

図 9 毒性等価係数と交差率

抗血清（5回投与後 no.5）：800,000倍希釈、II-6-HRP：1 μ g/mL

交差率：2378TCDDの検量線から算出した各同族体の2378TCDD相当量を各同族体の添加量で除して求めた。

抗ダイオキシンモノクローナル抗体の作製ならびに ELISA 法の確立と
高感度化の検討 (主任研究者 松木容彦)

協力研究報告書

ダイオキシン類に対する高親和力特異モノクローナル抗体の調製

後藤 順一 (東北大学薬学部)

免疫アッセイ検出系の高感度化の検討

前田 昌子 (昭和大学薬学部)

平成11年度 厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
研究報告書

生体試料中ダイオキシンの酵素イムノアッセイ法の開発研究
—ダイオキシン類に対する高親和力特異モノクローナル抗体の調製—

主任研究者 松木容彦 (財)食品薬品安全センター秦野研究所 研究部長
研究協力者 後藤順一 東北大学大学院薬学研究科 教授
小林典裕 東北大学大学院薬学研究科 助教授

研究要旨

ダイオキシンの発生毒性は成体の毒性に比べて感受性が高いうえ、その影響は多くの場合不可逆的でしかも次世代に及ぶため、極めて重大な問題である。なかでも妊娠中及び授乳中の母親が暴露されることによる子への影響は非常に低濃度のダイオキシンによって現れる可能性が高いため、その被曝量を的確かつ迅速にモニターしうる微量定量法の確立が切望されている。特異抗体を利用するイムノアッセイは、簡便に高感度で選択性の高い測定が可能な利点を有し、ルーチン分析に適している。しかもモノクローナル抗体を使用することで、アッセイ値の再現性が保証された標準分析法を確立することが可能となる。以上の観点から、各種ダイオキシン同族体のなかでもとくに毒性の強い2,3,7,8-四塩化ダイオキシン (2,3,7,8-TCDD) 及び1,2,3,7,8-五塩化ダイオキシン (1,2,3,7,8-PeCDD) に群特異性を示すモノクローナル抗体の調製を検討した。

ダイオキシン核の1位又は2位にブリッジを導入した4種ハプテンのウシ血清アルブミン (BSA) 結合体を、各々 BALB/c マウス及びA/Jマウス各5匹 (計40匹) に隔週で反復免疫投与した。5回目の追加免疫の7日後に全てのマウスから採血して血清中の抗ダイオキシン抗体価を調べ、良好な個体については、産生されている抗体の親和力を推測するために、1,2,7-三塩化-8-メチルダイオキシン (TMDD) の添加による阻害効果を更に検討した。その結果、I-2-BSAで免疫したBALB/cマウス #2とI-3-BSAで免疫したA/Jマウス #26の2個体が最も良好なことが判明した。そこで、これらマウスの脾細胞をP3/NS1/1-Ag4-1ミエローマ細胞とポリエチレングリコールを用いて融合した。HAT選択培養により得られた融合細胞の培養上清をELISAによりスクリーニングしたところ、BALB/c マウスの脾細胞に由来する64種のハイブリドーマが抗ダイオキシン抗体を分泌していることが示された。

今後、これらハイブリドーマをクローニングしてモノクローナル抗体を調製し、その諸性質を詳細に吟味する予定である。モノクローナル抗体は一定品質のものを大量かつ半永久的に供給することが可能なため、イムノアッセイの確立ばかりか、分析試料の簡易クリーンアップ法としてのイムノアフィニティー抽出法の開発にも極めて有用と期待される。

A. 研究目的

ダイオキシンが極めて強い毒性を有するこ

とは周知の事実であるが、その発生毒性にはとりわけ強い関心が払われている。発生毒性

は成体の毒性に比べて感受性が高いうえ、その影響は多くの場合不可逆的でしかも次世代に及ぶことが大きな理由である。なかでも妊娠中及び授乳中の母親が暴露されることによる子への影響は非常に低濃度のダイオキシンによっても現れるため、その被曝量を的確かつ迅速にモニターしうる微量定量法の確立が切望されている。

ダイオキシン類の分析においては、従来、ガスクロマトグラフィー質量分析法 (GC-MS) が主流となっている。本法では多種類のダイオキシン同族体の一斉分析が可能であるが、試料の煩雑なクリーンアップを必要とするため、迅速に多数の検体を処理することが困難である。一方、特異抗体を利用するイムノアッセイは、簡便に高感度で選択性の高い測定が可能な利点を有し、ルーチン分析に適している。しかもモノクローナル抗体を使用することで、アッセイ値の再現性が保証された標準分析法を確立することが可能となる。

以上の観点から、各種ダイオキシン同族体のなかでもとくに毒性の強い2,3,7,8-四塩化ダイオキシン (2,3,7,8-TCDD) 及び1,2,3,7,8-五塩化ダイオキシン (1,2,3,7,8-PeCDD) に群特異性を示すモノクローナル抗体の調製を検討した。

B. 研究方法

1. 実験材料

- 1) ハプテン-ウシ血清アルブミン (BSA) 結合体及びペルオキシダーゼ (HRP)標識ハプテン
4種ハプテン (図1; I-2、I-3、I-5、II-2) のBSA結合体、及び5種ハプテン (図1; I-2、

I-3、I-5、II-4、II-6) のHRP標識体は、神戸川により調製されたものを用いた (神戸川報告参照)。

2) マウス

BALB/c 及びA/Jマウス (いずれも雌、8週齢) は、日本SLCより購入した。

3) ミエローマ細胞株

P3/NS1/1-Ag4-1 ミエローマ細胞株は、ヒューマンサイエンス研究資源バンクから供与された。

2. 試薬と器材

1) 免疫・ELISA関係

Freund の完全及び不完全アジュバント: DIFCO 0638-60-7及び0639-60-6

アフィニティー精製ウサギ抗マウスIgG+IgM 抗体 (第二抗体): ジャクソン 315-005-044

1,2,7-三塩化-8-メチルダイオキシン (TMDD): Wellington Laboratories

o-フェニレンジアミン二塩酸塩: Sigma P9029

30% 過酸化水素水: 和光純薬工業

ELISA 用マイクロタイタープレート: 住友ベークライト MS-9596F

2) 細胞融合関係

RPMI 1640粉末培地: GIBCO-BRL 31800-022

ウシ胎児血清 (FCS): GIBCO-BRL 26140-079

ハイブリドーマクローニングファクター (HCF): IGEN

HAT Media Supplement: Sigma H0262

ポリエチレングリコール4000 (PEG): Merck Art 9727

ジメチルスルホキシド (DMSO): Sigma D2650

培養フラスコ(25 cm²): 岩城硝子3100-025
培養フラスコ(75 cm²): Becton Dickinson
3824

クラスターディッシュ (96ウエル): Costar
3598

その他の塩類・有機溶媒などは、試薬特級を用いた。

3. 機器

ELISAプレートリーダー (BL 312e) : Bio-Tek Instrument Inc.

4. 免疫及び試験採血 (株式会社シバヤギに依頼)

図1に示した4種ハプテン (I-2、I-3、I-5、II-2) のBSA 結合体の各々を、以下の手順でBALB/c マウス及びA/Jマウス各5匹に繰り返し免疫投与した。そのスケジュールを表1Aに示す。なお、各実験群のマウスは、表1Bのように番号を付して区別した。

ハプテン-BSA結合体 (50 µg) を滅菌生理食塩水 (大塚製薬) (0.1 mL) に溶解し、完全アジュバント (0.1 mL) とのエマルジョンとして、上記マウスのfoot pad (片足につき1カ所) 及び背部 (体毛をバリカンで除去して20カ所程度) に皮下投与した。以後、同量の免疫原を不完全アジュバントとのエマルジョンとして6回の追加免疫を行った。3回目、及び5回目の追加免疫 (各々1月11日、2月8日; 表1A) より7日後に眼静脈よりヘマトクリット管を用いて試験採血 (20-40 µL) した。得られた血液をマイクロ遠心管に移し、室温で3000 rpm、15分遠心して血清を分離し、そのHRP標識ダイオキシンの反応性を、下記のELISA法

により調べた。

5. ELISA

1) 緩衝液と基質溶液

Buffer A: 0.05 mol/L NaH₂PO₄ -Na₂HPO₄ 緩衝液 (pH 7.3)。

Buffer B: 0.9% NaClを含むbuffer A。

Buffer C: 0.1% ゼラチンを含むbuffer B。

基質溶液: 0.05% *o*-Phenylenediamine·HCl 及び0.01% 過酸化水素を含む50 mmol/L クエン酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0)。

2) 第二抗体固定化プレートの調製

96穴ELISA用マイクロタイタープレートの各ウエルに、第二抗体の buffer B 溶液 (2 µg/mL) を分注 (100 µL/well) して、4°Cで一晩放置。抗体溶液を吸引除去したのち、buffer Bでウエルを3回洗浄。BSA (0.5%) のbuffer B溶液 (150 µL/well) をウエルに分注して、室温で2-3時間放置。溶液を吸引除去したのち、buffer B でウエルを3回洗浄して第二抗体固定化プレートを作製した。

3) ELISAの方法

第二抗体固定化プレートにbuffer C で希釈したマウス血清及び酵素標識ダイオキシンを添加し (100 µL/well)、4°Cで一晩放置。溶液を吸引除去したのち、buffer B でウエルを3回洗浄し、基質溶液を添加し (100 µL/well)、室温で1時間放置。3 mol/L硫酸 (50 µL/well) を加えて酵素反応を停止したのち、490 nmの吸光度をプレートリーダーにより測定した。

6. 細胞融合によるモノクローナル抗体の調製

1) 培地

基本培地: 10 mmol/L HEPES-NaOH緩衝液

(pH 7.3)及び硫酸カナマイシン(0.06%)を含むRPMI 1640。

HAT培地：基本培地に10% FCS、0.05 mmol/L 2-メルカプトエタノール、2 mmol/L L-グルタミン、1 mmol/Lピルビン酸ナトリウム、及び HAT Media Supplement (1バイアル)を添加したもの(0.01 mmol/Lヒポキサンチン、16 μ mol/L チミジン、0.4 μ mol/Lアミノプテリンを含む)。

2) PEG溶液

PEG (40 g) をダルベッコPBS (-) (50 mL) に溶解し、DMSO (10 mL)、0.1% ポリ-L-アルギニン塩酸塩溶液 (1 mL) を加えたのち、1 mol/L NaOHを用いてpHを約7.5に調整した。

3) 細胞融合

抗体価の上昇が認められたマウスに、対応する免疫原 (50 μ g) の生理食塩水溶液 (0.5 mL) を腹腔内投与した。その3日後に脾臓を摘出して基本培地 (10 mL) を入れたシャーレ中で脾リンパ球をほぐし、細胞浮遊液を調製した。ステンレスメッシュを用いて組織片を除去したのち、室温で遠心 (1600 rpm、6分) し、上清を除去。ペレットに基本培地 (10 mL) を加えて細胞を懸濁させて、同条件で遠心し、上清を除去。この操作を更に1回行ったのちペレットに基本培地 (10 mL) を加えて細胞を懸濁し、その一部を用いて細胞数を計算した。

上記の脾細胞浮遊液 (全量) 及びその約1/5数のミエローマ細胞を遠心管に移して室温で遠心 (1600 rpm、5分) し、上清を十分に除去したのち、ペレットに予め37°Cに加温しておいたPEG溶液 (1 mL) を1分を要して滴下した。本細胞懸濁液を1分間静かに混合したのち基本培地を3回に分けて添加し (1 mLを1分; 1

mLを1分; 8 mLを3分)、同条件で遠心。上清を除去したのちペレットをよくほぐし、10% HCFを含むHAT培地 (用いた脾細胞1 x 10⁸個あたり50 mL) を加えて融合操作後の細胞を懸濁させた。これを、96ウエルクラスターディッシュに分注(100 μ L/well) し、37°C、5% CO₂で培養した。翌日、HAT培地 (100 μ L/well) を添加し、3日目、6日目に培地の約半量を吸引除去し、HAT培地 (100 μ L/well) を新たに加えた。

4) 培養上清中の抗ダイオキシシン抗体のスクリーニング

培養開始より9日後にハイブリドーマの培養上清の一部 (25 μ L) を採取し、0.1% BSAを含む buffer B (75 μ L) と混合して上述の第二抗体固定化 ELISA プレートに添加した。室温で1時間インキュベーションしたのち、溶液を吸引除去し、プレートを buffer Bで3回洗浄した。HRP標識ダイオキシシン(0.1 μ g; 100 μ L) を加えて同条件でインキュベーションしたのち、同様にプレートを洗浄した。各ウェルに基質溶液 (100 μ L/well) を添加し、上記の方法でプレート上の HRP 活性を測定した。

C. 研究結果

1. 各種ダイオキシシン-BSA結合体に対するマウスの免疫応答性

3回目及び5回目の追加免疫後に、マウス血中の抗ダイオキシシン抗体の力価の上昇をELISAにより調べた。ELISAの感度と特異性は、抗体産生に用いるハプテンと酵素標識に用いるハプテンの組み合わせに影響を受けることが知られている。一般に、抗体産生用ハプテンとブリッジの構造、又は導入部位が異なるハプ

テンで調製した酵素標識体を用いるアッセイ系（各々ブリッジヘテロログス系、サイトヘテロログス系）は、同一のハプテンを用いる系（ホモログス系）に比べて感度に優れる。この点を考慮して、40種のマウス血清サンプル全てについて5種類の HRP 標識ハプテンとの組み合わせでELISAを行った。

図2に、3回目の追加免疫後に得られた結果を示す。1000倍に希釈した40種血清サンプル（横軸にリストアップ）の各々について25 ng の HRP 標識ハプテンとの反応性を調べたもので、縦軸に1時間の酵素反応で得られた ELISA のシグナル（490 nmの吸光度）をプロットした。5種の HRP 標識体のうち、I-3-HRP 及び I-5-HRPを用いるとき、全ての血清サンプルについて有意な陽性反応が認められ、ダイオキシンに対する抗体が産生されていることが示された。標識体II-4-HRP、I-6-HRP でもある程度の反応がみられるが、I-2-HRPとの組み合わせでは十分なシグナルが得られず、本標識体は抗体価のスクリーニングに不相当と考えられた。

さらに追加免疫を2回繰り返したのち血清サンプルを再び調製し、同様のスクリーニングを行った。ここでは、先の検討で良好な反応性を示した4種の標識体（I-3-、I-5-、I-6-及びII-4-HRP）に加え、II-6-HRP との組み合わせを試みた（図3）。また、2回の追加免疫の間に抗体価が上昇しているものと推測して、血清サンプルの希釈率を25000倍に高め、他方、HRP標識体の希釈率は25 ng に設定した。I-6-、II-4-及びII-6-HRP の3種についてはどの血清サンプルについても十分な反応性が認められなかったが、I-3-HRP との組み合わせでは、

マウス#2、#6~10、#21、#26、#27、#29の10種血清で吸光度0.25を上回る有意な反応がみられた。血清サンプルの希釈率を考慮すると、これらマウスではダイオキシンハプテンに対して十分な免疫応答を示しているものと判断される。なおマウス#6~10及び #26~30はI-3-BSAで免疫されているもので、すなわち、ホモログスなELISAで強く反応していることが判る。また、I-5-HRPを用いる系では、血清#2、#26、#35の3種が強い反応性を示した。これらの組み合わせのうち、#35はホモログス系で、#2、#26はブリッジヘテロログス系である。

2. マウス血清中抗ダイオキシン抗体の性質

以上の検討で良好な ELISA シグナルを与えた12種の組み合わせについて、遊離型ダイオキシン誘導体の添加による競合的な結合阻害効果を検討した。まずELISAにおける抗体の希釈率を設定するため、各組み合わせで抗体希釈曲線を作成した（図4）。つぎに、1時間の酵素反応で0.1~0.8の範囲の吸光度を与える希釈率（20000~50000倍）で阻害実験を行った。すなわち、希釈血清サンプルとHRP標識体の反応系に、毒性の低い誘導体である TMDD を添加（2、10又は50 pg/10 μ L メタノール）して、標識体と抗体の結合に対する競合阻害の程度を調べた（図5、表2）。多くの組み合わせについては、ウサギ抗血清で得られたような大きな阻害率（奥山の報告参照）はみられなかった。しかし、血清#2は HRP 標識体I-5-HRP 及びII-6-HRP との組み合わせにおいて、血清#26はI-5-HRP との組み合わせで有意な阻害が認められた。この結果は、マウス#2、#26では、他のマウスに比べてダイオキシンに特異的で

親和性の高い抗体が産生されていることを示唆するものである。

3. 細胞融合

上記の検討結果より、マウス#2及び#26が細胞融合における脾細胞供与動物として好適と思われた。#2はI-2-BSAで免疫されたBALB/cマウス、#26はI-3-BSAで免疫されたA/Jマウスである。そこで、これらマウス個体から各々脾細胞を調製し、別々にP3/NS1/1-Ag4-1ミエローマ細胞とPEGを用いて融合した。得られた脾細胞数は、#2からは 1.3×10^8 個、#26では 1.1×10^8 個で、その全量を融合実験に用いた。融合操作後の細胞は96ウエルクラスターディッシュに分注したが、#2の融合実験では合計576ウエル、#26では488ウエルを使用した。実験方法に示したスケジュールでHAT選択培養を行い、培養開始から9日後に各マイクロウエルを検鏡したが、#26マウスの脾細胞を用いる融合実験からはハイブリドーマの形成を認めることができなかった。一方、#2マウスを用いる融合実験については多くのマイクロウエルでハイブリドーマが確認されたので、各ウエルから培養上清を採取し、抗ダイオキシン抗体の存否をELISAによりスクリーニングした。その結果、64個のマイクロウエルについて有意な抗体の産生が示された。現在、これらのウエルで形成されたハイブリドーマをスケールアップしており、近日中に限界希釈法によりクローニングする予定である。

D. 考察・結論

イムノアッセイは、簡便に高感度で選択的な分析が可能な反面、多成分のプロファイル分析

には必ずしも適さない。そこでダイオキシン汚染の一次簡易スクリーニング法を確立することを目的として、とりわけ毒性の強い、2,3,7,8,-TCDDと1,2,3,7,8-PeCDDをターゲット同族体として選択し、これらの合計値を求めうるイムノアッセイ系、しかもモノクローナル抗体に基づくアッセイ系の開発を企てることにした。

このためには、これら両同族体にほぼ等しい親和性を示す、いわゆる群特異的なモノクローナル抗体の産生が必要になる。ハプテン-キャリアー結合体に対して産生される抗ハプテン抗体は、一般にハプテン分子上、キャリアーとの結合に用いるブリッジの導入部位から離れた部分構造を鋭敏に認識する反面、ブリッジ近傍の構造変化の識別は不十分である。したがって、ダイオキシン核上1位の塩素原子の有無にかかわらず結合するような抗体を動物に産生させるためには、1位にブリッジを導入するのが最も有効と考えられる。しかし、免疫動物がこれに応答するとは限らないため、立体障害による認識力（上記2種同族体の区別）の低下が期待できる2位誘導体も併せて検討することにした。一方、母乳中に含まれる極微量のダイオキシンを定量するためには、親和常数 (K_a) にして 10^{10} M^{-1} を上回る高親和力の抗体を得ることが望まれる。そこで、十分なアフィニティマチュレーションを期待して、マウスを計7回にわたり繰り返し過免疫した。なおマウスの系統については、モノクローナル抗体の産生において最も標準的なBALB/cマウス（入手可能なミエローマ細胞がBALB/cマウス由来であることによる）及びステロイドなどのハプテンに対する応答性の

良好なA/Jマウスを用いた。

目的のモノクローナル抗体の産生確立を高めるためには、免疫原に対して十分に応答し、高親和力の抗体を産生しているマウスを脾細胞供与動物として選択することが重要である。そこで、免疫した40種マウス全てについて抗体価を調べ、良好な個体については、TMDDの添加による阻害効果（抗体の親和力の目安となる）を検討した。その結果、#2と#26の2個体が最も良好と思われた。これらマウス個体の免疫に用いられたハプテン（各々I-2-BSA、I-3-BSA）はいずれも1位にフレキシブルなブリッジ（両ハプテンでメチレンユニットの長さのみが異なっている）を配したものであるが、こうした化学構造上の特徴が今回の抗体価の上昇に関係するか否かについては不明である。

そこで、これらマウスの脾細胞を用いて細胞融合を行った。融合細胞の培養上清中の抗ダイオキシン抗体をスクリーニングして、抗体を分泌しているハイブリドーマ64種を得た。今後、これらハイブリドーマをクローニング

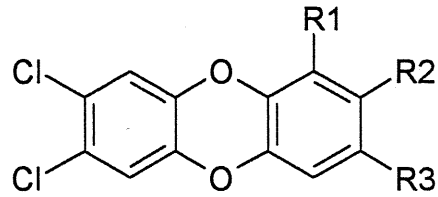
してモノクローナル抗体を調製し、その諸性質を詳細に吟味する予定である。モノクローナル抗体は一定品質のものを大量かつ半永久的に供給することが可能なため、免疫アッセイの確立ばかりか、分析試料の簡易クリーンアップ法としての免疫アフィニティ一抽出法の開発にも極めて有用と期待される。

E. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし



ハプテン誘導体	R1	R2	R3
I-2	NHCO(CH ₂) ₃ COOH	H	Cl
I-3	NHCO(CH ₂) ₄ COOH	H	Cl
I-5	CH=CHCOOH	Cl	Cl
II-2	H	O(CH ₂) ₃ COOH	Cl
II-4	H	CH=CHCOOH	Cl
II-6	H	CH=CHCOOH	H

図1 免疫原及び酵素標識体の調製に用いたダイオキシンのハプテン誘導体

I-2 ~ I-6 は佐藤 雅之、II-2 ~ II-6 は神戸川 明が合成した。

表 1A モノクローナル抗体産生のためのマウスの免疫
並びに採血スケジュール

日付	免疫回数	免疫原量		エマルジョン量		備考
		(μ g)	アジュバント	(μ L)		
11/30	初回	50	FCA ^{a)}	200		—
12/14	追加 1	50	FIA ^{b)}	200		—
12/28	追加 2	50	FIA	200		—
1/11	追加 3	50	FIA	200		—
1/18	—	—	—	—		試験採血
1/25	追加 4	50	FIA	200		—
2/ 8	追加 5	50	FCA	200		—
2/15	—	—	—	—		試験採血
3/ 1	追加 6	50	—	500		—
3/ 4	—	—	—	—		脾臓摘出

a) FCA : フロイントの完全アジュバント

b) FIA : フロイントの不完全アジュバント

表 1B マウス個体及び免疫原の組み合わせ

免疫原	マウス個体	
	BALB/c	A/J
I-2	1,2,3,4,5	21,22,23,24,25
I-3	6,7,8,9,10	26,27,28,29,30
I-5	11,12,13,14,15	31,32,33,34,35
II-2	16,17,18,19,20	36,37,38,39,40

表 2 遊離ハプテン (TMDD) の添加による結合阻害効果

HRP- 標識体	マウス 血清	免疫原	B/B ₀ (%)			アッセイ システム
			TMDD (pg/10 μ L methanol/well)	2	10	
I-3	#9	I-3	93	83	99	ホモロガス
	#10	I-3	92	91	85	ホモロガス
	#21	I-2	100	98	98	ヘテロロガス
	#29	I-3	102	101	97	ホモロガス
I-5	#2	I-2	93	86	67	ヘテロロガス
	#26	I-3	95	86	72	ヘテロロガス
	#35	I-5	98	96	85	ホモロガス
II-4	#17	II-2	100	100	99	ヘテロロガス
	#18	II-2	102	98	98	ヘテロロガス
	#36	II-2	98	95	98	ヘテロロガス
II-6	#2	I-2	94	73	54	ヘテロロガス
	#7	I-3	99	95	78	ヘテロロガス

抗血清(5回追加免疫後): 50000-500000 倍希釈

HRP: 0.2-1.0 μ g/mL

B/B₀: 各Abs.490nm(B)を溶媒対照のAbs.490nm(B₀)で除して求めた。

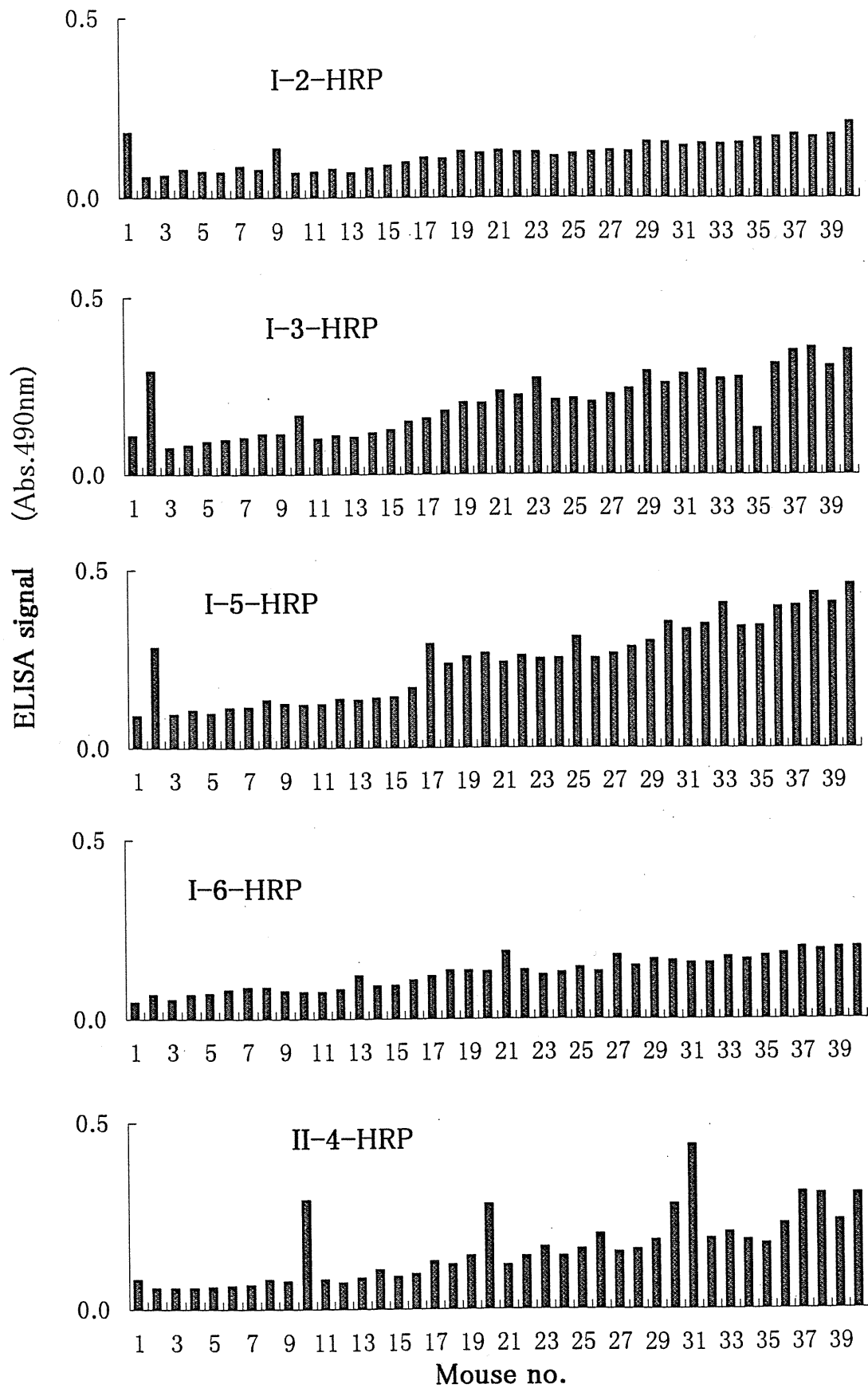


図2 マウス血清中の抗ダイオキシン抗体価（3回目追加免疫後）
 抗血清：1000倍希釈、HRP：0.25 μ g/mL

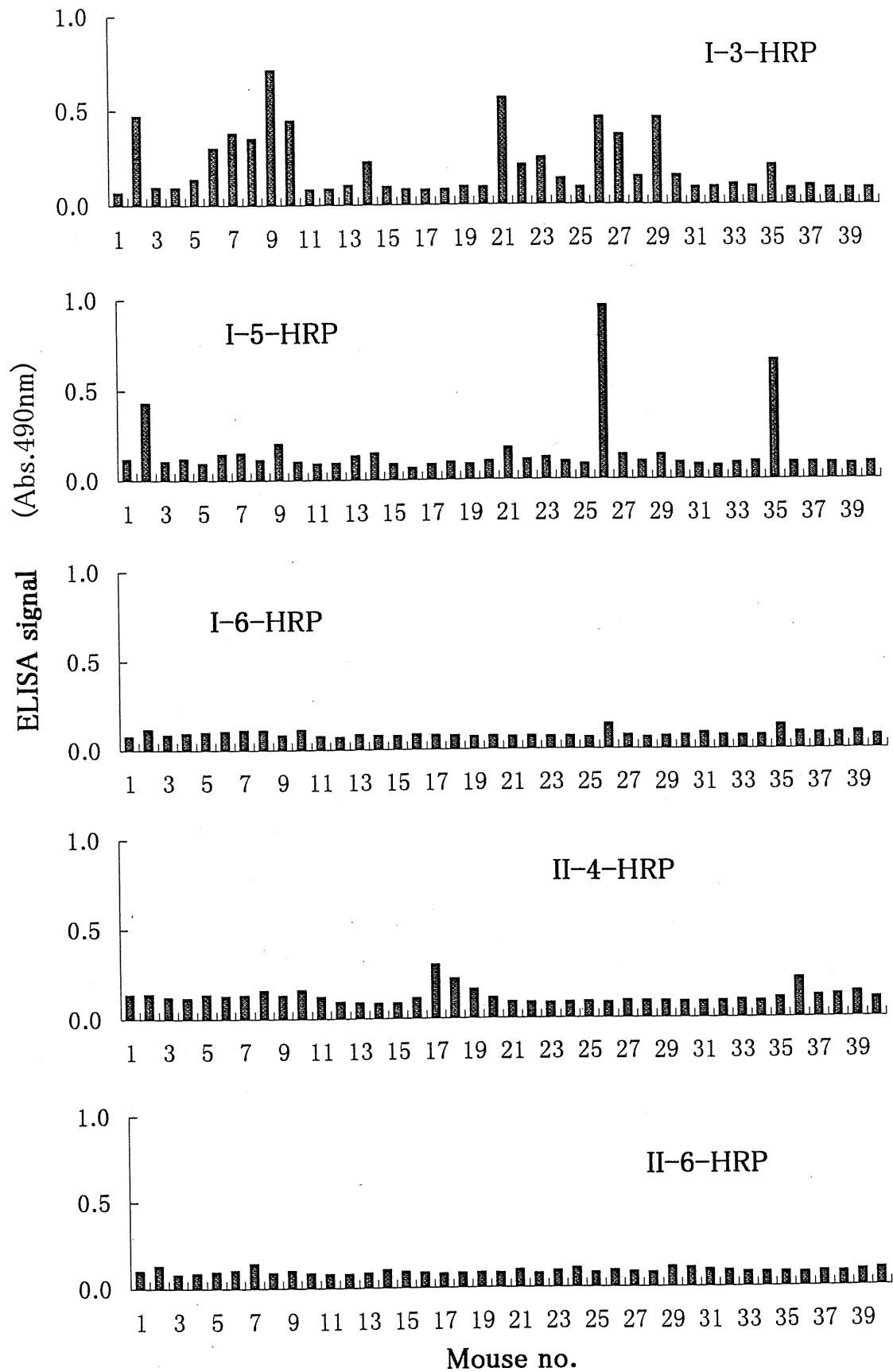


図3 マウス血清中の抗ダイオキシン抗体価(5回目追加免疫後)
 抗血清: 25000倍希釈、HRP: 0.25 μ g/mL

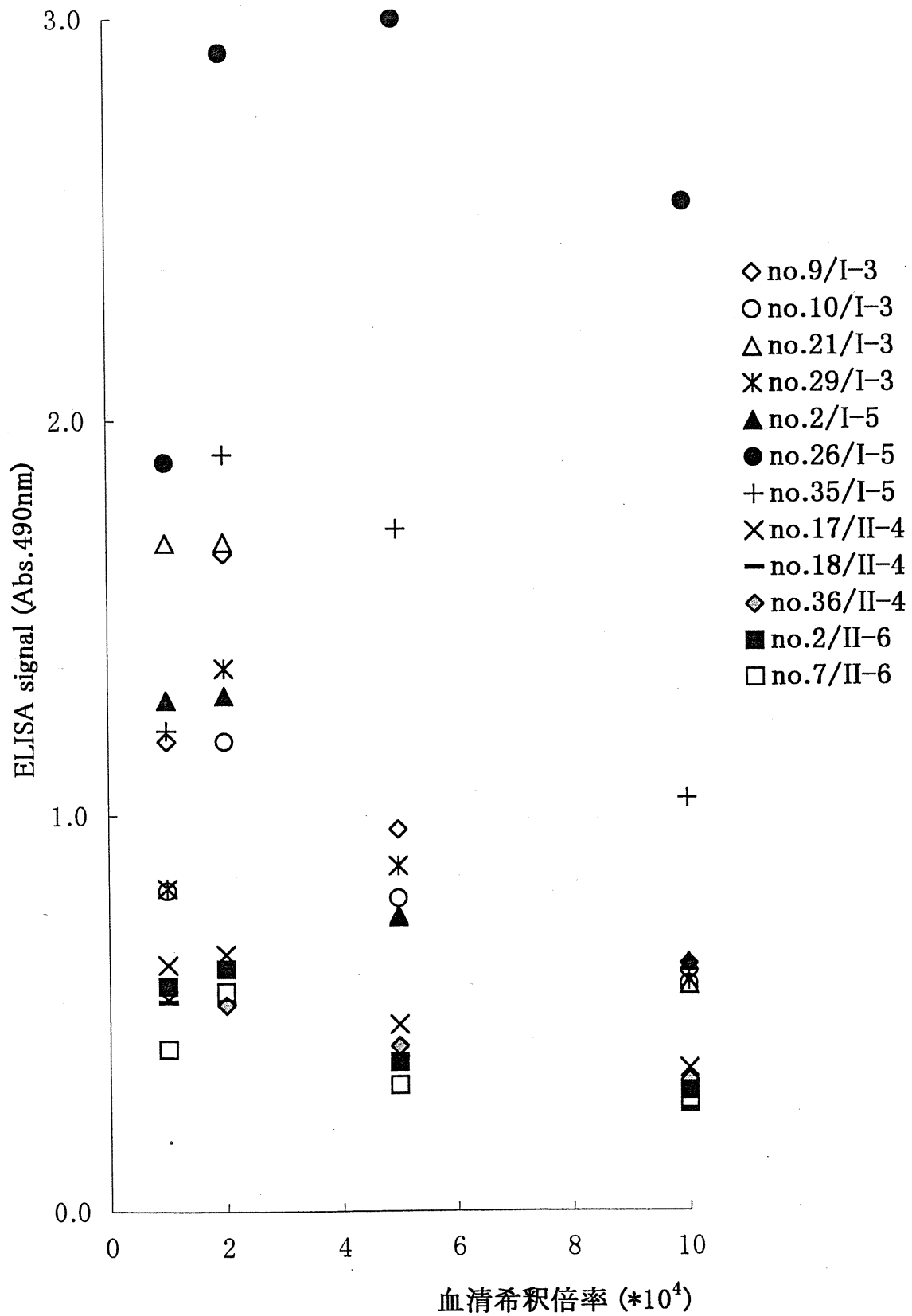


図 4 各 ELISA 系における抗体希釈曲線

抗血清 : 5 回追加免疫後、HRP : 0.5 μ g/mL

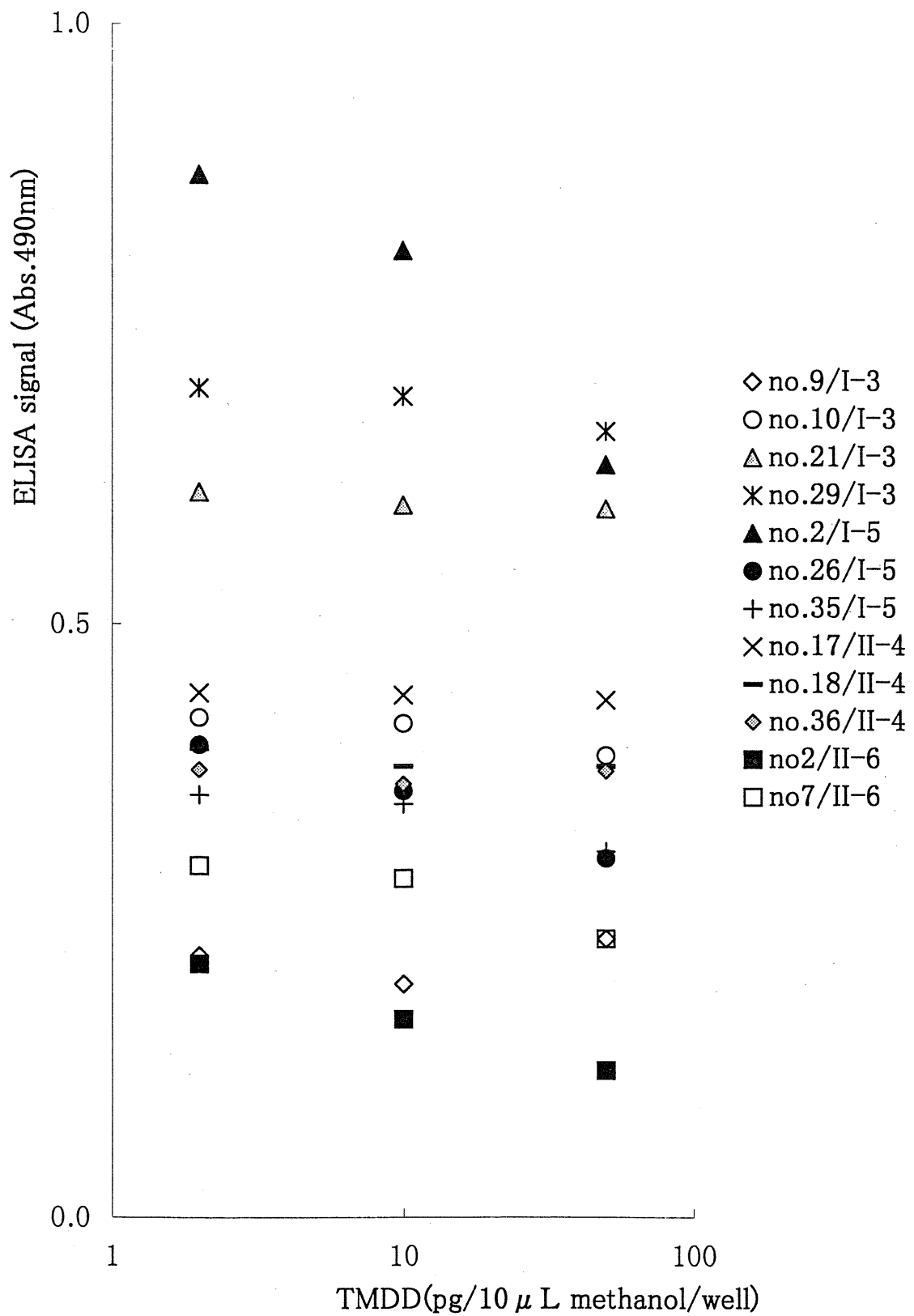


図 5 遊離ハプテン (TMDD) の添加による結合阻害効果
 抗血清(5回追加免疫後): 50000-500000 倍希釈
 HRP: 0.2-1.0 μ g/mL

平成 11 年度 厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
研究報告書

生体試料中ダイオキシンの酵素免疫アッセイ法の開発研究
—免疫アッセイの検出系高感度化の検討—

主任研究者 松木容彦 食品薬品安全センター秦野研究所 研究部長
研究協力者 前田昌子 昭和大学薬学部 教授

研究要旨

生体試料中のダイオキシンの定量のための免疫アッセイの高感度な検出系の検討を行う目的で、従来から当研究室で開発研究してきた化学及び生物発光検出法の詳細な検討を行った。

A. 研究目的

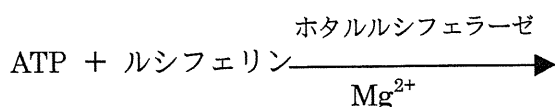
生体試料中のダイオキシンの定量を目的に免疫アッセイの検出系の高感度化を目的として主として、化学及び生物発光検出法を検討する。本年度は抗体の調製待ちのために、モデルとして生体内微量生理活性物質を用いて生物発光検出法について検討した。著者らは既に化学発光検出法を用いた種々の生体成分の超微量分析法を確立し、一部は実用化されている。ホタル等の生物発光の効率は化学発光法に比べて、その量子収率は約 20 倍高い、より高感度な生物発光検出法を用いれば、従来検出出来なかった微量の成分が検出可能となり、病態の解明に寄与出来る可能性を秘めている。本研究では遺伝子工学で再構成された耐熱性のホタルのルシフェラーゼによる生物発光を検出に用いる超高感度なアッセイ系を確立する目的で以下の検討を行った。

(1) アセテートキナーゼ(AK)を標識酵素

とする生物発光検出免疫アッセイによる生体内微量成分の測定

(2) ピルベートホスフェートジキナーゼ(PPDK)を標識酵素に用いる生物発光検出免疫アッセイによる生体内微量成分の測定

ホタルルシフェラーゼの発光反応は



オキシルシフェリン + 光 (生物発光) で示される。ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応を用いる生物発光検出法は ATP に対して特異的かつ高感度であるため、種々の生体試料中 ATP の測定に利用されている。用いたリコンビナントのホタルルシフェラーゼは、耐熱性ではあるが、化学修飾には弱く不安定であるため、免疫アッセイやブロットティングアッセイの標識酵素としては使用できない。そこで、ATP 産生酵素であるアセテートキナーゼ(AK)との組

み合わせによる方法をも考案した。すなわち、AK を標識酵素とし、AK 活性の測定に基質にアセチルリン酸と ADP を用い、生成した ATP を上記の反応で測定する方法である。多くの応用例を検討していく中で、AK を用いる生物発光法は基質に ADP を用いているため、試薬の汚染等によりアデニレートキナーゼ (AdK) が混在するとブランクの上昇が見られ、感度が低下する可能性が考えられた (Fig.1)。一方ピルベートホスフェートジキナーゼ PPDK は、AMP、PPi、Phosphoenolpyruvate (PEP) を基質として ATP を産生する酵素であり、基質に ADP を必要としないため、高感度生物発光検出を行う上で AdK によるブランクの上昇の影響を受けにくい。さらに PPDK は熱や化学的修飾に対する安定性に優れており生物発光検出酵素イムノアッセイ (BL-EIA) への応用も容易であると考えられる。そこでさらに従来のアセテートキナーゼよりバックグラウンドの低い PPDK を標識酵素に用いる目的で、検出にルシフェリン及び遺伝子組み替えで調製したルシフェラーゼを用いる PPDK の生物発光検出法を開発した。PPDK を標識酵素に用いインスリン、アルファフェトプロテイン、PACAP-38 等の生物発光酵素イムノアッセイを確立した。

B. 研究方法及び結果

PPDK 生物発光測定法 PPDK 測定用発光基質溶液は、560 μ M PEP、304 μ M PPi、5 μ M AMP、0.35mM ルシフェリン及び 1mg/mL ルシフェラーゼの条件で最適化された。発光時間の経時変化を観察したところ、約 15 分から一定となり測定し

た 120 分までは安定した発光を示した (Fig.2)。従って以下の実験では発光基質溶液を添加後、15 分後の発光強度を 5 秒間積算し測定した。その条件下での PPDK は $3.5 \times 10^{-20} \sim 4.5 \times 10^{-16}$ mol/assay の間で直線性を示し、最小検出感度は 1.36×10^{-20} mol/assay であった。AK の生物発光検出法と同程度の感度が得られた (Fig.3)。また、検量線の各点における再現性は、日内 (CV%、n=8) で 2.8% 以下で良好であった。

BL-EIA α -フェトプロテイン (AFP) の BL-EIA において、最小検出感度 (Blank+3SD) は 2.79×10^{-18} mol/assay であり、電気化学発光イムノアッセイの検出限界よりも 30 倍高感度であった。同時再現性は日内 (CV%、n=6) で 2.3~6.1%、日間 (CV%、n=9) で平均 4.1% で共に良好であった。また、ヒト血清試料からの添加回収率は $87.5 \pm 13.8\%$ (mean \pm SD) であった。昭和大学病院臨床検査部の検体についての日常分析法 (電気化学発光検出イムノアッセイ) との相関 ($r=0.998$, $n=94$) も良好であった。同様にインスリンの BL-EIA では、最小検出感度が 9.26×10^{-17} mol/assay であり、その同時再現性は日内 (CV%、n=8) で 1.4~5.7%、日間 (CV%、n=8) で平均 7.4% で共に良好であった。ヒト血清試料からの添加回収率は $82.9 \pm 12.7\%$ (mean \pm SD) であり、蛍光酵素イムノアッセイとの相関 ($r=0.942$, $n=104$) も良好であった。

C. 結論

本研究により確立された方法は、極微量の試薬の汚染による AdK の存在下でもブ

ランク値の上昇の影響を受けることなく、高感度でその有用性は生体試料の測定にも十分耐用可能であった。反応が迅速で、高感度で、手軽で、廃棄の簡単な生物発光検出イムノアッセイが種々の生体成分や生体中の薬物等の有力な分析法となると期待される。次年度はダイオキシンの抗体が入手出来るので本検出法を応用する予定である。

D. 研究発表

1. 論文発表

1) K. Ito, T. Goto S. Murakami and M. Maeda: Bioluminescent enzyme immunoassay for mouse interleukin-6 using acetate kinase as, *Anal. Sci.*, 15: 91 - 93 (1999)

2) K. Ito, T. Goto, S. Murakami, M. Maeda, S. Shiota and A. Arimura: Bioluminescent enzyme immunoassay for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide 38 (PACAP38), *Anal. Chim. Acta*, 382: 245 - 251 (1999)

3) H. Arakawa, A. Kokado, S. Yoshizawa, M. Maeda, A. Tokita and Y. Yamashiro: Bioluminescent PCR-RFLP enzyme-linked immunosorbent assay for analysis of vitamin D receptor gene polymorphism, *Anal. Sci.*, 15: 943 - 949 (1999)

4) 前田昌子: 生物発光反応を用いた生体

成分の免疫化学的測定法, 免疫化学測定法研究会報, 49-54 (1999)

2. 学会発表

1) 西村一美、伊藤克敏、荒川秀俊、前田昌子、村上成治: Pyruvate Phosphate Dikinase を用いる新規生物発光検出法の開発とその応用, 日本薬学会第 119 年会 1999 年 3 月

2) 伊藤克敏、村上成治、後藤照貴、西村一美、荒川秀俊、前田昌子: ルシフェリン-ルシフェラーゼ生物発光検出による生体成分の微量分析, 第 13 回生体成分の分析化学シンポジウム 1999 年 8 月

3) 西村一美、伊藤克敏、村上成治、荒川秀俊、前田昌子: PPK を用いる新規生物発光検出法の開発とその応用, 第 39 回日本臨床化学学会年会 1999 年 10 月

4) 西村一美、伊藤克敏、荒川秀俊、村上成治、前田昌子: Pyruvate Phosphate Dikinase を標識酵素に用いる生物発光検出酵素イムノアッセイの検討, 日本薬学会第 120 年会 2000 年 3 月

E. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

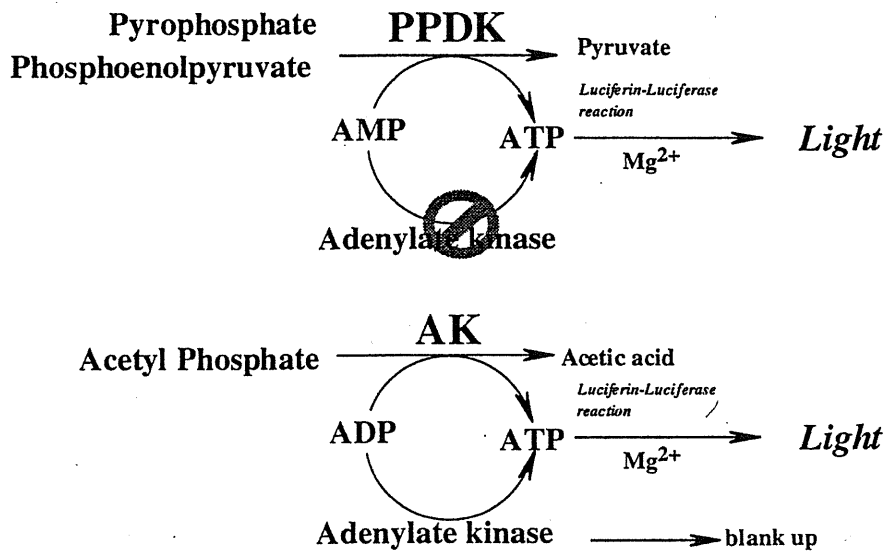


Fig.1 Principle of Bioluminescent Assay for Pyruvate Phosphate Dikinase (PPDK) and Acetate Kinase (AK).

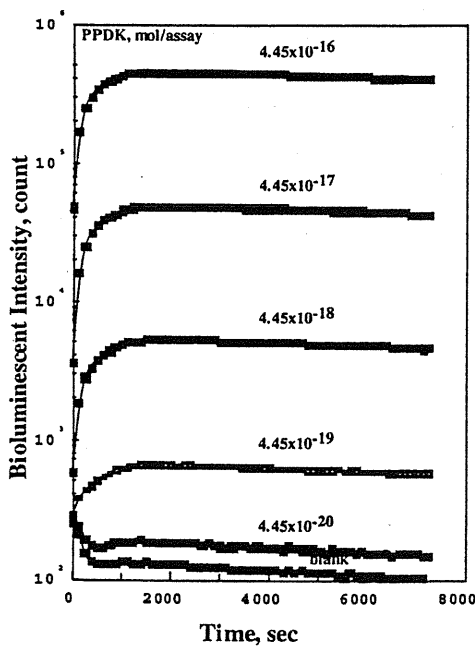


Fig.2 Timecourse of light emission from Bioluminescent Assay of PPDK

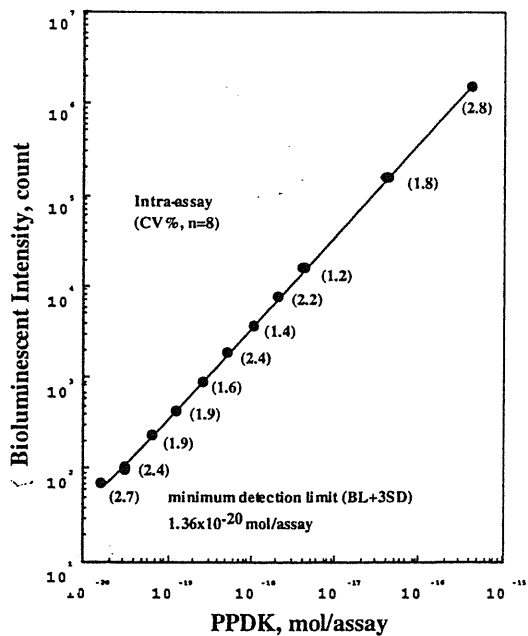


Fig.3 Standard Curve for PPDK