

レーザー光散乱の強度ゆらぎを用いた高感度イムノアッセイ

南波昭宏[®], 鈴木浩文, 宮川厚夫*, 武者利光**

(1989年9月16日受理)

レーザー光散乱における強度ゆらぎのパワースペクトル解析を単分散したラテックス粒子に適用した。単分散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はローレンツ型となり、理論曲線によく一致した。これをラテックス粒子による免疫反応の測定に用いたところ、反応前後でパワースペクトル密度に変化が現れた。これは免疫反応により、様々な粒径の凝集塊が形成されたことに基づくものであり、単一のローレンツ型パワースペクトル密度で記述することはできない。そこで、最小二乗法によるカーブフィッティングを行い、これに基づいて緩和周波数を求めた。反応前後の緩和周波数の比について調べたところ、抗原 IgE で、反応後 30 分で 0.1 IU/ml 程度の抗原濃度を検出できた。

1 緒 言

近年、レーザー光散乱を利用してコロイド粒子などの微粒子の物理的な性質を調べる研究が行われている¹⁾²⁾。とりわけ、ラテックス粒子は粒径がよくそろったものが比較的容易に手に入ることや、粒子の光学的な性質が良好であることもあり、散乱測定に好都合である。又、ラテックス粒子はほぼ完全な球形となっており、実験結果と理論的な解析結果との対応を行うことが可能である。大林ら³⁾はラテックス粒子による散乱光の強度ゆらぎの自己相関関数を実験より求めて、理論値との対応を行っている。Chowdhury ら⁴⁾は一定流量の溶液中におけるラテックス粒子のブラウン運動を散乱により求めて、理論的な検討結果と対比している。又、Lettieri ら⁵⁾はラテックス粒子による共鳴光散乱を実験的に検討し、Mie 散乱の理論値と対応する結果を得ている。更に、Girgis ら⁶⁾はラテックス粒子による散乱パターンを計測し、やはり、Mie 理論による予測との対比を行っている。

一方、ラテックス粒子を用いた免疫反応の測定が Singer ら⁷⁾によって試みられた。その後、光散乱を利用した免疫反応の測定が行われている⁸⁾。Cohen ら⁹⁾はラテックス粒子による免疫反応を散乱光の強度ゆらぎの自

己相関関数から粒子の並進拡散係数を求めることにより、高感度に測定できることを示しているが、測定に 24 時間以上を要している。著者ら¹⁰⁾¹¹⁾はラテックス粒子による散乱光の強度ゆらぎを利用して、短時間で簡単に免疫反応を測定した。

本研究では、ラテックス粒子による免疫凝集反応の検出を散乱光強度ゆらぎのパワースペクトル密度を用いて行った。このとき、緩和周波数をローレンツ型パワースペクトル密度に基づいて最小二乗法によるカーブフィッティングにより求め、これの反応による変化を調べたところ、良好な結果が得られたのでここに報告する。

2 原理及び解析方法

2・1 原 理

単分散している球形コロイド粒子が懸濁している液に平面波を入射させ、散乱光を十分遠方で観察するとき、散乱光強度はコロイド粒子のブラウン運動のために時間的に変動する。この散乱光をホモダイン的に検出した場合、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り、これを散乱光強度の平均値の自乗で規格化すると、以下のように表すことができる¹¹⁾。

$$S(f) = \frac{W}{1 + (f/f_r)^2} \quad (1)$$

$S(f)$ はフーリエ周波数 f における散乱光強度ゆらぎのパワースペクトル密度、 W は低い周波数領域の平坦な部分のパワースペクトル密度、 f_r は緩和周波数である。

* オリンパス光学工業(株)バイオメディカルリサーチセンター: 192 東京都八王子市久保山町 2-3

** 東京工業大学総合理工学研究科: 227 神奈川県横浜市長津田町 4259

緩和周波数 f_r は散乱ベクトル ΔK としたとき、次式で与えられる。

$$f_r = |\Delta K|^2 D / \pi$$

$$|\Delta K| = \left| \frac{4\pi n \sin(\theta/2)}{\lambda} \right| \quad (2)$$

D は並進拡散係数であり、Einstein-Stokes の式より、次のようになる。

$$D = k_B T / 6\pi\eta r \quad (3)$$

ただし、 n は溶媒の屈折率、 θ は散乱角、 λ は入射光の波長、 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。緩和周波数は粒子の半径 r の関数となっており、これより粒径を知ることができる。

免疫反応により粒子が凝集すると、凝集塊のブラウン運動の並進拡散速度は単一の粒子のそれより低下する。従ってパワースペクトル解析により、緩和周波数の変化として観測されることになる。

2.2 解析方法

免疫反応により様々な形状の凝集塊が生成されるので、パワースペクトル密度がローレンツ型からずれることを考慮する必要がある。粒径の異なる球形粒子が混在する系においては、パワースペクトル密度は異なる緩和周波数を有する幾つかのローレンツ型パワースペクトル密度の重ね合わせとなる¹²⁾。本実験での免疫反応の範囲では、生じた凝集塊より得られるパワースペクトル密度も球形粒子の混合による結果に近いものとなった。そこで両対数グラフにおいて、低い周波数領域で平坦、高い周波数領域で直線的に低下する関数、式(4)で近似した。

$$S(f) = \frac{W}{1 + (f/f_r)^a} \quad (4)$$

ただし、 $a < 2$ である。 W , f_r , a を未知数とし、最小二乗法を適用した。未知数の組 (W , f_r , a) に対して初期値を与え、逐次近似により収束させ、緩和周波数に対する十分な収束が得られたところで未知数 (W , f_r , a) をそれぞれ決定した¹³⁾。

免疫反応により W , f_r , a はそれぞれ変化するが、本実験では緩和周波数 f_r の変化に着目した。すなわち、反応前後の緩和周波数 f_r の比、RFR (relaxation frequency ratio) で抗原濃度を定量した。RFR = 反応後と反応前のパワースペクトル密度の緩和周波数の比である。

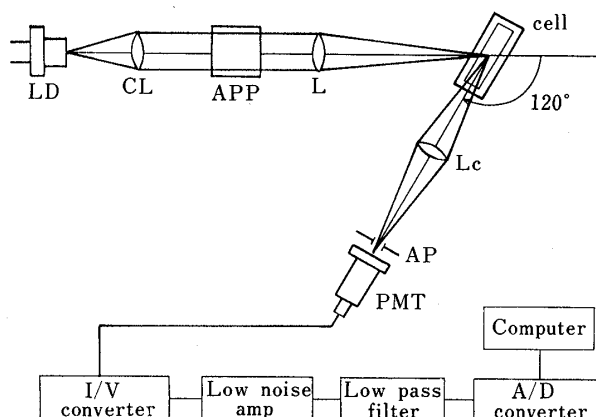


Fig. 1 Experimental setup

LD: laser diode; CL: collimator lens; APP: anamorphic prism pair; L: lens; Lc: confocal lens; AP: aperture; PMT: photomultiplier tube

3 実験装置及び方法

Fig. 1 に実験装置の概略を示す。光源には波長 830 nm の半導体レーザー (シャープ製 LT015) を出射光強度 20 mW で用いた。光ビームは垂直偏光とし、コリメートレンズ (CL), 及び、アナモルフィックプリズムペア (APP) を用いて直径約 5 mm の円形平行ビームとし、焦点距離 72 mm の凸レンズ (L) によりセル中央に集光させた。セルは光路長 1 mm, 幅 10 mm の直方体ガラスセルを用いた。散乱光は散乱角 120° で、焦点距離 22 mm の共焦点レンズ (Lc), 及び直径 0.4 mm の円形開口 (AP) を通して光電子増倍管 (浜松ホトニクス製 R632-01) により受光した。短時間で測定するためには、なるべく散乱角を大きく取ることが望ましいが、あまり大きくなると、迷光やセル壁面から反射される直接光の影響も無視できなくなるため、120° とした。

光電子増倍管からの光電流出力は電流-電圧変換器、更に、エイリアシング¹⁴⁾*1 を抑えるためのローパスフィルター (カットオフ周波数 500 Hz) を通して、12 bit の A/D 変換器に導き、マイクロコンピュータ (NEC PC9801VM) に入力して、FFT (fast Fourier transform) などの演算処理を行った。

測定は A/D 変換器のサンプリング周波数を 1 kHz, 取得したデータ数を 1 回の測定につき 30720 点とし

*1 A/D 変換器によってアナログ波形をデジタル化するうえで問題になる現象。アナログ波形に A/D 変換のサンプリング周波数の 1/2 以下の周波数成分のみが含まれるようにしないと正確なデジタル波形が得られない。

た. 全データを 512 点ずつ順次 60 分割し, それぞれ FFT を行い, 60 回の平均操作の後, ハニングウインドー^{15)*2}をかけて, パワースペクトル密度を求めた.

標準ラテックス粒子はセキスイ化学工業製標準ラテックス液, 及び, IDC (Interfacial Dynamics Corp.) 製標準ラテックス粒子懸濁液を用いた. ラテックス試薬は IgE (イムノグロブリン E) 抗体感作標準ラテックス試薬 (ダイアヤトロン製: 製品名 LPIA 用抗体感作標準ラテックス試薬) を用いた. ラテックス試薬に含まれる粒子の直径は $0.33\ \mu\text{m}$, 粒子濃度は 1.43×10^{10} 個/ cm^3 であった. 抗原は IgE を用い, 抗原を含む溶液 $25\ \mu\text{l}$ を IgE 抗体感作ラテックス液と緩衝液の混合液 $175\ \mu\text{l}$ に注入した. 測定はかき混ぜ後 30 分反応させて行った. 実験は室温で行った.

4 実験結果

4.1 標準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

Fig. 2 に標準ラテックス粒子 (直径 $0.22\ \mu\text{m}$) による散乱角 120° , 媒質温度 22.6°C における散乱光強度ゆら

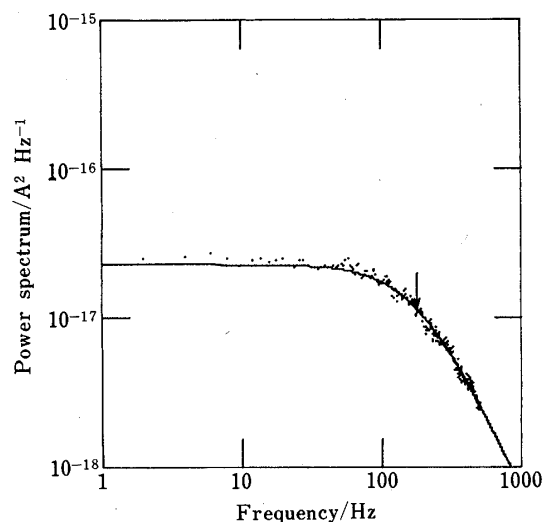


Fig. 2 Power spectral density of the scattered light intensity fluctuations

The diameter of the latex spheres was $0.22\ \mu\text{m}$. "A" denotes the photocurrent of the detector. The arrow indicates the relaxation frequency. Latex concentration: 7.6×10^9 particles/ cm^3 . The dotted line is experimental results and the solid line is the theoretical prediction.

*2 サンプル長が有限であることによって生じるパワースペクトル密度の推定値の変動を抑制する方法の一つ.

ぎのパワースペクトル密度を示す. 粒子濃度は 7.6×10^9 個/ cm^3 である. 図中の点線は実験結果であり, 実線は理論値である. 矢印は緩和周波数を示す. 実験結果はローレンツ型パワースペクトル密度によく一致した. このとき, パワースペクトル密度の緩和周波数は $179\ \text{Hz}$ であった. 相対標準偏差 (R.S.D.) は 10 回繰り返した結果, 6.76% であった.

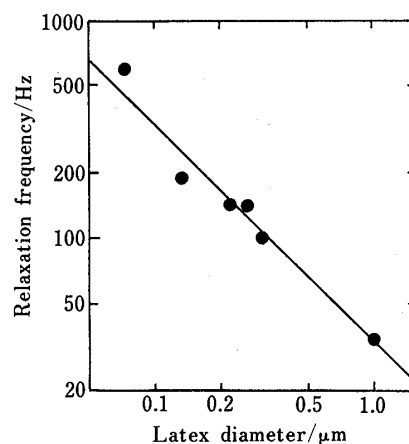


Fig. 3 Dependence of the relaxation frequency on the diameter of latex spheres

Solid circles are measured values and the solid line is theoretical calculation. The temperature of the solution was 20°C .

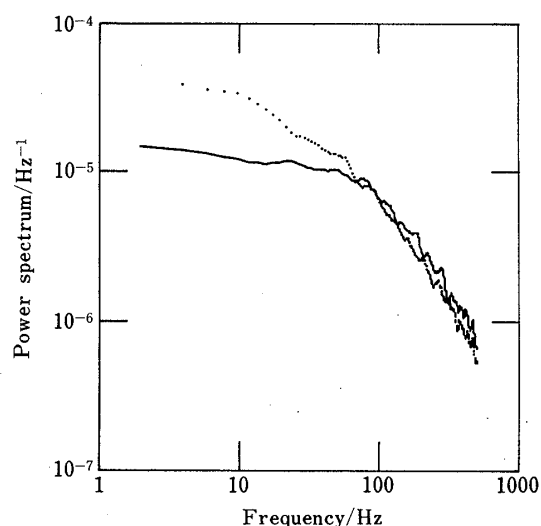


Fig. 4 Power spectral densities of the turbid solutions of the antigen-antibody reactions

The power spectral density was normalized by the square of the mean intensity. Antigen concentrations were $1\ \text{IU/ml}$ (solid line) and $250\ \text{IU/ml}$ (broken line). Antigen: IgE; Reaction time: 30 min

Fig. 3 に標準ラテックス粒子の直径と緩和周波数の関係を示す。図中の直線は媒質温度 20°C のときの理論直線であり、実験値（媒質温度 20°C）とほぼ一致した。この結果はパワースペクトル密度の緩和周波数を用いて、ラテックス粒子の直径を定量的に測定できることを示唆する。

4.2 パワースペクトル密度による免疫反応の測定

Fig. 4 に抗原濃度 1 IU/ml、及び、250 IU/ml のときの反応 30 分後に得られたパワースペクトル密度をそれぞれ実線と破線で示す。縦軸は散乱光強度の平均値の自乗で規格化したパワースペクトル密度である。免疫凝集反応によってパワースペクトル密度に変化が見られ、緩和周波数の低下と、50 Hz 以下の周波数領域の平坦な部分の上昇が現れている。しかも、抗原濃度によって、このパワースペクトル密度の変化が大きくなっている。しかし、この濃度範囲ではローレンツ型から大きく外れることがなく、式(4)で近似することができた。

Fig. 5 に抗原濃度と RFR の関係を示す。RFR は抗原濃度依存性を示し、抗原濃度の増加に伴って、右下がりの曲線となった。これより抗原 IgE において、抗原濃度 0.1 IU/ml 程度まで緩和周波数の変化としてとらえることができた。一方、高い抗原濃度に関しては、本実験では 500 IU/ml まで測定した。これ以上抗原濃度が高くなると、パワースペクトル密度の低い周波数領域の平坦な部分が極めて少なくなるなど、ローレンツ型からの大きな変形が見られた。このため、式(4)による近似では最小二乗法の適用をうまく行うことが不可能であ

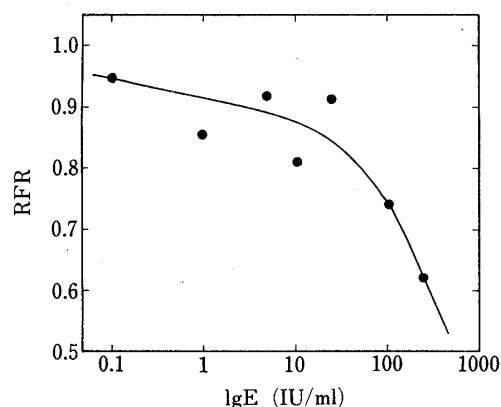


Fig. 5 Dependence of the RFR value on the antigen concentrations of IgE on RFR

RFR is defined by the ratio of relaxation frequencies of power spectral densities of before and after antigen-antibody reactions (see text). Reaction time: 30 min

った。

5 考 察

ラテックス粒子のようなコロイド粒子が懸濁した液にレーザー光を照射すると、散乱光強度の時間変化が検出される。これは粒子のブラウン運動を反映したものである。このとき、粒子が単分散していれば、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になるので、緩和周波数を求めることにより、粒径を知ることができる。そして測定と理論の条件をよく一致させれば、実験結果は Fig. 2 に示すように理論曲線にほぼ一致する。この場合、理論値は 187 Hz であり、実験値 179 Hz は R.S.D. を考慮すると、実験誤差の範囲と考えることができる。実験データの変動の原因は、測定したデータ数に起因するパワースペクトル密度の統計的な変動が主であると考えられる。

今回適用した最小二乗法によるカーブフィッティングは、抗原濃度 500 IU/ml 以下の免疫反応のようにパワースペクトル密度の形状がローレンツ型から大きく変化しない範囲内であれば、十分適用できる。しかし、これ以上の抗原濃度では、様々な大きさ、形状を有する凝集塊が生成されることが考えられる。このため、パワースペクトル密度はローレンツ型から大きく変化し、緩和周波数により抗原濃度を定量することは困難となる。この場合、1 回の FFT のデータ数を多くして広い周波数の範囲でパワースペクトル密度が得られるようにしたり、曲線近似方法について工夫する必要がある。

ところで、抗原濃度 0.1 IU/ml でも緩和周波数の変化が見られ、高感度検出の可能性は得られているが、データの変動も大きく、定量的な測定は困難である。この変動の原因として、散乱体積内の粒子数、凝集塊の形状、及び測定のデータ数などが考えられる。散乱粒子が免疫反応によって生じた凝集塊の場合は、凝集塊の粒度分布などの影響で、パワースペクトル密度の形状に変化が生じる。しかも凝集が起こると、見掛け上の粒子数が減少するので、粒子 1 個当たりの全散乱光強度に与える影響が大きくなり、パワースペクトル密度の形状は、より大きく変化することが予想される。

一方、粒子数が少なくても、1 回の測定のデータ数が多ければ、統計的に安定した形状を有するパワースペクトル密度を得ることができるので、緩和周波数の推定精度も向上することになる¹⁵⁾。しかし、データ数を増やすことは、測定時間の増加につながるため、凝集塊の自然沈降の影響も考慮しなければならない。又、試料セルの形状を小さくして、散乱体積内を出入りする粒子の影

響を防ぐ方法も考えられる。より精確に 0.1 IU/ml 程度以下の抗原濃度を検出するために、今後これらの問題点を解決してゆきたい。

散乱光の強度ゆらぎのパワースペクトル解析によるラテックス粒子のブラウン運動の計測は、簡便に実施することができ、しかも、広い粒径の範囲で、理論的な予測値に適合する結果を得ることができる。そのため、免疫反応の高感度検出のみならず、そのほかのコロイド粒子の凝集反応やブラウン運動の測定などにも広く応用することが可能と思われる。

本研究を進めるに当たり、御助言、御協力いただいた岡本良夫博士（千葉工業大学）、牧野 徹氏（オリンパス光学工業株式会社）に慎んで感謝致します。

文 献

- 1) F. T. Arecchi, M. Giglio, U. Tartari: *Phys. Rev.*, **163**, 186 (1967).
- 2) M. Cintre, S. Cambon, D. Leclerc, J. Dodds: *Anal. Chem.*, **58**, 86 (1986).
- 3) K. Ohbayashi, S. Kagoshima, A. Ikushima: *Jpn. J. Appl. Phys.*, **11**, 808 (1972).
- 4) D. P. Chowdhury, C. M. Sorensen, T. W. Taylor, J. F. Merklin, T. W. Lester: *Appl. Opt.*, **23**, 4149 (1984).
- 5) T. R. Lettieri, E. Marx: *Appl. Opt.*, **25**, 4325 (1986).
- 6) W. Girgis, H. Martin, R. Darmana, M. Granie, J. P. Morucci: *Proc. Annu. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.*, **7**, 119 (1985).
- 7) J. M. Singer, C. M. Plots: *Am. J. Med.*, **21**, 888 (1956).
- 8) P. Blume, L. J. Greenberg: *Clin. Chem.*, **21**, 1234 (1975).
- 9) R. J. Cohen, G. B. Benedek: *Immunochemistry*, **12**, 349 (1975).
- 10) 南波昭宏, 武者利光: 医用電子と生体工学, **26**, 170 (1988).
- 11) 南波昭宏, 武者利光: 光学, **17**, 20 (1988).
- 12) B. J. Berne, R. Pecora: "Dynamic Light Scattering",

Sect. 4.3 (1976), (John-Wiley & Sons, Inc., New York).

- 13) 栗屋 隆: "データ解析", 第 9 章 (1985), (学会出版センター).
- 14) 得丸英勝訳: "ランダムデータの統計的処理", 第 7 章 (1983), (培風館); [J. S. Bendat, A. G. Piersol,]
- 15) 日野幹雄: "スペクトル解析", 第 11 章 (1977), (朝倉書店).

☆

Highly sensitive immunoassay by analyzing intensity fluctuation in laser light scattering. Akihiro NAMBA, Hirobumi SUZUKI, Atsuo MIYAKAWA* and Toshimitsu MURASHI** (*Biomedical Research Center, Olympus Optical Co. Ltd., 2-3, Kuboyama-cho, Hachioji-shi, Tokyo 192; **Department of Applied Electronics, Tokyo Institute of Technology, Graduate School, 4259, Nagatsuta, Midori-ku, Yokohama-shi, Kanagawa 227)

Intensity fluctuations of laser light scattered by suspended latex spheres in water were measured. The power spectral density showed the Lorentzian form. The particle size of the latex spheres could be estimated from the relaxation frequency. The dependency of relaxation frequency on particle size was applied to an immunoassay of IgE. Latex sphere particles coated with an antibody agglutinated through immunoreaction and, as a result, the shape of power spectra changed. The change of the particle size was estimated from the relaxation frequency. The ratio of the relaxation frequency between the original and the reacted sample was measured as a function of IgE antigen concentrations. The IgE antigen of 0.1 IU/ml could be detected by this method.

(Received September 16, 1989)

Keyword phrases

laser power spectral analysis; antigen-antibody reactions of IgE; laser light scattering.