

Ah イムノアッセイによるダイオキシン類計測の実際

○ 小林康男¹、植地俊仁¹

¹ ㈱クボタ 技術開発本部

Ah イムノアッセイTMは細胞を使わず Ah レセプターのタンパク質を利用し、ELISA プレート上で生体内でのダイオキシン類の毒性発現メカニズムを再現した迅速・簡便・安価な生物化学的毒性検出キットである。

Ah イムノアッセイの大きな特徴は、高感度でダイオキシン類やその類似物質の毒性を総合的に検出でき、TEQ と極めて相関の高い結果が得られることにある。また、その用途は、①TEQ のスクリーニング ②Ah レセプターとの結合指標、③総合毒性評価、などがあり、現在、幅広く利用されている。この報文では Ah イムノアッセイ法の反応原理、ダイオキシン類などに対する基本反応性、及び、実際の計測方法および分析実例を報告する。

キーワード：Ah イムノアッセイ、ダイオキシン、Ah レセプター、クリーンアップ

1. Ah イムノアッセイの分析原理

このダイオキシン類の毒性メカニズムには、Ah レセプター (Aryl hydrocarbon Receptor) と ARNT (Ah Receptor Nuclear Trans-locator) と呼ばれる蛋白質が関与している。Ah イムノアッセイは、細胞内で起きるダイオキシン類との一連の反応を ELISA プレート上で行わせ、ダイオキシン類の毒性を定量化する。Ah イムノアッセイの分析原理を図1に示す。実際のサンプルは必要なクリーンアップを行い、DMSO 溶媒で準備しておく。ウェル内でサンプルを試薬と反応させるとダイオキシン類は Ah レセプター・ARNT と複合体を形成する。

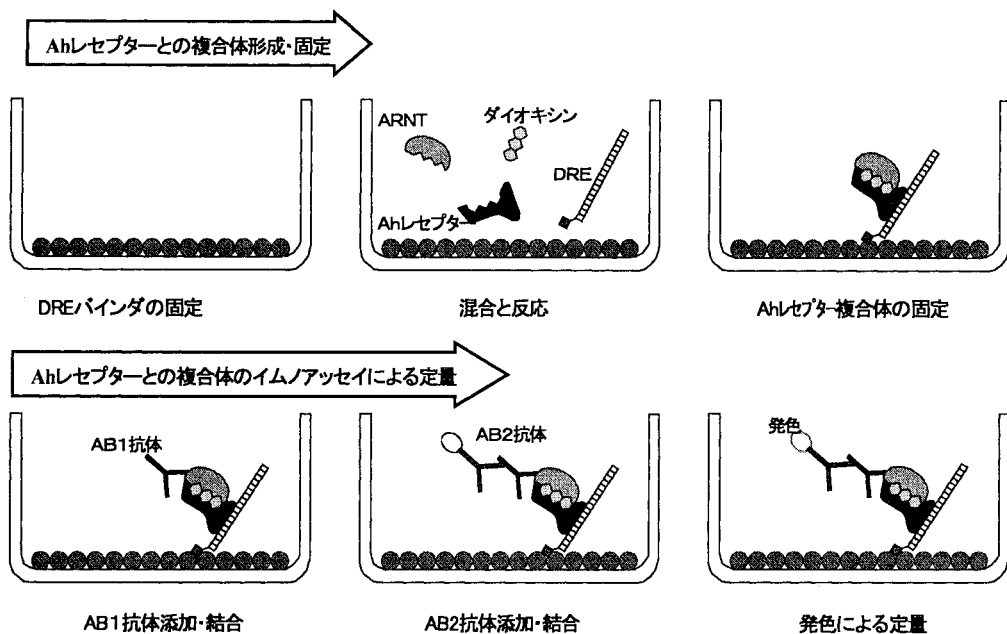


図1 Ah イムノアッセイの分析原理

さらに、この複合体は DRE と結合し、ELISA プレートウェル底に固定化される。この固定化された複合体に特異的に結合する一次抗体、さらに、発色反応を起こさせる二次抗体を添加し、発色反応による吸光度値として測定する。得られた吸光度値を 2, 3, 7, 8-TCDD の標準液に対する吸光度と比較して Ah レセプターに結合したダイオキシン類の総量として定量する。主要試薬はモルモットの肝細胞から抽出された Ah レセプター含有のサイトソル、ARNT、および DRE である。検出範囲は 1~64 pgDEQ/ウエルであるが、環境サンプルではその相関倍率から、TEQ ベースに換算すると約 0.1~6.4 pgTEQ/ウエルである。なお、この分析法は米国・欧州・日本で既に特許化されている。

2. 反応性

Ah イムノアッセイはダイオキシン類およびその類似物質を検出できる。

表 1 には、代表的な TEF のあるダイオキシン類 PCDDs/PCDFs 及び Co-PCBs、多環芳香族炭素水素 PAHs および臭素化ダイオキシン類などの交差反応性を示す。Ah イムノアッセイは TEF と非常に相関があることが認められる。多くの PAHs と Ah イムノアッセイは反応性を有するが、それらの PAHs 類は強い発がん性物質である。また、臭素化ダイオキシンが塩素化ダイオキシンと同等な反応性を有することがこの交差反応性から明らかである。

3. Ah イムノアッセイ分析事例

3. 1 Ah イムノアッセイと GCMS 分析の違い

Ah イムノアッセイで、土壌サンプルを測定する際の手順を図 2 に示す。

サンプルからの抽出、クリーンアップおよび Ah イムノアッセイ分析の順で行われるが、公定法と異なる点は、各工程を Ah イムノアッセイの感度および反応特異性に合わせて簡略化できることである。サンプルからの抽出は、基本的には公定法と同じであるが、高速溶媒抽出装置を利用することで、約 1 時間に短縮できる。

クリーンアップは、下記に示すように、Ah イムノアッセイの感度および特異性を加味した方法で行う。

Ah イムノアッセイの分析では、約 6 時間で約 20~40 の同時分析が可能であり、計測に使うプレートリーダーと分析者がいれば、分析数に制限はない。分析費用は実質的に公定法の 1/5 から 1/10 である。

また、標準液のスパイクを行わない点は公定法と異なる。

3. 2 クリーンアップ方法

一般的にバイオアッセイやイムノアッセイは、感度および反応特異性が各々異なるため、アッセイに合ったクリーンアップ方法が必要である。ダイオキシン類の TEQ を求める場合には、多環芳香族炭化水素 (PAHs) の影響を可能な限り排除することが必要である。そのため、Ah イムノアッセイでは硫酸処理や硫酸カラム主体の多層カラムでクリーンアップする。

従来からの研究で、PAHs 除去を目的として多層シリカカラムクリーンアップの適用性を検討した結果では、PAHs が多層シリカカラムで分解除去できることが明らかになっている¹。さらに、多くの土壌サンプルの分析実例から、サンプル量と硫酸シリカカラム主体の多層シリカとの比が重要であることが明らかになってきた^{2,3}。図 3 にはサンプル量と硫酸シリカ量を目安とした多層シリカカラムの量を指標として整理した土壌の分析結果を示す。その結果、2 g の土壌サンプル量で硫酸処理後 2 回の多層シリカカラム (硫酸シリカ量 44% x3 g) で極めて良い分析結果が得られるようになった。これらの知見を元に特に低濃度側のサンプルでのクリーンアップ程度を配慮した分析を行った結果、相関性の良いデータが得られた (図 4 参照)。以上のことから、土壌

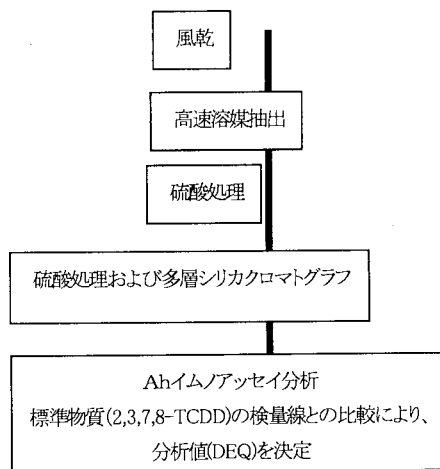


図 2 土壌サンプルの分析手順

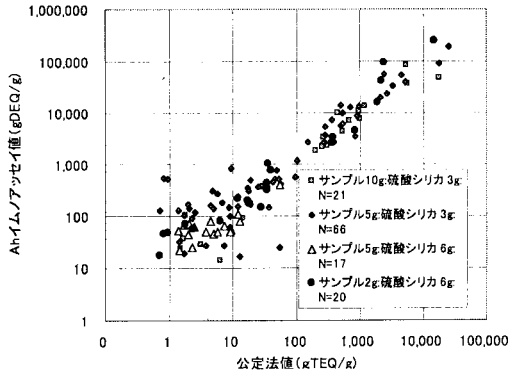


図3 クリーンアップの度合の違いによる
相関性

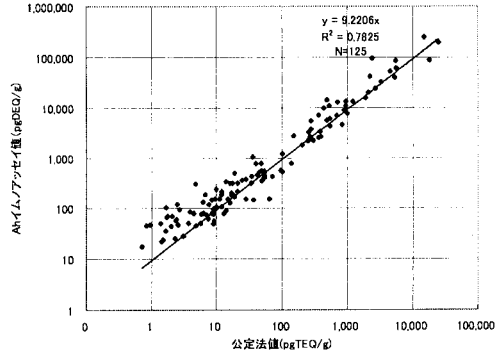


図4 改善したクリーンアップ条件での相関性

の場合のクリーンアップは、2g・サンプル/6g・44%硫酸シリカの値が一つの重要なパラメータになるであろう。

4. PCDD/Fs と Co-PCB 類の組成の影響

Ah イムノアッセイの分析結果はサンプルの組成を反映する。特に、PCDD/Fs と Co-PCB 類の組成の影響は大きいと考えられる⁴。図3で示すサンプルではその組成がすべてわかっているので、TEQに占めるCo-PCBのTEQの割合を指標として、層別した結果を図5に示す。

この図から採取された土壌サンプルの由来はさまざまであり、Co-PCBのTEQの割合が0%から50%まで、広範囲にわたっていることが理解できる。Co-PCBのTEQの割合が30%を超えるサンプルは、濃度では95%以上がCo-PCBである。TEQが10pgTEQ/g以下のサンプルでは多少、ばらつきはあるものの、広範囲にTEQとの相関性が維持されていることは、PCB汚染の土壌でも、Ahイムノアッセイ法がスクリーニング手法としても有用であることを示している。

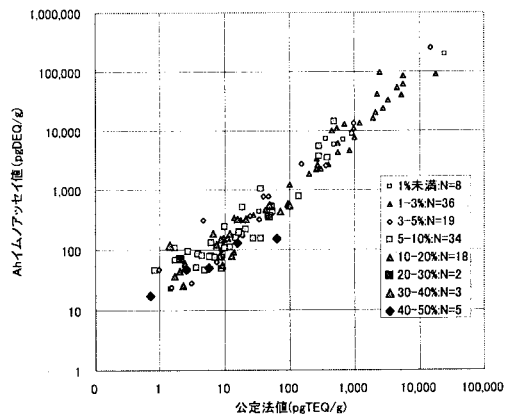


図5 Co-PCB (TEQ) の割合を指標とした
相関性

5. いろいろな環境サンプル

現在まで、土壌、焼却灰、排水、排ガスなど多くの環境サンプルに対して、Ahイムノアッセイの分析を行ってきた。それらの環境サンプル全体を総合的に見ると、対象種類によらず、TEQとの相関係数は多少異なるものの、極めて高い相関性があることが示されている。たとえば、土壌や焼却灰・飛灰などの固体サンプルで平均10~13倍、低濃度の排水サンプルでは約16倍の相関倍率が得られている⁵。

6 まとめ

Ahイムノアッセイは、①TEQのスクリーニング、②Ahレセプターとの結合指標、③総合毒性評価、など幅広い利用用途がある。土壌サンプルなど多量サンプルのTEQ迅速スクリーニングには、最も適した分析法である⁵。高濃度の飛灰から低濃度の土壌や排水までAhイムノアッセイで測定できることから、焼却炉解体工事に伴うダイオキシン類のトータル管理にも有効である。また、ダイオキシン類の分解実験では、迅速かつ安価に分解性能を測定できるので、研究開発の効率を上げるための良い手段にもなる。

Ah イムノアッセイの本来機能である「Ah レセプターとの結合指標」では、薬品などの毒性チェックや医学分野での疫学的症例研究、さらに、大気煤塵などでは発ガン性の PAHs 類を含む煤塵モニタリングとしても利用の可能性がある。近い将来、Ah イムノアッセイは、塩素化ダイオキシン類のみならず、同様な毒性を有する臭素化ダイオキシン類をも検出できることから、総合的毒性評価する新手法として有望になるであろう。

表 1 Ah イムノアッセイの交差反応性

化学物質	反応性 ^{a)}	備考 ^{b)}	化学物質	反応性 ^{a)}	備考 ^{b)}	化学物質	反応性 ^{a)}	備考 ^{b)}
1.1 TEFのあるPCDDs			1,2,8,9-TCDF	0.007		2,3,7,8-TeBDF	0.5	
2,3,7,8-TCDD	(1)	(基準)	1,3,6,8-TCDF	0.001		1,2,3,7,8-PeBDF	0.2	
1,2,3,7,8-PeCDD	0.8	1	2,3,4,7-TCDF	0.6		2,3,4,7,8-PeBDF	0.3	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.5	0.1	2,3,4,8-TCDF	0.2		1,2,3,4,7,8-HxBDF	0.03	
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.5	0.1	1,4,6,8-TCDF	ND	*1	3,3',4,4'-TetraBB	0.2	
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.5	0.1	1,3,4,8-TCDF	0.0002	*1	2,2',4,4'-TBDE	0.0003	
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.2	0.01	3,4,6,7-TCDF	0.8	*1	2,2',4,4',5,5'-PeBDE	0.0004	
OCDD	0.003	0.0001	1,3,4,7-TCDF	0.02	*1	2,2',4,4',5,5'-HxBDE	0.0001	
1.2 その他のPCDDs			1,6,7,8-TCDF	0.03	*1	5. 多環芳香炭化水素 PAHs		
1,2,3-TrnCDD	0.009		1,2,4,8-TCDF	ND	*1	Benzo(b)fluoranthene	1	
1,2,4-TrnCDD	0.003		1,3,7,8-TCDF	0.003	*1	Benzo(j)fluoranthene	0.3	
1,7,8-TrnCDD	0.005		1,3,6,7-TCDF	0.002	*1	Benzo(k)fluoranthene	1	
2,3,7-TrnCDD	0.1		2,4,6,7-TCDF	0.2	*1	Benzo(a)fluorene	0.001	
1,2,3,4-TCDD	0.005		2,3,6,7-TCDF	0.4	*1	Benzo(b)fluorene	0.001	
1,2,3,6-TCDD	0.02		2,3,4,6-TCDF	0.08	*1	Benzo(a)pyrene	0.2	
1,2,3,9-TCDD	0.02		1,3,4,9-TCDF	ND	*1	Benzo(e)pyrene	ND	
1,2,6,7-TCDD	0.4		2,3,6,8-TCDF	0.02	*1	Indeno(1,2,3-cd)pyrene	0.8	
1,2,7,8-TCDD	0.9		1,2,3,4,8-PeCDF	0.1		Dibenzo(a,c)anthracene	0.3	
1,2,8,9-TCDD	0.3		1,2,3,8,9-PCDF	0.07		Dibenzo(a,h)anthracene	1	
1,3,6,8-TCDD	ND		1,3,4,6,8-PCDF	0.01		Dibenzo(a,h)pyrene	0.1	
1,3,7,8-TCDD	0.3		2,3,4,6,7-PeCDF	0.9		Dibenzo(a,i)pyrene	0.6	
1,3,7,9-TCDD	ND		1,2,3,4,6,8-HxCDF	0.01		Picene	0.9	
1,2,3,7-TCDD	0.7		1,2,3,4,6,7-HxCDF	0.4		3-Methyl-cholanthrene	0.8	
1,2,3,8-TCDD	0.4		1,2,3,4,8,9-HxCDF	0.2		Benzo(a)anthracene	0.001	
1,4,7,8-TCDD	0.03		1,2,3,4,6,8,9-HpCDF	0.006		Naphthalene	ND	
1,2,3,4,7-PeCDD	0.2		2.3 OH-PCDFs			Phenanthrene	ND	
1,2,3,8,9-PeCDD	0.7		8-OH-2,3,4-TrCDF	0.001	*1	Anthracene	ND	
1,2,4,7,8-PeCDD	0.5		7-OH-1,2,3,6,8-PCDF	0.003	*1	Fluoranthene	ND	
1,2,3,4,6,7-HxCDD	0.4		1-OH-2,3,4,7,8-PCDF	0.6	*1	Pyrene	ND	
1,2,3,4,6,9-HxCDD	0.001		3.1 Co-PCBs			3,3',4,4'-tetrachlorodiphenyl ether	ND	
1,2,3,4,6,7,9-HpCDD	0.02		3,4,4',5-TetraCB(#81)	0.03	0.0001	6. その他化学物質		
2.1 TEFのあるPCDFs			3,3',4,4'-TetraCB(#77)	0.01	0.0001	6.1 インデルピンなど		
2,3,7,8-TCDF	0.06	0.1	3,3',4,4',5-PentaCB(#126)	0.3	0.1	Indilubin	0.12	*2
1,2,3,7,8-PeCDF	0.07	0.05	3,3',4,4',5,5'-HexaCB(#169)	0.06	0.01	Indigo	0.0002	
2,3,4,7,8-PeCDF	0.9	0.5	2,3,4,4',5-PentaCB(#123)	0.002	0.0001	6.2 毒害		
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.08	0.1	2,3',4,4',5-PentaCB(#118)	0.0002	0.0001	Aflatoxin B1	ND	
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.6	0.1	2,3,4,4',5-PentaCB(#114)	0.001	0.0005	Aflatoxin B2	ND	
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.6	0.1	2,3,3',4,4'-PentaCB(#105)	0.0003	0.0001	Aflatoxin G1	ND	
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.5	0.1	2,3',4,4',5,5'-HexaCB(#167)	0.0001	0.00001	Aflatoxin G2	ND	
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.06	0.01	2,3,3',4,4',5-HexaCB(#156)	0.001	0.0005	Microcystin MC-LR	0.0001	
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.07	0.01	2,3,3',4,4',5-HexaCB(#157)	0.002	0.0005	Microcystin MC-YR	0.001	
OCDF	0.008	0.0001	2,3,3',4,4',5,5'-HeptaCB(#189)	0.0002	0.0001	Microcystin 6Z-MCLR	0.001	
2.2 その他のPCDFs			3.2 OH-Co-PCBs			6.3 カネクロール		
1,2,3-TrnCDF	0.0003		4-OH-3,5,2',5'-TCB	ND	*1	KC-200	0.0006	*3
2,3,8-TrnCDF	0.0005		4-OH-3,5,3',4'-TCB	ND	*1	KC-300	0.0008	*3
1,2,3,4-TCDF	0.006		4-OH-3,5,3',4',5'-PeCB	ND	*1	KC-400	0.0001	*3
1,2,3,8-TCDF	0.002		4. 臭素化ダイオキシン類			KC-500	0.0007	*3
1,2,3,9-TCDF	0.006		2,3,7,8-TeBDD	0.5		KC-600	0.0006	*3
1,2,6,9-TCDF	0.01		1,2,3,7,8-PeBDD	0.3		KC-1000	0.0005	*3
1,2,7,8-TCDF	0.06		OBDD	0.004				

^{a)} 2,3,7,8-TCDD の Ah イムノアッセイ値を 1 とした場合の反応比較値である。^{b)} 備考中の斜字は WHO-TEF である。^{*}1 第一薬科大学 黒

木教授からのご提供、^{*}2 京都大学 松田助教授からのご提供、^{*}3 日新環境調査センターのご提供による。

参考文献

- 第 10 回環境化学討論会「Ah レセプター利用ダイオキシン簡易測定技術の実証研究」中西俊夫、小林 康男、中尾見幸、宮田秀明 2001.6
- 財団法人環境研究財団「廃棄物に係わるダイオキシン類等の分析方法の体系化に関する研究」報告書 H14 年 3 月
- 東京環境計測協議会「Ah イムノアッセイ™によるダイオキシン類の測定」芦枝和典 中嶋真日(日新環境調査センター) H13 年 11 月
- 第 11 回環境化学討論会「Ah レセプター利用ダイオキシン簡易測定技術の実証研究 2」中西俊夫、小林 康男、中尾見幸、宮田秀明 2002.6
- 造水技術「Ah レセプターによる環境サンプルのダイオキシン類測の実例」小林康男、中西俊夫、Vol. 27 No. 4 2000