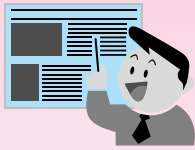


解説

ポルフィリンの光特性を用いる標識酵素の分析



ポルフィリンは、高感度な光特性（吸光・蛍光・りん光）と錯形成能をもつことから金属イオンの高感度分析試薬として研究されてきたが、近年、分析対象物を生体物質や環境物質に広げつつある。本稿では、ポルフィリンを用いた生体物質の分析法として、特にエンザイムイムノアッセイの標識酵素の定量を行った例を紹介し、それらの分析システムについて解説する。

五十嵐 淑郎，川上 貴教

1 はじめに

ポルフィリンは、ポルフィン核を持つ化合物の総称であり、生物系に金属錯体として広く存在している。ポルフィリンは多くの元素（50種類以上）と錯体を形成することができ、さらにポルフィリンとその金属錯体は高感度な光特性（吸光・蛍光・りん光）など優れた機能を備えている。このキレート形成能や光特性は、主として錯体形成反応に基づいた各種金属イオンの超高感度スペクトル分析法の開発に用いられてきた。これまで、分析化学の見地からいくつかの総説^{1)~4)}が執筆されている。また最近、ポルフィリンの光特性と新しい機能の発現による特異的反応との組み合わせによって、金属イオン以外の化学物質、特に生体物質⁵⁾（DNA, RNA, アルブミン, グルタチオン, 過酸化水素⁶⁾等）に対しても分析対象の広範な広がりを見せている。このような展開の中で、分析化学におけるはじめてのポルフィリンシンポジウム（田端らがオーガナイザー）が国際会議 ICAS2001で開催され、現在までの研究成果が議論された。

本稿では、エンザイムイムノアッセイ（EIA）における標識酵素 { アルカリホスファターゼ（ALP）およびペルオキシダーゼ } の分析に焦点を絞り解説する。これらの分析法は、ポルフィリンの高感度光特性とエンザイムイムノアッセイとの組み合わせによって、数多くの生体・環境成分の高感度かつ特異的な分析が可能となるユニークな方法である。

2 高感度酵素分析の必要性

医療診断の分野において、抗原抗体反応を利用したイムノアッセイは、広く用いられている分析技術である。生体の免疫システムは、外来物質（抗原）の一つ一つに対して特異的な親和性を持つタンパク質分子、すなわち

抗体を作ることができる。イムノアッセイは、この抗原抗体反応の高いパイオアフィニティを利用するものである。イムノアッセイに關与する抗原または抗体を検出するには、どちらかに結合した標識物質を検出する必要がある。

当初は感度および簡便性から放射性同位元素を用いたラジオイムノアッセイ検査が盛んであったが、放射性物質を用いる点が制約となり、次第に非放射性的の標識が求められてきた。現在、汎用されている方法に、酵素の増感作用を利用するEIAがある（図1）。分析操作の詳細は成書及び総説⁷⁾を参照されたい。図1に示すように標識酵素を分析することで間接的に分析対象物である抗原を分析できる。EIAで用いる標識酵素には、基質特異性が小さく、かつ高感度検出が可能なものが望ましい。最もよく使われている標識酵素には、ALPとホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）がある。これらの酵素を定量する方法には大きく分けて、吸光法、蛍光法、化学発光法の三つが存在する。吸光法では、ALPに対して

-

ニトロフェノールリン酸エステル、フェノールフタレインリン酸エステル等が用いられ、一方HRPに対しては1,2-ジアミノベンジジン等が用いられているが、モル吸光係数（ ϵ ; $M^{-1} cm^{-1}$ ）が数万オー

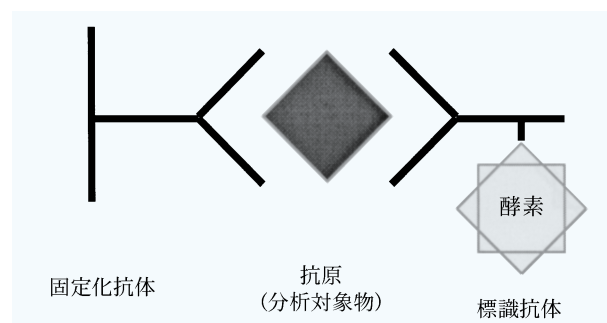


図1 エンザイムイムノアッセイ（EIA）

ダーである点と、試薬自体の安定性が小さいことから検出限界が制限されている。蛍光法では、ウンベリフェロン誘導体、フルオレセイン誘導体を用いた方法が一般的だが、蛍光法は濃度消光などの影響を受ける欠点がある。化学発光法も近年報告されており、確かに感度が高いのが利点であるが、バックグラウンドが不安定で精度の点に課題を残していた。以上の観点から、簡便かつ高感度な ALP 及び HRP の定量法の開発に対して強いニーズが存在している。

ポルフィリンは、現存する比色試薬の中では最大の感度 { 発見者の名にちなんで名づけられた : Soret 帯 (400 ~ 500 nm, $\epsilon = 50$ 万以上) } を持つ化合物であり、試薬としての安定性も高いことから吸光法における標識酵素分析試薬として期待できる。最近、EIA の市販キットとの組み合わせにより選択性と分析対象物の種類を飛躍的に増大させることを目的として、ポルフィリンを用いる高感度酵素分析法の開発が行われた。以下に筆者らの開発した分析法をいくつか述べる。

3 ポルフィリンの分子設計

3.1 リン酸エステル基の導入と ALP の分析

設計指針：一般的な高感度比色試薬としてはトリフェニルメタン系、*p*-ニトロフェノール系、及びアゾ系色素などが知られている。これらの試薬の多くは、分析対象となる化学種と反応して、それ自身の持つ π 電子共鳴系が広がり、高感度比色試薬としての機能が発揮できる。しかし、ポルフィリン化合物の場合には、 π 電子共鳴系をさらに広げようとする、一般的な試薬とは逆に吸光度の大幅な減少が観測される⁸⁾。これは、余分な電子がポルフィン核に加わることにより、ポルフィン核の持つ 18π 電子共鳴系が乱されるためであると考えられる。吸光度の減少幅はモル吸光係数にして 30 万以上もあることから、ポルフィン核の外側に一般的な比色試薬と類似の発色団を付与することにより、Soret 帯の吸光特性を分析化学的に利用することを着想した。吸光度法による ALP 酵素活性の検出には一般に *p*-ニトロフェニルリン酸が用いられていることから、これと類似構造を有するポルフィリン TPPP_m (図 2) による検出が可能であると考えた。すなわち、ポルフィン核の外側のリン酸エステル基は ALP 酵素反応により加水分解が生じてヒドロキシル基になる。このヒドロキシル基がアルカリ性水溶液中においてキノイド構造となることから、ポルフィン核の 18π 電子系が乱されて Soret 帯の吸光度が減少する ($\Delta\epsilon_{\max} = 3.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ものと推定される。反応スキームと吸収スペクトル変化を図 3 に示す。

ALP の定量⁹⁾ : TPPP_m を用いる分析における ALP の検出限界 ($S/N=3$) は 0.08 ng/ml であった。また、EIA の併用により、肝臓疾患の指標であるヒト血清中

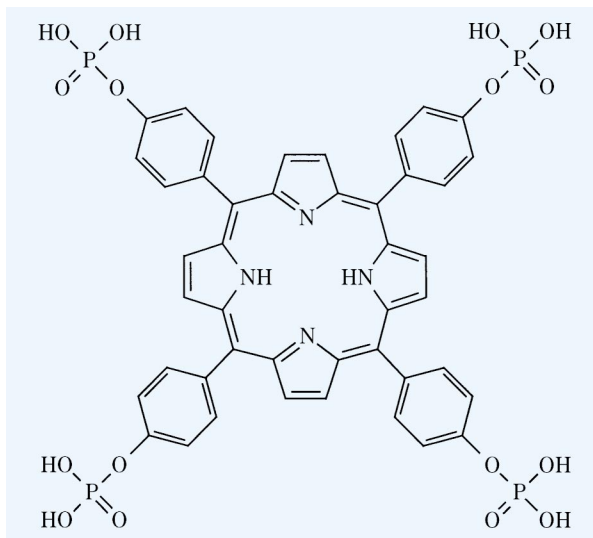


図 2 リン酸エステル基を有するポルフィリン (TPPP_m)

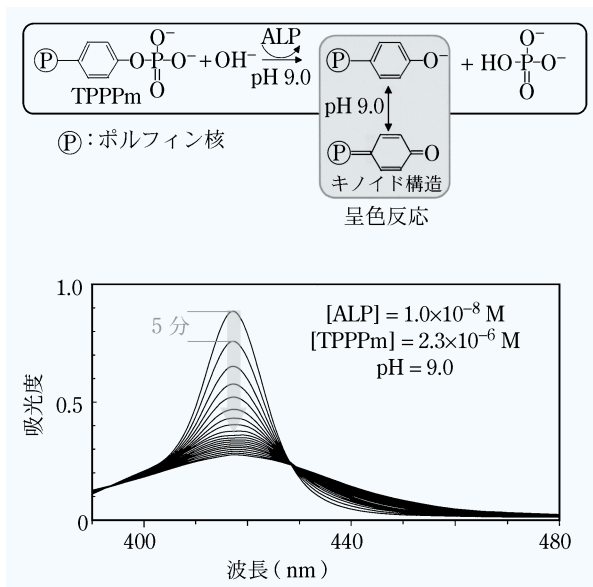


図 3 ALP 酵素反応における TPPP_m の発色機構と吸収スペクトル変化

表 1 ヒト血清中の α -フェトプロテイン (AFP) の定量

	AFP [ng/ml] (変動係数 ^{b)} , %)		
	サンプル A	サンプル B	サンプル C
TPPP _m	24.3(1.9)	116(1.3)	279(2.7)
標準法 ^{a)}	23.4(8.7)	121(4.2)	277(4.4)

a) メチルウンベリフェリルリン酸を用いる蛍光光度法
b) 10 回測定

の α -フェトプロテインの定量を行った (表 1)。本法は、標準法と比較しても変動係数は小さく高精度な方法である。

3・2 ポルフィリノーゲンを用いる HRP の分析

設計指針：ポルフィリノーゲンはポルフィリンの還元体の一つであり、生物学的にも合成化学的にもポルフィリンの前駆体として知られている。ポルフィリノーゲンは無色で可視領域に吸収を持たない。この分光学的特性は、ポルフィリンと全く対照的である。これまでポルフィリノーゲンの分析化学的応用が報告されていない理由もそこにあると考えられる。ここでは、HRP が 5,10,15,20-テトラヒドロテトラフェニルポルフィリノーゲン (TPPN) から 5,10,15,20-テトラフェニルポルフィリン (TPP) への酸化反応における触媒になるのではないかと考えた (図 4)。この着想に基づき、生成するポルフィリン TPP の増加量から生じる吸収スペクトル変化 (図 5) を利用して HRP の接触吸光分析法を設計した。

HRP の定量¹⁰⁾：定量操作において、TPP の吸収スペ

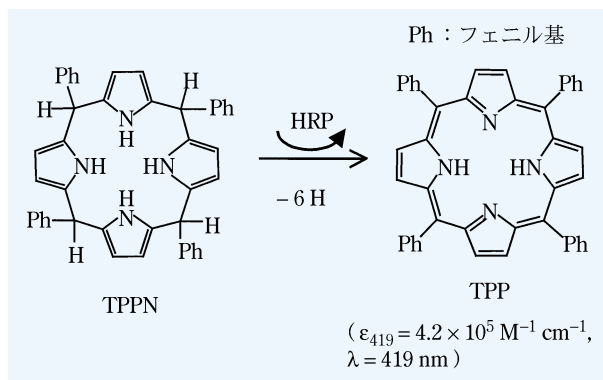


図 4 ポルフィリノーゲンからポルフィリンへの反応

クトルは極大吸収波長 419 nm で ϵ は $4.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であった。なお、TPPN から TPP への変換反応は 6 電子酸化反応である。これはゆっくりとした段階的な酸化反応ではなく、見かけ上、ほぼ 1 段階で TPP への反応が進むものと考えられる。HRP の定量範囲は 0.05 ~ 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、検出限界 ($S/N = 3$) は 29 ng/ml であった。また、変動係数は 3.19% (7 回測定) であった。この検量線の傾きから得られる本法の見かけのモル吸光係数は $2.1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であり、これは 30 分間で触媒としての HRP 1 分子が 50 分子の TPPN を TPP に変換したことに相当する。さらに、本法は反応開始剤や反応停止剤を必要としない簡便な操作を特徴として持っている。EIA の併用により、環境ホルモンの一つであるビスフェノール A の分析を行った。

4 化学増幅反応に基づく分析システム的设计

ここでは、化学増幅反応に基づく HRP の高感度・高精度分析システム及び簡易分析システムについて述べる。化学増幅反応モデルと特徴的な反応曲線を図 6 に示す。

4・1 通常の接触分析

分析対象である触媒が循環、再生して反応に関与し積算的な増幅が起こる化学反応が接触反応である。この接触反応の増幅作用を利用すると触媒の高感度分析が可能である。酵素反応では、酵素がこの触媒に相当する。接触反応の反応モデルと指示薬 (ポルフィリン等) に関する濃度-時間曲線を図 6(A) に示す。この接触反応では指数関数的な減衰や増加曲線を示し、分析対象の触媒の

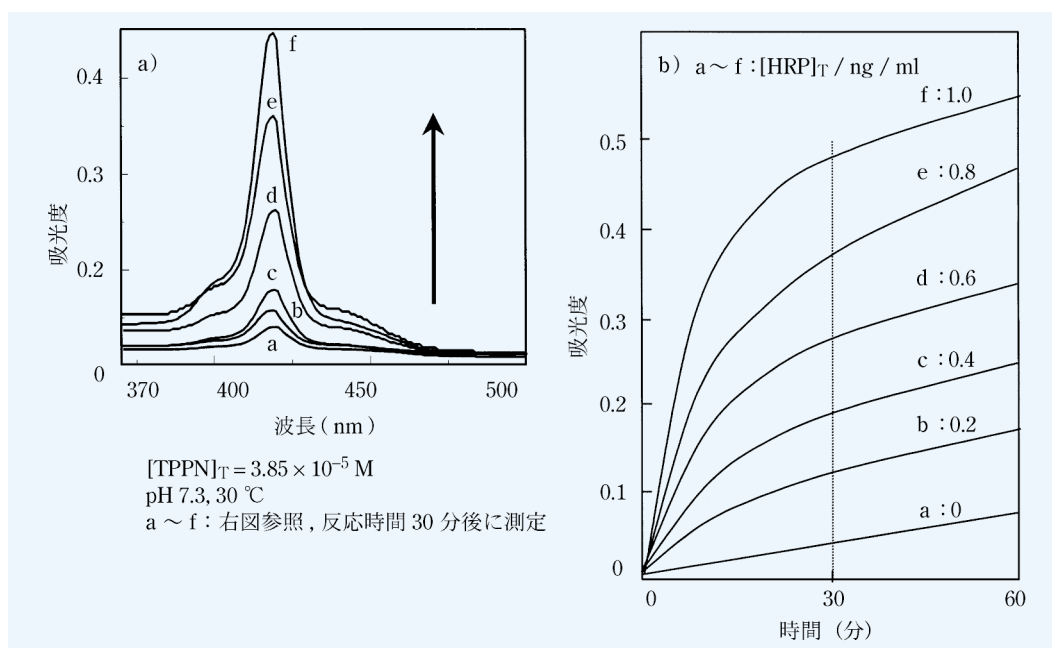


図 5 HRP 濃度の増加に伴う TPPN の吸収スペクトル変化と時間-吸光度曲線

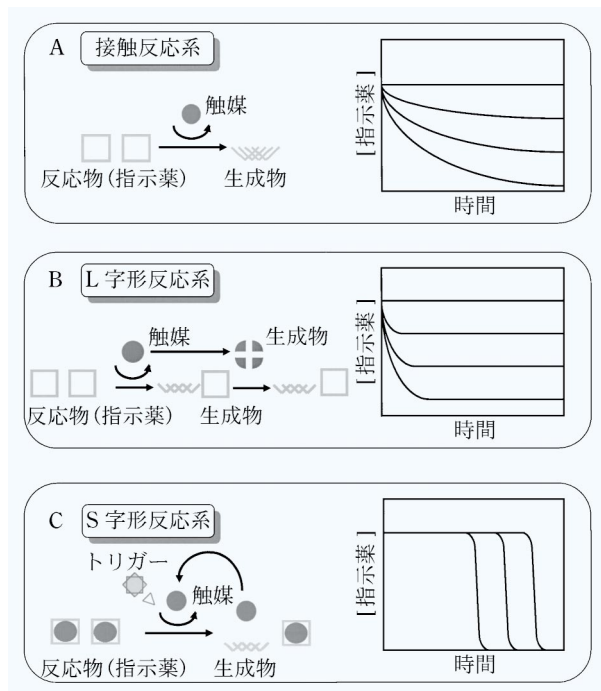


図6 化学増幅反応モデルと特徴的な反応曲線

濃度に応じて指示薬濃度が減少あるいは増加する。したがって、反応時間を一定にして指示薬濃度を測定する。

先に述べた 3・1 及び 3・2 の例は、このタイプの反応である。

4.2 L 字形反応曲線による HRP の接触分析

これまで、触媒の活性が低下することは、反応において障害と見なされてきた。しかし筆者らは、信号増幅とデータ処理の観点から、触媒が分解し、失活する反応を新しい分析システムの確立に用いることを着想した。

触媒および指示薬の同時分解反応の反応モデルを図 6 (B)(左) に示す。この反応は、接触反応の触媒が分解する反応である。指示薬濃度-時間曲線は図 6(B)(右) となる。この系では通常の接触反応系と同様に触媒作用による増幅作用が得られるのだが、指示薬と触媒が同時に分解するため、触媒の分解とともに反応は終了する。すなわち、触媒は指示薬を分解しながら自らも少しずつ分解してゆき、十分な増幅作用を示した後に役目を終えて自ら分解して反応を停止させる。これによって得られる指示薬濃度は時間的に安定な L 字曲線を示すことから、一般の接触反応系とは異なり時間の制約なしに触媒を分析することができる。

実際の指示反応：図 7 に示すように反応系として指示薬（水溶性ポルフィリン）、触媒（鉄-クロロフィリン錯体）および酸化剤（ペルオキシ-硫酸塩）の組み合わせによって L 字曲線が観測された¹¹⁾。

HRP の定量¹²⁾：反応系として指示薬（水溶性銅-フタロシアニン錯体）{ 図 8(a) }、触媒（HRP）および酸

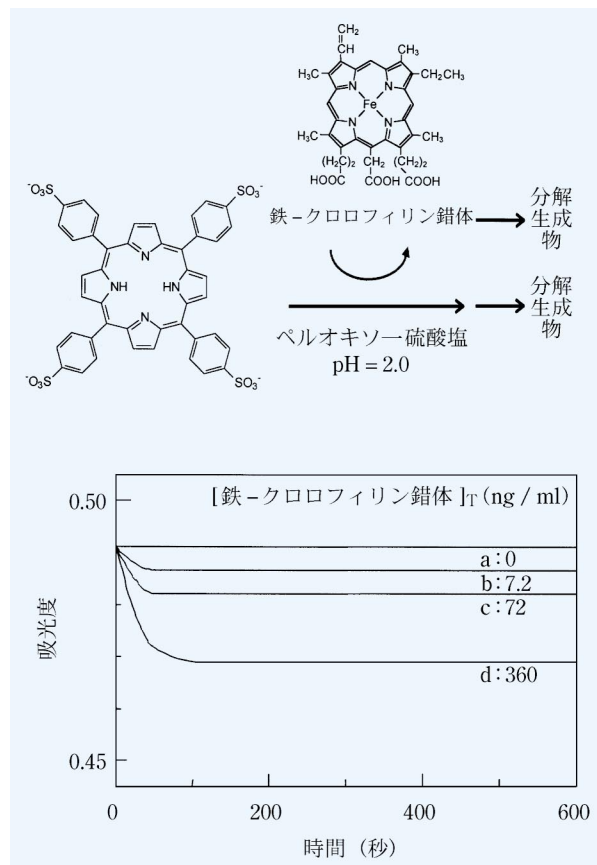


図7 L 字形反応と吸光度-時間曲線

化剤（ペルオキシ-硫酸塩）の組み合わせによっても L 字曲線は観測される。ポルフィリンの類縁体である水溶性銅-フタロシアニン錯体が選ばれた理由は、反応性の高い窒素原子をメソ位に有することから通常のパルフィリンと比較して酸化分解しやすいためである。フタロシアニンをういたことにより触媒の大きなターンオーバー数による高い化学増幅効果が得られ、HRP を高感度に分析することができる。

本法における HRP の定量範囲は 0.1 ~ 30 $\mu\text{g/ml}$ 、検出限界 ($S/N=3$) は 20 ng/ml 、0.5 $\mu\text{g/ml}$ における変動係数は 3.7% (10 回測定) の分析が可能であった。また HRP 0.5 $\mu\text{g/ml}$ における見かけのモル吸光係数は、 $5.80 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であった。この値は、5 分間における HRP 1 分子の銅-フタロシアニン錯体に対するターンオーバー数が約 120 であることを示した。また、HRP を標識とする EIA へと応用した。分析対象物として、ヒト血清中のインターロイキン 8 (hIL-8) の定量を行った。hIL-8 は免疫応答をつかさどるサイトカインの一種であり、生体内で好中球を活性化させ殺菌効果を高めるなどの役割を担った重要な物質である。

4.3 S 字形反応曲線による HRP の簡易目視定量

化学増幅反応の一つに自己触媒反応がある。自己触媒反応の反応スキームを図 6(C)(左) に示す。この反応

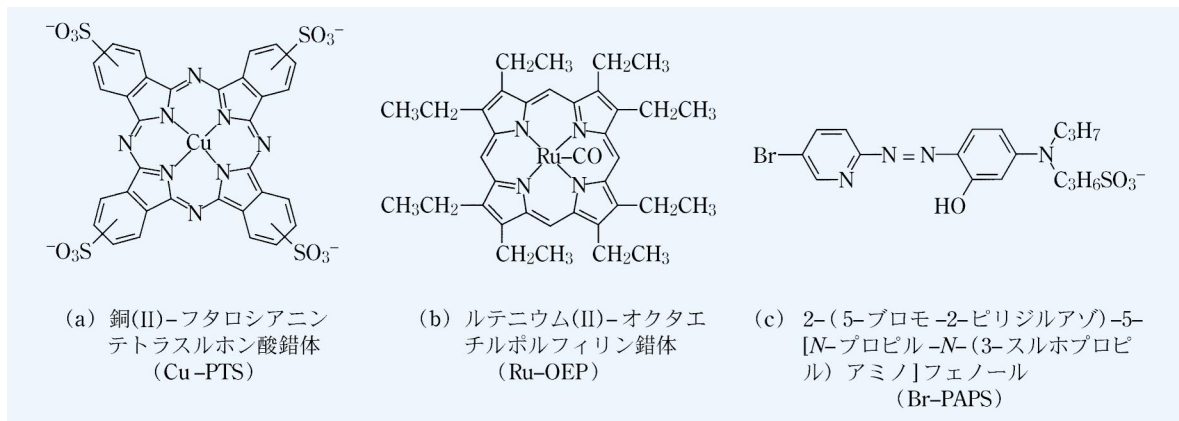


図8 化学増幅反応に用いられる金属錯体及び試薬の構造

は接触反応系の指示薬に、あらかじめこの反応自体の触媒を閉じ込めておくものである。ここに、触媒作用をもつ分析対象が外部から供給されることで初めて反応が開始される。最初の分析対象物が指示薬を分解すると、それに伴い指示薬に閉じ込められていた触媒が次々と系に放出される。それらの触媒はまた次の指示薬を分解して新たな触媒を放出させてゆき、触媒はネズミ算式に増加する。この反応の指示薬濃度-時間曲線を図6(C)(右)に示す。この自己触媒反応系では誘導期間を有する特徴的なS字曲線を示す。ここでは、誘導期間や半減期を測ることで、分析対象物である最初に添加された触媒の濃度を分析することができる。なお、最初に添加される分析対象物は、あらかじめ指示薬中に封じられている触媒と同一種である必要はない。分析対象物が最初に指示薬を壊す作用を有していればトリガー(引き金)物質として自己触媒反応を開始させることができるので、同様にS字曲線による分析が可能である。

自己触媒反応系のS字曲線は、触媒に対し原理上無限の感度を持つ。これは、誘導期間が異なるだけでS字曲線の形状には変化がなく、いかなる低濃度でも濃度によらず常に一定の信号強度で検出し、分析対象の触媒及びトリガーの濃度を時間に変換できることを意味している。

実際の指示反応：図6(C)に示す自己触媒反応モデルの研究の出発点は、金属-ポルフィリン錯体の分解反応の研究であった。ルテニウム-オクタエチルポルフィリン錯体{図8(b)}は、ルテニウム(II)イオンが触媒となり酸化剤の共存下で分解し、時間-吸光度曲線は特徴的なS字形曲線を示すことが見いだされた¹³⁾。その後、コバルト-フタロシアニンスルホン酸錯体/オキソコバルト(II)イオンの系¹⁴⁾、コバルト-5-Br-PAPS(2-(5-プロモ-2-ピリジルアゾ)-5-[N-プロピル-N-(3-スルホプロピル)アミノ]フェノール){図8(c)}錯体/ペルオキソ-硫酸塩/コバルト(II)イオンの系¹⁵⁾が相次いで報告された。筆者らは、コバルト-5-

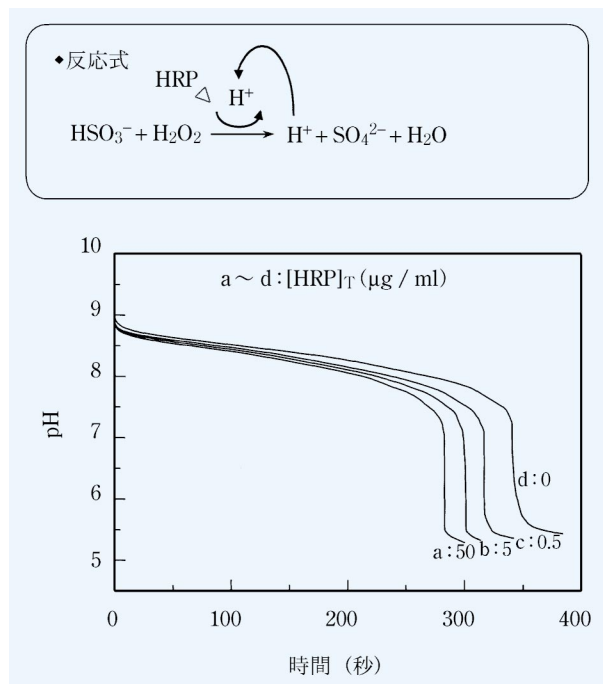


図9 HRP濃度を変化させた時のpH-時間曲線

Br-PAPS/ペルオキソ-硫酸塩の系においてトリガーとしてのHRPを定量した¹⁶⁾。また、次に述べるように、最近、亜硫酸塩の過酸化水素による自己触媒反応を利用してHRPの分析法が開発された。

HRPの定量¹⁷⁾：過酸化水素による亜硫酸イオンの硫酸イオンへの酸化反応は、反応生成物であるプロトンが反応の進行に関与する自己触媒反応である。この反応は、誘導期間と急激なpH変化を有する特徴的なS字形pH-時間曲線を示す。この反応においても、誘導期間は共存する微量のHRPの濃度に応じて変化する(図9)。先に挙げた反応と異なり、この反応においては反応終点での急激なpH変化が生じることから、高価な測定装置を用いなくともpH指示薬やpH試験紙によって視覚化が可能である。これらの知見により、安価な汎用

表2 ヒト血清中のTNF- α の目視定量

TNF- α [pg/ml]	時間 [秒]	変動係数 ^{a)} [%]
0	338	1.4
500	316	2.2
1000	301	2.5

a) 8回測定

試薬及びストップウオッチを使ったHRPの簡易目視定量法が確立された。

目視によるHRPの検量線の定量範囲は0.5~50 $\mu\text{g/ml}$ 、検出限界 ($S/N=3$) は40 ng/ml、変動係数3.4% (5回測定) であった。本法をHRPを標識とするEIAへと応用し、生体中の腫瘍壊死因子 (TNF- α) を目視定量した (表2)。本法は、96穴マイクロプレートリーダー吸光検出器 (コロナ電気^株製) を用いて、多検体同時検出が可能であることも確認されている。現状では、前述したポルフィリンを用いる方法より若干感度は劣るが、場所を選ばず、また特殊な装置を一切使用しない簡便なHRPの分析法である。

5 おわりに

本稿では、分子設計、分析システム設計の両面からポルフィリンの光機能、特にSoret帯における高感度吸光特性及び溶液内特性に基づいて、EIAと組み合わせた新しい酵素分析システムについて論じた。現在、市販されているエンザイムイムノアッセイキットのほとんどがALP及びHRPを標識酵素としており、臨床、薬品、食品及び環境等の試料中の数千にも及ぶ微量成分に対して、ポルフィリンを用いる分析システムが適用可能である。

巧妙な化学反応及び優れた生物現象や生体機能などの利用は、高価な機器分析法に優るとも劣らない、可能な限り簡易化された高感度かつ高選択的な高性能分析システムを生み出す可能性を秘めている。化学分析法の極限には、必ず発想の転換や高度な物質系が存在する。このような化学分析法の開発が、多様な領域で確固たる地歩を占め発展することを期待する。

文 献

- 1) 四ツ柳隆夫, 伊藤純一: 化学の領域, **31**, 146 (1977).
- 2) 石井 一: ぶんせき, **1981**, 865.
- 3) 五十嵐淑郎: ぶんせき, **1989**, 190.
- 4) 田端正明: ぶんせき, **1994**, 188.
- 5) 五十嵐淑郎: 分析化学 (分析化学総説), **46**, 1 (1997).
- 6) C. Matsubara, N. Kawamoto, K. Takamura: *Analyst* (London), **117**, 1781 (1992).
- 7) P. Tijssen (石川栄治監訳): “エンザイムイムノアッセイ (生化学実験法11)”. (1989), (東京化学同人); 前田昌子, 辻 章夫: ぶんせき, **1993**, 183.
- 8) 五十嵐淑郎, 橋本孝司, 松本好広, 四ツ柳隆夫: 分析化学, **32**, 591 (1983).
- 9) T. Kawakami, S. Igarashi: *Analyst* (London), **120**, 539 (1995).
- 10) A. Manaka, S. Igarashi: ICAS2001, Abstract, p. 210 (2001); 酒井睦子, 五十嵐淑郎: 第78回日本化学会春季年会予稿集, p. 200 (2000).
- 11) 高畑圭二: 博士学位論文 (茨城大学), (2000).
- 12) T. Takahata, K. Ohguchi, S. Igarashi: *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 1936 (1998).
- 13) 石原正仁: 博士学位論文 (東北大学), (1995).
- 14) M. Ishihara, M. Endo, S. Igarashi, T. Yotsuyanagi: *Chem. Lett.*, **1995**, 349.
- 15) M. Endo, M. Ishihara, T. Yotsuyanagi: *Analyst* (London), **121**, 391 (1996).
- 16) 高畑圭二, 五十嵐淑郎: 第13回生体成分の分析化学シンポジウム予稿集 p. 141 (1999).
- 17) A. Manaka, S. Igarashi: International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Abstract, p. 123 (2000).



五十嵐淑郎 (Shukuro IGARASHI)
茨城大学工学部物質工学科 (〒316-8511 茨城県日立市中成沢町4-12-1)。北海道大学大学院工学研究科博士課程修了。工学博士。現在の研究テーマ 超高倍率濃縮分離法および超高感度化学計測法の開発。
主な著書 “Advances in Multidimensional Luminescence”, (JAI Press INC.)
趣味 溪流釣り, 化学マジック。



川上貴教 (Takanori KAWAKAMI)
富山大学水質保全センター (〒930-8555 富山市五福3190)。茨城大学大学院理工学研究科博士後期課程修了。工学博士。現在の研究テーマ 環境計測法, 生体計測法, 超臨界二酸化炭素における分子設計。
趣味 圧力鍋を使った料理, ケーキ作り, 小鳥とのコミュニケーション。