

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003 - 98173

(P2003 - 98173A)

(43)公開日 平成15年4月3日(2003.4.3)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ド* (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	S 2 G 0 5 2
C 0 7 K 16/44		C 0 7 K 16/44	4 H 0 4 5
G 0 1 N 1/36		G 0 1 N 27/62	ZAB V
27/62	ZAB	33/00	D
33/00		33/531	A

審査請求 未請求 請求項の数 20 O L (全 13数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2002 - 107209(P2002 - 107209)

(22)出願日 平成14年4月9日(2002.4.9)

(31)優先権主張番号 特願2001 - 109427(P2001 - 109427)

(32)優先日 平成13年4月9日(2001.4.9)

(33)優先権主張国 日本(JP)

(71)出願人 501218566

学校法人片柳学園

東京都八王子市片倉町1404番1号

(72)発明者 志水 美文

東京都世田谷区池尻4 - 24 - 15 - 102

(72)発明者 野村 陽子

東京都東大和市湖畔2 - 325 - 10

(72)発明者 軽部 征夫

神奈川県川崎市宮前区東有馬1 - 3 - 16

(74)代理人 100101591

弁理士 川俣 静子 (外 1 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ダイオキシン類の検出または定量方法

(57)【要約】

【課題】ダイオキシン類を、簡便な方法で且つ低コストで測定する方法を提供する。

【解決手段】試料に対して、抗 8 塩化ダイオキシン抗体を用いるイムノアッセイを行い、その結果に基づき試料中のダイオキシン類の存在を検出するか、またはダイオキシン類の量を算出することからなるダイオキシン類の検出または定量方法、土壌または底質試料に有機溶媒を加え、20分間以上超音波をかけることによりダイオキシン類を抽出し、抽出されたダイオキシン類をダイオキシン類に対する抗体を用いるイムノアッセイにより分析することを特徴とする土壌または底質試料中のダイオキシン類の検出または定量方法、並びに該方法を実施するための土壌または底質試料中のダイオキシン類の検出または定量用キットまたは検出器具。

【特許請求の範囲】

【請求項1】試料に対して、抗8塩化ダイオキシン抗体を用いるイムノアッセイを行い、その結果に基づき試料中のダイオキシン類の存在を検出するか、またはダイオキシン類の量を算出することからなるダイオキシン類の検出または定量方法。

【請求項2】試料を有機溶媒で処理した後、抗8塩化ダイオキシン抗体を用いるイムノアッセイを行い、その結果に基づき試料中のダイオキシン類の存在を検出するか、またはダイオキシン類の量を算出することからなるダイオキシン類の検出または定量方法。

【請求項3】試料を複数に分け、その各々を異なる有機溶媒で処理した後、抗8塩化ダイオキシン抗体を用いるイムノアッセイを行い、各有機溶媒で処理した各試料についての結果から、試料中のダイオキシン類の総量または各ダイオキシン類の量を算出することを特徴とするダイオキシン類の検出または定量方法。

【請求項4】検出または定量されるダイオキシン類が、6塩化ダイオキシン、7塩化ダイオキシン、8塩化ダイオキシン、6塩化ジベンゾフラン、7塩化ジベンゾフラン及び8塩化ジベンゾフランからなる群より選択される1種または2種以上のダイオキシン類である請求項1～3のいずれか1項に記載のダイオキシン類の検出または定量方法。

【請求項5】前記抗8塩化ダイオキシン抗体がポリクローナル抗体である請求項1～4のいずれか1項に記載のダイオキシン類の検出または定量方法。

【請求項6】前記イムノアッセイが、競合法により行われる請求項1～5のいずれか1項に記載のダイオキシン類の検出または定量方法。

【請求項7】前記イムノアッセイが、サンドイッチ法により行われる請求項1～5のいずれか1項に記載のダイオキシン類の検出または定量方法。

【請求項8】請求項1～7のいずれか1項に記載のダイオキシン類の検出または定量方法に使用される標識または非標識抗8塩化ダイオキシン抗体。

【請求項9】8塩化ダイオキシンと反応し、且つ少なくとも6塩化ダイオキシン、7塩化ダイオキシン、6塩化ジベンゾフラン、7塩化ジベンゾフラン及び8塩化ジベンゾフランからなる群より選択されるダイオキシン類の1種またはそれ以上と0.01%以上の交差反応性を有する請求項8記載の抗体。

【請求項10】標識剤と、試料中のダイオキシン類を抗8塩化ダイオキシン抗体との免疫特異的反応を利用して該標識剤と結合させる手段と該標識剤の活性を測定するための手段を含む、ダイオキシン類の検出または定量のためのキットまたは検出器具。

【請求項11】土壌または底質試料に有機溶媒を加え、20分間以上超音波をかけることによりダイオキシン類を抽出し、抽出されたダイオキシン類をダイオキシン類*

*に対する抗体を用いるイムノアッセイにより分析することを特徴とする土壌または底質試料中のダイオキシン類の検出または定量方法。

【請求項12】前記有機溶媒が、炭素原子数1～5のアルコール、炭素原子数3～8のケトン、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミドからなる群より選択される請求項11に記載のダイオキシン類の検出または定量方法。

【請求項13】前記ダイオキシン類を、前記有機溶媒中、常圧下、10～80の温度で、20～180分間超音波をかけることにより抽出することを特徴とする請求項11または12記載のダイオキシン類の検出または定量方法。

【請求項14】前記有機溶媒で抽出されたダイオキシン類を、前記イムノアッセイを行う前に緩衝液で希釈することを特徴とする請求項11～13のいずれか1項に記載のダイオキシン類の検出または定量方法。

【請求項15】前記緩衝液による希釈を、前記有機溶媒の濃度として1.0容量%未満、ダイオキシン濃度として0.7ng/ml以上となるように行うことを特徴とする請求項14に記載のダイオキシン類の検出または定量方法。

【請求項16】前記試料を、該試料1mgあたり1～100μlの量の前記有機溶媒に入れることを特徴とする請求項11～15のいずれか1項に記載のダイオキシン類の検出または定量方法。

【請求項17】前記ダイオキシン類に対する抗体が、抗4塩化ダイオキシン抗体及び/または抗8塩化ダイオキシン抗体である請求項11～16のいずれか1項に記載のダイオキシン類の検出または定量方法。

【請求項18】前記ダイオキシン類に対する抗体が、抗8塩化ダイオキシン抗体である請求項11～16のいずれか1項に記載のダイオキシン類の検出または定量方法。

【請求項19】8塩化ダイオキシンまたは8塩化ジベンゾフランの検出または定量のための請求項18記載のダイオキシン類の検出または定量方法。

【請求項20】請求項11～19のいずれか1項に記載の方法を実施するための、少なくとも抗ダイオキシン類抗体を含む、土壌または底質試料中のダイオキシン類の検出または定量用キットまたは検出器具。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】本発明はダイオキシン類の検出または定量方法及びこれに使用される抗体に関する。

【0002】

【従来の技術】ダイオキシン類の測定方法としては、GC-MSによる方法、ELISAによる簡易法等が知られている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】GC-MS法では、前処理として、測定前にサンプルに対して濃縮や、ピューリフィケーションを手作業で繰り返し行う必要がある。あるいは、この簡便法である、高温・高圧条件下での溶媒抽出を行う必要がある。また、前処理後の測定にも高価な機器を要する。ELISA法は、これに比べて簡便であるが、現在、4塩化ダイオキシンに対する抗体しか得られておらず、この抗体では、塩素置換が8個のダイオキシン類は測定することができない。また、土壌・底質試料中のダイオキシンの測定をイムノアッセイで行う*10

*方法は確立されていなかった。ダイオキシン類は、ポリ塩化ジベンゾパラダイオキシンとポリ塩化ジベンゾフランの異性体の総称であり、これらには、各々75種類及び135種類の異性体が含まれる。また、コプラナー構造を有するものを含む場合もある。これらのうち、現在、毒性のあるダイオキシン類とされているのは、下記の表に示す化合物である。

【0004】

【表1】

		TEF
PCDD	2, 3, 7, 8-TCDD	1
	1, 2, 3, 7, 8-PeCDD	1
	1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDD	0.1
	1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDD	0.1
	1, 2, 3, 7, 8, 9-HxCDD	0.1
	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDD	0.01
	OCDD	0.0001
	その他	0
PCDF	2, 3, 7, 8-TCDF	0.1
	1, 2, 3, 7, 8-PeCDF	0.05
	2, 3, 4, 7, 8-PeCDF	0.5
	1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDF	0.1
	1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDF	0.1
	1, 2, 3, 7, 8, 9-HxCDF	0.1
	2, 3, 4, 6, 7, 8-HxCDF	0.1
	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDF	0.01
	1, 2, 3, 4, 7, 8, 9-HpCDF	0.01
	OCDF	0.0001
	その他	0

TCDD: テトラクロロジベンゾパラダイオキシン

PeCDD: ペンタクロロジベンゾパラダイオキシン

TCDF: テトラクロロジベンゾフラン

PeCDF: ペンタクロロジベンゾフラン

【0005】表中、TEFは1997年にWHOにより提案された毒性等価係数であり、最も毒性の強い2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾパラダイオキシンの毒性を1とした場合の相対的な毒性の強さを表す。この係数を各ダイオキシン類に乗じて、合計した値を、毒性等量(TEQ)という。従って、ダイオキシンによる環境汚染の程度を調べる場合には、このTEQの値を求めている。従って、正確なTEQ値を得るためには、ダイオキシン類の各化合物を定量し、これに毒性等価係数を乗じる必要があるが、現在、得られているダイオキシン抗体は、8塩化ダイオキシン(8塩化ジベンゾパラダイオキシン、以下、場合によりOCDDと記す)に対して交差反応性を有しないため、正確な値を求めることはできなかった。7塩化ダイオキシン(7塩化ジベンゾパラダイオキシン、以下、場合によりHpCDDと記す)、8塩化ダイオキシンは、特に土壌や底質に多く含まれているた

め、これらの量を測定することは、土壌及び底質中のダイオキシンの毒性を知る場合には特に重要である。本発明において、8塩化ダイオキシンに対する抗体の製造に成功した。また、本発明者らはこのダイオキシンが7個以下の塩素置換を有するダイオキシン及び8個以下の塩素置換を有するジベンゾフランに対して交差反応性を有することを見出し、本発明を完成させた。また、本発明において有機溶媒を用いた簡便な前処理を行うことにより、土壌・底質試料中のダイオキシンを検出または定量し得ることが見出された。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明は、下記のダイオキシン類の検出または定量方法に関する。

(1) 試料に対して、抗8塩化ダイオキシン抗体を用いるイムノアッセイを行い、その結果に基づき試料中のダイオキシン類の存在を検出するか、またはダイオキシン

類の量を算出することからなるダイオキシン類の検出または定量方法。

(2) 試料を有機溶媒で処理した後、抗8塩化ダイオキシン抗体を用いるイムノアッセイを行い、その結果に基づき試料中のダイオキシン類の存在を検出するか、またはダイオキシン類の量を算出することからなるダイオキシン類の検出または定量方法。

(3) 試料を複数に分け、その各々を異なる有機溶媒で処理した後、抗8塩化ダイオキシン抗体を用いるイムノアッセイを行い、各有機溶媒で処理した各試料について10の結果から、試料中のダイオキシン類の総量または各ダイオキシン類の量を算出することを特徴とするダイオキシン類の検出または定量方法。

(4) 検出または定量されるダイオキシン類が、6塩化ダイオキシン、7塩化ダイオキシン、8塩化ダイオキシン、6塩化ジベンゾフラン、7塩化ジベンゾフラン及び8塩化ジベンゾフランからなる群より選択される1種または2種以上のダイオキシン類である(1)~(3)のいずれかに記載のダイオキシン類の検出または定量方法。

(5) 前記抗8塩化ダイオキシン抗体がポリクローナル抗体である請求項1~4のいずれか1項に記載のダイオキシン類の検出または定量方法。

(6) 前記イムノアッセイが、競合法により行われる(1)~(5)のいずれかに記載のダイオキシン類の検出または定量方法。

(7) 前記イムノアッセイが、サンドイッチ法により行われる(1)~(5)のいずれかに記載のダイオキシン類の検出または定量方法。

【0007】また、本発明は下記の抗体に関する。30

(8) (1)~(7)のいずれかに記載のダイオキシン類の検出または定量方法に使用される標識または非標識抗8塩化ダイオキシン抗体。

(9) 8塩化ダイオキシンと反応し、且つ少なくとも6塩化ダイオキシン、7塩化ダイオキシン、6塩化ジベンゾフラン、7塩化ジベンゾフラン及び8塩化ジベンゾフランからなる群より選択されるダイオキシン類の1種またはそれ以上と0.01%以上、好ましくは1%以上、特に10%以上の交差反応性を有する(8)の抗体。

また、本発明は下記のキットまたは検出器具に関する。40
標識剤と、試料中のダイオキシン類を抗8塩化ダイオキシン抗体との免疫特異的反応を利用して該標識剤と結合させる手段と該標識剤の活性を測定するための手段を含む、ダイオキシン類の検出または定量のためのキットまたは検出器具。さらに、本発明は、上記ダイオキシン類の検出または定量方法により求められた値から、1997年にWHOで規定された毒性等量を求める方法を提供する。さらに、本発明は、試料を複数に分け、その各々を異なる有機溶媒で処理した後、ダイオキシン類に対する抗体を用いるイムノアッセイを行い、各有機溶媒で処

理した各試料についての結果から、試料中のダイオキシン類の総量または各ダイオキシン類の量を算出することを特徴とするダイオキシン類の検出または定量方法にも関する。該方法においては、異なるダイオキシン類に対する抗体を用いるイムノアッセイを組み合わせることもよい。

【0008】さらに、本発明は、下記のダイオキシン類の検出または定量方法に関する。

(11) 土壌または底質試料に有機溶媒を加え、20分間以上超音波をかけることによりダイオキシン類を抽出し、抽出されたダイオキシン類をダイオキシン類に対する抗体を用いるイムノアッセイにより分析することを特徴とする土壌または底質試料中のダイオキシン類の検出または定量方法。

(12) 前記有機溶媒が、炭素原子数1~5のアルコール、炭素原子数3~8のケトン、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミドからなる群より選択される(11)のダイオキシン類の検出または定量方法。

(13) 前記ダイオキシン類を、前記有機溶媒中、常圧下、10~80の温度で、20~180分間超音波をかけることにより抽出することを特徴とする(11)または(12)のダイオキシン類の検出または定量方法。

(14) 前記有機溶媒で抽出されたダイオキシン類を、前記イムノアッセイを行う前に緩衝液で希釈することを特徴とする(11)~(13)のダイオキシン類の検出または定量方法。

(15) 前記緩衝液による希釈を、前記有機溶媒の濃度として1.0容量%未満、好ましくは0.5容量%未満、ダイオキシン濃度として0.7ng/ml以上となるように行うことを特徴とする(14)のダイオキシン類の検出または定量方法。

(16) 前記試料を、該試料1mgあたり1~100μl、好ましくは5~25μlの量の前記有機溶媒に入れることを特徴とする(11)~(15)のダイオキシン類の検出または定量方法。

(17) 前記ダイオキシン類に対する抗体が、抗4塩化ダイオキシン抗体及び/または抗8塩化ダイオキシン抗体である(11)~(16)のダイオキシン類の検出または定量方法。

(18) 前記ダイオキシン類に対する抗体が、抗8塩化ダイオキシン抗体である(11)~(16)のダイオキシン類の検出または定量方法。

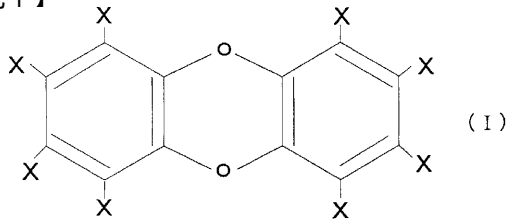
(19) 8塩化ダイオキシンまたは8塩化ジベンゾフランの検出または定量のための(18)のダイオキシン類の検出または定量方法。

また、本発明は、上記(11)~(19)のいずれかに記載の方法を実施するための、少なくとも抗ダイオキシン類抗体、例えば抗4塩化ダイオキシン抗体及び/または抗8塩化ダイオキシン抗体を含む、土壌または底質試料中のダイオキシン類の検出または定量用キットまたは

検出器具に関する。本明細書において、「ダイオキシン類」とは、ポリ塩化ジベンゾパラダイオキシン（下記式I）、ポリ塩化ジベンゾフラン（下記式II）及びコプラナPCB（下記式III）のうち、毒性を有することが知られている物質を意味する。より具体的には、前記の表1に示した物質を意味する。

【0009】

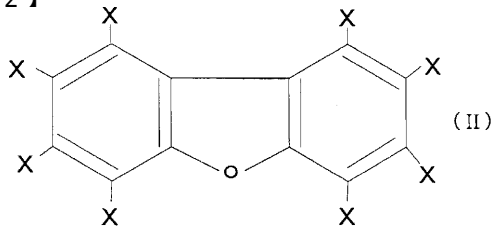
【化1】



【0010】（式中、Xは各々独立に水素原子または塩素原子を表す。）

【0011】

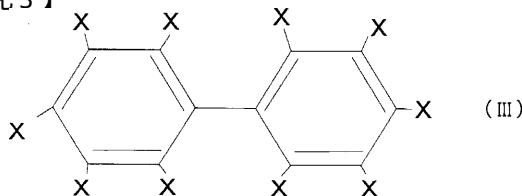
【化2】



【0012】（式中、Xは各々独立に水素原子または塩素原子を表す。）

【0013】

【化3】



【0014】（式中、Xは各々独立に水素原子または塩素原子を表す。）

本明細書において、「検出」とは、ダイオキシン類を全体として検出すること、及び各ダイオキシン類を個別に検出することの両方を意味する。本明細書において、「定量」は、各成分の正確な量を求めることだけでなく、各成分のおおよその量を調べることも意味する。

【0015】

【発明の実施の形態】本発明において、8塩化ダイオキシンに対するポリクロール抗体が得られ、これが、6塩化ダイオキシン、6塩化ジベンゾフラン（以下、場合によりHeCDFと記す）、7塩化ダイオキシン、7塩化ジベンゾフラン（以下、場合によりHpCDFと記す）、8塩化ジベンゾフラン（以下、場合によりOCDFと記す）とも交差反応性を有し、これを用いたイムノアッセイによりこれらのダイオキシン類の測定が可能であることが明らか

かとなった。さらに、試料を予め特定の有機溶媒で処理すると、使用する溶媒により、各抗原の抗体との反応性が異なることを見出した。これにより、試料を複数に分け、異なる溶媒で処理した後、イムノアッセイを行うことにより、試料中に多く含まれるダイオキシン類を特定すること、各ダイオキシン類の量を算出すること、ダイオキシン類の総量を算出することが可能となった。このような検出または定量は、本発明において初めて見出された、ダイオキシン類のイムノアッセイにおける抽出率が前処理に用いる溶媒によって異なるという事実に基づいている。4塩化ダイオキシンのGC/MSによる抽出率は、メタノール、ジメチルスルホキシドでは70%程度とほとんど一致している（表3参照）。イムノアッセイキットを用いた場合の抽出率（メタノール、ジメチルスルホキシド）を考慮したのち、ジメチルスルホキシドで抽出したサンプルの測定値が、メタノールで抽出し、測定した値よりも高い場合には、6塩化ダイオキシンが存在する人が多い。8塩化ダイオキシン抗体を用いるイムノアッセイにおいても、6塩化ダイオキシンが応答することから、ジメチルスルホキシドで抽出し測定した値が、メタノールで抽出した結果よりも高い場合には6塩化ダイオキシンが存在する可能性が高い。ただし、この場合、表3に示すGC/MSの抽出率を考慮する必要がある。

【0016】また、本発明の抗8塩化ダイオキシン抗体を用いる方法を抗4塩化ダイオキシン抗体を用い、所望により異なる溶媒による前処理を行うイムノアッセイと組み合わせて行うこともできる。これまでの4塩化ダイオキシン抗体では、ほとんど8塩化ダイオキシンを検出することができないことから、この方法により、4塩化ダイオキシン、8塩化ダイオキシンを分けて検出できる可能性が高い。また、8塩化ダイオキシンと8塩化ジベンゾフランは、ジメチルスルホキシド（以下、場合によりDMFと記載する）に対する溶解度により区別することができる。

【0017】さらに、本発明は、上記方法により、試料中に多く含まれるダイオキシン類を特定し、ダイオキシンの由来を予測する方法にも関する。例えば、8塩化ダイオキシンが多く含まれる場合、ダイオキシンは土壌中の農薬由来である可能性が高く、4塩化ダイオキシンが多く含まれる場合、ダイオキシンは焼却炉等からの飛灰由来である可能性が高く、6塩化ダイオキシンが多く含まれる場合、ダイオキシンはパルプ工場等の処理排水由来である可能性が高い。

【0018】本明細書において、「イムノアッセイにおける抽出率」、「GC/MSにおける抽出率」という場合、各々イムノアッセイ、GC/MSにより定量された量の、試料中に実際に含有される量に対する割合を、百分率で表したものをいう。この値は、各化合物の各溶媒に対する溶解度とは必ずしも関連がない。有機溶媒は、

1種類または2種類以上のダイオキシンの溶解性が高く、抗原抗体反応に影響を与えにくい有機溶媒である。好ましくはダイオキシン類によってイムノアッセイによる抽出率が異なる溶媒を組み合わせる。例えばジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルスルホキシド(DMSO)、メタノール等を組み合わせることができる。

【0019】〔試料〕本発明の測定方法の対象となる試料は、土壌、底質、灰、農作物、食品、排水、血液、大気、環境水等であり得る。測定は、試料の種類、状態等によるが、特に土壌、底質、農作物の場合は、好ましくは粉碎、篩過、乾燥等の処理を行った後に行われる。乾燥は、例えば40%以下の水分率まで行う。有機溶媒による処理は、例えば試料に溶媒を添加し、所望により超音波をかけながら抽出することにより行われる。好ましくは、試料1mg当たり5~100 μ lの溶媒を添加し、所望により10~100kHzの超音波をかけながら、20~180分間、溶媒が蒸発により測定に影響与えるほどに減少しないようにして、抽出することにより行われる。抽出中は、所望により、1~10分間毎に5~20秒間振とうする。

【0020】〔抗8塩化ダイオキシン抗体〕本発明で使用される抗8塩化ダイオキシン抗体は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体であるが、好ましくはポリクローナル抗体である。例えば、8塩化ダイオキシンで免疫した動物から採取したポリクローナル抗体であり得る。より具体的には、8塩化ダイオキシンと反応し、且つ7個以下の塩素により置換されたジベンゾパラダイオキシン、特に6塩化ダイオキシン及び7塩化ダイオキシン、並びに8個以下の塩素により置換されたジベンゾフラン、特に6~8塩化ジベンゾフランのうち1種類以上のダイオキシン類と交差反応性を有する抗体である。例として、8塩化ダイオキシンとの反応性を100%として、8塩化ジベンゾフランとの交差反応率が30~130%、1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-ヘプタクロロジベンゾフランとの交差反応率が0.01~70%、より具体的には1~50%、1, 2, 3, 7, 8, 9-ヘキサクロロジベンゾパラダイオキシンとの交差反応率が0.01~90%、より具体的には、10~70%であるポリクローナル抗体が挙げられる。8塩化ダイオキシンに対するポリクローナル抗体は、例えば下記の方法により製造したものである。

【0021】〔ポリクローナル抗体の製法〕8塩化ダイオキシンをタンパク質やポリペプチドと結合したものを免疫原として一定期間温血動物に投与した後、その腹水、血液等を採取したのちから精製して、8塩化ダイオキシンに対するポリクローナル抗体を得る。8塩化ダイオキシンと結合させる物質は、好ましくはポリリジンである。温血動物は、例えば、ウサギ、ヤギ、ウシ、ヒツジ、ラット、マウス、モルモット、ウマ、ブタ等の哺乳

乳類、ニワトリ、ハト、アヒル、ガチョウ、ウズラ等の鳥類である。投与間隔は、例えば、5~30日である。投与量は、抗体産生に有効な量でよく、例えばウサギの場合、1回に約0.01~1.0mgを約1~5mlの生理食塩水およびフロイントの完全アジュバントで乳化して、皮下に投与する。投与回数は、例えば5~30回である。温血動物中に形成された抗体は、例えばウサギでは、通常最終接種後7~12日の間に耳静脈から採取される。

【0022】8塩化ダイオキシン抗体の血清からの精製は、免疫グロブリンの分離精製法、例えば、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原抗体結合物あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法により行われる。より具体的には、リガンドとしてアルブミン結合領域を欠失した組換えProteinGを用いたクロマトグラフィで分離することができる。この場合、ベース担体は、好ましくは高度架橋球状のセファロースであり、精製時間は例えば5~20分間、最大流速は、例えば1~10ml/分である。本発明の抗8塩化ダイオキシンポリクローナル抗体の分子量は、例えば約100~200キログルトンであり、例えばIgG抗体である。

【0023】〔モノクローナル抗体〕本発明の測定方法において使用される抗体はモノクローナル抗体であってもよい。モノクローナル抗体は例えば下記の方法により製造される。モノクローナル抗体は、例えばケラーとミルステインの方法〔ネイチャー(Nature), 第256巻(1975)、第495頁〕に記載の方法と同様の方法により得られる。すなわち、上記のポリクローナル抗体の調製法と同様に免疫された温血動物の脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髄腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを得ることができる。モノクローナル抗体は、ラット、マウスを用いて得るのが好ましい。例えばマウスを免疫する場合、皮下、腹腔内、静脈内に注入するのが好ましい。例えば2週間の免疫間隔で約2~6回免疫し、最終免疫後、約1~5日、好ましくは約2~4日後に摘出した脾臓細胞を用いる方法が一般的である。投与量はマウス当たり例えば約0.1 μ g以上、好ましくは約10 μ g~300 μ gである。また、脾臓を摘出する前に、部分採血を行い、血中の抗体価の上昇を確認し、抗体価の上昇した個体の脾臓を摘出する。

【0024】融合操作は既知の方法、例えば上記ケラーとミルステインの方法またはこれに準じた方法により行うことができる。骨髄腫細胞としてはたとえばNS-1、P3U1、SP2/0などが挙げられる。抗体産生細胞(脾臓細胞)数と骨髄細胞数との好ましい比率は約1:1~約20:1である。融合促進剤としてはポリエチレングリコー

ル(PEG)やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。PEGの重合度は、ふつう約1,000~6,000、濃度は約10%~80%等で用いられる。融合時間は約0.5~30分、融合温度は例えば20~40、好ましくは30~70である。好ましい条件の一例として、PEG6,000を約35~55%で約4~10分間処理することにより、効率よく融合させることが出来る。融合細胞は、ヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン培地〔HAT培地; ネイチャー(Nature), 256,495(1975)〕等を用いて、選択的に増殖させることが出来る。

【0025】増殖した細胞の培養上清は、目的とする抗体産生があるか否かについてスクリーニングを行うことができるが、抗体価のスクリーニングは次の様に行うことが出来る。即ち、この場合には、まず第1段階として免疫原に対する抗体産生の有無を、ラジオイムノアッセイ(RIA)法またはエンザイムイムノアッセイ(EIA)法等の方法で調べることが出来るが、これらの方法についても種々の変法が可能である。好ましい測定法の一例として、EIAを用いる一つの方法について述べる。セルロースビーズ等の担体に、例えばウサギ抗マウスイムノグロブリン抗体を常法に従ってカプリングさせておき、これに測定したい培養上清や、マウスの血清を加え、一定時間、一定温度(約4~40)で反応させる。この後、反応物をよく洗った後、酵素で標識した免疫原を加え、一定時間、一定温度(約4~40)で反応させる。反応物をよく洗った後、酵素基質を加え、一定時間、一定温度(約4~40)で反応させ、その後、生成発色物を吸光度または蛍光度等で測定することが出来る。選択培地で増殖を示し、かつ免疫原に対する抗体活性のみられたウエルの細胞は、限界希釈法等によりクローニングを行うことが望ましい。クローン化された細胞の上清について同様にスクリーニングを行い抗体価の高いウエルの細胞を増やすことにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマクローンが得られる。

【0026】このようにしてクローン化されたハイブリドーマを、液体培地中で増殖させる。具体的には例えば、液体培地、例えばRPMI-1640〔Moore, G.E.ら、ジャーナル・オブ・アメリカン・メディカル・アソシエーション(J. Am. Med. Assoc.) 199, 549(1967)〕に約0.1~40%の牛血清を加えた培地等で約2~10日間、好ましくは約3~5日間培養することにより、培養液から該モノクローナル抗体を得ることが出来る。また哺乳動物の腹腔内に接種し、細胞を増殖させ、腹水を採取することにより抗体を得ることが出来る。このためには、例えばマウスの場合、ミネラルオイル等を前もって接種したBALB/c等のマウスに約 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^7$ 個、好ましくは約 $5 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ 個のハイブリドーマを腹腔内に接種し、約7~20日後、好ましくは約10~14日後に腹水を採取する。腹水に生成蓄積した抗体は、例えば硫酸分画、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー等によ

り、容易にモノクローナル抗体を純粋な免疫グロブリンとして単離することが出来る。

〔抗体の固定化〕抗体は、例えば96穴プラスチックプレート(例えばヌンク社、デンマークのイムノプレート)、ガラスビーズ、プラスチックビーズなどの担体に固定する。固定は、プラスチックの場合約4で10~20時間または室温~40で約0.5~4時間反応させることにより行われる。ガラスの場合、例えばプロシーディングス ナショナル オブ ザ アカデミー オブ サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 第80巻、第3513~3516頁(1983年)に記載したような方法で固定する。その他、抗体固定のための各種プレート(前述、ヌンク社等)として市販されているものを使用することもできる。

【0027】〔イムノアッセイ〕イムノアッセイは、例えば、ラジオイムノアッセイ、エンザイムイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイである。イムノアッセイの標識には、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質、金コロイドなどが用いられるが、酵素、または金コロイド等のいわゆる直接標識を用いるのが好ましい。また、表面プラズモン共鳴法(以下、SPR法と記す)や、水晶振動子による方法で抗原抗体反応を定量的または定性的に検出することもできる。SPR法とは、同一金属膜上に、抗体を固定化した面と、抗体を固定化しない面を作製し、両方の面で得られる共鳴波長を比較することで抗原抗体反応を測定する方法である。水晶振動子による方法は、水晶振動子上に抗原または抗体を固定化させ、これに抗体または抗原が結合した時の振動の減少により抗原抗体反応を検出する方法である。エンザイムイムノアッセイとしては、ELISA法が特に好ましい。酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、D-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ等を用いることができるが、ペルオキシダーゼが好ましい。ペルオキシダーゼとしては、種々の起源のものを用いることができるが、その例としてはたとえば西洋わさび、パイナップル、イチジク、甘藷、ソラマメ、トウモロコシなどから得られるペルオキシダーゼが挙げられ、特に西洋わさびから抽出されたホースラディッシュ ペルオキシダーゼ(horseradish peroxidase)(HRP)が好ましい。より具体的には、未知量のダイオキシシン類を含むサンプルを、必要であれば溶媒で処理しその抽出液あるいは未処理のサンプルを、一定量の標識8塩化ダイオキシシンと混合する。その混合物を8塩化ダイオキシシンの抗体を固定化した支持体に接触させ、洗浄する。その後TMBなどの発色性の基質と接触させて反応し、反応を停止させた後の吸光度を測定し、8個以下の塩素で置換されたダイオキシシン類の量を測定する。この反応は蛍光反応でもよい。ここで得られた値から8個以下の塩素で置換されたダイオキシシン類の総量、あるいは個々のダイオキシシン類

の量を算出することができる。

【0028】〔キットまたは検査器具〕本発明は、標識剤と、試料中のダイオキシン類を抗8塩化ダイオキシン抗体との免疫特異的応答を利用して該標識剤と結合させる手段と、該標識剤の活性を測定するための手段を含む、ダイオキシン類の検出または定量のためのキットまたは検出器具にも関する。標識剤は、「イムノアッセイ」の項で例示したものであり得る。標識剤と結合させる手段は、標識または非標識抗8塩化ダイオキシン抗体、標識または非標識8塩化ダイオキシンから、イムノアッセイの種類によって適宜選択される。上記抗8塩化ダイオキシン抗体及び上記8塩化ダイオキシンは、イムノアッセイの種類によって、固相に固定化されたものまたは固定化されていないものであり得る。即ち、標識剤と結合する手段は、試料及び場合により8塩化ダイオキシンまたは抗8塩化ダイオキシン抗体のいずれかが移動可能であり、且ついずれかが固定化された固相を含んでいてもよい。標識剤の活性を測定するための手段は、例えば標識剤が酵素の場合はその基質及び反応停止剤等である。固相は、例えば、ポリスチレン製のビーズ、プレート、管等のほか、ナイロン、ニトロセルロース、酢酸セルロース、ガラス繊維、または他の多孔性ポリマーでありうる。固相は、ディップスティックの形態であってもよい。キットの場合は、上記手段、例えば抗8塩化ダイオキシン、8塩化ダイオキシン、基質等に加えて、溶媒、洗浄剤、標準物質等を含んでいてもよい。検査器具は、例えば、抗8塩化ダイオキシン抗体が固定され、標識化抗8塩化ダイオキシン抗体が湿潤時に移動可能な状態で担持された多孔性材料よりなる固相と、該固相を、該固相の一部を試料に接触させ得るように収納したケーシングからなる検出器具であり得る。

【0029】〔土壌試料中のダイオキシン類の検出または定量〕本発明は、特に、上記(11)～(19)に記載した土壌試料中のダイオキシン類の検出または定量方法、並びにこれを実施するためのキットまたは検出器具に関する。この場合、ダイオキシン類の抽出は、10～80、特に10～40で行うのが好ましい。例えば常温で行うことができる。前記有機溶媒は、土壌試料1mgに対して1～100 μ l、好ましくは5～25 μ lの量である。抽出時間は、20分間以上、好ましくは20～180分間、特に60～120分間である。前記緩衝液による希釈は、前記有機溶媒の濃度として1.0容量%未満、好ましくは0.5容量%未満、ダイオキシン濃度として0.7ng/ml以上となるように行うのが好ましい。測定において、ダイオキシン濃度は未知であるが、予想されるダイオキシン濃度に基づいて、ダイオキシン濃度が上記範囲となるように添加する緩衝液の量を調整するのが好ましい。なお、通常的环境レベルのダイオキシン濃度であれば、希釈、濃縮等の操作を要することなく、溶媒により抽出した抽出液をそのままイムノア

アッセイにかけることもできる。抗ダイオキシン類抗体は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体である。イムノアッセイの方法、及びキットまたは検出器具は、上記の各項目で説明したものであり得るが、抗体としては、抗8塩化ダイオキシン抗体のほか、抗4塩化ダイオキシン抗体、その他の抗ダイオキシン類抗体を使用することができる。これらの抗体はモノクローナル抗体でもポリクローナル抗体でもよく、いずれも市販されているものを使用するか、上記で抗8塩化ダイオキシン抗体について記載した方法に準じて製造することができる。

【0030】

【実施例】実施例1：抗体の製造

1-1 試薬

本実施例においては、1,2,3,4,6,7,8,9-オクタクロロペンゾ-p-ダイオキシン(OCDD)粉末、HRP(20,000 Unit EIA用)は和光純薬社製、Peroxidase-conjugated Goat IgG Fraction to Rabbit IgG(H+L)はICN Pharmaceuticals, Inc(CAPPEL)製、TMBはDAKO社製(substrate-chromogen, CA, USA)、ブロッキング剤としてのBlock Aceは大日本製薬社製のものを用いた。その他の試薬は全て和光純薬社製の特級試薬を用いた。

【0031】1-2 装置

Microplate readerはBIO-RAD社製(Model 550(日本バイオラッド))のものを用いて450nmで測定した。96穴EIAプレートとしてはCORNING9018(Corning, NY, USA)を用いた。抗体精製用キットとしてはMabTrapTMG^rキット(アマシャム・ファルマシアバイオテック株式会社製)を用いた。

【0032】1-3 8塩化ダイオキシン標識物の作製

以下の方法にてOCDDをBSAあるいはHRPで標識した。

(1) p-アミノ安息香酸にHCl, NaNO₂を添加し、pH6～8に調整し、0で2時間反応させた。

(2) 粉末状の8塩化ダイオキシンを60%エタノールで可溶化し、OCDD溶液にアンモニウム溶液とナトリウムアミドを添加した。これにより1、4、6、9位の塩素が脱離すると考えられ、一時的にベンゼン様になるためにここに活性基を導入し安定化することができる。

(3) OCDD溶液をエバポレーターにて約1/10量まで減圧濃縮した。これに(1)の溶液を添加し、2時間反応させた。

(4) (2)のOCDDに対し10倍量の活性化HRP/DMF溶液あるいはBSA/DMF溶液を添加し、2時間反応させた。

この際、エタノールではなくDMF溶液を用いることにより、タンパクの変性を防いだ。

(5) グリシンを添加し、反応を停止させた。150mMのNaClを含む10mMリン酸緩衝液pH7.5で希釈し、OCDD-HRP、OCDD-BSA濃度0.3mg/mLを得た。この際の、BSA、HRPとOCDDの結合比は、モル比(BSAまたはHRP:OCDD)で約1:10となる。

【0033】1-4 8塩化ダイオキシン抗体の作製
 OCDDにポリリジンを結合し、これを抗原とした。これを、OCDD-PLL (PLL: Poly-L-Lysine)と記す。OCDD-PLLは1-3に示した8塩化ダイオキシン標識物の作製と同様の方法で作製される。PLLとOCDDの結合比は、モル比(PLL:OCDD)として約1:20となる。免疫動物として、健康な雌の家兎(日本白色種)(体重2.5~3.0 kg)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(FCA; Freund's complete adjuvant)、2回目以降はフロイント不完全アジュバント(FIA; incomplete adjuvant)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0.25 mg / mLであった。OCDD-PLLの投与頻度は2週間間隔で投与回数15回とした。トータル投与濃度は7.5 mg / 羽であった。初回投与後、2週目と4週目に2回目、3回目の抗原投与を行った。初回の試験採血日は3回目の投与の1週間後であった。以降、ほぼ2週間毎に抗原を投与し、各々の投与後1週間後に採血をした。最終採血日には全採血を行った。血清は個体別に保存し、0.05%となるようにNa₂S₂O₃を防腐剤として添加した。

【0034】1-5 8塩化ダイオキシン標識物に対する抗血清の力価測定

50 mM炭酸塩緩衝液、pH 9.6をコーティングバッファーとして、10 mMリン酸塩緩衝液(PBS), pH 7.2を希釈用バッファーとして、0.05% Tween20-PBS pH 7.2を洗浄用に用いた。

(1) 96穴プレートに5 µg/ml OCDD-BSAを50 µl/well となるように添加し、37 °Cで2時間または4時間で15時間放置することによりコーティングした。コーティング終了後、各ウェルよりOCDD-BSAを除去し、洗浄液で3回洗浄した。

(2) 25% Block Aceを100 µl/wellの量で添加し、37 °Cで2時間または4時間で15時間反応させることによりブロッキングした後、溶液を除き、洗浄液で3回洗浄した。

(3) 抗血清をPBSで2n倍に希釈し(n=0~10)、各々の濃度に希釈された抗血清を50 µl/wellの量で添加した。

(4) 反応後、抗血清を除き、洗浄液で3回洗浄し、酵素標識抗体Anti-HRPを50 µl/wellとなるように添加し37 °Cで2時間インキュベートした。

(5) 反応後、酵素標識抗体を除き、洗浄液で3回洗浄し、発色液を50 µl/wellとなるように添加し15分間反応させた。反応は停止液2M H₂SO₄を100 µl/wellに添加させることにより停止させた。停止後、プレートリーダーで吸光度を測定した(450 nm)。

【0035】1-6 抗8塩化ダイオキシン抗体の精製
 ベース担体としてSephacryl (マトリックスとしては高度架橋球状、平均粒子径は34 µm、pH安定性は短時間2

~9、長時間3~9)である HPMAbTrap G2キット(アマシャム・ファルマシアバイオテック株式会社)を使用し、精製を行った。このキットはサブクラスによる反応欠損が少ないと言うメリットがある。また、リガンドとしてアルブミン結合領域を欠失した組換えPrp61Gが用いられており、そのリガンド量は2mg Protein G / ml担体以下であり、1回の精製で約20~25mgのIgGが精製可能である。抗血清量では、およそ1 mlに相当し最終的に回収されるIgG量は、10~15 mgとなる。また、結合容量は25 mg ヒトIgG/ml担体である。精製時間は10 minで最大流速は4 ml/minである。このようなキットによる精製では、抗血清からのIgG精製において塩析処理などの前精製なしでワンステップで高純度IgG精製が可能である。モノクローナル抗体では、溶出時のFc他の変性を考慮する必要があるが、本抗体はポリクローナル抗体なので変性は少ないものと思われる。具体的には、次の方法で精製を行った。3 mlの結合緩衝液をシリンジで送液しカラムを平衡化後、1-4で得られた抗血清を添加した。その後、5-10 mlの結合緩衝液で洗浄し、3-5 mlの溶出緩衝液で溶出させた。さらに、1 mlあたり75 µlの中和緩衝液を溶出画分に添加し安定化させた。精製された抗体は電気泳動(SDS-PAGE)を行った。すなわち泳動ゲルとして4-20% Gradientを用いて、サンプルであるanti-OCDD rb IgG精製品 2 µg / lane還元処理した。抗血清のKAL-1, 2, 3の濃度はそれぞれ1.74 mg / ml, 1.36 mg / ml, 3.14 mg / mlに調整した。また、0.15M NaClおよび0.1% Na₂S₂O₃を含む0.1M グリシン緩衝液pH7.5を泳動用バッファーとして用いた。

【0036】実施例2: OCDD-HRPと抗体の反応確認

2-1 抗8塩化ダイオキシン抗体またはBSAの固定化
 実施例1で得た抗OCDD抗体を0.05M炭酸緩衝液(pH9.6)で各濃度に希釈し、300 µl/wellずつ96穴プレートに添加した。ブランクとしてBSA100 µg/mlを同様にウェルに添加し、4時間で18時間インキュベートした。液を除き、0.05% Tween20を含む0.01M PBS緩衝液(pH7.2)で3分間の洗浄を2回行い、続いて0.01M PBS緩衝液のみを添加し、すぐに除去した。

2-2 反応の確認

OCDD-HRPを0.01MPBS(pH7.2)で0.29~4.69(µg/ml)に希釈し、50 µl/wellで37 °Cで4時間反応させた。OCDD-HRP溶液を除き、洗浄し、TMBを50 µl/wellに添加し、遮光しながら37 °Cで20分間反応させた。停止液として1MのH₂SO₄50 µl/wellを添加しプレートリーダーで吸光度測定(450 nm)を行った。結果を図1のグラフに示す。これにより、2.72 µg/mlの抗体濃度が最適であることがわかった。また、この抗体濃度におけるOCDD-HRPの最適濃度を調べた結果を図2のグラフに示す。これより、OCDD-HRP濃度が4.7 µg/ml以下で競合するこ

とがわかる。

【0037】実施例3：競合法によるOCDDの測定
OCDD-HRPを0.01MPBS(pH7.2)で希釈したものを
用いる代わりに、最終濃度が4.7µg/mlとなる
ようにPBSで希釈したOCDD-HRPと最終濃度が0~200ng/ml
となるようにPBSで希釈したOCDDとの混合液(容量比
1:4)を50µl/wellで添加すること以外は、実施
例2とほぼ同じ手順により、OCDDの測定を行った。結果
を図3のグラフに示す。

【0038】実施例4：HeCDD、HpCDD、OCDD、OCDFの測
定
OCDD-HRPIは、上記と同様にPBSで4.7µg/mlに希
釈して使用した。各ダイオキシン類はPBS(終濃度0.
5%DMSOを含む)で25ng/mlに希釈した。6
塩化ダイオキシン(HeCDD)と7塩化ジベンゾフラン(H
pCDF)は、0.5%MeOH、0.5%DMSOを含む
リン酸緩衝液で25ng/mlに希釈した。8塩化ダイ
オキシン(OCDD)と8塩化ジベンゾフラン(OCDF)は
0.5%DMF、0.5%DMSOを含むリン酸緩衝液
で25ng/mlに希釈した。各ダイオキシン類とOCDD
-HRPIは1:4の容量比で混合し、反応させた。溶媒の影響
をなくすため、吸光度から溶媒の吸光度を差し引き、
8塩化ダイオキシンの反応性を100とした時のOCDF、
HeCDD、HpCDFの交差率を求めた。結果を表2に示す。

【0039】

【表2】

ダイオキシン	交差率 (%)
1,2,3,4,6,7,8,9-OCDD	100
1,2,3,4,6,7,8,9-OCDF	79
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	22
1,2,3,7,8,9-HeCDD	52

30

*【0040】実施例5：土壌サンプル中のダイオキシンの測定
土を採取し、2mmの篩にかけた後、70℃で24時間乾燥させた(水分率約26%)。得られた乾燥土壌4mgに、1ppmの8塩化ダイオキシン40µl(10µg/g)を添加し、十分に振とうした後、2晩風乾した。これを試料として用い、溶媒としてジメチルスルホキシド100µlを添加して、周波数43kHzの超音波をかけながら90分間抽出した。その間、5分毎に10秒間振とうし、PBSでジメチルスルホキシドの濃度が0.5v/v%となるように希釈して試料溶液を調製した。この試料溶液について、上記実施例4の方法によりダイオキシンの測定を行ったところ、実際の重量に対応する測定値が得られた。

【0041】実施例6：前処理に使用される溶媒のイムノアッセイに与える影響を調べるために、溶媒として、表3に列挙するものを使用し、抗4塩化ダイオキシン抗体を用いたイムノアッセイにより、4塩化ダイオキシンの抽出率を調べた。結果を表3に示す。なお、参考のため、GC/MSによる抽出率を併記した。表に示すように抽出率はジメチルスルホキシドを用いた場合が一番高い。

【0042】

【表3】

キットによる抽出率

	GC/MS TCDD 抽出率 (%)	GC/MS OCDD 抽出率 (%)	ELISAキット TCDD 抽出率 (%)	水への溶解度 (wt%) (測定温度℃)
1,4-ジオキサン	94.10	80.91	-	∞ (25)
N,N-ジメチルホルムアミド	74.62	31.46	0.58	∞ (25)
ジメチルスルホキシド	70.18	48.22	95.35	∞ (25)
アセトン	69.40	20.6	0.0001	∞ (25)
メタノール	67.18	29.43	13.98	∞ (25)
エタノール	67.05	66.04	-	∞ (25)
テトラヒドロフラン	64.43	55.54	-	∞ (20)

【0043】実施例7：3~6塩化ダイオキシンについて、前処理に用いる溶媒による抽出率をGC/MSにつ

いて調べた。結果を図4に示す。図より、メタノールを用いた場合の抽出率は3～6塩化ダイオキシンではほぼ一定であるが、ジメチルスルホキシドを用いた場合の抽出率は、6塩化ダイオキシンが高かった。

【0044】実施例8：ポリ塩化ジベンゾフランとポリ塩化ダイオキシンの抽出率の^{*}を調べるために、各々^{*}ジベンゾパラダイオキシンとジベンゾフランの抽出率の比較

(溶媒：メタノール)

塩素置換数	4	7	8
ポリ塩化ジベンゾ パラダイオキシン	79.1	—	26.62
ポリ塩化ジベンゾ フラン	80.8	70.5	100.8
	81.8	72.2	102.3

【0046】

^{*} ^{*}【表5】
ジベンゾパラダイオキシンとジベンゾフランの抽出率の比較

(溶媒：ジメチルスルホキシド)

塩素置換数	4	7	8
ポリ塩化ジベンゾ パラダイオキシン	88.4	—	28.9
ポリ塩化ジベンゾ フラン	86.3	—	28.7
	81.5	94.7	116.0
	84.6	98.4	120.9

【0047】実施例9：溶媒が抗8塩化ダイオキシン抗体に与える影響を調べるために、メタノール、アセトン、ジメチルスルホキシド及びジメチルホルムアミドを溶媒として用いて、抗8塩化ダイオキシン抗体を用いたイムノアッセイを行った。結果を図5のグラフに示す。図に示されるように、メタノール以外の溶媒を用いた場合、0.1%以上で抗体に対する阻害が認められ、メタノールを用いた場合、0.5%以上の濃度で抗体に対する阻害が認められた。

【0048】実施例10：土を採取し、2mmの篩にかけた後、70℃で24時間乾燥させた。得られた乾燥土壤に、8塩化ダイオキシンを、乾燥土壤1gあたり8塩化ダイオキシンが10μgとなるように添加し、十分に振とうした後、2晩風乾した。これを試料として用い、溶媒としてジメチルホルムアミド100μlを添加して、周波数43kHzの超音波をかけながら抽出した。抽出時間と抽出率との関係を図6に示す。

【0049】実施例11：土を採取し、2mmの篩にかけた後、70℃で24時間乾燥させた。得られた乾燥土壤に、8塩化ダイオキシン、8塩化ジベンゾフラン、8塩化ダイオキシンと8塩化ジベンゾフランの1：1混合物を、各々乾燥土壤1gあたりの量が10μgとなるように添加し、十分に振とうした後、2晩風乾した。これらを試料として用い、溶媒としてジメチルホルムアミド100μlを添加して、周波数43kHzの超音波をかけながら90分間抽出した。各抽出液をリン酸緩衝液(10mM, pH7.2)で、ダイオキシン含有量が32.5ng/ml、65ng/ml、130ng/mlとなるように希釈した。得られた希釈液を用い、抗8塩化ダイオキシン抗

*についてジメチルスルホキシドを溶媒として前処理を行った場合と、メタノールを溶媒として前処理を行った場合について抽出率を調べた。結果を表4及び表5に示す。

【0045】

【表4】

体及びHRP標識OCDDにより、実施例3に記載したのと同様の方法により競合イムノアッセイを行った。結果を下記に示す。なお、下記に示した吸光度は、ダイオキシンが含まれない土壤試料を用いて同様に測定した吸光度から、上記で測定された吸光度を差し引いた値である。

【0050】

【表6】

ダイオキシンの量	吸光度		
	OCDD	OCDF	OCDD+OCDF
32.5 ng/ml	0.65	0.57	0.54
65 ng/ml	0.83	0.64	0.79
130 ng/ml	1.31	0.90	0.91

【0051】上記表より、抗8塩化ダイオキシン抗体を用いたイムノアッセイにより、試料中の8塩化ダイオキシン及び8塩化ジベンゾフランのおおよその量を知ることができることが明らかである。

【0052】

【発明の効果】本発明の方法単独で、または抗4塩化ダイオキシン抗体を用いるELISA法と組み合わせて行うことにより、試料中のダイオキシン類を定性的にまたは定量的に分析することができる。これにより、環境上重要なダイオキシン類を、簡便な方法で且つ低コストで測定することが可能になる。特に、土壤試料中のダイオキシン類については、前処理に、従来必要とされていたような複雑な処理や高価な装置を必要とすることなく、簡単な前処理を行った後にイムノアッセイを行うことによりダイオキシン類のおおよその量を知ることができ

30

40

50

まれるダイオキシンであり、これを測定することにより、その土壌や底質のダイオキシン汚染状況を把握することが可能である。従って、本発明の方法、キット及び検出器具は、特に土壌や底質の汚染状況のスクリーニング的な調査に適している。

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明の抗 8 塩化ダイオキシンと 8 塩化ダイオキシンの反応性を示すグラフである。

【図 2】本発明の抗 8 塩化ダイオキシンと 8 塩化ダイオ*

*キシンの反応性を示すグラフである。

【図 3】8 塩化ダイオキシン濃度と吸光度の関係を示すグラフである。

【図 4】溶媒と GC / MS 抽出率の関係を示すグラフである。

【図 5】抗体に対する溶媒の影響を示すグラフである。

【図 6】8 塩化ダイオキシン抽出時間と抽出率の関係を示すグラフである。

【図 1】

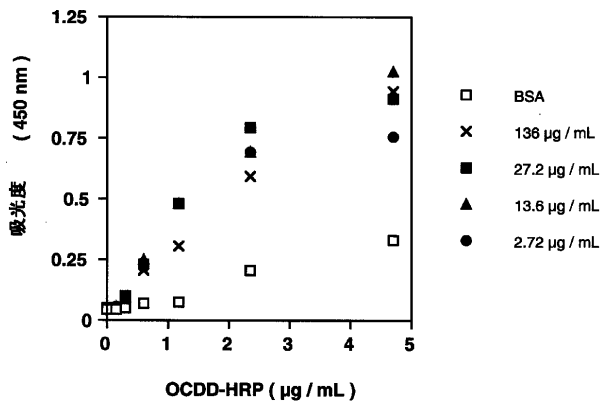


図 1 抗体の最適固定化濃度の検討

【図 2】

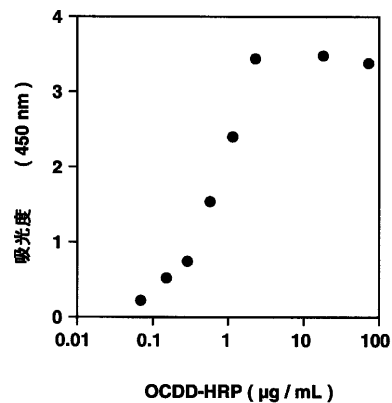


図 2 OCDD-HRPの濃度上昇に対する吸光度の上昇

【図 3】

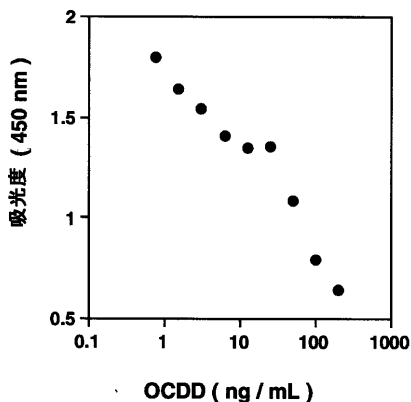
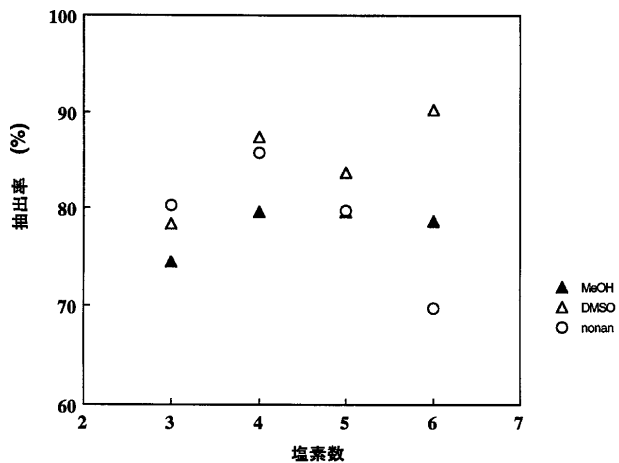


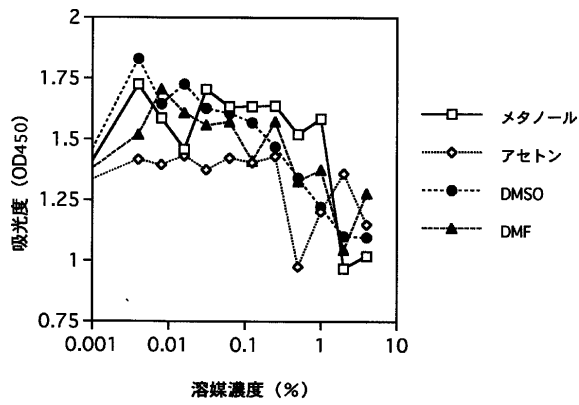
図 3 OCDD濃度上昇に対する吸光度の減少

【図 4】



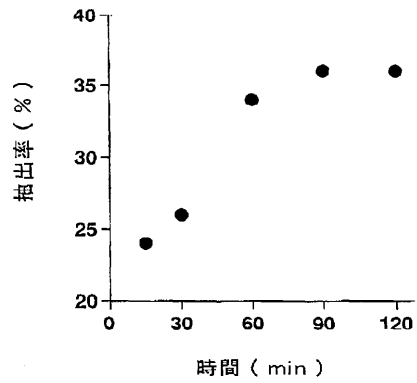
塩素数による抽出率の変化

【図5】



溶媒の影響

【図6】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

G 0 1 N 33/531

// G 0 1 N 33/577

識別記号

F I

G 0 1 N 33/577

1/28

テ-マ-コ-ト (参考)

B

Y

Z

Fターム(参考) 2G052 AA19 AB11 AB22 AD34 AD46
 EA04 EB12 EB13 FB02 FB08
 FB10 FC02 FC15 FD01 FD02
 FD09 FD18 GA11 GA22 GA24
 GA30 JA03 JA07
 4H045 AA11 CA42 DA75 EA50 FA74
 GA22

专利名称(译)	二恶英的检测或测定方法		
公开(公告)号	JP2003098173A	公开(公告)日	2003-04-03
申请号	JP2002107209	申请日	2002-04-09
申请(专利权)人(译)	学校法人Katayanagigakuen		
[标]发明人	志水美文 野村陽子 輕部征夫		
发明人	志水 美文 野村 陽子 輕部 征夫		
IPC分类号	G01N27/62 C07K16/44 G01N1/36 G01N33/00 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/577		
FI分类号	G01N33/53.S C07K16/44 G01N27/62.ZAB.V G01N33/00.D G01N33/531.A G01N33/577.B G01N1/28.Y G01N1/28.Z G01N1/38 G01N27/62.V G01N27/62.VZA.B		
F-TERM分类号	2G052/AA19 2G052/AB11 2G052/AB22 2G052/AD34 2G052/AD46 2G052/EA04 2G052/EB12 2G052/EB13 2G052/FB02 2G052/FB08 2G052/FB10 2G052/FC02 2G052/FC15 2G052/FD01 2G052/FD02 2G052/FD09 2G052/FD18 2G052/GA11 2G052/GA22 2G052/GA24 2G052/GA30 2G052/JA03 2G052/JA07 4H045/AA11 4H045/CA42 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA22 2G041/AA09 2G041/CA01 2G041/EA06 2G041/FA08 2G041/HA01		
优先权	2001109427 2001-04-09 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种通过简单易行的方法以低成本测量二恶英的方法。解决方案：在检测或测定二恶英的方法中，对样品进行使用抗8氯化二恶英抗体的免疫测定，检测样品中二恶英的存在，或者根据二恶英的数量计算二恶英的含量。免疫测定的结果。将有机溶剂加入土壤或沉积物样品中，并通过施加超声波提取二恶英20分钟或更长时间。在用于检测或测定土壤或沉积物样品中的二恶英的方法中，使用抗二恶英抗体通过免疫测定法分析提取的二恶英。提供了用于检测或确定土壤或沉积物样品中的二恶英以实施该方法的试剂盒或检测装置。

ンの測定をイムノアッセイで行う*10

		TEF	
PCDD	2, 3, 7, 8-TCDD	1	
	1, 2, 3, 7, 8-PeCDD	1	
	1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDD	0.1	
	1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDD	0.1	
	1, 2, 3, 7, 8, 9-HxCDD	0.1	
	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDD	0.01	
	OCDD	0.0001	
	その他	0	
	PCDF	2, 3, 7, 8-TCDF	0.1
		1, 2, 3, 7, 8-PeCDF	0.05
2, 3, 4, 7, 8-PeCDF		0.5	
1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDF		0.1	
1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDF		0.1	
1, 2, 3, 7, 8, 9-HxCDF		0.1	
2, 3, 4, 6, 7, 8-HxCDF		0.1	
1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDF		0.01	
1, 2, 3, 4, 7, 8, 9-HpCDF		0.01	
OCDF		0.0001	
その他	0		

TCDD: テトラクロロジベンゾパラダイオキシン