

モノクローナル抗体を用いたメダカビテロゲニン全自動 EIA 測定系の構築

丸尾直子 (東ソー株)、西川智浩、鏑迫典久、高木博夫、白石寛明 (国立環境研究所)

【目的】昨年演者らは、ポリクローナル抗体 (PoAb) を用いてメダカビテロゲニンを測定する全自動酵素免疫測定システムについて報告した。今回は、さらに特異性を高めることを目的として、独自に取得した抗メダカビテロゲニンモノクローナル抗体 (MoAb) を用いて全自動 EIA 系の構築を試み、ポリクローナル抗体系で見られる非特異反応を抑制し、特異性の高い自動 EIA 測定系を確立し、実サンプル測定への適用についても検討を行ったので報告する。

【方法】全自動 EIA 測定装置としては AIA-600II (東ソー製) を使い、標識酵素としてアルカリ性ホスファターゼを用いた。今回取得した MoAb の中で、異なるエピトープを有すると考えられる MVP47 及び MVP25 を用いて、固相 MVP47-標識 PoAb 系、及び固相 MVP47-標識 MVP25 系という 2 種の 1 ステップサンドイッチ測定系を構築し、比較検討を行った。免疫測定は、MVP47 を固定化した磁性ビーズの入ったカップに、サンプルと標識 PoAb あるいは標識 MVP25 を同時に加えて 40 分反応を行い、B/F 分離後、4-メチルウンベリフェリルりん酸を基質としその分解速度を求めることから、磁性ビーズに結合したアルカリ性ホスファターゼ量を定量した。

【結果及び考察】ビテロゲニン濃度 $12 \mu\text{g/mL}$ まで磁性ビーズ結合酵素量は単調増加を示し、本法におけるビテロゲニン最小検出濃度 (2SD 法) は MVP47-PoAb 系で 0.03ng/mL 、MVP47-MVP25 系で 0.06ng/mL となった。 0.6ng/mL ~ 37ng/mL のメダカ全個体ホモゲネート希釈液を用いて検討したところ、再現性は両系とも測定内 1.0-9.4%、測定間 1.6-8.6% と良好であり、希釈直線性試験、添加回収試験についても良好な結果を得た。魚類 6 種のビテロゲニンとの交叉反応性は両測定系とも 0.2% 未満であったが、MVP47-MVP25 系の方がより低い値を示した。エストロゲン曝露個体より得た全個体ホモジネートならびに血漿を希釈し測定したところ、両測定系について対照群に比して曝露群で有意な上昇が観察された。さらに測定例数を増やして、両系の反応性の相違を検討する予定である。

Development of Medaka vitellogenin enzyme immunoassay using monoclonal antibodies on automated enzyme immunoassay analyzer

Naoko Maruo (TOSOH Corporation, Japan), Tomohiro Nishikawa, Norihisa Tatarazako, Hiroo Takagi, and Hiroaki Shiraishi (National Institute for Environmental Studies, Japan)

We had previously reported an automated enzyme immunoassay for Medaka (*Oryzias latipes*) vitellogenin using polyclonal antibody (PoAb). To increase specificity, we developed this time two enzyme immunoassay systems using monoclonal antibodies (MoAb) named MVP47 and MVP25, which recognize different epitopes each other. AIA-600II (TOSOH Corp.) was used for these automated assays and alkaline phosphatase was used as a label. We constructed two immunoassays, one using immobilized MVP47 and labeled PoAb, and the other immobilized MVP47 and labeled MVP25. Minimum detectable concentration was estimated to be 0.03 ng/mL for MVP47-PoAb and 0.06 ng/mL for MVP47-MVP25. Precision studies gave intra- and inter-assay CVs' of less than or equal to 9.4% for both MVP47-PoAb and MVP47-MVP25. Assay MVP47-MVP25 showed lower cross-reactivity on vitellogenins derived from six different kinds of fishes than that of MVP47-PoAb. Using both homogenized whole body and plasma as an assay sample, significant increase in vitellogenin concentration was observed in males that were exposed to estrogen in comparison with that without estrogen treatments. Further studies are underway to clear the differences between the two assays.