

して脂肪を抽出した。

脂肪に 10 mol/L KOH/エタノール(19) 20 mL を加え、以下試料IIと同様に処理し、サンプル溶解液 0.06 mL を加えて再溶解した(図3)。

4 ELISA

ダイオキシン ELISA キットMおよびPの使用説明書に従って操作し、4-ハラメーター回帰式にフィットさせた検量線から試料中のダイオキシンをそれぞれ 2,3,7,8 TeCDD および TMDD 相当量として算出した。

キットM 試料溶解液で希釈した陽性コントロールの有機溶媒を乾固して、検量線希釈系列を作製した。検量線希釈系列および試料に緩衝液 B を加えて溶解し、抗ダイオキシン抗体溶液、次いでヘルオキシダーゼ標識ハプテン溶液を添加後、混合液 100 μ L を 2 次抗体固定化プレートの各ウェルに分注して冷蔵下で一晩放置した。ウェルを洗浄し、基質溶液を加えて室温で 30 分間酵素反応後の吸光度を測定した(図4)。

キットP ハプテン固相プレートのウェルにリン酸緩衝液 25 μ L ずつを入れ、標準液または試料溶液をそれぞれ 25 μ L、次いで 1 次抗体溶液を 50 μ L 重層した。室温で 90 分間静置後、洗浄液でウェルを洗い、2 次抗体溶液を加え、室温で 60 分間静置した。ウェルを洗浄し、発色液を加えて室温で 20 分間酵素反応後の吸光度を測定した(図5)。

C. D. 研究結果および考察

1 検量線

ハリデーション試験に参加した9機関の代表的な検量線の機関内変動(キットP)および

相対吸光度(キットM、P)をそれぞれ表2、図6および図7に示した。

キットMの検量線は昨年度の試験と同様で、再現性があった。

キットPの検量線吸光度の実施機関内における相対変動係数(cv)は1~10%であり、多くは5%以下であった。相対吸光度の測定機関間変動はやや大きかったものの、検量線を4ハラメーター回帰式にフィットさせたときの相関係数(r)はほとんどが0.99以上であり、本ELISAキットは再現性が高いことが示された。

2 試料I(標準品)の測定

キットPによる試料Iの測定値はL、M、Hそれぞれ62~388(平均201)、192~494(平均359)および662~1983(平均1243)TMDD pg eq/mLであり、機関間変動(各機関の平均値のcv)はそれぞれ43%、32%および31%であった。機関内変動(各機関のcv)はL、M、Hのそれぞれ2~40%、3~25%および4~21%、平均はそれぞれ14%、11%および12%でほとんどは20%以下であった(表3)。

また、キットに使用している抗体のダイオキシン異性体との交差反応性から算出した理論値はL、M、Hそれぞれ118、330、1180TMDD pg eq/mLであり、各機関のほとんどの測定値はこれらの値と大きくかけ離れることはなかった。

標準品試料の測定変動は機関間でやや大きかったものの機関内では小さく、また、測定値の濃度順位が逆転することはなかった。

3 試料II(標準品添加精製ハター)の測定

キットPによる試料IIの測定値はBL、L、

ジにより有機溶媒を乾固した。キットPのサンプル溶解液を加えて再溶解し、それぞれ試料I L、試料I・Mおよび試料I Hとした。

2) 試料II (標準品添加精製バター)

キットP バター10 gに10 mol/L KOH /エタノール(1/9) 160 mLを加えて室温で4時間攪拌し、一晩放置した。加温溶解して分液ロートに移し、*n* ヘキサン 80 mLおよび水 160 mLを加えて室温で2分間振とうして静置後、ヘキサン層を分取した。水層を*n* ヘキサン 80 mLで更に抽出してヘキサン層を合わせ、水 80 mLで2回洗浄後、ロータリーエバポレーターでヘキサンを約4 mLに濃縮した。その約1 mLを*n* ヘキサン 40 mLで予め洗浄した3層式シリカゲルカラムに負荷し、ヘキサン 40 mLで溶出した。残りの抽出液も同様に処理し、溶出液を合わせて濃縮後、ガラス試験管に入れて窒素ハースにより乾固した。キットPのサンプル溶解液またはダイオキシン標準液(低・中濃度)を加えて再溶解し、それぞれ試料II・BL、試料II Lおよび試料II Mとした(図1)。

3) 試料III (標準品添加牛乳)

キットM ブランク牛乳(試料III BL)およびダイオキシン標準液を添加した牛乳(試料III M) 30 mLにそれぞれシユウ酸ナトリウム 0.3 gとエタノール 30 mLを加えて混合した。ジエチルエーテル 15 mLおよび石油エーテル 15 mLを加えて、2~3分間振とうして脂肪を抽出した。水層をジエチルエーテル/石油エーテル(1/1) 30 mLでさらに2回抽出してエーテル層を分液ロートに合わせ、2% NaClおよび水 100 mLで洗浄した。エーテル層を無水硫酸ナトリウムで脱水して

ロータリーエバポレーターで有機溶媒を乾固し、脂肪重量を測定した。

脂肪にエタノール 10 mLおよび10 mol/L KOH 1 mLを加えて約40°Cで2時間攪拌し、室温で一晩放置した。加温溶解して分液ロートに移し、*n* ヘキサン 10 mLおよび水 10 mLを加えて室温で3分間振とうして静置後、ヘキサン層をナス型フラスコに分取した。水層を*n* ヘキサン 10 mLで更に2回抽出し、ロータリーエバポレーターでヘキサンを約5 mLに濃縮してガラス遠心管に移した。この遠心管に濃硫酸 1 mLを加えて室温で3分間振とう後、遠心分離(3000 rpm、室温 3分)して硫酸を除去した。硫酸層がほとんど着色しなくなるまで、この操作を更に2回繰り返した。ヘキサン層を乾固し、濃硫酸 1 mLを加えて60~70°Cで約30分間放置した。硫酸層を*n* ヘキサン 1 mLで3回抽出し、合わせたヘキサン層に水 2 mLを加えて室温で3分間振とうし、水冷後、遠心分離(3000 rpm、4°C、5分)した。次いで、フルオロベンゼン 1 mL、エタノール 1 mL、アセトン 3 mLおよび*n* ヘキサン 3 mLで順次洗浄したwakogel P-29カートリッジカラムに先のヘキサン層を負荷し、*n* ヘキサン 2 mLおよびフルオロベンゼン/*n* ヘキサン(3/97) 2 mLでカラムを洗浄後、フルオロベンゼン/*n* ヘキサン(1/1) 0.6 mLでダイオキシンを溶出した。溶出液に試料溶解液 50 μLを添加後、溶媒を乾固して緩衝液B 100 μLに再溶解した(図2)。

キットP ブランク牛乳(試料III BL)およびダイオキシン標準液を添加した牛乳(試料III M) 30 mLを、キットMと同様に処理

M それぞれ 17~84 (平均 53)、149~396 (平均 242) および 308~558 (平均 443) TMDD pg eq /mL であり、機関間変動はそれぞれ 40%、30% および 21% であった。機関内変動は BL、L、M それぞれ 5~61%、3~35% および 1~22%、平均はそれぞれ 27%、13% および 9% であり、L および M のほとんどは 20% 以下であった (表 4)。

また、キットに使用している抗体のダイオキシン異性体との交差反応性から算出した添加ダイオキシン理論値は BL、L、M それぞれ 0、118、330 TMDD pg eq /mL であり、各機関の測定値はこれらの値と大きくかけ離れることはなかった。

測定変動は機関間でやや大きかったものの機関内では小さく、また、測定値の濃度順位が逆転することはなかった。

4 試料Ⅲ (標準品添加牛乳) の測定

試料Ⅲより抽出した牛乳 30 mL 中の脂肪含量は、0.80~1.42 g (平均 1.04 g) であった (表 5、表 6)。

キット M による試料Ⅲの測定値は BL および M それぞれ 0~127 (平均 46) および 16~171 (平均 122) 2,3,7,8 TeCDD pg eq /mL であり、機関間変動はそれぞれ 83%、および 73% であった。機関内変動は BL および M それぞれ 0~82% および 6~65%、平均はそれぞれ 30% および 23% であった (表 7)。

また、キットに使用している抗体のダイオキシン異性体との交差反応性から算出した試料Ⅲ M の理論値は 25 TeCDD pg eq /g fat であり、各機関のほとんどの測定値はこの値と大きくかけ離れることはなかった。

キット P による試料Ⅲの測定値は BL およ

び M それぞれ 0~59 (平均 30) および 71~313 (平均 141) TMDD pg eq /mL であり、機関間変動はそれぞれ 59%、および 53% であった。機関内変動は BL および M それぞれ 0~65% および 2~49%、平均はそれぞれ 24% および 17% であった (表 8)。

また、キットに使用している抗体のダイオキシン異性体との交差反応性から算出した試料Ⅲ M の理論値は 15 TMDD pg eq /g fat であり、各機関のほとんどの測定値はこの値と大きくかけ離れることはなかった。

両キットとも、標準品試料の測定変動は機関間でやや大きかったものの機関内では比較的小さく、また、測定値の濃度順位は逆転することなく再現された。

E. 結論

マウスモノクローナル抗体およびウサギポリクローナル抗体を用いたダイオキシン ELISA キットを開発し、ダイオキシン標準品、標準品添加精製バターおよび標準品添加牛乳を共通試料として 9 機関でバリデーション試験を行い、ダイオキシン類のモニタリング法およびスクリーニング法としての有用性を評価した。

その結果、測定機関間変動はやや大きかったものの、試料Ⅰ、ⅡおよびⅢの測定機関内変動はほとんどが 20% 以下と小さく、簡易測定法として満足できるものであった。両キットとも操作が簡便で多検体が同時に測定できるうえ、測定内変動が比較的小さく、また試料中濃度順位が逆転することなく再現されたことから、安価な簡易測定法としてダイオキシン類のスクリーニング法およびモニタリン

グ法となることが示された。

現在、両キットとも生体試料だけでなく、
土壌や底質など環境試料や食品も測定できる
前処理法を検討し、適用範囲を広げている。

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

表1 ダイオキシン標準溶液の組成

	Compound	Concentration (ng/mL)
PCDD	2,3,7,8-TeCDD	100
	1,2,3,7,8-PeCDD	250
	1,2,3,4,7,8-HxCDD	250
	1,2,3,6,7,8-HxCDD	250
	1,2,3,7,8,9-HxCDD	250
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	250
	1,2,3,4,6,7,8,9-OCDD	500
PCDF	2,3,7,8-TeCDF	100
	1,2,3,7,8-PeCDF	250
	2,3,4,7,8-PeCDF	250
	1,2,3,4,7,8-HxCDF	250
	1,2,3,6,7,8-HxCDF	250
	1,2,3,7,8,9-HxCDF	250
	2,3,4,7,8,9-HxCDF	250
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	250
	1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	250
	1,2,3,4,6,7,8,9-OCDF	500

表2 ダイオキシンELISAキットP検量線(吸光度)の機関内変動

TMDD conc (pg/mL)	CV for Absorbance (%)										
	Lab A	Lab B	Lab C	Lab D	Lab E	Lab F	Lab G	Lab H	Lab I	Mean	
0	41	23	10	43	31	09	92	09	28	32	
256	41	04	10	03	25	22	21	13	12	17	
64	18	16	21	26	09	23	20	33	20	21	
1600	85	56	28	22	51	08	32	65	64	4.6	
40000	41	78	56	91	39	26	66	07	95	5.5	

表3 ダイオキシンELISAキットPによる試料I (標準品)の測定結果

Sample I	TMDD (pg eq /mL)											Mean	SD	cv (%)			
	Lab A	Lab B	Lab C	Lab D	Lab E	Lab F	Lab G	Lab H	Lab I	Lab J	Lab K						
L	158	355	212	261	245	167	63	213	174								
	153	439	210	216	215	167	37	188	161								
	nt	369	190	224	172	246	87	198	142								
	Mean	156	388	204	234	211	193	62	200	159					201	86	42.8
	SD	4	45	12	24	37	25	13	16								
	cv (%)	2.3	11.6	6.0	10.3	17.4	40.1	6.3	10.1					14.2			
M	221	495	466	516	372	306	176	335	265								
	260	464	441	422	414	400	184	280	240								
	nt	484	429	544	470	512	217	295	248								
	Mean	241	481	445	494	419	406	192	303	251					359	113	31.6
	SD	28	16	19	64	49	22	28	13								
	cv (%)	11.5	3.3	4.2	12.9	11.7	11.3	9.4	5.1					10.5			
H	650	1152	1520	2086	1335	896	1051	1250	1289								
	644	1545	1721	1990	864	1000	1033	871	1171								
	692	1062	1783	1873	1124	1294	1116	1226	1316								
	Mean	662	1253	1675	1983	1108	1063	1067	1116	1259					1243	382	30.8
	SD	26	257	137	107	236	44	212	77								
	cv (%)	4.0	20.5	8.2	5.4	21.3	19.4	4.1	6.1					12.0			

表4 ダイオキシンELISAキットPによる試料Ⅱ(標準品添加精製バター)の測定結果

Sample Ⅱ	TMDD (pg eq /mL)											Mean	SD	cv (%)			
	Lab A	Lab B	Lab C	Lab D	Lab E	Lab F	Lab G	Lab H	Lab I	Lab J	Lab K						
BL	49	41	63	70	68	32	20	56	52								
	63	16	51	69	64	62	14	121	61								
	56	15	71	75	29	43	18	74	68								
	Mean	56	24	62	71	54	46	17	84	60	53	21	40	2			
SD	7	15	10	3	21	15	3	34	8								
cv (%)	12.5	61.4	16.3	4.5	40.0	33.2	17.6	40.1	13.3	26.6							
L	186	407	269	287	237	234	185	221	214								
	199	365	243	326	171	287	96	243	236								
	195	416	271	267	115	237	166	230	228								
	Mean	193	396	261	293	174	253	149	231	226	242	73	30	2			
SD	7	27	16	30	61	30	47	11	11								
cv (%)	3.4	6.9	6.0	10.2	35.0	11.8	31.5	4.8	4.9	12.7							
M	297	530	481	572	547	291	358	405	498								
	332	594	515	591	411	431	249	399	500								
	337	541	501	512	388	453	317	397	502								
	Mean	322	555	499	558	449	392	308	400	500	443	93	21	1			
SD	22	34	17	41	86	88	55	4	2								
cv (%)	6.8	6.2	3.4	7.4	19.2	22.4	17.9	1.0	0.4	9.4							

表5 ダイオキシンELISAキットM用試料Ⅲ(標準品添加牛乳)の脂肪含量

SampleⅢ	Fat (g / 30 mL of milk)											Mean	SD	cv (%)			
	Lab A	Lab B	Lab B	Lab C	Lab C	Lab D	Lab D	Lab E	Lab E	Lab F	Lab F				Lab G	Lab G	Lab H
BL	1 12	0 74	1 19	1 19	1 13	1 13	0 92	1 12	1 12	1 13	1 30	0 99					
	1 14	0 98	1 22	1 22	1 17	1 17	1 00	1 14	1 14	1 12	1 40	1 08					
	1 10	0 74	1 22	1 22	1 19	1 19	0 64	1 13	1 13	1 12	1 60	0 95					
	1 10	1 19	1 17	1 17	1 05	1 05	0 70	1 13	1 13	1 01	1 40	0 97					
M	1 09	1 05	1 20	1 20	1 10	1 10	0 90	1 14	1 14	1 14	1 50	0 91					
	1 10	0 94	1 23	1 23	0 97	0 97	0 88	1 15	1 15	1 11	1 30	1 07					
Mean	1 11	0 94	1 21	1 21	1 10	1 10	0 84	1 14	1 14	1 11	1 42	1 00	1 09	0 16	15 0		
SD	0 02	0 18	0 02	0 02	0 08	0 08	0 14	0 01	0 01	0 05	0 12	0 07					
cv (%)	1 7	18 8	1 9	1 9	7 4	7 4	16 6	0 9	0 9	4 3	8 3	6 8	7 4				

表6 ダイオキシンELISAキットP用試料Ⅲ(標準品添加牛乳)の脂肪含量

SampleⅢ	Fat (g / 30 mL of milk)											Mean	SD	cv (%)			
	Lab A	Lab B	Lab C	Lab D	Lab E	Lab F	Lab G	Lab H	Lab I	Lab J	Lab K						
BL	1 15	0 68	1 25	1 02	0 84	1 05	1 12	1 00	0 83								
	1 10	0 63	1 25	1 12	0 82	1 05	1 12	0 80	0 91								
	1 19	0 59	1 24	1 07	0 71	0 85	1 12	0 90	0 84								
	1 18	0 85	1 26	1 10	0 91	1 02	1 07	0 70	0 80								
M	1 17	0 71	1 26	1 06	0 84	1 03	1 08	1 10	0 83								
	1 19	0 77	1 29	1 09	0 66	1 05	1 07	1 00	0 90								
	Mean	1 16	0 71	1 26	1 08	0 80	1 01	1 10	0 92	0 85	0 99	0 18	18 4				
SD	0 03	0 09	0 02	0 04	0 09	0 08	0 03	0 15	0 04								
cv (%)	3 0	13 4	1 4	3 3	11 7	7 8	2 4	16 1	5 1	7 1							

表7 ダイオキシンELISAキットMによる試料Ⅲ(標準品添加牛乳)の測定結果

SampleⅢ	2,3,7,8-TeCDD (pg eq /g fat)											
	Lab A	Lab B	Lab C	Lab D	Lab E	Lab F	Lab G	Lab H	Lab I	Mean	SD	cv (%)
BL	59	231	ND	26	ND	29	22	49	74			
	66	21	ND	17	ND	13	09	56	60			
	53	130	ND	12	138	32	22	nt	65			
	Mean	59	127	00	18	46	24	18	53	66	46	38
SD	07	105		07		10	08	05	07			
cv (%)	110	821	00	393		418	438	90	105	29.7		
M	136	169	35	146	16	76	159	68	171			
	165	336	42	132	33	78	135	79	179			
	164	442	41	159	24	56	27	nt	160			
	Mean	155	316	39	145	24	70	107	73	170	122	89
SD	16	138	04	14	09	12	70	08	09			
cv (%)	106	437	100	94	359	173	654	105	55	231		

表8 ダイオキシンELISAキットPによる試料Ⅲ(標準品添加牛乳)の測定結果

SampleⅢ	TMDD (pg eq /g fat)														Mean	SD	cv (%)	
	Lab A	Lab B	Lab C	Lab D	Lab E	Lab F	Lab G	Lab H	Lab I	Lab J	Lab K	Lab L	Lab M	Lab N				
BL	ND	57	21	14	38	21	39	19	68									
	ND	ND	19	57	27	24	32	17	56									
	ND	ND	18	76	31	32	37	42	52									
	Mean	00	19	19	49	32	26	36	2.6	59	30	17	586					
SD			02	32	0.6	06	04	14	08									
cv (%)	00		79	648	174	222	100	534	142	237								
M	155	107	101	313	162	62	170	113	146									
	149	89	91	340	126	82	175	54	217									
	149	106	90	285	169	69	171	50	78									
	Mean	151	101	94	313	152	71	172	72	147	141	74	525					
SD	03	10	06	28	23	10	03	35	70									
cv (%)	23	100	65	88	151	143	15	488	473	172								

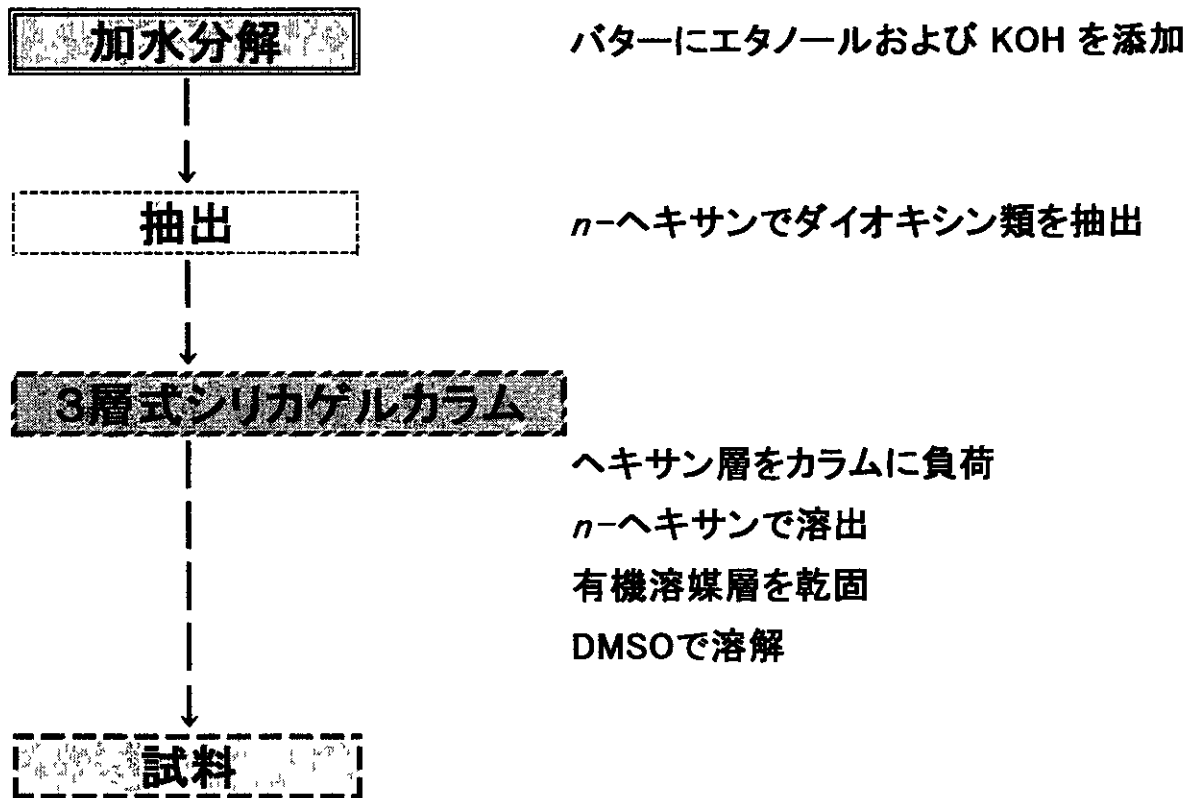


図1 ダイオキシンELISAキットP用試料Ⅱの調製法

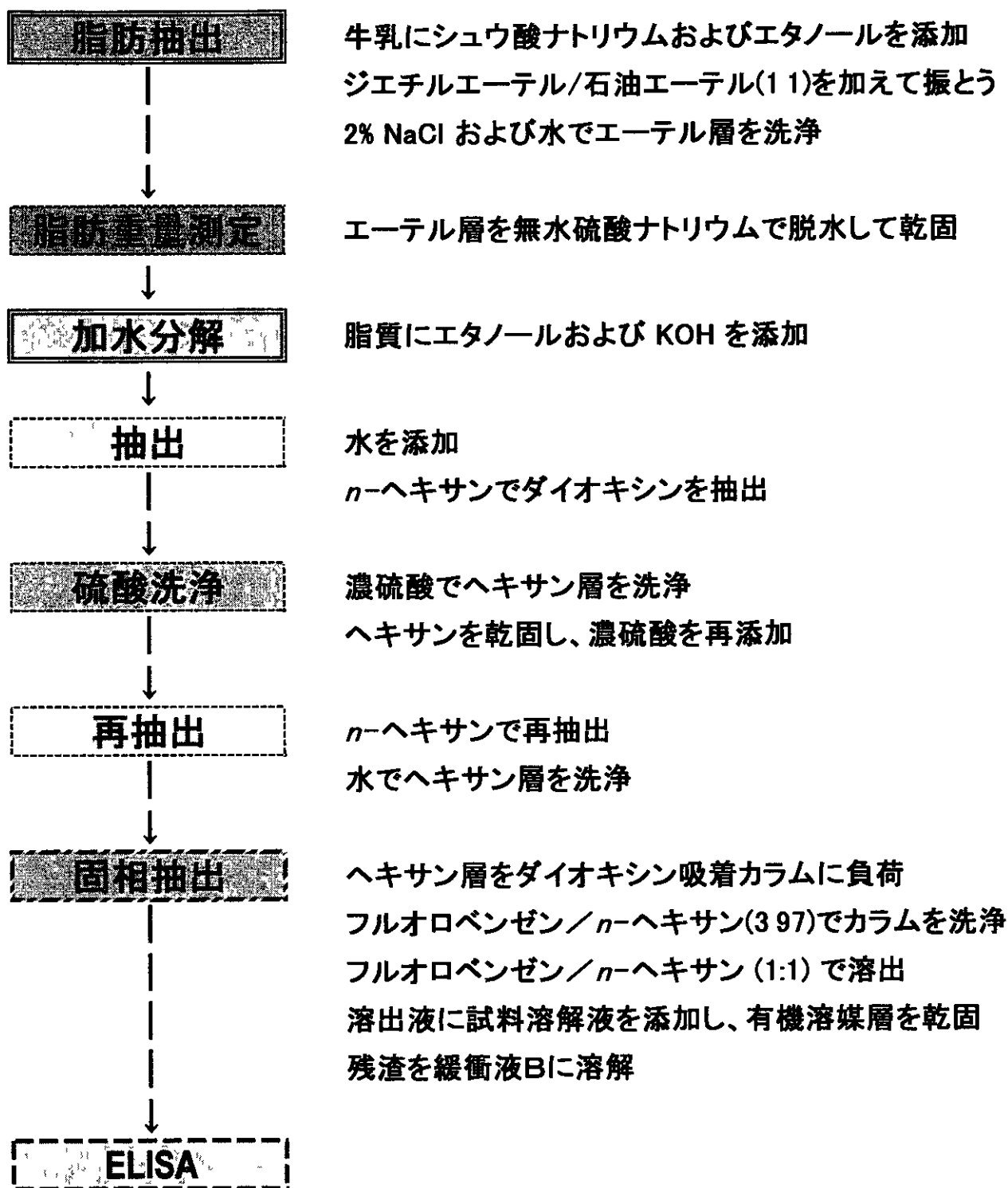


図2 ダイオキシソブチルセロソルゲル ELISA キットM用試料Ⅲの調製法

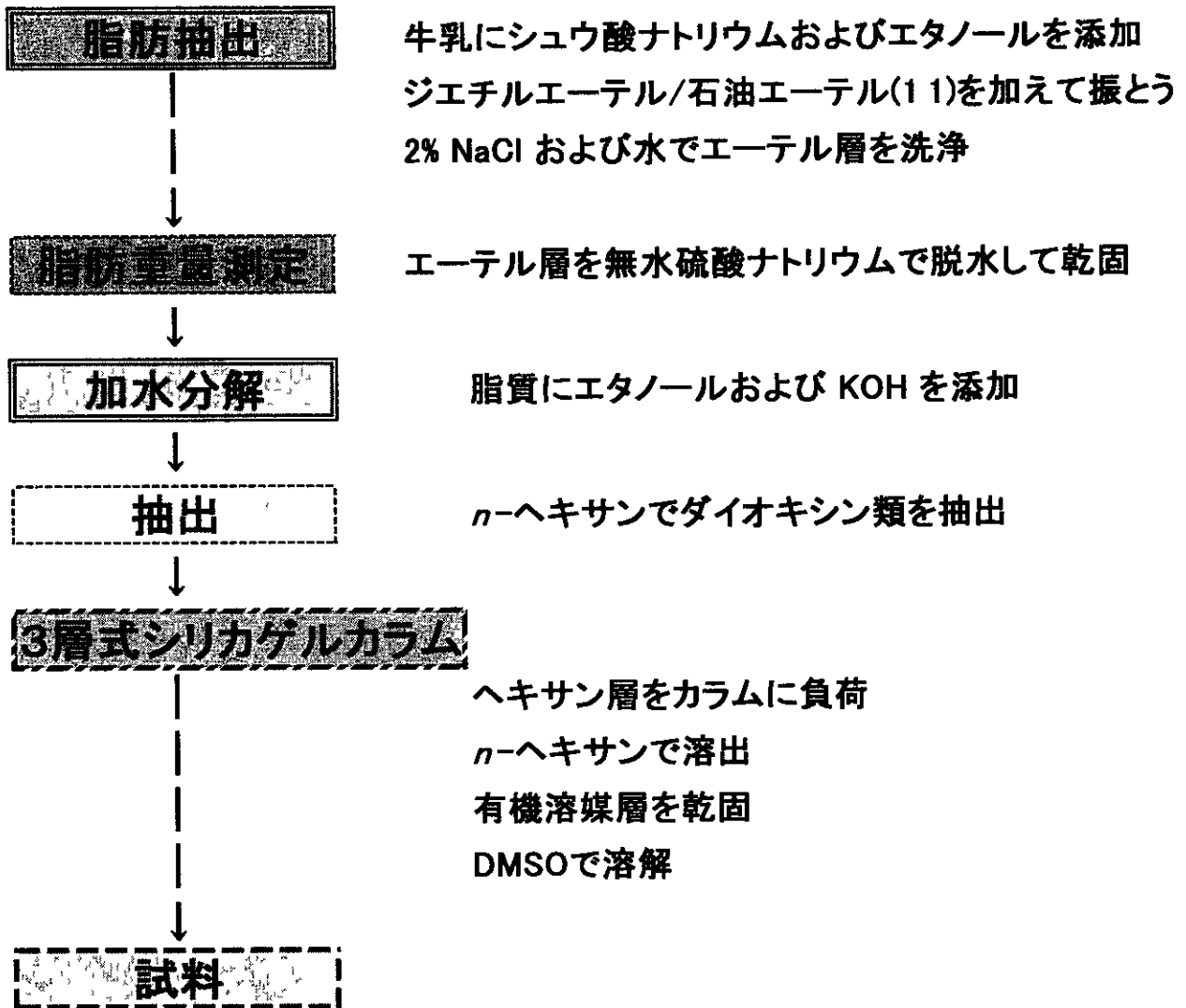


図3 ダイオキシンELISAキットP用試料Ⅲの調製法

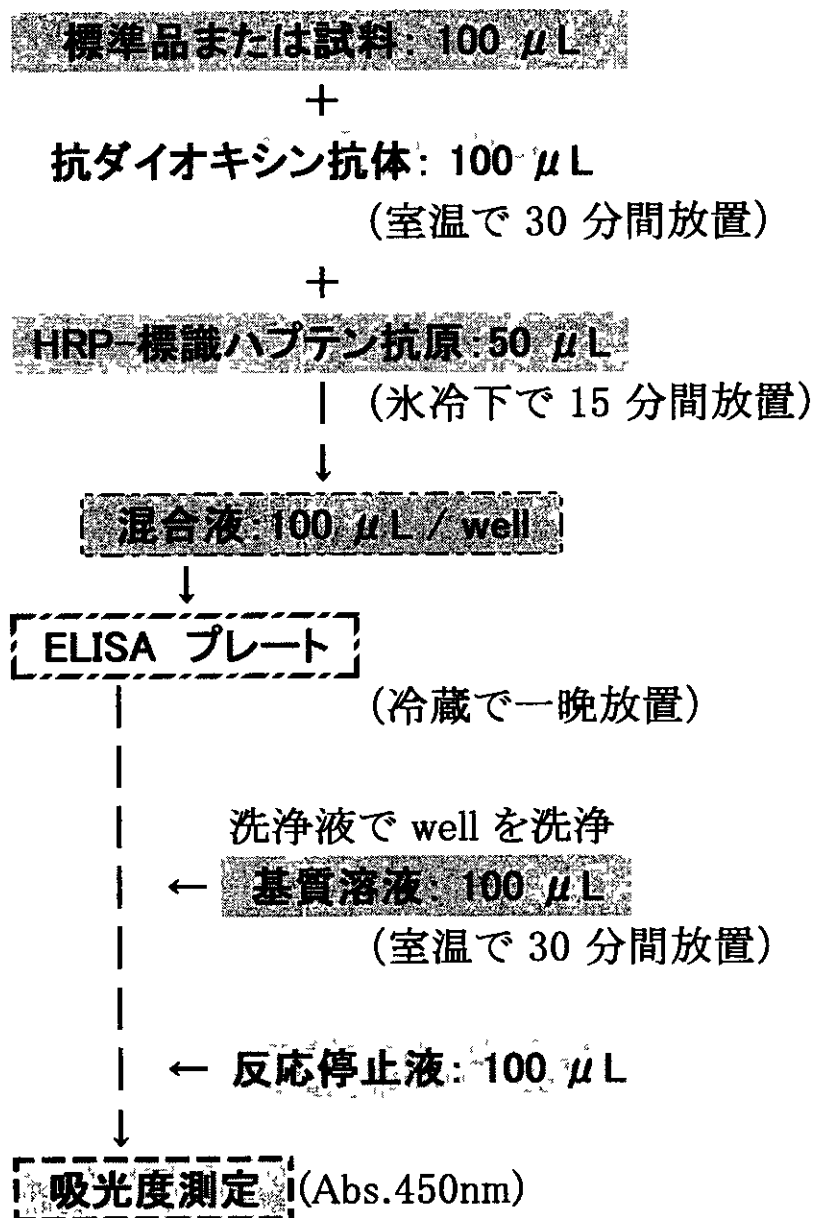


図 4 ダイオキシンELISA キットMの操作手順

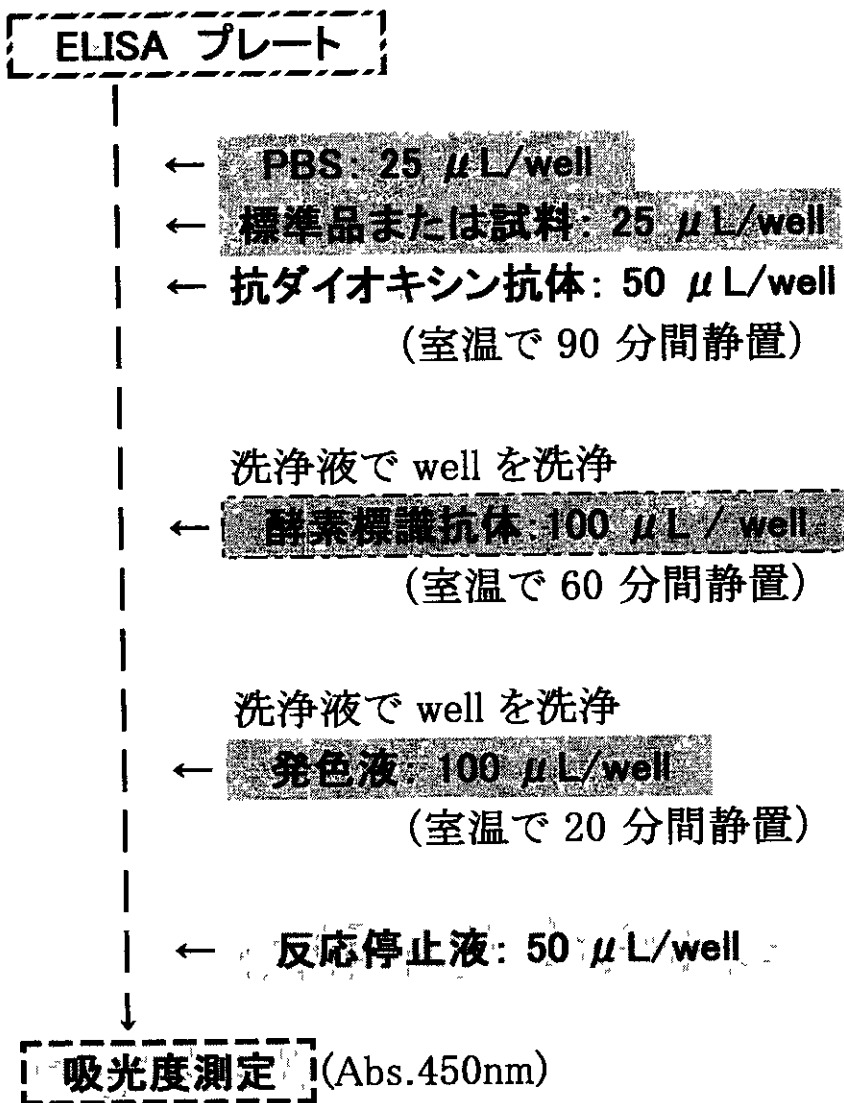


図 5 ダイオキシンELISA キットPの操作手順

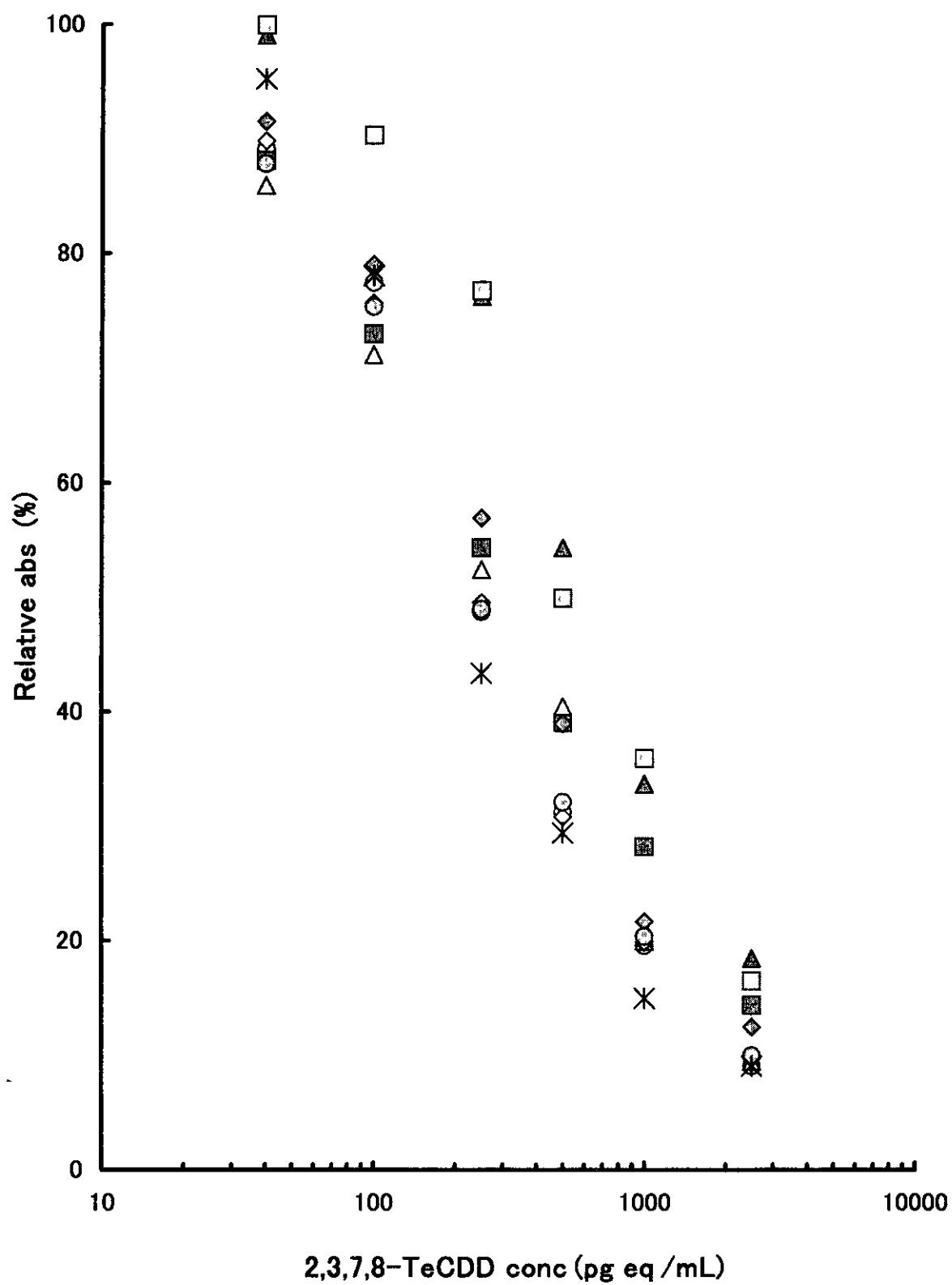


図6 ダイオキシンELISAキットMの検量線

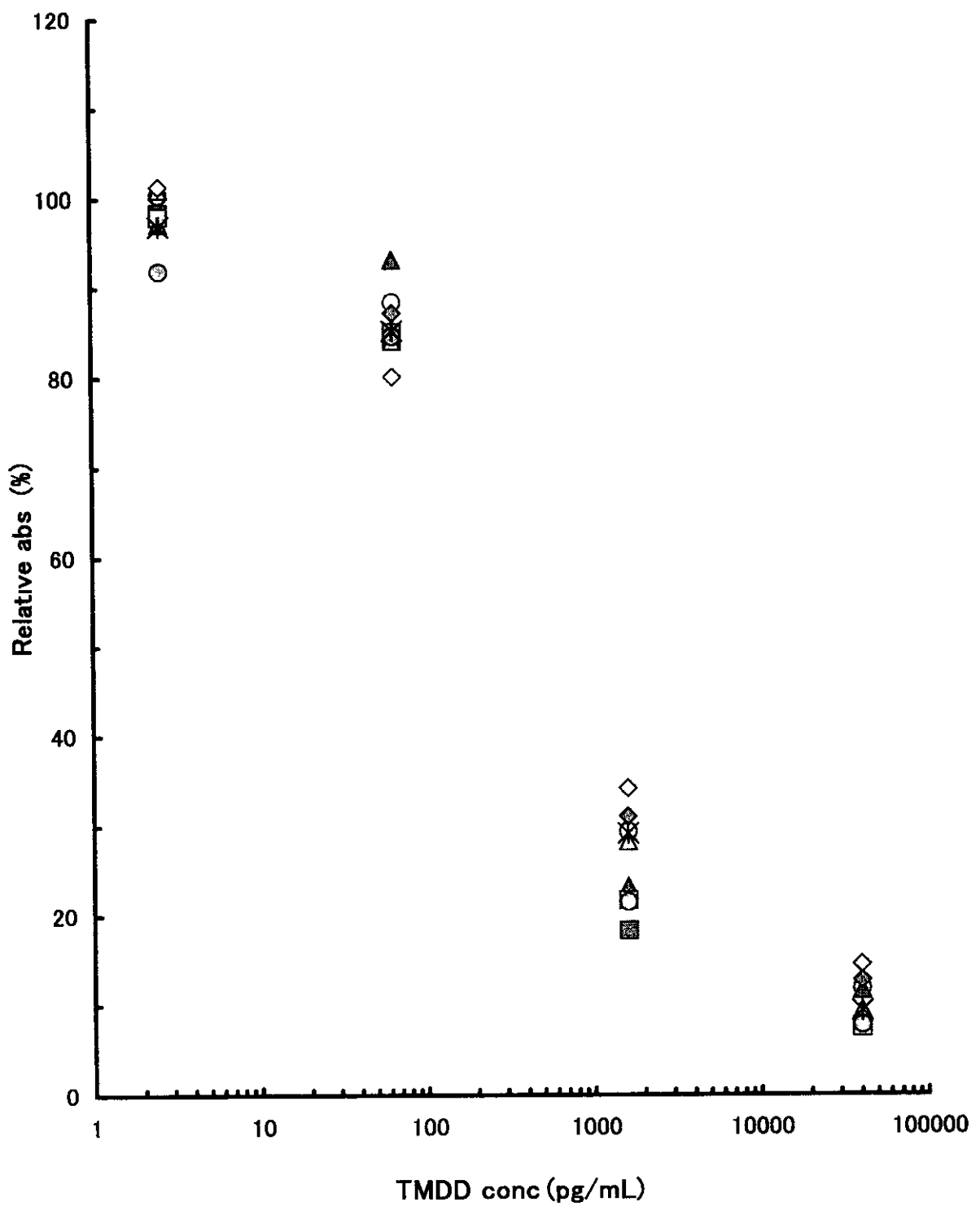


図7 ダイオキシンELISAキットPの検量線

平成 15 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）

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 2）
—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レベルを評価するため、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）およびポリ塩化ビフェニル（PCB））の中で毒性の強い 29 種の同族体レベルのモニタリングが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 およ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。昨年度はこの成果を基に、PBDD/Fs のヒト体内曝露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としての ELISA を提供することを目的とし、抗 PBDD/Fs マウスモノクローナル抗体を作製した。

本年度は得られたハイブリト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、最適なモノクローナル抗体を選択して PBDD/Fs の ELISA を構築し、さらに、脂質からの ELISA 試料調整法を検討した。選択したモノクローナル抗体 B6 11 は塩素化および臭素化ダイオキシンに対して同程度に親和性が高く、本抗体を用いる ELISA は 1 pg/assay の 2,3,7,8 TeBDD を検出できる感度を有するため、臭素化、塩素化、臭素・塩素混合ダイオキシン類の有用な簡易測定法として期待される。また、化学修飾シリカゲルカラムおよび Wakogel P-29 カラムを用いた簡便な ELISA 試料調整法を確立した。