1-メトキシフェナジンメトサルフェート及びイソルミノールによる還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドの化学発光を用いる 17 α -ヒドロキシprogステロンの化学発光酵素イムノアッセイ

須藤 幸夫*, 石澤 春生, 前田 昌子, 辻 章夫^②*

(1987 年 12 月 16 日受理)

先に報告した 1-メトキシフェナジンメトサルフェート及びイソルミノールを用いる還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドの化学発光分析法を 17 α -ヒドロキシprogステロンの化学発光酵素イムノアッセイに応用した。標識酵素としては NADH 産生酵素であるグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼとグルコースデヒドロゲナーゼについて検討したところ、前者が良かった。至適条件下での 17 α -ヒドロキシprogステロンの検出下限は 40 fg であり、従来検討してきた各種の酵素イムノアッセイの中で最も高感度であった。先天性代謝異常症検査用の乾燥汚紙血液ディスク中の測定に応用し、従来法とよい相関を得た。

1 緒 言

生体内の種々の脱水素酵素反応の生成物である還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) 及びそのリン酸型 (NADPH) は主として吸光分析法¹⁾, 蛍光分析法²⁾³⁾及び電気化学的分析法⁴⁾などで測定されている。

又, 超高感度な測定法としてはバクテリアルシフェラーゼを用いる生物発光法が知られている^{5)~7)}。

著者らは 1-メトキシフェナジンメトサルフェート (1-MPMS) とイソルミノール (IL)-マイクロペルオキシダーゼ (*m*-POD) による NAD(P)H の化学発光法を開発し, 胆汁酸やグルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PDH) の活性測定法やグルコースの定量法を既報⁸⁾で報告した。一方, 発光反応を酵素免疫測定法 (EIA) に応用し高感度な EIA 系を設計しようという試みは近年数多く報告されている^{9)~14)}。化学発光 EIA の標識酵素としては, オキシダーゼ系, ペルオキシダーゼ系の酵素がほとんどでありデヒドロゲナーゼ系酵素の化学発光 EIA への応用例は知られていない。本報ではグルコ-

スデヒドロゲナーゼ (GDH), G6PDH を標識酵素として用い, 酵素反応生成物の NADH を化学発光検出する 17 α -ヒドロキシprogステロン (17-OHP) の高感度な EIA を検討した。

2 実 験

2.1 試 薬

NAD⁺, NADH, グルコース-6-リン酸 (G6P), G6PDH (610 U/mg) はベーリンガーマンハイム山之内(株)より, IL は東京化成工業(株)より, GDH (39.7 U/mg) は天野製薬(株)より提供されたものを用いた。又, *m*-POD はシグマケミカルより, 1-MPMS は半井化学薬品製を購入した。抗 17-OHP 抗体は既報のものを用いた。その他の試薬は和光純薬工業製特級試薬を用いた。又, 蒸留水はイオン交換水をガラス蒸留装置を用い再蒸留した水を用いた。

2.2 試 液

GDH 活性の測定に際して, グルコース (0.1 mol/l), NAD⁺ (0.25 mmol/l) はリン酸緩衝液 (PB 50 mmol/l, pH 7.7) に溶解し, G6PDH 活性の測定に際しては NAD⁺ (0.5 mmol/l), G6P (0.6 mmol/l) をトリス塩酸緩衝液 (トリス B, 20 mmol/l, pH 7.8) に溶解する。IL (2.4×10^{-4} mol/l) は炭酸ナトリウム緩衝液 (0.8 mol/l, pH 9.5) に溶解し, 1-MPMS (5×10^{-6} mol/l) 及び *m*-POD (1×10^{-6} mol/l) は再蒸留水に溶解して使

* 富士写真フィルム(株)朝霞研究所: 351 埼玉県朝霞市泉水 3-11-46

** 昭和大学薬学部: 142 東京都品川区旗の台 1-5-8

用した。

2.3 測定装置

化学発光検出器は Picolite Model 6500 Luminometer (バックードインストルメント製) を用いた。

2.4 試料

標準乾燥汙紙血液は栄研イムノケミカル研究所より入手し、試料は昭和大学医学部附属病院及び神奈川県予防医学協会から入手した。

2.5 酵素標識体の調製

酵素として G6PDH, GDH を選び、17-OHP の誘導体として 17-OHP-3-(*O*-カルボキシメチル)オキシム (17-OHP-3CMO), 及び 4-カルボキシメチルチオエーテル (17-OHP-4CMT) の 2 種について既報¹⁵⁾ に準じて活性エステル法で調製した。トヨパール HW55 によるゲルクロマトグラフィーで精製し、酵素活性及び免疫活性のある画分を用いた。

2.6 EIA

小試験管 (12 mm×75 mm) に 17-OHP 標準液 0.1 ml 又は乾燥汙紙血液 ディスク (3 mm i.d.) 1 枚、希釈抗 17-OHP 抗血清 0.1 ml、酵素標識体 0.1 ml、50 mmol PB-0.1% BSA-0.05% NaN₃ (PB-BSA-NaN₃, pH 7.0) 0.1 ml (乾燥汙紙血液ディスクを用いるときは 0.2 ml) 及び第二抗体固相化ビーズ¹⁰⁾ 1 個を加え、よくかき混ぜて、37 °C で、4 時間免疫反応する。免疫反応後、小試験管内の液を吸引除去して、50 mmol/l PB-BSA 1.5 ml で 3 回洗浄する。洗浄したビーズを別の小試験管に移し、これに GDH 標識体では基質としてグルコース, NAD⁺ 溶液 0.5 ml を加え、G6PDH 標識体を用いた場合は、G6P, NAD⁺ 溶液 0.5 ml を基質溶液として加え、4 °C で一夜反応させる。

次に反応液 0.2 ml を化学発光測定用のプラスチックチューブ (55 mm×12 mm) に移し、測定器内に入れ 1-MPMS 溶液 0.5 ml を加えて 80 秒後に IL/*m*-POD 溶液 0.5 ml を加え、15 秒後から 6 秒間の発光量を測定する。

3 結果及び考察

3.1 原理

本化学発光 EIA 法の原理を Chart 1 に示す。

すなわち抗体との結合型 (B)/遊離型 (F) 分離剤としての第二抗体固相化ビーズ (6×5 mm)¹⁰⁾ 存在下、抗 17-OHP 抗血清と標識酵素として GDH, G6PDH を結

Chart 1 Principle of chemiluminescent enzyme immunoassay (EIA)

合させた 17-OHP 及び抗原 (17-OHP) を反応させる。抗原抗体反応後、ビーズについた酵素活性を NAD⁺ 存在下、グルコース又は G6P を基質として酵素反応させると NAD⁺ は NADH に還元され、更に電子伝達体である 1-MPMS と反応し、生成する 1-MPMSH₂ が溶存酸素と反応し、スーパーオキシドアニオン (O₂⁻) 及び過酸化水素 (H₂O₂) を生成する。この O₂⁻ 及び H₂O₂ が発光触媒の *m*-POD の存在下、IL と反応して化学発光する。この発光量から抗原量を知る方法である。

3.2 EIA の至適条件の検討

最も高感度で、かつ、安定に測定できるような EIA 系を確立するため、免疫反応における抗体、酵素標識抗原の希釈倍率、各試液の添加順序、反応温度、反応時間を検討し、酵素反応においては、各基質濃度、反応温度、反応時間及び化学発光反応では試薬濃度、測定時間などをそれぞれ検討した。

血液の存在しない状態では 1-MPMS を酵素反応時添加し、十分に H₂O₂ を生成する方法が良好な結果を与えたが、汙紙血液ディスクを用いた場合は発光強度が大幅に低下した。これは血液中の成分が第二抗体固相化ビーズに吸着し、1-MPMS の反応を阻害しているか、又は生じた H₂O₂ を分解することに起因していると考えられた。このため、酵素反応後に 1-MPMS を添加し、次いで IL/*m*-POD を加えて発光させる方法とした。

3.2.1 抗体と酵素標識抗原との組み合わせの検討

調製した 17-OHP-3CMO-GDH, 17-OHP-3CMO-G6PDH, 17-OHP-4CMT-G6PDH の酵素標識体を用いて、Table 1 に示すような 4 種の抗体との組み合わせ

で感度の比較を行った。表中の値は $B/B_0\%$ が 50% となる 17-OHP の値 (pg/アッセイチューブ) を示した。かつこ内は希釈倍率 ($\times 10^4$) を示す。検討した組み合わせのうち、最も高感度な組み合わせは G6PDH を標識酵素として用いた bridge heterologous な組み合わせ (17-OHP-4CET 抗体/17-OHP-4CMT-G6PDH) であり 50% 置換値は 11 pg/アッセイであった。なお, GDH が G6PDH より劣っているのは, 用いた GDH の比活性が G6PDH の約 1/6 であり, 従って, G6PDH を標識したほうが GDH 標識より高感度なアッセイ系を組むことができた。そこで以下試料の測定に際しては G6PDH を標識酵素として用いることとした。

Table 1 Comparison of 50% displacement value with various antibody and enzyme conjugate

Antibody (dilution, $\times 10^4$)	Conjugate		
	G6PDH (3CMO)	GDH (3CMO)	G6PDH (4CMT)
3CMO (40)	21 pg	72 pg	50 pg
4CET (15)	38	86	11
4CMT (10)	300	—	—
11HS (2)	39000	—	—

3CMO: 3-(O-carboxymethyl)oxime; 4CET: 4-carboxyethylthioether; 4CMT: 4-carboxymethylthioether; 11HS: 11-hemisuccinate. G6PDH: glucose 6-phosphate-dehydrogenase; GDH: glucose dehydrogenase

3.2.2 乾燥汙紙血液試料での G6PDH 活性の測定条件の検討 前項で検討した中で最も高感度な組み合わせである 17-OHP-4CMT-G6PDH と 17-OHP-4CET 抗体の組み合わせを選び, 試料として乾燥汙紙血液を用いた場合の G6PDH 活性の測定条件について検討した。G6PDH の酵素活性の測定に際し, 基質の G6P, 補酵素 NAD^+ の至適濃度は, Fig. 1(A), (B) に示すように G6P は 0.6 mmol/l, NAD^+ は 0.5 mmol/l 以上で, それぞれ一定の発光強度を与えた。更に発光試薬である 1-MPMS と IL/ m -POD の至適濃度は Fig. 1(C) に示すように 1-MPMS は 5×10^{-6} M, IL 及び m -POD

Fig. 1 Effects of various conditions on chemiluminescence intensity

(A): concentration of G6P, (B): concentration of NAD^+ , (C): concentration of 1-MPMS, (D): concentration of IL and m -POD

は 1.2×10^{-4} mol/l の IL と 5×10^{-7} mol/l の m -POD の各 0.5~5 倍濃度までそれぞれ 1:1 に混和したものについて検討したところ IL が 2.4×10^{-4} mol/l, m -POD は 1×10^{-6} mol/l のときが発光強度の S/N 比が最も高かった。

3.3 検量線及び精度

各種条件検討の結果, 最適条件下での標準溶液を用いた場合と乾燥汙紙血液ディスク (3 mm 径 1 枚) を用いた場合の 17-OHP の検量線と日内の相対標準偏差を Fig. 2 に示した。

検量域は標準溶液を用いた場合は 0.04 pg/アッセイから 200 pg/アッセイ, 汙紙血液の場合は 4 pg/アッセイから 256 pg/アッセイ (~ 160 ng/ml) であった。2点での相対標準偏差は 8 pg/アッセイにおいて 5.4% ($n=5$), かつこ内は発光強度 (カウント) で計算した相対標準偏差で 4.5% であった。32 pg/アッセイにおいても 6.1% と 4.7% で良好な結果であった。本法での測定限界は 40 fg/アッセイチューブであり, NADH の化学発光を利用して 17-OHP の高感度な EIA が確立できた。

3.4 他法との相関

本法と, 既に副じん皮質過形成症のマスクリーニングに用い始められているペルオキシダーゼ (HRP) を標

Fig. 2 Standard curves of 17 α -hydroxyprogesterone (17-OHP) by proposed chemiluminescent EIA

-- blood disc, — buffer standard; R.S.D., % (n=5)

識酵素とする 17-OHP の ELISA 法 (enzyme linked immuno sorbant assay)¹⁶⁾¹⁷⁾ との相関性について検討した。結果を Fig. 3 に示す。

$y(\text{本法}) = 0.98x(\text{ELISA}) + 1.25$, $r = 0.973$ ($n = 29$) と良い相関を示した。

Fig. 3 Comparison of 17-OHP values in dried blood disc obtained by enzyme linked immuno sorbant assay (ELISA) and the proposed chemiluminescent EIA

$$y = 0.98x + 1.25, r = 0.973, n = 29$$

以上, NAD(P)H の化学発光検出法を利用して GDH, G6PDH を標識酵素とする 17-OHP の化学発光検出酵素イムノアッセイを確立した。G6PDH を標識酵素とする EIA はバクテリアルシフェラーゼを用いる生物発光 EIA が報告されているが⁹⁾, 試薬が高価でかつ安定性に乏しいので日常分析には適さない。本法は生物発光法の欠点を補い, かつ, 生物発光法に匹敵する感度を有し, しかも第二抗体固相法を用いているので試料として全血

液を用いてもほとんど影響されず, 新生児の代謝異常症検査用の乾燥汚紙血液ディスク (3 mm i. d., 全血として 3.6 μ l) 1 枚の試料で十分測定可能である。著者らは種々の酵素を用い, 種々の検出法での 17-OHP の測定を検討してきたが^{14)~16)18)19)}, それらの中で本法が最も高感度で, 従来はアッセイ当たり 0.1 pg が最も低い検出限界であったが, 本法では 40 fg (100 amol) の検出限界であった。ステロイドのような低分子でこのような高感度なアッセイ法は他に報告例がなく, 本法は超微量分析法として有用な方法であると考えられる。

文 献

- 1) 真重文子, 山中 学: 臨床化学, **8**, 191 (1979).
- 2) H. P. Schwarz, K. V. Bergmann, G. Panmargariner: *Clin. Chim. Acta*, **50**, 197 (1974).
- 3) G. H. Murphy, B. H. Billing, D. N. Baron: *J. Clin. Path.*, **23**, 594 (1970).
- 4) L. Bartalits, G. Nagy, E. Pungor: *Clin. Chem.*, **30**, 1780 (1984).
- 5) M. Deluca, W. D. McElory: "Bioluminescence and chemiluminescence: Basic chemistry and analytical applications", p. 97 (1981), (Academic Press, New York).
- 6) L. J. Kricka, T. J. N. Curter: "Clinical and Biochemical Luminescence", p. 75 (1982), (Marcel Dekker, New York).
- 7) H. H. Weetall: "Method in Enzymology", **44**, 104 (1976), (Academic Press, New York).
- 8) 前田昌子, 辻 章夫: 生物試料分析, **6**, 35 (1983).
- 9) 田部一弘, 河崎孝男, 前田昌子, 辻 章夫, 藪内正彦: 分析化学, **36**, 86 (1987).
- 10) A. Woodhead, I. Weeks: *Clin. Chem.*, **29**, 1480 (1983).
- 11) H. Arakawa, M. Maeda, A. Tsuji: *Clin. Chem.*, **31**, 430 (1985).
- 12) M. Maeda, A. Tsuji: *Anal. Chim. Acta*, **167**, 241 (1985).
- 13) S. Takayasu, M. Maeda, A. Tsuji: *Immunolog. Methods.*, **83**, 317 (1985).
- 14) E. J. Kricka, P. E. Stanley, G. H. G. Thorpe, P. T. Whitehead Ed.: "Analytical applications of bioluminescence and chemiluminescence", p. 149 (1984), (Academic Press, New York).
- 15) K. Van Dyke Ed.: "Bioluminescence and chemiluminescence", Vol. 1, p. 185, 203, 213 (1985), (CRC Press, Boca Raton).
- 16) 池上卓志, 前田昌子, 辻 章夫, 細田 宏, 南原利夫: 薬誌, **107**, 150 (1987).
- 17) M. Maeda, H. Arakawa, A. Tsuji, Y. Yamagami, A. Isozaki, T. Takahashi, E. Haruki: *Clin. Chem.*, **33**, 761 (1987).
- 18) J. Sawada, T. Terao, S. Itoh, M. Maeda, A. Tsuji, H. Hosoda, T. Nambara: *J. Steroid. Biochem.*, **28**, 405 (1987).
- 19) 藪内正彦, 前田昌子, 辻 章夫: 分析化学, **34**, 6 (1985).
- 20) H. Arakawa, M. Maeda, A. Tsuji: "Immuno-enzymatic Techniques", Edited by S. Aurameas,

Vol. 18, p. 233 (1988), (Elsevier, Amsterdam).

☆

Chemiluminescent enzyme immunoassay of 17 α -hydroxyprogesterone by using dihydronicotinamide adeninedinucleotide chemiluminescence assay with 1-methoxyphenazinemethosulfate and isoluminol. Yukio SUDO*, Harumi ISHIZAWA, Masako MAEDA and Akio TSUJI**(*Fuji Photo Film Co., Ltd., Research Laboratories, Asaka, 3-11-46, Sensui, Asakashi, Saitama 351; **School of Pharmaceutical Sciences, Showa University, 1-5-8, Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo 142)

Dihydronicotinamide adeninedinucleotide (NADH) reduces molecular oxygen to O₂⁻ and H₂O₂ in the presence of electron mediator. The produced O₂⁻ and H₂O₂ could be measured by chemiluminescence reaction using isoluminol and microperoxidase. We have developed a chemiluminescence assay of NADH using 1-methoxyphenazinemethosulfate (1-MPMS) as electron mediator. This chemiluminescence reaction has been coupled to the assay of enzyme activities which produced NADH. A highly sensitive chemiluminescent enzyme immunoassay of 17 α -hydroxyprogesterone(17-OHP) using this NADH chemiluminescence assay have been developed. Glucose-6-phosphate dehy-

drogenase (G6PDH) and glucose dehydrogenase(GDH) were used as label enzyme. G6PDH gave good results than GDH because of its high enzyme activity. The second antibody-coated-bead was used to separate the bound and free fractions. The enzyme activity of bound fraction was measured by above NADH chemiluminescence reaction. Good standard curve was obtained in the range from 40 fg to 250 pg/assay. The 17-OHP values of dried blood spot samples (3 mm i.d.) were assayed by both ELISA and the present method. The results showed good correlation { y (proposed chemiluminescent enzyme immunoassay)=0.98 $\times$ (ELISA) +1.25, $r=0.973$, $n=29$ }. The present method may be usefully applicable for the neonatal congenital adrenal hyperplasia.

(Received December 16, 1987)

Keyword phrases

chemiluminescent enzyme immunoassay; chemiluminescent assay of dihydronicotinamide adeninedinucleotide; chemiluminescent enzyme immunoassay of 17 α -hydroxyprogesterone; glucose 6-phosphate dehydrogenase.