

CALUX バイオアッセイによる市販魚中ダイオキシン類のスクリーニング法の開発

堤 智昭¹、天倉 吉章¹、中村 昌文²、藤野 潤子²、北川 宏子²、

D.J.Brown³、G.C.Clark³、佐々木久美子¹、豊田 正武¹

¹国立医薬品食品衛生研究所・食品部、²株式会社 日吉、³Xenobiotic Detection Systems Inc.

【目的】ダイオキシン類の摂取は、そのほとんどが食事経由であると考えられている。わが国では特に魚介類由来の摂取量が多く、市販魚中のダイオキシン類濃度を把握することは重要な課題となっている。従来、ダイオキシン類の測定には高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計 (HRGC/HRMS) が用いられてきたが、煩雑な前処理作業を伴い、分析費用も高価であることから、より簡便かつ安価な分析法の開発が望まれてきた。近年開発された CALUX アッセイは、ルシフェラーゼ遺伝子を導入した培養細胞を利用し、ダイオキシン類と芳香族炭化水素レセプター (AhR) との結合を、ルシフェラーゼ活性により検出する簡易測定法である。そこで、我々は CALUX アッセイによる市販魚中のダイオキシン類分析を試みたので報告する。

【方法】魚検体の前処理 ホモジナイズした魚試料 (10g) を採取し、アセトンを加え 2 分間振とうした。その後、ジクロロメタン/ヘキサン (1:2) を加え、振とう抽出 (2 分×3 回) を行った。抽出液はヘキサン置換後、硫酸シリカゲルカラム等で精製し、PCDD/Fs 類と dioxin-like PCBs 類に分画した。各分画溶液は DMSO 置換後、細胞培養培地 (牛胎児血清を含む RPMI1640) を加え最終検液とし CALUX アッセイに供した。

CALUX アッセイ 最終検液及び検量液 (2,3,7,8-TCDD) を、96 穴培養プレートで生育した細胞 (マウス肝癌細胞 H1L1) に加えた。20~24 時間培養後、ダイオキシン類により誘導されたルシフェラーゼ活性をルミノメーターにより測定した。魚試料中のダイオキシン類濃度は、得られた活性を検量線と比較し、2,3,7,8-TCDD に対する毒性等量 (TEQ) 濃度として表した。

【結果・考察】本検量線における定量下限値は 1.0pg/ml (0.20pg/assay) で、定量範囲は 1.0~15pg/ml であった。また、定量範囲において実試料における添加回収実験を行った結果、PCDD/Fs 類及び dioxin-like PCBs 類について許容範囲内の回収率 (60~120%) が得られ、本法は実試料に対して応用可能なことが示された。実試料 10g を使用した場合、試料中の定量下限値は 0.16pgTEQ/g に相当し、既に報告されているバイオアッセイ及びイムノアッセイと比較すると高感度であった。また、本法の種々のダイオキシン類に対する交差反応性は WHO の毒性等価係数 (TEF) と良く対応することが既に明らかになっており、TEQ 濃度を把握する方法として優れた特徴を有していた。そこで、市販魚試料 ($n=22$) を使用し、従来法 (HRGC/HRMS) とダイオキシン類測定の比較試験を行った。両者の相関係数は PCDD/Fs 類で 0.89、dioxin-like PCBs 類で 0.91 と良好であった。しかし、本法で得られた TEQ 濃度は従来法と比較すると、PCDD/Fs 類で数倍高い値、dioxin-like PCBs 類でやや低い値を示すことが多かった。PCDD/Fs 類では、TEF を有するダイオキシン類以外に AhR に結合する化合物が存在するため、本法では高値になっていると考えられる。一方、dioxin-like PCBs 類では本法の dioxin-like PCBs 類に対する交差反応性が若干弱いため、低値になっているものと考えられる。以上の結果から、CALUX アッセイは市販魚中のダイオキシン類濃度を把握するスクリーニング法として有用であることが示された。

Application and validation of CALUX bioassay for the screening of PCDD/Fs and dioxin-like PCBs in retailed fishes

Tomoaki Tsutsumi¹, Yoshiaki Amakura¹, Masafumi Nakamura², Junko Fujino², Hiroko Kitagawa², David J. Brown³, George C. Clark³, Kumiko Sasaki¹, Masatake Toyoda¹

¹National Institute of Health Sciences, ²Hiyoshi Corporation, ³Xenobiotic Detection Systems Inc.

A CALUX assay was examined for its application for the screening of dioxins in retailed fishes. The sample (10g) was prepared for the assay by shaking extraction followed by a proprietary cleaned up method. The limit of quantification of the assay was 1.0 pg/ml of 2,3,7,8-TCDD in the standard curve, corresponding to 0.16 pgTEQ/g in the sample. Recovery tests in which dioxins were added to fishes resulted in acceptable recoveries (60-120%), therefore the assay performed well in the analysis of dioxins in fishes. Moreover, the cross-reactivity of the assay against dioxins corresponded well with TFE values set by WHO as reported previously. This characteristic of the assay was suitable for the screening of TEQ levels in the sample. Comparative study with HRGC/HRMS showed that CALUX assay gives reliable correlations with HRGC/HRMS for analysis of PCDD/Fs ($r=0.89$) and dioxin-like PCBs ($r=0.91$) in retailed fishes ($n=22$). These data clearly show that CALUX assay will be a useful screening method for dioxins in retailed fishes.