

ダイオキシンレセプターを利用したバイオアッセイ系環境モニタリング等への応用

住友化学工業(株) 生物環境科学研究所
松 永 治 之
齋 藤 幸 一
大江田 憲 治

Bioassay Systems Using Dioxin Receptors: Applications for Eco-monitoring

Sumitomo Chemical Co., Ltd.
Environmental Health Science Laboratory
Haruyuki MATSUNAGA
Koichi SAITO
Kenji OEDA

At present, chemical analysis of dioxin-like compounds by high-resolution GC/MS is the standard method for determining TEQs of various samples. However, this analysis is laborious, time-consuming and rather expensive, and thus unsuited for large scale screening. To circumvent these problems, we have made attempts to develop a new reporter gene assay and developed stably transformed mammalian cell lines. We tried to apply the obtained cell lines for analyzing dioxin and its related compounds in various samples such as human breast milk, and exhaust fumes and ash from incinerators, concluding that the results obtained by the reporter gene assay have very good correlation to those by GC/MS analysis.

はじめに

近年、ダイオキシン類による環境汚染が大きな社会問題となっている。これに対し、ダイオキシン類対策特別措置法等の法律が制定され、ダイオキシン類の主要な発生源とされる焼却施設に対して排出基準が設定された。その結果、ダイオキシン類の排出量は1997年の7600g/年から2002年の635g/年へと約90%減少し、問題は沈静化に向かっているとされている。しかしその一方で、休止・廃止となった焼却施設の解体やそれらの跡地の利用にあたり、ダイオキシン類の濃度測定が法的に求められているほか、各種環境基準値の制定などによりダイオキシン類測定の需要はさらに高まっている。しかしながら現在の公定法として唯一認められている高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計(HRGC/HRMS)を用いる分析は、“高価である”、“煩雑である”、“長時間を要す”、という問題を有していることから、ダイオキシン類の迅速且つ簡便なアッセイ法の開発が望まれている。このような状況の中、

2002年に環境省からの通知として「ダイオキシン類対策特別措置法に基づく底質環境基準の施行について」および「底質の処理・処分等に関する指針」が出され、さらに本年には国土交通省から「港湾における底質ダイオキシン類対策技術指針」が出されるに至り、従来は自主検査あるいは一部の地方自治体での利用に留まっていた簡易測定法の使用が、限定的ではあるが認められるようになった。また今春、環境省から「生物検定法によるダイオキシン類の簡易測定技術の公募」が行われ、公定法化に向けた新たな取り組みが開始された。

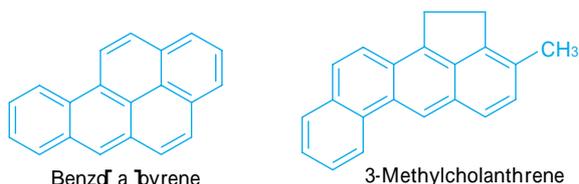
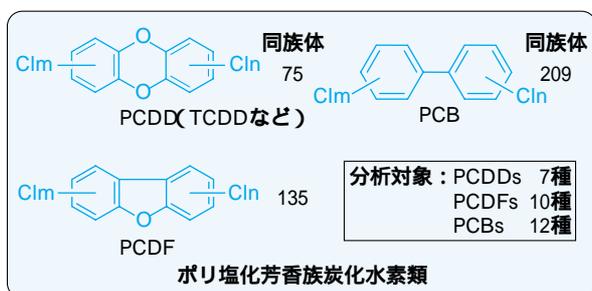
当所においては、これまで各種レセプターを利用した化学物質の毒性研究を進めてきており、その一環としてダイオキシン類の毒性発現機構に基づいたバイオアッセイの応用研究を行ってきた。このような背景から、上述した環境省の簡易測定系検討プロジェクトに応募することとし、現在、環境省指示の試験データの取得を行っている。本稿では我々が開発したダイオキシン類の毒性発現機構に基づいたバイオアッセイ系とその応用について紹介したい。

ダイオキシンについて

1. ダイオキシンとは

ダイオキシンはダイベンゾ-p-ダイオキシン骨格を有する化合物のうち、その骨格が塩素化された化合物の総称（ポリ塩化ダイベンゾ-para-ダイオキシン：PCDD）であり、塩素の置換数および位置により75種類と同族体（以降異性体も含む）が存在する。また、ダイオキシン類には、ダイベンゾフランポリ塩化誘導体（ポリ塩化ダイベンゾフラン：PCDF、135同族体）およびポリ塩化ビフェニール（PCB、209同族体）が含まれる（第1図）。

第1図 ダイオキシン様化合物の構造



2. ダイオキシン類の毒性¹⁾

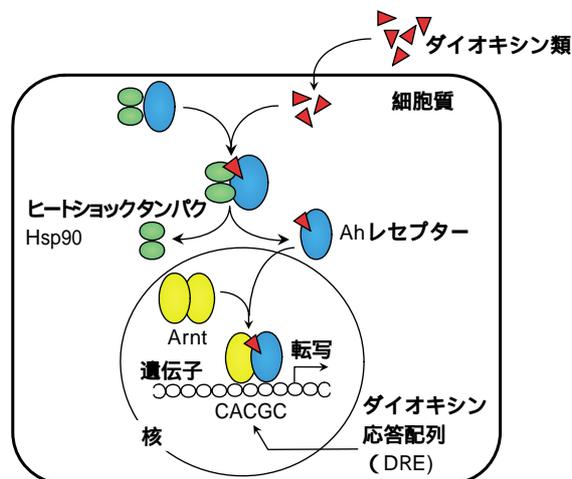
種々の毒性研究の結果、ダイオキシン同族体の毒性の強さは異なることが知られている。2,3,7,8位に塩素が置換した誘導体の毒性が比較的に強く、これらの中で2,3,7,8-TCDDが最も強い毒性を示し、多くの毒性研究が実施されている。ダイオキシンは生体に吸収されると、一般的に体内では分解されにくく、脂肪に蓄積しやすい。ダイオキシンは急性毒性に関して著しい種差を示し、最も感受性の高いモルモットの半数致死量（LD₅₀）はkg体重当り約1 μg、感受性の低いハムスターでは5mg/kg体重と、実に5000倍もの差がある。慢性的に投与すると多種の毒性が発現し、主なものは肝臓毒性および皮膚毒性（塩素ざ瘡、ポルフィリン症等）である。発癌性は、肝臓、肺、皮膚等に認められる。しかし、変異原性試験では2,3,7,8-TCDDは陰性であるので、2,3,7,8-TCDDは直接遺伝子に損傷を与えるものではなく、プロモーター作用により発癌するものと考えられる。また、有名な毒性としては、奇形を誘発することが挙げられ、マウスで口蓋裂、水腎症などが認められる。

しかし、2,3,7,8-TCDDの奇形誘発は種特異的である。サルとヒトにおいて、奇形を誘発する危険性を明確に示した報告は認められていない。免疫系への影響もよく知られており、低用量で胸腺萎縮が見られるほか、比較的高用量でリンパ系組織の欠失が生ずる。

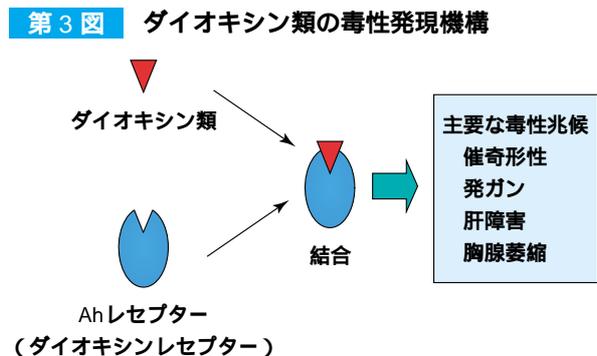
3. ダイオキシン類の毒性発現機構

ダイオキシン類は催奇形性、免疫毒性、発癌性など多岐に渡る毒性を惹起するが、その多くはアリルハイドロカーボンレセプター（Ahレセプター）を介することが明らかになってきた。Ahレセプターはもともと多環芳香族炭化水素化合物を動物に投与したときに薬物の分解・解毒に関連するある種の酸化酵素チトクロームP450（CYP1A1、1A2）が誘導される現象を担う主要因子と考えられていたが、1992年にAhレセプターの遺伝子が解明され、機能解明研究が進展した。Ahレセプターの作用は次のように説明されている。ダイオキシン類が細胞内に入り細胞質でAhレセプターに結合すると、レセプターは核内へと移行してArntと呼ばれる核内タンパク質とヘテロ二量体を形成し、遺伝子上のダイオキシン応答配列（DRE）と呼ばれる特定の部位に結合して、その下流の遺伝子の転写を活性化する（第2図）。Ahレセプターにより転写調節を受ける遺伝子は先に述べたチトクロームP450であるCYP1A1、1A2、1B1のほか、グルタチオンS-転移酵素（GST）、UDP-グルクロン酸転移酵素などの薬物代謝酵素群が代表的であるが、ダイオキシン類の示す毒性との関連は明確にはなっていない。Ahレセプターのダイオキシン類による毒性への関与は、Ahレセプター遺伝子破壊（Ahレセプターの機能破壊）マウスを用いた検討からも明らかになってきている。即ち、Ahレセプター遺伝子破壊マウスでは、ダイオキシンを投与しても正常マウスで認められる急性毒性、催奇形性および発癌性が全く認められなかった²⁻⁴⁾。

第2図 Ahレセプターの作用機構



これらの結果は、ダイオキシン類の毒性の多くはAhレセプターへの化学物質の結合が毒性発現の最初のステップであることを明示している（第3図）。



ダイオキシン類の測定法

1. 現行公定法

事業者に法律で義務付けられた現行のダイオキシン類の測定法は、例えば排ガスについては日本工業規格 JIS K0311 に定められており、HRGC/HRMS が用いられている。現在分析対象となっているダイオキシン類はダイオキシン (PCDD) 同族体のうちの7種、ダイベンゾフラン (PCDF) 10種およびコプラナーPCB類12種である。このうち最も強い毒性を示す2,3,7,8-TCDDの毒性強度を1として各同族体の相対的強さが毒性等価係数 (TEF: toxic equivalency factor) として定められている (第1表)。この係数は「試験管内毒性試験」と「動物を用いた毒性試験」の結果を総合勘案して決められている。この係数は一部見直しがされており、暫定的性格を有している。因みに現在用いられているのは1997年にWHOの会議で改定

第1表 WHO-TEFおよびLuc-TEF

	WHO-TEF	Luc-TEF	Luc-TEF/WHO-TEF
2,3,7,8-TCDD	1	1	1
1,2,3,7,8-PnCDD	1	0.563	0.56
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.1	0.106	1.06
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.1	0.085	0.85
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.1	0.084	0.84
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.01	0.041	4.13
2,3,7,8-TCDF	0.1	0.116	1.16
1,2,3,7,8-PnCDF	0.05	0.076	1.52
2,3,4,7,8-PnCDF	0.5	0.563	1.13
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.1	0.111	1.11
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.1	0.074	0.74
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.1	0.129	1.29
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.1	0.234	2.34
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.01	0.010	0.99

された係数である。ダイオキシン類の混合物の定量値は、各同族体の存在量と毒性等価係数を掛け合わせるにより求められ、これは毒性等量 (TEQ: toxic equivalents) と呼ばれている。例えばある混合物中のダイオキシン含量を求める際には、それぞれ同族体の含量を測定して、下記の計算によってTEQを求める。

$$TEQ = (\text{分析対象同族体量})_i \times (\text{毒性等価係数})_i$$

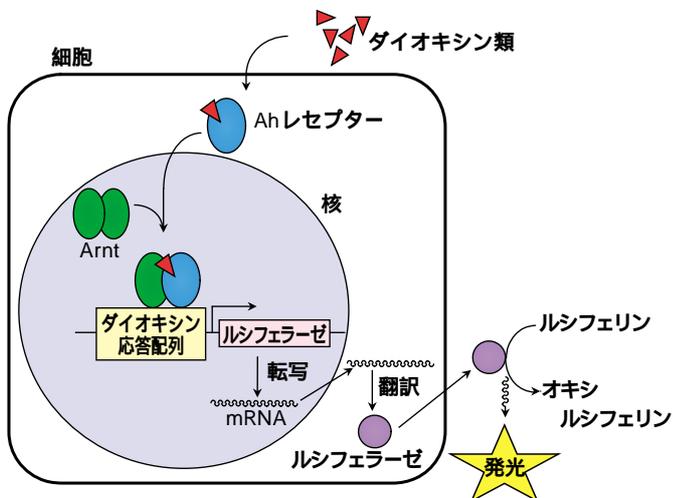
2. 簡易測定法

ダイオキシン類の公定法 (HRGC/HRMS) による分析は多大な時間を要することと高価であることから多数の検体を迅速に分析する目的には適していない。そのためHRGC/HRMS法の代替となる簡易な試験方法の開発が望まれ、各種方法が開発されて評価されつつある。簡易測定法を大別すると、安価な分析機器を用いた簡易GC/MS測定法と、バイオアッセイ法が挙げられる。バイオアッセイ法としては、毒性と密接に関連するAhレセプターをダイオキシン類の検出系として利用するいくつかの方法が検討されている。それらは酵素誘導法、レセプターバインディングアッセイ法、活性型Ahレセプター複合体認識抗体を用いたイムノアッセイ法、およびレポーター遺伝子アッセイ法に大別される。本稿では我々が検討してきたレポーター遺伝子アッセイ法について概説する。

(1) レポーター遺伝子アッセイ法

当初のバイオアッセイ法では、ダイオキシン類および多環芳香族炭化水素が薬物代謝酵素CYP1ファミリーを誘導する現象を利用し、肝由来培養細胞において誘導される酵素 (ethoxyresorufin O-deethylase, EROD) 活性を測定することによって検出する方法が用いられてきた。しかし、添加した化合物自身が誘導される酵素の基質でもある場合が多く、酵素反応が阻害されるといった問題もあった。CYP1Aなどの酵素遺伝子を外来のホタルルシフェラーゼ遺伝子のように哺乳動物には存在しない酵素に組換えれば、ERODのような阻害の問題は起きないと考えられる。即ち、DREの下流にレポーター遺伝子 (ルシフェラーゼ遺伝子) を連結したDNAを培養細胞内に導入し、遺伝子組換え細胞を作製する。本組換え細胞をダイオキシン類に曝露するとルシフェラーゼ遺伝子の転写が活性化され、ルシフェラーゼの触媒反応による発光量をルミノメーターによって測定することによりダイオキシン類の定量分析が行える (第4図)。1993年にPostlindらによってルシフェラーゼ遺伝子をCYP1A遺伝子プロモーターのDREを含む5' 隣接領域に結合したプラスミドDNAをヒト肝癌由来HepG2

第4図 Ahルシフェラーゼアッセイの概念図



細胞に導入した安定的形質転換細胞株が作製され、TCDD に対する応答が測定された⁵⁾。その後、ラット肝由来 H4 II E 細胞およびマウス肝由来 Hepa-1clc7 細胞にダイオキシン応答性のルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ安定形質転換細胞株が作製された^{6~7)}。

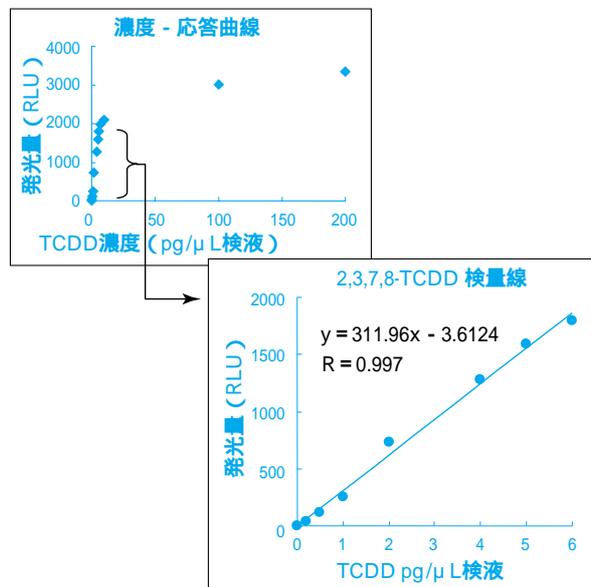
我々は、マウス肝由来 Hepa-1clc7 細胞に、ラット GST Ya サブユニット遺伝子の 5' 上流にある DRE を 5 個連結し、同 Ya サブユニット 5' 上流の最小プロモーター領域およびホタルルシフェラーゼ遺伝子を結合して組み込んだ安定形質転換細胞株を作製した。Hepa-1clc7 細胞は Ah レセプターおよび Arnt を内在しているので、ダイオキシン様の誘導化合物への曝露によってルシフェラーゼの発現が誘導される。さらに独自の取り組みとして、恒常的に発現するウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子をダイオキシン応答性ホタルルシフェラーゼ遺伝子と同時に導入、形質転換した細胞を取得した⁸⁾。本細胞を用いることにより、ダイオキシン類に対する応答をホタルルシフェラーゼの反応で測定し、細胞に対する毒性影響をウミシイタケルシフェラーゼの反応によって、同時に測定することが可能となった。即ち、内部標準を含有した精確な定量が可能になった訳である。

ダイオキシン類測定用安定形質転換細胞を用いたルシフェラーゼアッセイは従来の公定法に比べ短期間で測定が可能である(2~3日)。アッセイの操作は先ず一定数の細胞をマルチウェルプレートに播種し、一晚培養する。次に、培地中に測定化合物を混合し、細胞を化合物に曝露させる。適当な曝露時間経過後、培地を除き細胞を緩衝液で洗浄した後、細胞溶解剤を加え細胞を溶解する。得られた細胞溶解液に基質ルシフェリンを添加し、ルミノメーターで発光量を測定する。このような手順によって多検体の迅速測定が可能となった。

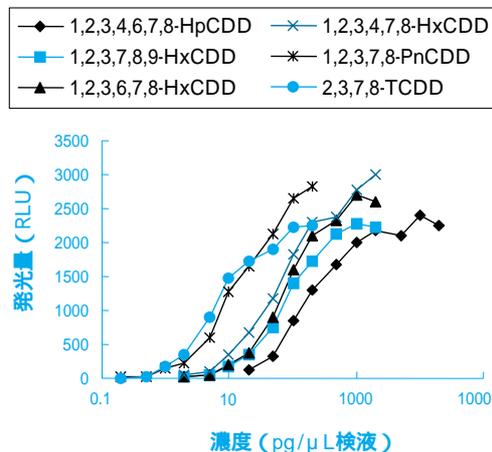
(2) レポーター遺伝子アッセイ法の応用

取得した安定形質転換細胞株(2H9-1G4)を用い、2,3,7,8-TCDD 標品に対する応答曲線を作成した。本曲線の低濃度領域には直線性を示す部分がある。この直線部分を検量線として用いることにより、未知試料の2,3,7,8-TCDD 等量が求められる(第5図)。第5図に示した例では1-6 pg/μL 検液の範囲で定量が可能であった。本アッセイはダイオキシン類の毒性に密接している Ah レセプターとダイオキシン様物質との相互作用を指標としているため、本アッセイ系では直接毒性等量を求められるという利点があるのに対し、HRGC/HRMS 測定で用いられる毒性等量(TEQ)とは、2,3,7,8-TCDD 量に換算した値である。次に、公定法で測定対象となっている PCDD/F 類の各同族体標品の濃度依存的な応答性を検討した(第6図)。各曲線からおよその EC₅₀ 値(最大応答強度

第5図 2, 3, 7, 8- TCDD の濃度 - 応答曲線および検量線



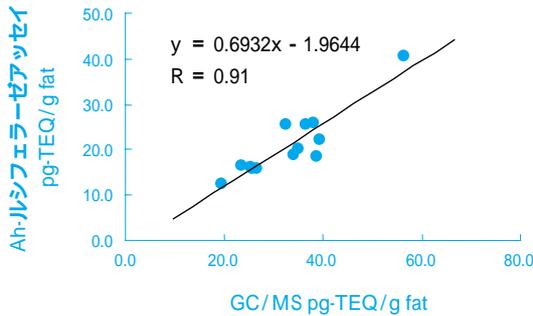
第6図 PCDD類の濃度 - 応答曲線



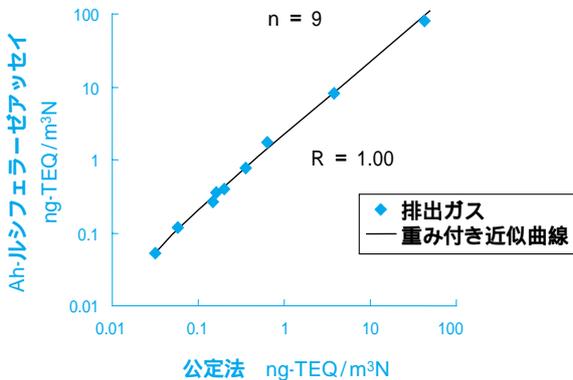
の半分を示す濃度)を計算し、2,3,7,8-TCDDのEC₅₀値との比をもとめた。この比は本アッセイ系における相対的な毒性の強さ、即ち毒性等価係数に相当する数値を表している(Luc-TEFと表す)。Luc-TEFをWHO-TEFと比較すると、一部に4倍ほどの開きがあるが概ね値は一致している(第1表)。従って、測定対象試料中の主成分がPCDD/Fであれば、アッセイ測定値はHRGC/HRMSによるTEQ値と近い値が得られることが示唆された。

上記の測定法を用いて、各種試料の測定を実施した。実際の試料は標品のような純品の溶液とは異なり、固体であったり各種夾雑成分と混合されていたりするため、溶媒抽出のほか夾雑成分の分解およびカラム精製による分離等の前処理が必要である。1998年から厚生労働省の厚生科学研究プロジェクトに参画し、母乳中ダイオキシン類の測定を実施した。抽出および脂肪分のアルカリ加水分解はHRGC/HRMS法の場合とほぼ同様であるが、前処理を多層カラム一段階のみに短縮する改良を加えた(HRGC/HRMS法ではさらにアルミナカラム、活性炭シリカカラムが必要)。アッセイ測定値とHRGC/HRMS測定値をプロットすると両者の間には良い相関がみとめられ(第7図)本アッセイ系が母乳中ダイオキシン類の測定に適用できることが示された。

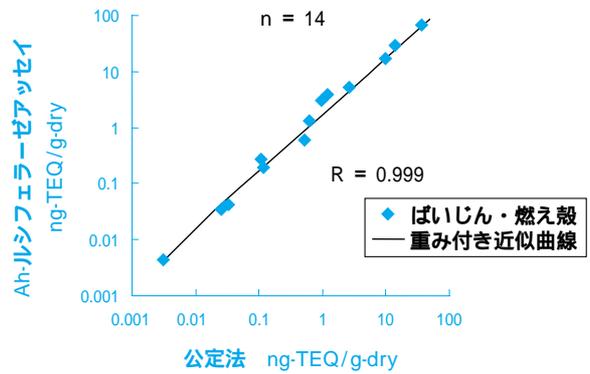
第7図 Ahルシフェラーゼアッセイと公定法との相関(1)母乳試料



第8図 Ahルシフェラーゼアッセイと公定法との相関(2)排出ガス



第9図 Ahルシフェラーゼアッセイと公定法との相関(3)ばいじん・燃え殻

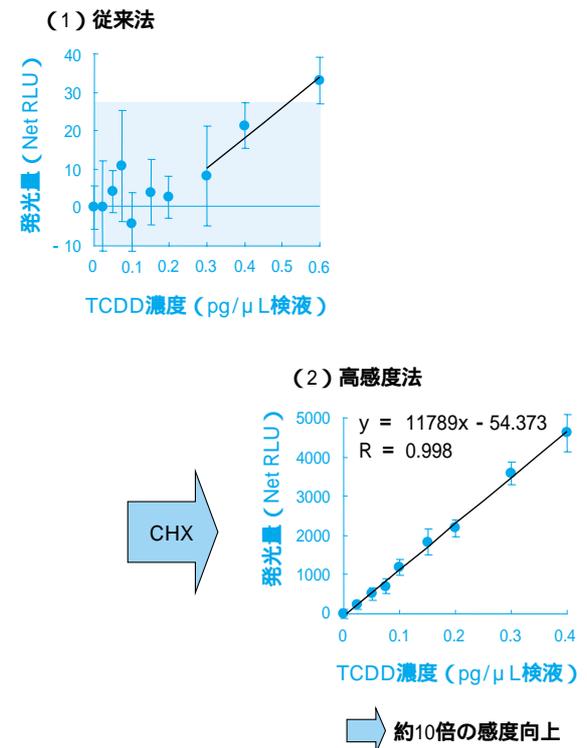


同様に廃棄物等の焼却施設から発生する試料、排出ガス、ばいじん及び燃え殻についてアッセイを実施した。HRGC/HRMS測定値とプロットすると、濃度が10⁴(4桁)という広範に及ぶ中で非常に良い相関が認められた(第8図および第9図)。これらデータは環境省の簡易測定技術募集への応募書類と共に提出され、現在、測定技術の基本的評価を目的とした第一次分析試験が実施されているところである。

3. レポーター遺伝子アッセイ法の感度向上検討

レポーター遺伝子アッセイ法の感度向上が達成できれば、従来測定不可能であった非常に低濃度の試料(野菜などの食品、生体成分など)へ適用が拡大でき、従来より微量の試料での測定が可能となる。そこで、

第10図 CHX添加による感度向上



各種方法による感度向上検討に取り組んでいる。その中の成果の一つとして、Ahレセプターによる酵素誘導活性を著しく増強することが報告されていたタンパク合成阻害剤シクロヘキシミド(CHX)をアッセイ系に添加すると、検出下限が0.1 pg-TEQ/ μ Lと約10倍改善されることが見出された(第10図)。これとは別に、応答配列の改変、別種の培養細胞の使用、転写共役因子等の共発現なども検討している。

4. レポーター遺伝子アッセイ法の特徴

Ahレセプターを用いた簡易測定ではAhレセプターに結合する化合物の総和を検出していることになるが、GC/MS分析では特定の(限られた)同族体の個別の定量値とTEFとの積の総和を求めている。Ahレセプターにはダイオキシン以外にもダイオキシン様毒性を示すベンゾピレンのような多環芳香族炭化水素化合物のほか、臭素化ダイオキシン類なども結合するため、一般的にはAhレセプターによる生物検定法はGC/MS分析よりも定量値が高くなる傾向にある。従って、レポーター遺伝子アッセイ法は、混合試料中のトータルのダイオキシン様活性を測定したい場合や、活性未知化合物のダイオキシン様活性を知りたい場合、あるいはそのダイオキシン等量を把握したいというような目的の場合に有効な方法と考えられる。

5. 簡易測定技術の位置づけ

簡易測定技術の利用状況は国内外で異なるが、今後、利用機会が増加する方向にあることは確実と見られる。ここ最近の例を見ると、1999年のベルギーにおける鶏肉の汚染禍の後、食品中ダイオキシン類の調査にレポーター遺伝子アッセイ法が採用された。また2002年にはEUにおいて食品中ダイオキシン類の基準の制定に伴い、EC指令で分析法を規定し、その中でスクリーニング手法としてバイオアッセイ法を採用している。一方、日本に於いては自主検査等その利用は非常に限られていたが、はじめに述べたように、最近になって条件を限定する形で簡易測定法の使用が認められたり、公定法化への取り組みが開始されたところである。

医薬品開発における初期スクリーニングへの応用

先に、AhレセプターがCYP1A1などの薬物代謝酵素の誘導に関わることを述べた。ある薬剤に薬物代謝酵素誘導能があると、それ自身あるいは併用剤が誘導された代謝酵素による代謝を受け、それらの血中濃度が劇的に変化する可能性があり、そのため期待される効果が現れなかったり予期せぬ副作用が生じることが考えられる(薬物相互作用)。このような薬

物相互作用は薬剤の性質として望ましいものではなく、開発の初期に簡便に調べることができれば有用である。2H9-1G4細胞によるアッセイ系は、CYP1A1の誘導能を、ルシフェラーゼ活性によって測定する系でもあることから、実際に住友製薬の医薬品開発の初期スクリーニングに活用中である。

おわりに

Ahレセプターを利用したレポーター遺伝子アッセイ法の、(1)ダイオキシン類の簡易測定、(2)医薬品開発における薬物代謝酵素誘導能スクリーニング、への応用について概説した。ダイオキシン類の簡易測定については、現在環境省の簡易測定系を評価するプロジェクトに参加し、試験を実施しているところで、レポーター遺伝子アッセイ法が公定法(または準公定法)として認められるようになれば、これを足がかりとしたビジネス展開も現実性を帯びてくる。今後は実施中の環境省の試験において実験を実施していくとともに、将来食品等に測定対象が広がることを睨んで各試料の効率的な抽出法や前処理法の検討、さらにはアッセイの測定感度のさらなる向上に取り組む予定である。

引用文献

- 1)広瀬：ファルマシア, 34(5) 445(1998)
- 2)P. M. Fernandez-Salguero, D. M. Hilbert, S. Rudikoff, J. M. Ward, F. J. Gonzalez : Toxicol. Appl. Pharmacol., 140(1) 173(1996)
- 3)J. Mimura, K. Yamashita, K. Nakamura, M. Morita, T. N. Takagi, K. Nakao, M. Ema, K. Sogawa, M. Yasuda, M. Katsuki, Y. Fujii-Kuriyama : Genes Cells, 2(10) 645(1997)
- 4)Y. Shimizu, Y. Nakatsuru, M. Ichinose, Y. Takahashi, H. Kume, J. Mimura, Y. Fujii-Kuriyama, T. Ishikawa : Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 97(2) 779(2000)
- 5)H. Postlind, T. P. Vu, R. H. Tukey, L. C. Quattrochi : Toxicol. Appl. Pharmacol., 118(2) 255(1993)
- 6)A. J. Murk, J. Legler, M. S. Denison, J. P. Giesy, C. van de Guchte, A. Brouwer : Fundam. Appl. Toxicol., 33(1) 149(1996)
- 7)P. M. Garrison, K. Tullis, J. M. Aarts, A. Brouwer, J. P. Giesy, M. S. Denison : Fundam. Appl. Toxicol., 30(2) 194(1996)
- 8)松永、大江：特開2000-253889



松永 治之
Haruyuki MATSUNAGA
住友化学工業株式会社
生物環境科学研究所 分子生物G
主任研究員



大江田 憲治
Kenji OEDA
住友化学工業株式会社
生物環境科学研究所 分子生物G
主席研究員 理学博士



齋藤 幸一
Koichi SAITO
住友化学工業株式会社
生物環境科学研究所 分子生物G
主席研究員 工学博士

