

NADH オキシダーゼを用いた NAD⁺ 依存性酵素活性の 化学発光測定とそのイムノアッセイへの応用

岡本 雅司*, 前田 昌子, 辻 章夫**

(1994年1月6日受理)

S. mutans より単離された還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) オキシダーゼ (NOD) を用い, グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PDH) 及びアルカリ性ホスファターゼ (ALP) の酵素活性測定法を確立し, 免疫学的測定法へ応用した。G6PDH との共役測定系では, 1.0 μU/ml~0.5 mU/ml の範囲で測定が可能であり, 2SD 法による最小検出感度は 1.0×10^{-18} mol/assay であった。一方, ALP により産生される NAD⁺ をアルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) と NOD を用いた酵素サイクリング系に供した場合には, 20 fM~10 pM の範囲で測定が可能であり, 2SD 法による最小検出感度は 4.0×10^{-19} mol/assay であった。この ALP の測定系を用い, ヒト血清じゅう毛性ゴナドトロピン (hCG) の測定に応用したところ, 0.2~100 mIU/ml の範囲で測定が可能であり, 既存の時間分解蛍光 (TR-FIA) 測定系であるデルフィアキットとの相関も良好であった。

1 緒 言

生体成分の高感度な測定のため, 特異性の高い抗原-抗体反応を利用した免疫学的測定法が繁用されている。しかし, これら測定によく用いられている I-125 はアイソトープであり, 昨今の状況下, 制限の多いラジオイムノアッセイ (RIA) 系からの脱皮が求められている。著者らは, 今回新しく *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) より単離された還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) オキシダーゼ (NOD)^{1)~3)} を用い, 產生される H₂O₂ をイソルミノール (IL)/マイクロペルオキシダーゼ (mPOD) で発光させ測定する系について検討した。現在までに, NAD⁺-NADH の電子伝達系補酵素を用いた酵素サイクリング系による測定系が報告されている^{4)~9)}。しかし, これらの系では產生された NADH を 1-メトキシフェナジンメトサルフェートにより分子状酸素を H₂O₂ へと変換する過程が必要となる。この過程で NOD を利用することにより, 操作の簡便化及び変換の効率化が図られると考え検討した。NOD は NADH を基質とし NAD⁺ を產生するため,

NAD 依存性酵素 (デヒドロゲナーゼ) との共役反応を構築することにより, その酵素活性測定系を作成できる。更に酵素サイクリングの観点から, ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADP) を基質とするホスファターゼの測定系も考えられる。これらを免疫学的測定法へと展開させるため, 使用酵素は比活性の高いものがよく, この目的からイムノアッセイで繁用される酵素として, 前者にグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PDH), 後者にアルカリ性ホスファターゼ (ALP) を選択し, Fig. 1 に示す反応系を考えた。

NAD⁺ 依存性 G6PDH の測定原理は, 補酵素として加えた NAD⁺ から生成する NADH を NOD で H₂O₂ に変換し, 化学発光検出する。又, ALP 活性の測定は NADP⁺ を基質とし, 生成した NAD⁺ にアルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) を共役して NADH とし, それを NOD で H₂O₂ に導き化学発光検出する方法である。

2 実験

2・1 試 料

ヒト血清じゅう毛性ゴナドトロピン (hCG) 測定のための血清試料は, 昭和大学医学部付属病院中央検査部より時間分解蛍光 (TR-FIA) 法のデルフィアキットでの測定値付き試料を入手して測定した。

* 日本メジフィジックス(株)中央研究所: 669-13 兵庫県三田市テクノパーク 9-1

** 昭和大学薬学部薬品分析化学教室: 144 東京都品川区旗の台 1-5-8

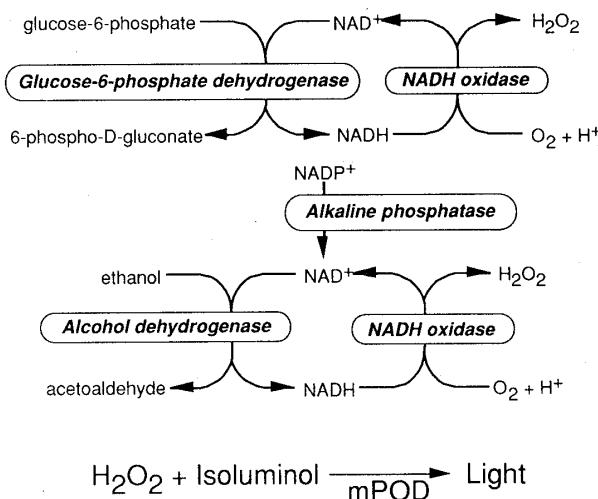


Fig. 1 The principle of determinations of activities for G6PDH and ALP

2・2 試薬及び装置

IL は東京化成工業製を入手し, mPOD, ADH (320 U/mg) はシグマ社より入手した。

NAD⁺, NADP⁺, NADH, NADPH, G6P, G6PDH (約 550~650 U/mg), ALP (>2500 U/mg) はベーリンガーマンハイム山之内より入手し, ビストリスは同仁化学研究所より入手した。hCG 標準血清は, アレグロ hCG キット (日本メジフィジックス) の標準溶液を使用し, 固相用 hCG 抗体及び ALP-hCG 抗体結合体は東ソーより供与を受けた。発光測定はダイナテック社製白 (011-010-7901) 及び黒 (011-010-7801) の蛍光測定用プレートを用い, コロナ電気製 MLR-100 にて測定した。その他の試薬は和光純薬より入手した。NOD に関しては, *S. mutans* 由来のものは日本ペイントより, *Bacillus licheniformis* (*B. licheniformis*) 由来のものはマルキン醤油より供与を受けた。又, NOD 及び ADH の希釈にはトリス-塩酸緩衝液 (20 mM, pH 7.2; 0.2 mM EDTA, 10% グリセロールを含む) を使用し, 所定の濃度に調製した。

2・3 MLR-100 発光測定条件

NADH, NADPH の測定及び G6PDH の測定では, 各反応の終了した白プレートを直ちに MLR-100 に挿入し, 付属のインジェクターで炭酸ナトリウム緩衝液 (0.8 M, pH 9.5) で希釈した IL 溶液 (0.2 mM) と mPOD 水溶液 (1 μM) を各々 50 μl 注加し, auto sensitivity, response 680, delay time 0 の条件で測定した。又, ALP の測定及びこの測定系を用いる hCG の測定では黒プレートを用い, 反応終了後常温で 15 分間放置

した後, 炭酸ナトリウム緩衝液 (0.8 M, pH 9.5) で希釈した IL 溶液 (0.4 mM) 及び mPOD 溶液 (2 μM) を各々 50 μl 注加し, auto sensitivity, response 233, delay time 3 秒で測定した。ここで指定される response (R) は MLR-100 における測光時間 (T 秒) のパラメーターであり, $(T) = 0.00779 \times (R) + 0.1842$ の式で与えられる。

2・4 NADH 及び NADPH の測定と H₂O₂ の標準曲線

トリス-塩酸緩衝液 (5 mM, pH 8.0) で希釈した NAD(P)H 溶液 5 μl に, NOD 溶液 (1.0 U/ml) 5 μl 及びグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液 (50 mM, pH 7.2) 40 μl を加え, 常温 30 分間反応させた。一方, H₂O₂ の標準曲線作成のため, 同様の組成で NAD(P)H の代わりに H₂O₂ を添加し, 酵素を加えずに 2・3 に示す手順で測定した。

2・5 G6PDH の測定

トリス-塩酸緩衝液 {5 mM, pH 8.0; 0.01% ウシ血清アルブミン (BSA) 含む} で希釈した G6PDH 標準溶液 10 μl に対し, NOD-基質溶液を 40 μl 加えた後常温 4 時間静置で反応させ, 2・3 に示す手順で測定した。NOD-基質溶液は, 測定直前にグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液 (5 mM, pH 8.0), トリス-塩酸緩衝液 (5 mM, pH 7.2) で希釈した G6P 溶液 (50 mM), トリス-塩酸緩衝液 (5 mM, pH 8.0) で希釈した BSA 溶液 (3%) 及び NAD 溶液 (10 mM), NOD 溶液 (0.25 U/ml) を 24.8 : 1 : 1.7 : 2.5 : 10 の割合で混合して作製した。

2・6 ALP の測定

BSA 水溶液 (0.01%) で希釈した ALP 標準溶液 20 μl に対し, 反応直前に作製した NADP⁺ 水溶液 (25 μM) 及びトリス-塩酸緩衝液 (5 mM, pH 10.0) の 1 : 3 混合液 40 μl を加え, 37°C 2 時間振り混ぜながら反応させた。反応後サイクリング溶液を 60 μl 加え, 37°C 2 時間振り混ぜながら反応させた後, 2・3 に示す手順で測定した。サイクリング溶液は, エタノール水溶液 (2.5 M), BSA 水溶液 (1%), グリシン-水酸化ナトリウム緩衝液 (100 mM, pH 7.2), ビストリス-塩酸緩衝液 (100 mM, pH 7.0), NOD 溶液 (0.5 U/ml) 及び ADH 溶液 (1 U/ml) を 8 : 2 : 13 : 13 : 2 : 2 の割合で混合し作製した。

2・7 hCG の測定

炭酸ナトリウム緩衝液 (35 mM 炭酸ナトリウム-15 mM 炭酸水素ナトリウム, pH 9.6) により 10 µg/ml に調製した固相用 hCG 抗体を各ウエルに 100 µl ずつ加え, 4°C 一晩放置した。その後この溶液を除去し, トリス-塩酸緩衝液 (50 mM, pH 7.0; 0.1% ゼラチン, 0.05% アジ化ナトリウム含む) を各ウエルに 300 µl ずつ加え 4°C 一晩放置し, 使用するまでこの状態で保存した。このようにして作製された hCG 抗体固相プレートを使用直前に洗浄液 (0.9% 塩化ナトリウム/0.1% Tween 20/0.05% アジ化ナトリウム) 300 µl で 3 回洗浄し, hCG 標準溶液又はサンプルを 50 µl 加え, 37°C 振り混ぜながら 1 時間反応させた。次いでこの溶液を除去後 3 回洗浄し, トリス-塩酸緩衝液 (0.1 M, pH 7.0; 0.1% BSA, 0.05% アジ化ナトリウム含む) により希釈した ALP-hCG 抗体結合物を 50 µl 加え, 37°C 振り混ぜながら 1 時間反応させた。この反応溶液を除去後同様に洗浄液で 3 回洗浄し, 2・6 に示す手順で測定した。

3 結 果

3・1 NADH 及び NADPH の測定と H₂O₂ の標準曲線

2 種の NOD による NADH 及び NADPH に対する反応性と, 同一条件での H₂O₂ に対する反応性を Fig. 2 に示す。X 軸にはサンプルとして加えた NAD(P)H の濃度又は H₂O₂ の濃度を示し, Y 軸には各 0 濃度時の CLI (chemiluminescence intensity) を 1 としたときの CLI 比を示す。両酵素とも NADPH に対してほとんど反応性を示さず, 又 NADH に対する曲線は H₂O₂ とほぼ一致し, NADH から H₂O₂ への変換率はほぼ 100% と推察された。

3・2 G6PDH の測定

Fig. 3 に示すとおり, 1.0 µU/ml~0.5 mU/ml の濃度範囲で良好な直線性のある標準曲線が作成できた。G6PDH の分子量は約 15 万であり比活性は 550~650 U/mg であるので, 0 濃度の CLI 値にそのときの SD 値の 2 倍を加えた CLI 値以上を示す濃度を最小検出感度とすると (2SD 法), アッセイ当たり 1.0×10^{-18} mol/assay となった。

3・3 ALP の測定

Fig. 4 に示すように, 20 fM~10 pM の濃度範囲で良好な直線性のある標準曲線が作成できた。2SD 法から算出された最小検出感度は, アッセイ当たり $4.0 \times$

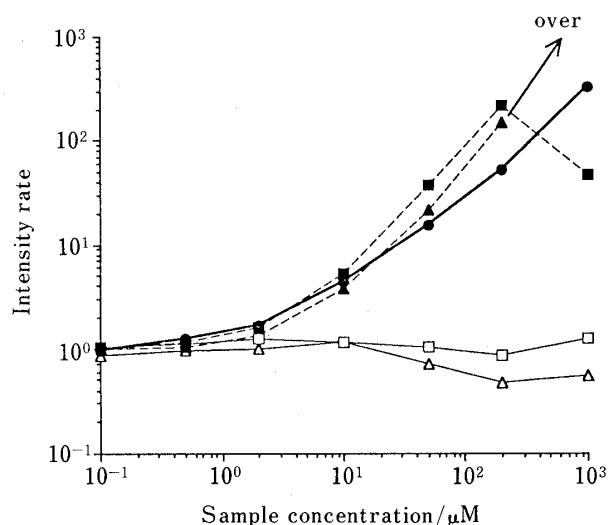


Fig. 2 Standard curves for NAD(P)H with NADH oxidase and reactivity of H₂O₂ in the same condition NADPH (NOD from *S. mutans*) (\triangle); NADPH (NOD from *B. licheniformis*) (\square); NADH (NOD from *S. mutans*) (\blacktriangle); NADH (NOD from *B. licheniformis*) (\blacksquare); H₂O₂ (\bullet)

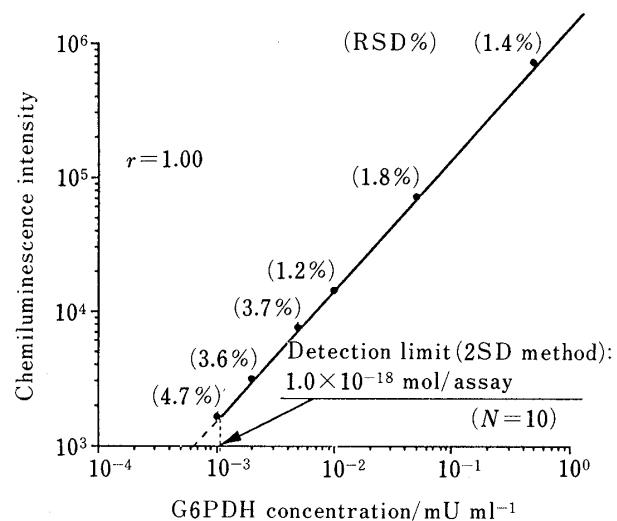


Fig. 3 Standard curve of G6PDH

10^{-19} mol/assay であった。

3・4 hCG の測定

各濃度において 3 重測定したときの hCG の標準曲線を Fig. 5 に示す。2SD 法による最小検出感度は 0.2 mIU/ml であった。この値は既存の TR-FIA のキットであるデルフィアに比較し, 5 倍高感度となつた。

3 種の異なる濃度の試料を用い, 再現性試験, 希釈

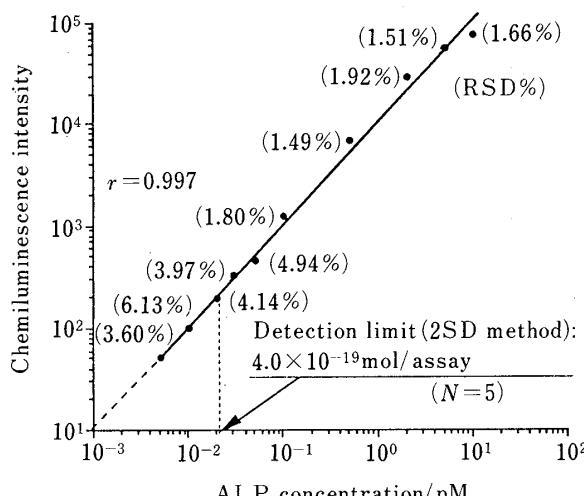


Fig. 4 Standard curve of ALP

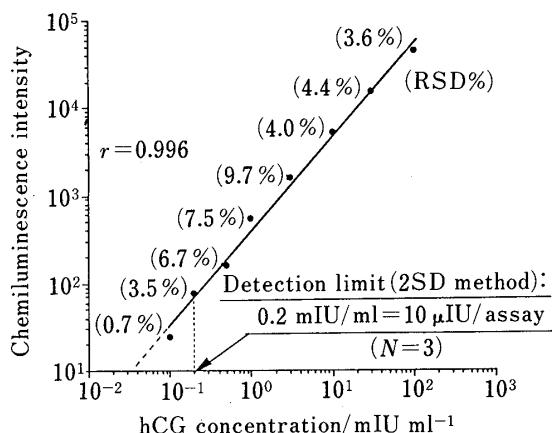
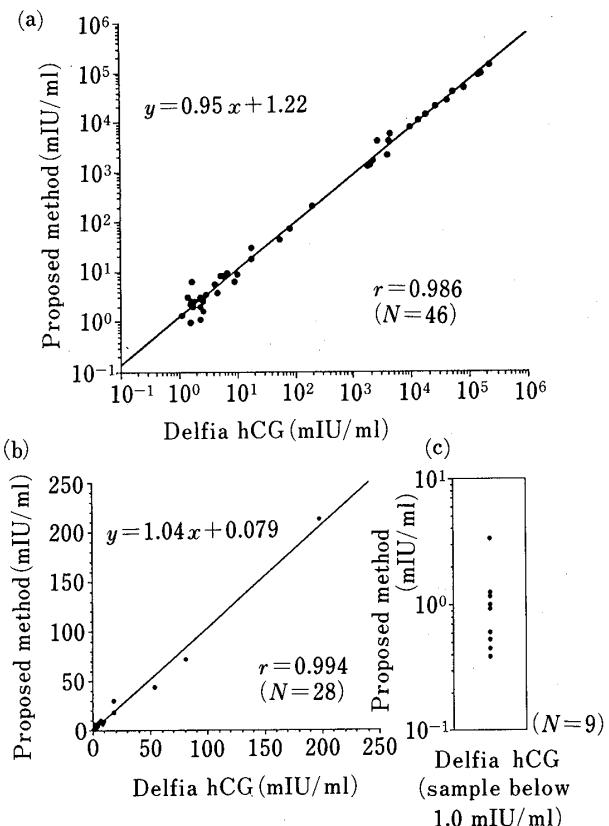


Fig. 5 Standard curve of hCG

試験、添加回収試験、相関性試験を行った。日内再現性に関しては各々 $n=3$ で測定を行い、試料 1, 2 は 9 回、試料 3 は 5 回行った。その結果、相対標準偏差は試料 1 では 0.9~12.2%, 試料 2 では 1.3~8.6%, 試料 3 では 5.6~14.7% であった。プレート間再現性は、同一日に 3 枚（試料 1, 2）あるいは 2 枚（試料 3）のプレートを使用して測定した。なお、各プレートにおける測定値は $n=3$ で算出した。その結果、相対標準偏差は各々 1.9, 1.8, 11.5% であった。又、日差再現性は同一日のすべての測定値を平均し算出した。その結果は、各々 4.8% ($n=5$), 9.3% ($n=5$), 6.1% ($n=3$) であった。

希釈試験については、3 試料とも原点を通る直線性を示した。一方添加回収試験は 2 濃度の試料を用い、平均 107% であった。

相関性試験は、濃度範囲が非常に大きいので対数プロ



簡便になった。S. mutans 由来及び B. licheniformis 由来の酵素とも、NADPH に比し NADH に対して特異的に反応する点では同様であるが、NADH 高濃度時における挙動が幾分異なっていた (Fig. 2)。しかしここでは示さなかつたが、B. licheniformis 由来の酵素で観察された現象は、添加酵素量の増加により解消できるため、両酵素とも同様の目的に使用できると考えられる。フラビンアデニジヌクレオチド (FAD) は後者の酵素を活性化させるという報告があるが、この現象は両酵素共に認められた。しかし、FAD の添加は NADPH に対する反応性も増加させてしまうために、本検討では使用しなかつた。

G6PDH の酵素活性測定において、再生される NAD が再利用されることは、G6PDH 一定濃度において添加 NAD⁺ 量又は NADH の添加量を変化させたとき、NAD(H) 量に従い、又反応時間に従い、標準曲線が低濃度側にシフトすることにより確認された。

ALP の測定系では当初全量 50 μl で測定系を作成したが、免疫測定系へと展開したとき満足な成果が得られなかつた。そこで、当初作成した 50 μl の系を参考にして再度全量 100 μl の系を作成して用いた。今回は ALP についてのみ免疫学的測定へ利用したが、G6PDH の系においても免疫測定系へと展開したときには、同様の結果がでる可能性がある。

最近、H₂O 型ではあるが Streptococcus faecalis 10CI の NOD も遺伝子が単離され、大腸菌の中で活性型の酵素を産生させることに成功している¹⁰⁾。このような遺伝子工学の手法を利用した生産方式への変更により、より安価な酵素供給を可能とすると考えられる。又、一方でジアフォラーゼ-ADH の酵素サイクリング法を用い

るレサズリンの蛍光の系でも ALP の 0.6 zeptomol の測定が報告¹¹⁾されており、ADH の透析¹¹⁾による混在物の除去等により、本測定系も更に高感度化可能であると考えられる。

NADH オキシダーゼを供与下さいました日本ペイント株式会社及びマルキン醤油株式会社、固相用 hCG 抗体及び hCG 抗体の ALP 標識体を供与下さいました東ソー株式会社、血清検体を提供下さいました昭和大学医学部付属病院中央検査部に深謝いたします。

(1993 年 4 月、日本薬学会第 113 年会、及び 1993 年)
(10 月、日本臨床化学会第 33 年会にて一部発表)

文 献

- 1) M. Higuchi: *J. Gener. Microb.*, **130**, 1819 (1984).
- 2) M. Higuchi: *Oral Microb. Immun.*, **7**, 309 (1992).
- 3) M. Higuchi, M. Shimada, Y. Yamamoto, T. Hayashi, T. Koga, Y. Kamio: *J. Gener. Microb.*, **139**, 2343 (1993).
- 4) 田部一弘、河崎孝男、前田昌子、辻 章夫、薮内正彦: 分析化学, **36**, 82 (1987).
- 5) 須藤幸男、石沢春生、前田昌子、辻 章夫: 分析化学, **37**, 185 (1988).
- 6) T. Kato, S. J. Berger, J. A. Carter, O. H. Lowry: *Anal. Biochem.*, **53**, 86 (1973).
- 7) F. Kohen, Z. Hollander, F. M. Yeager, R. J. Carriico, R. C. Boguslaski: "Enzyme Labelled Immunoassay of Hormones and Drugs", p. 67 (1978), (Walter de Gruyter & Co., Berlin, New York).
- 8) 前田昌子、石沢春生、辻 章夫: 分析化学, **38**, 495 (1989).
- 9) 河本美津子、荒川秀俊、前田昌子、辻 章夫: 分析化学, **40**, 537 (1991).
- 10) D. B. Cook, C. H. Self: *Clin. Chem.*, **39/6**, 965 (1993).
- 11) R. P. Ross, Al Claiborne: *J. Mol. Biol.*, **227**, 658 (1992).



Chemiluminescent assay of NAD⁺-dependent enzyme activity using NADH oxidase and its application to immunoassay. Masashi OKAMOTO,^{*} Masako MAEDA and Akio TSUJI^{**} (*Central Research Laboratory, Nihon Medi-Physics Co., Ltd., 9-1, Techno Park, Sanda-shi, Hyogo 669-13; **School of Pharmaceutical Sciences, Showa University, 1-5-8, Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo 142)

We have developed a chemiluminescent assay for glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and alkaline phosphatase (ALP) using NADH oxidase (NOD) purified from S. mutans, and an ALP assay system applied to enzyme immunoassay. Regarding the assay for G6PDH, we could measure a range covering 1.0 μU/ml to 0.5 mU/ml. The detection limit was 1.0×10^{-18} mol/assay by the 2SD method. On the other hand, when we used an enzyme-cycling system with alcohol dehydrogenase (ADH) and NOD, we could measure from 20 fM to 10 pM of ALP, and the detection limit was 4.0×10^{-19} mol/assay by the 2SD method. We applied this ALP assay system to an enzyme immunoassay for

hCG; its measuring range was 0.2~100 mIU/ml in serum. The hCG assay gave good results for both inter and intra assays, a dilution test and a recovery test. It also gave a good correlation with a Delfia hCG kit in a TR-FIA assay; we could measure 9 samples below 1.0 mIU/ml, which was the detection limit of the Delfia hCG kit. We had confirmed NOD is a useful enzyme on EIA, and so on.

(Received January 6, 1994)

Keyword phrases

chemiluminescent assays for G6PDH and ALP; NADH oxisidase from *S. mutans*; chemiluminescent enzyme immunoassay; chemiluminescent enzyme immunoassay of hCG.
