

ダイオキシン様毒性のバイオアッセイ法 (CALUX) の基礎研究

中西・益永・中井研究室 坂下 玲奈

緒言

ダイオキシン類の測定は公定法として GC/MS 法があるが多くの時間とコストがかかり、低コスト・短時間で包括的に測定できる *in vitro* バイオアッセイである CALUX アッセイが注目されている。しかしながら、CALUX アッセイを用いた相加性、拮抗性の検討についての知見は少ない。また、ダイオキシン類の AhR を介する毒性発現と同様な作用をする PAH のダイオキシン相対活性についての知見も少なく、未だ基礎的知見が十分でない。このような知見は、今後 CALUX アッセイを用いて環境試料を測定及び評価する上で必要となる。そこで本研究では、ダイオキシン類を検出するバイオアッセイの一つである CALUX アッセイの環境試料への応用に向けた基礎的検討として以下の目的を設定した。

<目的 1> 曝露時間によるダイオキシン活性の相違についての検討

<目的 2> ダイオキシン類の相加・拮抗性の検討

方法

<目的 1> 曝露時間による応答の相違

対象物質

米国 EPA が主な環境汚染物質として指定している 16 種の PAH 及び変異原性が報告されているニトロ基を有する 3 種の PAH を対象とした。

ダイオキシン活性の測定

ラット肝ガン細胞(H4IIE-luciferase)を 96 穴マイクロプレートで 24 時間培養し、検量線用標準液及びサンプル液 (PAH) を加えた。6・24・48・72 時間培養後、ダイオキシン類が結合した AhR によって誘導されたルシフェラーゼ活性を発光量としてルミノメーターにより測定した。得られた活性を検量線から、ダイオキシン相対活性 (REP) を以下の式から算出した。

$$REP = EC50_{TCDD} / EC50_{PAH}$$

PAHの機器分析

曝露時間毎の well 中の PAH 濃度を HPLC により測定した。測定条件を表 1 に示した。

<目的 2> ダイオキシン類の相加・拮抗性の検討

対象物質

ダイオキシン(2378-TCDD)と Co-PCB (PCB77,81,126,169)をそれぞれ混合させた試料を対象とした。

ダイオキシン活性の測定

<目的 1>と同様の方法であるが、曝露時間は 72 時間のみで行なった。得られた活性を検量線と比較して TEQ-bio を求めた。また、設定濃度からダイオキシン活性に相加性が成り立つと仮定して TEQ-cal を算出した。

毒性増大指数 (TEI)

TCDD と PCB の相互作用を調べるために毒性増大指数を用いた。TEQ-bio と TEQ-cal から以下の式を用いて TEI を算出した。

$$TEQ-cal > TEQ-bio \text{ の場合 } TEI = -TEQ-cal / TEQ-bio + 1$$

$$TEQ-cal < TEQ-bio \text{ の場合 } TEI = TEQ-bio / TEQ-cal - 1$$

表 1. HPLC 分析条件

分析装置	HEWLETT PAKARD製 HPLC1100
カラム	Wakosil-PAHs (4.6φ×250mm 粒径5μm)
カラム温度	40°C
移動相	CH ₃ CN/H ₂ O=50/50
流速	0.8ml/min
注入量	100μl
検出器	ダイオードアレイDAD検出器 G1315A Sig=254,16 Ref=360,100

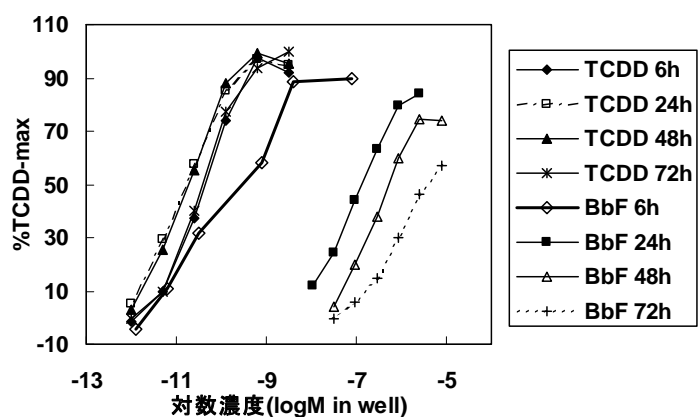


図 1. TCDD と (Benzo[b]flouranthene) BbF の用量応答曲線

TEI が 1 から -1 の間では相加性があり、TEI が >1 または <-1 の場合、それぞれ相乗的または拮抗的に作用することを示す。

結果と考察

<目的 1> 曝露時間による応答の相違

環数の少ない(2-3環)PAHではほとんど応答が得られなかった。他方、環数の多いPAH(4-6環)では応答が得られた。したがって環数の違いがルシフェラーゼ誘導能に関連していると考えられる。図1に曝露時間毎のTCDDとBenzo[b]flouranthene(BbF)の用量応答曲線を示した。曝露時間が長くなるほどBbFの用量応答曲線は右に移動した。表2に曝露時間毎に算出したREPを示した。

表 2. 曝露時間毎の PAH のダイオキシン相対活性(REP)

物質名	略語	本研究				文献値 ¹⁾	
		6時間	24時間	48時間	72時間 ²⁾	6時間	24時間
Benz[a]anthracene	BaA	7.18E-03	1.23E-05	wr	wr	7.64E-07	7.04E-06
Chrysene	Chr	1.44E-02	4.68E-04	1.84E-06	wr	1.41E-02	1.01E-04
Benzo[b]flouranthene	BbF	2.00E-01	1.21E-04	2.27E-05	1.44E-05	4.90E-02	3.35E-05
Benzo[k]flouranthene	BkF	7.24E-02	4.17E-04	7.57E-05	5.32E-05	2.80E-01	1.64E-03
Benzo[a]pyrene	BaP	3.52E-03	1.62E-05	3.47E-06	wr	1.11E-02	9.01E-05
Dibenz[a,h]anthracene	DBahA	2.52E-02	1.59E-04	3.79E-05	1.11E-04	6.00E-02	1.17E-03
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	IDP	7.95E-03	1.15E-04	3.51E-05	4.82E-05	8.60E-01	2.96E-04
Benzo[g,h,i]perylene	BghiP	wr	nr	nr	nr	2.27E-05	nr
1-Nitropyrene	1-NP	3.16E-05	wr	wr	nr	na	na
1,6-Dinitropyrene	1,6-DNP	wr	wr	nr	nr	na	na
3-Nitrofluoranthene	3-NF	2.47E-04	wr	wr	nr	na	na

(wr: weak response, nr: no response, na: no analysis)

曝露時間が長くなるほど PAH の REP は減少した。曝露時間 6 時間から 24 時間の間で著しく減少し、また文献¹⁾とほぼ同様の傾向を得た。これは PAH が TCDD よりも代謝を受けやすいためと考えられる。そこで、曝露時間毎の well 中の PAH 濃度を HPLC により測定し、PAH の代謝について更に検討を行なった。図 2 に BaP (Benzo[a]pyrene)の結果を示した。control の濃度は曝露時間に関係なく一定であったが、他方、sample 中の BaP 濃度は曝露時間が長くなるほど減少することが分かった。この結果、曝露時間が長くなるほど REP が小さくなる要因は代謝による影響であることが明らかになった。CALUX アッセイにおける PAH の代謝について、機器分析で詳細に調べた例はなく、本研究で得られた知見は貴重であると言える。

<目的 2> ダイオキシン類の相加・拮抗性の検討

TCDD と PCB の混合試料の TEQ-bio と TEQ-cal の TEI を比較した(図 3)。TCDD と PCB77、81 に相加性が示された。他方、PCB126 及び 169 に相加的以上の相互作用が示された。PCB がダイオキシン活性に拮抗的に作用するという報告があるが、本研究では拮抗性は認められなかった。今後、より詳細な濃度に設定した混合試料を作成し、相互作用について詳細に検討する必要がある。

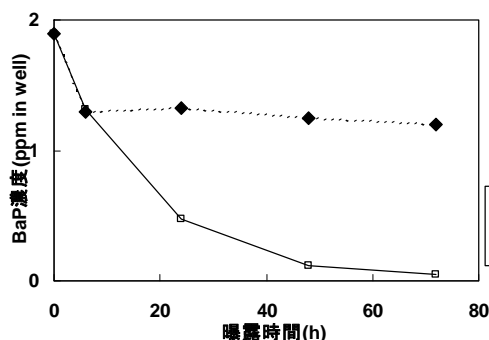


図 2. 曝露時間毎の well 中の Benzo[a]pyrene(BaP)濃度

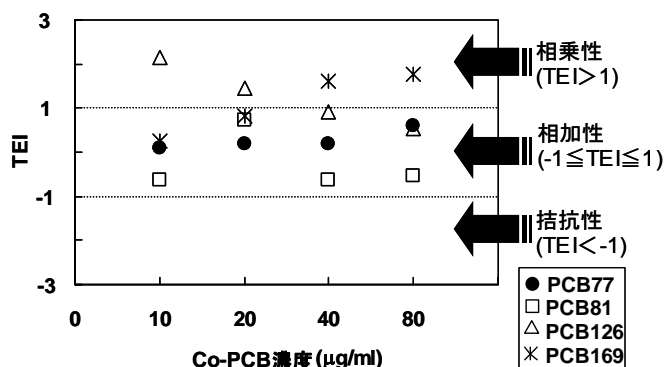


図 3. TCDD と PCB の混合試料の毒性増大指数(TEI)

参考文献 1) Machala M et al., (2001) *Mutation Research*, 497, 49-62

2) 白井純子(2002) 修士論文 横浜国立大学