

B-30

非意図的生成物質（ダイオキシン類）の簡易測定法の開発

大塚製薬（株）	○小平 司
（株）矢内原研究所	加藤 郁夫
同上	畠 新民
同上	矢内原 昇
東洋建設（株）	伊佐野 隆
積水化学工業（株）	大石 和之
同上	川辺 俊樹
独立行政法人土木研究所	田中 宏明
同上	小森 行也
同上	岡安 祐司

1. はじめに

化学工業の発展にともない、人間の生活に有益な化学物質が多く生み出されてきた。しかしながら、それらの化学物質の中には自然界に放出されても、簡単には分解されない化学物質もあることが徐々に判明してきた。その中でもダイオキシン類は毒性が強く、生態系への蓄積や食物への汚染により引き起こされるヒトへの健康影響が問題となっている。

この研究はダイオキシンの簡便かつ迅速に測定する方法の開発に関するものである。

本研究に用いたポリクローナル抗体は化学合成した 4-[(2,3,7-trichlorodibenzo-*p*-dioxin-1-yl)-carbamoyl]butanoic acid と 4-[(2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-1-yl)carbamoyl] butanoic acid を KLH または pTG（ブタサイログロブリン）とそれぞれ反応させた複合物を免疫原として 19 匹の家兎に注射免疫して作成した。標識体は、化学合成した 4-[(2,3,7-trichlorodibenzo-*p*-dioxin-1-yl)carbamoyl]butanoic acid と Arg-Arg-Biotin を反応させ水溶性を高めた。

測定系は常法にしたがい、ELISA によるアッセイ系を確立した。

このアッセイ系における再現性は測定内誤差および測定間誤差はそれぞれ、8.4 %と 11.3 %と良好であった。また、最小検出感度は 100 pg/mL であった。

本測定系での 2,3,7-trichlorodibenzo-*p*-dioxin と 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin との交差反応性は同等であり、毒性の少ない 2,3,7-trichlorodibenzo-*p*-dioxin を標準物質として用いることができた。（表 1 参照）さらに、アクリル酸エステル樹脂の吸着剤を使用した回収実験で良好な結果が得られた。

本アッセイ系の開発によりダイオキシンの多量検体を簡便にかつ迅速に測定することが可能となり、その有用性はきわめて高いと思われる。

2. 実験材料と方法

2. 1 免疫原の調製

4-[(2,3,7-Trichlorodibenzo-*p*-dioxin-1-yl)carbamoyl]butanoic acid 5 mg を (DMSO : NaH₂PO₄ = 3.5 : 2.5, v/v) 5 mL に溶解し、KLH (Pierce 社) 10 mg を (DMSO:Na₂HPO₄=0.2 : 1.8, v/v) 2 mL に溶解して混合攪拌した。ついで水溶性 DCC 69 mg（モル比 30 倍量）を添加し、室温 2 時間スターラーで攪拌した。ブタ TG (Sigma-Aldrich) も同様の比率で行った。

4-[(2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-1-yl)carbamoyl]butanoic acid も同様の比率で KLH またはブタ TG との複合体を作成した。

2. 2抗体作成

4-[(2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-1-yl) carbamoyl]butanoic acid と KLH, またはブタ TG をコンジュゲートした複合物、4-[(3,7,8-Trichlorodibenzo-*p*-dioxin-1-yl)carbamoyl]butanoic acid と KLH またはブタ TG をコンジュゲートした複合物の合計 4 種類を免疫抗原として用いた。各免疫原を初回免疫量 (500 μ g) 0.6 mL をフロイントの完全アジュバント (Calbiochem-Behring CA, USA) 0.6 mL とオムニミキサーを用いて、室温で 45 分間混合した後、合計 19 匹のウサギ (日本ホワイト オス 体重 2~2.5 kg) の皮下に注射免疫した。次回以降 6 回目までの免疫は抗原量として半分量の 250 μ L を二週間間隔で注射免疫した。

2. 3 ダイオキシン誘導体及び標識体の調整

1-amino-2,3,7-trichlorodibenzo-*p*-dioxin は 2,3,7-trichlorodibenzo-*p*-dioxin を硝酸酢酸処理してニトロ化し、さらに Sn(II)/HCL により還元して得られた。この化合物をモノエチルグルタミン酸の酸クロライドでアシル化し、NaOH/EtOH でケン化した。さらに、この合成物を 0.1% TFA/CH₃CN を使用した逆相の HPLC により精製し、4-[(2,3,7-trichlorodibenzo-*p*-dioxin-1-yl) carbamoyl]butanoic acid を得た。次に Fmoc を使用する液相法により合成した H-Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-NHNH-biotin と HOBt/WSCD を使用して 4-[(2,3,7-trichlorodibenzo-*p*-dioxin-1-yl) carbamoyl]butanoic acid とカップリングした。さらに官能基を保護した後、TFA で脱保護した。ここで得られた粗生成物は 0.1% TFA/CH₃CN を使用した逆相の HPLC で精製することにより、標識体としての (4-[(2,3,7-trichlorodibenzo-*p*-dioxin-1-yl)carbamoyl]butanoyl-Arg-Arg-NHNH-biotin) を得た。

2. 4 アッセイ系の確立

アッセイには標準品として 2,3,7-trichlorodibenzo-*p*-dioxin を使用した。

2,3,7-trichlorodibenzo-*p*-dioxin を DMSO で 1000 μ g/mL の濃度になるように調整し、次に、0.01 M のリン酸緩衝液 (0.1% (w/v), 0.15 M NaCl, pH 6.0) で使用範囲の 0.1~1000 ng/mL まで希釈して使用した。標識体も同様の緩衝液で 2ng/mL の濃度まで希釈して使用した。

抗体は 19 匹に免疫してえられた抗体のなかから、標識体と一番反応の強かった RY853 を使用した。RY853 をプロテイン A カラムで精製した後、96 穴のプレートに固相化した。固相化したプレートの各ウェルはアッセイに使用する前に洗浄液 (0.9% NaCl, 0.05% Tween 20) 350 μ L で 3 回洗浄した。アッセイ系は緩衝液 50 μ L, サンプルまたは標準液を 50 μ L, 標識体を 50 μ L をそれぞれマイクロタイタープレートの各ウェルに二重測定で分注し、プレートをミキシング後、4℃で一晩インキュベーションした。その後、プレートウォッシャー 3 回洗浄後、ストレプトアビジン-HRP (緩衝液で 2000 倍希釈) を 100 μ L 各ウェルに分注した。プレートをミキシング後室温で 1.5 時間インキュベーションし、再度、洗浄液で 3 回洗浄を行った。次に、o-フェニレンジアミン溶液 (10 mg/tablet, Sigma, USA, 1mg/mL) を 100 μ L 加えた。15 分静置後、2N HCl を 100 μ L 加えて、反応を停止した後、マイクロプレートリーダーにて 492 nm の波長で吸光度を測定した。

3. 結果

図 1 に典型的な標準曲線を示した。測定範囲は 0.1~1000 ng/mL と広範囲の測定が可能であった。この測定系における再現性は測定内誤差および測定間誤差はそれぞれ 8.4% と 11.3% であった。また、標準品は毒性係数のない 2,3,7-trichlorodibenzo-*p*-dioxin を使用しており、キット化した時の測定者の安全性も考慮されている。

次に、この抗血清 RY853 の特異性を調べるために各種ダイオキシン類との交差反応性を検討した。結果を表 1 に示した。表 1 より RY853 の抗血清は 2,3-dichlorodibenzo-*p*-dioxin と 46% の反応性を示したが、2,7-dichlorodibenzo-*p*-dioxin とはほとんど反応を示さなかった。さらに 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran とも 100% の反応を示したことより、ダイオキシン構造の二つの塩素基と一つの酸素基を強く認識している

と考えられた。また、塩素数が増えるにしたがって、交差反応性が減少しており、このことは毒性係数とも関係しており、この抗血清で測定することにより TEQ（総毒性量）とも強く相関することが示唆された。そこで、我々は実際の土壌検体を使用して、従来の GC-MS で測定した値との相関を調べた。その結果を図 2 に示した。土壌検体は公定法にしたがい、ソックスレーで抽出したのち、多層シリカゲルカラムでクリーンアップしたものを、ELISA 法で測定した。GC-MS は一般に用いられている、ソックスレー、多層シリカゲルカラム、活性炭カラムを通したものを測定に用いた。相関係数は $r = 0.97$ と非常に良い相関を示した。ただ、傾きが 0.6 と ELISA 法の方が低くなっていた。これは、今回 GC-MS の測定値はコプラナー PCB も含めた値であり、ELISA では PCB との交差反応性は少ないと考えられるので、この結果は妥当性があると考えられる。

また、アクリル酸エステル樹脂を使用して 2,3,7-trichlorodibenzo-p-dioxin の添加回収実験を行なった結果、85～110% の回収率が得られた。これは検体の前処理においても簡便に処理できる可能性を示していた。本アッセイ系の開発によりダイオキシンの多量検体を簡便にかつ迅速に測定することが可能になり、その有用性はきわめて高いと思われる。

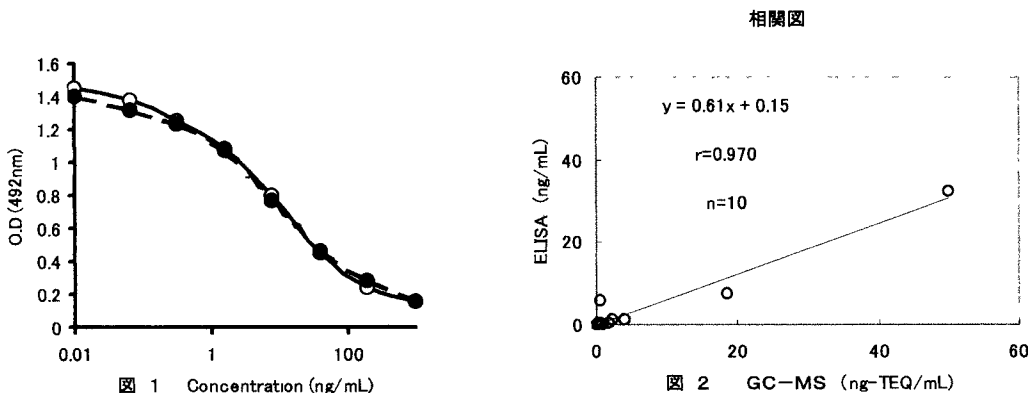


表 1 Crossactivities of Dioxins

	Cross-reactivity (%)
2, 3, 7-trichlorodibenzo-p-dioxin	100
2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin	100
2, 3-dichlorodibenzo-p-dioxin	45.5
2, 7-dichlorodibenzo-p-dioxin	1.7
2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzofuran	100
1, 2, 3, 7, 8-pentachlorodibenzo-p-dioxin	11
1, 2, 3, 4, 7, 8-hexachlorodibenzo-p-dioxin	0.3
1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-heptachlorodibenzo-p-dioxin	0.2
1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9-Octachlorodibenzo-p-dioxin	0.1>