

抗体工学を基盤とする
超高感度ハプテン免疫メトリックアッセイへのアプローチ

小林典裕,^{*,a} 加藤芳徳,^a 大山浩之,^a 後藤順一^{b,c}

Antibody Engineering-Based Approach for Hapten Immunometric Assays with High Sensitivity

Norihiro KOBAYASHI,^{*,a} Yoshinori KATO,^a Hiroyuki OYAMA,^a and Junichi GOTO^{b,c}

^aKobe Pharmaceutical University, 4-19-1 Motoyama-Kitamachi, Higashinada-ku, Kobe City 658-8558, Japan, ^bDepartment of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University Hospital, 1-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai City 980-8574, Japan, and ^cGraduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Aramaki, Aoba-ku, Sendai City 980-8578, Japan

(Received October 5, 2006)

The trace characterization of physiologically active substances with low molecular weight (*e.g.*, steroids, catecholamines, prostaglandins, and oligopeptides), which are classified as “haptens”, is an important subject in clinical analysis, and competitive immunoassays have conventionally been used for this purpose. However, the subfemtomole-range determination of haptens is very difficult, as the sensitivity of competitive immunoassays is essentially limited by the affinity of the anti-hapten antibodies that barely reaches the range of 10^{11} (1/mol) as the affinity constant (K_a). Although a noncompetitive “immunometric assay” format, the two-site immunometric assay (sandwich immunoassay), enables even subattomole-range measurements of macromolecules such as proteins, this principle can not be directly applied to haptens, as their low molecular mass prohibits simultaneous binding by two antibody molecules. To overcome such limitations, we are required either to create artificial antibodies showing ultrahigh affinity to haptens by protein engineering of antibody molecules (“antibody engineering”) or establishment of novel immunometric assay formats applicable to haptens. This review surveys the background and recent approach for subfemtomole-range determination of haptens using novel immunometric assay methods. Our studies for the development of hapten immunometric assays are also described.

Key words—antibody engineering; haptens; immunometric assays; sensitivity; detection limit

1. はじめに

—ハプテンの Subfemtomole 測定への挑戦—

ステロイド、プロスタグランジン、カテコールアミン、オリゴペプチドなど、生体内にはごく微量で生理作用を発揮する低分子化合物が数多く存在する。これらのように、相対分子質量 M_r が 2000 にも満たない化合物は一般に免疫原性を示さず、それ自体を動物に投与してもその構造を認識する抗体は得られない。しかし、適当な高分子キャリアーと共

有結合させたのちに非経口的に投与すると抗原決定基（エピトープ）として働くため、抗体が産生されるようになる。このような化合物は、免疫化学の領域ではハプテンと総称される。

ハプテンの超微量分析法として、抗原抗体反応の特異性と親和力を利用した免疫測定法（イムノアッセイ）が重用されている。イムノアッセイは測定原理から競合法と非競合法に大別できるが、¹⁻³⁾ ハプテンはもっぱら競合法により測定されている。競合法は、測定対象の化合物（抗原）と放射性同位元素、酵素などで標識した抗原を、一定量の抗体に対して競合的に反応させるもので（Fig. 1(A)）、抗原の増量に伴って標識体の結合率が低下する。高分子物質の測定にも適用できるが、そのアッセイ感度は用いる抗体の親和定数 K_a に依存するため、femtomole

^a神戸薬科大学（〒658-8558 神戸市東灘区本山北町 4-19-1）、^b東北大学病院薬剤部（〒980-8574 仙台市青葉区星稜町 1-1）、^c東北大学大学院薬学研究科（〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉）

*e-mail: no-kobay@kobepharmaceutical-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 126 年会シンポジウム S23 で発表したものを中心に記述したものである。

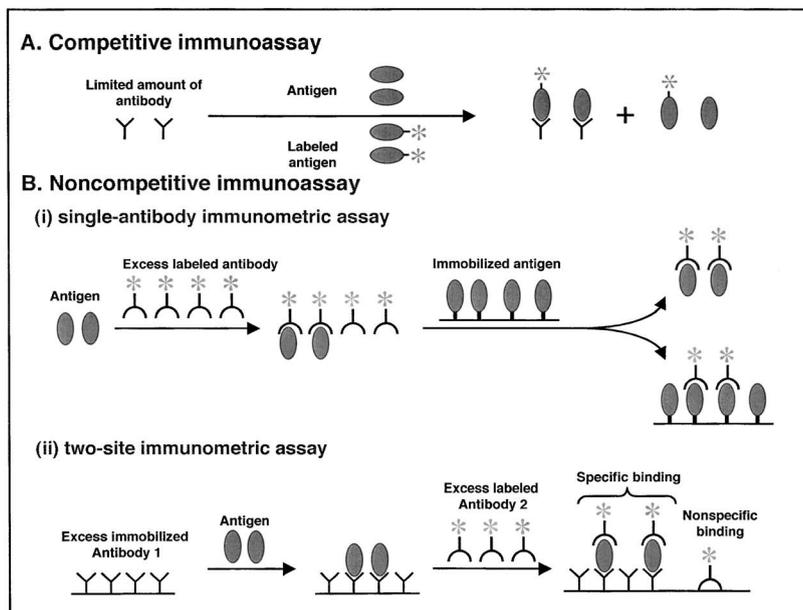


Fig. 1. Schematic Representation of (A) Competitive Immunoassays and (B) Noncompetitive Immunoassays (Immunometric Assays)

レベルを下回るごく微量の抗原を測定することは極めて困難である。^{4,5)}

一方、非競合型のアッセイ法はイムノメトリックアッセイとも呼ばれる。測定対象の抗原に、標識した抗体を過剰に加えて抗原抗体反応を行い、抗原の増量に応じて増加する免疫複合体の量を標識の活性からモニターする。単一抗体イムノメトリックアッセイ (single-antibody immunometric assay; SA-IMA) (i) と two-site イムノメトリックアッセイ (ii) に分類することができるが、いずれについても抗原量の増加に伴って標識のシグナル強度が増大する応答が得られる (Fig. 1(B))。後者はサンドイッチ法の別名で知られ、タンパク質のように、1分子上に2つ以上のエピトープを持つ高分子抗原にのみ適用できる。¹⁾ 標的抗原を固定化抗体上に捕捉し、さらに異なるエピトープを認識する標識抗体を反応させて、固相上の標識の活性を計測する。イムノメトリックアッセイは、過剰量の抗体を反応させることができるため競合法に比べて高感度化に有利であるが、特にサンドイッチ法では attomole—zeptomole レベルの測定例も報告されている。¹⁾ 異なる部分構造に対する二重の認識が働くため特異性にも優れ、精度も高く、また抗体アレイ法などのハイスループットスクリーニング系^{6,7)} やイムノセンサー⁸⁾ の構築にも適している。しかし、ハプテンの多くは分子サ

イズが小さいため、2種類の抗体分子が同時に同一のハプテン分子に結合することは不可能で、本法の適用は極めて難しい。

以上の諸問題を考慮すると、ハプテンの subfemtomole 測定を実現するためには、生体が産生する抗体よりはるかに高い親和力を有する抗ハプテン“超抗体”を人為的に創製するか、⁵⁾ ハプテンに適用が可能なイムノメトリックアッセイの新しい原理を工夫することになる。^{1,2)} 筆者らは、抗体の遺伝子工学、すなわち抗体工学の技術を積極的に採り入れながら、両方のアプローチを進めている。本稿では、これらのうちハプテンイムノメトリックアッセイへのアプローチを中心に研究の背景や現状を概説し、筆者らの研究成果についても紹介したい。なお、本総説に登場するハプテンの構造式と M_r を Fig. 2 に一括する。その大部分は臨床診断指標として測定が求められる生理活性物質である。



小林典裕

神戸薬科大学教授。1958年新潟県生まれ。1985年東北大学大学院薬学研究科博士課程修了・薬学博士。1994年～1995年ルンド大学(スウェーデン)にて文部省在外研究員として抗体工学の研究に従事。2002年4月より現職。現在の研究テーマ：抗体工学を基盤とする生体由来機能単位の創製と分析化学への応用。

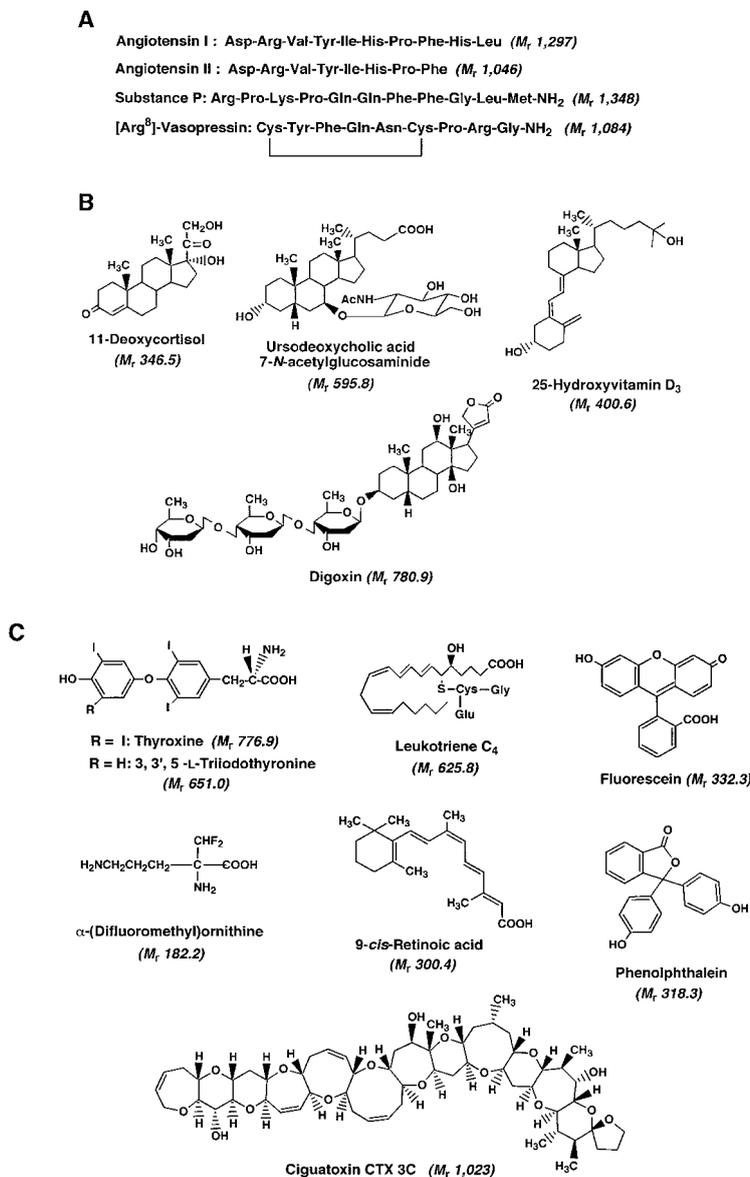


Fig. 2. Chemical Structures of the Haptens Covered in This Review Article: (A) Peptides, (B) Steroids, and (C) the Other Compounds

2. ハプテンイムノアッセイの感度

—Subfemtomole 測定への“壁”—

本節では、ハプテンイムノアッセイの感度に上記のような制約が生じる背景についてさらに詳しく述べる。

2-1. 抗ハプテン抗体の親和力とアッセイ感度
 競合型イムノアッセイの感度は、一般に用いる抗ハプテン抗体の親和力が大きいほど高くなる。抗体の抗原に対する親和定数 (K_a) と解離定数 (K_d) は次式で定義される。



$$K_a = \frac{[\text{Ag} \cdot \text{Ab}]}{[\text{Ag}] [\text{Ab}]} \quad (\text{l/mol}),$$

$$K_d = \frac{1}{K_a} = \frac{[\text{Ag}] [\text{Ab}]}{[\text{Ag} \cdot \text{Ab}]} \quad (\text{mol/l}).$$

K_a が大きいほど (K_d が小さいほど) 親和力が大きい。トリチウム標識ハプテンを用いるラジオイムノアッセイ (radioimmunoassay; RIA) のように、標識抗原がほぼ均一な構造を持ち、抗体に対して非標識抗原と等しい反応性を示す場合は、競合型イムノアッセイの標準曲線をシミュレーションすることができる。⁴⁾ すなわち、任意の非標識抗原添加濃度 (X pmol/l) における B/B_0 値 (標識抗原の結合阻

害率の尺度) は次式から算出されるが, これを基に作成された理論的な標準曲線は実験的に得られるそれとよく符合する.

$$B/B_0 = \frac{A}{X+A} \times \frac{K_d + X + A + R - \sqrt{(K_d + X + A + R)^2 - 4R(X+A)}}{K_d + A + R - \sqrt{(K_d + A + R)^2 - 4RA}} \quad (1)$$

A (pmol/l) = 標識抗原の濃度,

R (pmol/l) = 抗体の抗原結合部位の濃度,

K_d (pmol/l) = 抗体の解離定数.

Figure 3 に, 25-ヒドロキシビタミン D_3 ($25D_3$; M_r 400.6) をモデルハプテンとして, 標準曲線をシミュレーションした結果を示す. Figure 3(A) では, アッセイ反応液の体積を $500 \mu\text{l}$, 標識抗原 (^{125}I による 1:1 標識体) の濃度 A を 2 pmol/l (約 4400 dpm/assay に相当し, 現実的な値である), そして添加した標識抗原の 50% を結合するように R の値を設定 (この条件では $R = K_d + 1/2 A$ となる⁴⁾) している. K_d として 1.0×10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-15} (mol/l) の各抗体を用いた場合, K_d が小さいほど (親和定数 K_a が大きいほど) 標準曲線は左にシフトし, 感度が上昇している. そして, 抗体がアビジン-ビオチン反応と同等の親和力 ($K_d \approx 10^{-15} \text{ mol/l}$) を持つならば, 競合法の原理においても subfemtomole の感度が得られることも示されている [$25D_3$ 0.1 pg ($=0.25 \text{ fmol}$) 添加の点で既に B/B_0 (%) $< 80\%$ である]. Figure 3(B) は, ^{125}I よりも微量で追跡が可能な酵素や化学発光物質で標識した $25D_3$ を採用した場合のシミュレーションで, 感度は一層高くなり, 1 fg ($=2.5 \text{ amol}$) の検出すら可能と推定される.

ただし, 動物を抗原で免疫する従来の方法で, その K_a 値が 1×10^{11} (1/mol) を上回るような高親和力の抗ハプテン抗体が得られることは, 抗体がモノクローナル性かポリクローナル性かを問わず, 極めて稀である. $K_a = 1.7 \times 10^{12}$ (1/mol) のマウス抗ジゴキシン抗体を得たとする報告もあるが,⁹⁾ こうした高親和力抗体を確実に得るための戦略は見当たらない. このためアッセイに用いられる抗ハプテン抗体の K_a 値は一般的には $1 \times 10^8 - 10^{10}$ (1/mol) の範囲であり, 結果としてハプテインムアッセイの感度は femtomole のレベルに留まってい

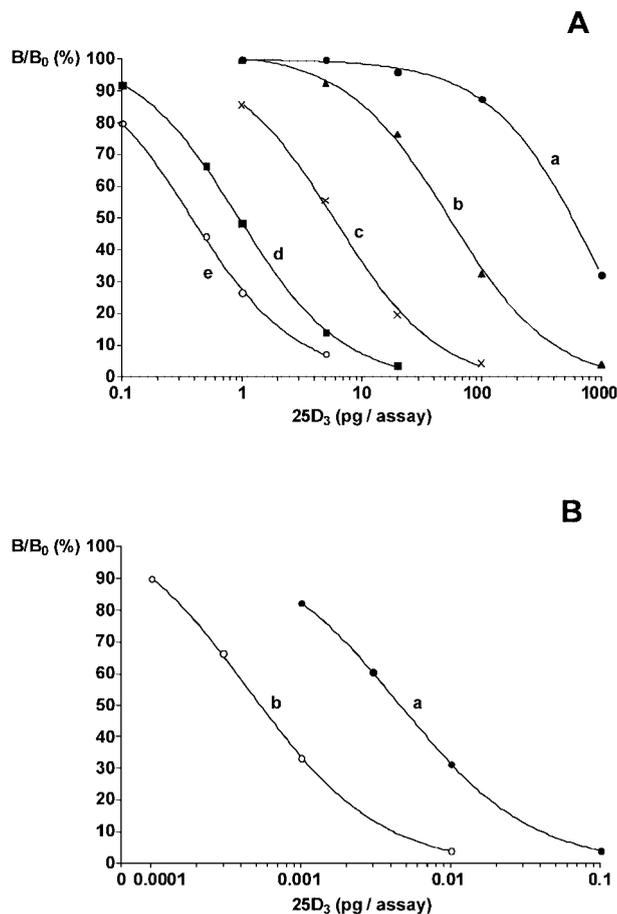


Fig. 3. Theoretical Standard Curves of Competitive Immunoassays for 25-Hydroxyvitamin D_3 ($25D_3$) Constructed on the Following Assumption

(A) ^{125}I -labeled $25D_3$ (molar ratio 1:1) is used as the labeled antigen at the concentration (A) of 2 pmol/l under the 50% saturation ($B_0/T=50\%$) condition (a–e), in combination with the antibody whose K_d is (a) 1.0×10^{-9} , (b) 1.0×10^{-10} , (c) 1.0×10^{-11} , (d) 1.0×10^{-12} , or (e) $1.0 \times 10^{-15} \text{ mol/l}$. (B) The antibody ($K_d=1.0 \times 10^{-15} \text{ mol/l}$) is used under the 50% saturation ($B_0/T=50\%$) condition (a and b), in combination with (a) an acridinium ester-labeled $25D_3$ at the concentration (A) is $2.0 \times 10^{-2} \text{ pmol/l}$ or (b) with an enzyme-labeled $25D_3$ (molar ratio 1:1) at the concentration (A) is $8.0 \times 10^{-5} \text{ pmol/l}$. All the competitive antigen-antibody reactions (both A and B) are assumed to be carried out in a $500 \mu\text{l}$ assay medium. The abbreviations, B , B_0 , T are as follows: B : the signal intensity due to the bound labeled-antigen at any unlabeled antigen concentration, B_0 : the signal intensity due to the bound labeled-antigen when the unlabeled antigen concentration is zero, T : the signal intensity due to the total labeled-antigen used in the competitive reaction.

る.

2-2. 抗体工学による超高親和力変異抗ハプテン抗体の創製 抗体工学により, $K_a > 1 \times 10^{11}$ (1/mol) の抗ハプテン抗体を自在に創出できるならば, 競合法の原理でも subfemtomol レベルのハプテンを測定することが可能になる. 抗体の抗原結合部位 (パラトープ) は, 抗体分子を構成する H 鎖と L 鎖の可変部 (V_H と V_L ドメイン) の間に位置する. これらドメインは各々 110 残基あまりのアミノ

酸から構築されるが、 V_H と V_L 各々の 3 ヲ所に抗原との接触に特に重要なアミノ酸配列が存在し、相補性決定部 (complementarity-determining region; CDR) と呼ばれている。 V_H , V_L 全体あるいは CDR のアミノ酸配列に遺伝子レベルで変異を導入することにより、元の抗体 (野生型抗体) よりも親和力の高い人工抗体に改変することが可能視されている。一般に、ランダムな変異が導入された多様な抗体フラグメント [一本鎖 Fv (single-chain Fv fragment; scFv) 又は Fab] をファージ粒子や酵母の細胞表面に提示させたライブラリーを作製する。^{5,10} この中から、目的の結合特性を偶然に獲得した変異抗体を、固定化抗原を用いるアフィニティー抽出 (バイオパンニング) あるいはセルソーターを用いて単離する。ファージ提示を用いる方法については、本特集の伊藤及び藤井の稿を参照されたい。

Boder らは、フルオレセイン基に対するマウスモノクローナル抗体 ($K_d=0.7$ nmol/l) に繰り返し改変を加えることにより、その親和力を天然の抗体のそれをはるかに凌ぐレベル ($K_d=48$ fmol/l; すなわち $K_a=2 \times 10^{13}$ l/mol) にまで高めた。¹¹ しかし、このような成功例は今のところ極めて少ない。仮に変異抗体ライブラリーの中にこうした超高親和力のクローンが実在しても、固定化抗原からの溶出が難しいため、バイオパンニングにより選別することは困難と思われる。Boder らは、目的 scFv の選択、回収に抗原抗体反応の解離が不要なプロセス、すなわち酵母表面提示とセルソーターによる選択を採用して上記の成功を収めている。筆者らは最近、抗原抗体反応の解離に依存しないファージ抗体の選択法を開発した。¹² 抗体工学による超高親和力抗ハプテン抗体の創製の効率を実用的なレベルまで高めるためには、こうした各ステップの徹底的な tuning up が必須であり、一層の研究が必要と思われる。

2.3 ハプテンサンドイッチ型イムノメトリックアッセイ サンドイッチ法はタンパク質の超高感度測定法として定着しているが、ハプテンの測定に用いることは難しい。分子サイズが小さいため、固定化抗体と標識抗体の間に立体障害が働き、両抗体が同じハプテン分子に同時に結合できないからである。アンジオテンシン II (AGII; M_r 1046),¹³ シガトキシン CTX3C (M_r 1023)¹⁴ についてサンドイッチ法が報告され、本法が成立する分子サイズの下

限としての指標になる。これらは一方向に長い分子構造を持つため、2つの抗体が同時に結合するうえで特に有利と考えられるが、一般論として、 $M_r < 1000$ の場合、サンドイッチ法を直接適用することは極めて困難であろう。この制約を克服するべく、ハプテンを対象とする新しいイムノメトリックアッセイ系が種々考案されるようになった。

3. ハプテンイムノメトリックアッセイ

3-1. ハプテンイムノメトリックアッセイの原理

これまでに報告されたハプテンイムノメトリックアッセイのほとんどは、3種類 (A, B, C) の原理のいずれかに基づいている (Fig. 4).¹⁾ 原理 A は、測

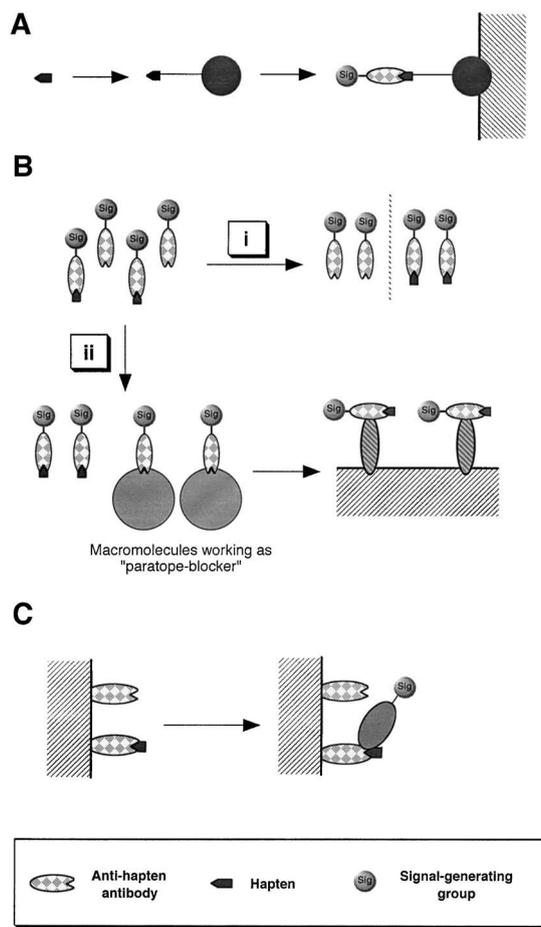


Fig. 4. Classification of Reported Hapten Immunometric Assays Based on the Assay Principle

(A) The assays including a chemical modification of hapten molecules to allow sandwich-type detection. (B) The improved single-antibody immunometric assays (SA-IMAs) (i) separating immune complex and excess labeled antibodies using hapten-immobilized affinity-column or based on the difference in their physical property and (ii) its variation based on masking of unoccupied antibodies by immunoreactive macromolecules that work as "paratope blocker" followed by selective capture and detection of the hapten-occupied antibodies. (C) The assays employing a probe molecule specific to a hapten-antibody complex.

定対象のハプテンに化学修飾を施して第2のエピトープを連結し、2価抗原に導くものである。エピトープの導入が定量的であることと、ハプテンと新たなエピトープの間に十分な隔たりがあることが求められる。原理Bは、前述の単一抗体イムノメトリックアッセイ (SA-IMA)¹⁾で、実は、ハプテンにも適用できる非競合法として従来から知られていた。測定対象の抗原に過剰量の標識抗体を反応させて定量的に抗原抗体複合体に導いたのち、未反応の標識抗体を何らかの方法で分離・除去する。反応液に固定化抗原を加えて吸収させることが多い。しかし、比較的大量の固定化抗原を継続的に供給することが必要で、また、過剰の標識抗体を吸着する際に固定化抗原が既に抗体に捕捉された遊離の抗原と交換して感度を損なう。こうした難点を改善し、実用的なハプテンのSA-IMA系を開発する試みが種々報告されている。原理Cは、ハプテンと抗ハプテン抗体の複合体を特異的に認識するプローブを用いるものである。後述する抗メタタイプ抗体がプローブとして用いられる。

なお、最近、A—Cのどの原理にも該当しないユニークなアッセイ系 (オープンサンドイッチアッセイ) が開発された。^{15,16)} 遺伝子工学的に調製される抗体のV_HとV_Lドメイン断片が、ハプテンの介在で3成分複合体 (ハプテン-V_H-V_L) を形成することに基づくアッセイ系である。以下に述べるほとんどのアッセイ系が抗原抗体反応後に過剰の試薬の分離操作 (B/F分離) を必要とするのに対して、こ

れが不要な“ホモジニアスアッセイ”である点が特に注目される。本法については、本特集の上田の稿を参照されたい。

3-2. ハプテンイムノメトリックアッセイの報告例 これまでに報告されたハプテンイムノメトリックアッセイのうち、重要なものについてその概要を紹介する。より詳細については筆者らの総説^{1,2)}を参照されたい。

3-2-1. Heterosandwich Immunoassay^{17,18)} 原理Aの例である。ハプテンイムノメトリックアッセイ開発のさきがけとなった方法で、Ishikawaらにより1980年代末に既に報告されている。測定対象はアミノ基を持つハプテンに限られるが、活性エステル化したカルボキシ基を有するビオチン化試薬を反応させて、ハプテン基とビオチン基が十分な長さのスペーサーにより連結された化合物に誘導する (Fig. 5(i)). 反応液を、抗ハプテン抗体を固定化したカラムに付して過剰のビオチン化試薬を除いたのち(ii)、ビオチン化ハプテンを固定化アビジン上に捕捉し、酵素標識した抗ハプテン抗体により検出する(iii)。検出限界は、アンジオテンシンI (M_r 1297) と [Arg⁸]-バソプレッシン (M_r 1084) の測定について各々 10 amol/assay, 50 amol/assay で、¹²⁵I 標識抗原を用いるRIAに比べ100倍高感度であった。これらのような低分子ペプチドのほか、チロキシンの測定にも応用されている。

3-2-2. Solid-phase Immobilized Epitope Immunoassay¹³⁾ 前項と同様に標的ハプテンのアミ

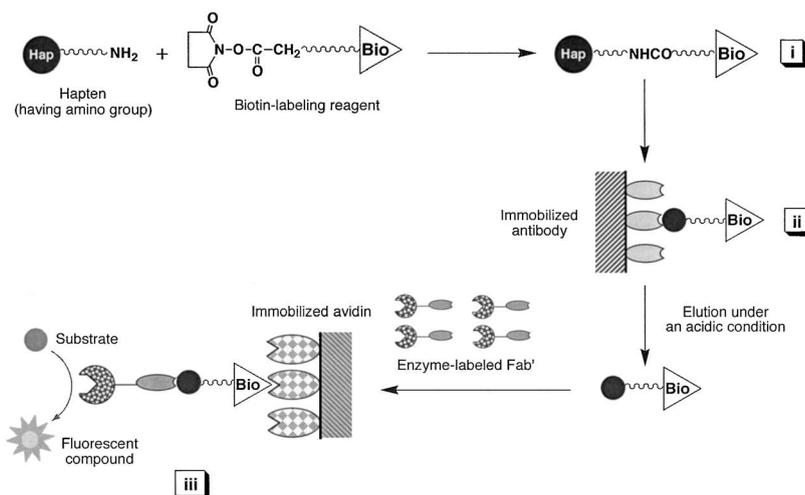


Fig. 5. Principle of Noncompetitive “Heterosandwich Immunoassay” for Haptens Based on Quantitative Biotin-labeling of the Target Molecules

ノ基への化学反応を利用しているが、原理 A の変法と言えるユニークなアッセイ系である。まず、標的ハプテンを過剰量の抗ハプテン抗体を固定化したマイクロプレート上に捕捉する (Fig. 6 (i))。ついで、アミノ基の架橋試薬(グルタルアルデヒドなど)を反応させて、ハプテンをプレートに吸着されている抗体やブロッキング用タンパク質に連結する (ii)。その後、酸又はアルカリで処理してハプテンを抗体のパラトープから解離させ (iii)、これに酵素で標識した抗体を反応させて検出する (iv)。この標識抗体はプレートに固定化したものと同じ抗体でよい。ロイコトリエン C₄、チロキシシン、サブスタンス P などに適用され、競合法に比べ 10—300 倍高

感度で、検出限界はおよそ 0.2—0.8 fmol/assay である。

3-2-3. フローインジェクション/SA-IMA
原理 B に基づく SA-IMA の改良法である。未反応の標識抗体を除去するために用いるハプテン固定化カラムをフローインジェクション系に組み込んだシステムを利用する (Fig. 7)。オンライン化のメリットに加え、未反応の標識抗体を吸着する反応が迅速化されるために上述の交換反応がある程度抑えられるものと期待できる。抗がん剤の α -(difluoromethyl) ornithine (DFMO) への応用例では 200 amol の感度が得られている。¹⁹⁾ 過剰のペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗 DFMO 抗体を反応させたの

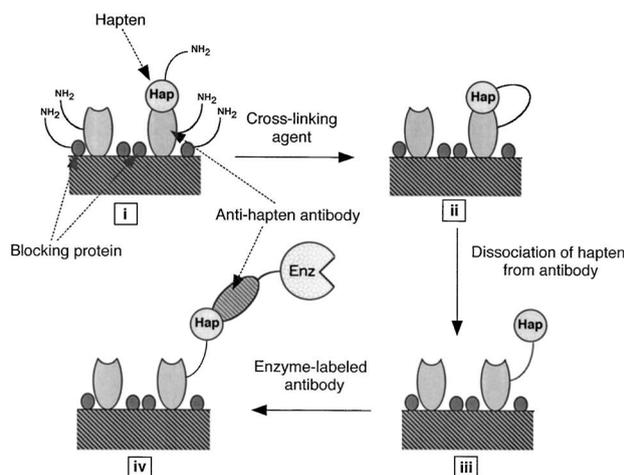


Fig. 6. Principle of the Solid-phase Immobilized Epitope Immunoassay (SPIE-IA)

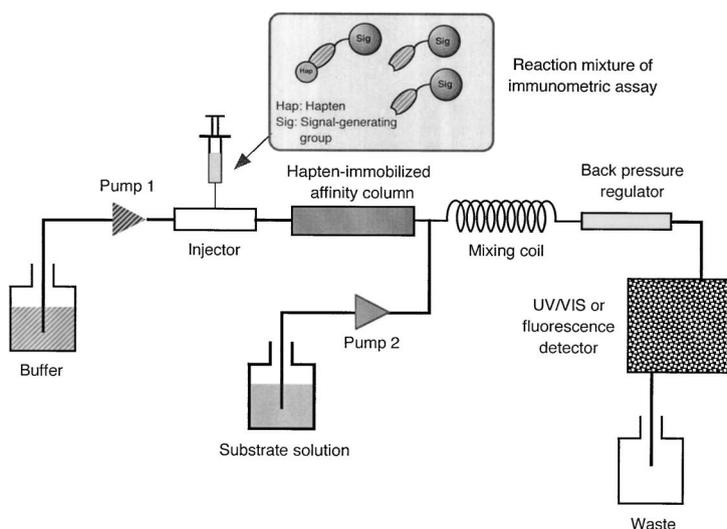


Fig. 7. Schematic Representation of the Flow Injection Immunometric Assay

ち、反応液をフロー系に注入して未反応の標識抗体を吸着する。抗原抗体複合体に基づく HRP 活性は、ミキシングコイル内で蛍光性基質を作用させることにより測定されている。DFMO 固定化カラムは 12—15 回の連続使用が可能で、そののち酸性の緩衝液を流して再生する。

3-2-4. “高分子量パラトープブロッカー”を利用するアッセイ系 未反応の標識抗体を分離、除去する代わりに、立体障害を利用してそのパラトープを飽和させることに基づく方法も SA-IMA の一方法とみることができる。Piran らは、Fig. 8 のようなトリヨードチロニン (T_3) の測定法を考案した。²⁰⁾ まず、化学発光性物質であるアクリジニウムエステル (AE) で標識した抗 T_3 抗体を T_3 に反応させたのち (i), T_3 のアナログ (T_2) を結合させたガラス粒子を加えて未反応の抗体を捕捉する (ii)。ついで、抗 AE 抗体を固定化した磁性ビーズを添加すると、 T_3 と AE 標識抗 T_3 抗体の複合体が選択的に結合する (iii)。ガラス粒子と磁性ビーズの間に大きな立体障害が働くためと考えられる。最後に磁性ビーズに捕捉された AE に基づく化学発光を測定する。同じ AE 標識抗 T_3 抗体を用いる競合型化学発光イムノアッセイに比べて約 10 倍高感度で、検出限界は $0.005 \mu\text{g/l}$ (約 70 amol/assay) である。

3-2-5. 抗イディオタイプ抗体を活用するアッセ

イ系 未反応のパラトープを飽和させるブロッカーとして抗イディオタイプ抗体 (抗 Id 抗体) を用いる方法である。抗 Id 抗体は、特定の抗体 (第 1 抗体) の可変部に結合する、“特殊な”第 2 抗体である。^{10,21)} 可変部のフレームワーク領域に結合し、第 1 抗体が認識する本来の抗原と同時に結合できるものを α 型、パラトープに結合し抗原と競合するものを β 型と分類する。^{10,21,22)} Figure 9 (A) のように、標的ハプテンを過剰量の固定化抗ハプテン抗体で捕捉したのち (i), β 型の抗 Id 抗体 (β -Id) で未反応のパラトープを飽和させ (ii), 酵素などで標識した α 型の抗 Id 抗体 (α -Id) を加えると、ハプテンを捕捉している抗体のフレームワーク (立体障害がより小さい) に選択的に結合する (iii)。その結果、ハプテン量の増加に伴って標識のシグナル強度が増大し、非競合型アッセイが成立する。Figure 9 (B) のような別法も可能である。Barnard らは、これらの原理を “idiometric assay” と呼び、ステロイド類の測定に応用した。標識にはユウロピウムキレートを用い、時間分解蛍光測定を行っているが、検出限界は 1—数十 femtomole の範囲である。

筆者らも、Fig. 9 (A) の原理に基づいて、胆汁酸代謝物であるウルソデオキシコール酸 7-*N*-アセチルグルコサミニドのヒト尿中レベルの測定を試みた。^{23,24)} α -Id の標識にはビオチンを用い、その固相

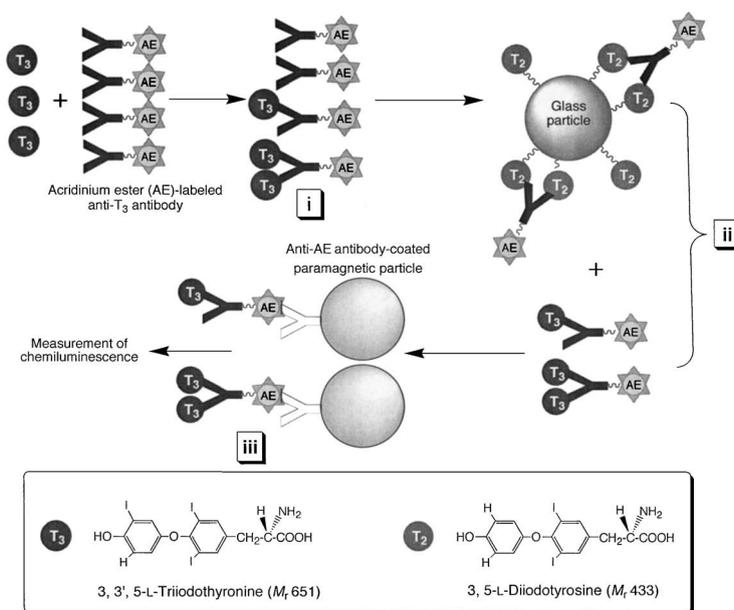


Fig. 8. Schematic Representation of the Immunometric Assay of Triiodothyronine Using a Solid-phase Immobilized Hapten Analog for Masking Unoccupied Antibodies

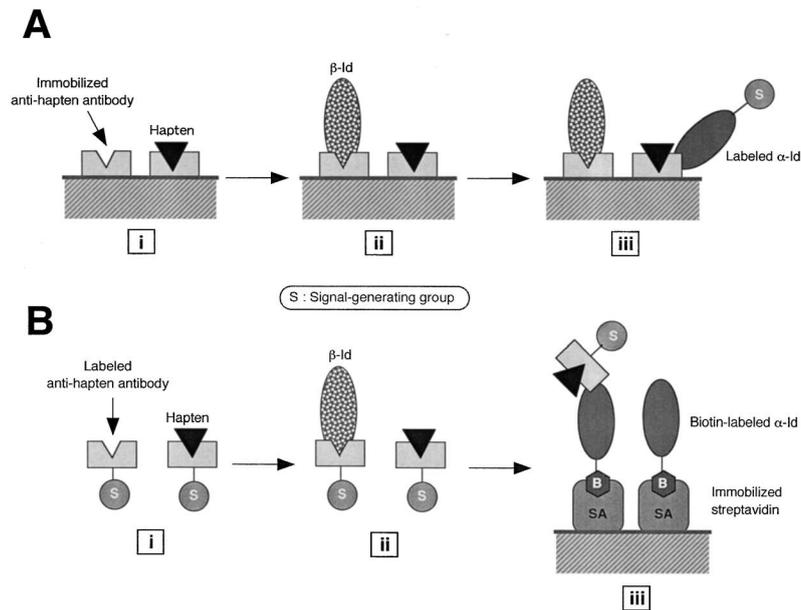


Fig. 9. Hapten Immunometric Assay Procedures (A and B) Using a Combination of the α -Type and β -Type Anti-idiotypic Antibodies (α -Id and β -Id) Each Recognizing the Framework and Paratope of the Anti-hapten Antibody

上への結合は HRP 標識ストレプトアビジンによりモニターした。HRP 活性は比色法により測定したが、118 amol/assay の検出感度を達成した。特異性も優れており、前処理を行うことなくヒト尿試料に適用することができた。なお、下垂体副腎系機能の診断指標として有用な副腎皮質ステロイドである 11-デオキシコルチゾール (11-DC) についても同様の成績を得ている。²⁵⁾ 抗 Id 抗体の調製はかならずしも容易ではないが、最近、変異抗体ライブラリーから迅速かつ効率よく選択した報告がなされ、²⁶⁾ 注目される。

3-2-6. 抗メタタイプ抗体を用いる免疫複合体の特異的モニタリング Voss Jr. らは、フルオレセイン (FL) と抗 FL 抗体の免疫複合体を特異的に認識して結合する抗体を発見し、抗メタタイプ抗体 (抗 Met 抗体) と命名した。^{27,28)} 抗 Met 抗体を利用すれば、原理 C に基づくアッセイ系 (Fig. 10(A), (B)) を構築することができる。前項の方法より直接的で理想的なアッセイ系と言えるが、抗 Met 抗体の調製は極めて困難であるため、本法によるハプテンの測定は数例に過ぎない。Self らはジゴキシン (Dig) と抗 Dig 抗体の複合体に対して抗 Dig 抗体単独に比べ 2000 倍以上も強く反応する抗 Met 抗体を得ることに成功し、実用的な Dig のアッセイ法を開発した。²⁹⁾ Figure 10(A) の原理によるアッセイ

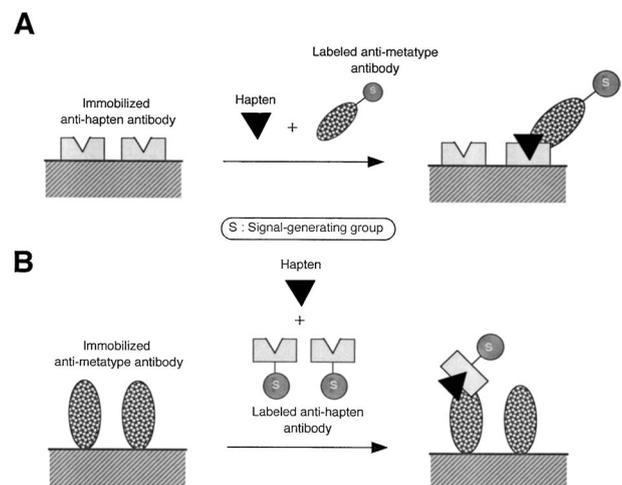


Fig. 10. Hapten Immunometric Assay Procedures (A and B) Using Anti-metatype Antibody Recognizing the Immune Complex between a Hapten and the Anti-hapten Antibody

系で、“anti-complex assay” と命名している。Dig とアルカリホスファターゼ (ALP) 標識抗 Met 抗体は同時にマイクロプレートに添加され、室温、10 分のインキュベーションののちに固相上の ALP 活性が酵素サイクリング法により測定されている。検出限界は $0.03 \mu\text{g}/\text{l}$ (約 $1 \text{ fmol}/\text{assay}$) で、インキュベーションを 1 分に短縮してもほぼ同等の感度が得られている。また、Townsend らは AG-II の測定に Fig. 10(B) の原理を応用し、“metatypic assay” と

して報告した.³⁰⁾ 標識には前出の AE を採用し化学発光検出を行っている. 検出限界が 1 pg/ml (約 50 amol/assay) と高感度で, サンドイッチアッセイに似た二重の認識により, AG-II の N 末端, C 末端とも認識するアッセイ系の確立に成功している.

最近, 変異 scFv のライブラリーからモルヒネ-抗モルヒネ抗体 (Fab フラグメント) 複合体を認識する scFv 分子種を単離し, イムノメトリックアッセイに応用した報告がなされた.³¹⁾ 標準曲線は ng/ml レベルに留まっているが, 蛍光共鳴エネルギー転移現象 (fluorescence resonance energy transfer; FRET) を利用したホモジニアスアッセイである点が注目される. こうした変異抗 Met 抗体が容易に得られるようになれば, この領域の研究は大きく進展するものと期待される.

4. ScFv-酵素融合タンパク質を用いたステロイドの超高感度イムノメトリックアッセイ³²⁾

4-1. 研究の背景 前節で紹介したように様々なアッセイ系が試みられているが, SA-IMA の測定原理は高感度化を図るうえで本質的なポテンシャルを有するものと考えられる. すなわち, 目的ハプテンを過剰量の標識抗体で捕捉したのち, 未反応の標識抗体を完全に分離・除去することが可能ならば, 標識に用いるシグナルグループのそれに匹敵する検出感度が得られるはずである. EIA に汎用される酵素ならば subattomole の検出も容易であるため,^{33,34)} これらで標識した抗体を用いる単一抗体イムノエンザイモメトリックアッセイ (single-antibody immunoenzymometric assay; SA-IEMA) は極めて高感度になるものと期待される. しかし, 従来のように抗体と酵素を架橋試薬で化学的に連結して得られる酵素標識抗体では, 抗体と酵素の結合モル比の制御や未反応の抗体, 酵素の除去が困難で, このため十分なアッセイ感度が得られない.

この問題点を解決するうえで, 遺伝子工学的に調製することができる scFv と酵素の融合タンパク質は有用と期待される. すなわち, scFv と酵素がモル比 1 : 1 で直結した構造であることが保証されているうえ, 遊離の scFv や酵素の混入を最少に抑えることが可能なため理想的な標識抗体となり得る. 以上の観点から, 筆者らは, 前述の副腎皮質ステロイド, 11-DC をモデルハプテンとして取り上げ, scFv と ALP の融合タンパク質を調製し, マイクロ

プレートで反応を行う ELISA 型の SA-IEMA 系を開発した.

4-2. 11-DC に特異的な scFv-ALP の融合タンパク質の調製 筆者らは既に, マウスモノクローナル抗 11-DC 抗体 (CET-M8) の V_H と V_L ドメイン遺伝子をリンカー配列を介して連結した scFv 遺伝子をクローニングしている.³⁵⁾ その産物である可溶性 scFv タンパク質は, 11-DC に対して CET-M8 抗体と同等の特異性と親和力を示す. そこで, 本 scFv 遺伝子を大腸菌からクローニングした ALP 遺伝子と直結させて融合遺伝子とし (Fig. 11 (A)), 大腸菌に発現させた. ペリプラズム抽出液中に得られる scFv-ALP 融合タンパク質を, C 末端に導入した FLAG タグを利用して精製し, SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析した結果を Fig. 11 (B) に示す. 予想される M_r (約 75 kDa) の位置にバン

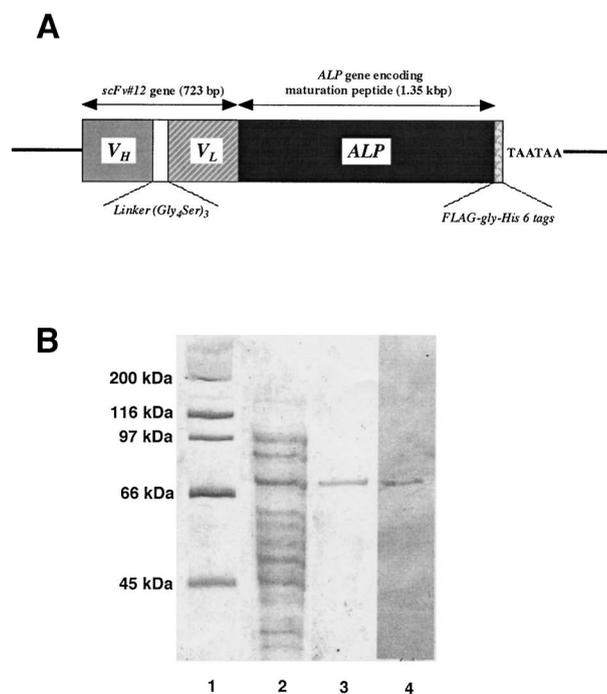


Fig. 11. (A) Diagrammatic Representation of the Chimera Construct Combining the Open Reading Frames of scFv against 11-DC and ALP Derived from *E. coli* RM39A Strain Followed by the FLAG and His 6 tag Sequences and (B) SDS-PAGE of the scFv-ALP Fusion Protein before and after Purification by Affinity Chromatography

Lane 1: M_r marker, 2: before purification, 3: after purification (Coomassie brilliant blue staining). Immunoblotting (lane 4: after purification) was performed as follows: after separation on the gel, proteins were transferred to a PVDF membrane and the fusion protein was detected by the sequential incubations with the anti-FLAG M2 antibody and an HRP-labeled second antibody. Bound HRP activity was visualized using H₂O₂ and 4-chloro-1-naphthol as substrates.

ドが認められ、HRP 標識抗 FLAG 抗体をプローブに用いたイムノブロットングにおいても明瞭な発色を示した。またこの精製標品は、十分な抗原結合活性と酵素活性を保持していた。

4-3. ScFv-ALP 融合タンパク質を用いる 11-DC イムノメトリックアッセイ系の確立 高感度な SA-IEMA を確立するためには、抗原抗体反応後に未反応の scFv-ALP を効率よく除去することが必須である。まず、従来の SA-IEMA における常法、すなわち、ハプテンとウシ血清アルブミンの結合体 (11-DC-BSA) を固定化したマイクロプレートに吸着させる方法を採用し、11-DC の添加によるシグナル (結合型酵素活性) の増強を調べた。種々の量の 11-DC と一定量の scFv-ALP を反応させたのち、反応液の一部を 11-DC-BSA 固定化プレートに移してさらにインキュベーションを行い、その上清の ALP 活性を蛍光光度法 (市販の “AttoPhos substrate” 基質を使用) で測定した。しかし、バックグラウンド値 (11-DC 添加量が 0 のときのシグナル) が著しく高いうえ、11-DC の増量に応じた ALP 活性の上昇も認められない (Fig. 12(A))。この結果は、11-DC への結合活性を持たず、かつ ALP 活性を有する妨害物質が混在することによるものと推測された。

この原因を解明するために、精製済みの scFv-ALP を緩衝液中でインキュベーションしたのち、matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)-time-of-flight (TOF) 質量分析に付したところ、主に ALP からなる C 末端側断片 (ALP, His 6 tag, FLAG を合わせた M_r は 48931.6 と予想される) の分子イオン M^+ 及びその 2 量体 $[M-M]^+$ とみられるピーク (各々、 m/z 約 49000 付近と約 98000 付近) が観測された。この結果は、scFv と ALP の連結部の付近は切断 (プロテアーゼによるものと考えられる) され易く、アッセイのインキュベーション中に遊離の ALP が生じることを強く示唆する。すなわち、“単独の scFv 又は酵素の混入によるアッセイ感度の低下に問題がない” という当初の期待に反する結果である。

このバックグラウンドの問題は、滅菌した緩衝液の使用や市販のプロテアーゼ阻害剤の添加によっても改善されなかったため、抗 Id 抗体の活用を試みた。筆者らは、CET-M8 抗体に対する α -Id と β -Id

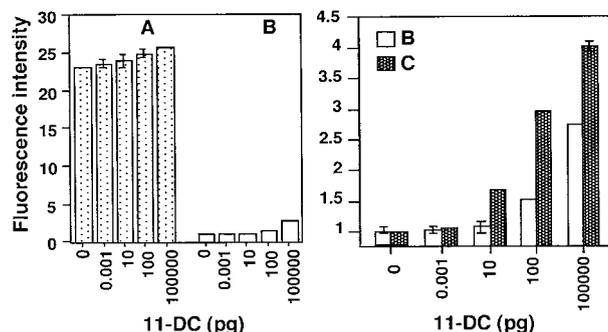


Fig. 12. Dose-response Relationships of 11-DC IEMAs Performed under Various Conditions

The vertical bars indicate the SDs ($n=4$). (A) scFv-ALP (200 fmol) and 11-DC (0 g, 1 fg, 10 pg, 100 pg, or 100 ng) were incubated in 55 μ l assay buffer in a standard microplate at 37°C for 2 h. An aliquot of this solution (50 μ l) was transferred to the 11-DC-BSA-coated plate, which were incubated for an additional hour at 37°C. An aliquot of the supernatant (45 μ l) was mixed with the AttoPhos substrate solution (10 μ l) and fluorescence intensity was measured. (B) The assay was performed as described above, but the aliquot of 11-DC-BSA-coated plate supernatant (45 μ l) was instead transferred to the α -Id-coated (indirectly via an anti-mouse IgG antibody) standard microplate. After incubation at 37°C for 30 min, the plate was washed five times. Water (90 μ l) and AttoPhos substrate solution (10 μ l) were added to each well and fluorescence intensity was measured. (C) The assay was performed according to the optimized procedure described in Fig. 13.

をマウスモノクローナル抗体として調製しているが、²⁵⁾ これらは scFv (可変部そのものである) にも反応する。上記のように 11-DC と scFv-ALP の反応を行い、反応液を 11-DC-BSA 固定化プレートに反応させたのち、その上清の一部を、ウサギ抗マウス IgG 抗体を介して α -Id を間接的に固定化したプレートに添加して、11-DC と scFv-ALP の複合体を捕捉した。未反応の成分 (切断反応により生じた ALP 断片を含む) を洗浄して除去したのち、固相上の ALP 活性を測定した。その結果、Fig. 12(B) のように、ハプテンの増量に応じた酵素活性の上昇が観測されたが、その程度は十分とは言い難い。これは、既に scFv-ALP に捕捉されている 11-DC が、11-DC-BSA 結合体の 11-DC 基に置換されるためと推測される。ハプテンに対する抗体が、ハプテン自体よりも BSA にブリッジを介して結合されたハプテン基により強い親和力を発揮する、いわゆるブリッジ現象³⁶⁾ も関与する問題である。

そこで、上記の β -Id を未反応 scFv-ALP の除去に用いることにした。本抗体は scFv-ALP のパラトープを認識して 11-DC 様の反応性を示すが、その親和力は BSA 結合体上の 11-DC 基に比べて弱いことが示されているため、³⁵⁾ 問題の置換反応を抑えることが可能と期待される。本 β -Id を組み込んだ

種々のバリエーションを検討した結果, Fig. 12(C)のように満足のいく用量依存性の応答を得ることができた. その至適アッセイ条件を Fig. 13 に図示する. まず 11-DC と scFv-ALP をハーフエリアのマイクロプレート内 (反応液量 $20 \mu\text{l}$; より高濃度で両者を反応させるため) で反応させ, β -Id の溶液を添加してさらにインキュベーションを行った. ついで, ヒツジ抗マウス IgG (イムノグロブリン G) 抗体を固定化した磁気ビーズを加えて, β -Id と scFv-ALP の複合体を吸着除去した. さらに, 11-DC と scFv-ALP の複合体を含む溶液を, α -Id を間接的に固定化したハーフエリアプレートに移し, 固相上に捕捉された ALP 活性を測定した. 本アッセイ系は, scFv-ALP, α -Id, β -Id の 3 種の抗体を使用し, 3-2-5 項の idiometric assay と同じ “道具立て” になってはいるが, 未反応のパラトープを飽和させて不活性化するのはではなく, ハプテン-抗体複合体から分離・除去する点が異なる.

4-4. 11-DC イムノメトリックアッセイの感度
上記のイムノメトリックアッセイ系は, 11-DC 量 $10 \text{ fg} - 100 \text{ ng}$ の広範囲に渡る標準曲線を与え (Fig. 14(A, \square)), 11-DC 添加量 0 におけるシグナルとの有意差検定 (t 検定) により求めた検出限界は 20 amol (6.9 fg) であった. この値は, CET-M8 抗体を用いた競合型 RIA, EIA の検出限界 ($5 - 10 \text{ pg}$) を大きく下回る. 本アッセイ系の感度の優越性を確認するために, Fig. 14(A(\square)) の標準曲線の作成に用いた 11-DC 標準液と scFv-ALP を使用して競合型 RIA を行った. 標識抗原には, $[^3\text{H}]$ -11-DC を用いている. その標準曲線 (Fig. 14(A) 及び (B), \bullet) は, 本 scFv の K_a 値 ($1.3 \times 10^{10} \text{ l/mol}$) と添加

した $[^3\text{H}]$ -11-DC 量を元に 2-1 項 Eq. (1) から理論的に求められる標準曲線 (Fig. 14(B), \diamond) とよい一致を示している. 実験的に得た標準曲線 (Fig. 14(A, \bullet)) では 11-DC 添加量が 10 pg 以下 ($B/B_0 > 80\%$) になると測定値の変動が大きく, 1 pg 以下では明らかに測定が不可能である. なお, 本 RIA の検出限界の目安として, B/B_0 値が 95% となる 11-DC 添加量を Eq. (1) より算出してみると 3.5 pg となる. 以上より, 確立したイムノメトリックアッセイは, 競合法ではほとんど実現不可能な感

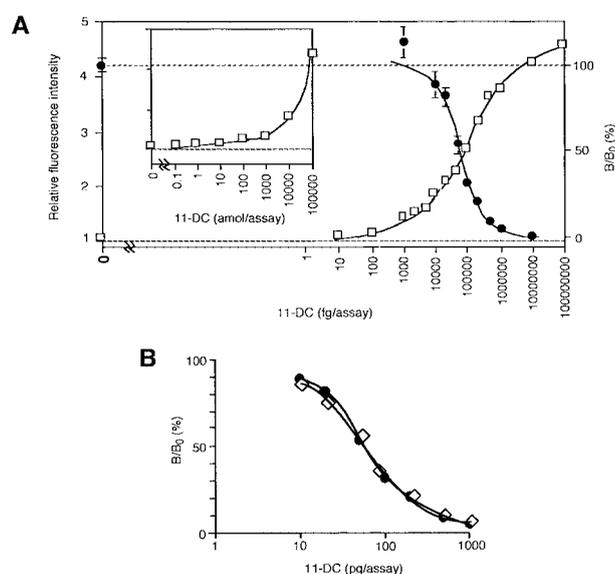


Fig. 14. Dose-response Curves of 11-DC Immunoassays

(A) Comparison of the dose-response curve of 11-DC in this IEMA (\square) to that of a competitive RIA (\bullet) [exhibited with fg/assay unit]. Both assay methods used the scFv-ALP fusion protein. The vertical bars indicate the S.D. ($n=4$). The inner square designates the extra-low dose area of the IEMA dose-response curve in amol/assay units. The coefficient of variation of the IEMA at each dose was below 4% . (B) Comparison of the dose-response curves of 11-DC in the competitive RIA obtained experimentally (\bullet) with those constructed theoretically (\diamond).

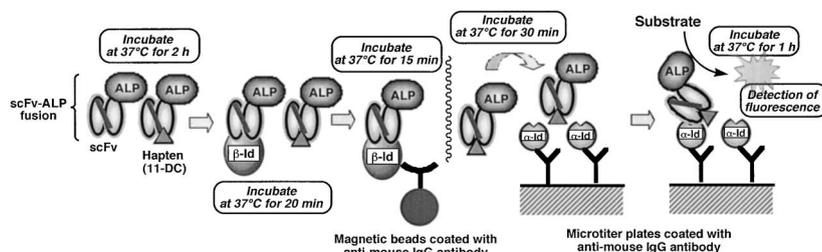


Fig. 13. Schematic Representation of the Optimized IEMA for 11-DC

Solutions of scFv-ALP ($200 \text{ fmol}/10 \mu\text{l/well}$) and an 11-DC standard ($0 - 100 \text{ ng}/10 \mu\text{l/well}$) were incubated in a half-area microplate at 37°C for 2 h. A solution of the β -Id ($6 \mu\text{g}/10 \mu\text{l/well}$) was added to the mixture and incubated at 37°C for 20 min with continuous shaking. An aliquot of this solution ($25 \mu\text{l}$) was mixed with a suspension of the second antibody-coated beads in a standard microplate. After incubation at 37°C for 15 min with continuous shaking, beads were removed by magnetic separation. An aliquot of the supernatant ($30 \mu\text{l}$) was transferred to the α -Id-coated (indirectly via an anti-mouse IgG antibody) half-area microplate and incubated at 37°C for 30 min. After washing five times, bound ALP activity was measured fluorometrically using AttoPhos substrate.

度を与えることが実証された。なお、本アッセイ系は実用に供し得る特異性も保持していた。健康人血清中 11-DC の測定を試みたところ、従来のイムノアッセイによる測定値と符合する値が得られている。

4-5. 考 察 以上のように、当初の目標であった subfemtomole レベルの感度を持つハプテン (11-DC) のイムノメトリックアッセイ系を構築することができた。これまで種々の報告がなされているが、本アッセイ系 (検出限界 20 amol) よりも高感度なステロイドの測定例は見当たらない。本研究では、新しいタイプの酵素標識抗体、scFv-ALP を採用した。しかし、4-3 項に記したように、当初の期待を覆す大きな問題点 (連結部において分解を受け易い) が示された。本研究では α タイプの抗 Id 抗体を導入することでトラブルシューティングを試み、満足いく成績を得ているが、アッセイ系が複雑化したことは否めない。抗体工学の技術を駆使して、この分解に対する耐性の高い (改良型) scFv-ALP を創製することが今後の課題である。

5. ハプテン・シクロデキストリン包接錯体に特異的な抗体フラグメントの創製とイムノメトリックアッセイへの応用

5-1. 研究の背景 ハプテンイムノメトリックアッセイの構築において、3-2-6 項で述べた抗 Met 抗体を利用する方法は非常に魅力的である。抗 Met 抗体を得るためには、目的ハプテンと抗ハプテン抗体の複合体で動物を免疫することになるが、成功例

は極めて少ない。抗体 (IgG) の分子サイズが大きく、しかもそのパラトープにハプテン分子の大部分を取り込むに十分な容積があるため、複合体の形成に伴う構造変化が小さいためと考えられる。

シクロデキストリン (cyclodextrin; CD) は、疎水性空洞を有する環状オリゴ糖で、様々な有機化合物を取り込んで包接錯体を形成する。その分子サイズは IgG に比べて格段に小さいため (7つのグルコース単位から成る β -CD では M_r 1135)、標的ハプテンとの錯体を形成する前後で大きな構造の変化が期待できる。しかし、その結合定数 K_a は $1 \times 10^2 - 10^4$ (1/mol) 程度であるため、動物に包接錯体を投与しても免疫担当細胞に認識される以前に解離する可能性が大きい。

2-2 項で述べた抗体ライブラリー法は、動物に抗原を免疫投与するプロセスを省略することが可能なため、この問題の解決に有効と期待される。¹⁰⁾ 例えばファージ提示法では、目的の結合特性を有する変異 scFv (あるいは Fab) を提示するファージクローンを、短時間で完結する *in vitro* の抗原抗体反応 (バイオパンニング) により選択するため、 K_a 値の小さい錯体についても特異的な scFv が得られる可能性がある。このような scFv は、Fig. 15 に示す“包接イムノメトリックアッセイ”系 (例として A, B の 2 種のアッセイ系を示す) を可能にするものと期待される。以上の観点から筆者らは、抗体ライブラリー法によるハプテン・CD 包接錯体に特異的な

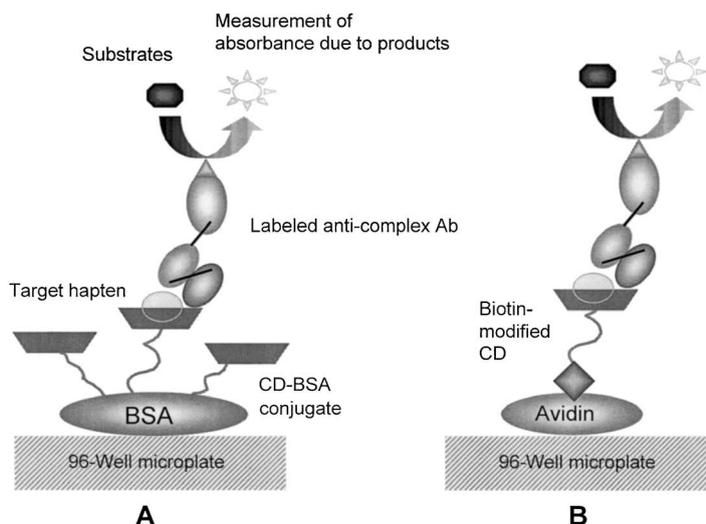


Fig. 15. Schematic Representation of “Inclusion Immunometric Assay” of Haptens Using Mutant Antibodies that Recognize a Hapten・Cyclodextrin (CD) Inclusion Complex

抗体フラグメントの創製を検討している。³⁷⁾

5-2. ハプテン・CD 包接錯体に特異的な変異抗体創製の試み 本研究では、十分な脂溶性を有し β -CD と安定な錯体 ($K_a > 1 \times 10^3$ l/mol) を形成する 9-*cis*-レチノイン酸, 25D₃, フェノールフタレインをモデルハプテンとして取り上げた. 英国 Medical Research Council (MRC) で開発された scFv 提示ファージのライブラリーを用いて, 上記のハプテンと β -CD の包接錯体に特異的な変異 scFv の探索を試みた. 本ライブラリーを構成するファージはヒトリンパ球に由来する V_H と V_L による scFv を提示しているが, CDR2, CDR3 についてランダム変異が導入されている.⁶⁾ β -CD の BSA 結合体 (β -CD-BSA) を固定化した試験管に標的ハプテンを添加して一定時間放置したのち, ファージライブラリーを加えてさらにインキュベートした. 未反応のファージを洗浄・除去したのち固相に残るファージを溶出し, 次のパンニングに用いた. このサイクルを 4 又は 5 回繰り返して得られた scFv 提示ファージをモノクローナル化し, その包接錯体認識能を Fig. 15(A) のアッセイ系で調べた. その結果, いずれのハプテンについても, その存在下で非存在下に比べ 2 倍以上強いシグナルを与える scFv 提示ファージを得ることができた. 実用的なアッセイ系を確立するためには, ハプテン存在下/非存在下で, 10 以上のシグナル強度比を示すクローンが求められよう. 今回得られた scFv をプロトタイプとして, より選択性に優れた抗ハプテン・CD 錯体 scFv を創製するべく, 研究を続けている.

6. おわりに

以上, ハプテンの高感度イムノメトリックアッセイの開発についてその現況を概説し, 筆者らの研究成果についても紹介した. イムノアッセイの基盤をなす理論や技術の大半は, 1980 年代前半までに確立されたと言ってよい. その過程で, 酵素や蛍光性キレートを標識するイムノアッセイが RIA を凌駕する勢いで普及し, 細胞融合法によるモノクローナル抗体調製法の発明はイムノアッセイの泣き所であった測定系の標準化の問題を根本的に解決した. しかし, ハプテンイムノアッセイの高感度化については, 活発な研究が展開されているものの今なお決定打となる名案はみえていない. 筆者らは, 本稿で紹介した SA-IEMA の汎用性を評価するために, 今後

も検討を重ねていく予定である. 現在, 抗体工学の発展により, 優れた機能を持つ非天然型抗体分子の創製が可能になっている. こうした“新世代の分析試薬”を活用する独創的なアプローチが, 各種ハプテンの subfemtomole 測定を標準化するに留まらず, 新たな分子センシングの開拓につながることを期待している.

謝辞 第 4 節に記した内容は, 丹羽俊文先生 (東北大学医学部保健学科助教授), 眞野成康先生 (東北大学大学院薬学研究科助教授) との共同研究の成果である. 第 4 節, 第 5 節の研究に際し, 貴重なご助言を賜りました上田 宏先生 (東京大学大学院工学系研究科助教授), 鈴木 巖先生 (東北大学大学院薬学研究科助教授) に感謝の意を表します. また, 第 5 節の研究に際し, 貴重な抗体ライブラリーを御恵与下さいました Ian M. Tomlinson 博士, Greg Winter 博士 (英国 MRC) に深謝致します. 最後に, 本研究全般を通じて終始暖かいご指導ご鞭撻を賜りました南原利夫先生 (東北大学名誉教授, 元星薬科大学学長) に慎んで感謝致します.

REFERENCES

- 1) Kobayashi N., Goto J., *Adv. Clin. Chem.*, **36**, 139–170 (2001).
- 2) Kobayashi N., Goto J., *Jpn. J. Clin. Chem.*, **33**, 90–100 (2004).
- 3) Kobayashi N., *Environ. Conserv. Eng.*, **35**, 631–638 (2006).
- 4) Wakabayashi K., “Collection of Articles on Experiments in Biochemistry,” 1st series, No. 16, Hormones, Tokyo Kagaku Dozin, Tokyo, 1977, pp. 157–171.
- 5) Kobayashi N., *Bunseki*, 551–552 (2004).
- 6) De Wildt R. M., Mundy C. R., Gorick B. D., Tomlinson I. M., *Nat. Biotechnol.*, **18**, 989–994 (2000).
- 7) Wilson D. S., Nock S., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **42**, 494–500 (2003).
- 8) Morgan C. L., Newman D. J., Price C. P., *Clin. Chem.*, **42**, 193–209 (1996).
- 9) Mudgett-Hunter M., Anderson W., Haber E., Margolies M. N., *Mol. Immunol.*, **22**, 477–488 (1985).
- 10) Kobayashi N., *Chemistry*, **58**, 53–55 (2003).

- 11) Boder E. T., Midelfort K. S., Wittrup K. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 10701–10705 (2000).
- 12) Kobayashi N., Karibe T., Goto J., *Anal. Biochem.*, **347**, 287–296 (2005).
- 13) Grassi J., Créminon C., Frobert Y., Etienne E., Ezan E., Volland H., Pradelles P., *Clin. Chem.*, **42**, 1532–1536 (1996).
- 14) Oguri H., Hirama M., Tsumuraya T., Fujii I., Maruyama M., Uehara H., Nagumo Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 7608–7612 (2003).
- 15) Suzuki C., Ueda H., Mahoney W., Nagamune T., *Anal. Biochem.*, **286**, 238–246 (2000).
- 16) Yokozeki T., Ueda H., Arai R., Mahoney W., Nagamune T., *Anal. Chem.*, **74**, 2500–2504 (2002).
- 17) Ishikawa E., Hashida S., Kohno T., Hirota K., *Clin. Chim. Acta*, **194**, 51–72 (1990).
- 18) Kohno T., Ishikawa E., *Protein Nucl. Acid Enzyme*, **37**, 144–150 (1992).
- 19) Gunaratna P. C., Wilson G. S., *Anal. Chem.*, **65**, 1152–1157 (1993).
- 20) Piran U., Riordan W. J., Livshin L. A., *Clin. Chem.*, **41**, 986–990 (1995).
- 21) Jerne N. K., Roland J., Cazenave P.-A., *EMBO J.*, **1**, 243–247 (1982).
- 22) Barnard G., Kohen F., *Clin. Chem.*, **36**, 1945–1950 (1990).
- 23) Kobayashi N., Oiwa H., Kubota K., Sakoda S., Goto J., *J. Immunol. Methods*, **245**, 95–108 (2000).
- 24) Kobayashi N., Kubota K., Oiwa H., Goto J., Niwa T., Kobayashi K., *J. Immunol. Methods*, **272**, 1–10 (2003).
- 25) Kobayashi N., Shibusawa K., Kubota K., Hasegawa N., Sun P., Niwa T., Goto J., *J. Immunol. Methods*, **274**, 63–75 (2003).
- 26) Goletz S., Christensen P. A., Kristensen P., Blohm D., Tomlinson I., Winter G., Karsten U., *J. Mol. Biol.*, **315**, 1087–1097 (2002).
- 27) Voss Jr. E. W., Miklasz S. D., Petrossian A., Dombrink-Kurzman M. A., *Mol. Immunol.*, **25**, 751–759 (1988).
- 28) Voss Jr. E. W., Mummert M. E., *Mikrochim. Acta*, **126**, 193–202 (1997).
- 29) Self C. H., Dessi J. L., Winger L. A., *Clin. Chem.*, **40**, 2035–2041 (1994).
- 30) Towbin H., Motz J., Oroszlan P., Zingel O., *J. Immunol. Methods*, **181**, 167–176 (1995).
- 31) Pulli T., Höyhty M., Söderlund H., Takkinen K., *Anal. Chem.*, **77**, 2637–2642 (2005).
- 32) Kobayashi N., Iwakami K., Kotoshiba S., Niwa T., Kato Y., Mano N., Goto J., *Anal. Chem.*, **78**, 2244–2253 (2006).
- 33) Ishikawa E., “Enzyme Immunoassay,” 3rd ed., eds. by Ishikawa E., Kawai T., Miyai K., Igaku Shoin, Tokyo, 1987, pp. 56–68.
- 34) Tsuji A., Maeda M., Arakawa H., “Enzyme Immunoassay,” 3rd ed., eds. by Ishikawa E., Kawai T., Miyai K., Igaku Shoin, Tokyo, 1987, pp. 68–74.
- 35) Kobayashi N., Shibahara K., Ikegashira K., Shibusawa K., Goto J., *Steroids*, **67**, 733–742 (2002).
- 36) Hosoda H., Kobayashi N., Ishii N., Nambara T., *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 2105–2111 (1986).
- 37) Kobayashi N., Oyama H., Kato Y., Goto J. (in preparation).