

1. はじめに

近年化学物質による水域の汚染が深刻になり、市民生活に与える影響が懸念されている。水環境の安全性を保持して行くには、水質を緻密に監視して行く事が最も効果的である。しかし汚染物質は年々多様化し、さらに汚染領域も拡大し続けているという状況では、監視のための分析サンプルの数は膨大となっており、今後さらに増加の一途をたどると考えられる。現状、化学汚染物質の検出法としてはGC、GC/MS、高速液体クロマトグラフィーなどによる機器分析が主流となっている。機器分析は、正確な測定結果が得られるという点で優れており、公定法にも記載されている。しかし一方では、分析に持込むまでに煩雑な前処理を必要とする事、装置一台で処理できるサンプル数に限界がある事など、大量処理という点で問題もある。多成分同時分析などの技術も一般化してきたが、分析効率を飛躍的に高めているとは言い難い。一般市民の環境汚染に対する感心、安全な水への要求が高まる中、将来的に機器分析を支援し、分析のコスト負担を軽減して行くために、大量処理が可能な水質分析技術の確立が急務となっている。

筆者は酵素免疫測定法を環境汚染物質の検出に応用する事によって、増大し続ける分析サンプルの処理能力を大幅に向上できると考えている。酵素免疫測定法は操作が簡単で短時間に正確な値が得られると言う点で、大量のサンプル処理に最も適した分析手法である。その利点と有用性から早くから技術開発が進められ臨床検査の分野では既に重要な位置を占めている。一方で残念な事に環境中の汚染物質の検出に応用された例は極く僅かしかない。今回は現在国内で水質監視項目の対象として取上げられている三種類の農薬アシュラム、チウラム、シマジンについて酵素免疫測定法による定量実験を行った結果について報告する。

2. 実験方法

2. 1. 各農薬に対する抗体の作製

農薬のような低分子に対する抗体を作製する場合通常タンパク質と結合した複合体を合成し、その複合体で動物を免疫し、目的とする抗体を得る。アシュラムとシマジンに関しては、それぞれの分子中に存在するアミノ基を利用してスペーサーを介してタンパク質に結合し、複合体を合成した(図1: 1~3式)。チウラムに関しては、分子に特徴的なジメチルチオカルバモイル基をスペーサーを介してタンパク質と結合した複合体を合成した(図1: 4、5式)。それぞれの複合体を抗原としてウサギを免疫する事により、各農薬に対する抗体を得る事に成功した。

2. 1. (1) 各抗体の調製

動物としてはウサギ(日本白色種)を用いた。抗原量はタンパク質量として、いずれの場合も初回免疫で

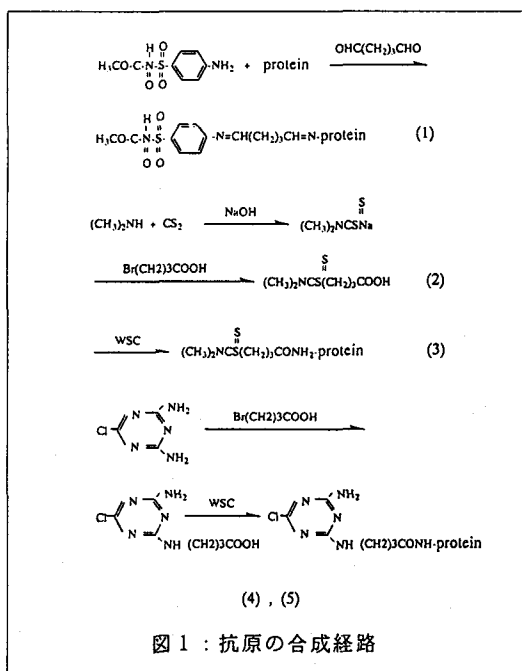


図1: 抗原の合成経路

は1 mg、2回目以降は0.5 mgとした。初回免疫ではフロイント完全アジュバント、追加免疫ではフロイント不完全アジュバントを抗原と混合し、定期的にウサギ背部に皮内注射する事により抗原投与を行った。抗原投与1週間後に毎回採血し、抗体価を測定した。4回目の抗原投与後に抗体価は平衡に達したので、この時点以降に採取した血清を実験に供した。

2. 1. (2) 抗体の精製

得られた抗血清についてDEAEイオン交換クロマトグラフィーを行って抗体の粗精製標品を調製した。農薬タンパク質複合体を抗原として動物を免疫すると、農薬に対する抗体と同時に結合に用いた支持タンパク質に対しても抗体が生産される。支持タンパク質に対する抗体の混入は測定系を妨害するので、これを除去する必要がある。それぞれの抗体作製時に用いた支持タンパク質を結合したアフィニティーカラムに、抗体標品を通じることにより、支持タンパク質に対する抗体を除去した。最終的にはプロテインAセファロースカラムでIgG画分として精製し、定量試験に用いた。

2. 2. 検量線の作製

検量線の作製は競合反応を応用した標準的なELISA法に従った。PBSに溶解した農薬タンパク質複合体(抗原)をポリスチレン製96穴ELISAプレートの底面に吸着させた後、0.2%スキムミルクでブロッキング処理を施した。試験管中で0から $1\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ までの一定濃度の農薬と抗体を混合し、室温に30分間放置して抗原抗体反応を充分に行わせた。この溶液 $100\text{ }\mu\text{l}$ をブロッキング処理したELISAプレートに移し、農薬と結合せずに残った抗体をプレート底面に吸着させた抗原で捕捉した。捕捉した抗体に西洋ワサビペルオキシダーゼ標識した二次抗体を反応させた後、オルトフェニレンジアミンと過酸化水素を基質とした酵素の発色反応を行った。各農薬濃度における発色の強さを比色によって測定し、検量線を作製した。本測定系の原理では、農薬濃度が高いほど発色は弱くなり、検量線はマイナスの傾きとなる。

3. 結果

図2、図3、図4にそれぞれアシュラム、チウラム、シマジンに関して検量線を作製した結果を示す。抗原抗体反応は、抗体の力価、共存物質の有無などによって微妙に影響される。また測定する抗原の濃度範囲によって抗原と抗体の比率も重要な要素になる。特に抗体の力価は検出系の感度を左右する最大の要因であるが、これは動物に対する免疫期間、投与した抗原の抗原性により毎回異なってくる。従って検出系を確立するに当たっては得られた抗体、抗原ごとに抗体濃度、固定化抗原量を詳細に検討する必要がある。本研究では0から $1\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ の間で最もよい感度を与える系として、アシュラムに関しては抗体濃度 $0.3\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ 、固定化抗原濃度 $1\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 、チウラムに関しては抗体濃度 $1\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ 、固定化抗原濃度 $5\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 、シマジンに関しては抗体濃度 $0.5\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ 、固定化抗原濃度 $10\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ を設定した。全体としては、非常によい直線性が得られたが、チウラム、シマジンについては高濃度側で直線からのずれが目立ち、特にシマジンにおいて顕著であった。アシュラムはナトリウム塩として水に可溶な事、チウラム、シマジンの水に対する溶解度はそれぞれ $30\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 、 $5\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ である事から、高濃度側での直線性からのずれは水への難溶性に起因しているとも考えられる。

4. 考察

本研究において酵素免疫測定法を農薬の検出に応用したところ、良好な定量性が得られた。0から $1\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ という測定濃度範囲は、アシュラムに関しては環境庁のゴルフ場農薬に係わる暫定指導指針値 $2.0\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 、厚生省の水質目標値 $0.2\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ を監視するのに充分な感度であるが、チウラム、シマジンに関しては、環境庁の掲げる指導指針値、 $0.06\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 、 $0.03\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 、厚生省の掲げる水質目標値、 $0.006\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 、 $0.003\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ をそれぞれ満足するには不十分であり、さらなる高感度化を図る必要がある。今回用いたような競合反応に基づいた酵素免疫測定法で高感度化を考えるには、

より低濃度の抗原と充分反応して結合し、固相の抗原とは二度と結合しないだけの強い力価の抗体を調製する事が重要である。本研究では、免疫開始後一ヶ月から二ヶ月で得られた抗体を用いているが、免疫期間をさらに延長する事により、特定の抗原に対してより強い親和性、特異性を示す抗体を調製できる。また今回検出系に供したのは、抗原に対して親和性を持たない抗体も含んだ I g G 画分であるので、さらに抗原に対するアフィニティー精製を行い、特定抗原により強い親和性を示す抗体標品として検出系に供すれば、高感度化は可能である。また酵素による反応系を、発色法、蛍光法に変換する事によっても高感度化がはかれる。

実際の環境水には化学物質だけでなく、有機物、金属イオンなど雑多な成分が含まれている。酵素免疫測定法が抗原と抗体の厳密な結合反応に基づいてる以上、抗体の立体構造に影響を与えたり、あるいは抗原の抗原決定基を塞いでしまうような反応阻害物質の存在を明らかにし、対策を検討して行く事も今後の重要な課題であろう。また測定対象物質を拡充していく必要性も感じており、現在、環境汚染農薬として指摘されている 2 種の農薬について新たに同様の実験を試みている。

酵素免疫測定法は操作が簡単である上に、機器分析に匹敵する感度と定量性を備えている。一番の利点はフィールドで測定を実施できる事である。環境水の水質分析に応用する場合にも採水現場でもっとも威力を発揮すると考えられる。採水現場で機器分析を必要としない陰性サンプルを本法によって除外できれば、分析機関に持込むまでの輸送、それに伴う人手とコストを大幅に低減できるはずである。

酵素免疫測定法の簡便さは、水質の監視を一般市民にとっても身近なものにする。環境汚染が深刻化する中、市民が在住地域の汚染状況を知る手掛かりはほとんど無いと言ってもよいだろう。酵素免疫測定法は、市民一人一人が自らの手で汚染状況を監視し、安全な住環境保全していく上で、重要な位置を占めるようになって考えている。

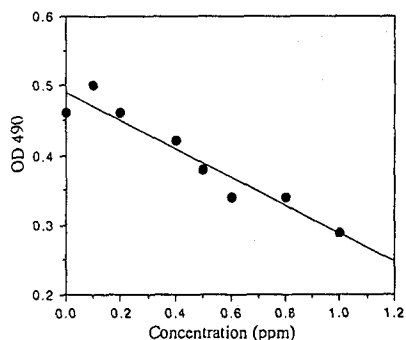


図 2 : アシュラムの検量線

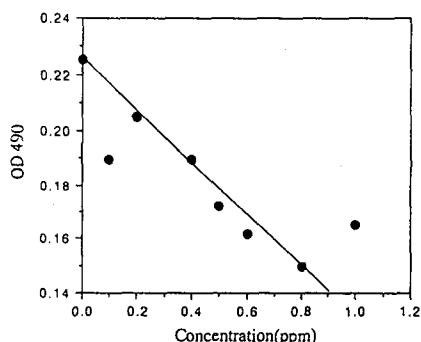


図 3 : チウラムの検量線

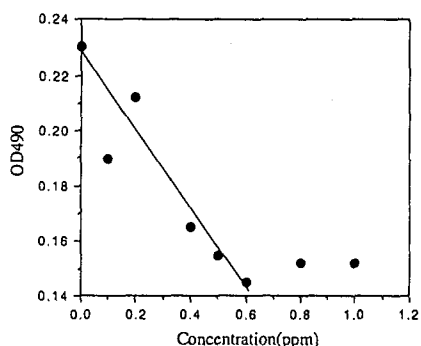


図 4 : シマジンの検量線