

審査の結果の要旨

論文提出者氏名 下村美文

本論文は、近年、外因性内分泌攪乱物質の中で最も毒性が高く問題となっている土壤中のダイオキシン類の抗原抗体反応を利用した簡易測定に関するものであり、6章より構成されている。

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ている。

第2章では、土壤中のダイオキシン類の簡易抽出法の検討を行っている。土壤サンプル中のダイオキシン類の測定をするためには、土壤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。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ている。

まず、ふるいにかき、乾燥させた土壤に4塩化ダイオキシン (2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin: 2,3,7,8-TCDD)、8塩化ダイオキシン (octachlorodibenzo-*p*-dioxin: OCDD) をそれぞれ添加し、常温で風乾して土壤試料を調製している。これらに抽出用有機溶媒を添加し、超音波による抽出を行い、得られた抽出溶液をGC/MS法で評価している。この結果、超音波を用いて効率良く土壤中のダイオキシン類を抽出することを確認している。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より土壤に吸着しにくいためであると考えられると述べている。

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の測定法を構築している。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活性化させ、抗2,3,7,8-TCDD抗体をアミノカップリング法で固定化している。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 との競合反応を行っている。2,3,7,8-TCDD

濃度の増加に伴い、抗 2,3,7,8-TCDD 抗体と結合する HRP 標識 TCDD の量が減少し、この時の SPR 応答値の変化を検出している。2,3,7,8-TCDD の検出下限は 0.1 ng mL^{-1} と高感度であることを明らかにしている。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させている。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 分間程度であり、1 回の試料量も数 $10\mu\text{L}$ 程度しか必要としなかったと述べている。

第 4 章では、抗 8 塩化ダイオキシシン (OCDD) 抗体の調製と精製を行っている。既存の 2,3,7,8-TCDD に対する抗体は OCDD に結合しないため新たに OCDD に対するポリクローナル抗体の作製を行っている。OCDD をポリ-L-リシン (PLL; Poly-L-Lysine) で標識し、これを抗原とし、免疫動物は家兎 (日本白色種) の雌 3 羽を用いている。2 週間間隔で PLL 標識 OCDD を投与し、トータル投与濃度は 7.5 mg/羽 であったと述べている。免疫開始から 148 日後にはいずれの兎から採取した抗血清についても、OCDD に対する力価の上昇がみられ、最終的に 240 日後に全採血を行っている。その後、これらの抗血清は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、電気泳動を行って IgG 抗体が作製されたことを確認している。

第 5 章では、第 4 章で作製した抗 OCDD 抗体を用いて OCDD の簡易測定を行っている。抗 OCDD 抗体溶液を 96 穴マイクロプレートに固定化し、競合法により OCDD を測定している。すなわち一定量の HRP 標識 OCDD と各濃度に調製した OCDD の混合 (4:1, v/v) 溶液を添加し、 37°C で 4 時間反応させた後、HRP の発色基質である 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) を添加し、プレートリーダーで吸光度の測定を行っている。

本実験で得られた OCDD の検出下限は JIS 法 (GC/MS 法) における OCDD の検出下限と同レベルであり、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述べている。

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ている。

以上のように、本論文は、免疫反応を利用した土壤中のダイオキシシン類の測定を目的として、土壤からのダイオキシシン類の簡易抽出法と 2,3,7,8-TCDD の迅速で高感度な測定法を考案している。さらに OCDD に対する抗体を新たに作製し、ELISA の系を構築し、土壤サンプル中のダイオキシシン類の測定への応用に成功している。

よって、本論文は博士 (工学) の学位請求論文として合格と認められる。