

平成 14 年度 厚生科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）

ダイオキシン類等の化学物質の食品および生体試料検査における信頼性確保と
生体曝露モニタリング法の確立に関する研究

分担研究報告書

食品中ダイオキシン類分析の信頼性確保に関わる調査研究

分担研究者 米谷 民雄 国立医薬品食品衛生研究所食品部長
協力研究者 松田 りえ子 国立医薬品食品衛生研究所食品部第二室長

研究要旨

ダイオキシン類分析の外部精度管理方法を検討する目的で、技能試験を実施した。魚（ボラ）の筋肉部分を凍結乾燥して作製した試料を用いた。作製した試料の均一性を 2 カ所で評価したところ、外部精度管理の目的には充分均一であるという結果が得られた。8 カ所に試料を送付し、7 カ所から結果が報告された。この報告値に均一性試験を行った 2 カ所の値を加えて解析を行った。7 置換 PCDF で機関間のばらつきが大きく RSD が 50%以上であった。また、コプラナー-PCB 類は濃度の小さい 3,3',4,4',5,5'-HxCB の機関間の RSD が 43%と高かったが、他は全て 40%以下の RSD であった。この傾向は、昨年度にスズキ試料で実施した結果と同様であった。TEQ の RSD は 7.5%であった。本年度は、昨年度のスズキ試料に比較して、脂肪含量が高く、前処理が複雑であるにも関わらず、良好な結果が得られた。

脂肪含量が高く均一化が困難なボラについても、調製した外部精度管理用試料の使用が可能であることが示された。また、植物性の試料として茶の外部精度管理試料を作成した。

A. 研究目的

近年、ダイオキシン類による健康への危害が、社会的に大きな問題となっている。ヒトへのダイオキシン曝露の主要な経路は食品であると考えられており、ダイオキシン曝露の影響を精密に評価するためには、多数の食品の分析値や、トータルダイエット試料を分析した結果から、食品に含まれるダイオキシン類の量の分布を知り、食品からのダイオキシン摂取による健康リスクを評価しなければならない。

正しいリスク評価のためには、食品中のダイオキシンの分析を注意深く行って、正確な分析値を得ることが重要である。しかし、前述のように食品からのダイオキシン類摂取量の総摂取量に対する割合は高いとはいえ、個々の食品におけるダイオキシン類の濃度は、たとえば飛灰などに比較すると非常に低い。また、多くの成分を含んだ複雑なマトリクスからの抽出のためには、長時間にわたる煩雑な前処理が必要となる。このため、ダイオキシンの分析

値は、食品のマトリクスによる妨害に加えて、試験室の空気や試薬の汚染といった、分析環境からのコンタミネーションの影響を受ける可能性が高い。このように、食品中のダイオキシン類の分析結果には大きな誤差が伴う可能性があり、このような分析値に基づいたリスク評価は、誤った結論に陥る危険もある。

食品からのダイオキシン類摂取量を求め、さらにその生体への影響を評価するためには、単に多数の食品中のダイオキシン分析値を収集するだけでは、その結果の信頼性は低いものとなる。正しい評価のためには品質の保証された分析値に基づいた推定が不可欠である。

分析値の品質あるいは正当性を保証するために、分析の精度管理あるいは品質管理を取り入れなければならない。品質の保証された分析値を得るために、厚生省、環境庁等が作成したダイオキシン類分析に関連したガイドライン・マニュアル中には、分析法だけではなく、測定データの品質管理に関する項目が設定されている。品質管理項目としては、分析法のバリデーション、分析時の信頼性の確認、データの管理・評価、内部精度管理の実施に加えて、外部精度管理に参加することが規定されている。外部精度管理は技能試験ともいわれ、多数の試験機関が共通試料を分析した結果を相互比較する事によって、個々の分析機関の能力を客観的に評価する手法である。

本研究では、ダイオキシン類分析の技能試験方法を検討する目的で、平成14年12月に8機関を対象とした外部

精度管理を実施した。試料としては、平成13年度に作製した魚試料を使用した。

B. 研究方法

8カ所のダイオキシン分析機関に試料を配布し、報告された分析結果を比較した。

試料

ボラ可食部分約14kgを細切し、200g毎にステンレストレーに入れて凍結する。これを凍結乾燥機を用いて乾燥し、フードミルにより均一化した。可食部の水分含量は75.5%であった。

試料を調製した日本食品分析センターと、試料を配布した国立医薬品食品衛生研究所で試料を測定し、均一性を確認した。

技能試験結果の評価

8カ所参加機関からの報告値および日本食品分析センターと国立医薬品食品衛生研究所食品部の分析値について、全ての異性体ごとに、平均値、標準偏差(SD)、相対標準偏差(RSD)を求めた。はずれ値を含む可能性もあるため、頑健な平均、標準偏差、相対標準偏差も求めた。頑健な統計量の算出には、algorithm Aを用いた。検出下限以下の分析値は除き、値が報告されたもののみについて、統計量を計算した。

zスコアの計算は、頑健な統計量に基づいて行った。

C. 研究結果

8参加機関全てから分析結果が報告

された。これに、試料の均一性評価を実施した、食品分析センターおよび国立医薬品食品衛生研究所のデータを加えて解析を行った。

Table 1 に各試料の分析値、Table 2 に全ての分析結果の最大値、最小値、平均値、SD、RSD(%で表示)、頑健な平均値、頑健な SD、頑健な統計量から計算した RSD%を示す。報告値から計算した TEQ の統計量も示した。Table 3 には、参考のため昨年度の魚試料(スズキ)の統計量を示した。また、Figure 1 および 2 には PCDD/Fs 及び Co-planar PCBs の平均値を、Figure 3 及び 4 には RSD%を示した。13 年度の値も Fig 中に含めた。14 年度の試料はボラ、13 年度の試料はスズキを用いて作成した。13 年度のスズキ試料は、14 年度のボラ試料に比較して、PCDD/Fs 濃度が高く、逆に、14 年度の試料では Co-planar PCBs 濃度が比較的高く、特に 2,3',4,4'-PeCB が高濃度に存在していた。TEQ は 13 年度は 6.12、14 年度は 7.32 で、14 年度がやや高かった。これは、3,3',4,4',5-PeCB、2,3',4,4',5-PeCB、2,3,3',4,4',5-HxCB の濃度が高いためと考えられる。

14 年度の試料は特に、6 置換 PCDD 及び PCDF の濃度が低かった。しかし、PCDD/Fs の RSD は濃度がやや小さいにもかかわらず、全体的に 13 年度よりも小さい傾向が見られた。

Co-planar PCB については全ての機関が分析値を報告した。13 年度よりも濃度が高いためか、RSD は全体として小さく、20%を越える異性体はなかった。異性体間の濃度には大きな差が

あったが、RSD への濃度の影響は見られなかった。

TEQ の RSD は 7.1%と良好な結果であり、昨年度の 11%よりもやや小さかった。

D. 考察

試料の均一性

測定による誤差の影響が少ないと考えられる、比較的高濃度の異性体の測定値から試料の均一性を評価したところ、前回の試料と同程度であり、今回調製した試料は技能試験の目的にかなうと考えられた。

試料の分析値のばらつき

試料 1 では、特に濃度の低い異性体を除き、参加機関間の報告値から計算した TEQ の変動は 7%程度の RSD となった。今回試料に選んだボラは、スズキよりも脂肪含量が高く、硫酸処理等の前処理工程が複雑であり、実際の食品からのダイオキシン摂取の主たる原因となっている魚に近いと考えられる。このような試料を用いても、TEQ で 7%程度の機関間 RSD が得られたため、食品中のダイオキシン分析の品質はかなり高いと考えられた。

一方、Fig.5 には個々の異性体ごとに計算した z-スコアを示した。TEQ では大きくはずれた値はないが、異性体によっては、非常に大きな z-スコアとなった機関がある。また、Co-planar PCBs では、z-スコアが正あるいは負に偏っている機関がみられ、個々の機関で用いている標準品あるいは内標準の濃度等にバイアスの要因があることが示唆された。これらの原因

を確定し、分析値のバイアスを小さくすることが、今後の信頼性保証の上で重要である。

E. 結論

技能試験の結果から、魚試料では試験室間の変動は7%RSD程度であることが示され、我が国における食品中のダイオキシン分析値の信頼性が保証された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 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
3. その他
なし

Table 1 ボラ凍結乾燥試料を用いたダイオキシン精度管理結果

分析項目	機関1 (pg/g)	機関2 (pg/g)	機関3 (pg/g)	機関4 (pg/g)	機関5 (pg/g)	機関6 (pg/g)	機関7 (pg/g)	機関8 (pg/g)	分析センター-衛研 (pg/g)
2,3,7,8-TCDD	0.22	0.28	0.24	0.27	0.25	0.32	0.20	0.29	0.25
1,2,3,7,8-PeCDD	0.37	0.49	0.50	0.40	0.39	0.49	0.42	0.50	0.40
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.13	0.07		0.08	0.09		0.08	0.08	0.06
1,2,3,6,7,8-HxCDD		0.16		0.16	0.13		0.10	0.15	0.11
1,2,3,7,8,9-HxCDD		0.06		0.09			0.05	0.05	0.04
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD		0.09	0.14	0.14	0.13			0.19	0.13
OCDD	0.29	0.12	0.17	0.29	0.30	0.36	0.29	0.65	0.26
2,3,7,8-TCDF	2.16	1.91	2.11	2.11	2.01	1.76	1.77	1.41	1.90
1,2,3,7,8-PeCDF	0.23	0.17	0.37	0.23	0.22		0.31	0.23	0.17
2,3,4,7,8-PeCDF	0.95	0.87	1.81	0.86	0.96	0.81	0.94	1.00	0.85
1,2,3,4,7,8-HxCDF		0.08	0.06	0.06			0.06	0.07	0.06
1,2,3,6,7,8-HxCDF		0.10	0.19	0.09	0.18		0.06	0.07	0.07
1,2,3,7,8,9-HxCDF									
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.12	0.13	0.12	0.13	0.16		0.17	0.11	0.13
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF		0.13	0.95	0.07	0.15	0.22	0.24	0.05	0.11
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF			0.02				0.11		0.05
OCDF		0.17			0.13		0.28		0.10
3,3',4,4'-TCB	144.3	160.0	182.2	181.0	190.0	181.0	367.0	186.9	170.0
3,4,4',5'-TCB	20.67	16.00	24.84	22.60	22.50	23.60	34.40	23.53	25.00
3,3',4,4',5'-PeCB	24.0	28.1	35.8	34.8	35.8	34.5	35.3	33.1	35.3
3,3',4,4',5,5'-HxCB	2.0	5.1	2.3	2.2	2.0	2.1	2.2	2.2	1.8
2,3,3',4,4'-PeCB	4567	4080	4892	3970	4195	4710	3144	4576	4600
2,3,4,4',5'-PeCB	341.3	316.0	378.3	291.0	310.0	357.0	222.0	263.4	330.0
2,3',4,4',5'-PeCB	12700	11400	13053	11200	11798	13400	7085	11400	12750
2',3,4,4',5'-PeCB	296.7	239.0	291.5	199.0	223.0	196.0	218.0	236.9	267.5
2,3,3',4,4',5'-HxCB	1370	1260	1326	1130	1263	1210	1356	1275	1350
2,3,3',4,4',5'-HxCB	334	319	315	277	305	300	411	297	338
2,3',4,4',5,5'-HxCB	581	569	599	456	556	560	577	576	598
2,3,3',4,4',5,5'-HpCB	82.0	67.4	79.8	68.3	72.8	84.7	62.8	75.6	80.8
TEQ	6.55	6.88	8.39	7.30	7.59	7.66	6.98	7.40	7.67
									7.04

Table 2 統計量

分析項目	最大值 最小值		Normal		RSD%		Robust	
	最大值	最小值	平均	SD	平均	SD	平均	SD
2,3,7,8-TCDD	0.32	0.20	0.26	0.03	13.3	0.04	0.25	0.04
1,2,3,7,8-PeCDD	0.50	0.37	0.43	0.05	12.3	0.06	0.43	0.06
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.09	0.06	0.07	0.01	14.6	0.01	0.07	0.01
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.16	0.10	0.14	0.02	16.3	0.03	0.14	0.03
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.09	0.04	0.06	0.02	31.2	0.02	0.05	0.02
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.19	0.09	0.13	0.03	20.3	0.02	0.13	0.02
OCDD	0.65	0.12	0.30	0.14	46.1	0.08	0.28	0.08
2,3,7,8-TCDF	2.16	1.41	1.91	0.22	11.7	0.20	1.93	0.20
1,2,3,7,8-PeCDF	0.37	0.17	0.23	0.07	28.8	0.06	0.23	0.06
2,3,4,7,8-PeCDF	1.81	0.81	1.00	0.29	29.1	0.09	0.93	0.09
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.08	0.06	0.07	0.01	13.5	0.01	0.07	0.01
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.19	0.06	0.10	0.05	48.6	0.06	0.10	0.06
1,2,3,7,8,9-HxCDF								
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.17	0.11	0.13	0.02	14.2	0.02	0.13	0.02
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.95	0.05	0.24	0.29	122.9	0.10	0.16	0.10
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.11	0.02	0.06	0.05	74.5	0.05	0.06	0.05
OCDF	0.28	0.10	0.17	0.08	46.9	0.09	0.17	0.09
3,3',4,4'-TCB	367.0	144.3	194.3	62.2	32.0	16.05	178.91	16.05
3,4,4',5'-TCB	34.40	16.00	23.73	4.58	19.3	2.38	23.36	2.38
3,3',4,4',5'-PeCB	35.8	24.0	32.7	4.0	12.1	3.6	33.1	3.6
3,3',4,4',5,5'-HxCB	5.1	1.8	2.3	1.0	41.1	0.26	2.09	0.26
2,3,3',4,4'-PeCB	4892	3144	4295	502	11.7	420	4353	420
2,3,4,4',5'-PeCB	378.3	222.0	318.0	49.0	15.4	50.3	320.3	50.3
2,3',4,4',5'-PeCB	13400	7085	11728	1801	15.4	1077	12064	1077
2',3,4,4',5'-PeCB	296.7	196.0	241.7	35.1	14.5	39.8	241.7	39.8
2,3,3',4,4',5'-HxCB	1370	1130	1268	86	6.8	97	1268	97
2,3,3',4,4',5'-HxCB	411	277	318	38	11.9	27.3	312.3	27.3
2,3',4,4',5,5'-HxCB	599	456	564	40	7.2	20	573	20
2,2,3',4,4',5,5'-HpCB	84.7	62.8	74.5	7.3	9.7	8.2	74.5	8.2
TEQ	8.39	6.55	7.35	0.52	7.1	0.52	7.32	0.52

Table 3 平成13年度統計量

分析項目	最大値	最小値	Normal			Robust		
			平均	SD	RSD%	平均	SD	RSD
2,3,7,8-TCDD	0.31	0.18	0.24	0.05	20.3	0.24	0.06	23.1
1,2,3,7,8-PeCDD	1.08	0.70	0.85	0.13	15.8	0.85	0.15	17.9
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.28	0.12	0.18	0.05	28.1	0.17	0.04	25.1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.63	0.47	0.56	0.06	10.6	0.56	0.07	12.0
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.13	0.07	0.09	0.02	24.4	0.09	0.03	27.7
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.70	0.20	0.33	0.16	48.0	0.29	0.08	26.1
OCDD	18.50	0.37	2.85	6.33	222.2	0.67	0.25	38.0
2,3,7,8-TCDF	1.93	1.27	1.50	0.24	15.8	1.50	0.25	16.9
1,2,3,7,8-PeCDF	0.69	0.34	0.45	0.12	27.4	0.44	0.12	27.8
2,3,4,7,8-PeCDF	2.49	1.51	1.86	0.29	15.8	1.82	0.23	12.9
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.35	0.14	0.20	0.07	34.7	0.18	0.04	20.4
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.19	0.14	0.17	0.02	14.0	0.17	0.03	15.9
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.33	0.26	0.30	0.03	8.8	0.30	0.03	10.0
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.57	0.06	0.19	0.17	91.5	0.14	0.06	45.4
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.14	0.01	0.07	0.05	76.5	0.07	0.06	86.8
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.29	0.01	0.18	0.11	60.6	0.18	0.13	68.8
OCDF								
3,3',4,4'-TCB	75.5	43.7	53.1	10.3	19.4	51.49	7.63	14.8
3,4,4',5'-TCB	3.32	1.69	2.34	0.50	21.4	2.28	0.44	19.0
3,3',4,4',5'-PeCB	38.7	20.7	29.4	5.4	18.4	29.4	6.1	20.8
3,3',4,4',5,5'-HxCB	14.6	9.4	11.0	1.8	16.5	10.45	2.32	22.2
2,3,3',4,4',5'-PeCB	1180	827	970	106	10.9	960	98	10.2
2,3,4,4',5'-PeCB	87.4	51.0	70.8	10.0	14.1	71.4	5.7	8.0
2,3',4,4',5'-PeCB	3589	2741	3172	304	9.6	3172	344	10.9
2',3,4,4',5'-PeCB	73.9	33.2	46.8	13.2	28.2	45.4	11.5	25.3
2,3,3',4,4',5'-HxCB	491	391	431	35	8.1	431	40	9.2
2,3,3',4,4',5'-HxCB	140	97	113	15	13.0	112.6	15.4	13.7
2,3',4,4',5,5'-HxCB	246	205	219	16	7.4	219	18	8.4
2,3,3',4,4',5,5'-HpCB	61.7	45.5	54.7	5.0	9.2	54.9	5.2	9.5
TEQ	6.90	5.19	6.12	0.60	9.7	6.12	0.68	11.0

PCDD/Fs

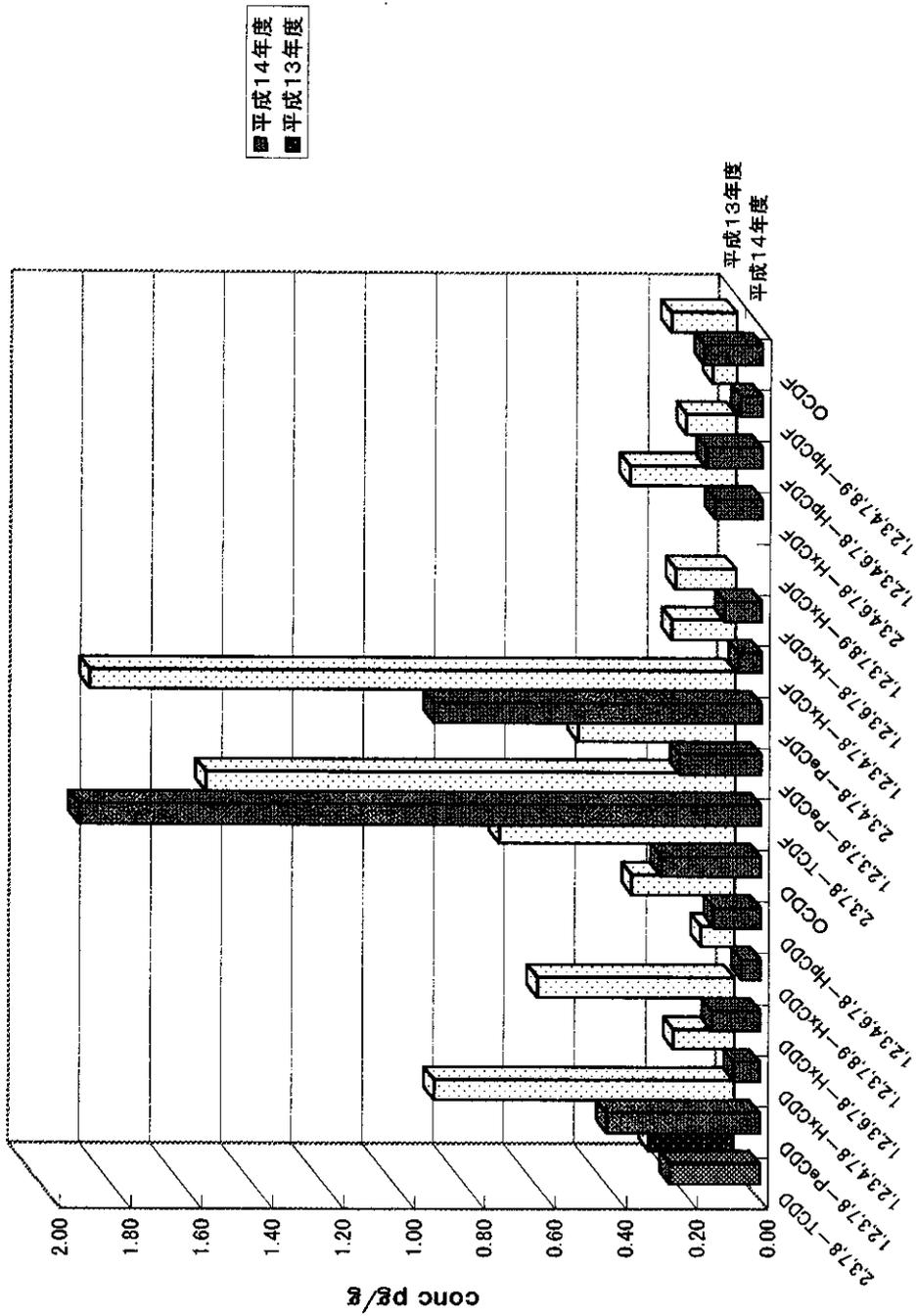


Fig.1 精度管理試料中のPCDD/Fs濃度

Co-planar PCB

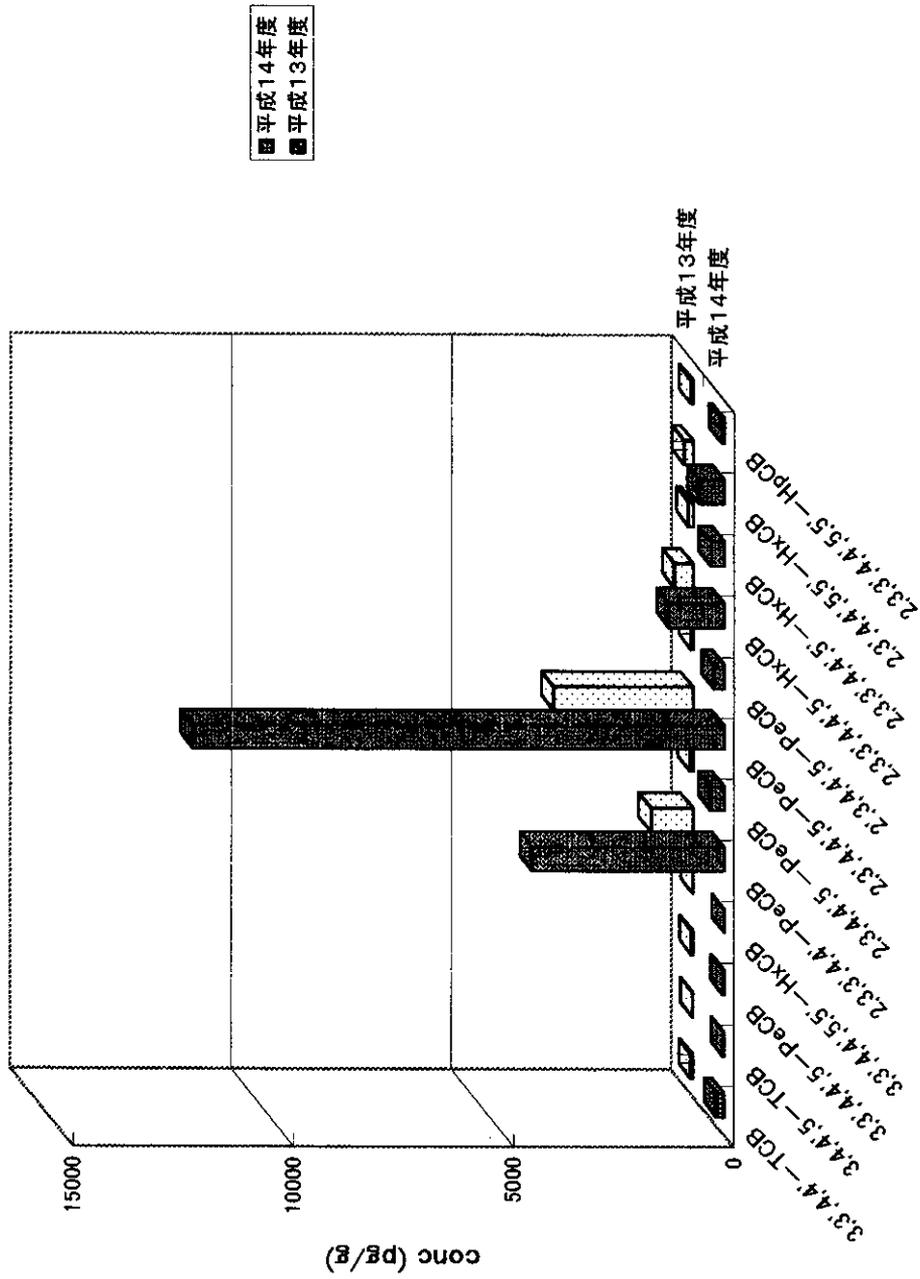


Fig.2 精度管理試料中のCo-planar PCBs濃度

PCDD/Fs

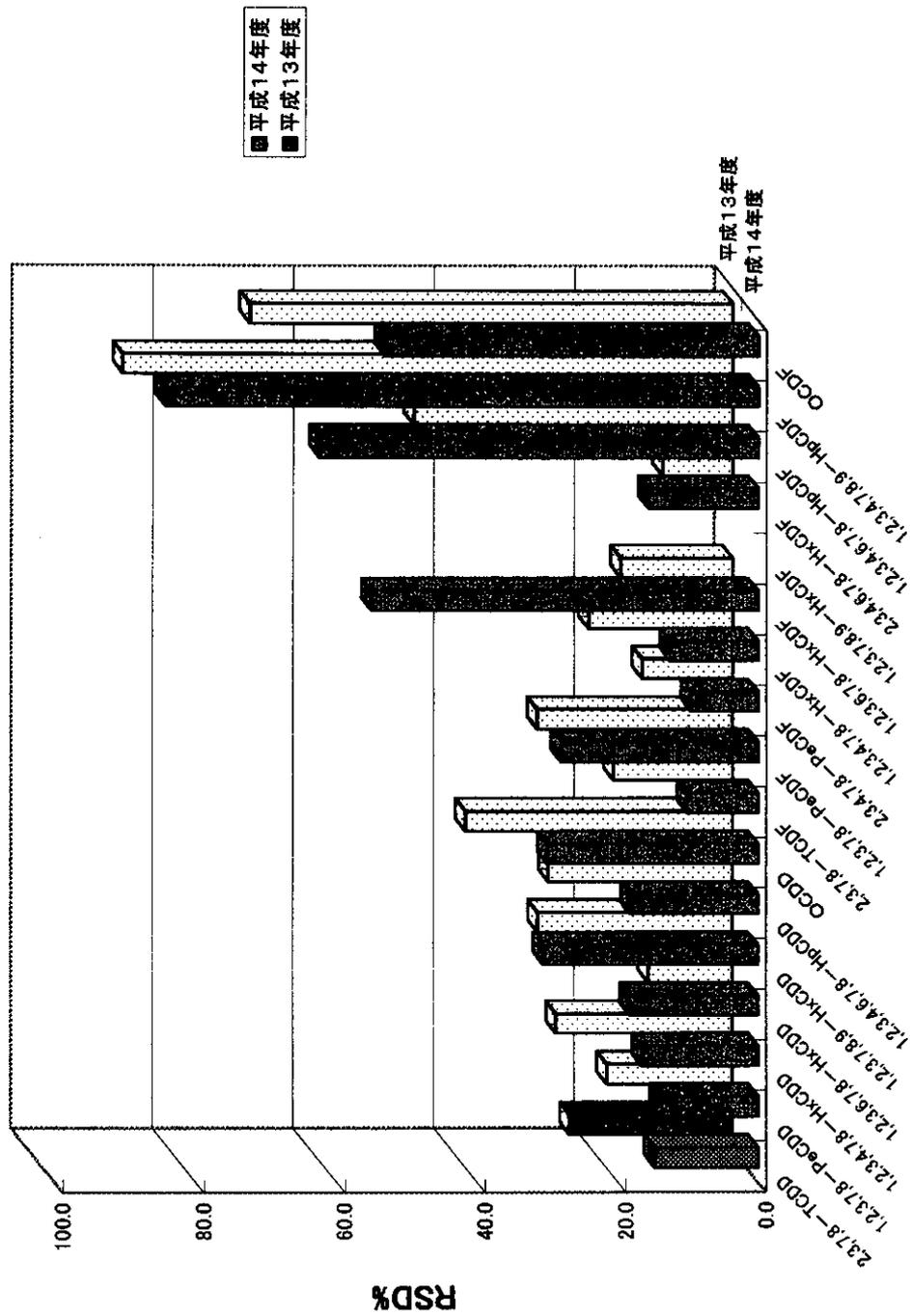


Fig.3 PCDD/Fsの機関間RSD%

Co-planar PCB

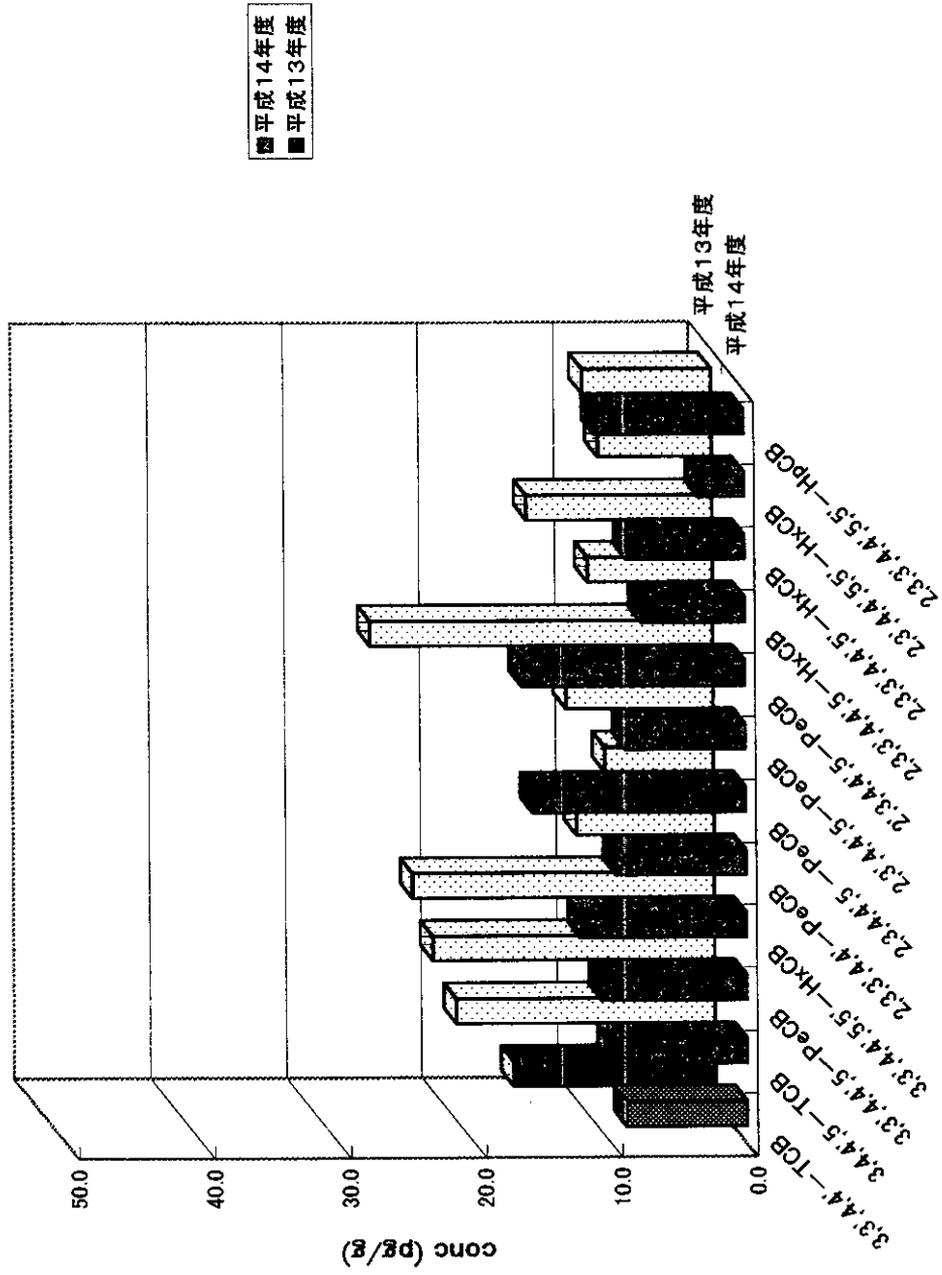


Fig.4 Co-planar PCBsの機関間RSD%

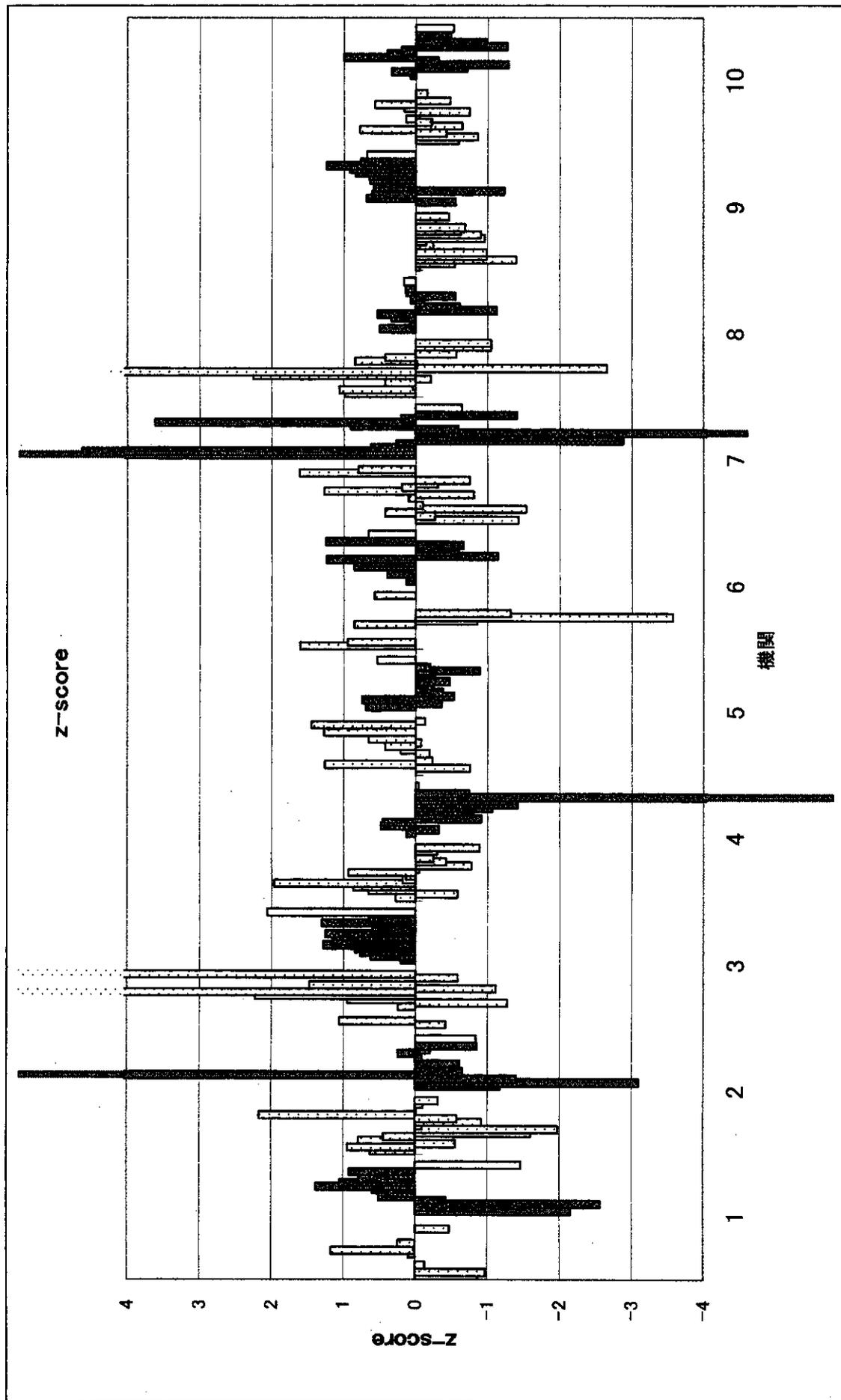


Fig. 5 参加機関の z-score

厚生労働科学研究費補助金研究（食品・化学物質安全総合研究事業）

「ダイオキシン類等の化学物質の食品及び生体試料検査における
信頼性確保と生体曝露モニタリング法の確立に関する研究」

分担研究報告書

生体試料中ダイオキシンの簡易モニタリング法の実用性評価および
臭素化ダイオキシン ELISA 確立に関する研究／食品衛生検査精度管理調査
における適正調査試料作製と質向上に関する調査研究

分担研究者 松木容彦

平成 14 年度 厚生科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）

ダイオキシン類等の化学物質の食品および生体試料検査における信頼性確保と
生体曝露モニタリング法の確立に関する研究

分担研究報告書

生体試料中ダイオキシンの簡易モニタリング法の実用性評価および
臭素化ダイオキシン ELISA 確立に関する研究／食品衛生検査精度管理調査における適正
調査試料作製と質向上に関する調査研究（その 1）
—臭素化ダイオキシンの酵素免疫測定法の開発—

主任研究者	柳澤 健一郎	(財)食品薬品安全センター 理事長
分担研究者	松木 容彦	(財)食品薬品安全センター-秦野研究所 副所長
協力研究者	奥山 光伸	(財)食品薬品安全センター-秦野研究所 研究員
	神戸川 明	神戸川研究所 所長
	伊藤 順子	相模女子短期大学 教授
	池川 繁男	近畿大学薬学部 教授

研究要旨

化学物質による環境汚染は社会的関心事であり、特に強い毒性が疑われているダイオキシン類は脂溶性が高く、食物連鎖を経てヒトに蓄積することが知られている。現在、食品や環境からのヒトへの曝露の安全レベルを確保するため、ガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリー (GC/MS) を用いて食品や大気さらには飲料水を対象としてポリ塩素化ダイオキシン類 (ポリ塩化ジベンゾ-*p*-ジオキシン (PCDDs)、ポリ塩化ジベンゾフラン (PCDFs)、ポリ塩化ジフェニル (PCB) の中で毒性の高い 29 種の同族体レベルならびにそれらのヒトの体内レベルのモニタリングがなされている。一方、ポリ臭素化ダイオキシン類 (PBDD/Fs) は化学合成品、特に難燃剤の不純物として存在し、焼却時に塩素化ダイオキシン同様、多量に発生するとされている。また、PBDD/Fs 及びごみ焼却や環境中で生ずる混合ハロゲン化ダイオキシン類 (PXDD/Fs) の毒性は PCDD/Fs と同等とされているが、それらの環境や食品の汚染あるいはヒトの体内曝露レベルに関する研究は PCDD/Fs に比較して遅れている。

我々は平成 11~13 年度に厚生科学研究費補助金研究において生体試料中 PCDD/Fs の酵素免疫測定法 (ELISA) を開発した。そこで本年度はこの成果を基に、PBDD/Fs の ELISA 法を構築し、ヒト体内曝露汚染レベルのスクリーニングあるいはモニタリングに適用可能な簡易アッセイ法を提供することを目的としている。

まず最初に炭素 1 位に、長さの異なるスペーサーを導入した臭素化ダイオキシオンハプテンを 3 種合成し、ついでそのウシ血清アルブミン結合体を作製し、その 2 種のタンパク結合物を免疫原に用いて BACB/c マウスに数回免疫した。抗体価の上昇したマウスの脾細胞とマウスミエ

ローマを細胞融合されてハイブリドーマを調製し、限界希釈法によりクローニングして抗 PBDD/Fs モノクローナル抗体を産生しているハイブリドーマ 5 種を得た。今後は得られたハイブリドーマの産生する抗体について臭素化、塩素化、臭素・塩素混合ダイオキシン類との交差性を調べ、さらに最適なモノクローナル抗体を用いて PBDD/Fs の ELISA を構築する。

A. 研究目的

ポリ臭素化ジベンゾ-*p*-ジオキシン (PBDDs) 及びポリ臭素化ジベンゾフラン (PBDFs) は、内装用繊維や家電用プラスチックなどに使用されている臭素化難燃剤の不純物として含まれており、また、これらの器材の熱処理過程で多量生成される。PBDD/Fs は塩素化ダイオキシン類 (PCDD/Fs) と同様程度の毒性を有すると考えられており、臭素化難燃剤の使用増加に伴って環境汚染やヒトへの健康影響が懸念されている。PBDD/Fs の分析法は複雑で市販されている標準物質も少ないことから環境中での汚染状況やヒトへの曝露及び健康影響などに関してほとんど明らかになっていない。今後、PBDD/Fs の汚染実態調査など大規模なモニタリング試験が実施される場合には、正規の測定法と期待され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) を補完する簡便法の開発が重要となる。

我々は平成 11~13 年度の厚生科学研究費補助金研究において生体試料中 PCDD/Fs の酵素免疫測定法 (ELISA) を開発したことから、その研究基盤をもとに本研究においては生体試料中 PBDD/Fs の ELISA を開発することとし、PBDD/Fs によるヒトでの汚染状況のスクリーニングやモニタリングに資することを目的としている。

本年度は、PBDD ハプテン 3 種、免疫原及び酵素標識ハプテンを合成し、ついで PBDD/Fs に対するモノクローナル抗体を得た。

B. 研究方法

1. 実験材料

1) ハプテン-ウシ血清アルブミン (BSA) 結合体及び西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識ハプテン

ハプテン 3 種の合成：4,5-dibromocatechol 及び 2,5-dibromonitrobenzene をカップリングさせて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し、酸無水物を反応させるか、また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スペーサーの長さの異なる 3 種のハプテンを得た (図 1)。(佐藤雅之、平成 13 年度厚生科学研究費補助金報告書-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-)

ハプテン 2 種 (図 1 ; TB-3、TB-4) の BSA 結合体及びハプテン 3 種 (図 1 ; TB-2、TB-3、TB-4) の HRP 標識体の合成については、ハプテンに塩酸 1-エチル 3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドの存在下、N-ヒドロキシコハク酸イミドを反応させて活性エステルに誘導し、BSA または HRP と常法により反応させて得た (神戸川 明、平成 13 年度厚生科学研究費補助金研究報告書-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)。

2) マウス

BALB/c マウス (雌、8 週齢) は、日本 SLC より購入した。

3) ミエローマ細胞株

P3/NS1/1-Ag4-1 ミエローマ細胞株は、ヒューマンサイエンス研究資源バンクから供与された。

2. 試薬と器材

1) 免疫・ELISA 関係

Freund の完全及び不完全アジュバント:

DIFCO 0638-60-7 及び 0639-60-6

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

2,3,7,8-tetrabromodibenzo-*p*-dioxin

(TBDD): Cambridge Isotope Laboratories,
Inc.

o-フェニレンジアミン二塩酸塩: Sigma
P9029

30% 過酸化水素水: 和光純薬工業

ELISA 用マイクロタイタープレート:
Costar 3590

2) 細胞融合関係

RPMI 1640 粉末培地: GIBCO-BRL 31800-022

ウシ胎児血清 (FCS): GIBCO-BRL 26140-079

ハイブリドーマクローニングファクター

(HCF): IGEN

HAT Media Supplement: Sigma H0262

ポリエチレングリコール 4000 (PEG):
Merck Art 9727

ジメチルスルホキシド (DMSO): Sigma
D2650

培養フラスコ(25 cm²): 岩城硝子 3100-025

培養フラスコ(75 cm²): Becton Dickinson
3824

クラスターディッシュ (96 ウェル): Costar
3598

マウスモノクローナル抗体アイソタイプピン
グキット: Amersham Pharmacia
Biotech code RPN29

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. 免疫及び試験採血 (株式会社シバヤギに 委託)

図 1 に示した 2 種ハプテン (TB-2、TB-3)
の BSA 結合体の各々を、以下の手順で
BALB/c マウス各 8 匹に繰り返し免疫投与し
た。

ハプテン-BSA 結合体 (50 µg) を滅菌生理
食塩水(0.1 mL) に溶解し、完全アジュバント
(0.1 mL) とのエマルジョンとして、上記マウ
スの foot pad (片足につき 1 カ所) 及び背部
(体毛をバリカンで除去して 20 カ所程度) に
皮下投与した。以後、同量の免疫原を不完全
アジュバントとのエマルジョンとして 6 回の
追加免疫を行った。4 回目の追加免疫より 7
日後に眼静脈よりヘマトクリット管を用いて
試験採血 (20-40 µL) した。得られた血液を
マイクロ遠心管に移し、室温で 3000 rpm、15
分遠心して血清を分離し、その HRP 標識ダ
イオキシシンの反応性を、下記の ELISA 法
により調べた。

5. ELISA

1) 緩衝液と基質溶液

Buffer A: 0.05 mol/L NaH₂PO₄ · Na₂HPO₄ 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*-Phenylenediamine·HCl 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)

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プレート
の各ウェルに、第二抗体の buffer B 溶液 (2
μg/mL) を分注 (100 μL/well) して、4°C で一
夜放置した。BSA (1.5%) の buffer B 溶液
(50 μL/well) をウェルに分注して、室温で 2-
3 時間放置した。溶液を吸引除去したのち、
buffer B でウェルを 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 buffer C で希釈
したマウス血清及び酵素標識ダイオキシンを
添加し (100 μL/well)、4°C で一夜放置した。
溶液を吸引除去したのち、buffer B でウェル
を 3 回洗浄し、基質溶液を添加して (100
μL/well)、室温で 1 時間放置した。3 mol/L 硫
酸 (50 μL/well) を加えて酵素反応を停止した
のち、490 nm の吸光度をプレートリーダー
により測定した。

6. 細胞融合によるモノクローナル抗体の調製

1) 培地

基本培地: 10 mmol/L HEPES-NaOH 緩
衝液 (pH 7.3) 及び硫酸カナマイシン (0.06%)
を含む RPMI 1640。

HAT 培地: 基本培地に 10% FCS、0.05
mmol/L 2-メルカプトエタノール、2
mmol/L L-グルタミン、1 mmol/L ビルビン酸
ナトリウム、及び HAT Media Supplement
(1 バイアル) を添加したもの (0.01 mmol/L
ヒポキサンチン、16 μmol/L チミジン、0.4
μmol/L アミノプテリンを含む)。

2) PEG 溶液

PEG (40 g) をダルベッコ PBS (-) (50 mL)
に溶解し、DMSO (10 mL)、0.1% ポリ-L-ア
ルギニン塩酸塩溶液 (1 mL) を加えたのち、
1 mol/L NaOH を用いて pH を約 7.5 に調整
した。

3) 細胞融合

抗体価の上昇が認められたマウスに、対応
する免疫原 (50 μg) の生理食塩水溶液 (0.5
mL) を腹腔内投与した。その 3 日後に脾臓を
摘出して基本培地 (10 mL) を入れたシャーレ
中で脾リンパ球をほぐし、細胞浮遊液を調製
した。ステンレスメッシュを用いて組織片を
除去したのち、室温で遠心 (1600 rpm、6 分)
し、上清を除去した。ペレットに基本培地
(10 mL) を加えて細胞を懸濁させて、同条件
で遠心し、上清を除去した。この操作を更に
1 回行ったのちペレットに基本培地 (10 mL)
を加えて細胞を懸濁し、その一部を用いて細
胞数を計算した。

上記の脾細胞浮遊液 (全量) 及びその約 1/5
数のミエローマ細胞を遠心管に移して室温で
遠心 (1600 rpm、5 分) し、上清を十分に除
去したのち、ペレットに予め 37°C に加温して
おいた PEG 溶液 (1 mL) を 1 分を要して滴
下した。本細胞懸濁液を 1 分間静かに混合し
たのち基本培地を 3 回に分けて添加し (1 mL
を 1 分; 1 mL を 1 分; 8 mL を 3 分)、同条
件で遠心した。上清を除去したのちペレット
をよくほぐし、10% HCF を含む HAT 培地
(用いた脾細胞 1×10^8 個あたり 50 mL) を加
えて融合操作後の細胞を懸濁させた。これを、
96 ウェルクラスターディッシュに分注 (100
μL/well) し、37°C、5% CO₂ で培養した。翌

日、HAT 培地 (100 $\mu\text{L}/\text{well}$) を添加し、3 日目、6 日目に培地の約半量を吸引除去し、HAT 培地 (100 $\mu\text{L}/\text{well}$) を新たに加えた。

4) 培養上清中の抗ダイオキシシン抗体のスクリーニング

培養開始より 8 日後にハイブリドーマの培養上清の一部 (25 μL) を採取し、0.1% BSA を含む buffer B (75 μL) と混合して上述の第二抗体固定化 ELISA プレートに添加した。室温で 1 時間インキュベーションしたのち、溶液を吸引除去し、プレートを buffer B で 3 回洗浄した。HRP 標識ダイオキシシン (20 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$) を加えて同条件でインキュベーションしたのち、同様にプレートを洗浄した。各ウェルに基質溶液 (100 $\mu\text{L}/\text{well}$) を添加し、上記の方法でプレート上の HRP 活性を測定した。

5) ハイブリドーマのスクリーニング

4) のスクリーニングにより選択した各ハイブリドーマについて、限界希釈法によりクローニングを行った。

ハイブリドーマを 10% HCF を含む HT 培地で 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈し、96 well の培養プレートの各 well に 0.2 mL ずつ分注して 10 日間培養した。ハイブリドーマの増殖がみられる well について、顕微鏡下で単クローンであることを確認した後、抗体産生ハイブリドーマを 48 well の培養プレートに移植して順次増殖させ、単クローンのハイブリドーマを得た。

6) モノクローナル抗体のアイソタイピング

マウスモノクローナル抗体アイソタイピングキットのプロトコールに従って操作した。タイピングスティックを buffer B で 5 倍希釈

した各ハイブリドーマの培養上清に浸して室温で 15 分間反応させた。スティックを洗浄し、HRP 標識抗マウス抗体と 15 分間反応させた後、酵素反応を行ってスティックの発色部位を観察した。

C. 研究結果

1. 各種ダイオキシシン-BSA 結合体に対するマウスの免疫応答性

4 回目の追加免疫後に、マウス血中の抗ダイオキシシン抗体の力価の上昇を ELISA により調べた。ELISA の感度と特異性は、抗体産生に用いるハプテンと酵素標識に用いるハプテンの組み合わせに影響を受けることが知られている。一般に、抗体産生用ハプテンとブリッジの構造、又は導入部位が異なるハプテンで調製した酵素標識体を用いるアッセイ系 (各々ブリッジヘテロログス系、サイトヘテロログス系) は、同一のハプテンを用いる系 (ホモログス系) に比べて感度に優れる。この点を考慮して、マウス血清サンプル全てについて 3 種類の HRP 標識ハプテンとの組み合わせで ELISA を行った。

図 2 に、4 回目の追加免疫後に得られた結果を示す。希釈した血清サンプルの各々について 25 ng の HRP 標識ハプテンとの反応性を調べ、縦軸に 1 時間の酵素反応で得られた ELISA のシグナル (490 nm の吸光度) をプロットした。3 種の HRP 標識体のうち、TB-2-HRP 及び TB-4-HRP でもある程度の反応がみられるが、TB-3-HRP を用いるとき、TB-3-BSA で免疫したマウス (no.1~8) の血清サンプルについて有意な陽性反応が認められ、臭素化ダイオキシシンに対する抗体が産生

されていることが示された。

2. マウス血清中抗ダイオキシン抗体の性質

以上の検討で良好な ELISA シグナルを与えた TB-3-HRP と血清 no.1~8 の組み合わせについて、遊離型臭素化ダイオキシンの添加による競合的な結合阻害効果を検討した。まず ELISA における抗体の希釈率を設定するため、各組み合わせで抗体希釈曲線を作成し（図3）、抗体希釈に比例した吸光度を与える希釈率で阻害実験を行った。すなわち、50000 倍希釈血清サンプルと TB-3-HRP 標識体の反応系に、TBDD を添加して、標識体と抗体の結合に対する競合阻害の程度を調べた（図4）。この結果、マウス#2 及び#6 では、他のマウスに比べて臭素化ダイオキシンに特異的で親和性の高い抗体が産生されていることが示唆された。

3. 細胞融合

上記の検討結果より、マウス#2 及び#6 が細胞融合における脾細胞供与動物として好適と思われた。そこで、これらマウス個体から各々脾細胞を調製し、別々に P3/NS1/1-Ag4-1 ミエローマ細胞と PEG を用いて融合した。得られた脾細胞数は、#2 からは 1.3×10^8 個、#6 では 1.2×10^8 個で、その全量を融合実験に用いた。実験方法に示したスケジュールで HAT 選択培養を行い、培養開始から8日後に各マイクロウエルを検鏡したところ、両融合実験とも多くのマイクロウエルでハイブリドーマが確認されたので、各ウエルから培養上清を採取し、抗ダイオキシン抗体の存否を ELISA によりスクリーニングした。その結

果、#2 及び#6 それぞれ 60 個及び 58 個のマイクロウエルについて有意な抗体の産生が示された。次いで、これらのウエルで形成されたハイブリドーマをスケールアップし、限界希釈法によりクローニングし、#2 及び#6 それぞれ 3 種及び 2 種の抗 PBDD/Fs 抗体産生ハイブリドーマを得た。これらモノクローナル抗体は IgG1、IgG2a 及び IgA であり、L鎖はすべて κ であった（表1）。

D. E. 考察・結論

イムノアッセイは、簡便・迅速かつに高感度で選択的分析が可能であるが、多成分のプロファイル分析には適さない。そこで臭素化ダイオキシンの簡易スクリーニング法を確立することを目的として、特に毒性が強いと考えられている 2,3,7,8-TBDD 及び 1,2,3,7,8-PeBDD をターゲット同族体として選択し、これらの合計値を求め得るモノクローナル抗体を用いるイムノアッセイ系の開発を検討した。

我々は平成 11~13 年度厚生科学研究費補助金研究において母乳中塩素化ダイオキシン濃度を測定し得る ELISA を開発した。この経験に基づいて1位にブリッジを有するハプテンを合成して免疫原とした。また、モノクローナル抗体の調製において最も標準的な BALB/c マウスを用い、親和性の高い抗体を期待して計7回繰り返し免疫した。

目的のモノクローナル抗体の産生確率を高めるためには、免疫原に対して、高親和力の抗体を産生しているマウスを脾細胞供与動物として選択することが重要である。そこで、免疫した全てのマウスについて抗体価を調べ、

良好な個体については、TBDD の添加による阻害効果を検討した。その結果、#2 と#6 の 2 個体が最も良好と思われた。

そこで、これらマウスの脾細胞を用いて細胞融合を行った。融合細胞の培養上清中の抗ダイオキシン抗体をスクリーニングならびにクローニングして、抗臭素化ダイオキシン抗体を分泌しているハイブリドーマ 5 種を得た。モノクローナル抗体は一定品質のものを大量かつ半永久的に供給することが可能なため、モノクローナル抗体を用いる ELISA はスクリーニング法やモニタリング法として汎用される簡便法として有用である。今後は作製したモノクローナル抗体について塩素化、臭素化及び塩素・臭素混合ダイオキシン同族体との交差反応性を調べて最適な抗体を選択し、臭素化ダイオキシンの ELISA を確立する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

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