



ラテックスによる散乱光強度ゆらぎのパワースペクトル 解析を用いた免疫反応の検出

南波 昭宏*・武者 利光**

*オリンパス光学工業(株)研究第2部 〒192 八王子市石川町 2951

**東京工業大学大学院総合理工学研究科 〒227 横浜市緑区長津田町 4259

(1987年5月8日受理)

Detection of Immunoreaction with the Power Spectrum Analysis of the Scattered Light Intensity Fluctuations by Latex Spheres

Akihiro NAMBA* and Toshimitsu MUSAH**

* Research Laboratory, Olympus Optical Co. Ltd.,
2951, Ishikawa-cho, Hachioji 192

** Department of Applied Electronics, Tokyo Institute of Technology, Graduate School,
4259, Nagatsuta, Midori-ku, Yokohama 227

We measured the intensity fluctuations of the scattered light from the solution of latex spheres illuminated by the laser beam. We also applied the power spectrum analysis to the detection of the immunoreaction. The ratio of relaxation frequency measured before and after the agglutination reaction is a function of antigen concentration. The power spectral density of the scattered light intensity fluctuations, which is plotted on a log-log graphic paper is divided in two main fragments. One is the flat horizontal level in the low frequency range, and the other is a line going down with frequency. The relaxation frequency is defined as the frequency where a horizontal line 3 dB below the flat horizontal level of the power spectral density. By means of this method, the antigen concentration (CRP) is detected quantitatively only in 15 minutes after the immunoreaction starts.

1. はじめに

現在用いられている主な免疫反応測定法は、標識した化合物を用いる標識測定法と、抗原抗体反応によって生成された複合物を直接検出する非標識測定法に分けられる。非標識測定法には単純免疫拡散法¹⁾ (single radial immunodiffusion: SRID), 免疫電気泳動法²⁾ (immunoelectrophoresis) 等がある。いずれも簡便な測定法ではあるが、検出感度や操作性の点で問題がある。

一方、標識測定法には酵素免疫測定法³⁾ (enzyme immunoassay: EIA), 放射免疫測定法⁴⁾ (radio immunoassay: RIA), ラテックス凝集法⁵⁾ (latex immunoassay) 等がある。ラテックス凝集法として最近比濁法^{6,7)} (latex photometric immunoassay: LPIA, latex agglutination

photometric assay: LA) が主に用いられている。

EIA 法は高感度な免疫反応測定法であるが、操作に手間と時間がかかるうえに、熟練を必要とする。RIA 法は最も高感度な免疫測定法であるが、手間と長い時間がかかるのみでなく、放射能汚染の問題があるので、相応の設備が必要である。比濁法は操作が簡便で測定に要する時間も短いので、広く用いられているが、測定感度が良くない。

また、微粒子による散乱光強度のゆらぎを利用して、粒子の大きさなどの物理的な性質を調べる研究が行なわれている⁸⁻¹⁰⁾。たとえば、Cohen ら¹¹⁾は抗原を固定化したラテックス粒子による散乱光強度の自己相関関数が免疫反応によって変化することから、抗体濃度の検出を行っている。ところが、免疫反応を開始させてから測定

を終了させるまでに 24 時間以上を要している。

本研究では、抗体を表面に固定化したラテックス粒子が抗原と反応し、凝集体が生じたときに起こるブラウン運動の変化を、散乱光の強度ゆらぎのパワー・スペクトル密度の変化として捉えることにより、免疫反応の検出を行なった。その結果、FFT を利用するため、短時間でパワー・スペクトル密度が計算でき、また緩和周波数の変化として凝集反応が捉えられ、抗原濃度を定量的に測定することができたので、ここに報告する。

2. 原理および解析方法

直線偏光した平面波をコロイド粒子を懸濁した液に当て、散乱光を十分遠方で観察する場合について考える。コロイド粒子は球形で、入射光の波長に比べて十分小さく、ブラウン運動を行なっているとす。このとき、時刻 t における散乱光の電場を $E_s(t)$ とすると、

$$E_s(t) = E_0 \sum_{i=1}^N b_i(\mathbf{r}_i) \exp [i \{ \Delta \mathbf{k} \cdot \mathbf{r}_i(t) - \omega t \}] \quad (1)$$

と書ける。ただし、 E_0 は 1 個の粒子による散乱光の電場、 N は粒子数、 $\Delta \mathbf{k}$ は Fig. 1 に示す散乱ベクトル、 $\mathbf{r}_i(t)$ は i 番目の粒子の時刻 t における位置、 ω は入射光の角周波数である。また、 $b_i(\mathbf{r}_i)$ は以下のような関数で表わされる。

$$\begin{aligned} b_i(\mathbf{r}_i) &= 1 & \mathbf{r}_i \in V_c \\ &= 0 & \mathbf{r}_i \notin V_c \end{aligned} \quad (2)$$

ここで、 V_c は散乱体積である。

散乱ベクトル $\Delta \mathbf{k}$ は入射光の波長を λ 、溶媒の屈折率を n 、散乱角を θ とすると、

$$\begin{aligned} |\Delta \mathbf{k}|^2 &= |\mathbf{k}_s - \mathbf{k}_i|^2 \\ &= \left| \frac{4\pi n \sin(\theta/2)}{\lambda} \right|^2 \end{aligned} \quad (3)$$

と書ける。

ホモダイナ法による散乱光強度ゆらぎのパワー・スペクトル密度は次式で与えられる¹²⁾。

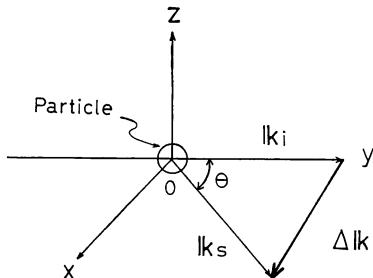


Fig. 1 Schematic illustration of the scattering vector by a small particle.

$$S(f) = S_n(f) + \langle N \rangle^2 \delta(f) + \frac{4 \langle N \rangle^2 |\Delta \mathbf{k}|^2 D}{(2\pi f)^2 + (2 |\Delta \mathbf{k}|^2 D)^2} \quad (4)$$

式(4)の右辺第1項は粒子が散乱体積を出入りすることによる散乱光強度ゆらぎのパワー・スペクトル密度、第2項は散乱光の平均強度によるもの、第3項は粒子が入射光の波長程度の距離をブラウン運動によって拡散していくことによる干渉成分のゆらぎに相当する。

右辺第1項は、第3項に比べて緩和周波数が非常に小さく、また、スペクトルのレベルも小さいので無視することができる。したがって、測定によって得られるパワー・スペクトル密度は第3項となる。これはローレンツ型のパワー・スペクトル密度となり、緩和周波数 (f_r) は次式で与えられる。

$$f_r = |\Delta \mathbf{k}|^2 D / \pi \quad (5)$$

D は並進拡散係数であり、Einstein-Stokes の関係より、

$$D = k_B T / 6\pi \eta r \quad (6)$$

となる。ただし、 k_B はボルツマン定数、 T は絶対温度、 η は溶媒の粘性係数、 r は粒子の半径である。

式(5)、(6)より溶媒の温度が一定であれば式(7)が成り立つ。

$$f_r \propto 1/r \quad (7)$$

なお、本実験により得られたパワー・スペクトル密度を低域の平坦な部分 (f^0) と、高域で $1/f^2$ に比例して低下する2種類の直線に分解し、低域の平坦な部分については平均値を求め、直線的に低下する部分については最小二乗法により、最適な直線を引いた。低周波数領域の平坦なレベルから 3 dB 低下した値に対応する周波数を緩和周波数と定義した。

3. 実験装置および方法

実験装置の概略を Fig. 2 に示す。光源には出力 3.5 mW の He-Ne レーザー (日本電気社製 GLG 5321) を用い、出力光の強度を安定させるために直流安定化電源 (HP 社製 Model 6525 A) を利用した。光源からの出射光は直線偏光となっており、これをハーフ・ミラー HM により 2 光路に分離し、一方を信号光、他方をモニター光とした。モニター光は GeAsP フォトダイオードで受光し、光源の強度の時間的なゆらぎをモニターした。信号光は ND フィルターにより減光した後、焦点距離 10 cm の凸レンズによって、光路長 1 mm、幅 10 mm の直方体ガラスセルに集光した。側方への多重散乱を防ぎ、単一散乱を測定できるようにするために、レーザー光の照射位置をセルの側面に近づけた。セルの側方

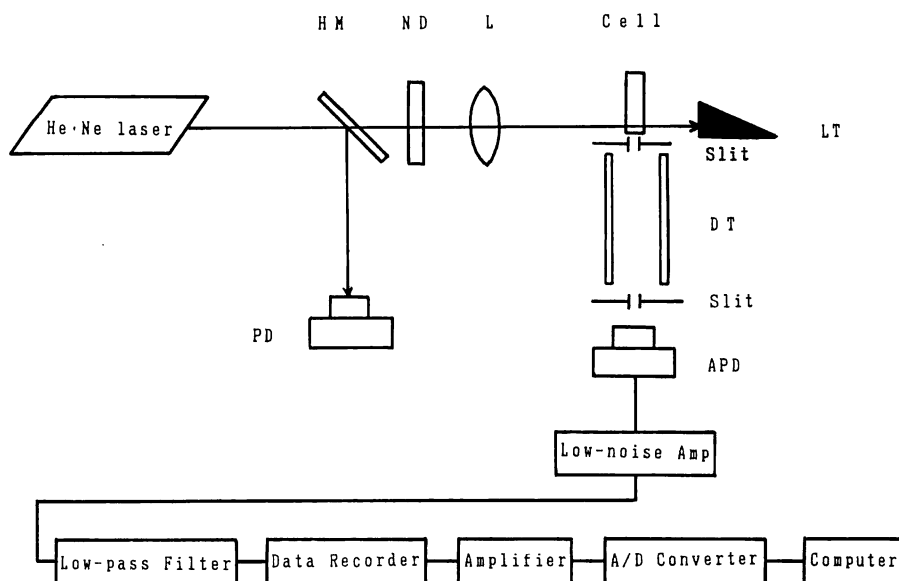


Fig. 2 Experimental setup. HM, Half mirror; ND, ND filter; L, Lens; APD, Avalanche photodiode; LT, Light trap; PD, GaAsP photodiode; DT, Dark tube.

に一对の円形スリット(セル側直径 0.2 mm , 受光素子側同 0.3 mm)をコヒーレンス長だけ離して配置した。 90° 散乱光を受光面 $3\text{ mm}\phi$ のアバランシェ・フォトダイオード(APD)(浜松ホトニクス社製 S2383)で受光した。一对の円形スリットの間、迷光を防ぐ目的で黒色の中空円筒を配置した。アバランシェ・フォトダイオードの出力信号を電圧信号に変換し、低雑音増幅器(Princeton Applied Research 社製 Model 113)で増幅した。これをローパス・フィルターに通して受光素子による高周波雑音をカットし、データ・レコーダー(ソニー社製 A-64)で記録した。反応終了後、データ・レコーダーで再生した信号を増幅器で増幅し、12 bit の A/D 変換器によってサンプリング周波数 2 kHz でデジタル信号に変換した。これをマイクロコンピュータ(日本電気社製 PC9801 VM)に送り、FFT 等の演算処理を行なった。FFT は 1 回について 2048 ポイント行ない、8 回の平均を取った。そして、得られたパワー・スペクトル密度にハニング・ウィンドーをかけて平滑化を行なった。

実験は室温で行なった。抗原を含む溶液 $25\text{ }\mu\text{l}$ をマイクロシリンジで試料を含むセル内に注入した後、攪拌した。懸濁液のラテックス粒子数密度は $7.4 \times 10^{11}/\text{cm}^3$ とした。

ラテックス試薬はダイアヤトン社製 LPIA 用標準試薬(CRP)を用いた。抗体感作ラテックスの直径は約

$0.2\text{ }\mu\text{m}$ となっている。ラテックスの比重は水とあまり変わらず(1.04 程度)、 $0.2\text{ }\mu\text{m}$ 程度の粒径では沈降することなく懸濁液中で長時間ブラウン運動を続ける。また、光源を He-Ne レーザーとしたときに十分な散乱光を得ることができた。

測定は反応前、および反応後 15 分について行なった。Deverill ら¹³⁾の抗原 IgG を用いた実験によれば、散乱光強度は反応後数分ですでに飽和に達しているが、凝集反応はさらに長い時間進行している。ラテックスによる免疫反応では、凝集が進むと沈降が起こるので、あまり長い反応時間は適当でない。したがって、十分反応が進んだと考えられる 15 分を測定時間とした。

4. 実験結果

4.1 ラテックス粒子による散乱光強度ゆらぎのパワー・スペクトル密度

直径 $0.222\text{ }\mu\text{m}$ のラテックス粒子による散乱光強度ゆらぎのパワー・スペクトル密度の一例を Fig. 3 に示す。ラテックス粒子数密度は $4.2 \times 10^{11}/\text{cm}^3$ となっている。縦軸は散乱光強度の平均値の二乗で規格化したパワー・スペクトル密度であり、横軸はフーリエ周波数である。図中、実線は実験結果であり、点線は溶媒を 17°C の水としたときのローレンツ型パワー・スペクトル密度を示す理論曲線である。実験結果は理論曲線にはほぼ一致している。

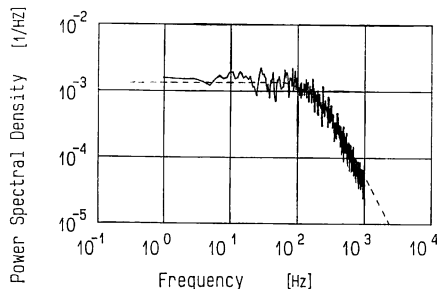


Fig. 3 Power spectral density of scattered light intensity fluctuations. The diameter of the latex particle is $0.222 \mu\text{m}$.

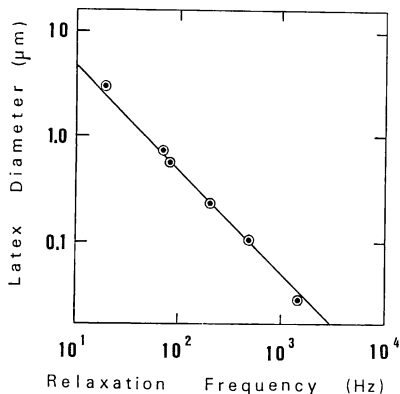


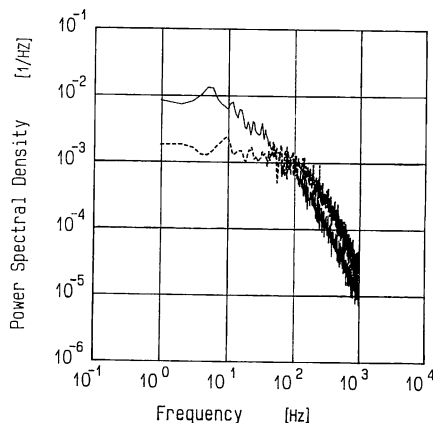
Fig. 4 Dependence of the relaxation frequency on the latex particle diameter.

Fig. 4 に測定したパワー・スペクトル密度から求めた緩和周波数と標準ラテックスの粒径の関係を示す。実線は **Fig. 3** と同一条件の理論直線であり、粒径の変化に対しても実験値は理論直線にほぼ一致した。したがって、本測定法の確認を行なうことができた。

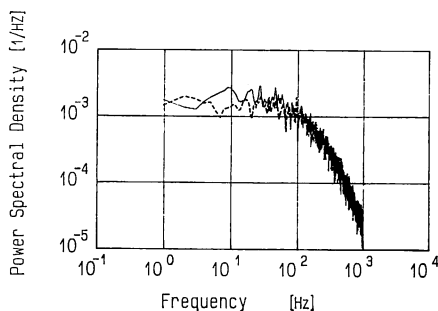
4.2 抗原抗体反応による散乱光強度ゆらぎのパワー・スペクトル密度の変化

Fig. 5 (a) に抗原濃度 $4 \times 10^{-6} \text{ g/ml}$ に関する抗原抗体反応前および反応後 15 分におけるパワー・スペクトル密度を、それぞれ破線と実線で示す。抗原抗体反応によって、散乱光の強度ゆらぎのパワー・スペクトル密度が変化していることがわかる。すなわち、抗原抗体反応後、低周波数領域のレベルが上昇し、緩和周波数が低域に移動している。

一方、抗原濃度 $2 \times 10^{-7} \text{ g/ml}$ に関しては **Fig. 5 (b)** の結果が得られるが、同図(a)と比べてみると、反応前後におけるパワー・スペクトル密度の変化が小さくなっている。つまり、反応後のパワー・スペクトル密度が、抗原濃度に応じて変化している。この事実から、抗原抗体反応前後のパワー・スペクトル密度の変化を調べるこ



(a) Antigen concentration is $4 \times 10^{-6} \text{ g/ml}$.



(b) Antigen concentration is $2 \times 10^{-7} \text{ g/ml}$.

Fig. 5 Power spectral densities before (broken lines) and after (solid lines) the immunoreaction.

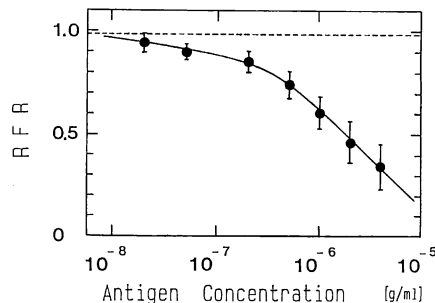


Fig. 6 Relation between the antigen concentration (CRP) and the RFR.

とにより、抗原濃度を定量できると結論される。また、抗原導入後 15 分という短時間で抗原抗体反応が検出できた。

4.3 緩和周波数の変化による抗原の定量

抗原抗体反応による緩和周波数の変化に着目し、導入された抗原濃度との関係を測定した。**Fig. 6** に実験結果を示す。測定は 7~9 回繰り返して行ない、平均をとり、標準偏差を縦線で示した。縦軸の値は反応前後のパ

ワー・スペクトル密度の緩和周波数の比であり、これを緩和周波数比 (relaxation frequency ratio, 略して RFR) と定義する。すなわち、

$$\text{RFR} = \frac{\text{反応後の緩和周波数}}{\text{反応前の緩和周波数}}$$

抗原を導入すると試料が希釈されるので、比較のために緩衝液のみを導入したとき (control) の結果を点線で示した。

Fig. 6 では右下がりの曲線となっており、この曲線を利用して抗原濃度を知ることができた。また、反応15分以後はほぼ反応が飽和に達したと考えられ、パワー・スペクトル密度に顕著な変化が認められなかった。

5. 考 察

反応前のラテックス懸濁液による散乱光の強度ゆらぎのパワー・スペクトル密度はローレンツ型となる。しかし、抗原が導入されるとラテックス粒子が互いに凝集するので、粒塊を形成するために、パワー・スペクトル密度は緩和周波数の異なるローレンツ型のパワー・スペクトル密度が複数混合したものとなる。実験結果から見ると、こうして得られる緩和周波数の反応による変化が、抗原濃度の大きさに対応していることが確認できた。

そこで、導入された抗原濃度を求めるために、反応前後の緩和周波数をそれぞれ求めて、その比を取ることにした。反応前のラテックス懸濁液の中には、すでに非特異的に凝集している粒子等が幾分存在しているが、本方法のように、コントロールを測定することで、すでに凝集した粒子などの影響が回避され、免疫反応による変化のみを捉えることができる。なお、通常はCohenら¹¹⁾が行なっているように、事前にフィルターを用いて、すでに凝集している粒子やゴミ等を取り除き、その後測定を開始する方法が取られている。この場合、フィルターレーションの手間がかかるが、本方法のように反応前後の比を取れば、この操作は省略できて測定がいっそう簡便になる。

実験により得られた RFR は Fig. 6 に見られるように、抗原濃度が高い領域である傾きをもって低下している。これは抗体を固定化したラテックスが抗原と出会う機会が多くなり、大きな凝集塊が多数成長しているためと考えられる。逆に抗原濃度が低い場合には凝集塊が大きく成長せず、未反応の単体ラテックスとのブラウン運動の拡散速度の違いがそれほど大きくないこと、また未反応の単体ラテックスが多数存在するために、RFR の傾きが小さくなっていると考えられる。

ところで、Cohenら¹¹⁾が行なっている方法においては、片対数目盛り上に自己相関関数をプロットして、これに直線を当てはめることにより、緩和時間を求めている。しかしこの場合、ラグが大きくなるに従って、自己相関関数のばらつきが大きくなってしまふ。それゆえ、実験結果に基づいて最適な直線を当てはめることに困難が生じる。

一方、パワー・スペクトル密度については、両対数目盛り上では統計的な変動の大きさに周波数依存性が見られない。つまり、どの周波数で見ても同じような変動を持っていることになる。このような場合には、測定されたすべてのデータを利用して、その変化を求めることが有効である。そこで、本研究では緩和周波数に着目し、これの変化をパワー・スペクトル密度の低い周波数領域の平坦な部分と、高い周波数の領域で直線的に低下する二つの部分に分離して推定した。その結果、緩和周波数をパワー・スペクトル密度から容易に決定でき、抗原濃度の定量を行なうことができた。

今回の実験では抗原 CRP について行なったが、他の抗原、たとえば AFP, CEA, IgE, IgG などについても、同様に測定できるのではないかと考えられる。

6. ま と め

ラテックス粒子を用いた免疫凝集反応の検出にレーザーによる散乱光の強度ゆらぎのパワー・スペクトル解析を応用した。このとき、緩和周波数の反応前後の比を抗原導入後15分で求めたところ、抗原濃度依存性を示した。FFTを用いたパワー・スペクトル解析によれば、短時間で簡便に測定を行なうことができ、免疫反応の定量方法として有効と考えられる。

終わりに標準ラテックス試料を提供して下さった日本合成ゴム工業株式会社の青谷征二氏に感謝いたします。また本研究を進めるに当たり、ご助言、ご協力いただいた東京工業大学の岡本良夫博士、寺町康昌博士(現：職業訓練大学校助教授)に深謝いたします。

文 献

- 1) G. Mancini, A. O. Carbonara and J. F. Heremans: "Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion," *Immunochemistry*, **2** (1965) 235-254.
- 2) 右田俊介: "免疫電気泳動法とその臨床的応用", *生物物理化学*, **20** (1976) 207-212.
- 3) B. K. Vanweemen and A. H. W. M. Schuurs: "Immunoassay using antigen-enzyme conjugates," *FEBS Lett.*, **15** (1971) 232-236.
- 4) S. A. Berson and R. S. Yalow: "Isotopic tracers in

- the study of diabetes," *Adv. Biol. Med. Phys.*, **6** (1958) 349-430.
- 5) J. M. Singer and C. M. Plots: "The latex fixation test. I. Application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis," *Am. J. Med.*, **21** (1956) 888-892.
 - 6) 坪田宣之: "ラテックス凝集反応を利用した測定法", *医用電子と生体工学*, **22** (1984) 267-273.
 - 7) 櫻林郁之介, 箕輪正和, 平林庸司: "比濁法による定量", *日本臨床*, **42**, 春季臨時増刊号 (1984) 1214-1220.
 - 8) M. Cintré, S. Cambon, D. Leclerc and J. Dodds: "Sizing synthetic mixtures of latex and various colloidal suspensions by photon correlation spectrometry," *Anal. Chem.*, **58** (1986) 86-90.
 - 9) D. P. Chowdhury, C. M. Sorensen, T. W. Taylor, J. F. Merklin and T. W. Lester: "Application of photon correlation spectroscopy to flowing brownian motion systems," *Appl. Opt.*, **23** (1984) 4149-4154.
 - 10) 馬嶋慶直, 湯浅英治, 田中豊一, 西尾 泉: "レーザー散乱光によるヒト水晶体核蛋白粒子の直径計測", *臨床眼科*, **36** (1982) 709-712.
 - 11) R. J. Cohen and G. B. Benedek: "Immunoassay by light scattering spectroscopy," *Immunochemistry*, **12** (1975) 349-351.
 - 12) B. J. Berne and R. Pecora: *Dynamic Light Scattering* (John-Wiley & Sons, Inc., New York, 1976) Sect. 5.5, pp. 62-65.
 - 13) I. Deverill and R. J. Lock: "Kinetics of the antigen: antibody reaction," *Ann. Clin. Biochem.*, **20** (1983) 224-226.