グルコース脱水素酵素を用いる 17 α -ヒドロキシプロゲステロンの生物発光酵素イムノアッセイ

数内 正彦*, 前田 昌子, 辻 章夫®**

(1984 年 8 月 24 日受理)

バクテリアルシフェラーゼを用いる生物発光反応を, 酵素免疫測定法 (EIA) に導入し, 17 α -ヒドロキシプロゲステロン (17-OHP) の定量に応用した. 17-OHP の標識にグルコースデヒドロゲナーゼ (GDH) を用い標識体を合成, これと 17-OHP を抗 17-OHP 抗体へ競合させ, 第二抗体固相法により結合型と遊離型を分離した. 17-OHP 濃度に依存した固相に吸着した GDH 活性を, ジヒドロニコチンアミドアデニンジスクレオチドを介する生物発光反応で検出した. 測定値は, 生物発光酵素試薬が不安定なため 1 試料を 4 回測定し, その平均により求めた. この測定法の検出限界は 2.5 pg/チューブであった. 乾燥汚紙血液に応用した場合のラジオイムノアッセイ (血清) との相関係数は 0.958 であり, ほぼ良好な相関を示した.

1 緒 言

既に知られているように, 生物の酵素系を利用する発光反応の量子収率は高く, 極めて高感度な分析法として種々応用されている^{1)~5)}. 代表的な生物発光法は二つあり, 一つはホタルルシフェラーゼを用いるアデノシン5'-三リン酸 (ATP) の検出法で, その検出限界は 10^{-13} mol とされている³⁾. 他の一つは発光細菌のルシフェラーゼで, この場合ジヒドロニコチンアミドアデニンジスクレオチド (NADH), 又はニコチンアミドアデニンジスクレオチドリッ酸 (NADPH) を検出し, NADH を 10^{-15} mol まで高感度に検出できると報告されている³⁾. NADH を生成する酸化・還元酵素系は多数知られており, 生物発光反応との組み合わせで, 基質及び酵素活性を高感度に検出する応用例は, 極めて多岐にわたっている.

一方, 発光反応の酵素免疫測定法 (EIA) への応用に関しては, 現在のところ化学発光に集中している²⁾³⁾. しかし生物発光を用いた EIA についても, 幾つかの試みがなされてきている. すなわち, 標識化合物として, 発光反応を構成する成分, ルシフェラーゼ, 又は ATP, NAD⁺ を直接用いる方法, NADH などの発光反応に関

与する補酵素の生成酵素を標識し, 生物発光の系と接続することにより間接的に EIA に導入する方法などがある. 前者は, それぞれ, 酵素の安定性や測定感度が低いなどの問題で, あまり成功していない. これに対し, 後者の間接的な方法は, 標識酵素の増幅作用が加わり, 極めて高感度な EIA として成功している. 例えば, グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PDH) を標識体とするトリニトロトルエンの EIA では, 5×10^{-18} mol の検出が可能となっている⁶⁾.

今回著者らは, NADH の産生酵素として, これまでに検討されていなかったグルコースデヒドロゲナーゼ (GDH) を選び, 市販の発光細菌ルシフェラーゼのキット (Boehringer 社製) と組み合わせることにより, 高感度な 17 α -ヒドロキシプロゲステロン (17-OHP) の新規な EIA を確立したので報告する.

2 実 験

2.1 試 薬

17-OHP と 17-OHP-3-*o*-カルボキシメチルオキシム (17-OHP-3-CMO) は Sigma 社製を用いた. G6PDH (*Leuconostoc mesenteroides*, 610 units/mg), NAD⁺ (Grade I), グルコース-6-リン酸, NAD(P)H 生物発光測定キットは, Boehringer 社製を用いた. GDH (EC 1.1.1.47, *Bacillus* sp., 39.7 units/mg) は天野製薬より提供されたものを用いた. 抗 17-OHP 抗血清 (抗 17-OHP-3-CMO-BSA 標識体ウサギ血清) は帝國機器製薬より提供されたものを用いた. その他の試薬は, 特に指定しないかぎり, 市販特級品を用いた.

* 日本化薬(株)総合研究所: 115 東京都北区志茂 3-31-12

** 昭和大学薬学部薬品分析化学教室: 142 東京都品川区旗の台 1-5-8

2.2 装 置

発光検出器は, Packard 社製の Auto picolite model 6200 luminometer を使用した. 蛍光光度計は, 日立製 MPF-2A を使用し, NADH の蛍光 (Ex: 360 nm, Em: 460 nm) を測定した. UV 測定には, 日立製 340 型自記分光光度計を用い, NADH の吸収極大 (340 nm) での吸光度を測定した.

2.3 17-OHP-GDH 標識体の合成

17-OHP-3-CMO の活性エステルを合成し, GDH のアミノ基に縮合した. すなわち, 0.1 ml のジオキサンに, 17-OHP 10.2 mg, *N*-ヒドロキシコハクイミド 10 mg, ジシクロヘキシルカルボジイミド 12.7 mg を加えて室温下 3.5 時間かき混ぜ反応した. 縮合により生じたウレイドを汙過により除去し, あらかじめ 10 mg の GDH を 100 mM のリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) 1 ml に溶解した酵素溶液に加え, 氷冷下 2 時間反応した. 反応液は, 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で 4°C, 1 夜透析し, 遠心により沈殿物を除去してから同緩衝液で平衡化した Toyopearl HW-55 fine カラム (1.4×49 cm) で精製した. 分画は 1.4 ml ずつ行い, 各分画の吸光度, 酵素活性及び免疫活性を測定した.

2.4 第二抗体固相化担体 (DASP ビーズ) の調製法

DASP ビーズは, 既に報告している方法に従って調製した⁷⁾. すなわち, アフィニティークロマトグラフィーにより精製したヤギの抗ウサギイムノグロブリン G (IgG) 抗体を, 0.55% リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) で希釈し, タンパク濃度として 22 µg/ml 溶液を調製した. 洗浄後乾燥したポリアセタール樹脂のビーズを, 上記溶液に浸せきし, 室温で 1 夜物理吸着させた. 作製した抗ウサギ IgG 抗体吸着ビーズは, 使用前に 0.3% BSA の生理食塩水で室温下 1 時間ブロッキング処理し, EIA に使用した.

2.5 測定原理と測定法

17-OHP の競合法による EIA の原理を Fig. 1 に, 標識酵素 GDH の活性を生物発光で測定する全反応系を Fig. 2 に示した. 測定法は免疫反応, 酵素反応, 生物発光反応の 3 段階から成り立っている. 免疫反応に使用する緩衝液は, すべて 0.1% BSA, 0.9% 塩化ナトリウムを含む 50 mM リン酸カリウム溶液 (pH 7.0) を使用した. 標準及び試料は, それぞれ乾燥汙紙血液 (3 mmφ 血液ディスク) 1 枚を用いて測定した.

2.5.1 免疫反応 小試験管 (10×70 mm) に試料血

Fig. 1 Schematic drawing of the competitive enzyme immunoassay for 17- α -hydroxyprogesterone

Fig. 2 Mechanism of enzyme reaction using dihydronicotinamide-adenine dinucleotide (NADH) bioluminescence assay system

液ディスク1枚を入れ、緩衝液 0.1 ml を加えて 4°C、1 夜放置して抽出した。一方、標準は、ステロイドを含まない血液ディスク1枚に、17-OHP 標準液 0.1 ml を加えた。次に、それぞれの試験管に抗 17-OHP 抗血清 ($1:4 \times 10^5$) 0.1 ml を加え、37°C、2 時間反応した。更に、17-OHP-GDH 標識体 (No. 32, $1:1 \times 10^5$) 0.1 ml と DASP ビーズ1個を加え 37°C、4 時間反応した。反応後、DASP ビーズを 2 ml の緩衝液で3回洗浄し、ビーズに吸着された酵素活性を測定した。

2.5.2 酵素反応 洗浄した DASP ビーズを、基質として 0.1 M グルコース、0.25 mM NAD^+ を含む、0.1% BSA 入りの 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.75) 0.5 ml の入った小試験管に移し 4°C で1夜反応した。

2.5.3 生物発光反応 発光測定用キュベットに酵素反応液 0.1 ml を入れ、発光検出器にセットした。Boehringer 社の NADH 測定用キットの試薬を 30 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) で 3~5 倍に希釈したものを 0.3 ml 注入し、15 秒間の放置後、発光強度を 15 秒間積算し発光量を求めた。

3 結果と考察

3.1 各種 NADH 検出法の感度比較

NADH を生物発光、蛍光、UV の三つの方法で測定し、それぞれの検出限界から感度を比較した。結果は Fig. 3 に示すように、NADH の検出限界 (測定液中の NADH の濃度を mol/l で示したが、測定液の量を 0.1 ml とすれば、 $1/10000$ 倍 mol/チューブとなる) は、生物発光: 10^{-10} mol/l, 蛍光: 2×10^{-7} mol/l, UV: 2×10^{-6} mol/l であり、生物発光は蛍光の約 2000 倍、UV

の約 20000 倍で生物発光法が極めて高感度であることが明らかである。

3.2 NADH 産生酵素の比較

NAD^+ の還元酵素として、GDH のほか、多数の脱水素酵素が知られている。これらのうちでも比活性の高い G6PDH は、EIA に応用され良好な結果を得ている⁶⁾。そこで今回著者らが使用する GDH の酵素活性の水準を知るため、G6PDH との比較を行った。初めに、それぞれの酵素の比活性を測定した。その結果、GDH: 39.7 units/mg, G6PDH: 610 units/mg であり、GDH の比活性は G6PDH の約 $1/15$ であった。更に、各酵素の活性を NADH の生物発光系で測定し、検量線を作成して検出限界を比較したところ、いずれの酵素も $10^{-6} \sim 5 \times 10^{-5}$ units/ml まで直線に乗る検量線が得られ、その検出限界は、 10^{-6} units/ml であった。又、いずれの酵素の分子量も約 11 万であることから、酵素1分子当たりの活性 (モル活性) で比較した場合、比活性と全く同様に約 15 倍の差となる。従って、理論上 GDH を標識酵素とすると、G6PDH の場合より 15 倍感度が劣るものと考えられる。しかし、G6PDH 及びその基質のグルコース-6-リン酸は高価であることを考えると、実用的には GDH でも十分使用に耐えるものと判断した。

3.3 17-OHP-GDH 標識体

2.3 で合成した標識体は、Toyopearl HW-55 を用いたゲル濾過により精製した。溶出のパターンは、Fig. 4 に示した。Fig. 4 の波長 250 nm 及び 280 nm における吸光度は、それぞれステロイドとタンパク質に由来するものである。又、GDH の酵素活性と免疫活性も測定した。免疫活性は、各画分の一部をとり、GDH 活性がほぼ一定 ($1.6 \sim 2.3 \times 10^{-4}$ units/ml) となるように希釈し、これを GDH 標識体として、2.5 に従い 500 pg の 17-OHP 存在下 (B)、非存在下 (B_0) における発光量の比で示した。Fig. 4 から明らかなように、酵素活性が高く、免疫活性も高い画分は No. 30~33 であり、いずれも使用可能な標識体と判断された。従って以下の実験では、酵素活性の最も高かった No. 32 を使用することにした。

3.4 検量線

最も感度が高く、かつ安定に測定できる EIA の最適条件を探索した。すなわち、免疫反応では、緩衝液系で 17-OHP の検量線を作成し、抗体及び標識体の希釈倍

Fig. 3 Comparison of NADH standard curves obtained by bioluminescence, fluorescence, and UV methods

Fig. 4 Elution profiles of 17- α -hydroxyprogesterone-glucose dehydrogenase conjugate with Toyopearl HW-55

率, 各試薬の添加順序, 反応温度などの条件を検討した。酵素反応では, 各基質の濃度, 緩衝液の濃度・pHなどを, 生物発光反応では, 試薬の濃度, 酸化防止剤の添加などをそれぞれ検討した。検討の結果については省略したが, 最終的に 2.5 に示した測定条件が最も良好な結果を与えた。以上, 安定に測定できる条件が確立したので, ステロイドフリーの血液ディスク存在下に検量線を作成した。Fig. 5 に示したように, この測定法における 17-OHP の検量範囲は, 2.5~500 pg/チューブであり, その検出限界は 2.5 pg であった。この測定法

Fig. 5 Standard curve for enzyme immunoassay of 17- α -hydroxyprogesterone in the presence of one disc of steroid-free dried blood spotted on filter paper

の感度はこれまで報告されている蛍光法, 化学発光法よりわずかに劣っていた。

3.5 再現性試験

17-OHP の濃度 0, 25, 250 pg/チューブにおける発光量の相対標準偏差 (R.S.D.) は, 日内: 13.6~14.4% ($n=28$), 日間: 22.5~23.7% ($n=48$) と極めて大きい。これは, 生物発光試薬が不安定なため (4°C, 30分で 5~10% 発光強度が低下) と, 試薬のロット間による発光強度の変動のためである。そこで, 安定に測定するために, 1 試料を 4 回測定しその平均値を求めて B/B_0 を算出することに決定した。すなわち, 1 試料は 8 回 ($B+B_0$) の測定により決定されることになる。このようにして測定した再現性試験の結果は, Table 1 のように, R.S.D. が日内: 3.9%, 日間: 5.1~7.1% であった。

Table 1 Reproducibilities of assay

17- α -Hydroxyprogesterone (pg/assay tube)		B/B_0 , %		
		Mean	S. D. ¹⁾	R. S. D., % ²⁾
Within	25	76.0	3.4	3.9
($n=7$)	250	36.8	1.4	3.9
Between	25	77.1	3.9	5.1
($n=6$)	250	35.2	2.5	7.1

1): Standard deviation; 2): Relative standard deviation; One sample was determined by 4 assays.

3.6 ラジオイムノアッセイ (RIA) との相関

国立小児病院から, RIA 測定データ付きの臨床試料 (3 mm ϕ 血液ディスク, 各 2 枚ずつ, 30 検体) を入手し, 本 EIA との相関性を見た。試料の測定は, 1 試料を 2 回測定し, 発光量の平均値の B/B_0 により, あらかじめ測定しておいた検量線から実測値を求めた。RIA データなしと, 極端に 17-OHP 濃度の高い検体を除いた 26 点での相関性は, Fig. 6 のとおりであった。17-OHP 濃度が 39 ng/dl 以下の正常値範囲のものが多く, 相関係数 r は 0.864 で良い相関があるとは言えない。しかし, 本 EIA で検量範囲を越えた 500 pg 以上の 3 点 (○印) を除くと, 相関係数は $r=0.958$ ($n=23$) となり, かなり良い相関を示した。又, この回帰式 $y=20.8x-71$ (x : EIA, pg/disc, y : RIA, ng/dl) は, 3 mm ϕ 血液ディスク 1 枚当たり 4 μ l の血液に対応するものとして計算すると, $y=0.834x-2.84$ (pg/4 μ l 血液) となり, 良好な相関性を示しているものと考えられる。

Fig. 6 Correlation between 17- α -hydroxyprogesterone levels determined by radioimmunoassay and proposed enzyme immunoassay

4 結 語

高感度な生物発光反応を EIA に導入するため、NADH 産生酵素としてこれまで検討されなかった GDH を標識酵素とし、17-OHP の競合法による EIA に応用した。生物発光試薬が不安定であるという問題はあつたものの、17-OHP を 2.5 pg/チューブまで高感度に測定できる系を確立することができた。しかし、当研究室で既に報告している、ペルオキシダーゼを標識体とする蛍光法の EIA⁸⁾ 及び、グルコースオキシダーゼを標識体とする化学発光の EIA⁹⁾ では、検出限界がそれぞれ 1, 0.5 pg/チューブと、本法より更に高感度な測定が可能となっている。このように、生物発光反応を用いているにもかかわらず感度が向上しなかった主な原因は、GDH の比活性が低かったため、生物発光の fmol オーダーの感度が十分に生かせなかったためと考えられる。更に、標識体が最良のものではなく（追試により、約 2 倍感度の高いものが作られた）感度を低下させる一因となった。このように、生物発光-NADH 産生酵素の組み合わせによる EIA を考える場合、その感度は標識酵素の比活性に依存するところが大きいと思われる。

(1984 年 3 月、日本薬学会第 104 年会において一部発表)

文 献

- 1) F. Gorus, E. Schram : *Clin. Chem.*, **25**, 512 (1979).
- 2) T. P. Whitehead, L. J. Kricka, T. J. N. Carter, G. H. G. Thorpe : *Clin. Chem.*, **25**, 1531 (1979).
- 3) L. J. Kricka, G. H. G. Thorpe : *Analyst* (London), **108**, 1274 (1983).
- 4) W. D. McElroy, M. DeLuca : *臨床化学*, **10**, 279 (1981).
- 5) 辻 章夫, 前田昌子 : *ぶんせき*, **1983**, 269.
- 6) "Luminescent Assays", Edited by J. Wannlund, H. Egghart, M. in Serio, M. Pazzagli, p. 125 (1982), (Raven, New York).
- 7) N. Kato, S. Ishii, H. Naruse, M. Irie, H. Arakawa, A. Tsuji : *Anal. Lett.*, **13**, (B 18), 1555 (1980).
- 8) H. Arakawa, M. Maeda, A. Tsuji, H. Naruse, E. Suzuki, A. Kambe-gawa : *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 2724 (1983).
- 9) H. Arakawa, M. Maeda, A. Tsuji : "Immuno-enzymatic Techniques", 18, Edited by S. Avrameas *et al.*, p. 233 (1983), (Elsevier, New York).

☆

Bioluminescence enzyme immunoassay of 17- α -hydroxyprogesterone using glucose dehydrogenase as label. Masahiko YABUCHI*, Masako MAEDA, and Akio TSUJI** (*Research Laboratories, Pharmaceuticals Group, Nippon Kayaku Co., 3-31-12, Shimo, Kita-ku, Tokyo, 115; **School of Pharmaceutical Sciences, Showa University, 1-5-8, Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo, 142)

A sensitive bioluminescence enzyme immunoassay for the determination of 17- α -hydroxyprogesterone (17-OHP) in dried blood samples spotted onto filter paper has been developed. 17-OHP was conjugated to glucose dehydrogenase by activated ester method. Separation of free and bound fractions after immune reaction was done by using polyacetal beads coated with purified second antibody. The enzyme activity was determined by using bacterial bioluminescence system. The sensitivity of the present method was 2.5 pg/assay tube for 17-OHP. The relative standard deviations of the intra- and interassay were 3.9 % and 5.1~7.1 %, respectively.

(Received August 24, 1984)

Keyword phrases

enzyme immunoassay of 17- α -hydroxyprogesterone; bioluminescent enzyme immunoassay; glucose dehydrogenase, bacterial bioluminescence; nicotinamide-adenine dinucleotide.