

図1. Dry plate と Wet plate の検量線

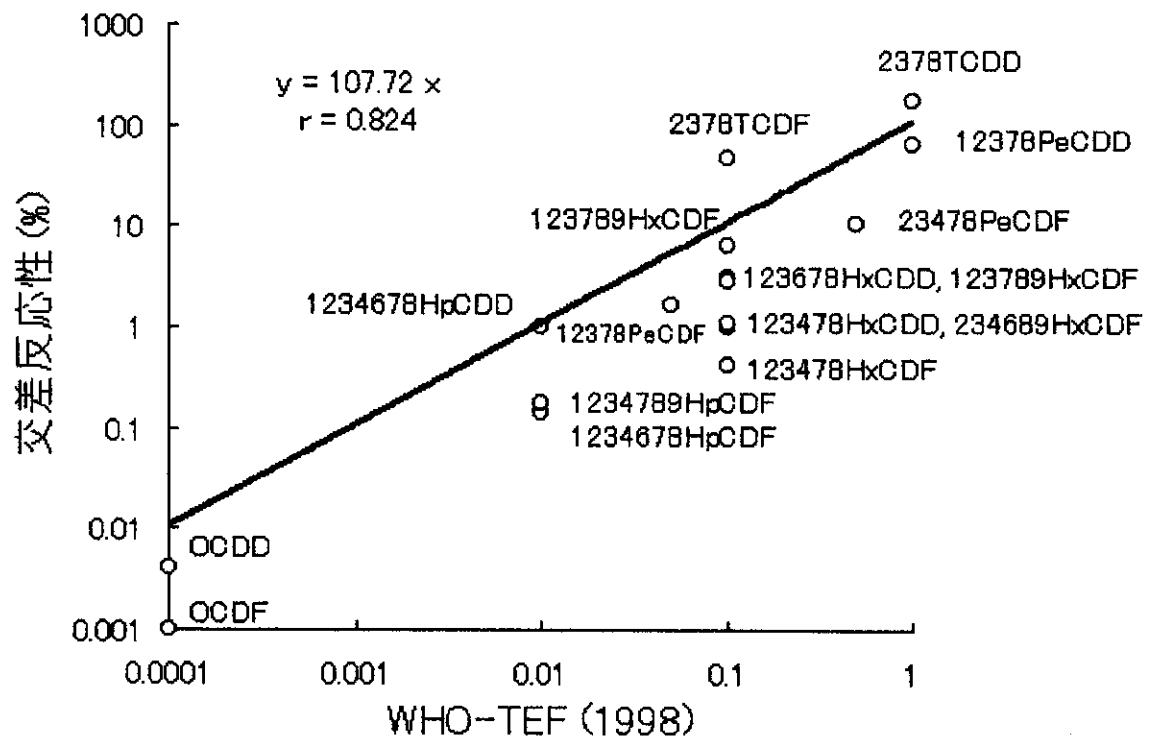


図2. 交差反応性と毒性等価係数(TEF)との相関

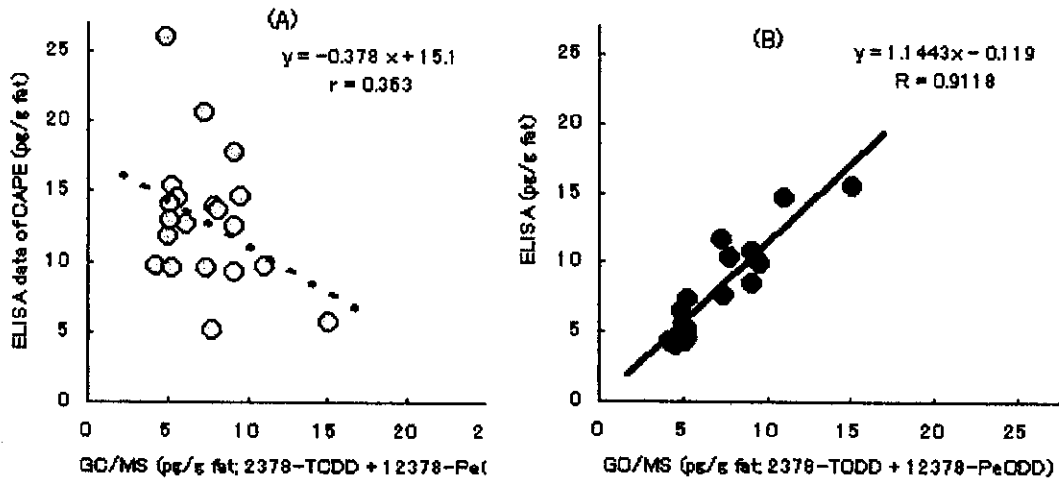


図3. 母乳中ダイオキシン分析における GC/MS データと ELISA データとの相関；
 (A) CAPE Technologies 社製 ELISA, (B) 本研究で開発した ELISA

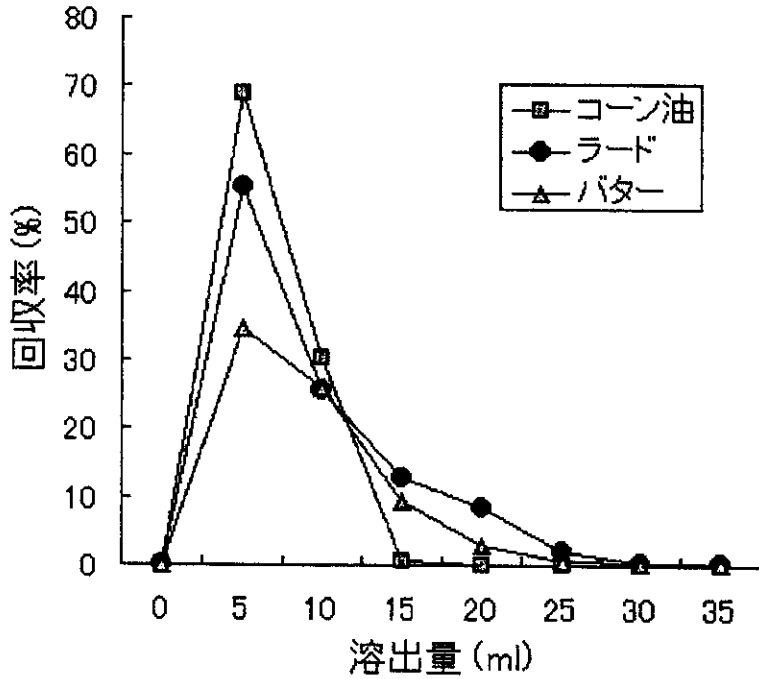


図4. カートリッジからの脂質溶出パターン

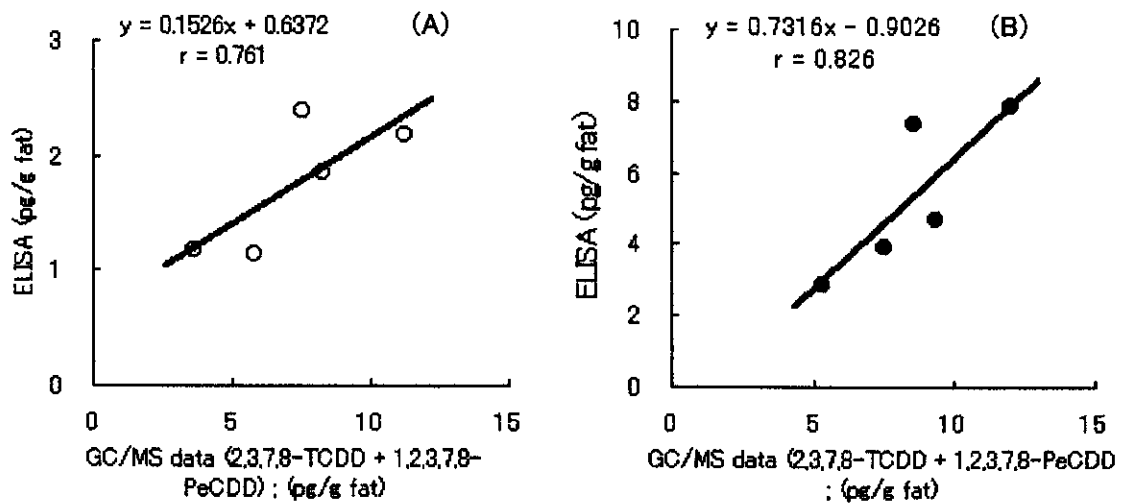


図5. 母乳中ダイオキシン分析における GC/MS データと ELISA データとの相関;
(A) Triton X-100 (6 μ g/ sample), (B) Triton X-100 (60 μ g/ sample)

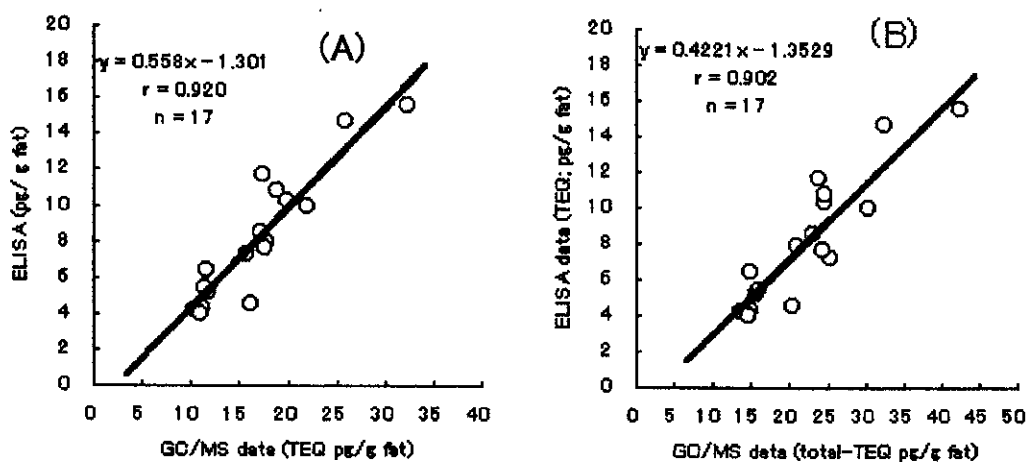


図6. 母乳中ダイオキシン分析における GC/MS データと ELISA データとの相関;
(A) TEQ (PCDD/Fs), (B) Total TEQ (PCDD/Fs + Co-PCBs)

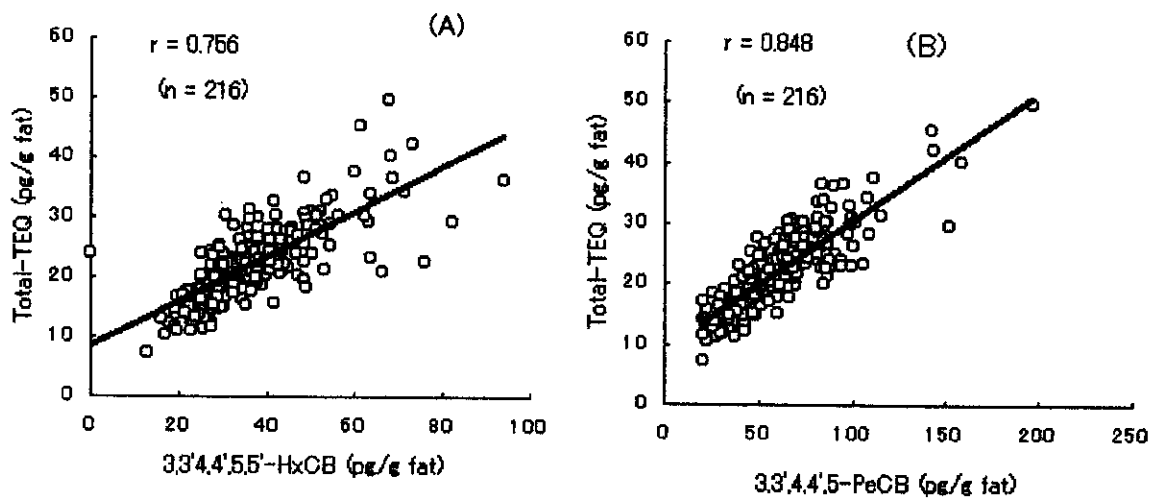


図 7. 母乳中ダイオキシン分析における Co-PCB と Total TEQ との相関:
 (A) 3,3',4,4',5,5'-HxCB, (B) 3,3',4,4',5-PeCB

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

生体試料中のダイオキシンの酵素イムノアッセイ法の開発研究

イムノ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
—母乳試料中の微量有害物質の検出—

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 星薬科大学薬品分析学教室 教授
研究協力者 織田 肇 大阪府立公衆衛生研究所 所長
堀 伸二郎 大阪府立公衆衛生研究所 課長

研究要旨

胎脂及び母乳中のダイオキシン類汚染を明らかにするための簡便、迅速定量法として、ポリクロナール抗体を用いるイムノアッセイ法やレポータジーンを用いるアッセイ法が開発されている。これらイムノアッセイ法に対する試料前処理法（精製・調製）として脂肪抽出、室温アルカリ分解、多層カラムで簡易精製を行う方法が一般的に行われている。しかしながら、これらの試料前処理後の試料（イムノアッセイにかける試料）中にはダイオキシン類以外の多くの化学物質が存在し、イムノアッセイによる測定に影響を及ぼすことが考えられる。そこで、母乳中ダイオキシン類、有機塩素系化合物、臭素化ジフェニルエーテル、多環芳香族炭化水素等の蓄積濃度を明らかにした。

一般産婦の母乳または体脂肪中にはダイオキシン類が 22669pg/g fat(27.4pg TEQ/g fat)、PCB が 263000pg/g fat、総 DDT が 240000 pg/g fat、 β -HCH が 166000 pg/g fat、HCB が 13820 pg/g fat、HCE が 8130 pg/g fat、総クロルデンが 76000pg/g fat、多環芳香族炭化水素が 1727 pg/g fat、臭素化ジフェニルエーテルが 1790pg/g fat 存在した。

A. 研究目的

現在、内分泌かく乱化学物質による環境及びヒトに対する汚染やその影響が社会問題になっている。中でも、ダイオキシン類のヒトへの汚染、特に胎児及び乳児に對

する影響等については不明な点が多い。そこで、ダイオキシン類の胎児汚染の有無及び母乳を介しての乳児移行量を明らかにするには、胎児及び母乳中のダイオキシン

類を測定する必要がある。

ダイオキシンの測定には高額な機器と高度な分析技術が必要である。さらに、分析には長期間を要する。そこで、最近ダイオキシン類の簡便、迅速定量法としてポリクロナール抗体を用いるイムノアッセイ法やレポータジーンを用いるアッセイ法が開発されている。

イムノアッセイ法やレポータジーンアッセイ法においても試料（母乳、胎脂等）を直接アッセイにかけることは不可能である。そこで試料はアルカリ分解、多層カラムクロマトグラム等で簡易な精製が行われる。しかしながら、この精製の試料溶液中には多くの有機化合物が存在する可能性があり、これら化合物がイムノアッセイ法等でのダイオキシン類測定値に影響を及ぼすことが考えられる。そこで、事前に母乳及び胎脂中に残留する化合物を把握し、イムノアッセイ法等に与える影響を検討する必要がある。

そこで、母乳及び体脂肪中に存在するダイオキシン類、有機塩素系化合物、臭素化ジフェニルエーテル、多環芳香族炭化水素等の残留濃度を明らかにした。

B. 研究方法

B-1 試料及び分析方法

B-1 試料：1) ダイオキシン類、PCB、有機塩素系農薬分析用；1999年度に大阪府下在住者より提供されたも
2) 臭素化ジフェニルエーテル分析用；1999年度に東海大学より提供されたもの。

B-2 分析法

B-2-1 ダイオキシン類：平成年度厚生科学研究。生体試料中のダイオキシンの酵素イムノアッセイ法の開発研究。報告書に記載の方法を用いた（図1）。

B-2-2 有機塩素系農薬及びPCB：母乳をジエチルエーテル/ n-ヘキサン混液で脂肪抽出する。次に、脂肪をフロリジルドライラムに負荷し、70%アセトニトリル/水溶出して脂肪分を除去する。この溶出液をフロリジルウエットカラムにより精製し測定試料を得る（図2）。

B-2-2 臭素化ジフェニルエーテル：

試薬：3,4,4'-トリプロモジフェニルエーテル (BDE-37), 2,2',4,4'-, 2,3',4,4'-, 2,3',4',6-, 2,4,4',6-, 3,3',4,4'-テトラプロモジフェニルエーテル (BDE-47, 66, 71, 75, 77), 2,2',3,4,4'-, 2,2',4,4',5-, 2,3',4,4',6-ペンタプロモジフェニルエーテル (BDE-85, 99, 119), 2,2',4,4',5,5'-ヘキサプロモジフェニルエーテル (BDE-153) および 2,3,3',4,4',5,6-ヘプタプロモジフェニルエーテル (BDE-190) は Cambridge Isotope Laboratories 製, 2,4,4'-トリプロモジフェニルエーテル (BDE-28), 2,2',4,4',6-ペンタプロモジフェニルエーテル (BDE-100) および 2,2',3,4,4',5'-, 2,2',4,4',5,6'-ヘキサプロモジフェニルエーテル (BDE-138, 154) は Wellington Laboratories 製のものを使用した。4,4'-ジプロモジフェニルエーテル (BDE-28) は東京化成工業 (株) 製, テカプロモジフェニルエーテル (BDE-209)

は和光純薬工業(株)製のものを使用した。

試料の調製：脂肪をゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)およびディスポーザブルミニ多層カラムを用いる簡便・迅速な精製法を用いた分析を行った(図3)。

GPC条件:GPC装置にはabc laboratories製のAS-2000を用いた。プレカラムおよびGPCカラムは、各々Shodex製CLN pak EV-G(100 mm x 20 mmφ)およびCLN pak EV-2000(300 mm x 20 mmφ)を使用した。GPC移動相にはアセトン/シクロヘキサン(3:7)を使用した(流速5mL/min)。なお、タイムプログラムはdump 15min, collect 13min, wash 12mn (total 40min)とした。

GC/MS条件：ガスクロマトグラフはHewlett Packard製のHP5890 seriesIIを使用した。分離カラムはJ&W Scientific製のDB-1(15m×0.25mmφ, 膜厚0.25μm)を使用した。キャリアーガスはHe(カラムヘッド圧6psi定圧)を用い、昇温条件は140°C(2min) -10°C/min↑-180°C-3°C/min↑-220°C-10°C/min↑-325°C(5min)とした。試料注入はスプリットレス方式(注入量2μL, パージオフ時間0-1.5min, 注入口温度275°C)により行った。

高分解能質量分析計は日本電子(株)製を使用した。

B-2-4 多環芳香族炭化水素(PAH):ヒト脂肪組織をアルカリ分解後、n-ヘキサンで抽出を行った。抽出液をアルミナの上にシリカゲルを乗せた積層カラムにより精製した(図4)。

定量：抽出・精製したPAHは蛍光検出器付きHPLCにより定量した。

HPLC条件：カラム；Lichrosorb RP-18 5μm(4.6mm x 200mm)、移動相；アセトリトル/水(70:30)、流量；2.0ml/min

アントラセン、ピレン、ベンゾ(a)アントラセン、ベンゾ(a)ピレン：Ex 334nm, Em 384nm

ベンゾ(b)フルオランセン、ベンゾ(k)フルオランセン、ベンゾ(a)ピレン、ベンゾ(g, h, i)ペリレン、：Ex365nm, Em 430nm

ベンゾ(a, h)アントラセン、3-メチルコラントレン：Ex 300nm, Em 393nm

C. 研究結果

ダイオキシン類：母乳中の実測濃度及びTEQ濃度(pg/g fat)の平均値はPCDDsで88.3 pg/g fat、11.2 pg TEQ/g fat、PCDFsで21.5 pg/g fat、6.9 pg TEQ/g fat、Non ortho Co-PCBsで89.1 pg/g fat、4.8 pg TEQ/g fat、Mono orth Co-PCBsで22470pg/g fat、4.1 pg TEQ/g fat、PCDDs+PCDFsで109.8 pg/g fat、18.1 pg TEQ/g fat、Non+Mono ortho Co-PCBsで2327.1 pg/g fat、8.8 pg TEQ/g fat、PCDDs+PCDFs+Co-PCBsで2436.9 pg/g fat、27 pg TEQ/g fatであった(表1)。

ダイオキシン類の各異性体実測濃度では1,2,3,6,7,8-HxCDD, OCDD, 2,3,4,7,8-PeCDFなどが比較的高い濃度を示した。一方、TEQ濃度においては1,2,3,7,8-PeCDD, 1,2,3,6,7,8-HxCDD, 2,3,4,7,8-PeCDFの3

種類の異性体で全体の約 83%を占めていた。分析結果の詳細は表 1 に示した。

母乳中の平均 PCBs 濃度は 263000 pg/g fat であった。各異性体濃度では 2,3',4,4',5-PePCB, 2,2',3,4,4',5'-HxPCB, 2,3,3',4',5,6-HxPCB, 2,3,3',4',5',6-HxPCB, 2,2',4,4',5,5'-HxPCB, 2,3',4,4',5',6-HxPCB, 2,2',3,3',4,4',5-HpPCB, 2,2',3,4,4',5,6'-HpPCB, 2,2',3,4,4',5,5',-HpPCB などの 5~7 塩素 PCB で約 70%を占めていた (表 2)。

母乳中に有機塩素系農薬の β -BHC が 166000 pg/g fat、総 DDT が 240000 pg/g fat、HCB が 14000 pg/g fat、HCE が 8000 pg/g fat、総クロルデンが 76 pg/g fat が存在した (表 3)。

母乳中の総臭素化ジフェニルエーテル (PBDEs) 濃度は 1789 pg/g fat であった (表 4)。異性体別では 2,4,4'-TrBDE, 2,2',4,4'-TeBDE, 2,2',4,4',6-PeDBE, 2,2',4,4',5-PeDBE, 2,2',4,4',5,5'-HxDBE などが高い値を示し、全体の約 92%を占めていた (表 4)。

母乳中の総多環芳香族炭化水素 (PAHs) 濃度は 1729 pg/g fat であった (表 5)。化合物別では anthracene, pyrene, benzo(e)pyrene, benzo(b)fluorene, などが高い値を示し、全体の約 94%を占めていた (表 5)。

D. 考察

ヒト体内に蓄積されているダイオキシン類は相対毒性係数 (TEF) の設定されている異性体に限られており、その TEQ の約 85%は 3 つの異性体で占められている。従って、ダイオキシンの人体汚染の程度を Ah レセプターを用いるダイオキシン類のスクリーニングアッセイあるいはポリクロナール抗体を用いるイムノアッセイ等でスクリーニングする場合は TEF の無い (毒性の無い) ダイオキシン類の妨害等を考慮する必要がない。

しかしながら、図 5 に示したように PCDDs 及び PCDFs 以外に数百~数千倍の化合物が存在する。これらの多量の化合物がアッセイ試料の溶解及びアッセイ溶液に添加する時に物理的妨害等も影響も考えられる。また、Ah レセプターを用いるダイオキシン類のスクリーニングアッセイではベンズピレン等の多環芳香族炭化水素、PCB、有機塩素系農薬等の影響 (Ah レセプターとの結合) に注意する必要がある。

E. 結論

1. Ah レセプターを用いるダイオキシン類のスクリーニングアッセイあるいはポリクロナール抗体を用いるイムノアッセイ法に影響を及ぼす可能性のある化合物の残留濃度を明らかにした。

一般産婦の母乳または体脂肪中にはダイオキシン類が 22669pg/g fat (27pg TEQ/g fat)、PCB が 263000pg/g fat、総 DDT が 240000 pg/g fat、 β -HCH が 166000 pg/g fat、

HCB が 13820 pg/g fat、HCE が 8130 pg/g fat、
総クロルデンが 76000pg/g fat、多環芳香
族炭化水素が 1727 pg/g fat、臭素化ジフ
ェニルエーテルが 1790pg/g fat 存在した。

F. 研究業績

論文

1. Shinjiro Hori, Kazuhiko Akutsu, Mikiya Kitagawa, Hajime Oda, Hiroyuki Nakazawa, Yasuhiko Matsuki, Tsunehisa Makino, Development of Analysis for Polybrominated Diphenyl Ether in Seafood and Actual Contamination of Seafood、Organohalogen compounds, 47,214-217(2000)
2. Kazuhiko Akutsu, Hirotaka Obana, Masahiro Okihashi, Mikiya Kitagawa, Hiroyuki Nakazawa, Yasuhiko Matsuki, Tsunehisa Makino, Hajime Oda, Shinjiro Hori, GC/MS analysis of polybrominated diphenyl ethers in

fish collected from the Inland Sea of Seto, Japan, Chemosphere, (2001) in press

3. Yoshimasa Konishi, Katsuyoshi Kuwabara, Shinjiro Hori、Continuous Surveillance of Organochlorine Compounds in Mothers Milk from 1972 to 1998 in Osaka, Japan, Archives of Environmental Contamination and Toxicology(2001) in press

学会発表

1. Shinjiro Hori, Kazuhiko Akutsu, Mikiya Kitagawa, Hajime Oda, Hiroyuki Nakazawa, Yasuhiko Matsuki, Tsunehisa Makino, Development of Analysis for Polybrominated Diphenyl Ether in Seafood and Actual Contamination of Seafood: 20th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs, August 13-17, 2000-Monterey, California, USA

表1 母乳中のダイオキシン類濃度

化合物	1999 母乳(1999)	
	試料中濃度 pg/g (ppt)	毒性等量 TEQ (ppt)
ダイオキシン異性体		
2,3,7,8-TCDD	1.5	1.5
1,2,3,7,8-PeCDD	6.6	6.6
1,2,3,4,7,8-HxCDD	1.6	0.2
1,2,3,6,7,8-HxCDD	24.0	2.4
1,2,3,7,8,9-HxCDD	5.4	0.5
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	7.4	0.1
OCDD	41.8	0.0
Total	88.29	11.2
ベンゾフラン異性体		
2,3,7,8-TCDF	0.6	0.1
1,2,3,7,8-PeCDF	0.8	0.0
2,3,4,7,8-PeCDF	12.3	6.2
1,2,3,4,7,8-HxCDF	2.1	0.2
1,2,3,6,7,8-HxCDF	2.5	0.3
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.0	0.0
2,3,4,6,7,8-HxCDF	1.6	0.2
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	1.3	0.0
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.2	0.0
OCDF	0.0	0.0
Total	21.5	6.9
PCDDs+PCDFs	109.8	18.1
コープラナP C B		
Non ortho		
3,4,4',5-TCB	3.6	0
3,3',4,4'-TCB	6.8	0.0
3,3',4,4',5-PeCB	44.7	4.5
3,3',4,4',5,5'-HxCB	33.9	0.3
Total	89.1	4.8
Mono ortho		
2,3,3',4,4'-PeCB	2914	0.3
2,3,4,4',5-PeCB	713	0.4
2,3',4,4',5'-PeCB	12852	1.3
2',3,4,4',5-PeCB	573	0.1
2,3,3',4,4',5-HxCB	3260	1.6
2,3,3',4,4',5'-HxCB	711	0.4
2,3',4,4',5,5'-HxCB	1093	0.0
2,3,3',4,4',5,5'-HpCB	265	0.0
Total	22470	4.1
Non ortho+Mono ortho	22559	9.3

表2 母乳中のPCB異性体濃度

	Cl 数	平均値	最小値 (%)	最大値	平均値	最小値	最大値
					ppb fat basis		
2,3',4,4',5-	5	7.1	4.1	10.0	18.7	10.9	26.3
2,2',3,4,4',5'-							
2,3,3',4',5,6-	6	8.2	3.9	12.1	21.7	10.3	31.7
2,3,3',4',5',6-							
2,2',4,4',5,5'-	6	17.7	10.4	23.4	46.7	27.3	61.5
2,3',4,4',5',6-							
2,2'3,3',4,4',5-	7	10.2	0.0	22.9	26.7	0.0	60.1
2,2',3,4,4',5,6'-	7	15.0	7.5	26.6	39.5	19.6	69.9
2,2',3,4,4',5,5',-	7	11.6	5.2	15.7	30.6	13.7	41.3

総PCB平均濃度 (60試料) : 263 ppb fat basis

表3 大阪府在住者の母乳中の残留有機塩素化合物濃度（1999年採乳）

	年齢 (years)	脂肪 (%)	β -BHC ng/g	T-DDT ng/g	PCB ng/g
平均値	27.8	3.66	166	240	263
標準偏差	3.7	0.99	113	163	89
幾何学平均	27.5	3.52	130	198	250
中央値	29	3.82	137	208	255
最大値	36	6.01	489	946	561
最小値	19	1.32	13	32	115

試料数：60

	HCB ng/g	HCE ng/g	T-CHL ng/g
平均値	14	8	76
標準偏差	3	6	59
幾何学平均	13	7	63
中央値	14	7	52
最大値	24	39	334
最小値	7	4	29

表4 母乳脂肪中の臭素化ジフェニルエーテル(PBDEs)濃度

異性体	IUPAC No.	平均値 pg/g	最小値 pg/g	最大値 pg/g
2,4,4'-	#28	157	31	298
	#37	16	0	42
2,4,4',6'-	#75	0		
2,3',4',6'-	#71	0		
2,2',4,4'-	#47	861	204	2247
2,3',4,4'-	#66	18	0	56
3,3',4,4'-	#77	0		
2,2',4,4',6'-	#100	163	47	377
2,3',4,4',6'-	#119	1	0	9
2,2',4,4',5'-	#99	196	56	447
2,2',3,4,4'-	#85	10	0	46
2,2',4,4',5,6'-	#154	30	11	59
2,2',4,4',5,5'-	#153	277	140	432
2,2',3,4,4',5'-	#138	1	0	6
2,2',3,4,4',5',6'-	#183	59	4	86
2,3,3',4,4',5,6'-	#190	0		
合計		1789		

表5 人体脂中のPAHs濃度

化合物名	平均値 (最低-最高) pg/g
anthracene	258 (0-575)
pyrene	1138 (49-2700)
benz(a)anthracene	0
benzo(e)pyrene	80 (30-150)
benzo(b)fluorethene	156 (77-260)
benzo(k)fluoranthene	26 (0-48)
benzo(a)pyrene	22 (0-59)
benzo(g,h,i)perylene	49 (13-110)
dibenz(a,h)anthracene	0

n=10

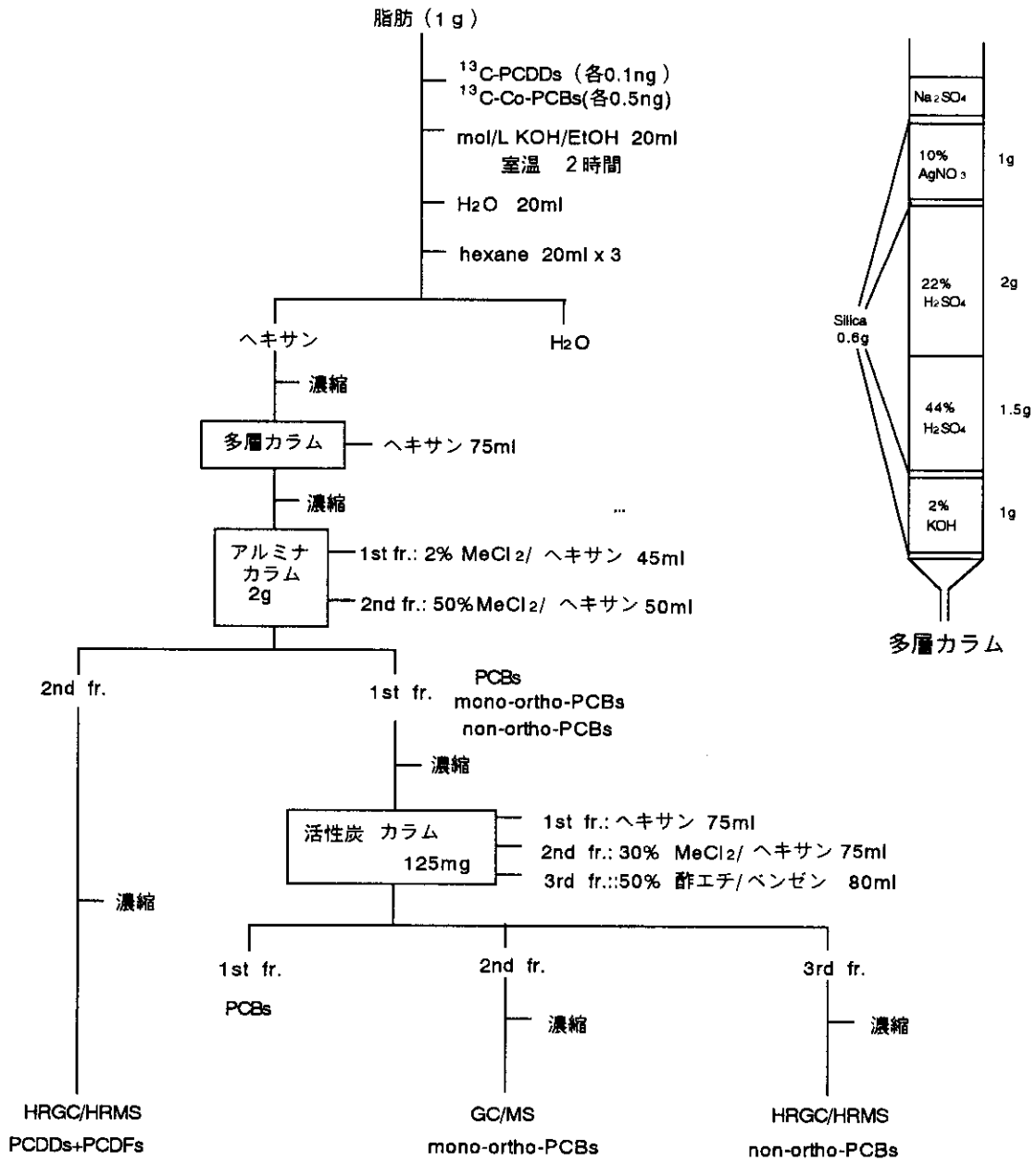


図1 脂肪からのダイオキシン分析方法

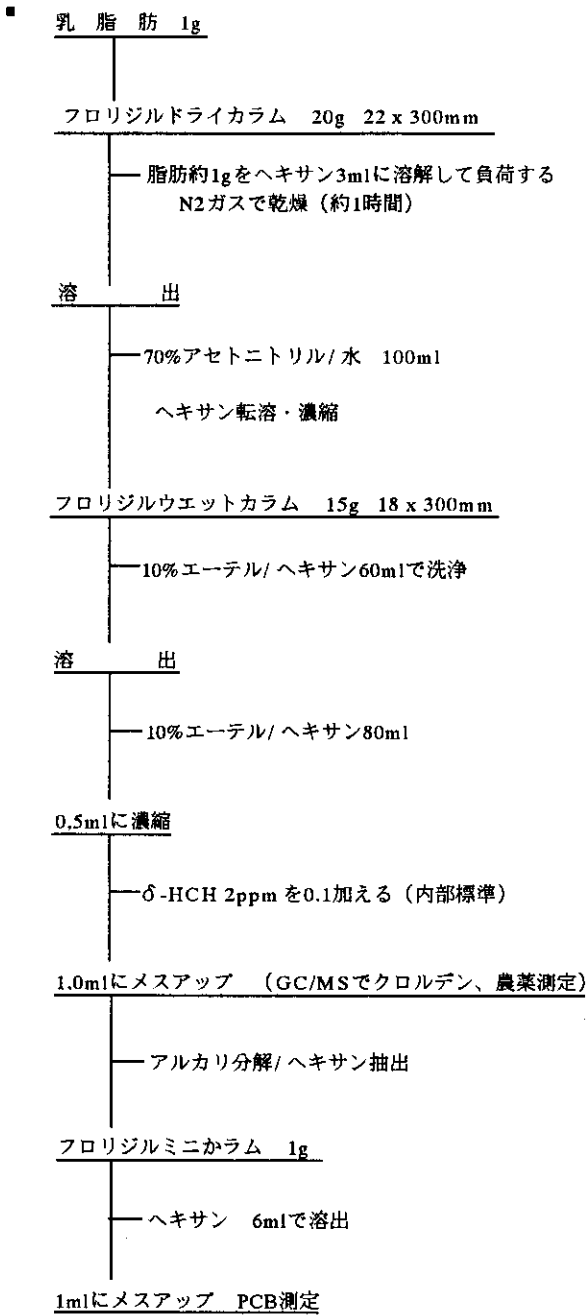


図2 母乳中有機塩素系農薬、PCBの分析法

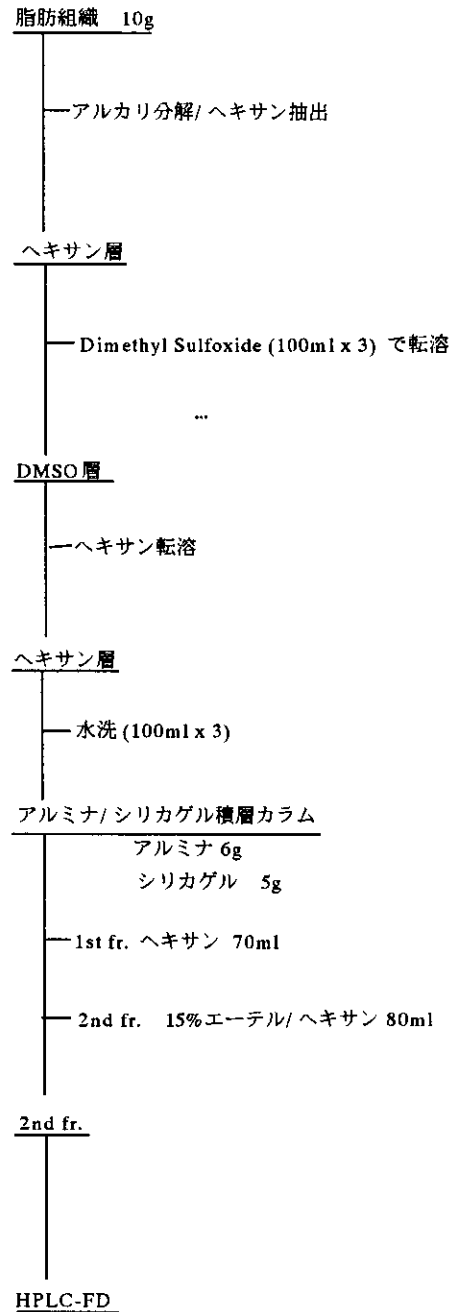


図4 脂肪組織中のPAHの分析法

Homogenized sample 300 g

extract with diethylether/*n*-hexane
 evaporate to dryness
 determine lipid weight

Extracted lipid 0.7 g

cleanup spike (BDE-190, 2.8 ng)
 30% acetone/cyclohexane 7 mL

GPC

column: Shodex CLNpak EV-2000
 mobile phase: 30% acetone/cyclohexane
 flow rate: 5 mL/min
 injection volume: 5 mL

Eluate (75-140 mL)

Evaporate to dryness
n-hexane 1 mL

Mini-column cleanup

elute with 10 mL of *n*-hexane
 concentrate
 syringe spike (BDE-138, 2 ng)
n-nonane 0.2 mL

GC/MS (NCI-SIM)

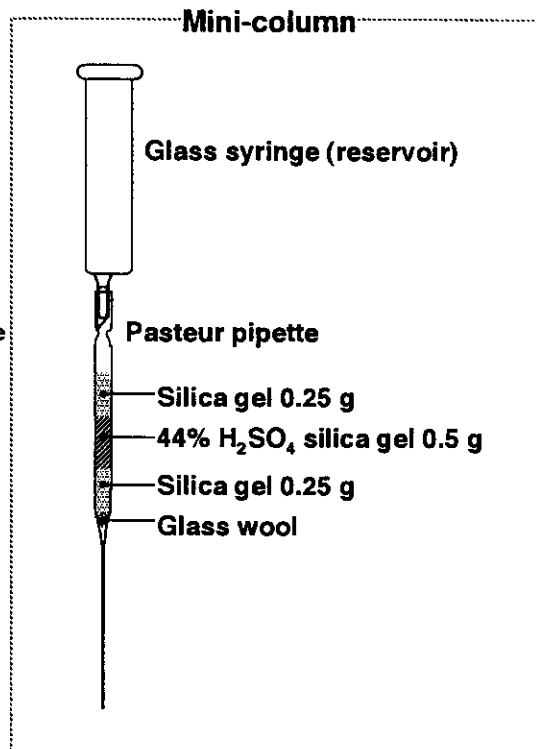


図3 PBDEsの分析法

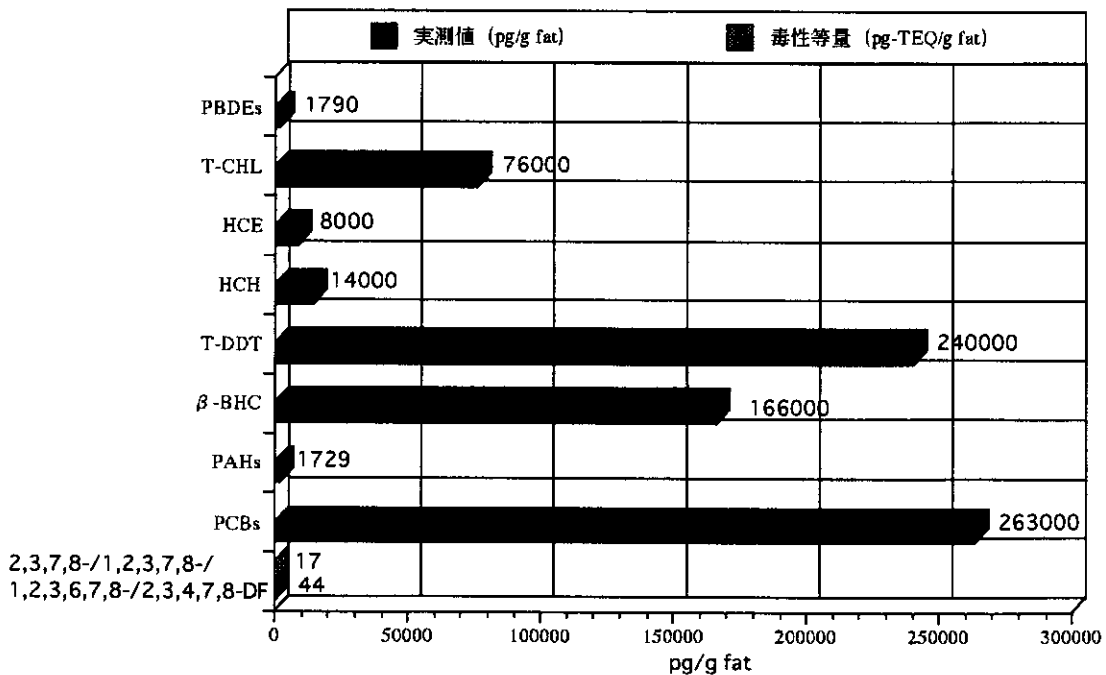


図5 母乳中に存在する化学物質

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
ーモノクローナル抗体を用いる ELISA の構築と母乳試料のクリーンアップ法の検討ー

主任研究者 松木 容彦 (財) 食品薬品安全センター秦野研究所 副所長
分担研究者 安生 孝子 (財) 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
神戸川 明 神戸川研究所 所長
奥山 光伸 (財) 食品薬品安全センター秦野研究所

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イムノアッセイ法の開発を目的として、昨年度はウサギポリクローナル抗体を用い二抗体固相法による ELISA を確立した。本年度は、ウサギの抗ダイオキシン抗血清の作製に有用であったハプテン抗原をマウスに免疫して、マウスモノクローナル抗体を調製し、この抗体を用いる ELISA を構築した。標準曲線は 2,3,7,8-TCDD 1~1000 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。さらに、牛乳およびバターを例として、ELISA に供するための試料中ダイオキシン類のクリーンアップ法を検討した。常法により脂肪を抽出しアルカリまたは酸分解後、種々のカートリッジミニカラムを用いて精製を試みたが、ダイオキシン類と油状成分あるいは抗原抗体反応の妨害物質との分離の再現性に乏しく、さらに検討を要すると判断された。

ヒトでのダイオキシン類による汚染のモニタリングにおいて、その毒性等価係数および存在量から重要な測定対象と考えられる 5 あるいは 6 塩素置換したダイオキシン異性体に特異性の高い抗体を得ることを目的として、新規に多塩素置換ダイオキシンハプテンを 3 種合成した。これらはさらにウシ血清アルブミンとの結合物に導いた。また、ELISA の検出系の高感度化を検討するために、標識プローブとしてダイオキシンハプテンのビオチン結合物を調製した。

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は社会的関心事であり、ヒトでの暴露と汚染の実態の把握は急務かつ重要な課題である。従来、ダイオキシン類の測定には主に高分解能ガスクロマトグラフィー/マススペクトルメトリー (GC/MS) が用いられているが、測定は

長時間を要し、その経費は著しく高い。そのため、安価で簡便かつ高感度な測定法の開発が望まれている。このような観点から、ヒトの生体試料中のダイオキシン類の酵素イムノアッセイ法を確立し、ヒトでの汚染の実態のモニタリングなどに資することを目的として、本研究に着手した。

昨年度は、ダイオキシンハプテンの合成か

ら開始し、ポリクローナル抗体を用いる ELISA を確立した。本年度は、まず、5 または 6 塩素置換ダイオキシンに特異性の高い抗血清の調製を目的に、多塩素置換ダイオキシンハプテンの合成とそのタンパク結合物を調製した。また、より高感度なアッセイ系の開発を目的に、抗原固相法による ELISA を検討した。さらに、モノクローナル抗体を作製し、これを用いて ELISA の確立および ELISA に供するための生体試料の前処理法の検討を行った。

B. 研究方法

B-1. 多塩素置換ダイオキシンハプテンの合成とタンパク結合物の調製

まず、目的のハプテンを合成するために、その母核となる 1-Amino-3,6,7,8,9-pentachlorodibenzo[1,4]dioxin を、3,4,5,6-テトラクロロカテコールとクロロニトロベンゼン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、あるい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、ダイオキシン骨格の C-1 に、スペーサー部にアミド結合を導入したハプテンを 3 種合成した。これらは活性エステル法によりウシ血清アルブミン (BSA) との結合物に導いた。

B-2. 抗原固相法による ELISA の検討

プレートに固相化する抗原には、昨年度合成したハプテン (I-5) のタンパク結合物を用い、タンパクにはウシグロブリン、卵白アルブミン、ゼラチンおよび BSA を選択した。抗原を固相化した各ウエルに、ダイオキシン類の標準溶液およびモノクローナル抗体を加え、インキュベートした。各ウエルを洗浄後、ヤギ抗マウス IgG 抗体のペルオ

キシダーゼ標識体を加えてインキュベート、洗浄し、過酸化水素/ 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。

アッセイ系について、固相化に用いるタンパクの種類、ハプテン/タンパク結合モル比、固相化の条件、アッセイ条件などの基礎的検討を行った。

B-3. モノクローナル抗体を用いる ELISA の検討

昨年度、ウサギポリクローナル抗体の調製に用いた抗原のうち、4 種を選択し、マウスに免疫した。抗体価の上昇と 2,3,7-Trichloro-8-methyldibenzo[1,4]dioxin (TMDD) による阻害のみられたマウス脾細胞とマウスミエローマ細胞を融合させて、抗ダイオキシン抗体産生ハイブリドーマを得た。有用な抗体を産生しているハイブリドーマを選択し、クローニングによりモノクローナル抗体を調製した。このモノクローナル抗体を用いて ELISA を確立し、また、ダイオキシン異性体との交差反応性などを調べた。さらに、ELISA に供するための生体試料の前処理法を、牛乳およびバターを例として種々検討した。

C. 研究結果および考察

C-1. 多塩素置換ダイオキシンハプテンの合成とタンパク結合物の調製

3,6,7,8,9-Pentachlorodibenzo[1,4]dioxin の C-1 に、スペーサー部にアミド結合を、その末端にカルボキシル基を有する側鎖を導入したハプテンを 3 種合成した。これらの構造は、NMR、MS 等により確認した。さらに、これらハプテンのタンパク結合物を調製した。