

<特集>

抗原・抗体反応—イムノアッセイ(ELISA)法による有害物質の計測

河野 猛、伊東 茂壽

(株)堀場製作所 医用システム統括部

(〒601-8510 京都市南区吉祥院宮の東町2番地 E-mail:takeshi.kono@horiba.com)

概要

様々な化学物質の環境への影響が懸念される中、抗体と抗原の特異的な反応を利用したイムノアッセイ(免疫測定)法の一つである酵素免疫測定法(ELISA)は、安価、簡便、迅速な化学物質の分析法として最近注目されている。環境省は「環境技術実証モデル事業」の「化学物質簡易モニタリング」技術としてELISAキットを採用し実証試験を実施した。試験の結果、製品性能の信頼性が確認され、一般環境モニタリングでも一部条件付きながら実用化可能と判断された。また、簡便性でも従来の機器分析法に比べ格段に測定時間、測定件数が改善された。ただ、マトリックスの影響や異性体を有する化合物との反応などELISAが有する懸念事項も改めて浮き彫りとなった。

キーワード: イムノアッセイ、ELISA、環境化学物質、環境技術実証モデル事業、モニタリング

1. はじめに

科学の進歩に伴い利便性を求めて石炭や石油から様々な化学製品が作られて利用されてきた。その結果、近年環境中に排出されたダイオキシン類、性ホルモン類、内分泌攪乱作用の疑われる化学物質、農薬など様々な環境化学物質の人の健康や生態系の及ぼす影響が懸念されている。これらの物質については、排出源を管理することが最重要であるが、その手段として環境中での存在を常に監視するモニタリングが必要となる。現在、化学物質の分析にはガスクロマトグラフィーや高速液体クロマトグラフィーなどの機器分析が使用されている。機器分析は感度や精度に優れ、質量分析機を併用することにより多くの化合物を同時に測定することが出来るなどの特徴を有している。しかし高価な機器を必要とし、抽出や分離、精製などの前処理が煩雑で大量の有機溶剤を使うこと、また正確な結果を出すためには高度な技術が必要であるなど、測定環境が整い定期的に測定を行う分析センターなどには有用であるが、測定環境が限定され非定期的な分析を行う機関などには適していない。これに対し、近年、抗原—抗体反応を利用したイムノアッセイ(免疫測定)

法の一つである酵素免疫測定法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA法)が安価・簡便・迅速な測定法として注目されている。ELISA法は高価な機器を必要とせず特定の場所を選ばないこと、煩雑な前処理を必要とせず機器の操作が簡便であり短時間で測定ができること、しかも機器分析と同等またはそれ以上の感度を有し、一度に多くの試料を測定することができるなどの特徴がある(Table 1)。医薬・臨床の分野ではすでに頻繁に利用され、近年は環境中の化学物質のみならず、作物や食品中の残留農薬の分析にも利用されている。このようは背景のもと、環境省は“普及が進んでいない先進的環境技術について、その環境保全効果等を第三者機関客観的に実証する事業”として平成15年度より「環境技術実証モデル事業」をスタートさせ、平成16年度には新たに追加された「化学物質簡易モニタリング」にイムノアッセイ法が採用された。(株)ホリバ・バイオテクノロジー(現堀場製作所)は主に農作物中の残留農薬分析を目的に販売していたELISAキット(SmartAssayシリーズ)の環境水への適用性を確認するため本事業に2年間参加した。本稿ではELISA法について原理と弊社のキットを例に操作方法の概要を実証モデル事業の結果を含めて述べる。

Table 1 ELISA および機器による環境化学物質測定の特徴

	長所	短所
ELISA	試料前処理が簡単(濾過、溶媒の添加のみ) 大型の分析機器が不要 多検体の同時処理が可能 操作が比較的簡単 出先機関などオンサイトでの分析が可能 前処理から測定まで短時間	1キット1成分の分析 マトリックスの影響を受け易い 交差反応性を示す場合あり 異性体間で感度が違う
機器分析	高精度 多成分一斉分析が可能 同定能力あり	高価な装置と特定のインフラが必要 煩雑な前処理(抽出、精製)あり 有機溶媒の大量消費 操作、データの解析に熟練者が必要 前処理から測定まで時間がかかる

2. イムノアッセイの原理

抗体は特定の物質(抗原)と特異的に結合するという特性をもっており、イムノアッセイ法はこの性質を利用したものである。用いられる抗体はマウス、ウサギなどの温血動物を抗原で免疫することによって作られる。ウイルスや蛋白質などの高分子化合物に対しては測定対象物質を酵素標識抗体で認識させる非競合的阻害法のサンドイッチ法が用いられるが、環境化学物質などの低分子化合物は競合的阻害法によって行われ、直接競合法と間接競合法がある。Fig.1 に低分子化合物に対する測定キットによく用いられる直接競合阻害法の原理の概要を示す。

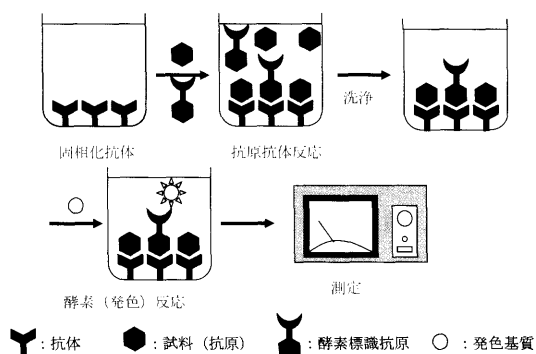


Fig.1 ELISA(直接競合阻害法)の原理

表面に抗体を固相化したマイクロタイタープレート(Fig.2)のウェルに抗原である目的する物質を含む試料と酵素標識抗原を加え、競合的に抗原抗体反応を起こさせる。一定時間反応後、ウェルを洗浄して未反応物を除き、ウェルに発色基質を加え酵素反応で発色させ、発色度をプレートリーダーで測定する。

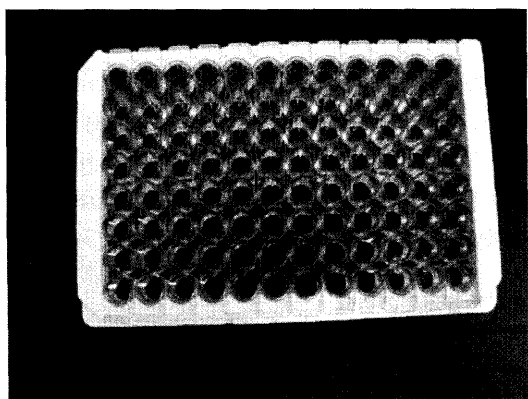


Fig.2 96穴マイクロタイタープレート

試料に抗原が多く含まれる場合には、競合反応で抗体に結合している酵素標識物量が少なくなるので発色度が小さくなり、逆に検体に含まれる抗原の量が少ない場合には、抗体への酵素標識物の結合量は多くなるので発色度は大きくなる。標準試薬(抗原)で濃度と発色度(実際の測定では吸光度で表示)との標準曲線を同時に作成し、吸光度から試料中の抗原の量を算出する(Fig.3)。

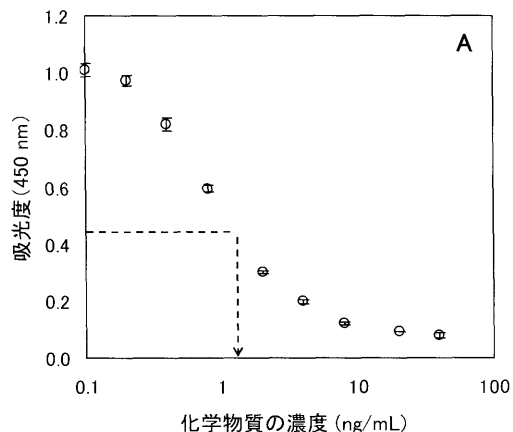


Fig.3 吸光度と濃度との関係

3. キットの構成

現在、環境化学物質に対する ELISA キットの形態としては、96穴のマイクロタイタープレートを用いるプレートタイプと試料の調整と測定に試験管を用いるチューブタイプの2種類がある。プレートタイプである SmartAssay シリーズの測定キットは、①抗体プレート、②標準試薬 L(2本)、③標準試薬 H(2本)、④酵素標識物試薬(2本)、⑤洗浄試薬、⑥発色試薬(Fig.4)およびプレートシールで構成されており、他のメーカーのキットもほぼ同様の構成となっている。

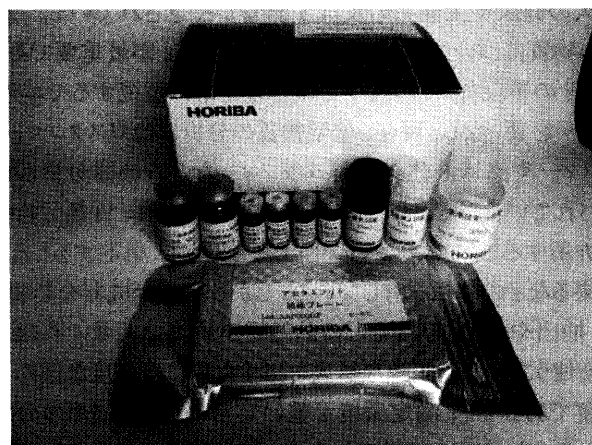


Fig.4 SmartAssay シリーズ測定キットの構成品

4. 測定方法

環境水の場合は、試料をガラス繊維フィルターでろ過し、10%メタノール溶液に調整して、これを試料溶液とする。試料溶液および10%メタノール 1mL で溶解した標準試薬各 150 μ L を別々の試験管にとり、それぞれに精製水で溶解した酵素標識物試薬 150 μ L を加え、試料混合液および標準混合液とする。次いでマイクロプレートのウェルに試料混合液および標準混合液を 1 μ L 加え、室温で1時間反応させる。反応液を吸引除去し、洗浄試薬を精製水で 10 倍に希釈した洗浄溶液で洗浄する。発色試薬 100 μ L を加え室温で10分間反応させた後、発色停止試薬 100 μ L を加える(色が黄

色から青色に変化する)。波長 450nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定する。

5. 環境用 ELISA キット

現在、環境用には POPs (残留性有機汚染物質; PCB, DDT, ダイオキシン類など)、内分泌攪乱作用が疑われる化学物質(ビスフェノール A, アルキルフェノールなど)、性ホルモン類(17β-エストラジオール、エストロン、エストラトリオール、エストロゲン、男性ホルモンなど)、洗剤類(LAS、APE、AE など)および農薬類(フェニトロチオン、ダイアジンなど約 50 種類)などを対象とした ELISA キットが販売されている²⁾。農薬類の 20 種類は弊社が独自に開発した SmartAssay シリーズに属するもので、他の約 30 種類は外国(主に米国)から製品を輸入し販売のみが行われている。弊社は実証モデル事業へ国内での法規制(水道法、公共用水等における農薬の評価指針、ゴルフ場で使用される農薬による水質汚濁の防止に係る暫定指導指針、内分泌攪乱作用が疑われる化学物質および PRTR 法)のいずれかに該当する 10 種類の農薬測定キットを選抜した³⁾。他社からも農薬、内分泌攪乱作用が疑われる化学物質など 6 種類のキットが申請され試験された。

6. 実証試験

実証試験は県または市の公的機関で実施された。試験内容としては、7 項目の基本的な性能試験(①測定範囲試験、②検出下限及び定量下限試験、③繰り返し再現試験、④日間再現性試験、⑤期間再現性試験、⑥プレート間再現性試験、⑦交差反応性試験)と実用的な性能試験(①回収特性

試験、②測定精度試験)が行われた。その結果は環境省のホームページ⁴⁾で閲覧できるが、Table 2 に実証モデル試験を実施した全てのキットについて概要を記す。

製品の基本性能に関しては、一部の技術では企業の申請した製品データより狭い範囲をもつ結果となったが、ピテルタノールを除いた 9 キットで表記載の濃度範囲において十分または妥当な信頼性が確認された。ピテルタノールについては、主な異性体として A と B が存在し、抗体は農薬製剤で存在比の比較的小さい B に高い感度を有する。実証用キットの標準品と実証機関が購入した市販標準品の異性体の割合が異なったため交差反応性に問題が生じたものである。環境モニタリングでの実用性では、実用可能なものと、今後、マトリックスの異なる環境試料に対するデータを蓄積することにより、環境試料に対する実用化が可能とのものがあった。ただ、マトリックスの代表としてのフミン酸や実試料のマトリックスによる影響の少ないキット(例えば、イブロジオン)についても、環境試料に対するデータの蓄積により実用可能な記載はあり、この表現に必ずしも制約されるものではないように思える。しかし、実際の環境水を使った添加回収試験でマトリックスの影響大きく受けたキットも存在しており、また、環境中の妨害物質による影響は常に懸念されることから、様々な環境水に対するデータの蓄積は必要と考えられる。製品操作等の簡便性では、試料の前処理から測定結果が得られるまで 4-5 時間、試料の前処理がない場合には 2-3 時間で測定できること、また、同時測定では 96 穴マイクロタイタープレートの場合は約 25-26 種類(3 重測定)、チューブ法の場合は 13 種類の測定が可能であった。これに対し、機器分析では、3 試料の測定に 1-3 日が必要であった。

以上のように、実証に供したキットについては、製品性能の信頼性が確認され、一般環境モニタリングでも一部は条件

Table 2 実証モデル事業試験結果のまとめ

実証番号	製品名	キットの形態	申請者 ^{*1}	製品性能の信頼性 ^{*2} 測定範囲、μg/L (申請製品データ)	実用性 ^{*3}	製品操作等の簡便性		
						ELISA		機器分析
						測定時間 ^{*4}	同時測定数 ^{*5}	測定日数/測定数
040-0401	アトラジン ELISA キット	96 well	JEC	○ 0.25-5.0 (0.05-5.0)	○	(約5 時間)	25	約3 日/3
040-0402	高感度フェニトロチオン	96 well	HOR	◎ 0.15-2.0 (0.15-2.0)	○	(約5 時間)	25	約3 日/3
040-0403	PCB ELISA System	96 well	EBTL	○ 10-250 (6.5-250)	○	2 時間	25	約3 日/3
040-0404	陰イオン界面活性剤LAS ELISA キット	96 well	JEC	○ 50-1000 (20-1000)	○	(4-5 時間)	25	
040-0405	アルキルフェノール ELISA キット	96 well	JEC	○ 20-500 (5-500)	○	約3 時間	25	約3 日/3
040-0406	イソキサチオン測定キット	96 well	HOR	○ 1-20 (1-20)	◎	約3 時間	25	約3 日/3
040-0407	マラチオン測定キット	96 well	HOR	○ 15-100 (15-100)	◎	約3 時間	25	約3 日/3
040-0408	イソプロチオラン測定キット	96 well	HOR	○ 6-100 (6-100)	◎	約3 時間	25	約3 日/3
040-0501	イミダクロプリド測定キット	96 well	HOR	○ 2-100 (2-100)	◎	約2.5 時間	25	約3 日/3
040-0502	イブロジオン測定キット	96 well	HOR	◎ 1.5-30 (1.5-30)	○	約2-3 時間	26	約3 日/3
040-0503	カルバリル測定キット	96 well	HOR	○ 1.5-30 (1.5-30)	◎	(4-5 時間)	25	
040-0504	ピテルタノール測定キット ^{*6}	96 well	HOR	○ 9-60 (9-50)	○	約3 時間	26	約3 日/3
040-0505	フルトラニル測定キット	96 well	HOR	◎ 1-8.0 (1-8.0)	◎	約3 時間	26	約3 日/3
040-0506	グリホサートELISAキット	96 well	JEC	○ 0.15-5 (0.15-5)	◎	約3 時間	25	約1 日/3
040-0507	クロロタロニル測定キット	96 well	HOR	◎ 0.15-1.5 (0.15-1.5)	○	約2-3 時間	26	約3 日/3
040-0508	ホリ臭化ジフェニールエーテル (PEDE) ELISA キット (マグネチック・パーティクル)	Tube	JEC	○ 0.025-1.0 (0.025-1.0)	○	2 時間	13	

*1 JEC; 日本エンバイロケミカルズ(株), HOR; 堺堀場製作所, EBTL; 堺エンバイオテック・ラボラトリーズ

*2 記載濃度範囲においては、◎; 十分な ○; ほぼ妥当な 信頼性が確認された。

*3 一般環境モニタリングでの実用性: ◎; 実用化可能 ○; 環境試料に対するデータの蓄積や適切な前処理等の条件付きで実用化可能

*4 試料の前処理がない場合(試料の前処理から測定結果が得られるまで)の測定時間

*5 同時測定が可能な試料数

*6 異性体B(製剤中に20-30%含有)に高感度の抗体であるため、異性体Bの測定は可能

付きながら実用化可能と判断された。また簡便性では従来の機器分析法に比べ格段に測定時間、同時測定件数で優っていたとの結果であった。

ただ、この実証モデル事業での ELISA 法に対する実証試験は、「実証」という文脈における技術的問題が見いだされ、ELISA法に対する行政側の実証ニーズがなくなった(第2回 ETV 国際フォーラム配布資料)との理由で、18年度以降見合わせられた。また、技術の紹介や広告等のために使用することのできるロゴマークは16年度に実証した技術について認められた。

7. 最新技術

低分子化合物の免疫化学的測定法として、競合法ではなくサンドイッチ法のように測定範囲が広く高感度である非競合法を目指す研究が行われている。例えば、抗原・抗体複合体を二次抗体(メタイプ抗体)で検出する方法、抗イデオタイプ抗体を用いて抗原・抗体複合体のみを検出する方法、また、ある種の抗体において可変領域 VH とVL間の弱い相互作用が抗原の存在下において著しく強まる現象を利用したオープンサッチ法などがあるが⁵⁾、これらはまだ実用化には至っていない。

一方、実用面では環境中のダイオキシン類のように夾雑物が多く検出が困難な物質に対し、試料粗抽出液の精製、濃縮及び測定用溶媒への転溶を自動的に行う前処理装置と、KinExA(平衡除外免疫測定法)と呼ばれる蛍光標識された抗体を用いるバイオセンサーで構成された簡易分析システムが開発され、短時間(約3時間)での高感度な測定が可能となっている⁶⁾。

8. ELISA の課題と展望

実証試験で ELISA キットの環境用測定法としての有用性の実証されたが、一方でイムノアッセイ法が抱えている課題も浮かび上がった。一つは異性体の問題であり、二つ目はマトリックスの問題である。農薬等のように付加価値の高い化合物は複雑な構造のものが多く、異性体を有するものも少なくない。抗原抗体反応は構造特異性が高いので、一般に抗体は特定の異性体のみ親和性が高いと考えられる。そのためキットの各異性体に対する反応性を把握し、化合物の代謝を含めてキットが異性体の集合体である化合物をどの程度測定しているのかを確認しておく必要がある。前処理を行ったために、結果のまとめの中に明確には現れていないが、マトリックスの影響の大きいキットも存在した。実試料への添加回収試験では、一般に濃度が低くなるに従い回収率は高くなる傾向にあり、本試験でも同様な傾向が見られたが、逆に高濃度で回収率が高くなったキット(LAS)もあり、マトリックスの影響には常に配慮する必要がある。

一方、測定キットの性能の信頼性は確認され、一般モニタリングでの実用性も可能との実証結果であり、今回確認され

た ELISA 法の特徴である簡便性、迅速性から、ELISA 法は環境分野でのスクリーニング手段として有用であると考えられる。国外においては、米国環境保護局(EPA)において、水、土壌中の一部の汚染物質(PCB、DDT 等)を対象にイムノアッセイによる環境分析を公定法に順ずる方法として評価している⁷⁾。また、ppm 単位以上の様々な夾雑物をも含む環境試料中の数 ppb または数 ppt の微量の化合物を分析する場合、機器分析では濃縮、精製などの前処理で出来るだけ夾雑物を除く必要がある。特異的な結合性を有する抗体を使用したアフィニティーカラムによる固相抽出はすでに精製法の一つとして食品分析分野などでは利用されており、今後、機器分析での精製手段としてこのような抗体の利用は有望と考えられる。

9. おわりに

平成16年度および17年度の実証試験で、市販 ELISA キットの環境モニタリング用としての性能および実用性に概ね良好な結果が得られ、安価で簡便、迅速な分析法であることが実証された。一方で、マトリックスや異性体などの ELISA 法が抱えている課題も改めて浮き彫りとなった。今後、これらの課題に配慮しまた改善することにより、ELISA 法がイムノアッセイの利点を生かして機器分析を補完する分析法として適用範囲の広がることを期待したい。

[参考文献]

- 1)渡邊栄喜「イムノアッセイで農作物中の残留農薬を簡易かつ迅速に検出する」、『農業および園芸』第81巻第9号(2006年)、981-988
- 2)生物化学的測定研究会ホームページ
(<http://wwwsoc.nii.ac.jp>)
- 3)伊東茂壽「農作物用の残留農薬キットを環境水用に適用」、『環境浄化技術』第5巻第7号(2006年)、53-56
- 4)環境省ホームページ
(http://www.env.go.jp/policy/etv/list/02_list_b.html)
- 5)上田宏ら「競争のいない小分子の高感度免疫測定法の開発」、『抗体エンジニアリングの最前線』、pp.89-96、シーエムシー出版(東京)、2004
- 6)片岡千和、澤田石一之「ダイオキシン簡易分析システムの開発」、『環境浄化技術』第4巻第2号(2005年)、33-37
- 7)有菌幸司、石橋弘志「ELISA法の現状と展望」、『環境浄化技術』第4巻第2号(2005年)、10-14