

P450HRGS (バイオアッセイ法) を用いたダイオキシン類の簡易分析法の検討

○ 藤田 明、山本 太一、飯島 聡 (日本環境株式会社)

【はじめに】

現在、日本におけるダイオキシン類の測定には、ガスクロマトグラフと二重収束型質量分析計を用いた HRGC/MS 法が公定法として用いられているが、煩雑な前処理操作やレベルの高い分析技術に加え高価な高分解能質量分析計が必要とされるため、分析に多大な時間とコストを必要とする。

P450 Human Reporter Gene System (P450HRGS) は、ヒトの培養細胞を用いて試料中のダイオキシン類濃度を迅速に低コストで分析できる測定法で、アメリカでは環境保護庁の認定法(EPA Method 4425)としてダイオキシン類測定プロジェクトで利用されている⁽¹⁾。当社はダイオキシン類の簡易分析法導入の可能性を探る目的で、P450HRGS を用いた分析法について基礎的検討試験をおこなった結果、公定法の数分の一のコストと時間で公定法と非常に相関の良い測定値を得ることができた。以下に検討結果を報告する。尚、本報告における P450HRGS で求めた毒性等量については、公定法で求めた毒性等量(TEQ)と区別するため、TEQ_{HRGS} と表記する。

【測定原理】

ダイオキシン類は免疫毒性・生殖毒性・発ガン性等多岐に渡る毒性を示すが、その多くは Ah レセプター (Aryl hydrocarbon receptor) と呼ばれる転写因子を介して毒性を発現するものと考えられている。P450HRGS では 101L 細胞という特殊な細胞を使用する。101L 細胞は、CYP1A1 遺伝子上の特定の塩基配列 XRE (xenobiotics response element) を含む 5'隣接領域にホタルルシフェラーゼ遺伝子をレポーター遺伝子として結合した大腸菌プラスミドをヒト肝臓ガン由来 HepG2 細胞に導入し、形質転換した細胞株である⁽²⁾。

ダイオキシン類を 101L 細胞に曝露させると、容易に細胞膜を通過して Ah レセプターにリガンドとして結合する。リガンドと結合した Ah レセプターは構造を変え、Arnt(Aryl hydrocarbon receptor trans-locator) 蛋白と結合し、DNA 上の XRE 部位に結合することで下流の遺伝子の転写を促進する結果、P450 とルシフェラーゼが生成される。ルシフェラーゼを細胞から抽出し、基質であるルシフェリンを加えると発光反応が起こる。このときの発光量をルミノメーターで測定することで、試料中のダイオキシン類濃度を総毒性等量(TEQ_{HRGS})として得ることができる(Fig.1 参照)。

【方法】

ダイオキシン類の抽出にはソックスレー抽出器(柴田科学)を用いた。

バイオアッセイの工程は、ルシフェラーゼ・アッセイキット(BD PhaMingen : 556866)を用い、次の手順でおこなった。101L 細胞を培養したプレート(FALCON : 353046)に試料を加え、CO₂ インキュベーター(三洋電機 : MCO17AIC)で 16 時間培養。培養プレートを Hanks 緩衝液(SIGMA : H9269)で洗浄後、Cell Lysis Buffer(Kit 付属)を加えてルシフェラーゼを抽出。抽出液をマイクロプレートに移し、ルシフェリン(Kit 付属)と反応させ、ルミノメーター(Perkin Elmer : LB96V)で発光量を測定。

公定法によるダイオキシン類の測定には 2 重収束型の HRGC/MS(日本電子 JMS700D)を用いた。

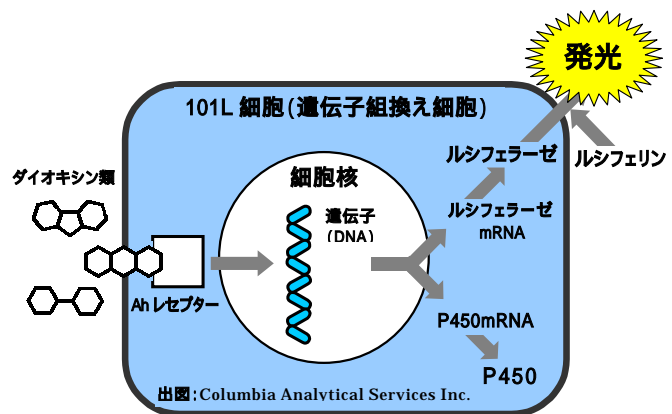


Fig.1 P450HRGS の測定原理

Study of Dioxin Screening Method Using P450HRGS Bioassay

Akira Fujita, Taichi Yamamoto, Satoshi Iijima

Nihon Environmental Services Co., Ltd. 5-11-19 Funabori Edogawa-ku Tokyo 134-0091

Tel: 03-5676-8713 Fax: 03-5676-8717 Email: t_yamamoto@kan-e.co.jp

1. バイオアッセイの再現性試験

- (1) 同時再現性：ダイオキシン Std(Cambridge : EDF7999)を溶媒(DMSO : IPA : Toluene=2 : 1 : 1)で希釈し、濃度の異なる3試料を調製した。試料を培養プレートの6ウェルに加えて、前述の手順により発光量を測定し、検量線から求めた毒性等量の再現性を検討した。
- (2) 日間再現性：(1)で調製した試料を培養プレートの3ウェルに加えて、前述の手順により発光量を測定し、検量線から毒性等量を求める操作を日をかえて6回実施し、毒性等量測定値の再現性を検討した。

2. 試料精製法の検討

P450HRGS は、ダイオキシン類以外に多環芳香族炭化水素(PAHs)にも反応を示すため、試料中の PAHs を精製工程で除去する必要がある。そこで JIS アルミナカラム JIS 多層シリカゲルカラム 44%硫酸シリカゲルカラム(5g 充填、自社調製) 多層カラム(スペルコ:54040-U)に、PAHs Std(AccuStandard:Z-013-17) 1ng-TEQ_{HRGS} 相当量を添加し、ヘキサン溶出により得た試料を P450HRGS で測定し、PAHs の除去効果を確認した。

3. 公定法との相関

JIS 法に準じた抽出操作を実施した試料(灰・排ガス・土壌)を二つに分け、一方は試料精製用カラムで精製後 P450HRGS で毒性等量を求めた。もう一方は JIS 法で精製後 HRGC/MS で測定し、毒性係数(TEF)を乗じて総毒性等量(Total TEQ)を求めた。両測定値から P450HRGS と公定法の測定値の相関を検討した。

【結果および考察】

1. バイオアッセイの再現性

同時再現性は 10.8~15.1%、日間再現性は 12.8~21.4%であった。

2. 試料の精製法

各カラムの PAHs 除去効果を Table1 に示す。PAHs 除去効果の高かった 3 種類のカラムのうち、操作が簡便で低コストの 44%硫酸シリカゲルカラムを試料精製用カラムに選定した。

Table 1 各カラムにおける PAHs の除去率

カラム	JIS アルミナ	JIS 多層	硫酸シリカゲル	多層(既製品)
PAHs 添加量 (ng-TEQ _{HRGS})	1.0	1.0	1.0	1.0
除去率	95.8%	99.1%	96.5%	-30%

3. 公定法との相関

実試料を P450HRGS で測定し、公定法による測定値との相関を検討した結果を Fig.2 に示す。試料の種類にかかわらず、公定法による測定値との間に良好な相関がみられた。公定法に比べ全体的に毒性等量が高い傾向にある点については P450HRGS におけるダイオキシン類各異性体の毒性発現量が WHO の定める毒性係数とは一致しない¹⁾ 臭素化ダイオキシン等 WHO で毒性係数が定められていない物質も Ah レセプターを介して毒性を発現している可能性がある PAHs を多量に含む試料の場合、精製工程で PAHs を完全に除去しきれない場合がある、等が理由に挙げられる。

4. 分析に要するコストと時間

P450HRGS は公定法に比べ 1/4 の分析コストと 1/6 の所要日数で分析することができた(比較は当社比)。

【結論】

1. P450HRGS によるダイオキシン類分析では、公定法と高い相関データを低コスト・短期間に得られる。
2. 一般的に公定法より高い毒性等量を示し、安全サイドにたった毒性評価のスクリーニング検査に適している。

【謝辞】

測定法の技術指導をいただいた Columbia Analytical Service Inc. の Anderson 博士と McCoy 氏、試料の前処理等に協力をいただいた当社微量分析グループの方々、校閲に協力をいただいた内藤昭治氏に深く感謝いたします。

【文献】

- (1) Jack W. Anderson et al. Proceedings Dioxin 2000, Organohalogen Compounds 45, 208-211(2000)
- (2) Hans Postlind et al. Toxicology and Applied Pharmacology 118, 255-262(1993)
- (3) Jones, Jennifer M. and Jack W. Anderson Environmental Toxicology and Pharmacology 7, 19-26(1999)

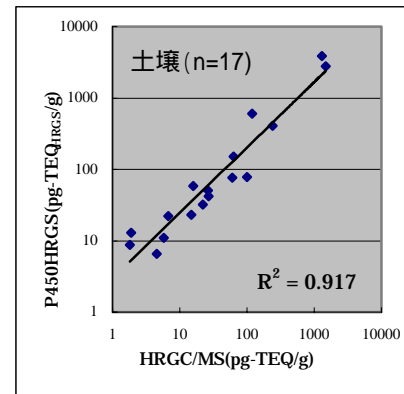
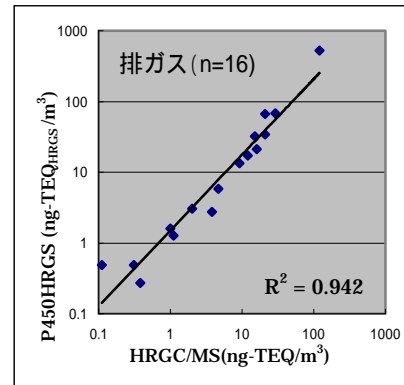
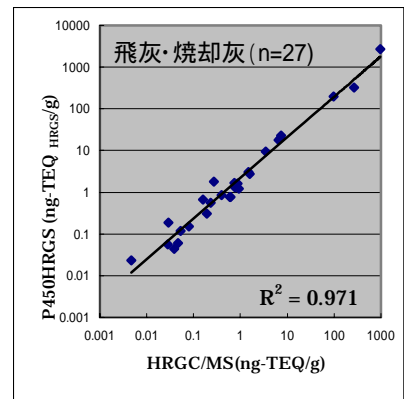


Fig.2 各種試料における P450HRGS と HRGC/MS との相関