

## NOTE

# 應用生物快速篩檢法 (DR CALUX<sup>®</sup>) 檢測不同水產動物之戴奧辛含量

張瑋倫 徐慈鴻\*

行政院農委會農業藥物毒物試驗所

(接受刊載日期: 中華民國一〇一年六月二十五日)

生物快速篩檢法 (DR CALUX<sup>®</sup>) 屬於一種應用報導基因的檢測技術, 主要是利用活化多環芳香烴受體並啟動冷光報導基因的表現來檢測戴奧辛類化合物。本研究建立水產動物基質之 DR CALUX<sup>®</sup> 生物快速篩檢法並應用於多種魚類、雙貝類及甲殼類的戴奧辛類化合物檢測。水產動物經萃取後, 包括石斑魚、七星鱸魚、鱒魚、文蛤、牡蠣及白蝦等六種水產動物的平均脂肪含量小於 3.0%, 其餘樣品的脂肪含量範圍為 4.5%-28.4%。DR CALUX<sup>®</sup> 生物快速篩檢法應用於魚肉樣品的偵測極限值為 0.01-0.04 pg DR CALUX-TEQ/g w.w., 定量極限值為 0.02-0.15 pg DR CALUX-TEQ/g w.w.; 而雙貝類及白蝦的偵測極限值為 0.01 pg DR CALUX-TEQ/g w.w., 定量極限值為 0.02-0.03 pg DR CALUX-TEQ/g w.w.。水產動物樣品的戴奧辛類化合物經檢測結果顯示魚肉樣品的總毒性當量範圍為 0.04-1.24 pg DR CALUX-TEQ/g w.w., 雙貝類為 0.13-1.43 pg DR CALUX-TEQ/g w.w., 蝦類為 0.05-0.14 pg DR CALUX-TEQ/g w.w., 所有樣品的戴奧辛含量皆低於歐盟訂定的水產動物中 (不包含鰻魚) 戴奧辛類化合物之最大限值 8.0 pg WHO-PCDD/F-PCB-TEQ/g w.w.。

關鍵字: 戴奧辛, DR CALUX<sup>®</sup>, 生物快速篩檢法, 水產動物基質。

## The Use of DR CALUX<sup>®</sup> Bioassay for Analysis of Dioxin-Like Compounds in Aquatic Organisms

Wei-Lun Chang and Chee-Hong Shyu\*

Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute Council of Agriculture

(Accepted for publication: June 25, 2012)

The DR CALUX<sup>®</sup> (Dioxin Responsive-Chemical Activated LUCiferase eXpression) bioassay is a type of reporter-gene assay that can detect dioxin-like compounds by activating the aryl hydrocarbon receptor (AhR), causing expression of the reporter gene. This study built up the DR CALUX<sup>®</sup> bioassay to determine the toxicity equivalent (TEQ) of dioxin-like compounds (PCDDs/DFs/dl-PCBs) in aquatic organisms and the assay was applied to determine the dioxin-like compounds in many species of fish, two species of bivalves, and one species of shrimp. The averages of the fat content of grouper, swam eel, hard clam, oyster, and white shrimp were less than 3.0%, and those of other samples were between 4.5% and 28.4%. The LOD and LOQ of the DR CALUX<sup>®</sup> bioassay for fish was 0.01-0.04 pg DR CALUX-TEQ/g w.w. and 0.02-0.15 pg DR CALUX-TEQ/g w.w., and for bivalves and shrimp they were 0.01 pg DR CALUX-TEQ/g w.w. and 0.02-0.03 pg DR CALUX-TEQ/g w.w., respectively. The total levels of dioxin-like compounds in fish samples ranged from 0.04 to 1.24 pg DR CALUX-TEQ/g w.w., in bivalve samples ranged from 0.13 to 1.43 pg DR CALUX-TEQ/g w.w., and in shrimp samples ranged from 0.05 to 0.14 pg DR CALUX-TEQ/g w.w.. These levels are all below the European Union's approved maximum limit (8.0 pg WHO-PCDD/F-PCB-TEQ/g w.w., with the exception of eel) for seafood.

Key words: Dioxins, DR CALUX<sup>®</sup>, Bioassay, Aquatic organisms.

### 前 言

自1999年比利時發生乳、蛋食品受戴奧

辛汙染事件, 到2010年德國雞蛋與雞肉受到戴奧辛汙染之事件, 凸顯監測農水畜產品中戴奧辛含量之必要性; 目前所關注的戴奧辛類

\* Corresponding author. E-mail: ths@tactri.gov.tw

化合物(dioxin-like compounds, DLCs)包括七種多氯二聯苯戴奧辛類化合物(polychlorinated dibenzo-p-dioxins, PCDDs)、十種多氯二聯苯呋喃類化合物(polychlorinated dibenzofurans, PCDFs)以及12種戴奧辛類多氯聯苯類化合物(dioxin-like polychlorinated biphenyls, DL-PCBs)，此29種化合物因其生物毒性較高而成為關注及分析的對象<sup>(1-2)</sup>；戴奧辛類化合物的法定分析方法為高解析氣相層析質譜儀分析法(high resolution gas chromatography mass, HRGC/MS)，分析出各種同源物(congeners)濃度，分別乘以世界衛生組織(WHO)所訂定之毒性當量因子(toxic equivalency factors, TEFs)後加總，得到總毒性當量(toxicity equivalent, TEQ)來表示戴奧辛類化合物的含量，但高解析氣相層析質譜儀分析法需耗費較繁複的樣品萃取淨化流程與較高的分析成本，要因應大量樣品的檢測耗時費力<sup>(3-6)</sup>。

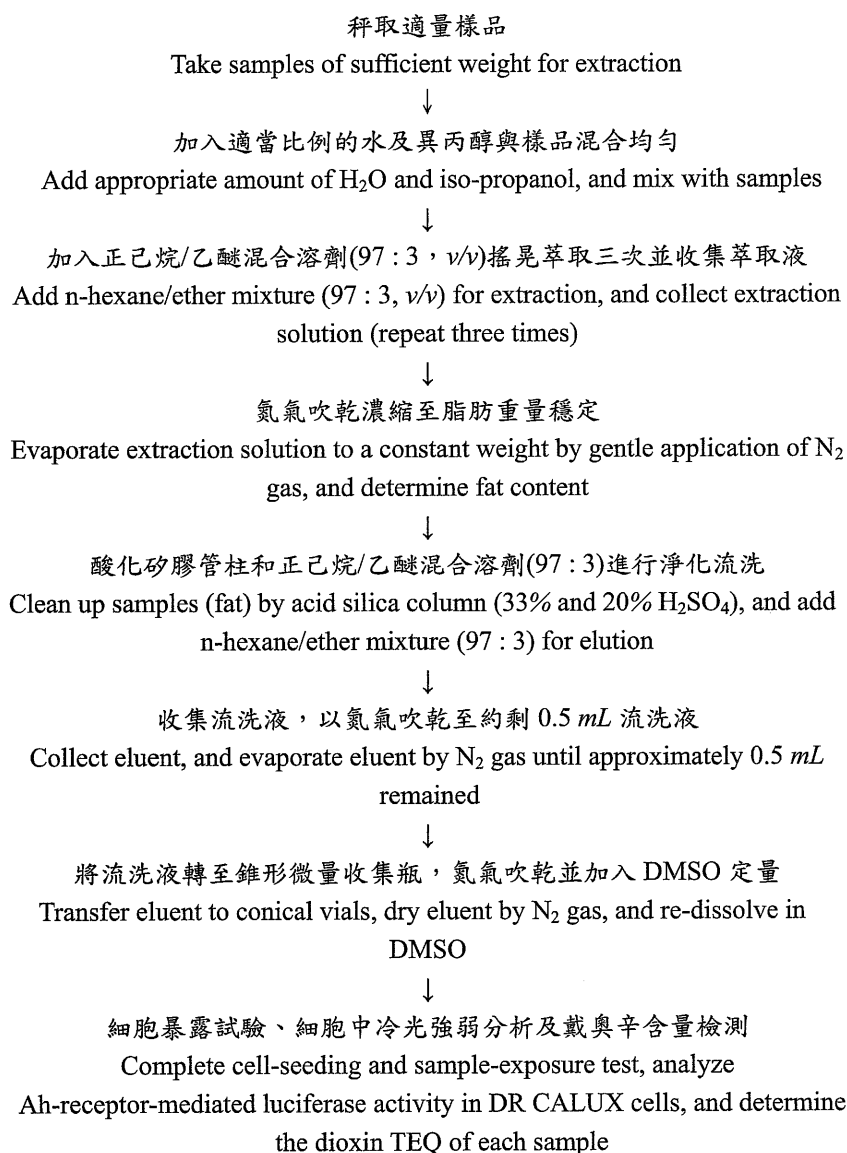
本研究於2005年引進荷蘭BDS公司(BioDetection Systems b.v.)開發的DR CALUX<sup>®</sup>(Dioxin Responsive-Chemical Activated Luciferase eXpression)生物快速篩檢法(bioassay)<sup>(6)</sup>，建置戴奧辛生物快篩實驗室並逐步建立農作物、禽畜及水產動物基質中戴奧辛含量的快速檢測流程<sup>(7-8)</sup>。DR CALUX<sup>®</sup>生物快速篩檢法分為化學萃取淨化及生物細胞暴露兩部分流程，相關化學萃取淨化流程如圖一；樣品中的戴奧辛類化合物經萃取淨化，最後回溶於DMSO(dimethyl sulfoxide)溶劑，並利用專利大鼠肝腫瘤細胞株(pGudLuc 1.1-transfected H4IIE cell)進行細胞培養暴露試驗，此專利細胞株具有戴奧辛反應元素基因片段(Dioxin Responsive Elements, DRE)及冷光報導基因(luciferase report gene)的質體，一旦戴奧辛類化合物與細胞內多環芳香烴受體(Aryl Hydrocarbon Receptor, AhR)結合形成複合物，可進一步與戴奧辛反應元素基因片段結合啟動冷光報導基因，產生冷光酵素，再與加入的冷光素(luciferine)反應產生冷光。每次試驗同時暴露一系列不同濃度的2, 3, 7, 8-TCDD標準品和分析樣品，再根據冷光強弱(RLU值)及2, 3, 7, 8-TCDD標準品產生之冷光強度比較，套用Hill reaction公式便可得到分析樣品中戴奧辛類化合物(PCDDs/PCDFs/DL-PCBs)的總毒性當量(DR CALUX-TEQ)<sup>(3, 6)</sup>。

BDS公司應用DR CALUX<sup>®</sup>生物快速篩檢法針對單一戴奧辛同源物進行系列濃度的細胞毒性反應，建立類似毒性當量因子(TEF)的相對效

力值(relative potency, REP)來表示細胞毒性反應之高低，同樣以2, 3, 7, 8-TCDD細胞毒性反應為最高，其CALUX REP值訂為1，並訂定出其他同源物之REP值<sup>(6, 9)</sup>；由於不同同源物之REP值與其TEF值相近，因此DR CALUX<sup>®</sup>生物快速篩檢法檢測結果與HRGC/MS的分析結果相當一致，無需額外換算<sup>(6, 9)</sup>。

DR CALUX<sup>®</sup>生物快速篩檢法符合歐盟2002/70/EC規範<sup>(10)</sup>，具有靈敏度高(可偵測到50 fg 2, 3, 7, 8-TCDD)、偽陰性低(出現機率<1%)、且和法定分析方法的相關性高等優點<sup>(3, 5, 6, 10)</sup>。為維護實驗室環境及操作流程穩定性和準確度，需注意的品保及品管條件(quality assurance/quality control, QA/QC)包括(1)每盤樣品的2, 3, 7, 8-TCDD標準品檢量線決定係數(coefficient of determination, R<sup>2</sup>)不可低於0.98、(2) EC<sub>50</sub>的範圍需在6-18 pM(picomolarity)之間、(3)分析樣品的測值需低於EC<sub>50</sub>濃度，但需高於定量極限(LOQ, 1 pM 2, 3, 7, 8-TCDD in well)的濃度、(4)每個樣品需進行三種濃度的暴露試驗，每種濃度需進行三重複的分析，而此三重複數值的標準偏差需小於15%、(5)每批次樣品的試驗流程空白組(procedure blank)須低於容許值(1.0 pM)、(6)建立品質管制樣品(certificated reference samples, CRMs)的管制圖(control chart)<sup>(3, 6, 10)</sup>等，符合上述條件的細胞暴露結果方能接受。圖二為本研究室所建立1 pM、3 pM標準品2, 3, 7, 8-TCDD和二種品質管制樣品(購自BDS公司之飼料及魚油標準參考物質)的管制圖；1 pM和3 pM 2, 3, 7, 8-TCDD的平均值分別為1.0 ± 0.1和3.0 ± 0.1 pM；飼料及魚油品管樣品的戴奧辛類化合物檢測平均值為0.6 ± 0.1 ng DR CALUX-TEQ/kg product及3.9 ± 0.6 pg DR CALUX-TEQ/g fat，顯示品質管制樣品的檢測結果符合分析證書(certificate of analysis)的數值含量範圍(飼料為0.9 ± 0.53 ng DR CALUX-TEQ/kg product，魚油為3.7 ± 2.1 pg DR CALUX-TEQ/g fat)，且落在管制圖的2個標準差範圍內，顯示試驗操作流程穩定，未偏離品管要求。

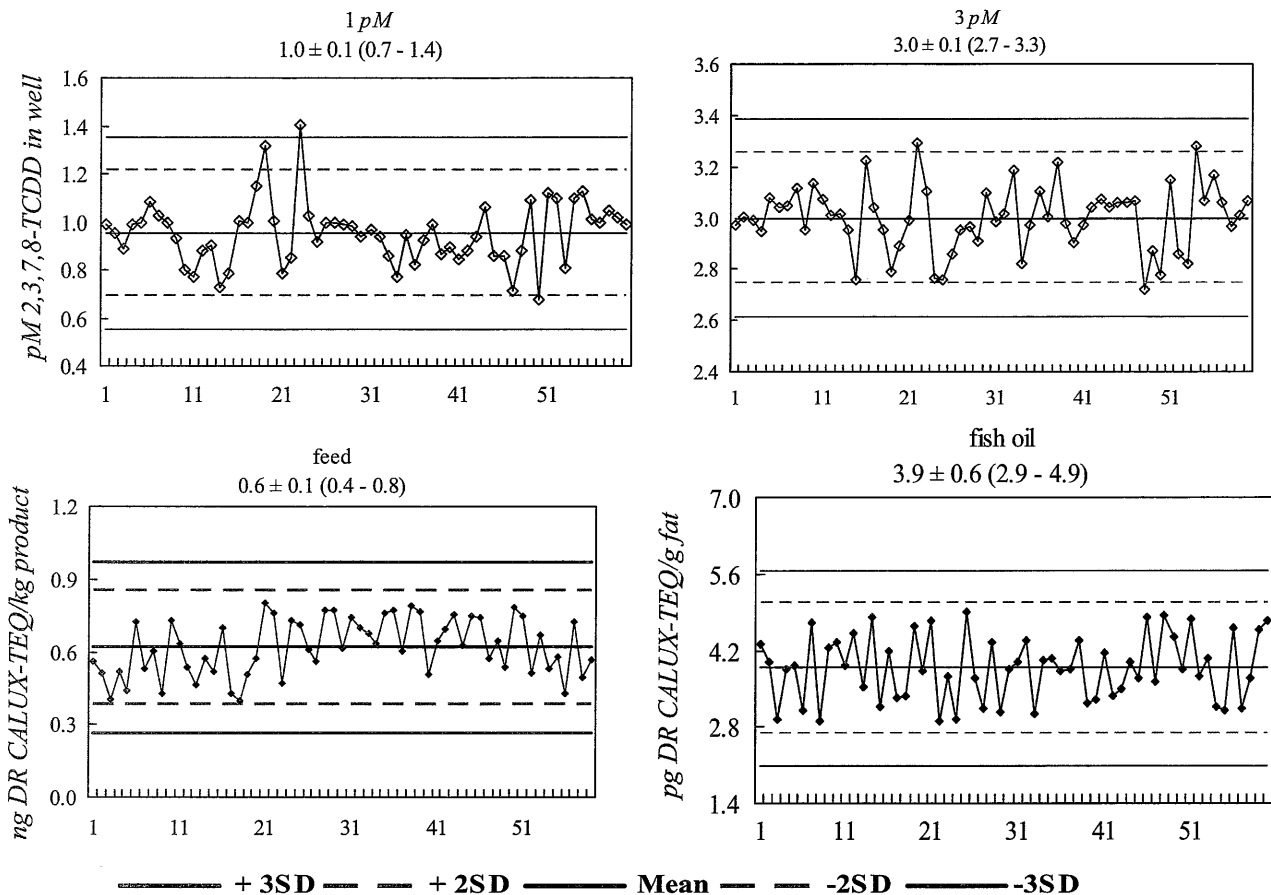
各類動物源食品的取用是人體暴露於戴奧辛類化合物的主要途徑<sup>(1-2)</sup>，根據Hsu等人<sup>(11)</sup>的研究顯示，我國成人對戴奧辛類化合物的每月預估攝取量(estimated monthly intake, EMI)有40%以上是來自於魚肉及其他水產動物；另根據衛生署2005至2008年國民營養健康狀況變遷調查結果發現，國人對於魚肉及海鮮的平均攝取量有上升之現象<sup>(12)</sup>，此說明國人飲食習性之

圖一 DR CALUX<sup>®</sup>生物快速篩檢法試驗流程圖Fig. 1. The experimental flow chart of DR CALUX<sup>®</sup> bioassay.

逐漸轉變，也顯示水產動物中戴奧辛類化合物含量檢測之必要性。本研究選擇15種魚類(虱目魚、七星鱸魚、白腹鯖魚、秋刀魚、鰻魚、石斑魚、肉鯽魚、吳郭魚、海鱺魚、烏格魚、鮭魚、鯨魚、鱈魚等)、二種雙貝類(文蛤、牡蠣)及一種甲殼類(白蝦)等18種國人經常食用之水產動物基質建立其DR CALUX<sup>®</sup>生物快速篩檢法流程，樣品經除鱗、去頭尾、除刺或去殼、清除內臟及瀝乾水分等保留主要食用部位，均質後秤取適量樣品進行萃取及淨化流程(圖一)。秤取的樣品重量及用來淨化的酸化管柱數量(acid silica columns)需依水產動物之脂肪含量調整，而水產動物種類、大小及魚齡都會影響樣品所萃取的脂肪量；由於戴奧辛類化

合物主要存在於脂肪，脂肪含量高的樣品需增加淨化管柱的數量，避免因淨化效果差而出現偽陽性結果或毒殺細胞的情形；若脂肪量低，則可能會影響分析結果的穩定度。部分種類的水產動物樣品(如牡蠣)脂肪含量低，需增加分析樣品的重量，同時也增加其他干擾物質的影響，導致淨化管柱數量的增加。

本次分析的各種水產動物樣品經萃取後，包括石斑魚、七星鱸魚、鱈魚、文蛤、牡蠣及白蝦等六種水產動物的平均脂肪含量小於3.0%，其餘魚肉樣品的平均脂肪含量範圍為4.5%–28.4%，以秋刀魚脂肪含量最高(26.8%–29.9%)，詳見表一，而試驗所秤取的魚肉樣品鮮重重量範圍為7~56公克、文蛤及牡蠣為



圖二 標準品  $1\text{ pM}$ 、 $3\text{ pM}$  2,3,7,8-TCDD 及二種品質管制樣品(飼料及魚油)的管制圖 ( $n = 60$ )

Fig. 2. The control chart of the  $1\text{ pM}$ ,  $3\text{ pM}$  2,3,7,8-TCDD and two certified reference materials (feed and fish oil), which was used to monitor performance of the experimental procedures. The analysis results of these two certified reference materials are all within the mean value  $\pm 3\text{SD}$ .

30-54公克、蝦類為32~100公克。

不同水產動物的戴奧辛類化合物檢測結果(表一), 顯示魚肉樣品的戴奧辛類化合物含量(以總毒性當量表示)範圍為 $0.04\text{--}1.24\text{ pg DR CALUX-TEQ/g w.w.}$ , 多數魚肉樣品的戴奧辛類化合物含量小於 $1.0\text{ pg DR CALUX-TEQ/g w.w.}$ , 鮭魚樣品的戴奧辛類化合物最高含量為 $1.24\text{ pg DR CALUX-TEQ/g w.w.}$ ; 而文蛤、牡蠣及白蝦的戴奧辛類化合物含量分別為 $0.13\text{--}0.46$ 、 $0.87\text{--}1.43$ 及 $0.05\text{--}0.14\text{ pg DR CALUX-TEQ/g w.w.}$ , 檢測結果顯示所有樣品的戴奧辛類化合物含量皆遠低於WHO訂定水產動物中(不包含鰻魚)戴奧辛類化合物之最大限值 $8.0\text{ pg WHO-PCDD/F-PCB-TEQ/g w.w.}$ <sup>(1-2)</sup>, 同時也低於衛生署公告水產品中戴奧辛含量之最大限值 $4.0\text{ pg WHO-PCDD/F-TEQ/g w.w.}$ <sup>(13)</sup>。所試驗分析的水產動物種類中, 以秋刀魚的脂肪含量最高, 但其戴奧辛含量並未較石斑、吳郭魚、文蛤、牡蠣等水產動

物基質高, 顯示雖然戴奧辛類化合物主要累積於脂肪, 脂肪含量高的生物基質累積戴奧辛的機率相對較高, 但水產動物體內的脂肪含量高低並非影響戴奧辛累積的唯一因素, 包括水產動物的年齡、體型大小、攝食習性、食物源種類、所處的食物鏈位階及所生活環境基質之戴奧辛含量等因素都會影響水產動物體內所累積的戴奧辛含量高低。由於本文以建立多樣性種類的水產動物基質檢測方法為目的, 因此部分種類的水產動物樣品件數較少, 將陸續增加各類水產動物的分析樣本件數並與高解析氣相層析質譜儀分析法結果比較後, 進一步探討影響各類水產動物累積戴奧辛類化合物之因素。

本研究建立國人常食用魚貝類及甲殼類中戴奧辛含量的DR CALUX®生物快速篩檢法流程, 檢測流程皆符合方法的QA/QC條件, 且魚肉樣品的偵測極限值(limit of detection, LOD)為 $0.01\text{--}0.04\text{ pg DR CALUX-TEQ/g w.w.}$ , 定量極限

表一 水產動物脂肪量及戴奧辛類化合物檢測結果

Table 1. The fat content and dioxin-like compounds in aquatic organisms

Species	English Name ( <i>Scientific name</i> )	Number of sample	Average of fat content (%)	Dioxin and dioxin-like compounds <sup>1</sup> ( <i>pg DR-CALUX TEQ/g w.w.</i> )
魚類	<b>Fish</b>	37		
土虱	Walking catfish ( <i>Clarias fuscus</i> )	2	6.4 (5.0~7.9)	0.23 ± 0.09 (0.17~0.29)
石斑	Grouper ( <i>Epinephelus sp.</i> )	2	1.8 (0.9~2.7)	0.15 ± 0.06 (0.10~0.19)
肉鯽魚	Japanese butterfish ( <i>Psenopsis anomala</i> )	2	8.6 (7.5~9.8)	0.37 ± 0.12 (0.29~0.46)
吳郭魚	Tilapia ( <i>Oreochromis sp.</i> )	6	4.6 (2.7~6.4)	0.22 ± 0.23 (0.06~0.63)
虱目魚	Milkfish ( <i>Chanos chanos</i> )	3	7.2 (1.0~11.4)	0.23 ± 0.18 (0.07~0.41)
秋刀魚	Pacific saury ( <i>Cololabis saira</i> )	2	28.4 (26.8~29.9)	0.13 ± 0.02 (0.11~0.14)
海鱸魚	Cobia ( <i>Rachycentron canadum</i> )	2	6.2 (3.6~8.9)	0.26 ± 0.15 (0.16~0.36)
烏格魚	Black seabream ( <i>Acanthopagrus schlegeli</i> )	2	4.5 (3.4~5.5)	0.21 ± 0.07 (0.16~0.26)
七星鱸魚	Japanese sea perch ( <i>Lateolabrax japonicus</i> )	2	1.0 (1.0~1.1)	0.08 ± 0.01 (0.07~0.08)
鮭魚	Salmon ( <i>Oncorhynchus kisutch</i> )	4	14.4 (11.2~17.3)	0.74 ± 0.39 (0.41~1.24)
白腹鯖魚	Mackerel ( <i>Scomber japonicus</i> )	3	16.9 (5.2~25.9)	0.30 ± 0.28 (0.11~0.62)
鯰魚	Catfish	2	9.7 (6.2~13.3)	0.60 ± 0.17 (0.48~0.72)
鰻魚	Eel ( <i>Anguilla japonica</i> )	3	12.2 (9.2~16.4)	0.41 ± 0.06 (0.35~0.47)
鱔魚	Swamp eel ( <i>Monopterus albus</i> )	2	0.6 (0.6~0.6)	0.04 ± 0.01 (0.04~0.05)
雙貝類	<b>Bivalves</b>	10		
文蛤	Japanese hard clam ( <i>Meretrix lusoria</i> )	5	1.3 (1.1~1.5)	0.23 ± 0.14 (0.13~0.46)
牡蠣	Oyster ( <i>Crassostrea gigas</i> )	5	2.3 (2.0~2.8)	1.11 ± 0.25 (0.87~1.43)
蝦類	<b>Shrimp</b>	2		
白蝦	White shrimp ( <i>Litopenaeus vannamei</i> )	2	1.1 (1.0~1.1)	0.09 ± 0.06 (0.05~0.14)

<sup>1</sup> Numbers represent Mean ± SD with the ranges shown in parentheses.

值 (limit of quantification, LOQ) 為 0.02-0.15 *pg DR CALUX-TEQ/g w.w.*; 而文蛤、牡蠣及白蝦的LOD值則是 0.01 *pg DR CALUX-TEQ/g w.w.*, LOQ值為 0.02-0.03 *pg DR CALUX-TEQ/g w.w.*。部分水產樣品經高解析氣相層析質譜儀進行再確認 (資料未發表) 皆未出現偽陰性的結果, 可實際應用於多種類且大量水產動物樣品中戴奧辛含量的例行性監測。除水產動物基質外, DR CALUX® 生物快速篩測法已廣泛被歐盟、美、日等國應用於農水畜產物、油脂、飼料、環境基質及血液等樣品中戴奧辛含量的篩檢<sup>(6, 14, 15)</sup>, 未來除陸續建立農作物及禽畜動物樣品的戴奧辛生物快速篩檢法檢測流程, 並將探討生物快速篩檢法與高解析氣相層析質譜儀分析法結果之相關性, 以期二種方法互相搭配應用於篩檢大量農作物、禽畜及水產動物之戴奧辛含量, 並達到縮短分析時程及降低分析成本的效果。

## 謝 辭

本研究承農委會「99農科-10.3.2-藥-P1(3)」計畫經費補助, 本組簡文彥先生、劉佩珊小姐等協助試驗進行, 謹此致謝。

## 參 考 文 獻

- (1) Commission Directive 2006/13/EC: Amending Annexes I and II to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council on undesirable substances in animal feed as regards dioxins and dioxin-like PCBs. *Offic. J. Eur. Commun.*, **L32**: 44-53 (2006).
- (2) Commission Regulation No 1881/2006: Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Offic. J. Eur. Union.*, **L364**: 5-24 (2006).
- (3) 徐慈鴻、李貽華、高淸文: 戴奧辛生物快速篩檢法在農、畜及水產品的應用。行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所技術專刊第167號, pp. 1-17, 台中, 中華民國(2008)。
- (4) M. Van den Berg, L.S. Birnbaum, M. Denison, M. De Vito, W. Farland, M. Feeley, H. Fiedler, H. Hakansson,

- A. Hanberg, L. Haws, M. Rose, S. Safe, D. Schrenk, C. Tohyama, A. Tritscher, J. Tuomisto, M. Tyskling, N. Walker and R. E. Peterson: The 2005 World Health Organization reevaluation of human and Mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicol. Sci.*, **93**: 223-241 (2006).
- (5) L. Hoogenboom, L. Goeyens, S. Carbonnelle, J. van Loco, H. Beernaert, W. Baeyens, W. Traag, T. Bovee, G. Jacobs and G. Schoeters: The CALUX bioassay: Current status of its application to screening food and feed. *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **25**: 410-420 (2006).
- (6) BioDetection Systems b. v. (BDS): Training-manual BDS' DR CALUX<sup>®</sup> bioassay. TACTRI. Wufeng Taichung, Taiwan, R.O.C. (2004).
- (7) T. H. Shyu, Y. H. Lee, M. L. Lee, S. Y. Lu, C. Chu, C. I. Wu and C. W. Kao: Determination of PCDDs/DFs and Dioxin-like PCBs in egg and fish feed samples in Taiwan by the DR CALUX<sup>®</sup> bioassay. *Organohalogen Compd.*, **71**: 418-422 (2009).
- (8) T. H. Shyu, Y. H. Lee, C. I. Wu and C. W. Kao: Determination of PCDDs/DFs/DL-PCBs in duck egg, salted duck egg and century egg samples by the DR CALUX<sup>®</sup> bioassay. *Organohalogen Compd.*, **72**: 922-924 (2010).
- (9) P. A. Behnisch, K. Hosoe and S. I. Sakai: Brominated dioxin-like compounds: in vitro assessment in comparison to classical dioxin-like compounds and other polyaromatic compounds. *Environ. Int.*, **29**: 861-877 (2003).
- (10) Commission Directive 2002/70/EC: Establishing requirements for the determination of levels of dioxins and dioxin-like PCBs in feedingstuffs. *Offic. J. Eur. Commum.*, **L209**: 15-21 (2002).
- (11) M. S. Hsu, K. Y. Hsu, S. M. Wang, U. Chou, S. Y. Chen, N. C. Huang, C. Y. Liao, T. P. Yu and Y. C. Ling: A total diet study to estimate PCDD/Fs and dioxin-like PCBs intake from food in Taiwan. *Chemosphere*, **67**: S65-S70 (2007).
- (12) 潘文涵、吳幸娟、葉志嶸、莊紹源、張新儀、葉乃華、謝耀德：台灣人飲食與健康之趨勢：1993-1996與2005-2008兩次營養健康調查之比較。In: 2005-2008台灣國民營養健康狀況變遷調查結果，pp. 17-40。行政院衛生署，台北，中華民國(2009)。
- (13) 食品中戴奧辛處理規範。中華民國95年4月18日衛署食字第0950402677號令發佈。
- (14) M. G. Porpora, E. Medda, A. Abballe, S. Bolli, I. De Angelis, A. di Domenico, A. Ferro, A. M. Ingelido, A. Maggi, P. B. Panici and E. De Felip: Endometriosis and Organochlorinated Environmental Pollutants: A Case-Control Study on Italian Women of Reproductive Age. *Environ. Health Perspect.*, **117**: 1070-1075 (2009).
- (15) H. Takigami, G. Suzuki and S. Sakai: Application of Bioassays for the Detection of Dioxins and Dioxin-like Compounds in Wastes and the Environment. In: *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry—Biological Responses to Chemical Pollutants* (Y. Murakami eds.), vol. 1, pp. 87-94. TERRAPUB, Tokyo, Japan (2008).