

免疫反応による2-methylisoborneolの検出法

Detection method of 2-methylisoborneol by immunoreaction

川田志加子*、田中 良春*、大戸時喜雄*、
Shikako Kawata Yoshiharu Tanaka Tokio Ohto

宮本 敬久**、波多野昌二**
Takahisa Miyamoto Shoji Hatano

* (株)富士電機総合研究所 水処理・バイオ研究所/

〒240-01 神奈川県横須賀市長坂2-2-1

Water Treatment and Bioelectric Laboratory, Fuji Electric Corporate Research and Development, Ltd./

**九州大学 農学部 食糧化学工学科 食品衛生化学教室/

〒812-81 福岡市東区箱崎6-10-1

Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Kyushu University/

6-10-1, Hakozaki, Higasi-ku, Fukuoka 812-81, Japan

Abstract

For the purpose of high sensitive detection of 2-methylisoborneol (2-MIB), which causes musty flavor in drinking water, we prepared monoclonal antibody that binds to 2-MIB, and developed a detection method for 2-MIB by competitive immunoreaction. As a result, it found that the antibody had high specificity of the functional group and coordination of the analogous compounds of 2-MIB. And we compared optical detection method to quartz crystal microbalance one using this antibody, and it found that quartz crystal microbalance method was ten thousands times higher sensitive and enabled detection within $10^{-4} \sim 10^{-2}$ mg/L.

Key words : 2-methylisoborneol • monoclonal antibody against 2-MIB
Quartz Crystal Microbalance • competitive immunoreaction

1. はじめに

近年、水道水に対し安全でおいしい水の供給の要望が高まってきている。一方、水道の異臭味についての被害は年々増加の傾向にある^{1,2)}。この異臭味は、水源の汚染や湖沼などの富栄養化によって大量に発生した藻類から生成される2-methylisoborneol(2-MIB)やジェオスミンなどのカビ臭物質が主な原因である³⁾。

現在、浄水の水質管理では、人間が鼻で一定時間ごとににおいを嗅いで監視を行っている。また、カビ臭の分析手段には、パージ・トラップガスクロマトグラフ質量

分析法および固相抽出ガスクロマトグラフ質量分析法が採用されている⁴⁾。

しかし、人間による検出方法は、熟練を要すること、個人差があるため再現性や客観性に乏しいこと、などの問題点がある。また、機器分析による手法は、操作が煩雑であること、測定時間が長いこと、装置が高価であること、などの問題がある。このため、水道の異臭味被害を防止するために、カビ臭物質の早期検出や常時監視が可能な測定方法、および装置の開発が望まれている。

筆者らは、短時間に容易で、かつ高感度に2-MIBを検出するセンサを開発するため、2-MIBと選択的に結

合する「モノクローナル抗体」を作製し⁹⁾、競合的な免疫反応による検出法について検討した⁹⁾。以下に、モノクローナル抗体の作製法、抗体を用いた2-MIBの検出原理およびこれまでの実験結果について述べる。

2. 抗体の開発⁷⁾

2.1 抗体の作製法

2-MIBは純水に難溶で取扱いにくいことから、モノクローナル抗体の作製には、Table 1に示す2-MIBと類似の構造を有するカンファーを用いた。さらに、カンファーは低分子で抗原性を示さないため、タンパク質である牛血清アルブミン (BSA) との複合体を合成し、これを抗原としてマウスに注射して抗2-MIBモノクローナル抗体を得た。

1) カンファー・BSA複合体の作製法

まず、カンファーの遊離のカルボニル基をカルボキシメチルオキシム化した。このカンファーカルボキシメチルオキシム18.9mgにトリエチルアミン12 μ Lとテトラヒドロフラン1mLを加え、-5 $^{\circ}$ Cで冷却した。これにクロロ炭酸イソブチル12 μ Lを加え、-5 $^{\circ}$ Cで30分振とうした。この反応液を4 $^{\circ}$ Cに冷却した5mg/mLのBSA溶液5mL中に滴下し4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた後、純水で透析してカンファー・BSA複合体を得た。

2) モノクローナル抗体の作製

得られたカンファー・BSA複合体をタンパク質濃度が700 μ g/mLとなるようにリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で希釈し、この希釈液300 μ Lと Freund のコンプリートアジュバント (ナカライテスク社製) 300 μ Lを用いてマウス免疫用のエマルジョンを作製した。この500 μ Lを5週令オスBALB/Cマウス (成和実験動物) に腹腔内注射した。同様に調製したエマルジョンをさらに2週間おきに2回腹腔内注射してマウスを免疫し、細胞融合の3~4日前に50 μ g/mLの抗原溶液500 μ Lを皮下注射した。モノクローナル抗体の調製法はMilsteinらの方法に従った⁹⁾。また、BSAと反応する抗体を排除するため、特異抗体のスクリーニングには抗原としてカンファー・オボアルブミン複合体を用いた。

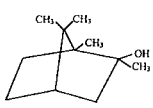
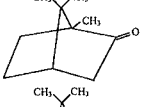
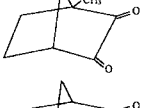
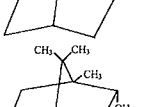
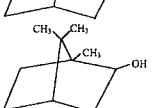
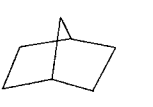
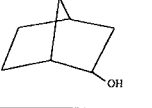
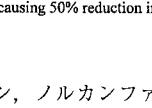
2.2 抗体の特異性試験

得られた抗体の特異性は競合ELISA (ELISA: enzyme linked immunosorbent assay) により調べた。

1) 方法

2-MIBとこれ以外の7種類の類似化合物(カンファー、

Table 1 Specificity of monoclonal antibody to 2-MIB and related compounds

| compound structure | IC ₅₀ * ($\times 10^{-4}$ M) (% cross-reactivity) |
|--|--|
|  | 8.35 (100) |
|  | 5.00 (168) |
|  | 20.2 (41) |
|  | nil (0) |
|  | 3.12 (268) |
|  | 2.83 (295) |
|  | nil (0) |
|  | nil (0) |

*:concentration causing 50% reduction in maximum absorbance.

カンファーキノン、ノルカンファー、ボルネオール、イソボルネオール、ノルボルナン、ノルボルネオール)を遊離抗原としてPBSに溶解し、それぞれ作製した抗体溶液と等量混合した。この混合溶液を、カンファーを固定化したマイクロプレートのウェルに添加して反応後、酵素標識抗体 (西洋ワサビパーオキシダーゼ標識ヒツジ抗マウスイムノグロブリン抗体) と反応させ、基質 (2,2-アジノビス 3-エチルベンゾチアゾリン-6-硫酸二アンモニウム塩) を添加してマイクロプレートリーダーで405nmの吸光度 (A_{405}) を測定した。なお、マイクロプレートへのカンファーの固定化には、カンファー・オボアルブミン複合体を用いた。

2) 結果および考察

特異性試験の結果をTable 1に示す。上段の数値は、カンファー・オボアルブミン複合体との競合反応によっ

て A_{405} を50%減少させる遊離抗原のモル濃度 (IC_{50})、かっこ内の数値は、2-MIBを基準にした交差反応性(%)である。ノルカンファー、ノルボルナン、ノルボルネオールとはほとんど反応性を示さないことから、抗体の認識には2-MIBおよびカンファー中のメチル基が重要であると考えられる。また、カンファーキノンに対する反応性が低いことから、3位のカルボニル基は抗体との結合を妨害するものと考えられる。さらに、2-MIBよりボルネオールやイソボルネオールに対する反応性が高いことから、2位のメチル基もまた抗体との結合を妨害するものと考えられる。

以上のことから、得られた抗体は、2-MIBやカンファーだけでなく、一部の類似化合物とも反応するが、類似化合物の官能基やその配位を認識可能な高選択性を有するモノクローナル抗体であると言える。

3. 2-MIBの検出原理の検討

2-MIBは低分子(分子量170)であるため、モノクローナル抗体に結合した2-MIB分子を直接検出することは困難である。そこで、Fig. 1のように、高分子である抗体の結合量から間接的に2-MIB分子が検出できる競合反応を利用した検出原理の検討を行った。以下に、①酵素標識抗体と基質を用いた光学的検出法、②水晶振動子を用いた気相系でのマイクロバランス法、および③液相系でのマイクロバランス法について述べる。

3.1 光学的検出法の検討

1) 方法

カンファー・オボアルブミン複合体溶液をマイクロプレートのウェルに添加し、37℃で1時間静置して固定化した。別の容器で濃度1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の抗2-MIBモノクローナル抗体と濃度0~5 mg/Lの2-MIBの混合溶液をそれぞれ30℃で4時間反応後、各混合溶液をウェルに添加して37℃で1時間反応させた。ここに酵素標識抗体を反応させ、基質を添加してマイクロプレートリーダーで405nmの吸光度を測定した。

2) 結果および考察

Fig. 2に既知濃度の2-MIBと、吸光度変化の関係を示す。吸光度は、抗2-MIB抗体に結合した酵素標識抗体が基質と反応した時の発色の度合を示しており、競合反応によってプレート上のカンファーと結合した抗体量に相当する。2-MIB濃度に対する吸光度の変化量は少なく、2-MIB濃度が0~5 mg/Lに増加した時の変化量

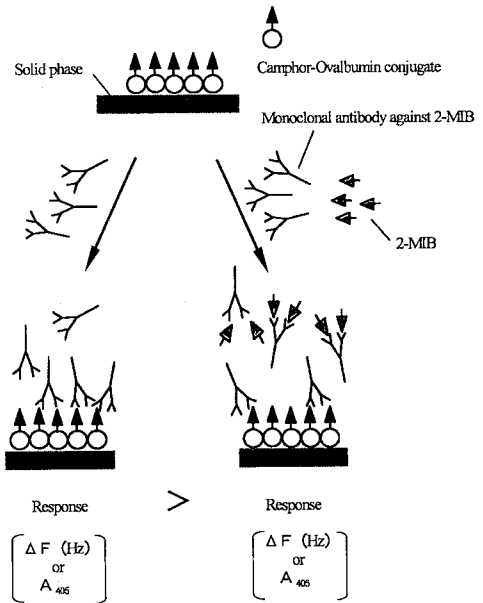


Fig.1 Detection principle of 2-MIB using competitive immunoreaction

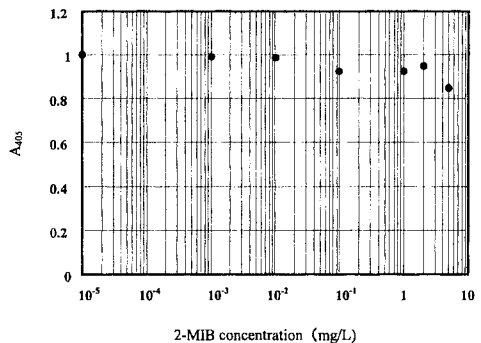


Fig.2 Relationship between 2-MIB concentration and absorbance after competitive immunoreaction

は0.22であった。また、2-MIB濃度 $10^{-5} \sim 10^{-2}$ mg/Lと $10^{-1} \sim 2$ mg/L間のそれぞれの吸光度には差が認められなかった。この結果より、酵素標識抗体と基質を用いて吸光度から2-MIBを検出する方法は、微量の2-MIBの濃度変化を測定するには感度が低く実用的でないと考えられる。

3.2 水晶振動子を用いたマイクロバランス法(気相系)

水晶振動子の金電極上に付着した物質の量を水晶振動

子の周波数変化から定量できることを利用し⁹⁾、競合反応によって電極上に結合した抗体の量から、2-MIBを定量する方法について検討した。

1) 装置の構成

Fig. 3に実験に用いた装置を示す。測定セル内に送り込まれる空気は、一定流量120mL/minで活性炭の層を通過した後、測定セルへ送られる。水晶振動子は測定セルに取付け、周波数カウンタによって周波数を測定する。本実験では電極が金で、ATカット、10MHzの水晶振動子を用いた。

2) 方法

水晶振動子の金電極表面の有機物を分解するために、UVオゾンクリーニングを行った。この振動子を濃度1mg/mLのカンファー・オボアルブミン複合体溶液に浸せきし、25℃で17時間静置した。洗浄後、金電極の未被覆部分への抗体の吸着を避けるために、濃度0.5mg/mLのオボアルブミン溶液に浸せきしてブロッキング処理を行い、洗浄、乾燥後、周波数(f_1)を測定した。次に、濃度 10^{-4} ~ 10^{-1} mg/Lの2-MIB溶液に、最終濃度が 10^{-2} mg/mLとなるように抗体溶液を添加し、4時間反応させた。この各混合溶液に前述の振動子を浸せきし、30℃で1時間反応させた。反応後、洗浄して乾燥させ周波数(f_2)を測定した。

3) 結果および考察

Fig. 4に既知濃度の2-MIBと、競合反応によって金電極上のカンファーと結合した抗体による周波数変化量の関係を示す。周波数変化量 ΔF は $f_1 - f_2$ より求めた。2-MIB濃度の増加に伴い ΔF の減少が認められたことから、溶液中の2-MIBが増加すると電極上のカンファーと結合する抗体は減少すると考えられる。

また、2-MIB濃度 10^{-4} mg/Lでは0mg/Lとの ΔF 値の差は約50Hzであった。本測定におけるノイズは約 ± 5 HzであるためS/N比は5となる。よって、S/N比2以上を検出下限とした場合、本検量線をもとに濃度 10^{-4} ~ 10^{-2} mg/Lレベルの2-MIBを充分検出可能である。

3.3 水晶振動子を用いたマイクロバランス法 (液相系)

前述の気相系では、周波数を測定する際に振動子を乾燥する必要がある。抗体のカンファーへの結合に及ぼす乾燥時間の影響を検討したところ、競合反応前の乾燥時間を長くすると、抗体の結合による周波数変化量は減少することが分かった。また、乾燥時間60分までに12%程度の周波数の減少が認められた。これは、金電極上のカ

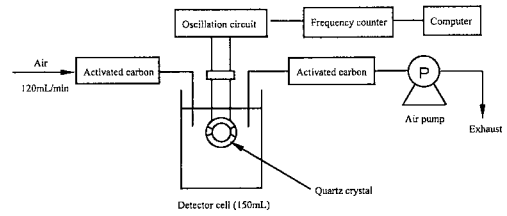


Fig. 3 Experimental setup with a quartz crystal detector

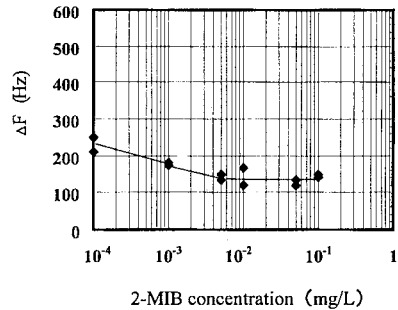


Fig. 4 Relationship between 2-MIB concentration and Frequency shift in gas phase

ンファー・オボアルブミン複合体が乾燥によって変性し、カンファーと抗体との結合力が低下するためと考えられる。

そこで、乾燥なしで周波数を測定できる液相系の検討を行った。

1) 装置の構成

純水30mLの入った測定セルと発振回路からなる。水晶振動子は純水に浸せきして周波数を測定した。本実験では電極が金、ATカットで、ポリッシング処理した10MHzの振動子(水晶表面の研磨度が高いため電極表面が平滑である)と、エッチング処理をした9MHzの振動子(研磨度が低いため電極表面に凹凸があり、表面積は大きい)について検討を行った。

2) 方法

液相系での測定の場合、固定化したカンファー・オボアルブミン複合体やブロッキング剤としてのオボアルブミンが脱離する恐れがある。そこで、共有結合によって金電極と強固に固定化する方法を採用し、従来の自然吸着による固定化法と比較した。

① 自然吸着法

水晶振動子をUVオゾンクリーナーで洗浄後、カンファー・オボアルブミン複合体溶液に浸せきし、

洗浄後、オボアルブミンでブロッキング処理を行った。この振動子の片面を絶縁して純水中で周波数 (f_1) を測定した。次に、振動子を外に出し、絶縁していない面に4時間反応させた抗体と 2-MIB の混合溶液を $100 \mu\text{L}$ 滴下して、 30°C で1時間反応させた。反応後、洗浄して純水中で周波数 (f_2) を測定した。

② 共有結合法^{10, 11, 12)}

Fig. 5 に共有結合法によるカンファー・オボアルブミン複合体の固定化法の概念図を示す。

まず、水晶振動子を水酸化ナトリウム溶液、塩酸、エタノールで順に洗浄し、 200°C で20分インキュベートした。空冷後、2%の γ -アミノプロピルトリエトキシシラン (APTES) アセトン溶液に室温で20時間浸せきし水晶振動子の金電極上にアミノ基を導入した。これをアセトンで洗浄後、 70°C で90分乾燥させ、空冷後、リン酸緩衝液 (pH 7) で2.5%に希釈したグルタルアルデヒド溶液に室温で2時間浸せきし、リン酸緩衝液と純水で洗浄した。次に、この振動子をカンファー・オボアルブミン複合体溶液に 25°C で17時間浸せきし、金電極上のアミノ基とオボアルブミンのアミノ基をグルタルアルデヒドのアルデヒド基を介して共有結合させ、カンファー・オボアルブミン複合体を金電極上に固定化した。次に、この振動子の片面を絶縁して純水中で周波数 (f_1) を測定した。その後、振動子を外に出し、絶縁していない面に4時間反応させた抗体と 2-MIB の混合溶液を $100 \mu\text{L}$ 滴下して、 30°C で1時間反応させた。反応後、洗浄して純水中で周波数 (f_2) を測定した。

3) 結果および考察

まず、気相系の測定結果と比較すると、液相系での測定では周波数変化量が $100 \sim 200\text{Hz}$ ほど大きく、また、特に低濃度側で 2-MIB 濃度の差に対する周波数変化量の差が大きかった。このことから、液相系の方がより高感度化が期待できる。

次に液相系で表面処理が異なる 2 種の水晶振動子について比較した。ポリッシング処理の振動子についての検討結果を Fig. 6 に、エッチング処理の振動子についての検討結果を Fig. 7 に示す。

エッチング処理の振動子については、複合体の固定化が共有結合法と自然吸着法ではほとんど差が認められず、両者とも周波数変化量は 2-MIB 濃度に依存していた。一方、ポリッシング処理の振動子については、自然吸着法では周波数変化量が 2-MIB 濃度に依存しない結果となった。また、共有結合法で複合体を固定化した振動子

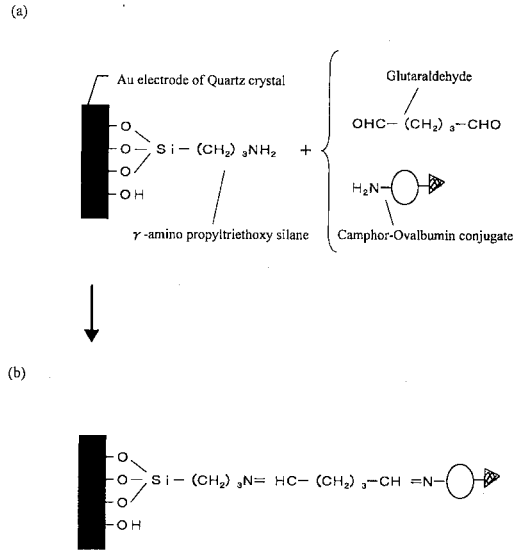


Fig. 5 Immobilization of Camphor-Ovalbumin conjugate by covalent bond

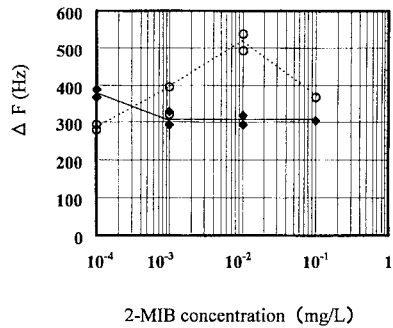


Fig. 6 Relationship between 2-MIB concentration and Frequency shift of polished quartz crystal for covalently immobilized conjugate (◆) and adsorbed conjugate (○)

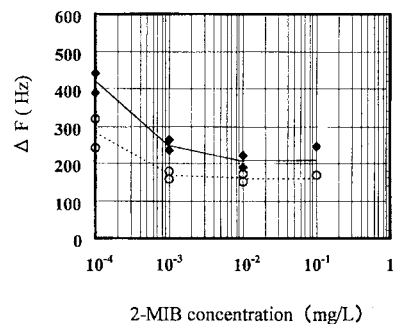


Fig. 7 Relationship between 2-MIB concentration and Frequency shift of etched quartz crystal for covalently immobilized conjugate (◆) and adsorbed conjugate (○)

に関して比較すると、ポリッシング処理の振動子はエッチング処理に比べて2-MIB濃度の変化に対する周波数変化量は小さかった。

エッチング処理の振動子の金電極表面は、水晶自身の研磨度が低い凹凸が多く表面積が大きい。従って、複合体と金電極表面の接触面積も大きく、自然吸着法でもカンファー・オボアルブミン複合体やオボアルブミンが強固に固定化されていると考えられる。一方、ポリッシング処理の振動子は電極が平滑なので接触面積が小さい。このため複合体やオボアルブミンは、共有結合法では比較的強固に固定化できるが、自然吸着法では脱離する可能性があると考えられる。

特に感度の良いエッチング処理の振動子については液相系での測定において、2-MIB濃度 10^{-4} mg/Lと0mg/Lとの ΔF 値の差は約120Hzであった。本測定におけるノイズは約 ± 5 HzであるためS/N比は12となる。よって、S/N比2以上を検出下限とした場合、検量線をもとに濃度 10^{-4} ~ 10^{-2} mg/Lレベルの2-MIBを充分検出可能である。さらに、カンファー・オボアルブミン複合体や抗体の濃度を調整することで、 10^{-5} mg/L以下の2-MIBの測定も期待できる。

また、2-MIBの定量的な測定には、水晶振動子の金電極の表面積が大きくできるエッチング処理が有効である。

4. まとめ

カビ臭物質の一つである2-MIBを高感度に検出するために、2-MIBを選択的に認識する抗2-MIBモノクローナル抗体を作製し、これを用いた競合反応による検出法の検討を行い、以下の結論を得た。

2-MIBと類似の構造を有するカンファーを抗原として得られた抗体は特異性試験の結果、類似化合物の官能基やその配位を認識可能な高選択性を有するモノクローナル抗体であった。

また、本抗体を用いて競合反応による2-MIB検出について検討を行った結果、酵素標識2次抗体を用いた発色反応を行って検出する方法は感度が極めて低かったが、水晶振動子の周波数変化から2-MIBを定量する方法は1万倍高感度であった。また、水晶振動子を用いる方法の中でも、気相系よりも液相系の方が感度に優れ、検量線から 10^{-4} ~ 10^{-2} mg/Lレベルの2-MIBが充分検出可能であった。さらに、水晶振動子の種類や抗体濃度を変えて、より低濃度の2-MIBの検出が期待できる。

今後、水道水質基準値(10^{-5} mg/L)を充分測定できる感度を有し、かつ、同一のセンサを繰り返し利用できる液相系での測定法を確立する予定である。

参考文献

- 1) 堤 重徳：最近の異臭味被害状況，第46回全国水道研究発表会講演集，450-451（平成7年）
- 2) 伊藤 雅喜：異臭味被害と処理方法の現状及び今後の対策における課題，第48回 全国水道研究発表会講演集，562-563（平成9年）
- 3) 八木 正一：水道水におけるかび臭障害の現状，用水と廃水，Vol.26 No.8，813-822（1984）
- 4) 梶野 勝司，芦谷 和芳，藤本 信之，八木 正一：パージ・トラップ・マスフラグメントグラフィーによる水中及び藍藻培養液中の2-メチルイソボルネオールとジオスミンの超微量分析，水道協会雑誌，vol.53 No.9，29-41（昭和59）
- 5) Si-Yin Chung, Peter B. Johnsen, and Phillip H. Klesius: Detection of an ELISA Using Polyclonal Antibodies Specific for 2-Methylisoborneol., Journal of Agricultural and Food Chemistry, 38, 410-415 (1990)
- 6) 三浦 則雄，肥後橋 弘喜，竹安 明，宇田 泰三，山添 昇：メタンフェタミンの高感度検出用としての免疫反応利用型水晶振動式センサ，CHEMICAL SENSORS, 7B, 53-56 (1991)
- 7) 宮本 敬久，倉光 洋一郎，田中 良春，川田 志加子，大戸 時喜雄，波多野 昌二：抗2-メチルイソボルネオールモノクローナル抗体の作製とその性質，水環境学会誌，20, 2, 112-116 (1997)
- 8) Kohler, G. And Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells in secreting antibody of predicted specificity., Nature, 256, 495-497 (1975)
- 9) S.-M. Chang, Y. Iwasaki, M. Suzuki, E. Tamiya and I. Karube: Detection of odorants using an array of piezoelectric crystals and neuralnetwork pattern recognition., Anal. Chim. Acta., 249, 323-329 (1991)
- 10) 梅本雅夫，氏平裕輔：水晶振動子を用いる免疫センサー，超音波 TECHNO, Vol.7, No.4, 11-16 (1995)
- 11) Bernd Köing and Michael Gräzel: DETECTION OF VIRUSES AND BACTERIA WITH PIEZOELECTRIC IMMUNOSENSORS., ANALYTICAL LETTERS, 26 (8), 1567-1585 (1993)
- 12) C. Raman Suri and G. C. Mishra: Activating piezoelectric crystal surface by silanization for microgravimetric immunobiosensor application., Biosensors & Bioelectronics, Vol. 11, No. 12, 1199-1205 (1996)

(受付 1997. 7. 18)

(受理 1997. 8. 18)