

厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)
分担研究報告書

ダイオキシン類等の有害化学物質による食品汚染実態の把握に関する研究
(2) 食品中のダイオキシン類等の有害化学物質に対する迅速測定法の開発
(2-1) ダイオキシン類に対する高感度レポータージーンアッセイの開発

研究分担者 堤 智昭 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

ダイオキシン類に対する芳香族炭化水素レセプターレポータージーンアッセイの高感度化を目的として、新規ダイオキシン類応答性レポーターベクターを用いて安定発現細胞株の作製を行った。20年度に作製した細胞株(pGL7.3)を使用したルシフェラーゼレポータージーンアッセイ(高感度CALUXアッセイ)について、ダイオキシン類標準品を用いた性能評価と、魚試料に対する適用を予備的に検討した。2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin 検量線を作製し、測定精度について検討した結果、定量下限は0.49 pg/mLであった。また、本アッセイの種々のダイオキシン類に対する応答性を検討した。その結果、試験したダイオキシン類に対する応答性は、各々のダイオキシン類が有する毒性等価係数に類似していた。従って、ダイオキシン類の毒性をスクリーニングするために適した選択性を有していた。また、前処理した魚試験液中でダイオキシン類が検出可能か検討するため、マグロ及びブリを前処理し得られたPCDD/Fs分画、及びCo-PCBs分画に対し添加回収試験を実施した。ダイオキシン類として該当分画に対しPCDD/Fs混合品あるいはCo-PCB(#126)を添加した結果、回収率はPCDD/Fs分画では67~92%、Co-PCBs分画では79~100%であった。試験液中に含まれるマトリックスの影響により回収率がやや低くなることが考えられたが、スクリーニング法として使用する場合は許容できる回収率であった。本レポータージーンアッセイは高感度であるため、食品などを対象にしたダイオキシン類のスクリーニング法として期待できる。

研究協力者

株式会社 日吉
中村 昌文、半田 洋士

A.研究目的

人が暴露するダイオキシン類の殆ど全ては食品の摂取に由来するため、食品中のダイオキシン類に対するスクリーニング法が開発できれば、食品衛生上有意義である。食品を対象にしたダイオキシン類のスクリーニング法としては、培養細胞を用いたレポータージーンアッセイ^{1,2)}や、酵素免疫測定法³⁻⁵⁾が検討されている。しかし、食品ではダイオキシン類の汚染濃度が環境試料と比較し低いことから、スクリー

ニング法の高感度化が強く望まれてきた。

レポータージーンアッセイではダイオキシン類の芳香族炭化水素レセプター(AhR)を介した毒性発現機構を利用し、ダイオキシン類を検出する。これらのアッセイでは、例えばルシフェラーゼをレポーター遺伝子にしたダイオキシン類応答性ベクターをDNAに組み込んだ培養細胞を使用する。ダイオキシン類は細胞内のAhRに結合した後、ダイオキシン類応答性ベクターのダイオキシン類応答性領域(DRE:Dioxin Responsive Element)に結合しプロモーター領域を活性化することで、定量指標となるルシフェラーゼ遺伝子の発現を誘導する。しかし、汎用されているダイオキシン

類応答性ベクターは4個のDREしか含んでおらず⁶⁾、微量のダイオキシン類が十分にルシフェラーゼ遺伝子を誘導できない可能性が考えられた。

19年度に我々はDREを多く含んだルシフェラーゼレポーター(pGL7.1~7.5)の特性を詳細に解析した結果、DREの数が増えると2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (2,3,7,8-TCDD)応答性が上昇することを確認した⁷⁾。そこで、20年度は本レポーターベクターを使用して安定細胞株の作製を行った。最も誘導倍率が高かったpGL7.3細胞株では、汎用されている細胞株であるHepa6.1と比較し、2,3,7,8-TCDDに対する応答性の上昇が認められた⁸⁾。そこで今年度は、pGL7.3細胞株を使用したレポータージーンアッセイ(高感度CALUXアッセイ)の性能評価として、定量下限の設定、種々のダイオキシン類に対する応答性の確認、及び魚試料に対する適用を予備的に検討した。

B.研究方法

1.試薬

MEM培地、牛胎児血清(FBS)はインビトロジェン社より購入した。G418はシグマアルドリッチ社製、ジメチルスルホキシド(DMSO)は和光純薬工業製を使用した。また、細胞溶解液(CCLR)及びルシフェラーゼ定量システム(スタンダードタイプ)はプロメガ社より購入した。2,3,7,8-TCDDは和光純薬より購入した。その他のダイオキシン類についてはAccuStandard社、及びCambridge Isotope Laboratories社より購入した。

2.装置

ルミノメーターはバルトールド社製のCentro LB960を使用した。

3.魚試料の前処理

魚試料の前処理については、平成13年度

厚生科学研究費補助金研究報告書¹⁾に従った。

4.ルシフェラーゼアッセイ

pGL7.3細胞株はMEM培地(10%FBS及び500 µg/ml G418を含む)を用いてCO₂インキュベーター内で培養した(37°C、5%CO₂)。96ウェルプレートに細胞を播種(75,000個/well)し、約24時間培養後、種々の濃度の2,3,7,8-TCDDあるいは試験液(DMSOの最終濃度は1%)に暴露した(95 µl/well)。一定時間培養後、培地を除きウェルをリン酸緩衝液で2回洗浄した。CCLRを加え(50 µl/well)、プレートミキサーで15分間振とう後、ルシフェラーゼ定量試薬を加え(100 µl/well)、ルミノメーターにより発光強度(RLU)を測定した。

C.研究結果及び考察

1.高感度CALUXアッセイの定量限界

本法の定量範囲を設定するため、2,3,7,8-TCDD標準溶液の繰返し測定を行い、測定精度及び正確度に関する検討を実施した(表1)。標準溶液を異なる日に複数回測定した結果、0.49~31.3 pg/mLの間では、変動係数が6%以内、得られた定量値も理論値から±5%以内であり、良好な結果であった。そこで定量下限は0.49 pg 2,3,7,8-TCDD/mL(0.047 pg 2,3,7,8-TCDD/assay)とした。本定量下限は現在、汎用されているCALUXアッセイ¹⁾と比較し、2倍ほど高感度であった。また、図1には典型的な2,3,7,8-TCDD標準曲線を示した。

2.高感度CALUXアッセイの種々のダイオキシン類に対する応答性

食品中には2,3,7,8-TCDD以外にも毒性を有する種々のダイオキシン類異性体が存在する。そのため、本法をダイオキシン類のスクリーニング法として利用を考えた場合、毒性の強い異性体を検出する必要がある。そこで、

一部のダイオキシン類異性体に対して本アッセイ法の応答性を調べた。図 2 には、2,3,7,8-TCDD を含む 7 種のダイオキシン類に対する標準曲線を示した。また、表 2 には EC50 (得られた最大の応答性を 100%とした場合に、50%の応答性を与える濃度)より算出した各異性体に対する応答性と、WHO により定められた毒性等価係数(WHO TEF 2005)を示した。本アッセイの各異性体に対する応答性は TEF と良く類似していた。このように、本アッセイは毒性の強い異性体に対して高い応答性を示すことから、ダイオキシン類の毒性等量を知るためのスクリーニング法として適切な特性を有していた。

3. 前処理した魚試験液に対する添加回収試験

本アッセイが魚試料中のダイオキシン類を測定可能か検討するため、前処理した魚試験液に対する添加回収試験を実施した。マグロ及びブリを前処理し、PCDD/Fs 分画と Co-PCBs 分画を調整した。PCDD/Fs 分画には PCDD/Fs 混合液、Co-PCBs 分画には #126 を既知量添加し、本アッセイにより供した(表3)。PCDD/Fs のマグロにおける回収率は 67~88%、ブリにおける回収率は 69~92%であった。#126 のマグロにおける回収率は 89~100%、ブリにおける回収率は 79~100%であった。PCDD/Fs 分画ではやや低い回収率が得られているが、試験液に含まれるマトリックスによる大きな影響は無いと考えられた。本アッセイは魚試料などを対象にしたダイオキシン類のスクリーニング法として有望であると考えられる。

D. 結論

- 1) pGL7.3 細胞株を使用したレポーター遺伝子アッセイの定量下限は 0.49 pg 2,3,7,8-TCDD/mL (0.047 pg 2,3,7,8-TCDD /assay)であった。
- 2) 本アッセイは毒性の強いダイオキシン類

異性体を選択的に応答するため、毒性等量のスクリーニング法に適した特性を有していた。

- 3) 前処理した魚試料液に対する回収率は、スクリーニング法としては許容できる範囲内であった。従って本アッセイは魚中のダイオキシン類に対するスクリーニング法として有望であると考えられる。

E. 参考文献

- 1) 平成 13 年度厚生科学研究費補助金研究報告書「ダイオキシンの汚染実態把握及び摂取低減化に関する研究」(分担報告書 1-2 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)
- 2) Hoogenboom L, Goeyens L, Carbonnelle S, Van Loco J, Beernaert H, Baeyens W, Traag W, Bovee T, Jacobs G, Schoeters G. The CALUX bioassay: Current status of its application to screening food and feed. Trends Analytical Chem., 25 (2006) 410-420.
- 3) 平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金研究報告書「ダイオキシンの汚染実態把握及び摂取低減化に関する研究」(分担報告書 3-1 ELISA による市販魚中のコプラナー PCBs 及び総 PCBs のスクリーニング法の開発)
- 4) 平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金研究報告書「ダイオキシン類による食品汚染実態の把握に関する研究」(分担報告書 3-1 PCB ELISA と Ah イムノアッセイによる市販魚中のダイオキシン類のスクリーニング法)
- 5) 平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金研究報告書「ダイオキシン類による食品汚染実態の把握に関する研究」(分担報告書 3-1 表面プラズモン共鳴センサーを用いた市販魚中のダイオキシン類スクリーニング法)
- 6) Denison MS, Zhao B, Baston DS, Clark GC, Murata H, Han D. Recombinant cell bioassay systems for the detection and relative quantitation of halogenated dioxins and related

chemicals. Talanta, 63 (2004) 1123-1133.

7) 平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金研究報告書「ダイオキシン類等の有害化学物質による食品汚染実態の把握に関する研究」(分担報告書 2-1 ダイオキシン類に対する高感度レポータージーンアッセイの開発)

8) 平成 20 年度厚生労働科学研究費補助金研究報告書「ダイオキシン類等の有害化学物質による食品汚染実態の把握に関する研究」(分担報告書 2-1 ダイオキシン類に対する高感度レポータージーンアッセイの開発)

F.研究業績

1.論文発表

1) Tsutsumi, T., Ishizuka, N., Denison, MS., Watanabe, T., Matsuda, R. A new reporter gene assay for dioxins using green fluorescent protein: increased responsiveness using amplification of the dioxins responsive element, Organohalogen Compounds 2009: 71: 1349-1352.

2.学会発表

1) 堤 智昭、石塚菜穂子、渡邊敬浩、松田りえ子:緑色蛍光タンパク質を用いたダイオキシン類に対する新規レポータージーンアッセイ. 第 18 回環境化学討論会(2009.6).

表 1 2,3,7,8-TCDD 標準溶液の繰返し測定結果

2,3,7,8-TCDD (pg/mL)	2,3,7,8-TCDD (n=5)		
	平均±SD (pg/mL)	CV (%)	理論濃度からの 乖離 (%)
0.12	—	—	—
0.24	0.30 ± 0.04	13.5	22.29
0.49	0.48 ± 0.03	6.0	-2.59
0.98	0.94 ± 0.03	2.7	-3.31
1.95	1.94 ± 0.05	2.6	-0.57
3.91	3.99 ± 0.03	0.8	2.04
7.81	7.72 ± 0.10	1.4	-1.12
15.6	15.62 ± 0.51	3.3	-0.01
31.3	32.24 ± 1.00	3.1	3.17

表 2 高感度 CALUX の各異性体に対する反応性

	応答性 ¹⁾	WHO TEF 2005
2,3,7,8-TCDD	1	1
1,2,3,7,8-PeCDD	0.72	1
OCDD	0.0021	0.0003
2,3,7,8-TCDF	0.22	0.1
OCDF	0.0019	0.0003
#118	0.000026	0.00003
#126	0.073	0.1

1) EC50を与える濃度を比較した応答性

表 3 前処理した魚試験液に対する添加回収試験結果¹⁾

試料液	測定分画	添加濃度 pg/mL ²⁾	回収率(%), <i>n</i> =3		
			平均	最小	最大
マグロ	PCDD/Fs 分画	1.1	79	67	88
		4.2	80	68	87
	Co-PCBs分画	1.3	95	89	100
		4.1	92	90	94
ブリ	PCDD/Fs 分画	1.0	88	80	92
		3.9	75	69	79
	Co-PCBs分画	1.2	84	79	91
		3.9	89	80	100

1) マグロ及びブリより得られた前処理済の試験溶液に、PCDD/Fs混合物およびCo-PCB(#126)を既知量添加後、本アッセイにより測定した。

2) 本アッセイにより得られた2,3,7,8-TCDD換算濃度

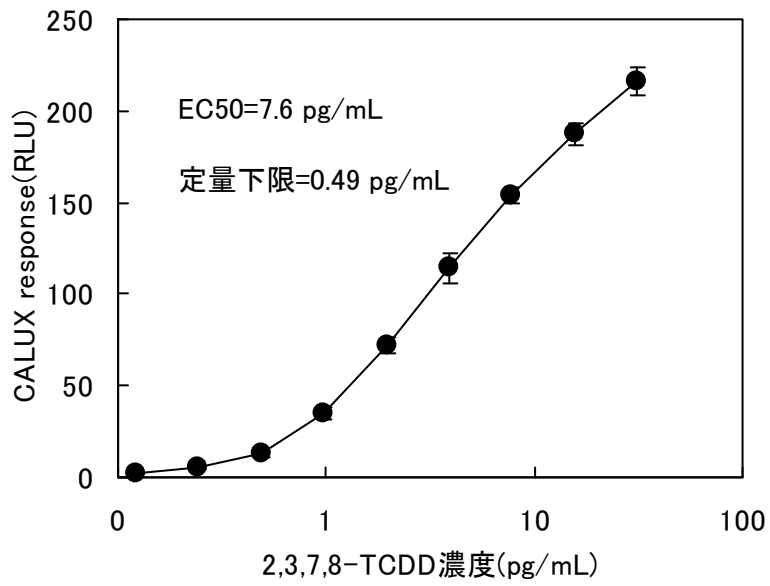


図 1 2,3,7,8-TCDD 標準曲線

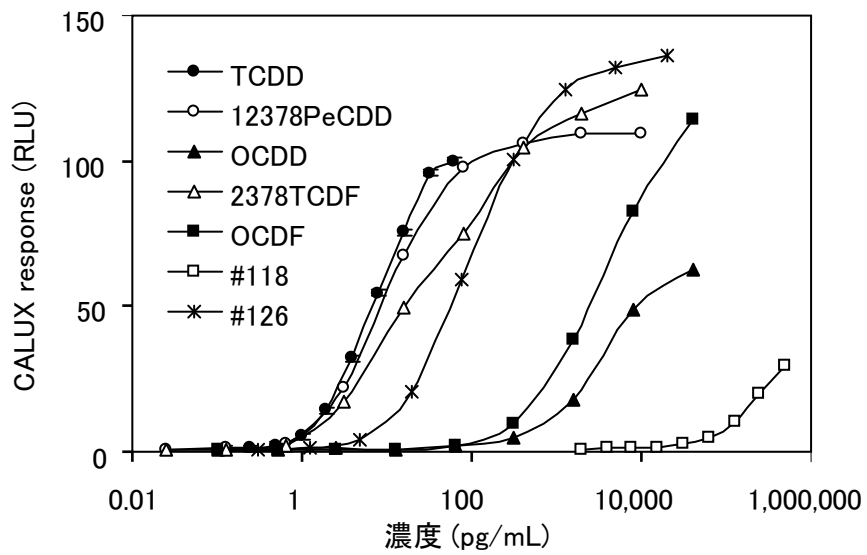


図 2 種々のダイオキシン類による標準曲線