

学 位 論 文 題 名

抗ダイコート抗体の作製とその法医学的応用

学位論文内容の要旨

緒 言

ダイコート (DQ) , パラコート (PQ) などのピピリジウム系除草剤はその除草効率の高さから今日広く使われているが, これらによる中毒例も多発しており, 問題になってきている. 法医学中毒学領域でのDQ・PQの検出法として従来, 比色法, ガスクロマトグラフィー, 高速液体クロマトグラフィーなどが報告されている. 一方, PQに関してはラジオイムノアッセイやEnzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) などの特異性の高い免疫測定法が開発されているが, DQについてはいまだ特異的な抗体を作製したという報告がない.

著者はDQのフェニルアラニン誘導体を担体タンパクに結合させた抗原をマウスに免疫することによって, 抗DQモノクローナル抗体を作製した. 確立したDQのELISAにより中毒患者の血液中のDQ濃度を測定した. さらにその抗体を用いてラットの肺, 腎臓, および心臓におけるDQの分布・蓄積に関する免疫組織化学的研究を行なった.

材料と方法

1. モノクローナル抗体の作製

4-Amino-D,L-phenylalanine をジアゾ化し, DQとcouplingしたのち, 1-ethyl-3-(3- dimethylaminopropyl)-carbodiimide HClを用いて担体タンパクであるウシ血清アルブミン (BSA) に結合させたDQ-BSA化合物を免疫原とし

た。免疫用動物にBALB/cマウスを用いた。一回目の免疫では1mgのDQ-BSAを1mlの生理食塩水に溶解し、これを等量のプロイントの完全アジュバントと乳化し、マウス1匹当たり0.25mg/0.5mlを腹腔内に注射した。4週間間隔で約5箇月間抗原のみの追加免疫を続けた。最終免疫の3日後に無菌操作でマウスの脾細胞を取りだし、P3U1培養ミエローマ細胞と5:1の細胞比でポリエチレングリコールによる細胞融合を行なった。ELISA法で増殖したコロニーをスクリーニングし、陽性のハイブリドーマを選んでその培養上清を一次抗体とした。

2. DQのELISA

免疫原DQ-BSAと同じ手法で調製したDQ-gelatinを固相化抗原とした。一次抗体に希釈培養上清、二次抗体にbiotinylated horse anti-mouse IgG、そしてABC溶液にavidin-biotinylated alkaline phosphatase-complex溶液を使用した。一次抗体添加の段階でDQ標準溶液、あるいは試料を加え競争的間接ELISAを用いた。基質液にはフェニルリン酸二ナトリウム二水和物と4-アミノアンチピリンの炭酸緩衝溶液を用い、1.2%フェリシアン化カリウム水溶液で呈色反応停止後、波長492nmでの吸光度を測定した。一方、DQのアナログである α, α' -dipyridyl, PQ, morfamquat, diethyl PQおよび1-methyl-4-phenyl-pyridinium (MPP⁺), 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridinium (MPTP) をELISA反応系に添加し、その交差反応率を求めた。

3. 実験動物の臓器中のDQの分布

生食で溶解したdiquat dibromideを30mg/kgの割合でラットの尾静脈に注射した。投与後3時間、12時間、24時間、3日および7日に肺、腎臓および心臓を剔出した。各組織を切りだし固定した。パラフィン切片を作製後、ABC法による免疫組織化学染色を行なった。抗体はELISA法と同じで、ABC複合物はbiotin-streptavidin-peroxidase complexの溶液を、発色基質はdiaminobenzidineを用いた。また、ヘマトキシリンで核を染色した。

結 果

1. DQのELISA

細胞融合で得られた二株の細胞の産生する抗体はそれぞれIgMとIgG₃であったが、ELISAでの吸光度の50%抑制は前者では0.625 μ g、後者では0.230 μ gであったので中毒患者の血液中DQの測定および免疫組織化学染色には後者を用いた。

ELISAで直線的に抑制される範囲は0.05-1.0 μ gであった。抗体の交差反応については、DQのアナログとの反応は全く認められなかった。また、正常成人の血清をこのELISA反応系に加えても検量線は変化せず、この抗体は正常ヒト血清とも反応しないことがわかった。また、三名の中毒患者の血清から5.0-32.0 μ g/mlのDQが検出された。

2. ラットの臓器中のDQの分布

肺では投与後12時間からDQがmacrophageに取り込まれた像がみられ、時間経過とともに陽性細胞が増加した。腎臓では投与後3時間で遠位尿細管および集合管にDQ陽性像がみられ、その他の部位にはDQは存在していなかった。DQの蓄積は12時間～24時間で最も強く、それ以降は弱まった。心臓については投与後3時間から7日まで陽性像を呈する少数の心筋細胞が認められた。

考 察

1. DQのELISA

抗DQモノクローナル抗体を初めて作製し、その抗体による特異性の高いDQのELISAを開発した。従来のDQの定量法と比べると煩雑な前処理が必要でなくなり、試料として血清そのままを測定することが可能であることがわかった。実際に三名の中毒患者の血清からDQを測定することができた。

2. ラットの臓器中のDQの分布

DQは水溶性なので細胞内に取り込まれなければ固定あるいは染色の段階

で水溶液中で流失する虞がある。どのような形で細胞成分と結合するかは明らかではないが、DQとPQがメラニン色素に親和性を示し、そのメカニズムはイオン性であるとの報告もある。本抗体の高い特異性がELISAによる交差反応試験によって証明され、抗体はDQのピピリジウム環状構造を識別するものと考えられるが、細胞内でのDQの構造に関しては、組織染色されるのでそのピピリジウム環状構造がそのまま保たれて細胞成分と結合しているものと考えられる。

DQはヒトにおいて主に消化系臓器に毒性を示すと言われているが、本研究において肺では投与後7日でも貪食されたDQが見られ、肺もDQのtargetの一つで肺線維化を起こす可能性があることが明かとなった。また、DQが腎尿細管に局在することを確認した。陽性を呈する心筋細胞も認められたことから水溶性のDQが体内に吸収され、心臓においてもある程度蓄積されることが明らかになった。PQの心臓への蓄積が急死に関係しているという報告がされており、DQにもその可能性があると考えられるが、今後の研究課題である。

以上述べたように本抗体が法医学および中毒学の領域において利用価値の高いことが示されたものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 寺 沢 浩 一

副 査 教 授 高 崎 勝 巳

副 査 教 授 小 山 富 康

学位論文題名

抗ダイコート抗体の作製とその法医学的応用

農薬のうちの除草剤ダイコート（DQ）は今日広く使われており，これによる中毒例が法医学的にも問題となっている．

申請者の行ったのは，この農薬に関する法医中毒学的研究であり，中毒の生化学的診断法と生体内分布に関するものである．

すなわち，

①DQに対するモノクローナル抗体（mcAb）を作製し，②それを用いて血清中のDQの定量を行うELISAを確立し，③DQの体内分布・蓄積に関して動物を用いて免疫組織化学的に検討した．

具体的には

①4-Amino-phenylalanine をDQにジアゾカップリングし，カルボジイミドを用いて担体蛋白に結合させて免疫原とし，マウスに5箇月間免疫した．その後常法により脾細胞を myeloma細胞と融合させ，hybridoma を選択してDQと反応するmcAbを作製した．

②このmcAbを用いてELISAを確立し，交差反応性をDQ類似化合物並にヒト血清について検査し，いずれとも交差反応しないこと，すなわち，ヒト血

清をそのまま試料としてDQを定量できることを明らかにした。そして、このELISAを用いてDQ中毒症例の血清中DQを定量した。

③ラットにDQを静注し、経時的に臓器を剔出し、作製したmcAbを用いて組織中のDQの免疫組織化学染色を行い、臓器内の分布・蓄積について検討した。

その結果、

①ELISAの感度はDQ50ngであり、中毒症例の血清中DQを十分に定量できることが明らかになった。

②ラットの肺・腎・心について、DQの分布・蓄積を経時的に観察したところ、肺では投与後12hからマクロファージに取り込まれてゆき、腎では投与後3hから遠位尿細管と集合管に次第に蓄積されてゆき、心筋では投与後3hから7日までDQが陽性の心筋細胞が認められた。

以上のように、

DQに対するmcAbを初めて作製し、それを用いたELISAを確立して血清中のDQを直接測定できるようになった。

また、DQの体内分布を観察し、肺および心筋に対しても障害を起す可能性のあることを推測させる結果を得ることができた。

口頭発表時の試問に際し、宮崎勝巳教授よりDQの化学的性質と体内分布の関係に関する質問が、小山教授よりDQの肺・腎における分布の必然性に関する質問がなされたが、申請者は概ね適切な回答をしたものと考えられる。

また副査の宮崎勝巳教授・小山教授に学位論文に関して個別に試問を受け、学位授与に値するとの判定がなされた。

因に、4年間司法解剖に対し熱心に学習し、そこで得られたテーマに関する質の高い論文（参考論文）も発表しており、法医学の種々の分野に関し、自立して研究活動を行うに必要な能力・学識が養われたものと認められる。

以上により、本論文は学位授与に値するものと判定される。