

図17. ハウスダスト分析におけるELISAとGC/MS測定値との相関

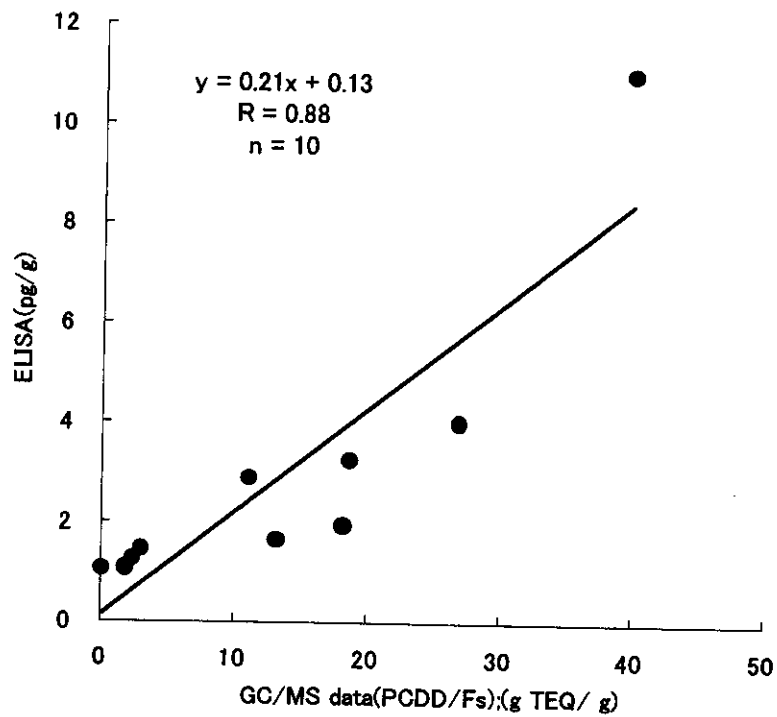


図 5. 土壌中ダイオキシン分析における GC/MS データと ELISA データとの相関

表 1. 交差反应率

Dioxin Isomers	TEF	交差反应率(%)
TMDD		100
1-CDD		< 0.01
2,7-DiCDD		1.03
2,3,7-TriCDD		27
1,3,7,8-TeCDD		48
1,2,3,4-TeCDD		0.01
1,3,6,8-TeCDD		1.8
1,3,7,9-TeCDD		0.6
2,3,7,8-TeCDD	1	174
1,2,3,7,8-PeCDD	1	65
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.1	1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.1	3
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.1	2.9
1,2,3,4,6,7,8-HeCDD	0.01	1
OCDD	0.0001	0.004
1,2,3,4-TeCDF		0.006
2,3,7,8-TeCDF	0.1	47.9
2,3,4,7,8-PeCDF	0.5	10.5
1,2,3,7,8-PeCDF	0.05	1.7
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.1	6.5
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.1	6.5
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.1	1.08
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.1	0.42
1,2,3,4,6,7,8-HeCDF	0.01	0.14
1,2,3,4,7,8,9-HeCDF	0.01	0.18
OCDF	0.0001	< 0.01
3,3',4,4'-TeCB	0.0001	0.11
3,3',4,4',5-PeCB	0.1	< 0.01
3,3',4,4',5,5'-HxCB	0.01	< 0.01

表2. ハウスダスト試料前処理操作(アルカリ分解法と多層シリカカートリッジ法)のダイオキシン類回収率の比較

	アルカリ分解法		多層シリカカートリッジ法	
	回収率 (%)		回収率 (%)	
	平均値 (n=5)	範囲	平均値 (n=5)	範囲
PCDD/Fs	74.0	66.0 - 78.3	89.6	75.6 - 90.8
Co-PCBs	78.1	53.3 - 90.1	94.4	88.2 - 99.7
PCDD/Fs & Co-PCBs	76.2	64.5 - 82.3	92.2	86.7 - 98.8

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
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 齊藤貢一

(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マル抗体を用いるELISAにおける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	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、ヒト試料における毒性評価法としての有用性について検討した。本年度の研究では、昨年度に引き続いて主に母乳を測定対象試料とした、前処理操作におけるクリーンアップ法を検討した。その結果、市販のディスポーザブルタイプの多層カートリッジとアルミナカートリッジを連結させたカラムを用いることで、より簡便で良好なクリーンアップが可能となった。

更に、実際に母乳を試料として、本研究で開発したELISAおよびGC/MS法を用いて同一試料を測定し、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性が得られた。この試料はダイオキシンを添加した擬似試料ではなく、実際の母乳を用いた測定結果であることから、本研究で開発されたELISAが母乳中ダイオキシン測定方法として十分な実用性があることが確認された。

A. 研究目的

ダイオキシンによる生態系や食物への汚染とそれらによって引き起こされるヒトの健康影響に対する社会的関心は高く、ヒトへの曝露とその汚染実態を把握することは行政上の急務かつ重点課題である。ダイオキシン分析においては、測定の信頼性確保のために適切な測定方法の確立と精度管理態勢の整備が不可欠であるが、一方で迅速なスクリーニングを目的とした簡易分析法のニーズが高まっており、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酵素免疫測定法(ELISA)を検討してきた。本研究においてはヒト生体試料中ダイオキシンの簡便で迅速かつ高感度なELISAを確立し、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ている。

本年度の研究においては、前年度までに構築したELISAを基盤として、実試料(母乳)を対象として、特別な実験室や装置を用いることなく、簡便で効果の高いクリーンアップ法を確立し、更に、最終段階とし

て GC/MS 法との相関を調査して、本分析法の実用性を確認することを目的とした。

B. 研究方法

B-1 ELISA 用試験溶液の調製

図 1 に示したフローチャートに従って母乳から脂肪を抽出し、重量を測定した後、再び n-ヘキサン 2-3mL で脂肪を溶解した。多層シリカカートリッジ (GL サイエンス社製) と塩基性アルミナカートリッジ (Waters 社製; Sep-Pak Alumina(B) Plus) を上下の順で連結し、予め n-ヘキサンでカラムを洗浄した後、n-ヘキサン溶解した脂肪を負荷した。連結カートリッジの上部から n-ヘキサン 160 mL を流した後、上部の多層シリカカートリッジをはずし、アルミナカートリッジを 60% ジクロロメタン/n-ヘキサン 7 mL で溶出した。窒素パージにより溶媒を留去した後、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。

B-2 ELISA 測定

前年度に検討して、その性能評価を行った ELISA 用ドライプレートを作製し、測定に用いた。測定手順を以下に示す。

- ① サンプル調製液 (PBS) をプレートの各 Well に 25 μ L 添加する。
- ② サンプルおよび標準液 (TMDD) を各 Well に 25 μ L 重層添加する。
- ③ 更に、抗ダイオキシン抗体液を各 Well に 50 μ 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 抗ウサギ HRP 標識抗体を各 Well に 100

μ 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 μ L 添加する。
- ⑩ 室温で 20 分間静置する。
- ⑪ 反応停止液を各 Well に 50 μ L 添加する。
- ⑫ 吸光度 450nm で測定する。

各異性体の検量線を作成し、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 (%) = (IC₅₀ of TMDD / IC₅₀ of the cross-reacting compound) × 100

B-3 GC/MS 用試験溶液の調製

ELISA 用試験溶液調製法と同様に脂肪を抽出した後、サロゲートを添加し、多層シリカカートリッジ、活性炭埋蔵シリカゲルカラム (和光純薬製) でクリーンアップを行い、窒素パージで溶媒を留去し、シリンジスパイクを加えて定容後、試験溶液とした。図 2 にフローチャートで概略を示した。

B-4 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はそれぞれ fat basis で計算し、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 クリーンアップ法の検討

1-1 多層シリカカートリッジからの PCDD/Fs と Co-PCBs の溶出パターン

多層シリカカートリッジに PCDD/Fs と ノンオルト Co-PCBs を負荷し、n-ヘキサンで溶出させて 40mL ずつのフラクションを分取し、回収率から各異性体の溶出パターンを調べた。その結果、図 3 に示したように、いずれのダイオキシン類も n-ヘキサン 160mL 以内で溶出されることがわかった。

1-2 多層シリカカートリッジにおける脂肪最大負荷量の検討

多層シリカカートリッジを用いたクリーンアップは、母乳脂肪中の脂質成分や色素成分など、マトリックス由来の共存物質を効果的に除去することができる有用な手段であったが、実際の母乳における脂肪含有率は、1%に満たないものから 10%を超えるものもあり、個人差が大きい。そのため、多層シリカカートリッジの処理能力を超えることがしばしば見受けられた。そこで、多層シリカカートリッジにおける脂肪最大負荷量の検討を行った。

実際の母乳（6 検体）から抽出した脂肪（1.1g, 1.2g, 1.3g, 1.5g, 1.8g, 2.3g）を、それぞれ多層シリカカートリッジに負荷し、カートリッジ内での硫酸シリカゲル層での反応を目視することで、脂肪最大負荷量を推測した。判定の目安としては、44%硫酸シリカゲル層での褐色変化反応に余裕がある状態、すなわち、反応に伴って形成された褐色層が、最下層の KOH シリカゲル層まで到達しない状態のものを限界量と判定した。その結果、脂肪量 1.5g 以下の場合には、44%硫酸シリカ層での褐色反応部分と KOH シリカ層との間に余裕が認められた

が、脂肪量 1.8g の場合には、境界線ぎりぎりの状態であった。この結果から、多層シリカカートリッジでの脂肪最大負荷量は、1.5g と判定した。

1-3 アルミナカートリッジからの PCDD/Fs と CoPCBs の溶出パターン

昨年度に検討した、母乳分析において脂肪抽出後に多層シリカゲルカートリッジ処理を行った試験溶液の ELISA 測定では、GC/MS データ（2,3,7,8-TCDD + 1,2,3,7,8-PeCDD ; (pg/g fat)）との相関性は認められたものの、Total-TEQ との相関性が不十分であった。これは、母乳から抽出した脂肪のクリーンアップに上記の多層シリカカートリッジを用いることで、大部分の脂質成分など、共存物質を除去することが可能であったが、ELISA での測定に際しては、微量の脂質が測定結果に擬陰性に作用することがこれまでの実験で判明した。これは、ダイオキシン類は極めて脂溶性が高いことに加えて、ELISA 測定が極性の大きい DMSO-水系緩衝液中で行われるため、微量の脂質成分の混在によって、本来行われるべき抗原抗体反応が阻害されてしまうためと推察された。また、多層シリカゲル処理液中にはダイオキシン以外の非プラナーPCBやモノオルトCo-PCB類も溶出されているため、これらもできる限り取り除くことが望ましいと思われた。

そこで、従来からダイオキシン分析に用いられているアルミナに着目し、簡便な市販のカートリッジを用いたクリーンアップ法を検討した。その際、多層シリカカートリッジからの溶出液を濃縮する操作を避けて、操作をできる限り簡便化するために、

アルミナカートリッジを多層シリカカートリッジの下部に接続した。これは、アルミナがダイオキシン類との相互作用が比較的強く、*n*-ヘキサンでは溶出されないことが予想されたためである。すなわち、多層シリカカートリッジから *n*-ヘキサンで溶出されるダイオキシン類をアルミナカートリッジにトラップした後、多層シリカカートリッジを取り外し、アルミナカートリッジからダイオキシン類を溶出する方法を検討した。そこで、アルミナカートリッジでのダイオキシン類の溶出挙動を調べたところ、PCDD/Fs とノンオルト Co-PCBs はいずれも *n*-ヘキサン 160mL 以内には溶出されず、続いて 60%ジクロロメタン/*n*-ヘキサン 5mL 以内で溶出されることがわかった。そこで実際の溶出には余裕を考慮して 7mL で溶出することにした。

これまでに、ELISA による母乳中ダイオキシン分析の前処理方法については、① 脂肪抽出+アルカリ分解+3 層硫酸シリカゲルカートリッジ法、② 脂肪抽出+多層シリカゲルカートリッジ法と検討してきたが、今回検討した方法ではアルカリ分解操作を省き、カートリッジタイプのカラムを使用することで ELISA に適した前処理方法を開発することができた。

C-2 ELISA による実試料分析 (GC/MS 分析データとの相関)

ELISA 及び GC/MS 法で測定した母乳 7 検体の結果を図 4, 5 に示した。GC/MS データにおいて TEQ (PCDD/Fs) 及び Total-TEQ のいずれも良好な相関性 ($r = 0.947 \sim 0.950$) が得られた。

なお、ELISA での実測値は、GC/MS で

測定した TEQ 値に比べて低めの値を示したが、これは GC/MS では、母乳から検出されるダイオキシン類 (PCDD/Fs とノンオルト Co-PCBs) の異性体を全て算出・合計しているのに対して、ELISA ではその交差反応性の特性から、主に 2,3,7,8-TCDD と 1,2,3,7,8-PeCDD の 2 種類の異性体に強く反応すること、更に GC/MS 法ではクリーンアップに際してサロゲートを添加することで回収量を補正しているが、ELISA ではそれができないため、回収率が低い場合には測定値が低めに出ってしまうためと推察された。

E. 結論

本研究においては、ELISA による高感度かつ簡便な生体試料中ダイオキシンの測定法を確立し、ヒト試料における毒性評価法としての有用性について検討した。最終年度となる本年度では、これまでに検討してきた ELISA を基盤として、更に母乳を対象とした簡便・迅速な前処理方法を開発した。本研究で開発したクリーンアップ操作は、市販のディスポーザブルタイプのカートリッジ (多層シリカカートリッジ及び Sep-pak Alumina Plus) を用いることで、従来の GC/MS 法のように特殊な実験室を用いることなく、また特別な専門技術を用いることなく、各種のフィールドでの使用が可能となった。

また、実試料 (母乳) を対象として ELISA 法と GC/MS 法とを比較検討したところ、両者の測定データには良好な相関があることが認められた。このことにより、本研究で開発した ELISA に十分な実用性があることが再確認された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (学会発表及び論文発表)

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, Gyeongju, 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 IV: A Study on Improvement of Stability), 21st International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants & POPs, Gyeongju, Korea, September 9-14, (2001).

G-3 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

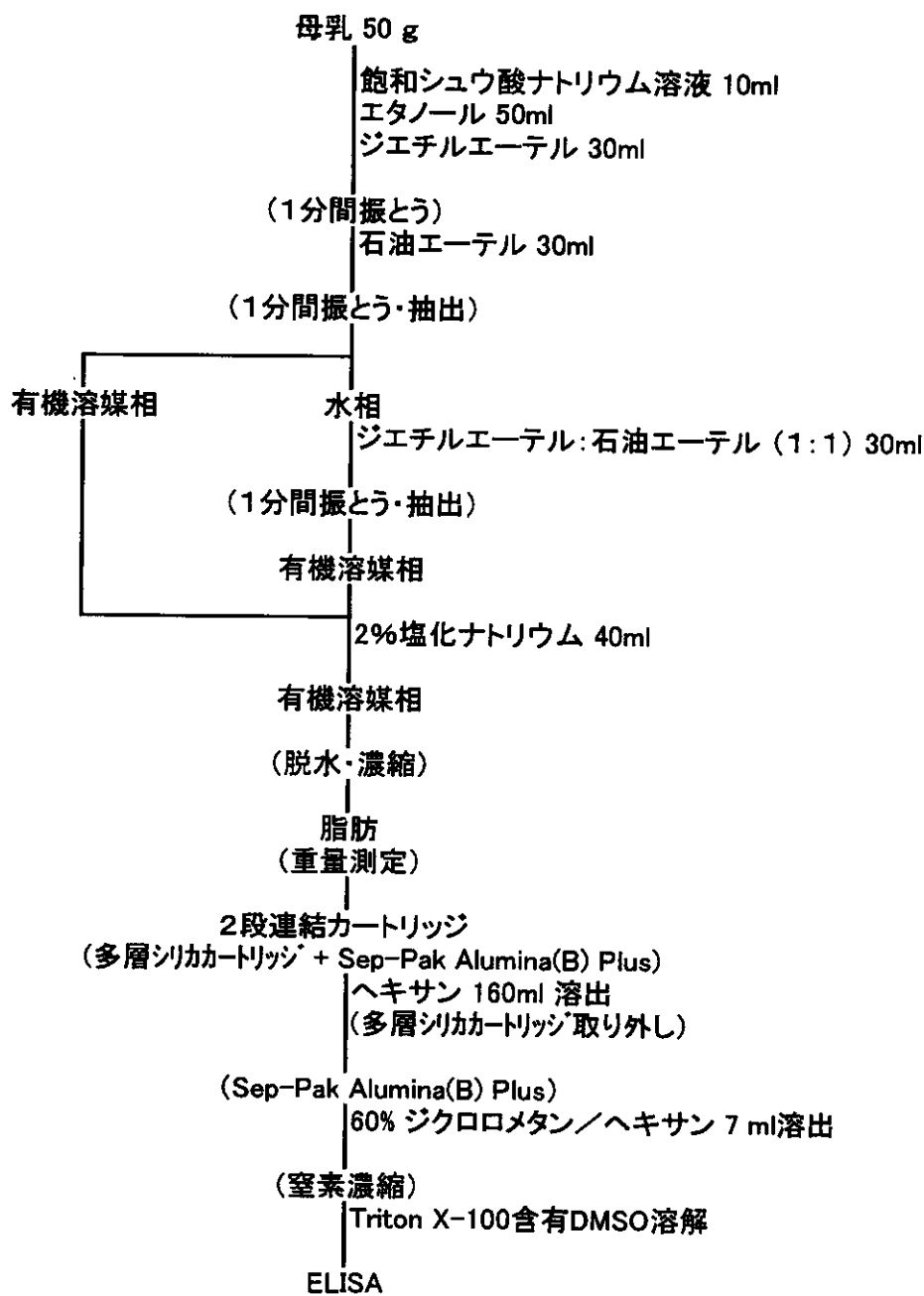


図1 ELISA用試験溶液調製フローチャート

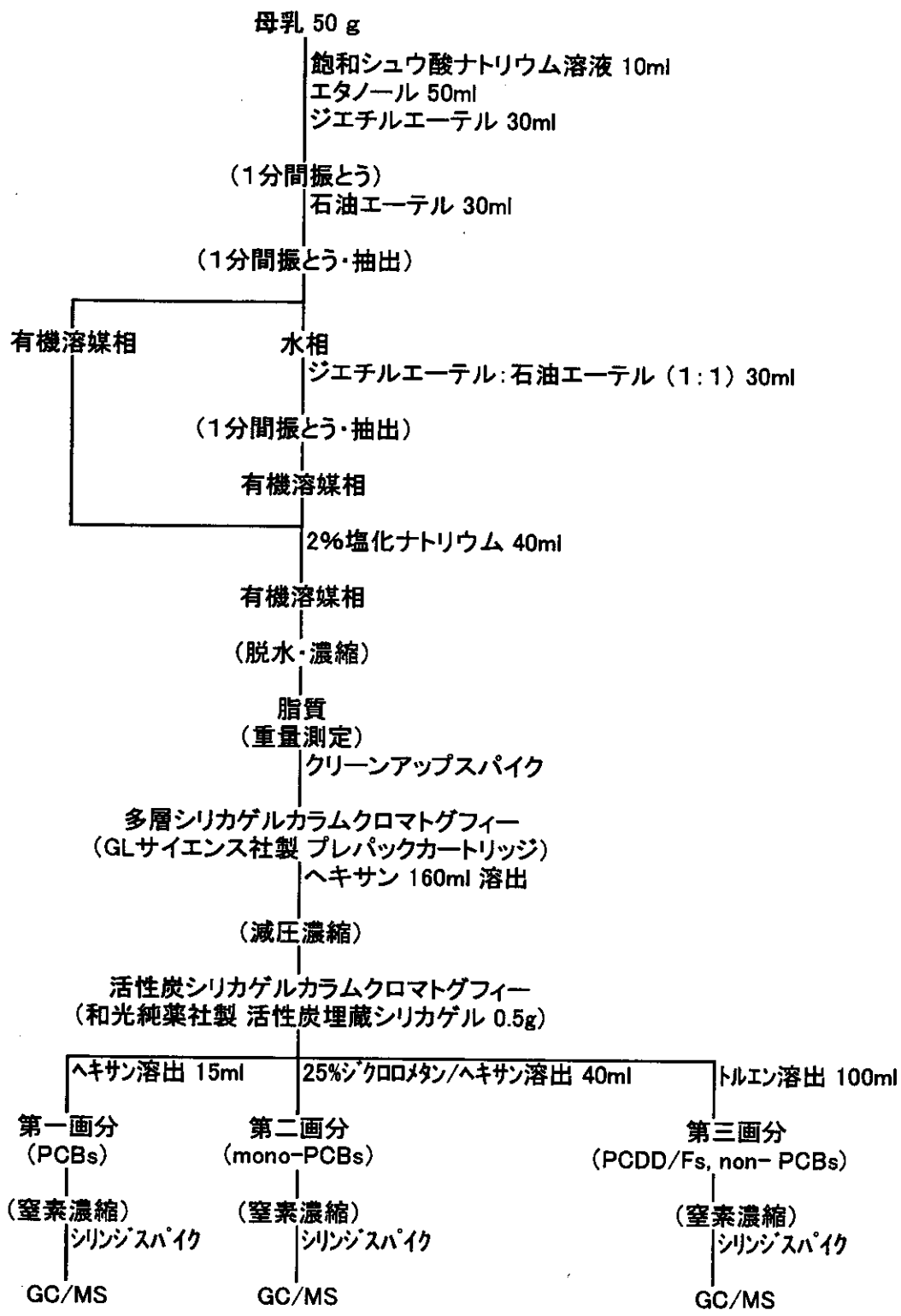


図2 母乳中ダイオキシン分析フローチャート

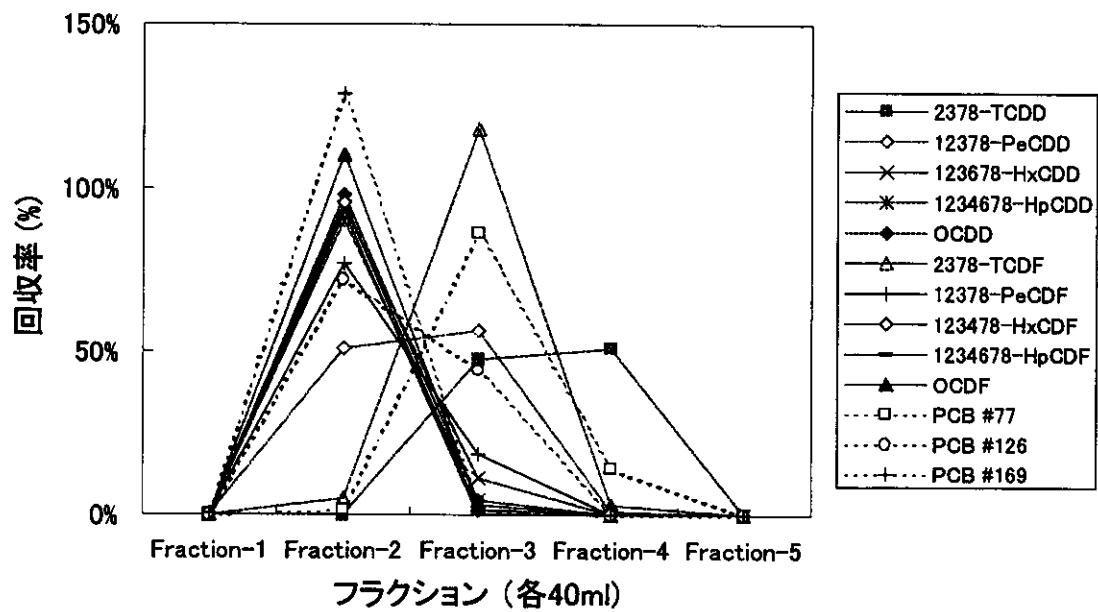
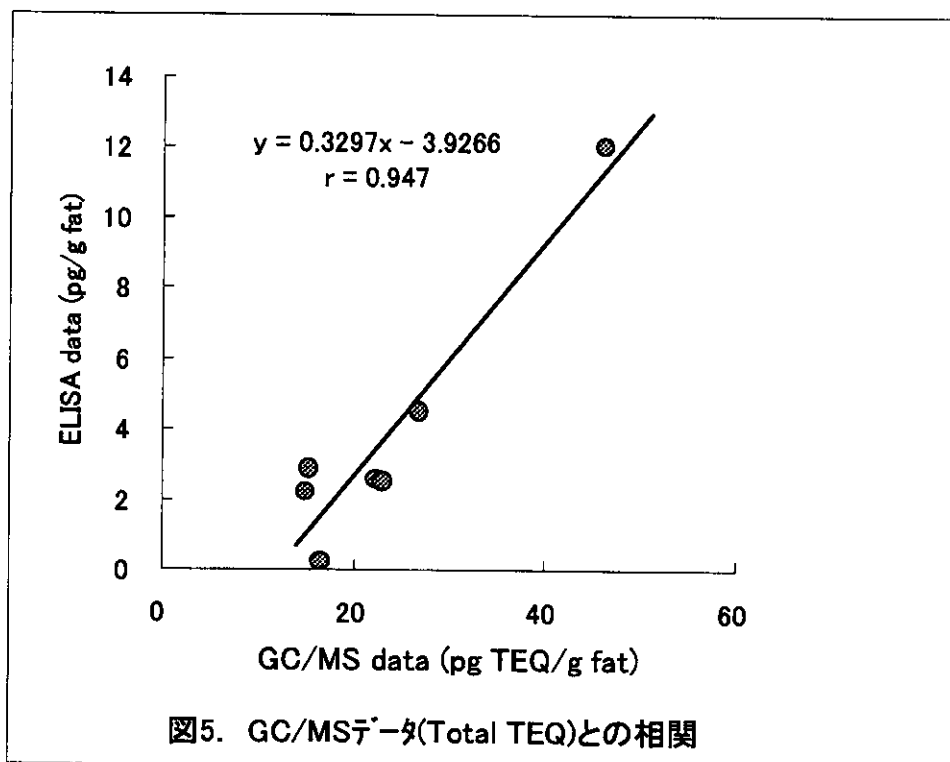
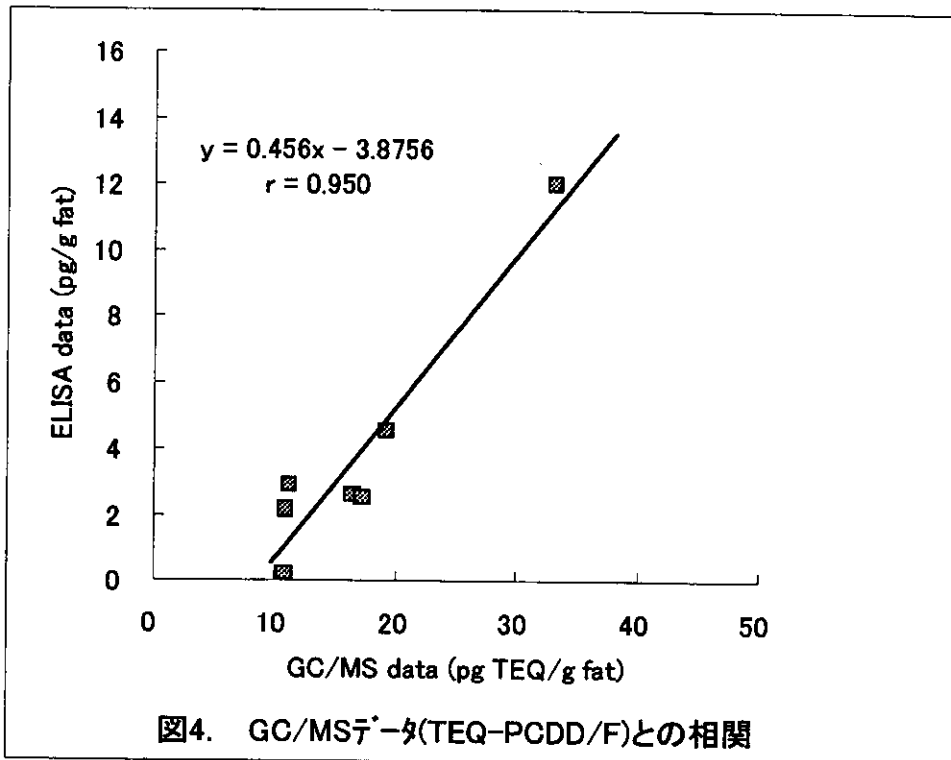


図3. 多層シリカゲルカートリッジからのPCDD/FsとCo-PCBsの溶出パターン



分担研究報告書

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

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免疫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 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法の確立と実用性の検討ー

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 研究員

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免疫アッセイ法 (ELISA) の開発を目的として、モノクローナル抗体を用いる ELISA および ELISA に供するための生体試料の前処理法を検討した。

昨年度構築した ELISA について、新規の酵素標識ハプテンとの組合せと ELISA の諸条件を詳細に検討し、2,3,7,8-TCDD 1~100 pg/assay の感度を有する系を確立した。一方、生体試料の前処理としては、脂肪をアルカリおよび酸で分解後、固相抽出カラムおよび免疫アフィニティー抽出と逆相系ポリマーカラムの併用による精製法を検討し、ELISA に供するための前処理法を確立した。バターを例として、ダイオキシンを添加した試料を固相抽出法で精製後、ELISA と GC/MS により測定した結果、両測定値には良好な相関がみられたことから、本方法は簡便でかつ安価なダイオキシン類のモニタリング法となり得ることが示された。

一方、ポリ塩素化ダイオキシン類と同様、ポリ臭素化ダイオキシン類は強い毒性を有することが知られているが、その汚染実態等は解明されていないことから、これらの簡便、高感度な測定法として ELISA を開発すべく、抗体調製に必要なハプテンとそのタンパク結合物を調製した。

A. 研究目的

化学物質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、とりわけ、極めて強い毒性を有するダイオキシン類による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/マススペクトロメトリー (GC/MS) が用いられているが、測定には長時間を要し、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、ヒト生体試料中のダイオキシン類の酵素免疫アッ

セイ法 (ELISA) を確立し、ヒトでの汚染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、その前年に確立したポリクローナル抗体を用いた ELISA を基盤として、モノクローナル抗体を用いた ELISA を構築した。本年度は、この ELISA の高感度化、ELISA に供するための試料の調製法および ELISA と GC/MS による測定値の相関を検討した。また、ポリ塩素化ダイオキシン類とともにその汚染の実態の把握が必要と考えられているポリ臭素化ダイオキシン類の ELISA を検討すべく、ハブテンの合成とそのタンパク結合物を調製した。

B. 研究方法

1. 臭素化ダイオキシンハブテンの合成とタンパク結合物の調製

まず、目的のハブテンを合成するための母核となる 1-amino-3,7,8-tribromodibenzo-*p*-dioxin を、4,5-ジプロモカテコールと 2,5-ジプロモ-1,3-ジ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させ生成したエステル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側鎖をダイオキシン骨格の C-1 に導入したハブテンを合成した。これらハブテン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。

2. モノクローナル抗体を用いる ELISA の検討

昨年度構築したモノクローナル抗体を

用いる ELISA をより高感度とするために、新規の酵素標識ハブテンとの組合せおよび抗原抗体反応の諸条件を詳細に検討した。すなわち、新規の酵素標識ハブテンには、昨年度用いたハブテンの C-2 の脱塩素体をハブテンとして調製したものを用いた。また、ELISA については、抗原抗体反応の反応時間、反応温度、ウエルへの添加順などを検討した。

3. 生体試料の前処理法の検討

ELISA に供するための生体試料の前処理法を、バターを例として検討した。すなわち、生体試料の脂肪をアルカリおよび酸で完全に分解した後、固相抽出カラムあるいはイムノアフィニティー抽出と逆相系ポリマーカラムの併用による精製法を検討した。各クリーンアップ法によるダイオキシンの回収率を GC/MS で調べ、さらに、固相抽出カラムにより精製した試料について ELISA と GC/MS による測定値の比較を行い、相関を調べた。

また、母乳を従来の方法により処理して得られる精製試料には、ELISA の妨害物質が含まれていることから、この妨害物質を化学的に変換して除去する方法を検討した。

C. D. 研究結果および考察

1. 臭素化ダイオキシンハブテンの合成とタンパク結合物の調製

3,7,8-Tribromodibenzo-*p*-dioxin の C-1 に、スパーサー部にアミド結合を、その末端のカルボキシル基を有する側鎖を導入したハブテンを 3 種合成した。これらの構造は、NMR、IR 等により確認し

た。さらに、これらハプテンの BSA 結合物を調製した。

2. モノクローナル抗体を用いる ELISA の検討

昨年度構築したモノクローナル抗体を用いる ELISA について、新規の酵素標識ハプテンとの組合せで抗原抗体反応の諸条件を詳細に検討した結果、2,3,7,8-TCDD 1~100 pg/assay の標準曲線を作成できた。

3. 生体試料の前処理法の検討

ELISA に供するための生体試料の前処理法を、昨年度に引き続いて、バターを例として検討した。その結果、バターをアリカリおよび酸で処理後、固相抽出カラムに付すことにより、ELISA に供することのできる試料を調製できた。本精製法による 2,3,7,8-TCDD および 1,2,3,7,8-PeCDD の回収率は良好であり、また、ELISA と GC/MS による測定値には良好な相関が見られた。上記の固相抽出の代りに、イムノアフィニティー抽出と逆相系ポリマーカラムの併用による精製法でも ELISA に供することのできる試料を調製でき、その回収率も比較的良好であった。

母乳を従来法により前処理した試料にはコレステロールが含まれ、ELISA によるダイオキシン測定を妨害する。そこで、ダイオキシンとコレステロールの画分を酸化後、オキシムに導き、続いて塩基性条件下ヘキサン抽出することにより大部分のコレステロールを除去することができた。

E. 結論

臭素化ダイオキシンハプテンを 3 種合成

し、その BSA 結合物を調製した。これらを抗原として用いることにより、臭素化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。

昨年度構築したモノクローナル抗体を用いるダイオキシン類の ELISA について、アッセイ系と反応条件に改良を加え、高感度な ELISA を確立した。さらに、この ELISA に供することのできる生体試料の簡便な前処理法を確立した。これらの方法により得られた試料の ELISA と GC/MS の測定値の相関は良好であることから、本方法はダイオキシン類のモニタリング法となり得るものと期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 奥山光伸、松木容彦、中澤裕之：ダイオキシン分析における酵素免疫測定法の役割、食品衛生学雑誌 第 42 巻 (4)、J233-238、2001

2. 学会発表

- 1) 奥山光伸、遠藤和香子、安生孝子、松木容彦、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
- 2) M.Okuyama, W.Endo, T.Anjo, A.Kambegawa, N.Kobayashi, J.Goto, Y.Matsuki : Enzyme-Linked

Immunosorbent Assay for Dioxins
Based on Monoclonal Antibodies, 21th
International Symposium on
Halogenated Environmental Organic
Pollutants and POPs, September 9-14,
2001, Gyeongju, Korea

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

協力研究報告書

モノクローナル抗体を用いる酵素免疫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

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）
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
ーモノクローナル抗体を用いる酵素イムノアッセイ法
及び生体試料精製法の開発ー

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
	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
	堀伸二郎	大阪府立公衆衛生研究所	
	伊藤順子	相模女子短期大学	教授

研究要旨

本研究においては、モノクローナル抗体を用いるダイオキシンの酵素免疫測定法 (ELISA) および ELISA 用試料の簡便な前処理法を検討した。

ダイオキシン毒性等価係数 (TEF) と近似した交差反応性を示すモノクローナル抗体 D9-36 と新規に調製したペルオキシダーゼ (HRP) 標識ハプテン I-5-2H を用いて反応条件を詳細に検討した。抗原と抗体を室温で 30 分間反応させた後、標識ハプテンを加えて冷却化で一晩反応させることにより、測定範囲 2,3,7,8-TCDD 1~100 pg/assay の感度を有する ELISA を構築した。

また、生体試料の脂肪をアルカリ及び酸で完全に分解して固相抽出あるいはイムノアフィニティー抽出による精製法を検討し、ELISA に適用できる簡便な前処理法を確立した。ダイオキシンを添加したバターについて wakogel を用いる固相抽出法で精製し、ELISA 及び GC/MS により測定した結果、両者の値に良好な相関性がみられ、2,3,7,8-TCDD 及び 1,2,3,7,8-PeCDD の回収率は良好であった。

この前処理法を組み合わせた本 ELISA は簡便・迅速で安価なダイオキシン類のモニタリングおよびスクリーニング法となることが示された。また、イムノアフィニティー抽出法はレポータージーンアッセイなど ELISA 以外のバイオアッセイ系や簡易 GC/MS の前処理法として有用な役割を果たす可能性が示された。

A. 研究目的

化学物質による生態系や食物への汚染とそれらのヒトの健康影響は社会的関心事であり、特にダイオキシン類は強い毒

性を有すると考えられていることから、それらの汚染実態の把握は行政上の急務な課題である。従来、ダイオキシンの測定には高分解能ガスクロマトグラフィー