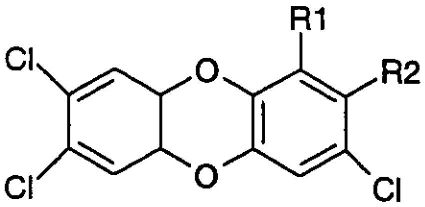
表1 ミルク中ダイオキシンの固層抽出による精製法

	カラム (担体量,g)	コンディショニング (mL)	添着	洗浄 (mL)	溶出
	Supelco				
1	3層硫酸シリカ	H(20)	H		H(10)
2	Carboxen 1000	T(20),H(20)	H	H(20)	T(20)
	Sep-pak plus				
3	alumina N (2)	D(10),H(20)	H(0.2)	H/D=98:2(5)	H/D=1:1(5)
	Bond elut				
4	silica (0.1)	A(1),H(3)	H(1)		H(5)
5	silica (0.1)	A(1),H(3)	H/E=95:5(1)		H(5)
6	silica (0.1)	A(1),H(3)	H/E=9:1(1)		H(5)
7	C18 (0.2)	M(3)	M/W=8:2(1)	M/W=8:2(3)	M/W=95:5(5)
8	C18 (0.2)	M(3)	M/W=6:4(1)	M/W=6:4(3)	M/W=95:5(5)
9	C18 (0.1)	M(2)	M/W=7:3(1)	M/W=7:3(2)	M(3)
10	C18 (0.1)	M(2)	N/W=7:3(1)	N/W=8:2(2)	N/W=95:5(3)
11	alumina N (0.5)	A(3),H(6)	H(0.2)	H/D=99:1(5)	H/D=1:1(5)
12	alumina N (0.5)	A(3),H(6)	H(0.2)	H/D=995:5(1)	H/D=98:2(5)
13	alumina B (0.5)	A(3),H(6)	H(0.2)	H/D=995:5(1)	H/D=98:2(5)

A:acetone, D:dichloromethane, E:ethanol, H:n-hexane, M:methanol, N:acetonitrile, T:toluene, W:water

表 2　ダイオキシンのハプテン誘導体



ハプテン誘導体	R1	R2
I −2	$NHCO(CH_2)_3COOH$	H
I −3	$NHCO(CH_2)_4COOH$	H
I −5	CH=CHCOOH	Cl
II −2	H	$O(CH_2)_3COOH$

表3 抗ダイオキシンモノクローナル抗体のアイソタイプ

モノクローナル抗体	マウス系統	免疫原	アイソタイプ	
			クラス	L 鎖
D2-37	BALB/c	I-2-BSA	IgG2a	κ
D9-36	BALB/c	I-3-BSA	IgG1	κ
D35-42	A/J	I-5-BSA	IgG2a	κ

表4 抗ダイオキシンモノクローナル抗体の交差反応性

		交差率		
ダイオキシン類	TEF	D2-37	D9-36	D35-42
2,3,7,8-TCDD	1.0	1.00	1.00	1.00
1,2,3,7,8-PeCDD	1.0	0.19	0.48	0.96
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.1	0.10	0.06	0.00
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.1	0.07	0.02	0.00
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.1	0.14	0.07	0.01
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.01	0.08	0.04	0.00
1,2,3,4,6,7,8,9-OCDD	0.0001	0.028	0.002	0.000
2,3,7,8-TCDF	0.1	0.26	0.23	0.00
1,2,3,7,8-PeCDF	0.05	0.08	0.06	0.00
2,3,4,7,8-PeCDF	0.5	0.29	0.45	0.00
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.1	0.06	0.03	0.00
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.1	0.13	0.05	0.00
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.1	0.05	0.01	0.00
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.1	0.07	0.04	0.00
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.01	0.04	0.00	0.00
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.01	0.03	0.01	0.00
1,2,3,4,6,7,8,9-OCDF	0.0001	0.023	0.008	0.000
2,3,7,8-TBrDD	(1.0)	0.27	0.09	0.13
1,2,3,4-TCDD	(0)	0.001>	0.001>	0.001>
3,3',4,4',5-PeCB	0.1	0.001>	0.001>	0.001>

表5 精製ダイオキシン画分の ELISA への影響

	カラム（担体量,g）	添加 TMDD（pg）	回収率**（%）	ELISA の妨害	
	Supelco				
*1	3 層硫酸シリカ		−	+++	カラム溶出物
2	Carboxen 1000		−	+++	トルエン
	Sep-pak plus				
3	alumina N（2）	100	50	+	
	Bond elut				
4	silica（0.1）	100	50	+++	油状成分
5	silica（0.1）	100	60	+++	油状成分
6	silica（0.1）	100	90	+++	油状成分
7	C18 (0.2)	100	40	++	
8	C18 (0.2)	100	50	++	
9	C18 (0.1)	100	80	+++	油状成分
10	C18 (0.1)	100	60	++	
11	alumina N（0.5）	100	40	+	
12	alumina N（0.5）	50	35	+	
13	alumina B（0.5）	100	25	+	

*：番号は表 1 に対応する。

**：TMDD だけを処理したときの値。

牛乳

	50	**mL**	
シュウ酸ナトリウム	0.5	g	溶解
エタノール	50	mL	混合
ジエチルエーテル	25	mL	
石油エーテル	25	mL	振盪10分
水層をジエチルエーテル/石油エーテル(1:1)	50	mL	で更に 2 回抽出

↓

エーテル層

	150	**mL**	
2% NaCl水溶液	150	mL	1 回洗浄
水	150	mL	3 回洗浄

硫酸ナトリウムで脱水、エバポレーターで乾固

↓

脂肪(バター)

	1-2	**g**	
エタノール	45	mL	懸濁
10 mol/L KOH	5	mL	鹸化

室温で 2 時間撹拌 (室温で一晩放置)

水	50	mL	
ヘキサン	50	mL	3 回抽出

↓ **濃縮**

ヘキサン層

	20	**mL**	
水	20	mL	1 回洗浄
濃硫酸	1	mL	3 回洗浄
水	20	mL	1 回洗浄
5% $NaHCO_3$水溶液	20	mL	1 回洗浄
水	20	mL	2 回洗浄

↓

(精製)

図1 ミルク中ダイオキシンの抽出・濃縮法

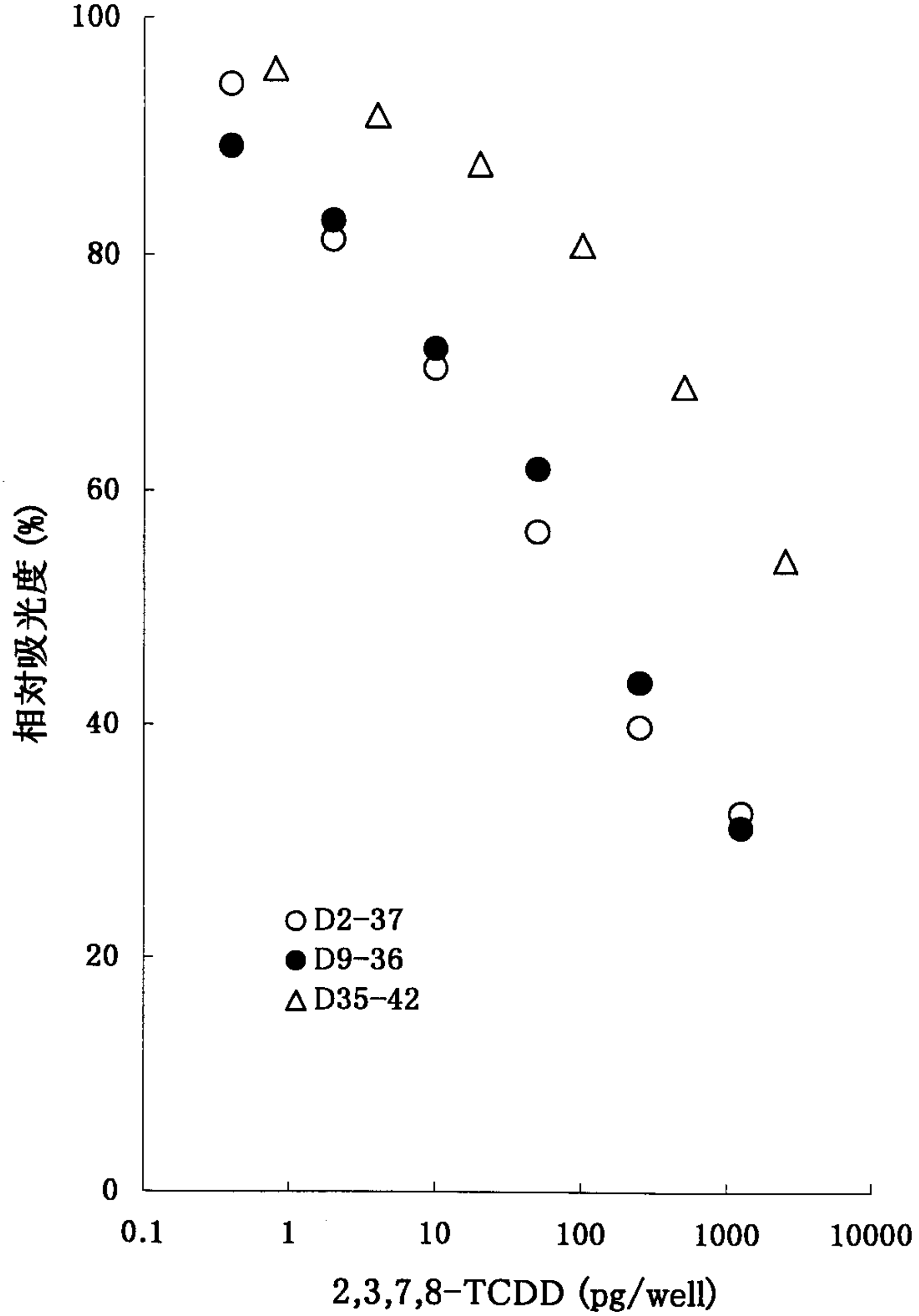


図2 2,3,7,8-TCDD の標準曲線

I-5-HRP : 200 ng/mL

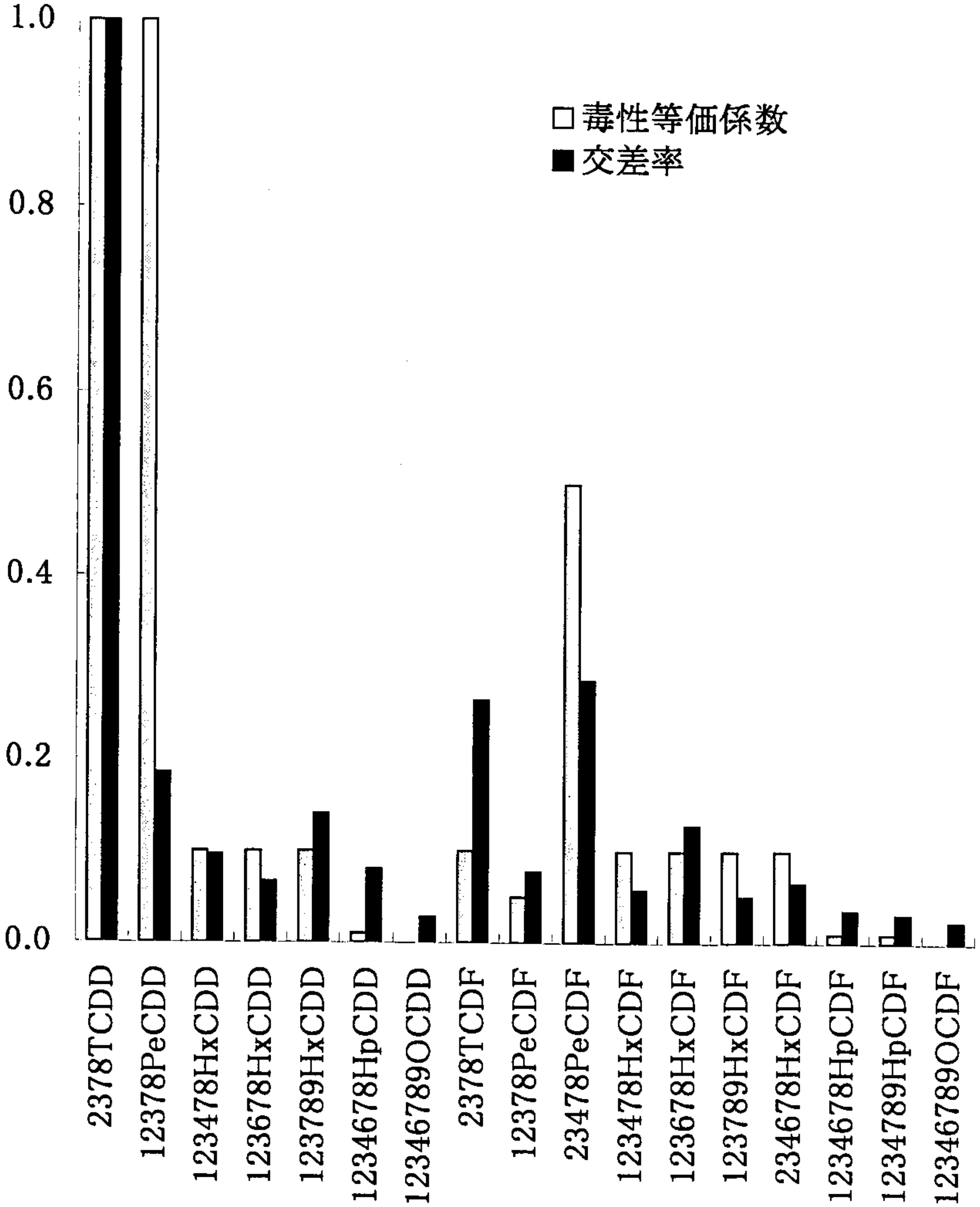


図3(A) D2-37 の交差率と毒性等価係数

D-2-37 : 50 ng/mL , I-5-HRP : 200 ng/mL

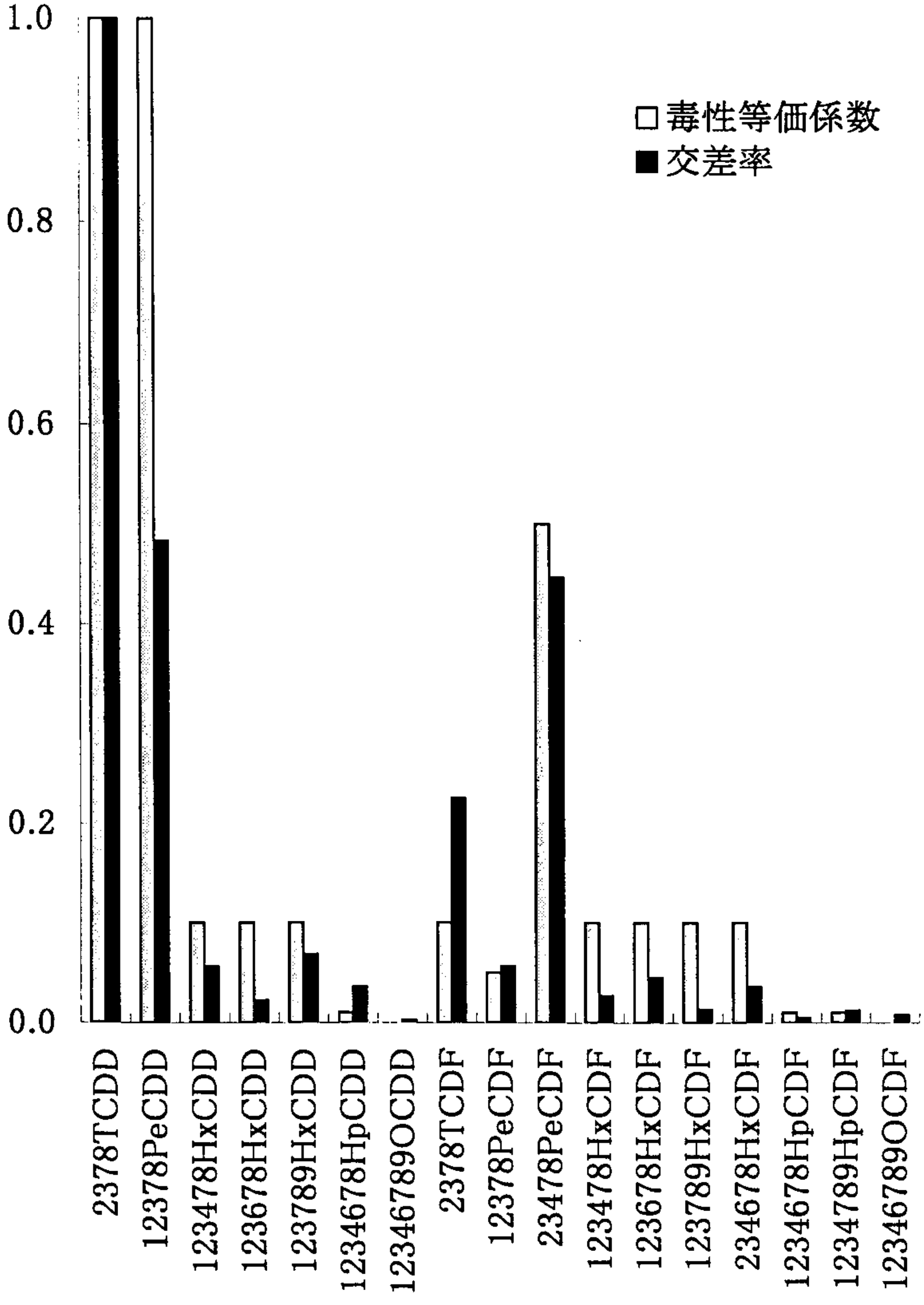


図3(B) D9-36 の交差率と毒性等価係数

D-9-36 : 10 ng/mL , I-5-HRP : 200 ng/mL

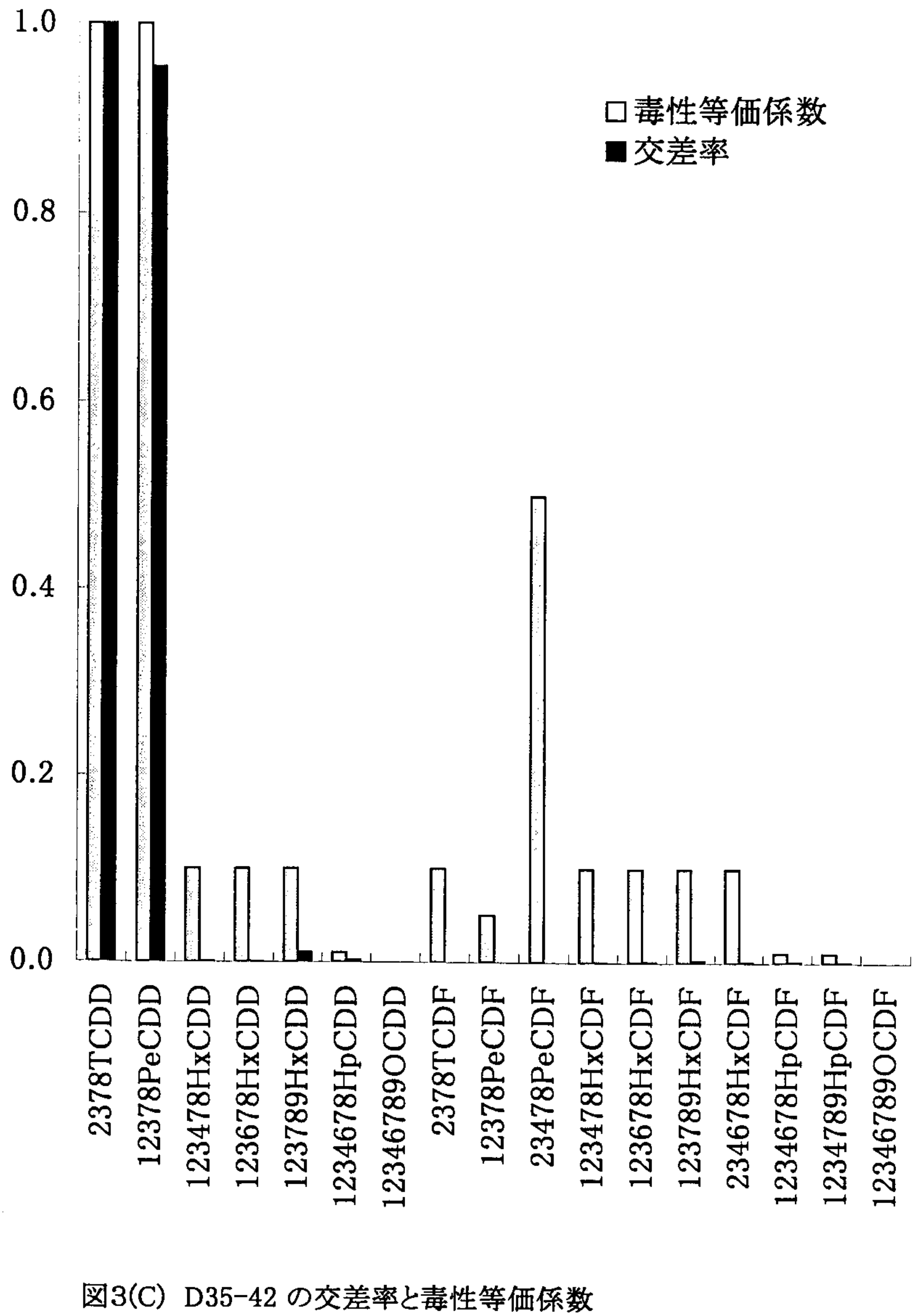


図3(C) D35-42 の交差率と毒性等価係数

D-35-42 : 100 ng/mL , I-5-HRP : 200 ng/mL

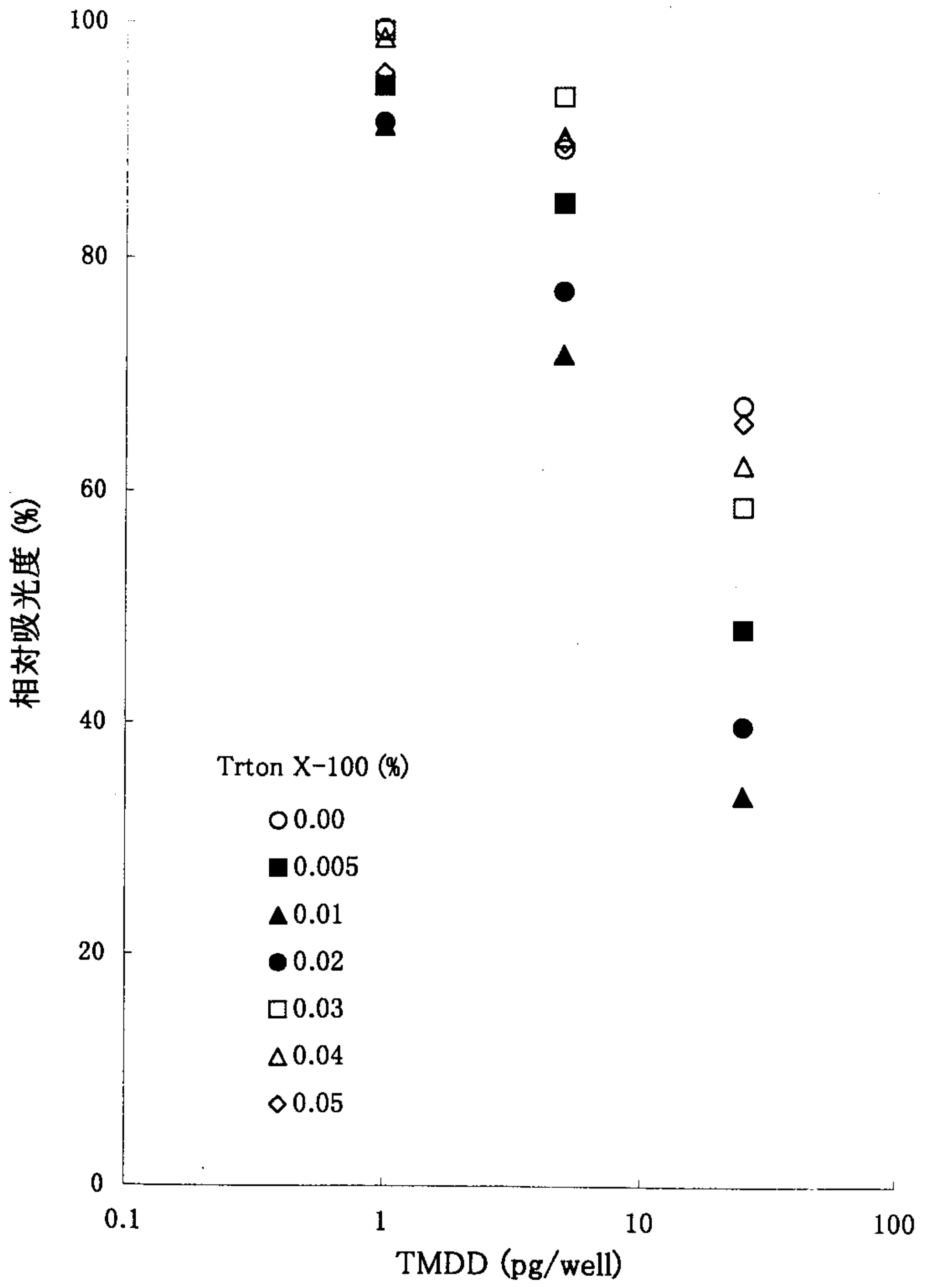


図4 測定感度に及ぼす Triton X-100 の影響

D9-36 : 10 ng/mL , I-5-HRP : 200 ng/mL

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）
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
―イムノアッセイの検出系高感度化の検討―

主任研究者　松木容彦　食品薬品安全センター秦野研究所　副所長
研究協力者　前田昌子　昭和大学薬学部　教授

研究要旨
生体試料中のダイオキシンの定量のため，イムノアッセイの検出系に高感度な生物発光検出法を検討した．その際，標識抗原には耐有機溶媒性でユニバーサルに使用できるビオチン標識化ダイオキシンを用い検討を行った．生物発光検出によるダイオキシンのELISAは0.02～62.5 ng/mL（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で行ったものより低濃度域での検出の安定性が見られた．

A. 研究目的

生体試料中のダイオキシンの定量のためのイムノアッセイを高感度化するため生物発光検出法の応用を行った．昨年度開発したピルベートフォスフェートジキナーゼ（PPDK）の生物発光測定法は10^{-20}モルレベルの検出が可能であり，生物発光検出法の特徴である幅広い濃度領域での直線性を有している．本検出法をヒト血清中のα-フェトプロテイン，インスリンのイムノアッセイ系に応用を行ったところ，いずれも電気化学イムノアッセイ，蛍光酵素イムノアッセイに比較して30倍程度の高感度化が出来た．また得られた値は日常分析法と良い相関が得られている．

今年度は開発したPPDKを検出酵素とする生物発光検出法をダイオキシンのELISAに応用し高感度化の検討を行った．また，応用を検討する際、耐有機溶媒性に優れ，ユニバーサルに使用可能と考えられるビオチン標識化ダイオキシンを標識抗原として使用し，比色法及び生物発光検出法の比較を行った．

B. 研究方法

1）試薬

ダイオキシン誘導体（図1）は
標準抗原；8-methyl-2, 3, 7-TCDD（関東化学）
標識抗原；biotinylated 7, 8, DCDD（II-6），biotinylated 8-methyl-7-CDD（II-7），biotinylated 8-*tert*-butyl-7-CDD（II-8）（神戸川研究所）を用いた．

2）免疫反応

ヤギ抗家兎IgG抗体固相化プレート

の各ウェルに標準抗原メタノール溶液（0〜62.5 ng/mL）50μL，ビオチン標識化ダイオキシン溶液 50μL 及び家兎抗ダイオキシン抗血清（no. 5）希釈液（1: 50000）を加え 4°C で一夜放置した．その後，0.05% Tween20，0.9% NaClを含む 0.05 M トリス-塩酸緩衝液で洗浄し測定に供した．

3）比色法

免疫反応を終えたプレートの各ウェル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（SA-HRP）（Vector 社製）希釈液 100μL を加え室温で 1 時間放置した．洗浄後，HRP の基質であるテトラメチルベンチジン（TMB）溶液（DAKO 社製）を加え室温で 15 分間酵素反応を行った．その後，2mol/L 硫酸 100μL を加えルことで酵素反応を停止させ，450nm の吸光度を測定した．（Wallac 1420 ARVOsx, Wallac Berthold 社製）

4）生物発光検出法

免疫反応を終えたプレートの各ウェルにストレプトアビジン-ピルベートフォスフェートジキナーゼ複合体（SA-PPDK）希釈液 100μL を加え室温で 1 時間放置した．洗浄後，生物発光試液（5 μmol/L AMP, 304 μmol/L pyrophosphate (PPi), 560 μmol/L phosphoenolpyruvate (PEP), 15 mM $MgSO_4$, 1 mM dithiothreitol, 7.5 mM ammonium sulfate, 1 mM EDTA, 10% Block Ace, 0.35 mM D-luciferin and 1 mg/mL luciferase を含む 50 mM HEPES-KOH 緩衝液, pH7.0）を加え室温で 15 分間放置後，生じた発光を 5 秒間積算した．（Wallac 1420 ARVOsx, Wallac Berthold 社製）

C. 結果及び考察

1）比色法

三種のビオチン標識体を検討したところ，II-6，II-7 は同等の強い免疫活性が見られたが，II-8 に関しては活性が弱く測定には適さなかった．ビオチン標識体 II-6，II-7 の希釈曲線を図 2 に示す．抗血清の希釈 1: 50000 でいずれの標識体を 15.6ng/mL の濃度で用いたとき．得られる吸光度が 1.0 程度で標準抗原 62.5ng/mL 存在下の B/B0 値が 11.3%（II-6），6.79%（II-7）が得られたため至適条件と定めた．至適条件下における比色法での標準曲線を図 3 に示す．2 つのビオチン標識体とも標準曲線は 0.02〜62.5 ng/mL（1〜3125 pg/assay）で良好な曲線が得られ，また同時再現性も 7%以下であった．

2）サンプル量による影響

確立した至適条件において，サンプル量を 10μL，25μL，50μL，100μL に変化させ測定を行った．図 4 に示されるように 10 から 50μL のサンプル量においてサンプル量が増すことにより ng/mL あたりの感度は上昇が見られた．また，10 から 50μL のサンプル量において標準抗原量が 0ng/mL 時の得られる吸光度（B0）は変化がみられなかった．しかしながら，100μL のサンプル量において得られた B0 の吸光度は極端に減少し，アッセイのバラツキも多く見られ満足な検量線は得られなかった．従って 50μL のサンプル量を至適

条件と定めた．尚，昨年度の報告書で奥山らが行っている方法の至適サンプル量は 10μL であることより，本法はビオチン標識化ダイオキシンを標識抗原として使用することでアッセイの有機溶媒性が上昇していると考えられた．

3）生物発光検出法

さらに高感度な検出法である PPDK を検出酵素とする生物発光法の応用を行った．免疫反応を終えた各プレートに調製した SA-PPDK を加えた後洗浄を行った．生物発光試薬加え 15 分間 37℃ で放置後，生じた発光を 5 秒間積算することで検出を行った．

抗血清及び標識抗原（II-6, 7）の希釈曲線を図 5 に示す．B0 の発光強度が 25000 程度で感度（B62.5ng/B0 値）が良好な抗血清 50000 倍希釈，標識抗原 15.6ng/mL で用いる条件を至適と定め以下の実験で使用した．尚，II-8 のビオチン標識化抗原は弱い免疫活性が見られたが使用に耐えうるものではなかった．標識抗原 II-6 及び II-7 の免疫活性は II-6 の方が II-7 に比較して若干高く，II-8 の結果を併せて考えると，今回用いた抗血清 no.5（免疫原：I-2-BSA 結合体）は 8 位の塩素を良く認識しているものと考えられた．

至適条件下における生物発光検出 ELISA の検量線を図 6 に示す．標識抗原 II-6, 7 共に 0.02～62.5 ng/mL（1～3125 pg/assay）で良好な検量域が得られた．この値は比色法と同等なものであった．さらに比色法，生物発光検出法で得られた検量線の S/N での比較を図 7 に示す．使用した標識抗原 II-6, 7 共に，生物発光検出法は比色法に比較して S/N 比の差の大きな検量線が得られた．このことは特にダイオキシン低濃度領域での測定の安定性が高いと考えられる．

D. 研究発表

1. 論文発表

1) K. ITO, K. NISHIMURA, S. MURAKAMI, H. ARAKAWA and M. MAEDA: Novel Bioluminescent Assay of Pyruvate Phosphate Dikinase using Firefly Luciferase-Luciferin Reaction and Its Application to Bioluminescent Enzyme Immunoassay, *Anal. Chim. Acta*, **421**, 113-120 (2000)

2) K. ITO, K. NISHIMURA, S. MURAKAMI, H. ARAKAWA and M. MAEDA: Development of Bioluminescent Assay for Pyruvate Phosphate Dikinase and Its Application to Bioluminescent Enzyme Immunoassay, *BIOLUMINESCENCE and CHEMILUMINESCENCE 2000*, in press

2. 学会発表

1) 西　佳子，伊藤克敏，荒川秀俊，前田昌子，神戸川明，奥山光伸，松木容彦：ビオチ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

E. 知的所有権の取得情報

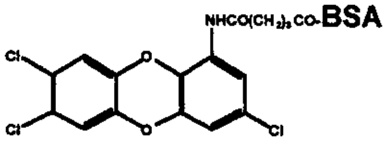
1. 特許取得

なし

2 実用新案登録

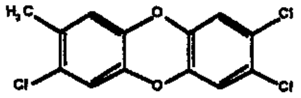
なし

免疫原



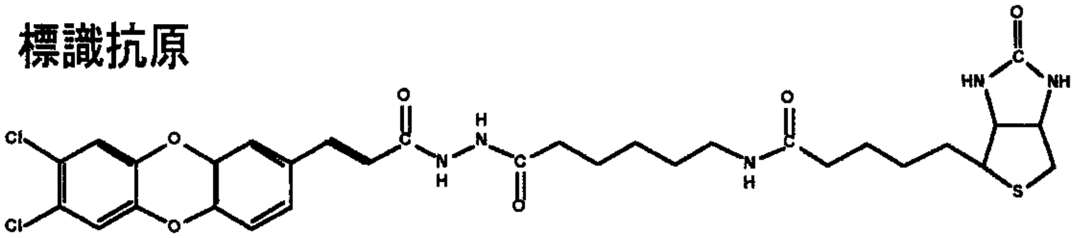
I-2-BSA conjugate

標準抗原

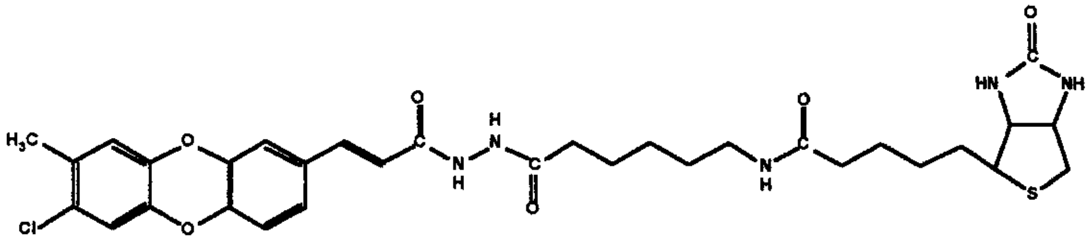


8-methyl-2, 3, 7-TCDD

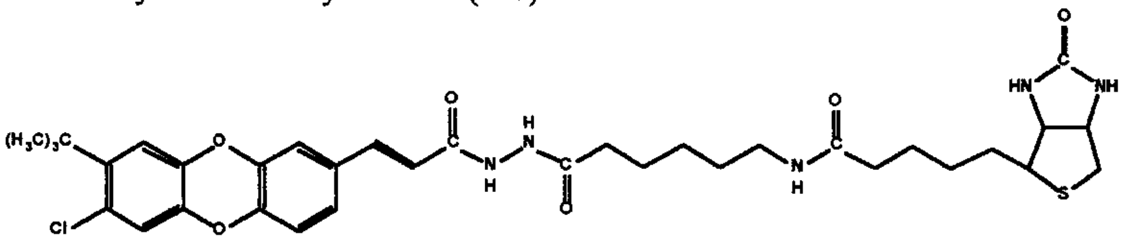
標識抗原



biotinylated 7,8-DCDD (II-6)

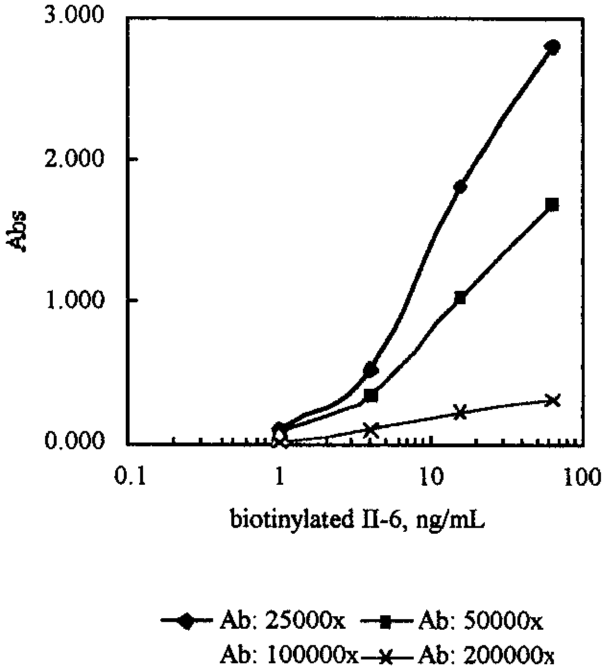


biotinylated 8-methyl-7-CDD (II-7)

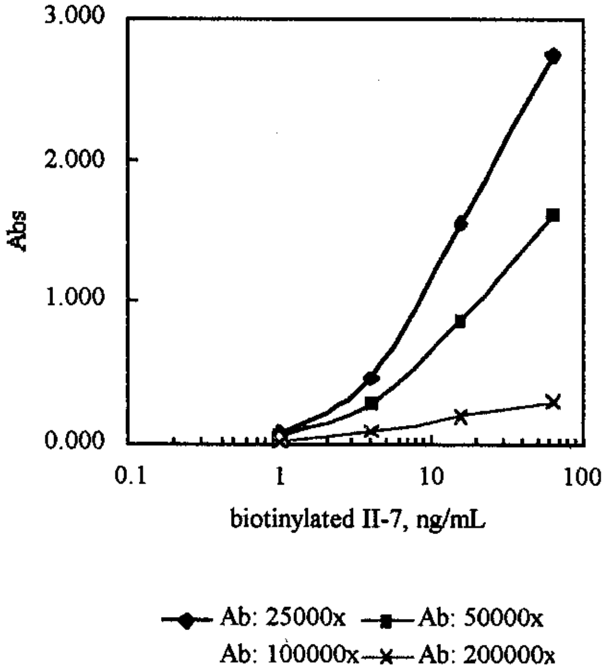


biotinylated 8- *tert*-butyl-7-CDD (II-8)

図1　使用したダイオキシン誘導体



Sensitivity, B62.5ng/B0ng, %				
conj (ng/mL)	62.5	15.6	3.91	0.977
Ab: 25000x	41.7	12.2	12.4	-
Ab: 50000x	19.9	11.3	8.32	-
Ab: 100000x	21	7.91	5.34	-
Ab: 200000x	22.2	8.31	6.64	-



Sensitivity, B62.5ng/B0ng, %				
conj (ng/mL)	62.5	15.6	3.91	0.977
Ab: 25000x	20.2	8.84	6.99	-
Ab: 50000x	16.8	6.79	5.23	-
Ab: 100000x	15.3	7.13	3.13	-
Ab: 200000x	30.4	15.1	12.4	-

図２　比色法における抗血清及びビオチン標識ダイオキシンの希釈曲線

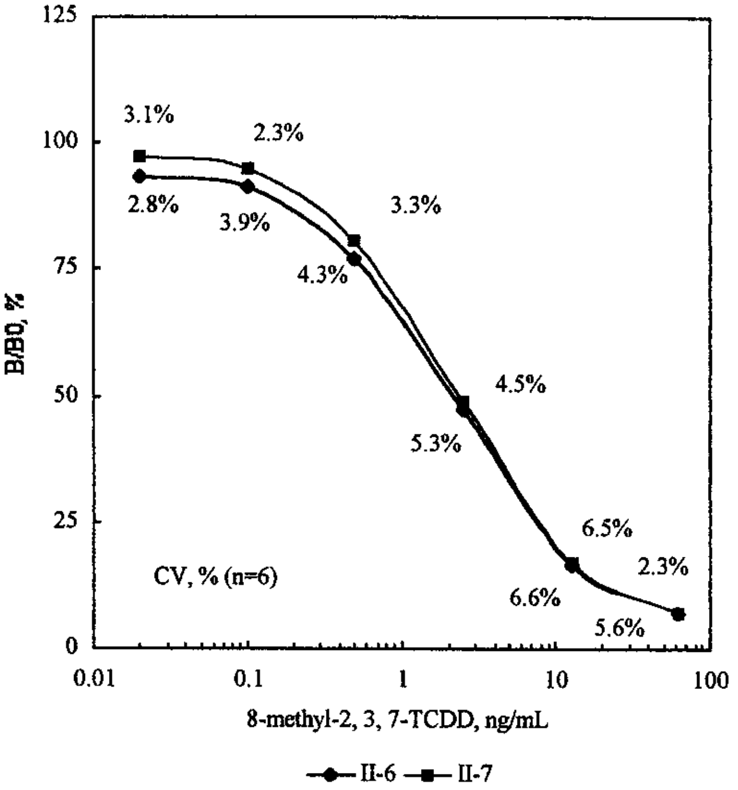


図３　比色法によるダイオキシン検量線

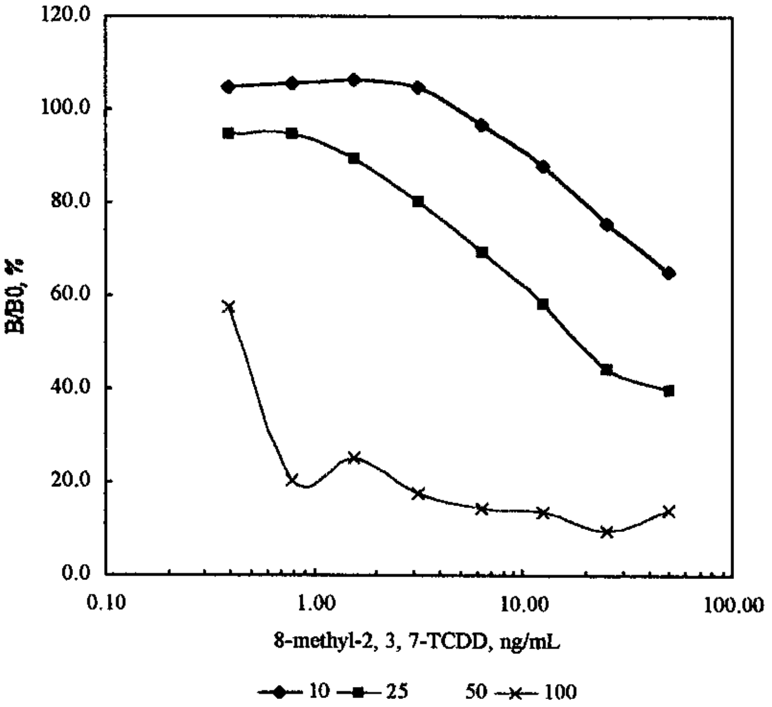
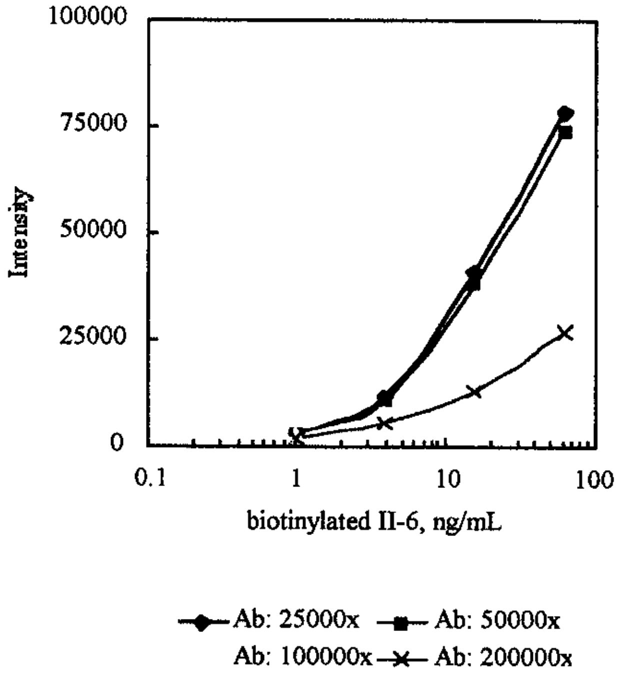
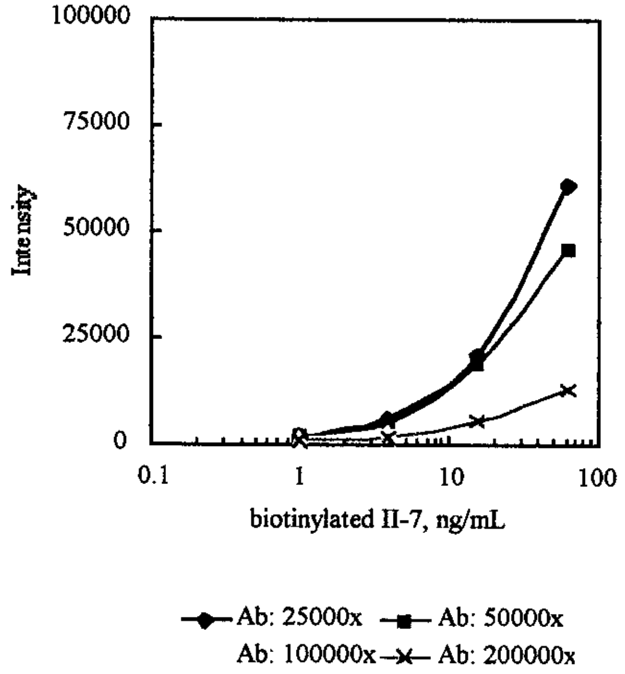


図４　サンプル量の影響



Sensitivity, B62.5ng/B0ng, %

conj (ng/mL)	62.5	15.6	3.91	0.98
Ab: 25000x	25.6	12.9	9.7	10.4
Ab: 50000x	21.9	10.1	9.2	5.8
Ab: 100000x	17.4	9.5	7.3	0.6
Ab: 200000x	19.7	10.1	14.6	0.1



Sensitivity, B62.5ng/B0ng, %

conj (ng/mL)	62.5	15.6	3.91	0.98
Ab: 25000x	13.1	11.6	9.4	9.3
Ab: 50000x	13.6	7.8	10.3	1.4
Ab: 100000x	12.3	8.5	6.8	-
Ab: 200000x	14.4	8.2	12.8	1.6

図５　生物発光検出法における抗血清及びビオチン標識ダイオキシンの希釈曲線

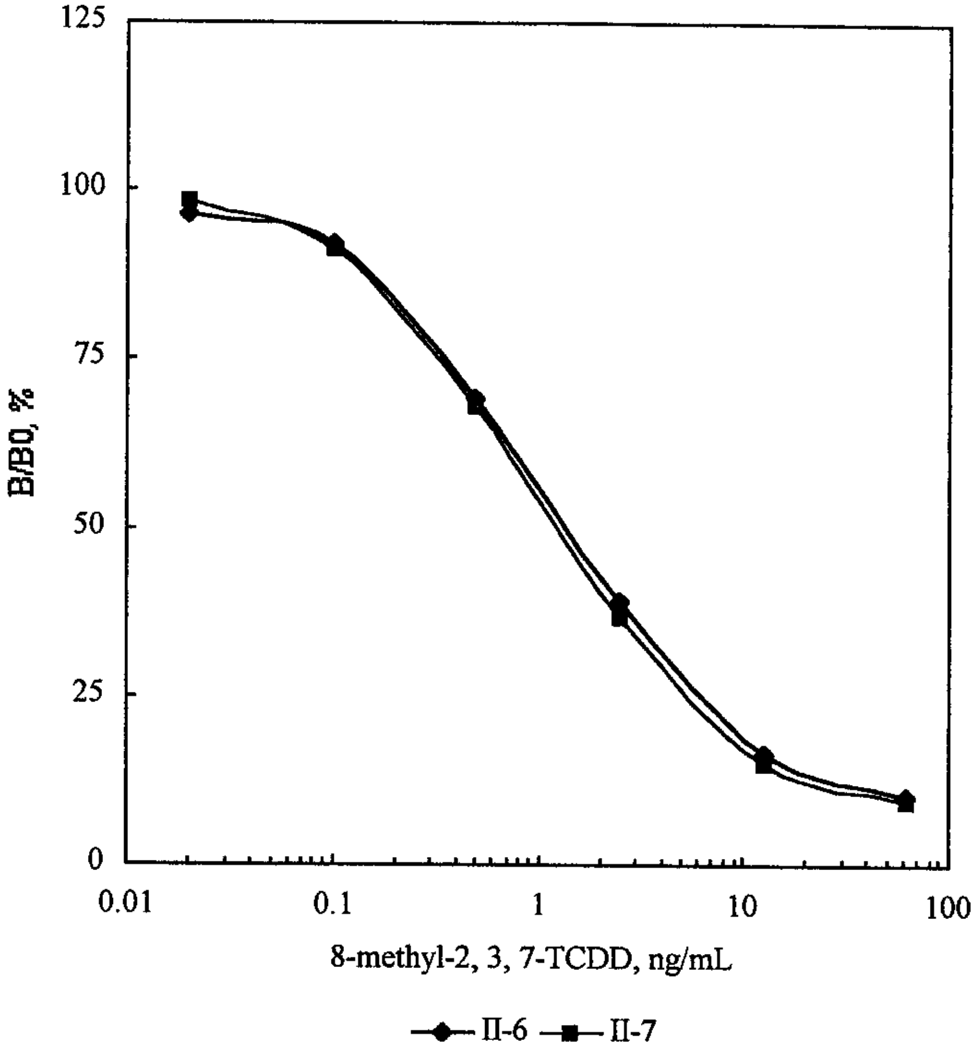


図6　生物発光検出法によるダイオキシン検量線

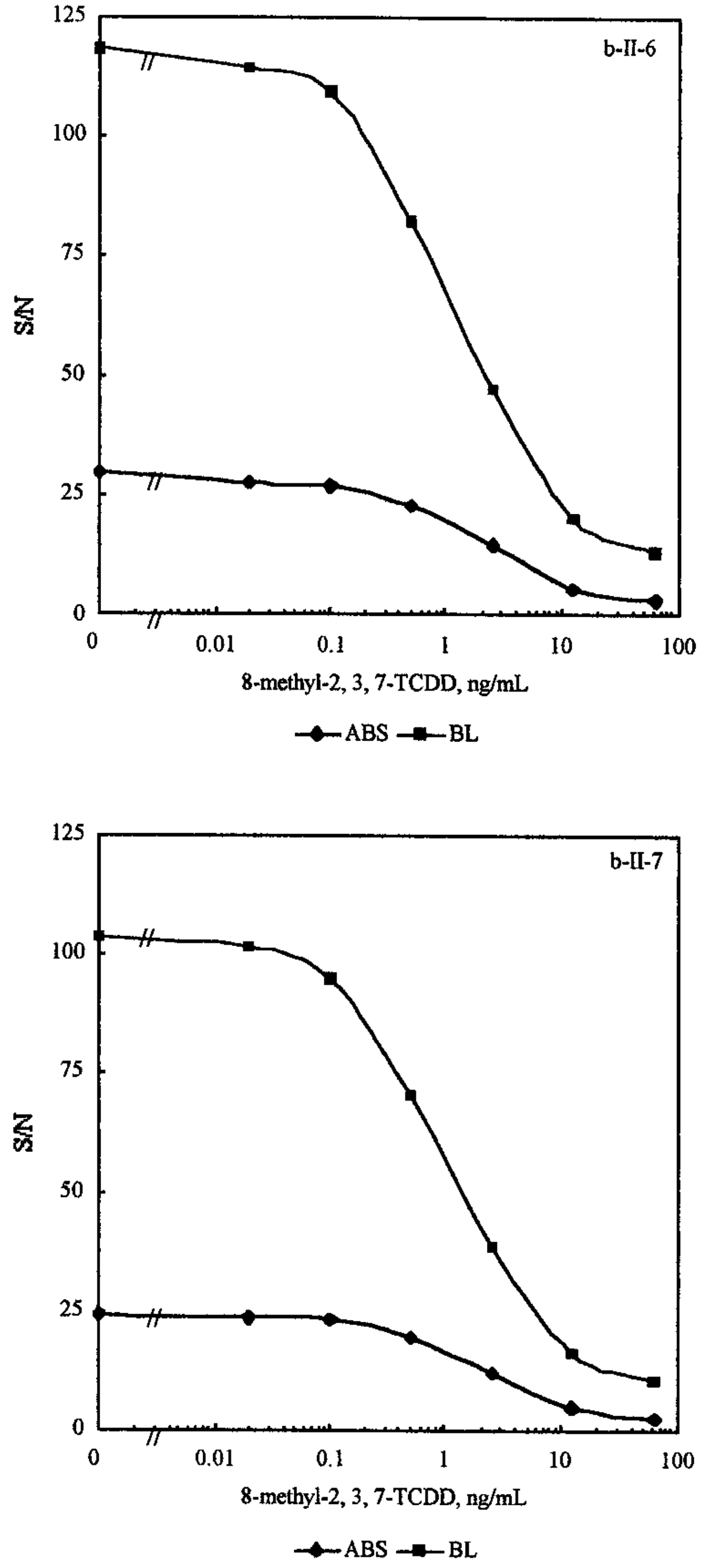


図７　比色法及び生物発光検出法による検量線の比較

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)

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

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　後藤順一　東北大学大学院薬学研究科 教授
　　　　　　小林典裕　東北大学大学院薬学研究科 助教授
協力研究者　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

ダイオキシンの発生毒性は成体の毒性に比べて感受性が高いうえ、その影響は多くの場合不可逆的でしかも次世代に及ぶため、極めて重大な問題である。なかでも妊娠中及び授乳中の母親が暴露されることによる子への影響は非常に低濃度のダイオキシンによっても現れるため、その被曝量を的確かつ簡便、迅速にモニターしうるイムノアッセイ法の確立が切望されている。しかし、母乳や血清に含まれるダイオキシン類の濃度は極めて低いうえ、これら体液中に大量に存在する夾雑物、とくに脂質による妨害を受けるため、アッセイに先立って十分なクリーンアップを行い、しかも目的成分を濃縮することが不可欠となる。

特異的な抗原抗体反応に基づくイムノアフィニティー抽出法は、一般に操作が簡便で迅速なうえ選択性に優れ、イムノアッセイばかりかHPLCやGC/MSなどのクロマトグラフ法によるダイオキシン類の分析においても極めて有用と期待される。我々は、高感度で選択性の高い酵素イムノアッセイ法の確立を目的としてダイオキシン類に対する特異モノクローナル抗体の調製を検討し、実用化が期待される抗体を分泌するハイブリドーマ株3種を樹立することに成功した。そこでこれら抗体を腹水法により大量に調製し、イムノアフィニティー抽出法への応用について基礎的な検討を行った。

3種モノクローナル抗体のうち、2,3,7,8-四塩化ダイオキシン (2,3,7,8-TCDD) に強い反応性を示した#2-37抗体 (IgG2a/κ) 又は#9-36抗体 (IgG1/κ) を、臭化シアン活性化アガロースに対して反応させてイムノソルベントを調製した (抗体結合率 97.6%および 97.3%)。これらを充填したアフィニティーカラム (ゲル容量1.5 ml) にTCDDのsurrogate化合物である 1,2,7-三塩化-8-メチルダイオキシン (TMDD) (100 pg 又は 200 pg) をアプライして、その溶出挙動を追跡した。すなわち、カラムを水、リン酸緩衝液、10-20% アセトニトリルで洗浄したのち吸着画分を 95%メタノールで溶出することを試みた。しかしながら、現在までのところ満足のいく結果が得られず、イムノソルベントの再調製を含めて詳細な検討が必要と思われた。

A. 研究目的

ダイオキシンが極めて強い毒性を有することは周知の事実であるが、その発生毒性にはとりわけ強い関心