

マイクロプレート固相化ビオチン-HRP 標識アビジン 競合法による血清ビオチンの定量法

山口 昭弘 西尾香奈子 水嶋 好清 福士 勝
阿部 克己 菊地由生子 高杉 信男

要 旨

ビオチンとアビジンとの特異結合を利用した簡便、迅速な血清ビオチンのマイクロプレート比色法を開発した。ペルオキシダーゼ標識アビジン (AV-HRP) を試料中ビオチンとマイクロプレート固相化ビオチニルIgG (B-IgG) との間で競合させ、固相に結合したAV-HRPの量をペルオキシダーゼ発色系で測定する方法で、さらに、タンパク結合性、非結合性ビオチンの分別定量を目的として、血清の直接測定 (Direct assay) に加え、分画分子量10,000カットのフィルターを用いた血清ろ液についての測定 (Filtrate assay) についても検討した。本法の定量範囲は、0.1~1.0ng/mlであり、再現性はこの範囲内で変動係数3.3~13.7%と良好であった。しかし、血清への添加回収率はDirect assayで32~64%、Filtrate assayで60~100%と非定量的であり、ビオチンの存在形態あるいは他の血清成分による影響が示唆された。

1. 結 言

ビオチン (ビタミンH) は生体内炭酸固定化反応に関与する4種のカルボキシラーゼの補酵素として、脂質、糖質代謝などに重要な働きを持つ物質である¹⁾。ビオチンの欠乏状態としては、生卵白中に含まれるアビジンの大量摂取によるビオチン吸収障害が最もよく知られており、全身の皮膚炎の出現と嘔吐、食欲不振をきたす。また、最近では、タンパク質の異化過程で、ビオチニルペプチドから遊離ビオチンを生成再利用する酵素、ビオチニダーゼの欠損症²⁾が数多く発見され、病態解析が進んできたことも加わり、ビオチン欠乏状態への関心が高まりつつある。

一方、血清ビオチンの定量法としては、従来、ビオチン要求性の乳酸菌を用いた比濁法^{3,4)}、あるいは寒天プレート法⁵⁾が一般的に用いられてきたが、これらバイオアッセイではアッセイ系の不安定性に加え、定量値自体がビオチン欠乏状態を正確に反映しないなどの問題点が指摘されてきたことから、近

年は、アビジンとビオチンの強力な特異結合 (解離定数 $10^{-15}M$) を利用した方法がいくつか開発されてきている。しかし、これらの方法は、ラジオアイソトープで標識したビオチンあるいはアビジンを用い、固相担体としてはセルロースディスク^{6,7)}や抗アビジン抗体⁸⁾を用いており、操作性とラジオアイソトープ使用の制限を受けることになる。そこで、我々は、酵素標識アビジンを用い、さらに操作性、検体処理能力を高めるため、B-IgGをマイクロプレートに固相化したマイクロアッセイ系の開発を行った。これに加え、分子量10,000カットの遠心式簡易限外ろ過ユニットを用いて、タンパク結合性および非結合性血清ビオチンの分別定量を試みた。

2. 方 法

2-1 試 薬

B-IgG, AV-HRPはVector社製、BSAはSigma社製のFraction V、ペルオキシダーゼ発色試薬はフナコシ社のPeroxidase substrate ABTS kit

を使用した。B-IgGはPBSで0.5 μ g/ml, AV-HRPはPBS-0.1%BSAで0.1 μ g/mlの濃度に、それぞれ5mg/mlの原液から希釈し調製した。ビオチンの標準溶液は、ビオチン(和光純薬製)100 μ g/mlの50%エタノール溶液原液からPBSで希釈し、0.05~1ng/mlの検量線用溶液を作製した。

2-2 器具および装置

血清の限外ろ過は遠心式の簡易限外ろ過ユニット Millipore社製 Ultrafree C3GCを用いた。また、競合反応後のマイクロプレート洗浄装置は Inter Med社製 NK-300型、比色用マイクロプレートリーダは Inter Med社製 NJ-2000型を用い、ABTSの414nmの発色を490nmを対照として吸光度を測定した。

2-3 B-IgG固相化マイクロプレートの作製

マイクロプレート(MS-3596FA, 住友ベークライト製)の各ウェルに、0.5 μ g/ml B-IgG PBS溶液200 μ lを分注し、25 $^{\circ}$ Cで一晩放置した後、溶液をPBS-1%BSA溶液200 μ lに置換し、2時間以上放置後を使用した。マイクロプレートは4 $^{\circ}$ Cで保存し、少なくとも3カ月は使用可能であった。

2-4 測定原理および操作

測定原理を図1に操作を図2に示した。前処理として血清中のビオチニダーゼにより、固相のB-IgGからビオチンが遊離されてくるのを防ぐた

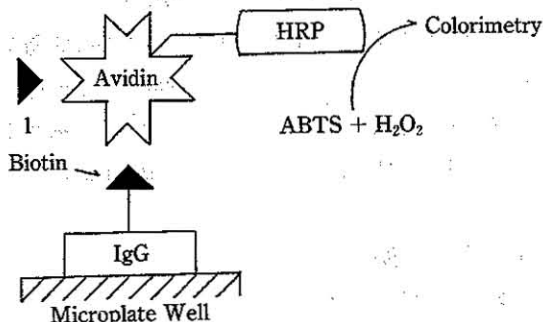


Fig.1 Microassay for Serum Biotin using Competitive Reaction with Solid-Phase Biotin and Peroxidase-Avidin

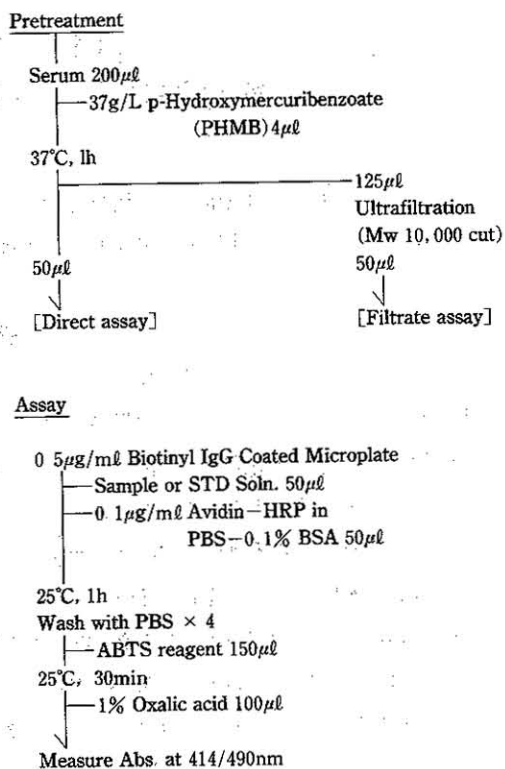


Fig.2 Procedure for Microassay

め、血清をビオチニダーゼの阻害剤 p-Hydroxymercuribenzoate (PHMB) で不活化処理を行った後、直接あるいは限外ろ過したる液をB-IgG固相化マイクロプレートに取る。次に、AV-HRP溶液を加え、25 $^{\circ}$ C、1時間の競合反応を行った後、PBSで4回洗浄し、固相に結合しなかったAV-HRPを除く。ABTS発色試薬を加え、25 $^{\circ}$ C、30分インキュベート後、1%シュウ酸溶液で反応を停止し、吸光度を測定する。

3. 結果

3-1 B-IgGおよびAV-HRP濃度の影響

マイクロプレート固相化に用いるB-IgG濃度および競合反応時のAV-HRP濃度の影響について調べたところ、両者とも濃度の増大に伴い全体に吸光度値の増大が認められたが、測定レンジおよびバックグラウンド値を考慮し、B-IgGは0.5 μ g/ml、

AV-HRPは0.1 μ g/mlとした。

3-2 検量線および再現性

ビオチン標準溶液による検量線を図3に、各測定点におけるCV値を血清の測定結果とともに表1に示した。標準溶液のビオチン濃度0.1~1ng/mlの範囲でCV値は3.3~13.7%, また、実際の血清試料においてもDirect, Filtrate assayで、それぞれ4.5, 10.5%と良好な再現性が得られた。上記の測定範囲を超えた試料についてはPBSで測定範囲内に希釈後、測定した。

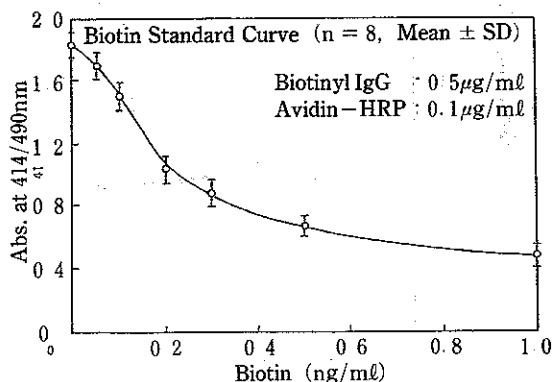


Fig. 3 Calibration Curve from Biotin Standard Solution

Table 1 Reproducibility in Biotin Microassay for Standard Solution and Serum Sample

Sample (n = 8)	Assay	Measured Biotin (ng/ml)		
		Mean	SD	CV (%)
STD Soln. 0.05*	Direct	0.083	0.021	24.9
0.1	Direct	0.116	0.016	13.7
0.2	Direct	0.210	0.007	3.3
0.3	Direct	0.322	0.012	3.6
0.5	Direct	0.530	0.021	3.9
1.0	Direct	1.02	0.094	9.2
Serum	Direct	0.294	0.013	4.5
	Filtrate	0.180	0.019	10.5

*Biotin (ng/ml)

3-3 添加回収率

ビオチンを血清に直接添加し、Direct, Filtrate assayを行った結果と血清をあらかじめろ過して得られたろ液に添加したときの結果を表2に示した。いずれの場合も低濃度域で定量的な回収率は得られていないが、ビオチン添加量の増大(0.1~0.5ng/ml)に伴い、血清直接添加のDirect assayでは32~64%の範囲で一定の傾向が得られなかったのに対して、血清直接添加のFiltrate assayおよびろ液への添加の場合は、それぞれ60~100%および50~104%と回収率の増大を示した。

Table 2 Recovery of Biotin from Serum Samples (n = 2)

Biotin Added (ng/ml)	Added to Serum				Added to Filtrate*	
	Direct assay		Filtrate assay		Found (ng/ml)	Rec. (%)
	Found (ng/ml)	Rec. (%)	Found (ng/ml)	Rec. (%)		
0	0.280	-	0.144	-	0.166	-
0.1	0.344	64	0.204	60	0.216	50
0.2	0.344	32	0.299	78	0.295	64
0.5	0.566	57	0.642	100	0.688	104

*Serum ultrafiltrate (Mw 10,000 cut)

3-4 血清希釈試験

血清を直接PBSで希釈し、Direct, Filtrate assayを行った場合と限外ろ過ろ液をPBSで希釈したときの結果を図4に示した。いずれの場合も8倍希釈までは直線性を示すものの、原点を通らず比例関係は得られなかった。

3-5 DirectおよびFiltrate assay間の相関

同一血清試料に対するDirect, Filtrate assay測定値間の相関を図5に示したが、相関係数は0.573 (n = 24) と危険率1%で有意の正の相関が認められた。

3-6 試料保存の影響

血清を-30, 4°Cで保存したときの経時変化を図6に示した。いずれの保存条件においてもFiltrate

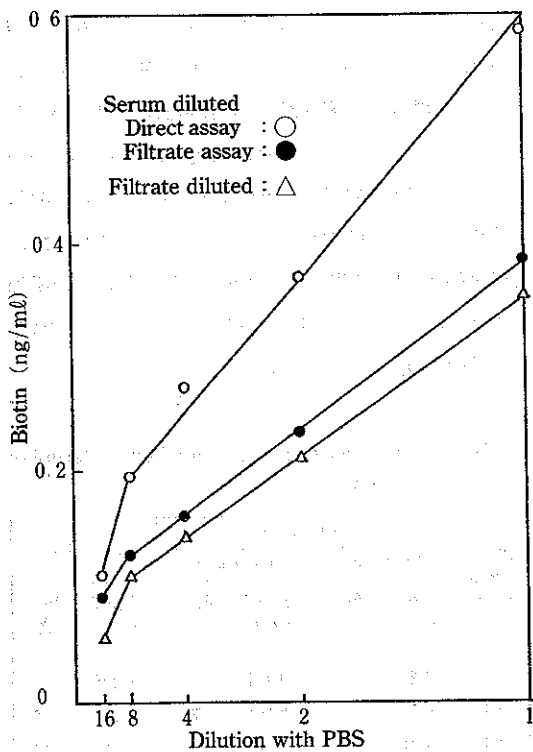


Fig. 4 Serum and Serum Filtrate Dilution Test

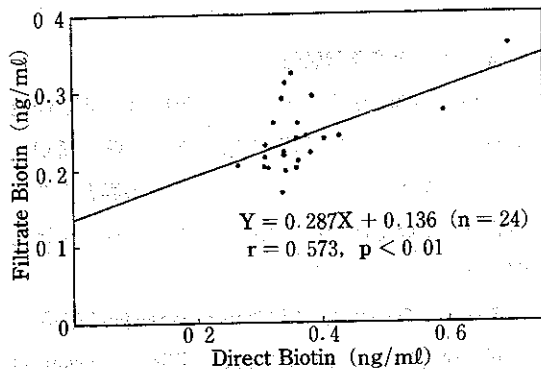


Fig. 5 Correlation of Biotin Concentrations in Direct and Filtrate Assays

assay の値は 16 日後も、ほとんど変化しなかったのに対し、Direct assay の値は経時的に減少を示し、16 日後には採血直後の値の約 50% に低下した。

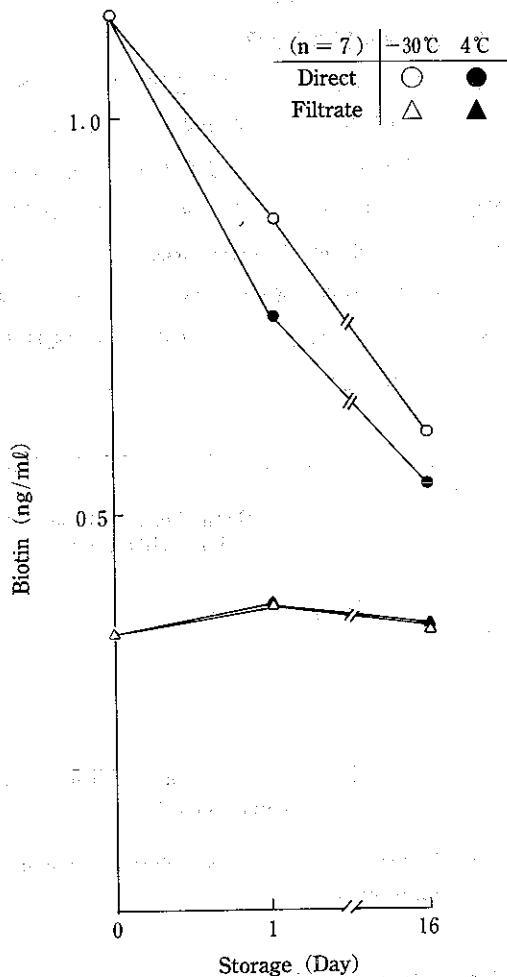


Fig. 6 Effect of Serum Storage

3-7 血清と血漿の測定値およびバイオアッセイ法との比較

同時に採血した血液から得られた血清と血漿（ヘパリン添加）の測定結果を乳酸菌寒天プレート法⁵⁾による血漿の測定結果とともに表 3 に示した。ピオチンは Direct, Filtrate assay いずれの値も血清の方が血漿よりも明らかに高値を示し、また、血清の Direct assay では、試料ごとに大きなバラツキが認められた。

一方、乳酸菌寒天プレート法については、バイオアッセイ法によるピオチン測定の前処理法として、

Table 3 Comparison of Biotin Concentration between Microassay and Bioassay

Sample	Microassay				Bioassay	
	Direct		Filtrate		Plasma	
	Serum	Plasma	Serum	Plasma	Hydrolyzed	Direct
1	0.837	0.430	0.411	0.291	3.62	18.6
2	0.756	0.337	0.384	0.317	2.06	18.6
3	2.50	0.425	0.450	0.140	2.23	18.6
4	1.18	0.378	0.330	0.195	2.59	20.0
5	1.05	0.257	0.416	0.199	2.59	21.5
6	0.487	0.227	0.334	0.198	3.02	17.2
7	0.582	0.408	0.371	0.278	2.24	13.8
Mean	1.03	0.350	0.390	0.234	2.62	18.3
SD	0.40	0.076	0.043	0.060	0.54	2.4

Concentration unit : ng/ml

一般的に用いられている硫酸加水分解を行った値と、血漿を無処理のまま直接測定した値と比較した。血漿の硫酸加水分解による測定値は2.62ng/mlに対し、無処理で直接測定した値は18.3ng/mlと無処理の方がかなり高い値を示し、本法によるDirect, Filtrate assayの定量値との比較においては1~2桁近い大きな相違を示した。

3-8 血清試料の測定結果

乾癬あるいは掌蹠膿疱症の見られる皮膚疾患患者血清10例および正常人16例の測定結果を図7に示

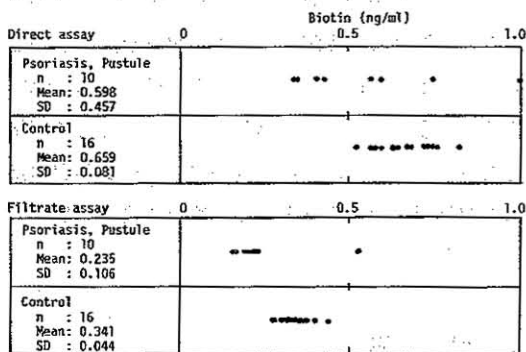


Fig 7 Serum Biotin level in Psoriasis and Pustule Patients

した。皮膚疾患患者血清のビオチン濃度の平均±SDはDirectおよびFiltrate assayでそれぞれ、0.598±0.457ng/mlおよび0.235±0.106ng/mlに対し正常群では0.659±0.081ng/mlおよび0.341±0.044ng/mlとDirect assayでは両群に差は認められなかったが、Filtrate assayでは皮膚疾患患者群で低値を示した。

4. 考 察

アビジンとの特異結合を利用したビオチンの測定法は、ホルモンなどの生体試料の測定に、広く用いられている抗原抗体反応を利用したイムノアッセイと原理的には全く同じであると言える。イムノアッセイの主流がラジオアイソトープ標識から酵素標識に移り、さらに、固相担体としてマイクロプレートを用いる Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) が開発されてきたのと同様に、今回、我々が検討したビオチンの測定法は、ラジオアイソトープ標識、試験管サイズの反応をマイクロプレート固相化ビオチンと酵素標識アビジンを用いることにより、ELISA 的な測定を可能としたものである。Hansen ら⁹⁾は、このようなラジオアイソトープと抗原抗体試薬を用いない方法を Enzyme-Linked Ligand Sorbent Assay (ELLSA) と呼び、葉酸の定量に応用している。

本法のビオチン定量範囲は0.1~1ng/ml (図3)と血清試料の測定に対し感度的に十分であり、再現性(表1)も実用上問題ないと思われる。また、ラジオアイソトープ標識を用いた、アビジン競合法による最近の報告⁸⁾(Direct assayに相当)では、正常人(n=51)の血清ビオチンの範囲は0.1~0.84ng/ml、平均値は0.34ng/mlと、本法のコントロール群(n=16)のDirect assay(範囲:0.528~0.820ng/ml、平均値±SD:0.659±0.081ng/ml)およびFiltrate assay(範囲:0.273~0.448、平均値±SD:0.341±0.044ng/ml)による値とおおむね良い一致を示している。

しかし、添加回収率、希釈試験については、定量性が得られておらず(表2, 図4), 血清中の他の成分による妨害, あるいはビオチンの存在形態による影響を受けているものと考えられる。特に血清ビオチンは、遊離状態では存在せず, そのほとんどがタンパク質と結合した状態で存在すると言われており¹⁾, 限外ろ過による前処理を検討した目的の一つも, タンパク結合性および非結合性ビオチンの分別定量にあったわけである。しかし, ビオチンのウレイド環の認識に基づくアビジン-ビオチンの結合力および反応速度は, ビオチンのカルボキシル基の修飾により影響を受けることが知られており¹⁰⁾, 今回の条件で, ビオチンとリジンのペプチド化合物であるビオシチンについては, ビオチンと同じ力価で測定されることは確認しているが, より分子量の大きいペプチドあるいはタンパク質と結合して存在するビオチンがどの程度測定されてくるのか, あるいは全く測定されないのか, 明らかではない。ただ, 立体障害による影響により, 真のビオチン量よりも低値を示すことは確かであると考えられる。このことは, 添加回収試験の血清直接添加 Direct assay において, ビオチン添加量の増大に係わらず回収率が低値のままであったことから推察される。従って Direct assay の測定値は, かなり不明確な値と言わざるを得ないが, タンパク結合型を含めた総ビオチンの大まかな推定値となる可能性はあると考えられる。また, Filtrate assay については分子量10,000カットのフィルターろ過を行っており, タンパク非結合性ビオチン(遊離およびペプチド結合ビオチン)の量を反映すると考えられる。ただ, この場合も, ペプチド結合ビオチンのアビジンに対する反応性の問題は, 本質的に Direct assay の場合と同じであり, 正確性には欠けることになる。

上述のように, Direct, Filtrate assay とともに, 測定値の意味は明確ではないが, 両者の間には正の相関が得られていること(図5), また, ビオチン不足状態を示すとの報告がある乾癬および掌蹠膿疱症

の皮膚疾患患者¹¹⁾ の測定結果は Direct assay では差が認められていないが, Filtrate assay において10例中9例でコントロール群より低値を示していることから(図7), 少なくとも Filtrate assay の値はビオチンの不足状態の指標となり得ると考えられる。

本法による測定値, 特に Direct assay の値は, 前述のように総ビオチンの量をかなり低く見積もっていると考えられ, 実際, バイオアッセイによる総量の測定値とされている硫酸加水分解による値に比べ1桁低い値となっている。ところが, バイオアッセイの場合, ビオシチンなどのビオチニルペプチドやタンパク結合性ビオチンは測定されないことが知られているにも係わらず, 血清を直接測定した値の方が, 硫酸加水分解を行った値よりも, 1桁も高くなっており, 硫酸加水分解あるいはバイオアッセイ自体の信頼性についても大きな疑問が残るところである。血清総ビオチンの正確な測定のためには, アビジン競合法, バイオアッセイ法いずれの測定系においてもペプチド結合, タンパク結合状態からの完全なビオチンの遊離が必要であり, 今後の重要な検討課題である。

血清の測定値が血漿よりも低値を示すこと(表3), また Direct assay の値だけが経時的に減少すること(図6)についても, これまでのビオチンに関する研究では説明できないわけであるが, 血液凝固系へのビオチンの関与, ビオチンを結合したタンパク質の3次元構造の変化などが原因として推測される。

最後に, 本法の Direct, Filtrate assay による測定値の真の評価は, 実際のビオチン欠乏状態およびビオチン内服中の血清を用いた測定を積み重ね, 臨床症状も考慮した総合的な判断により, はじめて可能となるものであり, 今後, 真の総ビオチン測定のための前処理法の開発とともに, 慎重に検討を加えて行く必要がある。

5. 結 語

血清ビオチンの測定法として, 酵素標識アビジンとマイクロプレート固相化ビオチンとの競合反応を

利用した方法を、血清の限外ろ過処理とともに検討した。その結果、標準溶液系では、良好な定量性を示したが、血清試料では、マトリックスあるいはビオチンの存在形態に起因すると思われる影響を受け、タンパク結合性および非結合性ビオチンの正確な測定は困難であった。今後、血清総ビオチン測定のための前処理法の開発が強く望まれる。

謝 辞

乾癬、掌跖膿疱症患者の血清試料のご提供並びに貴重なお助言を頂いた、北海道大学医学部皮膚科学教室加藤直子先生に深謝致します。

6. 文 献

- 1) 大泉純：代謝，27(2)，3-11，1990.
- 2) Wolf, B., et al: Clin. Chim. Acta, 131, 273-281, 1983.
- 3) Wright, L. D., and Skeggs, H. R.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 56, 95-98, 1944.
- 4) Baker, H., et al: Anal. Biochem., 3, 31-39, 1962
- 5) Fukui, T., et al: Abstract for International Screening Symposium of Inborn Errors of Metabolism, No. 124, 1988
- 6) Yankofusky, S. A., et al: Anal. Biochem., 118, 307-314, 1981.
- 7) Mock, D. M., and DuBois, D. B.: Anal. Biochem., 153, 272-278, 1986
- 8) Livaniou, E., et al: Clin. Chem., 33, 1983-1988, 1987.
- 9) Hansen, S. I., and Holm, J.: Anal. Biochem., 172, 160-164, 1988.
- 10) Green, N. M.: Biochem. J., 89, 599-609, 1963.
- 11) 牧野好夫, 他：皮膚科MOOK, No.2, 237-244, 金原出版(東京), 1985.

Microassay for Biotin in Serum by Competition with Solid-phase Biotin for Binding to HRP-Avidin

Akihiro Yamaguchi, Kanako Nishio, Yoshikiyo Mizushima, Masaru Fukushi, Katsumi Abe, Yuko Kikuchi and Nobuo Takasugi

ABSTRACT

We describe a simple and fast microcolorimetric assay for determination of biotin in serum based on the competition between biotin in sample and immobilized biotinyl-IgG coated onto microplate wells for binding to horseradish peroxidase-avidin conjugate. In addition to direct assay for serum, biotin in ultra-filtrate of serum obtained through membrane filter (Mw 10,000 cut), attached to a microcentrifuge tube, is also measured for fractional determination of protein binding- and nonbinding-biotin. The detection range of this assay is sensitive enough for measurement of biotin level in serum (0.1 to 1.0ng/ml), and the reproducibility is adequate for practical use (CV values: around 10%). But, the results of recovery and serum dilution tests are not quantitative, suggesting the interference of coexistent substances or influence of biotin species itself.