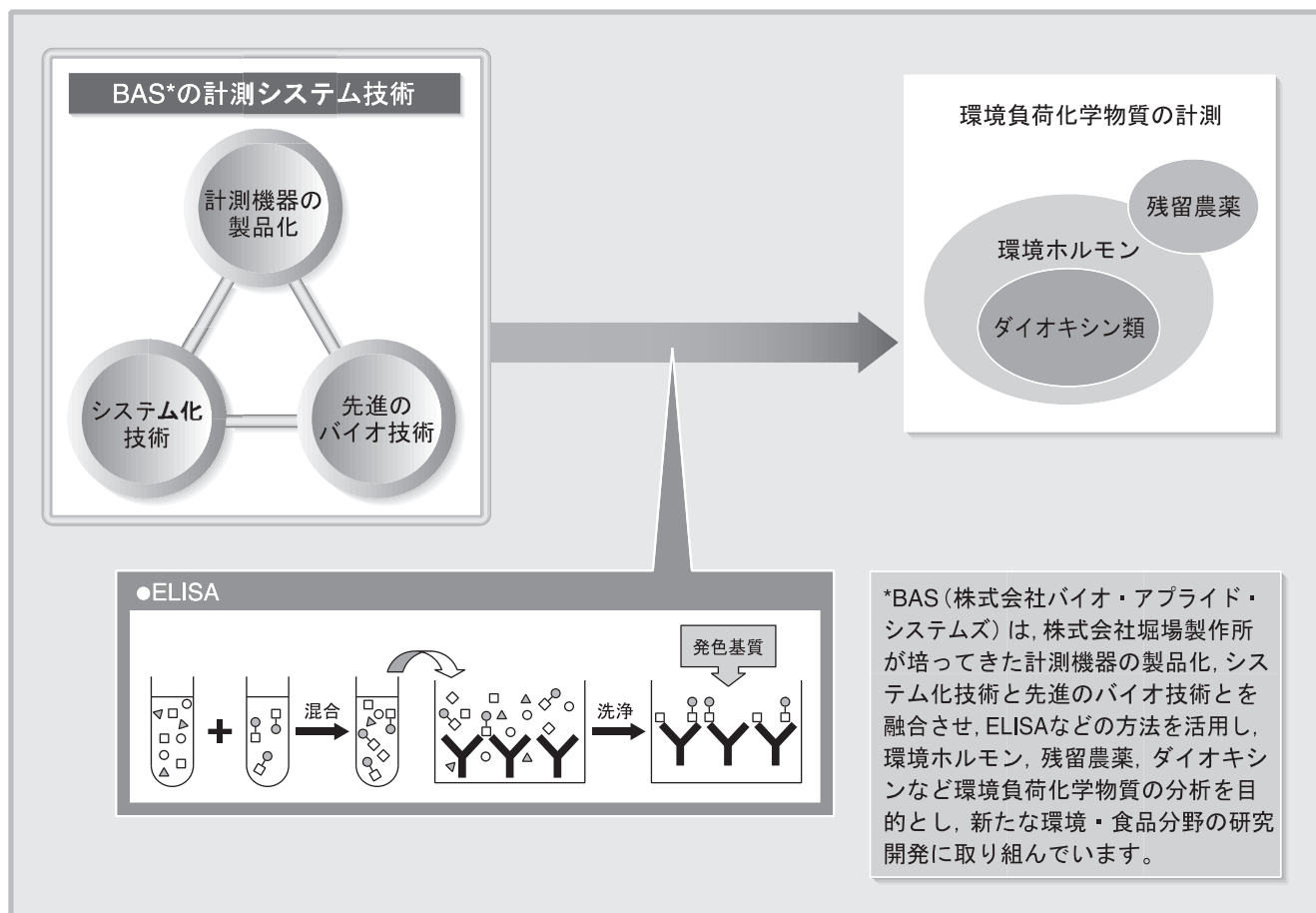


抗原抗体反応を利用した微量化学物質の分析と 食品・環境分野への応用

Analysis of Trace Amount of Chemical Compounds Utilizing Antigenantibody
Reaction and its Application to the Fields of Food and Environment

三宅 司郎*

* 株式会社 バイオ・アプライド・システムズ



要旨

環境や食品中に含まれる残留農薬や環境ホルモンなどの微量化学物質を、正確かつ迅速に測定するための分析技術が求められている。最近、ELISAは、これらの要求を満たす分析法として注目されており、株式会社バイオ・アプライド・システムズにおいて精力的に開発が進められている。本稿では、その測定原理を解説するとともに、微量化学物質測定への応用展開について紹介する。

Abstract

Analytical technology has been required for accurate and rapid determination of trace amount of chemical compounds, such as residual pesticides or endocrine disruptures, contained in foods and environments. Enzyme linked immuno-sorbent assays (ELISA) have been recently focused as assay methods for their determination, and development of the reagents are energetically proceeded by Bio Applied Systems Inc. In this article, principle of the assay method and its application to the trace amount of chemical compounds determination are introduced.

1 はじめに

英国で社会恐慌をきたした狂牛病が、国内でもついに発生した。政府はこの緊急の事態に対応するために、検査体制を急ピッチで整備している。狂牛病は、プリオンという特殊なたんぱく質によって引き起こされることから、その存在を確認することによって感染の有無を判定することが出来る。プリオンのような特殊なたんぱく質を測定する方法として、代表的なものに免疫化学測定法がある。狂牛病の検査においても、ELISA(Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay)やウエスタンブロット(Western Blotting Detection System)という免疫化学測定法を用いてプリオンの存在量が測定されている。

免疫化学測定法という言葉聞き慣れない方もおられるかもしれないが、医学・生化学・薬学などの分野で汎用されている測定法である。本法は、たんぱく質ばかりでなく薬物のような低分子のものからウイルス・細菌などの微生物まで、広い範囲の物質(微生物)の測定や検出に用いられている。病院で行われる臨床検査もかなりの種類が免疫化学測定法によってなされており、私たちにとって実は大変身近な測定技術なのである。たとえばホリバが開発した自動血球計数CRP測定装置LC-175CRPの測定項目である炎症マーカー「CRP」についても、ラテックス凝集法という免疫化学測定法が応用されている。

株式会社バイオ・アプライド・システムズ(BAS)では、免疫化学測定法の中でもELISAに着目し、これを応用した環境負荷化学物質(農薬・環境ホルモンなど)の迅速・高感度な測定技術の開発を進めている。本測定法は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)やガスクロマトグラフィー(GC)を用いた従来法と違い、サンプルの前処理がほとんどいらぬことから、迅速・簡便かつ廉価な測定方法といえる。本稿では、BASが開発を進めている環境負荷化学物質測定キットのためのELISA技術について紹介する。

2 ELISAの測定原理

2.1 抗体

ELISAの測定原理を説明するためには、まず抗体というたんぱく質の性質を理解しなければならない。

私たちは、なぜ風邪をひいてもすぐに治るのだろうか? この問いに対する答えは、「体内の免疫系が働き風邪の原因ウイルスを排除するから」である。免疫系で重要な役割を担っているのが、抗体と呼ばれる可溶性のたんぱく質である。ウイルスなどの微生物が体内に侵入すると、免疫系ネットワークが作用し微生物を排除すると同時に、その微生物を特異的に認識する抗体の産生が始まる。抗体は、血液やリンパ液の中で体内を駆け巡りながら侵入した微生物と結合し、これを不活化させるとともに免疫系ネットワークを活性化させる。予防接種は、病原微生物に対する抗体をあらかじめ体内で作らせておくということである。

抗体は、生体中に存在しない外来たんぱく質など高分子化合物を鋳型(免疫原)にして産生される。しかし、低分子化合物でもたんぱくと結合させることで抗体を産生できる場合があり、このような化合物をハプテンと呼ぶ。BASではこの現象を利用して環境負荷化学物質に対するハプテンを合成し、抗体を作製している。

2.2 測定プロセス

ELISAには数多くの変法があるが、環境負荷化学物質の測定には直接競合ELISA(図1)を用いることが多い。

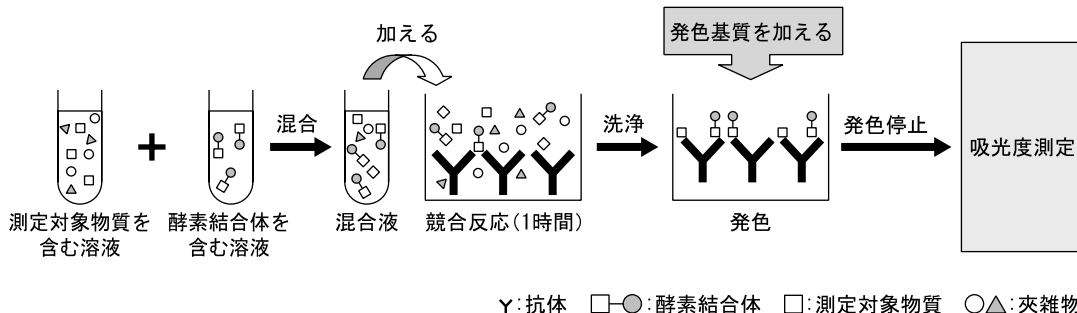


図1 直接競合ELISAによる測定の模式図

直接競合 ELISA は、以下(1)~(5)の5つの過程を経て測定が行われるが(1)と(2)はあらかじめ試薬化しており、実際の測定は(3)~(5)の過程だけでよい。

(1) 抗体の固相化

測定対象物質と特異的に結合する抗体をプラスチック容器(図2)の底面に固定化する。

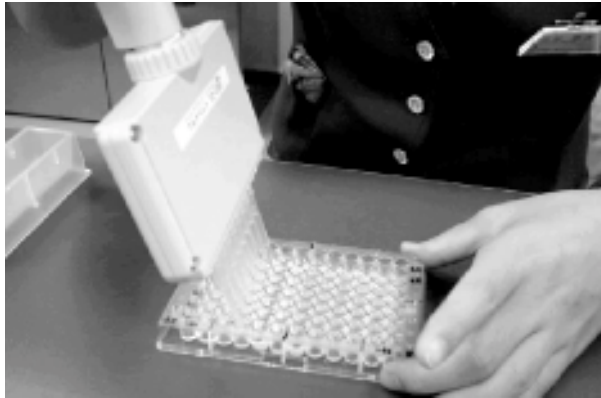


図2 プラスチック容器への抗体固相化風景

(2) 酵素による測定対象物質の標識化

測定対象物質のカルボン酸誘導体を合成し、酵素(西洋ワサビペルオキシダーゼ)のリジン(酵素を構成するアミノ酸の一種)残基と共有結合(酵素結合体)させる。

(3) 競合反応

測定対象物質を含む溶液と酵素結合体の溶液とを試験管中で混合する。この混合液を抗体固相化済みのプラスチック容器中に加えて、競合的に反応させる。1時間程度反応させた後、抗体と未反応な物質を洗浄操作によって取り除く。

(4) 発色反応

洗浄した容器に酵素の発色基質を加える。固相化抗体へ酵素結合体が結合していると、酵素反応によって発色基質が着色する。測定対象物質の濃度が高いと酵素結合体の抗体への結合量が減り着色しないが、測定対象物質の濃度が低い場合は逆に着色の程度が増す。

(5) 対象物質の測定

発色反応における着色の程度は測定対象物質の濃度に依存することから、両者の関係をグラフ化し標準曲線を作成することができる。未知試料中の物質の測定は、その試料の発色結果を標準曲線(図3)と比較することによって行う。

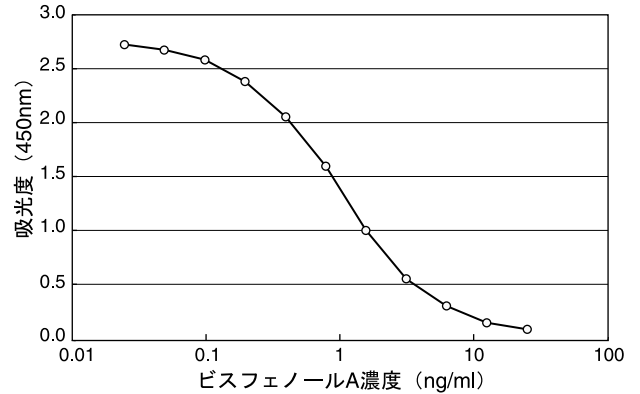


図3 ELISAによるビスフェノールAの測定(標準曲線)

3 試料の測定

3.1 液体試料

試料が液体の場合は、その1ml程度を濾過するのみで(清澄な場合は不要)ELISAへ供試することができる(図4a)。また、試料が粘張性を帯びている場合は、適宜希釈する必要がある。

一方、従来法のHPLCやGCは、500mlから1000ml程度の試料から対象物質を抽出・濃縮しなければならず、サンプリングと前処理に多大な労力と時間を必要とする。ELISAでは、これらの負担を大幅に軽減できる。

3.2 固形(食品・土壌)試料

試料が固形物の場合は、ELISAにおいても測定対象物を抽出する必要がある(図4b)。その際、抽出溶媒にはメタノールを用いる。試料の2.5倍以上のメタノールで抽出し、濾過もしくは遠心分離によって上清を得る。これを試料希釈液によってメタノール最終濃度が10%以下となるように希釈し、ELISAへ供試する。

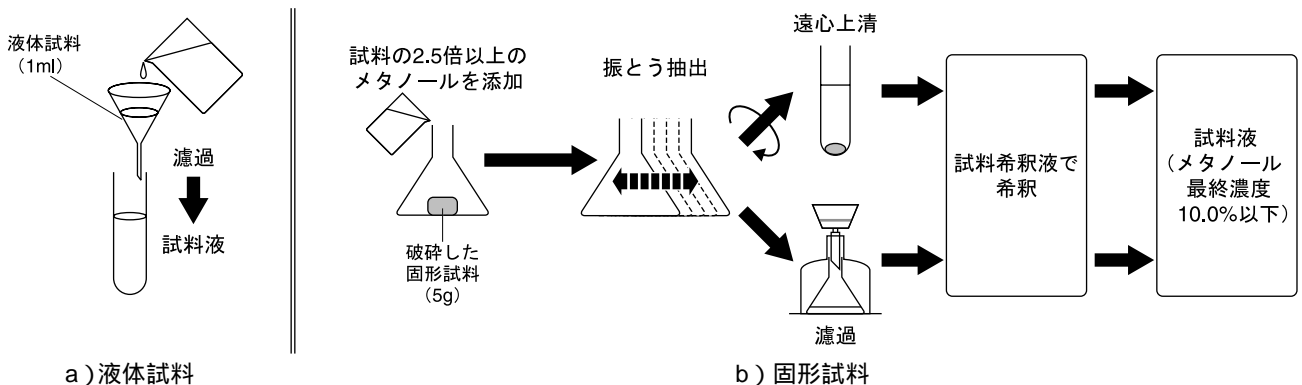


図4 試料の前処理法

固形試料の前処理は液体試料と比較してやや煩雑ではあるが、HPLCやGCでは通常3段階程度の抽出・精製を繰り返さねばならず、これらの負担を大幅に軽減できる。したがってELISAは、食品流通時の農薬残留分析など迅速性が必要であったにもかかわらず、それに答える測定法のなかった分野で、とりわけ有効な測定法といえる。

4 ELISAの展開

ELISAは、環境や食品に含まれる微量化学物質を迅速かつ簡便に検出することができる。BASでは、神戸大学遺伝子実験センターの大川秀郎教授との共同研究の成果に基づき、内分泌攪乱化学物質(環境ホルモン)の一つといわれているビスフェノールAをはじめ、各種の環境負荷化学物質に対する免疫化学測定キットの開発を進めている。

またBASは、堀場製作所が2002年12月に株式会社環境免疫技術研究所より購入した環境負荷化学物質への免疫化学測定法に関する研究成果を利用し、免疫化学測定キットの製品化と食品・環境分野への展開を計画している。食品の生産や流通現場などで手軽に扱うためには、簡単な読取器や試薬に合わせた専用ソフトの開発も重要である。この点については、親会社である堀場製作所が蓄積してきたノウハウが活用できる。

5 おわりに

ELISAは、従来環境負荷化学物質の測定に用いられてきたHPLCやGCと比較し、迅速・簡便・廉価な測定手段を提供できる。しかし、その開発には対象物質のハプテンの合成(有機化学合成技術)、抗体作製(ポリクローナル抗体・モノクローナル抗体・遺伝子組換え抗体作製;生化学的・遺伝子工学的技術)、測定系開発(試薬化技術)、周辺装置開発とそれぞれ専門性の高い技術の組み合わせが必要である。BASでは、分析・医学・農学・電子工学などの専門家が日々議論を重ねELISA開発に取り組んでいる。



三宅 司郎

Shiro MIYAKE, PhD.

株式会社バイオ・アプライド・システムズ
医学博士

会社案内

株式会社バイオ・アプライド・システムズ

Bio Applied Systems Inc.

設立 / 2000年6月30日

代表者 / 代表取締役社長 富田勝彦

資本金 / 5,000万円(株式会社堀場製作所全額出資)

人員 / 9名(2002年2月13日現在)

概要

バイオ・アプライド・システムズは環境ホルモン、残留農薬、ダイオキシンなど環境負荷化学物質の高感度分析をビジネスターゲットとして設立された市場・技術創造型のベンチャーカンパニーです。当社は、堀場製作所が培ってきた計測機器の製品化、システム化技術と先進のバイオ技術とを融合することで、環境・食品分野の新たな市場開拓を目指し、研究開発に取り組んでいます。また、当社は、環境負荷化学物質の分析に関し、豊富な研究実績をもつ大川秀郎神戸大学教授が取締役として参画しています。大川先生の研究成果や、先般堀場製作所が購入した経済産業省の基盤技術促進センターが支援する株式会社環境免疫技術研究所の研究成果に基づく開発、そして実用化を速やかに進めていきます。