている。また、ここでは反応をすべて平衡論的に取扱っているが、現実のサンドイッチ法では必ずしも平衡になるまで反応しているのではない。そうすると、解離した抗原および固相化抗体と結合した抗原に対する標識抗体の反応速度が異なるため、もし液-液系での反応が液-固系での反応に比較して早ければ、平衡に達する前に分離することにより、プロゾーン効果は Fig. 4 に示した以上に顕著になることが十分予想される。

サンドイッチ法における感度曲線は Fig. 5~8 に示したとおり、いずれの条件下においても1ステップ法が2ステップ法に比較してすぐれていることがわかる。1ステップ法と2ステップ法での平衡論的取扱いの上における差は(18)式にあり、したがって両法における感度を決定するのには K_1 に依存することになる。したがって K_1 を大にすれば(18)式より第1反応で反応する抗原が大になり、 $K_1 \rightarrow \infty$ になると $Ta' = Ta$ (ただし $Tb_1 \geq Ta$) になるため、計算上においてはその感度は1ステップ法、2ステップ法ともに同じになる。このことは、2ステップ法を採用する場合には K_1 を大きくした方がよいことを示している。そうでないと K_1 の値によっては、その感度が1ステップ法と比較して著しく減少するからである。サンドイッチ法における感度については Ekins ら⁸⁾も

その理論的感度曲線を報告している。それは単純に標識抗体平衡定数、すなわち K_2 をもとに計算を行っているが、それらの詳細な論述はみられていない。

Figure 6 に示したとおり、 K_1 および K_2 を増加させていくと感度は 2×10^{-14} mol/l に近づいていくことがわかる。これは $bTb_2 = 2 \times 10^{-14}$ mol/l としたことによるものである。この bTb_2 とは、標識抗体のうちで固相化抗体と反応したものの濃度を意味する。すなわち $SV \epsilon T^{1/2} = 1 \times 10^{15}$ count·l/mol としたことによる。したがって、例えば比放射能 (S) を無限大にすることが可能であれば、 bTb_2 はそれに応じて小さくすることが可能となり、最終的には1分子の抗原が測定可能になることを意味している。この点においては、競合反応を利用したRIAの感度とは大きく異なっている。

以上、平衡論理に得られた標準曲線、および感度曲線は現実のサンドイッチ法の標準曲線と比較した場合、非特異的結合、カウント誤差、バックグラウンドの変動などにより若干異なっているが、その傾向については現実のそれに良く対応している。そして、これらの平衡論的解析による取扱いは、サンドイッチ法における基本的概念を得るのに重要であると考えられる。

文 献

- 1) Berson SA, Yalow RS: General principles of radioimmunoassay. Radioisotopes in Medicine: In vitro studies (Hayes RL, Goswitz FS, Murphy BEP, Eds) USAEC, Oak Ridge, Tenn. 1968, p. 7.
- 2) Ekins RP, Newman BG, O'Riordam JLH: Theoretical aspects of saturation and radioimmunoassay. Radioisotopes in Medicine: In vitro studies (Hayes RL, Goswitz FS, Murphy BEP, Eds) USAEC, Oak Ridge, Tenn. 1968, p59.
- 3) Rodbard D, Ruder HJ, Vaitukaitis J, et al: Mathematical analysis of kinetics of radioligand assays: Improved sensitivity obtained by delayed addition of labeled ligand. J Clin Endocr 33: 343-355, 1971
- 4) Rodbard D, Feldman Y: Kinetics of two-site immunoradiometric (Sandwich) assays-I. Immunochemistry 15: 71-76, 1978
- 5) 池田勲夫, 飯沼一茂, 高井 優, 他: 2-サイトイムノラジオメトリックアッセイ (サンドイッチ法) における平衡論的取扱い(その1)——固相化抗体と抗

原との平衡定数が極めて大きい場合——. 核医学
19: 1051-1060, 1982

- 6) Ruoslahti E, Pihko H, Seppälä M: Alpha-Feto-protein: Immunochemical Purification and chemical properties. Expression in normal state and in malignant and non-malignant liver disease. *Transplant Rev* **20**: 38-60, 1974
- 7) Caft K, Niall HD, Tregear GW: Solid-phase radio-immunoassay of human growth hormone. *Biochem J* **100**: 310, 1966
- 8) Ekins R: Towards immunoassays of greater sensitivity, specificity and speed: Monoclonal antibodies and development in immunoassay (Albertini A and Ekins R Eds) Elsevier/North-Holland, 1981 p3-21.