薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
114 (3) 171-175 (1994)

抗原固定化ゲルによる特異精製抗体を用いたオキソン酸 カリウムの酵素免疫測定法

北村龍一,^{*,a} 佐藤俊幸,^a 前田昌子,^b 辻 章夫^b
大鵬薬品工業(株) 代謝分析研究所,^a 昭和大学薬学部^b

Enzyme Immunoassay of Potassium Oxonate Using Specific Antibody Isolated by Immunosorbent Gel

Ryuichi KITAMURA,^{*,a} Toshiyuki SATOH,^a Masako MAEDA,^b
and Akio TSUJI^b

*Pharmacokinetics Research Laboratory, Taiho Pharmaceutical Co.,
Ltd.,^a 224-2 Ebisuno, Hiraishi, Kawauchi-cho Tokushima 771-01,
Japan and School of Pharmaceutical Sciences, Showa University,^b
1-5-8 Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo 142, Japan*

(Received September 24, 1993)

An enzyme immunoassay for the determination of potassium oxonate in the plasma has been developed. The procedure is based on a competitive enzyme-linked immunosorbent assay using the second antibody solid phase method. The antiserum for potassium oxonate was prepared using oxonic acid 6-carboxypentylamide-BSA conjugate as immunogen. The specific antibody for oxonic acid was isolated from the antiserum using oxonic acid 6-carboxypentylamide immobilized immunosorbent gel. The purified antibody resulted in high sensitivity and low cross-reactivity as compared with the unpurified antiserum. Potassium oxonate in the plasma could be assayed in the range from 20 to 1000 ng/ml by the proposed EIA. The recovery was ranged from 82 to 117% and the coefficient of variation was from 6.6 to 14.7% ($n=6$).

Keywords—enzyme immunoassay; potassium oxonate; immunosorbent gel

緒 言

5-フルオロウラシル (5-FU) は生体内でリン酸化体となり、抗腫瘍効果を示すが、その一方で、副作用として消化管障害を引き起こすことが知られている。¹⁾ 5-FU のリン酸化を阻害するオキソン酸カリウム (Oxo) と 5-FU のマスク型であるテガフルを配合した製剤を経口投与すると、Oxo が消化管組織に高濃度に分布し、抗腫瘍効果を減弱させることなく、5-FU の副作用を軽減することが報告されている。²⁾

Oxo のヒトでの体内動態を把握することは、5-FU 製剤の抗腫瘍効果、副作用軽減に Oxo が及ぼす効果を判断するうえで重要である。そのためにヒト血漿中での Oxo 測定法を検討したが、Oxo は高い水溶性とカルボキシル基の不安定性のため、クリーンアップあるいは誘導体化を行うことができず、HPLC や GC/MS による定量は困難であった。

著者らは、前処理を行うことなく、かつ高感度分析が期待できる酵素免疫測定法 (EIA)³⁾ を検討

した。オキソン酸カルボキシペンチルアミド (Oxo-CPA) と BSA との結合体を免疫することにより得られた抗血清を用いて EIA を行った場合には、抗血清の Oxo に対する親和性が、Oxo-CPA-酵素結合体に比べて弱く、これが競合法に基づく EIA の高感度化の障害となった。そこで、ゲルに固定化した Oxo-CPA との抗原抗体反応を利用し抗 Oxo-CPA 抗体及びその他の抗体の除去を行うことにより、抗血清から Oxo に対し特異性の高い抗体成分を精製し、これを用いた EIA の検討を行った。

実 験 の 部

試薬及び試液 テガフル、Oxo-CPA は当研究所で合成した。BSA (fraction V) は生化学工業 (株)、西洋ワサビペルオキシダーゼは東洋紡績 (株)、完全アジュバント (Freund) は (株) ヤトロロン、ヤギ抗ウサギ IgG 抗体はケミコン (U.S.A.)、ブロックエースは大日本製薬 (株)、EAH-Sepharose 4B はファルマシア、96 穴イムノプレートは日本インタメッド (株)、アマライト発光検出試薬はアマシャム薬品 (株) より購入した。その他の試薬は和光純薬工業 (株) より購入した。

EIA 用緩衝液として、3.3% ブロックエース及び 0.9% 塩化ナトリウムを含む 50 mM リン酸緩衝液、pH 7.0 を、洗浄液として 0.05% Tween-20 及び 0.9% 塩化ナトリウムを含む 50 mM リン酸緩衝液、pH 7.0 を使用した。

ウサギ抗 Oxo 抗血清の作成 ハプテンである Oxo-CPA を酸無水物法⁴⁾により BSA に結合させ (反応モル比, BSA: Oxo-CPA (1:100)) 免疫原とした。2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸⁵⁾を用いて Oxo-CPA の結合モル比を測定した結果、BSA 1 mol あたり 45 mol であった。完全アジュバント (Freund) と乳化させた免疫原をニュージーランド系ホワイトウサギ (雌) に初回は胸部皮下に、それ以降は一週間おきに背部皮下に免疫した。免疫開始から 4 ヶ月後に全採血を行い、抗血清を得た。

Oxo-CPA 固定化ゲルの調製 Oxo-CPA のゲルへの固定化は既報⁶⁾に従った。EAH-Sepharose 4B (12 g) を 50 mM 炭酸水素ナトリウム (塩酸で pH 6 に調整) 溶液で洗浄、平衡化した後、10 mg/ml Oxo-CPA の 50 mM 炭酸水素ナトリウム溶液、pH 6 (30 ml) 及び 200 ng/ml 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride の 50 mM 炭酸水素ナトリウム溶液、pH 6 (10 ml) を加え、0.1 N 塩酸で pH 6 に保ちながら、室温で 1 時間転倒混和した。その後一夜攪拌し、蒸留水、続いて 0.05% アジ化ナトリウム及び 0.9% 塩化ナトリウムを含む 50 mM リン酸緩衝液、pH 7.0 で洗浄した。280 nm での吸光度測定より、Oxo-CPA のゲルへの結合率はゲル 1.0 ml (wet volume) あたり 1.1 μ mol であった。

抗 Oxo 抗体の精製 抗血清 (25 ml) から、硫酸分画、DEAE カラム精製⁷⁾により全抗体 (127 mg) を得た。

全抗体の 0.9% 塩化ナトリウムを含む 50 mM リン酸緩衝液、pH 7.0 (36 ml) に、Oxo を 100 mg 加え 1 時間、室温で放置した後、Oxo-CPA 固定化ゲルを 20 ml (wet volume) 加え、室温で 2 時間、転倒混和した。反応後ガラスフィルターでゲルから反応液をろ過し、さらに 0.9% 塩化ナトリウムを含む 50 mM リン酸緩衝液、pH 7.0 (50 ml) で洗浄した。これらを合わせ 10 mM リン酸緩衝液、pH 7.0 (2 l) で 4°C、48 時間 (3 回交換) 透析した後、これに 1 M グリシン-塩酸緩衝液、pH 2.3 (6 ml) を加え、4°C で 10 分放置後、0.9% 塩化ナトリウムを含む 50 mM リン酸緩衝液、pH 7.0 (1 l) で一夜透析した。これを Oxo-CPA 固定化ゲルを充填したカラム (gel volume, 1.5 ml) に 3 ml/min の流速で通し、さらに 0.9% 塩化ナトリウムを含む 50 mM リン酸緩衝液、pH 7.0 で洗浄を行った後、0.1 M グリシン-塩酸緩衝液、pH 4 で溶出した。280 nm の吸収を持つ画分を分取し、これに 10% ブロックエース及び 0.9% 塩化ナトリウムを含む 1 M リン酸緩衝液、pH 7.0 を

1/10 量加え、凍結保存した。

Oxo-CPA-酵素結合体の調製 酸無水物法⁴⁾により、Oxo-CPA と西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) とを結合させ (反応モル比, HRP : Oxo-CPA (1 : 16)) 調製した。トヨパール HW-55 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得た。これに等量の 0.2 mg/ml BSA 及び 0.9% 塩化ナトリウムを含む 50 mM リン酸緩衝液, pH 7.0 を加え、凍結保存した。

第二抗体固相化プレートの調製 10 µg/ml アフィニティー精製ヤギ抗ウサギ IgG 抗体の 50 mM 炭酸緩衝溶液, pH 9.5 をイムノプレートの各ウェルに 200 µl ずつ分注し、4°C で 2 日間放置した。その後各ウェルの溶液を除去し、25% ブロックエース, 0.05% アジ化ナトリウム及び 0.9% 塩化ナトリウムを含む 50 mM リン酸緩衝液, pH 7.0 を 250 µl ずつ分注し、4°C で使用時まで保存した。

EIA 法 第二抗体固相化プレートの各ウェルに、第一抗体として、抗血清の 20 万倍希釈液か 0.05 µg/ml の DEAE カラム精製抗体あるいは本特異精製抗体溶液 (50 µl), Oxo 溶液あるいは Oxo 添加ヒト血漿 (50 µl), 及び Oxo-CPA-HRP 結合体の 5 万倍希釈液 (50 µl) を分注した。4°C で一夜放置後、4 回洗浄し、アマライト発光試液 (200 µl) を分注した。室温で 10 分間放置後、各ウェルの発光量を Labsystems Luminoskan (大日本製薬) で測定した。

結果及び考察

抗 Oxo 抗体の特異精製

抗血清や DEAE カラム精製抗体を用いて EIA を行った場合、抗体の Oxo (Fig. 1) に対する親和性は、Oxo-CPA (Fig. 1) と比較して 1/1000 以下と極めて低かったため、Oxo-CPA-HRP 結合体は Oxo でほとんど競合を受けず、高感度分析が困難であった。その改善のために、まず酸無水物法で Oxo を直接 HRP で標識することを試みたが、標識体は確認されなかった。

そこで、Oxo と Oxo-CPA を認識する抗体が別々に存在するとの仮定のもとで、抗 Oxo 抗体成分の精製を抗原固定化ゲルを利用し行った。Oxo のカルボキシル基の反応性が極めて低いこと、リガンド固定化のためゲルについているスパーサーが CPA 部と構造的に類似していることから Oxo-CPA のほうをゲルに固定化した。精製原理を Chart 1 に示した。DEAE カラム精製抗体と Oxo, Oxo-CPA 固定化ゲルとを反応させると抗原抗体反応により抗 Oxo 抗体は Oxo に、抗 Oxo-CPA 抗体はゲルの Oxo-CPA 部に優先的に結合する。このとき抗 Oxo

Fig. 1. Structure of Pottasium Oxonate (Oxo) and Oxonic Acid 6-Carboxypentylamide (Oxo-CPA)

Chart 1. Schematic Procedure for Purification of Specific IgG

—Y—, anti-Oxo-CPA IgG; —Y—, anti-Oxo IgG; —Y—, other IgG; ●, Oxo; —Y—, oxo-CPA immobilized gel.

抗体の Oxo-CPA 部への結合を抑えるために、反応には Oxo-CPA に対して過剰モル量の Oxo を用いた。抗 Oxo-CPA 抗体はゲルをろ取することで除去した。非結合の Oxo を初めの透析で除去した後、抗体に結合した Oxo を pH 3 で解離させ、次の透析で除去した。この抗体溶液を再度 Oxo-CPA 固定化ゲルに反応させると、今度は抗 Oxo 抗体が Oxo-CPA 部に結合するので、ろ過、洗浄により他の抗体を除去した後、抗 Oxo 抗体を 0.1 M グリシン-塩酸緩衝液, pH 4 で溶出した。プロテインアッセイキット (BIO-RAD) で抗体量を測定した結果、DEAE カラム精製抗体 127 mg からの本特異精製抗体量は 0.69 mg であった。

特異精製抗体の Oxo に対する特異性は、抗血清や DEAE カラム精製抗体 (全抗体) に比べて増加したが (Fig. 2), それでもなお Oxo に対する親和性は、Oxo-CPA の 1/100 程度と低かった。この原因として、Oxo に対する抗 Oxo 抗体それ自体の親和性が、Oxo-CPA に比べて弱いこと、抗 Oxo-CPA 抗体がこの精製過程で完全に除去されていないことが考えられる。

検量線及び感度

EIA 条件の最適化を行ったところ、Oxo-CPA-HRP 結合体の希釈倍率が 5 万倍、抗体濃度が 0.05 $\mu\text{g/ml}$ のときが、最も高感度な検量線が描かれた。

EIA の抗体に、抗血清、全抗体及び特異精製抗体とを使用したときの検量線を Fig. 2 に示した。B/B₀ (結合全抗原量に対する結合標識抗原量比) が 50% での Oxo 濃度を比較した結果、抗血清が 1010 ng/ml, 全抗体が 910 ng/ml に対して、特異精製抗体が 48 ng/ml であり、本精製により約 20 倍高感度化された。

交差反応性

テガフル、5-FU, Oxo 分解物である 5-azauracil 及び構造的に類似したいくつかの生体成分との交差反応性を全抗体と特異精製抗体について調べた。Table I に示したように、全抗体を用いた場合には、5-azauracil, xanthine がそれぞれ 5.3, 9.4% と大きな交差を示したが、特異精製抗体では検討した化合物がすべて 1% 以下となり、本精製により抗体の選択性が向上した。

Fig. 2. Standard Curves for Oxo Using Purified Specific IgG, Whole IgG and Antiserum as Antibody

●, using purified specific IgG; ■, using whole IgG; ▲, using antiserum.

TABLE I. Cross-Reactivity of Oxo with Related Compounds Using Purified Specific IgG and Whole IgG as Antibody

Compound	Cross-reactivity (%)	
	Purified specific IgG	Whole IgG
Oxo	100	100
Tegafur	<0.02	0.12
5-Fluorouracil	<0.02	0.08
5-Azauracil	0.28	5.3
Adenine	<0.02	<0.02
Guanine	<0.10	<2.0
Uracil	<0.02	0.04
Thymine	<0.02	0.04
Uridine	<0.02	<0.02
Thymidine	<0.02	<0.02
Xanthine	0.63	9.4
Hypoxanthine	<0.02	0.05
Allantoin	<0.02	<0.02
Creatinine	<0.02	<0.02
Uric acid	0.02	0.18
Urea	<0.02	<0.02

ヒト血漿試料への適用

ヒト血漿試料について、血漿添加検量線での定量検討を行った。 B_0 の発光量に検体のロットに依存する大きなバラツキ（変動係数 40.2%, $n=5$ ）が認められたが、縦軸を発光量ではなく B/B_0 とする添加検量線を作成したところ、20—500 ng/ml の各ポイントでの変動係数は 7.3% 以下 ($n=5$) となり、そのバラツキの軽減が可能となった。

この検量線を用いて、ヒト血漿への添加回収試験を行った結果、20—1000 ng/ml の測定範囲で 82—117% の回収率が得られ、日内変動は 6.6—14.7% であった (Table II)。

以上示したように、固定化 Oxo-CPA 及び遊離の Oxo に対する抗体の結合特性を利用することで、Oxo-CPA の結合手まで認識する抗体から Oxo 自体を認識する抗体を分離精製でき、これにより EIA の感度及び選択性が向上した。

一般的に抗血清が測定化合物よりも酵素標識体や免疫原に用いたハプテンを強く認識するような問題が生じた場合には、免疫原と酵素標識体とを異なるハプテンから調製するヘテロログス法⁸⁾の適用が考えられるが、本法のように、測定化合物だけを認識する抗体成分を特異的に精製し、これを EIA に用いることでも改善できることが示唆された。

TABLE II. Recovery of Oxo from Human Plasma

Added (ng/ml)	Recovery (%)	C.V. (%)
20	117	14.7
50	102	9.5
100	95	10.2
200	102	8.8
500	82	6.8
1000	85	6.6

$n=6$.

引用文献

- 1) 藪内洋一, 納 庸子, 滝川勝雄, 藤井毅彦, 尾崎 隆, 播磨耕介, 応用薬理, **5**, 569 (1971); 池中一裕, 田中宏和, 川合清洋, 白坂哲彦, 藤井節郎, 癌と化学療法, **10**, 227 (1983).
- 2) 白坂哲彦, 島本雄司, 大下英之, 福島正和, 木村禎代二, 第 51 回日本癌学会総会, 1992, p. 387.
- 3) 前田昌子, 辻 章夫, ぶんせき, **1989**, 436.
- 4) T. Kitagawa, T. Fukitake, H. Taniyama, T. Aikawa, *J. Biochem.*, **83**, 1493 (1978).
- 5) B. V. Plapp, S. Moore, W. H. Stein, *J. Bio. Chem.*, **246**, 939 (1971).
- 6) D. N. Saiter, J. E. Ford, K. J. Scott, P. Andrews, *FEBS Lett.*, **20**, 302 (1972).
- 7) 中村 弘, 杉浦 勉, “新生化学実験講座 12 巻, 分子免疫学 III,” 第 2 版, 日本生化学会編, 東京化学同人, 東京, 1990, pp. 13—20.
- 8) 池上卓志, 前田昌子, 辻 章夫, 細田 宏, 南原利夫, 薬誌, **107**, 150 (1987).