

## 技術論文

ニトロセルロース膜を抗体固定化担体とする  
テストステロンの電気化学的酵素免疫測定法井上 久美<sup>1</sup>, フェラント パスカル<sup>1</sup>, 平野 悠<sup>2</sup>, 安川 智之<sup>®1</sup>,  
珠 玖 仁<sup>1</sup>, 末永 智一<sup>1</sup>

ニトロセルロース膜を抗体の固定化担体として用いた酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay) により膜に捕捉された標識酵素の活性を電気化学的に計測しテストステロンの定量検出を行った。膜に抗テストステロン抗体を固定化し、テストステロン及び西洋わさびペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase, HRP) 標識テストステロンを競争的に反応させた。電子伝達メディエーターであるフェロセンメタノール及び HRP の基質である過酸化水素を添加すると、捕捉された標識 HRP の酵素反応により酸化型フェロセンメタノール ( $\text{Fc}^+\text{OH}$ ) が生成される。金ディスク電極を用いて生成される  $\text{Fc}^+\text{OH}$  をアンペロメトリックに計測した。電極先端及び膜表面間の距離を常に一定に保持することが可能な電気化学測定用チャンバーを自作し、抗体を固定化したニトロセルロース膜及び金ディスク電極を設置した。ニトロセルロース膜の種類、抗体固定化の際に介在させるウシ血清アルブミン濃度、競合物質である HRP 標識テストステロン濃度及び電気化学計測における緩衝液の種類について検討し、条件の最適化を行った。得られた最適条件を用いてテストステロンを競合的に捕捉し、HRP の酵素活性を電気化学的に検出することによりテストステロンの定量を行った。テストステロン濃度の増加に伴い、還元電流応答の減少が観測され 0.5~20 ng/mL の濃度範囲において相関が得られた。この手法を用いると、通常のウェルプレートを用いた発色法と比較して 1 けた高い感度が得られた。

## 1 緒 言

高分子多孔質膜は、生化学分野において、汙過、精製及びブロッティング等に用いられる必要不可欠な実験材料である。特に、ニトロセルロース膜は、その高い生体分子の吸着能及び広い吸着面積のために酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) やその他のイムノアッセイのプラットフォームとして利用されている。膜を利用したイムノアッセイの形態として、ドット ELISA<sup>1)</sup>、フロースルーアッセイ (イムノフィルトレーションアッセイ)<sup>2)</sup>、ラテラルフロー型イムノクロマトグラフィー<sup>3)</sup>、プロテインアレイ<sup>4)</sup>などが考案されている。いずれもニトロセルロース膜を抗体の固定化担体とし、抗原抗体親和性によって検出対象分子を捕捉し、更にサンドイッチアッセイの場合、酵素標識抗体で処理し、捕捉された標識酵素の反応を発色等により検出している。トレーサーには酵素のほかに、金コロイド粒子<sup>3)5)</sup>、蛍光標識<sup>6)~8)</sup>や量

子ドット<sup>6)9)10)</sup>、あるいはアップコンバージョン蛍光微粒子<sup>11)12)</sup>、などが利用されている。また、酵素法では酵素による基質の発色を検出する方法<sup>13)</sup>のほかに、化学発光を検出する方法<sup>14)</sup>、pH の変化を検出する方法<sup>15)</sup>などがある。更に、導電性高分子をトレーサーとしたコンダクトメトリーセンサー<sup>16)</sup>やリボソームにルテニウム錯体を封入して電気化学発光を検出する方法<sup>17)</sup>なども報告されている。これらの開発は、古典的なウェルプレートをプラットフォームとする ELISA 法をより迅速、簡便、低サンプル消費量、小型、及び低コスト化することを目的として行われてきた。更に、point of care testing (POCT) の普及に伴って様々な応用製品が市場を創設し、その中でも 1999 年 1 月に日本ベクトン・ディッキンソンが発売したラテラルフロー型イムノクロマトグラフィーの A 型インフルエンザ抗原検出キットは大きなヒットとなった<sup>18)</sup>。

これらの多くは定性検出法であるが、より分析の客観性を高めるために定量化システムの研究が行われている。そのなかでも、電気化学検出法は装置の小型化、デバイス化が容易である点で有利であると考えられている。検出法に電気化学を用いる定量法としては、light-addressable potentiometric sensor (LAPS)<sup>2)</sup>、又は、pH 感受性高分子

<sup>1</sup> 東北大学大学院環境科学研究科環境科学専攻: 980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-11-605

<sup>2</sup> 独立行政法人産業技術総合研究所ゲノムファクトリー研究部門: 062-8517 北海道札幌市豊平区月寒東 2 条 17 丁目 2-1

層を被覆した電極を用いるインピーダンス法<sup>15)</sup>により、酵素反応に依存した pH 変化を検出する方法、電気化学活性種をリポソームに閉じ込めて高感度分析を行う方法<sup>19)</sup>、金コロイドに銀を析出させてストリッピングボルタンメトリーで測定する方法<sup>20)</sup>が報告されている。これまで著者らは、ELISA に電気化学顕微鏡 (SECM) を組み合わせたシステムを開発してきた<sup>21)</sup>。SECM は、マイクロ・ナノ電極をプローブとした走査型プローブ顕微鏡 (scanning probe microscopy, SPM) の一種であり、界面の局所領域において進行する化学反応を電気化学的に追跡可能なシステムである<sup>22)23)</sup>。更に、電極を 3 次元に走査することにより、局所領域における化学物質の空間的広がりをイメージとしてとらえることが可能である。著者らは以前に、ガラス基板表面に免疫複合体を作製し、標識酵素活性のイメージングによりがん胎児性抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA)<sup>24)</sup>、ロイコシジン<sup>25)</sup>及び C 反応性タンパク (CRP)<sup>26)</sup> の高感度検出を行った。更に、局所領域に 2 種類の抗体を固定化させたガラス基板を用い、デュアルイムノアッセイを成功させた<sup>27)</sup>。

本研究では、ニトロセルロース膜を抗体の固定化担体とし、標識西洋わさびペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase, HRP) の酵素活性の電気化学的評価に基づくテストステロンの定量を行った。テストステロンは、男性ホルモンの一種であり、内分泌検査項目の一つとして主に男性性腺機能検査に用いられる。特に、加齢に伴うテストステロンの産生低下が、男性更年期障害として一般に認知されつつある抑鬱症状や性機能低下症状の原因であるとの報告がある<sup>28)</sup>。また、女性の卵巣の機能異常やその他の疾患の診断、ホルモン治療の効果判定などにも利用される<sup>29)</sup>。抗テストステロン抗体をニトロセルロース膜に固定化し、各種濃度のテストステロン及び HRP 標識テストステロンの混合溶液を添加して競合イムノアッセイを行った。次に、電極先端及び膜表面間の距離を常に一定に保持することが可能な電気化学測定用チャンバーに膜及び金ディスク電極を設置し、アンペロメトリックに標識 HRP の酵素活性を計測した。過酸化水素の存在下において、電子伝達メディエーターである還元型フェロセンメタノール (FcOH) は HRP の酵素反応により酸化され、酸化型フェロセンメタノール (Fc<sup>+</sup>OH) が生成される。この Fc<sup>+</sup>OH を金ディスク電極により還元し、その還元電流量により膜に捕捉されたテストステロンを検出した。ニトロセルロース膜の種類、抗体固定化の際に介在させるウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) 濃度、競合物質である HRP 標識テストステロン濃度及び電気化学計測における緩衝液の種類について検討し、条件の最適化を行った。

## 2 実 験

### 2.1 試薬と溶液

モノクロナールマウス抗テストステロン抗体 (Testosterone-3, クローン番号: M021812) は、Fitzgerald Industries International 社 (USA) から購入した。テストステロン及び BSA は、和光純薬から購入した。HRP 標識テストステロン (分子量, 約 4 万) は、BiosPacific 社 (USA) から購入した。ニトロセルロース膜へのタンパク質の非特異的吸着を低減させるために、免疫学的測定用ブロッキング試薬 N101 (日本油脂) を蒸留水で 5 倍希釈してブロッキング溶液として使用した。抗テストステロン抗体の固定化担体として Millipore 製 HF135 (Hi-Flow Plus HF135 Unbacked), Millipore 製 HF180 (Hi-Flow Plus HF180 Unbacked) 及び Bio-Rad 製 (Trans-Blot<sup>®</sup> Transfer Medium Pure Nitrocellulose Membrane 0.2  $\mu\text{m}$ ) のニトロセルロース膜を使用した。ルミノール発光試薬として ECL ウェスタンブロットティング検出試薬 (GE ヘルスケアバイオサイエンス製) を用いた。電気化学計測のために、過酸化水素 (関東化学) 及び FcOH (Sigma-Aldrich) を用いた。本研究では、4 種類の緩衝液を用いた。テストステロン及び HRP 標識テストステロンの調製に、8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.7 mM KCl 及び 137 mM NaCl を含むリン酸緩衝液 (PBS, pH 7.6) を用いた。洗浄用に 0.05 v/v% Tween 20 を含む PBS (PBS-T) を用いた。ニトロセルロース膜上への抗体固定化のために 10 v/v% グリセロール, 1 mg/mL ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 及び 100 ng/mL BSA を含む PBS (抗体固定化用の PBS, pH 7.6) を用いた。これはスポット固定するための安定化緩衝液として利用されている<sup>30)</sup>。更に、電気化学計測に 0.2 M クエン酸, 0.34 M NaCl 及び 0.1 M KCl を含むクエン酸緩衝液 (pH 4.5) を用いた。使用した溶液はすべて蒸留水で調製し、4°C で保管した。

### 2.2 ニトロセルロース膜上への抗体のスポット固定及び化学発光計測

バイオチップアレイヤー (フィルジェン) を用いて抗テストステロン抗体溶液をニトロセルロース膜上に固定化した。直径 400  $\mu\text{m}$  のスポットピンを用いて抗体を含む抗体固定化用の PBS をスポットした。膜を 10 mL のブロッキング溶液に 4°C で 90 分間浸漬し、PBS-T により 3 回洗浄した。1  $\mu\text{g/mL}$  HRP 標識テストステロン (複合体濃度約 25 nM) を含む PBS 溶液 10 mL に 37°C で 30 分間浸漬し、スポット固定された抗体に HRP 標識テストステロンを反応させた。捕捉された HRP の活性は、ルミノール化学発光を用いて検出した。暗室にて、膜上に 0.125 mL/cm<sup>2</sup> の ECL 検出試薬を滴下し、室温で 5 分間インキュベートし

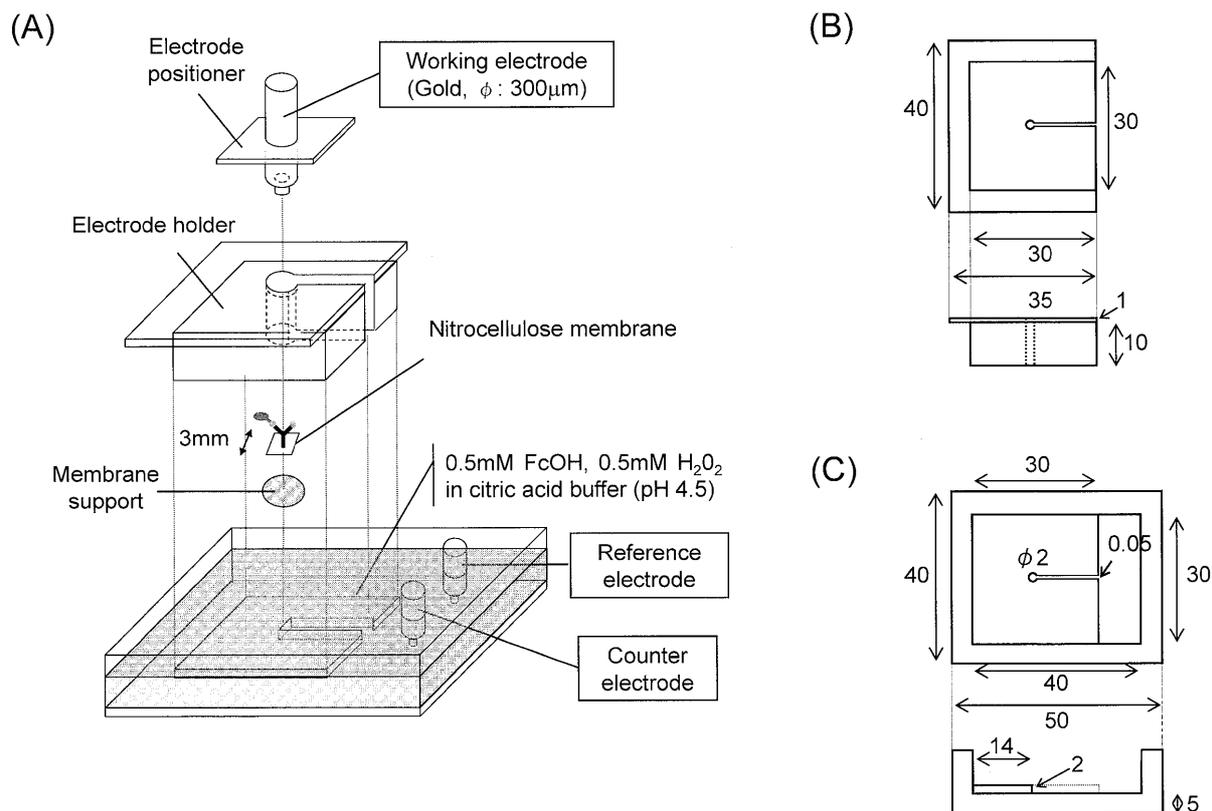


Fig. 1 Illustration of the electrochemical detection chamber

(A) Total view, (B) electrode holder, (C) container of the solution for electrochemical measurements. Numerical units in figure (B) and (C) are expressed in "mm".

た. 化学発光強度をイメージインテンシファイア付き CCD カメラ (PI-MAX Camera, Princeton Instruments 製) を用いて計測した. 露光時間は 10 分間とした.

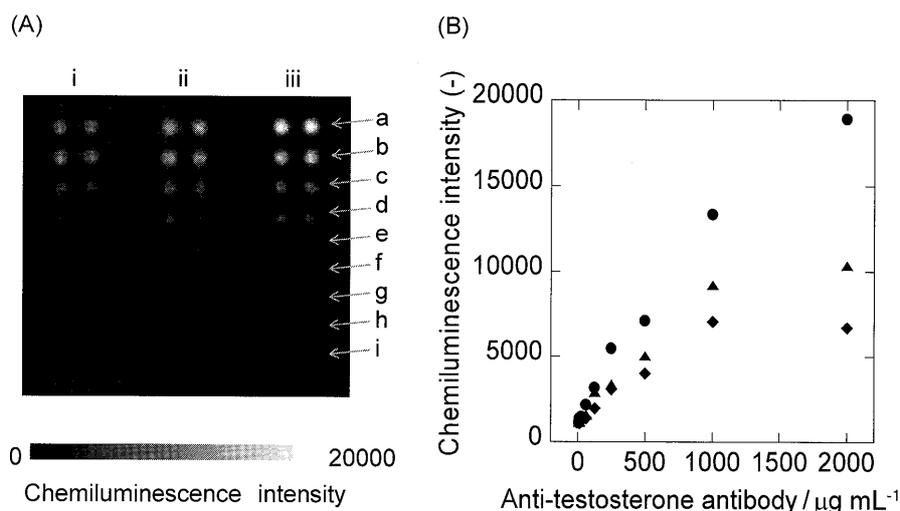
### 2・3 ニトロセルロース膜上への抗体の固定化及び免疫反応

Bio-Rad 製のニトロセルロース膜を  $3 \times 3$  mm に切り出し, 蒸留水で 3 回洗浄した. 膜を  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  抗テストステロン抗体 (230 mL) 溶液に浸漬し, 室温で 90 分間インキュベートした. PBS-T で 3 回洗浄後, ブロッキング溶液 (1 mL) に浸漬し,  $4^\circ\text{C}$  で 90 分間インキュベートした. 更に膜を PBS-T で 3 回洗浄した後, テストステロン及び  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  HRP 標識テストステロンを含む PBS 溶液に室温で 30 分間浸漬して免疫反応を競争的に進行させた. 最後に, 未反応物質を除去するために PBS-T を用いて膜を 5 回洗浄し, 電気化学測定用チャンバーに設置した. 膜上に捕捉された標識 HRP の酵素活性を電気化学的に計測した.

### 2・4 電気化学測定用チャンバーの作製

ニトロセルロース膜及び金ディスク電極間の距離を一定

に制御可能なアクリル製の電気化学測定用チャンバーを作製した. Fig. 1 に, チャンバーの模式図を示す. チャンバーは, 測定容器と電極ホルダーから構成されている. 測定容器のサイズは  $40 \times 30$  mm で, 左部  $30 \times 30$  mm の部分に電極ホルダーが設置される. その中心部に直径 2 mm 及び深さ 2 mm の孔があり, 孔は幅 0.5 mm のチャンネルにより右部の溶液注入口に接続されている.  $3 \times 3$  mm の膜は孔の上部に設置され, 電極ホルダーにより固定される. 電極ホルダーのサイズは  $30 \times 30$  mm で, 深さ 10 mm である. 測定容器と同様に中心部に直径 2 mm の貫通孔及び幅 0.5 mm のチャンネルが設置してある. 金ディスク電極は, この貫通孔から挿入する. 電極ホルダーを測定容器内の左部に設置し, 更に金ディスク電極を挿入する. 金ディスク電極には, 先端から 9.8 mm の位置に電極ポジショナーを取り付けてある. よって, 金ディスク電極の先端は, 測定容器上部に配置された膜から 0.2 mm に配置され, 電極-膜間の距離を簡便に再現性よくコントロールできる. 測定用溶液を溶液注入口から注入すると, 溶液は測定容器及び電極ホルダーに作製されたチャンネルを通じて膜及び電極へと到達する. 最後に, 溶液注入口に銀塩化銀参照極及び白金対極を挿入し電気化学計測を行う.



**Fig. 2** (A) Chemiluminescence image of labeled-HRP captured with the anti-testosterone antibody, and (B) Variation of the chemiluminescence intensities as a function of the concentration of anti-testosterone antibody

The nitrocellulose membrane, (i) Hi-Flow Plus HF135 Unbacked (Millipore); (ii) Hi-Flow Plus HF180 Unbacked (Millipore); (iii) Trans-Blot<sup>®</sup> Transfer Medium Pure Nitrocellulose Membrane 0.2  $\mu\text{m}$  (Bio-Rad). The spotted concentrations of antibodies were (a) 2.0 mg/mL, (b) 1.0 mg/mL, (c) 0.50 mg/mL, (d) 0.25 mg/mL, (e) 0.13 mg/mL, (f) 63  $\mu\text{g/mL}$ , (g) 31  $\mu\text{g/mL}$ , (h) 16  $\mu\text{g/mL}$ , and (i) 7.8  $\mu\text{g/mL}$ .  $\blacklozenge$ : HF135 (Millipore);  $\blacktriangle$ : HF180 (Millipore);  $\bullet$ : Trans-Blot<sup>®</sup> (Bio-Rad)

## 2.5 電気化学計測システム

作用極には、直径 300  $\mu\text{m}$  の金ディスク電極を使用した。銅リードワイヤを接続した金ワイヤを内径 1.5 mm のガラス管に挿入し、エポキシ樹脂 Epok 812 セット (応研商事) を注入して 60 $^{\circ}\text{C}$  で 12 時間硬化させた。電極先端を研磨して金ワイヤを露出させて金ディスク電極とした。作製した金ディスク電極の電気化学的特性を 4.0 mM フェロシアンイオンのサイクリックボルタンメトリーにより評価した。電気化学計測はポテンシostat (HA1010mM8, 北斗電工製) を用いて 3 極式で行った。

作製した金ディスク電極に電極ポジショナーを取り付け、電気化学測定用チャンバーに設置した。0.5 mM FcOH 及び 0.5 mM 過酸化水素を含むクエン酸緩衝液を注入後、膜に捕捉された標識 HRP の酵素反応により生成される  $\text{Fc}^+\text{OH}$  の還元電流をアンペロメトリーにより計測した。溶液を添加してから 6 分後に電極電位を 0.05 V に設定し、還元電流応答を経時的に測定した。還元電流応答として、電位ステップ後 120~130 秒に得られた電流量の平均を採用した。

## 2.6 マイクロタイタープレートを用いたテストステロンの比色検出

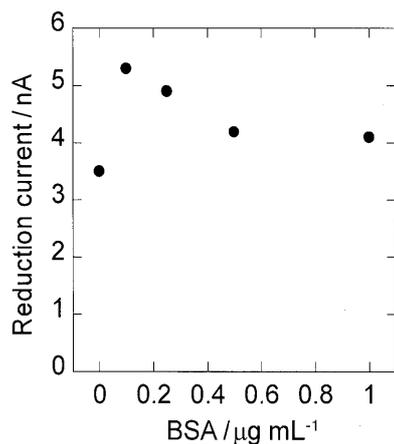
抗テストステロン抗体を物理吸着により 96 ウェルプレートの底に固定化した。100  $\mu\text{L}$  の 10  $\mu\text{g/mL}$  抗テストステロン抗体を含む抗体固定化用の PBS をウェルに添加し室温で 2 時間インキュベートした。非特異的吸着を抑制

するために、ウェルに 350  $\mu\text{L}$  のブロッキング溶液を添加し 4 $^{\circ}\text{C}$  で 1 晩インキュベートした。PBS-T で 3 回洗浄した後、ウェルに 100  $\mu\text{L}$  の各種濃度のテストステロン及び 1  $\mu\text{g/mL}$  HRP 標識テストステロンを含む PBS 溶液を添加し室温で 90 分間浸漬して免疫反応を競争的に進行させた。最後に、未反応物質を除去するために PBS-T を用いて 3 回洗浄し、200  $\mu\text{L}$  の TMB substrate Kit {3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン及び過酸化水素の等量混合液 (Thermo Fisher Scientific)} を添加し、30 分反応させた。100  $\mu\text{L}$  の 2 M 硫酸を添加し反応を停止させ、プレートリーダー (BioRad Model 680 Microplate Reader) を用いて 450 nm の吸光を測定した。

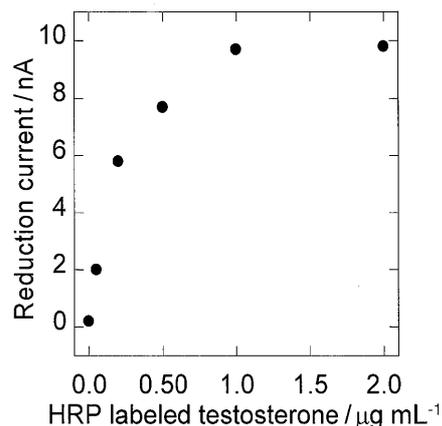
## 3 結果と考察

### 3.1 スポット固定によるニトロセルロース膜の抗体固定化能の評価

ニトロセルロース膜上に抗テストステロン抗体をスポット固定し、HRP 標識テストステロン溶液に浸漬し免疫複合体スポットを形成させた。そして、抗体スポットに捕捉された標識 HRP の酵素活性を化学発光計測により評価した。Fig. 2A に、免疫複合体スポットの化学発光イメージを示す。Millipore 製 HF135 (Fig. 2A-i), Millipore 製 HF180 (Fig. 2A-ii) 及び Bio-Rad 製 (Fig. 2A-iii) のニトロセルロース膜を用いた。それぞれのニトロセルロース膜に、抗テストステロン抗体を 3 mm 間隔、2 レーンでスポット固定した。スポットする抗体の濃度を 7.8  $\mu\text{g/mL}$ ~



**Fig. 3** Responses of reduction current to BSA concentration added to the solution for the immobilization of antibodies



**Fig. 4** Responses of reduction current to concentration of HRP-labeled testosterone

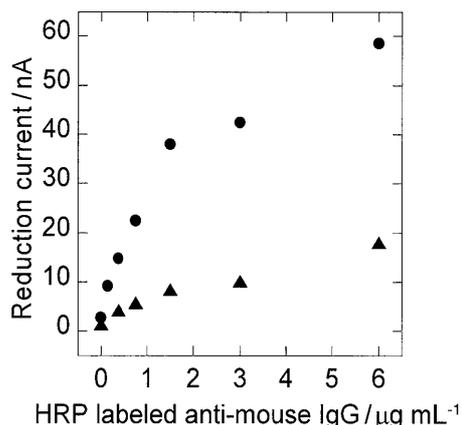
2.0 mg/mLとした。それぞれの膜を 1  $\mu\text{g/mL}$  HRP 標識テストステロンを含む PBS 溶液に 30 分間浸漬し、HRP の活性を化学発光計測により検出した。すべての膜において、スポット抗体の濃度の増加に伴って発光強度が増加した。スポットされる抗体の溶液量は一定であると仮定できるので、発光強度の増加は各スポットに固定化された抗体量の増加、すなわち捕捉される HRP 標識テストステロン量の増加に起因する。Fig. 2B に、スポット抗体の濃度に対する各スポットから得られた発光強度を示す。Bio-Rad 製のニトロセルロース膜を用いると、低い抗体濃度において最も高い発光シグナルが得られた。また、高濃度領域における発光強度を比較しても、同じ抗体濃度の場合、Bio-Rad 製の膜を使用すると発光シグナルが最も大きかった。このことから、Bio-Rad 製のニトロセルロース膜の抗テストステロン抗体吸着能力が最も高いことが分かった。よって、これ以降の実験では抗体固定化担体として Bio-Rad 製のニトロセルロース膜を使用することとした。また、抗体のスポット固定のための緩衝液として PBS を用いると、発光シグナルは約 30% に減少した。抗体をスポット固定する場合には、スポットされたわずかな溶液の乾燥速度や抗体の吸着密度が検出シグナルの強度に大きな影響を与えると予測できる。

### 3.2 アンペロメトリーによるテストステロン検出の最適化

ニトロセルロース膜に固定化された抗テストステロン抗体に捕捉された HRP の活性を高効率で計測するために、BSA 濃度、HRP 標識テストステロン濃度及び測定溶液の pH の影響を調査し最適化を行った。3  $\times$  3 mm に切り出した Bio-Rad 製のニトロセルロース膜を 10  $\mu\text{g/mL}$  抗テストステロン抗体溶液に浸漬し抗体を固定化した。まず、抗

体固定化の際に共存させて固定化した BSA 濃度が電流応答に与える影響について検討した。BSA を含む抗体固定化溶液に膜を浸漬し、HRP 標識テストステロンを 30 分間反応させた。その後、膜及び電極を電気化学測定用チャンパーに設置し、HRP の酵素反応に伴って生成される  $\text{Fc}^+\text{OH}$  の還元電流応答を計測した。チャンパーに 0.5 mM  $\text{FcOH}$  及び 0.5 mM 過酸化水素を添加し、6 分後にアンペロメトリーを行った。電極電位を開回路状態から 0.05 V にステップさせると、容量電流に基づく大きなスパイク状の電流応答が得られ、その後、徐々に減少し約 20 ~ 30 秒後に定常電流を得た。Fig. 3 に、BSA 濃度に対する得られた還元電流応答を示す。BSA 濃度の増加に伴い、電流応答はわずかに減少した。また、BSA を固定化しない場合の電流応答は最も小さくなった。このわずかな BSA の共存固定化が電流応答に与える影響について現時点では解明されていないが、BSA の存在は抗体の固定化密度や配向性を制御していると考えられる。すなわち、BSA の膜上への吸着固定により抗体はある程度まばらに固定化されると予想でき、タンパク質である HRP に結合された小分子のテストステロンの認識と捕捉に有利に作用すると考えられる。以上より、抗体の固定化の際に、100 ng/mL BSA を抗体固定化溶液に添加することにした。

次に、膜に固定化された抗体と競合反応させる HRP 標識テストステロン濃度の最適化を行った。100 ng/mL BSA を含む 10  $\mu\text{g/mL}$  抗テストステロン抗体溶液に浸漬した膜に、0 ~ 2.0  $\mu\text{g/mL}$  HRP 標識テストステロンを反応させ、捕捉された標識 HRP の活性を評価した。HRP 標識テストステロンの濃度の増加に伴い、得られた還元電流の増加が観測された。1  $\mu\text{g/mL}$  以上において電流応答はほぼ飽和し一定となった (Fig. 4)。このことから、競合反応に用いる競合物質の濃度として 0.2 ~ 1  $\mu\text{g/mL}$  が有力で



**Fig. 5** Variation of the reduction current of  $\text{Fc}^+\text{OH}$  generated by the enzymatic reaction of labeled-HRP as a function of the concentration of HRP-labeled anti-mouse IgG in the citric acid buffer (pH 4.5, ●) and PBS (pH 6.4, ▲)

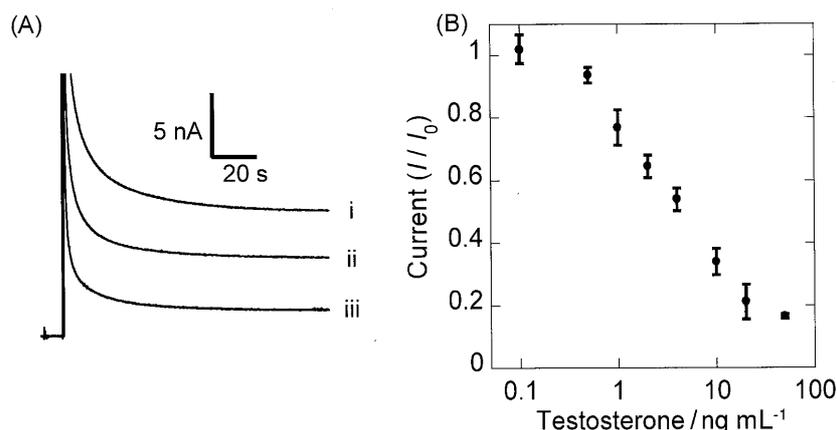
ある。しかし、迅速な検出のために反応時間の短縮を考慮した場合、競合物質である HRP 標識テストステロン濃度を減少させると、膜上に捕捉される標識 HRP 分子数を減少させるため、検出される電流量は全体的に減少する。競合免疫反応によって捕捉された標識酵素の活性を電気化学的にとらえる本手法では、検出対象物質の濃度増加に伴い電流応答が減少する系である。よって、金ディスク電極を用いる電気化学計測の感度を考慮し、測定対象物質を含まない場合に観測される初期電流応答が大きな  $1 \mu\text{g/mL}$  HRP 標識テストステロンを競合物質濃度として採用することにした。

最後に、測定溶液の pH が検出電流応答に与える影響について調査した。この実験には、HRP 標識抗マウス immunoglobulin G (IgG) 抗体を用いて緩衝液中で行った。所定濃度の HRP 標識抗マウス IgG 抗体を  $0.5 \text{ mM}$   $\text{FcOH}$  及び  $0.5 \text{ mM}$  過酸化水素を含むクエン酸緩衝液 (pH 4.5) 及びリン酸緩衝液 (pH 6.4) を用いて準備し、アンペロメトリーにより評価した。HRP 標識抗マウス IgG 抗体を投入してから 6 分後に電極電位を  $0.05 \text{ V}$  にステップさせた。電位ステップ後、 $120 \sim 130$  秒の間に得られた電流応答の平均をシグナルとし、HRP 標識抗マウス IgG 抗体濃度に対してプロットした (Fig. 5)。いずれも、HRP 標識抗マウス IgG 抗体濃度の増加に伴い、電流応答の増加が観測され、更に高濃度領域において応答は飽和する傾向にあった。クエン酸緩衝液を用いた場合には、リン酸緩衝液を用いた場合と比較して、得られる電流応答が 3 倍以上大きいことが分かる。すなわち、 $\text{FcOH}$  をメディエーターとして標識 HRP の活性を電気化学的に検出するためには、pH 6.4 の PBS を用いるよりも pH 4.5 のクエン酸

緩衝液を用いた場合のほうが大きな電流シグナルを得られる。よって、膜を用いた免疫反応により捕捉された標識 HRP の活性を計測する際の測定溶液としてクエン酸緩衝液を選択した。

### 3.3 標識 HRP 活性の電気化学的評価に基づくテストステロンの定量

電気化学測定用のチャンバーにニトロセルロース膜及び金ディスク電極を設置し、膜に捕捉された標識 HRP の活性を指標としてテストステロンの定量検出を行った。測定条件として、前節までに最適化した条件を採用した。抗テストステロン抗体固定化ニトロセルロース膜を所定濃度のテストステロン及び  $1 \mu\text{g/mL}$  HRP 標識テストステロンの混合溶液に浸漬し競合反応させた。膜をチャンバーに設置し、アンペロメトリーを用いて標識 HRP の酵素活性を検出した。Fig. 6A に、得られた典型的なアンペログラムを示す。電位を  $50 \text{ mV}$  にステップすると容量電流に起因する大きなスパイク状の電流応答が観測された。その後、徐々に減少し  $20 \sim 30$  秒後にほぼ定常電流に到達した。Fig. 6A のアンペログラム i, ii 及び iii は、それぞれテストステロン濃度が  $0$ ,  $2.0$  及び  $20 \text{ ng/mL}$  の場合に得られた。電流応答は、テストステロン濃度の増加に伴って減少している。これは、テストステロンとその標識体の間での競合反応であるため、テストステロン濃度の増加に伴い膜に固定化された抗体に捕捉される HRP 標識体の量が減少したことに起因する。また、電位印加後、数秒のレベルにおいてテストステロン濃度に対する十分な電流応答の差が観測されている。しかし、ここでは測定における再現性を重要視し  $120 \sim 130$  秒で得られた電流応答をシグナルとした。Fig. 6B に、テストステロン濃度に対する電流シグナルのプロットを示す。この際、各テストステロン濃度において得られた還元電流応答をコントロール電流 (テストステロン濃度ゼロにおいて得られた電流量) で規格化している。 $0.5 \sim 20 \text{ ng/mL}$  の濃度範囲において、電流応答とテストステロン濃度の対数との間には比例関係があった。また、この検量線を得るために各テストステロン濃度において 4 回計測を行っており、標準偏差は  $0.06$  であった。更に、マイクロタイタープレートを用いたテストステロンの比色検出を行った。 $1 \text{ ng/mL}$  以上のテストステロン濃度において吸光強度の減少が観測されたため、この抗体を用いた比色検出法の検出感度は  $1 \text{ ng/mL}$  以上である。ニトロセルロース膜に捕捉された標識 HRP の酵素活性を電気化学的に検出する本手法は、通常のウェルプレートを利用した ELISA と比較して 1 けた高い低濃度域をカバーしており、1 けた高い検出感度が得られた。また、アンペロメトリックな計測により、膜に固定化された抗体に捕捉された測定対象物質を迅速に検出できることが分かった。ニト



**Fig. 6** (A) Typical amperometric responses by the competitive immunoassay for testosterone, and (B) Standard curve of current ( $I/I_0$ ) against testosterone concentration

(A): The concentration of testosterone; (i) 0 ng/mL (ii) 2 ng/mL and (iii) 20 ng/mL. (B): The current is indicated as  $I/I_0$  (%), the ratios of the amperometric response at a certain testosterone concentration to the amperometric response without testosterone under the same conditions.

ロセルロース膜は、キャピラリー現象による溶液の浸透性を利用してイムノクロマトグラフィーへと展開されている。今後、複数の微小電極を配置した電極デバイスとイムノクロマトグラフィーを積極的に融合し、ワンステップ操作で迅速、多項目同時及び定量的に分析対象物質を検出可能な電気化学デバイスを目指して研究を進展させることを予定している。

#### 4 結 言

膜に捕捉された標識 HRP の活性を電気化学的に計測し、テストステロンの定量検出を行った。最初に、各種ニトロセルロース膜の抗体固定化能について、抗体スポット法を用いて、化学発光により評価したところ、Bio-Rad 製の固定化能が最も高かった。次に、アンペロメトリーにおける各種条件の最適化を行い、抗体固定化溶液を 100 ng/mL BSA 含有抗体固定化用の PBS とし、HRP 標識テストステロン濃度を 1  $\mu$ g/mL とし、電気化学計測用溶液をクエン酸緩衝液 (pH 4.5) とした場合に最も大きな電流応答を得られることが分かった。最後に、この最適条件下で、電気化学測定用チャンバーに膜及び金ディスク電極を設置し、捕捉された標識 HRP の酵素活性を指標としてアンペロメトリックにテストステロンの定量検出を行った。その結果、0.5~20 ng/mL の濃度範囲において直線関係が得られ、高感度な検出が可能であった。これは、通常のウェルプレートを用いた発色法と比較して 1 けた高い感度であった。

今回、ニトロセルロース膜を利用する方法が成功したことで、今後イムノクロマトグラフィーによるワンステップ検出への展開が期待できる。また、電気化学的な標識

HRP の酵素活性計測システムを用いると高感度な定量分析が可能であることから、今後、電極とイムノクロマトグラフィーを融合させ、更に小型、迅速な定量システムを目指して研究を行う予定である。

#### 文 献

- 1) M. G. Pappas: *Vet. Parasitol.*, **29**, 105 (1988).
- 2) K. Dill, L. H. Stanker, C. R. Young: *J. Biochem. Biophys. Meth.*, **41**, 61 (1999).
- 3) W. K. Fong, Z. Modrusan, J. P. McNevin, J. Marostenmaki, B. Zin, F. Bekkaoui: *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 2525 (2000).
- 4) Y. Lin, R. Huang, X. Cao, S. Wang, Q. Shi, R. Huang: *Clin. Chem. Lab. Med.*, **41**, 139 (2003).
- 5) H. S. Khaira, J. Mann: *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, **15**, 235 (1998).
- 6) Y. Xu, G. Bao: *Anal. Chem.*, **75**, 5345 (2003).
- 7) Y. M. Kim, S. W. Oh, S. Y. Jeong, D. Jinpyo, E. Y. Choi: *Environ. Sci. Technol.*, **37**, 1899 (2003).
- 8) S. Choi, E. Y. Choi, D. J. Kim, J. H. Kim, T. S. Kim, S. W. Oh: *Clin. Chim. Acta*, **339**, 147 (2004).
- 9) R. H. Daniels, A. R. Watson: US Patent Application 2002/0004246 (2002. 1. 10).
- 10) B. M. Lingerfelt, H. Mattoussi, E. R. Goldman, J. M. Mauro, G. P. Anderson: *Anal. Chem.*, **75**, 4043 (2003).
- 11) J. Hampl, M. Hall, N. A. Mufti, Y. M. Yao, D. B. MacQueen, W. H. Wright, D. E. Cooper: *Anal. Biochem.*, **288**, 176 (2001).
- 12) R. S. Niedbala, H. Feindt, K. Kardos, T. Vail, J. Burton, B. Bielska, S. Li, D. Milunic, P. Bourdelle, R. Vallejo: *Anal. Biochem.*, **293**, 22 (2001).
- 13) R. F. Zuk, V. K. Ginsberg, T. Houts, J. Rabbie, H. Merrick, E. F. Ullman, M. M. Fischer, C. C. Sizto, S. N. Stiso, D. J. Litman: *Clin. Chem.*, **31**, 1144 (1985).
- 14) E. Heinickeb, U. Kumarb, D. G. Munoz: *J. Immunol. Methods*, **152**, 227 (1992).

- 15) C. Fernández-Sánchez, C. J. McNeil, K. Rawson, O. Nilsson: *Anal. Chem.*, **76**, 5649 (2004).
- 16) Z. Muhammad-Tahir, E. C. Alocilja: *Biosens. Bioelectron.*, **18**, 813 (2003).
- 17) C. H. Yoon, J. H. Cho, H. Oh, M. J. Kim, C. W. Lee, J. W. Choi, S. H. Paek: *Biosens. Bioelectron.*, **19**, 289 (2003).
- 18) 株式会社富士経済: “2006 イムノアッセイ市場” (2006).
- 19) K. S. Lee, T. H. Kim, M. C. Shin, W. Y. Lee, J. K. Park: *Anal. Chim. Acta*, **380**, 17 (1999).
- 20) F. Lu, K. H. Wang, Y. Lin: *Analyst*, **130**, 1513 (2005).
- 21) H. Yamada, H. Shiku, T. Matsue, I. Uchida: *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **33**, 91 (1994).
- 22) R. C. Engstrom, M. Weber, D. J. Wunder, R. Burgess, S. Winquist: *Anal. Chem.*, **58**, 844 (1986).
- 23) A. J. Bard, F. R. F. Fan, J. Kwak, O. Lev: *Anal. Chem.*, **61**, 132 (1989).
- 24) H. Shiku, T. Matsue, I. Uchida: *Anal. Chem.*, **68**, 1276 (1996).
- 25) S. Kasai, A. Yokota, H. Zhou, M. Nishizawa, K. Niwa, T. Onouchi, T. Matsue: *Anal. Chem.*, **72**, 5761 (2000).
- 26) 安川智之, 平野 悠, 小笠原大知, 本地直美, 珠玖 仁, 川端荘平, 末永智一: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **55**, 979 (2006).
- 27) H. Shiku, Y. Hara, T. Matsue, I. Uchida, T. Yamauchi: *J. Electroanal. Chem.*, **438**, 187 (1997).
- 28) 熊本悦明, 青木正治: 日本医師会雑誌, **106**, 372 (1991).
- 29) 伊藤直樹, 塚本泰司: 内科, **93**, 1376 (2004).
- 30) T. O. Joos, M. Schrenk, P. Höpfl, K. Kröger, U. Chowdhury, D. Stoll, D. Schörner, M. Dürr, K. Herick, S. Rupp, K. Sohn, H. Hämmerle: *Electrophoresis*, **21**, 2641 (2000).

## Electrochemical ELISA of Testosterone Using Nitrocellulose Membrane as a Support for Antibodies

Kumi INOUE<sup>1</sup>, Pascal FERRANTE<sup>1</sup>, Yu HIRANO<sup>2</sup>, Tomoyuki YASUKAWA<sup>1</sup>,  
Hitoshi SHIKU<sup>1</sup> and Tomokazu MATSUE<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Graduate School of Environmental Studies, Tohoku University, 6-6-11-605, Aramaki-Aoba, Aoba-ku, Sendai-shi, Miyagi 980-8579

<sup>2</sup> Research Institute of Genome-based Biofactory, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 2-17-2-1, Tsukisamu-higashi, Toyohira-ku, Sapporo-shi, Hokkaido 062-8517

(Received 12 December 2006, Accepted 14 February 2007)

A quantitative electrochemical detection of testosterone was performed using a nitrocellulose membrane as a support for antibodies. Testosterone competitively reacted with horseradish peroxidase (HRP)-labeled testosterone, and was captured with an anti-testosterone antibody immobilized on the membrane. The activity of the labeled HRP was electrochemically estimated with a gold-disk electrode (diameter, 300  $\mu\text{m}$ ) by detecting the oxidized form of ferrocenemethanol (FcOH), which was produced by the HRP-catalyzed oxidation of FcOH with  $\text{H}_2\text{O}_2$ . The electrochemical detection chamber was fabricated in order to maintain a constant distance between the electrode and the membrane surface. We optimized some factors, especially nitrocellulose membranes and the concentration of bovine serum albumin (BSA) and HRP-labeled testosterone for the electrochemical analysis of testosterone with a high reliability. Testosterone was detected by a competitive amperometric measurement under the optimized conditions. As a result, the current response decreased with increasing testosterone concentration, and a linear current response was observed in the range of 0.5 ~ 20 ng/mL on a semi-log graph. This method provides high sensitivity by one order of magnitude, compared with the conventional well plate assay.

**Keywords** : nitrocellulose membrane; immunoassay; testosterone; amperometry; ELISA.