

化学発光イムノアッセイにおける標識試薬としての キノン導入デキストランの発光特性調査

○島田 愛¹、Mahmoud Hamed El-Maghrabey^{2,3}、岸川直哉²、黒田直敬²
(長崎大薬¹、長崎大院医歯薬²、マンスーラ大³)

【目的】イムノアッセイは、抗原-抗体反応の高い特異性により複雑な前処理を必要とせず微量成分を高感度に測定できる方法である。イムノアッセイの中でも、化学発光 (CL) 反応を触媒する酵素で標識した抗体を利用する化学発光免疫測定法 (CLEIA) は、感度および利便性に優れた測定法であるため、様々な微量成分の分析に広く用いられている。しかし、CLEIA には pH や温度変化に対する酵素の不安定性による低い再現性や酵素の非特異的吸着といった問題点が存在する。一方、我々はこれまでにキノン構造を有する化合物に還元剤およびルミノールを添加することで長時間持続する強い CL が生じる現象を見出している。そこで、CLEIA の酵素に代えて安定なキノンをシグナル発生タグとして用いる非酵素的化学発光イムノアッセイの開発を試みてきた。本研究では、感度の向上と水溶性の改善を目指し、Dextran 40 上に水溶性キノンであるドキソルビシンを集積させた新規化合物 DexDox を新たに調整し、さらに抗体への標識を容易にするためにビオチン化した DexDox (Biotin-DexDox) を合成し、その化学発光特性の調査を行った。

【方法】DexDox の合成: Dextran 40 (Mw.=ca. 40000, 平均グルコース数: 約 250 個) を NaIO_4 を用いて酸化して oxidized dextran (OxDex)を得た (Fig.1)。これに、Dextran あたり、2500 当量のドキソルビシン (Fig.2) を加えて PBS buffer 中で 50°C 、一晩加温した後、透析法により精製して DexDox を得た。Dextran 40 へのドキソルビシンの導入量は、ドキソルビシンに由来する吸光度を測定することで算出した。

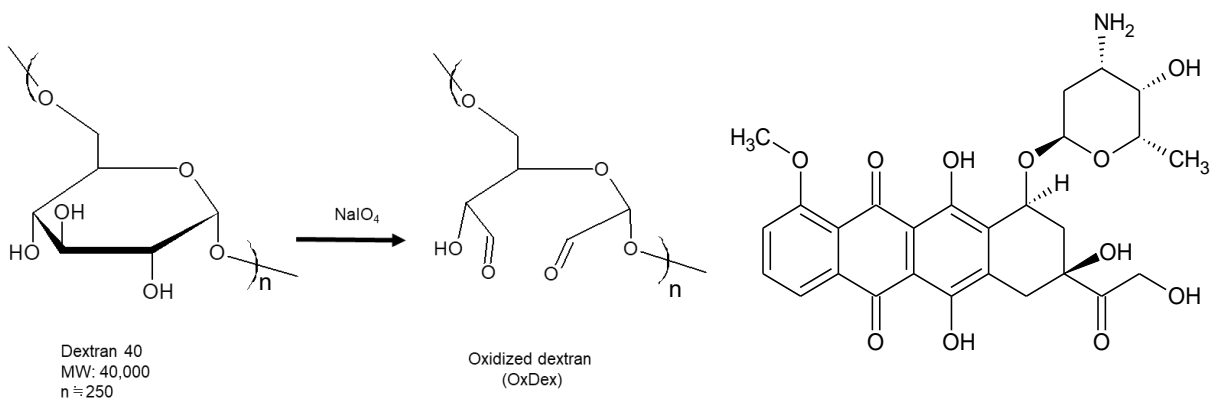


Fig.1 Synthesis of OxDex

Fig.2 The structure of Doxorubicin

Biotin-DexDox の合成: DexDox に対し 25 当量の Biotin-hydrazide を加え、PBS buffer 中で 50℃、一晩加温した後、透析法により精製することで Biotin-DexDox を得た。

Biotin-DexDox の CL 測定: 小試験管に Biotin-DexDox 水溶液及びルミノール水酸化ナトリウム水溶液をそれぞれ 100 μL 加えて、5 秒間攪拌した。この試験管をルミノメーター (Berthold, Sirius) にセットして、還元剤ジチオスレイトール (DTT) 水溶液 100 μL を注入し、生じる発光を 600 秒間測定した。

【結果及び考察】調製した DexDox は Dextran あたりドキソルビシンが約 110 分子結合していると概算された。Biotin-DexDox は、ルミノール及び DTT の添加により、ドキソルビシンと同様に長時間持続する強い CL を与えることが確認された。(Fig.3)

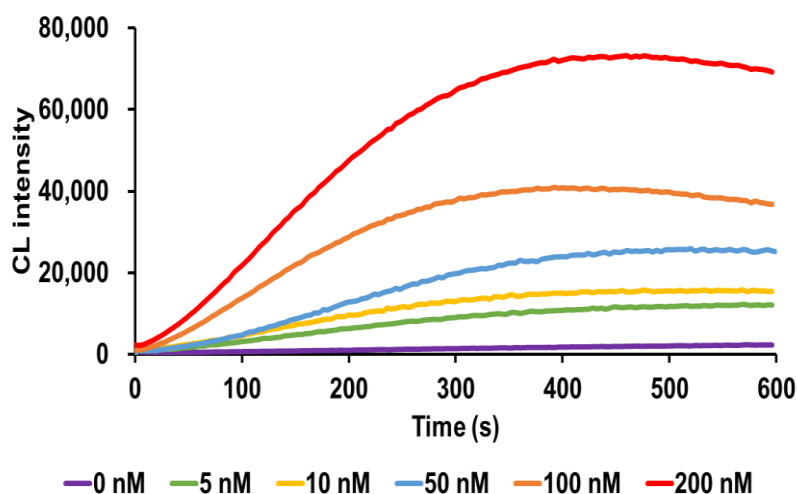


Fig.3 Time profile of CL from Biotin-DexDox

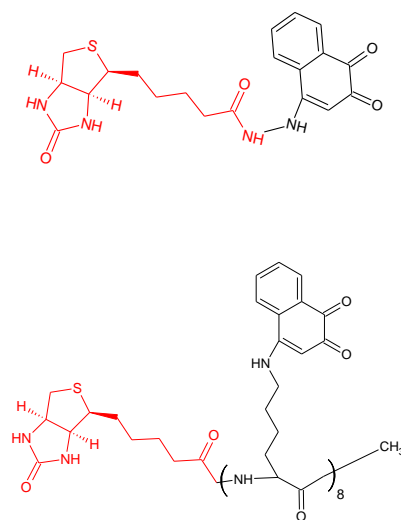


Fig.4 The structures of Biotin-NQ and Bio8mer-NQ

Biotin-DexDox 標準溶液を用いて検量線を作成したところ 5-200 μM の範囲で、濃度と CL 強度との間に相関係数 $r^2=0.998$ の良好な直線関係が得られ、LOD (blank + 3SD) は 0.25 nM であった。これまでに当研究室で開発したビオチン 1 分子にキノンが 1 分子結合した Biotin-NQ および 8 分子結合した Bio8mer-NQ (Fig.4) と比較して、感度がそれぞれ 30 倍および 5 倍向上した。今後は、アビジンを介して Biotin-DexDox で標識した抗体について同様に CL を測定し、実際のイムノアッセイへの適用性をさらに評価していく予定である。