

飛灰中 AhR 応答性物質の H4IIIE-luciferase による定量

中西・益永・中井研究室 学籍番号 00DB148 森中千恵子

1. はじめに

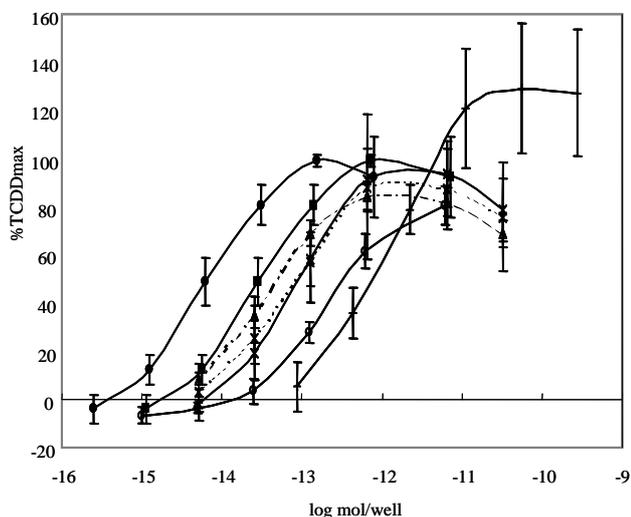
ダイオキシン類の発生源として判明しているうちの 95% は燃焼が原因とされ、我が国では 2000 年 1 月にはダイオキシン特別措置法の設置がなされ、焼却施設の改良が義務付けられた。しかし、現在規制の対象とされているダイオキシン類以外にも、ダイオキシン様毒性を示すとされる物質は数多く存在しているとされ、廃棄物処理施設からのダイオキシン類排出量を今後簡便かつ迅速にモニターする方法が必要とされて来ている。そこで本研究ではこうしたスクリーニング法の一つとして、簡便で迅速な試験法であるバイオアッセイの有用性を示す事を試みた。機器分析の結果とバイオアッセイの結果を比較する事でその試験法の妥当性を調査すると共に、機器分析では捕えられない未知物質の存在の有無を調査する事を目的とする。

2. 実験方法

相対比活性の測定：2378 位置換体 PCDD/DFs 17 異性体は Accustandard inc. 製のものを用いた。各異性体について用量反応曲線を描く為に 0.2 ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$) の希釈倍率でメタノールを用い 6 段階希釈を行った。各用量反応曲線からプロビット変換した回帰直線より ED50 を求め、2378D に対する相対比活性 (REP) を算出した。

相加的応答性に関する検討：2378 位置換体 PCDD/DFs の標準品を飛灰での異性体組成と同様の組成で混合した試料を作成した (standard 1-9)。Standard 1 については用量反応曲線を描く為に 6 段階希釈を行った。

飛灰試料の分析：飛灰試料は塩酸処理後ソックスレー抽出したものを粗抽出液 F1、また硫酸シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製分画したものの (F2)、活性炭カラムクロマトグラフィーにより mono-di-ortho-PCBs 及び other-PCBs 溶出画分である F3 と PCDD/DFs 及び non-ortho-PCBs 溶出画分である F4 とに精製分画を行った。各フラクションについてバイオアッセイによる活性値 (TCDD-EQ_{bio}) の定量を行った。また HRGC/HRMS による PCDD/DFs 及びピコプラナー PCBs の定量を行い、2378 PCDD/DFs の各濃度に REP を掛け合わせ TCDD-EQ_{calc} を算出した。



3. 結果と考察

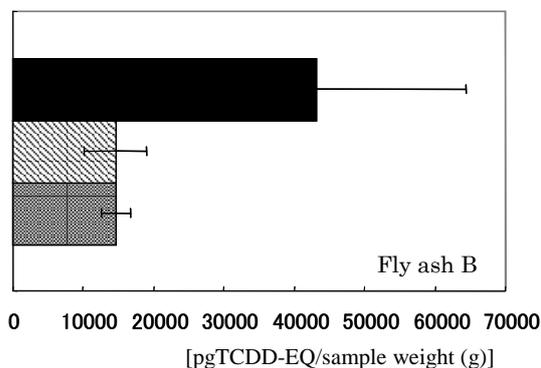
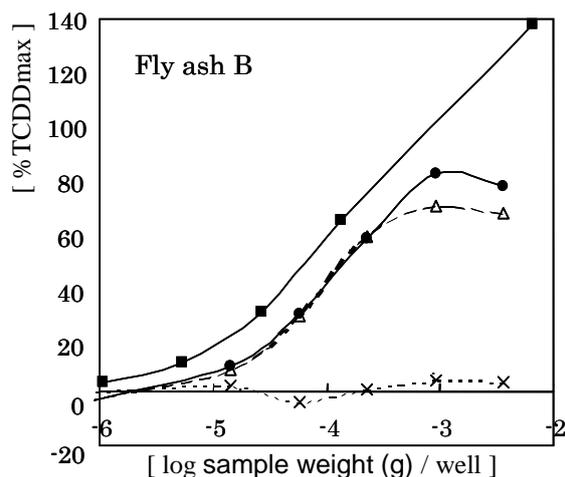
相対比活性：2378 置換体PCDD/DFsの 17 異性体に関して、本バイオアッセイで良好な用量反応曲線を描く事ができ、それによりREPを各異性体について求めた所、既存の研究のH4IIE-wtによるREPとは全体的に良く一致していた。PCDDに関して相関係数が 0.95 であったが、PCDFに関しては 0.025 と相関は見られなかった。PCDFのREPは既存の研究と比較して全体的に低い値を示す傾向が見られた。既存の研究のラット肝細胞AhR親和性との相関係数は 0.40 と低い値を示した為、ダイオキシン類を混合する事で相互作用が生じる可能性が示唆された。

congener	ED50(g/well)	CV(%)	n	REP
2378D	2.0E-12	37	33	1
12378D	3.2E-12	28	8	0.68
123478D	2.6E-11	18	6	0.082
123678D	3.6E-11	47	6	0.060
123789D	3.6E-11	36	10	0.061
1234678D	2.6E-10	20	6	0.0081
12346789D	3.8E-10	24	6	0.0064
2378F	2.3E-11	63	7	0.093
12378F	2.4E-11	41	6	0.11
23478F	6.7E-11	12	6	0.044
123478F	1.9E-10	17	6	0.019
123678F	2.8E-11	46	8	0.077
123789F	1.9E-11	31	8	0.12
234678F	2.2E-11	23	6	0.10
1234678F	2.4E-09	35	8	0.0023
1234789F	2.7E-11	28	6	0.080
12346789F	1.2E-09	92	6	0.0013

相加的応答性に関して：2378PCDD/DFsの内 15 種異性体を混合した時の用量反応曲線はTCDDの用量反応曲線と良く一致した。standard 1 から 9 のTEIは-0.18 から 0.27 の間であり、バイオアッセイでの変動を考慮に入れると、ほぼ相加的に作用している事が示せた。

飛灰試料の TCDD-EQcalc 及び TCDD-EQbio :

飛灰 B,C,D,F について、F1 (粗抽出液) の用量反応曲線が全ての分画試料中で最も左へシフトしていた。飛灰 A 及び E ではその用量反応曲線は F4 の用量反応曲線と重なった。飛灰 B,C,D,F には硫酸シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより除去され得る物質に、ダイオキシン様活性を示す物質が存在していた可能性が考えられる。飛灰 B を除く全ての試料について、F4 の用量反応曲線は 2378D よりも左にシフトした事から、2378 置換体以外のダイオキシン様活性を示す物質が F4 に含まれている事が予測された。



TCDD-EQcalc と TEQ を比較した場合、ほぼ同等かもしくは TEQ の方が僅かに高い値を示した。よって本研究で用いた REP によって、通常 GC/MS 分析より求める TEQ をある程度予測可能であると言える。