

機関番号：17301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21790539

研究課題名（和文） キノン標識抗体の創製と非酵素的新規化学発光イムノアッセイの開発

研究課題名（英文） Development of quinone-labeled antibody for non-enzymatic chemiluminescence immunoassay

研究代表者

岸川 直哉（KISHIKAWA NAOYA）

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：90336181

研究成果の概要（和文）：

キノンは還元剤の添加により、その酸化還元サイクルが誘起され、これに伴って発生する活性酸素をルミノールにより検出することでキノンの化学発光定量が可能となる。本研究では、このキノンの性質に着目し、化学発光イムノアッセイの新しい検出手段としてのキノン標識抗体の開発を行った。強い発光を与えるナフトキノンの誘導体を用いて、これを抗体のアミノ基と結合させることでキノン標識抗体の調製を行った。キノン標識抗体に還元剤及びルミノールを添加したところ、長時間持続する強い発光が観察された。したがって、目的抗原と結合させたキノン標識抗体に還元剤及びルミノールを添加し、生じる発光を測定することで抗原量の定量が可能であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

A strong and long-lived chemiluminescence was observed when quinone was mixed with dithiothreitol (DTT) and luminol, and the chemiluminescence intensity was proportional to the concentration of quinone. Therefore, we considered that quinone-labeled antibody could be applied to develop a non-enzymatic chemiluminescence immunoassay. In this study, quinone-labeled antibody was prepared by coupling of 1,4-dihydro-1,4-dioxo-3-methyl-2-naphthylmethyl chloroformate to amino group of antibody. Since the quinone-labeled antibody emitted chemiluminescence after addition of DTT and luminol, it should become a new analytical tool for various substances based on antigen-antibody interaction.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：化学発光、キノン、酸化還元、標識抗体、活性酸素

## 1. 研究開始当初の背景

生体内に存在する微量物質を測定する方法の一つとして免疫学的測定法があり、基礎

研究から臨床検査まで広範囲に用いられている。特に、酵素標識抗体と化学発光反応を組み合わせた化学発光酵素免疫アッセイは放射性物質を使用せずに高感度で測定できるために、近年最も使用されている方法である。また、酵素標識抗体は電気泳動後のタンパク質の同定及び定量のための検出手段（イムノブロット）としても用いられている。その応用範囲の広さから、多くの試薬メーカーから様々な酵素標識抗体が販売されており、大きな市場を形成している。

しかしながら、酵素標識抗体を用いる方法は複雑な巨大高分子である酵素の性質に由来する様々な欠点が存在する。すなわち、酵素の不安定さによる低い再現性、酵素標識抗体の調製の困難さ及び酵素分子の立体障害による抗原-抗体反応の阻害等である。

そこで、これらの欠点を克服する非酵素的な方法に基づく抗体の検出法は免疫学的測定法の利用をさらに拡大すると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、酵素標識抗体に代わる有用な免疫アッセイのための検出手段としてキノン標識抗体を用いる化学発光法を開発することにある。

キノンは還元剤の添加により、セミキノンラジカルへと還元され、このセミキノンラジカルが溶存酸素を活性酸素の一種であるスーパーオキシドアニオンへと変換するとともに自身は再び元のキノン化合物へと酸化されるという酸化還元サイクルを有している。このため、キノンにジチオスレイトール (DTT) 等の還元剤を添加することで酸化還元サイクルを介してスーパーオキシドアニオンが発生し、これにルミノールを共存させることで長時間持続する強い発光を得ることが可能である (図1)。さらに、この発光反応を利用することでキノンを高感度かつ選択的に定量することが可能であった。

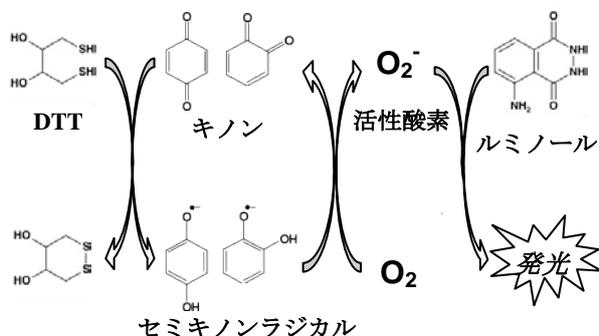


図1. キノンの酸化還元サイクルによる化学発光

そこで、キノンで標識した抗体は、同様に還元剤とルミノールを添加することで発光を示し、結果的に抗体に結合した抗原量を発光強度として定量することが可能であると考え、以下に述べる研究を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 効果的な発光を与えるキノンの探索

キノンのアセトニトリル溶液 100  $\mu$ L とルミノールの水酸化ナトリウム水溶液 100  $\mu$ L とを小試験管内で混合後、ルミノメーター (Berthold LB-9507) にセットする。ルミノメーター内で DTT のアセトニトリル溶液 100  $\mu$ L を自動注入後、発光開始から 10 分後まで発光強度の測定を行った。

### (2) キノン標識抗体の調製

1,4-ジヒドロ-1, 4-ジオキソ-3-メチル-2-ナフチルメチルクロロフォルメート (DMN-Cl, 図2) の DMF 溶液と抗アルブミン抗体溶液を混合後、炭酸緩衝液 (pH 10.2) を加え、室温で3時間放置することにより、抗体のアミノ基を介してキノンの導入を行った。反応後の溶液について、限外ろ過とリン酸緩衝液による洗浄を行い、未反応の DMN-Cl の除去を行った。

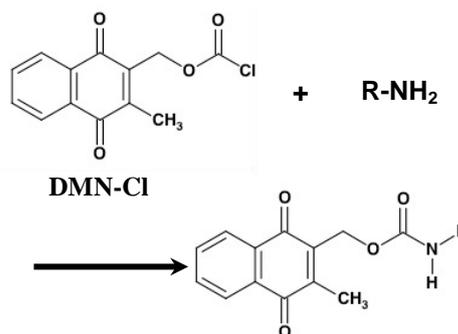


図2. アミノ基を介する抗体へのキノン標識

### (3) キノン標識抗体の化学発光

キノン標識抗体のリン酸緩衝液 (pH 7.4) 溶液 10  $\mu$ L にルミノールの水酸化ナトリウム水溶液 100  $\mu$ L を加え、ルミノメーター (Berthold LB-9507) にセットする。ルミノメーター内で DTT のアセトニトリル溶液 100  $\mu$ L を自動注入後、生じる発光を測定した。また、対照としてキノンによる処理を行っていない抗体についても同様に化学発光測定を行った。

#### 4. 研究成果

最初に、置換基を持たない比較的単純な構造のキノンについて、ルミノール及び DTT を添加後の発光を測定した。その結果、9,10-フェナンスレンノン等の *o*-キノン及び 1,4-ナフトキノン等の *p*-キノンどちらについても、試薬の混合直後から発光が観察され、その発光は 10 分以上持続していた。次に、1,4-ナフトキノン由来の発光について、標識酵素として広く用いられている西洋ワサビペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase, HRP) と過酸化水素による化学発光反応系と発光特性を比較した。その結果、1,4-ナフトキノン由来の発光強度は同濃度の HRP 由来の発光と比較して 10 倍ほど高く、発光持続時間についても 1,4-ナフトキノンの発光は 10 分以上持続するのに対して、HRP の発光はおよそ 1 分以内にすみやかに減衰した (図 3)。これらの結果より、免疫アッセイの検出手段としてのキノン化学発光法の有用性が示唆された。次に、抗体へのキノンの導入法を検討するために、様々な置換基を有するキノンについて発光強度を測定した。その結果、キノン構造の近傍にスルホン酸基や水酸基を有するキノンでは発光強度が大きく低下することが明らかとなった。一方で、アミノ基やカルボキシル基の存在はキノンの発光に顕著な影響を与えなかった。

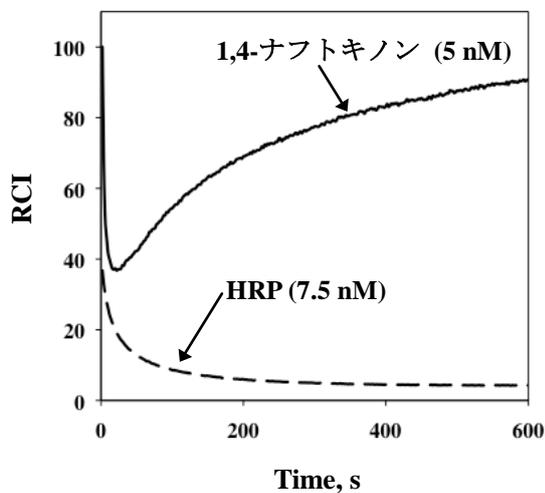


図 3. 1,4-ナフトキノン及び HRP に由来する化学発光

以上の結果より、抗体標識に用いるキノンとして長時間持続する強い発光を与える 1,4-ナフトキノンを選択した。本研究では、モデルとして抗アルブミン抗体を用いて、これに直接キノンを導入する手法について検討を行った。すなわち、アミノ基に対する反応基としてカルボニルクロリド基を有する 1,4-

フトキノン誘導体 DMN-Cl をアルカリ条件下で抗体とインキュベートすることにより、抗体のアミノ基を介してキノンを導入する手法である。未反応の DMN-Cl を除去した後で、キノン標識抗体にルミノール及び還元剤 DTT を添加したところ、長時間持続する強い発光が観察された (図 4)。一方、キノンによる処理を行っていない抗体では発光は観察されなかった。したがって DTT の添加により、抗体に結合したキノンの酸化還元サイクルが誘起され、スーパーオキシドアニオンが発生することにより発光が生じたと考えられた。以上のように、抗体へのキノンの導入は比較的容易であり、かつ抗体に導入した状態でもキノンは発光を示すことが明らかとなった。したがって、キノン標識抗体を用いて測定対象抗原と複合体を形成させ、これにルミノール及び DTT を添加することで生じる発光により、目的の抗原量を定量可能であると考えられる。以上のように、新しいタイプの化学発光免疫アッセイ開発への展開が期待できる結果を本研究で得ることができた。今後は調製したキノン標識抗体について、その発光特性や安定性を精査していく予定である。

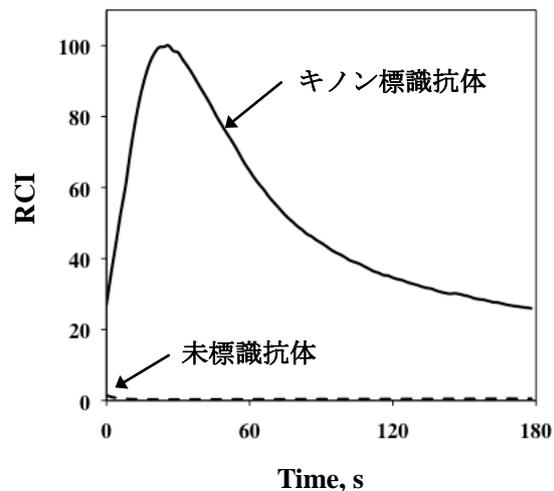


図 4. ルミノール及び DTT 添加後のキノン標識抗体の化学発光

さらに、化学発光試薬としてアクリジニウムエステルを用いることでルミノールよりも高感度にスーパーオキシドアニオンを検出可能であることや蛍光性を持たないキノンを 2-アミノチオフェノールと反応させることで強蛍光性誘導体へと変換できることを明らかにしている。これらの研究で得られた成果はキノン標識抗体の高感度検出のために有用であると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- (1) N. Kishikawa, N. Ohkubo, K. Ohyama, K. Nakashima, N. Kuroda: Selective determination of ubiquinone in human plasma by HPLC with chemiluminescence reaction based on the redox cycle of quinone, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400, 381-385 (2011). [査読有]
- (2) S. Yamaguchi, N. Kishikawa, K. Ohyama, Y. Ohba, M. Kohno, T. Masuda, A. Takadate, K. Nakashima, N. Kuroda: Evaluation of chemiluminescence reagents for selective detection of reactive oxygen species, *Analytica Chimica Acta*, 665, 74-78 (2010). [査読有]
- (3) N. Kishikawa, H. Nakashima, K. Ohyama, K. Nakashima, N. Kuroda: Determination of 9,10-phenanthrenequinone in airborne particulates by high-performance liquid chromatography with post-column fluorescence derivatization using 2-aminothiophenol, *Talanta*, 81, 1852-1855 (2010). [査読有]
- (4) S. Ahmed, N. Kishikawa, K. Ohyama, T. Maki, H. Kurosaki, K. Nakashima, N. Kuroda: An ultrasensitive and highly selective determination method for quinones by HPLC with photochemically initiated luminol chemiluminescence, *Journal of Chromatography A*, 1216, 3977-3984 (2009). [査読有]
- (5) S. Ahmed, N. Kishikawa, K. Ohyama, M. Wada, K. Nakashima, N. Kuroda: Selective determination of doxorubicin and doxorubicinol in rat plasma by HPLC with photosensitization reaction followed by chemiluminescence detection, *Talanta*, 78, 94-100 (2009). [査読有]
- (6) N. Kishikawa, N. Ohkubo, K. Ohyama, K. Nakashima, N. Kuroda: Chemiluminescence assay for quinones based on generation of reactive oxygen species through the redox cycle of quinone, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393, 1337-1343 (2009). [査読有]
- (7) 岸川直哉: キノンの選択的蛍光・化学発光定量法の開発と環境・生体分析への応用. *薬学雑誌*, 130, 1319-1324 (2010). [査読有]
- (8) 黒田直敬, 岸川直哉, 大山 要: キノンの選択的化学発光検出法とその臨床化学的応用. *臨床化学*, 39, 15-21 (2010). [査読無]

[学会発表] (計 2 件)

- (1) 岸川直哉: 蛍光・化学発光を利用するキノンの高感度かつ選択的な定量法の開発と

その応用, 第 22 回九州分析化学若手の会春の講演会, 福岡 (2009).

- (2) 岸川直哉: キノンの選択的蛍光・化学発光定量法の開発と環境・生体分析への応用, 平成 21 年度日本薬学会九州支部学術奨励賞受賞講演, 福岡 (2009).

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 免疫複合体の網羅的解析方法および新規調節リウマチバイオマーカー

発明者: 黒田直敬、大山 要、岸川直哉

権利者: 長崎大学

種類: 特許権

番号: 特願 2010-231935

出願年月日: 2011年10月14日

国内外の別: 国内

[その他]

6. 研究組織

(1)研究代表者

岸川 直哉 (KISHIKAWA NAOYA)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号: 90336181

(2)研究分担者

(3)連携研究者