

博士学位論文

論文題目

微細加工技術を利用した
化学物質検出用イムノアッセイの高度化

提出者

東北大学環境科学研究科

環境化学・生態学 コース

学籍番号 BOGD1307

氏名 伊達 安基

研究実績

【学術論文】

- Label-free Impedimetric Immunoassay for Trace Level of Polychlorinated Biphenyls in Insulating Oil, Yasumoto Date, Arata Aota, Kazuhiro Sasaki, Yukie Namiki, Norio Matsumoto, Yoshitomo Watanabe, Naoya Ohmura, Tomokazu Matsue, *Analytical Chemistry*, 86(6), 2989-2996 (2014).
- Microfluidic Heavy Metal Immunoassay Based on Absorbance Measurement, Yasumoto Date, Shingo Terakado, Kazuhiro Sasaki, Arata Aota, Norio Matsumoto, Hitoshi Shiku, Kosuke Ino, Yoshitomo Watanabe, Tomokazu Matsue, Naoya Ohmura, *Biosensors and Bioelectronics*, 33(1), 106-112 (2012).
- Trace-Level Mercury Ion (Hg²⁺) Analysis in Aqueous Sample Based on Solid-Phase Extraction Followed by Microfluidic Immunoassay, Yasumoto Date, Arata Aota, Shingo Terakado, Kazuhiro Sasaki, Norio Matsumoto, Yoshitomo Watanabe, Tomokazu Matsue, Naoya Ohmura, *Analytical Chemistry*, 85(1), 434-440 (2013).
- Pretreatment Method for Immunoassay of Polychlorinated Biphenyls in Transformer Oil Using Multilayer Capillary Column and Microfluidic Liquid-Liquid Partitioning, Arata Aota, Yasumoto Date, Shingo Terakado, Naoya Ohmura, *Analytical Sciences*, 29(4), 393-399 (2013).
- Analysis of Polychlorinated Biphenyls in Transformer Oil by Using Liquid-Liquid Partitioning in a Microfluidic Device, Arata Aota, Yasumoto Date, Shingo Terakado, Hideo Sugiyama, Naoya Ohmura, *Analytical Chemistry*, 83(20), 7834-7840 (2011).
- Monitoring oxygen consumption of single mouse embryos using an integrated electrochemical microdevice, Yasumoto Date, Shinichiro Takano, Hitoshi Shiku, Kousuke Ino, Takahiro Ito-Sasaki, Masaki Yokoo, Hiroyuki Abe, Tomokazu Matsue, *Biosensors and Bioelectronics*, 30(1), 100-106 (2011).

- GC-電子捕獲型検出器の選択的ピークパターン解析による絶縁油中ポリ塩化ビフェニルの定量 (Determination of PCBs in Insulating Oil Based on Pattern Analysis of Selected Peaks from Gas Chromatography with Electron Capture Detection) , 寺門真吾, Glass Thomas R., 齋藤仁宏, 伊達安基, 大村直也, *分析化学*, 61(11), 931-938, (2012)

【国際学会要旨】

- Micro Kinetic Exclusion Assay for Cadmium Analysis, Arata Aota, Yasumoto Date, Shingo Terakado, Kazuhiro Sasaki, Norio Matsumoto, Tomokazu Matsue, Naoya Ohmura, The 16th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ -TAS2012), Okinawa, Japan, October 2012.
- Analysis of Polychlorinated Biphenyls in Oil Using Microfluidic Based Pretreatment Method and Immunoassay, Arata Aota, Yasumoto Date, Shingo Terakado, Naoya Ohmura, The 16th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ -TAS2012), Okinawa, Japan, October 2012.

【招待講演・口頭】

- イムノアッセイのアドバンス：ナノ・マイクロテクノロジーを用いたフロー式イムノアッセイ, 生物化学的測定研究会 第17回学術集会, 2012年6月8日.

【国内会議・ポスター】

- マイクロイムノアッセイを用いた簡易水銀分析法, 第21回環境化学討論会, 2012年7月11日～13日
- マイクロ流体デバイスを用いた重金属の迅速イムノアッセイ, 第20回環境化学討論会, 2011年7月16日～18日

目次

第1章 序論

1-1	はじめに	1
1-2	微量化学物質による環境汚染	1
1-2-1	重金属汚染	2
1-2-2	残留性有機汚染物質	3
1-3	環境分析について	3
1-4	イムノアッセイ	4
1-4-1	抗体分子	4
1-4-2	イムノアッセイの利点	5
1-4-3	環境分析におけるイムノアッセイ	5
1-4-4	低分子イムノアッセイ	6
1-4-5	低分子イムノアッセイの高感度化に向けた課題	9
1-5	本論文の目的	9

第2章 抗体の捕捉・検出を目的としたマイクロ流路の作製と評価

2-1	はじめに	11
2-1-1	マイクロ流体デバイス	12
2-1-2	マイクロ流体イムノアッセイの検出技術	12
2-1-3	本章の目的	14
2-2	実験方法	15
2-2-1	試薬と材料	15
2-2-2	抗体捕捉用マイクロ流体デバイスの設計	16
2-2-3	マイクロ流体デバイスの作製	17
2-2-4	吸光度測定装置の作製	19

2-2-5	送液方法	20
2-2-6	抗体捕捉粒子の調製	21
2-2-7	金コロイド標識抗体の調製	22
2-2-8	酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA 法)	23
2-3	結果と考察	24
2-3-1	マイクロ流路内における抗体捕捉粒子の捕捉	24
2-3-2	マイクロ流路内における抗カドミウム抗体の捕捉	25
2-3-3	マイクロイムノアッセイによるカドミウム測定	27
2-4	まとめ	29

第3章 結合除外効果を利用した重金属マイクロイムノアッセイの開発

3-1	はじめに	30
3-1-1	結合平衡除外効果	30
3-1-2	重金属汚染と分析方法	31
3-1-3	抗重金属錯体抗体	32
3-1-4	本章の目的	32
3-2	実験方法	33
3-2-1	試薬と材料	33
3-2-2	抗体捕捉粒子および金コロイド標識抗体の調製	33
3-2-3	測定溶液の調製	34
3-2-4	測定操作	34
3-2-5	測定結果の解析	35
3-3	結果と考察	36
3-3-1	抗体の結合解離定数	36
3-3-2	カドミウム測定の高感度化	37
3-3-3	クロム・鉛・水銀測定の検討	40
3-3-4	水銀測定の高感度化	43
3-3-5	各重金属抗体の交差反応性の検証	46
3-4	まとめ	48

第4章 固相抽出法を利用した簡易水銀分析法の開発

4-1	はじめに	49
4-1-1	水銀の簡易分析法	50
4-1-2	簡易水銀分析に適した前処理方法	50
4-1-3	本章の目的	51
4-2	実験方法	52
4-2-1	試薬と材料	52
4-2-2	固相抽出カラム	52
4-2-3	マイクロイムノアッセイ	53
4-2-4	機器分析	53
4-3	結果と考察	55
4-3-1	固相抽出法による水銀抽出	55
4-3-2	水銀の吸着挙動	55
4-3-3	水銀の溶離挙動	57
4-3-4	共存金属の吸着挙動	60
4-3-5	カラム内のカドミウムの除去	62
4-3-6	固相抽出条件	63
4-3-7	SPEとイムノアッセイに基づく簡易水銀分析	64
4-3-8	環境水分析への適用	66
4-3-9	廃棄物溶出試験への適用	68
4-4	まとめ	70

第5章 抗体固定化マイクロ電極の作製と水溶液中PCBの検出

5-1	はじめに	71
5-1-1	電気化学インピーダンスによる親和性測定	72
5-1-2	ポリ塩化ビフェニルによる環境汚染	72
5-1-3	PCB分析法	73
5-1-4	本章の目的	73
5-2	実験方法	74

5-2-1	試薬と材料	74
5-2-2	モノクローナル抗体の作製	75
5-2-3	マイクロ金電極の作製	78
5-2-4	抗体固定化電極の作製	81
5-2-5	電気化学インピーダンス (EIS) 測定	84
5-2-6	EIS イムノアッセイ	85
5-3	結果と考察	86
5-3-1	PCB 抗原の構造推定	86
5-3-2	抗体のスクリーニング	89
5-3-3	PCB 異性体に対する反応性	91
5-3-4	電極修飾過程の評価	93
5-3-5	水溶液中 PCB の検出と反応時間	95
5-3-6	水溶液中 PCB に対する標準曲線	96
5-4	まとめ	98

第 6 章 抗体固定化マイクロ電極を用いた電気絶縁油中 PCB の定量

6-1	はじめに	99
6-1-1	イムノアッセイによる絶縁油中の PCB 分析	99
6-1-2	本章の目的	100
6-2	実験方法	101
6-2-1	試薬と材料	101
6-2-2	電気絶縁油の前処理	102
6-2-3	機器分析	104
6-3	結果と考察	105
6-3-1	模擬電気絶縁油に含まれる PCB 測定	105
6-3-2	実試料に含まれる PCB の定量	107
6-3-3	分析精度の評価	107
6-4	まとめ	109

第7章 結論と今後の展望

7-1 はじめに 110

7-2 各章の要約と結論 110

7-3 今後の展望 113

■ 謝辞 116

■ 本論文を構成する論文 117

■ 参考文献 118

第 1 章

序論

1-1 はじめに

産業革命以降、工業化に支えられた経済の発展こそが人類にとって最も重要であるとされてきた。我々がその考え方の誤りに気付いたのは、大量の資源消費とそれに伴う環境影響が次々と顕在化した 20 世紀半ばであった。当時、既に大気汚染が引き起こした酸性雨や無秩序な廃棄物管理による生態系への影響が次々と報告され、環境破壊が地球規模の問題であるという認識が広がった 1990 年代には、既に地球温暖化は加速度的に進み、生態系に大きな影響のある人為的な微量物質の拡散は不可逆な程に進行していた。現在、多くの国際条約や各国における環境規制により、人的活動由来の環境負荷は一定規模に抑制されつつあるが、依然として地球上の人口は増加の一途を辿り、地球環境を文明前の状態に回復するためには文明の破滅以外に特効薬はない。従って、現実的には持続可能性という希望を信じながら、徐々に汚染が進む環境の中で、如何にして自らの環境破壊に由来する被害を受けずに、緩やかに環境を修復・保持していくかという継続的なアプローチが必要となるだろう。

1-2 微量化学物質による環境汚染

地球温暖化の原因物質の 1 つとされる二酸化炭素は、2011 年には 318 億トンもの量が大气中に排出された¹。このように大量に排出されることで地球規模の環境影響を引き起こす物質があるのに対し、極めて微量であっても生態系に深刻な影響を与えうる化学物質が存在する。特に、我が国の高度経済成長期における公害の要因ともなった、カドミウム、鉛、6 価クロム、水銀などの主要な重金属は、低濃度の暴露であっても長期

的には中枢神経系に不可逆な影響を及ぼすことが知られており²⁴、国内においては厳格な環境基準と排出規制が敷かれている。海外においては、欧州における工業製品の含有量規制である Rhos 指令⁵や、重金属等を含む廃棄物の移動を制限するバーゼル条約⁶などによる管理が進められている。また、人工的に合成された化学物質、例えばレイチェル・カーソンが著作「沈黙の春」で予言したジクロロジフェニルトリクロロエタン（DDT）や、ティオ・コルボーンらによる著作「奪われし未来」で紹介されホルモン様の生理作用が疑われる物質群は、農薬として有用な作用を有することから使用の完全な制限が困難であったが、現在では国連環境計画によって、DDT をはじめとした 12 種の残留性有機汚染物質（Persistent Organic Pollutants ; POPs）として、製造と使用の制限⁷が進められている。

1-2-1 重金属による環境汚染

日本の国土は新期造山帯に分類される環太平洋造山帯に属することから、石炭や貴金属などの多様な地下資源に恵まれてきた。その一方で、地下資源の採掘と、それに伴う金属精錬においては目的の金属と共存する有害な微量金属が副生するため、健康被害を生じる例が歴史的に多かった。特に、銅採掘に伴うヒ素汚染、亜鉛採掘に伴うカドミウム汚染など、近代の工業化以降は特に大規模な健康被害が報告されるようになった。また、第二次世界大戦後に活性化した化学工業においては、優秀な反応触媒である重金属の使用機会が増加し、結果的に有機水銀やカドミウム等による深刻な健康被害が生じた。20 世紀後半、これら公害事例への対応が国民的な関心となって以降は悲惨な被害は無くなったとされるが、一方で、環境中に放出された重金属あるいは重金属化合物の回収は事実上不可能となっており、依然として重金属による環境汚染と生活へのリスクは過去のものとは言えない⁸。そのため、我が国では、毒性の高い重金属については特に厳格な環境基準値および指針が設定されており、経済活動に付随する化学物質の使用について、厳密な管理が為されている。ごく身近な例としては、我が国における主食であるコメに含まれるカドミウム量や、特定魚種の摂取における水銀量に関しても指針が設けられている。重金属汚染への対応という観点で国外に目を向けると、欧州においては、重金属の環境影響の抑制と電子機器リサイクルを容易とするために、Rhos 指定により工業製品における鉛、水銀、カドミウム、6 価クロム等の 6 物質の含有を制限⁵してい

る。また、平成 25 年 10 月に水俣市において調印された水銀に関する水俣条約⁹では、水銀の一次採掘から貿易、水銀添加製品や製造工程における水銀の利用、大気への排出や水、土壌への放出、水銀廃棄物に至るまでの包括的な規制に向けた意思決定がなされた。

1-2-2 残留性有機物質による環境汚染

残留性有機汚染物質（POPs）は、毒性、難分解性、生物蓄積性、長距離移動性を有する化学物質と定義され、主にポリ塩化ビフェニル（PCB）、DDT などの 12 種類の残留性有機汚染物質をいう。残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約⁷では、これらの、製造及び使用の廃絶と制限、環境への排出量の削減、これら物質を含む廃棄物等の期限までの適正処理等を規定している。日本国内では、すべての POPs は化学物質排出把握管理促進法（PRTR 法）あるいは化審法により特定化学物質に指定されている。また、農薬取締法¹⁰により DDT、アルドリン、ディルドリン等の農薬類は製造と使用が禁止されている。ダイオキシン類については、ダイオキシン類対策特別措置法に基づき、排出規制が規定され、各発生源別におけるダイオキシン類の排出量目録（排出インベントリー）を整備するなどの対策が取られている。我が国において健康被害（カネミ油症）の原因物質となった PCB については、ポリ塩化ビフェニル廃棄物の適正な処理の推進に関する特別措置法¹¹を制定し、広域的な処理体制の整備を進めるなどして期限内の処理に向けた対策が講じられている。

1-3 環境分析について

我々が自然環境と向き合い、汚染を修復し、人類を含む生態系への深刻な影響を回避するためには、問題となる物質が何であるか（定性分析）、どのくらい存在するのか（定量分析）について調べる必要がある。また、各種の環境汚染が地球規模に拡大している現状においては、何処に汚染物質が存在し、どのように環境中を移行しているのかを理解する動的な情報蓄積も不可欠である。環境分析技術が環境問題への対応と、安心して生活できる社会の実現に果たす役割は大きい。しかしながら、従来までの分析技術は多

量の検体を迅速に測定するという思想の下に構築されておらず、今後必要とされる網羅的な分析において、迅速性と費用対効果の面で力不足と言わざるをえない。そのため、近年では多項目測定可能な機器分析の開発や、従来機器の迅速化、さらには抗体や酵素、生物そのものを利用した分析技術が開発されつつある。特に、抗体などの生体分子が有する特異的な分子認識能を利用した測定原理（イムノアッセイ）は、簡便かつ安価な環境分析技術の構築において重要な役割を果たすと期待されている。

1-4 イムノアッセイ

1-4-1 抗体分子

抗体は生理的機能に基づく名称であるが、物質的な観点からは共通性の高いポリペプチド骨格を有するタンパク質群であり、免疫グロブリンと称される。抗体に共通する機能としては、抗原分子に対する結合性および補体結合性があり、前者は生体における異物認識の役割を担い、後者は異物を認識した後の免疫作用の発現を補助する役割をもつ。これらの機能の発現のため、抗体分子は2つの特徴的な機能性構造を有する。免疫グロブリンは、クラスおよびサブクラスによって、共通性の高い構造においても若干の相違点があるが、基本的な骨格は類似しており、基本的には2本ずつの2種類のポリペプチド鎖（短鎖：L鎖、長鎖：H鎖）から構成されている。合計4本のポリペプチド鎖は、各鎖内のシステイン残基により結合することで大分子を形成している。

抗体分子の分子的な特性を理解するために、免疫グロブリン G1 を例とすると、図 1.1 に示すように、IgG1 はH鎖を中心としたアルファベットのY字型となっている。Y字分子の胴体側では、H鎖のカルボキシル末端側が2対のジスルフィドにより結合されており、両腕部にはL鎖がジスルフィドを介して結合している。抗原認識に関与するのは、H-L鎖両ペプチド鎖アミノ末端側の約110個のアミノ酸で構成される抗原結合部位であり、各鎖の可変領域における遺伝子再構成の結果、理論上 $10^7 \sim 10^8$ の多様性が期待できる。

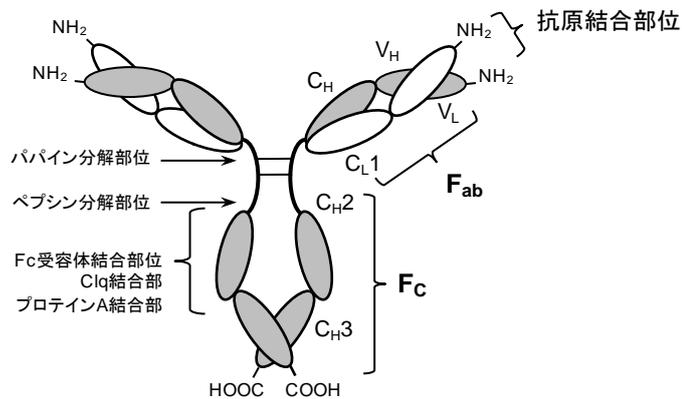


図 1.1 免疫グロブリンの分子構造と機能部位

1-4-2 イムノアッセイの利点

一般に、イムノアッセイは抗体分子が有する抗原に対する特異性と高い親和性を利用し、化学物質 (= 抗原) を検出・定量する手法を言う。一般的な機器分析 (ICP、LC 等) による分析原理は、測定マトリクスから分析対象をクロマトグラフィにより分離し、その後に検出を行うことから、分析対象の分離工程と検出工程は全く異なる原理を必要とする。それに対して、イムノアッセイは検出素子である抗体自身に、検出対象とそれ以外を分離する特異性を有することから、機器分析と比較して前処理等の分析工程を簡易化することが可能である。この点で、イムノアッセイは複雑なマトリクスを有する生体試料の分析において有利とされ、研究用途から医療現場までの幅広い分野で研究と実用が進められてきた。

1-4-3 環境分析におけるイムノアッセイ

医学・生物学分野を主たる場として、生体試料に含まれる高分子のホルモン分子などを対象として研究が進んだイムノアッセイは、環境物質に対する抗体の取得も含めて、技術開発が大きく遅れていた。また、機器分析による定量性をことさら重視する傾向にある環境分析においては、イムノアッセイが有する生物学的な曖昧さに対する理解が乏

しく、精度管理の観点から環境分析への応用例は近年まで少なかった。しかしながら、既に述べたように、イムノアッセイの検出素子である抗体分子は、極めて優れた抗原特異性を有することから、機器分析と比較して妨害成分の影響を受けづらいた測定系を構築できる。当然ながら、イムノアッセイでは機器分析で必要とされる実験室に設置された高額な機器を必要とせず、多数の環境試料を迅速かつ安価に測定ことが可能である。一方で、抗体の親和性の観点からイムノアッセイを考察すると、優れた抗体の親和性は結合解離乗数 (K_d) の値が $10^{-11} \sim 10^{-9}$ M 程度であることから、測定対象の分子が 1000 程度の低分子であると仮定すると $0.1 \sim 1 \mu\text{g/L}$ の抗原濃度に対応可能であると考えられる。この濃度域は、環境基準として設定されている規制物質の濃度の下限値に近く、環境分析におけるイムノアッセイの実用性を示唆している。

1-4-4 低分子イムノアッセイ

生体内に存在するステロイド等の微量の低分子化合物は免疫原性を示さないが、適当な高分子キャリアと結合させ、非経口的に投与することで抗体が産生されることが知られている。そのため、環境分析において対象となる多くの低分子化学物質について、抗体を作製することも十分に可能である。その一方で、低分子を対象としたイムノアッセイは、タンパク等の大分子を対象とする場合と比較して、感度を得るために工夫が必要となる。ここで、高感度な低分子イムノアッセイの実現に向けた必要な議論の下地として、一般的なイムノアッセイの原理を整理する。イムノアッセイの測定原理は競合法と非競合法に分類される。前者は、酵素などで標識した抗体（あるいは、抗原）を一定量の抗原（あるいは、抗体）に対して競合的に反応させるもので、反応中の抗原量の増加により標識体の結合率が低下する（図 1.2）。競合法では、分子のサイズによらず測定を構築できる半面、測定感度は抗体の親和性に依存することから、高感度化には限界がある。

他方、非競合法はイムノメトリックアッセイとも呼ばれ、測定対象の抗原に対して過剰量の標識抗体を反応させ、抗原量の増加に応じて増加する免疫複合体の量を標識活性から判断する（図 1.3）。非競合法は、単一抗体を用いた単一抗体イムノメトリックアッセイと、サンドイッチ法に分類することができ、後者は抗原に異なる 2 つのエピトープを有するタンパク等の大分子の測定に利用できる。一般に非競合法は過剰量の抗体を

用いることで微量の抗原と反応させることが可能であり、競合法と比較して高感度化に有利である。

以上、免疫アッセイに関する技術的な背景をもとに、低分子化学物質を対象とした免疫アッセイについて考察する。まず、競合法による低分子測定では抗原が多種の規制物質であることを考えると、抗原標識体の調製が分子構造的に、あるいは実用性の面で困難である。そのため、測定方式は固相抗原を用いる方法に、ほぼ限定される。この場合、低分子抗原と標識抗体を反応させ、免疫複合体と未反応抗体を分離する工程が必要となる。非標識法の場合、単一抗体免疫メトリックアッセイでは、過剰量の標識抗体と低分子抗原が反応した免疫複合体を分離し、複合体量を標識活性から定量する必要がある。また、サンドイッチ法については低分子抗原が複数のエピトープを有することは期待できないことから、事実上適用は不可能である。従って、近年報告されている遺伝子工学的な抗体改変に基づく新たな測定原理を用いない場合、抗原固相を用いた競合法が最も利便性が高い測定原理と言える。

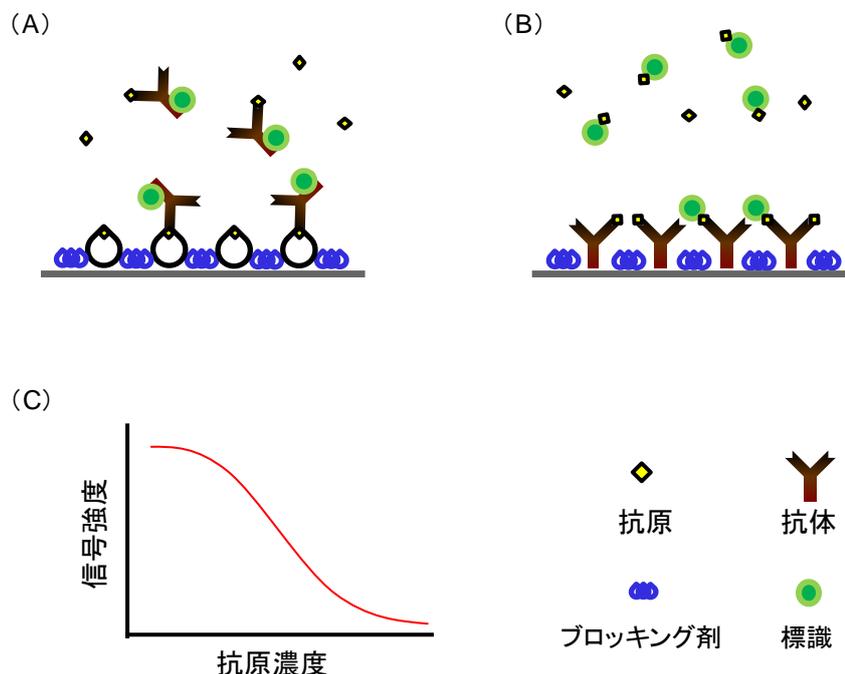


図1.2 競合法に基づく免疫アッセイ

(A) 抗原固相法では未反応の標識抗原を固相上に分離し、(B) 抗体固相法では標識抗原と未標識抗原が存在比に関係して固相上に結合する。(C) 競合免疫アッセイにおける検量線の典型。抗原濃度に対して信号強度は減少する。

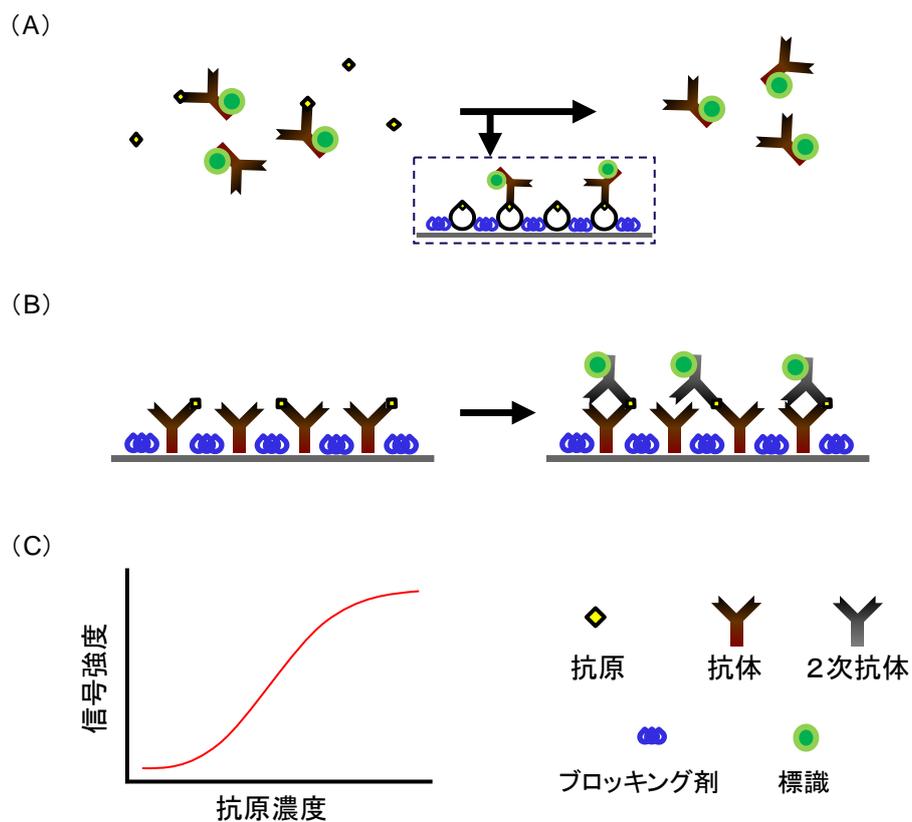


図1.3 非競合法に基づくイムノアッセイ

(A) 単一抗体イムノメトリックアッセイでは過剰の抗体と抗原を反応させ、未反応を吸収した後に免疫複合体量を計測する。(B) サンドイッチ法では、過剰の抗体により免疫複合体を形成し、形成された免疫複合体量を2次抗体により定量する。(C) 非競合イムノアッセイにおける検量線の典型。抗原濃度に対して信号強度は増加する。

1-4-5 低分子イムノアッセイの高感度化に向けた課題

前項で述べたように、低分子を対象としたイムノアッセイとして最も現実的なものは、抗原固相を利用した競合法である。この場合、反応溶液中において形成された免疫複合体を抗原固相と接触させることで、未反応抗体と免疫複合体を分離するが、分離工程において固相抗原と溶液中の抗原の間において競合反応が生じる。ここで生じる競合反応は測定原理そのものであるが、同時に反応溶液における化学平衡のシフトが生じ、測定感度が損なわれてしまう。この場合の競合反応による負の影響を低減する手法としては、一般的に抗体濃度の低減、固相抗原の低減、反応時間の短縮が行われるが、いずれも測定における信号値を減じる方向に作用することから、測定精度への影響を含めて最適な測定条件を見出す努力を要する。また、サンドイッチ法に代表される非競合法については、低分子抗原のエピトープが単一であることから、低分子測定への適用は困難であるが、これまでの酵素などを標識として用いた検出によらない、免疫複合体の検出技術が低分子を測定対象とした場合も可能であるならば、競合反応を無視できる高感度な低分子測定が可能となるだろう。

1-5 本論文の目的

本論文では、環境中の汚染物質の大半が低分子化学物質であることに着目し、それら低分子の簡便かつ迅速に分析しうるイムノアッセイの構築を目指した。その中で、これまでの低分子を対象としたイムノアッセイの測定感度に関する問題点を改善するために、以下に示す2つの方針に基づく測定原理を検討した。

(1) 競合イムノアッセイの未反応抗体分離の効率化 (第2章～第4章)

従来の競合イムノアッセイにおける、未反応抗体分離の際の固相抗原と抗原抗体反応溶液の競合を主因とする測定感度の損失を低減するため、流れ系における抗体捕捉の効率化を図り、未反応抗体分離の効率化と、低分子を対象とした競合イムノアッセイの高感度化を検討する (図 1.4(A))。

(2) 非競合イムノアッセイの構築 (第5章～第6章)

低分子を認識する抗体分子を検出基板上に固相化し、溶液中の低分子抗原と固相抗体間における抗原抗体反応に伴う、検出基板表面の物性変化を非標識検出を検討し、非競合の反応原理による高感度な低分子イムノアッセイを目指す (図 1.4(B))

各測定系の検討においては、前者では主要な重金属類であるカドミウム、クロム、鉛、水銀を測定対象とし、後者では POPs の一種であるポリ塩化ビフェニル (PCB) を測定対象として測定原理の構築を図るとともに、実試料を用いた分析性能の確認を行い、構築した高感度低分子イムノアッセイの有用性を示した。

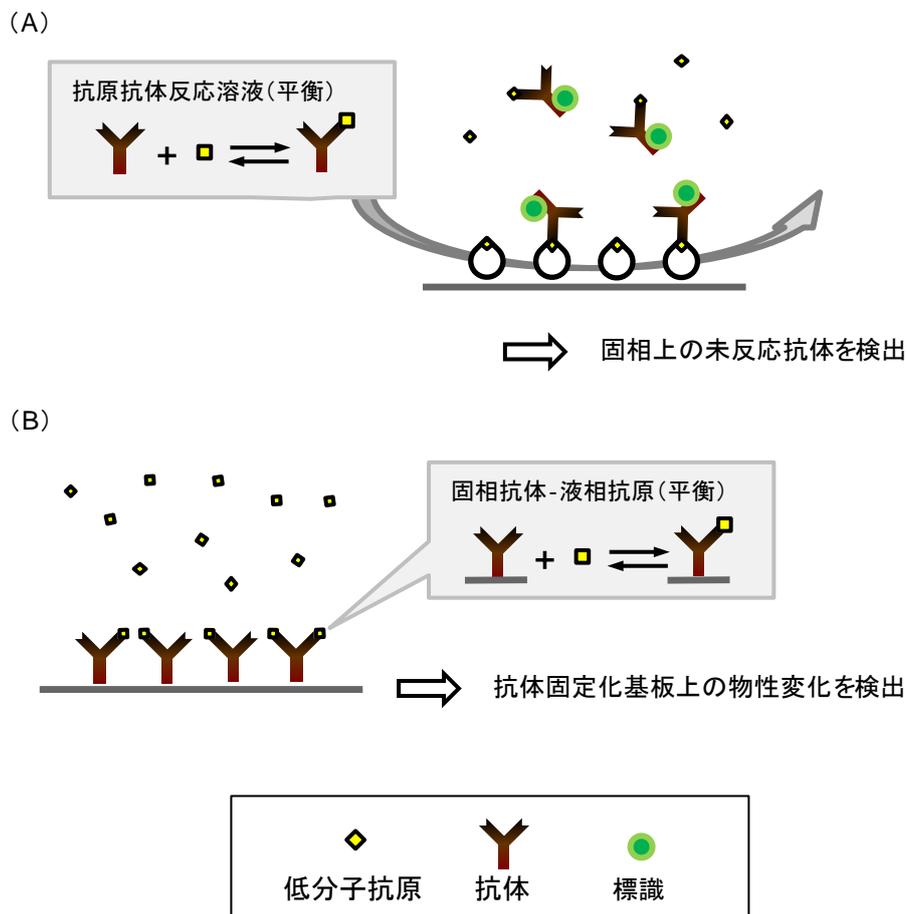


図 1.4 低分子イムノアッセイの高感度化に向けた方針

(A) 流れ系における効率的な未反応抗体の分離に基づく競合イムノアッセイの高感度化、(B) 固相化抗体と液相抗原間の平衡と、抗体固定化表面の抗原抗体反応に伴う物性変化の検出に基づく非競合イムノアッセイ。

抗体の捕捉・検出を目的とした マイクロ流路の作製と評価

2-1 はじめに

低分子を対象とするイムノアッセイでは、抗原固相、あるいは抗体固相を利用した競合法による測定が一般的である。なかでも、測定対象が規制物質である場合が多い環境分析においては、低分子抗原の標識を必要としない点において、抗原固相を用いた競合法が实际的である。しかしながら、抗原固相-競合法に基づく低分子測定では、最適な分析性能を得るためには反応時間、固相量といった測定条件の微調整が必要であった。また、これまで一般的であったマイクロタイタープレートを用いた測定では、精度の高い試料操作が困難であり、測定精度を得るためには分析者の技量を必要とする。そこで、本章では、抗原固相における抗体捕捉の利便性を活用し、競合法に基づくイムノアッセイの未反応抗体の分離工程の効率化を図ることで、測定感度や精度といった測定性能の向上を目指した。具体的には、抗原固相を流れ系に配し、未反応抗体の分離場とすることで、抗体捕捉時の競合反応の低減を期待した。以上の方針に合致する実験系として、下記条件を満たす実験系を構築した。

- ① 流れ系における一定量の抗原固相（抗体捕捉担体）の保持
- ② 高度に制御された測定溶液と担体の接触反応

ここで、抗体捕捉担体として、抗原タンパク複合体を表面に担持できるラテックス粒子を使用することとし、流れ系における粒子保持、担体粒子と測定溶液との接触を可能とするために、微細加工技術を用いたマイクロ流体デバイスの利用を着想した。

2-1-1 マイクロ流体デバイス

マイクロ流体デバイスは、様々なバイオアッセイを少量の試料で分析可能とし、従来法の分析時間を劇的に短縮する可能性を有する¹²⁻¹³。これは、マイクロ流路内における反応系内では、相互作用する分子の拡散距離が極端に短くなることで、拡散律速効果が解除され、混合時間や反応に要する時間が短縮されることによる¹⁴⁻¹⁵。濾過、濃縮、液-液抽出や気-液抽出といった一般的な前処理操作の小型化についても多くの研究がなされており、マイクロ流路内に複数の実験要素を組み込むことも可能である¹⁶。これらのマイクロ流体デバイスが有する特徴は、イムノアッセイを利用した簡易分析においても有用であり、本章で目指す抗体捕捉の効率化による感度向上に資すると考えられる。また、マイクロ流体デバイス上への分析技術の集積化がもたらす分析実験の小型化・自動化は、様々な分野（環境分析、食品分析、医療検査、基礎科学）において廉価な分析手法を実現することが期待される。^{12-13, 17-18}

2-1-2 マイクロ流体イムノアッセイの検出技術

マイクロ流体デバイスを利用したイムノアッセイにおける検出方法として、これまでに多くの原理が適用されてきた（表 2.1）。蛍光標識は波長の選択性は広く、また生体分子に容易に結合しうることから最も一般的に用いられている¹⁹⁻²⁰。表面プラズモン共鳴（SPR）現象を利用した SPR 法では、タンパク質程度の大きさの分子の吸着脱離現象を標識なしで検出できることから、非標識イムアッセイを可能とする原理として、盛んに研究が進められるとともに、実用化が図られている²¹⁻²²。熱レンズ顕微鏡（Thermal Lens Microscopy ; TLM）は同軸の励起光とプローブ光を用い、励起光により生じた試料溶液内分子の励起効果が緩和する際に生じる放出熱を、放出熱により溶媒内で生じる屈折率変化（熱レンズ効果）をプローブ光の屈折から検出する。TLM を原理とした検出方法の検出下限は 1 分子以下であり、対象を蛍光分子などに限らない²³⁻²⁴。電気化学検出は、中でも電流検出式、電位検出式、インピーダンス検出式が代表的な方式であり、電極を用い、反応により生じたメディエータ物質の酸化還元（過酸化水素、酸化還元性有機化合物、金属微粒子等）を検出する場合が多い。また、増感法として、相互楕形電極や酵素複合によるシグナル増幅法も提案されている²⁵⁻²⁶。以上において紹介した検出

方法は、高感度である一方、光学系における光路の確保や電子回路におけるノイズ対策等のために、一定の測定装置のサイズを必要とし、現時点での小型化は困難である。そのため、環境分析においてニーズがある現場分析での分析には不向きであると考えられる。一方、吸光度に着目すると、上記の方法と比較して感度は低いが、光源と検出器は安価であり、測定系外のノイズに対しても耐性が高い。そのため、検出分子の標識、あるいは増幅による感度補償が可能であれば、環境分析において実用的な検出方法といえる。免疫アッセイにおける吸光度検出の例としては、酵素反応による発色の利用、ナノ粒子等の発色粒子の利用が考えられる。近年では、高い吸光係数をもつ金コロイドなどの貴金属ナノ粒子により標識した抗体をマイクロ流路免疫アッセイに利用することで、タンパク質やウイルスを検出した例がある²⁷⁻²⁸。また、金ナノ粒子による標識を行った場合、金ナノ粒子表面の触媒的な還元力を利用した銀増幅による免疫アッセイの感度向上も期待できる²⁹。以上から、本章におけるマイクロ流体デバイスを用いた抗体捕捉の定量化には、次のステップにおける免疫アッセイの高感度化と、将来的な実用を考え、貴金属ナノ粒子を標識材とした吸光度検出の利用が妥当であると判断した。

表 2.1 マイクロ流体デバイスに適用可能な抗体検出原理

検出手法	蛍光	SPR	電気化学	TLM	吸光	
抗体標識	蛍光物質/酵素 /ナノ粒子	なし /ナノ粒子	酵素/ナノ粒子/ 酸化還元物質	なし /ナノ粒子	酵素	ナノ粒子
感度	○	○	◎	◎	○	○
簡便性	○	△	△	△	○	◎
費用	△	△	△	△	○	○
汎用例	蛍光免疫アッセイ FACS	—	—	—	ELISA	ImC 免疫染色

FACS : フローサイトメトリー
 ELISA : 酵素結合免疫吸着法
 ImC : イムノクロマトグラフィ

2-1-3 本章の目的

本章では、低分子を対象とした競合イムノアッセイの感度向上における隘路である、未反応抗体の分離場における固相抗原と抗原抗体反応溶液の間での競合反応に着目し、流れ系における固相抗原による抗体捕捉の効率化を検討した。流れ系における抗体捕捉を検討する基礎的な実験系として、抗原固相を保持し、微量試料を効率よく操作できるマイクロ流体デバイスを構築した。吸光度検出に基づく捕捉抗体量の定量を試みるとともに、競合イムノアッセイによるカドミウム測定を試みた。

2-2 実験方法

2-2-1 試薬と材料

本章で用いた試薬と材料の入手元を示した。

- 日本化薬：フィルム型ネガ型フォトレジスト (SU-8 film)、現像液 SU-8 Developer
- 東レダウコーニング：ポリジメチルシロキサン (2液混合 PDMS キット、SILPOT 184)
- 信越化学工業：3.3.4.4.5.5.6.6.6-nonafluorohexyl trichlorosilane
- 同人化学工業：1-(4-isothiocyananobenzyl) ethylenediamine-N.N.N'.N'-tetraacetic acid (ITCB-EDTA)
- 和光純薬工業：塩化金酸 X 水和物 (HAuCl_4)、塩化カドミウム (CdCl_2)
- ASONE : MICROWELL PLATE (ELISA 用)
- KPL(代理店:フナコシ):ELISA 用 2 次抗体 Affinity Purified Antibody Peroxidase Labeled Goat anti-Mouse IgG(H+L)、ペルオキシダーゼ発色試薬 ABTS Microwell Peroxidase Substrate (2-Component System)
- スクラム (腹水化、および精製) : 抗カドミウム EDTA マウスモノクローナル抗体 (NX2C3³⁰⁻³¹)

2-2-2 抗体捕捉用マイクロ流体デバイスの設計

マイクロ流体デバイスの微小な空間において、抗原抗体反応溶液からの未反応抗体を補足するために、抗原を表面に固相化した抗体捕捉粒子を精度よく充填することができる流路構造を設計した（図 2.1）。マイクロ流路は抗原抗体反応溶液、および緩衝液を導入する主流路部と、抗体捕捉粒子を導入する副流路で構成し、両流の合流部である T ジャンクション部を検出部位と位置付け、一定数の粒子が固定されるようなダム構造を配置した。はじめに流路の詳細な寸法は、流路幅：1000 μm 、流路深さ：225 μm とし、検出部のダム構造は 100 μm 幅、間隔 50 μm の楕円形構造とした。

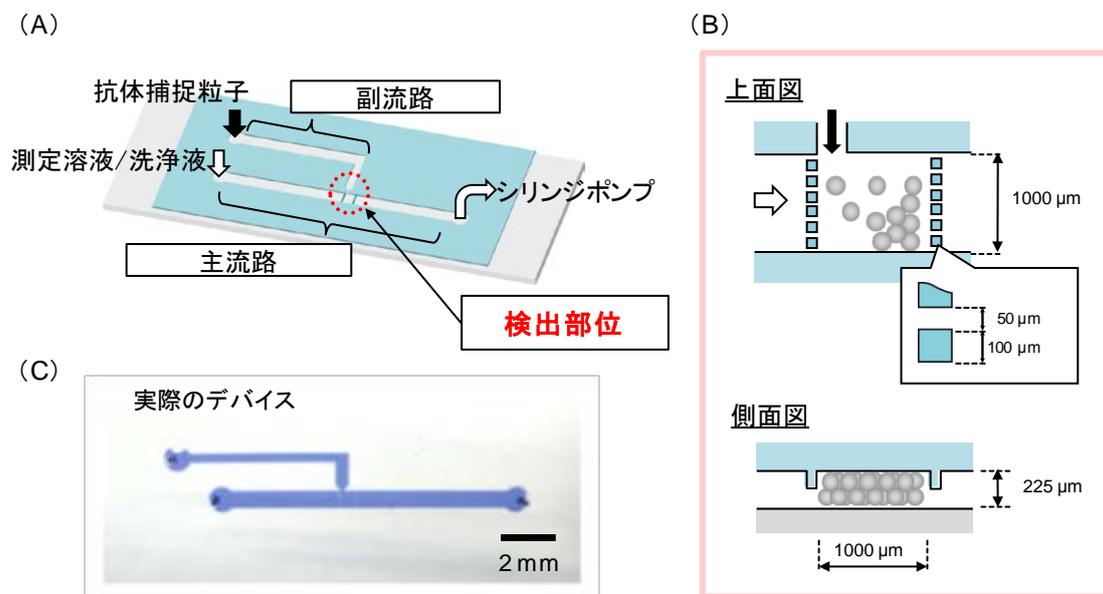


図 2.1 抗体捕捉用マイクロ流体デバイスの概要

(A) 主流路と副流路により構成されるマイクロ流体デバイスの概要図、
(B) 検出部位には抗体捕捉粒子が導入、捕捉されることで未反応抗体の分離場となる。(C) マイクロ流体デバイスの状面写真（流路内に色素溶液を満たして撮影）

2-2-3 マイクロ流体デバイスの作製

マイクロ流路デバイスはポリジメチルシロキサンを材料として、微細加工技術により作製した鋳型を用いてした。図 2.2 に作製工程の概要を示した。

(1) SU-8 鋳型の作製

清浄なシリコン基板にネガ型フォトリソレジスト SU-8 3050 をスピコート(1500 rpm、30 秒)し、プレバークした(65°C・1 分、95°C・10 分、65°C・3 分)。続いて、マスクアライナー上でレジスト面にクロムマスクを重ね、流路鋳型を形成する部位に露光を行った(波長 365 nm、450 カウント)。露光後の基板はポストバークの後、現像液(SU-8 developer)により非露光部位を除去し、2 プロパノールで十分に洗浄した。続いて、第 2 層も同様にして作製した。鋳型をパターニングしたシリコン基板は、ホットプレートを用いて熱処理(180 °C、6 時間)し、レジストの機械的強度を高めた。

(2) PDMS マイクロ流体デバイスの作製

PDMS 製の流路構造は、フォトリソグラフィにより作製した鋳型を用い、ソフトリソグラフィ法³²を用いて作製した。SU-8 製の鋳型に対して高さ 5 mm のアクリル製型枠を配置し、PDMS プレポリマー(東レダウコーニング)を流し入れた後に、熱硬化(80°C、2 時間)させた。硬化後の PDMS スラブは室温で放冷し、デザインナイフを用いて鋳型から剥がした。続いて、2 カ所のインレットと 1 カ所のアウトレットにステンレス管(19G)で貫通孔を開けた。PDMS スラブを中性洗剤で洗浄しエタノールでリンスすることでホコリと油脂を除去し、スライドガラス(26 mm × 76 mm × 1 mm)と共に、酸素プラズマ処理(プラズマアッシャー、ヤナコ)(100 W、15 秒)し、続いて両者を密着することで PDMS スラブをガラス上に固定した。

完成したマイクロ流体デバイスは、インレットおよびアウトレットにステンレス管(OD: 1 mm)を差し込み、根元をエポキシ系接着剤(Quick 5、コニシ株)で固定し、タイゴンチューブ(Tygon® R-3603、サンゴバン株)と接続できるように加工した。

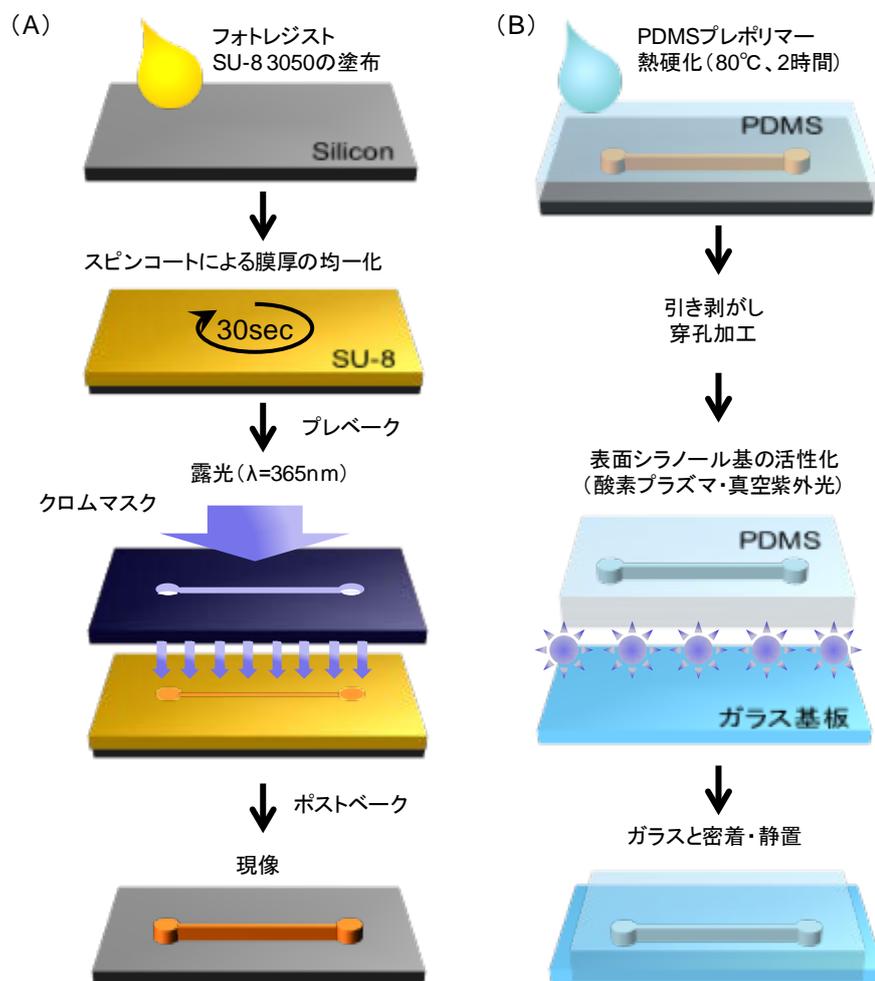


図2.2 微細加工技術を利用したPDMS製マイクロ流体デバイスの作製工程

(A) ネガ型フォトレジスト (SU-8) に対して目的の流路パターン状に露光し、非露光部を現像により除去して鋳型とした。(B) 表面処理した鋳型に対してPDMSプレポリマーを流し入れ、熱硬化させた後、鋳型からPDMSスラブを引きはがして加工した。PDMSスラブおよびガラス基板を酸素プラズマ等により処理し、接着面を接合して静置することで接着した。

2-2-4 吸光度測定装置の作製

測定装置の概要を図 2.3 に示した。流路内に捕捉される金コロイド標識抗体の検出のため、金コロイド特有の 526 nm 付近の吸収スペクトルが検出できるよう、緑色 LED（波長 520 nm、NSPG500S、日亜化学工業）とフォトダイオード（S1223-01、浜松ホトニクス）を光源と検出器として用いた。光源の発光制御と検出器の信号処理には柴田科学製ハンディ水質計 AQUAB の内部基板を利用し、フォトダイオードから出力された電流を電圧値として記録する構成とした。測定時のマイクロ流路基板の位置決めは、基板を金属板上のくぼみに固定し、治具により固定できるようにした。固定されたマイクロ流路の下部にはフォトダイオードが配置され、上部の光源から流路内を透過した光を検出できるように光学系を配置した。光源である LED は鉛直方向に配置されたスライダに搭載されており、流路上面と密着できるような構造とした。また、LED 光源、マイクロ流路、フォトダイオードの境界には、 $\phi 0.7$ mm の金属製円形スリットを配置し、LED 光源からの入射光の制限と、フォトダイオードへ入射する透過光の非垂直成分の低減を図った。

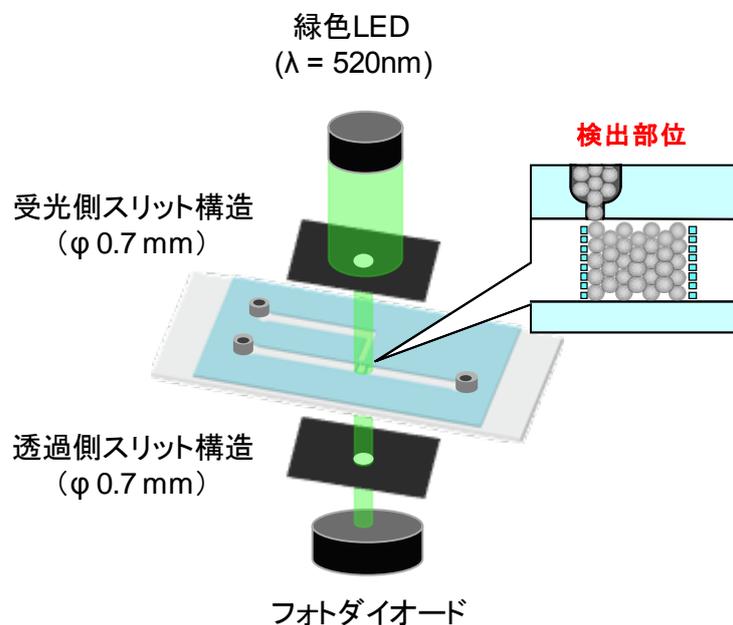


図 2.3 吸光度測定装置およびマイクロ流体デバイスの配置

吸光度測定装置は緑色 LED 光源、検出用フォトダイオード、および制御基板により構成され、マイクロ流体デバイス内の検出部位を通過した透過光はフォトダイオードに入射することで電圧値に変換される。

2-2-5 送液方法

マイクロ流体デバイスを用いた送液は、電気浸透流ポンプ（ナノフュージョン株）を駆動力とし、2箇所を設置したバルブの開閉を利用し、抗体捕捉粒子の導入と試料溶液などの通液を行った。図2.4に送液系、試料容器の概要図を示した。抗体捕捉粒子を含む懸濁液、試料溶液などはガラスチューブ（Kimble Chase Life Science and Research Products LLC.）にタイゴンチューブを挿入し、ポンプの吸引により一定量を採取できるように配置した。

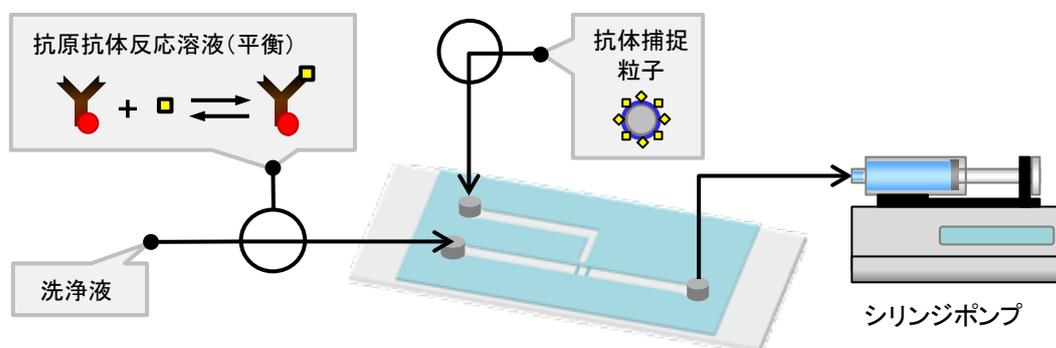


図2.4 検出部位における抗体捕捉のための送液操作

抗体捕捉粒子を検出部に導入・保持し、抗原抗体反応溶液（金コロイド標識抗体と抗原）と粒子の接触により未反応抗体が蓄積された。

2-2-6 抗体捕捉粒子の調製

未反応抗体の捕捉に用いる担体として、タンパク質を介して抗原である重金属錯体を PMMA 粒子上に固相化³⁰した。以下に簡単に方法を述べた。

0.4 g の単分散 PMMA 粒子（粒子径 100 μm 、ガンツ化成株）を 1 mL の BSA 溶液（1%（wt/v）、リン酸緩衝液）に懸濁し、室温で 2 時間転倒攪拌した。続いて上澄みを除き、ホウ酸緩衝液（pH 9.8、NaOH）で 4 回洗い、0.8 ml のホウ酸緩衝液で粒子を再懸濁した。PMMA 上の BSA のアミノ酸残基にキレート分子を導入するために、イソチオシアネート基を末端に持つキレート分子を用いた。上記の方法で調製した BSA 被覆 PMMA 粒子（0.8 ml ホウ酸緩衝液）に対して、1 mg/mL イソチオシアノベンジル EDTA (ITCB-EDTA、同仁化学研究所) もしくはイソチオシアノベンジル DTPA (ITCB-DTPA、Macrocyclics, Inc.) を含むホウ酸緩衝液 165 μL を添加し、室温で 2 時間転倒攪拌した。反応後には上澄みを除き、MES 緩衝液（pH 6.5、NaOH）で 5 回洗浄し、1.0 mL の MES 緩衝液で粒子を再懸濁して 4°C で保存した。

冷蔵保存されたキレート分子被覆粒子に対して、終濃度 2 mM となるよう調製したカドミウム塩酸塩水溶液を添加し、室温で 30 分以上転倒攪拌し、粒子上の EDTA とカドミウムの錯形成を図った。余分な金属イオンを除去するために、粒子懸濁液を MES 緩衝液（pH 6.5、NaOH）で 3 回以上洗浄し、調製後のカドミウム EDTA 固定化粒子は冷蔵庫（4°C）で保存した。

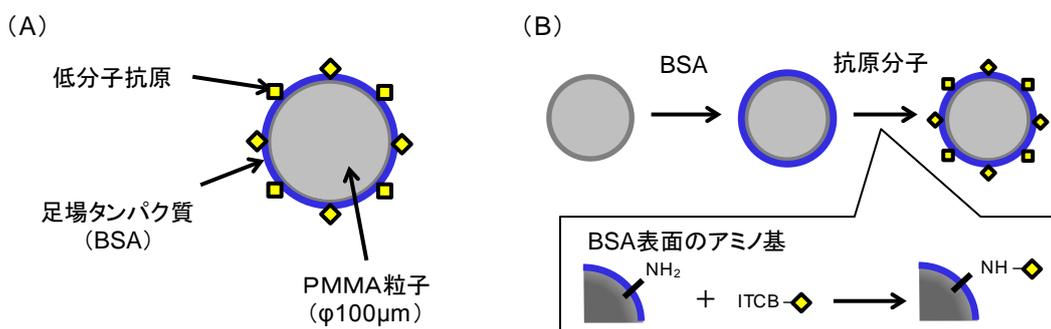


図2.5 抗体捕捉粒子の概要と作製工程

(A) 抗体捕捉粒子の概要図、(B) PMMA粒子表面にウシ血清アルブミン (BSA) を物理吸着させ、続いてBSA表面のアミノ基を利用して抗原分子を共有結合した。

2-2-7 金コロイド標識抗体の調製

(1) 金コロイドの調製

金コロイド溶液（粒径：約 35 nm、動的散乱法により計測）は、クエン酸還元法により調製した。体積 500 mL の平底フラスコを用い、250 mL の 1% 塩化金酸溶液 (HAuCl₄ 塩を純水に溶解) を攪拌しながら沸騰させた。続いて、5 mL に調製した 1% (w/v) クエン酸ナトリウムをフラスコ上部より速やかに添加し、塩化金酸水溶液が再沸騰し、水溶液の色が黄色から赤紫色に変化するのを待ち、最後に 10 分間沸騰させてから過熱を止めた。金コロイド溶液は、時間経過により凝集などの性質変化を生じることから、氷上で 20°C 近くまで速やかに冷却し、続く抗体標識に用いた。

(2) 抗カドミウム EDTA 抗体の標識

金コロイド表面に結合させる抗カドミウム EDTA 抗体は、プロテイン A カラムとイオン交換樹脂により精製された NX2C3 モノクローナル抗体を用いた。先に調製しておいた金コロイド溶液を炭酸カリウム溶液を用いて pH 9.15 に調製した。次に、200 mL の金コロイド溶液に対して、0.2 mL の抗体溶液 (1.5 mg/mL) を添加し、緩やかに転倒混和した後に室温で 2 分間反応させた。その後、反応溶液には 20 mL 牛血清アルブミン溶液 10% (w/v-水) を添加し、緩やかに混和した後に 9000 rpm で 25 分間遠心分離にかけた。遠心分離後の溶液において、抗体および血清タンパクと結合した金コロイド容器下部に集積された。金コロイドの回収には 10 mL ピペットを用い、底部の沈滓を 15 mL を採取し、樹脂容器に保存した (4°C、冷蔵庫)。

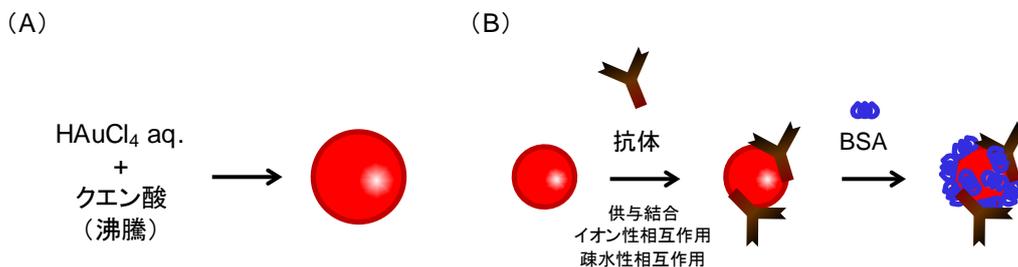


図 2.6 金コロイドおよび金コロイド標識抗体の作製工程

(A) 沸騰した塩化金酸水溶液にクエン酸水溶液を添加し、再沸騰させることで均一な金コロイド溶液が得られる。(B) 金コロイド表面のマイナス電荷と抗体分子の正電荷のイオン性相互作用、さらには疎水性相互作用等により金コロイドと抗体は複合体を形成する。ウシ血清アルブミン (BSA) によるブロッキングにより金コロイド表面が安定し、非特異吸着が低減される。

2-2-8 酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA 法)

96 穴マイクロタイタープレートにカドミウム EDTA - BSA 複合体を各ウェル 10 μg ずつ分注し 1 日以上、冷蔵庫内で静置し、抗体吸着のための固相を作成した。測定では、カドミウムと抗カドミウム EDTA 抗体 (2 nM) を含む 50 mM トリス緩衝液 (0.1% BSA、10 μM EDTA を含む) を各ウェルに 200 μL ずつ添加し、1 時間反応させた後に各ウェルを洗浄した。続いて HRP 標識 2 次抗体溶液 (1 nM) を各ウェルに 200 μL ずつ添加し、1 時間半反応させた。各ウェルの洗浄後、発色基質を添加し、15 分後に反応停止液を添加することで酵素による発色反応を停止した。各ウェルの吸光度は、96 穴プレート用の吸光度計を用いて測定を行った。

2-3 結果と考察

2-3-1 マイクロ流路内における抗体捕捉粒子の捕捉

マイクロ流路内の検出部位への抗体捕捉粒子の充填を検討した。ここでは、抗体捕捉粒子として、カドミウム EDTA を保持した粒子を用いた。はじめに、マイクロ流路内に 0.1% BSA を含むリン酸緩衝液を満たし、主流路および副流路のバルブを開放状態とし、シリンジポンプで吸引することで、副流路側から MES 緩衝液 (pH6.5) に懸濁した抗体捕捉粒子を検出部に導入した。その際の送液速度は 250 $\mu\text{L}/\text{min}$ とし、流れを可視化するために、副流路側の溶液には色素 (2 mM メチレンブルー) を予め添加した。

抗体捕捉粒子の導入開始直後の様子を図 2.7(A)に示した。主流路および副流路側から溶液が合流するとともに、粒子が検出部の流れ出口側に蓄積されつつあることが確認できた。しばらく粒子の導入を続けると、副流路側の入口、副流路内を粒子が充填することで、副流路側からの流れが自然と停止する (図 2.7(B))。以後、検出部位において保持された抗体捕捉粒子は、主流路側より導入された溶液の流れにおいて安定状態を維持することができた。

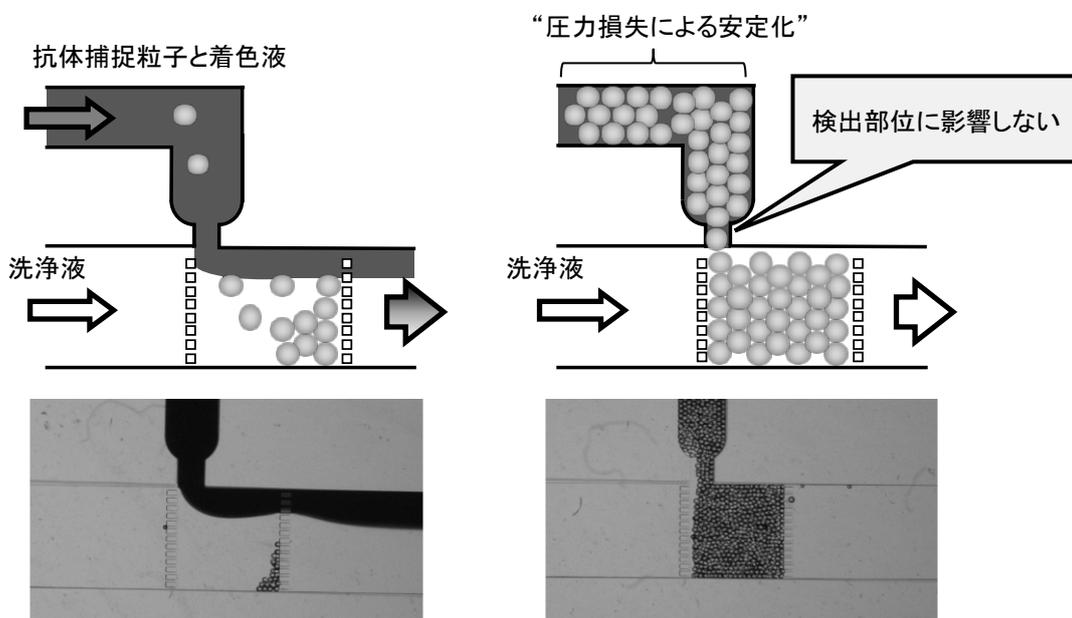


図 2.7 マイクロ流体デバイスの検出部位への抗体捕捉粒子の導入

(A) 抗体捕捉粒子は懸濁液として副流路に導入され、主流路との合流部に位置する検出部位内に導入・充填された。(B) 検出部位に充填された抗体捕捉粒子は流れ系において安定して保持され、粒子の移動や、副流路からの溶液の流入は確認されなかった。

2-3-2 マイクロ流路内における抗カドミウム抗体の捕捉

マイクロ流路内に保持した抗体捕捉粒子に対して、金コロイド標識した抗体を含む溶液を通液し、粒子表面への標識抗体の蓄積と、それらの光学的評価を検討した。抗体捕捉粒子としてカドミウム EDTA を保持した粒子を用い、2 nM の金コロイド標識抗カドミウム EDTA 抗体を含む 200 μ L トリス緩衝液 (50mM、10 μ M EDTA、および 0.1% (w/v) を含む) を反応溶液として、送液速度 20 μ L/min で検出部位に通液した。その後、0.1% BSA を含むリン酸緩衝液を約 3 分間通液し、検出部位内の捕捉されなかった抗体を除去した。その結果、反応溶液の導入により抗体捕捉粒子上への金コロイド標識抗体の蓄積が目視から観察できた。透過光測定装置の出力信号 (電圧) は透過光の強度と比例して減少し、その変化量は粒子上の金コロイド量と比例する。出力信号は、抗体を含む溶液の導入により、徐々に減少し、約 8 分の送液後にはほぼ一定値を示した (図 2.8)。また、同様の方法を用いて、抗体溶液中に抗原であるカドミウム (50 μ g/L) を共存させた場合の透過光の変化を検討した結果、抗体のみと比較して透過光量の減衰幅は少なかった。このことから、抗体を含む溶液にカドミウムを添加し、抗原抗体複合体を形成させることで溶液中の未反応抗体量を減じ、抗体捕捉粒子上に蓄積される抗体量を低減できることが示された。

抗体捕捉の結果としての出力信号値の変化は、測定における吸光度変化として記録することとし、抗体を含む反応溶液の導入前の出力信号と、反応液と洗浄液を通液した後の出力信号値の比から算出した。吸光度 A は、

$$A = -\log_{10}\left(\frac{I}{I_0}\right) \quad \dots \quad (1)$$

となる。ここで、 I_0 (V) は反応溶液を導入する前の透過光を示す出力信号値、 I (V) は反応液および洗浄液を通液した後の透過光を示す信号値である。この式より、抗体のみの反応溶液、および抗原と抗体を含む反応溶液を通液した際の吸光度は、それぞれ 0.40、および 0.20 であった。

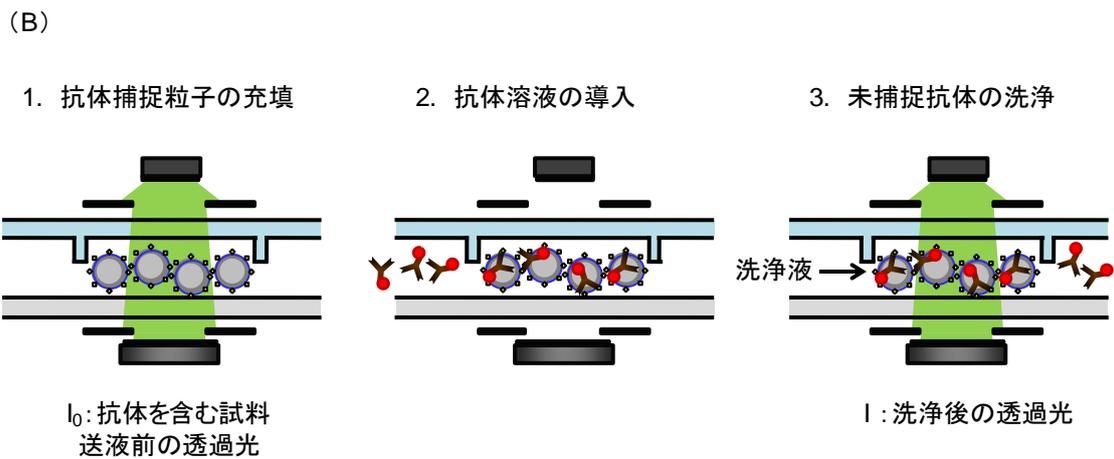
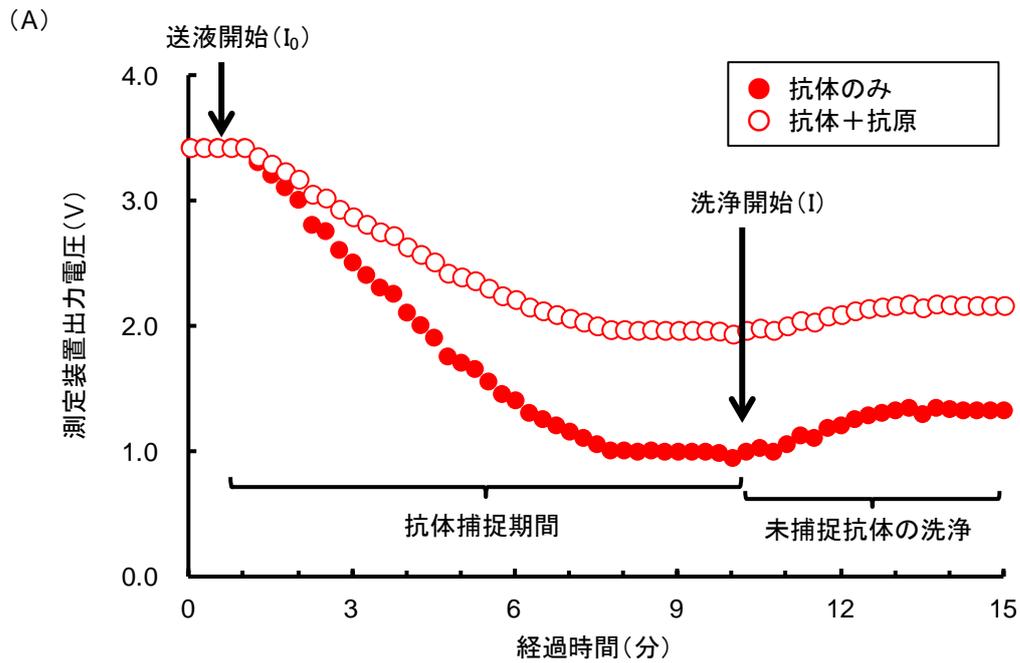


図 2.8 マイクロ流体デバイスを利用した抗体捕捉実験の結果

(A) 抗体溶液の導入に伴うマイクロ流路内検出部位からの透過光変動、(B) 各送液ステップにおける検出部位内抗体捕捉粒子上の抗体捕捉反応の模式図。

2-3-3 マイクロイムノアッセイによるカドミウム測定

前項において、抗体捕捉粒子への金コロイド標識抗体の蓄積と、溶液中への抗原であるカドミウムの共存による阻害効果が確認できた。そこで、溶液中のカドミウム濃度を変化させることで、出力信号とカドミウム濃度の関係を調べた。マイクロ流路内の検出部に抗体捕捉粒子を充填、保持し、2 nM の金コロイド標識抗カドミウム EDTA 抗体を含む 200 μ L トリス緩衝液 (10 μ M EDTA、および 0.1% (w/v) を含む) を反応溶液として、送液速度 200 μ L/min で検出部位に通液した。その後、0.1% BSA を含むリン酸緩衝液を約 3 分間通液した。反応溶液中のカドミウム濃度は、0.1~1000 μ g/L の範囲で変化させ、それぞれの濃度において 3 回測定を行った。カドミウムを含む試料溶液の測定で得られた吸光度は、カドミウムを含まない試料を測定した際の吸光度の平均値で標準化し、相対吸光度として評価した。相対吸光度 R (%) は、重金属がない場合の測定の吸光度を A_0 、重金属がある場合の測定の吸光度を A とすると、

$$R(\%) = \frac{A}{A_0} \times 100 \quad \dots (2)$$

となる。カドミウム測定のプロットと標準曲線を図 2.9 に示した。プロットから標準曲線を得るために、ここでは 4 変数ロジスティック関数による近似を行った。

$$R = \frac{A_1 - A_2}{1 + (C_{\text{Metal}}/x_0)^p} + A_2 \quad \dots (3)$$

ここで、 A_1 、 A_2 、 x_0 、および p は曲線の形状に応じた変数であり、それぞれ最大値、最小値、シグモイドの変曲点、および直線部分の傾きに対応する。検量線と、ブランクにおける吸光度測定の標準偏差値の 3 倍から算出 (3 σ 法) した検出下限値は、3.4 μ g/L であり、同時に測定を行った ELISA 法による検出下限値である 5.9 μ g/L と比較して、約 2 倍高い感度での測定が可能であった。

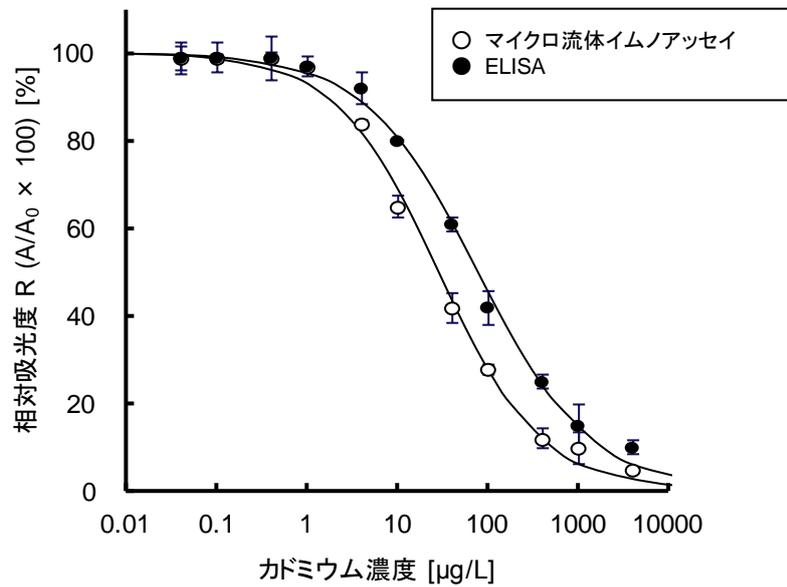


図2.9 マイクロ流体免疫アッセイとELISAによるカドミウム測定の結果
 同濃度（2 nM）の抗体を含む測定溶液を用い、各カドミウム濃度における測定は3回繰返し行い、平均値と標準偏差を算出した。（マイクロ流体免疫アッセイの測定条件；抗体濃度：2 nM、送液速度：20 μL/min、送液量：200 μL）

2-4 まとめ

本章では、マイクロ流路内の安定した流れ場による抗原抗体反応溶液中からの未反応抗体の捕捉を試みた。その結果、マイクロ流路内に形成した抗体捕捉場としての粒子充填構造に金コロイド標識抗体を蓄積し、簡易な透過光検出装置により捕捉量を定量できることを示した。抗カドミウム EDTA 抗体を用い、従来の ELISA 法と比較したところ、極めて短時間で同程度の測定感度が可能であり、流れ場における未反応抗体捕捉工程の効率化が示唆された。本章における検討は抗体濃度、流速などの感度に関係すると予測される項目については最適化が図れていないことから、より実際的な感度の向上については次章以降において検討した。

表 2.2 ELISA法とマイクロ流路イムノアッセイの検出下限値と測定時間

	検出原理	検出下限 ($\mu\text{g/L}$)	測定時間
ELISA	酵素標識抗体-発色	5.9	2.5 時間
マイクロ流路イムノアッセイ	金コロイド抗体-吸光度	3.4	10分

第3章

結合除外効果を利用した 重金属マイクロイムノアッセイの開発

3-1 はじめに

第2章における検討から、マイクロ流体デバイスを利用した競合イムノアッセイでは、抗体捕捉の効率化され、一般的な ELISA 法と比較して、測定感度の向上と測定に要する時間の短縮が可能であった。一方で、抗体捕捉の効率の上限については未だ不明瞭であり、抗体が有する親和性を最大限に活用した高感度測定を実現できる可能性を有する。そこで、本章では、流れ系を利用した競合イムノアッセイにおける結合平衡除外効果に関する知見をもとに、第2章で構築したマイクロ流体を用いたイムノアッセイ（マイクロイムノアッセイ）の高感度化を検討した。また、測定対象として、カドミウムだけでなく他の主要な重金属（クロム、鉛、水銀）についても同様の高感度測定法の構築を目指した。

3-1-1 結合平衡除外効果

抗原固相を利用した競合イムノアッセイにおいて、固相抗原と抗原抗体溶液の間の競合反応が存在しない理想的な実験条件では、得られる測定感度は実験に用いた抗体が有する抗原に対する親和性と一致すると考えられる。大村らは、抗原抗体反応における平衡式と、理想的な反応条件における物質収支から、競合反応がない理想的実験条件における標準曲線における 50%阻害濃度（IC50 値）は、結合解離定数 K_d と抗体濃度の関係式から算術的に求められることを示した³³。

$$IC50 = Kd + \frac{Ab.conc}{2} \dots (4)$$

また、式(4)を検証する実験的な検討においては、キャピラリに充填した抗原固相(セファロース)を利用し、競合反応が極小化された実験系を構築することで、理想的な実験条件に近い状態を構築し、固相抗原と抗原抗体反応溶液の間の競合反応を抑制するためには流れ系における送液速度の制御が重要であることを示した。また、結合平衡除外効果を得るためには、抗原固相に捕捉される抗体の量が溶液中の未反応抗体量と線形関係となるよう、抗体濃度と送液量の制御が必要となることを明らかにした。

3-1-2 重金属汚染と分析方法

カドミウム、6価クロム、鉛、水銀などの重金属類は、微量であっても深刻な健康被害を引起す代表的な環境汚染物質である²⁴。重金属汚染の摂取は主に経口的であり、汚染された飲料水や汚染された土壌で生育した穀物や野菜が主である。さらに、近代の産業革命以降の工業化により進んだ重金属汚染は全球的に広がっていることから、今後の人口増加に伴う水不足、食糧増産の流れの中で、重金属を分析する必要性が増加するのは必然的である。以上のような背景から、多種の分析対象、多くの分析試料に対応しうる安価で迅速な分析手法が必要とされている。

環境分析における重金属測定に最も多く用いられる手法は、原子吸光分析、誘導結合プラズマ原子発光分析(ICP-AES)、誘導結合プラズマ質量分析(ICP-MS)といった実験室レベルの大型機器分析である³⁴⁻³⁶。これらの機器分析法は高感度で正確だが、分析に時間を要し、機器のインシヤルコストと維持費が原因である高額な分析費用が問題である。対照的に、抗体を利用したイムノアッセイは、機器分析と比較して前処理の簡易化が可能であり、安価で迅速に多検体の分析が可能であるものの、対象となる重金属と基準値に対応しうる抗体、抗体の特性に合った前処理技術の開発が必要となる。

3-1-3 抗重金属錯体抗体

これまでに多くの重金属錯体と結合する抗体が見出されてきた^{30-31, 37-40}。初期の研究では、Blakeらは数種類の重金属に対する抗体を作製し、ELISA法による水試料の分析に成功している⁴¹。こうした例は、抗体を利用した重金属分析の可能性を示しており、安価で簡便な現場分析の構築が期待できる。我々の研究グループにおいても、カドミウム EDTA、クロム EDTA、鉛 DTPA、亜鉛 DTPA、水銀 EDTA といった重金属錯体に対して高い親和性を有するモノクローナル抗体を確立しており、イムノクロマトグラフィとの組合せと、簡易な前処理法により、コメや野菜に含まれるカドミウムを検出できる市販キットの開発に成功した^{30, 42-43}。

3-1-4 本章の目的

本章では、マイクロ流体デバイス内の流れ系を利用した抗体捕捉技術と吸光度測定法に対して、抗体捕捉の効率を高め得る結合平衡除外理論に基づく測定条件の検討を行い、測定感度の上限までの向上を図った。また、測定対象としてはカドミウムだけでなく、主要な重金属である(クロム、鉛、水銀)についても同様の高感度測定 of 構築を目指し、検討を行った。

3-2 実験方法

3-2-1 試薬と材料

本章で用いた試薬と材料の入手元を示した。

- ・ 同人化学工業：1-(4-isothiocyanobenzyl) ethylenediamine-N、N、N'、N'-tetraacetic acid (ITCB-EDTA)
- ・ Macrocyclics（代理店：薬研社）：1-(4-isothiocyanobenzyl) diethylenetriamine-pentaacetic acid (ITCB-DTPA)
- ・ 和光純薬工業：塩化金酸 (HAuCl₄)、塩化カドミウム (CdCl₂)、塩化クロム (CrCl₃)、塩化鉛 (PbCl₂)
- ・ ジャクソンイムノリサーチ：抗マウス IgG (H+L)モノクローナル抗体
- ・ スクラム（腹水化と精製）：抗カドミウム EDTA および抗水銀 EDTA マウスモノクローナル抗体 (NX2C3)、抗クロム EDTA モノクローナル抗体 (RD3G4)、抗鉛 DTPA マウスモノクローナル抗体 (Yj2H7) ³⁰⁻³¹
- ・ NOF Corporation：ブロッキング試薬 N101

3-2-2 抗体捕捉粒子および金コロイド標識抗体の調製

抗体補足粒子の調製は、第2章で示した実験方法と同様にして行った。但し、抗鉛 DTPA 抗体を補足する抗体補足粒子の調製の際には、ITCB-DTPA を用いた。各抗重金属錯体抗体に対応する抗体補足粒子への金属イオンの反応には、20 mM 金属塩水溶液を用い、終濃度 2 mM となるよう粒子懸濁液に添加した。各抗金属錯体抗体、およびマウスモノクローナル抗体への金コロイド標識についても、第2章と同様にして行った。

3-2-3 測定溶液の調製

測定溶液の調製では、10 μM のキレート剤 (EDTA、あるいは DTPA) を含む 50mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.5) を用いた。カドミウム、クロム、水銀を対象とした測定の際はキレート剤として EDTA、鉛を対象とした測定の際は DTPA を用いた。重金属の標準物質は、各重金属の塩酸塩を純水で溶解することで調製した。測定溶液の送液は、抗原抗体反応を行うガラスチューブ (Kimble Chase Life Science and Research Products LLC.) に目的濃度の 100 倍の重金属標準液を用意し、続いて適量のトリス塩酸緩衝液と混合する。続いて、抗重金属抗体を目的の濃度となるよう添加し、約 30 分間、室温で抗原抗体反応を行った。

3-2-4 測定操作

全測定操作は、流路内に緩衝液を満たしてから開始した。マイクロ流路を用いた測定は繰り返し可能になるように構成した。すべての送液操作は吸引と吐出が可能なシリンジポンプ (IC3100) と、2 か所のバルブ操作により行った。

(1) 抗体補足粒子の保持

主流路に接続するバルブを閉じ、副流路に接続するバルブが開いていることを確認した。続いて MES 緩衝液 (pH6.5、NaOH で調製) に懸濁した抗体捕捉粒子を送液速度 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ で吸引した。適当量の粒子が副流路から検出部に導入されたことを確認した。気泡が検出部に混入した場合は、再度粒子の導入操作を行った。

(2) 未反応抗体の分離操作

抗体捕捉粒子を保持した状態で主流路バルブを開放し、0.1% (w/v) 牛血清アルブミンを含むリン酸緩衝液 (PBS - BSA) を送液速度 250 $\mu\text{L}/\text{min}$ で通液した。およそ 30 秒後、流路内が安定したことを確認してから透過光を計測した。続いて、重金属抗原と金コロイド標識抗体の混合溶液である抗原抗体反応溶液を、任意の送液速度と送液量で導入することで、溶液に含まれる未反応抗体を粒子状に捕捉した。所定の抗原抗体溶液の送液後、再び PBS - BSA を 250 $\mu\text{L}/\text{min}$ で 1 分間通液することで流路内の液相に存

在する標識抗体を除去し、再度、透過光を計測した。以上を 1 測定操作とし、測定における吸光度 A は、式 (1) から算出した。

3-2-5 測定結果の解析

重金属を含む試料溶液の測定で得られた吸光度は、重金属を含まない試料を測定した際の吸光度の平均値で標準化し、相対吸光度として評価した。相対吸光度 R (%) は、重金属がない場合の測定の吸光度を A_0 、重金属がある場合の測定の吸光度を A とすると、

$$R(\%) = \frac{A}{A_0} \times 100 \quad \dots \quad (5)$$

となる。相対吸光度 R を、試料溶液に含まれる抗原重金属濃度に対してプロットすると、濃度依存的な相対吸光度の変化が得られる。各プロットから標準曲線を得るために、式 (2) に示した 4 変数ロジスティック関数による近似を行った。本章で構築したイムノアッセイの測定範囲は、**IC90** (90%各阻害濃度) から **IC10** (10%阻害濃度) の範囲と定義し、**IC50** と同様に検量線の近似式より算出した。重金属測定の検出下限値は、ブランクを繰り返し測定した際の標準偏差の 3 倍を目安とする 3σ 法に基づき、検量線の近似式から算出した。本論文では言及しないが、一般に定量下限は検出下限の 10 倍の濃度、あるいは標準偏差の 10 倍を基準として算出する方法がある。

3-3 結果と考察

3-3-1 抗体の結合解離定数

各重金属測定に用いる抗重金属錯体抗体について、蛍光検出型フロー式イムノアッセイ (KinExA 3000、Sapidyne Instruments Inc) を利用し、硝酸中和した 50 mM トリス緩衝液 (10 μ M EDTA あるいは DTPA を含む) を用い、抗体の結合解離定数を評価した (表 3.1)。その結果、抗カドミウム EDTA 抗体 (NX2C3)、抗クロム EDTA 抗体 (RD3G4)、抗鉛 DTPA 抗体 (Yj2H7)、それぞれの抗体の結合解離定数は 60.0 nM (6.74 μ g/L)、5.8 nM (0.30 μ g/L)、および 3.3 nM (0.68 μ g/L) であった。また、抗カドミウム抗体は水銀 EDTA に対しても高い親和性を示し、結合解離定数は 4.5 nM (0.89 μ g/L) を示したが、適切な測定を行うためには測定溶液から BSA 成分を除き、ブロッキング試薬 (N101) を 1%濃度で用いる必要があった。それぞれの抗体の結合解離定数は、各測定対象の国内環境基準値と比較して同程度、あるいは小さい値を示しており、抗体の結合解離定数までの測定感度が実現できれば、環境基準を含む多くの基準値への対応が期待できることが示された。

表 3.1 各重金属錯体抗体の測定対象に対する結合解離定数

抗体名	測定対象	結合解離定数 (nM)	結合解離定数 (μ g/L)	環境基準 (μ g/L)
NX2C3	カドミウム EDTA	60	6.7	3.0
	水銀 EDTA	4.5	0.89	0.5
RD3G4	クロム EDTA	5.8	0.30	30
Yj2H7	鉛 DTPA	3.3	0.68	10

3-3-2 カドミウム測定の高感度化

(1) 測定条件の検討

前章で示したカドミウム測定の高感度化のために、結合平衡除外理論に基づき³³、抗体濃度、送液量、送液速度の実験条件を検討した。種々の濃度(50、100、150、200 pM)の金コロイド標識抗体、10 μM EDTA および 0.1% (w/v) BSA を含むトリス緩衝液を、抗体捕捉粒子を保持した検出部に 400 μL/min で 5 分間通液し、補足した抗体由来の吸光度を測定した。その結果、50~200 pM において抗体濃度と吸光度には相関関係が確認でき(図 3.1(A))、本検討の送液速度と送液量の条件下では、200 pM を最適な抗体濃度と判断した。次に、200 pM の金コロイド標識抗体、10 μM EDTA および 0.1% (w/v) を含むトリス緩衝液を送液速度 400 μL/min において、送液量 0.5、1.0、1.5、および 2.0 mL で送液し、各送液条件における吸光度を測定した結果、その結果、0.5~2.0 mL において送液量と吸光度には相関関係が確認でき(図 3.1(B))、本検討の送液速度と抗体濃度の条件下では、2.0 mL を最適な送液量と判断した。以上で検討した抗体濃度、および送液量は、抗体捕捉粒子が有する抗体補足容量が十分であり、該当する抗体濃度と送液量において抗体捕捉粒子と接触する溶液に含まれる抗体量に対して適切に応答することを示す。続いて、送液速度について検討した。200 pM の金コロイド標識抗体、10 μM EDTA および 0.1% (w/v) BSA を含むトリス緩衝液 2.0 mL について、送液速度 200、300、400、500、および 600 μL/min で抗体捕捉粒子を保持した検出部に通液し、吸光度を測定した。また、同様の抗体濃度において、抗原であるカドミウムを 10 μg/L 含む試料を通液した場合の吸光度を測定した。最適な送液速度の指標として、各送液速度における抗原の有/無における相対吸光度 R を用いた。(図 3.1(C)) に送液速度と相対吸光度の関係を示した。感度を示す相対吸光度の値は、送液速度の増加に依存して減少し、高い送液速度において相対吸光度は一定値に近付いた。一方、送液速度 500 μL/min 以上においては、検出部に気泡が流入し、吸光度測定が困難になる頻度が増加した。この傾向は、流路内を通過する溶液の線流速が高速すぎることで理由として推測された。以上の送液速度に関する検討から、最適な送液速度は 400 μL/min と判断した。

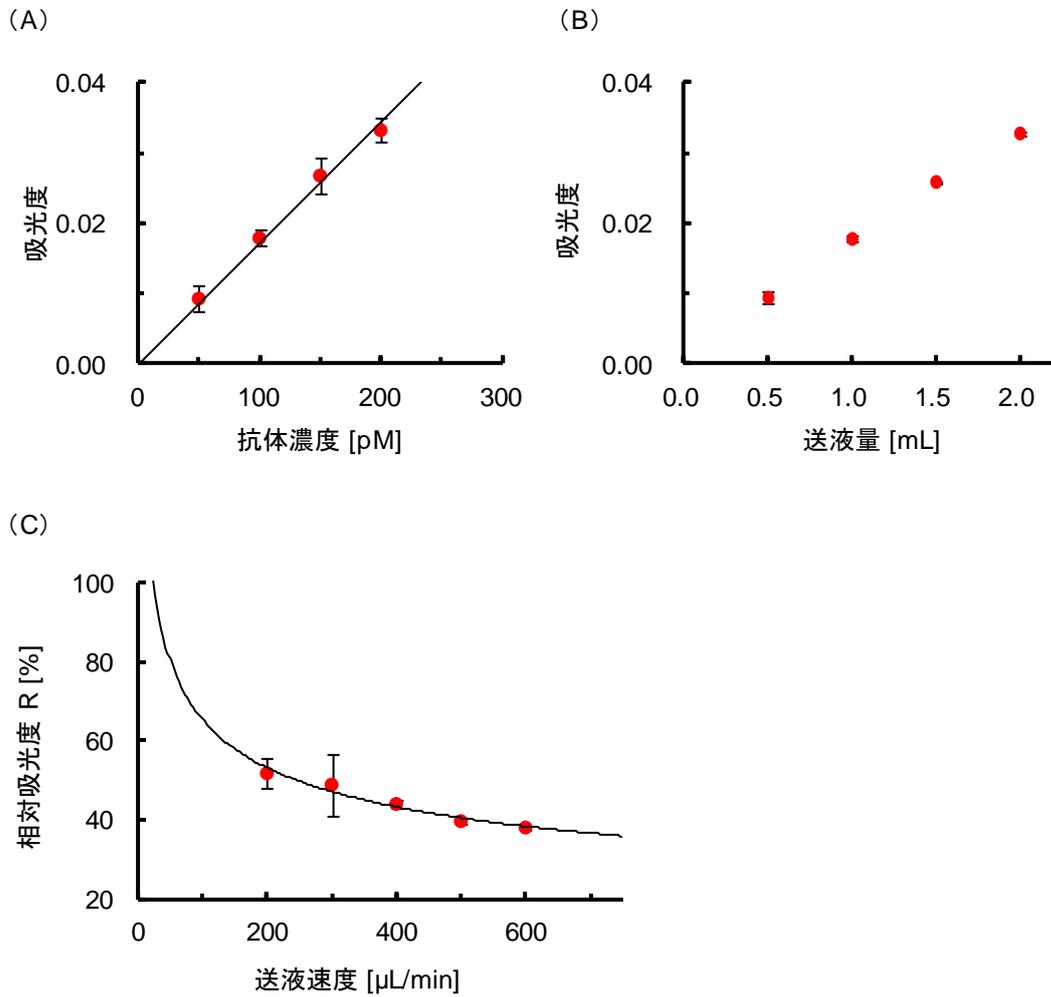


図3.1 マイクロ流体免疫アッセイによるカドミウム測定条件の検討結果

(A) 送液速度250 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、送液量2.0mLにおける吸光度の抗体濃度依存性、
 (B) 抗体濃度200 pM、送液速度250 $\mu\text{L}/\text{min}$ における吸光度の送液量依存性、
 (C) 抗体濃度200 pM、送液量2.0mLにおけるカドミウム (10 $\mu\text{g}/\text{L}$) の共存下における相対吸光度の送液速度依存性。各測定は3回繰返し行い、平均値と標準偏差を算出した。

(2) カドミウム測定

以上の検討から、抗体濃度 200 pM、送液量 200 μ L、送液速度 400 μ L/min をカドミウム測定における最適な実験条件として定め、カドミウム標準液を用いて検量線を作成した。各濃度における相対吸光度をプロットした標準曲線は、最小二乗法に基づき 4 変数ロジスティック関数に回帰した。測定により得られたシグモイド曲線を図 3.2 に示した。その結果、IC50 値は 5.9 μ g/L (52.5 nM) であり、カドミウム測定に用いた抗体の結合解離定数 (6.7 μ g/L、60.0 nM) とほぼ一致し、本測定が結合平衡除外条件とされる理想的な条件下において行われたことが示された。また、測定の検出下限値は 0.80 μ g/L であり、国内の環境基準値 (3 μ g/L)、排水基準値 (30 μ g/L) に対応できることが示された。

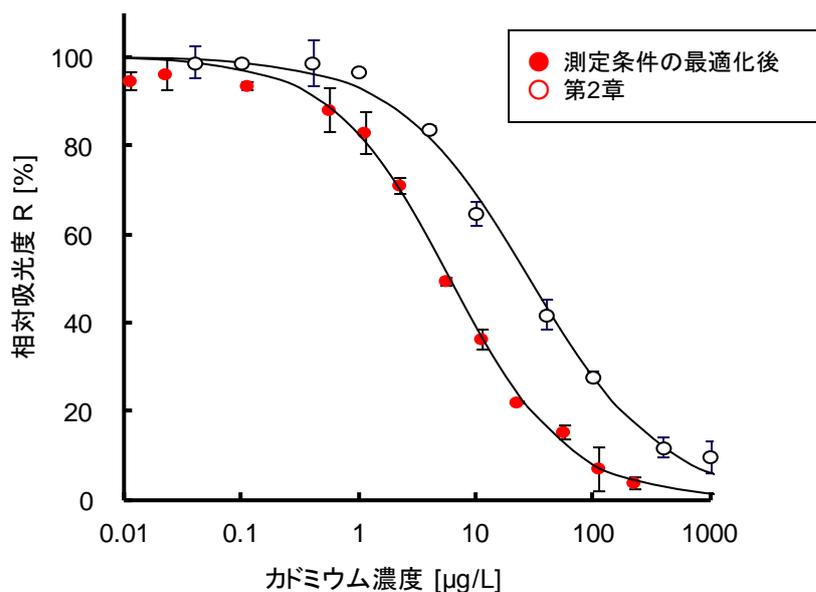


図 3.2 マイクロイムノアッセイによるカドミウムの測定結果

各カドミウム濃度における測定は3回繰返し行い、相対吸光度の平均値と標準偏差を算出した。

表3.2 マイクロイムノアッセイによるカドミウムの測定結果

重金属種	Cd	Cd (第2章)
検出下限値(μg/L)	3.4	5.9
IC50(μg/L)	5.6	23
結合解離定数(μg/L)		6.7

3-3-3 クロム・鉛・水銀測定の見直し

(1) 測定条件の見直し

前項におけるカドミウム測定と同様に、抗体濃度、送液量、送液速度を見直し、競合反応を低減した実験条件における、クロム、鉛、水銀を対象とした測定を見直した。クロム測定の見直しでは、抗体濃度として 50、100、200、300 pM、送液量として 0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mL を見直し、鉛の見直しでは、抗体濃度として 200、400、600、800 pM、送液量として 0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mL を見直した。送液速度は、200、300、400、500、および 600 μL/min について見直し、共存させる抗原濃度はクロムおよび鉛について、それぞれ 0.2 μg/L、および 1.0 μg/L とした。水銀測定の見直しは、カドミウム測定と同様の抗体を用いることから、測定条件の見直しは行わなかった。各金属の測定における条件見直しの結果を図 3.3 に示した。また、見直し結果から最適の測定条件と考えられた抗体濃度、送液量、送液速度を表 3.2 に示した。

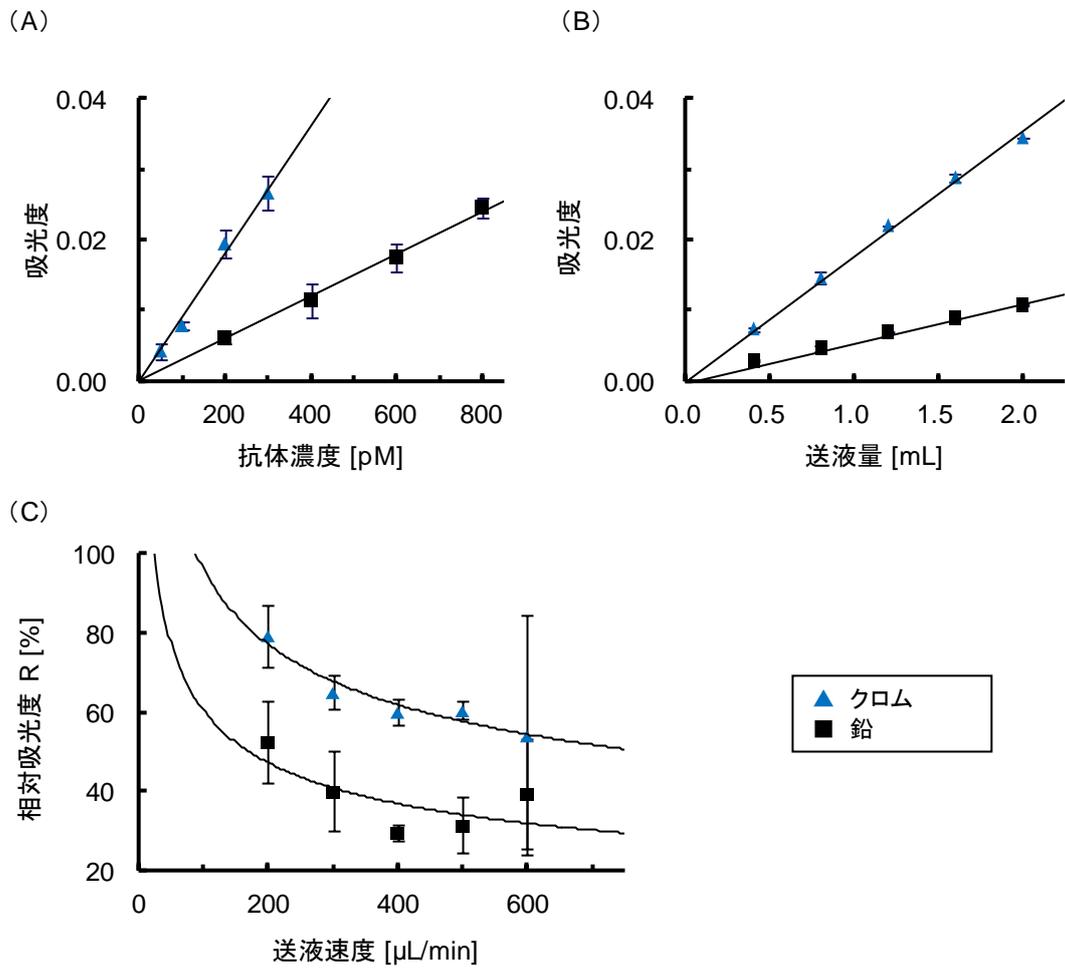


図3.3 マイクロ流体イムノアッセイによるクロム、鉛測定条件の検討結果
 (A) 吸光度の抗体濃度依存性、(B) 吸光度の送液量依存性、(C) 抗原重金属の共存下 (クロム: $0.2 \mu\text{g}/\text{L}$ 、鉛: $1.0 \mu\text{g}/\text{L}$) における相対吸光度の送液速度依存性。各測定は3回繰返し行い、平均値と標準偏差を算出した。

表3.2 クロムおよび鉛の測定条件

測定対象	クロム	鉛
抗体濃度 (pM)	300	800
送液速度 ($\mu\text{L}/\text{min}$)	400	400
送液量 (μL)	2.0	2.0

(2) クロム、鉛、及び水銀の測定

クロム、鉛、及び水銀について、最適化を行った実験条件においてイムノアッセイを行った。簡単には、各重金属を固相化した抗体捕捉粒子をマイクロ流路内に保持し、金コロイド標識抗体と重金属を含むトリス緩衝液（10 μM EDTA あるいは DTPA、および 0.1% (w/v) BSA を含む）を通液し、続いて 1 分間 0.1% BSA を含むリン酸緩衝液を通液した。各重金属測定の結果得られた標準曲線を図 3.4 に示した。クロム、鉛、および水銀の測定結果から、それぞれの測定の IC₅₀ 値は 0.19、0.39 $\mu\text{g/L}$ であり、抗クロム EDTA 抗体と抗鉛 DTPA 抗体の結合解離定数 (0.30、および 0.68) と凡そ一致し、理想的な条件下における測定であることが示唆された。一方、抗水銀 EDTA 抗体の IC₅₀ 値は 52 $\mu\text{g/L}$ であり、結合解離定数 0.89 $\mu\text{g/L}$ と大きく離れた値となったことから、何らかの妨害成分による測定の失敗と考えられた。また、クロム、鉛の各測定における検出下限値は 0.03、0.03 $\mu\text{g/L}$ であり、クロムと鉛については環境基準値である 50 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ を大きく下回る高い感度での測定が可能であることが示された。一方、水銀測定については、検出下限値 4.3 $\mu\text{g/L}$ は排水基準値である 5 $\mu\text{g/L}$ と近い値であったが、分析に十分な感度とは言い難かった。

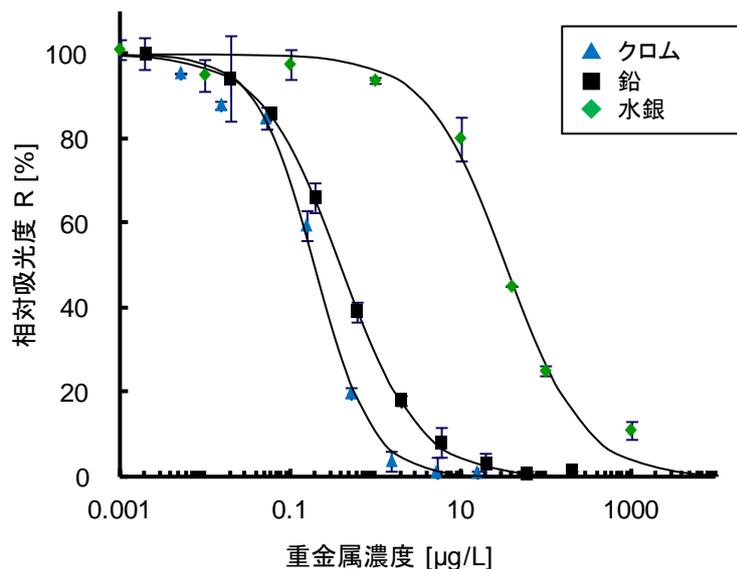


図3.4 マイクロイムノアッセイによるクロム、鉛、水銀の測定結果
各重金属濃度における測定は3回繰返しを行い、相対吸光度の平均値と標準偏差を算出した。

3-3-4 水銀測定的高度化

(1) 2段階送液に基づく測定操作

前項において検討した水銀を対象とした免疫アッセイでは、抗体濃度や送液条件を最適化したにも関わらず、期待される測定感度を得ることが出来なかった。主な原因として、水銀と抗体を反応させた抗原抗体反応溶液内に、水銀を吸着する可能性があるタンパク成分が含まれていたことが推測できた。そこで、抗原抗体反応溶液からタンパク成分を除去可能な測定方法として、金コロイド標識を行わない抗重金属錯体抗体（1次抗体）を用いてマイクロ流路内での抗体捕捉を行い、続いて金コロイド標識2次抗体を通液することで着色する、2段階送液を考案した（図3.5）。また、測定溶液として、これまでのトリス緩衝液に含まれていたタンパク成分であるBSAを除き、代わりに1%ブロッキング試薬を（N101、NOF Corporation）添加することで非特異吸着を抑制した。

測定溶液には、これまでと同様に硝酸中和した50 mM トリス緩衝液（10 μm EDTAを含む）を用い、抗水銀抗体（NX2C3）の希釈にブロッキング試薬（N101）を用いることでブロッキング試薬の最終濃度を1%とした。金コロイド標識した2次抗体は洗浄液と同様のPBS-BSAで希釈した。

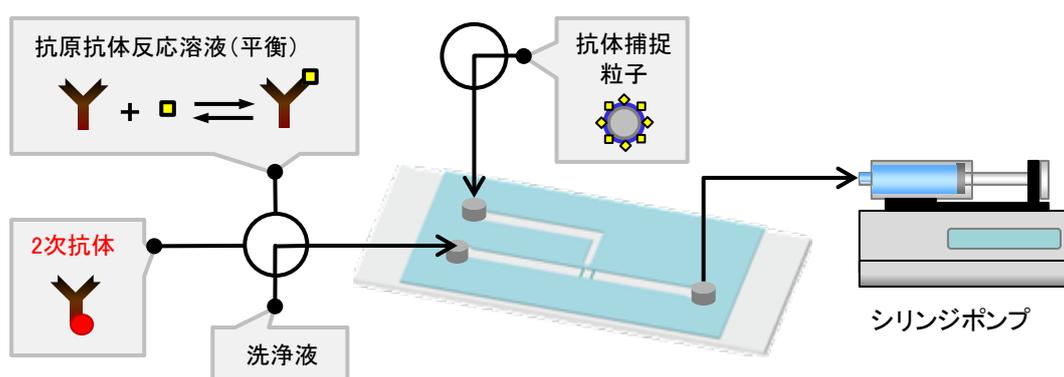


図3.5 水銀測定に向けた2段階送液によるマイクロ免疫アッセイ

金コロイド標識抗体に含まれる血清タンパクによる測定妨害を回避するために、抗原抗体反応溶液（抗水銀EDTA抗体と水銀）の通液後に金コロイド標識2次抗体溶液を通液した。

(2) 測定条件の検討

測定操作の最適化は、一次抗体溶液の抗体濃度、送液量、送液速度について行い、2次抗体溶液は抗体濃度 4 nM、送液速度 250 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、送液量 500 μL に固定して行った。吸光度は、1次抗体濃度送液前の透過光強度、および2次抗体通液後に30秒間リン酸緩衝液を通液した時点での透過光強度から算出した。各測定条件は以下の範囲で吸光度との関係を調べた(図3.6)。その結果、抗体濃度は100 pMまでにおいて吸光度との線形性が確認でき、送液量については1000 μL までにおいて吸光度との線形性が確認できた。また、送液速度については100 $\mu\text{L}/\text{min}$ 以上において相対吸光度が一定となった。

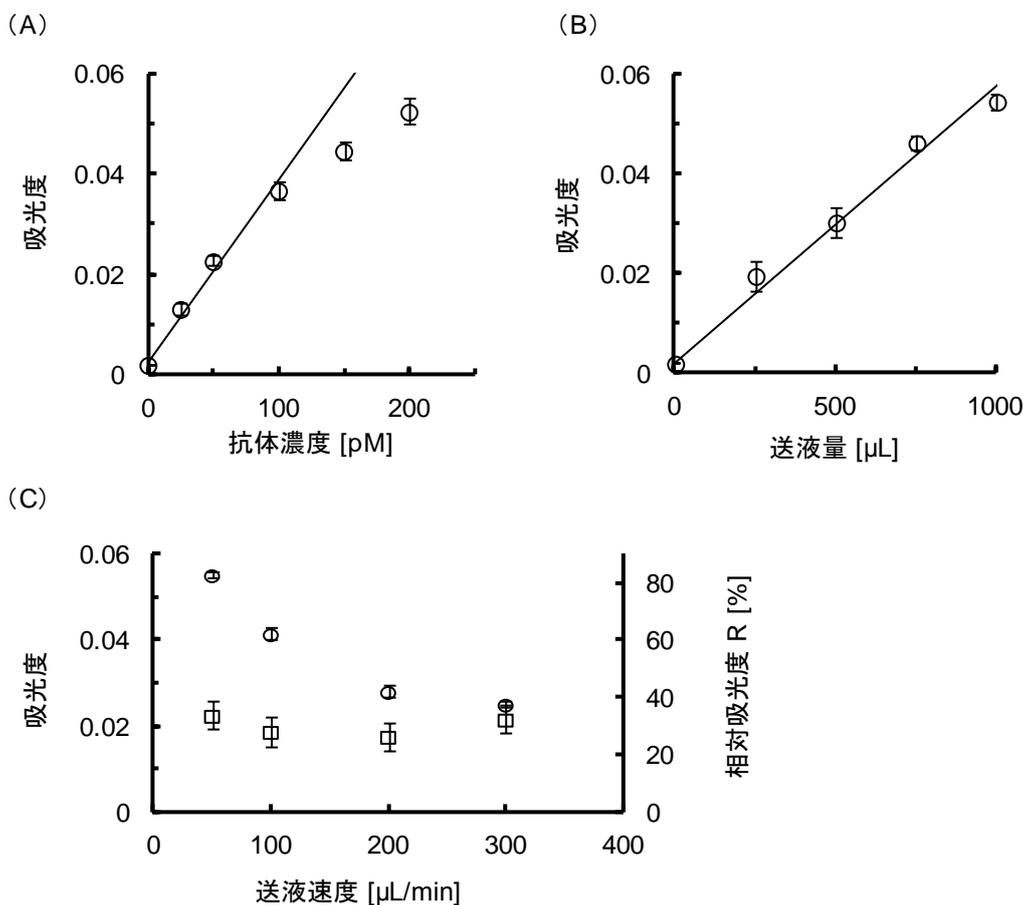


図3.6 2段階送液による水銀測定の測定条件検討

(A) 送液速度200 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、送液量1000 μL における吸光度の抗体濃度依存性、
(B) 抗体濃度150 pM、送液速度200 $\mu\text{L}/\text{min}$ における吸光度の送液量依存性、
(C) 抗体濃度150 pM、送液量1000 μL における吸光度、および水銀(3 $\mu\text{g}/\text{L}$)の共存下における相対吸光度の送液速度依存性。前測定の2次抗体溶液の実験条件は一定とした(抗体濃度2 nM、送液量500 μL 、送液速度250 $\mu\text{L}/\text{min}$)。各測定は3回繰返し行い、平均値と標準偏差を算出した。

(3) 水銀の測定

前項の検討結果から、抗体濃度 100 pM、送液量 750 μL 、送液速度 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ を水銀イムノアッセイの測定条件とした。最適化した測定条件の下で水銀標準溶液を用いて検量線を作成した(図 3.7)。シグモイド曲線の IC50 値は 1.12 $\mu\text{g}/\text{L}$ (5.6 nM) であり、抗水銀錯体抗体の結合解離定数 0.89 $\mu\text{g}/\text{L}$ と比較的一致した。また、検出下限値は 0.12 $\mu\text{g}/\text{L}$ (0.62 nM) であり、国内の環境基準値である 0.5 $\mu\text{g}/\text{L}$ を満たしていた。以上の結果から、2 段階送液により水銀を対象として、イムノアッセイの理想的な感度を得ることに成功した。

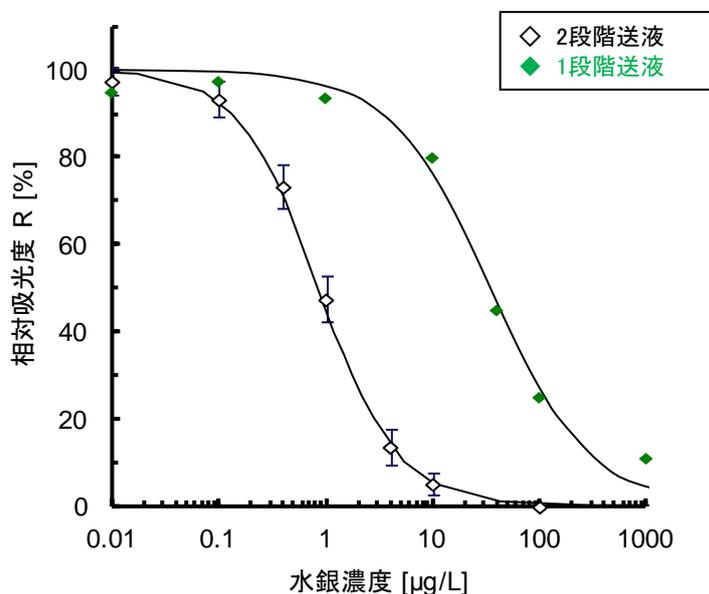


図 3.7 2 段階送液を採用したマイクロイムノアッセイによる水銀の測定結果
各水銀濃度における測定は3回繰り返し行い、相対吸光度の平均値と標準偏差を算出した。

表 3.3 2 段階送液による水銀測定の測定条件検討

送液方式	1段階	2段階
検出下限値($\mu\text{g}/\text{L}$)	4.3	0.12
IC50($\mu\text{g}/\text{L}$)	52	1.12
結合解離定数($\mu\text{g}/\text{L}$)	0.89	

3-3-5 各重金属抗体の交差反応性の検証

各重金属イムノアッセイに用いた抗重金属錯体抗体について、目的抗原以外に対する反応性を評価した。各金属錯体に対する反応性は、既報の文献値³⁰⁻³¹を用い、不明なものは結合解離定数の評価と同様に、蛍光検出型フロー式イムノアッセイ (KinExA 3000、Sapidyne Instruments Inc) を用いて行った。ここで、カドミウム、クロム、鉛の測定は 0.1% BSA、水銀の測定には 1% ブロッキング試薬 (N101) を非特異吸着抑制成分として試料溶液を調製した。各抗体の交差反応性は、目的となる抗原が有する感度 (IC50 値) を基準として、百分率で示した。交差反応性は、

$$CR(\%) = \frac{IC50^*}{IC50} \times 100 \quad \dots (6)$$

となる。ここで、IC50 (nM) は目的となる抗原が有する感度、IC50* (nM) は他の抗原が有する感度を示す。ここで、IC50 値は質量濃度ではなく、モル濃度を用いて評価した。表 3.3 に各抗体の交差反応性を示した。4 種類の金属の測定に用いる 3 種類の抗重金属抗体 (NX2C3、RD3G4、および Yj2H7) について、環境試料において多量の含有が想定されるアルミニウム、鉄、カルシウム、およびマグネシウムに対しては、低い交差反応性を示した (<0.1%)。抗カドミウム EDTA 抗体 (NX2C3) については、亜鉛、マンガン、および銅については交差反応性がやや高いことから、実際の環境測定の際は試料のマトリクスに注意するべきである。抗クロム EDTA 錯体抗体 (RD3G4) についても、同様に亜鉛と銅については注意が必要と考えられた。NX2C3 抗体については、水銀を目的抗原として見た場合、アルミニウム、クロム、鉄、マグネシウム、鉛、銅、およびカルシウムに対しては交差反応性が低かった (<0.01%)。一方で、カドミウムとマンガンについては、それぞれ 24.1%、7.64%の交差反応性を示したことから、実用的な環境分析においては、これら元素の効率的な除去が不可欠であると考えられた。

表 3.4 抗重金属錯体抗体^{注)}の交差反応性

抗体	Nx2C3	RD3G4	Yj2H7	
基準親和性 (nM)	60.0	4.5	5.8	3.3
Cd	100	24.1	0.024	0.001
Hg	415	100	0.001	0.001
Cr	0.001	0.003	100	<0.001
Pb	0.001	0.002	0.001	100
Al	0.002	0.006	0.001	<0.001
Fe	0.031	0.002	0.046	0.035
Ca	<0.002	0.002	<0.001	0.008
Mg	0.005	0.001	0.001	0.003
Zn	0.565	0.04	0.262	0.002
Mn	0.722	7.64	0.002	0.002
Cu	1.35	<0.001	0.323	0.285

注) 各抗体の交差反応性は基準親和性を比較対象として算出した値(単位:%)

3-4 まとめ

本章では、免疫アッセイにおける感度向上の阻害要因である競合反応を低減することを目的として、結合平衡除外理論に基づき、流れ系における抗体捕捉の最適化を行った。その結果、金コロイドを抗体標識に用いた簡易な検出系において、カドミウム、クロム、鉛の3種類の重金属について抗体が有する結合解離定数までの理想的感度での免疫アッセイが可能となった。一方、水銀を対象とした測定は抗体の性能から想定される測定感度が得られなかったが、水銀測定の際には、抗重金属抗体および金コロイド標識抗マウス IgG 抗体の2種類の抗体を用い、それぞれを2段階に分けて送液することで結合解離定数以下での測定が可能となった。

表3.5 マイクロ免疫アッセイと他の重金属測定技術の比較

	測定原理	検出下限値 (µg/kg)				測定時間
		Cd	Cr	Pb	Hg	
原子吸光法	原子固有の輝線スペクトル	5	0.5	0.5	0.5	10分
ELISA	酵素標識抗体-発色度	10	0.61	0.82	9.2	2.5時間
マイクロ免疫アッセイ	金コロイド抗体-吸光度	0.92	0.04	0.06	0.12	7 - 15分

原子吸光法の検出下限は「これからの環境分析科学入門(講談社)」より転載

固相抽出法を利用した簡易水銀分析法の開発

4-1 はじめに

水銀が有する生体濃縮性と毒性は、重金属類の中でも特に高く、生体系への大きな影響があるとされており⁴⁴⁻⁴⁵、数ある環境汚染の中でも、水銀による汚染は、最も注視すべき問題の1つとされている⁴⁶。通常的环境においては、水銀は表層水や地下水に非常に低濃度に存在し、特に鉱物や汚染物との接触によって、地下水中の水銀濃度が高まる場合がある。他方、陸域から流入した水銀は海水中などにおいて有機水銀（ CH_3Hg など）への変換が生じ、結果として高い毒性を誘導する⁴⁷。また、有機水銀は海の生態系において徐々に生物濃縮の作用を受け、我々が摂取する大型回遊魚などに顕著に蓄積する⁴⁸⁻⁴⁹。そのため、水銀については各国において厳しい基準値が設定されており、環境省は環境基準として $0.5 \mu\text{g/L}$ として定め、環境基準値の10倍である $5 \mu\text{g/L}$ を排水基準としている。また、国外における飲料水基準としては世界保健機構（WHO）は無機水銀の許容値を $6 \mu\text{g/L}$ 、アメリカ合衆国環境保護庁（U.S.EPA）は $2 \mu\text{g/L}$ を規制値としている。

今もなお広がり続けている水銀汚染の修復と健康被害の抑止には、環境中の水銀分布を理解する必要があり、そのためには多くの地域における汚染状況のマッピングが重要であることから、迅速性かつ安価な水銀分析法が必要となる。水銀分析の一般的な手法として、原子吸光法⁵⁰⁻⁵¹、原子蛍光法⁵²、誘導結合プラズマ質量分析法⁵³であり、これらの機器分析は、感度と精度に優れるが、高額な分析装置を初期費用として必要とする。

4-1-1 水銀の簡易分析法

酵素類似の活性を有するアプタマーである DNA ザイムを利用した手法⁵⁴⁻⁵⁵、オリゴヌクレオチドやオリゴヌクレオシドを用いたアプタマーを利用した手法⁵⁶、機能化ナノ微粒子の光学的特性を利用した手法が提案されている⁵⁷⁻⁵⁸。しかし、これらの手法は、日本国内における環境基準（0.5 µg/L）に対応することは困難であり、さらに水銀に対する特異性が不十分であった。一方で、抗体を素子として用いるイムノアッセイは、特異性に優れることから、適切な前処理方法との組み合わせで多様な環境試料を対象とした分析への適用が期待でき、水銀を測定対象とする抗体として水銀 EDTA、水銀グルタチオン、水銀 6-メルカプトニコチン酸といった錯体をハプテンとして作製されている⁵⁹⁻⁶¹。しかしながら、これらの抗体を利用した環境分析への適用報告は少なく、分析における共存物質の影響を低減しうる水銀抽出法との組み合わせについても検討されていない。

4-1-2 簡易水銀分析に適した前処理方法

環境試料に含まれる微量水銀を対象として、イムノアッセイによる分析を行うためには、抗体が有する交差反応性に注意し、試料からの共存金属の除去を行う必要がある。抗水銀 EDTA 抗体の交差反応性、および環境試料特有の成分として、特に問題となる金属としてはマンガ、アルミニウム、亜鉛が挙げられる。

最も一般的な、抽出方法は液液抽出法、あるいは固相抽出法であるが、特に固相抽出法は溶媒を必要とせずに、対象の抽出と濃縮が可能であり、イムノアッセイを利用した簡易分析にもちいる抽出法に相応しい特徴を有する。例えば、多種の不純物を含む試料を対象とした農薬測定のためにイムノアッセイでは、固相抽出の利用により簡便な分析系が構築されている⁶²。また、水銀を固相抽出の対象とした事例としては、イオン交換樹脂を使用した例があった^{50, 63-67}。

4-1-3 本章の目的

本章では、陰イオン交換樹脂を利用した簡易カラムの構築と水銀抽出条件の最適化を行った。次に、水銀抽出法と水銀マイクロイムノアッセイに基づく簡易水銀分析法について、本法の分析感度を検討するとともに、実際の環境試料を利用した場合の分析性能を検証した。

4-2 実験方法

4-2-1 試薬と材料

本章で用いた試薬と材料と入手元を示した。

- ・ ムロマチテクノス：強塩基性イオン交換樹脂 Dowex 1×2、100–200、Cl 型
 - ・ 和光純薬工業：塩化金酸四水和物 ($\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)、水銀標準液 (HgCl_2 ; 100 mg/L)、上水試験用多元素標準液 W-6 (Al、Ca、Mg、Cd、Cr、Cu、Fe、Mn、Pb、Zn; 100 mg/L)、塩酸 (35 - 37%、重金属測定用)、硝酸 (60%、精密分析用)
 - ・ 同人化学工業：1-(4-isothiocyananobenzyl) ethylenediamine-N、N、N'、N'-tetraacetic acid (ITCB-EDTA)、Ethylenediamine-N、N、N'、N'-tetraacetic acid 4Na (EDTA-4Na)
 - ・ 日本分析化学会：河川水標準物質 (JSAC 0301-3、JSAC 0302-3)
 - ・ スクラム (腹水化、抗体精製)：抗水銀 EDTA マウスモノクローナル抗体 (NX2C3)
- 40
- ・ NOF Corporation：ブロッキング試薬 N101

4-2-2 固相抽出カラム

固相抽出カラムは、5 mL 樹脂製シリンジ (φ 13 mm、テルモ) を容器とし、底部にセルロースフィルター (5B、φ 13 mm、アドバンテック) を敷き、任意の量の固相懸濁液を均等に滴下、続いて上面に再度セルロースフィルターを積層する構造とした (図 4.1)。試料溶液に含まれる水銀を効率よく抽出するために、強塩基性陰イオン交換樹脂 Dowex 1×2 (100–200、Cl 型) を固相とし、カラム作製の際には、イオン交換樹脂は 50% (v/v) 懸濁液として用いた。完成した固相抽出カラムは、乾燥と操作前の汚染を避けるために、作製後速やかに使用した。固相抽出カラムに滴下した溶液は、400～500 $\mu\text{L}/\text{min}$ 程度の流量でカラムを通過した。これは、5 mL の試料溶液を想定すると、10 - 12 分程度で通液される流量であった。

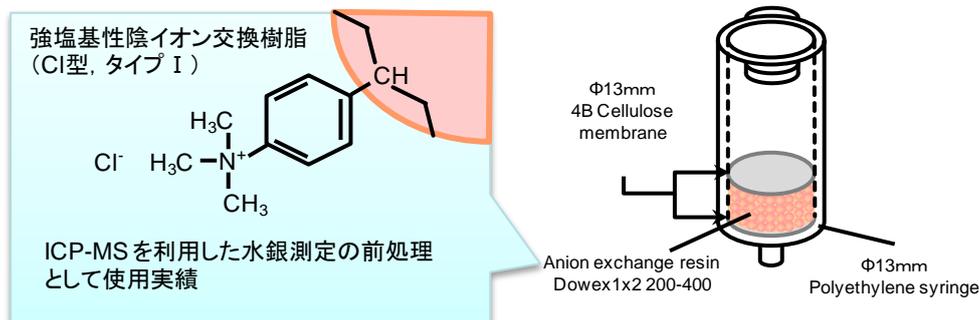


図4.1 水銀抽出と共存金属除外のための固相抽出カラム

樹脂カラムに対して、強塩基性陰イオン交換樹脂を任意量担持させ、固相抽出カラムとして使用した。

4-2-3 マイクロイムノアッセイ

水銀を対象としたマイクロイムノアッセイは、第3章において最適化を図った送液条件を用いて行った。第1溶液の抗体濃度は100 pM、送液量は750 μL、送液速度は250 μL/minとし、50 mM トリス硝酸緩衝液 (10 μM EDTA、1% N101 を含む、pH7.5) を用いて調製した。第2溶液の金コロイド標識2次抗体の抗体濃度は2 nM、送液量は1200 μL、送液速度は250 μL/minとし、リン酸緩衝液 (pH7.4) を用いて調製した。

4-2-4 機器分析

(1) 水銀分析

水溶液中の水銀分析は還元気化式の原子吸光分析装置 (水銀計 HG-200、平沼産業) を用いて定量分析を行った。水溶液中の水銀 (Hg²⁺) は、硫酸酸性下において添加された塩化鉛により還元 (Hg) されることで気相に移動し、原子化された水銀は固有の吸光を有することから、原子吸光セルにおいて分光的に検出される。水銀の定量は、標準物質 (100 mg/L、0.1M HNO₃) を用いた検量線法により行った。

(2) 多元素分析

水銀以外の試料溶液中の共存金属類は、誘導結合プラズマ原子発光分析装置 (ICP-AES、Valian Inc.) を用いて定量分析を行った。ICP のキャリアガスとしてヘリウムガスを用い、各金属についての発光測定は下記に示す波長で行った。(Mn、257.610; Mg、279.553; Fe、238.204; Zn、213.857; Pb、220.353; Al、396.152; Cd、214.439; Cu、324.754; Cr、267.716; Ca、396.847)。各金属の定量は混合標準物質(上水試験用標準物質、0.1 M HNO₃)を用いた検量線法により行った。

4-3 結果と考察

4-3-1 固相抽出法による水銀抽出

三級アミンを側鎖にもつ強塩基性陰イオン交換樹脂 Dowex™ 1×2 (200–400、CL型) を固相として、試料溶液からの水銀抽出と共存金属の除外を検討した。この実験では、初めに試料溶液から水銀を吸着・溶離する条件を検討し、続いて 10 種の共存金属を含む試料溶液から共存金属を除外可能な条件を検討した。

4-3-2 水銀の吸着挙動

試料溶液に含まれる水銀を全量吸着しうるイオン交換樹脂の量 (50、75、100、および 500 μL) を検討した。また、溶液中の水銀は塩化物錯体としてイオン交換樹脂に吸着すると考えられることから、試料溶液の塩酸濃度についても検討した (0.1、1、10、100、および 1000 mM)。吸着実験では、100 μg/L の水銀を含む試料溶液 5mL を固相抽出カラムに通液し、カラムからの回収液に含まれる水銀濃度 C_{Hg} (μg/L) を還元気化原子吸光法 (CV-AAS) により評価した。樹脂への水銀の吸着は吸着率として算出することとし、吸着率 A (%) は下式から算出した。

$$A (\%) = \frac{C_{\text{Hg}}}{100} \times 100$$

図 4.2 に示すように、イオン交換樹脂量 75 μL 以上で水銀を全量吸着でき、樹脂量が少ない (50 μL 以下) 場合は塩酸濃度が 10 mM 以上で吸着率が低下した。一般的に、固相抽出における溶離作業は固相量が少ない方が有利であるとされることから、固相カラムの樹脂量は 100 μL が適当であり、塩酸濃度は 1 - 100 mM の範囲が水銀吸着の観点から適すると考えられた。

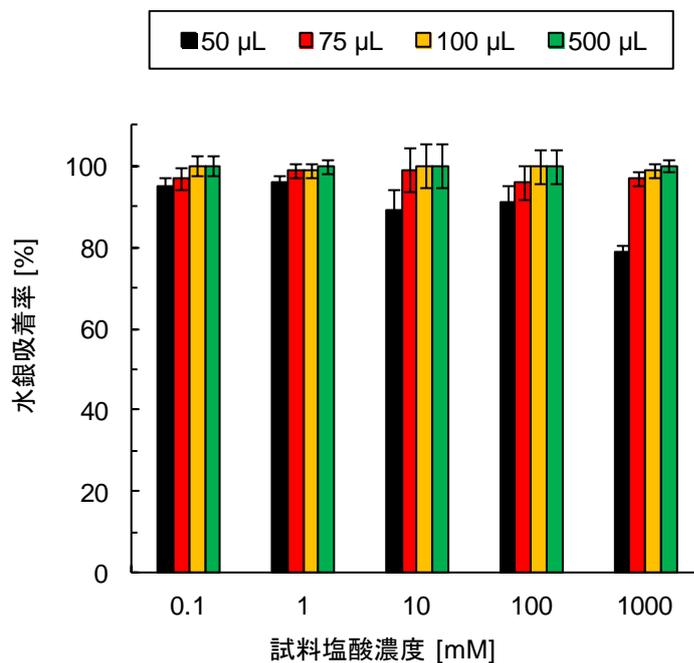


図 4.2 水銀の吸着率における試料塩酸濃度、固相量の影響

固相抽出カラムを構成するイオン交換樹脂量（50–500 μL）、試料溶液の塩酸濃度（0.1–1000 mM）を変化させ、カラムへの水銀吸着率を調べた結果、樹脂量75 μL以上、塩酸濃度100 mM以上が適することが明らかとなった。各吸着率実験は3回繰り返し行い、平均値と標準偏差を算出した。

4-3-3 水銀の溶離挙動

カラムに吸着できた水銀を最小の溶液量で溶離できる溶離液を探索した。実験は予め 100 µg/L の水銀を含む試料溶液 5mL を通液した固相抽出カラム(総水銀吸着 500 ng) に対して任意の溶離液を 5 mL ずつ総量 25 mL となるまで添加し、5 mL 毎に分取して水銀濃度を測定した。溶離液を通液した際の水銀回収率 R (%) は、n 回目の溶離液回収液の水銀濃度を $C'_{\text{Hg}}(n)$ (µg/L) とすると

$$R(\%) = \frac{1}{500} \times \sum_{n=0}^k (C'_{\text{Hg}}(n) \times 5) \quad \dots \quad (7)$$

となる。各溶離液量の増加に伴う回収率の挙動を図 4.3 に示した。ここでは、はじめに 40 mM 塩酸水溶液と 40 mM 硝酸水溶液について検討した。その結果、塩酸を溶離液として用いた場合 (○)、溶離液 10 mL を通液しても水銀は全く (<1%) 回収できなかった。この結果から、塩酸を主な陰イオンとする試料溶液を通液する場合、溶液量の増加による水銀の流出はないと考えられ、固相抽出カラムによる水銀の濃縮が可能であると考えられた。硝酸を溶離液として用いた場合 (●)、溶離液 5 mL の通液により約 55% を回収でき、合計 10 mL の溶離液の通液により全量 (98.7%) の水銀を回収できた。この結果から、イオン交換樹脂上の 3 級アミンに配位した塩化物イオンが硝酸イオンと交換することで、塩化水銀錯体を遊離することが推測できた。以上の結果から、溶離液には一定濃度の硝酸を含む水溶液が適すると考えられた。

一方で、固相抽出の次の工程である重金属イムノアッセイに適する溶離液について考えると、抗体の活性を維持するためにアルカリによる中和を必要とすることは望ましくない。そこで、硝酸を陰イオンとする中性緩衝液を用いた溶離を検討した。緩衝液は 50 mM トリス (トリスヒドロキシメチルアミノメタン) を緩衝成分とし、硝酸および塩酸により中和することで pH7.5 の中性緩衝液とした。また、両緩衝液には重金属イムノアッセイの測定溶液に必要な EDTA を 2 通りの濃度 (10 µM、および 100 µM) で添加した。図 4.4 に各緩衝液による水銀回収の挙動を示した。トリス - 硝酸緩衝液を溶離液として用いた場合 (□、■)、EDTA の濃度に関係なく、溶離液 5 mL の通液により約 80% の水銀を回収でき、10 mL では全量の水銀 (94.3 - 97.5%) を回収できた。他方、トリス - 塩酸緩衝液を溶離液として用いた場合 (△、▲)、溶離液 10 mL の通液

によっても水銀は50%回収されたものの、合計25 mLの通液によっても全量の水銀を回収するに到らなかった(86.3 - 87.3%)。以上の緩衝液を利用した通液から、硝酸イオンなどの陰イオンだけでなく、陽イオンのトリスの存在によっても水銀溶離効果が期待できることが明らかとなった。

さらに、トリスの濃度とそれに伴う硝酸イオンの濃度が水銀の溶離に与える影響を調べるために、トリス濃度5、10、50、100、および500 mMの緩衝液(10 μ M EDTAを含む)を調製した。この際、中和に用いた硝酸の凡その濃度は、4、8、40、80、400 mMであった。これまでと同様にして、トリス濃度が水銀の溶離に与える影響を検討すると、トリス濃度が100 mM以上の場合において溶離液5 mLによる水銀の全量回収が可能であり、トリス濃度10 mM以下では十分な溶離を期待できなかった(図4.5)。以上の結果から、トリスおよび硝酸の濃度増加は水銀の溶離において正の効果が期待できることが明らかとなった。一方で、トリスの濃度が50 mMを超える場合、抗水銀モノクローナル抗体では活性が著しく低下することが知見としてあることから、水銀溶離と後段の免疫アッセイにおける抗体活性の維持の点から、トリスの最適濃度は50 mMであると結論した。

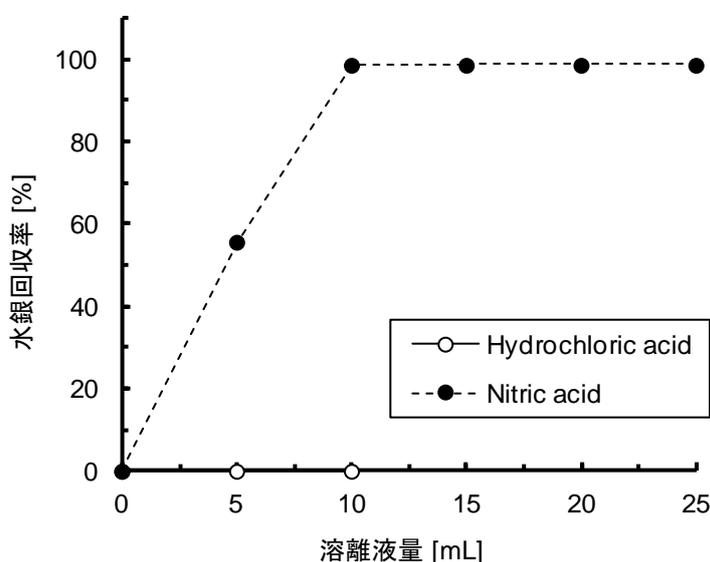


図4.3 塩酸および硝酸を用いた吸着水銀の溶離挙動

予め500 ngの水銀を吸着した固相抽出カラムに対して塩酸あるいは硝酸(いずれも40 mM)を溶離液として添加し、5 mL毎に回収して原子吸光法により水銀濃度を分析した。各回収実験は3回繰返し行い、平均値を算出した。

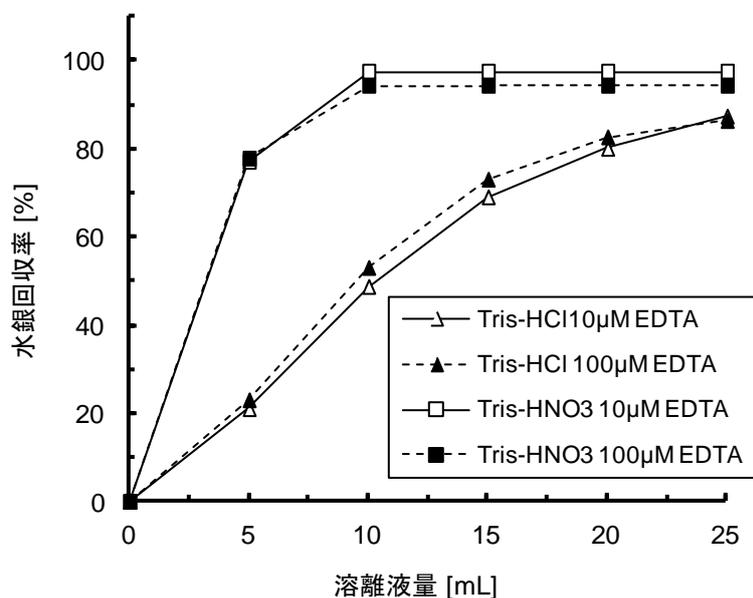


図4.4 中性緩衝液を用いた吸着水銀の溶離挙動

予め500 ngの水銀を吸着した固相抽出カラムに対して中性緩衝液を溶離液として添加し、5 mL毎に回収して原子吸光法により水銀濃度を分析した。各回収実験は3回繰り返し行い、平均値を算出した。

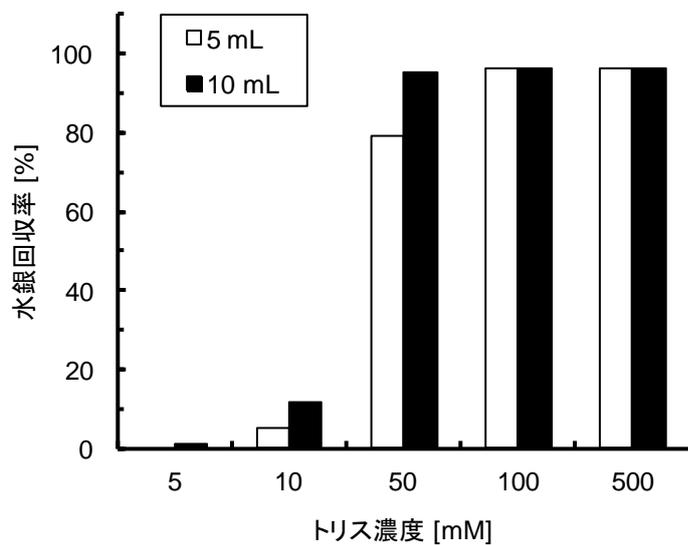


図4.5 トリス濃度が溶離液量に与える影響

各トリス濃度について、硝酸中和した緩衝液 (pH7.5) を調製し、予め500 ngの水銀を吸着した固相抽出カラムを用いて溶離実験を行った。各溶離液は10 μM EDTAを含み、各溶離実験は1回行った。

4-3-4 共存金属の吸着挙動

試料溶液中に含まれる共存金属類（水銀以外の金属）を効果的に除外するために、はじめにカラムへの吸着量の極小化を検討した。水銀の吸着に関する検討と同様に、各濃度（0.1、1、10、100、および1000 mM）の塩酸を用いて各共存金属（Al、Ca、Mg、Cd、Cr、Cu、Fe、Mn、Pb、およびZn）の濃度が100 µg/Lとなるよう試料溶液を調製し、100 µLのイオン交換樹脂を充填した固相抽出からむに通液し、回収液に含まれる各金属濃度をICP発光分析法により分析した。各試料溶液を通液した際の共存金属の吸着率A（%）は、各金属濃度の分析結果をC_{Metal}（µg/L）とすると

$$A(\%) = \frac{C_{\text{Metal}}}{100} \times 100 \quad \dots \quad (8)$$

と表わされる。図4.6に各塩酸濃度における共存金属類の吸着率Aを示した。塩酸濃度10 mM以下において鉄の吸着率が増大し、塩酸濃度100 mM以上においてカドミウムの吸着率が増大した。また、亜鉛とアルミニウムについても、それぞれ塩酸濃度1000 mM以上と0.1 mM以下で吸着率の増加傾向があった。イムノアッセイに用いるNX2C3抗体が有する反応性の観点からは、カドミウム、鉄、マグネシウム、亜鉛、マンガン、銅の除去が肝要であるが、カドミウム汚染の希少性から、それ以外の金属の吸着量を一覧すると、塩酸濃度100 mMにおいて共存金属類（カドミウムを除く）の吸着率を極小化できた。

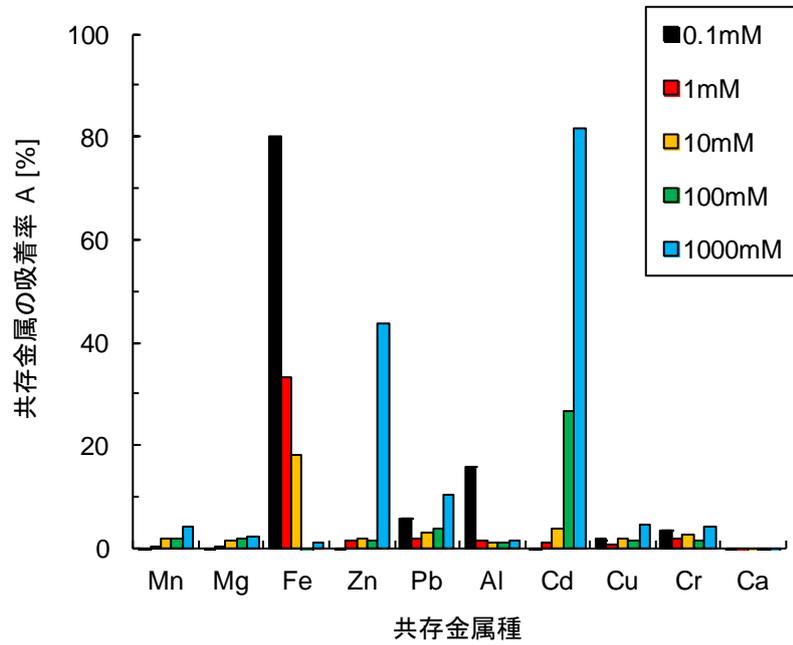


図 4.6 共存金属類の吸着における試料塩酸濃度依存性

イオン交換樹脂100 μ Lを用いて作製した固相抽出カラムに対して、10種類の共存金属類を含む試料溶液の塩酸濃度（0.1–1000 mM）を変化させ、カラムへの各金属の吸着率を調べた。

4-3-5 カラム内のカドミウムの除去

前項において、カドミウムを含む試料溶液を通液した場合、塩酸濃度 100 mM では試料中のカドミウムのうち約 30%が固相抽出カラム内のイオン交換樹脂に吸着することが明らかとなっている。そこで、測定試料中にカドミウムが存在した場合を想定し、吸着したカドミウムを洗浄除去する方法を検討した。洗浄液としては、強塩基性イオン交換樹脂からのカドミウム溶離には純水あるいは低濃度の塩酸が適する⁴³ことから、本章の検討では純水を用いた。これまでと同様に、100 µL のイオン交換樹脂を充填したカラムに対して、共存金属類 (Al、Ca、Mg、Cd、Cr、Cu、Fe、Mn、Pb、および Zn、各濃度は 100 µg/L) を含む 100 mM 塩酸溶液を試料として通液した。純水による洗浄は合計 15 mL まで行い、続いて溶離液として 10 µM EDTA を含む 50 mM トリス塩酸緩衝液を通液した。各通液操作による回収液は 5 mL 毎に採取し、各共存金属の濃度を測定した。

試料溶液の回収液、洗浄液 (1 - 3 回の各値)、溶離液 (1 - 2 回の合計) を表 4.1 に示した。試料溶液の通液により、試料溶液に含まれるカドミウムのうち 26.7%が吸着した。一方で、他の共存金属については吸着は抑制でき、96.1 - 100.5%がカラムを通過した。純水による洗浄では、最初の 5 mL の通液により試料として添加したカドミウムの 30.8%が回収され、以降の洗浄液の回収液からカドミウムは検出できなかった。また、続く溶離液の回収液には共存金属はほとんど含まれず、回収液の分析結果から、全固相抽出工程による共存金属の除去率を算出すると、除去率は 95.4-99.6%であった。

図 4.1 固相抽出による試料からの共存金属除去

試料体積 (mL)	添加量	カラムから回収した溶液の分析結果 (%)					共存金属 除去率
	($\mu\text{g/L}$)	回収液	洗浄1回目	洗浄2回目	洗浄3回目	溶離液	(%)
		5	5	5	5	10	
Mn	100	98.3	4.4	0.4	0.4	0.4	99.6
Mg	100	98.2	10.6	2.7	3.5	1.5	98.5
Fe	100	102.0	7.5	3.2	3.1	1.1	98.9
Zn	100	98.4	5.6	0.7	0.7	4.6	95.4
Pb	100	96.1	6.7	1.8	1.4	1.1	98.3
Al	100	99.0	6.2	2.3	2.1	1.0	99.0
Cd	100	73.3	30.8	0.7	0.6	0.7	99.3
Cu	100	98.5	4.3	0.4	0.3	1.0	99.0
Cr	100	98.4	4.7	0.9	0.9	0.7	99.3
Ca	100	100.5	2.3	0.7	1.1	1.7	98.3

4-3-6 固相抽出条件

水銀の吸着・溶離、共存金属の吸着とカラムからの除去、以上の検討から、水銀の固相抽出に適する実験条件の範囲が明らかとなった。イオン交換樹脂量 100 μL 、試料の塩酸濃度 100 mM、洗浄液量 10 mL、溶離液 10mL (50 mM トリス硝酸緩衝液 (10 μM EDTA を含む、pH7.5)) が適すると考えられた。そこで、以降の検討では、これらを固相抽出条件として用いた。

4-3-7 SPEとイムノアッセイに基づく簡易水銀分析

前項までにおいて最適化を図った固相抽出の実験条件を用い、模擬試料溶液に含まれる水銀分析を行った。試料として、各濃度の水銀（0、0.1、0.4、1、4、10、100 $\mu\text{g/L}$ ）を含み、同時に10種の共存金属（Al、Ca、Mg、Cd、Cr、Cu、Fe、Mn、Pb、およびZn、各100 $\mu\text{g/L}$ ）を含む100 mM 塩酸溶液を調製した。5 mL 試料溶液を固相抽出に供し、続く洗浄と水銀溶離工程を経て、第3章で構築した2段式送液に基づくマイクロイムノアッセイを行った。これまでと同様に、水銀を含まない試料におけるイムノアッセイの吸光度を対照区として、各濃度における吸光度を相対吸光度 R (%) として標準化した。図4.7に固相抽出前の水銀濃度と相対吸光度の関係を示した。固相抽出を行った場合（○）では、相対吸光度は試料溶液に含まれる水銀濃度の増加に伴いシグモイド型の減少を示した。その際のIC50値および3 σ 法に基づく検出下限値は、4.22 $\mu\text{g/L}$ 、および0.83 $\mu\text{g/L}$ であった。一方、固相抽出を行わずにイムノアッセイを行った場合、測定時の吸光度は極めて低く、共存金属類による抗原抗体反応への阻害が示唆された。相対吸光度も水銀濃度の増加と関連した変動を示すことはなかった。以上から、固相抽出をマイクロイムノアッセイの前段に配することで、高い無機金属マトリクスを有する試料を対象とする分析が可能となった。

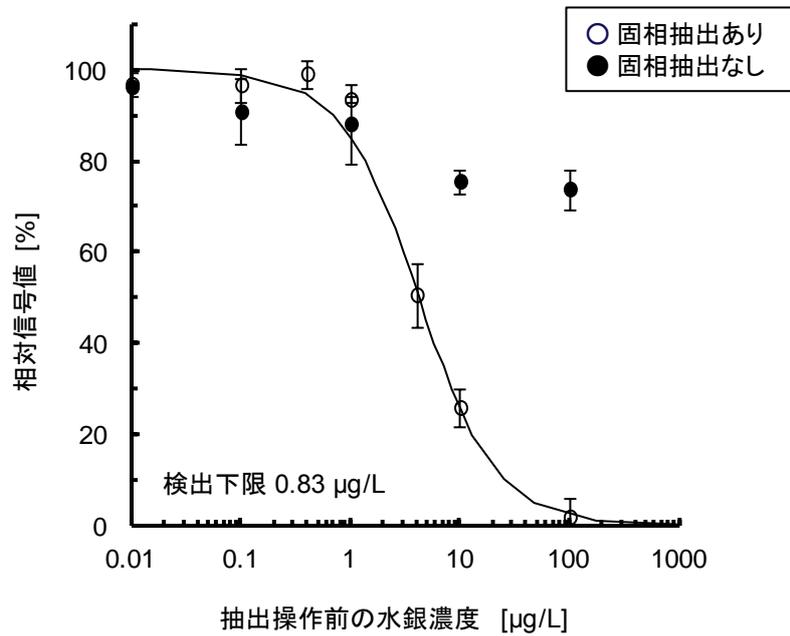


図4.7 固相抽出とマイクロイムノアッセイによる水銀標準溶液の測定結果

共存金属と水銀を含む模擬試料溶液について、固相抽出を行った場合では標準曲線は典型的なシグモイド型を示したが、固相抽出を行わなかった場合は吸光度が低く、標準曲線も濃度依存性に乏しかった。各測定は3回繰り返し行い、相対吸光度の平均値と標準偏差を算出した。

4-3-8 環境水分析への適用

飲料水試料を対象として、構築した簡易水銀分析（固相抽出-マイクロイムノアッセイ）の測定性能を検討した。実験には水道水、ミネラルウォーター（Volvic）、河川水標準物質を用い、各試料に水銀を添加したもの（水銀濃度；2、6、および10 µg/L）を分析試料とした。分析試料は、1 M 塩酸と体積比 9：1 で混合し、イオン交換樹脂を充填した固相抽出カラムに通液し、続いて洗浄と溶離を行った。溶離液はマイクロイムノアッセイに供し、前項で作成した標準曲線を用いて、固相抽出前の水銀濃度を算出した。従って、飲料水試料中の水銀 C_{Hg} は標準曲線から得られた水銀濃度 C^*_{Hg} および希釈倍率 r を用いて

$$C_{\text{Hg}} = C^*_{\text{Hg}} / r \quad \dots \quad (9)$$

となる。ここで、希釈倍率 r は固相抽出操作における塩酸添加量から 0.9 である。各試料の分析は 3 回繰返して行い、平均値と標準偏差を算出した。また、各試料の水銀濃度は還元気化原子吸光により測定を行った。表 4.2 に飲料水試料の分析結果を示した。3 種類の試料全てについて、簡易水銀分析による定量値は添加量、原子吸光分析による定量値と一致した。水道水とミネラルウォーターについては、添加量に対する回収率は、簡易水銀分析では 98.8 - 104.2%、変動係数は 0.9 - 6.4% と良好な分析精度を示した。高い無機マトリクスをもつ河川水標準試料（JSAC0302-3）についても、高い回収率（97.3 - 99.6）を示した。

表 4.2 水試料の添加回収実験結果

	水銀添加 ($\mu\text{g/L}$)	簡易水銀分析 ($\mu\text{g/L}$)	回収量 (%)	CV (%)	還元気化原子吸光 ($\mu\text{g/L}$)
水道水	2.0	2.05 ± 0.11	102.4	5.2	2.03 ± 0.02
	6.0	6.02 ± 0.14	100.4	2.3	6.00 ± 0.03
	10.0	10.42 ± 0.67	104.2	6.4	10.06 ± 0.09
ミネラルウォーター	2.0	1.98 ± 0.09	98.8	4.5	2.02 ± 0.02
	6.0	5.96 ± 0.15	99.3	2.5	5.98 ± 0.03
	10.0	10.25 ± 0.49	102.5	4.8	10.11 ± 0.06
河川水 (JSAC0302-3)	2.0	1.99 ± 0.14	99.6	7.0	1.98 ± 0.02
	6.0	5.96 ± 0.27	99.3	4.5	5.98 ± 0.03
	10.0	9.73 ± 0.36	97.3	3.7	9.95 ± 0.04

4-3-9 廃棄物溶出試験への適用

(1) 石炭火力発電所における水銀排出

石炭を燃料とする火力発電において、気化し易い水銀はプラント内において多くの位置に移行の可能性がある。一般的には移行リスクが低い石炭灰、排水処理関係の廃棄物についても、炭種の多様化や運転条件の変更による水銀移行量の増加は否定できない

(図 4.8)。そこで、将来にわたる火力発電設備の安定運用のため、埋立処理されている火力発電廃棄物を対象とした水銀溶出量の簡易測定を試みた。なお、一般的に、火力発電所から排出される石炭灰や汚泥廃棄物は、環告 13 号試験に基づき溶出量が定量されている。

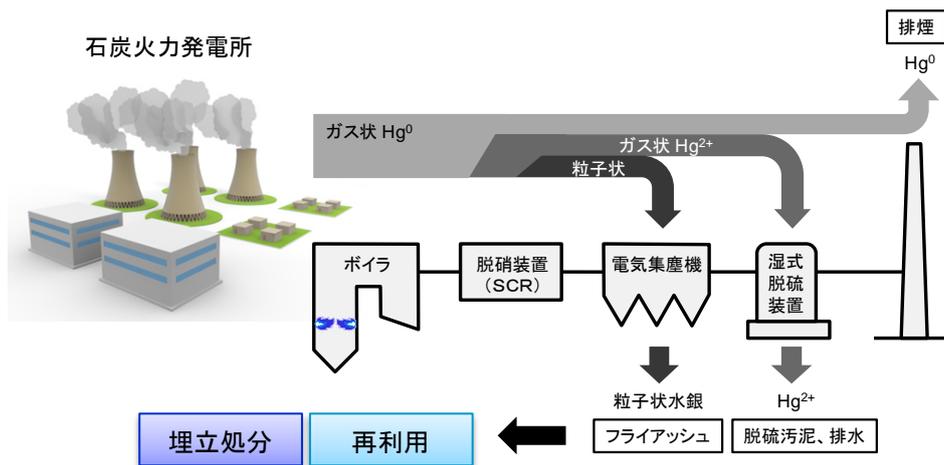


図 4.8 石炭火力発電所における水銀排出の概念図

(2) 廃棄物を対象とした溶出試験

実験には、石炭灰標準物質、および国内石炭火力発電所から採取した脱硫排水処理における汚泥を用いた。溶出検液は告示が定める方法に従い、固液比 10%となるよう試料と溶媒（純水、500 mL）を混合し、6 時間の水平振とう（振幅 4 - 5 cm、200 回/分）を行った。振とう後の容器は遠心分離（1000 rpm）により固液を分離し、続いて 1 μm 孔径のグラスファイバー濾紙（GFF、ワットマン）で微細な粒子を除去して検液とした。いずれの試料についても、予め検液を測定したところ水銀濃度は検出下限値以下であったことから、埋立基準値相当（管理型廃棄物埋立、5 μg/L）の塩化水銀を添加して実験を行った。固相抽出、およびマイクロイムノアッセイは前項までと同様の条件で行った。検液に含まれる水銀の定量値は標準曲線を用いて算出した。表 4.3 に各試料の水銀含有量の定量値、および添加量から算出した回収率を示した。いずれの試料の検液についても、添加量相当の定量値と良好な回収率（石炭灰溶出検液；104.8%、汚泥溶出検液；91.5%）が得られたが、汚泥試料については回収率は 91.5%と、やや過小評価であった。今後は、溶出検液に含まれる無機成分の詳細な分析を行い、分析精度に影響する項目を抽出することで簡易水銀分析の改善点を探索する。将来的には、石炭火力発電所における全ての廃棄物処理工程における水銀の濃度管理への適用を目指す。

表 4.3 溶出検液への添加回収実験の結果

廃棄物	水銀添加 (μg/L)	簡易水銀分析 (μg/L)	回収率 (%)	n
石炭灰	5.0	5.2 ± 0.3	104.8	5
脱硫汚泥	5.0	4.6 ± 0.2	91.5	3

4-4 まとめ

環境試料に含まれる測定妨害金属の影響を排除するため、強塩基性イオン交換樹脂を用いた固相抽出カラムを構築した。十種の共存金属（Al、Ca、Mg、Cd、Cr、Cu、Fe、Mn、Pb、およびZn）を含む模擬試料を対象として、試料の塩酸濃度、溶離液の組成、各溶液量を検討したところ、水銀回収率を損なわず、各金属イオンの除去に成功した。構築した固相抽出とマイクロイムノアッセイを連結した簡易水銀分析法を用い、模擬試料中の水銀イオンに関する検量線を作成した結果、0.83 µg/L までの水銀検出が可能であった。この検出下限値は、日本国内の環境基準（0.5 µg/L）には対応できないが、国外における飲料水基準（アメリカ合衆国環境保護庁：3 µg/L、世界保健機構：2 µg/L）を満足した。飲料としての利用の可能性をもつ実環境水を用いて本法の分析性能を検証した結果、水道水、ミネラルウォーター、河川水を対象として、機器分析（還元気化原子吸光）との高い相関性が確認できた。また、火力発電所から採取した石炭灰および汚泥の溶出液を対象として、産業廃棄物処分場における溶出基準である 5 µg/L 付近の水銀を分析できた。

表 4.4 簡易水銀分析、ELISA法、原子吸光分析の比較

	前処理法	測定原理	検出下限 (µg/kg)	所要時間 ^{注)}
原子吸光法	前処理工程数:1 所要時間:1分	原子固有の輝線スペクトル	0.5	10分
ELISA	抽出カラム 前処理工程数:3 所要時間:30分	酵素標識抗体-発色度	7.2	2.5 時間
簡易水銀分析		金コロイド抗体-吸光度	0.83	15分

注)ELISAおよびマイクロイムノアッセイの結果は、固相抽出-イムノアッセイの合計

抗体固定化マイクロ電極の作製と 水溶液中PCBの電気化学的検出

5-1 はじめに

低分子を対象とした非競合型の反応形式に基づくイムノアッセイを構築するためには、測定は抗体を固定した基板表面における抗原抗体反応を直接的に検出する必要がある。測定対象となる抗原と抗体の結合を直接的に検出する測定方法として、表面共鳴プラズモン (SPR) 法、水晶振動子法 (QCM)、電気化学インピーダンス法 (EIS) が挙げられるが (表 5.1)、対象が低分子であること、および測定法としての絶対感度から、電気化学インピーダンス法の利用が適すると考えた。本章では測定物質として、POPs の一種であるポリ塩化ビフェニルを対象とした。

表 5.1 非競合低分子イムノアッセイに適用可能性のある検出原理

検出手法	SPR	QCM	EIS
検出原理	プラズモン 共鳴角の変化	共鳴周波数 の変化	界面電気特性の 変化
感度	△	◎	◎
低分子検出	×	△	○

SPR : Surface Plasmon Resonance
 QCM : Quartz Crystal Microbalance
 EIS : Electrochemical Impedance Spectroscopy

5-1-1 電気化学インピーダンスによる親和性測定

電気化学インピーダンス法 (Electrochemical impedance spectroscopy : EIS) は、導電性材料の表面状態を短時間で非破壊的に分析することが可能であり、電極素材、固体電解質や触媒の特性評価に活用される。近年、この EIS を用いて生体分子を固定化した電極表面を観察することで、抗原抗体反応や酵素反応を非標識で検出する手法が提案されている⁶⁸⁻⁷⁵。特に、低分子を対象とした非競合イムノアッセイの例としては、電気化学インピーダンス法に基づく抗原抗体反応の検出を利用した例があり、いずれの例も電極上に抗体を固定化することで、それぞれ牛乳に含まれるペニシリン、血中コルチゾルの検出に成功している⁷³。これら EIS 法を検出原理とするイムノアッセイは、遺伝子レベルでの抗体改変を要するオープンサンドイッチ法、適用対象が限られる蛍光偏光法、蛍光消光法など、低分子測定に適用可能な非競合型のイムノアッセイと比較して、通常の抗体を用いることで、抗体を作製しうるあらゆる低分子に適用可能である点で優れる。電極構造という観点では、電極の微細化がもたらす電気化学検出のシグナルノイズ比の改善効果はよく知られているが、生体分子を固定化した電極表面を対象とした EIS 測定において同様の効果が報告されている⁷¹⁻⁷²。

5-1-2 ポリ塩化ビフェニルによる環境汚染

ポリ塩化ビフェニル (PCB) (図 5.1) は、209 種の異性体から構成される化合物群であり、化学的・熱的安定性が高く、不燃性や電気伝導率に優れることから、変圧器やキャパシタの絶縁油、熱媒体、潤滑油として、種々の工業分野において利用されてきた。しかしながら、1970 年代には、PCB が有する自然界における残留性、それに伴う内分泌攪乱性や発癌性といった生物影響が明らかとなった⁷⁶⁻⁷⁹。さらに、自然に排出された PCB は一か所に留まらず、食物連鎖による生物濃縮や大気中や海洋における拡散により非常に長い距離を移動し、その分布は全球的なものであることが報告された⁸⁰。そのため、商用としての PCB 生産と、その使用は 1970 年代半ばには、多くの国において禁止された。最終的には、2004 年に残留性有機汚染物に関するストックホルム条約 (Stockholm convention on persistent organic pollutants)、通称 POPs が批准され、PCB は優先すべき化合物の一つとして規制対象とされた⁷。

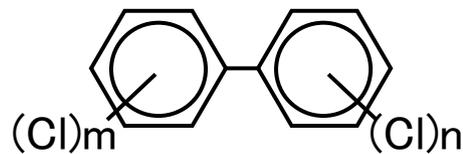


図5.1 ポリ塩化ビフェニルの化学構造

5-1-3 PCB分析法

環境試料に含まれる PCB 分析は、主にガスクロマトグラフィによる分離と種々の検出器の組み合わせで行われ、塩化物の特性に着目した電子捕獲型検出、異性体毎の質量差に着目した高分解能および低分解能質量分析が挙げられる⁸¹⁻⁸³。免疫アッセイを利用した PCB 分析は、ELISA や免疫クロマトグラフィをプラットフォームとして商品化されているが、高い検出感度を求められる環境分析において必要十分な分析性能を有するとは言い難く、絶縁油分析等への応用がなされている程度である

5-1-4 本章の目的

本章では、溶液中低分子の非競合免疫アッセイによる高感度測定を目指し、抗体固定化電極と電気化学インピーダンス法を利用した、溶液中に含まれる低分子の電極表面への捕捉と直接検出を検討した。測定対象は、POPs の一種であるポリ塩化ビフェニル (PCB) とし、新たに PCB 製剤であるカネクロールに高い結合親和性を有するマウスモノクローナル抗体を作製し、微細加工技術で作製したマイクロ電極に固定化した。電極表面に抗原抗体反応により結合した PCB について、EIS 法に基づく検出を検討した。

5-2 実験方法

5-2-1 試薬と材料

本章で用いた試薬および材料と、入手元の一覧を示した。

- ・ 理研バイオリソースセンター：マウスミエローマ細胞株 (NS0)
- ・ 日本クレア：BALB/cA 近交系マウス (雌、5 週齢)
- ・ 和光純薬工業：スカシガイ由来ヘモシアニン (Keyhole limpet hemocyanin : KLH)
- ・ シグマアルドリッチジャパン：ウシ血清アルブミン (Bovine serum albumin : BSA)、ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン (hypoxanthine aminopterin thymidine : HAT) 混合培地、ウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum : FBS)
- ・ Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc (KPL、代理店：フナコシ)：FITC 標識抗マウス IgG ヤギポリクローナル抗体
- ・ ローム・アンド・ハース電子材料：ポジ型フォトレジスト S1818、現像液 MF CD-26
- ・ 日本化薬：ネガ型フォトレジスト SU8-3005、現像液 SU8 Developer
- ・ 東京化成工業：Dithiobis-*N*-succinimidyl propionate (DTSP)
- ・ GLサイエンス：PCB 製剤 (カネクロール 300、400、500、600)
- ・ AccuStandard Inc. (代理店：和光純薬工業)：各種 PCB 異性体 (IUPAC number : 5、8、18、20、28、31、33、44、52、66、70、95、101、110、118、138、149、153、170、174、180、187、194、196、199、および 203)

実験で用いたリン酸緩衝液 (PBS、pH7.4) は実験室で作製した。組成を以下に示す。いずれの試薬も和光純薬工業から購入した。

- ・ 137 mM 塩化ナトリウム (NaCl)
- ・ 3 mM 塩化カリウム (KCl)
- ・ 20 mM リン酸 2 水素ナトリウム (Na_2HPO_4)
- ・ 1.5 mM リン酸水素カリウム (KH_2PO_4)

5-2-2 モノクローナル抗体の作製

モノクローナル抗体の作製はマウスに PCB 抗原を感作させることで作製した。実験動物の飼育と取扱は、(一財)電力中央研究所の内規に従って動物愛護法の観点から適切に行った。以下に抗原調整から抗体精製までの実験方法を述べた。

(1) PCB 抗原の構造評価

4 種類の PCB 抗原は、東京電機大学篠崎研究室の協力により合成を行った。各 PCB 抗原 (S6、S7、S8、S9) のうち、S6 および S7 はクロロビフェニル誘導体であるため、ほぼ単一の組成を有する。一方で、S8 および S9 は合成過程においてビフェニルに塩素基を導入していることから、複数の異性体混合物である。各抗原の主たる化合物の構造を知るため、H-NMR (東京工業大学) を利用し、各分子の構造の推定を実施した。通常の化合物の構造推定では、H-NMR および C-NMR を使った複合情報から推定を行うが、本研究で用いた PCB 誘導体の炭素構造は合成経路より容易に推定できるため、芳香環領域における H-NMR 情報からの塩素置換に関する構造推定を行った。NMR 測定用の溶媒としては、クロロホルムを用いた。

(2) PCB 抗原-キャリアタンパク質複合体の調製

キャリアタンパク質として、スカシガイ由来ヘモシアニン (KLH) を用いた。100 μ L DMSO に、1 mg PCB 抗原の等量混合物 (S6、S7、S8、S9 ; 1 : 1 : 1 : 1) を溶解し、10 mg の KLH を溶かした 9 mL 50 mM ホウ酸緩衝液 (pH9.6) に 1 滴ずつ添加した。この溶液を冷蔵庫 (4°C) で 3 日間静置し、複合体を形成させた。反応溶液は限外濾過膜を有する濃縮カラム (Amicon Ultra、メルクミリポア) を用い、全量が 3 mL となるように濃縮した。続いて、濃縮後の反応液は脱塩カラム (Econo-pac 10DG、Bio-Rad Laboratories) を用いて不純物を除去し、溶媒をホウ酸緩衝液からリン酸緩衝液 (pH7.4) と置換した。

3) 抗原の投与

5 週齢の雌マウス (Balb/cA jcl、日本クレア株式会社) を購入し、1 週間の順養の後に実験に供した。抗原-キャリアタンパク質複合体は、注射筒内でアジュバント (TiterMax Gold、CytRx) とよく混合し、約 200 μ g 腹腔内に投与した。以後、2 週間

間隔で合計 3 回の投与を行い、3 回目の投与後に血清の抗体価を測定した。測定では、1000 倍希釈した血清の抗体価を蛍光検出型フロー式免疫アッセイ (KinExA 3200、Sapidyne Inc.) を用いて評価し、免疫アッセイの固相として疑似抗原分子 S1 を BSA 上に固定化した S1-BSA を担持させたセファロース粒子を用いた (図 5.2)。最も高い抗体価と、PCB 抗原に対する親和性 (阻害効果) を示したマウスについて、4 回目の抗原-キャリアタンパク複合体の追加投与を行った。

4) ハイブリドーマの作製とスクリーニング

4 回目の抗原投与を行ったマウスを頸椎脱臼により安楽死させ、速やかに脾臓細胞を摘出した。脾臓は生理食塩水による洗浄後、脾臓細胞を懸濁し、ポリエチレングリコール (PEG 1500) を用いてマウスミエローマ細胞 (NS0) と融合した。融合細胞は HAT 培地を満たした平底 96 穴培養プレート内で 10 日間培養を行った。PCB に対する高い親和性を有する陽性クローンの探索のため、佐々木らの方法により全ウェルからの選別を行った。この際、血清チェックと同様に PCB に対する感度 (競合法免疫アッセイにおける阻害効果) を指標とした。得られたクローンは、半固体のメチルセルロース培地 (ClonaCell-HY、Stemcell Technologies Inc.) 上での培養を 2 回繰り返すことで、単一クローンとした。

5) 腹水化と精製

モノクローナル抗体の腹水化は、㈱スクラムに委託して行った。簡単に方法を示す。予め、500 μ L ブリスタンを腹腔内投与した 9-11 週齢のヌードマウスの腹腔内に、リン酸緩衝液 (PBS) で洗浄したハイブリドーマを注射した。ハイブリドーマの注射から 7~10 日後、マウス腹腔内に蓄積された腹水を注射針を取付けた注射筒を用いて採取した。採取された腹水は硫酸沈殿による粗精製の後、プロテイン A カラムを用いて精製した。腹水中のタンパク量、精製抗体の濃度はブラッドフォード法に基づき、発色試薬 (Quick Start Bradford 1x Dye Reagent、Bio-Rad Laboratories, Inc) とナノドロップ (NanoDrop 1000、Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて評価した。

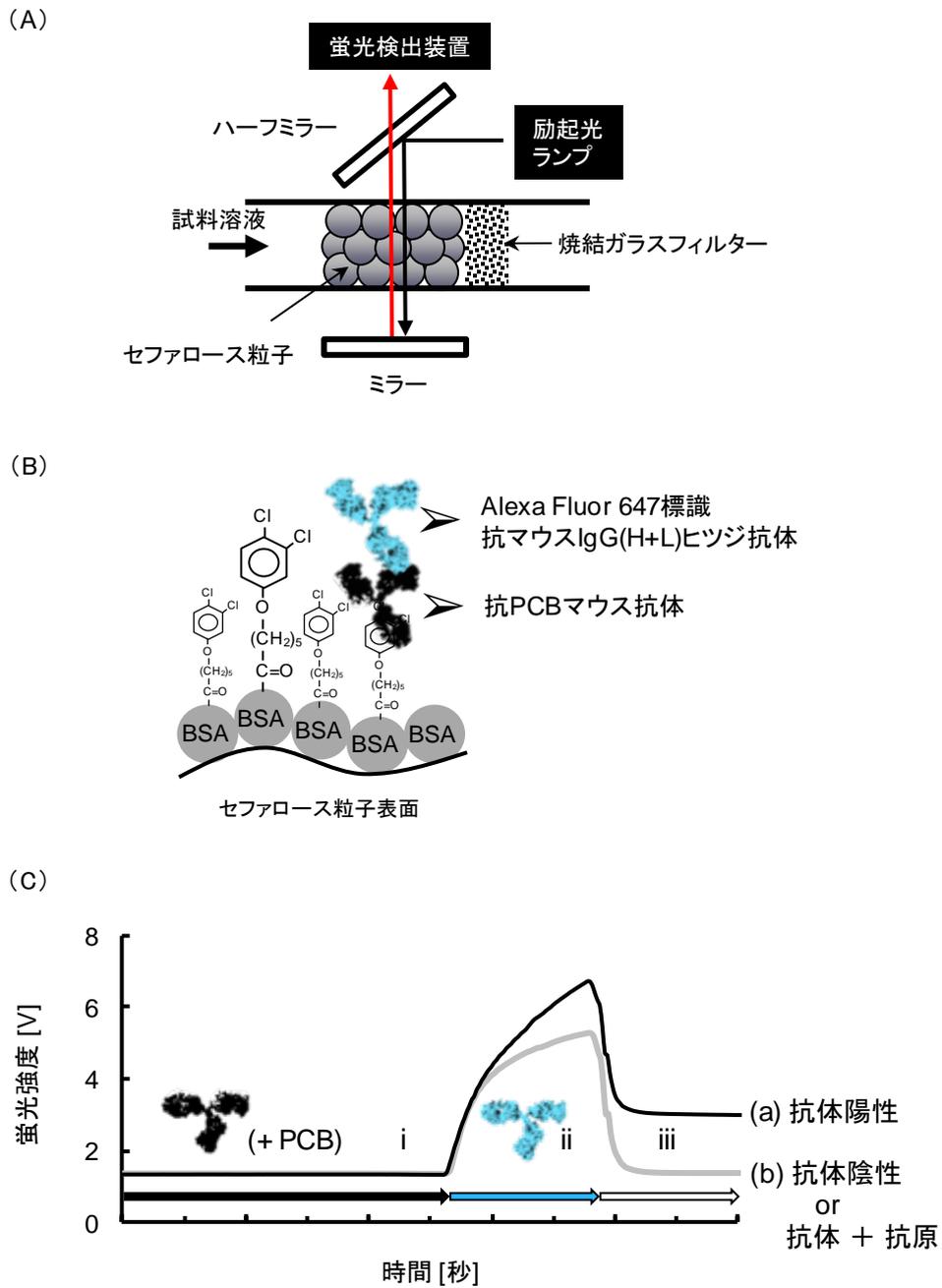


図 5.2 KinExAシステムを利用した血清チェック

(A) KinExAシステムの光学系、(B) セファロース固相上に固定化された S1-BSA抗原、(C) 抗PCB活性を有する血清、抗体溶液の導入により蛍光強度が増大する。

5-2-3 マイクロ金電極の作製

マイクロ金電極の概要図を図 5.3 に示した。本研究で用いた楕形電極であり、楕幅 2 μm 、楕長 2 mm、楕の相互間隔 10 μm 、楕数 250 本とした。マイクロ電極はフォトリソグラフィ、スパッタリング、リフトオフの工程により作製し、基材として石英基板を用いた。以下に簡単に述べた (図 5.4)。

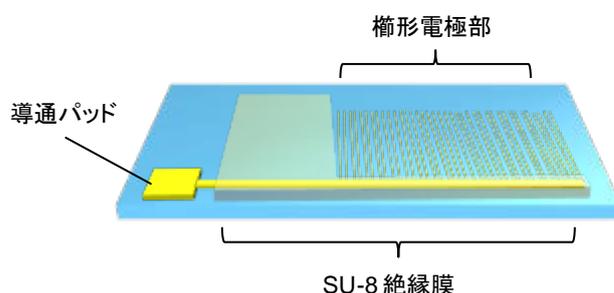


図 5.3 楕形マイクロ金電極の概要図

電極基板は楕型構造 (電極サイズ: 2 $\mu\text{m} \times 2 \text{ mm}$ 、楕数: 250 本、各楕間距離: 10 μm) のマイクロ金電極部、リード部、導通パッドで構成され、リード部はフォトレジスト SU-8 (膜厚: 5 μm) により絶縁した。

(1) ガラス基板の洗浄とレジストパターニング

合成石英基板 (厚さ 1 mm、仙台石英) を染色バットに配置し、ピラニア溶液 (硫酸、過酸化水素; 3:1) で 30 分間洗浄した後、超純水で 2 回以上リンスした。洗浄後のガラス基板を窒素ガスで乾燥させ、フォトレジスト S1818 を滴下し、スピコート (回転数 3000 rpm、30 秒) で約 10 μm の均一膜を形成した。続いて、基板をホットプレート上で加熱 (65°C-1 分、95°C-5 分、65°C-5 分) し、レジストに含まれる有機溶媒を除去することで、レジスト膜を基板上に定着させた。基板およびフォトマスク (2.5 インチ角、クロムマスク) をマスクアライナー (型式 MA-20、ミカサ) の露光部に配置し、ブローアップを行いながら露光を行った (波長 365 nm、150 カウント)。露光後の基板を現像液 (MF CD-26) に浸漬し、約 2 分かけて露光部のレジストを除去した。現像後の基板は超純水で 2 回洗浄し、窒素ガスで乾燥させてから顕微鏡でパターンを確認した。

(2) スパッタリングとリフトオフによる電極パターンニング

レジストパターンニング済みの基板を酸素プラズマアッシャーで洗浄（100W、30秒）し、速やかにマグネトロンスパッタ（L-332S-FH、キャノンアネルバ）内のサンプルホルダに固定した。製膜は出力 200W で行い、チタン、白金、金の順に行い、各々のスパッタ時間は 1、10、3 分とした。スパッタ後の基板はチャンバー減圧後に取り出し、染色バットに満たしたアセトン中に浸漬した。約 2 時間でレジストが完全に溶解することから、新しいアセトンに移動させてからスポイトを利用して表面に付着した金属片を除去する。最後に、アセトンを満たしたビーカーに基板を浸漬して数秒間超音波を照射し、微細な付着物を基板表面から除いた。全工程を終えた基板は窒素ガスで乾燥し、清浄かつ乾燥状態の保たれた容器内で保存した。

(3) SU-8 絶縁膜の形成

清浄な電極基板にネガ型フォトレジスト SU-8 3005 をスピコート（3000 rpm、30 秒）し、プレバークした（65°C・1 分、95°C・10 分、65°C・3 分）。続いて、マスクアライナー上でレジスト面にクロムマスクを重ね、絶縁膜を形成する部位に露光を行った（波長 365 nm、150 カウント）。露光後の基板はポストバークの後、現像液（SU-8 developer）により非露光部位を除去し、2 プロパノールで十分に洗浄した。絶縁膜をパターンニングした基板は、ホットプレートを用いて熱処理（180 °C、6 時間）し、機械的強度と有機溶媒耐性を高めた。全工程を終えた基板は窒素ガスで乾燥し、次の抗体固定化工程まで容器内で保存した。

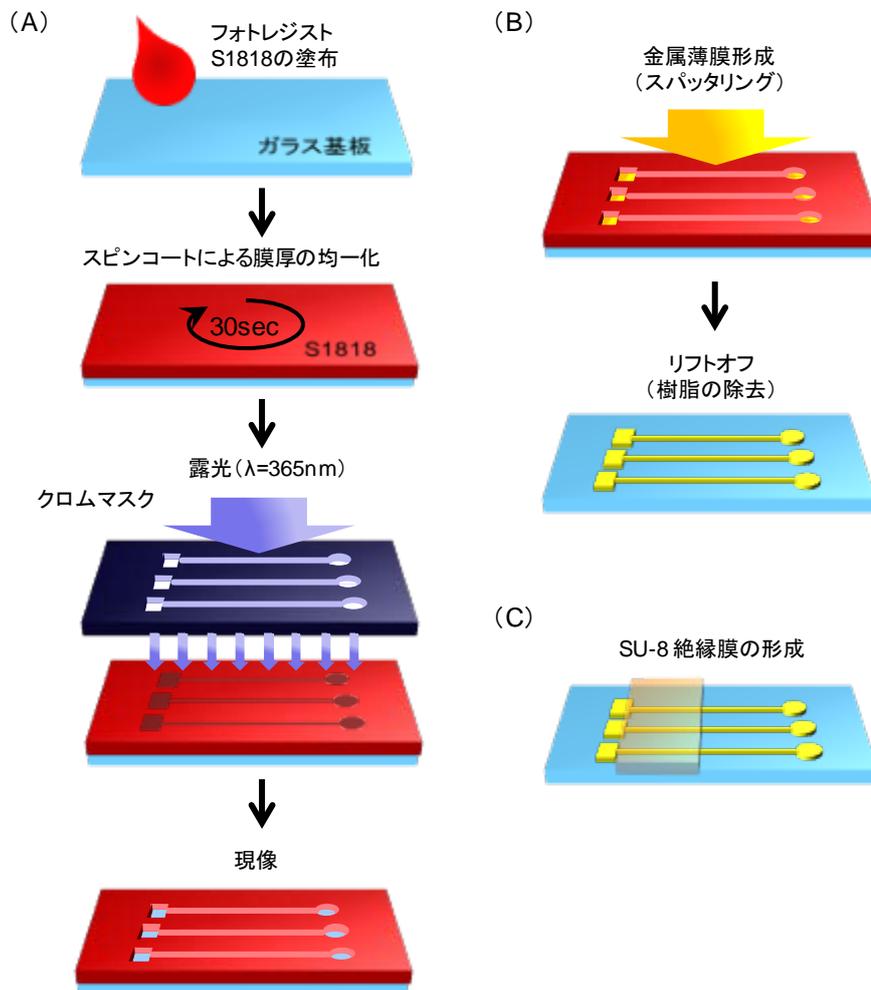
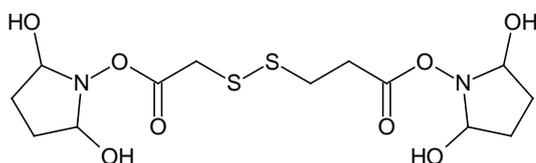


図5.4 微細加工技術を利用した電極基板の作製工程

(A) ポジ型フォトレジスト (S1818) に対して任意の電極パターン状に露光し、露光部を除去して電極となるガラス基板上の部位を露出させた。(B) 露出したガラス部位に対してチタン・白金・金の順で金属薄膜を積層し、レジスト部を溶媒で除去することで電極パターンを作製した。(C) ネガ型フォトレジスト (SU8-3005) により電気絶縁膜を作製した。

5-2-4 抗体固定化電極の作製

石英基板上にパターニングしたマイクロ電極上に抗PCB抗体を固定化した（以下、抗PCB電極とする）。抗体の基板への固定化には、非特異的な物理吸着に基づくもの、クロスリンカー等を用いた配向制御が可能なものがある。ここでは、ジチオビス-N-スクシンにミジルプロピオン酸 (DTSP: Dithiobis-N-succinimidyl propionate) (図 5.5) を用い、金電極表面上にチオール末端を有するクロスリンカーの単分子膜を形成し、クロスリンカーの別末端のスクシンイミド (NHS) 基を用いて抗体分子を電極上に固定化した。



DTSP : Dithiobis-N-succinimidyl propionate

図 5.5 電極修飾に用いた自己組織化試薬

ジチオビス-N-スクシンにミジルプロピオン酸は金電極と結合するチオール基とタンパク質のアミノ酸と結合しうるスクシンイミド基を有する。

(1) 電極基板の洗浄と自己組織化単分子膜 (SAM) の形成

電極基板をアセトンで 2 回洗浄し、窒素ガスにより乾燥させる。真空紫外光 (VUV) 照射装置 (エム・ディ・エキシマー、キャリアガス ; 窒素) を基板表面に 15 分間照射することで、電極基板表面の有機物を除去した。洗浄後の基板は、速やかに 5 mg/mL の DTSP を含むアセトン (脱水) に浸漬し、室温・窒素充填下において 4 時間静置することで自己組織化膜 (SAM) の形成を促した (図 5.6 (A))。その後、基板を新しいアセトン (脱水) に移動し、卓上超音波洗浄機により超音波を 30 秒間照射した。基板は再度アセトンで洗浄し、速やかに続く抗体固定化を行った。

(2) 抗体分子の固定化

抗 PCB モノクローナル抗体を含むリン酸緩衝液 (PBS、pH7.4) を調整し、予め金電極上に SAM を形成した電極基板を浸漬することで、DTSP-SAM 上のスクシンイミド基と抗体分子表面のアミノ基を結合させた。抗体濃度は、既報のタンパク質固定化電極の例から、電極表面を飽和できる濃度として $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ を用いた^{74, 76}。電極を抗体を含む溶液中に 2 時間の静置し抗体を電極上に固定した後、電極基板全体を PBS で洗浄した (図 5.6 (B))。続いて、50 mM モノエタノールアミン (MEA) を含むリン酸緩衝液 (PBS) に 15 分間浸漬し、金表面上に残るスクシンイミド基をブロッキングした (図 5.6 (C))。完成した抗 PCB 電極基板は、リン酸緩衝液 (PBS) で 2 回洗浄し、4°C 下において PBS 内で保存した。

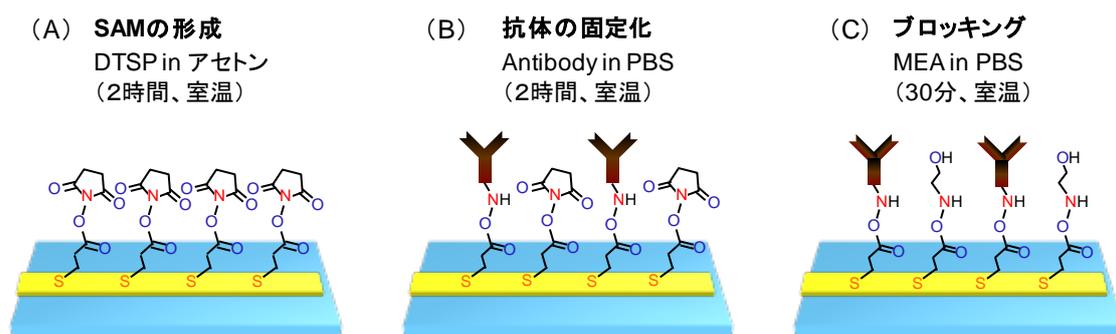


図 5.6 抗体固定化電極の作製工程

(A) 楡形マイクロ金電極の表面にDTSPによる自己組織化単分子膜 (SAM) を形成し、(B) SAM末端と抗体アミノ基を共有結合させた。(C) 未反応のSAM末端はMEA (モノエタノールアミン) によりブロッキングを行った。

5-2-5 電気化学インピーダンス (EIS) 測定

電気化学プローブとして各 5 mM の フェロシアン化カリウム・フェリシアン化カリウム ($K_3Fe(CN)_6 \cdot K_4Fe(CN)_6$) を添加したリン酸緩衝液 (PBS、pH7.4) に浸漬した。電極基板の導通パッドを測定セル上部の導通部に差し込み、測定セルはポテンシオスタット (ALS-600、BAS) と接続し、作用極に酸化還元電位付近の電位 (0.152 V vs. AgCl) を印加しながら、微小な電位幅 (5 mV) で周波数を変化させることで電極表面の状態を反映した電気化学インピーダンス (EIS) スペクトルを取得した。ここで、周波数は 0.1~100000 Hz の範囲で変化させ、高周波数側から各桁毎に 12 周波数について測定を行った。各周波数における測定は 5 回ずつ行い、平均値を代表値として用いた。

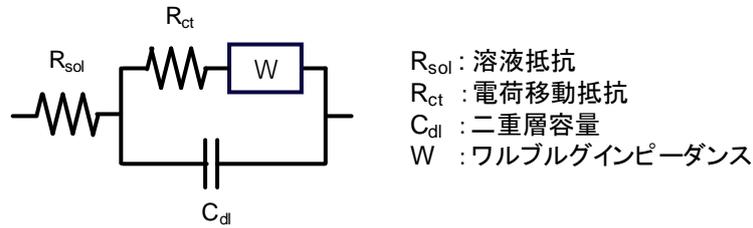
取得した EIS スペクトルを定量的に比較するために、電極表面の電気的特性を等価回路を用いて記述し、電気的なパラメータとして解析的に分離した。ここでは、生体分子による電極被覆の場合に一般的な 4 要素 (溶液抵抗 R_{sol} 、電気二重層容量 C_{dl} 、電荷移動抵抗 R_{ct} 、ワルブルグ拡散インピーダンス Z_w) による等価回路 (図 5.7 (A)) を用いた。計算には表計算ソフト (Excel 2007、マイクロソフト) を利用し、測定結果として得られた各周波数におけるインピーダンス (ナイキストプロット上では Z_{re} 、 Z_{im}) と計算から求められたインピーダンスの各周波数における残差が最小となるパラメータを求めた。インピーダンスの実数成分と、虚数成分は下式から計算される。

$$Z_{re} = R_{sol} + \frac{R_{ct} + \sigma\omega^{-1/2}}{(C_{dl}\sigma\omega^{1/2})^2 + \omega^2 C_{dl}^2 (R_{ct} + \sigma\omega^{-1/2})^2} \dots (10)$$

$$Z_{im} = \frac{\sigma\omega^{-1/2}(C_{dl}\sigma\omega^{1/2} + 1)^2 + \omega C_{dl}(R_{ct} + \sigma\omega^{-1/2})^2}{(C_{dl}\sigma\omega^{1/2})^2 + \omega^2 C_{dl}^2 (R_{ct} + \sigma\omega^{-1/2})^2} \dots (11)$$

ここで、 ω は周波数から算出される角速度、 σ はワルブルグインピーダンス成分を示す。既往の研究から、生体分子を固定化した電極の比較には電荷移動抵抗 (R_{ct}) を指標とすることが多い。本実験において電極の自己組織化単分子膜による被覆率評価、電極上への抗体固定化の確認では電荷移動抵抗 R_{ct} を評価指標として用いた。

(A)



(B)

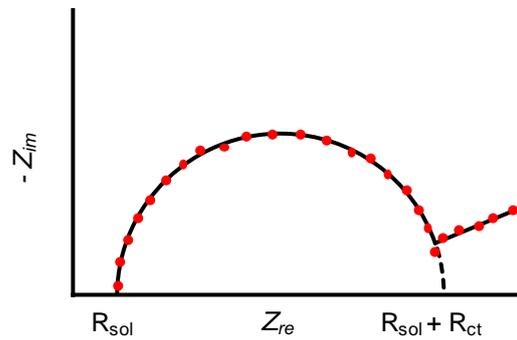


図5.7 EIS測定 of 解析方法

(A) 抗体などの比較的小さい生体分子を固定化した電極表面は、4つの電氣的パラメータ（溶液抵抗、電荷移動抵抗、二重層容量、拡散のワルブルゲインピーダンス）を用いて等価回路で表現できる。(B) 電気化学プローブを含む溶液内において、プローブの酸化還元電位付近においてEIS測定を行った場合、容量と抵抗成分を示す半円と、拡散律速過程を示す直線領域が観察できる。測定結果のプロットを理論式（式(10)、式(11)）に回帰することで各パラメータを決定した。

5-2-6 EISイムノアッセイ

抗 PCB 基板の初期インピーダンスを測定し、続いてジメチルスルホキシドに溶解した PCB 標準物質を 1%含むリン酸緩衝液 (PBS、pH7.4、室温) に浸漬した。これにより、電極表面上の抗体分子と溶液中の PCB 分子の間での抗原抗体反応が進む。任意の時間経過後、抗 PCB 電極をリン酸緩衝液 (PBS) で 2 回洗浄し、ブローで緩衝液を除去した後に、測定セル内の EIS 測定溶液に浸漬し、EIS 測定を行った。測定手順の概要を図 5.8 に示した。定前後のインピーダンス変化の指標として電荷移動抵抗 R_{ct} の変化量を用い、電極のロット差を補正するために初期電荷移動抵抗値により規格化を行った。規格化されたインピーダンス変化 R (%) は、

$$R(\%) = \frac{\Delta R_{ct}}{R_{ct}^*} \times 100 = \frac{R_{ct} - R_{ct}^*}{R_{ct}^*} \times 100 \quad \dots (12)$$

と表わされる。ここで R_{ct}^* は反応前の初期電荷移動抵抗値、 R_{ct} は抗原抗体反応後の電荷移動抵抗値である。

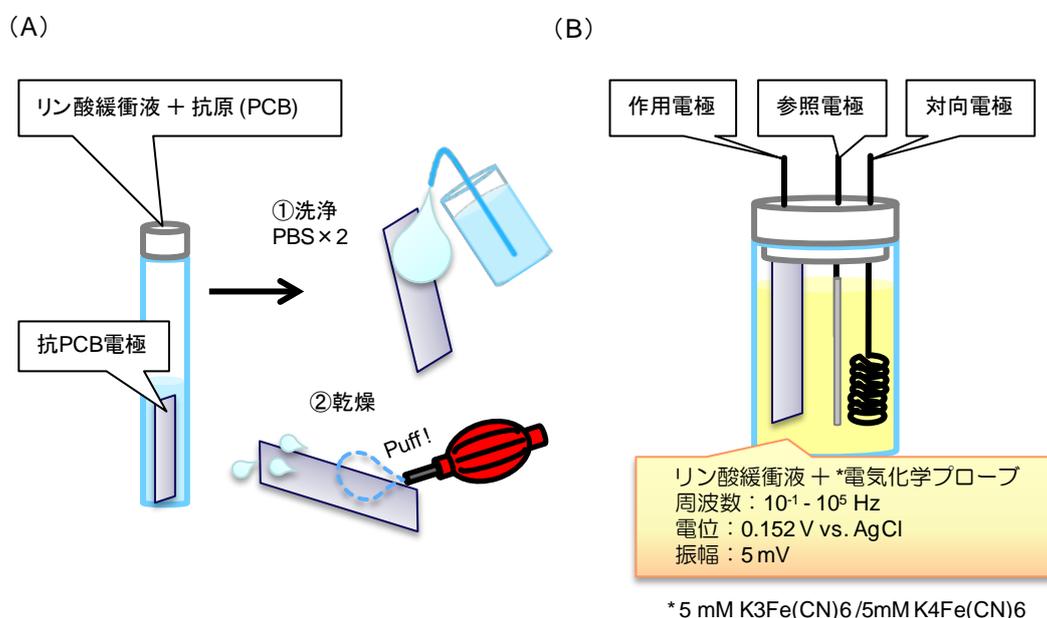


図 5.8 EISイムノアッセイの測定操作

(A) 抗 PCB 電極 (抗体固定化電極) と PCB を含む水溶液 (リン酸緩衝液) を反応させ、続いて (B) 電気化学プローブを含むリン酸緩衝液中において、塩化銀電極、白金ワイヤ電極を参照電極、対向電極として電気化学インピーダンス測定を行った。

5-3 結果と考察

5-3-1 PCB抗原の構造推定

PCB抗原 (S6、S7、S8、S9) の H-NMR スペクトル、および各ピークの積分値、合成経路から想定される炭素骨格を図 5.9 に示した。各ピークが示す炭素の帰属は、炭素骨格に付けたアルファベット (a-d) に対応させた。各ピークの積分値は、最もビフェニル環に近い炭素 (b、1 個) 上に水素を 2.0 として規格化しており、積分値は凡そ炭素上の水素数と一致する。抗原分子の炭化水素鎖上の水素に対応する炭素 (a、3 個) および炭素 (c、1 個) 上の水素数は、全ての化合物において、それぞれ 6 および 2 前後であり、想定される構造と一致した。同様に炭素 (d、2 個) はスクシンイミド基に対応しており、アミノ基反応性が保たれていることが示唆された。

次に、芳香環領域 (7-8 ppm) における各ピークの積分値、および酸素が結合したビフェニル環の配向性から塩素置換位の推定を行った。各抗原 (S6、S7、S8、S9) の芳香環上の水素数は、それぞれ 4.23、3.74、4.74、および 2.69 であった。ビフェニル環の最大水素数は 9 であるから、各抗原の塩素数は、4.58、5.26、4.26、および 6.31 であった。S7 および S9 については、芳香環領域のピーク形状から単一の化合物であると考えられることから、塩素数と配向性の観点から構造の推定は容易であった。S6 および S9 に関しては、塩素数と配向性から推測される複数の構造が共存することが示された。各 PCB 抗原が含むと推定される化合物の構造を図 5.10 に示した。

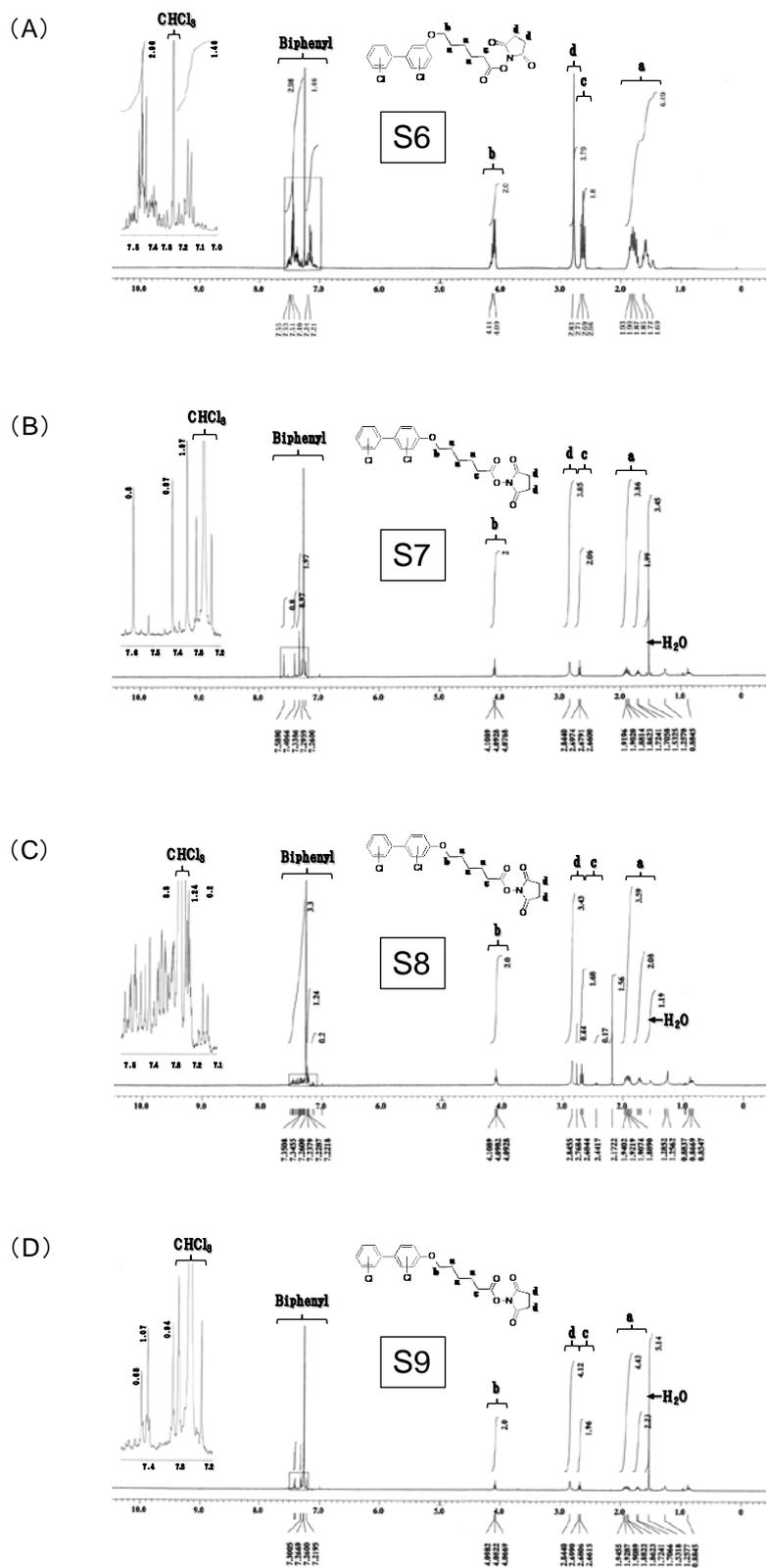
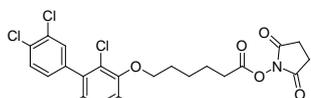


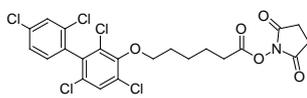
図5.9 PCB抗原の $^1\text{H-NMR}$ 測定結果

各PCB抗原はクロロホルムに溶解し $^1\text{H-NMR}$ 測定を行った。図内の構造式は合成経路から想定される炭素骨格、および各 $^1\text{H-NMR}$ ピークの帰属を示した。

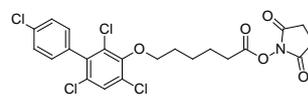
S6, Cl: 4.58



PCB 2,4,6,3',4'

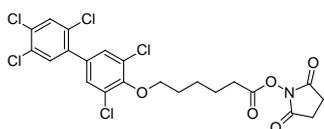


PCB 2,4,6,2',4'



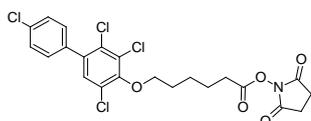
PCB 2,4,6,4'

S7, Cl: 5.26

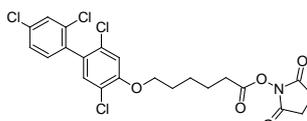


PCB 3,5,2',4',5'

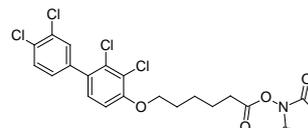
S8, Cl: 4.26



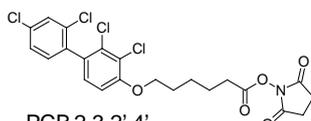
PCB 2,3,5,4'



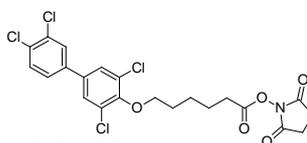
PCB 2,5,2',4'



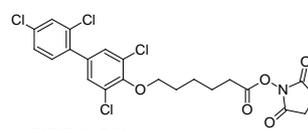
PCB 2,3,3',4'



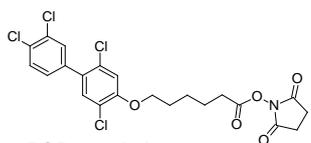
PCB 2,3,2',4'



PCB 3,5,3',4'

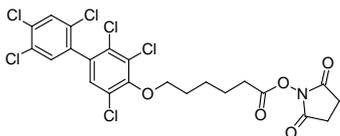


PCB 3,5,2',4'



PCB 2,5,3',4'

S9, Cl: 6.31



PCB 2,3,5,2',4',5'

図 5.10 H-NMRから予想されたPCB抗原の構造

H-NMR測定から得られた芳香環の塩素数と、合成経路から想定される配向性から、抗原構造を予想した。

5-3-2 抗体のスクリーニング

高い抗体価を示したマウス (RU) より採取した脾臓細胞から作製されたハイブリドーマは、HTA培地を満たした96穴マイクロウェルプレートにおいて約10日間培養し、各プレートのウェル毎に抗体価とPCBに対する親和性を評価した。本章の実験では、いくつかの候補である (RU3A、RU5C、RU2G4、およびRU6F9) のうちから、最も高い抗体価 (5.01 V、KinExAにおける蛍光シグナル値) と、高いPCBに対する親和性 (阻害率6.9%、100 µg/L PCB) を示したRU6F9を細胞株として抽出した (表5.2)。また、RU6F9株が産生する抗体はIgG1κであり、2回の限外希釈とメチルセルロース培地上での培養によりシングルクローン化できた。RU6F9株は実験方法に従い腹水化とプロテインAカラムによる精製を行い、約1 mg/mLとなるよう希釈して凍結保存した。

表5.2 ハイブリドーマのスクリーニング結果

クローン名	培養上精 (V)	培養上精+PCB (V)	阻害率 (%)
RU3A	2.61	2.80	107.3
RU5C	3.79	2.66	70.2
RU2G4	1.63	0.12	7.3
RU6F9	5.01	0.34	6.9

5-3-3 抗体が有するPCB親和性

RU6F9抗体のPCB製剤 (カネクロール) に対する結合性の算出では、フロー式イムノアッセイにおける結合除外効果を³³利用し、極めて低い抗体濃度において検量線のIC50が結合解離定数 (K_d) に漸近することを利用した。異なる抗体濃度 (5 pM – 1 nM) で取得した、PCB製剤の等量混合物 (KCmix) に対する検量線を図5.11 (A) に示した。その結果、KCmixに対する K_d 値は0.43 µg/Lであることが判った (図5.11 (B))。RU6F9抗体の K_d 値は、同時に単離されたクローン、および他の既報の抗PCB抗体と比較して優れたものであった⁸⁴⁻⁸⁷。

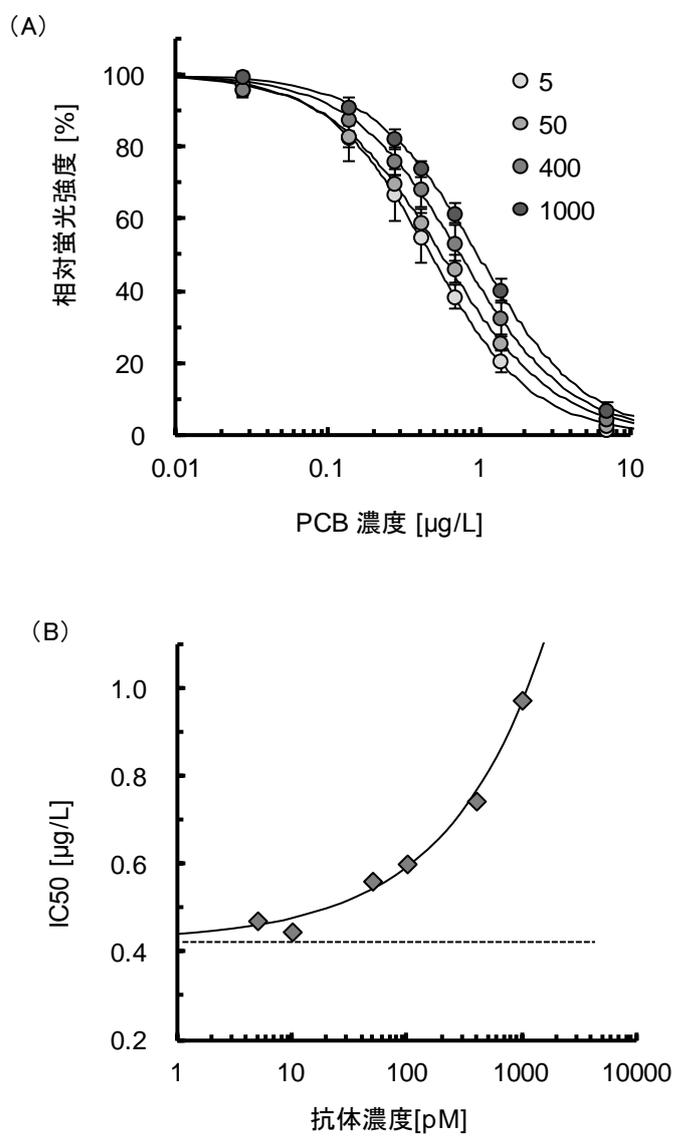


図5.11 抗PCB抗体 (RU6F9) のPCB結合親和性の評価

(A) 抗体濃度を1000 pMから5 pMまで減じながらPCB製剤に対する標準曲線を作成したところ、(B) 標準曲線のIC50値は一定値に近付いた。

5-3-3 PCB異性体に対する反応性

優れた抗 PCB モノクローナル抗体である RU6F9 について、単体の PCB 異性体に対する親和性を評価した。ここでは、全 209 種の異性体から PCB 製剤の主成分⁸⁸であり、環境分析において一般的に測定される 7 種類の PCB (IUPAC number : 28、52、101、118、138、153、および 180)⁸⁹を含む 26 種の PCB を抽出し、蛍光検出型フロー式イムノアッセイを利用して抗体との親和性を測定した。各異性体と抗体の反応性は、KCmix と抗体の反応性を基準とし、交差反応性 CR (%) として評価した。交差反応性 CR は下式で算出できる。

$$\text{CR (\%)} = \frac{K_d(\text{each PCB})}{K_d(\text{KCmix})} \times 100 \quad \dots \quad (13)$$

各 PCB の抗体との反応性は 0.12–1273 % と大きな範囲の値を示し、特に 6 種類の PCB で高い親和性を示した (IUPAC number : 101、153、170、180、187、および 203) (表 5.3)。このような異性体による親和性の差異は、他の PCB 抗体においても同様に確認されており、抗体の結合部位の構造と PCB が有するビフェニル構造由来の分子構造の多様性が原因と考えられた。RU6F9 が分析用途であることを鑑みると、異性体による親和性の差異が大きいことは望ましいことではない。一方で、本論文において対象とする廃棄物に含まれる PCB は、燃焼由来⁸⁸と農薬由来を除けば工業的に生産された PCB 製剤であり、凡そ一定の組成を有すること、また PCB 化合物の環境中での難分解性から、一定精度の分析が可能であると考えた。

表 5.3 抗PCB抗体 (RU6F9) の主要異性体に対する反応性

IUPAC number	IC50 (μg/L)	CR (%)	IUPAC number	IC50 (μg/L)	CR (%)
5	409	0.15	110	120	0.50
8	489	0.12	118	101	0.60
18	1.61	37.4	138	0.854	70.5
20	251	0.24	149	2036	0.03
28	223	0.27	153	0.286	210
31	184	0.33	170	0.537	112
33	106	0.57	174	2.49	24.2
44	1.00	60.2	180	0.174	346
52	0.482	125	187	0.0473	1273
66	86.1	0.70	194	1.04	57.99
70	51.9	1.16	196	3.27	18.38
95	1.32	45.6	199	29.9	2.01
101	0.233	258	203	0.325	185.13

5-3-4 電極修飾過程の評価

電極修飾の各過程における、電極の電荷移動抵抗値 R_{ct} を表 5.4 に示した。電極表面への DTSP による自己組織化単分子膜 (SAM) の形成、抗体の固定とブロッキングの過程において、電極表面が被覆されていることが定性的に示された。また、SAM による電極被覆を定量化する手法として、処理前後における R_{ct} 値の比較があり、SAM による電極の被覆率 θ (%) は下式から

$$\theta (\%) = \left(1 - \frac{R_{ct}^*}{R_{ct}} \right) \times 100 \quad \dots \quad (14)$$

と表わされる。ここで、 R_{ct}^* は真空紫外光による処理直後の電荷移動抵抗であり、 R_{ct} は SAM 形成後、抗体固定化後の電荷移動抵抗の値であり、真空紫外光の照射直後に測定した電極の R_{ct} 値は 2.6 kohm、DTSP による SAM の形成後の R_{ct} 値は 49.9 kohm であることから電極の被覆率は 94.8 % であることが明らかとなり、良好に被覆されていることが示された。

また、電極表面への抗体の固定を確認するために、抗 PCB 電極と FITC 標識抗マウス IgG 抗体を反応させ、蛍光顕微鏡による観察を行った。その結果、チオール化合物である DTSP を介して電極上に抗 PCB 抗体が選択的に結合する様子が観察できた (図 5.12)。

表 5.4 電極修飾ステップにおける電荷移動抵抗値

電極の修飾状態	電荷移動抵抗値 R_{ct} (kohms)
Au (未修飾、 R_{ct}^*)	2.6
Au / DTSP	49.9
Au / DTSP / Mab / MEA	84.6

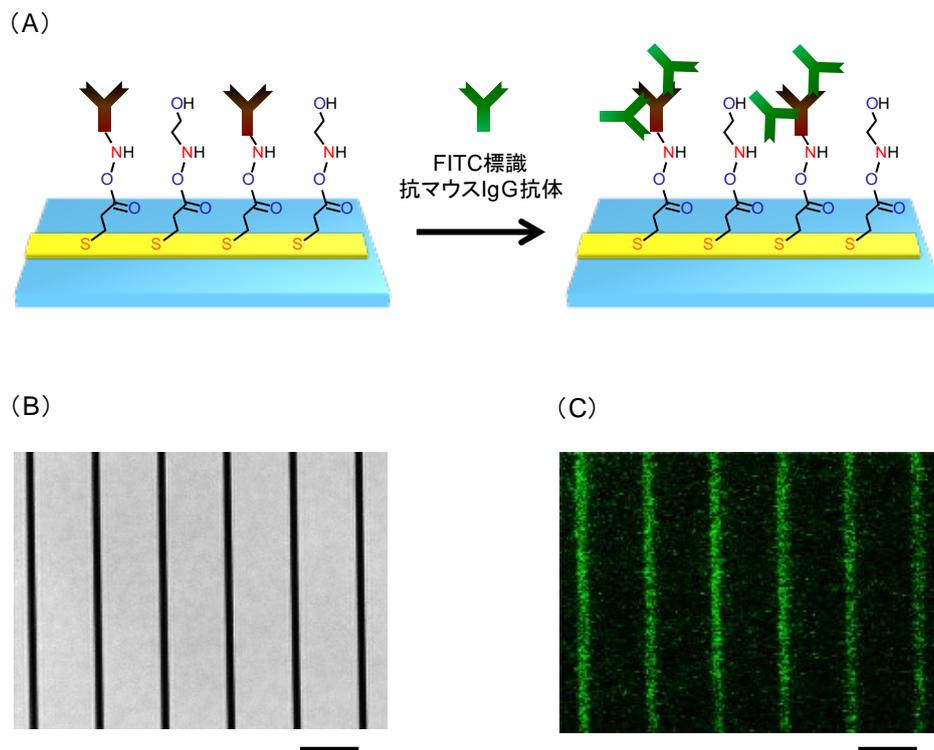


図5.12 水溶液中PCBに対する電荷移動抵抗値変化の時間依存性

各濃度のPCBに対する電極の電荷移動抵抗値変化は反応時間に依存し、30分以上の反応により電荷移動抵抗値の変化量は一定に達した。写真のスケールバーは10 μm を示す。

5-3-5 水溶液中PCBの検出と反応時間

抗体を固定化した抗 PCB 電極の水溶液中 PCB に対する反応性を確認するために、電極と DMSO 濃度 1% となるようにリン酸緩衝液で希釈した PCB 標準物質 (KCmix; 0、0.1、10 $\mu\text{g/L}$) を反応させ、EIS 測定により電極の電荷移動抵抗 R_{ct} の変化 ΔR_{ct} を評価した (図 5.13)。その結果、PCB を含まない溶液との反応後には、 R_{ct} 値は大きな変化がなかったのに対し、PCB を含む溶液との反応後には、溶液中の PCB 濃度に応じて R_{ct} 値が増加することが明らかとなった。また、いずれの PCB 濃度の場合も、約 30 分の抗原抗体反応により、電極表面の変化は飽和することが示された。

以上より、抗 PCB モノクローナル抗体を固定化した抗体固定化電極は、溶液中 PCB に対して特異的かつ濃度依存的な反応を示し、電荷移動抵抗 R_{ct} をシグナルとした場合、30 分で反応が飽和することが示された。

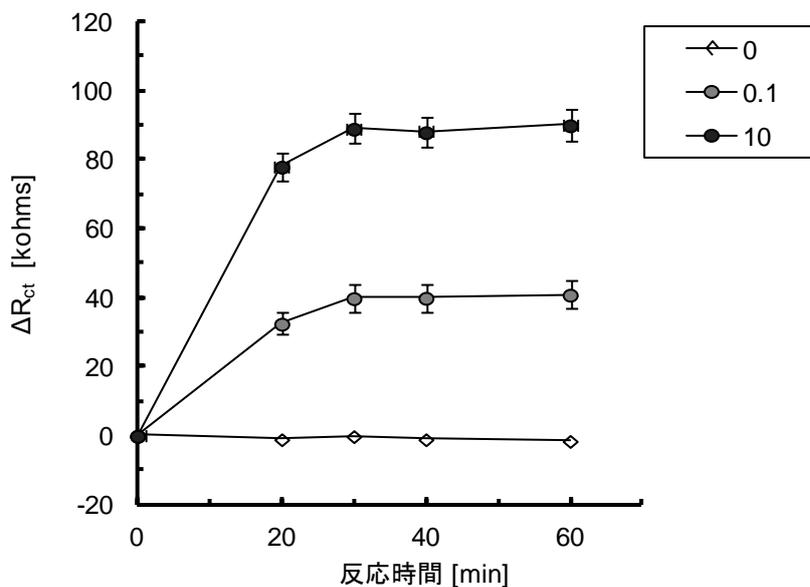


図5.13 水溶液中PCBに対する電荷移動抵抗値変化の時間依存性

各濃度のPCBに対する電極の電荷移動抵抗値変化は反応時間に依存し、30分以上の反応により電荷移動抵抗値の変化量は一定に達した。凡例は水溶液中のPCB濃度(単位： $\mu\text{g/L}$)を示す。各測定は3回繰返し行い、平均値と標準偏差を算出した。

5-3-6 水溶液中PCBに対する標準曲線

抗PCB電極とPCB標準物質(KCmix、0、0.001、0.01、0.1、1、10、100、1000 μg/L)を含むリン酸緩衝液(PBS)を順に反応させ、各溶液との反応後にEIS測定を行った。得られたインピーダンススペクトルを図5.14に示した。電荷移動抵抗 R_{ct} を示すスペクトルの半円は、PCB濃度に依存して増大することが示された。PCBを含まない緩衝液との反応後の R_{ct} 値をブランクとし、各PCB濃度における R_{ct} 値の変化率を求めると、溶液中のPCB濃度に対してシグモイド型の応答を示した(図5.15)。標準曲線は下に示す4変数ロジスティック関数によりフィッティングを行った。

$$\frac{R(\%)}{100} = \frac{A_1 - A_2}{1 + (C_{PCB}/x_0)^p} + A_2 \quad \dots (15)$$

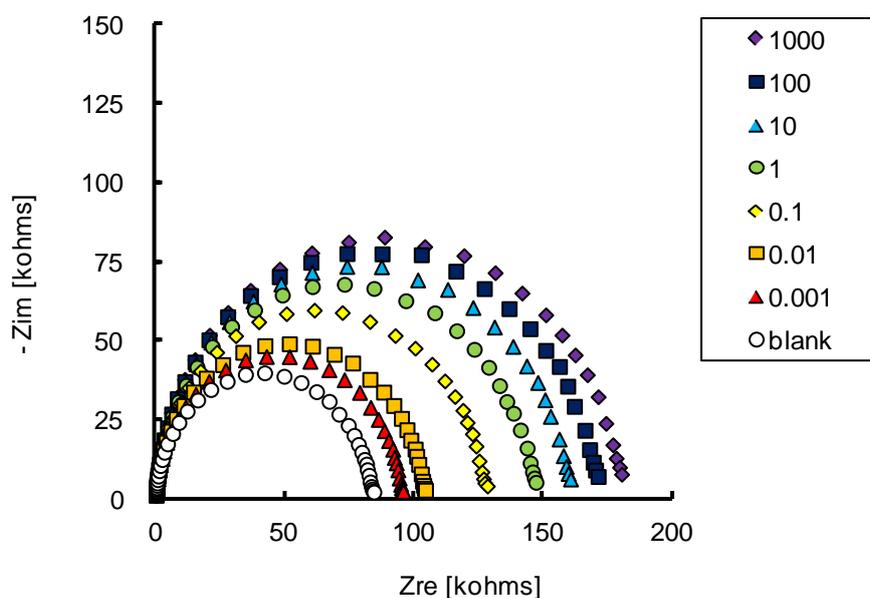


図5.14 水溶液中PCBに対するEISスペクトル変化

各濃度のPCBを含む水溶液と30分間反応させた電極についてEIS測定を行い、測定結果のEISスペクトルをナイキストプロットとして表示した。凡例は水溶液中のPCB濃度(単位: μg/L)を示す。

ここで、 R (%) は電荷移動抵抗値の変化率であり、 A_1 、 A_2 、 x_0 、および p は曲線の形状に応じた変数となる。ここで、ブランクを示す A_1 を 0 とし、最小二乗法による変数の最適化を行うと、 A_2 、 x_0 、および p は 119.4、0.234、および 0.391 となった。変曲点を示す x_0 は、シグモイドにおける 50 % 濃度 (EC50) であり、抗体のキャラクタライズの際に得られた RU6F9 抗体の結合解離定数 K_d (0.43 $\mu\text{g/L}$) より小さかった。EIS イムノアッセイの標準曲線と、フロー式イムノアッセイを検量線が示す測定範囲の点から比較すると、EIS イムノアッセイの方が 2 桁以上広い濃度域に対応可能であることが示された。また、検出下限はブランクにおける標準偏差から算出し、標準偏差の 3 倍に相当すると仮定した検出下限値は 0.001 $\mu\text{g/L}$ であった。この検出下限値は U.S.EPA が定める飲料水基準 (0.5 $\mu\text{g/L}$) を満たし、既報の PCB を対象としたイムノアッセイと比較して 100 倍程度低濃度であった^{84-87, 90-97}。

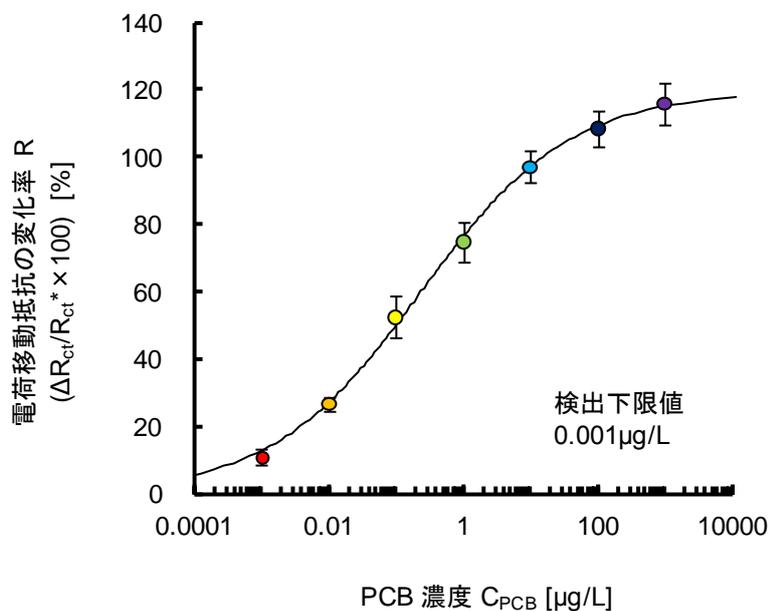


図5.15 水溶液中PCBに対する電荷移動抵抗値の変化率

各濃度のPCBを含む水溶液と反応させた電極の電荷移動抵抗値より、ブランクからの変化率を算出した結果、PCB濃度に対してシグモイド型の検量線が得られた。各測定は3回繰り返し行い、平均値と標準偏差を算出した。

5-4 まとめ

本章では、低分子を対象とした非競合イムノアッセイの構築を目指し、抗体固定化電極と電気化学インピーダンス (EIS) 法に基づく検出を利用した高感度イムノアッセイを構築した。本章における測定対象は、ポリ塩化ビフェニル (PCB) とし、はじめに PCB 製剤 (カネクロール) に対して優れた親和性を有するマウスモノクローナル抗体を作製した。作製した抗体は自己組織化単分子膜を介し、微細加工技術により作製した櫛型マイクロ金電極上に対した。抗体固定化電極は、PCB を含む緩衝液に浸漬することで抗原抗体反応が進行し、続く電気化学インピーダンス (EIS) 測定において電荷移動抵抗値の増加を示した。本法の検出下限値は約 0.001 $\mu\text{g/L}$ であり、既存の PCB を対象としたイムノアッセイと比較して約 100 倍優れた検出下限値であった。

本法は水溶液に含まれる PCB を高感度で検出可能であり、幅広い環境資料の分析への適用が期待できる。最も適用が容易な対象としては河川や海洋等の環境水、土壌や廃棄物の溶出液といった水溶液ベースの分析が考えられる。一方で、コンデンサー、トランス、OF ケーブルといった電気機器に含まれる油試料の分析についても、適切な分解処理や精製処理によって測定が可能であると考えられる。

表 5.5 各 PCB 測定法の検出下限および測定時間

	測定原理	検出下限 ($\mu\text{g/kg}$)	測定時間
公定法	HRGC/HRMS	0.000001	1日
ELISA	酵素標識抗体-発色	1.0 ^{注)}	2.5時間
EISイムノアッセイ	抗体固定化電極-EIS	0.001	45分

注) K2A抗体を用いたELISA測定結果から算出

抗体固定化マイクロ電極を用いた 電気絶縁油中PCBの定量

6-1 はじめに

変圧器などの PCB 使用履歴を有する機器類は商用期間が長いものが多く、POPs 条約の締結後の現在においても、汚染を疑われる機器が世界中で利用されている。日本国内においても、PCB の生産と利用に関しては、1973 年には規制（PCB 特別措置法）⁹⁸ が行われたが、多くの汚染機器が残されている¹¹。現在では、汚染変圧器の廃棄の際には機器の分析が義務付けられており、同様に現在使用されている機器についても汚染判定が推奨されている。

このような汚染判定のための分析技術としては、公定法として高分解能ガスクロマトグラフと高分解能質量分析計（HRGC-HRMS）による定量分析が定められており、複雑な前処理による試料のクリーンアップが必要であるものの、検出下限値として 0.0001 mg/kg までの分析が可能である⁸²。また、前処理の簡易化や、より安価な装置での分析方法として、電子捕獲型検出器、低分解能質量計を利用する PCB 分析法も実用化されている⁸¹⁻⁸³。

6-1-1 イムノアッセイによる絶縁油中の PCB 分析

イムノアッセイを利用した、電気絶縁油中の PCB 分析については、ELISA 法、イムノクロマトグラフィ、フロー式イムノアッセイ等を利用した方法が提案されている^{83-86, 89-92}。特に、金コロイド標識抗体を素子としたフロー式イムノアッセイでは、絶縁油に含まれる 0.1 mg/kg までの PCB を検出でき、機器分析に基づく定量分析を補完するス

クリーニング法として実用されている^{84,93}。しかしながら、この方法を用いた場合においても、絶縁油の PCB 含有量基準値 (0.5 mg/kg) 付近における定量性は乏しく、また、測定全体に要する時間は前処理を含めて 3 時間かかることから、より高感度かつ迅速な PCB 分析を可能とするイムノアッセイ法が求められている。

6-1-2 本章の目的

本章では、第 5 章において検出原理を構築した抗体固定化電極を利用した EIS イムノアッセイを活用し、絶縁油からの PCB 抽出には既報の分解カラムを用いた簡便な前処理法を適用することで、電気絶縁油に含まれる微量 PCB の定量法を構築した。また、実際の電気絶縁油試料への適用性を検証するために、変圧器から採取した試料を用いた分析性能の検証を行った。

6-2 実験方法

6-2-1 試薬と材料

本章で用いた試薬および材料と、入手元の一覧を示した。

- ・ GLサイエンス：PCB 製剤混合物（カネクロール 300、400、500、600）
- ・ 松村石油：電気絶縁油（Barrel Trans M）
- ・ 住化分析センター：無水硫酸ナトリウム、発煙硫酸含浸シリカゲル、アミノプロピルシリカゲル

本章の実験で用いたリン酸緩衝液（PBS、pH7.4）は実験室で作製した。組成を以下に示す。いずれの試薬も和光純薬工業から購入した。

- ・ 137 mM 塩化ナトリウム（NaCl）
- ・ 3 mM 塩化カリウム（KCl）
- ・ 20 mM リン酸 2 水素ナトリウム（ Na_2HPO_4 ）
- ・ 1.5 mM リン酸水素カリウム（ KH_2PO_4 ）

6-2-2 電気絶縁油の前処理

電気絶縁油からの測定前処理（PCB抽出）には、既報のイムノアッセイに適した前処理方法⁸⁵を用いた。本法は、簡易な絶縁油分解カラムによる夾雑物質の分解、DMSOへの分配工程、減圧蒸留によるヘキサン除去工程に分けることができる。以下に、絶縁油分解カラムの構造と、前処理の全工程を概説した。

1) 絶縁油分解カラム

図6.1に絶縁油分解カラムの概要を示した。10 mLポリプロピレン製カラムの底部に、φ16 mmのガラス繊維濾紙を配置し、続いて無水硫酸ナトリウム（0.75 g）、発煙硫酸含浸シリカゲル（2 g）、無水硫酸ナトリウム（0.75 g）、アミノプロピルシリカゲル（1.5 g）を順に積層した。

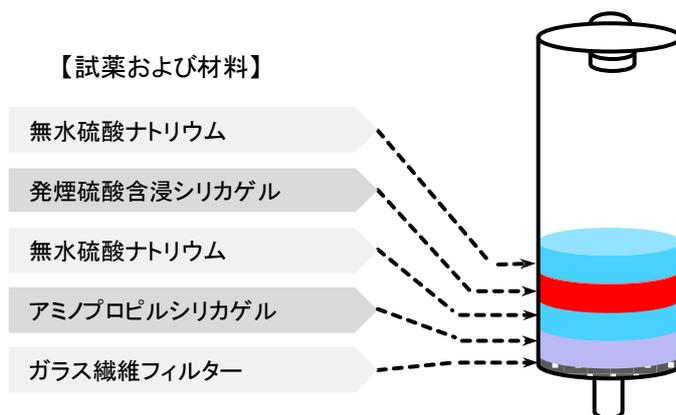


図6.1 電気絶縁油分解カラムの概要図

最下層にガラス繊維フィルターを敷き、アミノプロピルシリカゲル、無水硫酸ナトリウム、発煙硫酸含浸シリカゲル、無水硫酸ナトリウムの順で積層し、速やかに前処理に供した。

2) 前処理工程

図 6.2 に前処理工程の流れの概要を示した。絶縁油試料 295 μL をカラムの積層上面に添着し、発煙硫酸含浸ゲルと 3 分間接触させることで、絶縁油中の直鎖炭化水素、PCB 以外の芳香族化合物を分解した。次に、ヘキサン 150 μL をカラムに加えて 1 分静置し、絶縁油が十分に発煙硫酸含浸ゲルと反応するようにした。続いて、カラムの下部に 300 μL DMSO を入れた 50 mL ナシ型フラスコを配置し、速やかにカラムに 10 mL ヘキサンを添加することで、カラム中の分解試料を溶出した。ナシ型フラスコ内のヘキサンは、減圧したロータリーエバポレーターと 40°C のバスを用いて除去した。フラスコ内に残った DMSO と絶縁油分解物は 1.5 mL チューブに移し、遠心分離で 2 層に分離し、PCB を含む DMSO (下層) を分取して測定に用いた。

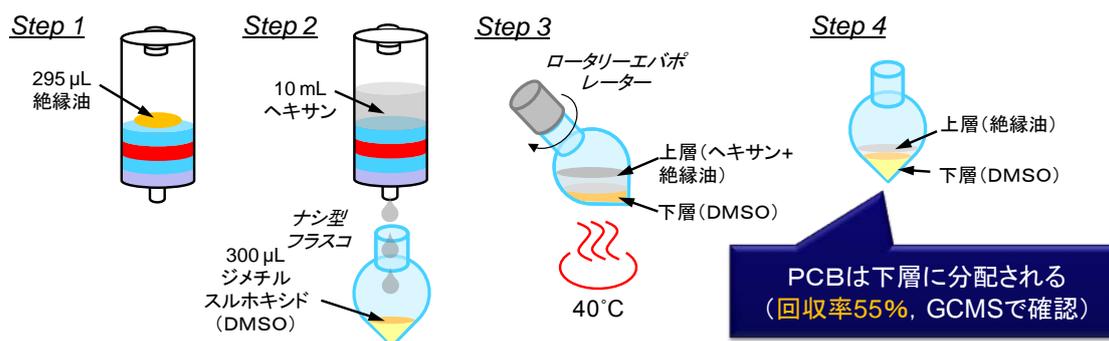


図 6.2 電気絶縁油からのPCB抽出工程

(Step1) 絶縁油試料は分解カラム内の発煙硫酸と接触することで妨害成分の分解を受け、(Step2) 続いてアミノプロピルシリカゲルとヘキサン溶媒により精製され、下部フラスコ内のDMSOと混合される。(Step3) ヘキサン、DMSO、絶縁油分解物の混合溶液からヘキサンを除き、(Step4) PCBを含む下層のDMSO層を回収した。

6-2-3 機器分析

PCB を含む模擬電気絶縁油試料の分析には、ゲル浸透クロマトグラフィ (GPC) カラムと電子捕獲型検出器付きガスクロマトグラフィ (GPC-GC-ECD) を利用し、PCB 簡易分析法マニュアル記載の簡易定量法により PCB 含有量を定量した。また、実変圧器より採取した PCB を含む実電気絶縁油試料は、高分解能ガスクロマトグラフー高分解能質量分析 (HRGC-HRMS) を利用し、公定法⁹⁹に従って PCB 含有量を定量した。

6-3 結果と考察

6-3-1 模擬電気絶縁油に含まれるPCB測定

PCB を含まない電気絶縁油（バーレルトランス M）を希釈溶媒として、PCB 製剤（KCmix）を希釈し、各濃度の標準試料（0.14、0.33、0.54、1.1、および 1.9 mg/kg-oil、GPC-ECD により PCB 濃度を規定）を調製した。各標準試料は、絶縁油分解カラムで処理した後、ヘキサン蒸発と DMSO 分配操作を行い、PCB が分配された DMSO 層をイムノアッセイに用いる測定試料とした。測定試料は、最終の DMSO 濃度が 1% となるようリン酸緩衝液（PBS）で 100 倍希釈し、EIS イムノアッセイに供した。

各元油 PCB 濃度毎の、EIS 測定において得られた電化移動抵抗値 R_{ct} (kohms)、変化量 ΔR_{ct} (kohms)、変化率 R を表 6.1 に示した。また、図 6.3 に PCB 濃度 (mg/kg-oil) と変化率 R (%) の関係をプロットした。その結果、両者には下式に示す高い相関係数を有する線形関係が確認でき、検量線の式は、

$$R(\%) = 60.33 \times \log_{10}(C_{PCB}(\text{mg/kg-oil})) + 81.31, (R^2 = 0.99) \quad \dots \quad (16)$$

であった。上記の線形を示す検量線とブランク標準偏差から算出した検出下限値は 0.052 mg/kg-oil であり、日本国内における汚染判定基準である 0.5 mg/kg-oil、および U.S. EPA が定める規制値である 50 mg/kg-oil を満足できた。

以上の結果から、約 30 分の前処理と、50 分の EIS イムノアッセイにより、電気絶縁油を対象とした微量 PCB の迅速分析が可能となった。

表6.1 PCB含有電気絶縁油のEISイムノアッセイ分析結果

PCB濃度 (mg/kg-oil)	電荷移動抵抗値 R_{ct} (kohms)	電荷移動抵抗差 ΔR_{ct} (kohms)	抵抗変化率 (%)
blank (R_{ct}^*)	107.3	-	-
0.07	119.0	11.7	10.9
0.14	142.1	34.8	32.4
0.33	158.0	50.7	47.3
0.54	181.0	73.7	68.7
1.1	197.5	90.2	84.0
1.9	212.0	104.7	97.6

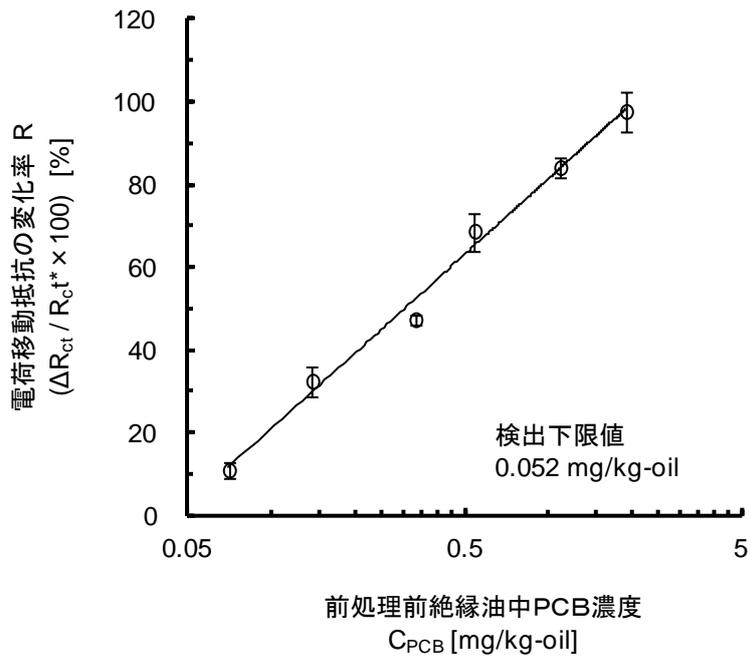


図6.3 EISイムノアッセイを利用した油中標準PCBの測定結果

標準PCBを含む絶縁油試料を前処理し、EISイムノアッセイによる測定を行った結果、基準値前後において線形の検量線が得られた。各測定は3回繰り返し行い、平均値と標準偏差を算出した。

6-3-2 実試料に含まれるPCBの定量

ここまでの検討では、PCB 標準物質として、4 種のカネクロールの等量混合物である (KCmix) を用いた。しかしながら、実際の変圧器やトランスに封入されている電気絶縁油に含まれる PCB が、どのようなカネクロールの混合比となっているか明らかでない。また、実際の使用済み絶縁油は、長期の使用により含水量が増え、また使用に伴う高電圧の課電により部材および絶縁油の酸化分解が進むことで化学的、物理的な性質が変化している¹⁰⁰。このような分析試料中の PCB 組成の不確定性と、電気絶縁油のマトリクス変化が分析に与える影響を検証する必要がある。そこで、実際の変圧器から採取した 33 種類の電気絶縁油について、EIS イムノアッセイに基づく分析を行い、公定法分析と比較した。

EIS イムノアッセイを用いた分析では、前項において構築した絶縁油分解カラムによる処理を前処理として用い、標準試料を用いて作成した検量線 (図 6.3、式(16)) を用いて定量を行った。公定法 (HRGC-HRMS) による精密な定量分析の結果と、EIS イムノアッセイによる簡易な定量分析の結果を図 6.4 に示した。その結果、EIS イムノアッセイを用いた方法は、日本国内における電気絶縁油中に含まれる PCB の基準値である、0.5 mg/kg-oil 付近の試料を対象とした PCB 定量分析において、公定法と高い相関性を示すことが示された。両手法により得られたプロットの相関係数は $R^2 = 0.95$ であり、傾きは 1.08 (理想的には 1.00) であった。

6-3-3 分析精度の評価

実試料 (33 種) の分析結果を表 2 に示した。全ての測定において、公定法による分析との偏差は 30 % 以内であった。PCB 分析の基準化が進んでいる欧州では、食品に含まれる PCB の分析手法における定量分析とスクリーニング分析の測定規格 (European commission regulation for PCB analysis in foodstuffs) として、真値 (精密分析による定量値) からの誤差が、定量分析法では 15 % 以内、スクリーニング分析法では 30 % 以内であることを要件としている¹⁰¹。また、日本国内における PCB を含む絶縁油の簡易測定マニュアルは、同規定を参考としており、30% 以内の誤差をスクリーニング法の要件と定めている。本章で構築した電気絶縁油を対象とした EIS イムノアッセイは、真値から

30%以内の誤差内での分析に成功しており、定量法としては精度の向上が必要であるものの、高感度なスクリーニング法としての有効性が示唆された。

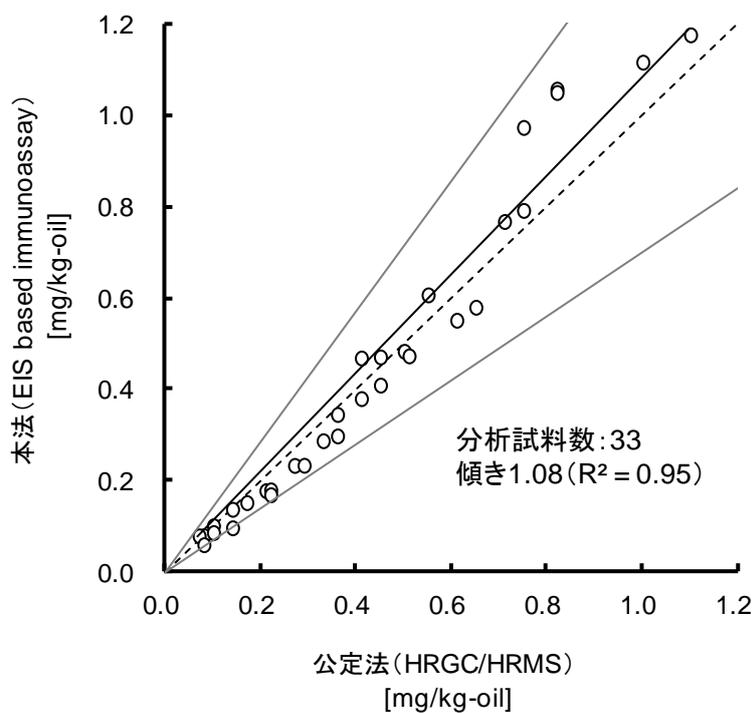


図6.4 EISイムノアッセイに基づくPCB分析法と公定法の比較

絶縁油分解カラムを用いた前処理に続いて、EISイムノアッセイを行うことで得られた電気絶縁油中PCBの定量値を公定法と比較した結果、両手法の定量値は良好な相関 ($R^2 = 0.95$) を示した。

6-4 まとめ

本章では、第5章で構築した PCB を対象とした EIS イムノアッセイを応用し、簡易な前処理を組み合わせることで、電気絶縁油中 PCB 分析法を構築した。その結果、既報の発煙硫酸カラムに基づく簡易な前処理と、抗体固定化電極を用いた EIS イムノアッセイにより、模擬 PCB 含有絶縁油に含まれる PCB を 90 分以内に測定することができ、検出感度は 0.052 mg/kg-oil であり、国内の基準値 (0.5 mg/kg-oil) を満足した。また、実際の変圧器から採取した絶縁油試料を対象とした分析においても、基準値付近の PCB 濃度において、公定法分析と高い相関性を示し、スクリーニング法として十分な分析精度を確認できた。

表 6.2 EIS イムノアッセイと他のイムノアッセイとの比較

	前処理法	測定原理／分析時間	検出下限 (mg/kg)	所要時間
HRGC/HRMS (公定法)	公定法前処理 所要時間:1日	HRGC/HRMS 所要時間:1日	0.00001	1日
ELISA	発煙硫酸カラム 所要時間:30分	酵素標識抗体-発色 所要時間:4時間	0.1 ^{注1)}	4.5時間
EIS イムノアッセイ		抗体固定化電極-EIS 所要時間:1.5時間	0.05	2時間

結論と今後の展望

7-1 はじめに

21世紀以降の地球人は、蓄積された負の遺産である破壊された環境を修復しながら新たな社会構造を育むという、これまでの経済重視の視点では解決しえない重い課題を背負っている。その中で我々が持つべき環境保全に関する正しい理解と問題意識は、身近な生活単位である個人・世帯から、自治体、国、そして世界へとボトムアップな積上げを続けていく必要がある。その前提となる地球環境に関する正確な情報を提供するのが、他ならぬ環境分析技術であるといえる。しかし、地球上の何処にどのような物質が分布し、いかなる時間軸で移行と影響が進むのか、そして物質毎の物質循環の特性や生物への影響、我々が把握し、理解すべき情報はあまりに多岐に及ぶ。そのような背景から、安価で優れた分析性能を有するイムノアッセイは、今後進められるべき有害化学物質のマッピングと汚染状況への対応において、その簡便さと幅広い分析対象への応用性から、主たる分析技術となると考えられる。本論文では、環境分析への応用を進める上で特に重要となる、低分子化学物質を対象としたイムノアッセイについて、従来の測定技術からの高度化を図った。

7-2 各章の要約

第1章

環境中には、生体濃縮性や生体毒性を有する、人為的に生産された低分子化学物質が数多く存在し、化学形態の変化や食物連鎖による濃縮・大気海洋における拡散を経て、

地球規模の汚染として拡大を続けている。その現状をモニタリングし、汚染状況を把握することは、深刻な環境破壊と健康被害を回避する有効な手段の一つである。一方で、簡便な環境分析技術として期待されるイムノアッセイは、低分子の測定において抗体が有する性能を完全に活用できていない。そこで、低分子イムノアッセイにおける測定感度向上のため、(1) 競合法イムノアッセイにおける未反応抗体の分離工程の効率化と、(2) 非競合法による低分子測定、2 通りの方針でイムノアッセイの高度化を図ることとした。

第 2 章

低分子を対象とした競合イムノアッセイでは、抗原抗体反応溶液から未反応抗体を分離する際に固相 - 液相間の相互作用により理想的な感度での測定が困難となる。そこで、未反応抗体を流れ系で効率良く分離する反応場を、微細加工技術を利用したマイクロ流路内に作製した。ポリジメチルシロキサン樹脂を材料としたマイクロ流路内には、抗体を捕捉するための微粒子を安定して保持できる構造を作製した。実験モデルとして、金コロイド標識した抗カドミウム EDTA 抗体と、カドミウム EDTA を固相化した抗体捕捉粒子を用いた場合、流路内に保持された粒子上に金コロイドに由来する赤色が蓄積することが確認でき、試作した透過光検出装置を用いることで着色度を吸光度として定量することができた。以上の原理に基づいて、競合法に基づくカドミウム測定を行ったところ検出下限値は $3.4 \mu\text{g/L}$ であり、酵素免疫測定法 (ELISA 法) の約 2 倍高い感度での測定を 10 分で行うことが可能であった。測定感度の向上と、測定に要する時間の短縮は、マイクロ流路を利用した抗体分離が効率的であることを示唆しており、さらなる測定感度の向上と測定対象の拡大が期待できる。

第 3 章

マイクロ流路を利用した抗体捕捉技術を用い、重金属を対象としたイムノアッセイの高感度化を図った。大村らによる結合平衡除外理論では、低分子の競合イムノアッセイにおいて、固相 - 液相間の競合反応を除外した上で、抗体濃度を十分に低減すると、抗体の結合親和性を最大限に活用した理想的な測定が可能とされている (結合解離定数 = IC_{50})。そこで、カドミウム、クロム、鉛、および水銀と特異的に結合する各抗体を金コロイド標識し、対応する抗体捕捉粒子を用い、マイクロ流路を用いた競合イムノアッセイの測定条件を検討した。抗体濃度と送液量は、溶液中の未反応抗体の捕捉量と関

連することから、抗体濃度、送液量と吸光度の間には線形関係が望ましく、送液速度は重金属抗原がある場合の相対吸光度が一定に近づく条件が望ましい。以上を満たす測定条件を見出し、各重金属について測定を行った結果、カドミウム、クロム、鉛について、理想的な感度での重金属測定が可能であった。一方、水銀測定については、金コロイド標識した抗水銀 EDTA 抗体は水銀と抗体の結合を阻害する血清成分を含むため、想定した感度得られなかった。そこで、未標識の抗水銀 EDTA 抗体と、金コロイド標識抗 IgG 抗体の 2 種類の抗体を利用した 2 段階の送液により測定を検討したところ、水銀についても他金属と同様に理想的な感度での測定が可能となった。以上から、本章において測定法を構築した 4 種類の重金属を対象としたマイクロイムノアッセイは、理想的な測定感度による測定が可能であった。

第 4 章

イムノアッセイに基づく簡易な水銀分析法を構築するために、種々の共存金属を含む環境試料の分析に対応した固相抽出法を検討した。固相抽出には強塩基性イオン交換樹脂を固相とする固相抽出カラムを用い、樹脂量、試料溶液の塩酸濃度、溶離液の組成等の抽出条件を詳細に検討した結果、試料溶液中の水銀を全量回収でき、かつ共存金属のほぼ全てを除外できる抽出条件を見出した。測定を妨害する恐れのある、10 種類の共存金属を含む模擬水試料に水銀を添加し、固相抽出と水銀マイクロイムノアッセイを用いて試料を分析した。その結果、本法の検出下限値は $0.83 \mu\text{g/L}$ となり、国内環境基準 ($0.5 \mu\text{g/L}$) を満足しないものの、WHO 世界保健機構が定める飲料水基準 ($2 \mu\text{g/L}$) には対応可能であることが示された。以上において構築した簡易水銀分析法を用い、水道水や河川水等の水試料、火力発電所廃棄物からの溶出検液を対象とした水銀の添加回収実験を行ったところ、各試料について 100%近い回収率が確認でき、本法の優れた分析性能が示された。

第 5 章

低分子抗原であるポリ塩化ビフェニル (PCB) を対象として、原理的に未反応抗体と反応抗体の分離工程を必要としない非競合イムノアッセイを構築するために、高感度に電極表面の変化を捉えることができる電気化学インピーダンス (EIS) 測定の利用を着想した。微細加工技術により作製したマイクロ金電極に対して、自己組織化単分子膜を介して新たに作製した抗 PCB モノクローナル抗体を共有結合的に固定し、電極表面近

傍にのみ不均一かつ非競合的な抗原抗体反応場を形成した。微量の PCB 製剤を含む反応溶液に抗体固定化電極を浸漬し、続いて 10 mM フェロシアン化カリウム/フェリシアン化カリウムを含む電気化学プローブとして含む測定溶液中で電極のインピーダンス変化を評価したところ、PCB 製剤の濃度と浸漬時間に依存した電荷移動抵抗（電極表面における電気化学反応の起り難さの指標）の増加が確認できた。本法で得られた標準曲線から算出した検出下限値は 1 ng/L であり、従来の PCB 製剤を対象としたイムノアッセイと比較して約 100 倍高い感度を確認した。

第 6 章

変圧器やトランス等の重電機器に使用され、今なお廃棄時の PCB 測定が義務づけられている電気絶縁油を対象として、PCB 含有量を迅速に定量しうる方法が求められている。そこで、水溶液中の PCB 製剤を高い感度で測定可能な非競合 EIS イムノアッセイを利用し、絶縁油中の微量 PCB の分析を試みた。電気絶縁油には多くの測定妨害成分が含まれ、抗体分子を変性させる恐れがあるため、発煙硫酸含浸シリカゲルを用いた分解カラムおよび分配操作による PCB 成分の抽出法を用いた。模擬 PCB 汚染絶縁油を作製し、ジメチルスルホキシド中に抽出した PCB はリン酸緩衝液を用いて希釈し、続く EIS イムノアッセイに供した。その結果、前処理前の油中 PCB 濃度と EIS 測定で得た電荷移動抵抗値には線形関係が確認でき、検出下限値は 52 $\mu\text{g}/\text{kg-oil}$ であった。続いて、実際に使用された変圧器より採取した電気絶縁油（試料数：33 種）を試料として、構築した前処理と EIS イムノアッセイに基づく定量分析を行った。その結果、本法による定量値は高分解能ガスクロマトグラフィ - 高分解能質量分析計を用いた公定法と高い相関を示した。

7-3 結論と今後の展望

本論文では、従来の低分子化合物を対象とした競合法に基づくイムノアッセイの問題点を明確化し、マイクロ流体デバイスを利用した流れ系におけるイムノアッセイ（マイクロイムノアッセイ）、及び抗体分子を化学的に固定化したマイクロ電極を利用した電気化学測定法を利用した高感度イムノアッセイ（EIS イムノアッセイ）の原理を構築した。また、両手法において実際の環境試料を対象とした分析における実用性を示すこと

に成功した。今後は、光学測定装置及び電気化学測定装置の小型化と簡易化を進めることで、より実用性に優れた簡易分析として実用化を進める。特に、マイクロイムノアッセイについては、これまで多様されてきたイムノクロマトグラフィと比較して高感度な測定が可能であることから、食品の安全、健康の維持といった身近な分析用途への原理の応用が期待できる。また、安価な分析としての技術開発を進めることで、海外における環境管理と輸出物の安全管理への展開が期待できる。一方、EIS イムノアッセイについては、従来の光学検出に基づくイムノアッセイとは異なり、低濃度域における測定感度に優れ、機器分析に匹敵する検出下限を有することから、定量分析を想定した高感度イムノアッセイの測定原理として期待できる。

今後は、本論文に係る研究において蓄積された技術的な課題を着実に解決するとともに、イムノアッセイが有する種々の環境問題の解決への貢献を意識し、研究のアウトプットの最大化に努めたい。

謝辞

本論文の作成にあたり、論文構成から審査に至るまで、様々な面でご指導頂きましたバイオエコマネジメント学講座の 渡部良朋 客員教授、松本伯夫 客員准教授（ともに、電力中央研究所）に心より感謝を申し上げます。

本論文の審査にあたり、副審査員として貴重なお時間を頂き、様々な御助言を頂きました東北大学環境科学研究科の 末永智一 教授、壹岐伸彦 教授に深く感謝申し上げます。

大学院時代からご指導頂き、社会人となった後も論文の書き方をご指導頂きました東北大学環境科学研究科の 珠玖仁 准教授に心より感謝を申し上げます。

電力中央研究所における研究活動のスタート以来、研究方針、報告書・論文執筆の際のアドバイスなど、あらゆる局面で多大なご指導を頂いております、電力中央研究所の 大村直也 副研究参事員に心より感謝を申し上げます。

本論文に関連する研究全般におきまして、実験の進め方や投稿論文へのアドバイス等、多くの御協力を頂きました電力中央研究所の 青田新 主任研究員、柴田科学株式会社 寺門信吾 氏に心より感謝を申し上げます。

論文検索や装置予約の代理など、様々な仕事を引き受けて頂いた、東北大学環境科学研究科博士課程後期3年の 高野真一朗 氏に心より感謝を申し上げます。

論文投稿の際、追加実験データの取得に御協力頂きました、電力中央研究所 亘理龍 研究員に心より感謝を申し上げます。

最後に、尊敬する母、愛する妻と娘、今は亡き大好きな祖父母に心より感謝を記し、謝辞とさせていただきます。

本論文を構成する論文

- Label-free Impedimetric Immunoassay for Trace Level of Polychlorinated Biphenyls in Insulating Oil, Yasumoto Date, Arata Aota, Kazuhiro Sasaki, Yukie Namiki, Norio Matsumoto, Yoshitomo Watanabe, Naoya Ohmura, Tomokazu Matsue, *Analytical Chemistry*, 86(6), 2989-2996 (2014).
- Microfluidic Heavy Metal Immunoassay Based on Absorbance Measurement, Yasumoto Date, Shingo Terakado, Kazuhiro Sasaki, Arata Aota, Norio Matsumoto, Hitoshi Shiku, Kosuke Ino, Yoshitomo Watanabe, Tomokazu Matsue, Naoya Ohmura, *Biosensors and Bioelectronics*, 33(1), 106-112 (2012).
- Trace-Level Mercury Ion (Hg²⁺) Analysis in Aqueous Sample Based on Solid-Phase Extraction Followed by Microfluidic Immunoassay, Yasumoto Date, Arata Aota, Shingo Terakado, Kazuhiro Sasaki, Norio Matsumoto, Yoshitomo Watanabe, Tomokazu Matsue, Naoya Ohmura, *Analytical Chemistry*, 85(1), 434-440 (2013).

【参考文献】

- (1) EDMC/エネルギー・経済統計要覧 2014 年版. 日本エネルギー経済研究所計量分析ユニット 2014.
- (2) Jarup, L. *Br Med Bull* 2003, 68, 167-82.
- (3) Nadal, M.; Schuhmacher, M.; Domingo, J.L. *Sci Total Environ* 2004, 321, 59-69, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2003.08.029 S0048-9697(03)00502-3 [pii].
- (4) Rowbotham, A.L.; Levy, L.S.; Shuker, L.K. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2000, 3, 145-78, DOI: 10.1080/10937400050045255.
- (5) *RoHS Directive 2002/95/EC*. European Commission: 2011.
- (6) *Basel Convention on the Control of Transboundary Movements of Hazardous Wastes and their Disposal*. United Nations Environment Programme: 1992.
- (7) *STOCKHOLM CONVENTION ON PERSISTENT ORGANIC POLLUTANTS (POPs)*. United Nations Environment Programme: 2004.
- (8) 渡邊泉, 重金属のはなし - 鉄、水銀、レアメタル. 中央公論新社: 2012.
- (9) *Minamata Convention on Mercury*. United Nations Environment Programme: 2013.
- (10) *Agricultural chemicals prescribed in paragraph*. Japan Ministry of the Environment, Government of Japan: 2003.
- (11) *State of PCB Waste in Storage under th PCB Special Measures Law*. Japan Ministry of the Environment, Government of Japan: 2003.
- (12) Ng, A.H.C.; Uddayasankar, U.; Wheeler, A.R. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2010, 397, 991-1007.
- (13) Lin, C.C.; Wang, J.H.; Wu, H.W.; Lee, G.B. *JALA - Journal of the Association for Laboratory Automation* 2010, 15, 253-274.
- (14) DeMello, A.J. *Nature* 2006, 442, 394-402.
- (15) Jakeway, S.C.; De Mello, A.J.; Russell, E.L. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 2000, 366, 525-539.
- (16) Kikutani, Y.; Hisamoto, H.; Tokeshi, M.; Kitamori, T. *Lab on a Chip - Miniaturisation for Chemistry and Biology* 2004, 4, 328-332.
- (17) Marle, L.; Greenway, G.M. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 2005, 24, 795-802.
- (18) Ohno, K.I.; Tachikawa, K.; Manz, A. *Electrophoresis* 2008, 29, 4443-4453.

- (19) Murakami, Y.; Endo, T.; Yamamura, S.; Nagatani, N.; Takamura, Y.; Tamiya, E. *Anal. Biochem.* **2004**, *334*, 111-116.
- (20) Gervais, L.; Delamarche, E. *Lab on a Chip - Miniaturisation for Chemistry and Biology* **2009**, *9*, 3330-3337.
- (21) Kanda, V.; Kariuki, J.K.; Harrison, D.J.; McDermott, M.T. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 7257-7262.
- (22) Lee, K.H.; Su, Y.D.; Chen, S.J.; Tseng, F.G.; Lee, G.B. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *23*, 466-472.
- (23) Sato, K.; Yamanaka, M.; Hagino, T.; Tokeshi, M.; Kimura, H.; Kitamori, T. *Lab on a Chip - Miniaturisation for Chemistry and Biology* **2004**, *4*, 570-575.
- (24) Ihara, M.; Yoshikawa, A.; Wu, Y.; Takahashi, H.; Mawatari, K.; Shimura, K.; Sato, K.; Kitamori, T.; Ueda, H. *Lab on a Chip - Miniaturisation for Chemistry and Biology* **2010**, *10*, 92-100.
- (25) Yoo, S.J.; Choi, Y.B.; Ju, J.I.; Tae, G.S.; Kim, H.H.; Lee, S.H. *Analyst* **2009**, *134*, 2462-2467.
- (26) Wang, J.; Ibáñez, A.; Chatrathi, M.P.; Escarpa, A. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5323-5327.
- (27) Chen, W.; Li, T.; He, S.; Liu, D.; Wang, Z.; Zhang, W.; Jiang, X. *Science China Chemistry* **2011**, *54*, 1227-1232.
- (28) Luo, C.; Fu, Q.; Li, H.; Xu, L.; Sun, M.; Ouyang, Q.; Chen, Y.; Ji, H. *Lab on a Chip - Miniaturisation for Chemistry and Biology* **2005**, *5*, 726-729.
- (29) Chin, C.D.; Laksanasopin, T.; Cheung, Y.K.; Steinmiller, D.; Linder, V.; Parsa, H.; Wang, J.; Moore, H.; Rouse, R.; Umvilighozo, G.; Karita, E.; Mwambarangwe, L.; Braunstein, S.L.; Van De Wijgert, J.; Sahabo, R.; Justman, J.E.; El-Sadr, W.; Sia, S.K. *Nature Medicine* **2011**, *17*, 1015-1019.
- (30) Sasaki, K.; Tawarada, K.; Okuyama, A.; Kayama, F.; Abe, K.; Okuhata, H.; Maruyama, Y.; Arakane, T.; Miyasaka, H.; Fujikawa, T.; Ohmura, N. *Bunseki Kagaku* **2007**, *56*, 29-36.
- (31) Sasaki, K.; Tawarada, K.; Ohmura, N. *CRIEPI Report (in Japan)* **2009**, *Rep.No. V08007*.
- (32) Duffy, D.C.; McDonald, J.C.; Schueller, O.J.A.; Whitesides, G.M. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4974-4984.
- (33) Ohmura, N.; Lackie, S.J.; Saiki, H. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 3392-3399.
- (34) Li, X.; Coles, B.J.; Ramsey, M.H.; Thornton, I. *Chem. Geol.* **1995**, *124*, 109-123, DOI: 10.1016/0009-2541(95)00029-1.

- (35) Saleh, M.A.; Wilson, B.L. *Ecotoxicol Environ Saf* **1999**, *44*, 113-7, DOI: 10.1006/eesa.1999.1807
S0147-6513(99)91807-9 [pii].
- (36) Duran, C.; Gundogdu, A.; Bulut, V.N.; Soylak, M.; Elci, L.; Senturk, H.B.; Tufekci, M. *J Hazard Mater* **2007**, *146*, 347-55, DOI: S0304-3894(06)01487-7 [pii]
10.1016/j.jhazmat.2006.12.029.
- (37) Chakrabarti, P.; Hatcher, F.M.; Blake, R.C., 2nd; Ladd, P.A.; Blake, D.A. *Anal Biochem* **1994**, *217*, 70-5, DOI: S0003-2697(84)71084-0 [pii]
10.1006/abio.1994.1084.
- (38) Blake, D.A.; Chakrabarti, P.; Khosraviani, M.; Hatcher, F.M.; Westhoff, C.M.; Goebel, P.; Wylie, D.E.; Blake, R.C., 2nd. *J Biol Chem* **1996**, *271*, 27677-85.
- (39) Blake, D.A.; Blake Ii, R.C.; Khosraviani, M.; Pavlov, A.R. *Anal. Chim. Acta* **1998**, *376*, 13-19, DOI: 10.1016/s0003-2670(98)00437-1.
- (40) Sasaki, K.; Oguma, S.; Namiki, Y.; Ohmura, N. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 4005-4009.
- (41) Blake, D.A.; Jones, R.M.; Blake, R.C., 2nd; Pavlov, A.R.; Darwish, I.A.; Yu, H. *Biosens Bioelectron* **2001**, *16*, 799-809, DOI: S0956566301002238 [pii].
- (42) Sasaki, K.; Tawarada, K.; Arakane, T.; Okuyama, A.; Maruyama, Y.; Okuhata, H.; Kayama, F.; Abe, K.; Miyasaka, H.; Fujikawa, T.; Glass, T.R.; Ohmura, N. *Bunseki Kagaku* **2008**, *57*, 105-112.
- (43) Sasaki, K.; Yongvongsoontorn, N.; Tawarada, K.; Ohnishi, Y.; Arakane, T.; Kayama, F.; Abe, K.; Oguma, S.; Ohmura, N. *J Agric Food Chem* **2009**, *57*, 4514-9, DOI: 10.1021/jf900155t.
- (44) Castoldi, A.F.; Coccini, T.; Manzo, L. *Reviews on Environmental Health* **2003**, *18*, 19-31.
- (45) Sweet, L.I.; Zelikoff, J.T. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews* **2001**, *4*, 161-205.
- (46) Clarkson, T.W.; Magos, L. *Crit. Rev. Toxicol.* **2006**, *36*, 609-662.
- (47) Gilmour, C.C.; Henry, E.A. *Environ. Pollut.* **1991**, *71*, 131-169.
- (48) Lawson, N.M.; Mason, R.P. *Biogeochemistry* **1998**, *40*, 235-247.
- (49) Mason, R.P.; Laporte, J.M.; Andres, S. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **2000**, *38*, 283-297.
- (50) Bloom, N.; Fitzgerald, W.F. *Anal. Chim. Acta* **1988**, *208*, 151-161.

- (51) Horvat, M.; Lupsina, V. *Anal. Chim. Acta* **1991**, *243*, 71-79.
- (52) Li, X.; Wang, Z. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *588*, 179-183.
- (53) Wan, C.C.; Chen, C.S.; Jiang, S.J. *J. Anal. At. Spectrom.* **1997**, *12*, 683-687.
- (54) Hollenstein, M.; Hipolito, C.; Lam, C.; Dietrich, D.; Perrin, D.M. *Angewandte Chemie - International Edition* **2008**, *47*, 4346-4350.
- (55) Liu, J.; Lu, Y. *Angewandte Chemie - International Edition* **2007**, *46*, 7587-7590.
- (56) Wang, J.; Liu, B. *Chem. Commun.* **2008**, 4759-4761.
- (57) Li, H.W.; Wang, B.; Dang, Y.Q.; Li, L.; Wu, Y. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **2010**, *148*, 49-53.
- (58) Lin, C.Y.; Yu, C.J.; Lin, Y.H.; Tseng, W.L. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 6830-6837.
- (59) Wylie, D.E.; Carlson, L.D.; Carlson, R.; Wagner, F.W.; Schuster, S.M. *Anal Biochem* **1991**, *194*, 381-7.
- (60) Zhang, Y.; Li, X.; Liu, G.; Wang, Z.; Kong, T.; Tang, J.; Zhag, P.; Yang, W.; Li, D.; Liu, L.; Xie, G.; Wang, J. *Biol Trace Elem Res* **2011**, *144*, 854-64, DOI: 10.1007/s12011-011-9031-z.
- (61) Wang, Y.; Yang, H.; Pschenitza, M.; Niessner, R.; Li, Y.; Knopp, D.; Deng, A. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2012**, *403*, 2519-2528.
- (62) Li, Z.; Wang, S.; Lee, N.A.; Allan, R.D.; Kennedy, I.R. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *503*, 171-177.
- (63) Atia, A.A.; Donia, A.M.; Elwakeel, K.Z. *React. Funct. Polym.* **2005**, *65*, 267-275.
- (64) Atia, A.A.; Donia, A.M.; Yousif, A.M. *React. Funct. Polym.* **2003**, *56*, 75-82.
- (65) De Wuilloud, J.C.A.; Wuilloud, R.G.; Olsina, R.A.; Martinez, L.D. *J. Anal. At. Spectrom.* **2002**, *17*, 389-394.
- (66) Mahmoud, M.E.; Osman, M.M.; Amer, M.E. *Anal. Chim. Acta* **2000**, *415*, 33-40.
- (67) Yamini, Y.; Alizadeh, N.; Shamsipur, M. *Anal. Chim. Acta* **1997**, *355*, 69-74.
- (68) Barton, A.C.; Davis, F.; Higson, S.P.J. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 9411-9416.
- (69) Barton, A.C.; Davis, F.; Higson, S.P.J. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 6198-6205.

- (70) Lee, J.A.; Hwang, S.; Kwak, J.; Park, S.I.; Lee, S.S.; Lee, K.C. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **2008**, *129*, 372-379.
- (71) Ramón-Azcón, J.; Valera, E.; Rodríguez, A.; Barranco, A.; Alfaro, B.; Sanchez-Baeza, F.; Marco, M.P. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *23*, 1367-1373.
- (72) Zhang, Y.; Wang, H.; Nie, J.; Shen, G.; Yu, R. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *25*, 34-40.
- (73) Arya, S.K.; Chornokur, G.; Venugopal, M.; Bhansali, S. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 2296-2301.
- (74) Dykstra, P.H.; Roy, V.; Byrd, C.; Bentley, W.E.; Ghodssi, R. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 5920-5927.
- (75) Loaiza, O.A.; Lamas-Ardisana, P.J.; Jubete, E.; Ochoteco, E.; Loinaz, I.; Cabañero, G.; García, I.; Penadés, S. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 2987-2995.
- (76) Orberg, J.; Kihlstrom, J.E. *Environ. Res.* **1973**, *6*, 176-179.
- (77) Platonow, N.S.; Reinhart, B.S. *CANAD.J.COMP.MED.* **1973**, *37*, 341-346.
- (78) Tumasonis, C.F.; Bush, B.; Baker, F.D. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **1973**, *1*, 312-324.
- (79) Nelson, J.A. *Biochem. Pharmacol.* **1974**, *23*, 447-451.
- (80) Sobek, A.; Gustafsson, Ö. *Environ. Sci. Technol.* **2004**, *38*, 2746-2751.
- (81) Gordon, R.J.; Szita, J.; Faeder, E.J. *Anal. Chem.* **1982**, *54*, 478-481.
- (82) Takasuga, T.; Senthilkumar, K.; Matsumura, T.; Shiozaki, K.; Sakai, S.I. *Chemosphere* **2006**, *62*, 469-484.
- (83) Sawatsubashi, T.; Tsukahara, C.; Baba, K.; Ohi, E.; Shinoda, A.; Miura, N. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1177*, 138-149.
- (84) Ohmura, N.; Sasaki, K.; Johe, T. *CRIEPI Report (in Japan)* **2009**, *Rep.No.V08053*.
- (85) Aota, A.; Date, Y.; Terakado, S.; Sugiyama, H.; Ohmura, N. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 7834-7840.
- (86) Aota, A.; Date, Y.; Terakado, S.; Ohmura, N. *Anal. Sci.* **2013**, *29*, 393-399.
- (87) Terakado, S.; Ohmura, N.; Park, S.U.; Lee, S.M.; Glass, T.R. *Anal. Sci.* **2013**, *29*, 963-969, DOI: doi.org/10.2116/analsci.29.963.
- (88) Kim, K.S.; Hirai, Y.; Kato, M.; Urano, K.; Masunaga, S. *Chemosphere* **2004**, *55*, 539-553.
- (89) Vilanova, R.M.; Fernández, P.; Grimalt, J.O. *Sci. Total Environ.* **2001**, *279*, 51-62.

- (90) Lambert, N.; Fan, T.S.; Pilette, J.F. *Sci. Total Environ.* **1997**, *196*, 57-61.
- (91) Kim, I.S.; Setford, S.J.; Saini, S. *Anal. Chim. Acta* **2000**, *422*, 167-177.
- (92) Glass, T.R.; Ohmura, N.; Taemi, Y.; Joh, T. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 5005-5009.
- (93) Ohmura, N.; Glass, T.R.; Sasaki, K.; Joh, T.; Taemi, Y.; Yokobori, N. *Bunseki Kagaku* **2006**, *55*, 1-7.
- (94) Přibyl, J.; Hepel, M.; Skládal, P. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2006**, *113*, 900-910.
- (95) Glass, T.R.; Ohmura, N.; Morita, K.; Sasaki, K.; Saiki, H.; Takagi, Y.; Kataoka, C.; Ando, A. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 7240-7247.
- (96) Tsutsumi, T.; Miyoshi, N.; Sasaki, K.; Maitani, T. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *617*, 177-183.
- (97) Altstein, M.; Aziz, O.B.; Skalka, N.; Bronshtein, A.; Chuang, J.C.; Van Emon, J.M. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *675*, 138-147.
- (98) *Regulations of Waste Management and Public Cleansing Law*. Ministry of the Environment, Government of Japan: **2002**.
- (99) *Notification, the ministry of health and welfare, Japan, No. 192*. The Ministry of Health and Welfare, Government of Japan: **1992**.
- (100) Saha, T.K. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation* **2003**, *10*, 903-917.
- (101) *Laying down methods of sampling and analysis for the official control of levels of dioxins and dioxin-like PCBs in certain foodstuffs* European Commission **2006**.