



重金属の簡便な測定が可能である測定用セット一式（写真はカドミウム測定用）

環境中の重金属の濃度を簡単に測定するために ——モノクローナル抗体を用いた重金属濃度測定方法の開発——

- 重金属簡易測定へのニーズの高まり
- 簡易測定実現に向けた3つの新抗体
- 様々な重金属の簡易測定実現に向けて

● ひとつと 環境科学研究所 バイオテクノロジー領域 主任研究員 佐々木 和裕

重金属簡易測定へのニーズの高まり

水俣病やイタイイタイ病など重金属が原因の健康被害は古くから知られており、環境中のカドミウム、六価クロム、鉛などの重金属には厳しい規制が設けられています。近年では重金属が生態系に及ぼす影響も問題視され、平成15年には水生生物の保全を主な目的として亜鉛の環境基準が設定されました。環境中の重金属の濃度を各基準で定める値以下に維持することは我々の健康と生態系を守る上で大変重要であり、そのためには適切に重金属の濃度を把握し、管理することが必要です。

これまで、環境中の重金属の濃度測定は主に大がかりな分析機器を用いて行われてきましたが、近年の規制の強化や国民の安全意識の高まりから、重金属の測定へのニーズは急激に増加しており、大がかりな分析機器だけでは、ニーズに十分応えられない状況となりつつあります。広大な工場跡地の汚染区画や大量に消費される作物の汚染検体を見つけ出すために、簡単で便利な測定方法が求められています。特に迅速性や優れたコストパフォーマンスも合わせ持った測定方法が必要となっています。

電力中央研究所では、そのような測定方法を実現するため、生物の抗原抗体反応に注目し、抗体が特定の重金属と反応する特性を活かして、反応の度合いから重金属を簡便に測定する方法であるバイオセンサーをこれまでに開発してきましたが、今般、バイオセンサーのさらなる活用を目指して、測定対象となる重金属を増やすための研究を行いました。

■実用化したカドミウム簡易測定

抗体は生物の体内で起きる免疫に重要な役割を果たす蛋白質です。この抗体は体外からの物質(抗原)に特異的に反応(抗原抗体反応)する性質を持っています。この抗原抗体反応を利用した測定方法は、臨床検査などの医薬分野では広く活用されていますが、重金属の測定などの食品や環境分野での利用の例は限られています。当研究所ではこれまでにカドミウムに反応する抗体の作製により、米に含まれるカドミウムを簡便に測定する方法の開発に成功し、関西電力(株)および(株)住化分析センターと共同で「カドミエール」の名称で商品化をしています(電中研ニュース444号参照)。

カドミウムにつづいて、それ以外の重金属を測定するための実用的な抗体を開発することを目的として、当研究所では、鉛、亜鉛及びクロムを測定するための抗体を作製し、その反応特性を評価しました。

■鉛測定用抗体の作製

鉛とDTPA(ジチオールホスホアミダイド)を結合させた抗原であるPb-DTPAと反応する抗体を作製しました。作製にあたっては、図1で示すような流れで、Pb-DTPAとKLH(スガシ貝ヘモシアニン、タンパク質の1種)の複合体をマウスに注射し、このマウスから抗体を生産する脾臓の細胞を採取し、自己増殖をする能力を持つミエローマ(注1)と合体させたハイブリドーマ(注2)を数万個単位で作製しました。数万個の中から、Pb-DTPAに優れた反応を示す抗体を生産する細胞を選別することにより、細胞を使った実用性の高い鉛測定用の抗体を作製することに成功しました。

鉛測定用の抗体のPb-DTPAに対する解離定数(注3)は $0.01\mu\text{M}$ であり、0.01%以上の交差反応性(注4)を示す金属は調べた範囲では存在せず、この抗体が優れた感度を持つことが分かりました。また、鉛測定用の抗体の反応特性の評価のため、鉛の濃度測定を行った結果、検出できた下限値は約0.6ppbで、10ppbという土壤環境基準に対応できることが分かりました。

(注1) 主に骨髄に生じる腫瘍細胞。

(注2) 脾臓細胞とミエローマが融合してできた自己増殖する抗体生産細胞。

(注3) 抗体の感度を示す値。単位は濃度。値が小さい程、高感度であることを示す。

(注4) 抗体が目的外の対象物に反応する割合。単位は%。

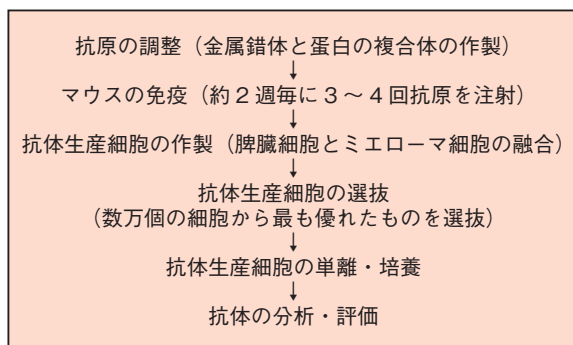


図1 重金属測定用抗体の作成手順

簡易測定実現に向けた3つの新抗体

■亜鉛測定用抗体の作製

亜鉛と DTPA を結合させた抗原である Zn-DTPA と反応する亜鉛測定用の抗体を作製しました。作製の方法は、鉛測定用の抗体とほぼ同様に行いました（図1参照）。亜鉛測定用の抗体の Zn-DTPA に対する解離定数は $0.3\mu\text{M}$ であり、銅と DTPA が結合した Cu-DTPA には約 20% の交差反応性を示したものの、それ以外の金属については 0.32% 以下でした。

亜鉛測定用の抗体と亜鉛の反応は、図2のとおり、銅によって阻害されやすいものの、硫黄が組込まれたチオール基を含む分子の抗体との共存により、銅の亜鉛測定用の抗体との反応を防ぎながら亜鉛との反応を起こせることが分かりました。この独自の方法により、試料に亜鉛と銅が含まれる場合にも銅の影響を受けずに亜鉛の濃度測定を行うことが可能となりました。

亜鉛測定用の抗体の反応特性の評価のため、亜鉛の濃度測定を行った結果、検出できた下限値は 6.5ppb であり、30ppb という水質環境基準に対応できることが分かりました。

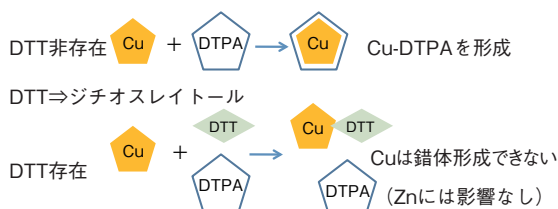


図2 亜鉛測定用抗体作製における工夫

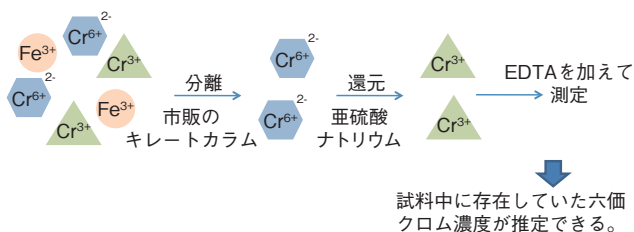


図3 六価クロム測定方法における工夫

■クロム測定用抗体の作製

クロムは環境中では主にクロム酸または二クロム酸として存在する六価クロムと、これらを還元したものである三価クロムとして存在していると考えられています。しかしながら、排水基準などでは六価クロムとしての規制となっているため、六価クロムのみを測定する必要があります。そこで、当研究所では、まず三価クロムと EDTA (エチレンジアミン四酢酸) を結合させた抗原である Cr-EDTA と反応するクロム測定用の抗体を作製しました。作製の方法は、鉛測定用の抗体とほぼ同様に行いました（図1参照）。クロム測定用の抗体の Cr-EDTA に対する解離定数は $0.6\mu\text{M}$ であり、鉄と EDTA が結合した Fe-EDTA とは約 24% の交差反応性を示したものの、それ以外の金属については 4.2% 以下でした。

このクロム測定用の抗体は三価クロムのみと反応するため、六価クロムを測定するには工夫が必要です。当研究所では試料から六価クロムを分別するカラム処理を利用しました。図3のとおり、カラム処理により、六価クロムと三価クロムを含む試料から六価クロムのみを簡便に分別できることが分かりました。また、同時に、カラム処理によりクロム測定用の抗体と三価クロムの反応を阻害する鉄も同時に除去できることが分かりました。しかし、分別した六価クロムはこのままでは抗体と反応しません。そこで、図3のとおり、抗体を亜硫酸ナトリウムと共存させることにより、六価クロムを三価クロムに還元しながら抗体と反応させることで、最終的に元々試料中に存在していた六価クロムを抗体で測定することが可能となることが分かりました。

この独自の方法を用いたクロム測定用の抗体の反応特性の評価のため、クロムの濃度測定を行った結果、検出できた下限値は 100ppb であり、500ppb という排水基準に対応できることが分かりました。

様々な重金属の簡易測定実現に向けて

■4つの重金属測定抗体への期待

今回紹介した鉛測定用、亜鉛測定用及びクロム測定用の3つの抗体は、重金属の濃度を測定するバイオセンサーに適用する抗体として実用的な特性（反応感度）を有していることが分かりました。既に実用化したカドミウム測定用の抗体と合わせ、4つの重金属に対する抗体が準備できたことになります。これらの抗体は各重金属において環境や排水の基準以下の濃度を検出できる特性があります。

特に、鉛とカドミウムについては、工場跡地などにおける土壤汚染物質として問題になっており、この分野での簡便な重金属の測定方法としての活用が期待されています。

表 今回得られた抗体の感度と関連する基準値

	各抗体の検出下限*1	環境に関わる主な基準とその基準濃度
鉛	0.6ppb	土壤環境基準*2(10ppb)
亜鉛	6.5ppb	水質環境基準*3(30ppb)
六価クロム	100ppb	排水基準*4(500ppb)

* 1 : 測定結果から求めた理論値

* 2 : 土壤溶出液中の基準値

* 3 : 水生生物の保全を目的として河川・湖沼において設定された水質環境基準

* 4 : 一律排水基準における健康項目として定められた値

■今後の課題

現時点ではまだ抗体を作製した段階ですが、今後、今回紹介した3つの抗体を活用し、環境中の鉛、亜鉛あるいはクロムの濃度を簡便に測定するためのバイオセンサーの開発を目指していきたいと考えています。

また、土壌中の重金属の濃度測定にあたっては、測定を妨害する様々な物質が存在することが考えられます。そのため、測定対象となる土壌の前処理方法を検討する必要があり、適切な土壌の前処理方法も合わせて開発していきたいと考えています。

さらには、測定の対象となる重金属を今回紹介したもの以外にも拡大することを目指して、新たな抗体を作製していきたいと考えています。

●ひとこと



環境科学研究所
バイオテクノロジー領域
主任研究員
佐々木 和裕

近年、バイオセンサーの適用範囲が広がりつつありますが、センサーの性能はそこに用いられる抗体の性質によって左右されると言っても過言ではありません。

抗体作製の面白さは、生物の機能を利用して未知の構造を持つ新しい分子を作り出すことにあると思います。

今後は、機能的に優れた抗体を迅速に作製する方法を開発し、新しい抗体を様々なバイオセンサーに応用することで世の中に役立てたいと考えています。

関連 報告書

- 「環境モニタリングを目的とした抗体の開発（5）—クロム、鉛、亜鉛に特異的に結合する抗体の作製—」
電力中央研究所報告：V08007