生体物質の超高感度測定法

石川榮治
宮崎医科大学

今から 16 年前、筆者は本誌のセミナー室で「ペプチドホルモンの定量——現状と将来」と題する論文を 2 回に分けて執筆した^(1,2)。第 1 回は既存の生物学的定量法と免疫学的定量法を紹介し、第 2 回は「Radioimmunoassay に勝る微量定量の一元化は可能か」という副題をつけて、エンザイムイムノアッセイを紹介するとともに将来の予測についても述べた。当時はラジオイムノアッセイが最も感度の高い測定法で、これ以上感度の高い測定法はないという考え方が一般的であった。筆者自身もエンザイムイムノアッセイの開発を始めてわずか 2 年であったので、実績といえば、エンザイムイムノアッセイによりインスリンをラジオイムノアッセイと同程度の感度で測定することができるというデータをもっていたに過ぎない。世界的にもラジオイムノアッセイに勝るエンザイムイムノアッセイが開発されていたわけではない。したがって、大部分の記述は予測の段階を越えるものではなかった。

以来、16 年という年月が経過した現在、まだ実現していない予測もあるが、測定感度に関する限り予測したことが実現し、あるいは実現する見通しとなっている。そればかりでなく、当時一般には不可能だと考えられ、その実用的意義さえ疑い意見がきかれた超高感度測定が、基礎研究を行なう実験室では言うに及ばず、臨床診断にもすでに実用化されている。16 年前の予測は文字通りの予測であり、単に机上の計算のみを頼りにしたものであり、技術的な裏付けはまったくなかったが、現在は、この 16 年間に開発された技術を基にして当時よりはるかに確実な予測をすることができる段階にある。

ところで、測定の対象は抗原、抗体、ハプテンの 3 つに大別することができるが、これらを測定する方法も共通性がある一方で各々異なった原理に基づいている。そこで、本稿では抗原、抗体、ハプテンの順に筆者らが開

発した超高感度測定法を紹介することとする。

抗原の超高感度測定法

1. atto mole 量の測定

筆者がエンザイムイムノアッセイの開発を始めたのは 1972 年のことである。最初はラジオイムノアッセイで使われている ^{125}I を単に酵素で置きかえるだけのことであった。つまり、インスリンを測定するためのラジオイムノアッセイのキットを購入して、 ^{125}I 標識インスリンの代わりにグルコアミラーゼ標識インスリンを使ってインスリンの測定を試みたのである。グルコアミラーゼによるインスリンの標識は既存のグルタルアルデヒド法を用いた。得られた測定感度はラジオイムノアッセイのそれとほぼ同じであった⁽³⁾。しかし、再現性は著しく不良であった。そこで、標識酵素を β -D-ガラクトシダーゼ（大腸菌）に置きかえて、マレイミド基とチオール基の反応を利用した新しい標識法を開発して再びインスリンの測定を試みたところ、測定感度が改善されたわけではなかったが、再現性については驚異的改善がみられた⁽⁴⁾。

しかし、感度の上でラジオイムノアッセイを越えることができそうもないこと、血清の影響が大きいことなどのために、インスリンの測定は中断し、マレイミド基とチオール基の反応を利用した抗体の新しい酵素標識法を開発し、その酵素標識抗体を使いオルニチン・ δ -アミノトランスフェラーゼ（ラット肝、分子量：170,000）の 1 atto mole を測定することに成功した^(5,6)。用いた測定システムはサンドイッチ法あるいは 2 点結合法と呼ばれるものであった。

1 atto mole というのは、現在ではよく知られているように、 1×10^{-18} mol、つまりアボガドロ数 (6×10^{23}) から計算して 60 万分子に相当するが、当時は atto mole とい

図 1 ■ 抗原を測定するためのサンドイッチ法（2点結合法）

う単位を知る者がいたとしてもきわめて少なく、1 atto mole という微量を測定することが実用上はもちろん、研究上でもほとんど意味のないことだという意見さえきかれたほどである。

筆者らが世界で初めて 1 atto mole という微量を測定することができたのは、次のような理由によるものである。

第一に、用いた抗体の親和性が高かったことである。これは小林、勝沼により調製されたものであったが、この抗体なしには 1 atto mole の測定はあり得なかった。

第二の理由は、測定システムとして競争法ではなく非競争法を用いたことである。競争法では一定量の抗体と一定量の標識抗原を測定すべき抗原とともに反応させて、抗体と結合した標識抗原の量が測定すべき抗原の量に応じて減少してゆくことを利用して測定する。ラジオイムノアッセイといえば、競争法を指す代名詞として使われるほど一般的に使われてきた方法であるが、このように減少を指標とする測定方法は高感度化することが困難であり、一般に femto mole (1×10^{-15} mol) レベルの測定感度しか得られない。筆者が最初に試みたインスリンの測定も競争法によるものであった。

これに対し、オルニチン・ δ -アミノトランスフェラ

図 2 ■ チオール基とマレイミド基の反応を利用した Fab' のヒンジ酵素標識法の一例

ーゼの測定には非競争法を用いた。つまり、固相（シリコンラバーの小片）の表面上に不溶化した抗体により測定すべき抗原をトラップし、ついで酵素標識抗体を反応させて、固相表面に結合した酵素活性から測定すべき抗原の量を知る方法である（図 1）。測定すべき抗原を不溶化抗体と酵素標識抗体により、はさみこむところから、サンドイッチ法あるいは 2 点結合法と呼ばれる。この方法では、測定すべき抗原の量の増加に応じて固相表面上に結合する酵素活性が増加するので、測定すべき抗原が存在しない時に固相表面上に非特異的あるいは物理的に結合する酵素活性を少なくすればするほどそれだけ微量の抗原を測定することができる。きわめて単純な仕組みである。この方法は筆者が始める以前にも既にあったが、高感度化できる方法だとは考えられていなかった。その証拠に、ラジオイムノアッセイでは長い間専ら競争法が使われ、この非競争法が使われるようになったのはごく最近のことである。1976 年、筆者が初めて高感度化が可能なことを実証し、やがてサンドイッチ法がラジオイムノアッセイの主流となり、大きく遅れてラジオイムノアッセイもこれに追隨することになった。

第三の理由は、筆者が新しい酵素標識法を開発したこ

とである。筆者が新しい方法を開発するまでは、抗体免疫グロブリン G (IgG) のアミノ基を使って酵素標識が行なわれていた。IgG には抗体活性とは関係のない Fc と呼ばれる部分があって、この部分の疎水性が高いため、物理的に固相に吸着し易く高感度化はできない。IgG をパパイニンあるいはペプシンにより部分分解して、Fab あるいは Fab' と呼ばれる抗体活性をもつフラグメントにすると、固相への物理的吸着は少なくなるが、アミノ基を利用して酵素標識を行なう限り、抗体活性が 1/2 から 1/3 に低下してしまう。これに対し、筆者が新しく開発した方法は、Fab' の抗体活性とは関係のない、ヒンジ部と呼ばれる部分のチオール基を利用して酵素に導入したマレイミド基と反応させるものである（ヒンジ法）（図 2）。こうしたことにより、抗体活性が高く維持されるばかりでなく、固相への物理的吸着が一層少なくなり、超高感度化が可能となったわけである。

第四の理由は、標識として用いた β -D-ガラクトシダーゼを蛍光法を用いて高感度で検出したことである。1976~7 年当時、標識酵素は比色法で検出されており、筆者が初めて超高感度な蛍光法を利用したのである。

2. atto mole 測定一般化

分子量 170,000 のオルニチン・ δ -アミノトランスフェラーゼの 1 atto mole が測定できたことは、他の抗原も一般にそのレベルで測定しうることを強く示唆するのであり、atto mole 測定一般化を追求させる強い原動力となった。しかし、それで直ちにすべての抗原の atto mole 量が測定できるようになったわけではなく、むしろほとんどすべての抗原ではそうはならなかった。その原因が明らかになり、対策を具体化するまでには相当な年月が必要であった。

atto mole 量の測定を阻む原因を明らかにする上で最大の障害となったのは、充分な量の抗体を入手することが困難であったことである。ラジオイムノアッセイ（競争法）では 0.1 ml の抗血清があればかなり多くの測定を行なうことができるが、サンドイッチ法によるエンザイムイムノアッセイを可能にするためには、固相への不溶化と当時の技術による酵素標識には少なくとも数 ml の抗血清を必要とした。感度が低い原因を明らかにするには、その 10 倍以上の抗血清を必要とした。

障害が何であったにせよ、わかってしまえば原因は簡

単なことである。多くの場合、感度の低い原因は抗体の純度が低いことである。つまり、非特異抗体も酵素で標識され、これが固相に物理的に吸着して測定バックグラウンドを上げるため感度が低下する。したがって、アフィニティー精製により抗体の純度を上げれば atto mole 測定が一般に可能となる^(7,8)。

酵素標識には当時の技術では約 1 mg のアフィニティー精製抗体を必要としたので、多くの場合、10 ml かそれ以上の抗血清がないと atto mole 測定はできなかった。そこで筆者らは、どんな酵素を使っても標識ができるよう、効率的で一般的な酵素標識法を開発するとともに、 μ g 量のアフィニティー精製酵素標識抗体を調製する方法を開発した^(9,10)。このため現在では、競争法によるラジオイムノアッセイより多くの抗血清を必要とするものの、1 ml 以下の抗血清でも atto mole 測定を行なうことができるようになっている。

最近では、高い親和性のモノクローナル抗体が調製されるようになり、atto mole の測定は一層容易になっている。つまり、モノクローナル抗体は通常かなり高い純度のものが得られ、アフィニティー精製の必要がないからである。ちなみに、競争ラジオイムノアッセイによる血清中抗原の感度は ng/ml であり、非競争エンザイムイムノアッセイによる感度は pg/ml である。

3. atto mole 測定の実用化

ラジオイムノアッセイが開発され、それまでは測定できなかった血中ホルモンなど微量の生体物質が次々と測定されるようになり、ラジオイムノアッセイを使えば測れないものはないかのような印象を与えた。しかし、競争法ラジオイムノアッセイでは測定できない生体物質は数多く残されている。競争ラジオイムノアッセイでは測定できないが、非競争エンザイムイムノアッセイにより測定できるようになった例として次のようなものがある。男性、非妊婦女性の血中胎盤性ゴナドトロピン、パセドウ病の血中甲状腺刺激ホルモン、尿中成長ホルモン、小児血中の黄体形成ホルモン、血中心房性ナトリウム利尿ホルモンなどである^(8,9)。これにより基礎研究が進展するばかりでなく、絨毛癌、パセドウ病、小人症、性的発育不全、心疾患などの診断が一層容易になっている。

最近ではエンザイムイムノアッセイの全自動測定装置

が何種類も市販されるようになり、実用化が進んでいるが、現在でも実用化を阻む一つの要因は、充分親和性の高い抗体の供給が不足していることである。

4. milli atto mole 量の測定

これまで述べた atto mole の測定は、反応液を 150 μ l とし、直径 3.2 mm のポリスチレンボールを固相として行なったものである。測定感度は抗体の親和性によって左右されるが、ごく大ざっぱにいても atto mole 以下の測定は困難である。しかし、反応液を少なくし、固相を小さくすれば測定のバックグラウンドが下がり、atto mole 以下の測定も可能となる。事実、筆者らは反応液を 5 μ l とし、直径 1 mm のガラスボールを固相とし、ヒトフェリチンの 1 milli atto mole (1×10^{-21} mol, 600 分子) を測定することができた⁽¹¹⁾。

さらに、抗体の項で述べる免疫複合体転移測定法により、反応液 150 μ l、直径 3.2 mm の固相を使うシステムで高感度化を進めている。測定すべき抗原とジニトロフェニル抗体および酵素標識抗体を反応させ、形成された免疫複合体を抗ジニトロフェニル抗体不溶化固相にトラップする。固相を洗浄した後、免疫複合体をジニトロフェニル・リジンにより固相から溶出して第二抗体（抗体に対する抗体）不溶化固相に移しかえて、2 番目の固相に結合した酵素活性から測定すべき抗原の量を知る。免疫複合体を固相から固相へ移すことにより、バックグラウンドを低下させることができ、高感度化が可能となる。こうして 20 milli atto moles の甲状腺刺激ホルモンを測定することができた⁽¹²⁾。現在、さらに高感度化しつつある。

抗体の超高感度測定法

1. 従来法の種類と感度

血中の抗体を測定するために現在使われている方法としては、血球凝集法、ゼラチン粒子凝集法、ウエスタンブロット法、蛍光抗体法、エンザイムイムノアッセイ (ELISA と呼ばれる)、免疫沈降法などがある。従来、異なった抗体測定法の感度を厳密に比較するようなことは行なわれていないので、詳しくはわからないが、蛍光抗体法の感度が最も低く、ゼラチン粒子凝集法、ウエスタンブロット法は少し感度が高く、ELISA の感度はもう少し高く、免疫沈降法が最も高感度であると考えてよい

ようである。

抗体はその親和性により測定感度が異なるので、抗原とは異なり標準抗体というものがなく、感度を数値で表わすことは難しいが、上記のように pg/ml レベルで測定できる抗原の感度に比べれば、5～6 桁の違いがあると考えられる。

2. 高感度測定の必要性

血中の抗体は感染症と自己免疫疾患の診断に使われている。

通常の感染症では一般に多量の抗体が産生されるので、抗体測定により感染した血清とそうでないものとを容易に区別することができる。しかし、現在使われている測定法によりすべてが解決されているわけではない。たとえば、human T-lymphocyte leukemia virus type I (HTLV-I, 成人 T 細胞白血病ウイルス) のキャリアーのスクリーニングは、抗 HTLV-I 抗体の検出により行なわれている。スクリーニングはゼラチン粒子凝集法で行なわれた後、さらにウエスタンブロット法により、いわゆる確認試験が行なわれる。ウエスタンブロット法は凝集法より感度が高いというわけではないので、はっきりしない検体は確認試験の結果にかかわらず、輸血用から除外される。ところが、検体が妊婦のものであって結果がはっきりしない場合、出産後母乳で新生児を育てるかどうか深刻な問題となる。また、スクリーニング法の感度が充分であるかどうか疑問が残っている。

この種の問題は human immunodeficiency virus (HIV, エイズウイルス)、hepatitis C virus (HCV, C 型肝炎ウイルス) についても同様である。HIV の場合は感染の結果がより重大であるだけに、それだけ一層深刻である。現在使われているスクリーニング法では HIV 感染から数週間が経過しないと抗 HIV 抗体は検出されないといわれているので、HIV 感染後数週間以内の血液は輸血に使われることになる。一層の高感度化が必要であろう。

古くは原因不明であった疾患の多くのものが、現在では自己免疫疾患と考えられるようになり、それらの診断、治療経過、予後の推測などの目的で種々の自己抗体が測定されている。しかし、疾患の原因（病因）と考えられる自己抗体さえ、自己抗体以外の所見から診断された自己免疫疾患患者のすべてに検出されるわけではな

い。自己抗体と病因との関係を明らかにし、診断を容易にするためばかりでなく、自己免疫疾患の発症予測、予防の可能性を探るためにも、自己抗体の高感度測定が必要である。

3. 免疫沈降法

従来法の中で最も感度の高い方法が免疫沈降法であるが、これは2つに大別することができる。1つはポリエチレングリコール (PEG) による非特異的沈降による方法であり、他の1つは抗 Ig 抗体あるいはプロテイン A などの沈降による方法である。

PEG 沈降法は、PEG では沈降しない抗原に対する抗体の測定に利用される。たとえば、 ^{125}I 標識インスリンと抗インスリン抗体を反応させた後、PEG を加えると、抗体と結合した ^{125}I 標識インスリンが沈降し、遊離の ^{125}I 標識インスリンは沈降しないので、沈降物の放射活性から抗体の量を知ることができる。この際、沈降前にデキストランチャコールによる処理を行なえば、遊離の ^{125}I 標識インスリンを一層完全に除去できるので高感度となる。筆者らは ^{125}I 標識インスリンの代わりにインスリンそのものと抗体とを反応させ、デキストランチャコール処理後の PEG 沈降物中のインスリンそのものを上述の高感度非競争エンザイムイムノアッセイにより測定した。これによると、 ^{125}I 標識インスリンを使う場合に比べて、測定のバックグラウンドが低く、感度も 30 倍高くなった⁽¹³⁾。この方法は、ペプチドなどハプテンに対する抗体の測定には有効であるが、抗体のクラスを同定することができない。

これに対し、抗原抗体結合物を抗 Ig 抗体あるいはプロテイン A などにより分離すれば、かなりの高感度が得られて、抗体のクラスも同定できる。酵素標識抗原と抗体とを反応させた後、抗 Ig 抗体あるいはプロテイン A により結合物を分離してもよいが、Ig の量が多量なためバックグラウンドが高くなるので、まず抗酵素抗体 $\text{F}(\text{ab}')_2$ により結合物を沈降させ、沈降物を洗浄して非特異 Ig の大部分を除去する。還元剤で $\text{F}(\text{ab}')_2$ を還元することにより沈降物を溶解し、次に抗 Ig 抗体 $\text{F}(\text{ab}')_2$ により沈降させる。ここで抗体と結合していない酵素標識抗原が除去されるが、より一層完全に除去するために、沈降物を還元剤によりもう一度溶解し、再び抗 Ig 抗体により沈降させる。こうするとバックグラウ

ンドが低くなり高感度が得られる⁽¹³⁾。この方法は、どんな抗原に対する抗体の測定にも利用できる高感度測定法であるが、操作が複雑である。

4. 免疫複合体転移測定法 (immune complex transfer immunoassay)

過去 10~15 年の間に ELISA と呼ばれる方法がかなり普及した。固相表面上に不溶化した抗原により測定すべき抗体をトラップした後、酵素標識抗 Ig 抗体により抗体量を測定する方法である。この方法の操作は簡単であるが、感度は高くならない。その理由は、試料血清中の非特異 Ig が固相に物理的に吸着するためバックグラウンドが著しく高くなるからである。したがって、非特異 Ig を効率的に除去する方法の開発が必要であった。

筆者らは、試料中の非特異 Ig を効率的かつ簡単に除去する新しい方法、免疫複合体転移法 (immune complex transfer method) を開発した⁽¹³⁾。ジニトロフェニル基とビオチンの双方により標識した抗原と抗体を反応

図 3 ■ 免疫複合体転移免疫測定法 (immune complex transfer immunoassay) による抗体の測定

させて、その結合物を抗ジニトロフェニル基抗体を不溶化した固相上にトラップした後、固相を洗浄して、ジニトロフェニル・リジンにより結合物を固相から溶出し、アビジン不溶化固相にトラップする。こうすると、最初の固相を洗浄することにより試料血清中の非特異 Ig の大部分が除去されるばかりでなく、固相に物理的に吸着していた非特異 Ig も第2の固相へは移らないので非特異 Ig をより一層完全に除去することができる。次いで、酵素標識抗 Ig 抗体を反応させて、固相に結合した酵素活性から抗体量を知ることがで

きる(図3)⁽¹³⁾。非特異 Ig が除去されているのでバックグラウンドが著しく低下し、高感度測定が可能となる。この方法は、ジニトロフェニル基と酵素により別々に標識した抗原あるいは同時に標識した抗原などを用いて、より高感度に、またより簡便にすることも可能である⁽¹³⁾。

この免疫複合体転移酵素免疫測定法により、抗サイログロブリン抗体を測定した結果、バセドウ病、橋本病などの自己免疫性甲状腺疾患のすべての患者ばかりでなく大部分の健康人にも検出された(図4)⁽¹³⁾。従来法ではバセドウ病、橋本病の患者の50~70%、健康人の数%に検出されるのみであったことから、新しい方法の感度の高さがうかがえる。親和性にもよるが、新しい方法の感度は100 pg/ml である⁽¹³⁾。

自己抗体ばかりでなく、抗 HTLV-I 抗体、抗 HIV 抗体も従来法より数百倍から千倍高感度となることがわかっている。多分、抗 HCV 抗体も高感度測定が必要となり、可能となると考えられる。

ハプテンの高感度測定法

ハプテンのうち分子量が比較的大きいものについては、1分子のハプテンに2分子の抗体が結合しうるので、抗原の項で述べた2点結合法により高感度で測定することができる。アミノ酸28個からなる α -心房性ナトリウム利尿ホルモンはその好例で10 atto moles を測定することができる。抗体1分子に対応するアミノ酸の数が

図4 ■免疫複合体転移酵素免疫測定法(immune complex transfer enzyme immunoassay)による抗サイログロブリン自己抗体の測定
白丸は男性、黒丸は女性を示す。

3~5個であることを考えると、12~15個以上のペプチドはハプテンであっても2点結合法により高感度で測定することができるものと考えられる。しかし、アミノ酸10個以下のペプチドあるいは一般の低分子ハプテンには2分子の抗体は結合しえないので2点結合法による測定はできない。少なくとも高感度とはならない。このため、ラジオイムノアッセイが開発されて以来、過去30年の間、ハプテンは専ら競争法により測定されてきた。競争法によるハプテンの検出限界は femto mole (1×10^{-15} mol) レベルあるいはそれ以上であった。

最近、筆者らは2点結合法では測定できない低分子ペプチドを高感度で測定するための非競争法を開発した。その原理は、測定すべきハプテン分子を何らかの化学物質により標識して、抗ハプテン抗体と、標識に結合しうる結合物質の2つを結合して、2点結合法を可能にするもので、単純な考え方である。筆者らの最初の試みは、アミノ酸10個からなるアンギオテンシンIにビオチンを結合した後、抗アンギオテンシンI抗体とアビジンを使ってビオチン化アンギオテンシンIを測定するシステムである。ビオチン化はビオチンのサクシニミド活性エステルにより効率よく行なうことができる。抗アンギオテンシン抗体を酵素で標識するか、あるいは固相に不溶化し、アビジンをそれに応じて固相に不溶化するか、あるいは酵素で標識する。競争法では femto mole レベルであったアンギオテンシンIの検出限界が atto mole レベルに低下する(図5)。この方法はアミノ基をもつ他の

図 5 ■ 西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ標識抗アンギオテンシン I Fab' とアビジン不溶化ポリスチレンボールを用いた非競争測定法と ¹²⁵I 標識アンギオテンシン I を用いたラジオイムノアッセイによるアンギオテンシン I の標準曲線

ペプチドばかりでなく、ペプチド以外のハプテンにも応用しうることはいうまでもない。今後、種々の変法が開発され、ハプテンの非競争法による測定が発展してゆくものと考えられる。

*

ラジオイムノアッセイが競争法で行なわれ、その感度が femto mole レベルであったものを、非競争法を導入するとともに、アミノ基の代わりにチオール基を利用する新しい酵素標識法（ヒンジ法）を開発することにより atto mole レベルにまで向上させることができた。抗体の測定においても、高感度化の障害となっていた非特異 Ig を効率的に除去する新しい方法（免疫複合体転移法）を開発し高感度化した。ハプテンも同様にして新しい非競争法（hetero-two-site immunoassay あるいは heterosandwich immunoassay）を開発し高感度化の糸口を開いた。

大腸菌 β-D-ガラクトシダーゼはすでに 100 分子以下まで検出できるようになっている^(8,9)。標識としての酵素を 1 分子まで数えることも、それほど遠くない将来、可能になると考えられる。しかし、抗原、抗体、ハプテンを 1 分子まで数えるには、それぞれ新しい方法が開発されなければならないし、また 1 μl 中の 1 分子、1 ml 中の 1 分子、1 l 中の 1 分子の検出は、それぞれ異なった方法論が必要であろうと考えている。

超高感度測定の意義については次のことを指摘すれば充分であろう。今から 16~7 年前、1 atto mole の測定を報告した際、その意義を疑う意見のあったことを記憶しているが、現在、基礎研究にも臨床診断にも atto mole の測定がすでに使われているのである。

文献

- 1) 石川榮治：化学と生物，12，558 (1974)。
- 2) 石川榮治：化学と生物，12，626 (1974)。
- 3) E. Ishikawa : *J. Biochem.*, **73**, 1319 (1973)。
- 4) K. Kato, Y. Hamaguchi, H. Fukui & E. Ishikawa : *J. Biochem.*, **78**, 235 (1975)。
- 5) K. Kato, Y. Hamaguchi, S. Okawa, E. Ishikawa, K. Kobayashi & N. Katunuma : *Lancet*, **i**, 40 (1977)。
- 6) E. Ishikawa & K. Kato : *Scand. J. Immunol.*, **8** (Suppl. 7), 43 (1978)。
- 7) E. Ishikawa, M. Imagawa & S. Hashida : *Develop. Immunol.*, **18**, 219 (1983)。
- 8) E. Ishikawa : *Clin. Biochem.*, **20**, 375 (1987)。
- 9) E. Ishikawa, S. Hashida, K. Tanaka & T. Kohno : *Clin. Chem. Enzymol. Commun.*, **1**, 199 (1989)。
- 10) E. Ishikawa, M. Imagawa, S. Hashida, S. Yoshitake, Y. Hamaguchi & T. Ueno : *J. Immunoassay*, **4**, 209 (1983)。
- 11) K-h. Ruan, S. Hashida, K. Tanaka, E. Ishikawa, Y. Niitsu, I. Urushizaki & H. Ogawa : *Anal. Lett.*, **20**, 587 (1987)。
- 12) S. Hashida, K. Tanaka, T. Kohno & E. Ishikawa : *Anal. Lett.*, **21**, 1141 (1988)。
- 13) E. Ishikawa & T. Kohno : *J. Clin. Lab. Anal.*, **3**, 252 (1989)。