

ダイオキシン類，PCB を検出する バイオアッセイ

Ah 受容体結合アッセイやイムノアッセイなど、ダイオキシン類や PCB の分子構造を高感度に認識できるバイオアッセイは、規制値 (action limit) をしきいとするスクリーニングや日常環境管理のための安価で迅速な測定手段として汎用される可能性を有している。その際、試料前処理の簡易最適化を含めた全体工程の縮小化が必要となり、また、偽陰性データを出さないためのバリデーションが求められる。

滝上 英孝，酒井 伸一

1 はじめに

日本においては 2001 年 1 月よりダイオキシン類対策特別措置法が施行され、大気、水質、土壌における環境基準値や廃棄物焼却炉の排ガス、排水の排出基準値が定められ、発生源管理に重点を置いた削減対策が進められてきている。これにより、廃棄物焼却や鉄鋼、金属産業を中心に排出量の大幅削減が図られており、排出量予測が可能な発生源についての国内排出インベントリ (排出量目録) は、1997 年の国内排出量見積り約 7500 g-TEQ (2,3,7,8-TCDD 毒性等価量) に比べて、2001 年では年間排出予測量が 1700 g-TEQ となっており、4 分の 3 以上の年間排出量が削減されていることになる¹⁾。このような取り組みが高く評価できる一方で、並行して、過去に環境中に放出されたダイオキシン類についての対策、特に食物連鎖系に入り込んでくるものへの対策が大変重要になってきている。

欧州においては実際に食品、飼料中のダイオキシン規制 (IP/01/1698, IP/01/1670) が 2002 年 7 月 1 日より発効しており、食品では食肉、魚肉、卵、乳製品、油脂について 0.75~6 pg-TEQ/g 脂肪、また畜産動物、養殖魚類に与える各種飼料についても 0.75~6 ng-TEQ/kg (12% 含水率換算) という規制値が設けられている²⁾。規制は、ジベンゾダイオキシン、ジベンゾフランのみを対象としているが、2004 年までにダイオキシン様 PCB (Co-PCB) についても規制が検討され、2006 年末までにさらに規制値の引き下げが検討される見通しである。このようにダイオキシン耐容摂取量に対応した厳しい基準が、食品というダイオキシン摂取寄与の最も高い媒体について定められることにより、基準値を超過した食品や飼料が食物連鎖の環から排除される枠組みが

構築されつつある。ダイオキシンのヒトの健康に影響を及ぼす可能性のある決定経路において、ダイオキシンの流入を直接食い止めようとする非常に画期的なアクションと捉えることができる。

基準設定の引き金となった汚染事故、例えば 1999 年のベルギーにおけるダイオキシンクライシス (実際は PCB 汚染が主体である)³⁾において、欧州は食肉廃棄に伴う数千億円以上といわれる莫大な経済損失を被っているが、膨大な検体数に機器分析能力が追いつかず、その結果、汚染範囲を特定できずに疑わしき食肉を一方的に廃棄したことが要因の一つとなっている。このような汚染事故時には汚染レベル、汚染範囲を迅速に知るための検知手法が必要であることを、欧州各国は身をもって思い知らされた。また、実際に規制が敷かれた後のモニタリング検査においても、規制値 (action limit) を上回るか下回るかを効率的に知るスクリーニング手法が必要となっている。

この講義で紹介する *in vitro* (「試験管内でできる」の意味、「*in vivo* = 生体内」での対義語) のバイオアッセイは残留性有機汚染物質 (persistent organic pollutants; POPs) のうち、上述のようなダイオキシン類、PCB のスクリーニング目的にかなうコストパフォーマンスに優れた有力な簡易分析技術と期待されるものであり、欧州では食品中ダイオキシン類の公的なスクリーニング法として汎用機会が現実のものとなっている⁴⁾。我が国においても水底底質のダイオキシン類の汚染監視調査においては、公定分析に代替する迅速簡易分析方法の適用が実際に認められるようになり、バイオアッセイの利用が期待される⁵⁾。本稿では、適用段階にあるバイオアッセイについての検出原理、検出特性等について触れた後、実際の環境・廃棄物試料等への測定応用事例を紹介し、今後の課題、展開について講述する。

2 ダイオキシン類、PCBを検出するバイオアッセイ

ダイオキシン類を検出する *in vitro* バイオアッセイは、その毒性メカニズムの解明や生化学技術の発展に伴って1990年代頃より盛んに開発、研究利用されるようになり、現在では高分解能GC/MS (HRGC/HRMS)とは異質の生物学的検出法として環境、生体分析における一角を占めるようになってきている⁶⁾。ダイオキシン類の分子構造を認識し結合親和性の高い、Ah受容体と免疫抗体をそれぞれ用いた受容体結合アッセイとイムノアッセイが中心である。

2.1 多環芳香族炭化水素受容体 (Ah受容体) 結合アッセイ

ダイオキシンの多様な毒性は、核内移行転写因子であるAh受容体との結合を通して関連遺伝子が転写、翻訳されることにより発現すると考えられているが、このメカニズムの初期反応、すなわちAh受容体とリガンド(ダイオキシン類)の結合に起因する応答を受容体結合レベル、受容体-遺伝子相互作用レベル、遺伝子転写レ

ベル(応答遺伝子のmRNA量測定)、遺伝子翻訳レベル(応答遺伝子発現産物である酵素タンパク活性測定)の各段階で対象試料の「ダイオキシン様作用」を測定しようとするものである。これまでよく知られた方法としては、ダイオキシン-Ah受容体結合依存的に発現される内因性薬物代謝酵素(CYP1A)の活性(CYP1Aの特異機能であるethoxyresorufinの脱エチル化反応をresorufinの生成速度を蛍光測定して評価)を観察するEROD(ethoxyresorufin-O-deethylase)がある(図1)。ERODは*in vitro*⁷⁾、*in vivo*⁸⁾両方の試験系が成り立ち、*in vivo*では環境生息動物を直接、材料としてのモニタリングも可能である。ただし、測定可能な発現誘導までにやや時間を要し(*in vitro*でも3日程度)、内因性酵素であるがゆえに曝露物質以外の内因的未知要因による影響を受ける可能性がある、また、物質の過剰曝露によりCYP1Aの機能阻害が起こり、分析定量に必要な量-反応関係が得られない場合がみられる。こういった欠点を補う意味で開発されたのがAh受容体/レポーター遺伝子アッセイ⁹⁾であり、哺乳類細胞株(ラット、マウス、ヒト肝癌細胞等)に、外来遺伝子であるホタル(*Photinus pyralis*)ルシフェラーゼ遺伝子にDRE(dioxin

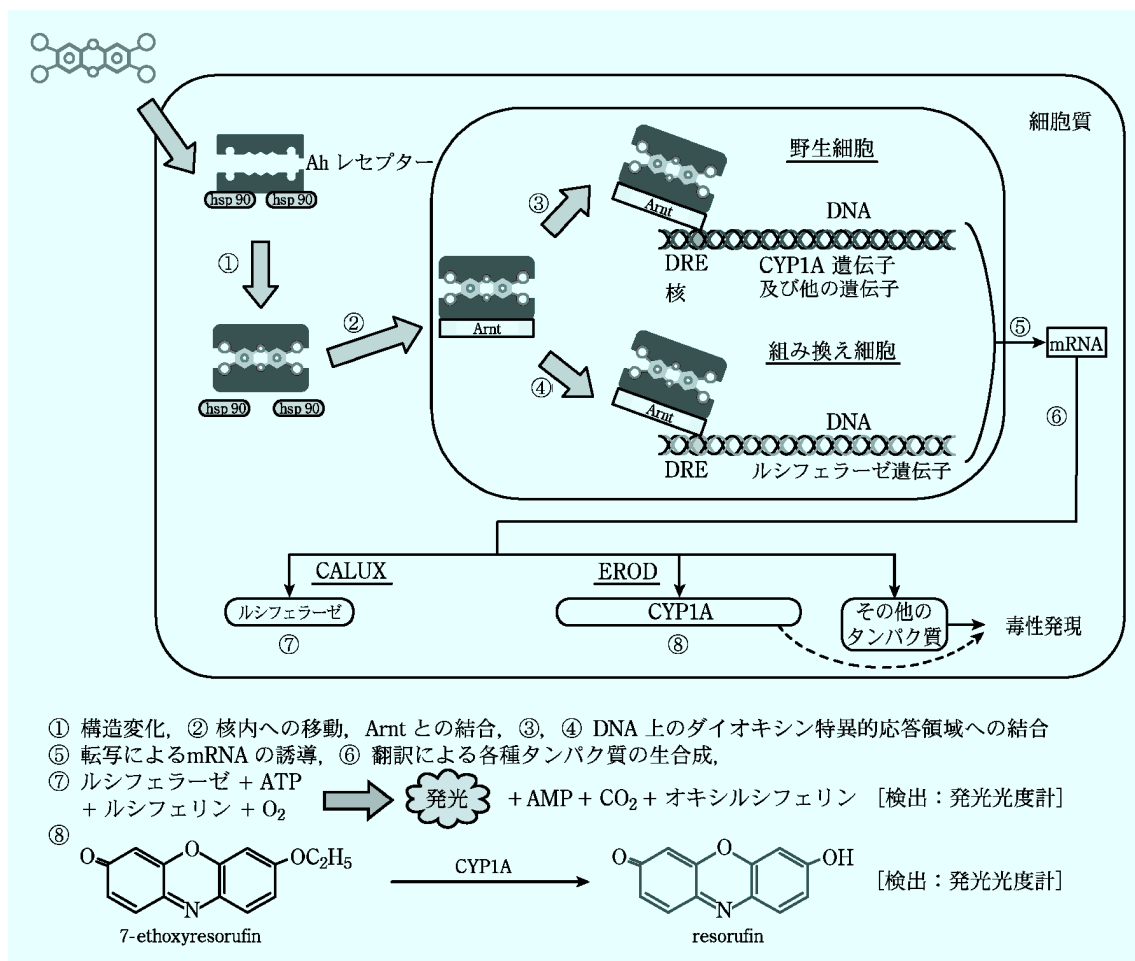


図1 EROD (ethoxyresorufin-O-deethylase) と Ah 受容体/レポーター遺伝子 (ルシフェラーゼ遺伝子) アッセイの試験原理 {滝上英孝, 酒井伸一: 環境浄化技術, 2(2), 1 (2003) から引用}

responsive element) をつないだベクターを細胞内に安定的に挿入した組み換え細胞が用いられる (図1)。リガンド-Ah 受容体複合体が DRE に結合し、下流遺伝子転写の結果発現するルシフェラーゼの活性に基づく発光 (基質ルシフェリンがオキシルシフェリンに変換される際に生じる) を光電子増倍装置で測定することにより定量を行う。本原理のアッセイは、rat H4 II E や mouse H1L6.1 細胞を用いた CALUX (chemical activated luciferase gene expression)⁶⁾⁹⁾ や human 101L 細胞を用いた P450HRGS (P450 human reporter gene system)¹⁰⁾ などといった名称で呼ばれている。

CALUX (rat H4 II E を用いる DR-CALUX[®]) を例に挙げ説明するが、試験操作方法は特殊技術を必要とせず簡単である。アッセイに必要な主な機器は、通常の細胞培養用機器 (クリーンベンチ/安全キャビネット、細胞観察のための倒立型顕微鏡、組換え細胞廃棄のためのオートクレーブ、CO₂ インキュベーター) 及び発光プレートリーダーである。Rat H II 4E を用いた CALUX アッセイは、継代維持した細胞を 96 ウェル培養プレートに播種し、まず 24 時間の培養を行い、細胞をプレートに単層固定化 (70000~100000 cells/well) する。その後、試験物質を溶解させた培地を追加し、化学曝露を行う。試験時には必ず同一プレートに 2,3,7,8-TCDD と試験試料による曝露を並行実施し、TCDD の比活性 (TCDD 毒性当量) として試験試料の活性を測定する。曝露時間は、陽性対照である TCDD の活性発現が安定

する 24 時間を基本として実施している。曝露時間終了後、界面活性剤により細胞を溶解させ、ルシフェリンを添加することにより生じる発光をプレートリーダーにより積算測定する。試験作業に要する時間は、3 日間 (正味 48 時間余) である。

DR-CALUX[®] で得られた TCDD の濃度-応答曲線の一例を図 2 に、ジベンゾダイオキシン類に対する応答を図 3 に示す。シグモイドカーブフィッティング (1-site ligand equation や four-variable Hill equation 等) を行うと、TCDD の EC₅₀ 値はほぼ 10 pM (プレートウェル当たり約 0.6 pg の負荷) の前後で再現性のよい

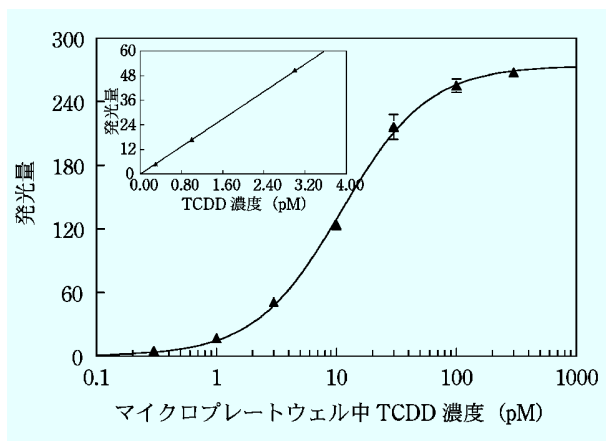


図 2 CALUX により得られた TCDD の濃度-反応曲線 (検量線) の一例

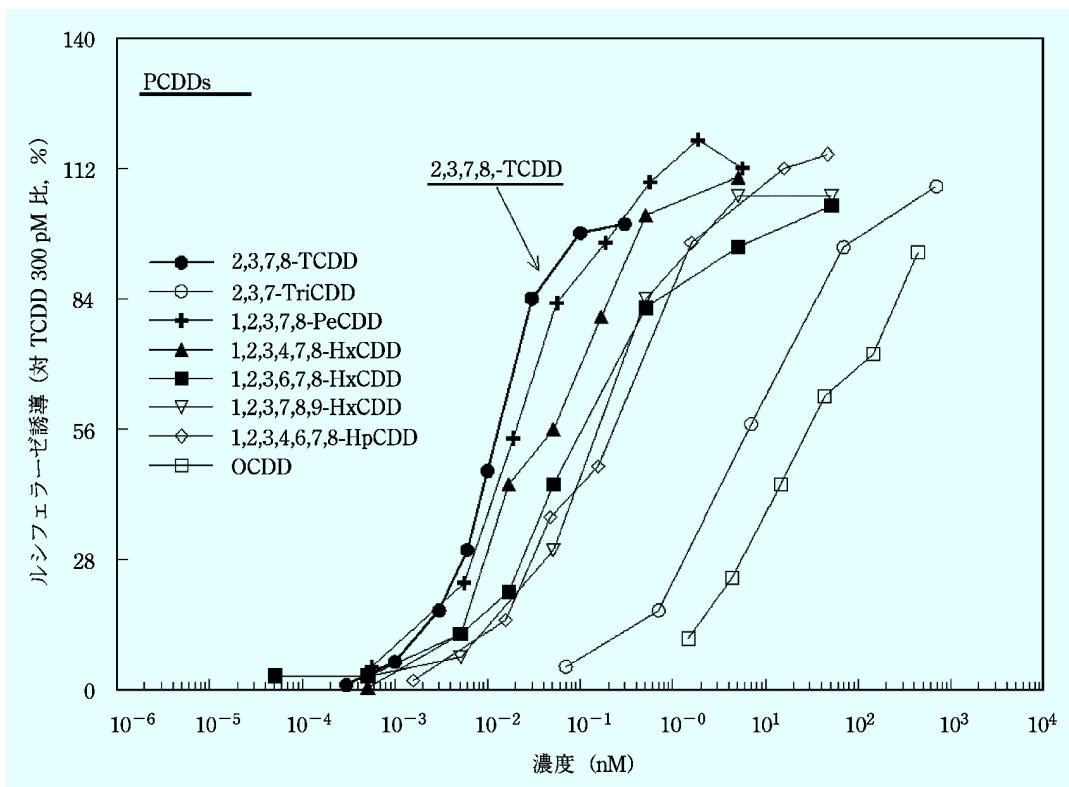


図 3 ジベンゾダイオキシン類 (PCDDs) の CALUX 濃度-反応曲線

結果が得られる。DR-CALUX®の検出下限はブランクの標準偏差の3倍 (S/N=3), 定量下限は同10倍 (S/N=10) を示す活性値に相当する TCDD 濃度で定義されるが, 定量下限値は1 pM (プレートウェル当たり約0.06 pgの負荷) を下回る場合が通例で, HRGC/HRMSでも検量線の最低濃度を与える打ち込み負荷が0.1 pg/injectionであることを考えると, CALUXのTCDDに対する感度の極めて高いことが分かる。標準物質の比活性 (CALUX-TEF) は, 基本的にはTCDDと同様にシグモイドカーブを描き, EC₅₀ 値 (飽和活性の半量を示す濃度) のTCDDとの比較により求めるが, CALUX細胞ではPCDD/Fs, Co-PCBsについてWHO-TEF¹¹⁾ (TCDD毒性等価係数) と比較的良好一致した2,3,7,8-TCDD比活性を与える (表1)。

多くの化学物質標準品や実際の環境・廃棄物試料の活性評価に関しては, フルカーブを得られない場合が多く, DR-CALUX®ではTCDDのカーブの1~4 pMの濃度域 (シグモイドカーブの立ち上がりである線形活性域, 図2参照) に相当する試料の活性値を採用して定量を行い, CALUX-TEQとして表現する。このため, 定量域であるTCDDカーブの1~4 pMの濃度域の繰り返し再現性は重要であり, 精度管理 (TCDD検量濃度点の名目濃度とシグモイドカーブ回帰換算濃度の一致性確認) は厳密に実施しなければならない。他のAh受容体/レポーター遺伝子アッセイについても, 再現性のよい低活性領域を利用して定量が行われている。

2.2 イムノアッセイ (酵素免疫測定法)

本法は, 抗原抗体反応を利用した測定法である¹²⁾¹³⁾。抗体は, 測定対象となるダイオキシン類の特定の異性をターゲットとした抗原 (目的物質と類似構造を有するハプテン) を, ウサギやマウスなどの免疫動物に投与することにより得られる。抗血清 (ポリクローナル抗体) を精製し利用する方法と, 脾臓細胞と腫瘍細胞とを融合して不死化させた融合細胞 (ハイブリドーマ) から, 有用な抗体を産生する細胞をスクリーニング・クローニングし, 単一抗体 (モノクローナル抗体) を安定的に得る方法があり, それぞれの抗体が目的, コストに応じてイムノアッセイに使用される。イムノアッセイには競合法とサンドイッチ法 (非競合法) があり, 前者は抗体に対して試料物質と酵素標識抗原を競合的に結合させる方法で, 後者は試料物質をプレート上に固相化した抗体と酵素標識抗体で挟み込む方法である。標識酵素の発色 (または蛍光) 基質を加えて目的物質の定量算出を行う。ダイオキシン類のような低分子化合物を対象とする際には, 一般に競合法が用いられる。バイオアッセイの中でイムノアッセイは毒性試験ではなく, 抗体を使用した対象物質の捕捉分析 (bioresponse-linked chemical analysis) の色合いが濃い。

表1 ダイオキシン類のCALUX結果 (TCDD比活性) とWHO-TEF¹¹⁾ (毒性換算係数) との比較

Compounds	CALUX-TEF	TEF/WHO (Humans/mammals, 1998)
PCDDs		
2,3,7,8-TetraCDD	1	1
1,2,3,7,8-PentaCDD	0.54	1
1,2,3,4,7,8-HexaCDD	0.30	0.1
1,2,3,6,7,8-HexaCDD	0.14	0.1
1,2,3,7,8,9-HexaCDD	0.066	0.1
1,2,3,4,6,7,8-HeptaCDD	0.046	0.01
OctaCDD	4.7 × 10 ⁻⁴	0.0001
PCDFs		
2,3,7,8-TetraCDF	0.32	0.1
1,2,3,7,8-PentaCDF	0.21	0.05
2,3,4,7,8-PentaCDF	0.50	0.5
1,2,3,4,7,8-HexaCDF	0.13	0.1
1,2,3,6,7,8-HexaCDF	0.039	0.1
1,2,3,7,8,9-HexaCDF	0.11	0.1
2,3,4,6,7,8-HexaCDF	0.18	0.1
1,2,3,4,6,7,8-HeptaCDF	0.029	0.01
1,2,3,4,7,8,9-HeptaCDF	0.041	0.01
OctaCDF	0.0065	0.0001
Non-ortho PCBs		
3,3',4,4'-TetraCB (77)	0.0013	0.0001
3,4,4',5'-TetraCB (81)	0.0042	0.0001
3,3',4,4',5'-PentaCB (126)	0.067	0.1
3,3',4,4',5,5'-HexaCB (169)	0.0034	0.01
Mono-ortho PCBs		
2,3,3',4,4'-PentaCB (105)	1.2 × 10 ⁻⁵	0.0001
2,3,4,4',5'-PentaCB (114)	4.8 × 10 ⁻⁵	0.0005
2,3',4,4',5'-PentaCB (118)		0.0001
2',3,4,4',5'-PentaCB (123)	2.4 × 10 ⁻⁵	0.0001
2,3,3',4,4',5'-HexaCB (156)	2.1 × 10 ⁻⁴	0.0005
2,3,3',4,4',5'-HexaCB (157)	8.0 × 10 ⁻⁵	0.0005
2,3',4,4',5,5'-HexaCB (167)	8.2 × 10 ⁻⁶	0.00001
2,3,3',4,4',5,5'-HeptaCB (189)	6.7 × 10 ⁻⁶	0.0001

抗体作製戦略 (測定対象物質を何とするか) がイムノアッセイの適用可能性において非常に重要な意味をもつ。毒性の強いTCDDを標的とする抗体の適用が多いが, TCDDにこだわらず, 環境存在量の多い異性を検出するための抗体作製もなされている¹³⁾。また, PCBに関してはAroclor製品 (英米で製造された種々のPCB混合物) にブロードに反応するようにPCB mixtureを抗原として得たポリクローナル抗体を利用す

るキットもある⁶⁾。対象物質に対する応答感度は抗体性能に左右されるが、96 ウェルマイクロプレートで数～1000 pg/well の辺りが定量限界となっている。

抗体の特異性は類似構造をもつ異性体や関連物質への交差反応性で決められるが、一般的にはモノクローナル抗体の特異性はポリクローナル抗体より高い。一般にイムノアッセイの値が測定対象の化学分析値よりも高くなる現象は、抗体の交差反応性（標的分子以外の分子を認識する特性：抗体は、分子全体を認識するというよりは分子の特定部分の化学構造を認識する）に理由を求めることが多い。

イムノアッセイは、上記の Ah 受容体結合ベースの細胞アッセイのような 24 時間といった曝露時間を必要とせず、数時間オーダーの抗原-抗体結合平衡到達時間でもってより迅速な測定が可能である。実際のモニタリングに際して、測定のためのラグタイムを極力短くしてリアルタイムに近い形での対応がつけられる可能性がある点が魅力である。

最近では、イムノアッセイの原理を応用したイムノクロマトグラフィーの開発もなされており、オンサイトでダイオキシン類の即時簡易測定を可能にする、いわゆる「リトマス試験紙」としての期待が持たれている。タンパク質のような高分子化合物を測定対象としたイムノクロマトグラフィーは、妊娠検査薬（絨毛性ゴナドトロ

ピンの検出目的）等の分野で既に確立済みの検出技術である¹⁴⁾。測定原理としては、対象物質に標識抗体を結合させた後に、メンブレン上に固定化した別の抗体（対象物質を認識）とさらにサンドイッチさせて発色させている。しかし、ダイオキシン類や PCB などの低分子を測定対象とする場合、従来型のイムノクロマトグラフィーでは分子量が小さいがゆえの立体障害が原因となり、標識抗体とメンブレン上の抗体で対象物質を挟み込むことができないという問題があった。これを解決するために標識抗体を認識する抗体をメンブレン上に固定化し、対象分子と未結合の標識抗体については、あらかじめメンブレンの上流部に固定化したハプテンに結合させ除去を行い、対象分子の結合した標識抗体との分離を行う。その結果、測定対象物質の結合した標識抗体のみを固定化抗体のバンド帯で発色検出するという、新型のイムノクロマトグラフィーの開発が進められている（図 4）。抗 PCB #118 モノクローナル抗体を用いたイムノクロマトグラフィーの応答能を写真 1 に示すが、100 ppb を超える濃度から判定ラインに現れたバンドが目視確認できる。試薬改良やイムノリーダーの使用等によって、さらに感度上昇を図れる可能性がある。

2.3 Ah イムノアッセイ

Ah イムノアッセイは市販キットでその名前をよく聞

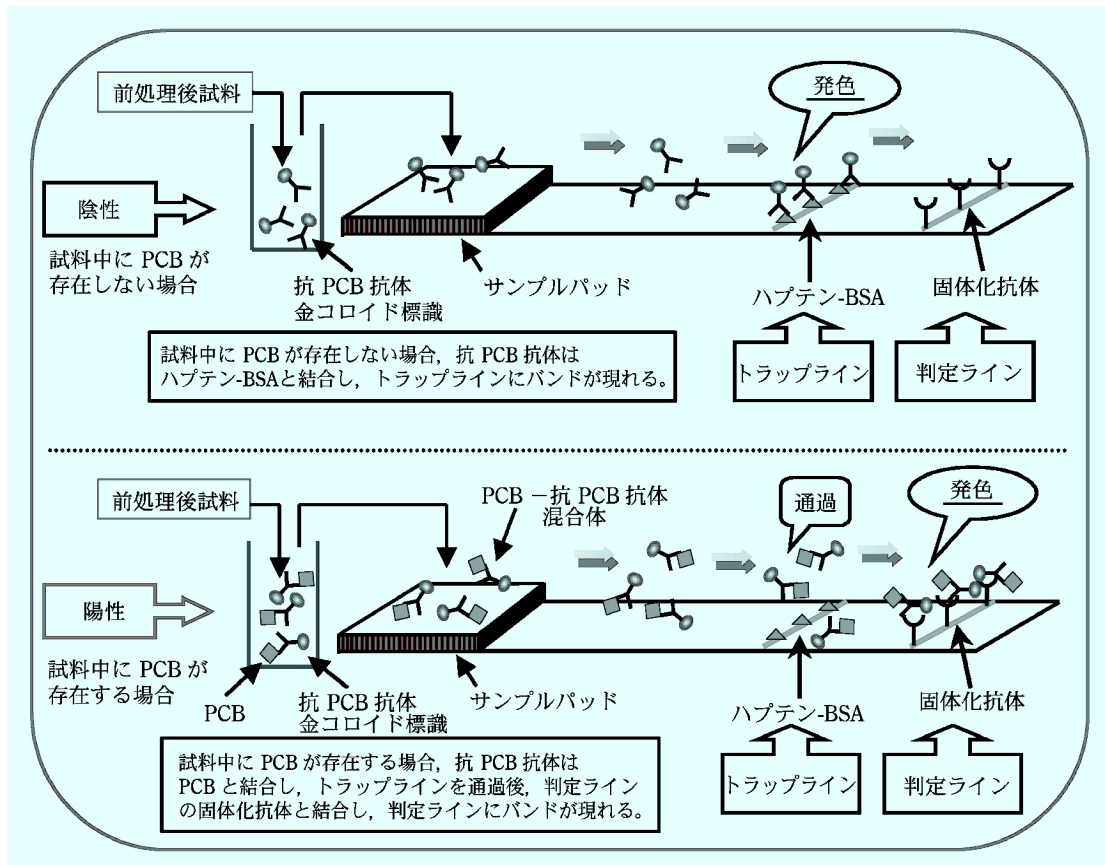


図 4 抗 PCB 抗体を用いたイムノクロマトグラフィー原理図

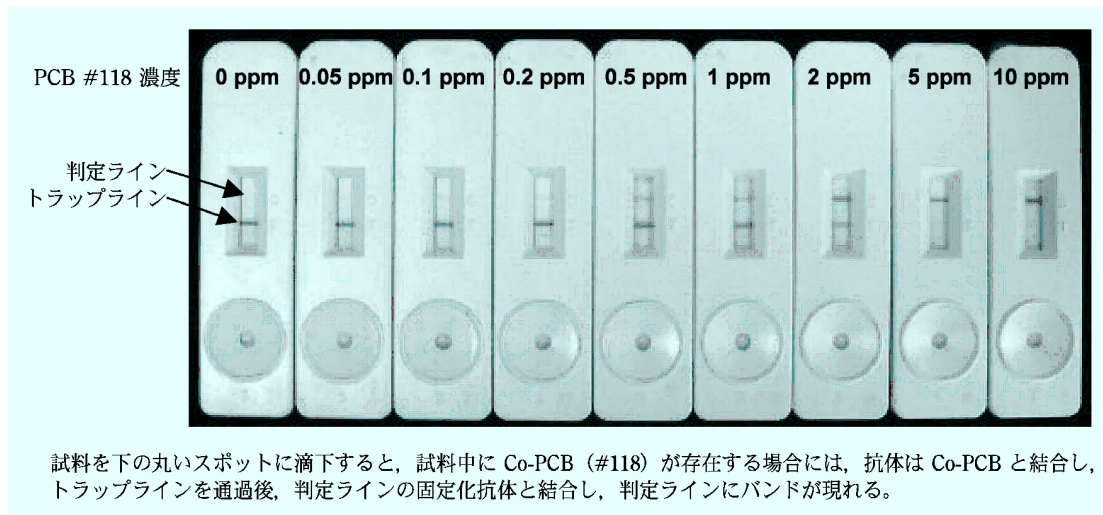


写真1 抗 Co-PCB (#118) モノクローナル抗体を用いたイムノクロマトグラフィー {写真提供：株式会社エンバイオテック・ラボラトリーズ，滝上英孝，酒井伸一：環境浄化技術，2(2)，1(2003) から引用}

き，2・1 及び 2・2 で取り上げた 2 アッセイを合わせた呼び名となっているので別項目としたが，基本的には Ah 受容体結合アッセイであり，受容体へのダイオキシン類の結合反応を細胞内ではなく，マイクロプレートウェル内で測定することを目的としてデザインされている。試験原理としては，Ah 受容体及び ARNT タンパク (Ah 受容体核転送因子) と測定試料中のリガンドから形成される複合体を，DRE を介してマイクロプレートウェル上に固定化させる受容体結合の過程と，上記の複合体中の ARNT を認識する結合抗体と酵素標識抗体を付加して酵素活性を測定する検出過程を組み合わせてダイオキシン類を定量する方法である¹⁵⁾。測定結果については，TCDD 標準品の線形活性域 (モルモット受容体では 1～64 pg-TEQ/well) で定量を行い，TCDD 当量 (DEQ) として表現する。

現在，哺乳類のうち，ダイオキシン類に対して感受性 (急性毒性) の高いモルモット肝細胞から抽出された Ah 受容体を含むサイトソル (細胞質)，ARNT，DRE をセットとするキットが出ているが，哺乳類に対する毒性を総合的に考慮して定められている WHO-TEF の設定物質以外の様々な物質に対しても交差反応性を有しており，環境試料の測定値に WHO-TEQ との差が生じている¹⁵⁾。本法は，数時間内で簡単に実施できる毒性評価アッセイとして期待されるが，ヒトやラット，マウス等の Ah 受容体に関しても同原理の Ah イムノアッセイを組んで種差評価を実施し，試験原理についての妥当性検証を進める必要があると考えられる。

3 バイオアッセイスクリーニングに向けた試料前処理

バイオアッセイによる環境媒体，廃棄物中のダイオキ

シン類，PCB のスクリーニングの成否を検証するためには，対応する化学分析 (HRGC/MS, GC/ECD 等) 値との比較が必須であり，バイオアッセイの定量下限の見極め，分析-アッセイデータ間の相関性についての評価がまず行われる。続いて，規制値や管理値があれば，バイオアッセイによるそれらに近い値付近の検出性能が検討されなければならない。標準物質に対するアッセイの検出特性を明らかにし，対象試料種類別にアッセイ結果が化学分析データによって「比較的」必要十分に裏付けられることを明示する検討過程をバリデーションという。

環境・廃棄物試料の前処理において，一般に必要なとされる単位操作を表 2 に示す¹⁶⁾。Ah 受容体結合アッセイにおいては，ダイオキシン類より親和性は弱いものの多環芳香族炭化水素 (PAHs) に対して，Ah 受容体はその名の通り結合性を有しており，HRGC/MS で測定した TEQ との間で高相関性を得る条件として，硫酸液々洗浄や硫酸シリカゲルカラム等を用いてこれら夾雑活性成分の除去を行う必要がある。また，幾種かの PCB 異性体 (ジオルト体を主体) は Ah 受容体に対して拮抗作用 (antagonistic effect : Ah 受容体に結合するが，リガンド-受容体複合体のコンフォメーション変化が不十分であるため DRE への結合性が低く，結果的に下流遺伝子の発現が起こらない，または起こりにくくなる現象) を示すことが分かっている¹⁷⁾。これらとダイオキシン類との共存下では TEQ を下回る測定評価を下す可能性があり，さらに活性炭カラム等を用いてダイオキシン類の選択的分画を行う必要がある。

バイオアッセイのための試料前処理の検討については，HRGC/MS など従来の化学分析仕様の試料前処理と共通手法となる部分が多く，また化学分析値との比較の意

表2 バイオアッセイのための試料前処理に用いられる単位操作とその目的(文献16を改変)

クリーンアップ手法の例	主な適用目的
DMSO/ヘキサン分配	油状試料からの芳香族化合物の選択的抽出と油分(鎖状炭化水素, 脂環式炭化水素)の除去
硫酸処理(液々洗浄, H ₂ SO ₄ /Silica gel)	有機マトリックス成分の分解除去, 着色物質, PAHs, 不飽和炭化水素, フタル酸エステル, 一部の有機塩素化合物の除去
アルカリ処理(液々洗浄, KOH/Silica gel)	フェノール類, 酸性物質, 脂質, タンパク質の除去
AgNO ₃ /Silica gel, AgO ₂ /Silica, 活性化銅	含硫黄化合物(S8), DDE, 脂肪族炭化水素の除去
Tetrabutylammonium (TBA)	硫黄単体の硫酸イオン化, 除去
Silica gel カラムクロマトグラフィー	強極性物質, 着色物質, 有機塩素系農薬の除去
アルミナ(フロリジル) カラムクロマトグラフィー	低極性物質, PCB, ポリ塩化ナフタレン(PCN), 有機塩素系農薬の除去
活性炭カラムクロマトグラフィー	Planar 化合物の選択的分取, 生体由来成分等の除去
HPLC(順相, 逆相, GPC)	高精度のクリーンアップ, 分取

味からも分析用前処理を基礎としてバリデーションが開始されているが, 分析において律速段階となっている前処理の簡易迅速化を実現しなければ, バイオアッセイの簡易分析法としての意味が薄らいでしまう。

Ah 受容体結合アッセイでは, HRGC/MS により得られた TEQ 値や関連化学分析値に対応したバイオアッセイ値を得られることが, 環境(大気, 土壌, 底質, 水質等), 廃棄物(排ガス, 焼却灰, 汚泥, 廃油, 排水等), 生体試料(母乳, 血液等)を対象とした両者の相関データの蓄積によって示されている。その際, 採用された前処理方法についても併せ, 一例を表3に示す^{7)18)~23)}。

試料前処理の簡易化を実施している例としては, 化学分析前処理をミニチュア化する方向があり, 例えば試料抽出液を硫酸(33%)シリカゲル充填ミニカラムに通し, ヘキサン溶出液を続いて活性炭を充填したミニカラム(XCARB)に添加し, PCBとPCDD/Fsの溶出画分をそれぞれ得るといふものがある²²⁾²⁴⁾。また, 高濃度のPAHs等を含むような焼却飛灰や鉍物油試料については, 硫酸処理やカラム処理によるPAHs除去が十分でないことが判明しており, 筆者らは抽出液に硫酸(44%)シリカゲルを加えて加熱還流を行うことによりPAHsの除去を行い, TEQに相関するバイオアッセイ

値(CALUX-TEQ)が得られることを確かめている²¹⁾²³⁾。

イムノアッセイについても, Ah受容体結合アッセイ同様の前処理検討を行い, 適用性を評価するのが基本的な流れであり, バリデーションの時点では, 試料別に交差反応物質の化学分析濃度と交差反応率から理論的なイムノアッセイ値を算出して実測値との比較を行うべきであり, それにより例えば, ダイオキシン以外の夾雑物による過剰反応や試料マトリックスの妨害作用が問題となれば, その除去のための前処理方法が定まってくるものと考えられる。しかし, イムノアッセイ, イムノクロマトグラフィーは前述したように現場測定を行える, いわゆる即効性がより求められてくるため, さらに前処理の簡易化が求められる。

4 課題と今後の展開

バイオアッセイの用途ニーズは, 汚染物, 汚染媒体の実態把握のモニタリングのみならず, 汚染物の処理過程での毒性変化観察や除染状況の確認など工程管理にも拡大しており, 適切なバリデーションを踏まえた上で, 環境・廃棄物分野等での適用合意形成と実地適用成果の蓄積が, 同時かつ早急に行われてゆくべき状況にあるといえる。

その際, 簡易分析法としての一連の試料前処理を含めたバイオアッセイのポイントは, 測定に必要な試料量, 使用前処理ステップ, スケールについて, 定量性を損わない範囲でできるだけ縮小して全体工程を簡易化することであり, スクリーニング手法として機器分析との差別化を図るための検討, 工夫点がここにある。

バイオアッセイでは, 簡易分析法としての意味合いから, HRGC/MSに匹敵する精確値を出すことは求められず, 大量検体処理への対応能力が第一に求められる。ただし, 測定精度をある程度犠牲にすといっても, 公定法的な利用のためには繰り返し再現性は20~30%の変動係数に抑える必要があると考えられる。また, 真値(化学分析値)が規制値以上であることに反して, バイオアッセイスクリーニングの結果が規制値未満を示すというサンプル偽陰性率はできる限り低く抑えられなければならない。バイオアッセイスクリーニングの有効性評価マトリックスを表4に示す。表4においてA/(A+C)で示される比率を敏感度(sensitivity)と呼び, 実際に規制値以上の試料をバイオアッセイで陽性と判断する確率, すなわちアッセイによる汚染試料発見の能力を表し, 率が高いほどアッセイの検出力が高い(偽陰性率の余事象確率である)。また, D/(C+D)で表される比率を陰性的中度(negative predictive value)と呼び, アッセイで陰性と判定された場合に実際の規制値以上の試料の存在しない確率を意味する。これら敏感度と陰性的中度については限りなく100%に近いことが求めら

表3 Ah受容体結合アッセイにおける各種試料における前処理法と分析結果の一例

バイオアッセイ	対象試料	試料前処理	Bio-TEQ	対応化学分析値	備考	文献
EROD (H4IIE)	都市ゴミ焼却場飛灰 (n=2) 都市ゴミ焼却場フィルターダスト (n=3) 火災燃えがら (n=5) 下水処理場生汚泥, 活性汚泥 (n=5) 下水処理場発酵汚泥 (n=5) 湖底質 (n=2) 湖周辺地域土壌 (n=3) 堆肥工場コンポスト (n=3)	抽出濃縮液を多層シリカゲルカラム (シリカゲル, 44% 硫酸シリカゲル, シリカゲル) クリーンアップ	450, 705 ng-TEQ/kg 735~2015 ng-TEQ/kg 310~1040 ng-TEQ/kg 106~152 ng-TEQ/kg 144~198 ng-TEQ/kg 1200, 14 ng-TEQ/kg 1.4~3.8 ng-TEQ/kg 11~16 ng-TEQ/kg	264, 416 ng-TEQ/kg 651~1645 ng-TEQ/kg 136~880 ng-TEQ/kg 32~69 ng-TEQ/kg 53~64 ng-TEQ/kg 861, 7.2 ng-TEQ/kg 0.2~1.0 ng-TEQ/kg 6.1~8.8 ng-TEQ/kg	Bio - TEQ / 化学TEQ比は試料の種類によってはほぼ一定 • fly ash, tissue filter dust, fire residue, compost, sediment : 1~2 • 汚泥 : 2~2 • soil : 5~9	7)
CALUX (H4IIE-luc)	牛乳 (n=22)	ヘキサン/ジエチルエーテル抽出, 硫酸(33%) シリカゲル クリーンアップ	0.2~4.6 ng-TEQ/kg fat	0.5~4.7 ng-TEQ/kg fat (I-TEQ)	2 pg I-TEQ/g fatを示した5試料はすべてCALUXでも2 pg I-TEQ/g fat以上	18)
CALUX (H4IIE-luc)	ヒト血清 (n=106) ヒト卵胞液 (n=9)	ヘキサン抽出, 硫酸(33%) シリカゲル クリーンアップ	0~200 pg-TEQ/g-lipid	50~750 ng/g-lipid (PCB 4異性体)	CALUX - TEQとPCB総濃度は良好な相関	19)
CALUX (H4IIE-luc) EROD (H4IIE)	PCB油, 化学処理油 (n=6)	DMSO/ヘキサン分配シリカゲル/硫酸(22%) シリカゲル クリーンアップ	0.02~5140 ng-TEQ/g (CALUX) 0.07~4100 ng-TEQ/g (EROD)	0.13~960000 mg/kg (PCB) 0.114~2500 ng-TEQ/g (WHO-TEQ)		20)
CALUX (H4IIE-luc)	PCB混入鉱物油	DMSO/ヘキサン分配, 硫酸(44%) シリカゲル加熱還流処理	0.27~1.6 ng-TEQ/g	0.12~1.2 ng-TEQ/g (I-TEQ)	Bio-TEQ/I-TEQ比は, 1~1.1倍	21)
CALUX (mouse)	下水汚泥 (n=22)	超音波抽出 (トルエン), 33% 酸シリカカラム及び活性炭カラム クリーンアップ	7~12,802 ng-TEQ/g	8~718 ng-TEQ/g	GC/MSにより得られたTEQとの相関係数(r ²)は69.5% 相関直線の傾き (Bio-TEQ / C-TEQ) は1.41	22)
CALUX (H4IIE-luc) EROD (H4IIE)	焼却飛灰 (n=24)	ソックスレー抽出 (トルエン), シリカゲル クリーンアップ, または硫酸(44%) シリカゲル加熱還流処理	0.02~230 ng-TEQ/g (CALUX) 0.003~35 ng-TEQ/g (EROD)	0.0018~21.1 ng-TEQ/g (I-TEQ)	硫酸(44%) シリカゲル加熱還流処理を行った飛灰試料はBio-TEQ/I-TEQ比が1.1~4.6 (CALUX) 及び0.7~1.5 (EROD)	23)

表4 バイオアッセイを用いたスクリーニングの有効性評価マトリックス

	基準/規制値 (action limit) 以上	基準/規制値 (action limit) 未満
バイオアッセイ陽性	真陽性 (true positive) (n=A)	偽陽性 (false positive) (n=B)
バイオアッセイ陰性	偽陰性 (false negative) (n=C)	真陰性 (true negative) (n=D)

れる。厳しいダイオキシン規制値を敷く欧州の食品検査スクリーニングに求められる敏感度は99%以上 (偽陰性率は1%未満) となっており⁴⁾, 併せて陽性応答試料が本当に規制値以上であるかどうか, 陽性的中度 {positive predictive value : A / (A+B)} もできる限り

高いことが望ましい。

ダイオキシン類の規制値管理手段だけでなく, バイオアッセイは未知のダイオキシン様活性化学物質の検索ツールとしても利用できる。多くのバイオアッセイ, 特にAh受容体結合アッセイの種々の実試料を対象としたバリデーションにおいては, 多分にアッセイ値がTEQ値を数倍程度まで上回る傾向が観察されている (表3)。この傾向は規制値管理上, 「安全」側での毒性評価という観点では偽陰性を出さないため, スクリーニング上好ましい現象と捉えることができる一方で, TEQ値との差を示す要因についての考察を科学的に深めなければならない。臭素化ダイオキシン類 (PBDD/Fs) はPCDD/Fsと同等のAh受容体結合活性を有する²⁵⁾。また, ポリ塩化ナフタレン (PCNs), ポリ臭素化ジフェ

ニルエーテル (PBDEs), 塩素化 PAHs 等の POPs もダイオキシンに比較して弱い活性ながらも存在濃度によっては影響を考慮しなければならない²⁵⁾。未知活性物質の検索や複合物に対する細胞の応答メカニズムの研究など, ダイオキシン測定以外にも視点を変えてバイオアッセイを利用する意義があり, 多面的な研究展開を行う必要がある。

文 献

- 1) 環境省: ダイオキシン類の排出量目録 (排出インベントリ), 平成 14 年 12 月 (2002)。
- 2) European Commission Press Releases IP/02/959 (2002)。
- 3) A. Bernard, C. Hermans, F. Broeckaert, G. De Poorter, A. De Cock, G. Houins: *Nature*, **401**, 231 (1999)。
- 4) Commission Directive 2002/69/EC of 26 July 2002, Official Journal of the European Communities, L209/5 (2002)。
- 5) 底質の処理・処分等に関する指針, 平成 14 年 8 月 30 日環水管 211 号 都道府県知事・政令指定都市市長・中核市市長宛, 環境省環境管理局水環境部長通知, (2002)。
- 6) J. Diaz-Ferrero, M. C. Rodriguez-Larena, L. Comellas, B. Jimenez: *Trends Anal. Chem.*, **16**, 563 (1997)。
- 7) S. M. G. Schwirzer, A. M. Hofmaier, A. Kettrup, P. E. Nerdinger, K.-W. Schramm, H. Thoma, M. Wegenke, F. J. Wiebel: *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **41**, 77 (1998)。
- 8) J. J. Whyte, R. E. Jung, C. J. Schmitt, D.E. Tillitt: *Crit. Rev. Toxicol.*, **30**(4), 347 (2000)。
- 9) P. M. Garrison, K. Tullis, J. M. M. J. G. Aarts, A. Brouwer, J. P. Giesy, M. S. Denison: *Fundam. Appl. Toxicol.*, **30**, 194 (1996)。
- 10) USEPA, Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods (SW-846), Method 4425 (2000)。
- 11) M. van den Berg, L. Birnbaum, A. T. C. Bosveld, B. Brunstrom, P. Cook, M. Feeley, J. P. Giesy, A. Hanberg, R. Hasegawa, S. W. Kennedy, T. Kubiak, J. C. Larsen, F. X. R. van Leeuwen, A. K. D. Liem, C. Nolt, R. E. Peterson, L. Poellinger, S. Safe, D. Schrenk, D. Tillitt, M. Tysklind, M. Younes, F. Waern, T. Zacharewski: *Environ. Health Perspect.*, **106**, 775 (1998)。
- 12) 前田昌子: *ぶんせき*, **1999**, 839。
- 13) R. O. Harrison, G. H. Eduljee: *Sci. Total Environ.*, **239**, 1 (1999)。
- 14) K. May: *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **165**, 2000 (1991)。
- 15) 小林康男, 植地俊仁: *環境技術*, **31**(8), 594 (2002)。
- 16) 高菅卓三: *環境浄化技術*, **2**(2), 10 (2003)。
- 17) S. A. van der Plas, H. Sundberg, H. van den Berg, G.

Scheu, P. Wester, S. Jensen, A. Bergman, J. de Boer, J. H. Koeman, A. Brouwer: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **169**, 255 (2000)。

- 18) F. H. Bovee, L. A. P. Hoogenboom, A. R. M. Hamers, W. A. Traag, T. Zuidema, J. M. M. J. G. Aarts, A. Brouwer, H. A. Kuiper: *Food Addit. Contam.*, **15**, 863 (1998)。
- 19) A. Pauwels, P. H. Cenijs, P. J. Schepens, A. Brouwer: *Environ. Health Perspect.*, **108**, 553 (2000)。
- 20) S. Sakai, P. A. Behnisch, K. Hosoe, K. Shiozaki, M. Ohno, A. Brouwer: *Organohalogen Compounds*, **54**, 293 (2001)。
- 21) H. Takigami, K. Hosoe, P. A. Behnisch, K. Shiozaki, H. Mizukami, M. Ohno S. Sakai: *Organohalogen Compounds*, **58**, 397 (2002)。
- 22) USEPA Office of Water: Report on the Comparison of Cell-Based Assays with Mass Spectrometry Methods for the Analysis of PCDDs/PCDFs and PCBs in Biosolids, (2002)。
- 23) P. A. Behnisch, K. Hosoe, K. Shiozaki, H. Ozaki, K. Nakamura, S. Sakai: *Environ. Sci. Technol.*, **36**, 5211 (2002)。
- 24) D. J. Brown, I. V. Overmeire, L. Goeyens, M. D. Chu, M. S. Denison, G. C. Clark: *Organohalogen Compounds*, **58**, 401 (2002)。
- 25) 酒井伸一, 滝上英孝, 細江和典, ピーター・ペーニッシュ: *廃棄物学会誌*, **14**, 1 (2003)。



滝上英孝 (Hidetaka TAKIGAMI)

独立行政法人国立環境研究所循環型社会形成推進・廃棄物研究センター (〒305-8506 茨城県つくば市小野川 16-2)。京都大学大学院工学研究科環境地球工学専攻修了。工学博士。《現在の研究テーマ》残留性有機汚染物質 (POPs) のバイオアッセイを用いたモニタリング。《主な著書》“環境ホルモンのモニタリング技術”(分担執筆)(シーエムシー)。
E-mail: takigami@nies.go.jp



酒井伸一 (Shinichi SAKAI)

独立行政法人国立環境研究所循環型社会形成推進・廃棄物研究センター (〒305-8506 茨城県つくば市小野川 16-2)。京都大学大学院工学研究科博士課程修了。工学博士。《現在の研究テーマ》物質循環・廃棄過程における化学物質の挙動と制御。《主な著書》“循環型社会 科学と政策”(有斐閣アルマ)。
E-mail: sakai@nies.go.jp