

DNA ハイブリダイゼーション免疫アッセイ によるインスリンの高感度分析

川 口 成 治
石 黒 敬 彦

A Highly Sensitive DNA Hybridization Immunoassay for Insulin

Seiji KAWAGUCHI
Takahiko ISHIGURO

A highly sensitive sandwich enzyme immunoassay for insulin in human serum has been developed, using a solid phase antibody in which the DNA oligomer (dA)-labeled anti-insulin Fab' was immobilized through the DNA hybridization onto the DNA oligomer (dT) on the gel support. After the antigen-antibody reaction in the presence of 0.5 M NaCl, the solid phase was washed and the sandwiches formed on it were cleaved by dissociating the double-stranded DNA in the absence of NaCl. By this procedure, the noise signals arising from the antibody-enzyme conjugates nonspecifically adsorbed on the solid phase decreased significantly. Total assay time was 15 min and the sensitivity was 5 pg/ml (*ca.* 0.1 μ IU/ml) when 25 μ l of a standard sample was used. The coefficient of within-assay variation was 8.4% when normal fasting serum (mean=42.6 pg/ml, n=10) was measured.

1. 緒 言

1970年代に開発された酵素免疫測定法 (EIA)¹⁾ は、従来の放射免疫測定法 (RIA)²⁾ のもつ使用設備、試薬期限、使用後の廃棄処理などの問題点を解決した高感度測定法として現在広く使用されている。その中でも特に高感度な EIA 法として広く用いられている、いわゆるサンドイッチ法では、抗体を固相に結合させ、これに抗原を捕捉、さらに酵素標識抗体を反応させて免疫複合体(固相抗体-抗原-酵素標識抗体)を形成させ、この結合酵素の活性から抗原量を求めている³⁾。

原理的には、抗原抗体反応の特異性と高感度検出が可能な標識物質を利用することにより、高感度な分析が期待できる。しかしながら、現実的には反応系に過剰に加える酵素標識抗体が非特異的に固相の表面に吸着し、その結果、測定バックグラウンドが上昇し、また再現性も

低下するため十分な高感度化が達成されないという問題点があった。

固相への非特異吸着成分による問題点を解決するために、次の2つの方法が検討された。1つは固相への非特異吸着量そのものを少なくする方法、他の1つは固相への非特異吸着成分を残した状態で免疫複合体のみを固相から切り出して測定する方法であった。前者では非特異結合の低い酵素標識抗体、すなわち IgG を Fab' にしてから酵素をモノマー標識したものを用い、特異結合の非特異結合に対する比を大きくすることによって高感度化を達成した例が報告されている^{4),5)}。後者では、例えばジニトロフェニル基を有する化合物 (DNP) とビオチンを標識した第1抗体、抗原および酵素標識抗体の複合体を固相抗 DNP 抗体を用いて一旦トラップし、そのあと過剰の DNP で溶出させ、次に固相アビジンにトラップさせて測定する方法⁶⁾、核酸を介して固定化した第1

抗体を用い、形成された抗原および酵素標識第2抗体との免疫複合体をその核酸部分を制限酵素で切断することによって固相から乖離させる方法⁷⁾等が報告されている。しかし、いずれの方法も測定に長時間を要し、材料調製が煩雑でランニングコストも高いなど実用面において改善の余地があった。

そこでわれわれは、容易に合成が可能な DNA オリゴマーを固相からの乖離用ツールとして用い、塩濃度を調節することによって免疫複合体の乖離を迅速かつ特異的に行う方法を開発し、さらにインスリンのイムノアッセイに適用して良好な結果を得たので報告する⁸⁾。

2. 原 理

Fig. 1 に測定原理を示した。固相に1本鎖 DNA を固定化し、その1本鎖 DNA と相補性を示す、他の1本鎖 DNA を標識した第1抗体を、NaCl 存在下においてハイブリダイズさせることによって固相に固定化する。

測定試料および酵素標識第2抗体を加え NaCl 存在下において抗原抗体反応を行った後、ゲルを洗浄し、NaCl を含まない緩衝液を用いて DNA を1本鎖に解離させ、サンドイッチを固相から特異的に乖離して測定する。

上記乖離方法によると固相サンドイッチイムノアッセ

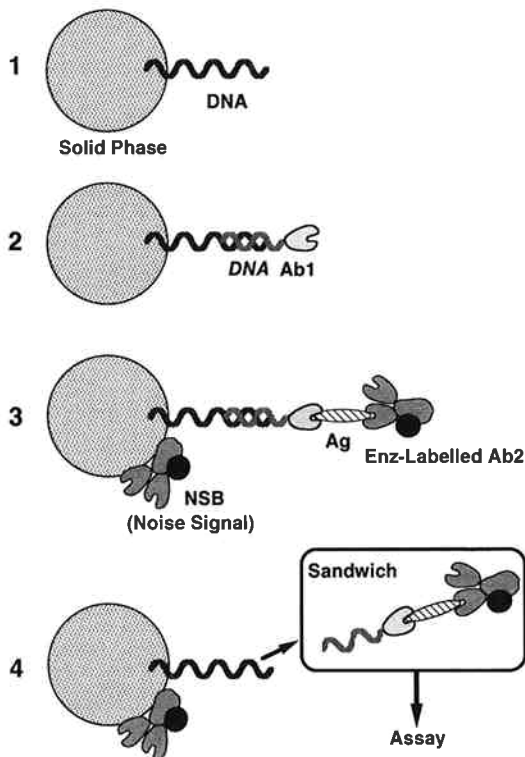


Fig. 1 Principle of the DNA hybridization immunoassay.

イにおいてバックグラウンドを上げる要因となる固相に非特異的に吸着した標識第2抗体 (NSB) を固相に残した状態で、サンドイッチのみを特異的に効率よく乖離させることが可能となる。その結果、測定のバックグラウンドが低減され、特に低濃度における再現性の向上にもとづいて高感度化を達成することが可能となる。

合成オリゴヌクレオチドの Tm 値 (2本鎖 DNA の50%が解離している温度) は次式のごとくイオン強度に依存する⁹⁾。

$$T_m = 81.5 + 16.6 \log_{10} M + 0.41 (\%GC)$$

$$- 500/n - 0.61 (\%FA)$$

M : イオン強度、GC : GC 含量

n : 鎖長、FA : 変性剤

通常オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションは中性近辺、高塩濃度かつ Tm 値から 5°C 低い温度において行うのがよいとされている。

3. 材料 および 調製法

材料の調製法は Fig. 2 に示した。

(1) 材 料

抗ヒトインスリンモノクローナル第1抗体 (INK) およびアルカリフォスファターゼ標識抗ヒトインスリンモノクローナル第2抗体 (ALP-IND) は東ソー製のものを使用した。インスリン標準物質には CALBIOCHEM 社のヒトインスリン (Zn、リコンビナント) を用いた。固相には高速液体クロマトグラフィー用非多孔性充填剤トレスル-NPR (2.5 μm、東ソー)、固相のブロック剤には牛血清アルブミン、Fraction V (BSA、シグマ) を用いた。5'末端アミノ化オリゴヌクレオチドはβ-シアノエチルフォスフォアミダイト法自動合成装置

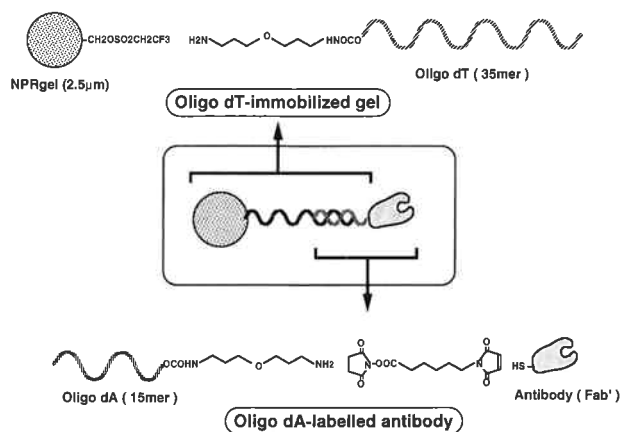


Fig. 2 Preparation for the antibody-immobilized gel.

(ABI380B、ABI) により調製した。

5'末端アミノ化用試薬には、ビス(3-アミノプロピル)エーテル(東京化成)、5'末端アミノ化オリゴヌクレオチドと第1抗体との架橋剤にはN-(ε-マレイミドカプロリロキシ)サクシイミド(EMCS、同仁化学)、チオール基のプロッキング剤としてはN-エチルマレイミド(東京化成)を用いた。アルカリフォスファターゼ活性測定用基質緩衝液には、Eテスト「TOSOH」II基質セット(東ソー)を用いた。EMCS化オリゴdA(15mer)およびオリゴdA(15mer)標識INKの精製には高速液体クロマトグラフィー用カラム、TSKgel ODS-120T(5μm、φ4.6mm×25cm、東ソー)とTSKgel G2000 SW_{XL}(5μm、φ7.8mm×30cm、東ソー)を用いた。またオリゴdA(15mer)標識INKの定量にはTSKgel SP-NPR(2.5μm、φ4.6mm×3.5cm、東ソー)を用いた。

(2) オリゴdT(35mer)固定化ゲルの調製¹⁰⁾

5'末端アミノ化オリゴdT(35mer)600μgを1Mリン酸緩衝液、pH9.0、6mlに溶解したものにトレンシル-NPR1gを添加し、攪拌しながら室温にて2時間反応させた。固定化量は反応前後の上清中オリゴdA量をTSKgel ODS-120Tを用いたHPLCにて定量し、値を差し引くことにより求めた。遠心分離後、上清を除去し、0.5Mトリス塩酸緩衝液、pH8.5にて残存トレンシル基をプロッキングした。遠心分離後、上清を除去し、1%BSA添加10mMリン酸緩衝液、pH7.0にてゲル表面をプロッキングし、保存した。

(3) オリゴdA(15mer)標識INKの調製

5'末端アミノ化オリゴdA(15mer)600μgを90μl0.1Mリン酸緩衝液、pH7.0に溶解し、これに12mgEMCS¹¹⁾を100μlジメチルホルムアミドに溶解したものを10μl添加し30°C、1時間反応させた。反応液をTSKgel ODS-120TにかけてEMCS化オリゴdA(15mer)を精製し、濃縮した。INKは常法に従ってFab'に調製した¹²⁾。精製したEMCS化オリゴdA(15mer)300μgに0.1Mリン酸緩衝液、5mMEDTA、pH6.0に溶解した450μgの抗体(Fab')を加えて30°C、1時間反応させた。50mMN-エチルマレイミド10μl加えて抗体の残存SH基をプロッキングした後、TSKgel G2000SW_{XL}にて精製し、オリゴdA(15mer)標識INKを得た。抗体1分子に対するdAの導入量は、得られた標識体の260nm、280nmにおける吸光度を測定し、核酸、抗体のモル吸光係数から濃度換算することにより求めた。

(4) 抗体固定化ゲルの調製

オリゴdT(35mer)固定化ゲルを10mMリン酸緩衝液、1MNaCl、0.1%BSA、pH7.0で洗浄した後、1MNaCl存在下、オリゴdA(15mer)標識INKを添加してオリゴヌクレオチド部分をハイブリダイズさせることにより固定化した。次に10mMリン酸緩衝液、0.5MNaCl、0.1%BSA、0.05%Tween-20、pH7.0にてゲルを洗浄し、10mMリン酸緩衝液、0.5MNaCl、1%BSA、pH7.0中に保存した。

4. 結果 および 考察

(1) 抗体固定化ゲルにおけるオリゴヌクレオチド相補結合の塩濃度および温度依存性

オリゴdT(35mer)固定化ゲルにオリゴdA(15mer)標識INKを2MNaCl存在下にて相補結合させた後、25、37、48°Cのそれぞれの温度条件において0~1.5MNaClの範囲で10分間解離反応を行った。遠心分離後、上清中のオリゴdA(15mer)標識INKをTSKgel SP-NPRを用いたHPLCにて定量し解離量を求めた。25、37、48°Cの各温度条件において0.25、0.75、1.0M以上のNaCl存在下で相補結合が安定で、また48°C、NaCl非存在下ではほぼ100%解離することが認められた(Fig. 3)。また測定時間の短縮をめざして解離反応時間の検討を行った結果、48°Cに予備加温した解離液を添加して室温にて5秒間の攪拌操作を行うだけで約90%の解離が、さらに加温温度を53°Cにあげるによりほぼ100%の解離が認められた(Fig. 4)。オリゴヌクレオチドを相補結合させ再度1本鎖に解離させる場合、塩濃度を一定にして温度を上げる方法と温度を一定にして塩濃度を上げた条件から下げる方法がある。本法の場合、相補結合した状態で抗原抗体反応をさせ、その後免疫複合体成分を固相から乖離させる必要がある関係上、塩濃度および温度は抗原抗体反応が阻害されない、形成された免疫複合体が解離しない、かつ標識酵素が失活しない条件に設定する必要がある。従って、より緩和な条件で効率よくオリゴヌクレオチドの結合と解離が達成できるようこれら2つの因子を同時に調節する方法を検討した。

(2) 抗原抗体反応における塩濃度の影響

INK Fab'を固定化したマイクロプレートにALP-INDおよびインスリンを0.15~2.0MNaClの濃度下において添加し、室温にて1時間インキュベーションを行った。次に、基質(p-ニトロフェニルリン酸、PNPP)を加え37°Cにて30分間反応させた後、415nmにおける吸光度を測定した。0.15M~0.5MNaClの範

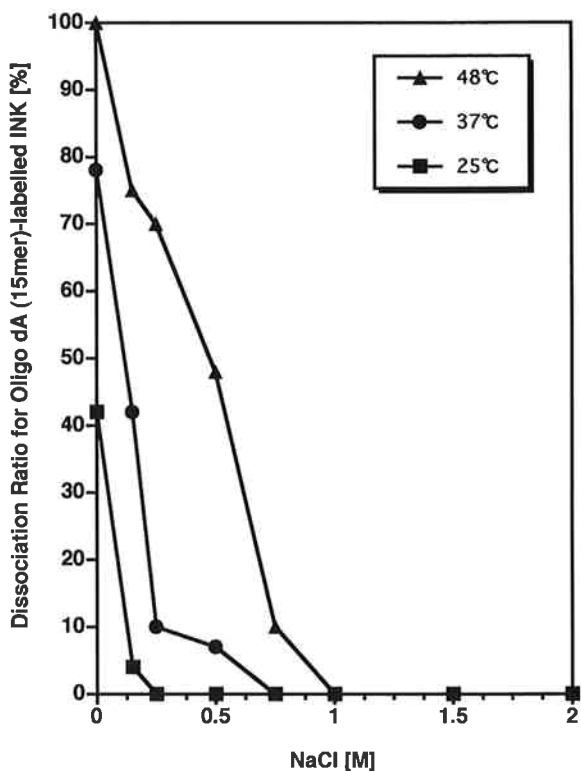


Fig. 3 Effect of NaCl concentration and temperature on the double-stranded DNA.

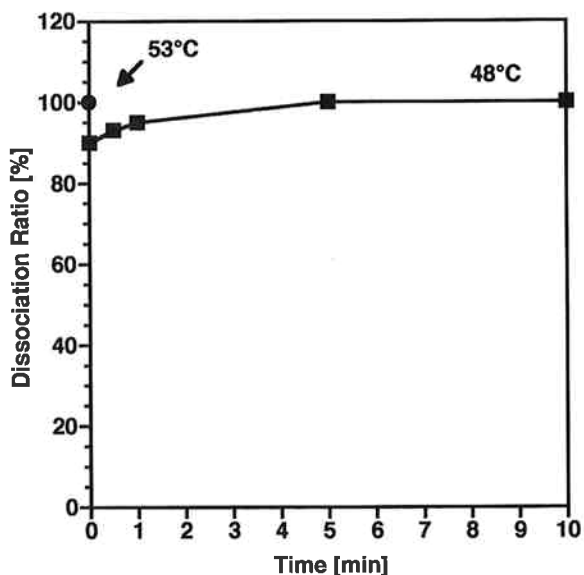


Fig. 4 Incubation time for DNA dissociation.

困では一定の免疫複合体形成量を示し、抗原抗体反応への影響が認められなかった (Fig. 5)。

以上の結果より、オリゴ dT (35 mer) 固定化ゲルに相補結合によって固定化されたオリゴ dA (15 mer) 標識抗インスリン抗体を用いる場合、抗原抗体反応の条件は、反応温度 25°C、NaCl 濃度 0.25~0.5 M と結論で

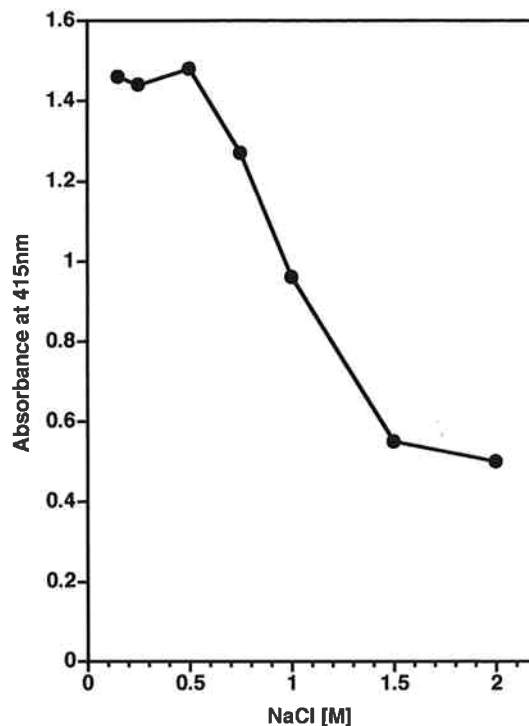


Fig. 5 Effect of NaCl concentration on antigen-antibody reaction.

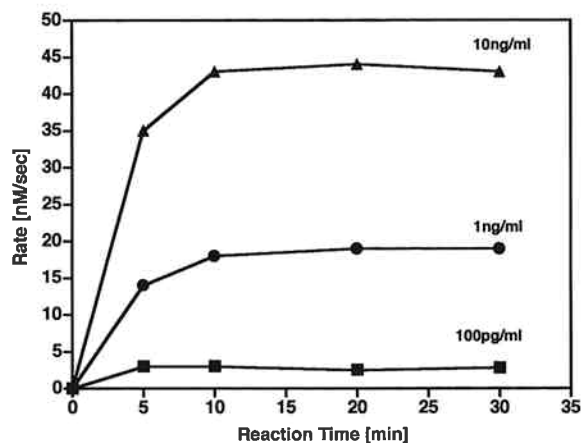


Fig. 6 Antigen-antibody reaction time for 1step sandwich assay.

きた。

(3) 抗原抗体反応時間

マイクロチューブに 460 ng のオリゴ dA (15 mer) 標識 INK を固定化した 5 μl のゲルを取り、インスリン標準液および ALP-IND を用いて 1step サンドイッチ法にて検討した結果、抗原抗体反応は約10分でほぼプラトーに達していることがわかった (Fig. 6)。固相サンドイッチ法において抗原抗体反応時間を短縮するためには液-液反応にできる限り近い条件にて行う必要がある。そのためには固相の粒径を小さくして有効抗体量を増や

せばよい。本法における固定化抗体はヒンジ法にて調製した核酸標識抗体を用いているため、物理吸着法により調製した固定化抗体に比べ抗原との結合部位は効率よく外に配向されて固定化されるため有効抗体量は増えていると予想できる。

〔4〕 測定方法

以上の実験結果にもとづき確立した測定方法を Fig. 7 に示した。5 μ l の抗体固定化ゲルをマイクロチューブに入れ、200 μ l の ALP-IND 溶液 (0.5 M NaCl を含む) を加え、室温下 5 秒間ボルテックスミキサーにて攪拌 (以下、攪拌はすべてこの方法に従う) した。次に NaCl の終濃度が 0.5 M となるよう希釈した試料 25 μ l を添加し、5 秒間攪拌した後、室温にて 10 分間静置して抗原抗体反応を行った。5 秒間攪拌した後、10,000 rpm にて 5 秒間遠心分離 (以下、遠心操作はすべてこの方法に従う) し上清を除去した後、ゲルを 1 ml 0.5 M NaCl、0.1% BSA、0.05% Tween-20 を含む 10 mM トリス塩酸緩衝液、pH 7.0 にて 4 回洗浄した。洗浄の終わったゲルに対し、250 μ l 0.02% BSA を含む 10 mM トリス塩酸緩衝液、pH 7.0 (53°C に予備加熱) を添加し、5 秒間攪拌して DNA 解離反応を行った後遠心分離した。回収した上清のうち 100 μ l に対し、100 μ l、2 mM 4-メチルウンベリフェリリン酸を含む基質緩衝液を加え、37°C で 100 秒間酵素反応させてその活性レートより測定値を求めた。1 検体当たりの測定

時間は約 15 分であった。

〔5〕 検量線

インスリン標準液を 0.5 M NaCl、0.1% BSA を含む 10 mM リン酸緩衝液、pH 7.0 にて希釈系列を作成し測定した結果、10 pg/ml から 5 ng/ml まで良好な直線性

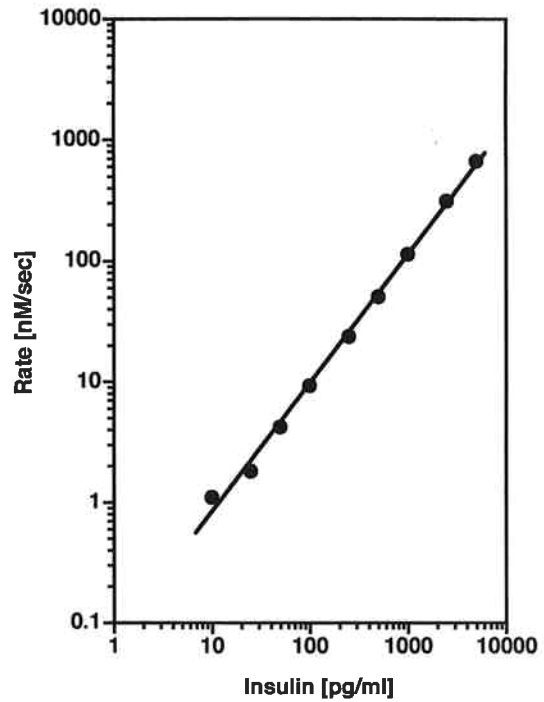


Fig. 8 Standard curve for insulin.

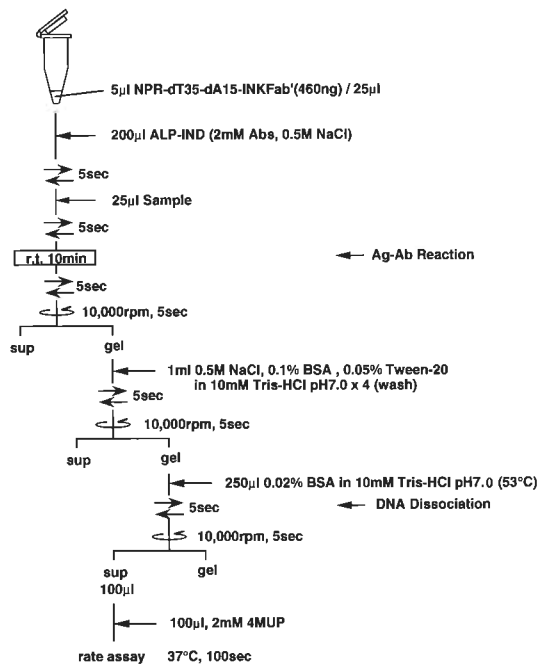


Fig. 7 Procedure for the DNA hybridization immunoassay.

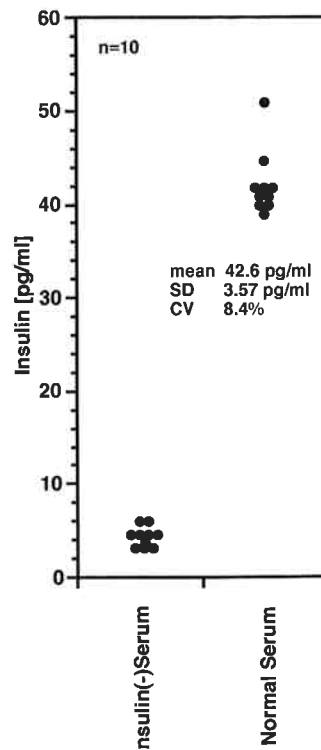


Fig. 9 Within-assay precision for serum insulin.

が確認できた (Fig. 8)。また 2SD 法による検出下限値を求めた結果、 $25 \mu\text{l}$ を測定試料に用いた場合、 5 pg/ml (約 $0.1 \mu\text{IU/ml}$)、絶対量に換算して 125 fg/assay (20 amol/assay) であった。

〔6〕 血清試料の測定

インスリン (一) 標準血清および健常人空腹時血清をそれぞれ10回測定した結果、両者には明らかに有意な差が認められ、健常人空腹時血清の同時再現性は平均値 42.6 pg/ml において変動係数 8.4% と良好であった (Fig. 9)。

5. 結 論

固相 1 本鎖 DNA オリゴマーおよびこれと相補性を示す他の 1 本鎖 DNA オリゴマーを標識した抗体を用いて固相から免疫複合体を乖離させて定量する迅速高感度測定法を開発した。酵素標識第 2 抗体による固相への非特異吸着成分由来のバックグラウンドは顕著に低減し、 20 amol のインスリンが15分で測定可能となった。今後、自動化システムへの適用、さらに化学発光法等の他の検出系との組み合わせによりさらなる高感度化が可能と思われる。特に、核酸固定化担体の使用方法において再利用と複数の測定項目間での共通化が容易であると考えられるため、固相抗体調製からイムノアッセイに至るまで全自動化を行う場合の有力な手段として期待できる。

6. 附 記

昭和63年度より7年間の計画で、厚生省の(株)医薬品副作用被害救済研究振興基金および当社を含む民間企業4社(中外製薬、浜松ホトニクス、クラレ、東ソー)の出資によって(株)バイオセンサー研究所を設立し、医用バイオセンサー機器、診断用医薬品に関わる技術の開発研究を実施してきた。本研究は(株)バイオセンサー研究所において行われたものであり、本成果については特許出願済

である(特願平5-274610)。

文 献

- 1) Engvall, E. and Perlmann, P., *Immunochemistry*, **8**, 871-874 (1971).
- 2) Berson, S. A. and Yallow, R. S., *Adv. Biol. Med. Phys.*, **6**, 350 (1958).
- 3) Miyai, K., Ishibashi, K. and Kawashima, M., *Clin. Chem.*, **27**, 1421-1423 (1981).
- 4) Imagawa, M., Yoshitake, S., Hamaguchi, Y., Ishikawa, E., Niitsu, Y., Urushizaki, I., Kanazawa, R., Tachibana, S., Kanazawa, N. and Ogawa, H., *J. Appl. Biochem.*, **4**, 41-57 (1982).
- 5) Ishikawa, E., Imagawa, M. and Hashida, S., *Develop. Immunol.*, **18**, 219-232 (1983).
- 6) Ishikawa, E., Hashida, S., Kohno, T. and Hirota, K., *Clinica Chimica Acta*, **194**, 51-72 (1990).
- 7) 今井一成、野村 靖、時永大三、安田健二、公開特許公報(A)、平4-204379, 547-553 (1992).
- 8) 川口成治、石黒敬彦、第114回日本薬学会講演要旨集、**4**, 131 (1994).
- 9) Schildkraut, C. and Lifson, S., *BIOPOLYMERS*, **3**, 195-208 (1965).
- 10) Mitoma, Y., Yamagishi, H., Ishiguro, T. and Hayashi, H., *J. TOSOH Res.*, **2**, 35, 141-147 (1991).
- 11) Kitagawa, T., Shimozono, T., Aikawa, T., Yoshida, T. and Nishimura, H., *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 1130-1135 (1981).
- 12) Ishikawa, E., Imagawa, M., Hashida, S., Yoshitake, S., Hamaguchi, Y. and Ueno, T., *J. Immunoassay*, **4**, 209-327 (1983).



著 者

氏名 川 口 成 治
Seiji KAWAGUCHI
入社 昭和61年11月1日
所属 科学計測事業部
技術部
主任研究員
獨バイオセンサー研究所出向中



著 者

氏名 石 黒 敬 彦
Takahiko ISHIGURO
入社 昭和58年4月1日
所属 科学計測事業部
技術部
主任研究員
獨バイオセンサー研究所出向中