



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
ダイオキシン土壤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

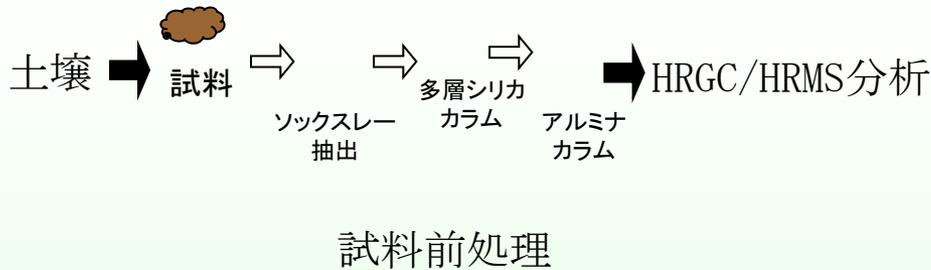
簡単な試料前処理で実施可能なダイオキシン土壤汚染
1次スクリーニング用アッセイキットの開発

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



提案者らのダイオキシン検出酵母キット

2 酵母の高感度化

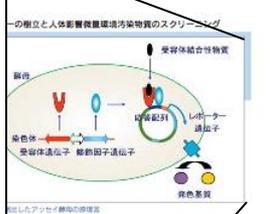
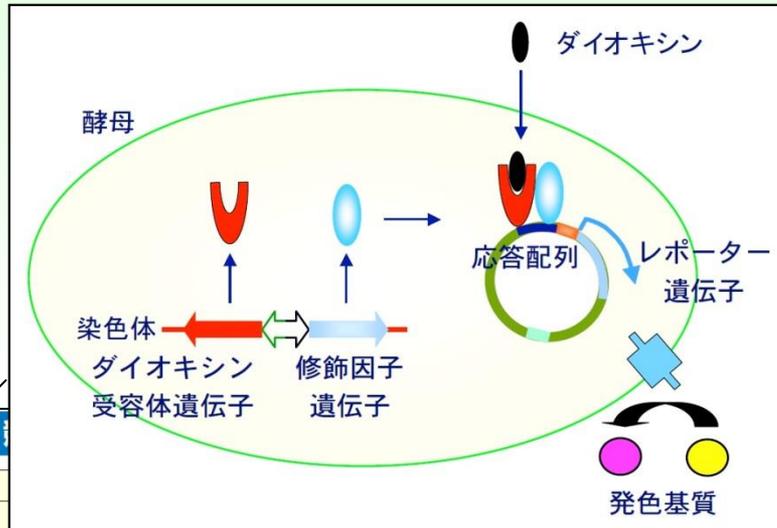
分析コストの削減・分析時間の短縮に貢献

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
同研究を行っています。平成15年度～平成
16年度に3回、平成16年度に2回共同研究の
共同研究を実施しました。

【産業応用の可能性】
少量測定法の開発(生物
学的)は、公定法(生物
学的)と異なり、研究
が容易です。また他の酵母も、
一代培養としての機能が
発現し、発現が容易で
なく、医薬品製造の場
合に、発現のコントロール
が容易です。また、本
酵母は生活環境との関
係が深いと考えられて
います。また、本酵母
は、研究開発の場
合に、発現のコントロール
が容易です。また、本
酵母は生活環境との関
係が深いと考えられて
います。

【産業応用の可能性】
少量測定法の開発(生物
学的)は、公定法(生物
学的)と異なり、研究
が容易です。また他の酵母も、
一代培養としての機能が
発現し、発現が容易で
なく、医薬品製造の場
合に、発現のコントロール
が容易です。また、本
酵母は生活環境との関
係が深いと考えられて
います。

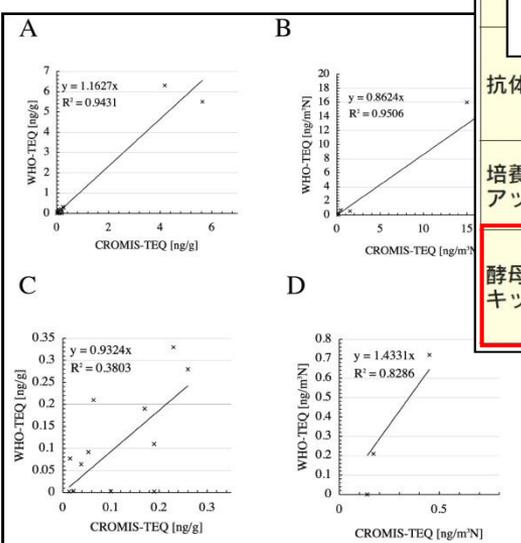
備考
アンタゴニスト(注2)・アゴニ
スト(注3)の区
別ができない
細胞培養技術
が必要

前回のレポート
の続きとして、本酵母の
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】
少量測定法の開発(生物
学的)は、公定法(生物
学的)と異なり、研究
が容易です。また他の酵母も、
一代培養としての機能が
発現し、発現が容易で
なく、医薬品製造の場
合に、発現のコントロール
が容易です。また、本
酵母は生活環境との関
係が深いと考えられて
います。

【産業応用の可能性】
少量測定法の開発(生物
学的)は、公定法(生物
学的)と異なり、研究
が容易です。また他の酵母も、
一代培養としての機能が
発現し、発現が容易で
なく、医薬品製造の場
合に、発現のコントロール
が容易です。また、本
酵母は生活環境との関
係が深いと考えられて
います。

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 ($n=20$)



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)

商品化し長瀬産業(株)から上市

(社)近畿化学協会 第9回環境技術賞受賞

【キットの概要】
ダイオキシン類を分析するに必要として、必須で環境汚染物質のスクリーニングに利用されています。CROMIS-TEQ AhRは、簡単に高精度の測定を必要とせず、迅速にダイオキシン類をスクリーニングし、環境汚染物質のスクリーニングに利用されています。ダイオキシン類のスクリーニングに利用されています。ダイオキシン類のスクリーニングに利用されています。

【キットの構成】
1. 検体受容体発現酵母
2. 発色基質
3. アッセイ用緩衝液
4. 発色基質

【分析手順】
1. 検体受容体発現酵母
2. 発色基質
3. アッセイ用緩衝液
4. 発色基質

【分析結果】
発色基質(黄色)で測定

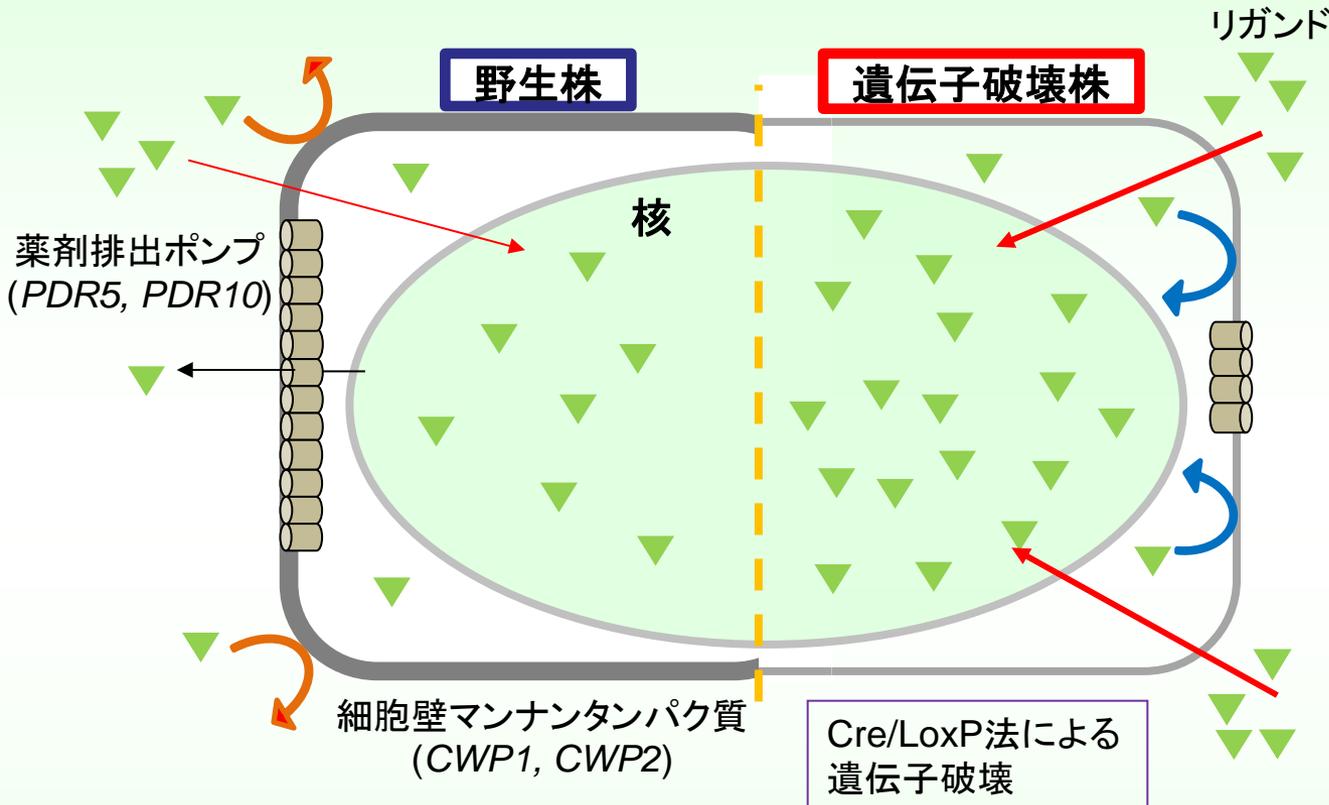
は市場に流通しています。しかし市場において競争力のある商品とするため、検出感度の向上が必要となります。また、製品製造時には酵母を大量培養する必要があります。酵母の生育速度もさらに高速化し、短時間でアッセイが完了するようになります。また、製品製造時には酵母を大量培養する必要があります。酵母の生育速度もさらに高速化し、短時間でアッセイが完了するようになります。また、製品製造時には酵母を大量培養する必要があります。酵母の生育速度もさらに高速化し、短時間でアッセイが完了するようになります。

【産業応用の可能性】
少量測定法の開発(生物
学的)は、公定法(生物
学的)と異なり、研究
が容易です。また他の酵母も、
一代培養としての機能が
発現し、発現が容易で
なく、医薬品製造の場
合に、発現のコントロール
が容易です。また、本
酵母は生活環境との関
係が深いと考えられて
います。

NEDO成果実例集より

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 ↑

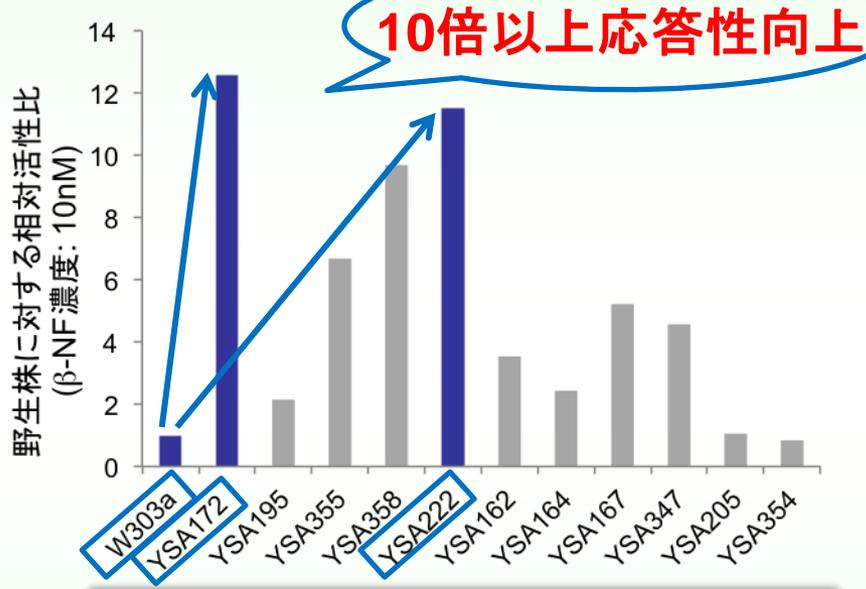
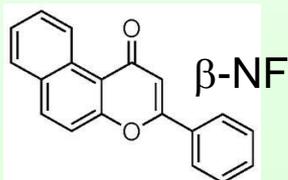
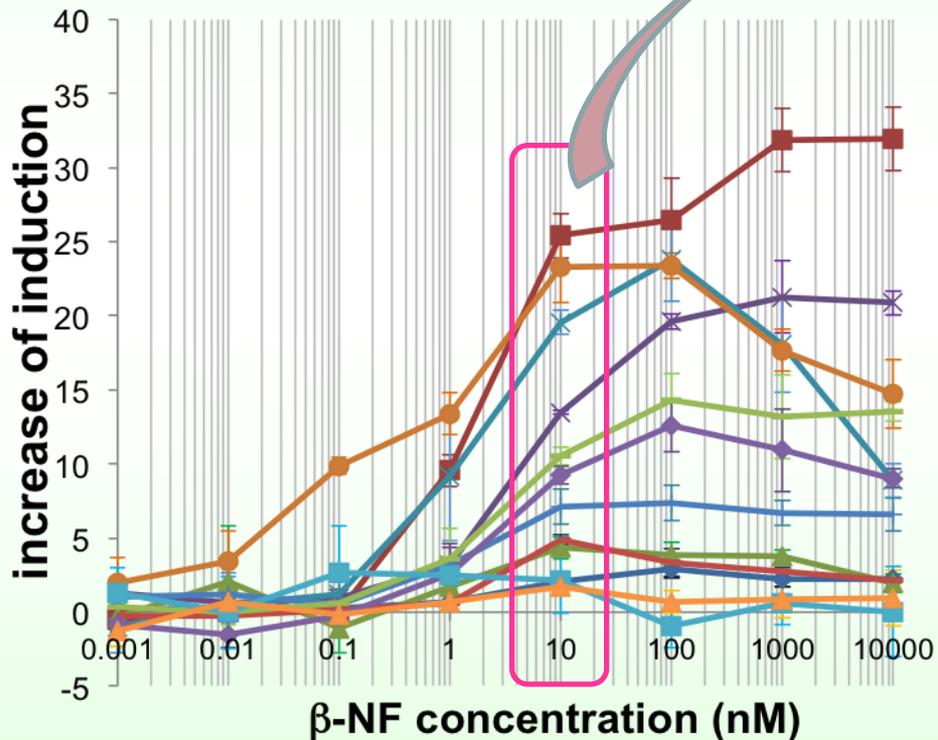
遺伝子破壊によるアッセイ酵母の高感度化

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

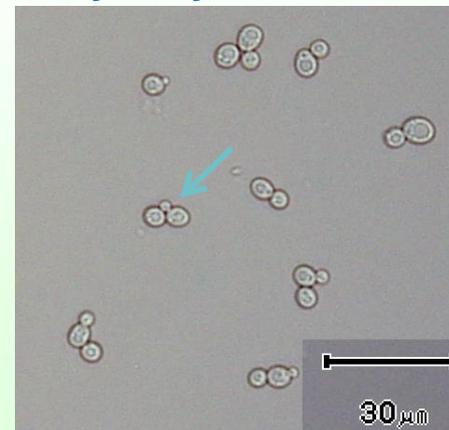


25°C, 2 h, gentle shake (120 rpm)

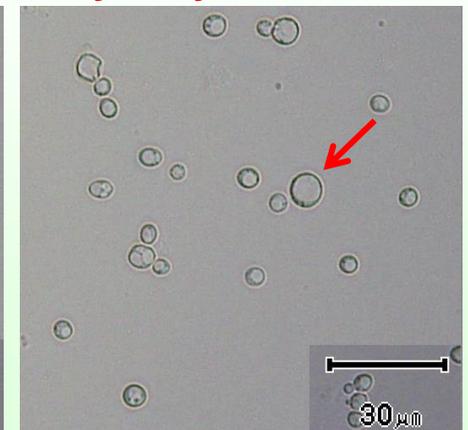
酵母細胞壁の構成成分

分子	細胞壁における重量比 (%)	平均分子量 (kDa)
mannoprotein	30 - 50	100 - 200
β1, 6-glucan	5 - 10	24
β1, 3-glucan	30 - 45	240
chitin	1.5 - 6	25

Zymolyase処理前



Zymolyase処理後

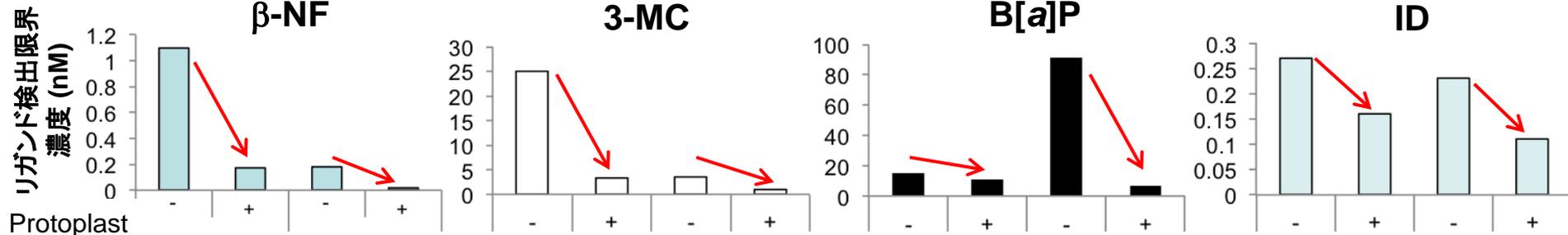


アッセイプロトコル改変および 遺伝子破壊型アッセイ酵母のプロトプラスト化による アッセイ短時間化・高感度化



2~10 倍感度向上

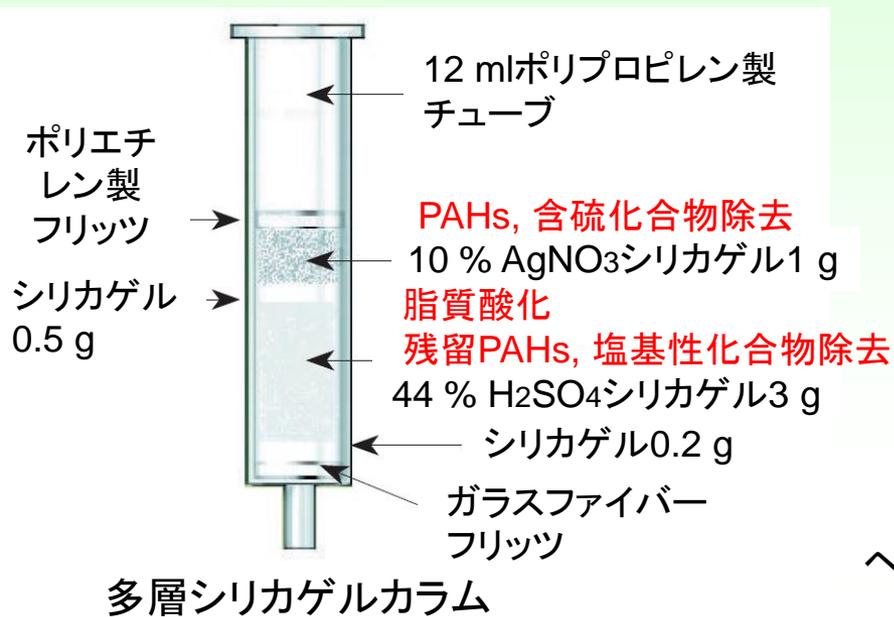
各酵母株およびそのプロトプラストのリガンド検出限界濃度



- 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

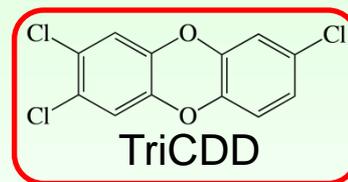
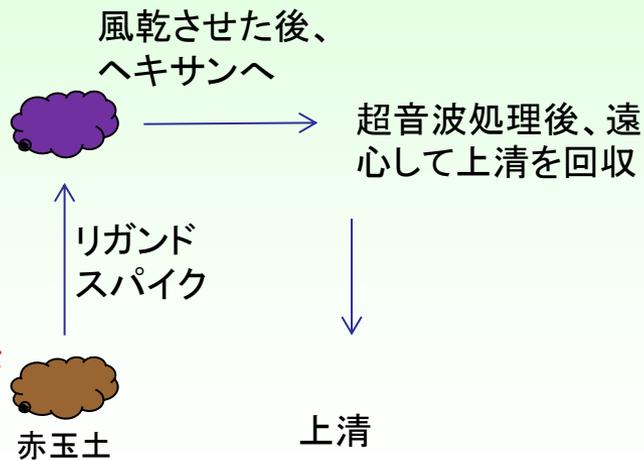
迅速な試料前処理法の開発



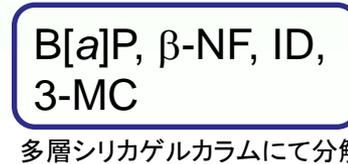
カーボンリバーシブルカラム



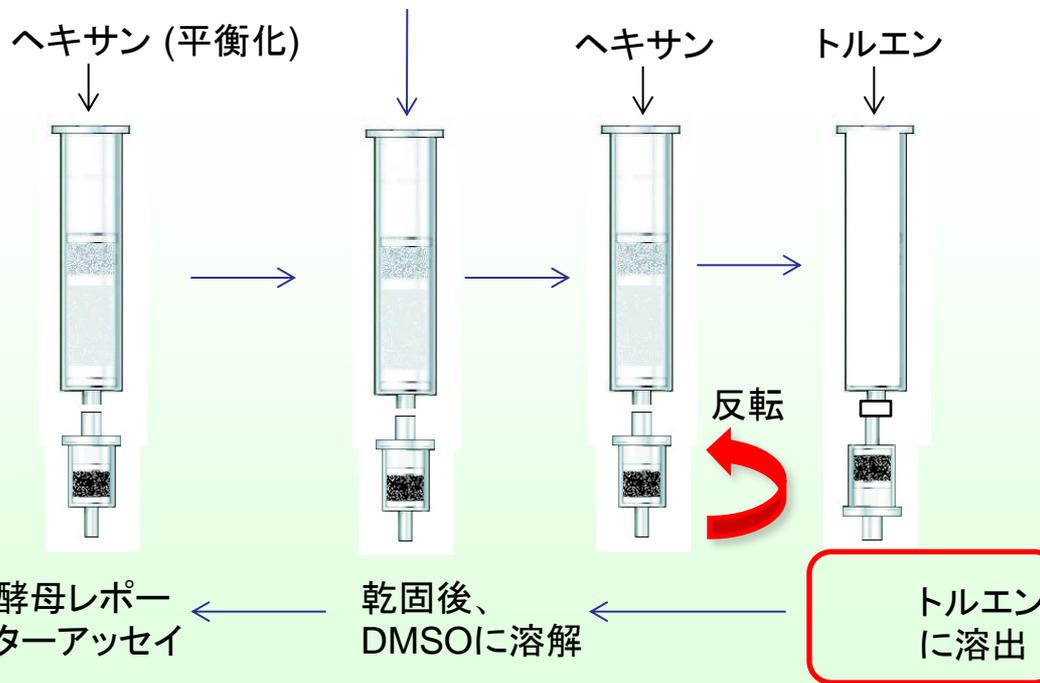
ダイオキシン類
吸着



毒性等価係数TEF=0
多層シリカゲルカラムにて非分解



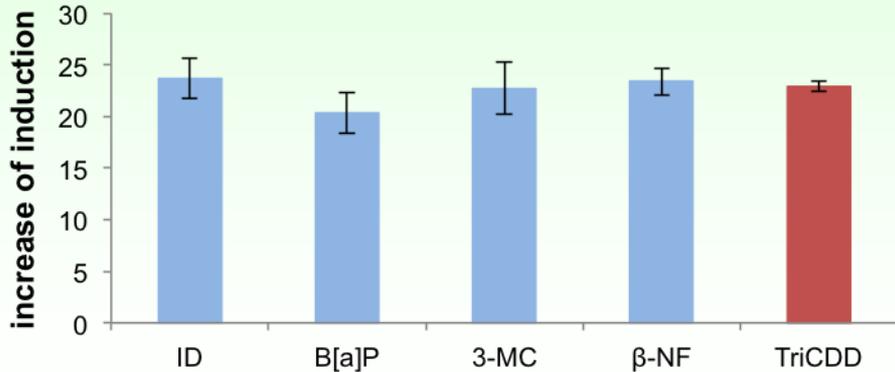
多層シリカゲルカラムにて分解



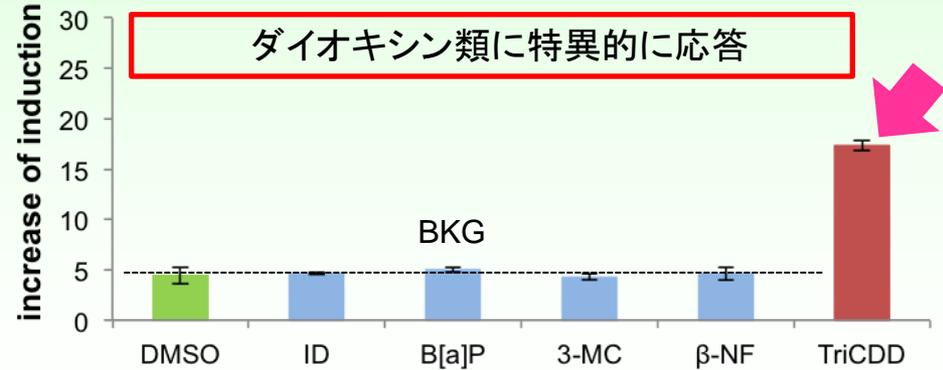
SUPELCO, SIGMA-ALDRICH社製

不純物質除去とダイオキシン類の回収

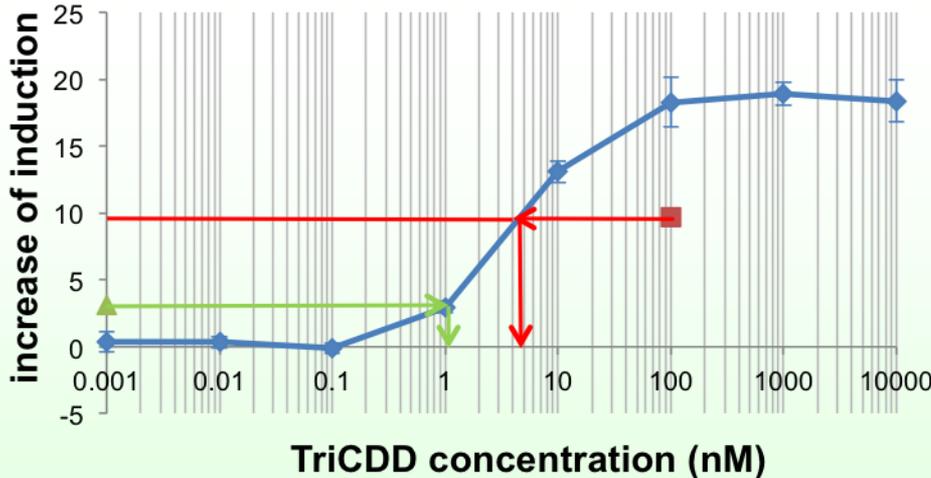
カラム処理前



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 (3σ法)

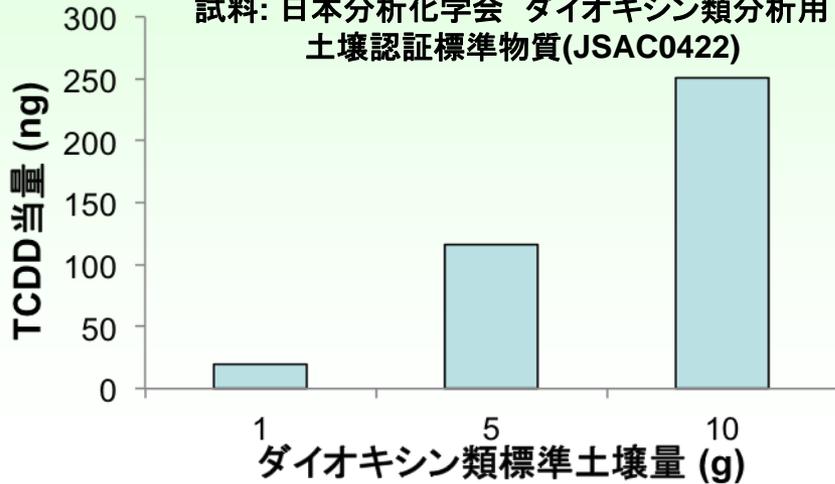
0.061 [ng/g土壌]のTriCDDを検出可

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

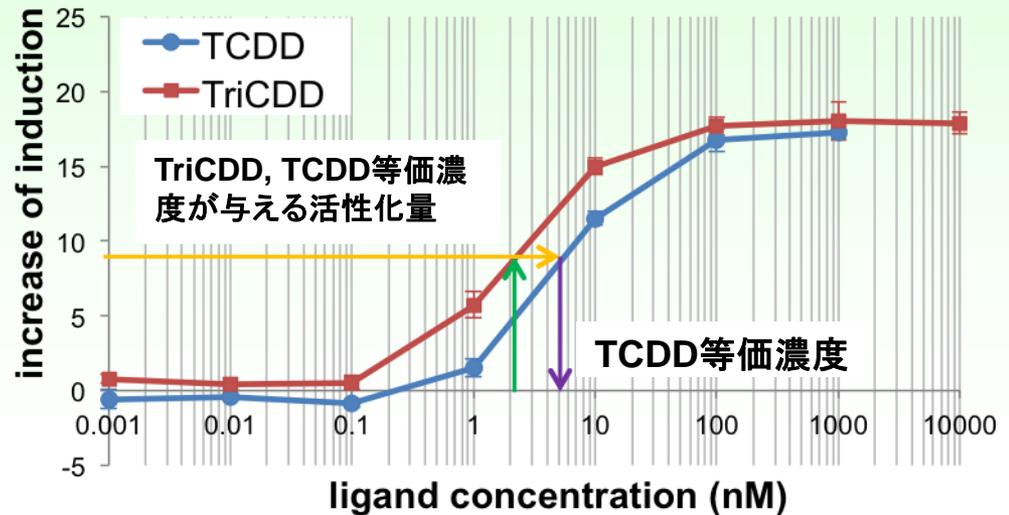
簡易カラム処理と組み合わせ、酵母レポーターアッセイ法で、ダイオキシン類を特異的に検出した。

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

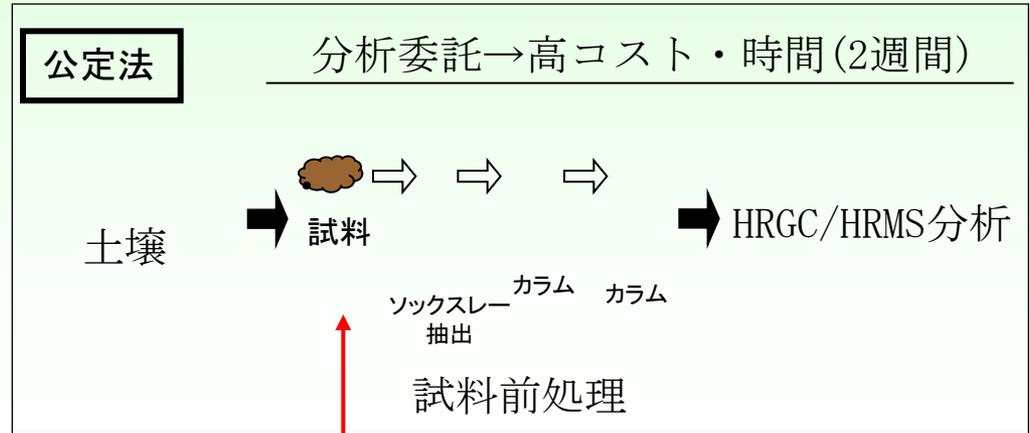
実際の汚染山林土壌 1gでダイオキシン類を検出可能
定量値(TEQ値)は過大、試料中の異性体多種のため？

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

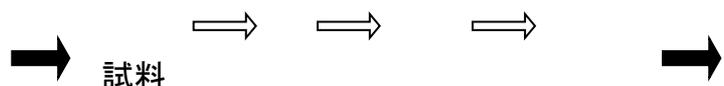
【重点課題17】② 土壌汚染対策法、ダイキシン類対策特別措置法

ダイオキシン土壌汚染調査

現状

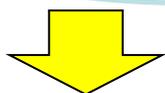
分析委託→高コスト・時間(2週間)

土壌



HRGC/HRMS分析

本成果



分析コスト・時間の削減に貢献

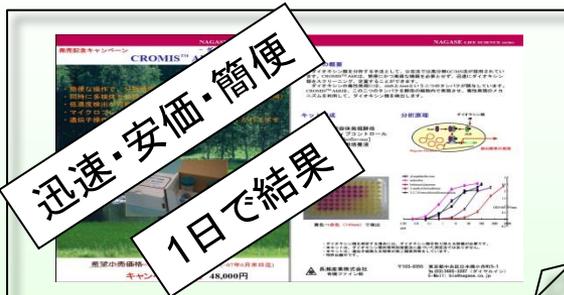
簡易前処理開発

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

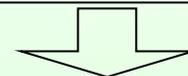
ダイオキシン検出酵母の改良



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。