

平成13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 ——

課 題 名

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

(H11-生活-001)

主任研究者

(財) 食品薬品安全センター秦野研究所 副所長

松木容彦

分担研究者

星薬科大学 教授

中澤裕之

埼玉県衛生研究所 専門研究員

斉藤貢一

(財) 食品薬品安全センター秦野研究所 室長

安生孝子

昭和大学薬学部 教授

前田昌子

(別添 2)

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13年度 総括・分担研究報告書
主任研究者 松木容彦

平成14(2002)年4月

目 次

I. 総合研究報告

| | |
|--|---|
| 平成 13 年度厚生科学研究費補助金 (生活安全総合研究事業) 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 主任研究者 松木容彦 ----- | 1 |
|--|---|

| | |
|--|---|
| 平成 13 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 国外入手ポリクローナル抗体を用いる ELISA における母乳中 ダイオキシンの簡易クリーンアップの確立と実用性の検討 分担研究者 中澤裕之 ----- | 9 |
|--|---|

| | |
|--|----|
| 国外入手ポリクローナル抗体を用いる ELISA におけるハウス ダストおよび土壤中ダイオキシンの簡易クリーンアップの確 立と実用性の検討 分担研究者 斉藤貢一 ----- | 20 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| モノクローナル抗体を用いる ELISA における生体試料中ダイ オキシンの簡易クリーンアップの確立と実用性の検討 分担研究者 安生孝子 ----- | 29 |
|---|----|

| | |
|--|----|
| モノクローナル抗体を用いる酵素イムノアッセイ法の確立及 び生体試料精製法の検討 協力研究者 奥山光伸 ----- | 30 |
|--|----|

| | |
|--------------------------------------|----|
| 臭素化ダイオキシンハプテンの合成 協力研究者 佐藤雅之 ----- | 50 |
|--------------------------------------|----|

| | |
|---|----|
| イムノアッセイの検出高感度化と実用性についての検討 分担研究者 前田昌子 ----- | 59 |
|---|----|

| | |
|--------------------------|----|
| II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- | 66 |
|--------------------------|----|

| | |
|------------------------|----|
| III. 研究成果の刊行物・印刷 ----- | 68 |
|------------------------|----|

(別添 4)

平成 13 年度 厚生科学研究費補助金 (生活安全総合研究事業)
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

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、胎脂等に含まれる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法を確立することを目的に、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、生体試料のみならず、環境試料測定への実用性について調べることに、国内で新しくモノクローナル抗体を作製し、この確立した ELISA 法の実用性について調べ、さらに、ヒト試料への応用を試みることに、確立した ELISA 法の高感度あるいはクリーンアップ操作の簡便化を図ること、の 3 点に視点を置き、研究を進めた。

1. 国外入手ポリクローナル抗体を用いる ELISA における母乳、ハウスダストおよび土壌中ダイオキシンの簡易クリーンアップの確立: 1) 母乳試料のクリーンアップならびに実用性の検討: ①多層シリカカートリッジの溶出パターンを検討した結果、ダイオキシン類は、n-ヘキサン (100 mL 以内) で溶出されることを、また、②脂肪負荷の許容量について検討した結果、脂肪量最大負荷量は 1.5 g であることを明らかにした。さらに③ ①、②の操作に加え、クリーンアップ効果を向上させるため、アルミナカートリッジ固相カラムでの溶出パターンを調べた結果、ダイオキシン類は 6%ジクロロメタン/n-ヘキサン (7 mL) で溶出した。多層シリカカートリッジとアルミナカートリッジカラムを直接結合させ、クリーンアップを行った結果、妨害物が除去でき、本クリーンアップ操作により測定した ELISA と GC/MS の測定結果の TEQ および total TEQ に良好な相関性が認められた。 2) ハウスダストおよび土壌のクリーンアップならびに実用性の検討: ①ソックスレー法と高速溶媒法 (ASE) によるハウスダストからのダイオキシンの抽出率について比較検討した結果、ASE 法が有用であることを示した。約 60%脂肪分画が得られ、迅速抽出法として②アルカリ処理操作を省略して直接、抽出した脂肪を多層シリカカートリッジカラムに通導、ついで、活性炭処理法により、GC/MS での測定が可能であった。③ハウスダスト試料を ASE 抽出処理後、多層シリカカートリッジに通導し、GC/MS 法と ELISA 法により測定した結果、両者には良好な相関がみられた。④土壌試料についてもソックスレー抽出後、プレバック 4 層シリカゲルカラムによるクリーンアップ操作の ELISA への実用性が確認され、得られた結果は GC/MS 値と相関した。

2. モノクローナル抗体を用いる ELISA における簡易クリーンアップの確立ならびに実用性についての検討: 1) ELISA の測定条件、クリーンアップならびに実用性の検討: ①最終的にモノクローナル抗体 D9-36 と HRP 標識ハプテン I-5-2H との組み合わせで反応時間、反応濃度について検討し、最良の測定系を確立した。② 3 種のモノクローナル抗体を用いてイムノソルベントを調製した。③脂肪をアルカリおよび硫酸処理により分解、ついで wakogel P-28 に通導した結果、2,3,7,8-TCDD および 1,2,3,7,8-PeCDD の回収率はそれぞれ 80%および 90%であり、また、ELISA 法による測定値と GC/MS の測定結果に良好な相関がみられた。また、同様の手順でイムノソルベントカラムに通導した時も回収率は約 70%と良好であった。

2) 臭素化ダイオキシンのハプテン合成: 常法に従い、catechol の臭素化により

4,5-dibromocatechol を得、2,5-dibromonitrobenzene のニトロ化によりあるいは2,6-dinitroaniline の臭素化により 4-bromo-2,6-dinitroaniline に導いた後、アミノ基を臭素に置換する方法で得た。両精製物をカップリングさせ臭素化ダイオキシソ母核を得、ついでニトロ基を還元してアミノ基に誘導し、最終的に無水コハク酸、グルタル酸およびアジピン酸を反応させ目的のダイオキシソハブテン3種を得た (38 mg、86 mg、72 mg)。現在、これらのハブテンを用いてさらにタンパク結合物、標識体を合成している。

3. イムノアッセイ検出高感度化と血清試料の測定：ビオチン標識化ダイオキシソおよびマウスモノクローナル抗体を用いた血清試料中ダイオキシソ測定について検討した結果、検出系として生物発光法に比べ、比色法を用いた時、良好な検量線が得られた (1~3125 pg/assay)。比色法により測定した結果、血清に添加した TMDD の回収率は 105.5% (n=10) で良好であった。

分担研究者

中澤裕之 星薬科大学 教授
齊藤貢一 埼玉県衛生研究所 専門研究員
安生孝子 (財)食品薬品安全センター 室長
前田昌子 昭和大学 薬学部 教授

A. 研究目的

ダイオキシソによるヒトでの曝露実態の解析や曝露推移状況の把握は行政上、も急務とされ、従来の GC/MS 法に代わる安価でかつ迅速なダイオキシソ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ソ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の生体試料(母乳、血液、脂肪等)中のダイオキシソの簡便でかつ高感度な酵素免疫測定法 (ELISA) を確立し、ヒトや動物での経日的さらには経年的体内曝露推移のモニタリングあるいはダイオキシソによる環境汚染状況調査への応用に資することを目的としている。

本年度は、ヒト試料に加え、さらに土壤およびハウスダストに含まれるダイオキシソに着目し、簡易なクリーンアップ法ならびに先に確立した ELISA の実用性の確認を行うことに焦点を当てた。

B. 研究方法

1. 国外入手ポリクローナル抗体を用いる ELISA における母乳、ハウスダストおよび土壤中ダイオキシソの簡易クリーンアップの確立ならびにその実用性についての検討：

1) 母乳試料：①多層シリカゲルカートリッジ (GLサイエンス製) を用い、PCDD/Fs とノンオルト Co-PCBs の n-hexan での溶出パターンについて検討を行った。ついで多層シリカカートリッジに脂肪量(1.1~2.3 g)を変えて負荷し、硫酸シリカゲル層における色調変化とその色調変化の KOHシリカゲル層への影響について調べ、脂肪の最大負荷量を推測した。②多層シリカカートリッジに直接アルミナカートリッジを結合させ、2段カラムでの脂肪除去率の効果について調べた。③本2段クリーンアップ操作により処理した母乳 (7 検体) について ELISA を GC/MS により測定し、相関性を調べた。

2) ハウスダストおよび土壤試料：①ハウス

ダスト試料については高速溶媒抽出法 (ASE) とソックスレー抽出法の比較を行った。予め、2 段の篩にかけて固形物と微粉末を除去し、その残渣 (5 g) をソックスレー抽出 (トルエン/16 時間還流) と 3 サイクルの ASE 抽出 (トルエン、150°C、2000 psi) を行った。ついで、1 mol/L の KOH/EtOH (40 mL)、室温、一夜放置し、加水分解した後、n-ヘキサンにより抽出した。さらに、この抽出物をプレバックタイプが多層シリカカートリッジに負荷した。ヘキサン溶出分画について、ELISA および GC/MS により測定し、両者の値について比較した。一方、土壌試料についても 50 g をソックスレー抽出し、その 1/2 量を GC/MS へ、1/4 量を ELISA に使用した。これらの試料について GC/MS 法では既存法 (環境省水質保全局土壌農薬課のマニュアル) に従い、ELISA ではプルバックタイプの 4 層シリカゲルカラム (SUPELTO 製) に通導後、本 ELISA 法により測定した。

2. モノクローナル抗体を用いる ELISA における簡易クリーンアップの確立と実用性についての検討

1) 母乳試料の簡易クリーンアップの確立と実用性についての検討: ①ダイオキシンとハブテンとの競合阻害: ダイオキシン標準 (TMDD) とモノクローナル抗体 (D9-36) を加えた後の反応時間 (1-90 分) と反応温度 (0°C、室温) を変え、HRP 標識ハブテンと抗体との結合阻害への影響について調べた。②イムノアフィニティーの調製、抽出: モノクローナル抗体 3 種 (D2-37、D9-36、D35-42) を Affi-Gel 10 または CNBr Sepharose 4FF に結合させ、TMDD (100-200 pg) を負荷させた時の回収率を調べた。③固相抽出カラムによる生体試料の

精製: バターをアルカリおよび酸処理により脂肪分解した後、wakogel p-28 に負荷し、回収率を調べた。また、ELISA 測定結果を GC/MS 測定結果について比較した。④回収率: ②で作製したイムノソルベント 3 種を逆相系ポリマー (wakogel P-28) との組み合わせ時の TMDD の回収率について調べた。

2) 臭素化ダイオキシン合成: ①catechol から 4,5-dibromo catechol(1) を合成した。2,5-dibromonitrobenzene のニトロ化または 2,6-dinitroaniline の臭素化により 4-bromo-2,6-dinitroaniline、さらにアミノ基を臭素化して、2,5-dibromo-1,3-dinitrobenzene(2) を合成した。②(1) および (2) をカップリングさせ、臭素化ダイオキシン母核を合成し、次いで、ニトロ基を還元してアミノ基に誘導後、さらに酸無水物 (またはジカルボン酸クロライドモノエステル) を反応させ、加水分解する方法により目的の 3 種のハブテン分子 (スクサミド、グルタミド、アジバミド) を合成した。③②で合成した 1-amino-3,7,8-tribromodibenzo[1,4]dioxin のスクサミド、グルタミドおよびアジバミド 3 種 (各 10 mg) に N-ヒドロキシコハク酸イミド (15 mg) を反応させ、活性エステル体 (NHS エステル) を得た後、さらに BSA を反応させ、目的とする BSA 結合物 3 種合成した。1-amino-3,6,7,8,9-pentachlorodibenzo[1,4]dioxin のハブテン合成については検討中である。

3. イムノアッセイの検出高感度化と実用性についての検討

1) 比色法および生物発光法の検討: ヤギ抗マウス IgG 抗体固相化プレートの各ウェルに標準抗原 (TMDD) 濃度 (0-62.5 ng/mL) とピチオン標識化ダイオキシンおよびマウ

スモノクローナル抗ダイオキシン抗体を加え、4℃、一夜放置した。ついで、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 (HRP-SA) を加え、放置した後、テトラメチンベンチジン (TMM) を加え、酵素反応に付し、450 nm で吸光度を測定した。また一方、酵素反応後の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 (PPDK-SA) を加え、さらに、生物発光試液を加えて 15 分放置後、生じた発光を 5 秒間積算した。

2) 血清試料への応用：標準 TMD D を添加したヒト血清に MeOH を添加し、除タンパク後 ELISA で測定した

(倫理面への配慮)

ダイオキ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法等については予め、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. 結果および考察

1. 国外入手ポリクローナル抗体を用いる ELISA における母乳、ハウスダストおよび土壤中ダイオキシンの簡易クリーンアップの確立ならびに実用性についての検討：1) 母乳試料：①多層シリカゲルカートリッジに PCDD/Fs とノンオルト Co-PCBs を負荷し、溶出パターンを調べた結果、いずれのダイオキシン類も n-ヘキサン 160 mL 以内に溶出されることが分かった。また、この多層シリカカートリッジで処理可能な母乳中脂肪最大負荷量は 1.5 g であることを明らかにした。②多層シリカカートリッジの実用性を高めるため、このカートリッジの下に市販のアルミナカートリッジを直接結合し、ダイオキシン類の溶出パターンを調べた結果、60% ジクロロメタン/n-ヘキサン 7 mL で十分に溶出され、より精製度の高い測定が可能となった。本 2 段カラム法は従来法のアルカリ処理操作を省略でき、簡易なクリーンアップ操作法であることを確認できた。③本操作法を用いて母乳検体を ELISA 法で分析した結果は、GC/MS での結果と TCDD/Fs の TEQ および Total-TEQ の両者において良好な相関性 ($r=0.947\sim 0.95$) が得られた。

2) ハウスダストおよび土壌試料：①ハウスダストからの脂肪抽出率について従来型のソックスレー抽出と高速溶媒抽出法 (ASE) の比較を行った結果、ハウスダストに含まれる脂肪含量は約 6% であり、また、29 種のダイオキシン異性体の総抽出量は両抽出法での差は見られず、ASE の有効性が示された。②クリーンアップの簡易化法として、多層シリカカートリッジの処理法を検討し

た結果、脂質 1.5 g 程度までは本カートリッジで処理可能であり、ELISA 分析に有効であることが確認された。③試料 3 検体について、①、②を組み合わせたクリーンアップ操作を行い、GC/MS と ELISA から測定した結果、総 TEQ について両者に良好な相関が認められた。④工場跡地などの土壤試料についてソックスレー抽出後、4 層シリカゲルカラムに通導 (約 12 g) する簡便法により ELISA での測定が可能であり、その結果、GC/MS との結果と良好な相関があることが確認された。

2. モノクローナル抗体を用いる ELISA における簡易クリーンアップの確立ならびに実用性についての検討

モノクローナル抗体 (D9-36) と数種の HRP 標識ハプテンの組み合わせについて検討した結果、D9-36 と I-5-2H との組み合わせにより感度の最も良好な測定系を構築した。

1) ダイオキシンとハプテンとの競合阻害：上述の ELISA 測定系を用いて、ダイオキシン標準液とモノクローナル抗体混合液の反応時間と反応温度について調べた結果、抗原の高濃度域では反応時間が長いほど HRP 標識ハプテン抗原との結合阻害が大きく、低濃度域では反応時間 15~60 分で安定した結合阻害効果が得られた。また、抗原・抗体反応を室温または氷冷下で 30 分間反応したところ、室温の方が検出感度は高かった (1~100 pg/assay の標準曲線が得られた)。

2) イムノアフィニティーカラムの調製、抽出：3 種のモノクローナル抗体 (D2-37、D9-36、D-35-42) をそれぞれ Affi-Gel10 または CNBr-Sepharose 4FF に結合させ、充填したイムノソルベントカラムに TMDD (100~200 pg) を負荷し、95% MeOH で溶出した時の TMDD の回収率は、D2-37 ま

たは D9-36 のイムノソルベントが良好であった。

3) 固相抽出による生体試料の精製：ダイオキシン添加バターを可性カリおよび濃硫酸で処理し、脂肪分解後、固相抽出カラム (wakogel p-28) に通導した ELISA 妨害物の除去が可能となり、ELISA および GC/MS による測定値は良好な相関を示した ($r=0.911$)。

4) 回収率：同様の操作により得られた抽出物に TMDD を添加し、イムノソルベントカラム、次いで、wakogel p-28 に通導した時、TMDD の回収率は約 70% と良好であった。

3. イムノアッセイの検出高感度化と実用性についての検討

比色法および生物発光法の両者について検討した結果、比色法が優れていた。この理由の一つには PPK-SA の分子量が HRP-SA の分子量に比し、著しく大きいことによると考えられた。

E. 結論

1. 国外入手ポリクローナル抗体を用いる ELISA における母乳、ハウスダストおよび土壤中ダイオキシンのクリーンアップの確立ならびに実用性についての検討

1) 母乳試料：ポリクローナル抗体を用いる ELISA と GC/MS により同一試料の母乳中ダイオキシンの測定を行った結果、TEQ は両者の間に良好な相関が得られ、ELISA 法が実試料測定において十分実用性の高く、今後の母乳中ダイオキシンのモニタリング等に使用できる測定法であることが証明された。

2) ハウスダストおよび土壤試料：本 ELISA 法をハウスダストならびに土壤中ダイオキシン測定に適用し、GC/MS 測定結果を比較

した結果、TEQ はともに良好な相関が得られ、環境試料分析にも十分実用性が高いことが示された。

2. モノクローナル抗体を用いる ELISA における簡易クリーンアップの確立と実用性の検討

1) 母乳試料の簡易クリーンアップの確立と実用性についての検討：①ELISA 条件を確立した。②イムソルベントカラムの有用性を確認した。③ELISA 法測定系を実用化させる上で脂肪除去法が隘路の一つになっていたが、市販の種々の材質のカートリッジタイプの固相カラムとの組み合わせについて多角的に検討した結果、精製法として芳香環化合物に選択性のある Wakogel P-28 が最適であることが確認された。常法通り、脂肪をアルカリおよび酸で分解後、抽出物を Wakogel P-28 に通導し、ELISA で測定したところ、TEQ は、同一試料を GC/MS で測定した結果と良好な相関がみられ、本モノクローナル抗体を用いる ELISA 法は、母乳中ダイオキシンの測定法として実用性が高いことが示された。現在、汎用性を高めるため本 ELISA キットの構築を試みている。2) 臭素化ダイオキシンのハブテン合成：塩素化他と引き続き臭素化ダイオキシンの ELISA 構築を目的に基本的には塩素化ダイオキシンと同様の方法に従い、ダイオキシン骨格の C-1 に長さの異なる 3 種のスペーサーを導入し、免疫化に必要な量のスクサミド (38 mg)、グルタミド (86 mg) およびアジバミド体 (72 mg) をそれぞれ得、現在、タンパク結合物を作製し、臭素化ダイオキシンの ELISA 構築計画を進めている。

3. イムノアッセイの検出高感度化と実用性についての検討

ピチオン標識化ダイオキシン 4 種とモノクローナル抗体 2 種の組み合わせ下、検出系として比色法 (ストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ：HRP-SA) および生物発光法 (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：PPDK-SA) について検討した結果、期待に反して、比色法に比べ生物発光系の方が感度が低く、この要因としては用いたモノクローナル抗体では、抗体との結合がピチオン標識抗原の C-1 に近いところで行われており、用いた PPDK の分子量が大きく、立体障害が生じたためと考えられた。

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.
- 3) Mitsunobu Okuyama, Yasuhiko Matsuki and Hiroyuki Nakazawa : The Role of Enzyme-Immunoassay in Analysis of Dioxins, J. Food Hyg. Soc. Japan. Vol.42 (4) P233-238 (2001)
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, 松本容彦: 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, Koich 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 Organic Pollutants & 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 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)
- 5) Takako Anjo Mitsunobu Okuyama, Masayuki Satoh, Akira Kambegawa and Yasuhiko Matsuki : SYNTHESIS OF NEW DIOXIN HAPTENS AND DEVELOPMENT OF ENZYME IMMUNOASSAY FOR DIOXINS USING POLYCLONAL ANTIBODIES : 20th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants & 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 SEAFOOD : 20th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants & POPS, Monterey, California, USA August 13-17 (2000)
- 7) 奥山光伸、遠藤和香子、安生孝子、松本容彦、小林典裕、後藤順一、岩本憲人、佐藤雅之、神戸川明: モノクローナル抗体を

用いたダイオキシン ELISA の開発、第 14 回バイオメディカル分析化学シンポジウム、2001.7.11～13、松島

- 8) H. Nakazawa, K. Saito, M. Takekuma, M. Ogawa, S. Kobayashi, Y. Sugawara, M. Ishizuka and Y. Matsuki : Development of Dioxin Toxicity Evaluation Method in Human Milk by Enzyme-linked Immunosorbent Assay (Part IV : A Study on Simplification of Pretreatment). : ORGANOHALOGEN COMPOUNDS Vol. 54, P55-58 (2001)
- 9) M. Ishizuka , Y. Sugawara, K. Saito, M. Takekuma, M. Ogawa, S. Kobayashi, G. Shan, B.D. Hammock, H. Nakazawa and Y. Matsuki : Development of Dioxin Toxicity Evaluation Method in Human Milk by Enzyme-linked Immunosorbent Assay (Part V : A Study on Improvement of Stability). : ORGANOHALOGEN COMPOUNDS Vol. 54 P59-62 (2001)
- 10) M. Okuyama, W. Endo, T. Anjo, A. Kmbegawa, N. Kobayashi, J. Goto and Y. Matsuki : Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Dioxins Based on Monoclonal Antibodies, : ORGANOHALOGEN COMPOUNDS Vol. 54, P77-80 (2001)
- 11) K. Saito, M. Takekuma, M. Ogawa, S. Kobayashi, Y. Sugawara, M. Ishizuka, H. Nakazawa and Y. Matsuki : Study of Extraction and Cleanup Methods of Dioxins in House Dust, : ORGANOHALOGEN COMPOUNDS Vol. 50, P134-136 (2001)

H. 知的財産権の出願・登録状況

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
なし
3. その他
なし

分担研究報告書

国外入手ポリクローナル抗体を用いる ELISA における
母乳中ダイオキシンの簡易クリーンアップの確立と
実用性の検討

分担研究者 中澤裕之

(別添 5)

平成 13 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
—国外入手ポリクロール抗体を用いる ELISA における母乳中ダイオキシンの
簡易クリーンアップの確立と実用性の検討—

| | | |
|-------|-------|---------------------|
| 主任研究者 | 松木 容彦 | 財団法人 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 |
| 研究協力者 | 斉藤 貢一 | 埼玉県衛生研究所 専門研究員 |
| 研究協力者 | 菅原 幸雄 | コスモ総合研究所 主査 |
| | 石塚 昌宏 | コスモ総合研究所 主査 |

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、ヒト試料の他に環境試料としてハウスダストや土壌への適用性について検討した。そのために、環境試料中に比較的多量に存在するダイオキシン異性体及び農薬成分や多環芳香炭化水素類 (PAHs) と、本研究で開発した ELISA 抗体との交差反応性を調べたところ、いずれも反応率は極めて低く、本研究の ELISA 抗体はこれらの化学物質からの影響を受けにくいことがわかった。

ハウスダストについては、抽出操作の簡便・迅速化を目的として高速溶媒抽出法 (ASE) とソックスレー抽出法を比較検討し、クリーンアップ操作としてアルカリ分解法や多層シリカゲルカートリッジ法の適用とその実用性について比較検討した。

更に、昨年度までに本研究において開発研究してきた ELISA 法を用いて、ハウスダストや土壌を試料とした測定を行い、ELISA 測定値と GC/MS 測定値 (TEQ) とを比較したところ、両者の間には良好な相関が示されたことにより、本研究で開発された ELISA が生体試料 (母乳) 中ダイオキシン測定方法としてだけでなく、環境試料分析にも十分な実用性があることが確認された。

A. 研究目的

廃棄物の焼却などにより非意図的に生成されたダイオキシン類が生態系や食物を汚染し、食物連鎖からヒトへの曝露と、更に、母乳を介して次世代へ汚染が拡大していることが懸念されている。このことから、本研究においては、これまで母乳を対象とし

たダイオキシン類の簡便・迅速な測定法として ELISA を検討し、一定の成果を上げてきた。

しかし、ダイオキシン曝露による生体への影響調査及び対策を検討する際には、その曝露経路も含めて調査・検討する必要がある。そこでこれまでに本研究で開発して

きた ELISA を用いて、母乳以外の試料への適用性を試みることにした。特にハウスダストからの曝露については、これまでほとんど検査・報告例がないこと、更に室内環境からの曝露、特に、新生児や幼児など若年齢層は、室内で過ごす生活時間が長く、しかも成人に比べて室内の床に近い空間で過ごすことから、ハウスダストからの曝露影響の実体を調査することは重要であり、急務である。

そこで本年度の研究では、開発した ELISA がハウスダストや土壌などの環境試料の測定に適用できるよう、試料からの抽出法やクリーンアップ法を検討するとともに、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た。

B. 研究方法

B-1 ELISA での測定

B-1-1 交差反応性検討実験

1,3,6,8-TCDD と 1,3,7,9-TCDD および多環芳香族炭化水素類 (PAHs) 12 種類について交差反応性の実験を行った。各化合物濃度が $5\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように Triton X-100 を含有した DMSO 溶液に溶解した。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。

B-1-2 ELISA 測定手順

昨年度の研究で検討したドライプレートを用いて間接競合 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)をプレートの各 Well に $25\mu\text{L}$ 添加する。
- ②サンプルおよび標準液(TMDD)を各 Well に $25\mu\text{L}$ 重層添加する。

③更に、抗マウス抗体液を各 Well に $50\mu\text{L}$ 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抗マウス HRP 標識抗体を各 Well に $100\mu\text{L}$ 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 $100\mu\text{L}$ 添加する。

⑩室温で 20 分間静置

⑪反応停止液を各 Well に $50\mu\text{L}$ 添加する。

⑫吸光度 450nm で測定する。

各化合物の検量線を作成し、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。

交差反応性(%) = $(\text{IC}_{50} \text{ of TMDD} / \text{IC}_{50} \text{ of the cross-reacting compound}) \times 100$

B-2 ハウスダストからの抽出(ソックスレー抽出および ASE)

一般家庭で使われている掃除機の集塵バッグから集めたハウスダストを 2 段の篩い (1mm , $75\mu\text{m}$) にかけて、比較的大きな固形物と微粉末を取り除き、 $75\mu\text{m}-1\text{mm}$ の大きさの物をハウスダスト試料とした。ソックスレー抽出では、試料 5g をトルエンで 16 時間、還流抽出させ、ASE では、抽出溶媒にトルエンを用い、 150°C 、 2000psi で、1 試料について 3 サイクル抽出操作を行った。各抽出液をロータリーエバポレーターで濃縮してトルエンを留去し、油状の粗抽出残渣を得た。この油状残渣の重量を量り、ハウスダスト中の脂質量とした。

B-3 クリーンアップ

B-3-1 アルカリ分解法

抽出した脂質に 1N-KOH/EtOH 40mL を加えて攪拌し、更に室温で一夜放置してアルカリ分解を行った。これに n-ヘキサン 40mL と水 40mL を加えて振とう抽出を行い (2 回)、n-ヘキサン層を脱水・濃縮後、3 層硫酸シリカゲルカートリッジ (シリカゲル 0.5g, 44%硫酸シリカゲル 2g, シリカゲル 1g ; Supelco 製) 処理を行った。

B-3-2 多層シリカカートリッジによる簡易クリーンアップ法

抽出した脂質を n-ヘキサン少量で溶解し、これを予め n-ヘキサンで十分に洗浄したプレパ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 ; Fig.1) に負荷した。n-ヘキサン 160mL で溶出させた。

ELISA 測定に際しては、上記の前処理を行った溶液を窒素パージにより溶媒留去した後、Triton X-100 を含有した DMSO を加えて再溶解し、ELISA 用試験溶液とした。

同一試料を GC/MS で測定する際には、抽出脂質を二分し、ダイオキシン類の安定同位体(¹³C)をサロゲートとして添加して上記アルカリ分解法または多層シリカカートリッジ法を行い、更にそれぞれ活性炭シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行った。

B-4 土壌試料の前処理 (抽出・クリーンアップ)

試料は、土壌約 50g 程度をソックスレー抽出し、抽出液の 1/2 量を GC/MS データ用に 1/4 量を ELISA 用に使用した。

GC/MS データ用の分析は、「ダイオキシン

類に係る土壌調査測定マニュアル」(平成 12 年 1 月環境庁水質保全局土壌農薬課)に従った。一方、ELISA 用の分析は、抽出液を 0.5mL 程度まで濃縮し、これを予め n-ヘキサンで十分に洗浄したプレパックタイプの 4 層シリカゲルカラム (SUPELCO 社製) に負荷した。n-ヘキサン 60mL で溶出・濃縮させた後、少量の n-ヘキサンでスピッツ管に洗い込み、窒素パージにより溶媒を留去させ、Triton X-100 を含有した DMSO を加えて再溶解し、ELISA に供した。

B-5 GC/MS 測定

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 (TEQ) は、WHO-TEF(1998)を用いて算出した。

C. D. 研究結果及び考察

C-1 交差反応性の検討

表 1 に今回検討した 1,3,6,8-TCDD と 1,3,7,9-TCDD 及び昨年度に確認した異性体を含む 29 種類の交差反応率を示した。PAHs 12 種類との交差反応率は図 1 に示した。1,3,6,8-TCDD と 1,3,7,9-TCDD は、廃棄物焼却過程で発生するほかに、農薬製造での副産物由来の異性体であることが知られている。これらの異性体は生体試料では代謝されてしまい、殆ど存在しない異性体ではあるが、環境試料中には比較的多量に存在する。そこで、開発した ELISA キットが生体試料だけでなく、環境試料へも適用可能かどうかを確認する目的で、ハウスダストや土壌中に混入してくる可能性のある

農薬由来の成分や PAHs 成分との交差反応性を検討した。その結果、1,3,6,8-TCDD と 1,3,7,9-TCDD に対しては 2% 以下と低い反応率を示し、PAHs の 12 種類に対しては、いずれも反応率は 0.01% 以下を示し、ハウスダストや土壌試料についてこれら異性体等の影響を受けにくいことがわかった。

C-2 ハウスダストからの抽出方法

ハウスダストは、風や衣服について運ばれてきた大気降下物や土壌など屋外由来の物や、室内カーペットや衣服などの繊維くず、ヒトや動物から剥がれ落ちた皮膚、垢、毛等の動物性組織など、複雑なマトリックスから構成されている。そこで環境試料からの抽出法として有効とされているソックスレー抽出法と、近年、迅速な抽出法として注目されている ASE について脂質の抽出効率およびダイオキシン異性体濃度に関して比較検討した。その結果、何れの試料においても脂質含有率は、約 6% 程度であった。ダイオキシン濃度については、TEF のある 29 種類のダイオキシン異性体の総量（実測濃度）と TEQ を図 2, 3 に示した。実測濃度で比較すると、ASE ではソックスレー抽出法に比べて若干低い値を示したが、TEQ では各抽出法とも、ほぼ同程度を示した。このことから、ハウスダストからのダイオキシン類の迅速抽出法として ASE が使用可能であると思われる。

C-3 ハウスダストのクリーンアップ法

これまでに本研究で検討してきた、母乳分析におけるアルカリ分解と 3 層硫酸シリカゲルカートリッジを組み合わせたクリーンアップ方法は、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 n-ヘキサンによる液液分配抽出も必要とした。そこで、昨年度の研究で母乳抽出脂肪のクリーンアップ法として検討した、多層シリカカートリッジを用いて、更に簡便なクリーンアップ法として、抽出した脂質をアルカリ分解することなく、直接、多層シリカカートリッジで処理する方法について検討した。更に、比較のため、上記のアルカリ分解法についても別のハウスダスト試料で行い、それぞれサロゲートの回収率や GC/MS クロマトグラムへの影響について比較検討した。

ハウスダストから抽出した脂質を少量の n-ヘキサンに溶解し、直接このカートリッジに負荷したところ、脂質重量が 1.5 g 程度までならば、カートリッジ内の充填剤で脂質等の夾雑物の分解除去が可能なことがわかった。この多層シリカゲルカートリッジ処理後に活性炭カラム処理を行い、GC/MS 分析によりサロゲートの回収率を調べたところ、アルカリ分解-3 層硫酸シリカゲルカートリッジ処理方法と比べて、ほぼ同等な良好な回収率が得られた（表 2）。

C-4 GC/MS 法との相関

C-4-1 ハウスダスト

ハウスダスト試料 3 検体について、従来の GC/MS 測定と、ELISA による測定値との比較検討した。試料の前処理法は ASE 抽出後、多層シリカカートリッジによるクリーンアップを行った。今回の測定データは検体数が少ないものの、図 4 に示したように、両者の間には良好な相関性が認められた。このことから、本研究で開発したハウ

スダストの前処理方法が GC/MS 法のみならず、ELISA 測定に際しても十分に実用的であることが確認された。

C-4-2 土壌試料

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 ELISA を検討し、ほぼ満足できる結果を得ることができた。そこで、我々が開発した ELISA が、環境試料にも適用可能かどうかを確認するために、埼玉県環境科学国際センターとの共同により、最近、特に話題となっている工場跡地などの土地のリスク評価をターゲットに土壌を試料として検討することとした。その結果、図 5 に示したように、土壌試料においても GC/MS 法と良好な相関を示すことが確認された。回帰直線の傾きが、母乳の場合に比べ低くなったのは、抗体が一番強く反応する 2,3,7,8-TCDD 量の占める割合が母乳ほど多く寄与していなかったためと推察された。前処理操作の簡便化では、GC/MS データ用では、通常 1 週間程度の前処理を必要としたが、ソックスレー抽出+4 層シリカゲルカラムで測定できることが確認され 3 日に短縮することができた。また、試料量の面でも、昨年度報告した市販キットの性能評価では、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、比較的高濃度試料をターゲットにした。そのため、低レベルの残留ダイキシンを検出することは困難であり、試料量を要する可能性が高かったが、我々が開発した ELISA は、既に母乳中ダイオキシンを検出することが可能なことから、土壌の試料量を少なくしても検出することができ(約 12g 程度)、環境試料(土壌)についても適用可能であることを

確認できた。

E. 結論

本研究においては、当研究班で開発してきた ELISA の環境試料分析への適用性を検討するために、環境試料特有の農薬副産物由来のダイオキシン異性体や PAHs などの交差反応性を調べ、これらの化学物質からほとんど影響を受けないことを確認した。

また、環境試料としては、ヒトの生活環境との接点が大きく、生体への影響が危惧されるハウスダストと土壌を対象とし、ハウスダストにおいては、簡便・迅速な抽出・クリーンアップ法として、ASE と多層シリカカートリッジ法を検討し、他方、土壌においてもプレパックの 4 層シリカゲルカラムによる簡便な方法を検討し、それぞれ良好な結果が得られた。

更に、ハウスダストと土壌試料において、GC/MS 法と ELISA 測定値の間に良好な相関が示されたことにより、本研究で開発された ELISA が生体試料(母乳)中ダイオキシン測定方法としてだけではなく、環境試料分析にも十分な実用性があることが確認された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表(学会発表、論文発表)

G-1 Hiroyuki Nakazawa, Koichi Saito, Mikiko Takekuma, Masahiko Ogawa, Susumu Kobayashi, Yukio Sugawara, Masahiro Ishizuka, and Yasuhiko Matsuki: Development of Dioxin Toxicity

Evaluation Method in Human Milk by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (part IV: A Study on Simplification of Pretreatment), 21st International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants & POPs, Kyongju, Korea, September 9-14, (2001).

G-2 Masahiro Ishizuka, Yukio Sugawara, Koichi Saito, Mikiko Takekuma, 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 V: A Study on Improvement of Stability), 21st International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants & POPs, Kyongju, Korea, September 9-14, (2001).

G-3 Koichi Saito, Mikiko Takekuma, Masahiko Ogawa, Susumu Kobayashi, Yukio Sugawara, Masahiro Ishizuka, Hiroyuki Nakazawa and Yasuhiko Matsuki : Study of Extraction and Cleanup Method of Dioxins in House Dust, 21st International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants & POPs, Kyongju, Korea, September 9-14, (2001).

G-4 石塚昌宏, 細野繁雄, 斉藤貢一, 肥後麻衣, 山崎哲男, 長森正尚, 杉崎三男 : 環境科

学会 2001 年会 (山梨), 2001 年 10 月 ; タイトル : 酵素免疫学的手法による土壌試料中のダイオキシン類の測定

G-5 Yukio Sugawara, Koichi Saito, Masahiko Ogawa, Susumu Kobayashi, Guomin Shan, James R. Sanborn, Bruce D. Hammock, Hiroyuki Nakazawa, Yasuhiko Matsuki, " Development of dioxin toxicity evaluation method in human milk by enzyme-linked immunosorbent assay-validation for human milk" , Chemosphere., accepted(2001)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

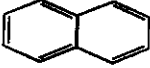
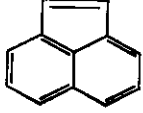
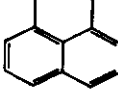
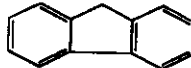
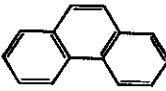
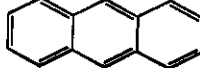
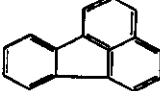
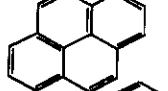
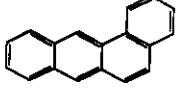
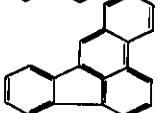
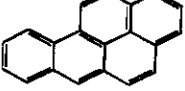
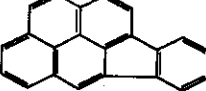
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

| 化合物名 | 構造 | 化合物名 | 構造 |
|----------------------|---|--------------------------|---|
| Naphthalene |  | Acenaphthylene |  |
| Acenaphthene |  | Fluorene |  |
| Phenanthrene |  | Anthracene |  |
| Fluoranthene |  | Pyrene |  |
| Benzo [a] anthracene |  | Benzo [b] fluoranthene |  |
| Benzo [a] pyrene |  | Indeno [1,2,3-cd] pyrene |  |

—交差反応率は全て 0.01%以下—

図 1. 多環芳香族炭化水素類 (PAHs) に対する交差反応率

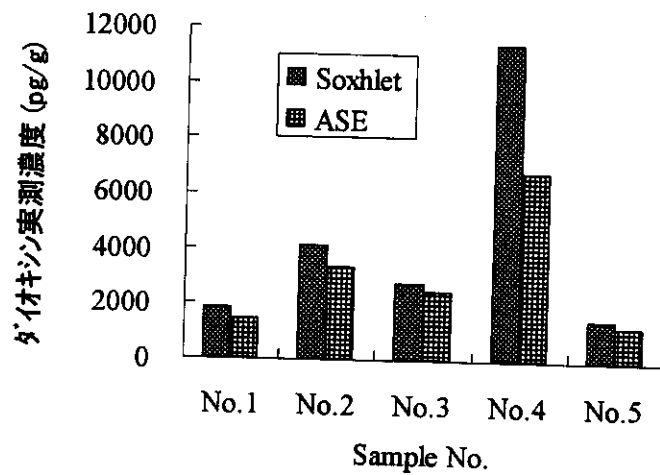


図2. ソックスレー抽出法とASE法とのダイオキシン実測濃度の比較

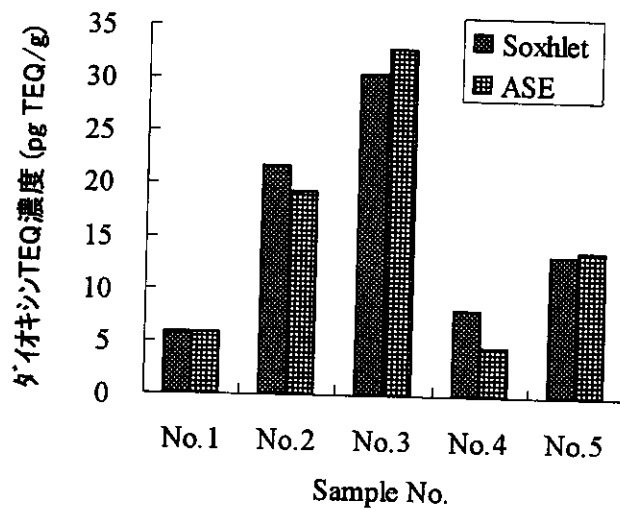


図3. ソックスレー抽出法とASE法とのダイオキシンTEQ濃度の比較