

ホリバ・バイオテクノロジーの 基盤技術と新製品

安井 義晶

要旨

株式会社ホリバ・バイオテクノロジー社(HBT)は、先端バイオテクノロジーを駆使して残留農薬やダイオキシンなどの環境負荷化学物質を迅速・高感度に分析するシステムの開発を目指して2000年6月に設立されたベンチャーカンパニーである。本稿では、当社の設立背景、免疫化学測定法の一つである酵素標識免疫測定法(ELISA)を使った試薬測定キット及びマイクロプレートリーダーMPR-01、更に今後の方向性などを紹介する。

1 はじめに

株式会社ホリバ・バイオテクノロジー社(HBT)は、HORIBAが開発した技術シーズの事業化を目指して2000年6月に設立された。

まずは、神戸大学遺伝子実験センターの大川秀郎教授の研究成果と、HORIBAの機器分析に関するノウハウを融合することから着手した。大川教授は、特定の物質と選択的に反応する抗体を使った超微量物質の検出に関する多くの研究成果を上げている。一方、HORIBAは半導体センサを使ったユニークな計測機器を多数製品化している。当社は、両者シーズと基盤技術を最大限に活用し、他に類を見ない環境用計測機器の製品化を目指している。

HBTは、創立間もなく大川教授を取締役に迎える一方で、通商産業省(当時)が推進するナショナル研究開発プロジェクト“エコモニタリングプロジェクト”に参加し、“生物の持つ機能を利用した環境中化学物質の高感度検出・計測技術の開発”に着手した。翌2001年には、HORIBAが(財)基盤技術研究促進センターの支援で設立された株式会社環境免疫技術研究所から購入した特許や抗体産生細胞株を含めた残留農薬の免疫化学測定法に関する研究成果の移管を受け知的資産の充実を図った。当社は、まさに大学発のベンチャー企業として船出した。

2002年には、本社社屋(図1)をHORIBAから移転し、研究・生産棟を設置し本格的に事業を開始した。また、近畿経済産業局が推進する新規のナショナルプロジェクトにも参加し、各種設備機器の充実を図ると共にバイオ・計測関係の研究者・技術者を多数採用し研究開発環境を充実した(図2a,b)。2003年の現在、バイオテクノロジー(BT)はもちろん、ナノテクノロジー(NT)や情報技術(IT)の融合分野に向けて新たなチャレンジを始めている。



図1 本社社屋

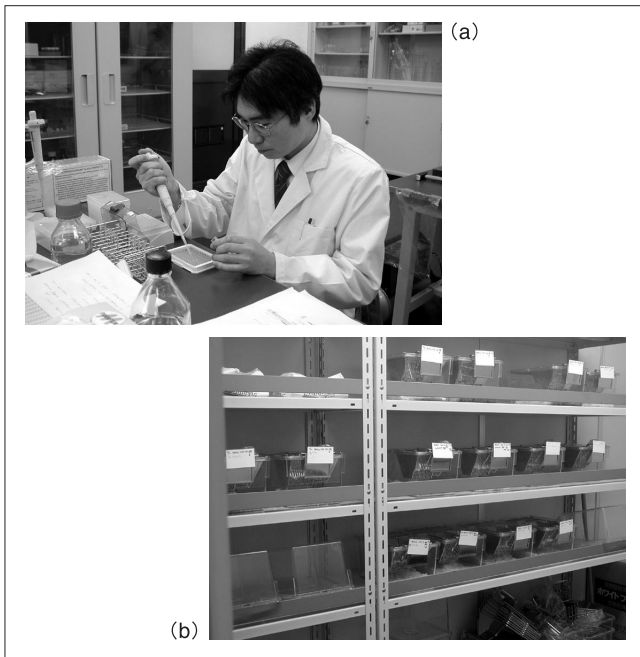


図2 研究開発環境の例
(a)基礎実験,(b)実験用マウスの飼育室

2 免疫化学測定法による微量化学物質の分析

学校や企業で行う定期健康診断における血液検査では、血液中のホルモンや酵素、タンパク質などを定量分析しているが、それらのほとんどが免疫化学測定法に基づく検査キットを使っている。

通常、動物は、ウイルスや細菌、蛇の毒素などが体内に侵入してくると、リンパ球の免疫作用によって体を防御している。リンパ球は、細菌などの外敵（抗原）に対して選択的に結合する抗体（タンパク質の一種）を生産し、この抗体が抗原にとりついて抗原を不活性化する。これを液性免疫機構という。更に、抗体と結合した抗原は、マクロファージといわれる食細胞（白血球の一種）によって分解され、体外へ排出される。これを細胞性免疫という。このように、液性免疫と細胞性免疫によって我々の体は、常に外敵から守られている。これらの免疫メカニズムを使って微量の化学物質を分析する手法を免疫化学測定法と呼んでいる。

従来、残留農薬などの微量の化学物質は、高速液体クロマトグラフィ（HPLC）、ガスクロマトグラフィ（GC）、質量分析計（MS）などを公定法として分析されてきた。しかし、これらの装置は専門の技術者による複雑な操作が必要であり、更に分析結果を得るまでには数日あるいは1～2週間も必要としていた。

近年、ヨーロッパや日本国内で社会恐怖を巻き起こした狂牛病は、プリオンという微量のタンパク質が原因で脳の萎縮が起こるといわれ、狂牛病のスクリーニング検査用として大量のサンプルを迅速、簡便でしかも、廉価な検査法として免疫化学測定法を使った分析方法が注目されている。

HBTでは、現在、農産物や食品、あるいは土壌や河川水などに残留している農薬の分析用として、免疫化学測定法の一つである酵素標識免疫測定法（ELISA: Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay）を使った試薬測定キットの開発を進めている。

3 抗原・抗体の開発

免疫化学測定法では、分析すべき対象化学物質に応じて高感度・高選択性で、かつ取り扱いが容易で、コストの安い抗原・抗体の確保が最大の課題となる。HBTでは、最新のバイオテクノロジーを駆使して抗原・抗体の開発、更にそれらを使った試薬キットの製品化に取り組んでいる。

3.1 ハプテン化抗原の化学合成

現在使われている農薬のほとんどは分子量が100～300の化学合成されたもので、抗体産生細胞（リンパ球）で抗体を作ることは困難である。そこで、血液に含まれるアルブミンのような大きな分子量のタンパク質の表面に、分子量の小さな農薬を結合させたハプテン化抗原を化学的に合成させることによって、抗体産生細胞が農薬を異物として認識し抗体を産生するようになる。

3.2 モノクローナル抗体産生細胞株

抗体産生能力とガン細胞のように永久に増殖する両方の性質を兼ね備えた細胞が実現できれば、生体外でも同じ抗体を永久に産生することが可能となる。それを実現させたのが、ドイツの免疫学者ケーラー（Kohler, J.F. Georges）で、正常なリンパ球とガン化したリンパ球とを細胞融合させて雑種細胞（ハイブリドーマ）を作製し、このハイブリドーマを使ってモノクローナル抗体を得ることに1975年に成功した。

HBTは、この技術をベースとして、マウスを使ったモノクローナル抗体を産生する細胞株（ハイブリドーマ）の作製技術を確立し、社外からの受託開発に応じる体制を整えている。

図3にモノクローナル抗体の製作プロセスを示す。

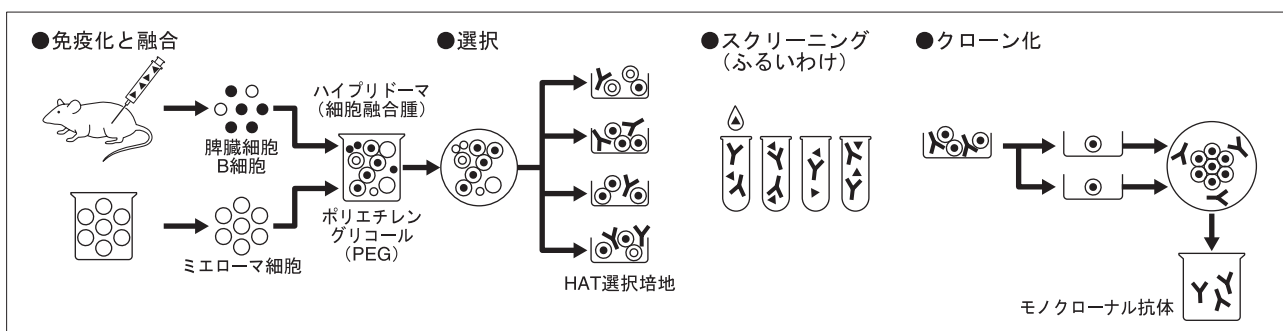


図3 モノクローナル抗体の製作プロセス

3.3 遺伝子組換による抗体作成

遺伝子組換による抗体の生産技術とは、前述の抗体産生細胞株から得られた抗体を生産する遺伝子を分離し、得られた遺伝子を大腸菌に組み込み、更にその大腸菌を培地の中で増殖させることによって目的とする抗体を大量かつ安価に生産する手法のことである。HBTでは、エコモニタリング・プロジェクトの中でこの技術の実用化を進めている。図4に環境ホルモン(内分泌かく乱物質)の一種とされるビスフェノールAに特異的なモノクローナル抗体可変領域のクローニングプロセスを示す。

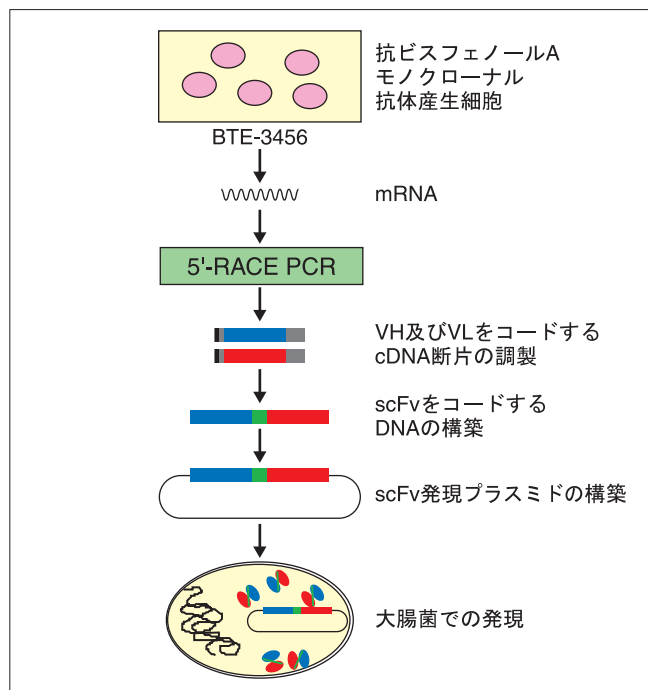


図4 ビスフェノールAに特異的なモノクローナル抗体可変領域のクローニングプロセス

4 免疫化学測定法試薬キット

免疫化学測定法試薬キットは、96穴のマイクロプレートと2次抗体試薬/発色用停止試薬/検量線用の標準試薬などの生理活性物質の数種類で構成されている。図5に本キットの外観を、表1に主な仕様例を示す。

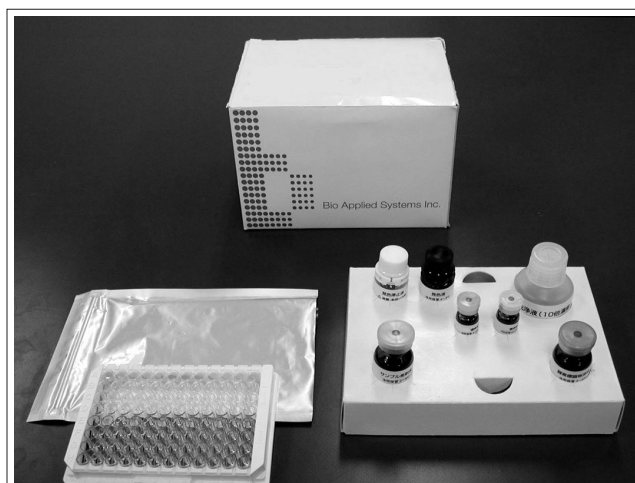


図5 免疫化学測定法試薬キット

表1 免疫化学測定法試薬キットの主な仕様例 (農薬アセタミプリド測定用)

品名	容量	剤型	数量
抗体プレート	8ウェル×12列 (96ウェル)	乾燥品	1枚
アセタミプリド標準試薬L(0.3ppb)	1mL	凍結乾燥品	1本
アセタミプリド標準試薬H(4ppb)	1mL	凍結乾燥品	1本
酵素標識物試薬	5mL	凍結乾燥品	2本
洗浄試薬(10倍濃縮)	50mL	液体	1本
発色停止試薬	13mL	液体	1本
発色試薬	13mL	液体	1本

4.1 測定プロセス

HBTの免疫化学測定法試薬キットは、直接競合ELISA法を採用しており、測定は次のプロセスで行う。図6に直接競合ELISA法の測定フローを示す。

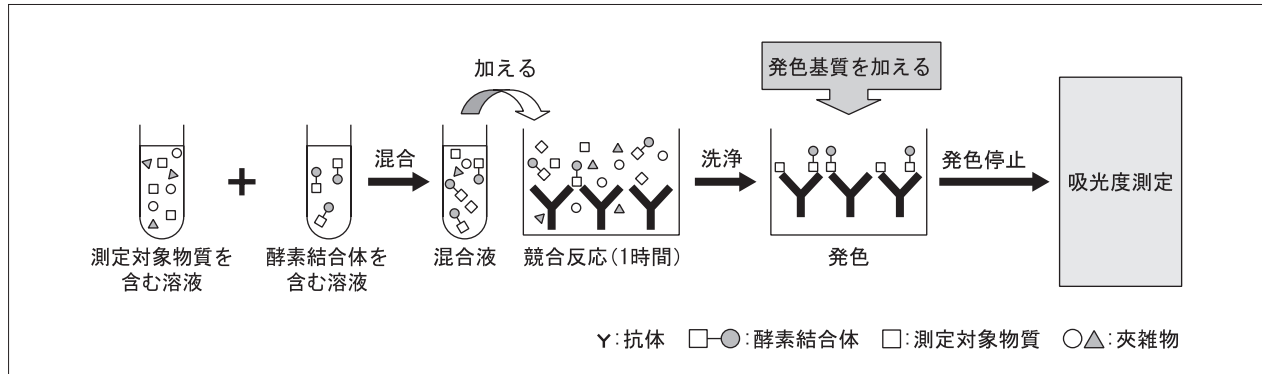


図6 直接競合ELISA法の測定フロー

(1) 抗体の固定化

測定対象物質と特異的に結合する抗体を96穴のマイクロプレートの穴底面に固定化する。

(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て、酵素(西洋ワサビペルオキシダーゼ)のリジン残基と共有結合させる。

(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定化済みのプレート穴に加えて、競合的に反応させる。約1時間反応させた後、抗体と未反応物質を洗浄操作によって除去する。

(4) 発色反応

洗浄したプレート穴に酵素の発色基質を加える。固定化抗体へ酵素結合体が反応していると、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着色しないが、濃度が低い場合は着色の程度が増す。

(5) 対象物質の測定結果

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して、未知試料中の測定対象物質の濃度を算出する。

ただし(1)(2)の工程はキット中のプレートにあらかじめ処理が施されているため、実際の測定者は(3)~(5)の作業をすればよい。

4.2 マイクロプレートリーダー

HBTは、免疫化学測定法試薬キットに合わせてマイクロプレートリーダーMPR-01(図7)を製品化している。本機は吸光強度を正確に測定、演算、表示するデスクトップタイプのマイクロプレートリーダーで、次のような特長を持っている。



図7 マイクロプレートリーダーMPR-01

- [1] 固体発光素子を使って広い濃度範囲(0 ~ 2.9Abs) を安定に計測可能。
 - [2] マイクロプレート1枚あたり10秒以下の高速で測定。
 - [3] 測定結果は汎用の表計算ソフトで処理するため、データの転用・活用が容易。
 - [4] 小型・薄型で、狭い研究室でも場所をとらない。
- 図8にMPR-01の機器構成を、表2に主な仕様を示す。

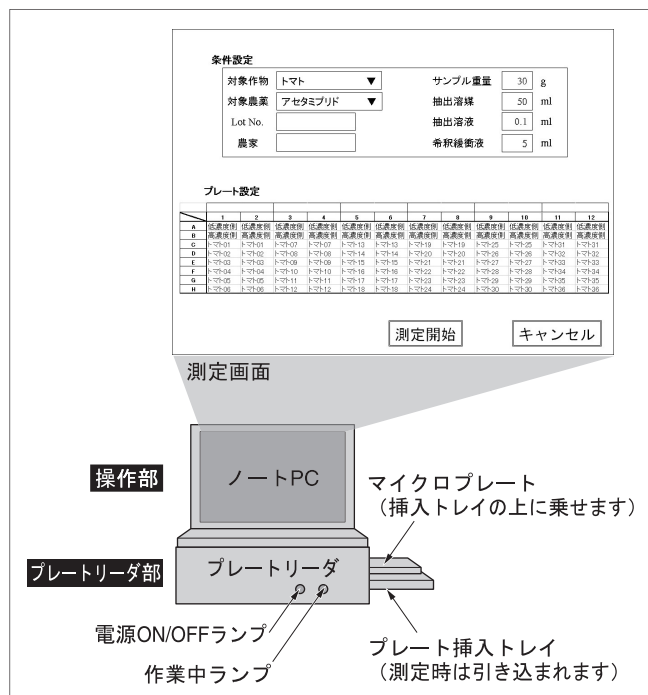


図8 MPR-01の構成

表2 MPR-01の主な仕様

[プレートリーダー部]

測光方式	8列平行光路、垂直照射方式
測定範囲	0 ~ 2.9Abs.
測定波長	450nm
測定モード	1波長または2波長可能 縦列 / 横列選択可能
測定可能プレート	96ウェルマイクロプレート
測定時間	10秒以下 / プレート
光源	固体発光素子
外部接続	D-SUB(37pin) 1ポート
外形寸法/重量	300(W) × 300(D) × 65(H) mm / 約7kg

[操作部]

操作本体	ノートPC
外部接続	A/D変換PCカード+接続端子 (D-SUB(37pin))

5 おわりに

科学技術の目覚ましい発展は、多くの利便性をもたらしたが、一方では、農産物の残留農薬、環境水中の外因性内分泌攪乱物質（環境ホルモン）、土壌中のダイオキシンなどの微量化学物質が、生態系の根本を脅かす危険が指摘されている。このような危険を正しく把握しクリアするために、微量化学物質の迅速で、高感度かつ簡便な分析システムが不可欠である。

HBTが研究開発を進めている免疫化学測定技術は、まさに、このようなニーズにお応えできる最高の手段であるものと確信している。

バイオテクノロジーは21世紀の人類を幸福に導く最大のコア・テクノロジーだと言われているが、現段階では、生体が持つ豊富な機能のごく一部しか活用できていない。HBTは、HORIBAが長年培ってきた分析技術をベースとし、最新のバイオテクノロジーと情報技術を駆使して、人類の真の幸福に向けて貢献したいと願っている。



安井義晶
Yoshiaki Yasui

株式会社ホリバ・バイオテクノロジー
技術顧問