

L乾燥による試薬化藻類を用いた 遅延発光バイオアッセイ法の開発

国立研究開発法人国立環境研究所

生物多様性領域 生物多様性資源保全研究推進室

室長 河地 正伸

2023年7月13日

SIP1期 ー産学連携での海底資源開発への取り組みー

SIP（内閣府戦略的イノベーション創造プログラム）
次世代海洋資源調査技術（2014～2018年）

1. 鉱床の形成条件の解明

広大な海から有望海域を絞り込み

2. 新たな探査技術の開発

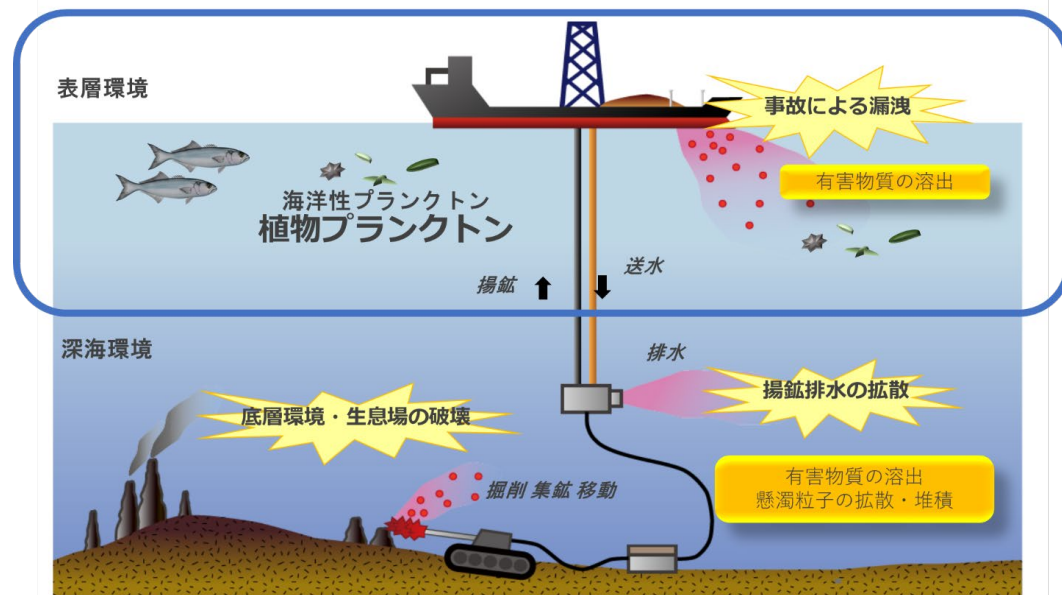
効率的・低コストな調査システム

3. 環境影響評価手法の開発

開発域の環境・生態系への影響評価技術

- 現在は開発前（まだ環境問題は生じていない）
- 環境リスクを洗い出し、事前に対応策を検討する

環境への予防的アプローチ



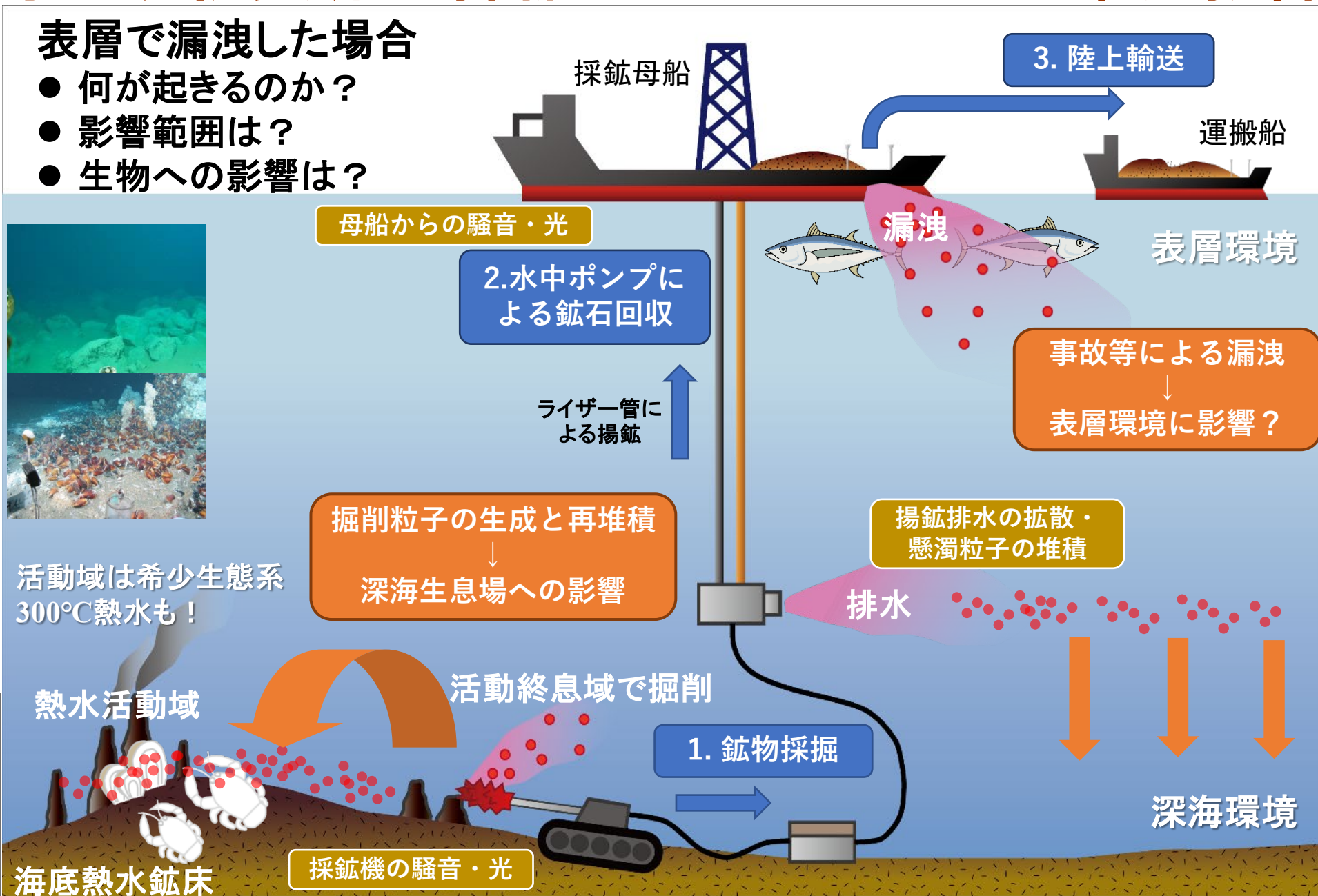
海洋研究開発機構
国立環境研究所
横浜国立大学
東京海洋大学

持続可能な開発

海底鉱物資源の採掘により懸念される環境影響

表層で漏洩した場合

- 何が起きるのか？
- 影響範囲は？
- 生物への影響は？

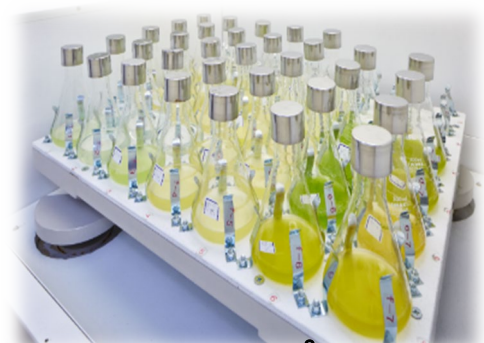


洋上汚染監視のための洋上バイオアッセイの開発

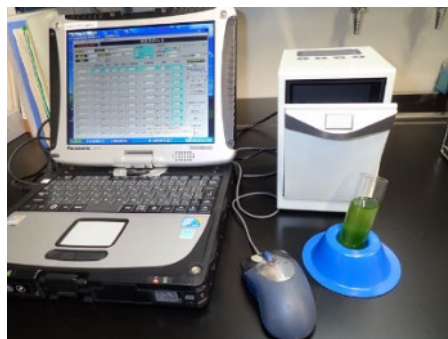
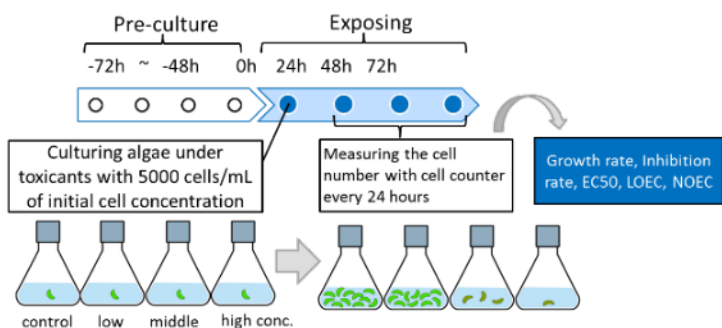
水質管理・生態系リスクアセスメントで使われている試験生物を用いた生態毒性試験(バイオアッセイ)

従来の方法

試験株の増殖阻害試験
長期培養(1週間)、要スペース、前培養、細胞計数等の労力等



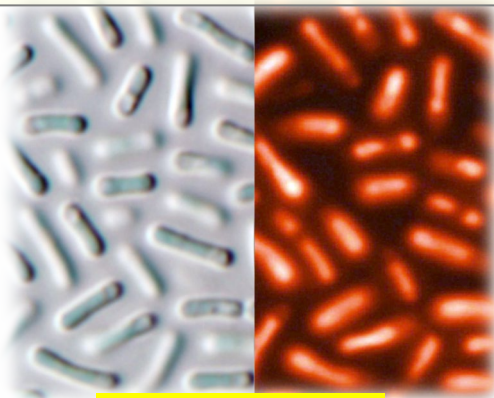
OECD TG201 プロトコル



遅延発光はコンパクトな装置で測定可能

海産試験株の確保

凍結保存による管理が可能で、扱いやすく高い感受性をもつ株を確保



シアノビウム
(NIES-981)

省スペース、短期間に試験が可能な遅延発光を指標とする試験法

浜松ホトニクスとの共同研究で淡水産試験株を用いた試験法を開発

洋上バイオアッセイ

銅イオンに対するEC50濃度 (ppm)

シアノビウム (NIES-981)	0.88
<i>Prorocentrum minimum</i>	13.5
<i>Tetraselmis suecica</i>	40
<i>Dunaliella salina</i>	220
<i>Heterocapsa triquetra</i>	7

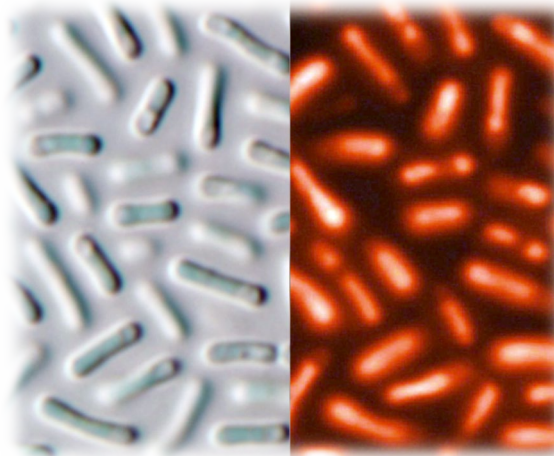
数値: Yamagishi et al. (2016) など

微細藻類を利用したバイオアッセイ

- 微細藻類を利用した**バイオアッセイのプロトコルが定められている(OECD TEST201)**
- 遅延発光装置を利用した簡易法も報告されており、特に、水質監視に適した海産微細藻類である *Cyanobium* sp. NIES-981による**バイオアッセイは国際規格化された(ISO23734:2021)**



試験・計測用アンプル、右がシアノビウム (NIES-981)



シアノビウム(NIES-981)



遅延発光計測の様子

藻類バイオアッセイ(従来技術)とその問題点

- 従来技術では**高密度の前培養細胞が必要**
→細胞が十分に増えない場合、試験の実施が不可能
- 培養のためのインキュベーターや振盪装置等の**大型装置が必要**であり、**洋上で実施できる船舶は限られる。**
- 微細藻類の培養に**一定の技術・経験が必要**
- 増殖は**培養条件(光・温度)や培地組成に依存**する。

本技術の特徴・従来技術との比較

	生長阻害試験 OECD Test No. 201	藻類細胞を利用し た遅延発光 ⁽¹⁾ ISO23734	L乾燥サンプルを 利用した遅延発光 (本研究)
培養時間	前培養3日 本培養3日	24~72時間 (前培養が必要)	不要
検出時間	暴露後2日	暴露後約数時間~数日	暴露後、0~90分
必要量	100 mL	2~10 mL	1~4 mL
振盪培養	要	要	不要
再現性	培養条件に依存 ⁽²⁾	培養条件に依存 ⁽²⁾	培養条件に依存しない ⁽²⁾
解析法	細胞数計測	微弱光計測	微弱光計測
試験対象種	限定 ⁽³⁾	すべての光合成種 (NIES-981推奨)	ほぼすべての藻類

従来の微細藻類を利用するバイオアッセイと比較して、本方法は、(1)検出までの時間が90分以内と短縮されること(従来法では少なくとも48時間必要)、(2)光化学系に影響する化学物質では特に鋭敏に検出できること(ppbオーダー)、(3)培養等の操作が不要であり再現性が高いこと、以上の点が特筆できる。

(1) Ota et al. 2021に基く。

(2) TEST201と遅延発光法は生細胞を用いるため、再現性は細胞の培養条件に大きく依存する。L乾燥サンプルはロットごとに均一な品質かつ、培養をしないため比較的再現性が高い。

(3) OECDにより試験生物が指定されている。

新技術の特徴・従来技術との比較

- 従来技術の問題点であった培養・準備にかかる時間を削減し、検出までの**スピードアップに成功**した。
- 本方法では前培養のステップが不要であり、**洋上船舶等での限られた実験機材や時間的制約のなか**でも実施可能
- 本技術の適用により、アッセイに使う藻類が長期安定保存できるため、**藻類の維持・管理コストが大きく削減**されることが期待される。

微細藻類の“試薬化”の検討

■ 試薬化藻類に求められる性能

- ✓ 前培養不要
- ✓ 長期安定保存可能性
- ✓ 再現性、簡便性

■ 生・凍結・乾燥サンプルの比較(参考)

	生細胞	凍結保存	L乾燥標品
保存温度	室温	液体窒素	冷蔵・室温 (*1)
品質安定性	低い	半永久	数年
予備培養	必要	必要	不要
ロット管理 (*2)	不可	可	可

(1*) 低温保存のほうがより品質が安定するが、室温での保存も可能

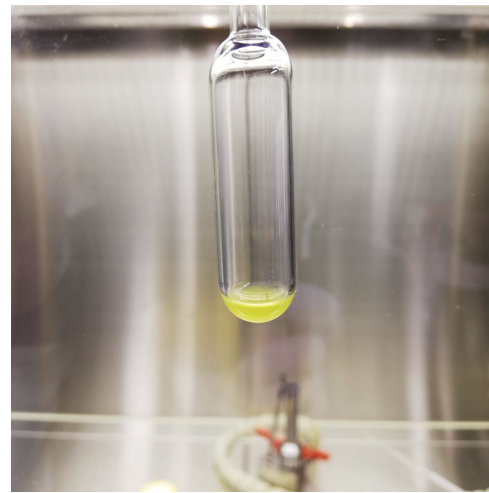
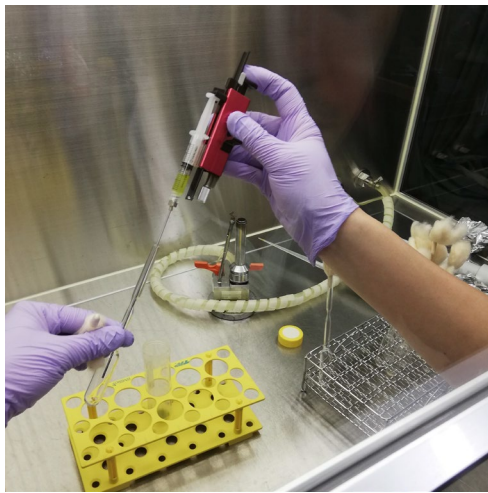
(2*) 同一培養条件ごとに保存管理が可能で、再現性が高くなる

■ 藻類の試薬化の検討項目

- ✓ 培養・保護培地・乾燥条件
- ✓ 加速劣化実験
- ✓ 金属曝露試験
- ✓ サンプル容器の検討
- ✓ 品質保持の検討と品質評価法

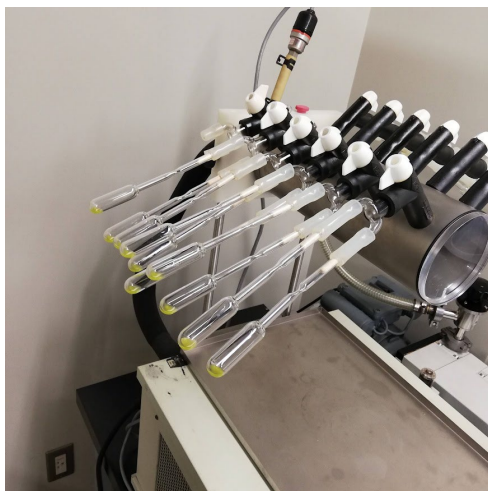
L乾燥標品は船舶等の時間・空間が限られた場所でも利用可能

L乾燥法を利用した試薬化藻類技術



- 細胞を凍結させずに乾燥させる方法
- 藻類・菌類の培養株の長期株保存の方法のひとつ
- 試薬化藻類は4℃あるいは室温保存が可能
- 培養不要で、直ぐに使用可能

L乾燥技術を応用し、藻類を「試薬」のように、安定して保存し、遅延発光アッセイに利用できる方法を開発した。



ガラスアンプルによるL乾燥サンプル作製の様子

L乾燥法の改良、コスト削減

■ サンプル容器の取り扱いやすさやコストについても考慮



従来法 (1)



改良法

改良点

- ✓ ガラスアンプルからクライオバイアルに変更(大気圧保存可)
- ✓ 金属製ラック(CoolRack)を使うことで、 $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ の均一な分布精度を維持、乾燥時の温度バラツキを抑制
- ✓ 溶封工程を省略
- ✓ 1本あたりの作製コストを低減⁽²⁾

(1) 株保存を目的とした方法

(2) 作製コスト：約500円/本 → 50円/本程度

作業工程



大量培養



遠心



保護培地に懸濁後、分注



氷上で真空乾燥 (L乾燥)

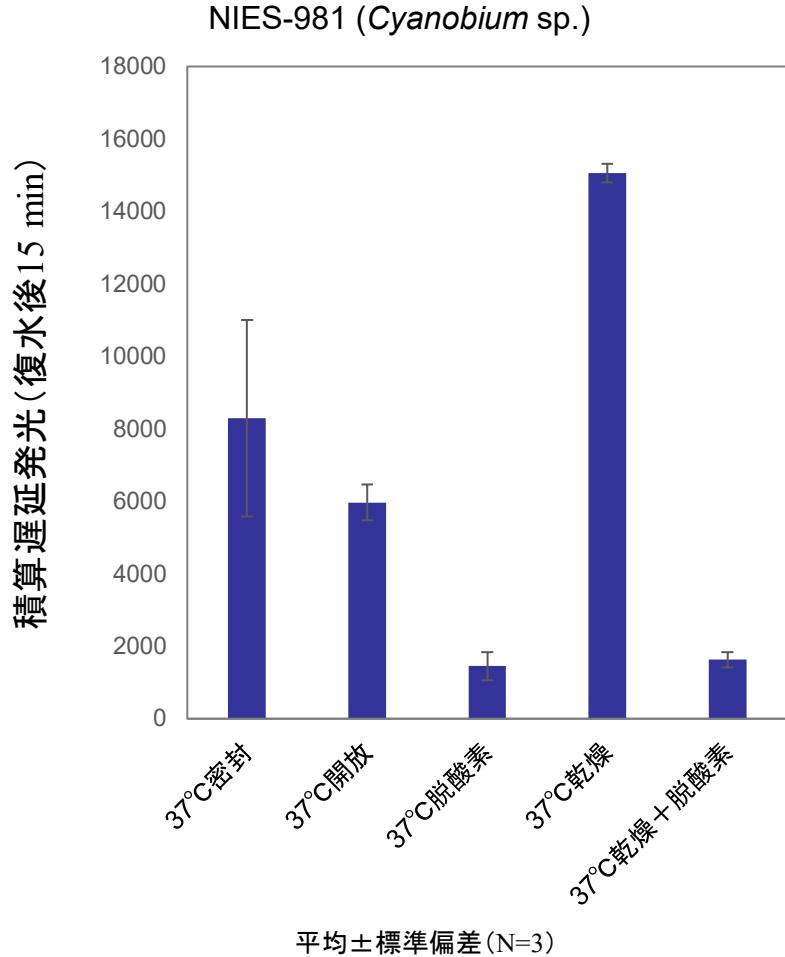


L乾燥試料

試薬化藻類の品質安定性

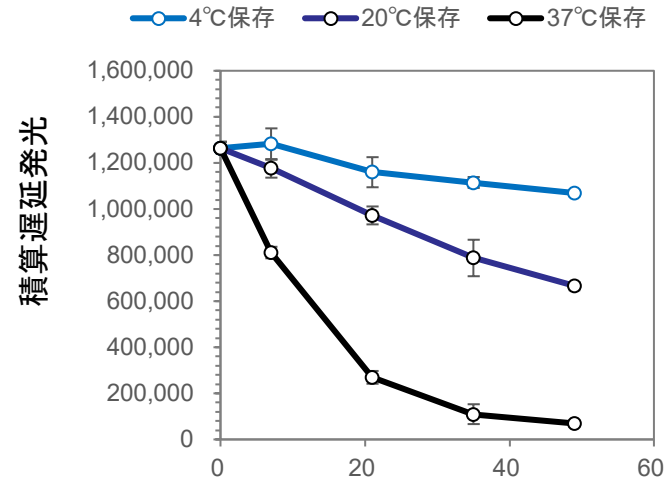
■ 保存条件

- ✓ 37°C加速劣化条件で14日間保存
- ✓ 安定性には保存温度と乾燥状態が重要
- ✓ 大気圧下で保存しても問題ない

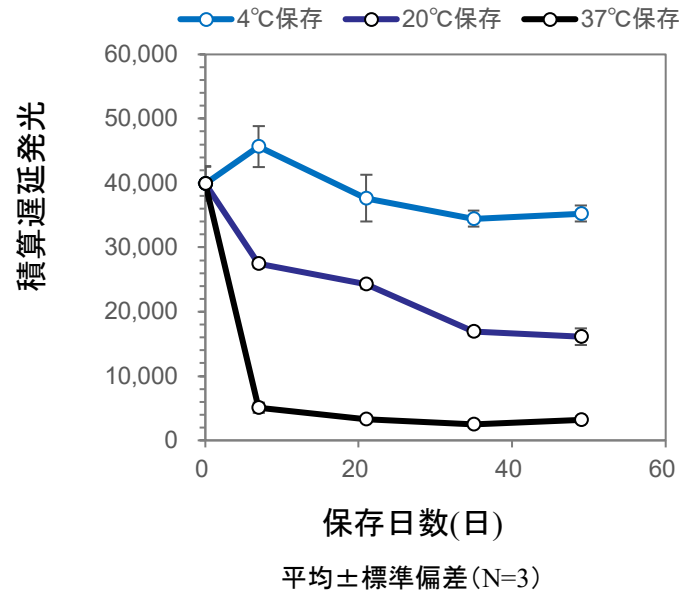


■ 長期安定性試験

NIES-35 (ムレミカズキモ)

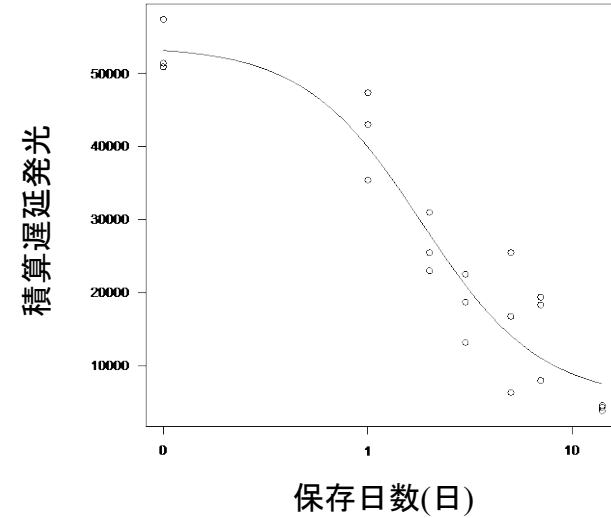


NIES-981 (*Cyanobium* sp.)



■ 劣化加速試験

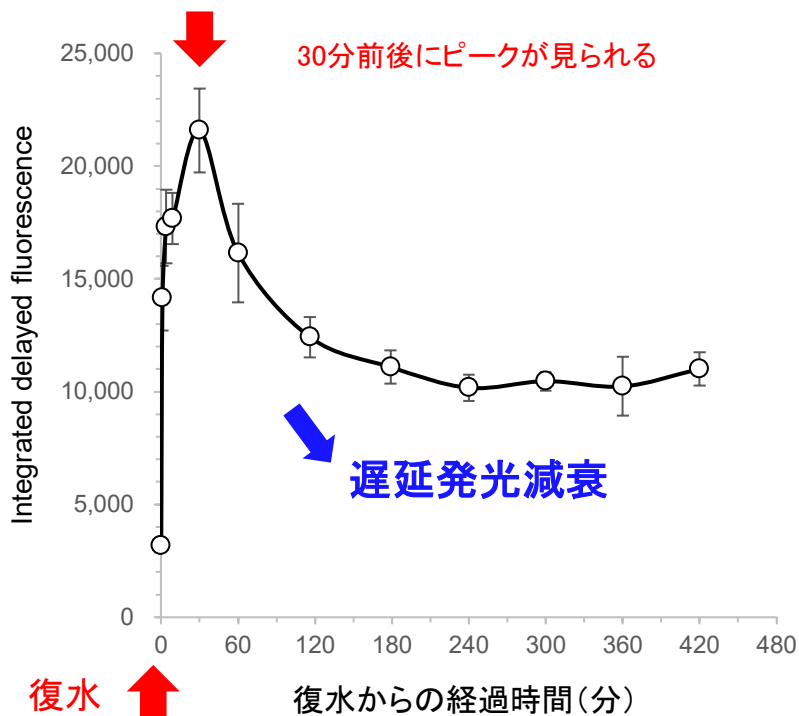
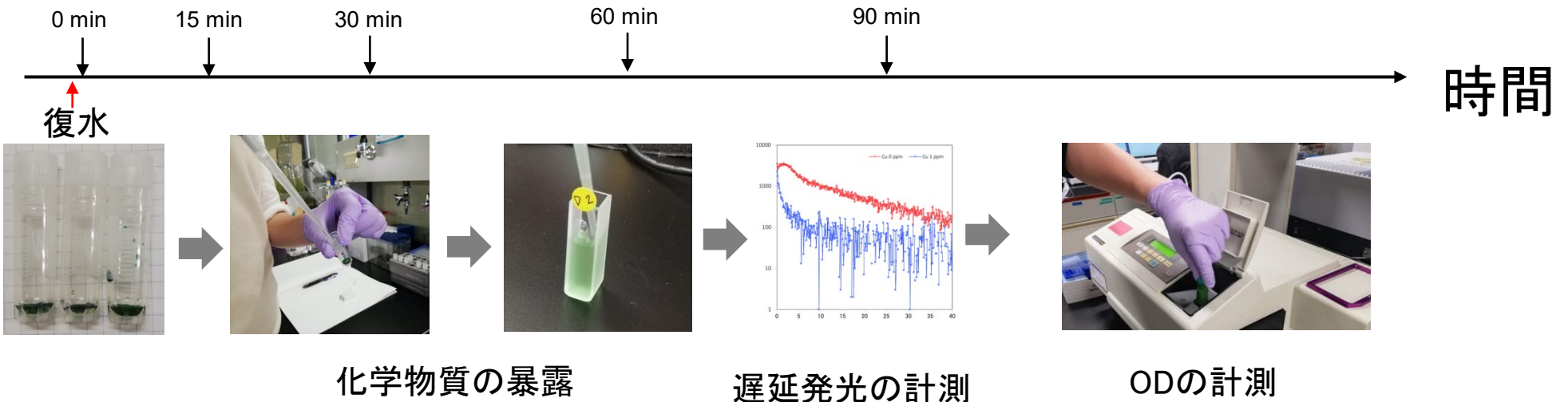
NIES-981 (*Cyanobium* sp.)



- ✓ 37°C条件で10日間保存が4°Cで20年間の保存に相当すると仮定した。

- ✓ ガラスアンプル中において理想的な条件で保存した場合の推定半減期は **2.63年**

L乾燥標品を用いた金属暴露実験の流れ

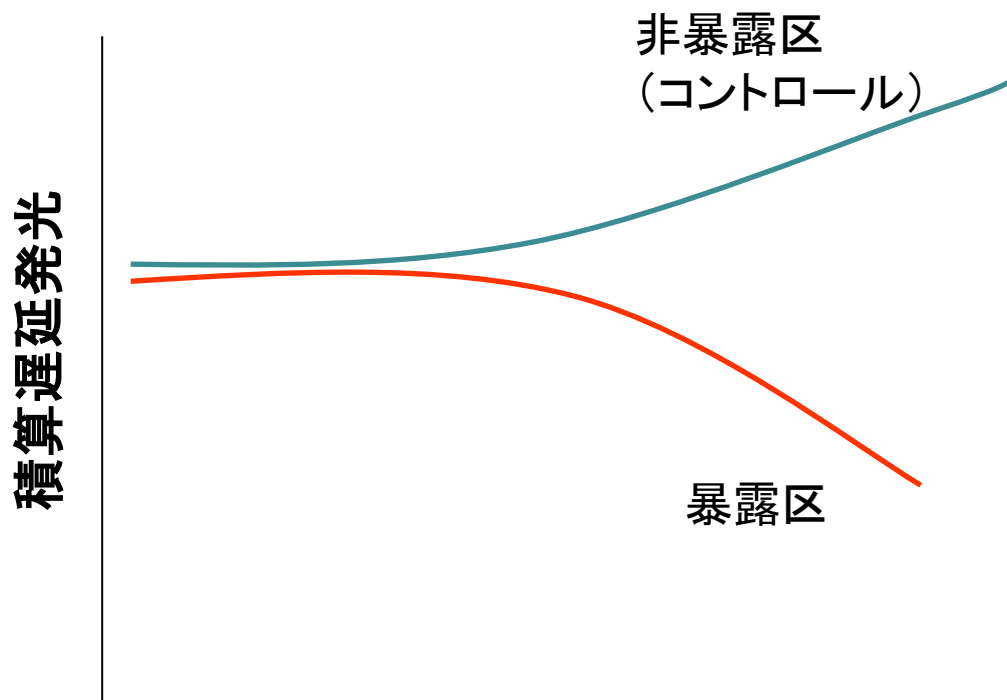


- ✓ 復水後、数十分で積算遅延発光がピークに達したあと、減衰がみられる。
- ✓ 生細胞サンプルではこのような減衰は見られない。
- ✓ 数分から数十分の間に見られる短期寿命遅延発光⁽¹⁾をバイオアッセイに利用する。

(1) L乾燥のみに見られる遅延発光現象。光合成系膜（チラコイド）が乾燥され、復水による電荷再結合したものであると考えている。

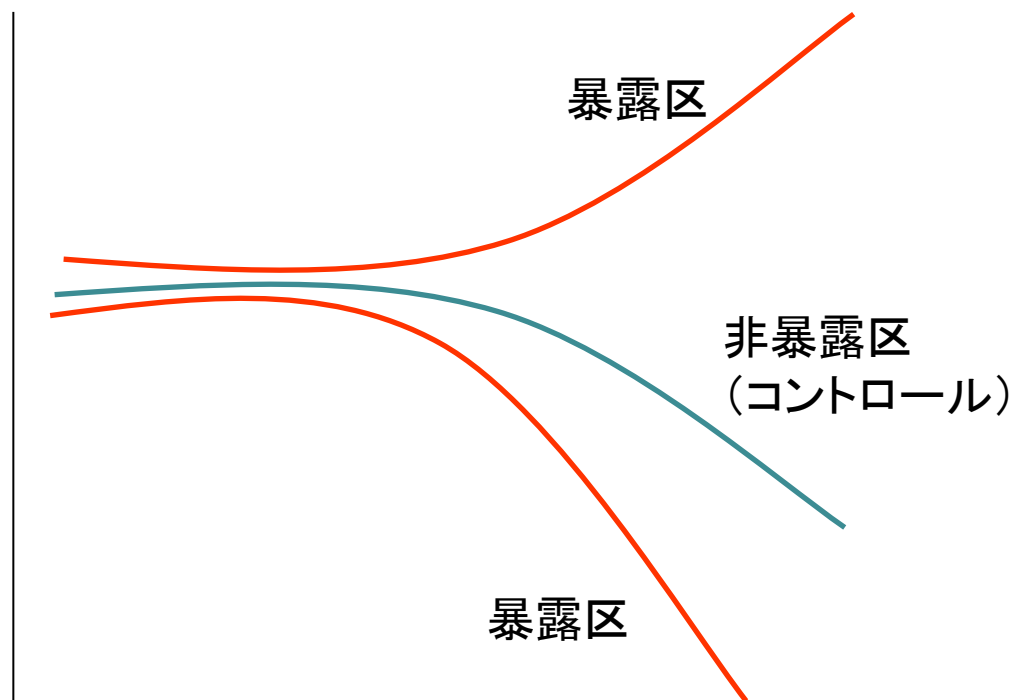
従来法との遅延発光反応の比較

生細胞(従来法)



※遅延発光の減少を検出

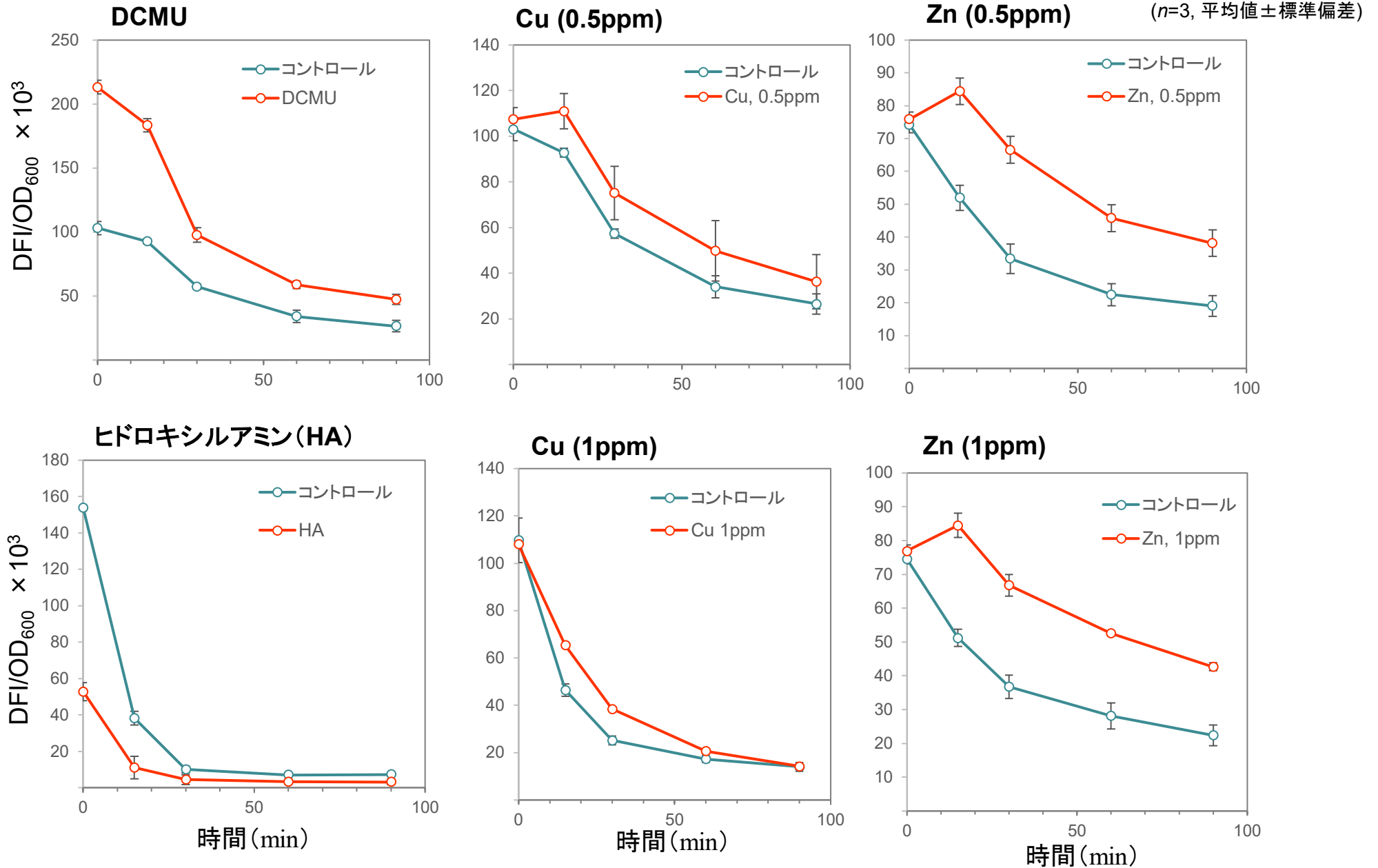
L乾燥細胞(本研究)



※遅延発光の減少または増加を検出

現方法では化学物質により遅延発光の応答が異なる

毒性評価試験の実施例



各種化学物質の最短検出時間

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

上段：最短検出時間、下段：コントロールに対する遅延発光反応

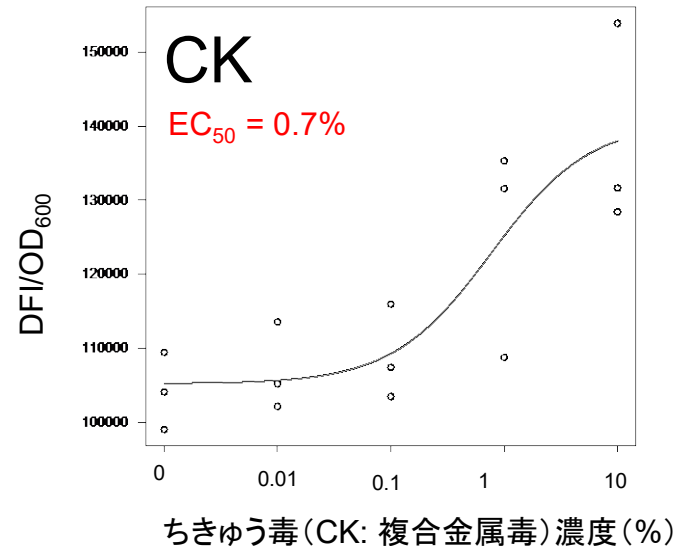
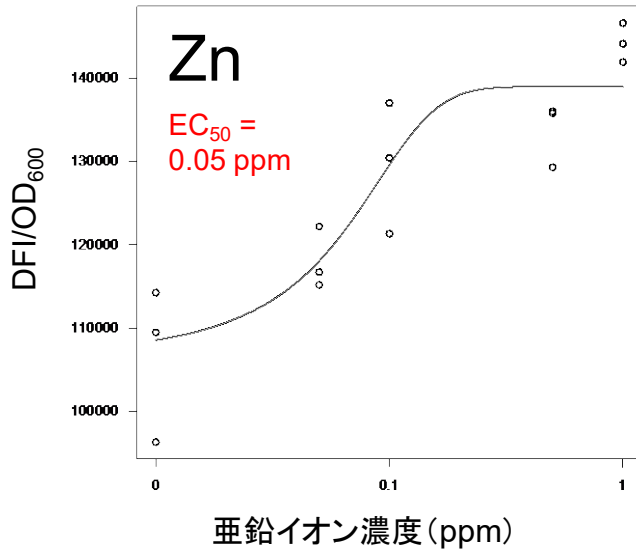
	DCMU 1 μ M	HA 50 μ M	Cy1%	As(III) 0.5 ppm	As(III) 1 ppm	As(V) 0.5ppm	As(V) 1 ppm	Cu ²⁺ 0.5ppm	Cu ²⁺ 1ppm	Zn ²⁺ 0.5ppm	Zn ²⁺ 1ppm	Pb ²⁺ 0.5 ppm	Pb ²⁺ 1 ppm
NIES-35	15 min**	15 min**	15 min**	NA	NA	NA	30 min**	15 min**	15 min**	15 min**	15 min**	15 min**	15 min**
	上昇	下降	上昇	変化なし	変化なし	変化なし	下降	下降	下降	上昇	上昇	上昇	上昇
NIES-969	0 min**	0min**	60 min**	15 min*	90 min*	NA	15 min**	90 min*	15 min*	15 min**	60 min**	15 min**	15 min**
	上昇	下降	上昇→ 下降	減少	増加	変化無	上昇	下降	下降	上昇→ 下降	下降	上昇→ 下降	上昇→ 下降
NIES-981	0min**	0min**	0min**	NA	NA	NA	NA	15 min*	15 min**	15 min**	15 min**	NA	15 min**
	上昇	下降	上昇	変化無	変化無	変化無	変化無	上昇	上昇	上昇	上昇	変化無	上昇
NIES-2885	0 min*	0min**	0min*	NA	0min*	NA	90 min*	NA	0min**	0 min*	30 min**	0 min*	15 min**
	下降→上 昇	下降	上昇→下 降	変化無	上昇	変化無	下降	変化無	下降	上昇→ 下降	上昇→下 降	上昇→ 下降	上昇→ 下降

- ✓ 曝露後初めて有意差が生じた時間を最短検出時間とする。
- ✓ DCMUやHAのように電子伝達系に直接作用する化学物質は鋭敏で、0~15分で検出可能
- ✓ 銅、亜鉛、鉛に関してはNIES-2885以外のすべての株で90分以内に検出できることを確認

NIES-35: *Raphidocelis subcapitata* (淡水緑藻)、NIES-969: *Synechococcus* sp. (海産シアノバクテリア)、
NIES-981: *Cyanobium* sp. (海産シアノバクテリア)、NIES-2885: *Prochlorococcus* sp. (海産シアノバクテリア)

代表的な金属・化学物質による半影響濃度 (EC₅₀)、 検出限界の推定

- ✓ 使用株NIES-981
- ✓ 復水と同時に亜鉛または混合毒 (CK) を暴露させ、15分後に遅延発光を計測



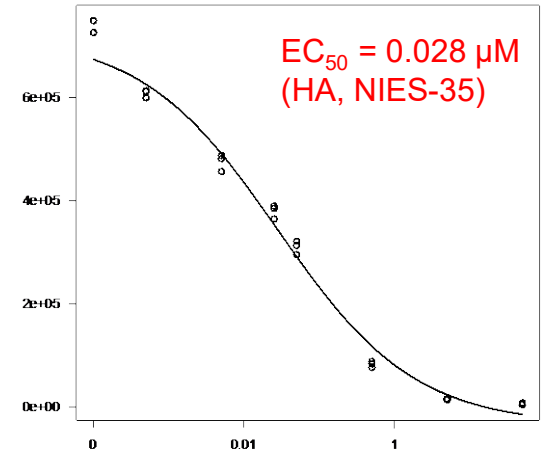
■ 検出限界 (P値表)

- ✓ NIES-35, DCMU

濃度 (μM)	0.001	0.01	0.1	1
0 min	0.212	0.135	0.065	0.004
15 min	0.435	0.062	0.019	0.000
30 min	0.018	0.046	0.010	0.000

- ✓ NIES-35, HA

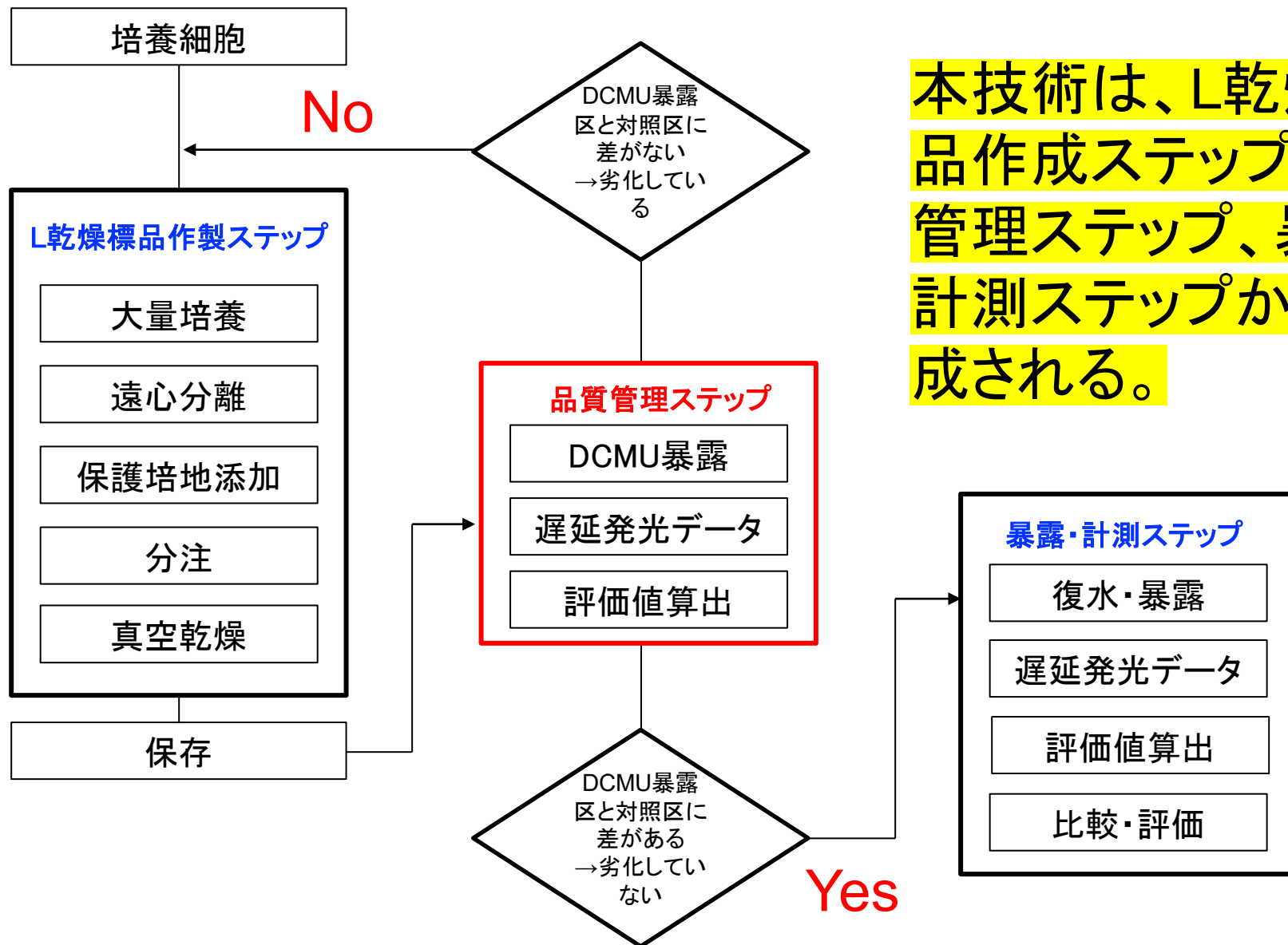
濃度 (μM)	0.0005	0.005	0.025	0.05	0.5	5	50
0 min	0.256	0.214	0.038	0.021	0.004	0.002	0.001
15 min	0.010	0.003	0.001	0.001	0.000	0.000	0.000
30 min	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000



- ✓ 銅、鉛なども0.5 ppm以下で検出できることを確認 ピンク網掛け部分 P<0.05
- ✓ DCMUの検出限界は0.1 μM (約0.02ppm) (NIES-35、15分暴露)
- ✓ HAの検出限界は0.0005 μM* (NIES-35、15分暴露)
- ✓ 電子伝達系に直接作用する化学物質は極めて鋭敏に反応する。

*希釈率：原液の1億倍希釈に相当する濃度

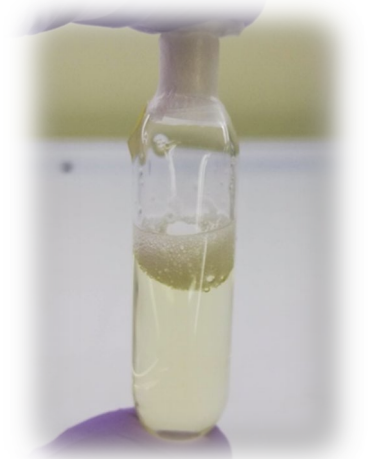
L乾燥標品による化学物質の毒性評価のフロー



本技術は、L乾燥標品作成ステップ、品質管理ステップ、暴露・計測ステップから構成される。

想定される用途

- 洋上船舶などの使用できる機材が限られる場所での環境影響評価やモニタリング
- 重金属、ヒ素、農薬などの化学物質汚染の一次スクリーニング
- 藻類系統保存で使用されているL乾燥標品の品質チェック



実用化に向けた課題

- ・ HA、DCMUなど光化学系に直接作用する化学物質は極めて微量でも検出できる（1ppb以下の検出感度）。一方で、重金属やヒ素ではppmオーダーでの検出にとどまる。これを一般的な化学物質すべてについてppbオーダーで検出できれば、実用化の可能性が広がると考えられる。
- ・ 現在では遅延発光のデータは、統計的に有意な差をもとに判定している。研究上は問題ないが、実用化に向けて、検出の判定基準を明確にする必要があるだろう。

本技術に関する知的財産権

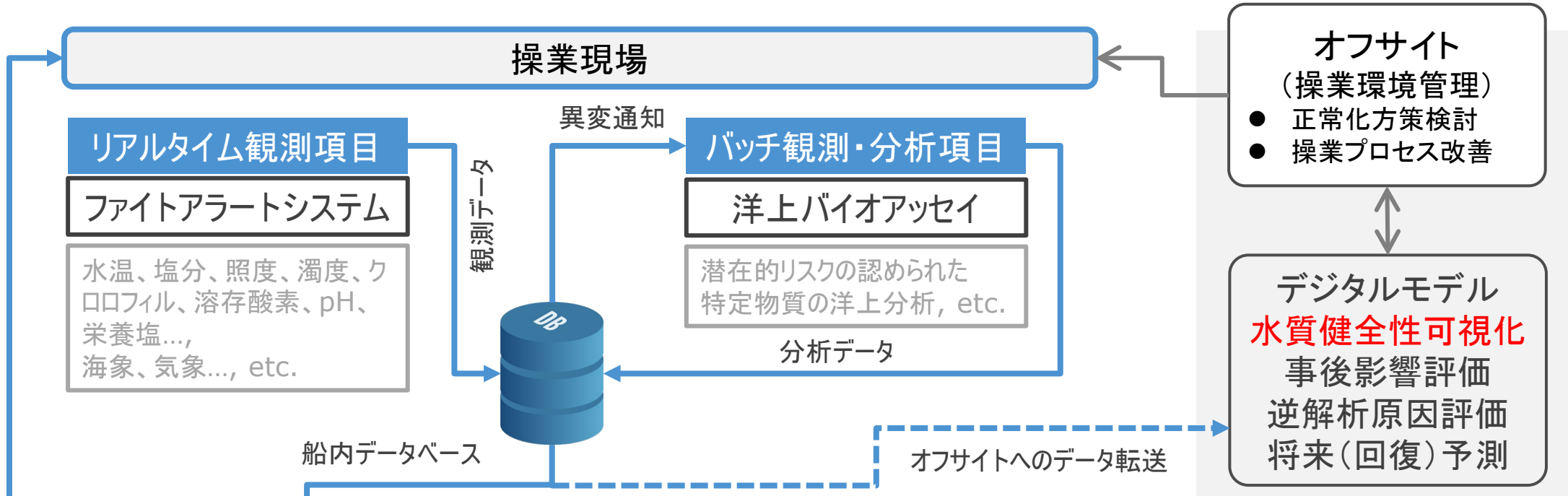
- 発明の名称：海水中の重金属の存在を検出する方法及びキット
- 特許番号：特許第7148127号
- 出願人：国立研究開発法人国立環境研究所
- 発明者：大田修平、越川海、河地正伸

- 発明の名称：検出方法、藻類乾燥物の製造方法、藻類乾燥物、及び藻類乾燥物の品質管理方法
- 特許番号：特許第7290367号
- 出願人：国立研究開発法人国立環境研究所
- 発明者：大田修平、越川海、河地正伸

企業への期待

- 常温・大気圧でも数年間は生きたまま藻類を保存できる“**試薬化藻類**”や藻類の“**遅延発光**”に関心のある企業。
- 藻類を用いた**生態毒性試験**、**簡易バイオアッセイ**等、環境影響評価分野への展開を考えている企業。
- 内閣府**戦略的イノベーション創造プログラム**(SIP, 2023-2027)において、**海底鉱物資源開発時の海洋環境影響評価技術**の開発に、**JAMSTEC**と共同で取り組んでいます。
- 関連技術開発は今後も継続、内容をアップデート予定。
- ご関心のある方は、是非ご連絡ください。

SIP: 海洋安全保障プラットフォームの構築

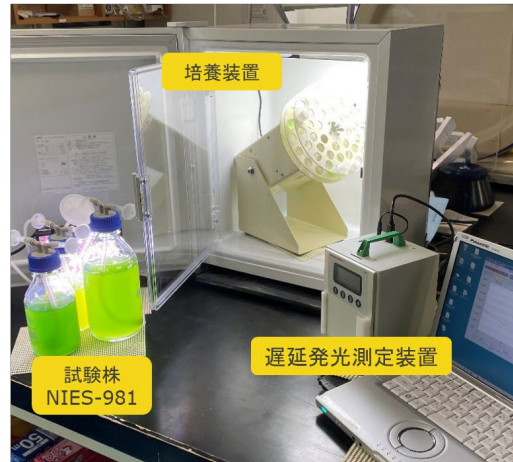


船内海洋環境揭示

現在の海洋環境 **良好**

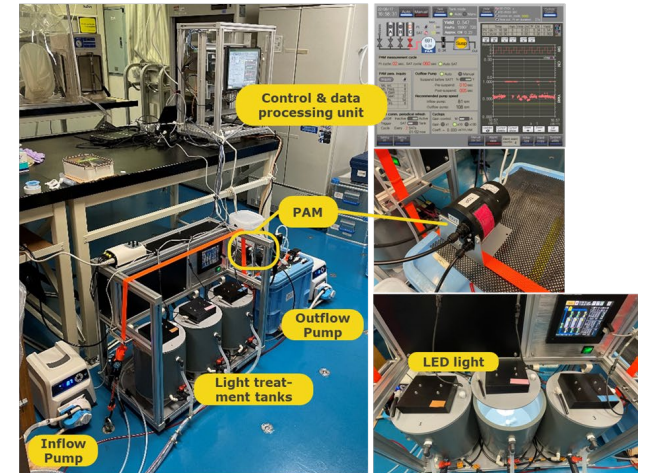
メール送信、船内LCDパネル表示等

洋上バイオアッセイ (2015年～)



2021年ISO登録完了
2023年5月派生技術の国内特許成立

ファイトアラートシステム (2017年～)



2022年国内特許成立、現在、海外特許審査中

お問い合わせ先

国立研究開発法人国立環境研究所
連携推進部 研究連携・支援室

TEL 029-850-2956
e-mail kikaku-ip@nies.go.jp