

メダカビテロゲニン高感度自動 EIA 法の開発と評価

丸尾直子（東ソー株）、鎌迫典久、小塩正朗、白石寛明、森田昌敏（国立環境研究所）

【目的】 昨年演者らは、2種のモノクローナル抗体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、非特異反応を抑制して感度の向上をはかり、曝露メダカの血液と肝臓の両者を測定対象として測定系評価を実施したので以下に報告する。

【方法】 異なるエピトープを有するモノクローナル抗体 MVP47 及び MVP25 を用い、1ステップサンドイッチ測定系を構築した。MVP25 はペプシン処理した後、標識酵素であるアルカリ性ホスファターゼをマレイミドヒンジ法で結合した。全自動 EIA 測定装置としては ALA-600II(東ソー製)を用い、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 MVP25 を同時に加えて 40 分反応を行い、B/F 分離後、基質である 4-メチルウンベリフェリルリン酸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。実サンプル評価は、エチニルエストラジオール(9.8~320ppt)で1週間曝露したメダカより取得した血漿及び肝臓ホモジネート抽出物を用いて行った。

【結果及び考察】 本改良法におけるビテロゲニン最小検出濃度(2SD 法)は 0.02ng/mL となり、改良前の報告(0.06ng/mL)より感度向上が見られた。再現性は測定内 1.0-4.4%、測定間 1.3-3.1%であり、特に低濃度域の再現性が改善された。血漿及び肝臓ホモジネート抽出物をサンプルとして用いた希釈直線性試験、添加回収試験結果も良好であった。エチニルエストラジオールで1週間曝露した雄個体より得た血漿ならびに肝臓ホモジネート抽出物を希釈し測定したところ、血漿、肝臓とも1週間曝露によりビテロゲニン濃度上昇が認められた。また、血漿測定値と肝臓ホモジネート抽出物測定値の間には相関係数 0.97 と非常に高い相関関係が示され、本法は血漿と肝臓ホモジネート抽出物両者を測定可能であるメダカビテロゲニン測定系であることが確認された。

Development and evaluation of highly-sensitive Medaka (*Oryzias latipes*) vitellogenin automated immunoassay system.

Naoko Maruo (TOSOH Corporation, Japan), Norihisa Tatarazako, Masaki Koshio, Hiroaki Shiraishi and Masatoshi Morita (National Institute for Environmental Studies, Japan)

We had previously reported an automated immunoassay for Medaka vitellogenin using two monoclonal antibodies. To improve sensitivity, one monoclonal antibody, MVP25, was subjected to digestion by pepsin and conjugated with alkaline phosphatase as a label for the purpose of reducing non-specific binding. The other monoclonal antibody, MVP47, was immobilized on magnetic beads. Automated assay was performed on AIA-600II (TOSOH Corp.) and vitellogenin in a sample was bound to both immobilized and labeled monoclonal antibodies. After B/F separation, the conversion rate was measured for 4-methylumbelliferyl phosphate to 4-methylumbelliferone by the bound enzyme. In this improved assay, minimum detectable concentration was estimated to be 0.02 ng/mL, which showed more sensitive than that reported previously. Improved reproducibility was also obtained by precision studies which gave intra- and inter-assay CVs of less than or equal to 4.4%. Using both homogenized liver extract and plasma as assay samples, the increase in vitellogenin concentration was observed in males exposed to ethynylestradiol for a week. Liver homogenate extract or plasma could be applicable as evaluation samples due to the good correlation coefficient between these.