

ELISA 及び SRID によるボラビテロジェニン測定系の確立

尾田 典久¹、平井 政彦¹、藤野 博良¹、天野 春菜²、原 彰彦²

¹片山化学工業㈱、²北大院水

【目的】 ビテロジェニン(Vg)は魚類など卵生脊椎動物の卵黄蛋白前駆物質であり、卵黄形成期雌の血清中には高濃度に出現する。一方、雄及び未成熟雌魚でも、エストロジェンの刺激により Vg が誘導されることから、血中 Vg が外因性エストロジェン様物質（環境エストロジェン）の影響を評価する生物指標（バイオマーカー）となっている。

ボラは雑食性であるため水質・底質の影響を受けやすく、清浄海域から汚染海域まで生息可能で、日本ばかりでなく世界各地において広く生息する。採捕にあたっては河川下流部、内湾河口域、沿岸域等に生息するためサンプリングも比較的容易である。野生生物への影響評価と共に、実験生物を用いた評価試験には低濃度域から高濃度域まで測定可能な血中 Vg 測定系の構築が必須と考えられる。本研究は、ボラ Vg 測定法として ELISA 測定法(enzyme-linked immunosorbent assay)と SRID 測定法(寒天ゲル内一元放射免疫拡散法：single radial immunodiffusion)を確立することを目的に行った。

【方法】 ELISA 測定法に用いた抗体は、ボラ卵より調製した egg extract (EE)を抗原としたマウスモノクローナル抗体、並びにボラ卵より精製した Vg 構成タンパクであるリポビテリン(Lv)を抗原としたウサギポリクローナル抗体をそれぞれ常法にて作製した。固相モノクローナル抗体とポリクローナル抗体によるサンドイッチ ELISA を構築し、至適条件を検討した後、同時再現性、日差再現性、添加回収試験、希釈試験等検討した。SRID 測定法として、ボラ卵から単離したリポビテリン(Lv)を抗原とし、作製したウサギポリクローナル抗体を用いて寒天ゲル板を作製し、試料添加量、反応温度・時間及び測定範囲等検討した。また、両測定法における相関性・連続性を検討した。

【結果・考察】 ELISA 測定法における測定範囲は 5~1,000ng/ml、同時再現性は CV3.3~5.4%、日差再現性は CV2.7~6.4%、添加回収試験は 96~103%であり、希釈試験においても良好な結果を得た。SRID 測定法においては試料添加量 10 μ l、反応温度 37°C、反応時間 48 時間にて、測定範囲 25~400 μ g/ml であった。両測定法における相関性は $r=0.995$ 、連続性 $r=0.999$ と非常に良好な結果を得た。以上の結果より、連続性と相関性に優れ、高感度かつ微量定量が可能な ELISA 測定法、定量一次スクリーニングが簡易に行える SRID 測定法の両測定法が構築され、今後のボラ Vg の低濃度域から高濃度域に至る一貫した測定に有用であることが示唆された。

Quantitative immunoassay for mullet vitellogenin using ELISA and SRID

¹ Norihisa Oda, ¹ Masahiko Hirai, ¹ Hiroyoshi Fujino, ² Haruna Amano, ² Akihiko Hara

¹ Katayama Chemical Industries Co., LTD, Japan,

² Graduate School of Fisheries Science, Hokkaido University, Japan

Recently fish vitellogenin (Vg), an estrogen-induced female-specific serum protein, has been used as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. In this study, ELISA and SRID for mullet Vg were developed using monoclonal and polyclonal antibodies raised against mullet lipovitellin. The measurable range of mullet Vg in the ELISA and SRID were 5 - 1,000 ng/ml and 25 - 400 μ g/ml, respectively. The correlation nature in both methods was obtained as $r= 0.995$, and continuity as $r= 0.999$, respectively. Since the ELISA and SRID developed in the present study covered a wide range from 5 ng/ml to 400 μ g/ml, and were excellent in continuity and correlation, combination of both assays will be an excellent tool for the survey of endocrine disrupters. The simultaneous reproducibility, sunlight reproducibility, recovery examination, and the dilution examination in ELISA were also examined.