

神戸大学遺伝子実験センター
免疫化学測定法研究会・会長
大川 秀郎

はじめに

難分解性有機汚染物質 (Persistent Organic Pollutants, POPs) は、環境において安定で長期に残留して生態系を通じて汚染が拡大し、しかも、生態系や人の健康に影響を及ぼすことが心配されており、ダイオキシン類、内分泌攪乱化学物質、ある種の残留農薬などが含まれ、これらによる大気、水質、土壌及び農水畜産物の汚染の拡大は深刻な問題である。

POPs は極低濃度で環境及び農水畜産物を汚染しており、しかも、極低濃度で生態系や人の健康に影響を及ぼす可能性がある。従って、従来にはない、新規のモニタリング技術の開発が必要である。現在、モニタリングは、主に、多数の広範囲にわたる試料の採集とそれらの機器分析によって行われているが、機器分析は分析設備と熟練を必要とし、時間と経費が掛かることから、高感度、簡便、迅速、安価な新規測定法が求められている。とりわけ、モニタリングには有機溶媒の多用などに伴う二次汚染の危険性の少ない生物機能に基づく新技術開発がパブリックアクセプタンスを得やすい。

生物機能に基づくバイオアッセイ的手法には、生物個体・細胞、酵素、レセプター、抗体などの生物材料を用いた方法がある。これらのうち、生物個体・細胞、酵素、レセプターなどを用いるアッセイ法は、いわゆる“バイオアッセイ”であり、主に、生物学的作用を基にして生物作用量を測定する方法である。それに対して、抗体を用いるイムノアッセイは抗原抗体反応の特異性に基づき、試料に存在する特定化合物の定量的測定を目的としている (1)。

そこで、POPs のモニタリングのための生物機能に基づく手法のうち、特に、抗原・抗体反応に基づいた免疫化学測定法について紹介する。

1. 免疫化学測定法

環境ホルモン、ダイオキシン類などは環境中に ppt~ppb レベル、あるいはそれ以下の極低濃度で検出され、また、残留農薬は ppt~ppm またはそれ以下で環境試料・農水畜産物などで測定される。こうした極低濃度の化学物質を生物機能に基づいて測定する方法として、抗原・抗体反応の特異性を用いたイムノアッセイがある。イムノアッセイは臨床検査でホルモンなどの測定に広く用いられているが、最近、環境分野での化学物質の測定に応用されるようになった。本法は高感度であり、目的の化学物質を試料から抽出・精製することなく、あるいは最小限の前処理によって迅速かつ簡便に測定できる。また、高価な機器を必要としないため、オンサイトで測定するキットなども市販されている。POPs の免疫化学

測定法についてはいくつかの総説があり (2-4)、ここでは POPs に特異的な抗体の調製法とそれらを用いた ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) について具体例を示す。

1. 1. 抗体の調製

ELISA では標的化学物質に特異的な抗体を用いる。一般に、哺乳動物は分子量が 1 万以下の低分子化合物に対しては免疫応答を起こさない。即ち、POPs の多くは低分子化合物であるため、これらを哺乳動物に直接免疫してもそれに対する特異的な抗体は得られない。そこで標的化学物質についてカルボキシル (COOH) 基などを導入した誘導体 (ハプテン) を合成し、それをアルブミンなどの担体蛋白質のアミノ (NH₂) 基と結合させて免疫原または抗原とする。これを哺乳動物に接種すると免疫反応が惹起され、ハプテンに特異的な抗体を得ることができる (5)。ウサギなどを免疫して得られる抗血清は免疫原の様々な部位に特異的な複数の抗体の混合物が得られ、これをポリクローナル抗体と呼ぶ。一方、単一の脾臓細胞 (B リンパ球) が産生する抗体はモノクローナル抗体と呼び、単一の抗原決定基 (エピトープ) を認識する。Kohler (6) らが開発したモノクローナル抗体作製技術がマウスの系で確立されており、比較的容易にモノクローナル抗体を調製できるようになった。

1. 2. 測定の方法

一般に、POPs などの低分子化合物は抗体との結合が可能な箇所が限定されるため、これらに対する ELISA は主に競合阻害 ELISA 法が用いられる。競合阻害 ELISA 法は直接競合法と間接競合法に分類できる。直接競合 ELISA 法では、あらかじめ 96 穴マイクロタイタープレートのウェル、あるいは、チューブ、磁性ビーズなどの表面に抗体を固相化し、それらに試料と一定量の酵素標識抗原を加えると、試料の検体と標識抗原が競合的に抗体と結合する。未反応物を洗浄した後、酵素の発色基質を加え、酵素反応生成物の吸光度をマイクロプレートリーダー等で測定する。その測定値は試料の検体量に反比例する (7)。そのため、標準品の検量線と比較し、吸光度に基づいて検体濃度を決定する。間接競合 ELISA 法では抗原を支持体に固相化し、試料と一定量の抗体を加えると試料の検体と固相化抗原が競合的に抗体と結合する。洗浄後、酵素標識二次抗体を加えて支持体上の抗原抗体複合体を追跡する。再度洗浄を行った後、酵素の発色基質を加え、上記と同様にして試料の検体量を測定する。

1. 3. ダイオキシン類の測定

Stanker (8) らは 5 種の抗ダイオキシン・モノクローナル抗体を調製した。これらを用いた ELISA 法は 0.5ng の 2,3,7,8-四塩基ジベンゾ-p-ダイオキシン (TCDD) を測定することができた。Harrison (9) らは、これら 5 種のモノクローナル抗体のうち 1 種 (DD3) を用いて、チューブとマイクロプレートを用いた ELISA 法を開発した。2,3,7,8-TCDD の検出限界はチューブ法とマイクロプレート法でそれぞれ 100pg/チューブ、25pg/ウェルであった。さらに、抗ダイオキシンモノクローナル抗体 DD3 を用いたチューブ ELISA 法の交叉反応性と TEF (注 1) に相関が見られたことから、試料中のダイオキシン類の TEQ (注 2) 値を予測する ELISA 法を開発した。43 種の土壌試料をガスクロマトグラフ質量分析 (GC-MS)

法と予測 ELISA 法により測定し、前者によって算出された TEQ 値と後者によって推測された TEQ 値を比較し、その結果、両者の値には高い相関がみられた ($Y=0.99X-0.53$ 、相関係数 0.988)。

一方、Sanborn (10) らは抗ダイオキシン抗体を得るための新規ダイオキシンハプテンを合成し、ウサギに免疫して抗ダイオキシン抗血清を得た。このポリクローナル抗体を用いた ELISA 法でダイオキシンを測定した結果、IC50 値が 16ng/mL であった。Sugawara (11) らは、これらのハプテンを用いて同様に抗ダイオキシンポリクローナル抗体を得、それを用いた ELISA 法で測定した結果、IC50 値は 240pg/mL、測定可能範囲は 40pg/mL~4800pg/mL であり、非常に高感度であった。

臼杵 (12) はダイオキシン特異的 ELISA 法を開発し、焼却灰及び飛灰のダイオキシン量を ELISA 法及び GC-MS 法を用いて測定し、両者の測定値を比較した。試料からダイオキシン類をソックスレー抽出し、多層シリカゲルクロマトグラフィーでクリーンアップした。その後、DMSO に転溶してクエン酸緩衝液で希釈し、ELISA に供した。その結果、ELISA 法と GC-MS 法による測定値には有意な正の相関が認められ、両者の相関係数は焼却灰試料で 0.848、飛灰試料で 0.894 であった。

POPs に特異的に反応する抗体を用いたイムノアッセイのうち、水試料について測定する ELISA キットなどが実用化されている。しかしながら、土壌、農産物などの測定に ELISA を実用化するためには、試料に由来するミセルやマトリックスの効果に基づく測定の精度の確保、標準化合物の代謝物や同族体に対する交叉反応性の回避などを克服することが求められる。

なお、POPs に対する ELISA キットに関して、日本国内で発売されている環境分野関連のイムノアッセイキット等が免疫化学測定法研究会のウェブサイトにもリストアップされている (<http://wwwsoc.nii.ac.jp/icsj/>)

2. 免疫化学測定法の標準化

POPs の多くの化合物は法的規則の対象になっており (表 1)、それらの測定には公定法の適用が求められている。即ち、ELISA の普及には JIS 規格や ISO のなどに適合した公定法として認定されることが必要である。そこで、平成 9 年度に新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) の国際標準創成型研究開発事業として、「免疫化学的な化学物質計測の国際標準化に関する試験研究」を (財) 日本規格協会からの再委託で (株) コスモ総合研究所及び (株) ヤトロンが単年度の研究開発テーマとして実施した。

平成 10 年度以降、それらの成果をもとに、国際標準開発事業「国際標準化プロセスの整備・拡充調査」の一環として、免疫化学測定法による水質の農薬の測定法の標準化を図るべく、国際規格原案作成検討委員会及び免疫化学測定法標準化検討技術委員会を組織して ISO への規格提案を目標に活動を行った。

平成 10 年度は、国際規格原案作成検討委員会の活動を中心に、国際規格提案に必要な各種情報収集、国内外の関連分野の規格設備状況の調査、海外調査などを実施し、規格ドラフト案を作成した。

本規格ドラフト案は、水道水、河川水、湖沼水、地下水のチオカーバメート系除草剤チオベンカルブ及びアニリド系殺菌剤フルトラニルをモノクローナル抗体を用いた ELISA により定量測定する方法を個別に規定したものである。

平成 11 年度はそれを受けて免疫化学測定法標準化検討技術委員会を発足し、開発技術の評価検討、国際標準化のための対応策の検討を行った (13)。本活動は平成 11 年度をもって終了したが、今後、免

疫化学測定法の普及、実用化に際しては公定法化、標準化への積極的な取り組みを含む産官学連携による様々な基盤作りが必要である。また、環境分野における化学物質の測定分析法についてはこれから ISO の規格として次々に取り上げられる可能性があり、免疫化学測定法についても国際標準化活動を積極的に推進していかなければならない (14)。

米国では環境保護庁 (EPA) において、試験法の標準化、ガイドラインの作成を経て個々の製品に認証番号が与えられ、これまでに 20 品目について水質、土壌などの測定に関する試薬キットが実用化されている。なお、EPA のウェブサイトには認証番号と試薬キットなどが掲載されている (<http://www.epa.gov/epahome/index1>)。また、EU では、ドイツ・ミュンヘン工科大の Hock 教授を中心に水質測定用試薬キットに関して ISO への規格提案が作成されている。

おわりに

平成 14 年 7 月に免疫化学測定法研究会に、標準化検討委員会が発足し、本格的取組みを開始した。標準化の目的には、(1) 産業基盤技術の整備があり、化学品の開発において、測定技術は極めて重要であり、高感度、簡便、迅速、安価な測定法の導入により国際競争力を獲得できる。また、(2) POPs の多くの化学物質は法規制の対象になっており、公定法に基づく測定が求められている。従って、免疫化学測定法の公定法化により、公的分析機関、分析研究機関、生協、農協などにおける測定を効率的に実施できるようになる。とりわけ、POPs に係わる測定は、環境・食品・人の安全性確保の面から緊急に整備する必要がある。(1) 大気、土壌、水質におけるダイオキシン類、重金属、環境ホルモンなどの測定、(2) 農産物、輸入食糧、畜産物、水産物などの残留農薬、抗生物質、マイコトキシンなどの測定、(3) 労働安全衛生に係わる発ガン物質の測定などは重要である。

標準化に関しては (1) デジュール標準 (JIS などの公的標準)、(2) デファクト標準 (非公的標準) (3) 認定・認証制度、(4) 国際規格 (ISO) などに関する検討を行う。それに基づき公定法としての制度を確立する。例えば、(1) 測定法の標準化 (2) ガイドライン作成 (3) 技術審議委員会の設置 (4) 対象化合物/対象試料別の製品に対する認可番号を与える、などの制度の確立を目指す。

注 1 ; ダイオキシン類には多くの異性体があり、各異性体毎に毒性が異なるため、最も毒性の強い 2,3,7,8-TCDD の毒性を 1 としたときの各異性体の相対毒性を毒性等価係数 (TEF) として設定している。

注 2 ; ダイオキシンの毒性は含まれるダイオキシンの各異性体濃度値にそれぞれの TEF を乗じて、それらの総和を 2,3,7,8-TCDD の毒性等量 (TEQ) 値として表す。

【引用文献】

- (1) 森田昌敏監修 環境ホルモンのモニタリング技術・分析・測定法の実際、シーエムシー、(1999)
- (2) 中田昌伸、大川秀郎 ; 植調 30, 145-152 (1996)
- (3) 中田昌伸、大川秀郎 ; 蛋白質核酸酵素 41, 2132-2138 (1996)
- (4) 中田昌伸、大川秀郎 ; ぶんせき 6, 62-70 (1999)
- (5) Jung, F., Gee, S. J., Harrison, R. O., Goodrow, M. H., Karu, A. H., Braun, A. L., Li., Q. X., Hammock, B. D ; Pestic. Sci. 26, 303-317 (1989)

- (6) Kohler, G., Milstein, C., ; Nature 256, 495-497 (1975)
- (7) 湯浅洋二郎 ; 食衛誌 39, 61-66 (1998)
- (8) Stanker, L. H., Watkins, B., Rogers, N., Vanderlaan, M., Toxicology 45, 229-243 (1987)
- (9) Harrison, R. O., Carlson, R. E. ; Chemosphere 34, 915-928 (1997)
- (10) Sanborn, J. R., Gee, S. J., Gilman, S. D., Sugawara, Y., Jones, A. D., Rogers, J., Szurdoki, F., Stanker, L. H., Stoutamire, D. W., Hammock, B. D. ; J. Agric. Food Chem. 46, 2407-2416 (1998)
- (11) Sugawara, Y., Gee, S. J., Sanborn, J. R., Gilman, S. D., Hammock, B. D ; Anal. Chem. 70, 1092-1099 (1998)
- (12) 臼杵靖晃 ; 免疫化学測定法研究会第 6 回学術シンポジウム講演要旨集, pp23-26 (2001)
- (13) 国際標準研究開発事業 平成 11 年度「免疫化学的な化学物質計測の国際標準化」成果報告書、平成 12 年 3 月 (財) 日本規格協会
- (14) (独) 製品評価技術基盤機構、(株)ダイヤリサーチマーテック “バイオテクノロジー分野の標準化に係わるニーズと今後の取り組みに関する調査” 平成 14 年 3 月。