

平成 30 年度 博士論文

免疫複合体転移法による  
超高感度酵素免疫測定法の開発と  
その高感度化機序の解明

渡辺 敏弘

指導教官：橋田 誠一

## 目次

1	免疫複合体転移法による高感度化機序の解明	1
1.1	背景および目的	1
1.1.1	背景	1
1.1.2	目的	3
1.2	方法	3
1.2.1	バッファ	3
1.2.2	抗原および抗体	3
1.2.3	捕捉および検出抗体コンジュゲートの作製	3
1.2.4	タンパク質固定ポリスチレンビーズの作製	4
1.2.5	サンドイッチ酵素免疫測定法 (Sand-EIA)	4
1.2.6	免疫複合体転移酵素免疫測定法 (ICT-EIA)	5
1.2.7	データ解析	6
1.3	結果	7
1.3.1	サンドイッチ EIA (Sand-EIA) および免疫複合体転移酵素免疫測定法 (ICT-EIA) によるサイトカイン測定	7
1.3.2	免疫複合体転移法 (ICT 法) による高感度化機序	8
1.4	考察	10
2	抗体コンジュゲート作製における PEG スペーサーの有用性検証	13
2.1	背景および目的	13
2.1.1	背景	13
2.1.2	目的	13
2.2	方法	13
2.2.1	バッファ	13
2.2.2	抗原および抗体	13
2.2.3	捕捉および検出抗体コンジュゲートの作製	14
2.2.4	タンパク質固定ポリスチレンビーズの作製	14
2.2.5	サンドイッチ酵素免疫測定法 (Sand-EIA)	14
2.2.6	免疫複合体転移酵素免疫測定法 (ICT-EIA)	15
2.2.7	データ解析	15
2.3	結果	15
2.3.1	ICT-EIA における PEG スペーサー導入コンジュゲートの有用性	15
2.3.2	抗体コンジュゲートへの PEG スペーサー導入による高感度化機序	17
2.3.3	PEG スペーサーの重合度の影響	18
2.4	考察	19
3	SS 還元反応を利用した免疫複合体転移法の有用性検証	20
3.1	背景および目的	20
3.1.1	背景	20
3.1.2	目的	20
3.2	方法	20
3.2.1	バッファ	20
3.2.2	抗原および抗体	20
3.2.3	捕捉および検出抗体コンジュゲートの作製	21
3.2.4	タンパク質固定ポリスチレンビーズの作製	21
3.2.5	サンドイッチ酵素免疫測定法 (Sand-EIA)	21
3.2.6	免疫複合体転移酵素免疫測定法 (ICT-EIA)	21
3.2.7	データ解析	22
3.3	結果	22
3.3.1	DNP トランスファーおよび SS トランスファーによる溶出反応効率	22
3.3.2	DNP トランスファーおよび SS トランスファーを用いた ICT-EIA による IL-12/23p40 測定	23
3.3.3	SS トランスファーによる高感度化機序	24
3.4	考察	25
4	総括	27
5	参考文献	28
6	謝辞	30

## 免疫複合体転移法による高感度化機序の解明

### 1.1 背景および目的

#### 1.1.1 背景

イムノアッセイは、臨床医療において、疾病の診断や経過観察、薬効予測やその他の目的でタンパク質バイオマーカーを測定する方法として広く用いられている方法である。1960年にインスリンのラジオイムノアッセイが世界で初めて報告されて以来（Yalow and Berson, 1960）、多くの高感度化技術が開発され、より微量なタンパク質を検出することができるようになり、早期診断などに用いられてきた。

現在、広く利用されている代表的なイムノアッセイである酵素免疫測定法のシグナルは3つの成分から構成される(図1)。

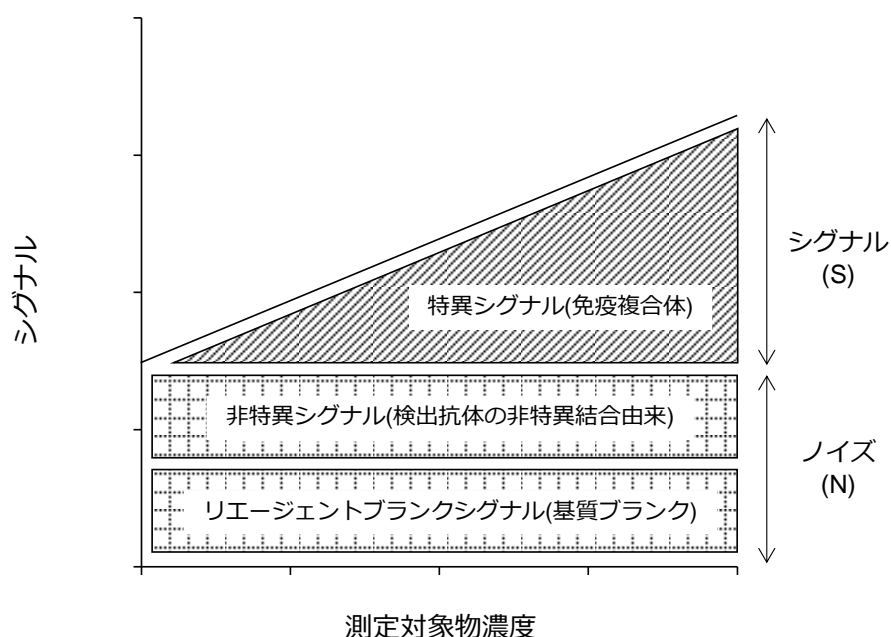


図1 酵素免疫測定法のシグナル成分

一般的なサンドイッチ EIA (Enzyme immunoassay) では、ターゲットの濃度に依存してシグナルが増大する。イムノアッセイの感度は  $S/N$  比を用いて表すことができる。 $S$  (シグナル) は特異シグナルを意味し、捕捉抗体と検出抗体によって形成されたサンドイッチ型の免疫複合体に由来するシグナル成分である。一方、 $N$  (ノイズ) は2つのシグナル成分から構成される。1つは非特異シグナルであり、96穴プレートの底面や磁性粒子の表面に非特異吸着した検出抗体に由来するシグナル成分である。もう1つは、リエー

ェントブランクシグナルであり、基質中にわずかに混入している活性型の基質や酵素基質反応のインキュベーション中に分解等の理由で非酵素的に活性型に変換されてしまう基質に由来するシグナル成分である。蛍光や化学発光を検出原理に用いたアッセイでは、多くの場合、蛍光光度計やフォトマルチプライヤー等の検出系でリエージェントブランクシグナルを検出することが可能である。一方で、古典的な比色法では、発色基質のリエージェントブランクシグナルが分光光度計の検出下限未満になってしまうことも多い。

基本的に、サンドイッチ EIA のシグナルはこの 3 成分から構成されているため、高感度化もこの 3 成分のシグナルをコントロールすることで可能となる。特異シグナルを増大するためにはより親和性の高い抗体が必要になる。IgG から疎水性の高い Fc 領域を切断し、Fab' フラグメントを使用する方法 (Kato et al, 1975) や Fab' のヒンジ部を用いた酵素-抗体コンジュゲート作製技術 (Yoshitake et al, 1982) は、特異シグナルを維持しつつ、非特異シグナルを減少させる方法として広く用いられている。リエージェントブランクは検出することが可能な検出抗体の最低量、すなわちその酵素免疫測定法の理論上の感度限界を決定する。高比活性の酵素 (Mandecki et al, 1991) を使用すると酵素由来のシグナルを増大することができる。すなわち、特異シグナルおよび非特異シグナルと比較して、リエージェントブランクシグナルを相対的に減少させることになる。近年、開発されたデジタルカウンティングは、基質を fL オーダーの液滴に分離し、酵素を含む液滴とそうでない液滴から検出されるシグナルにカットオフ値を設けることで酵素あり/なしをデジタル的に解析することで、原理上、リエージェントブランクを 0 とする技術である。本技術を用いることで、10 分子の  $\beta$ -D-ガラクトシダーゼが検出可能であったことが実験的に証明されている (Rissin et al, 2010 and Kim et al, 2012)。

免疫複合体転移酵素免疫測定法 (Immune complex transfer enzyme immunoassay、ICT-EIA) が初めて報告されたのは 1988 年である。サンドイッチ型免疫複合体を 1 つ目の固相で捕捉し、それを 2 つ目の固相に移し替えるこの方法は、非特異シグナルを著明に減少させることが可能となる高感度化技術であり、本手法を用いることで、1 zmol (約 600 分子) のフェリチンが検出可能であったことが報告されている (Hashida and Ishikawa, 1990)。その他にも、ICT-EIA を用いて種々のバイオマーカーが測定された結果が報告されているが (Umehara et al, 2009, Numata et al, 2016, and Yamamoto et al, 2018)、非特異シグナルが減少するメカニズムについて、その詳細は明らかにされていない。

### 1.1.2 目的

本研究では、サイトカイン3項目（TNF- $\alpha$ 、TARC、IL-12/23p40）をモデルターゲットとして ICT-EIA を開発し、従来法であるサンドイッチ EIA（Sand-EIA）と比較することで、免疫複合体転移酵素免疫測定法による高感度化レベルを明らかにすることを目的とした。そして、ICT-EIA の反応ステップを詳細に分析することで、なぜ ICT-EIA が高感度となるのか、その原理を明らかにすることを目的とした。

## 1.2 方法

### 1.2.1 バッファ

実験に使用したバッファの組成は以下の通り。

希釈液： 10 mM リン酸バッファ（pH7.0）、0.4 M 塩化ナトリウム、1.0 mM 塩化マグネシウム、0.1% アジ化ナトリウム、0.1% 牛血清アルブミン（BSA）

洗浄液： 10 mM リン酸バッファ（pH7.0）、0.1 M 塩化ナトリウム、1.0 mM 塩化マグネシウム、0.1% アジ化ナトリウム、0.1% 牛血清アルブミン（BSA）

反応停止液： 0.1 M Gly-NaOH（pH10.3）

### 1.2.2 抗原および抗体

全ての抗原と抗体は R&D Systems 社（Minneapolis, MN）より購入した。

TNF- $\alpha$ 、TARC および IL-12/23p40 のスタンダードは Quantikine ELISA kits に含まれるものを使用した。抗原の希釈系列は希釈液を用いて作製した。

TNF- $\alpha$  測定系における捕捉および検出抗体として、アフィニティ精製済ヤギ抗ヒト TNF- $\alpha$  ポリクローナル抗体（Antibody Registry: AB\_354395）およびマウス抗ヒト TNF- $\alpha$  モノクローナル抗体 IgG1（Clone: 28401, Antibody Registry: AB\_2203945）を使用した。TARC 測定系における捕捉および検出抗体として、アフィニティ精製済ヤギ抗ヒト CCL17/TARC ポリクローナル抗体（Antibody Registry: AB\_355325）を使用した。IL-12/23p40 測定系における捕捉および検出抗体として、アフィニティ精製済ヤギ抗ヒト IL-12/23p40 ポリクローナル抗体（Antibody Registry: AB\_10718110）を使用した。ウサギ抗 DNP（2,4-dinitrophenyl -BSA）抗体はシバヤギ社（群馬、日本）より購入した。

### 1.2.3 捕捉および検出抗体コンジュゲートの作製

Pierce<sup>TM</sup> SATA（N-succinimidyl S-acetylthioacetate）（Thermo Fisher Scientific

Inc., Waltham, MA)を用いて、ヤギ抗ヒト TNF- $\alpha$  ポリクローナル抗体にチオール基を導入した後、6-maleimidohexanoyl-DNP および 6-maleimidohexanoyl-biotin と反応させ、捕捉コンジュゲートを作製した (Hashida and Ishikawa, 1990 and Hashida et al, 1995)。その他のモノクローナルおよびポリクローナル抗体 (IgG1) はペプシン (Roche, Basel, Switz) を用いて F(ab')<sub>2</sub> とした後に還元反応を行い、Fab' を作製した。Fab' はその一部を 6-maleimidohexanoyl-DNP-biotinyl-BSA とカップリングすることで捕捉コンジュゲートを作製した (Hashida and Ishikawa, 1990 and Hashida et al, 1995)。また、一部は N,N'-(o-Phenylene)dimalimide (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO) を用いて  $\beta$ -D-ガラクトシダーゼとカップリングすることで検出抗体を作製した (Hashida and Ishikawa, 1990 and Hashida et al, 1995)。作製したコンジュゲートは希釈液を用いて希釈して測定に使用した。

#### 1.2.4 タンパク質固定ポリスチレンビーズの作製

ポリスチレンビーズ (6.4 mm diameter; Immuno Chemical, Inc., Okayama, Japan) に物理吸着法により抗 DNP 抗体 (0.01 g/L) を固定した (Hashida and Ishikawa, 1990 and Hashida et al, 1995)。同様に、物理吸着法によりビオチン化 BSA (0.01 g/L) を固定したポリスチレンビーズにストレプトアビジン (0.01 g/L, Wako, Osaka, Japan) を反応させることにより、ストレプトアビジンを固定した (Hashida and Ishikawa, 1990 and Hashida et al, 1995)。

#### 1.2.5 サンドイッチ酵素免疫測定法 (Sand-EIA)

サンドイッチ EIA の反応フローを図 2 に示す (上段)。抗原の希釈液 (100  $\mu$ L) と捕捉および検出コンジュゲート溶液 (100  $\mu$ L) を混合し、4  $^{\circ}$ C、オーバーナイトで反応させた (免疫複合体形成)。TNF- $\alpha$ 、TARC、および IL-12/23p40 測定に用いた捕捉/検出抗体濃度はそれぞれ、1200/30、100/30 および 100/10 fmol/test であった。その後、抗 DNP 抗体を固定したポリスチレンビーズ 1 つを加え、30 分反応させた (捕捉)。洗浄の後、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼの蛍光基質である 0.2 mM 4MUG (4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-galactosidase) を加えて 30  $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベートした (Hashida and Ishikawa, 1990 and Hashida et al, 1995)。2 時間後、反応停止液 2 mL を添加し、蛍光光度計 (F-3010, Hitachi, Ltd., Tokyo, Japan) を用いて、360 nm の励起光で 450 nm の蛍光を計測した。蛍光強度 (fluorescence intensity, FI) は反応停止液で調整した  $1.0 \times 10^{-8}$  M の 4MU (4-methylumbelliferone) 溶液の蛍光強度を 100 として規格化した。なお、ポ

リスチレンビーズを含むインキュベーションは全て室温、210 strokes/min の条件で行った。

#### 1.2.6 免疫複合体転移酵素免疫測定法 (ICT-EIA)

ICT-EIA の測定フローを図 2 に示す (下段)。抗原の希釈液(100  $\mu$ L)と捕捉および検出コンジュゲート溶液(100  $\mu$ L)を混合し、4  $^{\circ}$ C、オーバーナイトで反応させた (免疫複合体形成)。捕捉および検出抗体の使用量は Sand-EIA と同量とした。その後、1 次固相 (抗 DNP 抗体を固定したポリスチレンビーズ) 1 つを加え、30 分反応させた (捕捉)。洗浄の後、1 次固相を 150  $\mu$ L の 2 mM の  $N_{\epsilon}$ -DNP-L-lysine hydrochloride (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO) 溶液に入れ、30 分間インキュベートした (溶出)。1 次固相を取り除き、2 次固相 (ストレプトアビジンを固定した新たなポリスチレンビーズ) 1 つを加え、30 分反応させた (2 次捕捉)。洗浄の後、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼの蛍光基質である 0.2 mM 4MUG (4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-galactosidase) を加えて 30  $^{\circ}$ C で 20 時間インキュベートした (Hashida and Ishikawa, 1990 and Hashida et al, 1995)。2 時間後、反応停止液 2 mL を添加し、蛍光光度計 (F-3010, Hitachi, Ltd., Tokyo, Japan) を用いて、360 nm の励起光で 450 nm の蛍光を計測した。また、免疫複合体転移のステップを詳細に分析するため、溶出反応の後に取り除いた 1 次固相も洗浄し、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ活性を測定した (30  $^{\circ}$ C、2 時間)。

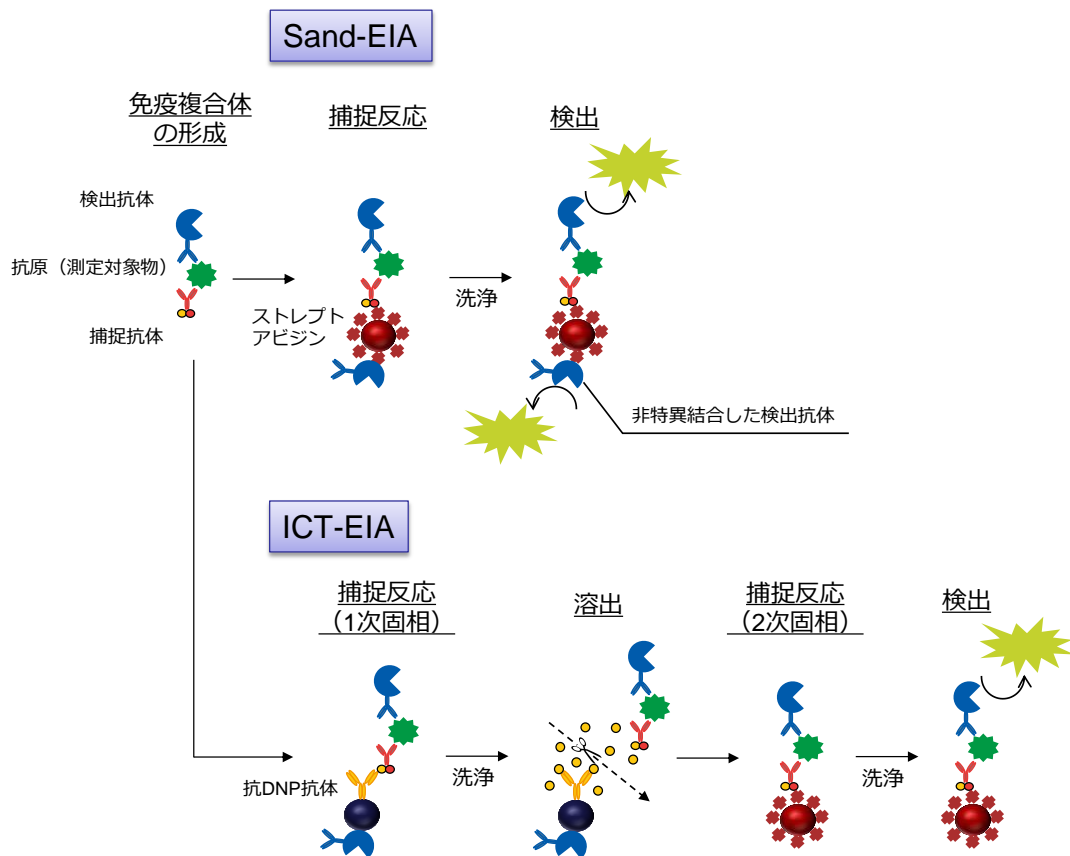


図2 サンドイッチ EIA および免疫複合体転移酵素免疫測定法 (ICT-EIA) の反応フロー

### 1.2.7 データ解析

検出下限 (検出限界、limit of detection、LOD) の定義は、バックグラウンドシグナル (抗原なし) と比較して、そのシグナルに有意差が認められる最小抗原濃度とした。有意差は T 検定を用いて確認した ( $P < 0.05$ )。

$\beta$ -D-ガラクトシダーゼを含まない 4MUG 溶液をインキュベートすることで取得したリエージェントブランク値を用いて、特異シグナルおよび非特異シグナル (図 1) を算出した。蛍光強度 (FI) として計測された特異シグナルおよび非特異シグナルより、数式 (A) を用いて酵素の分子数に変換した。

$$\text{Enzyme (fmol)} = \text{Signal (FI)} / t \text{ (min)} / 200 \text{ (FI/fmol/min)} \quad (\text{A})$$



数式(A)において、t (min) はインキュベーションを行った時間であり、200 (FI/fmol/min) は1 fmol の $\beta$ -D-ガラクトシダーゼを1分間インキュベートした際の酵素基質反応のターンオーバー速度である。特異シグナルおよび非特異シグナルの解析には、Specific ratio (Sp.ratio、数式(B)) および non-specific ratio (NS.ratio、数式(C)) という指標を算出した。

$$\text{Specific ratio (Sp.ratio)} = \frac{\text{Specific enzyme (mol/assay)}}{\text{Antigen (mol/assay)}} \quad (\text{B})$$

$$\text{Non-specific ratio (NS.ratio)} = \frac{\text{Non-specific enzyme (mol/assay)}}{\text{Detection antibody conjugate (mol/assay)}} \quad (\text{C})$$

数式(B)において、Antigen (mol/assay) の値は標準物質の既知濃度である。Specific ratio は、反応チューブ内でサンドイッチ型免疫複合体を形成した抗原の割合を意味する。

数式(C)において、Detection antibody conjugate (mol/assay) は測定に供された検出抗体の使用量である。Non-specific ratio は測定に使用した検出抗体の内、ビーズ表面に非特異結合したものの割合を示す。

### 1.3 結果

#### 1.3.1 サンドイッチ EIA (Sand-EIA) および免疫複合体転移酵素免疫測定法 (ICT-EIA) によるサイトカイン測定

Sand-EIA および ICT-EIA を用いてサイトカイン3項目の測定を行った結果を図3に示す。

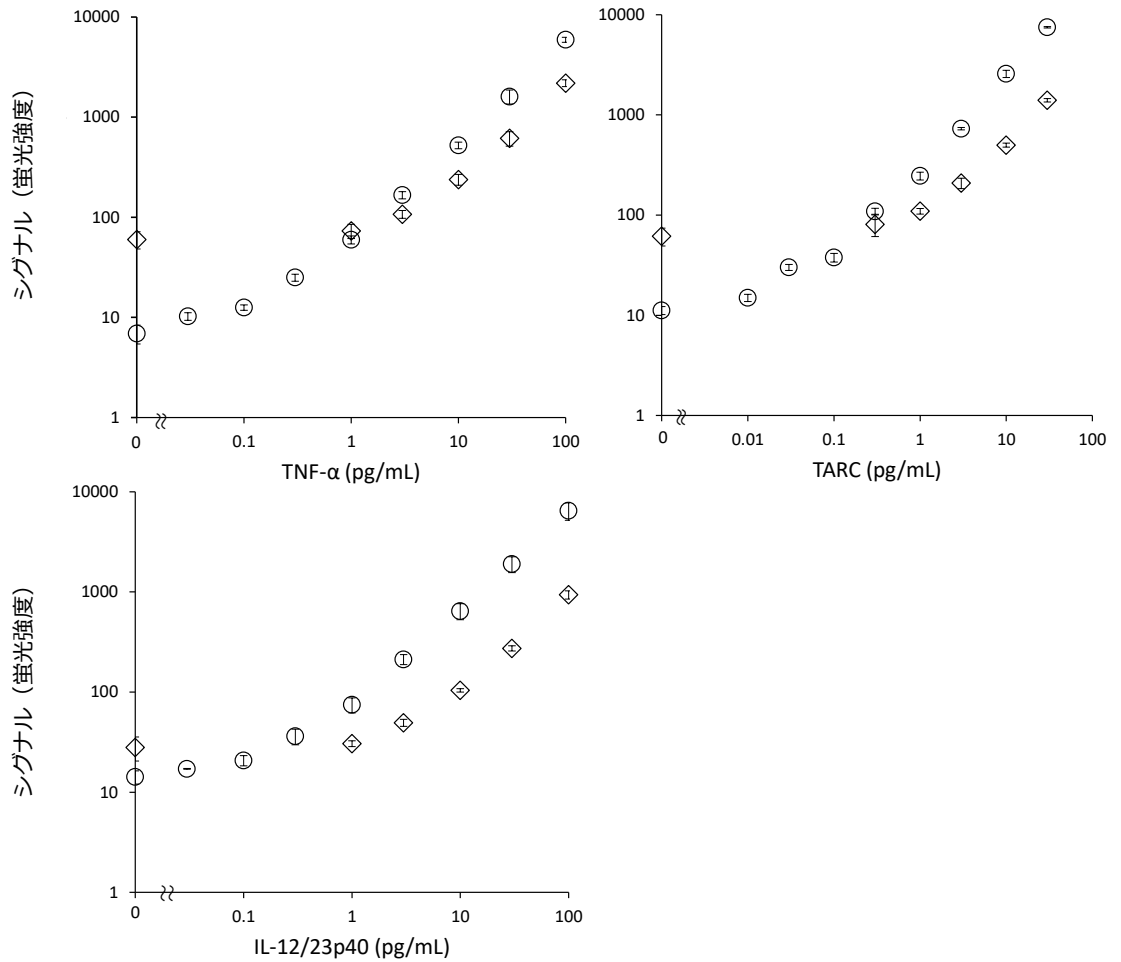


図3 サイトカイン3項目の検量線

○は ICT-EIA (n=5)、◇は Sand-EIA (n=3) の結果を示す。エラーバーは±2SD。  
シグナル (蛍光強度) は測定値からリエージェントブランク値を差し引いた値。

TNF- $\alpha$ 、TARC および IL-12/23p40 の Sand-EIA/ICT-EIA の検出下限はそれぞれ、3/0.03、  
1/0.01 および 3/0.03 pg/mL であった。ICT-EIA の感度は、同じ抗体やポリスチレンビ  
ーズ試薬を用いた Sand-EIA の 100 倍高感度であった。

### 1.3.2 免疫複合体転移法 (ICT 法) による高感度化機序

ICT-EIA は Sand-EIA と比較して 100 倍高感度であった。この2つの測定法の性能と差異  
の理解には、モル数計算による詳細なデータ解析が有用である。1次固相および2次固

相のビーズ上に存在した特異結合由来および非特異結合由来の酵素数は、検量線のデータから、数式(A)を用いて算出することができる。同様に、Sp.ratio および NS.ratio も数式(B)および数式(C)を用いて算出した。

表 1 Sand-EIA および ICT-EIA による TNF- $\alpha$  測定結果における特異シグナルおよび非特異シグナルの分析

特異シグナル				
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	Sand-EIA (zmol)	Sp.ratio	ICT-EIA (zmol)	Sp.ratio
100	87,853	15%	24,640	4.3%
30	22,905	13%	6,659	3.9%
10	7,362	13%	2,151	3.8%
3	1,950	11%	665	3.9%
Average		13%		3.8%

非特異シグナル				
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	Sand-EIA (zmol)	NS.ratio	ICT-EIA (zmol)	NS.ratio
0	2,277	0.0076%	8.0	0.000027%

ICT/Sand Sp.ratio	NS.ratio	高感度化 レベル
31%	0.35%	87

Sand-EIA の Sp. ratio は平均 13%であった。これは、反応容器内の TNF- $\alpha$  の 13%がサンドイッチ型免疫複合体を形成したことを意味する。ICT-EIA では Sp. ratio は 3.8%に減少していた。一方、Sand-EIA では 0.0076%であった NS. ratio は、ICT-EIA では 0.000027%まで著明に減少していた。ICT 法により、特異シグナルの 2/3 を失ったが、非特異結合に由来する検出抗体量が著しく減少したため、結果的に、特異シグナル/非特異シグナル比率は 87 倍向上した。

次に、溶出反応後の抗 DNP 抗体ビーズに残存する酵素活性も測定し、1 次固相での捕捉反応～溶出～2 次固相での捕捉反応～検出までの工程における特異シグナルおよび非

特異シグナルの変化を詳細に分析した結果を表 2 に示す。

表 2 ICT-EIA の各反応ステップにおける特異シグナルと非特異シグナルの分析  
 溶出液中の酵素数は溶出前後のビーズ上の酵素数から算出した。

特異シグナル (30 pg/mLのサンプルを測定した時)

	1次固相 (zmol)	溶出液 (zmol)	溶出液 /1次固相	2次固相 (zmol)	2次固相 /溶出液
TNF- $\alpha$	22,905	19,821	87%	6,659	34%
TARC	56,753	49,313	87%	30,516	62%
IL-12/23p40	10,479	9,101	87%	5,967	66%

非特異シグナル

	1次固相 (zmol)	溶出液 (zmol)	溶出液 /1次固相	2次固相 (zmol)	2次固相 /溶出液
TNF- $\alpha$	2,277	996	44%	8.0	0.8%
TARC	2,610	2,125	81%	30	1.4%
IL-12/23p40	981	809	82%	35	4.3%

1 次固相における特異シグナル、すなわちサンドイッチ型免疫複合体に由来する酵素は、過剰量の N $\epsilon$ -DNP-L-lysine hydrochloride を含む溶出液によってその大半 (87%) が溶出していたが、その後、2 次固相で捕捉されたものはその一部 (34~66%) であった。一方、1 次固相に非特異結合した検出抗体も、サンドイッチ型免疫複合体と同様に、その一定量 (44~82%) が溶出液中に遊離していたが、2 次固相に残存したものはその内ごくわずか (0.8~4.3%) であった。

#### 1.4 考察

本研究では、同じ試薬を用いて Sand-EIA および ICT-EIA を構築し、その感度の比較を行った。その結果、ICT-EIA では、ポリスチレンビーズ表面に非特異吸着した検出抗体由来のバックグラウンドシグナルが著明に低下したため、Sand-EIA と比較して 100 倍高感度であった。

Sand-EIA の NS. ratio は 0.0076% であった。すなわち、検出抗体コンジュゲートの 0.0076% がポリスチレンビーズ表面に非特異吸着していた。一方、ICT-EIA では、これが 0.000027% ま

で低下していた（表1）。Sand-EIA と ICT-EIA の最も大きな違いは、免疫複合体に対する遊離検出抗体コンジュゲートの存在比率であった。3 pg/mL の TNF- $\alpha$  の測定において、その比率は、1 次固相による捕捉反応中は  $1.5 \times 10^4$  であったのに対し、2 次固相ではわずか 1.5

(1/10,000) であった。イムノアッセイでは、高効率で測定ターゲットのサンドイッチ型免疫複合体を形成するために多量の抗体を投入するため、その直後の 1 次固相での捕捉反応ではこの比率が極めて高い状態にある。

興味深いことに、1 次固相に非特異吸着した検出抗体コンジュゲートは、溶出反応中に溶出液中に移動しており、その大部分が 2 次固相に再度結合していた。NS.ratio として算出すると 0.8% となり、1 次固相 (0.0076%) と比較しても極めて高い割合であった。この原因として、補足抗体コンジュゲートと検出抗体コンジュゲートの非特異結合が考えられる。このような非特異結合による複合体は、一連の免疫複合体転移法アッセイにおいて、2 次固相まで持ち運ばれ、シグナルを生成するためである。

免疫複合体転移法の弱点は、非特異シグナルの著明な低下に合わせて、特異シグナルの一部も失われることである（表2）。1 次固相で捕捉した免疫複合体の切り離し反応は理想的に進んでおり、ここでの特異シグナルのロスは大きな問題ではなかったが、1 回目の洗浄の後、反応液中に余剰の抗体コンジュゲートが存在しない状態での反応を行うため、抗原-抗体結合の平衡反応は乖離の方向に進むことが原因と考えられる。

本研究では、免疫複合体転移法による高感度化機序を詳細に分析するため、3 項目のサイトカインアッセイについて、Sp.ratio と NS.ratio という指標を算出し、特異シグナルおよび非特異シグナルを解析した。TNF- $\alpha$  の Sand-EIA の Sp.ratio は 13% であった。検出抗体に 1 種類のモノクローナル抗体が用いられた場合、Sp.ratio の最大値は 100% である。これは、特異シグナルを増大することによる高感度化の伸びしろは、7.5 倍 ( $100 \div 13$ ) であるということの意味する。ただし、今回構築した TARC や IL-12/23p40 アッセイのように、ポリクローナル抗体やモノクローナル抗体のカクテルを検出抗体に用いた場合には、Sp.ratio が 100% 以上になることも原理的には起こり得る。

一方、Sand-EIA における非特異結合した検出抗体コンジュゲートの数は、TNF- $\alpha$ 、TARC および IL-12/23p40 で、それぞれ、 $1.4 \times 10^6$ 、 $1.6 \times 10^6$  および  $5.9 \times 10^5$  molecules/assay であった。そして、免疫複合体転移法によってこれらが、 $4.8 \times 10^3$ 、 $1.8 \times 10^4$  および  $2.1 \times 10^4$  molecules/assay まで減少した。これは、免疫複合体転移法によって非特異シグナルは著明に減少したが、それでもなお  $10^3$ - $10^4$  倍の高感度化の余地が残されていることを意味する。しかしながら、ここでさらなる高感度化の制約となるのが、標識体としての酵素を検出する、検出系の感度である。酵素免疫測定法に用いられる代表的な酵素であるアルカリフォスファターゼの高感度化学発光基質による検出下限は約 30 aM である (Rissin et al, 2010)。アッセイ液量を 100  $\mu$ L とすると、 $1.8 \times 10^3$  molecules/assay 以上のアルカリフォスファターゼは

検出可能ということになるが、これは ICT-EIA の非特異結合した検出抗体コンジュゲートの数とほぼ同等であり、さらに非特異結合を抑制することができても、今度はそれを検出することができない計算になる。近年では、原理的に 1 分子の標識体の検出を可能とするデジタルカウンティング技術 (Rissin et al, 2010 and Kim et al, 2012) やイムノ PCR 技術 (Sano et al, 1992 and Zhou et al, 1993) が開発されており、もし、ICT-EIA 以上に検出抗体コンジュゲートの非特異結合を抑制することができた場合、これらの超高感度検出系が必要である。

## 2 抗体コンジュゲート作製における PEG スペーサーの有用性検証

### 2.1 背景および目的

#### 2.1.1 背景

ICT-EIA では、1 次固相（抗 DNP 抗体固相）および 2 次固相（ストレプトアビジン固相）による 2 回の捕捉反応を行うため、捕捉抗体に DNP およびビオチンの両方を標識する必要がある。このため、DNP およびビオチン修飾した BSA を抗体の抗体フラグメント

（Fab'）に結合させるなどの方法が用いられる。一方、ストレプトアビジン固相のみを使用する従来のサンドイッチ EIA では、捕捉コンジュゲートとして Fab' -Bio が用いられる。各構成要素の分子量は抗体フラグメント（Fab'）：約 46 kDa、BSA：約 66kDa、ビオチン：244、DNP-Lys：478 であり、ICT-EIA では、抗体フラグメント（Fab'）に比較的大きい分子である BSA を結合させることが、抗原抗体反応の阻害要因となり、これが感度（S/N 比）を制限する一因となっている可能性が考えられる。

#### 2.1.2 目的

本研究では、ICT-EIA に用いる捕捉抗体コンジュゲートである Fab' -BSA-Bio-DNP の Fab' と BSA の架橋部にスペーサーを導入し、立体構造上の自由度を向上させることにより、ICT-EIA をさらに高感度化することを目的とした。

## 2.2 方法

### 2.2.1 バッファ

1.2.1 に記載のバッファを使用した。

### 2.2.2 抗原および抗体

TNF- $\alpha$  測定系における捕捉および検出抗体として、マウス抗ヒト TNF- $\alpha$  モノクローナル抗体 Clone Mab1 および Clone: 28401 (Antibody Registry: AB\_2203945) をそれぞれ Biologend 社 (San Diego, CA) および R&D Systems 社 (Minneapolis, MN) より購入した。スタンダードは Quantikine ELISA kits に含まれるものを、希釈液を用いて 100 pg/mL に希釈して使用した。

インスリン測定系における捕捉および検出抗体として、マウス抗インスリンモノクローナル抗体 Clone 6F7 および 16E9 をミクリ免疫研究所 (大阪、日本) より購入した。スタンダードに用いた抗原はミリポア社 (St. Charles, MO) より購入したものを、希釈液を用いて 3  $\mu$ U/mL に希釈して使用した。

IL-12/23p40 測定系における捕捉および検出抗体として、マウス抗ヒト IL-12/23p40 モノクローナル抗体 Clone 31052 およびアフィニティ精製済ヤギ抗ヒト IL-12/23p40 ポリクローナル抗体 (Antibody Registry: AB\_10718110) を R&D Systems 社 (Minneapolis, MN) より購入した。スタンダードは Quantikine ELISA kits に含まれるものを、希釈液を用いて 100 pg/mL に希釈して使用した。

HBsAg 測定系における捕捉および検出抗体として、マウス抗 HBsAg 抗体 Clone 1053 および 85 (シスメックス社、兵庫、日本) を使用した。スタンダードは HISCL HBsAg キャリブレーション (シスメックス社、兵庫、日本) を、希釈液を用いて 0.25 IU/mL に希釈して使用した。

ウサギ抗 DNP (2,4-dinitrophenyl -BSA) 抗体はシバヤギ社 (群馬、日本) より購入した。

### 2.2.3 捕捉および検出抗体コンジュゲートの作製

全てのモノクローナル抗体 (IgG1) はペプシン (Roche, Basel, Switz) を用いて F(ab')<sub>2</sub> とした後に還元反応を行い、Fab' を作製した。Fab' の一部を EMCS (同仁化学、熊本、日本) もしくは SM(PEG)2/8/24 (Life Technologies 社, California, CA) を用いてマレイミド基を導入した DNP-biotinyl-BSA とカップリングすることで、PEG リンカーによるスパーサーを含まない捕捉コンジュゲートと含む捕捉コンジュゲートを作製した。また、一部は N,N'-(o-Phenylene) dimaleimide (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO) を用いて  $\beta$ -D-ガラクトシダーゼとカップリングすることで検出抗体を作製した (Hashida and Ishikawa, 1990 and Hashida et al, 1995)。作製したコンジュゲートは希釈液を用いて希釈して測定に使用した。

### 2.2.4 タンパク質固定ポリスチレンビーズの作製

1.2.4 に記載の方法で抗 DNP 抗体固定ビーズおよびストレプトアビジン固定ビーズを作製した。

### 2.2.5 サンドイッチ酵素免疫測定法 (Sand-EIA)

1.2.5 に記載の方法で Sand-EIA による測定を行った。なお、TNF- $\alpha$ 、インスリン、IL-12/23p40 および HBsAg 測定に用いた捕捉/検出抗体濃度はそれぞれ、300/30、300/30、300/10 および 100/100 fmol/test であった。



## 2.2.6 免疫複合体転移酵素免疫測定法 (ICT-EIA)

1.2.6 および 2.2.5 に記載の方法で ICT-EIA による測定を行った。

## 2.2.7 データ解析

①Sand-EIA、②溶出後の 1 次固相、および③ICT-EIA の測定結果について、以下の算出式を用いて測定結果の解析を行った。なお、全て測定値は、リエージェントブランクシグナル (基質由来のバックグラウンドシグナル) をあらかじめ減じた上で、N=3 の平均値を用いた。

$$\text{非特異シグナル} = \text{ブランクサンプル測定時のシグナル} \quad (\text{D})$$

$$\text{特異シグナル} = \text{抗原ありサンプル測定時のシグナル} - \text{非特異シグナル} \quad (\text{E})$$

$$\text{S/N} = \text{特異シグナル} \div \text{非特異シグナル} \quad (\text{F})$$

$$\text{溶出率} = 1 - \text{②の特異シグナル} \div \text{①の特異シグナル} \quad (\text{G})$$

複合体乖離率

$$= 1 - \text{③の特異シグナル} \div 10 \div (\text{①の特異シグナル} - \text{②の特異シグナル}) \quad (\text{H})$$

$$\text{複合体保持率} = 1 - \text{複合体乖離率} \quad (\text{I})$$

数式(G)により算出される溶出率は、1 次固相で捕捉された免疫複合体のうち、溶出反応により液相中に遊離したものの割合を示す。数式(H)および(I)で算出される複合体乖離率および複合体保持率は、溶出された免疫複合体のうち、2 次固相による捕捉～検出までの反応において、乖離したもの、および乖離しなかったものの割合である。なお、今回実験に使用した捕捉コンジュゲートの 1 次固相および 2 次固相による捕捉率はほぼ 100%であった (data not shown)。

## 2.3 結果

### 2.3.1 ICT-EIA における PEG スペーサー導入コンジュゲートの有用性

PEG スペーサーを導入した抗体コンジュゲートと従来の抗体コンジュゲートを用いて、

ICT-EIA でインスリン、TNF- $\alpha$ 、IL-12/23p40、および HBsAg を測定し、数式(D)および(E)を用いて非特異シグナルおよび特異シグナルを算出した結果を図4に示す。

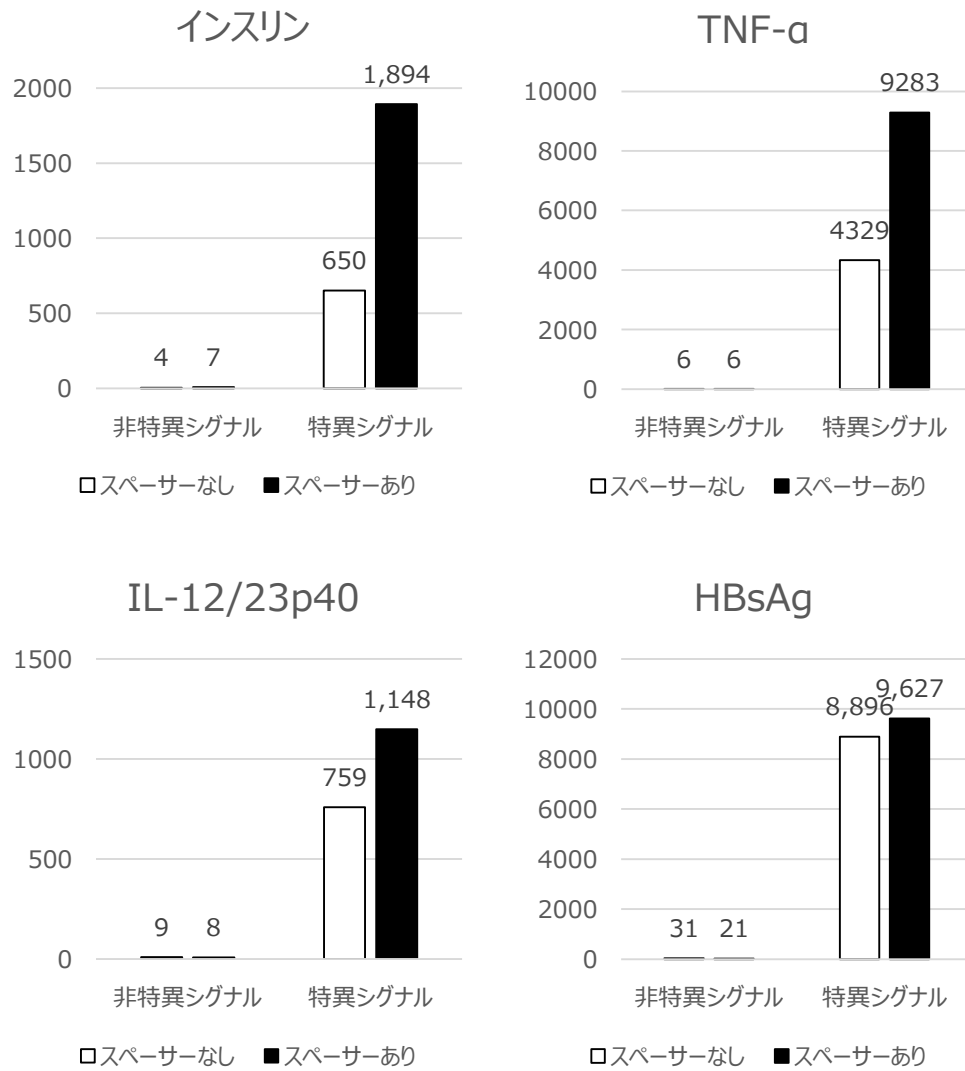


図4 ICT-EIA における PEG スペーサー導入コンジュゲートの有用性

PEG スペーサーの導入により、非特異シグナルは変化しないもしくは同等以下であったが、いずれの測定系においても特異シグナルは増大した。その結果、数式(F)より算出される S/N の向上レベルは、インスリン、TNF- $\alpha$ 、IL-12/23p40、および HBsAg でそれぞれ、1.9、2.2、1.8、および 1.6 倍であった。

### 2.3.2 抗体コンジュゲートへの PEG スペーサー導入による高感度化機序

PEG スペーサーを導入した抗体コンジュゲートによる高感度化機序を調べるため、Sand-EIA で TNF- $\alpha$  を測定し、数式(D)および(E)を用いて非特異シグナルおよび特異シグナルを算出した結果を図 5 に示す。

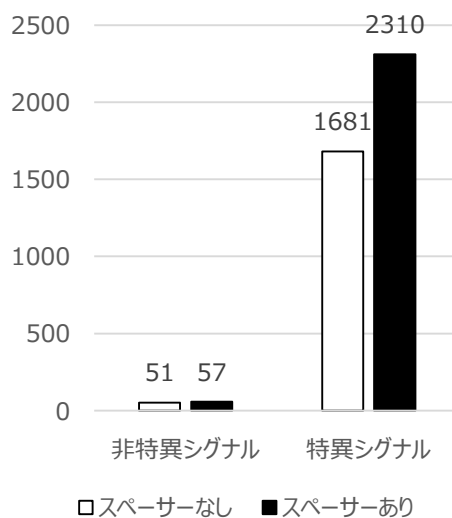


図 5 TNF- $\alpha$  Sand-EIA における PEG スペーサー導入コンジュゲートの有用性

ICT-EIA の結果 (図 4) と同様に、PEG スペーサーの導入により、非特異シグナルはほぼ変化しなかったが、特異シグナルは増大した。その結果、数式(F)より算出される S/N の向上レベルは 1.2 倍となり、PEG スペーサーの導入により Sand-EIA の感度も向上していることが分かった。

次に、TNF- $\alpha$  の Sand-EIA および ICT-EIA の結果から、数式(H)および(I)を用いて、複合体保持率を算出した結果を図 6 に示す。

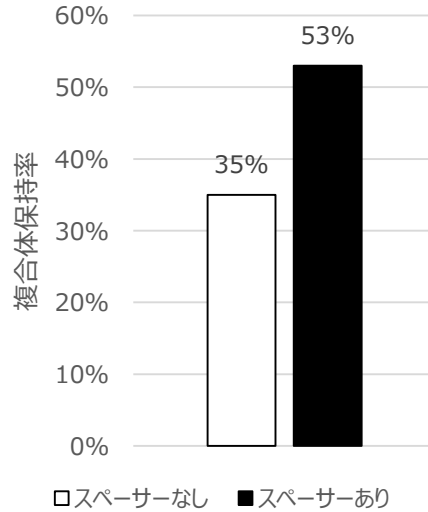


図 6 PEG スペーサーが複合体保持率におよぼす影響

複合体保持率は約 1.5 倍向上しており、PEG スペーサーの導入が Sand-EIA の感度のみでなく、複合体保持率の性能改善にも有用であることが明らかとなった。

### 2.3.3 PEG スペーサーの重合度の影響

さらに、PEG スペーサーの長さが複合体保持率におよぼす影響を調べるため、異なる長さの PEG スペーサーを導入した抗体コンジュゲートを用いて、Sand-EIA および ICT-EIA で TNF- $\alpha$  を測定し、数式(I)を用いて複合体保持率を算出した結果を図 7 に示す。

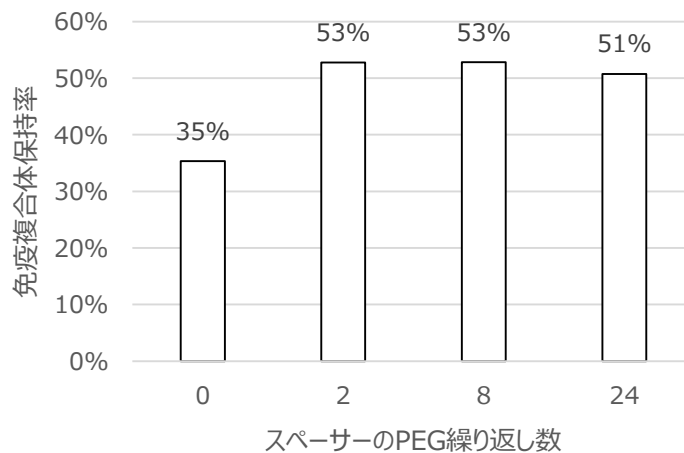


図 7 異なる長さの PEG スペーサーが複合体保持率におよぼす影響

PEG スペーサーを導入しない場合と比較して、導入時の複合体保持率は高値であった。  
また、PEG 繰り返し数が 2、8、および 24 の場合複合体保持率はほぼ同等であった。

## 2.4 考察

本研究では、インスリン、TNF- $\alpha$ 、IL-12/23p40、および HBsAg の 4 項目の測定系において、PEG スペーサーを導入した抗体コンジュゲートを作製し、その有用性を検証した。いずれの ICT-EIA においても、非特異シグナルは変化せず、特異シグナルが増大することで、1.6～2.2 倍の感度 (S/N) 改善効果が得られたが、特異シグナルの上昇はインスリンが最も高く (2.9 倍)、HBsAg が最も低い (1.1 倍) 結果となった (図 4)。今回検討した 4 項目の分子量はインスリン、TNF- $\alpha$ 、IL-12/23p40、および HBsAg でそれぞれ、約 6 kDa、約 17.5 kDa、約 40 kDa、および約 4 MDa であり、本結果は、抗体コンジュゲートへの PEG スペーサーの導入が免疫複合体形成時の立体障害を緩和するという本研究の仮説を支持する結果であると言える。

さらに、Sand-EIA においても、同様に特異シグナルの上昇が認められ (図 5)、複合体保持率も改善していたこと (図 6) から、抗体コンジュゲートへの PEG スペーサーの導入は、免疫複合体の形成を促進するだけでなく、さらにはその乖離反応も抑制していることが明らかとなった。その結果、TNF- $\alpha$  Sand-EIA および ICT-EIA の S/N (感度) 改善効果は 1.2 倍および 2.2 倍となり、ICT-EIA でより高い効果が得られた。免疫複合体転移法は非特異シグナルを著明に減少させることによる高感度化技術であるが、その一方で、その反応過程において免疫複合体の乖離により特異シグナルが減少するというデメリットも存在していた (図 3、表 1 および表 2)。従って、本研究でその有用性を検証した PEG スペーサーの導入抗体コンジュゲートのような特異シグナルを向上させる技術は、Sand-EIA と比較して、ICT-EIA において相対的に高い感度改善効果が得られると考えられる。

TNF- $\alpha$  ICT-EIA における複合体保持率の改善効果は、PEG スペーサーの長さに関わらず一定であったが (図 7)、この結果は、測定対象物、ペアとして使用する抗体やエピトープ等、種々の条件により異なるものと考えられるため、実際には構築する測定系に応じて最適化が必要であると考えられる。

### 3 SS還元反応を利用した免疫複合体転移法の有用性検証

#### 3.1 背景および目的

##### 3.1.1 背景

橋田らは ICT-EIA の発展版として、Hetero-Two-Site Complex Transfer Enzyme Immunoassay という手法を開発している (Hashida et al, 1991)。これは、1 アッセイの中で、DNP の溶出反応および SS 結合の還元開裂反応を用いて、免疫複合体転移法を 2 度繰り返す測定方法である。DNP の溶出反応を用いた免疫複合体転移法 (DNP トランスファー) では、固相へ非特異吸着する検出抗体の量が Sand-EIA の 1/125~1/23 レベルとなることが明らかになったが (表 2)、これを 2 回繰り返すことでさらなる高感度化の可能性が考えられる。しかしながら、同論文で示された方法は、ヘテロサンドイッチ法という特殊な測定系をベースにしていること、測定ターゲットがペプチドであるため特異シグナルが低いことなどの理由から、10 kDa 以上のタンパク質を測定対象とした場合と比較して十分な感度が得られておらず、その有用性の詳細な検証や高感度化機序の解明は今後の課題であった。

##### 3.1.2 目的

本研究では、SS 結合の還元反応を用いた免疫複合体転移法 (SS トランスファー) による ICT-EIA と DNP トランスファーによる ICT-EIA を比較し、SS トランスファーの有用性を検証するとともに、その高感度化機序を解明することを目的とした。

#### 3.2 方法

##### 3.2.1 バッファ

1.2.1 に記載のバッファを使用した。

##### 3.2.2 抗原および抗体

IL-12/23p40 測定系における捕捉および検出抗体として、アフィニティ精製済ヤギ抗ヒト IL-12/23p40 ポリクローナル抗体 (Antibody Registry: AB\_10718110) を R&D Systems 社 (Minneapolis, MN) より購入した。スタンダードは Quantikine ELISA kits に含まれるものを使用し、希釈系列は希釈液を用いて作製した。

### 3.2.3 捕捉および検出抗体コンジュゲートの作製

ポリクローナル抗体はペプシン(Roche, Basel, Switz)を用いてF(ab')<sub>2</sub>とした後に還元反応を行い、Fab' を作製した。Fab' の一部をEZ-Link HPDP-Biotin(Thermo Scientific 社, Waltham, MA)を用いてマレイミド基を導入したDNP-biotinyl-BSA とカップリングすることで、SS 結合を含む捕捉コンジュゲートを作製した。また、一部はN,N'-(o-Phenylene)dimalimide (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO)を用いてβ-D-ガラクトシダーゼとカップリングすることで検出抗体を作製した(Hashida and Ishikawa, 1990 and Hashida et al, 1995)。作製したコンジュゲートは希釈液を用いて希釈して測定に使用した。

### 3.2.4 タンパク質固定ポリスチレンビーズの作製

1.2.4に記載の方法で抗DNP抗体固定ビーズおよびストレプトアビジン固定ビーズを作製した。

### 3.2.5 サンドイッチ酵素免疫測定法 (Sand-EIA)

1.2.5に記載の方法でSand-EIAによる測定を行った。

### 3.2.6 免疫複合体転移酵素免疫測定法 (ICT-EIA)

抗原の希釈液(100 μL)と捕捉および検出コンジュゲート溶液(100 μL)を混合し、4 °C、オーバーナイトで反応させた(免疫複合体形成)。その後、1次固相(抗DNP抗体を固定したポリスチレンビーズ)1つを加え、30分反応させた(捕捉)。洗浄の後、DNPトランスファーでは、1次固相を150 μLの2 mMのNε-DNP-L-lysine hydrochloride (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO)溶液に入れ、5~30分間インキュベートした(溶出)。一方の、SS還元トランスファーでは、1次固相を150 μLのメルカプトエチルアミンを添加した希釈液に入れ、5~30分間インキュベートした(溶出)。1次固相を取り除き、2次固相(ストレプトアビジンを固定した新たなポリスチレンビーズ)1つを加え、30分反応させた(2次捕捉)。洗浄の後、β-D-ガラクトシダーゼの蛍光基質である0.2 mM 4MUG(4-methylumbelliferyl-β-D-galactosidase)を加えて30 °Cで20時間インキュベートした(Hashida and Ishikawa, 1990 and Hashida et al, 1995)。2時間後、反応停止液2 mLを添加し、蛍光光度計(F-3010, Hitachi, Ltd., Tokyo, Japan)を用いて、360 nmの励起光で450 nmの蛍光を計測した。また、免疫複合体転移のステップを詳細

に分析するため、溶出反応の後に取り除いた1次固相も洗浄し、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ活性を測定した(30℃、2時間)。

### 3.2.7 データ解析

1.2.7 および 2.2.7 に記載の方法でデータ解析を行った。

## 3.3 結果

### 3.3.1 DNP トランスファーおよび SS トランスファーによる溶出反応効率

100/100 fmol/test の捕捉/検出抗体を使用し、Sand-EIA および ICT-EIA における溶出反応の条件検討を行った結果を図8に示す。

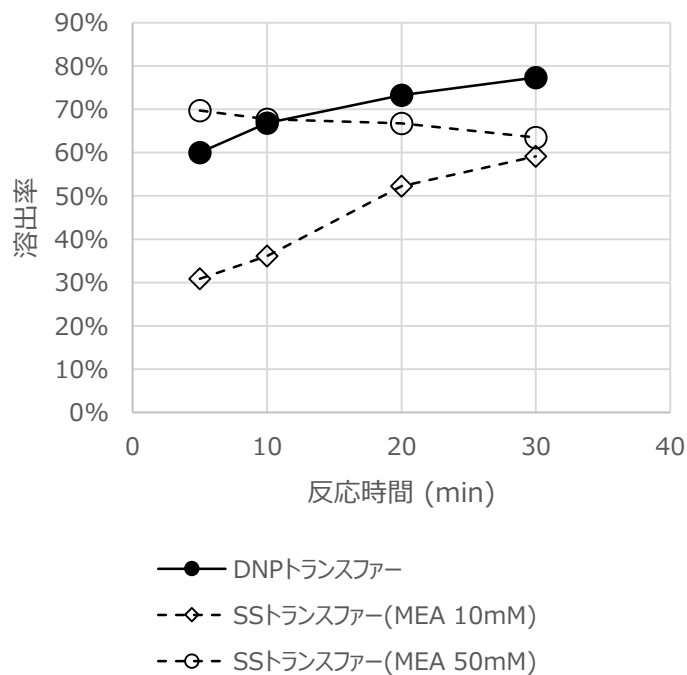


図8 溶出反応条件と溶出率 (MEA : メルカプトエチルアミン)

10 mM のメルカプトエチルアミンを用いた SS トランスファーでは、溶出率は反応時間の延長とともに増大した。一方、50 mM のメルカプトエチルアミンを用いた SS トランスファーおよび DNP トランスファーでは反応時間 5~30 分での溶出率はほぼ一定であった。



反応時間 30 分における、DNP トランスファー、SS トランスファー (MEA10mM) および SS トランスファー (MEA50mM) での溶出率はそれぞれ、77%、59%および 64%であり、最適化の余地はあるものの、著明な性能差は認められなかった。

**3.3.2 DNP トランスファーおよび SS トランスファーを用いた ICT-EIA による IL-12/23p40 測定**  
 100/10 fmol/test の捕捉/検出抗体を使用し、Sand-EIA および ICT-EIA で IL-12/23p40 を測定した結果を図 9 に示す。なお、SS トランスファーの溶出反応条件は、10 mM のメルカプトエチルアミンを用いて、反応時間は 30 分とした。

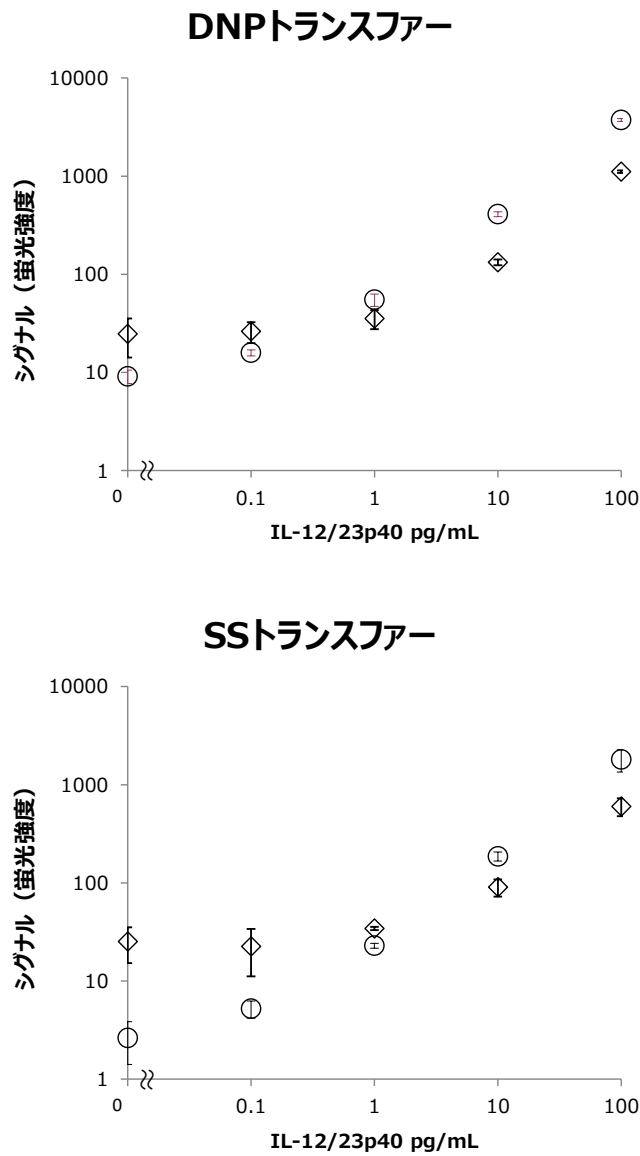


図 9 IL-12/23p40 の検量線  
23

○は ICT-EIA (n=3)、◇は Sand-EIA (n=3) の結果を示す。エラーバーは±2SD。  
 シグナル (蛍光強度) は測定値からリエージェントブランク値を差し引いた値。

SS トランスファーにおいても、DNP トランスファーと同様の非特異シグナルの抑制効果が認められた。2つの手法間で顕著な性能差はなく、2SD 法による最小検出感度は、今回検量線データを取得した範囲ではともに、Sand-EIA では 10 pg/mL、ICT-EIA では 0.1 pg/mL となった。

### 3.3.3 SS トランスファーによる高感度化機序

SS トランスファーによる ICT-EIA の高感度化機序を詳細に分析するために、表 2 と同様、1 次固相での捕捉反応～溶出～2 次固相での捕捉反応～検出までの工程における特異シグナルおよび非特異シグナルの変化を詳細に分析した結果を表 3 に示す。

表 3 DNP トランスファーと SS トランスファーによる ICT-EIA の各反応ステップにおける特異シグナルと非特異シグナルの分析  
 溶出液中の酵素数は溶出前後のビーズ上の酵素数から算出した。

特異シグナル (100 pg/mLのサンプルを測定した時)						
	1次固相 (zmol)	溶出液 (zmol)	溶出液 /1次固相	2次固相 (zmol)	2次固相 /溶出液	2次固相 /1次固相
DNPトランスファー	36,261	29,848	82%	15,238	51%	42%
SSトランスファー	19,230	8,911	46%	7,379	83%	38%

非特異シグナル						
	1次固相 (zmol)	溶出液 (zmol)	溶出液 /1次固相	2次固相 (zmol)	2次固相 /溶出液	2次固相 /1次固相
DNPトランスファー	826	664	80%	37	5.6%	4.5%
SSトランスファー	841	502	60%	11	2.1%	1.3%

まず、特異シグナルについて、数式(G)より算出される溶出率 (表 3 中、溶出液/1 次固相) は 82% (DNP トランスファー) および 46% (SS トランスファー) となり、および数式 (I)より算出される複合体保持率 (表 3 中、2 次固相/溶出液) は 51% (DNP トランスフ

ァー) および 83% (SS トランスファー) であった。その結果、2 次固相における特異シグナルは 1 次固相の 42% (DNP トランスファー) および 38% (SS トランスファー) と、ほぼ同等レベルであった。

一方、非特異シグナルについて、1 次固相に非特異吸着した検出抗体が溶出する割合 (表 3 中、溶出液/1 次固相) は 80% (DNP トランスファー) および 60% (SS トランスファー) とほぼ同等であったが、その後溶出液中に移行した免疫複合体を形成していない検出抗体のうち、2 次固相の非特異吸着したものの割合 (表 3 中、2 次固相/溶出液) は 5.6% (DNP トランスファー) および 2.1% (SS トランスファー) であった。その結果、2 次固相における特異シグナルも 1 次固相の 4.5% (DNP トランスファー) および 1.3% (SS トランスファー) と SS トランスファーにおいて、より効率的に非特異シグナルが抑制されていることが分かった。

### 3.4 考察

本研究では、IL-12/23p40 を測定対象物として、SS トランスファーによる ICT-EIA を構築し、その有用性を検証した。SS トランスファーによる ICT-EIA では、DNP トランスファーと同様、Sand-EIA と比較して非特異シグナルが減少することで感度が向上しており、高感度化レベルはほぼ同等であった (図 9)。

さらに詳細に特異シグナルおよび非特異シグナルの分析を行ったところ、特異シグナルに関しては、SS 結合の還元反応に最適化の余地を残すものの (溶出率)、最終的に 1 次固相から 2 次固相へ持ち運ばれる免疫複合体の割合に関しては、SS トランスファーと DNP トランスファーで明確な違いは認められなかった (表 3)。一方の非特異シグナルについては、溶出液中から 2 次固相へ非特異結合するものの割合が DNP トランスファー (5.6%) と比較して SS トランスファー (2.1%) でやや低値であった (表 3)。この現象がその他の抗体や項目においても再現するものであるかの検証やその機序の分析は今後の課題であるが、免疫複合体転移法による非特異シグナルの抑制に関しても SS トランスファーと DNP トランスファーで大きな違いがないことが明らかとなった。

DNP トランスファーでは高濃度の DNP-Lys 溶液が必要であるが、DNP-Lys は水に難溶であるため、長期保存時に析出が発生し、性能不良の原因になる可能性が考えられる。これは問題にならないことは SS トランスファーの長所であると考えられる。さらに、DNP トランスファーと SS トランスファーの組み合わせによってさらに非特異シグナルを抑制できる可能性があるが、2 次固相における非特異シグナルの主な原因は捕捉抗体と検出抗体の非特異結合である可能性があるため、同手法により根本的に非特異シグナルを除去することが難しいと考えられる。一方、SS トランスファーではメルカプトエチルアミンによる還元反応を必要とするため、SS

結合によりサブユニットが結合しているようなタンパク質の測定には不向きであると考えられるため、やはり測定対象物や使用する抗体に応じた、適切な測定原理を選択や最適化は必要であると考えられる。

#### 4 総括

本研究では、まず始めに、免疫複合体転移酵素免疫測定法（ICT-EIA）による測定系を開発し、その高感度化レベルを明らかにするとともに、その高感度化機序の解明に取り組んだ。モデルターゲットとして選択したサイトカイン3項目（TNF- $\alpha$ 、TARC、IL-12/23p40）の免疫複合体転移法による高感度化レベルは約100倍であった。通常のSand-EIAでは、高効率で測定ターゲットのサンドイッチ型免疫複合体を形成するために多量の抗体を投入するため、固相による捕捉反応時には、免疫複合体に対する遊離検出抗体コンジュゲートの存在比率が極めて高い状態（3 pg/mLのTNF- $\alpha$ の測定時は $1.5 \times 10^4$ ）であった。一方のICT-EIAにおける2次固相の捕捉反応時には、この比率はわずか1.5（1/10,000）であり、このためICT-EIAでは非特異シグナル（＝バックグラウンドシグナル）が著名に抑制され、高感度に測定することが可能になる。その反面、ICT-EIAでは、免疫複合体が乖離することにより特異シグナルを約3割程度失ってしまうというデメリットも存在していることも明らかになった。

次に、ICT-EIAで用いる抗体コンジュゲートにPEGスペーサーを導入することによりさらなる高感度化を試みた。Sand-EIAおよびICT-EIAともに、PEGスペーサーの導入による感度改善効果が認められたが、PEGスペーサーの導入は免疫複合体の形成効率を向上させるだけでなく、ICT-EIAのデメリットであった免疫複合体の乖離も抑制したため、ICT-EIAにおいてより高い感度改善効果が認められた。非特異シグナルの抑制を高感度化機序の本質とする免疫複合体転移法において、その逆のアプローチである特異シグナルを増大させる技術が、さらに重要であることを示す結果であると言える。

最後に、SS結合の還元開裂反応を利用した免疫複合体転移法を用いたICT-EIAを構築し、高感度化レベルおよびその高感度化機序が、従来法であるDNPの溶出反応による免疫複合体転移法と同様であることを確認した。将来的に、異なる免疫複合体転移法を選択あるいは組み合わせて使用することでさらなる高感度化が可能になるかもしれない。

一連の研究において、免疫複合体転移法の機序、そして、イムノアッセイの高感度化における非特異シグナル抑制の重要性を明らかにした。本手法と近年のデジタルカウンティングのような超高感度標識体検出技術を組み合わせることにより、近い詳細に、試料中に含まれるターゲット1分子の検出が可能になると考えられる。また、一連の分析において使用した溶出率や複合体保持率等の性能指標は、ICT-EIAの開発および品質管理を行う上で重要な知見であり、これらのノウハウを活かして本技術の実用化を促進し、臨床医療に貢献したいと考えている。

## 5 参考文献

- Hashida et al, 1988 Hashida S, Tanaka K, Kohno T, Ishikawa E  
Novel and Ultrasensitive Sandwich Enzyme Immunoassay (Sandwich Transfer Enzyme Immunoassay) for Antigens  
Analytical Letters 1988 July 21(7):1141-1154
- Hashida and Ishikawa, 1990 Hashida S, Ishikawa E.  
Detection of one milliattomole of ferritin by novel and ultrasensitive enzyme immunoassay.  
J Biochem. 1990 Dec;108(6):960-4.
- Hashida et al, 1991 Hashida, S., Tanaka, K., Yamamoto, N., Uno, T., Yamaguchi, K. and Ishikawa, E  
Detection of one attomole of [Arg8]-vasopressin by novel noncompetitive enzyme immunoassay (hetero-two-site complex transfer enzyme immunoassay)  
J. Biochem. 110 : 486-492 (1991)
- Hashida et al, 1995 Hashida S, Hashinaka K, Ishikawa E.  
Ultrasensitive enzyme immunoassay.  
Biotechnol Annu Rev. 1995;1:403-51.
- Kato et al, 1975 Kato K, Hamaguchi Y, Fukui H, Ishikawa E.  
Enzyme-linked immunoassay. II. A simple method for synthesis of the rabbit antibody-beta-D-galactosidase complex and its general applicability.  
J Biochem. 1975 Aug;78(2):423-5.
- Kim et al, 2012 Kim SH, Iwai S, Araki S, Sakakihara S, Iino R, Noji H.  
Large-scale femtoliter droplet array for digital counting of single biomolecules.  
Lab Chip. 2012 Dec 7;12(23):4986-91. doi: 10.1039/c2lc40632b.
- Mandecki et al, 1991 Mandecki W, Shallcross MA, Sowadski J, Tomazic-Allen S.  
Mutagenesis of conserved residues within the active site of Escherichia coli alkaline phosphatase yields enzymes with increased kcat.  
Protein Eng. 1991 Oct;4(7):801-4.
- Numata et al, 2016 Numata S, Katakami H, Inoue S, Sawada H, Hashida S.  
Development of a novel ultrasensitive enzyme immunoassay for human glutamic acid decarboxylase 65 antibody.  
Ann Clin Biochem. 2016 Jul;53(Pt 4):495-503. doi: 10.1177/0004563215609639.
- Rissin et al, 2010 Rissin DM, Kan CW, Campbell TG, Howes SC, Fournier DR, Song L,

- Piech T, Patel PP, Chang L, Rivnak AJ, Ferrell EP, Randall JD, Provuncher GK, Walt DR, Duffy DC.  
Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations.  
Nat Biotechnol. 2010 Jun;28(6):595-9. doi: 10.1038/nbt.1641.
- Sano et al, 1992                      Sano T, Smith CL, Cantor CR.  
Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates.  
Science. 1992 Oct 2;258(5079):120-2.
- Umehara et al, 2009              Umehara A, Nishioka M, Obata T, Ebina Y, Shiota H, Hashida S.  
A novel ultra-sensitive enzyme immunoassay for soluble human insulin receptor ectodomain and its measurement in urine from healthy subjects and patients with diabetes mellitus.  
Clin Biochem. 2009 Sep;42(13-14):1468-75.
- Yalow and Berson, 1960      Yalow RS, Berson SA.  
Immunoassay of endogenous plasma insulin in man.  
Obes Res. 1996 Nov;4(6):583-600.
- Yamamoto et al, 2018          Yamamoto M, Fujimoto Y, Hayashi S, Hashida S.  
A study of high-, middle- and low-molecular weight adiponectin in urine as a surrogate marker for early diabetic nephropathy using ultrasensitive immune complex transfer enzyme immunoassay.  
Ann Clin Biochem. 2018 Jan 1:4563217748681. doi: 10.1177/0004563217748681.
- Yoshitake et al, 1982          Yoshitake S, Imagawa M, Ishikawa E, Niitsu Y, Urushizaki I, Nishiura M, Kanazawa R, Kurosaki H, Tachibana S, Nakazawa N, Ogawa H.  
Mild and efficient conjugation of rabbit Fab' and horseradish peroxidase using a maleimide compound and its use for enzyme immunoassay.  
J Biochem. 1982 Nov;92(5):1413-24.
- Zhou et al, 1993                  Zhou H, Fisher RJ, Papas TS.  
Universal immuno-PCR for ultra-sensitive target protein detection.  
Nucleic Acids Res. 1993 Dec 25;21(25):6038-9.

## 6 謝辞

本研究にあたり、直接の御指導を頂いた徳島文理大学 健康科学研究所 橋田誠一教授に深謝致します。また、ご協力を頂きました、徳島文理大学 橋田研究室の皆様から心から感謝いたします。



## Abstract

Immune complex transfer enzyme immunoassay (ICT-EIA) is one of the technologies which enables ultrasensitive measurements of protein biomarkers. The ICT-EIA uses two types of beads and sandwich-shaped immune complexes are transferred from the 1<sup>st</sup> bead to the 2<sup>nd</sup> bead in the assay.

The purpose of the study is to reveal the reason why the ICT-EIA achieves ultrasensitive measurements by making a detailed comparison between conventional sandwich enzyme immunoassay (Sand-EIA) and ICT-EIA. ICT-EIAs for cytokines were developed and the sensitivities were compared with the sandwich EIAs. ICT-EIAs had about 100 times higher sensitivities because of markedly decreased non-specific signals derived from non-specific binding of detection antibody conjugates onto the polystyrene bead.

In order to higher the sensitivities of ICT-EIAs, PEG spacers were introduced to the antibody conjugates. Biotin (Mw=244) is labeled to capture antibodies in a conventional Sand-EIA. On the other hand, Fab' (Mw=46kDa) is conjugated with BSA (Mw=66kDa) which is labeled with Biotin and DNP (Mw=478) in ICT-EIAs. PEG spacers were used in binding of Fab' and BSA to avoid their steric hinderance. PEG spacer introduced conjugates increased specific signals of ICT-EIAs for 4 different biomarkers and the highest improvement was observed in insulin which is the smallest molecule. These results support the idea of steric hinderance in protein-protein conjugates and benefits of introducing PEG spacers.

Another transfer method of immune complexes was also investigated. DNP-Anti DNP antibody binding is used in an ICT-EIA, because the binding is not so strong and DNP can be released with sufficient amount of DNPs. Reductive reaction of S-S bond is used in an another ICT-EIA. Both ICT-EIAs showed almost the same sensitivities.

We clarified a mechanism of improved sensitivities in ICT-EIAs and these results have enabled us to show the importance of reducing non-specific signals in EIAs to obtain higher sensitivities. This methodology should be more valuable if combined with a different label detection system such as digital counting or immuno-PCR, which may enable the detection of single target protein molecules in the near future.

