

題目：A highly sensitive and rapid enzymatic method
using a biochemical automated analyzer to detect inorganic
pyrophosphate generated by nucleic acid sequence-based amplification

(邦題：Nucleic acid sequence-based amplification 反応生成物ピロリン酸の

高感度酵素的測定法の開発と生化学自動分析装置への応用)

保健医療学専攻・臨床検査学分野

学籍番号： 18S3006 氏名： 磯部 厚志

研究指導教員： 梅村 創 教授 (前任：大澤 進 教授) 副研究指導教員： 清宮 正徳 教授

キーワード：ピロリン酸、高感度酵素的測定法、生化学自動分析装置、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HPT)、2-ニトロソ-5-(N-プロピル-N-スルホプロピルアミノ)フェノール (Nitroso-PSAP)

【研究の背景と目的】 Polymerase chain reaction (PCR)法は、増幅した目的の DNA や RNA を検出する最も一般的な手法である。しかし、この検出には蛍光を検出する特殊な分析装置、手技の習熟、コスト、測定時間などが必要となり、一般病院の日常検査として普及していない。簡便な核酸の増幅法には、等温核酸増幅法の Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA)があるが、PCR と同様に蛍光プローブでの検出法を採用しており、専用の検出機器を必要するため、汎用性に乏しい。その他、核酸の増幅反応の生成物であるピロリン酸を利用する方法は、ルシフェラーゼ酵素を利用した蛍光検出法や電気化学的な手法で、汎用性や簡便性に乏しい。これらの課題を解決するため、今回、ピロリン酸の可視領域発色による高感度酵素的測定法を考案して NASBA 法に適用した。

【測定原理】 NASBA 法で生成するピロリン酸にヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HPT)を作用させ、ヒポキサンチンを生成した。さらに、ヒポキサンチンにキサンチンデヒドロゲナーゼ (XDH)を作用させ、生成した 2 モルの NADH の還元力で三価鉄イオンを 2 モルの二価鉄イオンとした。この二価鉄イオンとキレート試薬 2-ニトロソ-5-(N-プロピル-N-スルホプロピルアミノ)フェノール (Nitroso-PSAP) との錯体を発色させ、750nm の吸光度を測定した。

【方法】 10 $\mu\text{mol/L}$ のピロリン酸を標準液として、5 分以内に終点に達する HPT および XDH の至適酵素量、至適 pH、活性化剤の Mg イオン及び各種発色試薬の至適濃度を検討した。また、 $\beta\text{-NAD}^+$ 、イノシン-5'-1 リン酸、1-methoxy-PES、塩化鉄 (III)と配位子の酒石酸ナトリウムカリウム (酒石酸 Na・K)、Nitroso-PSAP の最適濃度条件を検討した。完成した試薬の測定条件を用い、生化学自動分析装置に適応し、その性能を検証した。10 $\mu\text{mol/L}$ のピロリン酸水溶液を 10 段階希釈した後、各濃度を 5 回測定し、直線性を確認した。3 濃度のピロリン酸水溶液を連続 20 回

測定し、日内再現性の変動係数 (CV) を算出した。2 濃度のピロリン酸水溶液を連続 20 日間 2 重測定し、日差再現性の CV を算出した。ピロリン酸を水解して測定する無機リン酸測定の比較対照法との相関分析では、0 から 10 $\mu\text{mol/L}$ のピロリン酸水溶液を 30 濃度用意し、本測定法と比較対照法で測定した。日立 7180 形自動分析装置の分析法は 2 ポイントエンド、測定波長 (主/副) は 750/600 nm、各検体量は試料/第一試薬/第二試薬は 10/110/60 μL 、反応温度は 37°C、測定時間は 10 分とした。生化学自動分析装置での性能検証後、NASBA 法を実施した検体を用いて、ピロリン酸濃度を測定した。

【結果】 緩衝液は、二つの酵素の至適 pH と二価鉄・Nitroso-PSAP 発色条件を考慮して、pH 8.0 の 50 mmol/L Tris-HCl とした。酵素反応が 5 分以内に終了する各試薬の終濃度は、HPT : 0.8 U/mL、XDH : 3.84 U/mL、 MgCl_2 : 0.5 mmol/L、 β -NAD⁺ : 8.0 mmol/L、イノシン酸-5'-1 リン酸 : 8.0 mmol/L、1-methoxy-PES : 2×10^{-3} mmol/L、 FeCl_3 : 0.2 mmol/L、酒石酸 Na · K : 0.4 mmol/L、Nitroso-PSAP : 0.8 mmol/L であった。生化学自動分析装置による妥当性評価において、10 $\mu\text{mol/L}$ のピロリン酸水溶液を 10 段階希釈した試料を測定した結果、0-10 $\mu\text{mol/L}$ の直線性を確認できた。低濃度 (2.27 $\mu\text{mol/L}$)、中濃度 (6.85 $\mu\text{mol/L}$)、高濃度 (8.70 $\mu\text{mol/L}$) のピロリン酸水溶液を試料とした日内再現性の CV は、それぞれ 1.76%、1.02%、0.57% であった。4.74 $\mu\text{mol/L}$ と 8.72 $\mu\text{mol/L}$ のピロリン酸水溶液を試料とした日差再現性の CV は、それぞれ 1.27% と 0.69% であった。無機リン酸測定の比較対照法と本測定法との相関性を確認した結果、回帰式 $y=0.938x-0.214$ 、Spearman の相関係数 $r=0.999$ であった。ヒト RNA 由来の β -アクチンを NASBA 法で増幅した試料の測定において、増幅時間とともにピロリン酸濃度の上昇し、比例性が認められた。

【考察】 ピロリン酸に特異的に作用し、PCR 法や NASBA 法の増幅反応の基質であるヌクレオチドのリン酸に作用しない酵素として HPT を見出し、本反応系の確立を試みた。酵素は種々の金属イオンで阻害を受けるが、採用した HPT は鉄イオンの影響を受けなかった。その結果、5 分以内に反応が終点に達するピロリン酸の可視部領域の高感度酵素的測定法を確立できた。本反応系は、生化学自動分析装置に適用可能であった。また、ヒト RNA 由来の β -アクチンを NASBA した試料でのピロリン酸濃度の測定が可能であった。NASBA 法は 41°C での等温核酸増幅法のため、検出用の酵素である HPT や XDH が失活せず、増幅と検出を 1 つの光学セルで実行できる可能性がある。本測定法は NASBA 反応の副生成物であるピロリン酸を特異的に測定するが、NASBA 反応の特異性を確保することが必要である。

【結語】 各種核酸バイオマーカーから生成される低濃度のピロリン酸を微量サンプルで高感度に測定できる酵素的測定法を確立し、生化学自動分析装置に応用した。本測定法は、日常臨床での核酸バイオマーカーの簡便、迅速かつ大量な測定に貢献できる。今後、この測定法を用いての疾患の診断が有用であるかを評価する。さらに、本法を小型光度計に適応し、POCT での利用を目指す。

【倫理上の配慮】 該当しない。ヒトや動物などの検体を対象とした実験を行っていない。