



平成24-25年度環境研究総合推進費(委託費)【若手】

5RFc-1201

簡単な試料前処理のみで実施できる
ダイオキシン土壌汚染バイオアッセイキットの開発

平成24年度～25年度 (実施期間2年間)

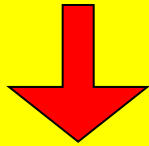
予算額: 11,202千円 (初年度5,745千円, 2年目5,457千円)

大阪府立大学理学系研究科
生物学専攻/放射線研究センター

川西優喜

研究体制

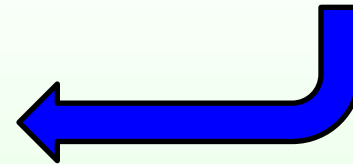
研究代表者
大阪府立大学
理学系研究科
川西優喜



【サブテーマ1】川西優喜
簡単な試料前処理のみで実施できる
ダイオキシン土壤汚染バイオアッセイ
キットの開発

研究体制

大阪府立大学
理学系研究科
教授 八木孝司
研究員 原島小夜子
大学院生 森健太郎



支援体制

研究開発目的

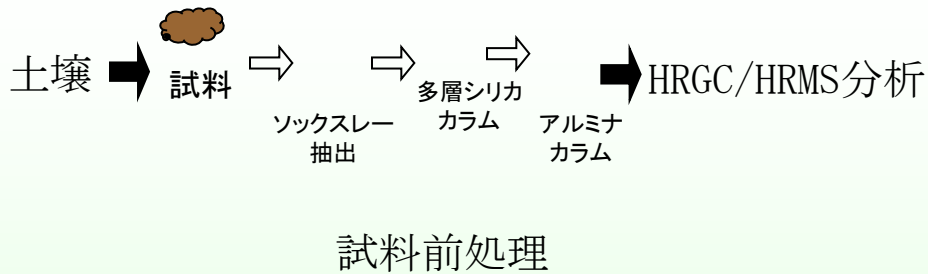
簡単な試料前処理で実施可能なダイオキシン土壤汚染
1次スクリーニング用アッセイキットの開発

概略

ダイオキシン土壤汚染調査

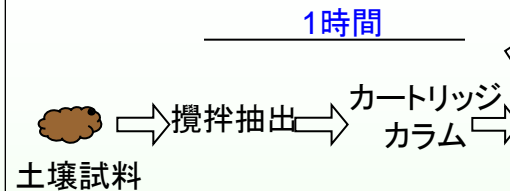
現状

分析委託→高コスト・時間(2週間)



本提案

1 迅速な試料前処理法開発



2 酵母の高感度化

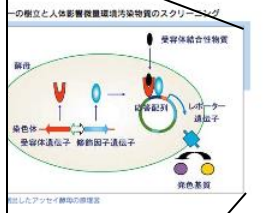
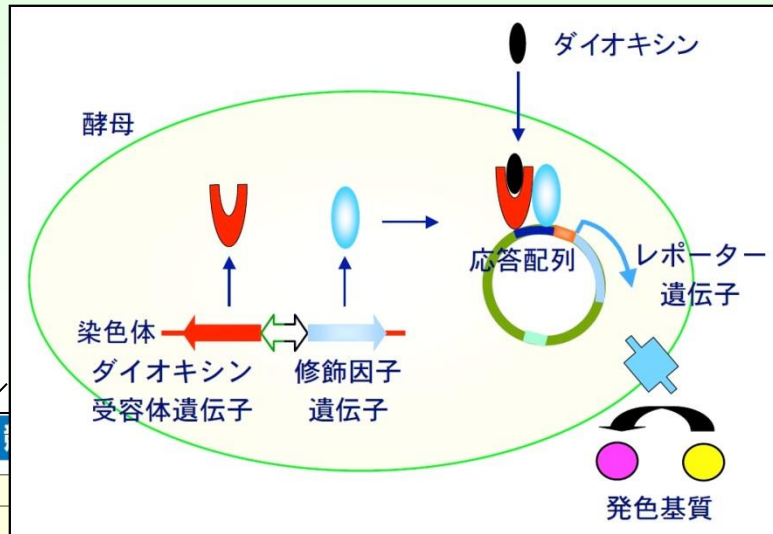
分析コストの削減・分析時間の短縮に貢献

ダイオキシン類検出バイオアッセイ酵母

NEDO若手研究助成(2006-08)

遺伝子組換え技術でヒトダイオキシン受容体(hAhR)全長発現バイオアッセイ酵母を開発

競合測定法より迅速・簡便・安価なダイオキシン類検出法として高い評価
(中間評価:4人中3委員が最高点)
(事後評価:1委員最高点,2委員が次点)



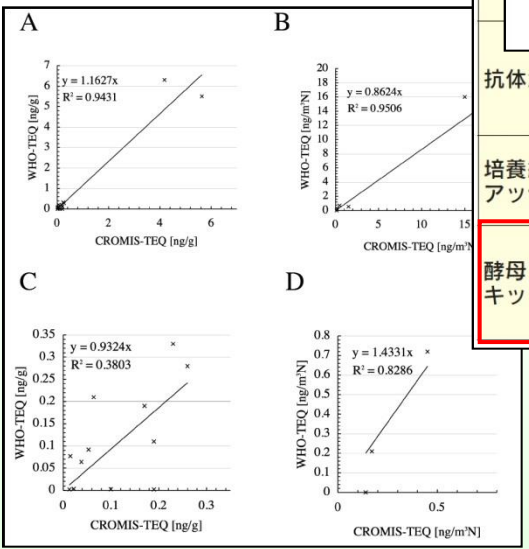
この測定と人体影響環境汚染物質のスクリーニング
せん。酵母の安定性を長期間にわたって試す必要
があります。こうした課題を克服し、本酵母を最
適に利用します。

【産業応用の可能性】
これまでの企業との共同研究(2006)以来、
共同研究として、平成15年度～平成16年度に
共同研究を実施しました。平成16年度に共同研
究を実施し、本酵母の安定性を長期間にわた
って試す必要があり、本酵母を最適に利用す
るための課題を克服し、本酵母を最適に利用
します。

【備考】
アンタゴニスト(注2)・アゴニスト(注3)の区別ができない
細胞培養技術が必要

抗体法	1日	高校理科室レベル	100,000円~140,000円/96ウェル(注1)	0.1~*1nM
培養細胞アッセイ	×	×	△	○
	4~5日	専用設備	約50,000円/検体(受託価格)	0.001~0.01nM
酵母アッセイキット(本研究)	△	○	○	△
	2日	高校理科室レベル	48,000円/96ウェル(注1)(AhR, ERαキット)	約0.5nM(AhR, ERαキット)

公定法と高い相関
一廃/産廃焼却炉
の焼却残渣/飛
灰・燃焼/排出ガ
ス試料 ($r^2=0.86\sim$
 0.94)、偽陰性・
偽陽性なし (n=20)



商品化し長瀬産業(株)から上市

キットの概要
キットの構成
分析手順
分析例

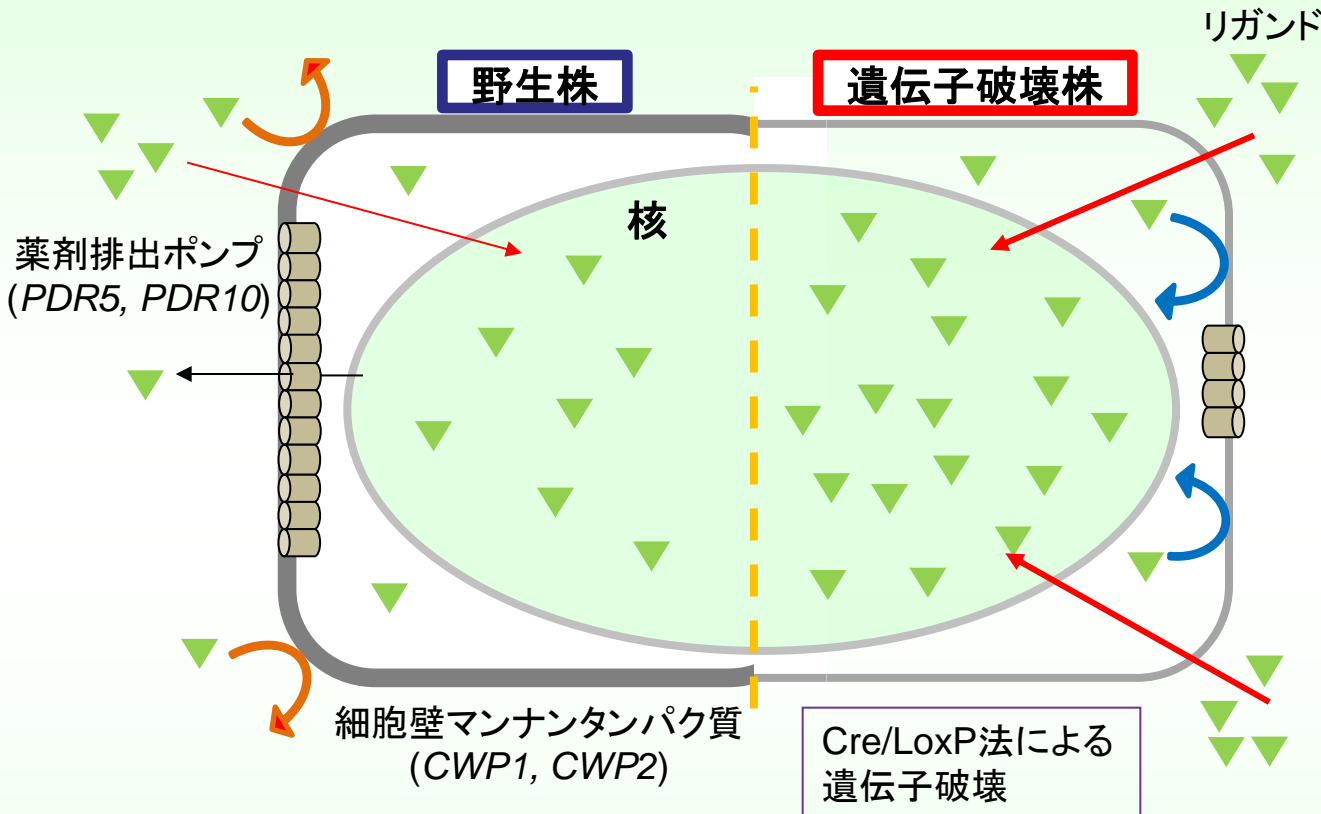
プロジェクトリーダー 川島 浩二
川島 浩二 大阪府立大学 理学部環境学専攻 助教

NEDO成果実例集より

(社)近畿化学協会 第9回環境技術賞受賞

アッセイ酵母の高感度化 1

宿主酵母の遺伝子を破壊



$cwp1\Delta, cwp2\Delta$ → リガンドの取り込み ↑

$pdr5\Delta, pdr10\Delta$ → リガンドの排出 ↓

細胞内の
リガンド蓄積

→ 感度 ↑

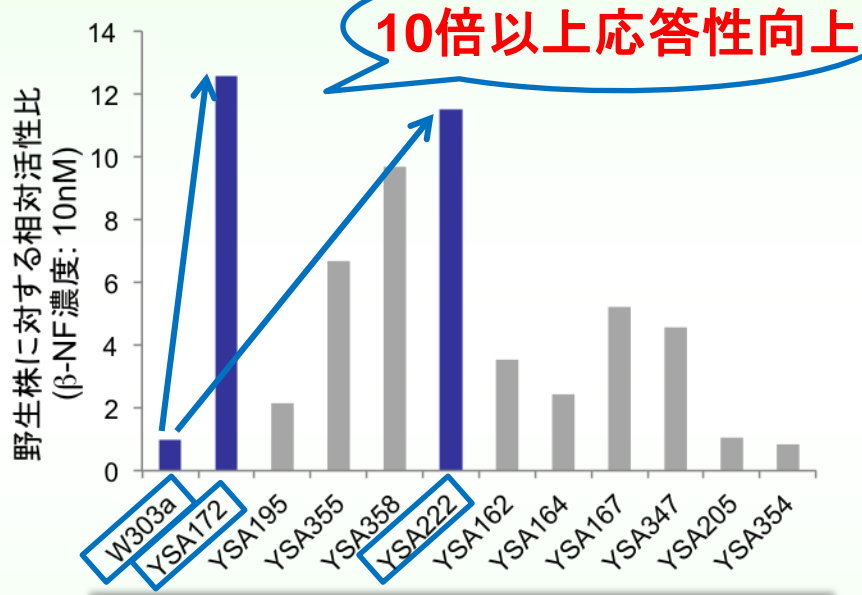
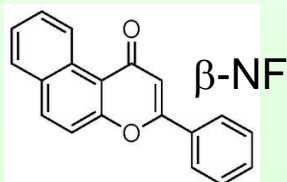
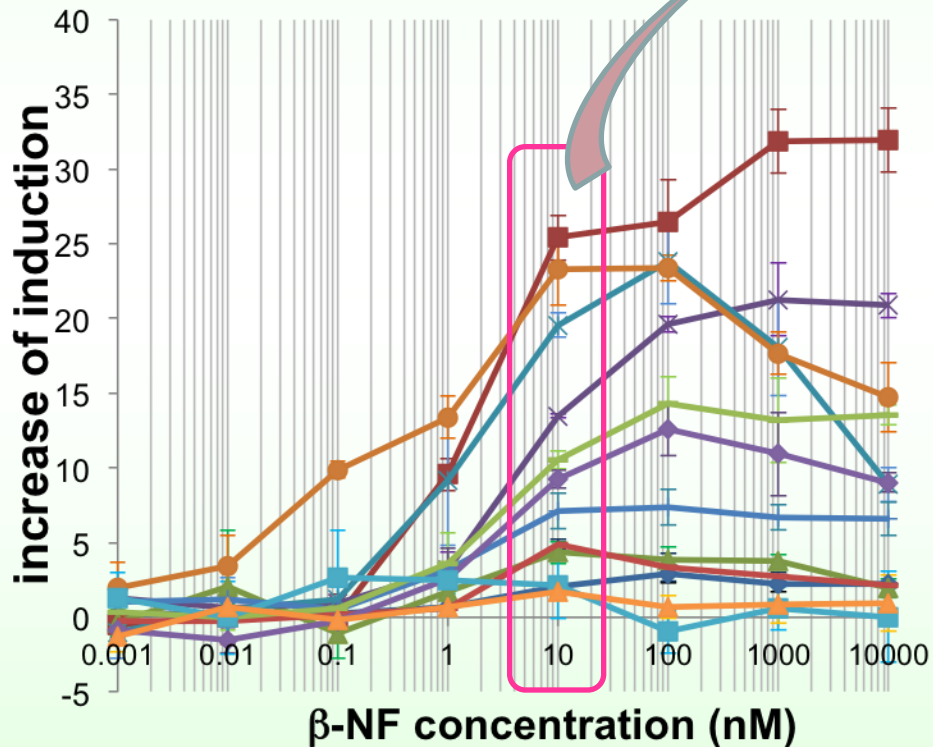
遺伝子破壊によるアッセイ酵母の高感度化

前培養 (18h)

リガンド曝露 (22h)

発色測定

AhR発現誘導



酵母株	β -NFに対する応答性	
	検出限界濃度 (nM)	EC ₅₀ (nM)
W303a (Wt)	0.66	3.8
YSA172	0.14	1.6
YSA222	0.0061	3.2

5~100 倍感度向上

アッセイ酵母の高感度化2

遺伝子破壊型アッセイ酵母のプロトプラスト化

プロトプラスト化 Method

酵母懸濁液 (蒸留水に懸濁)	3 ml
1.5 M D-sorbitol	5 ml
0.1 mg/ml Zymolyase (蒸留水に懸濁)	1 ml
蒸留水	1 ml
<hr/>	
Total	10 ml

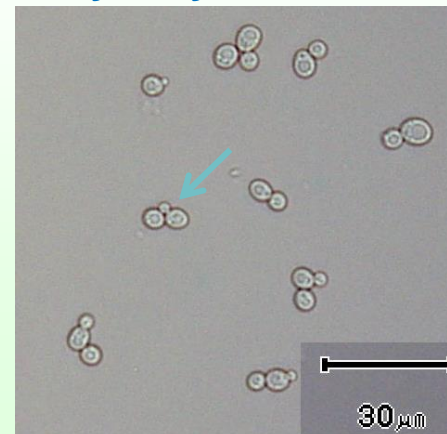


25°C, 2 h, gentle shake (120 rpm)

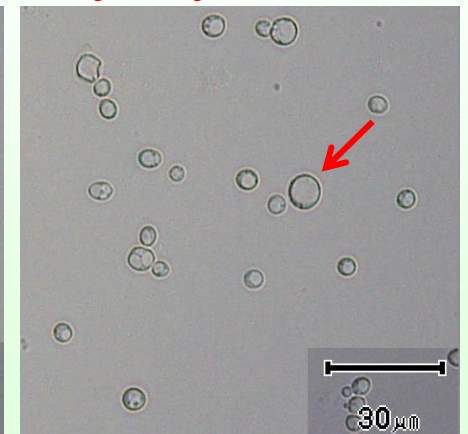
酵母細胞壁の構成成分

分子	細胞壁における重量比 (%)	平均分子量 (kDa)
mannoprotein	30 - 50	100 - 200
β 1, 6-glucan	5 - 10	24
β 1, 3-glucan	30 - 45	240
chitin	1.5 - 6	25

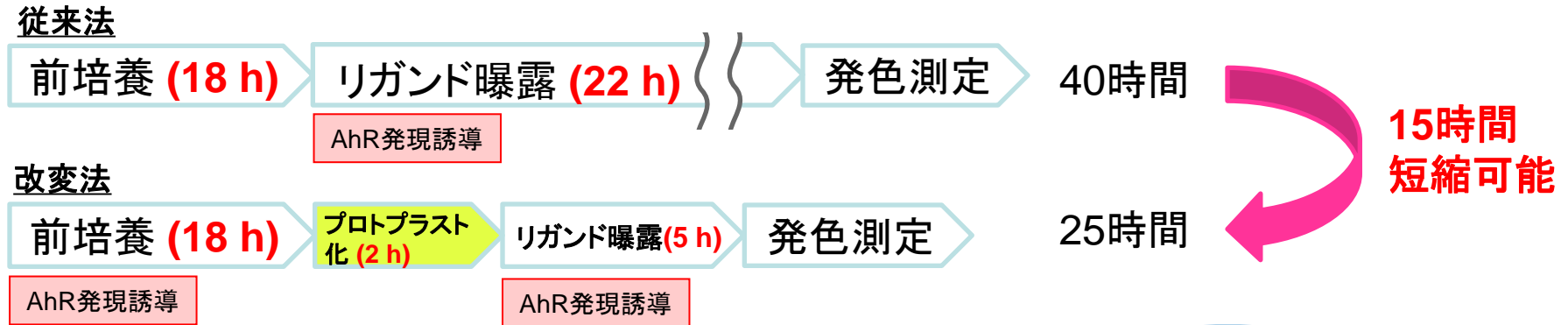
Zymolyase処理前



Zymolyase処理後

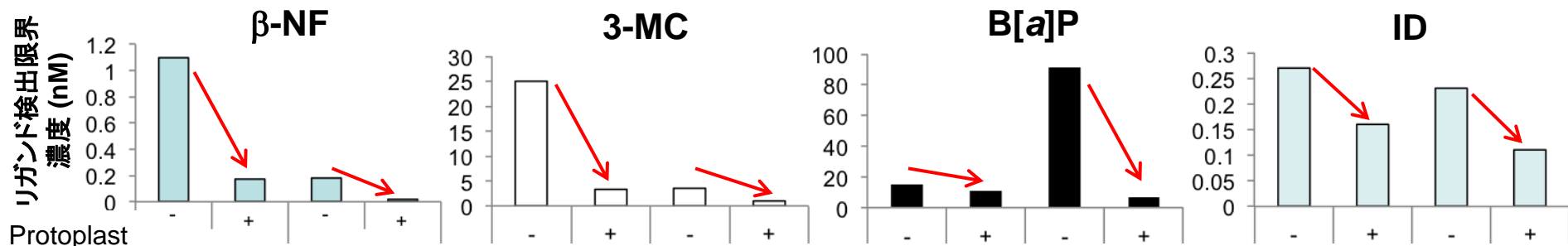


アッセイプロトコル改変および 遺伝子破壊型アッセイ酵母のプロトプラスト化による アッセイ短時間化・高感度化



2~10 倍感度向上

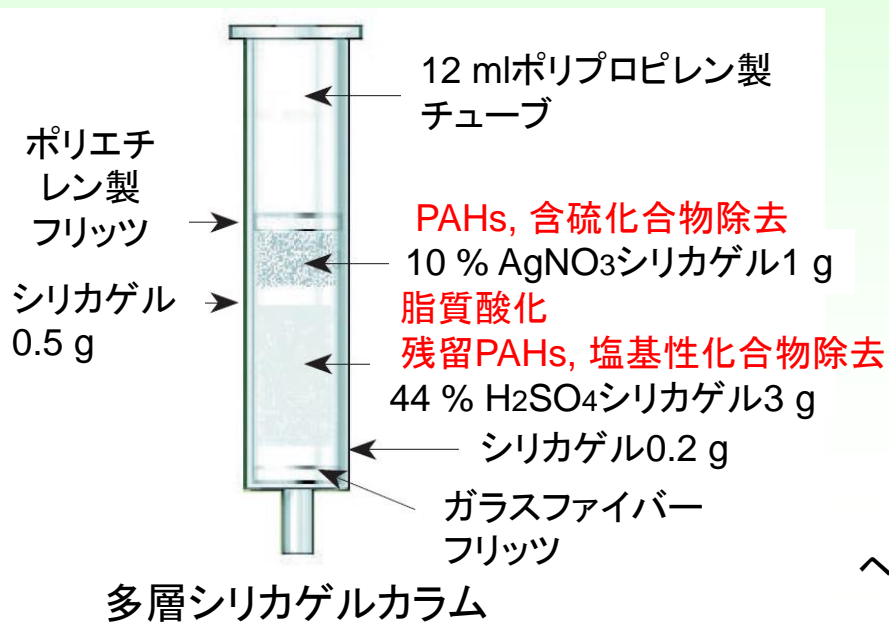
各酵母株およびそのプロトプラストのリガンド検出限界濃度



- アッセイ時間を15時間短縮
- プロトプラストアッセイ酵母でアッセイ可能、感度上昇

β-NF	β-naphthoflavone
3-MC	3-methylcholanthrene
B[a]P	benzo[a]pyrene
ID	indirubin

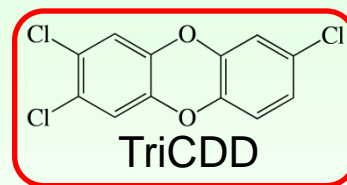
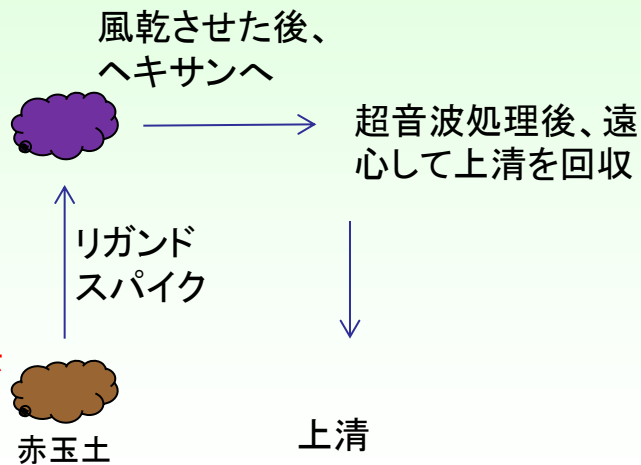
迅速な試料前処理法の開発



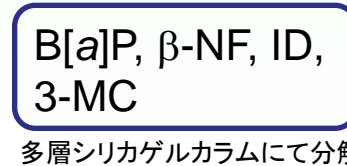
カーボンリバーシブルカラム



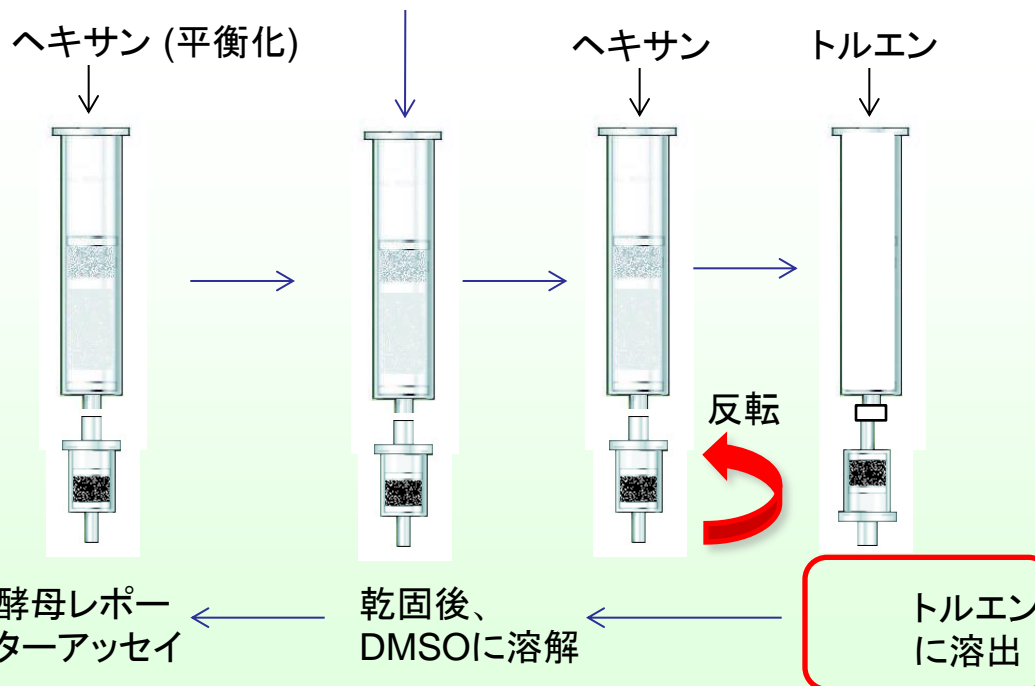
ダイオキシン類吸着



毒性等価係数TEF=0
多層シリカゲルカラムにて非分解



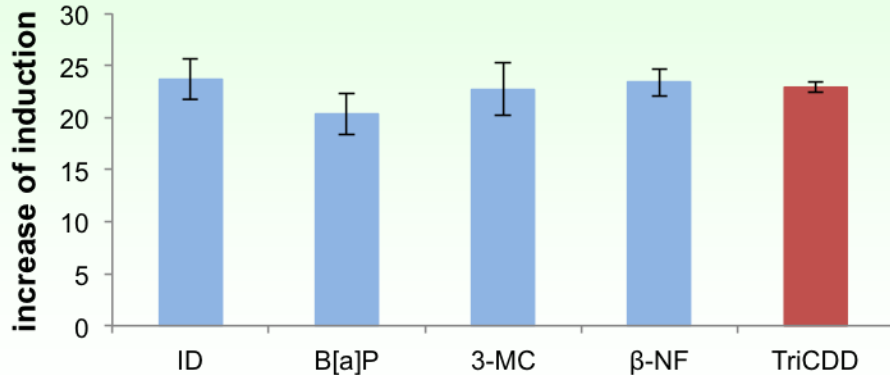
多層シリカゲルカラムにて分解



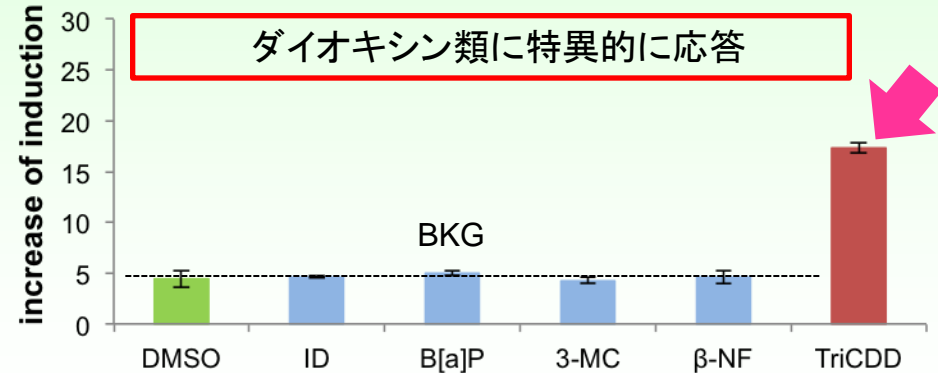
SUPELCO, SIGMA-ALDRICH社製

不純物質除去とダイオキシン類の回収

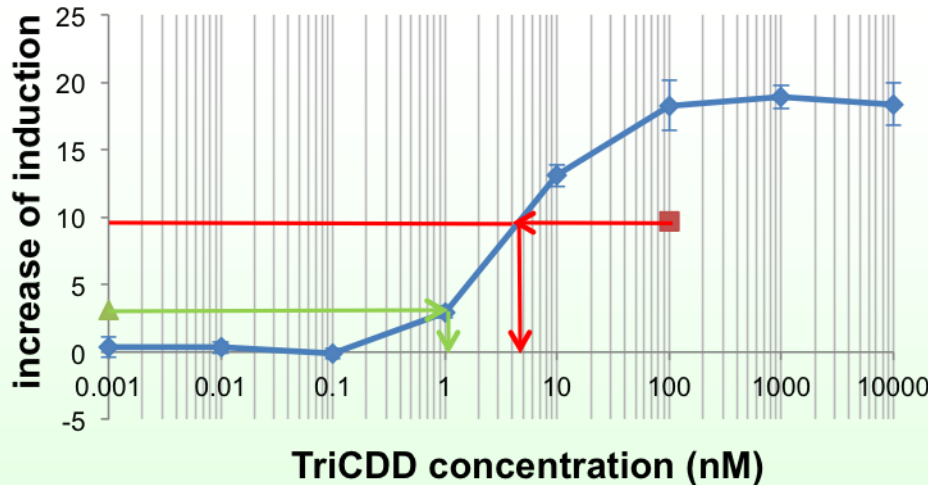
カラム処理前



カラム処理後



前処理でのTriCDD回収率算出



TriCDD回収率68.6%

TriCDD検出限界濃度
1.5 nM (3 σ 法)

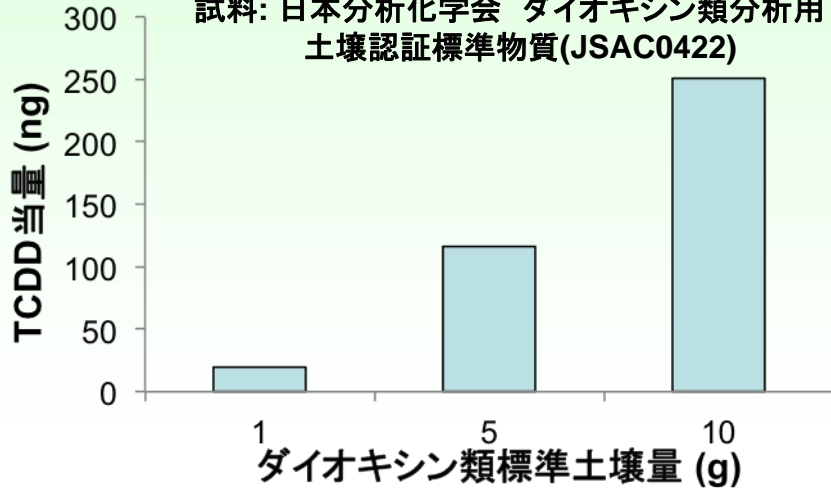
0.061 [ng/g土壌]のTriCDDを検出可

cf. 環境基準 1,000 [pg-TEQ/g]
調査指標値 250 [pg-TEQ/g]

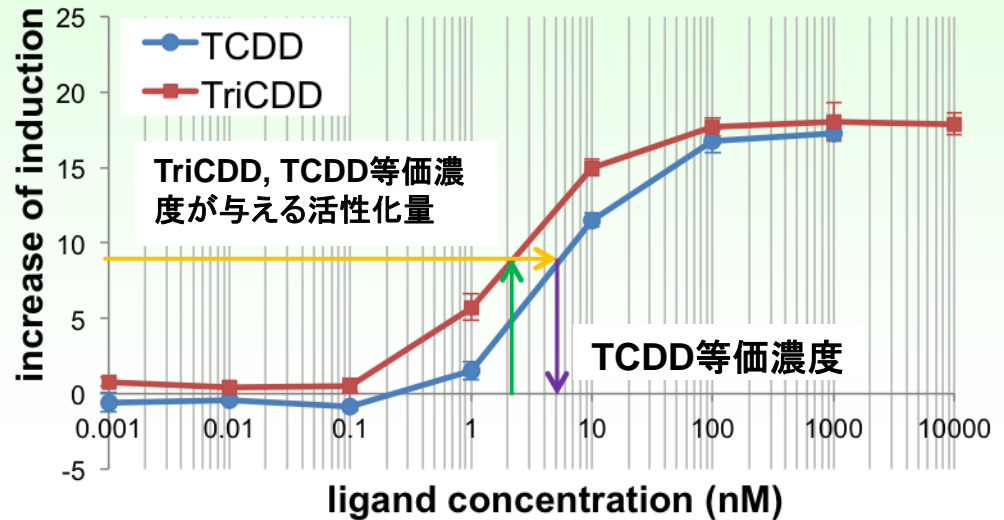
簡易カラム処理と組み合わせ、酵母レポーターアッセイ法で、ダイオキシン類を特異的に検出した。

実際の汚染土壌の測定

汚染森林土の酵母アッセイによる測定
試料: 日本分析化学会 ダイオキシン類分析用
土壌認証標準物質(JSAC0422)



TCDD, TriCDDの検量線



機器分析法と酵母レポーターアッセイ法で求めた
TCDD毒性当量値 (TEQ)

機器分析法	酵母レポーターアッセイ法
TEQ (pg/g)	TEQ (pg/g)
111.4 ± 9.6	23,000

ヒトの毒性等価係数TEFと
酵母のAhR活性化係数

ダイオキシン類	ヒト	酵母
TCDD	1	1
TriCDD	0	4

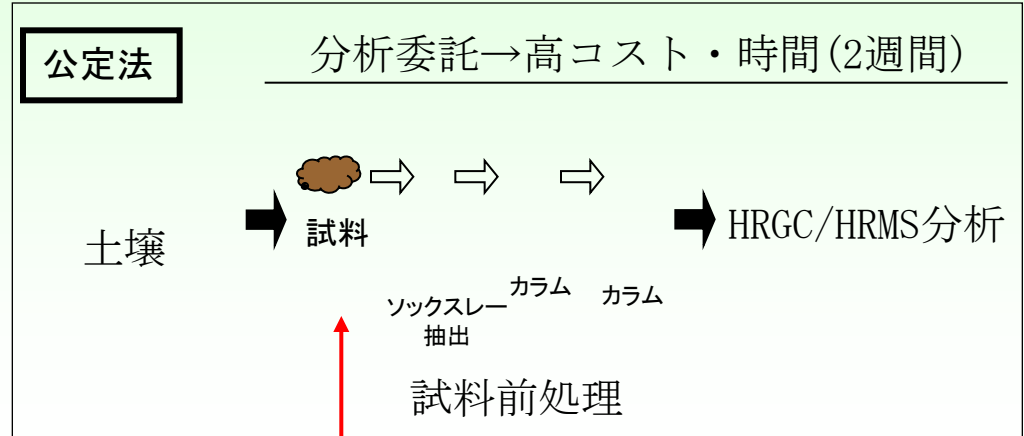
実際の汚染山林土壌 1gでダイオキシン類を検出可能
定量値(TEQ値)は過大、試料中の異性体多種のため？

1次スクリーニングとしては有用

本成果の科学的・技術的意義

【現状】ダイオキシン類分析(公定法)

- ・多段階の抽出・精製操作
- ・極めて高額な高分解能GC/MS
→高コスト、長時間
→分析を専門業者に委託



【本成果】簡易スクリーニングでダイオキシン汚染試料を選別

迅速・簡便な試料前処理・酵母アッセイで汚染有無判定

↓
陽性判定試料のみに対して公定法分析

↓
汚染調査費用と時間の大幅な低減



本研究の環境政策への貢献

2010年（新たな調査の契機等の追加）改正土壌汚染対策法 施行



土壌汚染調査件数の増加が見込まれる

しかし

汚染調査は費用と時間が多大



中小企業の負担大



土壌汚染リスク管理の制約

そのため

低コストの土壌汚染調査法開発



健康リスクの低減

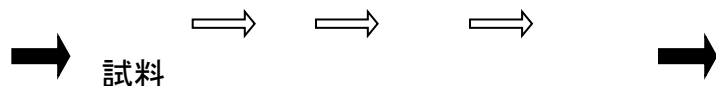
【重点課題17】② 土壌汚染対策法、ダイキシン類対策特別措置法

ダイオキシン土壌汚染調査

現状

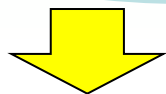
分析委託→高コスト・時間(2週間)

土壌



HRGC/HRMS分析

本成果



分析コスト・時間の削減に貢献

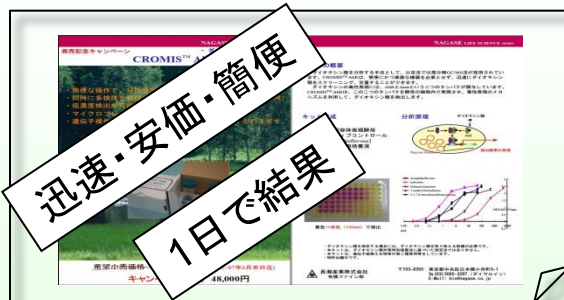
簡易前処理開発

1時間



ディスポ多層カラムを用いた
酵母アッセイ用簡易抽出法

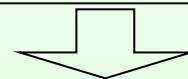
ダイオキシン検出酵母の改良



細胞壁破碎・薬物排出ポンプを
破壊した高感度化酵母株



迅速、簡便、安価
ダイオキシン汚染
土壌の一次
スクリーニング法



陽性試料のみを
公定法分析へ

ご清聴ありがとうございました。