

PSII-17 枯草菌 Rec-assay 液体法を用いた 環境変異原の自動測定評価装置の開発

○ 京都大学大学院 岩根知里
京都大学工学部 松井三郎
京都大学大学院 Mette Wrisberg

1.はじめに 今まで、枯草菌Rec-assay液体法によるDNA損傷性検出法の開発、紹介を行ってきた。従来、Monod恒温槽が培養器として用いられてきたが、今回本研究室ではアドバンテック東洋社製のバイオフィトレコーダーを導入し、枯草菌Rec-assayに適する様に改良を行った(以下、Rec-assay Biophotorecorderと呼ぶ)。それにより、濁度測定からデータ解析までをコンピューター制御できるようになり、実験者の労力・拘束時間が大幅に削減できると共に、より客観的な毒性評価指標値を得ることができるようになった。ここでは、Rec-assay Biophotorecorderの紹介を行う。

2. Rec-assay Biophotorecorderの概要 Rec-assay Biophotorecorderの概要図を図-1に示す。

Rec-assay Biophotorecorderは自動振盪培養濁度測定機であり、培養器、温度制御ボックス、パーソナルコンピューター(CPU, CRT, プリンター, ホッパー, インターフェイスボックス)で1セットになっている。培養器にはL字管を一時に36本挿入できる。培養環境(温度、振盪速度)の設定はダイヤルで行え、一度設定すれば後は自動的に制御される。菌の増殖細胞数は濁度で換算する。濁度は、L字管を通る透

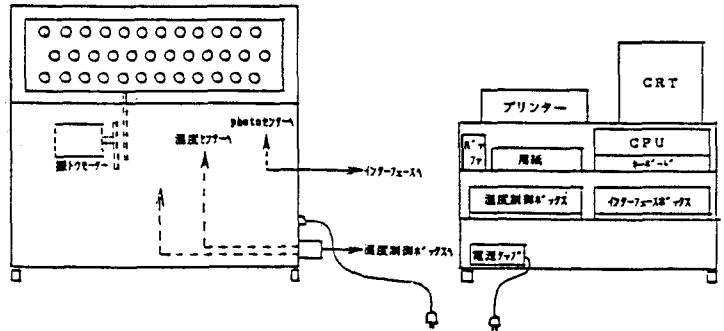


図-1 Rec-assay Biophotorecorderの概要図

過光をモニターすることによって測定され、プリンタ上に記録されると共にパーソナルコンピューターシステム内に蓄えられる。必要があれば、データを使ってCRT上に増殖曲線を描かせることができる。本来のバイオフィトレコーダーとの構造上の違いは、L字管の直径を小さくすることにより、検定試料が少なく済むようになった点と、振盪角度を大きくすることにより、酸素供給量が多くなった点である。ソフト上の違いは、本研究室で開発したRec-assayプログラムに沿って、プロビット理論・標的論に基づくDNA損傷性評価指標値を得られることである。

3. 実験方法 過去の文献を参照されたい。

4. 実験結果 Rec-assay Biophotorecorderによる実験結果と、従来法(Monod恒温槽)による実験結果とを比較する。図-2, 3に各々の増殖曲線を示す。但し、恒温槽法は時間がかかるので、時間短縮のため、菌をRec-assay Biophotorecorder法

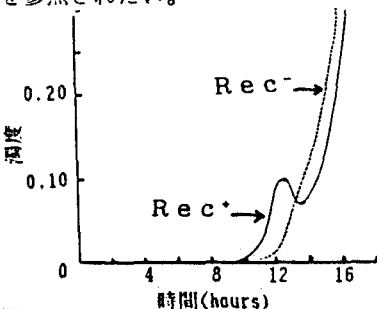


図-2 Rec-assay Biophotorecorderによる枯草菌の増殖曲線(37°C, 55rpm)

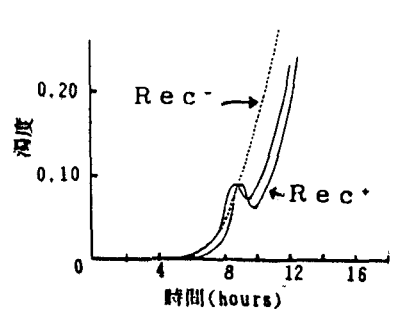


図-3 Monod恒温槽による枯草菌の増殖曲線(37°C, 72rpm)

のRec⁺4倍,Rec⁻8倍入れている。図-2,3より、Rec⁻はどちらも滑らかな曲線であるのに対して、Rec⁺はどちらの曲線でも同程度の落込みを生じていることがわかる。曲線の立ち上がりの角度は、どちらもほぼ同じであるが、培養開始から立ち上がるまでの時間は、同量の菌を用いたならばRec-assay Biophotorecorderの方がかなり短くなるとされる。ところで、より正確な毒性評価を行うには、菌の増殖曲線が滑らかである方が望ましい。そこで次に、Rec⁺菌のグラフの落込み解消を、Rec-assay Biophotorecorderを用いて試みた(恒温槽法では過去試みられていない)。

Rec⁺菌が、落込み後普通に増殖していることから、栄養状態は落込みの原因であるとは考えられない。そこで、落込みの原因ではないと思われる酸素供給量を変化させて(振盪角度を変えて)実験を行った。実験条件を表-1に、実験結果(増殖曲線)を図-4(Rec⁺)、図-5(Rec⁻)に示す。図-4,5より振盪速度を上げて酸素供給量を多くすると、増殖曲線の立ち上がりの時期が速くなり、終点に達するまでの時間が短くなり、するものの、Rec⁺菌の落込みは解消されないことが分かった。

表-1 実験条件

	振盪速度(rpm)
実験1	55
実験2	64
実験3	72
実験4	75

(温度(37°C)、振盪角度は全て同じ。)

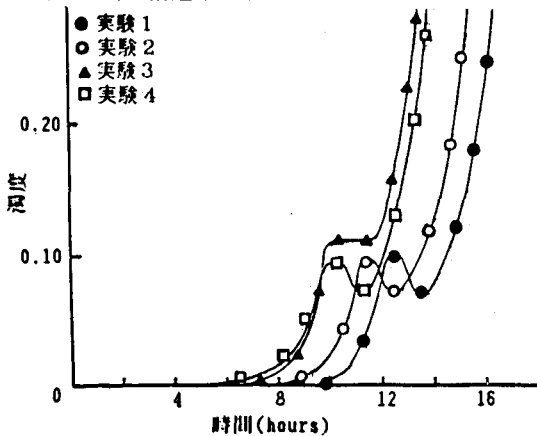


図-4 振盪速度を変化させた時のRec⁺の増殖曲線

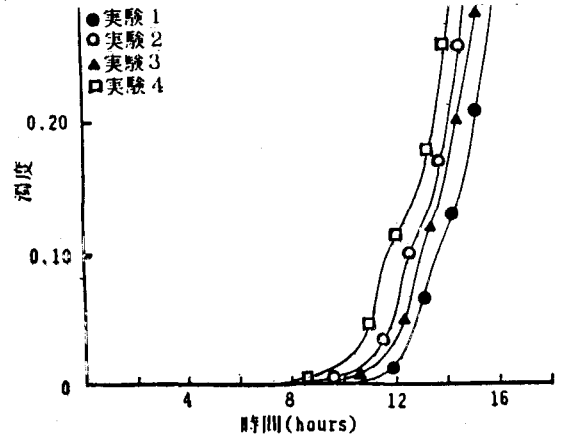


図-5 振盪速度を変化させた時のRec⁻の増殖曲線

5. 考察とまとめ Rec-assay Biophotorecorder法による増殖曲線は、恒温槽法のそれとほぼ同じ増殖カーブを描き、培養器の違いは菌の増殖に影響を与えないこと、しかし、対数増殖期に入るまでの時間はRec-assay Biophotorecorder法の方が数時間短いことがわかった。従って、Rec-assay Biophotorecorderが恒温槽と同様の実験結果を出すことが期待できるとされる。また、Rec⁺菌のグラフに生じる落込みは栄養状態、酸素供給量によるものではないことが分かった。他に特筆すべき落込みの原因が考えられないことから、落込みは培養器の特性によるものではなく、Rec⁺菌の孢子状態になり易いという性質からくる増殖特性であると考えられる。しかしながら、富栄養状態で孢子が形成されて落込みが生じるのであれば、栄養組成を変化させれば、あるいは孢子を形成しないまま実験終点に到達させることが可能であるかもしれない。現段階ではrec⁺菌の増殖曲線の落込みをなくすることができていないが、落込みの影響を受けない範囲で終点を設定すれば、毒性評価には支障がないと思われる(本研究室では濁度0.2を終点としている)。落込み解消とデータ蓄積が今後の課題である。

謝辞: Rec-assayプログラムソフトの開発については京都大学大学院生内藤茂喜氏の協力を得たことをここに記して感謝します。この研究は文部省科学研究費補助金(試験2)No.61850102によって行いました。

参考文献: ①松井三郎他;下水協誌 Vol.22.No.250(50-59),1985 ②松井三郎;水質汚濁研究Vol.8 No.3(162-171,171-180),1985 ③Matui S.;IAWPRC Fresh Water Biological Monitoring, Pergamon press, pp143-152,1984