

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02005/113767

発行日 平成20年7月31日(2008.7.31)

(43) 国際公開日 平成17年12月1日(2005.12.1)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 B	4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/42 (2006.01)	C 1 2 Q 1/42	4 B 0 6 3
G O 1 N 33/00 (2006.01)	G O 1 N 33/00 D	4 B 0 6 5
G O 1 N 33/15 (2006.01)	G O 1 N 33/15 Z	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 20 頁)

出願番号 特願2006-513687 (P2006-513687)	(71) 出願人 304023994 国立大学法人山梨大学 山梨県甲府市武田四丁目4番37号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2005/008875	
(22) 国際出願日 平成17年5月16日(2005.5.16)	
(31) 優先権主張番号 特願2004-153293 (P2004-153293)	(74) 代理人 100104754 弁理士 石川 英毅
(32) 優先日 平成16年5月24日(2004.5.24)	(74) 代理人 100119297 弁理士 田中 正男
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	(72) 発明者 北村 正敬 山梨県中巨摩郡玉穂町下河東1110 山梨大学内
	(72) 発明者 前田 秀一郎 山梨県中巨摩郡玉穂町下河東1110 山梨大学内
	Fターム(参考) 4B024 AA12 BA80 CA02 DA02 EA04 FA02 GA14 HA11
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ダイオキシン類等応答性プラスミド、ダイオキシン類等測定用遺伝子導入細胞、並びにそれを用いたダイオキシン類等検出方法及びバイオセンサー

(57) 【要約】

ダイオキシン類及び/又は多環芳香族炭化水素に反応して活性化される遺伝子(以下、D R E 遺伝子という。)と、前記D R E 遺伝子の下流に分泌型マーカートンパク発現遺伝子とを含むプラスミドと、このプラスミドが導入され、ダイオキシン類及び/又は多環芳香族炭化水素に曝露されると分泌型マーカートンパクを分泌する遺伝子導入細胞の開発と、この遺伝子導入細胞を使ったバイオセンサーとを開発する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ダイオキシン類、及び/又は多環芳香族炭化水素に応答性を有するプラスミドであって、ダイオキシン類及び/又は多環芳香族炭化水素に反応して活性化される遺伝子（以下、DRE 遺伝子という。）と、

前記 DRE 遺伝子の下流に分泌型マーカートンパク発現遺伝子

とを含むことを特徴とするプラスミド。

【請求項 2】

前記分泌型マーカートンパク遺伝子は、アルカリホスファターゼ発現遺伝子であることを特徴とする請求項 1 に記載のプラスミド。

10

【請求項 3】

前記 DRE 遺伝子が 2 つ以上組み込まれていることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載のプラスミド。

【請求項 4】

前記 DRE 遺伝子が所定のプロモーターの一部に組み込まれていることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載のプラスミド。

【請求項 5】

前記分泌型マーカートンパク遺伝子の下流にポリアデニレーションシグナルを更に含むことを特徴とする請求項 1 から 4 のいずれかに記載のプラスミド。

【請求項 6】

ダイオキシン類及び/又は多環芳香族炭化水素を測定するための遺伝子導入細胞であって

20

、

芳香族炭化水素受容体を高発現させる細胞に請求項 1 から 5 のいずれかに記載のプラスミドが導入され、

ダイオキシン類及び/又は多環芳香族炭化水素を含む雰囲気には置かれると分泌型マーカートンパクを分泌することを特徴とする遺伝子導入細胞。

【請求項 7】

前記細胞がマウスの癌細胞株（Hepa-1c1c7）であることを特徴とする請求項 6 に記載の遺伝子導入細胞。

【請求項 8】

請求項 6 又は 7 に記載の遺伝子導入細胞を含み、該遺伝子導入細胞をダイオキシン類及び/又は多環芳香族水素の検出に用いることを特徴とするバイオセンサー。

30

【請求項 9】

請求項 6 又は 7 に記載の遺伝子導入細胞を評価対象雰囲気にしたときに前記遺伝子導入細胞が分泌する分泌型マーカートンパクの活性を測定することによりダイオキシン類及び/又は多環芳香族水素を検出することを特徴とするダイオキシン類及び/又は多環芳香族炭化水素の検出方法。

【請求項 10】

請求項 6 又は 7 に記載の遺伝子導入細胞をタバコ煙に曝露させたときに前記遺伝子細胞が分泌する分泌型マーカートンパクの活性を測定することによりタバコ煙の生物学的毒性を評価することを特徴とするタバコ煙の生物学的毒性の評価方法。

40

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、ダイオキシン類、多環芳香族炭化水素などの内分泌攪乱物質や一部の発がん物質等が、細胞内受容体である芳香族炭化水素受容体（以下、AhR）を介して作用することに基づく有害化学物質の簡便、迅速かつ高感度な検出方法または定量方法、及び検出物質、並びにダイオキシン類検出バイオセンサーに関する。

【背景技術】**【0002】**

50

現代社会の深刻な問題の一つである環境汚染への対応策を確立するためには、環境中の有害化学物質への曝露の程度を正確に評価することが必要である。このためには、簡便で、感度や再現性の高い有害化学物質の分析方法が確立されていることが不可欠である。

【0003】

ダイオキシン類は、極微量で種々の有害作用を惹起する。従って、鋭敏かつ迅速にダイオキシン類を検出する方法の確立は、ダイオキシン類への曝露を正確に評価し、健康障害を予防するために、緊急の課題と考えられる。また、ダイオキシン類と同じように環境中の有害物質である多環芳香族炭化水素、及びこれらを複合的に含有するタバコ煙の生物学的毒性の総体的かつ定量的評価も大きな課題である。

【0004】

環境中のダイオキシン類等を検出するための代表的な手法としては、内因性のバイオマーカー、例えば薬物代謝酵素であるチトクロームP-4501A1の利用、培養細胞を用いたバイオアッセイ、酵素免疫アッセイ、クロマトグラフィーを用いた方法などがある。特に遺伝子工学技術を用いたバイオアッセイは、その簡便性と感度の高さから、近年注目を集めている。

【0005】

こうした遺伝子工学的バイオアッセイは、幾つかの基本ユニットにより構成されている。かかる基本ユニットは、(1)細胞、(2)細胞に組み込む遺伝子構造の2つである。ここで、かかる遺伝子構造はさらにダイオキシン類のセンサーとして機能するDNA配列であるダイオキシン類応答DNA配列と、マーカータンパクを規定するマーカータンパク遺伝子とにより成り立っている。

【0006】

こうした遺伝子構造を細胞に導入し、細胞の染色体DNAに安定に組み込むことにより、ダイオキシン類等に反応するセンサー細胞を作製することが可能である。

【0007】

こうした遺伝子導入細胞がダイオキシン類等を含む試料に曝露されると、まずダイオキシン類等が細胞内のAhRと結合し、さらに転写促進共役因子であるコアクチベーター（以下、Arnt）と複合体を形成、その複合体が転写因子としてダイオキシン類応答DNA配列を活性化させる。その結果、遺伝子配列下流のマーカータンパク遺伝子の発現が促進される。

【0008】

かかるマーカータンパク遺伝子が発現することによりマーカータンパクが産生され、当該タンパクを定量化することにより、試料中にどのくらいの濃度のダイオキシン類等が存在するかを評価することができる。

【0009】

マーカータンパク遺伝子としては、これまでクロラムフェニコール・アシルリボシル・トランスフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、などの酵素遺伝子や緑色蛍光タンパク遺伝子が用いられてきた。

【0010】

しかし、これまでのバイオアッセイでは、(1)マーカータンパクが分泌されないため、その定量のためには細胞を破壊してマーカータンパクを抽出する操作が必要、(2)環境中の極微量な有害物質を検出する上で感度が不十分であり、高感度なシステムでも2、3、7、8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin（以下、TCDD）換算で1 pMが検出の限界、(3)バイオアッセイに2日～3日必要、(4)1サンプルあたり60、000個から100、000個の細胞数が必要、このため、培養コスト、人件費などの経費が高つく、などの問題点を挙げる事ができる。特に(2)～(4)は、多数のサンプルを効率良くスクリーニングしてゆく上で大きな障害となっていた。

【非特許文献1】P.A. Behnisch、K. Hosoe、S. Sakai、Bioanalytical screening methods for dioxins and dioxin-like compounds:a review of bioassay/biomarker technology、Environ. Int. 27 (2001) 413-439.

10

20

30

40

50

【非特許文献2】特願2004-135662「ダイオキシン類測定用形質転換体並びにそれを用いたダイオキシン類の検出方法、定量分析方法及びスクリーニング方法」

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

そこで本発明は、従来のルシフェラーザや緑色蛍光タンパクを用いたダイオキシン類検出のバイオアッセイに比較し、(1)バイオアッセイプロセスの簡便化、(2)検出感度の向上、(3)バイオアッセイ時間の大幅な短縮、(4)培養コスト、人件費等の経費の削減、を課題とするものである。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明は、ダイオキシン類、及び/又は多環芳香族炭化水素に反応して活性化されるダイオキシン類及び/又は多環芳香族炭化水素高感受性遺伝子配列の下流に、分泌型マーカータンパク遺伝子を組み込んだダイオキシン類及び/又は多環芳香族炭化水素応答性プラスミドである。

【0013】

前記分泌型マーカータンパク遺伝子は、分泌型アルカリホスファターゼ遺伝子であることは好適である。

【0014】

本発明は、上述したダイオキシン類及び/又は多環芳香族炭化水素応答性プラスミドが、芳香族炭化水素受容体を高発現する培養細胞に導入され、前記芳香族炭化水素受容体がダイオキシン類及び/又は多環芳香族炭化水素に結合し、分泌型マーカータンパクを産生するダイオキシン類及び/又は多環芳香族炭化水素測定用遺伝子導入細胞である。

【0015】

前記芳香族炭化水素受容体を高発現する培養細胞は、Hepa-1c1c7であることは好適である。

【0016】

本発明は、上述したダイオキシン類及び/又は多環芳香族炭化水素測定用遺伝子導入細胞をダイオキシン類及び/又は多環芳香族炭化水素の検出センサーとして用いたバイオセンサーとするものである。

【0017】

本発明は、ダイオキシン類、及び/又は多環芳香族炭化水素に反応して活性化されるダイオキシン類及び/又は多環芳香族炭化水素高感受性遺伝子配列と、前記遺伝子配列の下流に分泌型マーカータンパク遺伝子を組み込んだダイオキシン類及び/又は多環芳香族炭化水素応答性プラスミドを芳香族炭化水素受容体を高発現する細胞に導入し作製したダイオキシン類及び/又は多環芳香族炭化水素測定用遺伝子導入細胞を、ダイオキシン類、及び/又は多環芳香族炭化水素に曝露し、前記遺伝子導入細胞が分泌する分泌型マーカータンパクの活性を定量し、ダイオキシン類、及び/又は多環芳香族炭化水素を検出するダイオキシン類、及び/又は多環芳香族炭化水素の検出方法である。

【0018】

分泌型マーカータンパクは、分泌型アルカリホスファターゼであることは好適である。また、前記細胞は、Hepa-1c1c7であることは好適である。

【0019】

本発明は、ダイオキシン類、及び/又は多環芳香族炭化水素に反応して活性化されるダイオキシン類及び/又は多環芳香族炭化水素高感受性遺伝子配列と、前記遺伝子配列の下流に、分泌型マーカータンパク遺伝子を組み込んだダイオキシン類及び/又は多環芳香族炭化水素応答性プラスミドを芳香族炭化水素受容体を高発現する細胞に導入し作製したダイオキシン類及び/又は多環芳香族炭化水素測定用遺伝子導入細胞をタバコ煙に曝露させ、前記遺伝子導入細胞が分泌する分泌型マーカータンパクの活性を定量することにより、タバコ煙の生物学的毒性を評価するタバコ煙の生物学的毒性の定量的評価方法である。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 0 】

前記分泌型マーカータンパクは、分泌型アルカリホスファターゼであることは好適である。

【 発明の効果 】

【 0 0 2 1 】

本発明によれば、単純な化学発光計測等により、簡便にダイオキシン類や多環芳香族炭化水素を測定できる。また、細胞の播種から計測までのダイオキシン測定プロセスを、数時間で完了でき、更に本発明によれば、低コストで高感度なダイオキシン類及び/又は多環芳香族炭化水素の測定を行うことができる。

【 0 0 2 2 】

本発明は、大気、河川、土壌、食品、生活器材に含まれるダイオキシン類及び/又は多環芳香族炭化水素を検出できる優れた発明である。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 2 3 】

発明を実施するための最良の形態について以下に述べる。

【 実施例 1 】

【 0 0 2 4 】

図 1 はダイオキシン類及び/又は多環芳香族炭化水素反応性プラスミドpDRE-SEAP10の構造図を示したものである。pDRE-SEAP10は、マウス乳ガンウイルスのプロモータ（以下、MM TV）の一部にダイオキシン類応答DNA配列（以下、DRE）を組み込んだダイオキシン類高感受性DNA配列（以下、MMTV-DRE11）およびその下流に位置する分泌型アルカリホスファターゼ（以下、SEAP）遺伝子12と、サルウイルス40（以下、SV40）由来のポリ阿德ニレーションシグナル（以下、poly A13）とにより構成されている。

【 0 0 2 5 】

従来、ダイオキシン類応答DNA配列としてDREが用いられてきたが、この実施例では、ダイオキシン類を感知するセンサーDNA配列として、MMTVの一部にDREを組み込んだMMTV-DREを用いた。これにより高感度なアッセイ系を確立した。

【 0 0 2 6 】

MMTV-DRE11は、ダイオキシン類に応答して活性化されることが知られているDREを4個、MMTVのプロモーターの一部に組み込んだものである。DRE単独のものに比べ強力なダイオキシン類への応答性がある。

【 0 0 2 7 】

図 2 は、MMTV-DREとDREのセンサー能力を比較検討した結果である。MMTV-DREとDREのみをセンサー配列として持つSEAPリポータープラスミドを作成し、これらを各々Hepa-1c1c7細胞に遺伝子導入した。なお、遺伝子導入の詳細は後述する。その後、これらの細胞をTCDDで刺激し、SEAP活性の増加を比較した。DREのみをセンサー配列として持つSEAPリポータープラスミドを導入した細胞では、TCDDの刺激によってSEAP活性は4.5倍に上昇した。

【 0 0 2 8 】

これに対して、MMTV-DREをセンサー配列として持つSEAPリポータープラスミドを導入した細胞（Hepa1c1c7-DRE-SEAP細胞、以下、HeDS細胞）では、TCDDの刺激によってSEAP活性は43.2倍に上昇した。MMTVのみをセンサー配列として持つSEAPリポータープラスミドを導入した細胞では、TCDDによりSEAP活性の増加は見られなかった。このことはMMTVの配列が、DREのダイオキシンに対する応答性を強力に増幅することを意味している。MMTV-DREの高反応性は、アッセイの迅速性、低コストを可能とする。

【 0 0 2 9 】

実施例 1 では、マーカータンパクとしてSEAPを用いた。SEAPを含め、これまで分泌型マーカータンパクを用いたダイオキシン類のバイオアッセイ系は確立されていなかった。SEAPはルシフェラーゼと並び高感度にダイオキシン類を検出するマーカータンパクであるが、ルシフェラーゼと異なり細胞外に分泌されるため、細胞を破壊してタンパクを抽出する操作が不要である。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 0 】

図3は5000個のHeDS細胞でTCDDの検出感度を測定したグラフである。従来のルシフェラーゼを用いたダイオキシンアッセイでは1pMのTCDDを検出するために60,000個~100,000個の細胞数が必要なのに対し、図3に示す通り、5000個のHeDS細胞で0.5pMのTCDDの検出が可能である。

【 0 0 3 1 】

SEAPをマーカータンパクとして用いることにより、僅か5 μ lという極めて微量な培養上清のサンプルのみで、ダイオキシン類のアッセイが可能である。SEAP遺伝子12の転写レベルとSEAPタンパクの分泌レベルは極めて良く相関し、その活性はルミノメーターなどの化学発光の検出システムで容易に検出・定量化が可能である。なお、polyA13はメッセンジャーRNAが作られてからタンパクに翻訳される過程で不可欠な遺伝子配列である。

10

【 0 0 3 2 】

pDRE-SEAP10は遺伝子工学的常法により作製する。即ち、制限酵素により切り出し精製したMMTV-DRE11の断片を、プロモーターを持たないSEAPプラスミドのSEAP遺伝子12の上流に、T4DNAリガーゼを用いて組み込む。

【 0 0 3 3 】

T4DNAリガーゼは、隣接するDNA鎖の5'末端と3'末端とを連結する酵素である。作製したpDRE-SEAP10は大腸菌に導入して大量に増やし、遺伝子工学的常法によりpDRE-SEAP10を精製する。

【 0 0 3 4 】

作製したpDRE-SEAPを、図4のような手順によりマウスの肝臓癌細胞株であるHepa-1c1c7細胞に遺伝子導入し、安定な組換え細胞を樹立する。ここで発明者がHepa-1c1c7細胞を選択したのは、(1)ダイオキシン類のバイオアッセイ系を確立するためには、芳香族炭化水素受容体(以下、AhR)を産生する細胞を用いることが不可欠であること、(2)高感度のアッセイ系を樹立するには、AhRを高度に発現している細胞を選択することが必須構成要件であること、との観点からである。

20

【 0 0 3 5 】

かかる観点から発明者は鋭意検討した結果、肝臓癌細胞由来の細胞系、Hepa-1c1c7を選択したものである。作製したpDRE-SEAPをHepa-1c1c7細胞に導入し、安定な組換え細胞を樹立した手順は図4に示す通りである。

30

【 0 0 3 6 】

トリプシンで培養皿から剥離した 4×10^6 個のHepa-1c1c7細胞をリン酸緩衝生理食塩水であるPBSで良く洗浄した後、電気穿孔法(以下、エレクトロポレーション)用キュベット(バイオラド社製、品番165-2088)に入れる(S1)。20 μ gのpDRE-SEAPと2 μ gのネオマイシン耐性遺伝子を含むプラスミドpcDNA3.1を添加して混和、10分間氷上で静置する(S2)。

【 0 0 3 7 】

次に、ジーンパルサー(バイオラド社製)を用いて150mV、960 μ Fの条件でエレクトロポレーションを施行、その1/10から1/20の細胞数を100mm培養皿に播種し、37 $^{\circ}$ C、CO₂濃度5%、10%の牛胎児血清(以下、FBS)存在下で3日間培養する(S3)。

40

【 0 0 3 8 】

培養液は α -MEM(ギブコ社製、品番12561-056)を用いた。その後500 μ g/mlのネオマイシン存在下で1~2週間培養することにより、非組換え細胞は死滅し(S4)、pDRE-SEAPが染色体DNAに安定に組み込まれた組換え細胞のみが生存・増殖して集塊を形成する。

【 0 0 3 9 】

この細胞集塊を個別にトリプシン処理して剥離し、各々を2穴づつ96穴培養プレートに移し1週間培養を継続する(S5)。細胞が飽和状態になった後、各穴の培養液を1%のFBSを含有する α -MEM100 μ lに交換し、10pMのTCDD存在下、または非存在下で24時間培養、その培養上清5 μ lを用いて所定のSEAPアッセイを行ない、低濃度のダイオキシンに最も鋭敏に反応するHeDS細胞を樹立、ダイオキシン類検出バイオアッセイに用いる(S6)。本明細書

50

ではこのバイオアッセイ法をDRE-based Sensing of dioxin via Secreted Alkalined phosphatase (以下、DRESSA法)という。

【0040】

樹立したHeDS細胞のダイオキシン類への応答メカニズムを図5に示す。HeDS細胞では、その染色体DNAの中にpDRE-SEAP10の各コンポーネント、即ちMMTV-DRE11およびその下流のSEAP遺伝子12とポリアデニレーションシグナル13が安定に組み込まれている。この細胞がダイオキシン類20に曝露されると、ダイオキシン類20はまず細胞膜を通過し、細胞質内に存在するAhR14に結合する。

【0041】

さらにAhR14は、コアクチベーターであるArnt15と複合体を形成し核内に入り、MMTV-DRE11に結合してそれを活性化させる。結果として下流のSEAP遺伝子12の転写が促され、メッセンジャーRNA16が作られ、リボゾーム17でタンパク18に翻訳されて、SEAPタンパクとして細胞外に速やかに分泌される19。従って培養上清中のSEAPタンパクの活性を測定することにより、細胞がどれだけのレベルのダイオキシン類に曝露されているのかを定量することができる。

10

【0042】

試料中のダイオキシン類の検出手順を、フローチャートとして図6に示す。まず96穴培養プレートの各穴にHeDS細胞を 2×10^4 / wellの密度で播種する。培養液は1% FBSを含むMEMを100 μ lずつ各穴に分注する(S1)。24時間培養して細胞を各穴の底に定着させた後、培養液を交換し、TCDDを含有する液体試料を1 μ lずつ添加する(S2)。24時間培養した後上清を5 μ lずつサンプリングし(S3)、以下に述べる手順でSEAPタンパク活性を測定する(S4)。

20

【0043】

培養上清中のSEAPタンパク活性は、以下のようにして定量する。5 μ lの培養上清に15 μ lの緩衝液を加え、30分65でインキュベートし、内因性のアルカリホスファターゼ活性を失活させる。さらに内因性のアルカリホスファターゼの阻害剤であるL-ホモアルギニンを含む緩衝液を20 μ l加え5分放置した後、15 μ lの基質CSPDを加え、30分暗所にて静置した後、ルミノメーターで化学発光度を計測する。

【0044】

図7は、HeDS細胞を6pMのTCDDで刺激し、その後の培養液中のSEAPタンパク活性の推移を経時的に10時間まで追ったものである。コントロールとして、TCDDの溶媒であるジメチルスルフォキシド(以下、DMSO)を用いた。優位なSEAPタンパク活性の増大はTCDD添加後4時間で認められ、時間の経過とともに漸増した。

30

【0045】

図8はその後のSEAPタンパク活性の推移を、さらに72時間まで追ったものである。SEAPタンパク活性の増加は刺激後48時間まで続き、その後平衡状態に達したことがわかる。

【0046】

図9は、HeDS細胞の感度を検討した結果である。HeDS細胞を0~1pMの低濃度のTCDDに曝露し、培養液中のSEAPタンパク活性の上昇を検討した。優位なSEAPタンパク活性の増加は0.25pM (250fM)ですでに認められた。

40

【0047】

このように、DRESSA法は従来のバイオアッセイの検出限界とされている1pM以下の濃度のTCDDを検出する。なお、発明者らは培養液中のSEAPタンパク活性が100 pMまで濃度依存的に上昇することを確認している。

【0048】

図10は、DRESSA法に必要な細胞数に関し検討を行なったものである。すなわちグラフに示された数の細胞を96穴培養プレートに播種し、その細胞を1nMのTCDDに曝露させた後、培養液中のSEAPタンパク活性を測定した。図10に示されるように、1試料(1穴)あたり50個の細胞が存在すれば、1nMのTCDDを十分に検出することが明らかになった。これは従来のアッセイに必要とされる細胞数60,000~100,000/穴に比べ、1000分の1から2

50

000分の1の数に相当する。

【実施例2】

【0049】

上述したDRESSA法を簡便、経済的かつ短時間に行なうため、前述した検出手順を、図1のように簡略化することが可能である。即ち、まず試料1 μ lを含む培養液を50 μ lづつ96穴培養プレートの各穴に分注し、直ちに50 μ lの培養液に浮遊させたHeDS細胞を添加する(total 100 μ l)(S1)。

【0050】

3~4時間後培養上清をサンプリングし(S2)、SEAPタンパク活性を測定する(S3)。この手法を用いることにより、現行の方法での検出限界とされる1pMのTCDDを、4~5時間以内に検出することが可能である。この便法を、本明細書では、以下、迅速DRESSA法という。迅速DRESSA法は検出感度の上でも、DRESSA法と遜色がない。

10

【0051】

図12は、迅速DRESSA法によりHeDS細胞をTCDD(6pMおよび1nM)で刺激し、その後の培養液中のSEAPタンパク活性の推移を経時的に追ったものである。いずれの場合にも、優れたSEAPタンパク活性の増大はTCDD添加後3時間の時点で既に認められ、時間の経過とともに漸増した。

【0052】

図13は、DRESSA法と迅速DRESSA法との感度を比較検討したものである。同数の細胞をDRESSA法では定着条件下で、また迅速DRESSA法では浮遊条件下で6pMのTCDDに曝露させ、その後の培養液中のSEAPタンパク活性の上昇を経時的に比較検討した。その結果、図13に示す通り、刺激後24時間まで、ダイオキシン類の検出感度に関し両者に差は認められなかった。

20

【0053】

図14はHeDS細胞を多環芳香族炭化水素である1 μ Mの3-methylcholanthrene(3-MC)、benzo[a]pyrene(B[a]P)、-naphthoflavone(NF)で各々刺激した後の、培養上清中のSEAPタンパク活性を示している。いずれの場合にも、コントロール刺激であるDMSOに比べ、著明なSEAPタンパク活性の誘導が認められた。このようにHeDS細胞は、AhRを介して作用するダイオキシン類以外の有害化学物質である3-MC、B[a]P、NF)にも反応しSEAPタンパクを分泌する。

30

【実施例3】

【0054】

タバコ煙には、ダイオキシン類や多環芳香族炭化水素などの有害化学物質が複合的に含まれている。こうしたタバコ煙中の有害化学物質と結合したAhRは、DREに結合してその生物学的毒性を発揮する。そこで、タバコ煙のAhR活性化能を、同等のAhR活性化を引き起こすTCDDの量に換算した値として示すことが可能である。かかる換算値をDRE-activating potential value(以下、DAP値)とし、タバコ煙の生物学的毒性の指標として、タバコ煙のAhR活性化能を定量的に評価した。なお、この評価法は喫煙の健康への影響度を定量化する上で極めて有用である。

【0055】

40

タール含量が各々1,6,10,14,20mg/本である5種類のタバコ銘柄を用いて、10.5l/minの吸引速度でタバコ煙を生成、タバコ1本あたりの煙を50mlのPBSに溶解する。

【0056】

HeDS細胞を96穴培養プレートに5000細胞/穴で播種し、上記タバコ煙抽出液(5種、各n=4)を100~1000倍の希釈で添加する。基準となる化学物質として、1~100pMのTCDDを同様に添加する。16時間培養後、培養上清を5 μ lづつ採取し、SEAP活性を測定する。

【0057】

TCDD濃度とSEAP活性との相関を示す検量線を作成し、それをもとに各タバコ煙抽出液中の有害物質の濃度をTCDDに換算する形で算出、各タバコ1本より生成する煙に含まれるAhR活性化能の総量を計算しDAP値として示したものが表-1である。

50

表-1に示されるように、タバコ煙には極めて高レベルのAhR活性化能が認められた。なお、タール含量とDAP値の間にはほぼ正の相関が認められるが、タール含量が1mgのものと20mgのものを比較した場合、前者のDAP値は後者のその1/20ではなく、1/3程度に過ぎない。また、DAP値はタール含量が20mgの銘柄よりも14mgの銘柄のほうが逆に高い。これらの事実は、一般に健康への影響度の指標として用いられているタール含量が、生物学的毒性の指標としては不十分であることを意味しており、より実用的な、新たな指標としてのDAP値の意義は高い。

【 0 0 5 8 】

【表 1】

銘 柄	タール含量(mg)	DAP値 (ng TCDD-相当/本)
マイルドセブン (one)	1	30.6 ± 7.5
マイルドセブン (super lights)	6	51.2 ± 6.4
マイルドセブン (original)	10	81.6 ± 8.0
セブンスター	14	100.8 ± 20.8
ピース	20	95.2 ± 5.2

10

20

【産業上の利用可能性】

【 0 0 5 9 】

ダイオキシンおよび類似有害化学物質を簡便、迅速、安価かつ超高感度に検出する本発明は、工業排水のモニタリング、飲用の水質管理、食品の品質管理、また工業製品における内分泌攪乱物質の混入の監視など、産業上の利用価値も高い。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 6 0 】

【図 1】ダイオキシン類等応答性プラスミド (pDRE-SEAP) の構造

【図 2】MMTV-DREとDREのセンサー能力を比較検討した図

【図 3】5000個のHeDS細胞でTCDDの検出感度を測定した図

30

【図 4】HeDS細胞樹立の手順

【図 5】HeDS細胞のダイオキシン類感知メカニズム

【図 6】DRESSA法によるダイオキシン類検出の手順

【図 7】HeDS細胞をTCDDで刺激した後の培養上清中SEAPタンパク活性の推移 (短時間)

【図 8】HeDS細胞をTCDDで刺激した後の培養上清中SEAPタンパク活性の推移 (長時間)

【図 9】HeDS細胞を0~1pMの低濃度のTCDDに曝露し、培養液中のSEAPタンパク活性の上昇をグラフにより示した図

【図 10】RESSA法に必要なHeDS細胞数をグラフにより示した図

【図 11】迅速DRESSA法によるダイオキシン類検出の手順

【図 12】迅速DRESSA法により細胞をTCDDで刺激した後の培養上清中SEAPタンパク活性の推移

40

【図 13】DRESSA法と迅速DRESSA法との検出感度の比較を示した図

【図 14】HeDS細胞をダイオキシン類似化学物質で刺激した後の培養上清中SEAPタンパク活性の上昇をグラフで示した図

【符号の説明】

【 0 0 6 1 】

1 HeDS細胞

10 ダイオキシン類応答性プラスミド (pDRE-SEAP)

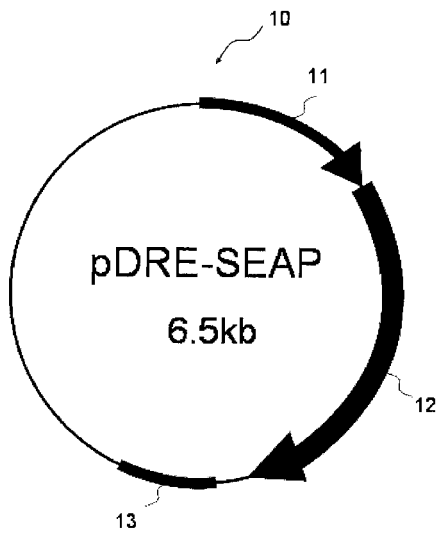
11 ダイオキシン類高感受性遺伝子配列 (MMTV-DRE)

12 分泌型マーカータンパク遺伝子 (SEAP)

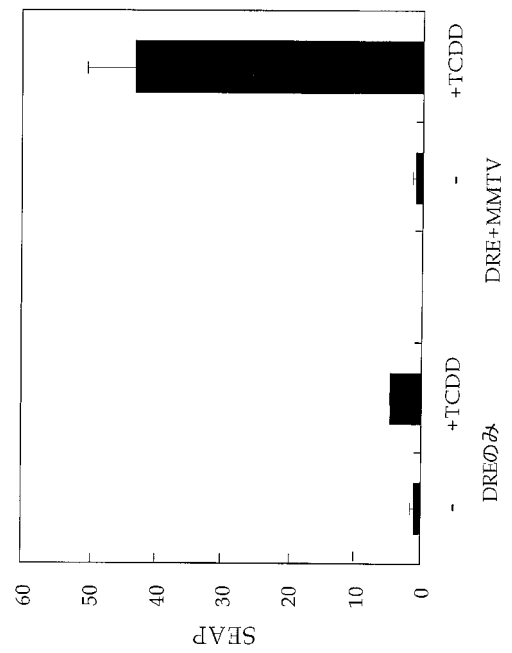
50

- 13 ポリアデニレーションシグナル (polyA)
- 14 芳香族炭化水素受容体 (AhR)
- 15 コアクチベーター (Arnt)
- 16 SEAP遺伝子のメッセンジャーRNA
- 17 リボソーム
- 18 SEAPタンパク
- 19 細胞外へのSEAPタンパクの分泌
- 20 ダイオキシン類

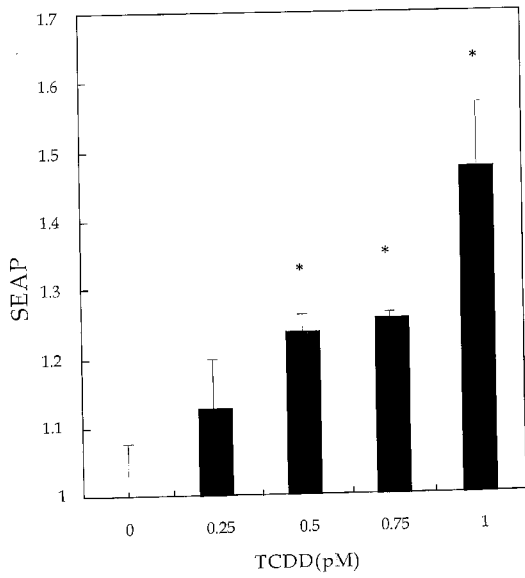
【 図 1 】



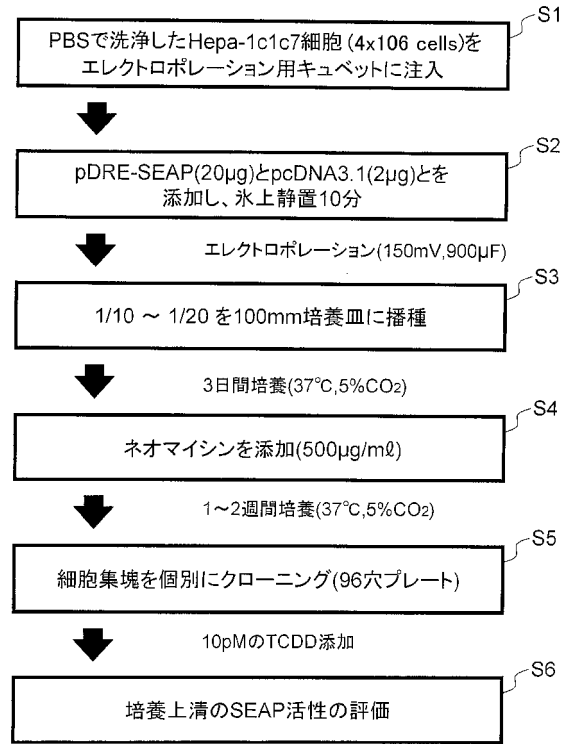
【 図 2 】



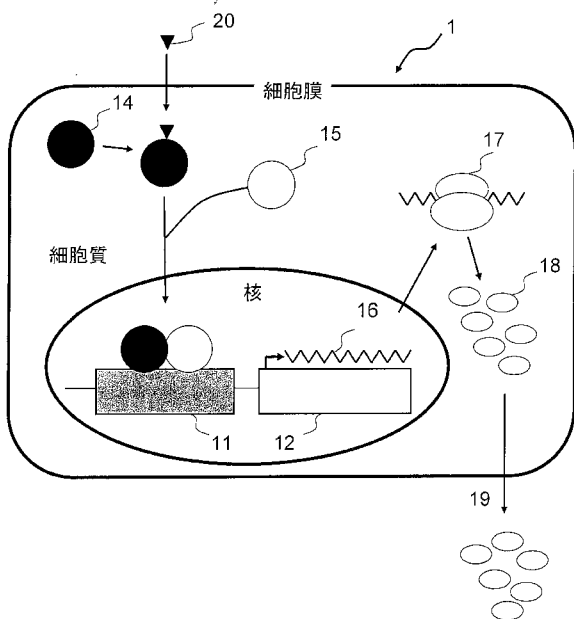
【 図 3 】



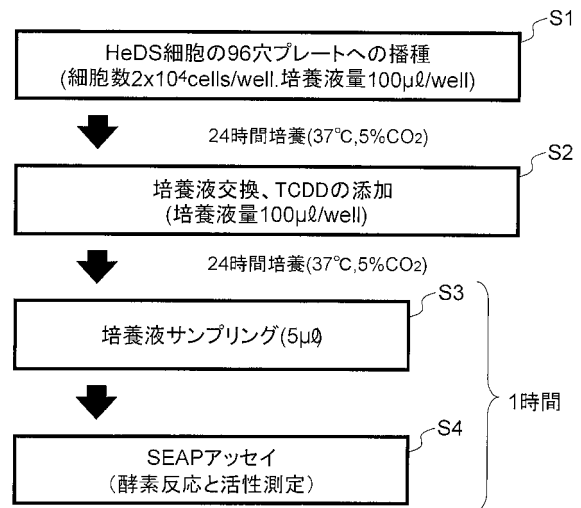
【 図 4 】



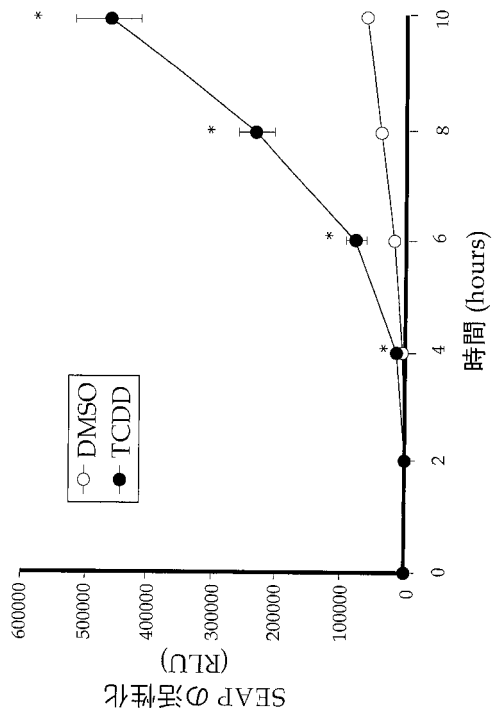
【 図 5 】



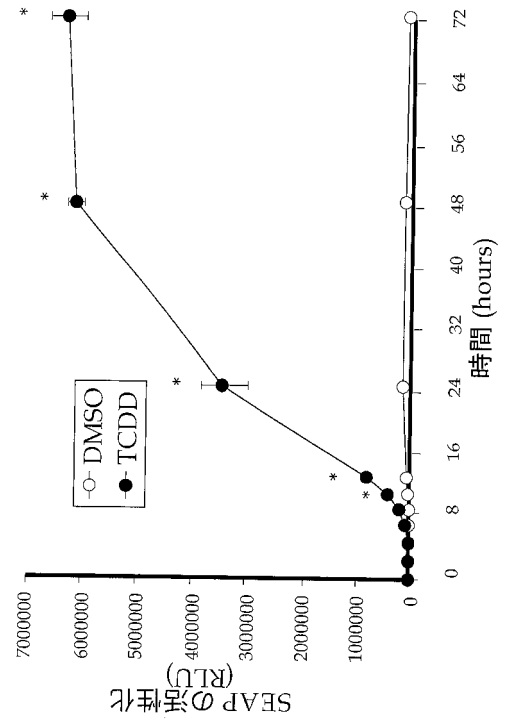
【 図 6 】



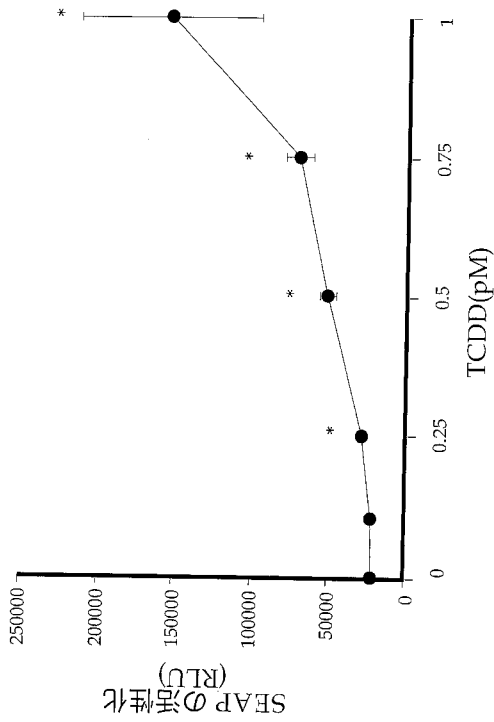
【 図 7 】



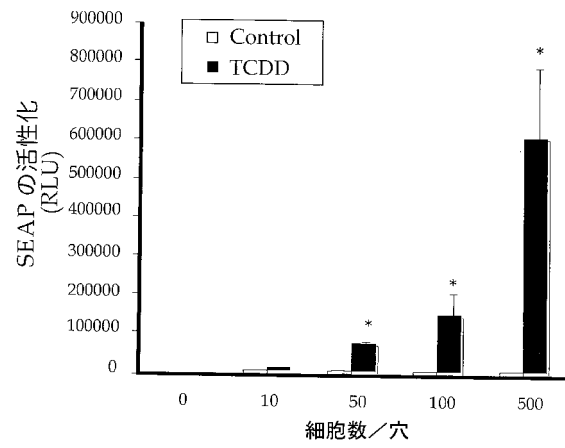
【 図 8 】



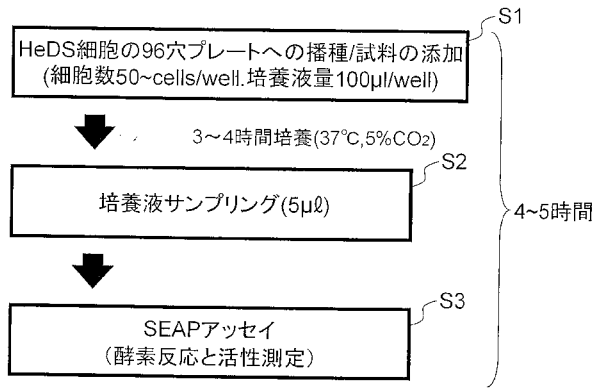
【 図 9 】



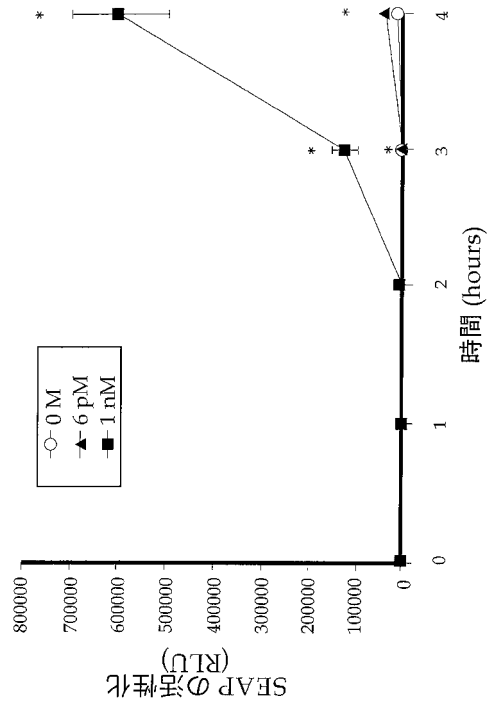
【 図 10 】



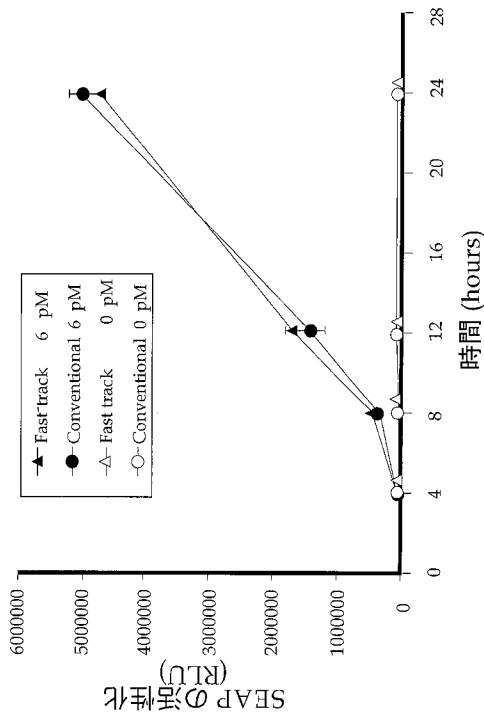
【 図 1 1 】



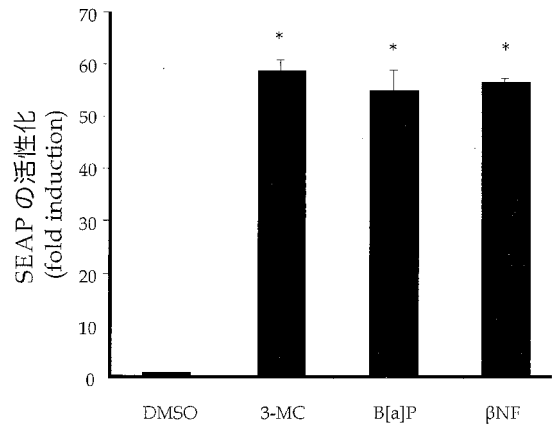
【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【手続補正書】

【提出日】平成18年7月20日(2006.7.20)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【書類名】請求の範囲

【請求項1】削除

【請求項2】削除

【請求項3】削除

【請求項4】削除

【請求項5】削除

【請求項6】(削除)

【請求項7】マウス乳癌ウイルスのプロモータ(以下、MMTVという。)の一部にダイオキシン類及び/又は多環芳香族炭化水素に反応して活性化される遺伝子(以下、DRE遺伝子という。)を組み込んだ遺伝子配列(以下、MMTV-DREという。)と、前記DRE遺伝子の下流に分泌型アリカリホスファターゼ遺伝子とを含むプラスミドを、マウスの癌細胞株(Hepa-1c1c7)に導入したことを特徴とするダイオキシン類及び/又は多環芳香族炭化水素を測定するための遺伝子導入細胞。

【請求項8】請求項7に記載の遺伝子導入細胞を含み、該遺伝子導入細胞をダイオキシン類及び/又は多環芳香族水素の検出に用いることを特徴とするバイオセンサー。

【請求項9】請求項7に記載の遺伝子導入細胞を評価試料に曝露させたときに前記遺伝子導入細胞が分泌する分泌型マーカータンパクの活性を測定することによりダイオキシン類及び/又は多環芳香族水素を検出することを特徴とするダイオキシン類及び/又は多環芳香族炭化水素の検出方法。

【請求項10】請求項7に記載の遺伝子導入細胞をタバコ煙に曝露させたときに前記遺伝子導入細胞が分泌する分泌型マーカータンパクの活性を測定することによりタバコ煙の生物学的毒性を評価することを特徴とするタバコ煙の生物学的毒性の評価方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2005/008875
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ C12N15/09, 5/10, C12Q1/42 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁷ C12N15/09, 5/10, C12Q1/42 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE (STN), BIOSIS/WPI (DIALOG), JSTPlus (JOIS)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<input checked="" type="checkbox"/> X <input type="checkbox"/> Y	Nao YOKOYAMA et al., "Dioxin-ru i no Kan' i Kenshutsuho no Kaihatsu", Eisei Yakugaku·Kankyo Toxicology Koen Yoshishu, Vol.2003, 10 October, 2003 (10.10.03), page 96	<u>1-3, 5, 6, 8-10</u> 4, 7
<input checked="" type="checkbox"/> X <input type="checkbox"/> Y	Nao YOKOYAMA et al., "Dioxin-ru i no Kan' i Kenshutsuho no Kaihatsu", Nippon Naibunpi Kakuran Kagaku Busshitsu Gakkai Kenkyu Happyokai Yoshishu, Vol.6, 02 December, 2003 (02.12.03), page 204	<u>1-3, 5, 6, 8-10</u> 4, 7
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 07 July, 2005 (07.07.05)		Date of mailing of the international search report 26 July, 2005 (26.07.05)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/008875

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> <u>Y</u>	Shigenori SHINBA et al., "Ah receptor Kajo Hatsugen Saibo oyobi Bunpitsugata reporter Idenshi o Mochiita Dioxin-ru'i no Kan'i Kenshutsuho no Kaihatsu (The Pharmaceutical Society of Japan S)", Forum 2001: Eisei Yakugaku·Kankyo Toxicology Koen Yoshishu Heisei 13 Nen, 15 October, 2001 (15.10.01), page 68	<u>1-3, 5, 6, 8-10</u> 4, 7
<u>Y</u> <u>A</u>	Jones et al., "Control of Cytochrome P1-450 Gene Expression: Analysis of a Dioxin-Responsive Enhancer System", Proc.Natl. Acad.Sci.USA, Vol.83, No.9, 1986, pages 2802 to 2806	<u>4</u> 1-3, 5-10
<u>Y</u> <u>A</u>	Holmes et al., "Determination of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein concentration and subcellular localization in hepatic and nonhepatic cell culture lines: development of quantitative Western blotting protocols for calculation of aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein in total cell lysates.", Mol.Pharmacol. 1997, Vol.52, No.2, 1997, pp.202-11	<u>7</u> 1-6, 8-10
A	De Benedetti et al., "A NOVEL BK VIRUS-BASED EPISOMAL VECTOR FOR EXPRESSION OF FOREIGN GENES IN MAMMALIAN CELLS", Nucleic Acids Research, Vol.19, No.8, 25 April, 1991 (25.04.91), pages 1925 to 1932	1-10
A	KR 2001-046920 A (POSTECH FOUND (POST-N); UNIV POHANG SCI & TECHNOLOGY (UYPO-N)), 15 June, 2001 (15.06.01), (Family: none)	1-10
A	James RI et al., "Engineering CHO cells to overexpress a secreted reporter protein upon induction from mouse mammary tumor virus promoter.", Biotechnol Bioeng., Vol.67, No.2, 20 January, 2000 (20.01.00), pages 134 to 140	1-10
P, X	KASAI et al., "Fast-track DRESSA: a bioassay for fast, sensitive, and selective detection of halogenated and polycyclic aromatic hydrocarbons", Anal Biochem, Vol.337, No.1, 01 February, 2005 (01.02.05), pages 84 to 88	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/008875

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	KASAI et al, "DRESSA: A bioassay for fast, sensitive and selective detection of dioxin and dioxin-like chemicals using a SEAP reporter system", The Molecular Biology Society of Japan Nenkai Program·Koen Yoshishu, Vol.27, 25 November, 2004 (25.11.04), page 1026	1-10
P,X	KASAI et al., "DRESSA: biosensing of dioxin and dioxin-like chemicals using secreted alkaline phosphatase", Anal Biochem, Vol.335, No.1, 01 December, 2004 (01.12.04), pages 73 to 80	1-10

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2005/008875									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. ⁷ C12N15/09, 5/10, C12Q1/42											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. ⁷ C12N15/09, 5/10, C12Q1/42											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2005年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2005年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2005年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2005年	日本国実用新案登録公報	1996-2005年	日本国登録実用新案公報	1994-2005年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2005年										
日本国実用新案登録公報	1996-2005年										
日本国登録実用新案公報	1994-2005年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) MEDLINE (STN), BIOSIS/WPI (DIALOG), JSTPlus (JOIS)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号									
X	横山直 他, ダイオキシン類の簡易検出法の開発, 衛生薬学・環境 トキシコロジー講演要旨集, Vol. 2003, 2003.10.10, p.96	1-3, 5, 6, 8-10									
Y		4, 7									
X	横山直 他, ダイオキシン類の簡易検出法の開発, 日本内分泌かく 乱化学物質学会研究発表会要旨集, Vol.6, 2003.12.02, p.204	1-3, 5, 6, 8-10									
Y		4, 7									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献											
国際調査を完了した日 07.07.2005		国際調査報告の発送日 26.7.2005									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 飯室 里美	4B 3435								
		電話番号 03-3581-1101	内線 3448								

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2005/008875
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	榛葉繁紀 他, "Ah レセプター過剰発現細胞および分泌型リポーター遺伝子を用いたダイオキシン類の簡易検出法の開発 (日本薬学会 S)", フォーラム 2001:衛生薬学・環境トキシコロジー講演要旨集 平成 13 年, 2001.10.15, p.68	1-3, 5, 6, 8-10
Y		4, 7
Y	Jones et al., "Control of Cytochrome P1-450 Gene Expression: Analysis of a Dioxin-Responsive Enhancer System", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 83, No. 9, 1986, pp.2802-2806	4
A		1-3, 5-10
Y	Holmes et al., "Determination of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein concentration and subcellular localization in hepatic and nonhepatic cell culture lines: development of quantitative Western blotting protocols for calculation of aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein in total cell lysates.", Mol Pharmacol. 1997, Vol. 52, No. 2, 1997, pp.202-11	7
A		1-6, 8-10
A	De Benedetti et al., "A NOVEL BK VIRUS-BASED EPISOMAL VECTOR FOR EXPRESSION OF FOREIGN GENES IN MAMMALIAN CELLS", Nucleic Acids Research, Vol. 19, No. 8, 1991.04.25, pp.1925-1932	1-10
A	KR 2001-046920 A (POSTECH FOUND (POST-N); UNIV POHANG SCI & TECHNOLOGY (UYPO-N)) 2001.06.15, (ファミリーなし)	1-10
A	James RI et al., "Engineering CHO cells to overexpress a secreted reporter protein upon induction from mouse mammary tumor virus promoter.", Biotechnol Bioeng., Vol. 67, No. 2, 2000.01.20, pp.134-140	1-10
P, X	KASAI et al., "Fast-track DRESSA: a bioassay for fast, sensitive, and selective detection of halogenated and polycyclic aromatic hydrocarbons", Anal Biochem, Vol. 337, No. 1, 2005.02.01, pp.84-88	1-10
P, X	KASAI et al., "DRESSA: A bioassay for fast, sensitive and selective detection of dioxin and dioxin-like chemicals using a SEAP reporter system", 日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集, Vol. 27, 2004.11.25, p.1026	1-10
P, X	KASAI et al., "DRESSA: biosensing of dioxin and dioxin-like chemicals using secreted alkaline phosphatase", Anal Biochem, Vol. 335, No. 1, 2004.12.01, pp.73-80	1-10

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA05 QA18 QQ08 QQ33 QR60 QR77 QR80 QR82 QS26
QS38 QX01
4B065 AA91X AA91Y AB01 AC20 BA03 BC41 BD21 CA46

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。