

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07890

研究課題名(和文) 光応答性活性酸素発生物質を標識試薬として用いる反応制御型化学発光分析法の開発

研究課題名(英文) Development of controllable chemiluminescence detection methods based on labeling with photo-responsive ROS generator

研究代表者

岸川 直哉 (KISHIKAWA, Naoya)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・准教授

研究者番号：90336181

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では光に応答して活性酸素を発生する性質を持つキノンを標識試薬とする新規化学発光分析法の開発を行った。フェネチルアミンといったアミンをアントラキノン-2-カルボニルクロリドで標識してから HPLC に注入して分離後、オンライン光照射とそれに続くルミノールとの混合によりアミン類を化学発光ピークとして検出できた。このとき、光照射装置をオフにすることで発光は消失したことから光照射装置のオン/オフにより発光反応を制御することが確認できた。また、化学発光イムノアッセイに利用可能な抗体標識試薬としてビオチン化アントラキノンを合成し、これが光照射により発光応答を示すことも確認した。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we attempted to develop a novel chemiluminescence assay by quinone labeling reagent using their reactive oxygen generating capability. Firstly, we developed an HPLC with chemiluminescence detection system coupled with an on-line photoreactor for the determination of amines including phenethylamine after labeling with anthraquinone-2-carbonyl chloride. This chemiluminescence method was based on generation of reactive oxygen species from anthraquinone labeled amine by on-line photo-irradiation, and then detected via luminol reaction. The chemiluminescence signal disappeared when the on-line photoreactor was switched off. Secondly, we synthesized biotinylated anthraquinone as a labeling reagent for antibody. The biotinylated anthraquinone provided significant chemiluminescence by photo-irradiation in the presence of luminol. Therefore, the biotinylated quinone should be useful to develop a novel and effective non-enzymatic chemiluminescence immunoassay.

研究分野：物理系薬学

キーワード：化学発光 キノン 標識試薬 HPLC 光照射 ビオチン化キノン イムノアッセイ

1. 研究開始当初の背景

ルミノール反応をはじめとする化学発光反応の多くは、化学発光試薬と活性酸素との反応で生じるエネルギーにより分子が励起され、これが基底状態へと戻る際に光を放出する。化学発光法は高感度であることから、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) やイノムアッセイといった分析法の検出手段として広く利用されている。このとき、測定対象化合物を化学発光検出するために、ルミノール誘導体等の化学発光試薬で標識する手法や horseradish peroxidase (HRP) のような化学発光反応を触媒する酵素で標識する手法が主にとられている。これらの試薬で標識した測定対象について発光を開始させるためには活性酸素の添加が必要であるが、生じる発光は活性酸素の添加直後に最大に達し、その後急速に減衰する。従って、活性酸素の添加から測定開始するまでの間に発光反応がほぼ終了し、効率的に発光を測定できないという大きな問題がある。また、活性酸素は極めて不安定であり、調製後に速やかに分解していくことから濃度が変動しやすい。このために発光量が安定せず、再現性が低いという問題もある。

そこで、本研究では光に応答して活性酸素を発生する性質を持つキノンを標識試薬として用いることで、化学発光が生じるタイミングを照射によって自在に制御可能な化学発光分析法の開発を試みる。本法では、測定中の装置内部で活性酸素を発生させて発光を開始させることができるため上記問題を解決可能であり、効率的で再現性の高い発光測定が期待される。

さらに、キノンは還元剤を添加することで還元-再酸化反応のサイクルが誘起され、活性酸素を連続的に発生させる性質を有する。そこで、この反応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によってキノンの化学発光定量が可能である。

2. 研究の目的

本研究では、活性酸素を発生する性質を持つキノンを標識試薬として用いて、反応を制御可能な化学発光分析法の開発を行う。具体的には、キノンをプレカラム標識試薬として用いる HPLC 化学発光分析法ならびにビオチン化キノンを標識試薬とする化学発光イムノアッセイの開発を目的とする。

(1) キノンをプレカラム標識試薬とする HPLC 化学発光分析法を開発する。キノンを標識した測定対象をカラムで分離後に、オンラインで照射してキノン標識体より活性酸素を発生させてからルミノールと混合し、生じる発光を検出する。

(2) キノン標識抗体を用いる化学発光イムノアッセイの開発を試みる。このとき、応用範囲の広さと調製の簡便さを考慮して抗体へのキノン標識法としてアビジン-ビオチンシステムを選択し、そのための試薬としてビオチン化キノンを合成する。すなわち、ビオチン化キノンとビオチン化二次抗体とをアビジンを介して結合させることにより、容易にキノン標識抗体を調製可能な方法である。

さらに、上記の実験において照射による化学発光反応の制御に加えて、還元剤である dithiothreitol (DTT) の添加に伴う活性酸素の発生を利用する化学発光法についても検討を行った。

3. 研究の方法

(1) キノンを標識試薬として用いる HPLC

最初に、tryptamine 及び phenethylamine といった典型的なアミンを測定対象モデルとして選択し、化学発光検出システム開発のための検討を行った。Tryptamine 及び phenethylamine のアセトニトリル溶液に、標識用キノン試薬として anthraquinone-2-carbonyl chloride のアセトニトリル溶液及び炭酸緩衝液を加え、室温で 10 秒間攪拌することにより誘導体化を行う (Fig. 1)。反応溶液中の誘導体を ODS カラムで分離後、殺菌灯 (10 W, 254 nm) に巻き付けたテフロンチューブ内を通過させてオンラインで光を照射してから、ルミノールの炭酸ナトリウム水溶液と混合し、化学発光検出器へ導入して測定した。

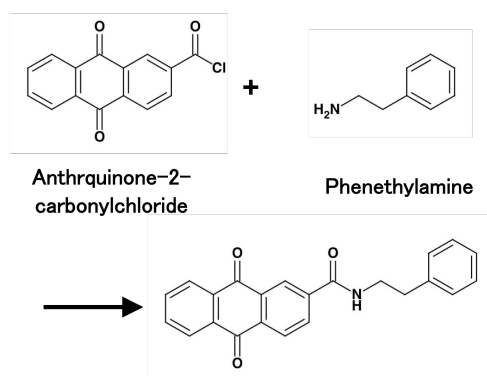


Fig. 1. Anthraquinone-2-carbonylchloride によるアミンの誘導体化反応

また、キノンの 1 種である menadione を標識試薬として用いるチオール類の HPLC 化学発光定量法を開発を試みた。Cysteine といったチオール類の水溶液に menadione のメタノール溶液及び HEPES 緩衝液を添加し、室温で 10 分間放置することにより誘導体化

を行う (Fig. 2)。この誘導体を ODS カラムで分離後に、オンラインで DTT 及びルミノールと混合することで誘導体から発生する活性酸素をルミノール化学発光検出する。

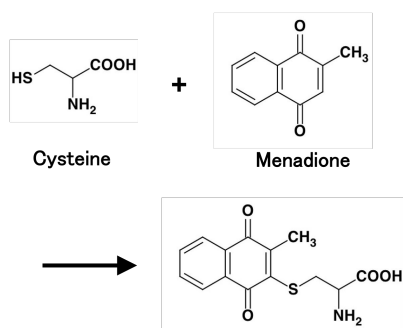


Fig. 2. Menadione によるチオールの誘導体化反応

(2) ビオチン化キノンによる化学発光イムノアッセイ

9,10-アントラキノン及び 1,4-ナフトキノン誘導体をそれぞれビオチンヒドラジドと結合させることで、ビオチン化アントラキノン (Biotin-AQ) 及びビオチン化ナフトキノン (Biotin-NQ) を合成する (Fig. 3)。合成したビオチン化キノンについて化学発光特性を調査するとともに安定性に関する評価を行う。さらに、ビオチン化キノンを化学発光イムノアッセイへと応用するための基礎検討として、ビオチン化抗体の化学発光定量を試みる。

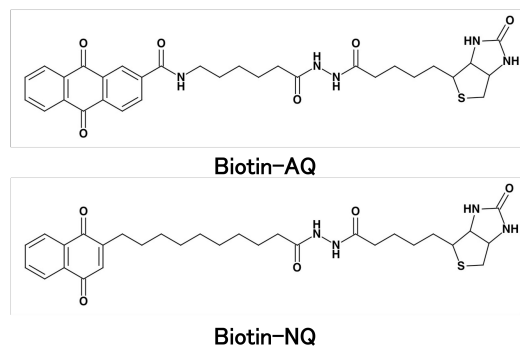


Fig. 3. Biotin-AQ 及び Biotin-NQ の構造

4. 研究成果

(1) キノンを標識試薬として用いる HPLC

Anthraquinone-2-carbonyl chloride と反応させたアミン類を HPLC システムに注入したところ tryptamine 及び phenethylamine はそれぞれ保持時間 13 分及び 15 分に化学発光ピークとして検出された (Fig. 4A)。これらのピークは光照射をオフにすることで消失したことから (Fig. 4B)、光照射により標識体から活性酸素が発生し、これがルミノールと反応して化学発光が生じたと考えられた。こ

の HPLC システムでは、ポストカラム試薬として活性酸素を送液する必要がないことから発光反応が安定化し、かつ照射装置のオン/オフにより発光反応を制御することが可能である。各種誘導体化条件及び HPLC 条件を最適化後の tryptamine 及び phenethylamine の検出下限 ($S/N = 3$) はそれぞれ 124 nM 及び 84 nM であった。次に、本法の実試料応用としてワインに含まれる tryptamine 及び phenethylamine の定量を行った。ワイン試料の前処理操作としてアセトニトリルを溶媒とする塩析液-液抽出を行うことにより、ワイン中から tryptamine 及び phenethylamine の誘導体ピークを良好に検出することが可能であった (Fig. 5)。

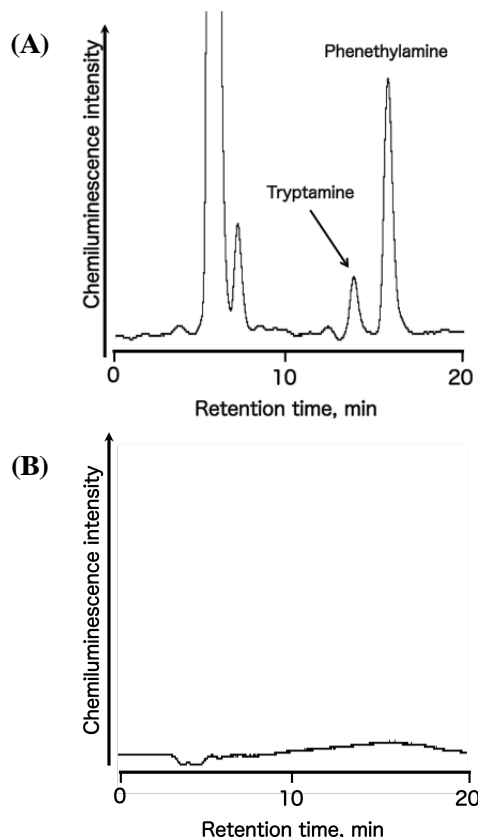


Fig. 4. アミン標準溶液のクロマトグラム (A) 光照射装置オン、(B) 光照射装置オフ

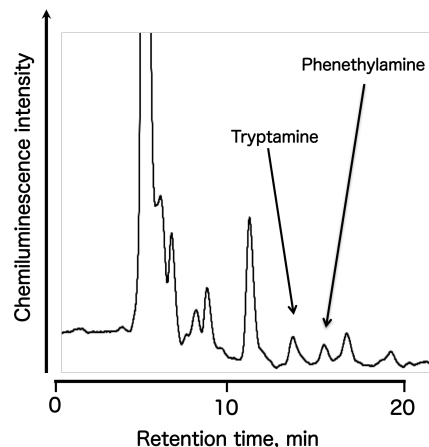


Fig. 5. 赤ワイン中アミンのクロマトグラム

Cysteine のようなチオールと menadione を弱アルカリ性条件下室温で放置することにより Michael 付加による誘導体が生成した。この誘導体に DTT 及びルミノールを添加したところ、強い発光が観察された。今回測定対象とした 4 種類のチオール類 (cysteine、homocysteine、N-acetylcysteine 及び glutathione) の誘導体は保持時間 12-40 分に検出され、その検出下限(S/N=3)は 0.02-0.08 nM であった。開発した HPLC 定量法をヒト血漿へと応用した結果、生体内成分の妨害を受けることなくこれらチオール類を良好に定量可能であった (Fig. 6)。本研究で標識試薬として用いた menadione は従来の試薬と比較して安定である上、より低温かつ短時間で反応が進行するという利点を有する。

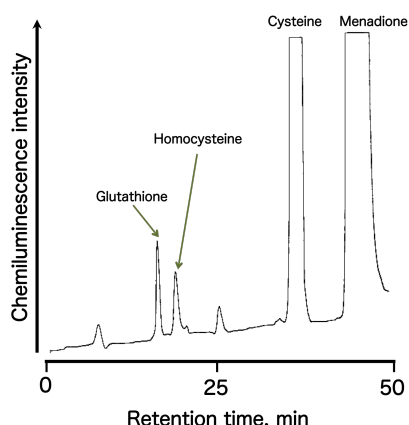


Fig. 6. 血漿中チオールのクロマトグラム

(2) ビオチン化キノンによる化学発光イムノアッセイ

Bioin-AQ 及び Biotin-NQ はビオチンヒドロジドを用いることにより一段階の反応で比較的容易に合成できた。これらのビオチン化キノンは、ビオチンと結合後であっても活性酸素発生能を維持しており、biotin-AQ はルミノールと混合してから光照射を行うことで発光性を示し、biotin-NQ はルミノール及び DTT を添加することで発光することが確認された。また、biotin-NQ は従来のイムノアッセイで汎用されている biotin-HRP と比較して、加熱、pH 変化、凍結融解、アジ化ナトリウム及びタンパク質分解酵素といった測定結果に影響を与える各種因子に対して高い安定性を有することが明らかとなった。

合成した biotin-NQ 及びアビジンを用いて、ビオチン標識抗体の定量を行ったところ、0.2-0.8 μM の濃度範囲でビオチン標識抗体濃度と発光強度との間に相関係数 0.943 の直線関係が見られ、検出下限 (blank + 3 SD) は 34.8 nM であった。これらの結果から、ビオチン化キノンを用いることで、従来のエンザイムイムノアッセイと比較して高い感度と再現性を有する化学発光イムノアッセイの開発が可能であると考えられた。

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 16 件)

[1] Elgawish MS, Kishikawa N, Kuroda N: Redox-based chemiluminescence assay of aminothiols in human urine: A fundamental study. *Talanta* 164: 116-120, 2017. DOI: 10.1016/j.talanta.2016.11.042 [査読有]

[2] Higashi A, Kishikawa N, Ohyama K, Kuroda N: A simple and highly selective fluorescent sensor for palladium based on benzofuran-2-boronic acid. *Tetrahedron Letters* 58: 2774-2778, 2017. DOI: 10.1016/j.tetlet.2017.06.005 [査読有]

[3] Fukuda M, El-Maghrabey MH, Kishikawa N, Ikemoto K, Kuroda N: Ultrasensitive determination of pyrroloquinoline quinone in human plasma by HPLC with chemiluminescence detection using the redox cycle of quinone. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 145: 814-820, 2017. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.08.008 [査読有]

[4] Miyamoto A, Nakano S, Nagai K, Kishikawa N, Ohyama K, Aoyama T, Matsumoto Y, Kuroda N: Development of an evaluation method for hydroxyl radical scavenging activities using sequential injection analysis with chemiluminescence detection. *Analytical Sciences* 33: 697-701, 2017. DOI: 10.2116/analsci.33.697 [査読有]

[5] Ohyama K, Yoshimi H, Aibara N, Nakamura Y, Miyata Y, Sakai H, Fujita F, Imaizumi Y, Chauhan AK, Kishikawa N, Kuroda N: Immune complexome analysis reveals the specific and frequent presence of immune complex antigens in lung cancer patients: A pilot study. *International Journal of Cancer* 140(2): 370-380, 2017. DOI: 10.1002/ijc.30455 [査読有]

[6] 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. *臨床化学*, 46(4): 299-304, 2017. [査読無]

[7] 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]

[8] Funasaka K, Asakawa D, Oku Y, Kishikawa

N, Deguchi Y, Sera N, Seiyama T, Horasaki K, Arashidani K, Toriba A, Hayakawa K, Watanabe M, Kataoka H, Yamaguchi T, Ikemori F, Inaba Y, Tonokura K, Akiyama M, Kokunai O, Coulibaly S, Hasei T, Watanabe T: Spatial correlativity of atmospheric particulate components simultaneously collected in Japan. *Environmental Monitoring and Assessment* 188(2): 1-14, 2016. DOI: 10.1007/s10661-015-5029-x [査読有]

[9] 岸川直哉：毒物を検出するための蛍光プローブ . *ぶんせき*, 7: 267-274, 2016. [査読無]

[10] Elgawish MS, Kishikawa N, Kuroda N: Quinones as novel chemiluminescent probes for the sensitive and selective determination of biothiols in biological fluids. *Analyst* 140: 8148-8156, 2015. DOI: 10.1039/c5an01604e [査読有]

[11] 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]

[12] 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]

[13] 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]

[14] 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]

[15] 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]

[16] 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 22 件)

1. 岸川直哉, 河本絢香, 黒田直敬, : 光応答性活性酸素発生物質を標識試薬として用いるアミン類の HPLC-化学発光検出法の開発, 日本薬学会第 138 年会, 2018 年 .
2. 黒田直敬, 岸川直哉: 臨床検査への応用を志向した化学発光分析法の開発, 日本薬学会第 138 年会, 2018 年 .
3. 福田瑞穂, 岸川直哉, 黒田直敬: 生体内キノン修飾体の高選択的の化学発光検出法の開発と挙動解析, 第 29 回日本臨床化学会九州支部総会, 2018 年 .
4. 八坂直幸, 岸川直哉, 大山 要, 黒田直敬: Sonogashira coupling に基づく甲状腺ホルモンの高選択的の蛍光誘導体化 HPLC 定量法の開発, 第 34 回日本薬学会九州支部大会, 2017 年 .
5. 福田瑞穂, 岸川直哉, 黒田直敬: キノン及びキノン修飾体の HPLC 化学発光定量法の開発と生体試料への応用, 第 57 回日本臨床化学会年次学術集会, 2017 年 .
6. 福田瑞穂, 岸川直哉, Mahmoud.H. El-Maghrabey, 池本一人, 黒田直敬: ピロロキノリンキノンの高感度 HPLC-化学発光 定量法の開発と血漿試料への応用, 第 15 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 (PPF2017), 2017 年 .
7. 東 杏澄, 岸川直哉, 大山 要, 黒田直敬: 簡便かつ迅速なパラジウムイオンの検出を目的とするアリールボロン酸型新規蛍光センサー分子の開発, 第 15 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 (PPF2017), 2017 年 .
8. 岸川直哉, 峰 正樹, Mahmoud Hamed El-Maghrabey, 大山 要, 黒田直敬: 多成分縮合反応に基づく精製タグ導入/蛍光誘導体化法の開発とグリオキシル酸の HPLC 定量への応用, 第 30 回バイオメディカル分析科学シンポジウム (BMAS2017), 2017 年 .
9. 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, 2017 年 .
10. Naoya Kishikawa: Development of selective chemiluminescence determination methods for quinones based on the redox reaction cycle of quinone, XVII International Symposium on Luminescence Spectrometry (ISLS2016), 2016 年 .
 11. 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), 2016 年 .
 12. 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 を発蛍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, 2016 年 .
 13. 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), 2016 年 .
 14. 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, 2016 年 .
 15. 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, 2016 年 .
 16. 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, 2016 年 .
 17. 八坂直幸, 岸川直哉, 黒田直敬: Sonogashira coupling に基づくアリールハライドの蛍光誘導体化: Suzuki coupling との反応性比較 第 32 回日本薬学会九州支部大会, 2015 年 .
 18. 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 回日本臨床化学学会年次学術集会, 2015 年 .
 19. 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), 2015 年 .
 20. 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, 2015 年 .
 21. 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), 2015 年 .
 22. 新藤敬梧, 岸川直哉, 大山 要, 黒田直敬: ビペ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, 2015 年 .
- 取得状況 (計 1 件)
- 名称: キノンを検出するための化合物および該化合物を用いたキノンの検出方法
 発明者: 黒田直敬、岸川直哉、大山 要、上村周平
 権利者: 長崎大学
 種類: 特許
 番号: 特許 6233834 号
 取得年月日: 2017 年 11 月 2 日
 国内外の別: 国内
- 〔その他〕
 ホームページ等
<http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/analysis/index-j.html>
6. 研究組織
 (1) 研究代表者
岸川 直哉 (KISHIKAWA, Naoya)
 長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・准教授
 研究者番号: 90336181