

《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 1)

—固相化抗体と抗原との平衡定数が極めて大きい場合—

Mathematical Treatment of 2-site Immunoradiometric (Sandwich)
Assay at Equilibrium-I

—In the Case of Equilibrium Constant of Solid Phase Antibody Approach Infinite—

池田 勲夫* 飯沼 一茂* 高井 優* 倉田 邦夫*

Isao IKEDA, Kazushige IINUMA, Masaru TAKAI, and Kunio KURATA

Dainabot Radioisotope Laboratories

I. 緒 言

ラジオイムノアッセイ (RIA) には大別して、標識された抗原を用いて検体中の抗原との競合反応を利用する方法と、標識された抗体と固相化抗体を用いて検体中の抗原を測定する方法とがある。前者については、Berson & Yalow¹⁾をはじめとして、Ekins²⁾、Rodbard^{3,4)}ら多くの研究者によって理論的解析がなされてきた。また後者は、イムノラジオメトリックアッセイ (IRMA)⁵⁾として端を発し、その後 2-サイト IRMA として発展し⁶⁻⁸⁾、現在では通常サンドイッチ法と呼ばれて広く応用されている。そのサンドイッチ法についてもその標準曲線は、Rodbard & Feldman^{9,10)}らによって反応速度論的に解析されている。しかしながら、それらは現実の種々の現象を説明する上では必ずしも十分なものではない。そこで著者らは実験データの解析、標準曲線の予測を目的とし、

サンドイッチ法における平衡論的解析を行うことにした。今回は、標準曲線の平衡論的な取扱いを簡略化するために、固相化抗体と検体中の抗原との反応が完全に進行する、すなわち、その平衡定数を K_1 とした場合、 $K_1 = \infty$ であるという条件のもとで解析を行ったので報告する。

II. 平衡論的解析

通常サンドイッチ法においては、(1)固相化抗体に標準抗原または未知検体を加えて反応させた後、未反応抗原を洗い去り、ついで標識抗体を加えて反応させ、反応、洗浄後、固相上の放射能を測定する、いわゆる 2 ステップ法および、(2)固相化抗体、標準抗原または未知検体、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 ステップ法が用いられている。今回は以下に述べるとおり、おのおの場合について平衡論的に解析してみることにする。まず反応モデルを作成するにあたり、競合反応を利用した RIA の抗原—抗体反応モデルの場合とほぼ同様^{2,4)}、次のような仮定をたてた。

* ダイナボットラジオアイソトープ研究所
受付：57 年 3 月 11 日
最終稿受付：57 年 4 月 30 日
別刷請求先：松戸市総台 344 (☎ 271)
ダイナボット RI 研究所

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

(i) 抗原は化学的に均一である.

(ii) 固相化抗体および標識抗体は化学的に均一であり, しかも抗原に対する反応性は互いに妨害することなく独立している.

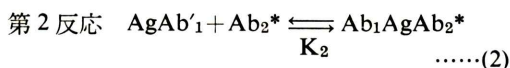
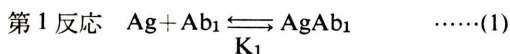
(iii) 固相化抗体および標識抗体は1価でありおのおの抗原内の異なる部位に対して1:1のみで反応し, この抗原-抗体反応による立体障害および協同効果はない.

(iv) 反応はすべて平衡に達するまで行う.

(v) 反応終了時の分離に際しては平衡状態を乱すことはない.

1. 2ステップサンドイッチ法

第1反応における平衡定数 (K_1) が非常に大きい場合, 固相化抗体と反応した抗原が第2反応中に解離するのが無視できるので, 第1反応および第2反応をおのおの次のように簡単に表わすことができる.



ここで, Ta = 総抗原濃度, Tb_1 = 固相化抗体のみかけの総濃度, Ta' = 第2反応で用いた総抗原濃度, Tb_2 = 標識抗体総濃度とすれば,

$$\text{Ta} = [\text{Ag}] + [\text{AgAb}_1] \quad \dots\dots(3)$$

$$\text{Tb}_1 = [\text{Ab}_1] + [\text{AgAb}_1] \quad \dots\dots(4)$$

$$\text{Ta}' = [\text{AgAb}'_1] + [\text{Ab}_1\text{AgAb}_2^*] \quad \dots\dots(5)$$

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

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

$[\text{AgAb}'_1]$: 第2反応での遊離固相化抗体-抗原結合物のみかけの濃度

$[\text{Ab}_2^*]$: 遊離標識抗体濃度

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

また, 第1反応終了後, 未反応抗原 Ag を洗い去り, 固相化抗体-抗原結合物 AgAb_1 を用いて標識抗体 Tb_2 と第2反応を行わせるのであるから,

$\text{Ta}' = [\text{AgAb}_1]$ となる.

一方, 第1反応および第2反応における平衡定数をおのおの K_1, K_2 とすれば, 第1反応より

$$K_1 = \frac{[\text{AgAb}_1]}{[\text{Ag}][\text{Ab}_1]} = \frac{\text{Ta}'}{(\text{Ta} - \text{Ta}')(\text{Tb}_1 - \text{Ta}')}$$

であるから, これより

$K_1\text{Ta}'^2 - \{(\text{Ta} + \text{Tb}_1)K_1 + 1\}\text{Ta}' + K_1\text{TaTb}_1 = 0$ の Ta' についての2次式が得られる. ここで $K_1 \rightarrow \infty$ として Ta' について解くと

$$\text{Ta}' = \frac{(\text{Ta} + \text{Tb}_1) - |\text{Ta} - \text{Tb}_1|}{2}$$

となり, これより

$$\text{Ta} \geq \text{Tb}_1 \text{ のとき } \text{Ta}' = \text{Tb}_1 \quad \dots\dots(7)$$

$$\text{Ta} < \text{Tb}_1 \text{ のとき } \text{Ta}' = \text{Ta} \quad \dots\dots(8)$$

となる. 次に標識抗体の結合した割合を $b (0 \leq b \leq 1)$ と置くと, $b = [\text{Ab}_1\text{AgAb}_2^*]/\text{Tb}_2$ であるから第2反応より

$$K_2 = \frac{[\text{Ab}_1\text{AgAb}_2^*]}{[\text{AgAb}_1][\text{Ab}_2^*]} = \frac{b}{(\text{Ta}' - b\text{Tb}_2)(1 - b)} \quad \dots\dots(9)$$

となる. 今回の報告では, K_1 が非常に大きい場合について論じているのであるから, 2ステップ法の標準曲線については次の2つの場合において考えなければならない. まず,

1) $\text{Ta} \geq \text{Tb}_1$ の場合

(7) 式より $\text{Ta}' = \text{Tb}_1$ であるから, これを (9) 式に代入して b について解くと,

$$b = \frac{(\text{Tb}_1 + \text{Tb}_2)K_2 + 1 - \sqrt{\{(\text{Tb}_1 + \text{Tb}_2)K_2 + 1\}^2 - 4K_2^2\text{Tb}_1\text{Tb}_2}}{2K_2\text{Tb}_2} \quad \dots\dots(10)$$

となる. 標準曲線を描くにあたり, Tb_1, Tb_2 および K_2 は一定であるから, $\text{Ta} \geq \text{Tb}_1$, すなわち総抗原濃度 \geq 固相化抗体のみかけの総濃度の領域においては, 抗原濃度に関係なく b は一定値を示す.

さらにここで $K_2 \rightarrow \infty$ とすれば,

$$\text{Tb}_1 \geq \text{Tb}_2 \text{ のとき } b = 1 \quad \dots\dots(11)$$

$$\text{Tb}_1 < \text{Tb}_2 \text{ のとき } b = \text{Tb}_1/\text{Tb}_2 \quad \dots\dots(12)$$

となって標準曲線はきわめて簡単な式になる.

(2) $\text{Ta} < \text{Tb}_2$ の場合

(8) (9) 式より b について解くと

$b =$

$$\frac{(Ta + Tb_2) K_2 + 1 - \sqrt{[(Ta + Tb_2) K_2 + 1]^2 - 4 K_2^2 Ta Tb_2}}{2 K_2 Tb_2} \quad \dots\dots(13)$$

となる。ここで得られる標準曲線は(13)式から明らかとなり2次曲線を示している。さらに $K_2 \rightarrow \infty$ とすることにより、

$$Ta \geq Tb_2 \text{ のとき } b = 1 \quad \dots\dots(14)$$

$$Ta < Tb_2 \text{ のとき } b = Ta/Tb_2 \quad \dots\dots(15)$$

で表わされる標準曲線になる。

ここで $K_1 = K_2 = \infty$ の場合についての標準曲線の例を示す。ここでは縦軸には b の代りに結合率(%) ($b \times 100$) を用いる。固相化抗体のみかけの総濃度 (Tb_1) および標識抗体総濃度 (Tb_2) が等しい場合、Fig. 1 に示したとおり、結合率(%)は(15)式に従い総抗原濃度 (Ta) の増加とともに上昇し、抗体濃度 (Tb_1, Tb_2) と同濃度になる点で100%になることがわかる。次に Tb_1 を一定に保ち、 Tb_2 を変化させた場合の標準曲線をFig. 2 に示した。 Tb_2 が Tb_1 より低い場合には、Fig. 1 と同様 Ta の増加に伴い(15)式に従って結合率(%)は増加

し、 Tb_2 と等しくなる点において100%を示す。

しかし、 Tb_2 が Tb_1 より濃い場合には、結合率は(15)式に従い、 Ta が Tb_1 と同濃度になるまで増加するが、以後、 $Ta \geq Tb_1$ の領域においては一定値 Tb_1/Tb_2 を示す。

一方、 K_2 変化($K_1 = \infty$)における標準曲線の例をFig. 3 に示した。抗原過剰領域で一定値を示す結合率(%)は K_2 の増加に従って増加し、しかも抗原の測定可能な領域が低濃度側に移行していくことがわかる。また K_2 が一定のもとで Tb_2 を変化させた場合の標準曲線をFig. 4 に示した。 Tb_2 が濃くなると、すなわちここで示した K_2 に対して第2反応の平衡が生成側に有意に移行する濃度以上になると、当然のこととして $K_2 = \infty$ の場合と同じ標準曲線を示すが、 Tb_2 が低くなるに従って K_2 の影響を受けることになるため、 $K_2 = \infty$ の場合と比較して結合率は低下する。

2. 1ステップサンドイッチ法

1ステップ法とは、固相化抗体、抗原および標識抗体を同時に加えて反応させることを意味しているから、固相化抗体と抗原との反応における平

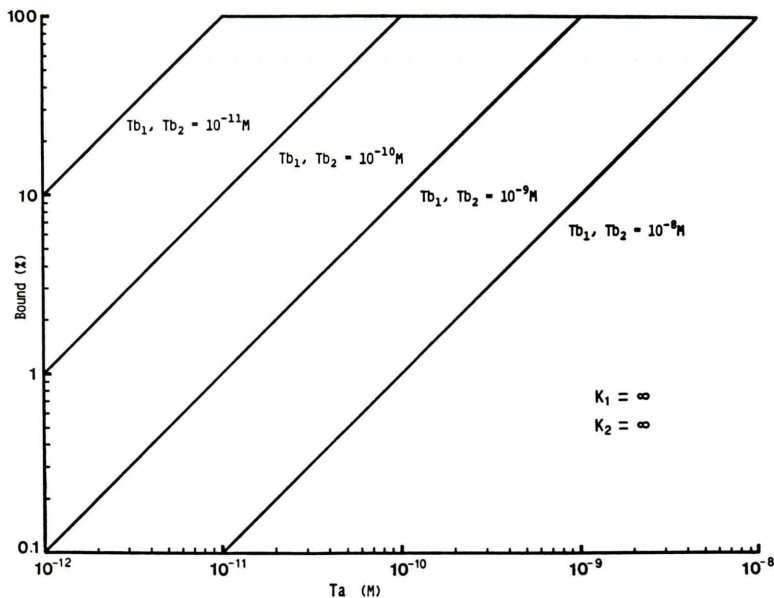


Fig. 1 Theoretical dose-response curves for 2-step Sandwich assay when all reaction are irreversible and allowed to reach completion ($K_1 = K_2 = \infty$).

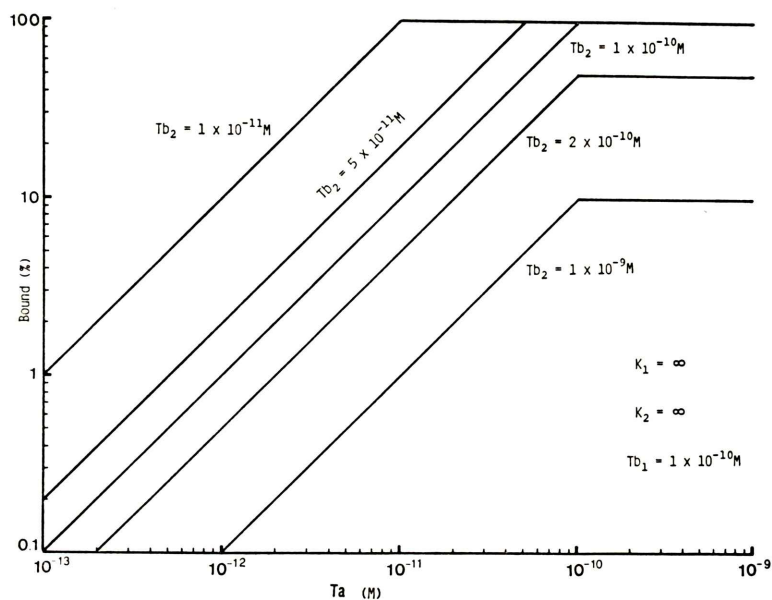


Fig. 2 Effect of labeled antibody concentrations on theoretical dose-response curves for 2-step Sandwich assay at $K_1=K_2=\infty$.

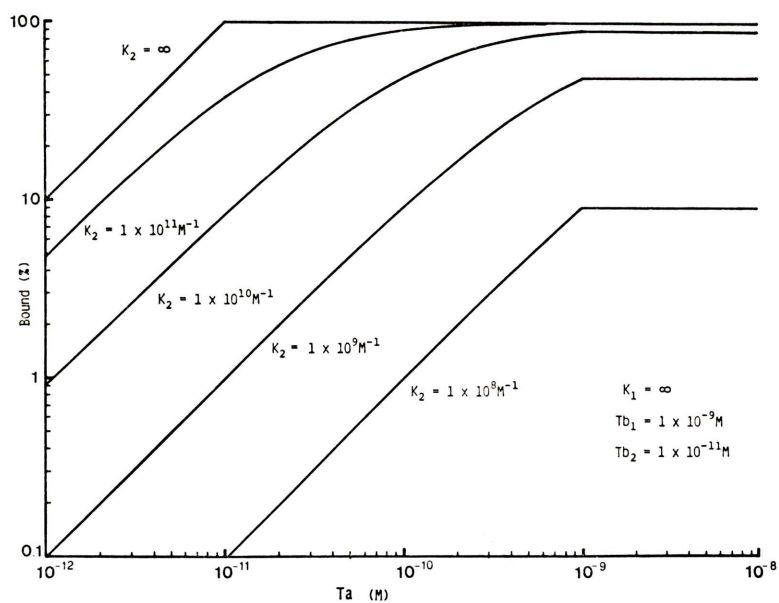


Fig. 3 Theoretical dose-response curves of 2-step Sandwich assay for various K_2 values. ($K_1=\infty$).

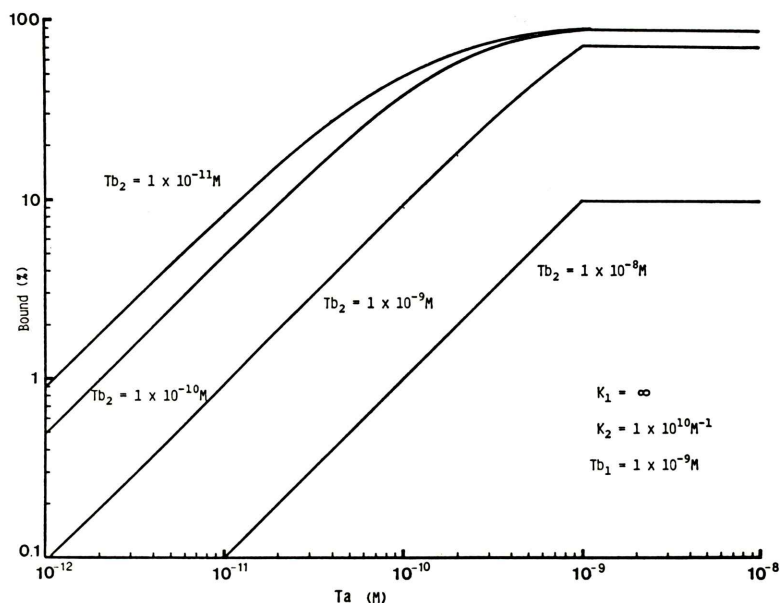
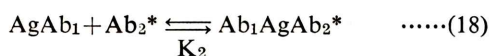
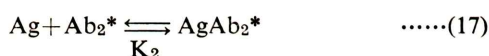
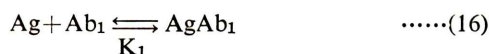


Fig. 4 Theoretical dose-response curves of 2-step Sandwich assay for Various labeled anti-body concentrations. ($K_1 = \infty$).

衡定数 (K_1) が非常に大きいとした場合, 主として次にあげた反応を考えなければならない.



ここでは K_1 が非常に大きいとしているのだから, (8) 式から明らかとなおり, $T_a < T_{b1}$ の場合, すなわち総抗原濃度 (T_a) が固相化抗体のみかけの総濃度 (T_{b1}) より低い場合, 抗原はすべて固相化抗体と反応することになり, (17) 式の反応は無視できる. このことは, $T_a < T_{b1}$ の領域においては, 2 ステップサンドイッチ法と同一の標準曲線を示すことを意味している. 一方, $T_a \geq T_{b1}$ の領域では (16)~(18) 式より

$$T_a = [\text{Ag}] + [\text{AgAb}_1] + [\text{AgAb}_2^*] + [\text{Ab}_1\text{AgAb}_2^*] \quad \text{.....(19)}$$

$$T_{b1} = [\text{AgAb}_1] + [\text{Ab}_1\text{AgAb}_2^*] \quad \text{.....(20)}$$

$$T_{b2} = [\text{Ab}_2^*] + [\text{AgAb}_2^*] + [\text{Ab}_1\text{AgAb}_2^*] \quad \text{.....(21)}$$

$$K_2 = \frac{[\text{AgAb}_2^*]}{[\text{Ag}][\text{Ab}_2^*]} = \frac{[\text{Ab}_1\text{AgAb}_2^*]}{[\text{AgAb}_1][\text{Ab}_2^*]} \quad \text{.....(22)}$$

と表わすことができる. ここで $b = [\text{Ab}_1\text{AgAb}_2^*]/T_{b2}$ とおく. (22) 式より, $[\text{AgAb}_2^*] = K_2 [\text{Ag}][\text{Ab}_2^*]$ および $[\text{AgAb}_1] = bT_{b2}/K_2 [\text{Ab}_2^*]$ が得られ, これを (19)~(21) 式に代入するとおのおのの式は, (19) 式より

$$T_a - T_{b1} = [\text{Ag}]\{1 + K_2[\text{Ab}_2^*]\} \quad \text{.....(23)}$$

また (20) 式より

$$T_{b1} - bT_{b2} = bT_{b2}/K_2 [\text{Ab}_2^*] \quad \text{.....(24)}$$

(21) 式より

$$T_{b2} - bT_{b2} = [\text{Ab}_2^*]\{1 + K_2 [\text{Ag}]\} \quad \text{.....(25)}$$

となる. (23)~(25) 式を用いて $[\text{Ag}]$ および $[\text{Ab}_2^*]$ を消去し b について解くと,

$$b = \frac{(Tb_1Tb_2 + TaTb_1) K_2 + Tb_1 - \sqrt{\{(Tb_1Tb_2 + TaTb_1) K_2 + Tb_1\}^2 - 4 K_2^2 TaTb_1^2 Tb_2}}{2 K_2 TaTb_2} \quad \dots\dots(26)$$

が得られる。これは、 $Ta \geq Tb_1$ の領域においては、 b と Ta との関係が 2 次曲線であることを示している。また $K_2 \rightarrow \infty$ とすることにより、

$$Ta \geq Tb_2 \text{ のとき } b = Tb_1/Ta \quad \dots\dots(27)$$

$$Ta < Tb_2 \text{ のとき } b = Tb_1/Tb_2 \quad \dots\dots(28)$$

が得られる。

$K_1 = K_2 = \infty$ の場合において、1 ステップ法による標準曲線の例を Fig. 5 および Fig. 6 に示した。標準曲線は、 $Ta \leq Tb_1$ の領域においては 2 ステップ法と同一であり、 $Ta \geq Tb_1$ になった場合、(27) 式または (28) 式に従い、一定値 (Tb_1/Tb_2) を示すかまたは Tb_1/Ta に従って減少する。さらに、 K_2 変化 ($K_1 = \infty$) における標準曲線を Fig. 7 に示し、 K_2 一定のもとで Tb_2 変化によるそれを Fig. 8 に示した。いずれの場合においても、 Ta が Tb_1 より大になると結合率 (%) は (26) 式に従って減少することがわかる。このような現象は、一般的にプロゾーン効果として知られている。

III. 考 察

今回、著者らはサンドイッチ法の平衡論的な解析を $K_1 = \infty$ 、すなわち固相化抗体と抗原との反応において、いずれか一方、濃度の低い方が完全に消費されるまで反応するとの仮定のもとで行った。この中でも、 $K_1 = K_2 = \infty$ における標準曲線は Fig. 1, 2, 5, 6 に示したとおり、非常に特殊な例であり、通常のスンドイッチ法の標準曲線にみられるような曲線ではない。しかし、サンドイッチ法では、競合反応を利用した RIA の場合とは異なり、固相化抗体に可能な限りの抗原をとらえ、しかもその抗原に可能な限りの標識抗体をとらえることが理想的であり、その意味において $K_1 = K_2 = \infty$ とした場合の標準曲線は、いわば理想的なものであるといえる。一方、 $K_2 \neq \infty$ においては、比較的滑らかな曲線が得られているものの、1 ステップ法のそれは、結合率 (%) が最大値を与える抗原濃度付近においてはかなり屈曲した状

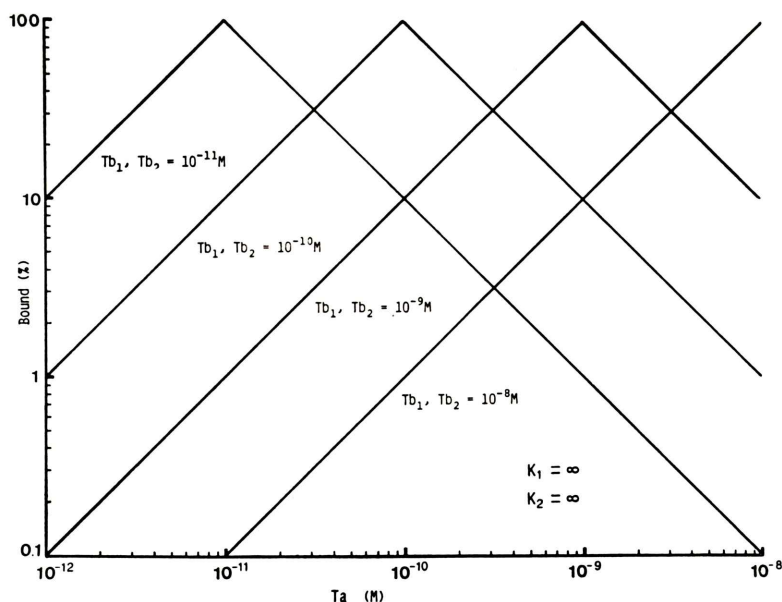


Fig. 5 Theoretical dose-response curves for 1-step Sandwich assay when all reactions are irreversible and allowed to reach completion ($K_1 = K_2 = \infty$).

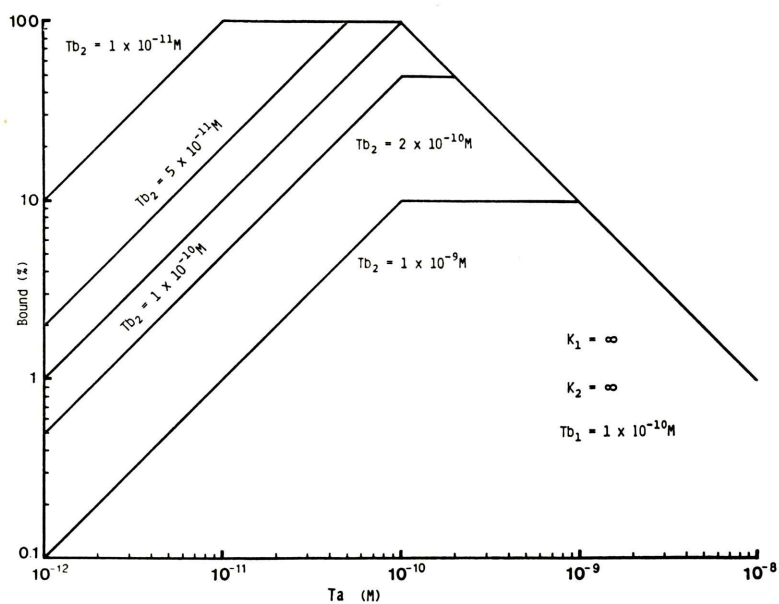


Fig. 6 Effect of labeled antibody concentrations on theoretical dose-response curves for 1-step Sandwich assay at $K_1=K_2=\infty$.

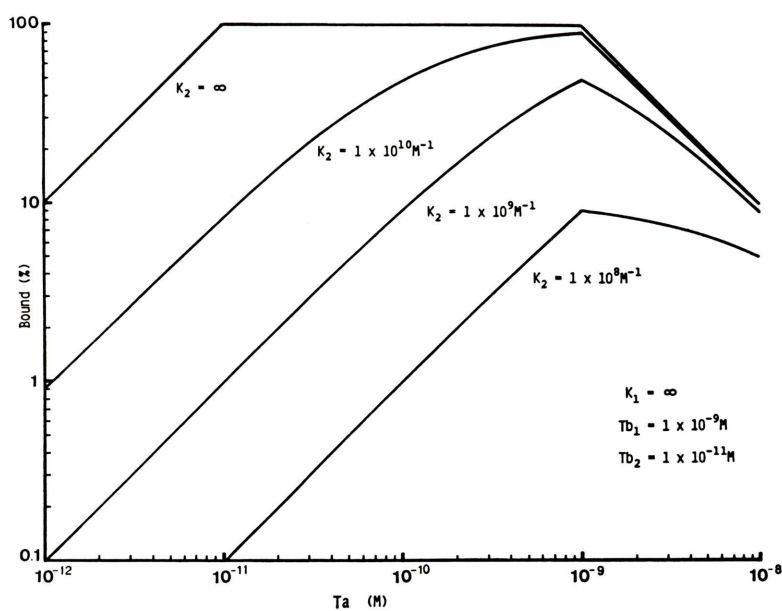


Fig. 7 Theoretical dose-response curves of 1-step Sandwich assay for various K_2 values. ($K_1=\infty$).

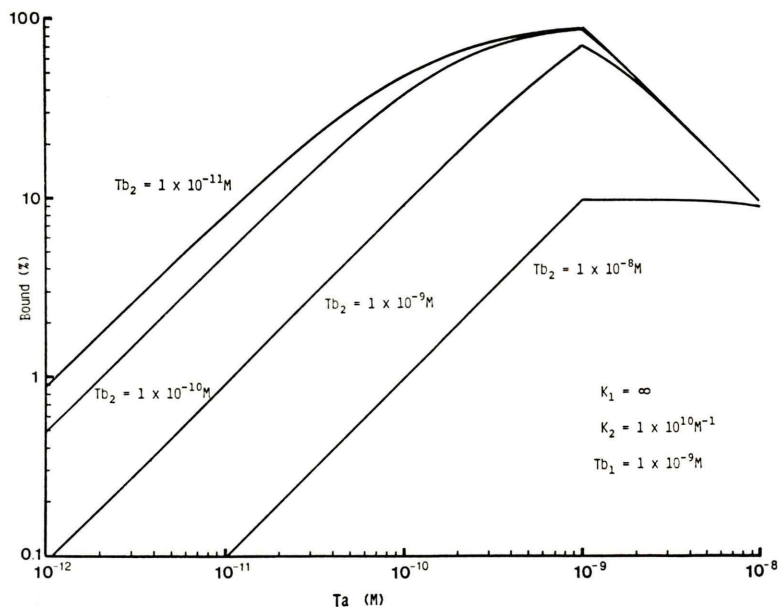


Fig. 8 Theoretical dose-response curves of 1-step Sandwich assay for various labeled antibody concentrations. ($K_1 = \infty$).

態になっている。これは、明らかに $K_1 = \infty$ としたことによるものである。通常 RIA に用いている抗体の K_1 は $10^8 \sim 10^{11}$ l/mol 程度であり、その場合の標準曲線は $K_1 = \infty$ の場合と比較して傾向は同じであるが、実際の形状は異なっている。その場合の平衡論的解析については、次報で詳細に述べるが、2ステップ法においては、第2反応中に抗原が固相化抗体から解離してくる反応も考慮しなければならない、さらに複雑な式で表わされる標準曲線になる。

また、サンドイッチ法の多くは、縦軸に結合率(%)の代りに反応した標識抗体のカウントでプロットしており、したがってその場合には標識抗体濃度だけでなく比放射能についても考慮しなければならない。そして反応した標識抗体のカウントを ($Ab_1AgAb_2^*$) カウントとすれば、

$$(Ab_1AgAb_2^*) \text{ カウント} = b \cdot Tb_2 \cdot SVT$$

ただし S: 標識抗体の比放射能

V: 反応液量

T: 測定時間

と表わせる。標準曲線をカウントでプロットする

場合、標準曲線はこの式より、比放射能、測定時間等によつて単純に上下平行移動することがわかる。

IRMA 法およびサンドイッチ法における理論的解析については Rodbard らによつても報告されている⁹⁻¹¹⁾。Rodbard らは解析をするにあたり、IRMA 法およびサンドイッチ法における固相化抗体濃度 $Tb_1 = 3/K_1$ という条件を設定し、速度論的に解析した結果、その標準曲線を作成している。この $Tb_1 = 3/K_1$ という関係は、RIA における最高感度を得るための最適条件であるが²⁾、サンドイッチ法の場合、最高感度を得るためには $K_1 = \infty$ あるいは $Tb_1 = \infty$ となることが必要条件である。しかも反応を速度論的に扱う場合、サンドイッチ法では多くの場合固相化抗体を使用するため、液相系のための反応の場合と異なってしまう複雑になることが予想される。一般的に抗原-抗体反応は拡散律速の反応であるといわれており¹²⁾、一方 (16) (17) 式はおのおのの固-液系、液-液系という不均一系での反応であり、この中でおのおのの速度定数のパラメータを設定するのは難しい場合が多い。さらに高感度の標準曲線を得

るために、 K_1 および K_2 に対して Tb_1 および Tb_2 を比較的少量に用いていることが多く、したがって比較的平衡に近い状態で測定しているものが多い。こうした意味において、サンドイッチ法の平

衡論的な解析による取扱いは、現実の標準曲線を理解する上において、またサンドイッチ法における基本的概念を得るのには最適であると考えられる。

IV. 結 論

サンドイッチ法での標準曲線において、1 ステップ法および2 ステップ法についておのおの平衡論的な解析を行った結果、標準曲線はおのおの次のとおりである。

(1) 2 ステップ法

(i) $K_1=K_2=\infty$ の場合

$Ta \geq Tb_1, Tb_1 \geq Tb_2$ のとき $b=1$

$Ta \geq Tb_1, Tb_1 < Tb_2$ のとき $b=Tb_1/Tb_2$

$Ta < Tb_1, Ta \geq Tb_2$ のとき $b=1$

$Ta < Tb_1, Ta < Tb_2$ のとき $b=Ta/Tb_2$

(ii) $K_1=\infty, K_2 \neq \infty$ の場合

$Ta \geq Tb_1$ のとき

$$b = \frac{(Tb_1 + Tb_2) K_2 + 1 - \sqrt{\{(Tb_1 + Tb_2) K_2 + 1\}^2 - 4K_2^2 Tb_1 Tb_2}}{2K_2 Tb_2}$$

$Ta < Tb_1$ のとき

$$b = \frac{(Ta + Tb_2) K_2 + 1 - \sqrt{\{(Ta + Tb_2) K_2 + 1\}^2 - 4K_2^2 Ta Tb_2}}{2K_2 Tb_2}$$

(2) 1 ステップ法

(i) $K_1=K_2=\infty$ の場合

$Ta \geq Tb_1, Ta \geq Tb_2$ のとき $b=Tb_1/Ta$

$Ta \geq Tb_1, Ta < Tb_2$ のとき $b=Tb_1/Tb_2$

(ii) $K_1=\infty, K_2 \neq \infty$ の場合

$Ta \geq Tb_1$ のとき

$$b = \frac{(Tb_1 Tb_2 + Ta Tb_1) K_2 + Tb_1 - \sqrt{\{(Tb_1 Tb_2 + Ta Tb_1) K_2 + Tb_1\}^2 - 4K_2^2 Ta Tb_1^2 Tb_2}}{2K_2 Ta Tb_2}$$

ただし、 $Ta < Tb_1$ の領域では2 ステップ法と同じである。

以上、平衡論的に得られた標準曲線は、 $K_1=\infty$ という条件下で解析されているため現実のサンドイッチ法のそれとは若干異なっているが、今後の平衡論的解析のための一端として有意義なもの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, p 59
- 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) Feldman Y, Rodbard D: Mathematical theory of radioimmunoassay. Principles of competitive protein binding assays. Odell WP, Daughaday WH,

- Eds. Lippincott, Philadelphia 1971, p 158
- 5) Miles LEM, Hales CN: Labeled antibodies and immunological assay systems. *Nature* **219**: 186-189, 1968
 - 6) Ling CM, Overby LR: Prevalence of hepatitis B virus antigen as revealed by direct radioimmune assay with ^{125}I -antibody. *J Immun* **109**: 834, 1972
 - 7) Miles LEM, Bieber CP, Eng LF, et al: Properties of two-site immunoradiometric (labeled antibody) assays. In *Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine*. IAEA Vienna 1974 vol 1, p 149
 - 8) Miles LEM: Immunoradiometric assay (IRMA) and two-site IRMA systems (Assay soluble antigens using labeled antibodies). In *Handbook of Radioimmunoassay*. Abraham G. Marcel Decker, New York, 1977, p 131
 - 9) Rodbard D, Feldman Y: Kinetics of two-site immunoradiometric (Sandwich) assays-I. *Immunochemistry* **15**: 71-76, 1978
 - 10) Rodbard D, Feldman Y, Jaffe ML, et al: Kinetics of two-site immunoradiometric (Sandwich) assays-II. *Immunochemistry* **15**: 77-82, 1978
 - 11) Rodbard D, Weiss GH: Mathematical theory of immunoradiometric (labeled antibody) assays. *Anal Biochem* **52**: 10-44, 1973
 - 12) Levison SA, Jancsi AN, Dandliker WB: Temperature effects on the kinetics of the primary antigen-antibody combination. *Biochem Biophys Res Comm* **33**: 942-948, 1968