

ルミノール増強化学発光反応を利用する 分析試薬及びシステムの開発に関する研究

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻 一番ヶ瀬 智子

[目的]

近年、化学発光法は高感度な分析法のひとつとして注目されており、その分析化学的応用が急速に広がりつつある。化学発光分析法においては、一般に得られる発光の強度が強いほど測定対象となる発光物質及び発光反応に関与する成分を高感度に検出できるため、より強い発光を示し、かつ優れた反応効率を有する発光反応系の開発が求められている。ルミノールは最も広く使われている発光試薬であり、中でも弱アルカリ性条件下、酸化剤として過酸化水素(H_2O_2)、触媒として西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)を用いるルミノールの化学発光反応系(ルミノール - H_2O_2 - HRP 化学発光系)は、酵素免疫測定法などにおける HRP 標識体の検出に汎用されてきた。しかしながら、HRP 触媒によるルミノール化学発光は、発光強度が比較的弱く、発光の減衰が速いなど、感度及び精度の面で問題を有している。これらの欠点を克服するため、化学発光強度の増強あるいは発光持続時間の延長を目的とした化学発光増強剤の開発が行なわれてきた。ロフィン及びその類似骨格を有するフェノール性誘導体である HDI、HPI 及びフェニルボロン酸誘導体 DPA、DPPA (Fig. 1) は当研究室で見出されたルミノール - H_2O_2 - HRP 化学発光系の有用な増強剤である。本研究ではこれらの増強作用を利用する分析試薬及び分析システムの開発を行った。

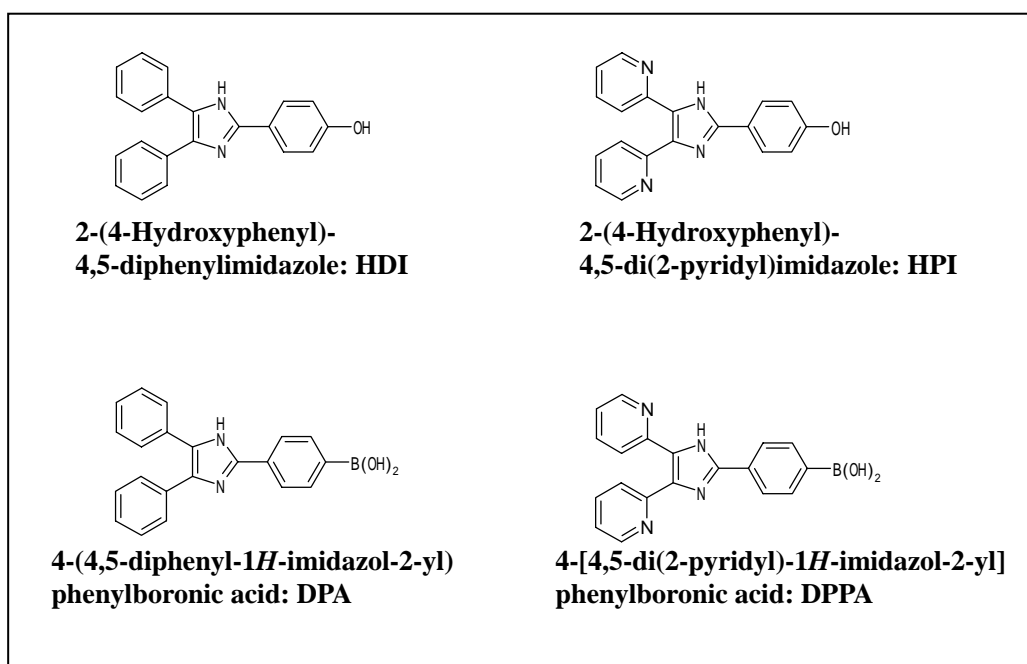
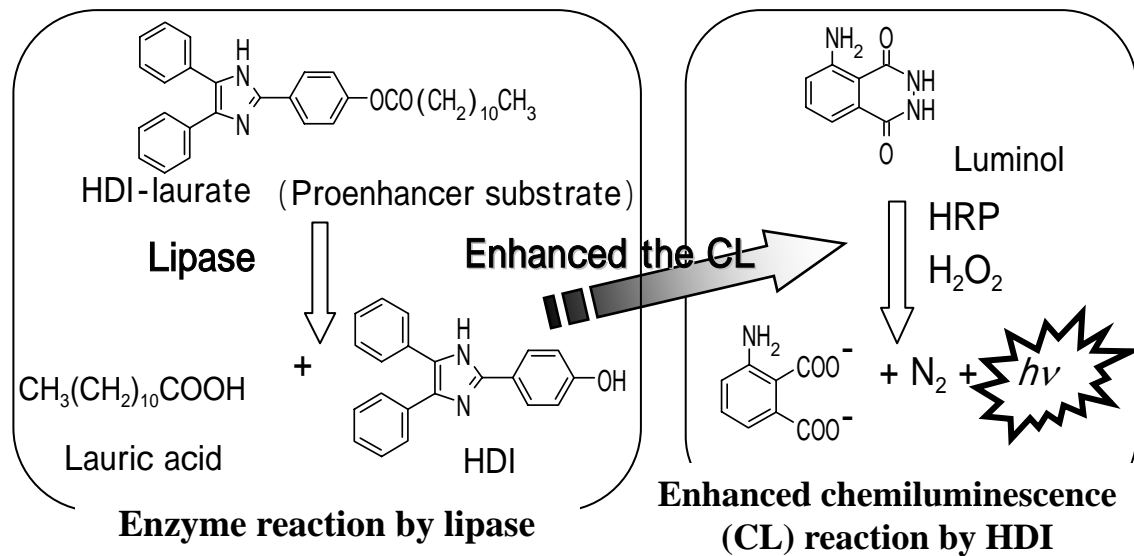


Fig. 1: Structures of the chemiluminescence (CL) enhancers

[結果・考察]

(第 1 章) プロエンハンサー型化学発光基質を用いるリパーゼ活性測定法の開発

増強剤として汎用されている *p*-ヨードフェノール(*p*-IP)と比較して、強い増強効果を有する HDI を用いてプロエンハンサー型基質の開発を行い、その性能を評価した。対象酵素としてリパーゼ(E.C. 3.1.1.3)を選択し、これに対応する基質として HDI のラウリン酸エステル(HDI-laurate)を調製した。HDI による化学発光増強効果はフェノール性水酸基部分を必要とするため HDI-laurate はルミノール - H₂O₂ - HRP 化学発光の増強作用を示さないが、リパーゼにより遊離した HDI は発光を増強し、この増加量はリパーゼ活性に比例することが期待された。そこで、リパーゼによる HDI-laurate の加水分解反応と HDI によるルミノールの増強化学発光反応を同時に行う、簡便で、迅速な分析法を考案し(Scheme 1)、分析条件の最適化を行ったところ、良好にリパーゼ活性を測定することができた。次に本法を市販の製剤中に含まれるリパーゼ活性の測定へと応用したところ、そのリパーゼ活性値は局法収載の滴定法で得られた値と良好な相関性を示した($r>0.919$)。滴定法では基質とリパーゼの酵素反応に 20 分間の反応時間を必要とするのに対し、本法ではインキュベーションを必要とせず、わずか 5 分で再現よく測定を行うことができた。

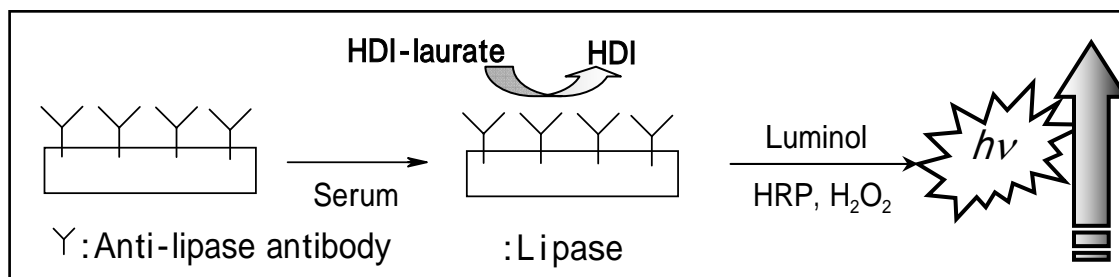


Scheme 1: Reaction scheme for the chemiluminescence (CL) assay of lipase

(第 2 章) イムノキャプチャー法とプロエンハンサー型化学発光基質を用いる血清中リパーゼ活性測定法の検討

HDI-laurate を用いて、膵疾患のバイオマーカーであるヒト血清中リパーゼ活性測定法の開発を試みた。ルミノール - H₂O₂ - HRP 化学発光は血清中の共存成分によりその発光が著しく阻害されたため、この影響を排除する目的で、血清中のリパーゼを抗体により捕捉

して、その活性測定を行うイムノキャプチャー化学発光分析法を開発した (Scheme 2)。この方法により、血清中の発光阻害物質の影響を受けることなくリパーゼ活性を化学発光定量することが可能となった。実際にヒト血清中腓リパーゼ測定へと本法を応用したところ (5 検体)、既存法である比色法と良好な相関性が得られ ($r=0.871$)、イムノキャプチャー化学発光法がヒト腓リパーゼへも応用可能であることが示唆された。



Scheme 2: Reaction scheme of the immunocapture-CL method

(第 3 章) ルミノール誘導体 L-012 を用いる HRP 及び H_2O_2 の高感度増強化学発光定量法の開発に関する検討

従来のルミノールを用いる増強化学発光よりもさらに高感度に HRP 及び H_2O_2 を検出するための分析法の開発を試みた。発光試薬として、HRP 及び H_2O_2 存在下、ルミノールと比較して約 10 倍高い発光強度を与えることが知られている L-012 を選択した。L-012 と 4 種類の増強剤 (HDI, HPI, DPA 及び DPPA) を用い、HRP 及び H_2O_2 の高感度検出に最適な増強剤及び反応条件を探索した。その結果増強剤として HPI を用いることで、従来報告されているルミノールを用いる方法よりも、約 40 倍高感度に H_2O_2 定量することができる方法を確立できた。

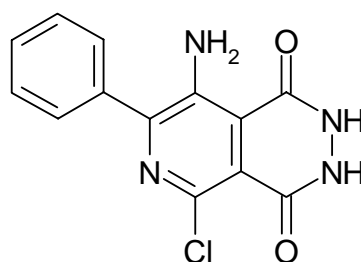


Fig. 2: Structure of 8-amino-5-chloro-7-phenylpyrid[3,4-d] pyridazine-1,4-(2H, 3H) dion (L-012).

以上、ルミノール増強化学発光反応を利用する分析試薬及びシステムを開発することができた。これらの試薬及びシステムは各種酵素活性や HRP 標識体の検出に有用であり、今後臨床化学分析への応用が期待できる。