HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	リポソームに内封したペルオキシダーゼを触媒に用いるフルオレセイン化学発光による過酸化水素の定量
Author(s)	上舘, 民夫; 石田, 良樹; 谷, 博文 他
Citation	BUNSEKI KAGAKU, 54(6), 569-572 https://doi.org/10.2116/bunsekikagaku.54.569
Issue Date	2005-06
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/71714
Type	journal article
File Information	bunseki.54-569.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

BUNSEKI KAGAKU Vol. 54, No. 6, pp. 569–572（2005）

© 2005 The Japan Society for Analytical Chemistry

ノート

リポソームに内封したペルオキシダーゼを触媒に用いるフルオレセイン化学発光による過酸化水素の定量

上舘　民夫®[1]，石田　良樹[1]，谷　博文[1]，石田　晃彦[1]

Determination of Hydrogen Peroxide by Fluorescein Chemiluminescence Catalyzed with Horseradish Peroxidase Encapsulated in Liposome

Tamio KAMIDATE[1], Yoshiki ISHIDA[1], Hirofumi TANI[1] and Akihiko ISHIDA[1]

[1] Division of Molecular Chemistry, Graduate School of Engineering, Hokkaido University, Kita 13-Nishi 8, Kita-ku, Sapporo-shi, Hokkaido 060‐8628

(Received 14 December 2004, Accepted 17 March 2005)

Fluorescein (FL) and H_2O_2 rapidly permeated into the inner phase of liposome which trapped horseradish peroxidase (HRP), to initiate HRP-catalyzed FL chemiluminescence (CL) with H_2O_2. The CL intensity was dependent on the concentration of H_2O_2. The optimum conditions of charge-type, composition and diameter of liposome in the assay of H_2O_2 were determined by measuring the CL intensity, to be maximal under optimum conditions. Anionic liposome containing phosphatidylcholine, dimyristoyl-glycero-phosphocholine and cholesterol (Chol) was effective for enhancing the CL intensity and stability of liposome. The CL intensity decreased with an increase in the content of Chol in liposome. The optimal content of Chol was thus determined to be 10 mol%. The effect of the liposome size on the CL intensity was examined by preparing liposomes with a different diameter. The CL intensity increased with an increase in the diameter of liposome. The optimal diameter of liposome was thus determined to be 1000 nm. The logarithmic calibration curve of H_2O_2 was linear over the range from the detection limit of 4.0×10^{-8} M up to 1.0×10^{-5} M. When HRP trapped in liposome was used as a catalyst, the CL intensity was greater than that observed by using HRP dissolved in the bulk solution in the range of 4.0×10^{-7} M up to 1.0×10^{-5} M of H_2O_2.

Keywords : chemiluminescence; liposome; peroxidase; hydrogen peroxide; fluoresein.

1　緒　　言

リン脂質二分子膜から成るリポソームは数十～数百 nm の粒子径を有するナノ閉鎖小胞であり，その内水相に多数の分子を封入できる．そこで，近年，酵素を内封したリポソームを調製し，その内水相を酵素反応の場に応用する研究が多数報告されている[1]．Hill らはグルコースオキシダーゼ（GOD）を内封したリポソームの外水相にグルコースを加え，過酸化水素（H_2O_2）への変換速度を測定し，リポソーム内水相とバルク溶液における GOD の酵素活性の比較を行っている[2]．また，α-キモトリプシンを内封したリポソームの外水相に基質を加え，基質の分解速度からリポソーム内水相における酵素反応の速度論的な解析が行われている[3]．しかしながら，これまでに多くの酵素反応が分析法に利用されているが，それらの酵素反応をリポソームの内水相で行う試みはなされていない．

そこで，著者らはイムノアッセイにおいて広く標識体として用いられている西洋わさび由来のペルオキシダーゼ（horseradish peroxidase，HRP）を封入したリポソームを調製し，リポソーム内の HRP を直接的に化学発光（CL）

[1] 北海道大学大学院工学研究科分子化学専攻：060‐8628　北海道札幌市北区北 13 条西 8 丁目

法で検出することを試みた[4]．その結果，CL 試薬であるフルオレセイン（FL）と H_2O_2 がリポソーム膜を迅速に透過し，リポソームの内水相で HRP を触媒とする FL-CL 反応が進行することを見いだし，HRP の検出に応用した．

一方，臨床診断的に重要な生体分子の定量において，酵素反応を用いて生体分子を H_2O_2 に変換後，生成した H_2O_2 の測定から間接的に生体分子の定量が行われている．そこで本研究では，リポソームの微小空間における HRP を触媒とする FL-CL 反応を H_2O_2 の定量に応用するため，H_2O_2 の定量に適した HRP 内封リポソームの調製条件について検討を行った．

2 実　　験

2・1 試　薬

CL 反応にはウラニン（FL のナトリウム塩），H_2O_2 及び HRP（生化学用）を使用した．リポソームの調製にはホスファチジルコリン（PC），ジミリストイルホスファチジルグリセロール（DMPG）及びジステアリルジメチルアンモニウムクロライド（DSDAC）及びコレステロール（Chol）を用いた．pH 緩衝溶液の 3-モルフォリノプロパンスルホン酸（MOPS）は同仁化学研究所製を使用した．ポリエチレングリコールモノ-*p*-イソオクチルフェニルエーテル（トリトン X-100）はナカライテスク製液体シンチレーション用を使用した．

2・2 装　置

CL の測定には東北電子産業製の TD-3A を使用した．

リポソーム調製器は AVESTIN 製の LiposoFast^{TM}-BASIC を使用した．フィルターは AVESTIN 製ポリカーボネートフィルター（ポアサイズ 100，400 及び 1000 nm）を使用した．

誘導結合プラズマ（ICP）発光分析装置には島津製 ICPS-1000IV，超音波ネブライザーには同社製 UAG-1，オートサンプラーには同社製 AS-6 を用いた．

2・3 操　作

2・3・1 HRP 内封リポソームの調製　アニオン性リポソームの調製にはクロロホルムに PC，DMPG 及び Chol を溶解したものを母液として使用した．カチオン性リポソームの調製にはクロロホルムに PC，DSDAC 及び Chol を溶解したものを母液として使用した．脂質の全量は 40 μmol ml^{-1} とした．いずれの母液も −20℃ で保存した．クロロホルムは使用前にソニケーターを用いて十分に脱気を行った．

HRP 内封リポソームは前報に準じ，押し出し法によりリポソーム（vesicles by an extrusion techniqwue，VET）を調製した[5]．なお，ポアサイズ 1000 nm のフィルターで処理したリポソームを VET_{1000} と表記する．また，HRP 内封リポソームと未封入の HRP の分離も前報に準じて行った[5]．

2・3・2 H_2O_2 の CL 測定　CL の測定は以下の手順で行った．ガラスキュベットに HRP 内封リポソーム溶液 500 μl 及び FL 溶液 500 μl を入れた．次にインジェクターを用いて H_2O_2 溶液を 500 μl 注入して CL 反応を開始した．CL 応答曲線は記録計で記録した．なお，HRP を MOPS 緩衝生理食塩水（以下，緩衝溶液）に溶解した HRP 標準溶液を用いる場合には，HRP 内封リポソーム溶液の代わりに HRP 標準溶液 500 μl を用いた．添加する FL 濃度は 4.0×10^{-4} M とした[4]．なお，本文中の試薬濃度は初濃度で表示した．

3 結果及び考察

3・1 CL 応答に及ぼすリポソームの表面電荷の影響

HRP をリポソームに内封する際，表面電荷がカチオン性及びアニオン性のリポソームを用いることができる．そこで，PC，DMPG 及び Chol のモル比が 7 : 1 : 2 になるようにクロロホルムに溶解し，アニオン性の HRP 内封リポソームを調製した．また，PC，DSDAC 及び Chol のモル比が 7 : 1 : 2 になるようにクロロホルムに溶解し，カチオン性の HRP 内封リポソームを調製した．また，アニオン性リポソームをトリトン X-100 で溶解後のバルク溶液中の HRP 濃度（1.6×10^{-6} M）に等しい濃度の HRP を緩衝溶液に溶解した HRP 標準溶液も調製した．

それぞれの溶液に 4.0×10^{-4} M FL 及び 4.0×10^{-5} M H_2O_2 溶液を加え，CL 応答曲線を測定した．Fig. 1 の CL 応答曲線から，FL 及び H_2O_2 が迅速にリポソーム膜を透過することが分かる．また，最大の発光量を CL 強度とすると，HRP 標準溶液の CL 強度と比較して，HRP 内封リポソームの内水相を反応場に用いたほうが CL 強度は著しく増大した．リポソーム内水相における CL 反応において CL 強度が増大する原因として，以下の理由が考えられる．いま，同一のモル数の HRP がバルク溶液に均一に分散している場合と，リポソームに封入されている場合を比較すると，リポソーム内に封入されているほうが HRP 濃度は局所的に増大する．また，HRP 濃度が高いほど CL 強度は増大する[4]．したがって，リポソーム内水相の CL 反応における CL 強度の増大は，HRP の局在化による効果が考えられる．また，そのほかにリポソーム内での HRP 活性の向上あるいは発光化学種の蛍光量子収率の増大などが考えられるが，詳細については現在のところ不明である．

次に，カチオン性リポソームを用いたほうが CL 強度が増大した原因として，以下の理由が考えられる．FL のモノアニオン化学種（FLH^-）からジアニオン化学種（FL^{2-}）への酸解離定数（$FLH^- \; FL^{2-} + H^+$）は $pK_a = 6.4$ である

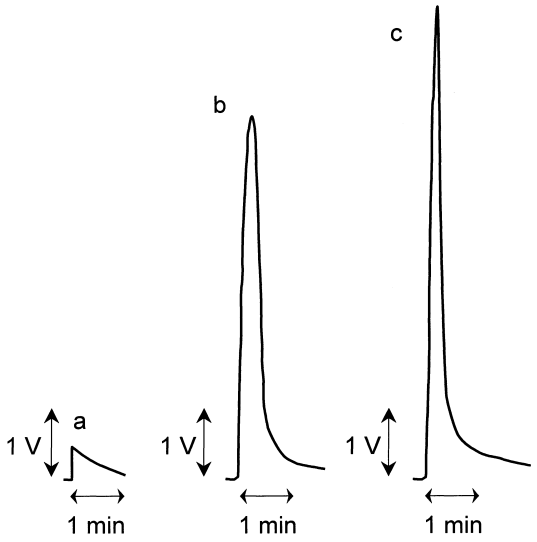


Fig. 1　Effect of charge-type of VET_{1000} on CL response curves observed in (a) HRP standard solution, (b) HRP-encapsulated anionic liposome suspensions and (c) HRP-encapsulated cationic liposome suspensions

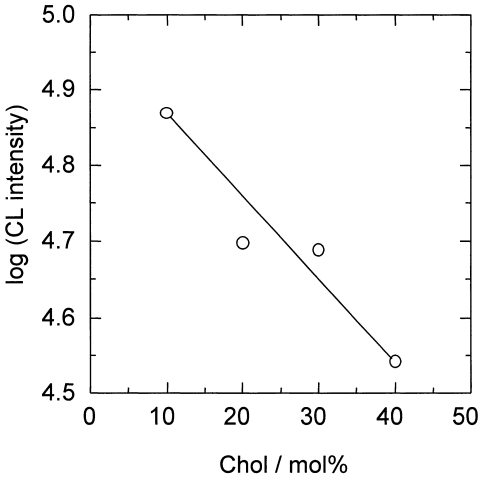


Fig. 2　Effect of cholesterol concentration on CL intensity

ことから[8]，CL反応のpH条件において，CL反応に関与するモノアニオン化学種が約20% 溶解していることになる．したがって，カチオン性リポソームの表面においてFLH^-との間で静電的な相互作用が起こり，リポソーム表面においてFLH^-濃度が増大し，FLH^-の膜透過が促進されるために，アニオン性リポソームと比較してCL強度が増大したものと考えられる．

なお，カチオン性リポソームを用いた場合，アニオン性リポソームを用いた場合よりCL強度は増大したが，調製後約2日で沈殿を生じた．一方，アニオン性リポソームは調製後1週間以上経過しても沈殿せず，保存安定性がよかった．したがって，以降の実験ではアニオン性リポソームにHRPを内封することにした．

3･2　CL強度に及ぼすリポソーム中のコレステロール含量の影響

Cholはリポソームの安定性を向上させることから，リポソームの膜構成成分として一般的に用いられている．一方，Cholはリポソームの膜流動性にも影響を与えることが知られている．したがって，Chol含量はFL及びH_2O_2の膜透過速度に影響を与え，その結果，CL強度に影響を及ぼすことが考えられる．そこで，CL強度に及ぼすリポソーム膜中のChol含量の影響を検討した．DMPGの組成を10% 一定とし，PC及びCholのモル比を変化させることにより，Chol含量が10～40% のVET_{1000}を調製した．なお，Chol含量が10～40% の範囲でHRPの保持効率は30% でほぼ一定であった（変動係数: 4%）．

それぞれのChol含量のHRP内封リポソーム溶液に，4.0×10^{-4} M FL及び4.0×10^{-5} M H_2O_2溶液を加えてCL応答曲線を測定した．Chol含量が増大するに従ってCL応答速度は減少し，発光量がCL強度の半分の値までに減衰する時間はChol含量が40% の場合，10% の場合と比較して約1.5倍増大した．また，Fig. 2に示すように，Chol含量が増加するに従ってCL強度も減少した．

Chol含量が増大するに従ってCL強度が減少する理由は次のように説明される．Chol含量が増大するに従って，リポソームの膜構成成分であるPC及びDMPGの炭化水素鎖とCholとの疎水性相互作用が増大する[9]．その結果，膜の流動性が低下してFL及びH_2O_2の膜透過速度が減少し，そのためCL強度が減少したと考えられる．

以上の結果から，アニオン性リポソームを調製する際の最適なChol含量は10% とし，PC，DMPG及びCholのモル比は8 : 1 : 1とした．

3･3　CL強度に及ぼすリポソームサイズの影響

粒子径が異なるVET_{100}, VET_{400}及びVET_{1000}を調製した．PC，DMPG及びCholのモル比は8 : 1 : 1とした．なお，VET_{100}，VET_{400}及びVET_{1000}のHRPの保持効率はほぼ一定（変動係数: 5.6%）であった．

それぞれのHRP内封リポソームを含む溶液に4.0×10^{-4} M FL及び4.0×10^{-5} M H_2O_2溶液を加え，CL応答曲線を測定した．VET_{1000}とVET_{400}ではH_2O_2を注入後，発光量は数秒で最大となり，その後，徐々に減少して約90秒ほどでCL反応は完了した．一方，VET_{100}ではH_2O_2を注入後，発光量は約30秒で最大となり，その後徐々に減少して，約3分ほどでCL反応は完了した．VET_{100}を用いたときのCL強度に対する相対強度比はVET_{400}で1.4，VET_{1000}で1.5となり，リポソームサイズが大きくなるほ

どCL強度は増大した．したがって，VET_{1000}を最適リポソームサイズとした．

リポソームサイズによってCL強度が異なるのは，リポソームの直径が大きくなるほどリポソームの曲率が増大し，リン脂質とコレステロールの疎水性相互作用が弱まるため，FLあるいはH_2O_2の膜透過性が増大したためと考えられる．

3・4 H_2O_2の検量線の作成

最適条件で調製したHRP内封リポソームを用いてH_2O_2のCL応答曲線を測定し，log-logプロットにより検量線を作成した．定量下限の4.0×10^{-8} Mから1.0×10^{-5} Mの範囲において，H_2O_2濃度とCL強度との間に良好な直線関係が得られた．なお，H_2O_2を含まない空試験溶液のCL強度を測定し，その標準偏差の3倍のCL強度を与えるH_2O_2濃度を定量下限とした．検量線の回帰式は$y=0.888x+9.09$，相関係数は$r^2=0.990$であった．各H_2O_2において3回の繰り返し測定を行い，H_2O_2の全濃度範囲における変動係数の平均は6.5%であった．

次に，HRP標準溶液を用いてH_2O_2の検量線を作成した．log-logプロットにおいて，定量下限の4.0×10^{-9} Mから1.0×10^{-5} Mの濃度範囲でH_2O_2濃度とCL強度との間に良好な直線関係が得られた．検量線の回帰式は$y=0.364x+5.52$，相関係数は$r^2=0.996$であった．各H_2O_2において3回の繰り返し測定を行い，H_2O_2の全濃度範囲における変動係数の平均は8.2%であった．

H_2O_2濃度が4.0×10^{-7} M以上になると，HRP内封リポソーム系のほうがHRP標準溶液系よりCL強度は増大した．一方，H_2O_2濃度が4.0×10^{-7} M以下では逆にHRP標準溶液系のほうがCL強度は大きくなり，H_2O_2の定量感度は約10倍向上した．この原因は次のように考えられる．リポソームの内水相でCL反応を行った場合，添加したH_2O_2の一部しかリポソーム内に分配されない．したがって，HRP内封リポソーム系の場合，CL反応に関与するH_2O_2量はHRP標準溶液系より減少することが考えられる．そのため，HRP内封リポソーム系におけるH_2O_2の定量下限がHRP標準溶液系より高濃度になったものと考えられる．

4 結　　言

リポソームの微小空間におけるHRPを触媒とするFL-CL反応をH_2O_2の定量に応用するため，H_2O_2の定量に適したHRP内封リポソームの調製条件について検討を行った．その結果，HRPを封入するリポソームとしては，アニオン性の構成成分を含み，Chol含量は10%で，1000 nmのポアサイズのフィルターで処理したリポソームが有効であることが分かった．また，リポソーム内水相を反応場に利用したFL-CL反応においても，CL強度はH_2O_2濃度に比例することから，H_2O_2の定量に応用できることが明らかになった．

本研究は文部科学省科学研究費補助金基盤（B）(2)（課題番号15350038）の助成を受けて行った．

文　　献

1) P. Walde, S. Ichikawa: *Biomol. Eng.*, **18**, 143 (2001).
2) K. J. Hill, M. Kaszuba, J. E. Creeth, M. N. Jones: *Biochim. Biophys. Acta*, **1326**, 37 (1997).
3) M. Blocher, P. Walde, I. J. Dunn: *Biotech. Bioeng.*, **62**, 36 (1999).
4) T. Kamidate, Y. Ishida, H. Tani, A. Ishida: *Chem. Lett.*, **32**, 402 (2003).
5) T. Segawa, A. Kakizaki, T. Kamidate, H. Watanabe: *Anal. Sci.*, **8**, 785 (1992).
6) B. B. Kim, V. V. Pisarev, A. M. Egorov: *Anal. Biochem.*, **199**, 1 (1991).
7) R. C. MacDonald, R. I. Macdonald, B. P. H. Menco, K. Takeshita, N. K. Subbarao, L. Hu: *Biochem. Biophys. Acta*, **1061**, 297 (1991).
8) T. Segawa, H. Ishikawa, T. Kamidate, H. Watanabe: *Anal. Sci.*, **10**, 589 (1994).
9) M. C. Blok, L. L. M. Van, J. D. E. Gier: *Biochim. Biophys. Acta*, **464**, 509 (1977).