

# 抗原-抗体反応に及ぼす界面活性剤の影響（イムノクロマト法）

永谷 尚紀・遠藤 智史\*・森山 佳子・竹田 邦雄・宮原 敏郎

岡山理科大学工学部バイオ・応用化学科

\*北陸先端科学技術大学院大学マテリアルサイエンス研究科

## 1. 緒言

今日、イムノクロマト法は、実用レベルで盛んに利用されている抗原-抗体反応を利用したバイオセンサーである。薬局で誰でも購入可能な妊娠検査薬も、イムノクロマト法である。特別な技術および装置を使用せず、目視で簡便・迅速な測定が可能であり、その実用性の高さから医療、食品、環境などの様々な分野で広く用いられている。イムノクロマト法の検出原理を図1に示す。バックシートで補強されたニトロセルロース膜上にテストラインとして一次抗体が固定化され、さらに、コントロールラインとしてサンプルが上端まで届いたことを示すための金ナノ粒子標識抗体に対する抗体が固定化されている。イムノクロマトテストストリップに試料溶液を滴下するとコンジュゲートパッド内に乾燥配置された直径数十 nm 金ナノ粒子標識抗体が溶解し、試料中の抗原と複合体を形成する。この抗体と抗原の複合体が毛細管現象によりメンブレン上を移動しテストライン上に固定化された抗原を認識する抗体に捕捉され、金ナノ粒子が集積することにより赤色を形成する。抗原がない場合は、コントロールライン一本の赤色のラインが見える。テストライン、コントロールライン二本の赤色のラインが見えたら抗原ありと判断できるようになっている。

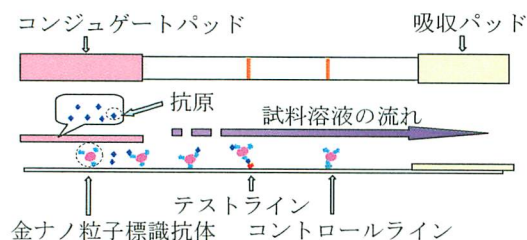


図1 イムノクロマト法の原理

イムノクロマト法は、簡便で迅速な測定が可能であり、実用性が高い反面、測定感度が低いことが問題視されている。そのため、様々なイムノクロマト法の高感度検出法が、研究、開発されている。例えば、抗体に標識する金ナノ粒子を金-白金コロイドに変えることによって、テストラインの赤のラインが黒のラインとなり、視認性を向上させることによって検出感度が

高められている<sup>1)</sup>。

筆者らも、イムノクロマト法の高感度検出法として二種類の手法を報告している<sup>2,3)</sup>。

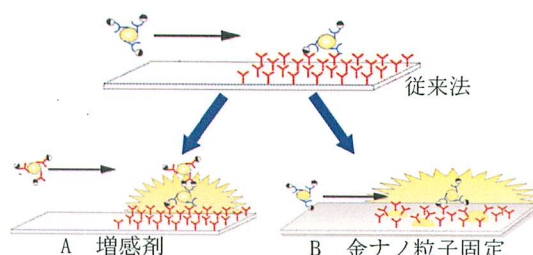


図2 イムノクロマト法の高感度化

一つは、テストラインに固定された一次抗体と抗原を増感剤とする手法である（図2 A）。一次抗体と二次抗体は、抗原を認識する部位が異なるため、一次抗体が固定されたテストラインに金ナノ粒子標識一次抗体と極微量の抗原を混ぜ合わせた増感剤は反応しない。しかしながら、テストライン上に金コロイド標識二次抗体が抗原と共に捕らえられていた場合、テストライン上の一次抗体-抗原-金ナノ粒子標識二次抗体-抗原-金ナノ粒子標識一次抗体として金ナノ粒子が集積し高感度の測定を可能とする手法である。測定対象である抗原が低濃度の場合は、金ナノ粒子標識二次抗体と抗原が全て結合していないため、増感剤中の抗原と反応し高感度化が可能となる。この方法で妊娠診断に用いられるヒト絨毛性ゴナドトロピン（hCG）の検出を行ったところ、25pg/mL の hCG の検出が可能であり、テストラインの濃さは従来法の 1ng/mL の検出時と同等であった。もう一つの方法は、目視で確認ができない程度の極微量の金ナノ粒子を予めテストライン上に固定することによって高感度に検出する手法である（図2 B）。イムノクロマト法は、金ナノ粒子をテストライン上に集積させて発色させることによって検出を行っているが、測定対象が目視で検出できない低濃度であっても、金ナノ粒子はテストライン上に捕らえられている。そこで、目視で検出できない低濃度の測定対象でも目視で検出できるようにテストライン上に金ナノ粒子を固定し、赤いラインが現れるまでの金ナノ粒子の数を減らし高感度を実現する方法である。この方法で

hCG の検出を行ったところ、従来法では 100pg/mL が検出限界であったが、金ナノ粒子をテストラインに固定した本手法では 1pg/mL の検出が可能であった。

イムノクロマト法では、妊娠検査薬のように測定試料（尿）を希釈せずに用いる場合もあるが、インフルエンザの迅速診断では、綿棒で鼻腔の粘液を拭い取り希釈液に綿棒を入れ、その希釈液を用いてインフルエンザの検出を行っている。また、HIV（ヒト免疫不全ウイルス）等の血液を用いたイムノクロマト法での検査では、コンジュゲートパッドの上部に配置されたガラスウールで血球を取り除き、そこに展開液を滴下することによって検出を行っている。そこで、我々は、イムノクロマト法の感度を良くする新たな手法として、測定対象を検出するために用いる希釈液（展開液）の検討を行った。その結果、3 % (w/v) 程度の非イオン界面活性剤を含んだ希釈液を用いることによって、高感度の検出が可能であった<sup>4)</sup>。本研究報告では、界面活性剤を用いた場合のイムノクロマト法の高感度化の実例と抗原-抗体反応への影響を円偏向二色性、分子間相互作用解析（Biacore）で解析した結果を報告する。

## 2. 実験方法

### 2-1 試料・試薬

Bethyl Laboratories, Inc. 製の Human hemoglobin antibody、Human IgA antibody、Human IgA、Human hemoglobin ELISA quantitation Set、Human IgA ELISA quantitation Set を購入した。Meridian Life Science, Inc. 製の human hemoglobin を購入した。金ナノ粒子は、粒径 40nm の金コロイド溶液を田中貴金属工業株式会社より提供して頂いた。ヘモグロビン、IgA 検出のためのイムノクロマトテストストリップは、コンジュゲートパッドの部分を省いたテストストリップの作製を有限会社バイオデバイステクノロジーに依頼した。その他の界面活性剤や試薬は、和光純薬より購入した特級をそのまま使用した。

### 2-2 金ナノ粒子標識抗体の調製

Human hemoglobin antibody、Human IgA antibody への金ナノ粒子標識は、以下の手順で行った。抗体を 5mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  溶液 (pH7.5) で 50  $\mu\text{g/mL}$  の濃度に調製し、調製した 200  $\mu\text{L}$  の抗体溶液に 1.8mL の金コロイド溶液を加えた。金ナノ粒子の表面に抗体を固定するために 10 分間、室温で放置後、50mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  溶液 (pH7.5) で調製した 100  $\mu\text{L}$  の 1% (w/v) ポリエチレングリコールと 50mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  溶液 (pH9.0) で調製した 200  $\mu\text{L}$  の 10% (w/v) BSA を非特異的な吸着を防ぐブロッキングのために加えた。金ナノ粒子標識抗体を得るために、混合溶液を遠心分離 (15 分間、4°C、8000 $\times$ g) し、金ナ

ノ粒子を沈殿させ上澄みを捨て、超音波洗浄機に沈殿が入ったマイクロチューブを数秒入れて再懸濁した。再懸濁した金ナノ粒子に 2mL の保護液 (1% (w/v) ウシ血清アルブミン、0.05% (w/v) ポリエチレングリコール、0.1% (w/v)  $\text{NaN}_3$ 、150mM NaCl を含んだ 20mM Tris-HCl 緩衝液 pH8.2) を加え、攪拌後、遠心分離して金ナノ粒子を沈殿させ、もう一度、超音波洗浄機で再懸濁し同様の操作を行った。遠心分離後、再懸濁させた金ナノ粒子を保護液で希釈し、吸光度計で 520nm の吸光度を測定し、懸濁した溶液の 520nm の吸光度が 6 になるように調製した。得られた溶液を金ナノ粒子標識抗体として使用した。

### 2-3 イムノクロマト法の界面活性による高感度化

唾液中のヘモグロビン濃度、s-IgA (分泌型免疫グロブリンA) 濃度 (IgA換算) を Human hemoglobin ELISA quantitation Set、Human IgA ELISA quantitation Set にて正確に測定した。濃度を正確に測定した唾液を非イオン界面活性剤 (Tween 20) が、1, 3, 5, 10% (w/v) 含まれた 10mM リン酸緩衝液で 100 倍希釈して、40  $\mu\text{L}$  の唾液希釈液と 6  $\mu\text{L}$  の金ナノ粒子標識抗ヘモグロビン抗体を混ぜ、ヘモグロビン検出用イムノクロマトテストストリップに吸収させテストラインの濃さを画像解析ソフトウェア (Image J) にて測定した。また、唾液をドデシル硫酸ナトリウム (SDS) が、0.13, 0.25, 0.5, 1.0% (w/v) 含まれた 10mM リン酸緩衝液で 2500 倍希釈して、40  $\mu\text{L}$  の唾液希釈液と 6  $\mu\text{L}$  の金ナノ粒子標識抗 IgA 抗体を混ぜ、IgA 検出用イムノクロマトテストストリップに吸収させ、同様に測定を行った。

### 2-4 ヘモグロビンの二次構造解析

ヘモグロビンを 10mM リン酸緩衝液 (pH7.5) 又は 5% (w/v) Tween 20 溶液で 10  $\mu\text{M}$  に希釈し、円偏向二色性 (CD) で測定し、ヘモグロビンの二次構造に影響があるか検討を行った。また、5% (w/v) SDS 溶液に対する影響についても同様に検討した。

### 2-5 Human IgA の結合量 (RU) 測定

Biacore で、非イオン性界面活性剤 Tween 20 を含んだ溶液を抗原の希釈液として用いた場合の抗原-抗体の結合量変化を測定した。以下に測定手順を示す<sup>5)</sup>。

#### 1) 抗体希釈液の pH の選択

1.0mg/ml Human IgA antibody を pH4.0, pH4.5, pH5.0, pH5.5, pH6.0 に調製した 10mM 酢酸緩衝液で 20  $\mu\text{g/mL}$  に希釈し、未処理の固定化実行予定のセル (カルボキシルメチル基を導入したデキストランを固定化) に流し、抗体の濃縮効果が得られるかを測定した。



## 2) センサーチップへの一次抗体の固定化

濃縮効果が得られた、10mM 酢酸緩衝液 (pH5.0) を使用して Human IgA antibody を  $20 \mu\text{g/ml}$  に希釈し、 $110 \mu\text{l}$  を Biacore 内部の Rack1, A4 にセットした。次に、0.1M N-hydroxysuccinimide を Rack1, A2 に 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride を Rack1, A1 に空のバイアルを Rack1, A3 に、1M Ethanolamine (pH8.5) を Rack1, A5 に、50mM sodium hydroxide を Rack1, A6 にセットし、センサーチップへのポリクローナル Human IgA 抗体の固定化を行った。

## 3) Tween 20 の各濃度での Human IgA の結合量測定

非イオン性界面活性剤 Tween 20 を Running Buffer (HBS-EP Buffer) で、3, 7% (w/v) に希釈した。希釈した Tween 20 を含んだ Running Buffer を用いて、Human IgA を  $20 \mu\text{g/ml}$  に希釈し、Biacore 内部の Rack1, A1 に、16mM sodium hydroxide を Rack1, A2 にセットし、Tween 20 存在下での Human IgA の結合量 (RU) の測定を行った。また、抗体の特異性を検証するために Human IgA antibody を固定化したセンサーチップに、同様に希釈した Dog IgA を抗原として、上記の方法で結合量を測定した。

## 3. 結果と考察

### 3-1 イムノクロマト法の界面活性による高感度化

イヌ唾液中のストレスマーカーである s-IgA を 3% (w/v) の Tween 20 を含んだ溶液で希釈した場合、含まない溶液に比べ高感度に検出が可能であることは既に報告している<sup>4)</sup>。そこで、歯周病のマーカーとしても

利用可能な唾液中のヘモグロビンも同様に高感度に検出可能であるか検証を行った。朝、歯を磨くと歯茎から出血している 40 歳代の男性の唾液を採取し、Human hemoglobin ELISA quantitation Set を用いて唾液中のヘモグロビン濃度を測定したところ  $780 \mu\text{g/mL}$  であり、その採取した唾液を Tween 20 が含まれたリン酸緩衝液で 100 倍希釈し、イムノクロマト法で検出を行ったところ、リン酸緩衝液中の Tween 20 の濃度が濃いほどテストラインが明確に観察された (図 3 A)。

さらに、テストラインの濃さを数値化するために画像解析ソフトウェア (Image J) でテストライン上のピクセル値を読み取り、テストストリップ上の白い部分のピクセル値との差を輝度として評価した (図 3 B)。その結果、3% (w/v) の Tween 20 を含んだリン酸緩衝液で唾液を希釈し、イムノクロマト法で測定した場合、全く Tween 20 が含まれていないリン酸緩衝液で希釈した場合より、テストラインが 3 倍程度濃くなるのが分かった。唾液を純水に代えて抗原 (ヘモグロビン) のない状態で同様の測定を行ったところ、5% (w/v) 以上の Tween 20 を含んだリン酸緩衝液の場合、テストラインに薄い赤い発色が認められた。これは、イヌ唾液中の s-IgA でも同様に見られた結果であり、Tween 20 によって抗体の特異性が低下し、抗体同士が結合したためであると考えられる。

非イオン界面活性剤である Tween 20 を含んだ溶液によって唾液を希釈し、s-IgA、ヘモグロビンを高感度に検出可能であることが分かったが、イオン性界面活性剤でも同様に高感度の検出が可能であるか検討を行った。ヘモグロビンを採取した唾液中の s-IgA 濃度を

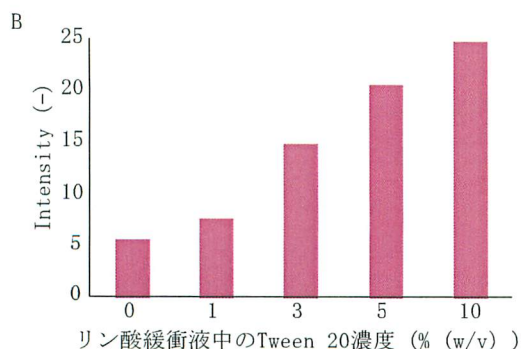
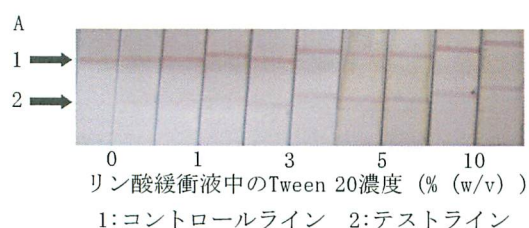


図3 唾液中ヘモグロビン検出 (Tween20)

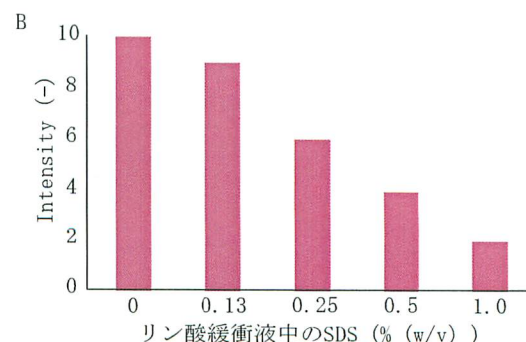
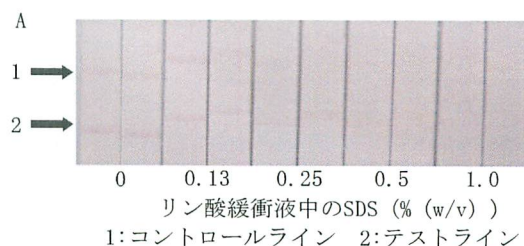


図4 唾液中s-IgA検出 (SDS)

Human IgA ELISA quantitation Set を用いて測定を行ったところ、820  $\mu\text{g/mL}$  であった。その唾液を SDS が、0.13, 0.25, 0.5, 1.0% (w/v) 含まれたリン酸緩衝液で2500倍希釈し、イムノクロマト法で検出を行ったところ、Tween 20 とは逆にリン酸緩衝液に含まれる SDS 濃度が高くなるほどテストラインが薄くなることが分かった(図4)。また、0.25% (w/v) 以上の SDS を含んだリン酸緩衝液の場合には金ナノ粒子の凝集が見られ、テストストリップ末端に留まり、吸収されないことも確認した。陽イオン界面活性剤である塩化ラウリルトリメチルアンモニウムを用いて、同様に唾液中の s-IgA の検出をイムノクロマト法で行ったところ、0.25% (w/v) を含んだリン酸緩衝液では金ナノ粒子の凝集が見られ、高感度に検出することは出来なかった。

### 3-2 ヘモグロビンの二次構造解析

界面活性剤による抗原(タンパク質)の二次構造への影響を抗原としてヘモグロビン、界面活性剤として Tween 20、SDS を用いて、CD で検証を行った(図5)。

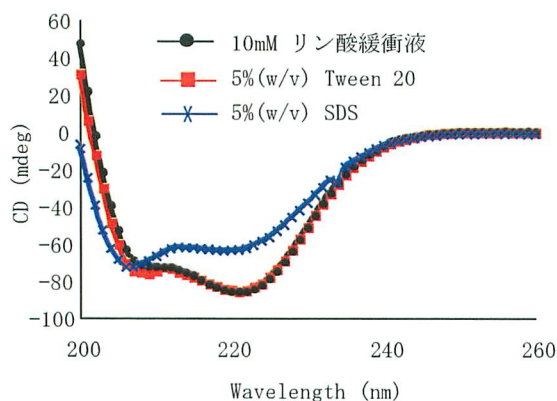


図5 界面活性による二次構造変化 (CD)

5% (w/v) Tween 20 溶液でヘモグロビンを10  $\mu\text{M}$  に調製した場合と10mM リン酸緩衝液で調製した場合のCDスペクトルは、ほぼ同一であり、ヘモグロビンの二次構造に変化はないと考えられる。それに対して、5% (w/v) SDS 溶液では、CDスペクトルが大きく異なり、SDSによってヘモグロビンの二次構造が変化していると考えられる。

ヘモグロビンは、 $\alpha$ -ヘリックス構造を多く持ったタンパク質であり、CDスペクトルの波形の変化は、 $\alpha$ -ヘリックス構造が変化したためだと考えられる。5% (w/v) SDS 溶液で調製した以外のヘモグロビンのCDスペクトルは、222nmのピークが208nmのピークよりマイナス側に大きく現れているが、5% (w/v) SDS 溶液で調製したヘモグロビンのCDスペクトルでは、222nmのピークの値が小さくなっている。これらの結果より、非イオ

ン界面活性剤であるTween 20を含んだ希釈液では、Tween 20の濃度が濃くなってもイムノクロマト法での検出感度は低下しないが、陰イオン界面活性剤のSDSでは希釈溶液中の濃度を濃くした場合、検出感度の低下が見られたのは抗原(タンパク質)の二次構造の変化が一因であることが示唆される。

### 3-3 Tween 20の各濃度でのHuman IgAの結合量測定

Biacoreを用いて非イオン性界面活性剤のTween 20を抗原(IgA)の希釈液として用いた場合の抗原-抗体の結合量変化がどのように変化するか検証した(図6)。

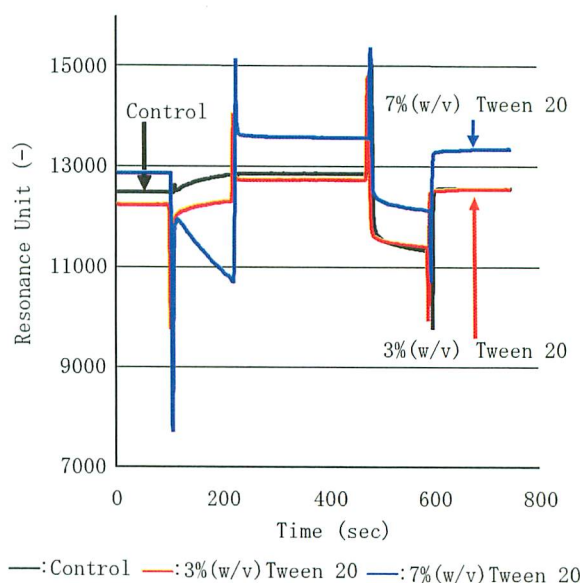


図6 Biacoreで得られたセンサーグラム

通常のRunning Bufferを用いたコントロールでは、センサーチップ上の抗体に抗原が結合していく様子が、なだらかなセンサーグラムとして観察されたが、Tween 20を含んだRunning Bufferを用いた場合には、大きなノイズが見られた。これは洗浄液であるsodium hydroxideを流した時にも見られるようにTween 20を含んでいるためRunning Bufferと組成が異なるためと考えられる。測定時間0秒のresonance unit (RU) と抗原-抗体反応が安定した400秒付近のRUの値の差を抗原の結合量として算出すると表1のようになった。

表1 Tween 20濃度と結合量 (Human IgA)

Tween 20濃度 % (w/v)	抗原結合量 (RU)
0	376.6
3	487.9
7	760.9



表1から明らかなようにRunning Buffer中のTween 20の濃度が濃くなるに従いセンサーチップ上の抗体への抗原の結合量も増えていることが分かる。Tween 20が含まれていないRunning Bufferと7% (w/v)のTween 20が含まれているRunning Bufferでは、2倍以上のIgAが結合している。Human IgA anitiboyとは結合しないことが確認できているDog IgAを用いて同様の実験でHuman IgA anitiboyとの結合量を算出したところ、通常のRunning Bufferではセンサーチップに結合しないが、Tween 20が含まれているRunning Bufferでは結合し、その結合量は、Running Buffer中のTween 20の濃度と共に増加した(表2)。

表2 Tween20濃度と結合量 (Dog IgA)

Tween 20濃度 % (w/v)	抗原結合量 (RU)
0	0
3	21.3
7	54.5

これらの結果より、Tween 20は抗体と抗原の結合を増加させるが、抗体の特異性も低下させていると示唆される。精製されたs-IgA、ヘモグロビンをTween 20が含まれた希釈液で希釈し、イムノクロマト法で検出した場合より、唾液をTween 20が含まれた希釈液で希釈し、唾液中のs-IgA、ヘモグロビンを検出した場合の方が、Tween 20の効果が大きいことが確認できている。これは唾液中の夾雑物が、金ナノ粒子標識抗体と反応し、テストラインに集積するためと考えられる。また、5%(w/v)以上のTween 20を含んだリン酸緩衝液と金ナノ粒子標識抗体の混合液をテストストリップに吸収させた場合、抗原がないにも関わらずテストラインが薄く見える。これらの結果より、Tween 20は抗原との結合量も増加させるが、抗体の特異性を低下させていると考えられる。

#### 4. おわりに

抗原-抗体反応を利用したELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)では、抗体の特異性が高いほど測定感度が良なる。しかしながら、今回の結果では、イムノクロマト法では、抗体の特異性が低下することによって検出感度が向上していることになる。これは、ELISAでは試料中の抗原と抗体を反応させた後に洗浄操作があり、非特異的な反応があれば測定感度は低下する。一方、イムノクロマト法では洗浄操作をすることがなく、抗原-抗体反応によって集積した金ナノ粒子の発色によって検出を行っている。筆者らは、テストラインに目視で確認ができない濃度の金ナノ粒子をテストラインに固定し、血液中のガンマーカである

PSA (prostate specific antigen) 検出感度を向上させることに成功<sup>6)</sup>しているが、同様の効果がTween 20を含んだ希釈液で希釈し、イムノクロマト法で測定することによって起きていると考えられる。Tween 20によって抗体の特異性が低下し、極微量の金ナノ粒子がテストライン上に集積することで予め金ナノ粒子をテストラインに固定する場合と同様に、目視で発色が確認できるまでの金ナノ粒子の量が低下し、高感度の検出を可能としていると考えられる。通常のイムノクロマト法で用いている希釈(展開)溶液にTween 20を3% (w/v)ほど加えれば、イムノクロマト法の高感度化が可能な方法であり、極めて有用な結果である。

#### 謝辞

本研究は科研費(20560731)の助成を受けたものである。

#### 参考文献

- 1) 清水秀明, 石丸陽子, 藤本嗣人, "白金-金コロイドイムノクロマトグラフ法を使用したアデノウイルス検査キットの有用性" 感染症学会誌, 第83巻, 第1号, 64-65 (2009)
- 2) N. Nagatani, R. Tanaka, T. Yuhi, T. Endo, K. Kerman, Y. Takamura and E. Tamiya, Gold nanoparticle-based novel enhancement method for the development of highly sensitive immunochromatographic test strip, Sci. Technol. Adv. Mater., 7, 270-275 (2006)
- 3) R. Tanaka, T. Yuhi, N. Nagatani, T. Endo, K. Kerman, Y. Takamura and E. Tamiya, A novel enhancement assay for immunochromatographic test strips using gold nanoparticles, Anal. Bioanal. Chem., 385, 1414-1420 (2006)
- 4) A. Takahashi, S. Uchiyama, Y. Kato, T. Yuhi, H. Ushijima, M. Takezaki, T. Tominaga, Y. Moriyama, K. Takeda, T. Miyahara and N. Nagatani, Immunochromatographic assay using gold nanoparticles for measuring salivary secretory IgA in dogs as a stress marker, Sci. Technol. Adv. Mater., 10, 034604 (5p) (2009)
- 5) 橋本せつ子, 森本香織 編. Biacoreを用いた相互作用解析実験法, シュプリンガー・ジャパン株式会社 (2009)
- 6) N. Nagatani, T. Yuhi, M. Chikae, K. Kerman, T. Endo, Y. Kobori, M. Takata, H. Konaka, M. Namiki, H. Ushijima, Y. Takamura and E. Tamiya, A sensitive immunochromatographic assay using gold nanoparticles for the semiquantitative detection of prostate-specific antigen in serum, NanoBiotechnology, 2, 79-86 (2006)

# Effect of Surfactant on Antigen-Antibody Reaction (Immunochromatography Method)

Naoki NAGATANI, Satoshi ENDO\*, Yoshiko MORIYAMA, Kunio TAKEDA and  
Toshiro MIYAHARA

Department of Applied Chemistry and Biotechnology, Faculty of Engineering,  
Okayama University of Science,  
1-1 Ridai-cho, Kita-ku, Okayama 700-0005, Japan

\* School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology,  
1-1 Asahidai, Nomi, Ishikawa 923-1292, Japan

The effect of surfactant on immunochromatography method was examined. The experiments were performed to determine the suitable concentration of Tween 20 for immunochromatography method. The suitable concentration of Tween 20 in phosphate buffer was 3 percent. The circular dichroism spectra for evaluation of the effect of surfactant on secondary structure of protein was measured. Tween 20 did not affect the secondary structure of hemoglobin. Also, the affinity of the antibody for its antigen in the developing solution was evaluated by measuring the binding kinetics of interaction using Biacore. The affinity increased with the concentration of Tween 20 solution. However, the specificity increased with the concentration of Tween 20. The increasing affinity and decreasing specificity of antibody are sensitively detected by the immunochromatography method.

**Keywords:** immunochromatography method; surfactant; Tween 20; circular dichroism.