特集・環境の簡易測定の実状と将来

バイオ技術による水質の簡易測定法の紹介

日 色 和 夫*

1. はじめに

最近、農薬や各種の環境汚染物質による水質汚染が深刻となっている。そのため、環境庁は1993年3月8日に「水質汚濁に係る環境基準の一部改正」の告示を出して、新たな項目を追加指定した。追加指定された化合物の中には、たとえば有機塩素化合物や各種の農薬などが含まれているが、環境中のこれらの汚染物質を測定するためには、高度な分析装置を使用して熟練した技術者による複雑な分析操作が必要である。さらに分析結果が判明するまでに長時間を要するという問題点もあるので、近年は、より簡単に迅速に現場で分析結果が得られないか、という要望が強く出されていた。

このような要望に答えるために、酵素標識固相免疫測定 (Enzyme-linked immuno-sorbent assay, ELISA) 法が研究され、この方法を野外でも簡単に実行できるような測定キットが開発・商品化され、市販されるようになった。

この方法は、最近急速に注目されはじめているが、その理由は(1)抗原-抗体反応を利用して特定化合物を検出するので、極めて選択的である、(2)本測定法を野外で簡単に実施できるような現場用測定キットが数種類市販されている、(3)アメリカの環境保護局 (EPA) で承認を得ているキットも多く信頼性が高い、などであろう。

以下、本稿では酵素標識固相免疫測定法の原理を説明し、いくつかの測定キットの特徴や機能を解説することにした。

2. 酵素標識固相免疫測定法 (ELISA) の原理¹⁾

生体内に外部から異物質が侵入したとき、生体は自分の身を守るために、この異物質を閉じ込めてしまう特定の物質を体内で生産する。この時外部から侵入した異物質は抗原であり、生体内で生産される防衛物質は抗体である。たとえば人間の体内に風邪のウイルスが侵入したとき、ウイルスは抗原であり、このウイルスに対する抗体が体内でつくられ、抗体はウイルスと結合してその活動を抑える。しかしこの抗体は別種のウイルスが侵入したときは全く反応しないので、風邪のウイルスの抗原とその抗体との反応は極めて選択的である。これが抗原-抗体反応の特徴であり、生体のもつ免疫機能である。

次に、一例としてある農薬化合物を酵素標識固相免疫測定法で検出する場合を、図-1を用いて説明する。

この場合、農薬化合物は抗原であり図-1では●印で示している。この抗原と選択的に結合する抗体

図-1 酵素標識固相免疫測定法による操作手順 (1)

* 神戸女子短期大学
Kazuo HIIRO

をつくる。これは図中でY字型の印で記入している。別に、この農薬化合物と適当な酵素とを結合した複合体（これは酵素標識抗原と呼ばれる）を調製する。図には●と小さな矩形とが結合した記号で示している。図中の▲の印や□の印は農薬に混ざった夾雑物である。

さて、農薬の測定操作は以下のように行う。測定には2つの操作法が使用されている。まづ第1の測定法では、

A. 内壁に抗体を固定したチューブを作製する。

B. このチューブ内に農薬化合物を含む試料溶液を入れる。抗体である農薬は抗体と選択的に結合する。夾雑物は抗体と結合しない。

C. チューブ内の試料溶液を捨てる。これに農薬と酵素とが結合した複合体（酵素標識抗原）を入れる。B. の段階で農薬と結合しなかった抗体に酵素標識抗原が結合する。

D. 発色剤を添加する（図中で発色剤は◇の印で示した）。酵素の作用で着色物質（◆の印で示した）が得られる。この着色強度を測定する。

以上の過程で、試料中に農薬が多量に含まれていれば、B. の段階で多くの抗体が結合して未結合で残っている抗体が少なくなり、C. で結合できる酵素標識抗原の量が少なくなるので、D. で得られる着色が弱くなる。逆に試料中の農薬量が少なければ、着色は強くなることになる。

このように、抗体を内面に固定したチューブ、酵素標識抗原、発色剤などを用意しておけば、チューブ内に試料溶液や試薬溶液を入れるだけの簡単な操作で着色が得られ、その吸光度を分光光度計で測定して農薬量を決定することができる。

図一2には第2の測定法の原理を示している。この方法では、

A. 農薬を含む試料溶液に一定量の酵素標識抗原を混合する。この混合物には酵素標識抗原と元の農薬（酵素が結合していない非標識抗原）とが存在しており、両者の存在割合は元の農薬の量に依存する。すなわち試料中の農薬量が多ければ相対的に酵素標識抗原の割合は低くなり、試料中の農薬量が少なければ相対的に標識抗原の割合は高い。

B. この混合物を、内面に抗体を固定したチューブに入れる。標識と非標識の両抗原は競合して抗体と

図一2 酵素標識固相免疫測定法による操作手順（2）

結合し、結合した抗原の標識と非標識の割合も同じ割合となる。

C. 第1の方法と同様、発色剤を添加し、得られた着色の強度を測定して試料溶液中の農薬量を決定する。

この過程の場合でも、試料中に農薬が多量に含まれていれば、B. の段階で抗体と結合した酵素標識抗原の割合は相対的に少なくなり、C. で得られる着色が弱くなる。また試料中の農薬量が少なければ、着色は強くなる。この農薬量と着色強度との関係は、第1の測定法の場合と同じ傾向になる。

以下に、酵素標識免疫測定法を応用したいいくつかの主な市販測定キットの内容を解説する。

3. EnSys 免疫測定キット

本免疫測定キットはアメリカのエンシィス (Ensys) 社製で、土壌や水質試料中に含まれる各種の化学物質を酵素標識固相免疫測定法で現場測定できるものである。水中のベンゼン検出キット、ダイオキシン測定キット、水中の Cryptosporidium 接合子と Giardia シスト検出キット、水銀検出キット、PAH (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) 検出キット、土壌や廃油中の PCB 測定キット、水中のペンタクロルフェノール検出キット、土壌や水中の石油系物質の検出キットなど、それに試薬類のみのキット、光度計、自動希釈装置もある。

試験操作法は以下の4段階で行われる。前処理法は試料の種類で異なるが、ここでは土壌試料の例を示す。

ステップ1：試料抽出段階。10gの土壌試料をとりメタノールで対象成分を抽出する。土壌はろ過する。

本段階の操作には約5分が必要である。

ステップ2：試料と標準の希釈段階。検出に必要なレベルに試料と標準を希釈する。本操作には約5分が必要である。

ステップ3：免疫測定。試料溶液と酵素標識抗原を内面に抗体をコーティングしたチューブに入れて、放置する。チューブの液を捨てて洗浄する。発色溶液を添加する。本操作に10～15分を要する。

ステップ4：測定値の決定。光度計を使用して標準と試料の着色を比較する。対象となる汚染物質の半定量的な測定ができる。約5分が必要である。

主なキットによる検出レベルと分析試料の処理数は表1の通りである。

EPA法4030には、全石油系炭化水素の測定に免疫測定法が採用されており、土壤中のガソリン、ディーゼル燃料、ケロセン、ジェット燃料の測定に極めて有効であると言われている。さらにEPAは土壤中の2,4-D, DDT, トキサフェン、クロルダンの測定およびPHA, PCB, また試験的に爆薬などに免疫測定法の使用を認めている²⁾。

またEnsys社では免疫測定法以外に、濁度測定法や湿式化学分析法による測定キットも準備しているが、本稿では詳細は省略する。

4. EnviroGard テストキット

アズマックス(AZmax)社が販売している、酵素標識免疫吸着測定法による環境汚染物質の検出・測定用のキットである。

このエンバイロガード・テストキットによる操作手順の一例は以下の通りである。

ステップ1：抗体を内壁にコーティングした試験管

表1 エンシス免疫測定キットによる検出レベルと試料処理数

対象物質	検出レベル	試料処理数
ベンゼン	5と50ppb(水中)	5/1時間
ダイオキシン (2,3,7,8-TCDD)	ng/L～pg/L	5/70分
水銀	0.5ppm(土壤中) 0.25ppb(水中)	13/1.5時間
PAH	1ppm(土壤中)	8/1時間
PCB	0.5～4.0ppm(土壤中) 3.0～20.0ppm (ディーゼル燃料中)	8/1時間 4/1時間
ペンタクロルフェノール	1.0～10ppm(鉱油中)	8/1時間
石油系物質	5ppb(水中) 10～40ppm(土壤中) 165～490ppb(水中)	10/1時間 8/1時間 10/1時間

に、試料液または標準液を添加する。

ステップ2：測定対象物質(抗原)と酵素とを結合した複合体(酵素標識抗原)の溶液を添加する。非標識の抗原と酵素標識抗原は競合しながら抗体と結合する。

ステップ3：しばらく放置して平衡状態とする。

ステップ4：水で洗浄する。抗原(非標識と標識)と抗体の結合体が試験管内に残る。残存酵素標識抗原-抗体の量は試料中の非標識抗原の量に反比例する。試料中の共存物質は洗浄で排出される。

ステップ5：基質液を添加する。

ステップ6：発色液を添加する。

ステップ7：酵素標識抗原の酵素の作用で基質から着色が生成する。酵素の量が多ければそれだけ着色が強くなる。

ステップ8：反応停止液を添加する。この液は酵素を破壊する作用があるので着色の生成反応は停止する。

ステップ9：溶液の着色強度を450nmで測定する。吸光度は測定対象物質が多いと低くなる。

図-3はブルーベリーの試料から農薬のペノミル(MBC)をメタノールで抽出した後、エンバイロガード・テストキットによる測定結果と、液体クロマトグラフ法による結果との相関を調べたものである。図から明らかに判断されるように、両者の相関は極めて優れており、 $n=20$ のときの相関係数は0.98である。

表2はエンバイロガード・チューブキットによる

図-3 ブルーベリーのMBC測定における免疫測定法と液体クロマトグラフ法の相関

表2 エンバイロガード・チューブキットによる最低検出濃度

対象物質	最低検出濃度(試料)
Alachlor	0.1 ppb (Water)
Aldicarb	2.0 ppb (Water)
Benomyl (MBC)	0.2 ppb (Water)
Carbofuran	0.1 ppb (Water)
Chlorpyrifos-Methyl	0.03ppm (Grain)
Cyclodienes (Chlordane)	2.0 ppb (Water)
2,4-D	0.5 ppb (Water)
Fenitrothion	0.08ppm (Grain)
Methoprene	3.0 ppm (Tobacco)
Procymidone	2.0 ppb (Wine)
Triazines	0.1 ppb (Water)
DDT	0.04ppm (Water)
Toxaphene	0.2 ppm (Soil)
Chlordane	14.0 ppb (Soil)
PCB	1.0 ppm (Soil)
Petroleum Fuels (BTEX)	5.0 ppm (Soil)
Petroleum Fuels (BTEX)	0.1 ppm (Water)
Pentachlorophenol	5.0 ppb (Water)
Pentachlorophenol	25.0 ppb (Soil)
Polycyclic Aromatic Hydrocarbons	0.2 ppm (Soil)

農薬や工業汚染物質の最低検出濃度を、試料の種類も合わせてまとめた結果である。

5. RaPID Assay キット

酵素免疫測定法の直接競合法を使用した、アメリカのオーミクロン (OH Micron) 社の測定キットである。すでに述べた2種の方法では抗体を試験管内面にコーティングしていたが、RaPID Assay キットでは抗体を微細な磁性体に吸着したものを使用している点が特徴的である。図-4で本キットによる操作手順を説明する。

A. 図の中で、Y字の印で示された抗体は○印の磁性体にコーティングされている。△印で示した測定対象物質(抗原)と、測定対象物質(抗原)と×印の酵素との結合体(酵素標識抗原)の一定量とを混合する。この混合物を小さなチューブ内に入れ磁性体コーティング抗体を添加する。前に述べたと同様に、試料中の抗原(非標識)の量が多ければ、一定量の酵素標識抗原を添加しているので両者の存在割合は相対的に標識抗原の方が小さくなる。その割合と同一比で磁性体コーティング抗体と抗原とが結合する。この段階の所要時間はインキュベーションを含めて15~30分である。

B. チューブを磁石ユニットに入れると、磁性体コ

図-4 酵素免疫測定法の測定原理と操作方法

ーティング抗体は抗原と結合したもののも、結合していないものも共に集められる。この状態で内容物を流し出す。抗体と結合しなかった抗原は非標識、標識ともに排出される。ここで洗浄する。

C. これに発色のための基質(図中では□印で示している)を添加する。酵素標識抗原の酵素の作用で基質から着色物(図中では■印で示している)が生成する。着色物の量は酵素の量に比例し、その量は試料中の測定対象物質の非標識抗原の量に反比例しているので、溶液の吸光度から測定対象物質の量が決定される。この段階の所要時間は20分程度である。

本法ではインキュベーション時間中も磁性体が溶液中で浮遊しているので操作が容易であり、結果の再現性もよいと言われている。抗体は溶液中に保存されているので安定であるとされている。図-5は本免疫測定法とガスクロマトグラフ法(GC/ECD EPA法8080)によるPCBの側定値の相関を示したものである。図中●印は標準液の測定結果であり、○印は土壌試料の測定結果である。

高橋はRaPID Assay キットを使用してクロロタロニル(TPN)やペノミル(MBC)などの農薬を測定しており、再現性のよい結果が得られたと報告し

図一五 酵素免疫測定法とガスクロマトグラフ法による PCB の測定結果の相関

ている³⁾⁻⁵⁾。

6. 硝酸還元酵素キット

最近、環境水中の硝酸イオンを分析するとき、銅—カドミウム還元法、ヒドラジン還元法で硝酸イオンを亜硝酸イオンに還元し、得られた亜硝酸イオン量を N—(1—ナフチル)エチレンジアミン—スルファニルアミド試薬で発色反応を行い、吸光度定量する方法が広く採用されている⁶⁾。この還元操作では、様々な原因によって高い還元率と優れた再現性を得るのが困難であると言われている。

ベーリンガー・マンハイム (Boehringer Mannheim) 社による食品中の硝酸イオン分析用キットでは、硝酸イオンの亜硝酸イオンへの還元硝酸還元酵素 (Nitrate reductase) を利用しており、筆者の所属大学でも硝酸イオンの十分な還元率と再現性を確認した実験結果を得ている。本キットは食品分析のみならず環境中の硝酸イオンの測定にも活用できるので、ここに紹介することにした。

硝酸還元酵素は、硝酸イオンと β —ニコチンアミドアデニン・ジヌクレオチド—リン酸から亜硝酸イオンを生成する反応を進行させる。ここで β —ニコチンアミドアデニン・ジヌクレオチド—リン酸量は硝酸イオンと反応した分だけ無くなるので、その 340 nm における吸光度の減少から硝酸イオンを定量することができる。

Von H. -O. Beutler, B. Wurst, S. Fischer は、この方法を詳細に研究し、最適反応条件は、イミダゾール緩衝溶液濃度 36 mmol/l, pH 7.3, フラビンア

デニン・ジヌクレオチド濃度 3.8 μ mol/l, β —ニコチンアミドアデニン・ジヌクレオチド—リン酸濃度 220 μ mol/l, 硝酸還元酵素 70 U/l であると報告している⁷⁾。食品中の多種類の有機化合物は定量に影響しないが、マンガン(II), チオシアン酸, シアンイオンなどは妨害作用を示す。

この方法を、家庭排水中の硝酸イオンの定量に応用した研究では、標準分析法 (カドミウムによる還元法) と同じ結果が得られ、高い作業性があると報告している⁸⁾。

一方、硝酸還元酵素の作用で硝酸イオンの還元で生成した亜硝酸イオンを、従来から使用されている N—(1—ナフチル)エチレンジアミン—スルファニルアミド試薬を用いてアゾ染料に変換し、その着色強度を測定する方法もある。すなわち、通常の銅—カドミウム還元法やヒドラジン還元法の代わりに硝酸還元酵素を使用するもので、操作が簡単で、再現性もよい。

本キットを使用して、還元ニコチンアミドアデニン・ジヌクレオチド—リン酸の吸光度の減少に基づく硝酸イオンの定量操作法は次の通りである。

A. 試料溶液またはブランクの純水の 0.10 ml に、イミダゾール緩衝溶液、還元ニコチンアミドアデニン・ジヌクレオチド—リン酸ナトリウム溶液、フラビンアデニン・ジヌクレオチド・ナトリウム溶液を添加する。一定量 (3.10 ml) に希釈し、良く混合する。

B. 約 3 分後、溶液の吸光度を 340 nm で測定する。この吸光度を E_1 とする。

C. 硝酸還元酵素の溶液を添加し、混合し 40 分後、340 nm で吸光度を測定し E_2 とする。

D. さらに 20 分後、340 nm で吸光度を測定し E_3 とする。

E. 試料について、 $(E_1 - E_2) - 2 \times (E_2 - E_3) = \Delta E$ (試料) と

ブランクについて、 $(E_1 - E_2) - 2 \times (E_2 - E_3) = \Delta E$ (ブランク)

を計算する。さらに ΔE (試料) - ΔE (ブランク) = ΔE を計算する。 ΔE から試料中の硝酸イオン濃度を計算する。

次に、本キットを使用して硝酸イオンを亜硝酸イオンに変え、アゾ染料生成による吸光度定量法の測定操作法を以下に示す。

A. 試料または標準液の2.00mlに、還元ニコチンアミドアデニン・ジヌクレオチドリン酸とフラビンアデニン・ジヌクレオチドの混合物、イミダゾール緩衝溶液とEDTAの混合物などを添加する。

B. 室温で60min間インキュベートする。

C. スルファニルアミド、N—(1—ナフチル)—エチレンジアミンの発色試薬混合物を加える。

D. 室温で30min間、暗所で放置する。

E. 540nmで吸光度を測定する。

硝酸イオンと亜硝酸イオンが共存する場合は、試料の一部にスルファニルアミド、N—(1—ナフチル)—エチレンジアミンの試薬混合物を添加して発色反応を行い、吸光度を測定して亜硝酸イオンのみを定量する。別の試料の一部をとり上記のA.～E.の操作を行って硝酸イオンと亜硝酸イオンの含量を求め、先に決定した亜硝酸イオン量を差し引いて硝酸イオン量を決定する。

本法に類似の方法が“Methods of Enzymatic Analysis”に採用されており、標準液による硝酸イオンの $n=10$ での平均回収率は100%で、同量の亜硝酸イオンの共存では98%である⁹⁾。

7. おわりに

以上、酵素標識免疫測定法の理論と市販測定キットの概要を紹介したが、これらと類似の農薬検出キットがオーストラリアの連邦科学産業研究庁でも開発されている。農場や果樹園で、周辺の農薬汚染や除草剤濃度の測定に使用されている。

最近、上述のような免疫測定法に必要な抗体を作製しようという動きが出ている。そのひとつとして、基盤技術研究促進センターの出資を得て環境免疫技術研究所が設立され、低分子でも認識できる抗体や各種環境負荷物質の新測定法の開発を目指して研究開始が進められている。

酵素免疫測定法は操作が簡単で高感度であり、何

よりもフィールドで迅速に利用できる点が最大のメリットであると考えられるが、環境測定に適用した場合は共存する抗原—抗体反応の阻害物質の影響が問題点として指摘されている¹⁰⁾。今後はこうした夾雑物による影響をいかに排除するかが重要な課題となるであろう。

免疫化学的方法の環境分析への応用に関する今後の展開について、山根は測定対象物質の濃縮法への応用として抗体を固定化したカラムの活用、このようなイムノアフィニティーカラムを用いたフローインジェクション分析法の開発、その他様々な応用が進展すると述べている¹¹⁾。現在の高度な機器分析法では達成されない利便性や現場適応性を免疫測定法でカバーすることにより、環境のモニタリングやスクリーニングがより完全なものになるもと期待されている。

参考文献

- 1) J A全農 農技センター・農薬研究部：グリーンレポート No.243 (1995)
- 2) D. Friedman : International Symposium on New Developments of Environmental Analysis Methods (東京) (1994)
- 3) 高橋義行：植物防疫，49巻，9号，398 (1995)
- 4) Y. Takahashi, A. Hayashi, A. Sakurai, T. Umezu and Y. Wada : J. Pesticide Sci., Vol.21, 65 (1996)
- 5) 高橋義行，千田茂樹，梅津 透，河野敏郎：関東東山病害虫研究会年報，第42集，297 (1995)
- 6) 環境庁水質保全局：窒素・りん公定測定法技術指針，(1983) 環境公害新聞社
- 7) Von H. -O. Beutler, B. Wurst, S. Fischer : Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 82, [9], 283 (1986)
- 8) R. Kretzschmar, T. Kretzschmar : Vom Wasser, 70, 119 (1988)
- 9) H. U. Bergmeyer, J. Bergmeyer, M. Grassl 編 : “Methods of Enzymatic Analysis, 3rd Ed., Vol. VII, 578 (1985) VCH Publishers
- 10) 野上尊子：水環境学会誌，16巻，10号，747 (1993)
- 11) 山根昌隆：ぶんせき，7号，578 (1995)