

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 27 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670283

研究課題名(和文)キノンの活性酸素発生能を利用する化学発光ホモジニアス免疫アッセイ法の開発

研究課題名(英文) Development of a new homogeneous chemiluminescent immunoassay using reactive oxygen species generating capability of quinone

研究代表者

黒田 直敬 (KURODA, Naotaka)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・教授

研究者番号：50234612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、キノンの活性酸素発生能を利用する化学発光ホモジニアス免疫アッセイの開発を試みた。本法は、抗体に標識したキノンより発生する活性酸素と抗原に標識した活性酸素消去剤との相互作用による化学発光の減衰に基づく方法である。抗体及び抗原の標識に用いるキノン及び活性酸素消去剤のスクリーニングを行った結果、それぞれアントラキノン(AQ)類及びチラミン(TA)が標識に適していると考えられた。次に、AQとTAとを直接結合させたモデルを作成して化学発光を測定した結果、これらの相互作用による化学発光の減衰が見られ、本ホモジニアス免疫アッセイ構築の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We attempted to develop a new homogeneous chemiluminescent immunoassay using a combination of quinone labeled antibody and reactive oxygen species (ROS) scavenger labeled antigen. The proposed assay is based on the chemiluminescence decrease due to the scavenging of ROS that is generated from quinone. After the screening of suitable compounds for labeling, anthraquinone (AQ) and tyramine (TA) were selected as quinone and ROS scavenger, respectively. Then, we synthesized a model compound (AQ-TA) that contains AQ and TA moieties in one molecule in order to evaluate the interaction between quinone and ROS scavenger. As we expected, the chemiluminescence intensity of AQ-TA was weaker than that of control compound that does not contain TA moiety. Therefore, the possibility of development of the proposed homogeneous immunoassay was sufficiently suggested.

研究分野：病態検査学

キーワード：化学発光 ホモジニアス免疫アッセイ キノン 活性酸素消去剤 紫外線照射

1. 研究開始当初の背景

酵素免疫測定法 (enzyme immunoassay, EIA) は、酵素標識した抗体 (あるいは抗原) によって抗原 (あるいは抗体) を検出するための方法である。酵素は、放射性同位元素が標識に用いられる放射免疫測定法 (radio immunoassay, RIA) に比べて安全性や安定性に優れ、取り扱いが容易であるため、現在広く普及している。しかしながら EIA 法の短所として、比較的大きな分子量の酵素を標識に用いることによる抗原-抗体反応の立体障害やタンパク質である酵素の不安定性等が挙げられる。一方、EIA の原理には種々の様式が開発されているが、なかでも酵素標識体の結合型 (B) と遊離型 (F) の分離 (B/F 分離) が不要なホモジニアス免疫アッセイ (均一系免疫測定法) は、簡便な操作で迅速な結果が得られることから利便性の高い EIA 法として注目を集めており、血中薬物濃度測定等に応用されている。ホモジニアス免疫アッセイは、その簡便性や迅速性から今後免疫測定法の主流として臨床検査の現場などで普及していくことは確実であるが、上述の酵素の性質に由来する短所は依然として問題となっている。そこで、酵素を必要としない新たな原理に基づくホモジニアス免疫アッセイの開発が期待されている。

2. 研究の目的

本研究では、新たな原理に基づくホモジニアス免疫アッセイとして、紫外線照射下で活性酸素発生能を有するキノンと活性酸素消去剤との組み合わせによる化学発光法の開発を試みた。キノンは、紫外線照射により活性酸素を発生する性質を有するが、このときルミノールが共存すると活性酸素がルミノールを酸化して化学発光が生じる。本研究で開発を目指すアッセイは、このような性質を有するキノンで標識した抗体と、活性酸素消去剤で標識した抗原を用いる競合型の免疫アッセイである。すなわち、測定対象の抗原が存在せずキノン標識抗体と活性酸素消去剤で標識した抗原が結合して近接する場合はルミノールの発光は抑制されるが (Fig. 1A)、測定対象抗原との競合により両者の距離が離れることで発光が回復するという原理に基づいている (Fig. 1B)。このように両者が近接した場合にシグナルオフ、離れた場合にシグナルオンとなるような化学発光システムを構築することで、B/F 分離なしに微量の測定対象を高感度に測定することが可能となる。また、キノンは安定な低分子化合物であるため、酵素標識法において問題となる抗原-抗体反応の立体障害や酵素の不安定性を克服できると考えられる。

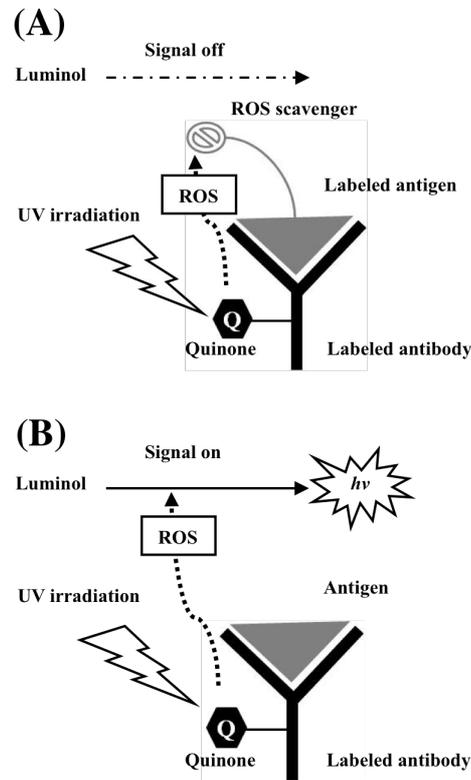


Fig. 1 Proposed homogeneous immunoassay.

3. 研究の方法

(1) キノン及び活性酸素消去剤のスクリーニング

最初に、抗体の標識に適したキノンを探索する目的で、ルミノール誘導体である L-012 存在下で紫外線照射により強い発光を与えるキノンのスクリーニングを行なった。また、抗原の標識に適した化合物を探索するため、典型的な活性酸素消去剤及びその類似化合物について、紫外線照射後のキノンの化学発光に対する阻害効果を調査した。当研究室では既に、キノンと L-012 の混液に対し時間分解蛍光プレートリーダーを用いてパルス紫外線照射を行なうことで、キノンの濃度に依存した発光が得られることを確認している。本研究においてもその基本的な測定原理を利用し、1,4-naphthoquinone 類 7 種及び 9,10-anthraquinone 類 7 種の化学発光応答性を調査した。また、抗酸化効果やラジカル消去能を有するとされる既知の化合物及びその類似化合物 22 種類について、menadione 及び 9,10-anthraquinone の化学発光系に共存させた時の発光阻害を調査し、その活性酸素消去能を評価した。

(2) キノン-活性酸素消去剤近接モデルによる発光阻害効果の確認

本研究で開発を目指すホモジニアスイムノアッセイは、キノン及び活性酸素消去剤でそれぞれ標識した抗体及び抗原が抗原-抗体反応により結合して近接することで、キノンから発生する活性酸素の消去率が増大し、化学発光強度が減少するという原理に基づいている。そこで、実際に抗原-抗体反応を用いて検討する前に、キノンと活性酸素消去剤との近接モデルを作製して、両者の近接により発光阻害効果が増大するかの確認を行った。

まず初めに、キノンと活性酸素消去剤とを直接結合させたモデルを作製して発光を測定し、結合していないキノンと活性酸素消去剤の与える発光と比較することで、両者の近接による発光阻害の増大を調査した。次に、抗原-抗体反応により近い条件で発光阻害を評価する目的で、ピオチン化キノンとピオチン化活性酸素消去剤をアビジンを介して結合させた近接モデルを用いて検討を行った。これら二つのモデルで得られた結果を解析し、本ホモジニアスイムノアッセイ開発の可能性を評価した。

4. 研究成果

(1) キノン及び活性酸素消去剤のスクリーニング

測定に用いたキノンの中で、1,4-naphthoquinone や menadione 及び 9,10-anthraquinone (AQ) では強い発光が観察された。安定な発光を与えたキノンのうち、anthraquinone-2-carbonyl chloride が標識反応に利用可能な反応性基を有しているため、標識に用いるキノンとして適していると考えた。活性酸素消去剤としては、フェノール、カテコール、ピロガロール及びヒドロキノンといったフェノール性水酸基を有する化合物が高い発光阻害効果を示すことが明らかとなった。その中でも安定性に優れ、かつ標識反応に有用な脂肪族アミンを有する tyramine (TA) を標識用活性酸素消去剤としてその後の検討に用いることにした。

(2) キノン-活性酸素消去剤近接モデルによる発光阻害効果の確認

キノンと活性酸素消去剤が近接状態にあるモデル化合物として、anthraquinone-2-carbonyl chloride と TA が直接結合した化合物 AQ-TA を合成した (Fig. 2)。また、比較対象としてフェノール性水酸基を持たず活性酸素消去能を示さない phenethylamine (PA) と anthraquinone-2-carbonyl chloride を結合させた AQ-PA を合成した。さらに、

anthraquinone-2-carbonyl chloride へのアミノ基の導入により変化する可能性のある化学発光強度を確認する目的で、anthraquinone-2-carbonyl chloride に ethylamine (EA) を導入した AQ-EA を合成した。これら 3 種類の合成キノンについて、紫外線照射後に生じる化学発光を測定した結果、AQ-PA 及び AQ-EA の発光強度は標識に用いた anthraquinone-2-carbonyl chloride よりも高い値を示し、anthraquinone-2-carbonyl chloride はアミンと反応することで発光強度が強くなることが確認された。一方で、構造中に活性酸素消去部位を導入した AQ-TA は、極めて弱い発光しか示さず、その発光強度は対象化合物である AQ-PA の約 46 分の 1 であった (Fig. 3)。さらに、AQ-TA の化学発光強度と AQ-EA に同量の phenol を添加して得られる発光強度を比較することにより、キノンと活性酸素消去剤の近接による発光阻害効果の増大を確認した。この結果から、活性酸素消去剤とキノンを直接結合させたモデルでは、紫外線照射によってキノンから生じる活性酸素の消去効率が向上することが確認された。

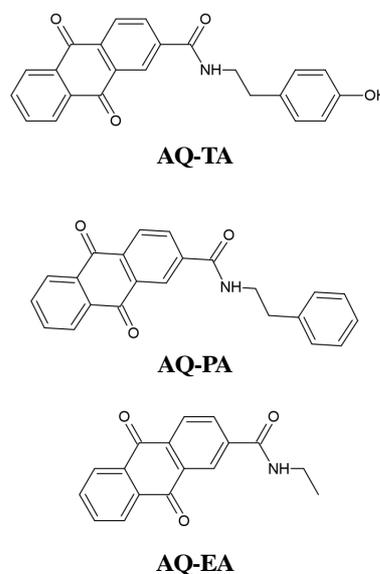


Fig. 2 Structures of AQ-TA, AQ-PA and AQ-EA

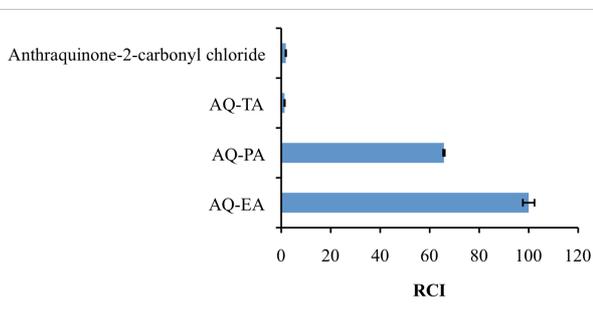


Fig. 3 Chemiluminescence obtained from anthraquinone-2-carbonyl chloride, AQ-TA, AQ-PA and AQ-EA.

続いて、アビジンとビオチンの結合を介してキノンと活性酸素消去剤を近接化させるモデルを作成した。すなわち、ビオチン化した AQ 及び TA について、アビジンを介した複合体として結合させるモデルである。合成した Biotin-AQ 及び Biotin-TA にアビジンを添加して結合させることでキノン及び活性酸素消去剤を近接させ、その発光強度を測定した。また、ビオチン化していない TA を添加した時の発光強度、またはアビジンを添加しない時の発光強度を測定し、両者の発光強度を比較することで近接による発光阻害効果の増大を評価した。その結果、ビオチン化していない TA を添加して測定した発光強度の方が Biotin-TA を添加した時よりも低くなるという予想とは反する結果となり、キノンと活性酸素消去剤の近接による発光阻害効果の増大を確認することはできなかった。また、アビジンを添加しない、すなわち Biotin-AQ と Biotin-TA が結合しない条件下で発光強度を測定したところ、アビジンを添加した時よりも発光強度が低下し、発光阻害効果が高まっていることを示唆する結果となった。このように、アビジン-ビオチン結合を介する近接化モデルにおいて発光阻害効果が減少した理由のひとつとして、アビジンのような高分子に低分子のキノン及び TA が結合して固定化されることで、逆に両者が十分に近接できなくなり、半減期の非常に短い活性酸素が消去剤に到達して消去される前に化学発光試薬と反応している可能性が考えられた。従って、本原理を抗原-抗体反応に応用した場合でも、アビジン-ビオチン近接モデルと同様の結果になることが予想される。この問題を解決するために、キノン及び活性酸素消去剤を高分子化し、両者の距離の近接化による阻害効果の効率化を図ることや、活性酸素発生量及び活性酸素消去能の向上による高感度化の必要性があると考えられる。

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 12 件)

[1] Ohyama K, Baba M, Tamai M, Yamamoto M, Ichinose K, Kishikawa N, Takahashi H, Kawakami A, Kuroda N: Immune complexome analysis of antigens in circulating immune complexes isolated from patients with IgG4-related dacryoadenitis and/or sialadenitis, *Modern Rheumatology* 26(2): 248-250, 2016. DOI: 10.3109/14397595.2015.1072296 [査読有]

[2] Ohyama K, Huy NT, Yoshimi H, Kishikawa N, Nishizawa JE, Roca Y, Revollo Guzmán RJ, Velarde FU, Kuroda N: Proteomic profile of circulating immune complexes in chronic Chagas

disease, *Parasite Immunology* 38(10): 609-617, 2016. DOI: 10.1111/pim.12341 [査読有]

[3] El-Maghrabey MH, Kishikawa N, Kuroda N: 9,10-Phenanthrenequinone as a mass-tagging reagent for ultra-sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay of aliphatic aldehydes in human serum, *Journal of Chromatography A* 1462: 80-89, 2016. DOI: 10.1016/j.chroma.2016.07.082 [査読有]

[4] Wada M, Ikeda R, Fuchigami Y, Koyama H, Ohkawara S, Kawakami S, Kuroda N, Nakashima K: Quantitative and antioxidative behavior of Trolox in rats' blood and brain by HPLC-UV and SMFIA-CL methods, *Luminescence* 31(2):414-418, 2016. DOI: 10.1002/bio.2975 [査読有]

[5] 和田光弘, 黒田直敬, 中島憲一郎: 機能性食品及びサプリメントの有効成分の分析と機能性評価, *分析化学*, 65(6):301-308, 2016. DOI: 10.2116/bunsekikagaku.65.301 [査読有]

[6] Ohyama K, Baba M, Tamai M, Aibara N, Ichinose K, Kishikawa N, Kawakami A, Kuroda N: Proteomic profiling of antigens in circulating immune complexes associated with each of seven autoimmune diseases, *Clinical Biochemistry*, 48: 181-185, 2015. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2014.11.008 [査読有]

[7] Imazato T, Kanematsu M, Kishikawa N, Ohyama K, Hino T, Ueki Y, Maehata E, Kuroda N: Determination of acrolein in serum by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after pre-column fluorogenic derivatization using 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzene, *Biomedical Chromatography*, 29: 1304-1308, 2015. DOI: 10.1002/bmc.3422 [査読有]

[8] El-Maghrabey MH, Kishikawa N, Ohyama K, Imazato T, Ueki Y, Kuroda N: Determination of human serum semicarbazide-sensitive amine oxidase activity via flow injection analysis with fluorescence detection after online derivatization of the enzymatically produced benzaldehyde with 1,2-diaminoanthraquinone, *Analytica Chimica Acta*, 881: 139-147, 2015. DOI: 10.1016/j.aca.2015.04.006 [査読有]

[9] 岸川直哉, 黒田直敬: 化学発光法に基づく生体内活性酸素産生物質の解析, *薬学雑誌*, 135(2):191-126, 2015. DOI: 10.1248/yakushi.14-00213-1 [査読有]

[10] Elgawish MS, Kishikawa N, Helal MA, Ohyama K, Kuroda N: Molecular modeling and spectroscopic study of quinone-protein adducts:

insight into toxicity, selectivity, and reversibility, Toxicology Research, 4: 843-847, 2015. DOI: 10.1039/C5TX00098J [査読有]

[11] Elgawish MS, Kishikawa N, Ohyama K, Kuroda N: Characterization of quinone derived protein adducts and their selective identification using redox cycling based chemiluminescence assay, Journal of Chromatography A, 1403: 96-103, 2015. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.05.033 [査読有]

[12] 新藤敬梧, 岸川直哉, 大山 要, 黒田直敬: 化学発光 HPLC による血漿中パラコート及びジクワットの同時定量, 分析化学, 64: 581-587, 2015. DOI: 10.2116/bunsekikagaku.64.581 [査読有]

[学会発表](計 17 件)

1. 岸川直哉, 黒田直敬: 脂質過酸化アルデヒドをマーカーとする酸化ストレス疾患の新規評価法の開発, 日本薬学会第 137 年会, 仙台国際センター(宮城県・仙台市), 2017 年 3 月 26 日.
2. Naoya Kishikawa, Sameh Abdel-Raouf Ahmed, Naotaka Kuroda: Selective determination of quinones in biological and environmental samples by HPLC with photo-induced chemiluminescence detection, XVII International Symposium on Luminescence Spectrometry (ISLS2016), 台北(台湾), 2016 年 11 月 23 日.
3. 黒田直敬, Mahmoud El-Maghrabey, 岸川直哉, 大山 要, 今里孝宏, 植野幸隆: 1,2-Diaminoanthraquinone を発光試薬として用いる芳香族アルデヒドの FIA による semicarbazide-sensitive amine oxidase 活性の定量, 第 53 回フローインジェクション分析講演会, 同志社大学室町キャンパス(京都府・京都市), 2016 年 11 月 5 日.
4. 黒田直敬: 化学発光検出を利用するフロー分析法の開発と応用, 日本分析化学会第 65 年会, 北海道大学工学部(北海道・札幌市), 2016 年 9 月 15 日.
5. 岸川直哉, 原田詩織, 大山 要, 黒田直敬: ナフトキノンをシグナル発生タグに用いる非酵素的化学発光イムノアッセイ開発の検討, 第 29 回バイオメディカル分析科学シンポジウム(BMAS2016), 京都大学桂キャンパス(京都府・京都市), 2016 年 9 月 2 日.
6. 黒田直敬, 新藤敬梧, 岸川直哉: 電荷

移動相互作用に基づく発色反応を利用するピペリジニウム化合物の検知管の開発, 日本法中毒学会第 35 年会, 大阪産業創造館(大阪府・大阪市), 2016 年 7 月 1 日.

7. Naotaka Kuroda: Development of an Ultrasensitive Assay for Pyrroloquinoline Quinone in Human Plasma by HPLC-CL Detection, The 19th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence (ISBC2016), つくば国際会議場(茨城県・つくば市), 2016 年 5 月 31 日.
8. 岸川直哉, 永井海舟, 大山 要, 黒田直敬: 抗酸化能を可視化するための化学発光イメージング技術の開発, 日本薬学会第 136 年会, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市), 2016 年 3 月 28 日.
9. 秋武将俊, 岸川直哉, 黒田直敬: 化学発光 HPLC によるアスコルビン酸及びデヒドロアスコルビン酸の同時定量法の開発, 日本薬学会第 136 年会, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市), 2016 年 3 月 28 日.
10. 岸川直哉, 黒田直敬: 化学発光自動分析装置による医薬品及び生体試料のヒドロキシルラジカル消去能の評価, 第 55 回日本臨床化学会年次学術集会, 大阪大学コンベンションセンター(大阪府・吹田市), 2015 年 10 月 31 日.
11. 新藤敬梧, 岸川直哉, 大山 要, 黒田直敬: 除草剤パラコート及びジクワットの HPLC-化学発光定量法の開発と血漿試料への応用, 第 28 回バイオメディカル分析科学シンポジウム(BMAS2015), 長崎大学文教キャンパス(長崎県・長崎市), 2015 年 8 月 22 日.
12. Mahmoud El-Maghrabey, 福田瑞穂, 岸川直哉, 池本一人, 黒田直敬: Development of an ultrasensitive assay for pyrroloquinoline quinone in human plasma by HPLC-CL, 第 28 回バイオメディカル分析科学シンポジウム(BMAS2015), 長崎大学文教キャンパス(長崎県・長崎市), 2015 年 8 月 21 日.
13. 永井海舟, 岸川直哉, 大山 要, 黒田直敬: 抗酸化能を可視化できる化学発光イメージング技術の開発, 第 13 回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム (PPF2015), 長崎ホテル清風(長崎県・長崎市), 2015 年 8 月 20 日.

14. 新藤敬梧, 岸川直哉, 大山 要, 黒田直敬: ピピリジニウム系除草剤のHPLC-ルミノール化学発光定量法の開発, 日本法中毒学会第34年会, 九州大学馬出キャンパス(福岡県・福岡市), 2015年6月26日.
15. 上村周平, 岸川直哉, 大山 要, 黒田直敬: キノンの高効率検出を目的とする新規化学発光分析試薬の開発, 第31回日本薬学会九州支部大会, 第一薬科大学(福岡県・福岡市), 2014年12月6日.
16. Naotaka Kuroda, Mohamed Elgawish Saleh, Naoya Kishikawa, Kaname Ohyama, Kenichiro Nakashima: Identification of quinone modified proteins in biological fluids using redox cycling based chemiluminescence assay, The 18th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence (ISBC2014), Uppsala (Sweden), 2014年6月25日.
17. 岸川直哉, Elgawish Mohamed Saleh, 大山 要, 黒田直敬: キノンとのマイケル付加体生成に基づくチオール類のプレカラム誘導体化 HPLC-化学発光定量法の開発, 第74回分析化学討論会, 日本大学工学部(福島県・郡山市), 2014年5月24日.

〔その他〕

ホームページ等

長崎大学薬学部薬品分析化学研究室

<http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/analysis/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒田 直敬 (KURODA, Naotaka)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・教授

研究者番号: 50234612