

C・2. 抗原固相法による ELISA の検討

ダイオキシンハブテン (I-5) のタンパク結合物を固相化したプレートを用いて抗原固相法によるアッセイ系を検討した。抗体には新規に作製したモノクローナル抗体を用い、アッセイ系の種々の条件を検討した結果、標準物質 TMDD を用いて標準曲線を作成できた。しかし、昨年度確立した二抗体固相法の結果を超えるものではなかった。

C・3. モノクローナル抗体を用いる ELISA の確立

昨年度の方法に準じて、モノクローナル抗体を作製した。抗体の特性を調べるとともに、このモノクローナル抗体を用いて ELISA を確立した。標準物質 2,3,7,8-TCDD 1~1000 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た。さらに、牛乳またはバターを例として、ELISA に供するための生体試料の前処理法を検討した。試料の前処理法については、ダイオキシン類と油状成分または抗原抗体反応の妨害物質との分離が不十分であり、さらに検討が必要であった。

D. 結論

多塩素置換ダイオキシンのハブテンを合成し、そのタンパク結合物を調製した。今後、これを免疫原として抗血清を調製する予定

である。本抗原を用いることにより、多塩素置換ダイオキシン類に特異性の高い抗体を得られる可能性が期待される。

昨年度合成したハブテンのタンパク結合物を用いて、マウスモノクローナル抗体を作製し、このモノクローナル抗体を用いる ELISA を確立した。この抗体は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、汚染実態のモニタリングへの適用が期待される。

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) T. Anjo, M. Okuyama, M. Satoh, A. Kambegawa, Y. Matsuki :
20th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs, August 13-17, 2000, Monterey, California, USA

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得

- 1) ダイオキシンに対するモノクローナル抗体 (特願 2000-315948 号) 出願

2. 実用新案登録

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免疫アッセイ法の開発研究
—多塩素置換ダイオキシンハプテンおよび新規ダイオキシンハプテンの合成—

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

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、その測定には従来から主に、機器分析すなわち GC Mass spectroscopy や HPLC(High performance liquid chromatography)が応用され、多くの成果が得られているのは周知の通りである。また、検体物質が主として河川、土壌、大気中にあり、それらに含まれる内分泌攪乱物質の抽出には各種の方法が考案されているとはいえ、その抽出過程や一つの測定機器における測定検体数（時間）が問題となっている。

こうした前処理および測定法の簡易化を目指し、免疫アッセイを応用する内分泌攪乱物質の測定法の開発とスクリーニングについて検討がなされている。免疫アッセイは、迅速、正確かつ簡便に多数の検体を低価格で測定できるのが特徴であり、すでに基礎・臨床医学や医薬品化学分野において広く応用され、実用価値が高いことが実証されており、免疫アッセイへの応用は今後ますます増大すると考えられる。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。

ところで、抗体は、免疫アッセイ法に使用する免疫試薬として最も重要である。特にハプテンの EIA 法においては、抗体の特性がその EIA 法の優劣を決定する最も重要な要因である。そこで、これまで 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (2,3,7,8-TCDD)のハプテン分子を種々設計・作製してきた知見を基に、(1) 母乳中に高濃度で検出される脂溶性の高い、さらに高度塩素置換されたダイオキシンの EIA 法による検出のためのハプテン分子の作成、(2) 2,3,7,8-TCDD を検出対象物質として、より高感度・高特異性を有する新規ハプテン分子設計とその合成、の 2 つを目的とし種々の検討を行った。

EIA 法による多塩素置換ダイオキシンを検出対象としたハプテン合成では、まず 1,2,3,4,7-PeCDD あるいは、1,2,3,4,7,8-HexCDD を対象としたハプテンを 3 種合成した。

また、新規ダイオキシンハプテンの合成としては、ダイオキシン代替母核としてフェノキサジン環を選択し、より高特異性を有するハプテン合成の検討を行った。

A. 研究目的

ダイオキシン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検討を行った。

ハプテン作成にあたっては、

- (1) 高度塩素置換されたダイオキシンのEIA法による検出のためのハプテン分子の作成
- (2) 2,3,7,8-TCDDを検出対象物質として、より高感度・高特異性を有する新規ハプテン分子設計とその合成

を目的とした。

- (1) では、検出対象を1,2,3,4,7-PeCDDあるいは、1,2,3,4,7,8-HexCDDとし、1,2,3,4,7-PeCDDに適当なスペーサーを導入したハプテン分子を合成することとした。(図1)。

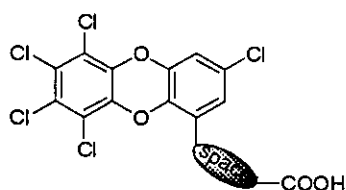


図1

(2) 文献上既知のダイオキシンハプテンは、いずれもがダイオキシン母核の1位または2位に種々の結合手が導入されている。一般的にはアミド結合を有するスペーサーがその合成の容易さから作られている。しかしながら、免疫アッセイによるダイオキシン検出をより実用的なものとするためには、高感度かつ高特異的な抗体を産生する必要がある。

このような見地から、検出対象を2,3,7,8-TCDDとし、これまでに報告例のない新規ハプテン合成を検討した。

一般的には、ハプテン分子のスペーサーが結合している部位の近傍は抗体認識能が悪くなる傾向にあるといわれる。そこで、これまで、ダイオキシン母核の1あるいは2位に導入していたスペーサー部をベンゼン環上から移動することを考えた。そのためには、ジフェニールエーテル部位の構造を変換する必要がある。そこで、ジベンゾダイオキシンの代替母核としてフェノキサジン環を選択し、フェノキサジン骨格の窒素上にスペーサー部を導入した化合物を合成することを計画し、合成検討を行った。

(図2)

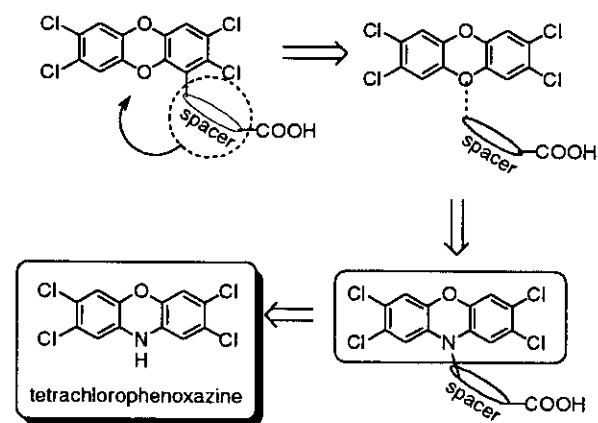


図2

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)二水和物、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、ジメチル硫酸、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、2-アミノ-4,5-ジクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、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、無

水コハク酸, 無水グルタル酸, 塩化チオニル, 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, クロロホルム-d, ジメチルスルホキシド-d6: 和光純薬(株)

ベンゼン, クロロベンゼン, 二塩化オキサリル, シリカゲル 60: 関東化学(株)

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: Aldrich co.

1,2,3,4-テトラクロロカテコール: Lancaster Co.

2. 多塩素置換ダイオキシシンハブテンの合成

1) 1-Amino-3,6,7,8,9-PeCDD (3)の合成

スパーサー部にアミド結合を有する多塩素置換ダイオキシシンハブテンの合成を行うために, まずその母核となる

1-Amino-3,6,7,8,9-PeCDD (3)を図3の方法で合成した。

すなわち, 3,4,5,6-テトラクロロカテコールと文献既知¹⁾のクロロニトロベンゼン体(1)とを, アセトン中, 炭酸カリウム存在下カップリングさせる方法で合成した。

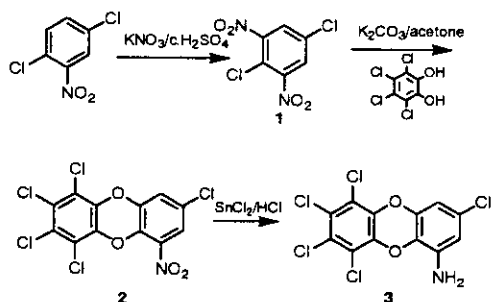


図3

2) 化合物3合成にかかる実験

テトラクロロカテコール(12 g, 50.6

mmol)及び炭酸カリウム(15.4 g, 50.8 mmol)をアセトン(30 mL)に懸濁し, 30分間加熱還流した。次いでクロロニトロベンゼン(1)(13.9 g, 50.6 mmol)を加え, 3.5時間加熱還流した。冷後, 氷水(600 mL)に注ぎ, 析出した結晶を吸引ろ取した。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー(n-ヘキサン:ベンゼン=95:5)により精製し, 化合物2 (8.9 g, 44%)を得た。

ナス型フラスコに化合物2 (8.9 g, 22 mmol), エタノール (230 mL)及び濃塩酸(22 mL)の混合物をとり, これに塩化スズ(II)二水和物を徐々に加えた。反応混合物を室温で24時間攪拌後, エタノールを半量になるまで濃縮した。反応液に水を加えて2N NaOH(約250mL)でpH 8とし, エーテル(200 mL×2)で抽出した。エーテル層を水(400 mL)で洗浄し, 無水硫酸ナトリウムで乾燥後, 溶媒を減圧留去した。残さをシリカゲルクロマトグラフィー(ベンゼン:ヘキサン = 9:1)により精製し, アミノ体3(5.3 g, 65%)得た。

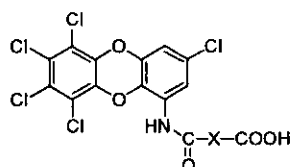
3) 化合物3へのスパーサー部の導入

次いで, 3,6,7,8,9-PeCDDの1-アミノ体からスパーサー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パーサー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パーサー部にアミド結合を有するハブテン

を合成する方法。

1-Amino-3,6,7,8,9-trichlorodibenzo-[1,4]-dioxin (3)に上記いずれかの方法を適用することにより、スペーサー部にアミド結合を導入したハブテン3検体(4, 5, 6)を合成した。(図4)



Comp.	X	Method	Yield (%)
4	(CH ₂) ₂	A	65
5	(CH ₂) ₃	A	21
6	(CH ₂) ₄	B	32

図4

4) ハブテン4, 5および6合成の実施例
4-[(3,6,7,8,9-Pentachlorodibenzo[1,4]-dioxin-1-yl) carbamoyl] butanoic Acid (5)の合成 (Method A)

1-Amino-3,6,7,8,9-pentachlorodibenzo-[1,4]-dioxin(3)(100 mg, 0.3 mmol)及び無水グルタル酸(34 mg, 0.3 mmol)を無水THF(3 mL)に溶解し、75 °Cで16時間加熱還流した。冷後、THFを留去し、残さの無色固形物を水洗、乾燥することにより5(66.8 mg, 50%)を得た。

4-[(3,6,7,8,9-Pentachlorodibenzo[1,4]-dioxin-1-yl) carbamoyl] pentanoic Acid (6)の合成 (Method B)

アジピン酸モノメチルエステル及び二塩化オキサリル(1.8 mL)より調製した粗製アジピン酸モノエチルエステルクロライドを

化合物3(200 mg, 0.54 mmol)の無水ピリジン(6 mL)の懸濁液に氷冷下加えた。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、6(84 mg, 32%)を得た。

3. 新規ダイオキシンハブテンの合成検討 1) 新規ダイオキシンハブテンの設計

研究目的に記載したように、より高感度、高特異性を有する2,3,7,8-TCDD検出のためのハブテン合成として、ダイオキシン環の代替母核としてフェノキサジン環を選択した。フェノキサジン環はジフェニルエーテル部を有するとともにジフェニルアミン部を有する。このジフェニルアミン部の窒素原子上に適当なスペーサーを導入することによりスペーサーをベンゼン環上から移動させることができ、より認識能を高めることができると考えた。(図5)。

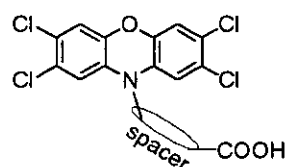


図5

2) 2,3,7,8-テトラクロロフェノキサジン環の構築検討

a) フェノキサジン骨格の構築法としては、

(a)Antoniによる方法²⁾, (b)Kehrmann³⁾らによる方法, そして(c)Bonvicino⁴⁾らによる方法などがある。(図6)

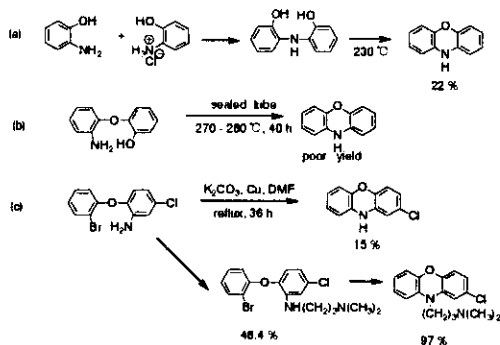


図6

この中で, 本研究では (c) の方法を参考に合成検討を行うこととした。

b)合成ルート計画

図7に示すルート1, 2の2経路を計画しその検討を行った。いずれも, まずジフェニルエーテル体を構築し, そこから閉環反応を経て, フェノキサジン環を構築しようとする試みである。

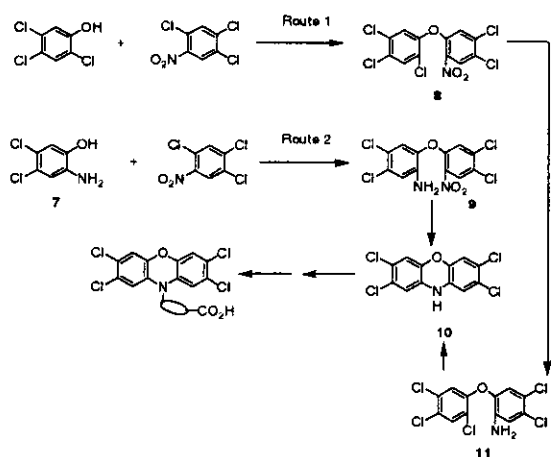


図7

Route 1 では, いずれも市販の試薬同士をカップリングさせてジフェニルエーテル体を得る方法であり, その反応条件として, A から D の4種を検討した。(図8)

Method	solvent	base	cat.	temp.	time
A	acetone	K ₂ CO ₃	—	reflux	11h
B	DMF	K ₂ CO ₃	—	reflux	3h
C	DMF	K ₂ CO ₃	Cu	reflux	21h
D	(neat)	MeONa	—	160-165°C	2h

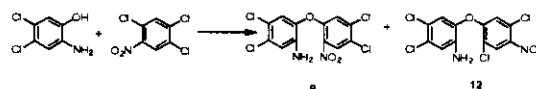


図8

これらの検討の結果, 目的物9は得られるが低収率であり, また同時に副生する化合物12との分離が非常に困難であったので, この経路での合成はこの段階で中断した。

ルート2の出発物質となる, 2-アミノ-4, 5-ジクロロフェノール(7)は, 文献記載の方法⁵⁾により市販の2-アミノ-4, 5-ジクロロフェノール(Wako)から合成した。化合物7とトリクロロニトロベンゼン(Wako)を図9に示す条件でカップリングさせ, ジフェニルエーテル体(8)を合成した。この際, 3量体である13も同時に生成するが, 両者は蒸留操作により比較的容易に分離された。

Method	Conditions	Yield (%)	
		8	13
E	K ₂ CO ₃ /acetone reflux, 40 h	26	13
P	23 M KOH aq., 140°C, 18 h	46	20

図9

化合物8はさらに塩化スズで還元し, フェノキサジン閉環前駆体であるアミノ体(11)に誘導した。

化合物11からフェノキサジン環への誘導は図10に示した経路で行った。すなわち, ジメチル硫酸でN-ジメチル化後, フェノキサジンへと閉環し, 脱メチル化を経て,

ハブテン合成の原料となる 2,3,7,8-テトラクロロフェノキサジン体(10)へと誘導する経路である。

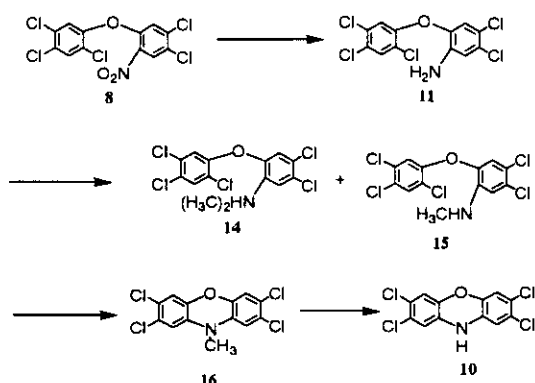


図 1 0

化合物 11 のメチル化はジメチル硫酸を用いたが、この際、*N*-ジメチル化体(14)および *N*-モノメチル化体(15)が生成した。これらは、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離精製を行った。化合物 14 は、さらに高沸点溶媒中で加熱することにより閉環体 16 に誘導されることを確認した。現在、さらに詳細を検討中である。

c)実験項

4,5-Dichloro-2-(4,5-dichloro-2-nitrophenoxy) aniline (9)

4,5-ジクロロ-2-アミノフェノール(7)(500 mg, 2.81 mmol)および 2,4,5-トリクロロニトロベンゼン(635 mg, 2.81 mmol)を炭酸カリウム(777 mg, 5.62 mmol)存在下、アセトン(17 mL)中 1 1 時間加熱還流した。冷後、アセトンを留去し、残さを酢酸エチル(150 mL)で抽出した。酢酸エチル層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下留去した。残さを、乾式カラムクロマトグラフィー (ヘキサン：酢酸エチル=10:1) で分離精製し、9 (16 %)を得た。

4,5-Dichloro-2-(2,4,5-trichlorophenoxy)nitrobenzene (8)

2,4,5-トリクロロフェノール(1.0 g, 5.06 mmol)および 2,4,5-トリクロロニトロベンゼン(1.15 g, 5.06 mmol)を炭酸カリウム(1.40 g, 10.1 mmol)存在下、アセトン(30 mL)中 14 時間加熱還流した。冷後、アセトンを留去し、残さを酢酸エチル(150 mL)で抽出した。酢酸エチル層を 10%水酸化ナトリウム水溶液、飽和食塩水の順で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下留去した。残さを、減圧蒸留し、8 (26 %, bp 202°C; 6.5 mmHg)を得た。同時に 13 (13 %, bp 235 – 240°C; 4.0 mmHg)を得た。

4,5-Dichloro-2-(2,4,5-trichlorophenoxy)aniline (11)

氷冷下、攪拌しながらエタノール(26 mL)に濃塩酸(2.6 mL)を加え、これに化合物 8(1.0 g, 2.58 mmol)を徐々に加えた。さらに塩化第二スズ 2 水和物(2.0 g)のエタノール溶液を徐々に滴下した。滴下終了後、室温まで昇温し、そのまま 1 9 時間攪拌した。エタノールを留去し、残さに水(17 mL)を加え、1N NaOH 水溶液でアルカリ性とした。エーテル(40 mL×4)で抽出し、エーテル層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧下留去した。残さを、カラムクロマトグラフィー (ヘキサン：酢酸エチル=10:1) で精製し、化合物 11(765 mg, 83 %)を得た。

[4,5-Dichloro-2-(2,4,5-trichlorophenoxy)phenyl]dimethylamine (14)

化合物 11(50 mg, 0.14 mmol)、硫酸ジメチル(36 mg, 0.28 mmol)をクロロベンゼン(0.18 mL)に溶解した。これを外温 110°C で 3 0 分加熱した。冷後、酢酸エチル(3 mL)で抽出し、よく水洗した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下溶媒を留去した。残

さをカラムクロマトグラフィー(ヘキサン：酢酸エチル=20:1)で分離精製し、化合物 14 (黄色針状晶)を得た。

4. 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。

(ア) 当実験に関わる者に対して十分な安全教育を行う。

(イ) 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。

(ウ) すべての作業は、排気システム内で行う。特に結晶物を扱う場合には、その飛散に十分留意し、ヘパフィルタなどでの飛散防止策を講じる。

(エ) 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中に入れ、特定の位置に置き、処理方法が確立するまで保存する。

(オ) 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。

(カ) 排水を通じての環境中への流出に留意する。

(キ) 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、1 2 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。

(ク) 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長時間照射する。

(ケ) 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)^{6), 8)}や Young(1983)^{7), 8)}の発表した実験室運営に関する行動基準に準拠した。

5. 引用文献

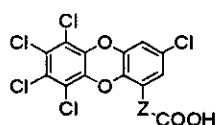
- 1) a) K. Chae, L. K. Cho, J. D. McKinny, *J. Agric. Food Chem.*, 25, 1207-1209 (1977)
b) J. R. Sanborn, S. J. Gee, S. D. Gilman, Y. Sugawara, A. D. Jones, J. Rogers, F. Szurdoki, L. H. Stanker, D. W. Stoutamire, B. D. Hammock, *J. Agric. Food Chem.*, 46, 2407-2416 (1998)
- 2) J. de Antoni, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 12, 2871-2873 (1963) [*Chem Abstr.*, 60, 8022e (1964)]
- 3) F. Kehrmann, A. Saager, *Ber.*, 36., 477 (1903)
- 4) G. E. Bonvicino, L. H. Yagodzinski, R. A. Hardy, *J. Org. Chem.*, 26, 2797-

2803 (1961)

- 5) a) J. T. Warren, R. Allen, D. E. Carter, *Drug Metab. Dispos.*, 6, 38-44 (1978)
 b) H. D. Cossey, C. J. Sharpe, F. F. Stevens, *J. Chem. Soc.*, 4322-4330 (1963)
- 6) H. Beck, *Human and Environmental Risks of Chlorinated Compounds*, 691-697, Plenum Press, New York (1983)
- 7) A. L. Young, *Human and Environmental Risks of Chlorinated Compounds*, 667-674, Plenum Press, New York (1983)
- 8) K. Ballschmiter, R. Bacher, *Dioxine - Chemie, Analytik, Vorkommen, Umweltverhalten und Toxikologie der halogenierten Dibenzop-dioxine und Dibenzofurane*, VHC Press, Germany (1996)

C. 研究結果

1) 合成ハブテンー覧



Comp.	Z
4	NHCO(CH ₂) ₂
5	NHCO(CH ₂) ₃
6	NHCO(CH ₂) ₄

2) 化合物データ

表 1 : 4 - 6

表 2 : 8, 9, 11

表 1

Comp.	¹ H-NMR (DMSO)	IR (cm ⁻¹)	mp (°C)
4	12.22 (brs, 1H, CO ₂ H), 9.68 (s, 1H, NH), 7.41 (d, J = 2.4, 1H, Ar-H), 7.12 (d, J = 2.4, 1H, Ar-H), 2.63 (m, 2H, NHCO-CH ₂ -CH ₂), 2.50 (m, 2H, NHCO-CH ₂ -CH ₂)	3338 (CONH), 1715 (CO ₂ H), 1680 (CONH), 1616, 1560, 1535, 1465, 1420, 1232, 847	253-254
5	12.15 (brs, 1H, CO ₂ H), 9.64 (s, 1H, NH), 7.33(d, J = 2.4, 1H, Ar-H), 7.15 (d, J = 2.4, 1H, Ar-H), 2.41 (t, J = 7.3, 2H, NHCO-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂), 2.32 (t, J = 7.3, 2H, NHCO-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂), 1.84 (q, J = 7.3, 2H, NHCO-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂)	3274 (CONH), 1703 (CO ₂), 1666 (CONH), 1420, 845	254-257
6	12.05 (brs, 1H, COOH), 9.60 (1H, s, NH), 7.35 (d, J = 2.4, 1H, Ar-H), 7.13 (d, J = 2.4, 1H, Ar-H), 2.38 (2H, t, J = 6.8), 2.25 (2H, t, J = 6.8), 1.69 - 1.50 (4H, m)	3258 (CONH), 1963 (CO ₂ H), 1672 (CONH), 1422, 1192, 963, 845	225-228

3) 測定機器

¹H-NMR スペクトル: JEOL JMN-GSX270 NMR-Spectrometer. (ケミカルシフトは parts per million(ppm)で表示し, テトラメチルシラン(TMS)を内部標準物質として用い, 低磁場から TMS へδ値で記録した. また, 結合定数(J)は Hz で表示した. 以下に示す略語を用いた.

s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, quint = quintet, m = multiplet, brs = broad singlet.

IR スペクトル: Jasco A-102 Infrared Spectrometer. (すべて KB r 法による測定).

融点はすべて未補正.

D. 考察

今回合成したダイオキシンハブテンは, 多塩素置換ダイオキシンを検出対象としたものであった. 具体的にはその検出対象は, 1,2,3,4,7-PeCDD(CAS No. 39227-61-7), 1,2,3,4,7,8-PeCDD(CAS No. 39227-28-6) 今回は合成上の簡便さ等を考慮してスパーサー部にアミド結合を導入したハブテンを合成したが, さらにこのスパーサー部を変換することは可能であり, 今後の検討課題である.

また, 新規ダイオキシンハブテンの合成では, ハブテン分子となるダイオキシン母核の代替としてフェノキサジン環を選択し, 塩素置換フェノキサジンの合成検討を行いその方法を見いだした.

最近開発されたいくつかの生物学的定量分析法によって, 2,3,7,8-TeCDD に対して pg の範囲の検出限界が達成されているが, これらの方法でいずれも指摘されているの

表 2

Comp.	¹ H-NMR (DMSO)	IR (cm ⁻¹)	mp (°C)
8	8.17 (s, 1H, H ³), 7.64 (s, 1H, H ²), 7.18 (s, 1H, H ⁶), 6.98 (s, 1H, H ⁶)	3094, 1604, 1521, 1454, 1338, 1263, 1126, 1080	103 - 105
9	7.57 (s, 1H, H ³), 7.00 (s, 1H, H ⁶), 6.95 (s, 1H, H ⁶), 6.83 (s, 1H, H ³), 4.13 (brs, 2H, NH ₂)	3477, 3441, 3377, 3208, 3088, 1620, 1489, 1454, 1242	101.5 - 103
11	7.55 (s, 1H, H ³), 7.04 (s, 1H, H ⁶), 6.95 (s, 1H, H ⁶), 6.75 (s, 1H, H ³), 2.79 (s, 6H, N(CH ₃) ₂)	3086, 1458, 1350, 1251, 1128, 1074	87 - 88

は、培養媒体中での PCDD/PCDF の高ハロゲン化同骨格体の溶解度が低いということである。これらのことも考慮に入れて、ハブテン分子の設計をすることが必要であると考える。

E. 結論

今回合成した検体のスクリーニング結果を指標とし、さらに高特異性を持ったハブテン抗原が設計できると期待される。

また、高ハロゲン置換ダイオキシンハブテン作製を、これまで得られた知見をもとに作製することにより、ヒト生体試料中のダイオキシン測定に資することが可能であると期待される。

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）
協力研究報告書

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
－新規ダイオキシンハブテンタンパク結合物の調製と抗原固相化 ELISA の検討－

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
研究協力者 神戸川 明 神戸川研究所 所長

研究要旨

ダイオキシン類の抗原固相法による ELISA を検討した。固相化抗原には、ウシγグロブリン、卵白アルブミン、ゼラチンおよびウシ血清アルブミンを用いて作製したハブテンタンパク結合物を用い、ハブテン/タンパク結合モル数やプレートへの固相化に用いるタンパク結合物の量などを変え、アッセイ系の基本条件を検討した。その結果、標準物質 2,3,7-Trichloro-8-methyldibenzo[1,4]dioxin (TMDD) を用いて標準曲線を作成できたが、昨年度確立した二抗体固相法を超えるものではなかった。

別に、多塩素置換ダイオキシンハブテンとして、佐藤らが合成した 3,6,7,8,9-Pentachlorodibenzo[1,4]dioxin の C-1 にスクサミド、グルタミド、アジバミドの 3 種を導入したハブテンを用いて、ウシ血清アルブミン結合物を調製した。また、ELISA の検出系の高感度化の検討のために、ダイオキシンハブテンのビオチン結合物を調製した。

A. 研究目的

ダイオキシン類の簡便かつ高感度な測定法として、酵素イムノアッセイ法を開発するために、昨年度は、新規ハブテンの合成、抗ダイオキシン抗血清の調製、アッセイ系の構築等を行い、二抗体固相法による ELISA を確立した。本年度は、引き続き以下の 3 点について検討した。

1) より高感度なアッセイ系の確立を目的に、抗原固相法による ELISA を検討した。

2) 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血清を得ることを目的として、多塩素置換したダイオキシンハブテンのタンパク結合物を調製した。

3) ダイオキシン類の ELISA の開発において、検出系の高感度化の検討の一つとして、

ビオチンとアビジンの結合力を利用する系を取り上げ、その検討に必要な標識プローブとしてダイオキシンハブテンのビオチン結合物を調製した。

B. 研究方法

B-1. 使用試薬

ウシ血清アルブミン (BSA)、ヘルオキシダーゼ (HRP)、*N*-ヒドロキシコハク酸イミド (NHS)、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 (EDC)、ゼラチン、ウシγグロブリン (BGG)、卵白アルブミン (OVA)、*o*-フェニレンジアミン (OPD)、Tween 20、Triton X-100 : Sigma chemical

ビオチナミドカプロイルヒドラジド : Vector

HRP 結合アフィニティー精製ヤギ抗マウス IgG (H+L) : Cappel 社

B・2. 器材

ELISA 用マイクロタイタープレート：
Nunc 4-39454

B・3. 機器

紫外分光光度計：Hitachi 2000

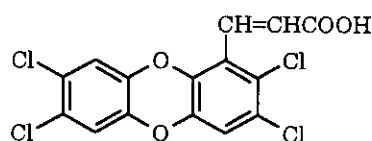
GC-MS：Heulet Packard 5870 (GC) /
5972 (MS)

マイクロプレートリーダー：Toso MRP
A4

B・4. 抗原固相法による ELISA の検討

1) ダイオキシンハプテンのタンパク結合物の調製

(*E*)-3-(2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo[1,4]-dioxin-1-yl)propenoic acid (I・5、図1) の NHS エステル 4 mg を DMF 200 μ L にとかし、その 12.5 μ L (I・5-NHS エステル 250 μ g、BGG の 5 倍モル) または 25 μ L (I・5-NHS エステル 500 μ g、BGG の 10 倍モル) をそれぞれ、BGG 20 mg を 0.1 mol/L NaHCO₃ とジオキサンの混液 (1:1) 1 mL に溶かした溶液に加えて室温で 1 時間攪拌後、一夜透析した。得られた液をクロロホルム 3 mL で 2 回抽出して未反応のハプテンを除いて後、0.8 μ m のメンブランフィルターで加圧濾過し、蛋白濃度を 10 mg/mL になるよう調整し、蛋白結合物とした (I・5-BGG)。同様の方法を用いて、卵白アルブミン (I・5-OVA) またはゼラチン (I・5-Gelatin) との結合物を調製した。



I・5

図 1

2) 酵素免疫アッセイ法 (ELISA)

1) で調製したダイオキシンハプテンの各タンパク結合物を 0.05 μ g、0.1 μ g、0.2

μ g および 0.4 μ g/mL の濃度に 0.05 mol/L 炭酸緩衝液 (pH 9.8) で希釈後、マイクロタイタープレートの各ウエルに 100 μ L ずつ加え、シールをして二日間放置した。各ウエルの液を捨て 0.01% Tween 20 を含有する 0.8% NaCl で 5 回洗浄後、0.2% BSA を含有する 3% Sucrose 200 μ L を加えて一夜放置してブロッキングし、4°C で保存した。

ダイオキシン標準品のメタノール溶液 10 μ L ずつを各ウエルにとり、これに抗ダイオキシンモノクローナル抗体 (#9-36) を 0.01% Triton X-100 および 0.1%ゼラチンを含有するホウ酸緩衝液で希釈した液 100 μ L を加えて一夜インキュベートした。この液を捨て 0.01% Tween 20 を含有する 0.8% NaCl で 5 回洗浄後、ヤギ抗マウス IgG 抗血清の HRP 標識体を 0.1%ゼラチンを含有するホウ酸緩衝液で 3000 倍希釈した液 100 μ L を加えて、室温で 60 分間インキュベートした。プレートの各ウエルを 5 回洗浄後、基質液 (0.2% OPD、0.1% H₂O₂ を含有する 0.1 mol/L クエン酸緩衝液 pH 5.4) 150 μ L ずつを加え、反応させた。30 分後、5 mol/L 硫酸で反応を止め 492 nm の吸光度を測定した。

B・5. 多塩素置換ダイオキシンハプテンのタンパク結合物の調製

1-Amino-3,6,7,8,9-pentachlorodibenzo[1,4]dioxin のスクサミド、グルタミドおよびアジパミド (図 2、R=OH、n=2,3,4) のそれぞれ 10 mg を DMF 50 μ L にとかし、*N*-ヒドロキシコハク酸イミド 15 mg と EDC 20 mg 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、Na₂SO₄ で脱水して溶媒を留去し、酢酸エチルから再結晶してそれぞれの活性エステル (NHS エステル) を得た。各 NHS エステル 10 mg を DMF 50 μ L に加温溶解し、これを、BSA 20 mg を 0.05 mol/L 炭酸緩衝液 (pH 10.0) 0.4 mL とジオキサ

ン 0.4 mL の混液にとかした溶液に滴下した。反応液を流水に対して一夜透析後、pH 10 で遠心して上層を分取した。これを pH 4.5 に調整し、析出するタンパクを遠心により採り、1 mol/L NaOH で pH 11.0 にして溶解した液を pH 7.4 に調整し BSA 結合物とした (図 2、R=NH·BSA、n=2,3,4)。BSA に結合したハプテンのモル数は UV 法により求めた。

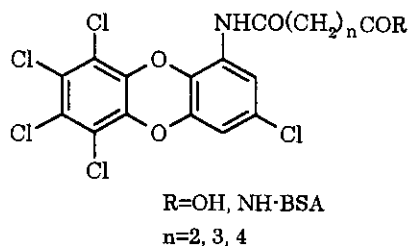


図 2

B・6. ダイオキシシンハプテンのビオチン結合物の調製

昨年度合成したハプテン (図 3、R=Cl、CH₃ または C(CH₃)₃、R'=OH) を、B・5 と同じ方法で NHS エステルに導いた。この NHS エステル 2 mg を DMF 50 μL に温めてとかし、ビオチナミドカプロイルヒドライド 7 mg を 0.1 mol/L NaHCO₃ とジオキサンの混液 (1:1) 100 μL に溶かした溶液に加えた。50°C、30 分間反応後、減圧下溶媒を留去し、さらにベンゼンとの共沸で溶媒量を減じた。残渣を少量のメタノールに溶かして分取用シリカゲル TLC に付し、クロロホルム/メタノール (9:1) で展開し、目的物に相当する部分を取りメタノールで溶出してダイオキシシンハプテンのビオチン誘導体を得た。

C. 研究結果および考察

C・1. 抗原固相法による ELISA の検討

より高感度な ELISA を確立するために、新規に作製したモノクローナル抗体 (# 9-36) を用い、菅原ら¹⁾の方法を参考にして抗原固相法を検討した。

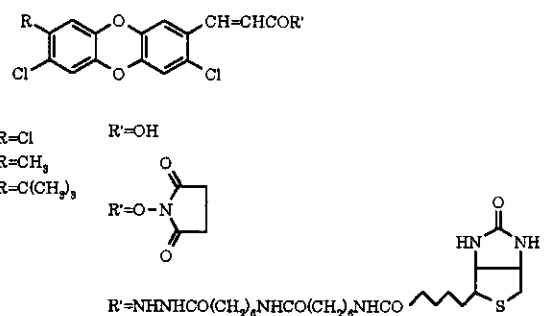


図 3

アッセイ系の基本的条件を種々検討した結果、各タンパクへのダイオキシシンハプテンの結合モル数が多い程、492 nm の吸光度は強いものの (図 4 a)、ダイオキシシンが結合していないタンパクのみでも非特異的な結合がみられ、BGG と OVA では非特異的な結合が比較的少なかった。また、タンパクによりプレートへの結合力に差がみられ、分子が大きい BGG は結合力が強く、ゼラチンは洗浄を重ねると吸光度の低下がみられた。一方、プレートの固相に用いるタンパク濃度は 400 ng/mL では吸光度は高いが、TMDD 1000 ng/mL の障害は約 20%であり、50 ng/mL では吸光度が低かった。タンパク濃度 100 ng/mL のとき吸光度が約 1 であり、標準曲線も比較的良好であった (図 4b)。

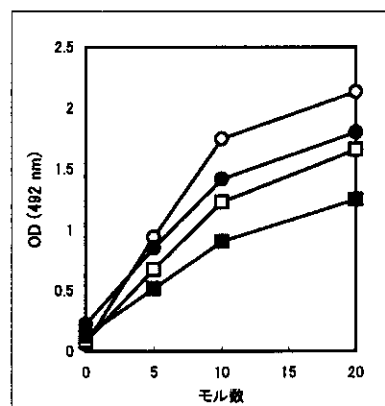


図 4a ハプテン/タンパク結合モル数と酵素活性

○— BGG □— OVA
●— BSA ■— Gelatin

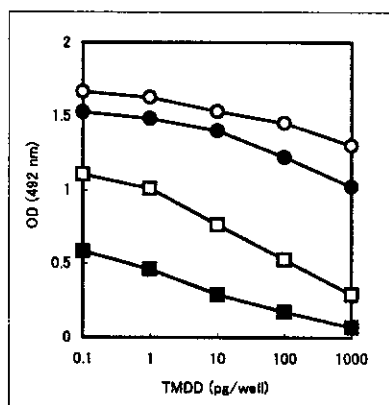


図 4b ダイオキシン-BGG の固相量と標準曲線

—○— 400 ng/mL —□— 100 ng/mL
 —●— 200 ng/mL —■— 50 ng/mL

C・2. 多塩素置換ダイオキシンハプテンのタンパク結合物の調製

佐藤らが合成したダイオキシン骨格に塩素を5つ導入したハプテン3種を用いて、活性エステル法により BSA との結合物を調製した。これらを抗原として用いて、今後、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体の調製を行う予定である。

C・3. ダイオキシンハプテンのビオチン結合物の調製

ELISA の検出系の高感度化の検討のために、昨年度合成したダイオキシン骨格の8位

にクロル、メチル、または *tert*ブチル基を、2位にプロペニル酸を有するハプテンを用いて、これらのビオチン結合物を調製した。アビジンとの結合の特性から、長鎖を有するビオチンを結合させた。これらは、前田らによる検出系の高感度化の検討に供した。

D. 結論

今回検討した抗原固相化による ELISA は、アッセイ系の条件設定などにやや難があり、また、昨年度確立した二抗体固相法による結果を超えるものではなかった。

また、多塩素置換ダイオキシンハプテンの BSA 結合物を調製した。これを抗原として、ヒトでの汚染のモニタリングにおいて重要と考えられる多塩素置換ダイオキシンに特異性の高い抗血清を得られる可能性がある。

E. 文献

- 1) Sugawara Y., Gee S.J., Sanborn J.R., Gilman, S.D. and Hammock B.D. : Development of a highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay based on polyclonal antibodies for the detection of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, Anal. Chem., 70, 1092-1099 (1998)

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酵素イムノアッセイ法の開発ー

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
研究協力者 奥山光伸 (財)食品薬品安全センター秦野研究所 研究員
遠藤和香子 (財)食品薬品安全センター秦野研究所 研究員

研究要旨

本研究においては、ダイオキシンの標準分析法を永続的に提供するためにモノクローナル抗体を用いる ELISA の構築および母乳中ダイオキシン類の ELISA のための前処理法を検討した。昨年度の研究においてウサギの抗ダイオキシン抗血清を得るのに有用であったハプテン抗原 4 種でマウスを免疫した。血清中抗体価が上昇し、かつ TMDD による阻害のみられたマウスの脾細胞とマウスミエローマ細胞とを融合させて、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、実試料の測定に適用可能な感度を有する ELISA を構築した。これらのモノクローナル抗体は TEF の大きなダイオキシン同族体に親和性が高いため、スクリーニングのみならずダイオキシン毒性のモニタリングにも使用できる可能性がある。また、常法により母乳から脂肪を抽出してアルカリおよび酸分解後、逆相系および順相系のカートリッジカラムを用いて ELISA 用試料の精製法を検討した。

研究目的

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は社会的関心事であり、特にダイオキシン類は極めて強い毒性を有することから、環境、食物やヒトの汚染実態の把握は行政上の急務な課題である。従来、そ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) が用いられているが、いずれの試料についても煩雑なクリーンアップ操作を要するため、その測定には長い時間と高い経費がかかっている。一方、特異抗体を用いるイムノアッセイは簡便、迅速に高感度で多数の検体を同時

に測定できるため、スクリーニングやモニタリングに適している。

昨年度の本研究において、ウサギの抗血清を用いたダイオキシンの酵素イムノアッセイ法を確立したことから、本年度は永続的な標準分析法が可能となるモノクローナル抗体を用いるダイオキシンの ELISA の構築を実施した。さらに、ELISA に供する母乳を想定し、牛乳またはバターを用いて ELISA のための前処理法を検討した。

B. 研究方法

1. 実験材料及び機器

1) 試薬

ウサギ抗マウス IgG+IgM 抗体
(第二抗体) : Jackson
ImmunoResearch Laboratories,
Inc.

ゼラチン : ナカライテスク

ウシ血清アルブミン (BSA)、Triton
X-100 及び σ フェニレンジアミン
塩酸塩 : Sigma Chemical

アセトン、ジクロロメタン、エタノール、メタノール、ジエチルエーテル、*n*-ヘキサン及びトルエン : 和光純薬 ダイオキシン類分析用

アセトニトリル及び石油エーテル :
和光純薬 残留農薬 PBC 試験用

その他の試薬 : 特級

2,3,7-trichloro-8-methyl-dibenzo-*p*-dioxin(TMDD), 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-*p*-dioxin(2,3,7,8-TCDD), 1,2,3,7,8-pentachloro-dibenzo-*p*-dioxin(1,2,3,7,8-PeCDD), 1,2,3,4,7,8-hexachloro-dibenzo-*p*-dioxin(1,2,3,4,7,8-HxCDD), 1,2,3,6,7,8-hexachloro-dibenzo-*p*-dioxin(123678HxCDD), 1,2,3,7,8,9-hexachloro-dibenzo-*p*-dioxin(1,2,3,7,8,9-HxCDD), 1,2,3,4,6,7,8-heptachloro-dibenzo-*p*-dioxin(1,2,3,4,6,7,8-HpCDD), 1,2,3,4,6,7,8,9-octachloro-dibenzo-*p*-dioxin(1,2,3,4,6,7,8,9-OCDD), 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzofuran(2,3,7,8-TCDF), 1,2,3,7,8-pentachloro-dibenzofuran(1,2,3,7,8-PeCDF), 2,3,4,7,8-pentachloro-dibenzofuran(2,3,4,7,8-PeCDF), 1,2,3,4,7,8-hexachloro-dibenzofuran(1,2,3,4,7,8-HeCDF), 1,2,3,6,7,8-hexachloro-

dibenzofuran(1,2,3,6,7,8-HxCDF), 1,2,3,7,8,9-heptachloro-dibenzofuran(1,2,3,7,8,9-HxCDF), 2,3,4,6,7,8-hexachloro-dibenzofuran(2,3,4,6,7,8-HxCDF), 1,2,3,4,6,7,8-heptachloro-dibenzofuran(1,2,3,4,6,7,8-HpCDF), 1,2,3,4,7,8,9-heptachloro-dibenzofuran(1,2,3,4,7,8,9-HpCDF)及び 1,2,3,4,6,7,8,9-octachloro-dibenzofuran(1,2,3,4,6,7,8,9-OCDD) : Wellington Laboratories
2,3,7,8-tetrabromo-dibenzo-*p*-dioxin(2,3,7,8-TBDD) : Radian CIL, Inc.

1,2,3,4-tetrachloro-dibenzo-*p*-dioxin(1,2,3,4-TCDD) : Accu Standard Inc.

3,3',4,4',5-pentachloro-biphenyl (3,3',4,4',5-PeCB) : Cambridge Isotope Laboratories, Inc.

2) 器材

ELISA 用マイクロタイタープレート : Corning Inc. Costar 3590

マウスモノクローナル抗体アイソタイプングキット : Amersham Pharmacia Biotech

3層硫酸シリカゲルカラム及び

Carboxen 1000 : Supelco

Sep-pak plus : Waters Co.

Bond elut : Varian Inc.

3) 機器

マイクロプレートリーダー (BL 312e) : BioTek Instrument Inc.

4. 酵素免疫アッセイ法 (ELISA)

0.9% NaCl 添加 50 mmol/L リン酸緩

衝液 pH 7.3 (PBS) で希釈した第二抗体 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 100 μL を ELISA 用マルチプレートの各 well に加え、4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩放置した。抗体溶液を捨て、0.5% BSA の PBS 溶液 150 μL を加えて室温で 2~3 時間放置した。この液を捨て、ペルオキシダーゼ (HRP) 標識ハプテンの 0.1%ゼラチン PBS 溶液 50 μL とダイオキシン標準品または試料とモノクローナル抗体の混合液 (0~0.1%トリトン X-100 含有) 50 μL を各 well に加えて 4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩放置した。PBS で well を 3 回洗浄後、0.05% σ フェニレンジアミン及び 0.01% H_2O_2 を含む 50 mmol/L クエン酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 100 μL を各 well に加えて室温で 30~60 分間反応後、3 mol/L 硫酸 50 μL を加えて反応を止め、波長 490 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。

5. 抗ダイオキシン抗体産生ハイブリドーマのスクリーニング

昨年度の研究報告「ダイオキシン類に対する高親和力特異モノクローナル抗体の調製」に準じて細胞融合を実施した。細胞融合後、7~11 日後に培養上清の一部 (25 μL) を採取し、0.1% BSA を含む PBS (75 μL) と混合して、第二抗体固定化 ELISA プレートに添加した。室温で 1 時間放置したのち、溶液を吸引除去して、well を PBS で 3 回洗浄した。HRP 標識ハプテン (0.02~0.1 $\mu\text{g}/100\mu\text{L}$) を加えて同条件で放置したのち、4. の操作に従って基質溶液 100 μL を各 well に加えて HRP 活性を測定した。

抗体産生のみられたハイブリドーマについて 1~100 pg/well の TMDD、2,3,7,8-TCDD、または 1,2,3,7,8-PeCDD を加えた後、4. の操作に従って ELISA を

行い、阻害効果の大きい抗体を産生しているハイブリドーマを選択した。

6. ハイブリドーマのクローニング

5. のスクリーニングにより選択した各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った。

ハイブリドーマを 10%ハイブリドーマクローニングファクター (HCF) を含む HT 培地で 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈し、96 well の培養プレートの各 well に 0.2 mL ずつ分注して 10 日間培養した。ハイブリドーマの増殖がみられる well について、顕微鏡下で単一クローンであることを確認した後、抗体産生ハイブリドーマを 48 well の培養プレートに移植して順次増殖させ、単一クローンのハイブリドーマを得た。

7. モノクローナル抗体のアイソタイピング

マウスモノクローナル抗体アイソタイピングキットのプロトコールに従って操作した。タイピングスティックを PBS で 5 倍希釈した各ハイブリドーマの培養上清に浸して室温で 15 分間反応させた。スティックを洗浄し、HRP 標識抗マウス抗体と 15 分間反応させた後、酵素反応を行ってスティックの発色部位を観察した。

8. 前処理法の検討

牛乳 50 mL またはバター 2 g から図 1 の操作に従って得られたヘキサン抽出画分をさらに表 1 に示す種々の条件下で固相カラムを用いて精製した。得られたダイオキシン溶出画分に 0.1%トリトン X-100 のメタノール溶液 25~50 μL を加えて窒素ガスまたはロータリーエバポレーターで乾固したのち、残渣に抗体溶液 (D9-36、20 ng/mL) 120 mL を加えて ELISA 用試料と

し、この 50 μ L を I-5-HRP (20 ng/50 μ L/well) の入った well に添加して測定した。

C. 研究結果

抗ダイオキシンモノクローナル抗体の作製

表 2 に示したハプテンの BSA 結合物で免疫したマウスのうち、血清の抗体価が上昇し、かつ TMDD の添加により阻害のみられた 5 匹のマウス脾細胞を用いてマウスミエローマ NS-1 と細胞融合させた。ダイオキシン類による阻害効果の大きい抗体を産生しているハイブリドーマをスクリーニングした後、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、そのうち 3 種の細胞の産生するモノクローナル抗体について特性を詳細に調べた。

その結果、IgG のクラスは G1 および G2a であったが、L 鎖はすべて κ であった (表 3)。2,3,7,8-TCDD に対する親和性は D2-37 が最も高く、次いで D9-36、D35-42 の順であった。定量域は D2-37 と D9-36 では 1~1000 pg/well、D35-42 では 10~2500 pg/well であった (図 2)。

D2-37 の交差反応性は 2,3,7,8-TCDD に特異性が高く、次いで、2,3,4,7,8-PeCDF、1,2,3,7,8-PeCDF、1,2,3,7,8-PeCDD 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 に親和性が高かった。また、D35-42 は 2,3,7,8-TCDD と 1,2,3,7,8-PeCDD にのみ反応した (表 4、図 3)。

トリトン X-100 濃度の影響

TMDD を標準物質として用い、トリトン X-100 の最終濃度を 0~0.05% に変化させて ELISA による標準曲線を作成したところ、トリトン濃度 0.01~0.02 で最良の感度

が得られた (図 4)。

ミルク中ダイオキシンの前処理

牛乳 50 mL またはバター 2 g を用い、図 1 に示す前処理操作により得られたダイオキシン画分について ELISA を行い妨害物質の有無について検討した結果、硫酸シリカゲルカラム処理ではヘキサンでの溶出物が、活性炭カラム (carboxen 1000) 処理ではトルエンに含まれる不揮発性成分が抗原・抗体反応を阻害した。シリカゲルカラム処理ではダイオキシン類と油状成分が十分分離せず、試料中のダイオキシンは HRP 標識ハプテンとの競合反応に寄与できなかった。逆相系カラム (C18) では油状成分は除去できるものの、何らかの成分により抗原・抗体反応の妨害がみられた。さらに、中性 (N) および塩基性 (B) のアルミナカラムを用いた時、両者の分離状態には特に違いは認められず、ともにダイオキシン類が油状成分や抗原・抗体反応を妨害する成分と分離する結果が得られたが、その再現性が得られず、引き続き検討中である (表 5)。

D. 考察・結論

2,3,7,8-TCDD の測定範囲 1~1000 pg/well と良好な親和性を有し、かつ TEF の大きな同族体に特異的なマウスモノクローナル抗体を得た。また、非イオン性界面活性剤であるトリトン X-100 はダイオキシンの ELISA の感度に影響を及ぼした。トリトン X-100 がダイオキシンを取り込んで可溶化し、さらにダイオキシンが水系へ解離することが示され、界面活性剤は実試料の測定においては重要な役割を果たすことが示唆された。

モノクローナル抗体は均質なものを永続的に供給することができるため、ダイオキシンの ELISA の標準分析法を構築するこ

とが可能となる。簡便で再現性のある前処理法を確立すれば、生体試料に限らず、食品や環境試料などあらゆる試料中のダイオキシンの毒性を評価するモニタリング法として本 ELISA を適用できる可能性が示された。

今後は母体中ダイオキシン測定のための前処理法を検討してバリデーションを実施し、再現性および汎用性のある前処理法および ELISA を確立する。

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) T. Anjo, M.Okuyama, M. Satoh,

A. Kambegawa, Y. Matsuki,
20th International Symposium
on Halogenated Environmental
Organic Pollutants and POPs,
August, 13-17, 2000,
Monterey, California, USA

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

1) ダイオキシンに対するモノクローナル抗体 (特願 2000-315948 号)
出願

2. 実用新案登録

なし