

生物検定法によるダイオキシン類簡易測定法の概要

1. 試料の採取

試料の採取方法は、基本的に現行公定法(高分解能 GC/MS 法)と同じである。

2. 前処理方法

(1) 抽出方法

抽出は、ダイオキシン類を含む有機物を試料から分離・回収する操作である。

生物検定法における抽出方法は、基本的に現行公定法と同じである。

(2) クリーンアップ方法

クリーンアップは、多様な有機物成分の中から、妨害物質を除去し、ダイオキシン類を選択的に回収する操作である。

生物検定法におけるクリーンアップ方法も、基本的に現行公定法と同じであるが、各測定法の特性に応じ、現行公定法に比べ、簡略化されている場合が多い。

代表的なクリーンアップ方法は、硫酸シリカゲルカラムで大部分の試料のマトリックス成分(鎖状炭化水素類や脂肪等の試料中に高濃度で存在する有機物)の分解除去及び極性をもった化合物や農薬等の除去を行ったのち、活性炭カラムで、ダイオキシン類等の選択的な吸着及び溶出を行う方法である。

また、現行公定法では、多層シリカゲルカラム処理を行ったあと、ダイオキシン/フラン測定用とコプラナー PCB 測定用に分けて更なるカラムによる処理を行うが、生物検定法の場合は、後段のカラム処理の必要がないため、更に簡略化される。

クリーンアップにより得られた回収液は、通常、生物検定法に用いる培地に溶解し、細胞や生体分子の働きを阻害しない DMSO(ジメチルスルホキシド)などの溶媒に置き換えて(転溶)、測定に供する。

なお、生物検定法においては、内標準物質と試料中のダイオキシン類の区別ができないため、内標準物質の試料への添加は行わない。しかし、別途抽出からクリーンアップを通じて良好な回収率が得られているか確認する必要がある。

3. 測定方法

主な測定方法としては、生きた細胞を用いる方法と抗体等の試薬からなるキットを用いる方法とがある。

いずれの方法も、ダイオキシン類の毒性等量に相当する値を一度に測定することができるため、現行公定法に比べ、測定の手間が少なく、データ解析も短時間ですむ。また、多くの場合、96穴のプレートを用いて測定を行うため、一度に数多くの試料の測定を行うことが可能である。

細胞を用いる方法としては、遺伝子組み換え細胞を用いるレポータージーンアッセイ法がある。この方法で用いる細胞は、ダイオキシン類が存在すると細胞内でホタルの発光酵素であるルシフェラーゼ等を発現させるレポータージーンを遺伝子組み換えにより導入した細胞である。試料を添加した細胞を培養して反応させる必要があるため、通常、測定に1日程度かかる。

一方、キットを用いる方法としては、イムノアッセイ法や AhR アッセイ PCR 法がある。イムノアッセイ法は、抗原となる物質の違いにより、抗ダイオキシン類抗体を用いたイムノアッセイ法と抗 Ahレセプター複合体抗体を用いたイムノアッセイ法に分けられる。いずれの方法も細胞を培養する必要がないため、通常、1回あ

たり数時間程度で測定が終わる。

4. 分析時間及び費用

「ダイオキシン類簡易測定法検討会」で検討した技術における抽出からデータ整理までの分析時間は、細胞を用いる方法で、約3～5日程度であり、キットを用いる方法で約1～3日程度であった。

また、分析費用は、細胞を用いる方法で、1検体あたり3.5～6.5万円、キットを用いる方法で1検体あたり、3.6～5万円であった。

図1 生物検定法によるダイオキシン類簡易測定技術のフローチャート

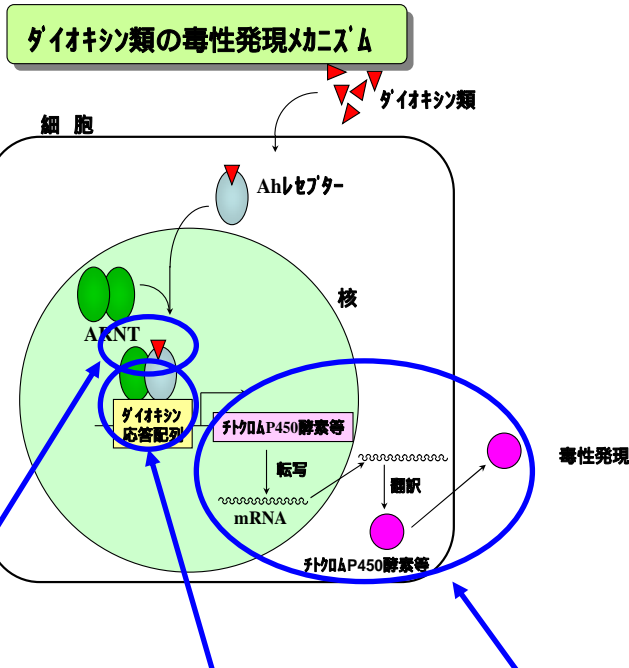


図2 主な生物検定法の概要

Ah レセプターバインディングアッセイ法

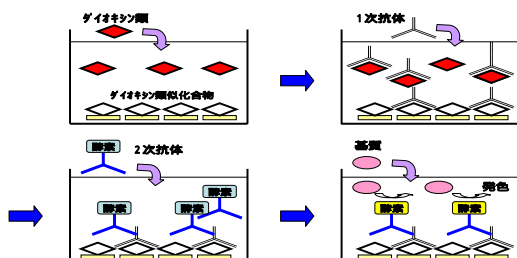
ダイオキシン類は、細胞の中に入ると、細胞内の Ahレセプターに結合して核の中に移動し、ダイオキシン類と結合した Ah レセプターは、更に ARNT と呼ばれる核運搬タンパク質と複合体を形成し、DNA 上のダイオキシン応答配列 (DRE) と呼ばれる部位に結合して薬物代謝酵素であるチトクロム P450 酵素 (CYP1A 1)などを誘導し、毒性を発現する。

Ah レセプターバインディングアッセイ法は、このダイオキシン類が生体内で毒性を発現するメカニズムを活用して、ダイオキシン類の量を測定する方法。



抗 Ah レセプター複合体抗体を用いたイムノアッセイ法	Ahレセプターアッセイ PCR 法	レポーター遺伝子アッセイ法
<p>ダイオキシン類、Ahレセプター、及びARNTからなる複合体に対して特異的に反応する抗体による抗原抗体反応を利用して、ダイオキシン類の量を測定する方法。</p>	<p>ダイオキシン類、Ahレセプター、及びARNTからなる複合体と結合したダイオキシン応答配列を含んだ DNA 断片の量をリアルタイムPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)法で定量することにより、ダイオキシン類の量を測定する方法。</p>	<p>ホタル等の発光酵素であるルシフェラーゼを発現させるレポーター遺伝子を導入した組換え細胞を用いて、試料中のダイオキシン類に反応した遺伝子により生成されるルシフェラーゼの活性(発光量)を測定することによりダイオキシン類の量を測定する方法。</p>

抗ダイオキシン類抗体を用いたイムノアッセイ法



ダイオキシン類に特異的に反応する抗体による抗原抗体反応を利用して、試料中のダイオキシン類の量を標識物質の反応により定量する方法。