

絶縁油中のPCBを高スループットで検出できる バイオアッセイ技術

Bioassay Technology for Detection of PCBs in Insulating Oil Offering High-Throughput Screening

菅野 美津子 宇留野 さえ子 服部 佐江子

■ SUGANO Mitsuko

■ URUNO Saeko

■ HATTORI Saeko

ポリ塩化ビフェニル (PCB) は、過去には多くの電気機器の絶縁油や冷媒などとして使用されていたが、その有害性のために現在は使用が禁止されている。それまでに製造されたPCB含有機器は厳重に保管されているが、早期の適正処理が求められている。処理の迅速化を図るうえで、近年顕在化した低濃度PCB汚染が疑われる廃棄物のスクリーニングは急務であり、簡易検出法として生体機能を利用した検出方法であるバイオアッセイ (生物検定法) が期待されている。

東芝は、マウスの神経細胞をPCBセンサとして用いるバイオアッセイ“TH (Tyrosine Hydroxylase : チロシン水酸化酵素) アッセイ”を開発し、絶縁油に含まれる低濃度PCBの多検体スクリーニングを高いスループットで行うことを可能にした。

Polychlorinated biphenyls (PCBs) were widely used in the past as insulating and coolant fluids for electrical equipment, including transformers, capacitors, and electric motors. Since the 1970s, the production and use of PCBs have been prohibited because of their toxicity. In order to accelerate the disposal of PCB wastes that are stored and required to be disposed of with dispatch, the establishment of a screening method for the detection of low-level contamination is necessary. As a solution to this issue, a bioanalytical method is expected to be a promising tool for the rapid and low-cost detection of PCBs.

Toshiba has developed the tyrosine hydroxylase (TH) assay method, a novel bioassay technology using mouse neuronal cells as a sensor of PCBs. The TH assay method is applicable to high-throughput screening.

1 まえがき

ポリ塩化ビフェニル (PCB) は、絶縁性や不燃性などの優れた特性を持つことから電気機器をはじめ幅広い用途に使用されてきたが、その有害性が社会問題化し、1972年以降、製造及び使用が禁止され、厳重に保管されることになった。しかし、長期間にわたって保管されてきたため紛失などが起こり、近年、環境汚染が国際問題になってきた。このため、“PCBなど環境に残留しやすい有機汚染物質の廃絶や削減などを行う”ことを目的とした「残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約 (POPs (Persistent Organic Pollutants) 条約)」が2001年に採択された⁽¹⁾。現在、わが国やEU (欧州連合) を含む170以上の国と地域がこの条約を締結している。

国内では、この動きを受けて、2001年に「ポリ塩化ビフェニル廃棄物の適正な処理の推進に関する特別措置法 (PCB 特措法)」が施行され、処理基準に従った早期の処理が求められている⁽²⁾。

PCBを含む絶縁油やそれを使った変圧器の処理に関する大きな問題の一つに低濃度PCB含有廃棄物の問題がある。1972年以前に製造された高濃度のPCBを含む絶縁油だけではなく、それ以降に製造された絶縁油の中にも数mg/kg程度の微量のPCBが混入していることが判明している⁽³⁾。このような低濃度PCBを含む絶縁油を使った機器の量は、電気機

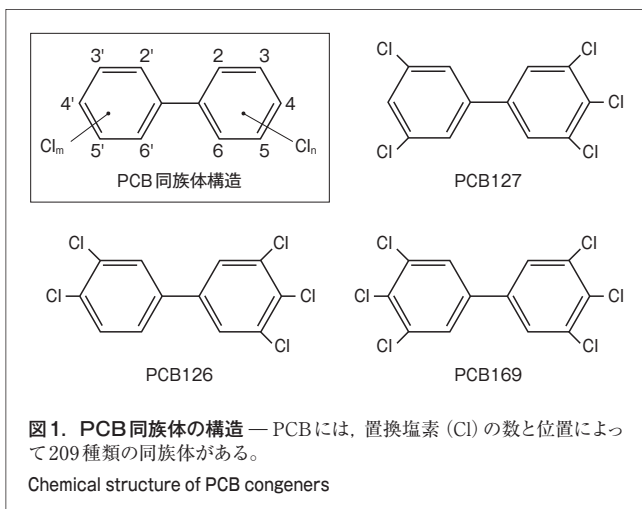
器が約450万台、ケーブルが約1,400 kmと推計されており、処理期限に向けて低濃度PCBの迅速なスクリーニング法の確立が急務である。

東芝は、低濃度PCBの迅速なスクリーニングを実現するバイオアッセイとして“TH (Tyrosine Hydroxylase : チロシン水酸化酵素) アッセイ”を開発した。バイオアッセイとは、生体機能を利用した検出法 (生物検定法) のことである。この方法では、マウスの細胞にPCBと反応する“センサDNA (デオキシリボ核酸)”を組み込み、微量のPCBと接触する細胞を発光させることでPCBを検出する。ここでは、THアッセイの仕組み、PCB検出特性、及び検出能力を検証した結果について述べる。

2 THアッセイの検出原理

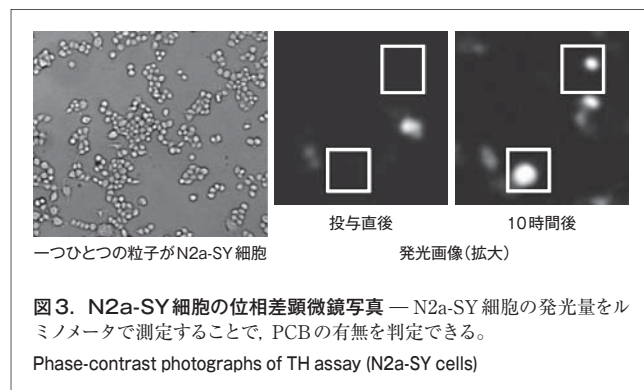
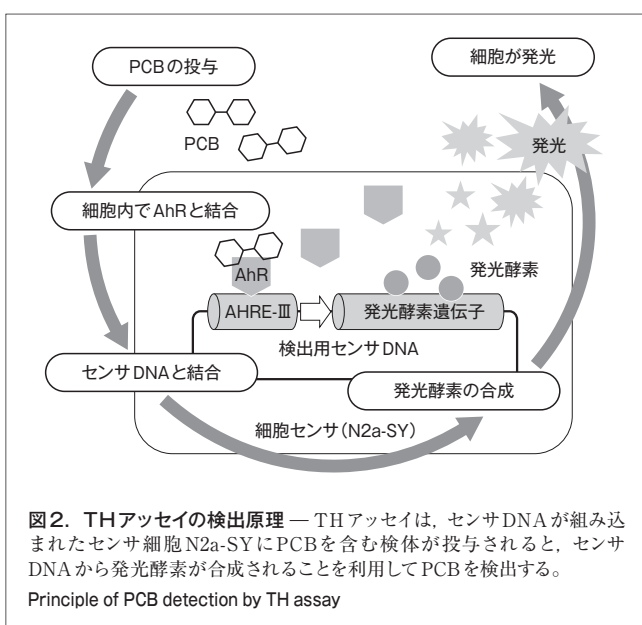
バイオアッセイは、生物が本来持つ機能を利用して有害物質の検出と評価を行う方法である。機器分析などに比べて多検体処理が容易であり、低コストで実施できる。これらの特長から、有害物質のスクリーニング目的に合った有力な簡易分析技術として期待されている。

生体内では、PCBなどの多環芳香族炭化水素類 (図1) は、多くの生物が細胞内に持つアрилヒドロカーボン受容体 (AhR) というたんぱく質と結合する⁽⁴⁾。PCBは、細胞の中で



は不活性化状態にある AhR と結合することによって AhR を活性化し、AhR をゲノム DNA 上の特定の配列 (XRE (Xenobiotic Responsive Element) 配列) と結合させる⁽⁵⁾。その結果、XRE 配列によって制御されている遺伝子に対して、異常な遺伝子を活性化し、生物個体に対して“有害性”を発現させる、というのが PCB の有害性発現機構の一つであると考えられている⁽⁶⁾。PCB を識別する性質を持つ受容体である AhR と、PCB 存在下で AhR は特定の DNA 配列と結合するという生体機能を工学的に利用したのがバイオアッセイである。

当社は、これまで知られていた XRE とは異なる DNA 配列が、PCB 受容体である AhR とよく結合することを見いだした。その配列が、神経系において、ドーパミン合成を担う TH 遺伝子の一部にある AHRE-Ⅲ 配列である⁽⁷⁾。PCB を識別して受容する AhR と、活性化した AhR を結合させてセンシングする AHRE-Ⅲ 配列の DNA を使用したのが TH アッセイである⁽⁸⁾。



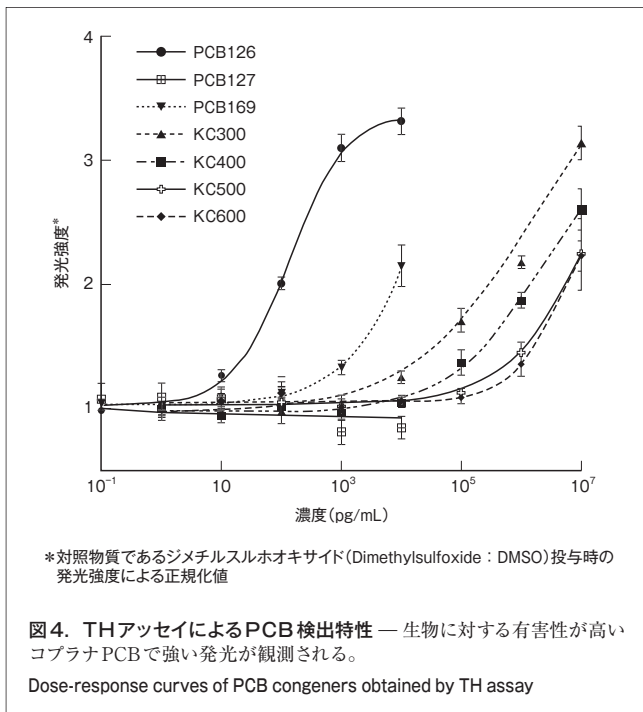
THアッセイの原理を図2に示す。まず、AHRE-Ⅲ配列と蛍光酵素遺伝子 (ルシフェラーゼ遺伝子) を結合させた人工的なセンサDNAを合成し、マウスの神経細胞 Neuro2a に組み込んだセンサ細胞 N2a-SY を作製した。

N2a-SY細胞に検体を投与すると、もしPCBが含まれていれば細胞内のAhRと結合して活性化し、センサDNA上のAHRE-Ⅲ配列に結合する。活性化したAHRE-Ⅲ配列は隣接した蛍光酵素遺伝子を読み出し、細胞内で発光酵素が合成され、細胞が発光する(図3)。細胞の発光量を、ルミノメータで測定することで、検体中に含まれるPCBの有無を判定できる。

3 THアッセイのPCB検出特性

PCBには、置換塩素 (Cl) の数と位置によって、209種類の同族体が存在する。図1において、3, 3', 4, 4', 5位にClが置換された5 Cl置換体である3, 3', 4, 4', 5-ペンタクロロビフェニル (Pentachlorobiphenyl) をPCB126、3, 3', 4, 5, 5'-ペンタクロロビフェニルをPCB127、3, 3', 4, 4', 5, 5'-ヘキサクロロビフェニル (Hexachlorobiphenyl) をPCB169と呼ぶ。また、絶縁油に使用されたPCBは複数の同族体の混合物である。代表的なPCBであるカネクロール (KC) では、主に3 Cl置換体を含むものをKC-300、4 Cl置換体をKC-400、5 Cl置換体をKC-500、6 Cl置換体をKC-600としている⁽⁹⁾。

三つのPCB同族体 (PCB126, PCB127, 及びPCB169) と、四つのPCB混合物 (KC-300, KC-400, KC-500, 及びKC-600) に対するTHアッセイの検出特性を図4に示す。PCB単体の場合、種類によって発光倍率に違いがある。PCB126とPCB169は高い発光強度を示すが、PCB127は発光がほとんど観察されない。PCB126とPCB169はコプラナPCB、PCB127は非コプラナPCBと分類される同族体である。メタ位とパラ位が選択的に置換され、共平面構造 (コプラナリティ) をとる同族体をコプラナ体といい、生物に対して高い有害性を持つことが知られている⁽¹⁰⁾。バイオアッセイの測定値は、被験物質の多寡だけでなく、生理的活性 (有害性) の強弱を



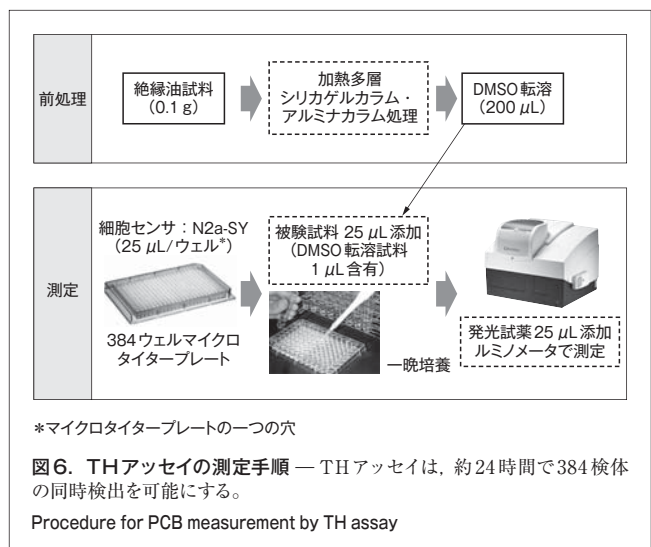
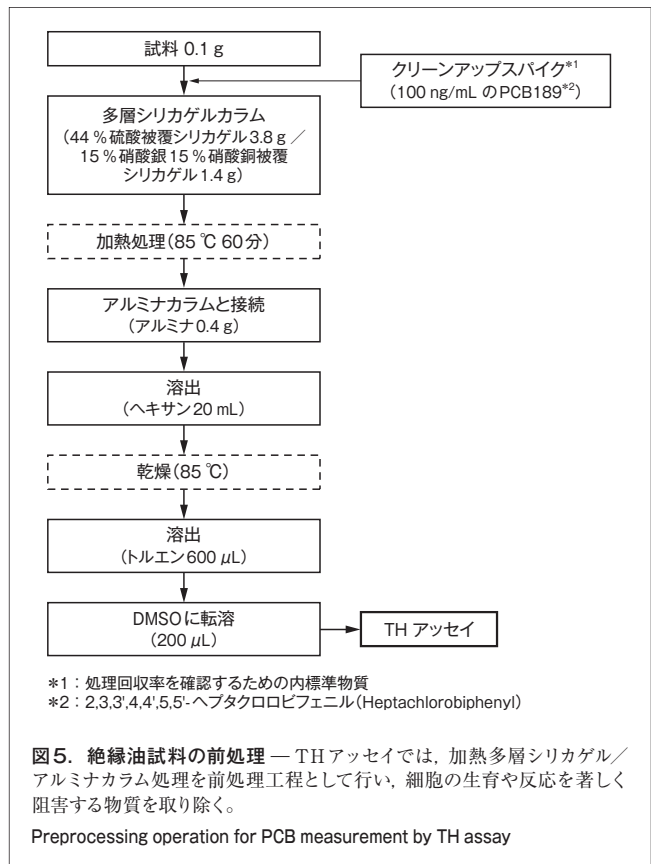
反映するため、有害性が特に高いコプラナ体を含む場合に、高い値が計測される。

KC-300～KC-600においても、コプラナ体を多く含むKC-300の発光量が高い傾向にある。PCB特措法施行基準で定められたPCB処理基準である、0.5 ppm (5×10⁵ pg/ml, p (ピコ): 10⁻¹²) では、いずれも検出可能であり、低濃度PCBのスクリーニングに適用可能であることが示された。

4 THアッセイによる測定

環境省では、低濃度PCBで汚染された廃電気機器などの処理を効率的に推進するために、絶縁油に含まれる微量PCB濃度を短時間にかつ低コストで測定できる簡易測定法に関する検討を行った。そして、いくつかの測定方法について、「絶縁油中の微量PCBに関する簡易測定法マニュアル」として公表している^[1]。このマニュアルには、キャピラリーガスクロマトグラフ/電子捕獲型検出器 (GC/ECD) 法などの機器分析法を中心にいくつかの手法が挙げられている。そのいずれの測定法においても、分析に影響を与えるパラフィン、ナフテンといった直鎖状又は環状の飽和炭化水素類や芳香族炭化水素などの成分を除くための前処理方法が含まれている。

THアッセイを絶縁油中のPCBスクリーニングに用いる場合にも、同様の前処理工程は不可欠である。細胞の生理活性を利用するため、細胞の生育を著しく阻害する物質を取り除くことが求められる。THアッセイでは、前記の「絶縁油中の微量PCBに関する簡易測定法マニュアル」で公表されている方法の一つである「加熱多層シリカゲルカラム/アルミナカラ



ム/キャピラリーガスクロマトグラフ/電子捕獲型検出器 (GC/ECD) 法」の加熱多層シリカゲルカラム/アルミナカラム処理を前処理工程として行う。前処理の流れを図5に、前処理を含むTHアッセイの測定手順を図6に示す。あらかじめ培養しておいたN2a-SY細胞を使用した場合、測定時間は24時間である。また、市販のマイクロタイタープレートを使用した場合、384検体を同時に処理できるため、多数の検体に対する簡易スクリーニングに適用可能である。

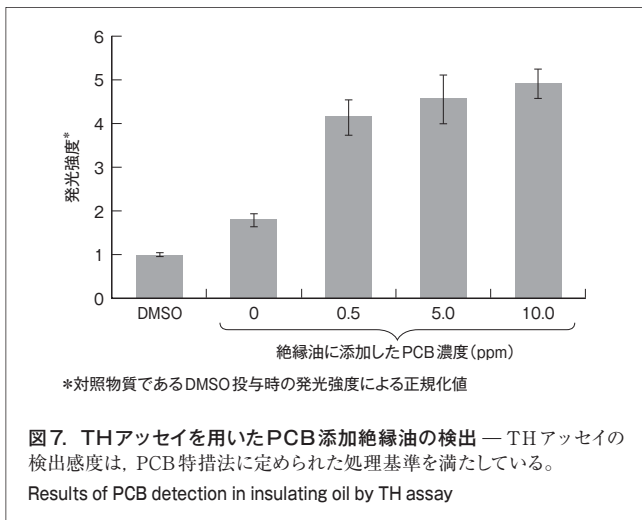


図7. THアッセイを用いたPCB添加絶縁油の検出 — THアッセイの検出感度は、PCB特措法に定められた処理基準を満たしている。
Results of PCB detection in insulating oil by TH assay

5 THアッセイを用いた絶縁油からのPCB検出

絶縁油に含まれるPCBに対するTHアッセイの検出能力を検証するために、PCBをほとんど含まない絶縁油として認証されている低濃度PCB絶縁油に定量のPCBを添加した試料を作製し、THアッセイによる検出を行った。

低濃度PCB絶縁油には、独立行政法人 産業技術総合研究所 計量標準総合センターの認証標準物質¹²⁾である絶縁油 (NMIJ CRM 7903-a) を使用した。この絶縁油は、26年間使用した変圧器から採取した電気絶縁油 (JIS C 2320 (日本工業規格 C 2320) 1種2号) であり、「特別管理一般廃棄物及び特別管理産業廃棄物に係る基準の算定方法」¹³⁾に基づくCl数別PCB濃度が約 $6 \mu\text{g}/\text{kg}$ (0.006 ppm) のものである。この絶縁油にコプラナ体であるPCB126をそれぞれ、0.5 ppm, 5.0 ppm, 及び10.0 ppm 添加し、前記の前処理を行った後、THアッセイによる検出を行った (図7)。THアッセイによる発光強度は、0.5 ppm 以上の全ての濃度において、PCBを添加していない試料に対して十分に大きく、THアッセイによる絶縁油中の低濃度PCB検出が可能であることが示された。

6 あとがき

生物が持つ異物を認識する機能を生かして、マウスの神経細胞をPCBセンサとする生物検定法THアッセイの開発を行い、これを用いて絶縁油からPCB特措法による処理基準である0.5 ppmのPCBを検出した。

バイオアッセイは取扱いが容易であることから、多検体を扱う大規模スクリーニングに適した手法であると言える。またバイオアッセイは、特定物質の簡易検出という側面だけではなく、物質の種類を限定せず、例えば特定の細胞や遺伝子に影響を与える物質のように、同種の生理活性を持つ物質を同時に検出できるという側面も持つ。これは、従来の高精度な分

析技術を補完するものであり、様々な用途における一次スクリーニング手法としての応用が期待される。

文献

- (1) "Stockholm Convention". <<http://chm.pops.int/Home/tabid/2121/mctl/ViewDetails/EventModID/871/EventID/230/xmid/6921/Default.aspx>>, (accessed 2012-06-20).
- (2) “ポリ塩化ビフェニル廃棄物の適正な処理の推進に関する特別措置法”. 環境省ホームページ. <<http://www.env.go.jp/recycle/poly/law/index.html>>, (参照 2012-06-20).
- (3) 日本電気工業会. “変圧器等への微量PCBの混入可能性に関する調査結果について”. <http://www.jema-net.or.jp/Japanese/pis/pcb/p_6.html>, (参照 2012-06-20).
- (4) Hankinson, O. The aryl hydrocarbon receptor complex. *Ann. Rev. Pharmacol Toxicol.* **35**, 1995, p.307-340.
- (5) Lai, Z. W. et al. Identification of dioxin-responsive elements (DREs) in the 5' regions of putative dioxin-inducible genes. *Chemico-Biological Interact.* **100**, 2, 1996, p.97-112.
- (6) Boutros, P. C. et al. Transcriptomic responses to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in liver: comparison of rat and mouse. *BMC Genomics.* **9**, 2008, p.419.
- (7) Akahoshi, E. et al. Effect of dioxins on regulation of tyrosine hydroxylase gene expression by aryl hydrocarbon receptor: a neurotoxicology study. *Environmental Health.* **8**, 2009, p.24-34.
- (8) Akahoshi, E. et al. Tyrosine hydroxylase assay: A bioassay for aryl hydrocarbon receptor-active compounds based on tyrosine hydroxylase promoter activation. *Toxicology Mechanism and Method.* **22**, 6, 2012, p.458-460.
- (9) Takasuga, T. et al. Chemical characterization of polychlorinated biphenyls, -dibenzo-p-dioxins, and -dibenzofurans in technical Kanechlor PCB formulations in Japan. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **49**, 3, 2005, p.385-395.
- (10) Fuoco, R. et al. Polychlorobiphenyl Residues Handbook of Food Analysis. USA, CRC Press, 2004, 2296p.
- (11) 環境省. “絶縁油中の微量PCBに関する簡易測定法マニュアル (第3版)”. <http://www.env.go.jp/recycle/poly/manual/sim_method-io.pdf>, (参照 2012-06-20).
- (12) 産業技術総合研究所 計量標準総合センター. “NMIJ認証標準物質”. <<http://www.nmij.jp/service/C/>>, (参照 2012-06-20).
- (13) “特別管理一般廃棄物及び特別管理産業廃棄物に係る基準の検定方法”. 環境省ホームページ. <<http://www.env.go.jp/hourei/syousai.php?id=11000314>>, (参照 2012-06-20).



菅野 美津子 SUGANO Mitsuko, Ph.D.

研究開発センター フロンティアリサーチラボラトリー主任
研究員, 博士 (理学)。バイオアッセイの開発に従事。米国
神経科学学会会員。
Frontier Research Lab.



宇留野 さえ子 URUNO Saeko

研究開発センター フロンティアリサーチラボラトリー研究
主務。
バイオアッセイの開発に従事。日本環境化学学会会員。
Frontier Research Lab.



服部 佐江子 HATTORI Saeko

(株)テルム 環境エンジニアリング事業部 環境分析部主任。
ダイオキシン類及びPCBの分析に従事。
Term Corp.