

／マススペクトロメトリー (GC/MS) が用いられているが、試料のクリーンアップには煩雑な操作を要するため、その測定には長い時間と高い経費がかかっている。そこで迅速なスクリーニングやモニタリングを目的とした酵素免疫測定法 (ELISA) などの簡易分析法の開発が望まれている。

本研究では母乳中ダイオキシン類のモニタリングを目的として、モノクローナル抗体を用いるダイオキシン ELISA の詳細な操作条件、ならびに ELISA に供する生体試料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：
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 *o*-フェニレンジアミン
塩酸塩：Sigma Chemical

アセトン、エタノール、メタノール
及び *n*-ヘキサン：和光純薬 ダイ
オキシン類分析用

ベンゼン：和光純薬 残留農業 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-pentachlorodibenzo-*p*-dioxin
(1,2,3,7,8-PeCDD) 及び 2,3,4,7,8-
pentachlorodibenzofuran (2,3,4,7,8-
PeCDF)：Wellington Laboratories

2) 器材

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

Wakogel P-28：和光純薬

Absolut™ NEXUS：Varian Inc

CNBr 活性化 Sepharose 4FF：
Pharmacia Biotech

Affi-Gel 10：Bio-Lad.

3) 機器

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

2. ELISA の構築

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 μ g/mL) 100 μ L を ELISA 用マルチプレートの各 well に加え、4°C で一晩放置した。抗体溶液を捨て、0.5% BSA の PBS 溶液 150 μ L 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 μ L 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 (0.01%トリトン X-100 含有) 50 μ L を各 well に加えて 4°C で一晩放置した。PBS で well を 3 回洗浄後、0.05% *o*-フェニレンジアミン及び 0.01% H₂O₂ を含む 50 mmol/L クエン酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 100 μ L を各 well に加えて室温で 30~60 分間反応後、3 mol/L 硫酸 50 μ L 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 (図 1)。

3. ELISA 条件の検討

上記 ELISA において、ダイオキシン標準液とモノクローナル抗体混合液の調製条件、つまり反応時間 (1~90 分) 及び反応温度 (室温または氷冷) について検討した。

4. 生体試料のクリーンアップ法

(固相抽出)

バターを 1mol/L KOH で加水分解して *n*-ヘキサンでダイオキシンを抽出後、濃硫酸でヘキサン相を洗浄した。次いで、約 0.1mL に濃縮したヘキサン相を wakogel P-28 (100 mg) にアプライし、ヘキサン 5mL 及びベンゼン/ヘキサン(1:9)混液 1mL で洗浄後、ベンゼン/ヘキサン(1:9)混液 3mL でダイオキシンを溶出し、トリトン X-100 を加えたのち有機溶媒を乾固して ELISA に供した (図 2)。

(イムノアフィニティー抽出)

TMDD にトリトン X-100 を加えて有機溶媒を乾固し、残渣を PBS に溶解後、平成 12 年度の本研究報告書(小林ら)に準じて作製したイムノソルベントを充填したカラムにアプライした。PBS、水及び 10%メタノールでカラムを洗浄後、95%メタノールで吸着画分を溶出した。更に、各画分 5mL (メタノール濃度を 60%以下に希釈) を逆相系ポリマー固相カラム NEXUS (60mg) にアプライした。90%メタノール 3mL で洗浄後、アセトン 3mL で溶出し、トリトン X-100 を加えたのち有機溶媒を乾固して ELISA に供した (図 3)。

5. ELISA と GC/MS 測定値の比較

バターに 2,3,7,8-TCDD 及び 1,2,3,7,8-PeCDD を添加して wakogel を用いる固相抽出法により精製した試料を、本 ELISA 及び GC/MS により測定した。GC/MS による測定は、平成 11 年度の本研究報告書(堀ら)に記載の方法により、大阪府立公衆衛生研究所で実施した。

C,D. 研究結果及び考察

ELISA の構築

モノクローナル抗体 D9-36 と HRP 標識ハ

プテン I-5-2H (図 4) との組み合わせで最も感度の良好な測定系が得られた(図 5)。

ELISA 条件の検討

構築した ELISA 系において、標識ハプテンを加える前の抗原・抗体反応時間及び反応温度を検討したところ、抗原の高濃度域では反応時間が長いほど HRP 標識ハプテンと抗体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を示した (図 6A)。また、抗原・抗体反応を室温または氷冷下で 30 分間行ったところ、室温反応で検出感度が優れていた (図 6B)。

一般にハプテン抗原に対する抗体は標識ハプテンのブリッジ部位も認識するため、抗体の標識ハプテンへの親和性はハプテン抗原に対するよりも高くなる場合が多い。本抗体も同様であり、ハプテン抗原と抗体とを先に反応させた後に標識ハプテンを加えることにより、また室温で反応させることにより測定感度が向上したことから、抗原・抗体の反応時間や標識ハプテンを加える手順及び反応温度が重要であることが示めされた。

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下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 の標準曲線が得られた (表 1、図 7)。

イムノアフィニティー抽出

3 種のモノクローナル抗体(D2-37, D9-36, D35-42)をそれぞれ Affi-Gel 10 または CNBr-Sepharose 4FF に結合させたイムノソルベントを用いたカラムに TMDD 100~200pg を負荷し、95% MeOH で溶出した時の TMDD の回収は D2-37 または D9-36 を CNBr-Sepharose に結合させたカラムで

良好であった (図 8)。

Wakogel P-28 を用いる生体試料の精製

KOH 及び濃硫酸で完全に脂肪を分解したバターを固相抽出カラム wakogel P-28 で精製することにより、ELISA に適用できる試料の調整法を確立した。

生体試料の前処理においてアルカリや酸により完全に脂肪を分解することが重要であったことから、脂溶性の高いダイオキシン類の抗体や固相リガンドとの反応を極少量の脂肪が妨害するものと考えられた。

この方法で前処理したダイオキシン添加バターを GC/MS により測定した結果、2,3,7,8-TCDD 及び 1,2,3,7,8-PeCDD の回収率はそれぞれ約 80% 及び 90% であり (表 2)、また、GC/MS の測定値は ELISA による測定値とも良好な相関性 ($r=0.911$) がみられた (表 3、図 9)。

固相抽出と同様に脂肪を分解したバター抽出物に TMDD を添加してイムノアフィニティー抽出及び逆相系ポリマーで精製した結果、ELISA に適用できる試料が得られ、モノクローナル抗体 D9-36 を CNBr 活性化セファロースに結合させたイムノソルベントが最も良く、その回収率は約 70% であった (図 10)。

E. 結論

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下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。

ダイオキシン添加バターの ELISA 及び GC/MS による測定値は良好な相関性を示したことから、wakogel P-28 による前処理法と各同族体の TEF に近似した交差反応性をもつモノクローナル抗体 D9-36 を用いる

ダイオキシン ELISA とを組み合わせた本法は、安価で簡便・迅速なダイオキシン類のモニタリング及びスクリーニング法となることが示された。

また、TEF の大きなダイオキシン類に特異性の高いモノクローナル抗体を用いたイムノアフィニティー抽出法は、ダイオキシン類の簡易モニタリング系として期待されている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の前処理法として有用である可能性が示された。

今後は本 ELISA をキット化して前処理法と共にバリデーションを実施し、再現性及び汎用性のあるダイオキシンの簡易測定法として生体試料及び環境試料の実態調査に寄与したい。

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

- 1) 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. 特許出願

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

3. その他

なし

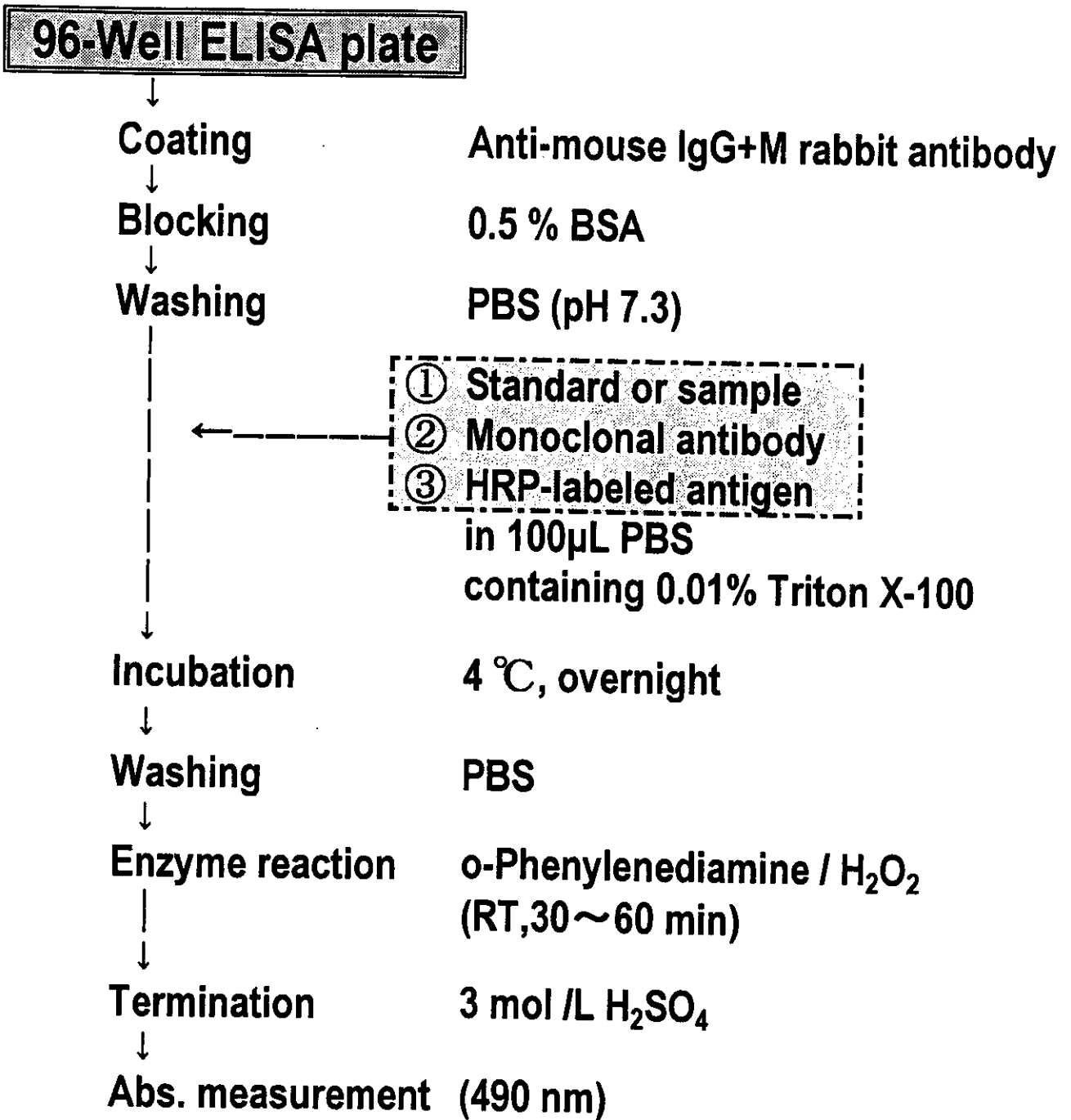


図1 ダイオキシン ELISA の手順

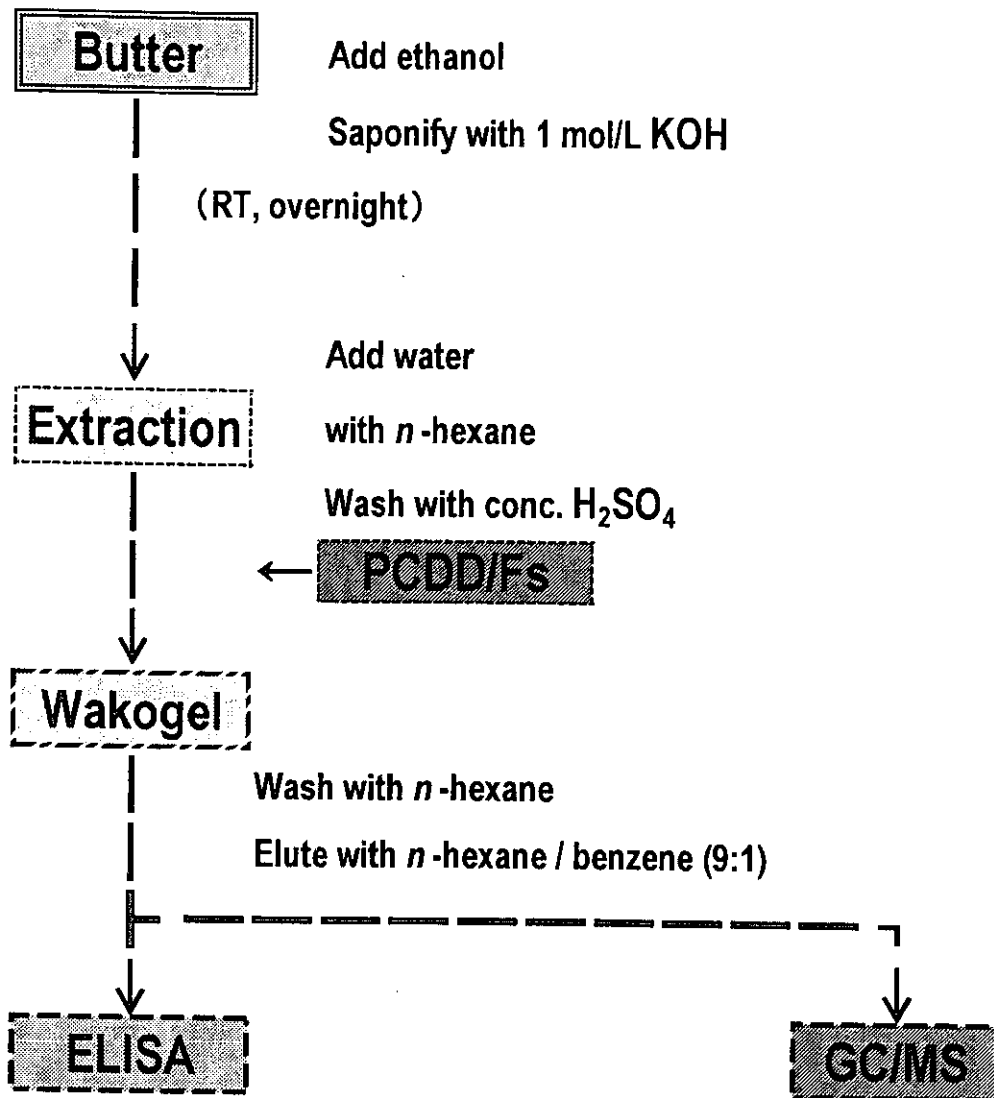


図2 固相抽出によるバター中ダイオキシンの精製

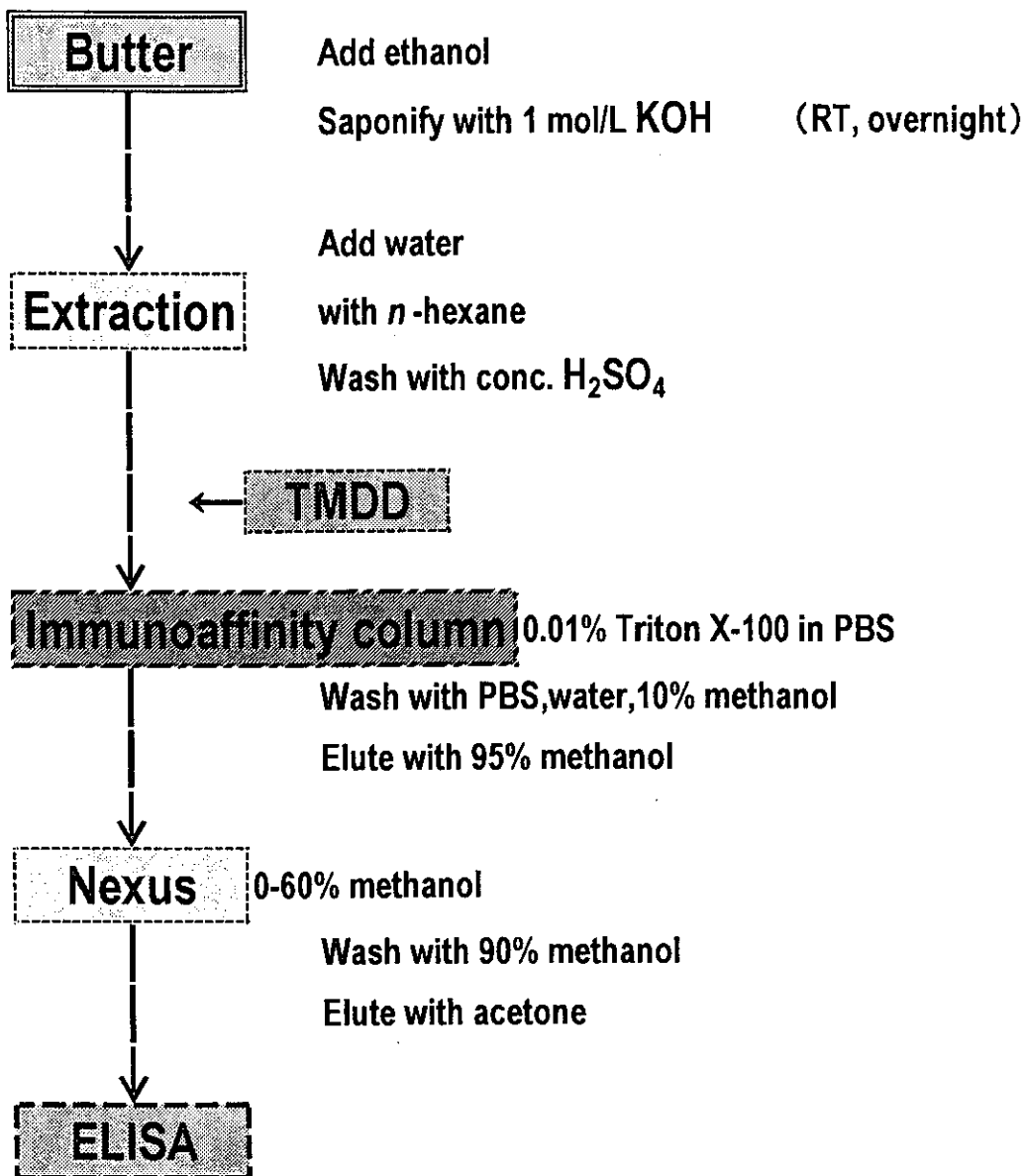
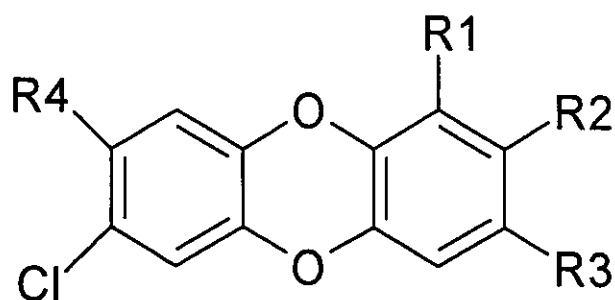


図3 イムノアフィニティ抽出によるバター中ダイオキシンの精製



| Compound | R1 | R2 | R3 | R4 |
|----------|--|---------------------------------------|----|----------------------------------|
| I-1 | NHCO(CH ₂) ₂ COOH | H | Cl | Cl |
| I-2 | NHCO(CH ₂) ₃ COOH | H | Cl | Cl |
| I-3 | NHCO(CH ₂) ₄ COOH | H | Cl | Cl |
| I-4 | NHCOCH=CHCOOH | H | Cl | Cl |
| I-5 | CH=CHCOOH | Cl | Cl | Cl |
| I-5-2H | CH=CHCOOH | H | Cl | Cl |
| I-5-3H | CH=CHCOOH | Cl | H | Cl |
| I-6 | CH=C(CH ₃)COOH | Cl | Cl | Cl |
| I-7 | NHCO(CH ₂) ₂ COOH | Cl | Cl | Cl |
| I-8 | NHCO(CH ₂) ₃ COOH | Cl | Cl | Cl |
| I-9 | NHCO(CH ₂) ₄ COOH | Cl | Cl | Cl |
| I-10 | (CH=CH) ₂ COOH | Cl | Cl | Cl |
| II-1 | H | O(CH ₂) ₂ COOH | Cl | Cl |
| II-2 | H | O(CH ₂) ₃ COOH | Cl | Cl |
| II-3 | H | O(CH ₂) ₄ COOH | Cl | Cl |
| II-4 | H | CH=CHCOOH | Cl | Cl |
| II-6 | H | CH=CHCOOH | H | Cl |
| II-6M | H | CH=CHCOOH | H | CH ₃ |
| II-6B | H | CH=CHCOOH | H | C(CH ₃) ₃ |

図4 ダイオキシシンハプテンの構造式

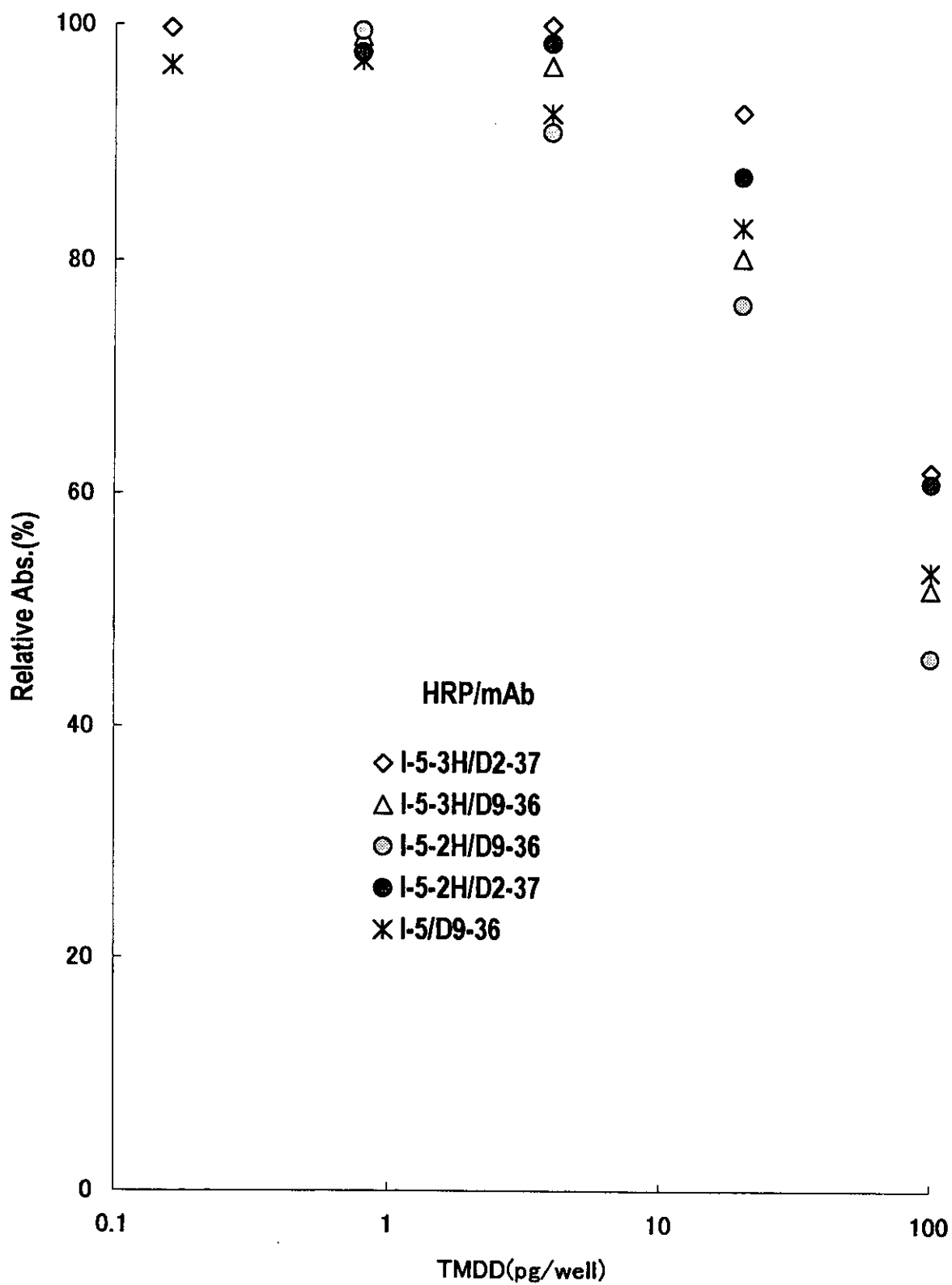


図5 標識ハプテンと抗体の組み合わせによるTMDDの標準曲線

HRP-hapten ; 20 ng/well

D2-37 ; 5 ng/well

D9-36 ; 0.5 ng/well

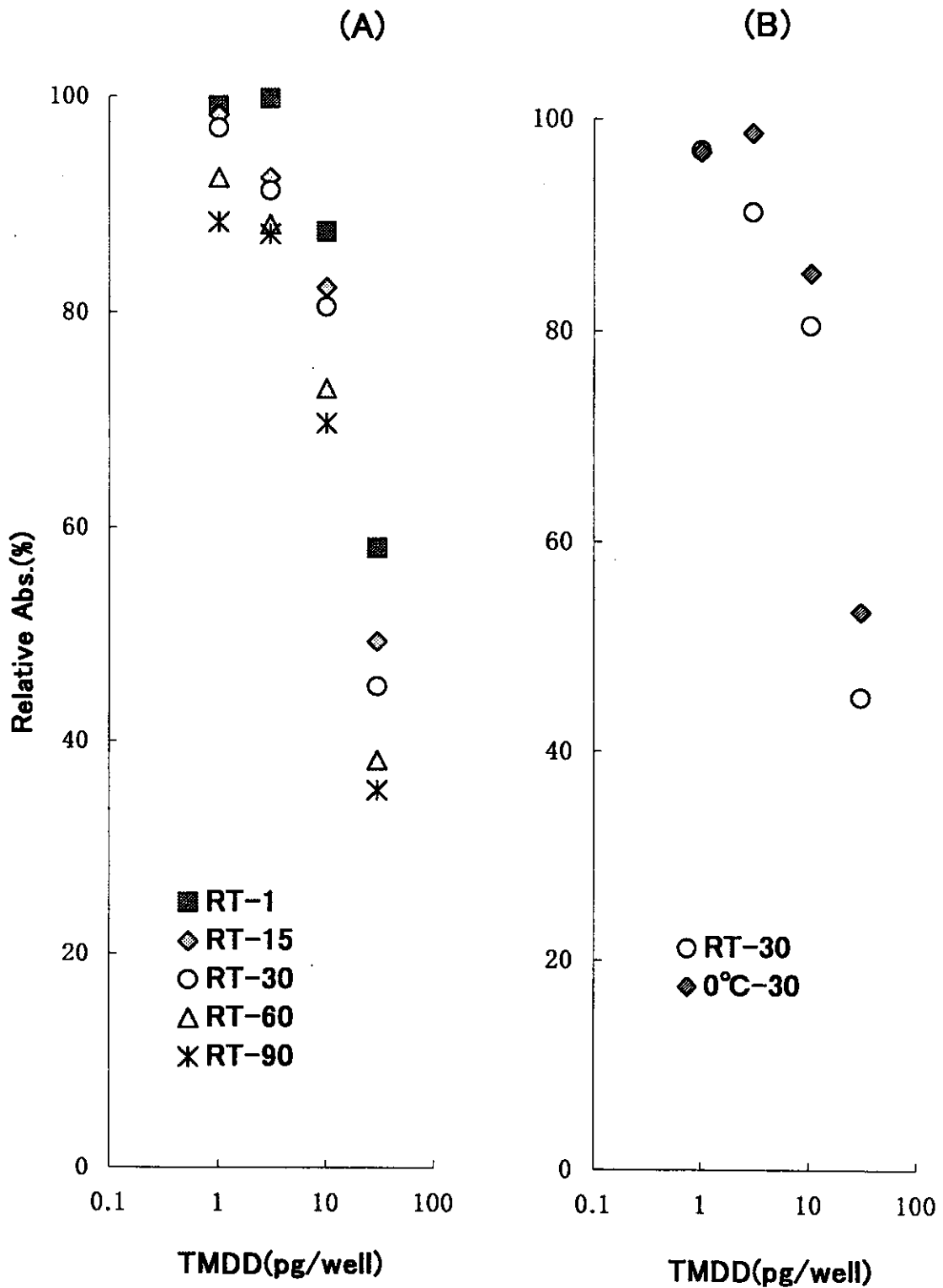


図6 ELISA の感度に及ぼす抗原・抗体反応条件の影響

抗体 : D9-36 (0.5 ng/well)

酵素標識ハプテン : I-5-2H-HRP (20 ng/well)

界面活性剤 : Triton X-100 (0.01%)

表1 2,3,7,8-TCDD の標準曲線

| TCDD(pg/well) | Abs 490nm | | | Relative Abs.(%) | | |
|---------------|-----------|---|-------|------------------|---|-----|
| 0 | 1.804 | ± | 0.027 | 100.0 | ± | 1.5 |
| 1 | 1.683 | ± | 0.039 | 93.3 | ± | 2.2 |
| 3 | 1.517 | ± | 0.029 | 84.1 | ± | 1.6 |
| 10 | 1.205 | ± | 0.024 | 66.8 | ± | 1.3 |
| 30 | 0.710 | ± | 0.016 | 39.4 | ± | 0.9 |
| 100 | 0.269 | ± | 0.011 | 14.9 | ± | 0.6 |

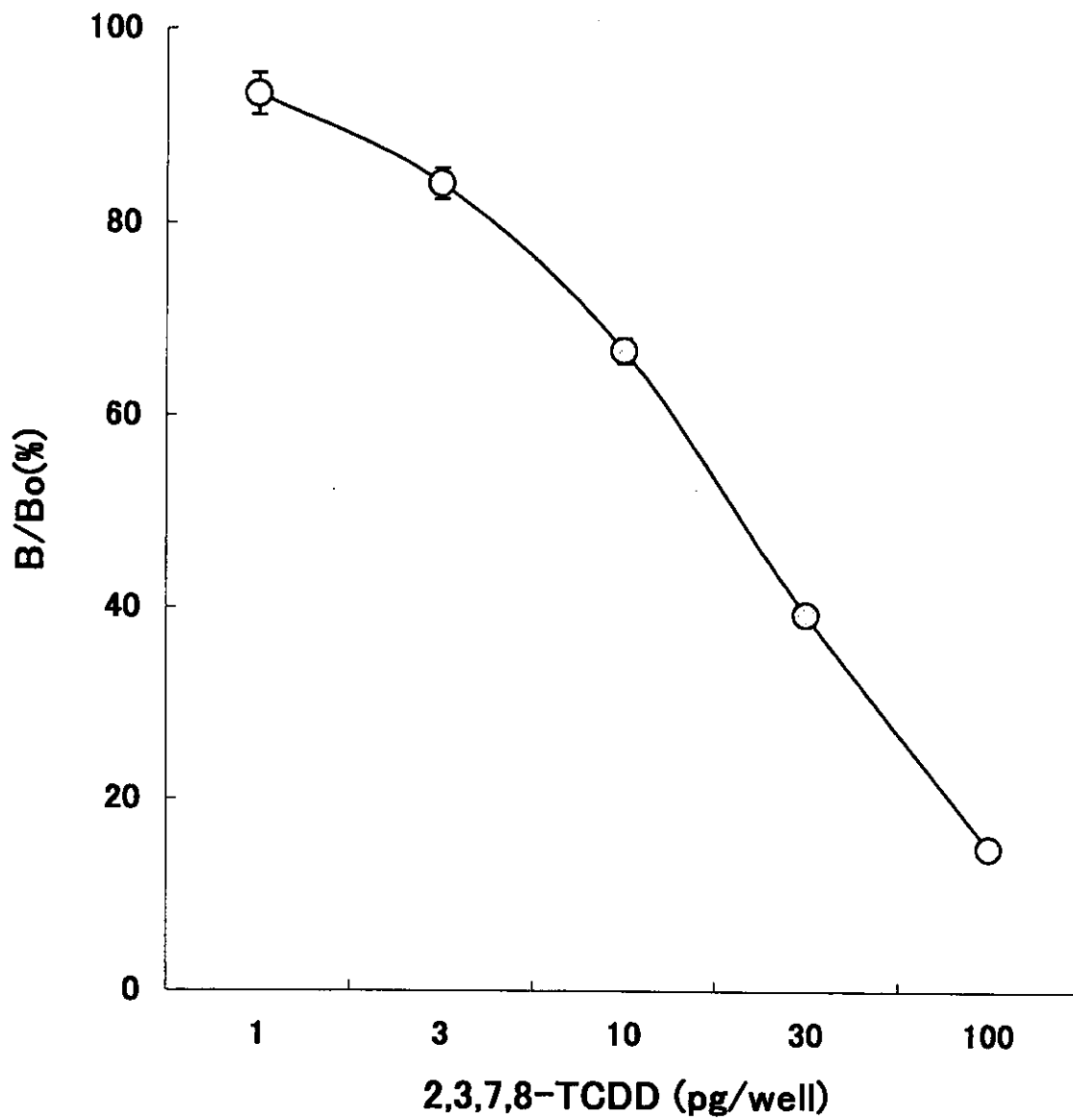


図7 2,3,7,8-TCDD の標準曲線

D9-36 : 0.5 ng/well

I-5-2H-HRP : 15 ng/well

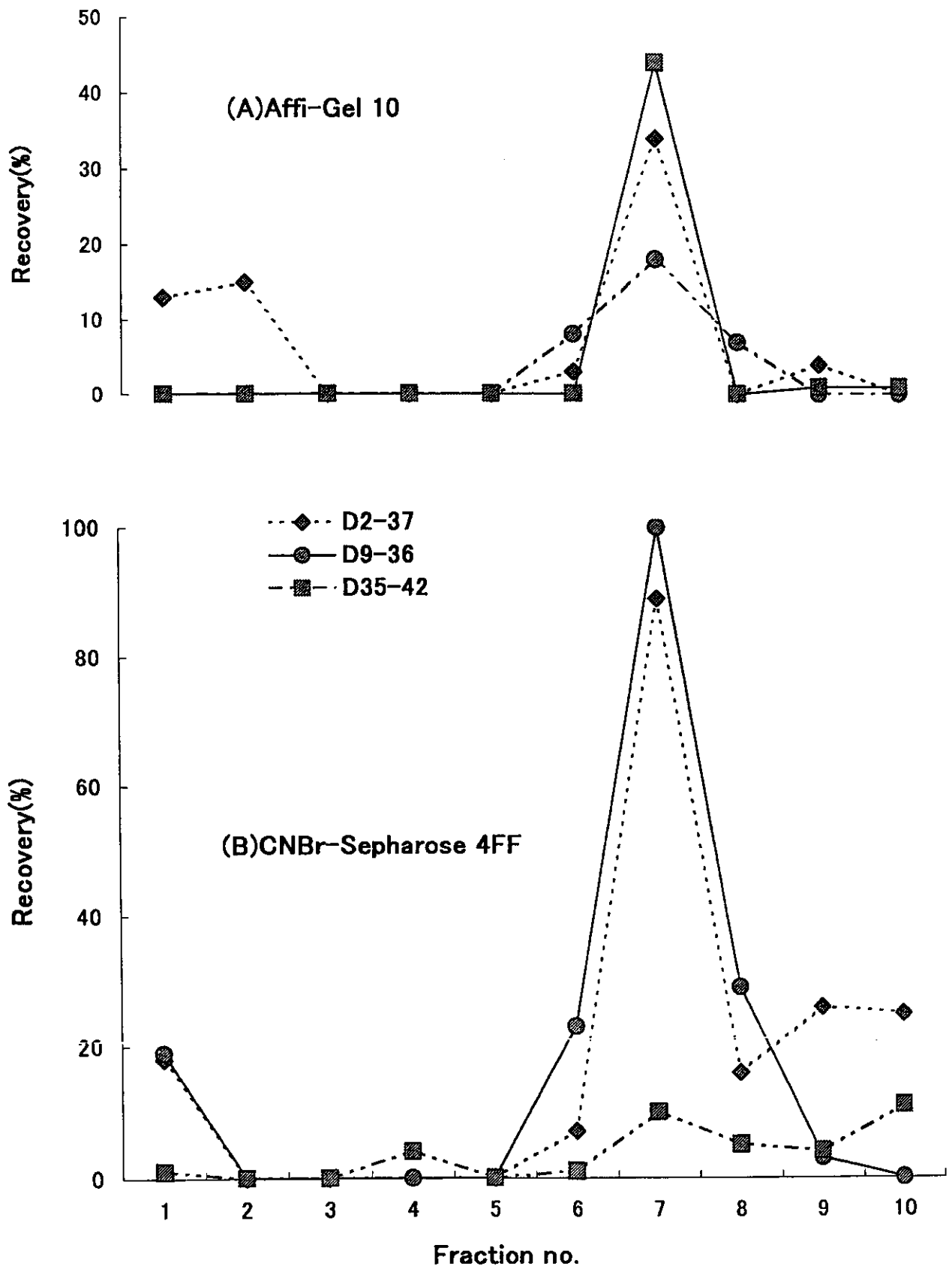


図8 イムノアフィニティ抽出によるTMDDの溶出パターン

fr.no.1,2 ; PBS
fr.no.3,4 ; water

fr.no.5,6 ; 10% methanol
fr.no.7-10 ; 95% methanol

表2 Wakogel P-28 を用いた精製法における PCDD/Fs の回収率

| 試料 | 添加 | | 回収(GC/MS) | | 回収率(%) |
|-----|-----------------------|-----------------------|-----------------|------------|-----------|
| | PCDD/Fs (pg/g fat) | PCDD/Fs (pg/g fat) | PCDD/Fs | (pg/g fat) | |
| | 0 | - | - | 0.5 未満 | - |
| バター | 2,3,7,8-TCDD | 10 | 2,3,7,8-TCDD | 6.9±1.7 | 69.0±16.5 |
| | | 30 | 2,3,7,8-TCDD | 22.6±0.4 | 75.5±1.3 |
| | | 各 10 | 2,3,7,8-TCDD | 7.8±2.1 | 78.3±20.8 |
| | 2,3,7,8-TCDD | | 1,2,3,7,8-PeCDD | 9.2±0.4 | 92.0±4.4 |
| | | 各 30 | 2,3,7,8-TCDD | 25.0±3.9 | 83.4±12.9 |
| | 1,2,3,7,8-PeCDD | | 1,2,3,7,8-PeCDD | 27.7±1.5 | 92.2±5.1 |

(n=3)

表3 バター中ダイオキシンの ELISA と GC/MS による測定

| 添加 | TEQ(pg/g fat) | | | | | | | | | | | | |
|-------|---------------|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 0 | 10 | | | 30 | | | 20 | | | 60 | | |
| ELISA | <1 | 6.6 | 7.4 | 6.5 | 17.2 | 15.1 | 18.2 | 9.6 | 9.8 | 13.3 | 27.3 | 19.4 | 21.1 |
| GC/MS | <0.5 | 5.8 | 6.1 | 8.8 | 22.4 | 22.4 | 23.1 | 17.0 | 19.1 | 14.9 | 53.6 | 48.1 | 58.1 |

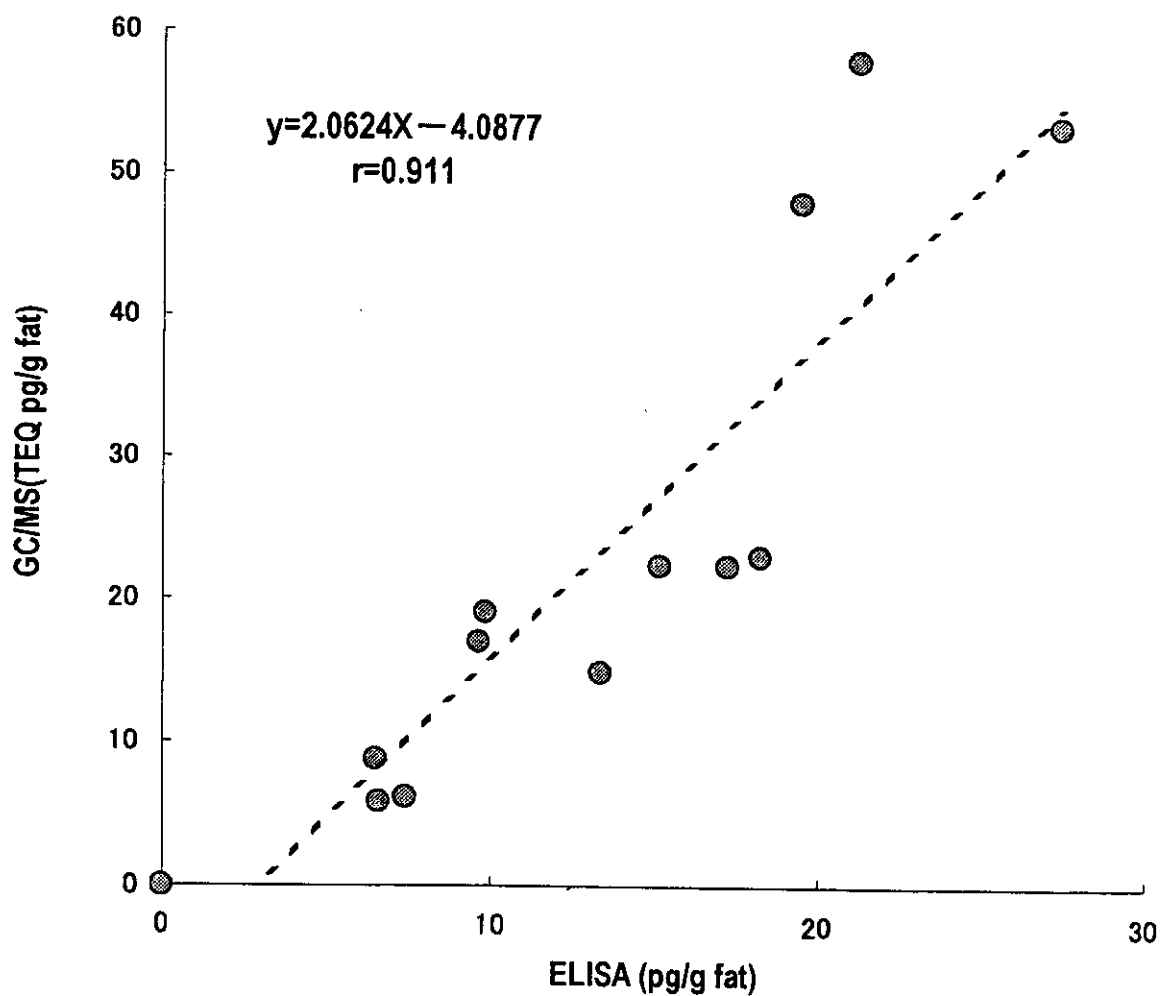


図9 ELISA と GC/MS による測定値の相関性

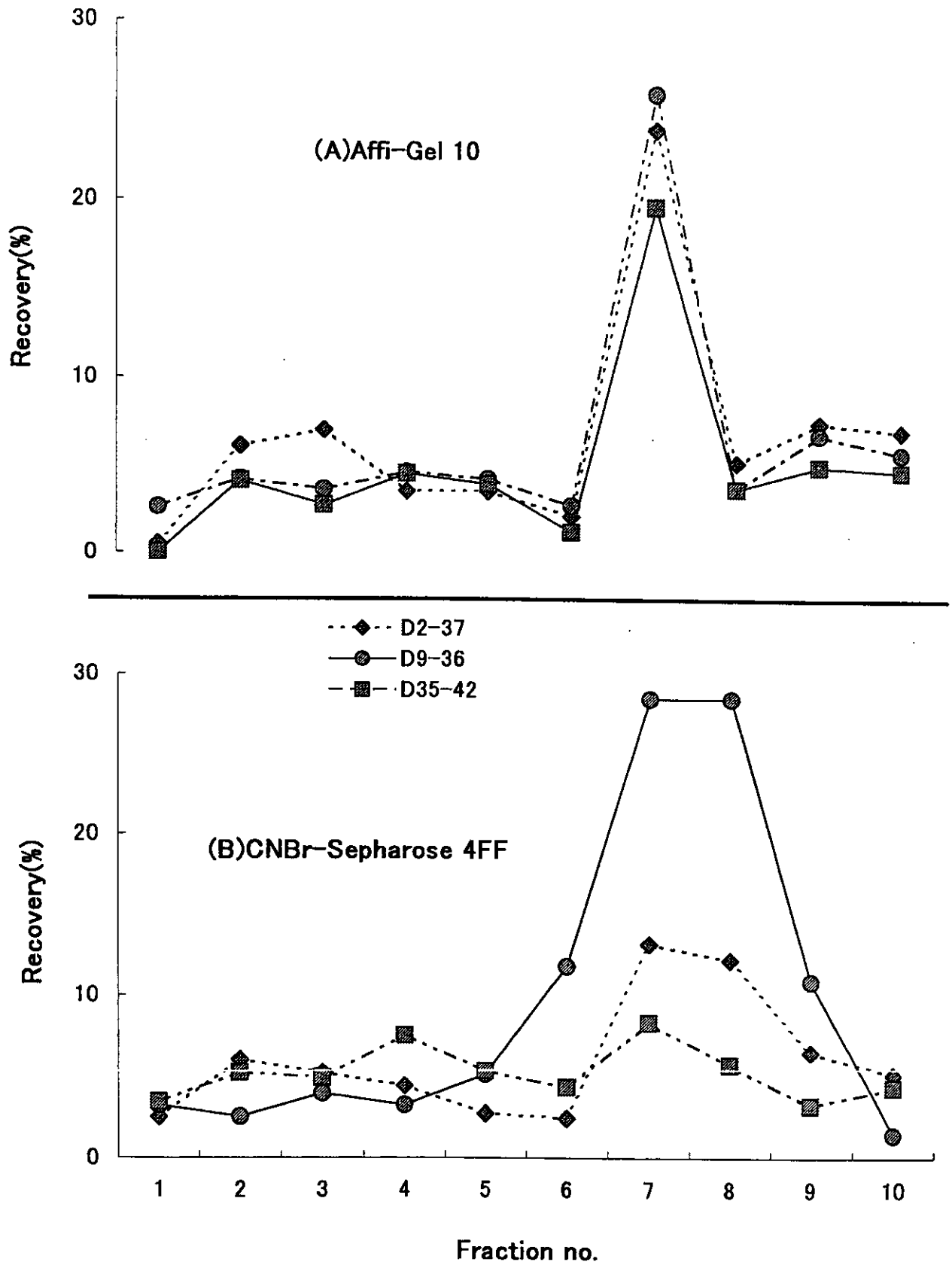


図10 イムノアフィニティ抽出によるバター中TMDDの溶出パターン
 fr.no.1,2 ; PBS fr.no.5,6 ; 10% methanol
 fr.no.3,4 ; water fr.no.7-10 ; 95% methanol

協力研究報告書

臭素化ダイオキシシンハプテンの合成

協力研究者 佐藤雅之

(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)
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
-臭素化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

臭素化難燃剤は様々なプラスチック製品に多用化され、日常生活の中に入り込んでいる。ポリ臭素化ジベンゾ・パラ・ダイオキシン(PBDDs)は、これら臭素化難燃剤中に不純物として含まれ、また熱的処理の過程においても発生する。いくつかのPBDD同族体は極めて毒性が強いが、分析法が複雑で、標準物質が少なく、特性が明らかにされているのは少数である。

また、PBDDsの発生源はある程度特定されても、それらの環境中での分布、変化、濃度あるいはヒトへの曝露および影響等に関して、ポリ塩素化ジベンゾ・パラ・ダイオキシン(PCDDs)ほど実体が明らかとはなっていないのが現状である。

今後、PBDDsの汚染状況等大規模モニタリングプログラムが実施されることになると、PBDDsの効率的な検出方法が必要である。現在用いられているガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリー(GC/MS)は、きわめて高感度の選択的特異的分析法であるが、欠点もある。いくつかを列挙すれば、まず、高コストであることが挙げられる。また、PBDDsは分子量が大きいため、GCの保持時間が塩素化同族体よりも長く、MS同位体クラスターパターンが異なり、干渉物質も異なる。さらに、分析前処理を含めて測定時間がかかる、などがある。大量サンプル処理を前提としたモニタリングプログラムにおいて、これらに取って代わる分析法の開発は急務であるといえる。

測定法の簡易化を目指し、イムノ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。イムノアッセイは、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、イムノ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。また、ポリ塩素化ジベンゾ・パラ・ダイオキシン(PCDDs)のEIA系もすでに確立しつつあるという観点から、本研究においてはヒトの生体試料中臭素化ダイオキシン類の簡易でかつ高感度な酵素イムノアッセイ法を確立し、特にヒトでの臭素化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、イムノ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ため、抗体を得るためのハプテン分子の設計は非常に重要である。そこで、これまでPCDDsハプテン分子を種々設計・作製してきた知見を基に、特に毒性の高い2,3,7,8-tetrabromo-dibenzo-*p*-dioxin(2,3,7,8-TBDD)を検出対象としたハプテン分子の合成をおこなった。

A. 研究目的

2,3,7,8-Tetrabromodibenzo-*p*-dioxin (2,3,7,8-TBDD)検出のための酵素免疫アッセイ系確立を目的とし、抗体入手に必要な臭素化ダイオキシンハプテンの作成を行った。

ハプテン作成にあたっては、

- (1) 既存の PCDDs ハプテン分子の合成方法の応用
- (2) ハプテン分子の低毒性化
- (3) 合成の容易さ

を考慮し、2,3,7-トリプロモジベンゾ-*p*-ダイオキシンをハプテン分子の母核に選定し、その C-4 位に適切な結合手 (スペーサー) を導入し、スペーサー末端部にカルボキシル基を有する (図 1) ことでタンパクなどと結合可能とした。

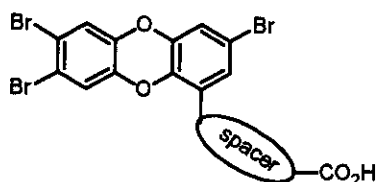
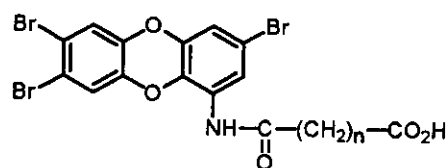


図 1

次いで、ダイオキシン母核とスペーサーとの結合様式は、合成上の容易さからアミド結合とした。また、スペーサー部の長さを 6-9 Å 程度とし、3 種のスペーサーを導入することとした。

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ため、また、より低毒性のハプテン分子合成という観点から、母核には臭素原子を 3 個導入し、スペーサー結合部隣接炭素は無置換の形とした。

以上の観点より図 2 に示す 3 種のハプテン分子の合成を行った。



$n = 2, 3, 4$

図 2

B. 研究方法

1. 使用試薬

カテコール、酢酸、臭素、硫酸ナトリウム、硝酸カリウム、メタノール、無水グルタル酸、ピリジン、エタノール、エーテル、塩酸、水酸化ナトリウム、硝酸銀、2, 5-ジプロモアニリン、2, 6-ジニトロアニリン、濃硫酸、アセトン、炭酸カリウム、ヒドロサルファイト、2-メトキシエタノール、炭酸ナトリウム、ヘキサン、無水コハク酸、テトラヒドロフラン、クロロホルム-*d*, ジメチルスルホキシド-*d*6: 和光純薬(株)

ベンゼン、二塩化オキサリル、シリカゲル 60: 関東化学(株)

アジピン酸モノメチルエステル: Aldrich Co.

塩化メチレン: 旭硝子(株)

クロロホルム: 信越化学工業(株)

2. 臭素化ダイオキシンハプテンの合成

1) 合成計画

図 3 に示す経路で、臭素化ダイオキシンハプテンの合成を計画した。

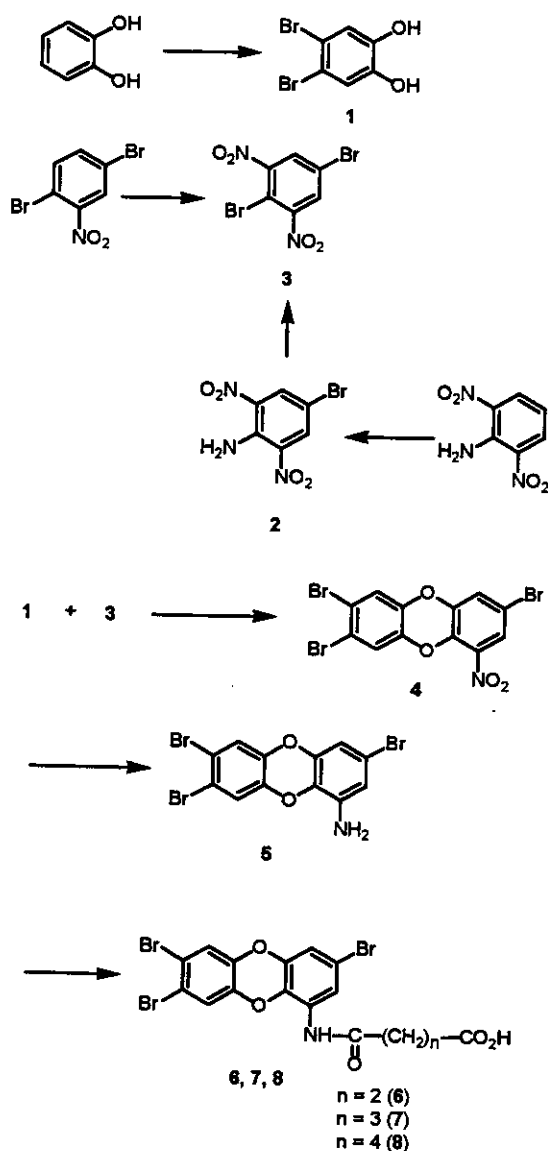


図 3

2,3,7-Tribromodibenzo-*p*-dioxin 母核構築の原料となる 4,5-dibromocatechol (1) は catechol の臭素化により合成する。同じく構築原料である 2,5-dibromo-1,3-dinitrobenzene (3) は、2,5-dibromonitrobenzene のニトロ化法、もしくは 2,6-dinitroaniline の臭素化による 4-bromo-2,6-dinitroaniline (2) への誘導後、2 のアミノ基を臭素原子に置換する方法のいずれかで合成する。

得られた 1 および 3 をカップリングさせ臭素化ダイオキシン母核 (4) を合成し、次いで 4 のニトロ基を還元してアミノ基に誘導 (5) し、5 に、適切な酸無水物を反応させるか、もしくはジカルボン酸クロライドモノエステルを反応後加水分解に付すかの方法で目的とするハブテン分子を合成する。

以下に実験部を詳述する。

2) 4,5-Dibromocatechol (1) の合成

Kohn¹⁾ は酢酸中、カテコールを臭素にて臭素化することにより 1 が得られると報告しているが、条件など詳細には述べられていない。そこで、氷冷下、2 時間という条件で、酢酸溶媒を用い、カテコールを臭素化したところ黒色油状物を得、これを通常の後処理後、ベンゼンに溶解させ 2 日間放置することにより無色結晶として 1 を得た (収率 14%)。

3) 2,5-dibromo-1,3-dinitrobenzene (3) の合成

化合物 3 の合成を、まず、市販の 2,5-dibromonitrobenzene のニトロ化法により合成しようと試みた。しかしながら、生成物は、目的物とともにニトロ基の位置異性体を含む混合物であり、それらの極性の類似性から、両者を分離することは出来なかった。

そこで、Hammond らの報告²⁾ を基に別法を試みた。すなわち、まず、2,6-dinitroaniline を臭素化して 4-bromo-2,6-dinitroaniline (2) への誘導し、2 のアミノ基を臭素原子に置換する方法である。

2,6-Dinitroaniline の臭素化を行う条件で、途中 4-bromo-2,6-dinitroaniline (2) を