

〈高速化・微量化への挑戦〉 ③

## NADH および酵素活性の化学発光分析法

辻 章夫\* 前田 昌子\*

バイオメディカルの領域では、ますます高感度な分析法の開発が要求されている。化学・生物発光に基づく分析法は吸光度法や蛍光法より高感度で、次世代の分析法として注目され、開発研究が進展している。本稿では、NAD(P)Hの化学発光分析法、その応用の胆汁酸、グルコースの化学発光分析法およびグルコースオキシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼなどの酵素活性の化学発光測定法を紹介する。

キーワード：化学発光 化学発光分析法 NADH 酵素 酵素活性

## はじめに

バイオメディカル領域において、最近、化学・生物発光反応に基づく分析法が、吸光度法や蛍光法より高感度であることから次世代の分析法として注目されている<sup>1)</sup>。化学・生物発光に基づく分析法は、① きわめて高感度で、 $\text{H}_2\text{O}_2$ は $10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 、ATPは $10^{-13} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 、NADHは $10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ を検出でき、② 定量範囲が幅広く、 $10^3 \sim 10^4$ オーダーの領域で直線性があり、また③ 反応の応答がきわめて速く、④ 選択性、特異性に優れている、などの特徴を有している。さらに、その検出器には光源と分光部を必要とせず、セル室と受光部のみでよいから構造が簡単で安価である。

本稿では、われわれの研究室で最近開発した補酵素 NAD(P)H の化学発光分析法<sup>2)</sup>と化学発光イムノアッセイ<sup>3)</sup>について述べることにする。

1. NAD(P)H の化学発光分析法<sup>3)</sup>

種々の脱水素酵素の補酵素である NADH、NADPH は、主として UV 法(340 nm)、蛍光法

(Ex 340 nm, Em 460 nm)で測定されている。バクテリアルシフェラーゼを用いる生物発光法はきわめて高感度であるが、ルシフェラーゼが不安定であり、かつ高価であるためルーチン分析法としては利用しがたい。

さきにわれわれの研究室では、胆汁酸の HPLC の検出に  $3\alpha$ -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼを固定化した酵素リアクターを用い  $\text{NAD}^+ \rightarrow \text{NADH}$  とし、ついで、フェナジニウムメチルサルフェート(PMS)を反応させ生成する還元型の PMSH を、ボルタメトリー電気化学検出器によりボルタメトリー検出する方法を開発した<sup>4)</sup>。

さらに PMSH が溶存酸素分子と反応しスーパーオキシドアニオン( $\text{O}_2^-$ )および HO を生成することに着目して、ルミノール発光により化学検出する方法を検討した。図1にこの化学反応系を示す。ルミノール発光には、イソルミノール/マイクロペルオキシダーゼを用い、種々の分析条件を検討して図2に示す測定法を確立した。

UV 法、蛍光法およびバクテリアルシフェラーゼによる生物発光と、本法による NADH の検量線の比較を図3に示す。本法の検出感度は、NADH、NADPH とともに  $10^{-11} \text{ mol}$  であり、生物発光法の

\* Tsuji A., Maeda M. 昭和大学薬学部薬品分析化学

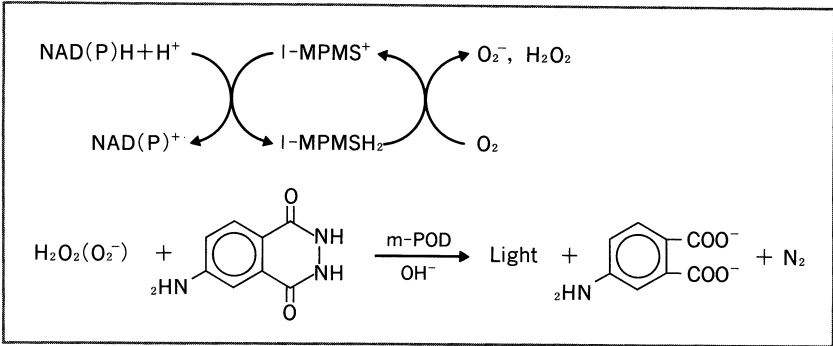


図 1 NAD(P)H の化学発光反応

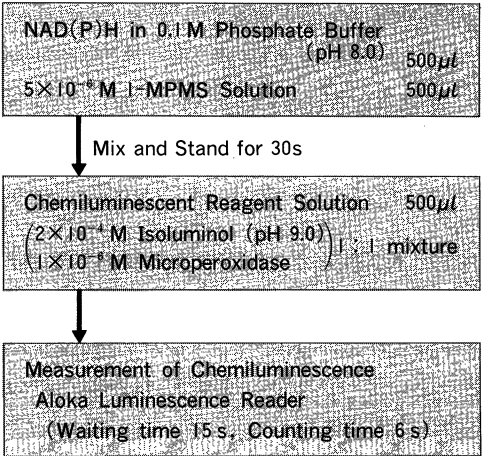


図 2 NAD(P)H の化学発光測定法

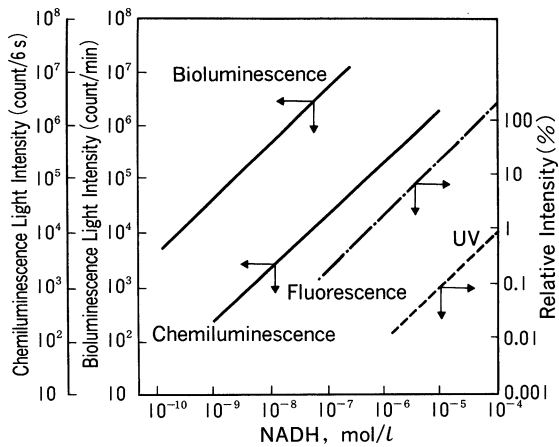


図 3 種々の方法による NADH の検量線

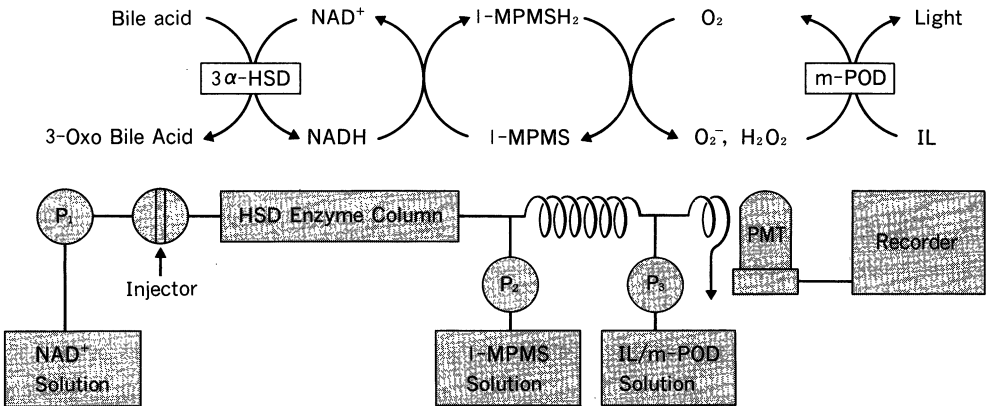


図 4 3α-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼを酵素リアクターとして用いる胆汁酸の化学発光フローインジェクション分析法の原理とフローダイアグラム

10<sup>-14</sup> mol よりは劣るが、UV 法、蛍光法よりは高感度である。

さらに、われわれは本化学発光法に基づく 3α-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ(3α-HSD)

を固定化酵素リアクターとする胆汁酸の測定システムを開発した<sup>5)</sup>。図 4 にフローインジェクション分析法の原理とシステムを示す。血清中の総胆汁酸について市販キットによる方法との相関は、Y

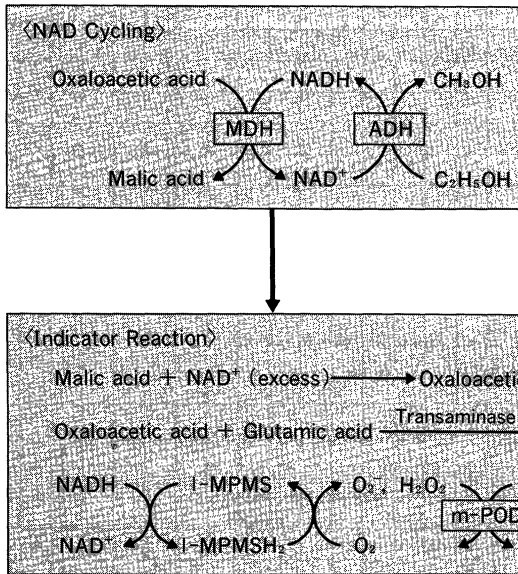


図5 酵素サイクリング法を用いた NADH の化学発光測定法  
MDH：リンゴ酸デヒドロゲナーゼ  
ADH：アルコールデヒドロゲナーゼ  
Transaminase：グルタミン酸-オキサロ酢酸トランスアミナーゼ  
1-MPMS：1-メトキシ-5-メチルフェナジウムメチルサルフェート，1-MPMSH<sub>2</sub>：同上還元型  
m-POD：マイクロペルオキシダーゼ

表1 NADH の各種測定法の検出感度

Method	Detection Limit (mol/assay)
Spectrophotometry	10 <sup>-9</sup>
Fluorophotometry	10 <sup>-10</sup>
Chemiluminescence	10 <sup>-11</sup>
Bioluminescence	10 <sup>-14</sup>
Enzyme cycling- Chemiluminescence	3×10 <sup>-14</sup>

(化学発光法) = 1.00 × (比色法) + 3.05, 相関係数  $r = 0.96$  ( $n = 83$ ) であった。同様に、グルコースデヒドロゲナーゼを酵素リアクターとするグルコースのフローインジェクション分析法を開発した<sup>5)</sup>。電極法との相関は  $Y$  (化学発光法) = 1.01 × (電極法) + 2.66, 相関係数  $r = 0.986$  ( $n = 45$ ) であった。

本法を利用し、その他の NAD を補酵素とするデヒドロゲナーゼ系とを組み合わせることにより、多くの生体成分の化学発光分析法の開発が検討されている。

さらに、NADH の化学発光法を高感度化するために、酵素サイクリング法を組み合わせた測定システムが検討された。図5に示すように、アルコールデヒドロゲナーゼとリンゴ酸デヒドロゲナーゼを用いる NADH の酵素サイクリングにより増幅する方法である<sup>6)</sup>。NADH の検出感度は  $3 \times 10^{-14}$  mol となり、約 300 倍感度を向上させることがで

きた。

表1に NADH の各種測定法の検出感度を示す。吸光度法、蛍光法、生物発光法は文献値である。本化学発光法は、酵素サイクリング法と組み合わせることにより、生物発光法とほぼ同じレベルとすることができた。

## 2. 酵素活性の化学発光測定法と化学発光イムノアッセイ<sup>3)</sup>

化学発光反応に基づく分析法は高感度であるが、特異性に劣る欠点がある。そこで特異性の高い免疫測定法(イムノアッセイ)と組み合わせた化学発光イムノアッセイが開発されてきた。われわれが研究を開始した頃(1972年)から英国、ドイツ、イスラエル、米国などの研究グループにより研究開発が行われてきた。それらは次の4種に大別される。

1) 標識化合物としてルミノールやイソルミノール、アクリジニウムエステル誘導体などの化学発光性物質(図6)を標識する方法。

2) 酵素を標識した酵素イムノアッセイ(EIA)で、その酵素活性を化学発光法で測定する方法。

3) 酵素イムノアッセイで標識酵素の活性を生物発光法で測定する方法。

4) 補酵素である NAD や ATP 誘導体を標識し、抗原-抗体反応が起こると、その補酵素活性が

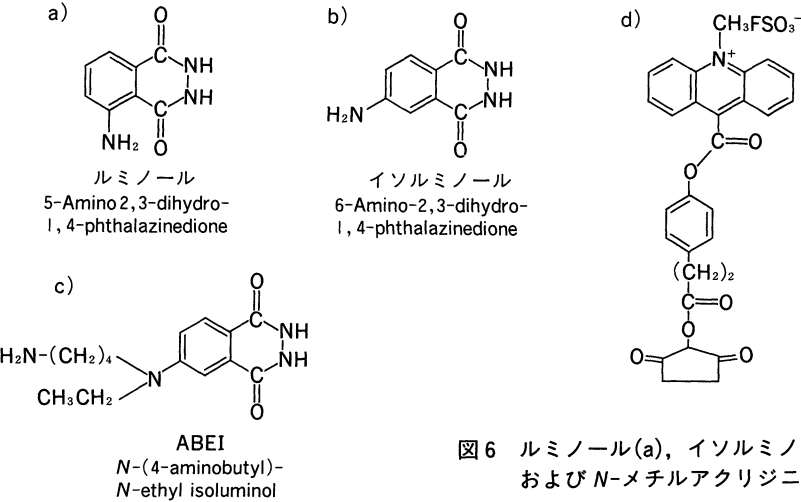


図6 ルミノール(a), イソルミノール(b), イソルミノール誘導体(c) および N-メチルアクリジニウムエステル誘導体(d)

表2 化学発光検出による酵素活性の測定法

酵 素	化学発光反応	対象物質
ペルオキシダーゼ (POD)		コルチゾール, デヒドロエピアン ドロステロン他
グルコースオキシダーゼ (GOD)		サイロキシン, 17α-ヒドロキシ プロゲステロン 他
インベルターゼ (INV)		サイロキシン, 17α-ヒドロキシ プロゲステロン
β-D-ガラクトシダーゼ (β-Gal)	<p>①</p> <p>②</p> <p>③</p>	フェニトインなど 薬物; TSH他
グルコース-6-リン酸 デヒドロゲナーゼ (G6PDH)		サイロキシン 他
		17-α-ヒドロキシ プロゲステロン

不活性となる現象を用いたホモジニアス(均一系)なイムノアッセイで、その活性測定に生物発光反応を用いる方法。

われわれの研究室では、主に2)の化学発光酵素イムノアッセイの開発を目的として、化学発光法による酵素測定法を開発した。これを表2にまとめて示す。

ペルオキシダーゼ(POD)は、ルミノール- $H_2O_2$ による化学発光反応により測定されるので、これを利用してコルチゾール<sup>7)</sup>、デヒドロエピアンドロステロン<sup>8)</sup>などのEIAを開発した。最近、英国のKrickaら<sup>9)</sup>は、ペルオキシダーゼ-ルミノール- $H_2O_2$ の発光反応に対するエンハンサーを検討し、 $D$ -ルシフェリン、6-ヒドロキシベンゾチアゾール類、パラハロゲンフェノール類などが有効であることを見出した。特にパラヨードフェノールは、PODのルミノール発光を5000倍に増強した。

Krickaら<sup>9)</sup>は、PODを標識酵素とするEIAに本反応を適用し、きわめて高感度な化学発光EIAを開発した。特に甲状腺刺激ホルモン(TSH)のEIAは、RIAの100倍以上高感度であり、RIAでは測定できなかった正常値以下の低TSH(バセドウ病など)の病態解明が可能となった。ヨーロッパでは本法によるEIAの種々のキットが実用化され、臨床診断に用いられている。

グルコースオキシダーゼ(GOD)については、グルコースを基質とし、生成する $H_2O_2$ をビス(2,4,6-トリクロロフェニル)オキザレート(TCPO)-蛍光色素(8-アニリノナフタレン-1-スルホン酸; ANS)により化学発光検出する方法を確立した。本法によるGODの検出感度はGOD活性として $10 \mu U/ml$ 、GOD量として $1.6 \times 10^{-15} \text{ mol/assay}$ の高感度である。本法を用いサイロキシシン( $T_4$ )<sup>10)</sup>および $17\alpha$ -ヒドロキシプロゲステロン( $17 \text{ OHP}$ )<sup>11)</sup>の化学発光EIAを開発した。検出感度は $T_4$ は $0.5 \text{ pg}$ ( $6.5 \times 10^{-15} \text{ mol}$ )、 $17 \text{ OHP}$ は $0.5 \text{ pg}$ ( $1.5 \times 10^{-15} \text{ mol}$ )である。これによって、 $T_4$ や $17 \text{ OHP}$ の測定は新生児の先天性代謝異常症のスクリーニングの濾紙血1デスク(3 mm 径、全血として $3.6 \mu l$ )の分析が可能である。

表3 種々の検出法での $\beta$ -D-ガラクトシダーゼの感度の比較

検 出 方 法	検出限界
比色法( $o$ -NPGal, 410 nm)	$5 \times 10^{-10} \text{ mol}$
蛍光法(4-メチルウンベリフェリルガラクトシド)	$2 \times 10^{-14} \text{ mol}$
化学発光法	
(ラクトース/IL/m-POD)	$5 \times 10^{-15} \text{ mol}$
(ラクトース/TCPO/ANS)	$2 \times 10^{-16} \text{ mol}$
( $o$ -NPGal/GalDH/IL/m-POD)	$1 \times 10^{-20} \text{ mol}$
生物発光法 <sup>15)</sup>	
( $o$ -NPGal/GalDH/バクテリアルシフェラーゼ)	$2 \times 10^{-22} \text{ mol}$

グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ(G6PDH)の化学発光測定法は、グルコース-6-リン酸とNADを基質とし、生成するNADHをさきに述べたNADHの化学発光分析法で測定する方法である。検出感度は $1 \times 10^{-18} \text{ mol}$ であった。著者らはG6PDHを標識酵素とする $17 \text{ OHP}$ のEIAを確立したが、その検出感度は $0.1 \text{ pg/チューブ}$ で、さきのGODを用いる方法より高感度であった<sup>12)</sup>。

$\beta$ -D-ガラクトシダーゼ( $\beta$ -Gal)の化学発光測定法は、①ラクトースを基質として生成するグルコースを基質としてGODにより $H_2O_2$ を産生させ、TCPO-ANS法で測定する方法、②同様に、 $H_2O_2$ をイソルミノール-マイクロペルオキシダーゼ系の化学発光で測定する方法<sup>13)</sup>、および③ $o$ -ニトロフェニル- $\beta$ -D-ガラクトシドを基質とし、生成するガラクトースをNAD-ガラクトースデヒドロゲナーゼ(GalDH)によりNADHを生成させ、前述のNADHの化学発光反応で検出する方法<sup>14)</sup>が開発された。これらの方法と $\beta$ -Galのその他の検出法との比較を表3に示す。石川ら<sup>15)</sup>のバクテリアルシフェラーゼを用いた生物発光法には及ばないが、前述のGODやG6PDHよりさらに高感度で、 $1 \times 10^{-20} \text{ mol}$ の検出感度である。本法を用いたEIAの開発が行われている。

われわれはアルカリホスファターゼ活性の化学発光測定法を確立した<sup>16)</sup>。NADPを基質とし、生成するNADをエタノール-アルコールデヒドロゲ

ナーゼ(ADH)により NADH とし, 前述の NADH の化学発光法で測定する方法である. 検出感度は  $1.3 \times 10^{-18}$  mol である. NADH-NAD の酵素サイクリング系を組み合わせることにより, さらに高感度化することができる.

### ま と め

生体成分の分析法はますます高感度化, 微量化

が要求されている. われわれの研究室で開発した NADH, NADPH の化学発光分析法は, 種々の NAD, NADP を補酵素とする酵素活性の測定や, 関与する生体成分の分析に活用できるであろう. また, GOD, G6PDH,  $\beta$ -Gal, アルカリホスファターゼなどの化学発光測定法により, RIA より高感度の化学発光 EIA を開発することができた.

### 文 献

- 1) Van Dyke K(ed) : Bioluminescence and chemiluminescence, Vol I, II, CRC press, 1985 ; Kricka LJ(ed) : Ligand-binder assays, Marcell Dekker, 1985 ; 前田昌子, 辻 章夫 : ホルモンと臨床 **35** : 677, 1987.
- 2) 田部一弘, 河崎孝男, 前田昌子, 辻 章夫 : 1-メトキシフェナジンサルフェートによる NAD(P)H の化学発光分析法とその応用, 分析化学 **36** : 82, 1987.
- 3) 前田昌子 : 薬物動態 **1** : 191, 1986.
- 4) Kamada S, et al : Separation and determination of bile acids by HPLC using immobilized 3 $\alpha$ -HSD and ECD, J Chromatogr **239** : 773, 1982.
- 5) Maeda M, Tanabe K, Kawasaki T, Tsuji A : Flow injection analysis using chemiluminescence reaction of NADH ; Determination of bile acids and glucose in serum, Ann Clin Biochem **24** : 123, 1987.
- 6) 石沢春生, 前田昌子, 辻 章夫 : 未発表, in preparation.
- 7) Arakawa H, Maeda M, Tsuji A : Chemiluminescence EIA of cortisol using peroxidase as label, Anal Biochem **97** : 248, 1979.
- 8) Arakawa H, Maeda M, Tsuji A : Chemiluminescence EIA of DHEA and DHEA-S using peroxidase as label, Steroids **38** : 453, 1981.
- 9) Thorpe GHG, Kricka LJ : Enhanced chemiluminescence reactions catalyzed by HRP, Methods Enzymol **133** : 331, 1986.
- 10) Arakawa H, Maeda M, Tsuji A : Chemiluminescence EIA for T<sub>4</sub> with use of GOD and TCPO-ANS system, Clin Chem **31** : 430, 1985.
- 11) Arakawa H, Maeda M, Tsuji A : Chemiluminescence EIA of 17-OHP using GOD and TCPO-dye system, Chem Pharm Bull **30** : 3036, 1982.
- 12) Tsuji A, Maeda M, Sudo Y, et al : Chemiluminescence enzyme immunoassay using invertase, G6PDH and  $\beta$ -D-galactosidase as label, Bioluminescence and chemiluminescence ; New perspectives, p. 233, J Wiley, 1987.
- 13) 辻 章夫ほか : 未発表, in preparation.
- 14) 辻 章夫ほか : 未発表, in preparation.
- 15) Isikawa E, et al : Anal Lett **19** : 433, 1986.
- 16) 辻 章夫ほか : 日本薬学会第 107 年会要旨集, p. 420, 1987.