

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：25850091

研究課題名(和文) 農水産物中のダイオキシン類の生物学的測定法の開発とその適用

研究課題名(英文) Development and its application of biological measurement of dioxins in the farm and marine products

研究代表者

福田 伊津子 (FUKUDA, Itsuko)

神戸大学・農学研究科・助教

研究者番号：50418943

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らはこれまで、活性化したダイオキシン受容体(アリール炭化水素受容体、AhR)をダイオキシン応答配列を含むオリゴヌクレオチドプローブを用いて定量的に検出できる簡易測定法ELISAを開発している。本研究では、これをさらに改良してより簡便に農水産物中のダイオキシン類を測定することを試みた。残念ながら、研究期間中に公定法と改良ELISA法の比較検討に至らなかったが、エビのダイオキシン類を公定法により測定した結果、外国産エビの1検体で他の2検体と比較しておよそ10倍の高濃度のダイオキシン類が検出されたことから、市場や加工段階での簡易測定法の開発が望ましいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have developed an ELISA system, which can quantify the transformed dioxin receptor (aryl hydrocarbon receptor, AhR) protein using dioxin responsive element (DRE) oligonucleotide probe. In this study, we tried to further improve this system and to measure dioxins in the farm and marine products more conveniently. Unfortunately, during this research period we could not reach a comparative study between the official method and the improved ELISA method. As a result of measuring dioxins in the shrimps by the official method, 10 times higher concentrations of dioxins were detected in one specimen from a foreign country compared to the other two specimens. It is expected to develop a simple measurement method at the market and processing stage.

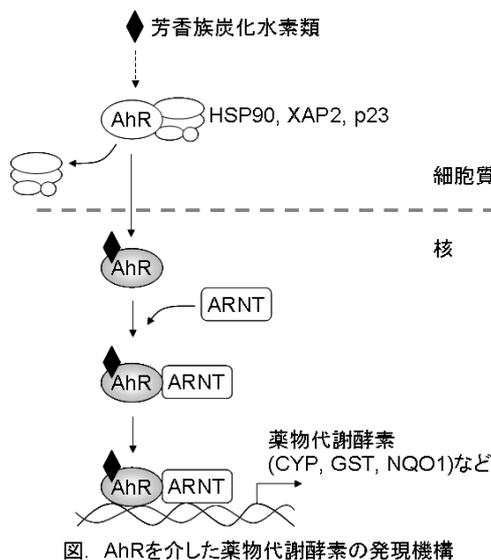
研究分野：食品科学

キーワード：ダイオキシン類 農水産物

1. 研究開始当初の背景

環境汚染物質であるダイオキシン類は、75種のポリ塩化ジベンゾ-p-ダイオキシン類(PCDDs)、135種のポリ塩化ジベンゾフラン類(PCDFs)、209種のコプラナーポリ塩化ビフェニル類(Co-PCBs)の総称であるが、このうち、実際に毒性を示す化合物としては、7種のPCDDs、10種のPCDFs、12種のCo-PCBsであることが世界保健機構(WHO)により提唱されている。環境中にはこれらの化合物が混在して存在するため、最も毒性の強い2,3,7,8-四塩化ジベンゾ-p-ダイオキシン(TCDD)の毒性を1として、その他のダイオキシン類の毒性を相対的に示す毒性等価係数(TEF)に存在量乗じて、これらの総和により求めた毒性等量(TEQ)により環境中のダイオキシン類量を表す。平成22年版環境・循環型社会・生物多様性白書によると、我が国におけるダイオキシン類排出総量、ダイオキシン摂取量、並びに食品からのダイオキシン類の一日摂取量の経年変化は減少傾向にあるが、我が国の食品の6割程度を輸入に依存していること等から、ダイオキシン類による健康影響への懸念は未だ払拭されていない。

ダイオキシン類は我々の体内に侵入すると、リガンド活性化型転写因子の一つであるアリール炭化水素受容体(AhR)を活性化し、第1酵素であるシトクロームP450 1A1(CYP1A1)、第2相酵素であるグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)、UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ(UGT)などの様々な薬物代謝酵素の発現誘導を制御する(下図参照)。



ダイオキシン類の定量には、従来、公定法である高分解能GC-MS法と簡易測定法であるレポーター遺伝子アッセイがあるが、前者には試料中の夾雑物を除去するための煩雑な前処理と高額機器である高分解能GC-MSが必要であり、後者には動物細胞培養の技術および施設が必要となる。

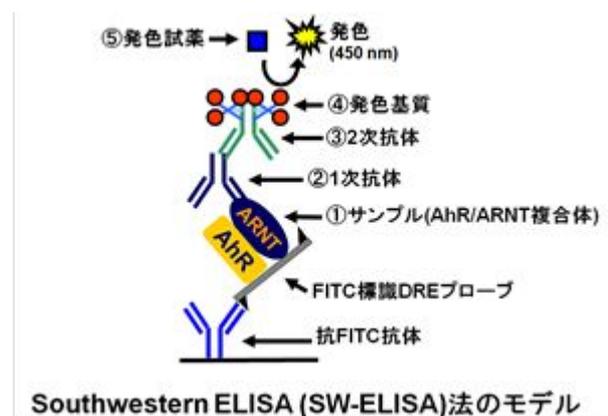
一方、申請者らが開発した簡易測定法ELISAは、活性化したAhRがDNA上のダイオキシン応答配列(DRE)に結合することを利用したサウスウェスタンケミストリーに基づくELISA(SW-ELISA法)であり、AhR源としてラット細胞質画分のほか、市販の抗体等を使用するため、特別な技術は要しない。

最近、予備試験結果より、ラット肝臓細胞質画分の代わりに最もTCDDに対する感受性が強いモルモット肝臓由来の細胞質画分を使用したところ、より高感度にダイオキシン類によるAhRの活性化を検出できることがわかった。この試験系を使用して、農産物中のダイオキシン類を測定したところ、公定法である高分解能GC-MS法と比べておよそ225~4200倍高値のTEQ値が見積もられたが[Fukuda et al., Dioxin 2012にて発表]、本法は環境中および農産物中のダイオキシン類を測定する一次スクリーニングには適していると考えられた。

2. 研究の目的

高分解能GC-MSを用いた公定法と、市場で従来使用される簡易測定法であるレポーター遺伝子アッセイ、並びに申請者らが開発した簡易測定法ELISAの改良法を用いて、輸入および国産食品に含まれるダイオキシン類を定量して比較するとともに、方法の違いによるデータの相関性及びELISAの改良法の適用について検討することを目的とした。

申請者は、農水産物中に含まれるダイオキシン類を簡便に測定する生物学的測定法の開発を目標とし、試料の前処理方法の簡易化、SW-ELISA法の材料に使用するAhR源の見直し、またSW-ELISA法の作業ステップ(下図参照)の短縮を本申請課題の目的とした。



3. 研究の方法

1) 試薬類

2,3,7,8-四塩化ジベンゾ-p-ジオキシン(TCDD)は、AccuStandard (New Haven, CT)より購入し生化学用ジメチルスルホキ

シド(DMSO)にて希釈して使用した。AhRと結合する DRE プローブ作製のため、5'-GAT CTG GCT CTT CTC ACG CAA CTC CG-3' (coding)、5'-GAT CCG GAG TTG CGT GAG AAG AGC CA-3' (non-coding) の 2 種類の本鎖 DNA オリゴヌクレオチドを合成委託した。下線部が特異的結合配列である。その他の実験試薬は、市販の特級品を使用した。水産物中のダイオキシン類を分析するため、外国産(インドネシア、ベトナム)および国内産のエビを平成 29 年に国内の市場にて購入し、使用時まで -20℃にて保存した。

## 2) 肝臓細胞質画分の調製

ラットは断頭後、マウスおよびモルモットは麻酔下で放血後に肝臓を採取した。採取した肝臓は、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)を用いて脱血後、肝重量の 2 倍量の HEDG バッファー(25 mM HEPES, pH 7.4, 1.5 mM EDTA, 1.0 mM DTT, 10% glycerol)を加えてホモジナイズし、得られた肝ホモジネートを 105,000 × g、4℃で 70 分間遠心分離した。遠心後上清を回収し、細胞質画分として -80℃で凍結保存した。なお、動物実験は、本学動物実験員会にて審査・承認を受けたものであり、神戸大学動物実験実施規則に基づいて実施した(承認番号: 26-01-03、26-01-04、26-09-08)。

## 3) ゲルシフトアッセイ

AhR の活性化は、マイクロチューブにタンパク質量として 400 μg となるように HEDG バッファーで希釈した細胞質画分と、TCDD の DMSO 溶液を全量が 100 μl となるように入れ、20℃で 2 時間反応させた。対照として DMSO のみを処理した細胞質画分を用いた。

AhR と結合する 2 種類の本鎖 DNA オリゴヌクレオチドを等モル混合し、アニーリングして二本鎖 DNA オリゴヌクレオチドプローブ(DRE)を作製した。調製した DRE プローブは、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  と T4 polynucleotide kinase (T4PK)を用いてその 5'末端を  $^{32}\text{P}$  でラベルした。すなわち、1 pmol の DRE プローブ、50 unit の T4PK、50 mCi の  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  を混合し、T4PK buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5.0 mM DTT)中で 37℃で 30 分間反応させた。未反応の ATP を除くため、反応混液を Quick Spin Column にアプライし、3,000 rpm で 10 分間遠心分離して  $^{32}\text{P}$  でラベルされた DRE プローブを溶出した。プローブの放射活性を測定した後、以下に示すゲルシフトアッセイに用いた。

活性化した AhR を含む細胞質 2.5 μl (タンパク質量として 10 μg)と 9.5 μl の poly[dIdC]-KCl 溶液(250 ng poly[dIdC]、終濃度 150 mM KCl)を混合し、室温で 15 分間放置してタンパク質と DNA との特異

的結合を促した。次いで、0.5 μl の  $^{32}\text{P}$  ラベルした DRE プローブ(30 kcpm, 10 fmols)を加え室温で 10 分間反応させ、活性化した AhR と DRE プローブを特異的に結合させた。予め 4%の 0.25 × TBE ゲルを作成し、0.25 × TBE バッファー(25 mM Tris-HCl, 22.5 mM ホウ酸, 0.25 mM EDTA)中で 60V で 30 分間予備電気泳動した。このゲルに上記の DRE プローブと反応させた細胞質タンパク質を供し、新しいバッファーで 60V、90 分間電気泳動した。泳動開始後 50 分で上下のバッファーを入れ替えた。泳動終了後、ゲルを 80℃で 40 分間乾燥させ、X 線フィルムに感光させてオートラジオグラフィを行った。フィルム上で検出された活性化 AhR のバンドをイメージングアナライザーにより解析した。

## 4) ウェスタンブロッティング法

モルモット、マウス、並びにラット肝臓細胞質画分に ARNT(AhR パートナータンパク質)が発現しているか確認するため、各細胞質画分 10 μg を SDS 化し、10%ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動後に PVDF メンブレンに転写して 5%スキムミルクを含む PBST (0.03% Triton-X 含有 PBS) でブロッキングした。PBST で洗浄後、一次抗体として抗 ARNT 抗体(Arnt 1, sc-8076, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA)を 500 倍希釈して、二次抗体として HRP 標識抗ヤギ抗体(HAF017, R&D Systems, Minneapolis, MN)を 20,000 倍希釈してそれぞれ 0.5%スキムミルク/PBST 中で反応させた。洗浄後に化学発光させて X 線フィルムに感光させた。

## 5) 公定法によるダイオキシン類の分析

市場にて入手した外国産エビ 2 検体および国内産エビ 1 検体は、株式会社カネカテクノリサーチに公定法によるダイオキシン類量の分析を委託した。

## 4. 研究成果

先ず、簡易測定法 ELISA の改良法として、従来の材料であるラット肝臓細胞質画分に加えて、モルモット肝臓細胞質画分およびマウス肝臓細胞質画分を調製し、それぞれのダイオキシン応答性を TCDD を用いて確認した。

従来法である  $^{32}\text{P}$  ラベルした DRE を用いたゲルシフトアッセイにより活性化した AhR を検出した結果、モルモット肝臓細胞質画分ではラット肝臓細胞質画分での検出結果と同等あるいはそれ以上のダイオキシン応答性が見られたのに対して、マウス肝臓細胞質画分ではほとんど応答性が見られなかった。

また、モルモット、マウス、並びにラット肝臓細胞質画分の ARNT の発現量をウェスタンブロッティング法により検出した

結果、マウスおよびラット肝臓細胞質画分からは活性化した AhR を検出できたことから、ウェスタンブロッティング法で使用した抗体の交差性がなかった可能性が考えられた。

また、生体試料に限らず、昆虫細胞を用いたダイオキシン受容体およびパートナータンパク質の発現系構築を目指したが、研究期間中には構築できず、公定法と改良 ELISA 法との比較検討に至らなかった。参考までに、農産物中のダイオキシン類を公定法または簡易測定法 ELISA にて測定した結果を紹介する（表 1 参照）。

表 1. 農産物中のダイオキシン類測定結果の比較

| 農産物  | 公定法      | 簡易 ELISA |
|------|----------|----------|
| タマネギ | 0.000072 | 0.308    |
| 米    | 0.0012   | 0.270    |
| 牛肉   | 0.0038   | 3.79     |

（単位：pg-TEQ/g 湿重量）

簡易測定法 ELISA では、公定法より高濃度に検出される傾向にあり、一次スクリーニング法としては高濃度側に見積もられることで過小評価される懸念はなかった。

一方、市販のエビ 3 検体（外国産 2 検体および国内産 1 検体）を購入し、公定法によるダイオキシン類の分析を行ったところ、外国産 2 検体のうち 1 つは総ダイオキシン類が 0.0066 pg-TEQ/g、もう 1 つは 0.00030 pg-TEQ/g、国内産は 0.00011 pg-TEQ/g であった（表 2 参照）。外国産のうち 1 検体は、他の 2 検体と比較しておよそ 10 倍の総ダイオキシン類が検出された。

表 2. 市販エビのダイオキシン類分析結果

| 検体  | PCDDs+PCDFs | 総 DL-PCB | 総量      |
|-----|-------------|----------|---------|
| 外国産 | 0.0064      | 0.00018  | 0.0066  |
| 外国産 | 0           | 0.00030  | 0.00030 |
| 国内産 | 0           | 0.00011  | 0.00011 |

（単位：pg-TEQ/g 湿重量）

エビの輸入量は平成 26 年から年間輸入量が約 175 千トンと横ばい傾向にあり、平成 29 年の輸入相手国としてはベトナムが最も多く約 175 千トン、インドからは 35 千トン、次いでインドネシアから 35 千トンの輸入概況が報告されている。今後の研究展開としては、実験室ではなく、市場や加工段階での簡易測定法の開発が望ましい

と考えられる。

## 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

福田 伊津子 (FUKUDA, Itsuko)  
神戸大学・大学院農学研究科・助教  
研究者番号：5 0 4 1 8 9 4 3

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

なし