

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

(3) 食品中ダイオキシン類分析の迅速化・信頼性向上に関する研究

(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

分担研究者 堤 智昭 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

市販のバイオアッセイキットである PCB ELISA ((株) エンバイオテック・ラボラトリーズ製) と Ah イムノアッセイ (パラセルシアン社製) を組み合わせた、市販魚中のダイオキシン類のスクリーニング法を開発した。魚試料を前処理分画後、モノオルト PCBs 分画を PCB ELISA により、ノンオルト PCBs 及び PCDD/Fs 分画を Ah イムノアッセイにより測定した。各分画における添加回収試験結果は良好 (90.4~114.7%) であり、本法により市販魚中のダイオキシン類が正確に定量できることが示唆された。また、同一の魚試料を用いた繰り返し測定試験の変動係数も許容範囲内の値であった (< 30%)。20 検体の魚試料に対して本法と従来法 (HRGC/HRMS 分析) の比較試験を行ったところ、両分画で従来法の毒性等量濃度に対し良好な相関係数 ($r > 0.97$) が得られた。本法は従来法と比較し、数分の一の時間及び費用で市販魚中のダイオキシン類濃度の把握が可能であり、スクリーニング法として有用であると考えられる。

研究協力者

(株) 日新環境調査センター

芦枝和典

第一ファインケミカル (株)

坂田一登、谷岡洋平

(株) エンバイオテック・ラボラトリーズ

奥山 亮

(株) クボタ

小林康男

国立医薬品食品衛生研究所・食品部

佐々木久美子、天倉吉章

培養細胞を用いたレポータージーンアッセイが早くから行われている^{1, 2)}。しかし、これらのレポータージーンアッセイを導入するにはライセンス契約が必要である場合があり、さらに細胞培養施設も必要であることから、汎用性は必ずしも高くない。近年、ダイオキシン類に対するモノクローナル抗体や、芳香族炭化水素 (Ah) レセプターを利用したバイオアッセイキットが市販されており、簡単に入手することが可能になった。そこで本研究では、市販のバイオアッセイキットである PCB ELISA と Ah イムノアッセイを組み合わせた、ダイオキシン類のスクリーニング法を検討した。

本研究で使用したバイオアッセイキットの特性を、表 1 に示した。魚試料を前処理分画後、モノオルト分画を PCB ELISA により、ノンオルト PCBs 及び PCDD/Fs 分画を Ah

A. 研究目的

我が国では、魚を介したダイオキシン類の摂取量が多いため、市販魚における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。魚などの食品を対象にしたスクリーニング法としては、

イムノアッセイにより測定するスクリーニング法を検討した。なお、Ah イムノアッセイは Ah レセプターを介した毒性発現機構に基づきダイオキシン類を定量するため、モノオルト PCBs 分画の測定も当初は可能であると考えられた。しかし定量値が低く抑えられる結果が予備的な実験で得られたため、本研究ではモノオルト PCBs 分画の測定に PCB ELISA を適用した。

B. 研究方法

1. 試薬

溶媒は全てダイオキシン類分析用（関東化学（株））を使用した。シリカゲルは PCB 分析用（和光純薬工業（株））、10%硝酸シリカゲルはダイオキシン分析用（和光純薬工業（株））、22%及び 44%硫酸シリカゲルはダイオキシンクリーンアップ用（ジーエルサイエンス（株））、アルミナはダイオキシン分析用（ICN 社）を使用した。多層シリカゲルカラムはガラス製カラム（内径 15 mm、長さ 300 mm）に無水硫酸ナトリウム（2 g）、シリカゲル（0.9 g）、44%硫酸シリカゲル（4.5 g）、22%硫酸シリカゲル（6 g）、シリカゲル（0.9 g）、10%硝酸シリカゲル（3 g）、無水硫酸ナトリウム（6 g）を順次、充填し作製した。アルミナカラム及び硫酸シリカゲルカラムは既報³⁾に従い作製した。ダイオキシン類標準品は和光純薬工業（株）又は Wellington 社製を使用した。

2. 試料

魚試料は、東京都内のスーパーマーケットで購入したものを、ホモジナイザーで均一化し使用した。

3. 装置

ホモジナイザーは（株）日本精機製作所製マルチブレンダーミルを用いた。また、マイクロプレート分光光度計は Wallac 社

製 1420victor2 及び和光純薬工業（株）製スペクトラクラシックを、高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計（HRGC/HRMS）は日本電子製（JMS-700）を使用した。

4. 前処理

均一化した試料（20 g）を採取し、2 mol/L 水酸化カリウム水溶液（100 ml）を加え、室温で一晩放置（約 16 時間）しアルカリ分解処理を行った。アルカリ分解液はメタノール（150 ml）を加えた後、ヘキサン（100 ml）で振とう抽出（10 分×3 回）を行った。抽出液は 2%（w/v）塩化ナトリウム水溶液（150 ml）で 2 回洗浄後、濃硫酸を加え硫酸処理を行った。硫酸層の着色が薄くなるまで数回繰り返し洗浄した後、2%塩化ナトリウム水溶液（50 ml）で 2 回洗浄し、さらにヘキサン洗浄水（50 ml）で 1 回洗浄した。その後、多層シリカゲルカラムに負荷し、ヘキサン（200 ml）により溶出した。溶出液は、さらにアルミナカラムに添加し、ヘキサン（150 ml）で洗浄後、2%（v/v）ジクロロメタン/ヘキサン（150 ml）により第 1 分画（モノオルト PCBs）を溶出、60%（v/v）ジクロロメタン/ヘキサン（200 ml）により第 2 分画（ノンオルト PCBs 及び PCDD/Fs）を溶出した。第 1 分画は濃縮後、DMSO（100 μ l）に置換し ELISA に供した。第 2 分画は、さらに硫酸シリカゲルカラムに添加し、ヘキサン（100 ml）により溶出した。溶出液は濃縮後、DMSO（20 μ l）に置換し、Ah イムノアッセイに供した。図 1 には本前処理法のフローチャートを示した。本前処理法におけるダイオキシン類異性体の回収率を HRGC/HRMS 分析で測定したところ、80%以上であった（データ未掲載）。

5. PCB ELISA

PCB ELISA キット（（株）エンバイオテック・ラボラトリーズ製）を購入し、添付の

マニュアルに従い測定した。

6. Ah イムノアッセイ

Ah イムノアッセイキット（パラセルシアン社製）を購入し、添付のマニュアルに従い測定した。

7. HRGC/HRMS 分析

既報²⁾に従い、ダイオキシン類を定量した。

C. 研究結果及び考察

1. 魚試料における定量下限値の設定

魚試料における定量下限値を設定するため、前処理操作における操作ブランクの有無を検討した。ブランク試料（魚試料を含まない試料）の前処理を異なった日に行い、得られた最終検液を PCB ELISA 及び Ah イムノアッセイにより測定した（表 2）。PCB ELISA では操作ブランクは認められず、前処理操作後の定量下限値は 125 pg/well となった。一方、Ah イムノアッセイでは若干の操作ブランク値が認められた。そのため、操作ブランク値の標準偏差の 8 倍に相当する 2.0 pg-DEQ/well を、前処理操作後の定量下限値とした。20 g の魚試料を使用した場合の試料における定量下限値は、PCB ELISA で 50 pg PCB/g、Ah イムノアッセイで 1.0 pg DEQ/g に相当した。

2. 希釈直線性試験

前処理操作後のマトリックスの影響を検討するため、希釈直線性試験を行った。ダイオキシン類汚染が認められる魚試料の前処理済み溶液を DMSO で段階希釈し、希釈測定時の定量値を初期濃度と比較した（図 2）。その結果、PCB ELISA では希釈操作による定量値の大きな変化は認められず、マトリックスの影響は小さいと考えられた。一方、

Ah イムノアッセイでは希釈操作により得られる定量値が 2 倍程度増加する場合があります、マトリックスの影響が疑われた。従って、Ah イムノアッセイにおいては、希釈系列をとり測定し、最大の定量値を試料の最終濃度とした。

3. 添加回収試験

前処理済みの抽出液に対し添加回収試験を行い、本法が前処理後のダイオキシン類を正確に定量できるか検討した。最終検液に既知量の PCB118 あるいは 2, 3, 7, 8-TCDD を添加し、PCB ELISA あるいは Ah イムノアッセイにより測定した（表 3）。その結果、PCB ELISA では 92.0~114.7%、Ah イムノアッセイでは 90.4~99.4% の良好な回収率が得られた。従って、本法は前処理後の魚試料中のダイオキシン類を正確に定量できることが示唆された。

4. 再現性試験

本法のダイオキシン類測定の再現性について検討するため、同一の魚試料の分析を複数回行った。前処理操作から測定までの一連の操作を異なった日に行った結果、PCB ELISA では 0.5~4.9% の変動係数、Ah イムノアッセイでは 19.9~23.4% の変動係数が得られた（図 3）。変動係数は許容範囲内の値であり、本法の繰り返し測定の精度は良好であった。

5. HRGC/HRMS 分析との比較試験

本法の測定値と従来法（HRGC/HRMS 分析）のダイオキシン毒性等量値を比較するため、市販魚試料（20 試料）について比較試験を行った。PCB ELISA の測定濃度と、従来法のモノオルト PCBs 毒性等量濃度の比較を行った結果、良好な相関係数（ $r = 0.99$ ）が得られた（図 4(a)）。なお、極端に高濃度であった 2 試料を除いた場合も相関係数

は良好であった ($r = 0.98$)。また、Ah イムノアッセイの測定濃度と、ノンオルト PCBs 及び PCDD/Fs の毒性等量濃度を比較した結果も、良好な相関係数 ($r = 0.97$) が得られた (図 4b))。従って、本法は市販魚中のダイオキシン類毒性等量濃度のスクリーニング法として有用であると考えられる。

魚試料から得られた前処理済み検液には種々の化合物が含まれる。そこで、比較試験検体における PCB ELISA の特異性について考察するため、ELISA の測定濃度と HRGC/HRMS の PCB 118 濃度の比較を行った (図 5)。直線回帰を行った結果、傾きが 1 に近い直線が得られ、相関係数も良好であった ($r = 0.98$)。従って、ELISA の定量値は概ね PCB 118 に対する反応性を反映していると考えられた。回帰直線の傾きが 1 より若干大きくなる理由としては、本 ELISA が PCB 118 以外の PCBs 異性体に交差反応性を示すことが考えられる。本 ELISA は PCB 31、PCB 66、PCB 70、PCB 77 及び PCB 156 に対して若干の交差反応性 (5-20% of PCB 118) を示す⁴⁾。本研究では Co-PCBs に分類されない PCB 31、PCB 66 及び PCB 70 の HRGC/HRMS 分析は行っていないため、これらの異性体の試料中濃度は不明である。しかし、仮にこれらの異性体が最終検液に多量に含まれた場合、ELISA の定量値に加算されることになる。

また、比較試験検体における Ah イムノアッセイの特異性についても考察した。各比較検体について、HRGC/HRMS 分析で得られたノンオルト PCBs 及び PCDD/Fs 異性体 (WHO-TEF を有する 21 異性体) の濃度に、対応する Ah イムノアッセイの公差反応値⁵⁾ を掛けて合計したダイオキシン類予測値を算出した。これらの予測値を Ah イムノアッセイの定量値と比較した結果 (図 6)、傾きがおおよそ 1 の回帰直線が得られ、相関係数も良好であった ($r = 0.95$)。従って、

Ah イムノアッセイの定量値は概ね WHO-TEF が定められているダイオキシン類異性体の反応性を反映していると考えられた。回帰直線の傾きが 1 より若干大きくなる理由としては、Ah レセプター結合能を有するダイオキシン様化合物の共存が示唆される。このような化合物として、塩素・臭素化ダイオキシン類や臭素化ダイオキシン類などが考えられる⁶⁾。

6. スクリーニング法としての利用

比較試験の結果を使用して、毒性等量濃度に対するスクリーニング法としての本法の利用について検討した。図 7 は比較試験で得られた毒性等量濃度との相関関係を示しており、図中の点線は回帰直線の 95% 予測区間を示している。例えば、モノオルト PCBs 毒性等量濃度が 0.5 pg-TEQ/g の検体は、PCB ELISA で 2,300~3,800 pg/g に相当することが予測される (図 7(a))。また、ノンオルト PCBs 及び PCDD/Fs 毒性等量濃度が 3 pg-TEQ/g の検体は Ah イムノアッセイで 6.7~13 pg-DEQ/g に相当することが予測される (図 7(b))。従って、これらの予測範囲の下限値をバイオアッセイにおけるカットオフ値に設定することで、数 pg-TEQ/g 以上に汚染された魚試料のスクリーニングに利用することが可能であると考えられる。今後はより多数の比較検体の測定を行い、本法の実用性を高めていく必要がある。

D. 結論

- 1) PCB ELISA と Ah イムノアッセイの組み合わせにより、市販魚中のダイオキシン類を良好に測定することが可能であった。
- 2) 従来法 (HRGC/HRMS 分析) と良い相関が得られたことから、魚中のダイオキシン類の毒性等量濃度を推測することが可能であると考えられる。

3) 従来法と比較すると、安価で迅速に定量結果が得られることから、スクリーニング法として有用である。

E. 参考文献

1) Besselink H, Leonards P, Felzel E, Brouwer B. Analysis of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDD), dibenzofurans (PCDF) and biphenyls (PCB) in fish using DR-CALUX® and GC/MS: A comparison. *Organohalogen Compounds*, 58 (2002) 413-415.

2) 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)

3) 平成 14 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 食品中のダイオキシン類測定迅速法の開発 (Ah イムノアッセイ))

4) 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)

5) Kobayashi Y, Lundquist A, Uechi T, Ashieda K, Sasaki K, Hughes B, Kaise T. Dioxin screening in environmental samples using the Ah-immunoassay. *Organohalogen Compounds*, 58 (2002) 337-340.

6) Behnisch PA, Hosoe K, Sakai S. Brominated dioxin-like compounds: in vitro assessment in comparison to classical dioxin-like compounds and other polyaromatic compounds.

Environmental International, 29 (2003) 861-877.

F. 研究業績

1. 論文発表

1) Tsutsumi T, Amakura Y, Ashieda K, Okuyama A, Tanioka Y, Sakata K, Kobayashi Y, Sasaki K, Maitani T. Screening for dioxins in retail fish using a combination of a PCB ELISA and an aryl hydrocarbon receptor immunoassay (Ah-immunoassay). *Organohalogen Compounds*, 67 (2005) 42-45.

2. 学会発表

1) 堤 智昭*1、天倉吉章*1、芦枝和典*2、奥山 亮*3、坂田一登*4、谷岡洋平*4、小林康男*5、佐々木久美子*1、米谷民雄*1: Ah イムノアッセイと PCB ELISA による市販魚中ダイオキシン類のスクリーニング法. 第 14 回環境化学討論会(2005.6)

*1 国立医薬品食品衛生研究所

*2 (株)日新環境調査センター

*3 (株)エンバイオテック・ラボラトリーズ

*4 第一ファインケミカル(株)

*5 (株)クボタ

表1 PCB ELSIAとAhイムノアッセイの性能特性

	PCB ELISA	Ahイムノアッセイ
測定原理	モノクローナル抗体を使用した競合ELISA	芳香族炭化水素レセプターを介した毒性発現機構に基づくイムノアッセイ
特異性	PCB 118Iに高い反応性	ダイオキシン様化合物
定量範囲	125 - 3,100 pg/well for PCB 118	1 - 64 pg/well for 2,3,7,8-TCDD
処理検体数	40検体/プレート	16検体/プレート
測定時間	約1.5時間	約6時間

表2 魚試料における定量下限値の設定

	ブランクテスト (n = 4)	前処理後の 定量下限値	魚試料の 定量下限値 ²⁾
PCB ELISA	- ¹⁾	125 pg/well	50 pg/g
Ahイムノアッセイ	1.5 ± 0.25 pg-DEQ/well	2.0 pg-DEQ/well	1.0 pg-DEQ/g

1) 定量下限値 (125 pg/well) 以下

2) 20 gの魚試料を用いた場合

表3 前処理済みの魚抽出液に対する添加回収試験

(a) PCB ELISA (モノオルトPCBs分画)			(b) Ahイムノアッセイ (ノンオルトPCBs+PCDD/Fs分画)		
サンプル	添加PCB 118濃度 (pg/well)	添加回収率 (%)	サンプル	添加TCDD濃度 (pg/well)	添加回収率 (%)
スズキ	190	114.7	サケ・ブリ混合	10	90.4
	500	92.0			
	1,250	96.2	スズキ・ブリ混合	10	99.4
サバ・マグロ混合	190	101.7			
	500	103.6			
	1,250	93.3			

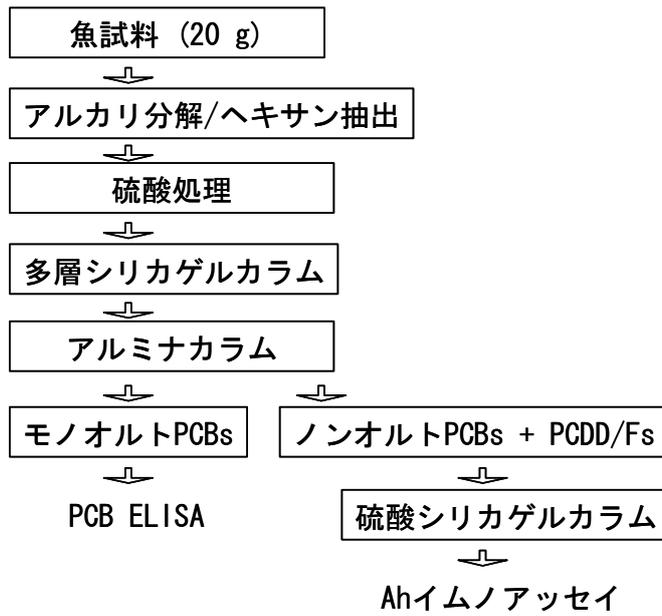


図1 前処理方法のフローチャート

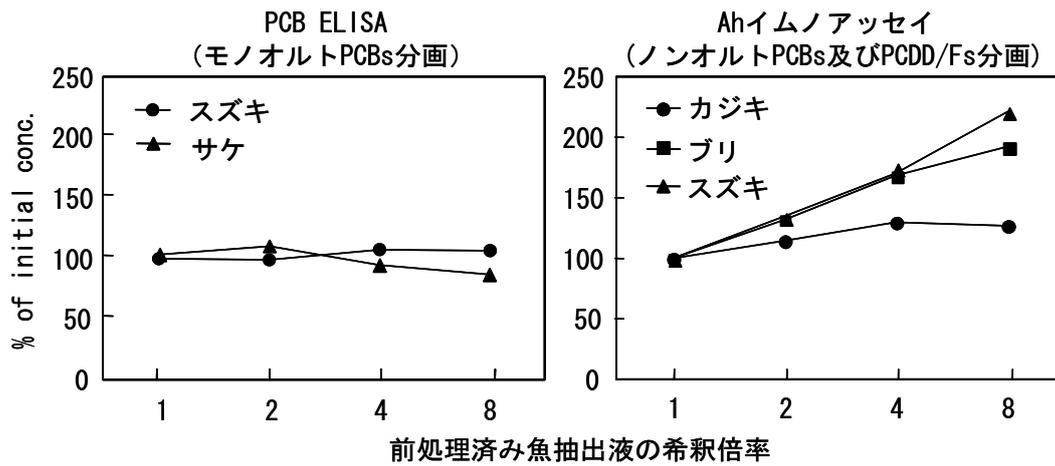


図2 希釈直線性試験

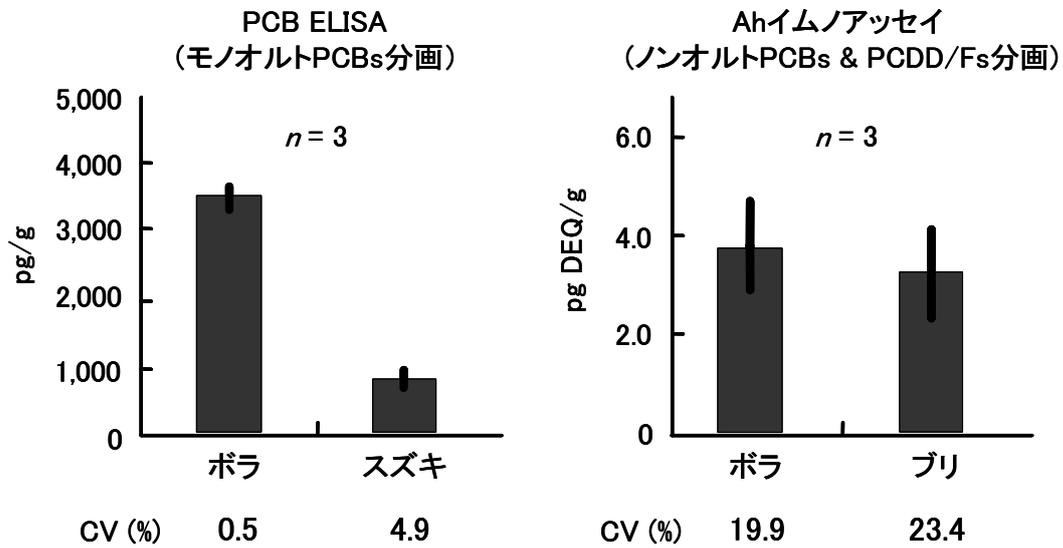


図3 魚試料の繰り返し測定

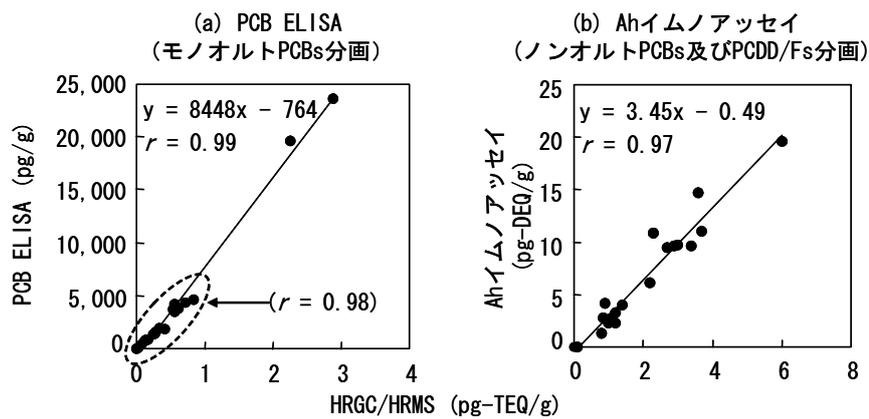


図4 HRGC/HRMSによる毒性等量濃度との比較 ($n = 20$)

市販魚(カジキ、サケ、サバ、スズキ、ブリ、マグロなど)を比較検体として測定した。

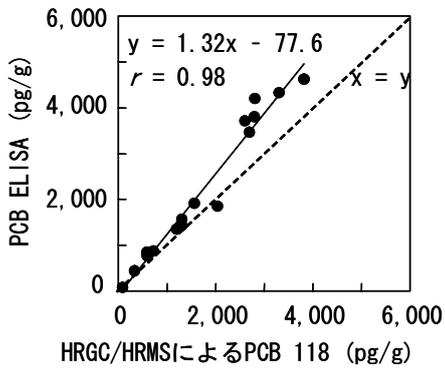


図5 ELISAとPCB 118濃度の比較

高濃度汚染試料(2試料)は除いた。

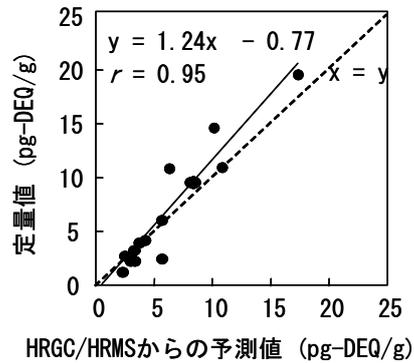


図6 Ah免疫アッセイにおける
定量値と予測値の比較

定量下限以下の試料(2試料)は除いた。

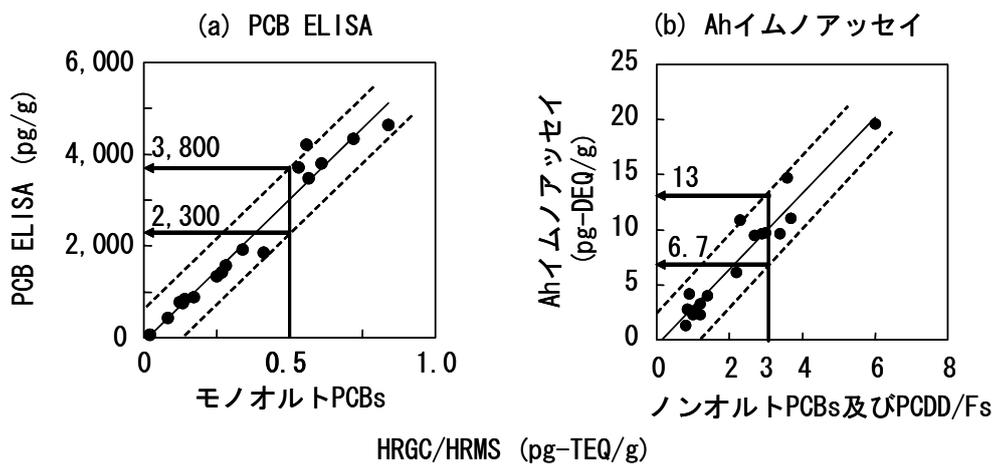


図7 比較試験結果を用いた毒性等量濃度の予測

グラフの点線は回帰直線の95%予測区間を示す。PCB ELISAでは高濃度の2試料、Ah免疫アッセイでは定量下限以下の2試料を除いた。

