

199900666A

平成11年度 厚生科学研究費補助金研究報告書

—— 生活安全総合研究事業 ——

課 題 名

生体試料中ダイオキシンの
酵素イムノアッセイ法の開発研究

主任研究者

(財)食品薬品安全センター秦野研究所 研究部長

松木容彦

分担研究者

星薬科大学 教授

中澤裕之

(財)食品薬品安全センター秦野研究所化学試験室長

安生孝子

平成11年度 厚生科学研究費補助金研究報告書

—— 生活安全総合研究事業 ——

課 題 名

生体試料中ダイオキシンの
酵素イムノアッセイ法の開発研究

主任研究者

(財)食品薬品安全センター秦野研究所 研究部長

松木容彦

分担研究者

星薬科大学 教授

中澤裕之

(財)食品薬品安全センター秦野研究所化学試験室長

安生孝子

目 次

平成 11 年度厚生科学研究費補助金研究報告書

平成 11 年度厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要 主任研究者 松木容彦

平成 11 年度厚生科学研究費補助金総括研究報告書

生体試料中ダイオキシンの酵素イムノアッセイ法の開発研究 主任研究者 松木容彦

平成 11 年度厚生科学研究費補助金分担研究報告書

国外産ポリクローナル抗体を用いるダイオキシンの ELISA 法の
確立と実用性の検討 分担研究者 中澤裕之

新規ポリクローナル抗体を用いるダイオキシンの ELISA 法の
確立と実用性の検討 分担研究者 安生孝子

抗ダイオキシンモノクローナル抗体の作製ならびに ELISA 法の
確立と高感度化の検討 主任研究者 松木容彦

(別紙 1)

平成 11 年度厚生科学研究費補助金総括報告書概要

研究費の名称=厚生科学研究費

研究事業名=生活安全総合研究事業

研究課題名=生体試料中ダイオキシンの酵素イムノアッセイ法の開発研究
(H11-生活-001)

国庫補助金清算所要額 (円) =42,000,000

研究実施期間 (西暦) =1999~2000

研究年度 (西暦) =1999

主任研究者名=松木容彦 ((財) 食品薬品安全センター・秦野研究所)

分担研究者名=中澤裕之 (星薬科大学)、安生孝子 ((財) 食品薬品安全センター・秦野研究所)

研究目的=ダイオキシンの測定については主に高分解能ガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリー (HRGC/MS) が用いられているが、HRGC/MS による測定法では環境、食物、生体試料等いずれの試料種の測定においても多段階で複雑なクリーンアップ操作が避けられず、測定に要する操作時間は著しく長く、かつ測定経費も高価なものとなっている。一方、ダイオキシンによるヒトでの汚染実態の解析や曝露推移状況の把握も行政上も急務とされ、安価でかつ迅速なダイオキシンのスクリーニングまたはモニタリング法の開発が強く望まれている。本研究ではダイオキシンのポリクロールまたはモノクロール抗体の作製を行い、これらを用いてヒトの生体試料 (母乳、血液、脂肪、胎児等) 中のダイオキシンの簡便でかつ高感度な酵素免疫測定法 (ELISA) を確立し、ダイオキシンによる汚染状況のスクリーニング調査やヒトでの経日的あるいは経年的体内曝露推移のモニタリングに資することを目的としている。

研究方法=1. 国外入手抗体を用いた母乳中ダイオキシンの ELISA 法の構築と GC/MS との相関: GC/MS により母乳 100 検体を分析し、得られたダイオキシン異性体の中で毒性等量 (TEQ) と相関が高く、かつ検出量の多いダイオキシンを検索した。ダイオキシン同族体濃度はそれぞれ fat basis で換算し、TEQ は WHO-TEF (1988)

を用いて算出した。ついで既存の抗体（カリフォルニア大学デイビス校より入手）を用いて ELISA 手法、溶媒、界面活性剤などの組み合わせについて検討し、至適条件を得、ELISA 法を確立した。一方、同一母乳試料を用いて ELISA 法による測定値の真度や精度について GC/MS により確認するために試料に加えるサロゲート種について検討を行い、また、従来の GC/MS 測定に用いられている前処理法を改良して簡便な前処理操作を確立した。そこで、母乳を 2 分してそれぞれ確立した ELISA 法と GC/MS 法によりダイオキシン類を測定し、両手法による測定結果（17 検体）の比較と TEQ 換算値の比較を行った。

2. 新規抗体作製と ELISA 法の確立：

1) ハプテン合成、BSA および HRP 結合物の調製：①常法に従い、ダイオキシン骨格 C-1 および C-2 位に結合種と長さの異なる側鎖を導入し、十数種のハプテン抗原のエステル体を得た。② ①で得られたハプテン-エステル体の中から 6 種について脱エステル化後、N-ヒドロキシサクシニルイミド (NHS) との反応により対応するハプテン NHS エステル体を得た。NHS-エステル体と BSA との反応により目的の各ハプテン-BSA 結合物を得た。③同様にハプテン-NHS エステルと HRP との反応により目的の各ハプテン-HRP 標識体を得た。

2) ポリクローナル抗体の調製と ELISA 法の確立：① 6 種のハプテン-BSA 結合物を常法に従い雄性ウサギ（各ウサギに免疫、各 3 匹）背部皮内に 3 週間 5 回投与し、それぞれ各抗血清を得た。②投与期間中に得られた血清について抗体価を調べた。③ ②の結果から抗体価の良好な抗血清について HRP-ハプテン標識体に対する TMDD 阻害効果について調べ、最も良好な阻害効果反応性有する抗血清を選択した。さらにブロッキング液や反応液の条件も整えて最終的に至適 ELISA 条件を設定した。④ ③で設定した ELISA 法により 2,3,7,8-TCDD の標準曲線を得、この標準曲線により他のダイオキシン同族体 16 種についての交叉性を調べた。

3) モノクローナル体の調製：ハプテン-BSA 結合物 4 種をマウスに反復免疫投与し、各マウスから抗血清を得、抗ダイオキシン抗体価について調べた後、良好な値を示した抗血清について TMDD による阻害効果について調べた。抗体価と阻害効果の良好なマウス個体から脾細胞を得、これらとミエロマ細胞と融合させ、HAT 選択培養により得られた融合細胞の培養上清を ELISA によりスクリーニングして、抗ダイオキシン抗体の分泌の有無を確認した。

研究結果ならびに考察 = 1. 国外入手抗体を用いた母乳中ダイオキシンの ELISA 法の構築と GC/MS との相関：GC/MS 測定により得た各ダイオキシン同族体毎に TEQ との相関性を求めた結果、毒性等価係数 (TEF) が高かつ存在量比も大きい 1,2,3,7,8-PeCDD と 2,3,4,7,8-PeCDF が TEQ に対して高い相関 ($r=0.962$ 、 $r=0.941$) があることがわかり、これらの結果からこの両化合物が ELISA の測定対象として最適であることが確認された。用いた国外の抗体は 2,3,7,8-TCDD と 1,2,3,7,8-PeCDF に対しほぼ等価で反応するポリクローナルであり、検量線から 1.5 pg/well~135 pg/well の両化合物の測定が可能と

なった。つぎに、簡易化改良した GC/MS により、同一試料母乳中のダイオキシンを測定し、本 ELISA 法と比較したところ、GC/MS から得られた 2,3,7,8-TCDD と 1,2,3,7,8-PeCDD の合計値は、ELISA 法の測定値とほぼ一致する結果が得られ、さらに、TEQ と ELISA 法の測定値との関係には良好な相関関係が認められた。

2. 新規抗体の作製お ELISA 法の確立：1) ハプテン抗原、ハプテンタンパク結合物および標識体の合成：ELISA 構築に当りダイオキシンの対称構造を考慮して C-1 および C-2 位にスパーサー導入を図り、十数種合成した。これらの中から炭素鎖が 2~4 の 6 種 (C-1 結合 3 種、C-2 結合 3 種) を用いて常法に従い活性エステル法によりそれぞれ BSA 結合物と、HRP 標識体を作製した。2) ポリクローナル抗体の調製と ELISA 法の確立：得られた各ハプテン-BSA 6 種をウサギに免疫して得られた血清 (no.1~no.18) の中から抗体価が高く、TMDD による阻害効果も良好な抗血清 (no.5：C-1 ハプテン-BSA で免疫) と HRP 標識体 (II-6-HRP、C-2 位に HRP 導入) を選択した。最終的にサイトヘテロログスな ELISA 法を確立した。検量線の範囲は 1~625 pg/well で良好な精度および真度を与えた。さらに、抗血清 no.5 は TEF の大きい 2,3,7,8-TCDD、1,2,3,7,8-PeCDD およ 2,3,4,7,8-PeCDF と比較的高い交叉性が、また、1,2,3,4,7,8-HxCDD ともいくぶん交叉性がみられ、新規抗体を用いた本 ELISA 法の母乳実試料の測定への適用性は十分可能性が高く、TEQ との高い相関性が得られると期待される。3) モノクローナル抗体の調製：比較的良好な抗ダイオキシンポリクローナル抗血清が得られたハプテン-BSA 4 種を用いてマウスに免疫し、得られた各抗血清について各 HRP 標識体との反応性、ダイオキシンとの競合的な結合阻害効果を調べ、その中でも良好な結果を与えるマウス 2 匹を選択し、細胞融合実験を行い、有意な抗体産生を示したハイブリドーマについて現在、スケールアップ操作を行っている。

結論=今回、GC/MS との組み合わせ検討により、国外入手の抗体を用いた ELISA 法により、実際に母乳中の TEF の大きいダイオキシン 2 種の測定が可能であることが示され、高い正確さでヒトでの TEQ 換算曝露レベルの評価が可能となった。一方、国外抗体と同等もしくはさらに優れた国産のダイオキシン抗体の作製にも成功し、ELISA 測定法が確立できた。今後、クリーンアップ操作の検討を加え、早急に実生体試料の測定に応用したい。また、生体試料中のダイオキシンのスクリーニングやモニタリングに使用できる汎用性のある ELISA 法を確立するため、一定の品質の抗体を供給できるモノクローナル抗体の作製を成功させ、ELISA 法の確立を図るとともにイムノアフィニティー抽出法やクリーンアップへの応用についても検討を始める。さらに、ELISA 法の超高感度化を図り、測定試料を可能な限り少なくするため、ELISA 法と生物発光検出系を組み合わせた測定法の開発や非競合法のイディオメトリックイムノアッセイ系の開発を行うことを予定している。

総括研究報告書

生体試料中ダイオキシンの
酵素免疫アッセイ法の開発研究

主任研究者

松木容彦

(別紙 2)

平成 11 年度 厚生科学研究費補助金 (生活安全総合研究事業)
総括研究報告書

生体試料中ダイオキシンの酵素イムノアッセイ法の開発研究

主任研究者 松木容彦 (財)食品薬品安全センター 研究部長

研究要旨

本研究ではヒトの母乳、血液、脂肪、胎脂等のダイオキシンレベルの高感度かつ簡便な酵素イムノアッセイ測定法を確立するため、1. 国外より入手した抗体を用いて ELISA 法を確立し、生体試料測定への適用性について調べること、2. 国内で新しく抗体を作製し、確立した ELISA 法を用いて生体試料中のダイオキシンのモニタリングおよびスクリーニングを行うこと、3. 確立した ELISA 法の簡便化と高感度化を図ることの3つの視点で研究を進めた。

1. 国外入手抗体を用いた母乳中ダイオキシンの ELISA 法の構築と GC/MS との相関

既にダイオキシンの ELISA 法に関する報告は 2, 3 はみられるが、いずれも実用性に欠ける。そこでまず、ELISA 法による測定対象の選択とその適切性について確認するため、HRGC/MS により測定し得られたヒト母乳中のダイオキシンの同族体の各測定結果と毒性等価係数 (TEF) をもとに算出した毒性等量 (TEQ) との相関性について調べた。その結果、特に 2,3,7,8-TCDD、1,2,3,7,8-PeCDD と 2,3,4,7,8-PeCDF の 3 種が特に TEQ との相関が優れており、この 3 種を ELISA で測定できれば、毒性等量換算値としてのヒトでのダイオキシン曝露評価ができることが確認された。

そこで、ELISA 法を確立するとともにこの ELISA 法と同一試料を用いて測定値の正確さを保証できる GC/MS 測定法を確立した。すなわち、一般的に GC/MS 法で用いられているクリーンアップ法の改良とサロゲートの選択を行った結果、サロゲートとしては 4~6 塩基体分析用に (^{13}C) 1,2,3,4-TCDF を、7,8 塩基体分析用に (^{13}C) OCDD の使用が可能であり、また、クリーンアップには従来の操作を大幅に簡略した 3 層硫酸シリカゲルカートリッジを用いることにより対象物の測定が可能となることを確認した。さらに、確立した ELISA 法と GC/MS 法により同一試料中の母乳中のダイオキシンをそれぞれ測定したところ、ELISA 法で得られた測定値 (2,3,7,8-TCDD + 1,2,3,7,8-PeCDD) (今回用いた抗体は 2,3,4,7,8-PeCDF とは交叉しない) は GC/MS 法により得られた値とほぼ一致し、また、ELISA 法で得られた 2 種の TEQ は GC/MS で得られた総 TEQ 換算値と良好な相関が得られた。これらの結果から、本 ELISA 法は母乳中のダイオキシンの TEQ 換算曝露レベル評価に十分、実用性が高いことが示された。

2. 新規ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体作製と ELISA 法の構築

国外から入手した抗体はその性状が不明な点が少なく、また、高価でもある。さらに、使用に当たっては特許の問題をクリアしなければならないなどの問題も多い。そこで、新しくダイオキシンに対する抗体の作製を開始した。

1) ハプテン抗原、タンパク結合物および標識体の合成

ダイオキシン骨格の C-1 または C-2 に、末端にカルボキシル基を有し、酸アミド、エーテルあるいは二重結合を介した長さの異なるスペーサーを導入したハプテン抗原を十数種合成した。これらの中から数種のハプテンを選び、活性エステル法によりウシ血清アルブミン (BSA) との結合物を、また一方、西洋ペルオキシダーゼ (HRP) と反応させ数種の酵素標識体を得た。

2) ポリクローナル抗体作製および ELISA 法の構築

1) で得られたハプテン-タンパク結合物 6 種を用いてウサギ (各抗原に対し 3 匹) に免疫し、それぞれから抗血清を得、暫定的に確立した ELISA 法によりそれぞれ抗体価を調べた。ついで、良好な反応性を示した抗血清と HRP ハプテンの組み合わせの中から適切な組み合わせを選び、さらに TMDD (2,3,7-trichloro-8-methyl-dibenzo-o-dioxin) との競合反応を行い、至適な組み合わせを選択し、種々条件検討の末、ELISA 法を確立した。本 ELISA での 2,3,7,8-TCDD の標準曲線は 1 ~ 625 pg/well の範囲で良好な精度と真度を示した。また、使用した抗血清は TEF の大きな同族体である 2,3,7,8-TCDD、1,2,3,7,8-PeCDD、2,3,4,7,8-PeCDF の他に 1,2,3,4,7,8-HxCDD とも交叉性を有することから、本抗血清を ELISA 測定法に用いることにより TEQ と測定結果の相関性は向上し、生体試料中のダイオキシンの信頼性の高い曝露評価が可能になると推察された。

3) モノクローナル抗体

2) において良好な抗血清を与えたハプテン 4 種の BSA 結合物を BALB/c マウスに反復免疫投与し、血清中の抗ダイオキシン抗体価が良好な結果を与えた個体について、さらに TMDD による阻害効果により抗体の親和力について調べた。ついで、良好な結果が得られた BALB/c マウス 1 匹と A/J マウス 1 匹から得られた脾細胞と P3/NSI/1-Ag4-1 ミエローマ細胞およびポリエチレングルコールを用いて融合し、HAT 選択培養により得られた融合細胞の培養上清を ELISA によりスクリーニングした。その結果、BALB/c マウスの脾細胞に由来する 64 種のハイブリドーマが抗ダイオキシン抗体を分泌していることが示唆された。

3. 2.2)、2.3) で確立される ELISA 法をもとに、さらに検出系の高感度を果たすため、本年はそのモデルとして生体内微量生理活性物質についての生物発光検出法について検討した。すなわち、基質に APP を必要とせず、熱や化学修飾に対する安定性が優れたピルベートホスフェートジキナーゼ (PPDK) を標識酵素に用いる生物発光検出イムノアッセイ法を α -フェトプロテインやインスリン等の測定に応用した結果、いずれも再現性の良好な検量線感度はそれぞれ 2.79×10^{-8} mol/assay、 9.26×10^{-7} mol/assay であり、ダイオキシンのイムノアッセイに利用性の高いことが示された。

分担研究者 中澤裕之 星薬科大学教授

安生孝子 (財)食品薬品安全センター 化学試験室長

A. 研究目的

化学物質による環境汚染とそれらのヒト健康への影響の懸念から、大気、焼却灰、排ガス、排水、常水、食物等に含まれるダイオキシンについては、日本のみならず世界各国においても社会関心事である。ダイオキシンの測定については主に高分解能ガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリー (HRGC/MS) が用いられ、ダイオキシン異性体や同族体の測定の公的方法として採用されている。しかし、HRGC/MS による測定法では前述のいずれの試料種の測定においても多段階で複雑なクリーンアップ操作が避けられず、測定に要する操作時間は著しく長く、かつ測定経費も著しく高価なものとなっている。

一方、ダイオキシンによる環境や食物汚染が明らかになるにつれヒトでの汚染実態の解析や汚染推移状況の把握は行政上も急務とされ、安価でかつ迅速なヒトダイオキシンのスクリーニングまたはモニタリング法の開発が強く望まれている。

このような観点から、本研究ではダイオキシンのポリクロールまたはモノクロール抗体の作製を行い、これらを用いてヒトの生体試料 (母乳、血液、脂肪、胎児等) 中のダイオキシンの簡便でかつ高感度な酵素免疫測定法 (ELISA) を確立し、ダイオキシンによる汚染状況のスクリーニング調査やヒトでの経時的あるいは経年的体内曝露推移のモニタリングに資することを目的としている。また、本研究において得られる抗体と確立する ELISA 法は今後のダイオキシン曝露調査において広く活用されることが期待される。

B. 研究方法

1. 国外入手抗体を用いた母乳中ダイオキシンの ELISA 法の構築と GC/MS との相関
 - 1) 常法に従って GC/MS (キャピラリーカラム: DB-17ht、分解能 10000) により母乳 100 検体を分析し得られたダイオキシン異性体の中で毒性質量 (TEQ) と相関が高く、かつ検出量の多いダイオキシンを検索した。ダイオキシン異性体および同族体濃度はそれぞれ fat basis で換算し、TEQ は WHO-TEF (1988) を用いて算出した。
 - 2) ELISA 法の確立と GC/MS 法との比較
既存の抗体 (カリフォルニア大学デビス校より入手) を用いて ELISA 手法、溶媒、界面活性剤などの組み合わせについて検討し、至適条件について検討した。ついで同一母乳試料を用いて ELISA 法による測定値の真度や精度について GC/MS により確認するために試料に加えるサロゲート種について検討を行った。従来の GC/MS 測定に用いられている多層シリカゲルカラム処理法を改良して簡便な前処理操作を確立した。さらに、母乳を 2 分してそれぞれ確立した ELISA 法と GC/MS 法によりダイオキシン類を測定し、両手法による測定結果 (17 検体) の比較と毒性等量換算値の比較を行った。
 - 3) 生体試料の採取と GC/MS の開発
患者から母乳、臍帯血、母体血を中心に採取法の検討を行い、汚染に対する対応や採取操作の工夫などを行った。また、得られた胎脂、母乳脂を用いて GC/MS 法の検討を行った。
2. ハプテン抗原、ハプテン-タンパク結合物および標識体の合成

1) ハプテン抗原の合成
常法に従い、ダイオキシソ骨格 C-1 および C-2 位に結合種と長さの異なる側鎖を導入し、それぞれ 10 種および 8 種のハプテン抗原のエステル体を得た。

2) ハプテナータンパク結合物
1) で得られたハプテン抗原の中から C-1 および C-2 側鎖を有するハプテナーエステル体 6 種について脱エステル化後、N-ヒドロキシサクシニルイミド (NHS) と反応させ、これらのハプテン NHS エステル体を得た。ついで常法に従い、これらの NHS-エステル体と BSA との反応により目的の各ハプテナーBSA 結合物を得た。
3) 常法に従い 2) で得られたハプテナー NHS エステルと HRP との反応により目的の各ハプテナーHRP 標識体を得た。

3. ポリクローナル抗体の調製と ELISA 法の確立

1) 6 種のハプテナーBSA 結合物を常法に従い雄性ウサギ (各ウサギに免疫、各 3 匹) 背部皮内に 3 週間 5 回投与し、それぞれ各抗血清を得た。
2) 暫定 ELISA 法：第 2 抗体の抗ウサギ IgG ヤギ抗体をマイクロプレートタイタープレート (Nunc 4-39454) の各 well にコート後、抗血清/HRP ハプテン標識体混液を加え、結合した HRP-ハプテン標識体の吸光度 (490 nm) を測定した。
3) 抗ダイオキシソ抗体価の測定
2) の ELISA 法を用いて投与期間中に得られた血清について抗体価を調べた。
4) 至適 ELISA 条件の設定
3) の結果から抗体価の良好な抗血清について HRP-ハプテン標識体に対する TMDD 阻害反応性について調べた。つき

に最も良好な交換反応性を有する抗血清を選択し、さらにブロッキング液や反応液の条件も整えて最終的に至適 ELISA 条件を設定した。

5) 標準曲線と交叉性

4) で設定した ELISA 法により 2,3,7,8-TCDD の標準曲線を得、この標準曲線により他のダイオキシソ同族体 16 種についての交叉性を求めた。

4. モノクローナル体の調製

3) の実験結果をもとに抗体産生の良好な結果を与えたハプテン抗原 4 種を用い、それらの BSA 結合物を BALB/c マウスおよび A/J マウス (各 5 匹、計 40 匹) に隔週で計 7 回、反復免疫投与し、各マウスから抗血清を得た。3. と同様の手順で得られた各抗血清について抗ダイオキシソ抗体価について調べた後、良好な値を示した抗血清について TMDD による阻害効果について調べた。抗体価と阻害効果の良好なマウス個体から脾細胞を得、これらと P3/NS1/1-Ag4-1 ミエローマ細胞と融合させた。HAT 選択培養により得られた融合細胞の培養上清を ELISA によりスクリーニングし、抗ダイオキシソ抗体の分泌の有無を確認した。

5. PPKD 生物発光測定法

PPDK 測定用発光基質溶液に 560 μ M PEP、304 μ M PPI、5 μ M AMP、0.35 mM ルシフェリン、1 mg/mL ルシフェラーゼを加え、15 分後の発光強度を 5 秒間積算し、測定した。

(倫理面への配慮)

以下に示すような倫理面での注意点と対応を行い、本実験を実施した。

取り扱う物質は特に毒性の高い物質であることから特定の実験区域を設け、実験は可能な

限りフィルター完備のドラフト内で実施した。また、他の一般試薬等や器具類と標準品や実験器具類の区分、これらの取り扱い、器具洗浄の方法、廃棄容器とその設置、標準品等の保管管理あるいは事故時の処理法等については予め、簡単な操作手順書を作成し、自主的管理体制を築いて実施した。また、実験担当者においては実験操作手順書を作成し、極力安全に実験が行えるように心掛けるよう指導した。実験廃棄物や動物屍体処理は露出しないようにダイオキシン廃棄物処理操作手順を決め、それに従って処理し、所定の手続きにより専門業者に委託することとした。当面、専門業者がいない時には、汚染物をまとめて廃棄物保管庫に保管し、厳重に管理するとともにその記録を保管する。動物実験に当たっては動物愛護の観点から、動物に苦痛を与えないように飼育管理を行い、処置操作にも十分配慮する。被験者からの採乳に当たっては十分なインフォームドコンセントを得るとともに、倫理委員会からの承認を得ることとした。

C. 研究結果ならびに考察

1. 国外入手抗体を用いた母乳中ダイオキシンの ELISA 法の構築と GC/MS との関連

1) GC/MS 法を用いて母乳 100 検体を分析し、得られた各ダイオキシン同族体毎に TEQ との相関性を求めた結果、毒性等価係数 (TEF) が高かつ依存量比も大きい 1,2,3,7,8-PeCDD と 2,3,4,7,8-PeCDF が TEQ に対して高い相関 ($r=0.962$, $r=0.941$) があることがわかった。2,3,7,8-TCDD については 5 塩素体に比し、その存在量比が小さいため相関が $r=0.759$ と低く、十分正確な測定精度が得られないためと考えられた。これらの結果から 1,2,3,7,8-PeCDD と 2,3,4,7,8-PeCDF が ELISA の測定対象として最適であることが確認された。

2) ELISA 法の確立と GC/MS との比較

ELISA 法としては既存の間接競合法を採用した。抗体は国外で作製されたもので、2,3,7,8-TCDD と 1,2,3,7,8-PeCDF に対しほぼ等価で反応するポリクローナル抗体なので本 ELISA 法により得られる測定結果は、この両化合物の合計量である。

確立した本 ELISA 法により得られた検量線から判断して 1.5 pg/well~135 pg/well のダイオキシンの測定が可能と思われた。つぎに、ELISA 法の正確さを調べるため、GC/MS のクリーンアップ操作をカートリッジタイプのカラムを採用するなど簡便化、また適切なサロゲートの選択を行い、同一試料を用いて両測定法により母乳中のダイオキシンを測定して両測定値の比較を試みたところ、GC/MS から得られた 2,3,7,8-TCDD と 1,2,3,7,8-PeCDD の合計値は、ELISA 法の測定値とほぼ一致する結果が得られ、また、TEQ と ELISA 法の測定値との関係には良好な相関関係が認められた。

3) 本年度は東海大学付属病院産科外来において当院で分娩予定の患者に対し、採取目的、方法など十分に説明し、インフォームドコンセントを得、同意書を作成し、検体を採取した。確定した採取法に従い、母乳脂、母体血、胎脂を各患者から得、各 GC/MS 測定機関へ提供した。GC/MS 測定機関の方では、母乳脂、胎脂試料を用いてクリーンアップ条件の検討を行い、ダイオキシンならびに PCB の測定法を確立した。

2. ハプテン抗原、ハプテナータンパク結合物および標識体の合成

ELISA 構築に当りダイオキシンの対称構造を考慮して C-1 および C-2 位にスペーサー導入を図った。また、産生する抗体の分子構造認識機序に関する免疫抗体学的情報に基づき、スペーサー種を変えて末端にカルボ

キシル基を有し、酸アミド体、エーテル体、さらに、オレフィン体などを側鎖にもつ十数種のハプテン抗原を合成した。これらの中から炭素鎖が2~4の6種(C-1結合3種、C-2結合3種)を用いて常法に従い活性エステル法によりそれぞれBSA結合物を作製した。また、ハプテン抗原数種については同様にしてHRPによる標識化を行い各標識体を作製した。各ハプテン抗原の構造については既知報告との分析値の比較あるいはUVスペクトル、マススペクトル等から確認した。また、BSA結合物やHRP標識体については透析、クロマトグラフィー挙動および特徴的なスペクトルから確認した。また、免疫にはタンパク1分子に対しハプテン抗原10分子以上の結合物を用いた。

3. ポリクローナル抗体の調製とELISA法の確立

得られた各ハプテン-BSA 6種をウサギに免疫して得られた血清(no.1~no.18)の中から抗体価が高く、TMDDによる阻害効果も良好な抗血清(no.5: C-1ハプテン-BSAで免疫)とHRP標識体(II-6-HRP、C-2位にHRP導入)を選択した。さらに、ブロッキング液や反応液に含まれる界面活性剤やタンパク種、さらには被験物質の溶解液の性状についても検討を加え、最終的にサイトヘテロログスなELISA法を確立した。検量線の範囲は1~625 pg/wellで良好な精度および真度を与えた。さらに、抗血清no.5は、TMDDの他に毒性等価係数の高い2,3,7,8-TCDD、1,2,3,7,8-PeCDDおよび2,3,4,7,8-PeCDFと比較的大きな交叉性が、また、1,2,3,7,8-PeCDDおよび2,3,4,7,8-PeCDともいくぶん交叉性がみられた。従って前述した1. 実験結果からも明らかなように本ELISA法の母乳実試料の測定への適

用性は十分可能性が高く、TEQとの高い相関性が得られると期待される。

4. モノクローナル抗体の調製

3.の結果を踏まえ比較的良好な抗ダイオキシン抗血清が得られたハプテン-BSA 4種を用いてマウスに免疫し、得られた各抗血清についてC-1およびC-2結合手を有する各HRP標識体との反応性を調べ、さらにダイオキシンとの競合的な結合阻害効果を調べた結果、3.で述べたポリクローナル抗体実験で得られたような明確な阻害は認められなかったが、その中でも良好な結果を与えるマウス2匹を選択し、細胞融合実験を行った。各ハイブリドーマについてELISA法により抗ダイオキシン抗体産生の有無を確認し、有意な抗体産生を示したハイブリドーマについて現在、スケールアップ操作を行っており、得られる抗ダイオキシンモノクローナル抗体を用いて今後イムノアフィニティー抽出法の構築やELISA法の確立を行うことと予定している。

5. PPDK生物発光測定法

PPDKを標識酵素に用いた生物発光測定法においては、PPDKの検量線は 3.5×10^{-20} ~ 4.5×10^{-16} mol/assayの間で直線性を示し、最小検出感度は $\sim 1.36 \times 10^{-20}$ mol/assayであった。また、 α -フェトプロテイン(AFQ)およびインスリンのBL-EIAにPPDK反応系を導入した結果、最小検出感度は 2.79×10^{-18} mol/assay および 9.26×10^{-17} mol/assayであり、これらの測定結果は蛍光酵素イムノアッセイとの相関も良好であった。したがって、今後、ダイオキシンのイムノアッセイ系高感度へのPPDK標識酵素の利用性が十分期待された。

D. 結論

これまでも国外でダイオキシン ELISA用のポリクローナルおよびモノクローナル抗体の作製は試みられているが、実用化された例はなく、今回、GC/MSとの組み合わせにおいて母乳のクリーンアップを工夫することにより国外から入手した抗体を用いて実際に母乳中の毒性等価係数の高いダイオキシン2種の測定が可能であることが示され、高い正確さでヒトでのTEQ換算曝露レベルの評価が可能となった。また、母乳脂、胎脂についての簡易GC/MS測定法を確立した。一方、国外抗体と同等もしくはさらに優れた国産のダイオキシン抗体の作製にも成功し、ELISA測定法が確立できた。今後、クリーンアップ操作の検討を加え、実試料の測定に応用したい。また、生体試料中のダイオキシンのスクリーニングやモニタリングに使用できる汎用性のあるELISA法を確立するためモノクローナル抗体の作製を行いELISA法の確立を図るとともにイムノアフィニティー抽出法やクリーンアップへの応用について検討している。さらに、良好なモノクローナル抗体が入手できた段階では、ELISA法の高感度を図るため、ELISAに生物発光検出系を組み入れた高感度測定法の開発やイディオメトリックイムノアッセイ系の開発を行うことを予定している。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sugawara, Yukio, Gee, S.J., Sanborn, J.R., Gilman, S.D., Hammock, B.D. Development of a Highly Sensitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Based on Polyclonal Antibodies for the Detection of Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins, *Analytical Chemistry*, 1998, Vol. 70, No. 6, p. 1092-1099.
- 2) Sanborn, J.R., Gee, S.J., Gilman, S.D., Sugawara, Y., Jones, A.D., Rogers, J., Szurodoki, F., Stanker, L.H., Stoutamire, D.W., Hammock, B.D., Hapten Synthesis and Antibody Development for Polychlorinated Dibenzo-p-dioxin Immunoassays, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998 Vol. 46, Issues 6, p. 2407-2416
- 3) Suzuki E., Nakagomi M., Hashimoto M., Agui M., Iida S., Konno K., Hara Y., Kurihara H., Matsuki Y. Imai K. and Ono H. : Preparation of specific antisera to 15 α hydroxyestrogens. *Steroids*, (1999) 64, 551-557
- 4) Nakagomi M., Yamada K., Matsuki Y., Kurihara H. and Suzuki E. : Enzymic immunoassay of 17 α -estradiol 17-N-acetylglucosaminide in rabbit urine in relation to pregnancy. *Steroids*, (1999) 64, 301-307
- 5) Ikegawa s., Isriyanthi Ni. M. R., Kobayashi N., Miyairi S. and Goto J. : Production and characterization of monoclonal antibodies recognizing the asymmetric center of optically active bufuranol and its metabolites. *Anal. Sci.* (1999) 16, 31-35.
- 6) Kobayashi N., Oiwa H. and Goto J. : Production and characterization of groupspecific monoclonal antibodies recognizing nonamidated ursodeoxycholic acid 7-N-acetylglucosaminides. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* (1998) 64, 171-177.
- 7) 小林典裕、後藤順一：イムノアフィニティー抽出法—バイオメディカル分析に威力を発揮するカスタムメイドの高選択的処理法— . *分析化学*(1998) 47, 557-562.

- 8) ITO K., GOTO T., MURAKAMI S. and MAEDA M.: Bioluminescent enzyme immunoassay for mouse interleukin-6 using acetate kinase as label. *Anla. Sci.*, (1999) 15, 91-93.
- 9) ITO K., GOTO T., MURAKAMI S., MAEDA M. SHIOTA S. and ARIMURA A. : Bioluminescent enzyme immunoassay for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide 38 (PACAP38). *Anal. Chim. Acta*, (1999) 382, 245-251.
- 10) Arakawa H., Kanemitsu M. and Maeda M. : Chemiluminescence assay for catecholamines by the generation of hydrogen peroxide in basic solution and the use of isoluminol-microperoxidase. *Anal. Sci.*, (1999) 15, 1269-1272.
- 11) S.Hori, Y.Konishi, K.Kuwabara: *Organohalogen Compounds*, 44,141
- 12) 堀 伸二郎: ダイオキシン類(PCDDs, PCDFs, Co-PCBs)の分析の実際, *ジャパニフードサイエンス*, 38, 58(1999)
- 村上成治: Pyruvate Phosphate Dikinase を用いる新規生物発光検出法の開発とその応用, *日本薬学会第 119 年会* 1999 年 3 月
- 3) 伊藤克敏、村上成治、後藤照貴、西村一美、荒川秀俊、前田昌子: : ルシフェリン-ルシフェラーゼ生物発光検出による生体成分の微量分析, 第 13 回生体成分の分析化学シンポジウム 1999 年 8 月
- 4) 西村一美、伊藤克敏、村上成治、荒川秀俊、前田昌子: PPK を用いる新規生物発光検出法の開発とその応用, 第 39 回日本臨床化学学会年会 1999 年 10 月
- 5) 西村一美、伊藤克敏、荒川秀俊、村上成治、前田昌子: Pyruvate Phosphate Dikinase を標識酵素に用いる生物発光検出酵素イムノアッセイの検討, *日本薬学会第 120 年会* 2000 年 3 月
- 6) S.Hori, Y.Konishi, K.Kuwabara: 19th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs, September 12-17, 1999-Venice, Ital

F. 知的所有権の取得状況

2. 学会発表

- 1) 斎藤貢一、菅原幸雄、小林 進、中澤裕之: 第 5 回免疫化学測定法研究会学術講演会シンポジウム(神戸)、2000 年 6 月:(発表予定)、タイトル: ELISA による母乳中のダイオキシン毒性評価法の開発-GC/MS 法との両立は可能か? -
- 2) 西村一美、伊藤克敏、荒川秀俊、前田昌子、

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録その他

なし

3. その他

なし

国外産ポリクローナル抗体を用いるダイオキシンの ELISA 法の
確立と実用性の検討 (分担研究者 中澤裕之)

分担研究報告書

母乳中ダイオキシンの ELISA による測定法の構築と GC/MS との相関
中澤 裕之 (星薬科大学)

協力研究報告書

免疫アッセイ法によるダイオキシン類のスクリーニング法の開発
堀 伸二郎 (大阪府立公衆衛生研究所)

臍帯血、母体血、母乳採取に関する研究
牧野 恒久 (東海大学医学部)

平成 11 年度厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業） 分担研究報告書

生体試料中ダイオキシンの酵素免疫アッセイ法の開発研究

－（１）母乳中ダイオキシンの ELISA による測定法の構築と GC/MS との相関－

主任研究者	松木 容彦	財団法人食品薬品安全センター	研究部長
分担研究者	中澤 裕之	星薬科大学	教授
研究協力者	小林 進	埼玉県衛生研究所	所長
	齊藤 貢一	埼玉県衛生研究所	専門研究員
	菅原 幸雄	コスモ総合研究所	主査

研究概要

本研究においては、高感度かつ簡便な生体試料中のダイオキシンの酵素免疫測定法 (ELISA) を開発し、ヒト試料における毒性評価法としての有用性について検討した。本年度の研究では、まずその戦略として、ダイオキシン分析における ELISA を単に簡便なスクリーニング法ではなく、直接的に毒性を評価できる方法として位置づけることにした。そのために、実際に母乳を分析して得られたダイオキシン異性体のなかで、毒性等量 (TEQ) と相関が高く、かつ検出量の多い異性体を調べたところ、1,2,3,7,8-PeCDD 及び 2,3,4,7,8-PeCDF が ELISA で検出するターゲットとして最も適していることがわかった。次に既存の GC/MS 法と両立させるために、前処理操作の共通化を試みた。GC/MS 測定に必要なサロゲートで、ELISA に影響を及ぼさないダイオキシン異性体の検討を行ったところ、4~6 塩素体分析用に (^{13}C)1,2,3,4,-TCDF、7,8 塩素体分析用に (^{13}C)OCDD が使用可能であることがわかった。また、従来極めて煩雑であった前処理操作を簡便化するために、多層シリカゲルカラムに代わる 3 層硫酸シリカゲルカートリッジを試作し、その有用性を確認した。ELISA で使用する抗体や酵素標識抗原については、既に国外で作製されたものを用いてアッセイ系の至適化を検討した。実際に、母乳を対象として、本研究で検討・開発した ELISA でダイオキシンを測定したところ、検出対象とした 2,3,7,8-TCDD と 1,2,3,7,8-PeCDD の合計量は、GC/MS 法で得られた値とほぼ一致し、更に、TEQ に対しても良好な相関を示した。これらの結果から、本研究で開発した ELISA が母乳中ダイオキシンの曝露評価法として十分に実用性があることが確認された。

A. 研究目的

ダイオキシンによる生態系や食物への汚染とそれらによって引き起こされるヒトの健康影響に対する社会的関心は高く、ヒトへの曝露とその汚染実態を把握することは

行政上の急務かつ重点課題である。また、平成 12 年にダイオキシン類対策特別措置法が施行されたことにより、今後、測定の対象種と試料数はますます増大することが予想される。

従来、ダイオキシンの測定には高分解能ガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリー(GC/MS)が用いられてきたが、GC/MSで測定するためにはいずれの試料種においても他段階で煩雑なクリーンアップ操作を必要し、測定に要する時間と経費は著しく高価なものとなっていることから、コストが安価で簡便かつ高感度なダイオキシン測定法の開発が、行政及び国民の中からも強く望まれている。このような観点から、本研究においてはヒト生体試料中ダイオキシンの簡便で迅速かつ高感度な酵素免疫測定法(ELISA)を確立し、ダイオキシン汚染実態のモニタリング調査に資することを目的としている。

本年度の研究においては、まず 1)ELISAを単に簡便なスクリーニング法ではなく、直接的に毒性等量換算曝露レベル評価が可能な方法として位置づけること、2)貴重な生体試料を有効に活用するために GC/MS法と ELISA で共通の前処理操作が行うことができ、それぞれが両立する方法を構築すること、3)煩雑な前処理操作を簡便なものとする、4)実試料(母乳)において、GC/MS法との相関性を調べることを具体的な目標とした。

B. 研究方法

本研究で目標とする分析法の概念をフローで示した(Fig.1)。すなわち、脂肪抽出後、最初に簡便な前処理(ステップI)を行い、直ちに ELISA でその曝露評価を行う。その後、詳細な異性体別濃度が必要になった場合には、ELISA で得られた結果をフィードバックさせて、更に試料のクリーンアップ(ステップII)を行い、GC/MS で測定する。

そのために必要な ELISA の戦略として次の4項目を検討した。

B-1 毒性評価法構築のためのターゲットとする異性体の検討

ELISA は特定の化学物質に対してのみ特異的な測定が行えるという性質上、GC/MS法のように異性体ごとに分離・定量することはできない。しかし、毒性の高い異性体との反応が強くて毒性の低い異性体との反応が小さい抗体を用いることによって、その測定結果は単なる検出値にとどまらず、必然的に毒性の高さを表したものと見なすことができる。このコンセプトを基盤とした ELISA による毒性評価法を構築するためには、実際に生体試料から検出される各種の異性体とその毒性等量(TEQ)との関係を調べる必要があった。そこで、GC/MS法を用いて母乳100検体を分析し、得られたダイオキシン異性体のなかで、毒性等量(TEQ)と相関が高く、かつ検出量の多い異性体を調べた。

母乳中ダイオキシンの分析方法は、常法に従って脂肪抽出後、硫酸処理、続いて各種クロマトグラフィー(シリカゲル、アルミナ、及び活性炭シリカゲル)を行い、GC/MSで測定した。その際、GCでの分離用キャピラリーカラムには DB-17ht を用い、高分解能 MS には JEOL JMS-700 を用い、分解能を 10000 に設定してロックマス法により SIM 測定した。ダイオキシン異性体濃度はそれぞれ fat basis で計算し、TEQ は WHO-TEF(1998)を用いて算出した。

B-2 アッセイ系の検討

ELISA を行う上で最も重要な位置を占め

る抗体については、本研究班内の他のグループがハプテン合成からの地道な研究を行っているが、我々は既存の抗体についてもその有用性を検討することにした。既に本研究の研究協力者が作製したもの（文献1）及び国外（カリフォルニア大学デイビス校：UC Davis）で作製された抗体を用いて、ELISA としての手法（直接競合法、間接競合法、サンドイッチ法など）や使用する溶媒及び界面活性剤の種類など、高感度かつ高精度のアッセイ系を確立するために、その至適条件について検討を行った。なお、抗体については、UC Davis の Dr. Bruce D. Hammock より提供を受けた。

B-3 GC/MS 法との両立

GC/MS によるダイオキシン分析では、試料の前処理操作に際して、測定対象物質 (native) の安定同位体 (主に ^{13}C) をサロゲートとして添加し、両者の比から濃度を算出する、いわゆる同位体希釈質量分析法が採用されている。その際、安定同位体の種類として、通常は 17 種類の 2,3,7,8 位塩素置換異性体全てか、あるいはジオキシンとジベンゾフランそれぞれの同族体ごとに最低 1 種類 (合計 10 種類) 添加される場合が多い。そのため、GC/MS 法用にサロゲートを添加した場合、そのサロゲートが ELISA において交差反応を起こすことから、通常は GC/MS 法と ELISA を共存させることは難しい。そこで、本研究では、ELISA で交差反応を起こさず、かつ GC/MS 法で精度良く異性体の測定が可能なサロゲートを検討することにした。そのために具体的に次の条件を設定した；①ELISA における交差反応性が極めて小さいこと、②通常の GC/MS 法

では 4~6 塩素体、及び 7,8 塩素体の 2 つのグループに分けて測定されることから、サロゲートがそれぞれのグループにおいて 1 種類ずつ入るようにすること、③サロゲートの回収率からクリーンアップが問題なく適正に行われていたかどうか確認できること、④選定したサロゲートで測定した値が通常の方法で測定した値と一致すること。

B-4 前処理操作の簡便化

ダイオキシンの分析において、前処理操作の簡略化について検討した。従来は、例えば母乳分析の場合、脂肪抽出後、硫酸処理、続いて各種クロマトグラフィー（シリカゲル、アルミナ、及び活性炭シリカゲル）が行われてきた。しかし、これらの操作は煩雑であり、長時間を必要とする。特に硫酸処理は濃硫酸を用いることから取り扱い上難点があり、また廃液処理にも問題が残る。そこで、ELISA のための前処理操作として、アルカリ分解と多層シリカゲルカラム処理法を採用することにし、本年度の研究では、クリーンアップ操作として重要な位置を占める多層シリカゲルカラムを容易に行う手法について検討した。

従来の多層シリカゲルカラムでは充填剤の種類・量ともに多く、カラムへの充填操作が極めて煩雑であり、且つ熟練を必要とした。そこで充填剤の種類の省略化と充填剤量のスケールダウンについて検討した。更に、充填操作の省力化のために、ディスポーザブルタイプのカートリッジに予め同様に充填したものを試作し、その性能評価を行った。

B-5 ELISA による実試料分析 (GC/MS 分析