

論文内容の要旨

論文題目 免疫反応を利用した土壤中のダイオキシン類の測定

氏名 下村美文

本論文は、抗原抗体反応を利用した土壤中のダイオキシン類の測定に関するものであり、6章より構成されている。

現在、化学物質による環境汚染が世界的にも深刻な問題となっている。特に外因性内分泌攪乱物質が生物の内分泌機能を攪乱し、種の存続にも関わる問題として研究が進められている。その中で最も毒性が高いのがダイオキシン類であり、胎児の催奇性および発ガン性や免疫毒性などが懸念されている。

ダイオキシン類の主な発生源は農薬の不純物、ゴミの焼却などで環境中に非意図的に発生し、最終的には土壤中に蓄積される。ダイオキシン類は水への溶解度が低く、極めて安定な物質であるために長期間にわたり土壤に吸着し分解されないものも多いことから、土壤環境中に残存するダイオキシン類の迅速な定性・定量が切望されている。

しかし日本工業規格 (JIS) で定めた高分解能 GC/MS などの機器分析による計測は分析費用が非常に高く、前処理や操作が煩雑で測定に長い時間を要する。

そこで本研究では、免疫反応を利用して土壤中のダイオキシン類を迅速で簡便に測定することを目的とした。ダイオキシン類の中でも特に、最も毒性の高い4塩化ダイオキシン (2,3,7,8-Tetra-chlorodibenzo-*p*-dioxin: 2,3,7,8-TCDD) および毒性が低いものの土壤中に最も多く存在し、紫外線で毒性の高い2,3,7,8-TCDDに分解されることが示唆されている8塩化ダイオキシン (octa-chlorodibenzo-*p*-dioxin: OCDD) に着目した。すなわち、土壤からの

ダイオキシン類の簡易抽出、2,3,7,8-TCDD を迅速で高感度に測定できる酵素免疫法の系の開発、また新たに抗 OCDD 抗体の作製して OCDD 簡易測定法を検討した。

第 1 章は緒論であり、本研究の行われた背景について述べ、本研究の目的と意義を明らかにした。

第 2 章では、土壌中のダイオキシン類の簡易抽出法の検討を行った。土壌サンプル中のダイオキシン類の測定をするためには、土壌からのダイオキシン類の抽出処理の過程は必要不可欠である。しかし、JIS 法で定められているトルエンソックスレー抽出は 16 時間以上必要とされる。そこで常温で簡便な操作でダイオキシン類の抽出を行うことを目的として超音波による溶媒抽出を行った。

そこでまず、2 mm のふるいにかけて、70 °C で 24 時間乾燥させた土壌 4 mg に $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ の 2,3,7,8-TCDD、OCDD をそれぞれ $10 \mu\text{g g}^{-1}$ となるように添加し、常温で風乾して土壌試料を調製した。これらに抽出用有機溶媒を各 100 μL 添加し、超音波による抽出を行った。このようにして得られた抽出溶液を 10 倍に希釈して抽出試料とした。この場合に各濃度は GC/MS 法で求めた。この結果、超音波を用いて効率良く土壌中のダイオキシン類を抽出することが確認できた。特に 2,3,7,8-TCDD は OCDD より抽出されやすい傾向が見られたが、これは 2,3,7,8-TCDD が OCDD より土壌に吸着しにくいためであると考えられる。

第 3 章では抗原抗体反応と表面プラズモン共鳴 (SPR: Surface Plasmon Resonance) 現象を組み合わせた迅速、簡便な 2,3,7,8-TCDD の測定法を構築した。すなわち、センサチップ上の金薄膜に結合させてあるデキストランのカルボキシル基を N-hydroxysuccinimide (NHS)、N-ethyl-N'-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) によって活性化させ、市販の抗 2,3,7,8-TCDD 抗体をアミノカップリング法で固定化した。次に一定量の horseradish peroxidase (HRP) 標識 TCDD と各濃度に調製した 2,3,7,8-TCDD の混合 (1:1, v/v) 溶液を注入して HRP 標識 TCDD と 2,3,7,8-TCDD の競合法を行った。2,3,7,8-TCDD 濃度の増加に伴い、2,3,7,8-TCDD 抗体と結合する HRP 標識 TCDD の量が減少する。この時の SPR 応答値の変化を検出した。2,3,7,8-TCDD の検出下限は 0.1 ng mL^{-1} で $0.1\text{--}10 \text{ ng mL}^{-1}$ の濃度範囲で測定が可能な高感度システムを構築できた。さらに競合法に続いて抗 HRP 抗体を添加してサンドイッチ法を行うことにより、シグナルを競合法に比べて増幅することができた。抗体の固定化時間は 40 分間で、1 サイクルの測定時間は競合法で 20 分間、サンドイッチ法でも 40 分間程度である。1 回の試料量も数 10 μL 程度しか必要としなかった。

第 4 章では抗 8 塩化ダイオキシン (OCDD) 抗体の調製と精製を行った。既存の 2,3,7,8-TCDD に対する抗体は OCDD に結合しない。そこで新たに OCDD に対するポリクローナル抗体の作製を行った。ターゲットは OCDD であるが、分子量が小さいためにポリリシン (PLL; Poly-L-Lysine) で標識し、これを

抗原とした。免疫動物は家兎（日本白色種）で、2.5 -3.0 kg / body の雌 3 羽（KAL-1, 2, 3）を用いた。アジュバント（免疫系の非特異的強化剤）として初回免疫時にはフロイント完全アジュバント、2 回目以降はフロイント不完全アジュバントを用いた。いずれも免疫部位は皮内とし 1 回の OCDD-PLL 投与量は 0.5 mg / 羽でそのエマルジョン濃度は 0.25 mg mL⁻¹であった。OCDD-PLL の投与頻度は 2 週間間隔で投与回数 15 回に及んだ。トータル投与濃度は 7.5 mg / 羽であった。免疫開始から 148 日後にはいずれの兎から採取した血清についても、OCDD に対する力価の上昇がみられた。最終的に 231 日後に全採血を行った。その後、これらの抗血清をアフィニティクロマトグラフィー抗体精製用キットを用いて精製し、電気泳動（SDS-PAGE）を行って IgG 抗体が作製されたことを確認した。

第 5 章で第 4 章で作製した抗 OCDD 抗体を用いて OCDD の簡易測定を行った。OCDD を測定するためにはまず、HRP 標識 OCDD と抗 OCDD 抗体の結合を確認した。抗 OCDD 抗体溶液（27.2 μg mL⁻¹）を 96 穴マイクロプレートに添加し、4 °C で 18 時間インキュベートし固定化した。余分な抗 OCDD 抗体溶液を取り除いた後、各濃度に調製した HRP 標識 OCDD を添加し、37 °C で 4 時間、反応させた。さらに洗浄後、HRP の発色基質である 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine（TMB）を添加し、37 °C で 20 分間反応させ、1M H₂SO₄ を添加して反応を停止した後、プレートリーダーで吸光度の測定（450 nm）を行った。HRP 標識 OCDD の濃度変化に対しては、2.34 μg mL⁻¹ まで測定値が増加し、その後一定の値を示した。

次に一定量の HRP 標識 OCDD（3.75 μg mL⁻¹）と各濃度に調製した OCDD の混合（4:1, v/v）溶液をあらかじめ抗 OCDD 抗体を固定化したプレートに添加し、37 °C で 4 時間、反応させ、競合法により OCDD を測定した。さらに HRP 標識 OCDD の測定と同様に TMB を添加し、37 °C で 20 分間反応させ、吸光度による測定（450 nm）を行った。

本実験で得られた OCDD の検出下限は、0.78 ng mL⁻¹ であり、JIS 法（GC/MS 法）における OCDD の検出下限は 0.5 ng mL⁻¹ であるため、本研究のイムノアッセイは、より迅速・簡便でありかつ十分な感度を有すると考えられる。

第 6 章は総括であり、本研究を要約して得られた研究結果をまとめた。

本研究では、最終的に実サンプル中に存在するダイオキシン類を測定することを目的としてまず土壌からのダイオキシン類の簡易抽出法を確立した。次に抗原抗体反応と SPR 現象を組み合わせ、2,3,7,8-TCDD を検出下限 0.1 ng mL⁻¹ と高感度に測定できるシステムを確立した。また OCDD に対する抗体を新たに作製し、ELISA の系を構築した。OCDD の検出下限は 0.78 ng mL⁻¹ であった。そしてこれらを応用し、土壌サンプル中のダイオキシン類の測定を行った。本研究は簡単・迅速・高感度なダイオキシン類の計測法の開発を大きく前進させ、極めて意義深いものである。