

<特集>

ケイラックス® アッセイによるダイオキシン類の迅速測定

Rapid and Simple Measuring Method of Dioxins

Review of Bioassay, CALUX® Assay

○ 中村昌文, 山本司, 村田弘司

株式会社日吉 技術部*

○ Masafumi Nakamura, Tsukasa Yamamoto, Hiroshi Murata
Hiyoshi Corp. Technical department

1 はじめに

平成12年(2000年)1月15日に「ダイオキシン類対策特別措置法」が施行された。それに伴って大気、水、土壌、底質等の環境試料や排ガス、排水等のダイオキシン類発生源由来試料等、多種多様な試料について、ダイオキシン類の濃度を測定することが必要になっている。しかしながら、ダイオキシン類の公定法は、煩雑で長時間を要する前処理に加えて、高価な高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計 (High-Resolution Gas Chromatography/High-Resolution Mass Spectrometry; HRGC/HRMS) が必要であるため、その分析に長時間で且つ高価な分析費用が必要である。

近年、このような状況において、公定法の難点を補充、あるいは公定法分析を行うべく試料を選ぶための一次スクリーニングとして、簡便な生物検定法が注目されている。その中の Ah 受容体 (Arylhydrocarbon) を介した遺伝子発現に基づくバイオアッセイの一種であるケイラックス® アッセイを本稿で説明する。

2 ケイラックス® の概要

2.1 概要

ケイラックス® アッセイは、CALUX® (Chemically Activated Luciferase eXpression) の呼称でアメリカの

Xenobiotic Detection Systems International, Inc. (XDS社) が開発した技術¹⁾である。ケイラックス® アッセイは1996年にアメリカで開発された技術で、弊社では1998年より導入し、これまでに多くの政府研究機関、大学、民間企業などと共同研究を進め検証作業に取り組んでいる。土壌、灰、廃水、排ガスなどの環境試料や、血液、母乳、脂肪組織などの生体試料さらに魚、乳製品などの食品試料など様々な試料媒体について検証を行っている。

ダイオキシン類の毒性は、細胞内のいわゆるダイオキシンレセプター (Aryl hydrocarbon Receptor: AhR) にダイオキシン類が結合することに非常に大きな関連があるものとされている。ダイオキシン類と結合した AhR は細胞核内に移行し、さらに ARNT (Ah Receptor Nuclear Translocator) と呼ばれるタンパク質と結合し複合体を形成する。この複合体は XRE: Xenobiotic Responsive Elements (異物応答配列) と呼ばれる DNA の特定の配列を認識しており、結合する。この複合体と XRE の結合により XRE に下流にある遺伝子が発現する。XRE のコントロール下にある代表的な遺伝子には異物代謝酵素として知られる P450 酵素 (CYP1A1) がある。このようにダイオキシン類による毒性は細胞の遺伝子発現系を乱すことが大きな要因の一つであると考えられている。

2.2 測定原理

ケイラックス® アッセイは、この生物に対するダイオキシン類の毒性発現メカニズムを利用したダイオキシン

* 〒 523-8555 滋賀県近江八幡市北之庄町 908 番地
TEL:0748-32-5001 FAX:0748-32-4192
E-mail:m.nakamura@hiyoshi-es.co.jp

類の簡易測定方法である。その測定原理の詳細は Fig.1 に示すが、要約すると、ダイオキシン類の毒性発現の鍵となる DNA 配列である XRE のコントロール下に、蛍光を発生させる酵素であるルシフェラーゼをコードする遺伝子を組み込んだマウス肝ガン細胞 (H1L1.6) を使用し、ダイオキシン類を測定する方法である。こうした遺伝子組

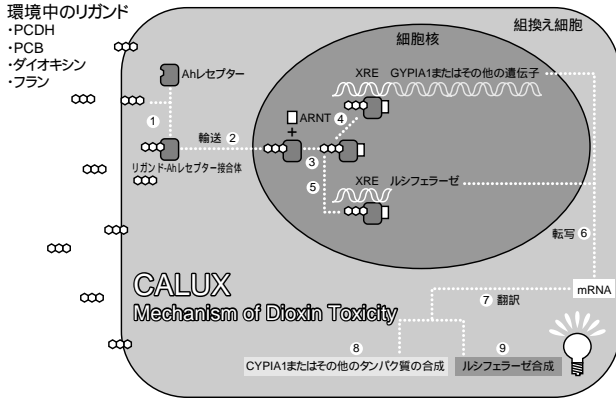


Fig.1 Mechanism of CALUX®

換えにより、ダイオキシン類の量に応じてルシフェラーゼ酵素が合成されることとなり、そのルシフェラーゼ酵素による発光の強さ (RLU) をルミノメーターで測定することによって試料中のダイオキシン類濃度を測定することができるというメカニズムである。この測定原理からわかるように、ケイラックス® アッセイは試料中のダイオキシン類の総毒性量を直接評価するという特徴がある。(詳細は <http://www.hiyoshi-es.co.jp/topics/calux/calux4.html>)

3 ケイラックス® アッセイの特性

3.1 ケイラックス® アッセイの手順

Fig.2 にマウス組み替え肝がん細胞 H1L1.6 を用いたケイラックス® アッセイの操作手順を示す。

試料は、JIS 法もしくは、独自の超音波抽出法を用いることによって、粗抽出液を得る。この粗抽出液を濃縮した後、ヘキサンに再溶解させ、特許申請中のクリーンアップ法 (硫酸シリカゲルカラムと XCARB カラム) に通液させた後、適切な溶媒でコプラナー PCB (Co-PCBs) とダイオキシン/フラン (PCDD/DFs) を溶出、分画させる。その後、ジメチルスルホキシド (DMSO) に転溶し、96 穴プレート内で生育させた H1L1.6 マウス肝がん細胞の単層に曝露させる。また、同一プレート内に希釈段階の 2, 3, 7, 8-TCDD の標準物質を曝露し、検量線を得る。このプレートを 24 時間培養させた後、試料中のダイオキシ

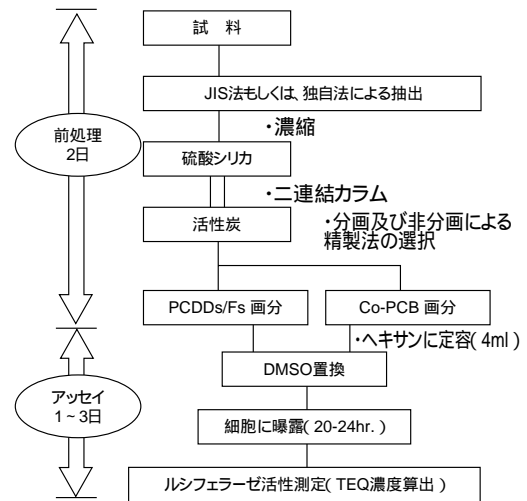


Fig.2 Flow chart for CALUX®

ン類濃度による毒性に応じて生成されるルシフェラーゼを定量しダイオキシン類の総毒性量 (CALUX-TEQ) を得る。試験作業に要する時間は、前処理 2 日、アッセイ 1~3 日間である。

3.2 ケイラックス® の特性

ケイラックス® で得られた TCDD の濃度-応答曲線を Fig.3 に示す。ケイラックス® の検出下限値はブランクサ

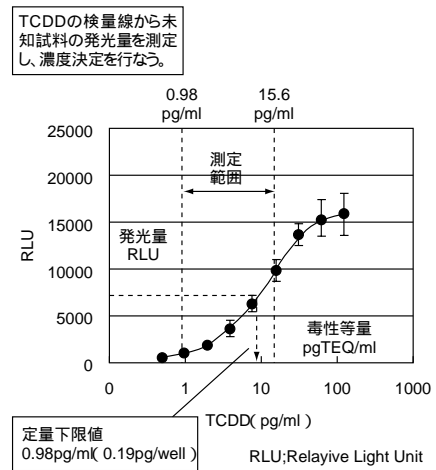


Fig.3 Characteristics of CALUX®

ンプルの標準偏差の 3 倍 (0.098pgCALUX-TEQ/well), 定量下限値は同 6 倍 (0.19pgCALUX-TEQ/well) である。土壌、灰などの固形試料の場合 3.5g を使用して、1.0pgCALUX-TEQ/g の定量下限値で非常に高感度である。測定範囲は、0.98pg/ml~15.6pg/ml とダイナミック

レンジが狭いが、検量線のレンジ幅に入るように精製液を一定容量に希釈し、細胞への暴露をすることで対応し、ナノオーダーの高濃度試料についても、対応可能である。

3.3 化合物の反応性

ケイラックス[®]ではその測定原理からも推測できるように JIS で定義されているダイオキシン類以外の物質にも反応する。ただし、これらケイラックス[®] アッセイに反応するダイオキシン類以外の物質はダイオキシン類と同等の毒性を持っている可能性がある物質とも言える。Tab.1 にこれまで得られたダイオキシン類や Benzo (a) pyrene などの多環芳香族炭化水素類 (PAHs) さらに DDT などの POPs 条約における規定物質の反応性の全データを示す。

WHO で TEF が定められている PCDDs や PCDFs 及び Co-PCBs についてのケイラックス[®] アッセイの交差反応性 (CALUX-TEF) は WHO-TEF と非常によく一致していることがわかる。また WHO-TEF が設定されていない 1, 2, 3, 4-TCDD などについてはほとんど反応してないことがわかる。

臭素と塩素とが混合している臭素系ダイオキシン類 (PXDD/Fs X=Cl, Br) についても調査した結果、すべての置換基が塩素であるダイオキシン類と同等の TEF をもっていることがわかった。これら臭素系ダイオキシン類の環境汚染の実態についてはまだまだ未解明な部分が多く残されており今後も注目していきたい。あとでも触れるがこの臭素系ダイオキシン類による影響がケイラックス[®] アッセイによる測定値と公定法による測定値の違いの一因となっていると推測される。

さらに 41 種の PAHs についての反応性は概ね小さいことが確認できた。ただ Benzo (k) fluoranthene については若干高い反応性を示したが、精製により除去できていることを確認しており、ダイオキシン類の測定にはあまり影響がないと考えている。また PCP や CNP といった農薬についてもほとんど反応性は示さず、その他 9 種の POPs についても全く反応性を示さなかった。

3.4 ケイラックス[®] アッセイの汎用性

生物検定法は、概して特性及び使用方法を理解して行わなければ、間違った評価を行う危険性がある。

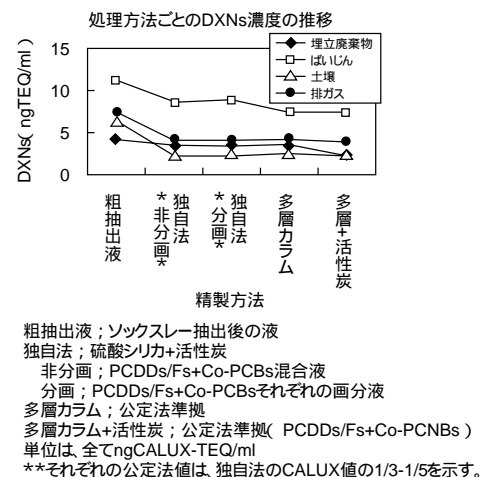
- ・活性炭カラムを前処理で使用できない
- ・試料によっては、操作ブランクが高くなる

- ・高濃度試料では、試料量をごく少量を分析で供する必要があるため、前情報が必要。など、注意点がある。

しかし、ケイラックス[®] アッセイの場合、簡便な前処理をすれば、生きた細胞内で代謝・分解が行われることにより、ダイオキシン類類似物質以外の影響をほとんど受けることなく、評価できる。

- ・様々な処理方法で対応ができ、更なる簡便化を模索することも可能である
- ・生体など、ごく低濃度試料における操作ブランクも十分考慮することが可能である
- ・前情報として、濃度範囲・汚染由来の原因等なくても、対応が可能である

処理方法については、Fig.4 に記載する。様々な処理方



試料名	粗抽出液	独自前処理		多層カラム	活性炭 Fr1+Fr2
		非分画	分画 (Fr1+Fr2)		
ブランク	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
埋立廃棄物	4.1	3.5	3.4	3.4	2.2
ばいじん	11	8.5	8.9	7.3	7.3
土壌	6.4	2.3	2.4	2.4	2.5
排ガス	7.2	4.0	4.0	4.1	3.8

Fig.4 Difference of the results from each Clean-up methods

法を用いることにより、多少数値に開きがあるが、スクリーニング目的で考えた場合、許容範囲であり、粗抽出液を評価する値では、ダイオキシン類類似物 + PAHs の毒性影響を考慮することができる。また、化学機器分析で考慮されない相互作用 (相加, 相乗, 拮抗) を併せて評価できることにより、今後の総合的毒性評価のツールとなりえると考えられる。さらに、ダイオキシン類ばかりでなく、Ah レセプター活性試験として、疫学調査等を行うことも可能である。

Tab.1 Cross-reactivity of WHO & CALUX®

Compounds	反応性		
	CALUX-TEF	WHO-TEF	
PCDDs	2, 3, 7, 8-TCDD	1	1
	1, 2, 3, 7, 8-PeCDD	0.64	1
	1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDD	0.21	0.1
	1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDD	0.11	0.1
	1, 2, 3, 7, 8, 9-HxCDD	0.12	0.1
	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDD	0.055	0.01
	OCDD	0.001	0.0001
	1, 2, 3, 4-TCDD	1.8E-06	—
	1, 3, 6, 8-TCDD	8.8E-05	—
	1, 3, 7, 9-TCDD	5.9E-05	—
PCDFs	2, 3, 7, 8-TCDF	0.03	0.1
	1, 2, 3, 7, 8-PeCDF	0.106	0.05
	2, 3, 4, 7, 8-PeCDF	0.651	0.5
	1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDF	0.165	0.1
	1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDF	0.152	0.1
	1, 2, 3, 7, 8, 9-HxCDF	0.115	0.1
	2, 3, 4, 6, 7, 8-HxCDF	0.198	0.1
	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDF	0.02	0.01
	1, 2, 3, 4, 7, 8, 9-HxCDF	0.087	0.01
	OCDF	0.005	0.0001
CO-PCBs	3, 3', 4, 4'-TCB (#77)	0.0014	0.0001
	3, 4, 4', 5-TCB (#81)	0.0045	0.0001
	3, 3', 4, 4', 5-PeCB (#126)	0.038	0.1
	3, 3', 4, 4', 5, 5'-HxCB (#169)	0.0011	0.01
	2, 3, 3', 4, 4'-PeCB (#105)	0.000001	0.0001
	2, 3, 4, 4', 5-PeCB (#114)	0.00014	0.0005
	2, 3', 4, 4', 5-PeCB (#118)	0.000001	0.0001
	2', 3, 4, 4', 5-PeCB (#123)	0.0000003	0.0001
	2, 3, 3', 4, 4', 5-HxCB (#156)	0.00014	0.0005
	2, 3, 3', 4, 4', 5'-HxCB (#157)	0.000003	0.0005
2, 3, 4, 4', 5, 5'-HxCB (#167)	0.0000003	0.00001	
2, 3, 3', 4, 4', 5, 5'-HpCB (#189)	0.0000002	0.0001	
PXDDs/Fs	1-B-2, 3, 7, 8-TCDD	0.69	—
	2-B-3, 7, 8-TriCDD	0.99	—
	2-B-1, 3, 7, 8-TCDD	0.91	—
	2-B-3, 6, 7, 8, 9-PeCDD	0.083	—
	3-B-2, 7, 8-TriCDF	0.55	—
	2, 3-diB-7, 8-DiCDD	0.91	—
	2, 3, 7-TriBDD	0.028	—
	2, 3, 7, 8-TBDD	1.0	—
	1, 2, 3, 7, 8-PeBDD	0.38	—
	2, 3, 7, 8-TBDF	0.21	—
	1, 2, 3, 7, 8-PeBDF	0.15	—
	1, 2, 3, 7, 8, 9-HxBDD	0.0191	—
	OBDD	0.00017	—
	PBBs	3, 3', 4, 4'-TBB (#77)	2.7.E-02
2, 3, 3', 4, 4'-PeBB (#105)		2.6.E-07	—
3, 3', 4, 4', 5-PeBB (#126)		4.7.E-01	—
3, 3', 4, 4', 5, 5'-HxBB (#169)		4.4.E-03	—
BDEs 等	2244BDE	—	—
	TBBA	—	—
	DecaDE	—	—
	2MonoBDE	—	—
PCBs	KC300	3.1E-06	—
	KC400	4.6E-06	—
	KC500	2.6E-06	—
	KC600	1.1E-06	—
PCNs	Halwaxl013	—	—
	Hafwaxl051	5.2.E-06	—
	Halwaxl000	1.1.E-07	—

・ CALUX-TEF において「—」は 0.1mM 以上の濃度においても反応性が認められなかった。
 ・ WHO-TEF において「—」は設定がないことを示す。

Tab.2 Cross-reactivity of WHO & CALUX[®]

Compounds	反応性	
	CALUX-TEF	WHO-TEF
PAHs		
Naphthafene	—	—
Acenaphthene	—	—
Acenaphthylene	—	—
Fluorene	—	—
Phenanthrene	—	—
Anthracene	—	—
Fluoranthene	—	—
Pyrene	—	—
Benz[a]anthracene	1.9E-05	—
Chrysene	2.5E-05	—
Benzo[b]fluoranthene	2.8E-04	—
Benzo[k]fluoranthene	6.3E-03	—
Benzo[a]pyrene	8.3E-05	—
indeno[123]pyrene	1.7E-04	—
Dibenz[a,h]anthracene	5.5E-04	—
Benzo[ghi]perylene	3.0E-09	—
β -Naphthoflavone	3.4E-05	—
5, 12-Naphthacenquinone	9.2E-06	—
Benz (a) anthracenequinone	8.3E-05	—
Dibenz (a, C) anthracene	1.7E-04	—
3-Methylcholanthrene	5.5E-04	—
Triphenylene	3.0E-09	—
Benzo (b) fthroene	3.4E-05	—
Naphtho (2, 3-a) pyrene	9.2E-06	—
Phenarenone	8.3E-05	—
7H-Benz (de) anthracene-7-One	1.7E-04	—
Fluorenone	—	—
anthrone	—	—
Xanthone	—	—
Trioxanthone	—	—
11H-Benzo (a) fhroene-11-one	8.3E-05	—
11H-Benzo (b) fhroene-11-one	1.7E-04	—
7H-Benz (c) anthracene-7-one	5.5E-04	—
Cyclopenta (cd) pyrene-3 (4H)-one	3.0E-09	—
6H-Benzo (cd) pyrene-6-one	—	—
anthraquinone	—	—
phenanthrenequinone	—	—
1, 4-Chrysenequinone	8.3E-05	—
alizorin	1.7E-04	—
Phetacenequinone	—	—
1, 8-Naphthalic Anhydride	—	—
農薬等		
PCP	5.4E-08	—
CNP	—	—
2,4dichlorobenzene	—	—
POPs 条約 規定物質等		
Chlordane	—	—
Heptachlor	—	—
Endrin	—	—
Aldrin	—	—
Toxafene	—	—
Mirex	—	—
Hexachlorobenzene	—	—
Dieldrin	—	—

・ CALUX-TEF において「—」は 0.1mM 以上の濃度においても反応性が認められなかった。
 ・ WHO-TEF において「—」は設定がないことを示す。
 ・ なお、これらのデータは中小企業総合事業団から課題対応技術革新促進事業として、委託を受けて実施し得られたものである。

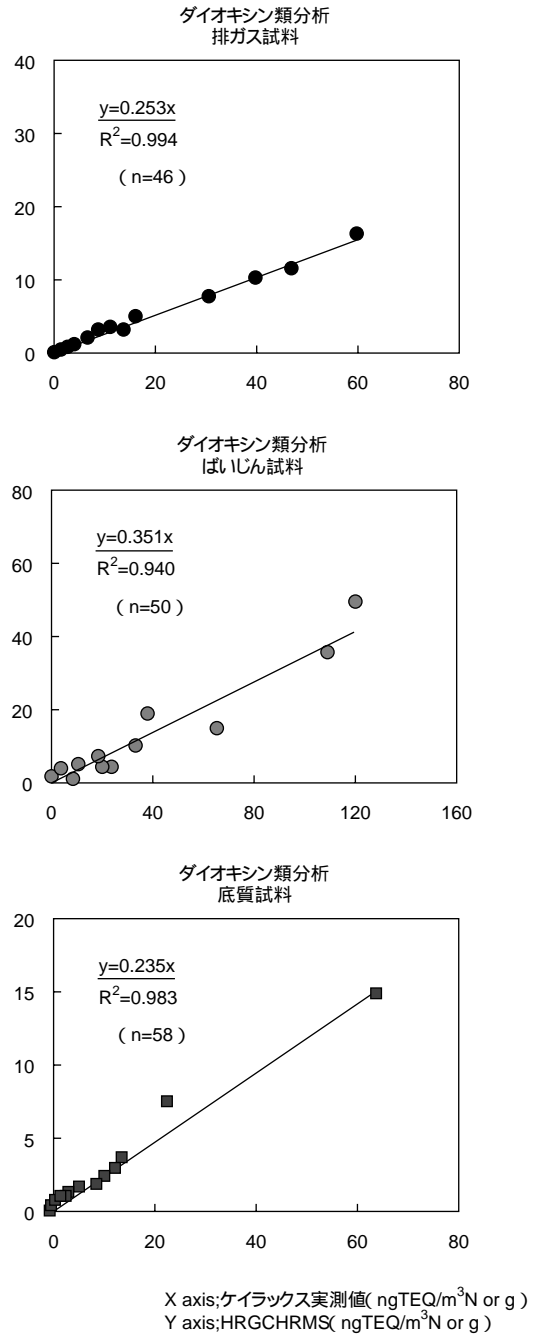
3.5 公定法との相関

簡易的な測定法を評価する時、重要視されるのは、公定法による分析値との比較(乖離度)である。我々は、各々の媒体ごとに様々な由来による汚染試料を公定法とケイラックス® アッセイでの相関性を調べてきた。その一部で、排ガス、燃え殻、ばいじん、底質について、Fig.5に示す。それぞれ非常に優れた相関を示していることがわかる。一様にケイラックス® アッセイにより求めたTEQはHRGC/MSのTEQの3倍から5倍ほど高値を示している事がわかる。直線関係から外れる検体もあるが、過小評価することはほとんどない。これはスクリーニング法としては非常に重要な要素の一つである。この高めに評価するという傾向は、先ほど述べたように公定法で定められているダイオキシン類以外の臭素系ダイオキシン類とも交差反応性を有しているためだと考えられる。

さらに、相関式の傾きを補正係数として求め、ケイラックス® アッセイの実測値に補正係数を乗することにより、公定法推測値を算出することが可能である。これにより基準値に対する判定を行うことも可能である。ただ、第一次スクリーニングであり(擬)陽性であれば公定法による詳細な分析が必要である。

4 土壌中のダイオキシン類のスクリーニング

ダイオキシン類の底質汚染状況が把握され、その対策のため、環境省や国土交通省の指針により、ようやく簡易測定法が利用できる状況になった。その指針によればその利用は限定的だが、公定法と併用することにより簡易測定法を使用することができる。我々は既に2000年から、この手法を用いて土壌のダイオキシン類のスクリーニングを行っている。簡易測定法と公定法を併用したスクリーニングは長浜市で行われた。市内全域のダイオキシン類汚染の状況を把握するために行ったものである。長浜市は面積約45平方kmで、全域を1kmメッシュに区切り、40区画に分画し、市街地域は1区画につき5地点の調査、その他の区画は1区画につき1地点の調査、合わせて56地点の調査をケイラックス® アッセイを利用して行った。またケイラックス® アッセイによる調査とは別に5地点についてはHRGC/MSとの並行測定を行い、ケイラックス® アッセイの適用性を確かめている。この市内全域の調査をFig.6に示す。今回は顕著なダイオキシン類汚染は確認できなかった。公定法との並行分析の結果も妥当なものであった。この長浜市の例に見られるように、公定法によって広範囲な調査を行うには



・弊社にて各々の媒体について、HRGC/HRMS測定済み抽出液の一部をケイラックス®精製(非分画)後、ケイラックス®アッセイを行い得られた毒性等量をHRGCMS値と比較した。

Fig.5 Correlation between CALUX® & HRGCHRS

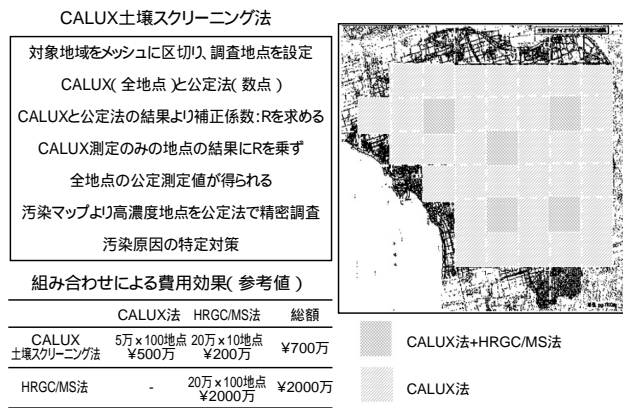


Fig.6 CALUX® screening method

非常にコストがかかるが、ケイラックス® アッセイを併用することにより、より広範囲の調査をより安価に行うことができた。

5 生体・食品のモニタリング

比較的low濃度である生体・食品試料を対象とした場合には、感度と迅速性が求められる。ケイラックス® アッセイは非常に高感度で迅速なダイオキシン類の測定方法であり、このような媒体に対しても非常に強力なスクリーングツールである。自治医科大学では、生体(脂肪組織、血液、母乳)国立医薬品食品衛生研究所では、市販魚を対象としてケイラックス® アッセイの有効性を検証している。それらの報告書²⁾では、従来法であるHRGC/HRMS分析との比較試験の結果、良好な相関が得られ、毒性等量を推測するモニタリング法として適した性質を有していた、と結論している。現在、高感度化の研究³⁾を行っており、さらに臍帯血、野菜等さらに低濃度試料への適用を模索している。なお、国外における情報としてEUではケイラックス® アッセイが食品のスクリーニングに使用され食品の安全性の確保に寄与している。

6 最後に

2003年5月環境省に「ダイオキシン類簡易測定法検討会」が設置され、バイオアッセイの有用性、実用性について検討された。レポーターゼンアッセイ法4、ELISA法5社、Ahバインディング法2社の系11社の申し込みがあった。第一次試験(排ガス1、燃え殻1、ばいじん1、標準試料3)、第二次試験(排ガス3、燃え殻3、ばいじん3)の両方を併せて判断し、技術的に妥当な簡易測定

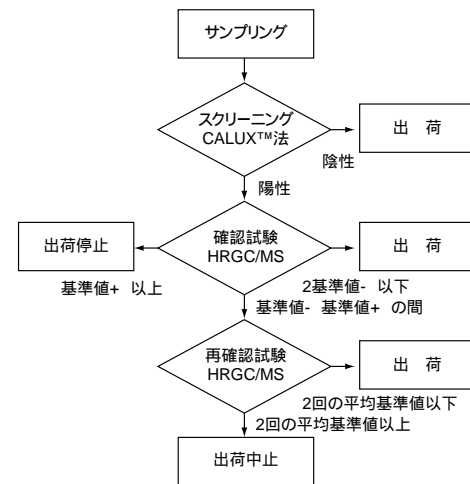


Fig.7 Food monitoring plan

法については、公定法を補完する方法としての位置づけを検討している。

さらに、河川における底質のダイオキシン類対策を実施するに当たり、汚染範囲の確定作業を実施することが必要となるが、公定法では、時間・コストにおいて問題がある。このような状況を受け、2003年12月国土交通省河川局では、河川底質中のダイオキシン類の簡易測定法についてその適用条件をまとめ全国に周知することになった。今回は、マニュアル作成に当たり技術を広く公募し、実試料(底質19、標準1)を実際分析することにより、検討を行うことになった。生物検定法及びGC/MSによる簡易分析およそ20社が参加し、2004年度初旬には纏められることになっている。

今後、ダイオキシン類対策現場では、様々な簡易測定法の中からその利用目的に応じた、迅速測定法を選択できるようになると考えられる。さらにHRGC/MS法とダイオキシン類迅速測定法の両者の特徴を生かし併用することにより効果的なダイオキシン類対策がいつそう推進されることを期待する。

[参考文献]

- 1) US. Patent No. 5,854,010
- 2) ダイオキシン類の迅速測定法の開発及び分析の精密化に関する研究、厚生科学研究費補助金分担研究報告書 (<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2003/01/h0116-1b.html>)
- 3) 経済産業省 平成15年度創造技術研究開発事業「レポーターゼンアッセイによる超高感度ダイオキシン類測定方法の開発に関する研究」