

《原 著》

ヒト TSH モノクローナル抗体を用いた 2-サイトイムノラジオメトリックアッセイの平衡論的解析

小幡 公道* 久保 恵宣* 岡根 由香* 加藤 明彦*
池田 熱夫* 倉田 邦夫*

要旨 ヒト TSH に対して作製した 10 種類のモノクローナル抗体を利用して、2-サイトイムノラジオメトリックアッセイ (IRMA) による TSH 測定を行い、平衡論的解析から求めた理論値と比較することで、その実用的意義を検討した。

10 種類の抗体の平衡定数は 2.5×10^8 から $3.3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ であった。ビーズ固相化抗体とトレーサ抗体を作製し、平衡定数の異なる種々の組み合わせにより平衡に達する条件で標準曲線を作成した。実験に使用した固相化抗体とトレーサ抗体の濃度はそれぞれ $2 \times 10^{-8} \text{ M}$ と $1.5 \times 10^{-10} \text{ M}$ であった。一方、IRMA を平衡論の立場から解析して得た標準曲線の理論式を用いて平衡定数が $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ の種々の組み合わせについて理論曲線を作成し、実験値と比較した。理論曲線は平衡定数が大きくなるにしたがい低濃度側へほぼ平行に移動するもの、固相化抗体とトレーサ抗体の平衡定数がそれぞれ $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 以上および $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 以上では平衡定数が無限大の条件でのカーブに近似され、高感度測定における限界に達することがわかった。このときの測定上限は、トレーサ抗体濃度にほぼ等しい約 $2 \times 10^{-10} \text{ M}$ であった。モノクローナル抗体を用いた実際の標準曲線では多くの抗体の組み合わせで理論値とよく一致したカーブが得られ、平衡論的解析が実験値の推定に有用であることを確かめた。最小検出感度についても理論値と実験値はよく一致し、理論的に可能な最小検出感度は $4 \times 10^{-14} \text{ M}$ (TSH 濃度で約 $0.005 \mu\text{IU}/\text{ml}$) であった。

IRMA の平衡論的解析の有用性を、ヒト TSH に対するモノクローナル抗体を用いた実験結果と比較することで明らかにし、抗体の平衡定数を知ることがモノクローナル抗体を用いた IRMA の開発における測定限界を知る上で有用であることを確かめた。

I. 緒 言

Miles ら¹⁾ により紹介され、Rodbard ら^{2,3)} によって速度論的考察が加えられた 2-サイトイムノラジオメトリックアッセイは、優れた感度と測定範囲の広さなど多くの利点をもつことから、今日ラジオイムノアッセイ (RIA) の分野において主要な測定法としての地位を占めるにいたった。このことは、当初競合法 RIA を用いて市販されていた多くの RIA キットが IRMA キットに置き代

わっていったことからも明らかである。IRMA の理論的解析の一つとして平衡論の立場から解析し理解しようとする試みは、池田ら^{4,5)} によって行われ理論的に体系づけられた。しかし、仮定の一つとして抗体が均一であることが必須条件であり、一方、実際の実験は不均一なポリクローナル抗体を用いていたことから、実験結果を十分に平衡論的に説明することに限界があった。しかし、近年、モノクローナル抗体作製技術が Milstein ら⁶⁾ によって導入されたことにより、化学的に均一な抗体 (モノクローナル抗体) を容易に得ることができるようになった。このモノクローナル抗体を用いることにより、実験条件を平衡論的解析における仮定条件に近づけることが可能となり、本解析の有用性が高まったと考えられる。今回、われわれは

* ダイナボット株式会社研究開発部

受付：63年8月19日

最終稿受付：63年12月12日

別刷請求先：千葉県松戸市稔台344 (番271)

ダイナボット株式会社研究開発部

小幡 公道

ヒトTSHに対して作製した10種類のモノクローナル抗体を利用して、ヒトTSHによるdose-response curveを実験的に得、平衡論的解析から得た理論値と比較することで本解析の実用面への応用について考察した。

II. 実験方法

1. 実験材料

ヒトTSHはUCB社より入手し、濃度の校正にはWHOのinternational reference preparation(80/558)を用いた。ヒトTSH1mgは3.83IUに相当した。ヒトTSHに対する10種類のモノクローナル抗体はマウスを用いてMilsteinらの方法に準じ作製し、モノクローナル抗体を產生するhybridoma cellをマウス腹腔内に投与して作製した腹水から、40%飽和硫酸アンモニウム沈澱法により γ -グロブリン分画を調製し、固相化抗体および ^{125}I 標識抗体として使用した。それぞれの抗体の認識するエピトープについてはTable 1に示した。

2. 抗体固相化ビーズの調製

1/4"ポリスチレンビーズ1個あたり1 μg の γ -グロブリン分画を用い、Ziolaら⁷⁾の方法に準じて吸着固相化した。

3. ヒトTSHおよびモノクローナル抗体の ^{125}I 標識

^{125}I の標識にはクロラミン-T法を用い、比放

射能76.3 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ の ^{125}I 標識TSHと比放射能4.8~10.1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ の ^{125}I 標識モノクローナル抗体を作製した。

4. 平衡定数の測定

Assay buffer(0.1M phosphate buffer, 0.5%BSA, pH 7.4)で10倍から 1×10^9 倍まで連続10倍希釈した抗体100 μl に ^{125}I 標識TSH100 μl (約20,000 cpm)、マウス γ -グロブリン液(200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)100 μl 、およびassay buffer200 μl を加え、4°Cで一昼夜インキュベーションした。55倍希釈抗マウス・ヤギ血清1mlを加え、室温で30分インキュベーションし、生じた沈澱を遠心分離後、放射能を測定した。得られた力価曲線から最大結合率に対し60%の ^{125}I 標識TSHを結合する抗体希釈率を求め、標準曲線の作成に用いた。同時に ^{125}I 標識TSHの最大結合率と非特異的結合率を力価曲線から求めた。

標準TSHには、 ^{125}I 標識TSHと非標識TSHの2種を1 $\mu\text{IU}/\text{ml}$ ~ $1\times 10^3\mu\text{IU}/\text{ml}$ まで倍々希釈により作製して用いた。標識TSH200 μl に ^{125}I 標識TSH100 μl (約20,000 cpm)、希釈モノクローナル抗体100 μl 、マウス γ -グロブリン液100 μl を加え、4°Cで一昼夜インキュベーションした。抗マウス・ヤギ血清1mlを加え、室温で30分インキュベーションし、生じた沈澱を遠心分離後、放射能を測定した。 ^{125}I 標識TSHと非標識TSHの2種類の標準曲線から池田らの方法⁸⁾に基づき各

Table 1 Characteristics of anti TSH monoclonal antibodies

Epitope	Clone	Affinity constant (M^{-1})		Concentration used for IRMA (M)	
		K	Ab-bead (Tb ₁)	Tracer (Tb ₂)	Tracer (Tb ₂)
α -subunit-1	12-1	2.5×10^8	2.3×10^{-8}	1.9×10^{-10}	
	12-27	2.9×10^8	—	—	
	12-162	2.2×10^9	1.8×10^{-8}	2.2×10^{-10}	
α -subunit-2	12-130	3.5×10^9	—	—	
	12-240	7.6×10^9	—	—	
	12-274	1.6×10^9	3.1×10^{-8}	1.0×10^{-10}	
	12-310	1.2×10^9	—	—	
β -subunit	12-183	1.0×10^{10}	1.6×10^{-8}	1.6×10^{-10}	
	8-1	6.2×10^8	—	—	
Intact	8-4	3.3×10^{10}	—	3.8×10^{-10}	

モノクローナル抗体の平衡定数を求めた。

5. 固相化抗体およびトレーサ抗体の有効抗体量の測定

固相化抗体の有効抗体濃度を求めるため、抗体固相化ビーズと ^{125}I 標識 TSH を用いて TSH 標準曲線を作成した。標準 TSH $200 \mu\text{l}$ に ^{125}I 標識 TSH $100 \mu\text{l}$, assay buffer $200 \mu\text{l}$ および抗体固相化ビーズ 1 個を加え、 4°C で一昼夜インキュベーションした。ビーズを蒸留水で洗浄し、放射能を測定した。得られた標準曲線から ^{125}I 標識 TSH の結合を 50% インヒビションする TSH 濃度を求め、前項で求めた平衡定数とともに Scatchard plot の式に代入し、抗体濃度を求めた。

トレーサ抗体の有効濃度は、TSH 標準液 $200 \mu\text{IU}/\text{ml}$ を用いた 2-ステップサンドイッチ法 IRMA を行って求めたトレーサ抗体結合率と、理論式に TSH 濃度と用いた抗体の平衡定数を代入して求めた結合率からトレーサ抗体の純度を求め、この値で比放射能から得られた抗体濃度を補正して求めた。

6. 2-サイトイムノラジオメトリックアッセイによる TSH の dose-response curve の作成

1) 1-ステップサンドイッチ法

ヒト TSH を $0.1 \mu\text{IU}/\text{ml}$ ～ $6.380 \mu\text{IU}/\text{ml}$ 含む標準液 $100 \mu\text{l}$ に ^{125}I 標識モノクローナル抗体 $100 \mu\text{l}$ (約 100,000 cpm), 抗体固相化ビーズ 1 個を入れ、 25°C で一昼夜振とう下でインキュベーションした。ビーズを蒸留水で 3 回洗浄後、ビーズの放射能を測定した (計数効率 80.0%)。したがって、反応系で TSH の濃度は 4.1×10^{-13} ～ $2.6 \times 10^{-8} \text{ M}$ であった。

2) 2-ステップサンドイッチ法

ヒト TSH 標準液 $100 \mu\text{l}$ に assay buffer $100 \mu\text{l}$ と抗体固相化ビーズを加え、 25°C で一昼夜振とう下でインキュベーションした。ビーズを蒸留水で 3 回洗浄後、 ^{125}I 標識モノクローナル抗体 $100 \mu\text{l}$ (約 100,000 cpm) と assay buffer $100 \mu\text{l}$ を加え、 25°C で一昼夜振とう下でインキュベーションした。ビーズを洗浄後、放射能を測定した。

III. 平衡論的解析

解析を行うにあたり、次の仮定に従った。①抗原および抗体は化学的に均一である。②固相化抗体およびトレーサ抗体に対する抗原の反応はそれぞれ一価であり、相互に反応を妨害することはない。また、抗原-抗体反応による立体障害や協同効果はない。③反応はすべて平衡に達するまで行う。④反応終了後の未反応物の分離に際しては、平衡状態を乱すことはない。これらの仮定に基づいて導かれる 1-ステップサンドイッチ法と 2-ステップサンドイッチ法の標準曲線を表す理論式は、池田らの報告⁵⁾の 4 次式となり、次に示す式となる。

1. 1-ステップサンドイッチ法

b: トレーサ抗体の結合した割合 ($0 \leq b \leq 1$), T_a : 総抗原濃度, T_{b1} : 固相化抗体の見かけの総濃度, T_{b2} : トレーサ抗体の総濃度とすると、標準曲線は

$$\begin{aligned}
 & K_1^2 K_2^2 T_a T_{b2}^2 b^4 \\
 & - K_1 K_2 T_{b2} \{ K_1 K_2 T_a^2 + K_1 K_2 T_a T_{b2} \\
 & + K_1 K_2 T_a T_{b1} + K_1 K_2 T_{b1} T_{b2} + K_1 T_a \\
 & + K_2 T_a + K_1 T_{b1} + K_2 T_{b2} + 1 \} b^3 \\
 & + \{ 2 K_1^2 K_2^2 T_a T_{b1} T_{b2} + K_1^2 K_2^2 T_a^2 T_{b2} \\
 & + K_1^2 K_2^2 T_{b1}^2 T_{b2} + K_1^2 K_2^2 T_{b1} T_{b2}^2 \\
 & + K_1^2 K_2^2 T_a^2 T_{b1} + 2 K_1 K_2^2 T_a T_{b2} \\
 & + 2 K_1^2 K_2 T_a T_{b1} + 2 K_1^2 K_2 T_{b1} T_{b2} \\
 & + 2 K_1 K_2^2 T_{b1} T_{b2} + K_1^2 T_{b1} + K_2^2 T_{b2} \} b^2 \\
 & - K_1 K_2 \{ K_1 K_2 T_a T_{b1}^2 + K_1 T_{b1}^2 \\
 & + K_1 K_2 T_{b1}^2 T_{b2} + K_1 K_2 T_a^2 T_{b1} + K_1 T_a T_{b1} \\
 & + K_1 K_2 T_a T_{b1} T_{b2} + K_2 T_a T_{b1} + T_{b1} \\
 & + K_2 T_{b1} T_{b2} \} b + K_1^2 K_2^2 T_a T_{b1}^2 = 0 \quad \dots \dots (1)
 \end{aligned}$$

で表される 4 次曲線となる。ここで K_1 および K_2 は固相化抗体とトレーサ抗体の平衡定数を表す。

(1) 式で $T_{b1} = 2 \times 10^{-8} \text{ M}$, $T_{b2} = 1.5 \times 10^{-10} \text{ M}$ と一定にし、 T_a , K_1 , K_2 をそれぞれ次に示す範囲で変化させて b (%) を求め、標準曲線を作成した。

$$T_a = 1 \times 10^{-13} \sim 7 \times 10^{-8} \text{ M}$$

$$K_1 = 1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$$

$$K_2 = 1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$$

Figure 1 に K_1 を $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ とし、 K_2 を $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ まで変化させた場合の標準曲線

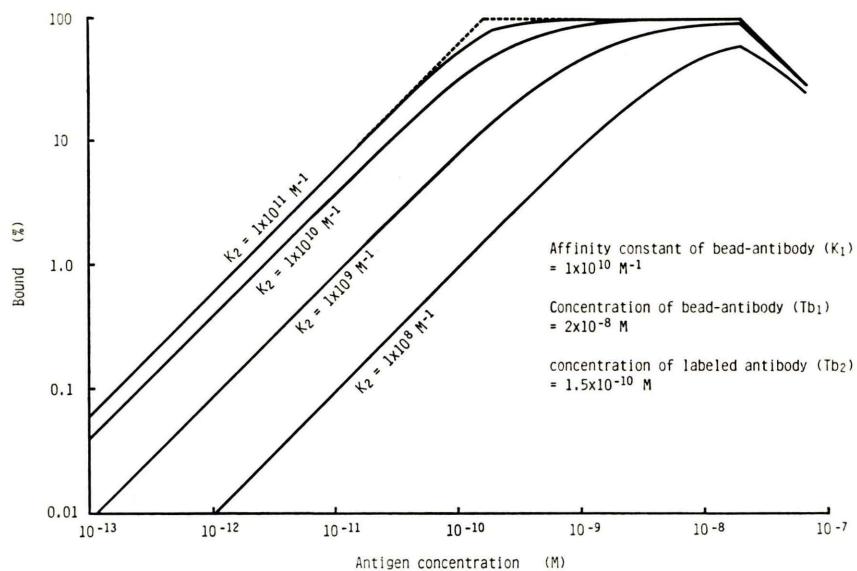


Fig. 1 Theoretical dose-response curves of 1-step IRMA with changing affinity constant of labeled antibody (K_2). The dotted line showed an ideal curve with $K_1 = K_2 = \infty$.

を示した。 K_2 が $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ までは K_2 が大きくなるにしたがいカーブは低濃度へほぼ平行に大きく移動するが、 K_1 が $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 以上で bound% 变化は減少し、 $1 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ のカーブは図中破線で示した $K_1 = K_2 = \infty$ の曲線にほぼ一致した。したがって、低濃度まで測定できるカーブを得るために K_2 が $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 以上となるトレーサ抗体を用いることが必須条件であるが、一方、 K_2 が $1 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ 以上となる抗体を用いても有意な変化はなかった。また、測定の上限は $K_1 = K_2 = \infty$ ではトレーサ抗体濃度 (T_{b2}) に等しい $1.5 \times 10^{-10} \text{ M}$ となるが、 K_2 が $1 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ 以上では測定上限は $K_2 = \infty$ の場合と等しい $1.5 \times 10^{-10} \text{ M}$ となる成績であった。

Figure 2 には K_2 を $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 一定とし、 K_1 を $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ まで変化させた場合の標準曲線を示した。 K_1 が $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 以上でカーブはほぼ一定となり、 K_1 の変化の影響を受けなかった。

2. 2-ステップサンドイッチ法

次式で示される、第一反応で固相化抗体に結合した抗原 ($T_{a'}$) だけが第二反応に関与することに

なり、この場合の標準曲線は(1)式の T_a を $T_{a'}$ に置き変えたものとなる。

$$T_{a'} = [(T_a + T_{b1}) K_1 + 1 - \sqrt{(T_a + T_{b1}) K_1 + 1}^2 - 4 K_1^2 T_a T_{b1}] \div 2 K_1 \quad (2)$$

1-ステップ法と同様に K_1 を $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 一定とし、 K_2 を $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ まで変化させた場合の標準曲線を Fig. 3 に示した。高濃度でのhook effect が認められない以外、カーブは1-ステップ法のカーブと一致した。これは固相化抗体として平衡定数 $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ の抗体を $2 \times 10^{-8} \text{ M}$ 用いれば、第一反応に関与した抗原濃度 (T_a) と第二反応に関与した抗原濃度 ($T_{a'}$) が等しいことを示し、第一反応で抗原がほぼ 100% 固相化抗体に結合したことを示している。

Figure 4 に K_2 を $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 一定とし、 K_1 を $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ まで変化させた場合の標準曲線を示した。Hook effect を認めないほか、 K_1 が $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 以下の場合は測定領域でもカーブは1-ステップ法より低い bound % を示した。これは K_1 が $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 以下では第一反応に用

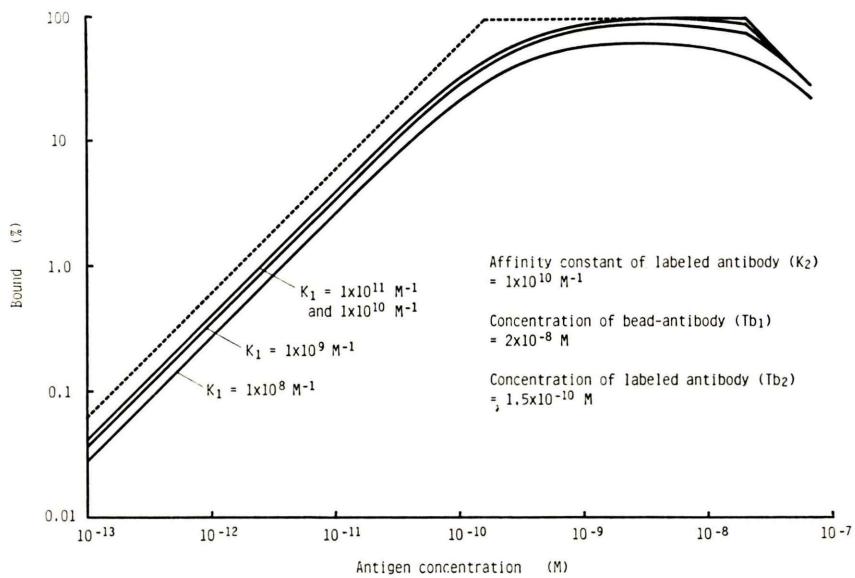


Fig. 2 Theoretical dose-response curves of 1-step IRMA with changing affinity constant of solid-phase antibody (K_1). The dotted line showed an ideal curve with $K_1 = K_2 = \infty$.

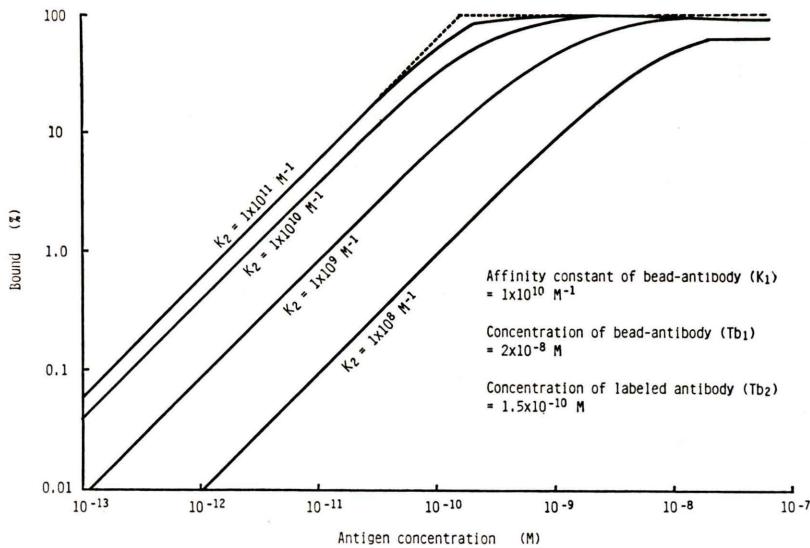


Fig. 3 Theoretical dose-response curves of 2-step IRMA with changing affinity constant of labeled antibody (K_2). The dotted line showed an ideal curve with $K_1 = K_2 = \infty$.

いた抗原をすべて固相化抗体が結合できず、 $T_a > T_{a'}$ の状態であることを示している。したがって 1-ステップ法と 2-ステップ法のカーブが測定領域で一致するためには、固相化抗体に $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$

以上の平衡定数をもつ抗体を用いる必要がある。

3. 最小検出感度

最小検出感度を、TSH 標準曲線において、 $0 \mu\text{IU}/\text{ml}$ 標準液の与える放射能の 2 標準偏差に

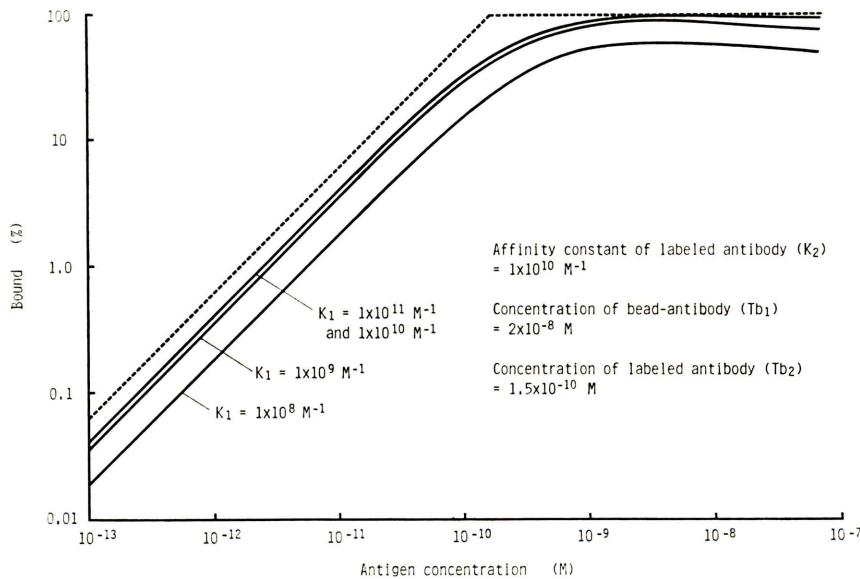


Fig. 4 Theoretical dose-response curves of 2-step IRMA with changing affinity constant of solid-phase antibody (K_1). The dotted line showed an ideal curve with $K_1 = K_2 = \infty$.

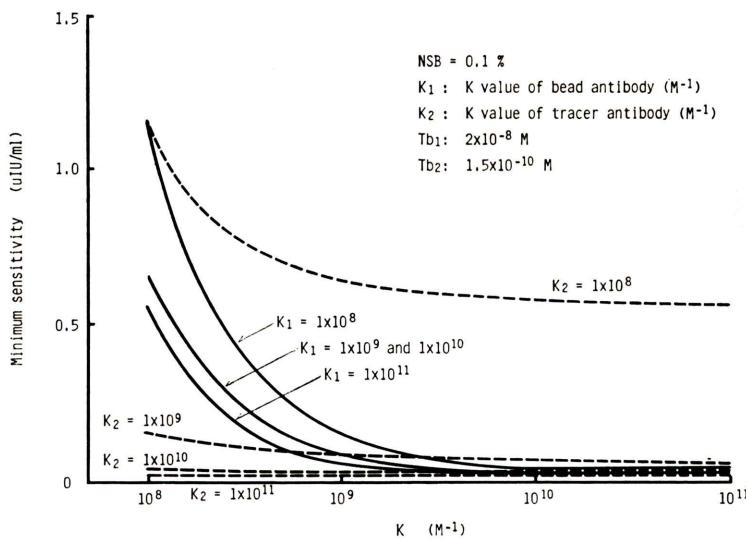


Fig. 5 Effect of affinity constant on minimum sensitivity of 2-step IRMA. Solid lines showed the effect of K_2 values with constant K_1 and dotted lines showed the effect of K_1 values with constant K_2 .

相当する放射能を示す TSH 濃度とし、その放射能を結合率 (b) で表すと、b は次式で示すようになる⁵⁾。

$$b = \frac{2\sqrt{(aT_{b2} SV\epsilon/100) + c}}{T_{b2} SV\epsilon}$$

ここで、a : 非特異的結合率 (%), T_{b2} : トレー

サ抗体の総濃度 (M), S : トレーサ抗体の比放射能 (cpm/mol), V : 反応容量 (l), ϵ : 測定効率, c : バックグラウンド (cpm) をそれぞれ示す。 $T_{b1}=2\times 10^{-8} M$, $T_{b2}=1.5\times 10^{-10} M$ 一定とし, K_1 および K_2 を $1\times 10^8 \sim 1\times 10^{11} M^{-1}$ まで変化させて求めた標準曲線から (3) 式の b を与える TSH 濃度を読み取って最小検出感度 ($\mu\text{IU}/\text{ml}$) を求めた。ただし c を 40 cpm, V を $2\times 10^{-4} l$, ϵ を 0.80 とした。Fig. 5 に 2-ステップ法における最小検出感度について, K_1 を一定として K_2 を変化させた場合を実線で, K_2 を一定として K_1 を変化させた場合を破線で示した。最小検出感度におよぼす平衡定数の影響は固相化抗体 (K_1) とトレーサ抗体 (K_2) の両方に認められたが, とくにトレーサ抗体で大きく, 平衡定数が最小検出感度を決定する重要な要因となることが確認された。Fig. 5 から, K_1 を $1\times 10^9 M^{-1}$ 以上でかつ K_2 を $1\times 10^{10} M^{-1}$ 以上とすることでおよそ一定の最小検出感度 ($4\times 10^{-14} M$, TSH 濃度は約 $0.005 \mu\text{IU}/\text{ml}$) が得られた。

IV. 結 果

1. モノクローナル抗体の平衡定数および使用濃度

非標識 TSH に対する 10 種類のモノクローナル抗体の平衡定数は Table 1 に示したように $2.5\times 10^8 \sim 3.3\times 10^{10} M^{-1}$ であった。この結果から, 理論式から標準曲線を求める際の平衡定数の範囲を $1\times 10^8 \sim 1\times 10^{11} M^{-1}$ とした。10 種類のモノクローナル抗体のうち, サンドイッチアッセイが可能でまた平衡定数ができるだけ異なる組み合わせを選択し, 固相化抗体とトレーサ抗体を作製した。すなわち, 固相化抗体には 12-1 ($K=2.5\times 10^8 M^{-1}$), 12-162 ($K=2.2\times 10^9 M^{-1}$), 12-274 ($K=1.6\times 10^9 M^{-1}$), および, 12-183 ($K=1.0\times 10^{10} M^{-1}$), の 4 種類を用い, トレーサ抗体には固相化抗体と同じ抗体, および, 8-4 ($K=3.3\times 10^{10} M^{-1}$) の 5 種類を用いた。固相化抗体およびトレーサ抗体の有効抗体濃度は Table 1 に示したとおり, 固相化抗体は $1.6\times 10^{-8} \sim 3.1\times 10^{-8} M$, トレーサ抗体は $1.0\times 10^{-10} \sim 3.8\times 10^{-10} M$ であった。この結果から

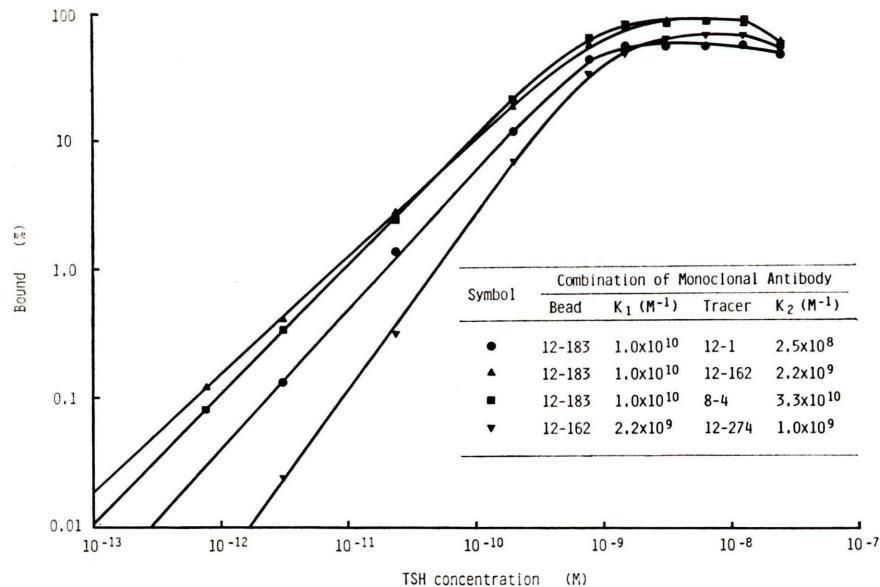


Fig. 6 Experimental dose-response curves of 1-step IRMA using various combinations of anti-TSH monoclonal antibodies.

理論式に用いる固相化抗体濃度(T_{b1})とトレーサー抗体濃度(T_{b2})をそれぞれ 2×10^{-8} M と 1.5×10^{-10} M とした。

2. モノクローナル抗体を用いたIRMAの標準曲線

1) 1-ステップサンドイッチ法

Table 1 に標準曲線の作成に用いた平衡定数の異なるモノクローナル抗体の組み合わせ10種類を示した。作成した標準曲線は、理論曲線とよく

一致した7種類、平行性はあるが結合率が低い1種類(12-183と8-4)、および理論曲線より結合率が低く平行性もない2種類(12-274と12-1および12-162と12-274の組み合わせ)に分類された。Fig. 6にこれら3群の特徴を示す4種類の標準曲線を示した。

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により作成した10種類の標準曲線も、1-ステップサンドイッチ法と

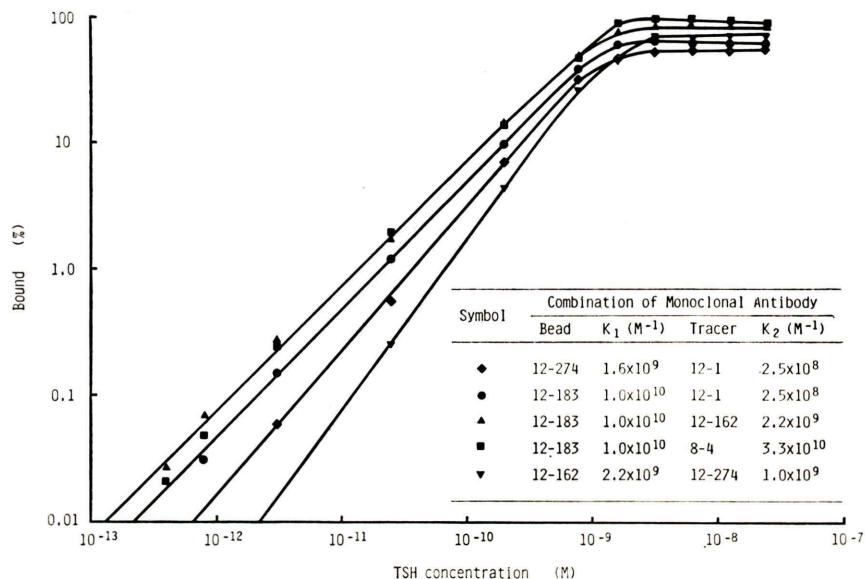


Fig. 7 Experimental dose-response curves of 2-step IRMA using various combinations of anti-TSH monoclonal antibodies.

Table 2 Comparison of experimental and theoretical sensitivity

Bead	Monoclonal antibody			NSB (%)	Minimum sensitivity ($\mu IU/ml$)			
	K_1 (M^{-1})	Tracer	K_2 (M^{-1})		Experimental curve		Theoretical curve	
					Actual NSB	NSB 0.1%	NSB 0.1%	
12-274	1.6×10^9	12-1	2.5×10^8	0.14	0.42	0.37	0.29	
12-183	1.0×10^{10}	12-1	2.5×10^8	0.14	0.20	0.17	0.29	
12-1	2.5×10^8	12-274	1.6×10^9	0.10	0.20	0.20	0.10	
12-162	2.0×10^9	12-274	1.6×10^9	0.10	1.0	1.0*	0.05	
12-183	1.0×10^{10}	12-274	1.6×10^9	0.10	0.06	0.06	0.05	
12-183	1.0×10^{10}	12-162	2.0×10^9	0.16	0.09	0.08	0.04	
12-1	2.5×10^8	12-183	1.0×10^{10}	0.21	0.16	0.13*	0.03	
12-274	1.6×10^9	12-183	1.0×10^{10}	0.21	0.08	0.06	0.02	
12-162	2.0×10^9	12-183	1.0×10^{10}	0.21	0.08	0.06	0.02	
12-183	1.0×10^{10}	8-4	3.3×10^{10}	0.02	0.06	0.07*	0.01	

同様に 3 群に分類された。Fig. 7 に 3 群の特徴を示す 5 種類の標準曲線を示した。

3. 最小検出感度の実験値と理論値の比較

Table 2 に 5 種類のモノクローナル抗体を用いた 10 種類の標準曲線における最小検出感度の実験値と理論値を示した。実験値ではトレーサ抗体の純度や変性物の有無により組み合わせごとに非特異的結合率 (NSB) が異なるため、必ずしも真的最小検出感度を表しているとはいえない結果であった。そこで、NSB を 0.1% と仮定しおののの実験曲線から最小検出感度を求め、同様に理論曲線から求めた最小検出感度と比較した。表中 * 印で示す 3 例を除いて実験値と理論値の差は最大でも 3 倍であり、よく一致する成績であった。

V. 考 察

2-サイトイムノラジオメトリックアッセイを平衡論から解析する場合に、固相化抗体とトレーサ抗体の濃度が、抗体の平衡定数を知ることとともに dose-response curve を決定する重要な要素となる⁵⁾。本報告で使用したビーズ吸着法による固相化抗体作製法は、広く利用されている方法であるが、吸着抗体量がビーズ表面積に依存するため、IRMA における固相化抗体濃度は抗体の純度が等しければ種類にかかわらずほぼ一定となる。また、トレーサ抗体は、比放射能と使用量が抗体の安定性と実用性の面から決定されるため、使用濃度範囲は固相化抗体と同様に限定されている。今回、われわれが実験曲線の作成に用いた固相化抗体とトレーサ抗体は実用に即して作製されたもので、それらの濃度は Table 1 に示したように、固相化抗体が $1.6 \times 10^{-8} \sim 3.1 \times 10^{-8}$ M、トレーサ抗体が $1.0 \times 10^{-10} \sim 3.8 \times 10^{-10}$ M と狭い範囲にある。したがって、これらの平均濃度を用い、平衡定数だけを変化させて理論曲線を作成することで、実験曲線と直接比較することができると推定した。本報告では、理論曲線の作成に用いる抗体濃度として固相化抗体 2×10^{-8} M、トレーサ抗体 1.5×10^{-10} M を選定した。一方、ヒト TSH に対する 10 種類のモノクローナル抗体の平衡定数は $2.5 \times$

$10^8 \sim 3.3 \times 10^{10}$ M⁻¹ であったことから、理論曲線の作成に適用する平衡定数 K_1 および K_2 の範囲をそれぞれ $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{11}$ M⁻¹ とした。

Figures 1~4 で示した理論曲線は、1-ステップ法、2-ステップ法とともに、直線的な b% の増加を示す部分はすべて 45° の傾きをもった平行線であった。

実験的に得られた 10 種類の dose-response curve (Figs. 6, 7) は、理論曲線とよく一致した 7 種類、より低い平衡定数から得られる理論曲線と一致する 1 種類、および理論曲線と一致しない 2 種類に分かれた。理論曲線とよく一致する組み合わせが 10 種類中 7 種類あったことから、IRMA は平衡論にのっとって進行する反応であり、平衡定数を求めることがその抗体の組み合わせで得られる最良の dose-response curve を予測する上できわめて重要であることを明らかにすることができた。本報告における実験条件で、IRMA の最小検出感度は 4×10^{-14} M であり、ヒト TSH 濃度の $0.005 \mu\text{IU}/\text{ml}$ に相当し、この濃度が IRMA による TSH 測定の限界であることがわかった。実験曲線においては、標準液を assay buffer で 2 倍希釈するため最小検出感度は $0.01 \mu\text{IU}/\text{ml}$ となり、したがって、さらに低濃度まで測定するためには assay buffer の添加を避けることと非特異的結合率を下げることが有効である。今回、実験値が理論値とよく一致した原因の一つとして、同じ平衡定数をもった均一な抗体だけからなるモノクローナル抗体を用いたことをあげることができ、平衡論的解析がモノクローナル抗体を用いる IRMA の解析に有力な手段となることがわかった。

理論的に得られる curve より低い結合率を示した固相化抗体 12-183 とトレーサ抗体 8-4 の組み合わせは、直線部分の平行性があることから、実際の反応における見かけの平衡定数が低いことが推定できる。このような現象は平衡論的解析を行うにあたって設定した仮定のうち、固相化抗体とトレーサ抗体が相互に反応を妨害せず、立体障害や協同効果がないという仮定が成立しない場合に

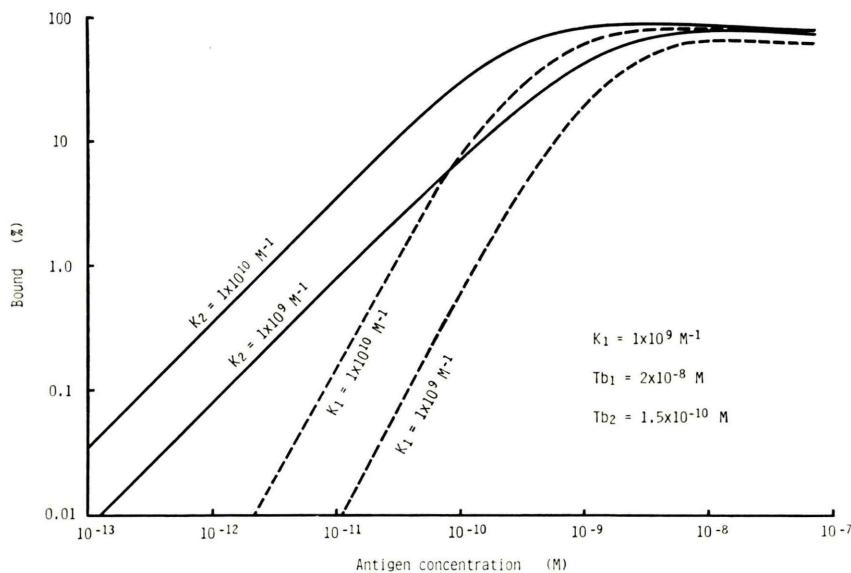


Fig. 8 Theoretical dose-response curves of 2-step IRMA. Solid lines: no change of equilibrium stage during washing out of unbound tracer. Dotted lines: new equilibrium stage was achieved during washing out of unbound tracer.

起こり得る。抗体の相互妨害または立体障害により見かけの平衡定数が低下する場合であり、同等の平衡定数をもった立体障害等の影響を受けない抗体を作製することで、理論値に一致する curve が得られることが予想される。また、直線的 $b\%$ 増加域で理論曲線と平行性のない固相化抗体 12-162 とトレーサ抗体 12-274 および 12-1 と 12-183 の組み合わせでの curve は、平衡論的解析における仮定条件 1~3 項に対する不適合では推察できない。Fig. 8 には平衡定数が $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ のトレーサ抗体について、洗浄中に未反応抗体および抗原が除かれることで新たな平衡状態へ移行する場合の curve を示した。これらの curve は、固相化抗体 12-162 とトレーサ抗体 12-274 および 12-1 と 12-183 の組み合わせから得られた curve と等しい形状を示した。したがって、ビーズの洗浄段階で洗浄前の平衡状態が乱されないという条件が成立しない場合として、新たな平衡状態へ移行する場合を想定することが本現象を説明するひとつの手段となることがわかった。すなわち、実験値が理論値と一致しない場合においても、平衡

論的解析を基にした理論的説明が可能であることが明らかになった。これまで、池田らの報告などにみられたように、互いに異なる平衡定数をもった抗体群からなるポリクローナル抗体を用いた IRMA の実験結果は直接理論値を反映せず、実験値を平衡論的解析で説明する場合に大きな障害となっていたが、本報告においては、モノクローナル抗体を用いることで反応系を単純化し、IRMA の理論的解析が実用的に利用できることを明らかにした。

IRMA による測定法を開発する場合に、用いる抗体の平衡定数を求ることで得られる curve を予想でき、さらに実験的に得られた curve を理論曲線と比較することで、用いた抗体の組み合わせが至適であるかどうかを知ることができることを明らかにした。とくにモノクローナル抗体を用いる IRMA には実用的価値が高いと考える。

VI. まとめ

1) モノクローナル抗体を用いた IRMA を平衡論的に解析することが、実験値を推測する上で

有用である。

2) 固相化抗体とトレーサ抗体の濃度としてそれぞれ 2×10^{-8} M および 1.5×10^{-10} M を用いる場合、それぞれの抗体の平衡定数として 1×10^9 M $^{-1}$ (K₁) 以上および 1.5×10^{10} M $^{-1}$ (K₂) 以上を使用することで最も高感度のカーブが得られ、そのときの最小検出感度は 4×10^{-14} M (ヒトTSHで約 0.005 μIU/ml) であった。

3) TSHに対する10種類のモノクローナル抗体を種々組み合わせて作成した標準曲線10種類のうち7種類が平衡論的解析から得られた理論曲線とよく一致した。また、理論曲線との解離を示した3種類の実験曲線についても、平衡論的解析による説明が可能であった。

文 献

- 1) Miles LEM, Hales CN: Labeled antibodies and immunological assay system. *Nature* **219**: 186-189, 1968
- 2) Rodbard D, Feldman Y: Kinetics of two-site

- immunoradiometric (sandwich) assays-II. *Immunochemistry* **15**: 77-82, 1978
- 3) Rodbard D, Weiss GH: Mathematical theory of immunoradiometric (labeled antibody) assays. *Anal Biochem* **52**: 10-44, 1973
- 4) 池田勲夫, 飯沼一茂, 高井 優, 他: 2-サイトイムノ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
- 5) 池田勲夫, 関口 潔, 飯沼一茂, 他: 2-サイトイムノ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——。核医学 **20**: 723-731, 1983
- 6) Galfre G, Milstein C: Methods in Enzymology 61, eds, Langone JJ, Vunakis HV, Academic Press Inc., New York, 1981, p. 3
- 7) Ziola BR, Matakainen MT, Salmi A: Polystyrene balls as the solid phase of double antibody radioimmunoassay for human serum albumin. *J Immunol Methods* **17**: 309-315, 1977
- 8) Ikeda I, Iinuma K, Takai M, et al: Graphical determination of affinity constant for labeled and unlabeled ligand from angiotensin I radioimmunoassay. 核医学 **20**: 385-390, 1983

Summary

Mathematical Analysis of Equilibrium on 2-site Immunoradiometric Assay Using Anti-Human TSH Monoclonal Antibody

Kimimichi OBATA, Yoshinobu KUBO, Yuka OKANE,
Akihiko KATO, Isao IKEDA and Kunio KURATA

Dainabot Co., Ltd.

A mathematical analysis of equilibrium was adapted on a practical 2-site immunoradiometric assay (IRMA) using 10 murine monoclonal antibodies (Mabs) to human TSH. The affinity constant of 10 Mabs was from 2.5×10^8 to 3.3×10^{10} M $^{-1}$. The dose-response curves using appropriate combinations of Mab-coated bead and 125 I-labeled Mab were compared with the theoretical curves calculated from mathematical analysis of equilibrium. Theoretical curves were directly affected by the affinity constants in which antibodies with higher affinity constants showed higher binding activity of tracer. However, the curves which antibodies have more than 1×10^9 M $^{-1}$ and $1 \times$

10^{10} M $^{-1}$ for capture antibody and tracer antibody did not show remarkable change, but were similar with the curve obtained from unlimited affinity constant. From these curve, the maximum and minimum detectable dose were approx. 2×10^{-10} M and 4×10^{-14} M, respectively. Seven out of 10 experimental curves for TSH showed good consistency with the corresponding theoretical curves which indicated that a mathematical analysis of equilibrium was useful to presume experimental results using monoclonal antibody.

Key words: Affinity constant, Monoclonal antibody, Immunoradiometric assay, Human TSH, Equilibrium.