

し、以下の操作で洗浄した。・洗剤 (Extran MA 01 [メルク] 5%溶液) に一晩以上浸け置き、そのまま超音波洗浄・脱塩水で洗浄および超音波洗浄・アセトン洗浄・超純水で置換、乾燥後アルミホイルで巻く・200°C 2時間加熱・フタレートがない場所で放冷後、蓋をする

(4) 検体の分離・保存

母体血、臍帯血の採取については、抗凝固剤を用いずに採取し、すぐにスピッツへ分注、遠沈は 2000 回転で 20 分行い、上清の血清のみ採取して、スピッツへ注出した。保存は -4°C で行った。母乳採取は、搾乳器を用いずに直接哺乳びんに採取し、キャップはアルミホイルで行ったのち、-4°C で保存した。

C. 結果

平成 11 年度分として 4 月 1 日から 12 月 31 日までの間に採取した各患者の症例概要を表 1 に、また、母体血、臍帯血および

母乳脂の採取量を表 2 に示した。これらの各試料を各研究協力者に頒布した。

D. 結論

生体試料採取という立場からは、患者個々の対応、採取状況や条件などの複雑問題もあり、採取検体量にどうしても制限が有るため、必ずしも予定した量を採取できない例もあった。また、全く採取できない症例もかなり存在することから、今後、多面的な検討を行い、各分担研究所の希望検体数を確実に提供できるように準備する。また、臍帯血、母体血、母乳といった一連のペア検体に加えて、胎脂、毛髪といった検体についても提供できるよう、患者の協力をあおぎながら準備をすすめていきたい。

E. 研究発表

なし

F. 知的所有権の取得状況

なし

表1 検体採取症例の概要

年齢	: 30.9 ± 4.8 (20-29) 才
身長	: 158.1 ± 5.3 (146.0-168.0) cm
体重	: 59.3 ± 5.1 (48.2-72.0) kg
分娩歴	: 0経 15, 1経 11, 2経 3, 3経 1 症例
分娩週数	: 39週3日 ± 2日 (37週4日, 41週1日)
出生体重	: 3016.2 ± 301.8 (2330-3642) g
性別	: 男児 10, 女児 20 症例

表2 1999年度 母体血・臍帯血・母乳採取状況

No	母体血(mL)	臍帯血(mL)	母乳(mL)
16	5.5	18.4	30
17	5.4	5.5	
18	8	4	
19	5	5.9	50
20	2	8.5	50
21	7.5	17	50
22	5.2	17	40
23	5	10	30
24	7.3	13.5	
25	6.3	13.7	50
26	7.2	16.8	
27	8.5	10	60
28	6	6	10
29	8.5	14	5
30	10	20	50
31	6	7	10
32	7	9.5	
33	5	8	35
34	8	17	20
35	5	10	
36	4.5		
37	7.2	22	50
38	8	15	50
39	7	23	50
40	7	17	
41	6	19	10
42	8	9	30
43	6.5	11.5	50
44	8	18	5
45	8	8	50

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)

分担研究報告書

ポリクローナル抗体を用いるダイオキシンの酵素免疫アッセイ法の確立
安生 孝子 ((財)食品薬品安全センター秦野研究所)

協力研究報告書

2位に側鎖を導入したダイオキシンハプテンの合成ならびに蛋白および
酵素結合物の調製 神戸川 明 (神戸川研究所)

ダイオキシン1位に側鎖を導入したカルボン酸を有するハプテンの合成
佐藤 雅之 (静岡県立大学薬学部)

ウサギポリクローナル抗体を用いる酵素免疫アッセイ法の開発
奥山 光伸 ((財)食品薬品安全センター秦野研究所)

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)
研究報告

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
ーポリクローナル抗体を用いるダイオキシンの酵素免疫アッセイ法の確立ー

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	安生 孝子	財団法人食品薬品安全センター	室長
研究協力者	佐藤 雅之	静岡県立大学薬学部	教授
	神戸川 明	神戸川研究所	所長
	奥山 光伸	財団法人食品薬品安全センター	

研究要旨

生体試料中のダイオキシン類の高感度かつ簡便な酵素免疫アッセイ法の開発を目的とし、本年度は、まず、ジベンゾダイオキシン骨格の C-1 および C-2 の位置に側鎖を導入したハプテンの合成を行った。スペーサー部にはアミド結合、エーテル結合または二重結合を導入し、これらを介して末端にカルボキシル基を有するハプテンを、既知物質も含め、C-1 の位置については10種、C-2 については8種合成した。ついで、これらのうち、6種のハプテンの蛋白 (BSA) 結合物を免疫原としてウサギに投与し、抗ダイオキシン抗血清を得た。得られたポリクローナル抗体および8種の酵素 (HRP) 標識ハプテンを用いてアッセイ系を検討し、ヘテロログス系、すなわち、C-1 の側鎖に BSA を結合した免疫原により調製した抗体と、C-2 の側鎖に HRP を結合した酵素標識ハプテンの組み合わせで、最も高感度なアッセイ系を確立できた。標準曲線は2,3,7,8-TCDD 1~625 pg/well の範囲で作成することができ、また、毒性等価係数の大きいダイオキシン異性体に高い交差反応性を示した。

A. 研究目的

ダイオキシン類による環境や食物の汚染とそれらのヒトの健康への影響に対する社会的関心は高く、ヒトでの曝露と汚染の状況の把握が急務となっており、重要課題である。一方、種々の試料中のダイオキシンの測定には、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 (GC/MS) が用いられているが、煩雑なクリーンアップ操作を必要とするため、測定には長時間を要し、経費は著しく高価となっている。そのため、安価で簡便かつ高感度なダイオキシンの測定法の開発が強く望まれている。このような観点から、本研究においては、ヒトの生体試料中のダイオキシン類の簡便かつ高感度な酵素免疫アッセイ法を確立

し、ヒトでの曝露や汚染の実態のモニタリングに資することを目的としている。

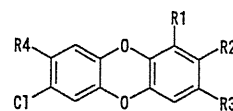
本年度は、まず、酵素免疫アッセイ法を確立するために必要なハプテン、すなわち、ダイオキシン骨格の C-1 および C-2 の位置に種々の側鎖を導入したハプテンの合成を行った。ついで、ハプテンの蛋白 (BSA) 結合物を免疫原として抗ダイオキシン抗血清を得、この抗血清と酵素 (HRP) 標識ハプテンを用いて酵素免疫アッセイ法の基礎的検討を行った。

B. 研究方法

B-1. ダイオキシン骨格の C-1 に側鎖を導入したハプテンの合成

まず、スペーサー部にアミド結合を有するハ

ブテンを合成するために、その母核となるダイオキシンの1-アミノ体を、4,5-ジクロロカテコールとクロロジニトロベンゼン体とのカップリング反応後、ニトロ基を還元することにより合成した。この1-アミノ体を酸無水物と反応させることにより、または、酸クロリドと反応後、生成したエステルを加水分解することにより、スペーサー部にアミド結合を有するハブテンを合成した。本方法により、I-1、I-2、I-3、I-4、I-7、I-8およびI-9の7物質を合成した。つぎに、スペーサー部に二重結合を有するハブテンを合成した。2,3,6-トリクロロベンズアルデヒドを出発物質とし、ニトロ化、ついで、Horner-Emmons 反応によりオレフィン部を導入した後、4,5-ジクロロカテコールとのカップリング反応によりダイオキシン骨格を構築した。生成したエステルを加水分解することにより、I-5、I-6およびI-10の3物質を得た。



ハブテン	R1	R2	R3	R4
I-1	NHCO(CH ₂) ₂ COOH	H	C1	C1
I-2	NHCO(CH ₂) ₃ COOH	H	C1	C1
I-3	NHCO(CH ₂) ₄ COOH	H	C1	C1
I-4	NHCOCH=CHCOOH	H	C1	C1
I-5	CH=CHCOOH	C1	C1	C1
I-6	CH=C(CH ₃)COOH	C1	C1	C1
I-7	NHCO(CH ₂) ₂ COOH	C1	C1	C1
I-8	NHCO(CH ₂) ₃ COOH	C1	C1	C1
I-9	NHCO(CH ₂) ₄ COOH	C1	C1	C1
I-10	(CH=CH) ₂ COOH	C1	C1	C1
II-1	H	OCH ₂ COOH	C1	C1
II-2	H	O(CH ₂) ₃ COOH	C1	C1
II-3	H	O(CH ₂) ₄ COOH	C1	C1
II-4	H	CH=CHCOOH	C1	C1
II-5	H	(CH=CH) ₂ COOH	C1	C1
II-6	H	CH=CHCOOH	H	C1
II-6M	H	CH=CHCOOH	H	CH ₃
II-6B	H	CH=CHCOOH	H	C(CH ₃) ₃

加水分解することにより合成した。本方法により、II-4およびII-5を合成した。また、4-クロロ-3-ニトロベンズアルデヒドを出発物質とし、これに Wittig 試薬を反応させた後、4-メチルまたは 4-*tert*-ブチルカテコールをあらかじめクロル化して得たそれぞれの 5-クロロ体あるいは 4,5-ジクロロカテコールとのカップリング反応によりダイオキシン骨格を構築し、エステルを加水分解することにより、II-6、II-6M およびII-6B を合成した。

B-3. 酵素イムノアッセイ法の検討

まず、ハブテン6物質 (I-1、I-2、I-5、II-1、II-2、II-4) を N-コハク酸イミドエステル (活性エステル) に導いた後、BSA と反応させ、透析等により未反応のハブテンを除去して BSA 結合物を調製した。これらをフロイントの完全アジュバントと混合してエマルジョンとし、各免疫原につき雄ウサギ3匹に投与し、抗血清を調製した。一方、ハブテン8種を選択し、同様に活性エステル法により HRP 標識ハブテンを調製した。

酵素イムノアッセイ法はマイクロプレートを用いる二抗体固相法により行った。すなわち、

B-2. ダイオキシン骨格の C-2 に側鎖を導入したハブテンの合成

まず、スペーサー部にエーテル結合を有するハブテンを合成した。2,5-ジクロロフェノールを出発物質として、エーテル結合を導入後ニトロ化してジクロロニトロ体を合成し、Sanbornらの方法により 4,5-ジクロロカテコールとのカップリング反応に付した。生成したダイオキシンの2-ヒドロキシ体にプロモアルキルカルボン酸エチルエステルを反応させて再度エーテル結合を導入し、エステルを加水分解することにより、スペーサー部にエーテル結合を有するII-1、II-2およびII-3を合成した。一方、スペーサー部に二重結合を有するハブテンは、2,4-ジクロロベンズアルデヒドを出発物質として、ニトロ化、ついで、Wittig 試薬を反応させてオレフィン部を導入した後、4,5-ジクロロカテコールとのカップリング反応によりダイオキシン骨格を構築し、生成したエステルを

抗ウサギ IgG ヤギ抗体を固相化した各ウエルに、抗血清、HRP 標識ハプテンおよびダイオキシンの標準溶液を加え、4℃で一晩反応した。各ウエルを洗浄後、 α -フェニレンジアミンを基質として酵素活性を測定した。また、アッセイ系に用いる抗血清の希釈率、HRP 標識ハプテンの濃度、ブロッキング液および反応液ならびに溶媒についてそれぞれ検討した。2,3,7,8-TCDD または 2,3,7-trichloro-8-methylbenzo[1,4]dioxin (TMDD) の標準曲線はともに 1~625 pg/well の範囲で作成し、ダイオキシン異性体の交差率は、それぞれの添加量と標準曲線による測定値を基に算出した。

C. 研究結果および考察

C-1. ダイオキシン骨格の C-1 に側鎖を導入したハプテンの合成

スペーサー部にアミド結合および二重結合を導入し、これらを介して末端にカルボキシル基を有するハプテン I-1~I-10 (I-3、I-5 は既知物質) を合成した。これらの構造は NMR、MS 等により確認した。

C-2. ダイオキシン骨格の C-2 に側鎖を導入したハプテンの合成

スペーサー部にエーテル結合および二重結合を導入し、これらを介して末端にカルボキシル基を有するハプテン II-1~II-6、II-6M、II-6B (II-4、II-5、II-6M は既知物質) を合成した。これらの構造は NMR、MS 等により確認した。

C-3. 酵素イムノアッセイ法の検討

本研究において合成したハプテンのうち、6物質 (I-1、I-2、I-5、II-1、II-2、II-4) を選択し、活性エステル法により BSA 結合物を調製した。これら BSA 結合物を免疫原としてウサギに投与し、抗ダイオキシン抗血清を調製した。一方、ハプテン 8 種を選択し、活性エステル法により HRP 標識ハプテンを調製した。得られたポリクローナル抗体および HRP 標識ハプテンを用いて酵素イムノアッセ

イ法を検討した。その結果、アッセイ系には二抗体固相法を採用し、抗体には I-2 の BSA 結合物を投与して得た抗血清を、酵素標識ハプテンには HRP 標識した II-6 を用いるとき、最も高感度であった。さらに、アッセイ系における溶媒の影響等についても検討を加えたところ、2,3,7,8-TCDD または TMDD 1~625 pg/well の範囲で標準曲線を作成することができ、その精度、真度も良好であった。また、1,2,3,7,8-PeCDD、1,2,3,4,7,8-HxCDD、2,3,7,8-TCDF、2,3,4,7,8-PeCDF に対して比較的高い交差率を示した。

抗ダイオキシン抗血清および HRP 標識ハプテンの組み合わせならびにアッセイ系の条件を検討し、高感度なヘテロログス系の酵素イムノアッセイ法を確立した。2,3,7,8-TCDD 1~625 pg/well の範囲で標準曲線を作成することができ、また、毒性等価係数の大きいダイオキシン異性体に対して高い交差反応性を示し、毒性等量のモニタリングへの適用の可能性が示唆された。

D. 結論

ダイオキシン骨格の C-1 および C-2 の位置に側鎖を導入した種々のハプテンを合成し、その BSA 結合物をウサギに投与して、抗ダイオキシン抗血清を調製した。このポリクローナル抗体を用いて酵素イムノアッセイ法の基礎的な検討を行い、ヘテロログス系、すなわち、I-2 の BSA 結合物により調製した抗体と HRP 標識した II-6 の組み合わせで、高感度なアッセイ系を確立した。今後、本アッセイ系を生体試料に適用するために、生体試料からのダイオキシン類の抽出精製法の検討が必要である。

E. 研究発表

なし

F. 知的所有権の取得状況

なし

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）
研究報告

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
－ 2 位に側鎖を導入したダイオキシンハプテンの合成ならびに
蛋白および酵素結合物の調製－

主任研究者 松木 容彦 食品薬品安全センター秦野研究所 研究部長
分担研究者 安生 孝子 食品薬品安全センター秦野研究所 室長
研究協力者 神戸川 明 神戸川研究所 所長

研究要旨

ダイオキシン類の高感度かつ簡便な酵素イムノアッセイ法を確立することを目的として、まず、抗原および酵素標識体の調製に必要なハプテンを合成した。ジベンゾダイオキシン骨格の C-2 の位置に種々の側鎖を導入したハプテンを対象物質として、スペーサー一部のエーテル結合または二重結合を介して末端にカルボキシル基を有するハプテン 8 種を合成した。つぎに、本研究および佐藤雅之により合成された C-1 および C-2 の位置に側鎖を導入したハプテンのうち、数種を選択して、抗体の調製に用いる抗原としてのハプテン-蛋白 (BSA) 結合物ならびにアッセイ系に用いる酵素 (HRP) 標識ハプテンを調製した。

A. 研究目的

ダイオキシン類のラジオイムノアッセイ法および酵素イムノアッセイ法については、これまでにいくつかの報告がみられるが、感度や特異性等十分な結果が得られていない。一方、ダイオキシン類によるヒトでの曝露や汚染の実態の把握またはモニタリングが行政上必要とされている。そこで、高感度かつ簡便な、さらに短時間に多数の試料の測定が可能な酵素イムノアッセイ法の確立を目的とし、抗体作製に必要なダイオキシンハプテンの合成を行った。合成に際しては、既知ハプテンの状況、合成の難易度、毒性等を考慮し、ジベンゾダイオキシン骨格の C-2 の位置に種々の側鎖を導入したハプテン (図 1) を対

象物質とした。また、抗原としての蛋白 (BSA) 結合物およびアッセイ系に用いる酵素 (HRP) 標識体の調製を行った。

B. 研究方法

B-1. 使用試薬

カリウム-*tert*-ブトキシド、2-メトキシエタノール、4-*tert*-ブチルカテコール、4-メチルカテコール、2,4-ジクロロベンズアルデヒド、ホスホノ酢酸トリエチル、4-ホスホノクロトン酸トリエチル、プロモ酢酸エチル、4-プロモ酪酸エチル、塩化スルフリル:Aldrich または関東化学

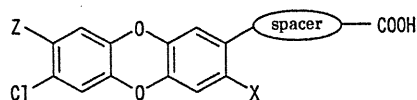
BSA、HRP、N-ヒドロキシコハク酸イミド、塩酸 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド:Sigma

B-2. 使用機器

紫外分光光度計:Hitachi 2000

GC-MS:Hewlet Packard 5890GC および 5972MS

マイクロプレートリーダー:TOSO MPR A4



X = H, Cl
Z = Cl, CH₃, C(CH₃)₃

図 1

B-3. スペーサー部にエーテル結合を有する
ダイオキシンハプテンの合成

まず、図2に示すように、文献¹⁾の方法によりカテコールから4,5-ジクロロカテコール(1)を合成した。一方、1とカップリングさせるジクロロニトロ体(3)を、文献^{2,3)}の方法により2,5-ジクロロフェノールから2工程で合成した。ついで、Sanbornら⁴⁾の方法に準じて、1と3をDMF中 *t*-BuOKの存在下加熱還流してカップリング反応を行った。しかしながら、得られた化合物は目的とする5aではなく、側鎖のない2-ヒドロキシ体(4)であった。そこで、4に炭酸カリウムの存在下プロモ酢酸エチル、4-プロモ酪酸エチルまたは5-プロモ吉草酸エチルを反応させて5a、5bまたは5cに導いた。さらに、これらを2-メトキシエタノール中水酸化カリウムにより鹼化し、2位にスペーサーを介して末端にカルボキシル基を有する6a、6bまたは6cを得た。

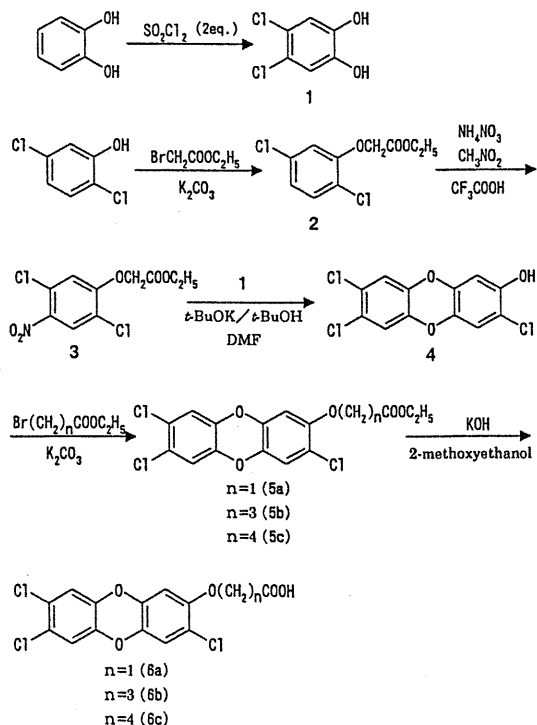


図 2

以下に実施例を示した。

1) Ethyl 2-(2,5-dichlorophenoxy)-
Acetate (2) の合成

2,5-ジクロロフェノール 2 g を DMSO 2 mL に溶かし、プロモ酢酸エチル 2 mL および炭酸カリウム 2 g を加えて 65-70°C で 2 時間攪拌した。塩酸酸性とした後、酢酸エチルで抽出し、溶媒留去後の残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付した。ヘキサン-ベンゼン混液で溶出し、2を得た。

2) Ethyl 2-(2,5-dichloro-4-nitrophenoxy)-
acetate (3) の合成

2 1.7 g をニトロメタン 10.8 mL とトリフルオロ酢酸 2.3 mL の混液に溶かし、氷冷下、翔さんアンモニウム 1.3 g を 3 回に分けて加えて室温、1 時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮後、水を加えてエーテルで抽出した。アルカリ水溶液で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を留去して得られた油状物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付した。ヘキサン-ベンゼン混液で溶出し、ヘキサン-酢酸エチルより再結晶して 3 を得た。

3) 1 と 3 のカップリング反応

1 356 mg (2 mmol) および 3 310 mg (1.1 mmol) を DMF 1 mL に溶かし、*t*-BuOK/*t*-BuOH 溶液 (1 mol/L) 2 mL を加えて一晩加熱還流した。酢酸エチルで抽出後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ベンゼン-メタノール混液で溶出して 2-hydroxy-3,7,8-trichlorodibenzo[1,4]dioxin (4) (265 mg、収率 65%) を得た。

4) 5a、5b および 5c の合成

4 265 mg を DMSO 1 mL に溶かし、炭酸カリウム 1 g およびプロモ酢酸エチル 0.2 mL を加えて 100°C で一晩攪拌した。常法により処理後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーに付して精製し、ethyl 2-((3,7,8-trichlorodibenzo[1,4]dioxin-2-yl)oxy)-

acetate (5a) を得た。同様に、4-ブロモ酪酸エチルおよび 5-ブロモ吉草酸エチルを用いて、4 から、ethyl 4-((3,7,8-trichlorodibenzo[1,4]dioxin-2-yl)oxy)butyrate (5b) および ethyl 5-((3,7,8-trichlorodibenzo[1,4]dioxin-2-yl)oxy)valerate (5c) を合成した。

5) 6a、6b および 6c の合成

5a 100 mg を 2-メトキシエタノール 1 mL に溶かし、水酸化カリウム水溶液 30 mg/0.15 mL を加えて 80°C、1 時間加熱した。塩酸酸性とした後、温めた酢酸エチルで抽出し、水洗後、溶媒を留去して粗結晶を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ベンゼン-メタノール混液で溶出し、2-((3,7,8-trichlorodibenzo[1,4]dioxin-2-yl)oxy)acetic acid (6a) を得た。同様にして、5b および 5c から 4-((3,7,8-trichlorodibenzo[1,4]dioxin-2-yl)oxy)butyric acid (6b) および 5-((3,7,8-trichlorodibenzo[1,4]dioxin-2-yl)oxy)valeric acid (6c) を得た。

B-4. スペーサー部に二重結合を有するダイオキシンハプテンの合成

まず、図 3 に示すように、文献⁵⁾の方法に従って、2,4-ジクロロベンズアルデヒドをニ

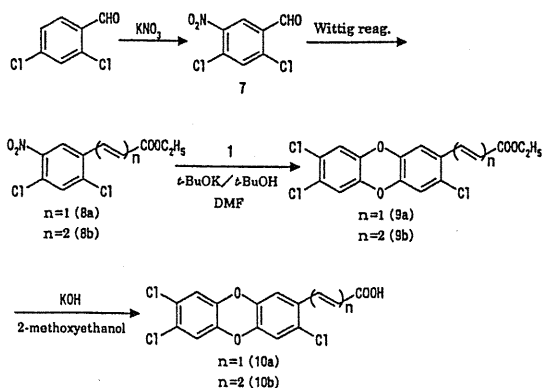


図 3

トロ化して 2,4-ジクロロ-5-ニトロベンズアルデヒド (7) を得、7 を Wittig 試薬で処理することにより、オレフィン部を導入した化合物 8 を合成した。ついで、この 8 と前述の 1 とのカップリング反応により、ダイオキシン骨格を構築し、2 位のスペーサー部に二重結合を有する 9 を合成した。前述と同様、9 を鹼化して 10 を得た。なお、10a および 10b は既知物質である。

別に、図 4 に示すように、4-メチルカテコールおよび 4-tert-ブチルカテコールを塩化スルフリルによりクロル化し、4-メチル-5-クロロカテコール (11a) および 4-tert-ブチル-5-クロロカテコール (11b) を合成した。一方、4-クロロ-3-ニトロベンズアルデヒドを Wittig 試薬による処理に付して、オレフィン部を導入した化合物 12 を合成した。この 12 とカテコール (1 または 11) とのカップリング反応により 2 位のスペーサー部に二重結合を有する 13 を合成した。ついで、前述と同様、13 を鹼化し、14 を得た。なお、14a は既知物質である。

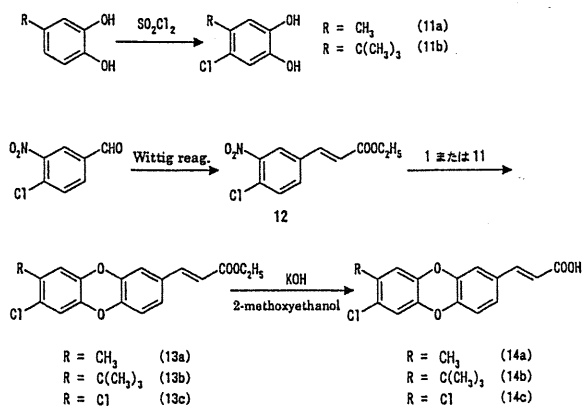


図 4

以下に実施例を示した。

1) 2,4-Dichloro-5-nitrobenzaldehyde (7) の合成

2,4-ジクロロベンズアルデヒド 3.5 g (20 mmol) を硫酸 50 mL に溶かし、氷冷下、硝酸カリウムの硫酸溶液 2 g (20 mmol)/10 mL を

滴下した。90 分間攪拌後、反応液を氷水にあげ、析出した結晶を濾取、水洗し乾燥した。酢酸エチルより再結晶し、7 を得た (収率 60%)。

2) 8a および 8b の合成

ホスホノ酢酸トリエチルの THF 溶液 1.6 g (7.2 mmol)/7 mL に 60% NaH (0.35 g) を少しずつ加え、発砲が治まったら、7 の THF 溶液 1.1 g (5 mmol)/3.5 mL を徐々に加えて 60°C で 2 時間加熱した。反応液を窒素気流下濃縮後、酢酸エチルで抽出し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去後、酢酸エチルより再結晶して ethyl(*E*)-3-(2,4-dichloro-5-nitrophenyl)propenoate (8a) を得た。同様にして、7 から 4-ホスホノクロトン酸トリエチルを用いて ethyl(*E,E*)-5-(2,4-dichloro-5-nitrophenyl)penta-2,4-dienoate (8b) を合成した。

3) 9a および 9b の合成

8a 640 mg (2.2 mmol) および 1 500 mg (2.7 mmol) を無水 DMF 1.6 mL に溶かし、窒素気流下 *t*-BuOK/*t*-BuOH 溶液(1 mol/L) 6 mL を加えて 1 時間加熱還流した。還流冷却器を外して 140-150°C に加熱して大部分の溶媒を除いた後、温めたベンゼンで抽出した。希塩酸、温水で順次洗浄後、ベンゼン層を放冷し、析出した結晶を濾取した。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ベンゼン-酢酸エチル混液で溶出して ethyl(*E*)-3-(3,7,8-trichlorodibenzo [1,4]dioxin-2-yl)propenoate (9a) (120 mg、収率 14%) を得た。同様にして、8b と 1 とのカップリング反応により、ethyl(*E,E*)-5-(3,7,8-trichlorodibenzo[1,4]dioxin-2-yl) penta-2,4-dienoate (9b) を合成した。

4) 10a および 10b の合成

9a 100 mg を 2-メトキシエタノール 1 mL に溶かし、水酸化カリウムの水溶液 30 mg/

0.15 mL を加えて 80°C、1 時間加熱した。前述と同様に処理して (*E*)-3-(3,7,8-trichlorodibenzo[1,4]dioxin-2-yl)-propenoic acid (10a) (94 mg) を得た。同様の方法により、9b を鹼化して (*E,E*)-5-(3,7,8-trichlorodibenzo[1,4]dioxin-2-yl)penta-2,4-dienoic acid (10b) を得た。

5) 4-Methyl-5-chlorocatechol(11a) および 4-*tert*-butyl-5-chlorocatechol(11b) の合成

4-メチルカテコール 4.7 g をエーテル 20 mL に溶かし、氷冷下塩化スルフルル 3.2 mL を滴下後、室温、1 時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮乾固し、ヘキサンより再結晶して 11a を得た。同様にして、4-*tert*-ブチルカテコールから 11b を合成した。

6) Ethyl(*E*)-3-(4-chloro-3-nitrophenyl)-propenoate (12) の合成

4-クロロ-3-ニトロベンズアルデヒドを、8a の場合と同様に、ホスホノ酢酸トリエチルで処理して、12 を合成した。

7) 13a、13b および 13c の合成

11a または 11b と 12 を、9 の場合と同様に、カップリング反応に付し、それぞれ ethyl(*E*)-3-(7-chloro-8-methyldibenzo-[1,4]dioxin-2-yl)propenoate (13a) または ethyl(*E*)-3-(7-chloro-8-*tert*-butyldibenzo[1,4]dioxin-2-yl) propenoate (13b) を合成した。同様にして、前述の 1 と 12 とのカップリング反応により、ethyl(*E*)-3-(7,8-dichlorodibenzo[1,4]dioxin-2-yl)-propenoate (13c) を合成した。

8) 14a、14b および 14c の合成

13a、13b および 13c を、前述と同様に、2-メトキシエタノール中水酸化カリウムで鹼化して、それぞれ (*E*)-3-(7-chloro-8-methyldibenzo[1,4]dioxin-2-yl)propenoic acid (14a)、(*E*)-3-(7-chloro-8-*tert*-

butyldibenzo[1,4]dioxin-2-yl)propenoic acid (14b) および (*E*)-3-(7,8-dichloro-dibenzo[1,4]dioxin-2-yl)propenoic acid (14c) を合成した。

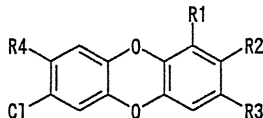
B-5. ハプテン-BSA 結合物の調製

本研究および佐藤雅之により合成されたハプテンのうち、図5に示すものについて BSA 結合物を調製した。すなわち、まず、文献⁶⁾の方法に準じて、ハプテンに塩酸 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドの存在下、N-ヒドロキシコハク酸イミドを反応させて N-コハク酸イミジルエステル(活性エステル)に導いた。ついで、この活性エステルと BSA を常法により反応させ、透析等により未反応のハプテンを除いて BSA 結合物を調製した。

以下に実施例を示した。

ハプテン 50 mg に N-ヒドロキシコハク酸イミド 40 mg、塩酸 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド 65 mg および DMF 200 μ L を加えて 50°C で 1 時間加温後、一晩放置した。温めた酢酸エチルで抽出し、水洗後溶媒を留去、酢酸エチルより再結晶して活性エステルを得た。この活性エステル 25 mg を DMF 200 μ L に加温して溶かし、これを BSA 50 mg を 0.1 mol/L 炭酸緩衝液 (pH 10) 1 mL-ジオキサン 1 mL の混液に溶か

図 5



R1	R2	R3	R4
NHCO(CH ₂) ₂ COOH	H	Cl	Cl
NHCO(CH ₂) ₃ COOH	H	Cl	Cl
CH=CHCOOH	Cl	Cl	Cl
H	OCH ₂ COOH	Cl	Cl
H	O(CH ₂) ₃ COOH	Cl	Cl
H	CH=CHCOOH	Cl	Cl

した溶液に滴下し、1 mol/L の水酸化ナトリウムを加えて pH を保ちながら 1 時間反応した。反応液を水に対して透析後、pH 10 で遠心し上清を分離した。これを pH 4.5 とし析出したものを遠心により得、アルカリ水溶液で溶解後 pH 7.4 に調整し BSA 結合物とした。冷蔵保存により未反応のハプテンが析出したときは、遠心によりこれらを除去し、上清を使用した。また、ハプテンと BSA の結合モル比は UV 法により求めた。

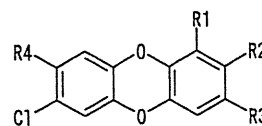
B-6. ハプテン-HRP 結合物 (酵素標識体) の調製

本研究および佐藤雅之により合成されたハプテンのうち、図6に示すものについて HRP 結合物を調製した。すなわち、前述の活性エステルを炭酸水素ナトリウム水溶液中 HRP と反応させた後、ゲル濾過により未反応のハプテンを除去した。BSA 結合物と同様、冷蔵保存により析出する未反応のハプテンを除去後、クロロホルムで洗浄し、HRP 結合物を得た。

以下に実施例を示した。

HRP 4 mg (0.1 μ mol) を 5 mmol/L の炭酸水素ナトリウム水溶液 200 μ L に溶かし、これに前述の活性エステルの DMF 溶液 200 μ g/4 μ L または 300 μ g/6 μ L を加えて混和した。室温 30 分後、セファデックス G-25

図 6



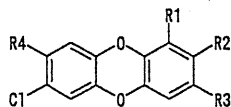
R1	R2	R3	R4
NHCO(CH ₂) ₃ COOH	H	Cl	Cl
NHCO(CH ₂) ₄ COOH	H	Cl	Cl
CH=CHCOOH	Cl	Cl	Cl
CH=C(CH ₃)COOH	Cl	Cl	Cl
H	CH=CHCOOH	Cl	Cl
H	CH=CHCOOH	H	Cl
H	CH=CHCOOH	H	CH ₃
H	CH=CHCOOH	H	C(CH ₃) ₃

を用いるゲル濾過に付し、HRP 結合物の画分を分取した。冷蔵保存により生じる沈澱物を除去後、その上清を5倍量のクロロホルムで2回洗浄し、HRP 結合物を得た。

C. 研究結果および考察

1) ジベンゾダイオキシン骨格の C-2 の位置に、エーテル結合または二重結合を有するスペーサーを介して末端にカルボキシル基を持つ側鎖を導入したハプテンを、既知物質も含め、以下の8物質を合成した(図7)。

図 7



ハプテン	R1	R2	R3	R4
6a	H	OCH ₂ COOH	Cl	Cl
6b	H	O(CH ₂) ₃ COOH	Cl	Cl
6c	H	O(CH ₂) ₄ COOH	Cl	Cl
10a	H	CH=CHCOOH	Cl	Cl
10b	H	(CH=CH) ₂ COOH	Cl	Cl
14a	H	CH=CHCOOH	H	Cl
14b	H	CH=CHCOOH	H	CH ₃
14c	H	CH=CHCOOH	H	C(CH ₃) ₃

2) 本研究および佐藤雅之により合成されたハプテン 18 物質のうち、6 物質を選択し、抗原として用いる BSA 結合物を調製した。また、8 物質を選択してアッセイ系に用いる HRP 結合物を調製した。

今回合成したダイオキシンハプテンは、佐藤雅之により合成されたハプテンとともに、酵素イムノアッセイ法による 2,3,7,8-TCDD の検出法の開発を目的としたものである。ダイオキシン骨格における側鎖の位置およびスペーサー部の構造の異なるこれらハプテンは、アッセイ系における抗体と HRP 結合物との組み合わせを検討し、より高感度な測定系の確立に有用であると考えられる。

D. 結論

ダイオキシン類の酵素イムノアッセイ法を

開発することを目的として、今回、種々の側鎖を導入したダイオキシンハプテンを合成した。また、測定法の確立に必要な抗体を作製するためのハプテン-BSA 結合物およびアッセイ系に用いるハプテン-HRP 結合物を調製した。今後、これらを用いて得られる結果およびこれまでに得られている知見を基に、ダイオキシンの毒性や曝露、汚染のモニタリングの観点からより適切な測定系を確立するためのハプテン設計の可能性が期待される。

E. 文献

- Willstatter, R., Muller, H.E. : Uber chloroderivate des brenzcatechins und des o-chions. Ber. Dtsch. Chem. Ges. 44. 2182-2191 (1911)
- Singh, S.K., Kumar, S.: Synthesis of oxygenated derivatives of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. J. Agric. Food Chem. 41. 1511-1516 (1993)
- Oliver, J.E., Ruth, J.M. : Nitration of two TCDDs and their conversion to 1,2,3,6,7,8-HCDD. Chemosphere 12. 1497-1503 (1983)
- Sanborn, J.R., Gee, S.J., Gilman, S.D., Sugawara, Y., Jones, A. D., Rogers, J., Szurdoki, F., Stanker, L.H., Stoutamire, D. W., Hammock, B.D.: Hapten synthesis and antibody development for polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin immunoassays. J. Agric. Food Chem. 46. 2407-2416 (1998)
- Aldous, F.A., Barrass, B.C., Brewster, K., Buxton, D.A., Green, D.M., Pinder, R. M., Rich, P., Skeels, M., Tutt, K.J.: Structure-activity relationships in

- psychomimetic phenylalkylamines. J. Med. Chem. 17. 1100-1111 (1974)
- 6) Hosoda, H., Sakai, Y., Yoshida, H., Miyairi, S., Ishii, K., Nambara, T. : The preparation of steroid N-hydroxysuccinimide esters and their reactivities with BSA. Chem. Pharm. Bull. 27. 742-746 (1979)
- F. 研究発表
なし
- G. 知的所有権の取得状況
なし

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）
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
ーダイオキシン 1 位に側鎖を導入した
カルボン酸を有するハプテンの合成ー

主任研究者	松木 容彦	食品薬品安全センター秦野研究所	研究部長
分担研究者	安生 孝子	食品薬品安全センター秦野研究所	室長
協力研究者	佐藤 雅之	静岡県立大学薬学部	教授

研究要旨

現在、化学物質による環境汚染とそれらのヒトの健康への影響の観点から、大気、焼却灰、排ガス、土壌、食物等に含まれるダイオキシンは社会的関心事であり、その測定に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(GC/MS)が用いられている。しかし、GC/MS による測定法においては、いずれの種の試料についても多段階で複雑なクリーンアップ操作を必要とするため、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。一方、昨今の社会的情勢を鑑みるに環境や食物汚染状況の把握に加え、ヒトの汚染実態などの把握は急務となっており、重要課題である。測定の対象種と試料数は今後益々増大することが予想されることから、簡便で高感度な測定法を確立し、安価なスクリーニング法を早急に提供することが強く望まれる。

このような観点から、本研究においてはヒトの生体試料中ダイオキシン類の簡易でかつ高感度な酵素免疫アッセイ法を確立し、特にヒトでのダイオキシンによる汚染のモニタリングや状況調査に資することを目的としている。本研究においては、抗体入手に必要な種々のハプテン抗原、アッセイに必要な酵素標識抗原、ポリクロナール抗体ならびにモノクロナール抗体の作製が必要であるが、今回、当研究者は、ダイオキシン 1 位に側鎖を導入したカルボン酸を有するハプテンの作製を担当した。

作製に当たっては、ジベンゾダイオキシン骨格の C-1 の位置に種々の側鎖（以下スペーサー）を導入したハプテン抗原のみを今回の対象とし、既知物質から新規物質に至る多くのハプテン抗原の合成を計画した。

抗体作製にあたっては、スペーサー結合部近傍環境の認識能が低下する事例が知られている。そこで、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo[1,4]dioxin（以下 2,3,7,8-TeCDD）を検出対象とした抗体作製のためには、スペーサー結合隣接部位である C-2 位に塩素原子を導入した化合物と共に塩素原子を導入しない化合物の両者を比較することが望ましいと考えられる。よって合成対象物質としては、1 位にスペーサーを導入したカルボン酸を有する 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo[1,4]dioxin ならびに 3,7,8-trichlorodibenzo[1,4]dioxin とした。

スペーサー部には、アミド結合、二重結合、エーテル結合を導入することとし、種々の検討の結果、計 10 検体のハプテンを合成した。

A. 研究目的

2,3,7,8-TeCDD 検出のための酵素免疫アッセイ法確立を目的とし、抗体入手に必要なダイオキシンハプテンの作成を行った。

ハプテン作成にあたっては、

1. 既知抗原の状況
2. 合成の容易さ
3. 毒性

等を考慮し、ジベンゾダイオキシン骨格の C-1 の位置に種々のスペーサーを導入したハプテン抗原のみを今回の対象とし対象物質を選定した。(図 1)

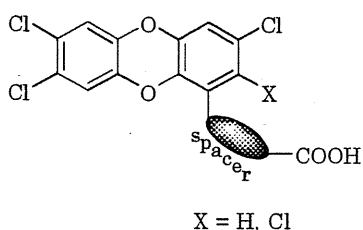


図 1

B. 研究方法

1. 使用試薬

硝酸カリウム、硫酸、炭酸カリウム、塩酸、塩化ナトリウム、塩化スズ(II)、発煙硝酸、塩化亜鉛、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、ジメトキシエタン、硫酸ナトリウム、ジメチルスルホキシド、メタノール、エタノール、エーテル、ヘキサン、酢酸エチル、トルエン、ピリジン、2,5-ジクロロニトロベンゼン、2,4,5-トリクロロニトロベンゼン、2,3,6-トリクロロベンツアルデヒド、トリエチル 2-ホスホプロピオネート、トリエチル 3-ホスホプロピオネート、無水コハク酸、無水グルタル酸、塩化チオニル、フマル酸モノエチルエステル、*t*-ブタノール、水素化ナトリウム (60%油性)、2-メトキシエタノール、テトラヒドロフラン、ジメチル

ホルムアミド、亜硝酸ナトリウム、尿素、硝酸銅(II)：和光純薬(株)

ベンゼン、二塩化オキサリル、シリカゲル 60：関東化学(株)

カテコール、コハク酸モノエチルエステルクロライド：東京化成(株)

アジピン酸モノメチルエステル、ジベンゾ-18-クラウン-6, 1,1,1,3,3,3-ヘキサメチルジシラザン、42%フルオロホウ酸：Aldrich co. n-ブチルリチウム (1.6M ヘキサン溶液)：半井(株)

2. スペーサー部にアミド結合を有するダイオキシンハプテンの合成

1) 1-Amino-3,7,8-TrCDD (4)および 1-amino-2,3,7,8-TeCDD (8)の合成

スペーサー部にアミド結合を有するハプテンの合成を行うために、まずその母核となる 1-amino-3,7,8-trichlorodibenzo-[1,4]dioxin (4) 及び 1-amino-2,3,7,8-tetrachlorodibenzo[1,4]dioxin (8) を文献¹⁾記載の方法で合成した。

すなわち、図 2 に示すように、4,5-ジクロロカテコール(1)²⁾を合成し、これとクロロニトロベンゼン体(2)あるいは(6)とをカップリングさせる方法で合成した。

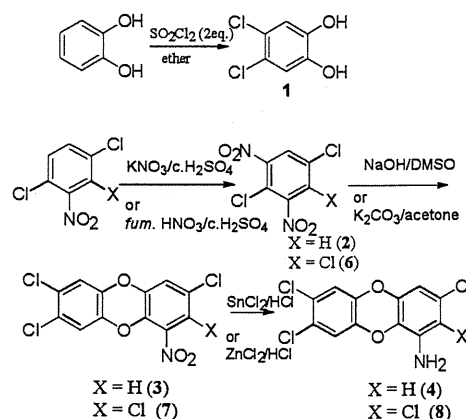


図 2

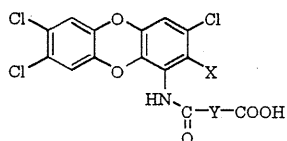
2) 4 および 8 へのスペーサー部の導入

次いで、TCDD の 1-アミノ体からスペーサー一部にアミド結合を有するハブテンの合成方法として、2 種類検討した。

Method A: ダイオキシンのアミノ体を酸無水物と反応させることによりスペーサー一部にアミド結合を有するハブテンを合成する方法。

Method B: Schotten-Baumann 反応を応用し、塩基性条件下で、ダイオキシンのアミノ体と酸クロライドを反応させ、生成したエステル体を加水分解することによりスペーサー一部にアミド結合を有するハブテンを合成する方法。

1-amino-3,7,8-trichlorodibenzo[1,4]-dioxin (4) 及び 1-amino-2,3,7,8-tetrachlorodibenzo[1,4]dioxin (8) に上記いずれかの方法を適用することにより、スペーサー一部にアミド結合を導入したハブテン 7 検体(5a - 5d, 9a - 9c)を合成した。(図 3) なお、5c は既知物質¹⁾である。



Comp.	X	Y	Method	Yield (%)
5a	H	(CH ₂) ₂	B	9
5b	H	(CH ₂) ₃	A	50
5c	H	(CH ₂) ₄	B	14
5d	H	CH=CH	B	35
9a	Cl	(CH ₂) ₂	B	45
9b	Cl	(CH ₂) ₃	B	32
9c	Cl	(CH ₂) ₄	B	21

図 3

3) 5a - 5d および 9a - 9c 合成の実施例
4-[(3,7,8-Trichlorodibenzo[1,4]dioxin-1-yl) carbamoyl] butyric Acid (5b) の合成 (Method A)

1-Amino-3,7,8-trichlorodibenzo[1,4]-dioxin(4) (100 mg, 0.32 mmol) 及び無水グルタル酸(36 mg, 0.32 mmol)を THF(3 mL)に溶解し、75 °Cで 10 時間加熱還流した。冷後、無色固形物をろ取り、メタノールから再結晶することにより 5b(66.8 mg, 50%)を得た。

(E)-3-[(3,7,8-Trichlorodibenzo[1,4]dioxin-1-yl) carbamoyl] propionic Acid (5d) の合成 (Method B)

フマル酸モノエチルエステル(2 g, 13.9 mmol)を無水ベンゼン(17 mL)に溶解し、無水ピリジン(1 滴)及び二塩化オキサリル(1.8 mL)を加え、一夜攪拌することにより粗製フマル酸モノエチルエステルクロライドを得た。

次いで、化合物 4(200 mg, 0.66 mmol)を無水ピリジン(6 mL)に懸濁し、これに粗製フマル酸モノエチルエステルクロライド(107 mg, 0.66 mmol)を氷冷下滴下した。1 時間攪拌後、これにエーテルを加え、不溶物を濾去した。ろ液は、1N 塩酸、水、0.8N 炭酸カリウム、水の順に洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、エーテルを減圧溜去後、残渣を 95% エタノール(40 mL)に溶解した。これに、0.3N 水酸化ナトリウム(20 mL)を加え、90 分間還流した。冷後、1N 塩酸で酸性とし、エーテル(100 mL)で 3 回抽出した。エーテル層を合わせ、水洗し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧下溜去し、5d(93 mg, 35%)を得

た。

4- [(2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo [1,4]-dioxin-1-yl) carbamoyl] butanoic Acid (9b)の合成 (Method B)

化合物 8 (500 mg, 1.49 mmol) を無水ピリジン (20 mL) に懸濁し、氷冷下エチルグルタルクロライド (0.4 mL) を徐々に滴下した。反応液を室温まで昇温し 17 時間攪拌後、反応液に氷片を少量加え、エーテルおよび 1N 塩酸を加えエーテル層を分取した。エーテル層を飽和食塩水、2N 炭酸ナトリウム水溶液 (2 回)、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下溜去し、3-[(2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-[1,4] dioxin-1-yl) carbamoyl]butanoic acid ethyl ester を得た。これをエタノール (110 mL) に溶解し、1N 水酸化ナトリウム (45 mL) を加え、1 時間加熱還流した。冷後、反応液を 1 N 塩酸 (約 14 mL) で酸性とし、溶媒を減圧下溜去した。残渣を水洗し、乾燥後、エーテルで洗浄することにより 9b (230 mg, 32 %) を得た。

3. スペーサー部に二重結合を有するダイオキシンハブテンの合成

1) 合成手順

スペーサー部が堅固となる二重結合を有するハブテン (13a - c) の合成を行った。(図 4)

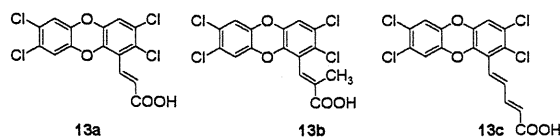


図 4

13の合成は 2,3,6-trichlorobenzaldehyde を出発物質とし、ニトロ化 (10)、次いで、

あらかじめ Horner-Emmons 反応によりオレフィン部を導入した後 (11a - c)、化合物 1 とのカップリング反応よりダイオキシ骨格を構築した。(図 5) なお 13a は既知物質³⁾である。

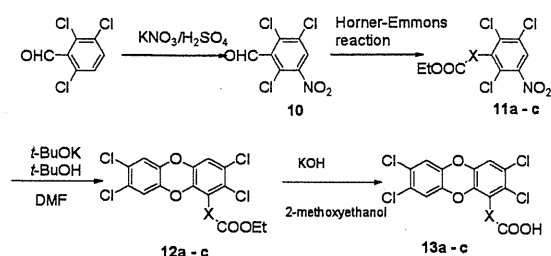


図 5

1) 13a - c 合成の実施例

Ethyl (*E*)-3-(2,5,6-Trichloro-3-nitrophenyl)-2-methylpropionate (11b) の合成
氷冷下、無水 THF (10 mL) に triethyl 2-phosphonopropionate (2.5 g, 11 mmol), 60 % NaH (0.6 g, 45 mmol) を加え、1 時間攪拌した。これに 2,3,6-trichloro-5-nitrobenzaldehyde (10) (2.5 g, 10 mmol) を加え、さらに 1 時間攪拌した後、反応液を氷水に注いだ。析出した結晶を吸引ろ取することにより、11b (3.0 g, 89 %) を得た。

Ethyl (*E*)-3-(2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo[1,4]dioxin-1-yl)methylpropionate (12b) の合成

無水 DMF (6 mL) に化合物 1 (1.2 g, 6.6 mmol) 及び、化合物 11b (2.0 g, 6.0 mmol) を溶解した。次いで反応液を氷冷し、これに $t\text{-BuOK}/t\text{-BuOH}$ 溶液 (12 mL) を加えた。反応液を 145 °C まで昇温し、そのまま 2 時間加熱した。冷後、反応液を水に注ぎ、析出した結晶を吸引ろ取し、よく水洗した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ($n\text{-ヘキサン}:\text{酢酸エチル}=9:1$) により

精製することにより, 12b(599 mg, 23%)を得た。

(*E*)-3-(2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo[1,4]-dioxin-1-yl)methylpropionic Acid (13b)の合成

化合物 12b(500 mg, 1.48 mmol)を 2-methoxyethanol(15 mL)に溶解し, これに水酸化カリウム(240 mg)の水溶液(5 mL)を加え, 1 時間還流した。冷後, 1 N 塩酸で酸性とし, 析出した結晶を吸引ろ取した。残渣をよく水洗し乾燥後, 少量のエーテルで洗浄することにより, 13b(240 mg, 52.3%)を得た。

Ethyl (*E, E*)-5-(3,5,6-Trichloro-2-nitrophenyl-1-yl) penta-2,4-dienoate (11c)の合成

三頸フラスコ中 1,1,1,3,3,3-hexamethyl-disilazane(3.7 mL, 0.02 mmol)を無水 THF(40 mL)に溶解し, -78 °Cで *n*-ブチルリチウム(1.6 M *n*-ヘキサン溶液 14.3 mL, 0.02 mmol)を徐々に滴下した。次いで triethyl 4-phosphonocrotonate(5.5 mL, 0.02 mmol)を徐々に滴下し, 30 分間攪拌後, -40 °Cまで昇温した。これに化合物 10(5 g, 0.02 mmol)を無水 THF(20 mL)に溶解した溶液を徐々に滴下すると, 茶色油状物となった。反応液を室温まで昇温した。次いで反応液に氷を少し加え, THFを減圧下溜去した。残渣に水, 酢酸エチル, 食塩水を加え酢酸エチル層を分取した。酢酸エチル層にシリカゲル(10 g)を加え, 溶媒を減圧下溜去し, 乾式カラムクロマトグラフィー(*n*-ヘキサン:酢酸エチル=10:1)により精製し, 11c(4.20 g, 60%)を得た。

Ethyl (*E, E*)-5-(2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo[1,4]dioxin-1-yl) penta-2,4-dienoate (12c)の合成

化合物 11c(4 g, 0.01 mol), ジクロロカテコール(1)(2.56 g, 0.01 mol), potassium *t*-butoxide(2.6 g)及び *t*-butanol(23.3 mL)を無水 DMF(11.7 mL)に溶解し, 150 °Cで 2 時間加熱還流した。これに水を加え, 析出した茶色結晶を吸引ろ取した。これを乾式カラムクロマトグラフィー(*n*-ヘキサン:酢酸エチル=95:5)により精製し, 12c(53 mg, 24%)を得た。

(*E, E*)-5-(2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo[1,4]dioxin-1-yl) penta-2,4-dienoic Acid (13c)の合成

化合物 12c(53 mg, 0.12 mmol), 水(0.075 mL)及び水酸化カリウム(15 mg, 0.23 mmol)を methoxyethanol(0.45 mL)に溶解し, 1 時間加熱還流した。反応液を冷却し, 1N 塩酸を加え酸性とした。析出した結晶を吸引ろ取することにより 13c(39.6 mg, 79%)を得た。

4. スペーサー部にエーテル結合を有するダイオキシンハブテンの合成

次に, スペーサー部にエーテル結合を有するハブテンの合成検討を行った。これは従来の, スペーサー部に極性の高いアミド結合を有するハブテンと違い, 極性の低く, かつ柔軟な構造を持つスペーサーを導入したハブテンである。

化合物 4 のアミノ基をジアゾ化することにより, 水酸基に変換し A を合成することとした。

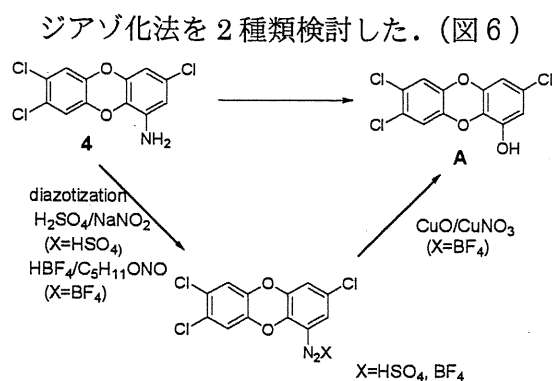


図6

第1は、硫酸と亜硝酸によるジアゾ化であり、第2は、フルオロホウ酸と亜硝酸アミルによるジアゾ化である。しかしどちらのジアゾ化も化合物4が酸性水に溶解しにくかったため、反応は進行しなかった。

5. 倫理面への配慮

ダイオキシン類縁体合成にあたっては、その取り扱いには十分な配慮が求められる。合成実験においては、以下の点に留意した。

- 1) 当実験に関わる者に対して十分な安全教育を行う。
- 2) ダイオキシン骨格が形成されたあるいはされるであろうと予測された時点から、取り扱いには保護手袋、実験衣、保護眼鏡、防塵マスク等の着用を義務付ける。
- 3) すべての作業は、排気システム内で行う。
- 4) 実験の際に排出される廃棄物は、一般の廃棄物と明確に区別し、二重のポリエチレン製袋に入れ、特定の位置に置き、処理方法が確立するまで保存する。
- 5) 実験廃液においては、ダイオキシン類の揮発性がほとんどない

ことから、有機廃液であれば、できるだけ濃縮をした後、ポリエチレン製のタンクに保管する。水性廃液もポリエチレン製のタンクに保管する。

- 6) 排水を通じての環境中への流出に留意する。
- 7) 実験器具は KPEG 試薬(水酸化カリウムとポリエチレングリコールから得られるカリウムポリエチレングリコラート)を用いて、温度 150°C、12 時間の反応で、残留ダイオキシン類縁体の脱塩素化を行う。
- 8) 実験台などの汚染があった場合には、汚染された場所は、脱脂綿をアセトン、トルエン、メトキシエタノール等の溶剤で湿らせたうえで拭き取る。その後、可搬型 UV ランプで当該箇所を照射する。
- 9) 作業者の緊急時の行動マニュアルを作成し、常時実験室内に保管する。

なお、これらは、Beck(1983)^{4), 6)}や Young(1983)^{5), 6)}の発表した実験室運営に関する行動基準に準拠した。

6. 引用文献

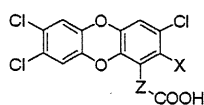
- 1) K. Chae, L. K. Cho, J. D. McKinny, *J. Agric. Food Chem.*, 25, 1207-1209 (1977)
- 2) A. P. Gray, S. P. Cepa, I. J. Solomon, O. Aniline, *J. Org. Chem.*, 41, 2435-2437 (1976)
- 3) J. R. Sanborn, S. J. Gee, S. D.

Gilman, Y. Sugawara, A. D. Jones, J. Rogers, F. Szurdoki, L. H. Stanker, D. W. Stoutamire, B. D. Hammock, J. *Agric. Food Chem.*, 46, 2407-2416 (1998)

- 4) Beck H, *Human and Environmental Risks of Chlorinated Compounds*, 691-697, Plenum Press, New York (1983)
- 5) Young AL, *Human and Environmental Risks of Chlorinated Compounds*, 667-674, Plenum Press, New York (1983)
- 6) Karlheinz Ballschmiter, Reiner Bacher, *Dioxine - Chemie, Analytik, Vorkommen, Umweltverhalten und Toxikologie der halogenierten Dibenzo-p-dioxine und Dibenzofurane*, VHC Press, Germany (1996)

C. 研究結果

1) 合成ハブテンー一覧



Comp.	X	Z	Comp.	X	Z
5a	H	NHCO(CH ₂) ₂	9b	Cl	NHCO(CH ₂) ₃
5b	H	NHCO(CH ₂) ₃	9c	Cl	NHCO(CH ₂) ₄
5c	H	NHCO(CH ₂) ₄	13a	Cl	CH=CH
5d	H	NHCOCH=CH	13b	Cl	CH=CCH ₃
9a	Cl	NHCO(CH ₂) ₂	13c	Cl	(CH=CH) ₂

2) 化合物データ

表 1 : 5a -b, 5d

表 2 : 9a -9c

表 3 : 13b -c

表 1

Comp.	¹ H-NMR (DMSO)	IR (cm ⁻¹)	mp (°C)
5a	12.22 (brs, 1H, CO ₂ H), 9.56 (s, 1H, NH), 7.75 (d, J = 2.4, 1H, Ar-H), 7.42 (s, 1H, Ar-H), 7.29 (s, 1H, Ar-H), 6.91 (d, J = 2.4, 1H, Ar-H), 2.68 (t, J = 6.4, 2H, NHCO-CH ₂ -CH ₂), 2.54 (t, J = 6.4, 2H, NHCO-CH ₂ -CH ₂)	3268 (CONH), 1700 (CO ₂ H), 1667 (CONH), 1576, 1531, 1465, 1428, 1321, 1263, 1181, 1107, 858, 667	251-253
5b	12.13 (brs, 1H, CO ₂ H), 9.51 (s, 1H, OH), 7.71 (d, J = 2.4, 1H, Ar-H), 7.42 (s, 1H, Ar-H), 7.29 (s, 1H, Ar-H), 6.92 (d, J = 2.4, 1H, Ar-H), 2.46 (t, J = 7.3, 2H, NHCO-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂), 2.30 (t, J = 7.3, 2H, NHCO-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂), 1.82 (q, J = 7.3, 2H, NHCO-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂)	3276 (CONH), 1715 (CO ₂), 1666 (CONH), 1146, 1428, 1263, 1197, 855	252-253
5d	8.16 (d, J = 2.2, 1H, Ar-H), 7.63 (s, 1H, NH), 7.10 (s, 1H, Ar-H), 7.07 (d, J = 15.0, 1H, NHCO-CH=CH), 7.02 (s, 1H, Ar-H), 6.98 (d, J = 15.0, 1H, NHCO-CH=CH), 6.70 (d, J = 2.2, 1H, Ar-H), 4.31 (q, J = 7.3, 2H, CH ₂ -CH ₃), 1.36 (t, J = 7.3, 2H, CH ₂ -CH ₃)	3230 (CONH), 1712 (CO ₂ H), 1662 (CONH), 1464, 1299, 1166, 1109, 973, 855	225-228