

CDA-1000 Ames 試験への対応_1

1. はじめに

細菌復帰突然変異試験(Ames 試験)は、試験菌株(サルモネラ菌, 大腸菌)の突然変異に伴う機能復帰で回復した増殖能を検出することにより、被験物質によって引き起こされる点変異の有無を捉える試験である。

試験に用いる菌株はアミノ酸要求性であるが、被験物質によってもたらされる点変異によりアミノ酸合成能を回復するとアミノ酸非存在下で増殖できるようになる現象を利用するもので、一般的には、被験物質を含んだ溶液中で一定時間暴露させた後、軟寒天に混合してから平板培地に重層し、恒温槽(37℃)で48時間培養後に観察されるコロニーを計数するため、とても手間の掛かる試験作業となっている。

そこで、より簡便に変異を捕らえるためにCDA-1000を用いた試験方法を検討したので紹介する。CDAは検出器を変更することで様々な大きさの粒子を測定可能なので、今回は細菌サイズが計数できる検出器に変更し、Ames試験に用いられる菌株の測定を試みた。

2. 菌株と被験物質(陽性対照)

菌株	被験物質
TA98 (ネズミチフス菌)	AF-2 (フリルフラミド)
TA100 (ネズミチフス菌)	AF-2 (フリルフラミド)
TA1535 (ネズミチフス菌)	NaN3 (アジ化ナトリウム)
TA1537 (ネズミチフス菌)	9AA (9-アミノアクリジン)
<i>E.coli</i> WP2uvrA (大腸菌)	AF-2 (フリルフラミド)

3. 装置条件

装置 : CDA-1000
 検出器 : 25 μm
 X軸 : 粒子径
 モード : 標準モード

4. 検討方法

CDA-1000で測定するための検討手順は次の通り。

1. 試験管に被験物質を入れる
2. 0.1M ナトリウム-リン酸緩衝液を添加する
3. 菌液を加えてよく攪拌する

4. 最少グルコース液体培地を加えてよく混合する
5. 37℃で振とう培養する(24時間)
6. 培養後、生理食塩水を用いて試料を適切な濃度に希釈しCDA-1000で測定する

被験物質溶解液量、菌液量などの容量は平板法と同等とした。

参考に、プレインキュベーション法の場合の手順を示す。

1. 試験管に被験物質を入れる
2. 0.1M ナトリウム-リン酸緩衝液を添加する
3. 菌液を加えてよく攪拌する
4. 37℃ 20分間 プレインキュベーションを行う
5. 軟寒天を加えてよく混合する
6. 最少グルコース寒天平板培地の上に注ぎ広げる
7. 37℃で培養する(48時間)
8. コロニー数を数える

4. 測定条件

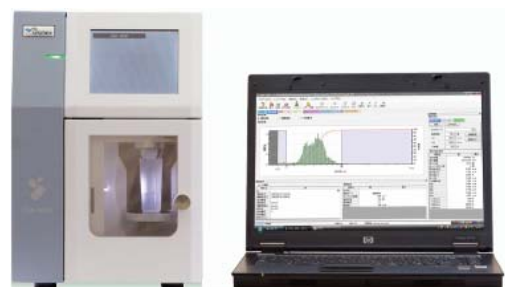
希釈液 : 生理食塩水
 分析量 : 25 μL
 希釈倍率 : 総カウント数が数千程度となるように希釈倍率を設定 1000倍程度

5. 総括

菌株と被験物質の組み合わせ各々において、溶媒対照と被験物質に暴露した試料をCDAで測定することができた。

今後、CDAを用いた場合の被験物質濃度や開始時の菌濃度について至適条件を見出したい。

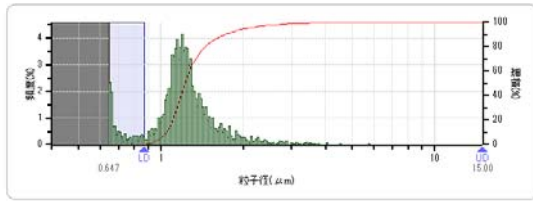
また、代謝活性化系存在下(S9mix(+))での検討も実施し、Ames試験の簡便・迅速化を提案したいと考える。



6. 測定結果

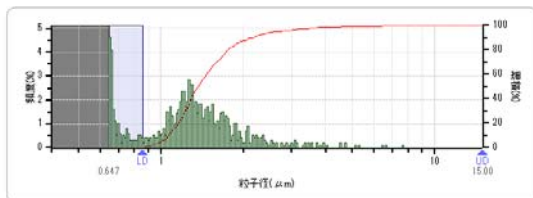
1) TA98

・開始時



濃度 5.27×10^7 (/mL)

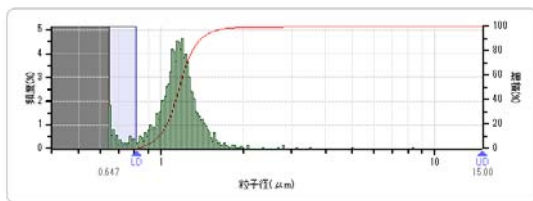
・薬剤 : AF2 (0.05 μ g/plate)



濃度 1.58×10^8 (/mL)

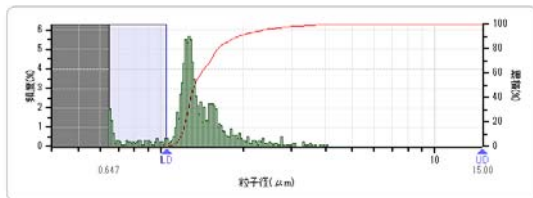
2) TA100

・開始時



濃度 3.88×10^7 (/mL)

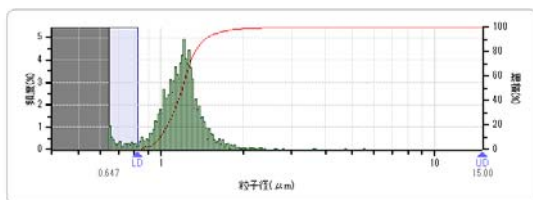
・薬剤 : AF2 (0.05 μ g/plate)



濃度 2.12×10^8 (/mL)

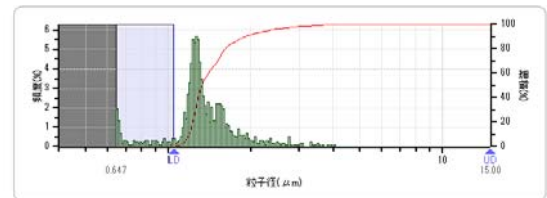
3) TA1535

・開始時



濃度 4.96×10^7 (/mL)

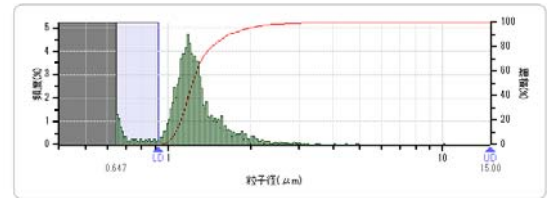
・薬剤 : NaN₃ (0.25 μ g/plate)



濃度 3.63×10^8 (/mL)

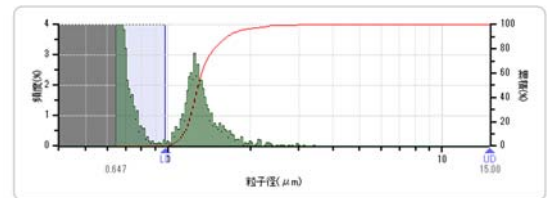
4) TA1537

・開始時



濃度 5.27×10^7 (/mL)

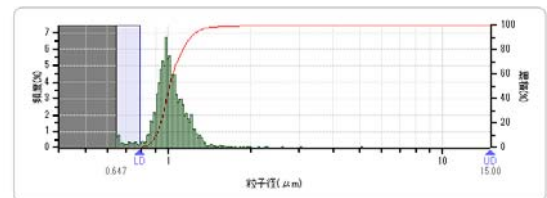
・薬剤 : 9AA (20 μ g/plate)



濃度 2.35×10^8 (/mL)

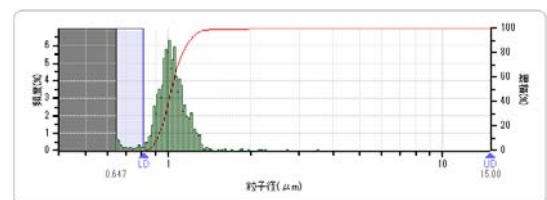
5) *E.coli* WP2uvrA

・開始時



濃度 6.30×10^7 (/mL)

・薬剤 : AF2 (0.005 μ g/plate)



濃度 4.01×10^8 (/mL)

いずれの菌株も粒度分布の山を的確に捉えており計数に問題はなく、被験物質への暴露によって増殖して菌濃度は高くなったことがわかる。

発行 : シスメックス株式会社 R&I 事業本部 バイオリサーチ課

〒651-2271 神戸市西区室谷1丁目3番地の2

Tel. (078) 991-2091 Fax (078) 997-9976

URL : <http://www.sysmex-labscience.jp/>

Published by : SYSEMEX CORPORATION SCIENTIFIC INSTRUMENTATION BUSINESS DIV.

Copyright © 2015 by SYSEMEX CORPORATION

No part of this publication may be reproduced without the prior the written permission of the publisher.

Printed in Japan.

本誌の内容を無断で複写・複製・転写すると、著作権・出版権の侵害となることがありますのでご注意ください。