

平成12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 ——

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

平成12年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 松木容彦

平成13(2001)年 4月

目 次

I. 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 松木容彦	----- 1
II. 分担研究報告書	
1. 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 中澤裕之	----- 9
2. モノ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 安生孝子	----- 37
3. イムノアッセイの検出系高感度化の検討 前田昌子	----- 69
4. 特異モノクローナル抗体を活用するダイオキシン類の簡易 イムノアフィニティー抽出法の開発 後藤順一	----- 78
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 88
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 89

平成 12 年度 厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
（総括・分担）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 副所長

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. 国外より入手したポリクローナル抗体を用いて ELISA 法を確立し、生体試料ならびに環境試料測定への適用性について調べること、2. 国内で新しくモノクローナル抗体を作製し、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 法の構築とクリーンアップ

1) ドライプレートの性能検討：フィールドでの迅速な検査をも考慮し、プレバック ELISA 法について検討した結果、ウェットプレートと同様の標準検量線が得られ、検出感度は 19.8 pg/well (IC50) であった。2) 生体試料からの簡易脂肪抽出法：胎脂中ダイオキシンの測定を想定して、従来の液-液抽出法に代わる方法として固相担体としての無水硫酸ナトリウムに一旦、脂肪を分散させ、有機溶媒抽出とすることにより簡便に効率良く、脂肪抽出が可能となった。3) 多層シリカゲルカートリッジの簡易クリーンアップ：脂肪のアルカリ分解処理せず、直接カートリッジタイプの多層シリカゲルに通導し、活性炭処理を行うことにより GC/MS 法で通常と同様のダイオキシンの回収率が得られることを確認した。本クリーンアップ法を ELISA 法に適用した結果、測定結果 (2,3,7,8-TCDD と 1,2,3,7,8-PeCDD の合計値) は GC/MS の値に比し低く、脂肪分の溶出が従来より多いため偽陰性結果を与えるものと考えられた。4) Co-PCB を対象とする ELISA 法と Total TEQ との関係：ノンオルト Co-PCBs の 3,3',4,4',5'-PeCB と 3,3',4,4',5,5'-HxCB が Total TEQ と相関があることが明かとなった。これらの PCBs は、2,3,7,8 位に塩素がある 17 種の PCDD/Fs と 3 種とのノンオルト Co-PCB の合計量の約 40% を占め、脂肪 1 g 当たり 100 pg 存在していた。5) 母乳中ダイオキシン、Co-PCBs、 β -BHC、総臭化ジフェニルエーテル (PBDEs) および総多環芳香族炭化水素 (PAHs) の測定：ダイオキシン分析の簡易分析法の開発を進める上で測定系に影響を与えると推定される他の汚染化学物質の存在量を調べた結果、母乳あるいは体脂肪中に、ダイオキシン類は 22.669 ng/g fat (27.4 pg TEQ/g fat)、PCB は 263 ng/g fat、総 DDT は 240 ng/g fat、 β -HCH は 166 ng/g fat、多環芳香族炭化水素は 1.727 ng/g fat、臭化ジフェニルエーテルは 1.79 ng/g fat であった。

2. モノクローナル抗体を用いる ELISA 法の確立と母乳試料のクリーンアップの検討 1) モノクローナル抗体の作製：2,3,7,8-TCDD に特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ 3 種の細胞が産生するモノクローナル抗体について特性を調べた結果、2,3,7,8-TCDD に対する親和性は D2-37 (#2-37) が最も高く、次いで D9-36 (#9-36)、D35-42 (#35-42) の順であった。#9-36 の交差率は、ダイオキシン同族体の TEF の比率と近似しており、2,3,7,8-TCDD、1,2,3,7,8-PeCDD および 2,3,4,7,8-PeCDF と親和性が高く、感度も 1~1000 pg/well であり、最

も ELISA への利用性が高かった。2) ミルク中のダイオキシンのクリーンアップの検討：検討した種々の分離担体の中でアルミナカラムがモノクローナル抗体に対する妨害物の除去効果が最も良好であったが、再現性が低く、検討中である。3) 抗原固相化 ELISA 法の検討：モノクローナル抗体 (#9-36) および牛γグロブリン (BGG)、卵白アルブミンならびにゼラチンとハプテン (I-5 NHs) との結合物を用いて抗原固相法 ELISA について検討した結果、第2抗体固相法 (平成 11 年度報告) に比し、特に優れた結果は得られなかった。4) 新規ハプテン合成：モノクローナル抗体 (#9-36) が有機溶媒への安定性が低いことから、新しく多塩素置換 (5 塩化) ダイオキシンハプテンとダイオキシン環に窒素基を導入したフェノキサジン骨格を有するハプテンを合成した。5) 新規ハプテン合成 BSA 結合物ならびにビオチン結合物の調製：4) で得られた 3 種の 5 塩化ハプテンから常法に従い、N-ヒドロコハク酸イミドと EDC を用いて各 BSA 結合物を得、ついでこれらのハプテンおよびその BSA 結合物を用いて新化抗体を作製し、ELISA 構築やアフィニティーカラム作製への利用性についての検討を予定している。

3. イムノアッセイの検出系高感度化の検討 昨年度作製した家兔ポリクローナル抗体と 2. 5) で得た標識抗原のビオチン標識ダイオキシンとの免疫反応後、さらにストレプトアビジン-西洋わさびペルオキシダーゼあるいはストレプトアビジン-ビルベートフォスフェートジキナーゼをそれぞれ加え、比色分析あるいは生物発光分析を行った結果、後者の検出法では 1~3125 pg/assay の範囲で良好な検量線が得られた。

4. イムノアフィニティー抽出法の検討 1) 腹水法によるモノクローナル抗体の大量調製と IgG 画分の調製：腹水 (7 mL) をプロテイン G カラムにより精製し、IgG 画分として #2-37 から 13.1 mg、#9-36 から 11.6 mg、#35-42 から 12.5 mg であった。2) イムノソルベントおよびアフィニティーカラムの調製：3 種のモノクローナル抗体の中から ELISA で高感度の検量線を与えた #2-37 と #9-36 についてアフィニティーカラムを作製した。

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
	前田昌子	昭和大学	薬学部 教授
	後藤順一	東北大学	薬学部 教授

A. 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ナルまたはモノクローナル抗体の作製を行い、これらを用いてヒ

トや野生生物の生体試料(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。

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法の構築とクリーンアップ

1) ドライタイプのELISAプレートの作製と性能の検討: 緩衝液を希釈した固相化ハプテン 0626BSA を 96 穴プレートに加え(100 μ L/ウェル) 固相化し、ドライプレートを作製し、定期的にその性質を確認した。ついて 17 種のダイオキシンと 3 種の Co-PCBs との交差反応性を調べた。2) 生体試料からの簡易脂質抽出法: 脂質試料(コーン油、ラード、バター) 2~3 g を無水硫酸ナトリウムで脱水後、エーテル/石油エーテル(1:1)を溶出し、脂質を得、この脂質をヘキサンで溶解した後、多層シリカゲルカートリッジに負荷させ、ヘキサン(120 mL)で溶出した。溶媒留去 0.1% Triton X-100 を添加し、窒素バージした。3) 多層シリカゲルカートリッジによる簡易クリーンアップ化: 抽出した脂肪をヘキサンに溶解し、プレバックタイプ多層シリカゲルカートリッジに負荷し、ヘキサンで溶出後、0.1% Triton X-100 を加え、GC/MS により測定した。4) Co-PCB を対象としたELISAと Total TEQ との関係: 昨年度得られた母乳中ダイオキシン類のGC/MS測定結果をもとに、Co-PCB の測定値と Total-TEQ との関係について整理し、微量ダイオキシン含有試料についてのELISAにおける測定対象物の妥当性について検討した。5) 母乳中ダイオキシン、

Co-PCBs、 β -BHC、総臭素化ジフェニルエーテル(PBDEs)および総多環芳香族炭化水素(PAHs)の測定: 常法に従って母乳を処理し、それぞれの化学物質毎にHRGC/MSにより測定した。

2. モノクローナル抗体を用いるELISAの確立と母乳試料のクリーンアップの検討

1) モノクローナル抗体の作製: 選択したハイブリドーマについて限界希釈法によりクローニングを行い、抗体産生ハイブリドーマを 48 well 培養プレートで増殖させ、その中から単クローンのハイブリドーマを得、ついて、アイソタイピングを行った。2) モノクローナルELISA法の検討: 昨年度検討したELISA法を用い、トリトン添加量の検討を行い、至適ELISA法を確立した。3) ミルク中のダイオキシンのクリーンアップの検討: 母乳の代わりに牛乳またはバターを用いてヘキサン抽出を行った後、市販の数種の固相カラムを用い、その組み合わせによる精製効果について調べた。4) 抗原固相化ELISA法の検討: 昨年度合成したダイオキシン・1-プロペオニック NHS エステル(I-5-NHS)と牛 γ -グロブリン(BGG)を反応させた。同様の方法で卵白アルブミンおよびゼラチンにも結合させた。得られたハプテン蛋白結合物を希釈後、Nuncのプレートに加え、常法処理してプレートに固定した。得られた抗原固相プレートを用いてELISA法を確立しその感度について調べた。5) 新規抗体作製: (1) 多塩素置換ダイオキシンハプテンの合成; 既知の方法を駆使し、クロロニトロベンゼン体と 3,4,5,6-テトラクロロカテコール体とをカップリングさせ、3,6,7,8,9-PeCDD の 1-アミノ体を得た。ついて Schotten-Baumann 反応によりアミノ体とクロリドを反応させた後、生成したエス

テルを加水分解し、目的のスペーサーの導入を図った。(2) 新規ダイオキシシンハブテンの合成の検討；数工程を経て、フェノキサジン閉環前駆体であるアミノ体を合成した後、さらに数工程を経て閉環させ目的のフェノキサジン体を得た。6) 新規ハブテンの BSA 結合物ならびにピチオン結合物の調製：(1) 2. 5) で得られた 1-アミノ-3,6,7,8,9-ペンタクロロジベンゾダイオキシシンのサクシミド、グルタミドおよびアジバミド体それぞれを N-ヒドロキシコハク酸イミドと EDC 試薬を用いて BSA と結合させ、タンパク結合物を調製した。(2) 3,7-ジクロロ-8-R-ジベンゾダイオキシシン-1-プロペオニック-NHS (R:Cl, CH₃, C(CH₃)₃) を用い、これに bionamide capronate hydrazide を反応させ 3 種のピチオン誘導体を合成した (3. で利用)

3. イムノアッセイの検出系高感度の検討

ヤギ抗家兔 IgG 抗体固相化プレートにピチオン標識化ダイオキシシン (2. 6) ②より) と家兔抗ダイオキシシン抗血清 (平成 11 年度報告) を加え、免疫反応を行い、これにストレプトアビジン-西洋わさびペルオキシダーゼ複合体を加え、放置後、基質であるテトラメチルベンジンを加え、酵素反応を行い 450 nm の吸光度を測定した。また、酵素反応を終えたプレートにストレプトアビジン-ビルベートフォスフェートジオキナーゼ複合体を加え、洗浄後、生物発光試薬を加え、発光を測定した。

4. イムノアフィニティー抽出法の検討

1) 腹水法によるモノクローナル抗体の大量調製と IgG 画分の調製：3 種のハイブリドーマ株、#2-37、#9-36 および #35-42 の各々をハイブリドーマ培地中で大量培養し、

細胞浮遊液を得た。その 1 mL をマウス腹腔内に投与した。腹部の肥大が認められた時点で腹水を採取し、プロテイン G カラムにより IgG 画分を得た。2) イムノソルベントおよびアフィニティーカラムの調製：IgG 画分を CNBr-活性化、Sepharose 4FF に加え、ついで 0.1 mmol/L Tris-HCl (pH 8) を加えて未反応の活性基をブロックした。洗浄後、イムノソルベント (1.5 mL) をディスボーズブルカラムに充填しアフィニティークラムを作製した。

(倫理面への配慮)

ダイオキシシン標準品を取り扱う時に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する。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等については予め、十分考慮し、実験場所、保管場所等の区別をする。ダイオキシシン標準物質を含む実験廃棄物は露出しないようにダイオキシシン廃棄物処理操作手順を決め、それに従って処理し、保管し、所定の手続きにより専門業者に委託する。その記録を保管する。実験担当者においては簡単な実験操作手順書を作成し、安全に実験を行うように指導する。さらに、携わった実施担当者の健康管理に十分配慮し、その健康診断等の記録の保管を行う。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(動物試験倫理委員会での審査を得る)。

母乳や血液など、ヒト由来の試料を採取する際には、研究協力者に対する人権擁護上の配慮、研究による研究協力者に対する不利益、危険性の排除に関する説明を行い、インフォームドコンセントを得、同意の署名をもらう。

C. D. 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法の構築とクリーンアップ

1) ドライプレートの性能検討: フィールドでの迅速な検査をも考慮し、プレバックELISA法について検討した結果、ウェットプレートと同様の標準検量線が得られ、検出感度は19.8 pg/well (IC50)であった。2) 生体試料からの簡易脂質抽出法: 胎脂中ダイオキシンの測定を想定して、従来の液-液抽出法に代わる方法として固相担体としての無水硫酸ナトリウムに一旦、脂肪を分散させ、有機溶媒抽出とすることにより簡便に効率良く、脂肪抽出が可能となった。3) 多層シルカゲルカートリッジの簡易クリーンアップ: 脂肪をアルカリ分解処理せず、直接カートリッジタイプの多層シリカゲルに通導し、ついで、活性炭処理を行うことによりGC/MS法で通常と同様のダイオキシンの回収率が得られることを確認し、また、本クリーンアップ法をELISA法に適用した結果、測定結果(2,3,7,8-TCDDと1,2,3,7,8-PeCDDの合計値)はGC/MSの値に比し低く、この要因として脂肪分の溶出が従来より多いため偽陰性結果を与えるものと考えられた。4) Co-PCBを対象としたELISA法とTotal TEQとの関係: ノンオルト Co-PCBsの3,3',4,4',5'-PeCBと3,3',4,4',5,5'-HxCBがTotal TEQと相関があることが明かとなった。これらのPCBsは、2,3,7,8位に塩素がある17種のPCDD/Fsと3種とのノンオルト Co-PCBの合計量の約40%を占め、脂肪1g当たり100 pg存在していた。したがって、この両化合物を測定することにより少量の母乳あるいは母乳よりもより微量の試料中ダイオキシンのTEQの測定が可能と考えられた。5) 母乳中ダイオキシン、Co-PCBs、 β -BHC、総臭化ジフェニルエーテル(PBDEs)および総多環芳香族炭化水素(PAHs)の測定: ダイオキシ

ン分析の簡易分析法の開発を進める上で測定系に影響を与えると推定される他の汚染化学物質の存在量を把握することの重要性からGC/MS法により母乳および体脂肪中のこれらの濃度の確認を行った。その結果、母乳あるいは体脂肪中にダイオキシン類が22.669 ng/g fat (27.4 pg TEQ/g fat)、PCBが263 mg/g fat、総DDTが240 ng/g fat、 β -HCHが166 ng/g fat、多環芳香族炭化水素が1.727 ng/g fat、臭化ジフェニルエーテルが1.79 ng/g fatであった。

2. モノクローナルELISA法の確立と母乳試料のクリーンアップの検討

1) モノクローナル抗体の作製: 2,3,7,8-TCDDに特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ6種をクローニングし、その中の3種の細胞が産生するモノクローナル抗体について特性を調べた結果、得られた抗体のIgGクラスはG1およびG2であり、L鎖はすべてkであり、2,3,7,8-TCDDに対する親和性はD2-37 (#2-37)が最も高く、次いでD9-36 (#9-36)、D35-42 (#35-42)の順であった。D9-36の交差率はダイオキシン同族体のTEFと近似しており、2,3,7,8-TCDD、1,2,3,7,8-PeCDDおよび2,3,4,7,8-PeCDFと親和性が高く、感度も1~1000 pg/wellであり、最もELISAへの利用性が高かった。2) モノクローナルELISA法の検討: TMDDを標準物質として用い、トリトンX-100の添加量を変化させ(0~0.05%)、ELISA標準曲線を得た結果、0.01~0.02%で最良の感度を得られた。3) ミルク中のダイオキシンのクリーンアップの検討: 検討した種々の分離担体の中でアルミナカラムがモノクローナル抗体に対する妨害物の除去効果が最も良好であったが、再現性が低く、さらに検討中である。4) 抗原固相化ELISA法の検討: モノクローナル抗体(#9-36)および牛 γ グロブリン(BGG)、卵白ア

ルブミンおよびゼラチンとのハプテン結合物を用いて抗原固相法 ELISA について検討した結果、第2抗体固相法（平成11年度報告）に比し、ほぼ同等の感度であり、特に優れた結果は得られなかった。5) 新規ハプテン合成：モノクローナル抗体（#9-36）が有機溶媒への安定性が低いことから、新しく多塩素置換（5塩化）ダイオキシンのハプテンとダイオキシン環に窒素基を導入したフェノキシサジン骨格を有するハプテンを合成した。6) 新規ハプテン-BSA 結合物ならびにビオチン結合物の調製：5) で得られた3種の5塩化ハプテンから常法に従い、N-ヒドロコハク酸イミドと EDC を用いて各 BSA 結合物を得、ついでこれらのハプテンおよびその BSA 結合物を用いて新規モノクローナル抗体を作製し、ELISA 構築やアフィニティーカラム作製への有用性について検討している。

3. イムノアッセイの検出系高感度化の検討

昨年度作製した家兔ポリクローナル抗体と2.6) で得た標識抗原のビオチン標識ダイオキシンとの酵素反応にさらにストレプトアビジン-西洋わさびペルオキシダーゼあるいはストレプトアビジン-ビルベーフオスフェートジキナーゼをそれぞれ加え、比色分析あるいは生物発光分析を行った。その結果、後者の検出法では 1~3125 pg/assay の範囲で良好な検量線が得られ、S/N 比で比較した検量線は比色法よりも低濃度域で安定していた。

4. イムノアフィニティー抽出法の検討

1) 腹水法によるモノクローナル抗体の大量調製と IgG 画分の調製：腹水（7 mL）をプロテイン G カラムにより精製し、IgG 画分として #2-37 から 13.1 mg、#9-36 から 11.6 mg、#35-42 から 12.5 mg であった。2) イムノソルベントとアフィニティーカラムの調製：3種

のモノクローナル抗体の中から ELISA で高感度の検量線を与えた #2-37 と #9-36 についてアフィニティーカラムを作製した。ついで #9-36 抗体固相化カラムを用い TMDD についての添加回収を行い、クリーンアップ手法としての有用性について検討している。

E. 結論

昨年度、国外から入手したポリクローナル抗体を用いた ELISA 法を確立し、母乳試料中ダイオキシン TEQ の評価が可能であることを示した。本年度はさらにドライタイプの ELISA プレートを作製し、実試料測定への利用性が高いことを確認した。また、従来市販されている ELISA キットは実用に適さないことを確認した。生体試料からの簡易な胎脂質抽出法としてディスポーザブルタイプのカートリッジが有効であることを確認し、さらにプレバックタイプ多層シリカゲルカートリッジを用い、抽出した脂肪からのダイオキシンの簡便なクリーンアップに成功した。そして、試料入手が困難なあるいは入手量が制限されるような生体試料中のダイオキシン類の曝露を評価する上で、PCBs 中の 3,3',4,4',5'-PeCB と 3,3',4,4',5,5'-HxCB の両化合物が適していることを示した。さらに母乳や体脂肪に残留するダイオキシン以外のエストロゲン様汚染化学物質の濃度確認を行い、クリーンアップ法確立の基礎的データを得た。

新規モノクローナル抗体は、交差性の結果から TEQ との相関性が高く、また、ELISA においては感度の点でも良好な結果が得られ、特許申請を行い、キット化を進めている。しかし、本抗体は上述のポリクローナル抗体に比し、有機溶媒に対する安定性が低く、従来のクリーンアップで抽出する脂肪残渣により影響を受け易いことから、さらに実試料

のクリーンアップにおいて脂肪残渣を極力低減するために検討を行っている。免疫アッセイ系の高感度化を図る一つの方策として、生物発光検出を用いる ELISA 法を確立するため、ピオチン標識化ダイオキシン標識抗原として調製し、ビルベートフォスフェートジキナーゼ生物発光測定系を組み入れたポリクローナル抗体での ELISA 法について検討し、現段階では上述の比色法による ELISA 系と同等以上の感度が得られているが、今後、モノクローナル抗体を用いてさらに高感度化の検討を行う予定である。一方、有機溶媒処理に対して耐容性があり、TEF の大きい TCDD、PeCDD、PeCDF 等と交差性のある新しい抗体を得るために多塩素化ダイオキシンやダイオキシン環に窒素を導入した新しいタイプのハプテンならびにハプテン-BSA 結合物を合成した。抗体により妨害物質に対する交差性や有機溶媒に対する安定性なども異なることからさらにより ELISA 法を確立するため種々合成したハプテンに対する新しい抗体を用い、緩和でかつ簡易クリーンアップ法について検討を行い、ELISA 測定系への導入を試みており、継続検討中である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Koichi Saito, Masahiko Ogawa, Mikiko Takekuma, Susumu Kobayashi, Yukio Sugawara, Masahiro Ishizuka, Hiroyuki Nakazawa and Yasuhiko Matsuki : Development of Toxicity Evaluation Method of Dioxins in Human milk by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (part I ; Basic Strategy for Methodology

Construction and Examination of Preprocessing Technique to Make ELISA and GC/MS Method Compatible).

Chemosphere, submitted.

- 2) Yukio Sugawara, Koichi Saito, Masahiko Ogawa, Susumu Kobayashi, Guomin Shan, James R. Sanborn, Bruce D. Hammock, Hiroyuki Nakazawa and Yasuhiko Matsuki : Development of Dioxin Toxicity Evaluation Method in Human Milk by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (part II ; Assay Validation for Human Milk). Chemosphere, submitted.

2. 学会発表

- 1) 西 佳子, 伊東克敏, 荒川秀俊, 前田昌子, 神戸川明, 奥山光伸, 松木容彦 : ピチオン化ダイオキシンを標識プローブとする酵素免疫測定法の検討, 日本薬学会第 121 年会, 2001 年 3 月
- 2) Hiroyuki Nakazawa, Yukio Sugawara, Koichi Saito, Masahiko Ogawa, Susumu Kobayashi and Yasuhiko Matsuki : Development of Dioxin Toxicity Evaluation Method in Human Milk by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (part I : Basic Strategy for Methodology Construction), 20th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants & POPS, Monterey, California, USA August 13-17, (2000)
- 3) Koichi Saito Masahiko Ogawa, Mikiko Takekuma, Susumu Kobayashi, Yukio Sugawara, Hiroyuki Nakazawa and Yasuhiko Matsuki : Development of Dioxin Toxicity Evaluation Method in Human Milk by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (part II:

Examination of Preprocessing Technique to Make Compatible with GC/MS Method) : 20th International Symposium on Halogenated Environmental OrganicPollitants & POPS, Monterey, California, USA August 13-17, (2000)

SEAFOOD : 20th International Symposium on Halogenated Environmental OrganicPollitants & POPS, Monterey, California, USA August 13-17 (2000)

- 4) Yukio Sugawara, Koich Saito, Masahiko Ogawa, Susumu Kobayashi, Guomin Shan, Bruce D. Hammock, Hiroyuki Nakazawa and Yasuhiko Matsuki : Development of DioxinToxicity Evaluation Method in Human milk by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (part III : Assay Validation for Human Milk) , 20th International Symposium on Halogenated Environmental OrganicPollitants & POPS, Monterey, California, USA August 13-17 (2000)
- 5) Takako Anjo Mitsunobu Okuyama, Masayuki Satoh, Akira Kambegawa and Yasuhiko Matsuki : SYNTHESSES OF NEW DIOXIN HAPTENS AND CEVELOPMENT OF ENZYME IMMUNOASSAYFOR DIOXINS USING POLYCLONAL ANTIBODIES : 20th International Symposium on Halogenated Environmental OrganicPollitants & POPS, Monterey, California, USA August 13-17 (2000)
- 6) Shinjiro Hori, Kazuhiko Akutsu, Mikiya Kitagawa, Hajime Oda, Hiroyuki Nakazawa, Yasuhiko Matsuki : DEVELOPMENT OF ANALYSIS FOR POLYBROMINATED DIPHENYL ETHER IN SEAFOOD AND ACTUAL CONTAMINATION OF

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
特願 2000-315948 号(ダイオキシンに対するモノクローナル抗体)
2. 実用新案登録その他
なし
3. その他
なし

平成 12 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イムノアッセイ法の開発研究
— 国外産ポリクロー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 —

主任研究者	松木 容彦	(財) 食品薬品安全センター 副所長
分担研究者	中澤 裕之	星薬科大学 教授
協力研究者	小林 進	埼玉県衛生研究所 所長
	斉藤 貢一	埼玉県衛生研究所
	菅原 幸雄	コスモ総合研究所
	石塚 昌宏	コスモ総合研究所

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を評価すると共に実用化へ向けた検討を行った。本研究で検討している抗体とダイオキシン異性体との交差反応性を詳細に検討したところ、毒性等価係数との間に良好な相関が認められた。このことから、開発した ELISA が単に簡便なスクリーニング法ではなく、毒性等価量 (TEQ) を推定できる方法として位置づけられることを確認した。また、フィールドにおける実用化を想定して、ドライタイプの ELISA プレートを作製してその性能評価を検討したところ、検量線及びダイオキシン異性体との交差反応性も、従来のウェットタイプのプレートと比べてほとんど変わらないことが認められた。更にドライプレートは冷蔵状態で約 1 年間、保存可能なことが確認された。また、既に市販されている ELISA キットについて、母乳分析への適用可能性を調べたところ、GC/MS データとの相関は認められず、実用に適さないことがわかった。次に、前処理操作の簡便化を目的として、生体試料 (胎脂) から脂質を簡便に抽出するために、ディスポーザブルタイプのカートリッジを用いた方法を検討した。更に、母乳や胎脂から抽出された脂肪を一段階で簡便にクリーンアップするための方法として、プレバックタイプの多層シリカゲルカートリッジの適用についても検討した。この方法を、GC/MS 法並びに ELISA に適用したところ、ほぼ満足できるクリーンアップが行えることがわかった。また、GC/MS による母乳中ダイオキシン分析データ (216 検体) についてその異性体パターンを再解析したところ、3,3', 4,4', 5-PeCB 及び 3,3', 4,4', 5,5' -HxCB については、それぞれ Total-TEQ と良好な相関があり、しかもダイオキシン検出量全体の約 40% を占めていることが確認された。以上のことから、母乳中ダイオキシンをより高感度で測定するためには、これらの Co-PCBs がターゲットとして適していることを明らかにした。更に、これらの Co-PCBs を指標にすることにより、母乳よりもダイオキシン濃度が一桁低い血液中ダイオキシンを ELISA で検出できる可能性が考えられた。

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。ダイオキシン分析においては、測定の信頼性確保のために適切な測定方法の確立と精度管理態勢の整備が不可欠であるが、一方で迅速なスクリーニングを目的とした簡易分析法のニーズが高まっており、当研究班では母乳中ダイオキシン分析法として実用性のある酵素免疫測定法(ELISA)を検討してきた。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 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、昨年度構築した ELISA を実用化させるためにドライタイプのプレートを作製し、交差反応性などの基礎検討や GC/MS 法との相関の再解析を行って、毒性評価法としての妥当性を検討し、更にクリーンアップ操作についても簡便化を目指すことを具体的な目標とした。

B. 研究方法

B-1 ドライプレートの作製と性能検討

緩衝液で希釈した固相化ハプテン 0626BSA (UCD 製) を 50mM 固相化緩衝液 (50mM 炭酸一重炭酸緩衝液, pH9.6) で 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈し、96 ウェルプレート (住友ベークライト製) に 1 ウェルあたり 100 μL 注入し、4°C で 15 時間静置して固相化させた。PBS で 5 回洗浄後、常法に

従って BSA ブロッキングと sucrose コーティングを行い (室温, 30 分間), 必要に応じてアジ化ナトリウム等の防腐剤を加えた後, 水気をよく取り除き, 更に真空乾燥 (25°C で 4 時間) を行い, プレートと乾燥剤を 1 枚ずつアルミ袋に入れ, 真空パックを行った。作製したドライプレートは, 2~11°C 保存しながら定期的に性能チェックを行い, 更に 37°C 保存で加速試験により保存性についての検討を行った。

B-2 交差反応性の検討

ダイオキシンを異性体 (TEF が設定されている 7 種類の PCDDs, 10 種類の PCDFs 及び 3 種類のノンオルト Co-PCBs) をはじめ, 4 塩素体以下の化合物も含めて全部で 27 種類の異性体について交差反応性実験を行った。各異性体 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$; ノナン溶液) をデカンで 10 倍希釈し, その 0.25 ml を先細スピッツ管に採取し, 窒素バージにより溶媒を留去させ, 再度 Triton X-100 を含有した DMSO を加えて再溶解した (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。これを DMSO 溶液で 5 倍ずつ 10 段階まで希釈して試験溶液とした。これを我々が昨年度の研究で検討した間接競合 ELISA で測定した。測定手順を以下に示す。

- ① サンプル調整液 (PBS) をプレートの Well に 25 μL 添加する。
- ② サンプルおよび標準液 (TMDD) を各 Well に 25 μL 重層添加する。
- ③ 更に, 抗ダイオキシン抗体液を各 Well に 50 μL 重層添加する。
- ④ 室温で 1.5 時間静置する。

- ⑤反応終了後,洗浄液にて5回洗浄する。
- ⑥抗カキ HRP 標識抗体を各 Well に 100 μ L 添加する。
- ⑦室温で1時間静置する。
- ⑧反応終了後,洗浄液にて5回洗浄する。
- ⑨発色液を各 Well に 100 μ L 添加する。
- ⑩室温で20分間静置する。
- ⑪反応停止液を各 Well に 50 μ L 添加する。
- ⑫吸光度 450nm で測定する。

各異性体の検量線を作成し, 交差反応性については, 次式に従って IC50 の値を TMDD により得られた IC50 値と比較して算出した。

$$\text{交差反応性(\%)} = (\text{IC50 of TMDD} / \text{IC50 of the cross-reacting compound}) \times 100$$

B-3 市販キットの性能評価

母乳を試料として, 市販のダイオキシン測定 ELISA キット(CAPE Technologies 製)をそのマニュアルに従って試験を行った。試料は, 昨年度検討した方法に従って調製した。即ち, 母乳の脂肪抽出後, アルカリ分解を行い, 更に 3 層硫酸シリカゲルカラムを用いてクリーンアップした。

B-4 生体試料からの簡易脂質抽出法

脂質試料(コーン油, ラード, バター) 2~3g に 20 倍量の無水硫酸ナトリウムを加えてよく混和して脱水と試料の分散を行った後, 内容積約 60ml の PP 製カートリッジ(内径 26 mm x 120 mm; スベルコ製)に充填した。付属のフリットで充填内容物に蓋をして固定した後, エーテル:石油エーテル(1:1)混液 35ml で溶出

した。溶出速度は, カートリッジ先端に PP 製ミニコックを取り付けて 2-3 ml/min 程度に調整した。溶出液をロータリーエバポレーターまたは窒素バージにより溶媒を留去させ, 脂質を得た。

B-5 多層シリカゲルカートリッジによる簡易クリーンアップ

抽出した脂肪をヘキサン少量で溶解し, これを予めヘキサンで十分に洗浄したプレバックタイプの多層シリカゲルカートリッジ(GLサイエンス社製)に負荷した。ヘキサン 120ml で溶出させた後, 溶媒を留去し, 少量のヘキサンスピッツ管に洗い込んだ。これに 0.1% Triton X-100 (MeOH 溶液) 60 μ L を添加した後, 窒素バージを行った。

B-6 GC/MS 測定

GC/MS による母乳中ダイオキシンの分析では, 常法に従って脂肪抽出後, 1)アルカリ分解処理, 3層硫酸シリカゲルカラムを行う方法と, 2)抽出した脂肪を直接, 多層シリカゲルカートリッジ処理を行う方法とを比較検討した。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。

また, Co-PCBs も含めた Total TEQ と ELISA との相関を調べるために, GC/MS によって得られたデータ(216 検体)の再解析を行った。

C. 研究結果及び考察

C-1 ドライブレートの性能検討

本研究で目指す ELISA は、実験設備の整った検査機関だけを対象としたものというよりも、むしろフィールドでの迅速な検査を目的としている。そのためには、ELISA のキット化は不可欠であり、ELISA プレートも従来のようなウェットプレートではなく、保存性があり、且つ、事前に調製する必要のない、プレバックの ELISA が望ましい。そこで本研究では、ハブテンをプレートに固相化した後、真空バック状態で長期間保存できるドライブプレートについて検討した。まず、標準物質である TMDD に対する検量線を作成したところ、ウェットプレートの場合とほぼ同様なシグモイドカーブが得られた (図 1)。検出感度については、ウェットプレートの IC 50 (pg/well) が 27.1 pg/well であったのに対して、ドライブプレートでは 19.8 pg/well であり、ドライブプレートの方が若干高感度であった。

C-2 交差反応性の検討

表 1 に各異性体との交差反応性を一覧にして示した。なお比較のために、昨年まで使用していた、用時調製のウェットタイプのプレート (以下ウェットプレート) で得られた結果を併せて示した。交差反応率は、標準として使用した TMDD を 100% とした場合の相対値で示したが、ドライブプレートもウェットプレートも何れも 2,3,7,8-TCDD と 1,2,3,7,8-PeCDD に対して強く反応した。また、PCDDs 及び PCDFs 共に置換塩素数が多い異性体ほど

反応率が低下する傾向が認められた。他方、TEF が設定されていない低塩素体の、2,3,7-Tri-CDD や 1,3,7,8-TCDD に対しても比較的交差反応性が高いことがわかった。また、TEF との関係性を考察するために、横軸に TEF をとり、縦軸には交差反応率をとると図 2 のようになり、両者は十分に相関していることが明らかになった。この結果から、本研究で用いた ELISA 抗体は、2,3,7,8-TCDD に対する特異性という点でも優れているが、TEQ に基づいた毒性を評価するためのスクリーニング法としての要素も備えていることが確認された。

なお、表 1 でドライブプレートとウェットプレートの結果で相対的に大きな傾向の違いは認められなかったが、交差反応率に若干の違いが認められた。これはプレートの状態に違いがあったこと、また、濃度調整が極微量であったためと思われる。

C-3 市販キットの性能評価

既にダイオキシン分析用 ELISA として市販されている CAPE Technologies 社製のキットについて、実際に母乳を試料として、実用性を検討した。母乳試料は昨年度の研究において GC/MS 法との相関性を検討する際に用いたものとはほぼ共通したものであり、比較のために両者の結果を併せて図 3 に示した。その結果、CAPE 社の ELISA では GC/MS で得られた値とは全く相関が得られず、母乳中ダイオキシン分析には適さないことがわかった。このキットはもともとフライアッシュなど環境試料分析用に開発されたものであり、

母乳のように低レベルの残留ダイオキシンを検出するのは困難であり、このことから、ELISAで生体試料中のダイオキシンを測定することの難しさが伺えると共に、本研究で開発したELISAの優秀性が確認された。

C-4 前処理操作の簡便化

4-1 生体試料からの簡易脂質抽出の検討

現在、母乳や血液など生体試料中に残留するダイオキシンを評価する際には、毒性等価量(TEQ)をその試料中に含有されている脂質量1g当たりの量で表す、いわゆるfat basisが一般的に行われている。従って、生体試料中のダイオキシン分析においては試料からの脂質抽出が不可欠となる。従来、生体試料からの脂質抽出法としては、分液ロートと多量の有機溶媒を用いた振とう抽出法や、高速ホモジナイズ抽出法などが行われてきたが、何れも相応な実験設備を必要とする。そこで本研究では、フィールドで簡便に行えることを目指して検討を行った。生体試料としては、胎脂や脂肪組織を対象とした場合の抽出法について検討した。なお、胎脂とは脂質を主体とした胎児の分泌物で、出産の際にのみ体表面から採取することが出来る。この胎脂を分析することで、胎児のダイオキシン汚染状況を把握することが出来ることから、生体試料として有益であるが、通常数グラム程度しか採取することが出来ない貴重な試料である。そこで本年度は、この胎脂からの脂質抽出を想定した簡便な方法について検討した。

胎脂は貴重な試料であり、入手が難し

いことから、実験のための模擬試料としてコーン油(液体)、ラード(半固体)、バター(固体)を選定した。また上記「研究方法B-4」で記したように、実験操作は最小限の実験器具と最小量の有機溶媒を用いる方法を検討した。無水硫酸ナトリウムは、試料中の水分除去と、試料を分散させて有機溶媒との接触面積を高めるために添加した。無水硫酸ナトリウムの必要量について検討したところ、各模擬試料とも、試料重量のほぼ20倍量が適量であった。脂質を溶出するための有機溶媒には、母乳中脂肪抽出で使われているエーテル:石油エーテル(1:1)混液を用いた。各試料について、溶出液5mlごとのフラクションを分取して、その溶出パターンを調べたところ、何れの試料においても30-35ml以内に溶出された(図4)。全体の回収率は、コーン油とラードについてはほぼ100%であり、バターについては約75%であった。但し、今回の実験で用いたバターは、植物性脂肪と動物性脂肪を併せて75%含有し、その他無脂乳固形物などを成分として含んでいたことから、バターにおいても実質的な回収率はほぼ100%得られたものと判断した。この操作は固相として用いた無水硫酸ナトリウムに分散させた試料と有機溶媒とをクロマトグラフィー的に液液分配抽出することから、通常のバッチ操作での液液抽出に比べて抽出効率が高く、簡便で迅速に行えることから、胎脂以外の生体試料(脂肪組織など)にも適用可能と思われた。

4-2 多層シリカゲルカートリッジによる簡易クリーンアップ法の検討

母乳分析において昨年度の研究で検討した、アルカリ分解と3層硫酸シリカゲルカートリッジを組み合わせた方法は、良好なクリーンアップ効果が得られるが、アルカリ分解処理に一晚(約12時間)を必要とし、更にヘキサンによる液液分配抽出も必要とした。そこで本年度は、更に簡便なクリーンアップ法として、食品中ダイオキシン分析ガイドラインやマニュアル等に採用されている多層シリカゲルカラム処理法について検討した。この多層シリカゲルカラム処理がクリーンアップ手段として有効であることは、すでに広く認められているが、カラム調製が極めて煩雑であるという問題点がある。最近になって、この多層シリカゲルをディスプレイザブルタイプのカートリッジにプレバックされた製品が試作されたため、この活用を試みた。母乳から抽出した脂肪を少量のヘキサンで溶解し、アルカリ分解処理を行うことなく、直接このカートリッジに負荷したところ、脂肪重量が2g程度までならば、カートリッジ内の充填剤で脂肪等の夾雑物の分解除去が可能なのことがわかった。この多層シリカゲルカートリッジ処理後に活性炭処理を行い、GC/MS分析により、サロゲートの回収率を調べたところ、昨年度検討した方法(アルカリ分解-3層硫酸シリカゲルカートリッジ処理-活性炭カラム処理)と比べて、ほぼ同等な良好な回収率が得られた(表2)。

そこで、この多層シリカゲルカートリッジ処理を行った試験溶液について、ELISAで測定可能かどうか検討した。その結果、同一試料をGC/MS法で測定した場

合と比べて(2,3,7,8-TCDDと1,2,3,7,8-PeCDDの合計値)、ELISAで得られた値はかなり低いものとなった(図5-A)。これは、試験溶液中に存在する微量の脂質成分にダイオキシンが取り込まれたため、競合法ELISAにおいて偽陰性を示したものと推察された。昨年度の研究において、試料中の微量脂質成分を分散・可溶化するためにTriton X-100が有効であることを報告した。その際の添加量は6 μ gで有効であったが、多層シリカゲルカートリッジからの溶出液に対しては不十分と推察されたので、10倍量の60 μ g、更に600 μ g添加についてその効果を検討した。その結果、図5-Bに示したように、60 μ g添加では大幅に改善が認められ、GC/MSデータとの相関性も十分に認められた。回帰直線の傾きは、昨年度に比べてやや低い結果であったが、これは、本年度使用したドライプレートの交差反応性が、1,2,3,7,8-PeCDDよりも2,3,7,8-TCDDに対してより強く反応したためと推測された。他方、Triton X-100を600 μ g添加した場合には、窒素パーズ濃縮に際して白濁・沈殿物が生じ、ELISA測定も良好な結果が得られなかった。従って、Triton X-100の至適添加量は60 μ gと判断した。

C-5 ELISAとTotal-TEQとの関係、及びターゲットの再検討

昨年度に報告した母乳を試料としたELISAとGC/MSによるデータの相関は、PCDD/FsのTEQを調べたものであった。昨年、ダイオキシン対策特別措置法が施行されたことにより、いわゆる“ダイオキ

シン類”には Co-PCBs も正式に含まれるようになったことから、昨年度の GC/MS データに Co-PCBs も加えて相関性の再解析を行った。その結果、図 6 に示したように、Total TEQ に対しても本研究で開発した ELISA は良好な相関があることが確認された。

また、昨年度、本年度と、ELISA による母乳中ダイオキシン測定方法を検討し、ほぼ満足できる結果が得られたが、より高感度で測定するため、また母乳よりも微量の血液中のダイオキシンを測定するためには、更に高感度化が必要と思われた。そのための方策として、①これまでの競合法からイディオタイプのサンドイッチ法の採用、②検出試薬を従来の可視部吸収から、蛍光や化学発光法に切り替える、などが考えられる。これらについては、当研究班の別の分担グループで研究が進められている。そこで、毒性評価を行うために TEQ と相関がある別の異性体をターゲットにすることを想定して、その調査を行った。すでに GC/MS で異性体測定を行った母乳検体 (216 検体) について、その各異性体と Total TEQ との関係について再解析を行った。その結果、ノルット Co-PCBs の 3,3,' 4,4' ,5-PeCB と 3,3,' 4,4' ,5,5' -HxCB が、Total TEQ と良好な相関があることがわかった (図 7)。これらの異性体は脂肪 1g 当たりから検出されるダイオキシン類 (17 種類の 2378 位に塩素がある PCDD/Fs と 3 種類の ノルット Co-PCBs) の約 40% を占め、絶対量 (平均値) で約 100pg 存在していた。他方、2,3,7,8-TCDD と 1,2,3,7,8-PeCDD は合わせても 10pg 程度であった。従って、母乳

よりも微量のダイオキシンを ELISA で検出するためには、上記の PCB 異性体 (3,3,' 4,4' ,5-PeCB と 3,3,' 4,4' ,5,5' -HxCB) が有効であることが推定された。

D. 結論

本研究においては、ELISA による高感度かつ簡便な生体試料中ダイオキシンの測定法を確立し、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、昨年度開発した ELISA の実用化を想定してキット化のためのドライプレートを作製し、その性能評価を行うと共に、交差反応性についても詳細に調査したところ、TEF と交差反応性との間に良好な相関が認められ、毒性評価法として有用であることが確認された。また、生体試料からの簡便な脂質抽出法を検討すると共に、抽出した脂肪を多層シリカゲルカートリッジでクリーンアップする、より簡便な前処理法を確立した。また、GC/MS による母乳中ダイオキシン異性体のデータを再解析して、ノルット Co-PCBs の 3,3,' 4,4' ,5-PeCB と 3,3,' 4,4' ,5,5' -HxCB が、Total TEQ と良好な相関があることを明らかにした。このことにより、血液など、より微量なダイオキシンを ELISA で検出するための方針を示すことが出来た。

E. 研究発表 (学会発表)

E-1 齊藤貢一、菅原幸雄：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；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？-

E-2 Hiroyuki Nakazawa, Yukio Sugawara, Koichi Saito, Masahiko Ogawa, Susumu Kobayashi, and Yasuhiko Matsuki : Development of Dioxin Toxicity Evaluation Method in Human milk by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (part I : Basic Strategy for Methodology Construction) , 20th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants & POPs, Monterey, California, USA, August 13-17, (2000).

E-3 Koichi Saito, Masahiko Ogawa, Mikiko Takekuma, Susumu Kobayashi, Yukio Sugawara, Hiroyuki Nakazawa and Yasuhiko Matsuki : Development of Dioxin Toxicity Evaluation Method in Human Milk by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (part II : Examination of Preprocessing Technique to Make ELISA compatible with GC/MS Method) , 20th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants & POPs, Monterey, California, USA, August 13-17, (2000).

E-4 Yukio Sugawara, Koichi Saito, Masahiko Ogawa, Susumu Kobayashi, Guomin Shan, Bruce D. Hammock , Hiroyuki Nakazawa and Yasuhiko Matsuki : Development of Dioxin Toxicity Evaluation Method in Human Milk by Enzyme-Linked Immunosorbent

Assay (part III: Assay Validation for Human Milk), 20th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants & POPs, Monterey, California, USA, August 13-17, (2000).

表1. 交差反応性

Dioxin Isomers	TEF	Cross Reactivity (%)	
		Dry Plate	Wet Plate
TMDD		100	100
1-CDD		< 0.01	< 0.01
2,7-DiCDD		1.03	0.19
2,3,7-TriCDD		27	6.7
1,3,7,8-TCDD		48	43
1,2,3,4-TCDD			0.01
2,3,7,8-TCDD	1	174	129
1,2,3,7,8-PentaCDD	1	65	72.9
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.1	1	1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.1	3	
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.1	2.9	
1,2,3,4,6,7,8-HeptaCDD	0.01	1	0.3
OCDD	0.0001	0.004	0.006
1,2,3,4-TCDF		0.006	0.007
2,3,7,8-TCDF	0.1	47.9	26
2,3,4,7,8-PentaCDF	0.5	10.5	9
1,2,3,7,8-PentaCDF	0.05	1.7	0.1
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.1	6.5	5.4
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.1	6.5	5.4
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.1	1.08	
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.1	0.42	< 0.01
1,2,3,4,6,7,8-HeptaCDF	0.01	0.14	0.06
1,2,3,4,7,8,9-HeptaCDF	0.01	0.18	
OCDF	0.0001	< 0.01	< 0.01
3,3',4,4'-TCB	0.0001	0.11	0.1
3,3',4,4',5-PCB	0.1	< 0.01	< 0.01
3,3',4,4',5,5'-HCB	0.01	< 0.01	< 0.01

表2. 多層シリカゲル処理法とアルカリ分解法との回収率の比較

ダイオキシン異性体 (¹³ C ₁₂ 安定同位体)	平均回収率 (%)	
	多層シリカゲルカラム法アルカリ分解法	
	(n=5)	(n=5)
2,3,7,8-TCDD	81.3	81.2
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	77.4	69.7
2,3,7,8-TCDF	89.5	84.3
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	62.2	69.5

母乳中添加濃度: 2 ppb