報 文

マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法による
ハプテン-ウシ血清アルブミン及び酵素-抗体複合体の分析橋 本 豊^{®*}, 山下 法幸^{*}, 山下 幸和^{*}, Tim Williams^{**}Analysis of hapten-bovine serum albumin and enzyme-antibody conjugates
by MALDI-TOFMSYutaka HASHIMOTO, Noriyuki YAMASHITA, Kouwa YAMASHITA^{*} and Tim WILLIAMS^{**}^{*} Pharmaceuticals Group, Nippon Kayaku Co., Ltd., 3-31-12, Shimo, Kita-ku, Tokyo 115^{**} Instrument Group, JASCO International Co., Ltd., 2-4-21, Sennin-cho, Hachioji-shi, Tokyo 193

(Received 26 January 1996, Accepted 22 February 1996)

The molecular weights of hapten-BSA conjugates were rapidly determined by MALDI-TOFMS. Forskolin, deacetylforskolin and etoposide were the haptens used to prepare the hapten-BSA conjugates. Protonated molecules ($[M+H]^+$) of these conjugates were detected clearly by MALDI-TOFMS, and therefore, the number of haptens molecules bonded to BSA could be calculated easily. The relationship between the number of haptens molecules bonded to BSA and the immune response was studied. Enzyme-antibody conjugates were also determined by MALDI-TOFMS. In the HRPO-SOD antibody (IgG) conjugate, the ion of m/z 240000 was detected; this ion corresponds to the conjugate of three moles of HRPO bonded to IgG. There was a linear relationship between the number of HRPO molecules conjugated to IgG and ELISA activity.

Keywords : MALDI-TOFMS; hapten-BSA conjugate; enzyme-IgG conjugate; forskolin; etoposide.

1 結 言

薬物の ELISA (酵素免疫測定), RIA (ラジオイムノアッセイ) による測定系を作製するためには, まず抗体を調製する必要がある。通常, 低分子性薬物はそれ自身が免疫原性を持たず, いわゆるハプテンであるため, 抗体産生のためにはウシ血清アルブミン (BSA) をキャリアーに選り両者を結合させたハプテン-BSA を用いるのが一般的である。このとき, ハプテン-BSA 中のハプテ

ンの結合数が抗体産生に大きく影響すると言われている。しかし, これまでハプテンが特徴的な分光学的特性を持たない場合には, ハプテンの結合数を迅速に決定する有効な手段がなく, 結合体をなんらかの手段で切断し, 遊離して来るハプテンを測定し, その結合数を推定しているのが現状である。切断が定量的に行われる保証はなく, 結合数を正確に算出するためには, かなり煩雑な操作が必要となる。又, 得られた抗体を用いて ELISA の系を組む際の酵素-抗体複合体も同様の問題を抱えており, 両者とも簡便で迅速な分析法が待たれるところである。

1988年 Karas らは有機酸をマトリックスに用いたレーザー脱離イオン化質量分析 (matrix-assisted laser

* 日本化薬(株)創薬本部分析センター: 115 東京都北区志茂 3-31-12

** ジャスコインタナショナル株式会社: 193 東京都八王子市千代町 2-4-21

desorption ionization mass spectrometry; MALDI-MS) により分子量 10000 以上のタンパク質をはじめ、生体高分子の分子量を容易に決定できることを示したり。そこで著者らは、Karas らの MALDI 法を用いて、前述のハプテン-BSA の分子量を精度よく決定できれば、簡便かつ迅速にハプテン結合数を求められるものと考えた。

本論文では、二～三の薬物のハプテン-BSA 複合体を調製し、MALDI-飛行時間型質量分析 (time of flight mass spectrometry; TOFMS) によりハプテン結合数を求め、結合数と抗体産生能の関係を検討した。又、酵素-抗体複合体中の酵素の結合数と ELISA の活性との関係も併せて検討した。

2 実 験

2.1 試 薬

β -ガラクトシダーゼ、西洋わさびペルオキシダーゼ (HRPO)、BSA、*o*-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド、完全フロイントアジュバントは Sigma 製を使用。セファロース 6B はファルマシア製を、96 穴イムノプレートは Nunc 製を使用した。ホルスコリン、ジアセチルホルスコリン、エトポシドは当研究所で合成したものを使用した。スーパーオキシジスムターゼ (SOD) は当社で遺伝子組換え法により大腸菌で発現させたヒト型 Cu-Zn-SOD を使用した²⁾。SOD の 2 種のモノクローナル抗体は岐阜薬科大学平野和行教授より恵与されたものを使用した。そのほかの試薬、試液類は東京化成製の特級品を使用した。

2.2 方 法

2.2.1 ハプテン (薬物)-BSA 結合体と抗血清の調製
ジアセチルホルスコリン [Fig. 1(A)]、ホルスコリン [Fig. 1(B)]、エトポシド [Fig. 1(C)] 等の薬物を用い、これらの水酸基にヘミサクシネートを、カルボニル基に *o*-カルボキシメトキシ基を導入することにより活性化した後、BSA と結合させた³⁾。すなわち、ホルスコリン又はジアセチルホルスコリンをピリジン中に採り、無水コハク酸と 4-モルフォリン-*N,N'*-ジシクロヘキシルカルボキシアミジンを加え、室温で 10 時間かき混ぜて、水酸基にヘミサクシニル基を導入した。エトポシドは 1,1-ジメトキシ-3-ブタンによりアセトニルエトポシドを合成した後、ピリジン中でカルボキシメトキシアミンヘミヒドロクロライドを加えアセトニルカルボキシメトキシエトポシドを得た。これら活性化薬物を水-ジオキサン中で BSA と反応させた。反応液は透析後、

Fig. 1 Structures of deacetylforskolin(A), forskolin(B) and etoposide(C)

完全フロイントアジュバントとともにウサギ背部皮下に感作した。最終感作後、ウサギの全血を採取し抗血清を得た。抗体- β -ガラクトシダーゼの調製: ハプテン-BSA と同様にして調製した。SOD モノクローナル抗体-HRPO 標識体の調製: グルタルアルデヒド法⁴⁾を用いた。すなわち HRPO にグルタルアルデヒドを加え室温で一晩放置後、SOD モノクローナル抗体を加え室温で 24 時間反応後、セファロース 6B カラムにより SOD-HRPO 標識画分を分取した。ELISA 測定: β -D-ガラクトシダーゼを標識酵素とした場合は、抗原抗体反応の後、デキストラン-炭末法により Bound/Free 分離を行い、*o*-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシドを基質にし、酵素反応後、生成する *o*-ニトロフェノールを 420 nm の吸光度を測定し薬物量を算出した。SOD 量測定は 2 種のモノクローナル抗体を用いるサンドイッチ法⁵⁾を 96 穴イムノプレート上で行い、基質には H_2O_2 及び *o*-フェニレンジアミンを用い、酵素反応後 420 nm の吸光度を測定し SOD 量を算出した。

2.2.2 MALDI-TOFMS Fisons Instruments (VG) 製 ToFSpec レーザー脱離イオン化-飛行時間型質量分析計に、DEC 製 VAX ステーション 4000 VLC ワークステーションを装着し、 N_2 レーザー (波長 337 nm)、加速電圧 20 又は 25 kV の正イオンモードで行った。マトリックスには α -シアノヒドロキシケイ皮酸、ジヒドロ

Fig. 2 MALD mass spectra of forskolin-BSA conjugate (upper) and BSA (lower)

Vertical line is relative-ion intensity. Horizontal lines are m/z value

キシベンゾイル酸及びシナピン酸を適宜用いた。質量数決定の標準品には BSA 及びホスホリラーゼ B を用いた。マトリックスは 50% アセトニトリル-水に溶解し 0.05 M の溶液にした。試料は 0.1% トリフルオロ酢酸を含む水に 10~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶解した。マトリックスと試料溶液を等量ずつ混合し、そのうち 1.5 μl をサンプルターゲット上に塗布し乾燥させた後、MS の測定に供した。

3 結果及び考察

3・1 ホルスコリン及びジアセチルホルスコリン-BSA 複合体の質量スペクトル

ホルスコリン-BSA 複合体を MALDI 法で測定し、プロトン化分子 ($[M+H]^+$) m/z 79200 を確認することができた (Fig. 2)。標準品として用いた BSA は m/z 66420 と算出され計算値 (66430.3) の 0.015% に収まる値であった。これらの値からホルスコリンの結合個数を計算すると、ホルスコリン-BSA のハプテン部分は 493 Da であることから、25.9 mole と算出された。又、ホルスコリン-BSA 複合体のスペクトルは BSA に比べかなりブロードなスペクトルを示している。これはホルスコリン結合数に、ある種の分布が存在するものと考えられた。

ジアセチルホルスコリン-BSA 複合体では m/z 82900 に $[M+H]^+$, m/z 41400 に $[M+2H]^{2+}$ を明りように確認することができた (Fig. 3)。

ホルスコリンと同様にしてハプテン結合数を算出すると、36.5 mole となった。この場合もスペクトルはブ

Fig. 3 MALD mass spectrum of deacetylforskolin
Vertical line is relative-ion intensity. Horizontal lines are m/z value

Fig. 4 MALD mass spectra of forskolin-BSA conjugate when ionization spots on a sample target are changed

Vertical line is relative-ion intensity. Horizontal lines are m/z value

ロードな形状を示し、ハプテン結合数の分布状態を示しているものと考えられた。なお、これら複合体を用いた免疫感作ではどちらの複合体についても高い抗体価の抗血清を得ることができた。

3・2 ホルスコリン-BSA 複合体の不均一性について

ホルスコリン-BSA 複合体をレーザー照射によりイオン化する際、ターゲット上のレーザーの照射位置を変えたときのスペクトル変化を観察した。照射位置により m/z 86300, 82900 及びその中間的な値が観測され (Fig. 4)、これはホルスコリン-BSA 複合体が均一では

Fig. 5 MALD mass spectrum of etoposide-BSA conjugate

Vertical line is relative-ion intensity. Horizontal lines are m/z value

なく、ターゲット上で各々別の結晶を形成しているためと考えられた。

3.3 エトポシド-BSA 複合体の質量スペクトル

エトポシド-BSA 複合体の MALDI 質量スペクトルを測定した。[M+H]⁺ (m/z 67800), [M+2H]²⁺ (m/z 34000) 及び [M+3H]³⁺ (m/z 22690) が観測された (Fig. 5)。プロトン化分子よりエトポシドの結合個数は 2 mole と算出された。なお、本複合体を用いた免疫感作では、ほとんど抗体価の上昇は見られなかった。

3.4 ホルスコリン-β-ガラクトシダーゼ複合体の質量スペクトル

[M+H]⁺ と考えられる m/z 117400 が観測された (Fig. 6)。この周辺のスペクトルを詳細に解析したところ、このスペクトルは m/z 116900, 117400, 118000, 118600 の集合体と考えられ、これはホルスコリンの結合数が 1 個ずつ増した複合体に相当するスペクトルと解釈された (Fig. 7)。

3.5 SOD モノクローナル抗体 (IgG)-HRPO 複合体の質量スペクトル

SOD モノクローナル抗体-HRPO 複合体を調製する際、HRPO の添加量を 1, 10, 100 倍に変えて反応させた。反応混液は精製することなくそのまま MALDI-TOFMS 測定に供した。HRPO 量が 1 及び 10 では IgG と HRPO のスペクトルしか観測されなかったが、

Fig. 6 MALD mass spectrum of forskolin-β-galactosidase conjugate

Vertical line is relative-ion intensity. Horizontal lines are m/z value

Fig. 7 MALD mass spectrum of forskolin-β-galactosidase conjugate (enlarged)

Vertical line is relative-ion intensity. Horizontal lines are m/z value

100 倍量添加すると IgG の 150000 Da 以外に HRPO が 1 mole 結合したと考えられる m/z 195000 付近と、2 mole 結合したと考えられる m/z 240000 付近にピークが観測された (Fig. 8)。次にこれら複合体を ELISA 法により HRPO 活性を測定したところ、抗体に結合した HRPO 1 mole の結合割合に正比例した活性を示した (Table 1)。このように MS と生物活性が、おおよそ正の相関を示していることから m/z 195000 及び 240000 のイオンは HRPO が大過剰に存在するための付加イオンではなく、IgG-HRPO 結合体のイオンと考えられた。

質量スペクトルの一部を採取していただいた日本ブルッ

Fig. 8 MALD mass spectra of SOD-HRPO conjugate

Addition of 100 volumes of HRPO (upper), 10 volumes of HRPO (middle) and 1 volume of HRPO (lower)

Vertical line is ion intensity. Horizontal lines are m/z value

カー株式会社に深謝いたします。

(1994 年 9 月, 第 11 回生体成分の分析化学シンポジウムにて一部発表)

Table 1 HRPO activity in SOD antibody-HRPO conjugates and the ion intensity at m/z 195000 by MALD mass spectra

HRPO addition	Ion intensity at m/z 195000 (relative)	HRPO activity (O. D. at 420 nm)
100	1	2660 $\pm$ 60
10	0.01	213 $\pm$ 6
1	n. d. [†]	24.4 $\pm$ 0.4

[†] n.d.: not detected.

文 献

- 1) M. Karas, F. Hillenkamp: *Anal. Chem.*, **60**, 2299 (1988).
- 2) T. Morino, M. Morita, K. Seya, Y. Sukenaga, K. Kato, T. Nakamura: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 170 (1988).
- 3) K. Yamashita, K. Watanabe, H. Takayama, M. Ishibashi, H. Miyazaki: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **5**, 11 (1987).
- 4) S. Avrameas: *Immunochemistry*, **8**, 1175 (1971).
- 5) T. Adachi, Y. Usami, T. Kishi, K. Hirano, K. Hayashi: *J. Immunol. Methods*, **109**, 93 (1988).

要 旨

ハプテン-BSA 複合体の分子量を MALDI-TOFMS を用いて測定した。MALD イオン化法では、用いたいずれのハプテン-BSA 複合体もプロトン化分子 ($[M+H]^+$) を確認することができた。このため複合体中のハプテンの結合個数を容易にかつ迅速に算出することができた。又、SOD の ELISA 測定系で酵素-抗体複合体を調製し、酵素結合数を MALDI-TOFMS で測定した。抗体に 1 mole の HRPO が結合した m/z 195000 のイオンが検出され、HRPO の結合割合と ELISA による酵素活性との間に正の相関が認められた。