

単離することなく3の生成まで反応が進行してしまふことが判明した。

4) 1-Nitro-3,7,8-tribromodibenzo-*p*-dioxin (4)の合成

次に、得られた原料1および3のカップリング反応を試みた。カップリング反応条件としてはTrCDD母核合成法³⁾に準じ、炭酸カリウム存在下、アセトンを溶媒とし、3時間還流することにより4を55%の収率で得た。化合物4の構造は、IRスペクトルでニトロ基の存在が確認され、¹H-NMRスペクトルにより芳香環プロトンが、7.29 ppmと7.25 ppmにシングレットで2本、7.71 ppmと7.25 ppmにダブルット($J=2.5$ Hz)で2本 o -カップリングを示していること、さらにこのダブルットのシグナルがシングレットのシグナルよりかなり低磁場であることにより決定した。

5) 1-Amino-3,7,8-tribromodibenzo-*p*-dioxin (5)の合成

次いで、ニトロ基の還元反応を検討した。まず、白金触媒による接触還元反応を試みようとしたが、4の溶媒に対する溶解性が低かったため行わなかった。金属による還元では、亜鉛および塩化スズを用いて還元反応を行ったが、全く反応は進行せず、原料回収に終わった。

そこで、還元剤としてヒドロサルファイトを選択し、塩酸酸性条件下反応⁴⁾を行ったところ、目的の5が28%の収率で得られ、原料4を38%回収した。回収した原料は再びヒドロサルファイトで還元し、5に誘導した。

化合物5の構造は、¹H-NMRスペクトル

により芳香環プロトンが7.41 ppmと7.27 ppmにシングレットで2本、6.53 ppmと6.32 ppmにダブルット($J=2.2$ Hz)で2本 o -カップリングを示していること、また、IRスペクトルによりアミノ基が存在することにより決定した。

6) スペーサー部の導入

次いで、化合物5からスペーサー部にアミド結合を有するハブテンを合成する方法として、次の2法(Method A, B)を検討した。

Method A: ダイオキシンのアミノ体を酸無水物と反応させることによりスペーサー部にアミド結合を有するハブテンを合成する方法。

Method B: Schotten-Baumann 反応を応用し、塩基性条件下で、ダイオキシンのアミノ体と酸クロライドを反応させ、生成したエステル体を加水分解することによりスペーサー部にアミド結合を有するハブテンを合成する方法。

1-Amino-3,7,8-tribromodibenzo-*p*-dioxin (5)に上記いずれかの方法を適用することにより、スペーサー部にアミド結合を導入したハブテン3検体(6, 7, 8)を合成した(図4)。

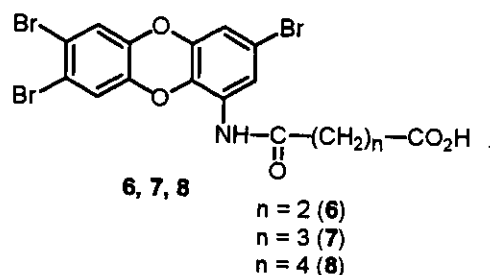


図4

7) 実験の項

4,5-Dibromocatechol (1)

カテコール(11 g, 0.1 mmol)を、酢酸(50 ml)に溶解し、これに、臭素(25 g)の酢酸溶液(61 ml)を滴下し、氷冷下で2時間攪拌した。酢酸を減圧下留去し、反応液を氷水(350 ml)に注いだ。沈殿した黒色の油状物をクロロホルムで抽出し、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧下留去し、茶色の油状物を得た。これを乾燥し、ベンゼンから再結晶することにより無色の結晶 1 (3.67 g, 14%)を得た。

Mp: 117 – 120°C (*lit.*¹⁾ 119 – 121°C)

2,5-Dibromo-1,3-dinitrobenzene (3)

硝酸カリウム(8.7 g, 86 mmol)を硫酸(33 ml)に溶解し、これを、2, 5-ジブロモニトロベンゼン(22.0 g, 78 mmol)に加え、内温 70°C で3時間加熱した。30°C まで冷却し、内容物を氷(250 g)へあけた。固形物をろ取りし、水洗、乾燥した。これをエタノールから再結晶し、3 を含む粗結晶を得た。再結晶、シリカゲルカラムクロマトグラフィーでは、位置異性体との分離は出来なかった。

2, 6-ジニトロアニリン(2.0 g, 10.9 mmol)および硝酸銀(1.6 g, 5.1 mmol)に濃硫酸(50 ml)を加えた。この混合物に、臭素(3.0 g, 18.8 mmol)を徐々に加えた。遮光下、120~140°C で16時間加熱した。冷後、反応液を250gの水に注ぎ、析出した固形物をろ取りし、水洗した。ろ過物をソックスレー抽出器を用い、熱エタノールで1時間連続抽出した。溶媒を減圧下留去し、残さをエタノールから再結晶することにより3の針状晶(711 mg, 25%)

を得た。

1-Nitro-3,7,8-tribromodibenzo-*p*-dioxin (4)

化合物1 (0.91 g, 3.38 mmol)および化合物3 (1.10 g, 3.38 mmol)を、炭酸カリウム(0.93 g, 6.76 mmol)存在下、アセトン(20 ml)中3時間加熱還流した。冷後、反応液に水(13.6 ml)を加え析出物をろ取した。粗結晶を、クロロホルムより再結晶することにより4 (859.8 mg, 54.6%)のオレンジ色結晶を得た。Mp: 207 – 209°C.

1-Amino-3,7,8-tribromodibenzo-*p*-dioxin (5)

化合物4 (100 mg, 0.21 mmol)およびハイドロサルファイト(134 mg, 0.77 mmol)を2-メトキシエタノール(0.4 ml)および水(0.4 ml)の混合溶媒中3時間加熱還流した。これに水(0.3 ml)を加え、さらに濃硫酸(0.3 ml)を滴下し、15分加熱還流した。冷後、20%炭酸ナトリウム水溶液(1.8 ml)を加えて15分間攪拌した。析出物を吸引ろ取りし、水洗した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ベンゼン:ヘキサン=1:3)で精製し、5 (25.6 mg, 28%)を得た。Mp: 227 – 228°C.

ハブテン6, 7および8合成の実施例

4-[(3,7,8-Tribromodibenzo-*p*-dioxin-1-yl) carbamoyl] butanoic Acid (7)の合成 (Method A)

1-Amino-3,7,8-tribromodibenzo-*p*-dioxin (5) (80 mg, 0.18 mmol)及び無水グルタル酸(21 mg, 0.18 mmol)を無水THF(3 mL)に溶解し、75 °Cで20時間加

熱還流した。冷後、THFを留去し、残さの無色固形物を水洗、乾燥することにより7 (85.9 mg, 85 %)を得た。

5-[(3,7,8-Tribromodibenzo-*p*-dioxin-1-yl) carbamoyl] pentanoic Acid (8)の合成 (Method B)

アジピン酸モノメチルエステル及び二塩化オキサリルより調製した粗製アジピン酸モノエチルエステルクロライド(230 mg, 0.76 mg)を化合物5 (330 mg, 0.76 mmol)の無水ピリジン(9.9 mL)の懸濁液に氷冷下加えた。30分攪拌後、これに氷を加え析出物をろ取し、水洗した。この粗エステル体 methyl 5-[(3,7,8-tribromo-dibenzo-*p*-dioxin-1-yl)carbamoyl]-pentanoate (9) (193.5 mg)をエタノールに懸濁し 0.3N 水酸化ナトリウムを加え、30分間還流した。冷後、1N 塩酸で酸性とし、エタノールを減圧下留去した。残さを乾燥後、エーテルでよく洗浄することにより8 (72 mg, 34 %)を得た。Mp: 241 – 243°C

3. 倫理面への配慮

ダイオキシン類縁体合成にあたっては、その取り扱いには十分な配慮が求められる。合成実験においては、以下の点に留意した。

- (ア) 当実験に関わる者に対して十分な安全教育を行う。
- (イ) ダイオキシン骨格が形成されたあるいはされるであろうと予測された時点から、取り扱いには保護手袋、実験衣、保護眼鏡、防塵マスク等の着用を義務付ける。
- (ウ) すべての作業は、排気システム内

で行う。特に結晶物を扱う場合には、その飛散に十分留意し、ヘパフィルタなどでの飛散防止策を講じる。

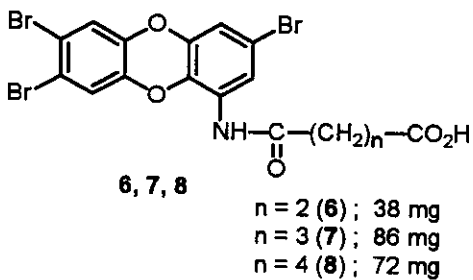
- (エ) 実験の際に排出される廃棄物は、一般の廃棄物と明確に区別し、二重のポリエチレン製袋中に入れ、特定の位置に置き、処理方法が確立するまで保存する。
- (オ) 実験廃液においては、ダイオキシン類の揮発性がほとんどないことから、有機廃液であれば、できるだけ濃縮をした後、ポリエチレン製のタンクに保管する。水性廃液もポリエチレン製のタンクに保管する。
- (カ) 排水を通じての環境中への流出に留意する。
- (キ) 実験器具は KPEG 試薬 (水酸化カリウムとポリエチレングリコールから得られるカリウムポリエチレングリコラート) を用いて、温度 150°C、12 時間の反応で、残留ダイオキシン類縁体の脱塩素化を行う。
- (ク) 実験台などの汚染があった場合には、汚染された場所は、脱脂綿をアセトン、トルエン、メトキシエタノール等の溶剤で湿らせたうえで拭き取る。その後、可搬型 UV ランプで当該箇所を長時間照射する。
- (ケ) 作業者の緊急時の行動マニュアルを作成し、常時実験室内に保管する。
なお、これらは、Beck(1983)⁶⁾、⁷⁾や Young(1983)⁶⁾、⁷⁾の発表した実験室運営

に関する行動基準に準拠した。

なお、ポリ臭素化ジベンゾダイオキシン全般の話題に関しては、WHO 発行の Criteria No. 205⁹⁾を参考にした。

C. 研究結果

1) 合成ハブテン一覧 (3検体)



2) 化合物データ

表 1 : 1-5

表 2 : 6, 7, 8

3) 測定機器

¹H-NMR スペクトル: JEOL JMN-GSX270 NMR-Spectrometer. (ケミカルシフトは parts per million(ppm)で表示し、テトラメチルシラン(TMS)を内部標準物質として用い、低磁場から TMS へδ値で記録した。また、結合定数(J)は Hz で表示した。以下に示す略語を用いた。

s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, quint = quintet, m = multiplet, brs = broad singlet.

IR スペクトル: Jasco A-102 Infrared Spectrometer. (すべて KBr 法による測定)。

融点はすべて未補正。

D. 考察

今回合成したダイオキシンハブテンは、臭素化ダイオキシンを検出対象としたものであった。具体的にはその検出対象は、2,3,7,8-TeBDD(CAS No. 103456-39-9), 2,3,7-TrBDD(CAS No. 103456-39-8)である。今回は合成上の簡便さ等を考慮してスペーサー部にアミド結合を導入したハブテンを合成したが、TCDD ハブテン合成での知見を考慮してさらにこのスペーサー部を変換することは可能である、今後の検討課題である。また、それら変換による特異性および感度への影響は非常に興味深い。

最近開発されたいくつかの生物学的定量分析法によって、2,3,7,8-TeCDD に対して pg の範囲の検出限界が達成されているが、これらの方法でいずれも指摘されているのは、培養媒体中での PCDD/PCDF の高ハロゲン化同骨格体の溶解度が低いということである。処理方法も考慮に入れて、ハブテン分子の設計をすることが必要であると考える。

E. 結論

今回合成した3検体の臭素化ダイオキシンハブテンのスクリーニング結果を指標とし、さらに高特異性を持ったハブテン抗原が設計できると期待される。また、これらの結果は、ヒト生体試料中の臭素化ダイオキシン測定に資することが可能であると期待される。

F. 健康危険情報

なし

Comp.	¹ H-NMR (DMSO)	IR (cm ⁻¹)	mp (°C)
6	12.23 (brs, 1H, COOH), 9.59 (s, 1H, NHCO), 7.90 (d, 1H, J = 2.4, C ² -H), 7.49 (s, 1H, Ar-H), 7.40 (s, 1H, Ar-H), 7.00 (d, 1H, J = 2.5, C ⁴ -H), 2.63 (t, 2H, J = 6.4, -COCH ₂ CH ₂), 2.53 (t, 2H, J = 6.4, -COCH ₂ CH ₂)	3410, 3285, 1699, 1668, 1479, 1429, 866, 852	253 (decomp.)
7	12.12 (brs, 1H, COOH), 9.47 (s, 1H, NHCO), 7.88 (d, 1H, J = 2.2, C ² -H), 7.48 (s, 1H, Ar-H), 7.39 (s, 1H, Ar-H), 7.01 (d, 1H, J = 2.2, C ⁴ -H), 2.46 (t, 2H, J = 7.3, -COCH ₂ CH ₂ CH ₂), 2.30 (t, 2H, J = 7.3, -COCH ₂ CH ₂ CH ₂), 1.81 (quint, 2H, J = 7.3, -COCH ₂ CH ₂ CH ₂)	3285, 1707, 1670, 1475, 1429, 868, 852	254 - 256
8	12.00 (brs, 1H, COOH), 9.46 (s, 1H, NHCO), 7.86 (d, 1H, J = 2.0, C ² -H), 7.47 (s, 1H, Ar-H), 7.40 (s, 1H, Ar-H), 7.01 (d, 1H, J = 2.0, C ⁴ -H), 2.43 (t, 2H, J = 7.1, -COCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂), 2.30 (t, 2H, J = 6.4, -COCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂), 1.68 - 1.46 (m, 4H, -COCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂)	3277, 1701, 1664, 1475, 1429, 1261, 868, 852	241 - 243
1	7.14 (s, 2H, Ar-H), 5.47 (s, 2H, OH)	IR (cm ⁻¹)	mp (°C)
2	8.65 (s, 2H, Ar-H), 8.47 (brs, 2H, NH ₂)	3082, 2462, 2250, 1637, 1236	158 - 159
3	8.04 (s, 2H, Ar-H)	3069, 1543, 1348, 717	119.5 - 120
4	7.71 (d, 1H, J = 2.5, C ² -H), 7.29 (s, 1H, Ar-H), 7.25 (d, 1H, J = 2.5, C ⁴ -H), 7.18 (s, 1H, Ar-H)	3074, 1537, 1466, 1289, 850	207 - 209
5	7.41 (s, 1H, Ar-H), 7.27 (s, 1H, Ar-H), 6.55 (d, 1H, J = 2.2, C ⁴ -H), 6.32 (d, 1H, J = 2.2, C ² -H), 5.48 (s, 2H, NH ₂)	1638, 1504, 1477, 1271	227 - 228

表 2

表 1

G. 引用文献

- 1) M. Kohn, *J. Am. Chem. Soc.*, 73, 480-482 (1951)
- 2) G. S. Hammond, F. J. Modic, R. M. Hedge, *J. Chem. Soc.*, 75, 1388-1392 (1953)
- 3) K. Chae, L. K. Cho, J. D. McKinny, *J. Agric. Food Chem.*, 25, 1207-1209 (1977)
- 4) L. F. Tietze, Th. Eicher, 精密有機合成実験マニュアル (改訂第二版) (南江堂), pp164.
- 5) H. Beck, *Human and Environmental Risks of Chlorinated Compounds*, 691-697, Plenum Press, New York (1983)
- 6) A. L. Young, *Human and Environmental Risks of Chlorinated Compounds*, 667-674, Plenum Press, New York (1983)
- 7) K. Ballschmiter, R. Bacher, *Dioxine - Chimie, Analytik, Vorkommen, Umweltverhalten und Toxikologie der halogenierten Dibenzo-p-dioxine und Dibenzofurane*, VHC Press, Germany (1996)
- 8) Polybrominated Dibenzo-p-dioxins and Dibenzofurans, *Environmental Health Criteria No. 205* (1998).

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

分担研究報告書

免疫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

(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
-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-

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
分担研究者 前田昌子 昭和大学薬学部 教授

研究要旨

生体試料中、特に血清試料中のダイオキシン定量のため、標識抗原に耐有機溶媒性でユニバーサルな検出に使用できるビオチン標識化ダイオキシン及びマウスモノクローナル抗体を用い検討を行った。検出に比色法を用いた時、ダイオキシンの ELISA は 0.02~62.5 ng/mL (1~3125pg/assay) の範囲で良好な検量線が得られたが、生物発光法では用いた PPKK-SA の立体障害の影響で感度は悪かった。

血清中ダイオキシン測定のため予備的検討を行った。血清に添加したダイオキシンは、メタノール添加による除タンパク後、濃縮して測定した。その結果、メタノール画分を窒素気流下 40°C で乾固させ 0.02% Triton X-100 を含む 80%メタノールで再溶解した時の回収率が最も良好で、血清添加標準曲線から得られた平均値は 105.5% (n=10) であった。

A. 研究目的

生体試料中ダイオキシンの定量のため、昨年度奥山らが調製したモノクローナル抗体及び耐有機溶媒性に優れユニバーサルな検出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用い ELISA の検討を行った。検出には西洋わさびペルオキシダーゼ-ストレプトアビジン複合体 (HRP-SA) を用いる比色法、ピルベートフォスフェートジキナーゼ-ストレプトアビジン複合体 (PPDK-SA) を用いる生物発光法を検討した。

さらに ELISA で血中ダイオキシンを測定する試みのため、血清試料の前処理の予備的な検討を行った。

B. 研究方法

1) 試薬

用いたダイオキシン誘導体は図 1 に示す。標準抗原は 8-methyl-2, 3, 7-TCDD (関東化

学) を購入して用いた。標識抗原は biotinylated 2, 3, 7, 8, TCDD (I-5), biotinylated 7, 8, DCDD (II-6) biotinylated 8-methyl-7-CDD (II-7), biotinylated 8-tert-butyl-7-CDD (II-8) の神戸川研究所で合成された計 4 種を用いた。

マウスモノクローナル抗ダイオキシン抗体は D2-37, D9-36 (食品薬品安全センター秦野研究所) の 2 種を用いた。

2) 免疫反応

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溶液 (0~62.5ng/mL) 50μL, ビオチン標識化ダイオキシン溶液 50μL 及びマウスモノクローナル抗ダイオキシン抗体溶液を加え 4°C で一夜放置した。その後、0.05% Tween20, 0.9% NaCl を含む 0.05M 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 (HRP-SA) (Vector 社製) 希釈液 100 μ L 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 100 μ L を加える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)

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-ビルベートフォスフェートジキナーゼ複合体 (PPDK-SA) 希釈液 100 μ L を加え室温で 1 時間放置した。洗浄後, 生物発光試液 (5 μ mol/L AMP, 304 μ mol/L pyrophosphate (PPi), 560 μ mol/L phosphoenolpyruvate (PEP), 15mM MgSO₄, 1mM dithiothreitol, 7.5mM ammonium sulfate, 1mM EDTA, 10% Block Ace, 0.35mM D-luciferin 及び 1mg/mL luciferase を含む 50mM HEPES-KOH 緩衝液, pH 7.0) 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)

5) 添加回収実験

ヒト血清中のダイオキシン測定のため前処理を検討した。前処理法はヒトプール血清に MeOH を添加する除タンパク法で行い, 以下に述べるような方法で添加回収試験を試みた。すなわちヒトプール血清 1 mL に標準 TMDD の MeOH 溶液 1mL 及び MeOH 3mL を添加し, 30 分 4 $^{\circ}$ C にて放置した。その後 3000rpm, 4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心分離し, 上清 4mL を得た。得られた上清に 0.02% Triton X-100 を 800 μ L 加えた後, 40 $^{\circ}$ C で減圧乾燥または窒素気流下で溶媒を留去させた。ポリクローナル抗体を用いる方法では残渣に水 160 μ L を加えた後 MeOH 540 μ L を加え溶解した。一方, モノクローナル抗体を用いる測定では残渣に測定用緩衝液を加え溶解させた。

C.D.E 結果、考察・結論

1) 比色法

今回我々は図 1 に示す 4 種のビオチン標識ダイオキシンを標識プローブとして用いた。これら標識抗原とモノクローナル抗体 D2-37, D9-36 の至適条件を検討した。

モノクローナル抗体 D2-37 を用いたとき, 4 種のビオチン標識抗原のうち, I-5 に対して弱い免疫活性が見られたものの使用には至らなかった。その他 II-6, II-7, II-8 に対しては免疫活性が認められなかった。

次にモノクローナル抗体 D9-36 と 4 種のビオチン標識抗原の至適条件を検討した。用いた 4 種のビオチン標識抗原のうち II-6, II-7, II-8 に対しては免疫活性が認められなかった。免疫活性が認められたビオチン標識抗原 I-5 の条件検討を行った。標識抗原とモノクローナル抗体 D9-36 の希釈曲線を図 2 に示す。得られた吸光度が 1.0 前後を示しかつ B/B0% 値の低い条件, モノクローナル抗体 D9-36 100ng/mL, ビオチン標識抗原 I-5, 12.5ng/mL を至適と定めた。

至適条件下での検量線を図 3 に示す。TMDD の検量域は 0.02~62.5ng/mL であり, 日内変動 (CV%, n=6) は 1.6~4.6% と良好であった。また得られた検量線から得た IC50 値は 1.28ng/mL であり, この値は昨年度行ったポリクローナル抗体を用いる結果も含めた検討した中で最も高感度であった。

2) 生物発光法

比色法と同様に 4 種のビオチン標識ダイオキシンを標識プローブとして用いた。これら標識抗原とモノクローナル抗体 D2-37, D9-36 の至適条件を検討した。

モノクローナル抗体 D2-37 を用いたとき, 4 種のビオチン標識抗原のうち I-5 に対して弱い免疫活性が見られたものの使用出来なかった。その他 II-6, II-7, II-8 に対しては免疫活性が認められなかった。

次にモノクローナル抗体 D9-36 で検討を

行った。同様にビオチン標識抗原 II-6, II-7, II-8 では免疫活性が認められなかったが, I-5 は免疫活性が認められたため, 引き続き条件検討を行った。標識抗原とモノクローナル抗体 D9-36 の希釈曲線を図 4 に示す。至適はモノクローナル抗体 D9-36 500ng/mL, ビオチン標識抗原 100ng/mL を用いる条件であった。また至適条件下, 生物発光法での TMDD の標準曲線を図 5 に示す。この結果より得られた IC₅₀ 値は 26ng/mL であった。

今回我々が用いたビオチン標識抗原に対する親和性は D9-36 のほうが D2-37 に対して高い結果が得られた。また D9-39 抗体はビオチン標識抗原 II-6, II-7, II-8 に親和性が見られなかった。これらのビオチン標識抗原にはいずれも dibenzo-p-dioxin 骨格の 2 位に比較的大きな分子であるビオチンが結合していることから, 抗体の結合に 2 位の官能基の関与が強いことが示唆された。

また検出法を比較した時, 得られた感度は比色法の方が生物発光法に比べ良い結果が得られた。この理由の一つとしては PPKD の分子量が約 230kDa であり比色法で用いた HRP-SA の分子量約 40kDa に比べ非常に大きいことに起因していると考えられた。モノクローナル抗体ではその結合がビオチン標識抗原の 1 位に近いところで行われていることが予想され, そのため PPKD-SA ではストレプトアビジンに標識された酵素が大きく立体障害によるものと考えられる。その結果, 生物発光法では使用したビオチン標識抗原及び抗体, それぞれの濃度がいずれも濃い状態でしか使用できなかったため感度が低下したと考えられる。

3) 添加回収試験

第一段階としてモノクローナル抗体を用いる方法と前年度行ったポリクローナル抗体を用いる方法を使用してヒトプール血清からの添加回収試験を行った。尚, 検出法は比色法を用いることとした。その結果,

得られた平均回収率はモノクローナル抗体使用の時 147.5±26.6%, ポリクローナル抗体使用の時 24.1±3.4%であった。ポリクローナル抗体使用時の回収率は低い値となったが, モノクローナル抗体使用時はバラツキが大きいこと及び 0 添加時の値が 4.17ng/mL と極めて高く血清中の非特異的な妨害を強く受けていることが示唆された。従って以下の実験ではポリクローナル抗体を用いる系で実験を行うこととした。

次に濃縮乾燥条件について検討を行った。当初減圧遠心濃縮器を用いて乾燥を行っていたが, 回収率が悪く測定目的物質が溶媒と共に揮散していることが考えられた。そこで濃縮乾燥時間ごとの回収率を比較した。添加した試料はヒト血清及び蒸留水を用いた。図 6 に示す通り, いずれの添加試料も濃縮乾燥時間が長くなることで回収率が低くなり, 目的物質が揮散していることが明らかとなった。

そこで窒素気流下, 40°C, 大気圧で溶媒を留去させる方法を試みた。窒素気流下での濃縮乾燥方法は蒸留水及び血清からの平均添加回収率はそれぞれ 96.7±10.8% (mean±SD, n=11), 127.3±21.9% (mean±SD, n=11) であり, これまでの遠心減圧乾燥器を用いる方法に比較すると高い回収率が得られたため, 以下の実験ではこの方法を用いることとした。

しかし, 血清を用いた時の回収率は蒸留水を用いた時の回収率と比較するとやや高値であった。さらに 0 添加時の値が 1.28ng/mL と高く, 血清中の非特異的な妨害物質の影響があると考えられた。そこで血清に添加した添加検量線を用いての回収試験を検討した。

表 1 に示すように, 添加検量線を用いる回収率は 106±6.9% (mean±SD, n=10) と良好な値が得られ, 0 添加時の値が 0.22ng/mL と検出限界程度まで低下した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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, 353-356 (2001)

2) H. Arakawa, M. Shiokawa, O. Imamura, A. Kokado and M. Maeda: New bioluminescent assay of alkaline phosphatase using adenosine-3' phosphate-5'0-phosphosulfate as substrate and luciferin-luciferase reaction, BIOLUMINESCENCE and CHEMILUMINESCENCE, 261-264 (2001)

3) 前田昌子: 化学発光・生物発光を免疫化学測定法検出に応用する, 化学と生物, 39, 2, 132-139, 2001

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, 免疫測定法研究会第6回学術集会, 2001年6月

2) 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-第2報-, 日本薬学会第122年会, 2002年3月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

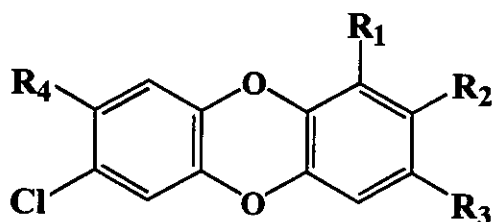
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



	R1	R2	R3	R4	備考
標準抗原	H	Cl	Cl	CH ₃	TMDD
	biotin*	Cl	Cl	Cl	I-5
ビオチン化 標識抗原	H	biotin*	H	Cl	II-6
	H	biotin*	H	CH ₃	II-7
	H	biotin*	H	C(CH ₃) ₃	II-8
免疫原	NHCO(CH ₂) ₃ CO-BSA	H	Cl	Cl	D2-37
	NHCO(CH ₂) ₄ CO-BSA	H	Cl	Cl	D9-36
	NHCH=CHCO-BSA	Cl	Cl	Cl	ポリクローナル抗体

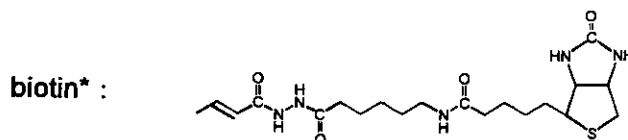


図1 用いたダイオキシシン誘導体

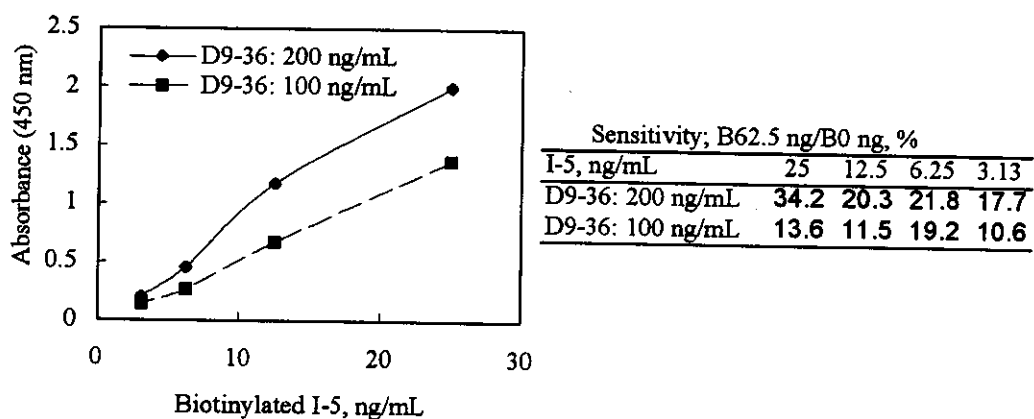


図2 比色法における D9-36 及びビオチン標識抗原の希釈曲線

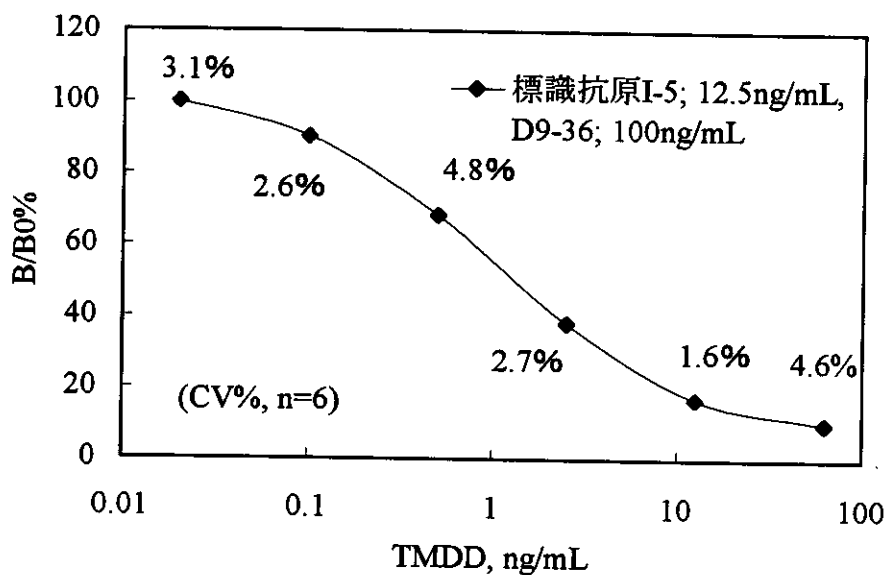


図3 比色法による TMDD の標準曲線

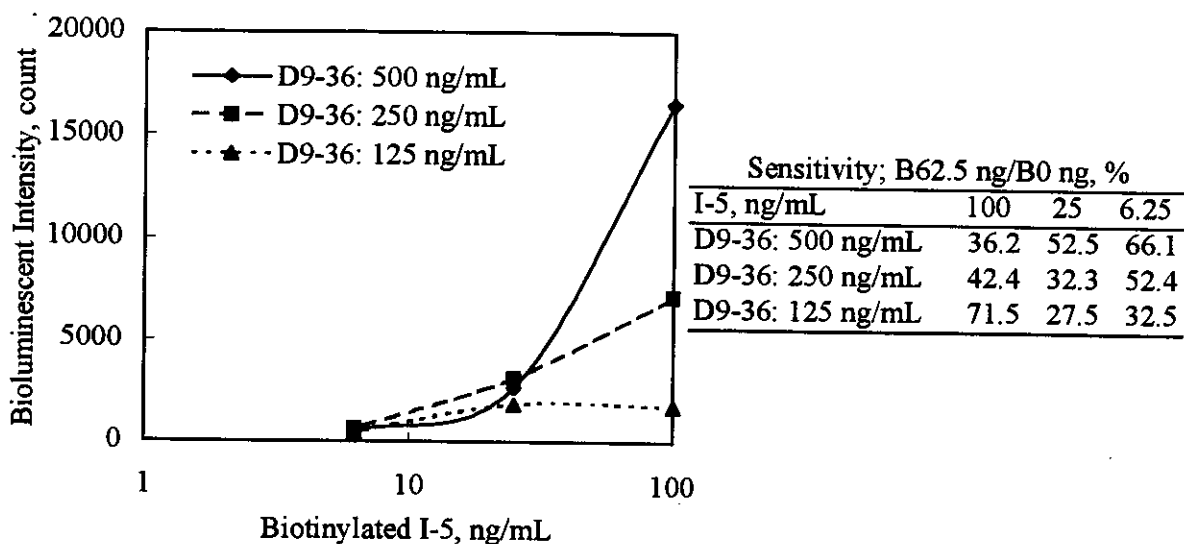


図4 生物発光検出法における D9-36 及びビオチン標識抗原の希釈曲線

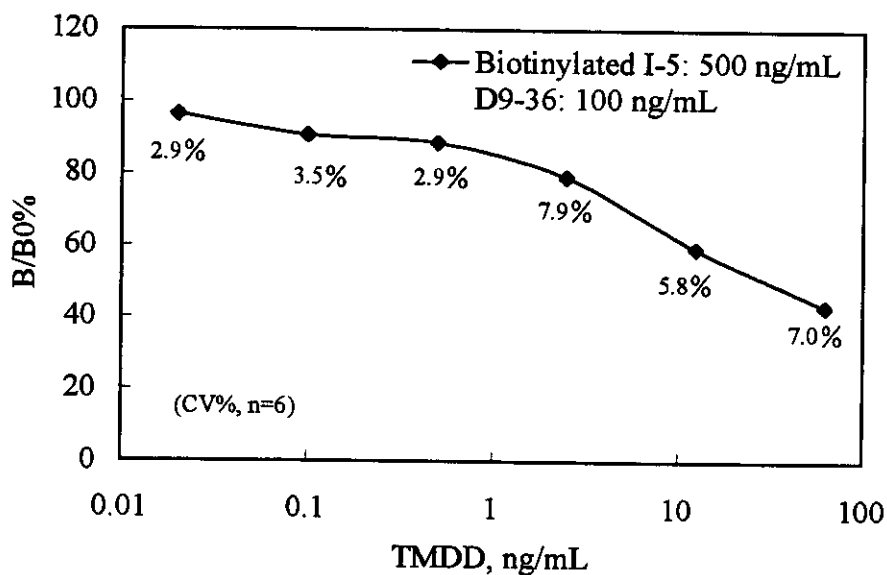


図5 生物発光検出法による TMDD の標準曲線

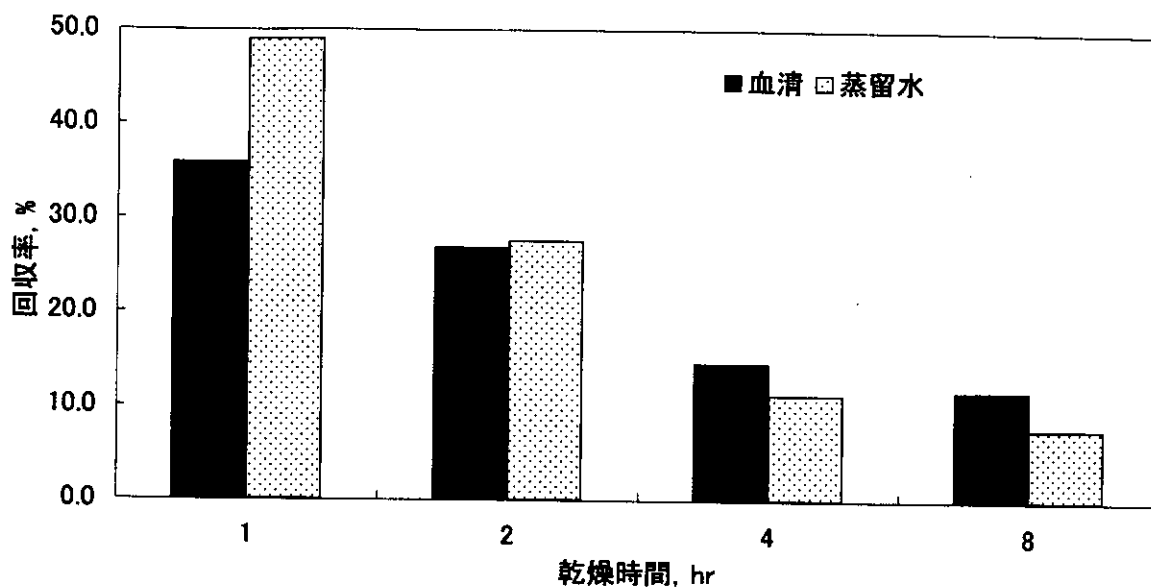


図6 遠心減圧濃縮器における乾燥時間が回収率に及ぼす影響

表1 ヒトプール血清からの TMDD の添加回収率

添加量 (ng/mL)	測定値 (ng/mL)	回収値 (ng/mL)	回収率 (%)
0	0.22	-	-
1.25	1.35	1.13	90.1
2.5	2.71	2.49	99.5
5	5.84	5.62	112.4
10	10.84	10.62	106.2
20	19.87	19.64	98.2
0	0.21	-	-
1.25	1.54	1.33	106.6
2.5	2.95	2.74	109.6
5	5.79	5.58	111.6
10	11.41	11.20	112.0
20	21.97	21.76	108.8

平均添加回収率 105.5 ± 6.9 (mean \pm SD, %, n=10)

(別添6)

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	SYNTHESSES 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
Mitsunobu	The Role of Enzyme-Immunoassay in	J. Food Hyg.	42	J-233-	2001

Okuyama et al	Analysis of Dioxins	Soc. Japan		J-238	
H. Nakazawa et al	Development of Dioxin Toxicity Evaluation Method in Human Milk by Enzyme-linked Immunosorbent Assay (Part IV : A Study on Simplification of Pretreatment).	ORGANOHALOGEN COMPOUNDS	54	55-58	2001
M. Ishizuka et al	Development of Dioxin Toxicity Evaluation Method in Human Milk by Enzyme-linked Immunosorbent Assay (Part V : A Study on Improvement of Stability).	ORGANOHALOGEN COMPOUNDS	54	59-62	2001
M. Okuyama et al	Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Dioxins Based on Monoclonal Antibodies	ORGANOHALOGEN COMPOUNDS	54	77-80	2001
K. Saito et al	Study of Extraction and Cleanup Methods of Dioxins in House Dust	ORGANOHALOGEN COMPOUNDS	50	134-136	2001

20010950

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、P.66-67の「研究成果の刊行に関する一覧」をご参照ください。