

(34) マイクロプレートを用いた枯草菌 rec-assay の開発とその評価

Development of the new *Bacillus subtilis* rec-assay method with a microplate

松井宏樹*、滝上英孝*、松田知成*、清水芳久*、松井三郎*

Hiroki MATSUI*, Hidetaka TAKIGAMI*, Tomonari MATSUDA*, Yoshihisa SHIMIZU*, Saburo MATSUI*

ABSTRACT ; The *Bacillus subtilis* rec-assay has been carried out using Monod tube (MT method) for evaluating DNA damaging toxicity. However, MT method has some drawbacks. We developed a new method with a microplate (MP method) for improving those drawbacks.

In this research, both MT and MP methods were applied for eight chemicals. The experimental results indicated that there was no difference between both methods in terms of DNA damaging toxicity, and that the sensitivity increased in MP method. Also it was found that the logarithmic values of LC50 had a linear relationship between the two methods. Furthermore, it was possible to make the required experiment time shorter and the required sample volume smaller (i.e., 1/10) in MP method. Based on these results, we can say that MP method is more effective and useful to detect DNA damaging toxicity of environmental samples.

KEYWORDS ; Microplate, Monod tube, *Bacillus subtilis* rec-assay, DNA damaging toxicity

1. はじめに

枯草菌 rec-assay は賀田らによってストリーク法として開発され¹⁾、さらに試験感度や再現性を上げるために我々の研究室で改良したものが rec-assay 液体法である²⁾。以来 rec-assay 液体法はL字管(Monod tube)を用いた手法(以下、L字管法と呼ぶ)で行われてきた。枯草菌 rec-assay は環境水サンプルの DNA 損傷性を検出する手法として優れているといえる³⁾が、従来のL字管法では実験操作が煩雑、一度に 1、2 物質しか実験を行えない、大量の試料を必要とする等といった問題点があった。そこでこれらの問題点を改善するために、L字管の代わりに 96 穴式マイクロプレートを用いた手法(以下、マイクロプレート法と呼ぶ)により枯草菌 rec-assay 液体法の小型実用化を検討した。マイクロプレートを用いたバイオアッセイの小型化は近年になってしばしば行われており、マイクロプレートを用いることによる利点も挙げられている⁴⁾⁵⁾。本研究ではL字管法とマイクロプレート法との比較を行い、両方法で得られた試験結果の相関性等を調べ比較検討を行った。

両方法の比較を行う上での検討事項を挙げると下記ようになる。

- ・各試験物質について S-probit で評価される DNA 損傷性の判定が両方法で変化しなかったか。
- ・LC50 で表わされる枯草菌への毒性の強さ、すなわち試験感度について両方法で違いはみられたか。
- ・試料調整時間、振とう時間等の実験に要する時間は短縮されたか。
- ・L字管(ガラス製)とマイクロプレート(プラスチック製)の材質の相違が試験結果に影響を及ぼさなかったか。

本研究ではこれらの点に特に着目し、マイクロプレート法を水環境中の化学物質の DNA 損傷性評価に適用していく上での有効性や問題点について検証した。

2. 枯草菌 rec-assay の試験原理

枯草菌(*Bacillus subtilis*)は、好気性、グラム陽性の桿菌で、土壌、枯草、塵埃などの環境中に広く分布している。枯草菌 rec-assay では枯草菌の野生株 rec+と DNA 修復機構の一部が欠損している変異株 rec-を用いることで両株の DNA 修復能の違いを利用し、その致死感受性を比較することによって検定試料の DNA 損傷性を評価する方法である(図-1 参照)。

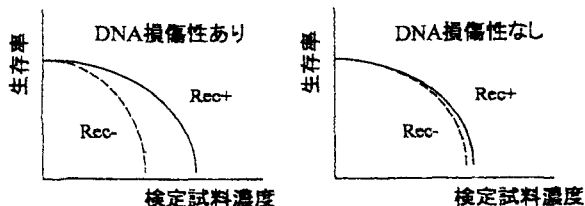


図-1 枯草菌 rec-assay の試験原理

*京都大学工学研究科附属環境質制御研究センター

(Research Center for Environmental Quality Control, Kyoto Univ.)

3. DNA 損傷性の評価方法²⁾

本研究では枯草菌 rec-assay の試験結果の評価を、Probit 理論とそれに基づく指標によって行った。Probit 理論は主にバイオアッセイの分野で用量－反応関係を説明する際に用いられてきた理論で、経験的類推に基づいた次の二つの仮定の下に成り立っている。

(1)ある生物集団において外部からの有害な刺激に対する生物の感受性は生物個体によって異なり、その分布は刺激量の関数について LD50(50%致死量)を平均とする正規分布に従う。

(2)仮定(1)において、刺激量の関数は幾何関数であり、刺激量の対数をとる。

枯草菌 rec-assay では生物の感受性は枯草菌の生存率で、刺激量の関数は検定試料の濃度の対数値で表せるので、実験値から正規分布の平均値、すなわち LC50(50%致死濃度 = 50%生存率)と分散を推定していくことになる。

枯草菌 rec-assay の結果を Probit 理論に適用する場合、検定試料の濃度(環境水の場合は濃縮倍率)の対数値を x 、枯草菌の反応率(生存率)を y とおくと、上で述べた仮定に従い、

$$y = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^z \exp\left(-\frac{z^2}{2}\right) dx \quad (1)$$

と書ける。式(1)で表される正規分布 $N(m, \sigma^2)$ を $z = (x-m)/\sigma$ とおき標準正規分布 $N(0, 1)$ に変換すると、

$$y = \int_{-\infty}^x \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(x-m)^2}{2\sigma^2}\right) dx \quad (2)$$

(σ = 分散, $m = \text{Log}_{10} \text{LC50}$)

となる。ここで種々の z の値に対する y の値は計算されているので、逆に実験値から得た y から z を求めることができる。ここで、

$$z' = z + 5 = \frac{5-m}{\sigma} + \frac{1}{\sigma} x \quad (3)$$

とし、 z に 5 を加えると、その値は実際上ほとんど負にはならないことから、 $z' = z + 5$ として z' は Probit 値と呼ばれる。このような変換を Probit 変換という。また、 z' の回帰式 $z' = a + bx$ から $m = (5-a)/b$ 、 $\sigma = 1/b$ として m および σ を推定することができる。

Probit 理論に基づく指標として S-probit が存在する。S-probit は rec+ と rec- の両増殖阻害曲線によって囲まれる部分の面積を求め、その大きさによって DNA 損傷性の強さを評価する指標である。実際には両増殖阻害曲線間の面積を求めることは困難であるため前述した Probit 変換を行い、求めた線形回帰式で囲まれた面積を利用する。すなわち、rec+、rec- の増殖阻害曲線から求められた回帰式をそれぞれ

$$\text{rec+} \quad Y = a_1 + b_1 \log X$$

$$\text{rec-} \quad Y = a_2 + b_2 \log X$$

とすると、S-probit は

$$S\text{-probit} = \int_{P_2}^{P_1} \left\{ \left(\frac{a_2}{b_2} - \frac{a_1}{b_1} \right) + \left(\frac{1}{b_1} - \frac{1}{b_2} \right) Y \right\} dY \quad (4)$$

として求められる。(図-2 に Probit 変換の概念図を示す。)

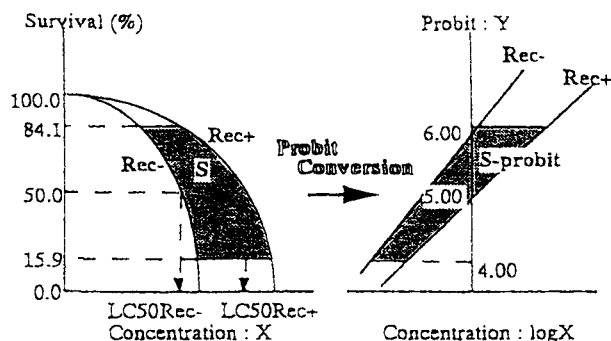


図-2 Rec-assay で得られる DNA 損傷性物質の増殖阻害曲線(左)と Probit 変換による回帰直線(右) : 右図の網掛けの部分が S-probit に相当。

式(4)における P_1 、 P_2 はそれぞれ 15.9%、84.1%の生存率に対応する Probit 値であり、 $P_1 = 4$ 、 $P_2 = 6$ となる。 P_1 から P_2 の区間で積分を行うのは、この区間が正規分布における $\mu \pm \sigma$ の範囲に相当し、この範囲で計算することにより両端(生存率 15.9%以下および 84.1%以上)にある不確実な情報を除くことが可能となる。なお、S-probit から DNA 損傷性を判定する際は、過去に実験で求められた陽性対照物質 7 種、陰性対照物質 2 種の S-probit から決定された判定基準域によるものとする²⁾(表-1 参照)。

表—1 DNA損傷性の判定基準域

S-probit	判定
0.59以上	強陽性 (++)
0.20~0.58	陽性 (+)
-0.12~0.19	陰性 (-)
-0.13以下	逆転 (r)

4. 実験方法⁶⁾⁷⁾

4.1 実験に用いた器具および試薬

図-3 および図-4 にそれぞれ L 字管およびマイクロプレートの形状を示す。

実験において用いた試験管、メスピペットはあらかじめ乾式滅菌(171℃、1.5 時間)を行い、ピペットチップや L 字管、および検定物質以外の実験で用いた試薬はオートクレーブにより湿式滅菌(120℃、20 分)を行った。なお、マイクロプレートは出荷時にすでに滅菌処理されているので滅菌操作は不要であった。

Rec-assay の対象試料とした物質は、陰性対照物質 2 種、陽性対照物質 6 種の計 8 種である。その内訳は、陰性対照物質が Kanamycin(KM)と Dimethylsulfoxide(DMSO)、陽性対照物質が N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)、4-nitroquinoline-1-oxide(4NQO)、N-methyl-N-nitrosourea(MNU)、2-methyl-5-nitroimidazole-1-ethanol (Metronidazole)、Benzo(a)pyrene (B(a)P)、*cis*-diamminedichloro-platinum(II) (cisplatin)である。B(a)P を除く物質については S9-mix を添加しない直接試験を行い、B(a)P についてはこの物質が間接変異原性を有することから S9-mix を添加する間接(代謝活性化)試験を行った。なお、DMSO を除く物質は水に難溶であるため 100%DMSO に溶解させたものを stock solution とし、試験に際しては stock solution を滅菌蒸留水で希釈したものを working solution として用いた。溶媒である DMSO の枯草菌に及ぼす影響を極力抑えるために working solution 中の DMSO 濃度は 5%(v/v)を超えないように調整した。

4.2 菌液および検定物質の準備

(1)枯草菌の準備

Schaeffer 寒天培地上に保存している孢子状の菌を栄養細胞の状態にするために次の操作を行った。遠沈管に Nutrient Broth(以下、N.B.とする) 5 mL を入れ、Schaeffer 寒天培地から白金耳で菌をかきとり、それを植種した。これをよく攪拌した後、37℃、71rpm で一晩(約 10-12 時間)振とう培養した(これを overnight culture と呼ぶ)。さらにこれに DMSO を 500 μ L 加え、エッペンドルフチューブに 500 μ L ずつ分注し、-80℃で stock culture として保存した。

(2)前培養

Stock culture を室温で自然解凍し、よく混合した後、その 500 μ L を新たに遠沈管中の N.B. 5 mL に植種した。植種後はよく振り混ぜた後、恒温槽に入れ 37℃、71rpm で振とう培養を行った。この操作を前培養(cultivation)という。なお、植種前に N.B. のみを 200 μ L、マイクロプレートの well に注入し、マイクロプレートリーダー(BIORAD, Model 550)を用いてこの吸光度(595nm)を測定して blank とした。振とう培養中の遠沈管内の枯草菌の増殖量の測定は、遠沈管中懸濁液 200 μ L をこのマイクロプレートの well に注入して吸光度を測定することにより実施し、blank からの吸光度増加分が 0.1-0.2OD₅₉₅(菌数が約 $1-2 \times 10^8$ cells/mL)に達した(対数増殖期が終了した)時点で遠沈管の前培養を終了した。この前培養に要する時間はおおよそ 2-3 時間であった。なお、過去の実験において blank から吸光度が 0.1-0.2 増加した時点で対数増殖期が終了することを確認している。

(3)菌の希釈

前培養した菌を、rec+および rec-の上記マイクロプレートにおける blank からの吸光度増加分がそれぞれ 0.001OD₅₉₅ および 0.002OD₅₉₅ になるように N.B.を用いて希釈した。

4.3 L字管を用いた rec-assay

(1)検定試料の作成および interaction

L字管法およびマイクロプレート法の試験操作のフローチャートを図-5 に示す。

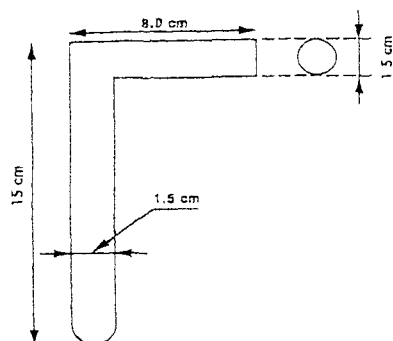


図-3 L字管 (Manod Tube)

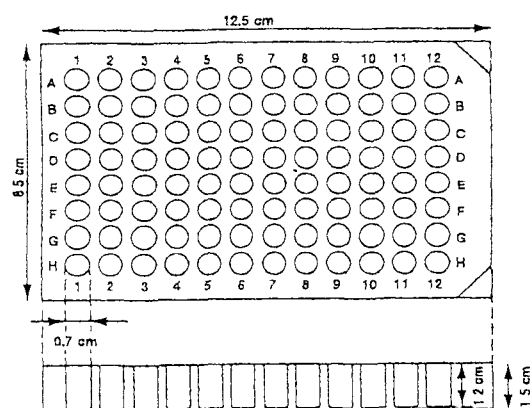


図-4 96 穴式マイクロプレート

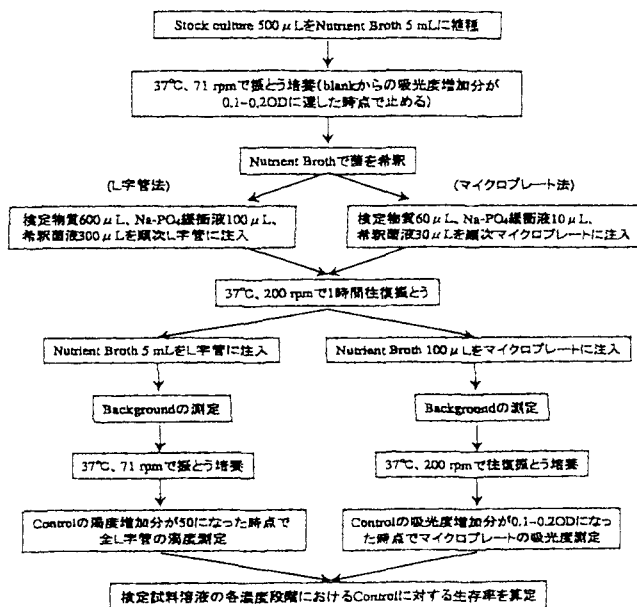


図-5 L字管法およびマイクロプレート法の試験操作手順

検定物質は、6-7 段階の異なる濃度のものを用意した。なお、この希釈には滅菌蒸留水を用いた。次に検定物質溶液 0.6 mL、100 mM の Na-PO₄ 緩衝液 (代謝活性化が必要なときは代わりに S9-mix) 0.1 mL、希釈した菌液 0.3 mL を、この順にメスピペットまたはピペッターで L 字管に注入した。なお、本研究では、基本的に 1 段階の濃度につき L 字管を 2 本ずつ用いて実験を行った。また、control (照査基準) として検定物質溶液の代わりに滅菌蒸留水を用いたものも用意した。

次に、L 字管の中の試料をよく混ぜ、恒温槽で 37°C、71rpm の条件で 1 時間振とう培養を行った。この操作は interaction と呼ばれるもので、菌と検定物質との反応を目的とするものである。

(2) 本培養

Interaction が終わった後、各 L 字管に N.B. を 5 mL 注入し、再び恒温槽で 37°C、71rpm の条件で振とう培養を行った。また、本培養の前に各 L 字管の濁度を濁度計 (KLETT-SUMMERSON, Photo electric colorimeter 800-3) で計測しておき、そこからの濁度増加分が 50 を超えた (対数増殖期の終了した) 時点で本培養を終了した。本培養の終了までに要する時間は rec+ では約 5 時間、rec- では約 7 時間であった。なお、過去の実験において blank から濁度が 50 増加した時点で対数増殖期が終了することを確認している。

4.4 マイクロプレートを用いた rec-assay

(1) 検定試料の作成および interaction

マイクロプレート上で検定物質溶液の希釈を行い、各 well に検定物質溶液を 60 μL ずつ分注した。なお、本研究では各濃度につき 3 つの well に分注した。マイクロプレートの最下段は control として検定物質溶液の代わりに蒸留滅菌水を 60 μL 注入した。次に 100 mM の Na-PO₄ 緩衝液 (代謝活性化が必要なときは代わりに S9-mix) 10 μL、および希釈した菌液 30 μL をこの順にピペッターでマイクロプレートの各 well に注入した。

そして、37℃の恒温槽中に設置した往復振とう機を用いて、200rpm の条件で1 時間振とう培養を行った。

(2)本培養

Interaction が終わった後、マイクロプレート各 well に NB (2 倍濃度)を 100 μ L 注入し、再び恒温槽の中で 37℃、200rpm の条件で振とう培養を行った。また、本培養の前にマイクロプレート各 well の吸光度をマイクロプレートリーダーで計測しておき、そこからの吸光度増加分が 0.1-0.2OD₅₉₅ になった時点(枯草菌の対数増殖期の終了直前)で本培養を終了した。本培養の終了までに要する時間は rec+では約 6 時間、rec-では約 8 時間であった。

4.5 試験結果の評価方法

本培養が終了した時点においてL字管法では濁度を、マイクロプレート法では吸光度をそれぞれ測定し各濃度段階において平均値を求め、その平均値を control の平均値で除したパーセンテージを生存率(survival rate)として算出した。そして横軸に試料濃度、縦軸にこの生存率をとって増殖阻害曲線を描き、S-probit および LC50 を求めた。

5 実験結果および考察

8 種の陰性および陽性対照物質の rec-assay の試験結果を表-2 に、また各物質に対する rec+および rec-の LC50 を両方法で比較した結果を図-6 に示す。S-probit から検定物質の DNA 損傷性を両方法で比較すると、陽性対照物質 6 種については全て強陽性と判定され、両方法で判定が相違することはなかった。一方、陰性対照物質については、KM は両方法で陰性と判定されたが、DMSO はL字管法では陰性と判定されたのに対しマイクロプレート法では逆転と判定された。表-2 より LC50 についてみると、マイクロプレート法ではL字管法と比べて同じか、やや低い値を示した。これは、本培養における培養液組成の違い(検定試料の希釈度合の違い)に起因するものと考えられる。しかし、図-6 より LC50 の対数値について両方法に直線的な相関が認められ、rec+および rec-ともに以下の同一直線上に回帰できると考えられた。

$$\text{Log LC50(マイクロプレート)} = 1.11 \text{ Log LC50(L字管)} - 0.40 \quad (R^2 = 0.973, N = 16) \quad (5)$$

LC50 は直接 DNA 損傷性の程度を示すものではないが、DNA 損傷能を記述する S-probit のパラメータであり、S-probit についても両方法に相関が認められることになる。また、両方法の S-probit を比較すると全体的にマイクロプレート法の S-probit が大きくなっていることから感度が上昇しているものと考えられた。相関性のみられた理由としては、マイクロプレート法による interaction の段階での菌と検定物質溶液の組成をL字管のそれと同様(検定物質溶液・緩衝液・菌液 = 6:1:3)に設定していることが挙げられる。またマイクロプレートは形状がL字管とは異なり、菌の培養時に水平方向の振とうしかできないために、枯草菌への空気供給や菌液の攪拌などL字管に比べ培養条件が不利であり、これが枯草菌の対数増殖の終了までに必要な時間がマイクロプレート法の方が約 1 時間長い理由と思われる。このことから試験感度が悪くなることが考えられたが、本研究の実験結果よりそのような点については問題がないと考えられた。

表-2 L字管法およびマイクロプレート法による LC50 と S-probit の比較

化学物質名	L字管法		S-probit	マイクロプレート法		S-probit
	LC50 (mg/L)			LC50 (mg/L)		
	rec+	rec-		rec+	rec-	
陰性対照物質						
DMSO	1.02 × 10 ⁵	9.02 × 10 ⁴	0.10(-)	5.55 × 10 ⁴	1.04 × 10 ⁵	-0.54(r)
Kanamycin	0.47	0.465	0.04(-)	0.17	0.18	-0.05(-)
陽性対照物質						
MNNG	17.7	0.905	2.58(++)	6.61	0.24	2.87 (++)
4NQO	5.50 × 10 ⁻²	2.86 × 10 ⁻³	2.57(++)	2.55 × 10 ⁻²	1.90 × 10 ⁻³	2.25 (++)
MNU	0.328	5.22 × 10 ⁻²	1.60(++)	0.159	1.16 × 10 ⁻²	2.27(++)
Metronidazole	74.3	6.62	2.10(++)	33.0	2.16	2.37(++)
B(a)P	1.80	0.74	0.77(++)	1.75	0.53	1.04(++)
Cisplatin	11.5	1.13	2.02(++)	1.25	0.37	2.47(++)

L字管とマイクロプレートでは材質が異なる。すなわちL字管はガラス製であるのに対し、マイクロプレートはプラスチック(ポリスチレン)製(市販の汎用されているマイクロプレートの大部分がプラスチック製)である。マイクロプレート法では有機物質のマイクロプレート内壁への吸着などによる rec-assay 試験への影響も考えられたが、B(a)P、MNNG、4NQO など疎水性有機物質に関しても特に試験感度が悪くなるなどの影響はみられなかった。また試験物質が DMSO などの有機溶媒でそれを高濃度で取り扱う場合、マイクロプレートの材質が溶出ししている可能性があるが、それは本実験では確認できていない。

実験時間の短縮という点については、前培養から interaction までの段階は両方法とも共通の時間を要する。一方、本培養に要する時間はL字管法で約 5-7 時間、マイクロプレート法で約 6-8 時間であり、マイクロプレート法の方が長い時間を要する。しかし、L字管法は試験操作自体に非常に手間がかかるため 1 人の人間が試験を行えるのは一度に 1 ないし 2 物質であるのに対し、マイクロプレート法では一度に最大 10 物質程度の試験を行うことができる。そのため試験物質数が多い場合、1 試料あたりの試験に要する時間はマイクロプレート法の方が短くて済む。また、必要とする試料量はマイクロプレート 1well あたり、L字管 1 本の 1/10 で済む。この必要試料量の削減は特に環境水サンプルの rec-assay の実施に際して大きな利点となる。つまり、環境水の濃縮に要する水量および作業時間を大幅に減らすことができることになる。これらのことからマイクロプレート法を用いた方法でも感度のよい、L字管法と高い相関性を持つ試験結果が得られ、マイクロプレート法の有効性を実証できた。

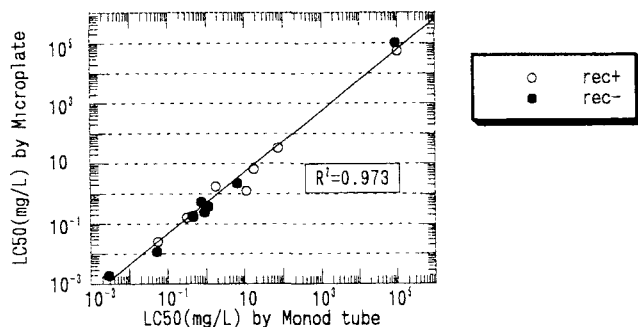


図-6 試験物質に対するLC50からみたL字管法とマイクロプレート法との比較

6. 結論

本研究では rec-assay のL字管法とマイクロプレート法とを比較するため、陰性および陽性対照物質 8 種に対して両方法で rec-assay を行った。その結果、DMSO を除いては両方法で DNA 損傷性の判定が変化するものではなく、マイクロプレート法では試験感度も上昇した。各物質に対する rec+および rec-の LC50 の対数値について、両方法間に直線的な相関が認められた。このことよりマイクロプレート法はL字管法と高い相関性を持つといえた。またマイクロプレート法では試験時間は約 1 時間長くなるが、試験物質が多い場合は 1 物質あたりの試験時間は短縮され、必要な試料量も約 1/10 で済むようになった。これらのことからマイクロプレート法の有効性を実証できた。

参考文献

- 1) Kada, T., Tsuchikawa, T. and Sadaie, Y.: In vitro and host-mediated "rec-assay" procedures for screening chemical mutagens ; and philoxine, a mutagenic red dye detected, *Mut. Res.*, 16, 165, 1972
- 2) Matsui, S.: Evaluation of *Bacillus subtilis* rec-assay for the detection of mutagens which may occur in water environments, *Water Res.*, 14, 1613-1619, 1980.
- 3) 松井三郎, 竺文彦, 中村正久ら: Rec-assay による水質評価, *用水と廃水*, 35(4), 320-325, 1993
- 4) Thellen, C., Blaise, C., Roy, Y. and Hickey, C. : Round Robin testing with the *Selenastrum capricornutum* microplate toxicity assay, *Hydrobiologia*, 188/189, 259-268, 1989
- 5) Sauvant, M.P., Pepin, D., Bohatier, J. and Groliere, C.A. : Microplate Technique for Screening and Assessing Cytotoxicity of Xenobiotics with *Tetrahymena pyriformis*, *Ecotoxicology and Environmental safety*, 32, 159-165, 1995
- 6) Matsui, S., Takigami, H., Matsuda, T. and Shimizu, Y. DNA Toxicity assessment of polluted and clean waters, *Proceedings of the Workshop Monitoring Tailor-made II*, September, Nunspeet, the Netherlands, 185-191, 1996.
- 7) 滝上英孝: 京都大学大学院工学研究科環境地球工学専攻修士論文, 1995