

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 27 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590707

研究課題名(和文)超高速高感度同時検出生物化学発光測定法の開発とマルチラベルイムノアッセイへの応用

研究課題名(英文)Development of ultra high speed and highly sensitive simultaneous bio- and chemi-luminescent assay and its application to multi labeled immunoassay.

研究代表者

伊藤 克敏 (ITO, Katsutoshi)

昭和大学・薬学部・准教授

研究者番号：20223141

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではイクオリン(AQ)、ガウシアルシフェラーゼ(GL)、アクリニジウムエステル(AE)の発光反応を組み合わせ、計3秒で測定可能な超高速高感度同時検出化学生物発光法を開発し、マルチラベルイムノアッセイに応用することで、高感度かつ短時間に貴重な試料中の多成分同時検出を可能とすることを目的とした。開発したマルチラベルイムノアッセイは、 α -フェトプロテイン(AFP)、前立腺特異抗原(PSA)、ガン胎児性抗原(CEA)の腫瘍マーカーおよびTNF- α 、IFN- γ 、IL-6のマウスサイトカインの組合せについて超高速高感度に多成分同時測定が可能であった。

研究成果の概要(英文)：I have developed simultaneous bio- and chemi- luminometric assay using aequorin (AQ), gaussia luciferase (GL) and acridinium ester (AE). In this study, we applied this analytical method to the detection of multiplex-labeled immunoassay. Minimum detection limit of AQ, GL and AE were 6.4×10^{-20} , 9.7×10^{-19} and 6.5×10^{-19} mol/assay utilizing proposed simultaneous bio- and chemi- luminometric assay, respectively. I also applied to multiplex-labeled immunoassay for tumor makers and mice cytokines. These measurable ranges were 4.0~263 ng/mL (AFP), 8.8~565 ng/mL (PSA) and 2.8~4620 ng/mL (CEA) for human tumor makers and 0.625-40ng/mL (TNF- α), 20-1250pg/mL (IFN- γ), 20-1250pg/mL (IL-6) for mice cytokines, respectively.

研究分野：分析化学

 キーワード：生物発光 化学発光 超高速高感度測定 イクオリン ガウシアルシフェラーゼ アクリニジウムエス
 テル マルチラベルイムノアッセイ 多成分同時測定

1. 研究開始当初の背景

申請者らは高感度な非放射性イムノアッセイの開発を目指し、発光検出法の開発を一貫して行ってきた。発光検出法のうち ATP の高感度測定に用いられるホタルのルシフェリン-ルシフェラーゼ反応は生物発光検出法として最も良く知られている方法であり、中性の液性で行われ、有機溶媒等を必要としないことから、高感度でかつ化学発光検出法より更に環境に優しい方法と考えられる。申請者らは生物発光検出をイムノアッセイ (BL-EIA) に応用するため、標識酵素に ATP 産生酵素を用いるその検出にホタルルシフェラーゼ-ルシフェリン反応を用いる方法を考案してきた。種々の ATP 産生酵素をスクリーニングした結果、アセテートキナーゼ (AK) とピルベートフォスフェートジキナーゼ (PPDK) を選択し、それら酵素の検出感度は 10^{-20} モルレベルと高感度測定が可能であった。この両酵素を標識に用いる BL-EIA は汎用性に富んでおり、申請者らは従来の西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) やアルカリ性フォスファターゼ (ALP) を用いる EIA に比して 10 倍から 100 倍程度高感度な種々の生体成分の測定を報告してきた。

一方、イムノアッセイは一度に一種類の抗原または抗体を検出するのが一般的である。申請者らは試料のダウンサイズ化及び試薬、コストの省力化を目的として多項目同時検出に着目し、時間分解蛍光法を用いる 2~3 成分の同時アッセイを確立した。しかし時間分解蛍光法は生物発光検出法よりも感度が 100 倍程度低いこと、用いる希土類元素により $10 \sim 100$ 倍程度感度が異なることより、同時測定が可能な分析対象物質に制限がある。そこで申請者はこの欠点を補うため、前述の AK と PPDK が同一反応条件下で、異なる基質から ATP を生成することに着目し、両酵素を同時に標識として用いる多成分同時検出 BL-EIA を開発した。その結果、両酵素の同時測定ではともに 10^{-20} モルレベルの感度を達成し、各々の単独測定と同等の高感度測定が可能であり、血清等の生体試料中の分析対象物が制限を受けずに多項目同時に高感度で測定が行える BL-EIA が構築できた。しかし、このアッセイ系では得られる発光が定常状態に達した後測定を行っているため、実際の測定では酵素反応時間が各々 15 分程度必要であり、スループットが高い測定とは必ずしも言えなかった。

井上らにより発光タンパク質イクオリンの遺伝子工学的な大量合成が報告され、現在ではアポイクオリンをほとんど含まない、純度の高いイクオリンを商業的に入手可能である。イクオリンはオワンクラゲから単離されたタンパク質で基質であるセレンテラジンと分子状酸素を分子内に持つ。イクオリン

はカルシウムイオンと結合すると、青色の発光を示しセレンテラジンの酸化物であるセレンテラミドおよび二酸化炭素を生成する。この発光反応は約 1 秒で最大発光を示し瞬時消失する。実際の測定ではカルシウム溶液添加後、1 秒間の積算を行うことで高感度測定が可能である。

またルシフェラーゼの発光機構は ATP、 Mg^{2+} および分子状酸素存在下ルシフェリンがルシフェラーゼにより酸化され、生じたオキシルシフェリンが励起状態を生成し基底状態に戻る際に発光することを原理とする。またその発光量子収率は 0.88 であり、これは化学発光に比べ驚異的に高く、その反応は数秒程度で最大値を示すことから、生体試料中の ATP の高感度測定や分子生物学の検出法として利用されている。辰巳らによって遺伝子工学的に産生されたピオチン化ルシフェラーゼは、高感度な生物発光検出酵素イムノアッセイ (BL-EIA) の応用例が報告されている。

申請者らはすでにイクオリン及びピオチン化ルシフェラーゼの発光機構が全く異なる事を利用した、連続した短時間で同一バッチ中での超高速生物発光同時測定を検討した。開発した測定法は、多項目同時検出イムノアッセイへ応用できた。その成果は両酵素の感度とも $10^{-19} \sim 10^{-20}$ モルレベルを達成し、2 成分測定を約 4 秒で同時に行えるスループットの高い方法となった。

今までにイクオリン及びピオチン化ルシフェラーゼを組み合わせた上記超高速生物発光測定法に加え、イムノアッセイの標識酵素として汎用される HRP の発光測定を同一バッチ内で引き続き行わせることで、発光測定法による高感度 3 成分同時測定法を開発し、遺伝子組み換えパパイアの遺伝子の 3 種遺伝子産物や歯周ポケット内の代表的な 3 種の歯周病菌遺伝子の測定に成功した⁸⁾。しかし、最後の HRP の測定前にルシフェラーゼによる発光の消去のためカチオン性界面活性剤の添加の後 7 分間必要であったこと、および HRP の検出限界が他の発光に比べ約 100 倍程度劣っており、 10^{-17} モルレベルの測定であったことによりまだまだ改良の必要性があると感じている。

2. 研究の目的

本申請では、上記の欠点を解消するために、近年遺伝子工学で純度が高く大量に産生されるようになったガウシアルシフェラーゼの生物発光法および古くから知られているアクリニジウムエステルの化学発光法をイクオリンの発光に組み合わせることにより高感度かつ短時間で 3 成分の測定を行うことを目的とした。

ガウシアルシフェラーゼはセレンテラジ

ンを基質として基質添加直後に発光し、数十分間の持続発光が得られる発光タンパク質である。申請者は基礎的検討においてガウシアルシフェラーゼの発光反応は硝酸酸性下にする事で、瞬間的に発光を停止することを見いだした。一方アクリニジウムエステルの発光はすでに良く知られているように、強塩基性下過酸化水素が存在することによって発光する。本申請では、イクオリンの瞬間発光の後セレンテラジンを加えガウシアルシフェラーゼの発光測定を行う。次に過酸化水素を含む硝酸を加えることでルシフェラーゼ発光を停止した後、強アルカリ性条件としてアクリニジウムエステルを瞬間発光させ計3秒間の測定で3成分を超高速かつ高感度に検出することを原理としている。本申請の使用するイクオリン(AQ)、ガウシアルシフェラーゼ(GL)、アクリニジウムエステル(AE)以下の原理での発光が知られている。

イクオリン(AQ)は、前述の通り、分子内にセレンテラジンと分子状酸素を持ちカルシウムイオンと結合すると、青色の発光を示しセレンテラジンの酸化物であるセレンテラミドおよび二酸化炭素を生成する。この発光反応は約1秒で最大発光を示し瞬時消失する。実際の測定ではカルシウム溶液添加後、1秒間の発光の積算を行うことで高感度測定が可能である。

また、ガウシアルシフェラーゼ(GL)はカイアシに属する *Gaussia princeps* に由来する発光タンパク質であり、セレンテラジンの酸化反応を触媒する。ルシフェラーゼ類の中では最も小さく分子量約20kda程度である。近年、遺伝子工学的に生産される様になり容易に入手可能である。GLの発光は中性の緩衝液に溶解した基質のセレンテラジンを加えた瞬間より強い発光が得られる。その発光は徐々に減衰するが、数十分間持続する。しかし、0.1mol/L程度の硝酸を加えることでその反応はすぐに停止する。従って、次に述べるアクリニジウムエステル(AE)の化学発光反応で使用する過酸化水素の硝酸溶液を加えることで、GLの発光が瞬間的に消光し、次のAEの発光測定に影響しないことを見いだした。

AEの化学発光は古くから知られており、臨床の現場でもイムノアッセイ検出に使用されており、標識化試薬も市販されている。図3に示すように、AEの化学発光は塩基性条件下過酸化水素の存在により発光する。実際の測定では、過酸化水素の硝酸溶液を添加した後、水酸化ナトリウム溶液を添加した直後の発光を測定するものである。その発光は、1秒以内に減衰する発光である。

本申請では多成分を超高速高感度に同時測定するため、AQ、GL、AEの同時高感度

測定系の開発を行った。

図1に示すように同一バッチ内の3種の発光タンパク質、化学発光試薬を、第1段階でCa²⁺溶液を添加することでAqの測定を行い、第2段階ではセレンテラジン溶液を加えることでGLの測定を行う。第3段階の最初では過酸化水素を含む硝酸溶液を添加し、GLを不活性化し消光させる。さらに水酸化ナトリウム溶液を加えることで同一バッチ内のAEの高感度測定を行う事が可能である。またそれぞれの発光検出時間は1秒程度で高感度測定が可能であるので、計3秒間の測定のみで測定が完了する。

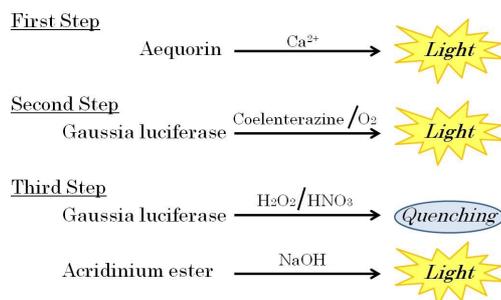


図1 同時発光法模式図

今回開発した同時測定系は、同一サンプル中の測定対象物が同一手技により超高速で多成分同時高感度測定が可能となることより、貴重な試料の必要量が少量で済み、さらに試薬、マンパワー等のコストの省力化がはかれることから利点が多いと考えられた。本測定系は検出に発光測定器が整備されていれば可能であり、マルチラベルイムノアッセイによるハイスループットスクリーニングシステムの構築が簡便安価に行えるものとする。

3. 研究の方法

AQ、GLおよびAEを用いる超高速高感度三成分同時生物化学発光測定法の開発

GLの発光はATPを必要とせず、基質であるセレンテラジンの添加のみで瞬時に発光する。GLは185残基のアミノ酸からなり、分子量約20kDaとルシフェラーゼ類では最も小さい。

GLを組み合わせた三成分同時発光法は次のように行った。プレートの各ウェルに酵素希釈用緩衝液で希釈したAq、GL及びAE標識IgGを各々5μLずつ分注した。最初に50mmol/Lカルシウム溶液50μLを加え、Aqの1秒間の発光強度を測定した。次に0.9% NaCl、2.5mmol/L EDTA、0.01% Tween20を含む25mmol/L HEPES緩衝液(pH 7.0)に溶解した1μg/mLセレンテラジン基質溶液50μLを加え、GLの1秒間の発光強度を測定した。最後に0.5%過酸化水素を含む0.1

mol/L 硝酸溶液を 50 μ L 加え GL の発光を停止させた後、7mmol/L 塩化 n-ヘキサデシルトリメチルアンモニウムを含む 2mol/L NaOH 溶液を 50 μ L 加え、AE の 1 秒間の発光強度を測定した。

マルチラベルイムノアッセイ

マルチラベルイムノアッセイへの応用としては PSA、AFP、CEA の 3 種の腫瘍マーカーの測定に応用を検討している。それぞれの腫瘍マーカーに対する抗体を固相化したプレートに標準溶液 60 μ L および AFP、PSA、CEA に対するそれぞれの抗体に Aq、GL、AE 標識した 3 種の標識抗体溶液 50 μ L 加え、4 \square で一晩放置した。洗浄により B/F 分離した後、上記の同時検出法で固相上のそれぞれの発光強度を測定した。

また、抗体の組み合わせをそれぞれマウスの TNF- α 、IFN- γ 及び IL-6 とし、同様に 3 種マウスサイトカインの同時測定に応用した。

4. 研究成果

・GL 発光の至適条件の検討

96 穴マイクロタイタープレートに酵素希釈用緩衝液で希釈した GL 5 μ L 及びカルシウム溶液を 50 μ L 加え、次に 10 mmol/L EDTA、0.01 % Tween20 を含む 50 mmol/L HEPES 緩衝液 (pH 7.0) で作成した 0.1 ~ 5 μ g/mL セレンテラジン基質溶液を加え GL の 1 秒間の発光強度を測定した。

図 2 に示すように発光強度はセレンテラジン濃度 5 μ g/mL の時最大であり、濃度が薄くなるにつれて低下した。セレンテラジン濃度は 1 μ g/mL の時、低濃度の GL の測定においてブランクとの差が大きく感度良く測定できると考えられた。以下の同時測定法では 1 μ g/mL をセレンテラジンの至適濃度とした。

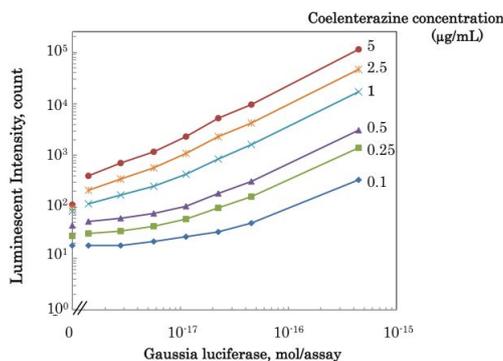


図 2 GL 発光に及ぼすセレンテラジン濃度の影響

・AE 発光の至適条件の検討

GL 発光の消去に硝酸濃度が関与すると考えた。その後に続く AE 発光は塩基性条件下、過酸化水素と反応し発光するため発光測定

時には強塩基性下で行うことが望まれると考えた。以上の点より GL 発光消去液として用いた硝酸溶液及び AE 発光試薬として用いた水酸化ナトリウム溶液の濃度を検討した。図 3 に AE 発光の S/N 比を示す。

水酸化ナトリウム濃度が濃くなるほど S/N 比が上昇した。また硝酸濃度が濃いほどブランク値が増加し S/N 比が低下した。

よって以下の本同時測定法では、GL 発光消去液として 0.5 %の過酸化水素を含む 0.1 mol/L 硝酸溶液、アクリジニウム発光試薬として 7 mmol/L 塩化 n-ヘキサデシルトリメチルアンモニウムを含む 2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を用いた。

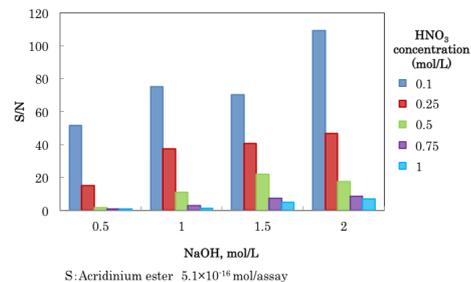


図 3 AE 発光に及ぼす硝酸および水酸化ナトリウム濃度の検討

・3 成分同時発光の経時変化

最初に第 1、第 2 段階の AQ、GL の発光経時変化を測定した。AQ の濃度は、0、 1.9×10^{-17} 、 1.9×10^{-16} 、 1.9×10^{-15} mol/assay、GL の濃度は 0、 4.5×10^{-16} 、 4.5×10^{-15} mol/assay とした。各ウェルに AQ、GL を各 5 μ L 添加し、カルシウム溶液を 50 μ L 加え 20 秒間 AQ の発光を測定した。引き続きセレンテラジン基質溶液 50 μ L を加え GL の発光を 20 秒間測定した。

図 4 に示すように、第 1 段階の AQ の発光は A 点でカルシウム溶液添加後、濃度依存的に 1 秒以内で最大値を示した後消失した。第 2 段階の GL は B 点でセレンテラジン基質溶液を加えた約 1 秒後に最大値を示し濃度依存的に発光した。その後持続して発光がみられた。

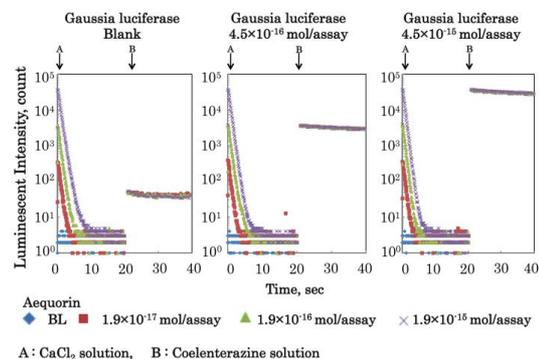


図 4 AQ 及び GL 発光の経時変化

次に第 2、第 3 段階の GL、AE の発光経時変化を測定した。GL の濃度は 0 、 4.5×10^{-17} 、 4.5×10^{-16} 、 4.5×10^{-15} mol/assay、AE の濃度は 0 、 5.1×10^{-16} 、 5.1×10^{-15} mol/assay とした。GL、AE 標識 IgG 各 $5 \mu\text{L}$ 及びカルシウム溶液 $50 \mu\text{L}$ を加えた各ウェルに、セレンテラジン基質溶液 $50 \mu\text{L}$ を加え GL を発光させ 20 秒間測定した。その後 GL 発光消去液 $50 \mu\text{L}$ を添加し、10 秒間発光変化を測定した。最後に AE 発光試薬 $50 \mu\text{L}$ を加え AE の発光を 10 秒間測定した。

図 5 に示すように、C 点で硝酸を含む GL 発光消去液を添加することで、GL の発光をブランク値まで低下させた。第 3 段階の AE は、D 点で AE 発光試薬の添加により濃度依存的に 1 秒で発光しその後消失した。

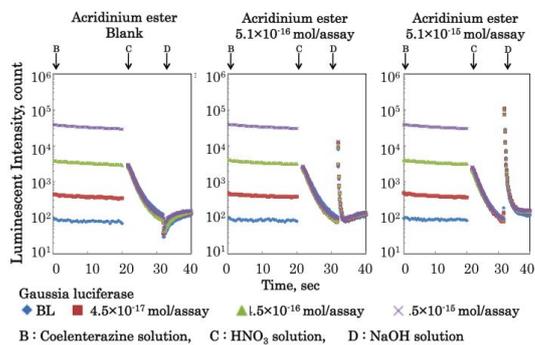


図 5 GL 及び AE 発光の経時変化

・AQ、GL 及び AE の標準曲線

AQ、GL 及び AE の 3 成分同時測定による標準曲線を図 6 にそれぞれの単成分測定および同時測定を行ったときの最小検出限界を表 1 に示す。

本同時測定法における AQ の測定では GL、AE の影響は受けず、検量域は 2.4×10^{-19} ~ 1.9×10^{-15} mol/assay、最小検出感度は 6.4×10^{-20} mol/assay (blank+3SD)、各濃度における同時再現性は 1.5 ~ 8.3 % (CV%, n=8) であった (図 6a)。また GL の測定では、検量域は 2.8×10^{-18} ~ 4.5×10^{-15} mol/assay、最小検出感度は 9.7×10^{-19} mol/assay (blank+3SD)、各濃度における同時再現性は 2.1 ~ 3.8 % (CV%, n=8) であった (図 6b)。AE の測定においてその検量域は 1.6×10^{-17} ~ 5.1×10^{-15} mol/assay、最小検出感度は 6.5×10^{-19} mol/assay (blank+3SD)、各濃度における同時再現性は 2.6 ~ 3.6 % (CV%, n=8) であった (図 6c)。各々の単成分測定時と 3 成分同時測定を発光強度で比較した結果、AQ はほぼ同等であったが GL では約 30 % に減少した。AE の発光はブランクの上昇を生じたが約 75 % の発光強度であった。各々の測定において他の成分の影響は見られず、安

定した測定が行えた。本測定はプレート 1 枚あたり約 6 分で測定が可能であった。

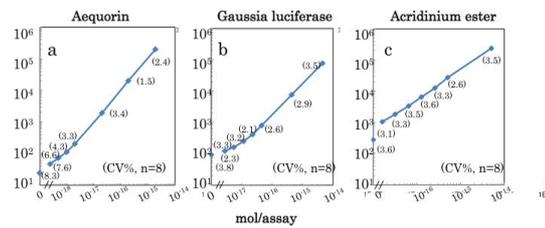


図 6 生物化学発光同時測定法による AQ、GL、AE の検量線

表 1 AQ、GL、AE の単独測定及び同時測定における最小検出限界

	Aequorin	Gaussia luciferase	Acridinium ester
単成分	3.4×10^{-20}	2.6×10^{-19}	1.1×10^{-19}
3成分	6.4×10^{-20}	9.7×10^{-19}	6.5×10^{-19}

(mol/assay)

・三成分同時発光イムノアッセイ

3 種ヒト腫瘍マーカー (AFP、CEA、PSA) の測定

三成分同時イムノアッセイ用固相化プレートを、抗ヒト AFP(6D2)、PSA(4D10)、CEA(8G6)モノクローナル抗体溶液を炭酸緩衝溶液に溶解し固相化を行った。ポストコーティングを行って保存した。三種の抗原 AFP/PSA/CEA を含む標準溶液と、AQ 標識抗 AFP 抗体、GL 標識抗 PSA 抗体、AE 標識抗 CEA 抗体を混合した免疫反応用緩衝液を添加し、4 で一晩保存洗浄し、それぞれの発光強度を測定した。(図 7)

その結果、AFP は $4.1 \sim 263$ ng/mL、PSA は $8.8 \sim 565$ ng/mL、CEA は $2.8 \sim 4620$ ng/mL の検量域が得られ、いずれの値もそれぞれの腫瘍マーカーのカットオフ値を含む検量域が得られた。

3 種マウスサイトカイン (TNF- α 、IFN- γ 、IL-6) の測定

同様に抗体および標準溶液をマウスサイトカイン TNF- α 、IFN- γ 及び IL-6 とし測定を行ったところ図 8 のような良好な検量線が得られた。

マウスサイトカインの測定においては、標識抗体に FITC 標識抗 TNF- α 抗体、ジゴキシン標識抗 IFN- γ 抗体およびビオチン標識抗 IL-6 抗体をそれぞれ使用した。その検出には、AQ 標識抗 FITC F(ab')抗体、GL 標識抗ジゴキシン抗体および AE 標識抗ビオチン抗体をそれぞれ用いた。検出に用いた AQ、GL、AE の標識抗体はビオチンや FITC、ジゴキシン等の標識化抗体の検出に用いることができる。したがって特異抗体の組合せを変えるの

みで種々の抗原のマルチラベルイムノアッセイに応用が簡便に行える。
 マウスサイトカインの検量域は、AQ で測定した TNF- α が 0.625-40ng/mL、GL で測定した IFN- γ が 20-1250pg/mL、AE で測定した IL-6 が 20-1250pg/mL が得られた。
 創薬の基礎研究で用いられるマウス等の小動物から得られる血液試料は極微量であるが、本法のような多成分を同時に測定できる方法を用いることで得られる情報は多くなり、使用する小動物の個体数は削減できることが推測される。

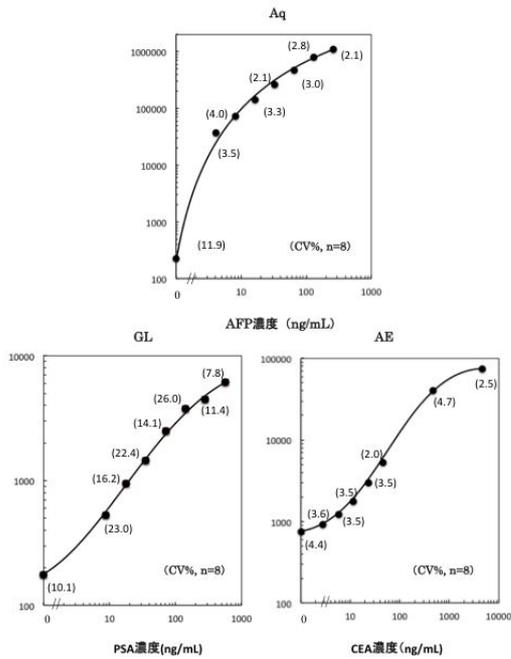


図 7 超高速高感度三成分同時生物化学発光測定法による腫瘍マーカーの測定

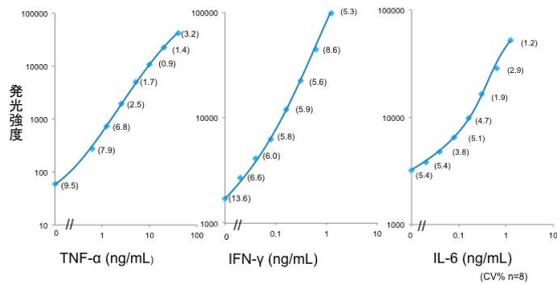


図 8 超高速高感度三成分同時生物化学発光測定法による腫瘍マーカーの測定

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

① 超高感度三成分同時生物化学発光測定法の開発とイムノアッセイへの応用

北脇丈裕、黒崎朝子、何美伶、後迫祐輔、杉原加奈子、中野未希、伊藤克敏、井上敏、荒川秀俊

第 56 回日本薬学会関東支部会 2012 年 10 月

② 生物発光化学発光検出を用いるマルチラベルイムノアッセイ

伊藤克敏

第 26 回生体成分の分析科学シンポジウム(招待講演) 2013 年 8 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

無し

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤克敏 (ITO, KATSUTOSHI)

昭和大学・薬学部・准教授

研究者番号：20223141

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し

(4)研究協力者

無し