

## 運動性細菌をセンサーとした迅速毒性試験法の開発

### Development of the Rapid Toxicity Bioassay Method Using Motile Bacteria as A Sensor

下城麻衣子<sup>1</sup>, 田中 宏英<sup>1</sup>, 洪 昌秀<sup>1</sup>, 黒田 章夫<sup>1</sup>

MAIKO SHITASHIRO, HIROHIDE TANAKA, CHANG SOO HONG, AKIO KURODA

滝口 昇<sup>1</sup>, 大竹 久夫<sup>2</sup>, 加藤 純一<sup>1\*</sup>

NOBORU TAKIGUCHI, HISAO OHTAKE and JUNICHI KATO

<sup>1</sup> 広島大学大学院先端物質科学研究科 分子生命機能科学専攻 〒739-8530 東広島市鏡山1-3-1

<sup>2</sup> 大阪大学大学院工学研究科 応用生物工学専攻 〒565-0871 吹田市山田丘2-1

\* TEL: 082-424-7757 FAX: 082-424-7047

\* E-mail: jun@hiroshima-u.ac.jp

<sup>1</sup> Department of Molecular Biotechnology, Graduate School of Advanced Sciences of Matter, Hiroshima University, 1-3-1 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-8530, Japan

<sup>2</sup> Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

キーワード: 運動性細菌, 運動性, 環境汚染物質, トリクロロエチレン, 毒性試験

Key words: Motile bacteria, chemotaxis, environmental pollutants, trichloroethylene, toxicity bioassay method

(原稿受付 2005年5月30日/原稿受理 2005年7月19日)

#### 1. はじめに

多数の環境試料の毒性を迅速に評価する技術は、これからますます重要になってくるであろう。環境中における毒性が特定の物質のみに起因しているのであれば、HPLC やガスクロマトグラフィーなどの化学的及び物理的な科学機器分析により、迅速かつ高感度に毒性を評価することができよう。しかし、不特定多数の物質により毒性が生じている場合、科学機器分析による毒性の評価は極めて困難である。環境試料中の総合的な有害性を評価するためには、やはり、生物を用いたバイオモニタリングに頼らざるを得ない。

従来からのバイオモニタリングは、微生物、原生動物、微細藻類、原生動物及び高等植物などを用い、その致死性、増殖阻害、代謝活性阻害等を指標に毒性を評価している。特に致死性や増殖阻害を指標にしたバイオモニタリングは一般的に行われている。しかし、評価の過程で細胞を増殖させるステップが含まれるために、増殖速度が速い細菌を用いても、結果を得るまで半日程度要してしまう。さらに増殖のための栄養源を添加することで、毒性に影響を及ぼしてしまう可能性もある。そこで、我々は細菌の運動性が毒性物質に敏感かつ迅速に応答することに着目し、化学物質の総合的な毒性の評価に細菌の運動性を指標として利用することが可能か検討を行った。

#### 2. 細菌の運動性を指標にした毒性試験法の開発

微生物の代謝などを阻害する様々な化学物質が、細菌の運動性を阻害することが報告されている。これらの化合物には、Hg, Cu や Ni などの重金属類、電子伝達系やATP 生合成系の阻害剤や<sup>1)</sup>、ジオールやジスルフィドなどの蛋白質変性剤が含まれる<sup>2)</sup>。我々は1990年代前半から、*Pseudomonas aeruginosa* の行動的応答、走化性の研究を行っている。*P. aeruginosa* の走化性研究の過程で、*P. aeruginosa* の運動性も毒性物質に対して極めて敏感で、毒性物質に遭遇するとすぐに運動性を停止することを見出した。この実験事実に基づき、運動性細菌 *P. aeruginosa* をセンサー素子とし、その運動性の阻害を指標にして、自然水および土壌サンプルに含まれる化学物質の総合的な毒性を迅速に試験する手法の開発できるのではないかと発想し、開発研究を開始した。

##### 2.1. 運動性阻害を指標とした毒性試験の開発—顕微鏡画像法の開発—

*P. aeruginosa* の菌体懸濁液に *p*-クレゾールなどの有害物質を添加してすぐに顕微鏡観察を行うと、活発に運動性を示していた細胞が即座に運動性を停止することが見てとれる。したがって、*P. aeruginosa* の運動性を評価する何らかの方法を開発すれば、迅速に有害性を試験できると期待された。そこで、走化性アッセイのために開発したコンピュータ支援キャピラリー法<sup>3)</sup>を基に運動性測定システムを構築した。この運動性測定システムで

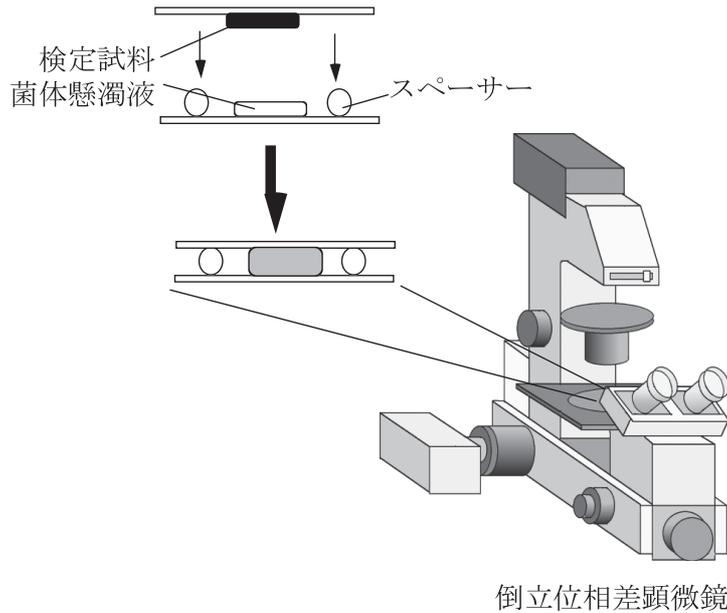


図1. 顕微画像法による有害性試験の概要。

運動性チャンバーを用いて検定試料と菌体懸濁液を混合し、すぐに倒立位相差顕微鏡-CCDカメラ-ビデオで顕微画像を録画する。録画後、ビデオ画像をコンピュータ解析することにより、停止菌体率を求める。

は、運動性チャンバー（図1）を用いて運動性を観察する。運動性チャンバーは上下2枚のカバーガラスとその間の空間を確保するためのスペーサー（市販のクリップを加工したもの）から構成される。まずあらかじめスペーサーを設置してある下部のカバーガラスの中央に10 $\mu$ lの菌体懸濁液をのせる。上部のカバーガラスの下面の中央部に毒性物質を含んだ緩衝液を10 $\mu$ l附着させ、速やかに下部のカバーガラスに重ね合わせ菌体懸濁液と混合させる。そしてただちに顕微画像をビデオで録画する。運動を停止した菌体の割合はコンピュータを用いた画像解析で行う。まず対照となる時点のビデオ画像をコンピュータに取込む。コンピュータ画面上の菌体の回りに

適当な直径の円を描く。そして対照とした時点の5秒後の画像を取込み重ね合わせる。もし5秒後の菌体が円内に留まっているようであれば、その菌体は運動を停止しているの見なしカウントする。画面上に描く円の直径は、菌体のブラウン運動を考慮して決める。われわれの経験では、5~7 $\mu$ mに相当する円を描けば、ブラウン運動をしている停止菌体も停止菌体としてカウントすることができることがわかっている。また、運動している菌体が偶然に円内に入って停止菌体と見なされる可能性も勿論ある。しかし、実際に測定を行ってみるとその確率は無視できる程小さいことがわかり、この方法で測定した停止菌体率（画面上の全菌体数に対する停止菌体の割

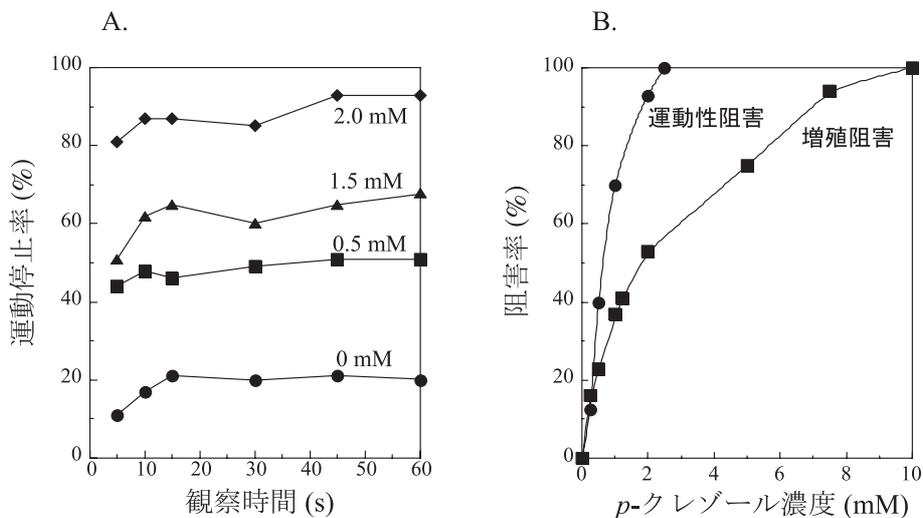


図2. 0~2.0 mM *p*-クレゾールを添加した時の *P. aeruginosa* の停止菌体率の経時変化 (A) と *p*-クレゾールの運動性阻害と増殖阻害の濃度依存曲線 (B)。

顕微画像法により停止菌体率を求めた。ビデオ画面上の全菌体数に対する停止菌体数の割合を停止菌体率とした。運動性阻害は、*p*-クレゾール無添加区の停止菌体率を差し引き補正を行った。

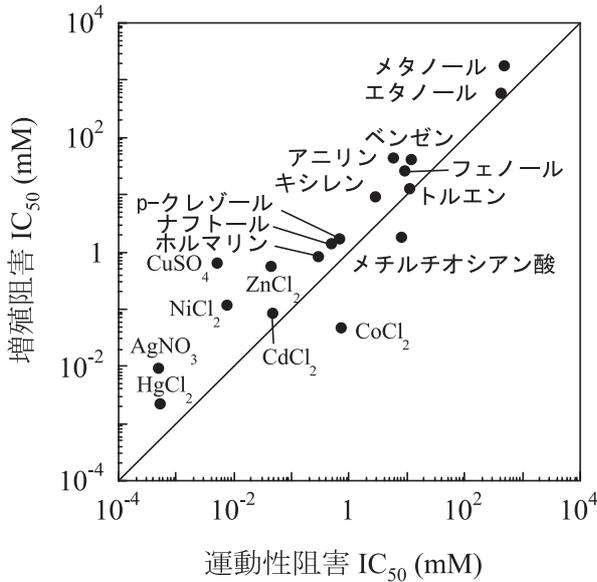


図3. 様々な化学物質の運動性阻害と増殖阻害を指標としたIC<sub>50</sub>の相関。  
相関計数は0.96であり、運動性阻害と増殖阻害の間に非常に高い相関があることがわかる。

合)は真の停止菌体率とほとんど同一であることが示された。

図2Aは、種々の濃度のp-クレゾール存在下での運動性の停止率の経時変化を示したものである。P. aeruginosaはp-クレゾールに曝露されると運動性が濃度依存的に阻害される。運動性の阻害は極めて迅速で、10秒もたつと阻害率は一定となる。p-クレゾールの増殖阻害を調べて運動性阻害と比較したところ、ほぼ同様な濃度依存性の曲線となった(図2B)。増殖阻害試験の場合は少なくとも10時間以上を要することから、運動性阻害を指標にした方がはるかに迅速に有害性を試験できることが示唆された。そこで、p-クレゾール以外の化学物質の有害性も運動性阻害を指標にして評価できるか、確かめた。種々の濃度の化学物質に曝露したときの運動性阻害と増殖阻害を測定した。そして、それぞれの50%を阻害する濃度(IC<sub>50</sub>)を求めた<sup>3)</sup>。図3は、縦軸に18種類の化学物質の増殖阻害のIC<sub>50</sub>、横軸に運動性阻害のIC<sub>50</sub>をとっ

てプロットしたグラフである。グラフを見て明らかのように、増殖阻害と運動性阻害のIC<sub>50</sub>の間には高い相関性(R=0.95)があった。また、ほとんどの点はy=xの直線より上方にあることから、運動性阻害の方が高感度であるといえる。このように、運動性を指標にして迅速かつ感度よく化学物質の毒性を評価できることが示された。我々は、運動性細菌をセンサー素子とし顕微画像を解析することにより毒性を試験する方法を顕微画像法と命名した。

## 2.2. 蛍光プレートリーダーを利用する有害性試験法の開発—蛍光プレートリーダー法—

顕微画像法の開発研究から細菌の運動性を指標にすれば、化学物質の毒性を迅速に評価できることが示唆された。しかし、顕微画像法では多数の試料を同時に測定することは困難である。また、測定の自動化も容易ではない。これら欠点のブレイクスルーのためには、複数試料の同時計測ならびに計測の自動化が容易な測定機器を用いて細菌の運動性を計測する方法を工夫する必要がある。そこで、緑色蛍光蛋白質(GFP)で蛍光標識したP. aeruginosa、マイクロタイタープレート、そして走化性カップを用い、蛍光プレートリーダーで複数の試料におけるP. aeruginosaの運動性を同時かつ自動的に計測できる測定システムの構築に取り組んだ<sup>8)</sup>。

蛍光プレートリーダーによる細菌の運動性の測定を可能にするため、まず、P. aeruginosaを蛍光ラベルした。GFP発現広宿主域ベクターであるpMRP9-1<sup>7)</sup>をP. aeruginosaに導入することにより、菌体を蛍光標識した。これにより、菌体濃度を緑色の蛍光強度で計測することが可能になった。P. aeruginosaの運動性は、マイクロタイタープレートと走化性カップ(商品名ケモタキセル、クラボウ製)から構成される走化性チャンパー(図4)を用いて計測した。24穴のマイクロタイタープレートを下層カップとし、そこに菌体懸濁液を1.1ml入れる。その上から、1.0mlのHEPES緩衝液を入れたケモタキセル(上層カップ)を重ねる。ケモタキセルの底は孔径8μmのメンブレンフィルターになっているので、P. aeruginosaはケモタキセルの底の穴を通過し、自由の上層-下層間を移動することができる。上層カップを重ねることにより上層と下層の間に溶存酸素濃度

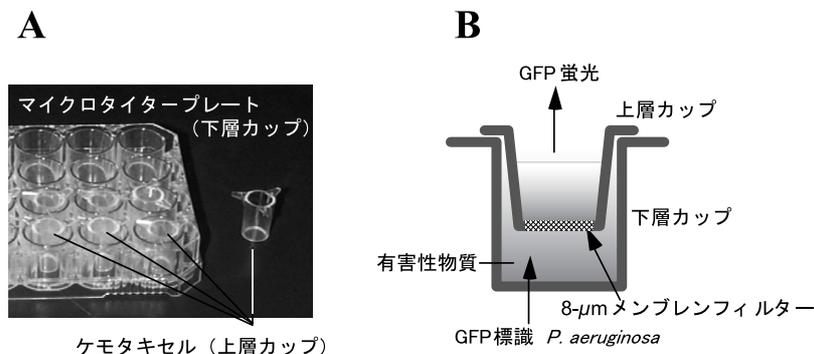


図4. 蛍光プレートリーダー法で用いた走化性チャンパー。

A. マイクロタイタープレート(下層カップ)とケモタキセル(上層カップ)の写真図。B. 走化性チャンパーの概念図。ケモタキセル(上層カップ)の底は孔径8μmのメンブレンフィルターになっており、P. aeruginosaはこのメンブレンフィルターを通過して下層カップと上層カップを行き来することができる。

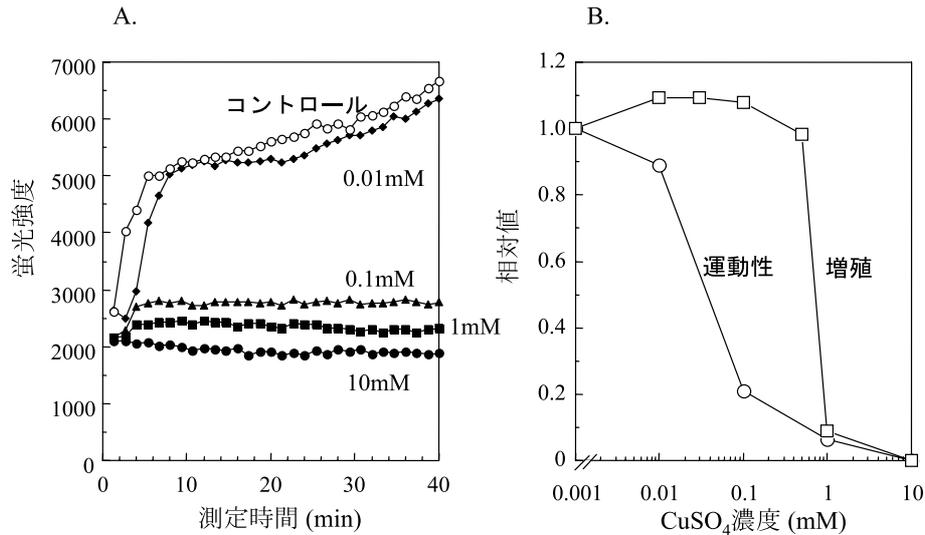


図5. 蛍光プレートリーダー法による硫酸銅の有害性試験。

硫酸銅を下層カップに0~10 mM 添加した時の上層カップの GFP 蛍光強度の経時変化 (A) と40分間の蛍光強度の増加の濃度依存曲線 (B)。濃度依存曲線は、硫酸銅無添加区 (コントロール) の蛍光強度の増加を1として作成した。

の勾配が形成される。*P. aeruginosa* は  $O_2$  に対して強い走化性 (走気性) を示すので、下層カップの *P. aeruginosa* は走気性を発揮して溶存酸素濃度が高い上層カップに移動する。*P. aeruginosa* は GFP で蛍光標識しているので、上層カップ内の蛍光強度は時間とともに増加すると考えられる。

そこで、走化性チャンパーを組み立て、上層カップ内の蛍光強度の経時変化を測定した。蛍光強度の測定はマルチラベルカウンター ARVO1420 (Wallac 社) を用い、上層カップの水面下約 5 mm に焦点を合わせ測定した。図5に示したように、予想通り上層カップ内の蛍光強度は時間とともに増加した。このことから、走化性チャンパーと蛍光標識した *P. aeruginosa* を用いることにより、*P. aeruginosa* の運動性 (走気性) を蛍光プレートリーダーで測定できることが示された。

毒性物質により運動性が阻害されれば、必然的に走気性も阻害されることになる。したがって、毒性がある検定試料を下層カップの菌体懸濁液に添加して走気性を測定した場合、毒性の強さに依存して走気性が阻害され、その分上層カップ内の蛍光強度の増加の割合は減少すると考えられる。そこで、毒性物質として  $CuSO_4$  を用い、それを種々の濃度下層カップの菌体懸濁液に添加して走気性を測定した。その結果、予想通り  $CuSO_4$  の添加量に依存して蛍光強度の増加の割合が減少する、すなわち走気性が阻害されることが示された (図5)。しかも、走気性の阻害は濃度依存性であった (図5B)。これらの結果から、蛍光プレートリーダー、走化性チャンパー及び蛍光標識した *P. aeruginosa* を用いて毒性を評価できることが示された。われわれは、この蛍光プレートリーダーを用いた毒性試験法を蛍光プレートリーダー法と命名した。

$CuSO_4$  以外の化学物質の毒性 ( $IC_{50}$ ) を蛍光プレートリーダー法を用いて計測した。その結果、 $HgCl_2$ ,  $Tl_2SO_4$ ,  $SnCl_2$ ,  $AgNO_3$ ,  $PbCl_2$ , アジ化ナトリウム及びシアノゲンブromidの  $IC_{50}$  は、それぞれ、0.003, 0.9, 3, 0.04, 3, 4.5

及び 0.4 mM と求められた。しかし、 $K_2CrO_4$  に関しては、その運動性阻害効果が低いため、 $IC_{50}$  を求められなかった。

次に、重要な環境汚染物質であるトリクロロエチレン (TCE) の毒性を蛍光プレートリーダー法により検知できるか調べた。下層カップの菌体懸濁液に 0~100 ppm の TCE を添加して蛍光強度の経時変化を測定した (図6)。100 ppm の TCE の添加区では蛍光強度はほとんど増加しなかった。このことから、TCE は運動性阻害効果を持つことが判明した。しかし、1 ppm の TCE を添加した場合、蛍光強度の増加は TCE 無添加区 (コントロール) より大きかった。すでに、*P. aeruginosa* が TCE を忌避物質として認識し、負の走化性を示すことが判明している<sup>9)</sup>。このことから、1 ppm の TCE を添加した場合、*P. aeruginosa* は TCE に対する負の走化性を

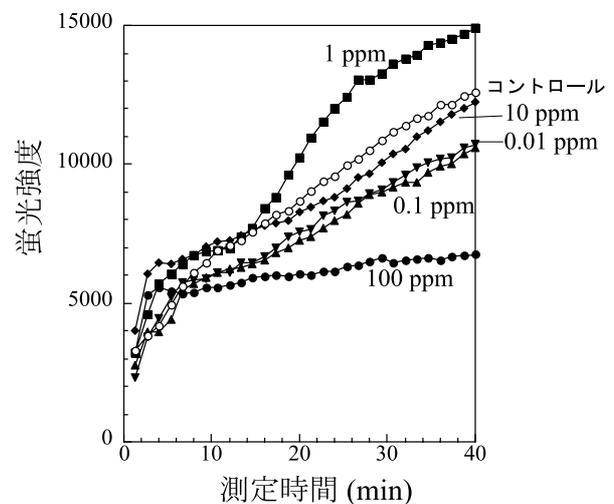


図6. 蛍光プレートリーダー法によるトリクロロエチレンの毒性試験。  
トリクロロエチレンは下層カップにのみ添加した。

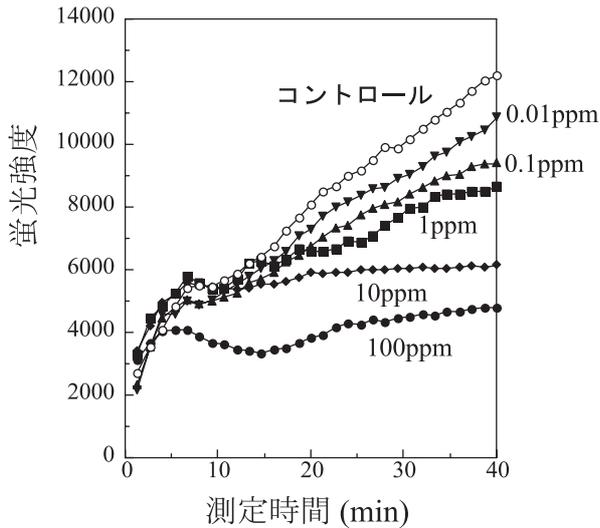


図7. 蛍光プレーとリーダー法によるトリクロロエチレンの有害性試験。  
トリクロロエチレンを下層カップと上層カップに同濃度添加して測定した結果。

発揮し、コントロールよりもすばやく菌体が上層カップに移動したため、このような現象が生じたと考えられた。100 ppm の TCE に曝露した場合は、負の走化性を発揮する前に重度に運動性阻害を受けたために、蛍光強度の測定において負の走化性の効果が現れなかったと考えられる。

以上の結果から、走化性を示す化学物質の毒性を試験する場合、蛍光強度の測定に走化性の影響が出てしまう恐れがあることが示された。この問題を克服するためには、何らかの方法で走化性が発揮されないような条件を作ればよい。細菌は、走化性物質の濃度そのものに対応するのではなく、濃度勾配を感知して走化性を引き起こす。したがって、走化性物質が存在してもその濃度分布が均一であれば、細菌は走化性を起こさない。そこで、下層カップだけでなく、上層カップにも同じ濃度の TCE を添加することにより、上層カップと下層カップ

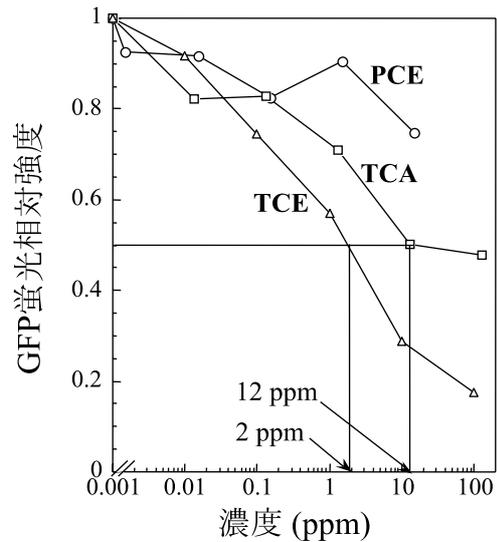


図8. 蛍光プレーとリーダー法で計測したトリクロロエチレン (TCE)、トリクロロエタン (TCA) およびテトラクロロエチレン (PCE) の毒性の濃度依存曲線。  
図中に示した濃度は TCE と TCA の IC<sub>50</sub>。

の間の濃度勾配が形成されないようにして再び測定をし直した。図7にその測定結果を示す。予想通り、蛍光強度の増加の度合いは、添加したトリクロロエチレンの濃度に依存して減少した (図8)。このように、上層カップにも同濃度になるように TCE を添加することにより、走化性の影響を回避できることが示された。環境試料に含まれる走化性物質の濃度の予測は困難である。しかし、下層カップと上層カップに同じ割合になるように環境試料を添加すれば、図7の TCE の場合と同様に、走化性の影響を排除して試験することができるであろう。そこで、標準的な手法として、上層カップと下層カップ双方に検定試料を添加して蛍光強度の経時変化の測定を行うこととした。

図8は標準的な蛍光プレートリーダー法により、テトラクロロエチレン (PCE) 及びトリクロロエタン (TCA)

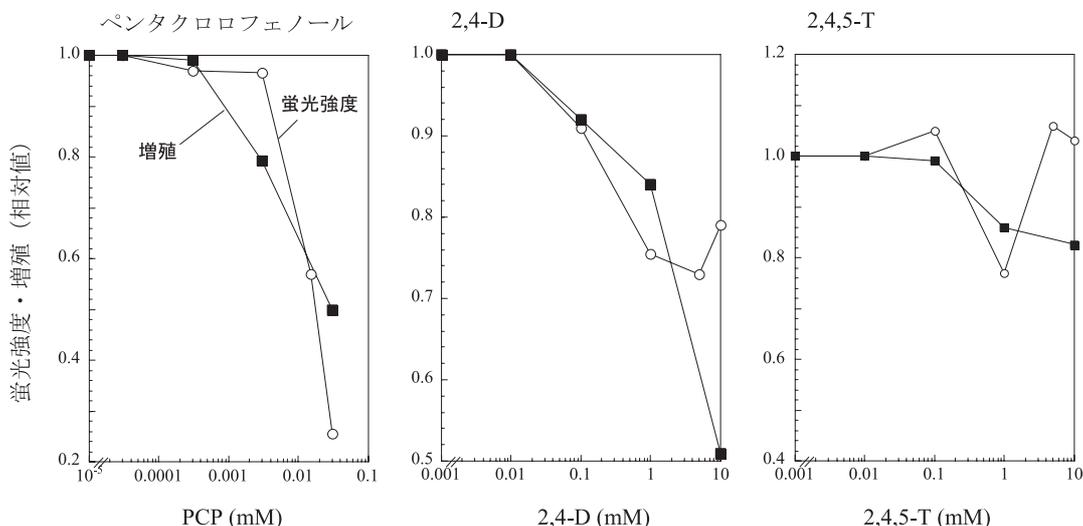


図9. 蛍光プレートリーダー法と増殖阻害法を用いたペンタクロロフェノール、2,4-D および 2,4,5-T の有害性の測定。

の毒性を試験した結果を表したグラフである。いずれも濃度依存的に運動性が阻害されていることがわかる。TCE 及び TCA の  $IC_{50}$  は、それぞれ 2, 12 ppm であった。PCE は測定した最大濃度においても運動性阻害は 50% に満たなかったことから、 $IC_{50}$  は求められなかった。以上のことから、蛍光プレートリーダー法による毒性試験では、これら揮発性有機塩素化合物のうち TCE が最も強い毒性を持つことが示唆された。培地に揮発性有機塩素化合物を添加してこれら物質の増殖阻害効果を調べてみたが、いずれの物質の添加区でも無添加区と同程度に増殖を示した。これは、培養中に添加した揮発性有機塩素化合物が揮発してしまうためと考えられた。このように、従来の増殖阻害試験では揮発性有機塩素化合物の有害性を評価するのは難しいようである。

さらに揮発性有機塩素化合物以外の環境汚染物質として 2,4-D, 2,4,5-T やペンタクロロフェノールについても毒性試験を行った。その結果を図 9 に示す。これらの物質は揮発性でないので、増殖阻害試験で濃度依存的な増殖阻害曲線が得られた。蛍光プレートリーダー法による測定で得られた運動性阻害の濃度依存性曲線も増殖阻害のものとはほぼ同様の曲線を描いた。このことから、芳香族塩素化合物の毒性も蛍光プレートリーダーで計測し得ることが示唆された。

### 3. おわりに

本研究では、細菌の運動性が毒性物質に敏感であることを利用し、運動性細菌をセンサー素子とした毒性試験法、蛍光プレートリーダー法の開発に至った。蛍光プレートリーダー法は下記のような利点を持つ。

- 1) 多数の試料 (23 試料まで) の有害性を同時に試験することができる。
- 2) 少量の試料で有害性試験ができる。通常、1 ml もあれば試験可能である。
- 3) 測定時間が短い。通常、30 分の測定で十分である。
- 4) プレートリーダーはコンピュータで制御しているので、自動化が容易である。
- 5) 増殖のステップがないので、毒性試験に影響を及ぼす可能性のある栄養源等の余計な物質を添加する必要がない。

これらはいずれも、毒性試験で要求される条件である。これら総ての条件を満たす毒性試験はまれであるこ

とから、蛍光プレートリーダー法は優れた毒性試験法であると言えよう。今後、さらに他の標準的な毒性試験法と比較検討を行うこと、環境試料の毒性試験を重ねること、ならびに土壌の毒性試験にも適用できるような操作法を開発するなどし、実用に耐え得る技術に育て上げる必要がある。

### 謝 辞

本研究は、科学技術振興事業団の戦略的基礎研究「微生物を活用する汚染土壌修復の基盤研究」(研究代表者: 矢木修身東京大学教授)の一環として行われたものです。研究の機会を与えて下さった東京大学大学院工学系研究科教授・矢木修身先生に厚く御礼申し上げます。本稿の研究成果は、広島大学大学院先端物質科学研究科分子生命機能科学専攻細胞構造機能学研究室に所属した Hardoyo 博士、福村 毅氏、中本麻記子氏、山本敬正氏によるものです。これらの皆様に御礼申し上げます。

### 文 献

- 1) Adler, J. 1973. A method for measuring chemotaxis and use of the method to determine optimum conditions of chemotaxis by *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol. 74: 77-91.
- 2) Conley, M.P., and H.C. Berg. 1984. Chemical modification of *Streptococcus flagellar* motors. J. Bacteriol. 158: 832-843.
- 3) Hardoyo, S. Kajiwara, J. Kato, and H. Ohtake. 1993. Bacterial motility as a tool for toxicity assay. Biotechnol. Techniques 7: 457-462.
- 4) Kato, J., M. Shitashiro, M. Yamamoto, A. Kuroda, T. Ikeda, N. Takiguchi, and H. Ohtake. 2001. Chemotaxis by *Pseudomonas aeruginosa* towards 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and volatile chlorinated aliphatic compounds. 101st general meeting of the American Society for Microbiology, Orlando, FL.
- 5) Laszlo, D.J., and B.L. Taylor. 1981. Aerotaxis in *Salmonella typhimurium*: role of electron transport. J. Bacteriol. 145: 990-1001.
- 6) Nikata, T., K. Sumida, J. Kato, and H. Ohtake. 1992. Rapid method for analyzing bacterial behavioral responses to chemical stimuli. Appl. Environ. Microbiol. 58: 2250-2254.
- 7) Parsek, M.R., and E.P. Greenberg. 1999. Quorum sensing signals in development of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Methods Enzymol. 31: 43-55.
- 8) Shitashiro, M., J. Kato, T. Fukumura, A. Kuroda, T. Ikeda, N. Takiguchi, and H. Ohtake. 2003. Evaluation of a bacterial aerotaxis for its potential use in detecting the toxicity of chemicals to microorganisms. J. Biotechnol. 101: 11-18.