

が払われている。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ことが大きな理由である。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迅速にモニターしうる微量定量法の確立が切望されている。

ダイオキシン類の分析においては、従来、ガスクロマトグラフィー-質量分析法 (GC-MS) が主流となっている。本法では多種類のダイオキシン異性体の一斉分析が可能であるが、多段階にわたる試料のクリーンアップを必要とするため、操作が煩雑で検体処理能力に乏しい。一方、特異抗体を利用するイムノアッセイは、簡便に高感度で選択性の高い測定が可能な利点を有する。このため、検体処理能力に優れ、特定の異性体のルーチン分析に適している。しかもモノクローナル抗体を使用することで、アッセイ値の再現性が保証された標準分析法を確立することが可能となる。以上の観点から、我々は、各種ダイオキシン異性体のなかでもとくに毒性の強い 2,3,7,8-四塩化ダイオキシン (2,3,7,8-TCDD) 及び 1,2,3,7,8-五塩化ダイオキシン (1,2,3,7,8-PCDD) に特異性を示すモノクローナル抗体の調製を検討し、ほぼ満足のいく結合特性を有する抗体3種を樹立することに成功している。

しかしながら、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、抗原抗体反応は体液中に存在するある種の夾雑物、とくに脂質により非特異的な妨害を受ける。このため、ダイオキシン類のように

とりわけ脂溶性の高い微量成分を対象とするイムノアッセイでは、分析に先立ってこうした脂質を十分に除去することが重要となる。しかし、従来の溶媒抽出やクロマトグラフィーによる前処理法ではダイオキシン類は脂質と類似の挙動を示すため、新規な分離機構に基づくクリーンアップ法の確立が切望される。

イムノアフィニティー抽出法は、固定化抗体 (イムノソルベント) を用いる目的成分の単離・精製法で、特異的な抗原抗体反応に基づくため一般に操作が簡便・迅速なうえ優れた選択性を示す。このため、イムノアッセイばかりか GC/MS 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。イムノソルベントの調製には比較的大量の抗体が必要なため、本法を確立するためには一定品質の特異抗体を大量かつ継続的に供給できることが求められる。そこで、上記のモノクローナル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。

B. 研究方法

1. 実験材料

1) モノクローナル抗ダイオキシン抗体産生ハイブリドーマ

3種ハイブリドーマ株、#2-37、#9-36、及び #35-42 は、我々が樹立したものをを用いた (奥山ら報告参照)。

2) マウス

BALB/c 及び A/J マウス (いずれも雌、8週齢) は、日本 SLC より購入した。

2. 試薬と器材

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

RPMI1640 粉末培地: GIBCO-BRL
31800-022

ウシ胎児血清 (FCS): GIBCO-BRL
26140-079

培養フラスコ (75 cm²): Costar
3075

プリスタン: 和光純薬工業(株)

プロテイン G カラム (HiTrap
affinity column): Pharmacia Biotech

2) イムノソルベント及びアフィニテ
ィーカラムの調製

CNBr- 活性化 Sepharose 4FF:
Pharmacia Biotech

Affigel-10: Bio-Lad

ディスポーザブルカラム: ジーエ
ルサイエンス(株)

3) イムノアフィニティー抽出条件の
検討

アフィニティー精製ウサギ抗マウ
ス IgG+IgM 抗体 (第二抗体): ジャ
クソン 315-005-044

1,2,7-三塩化-8-メチルダイオキシ
ン (TMDD): Wellington Laboratories

o-フェニレンジアミン二塩酸塩:

Sigma

トリトン X-100: Sigma

30% 過酸化水素水: 和光純薬工業(株)
ELISA 用マイクロタイタープレ
ート: Costar 3590

アセトニトリル: 和光純薬工業(株)
(残留農薬 PCB 試験用)

メタノール: 和光純薬工業(株) (ダイ
オキシシン類分析用)

エタノール: 和光純薬工業(株) (ダイ
オキシシン類分析用)

ヘキサン: 和光純薬工業(株) (ダイオ
キシシン類分析用)

その他の塩類・有機溶媒などは、試
薬特級を用いた。

3. 機器

ELISA プレートリーダー (BL 312e):
Bio-Tek Instrument Inc.

4. ELISA

1) 緩衝液と基質溶液

Buffer A: 0.05 M Na₂HPO₄-NaH₂PO₄
緩衝液 (pH 7.3)

Buffer B: 0.9% NaCl を含む buffer A

Buffer C: 0.1% ゼラチンを含む
buffer B

基質溶液: 0.05% o-Phenylene-
diamine·HCl 及び 0.01% 過酸化水
素を含む 50 mM クエン酸・酢酸
ナトリウム緩衝液 (pH 5.0)

2) 第二抗体固定化プレートの調製

96 穴 ELISA 用マイクロタイターブ
レートの各ウエルに、第二抗体の
buffer A 溶液 (2 µg/ml) を分注 (100
µL/well) して、4°C で一夜放置。抗体
溶液を吸引除去したのち、buffer B で
ウエルを 3 回洗浄。BSA (0.5%) の
buffer B 溶液 (150 µL/well) をウエルに
分注して、室温で 2-3 時間放置。溶液
を吸引除去したのち、buffer B でウ
エルを 3 回洗浄して第二抗体固定化プレ
ートを作製した。

3) ELISA の方法

第二抗体固定化プレートにペルオ
キシダーゼ (HRP) 標識ハプテンの
buffer C 溶液 50 µL とダイオキシシン標
準品または試料とモノクローナル抗
体の混合液 (0.02% トリトン X-100 含
有) 50 µL を各ウエルに加えて 4°C で
一晩放置した。Buffer B でウエルをを
3 回洗浄後、0.05% o-フェニレンジア
ミン及び 0.01% 過酸化水素を含む 50
mmol/L クエン酸・酢酸ナトリウム緩
衝液 (pH 5.0) 100 µL を各ウエルに加
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. 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 種ハイブリドーマ株、#2-37、#9-36、及び #35-42 の各々をハイブリドーマ培地 (10%FCS、10 mM HEPES、0.1 mM 硫酸カナマイシン、50 μ M 2-mercaptoethanol、2 mM L-グルタミン、1 mM ビルビン酸ナトリウムを含む RPMI-1640 培地) 中で大量に培養し、培養液を合わせたのち室温で遠心分離 (1000 rpm x 10 min)。上清を除去したのち、ペレットとして得られた細胞にハイブリドーマ培地を添加しておだやかに混合して細胞浮遊液を調製し、その 1 mL (ハイブリドーマ 5×10^6 個を含む) を各マウスの腹腔に投与した。なお、マウスは上記の 3 種細胞に対して各々 5 匹を用い、系統は、#2-37、#9-36 (BALB/c マウス由来) については BALB/c マウスを、#35-42 (A/J マウス由来) については BALB/c ヌードマウスを使用した。これらマウスを通常どおりに飼育して観察し、十分な腹部の肥大が認められた時点で頸椎脱臼により屠殺し、腹水を採取した。

得られた腹水 (7 mL) をプロテイン G カラム (HiTrap affinity column) に通導したのち添付のプロトコールに従ってカラムの洗浄と吸着画分の溶出を行い、IgG 画分をグリシン-塩酸緩衝溶液 (14 mL) として得た。これをリン酸緩衝液で透析後、Centriprep YM-10 (amicon) を用いて濃縮し、目的抗体のリン酸緩衝溶液 (1.5 mL) を得た。280 nm における吸光度 ($E^{1\%} = 14$) を測定して #2-37、#9-36 および #35-42 の各抗体について IgG 濃度を求めたところ、各々 5.4、7.7 および 5.5 mg/mL であった。

6. イムノソルベント及びアフィニティーカラムの調製

上記の IgG 画分溶液 (抗体 #2-37 又は #9-36) (2.4 又は 1.5 mL; IgG 13.1 又は 11.6 mg) を CNBr-活性化 Sepharose 4FF (ゲル容量 1.5 mL) に加えて 4°C で一夜穏やかに攪拌。ついで、0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) (1.5 mL) を添加して更に 1 h 攪拌し、未反応の活性基をブロックした。遠心 (500 rpm、5 min、4°C) して上清を分離して吸光度を測定し、未反応の IgG 量を算出した、一方で、ゲルを十分に洗浄し [0.1 mol/L 酢酸緩衝液 (pH 4.0) で 3 回、95% MeOH で 3 回、水で 3 回、次いでリン酸緩衝液で 3 回]、得られたイムノソルベント (約 1.5 mL) をディスボーズブルカラムに充填してアフィニティーカラムを作製した。

7. イムノアフィニティー抽出条件の検討

上記のアフィニティーカラムに TMDD のエタノール溶液 (100 pg 又は 200 pg / 10 μ L) を添加したのち 5-20% CH₃CN (5 mL) を添加してカラムを洗浄した。次いで 95% MeOH (10 mL) を添加して、吸着画分を溶出した。以上の操作において、カラムから溶出される溶液を 5 mL ずつ分取し、各フラクションの溶媒を N₂ ガス気流下で留去した。残渣を n-ヘキサン (4 mL) で溶解したのち水 (3 mL) を加えて vortex-mix し、有機層を分離した後、溶媒を N₂ ガス気流下で留去した。残渣を Buffer D で適宜希釈したのち上記の ELISA に付して TMDD 含量を測定、あるいは阻害物質の影響を調べた。なお、TMDD を添加することなく同様の実験を行い、アフィ

ニティーカーラム自体から漏出する免疫反応性物質の有無を調べた。

C. 研究結果

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、及び #35-42 を各々マウス 10匹に腹腔内投与したところ、BALB/c マウスの脾細胞に由来するハイブリドーマである #2-37 と #9-36 については著明な腹部の肥大が認められ十分な量の腹水 (各々 19 mL、15 mL) が得られた。他方、A/J マウスに由来する #35-42 [A/J マウス脾細胞と BALB/c マウス由来ミエローマ細胞 (NS1) のハイブリドーマである] はヌードマウスを用いても 5 匹中 2 匹は十分な腹水の貯留をみるに至らなかったが、3 匹から腹水が得られた (採取量 16 mL)。

これら腹水 (7 mL) をプロテイン G カラムに付したところ、得られた IgG 画分は、#2-37、#9-36、及び #35-42 の各抗体について、13.1 mg、11.6 mg、12.5 mg であり、下記の検討を行ううえで十分と思われた。

2) イムノソルベントの調製

上記の3種モノクローナル抗体のうち、ELISA において高感度の検量線を与えた (高い親和力を有するものと推定される) #2-37 及び #9-36 を用いてアフィニティークラムの調製を試みた。Sephacrose 4FF (ゲル容量 1.5 mL) に対して 13.1 および 11.6 mg の IgG 画分を反応させたところ、十分な結合効率 (#2-37、97.6%; #9-36、97.3%) で抗体を固定化することができた。そこで、このイムノソルベント (1.5 mL) をポリプロピレン製のディスプレイザブルカラム管に充填して

アフィニティークラムを作製し、以下の実験に用いた。

3) イムノアフィニティー抽出条件の検討

はじめに、#9-36 抗体固定化カラムを用いて、TCDD の surrogate 化合物である TMDD の保持・溶出挙動を検討した。すなわち、カラムに TMDD 100 pg 又は 200 pg を添加したのち、Buffer A (5 mL)、水 (5 mL)、10%又は 20% CH₃CN (5 mL) でカラムを順次洗浄した。次いで、95% MeOH (5 mL x 2 回) を添加して吸着画分を溶出した。これら溶出液を各々ヘキサンの抽出してロータリーエバポレーターで乾固したのち ELISA に付して、結合型酵素活性を 1 時間のインキュベーションで得られる吸光度として表示した (図 1A-D)。

いずれの実験においても、CH₃CN 水溶液でカラムを洗浄した時点で既に免疫反応性物質 (すなわち TMDD) の溶出が認められ、カラムの洗浄を更にマイルドな条件に変更する必要があるものと思われた。

そこで、洗浄溶媒を 5% CH₃CN に変更して実験を行ったが (図 2A、B)、Buffer A 及び水による洗浄画分に免疫反応性物質 (あるいは ELISA における標識抗原の結合を阻害する非特異的な妨害因子) の存在が示された。この現象は、TMDD をアプライすることなく同様の手順でカラムを洗浄、溶出した場合においても認められ (図 2C、D)、アフィニティークラムからリークする微量の抗ダイオキシン抗体 (すなわち #9-36) による妨害も考慮する必要があるものと考えられた。

この可能性を検討をするため、抗体 #2-37 固定化カラムに TMDD をアプライすることなく洗浄・溶出操作を

行い、ELISA 妨害物質の有無を調べた (図 3A-C)。

まず、抗体を固定化した直後のイムノソルベントを充填したカラムを、buffer B (5 mL)、90%メタノール (5 mL x 3 回)、次いで buffer A (5 mL x 3 回) で順次洗浄し、これら洗浄液を各々 ELISA に付した。その結果 (図 3A)、90%メタノール洗浄画分は強い結合阻害活性を示し、アフィニティーカラムからの脂溶性の免疫反応性物質の溶出が示唆された。これは、抗体 #2-37 が、その調製の過程でマウス体内のダイオキシン様の免疫反応性を示す化合物と複合体を形成しており、この物質がメタノールにより溶出された結果とも考えられる。次に、この手順で十分に洗浄したアフィニティーカラムに TMDD を添加することなく 10% CH₃CN 又は 20% CH₃CN で洗浄したのち 95%メタノールで処理し、各溶出液を ELISA に付した (図 3B、C)。その結果、全ての画分に阻害物質が認められ (B/B₀ ≤ 80%)、抗体の固定化に用いたマトリックスに由来する妨害物質の存在も考慮する必要があると思われた。

D 考察・結論

イムノアフィニティー抽出法は特異的な抗原抗体反応による目的物質の保持に基づくため、一般に極めて選択的で、物理的な保持機構による従来の前処理法に比べて優れた精製効率が期待できる。しかし、ダイオキシン類のようにその存在が極く微量で、しかも脂溶性の高いハブテンに対してイムノアフィニティー抽出法を確立することは、必ずしも容易ではない。実際、前節に記したように、今のところ満足のいく結果は得

られておらず、イムノソルベントの再調製も含めて、系統的な検討が必要である。

これまでの研究結果も考慮したうえで、イムノアッセイのための前処理法としてのイムノアフィニティー抽出法を確立するうえで想定される問題点とその対策を列挙すると次のようになる。すなわち、①アフィニティーカラム作製の担体それ自体から漏出する抗原抗体反応の妨害因子がありうる。

②母乳や血清中には多量の脂質が存在し、これらが脂溶性の高いダイオキシン類と疎水性相互作用によりコンプレックスを形成し、アフィニティー抽出における抗原抗体反応を阻害するものと考えられる。そこで、アフィニティーカラムに付加するに先立って、体液試料から脂質をできるだけ除去することが必要となる。この目的には、C18系のカートリッジによる固相抽出法が有効と期待される。また、脂溶性妨害物質を効率良く洗浄除去するためには、試料のアブライの後に、できるだけ有機溶媒の含量の高い溶媒でカラムを洗浄することが望まれるが、今回採用した #2-37 と #9-36 抗体では、10%以上のエタノール処理で抗原の解離が認められ、こうした厳しい洗浄条件を適用することができない。そこで、親和力はやや低い有機溶媒に対して安定な #35-42 抗体の適用を試みるのが良いと思われる。

③イムノソルベントから微量の抗体がリークすることが知られているが、これは引き続くイムノアッセイを妨害する。これを防ぐために、できるだけリークの少ない活性化担体 (N-ヒドロキシコハク酸イミド法に基

づく Affi-gel 10 などが有望と思われる)を採用し、しかも溶出画分に有機溶媒による後抽出を施してリーク抗体を徹底的に除去する工夫が必要と思われる。

④以上のように、アフィニティークラムによる抽出の前後に簡易抽出を加えることを考慮すると、トレーサー物質の添加により各試料からのダイオキシンの回収率を補正することが必要と思われる。高比放射能のトリチウム標識ダイオキシンが理想的であるが、現在、その入手は絶望的である。そこで、ハプテン-キャリア結合体の調製に用いたダイオキシンカルボン酸誘導体に市販のトリチウム標識アミノ化合物(ヒスタミン、グリシンなど)をカップリングさせ、これをトレーサーとして利用することを試みる。

今後、このようなストラテジーに従って検討を進めることで、免疫アッセイばかりか、クロマトグラフ法によるダイオキシン類分析においても試料の簡易クリーンアップ法として有用な免疫アフィニティー抽出法の開発を検討する予定である。

E. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
2. その他
なし

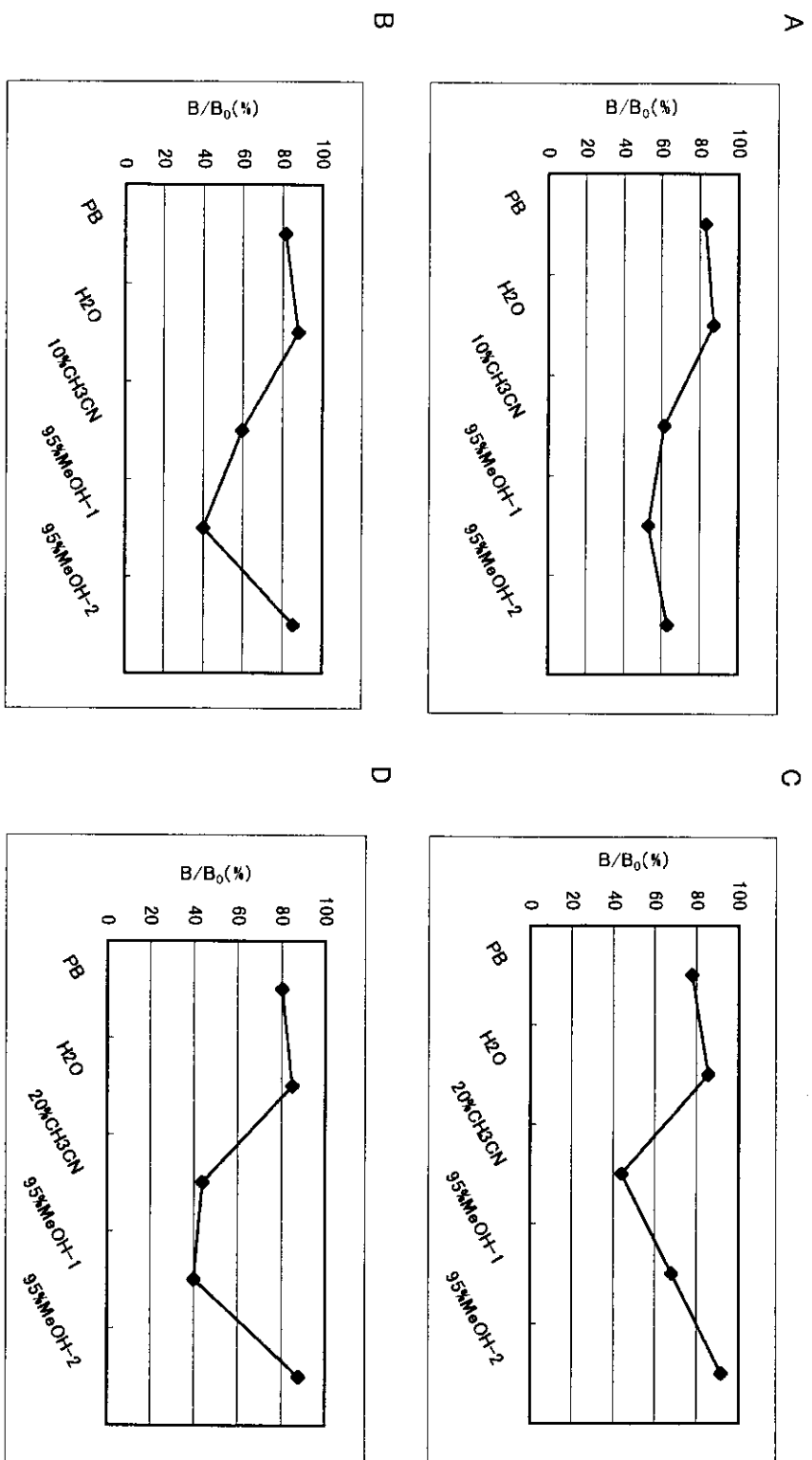
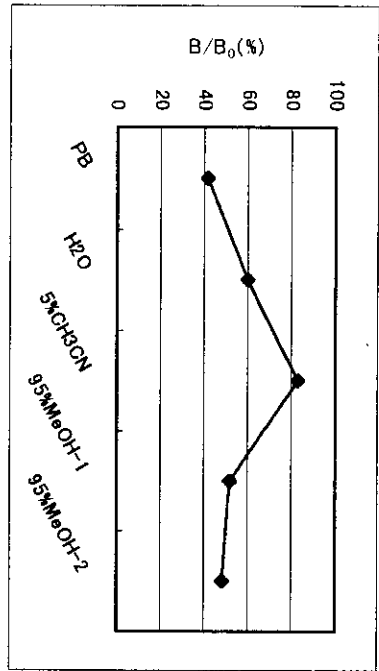


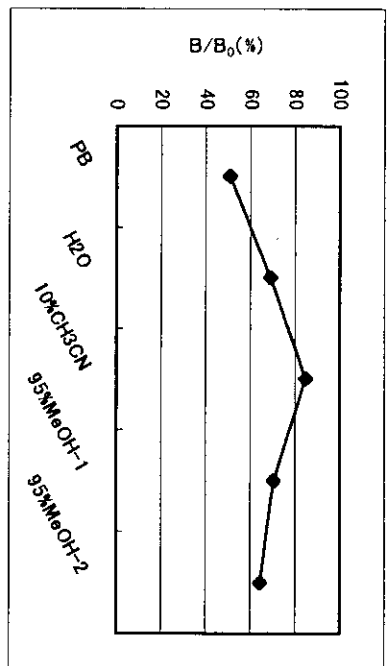
図 1 イムノアフィニティーカラム洗浄・溶出画分のELISAにおける標識抗原結合阻害活性 (#9-36抗体使用)

- A TMDD 100 pg を添加し、10%CH₃CN でカラムを洗浄
- B TMDD 200 pg を添加し、10%CH₃CN でカラムを洗浄
- C TMDD 100 pg を添加し、20%CH₃CN でカラムを洗浄
- D TMDD 200 pg を添加し、20%CH₃CN でカラムを洗浄

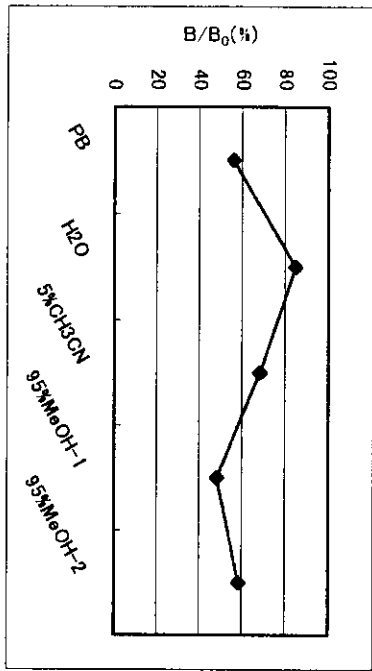
A



C



B



D

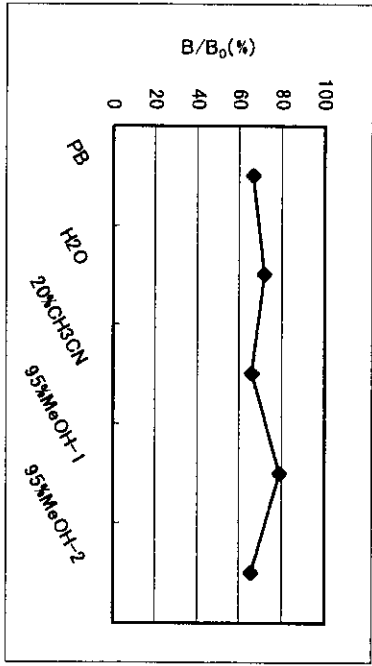
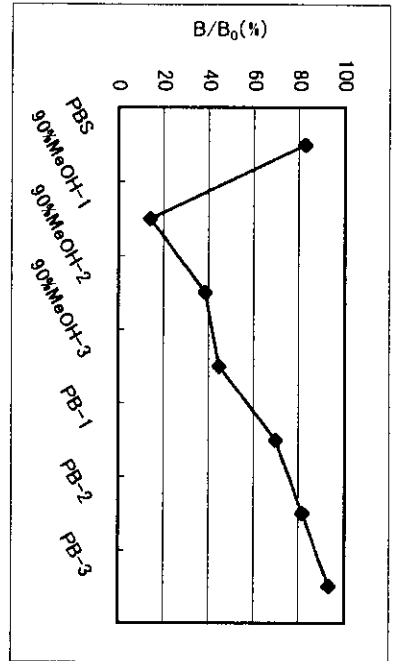


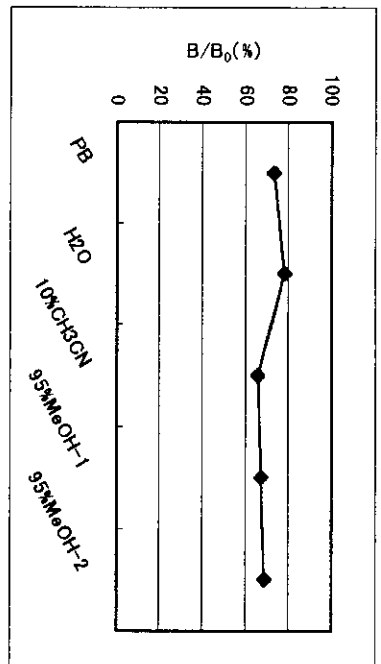
図 2 イムノアフィニティーカラム洗浄・溶出画分のELISAにおける標識抗原結合阻害活性
(#9-36抗体使用)

- A TMDD 100 pg を添加し、5%CH₃CN でカラムを洗浄
- B TMDD 200 pg を添加し、5%CH₃CN でカラムを洗浄
- C TMDD 0 pg を添加し、10%CH₃CN でカラムを洗浄
- D TMDD 0 pg を添加し、20%CH₃CN でカラムを洗浄

A



B



C

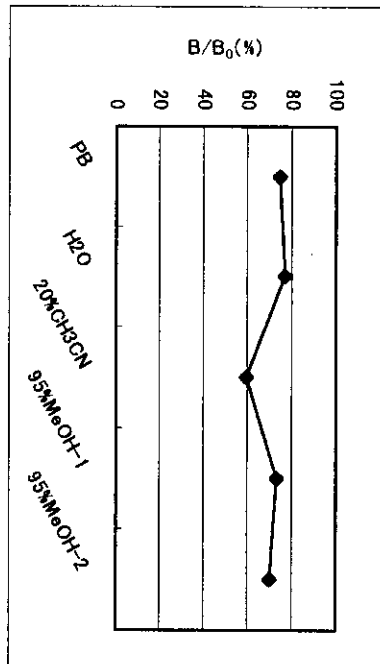


図 3 イムノアフィニティーカラム洗浄・溶出画分のELISAにおける標識抗原結合阻害活性 (#2-37抗体使用)

- A TMDD 添加前
- B TMDD 0 pg を添加し、10%CH₃CN でカラムを洗浄
- C TMDD 0 pg を添加し、20%CH₃CN でカラムを洗浄

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻名 | ページ | 出版年 |
|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|----|---------|------|
| Hiroyuki Nakazawa et al | Development of Dioxin Toxicity Evaluation Method in Human Milk by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (part I : Basic Strategy for Methodology Construction), | Organohalogen Compounds | 45 | 86-89 | 2000 |
| Koichi Saito et al | 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) | Organohalogen Compounds | 45 | 168-171 | 2000 |
| Yukio Sugawara et al | Development of Dioxin Toxicity Evaluation Method in Human milk by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (part III : Assay Validation for Human Milk), | Organohalogen Compounds | 45 | 172-175 | 2000 |
| Takako Anjo et al | SYNTHESIS OF NEW DIOXIN HAPTENS AND DEVELOPMENT OF ENZYME IMMUNOASSAY FOR DIOXINS USING POLYCLONAL ANTIBODIES | Organohalogen Compounds | 45 | 224-226 | 2000 |
| Shinjiro Hori et al | DEVELOPMENT OF ANALYSIS FOR POLYBROMINATED DIPHENYL ETHER IN SEAFOOD AND ACTUAL CONTAMINATION OF SEAFOOD | Organohalogen Compounds | 47 | 214-217 | 2000 |
| 西 佳子 他 | 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 要旨集 | 4 | 148 | 2001 |
| Yukio Sugawara et al | 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 印刷中 | | | 2001 |
| Koichi Saito et al | Development of Dioxin Toxicity Evaluation Method in Human Milk by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (part II ; Assay Validation for Human Milk) | Chemosphere 印刷中 | | | 2001 |
| Kazuhiro Akutsu et al | GC/MS analysis of polybrominated diphenyl ethers in fishu collected from Inland Sea of Seto, Japan | Chemosphere 印刷中 | | | 2001 |

20000722

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。