

リポソームを用いる抗アシアロ GM₁ 抗体の免疫測定 へのフローインジェクション/接触分析法の応用

片岡正光[†], 阿部浩久, 梅澤喜夫*, 保田立二**

(1991年7月16日受理)

リポソームを用いた免疫測定にフローインジェクション/接触分析法を適用し, 抗アシアロ GM₁ (GAI) 抗体を定量する方法を開発した. リポソームは, 糖脂質である GAI 抗原, ジバルミトイルホスファチジルコリンとコレステロールを用い, 内水層にマーカージオンとしてモリブデン酸ナトリウムを封入して調製した. リポソーム表面で抗原/抗体/補体反応が起きるとリポソームが損傷を受けチャンネル状の穴が生じ, モリブデン酸イオンが外液に流出する. モリブデン酸イオンは過酸化水素/ヨウ化物イオン酸化還元反応の触媒として働き, その反応速度はモリブデン酸イオン濃度に比例する. 反応速度はフローインジェクション法により一定時間後の反応混液中のヨウ化物イオン濃度減少に基づくイオン選択性電極の電位ピークの高さとして求めた. 本法により $10^3 \sim 10^4$ 倍希釈の抗 GAI 抗体を定量することが可能である.

1 緒 言

リポソームは脂質二分子膜から成る小胞で, リン脂質, コレステロール, 糖脂質などが水溶液中で安定な集合体となって形成され, 細胞膜の物性機能を再構成的に研究する手段として広く使われている. Kinsky ら¹⁾によって脂溶性の抗原又はハプテンを含むリポソームは, 活性化した補体によって生物細胞のように損傷を受けることが報告された. 膜抗原を含むリポソーム内胞にマーカージオンを封入し, 抗原/抗体/補体反応によってマーカージオンの小胞外への流出を測定する方法が抗原抗体定量法として研究されている. マーカージオンは次のような諸条件を満足するものが理想的である²⁾. (1) リポソーム内に安定に封入され漏出が少ないこと, (2) リポソーム調製中に封入されなかったマーカージオンを除去しやすいこと, (3) マーカージオンを高感度にしかも少量で検出でき, その際血清や反応液の影響を受けないこと, (4) 容易に入手でき, 危険性のないもの, (5) 検出に特殊な装置を要しないこと. これまでに封入マーカージオンとして Rb⁺, Cd²⁺ などの金属イオン³⁾⁻⁵⁾, テトラベンチ

ルアンモニウムイオン (TPA⁺)⁶⁾⁷⁾, フッ化物イオン⁸⁾⁹⁾や, 蛍光物質であるカルボキシフルオレセイン (CF)¹⁰⁾¹¹⁾などの色素, グルコースやスクロースなどの糖¹²⁾¹³⁾, ⁵¹Cr などの同位体¹⁴⁾などがよく用いられてきた. 一般に金属イオンやハロゲン化物イオンは漏出が大きく, 同位体は放射性廃棄物の処理に問題がある. グルコースは酵素反応と組み合わせることによって比較的よく前述の条件を満足するため, これらのマーカージオンの中でよく用いられてきた. しかしこの方法を血清中の抗体価測定に応用するときには, 血清中のグルコースをあらかじめ除去しておかなければならず, 実用的に問題がある. 近年 CF がマーカージオンとして注目されている. CF は 2 個のカルボキシル基を有する二塩基酸で, 比較的分子量が大きくかさ高いためリポソーム内胞からの漏れが少ない. 又この物質は蛍光物質で, 濃度が高いと自己消光を起こし, バックグラウンドが低いリポソームが調製でき, 又蛍光光度計を用いて高感度な定量が可能である.

著者らは免疫反応などによってリポソームから外液に流出したマーカージオンをイオン選択性電極を用いた薄層ポテンシオメトリーで検出する新しい方法を提案した⁶⁾⁻⁹⁾. しかしこれらの方法で用いられたマーカージオンはいずれも一価のイオンでバックグラウンド流出が無視できないこと, 外液中に含まれる高濃度のナトリウムイオンや塩化物イオンがしばしばマーカージオン濃度の測

* 北海道大学理学部: 060 北海道札幌市北区北 10 条西 8 丁目

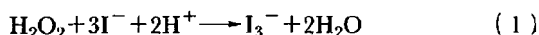
† 現在 小樽商科大学商学部: 047 北海道小樽市緑 3-5-21

** 岡山大学医学部: 700 岡山県岡山市鹿田町 2-5-1

定を妨害することなどの解決しなければならない問題がある。

一方、著者らは酸化-還元反応を触媒する触媒物質を高感度に定量する接触分析法にイオン選択性電極を応用し、モリブデン(VI)^{15)~20)}、バナジウム(V)²⁰⁾²¹⁾、タングステン(VI)¹⁵⁾²¹⁾、鉄(III)²²⁾、ジルコニウム(IV)²²⁾などの高感度分析を報告してきた。

過酸化水素とヨウ化物イオンの酸性溶液中での反応は次式で示される。



この反応の常温での反応速度は小さいが、モリブデン酸イオンなどの均一触媒の存在によって反応速度は著しく増大する。式(1)の触媒モリブデン酸イオン存在下での反応速度は次式によって与えられる²³⁾。

$$2 \times \frac{d[\text{I}_2]}{dt} = - \frac{d[\text{I}^-]}{dt} \\ = (k_1 + k_2[\text{MoO}_4^{2-}])[\text{H}_2\text{O}_2][\text{I}^-] \\ + (k_3 + k_4[\text{MoO}_4^{2-}])[\text{H}_2\text{O}_2][\text{I}^-][\text{H}^+] \quad (2)$$

ここで k_1 及び k_3 は非接触反応の反応速度定数、 k_2 及び k_4 は接触反応の速度定数である。過酸化水素と水素イオン濃度をヨウ化物イオン濃度に対して過剰に保つことによって式(2)は次のように示される。

$$\frac{d[\text{I}^-]}{dt} = -(k[\text{MoO}_4^{2-}] + k')[\text{I}^-] \quad (3)$$

ここで $k = k_2[\text{H}_2\text{O}_2] + k_4[\text{H}_2\text{O}_2][\text{H}^+]$ 、 $k' = k_1[\text{H}_2\text{O}_2] + k_3[\text{H}_2\text{O}_2][\text{H}^+]$ である。式(3)を積分すると、

$$\log[\text{I}^-] = -(k[\text{MoO}_4^{2-}] + k')t + \log[\text{I}^-]^* \quad (4)$$

ここで t は時間、 $\log[\text{I}^-]^*$ はヨウ化物イオンの初濃度である。ところでヨウ化物イオン選択性電極のヨウ化物イオンに対する起電力は次式で示される。

$$E = E_0 + \frac{2.303RT}{F} \log a_{\text{I}^-} \quad (5)$$

ここで E_0 は定数、 a_{I^-} はヨウ化物イオンの活量である。本法ではヨウ化物イオン選択性電極により $\log[\text{I}^-]$ が電位となって現れるので、電位の時間変化の測定によってモリブデン酸イオンの定量が可能である。

今回、モリブデン酸イオンが二価の陰イオンでありかつかさ高いこと、又接触分析法によって高感度に定量可能であることなど、前述の(1)~(5)の条件を満足していることから、これをマーカーイオンとして膜中に Gal 抗原 $\{\text{Ganglotetraosylceramide, Gal}_{(\beta 1-3)}\text{GalNAc}_{(\beta 1-4)}\text{Gal}_{(\beta 1-4)}\text{Glc-Cer}\}$ を含むリポソームに封入し、

補体及び未知濃度の抗体を添加して免疫反応を行った。又分析に当たっては、接触分析に FIA を組み合わせ、試料の必要量を少量とし、かつ短時間に多くの試料の分析が可能となるようにした。

2 試薬及び装置

2.1 試薬

ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) 及びコレステロール (Chol) はシグマ社製の試薬をそのままクロロホルムに溶解し、 -20°C 、窒素雰囲気中で保存した。アシアロ GM_1 (GA1) 糖脂質は既報²⁴⁾の手順に従って、ウシの脳を精製して得た GM_1 ガングリオシドをギ酸で処理して調製した。抗 GA1 抗体は既報²⁵⁾に報告したように 1.5 mg の GA1 、 5 mg のウシ血清アルブミンをフロイント完全アジュバントとのエマルジョンとし、ウサギに免疫して得た。5週間飼育の後に採血し、分離した血清は 56°C で30分間加熱して非働化した。

補体は SPF モルモット (静岡ラボラトリー動物センター、浜松) から採取し、 -80°C で凍結して保存した。

HEPES 緩衝溶液は和光純薬工業製 HEPES 2.38 g と、塩化ナトリウム 0.4 g 、塩化カリウム 0.25 g 、リン酸二ナトリウム 2.38 g を 1 l の水に溶解し、 0.1 M 水酸化ナトリウム溶液を添加して $\text{pH } 7.45$ に調整した。

ゼラチンペロナル緩衝生理食塩水 (GVB^-) は既報¹⁰⁾に従って調製した。この溶液に MgCl_2 と CaCl_2 をそれぞれ $3.5 \times 10^{-2} \text{ M}$ 及び $1.5 \times 10^{-4} \text{ M}$ となるよう添加して GVB^{2+} 溶液とした。その他の試薬は和光純薬工業製特級品を用いた。試薬調製にはミリ Q 水 (抵抗 $17.5 \text{ M}\Omega$ 以上) を用いた。

2.2 装置

リポソームの調製には東京理化工業製のロータリーエバポレーター N 型、Scientific Industries 製 Vortex ミキサー、トミー精工冷却遠心分離装置 RB-18 IV S 及び Eycla ソフトインキュベーター、SLI-450 を用いた。フローインジェクション分析は、Eycla 2 チャンネルベリスタポンプ、MP3 を用いて送液し、試料はレオダイン サンプルインジェクターを用いて注入した。使用した混合コイル及び反応コイルのチューブは外径 2 mm 、内径 1 mm であり、これらを直径 8 mm のアルミニウム製の棒に巻き付けて恒温槽中に浸した。検出器は電気化学計器製フローセル、FCL-12 に同社製ヨウ化物イオン選択性電極 7061 と参照電極 4401 を取り付け、両電極間の電位はオリオン社製デジタルイオナライザー、701A 型

で測定し, 同時に日立 883 データプロセッサを用いて記録した。

3 実 験

3.1 リポソームの調製

多重層リポソームは以下の手順で調製した。DPPC, コレステロール及び GA1 のクロロホルム溶液をモル比で 1:1:0.1 (全量 1.25 μmol) となるようにナシ型フラスコに取り, 回転式エバポレーターを用いてクロロホルムを除去し, ガラス壁に均質な脂質フィルムを作る。フラスコを真空デシケーターに入れ, シリカゲル存在下で 1 時間真空ポンプで吸引する。次にフラスコ内部に 0.1 M モリブデン酸ナトリウム溶液を 1 ml 加え, Voltex ミキサーで強くかき混ぜ, リポソームを調製する。リポソーム内に封入されないモリブデン酸ナトリウムは, この懸濁液を 0°C 15000 rpm で 20 分間遠心分離して除去する。分離したリポソームを再び GVB^{2+} 溶液に懸濁し, 遠心分離する操作を 3 回繰り返すことにより, 未封入のモリブデン酸ナトリウムを完全に除去する。リポソームは 500 μl の GVB^{2+} 溶液中に懸濁し 4°C で保存する。

3.2 標準イムノアッセイ手順

25 μl の抗 GA1 抗体をマイクロプレートにとり, GVB^{2+} で 33 倍希釈した補体 25 μl と, 3.1 の操作で調製したリポソーム懸濁液 25 μl を加える。よく混合した後 37.5°C の水蒸気で飽和した温置器中で 1 時間反応させ, 10 mM EDTA を含む GVB^- 溶液を 25 μl 添加して反応を停止させる。

3.3 FIA/接触分析手順

本研究で使用した FIA/接触分析の系統図を Fig. 1 に示す。溶液 A, B の組成は, 溶液 A: 過酸化水素 (9.4×10^{-3} M) + 塩酸 (0.2 M) + 塩化ナトリウム (0.15 M), 溶液 B: ヨウ化カリウム (2.0 mM) + 塩化ナトリウム (0.15 M) である。これらの溶液は 2 チャンネルの

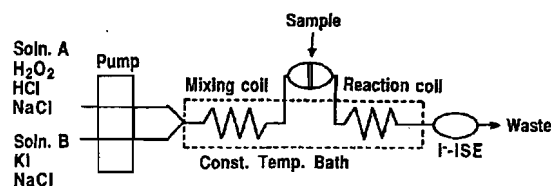


Fig. 1 The schematic diagram of the FIA system

ペリスタ型ポンプで送液され, ミキシングコイルで等量が混合される。3.2 の操作による免疫反応を終えたりポソーム懸濁液 20 μl はインジェクターのサンプルループから A, B 混合溶液中へと送られる。抗原/抗体/補体反応によってリポソーム中から GVB 溶液に流出したモリブデン酸イオンは, ヨウ化物イオンの過酸化水素による酸化反応の触媒として働き, 反応混液中のヨウ化物イオン濃度が減少する。この溶液はサンプル注入から一定時間後にフローセルを通過し, ヨウ化物イオン濃度の減少はヨウ化物イオン選択性電極によって電位ピークとして検出され, データプロセッサで記録される。

4 結果と考察

4.1 FIA/接触分析における最適濃度の検討

過酸化水素, ヨウ化ナトリウム, 塩酸から構成される反応混液の最適組成について検討した。すべての実験は, 反応混液中に 0.15 M の塩化ナトリウムを添加して行った。最適組成の検討は FIA 装置を利用し, 過酸化水素, ヨウ化ナトリウム, 塩酸のうち二成分の濃度を固定し, 一成分の濃度を变化させた反応混液中に 20 μl の 5×10^{-4} M モリブデン酸ナトリウム溶液を注入し, 一定時間後のヨウ化物イオン濃度の減少をイオン選択性電極で測定した。

4.1.1 pH の検討 反応混液中の過酸化水素及びヨウ化カリウム濃度をそれぞれ 4.7×10^{-3} M 及び 1×10^{-3} M とし, 塩酸を用いて pH を 4 から 0.5 まで変化させて, 反応速度への影響について検討した結果を Fig. 2(a) に示す。反応混液の pH が 0.5 から 1 の間では反応速度は最大でかつほとんど変化しなかったが, pH 1 以上では, pH の増加とともに反応速度は減少した。このため塩酸濃度は 0.1 M (pH 1) とした。

4.1.2 過酸化水素濃度の検討 反応混液中のヨウ化カリウム濃度及び pH を, それぞれ 1×10^{-3} M 及び 1 に固定し, 過酸化水素濃度を 2×10^{-4} M から 2×10^{-2} M まで変化させて反応速度を測定した結果を Fig. 2(b) に示す。過酸化水素イオン濃度 2×10^{-3} M 以上ではほぼ最大一定の反応速度となったため, 過酸化水素濃度を 4.7×10^{-3} M とした。

4.1.3 ヨウ化物イオン濃度の検討 反応混液中の過酸化水素濃度及び pH をそれぞれ 4.7×10^{-3} M 及び 1 とし, ヨウ化物イオンの最適濃度について検討した結果を Fig. 2(c) に示す。ヨウ化カリウム濃度 3.2×10^{-5} M から 3.2×10^{-3} M の範囲で反応速度はほぼ最大一定の値となったため, ヨウ化物イオンの最適濃度を 1×10^{-3} M とした。

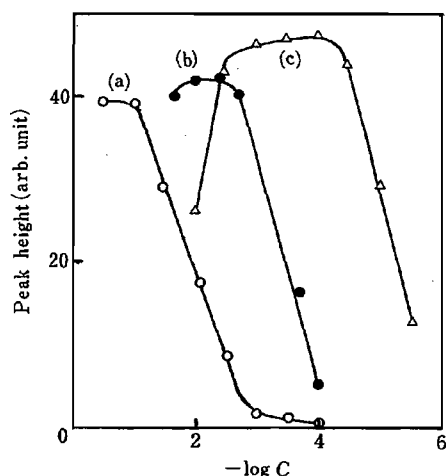


Fig. 2 Effect of pH and concentrations of hydrogen peroxide and potassium iodide on the height of peak potential

Twenty micro liters of 5×10^{-4} M sodium molybdate solution was injected to the reaction mixture (temp. 37.5°C). pH was adjusted by adding hydrochloric acid. (a) pH: $[\text{H}_2\text{O}_2]=4.7 \times 10^{-3}$ M; $[\text{KI}]=1.0 \times 10^{-3}$ M; $[\text{NaCl}]=0.15$ M. (b) hydrogen peroxide: $[\text{KI}]=1.0 \times 10^{-3}$ M; pH=1; $[\text{NaCl}]=0.15$ M. (c) potassium iodide: $[\text{H}_2\text{O}_2]=4.7 \times 10^{-3}$ M; pH=1; $[\text{NaCl}]=0.15$ M

4-1-4 温度の影響 反応速度の温度依存性について検討した。反応混液の組成を上記の検討の結果得られた最適値に保ち、フローインジェクション系の混合コイル及び反応コイルの温度を 15.2°C から 45°C と変化させ、一定量の触媒を添加して反応速度を測定したところ、反応温度がそれぞれ $25, 35, 45^\circ\text{C}$ のとき 15.2°C の反応速度と比較して 1.46, 2.49, 4.14 倍となり、温度の上昇とともに接触反応の速度は下に凸の曲線を描きながら上昇した。温度が高いほど反応速度は上昇し、感度よく触媒モリブデン酸イオンを定量することが可能であるが、本研究はリポソームを反応混液に直接導入するため、高い温度ではリポソームが壊れバックグラウンドが上昇する危険性が高い。そこで免疫反応を行う 37.5°C を FIA/接触分析の反応温度とすることにした。

4-1-5 反応時間の検討 式(4)に示したように、接触反応によって $\log[I^-]$ は反応時間 t の経過とともに減少する。本実験では反応時間はペリスタ型ポンプの送液速度を変化させることによって任意に設定することができる。反応時間を 3 から 13 分と変化させて測定したところ反応時間とピーク高さとは、比例関係を示した。このことは反応時間を長くするとより高感度に触媒の定

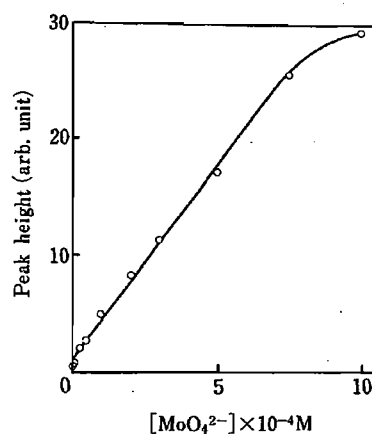


Fig. 3 Calibration curve for molybdate ion

Concentrations of hydrochloric acid, hydrogen peroxide, potassium iodide and sodium chloride are 0.1 M, 4.7×10^{-3} M, 1.0×10^{-3} M and 0.15 M, respectively (temp. 37.5°C).

量ができることを示しているが、FIA/接触定量が 10 分以内に終わるように、反応時間を 8 分とした。このときの反応混液の流量は 1.03 ml/min である。試料中の抗 GA1 抗体の濃度が高濃度の場合には反応時間を短くすることが可能である。又、試料注入後検出器からピークが出力されるのを待たず次々と試料を注入すれば、時間当たりの処理数を増すことが可能である。

4-1-6 モリブデン酸イオンの検量線 反応混液中の各試薬の濃度を最適値に保ち、 10^{-3} ~ 10^{-5} M の間の種々のモリブデン酸ナトリウム溶液をそれぞれ $20 \mu\text{l}$ ずつ注入 (2×10^{-10} から 2×10^{-8} mol に相当) し、FIA/接触分析によるモリブデン酸イオンの検量線を作成した結果を Fig. 3 に示す。モリブデン酸イオンを含まない純水 $20 \mu\text{l}$ を注入したときのピーク (ブランク) の値は 0.54 であるが、これは反応混液に少量の試料を注入したため、反応混液中のヨウ化物イオン濃度がわずかに希釈されたためである。モリブデン酸イオン濃度が 7.5×10^{-4} mol 以上で直線から外れるが、これは反応混液中のヨウ化物イオンが検出器を通過する以前にほとんど酸化されたためと思われる。本法によるモリブデン酸イオンの定量範囲は 2×10^{-10} から 1×10^{-8} mol である。又 5×10^{-4} M のモリブデン酸ナトリウム溶液を繰り返し $20 \mu\text{l}$ 注入して再現性について検討したところ RSD は 0.32% ($n=4$) であり、十分な再現性が得られた。

4・2 リポソーム膜上での免疫反応

4・2・1 マーカーイオンのバックグラウンド流出

リポソームに封入されたモリブデン酸イオンはリポソーム中に安定に存在し, 抗原/抗体/補体反応によってのみ外液中に放出されることが望ましい。調製したリポソーム懸濁液を室温で 15 日間放置し, モリブデン酸イオンの流出量を FIA-接触分析法で測定した。リポソームに封入されているモリブデン酸ナトリウムの全量は, トリトン X-100 を添加してすべてのリポソームを破壊して測定し, その値を 100% リリース値とした。測定の結果, 15 日間の放置でもわずか 2.45% のモリブデン酸イオンがリポソームから外液に流出したにすぎなかった。このことから, 調製したリポソームは GVB^{2+} 懸濁液として $4^{\circ}C$ で保存し, 使用の都度遠心分離した後新しい GVB^{2+} 溶液に懸濁して使用することが可能である。リポソームは同じ操作で調製しても同量のモリブデン酸ナトリウムを内包したリポソームを再現性よく得ることが極めて困難であるから, 一度に適当量のリポソーム溶液を調製して保存し, これを用いれば, 一連の実験を同一条件で行うことができる。

4・2・2 リポソーム中の GA1 抗原量の検討

DP-PC: Chol のモル比を 1:1 とし, これに種々のモル比で GA1 抗原を加えてリポソームを調製し抗原量の検討を行った。DPPC 又は Chol に対し GA1 をモル比で 0.02 から 0.2 まで変化させて調製したリポソームのマーカー封入量をトリトン X-100 を用いてリポソームを溶解して検討したところ, GA1 比が 0.02 から 0.1 で最大一定の値を示したが, GA1 比が 0.15 のときには約 1/2 に, 0.2 のときには約 1/3 に減少した。

次にこれらのリポソームに抗体及び補体を作用させて免疫反応を行い, FIA/接触分析した結果, 接触反応速度は GA1 比が 0.02 から 0.1 で最大一定の値を示したが, GA1 比が 0.15, 0.2 と大きくなるにつれて反応速度は低下した。これらの結果からリポソームは脂質のモル比を DPPC: Chol: GA1=1:1:0.1 とすることとした。

4・2・3 温置時間の検討

抗原/抗体/補体反応によるリポソームからのマーカーイオンの流出における温置時間の影響について検討した結果を Fig. 4 に示す。温置は水蒸気で飽和した温置器中 $37.5^{\circ}C$ で行った。リポソームからのマーカーイオンの流出は温置時間に比例するが 1 時間を超えるとその値は一定になる。しかし 1 時間を超えるとバックグラウンド流出が無視できなくなる。このことより温置時間は 1 時間とした。

4・2・4 補体濃度の検討

本実験で使用した補体は

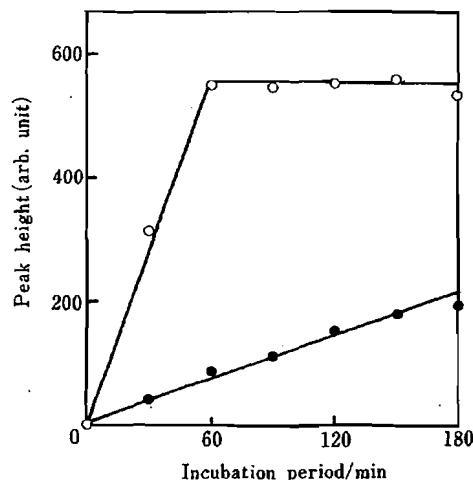


Fig. 4 Effect of incubation period on the marker release through the liposome membrane upon complement mediated immunoreaction

The concentrations of hydrochloric acid, hydrogen peroxide, potassium iodide and sodium chloride are 0.1 M, 4.7×10^{-3} M, 1.0×10^{-3} M and 0.15 M, respectively. Complement, 100 times dilution with GVB^{2+} . Anti-GA1 dilution: ● $\times 10^4$, ○ $\times 10^3$

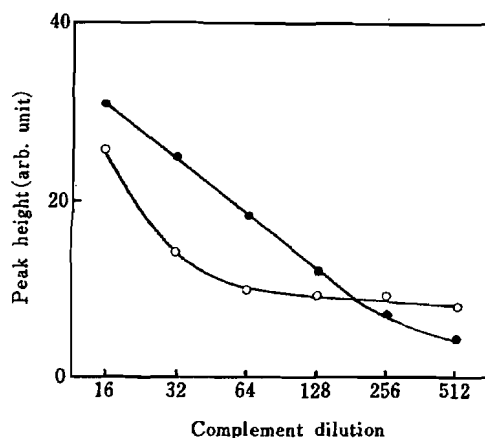


Fig. 5 Effect of complement concentration on the release of marker ion through liposome membrane in the presence (●) and absence (○) of antibody

The concentrations of hydrochloric acid, hydrogen peroxide, potassium iodide and sodium chloride are 0.1 M, 4.7×10^{-3} M, 1.0×10^{-3} M and 0.15 M, respectively. Incubation was done at $37.5^{\circ}C$ for 1 h.

SPF-モルモットの血液から得たが, 血清中に自然抗体が存在するとリポソーム脂質膜に含まれる抗原と反応しマーカーイオンの流出を促すことがある。そこで GA1

抗原を含むリポソームに抗体と補体もしくは補体のみを作用させて、補体濃度の検討を行った。結果を Fig. 5 に示す。抗体が存在すると補体の 512 倍希釈より補体濃度の上昇に伴ってモリブデン酸イオンの流出が増加するが、補体のみを添加した場合は補体濃度が 64 倍希釈以上でマーカージオンの流出が起こる。そこで補体濃度は 100 倍希釈して用いることとした。

4・2・5 抗体濃度依存性 抗体濃度の定量について検討した結果を Fig. 6 に示す。補体濃度を 100 倍希釈と一定に保ち、抗 GAI 抗体を GVB^{2+} 溶液として 10^2 から 10^5 倍に希釈しリポソーム懸濁液に添加して 3・2 の操作手順に従って免疫反応を行った。これらの溶液を FIA/接触分析し、マーカージオンの抗原/抗体/補体反応による流出を測定した。抗 GAI 抗体希釈率 10^4 倍で免疫反応が始まり、希釈率 10^3 倍以上で最大一定の定常値に達した。この図を検量線として抗 GAI 抗体を定量することができる。本法における 10^2 倍希釈倍率での 4 回の連続測定における RSD は 1.75% であり、抗原/抗体/補体反応によるリポソーム内胞からのモリブデン酸イオンの流出とその接触定量の再現性は十分であることが分かった。なお本法を実試料中の抗 GAI 抗体の定量に適用することは行えなかったが、生体試料中には接触分析やイオン選択性電極に妨害を与える物質はほとんどなく、本法の実試料への適用の可能性は高いと思われる。

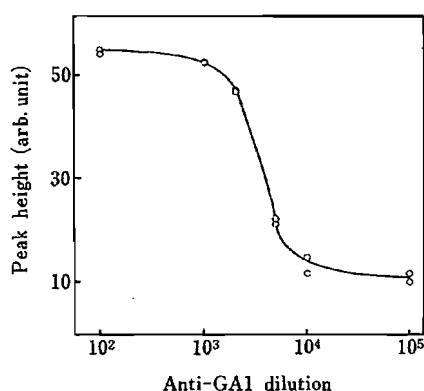


Fig. 6 Effect of anti-GAI antibody concentration on the release of marker ions through liposome membrane upon complement mediated immunoreaction.

The concentrations of hydrochloric acid, hydrogen peroxide, potassium iodide and sodium chloride are 0.1 M, 4.7×10^{-3} M, 1.0×10^{-3} M and 0.15 M, respectively. Complement, 100 times dilution with GVB^{2+} . Incubation was done at 37.5°C for 1 h.

以上、脂質二分子膜に GAI 抗原を含むリポソームを用いて、抗 GAI 抗体をポテンシオメトリックに測定する方法を開発した。内包にマーカージオンとしてモリブデン酸ナトリウムを封入したリポソームは、マーカージオンの漏出が少ない (15 日間常温放置で 2.45%)。抗原/抗体/補体反応によってリポソームから流出したモリブデン酸イオン濃度は FIA/接触分析法を用いて感度よく定量することができる。本法の抗 GAI 抗体の定量可能な希釈率は 10^4 倍以下である。FIA を適用したため、試料量が微量 (3・2 の操作に従って調製した試料 $75 \mu\text{l}$ 中 $20 \mu\text{l}$ を使用) で分析でき、しかも連続分析が可能であることから、ルーチン分析に適応可能な方法である。

文 献

- 1) H. R. Six, W. W. Young, K. Uemura, S. C. Kinsky: *Biochemistry*, **13**, 4050 (1974).
- 2) 保田立二: 化学の領域増刊, **135**, 117 (1982).
- 3) Paul D'Orazio, G. A. Rechnitz: *Anal. Chem.*, **49**, 2083 (1977).
- 4) E. J. Fogt: Ph. D. Dissertation, The State University of New York at Buffalo (1976).
- 5) P. A. D'Orazio: Ph. D. Dissertation, The State University of New York at Buffalo (1979).
- 6) K. Shiba, Y. Umezawa, T. Watanabe, S. Ogawa, S. Fujiwara: *Anal. Chem.*, **52**, 1610 (1980).
- 7) Y. Umezawa, S. Sofue, Y. Takamoto: *Talanta*, **31**, 375 (1984).
- 8) H. Abc, M. Kataoka, T. Yasuda, Y. Umezawa: *Anal. Sci.*, **2**, 523 (1986).
- 9) 片岡正光, 滝浪雅夫, 阿部浩久, 梅澤喜夫: 分析化学, **39**, 789 (1990).
- 10) T. Yasuda, Y. Naito, T. Tsumita, T. Tadakura: *J. Immunol. Methods*, **44**, 153 (1981).
- 11) Y. Ishimori, T. Yasuda, T. Tsumita, M. Notsuki, M. Koyama, T. Tadakura: *J. Immunol. Methods*, **75**, 351 (1984).
- 12) J. A. Haxby, C. B. Kinsky, S. C. Kinsky: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **61**, 300 (1968).
- 13) D. Papahadjopoulos, K. Jacobson, S. Nir, T. Isac: *Biochim. Biophys. Acta*, **311**, 330 (1973).
- 14) J. H. Kaplan: *Biochim. Biophys. Acta*, **290**, 339 (1972).
- 15) 神原富民, 片岡正光: 分析機器, **10**, 793 (1972).
- 16) M. Kataoka, T. Kambara: *Denki Kagaku*, **45**, 674 (1977).
- 17) M. Kataoka, K. Nishimura, T. Kambara: *Talanta*, **30**, 941 (1983).
- 18) M. Kataoka, H. Hemmi, T. Kambara: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **57**, 1083 (1984).
- 19) M. Kataoka, S. Tahara, K. Ohzeki: *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **321**, 146 (1985).
- 20) 片岡正光, 宮形さゆり, 神原富民: 口化, **1980**, 1520.
- 21) 片岡正光, 高橋眞彦, 神原富民: 分析化学, **28**, 169

- (1979).
- 22) M. Kataoka, Y. Yoshizawa, T. Kambara: *Bunseki Kagaku*, **31**, E171 (1982).
- 23) C. H. Bamford, C. F. H. Tipper: "Comprehensive Chemical Kinetics", Vol. 6, p. 406 (1972), (Elsevier, Amsterdam).
- 24) M. Kasai, M. Iwamori, Y. Nagai, K. Okumura, T. Tade: *Eur. J. Immunol.*, **10**, 175 (1980).
- 25) S. Hakomori: *Methods Enzymol.*, **28**, 232 (1972).



Liposome immunoassay of anti-asialo-GM₁ antibody detected by kinetic method of analysis in flow injection system.

Masamitsu KATAOKA[†], Hirohisa ABE, Yoshio UMEZAWA* and Tatsuji YASUDA** (*Department of Chemistry, Faculty of Science, Hokkaido University, Kita 10, Nishi 8, Kita-ku, Sapporo-shi, Hokkaido 060; [†]Present Address: Otaru University of Commerce, 3-5-21, Midori, Otaru-shi, Hokkaido 047; **Department of Cell Chemistry, Institute of Cellular and Molecular Biology, Okayama University Medical School, 2-5-1, Shikata-cho, Okayama-shi, Okayama 700)

An immunoassay technique using an immunoreaction at a liposome membrane surface is described. Multilamellar liposomes comprised dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), cholesterol (Chol) and anti-asialo-GM₁ (GAl) antigen in the molar ratio 1 : 1 : 0.1. Molybdate ions entrapped in the liposomes as marker ions were released from the liposomes by a complement-mediated immunoreaction, and acted as a catalyst for promoting the hydrogen peroxide-iodide ion redox reaction. The most suitable pH of the kinetic reaction and concentrations of hydrogen peroxide and sodium iodide for the determination of molybdate ion were found to be 1, 4.7×10^{-3} and 1.0×10^{-3} M, respectively. To minimize the sample volume, a flow-injection method was adopted. The immunoreaction was carried out as follows. A mixed solution of sample anti-GAl antibody, liposomes and complement were incubated at 37.5°C for 1 h. The resulting solution was injected into the kinetic-FIA system. The decrease in the number of iodide ions by the molybdate ion-catalyzed reaction was monitored using an iodide ion-selective electrode. The marker ion release was specific for the anti-GAl antibody, and depended on the presence of a complement. The present method can be used to detect as low as 10^3 to 10^4 dilution of anti-GAl.

(Received July 16, 1991)

Keyword phrases

immunoassay of anti-asialo-GM₁ antibody; kinetic method of analysis in a flow-injection system; molybdate ion loaded liposome; ion selective electrode.
