

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-257996

(P2004-257996A)

(43) 公開日 平成16年9月16日(2004.9.16)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 27/416	GO 1 N 27/46 3 3 6 N	2 GO 4 5
GO 1 N 27/327	GO 1 N 33/483 F	
GO 1 N 33/483	GO 1 N 33/535	
GO 1 N 33/535	GO 1 N 33/543 5 4 5 S	
GO 1 N 33/543	GO 1 N 27/30 3 5 7	

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2003-51937 (P2003-51937)	(71) 出願人	301021533 独立行政法人産業技術総合研究所 東京都千代田区霞が関1-3-1
(22) 出願日	平成15年2月27日 (2003.2.27)	(72) 発明者	水谷 文雄 茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内
(出願人による申告) 国等の委託研究の成果に係る特許出願 (平成14年度、新エネルギー・産業技術総合開発機構委託研究、「高次生体情報センサー基盤技術の開発」、産業再生法第30条の適用を受けるもの)		(72) 発明者	佐藤 縁 茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内
		(72) 発明者	澤口 隆博 茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内
		(72) 発明者	松浦 宏昭 茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 酵素免疫測定法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】生体内に極めて微量で存在する物質であっても、極めて高感度、簡便、かつ安全に測定することが可能な測定法を提供する。

【解決手段】標識酵素としてコリンエステラーゼを結合させた標識抗体を使用し、試料中の被験物質の濃度又は量を、コリンエステラーゼの活性を測定することにより計測する方法において、該酵素活性を、該酵素分解物であるチオコリンを貴金属電極に吸着、濃縮し、このチオコリンの電極における還元脱離により発生する電流信号を増幅して検出する。

【選択図】なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

コリンエステラーゼと被験物質に対する抗体とを結合せしめた酵素標識抗体を、試料に混合して試料中の被験物質と抗原抗体反応を生ぜしめ、反応したあるいは未反応の上記酵素標識抗体のコリンエステラーゼ活性を測定することにより、試料中の被験物質の量又は濃度を測定する方法であって、

上記コリンエステラーゼ活性の測定を、アシルチオコリンを基質とするコリンエステラーゼ分解物であるチオコリンを貴金属電極表面上に吸着濃縮させ、吸着チオコリンの還元脱離により生ずる電流値あるいはその積分値を検出することにより行うことを特徴とする、試料中の被験物質の量又は濃度を測定する方法。

10

**【請求項 2】**

測定対象物質が利尿ペプチドである請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

コリンエステラーゼがアセチルコリンエステラーゼ ( E C 3 . 1 . 1 . 1 7 ) である請求項 1 または 2 に記載の方法。

**【請求項 4】**

アシルチオコリンがアセチルチオコリンである請求項 1 ~ 3 にいずれかに記載の方法。

**【請求項 5】**

コリンエステラーゼからなる酵素イムノアッセイ用標識酵素。

**【請求項 6】**

コリンエステラーゼおよびアシルチオコリンを試薬として少なくとも含む酵素イムノアッセイ用試薬キット。

20

**【発明の詳細な説明】****【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、試料中に含まれる被験物質の濃度又は量を酵素イムノアッセイにより測定する方法および該方法に使用する試薬に関する。

**【0002】****【従来の技術】**

従来から、例えば生体に微量産生されるペプチド類を高選択的に測定する目的にはこれらペプチド類に対する抗体の分子認識能力を利用する免疫法が利用されてきており、現状でも、簡便性等を考えると免疫法に変わる方法は見当たらない。

30

一方、生体産生ペプチドの中でも、例えば利尿ペプチド類は生体試料中の濃度は通常、p p t オーダーと極めて低く、このような極めて微量存在するペプチドの測定においては、酵素イムノアッセイ法は感度の点で問題を有し、さらに酵素イムノアッセイ法の中で比較的高感度化に適した方法とされる二次抗体を利用するサンドイッチ法は、測定対象とするペプチド類の分子量が小さい場合、二次抗体と結合しにくいということから利用できる場合が限られていた。したがって、放射性同位元素を利用するラジオイムノアッセイ法が殆ど唯一の方法として採用されてきたが、放射性同位元素を用いる方法は、安全性の点で問題があり、また簡便性からはほど遠いものであり、例えば、心疾患の患者の血中の利尿ペプチド濃度をベッドサイドで迅速に計りたい等の臨床現場からの要求とはほど遠いものであった。

40

**【0003】****【発明が解決しようとする課題】**

本発明者の課題は、上記のような放射性同位元素を使用するラジオイムノアッセイ法での簡便性あるいは安全性上の問題点に鑑み、酵素イムノアッセイ法をさらに改良し、生体内に極めて微量で存在するペプチド類あるいはその分子量が小さなペプチド類であっても、極めて高感度、簡便、かつ安全に測定することが可能な新規酵素イムノアッセイ法を提供しようとするものである。

**【0004】**

50

**【課題を解決するための手段】**

本発明者等は、生体内に極めて微量存在するペプチドとして、特に利尿ペプチド類を酵素イムノアッセイ法を用いて高感度に測定するための方法を開発すべく鋭意研究した結果、抗体に結合させる標識酵素としてコリンエステラーゼを使用すれば、この酵素分解物であるチオコリンが貴金属電極に濃縮して吸着され、このチオコリンの電極における還元脱離により発生する電流信号が増幅され、さらに、ミリリットル以下の微量な溶液中で生成したチオコリンを、比較的大面積の貴金属電極により効率的に吸着させることにより、利尿ペプチドの微量を極めて高感度、かつ簡便に測定できることを初めて見いだした。さらに、このコリンエステラーゼを標識酵素とする酵素イムノアッセイ法は、利尿ペプチドのみに限らず、他の被験物質の測定にも極めて有効であるとの知見を得て本発明を完成させるに至ったものである。

10

**【0005】**

すなわち、本発明は、以下の(1)~(3)に係るものである。

(1) コリンエステラーゼと被験物質に対する抗体とを結合せしめた酵素標識抗体を、試料に混合して試料中の被験物質と抗原抗体反応を生ぜしめ、反応したあるいは未反応の上記被験物質のコリンエステラーゼ活性を測定することにより、試料中の被験物質の量又は濃度を測定する方法であって、

上記コリンエステラーゼアセチル活性の測定を、アシルチオコリンを基質とするコリンエステラーゼアセチル分解物であるチオコリンを貴金属電極上に吸着濃縮させ、吸着チオコリンの還元脱離により生ずる電流値あるいはその積分値として検出することにより行うことを特徴とする、試料中の被験物質の量又は濃度を測定する方法。

20

(2) 測定対象物質が利尿ペプチドである(1)に記載の方法。

(3) コリンエステラーゼがアセチルコリンエステラーゼ(EC 3.1.1.17)である上記1または2に記載の方法。

(4) アシルチオコリンがアセチルチオコリンである上記(1)~(3)のいずれかに記載の方法。

(5) コリンエステラーゼからなる酵素イムノアッセイ用標識酵素。

(6) コリンエステラーゼおよびアシルチオコリンを試薬として少なくとも含むことを特徴とする酵素イムノアッセイ用試薬キット。

**【0006】**

30

**【発明の実施の形態】**

本発明は試料中に含まれる被験物質を測定する方法において、コリンエステラーゼを標識酵素として上記被験物質に対する抗体に結合させた標識抗体を利用し、アセチルチオコリンを基質とする標識酵素反応生成物のチオコリンを貴金属電極表面に吸着、濃縮させ、吸着チオコリンの還元脱離に基づく電流あるいはその積分値を測定することにより、被験物質の量又は濃度を求めることを特徴とする酵素イムノアッセイ法、および利尿ペプチドの測定方法に関するものである。

本発明において標識酵素として使用するコリンエステラーゼとしては、アセチルコリンエステラーゼ(EC 3.1.1.17)およびアシルコリンエステラーゼ(EC 3.1.1.18)があげられる。これらは基質としてアセチルチオコリン等のアシルチオコリンを分解できる。また、これらコリンエステラーゼによる標識抗体の作製方法には特に制限が無く、酵素イムノアッセイの分野において汎用される化学結合法やアビジン-ビオチン法等が利用される。

40

**【0007】**

貴金属電極としてはコリンエステラーゼ反応により生成するチオールであるチオコリンがその表面に金属-硫黄結合を介して化学吸着され、かつ電気化学的、化学的に安定な銀電極や金電極が好都合に利用される。還元脱離の操作については、例えば文献(Langmuir, 7, 2687, 1991)記載等の方法に従って行われる。すなわち、アルカリ性水溶液中に移し、十分なマイナスの電位を印加して吸着していたチオコリンを還元すると、生成したチオレートアニオンは脱離して上記アルカリ水溶液中に溶解する。こ

50

の際、電極に流れる還元電流はファラデーの法則から、吸着していたチオコリンの分子数に比例すると考えられる。

また、本発明の目的のためには、生成したチオコリンをできるだけ効率よく、多量に電極上に吸着させることが高感度化の重要なキー技術となる。このためにはチオコリンを生成させるための溶液の量を少なくし、一方で大面積の電極を用いて吸着の効率を上げることが必要となる。一方、溶液の量を極端に小さくすると吸着のための容器の設計が困難になり、溶液の蒸発乾固も起こり得る。本発明においては、酵素反応溶液量 (ml あるいは  $\text{cm}^3$ ) / 電極面積 ( $\text{cm}^2$ ) 比は 100 ~ 3 ( $\text{cm}$ ) であり、好ましくは 30 ~ 3 ( $\text{cm}$ ) である。

#### 【0008】

10

以下に、本発明の測定法について利尿ペプチドを例にとり具体的に説明する。

生体産生ペプチドの中でも、例えば利尿ペプチド類は生体試料中の濃度は通常、pptオーダーと極めて低く、このような極めて微量存在するペプチドの測定においては、上記したように、酵素イムノアッセイ法は感度の点で問題を有し、さらに酵素イムノアッセイ法の中で比較的高感度化に適した方法とされる二次抗体を利用するサンドイッチ法は、利尿ペプチドの分子量が小さいために、二次抗体と結合しにくいということから、利尿ペプチドの測定においてはあまり有効とはえない。さらに脳性ナトリウム利尿ペプチドBNP等に対する抗体はモノクロナール抗体が市販されておらず、サンドイッチ法の適用は、この点からも不可能であった。

#### 【0009】

20

本発明の酵素イムノアッセイ法は、このような利尿ペプチド、具体的には脳性ナトリウム利尿ペプチドBNP等を電気化学的に高感度かつ簡便に測定することを可能とする。

例えば、BNPは健康人の血液中においては20ピコグラム/ミリリットル以下であるが、急性心不全、慢性心不全、狭心症、急性心筋梗塞、腎不全、高血圧症等においてその濃度が上昇し、特に心不全ではその病状に従って濃度が上昇することが知られている等、医療分野における重要なマーカー分子である。

#### 【0010】

被験物質として利尿ペプチドの濃度を測定しようとする場合、まず、(1)利尿ペプチド固定化基板を作成しておく、基板としては金属、炭素、硝子、高分子等の固体材料が広く利用される。例えば金を基板材料とする場合にはシステアミン等で金を処理することにより、表面に結合性のアミノ基を導入することができる。また、硝子や金属酸化物を基板材料とする場合には適当なシランカップラーを用いることで、表面に反応性のアミノ基、カルボキシル基などを導入できる。例えばアミノ基を導入した基板を水溶性カルボジイミドと利尿ペプチドとを含む水溶液中に浸せきすることにより、利尿ペプチドが基板の固定化され、利尿ペプチド固定化基板が形成される。

30

(2)一方、利尿ペプチド含有試料をコリンエステラーゼ標識抗体と混合し、適当な時間インキュベートし、利尿ペプチド(抗原)と抗体とを反応させる。

この反応液中には抗原と結合した標識抗体と、未反応の標識抗体とを含む。

(3)次いで、この反応液を上記(1)で作成した利尿ペプチド固定化基板と接触させ、適当な時間インキュベートする。この過程で、未反応の標識抗体は基板上に抗原抗体反応により固定化される。

40

標識抗体の固定化量あるいは固定化速度は、適当な条件では上記反応液中に当初存在した未反応の標識抗原の濃度と正の相関がある。言い換えれば、試料中の利尿ペプチド濃度と負の相関を有する。固定化された標識抗体の量は固定化コリンエステラーゼ活性に比例すると考えられるから、酵素活性の測定から利尿ペプチド濃度が求められることになる。あるいは逆に固定化されずに液中に残った標識抗体の量、すなわち、液中の酵素活性は試料中の利尿ペプチド濃度と正の相関を有するから、溶液中の酵素活性測定結果から利尿ペプチド濃度を求めることも可能である。

#### 【0011】

(4)酵素活性の測定においては、上記基板上に固定化された標識抗体と固定化されなか

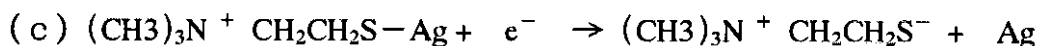
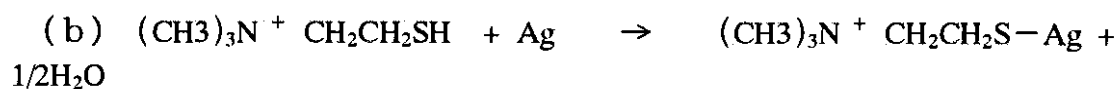
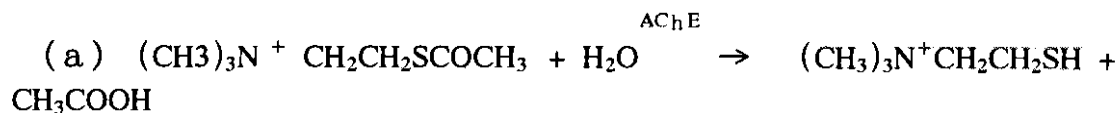
50

った標識抗体を分離し、固定化標識抗体、あるいは固定化されなかった標識抗体を含む溶液中に、酵素基質であるアシルチオコリンを添加する。添加されたアシルチオコリンは、標識抗体のコリンエステラーゼにより分解され、反応溶液中にチオコリンが生成する ( a )。この反応溶液に貴金属電極、例えば銀電極を挿入すると表面に酵素反応生成物であるチオコリンが金属 - 硫黄結合を介して吸着される ( b )。次いで吸着されたチオコリンは貴金属電極上から還元脱離し、このとき電極には電流変化が生じる ( c )。

酵素としてアセチルコリンエステラーゼ ( A C h E )、アシルチオコリンとしてアセチルチオコリンを用いた場合、これらの反応過程を以下に示す。

【 0 0 1 2 】

【 化 1 】



10

20

上記 ( b ) のチオコリンの吸着過程はチオコリンの濃縮過程とも見なし得る。すなわち溶液中のチオコリン濃度が低くても貴金属電極表面に吸着される過程で表面濃度は高くなる。このことにより以下の還元脱離過程での電極における電気化学信号は微小な酵素活性変化に対して増幅された大きなものとなり、結果として高感度な利尿ペプチドの測定を可能とする。

【 0 0 1 3 】

また、チオコリンの電極表面への吸着・濃縮には当然、ある程度の時間を必要とするが、

例えばチオコリンは酵素反応を行う中性溶液中では正に荷電しているため、電極に適当なマイナスの電位を印加しておくことにより、吸着速度の向上、言い換えれば吸着・濃縮時間の短縮は可能となる。

吸着貴金属電極に吸着したチオコリンは、例えば文献 ( Langmuir, 7, 2687, 1991 ) 記載の方法に従ってアルカリ性水溶液中に移し、十分なマイナスの電位を印加して吸着していたチオコリンを還元して脱離し、この還元脱離に伴い発生する還元電流あるいはその時間積分値 ( 電気量 ) を求める。電気量はファラデーの法則から明らかとなり吸着していたチオコリンの量 ( 分子数 ) に比例し、適当な条件下で測定した電流もまた、吸着していたチオコリンの量 ( 分子数 ) と正の相関がある。したがって、この電流あるいは電気量の測定から、上記 ( 3 ) に記載した、利尿ペプチド固定化基板に固定化された標識抗体におけるコリンエステラーゼ活性、あるいは該基板に固定化されなかった上記標識抗体のコリンエステラーゼ活性を測定でき、これにより試料中の利尿ペプチド濃度を決定することができる。

【 0 0 1 4 】

以上、例として、利尿ペプチドの濃度測定について説明したが、本発明によれば、被験物質が抗原性を有するものであれば、ペプチド、タンパク質、多糖類、ポリヌクレオチド等に限らず、上記 ( 1 ) ~ ( 4 ) のプロセスを適用することにより測定可能である。

また、上記したことから明らかのように、コリンエステラーゼは、酵素イムノアッセイにおける標識酵素として極めて有用な酵素であり、また該酵素とその基質であるアシルチオコリンを試薬として組み合わせたものは酵素イムノアッセイ用試薬キットとしても極めて優れているものである。さらに、例えば、生体内の様々な生理活性物質に対する抗体を調製

30

40

50

し、それぞれの抗体に上記コリンエステラーゼを標識した標識抗体は、生体内の各生理活性物質の濃度、量を測定するために非常に有効であり、アシルチオコリン等を試薬として有用な検査薬あるいは疾病等の診断剤となりうるものである。また、上記と同様に、アシルチオコリンを加え、検査役あるいは診断剤キットとしても使用することができるものである。

次に実施例により本発明をさらに詳細に説明する。

#### 【0015】

##### 【実施例】(BNPの測定)

直径1.6mmの金ディスク基板を0.1mMシスタミン二塩酸塩水溶液に一晩浸せきし表面にアミノ基を導入した。この基板を100mg/l水溶性カルボジイミドと2.5mg/lヒト由来BNPとを含む溶液に1時間浸せきし、BNP固定化基板を作製した。また、S-アセチルメルカプトサクシニルアヒドリドをアセチルコリンエステラーゼと反応させ、-SH基を導入した酵素分子と、スルホサクシニミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレートとを抗ヒトBNP抗体(ウサギ由来、ポリクロナール抗体)と反応させてマレイミド基を導入した抗体分子とを反応させてアセチルコリンエステラーゼ標識抗体を調製した。25ppbのアセチルコリンエステラーゼ修飾抗体を種々の濃度のBNPを含む水溶液を30分反応させ、次いで混合溶液(0.5ml)に上記BNP固定化基板を20分浸せきし未反応の標識抗体を基板上に結合させた。次いで、この基板と、直径1.6mmの銀ディスク電極とをアセチルチオコリンを含むpH8のリン酸緩衝液中(0.5ml)に浸せきし、銀電極に-0.7V(対銀-塩化銀電極)の電位を印加し、2分間放置した。

10

20

#### 【0016】

この過程で金基板表面に固定化させたアセチルコリンエステラーゼの触媒作用によりアセチルチオコリンが加水分解されてチオコリンが生成し、生成したチオコリンが銀電極表面に吸着・濃縮される。最後に、チオコリン吸着銀電極を0.1M KOH溶液に移し、-0.6V(対銀-塩化銀電極)から-1.4V(対銀-塩化銀電極)の範囲で50mV/sの速度で電位を掃引し、-1.15V(対銀-塩化銀電極)付近に観測される脱離ピークに対応する電気量を測定した。このとき得られた電気量と、試料中のBNP濃度との関係を図1に示す。図1から分かるようにBNP濃度40pptから200pptの範囲で、BNP濃度の増加とともに顕著に電気量の減少が観測され、この範囲でBNPの測定が可能となった。この範囲は臨床上要求されるBNPの測定範囲を十分カバーするものである。

30

#### 【0017】

##### 【比較例1】(BNPの測定)

上記の未反応標識抗体を基板上に結合させた金基板をアセチルチオコリンを含むpH8のリン酸緩衝液中(0.5ml)に5分間浸せきした後、この溶液中に生成したチオコリンをコリン酸化酵素を酸素電極上に固定化した汎用の酵素センサーによる電流測定法により検出を試みた結果、センサーの出力電流は極めて小さく、事実上、測定が不可能であった。

#### 【0018】

##### 【比較例2】(BNPの測定)

上記の未反応標識抗体を基板上に結合させた金基板と、直径1.6mmの銀ディスク電極とをアセチルチオコリンを含むpH8のリン酸緩衝液中(実施例に比べてはるかに多量の20ml)に浸せきし、銀電極に-0.7V(対銀-塩化銀電極)の電位を印加し、2分間放置した。その後、チオコリン吸着銀電極を0.1M KOH溶液に移し、-0.6V(対銀-塩化銀電極)から-1.4V(対銀-塩化銀電極)の範囲で50mV/sの速度で電位を掃引し、-1.15V(対銀-塩化銀電極)付近に観測される脱離ピークに対応する電気量を測定した場合、測定可能なBNPの濃度範囲は2ppbから100ppbの範囲に留まり、臨床上要求されるBNPの測定感度には達していなかった。

40

#### 【0019】

50

**【発明の効果】**

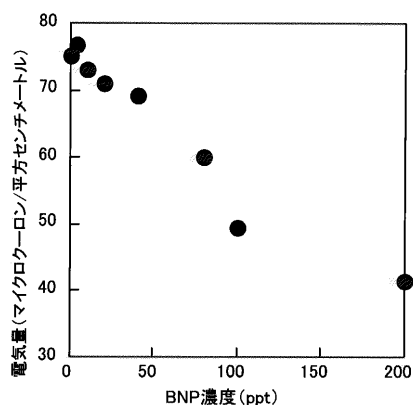
上記したとおり、本測定法は酵素イムノアッセイ法の一つであり、本質的に、汎用されているラジオイムノアッセイ法に比べて簡便で安全性も高いものである。

特に本測定法は、酵素イムノアッセイ法がラジオイムノアッセイ法に比べて感度が低いという問題点、特に二次抗体を用いたサンドイッチ法が適用し難いことに起因する酵素イムノアッセイによる感度向上が困難であるとの問題点を、標識酵素反応生成物の濃縮を介する増幅測定手段を採用することによりクリアしたものであり、本発明は上記BNP等の生体内に極めて微量にしか存在しない物質を、酵素イムノアッセイ法を用いて可能にしたことに特に価値を有する。したがって、酵素イムノアッセイ法の特徴である簡便性、安全性を保ったまま感度の問題をクリアした方法として患者のベッドサイドでの測定等にも応用を可能としたものである。

10

**【図面の簡単な説明】**

**【図1】** 試料中のBNP濃度と銀電極上でのチオコリン還元脱離時の電気量との関係を表すグラフ（BNPの校正曲線）である。図中、横軸はppb単位で表した試料中のBNP濃度、縦軸は電極の単位面積あたりに換算した電気量である。

**【図1】**

フロントページの続き

Fターム(参考) 2G045 AA13 BB11 BB51 DA36 FB01 FB03 FB05 FB07 GC18 GC20