

ノニルフェノールに対する免疫原の構造と抗体の抗原結合能に関する一考察

松本, 清
九州大学大学院農学研究院

品原, 桂
九州大学大学院生物資源環境科学府

坂井, 隆敏
九州大学大学院生物資源環境科学府

石飛, 幸子

他

<https://doi.org/10.15017/4366>

出版情報：九州大学大学院農学研究院学芸雑誌. 60 (2), pp.213-222, 2005-10-01. 九州大学大学院農学研究院

バージョン：

権利関係：

ノニルフェノールに対する免疫原の構造と抗体の抗原結合能 に関する一考察

松本 清[†]・品原 桂*・坂井 隆敏*
石飛 幸子*・石川 洋哉

九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門食品バイオ工学講座食品分析学分野
(2005年6月28日受付, 2005年7月26日受理)

On the Relationship Between the Structure of Immunogen and Affinity of Raised Antibody for Nonylphenol

Kiyoshi MATUMOTO, Katsura SHINAHARA, Takatoshi SAKAI,
Sachiko ISHITOBI, and Hiroya ISHIKAWA

Laboratory of Food Analysis, Division of Food Biotechnology, Department of Bioscience and Biotechnology,
Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

緒 言

内分泌攪乱作用が疑われる化学物質として、1998年に環境庁は67物質をリストアップした(環境庁, 2001)。その翌年、4-nonylphenol (NP)は特に優先してリスク評価に取り組むべき4物質のひとつに指定されており(環境省, 2001)、イングランド南部では魚類の雌雄両性個体が見られた河川からNPが検出されるなど、その注目は世界的にも高まっている(環境省, 2001)。

NPはエストロゲン作用を有した化学物質であり(環境庁, 2001)、界面活性剤の原料及びプラスチック添加剤(主に酸化防止剤)として使用されるなど我々の生活に密接に関係しているため、迅速で高感度な測定が強く望まれている。現在、NPの測定には、主にガスクロマトグラフィー質量分析計(GC-MS)が用いられているが、こうした機器分析によるNPの測定には試料のろ過や抽出、クリーンアップ及び誘導体化といった煩雑な前処理を行わなければならない。また、このような機器分析による方法は、高価な機器や熟練技術者などを必要とするため、その測定には種々の制約が生じる(石川栄治, 1993)。

一方、抗原抗体反応の特異性を利用した免疫測定法は、測定対象物質に対する特異的抗体を用いることによって夾雑成分を多く含む試料中から特定物質を迅速に測定することが可能であると期待されている(石川栄治, 1993)。従って、免疫測定法は様々な夾雑成分の混在が予想される食品試料や環境試料中の特定物質を検出するのに有用な手段であると考えられる。免疫測定法では、測定対象物質に対する特異的抗体が必要となるが、一般に分子量が10,000以下の低分子化合物は単体では免役原性を持たないことが知られている(長宗秀明・寺田 弘, 1990; Pauillac *et al.*, 1998)。そこで、本研究ではNPの迅速、特異的かつ高感度な測定を目的とし、新たにNPハプテンとキャリアータンパク質との複合体を作製することによって免疫原を作製し(Pauillac *et al.*, 1998)、これを用いてNPに対する特異的抗体の獲得を試みた。なお、NPには理論上約170種もの異性体が存在し、GC-MSによる分析では22種以上のNPが検出されている(環境省, 2001)。本研究では、環境中から主に検出され、内分泌攪乱作用が比較的強いと報告されている分岐型のアルキル鎖をもったNPを測定対象物質とした。

NPの測定は間接競合 Enzyme linked immunos-

*九州大学大学院生物資源環境科学府生物機能科学専攻食品バイオ工学講座食品分析学研究室

*Laboratory of Food Analysis, Division of Food Biotechnology, Department of Bioscience and Biotechnology, Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University

[†]Corresponding author (E-mail: kmatsu@agr.kyushu-u.ac.jp)

orbent assay (ELISA)あるいは間接競合 Surface plasmon resonance (SPR)測定法によったが、測定の過程で免疫原の構造と産生された抗体及び固相化抗原の構造によって競合による阻害に差が認められた。そこで、種々の免疫原による抗体を作製すると共に、測定対象物質である NP と産生された抗体及び固相化抗原の結合性を考察した。

実験方法

1. 試薬及び材料

各抗体作製における免疫原及び固相化抗原複合体作製には、4-nonylphenol (NP, 環境分析用, 分岐型混合物, 関東化学製), ウシ血清アルブミン (BSA, ナカライテスク製), 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (EDC, シグマ製), 卵白アルブミン (OVA, シグマ製), エコノバック10 DG カラム (Bio-Rad 製), グルタルアルデヒド (GA, ナカライテスク製), 無水グルタル酸 (GAn, ナカライテスク製), 3-アミノ吉草酸 (AVA, ナカライテスク製), N-ヒドロキシコハク酸 (NHS, ナカライテスク製), 3-(*p*-ヒドロキシフェニル)-プロピオン酸 (HPPA, ナカライテスク製) 及び 6-アミノヘキサ酸 (AHA), また、薄層クロマトグラフィーには Silica Gel 60F₂₅₄ (TLC プレート, メルク製) を用いた。動物への免疫には、Freund' 完全アジュバント (ディフコ製), 三方活栓及びガラスシリンジ (テルモ製) を用いた。抗体価及び間接 ELISA 測定には、イムノプレート (96穴, No. 446612, ヌンク製), 抗マウス IgG, アルカリホスファターゼ標識抗マウス IgG (シグマ製), *p*-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム塩 (*p*-NPP, ナカライテスク製), 4-*n*-ニルフェノール (*n*-NP), 4-*tert*-オクチルフェノール (*tert*-OP, 環境分析用, 関東化学製), 4-*n*-オクチルフェノール (*n*-OP, 関東化学製) 及び 3-フェニルプロピオン酸 (PPA, ナカライテスク製) を用いた。細胞融合及び細胞培養には、RPMI1640培地 (RPMI 培地, シグマ製), 胎児ウシ血清 (FBS, シグマ製), ポリエチレングリコール1000 (シグマ製), ヒポキサンチン (ICN バイオメディカル製), チミジン (ICN バイオメディカル製) 及びアミノプテリン (シグマ製) を用いた。腹水からのマウス IgG 抗体の獲得には、2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン (プリスタン, シグマ製) を用いた。実験動物は、いずれも BALB/c マウス (6 週齢, 雌, チャールズリバー) を用いた。

2. NP ハブテンの調製

NP をニトロ化し, スズを用いて得られたニトロ化合物を還元し, 2-アミノ-4-ニルフェノールを得た (Coombes and Diggle, 1994; 日本化学会, 1997)。

3. NP-タンパク質複合体の調製

3. 1 NP-BSA 複合体の調製

2-アミノ-4-ニルフェノールをカルボジイミド法により BSA と結合させ, 免疫原となる複合体の調製を行った (石川栄治, 1993)。まず, EDC 56mg を 20mM リン酸塩緩衝液 (pH 6.0) 4 ml に溶解させ, 1 ml のメタノールに溶解した 2-アミノ-4-ニルフェノール 1 mg を添加してよく攪拌した。この混合溶液を BSA 2.6mg に加えて BSA を溶解させ, 4 °C で 20 時間インキュベートすることによって縮合させた。その後, 反応物を超純水による透析に供し, ゲルろ過し, 吸光度 (280nm) の高い画分を集め凍結乾燥することにより NP-BSA 複合体を得た。

3. 2 NP-GAn-BSA 複合体の調製

2-アミノ-4-ニルフェノール 6 mg を 500 μ l のジメチルホルムアミドに溶解し, これに無水グルタル酸 32mg を添加し, 室温で 2 時間反応させた。反応後, 反応物を TLC (ヘキサン:酢酸エチル=1:1) に供し, NP のグルタル酸誘導体を得た。得られた化合物を 100 μ l のジメチルホルムアミドに溶解し, 15mM EDC 含有 BSA 溶液 (10mg/ml H₂O) を添加した後, 室温で 20 時間反応させた。超純水を用いて反応物をゲルろ過及び透析し, 凍結乾燥することにより NP-GAn-BSA 複合体を得た (Vanwetswinkle *et al.*, 1995)。

3. 3 NP-AVA-BSA 複合体の調製

NP-AVA-BSA 複合体の調製に当たって, まず AVA-BSA 複合体の調製を行った。BSA 250mg を 5 ml の超純水に溶解し, 5-アミノ吉草酸 450mg 及び EDC 150mg を添加して室温で 4 時間攪拌した。反応物を超純水でゲルろ過, 凍結乾燥し AVA-BSA を得た。続いて, 25mg の AVA-BSA を 2.7ml の 10mM リン酸塩緩衝液 (pH 7.5) に溶解し, 2.5mg の NHS を添加して攪拌後, EDC 5.5mg 及び 2-アミノ-4-ニルフェノール 0.6mg を添加して室温で 18 時間反応を行った。超純水を用いて反応物をゲルろ過及び透析し, 凍結乾燥させることによって NP-AVA-BSA を得た (Sarma *et al.*, 1995)。

3. 4 HPPA-AHA-BSA 複合体の調製

HPPA 10mg, AHA 10mg 及び EDC 150mg を 20

mM リン酸塩緩衝液 (pH 6.0) に溶解し、室温で20時間インキュベートした後、超純水を用いて透析を行った。その後、TLC (ヘキサン：酢酸エチル=1:1) により展開し、目的物質をメタノールで抽出し乾固した。本化合物10mgを上記リン酸塩緩衝液及びEDC 70mgを用いてBSA 20mgと縮合させることによりHPPA-AHA-BSA複合体を得た(石川栄治, 1993)。

4. 競合測定用固相化抗原の調製

4. 1 NP-OVA 複合体の調製

固相化抗原として、NP-OVA複合体を3. 1のNP-BSA複合体の調製と同様の手法で調製した。

4. 2 NP-O-ヘキサン酸-OVA (NP-O-C6-OVA) の調製

固相化抗原として、NP分子内のベンゼン環に置換した水酸基の代わりに酸素原子を有し、アルキル鎖部分の分岐状態をそのままにした固相化抗原(NP-O-C6-OVA)を調製した。まず、NP 50mg及び5-ブロモヘキサン酸エチルエステル50mgをジメチルホルムアミド500 μ lに溶解し、炭酸カリウム46mgを加えて80~85 $^{\circ}$ Cで2時間反応させた。その後、反応物を酢酸エチルで抽出し、TLC(酢酸エチル：ヘキサン=1:6)により分離・精製した。続いて、得られた化合物を70%エタノール溶液200 μ lに溶解し、85%水酸化カリウム溶液13g添加した後、75~80 $^{\circ}$ Cで1時間攪拌した。さらに、反応物を酢酸エチルで抽出しハプテンを得た(西井重明ら, 2000)。このハプテン15mgをジメチルホルムアミド150 μ lに溶解し、NHS 5mg及びEDC 10mgを加えて室温で5時間攪拌した。反応物を酢酸エチルで抽出し、TLC(酢酸エチル：ヘキサン=1:5)で精製後、イミドエステル化ハプテンを得た。このイミドエステル化ハプテンとOVAを次の手順で結合させた。まず、OVA 20mgを100mM ホウ酸塩緩衝液(pH 8.0) 1mlに溶解した後、500 μ lのジメチルホルムアミドを添加し、キャリアータンパク質溶液とした。続いて、本溶液に500 μ lのジメチルホルムアミドに溶解したイミドエステル化ハプテン6mgを徐々に添加し、25 $^{\circ}$ Cで18時間攪拌した。反応後、モノエタノールアミン250 μ lを添加し、活性エステルをブロックし、超純水を用いてゲルろ過及び透析を行うことによりNP-O-C6-OVAを得た。

5. NP-タンパク質複合体の確認

5. 1 各種NP-タンパク質複合体の確認

得られた各種NP-タンパク質複合体の結合状態はUVスペクトル測定により確認した。すなわち、各NP-タンパク質複合体を超純水に溶解して1mg/mlに調製し、UVスペクトルの測定を行った。このスペクトルを、同様に1mg/mlに調製したBSA溶液のスペクトルと比較し、結合の確認及びBSA 1mol当たりのNP結合量を推定した(Branaa *et al.*, 1999)。

5. 2 HPPA-AHA-BSA 複合体の確認

トリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)法により、BSA分子上のアミノ基の減少量を測定し、BSA 1mol当たりのHPPA-AHA結合モル比を算出した(西井重明ら, 2000; Haynes *et al.*, 1967)。まず、BSA溶液及び複合体溶液それぞれ1mg/mlを調製し、各々の溶液1mlに4% NaHCO₃ (pH 8.5) 1ml及び0.1% TNBS溶液1mlを加え、40 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートした。その後、10%ドデシル硫酸ナトリウム1ml及び1M HCl 0.5mlを添加し、344nmの吸光度を測定しアミノ基の数を算出した。

6. マウスへの免疫及び抗体価の測定

各々のNP-タンパク質複合体あるいはHPPA-AHA-BSA複合体をリン酸塩緩衝化生理食塩水(PBS)に溶解し1mg/mlに調製した。これをガラスシリンジ及び三方活栓を用いて等量のアジュバントと混和させ、十分に乳化させた。これを免疫原としてマウスへの腹腔内投与を行った(長宗秀明・寺田 弘, 1990)。なお、最終免疫のみ、アジュバントと混和させていないものを用いた。免疫は、6週齢、雌のBALB/cマウスを用いて行った。免疫操作は初回免疫、追加免疫及び最終免疫と計3回行い、初回免疫及びその2週間後の追加免疫では、腹腔内に免疫原200 μ lを注射した(長宗秀明・寺田 弘, 1990)。最終免疫では初回免疫から5週間後に尾静脈に100 μ l注射した。

各回の免疫1週間後に採血を行い、NP-OVA固相化したマイクロプレートを用いてELISAにより血清中の抗体価を測定した。抗体価測定用プレートは、10 μ g/mlとなるように50mM炭酸塩緩衝液(pH 9.6)に溶解したNP-OVAを100 μ l/ウエルになるよう分注し固相化を行った。一晩後、1%ゼラチン溶液200 μ l/ウエルの添加によりプレートのブロッキングを行った。1時間後、一次抗体として得られた血清をPBSにより希釈し、50 μ l/ウエルずつプレートに分注した。1時間静置後、二次抗体としてALP標識抗マウスIgG

を PBS で1000倍希釈し、100 μ l/ウエルずつ分注した。1時間静置後、最後に1 mM Mg^{2+} 、0.1 mM Zn^{2+} 、0.1% BSA 含有50 mM 炭酸塩緩衝液 (pH 9.6) を用いて2 mg/ml に調製した *p*-NPP を100 μ l/ウエルずつ添加し、30分間反応させた後、405nm の吸光度 (SPECTRA 1, TECAN) を測定した。なお、各操作の間には PBS による洗浄を行った。

7. 抗 NP モノクローナル抗体の作製

十分な抗体価が認められたマウスへ最終免疫を行い、その3日後、常法に従って無菌的に脾臓を摘出し、脾臓細胞を分散させて脾臓細胞と、あらかじめ培養していた SP2/0 ミエローマ細胞をポリエチレングリコール法により細胞融合させた (長宗秀明・寺田 弘, 1990)。これらの細胞を HAT (ヒポキサンチン, アミノプテリン, チミジン) 選択培地中で培養し、増殖の見られた細胞の培養上澄を用いてスクリーニングを行った。スクリーニングにより選択されたウエル中の細胞から抗体産生ハイブリドーマクローンを得るため、限界希釈法によりハイブリドーマのクローニングを行った。限界希釈及びスクリーニング操作を数回繰り返すことにより選択した細胞を5 ml 培養ディッシュに移して拡大培養し、抗体産生ハイブリドーマクローンを確立した。

8. 腹水からのマウス IgG 抗体の獲得

得られた抗体産生ハイブリドーマクローンを腹水嚙誘発マウスに投与することによって抗体の大量獲得を行った。まず、細胞投与の10日前及び3日前に、一回につき500 μ l のプリスタンマウスに腹腔内投与した。次に、抗体産生ハイブリドーマクローン 10^7 cells を滅菌した PBS 0.4 ml に各々溶解させ、腹腔内投与を行った。マウス腹部に肥大が認められ、逆毛だて動きが鈍くなってきた時点 (本実験では投与後11日目) で腹水を採取した。採取した腹水を10000rpm で5分間遠心分離し、2匹のマウスから計3.3ml の腹水を得た。この腹水に無水硫酸ナトリウム5.9g を加え塩析を行った。無水硫酸ナトリウムが完全に溶けてから、30分間25°C でインキュベートした。その後、7000rpm で5分間遠心分離を行い、ペレットを30mM NaCl 含有50 mM リン酸塩緩衝液 (pH 8.0) 1~2 ml に溶解後、同一緩衝液に対して4°C で一夜透析した。透析後のサンプルを同一緩衝液で平衡化した DEAE-セルロースカラムを用いて流速0.3~0.5ml/min で分画後、波長280nm における吸光度を測定し、吸光度が高かった

画分を回収した。

9. 間接競合 ELISA 法による抗 NP-BSA 抗体の NP 及び関連化合物への結合性評価

得られた抗 NP-BSA 抗体を用いて、間接競合 ELISA 法により NP 及び関連化合物の測定を行った。まず、96ウエルマイクロタイタープレートの各ウエルに50mM 炭酸塩緩衝液 (pH 9.6) に溶解した50 μ g/ml の NP-OVA 溶液を100 μ l/ウエルとなるように分注し、一夜静置して抗原を固相化した。次に、1%ゼラチン溶液200 μ l/ウエルを添加しブロッキングを行った。続いて、あらかじめ2時間のプレインキュベートを行っておいた PBS に溶解した100 μ g/ml の抗体溶液及び20%メタノール含有 PBS に溶解した各濃度の遊離抗原溶液 (NP あるいは NP 関連化合物) の等量混合溶液100 μ l/ウエルを添加し、室温で1時間反応を行った。その後、ALP 標識抗マウス IgG 溶液を100 μ l/ウエルとなるように分注し、室温で1時間反応させた後、発色基質である *p*-NPP を100 μ l/ウエルずつ添加した。室温で30分反応を行った後405 nm における吸光度を測定した。

10. 間接競合 SPR センサーによる NP の測定

抗 HPPA-AHA-BSA 抗体産生ハイブリドーマクローン培養上清を用いて、間接競合 SPR センサーによる NP の測定を行った。SPR 装置は SpreetaTM evaluation module kit (Texas Instruments, Inc., Texas, USA) を用いた。まず、キャリアー溶液に溶解した1mg/ml の固相化抗原溶液を1時間循環させ固相化抗原を物理的に吸着させた後、1mg/ml BSA 溶液を30分間循環させブロッキングを行った。その後、遊離抗原溶液と細胞培養上清の等量混合溶液を1分間流し、遊離抗原の測定を行った。キャリアー溶液は5%メタノール含有 PBS、解離剤は10mM glycine-HCl 緩衝液 (pH 2.2)、流速は300 μ l/min とした。なお、本実験では、固相化抗原として HPPA-AHA-OVA または NP-O-C6-OVA の2種類の複合体を用いて各々の固相化抗原に対する測定を行った。

結 果

1. 各種 NP-タンパク質複合体及び HPPA-AHA-BSA 複合体の確認

UV スペクトルを測定することにより各種の NP-タンパク質複合体について、NP-誘導体の BSA への結合を確認すると共に、BSA 1mol 当たりの NP の結合

モル比を推定した。数種の濃度の NP 溶液を調製することにより、NP の280nm におけるモル吸光係数を 2.0×10^6 と見積もった。この値を用いて NP-BSA 複合体の NP 結合量を算出した結果、BSA 1mol 当たり約 1.5mol の NP の結合が推察された。同様に、NP-GAn-BSA 複合体及び NP-AVA-BSA 複合体の NP 結合量を見積もったところ、BSA 1mol 当たりそれぞれ 24mol 及び 12.4mol であった。

HPPA-AHA-BSA 複合体における BSA への HPPA-AHA 結合量を TNBS 法によりアミノ基減少量から算出した。アミノ基のモル吸光係数を 1.09×10^4 として算出すると (Haynes *et al.*, 1967), BSA 1mol 当たり 25mol の HPPA-AHA の結合が示唆された。

2. 各種 NP-タンパク質複合体による血清中抗体価の測定

ELISA 法により、NP-BSA 複合体を用いて免疫を行ったマウスの血清中抗体価を経時的に測定した。Fig. 1 に示すように、コントロールマウスと比較して免疫を行ったマウスでは追加免疫以降顕著な抗体価の上昇が認められた。このことより、免疫操作による抗 NP-BSA 抗体の産生が示唆された。

NP-GAn-BSA 複合体、NP-AVA-BSA 複合体及び HPPA-AHA-BSA 複合体を用いて免疫を行ったマウ

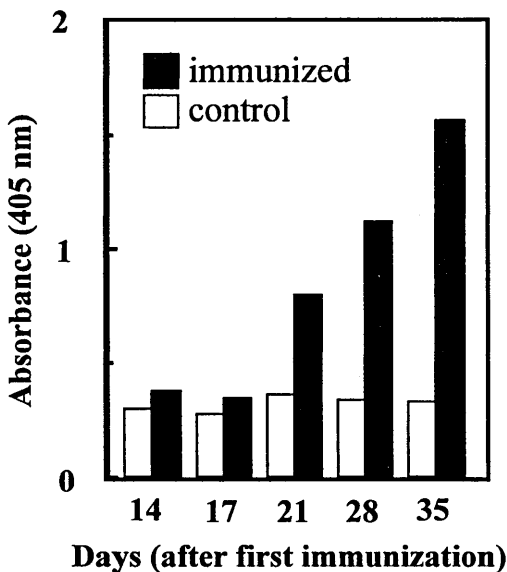


Fig. 1. Time course of anti-NP-BSA antibody titer.

スについても追加免疫以降同様な抗体価の上昇が認められた。

3. 抗 NP-BSA 抗体の遊離 NP 及び類似化合物に対する結合性

マウス腹水より得られた抗 NP-BSA 抗体を用いて、間接競合 ELISA 法により遊離 NP に対する結合性を評価した。結果は、遊離抗原を用いて得られた吸光度 B を、遊離抗原を含まないブランク溶液で得られた吸光度 B_0 で除した値として示した。遊離 NP 濃度依存的に B/ B_0 値の減少が認められたことから、本抗体は遊離 NP に対して結合性を有していることが示されたが、その結合性は弱いものであった (Fig. 2)。また、本抗体の類似化合物に対する結合性を評価するため、遊離抗原として *n*-NP、*tert*-OP 及び *n*-OP を用いて同様の測定を行った。その結果、*tert*-OP では分岐型 NP と同程度の結合性が認められたが、*n*-NP 及び *n*-OP では、抗体と化合物との結合はごく弱いものであった。このことから、本抗体は直鎖型よりも分岐型のアルキル鎖をもつ NP に対してより強い結合性を有していることが示された。

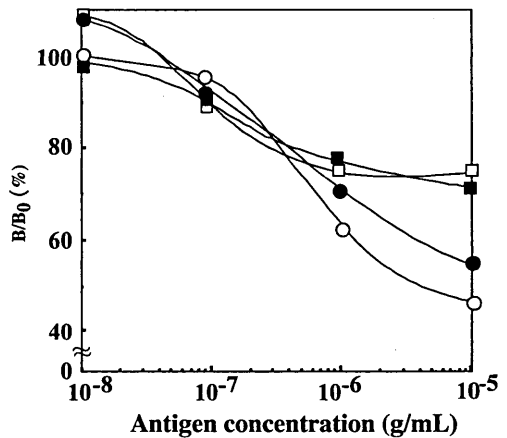


Fig. 2. Reactivity of anti-NP-BSA antibody for free alkylphenols. □ : *n*-OP ; ■ : *n*-NP ; ○ : *tert*-OP ; ● : NP (branched)

4. 抗 NP-GAn-BSA 抗体及び抗 NP-AVA-BSA 抗体の遊離 NP に対する結合性

NP-GAn-BSA 及び NP-AVA-BSA 複合体を免疫原として得られた抗 NP-GAn-BSA 及び抗 NP-AVA-BSA 抗体産生ハイブリドーマクローン培養上清を用

いて間接競合 ELISA 法により NP の測定を行った結果、遊離 NP 溶液を含む場合とブランク溶液との間で発色の差は認められず、抗体の遊離 NP に対する結合性は認められなかった。

5. 抗 HPPA-AHA-BSA 抗体の結合性

抗体の抗原認識特性を明らかにするため、抗 HPPA-AHA-BSA 抗体を用いて、間接競合 ELISA 法により HPPA 関連化合物に対する結合性を評価した。まず、炭素鎖側に関して、フェノール、HPPA、HPPA-OVA 及び HPPA-AHA の 4 種類の化合物をアナライトとして測定した。その結果、フェノール及び HPPA に対して、抗体はほとんど結合性を示さなかったが、HPPA-OVA 及び HPPA-AHA では抗体とアナライトとの結合性が認められた (Fig. 3)。続いて、ベンゼン環に置換した水酸基を除いた PPA-OVA 及び PPA-AHA をアナライトとして同様の測定を行った。その結果、水酸基がある場合には抗体との結合性が認められたどちらの化合物についても、水酸基がない場合には抗体との結合性は認められなかった (Fig. 4)。

6. 抗 HPPA-AHA-BSA 抗体の固相化抗原及び遊離 NP に対する結合性

固相化抗原として HPPA-AHA-OVA 及び NP-O-C6-OVA を用いて、間接競合 SPR センサーによる NP の測定を行った。その結果、HPPA-AHA-OVA

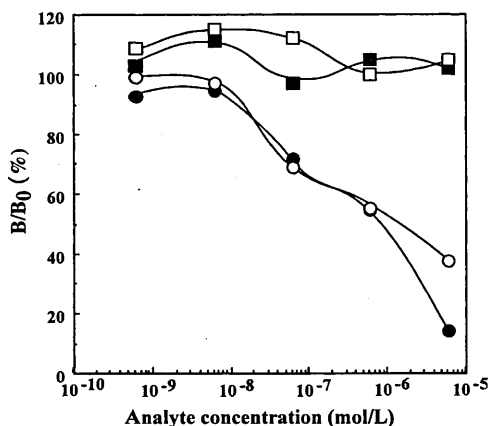


Fig. 3. Reactivity of anti-HPPA-AHA-BSA antibody for immunogen related compounds (1).

□ : HPPA ; ■ : phenol ; ○ : HPPA-OVA ; ● : HPPA-AHA

を固相化抗原とした測定系と比較して、NP-O-C6-OVA を固相化抗原とした測定系においては遊離 NP 抗原による抗体の固相化抗原への結合の阻害はより顕著に認められた (Fig. 5)。

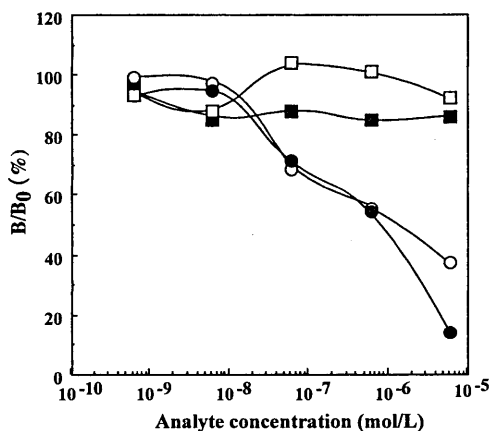


Fig. 4. Reactivity of anti-HPPA-AHA-BSA antibody for immunogen related compounds (2).

□ : PPA-OVA ; ■ : PPA-AHA ; ○ : HPPA-OVA ; ● : HPPA-AHA

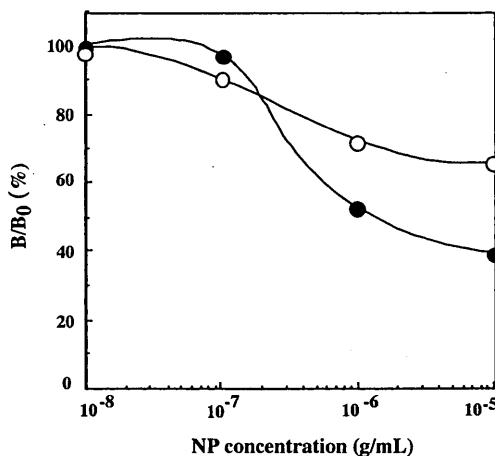


Fig. 5. Reactivity of anti-HPPA-AHA-BSA antibody for free NP.

○ : HPPA-AHA-OVA (Solid phase) ; ● : NP-O-C6-OVA (Solid phase)

考 察

免疫測定法による高感度で特異的な低分子化合物の測定を目的として、NP を例として低分子ハプテンを様々な方法でキャリアタンパク質と結合させることにより免疫原を作製し、得られた抗体の遊離抗原結合能に関して検討を行った。得られた抗 NP-BSA 抗体を用いて、間接競合 ELISA 法により NP の測定を行ったが、本抗体と遊離 NP との結合性は弱いものであった (Fig. 2)。そこで、キャリアタンパク質との間で様々な形でスパーサーを有する二種類の免疫原、NP-GAn-BSA 及び NP-AVA-BSA 複合体を作製し得られた抗 NP-GAn-BSA 及び抗 NP-AVA-BSA 抗体を用いて NP の測定を行った。しかし、これらの免疫原を用いた場合にも遊離 NP に対して強い結合性を有した抗体を得ることはできなかった。そこで、NP 分子の水酸基に対する位置関係に着目し、水酸基に対してパラ位に炭素鎖を有した HPPA-AHA-BSA を作製し、

これを免疫原として抗体を獲得した。また、これまで様々な免疫原を用いて免疫を行ったが、各免疫原に対する抗体価の上昇が見られるにもかかわらず遊離抗原に対して強い結合性を有した抗体を得ることができなかった。NP のように分子量がきわめて小さいハプテンの場合、高分子キャリアーとハプテンを結合させた複合体を免疫原として用いるため、抗体がキャリアーとの結合部を含めた部位を抗原として認識してしまうことはしばしば起こり得る (Tumola *et al.*, 2000)。そこで、抗体が遊離抗原認識能を有していないのではなく測定系に問題があるのではないかと考え、測定系に関して検討を行った。すなわち、固相化抗原の構造と免疫原の構造が極めて類似しているため、抗体は固相化抗原に対して親和性が非常に強く、結果として相対的に遊離抗原に対する結合性が弱くなるため、固相化抗原と遊離抗原との競合によるシグナルの減少が認められないのではないかとこの仮説を立てた (Danilova, 1994)。この仮説のもとに、抗体の固相化

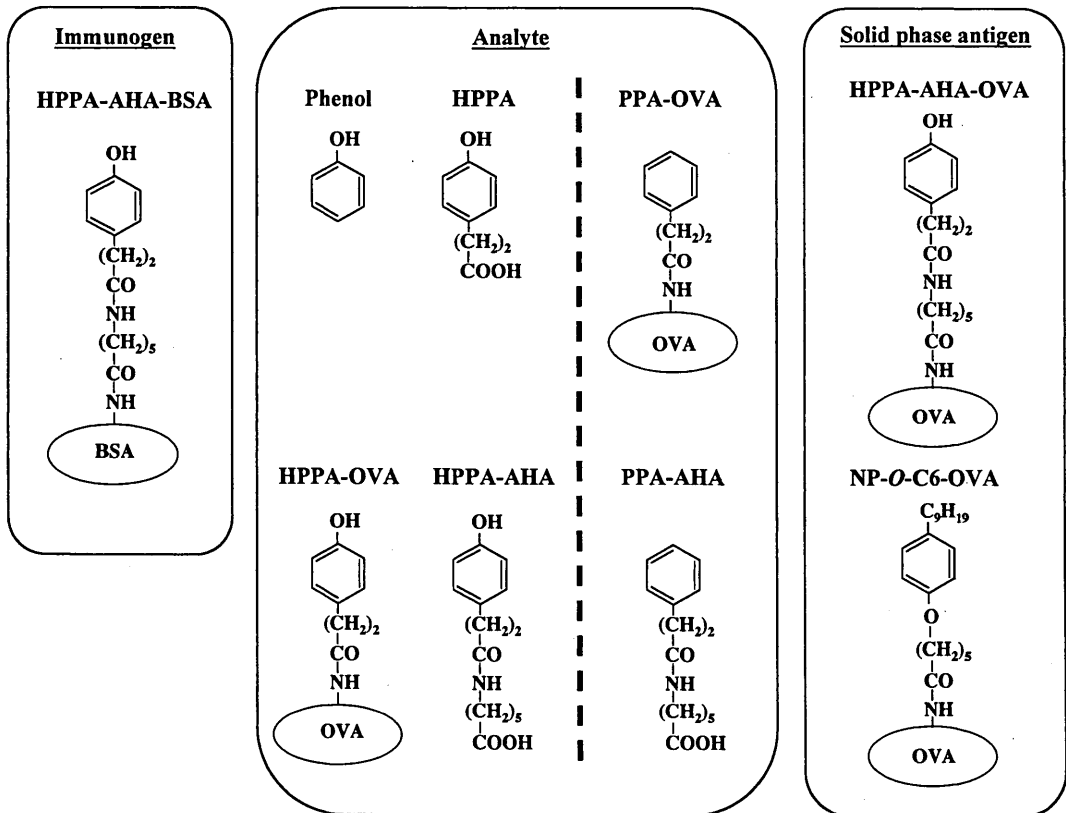


Fig. 6. Postulated structures of immunogen, analytes, and solid phase antigens.

抗原への結合を弱め、さらに抗原認識に重要と考えられる構造部位を有した新たな競合測定用固相化抗原の作製を試みた。

固相化抗原の作製に際して、抗体の抗原認識特性について検討した。すなわち、抗体が抗原を認識する際に、どのような構造部位が重要となってくるのかを明らかにするため、抗 HPPA-AHA-BSA 抗体を用いて関連化合物に対する抗体の結合性を評価した。Fig. 6 に用いた免疫原の構造とアナライトとして用いた各種化合物並びに固相化抗原の構造模式図を示す。抗 HPPA-AHA-BSA 抗体はフェノール及び HPPA には結合性を示さないが、HPPA-OVA 及び HPPA-AHA には結合性を示すこと、並びにベンゼン環に置換した水酸基を欠いた PPA-OVA 及び PPA-AHA には結合性を示さないことから (Fig. 3 及び Fig. 4), 抗原のもつ水酸基は抗体の抗原認識において重要な構造部位であると考えられた。これは、抗ビスフェノール A 抗体の抗原認識に関してハプテン分子内のヒドロキシフェニル基の重要性が示唆された報告 (折原二郎, 1992; Nishi *et al.*, 2003) とも一致する。また、HPPA と HPPA-OVA 及び HPPA-AHA で得られた結果を比較すると、免疫原構造中のベンゼン環に近い部位に存在するペプチド結合も抗体の抗原認識に関与していると考えられた。さらに、抗 NP-BSA 抗体を用いて得られた結果から (Fig. 1), 抗体の抗原認識において NP のアルキル基部分の構造が直鎖であるか分岐鎖であるかということも重要であることが示された。そこで、これらの必要条件を最低限に満たした新たな固相化抗原 NP-O-C6-OVA を作製し、抗 HPPA-AHA-BSA 抗体を用いて SPR センサーによる間接競合測定を行った。その結果、NP-O-C6-OVA を用いた測定系では、HPPA-AHA-OVA を固相化抗原とした測定系と比較して遊離 NP によるシグナルの減少がより顕著に認められた。すなわち、抗体の固相化抗原への結合性を弱めることにより、抗体の遊離抗原に対する認識をより強くし、遊離抗原と結合させることが可能となったものと考えられた (Kim *et al.*, 2003)。

このことから、同一抗体により測定を行った場合でも、固相化抗原への抗体の結合性を弱め、固相化抗原と遊離抗原をより構造的に近い状態にして競合させることにより、より低濃度域での遊離抗原の測定が可能であることが示された。これらの知見をもとに NP により近い構造をもった新たな免疫原及び固相化抗原を作製することによって、NP のより高感度な測定が可能になると予測される。

要 約

本研究では内分泌攪乱作用が疑われている 4-ノニルフェノール (NP) を測定対象物質とし、NP に対する抗体作製を試みた。まず、NP (分岐鎖混合物) のオルト位にアミノ基を導入し、キャリアータンパク質との複合体を作製した。これを免疫原として得られた抗体を用いて間接競合 ELISA 法により NP の測定を行ったところ、本抗体は NP に対する結合性を有していたが、その結合は弱いものであった。また、本抗体は直鎖状よりも分岐鎖状のアルキル基を持つアルキルフェノール類に対して強い結合性を有していることが示された。次に、NP のもつ水酸基とアルキル基との位置関係に着目し、新たに免疫原を作製したが、得られた抗体は NP に対して十分な結合性を有していなかった。これらの結果は抗体が遊離 NP よりも固相化抗原と強く結合するために両者が競合していないことが原因であると考えられた。そこで、抗体の抗原認識における特性を明らかにするため、交差反応性について検討した結果、本抗体はベンゼン環に置換している酸素原子または水酸基を特徴的に認識していることが示された。これらの結果を基に、NP のアルキル基部分の構造を変えずに水酸基を酸素原子に置換した構造をもつ固相化抗原を用いて NP の測定を行ったところ、抗体と遊離 NP との結合が確認された。

以上の結果より、抗体の NP に対する結合には、アルキル基部分の構造が分岐鎖であるか直鎖であるかということ、及びベンゼン環に置換した酸素原子の存在が大きく関与していることが示唆された。また、競合させる固相化抗原の構造も測定に影響を与えることが示唆された。構造上の特徴が NP により近い免疫原及び固相を用いて測定系を確立することにより、更に高感度な NP の測定が可能であると予測された。

文 献

- Branaa P., J. Naar, M. Chinain, S. Pauillac 1999 Preparation and Characterization of Domoic Acid-Protein Conjugates Using Small Amount of Toxin in a Reversed Micellar Medium: Application in a Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Bioconjugate Chem.*, 10: 1137-1142
- Coombes R. G., A. W. Diggle 1994 The Mechanism of nitration of phenol and 4-methylphenol by nitrogen dioxide in solution. *Tetrahedron Lett.*, 35: 6373-6376
- Danilova N. P. 1994 ELISA screening of

- monoclonal antibodies to haptens: influence of the chemical structure of hapten-protein conjugates. *J. Immunol. Meth.*, 173 : 111-117
- Haynes R., D. T. Osuga, R. E. Feeney 1967 Modification of amino groups in inhibitors of proteolytic enzymes. *Biochem.*, 6 (2) : 541-549
- 石川栄治 1993 超高感度酵素免疫測定法. 学会出版センター, 東京
- 環境庁 2001 内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について - 環境ホルモン戦略計画 SPEED' 98-
- 環境省総合環境政策局環境保健部 2001 ノニルフェノールが魚類に与える内分泌攪乱作用の試験結果に関する報告
- Kim Y. J., Y. A. Cho, H-S. Lee, S. J. Gee, B. D. Hammock 2003 Synthesis of haptens for immunassay of organophosphorus pesticides and effect of heterology in hapten spacer arm length on immunoassay sensitivity. *Anal. Chim. Acta*, 475 : 85-96
- 長宗秀明・寺田 弘 1990 単クローン抗体 調製とキャラクタリゼーション. 廣川書店, 東京
- 日本化学会編 1977 新実験化学講座 15 酸化と還元 II. 丸善, 東京
- Nishi K., M. Takai, K. Morimune, H. Ohkawa 2003 Molecular and immunochemical characteristics of monoclonal and recombinant antibodies specific to bisphenol A. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 67 (6) : 1358-1367
- 西井重明・増家義博. 松井一裕・石橋卓也・川村良久 2000 有機溶媒耐性抗ビスフェノール A モノクローナル抗体を用いた酵素免疫測定法によるビスフェノール A 測定法の開発. *分析化学*, 49 (12) : 969-975
- 折原二郎 1992 Bisphenol A の感作性, 交叉反応性および抗原決定構造に関する研究. *口腔病学会誌*, 59 (2) : 439-455
- Pauillac S., J. Naar, P. Branaa, M. Chinain 1998 An improved method for the production of antibodies to lipophilic carboxylic hapten using small amount of hapten-carrier conjugate. *J. Immunol. Meth.*, 220 : 105-114
- Sarma J. D., C. Duttagupta, E. Ali, T. K. Dhar 1995 Antibody to folic acid: increased specificity and sensitivity in ELISA by using ϵ -aminocaproic acid modified BSA as the carrier protein. *J. Immunol. Meth.*, 184 : 1-6
- Tumola M., R. Harpio, H. Mikola, P. Knuuttila, M. Lindstrom, V. M. Mikkala, M. T. Matikainen, T. Lovgren 2000 Production and characterization of monoclonal antibodies against a very small hapten, 3-methylindole. *J. Immunol. Meth.*, 240 (1-2) : 111-124
- Vanwetswinkle S., R. Touillaux, J. Fastrez, J. Marchand-Brynaert 1995 Bifunctional activity labels for selection of filamentous bacteriophages displaying enzymes. *Bioorg. Med. Chem.*, 3 (7) : 907-915

Summary

An antibody for 4-nonylphenol (NP), which is suspected to be an endocrine disrupting compound, was prepared. First, an amino group was introduced at the *ortho*-position of NP (mixture of branched alkyl chain compounds), and the NP-protein conjugates were prepared. When NP was measured using antibody raised with the conjugate as an immunogen by an indirect competitive ELISA, the antibody showed an affinity with NP, but the magnitude of the affinity was weak. The antibody showed stronger affinity with NP having branched alkyl-group than with NP having straight chain. Next, an attention was paid to the position of hydroxyl- and alkyl-group on NP, and new immunogens were prepared. The antibodies raised with newly prepared immunogens, however, showed only very weak affinity with NP. These results suggested that the antibody have stronger affinity with the solid phase antigen than with free NP, resulting weak competition. In order to elucidate the recognition property of the antibody against the antigen, the cross-reactivity of the antibody against various kinds of antigens were investigated. As the results, the antibody did recognize an oxygen atom or a hydroxyl-group on the benzene ring.

Based on these results, a solid phase antigen (NP-*O*-hexanoate-ovalbumin conjugate) having the structure including oxygen atom on the benzene ring was prepared. By the measuring system using NP-*O*-hexanoate-ovalbumin conjugate as a solid phase antigen, the antibody showed affinity with free NP. For sensitive measurement, the combination of a solid phase antigen, free antigen and an antibody is the most important factors in an indirect competitive immunoassay.