特集1・微量汚染物質のバイオ技術による測定法

ELISA法によるAhレセプターを利用した ダイオキシン分析

小林 康男*・植地 俊仁*

1. はじめに

近年、ダイオキシン類の規制強化と測定義務化に伴い、ダイオキシン類を迅速・簡便・安価に分析できる簡易毒性分析が求められている。Ah イムノアッセイ™は細胞を使わずAhレセプターの蛋白質を利用し、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 イムノアッセイは、従来のダイオキシン分析用イムノアッセイとは異なり、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、としての幅広い利用用途がある。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

ン類などに対する反応性、及び分析事例について報告する。

2. 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ことが知られている。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手順図を図-1に示す。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。ウエル内でサンプルを試薬と反応さ

図-1 Ahイムノアッセイの分析手順

*（株）クボタ 技術開発本部 Yasuo KOBAYASHI, Toshihito UECHI

せるとダイオキシン類はAhレセプター・ARNTと複合体を作成する。この複合体はDREを介してウエル底に固定化される。この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もしくは無毒性の α -ナフトフラボン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量を定量する。

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。この分析法は米国・欧州・日本で既に特許化されている。

3. Ahイムノアッセイの特徴

Ahイムノアッセイは、①ダイオキシン類やその類似物質の毒性を総合的に捉えることができる、②TEQと極めて高い相関性がある、③検出感度が高く少量のサンプル量で分析が可能である、などの特徴を有する。検出範囲はELISAプレートのウエルあたり1～64pgDEQ/ウエルである。ここで「DEQ」とはAhイムノアッセイにおける2,3,7,8-TCDD等量のことである。環境サンプルでは、測定結果がTEQに比べ平均10倍の倍率で出るため、TEQベースに換算すると約0.1～6.4pgTEQ/ウエルの検出範囲になる。また、分析時間は前処理後約6時間であり、同時に多数の検体測定が可能である。

4. 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、現在までに得られたダイオキシン類及びいろいろな純粋化学物質の反応性の全データを示す。今回新たに、水酸基のあるPCDFs・PCBs, 2,3,7,8類似の4塩化PCDFs, Indilubin, Indigo, 微毒, カネクロールなどを追加分析している。

4.1 PCDDs/Fs

低塩素化PCDDs, PCDFsの2,3,7,8塩素置換体に関して、Ahイムノアッセイの交差反応値はWHO-TEFとよく一致している。ただし高塩素化物になるとWHO-TEFとの差は大きくなる傾向がある。また、多くの2,3,7,8塩素置換体以外のPCDDs/Fs分析結果から、2,3,7,8類似体の中には反応性の高い

異性体が存在することが分かってきている¹⁾。特に2,3,4,6,7-PeCDF (交差反応値0.9), 2,3,4,7-TCDF (0.6) 及び2,3,6,7-TCDF (0.4) が顕著な例である。これらの2,3,7,8類似体の反応性には構造的な規則性がある。また、水酸基のあるPCDFsのうち、1-OH-2,3,4,7,8-PeCDF (0.6) は、2,3,4,7,8-PeCDF (0.9) と同等な反応性を有することが判明した。

4.2 Co-PCBs

Co-PCBsでは、交差反応値は全般的にWHO-TEFとよく一致している。水酸基のあるPCB (co-PCBではない) は反応性がない。しかし、水酸基のあるco-PCBは反応性があると推測される。

4.3 臭素化PCDDs/Fs

2,3,7,8-TBDDs/TBDFsの交差反応値は両者とも0.5であり、他の臭素化ダイオキシン類の交差反応性も、塩素化ダイオキシン類と類似の反応性がある。今後、臭素化ダイオキシン類は重要な毒性の評価対象であり、さらなるデータの蓄積を図りたい。

4.4 その他化学物質

本来のAhレセプターのリガンドではないかと報告されているIndilubin・Indigoのうち、Indilubinは強い反応(0.12)を示したが、Indigoの反応(0.0002)はわずかであった。強力な発ガン性物質である微毒に対してもAh-I分析を行った。その結果、Aflatoxinは反応性が皆無であったが、Microcystinは微量ながら反応性を示した。PCBの処理で問題となっているKCは、わずかであるが、反応性を示している。

5. 実際の分析事例

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い、論文や学会で発表してきた。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とは極めて高い相関性があることが示されるようになった(図-2)。土壌や焼却灰・飛灰などの固体サンプルで平均10～13倍、低濃度である排水サンプルで約16倍の相関倍率が得られている²⁾。今後さらにデータを蓄積し、精度を高め、スクリーニング用のデータとして十分に役立てたい。

6. スクリーニング法としての適用例

今までの分析事例から、汚染土壌のスクリーニング用としての応用事例を説明する⁶⁾。

表-1 Ahイムノアッセイによるダイオキシン類及び各種化学物質の交差反応性

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	0.00003	
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'-PeBDE	0.00004	
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. PAHs		
1,2,3-TriCDD	0.009		1,2,4,8-TCDF	ND	*1	Benzo (b) fluoranthene	1	
1,2,4-TriCDD	0.003		1,3,7,8-TCDF	0.003	*1	Benzo (j) fluoranthene	0.3	
1,7,8-TriCDD	0.005		1,3,6,7-TCDF	0.002	*1	Benzo (k) fluoranthene	1	
2,3,7-TriCDD	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 (ai) 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		
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 黴毒		
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-TriCDF	0.0003		4-OH-3,5,2',5'-TCB	ND	*1	KC-200	0.00006	*3
2,3,8-TriCDF	0.0005		4-OH-3,5,3',4'-TCB	ND	*1	KC-300	0.00008	*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. PBrDDs/PBrDFs/PBrBs/PBrDEs			KC-500	0.00007	*3
1,2,3,9-TCDF	0.006		2,3,7,8-TeBDD	0.5		KC-600	0.00006	*3
1,2,6,9-TCDF	0.01		1,2,3,7,8-PeBDD	0.3		KC-1000	0.00005	*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。

図-2 多種環境サンプルのAhイムノアッセイ値と公定法値

図-3に土壌サンプルでの公定法値とAhイムノアッセイ値との相関性を示す。この図には、一次近似相関直線 ($TEQ = 0.0855 \times Ah-I$ 値) 中心として、95%の信頼度で含まれるデータを分類し、土壌の環境基準である1,000pgTEQ/gに対するAhイムノアッセイ値の上限と下限の関連を示している。

これを利用すると、95%の確率で土壌基準1,000pgTEQ/gを判断できる。すなわち、Ahイムノアッセイの結果が3,000pgDEQ/g以下であれば1,000pgTEQ/g以下になり、20,000pgDEQ/g以上であれば1,000pgTEQ/g以上、また、その中間は1,000pgTEQ/g周辺で疑汚染の範囲になる。そのため、最初にAhイムノアッセイで広くかつ数多く分析し、疑汚染の範囲の部分だけを公定法で分析すればよい。このようなスクリーニングを行えば、公定法と同じコストで、より多くの試料をより迅速に分析することが可能になる。

7. 前処理方法

Ahイムノアッセイの標準的な前処理方法のフローを図-4に示す。TEQとの相関を求める場合には、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。バイオアッセイやイムノアッセイでは過剰反応物質や反応抑制物質の影響を可能な限り排除することが望ましい。Ahイムノアッセイ

では、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(「クリーンアップ度合い」と呼ぶ)が重要であることが明らかになった⁴⁾。

土壌サンプルの例では、2gの土壌サンプル量で硫酸処理後の多層シリカカラム(硫酸シリカ量44%×6g)で極めて良い分析結果が得られ、クリーンアップが十分に達成していることが報告されている⁵⁾。

このことから、確実なクリーンアップを期待するため、クリーンアップ度合いを一定値以下に抑えることが重要である。

図-5に、定量濃度とサンプル量との関係を示す。定量濃度100pgTEQ/gとして、定量下限をその1/10である10pgTEQ/gに設定するとクリーンアップすべきサンプル量は実質的に0.8gのわずかな量で済む。この量は、クリーンアップ度合から見て、前述した多層したシリカカラム一回で十分であることがわかる。土壌サンプル以外でも基本的に同様であり、サンプル量と定量下限濃度からクリーンアップ度合を決めることが必要である。

8. 利用用途

Ahイムノアッセイは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

図-3 土壌サンプルのスクリーニング例

(同時10から40検体可能)

図-4 前処理方法のフロー

分析法である。また、高濃度の飛灰から低濃度の土壌や排水まで、すべて、同じ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。さらに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なる。

Ahイムノアッセイの本来の機能である「Ahレセプターとの結合指標」では、薬品などの毒性チェッ

例：土壌100pgTEQ/gを測定する場合のサンプル量の計算例

定量濃度: pgTEQ/g	100	
定量下限: pgTEQ/g	10	
定量下限: pgDEQ/ウエル	4	AhIA
定量下限: pgTEQ/ウエル	0.4	TEQ=DEQ/10
使用ウエル	2	
必要量: pgTEQ	0.8	
実際量: pgTEQ	8	必要量の10倍
実際サンプル量: g	0.8

図-5 定量濃度とサンプル量

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も役立てたい。

9. ま と め

Ahイムノアッセイはダイオキシン類の毒性発現原理に基づく分析法であるため、多くの環境サンプルに対してダイオキシン等量TEQとの相関性が極めて高い。特に、土壌サンプルに関しては、既に多くのデータがあり、TEQのスクリーニングとして利用可能である。今後、土壌以外の環境サンプルに対してもさらにデータを蓄積し、ダイオキシン類の

簡易法のみならず、臭素化ダイオキシン類を含む総合毒性評価法のツールとしても確立していきたい。

参 考 文 献

- 1) 小林康男, 山田隆生, 荻原克俊, 中西俊夫: Ahレセプターを利用したダイオキシンの簡易測定, 資源環境対策(2001.7)
- 2) 小林康男, 中西俊夫: 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, 造水技術, 27(4)(2002)
- 3) 中西俊夫, 小林康男, 中尾晃幸, 宮田秀明: 第11回環境科学討論会, 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, (2002.6)
- 4) 芦枝和典, 中嶋進(日新環境調査センター): 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, H13年11月
- 5) (財) 廃棄物研究財団: 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
- 6) 植地俊仁, 小林康男, 芦枝和典, 佐々木一恵: 第11回環境科学討論会, Ahイムノアッセイ™による土壌中DXNsのスクリーニング法の適用(2002.6)

2002年7月25日
全窒素・全りん測定データの流用に関わる謝罪
東亜ディーケーケー株式会社

本誌2002年・3月号(vol.31)に掲載されました、当社のTNP-201型全窒素全りん計紹介記事
中の実測データは、このデータ採取に当ってご協
力いただきました某下水処理場のご了解を得ず流

用したものでした。また、掲載されたデータも得
られたデータの内の一部であり、全体像を示すも
のでなく、不適切な内容でした。関係各位並びに
読者の皆様に、心よりお詫び申し上げます。

(本社) 160-6848 東京都新宿区1-29-10
(連絡先) 国内営業本部営業企画部
(tel 02-3202-0218)