# 目的

サルモネラ菌を使った、エイムス・テストを使い、身近な食品の、変異原性を調べ

その方法の理解、習得すること

# 原理

Ames testは1973年にAmesらが発表した方法で、Salmonella菌の一種で病原性のないネズミチフス菌（Salmonella typhimurium）の変異株を用いて変異原性物質の検出を行うものである突然変異誘起物質や発がん物質の検出にSalmonella typhimuriumの栄養要求変異株でアミノ酸の一種であるヒスチジン合成酵素の遺伝子に突然変異（mutation）が起きていてヒスチジンを合成できないヒスチジン要求性（His）株を使用する。突然変異原物質を菌と共存させたとき、その物質が遺伝子に作用し、復帰突然変異を起こし、ヒスチジンを再び合成できるようになり（ヒスチジン非要求性（His）復帰体）、ヒスチジンを含まない培地でも生育できるようになる。この試験では塩基対交換型の変異（DNAの塩基対が変換交換されて復帰する変異）frame shift型の変異（塩基対が余計に加わったり、脱落したりして復帰する変異の検出が可能である。物質の違いによってDNAに対する損傷のパターンが異なるため、数種類の変異株が用いられる。生育したHis +コロニーの数を数えて、その物質がその濃度で遺伝子に変異を起こした頻度とする。また、使用されている株はDNA損傷を除去修復するシステム（uvr B）を欠損し、物質の細胞透過性を高めるための表面構成成分であるリポ多糖類が欠失している（rfaを導入したmutant）変異体である。さらに薬剤耐性因子（R因子）であるプラスミドpkM 101を導入した TA100（塩基対交換型突然変異検出株）とTA98（frame shift型突然変異検出株）は突然変異原物質の検出感度が高く、多種類の物質の突然変異誘起作用を検出できる菌株として優れたものである。しかし、例えばmitomycin Cの場合、TA100、TA98で陰性の結果となってもTA102では陽性になる場合もある。変異原物質が存在しないことを厳密にいうためには、さらに検出する能力の高い株を含めた数種類の菌株を用いて判断する必要がある。また、物質が生体内で代謝されてできた代謝産物が変異原性を示す場合も多く、この代謝活性化による変異原性の発現のを調べるためには、代謝促進物質の9 mixを加える必要がある。

# 実験方法

実験器具

|  |  |
| --- | --- |
| 冷蔵庫（‐80℃） | インキュベーター（37℃） |
| 高圧蒸気圧滅菌器 | クリーンベンチ |
| プレート | 分注器 |
| メンブランフィルターホルダー | 振とう培養器(37℃) |

実験方法

液体培地、寒天培地に関しては、前日TAが作成を行った。

ここでは、実験書に記載されている、培地の作成方法、組成等に関しては

最後の補足資料に関して記載。

ソフトアガーの作成

表1に従って、調整後それぞれオートクレーブ滅菌する。

滅菌後混合し、菌懸濁液を加えるまでは、45℃で保温しておいた。

なお以下表一の、(1)のみ我々が作成した。その他に関してはTAが作成した。

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| (1)0.7%寒天  0.6%NaCl溶液 | (2)1/15M  Nak緩衝液  (pH=6.8) | (3)0.5mMヒスチジン  0.5ｍMピオチン溶液 |
| 寒天（Difco）0.175g  蒸留水　　　 25ml  NaCl 0.15g | Na₂HPO₄　0.47g  KH₂PO₄　 0.45g  蒸留水　　100ml | LヒスチジンHCL・H₂O　　10.4mg  D-ピオチン　　　　　　　　12.2㎎  1/15M NaK緩衝液　　　　　0.5ml  蒸留水　　　　　　　　　　100ml |

エイムステスト

エイムステストにおける前培養は、TAが行ったため、補足資料にて、作成方法とを記載。

試料の準備

砂糖を、0.55gを分取し、10倍に希釈し沸騰浴中で10分間殺菌後、室温まで冷却する

プロトコール

作成した砂糖溶液、塩溶液、そして陽性比較用の標準溶液を100μl を滅菌試験管

底部に入れる。

S-9mixまたは1/5Mナトリウムカリウム緩衝液を0.5ｍｌを加える

Ta100菌懸濁液またはTa98菌懸濁液を、0.1ml混合する

以下の表２の組成で試料を作成した

表２　試料の混合割合

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 試料番号 | S-9mix | 1/5Mナトリウムカリウム緩衝液 | Ta100  菌懸濁液 | Ta98  菌懸濁液 |
| A塩1 | 500ml | 0ml | 0.1ml | 0ml |
| B塩2 | 500ml | 0ml | 0ml | 0.1ml |
| C塩3 | 0ml | 500ml | 0.1ml | 0ml |
| D塩4 | 0ml | 500ml | 0ml | 0.1ml |
| E砂糖１ | 500ml | 0ml | 0.1ml | 0ml |
| F砂糖２ | 500ml | 0ml | 0ml | 0.1ml |
| G砂糖３ | 0ml | 500ml | 0.1ml | 0ml |
| H砂糖４ | 0ml | 500ml | 0ml | 0.1ml |
| I陽性対称１ | 500ml | 0ml | 0.1ml | 0ml |
| J陽性対称２ | 500ml | 0ml | 0ml | 0.1ml |
| K陽性対称３ | 0ml | 500ml | 0.1ml | 0ml |
| L陽性対称４ | 0ml | 500ml | 0ml | 0.1ml |

プレインキュベーションする［37℃、20分間、5分間ごとに混合］

別の試験管に分袖したソフトアガー（50℃に保温）2mlに、上記で作成した溶液を

加え混合、アガープレートに加え、インキューベーションする。37℃で3日間安置

コローニ―数の計測をした。

# 結果

表3　コロニー数

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 試料番号 | コロニー | 試料番号 | コロニー | 試料番号 | コロニー |
| A | 92 | E | 4576 | I | 90 |
| B | 16 | F | 7840 | J | 17 |
| C | 140 | G | 0 | K | 216 |
| D | 9 | H | 0 | L | 37 |

砂糖に関してS―9がある時増殖して、ta98の方が、ta100よりも増殖した。

塩に関しては、s-9がない方が、増殖する数は多く、ta98よりta100の方が増殖は多かった。

このことより塩より砂糖の方が、菌が繁殖しやすかったことがわかる。

陽性対称に関しても以下にta100のs-9mixでない方が増殖が多くまた、

溶媒に水を使用したものは、s-9mixを添加していない方が増殖していた。

蒸留水に関しては、ta100の方が、ta98と比較して増殖数は多かった。

陽性対照に関しては、ta100のs-9mixが、s-9mixでない方と比較して増殖数は多かった。

実際のシャーレの写真を載せる。

カップ, テーブル, 座っている, 室内 が含まれている画像

自動的に生成された説明室内, 座っている, テーブル が含まれている画像

自動的に生成された説明室内, テーブル, カップ, 座っている が含まれている画像

自動的に生成された説明

図1砂糖　S-９+　ta100 図２陽性対称s-9+ ta100 図3陽性対称s-9- ta100

テーブル, カップ, 室内, 座っている が含まれている画像

自動的に生成された説明室内, テーブル, カップ, 座っている が含まれている画像

自動的に生成された説明テーブル, 室内, 皿, 座っている が含まれている画像

自動的に生成された説明

図4陽性対称s-9+ ta98 図5陽性対称s-9- ta98 図6 塩　s-9+ ta100

室内, 座っている, 次, テーブル が含まれている画像

自動的に生成された説明室内, テーブル, 皿, カップ が含まれている画像

自動的に生成された説明テーブル, 室内, 座っている が含まれている画像

自動的に生成された説明

図7砂糖s-9+ ta98 　　　　図8　塩　S-9+ ta98　　　　　　図9　塩　s-9- ta100

室内, カップ, 座っている, 次 が含まれている画像

自動的に生成された説明カップ, 室内, テーブル, 座っている が含まれている画像

自動的に生成された説明

　図10 砂糖　s-9- ta100　　　　 図11砂糖　s-9- ta98

# 考察

今回使用した菌は、ネズミチフス菌（Salmonella Typhimurium）の変異株で、ヒスチジン合成能がないヒスチジン要求性(his-)のTA株を使用した。

今回使用したTA株を使用したことで何がわかるのかは。、以下に示す。

Salmonella Typhimurium　TA98株 ：

フレームシフト型の突然変異を検出することができる。

Salmonella Typhimurium　TA100株 ：

塩基対置換型の突然変異を検出することができる。

TA株は。ヒスチジンがなければ生きることが出来ない。化学物質に変異原性が無ければ、菌は増殖しないと考えられる。

しかし、化学物質に変異原性がある場合、ヒスチジンがなければ生きることが不可能な菌が、突然変異することで、ヒスチジンがなくても生きることが可能になる。

この突然変異がどれくらい起こっているかを調べることで、その化学物質の変異原性の有無が判明すると考えた。

変異原性の判定方法としては、培地のコロニーが増加していれば、変異原性あり。変化なしの場合であれば、変異原性なしと判断した。

S9mixは、ラット肝ホモジネートの9000 ×g上清にNADPH生成系を加えて調整したものであり、これを加えることによって、調べたい化学物質を代謝的活性化させることができ

緩衝液と比較できた。

砂糖の場合は、S-9mix添加したものは、とても多くの菌が繁殖し、一方S-9mixを添加して

無い方は菌が繁殖しなかった。またSalmonella Typhimurium　TA98株の方が、多く繁殖したため塩基対置換型の突然変異が多く起きたことが分かった。

塩の場合は、Salmonella Typhimurium　TA100株のS-9mixを添加してない方が、一番増殖したが、Salmonella Typhimurium　TA100株の方が、増殖数は多くフレームシフト型の突然変異が多く起きたことが考えられた。

しかし今回の実験において、陽性対照に関して、他班は、ta100に関しては、

s-9mixの方が増殖数は多く、s-9mix出ない方は、菌が繁殖していなかった。

うちの班とは対照的な結果となった。またta98に関しても、-9mixの方が増殖数は多く、s-9mix出ない方は、菌が繁殖していなかった。これに関しても、うちの班とは対照的な結果となった。ここではなぜこのように他班と対照的な結果に関して考えていきたいと思う。

まず、シャーレに記載していた情報が、誤っていた可能性。

これに関しては、他班では、s-9mix出ない方は、菌が繁殖していなかったにもかかわらず

うちの班は増殖していたので、関係性はないと考えた。

そもそも、この陽性対照は、s-9mixの酵素活性が正常がどうかを調べるためのものにもかかわらず、ｓ－９-でも増殖した要因として

ベンズビレンの添加量が少なかった可能性、もしくは、雑菌等が入り込んだ可能性が考えられた。しかし、正確な要因に関しては、判明しなかった。

このことにより、s-9mixの酵素活性が正常だったのかが、疑われる結果となり

再現性が低くなったと考えた。

まとめ

砂糖に関しては　塩基対置換型の突然変異を多く引き起こした。

塩に関してはフレームシフト型の突然変異を多く引き起こした。

# 結論

サルモネラ菌を使った、エイムス・テストを使い、砂糖や塩の変異原性を調べ

その方法の理解し、その方法を習得できた。

# 検討事項

Abes test以外に突然変異物質の検索方法

マウスリンフォーマTK試験は、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験と同様に、化学物質によって誘発される染色体異常の有無を検索する試験。

マウスリンパ腫細胞L5178Ytk+/- -3.7.2c株のチミジンキナーゼ遺伝子座の変異を指標として、遺伝毒性誘発性の有無（TFT（トリフルオロチミジン）耐性の突然変異体の有無）を検索。

遺伝子の変異を指標とする点で、細菌を用いる復帰突然変異試験（Ames試験）と同じだが、

ほ乳類の培養細胞を用いる点でより高次な試験となっている

突然変異株とは何か。自然発生率は？

野生型に対し、変異遺伝子を持つ菌株、細胞株。

1遺伝子当たり10万分の1〜100万分の1

突然変異株の取得方法

紫外線や、放射線による、遺伝子変異による変異株の取得

遺伝形質の改良を目的とする場合、変異はどんな役割をするか

在来には、存在しなかった形質を発現させる役割。

# 参考文献

厚生省等による食品添加物の変異原性評価データシート（昭和54年度 〜 平成10年度分 ） 林 真 松井道子 石井健二 川崎通昭

# 補足

液体培地に関しては

以下の表４液体培地の組成を記載し、それを蒸留水で100mlに調整後、120℃20分でオートクレープ後滅菌

表4　液体培地の組成

|  |  |
| --- | --- |
| Nutrient Broth | 0.8g |
| NaCl | 0.5g |
| 蒸留水 | 100ml |

エイムステストの前培養

凍結保存してある菌を、実験前日に以下の手順で培養液に植種する。

1. Nutrient brothを5mlずつし字管に入れ、オートクレーブで120℃、20分間滅菌する
2. 凍結保存しておいた菌を滅菌したピペットでNutrient brothに植種する。※菌を植種する際、ドライアイスアセトンを利用して、極力、凍結液の解凍を防ぐ。
3. 37℃、16時間振とう培養する（60〜70往復/分）。これによってほぼ一定の菌濃度懸濁液（1〜2×109生菌数/ ml、660nmの吸光度OD660 ≒1 .7）が得られる。

④使用直前まで氷中に保存する。