

<論文>

発光 *umu* センサを用いた迅速・簡便な遺伝子毒性試験 The easy and rapid genotoxicity test (luminescence *umu*-test) using bio-sensor

○河上聖人¹、庄司良¹、田中良春²、田口和之²、平井正名³、今枝孝夫³、山田正人⁴、毛利紫乃⁵

1. 国立東京工業高等専門学校物質工学科 東京都八王子市桐田町 1220-2
2. 富士電機アドバンステクノロジー (株) 機器技術研究所計測技術グループ 東京都日野市富士町 1 番地
3. (株)豊田中央研究所バイオ研究室 愛知県長久手町大字長湫字横道 41-1
4. (独) 国立環境研究所循環型社会形成推進・廃棄物研究センター 茨城県つくば市小野川 16-2
5. 岡山大学大学院自然科学研究科 岡山市津島中 3-1-1

○Masato Kawakami¹, Ryo Shoji¹, Yoshiharu Tanaka², Kazuyuki Taguchi²,
Masana Hirai³, Takao Imaeda³, Masato Yamada⁴, Shino Mohri⁵

1. Dept. Chemical Science and Technology, Tokyo National College of Technology
Kunugidamachi1220-2, Hachioji city, Tokyo 193-0997, Japan
2. Fuji Electric Advanced Technology Co., Ltd., 1 Fuji-chou, Hino city, Tokyo 191-8502, Japan
3. Toyoda Central R&D Labs., Inc., Nagakute, Aichi 480-1192, Japan
4. Research Center for Material Cycles and Waste Management, National Institute
for Environmental Studies, Onogawa 16-2, Tsukuba, Ibaraki, 305-8506 Japan
5. Okayama University, Tsushimachu 3-1-1, Okayama, 700-8530, Japan

Abstract

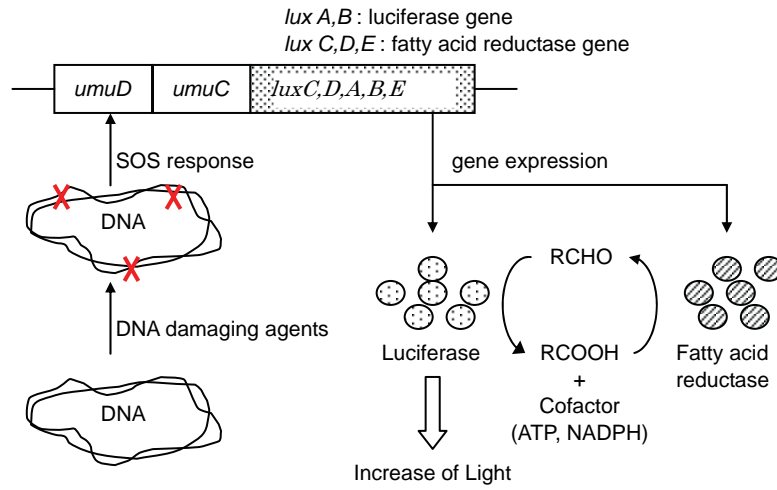
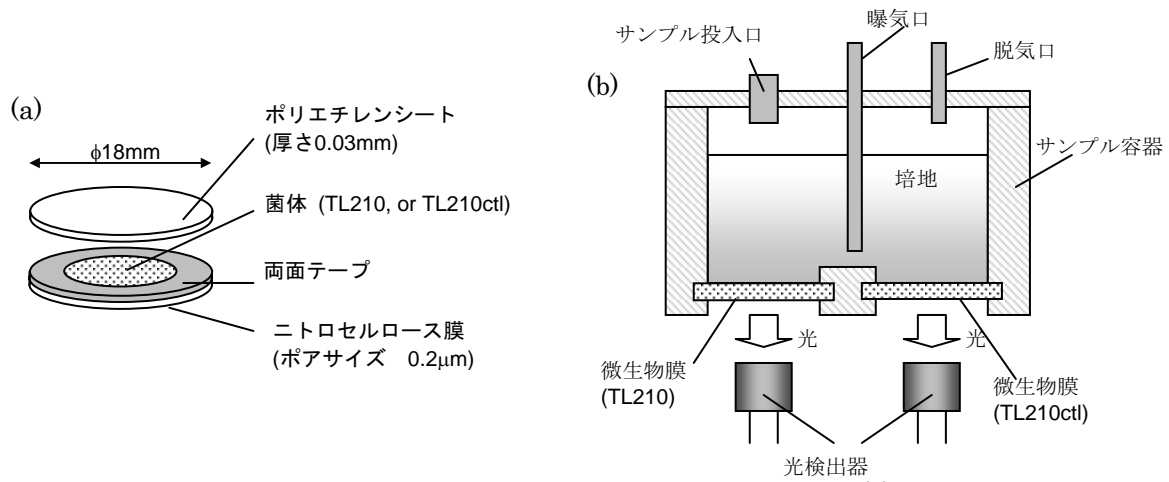
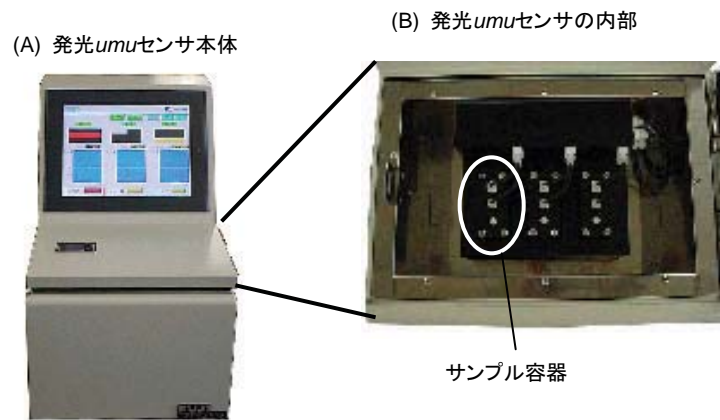
The *umu*-lux test is a genotoxicity test using the two genetically modified *Salmonella typhimurium* TA1535 strains (TL210 and TL210ctl) transformed with the *luxC,D,A,B,E* (luciferase gene and fatty acid reductase genes) of *Vibrio fischeri* as a reporter gene. The TL210 strain detect genotoxicants and the TL210ctl strain detect cytotoxicants. In order to develop a highly sensitive, simple, and rapid genotoxicity detection system, the biosensor using these immobilized strains was developed. We compared sensitivity for genotoxicants between the biosensor and *umu*-test. We performed genotoxicity test by using the biosensor toward some genotoxicants. Sensitivity of the biosensor was better than *umu*-test. *Umu* test could not detect genotoxicity of dye or colored water samples, because the *umu* test detect genotoxicity by measuring absorption photometry. However the biosensor using luminescence *umu* strain could detect genotoxicity of dye and colored sample. The biosensor was available to assess genotoxicity of various dye and colored samples.

Keywords : genotoxicity test, monitoring, bio-sensor, luminous strain, colored sample.

1. Introductions

現在、数千万とも言われる化学物質が工業や商業などの活発な人間活動によって生産、使用されており、その化学物質の中には人間などの生体に悪影響を及ぼすものがある。そのため、迅速かつ簡便な毒性物質の測定法が必要となっている^{1),2),3)}。化学物質の遺伝子毒性を計る手法の一つとして *umu* 試験(以下、発色 *umu* 試験と記す)がある。発色 *umu* 試験はβ-ガラクトシダーゼ活性を測定する事によって、SOS 応答を検知し、化学物質などによる遺伝子の損傷を調べる事が可能であるが、再現性が悪く、吸光度を測定するために、染料や着色試料などの測定では誤差が大きく出ることが知られている^{4),5),6)}。また発色 *umu* 試験は、菌体の培養などによって時間を要し操作も煩雑であるため、現在ある環境中の多くの化学物質による生体や人体への遺伝子毒性を評価するのは困難である⁷⁾。

近年、遺伝子組換え技術により造られた、サルモネラ菌である *Salmonella typhimurium* TA1535 菌株の組換え体 TL210 株は遺伝子毒性による SOS 応答に伴って発光する^{8),9)}。TL210 株を用いた発光 *umu* 試験 (*umu*-lux test)は発色 *umu* 試験よりも感度が高いことが知られており、発色反応を行う必要が無いので操作も発色 *umu* 試験より簡便である。また、発色 *umu* 試験と異なり発光を観察するため、着色試料における遺伝子毒性の検知も可能であると考えられる。さらに、発光により遺伝子毒性を評価するため、光検出器によりリアルタイムに遺伝子毒性影響を評価でき、より迅速な遺伝子毒性試験を確立することが可能となっている。我々は遺伝子毒性応答性発光菌 TL210 株を用いて開発された簡便・迅速な遺伝子毒性試験を行うためのバイオセンサ(発光 *umu* センサ)¹⁰⁾の試作機を用いて遺伝子毒性試験を行い、従来用いられている発色 *umu* 試験と感度において比較を行い、発光 *umu* センサの遺伝子毒性試験としての妥当性を確かめた。また、発色 *umu* 試験で

Fig. 1 組換え遺伝子 *luxC, D, A, B, E* の遺伝子発現機構⁹⁾Fig. 2 発光 *umu* センサに用いられる微生物膜の構造(a)
発光 *umu* センサのサンプル容器と光検出構造(b)Fig. 3 発光 *umu* センサ本体(A)、およびその内部(B)

は測定が困難であった着色試料に関して、発光 *umu* センサで遺伝子毒性試験を行い、その結果を、着色の影響を受けない Ames 試験と比較し、着色試料の遺伝子毒性が測定可能であるか確かめた。

2. Materials and Method

2.1 遺伝子毒性応答性発光菌株^{8), 9)}

発光 *umu* センサでは、遺伝子組換えサルモネラ菌である TL210 株および TL210ctl 株を使用する。TL210 株は、レポーター遺伝子として海洋性発光細菌 (*Vibrio fischeri*) 由来の発光遺伝子群 (*luxC,D,A,B,E*) を、SOS 遺伝子の一部である *umuDC* 遺伝子の下流に連結した組換え遺伝子を、サルモネラ菌 TA1535 株に導入した菌株であり遺伝子に損傷を与える物質に反応して発光する (Fig. 1)。

TL210ctl 株は、発光遺伝子群 (*luxC,D,A,B,E*) をプラスミドベクター pBR322 のテトラサイクリン ORF に挿入した組換え遺伝子をサルモネラ菌 TA1535 株に導入した菌株であり、常にルシフェラーゼを発現し発光する。そのため、TL210ctl 株は、TL210 株による遺伝子毒性の測定中、化学物質の影響によって菌体が死滅する場合 (キリング) や、共存物質による発光阻害を観察するために用いた。

2.2 発光 *umu* センサによる遺伝子毒性の測定

発光 *umu* センサには、TL210 株または TL210ctl 株をそれぞれ膜状に固定化した 2 種類の微生物膜を用いた。微生物膜は、菌体が漏出せず菌体へ栄養分と酸素の供給が可能な微孔性膜と菌体からの発光が透過できる光透過性膜とで挟む構造とした。微孔性膜として 0.2 μ m のニトロセルロース膜を使用し、光透過性膜として厚さ 0.03mm の透明ポリエチレンシートを使用した (Fig.2-a)。作製した微生物膜は使用するまで -20°C で保存した。微生物膜は Fig.2-b に示すように、サンプル容器に TL210 株および TL210ctl 株の 2 種類の微生物膜の両方を取付け、1 つの容器となる構造とし、それぞれの微生物膜に同時に同じ試料が接触できる構造である。微生物膜の発光は光検出器により検出する。

発光 *umu* センサは恒温槽、エアポンプ、光検出器から構成され、サンプル容器に取付けた 2 種類の微生物膜の発光強度を光検出器でリアルタイムに測定し電圧値として記録する (Fig.3)。

発光 *umu* センサによる試料の遺伝子毒性の測定は、解凍した微生物膜を取付けたサンプル容器に、5mL の 2 倍 TGA 培地 (バクトトリプトン 20g/L, NaCl 5 g/L, グルコース 4g/L) を注入し、発光 *umu* センサの恒温槽で 37°C、1 時間曝気を行って微生物膜を活性化した後、測定試料をサンプル容器に 100 μ L 添加し 30°C で 3 時間曝気しながら発光強度を測定した。

遺伝子毒性指標として、遺伝子損傷性物質の存在により発光する TL210 株の微生物膜の発光強度の時間に対する積分値を用いた。また、キリングによる微生物の発光阻害を観察するために TL210ctl 株の微生物膜の発光強度を確認した。

2.3 測定試料

発光 *umu* センサでの遺伝子毒性試験の代表的な遺伝子毒性物質として 2-aminoanthracene(+S9 mix 0.8ml)、4 NQO (4-nitroquinoline-N-oxide)、AF-2 (2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)-acrylamide)、*p*-phenyldiamine、ethyldium bromide、nitropyrene、biphenyl、benzo-[a]-pyrene をそれぞれ DMSO (dimethylsulfoxide) で希釈したものを使用した。

着色試料としてアゾ染料である Basic red、Acid Blue9、Toluidin blue、Acid yellow、Congor Red、Naphthal blue black、Acid red88、Basic blue17、Direct Red 27、Acid Black 1、Basic Violet 10 を用いた。アゾ染料のいくつかは変異原性があることが知られている。

2.4 遺伝子毒性

発光 *umu* センサによる遺伝子毒性結果と比較するため、遺伝子毒性試験方法である発色 *umu* 試験、Ames 試験を行った。

(1) *umu* 試験(発色 *umu* 試験)^{4),5),6)}

umu 試験は、SOS 応答遺伝子群のひとつである *umuDC* 遺伝子の下流にレポーター遺伝子として β -ガラクトシダーゼ遺伝子が存在するため、SOS 遺伝子発現によって β -ガラクトシダーゼを発現し、基質の添加によって発色し、 β -ガラクトシダーゼを定量する事によって試料の遺伝子毒性を検出する試験法である。

(2) Ames 試験^{11),12)}

Ames 試験はヒスチジン要求性菌株 TA98、TA100 が遺伝子毒性物質を暴露したときヒスチジン非要求性復帰変異株になるときのコロニーの個数をカウントして、試料の遺伝子毒性を検出する試験法である。復帰コロニー数が陰性対照の 2 倍以上なら遺伝子毒性陽性、1.5~2 倍なら遺伝子毒性擬陽性、1 倍程度なら遺伝子毒性陰

性であるとした。

3. Results and discussions

3.1 発光 *umu* センサにおける遺伝子毒性試験

遺伝子毒性の陽性対照物質である 4NQO および溶媒である DMSO を用い、発光 *umu* センサでの応答性の確認を行った。4NQO を終濃度 0.6mg/L、DMSO を終濃度 5%(wt/wt) でそれぞれ発光 *umu* センサの TL210 株および TL210ctl 株に曝露した。DMSO によって希釈した 4NQO-0.6mg/L、及び DMSO-5%(wt/wt) における発光 *umu* センサの応答の時間変化を Fig. 4 に示す。Fig. 4 では、横軸が時間、縦軸がその時間における光検出器の光感知による電圧値を示している。TL210 株での発光は SOS 遺伝子の誘導におけるルシフェラーゼの発現を示しており、遺伝子毒性の陽性対照である 4NQO では、測定時間 90min 程度から急激な上昇が観察され、遺伝子毒性が確認された。また、4NQO 以外の遺伝子毒性物質についても同様の傾向が見られた。

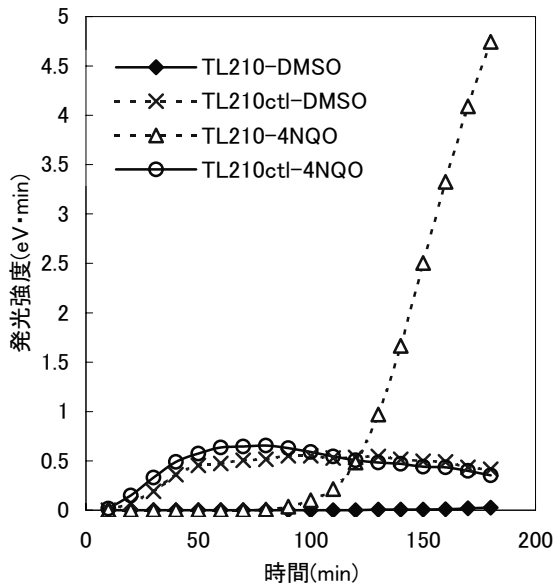


Fig. 4 発光 *umu* センサにおける 0.6mg/L 4NQO と、DMSO 曝露時 TL210, TL210ctl 株の発光強度の時間変化

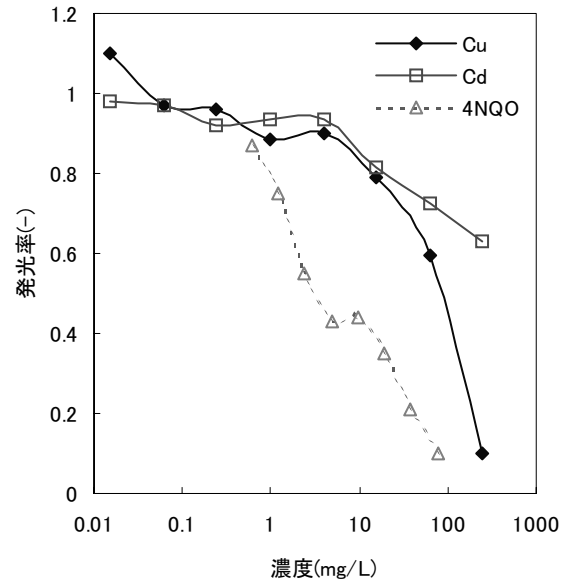


Fig. 5 発光 *umu* センサにおける各化学物質曝露 1 時間後の TL210ctl 株の発光強度の用量作用曲線 (純水曝露時の発光率を 1.0 とする。)

しかし、TL210 株における DMSO の発光強度はほとんど上昇せず、遺伝子毒性が弱いことが確認された。また、TL210ctl 株は常に発光する菌体であり、キリングや発光阻害などを観察することが出来る。Fig. 4 において、4NQO 及び DMSO をサンプルとした場合の TL210ctl 株の発光強度は、測定時の菌体の増殖に伴い、30min 程度から上昇を始め、発光強度計電圧 0.5eV 程度で安定した。4NQO、及び DMSO を曝露試料とした場合、TL210ctl 株は発光していることから、キリングや発光阻害は起こっていないと考えられる。遺伝子毒性指標は、すべての試験時間に対して総括的に観察できるように、TL210 株の発光強度の時間に対する積分値を用いることにした。

次に、キリングを検出する TL210ctl 株についての有効性を検討した。Fig. 5 に発光 *umu* センサにおける各化学物質曝露 1 時間後の TL210ctl 株の発光強度の用量作用曲線を示す。Fig. 5 の横軸は各種化学物質の濃度、縦軸は陰性対照である純水を曝露したときの TL210ctl 株の発光強度を 1、発光が見られない場合を 0 として発光強度比をとったものである。TL210ctl 株の発光強度比は化学物質の毒性が低い場合には 1 付近であるが、化学物質の濃度が高まり、毒性が強くなるにつれ発光が減少する。Cu や Cd を用いた場合においても、発光 *umu* センサでは TL210ctl の発光強度も同時に測定するため、キリングによる遺伝子毒性試験の阻害の有無を検出できる。化学物質曝露時の TL210ctl 株の発光強度比が 0.5 以上、2.0 以下ならば遺伝子毒性試験にキリングの影響はないと判断し、発光 *umu* センサによる遺伝子毒性試験を行った。

3.2 発光 *umu* センサと発色 *umu* 試験における感度の比較

発光 *umu* センサと発色 *umu* 試験における遺伝子毒性検出感度の比較を行った。Fig. 6 に 4NQO における発

光 *umu* センサ(TL210 株)と発色 *umu* 試験での用量作用曲線を示した。

横軸に4NQO濃度、縦軸に各濃度における発色 *umu* 試験、発光 *umu* センサの遺伝子毒性強度を示している。また、グラフ中の破線が発色 *umu* 試験での陰性対照における標準偏差、点線が発光 *umu* センサでの陰性対照における遺伝子毒性強度の標準偏差を示しており、それぞれの遺伝子毒性強度が陰性対照の標準偏差を越えていない場合、遺伝子毒性は無しとした。Fig. 6では、4NQOの濃度の上昇に伴って、発光 *umu* センサ、発色 *umu* 試験の遺伝子毒性強度が上昇しているが、発光 *umu* センサでは陰性対照の遺伝子毒性強度の標準偏差(0.2eV・min)が発色 *umu* 試験の陰性対象の標準偏差(256unit/min)に比べ小さいため、発色 *umu* 試験よりも遺伝子毒性の検知が低濃度で確認できることがわかった。そこで、本研究では遺伝子毒性試験の結果が陰性対象の標準偏差を超えた場合、遺伝子毒性が検出されたとして、発光 *umu* センサ及び発色 *umu* 試験における各試料の遺伝子毒性最低検出濃度を求め、比較した。結果を Fig. 7 に示す。

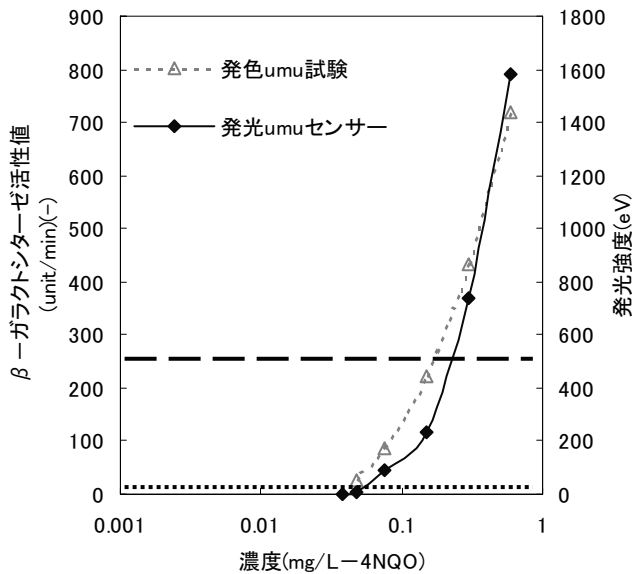


Fig. 6 発光 *umu* センサ、発色 *umu* 試験における4NQOの遺伝子毒性の用量作用曲線。(点線・破線は陰性対象における遺伝子毒性指標の標準偏差。破線が発色 *umu* 試験、点線が発光 *umu* センサにおけるもの)

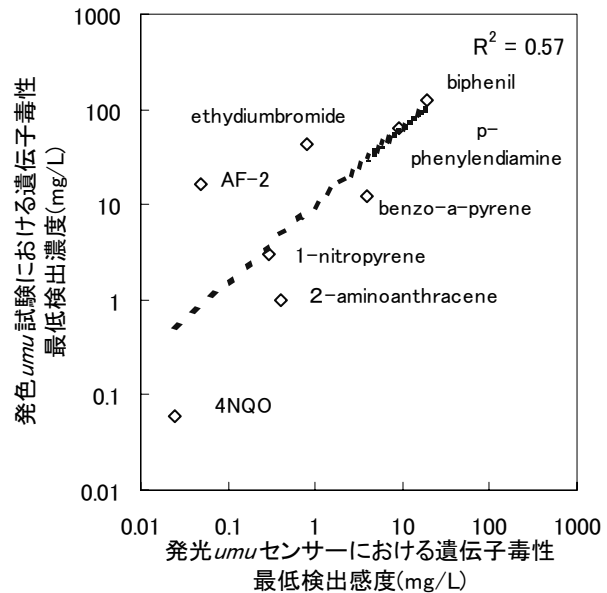


Fig. 7 発光 *umu* センサと発色 *umu* 試験における遺伝子毒性最低検出濃度の比較

横軸は発光 *umu* センサでの遺伝子毒性最低検出濃度、縦軸は発色 *umu* 試験での遺伝子毒性最低検出濃度を示している。発光 *umu* センサと発色 *umu* 試験での遺伝子毒性最低検出感度は正の相関を持っていることが確認され、開発された発光 *umu* センサは遺伝子毒性試験として発色 *umu* 試験を代替できることが確認できた。また、近似直線のx軸切片が負の値をとっており、発光 *umu* センサによる遺伝子毒性試験では、発色 *umu* 試験と比べ感度が10倍ほど良いことが確かめられた。

3.3 着色試料に対する遺伝子毒性評価

従来、用いられている発色 *umu* 試験はβ-ガラクトシダーゼによる基質の発色(405nm)、及び菌体濃度(600nm)を吸光度で測定するため、染料などの着色物質に対して、遺伝子毒性の測定が困難である。しかし、発光 *umu* センサは吸光度ではなく発光強度で遺伝子毒性応答を観察することができるため、着色試料に対しても遺伝子毒性の測定が可能であると考えられる。Table 1に各染料における発光 *umu* センサ、発色 *umu* 試験、Ames試験の結果を示す。発色 *umu* 試験では着色の影響を受け、ほとんどの染料において活性は認められなかった。しかし、着色の影響を受けないAmes試験では遺伝子毒性が確認される染料があり、多くの遺伝子毒性染料試料について発光 *umu* センサでも遺伝子毒性が認められた。

また、我々は発光 *umu* センサの発光が染料の着色の影響を受けているか確かめるために、各種染料水溶液に4NQO-0.6mg/Lを添加し、各種染料の用量作用曲線を検討することで、TL210株の発光に対する着色の影響を観察した。結果を Fig. 8 に示す。横軸は各染料の濃度を示しており、縦軸は0.6mg/Lの4NQOのみを曝露したとき遺伝子毒性強度を1とし、純水を曝露したときの遺伝子毒性強度を0とした場合の各染料の濃度における遺伝子毒性強度を示している。染料の濃度4mg/L以下の低濃度領域では発光強度は、4NQO-0.6mg/Lのみ曝

露時の発光強度の標準偏差内に納まり、低濃度側では染料の影響は見られなかった。5 mg/L を超える高濃度側では、キリングによる発光強度の測定阻害が起きたものと考えられる。^{13),14)}

Table. 1 各種遺伝子毒性試験の染料に対する結果

染料	濃度(mg/L)	発光 <i>umu</i> センサ	発色 <i>umu</i> 試験	Ames 試験
純水	—	—	—	—
DMSO	—	—	—	—
Bacic red	10	—	—	—
Acid Blue9	15	—	—	—
Toluianin blue	10	—	—	—
Acid yellow	10	—	—	+
Congor Red	2	+	—	+
Naphthal blue black	3	+	—	+
Acid red88	3	-	—	—
Basic blue17	3	+	—	—
Direct Red 27	10	+	+	+
Acid Black 1	3	+	—	+
Basic Violet 10	5	—	—	—

遺伝子毒性 + . . . 陽性 - . . . 陰性

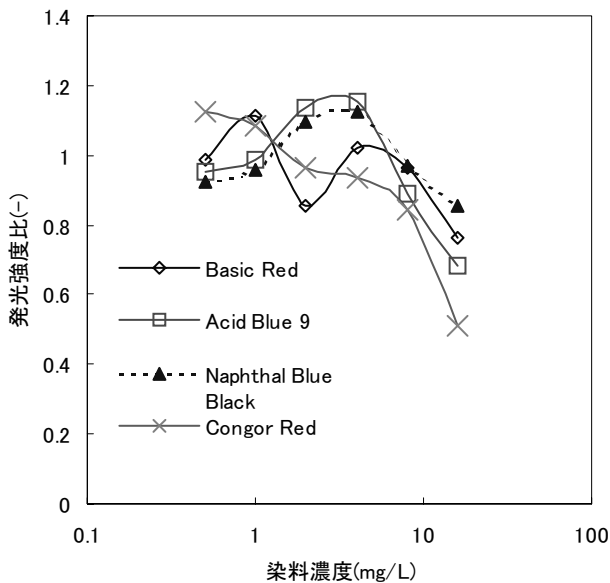


Fig. 8 陽性対照物質 4NQO-0.6mg/L を添加した時の発光 *umu* センサ (TL210 株) における各種染料の用量作用曲線

3.4 各遺伝子毒性試験の使用性の比較

各遺伝子毒性試験にあたり、各試験間の使用性を比較した。Table 2 に各遺伝子毒性試験の特徴を示した。

測定時間において、発光 *umu* センサは発色 *umu* 試験よりも測定時間が 6 倍短くなっている。これは、凍結された発光菌の微生物膜を用いることにより、菌体の活性化が短縮されたためである。発色 *umu* 試験の場合、使用菌体の活性化に 15~20 時間恒温槽で振とう培養を行う必要が有るが、発光 *umu* センサでは微生物膜を応用し、2 倍 TGA 培地と曝気によって菌体を迅速に活性化することができた。

試験操作において発光 *umu* センサは、発色 *umu* 試験に比べ相当簡便になっている。Fig. 9 に発光 *umu* センサの作業フローを示した。発光 *umu* センサでは、微生物膜をセットすることにより、装置の恒温槽が自動的に菌体の活性化を行う。また、遺伝子毒性の測定において、発色 *umu* 試験では細胞膜を破壊するための界面活性剤や、発色基質などを添加して、 β -ガラクトシダーゼ活性を発色させ測定する必要があったが、発光 *umu* センサでは菌体の発光で遺伝子毒性を測定するため、使用する試薬は培地のみで他の試薬を必要としないため、操作は非常に簡便である。さらに、発光 *umu* センサは測定も自動的に行き、リアルタイムでデータを取得できる。

各遺伝子毒性試験を環境試料などの未知の試料に適用する場合、測定困難物質が環境試料中に存在する場

合がある。発色 *umu* 試験では、吸光度で β -ガラクトシダーゼ活性値や菌体濃度などを測定するため、染料などの着色試料の測定が困難であり、Ames 試験ではヒスチジン要求性菌株の遺伝子変異による増殖を測定するため、食物などのヒスチジンを多く含む試料に適用できない。しかし発光 *umu* センサでは、発光により遺伝子毒性を測定するため、着色試料に有効であり、ヒスチジン要求性菌株を利用していない。また、感度・再現性の面でも発色 *umu* 試験より優れており、微量な遺伝子毒性物質の検出も可能であると考えた。

Table 2 各遺伝子毒性試験の特徴

	発光 <i>umu</i> センサ	発色 <i>umu</i> 試験	Ames 試験
測定指標	ルシフェラーゼ活性値 (発光強度)	β -ガラクトシダーゼ 活性値	コロニー数
試験時間(h)	4	24	50~75
必要試験試薬	1	7	6
AF-2(30 mg/L)曝露時の測定指標の変動係数	15	37	44
測定困難試料		着色試料	ヒスチジン混在試料
感度	発色 <i>umu</i> 試験より 高い	—	—

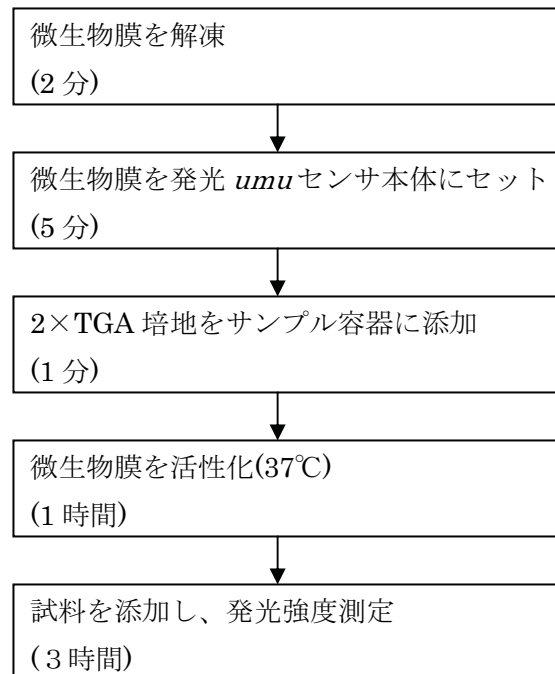


Fig. 9 発光 *umu* センサによる遺伝子毒性試験の作業フロー

4. Conclusions

本研究で得られた結論を以下に示す。

- ・従来の遺伝子毒性試験法である発色 *umu* 試験は、試料の遺伝子毒性測定に 24 時間を要するが、発光 *umu* センサにおける遺伝子毒性測定時間は約 4 時間であり、操作自体も発色 *umu* 試験に比べ簡便であった。
- ・発光 *umu* センサと発色 *umu* 試験での遺伝子毒性最低検出感度は良く相関しており、発光 *umu* センサにおける遺伝子毒性の検出感度は発色 *umu* 試験よりも高かった。
- ・発光 *umu* センサは、発色 *umu* 試験では測定困難であった染料などの着色試料に対しても遺伝子毒性測定が可能であった。

5. References

- 1) Grażyna Płaza, Grzegorz Nałęcz-Jawecki, Krzysztof Ulfig and Robin L. Brigmon, *Chemosphere*, 59, (2005) 289-296
- 2) Grażyna Płaza, Grzegorz Nałęcz-Jawecki, Krzysztof Ulfig and Robin L. Brigmon, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, (2005), inpress
- 3) Lei Shen, Jian-Yong Wu, Guo-Fang Lin, Jian-Hua Shen, Johannes Westendorf and Heinrich Huehnerfuss *Chemosphere*, 52, (2003) 1641-1646
- 4) Mitsuharu Matsumoto and Yoshimi Benno, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 568, (2004) 147-153
- 5) Yoshimitsu Oda, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 554, (2004) 399-406
- 6) Oda Y., Nakamura S., Oki I., Kato T., Shinagawa H., *Mutation Research*, 147 (1985) 219-229
- 7) H. Dizer, E. Wittekindt, B. Fischer and P. -D. Hansen, *Chemosphere*, 46, (2002) 225-233
- 8) Yoshio Osada, Takashi Kumagai, Kyoko Masuda, Tomoyuki Suzuki and Tamotsu Kanazawa, *Parasitology International*, 54, (2005) 29-34
- 9)特公平 7-163359
- 10) Kazuyuki Taguchi, Yoshiharu Tanaka, Takao Imaeda, Masana Hirai, Shino Mohri, Masato Yamada, Yuzo Inoue, *Environmental Sciences*, 11, (2004) 293-302
- 11) Pei-Ren Lo, Roch-Chui Yu, Cheng-Chun Chou and E-Chu Huang, *International Journal of Food Microbiology*, 93, (2004) 249-257
- 12) D. Kerns, Fumio Sagami, Satoru Motooka and Tetsuo Satoh, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 37, (2003) 20-27
- 13) A. Poth and A. Heidemann *Toxicology Letters*, 74, (1994), Page 66
- 14) King-Thom Chung and Carl E. Cerniglia *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 277, (1992) 201-220

(受付 2005. 4. 28)

(受理 2005. 8. 8)