

ケイラックス®(CALUX®)アッセイによるダイオキシン類の迅速測定

(株)日吉 半田 洋土、中村 昌文、山本 司

XDS-CALUX Bioassay for Screening of Dioxin and Dioxin-like Compounds, by Hiroshi HANDA, Masafumi NAKAMURA, Tsukasa YAMAMOTO, (Hiyoshi Corporation)

1. はじめに

2005年環境省告示第92号において、廃棄物焼却炉からの排ガス、ばいじん及び燃え殻に含まれるダイオキシン類の測定に用いることができる迅速で低廉な簡易測定法として、4種類の生物検定法が指定された。そのうちのひとつが、ケイラックスアッセイ(以降 CALUX)である。CALUXの概要説明、底質を中心としたHRGCMSとの相関性、環境省における評価検討に参加し、得られた結果¹⁾等を説明する。

2. CALUXの原理

CALUXは、Chemically Activated Luciferase eXpressionの呼称で米国のXenobiotic Detection Systems International, Inc. (以降 XDS社)が開発した技術で、マウス肝癌細胞遺伝子の一部をルシフェラーゼ遺伝子に組み換えしたレポーター遺伝子アッセイ法の一つである²⁾(原理は、図1.参照)。本法は、平成17年環境省告示第92号第1の1にて前処理に、硫酸シリカゲルカラム及び活性炭カラムを使用し、測定に、ダイオキシン類応答性組換え細胞H1L6.1c2を用いたレポーター遺伝子アッセイを利用してダイオキシン類の毒性等量を測定する方法」と記述されている。

3. CALUXの手順

CALUXにおける手順について図2.により説明する。底質の場合は、米国EPA8290抽出法を元に開発した方法により抽出を行う。具体的には、乾燥試料を粉碎後、3.5gを分取し、トルエン/メタノール混合溶液により超音波抽出を行った後、さらにトルエンで2回超音波抽出を行う。この抽出液を濃縮した後、ヘキサンに再溶解させ、現在XDS社が特許取得済みである³⁾クリーンアップ法を用いて処理を行う。このクリーンアップ法も簡便で、ヘキサンに再溶解させた抽出液を硫酸シリカゲルカラムとXCARBカラム(XDS社製活性炭カラム)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H1L6.1c2マウス肝がん細胞に曝露させる。また、同一プレート内に2,3,7,8-TCDDの希釈列を曝露し、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総毒性量 CALUX-TEQ を得る。およそ、4日間の測定である。

4. CALUXとHRGC/HRMSとの相関

CALUXとHRGC/HRMSによる測定値の相関を図3.に示す。HRGC/HRMSでは、ダイオキシン類29異性体の個々の濃度が得られ、それぞれに固有の係数(毒性等価係数)を乗じたものの総和をTEQ濃度として、算出する。生物検定法の場合、生物検定法毎に実測濃度が得られ、媒体ごとの換算係数を乗じてHRGC/HRMS法同等のTEQを換算する。その換算操作に用いるのが相関式で、

AhRに結合、核内への移行、AhRとの結合、DNA上のダイオキシン特異的応答領域への結合
転写によるmRNAの誘導、翻訳による各種蛋白質の生成
7-ethoxyresorufin (CYP1A1)
ルシフェラーゼ + ATP + ルシフェリン + O₂
「発光」 + AMP + CO₂ + オキシルシフェリン [発光光度計]

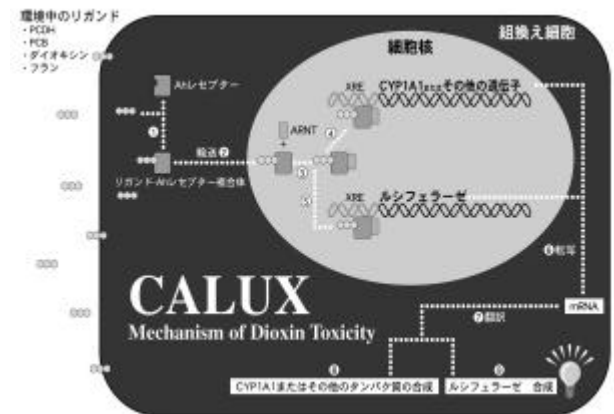


図1. CALUXの原理

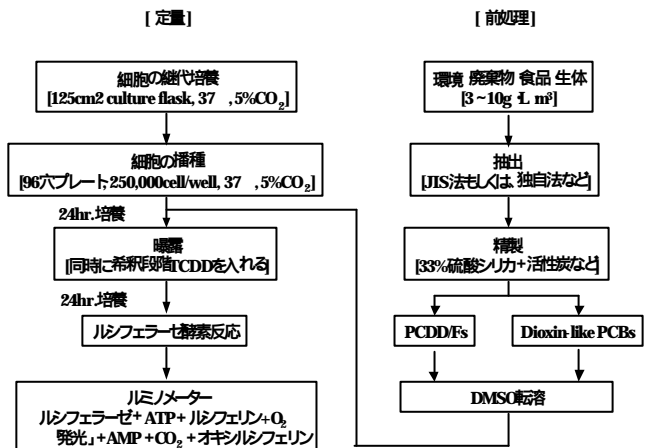


図2. CALUXの手順

個々の生物検定法技術ごとに換算係数の算出は決められており、CALUXの場合は、相関式の傾きより換算係数を決定する。さらに、他の生物検定法との違いは、PCDD/Fs及びCo-PCBsを簡易に分画し、各々の相関関係が良好であるため、各々の換算係数を得ることで、HRGC/HRMS法同等のTEQ濃度を換算することが可能である。

5. 環境省の報告書

平成18年7月5日、環境省より「ダイオキシン簡易分析法評価検討会報告書」¹⁾が取りまとめられた。この報告書は、平成17年1月から「ダイオキシン類簡易測定法検討会」を開催し、土壌及び底質におけるダイオキシン類測定を検討対象として、簡易測定法の適用可能性

について評価したものである。公募後書類審査の結果、生物検定法 14 機関 14 技術、機器分析 7 機関 7 技術が検討の対象となった。その後、土壌 19 検体及び底質 18 検体の実試料を用いて適用性の検討を行った。詳細は、環境省 HP (<http://www.env.go.jp/press/press.php?serial=7279>) にて公開されている。

弊社の底質の結果について表 1. に記す。環境省の評価基準としては、簡易法で得られた毒性等量値が公定法 (HRGC/HRMS) により得られた毒性等量の 1/2 ~ 2 倍の範囲内かどうかみているが、CALUX では、焼却や PCB 等汚染由来が異なっても、毒性等量評価に関して一定の正確度が得られていた。

報告書の中では、「生物検定法は、異性体組成についての情報が得られない欠点があるが、毒性等量を求めることについて迅速性が認められる。機器分析法の多くの技術は、異性体組成の情報が得られる長所が見られた。これらのうち、いくつかの方法が今後スクリーニング法等しての利用が考えられる。」と結論付けている。

6. 事例

平成 16 年度、神奈川県 芦ノ湖底質環境実態確認調査において、平成 12 年度から常時監視調査地点の中で、芦ノ湖底質のダイオキシン類濃度が環境基準に適合していないものの比較的高かったため、簡易測定法により 50 地点で汚染実態の把握調査を実施し、合わせて流入河川の水質及び底質を調査した⁴⁾。

調査内容として、底質について全域を対象とし、汚染状況を把握するため簡易測定法 (CALUX) を用いて調査を行い、比較的高濃度と思われる地点を絞り込んだ後、公定法 (HRGC/HRMS) により濃度を確認した。簡易分析 50 地点のうち 2 地点では公定法も併行実施した。流入河川について、底質調査で、比較的高濃度と思われる地点を絞り込んだ後、公定法 (HRGC/HRMS) のみで調査を行った。

7. 最後に

生物検定法がばいじん及び燃え殻と一部の排ガスに適用対象は限定はされているが、HRGC/HRMS の結果とほぼ同等に扱われることを前提とした公定法となった。環境省では、詳細な測定の手順を記載した「ダイオキシン類に係る生物検定法マニュアル」を作成公表した⁵⁾。次に、従来 (HRGC/HRMS) の精度管理指針内容を踏まえた上で、生物検定法によるダイオキシン類の環境測定において的確な精度管理を実現するため、「ダイオキシン類の環境測定に係る精度管理の手引き (生物検定法)」が作成公表された⁶⁾。土壌底質に関しても、国での検証・方策を進めている。

簡易測定は、誰でもできるといった意味ではなく、超微量の物質の測定を行うことには変わりはなく、測定精度には非常に慎重を期する部分が相当にあり、環境省はこれら生物検定法の精度管理指針を整備した。分析機関として、以前より国際クロスチェック参加等様々な活動を行っているが、さらに一層の信頼できる管理システムの構築や検証データを蓄積していきたいと思う。分析が安価で結果が早く得られることは、対策費用の大きな軽減、対策箇所、頻度の拡大に寄与することができる。さらに HRGC/HRMS との的確な併用及び使い分けを行うことによって、より効果的な調査・対策が期待できる。

さらに、日本ばかりでなく、今後、対策が必要となる途上国において POPs 対策として HRGC/HRMS との併用することにより、効果な対応が出来る提案をしていきたい。

$$\text{毒性等量 (pg-TEQ/g)} = \text{実測濃度 (pg-CALUX TEQ/g)} \times \text{補正係数}$$

$$\text{換算係数} = \text{PCDDs/Fs } ; 0.226, \text{ Co-PCBs } ; 3.206$$

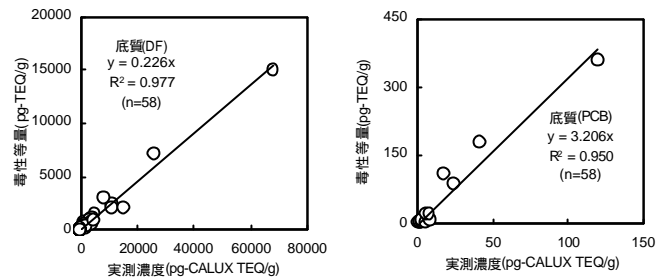


図 3. CALUX (横軸) と HRGC/HRMS (縦軸) の相関性

表 1. 種々の底質試料における HRGC/HRMS 法と CALUX 法の結果比較¹⁾

| 底質試料 | | | | |
|--------------------------|-----|-----------|----------|------|
| 試料名 | 技術名 | 技術 B-2 | | |
| | | HRGC/HRMS | CALUX法 | |
| 単位は、pg-TEQ/g | | TEQ濃度 | TEQ濃度 | 公定法比 |
| 焼却関連1 | G-1 | 110 | 121 | 1.1 |
| | G-2 | 240 | 288 | 1.2 |
| | G-3 | 71 | 99 | 1.4 |
| | G-4 | 1500 | 2400 | 1.6 |
| | G-5 | 180 | 270 | 1.5 |
| | G-6 | 380 | 684 | 1.8 |
| | G-7 | 2400 | 3840 | 1.6 |
| 焼却関連2 | H-1 | 180 | 252 | 1.4 |
| | H-2 | 550 | 1045 | 1.9 |
| | H-3 | 24 | 38 | 1.6 |
| PCB汚染油漏洩 | I-1 | 100 | 200 | 2.0 |
| | I-2 | 61 | 116 | 1.9 |
| | I-3 | 170 | 187 | 1.1 |
| | I-4 | 11 | 15 | 1.4 |
| 農薬 | J-1 | 180 | 270 | 1.5 |
| | J-2 | 120 | 180 | 1.5 |
| | J-3 | 2.8 | 2 | 0.61 |
| | J-4 | 28 | 36 | 1.3 |
| 公定法比 (CALUX ÷ HRGC/HRMS) | | | 平均 | 1.47 |
| | | | S.D. | 0.34 |
| | | | C.V. (%) | 23.0 |

参考文献

1. 環境省水・大気環境局総務課ダイオキシン対策室「ダイオキシン類簡易測定法評価検討会報告書」平成 18 年 3 月
2. Denison, M., Brouwer, A. and Clark, G. (1998). U.S. patent # 5,854,010
3. Chu, M. and Clark, G. (2004). U.S. patent #6,720,431
4. 神奈川県環境農政部大気水質課「平成 16 年度ダイオキシン類環境調査の結果について 記者発表資料」平成 17 年 5 月 30 日 (<http://www.pref.kanagawa.jp/press/0505/25066/index.htm>)
5. 環境省「環境管理局総務課ダイオキシン対策室「ダイオキシン類に係る生物検定法マニュアル (排出ガス、ばいじん及び燃え殻)」平成 17 年 9 月 14 日
6. 環境省「ダイオキシン類の環境測定に係る精度管理の手引き (生物検定法)」平成 18 年 3 月 23 日