

2 標本 t 検定に基づく Ames 変異原性 試験結果の陽性・陰性の判定

高梨 啓和[†]

(受付 2004 年 4 月 1 日; 改訂 2004 年 6 月 23 日)

要 旨

代表的な変異原性試験である Ames 変異原性試験に着目し、水道水中に含まれている変異原性物質を対象としてサルモネラ菌 TA100 株を用いて試験した結果の統計的解析を行った。すなわち、Ames 変異原性試験結果が正規分布に従うと見なせることを確認した上で、2 標本間の差の検出力が強い 2 標本 t 検定を用い、2 人の実験者が行った合計 100 回の Ames 変異原性試験で得られた合計 10702 点の測定データに対して著者等が提案した方法を適用し、検出限界を求めた。その結果、世界的に広く利用されている経験則である 2 倍則と本研究で求めた検出限界とは一致せず、本研究で求めた検出限界の方が低かった。サンプルの試験結果とブランク試験の結果との比(MR 値という)を用いて検出限界値を表した場合、2 倍則では MR 値が 2 以上の時に陽性と判断しているが、本研究では有意水準 95% で MR 値が 1.7 以上で陽性と判断できた。また、ブランク試験に用いるプレートの枚数(標本数)を 2 枚増やすことにより、検出限界を MR 値で 1.4 にすることができ、Ames 変異原性試験を簡易に高感度化できることを明らかにした。

キーワード：2 標本 t 検定，変異原性試験，Ames 試験，TA100 株，環境サンプル。

1. はじめに

先進国各国で年間 1 万トン以上使用されている化学物質の種類は 7~10 万種類と言われている。これらの化学物質は、使用にあたって 1 種類ずつ安全管理が求められる。我が国においては、化学物質審査規制法、労働安全衛生法などで、化学物質が生産・使用される前(上市前)に変異原性などの毒性を有するか否かが評価され、毒性を有する物質の使用を規制することによって主な管理が行われている。また、環境基準、水道水質基準などにより、上市後の管理がなされる。以上の上市前後の管理において、法的に、あるいは自主管理を行う際に変異原性試験が用いられている。

変異原性とは、遺伝子に傷を付ける性質を指し、変異原性を有する化学物質は発がんや奇形の発生などを引き起こす可能性がある。このため、変異原性を有する化学物質は発がん試験などのより詳細な試験が求められる。すなわち、より多くの費用、時間などを必要とする発がん試験の前に簡易な変異原性試験を行い、発がん試験を行うべき化学物質をスクリーニングしている。このように、化学物質の安全管理において変異原性を測定することは重要である。したがって、多くの化学物質を含んでいる水道水サンプルなどの環境サンプルにおいても変異原性

[†] 鹿児島大学 工学部：〒890-0065 鹿児島市郡元 1-21-40; takanashi@be.kagoshima-u.ac.jp

を評価することは重要と考えられ、Takanashi et al. (2002) の報告の他多くの研究例が報告されている。

変異原性試験には多くの方法が用いられているが、最も代表的な試験が 1971 年に米国カリフォルニア州立大学の B. N. Ames 博士が開発した Ames 変異原性試験である。Ames 変異原性試験はサルモネラ菌を用いる方法が一般的であり、予め遺伝子操作したサルモネラ菌を用いて、そのサルモネラ菌が遺伝子操作前の状態に戻る(復帰突然変異を起こす)頻度に基づいてサンプルの変異原性を定性的・定量的に評価する方法である。

Ames 変異原性試験は、同様の他の試験と比較して再現性がよく結果の誤差範囲が小さいとされているが、 10^{-8} ~ 10^{-6} 程度の確率で起こる突然変異を評価するためにある一定の誤差範囲をもち、変異原性が弱い検体を試験するときなどには誤差範囲が問題になる。このため、統計的な解析手法を用いて結果が陽性と見なせるか否かを検定する方法を提案し、検出限界を求めた検討が Hamada et al. (1994) など数多く報告されている。それらの多くは、提案された方法で求めた検出限界と 2 倍則とを比較している。2 倍則とは、サンプルを試験した際の結果と同時に行ったブランク試験の結果の比(MR 値という)が 2 倍以上であった場合に陽性と判断する方法であり、日本を含めた世界各国で最も広く用いられている。従来の統計的解析方法は、2 倍則の妥当性を検討する際には有効であったが、通常業務として定期的に変異原性試験を行い、その試験結果の陽性・陰性を判断するためには煩雑すぎるといった欠点を有している。このため、毎試験ごとに検定するのではなく、MR 値で判断できる方法などの簡易な判断方法が開発されることが望まれる。そこで Takanashi and Urano (1998) は、MR 値で判断できる簡易な判断方法を提案して報告した。

本研究では、大学で 1 年間以上訓練された実験者 A, B がそれぞれ 70 回及び 30 回行った合計 100 回の Ames 変異原性試験で得られた合計 10702 点の測定データに対して著者等が提案した方法を適用し、検出限界を求めた。

2. Ames 変異原性試験の原理

Ames 変異原性試験には、予め人工的に突然変異させておいたサルモネラ菌を用いる。このサルモネラ菌は、細胞分裂に必要なアミノ酸であるヒスチジンの合成酵素遺伝子が突然変異しており、自力ではヒスチジンを合成できない。このため、ヒスチジンを含まない培地上では成長できず、細菌の集合体であるコロニーを形成することができない。このサルモネラ菌と変異原性物質とを接触させた後にヒスチジンを含まない寒天培地(プレートという)で培養することにより、復帰突然変異を起こしてヒスチジン合成能力を取り戻した菌のみが増殖してコロニー(復帰コロニーという)を形成する。変異原性物質と接触させる菌体数を一定に保つことにより、復帰コロニー数で復帰突然変異を起こした確率を評価できるため、復帰コロニー数を計数することにより、サンプルの変異原性強度を定量的に評価することができる。また、ヒスチジンの合成酵素遺伝子に与える変異の型が異なる菌株が開発されており、検出したい変異の型に合わせて菌株を選ぶことができるので、被検物質の変異の型を明らかにすることができる。変異の型として、DNA の塩基対の種類が入れ替わる塩基対置換型、DNA に余分な塩基対が挿入されたり欠損したりするフレームシフト型、DNA に架橋する架橋型が知られており、それぞれの型の変異を検出する菌株が開発されている。また、被検物質がサルモネラ菌の細胞膜を通過し易いように細胞外膜を欠損(*rfa* 変異)させたこと、DNA 修復遺伝子を欠損($\Delta urrB$)させたこと、薬剤耐性因子をもつプラスミド pKM101 (R-factor)を導入して被検物質の急性毒性でサルモネラ菌が死滅するのを最小限にしたことにより、変異原性の検出感度を著しく改善し、検出可能物質の範囲を広げた。TA92, TA100, TA1535 株は塩基対置換型の変異原性物質の検索

に, TA94, TA98, TA1537, TA1538 株はフレームシフト型の変異原性物質の検索に用いられる。これらのうち, TA92 株と TA94 株は, 架橋型の変異原性物質も同時に検出することができる。通常の場合, R-factor が導入された TA98 株と TA100 株を用いて試験を行い, 比較的まれな変異である DNA 架橋型の変異を検出する必要がある場合には TA92 株と TA94 株を用いて追加試験されることが松原(1992)などにより推奨されている。用いる菌株により, ブランク試験値(陰性対照値という)の値が 10~160 復帰コロニー plate^{-1} (以下, $\text{rev.} \cdot \text{plate}^{-1}$ と表記)と大きく異なるため, 検出限界値が異なると考えられる。

そこで本研究では, 環境サンプルの中でも水道水サンプルを対象としているので, 水道水などの塩素処理された水試料の変異原性試験に広く利用されている TA100 株を用いることとした。

3. Ames 変異原性試験

Ames 変異原性試験は, Fig. 1 に示す労働省のガイドブック(労働省化学物質調査課(1991))を基にしたプレインキュベーション法で行った。菌株は, 国立公衆衛生院から提供を受けた TA100 株を用いた。これを, Difco Laboratories 社のニュートリエントブロスを用いて 37°C で 9 ± 1 時間前培養し, 菌懸濁液を得た。菌懸濁液 $100 \mu\text{l}$ に, リン酸緩衝液 $500 \mu\text{l}$ とジメチルスルホキシド(DMSO)を溶媒とした検体液 $100 \mu\text{l}$ とを加えて 37°C で 20 分間プレインキュベーション(予備培養)した後に, ソフトアガー 2 ml を加えてよく混合し, Difco Laboratories 社の Bacto Agar を用いて予め作成しておいたプレート上に添加した。その際, 用量作用関係を確認するため, 検液の用量が 2 分の 1 及び 4 分の 1 になるように $50 \mu\text{l} \cdot \text{plate}^{-1}$, $25 \mu\text{l} \cdot \text{plate}^{-1}$ の検液と $50 \mu\text{l} \cdot \text{plate}^{-1}$, $75 \mu\text{l} \cdot \text{plate}^{-1}$ の DMSO を添加した試験も同時に行った。添加後, 37°C で 48 時間培養して復帰コロニーを形成させた。

すべての試験において, プレート上に植菌した菌体数, 菌体の活性, プレートの含水率, ヒスチジンおよびピオチンの濃度を一定に保った。同一の用量段階でそれぞれ 2 枚のプレートを用いたが, DMSO のみを用いた陰性対照試験は 4 枚のプレートを用いて行った。また, 陽性対照物質である 4-ニトロキノリン-1-オキシド(4NQO)の DMSO 溶液を用いた陽性対照試験を毎回行い, 菌体の活性を確認した。

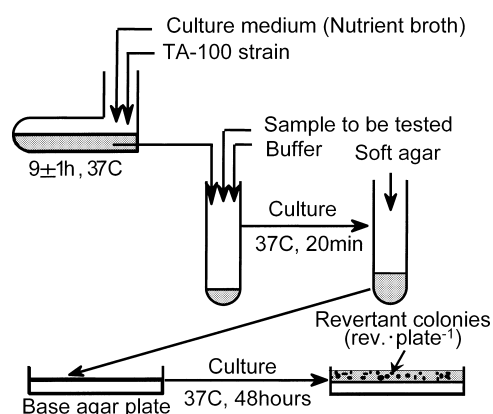


Fig. 1. Procedure for the Ames *Salmonella* mutagenicity assay.

4. 解析方法

解析に用いた方法を Fig. 2 に示す. 合計 l 回行った Ames 変異原性試験の結果について, まず, i 回目の Ames 変異原性試験における陰性対照値を, 陰性対照試験に用いた 2 または 4 プレートの復帰コロニー数の平均値 \bar{x}_{Si} ($i = 1, 2, 3, \dots, l$) として算出した. 次に, i 回目の Ames 変異原性試験において合計 m 回行った陰性対照試験以外の試験(検体試験)に用いた 2 プレートの復帰コロニー数の平均値 $\bar{x}_{Di,j}$ ($i = 1, 2, 3, \dots, l; j = 1, 2, 3, \dots, m$) を求めた. また, \bar{x}_{Si} と $\bar{x}_{Di,j}$ との組み合わせ(データセット)について, それぞれ MR 値 $MR_{i,j}$ ($i = 1, 2, 3, \dots, l; j = 1, 2, 3, \dots, m$) を式 (4.1) より求めた. なお, $MR_{i,j}$ が 0.95 以下の場合には陽性とは考えられないし, 2.05 より大きい場合には明らかに陽性と考えられるので, $MR_{i,j}$ が 0.95 より大きく 2.05 未満のデータセットについて解析した.

$$(4.1) \quad MR_{i,j} = \frac{\bar{x}_{Di,j}}{\bar{x}_{Si}}, \quad i = 1, 2, 3, \dots, l; \quad j = 1, 2, 3, \dots, m$$

\bar{x}_{Si} と $\bar{x}_{Di,j}$ との有意差を, 式 (4.2) に示した 2 標本 t 検定を用いて, 有意水準 0.05 で検定した. なお, Ames 変異原性試験で得られる値は離散変数であるが, 値が大きいために連続変数とし

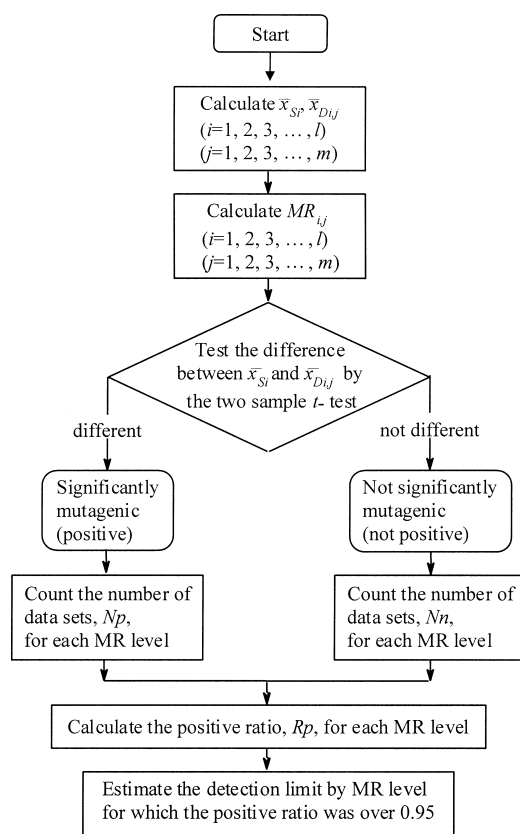


Fig. 2. Procedure for estimating detection limit.

Table 1. MR levels defined for estimating detection limit.

MR level	Range of $MR_{i,j}$
1.0	$0.95 \leq MR_{i,j} < 1.05$
1.1	$1.05 \leq MR_{i,j} < 1.15$
1.2	$1.15 \leq MR_{i,j} < 1.25$
1.3	$1.25 \leq MR_{i,j} < 1.35$
1.4	$1.35 \leq MR_{i,j} < 1.45$
1.5	$1.45 \leq MR_{i,j} < 1.55$
1.6	$1.55 \leq MR_{i,j} < 1.65$
1.7	$1.65 \leq MR_{i,j} < 1.75$
1.8	$1.75 \leq MR_{i,j} < 1.85$
1.9	$1.85 \leq MR_{i,j} < 1.95$
2.0	$1.95 \leq MR_{i,j} < 2.05$

て扱っても大きな問題は生じないと考え、2 標本 t 検定を行った。

$$(4.2) \quad t_{i,j} = \frac{\bar{x}_{Di,j} - \bar{x}_{Si}}{\sqrt{\frac{s_{Si}^2(n_S - 1) + s_{Di,j}^2(n_D - 1)}{n_S + n_D - 2}} \sqrt{\frac{1}{n_S} + \frac{1}{n_D}}}, \quad i = 1, 2, 3, \dots, l; \quad j = 1, 2, 3, \dots, m$$

ここで、 t は統計量、 s_{Si}^2 は陰性対照 2 または 4 プレートの復帰コロニー数の標本分散、 $s_{Di,j}^2$ は検体試験に用いた 2 プレートの復帰コロニー数の標本分散、 n_S は陰性対照試験における繰り返し数(プレート数)、 n_D は検体試験における繰り返し数(プレート数)であり、自由度は $n_S + n_D - 2$ である。2 標本 t 検定を行う際は、検定される母集団の分散が等しくなければならないが、本研究では検定に用いるユニット数(\bar{x}_{Si} と $\bar{x}_{Di,j}$ を求めた合計プレート数)が 4 または 6 と非常に少ないので、たとえ s_{Si} と $s_{Di,j}$ の分散に多少の差があっても有意な差とは考えにくい。したがって、2 標本間の等分散性は保たれていると考えることができる。また、 $\bar{x}_{Di,j}$ が常に \bar{x}_{Si} 以上なので両側確率で検定する必要がなく、片側確率で検定することとした。検定により、 \bar{x}_{Si} と $\bar{x}_{Di,j}$ の間に有意水準 0.05 で有意差が認められた場合に、陽性と判断した。

検定した全てのデータセットを、 $MR_{i,j}$ の大きさにより、Table 1 のように設定した 0.1 間隔の MR レベルに分類した。MR レベルごとに、陽性と判断されたデータセット数 N_p と判断されなかったデータセット数 N_n とを求め、全データセット数 $N_p + N_n$ に対する陽性と判断されたデータセット数の割合(陽性率) R_p を式(4.3)により求める。 R_p が 0.95 以上になる MR 値を検出限界とした。

$$(4.3) \quad R_p = \frac{N_p}{N_p + N_n}$$

5. 結果及び考察

5.1 データの信頼性と分布型

解析に用いた Ames 変異原性試験結果は、大学で 1 年間以上訓練された実験者 A, B が 5 年間に行った試験結果である。実験者 A は 70 回、B は 30 回 Ames 変異原性試験を行い、それぞれ 7526 枚のプレートをを用いた試験結果、3176 枚のプレートをを用いた試験結果を得た。得られた試験結果は、すべて解析に用いた。実験者 A が同一の検体について 45 枚のプレートをを用いて行った試験結果の分散と、同様にして Hamada et al. (1994) が 50 枚のプレートをを用いて行った試験結果の分散とを比較して Table 2 に示す。両者の分散に大きな差はなく、他の研究機関

Table 2. Reproducibility of the Ames assay results by the student A and a reference.

Student	Mean [rev. · plate ⁻¹]	Variance [rev. · plate ⁻¹]	Number of recurrence [plate]
Student A ^{a)}	127	117	45
Hamada et al. ^{b)}	141	128	50

a) The present study

b) Hamada et al., 1994

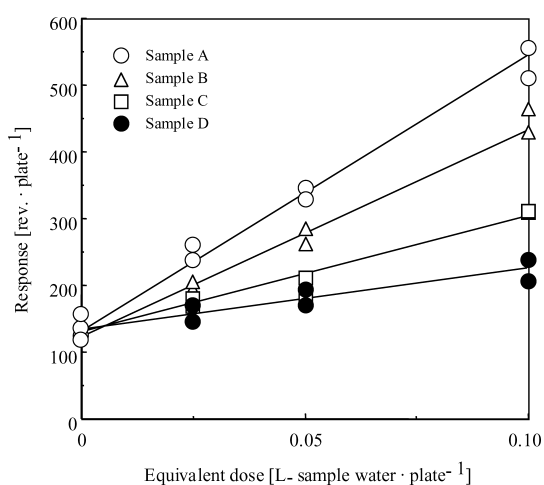


Fig. 3. Examples of dose-response line.

Table 3. Fitness of the Ames assay results for the normal distribution.

Mean revertant colonies [rev. · plate ⁻¹]	χ^2	Number of recurrence [plate]
127	3.59	45
347	4.56	47
591	3.59	47

Contingency number is 5 and χ_{α}^2 is 5.99.

と同等の再現性が得られる試験が行われていることが確認された。

実験者 A は合計 37 回 ($l = 37$)、実験者 B は合計 23 回 ($l = 23$) の Ames 変異原性試験を行い、得られた結果をすべて解析に用いた。すべての試験を通して、陰性対照値は 121 から 152 rev. · plate⁻¹、比活性は 9,200 から 11,000 net rev. · (ug-4NQO)⁻¹ の範囲であり、菌体の活性は安定していた。得られた用量作用直線は、Fig. 3 に例を示すようにすべて直線性が良く、回帰直線の勾配から変異原性を算出するのに問題はなかった。以上のことから、本研究で用いた試験結果は十分な信頼性を有すると考えられる。

次に、同一の検体を Ames 変異原性試験により試験した結果の分布型を検討するために、45

枚または 47 枚のプレートを用いて実験者 A が三種類の検体の試験を行い、3 つの母集団を得た。得られた母集団の復帰コロニー数の平均値は、それぞれ 127, 347, 591 rev. · plate⁻¹ であった。それぞれの母集団の分布型を正規分布と見なせるか否かを、 χ^2 検定を用いて有意水準 0.05 で検定して検討した。その結果、Table 3 に示すようにすべての母集団において $\chi^2 < \chi^2_\alpha$ であり、正規分布と見なせないことが否定された。このため、母集団が正規分布に従うことを仮定した 2 標本 t 検定による解析が可能であることが明らかになった。

Ames 変異原性試験で同一の検体を試験した結果の分布型は、二項分布に従うという Margolin et al. (1981) の報告や Weinstein and Lewinson (1978), Stead et al. (1981) などのようにポアソン分布に従うという報告、ポアソン分布に従わないという Snee and Irr (1984), Bogen (1994), Chu et al. (1981), Bernstein et al. (1982), Barry et al. (1981) の報告などがあり、結論に至っていない。Ames 変異原性試験は、プレート上に植菌された約 10^8 個の菌体のうちの 5×10^0 から 5×10^2 個程度の菌体のみを突然変異させる試験であり、このように確率が非常に低い事象の典型的な分布型であるポアソン分布を Ames 変異原性試験結果の分布型として仮定するのは妥当である。しかし、ポアソン分布は母集団の平均値が大きくなると正規分布とほぼ同型になるので、本研究の TA100 株を用いた結果のように、通常の陰性対照値が 100 rev. · plate⁻¹ 以上の場合には、より解析が容易な正規分布として取り扱うことができると考えられる。

5.2 陰性対照試験に 2 枚のプレートを用いた場合の検出限界

陰性対照試験に 2 枚のプレートを用いた場合の検出限界を実験者 A の試験結果を用いて検討した。陰性対照試験は 4 枚のプレートを用いて行ったが、4 枚の結果から 2 枚分の結果のみを無作為に抽出して解析に用いた。実験者 A の試験結果のうち、 $MR_{i,j}$ が 0.95 から 2.05 の範囲内のデータセットは 3733 セットであり、そのすべてを解析に用いた。

N_p, N_n および両者の合計数 $N_p + N_n$ を求め、MR レベルごとに Table 4 及び Fig. 4 に示す。各 MR レベルで 209 から 447 個のデータセットがあり、十分に正確な R_p を求められると考えられる。MR レベルが同じでも陽性と判断されたデータセットと判断されなかったデータセットがあった。MR レベルが 1.4 以下では、MR レベルが大きくなるにつれて N_n が減少し N_p が増加したが、MR レベルが 1.5 以上では $N_p + N_n$ が大きく減少したために N_p も減少した。そこで、MR レベルごとに R_p を算出し、Fig. 5 に示す。MR レベルが 1.6 では 94.9% の

Table 4. Number of data set toward the MR level (experimenter: A, negative control set: duplicate plates).

Positive	Negative	Total	Positive ratio	MR level
3	365	368	0.8	1.0
63	330	393	16	1.1
180	261	441	40.8	1.2
283	164	447	63.3	1.3
295	55	350	84	1.4
229	28	257	89	1.5
298	16	314	95	1.6
368	6	374	98	1.7
318	2	320	99	1.8
208	1	209	100	1.9
259	1	260	100	2.0

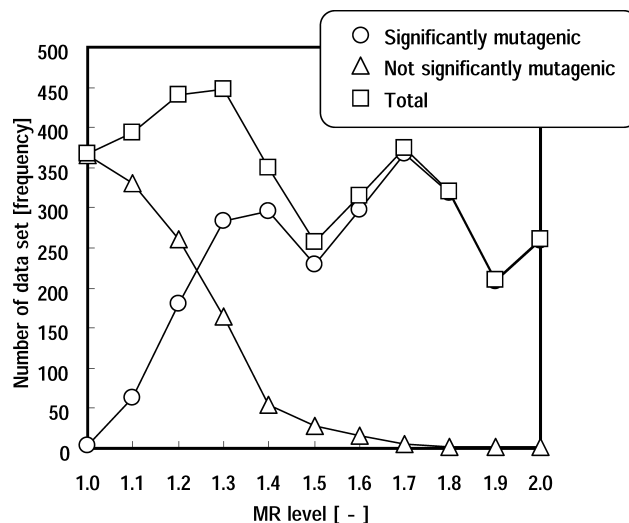


Fig. 4. Behavior of the number of data set toward the MR level (experimenter: A, negative control test: duplicate plates).

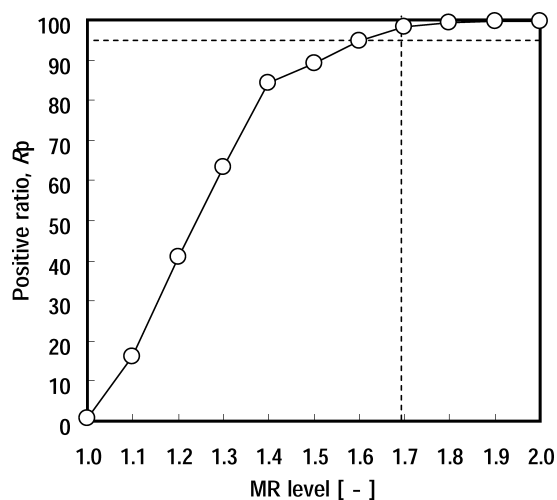


Fig. 5. Determination of detection limit by positive ratio (experimenter: A, negative control test: duplicate plates).

データセットが陽性と判断され, MR レベルが 1.7 以上では 95%以上のデータセットが陽性と判断された. このため, 陰性対照試験に 2 枚のプレートを用い, TA100 株を用いて行った実験者 A の試験結果に対しては, 検出限界を MR 値で 1.7 と判断できた.

前述のように, Ames 変異原性試験の検出限界を MR 値で 2 とする 2 倍則が広く用いられているが, TA100 株を用いた試験結果に対して 2 倍則を適用すると, 陽性の結果を陰性と判断する確率が高いとの Hamada et al. (1994) および Snee and Irr (1984) の報告がある. 本研究でも,

陰性対照試験に 2 枚のプレートを用いた場合の検出限界について、同様の結論が得られた。ただし TA98 株等の陰性対照値の小さい菌株を用いた試験結果に対しては、検出限界は 1.7 より大きくなると考えられる。

5.3 陰性対照試験に用いるプレート数を 4 枚にすることの効果

陰性対照試験に 4 枚のプレートを用いた場合の検出限界を実験者 A の試験結果を用いて同様に検討した。実験者 A の試験結果のうち、 $MR_{i,j}$ が 0.95 から 2.05 の範囲内のデータセットは 3763 セットであり、そのすべてを解析に用いた。

N_p , N_n および $N_p + N_n$ を求め、MR レベルごとに Table 5 および Fig. 6 に示す。各 MR レベルで 238 から 425 個のデータセットがあり、十分に正確な R_p を求められると考えられる。陰性対照試験に 2 枚のプレートを用いた場合と同様に、MR レベルが大きくなるにつれて N_n が減少し、 N_p が増加したが、2 枚のプレートを用いた場合と比較して明らかに急激に N_n が減少し、 N_p が増加した。MR レベルごとに R_p を算出して Fig. 7 に示したところ、MR レベルが 1.3 では 93% のデータセットが陽性と判断され、1.4 以上では 95% 以上のデータセットが陽性と判断された。このため、陰性対照試験に 4 枚のプレートを用い、TA100 株を用いて行った実験者 A の試験結果に対しては、検出限界を MR 値で 1.4 と判断できた。陰性対照試験に 2 枚のプレートを用いた場合と比較して検出限界が 0.82 倍になったことから、陰性対照試験に用いるプレート数を 2 枚から 4 枚に増やすことは Ames 変異原性試験を高感度化するのに有効であり、非常に簡易で優れた方法であることが明らかになった。検出限界が低くなったのは、母集団の平均値と分散を算出するためのユニット数(プレートの枚数)が増えたために、差の検出力が強くなったためと考えられる。検出限界が MR 値で 1.4 であれば十分に低く、陰性対照試験に用いるプレート数をさらに増やす必要はないと判断した。ただし、TA98 株等の陰性対照値の小さい菌株を用いる試験で、検出限界を TA100 株のそれと同程度に低くするためには、陰性対照試験に用いるプレート数をさらに増やす必要があると考えられる。

5.4 検出限界の個人差

実験者 B の試験結果を用いて、陰性対照試験に 4 枚のプレートを用いた場合の検出限界を同様に求めた。実験者 B の試験結果のうち、 $MR_{i,j}$ が 0.95 から 2.05 の範囲内のデータセ

Table 5. Number of data set toward the MR level (experimenter: A, negative control set: quadruple plates).

Positive	Negative	Total	Positive ratio	MR level
2	346	348	0.6	1.00
80	298	378	21	1.10
315	110	425	74.1	1.20
389	29	418	93	1.30
351	1	352	100	1.40
248	0	248	100	1.50
327	0	327	100	1.60
397	0	397	100	1.70
345	0	345	100	1.80
237	0	237	100	1.90
288	0	288	100	2.00

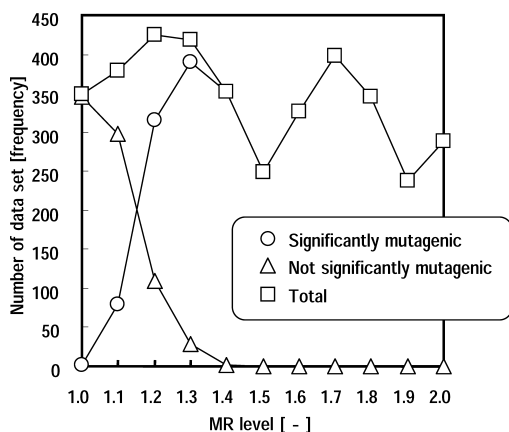


Fig. 6. Behavior of the number of data set toward the MR level (experimenter: A, negative control test: quadruple plates).

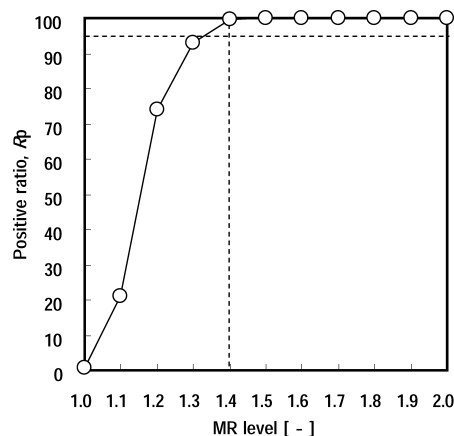


Fig. 7. Determination of detection limit by positive ratio (experimenter: A, negative control test: quadruple plates).

Table 6. Number of data set toward the MR level (experimenter: B, negative control set: quadruple plates).

Positive	Negative	Total	Positive ratio	MR level
0	145	145	0	1.0
36	133	169	21	1.1
96	58	154	62	1.2
153	18	171	89	1.3
167	2	169	99	1.4
120	0	120	100	1.5
136	0	136	100	1.6
128	0	128	100	1.7
133	0	133	100	1.8
120	0	120	100	1.9
143	0	143	100	2.0

トは 1588 セットであり、そのすべてを解析に用いた。

N_p , N_n および $N_p + N_n$ を求め、MR レベルごとに Table 6 および Fig. 8 に示す。各 MR レベルで 120 から 171 個のデータセットがあり、十分に正確な R_p を求められると考えられる。MR レベルごとに R_p を算出して Fig. 9 に示したところ、MR レベルが 1.4 以上では 95% 以上のデータセットが陽性と判断され、実験者 A の試験結果の場合と同じ検出限界が得られた。これは、実験者 A と B の熟練度に差がないことを示していると考えられる。両者の間で検出限界の個人差が無視できたことから、Table 2 に示した分散と同程度の分散となる試験結果が得られる実験者の検出限界には個人差がほとんどなく、本研究で例を示した検出限界と同程度になると考えられる。ただし、正確な検出限界は実験者ごとに求める必要がある。また、実験者の熟練度が同じであっても、陰性対照値が 121 から 152 rev. · plate⁻¹ の範囲から大きく逸脱し

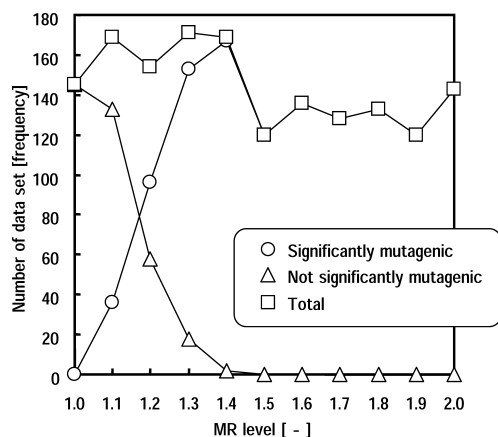


Fig. 8. Behavior of the number of data set toward the MR level (experimenter: B, negative control test: quadruple plates).

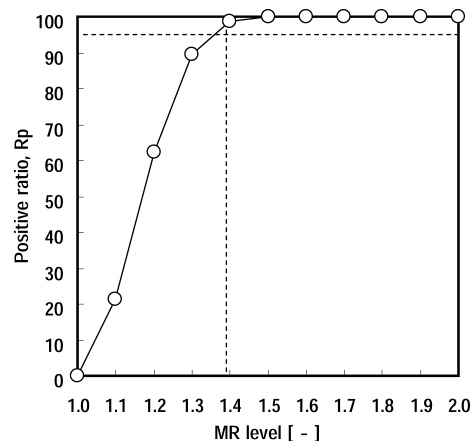


Fig. 9. Determination of detection limit by positive ratio (experimenter: B, negative control test: quadruple plates).

ている場合には、検出限界も異なると思われる。

6. まとめ

本研究では、大学で1年間以上訓練された実験者A、Bがそれぞれ70回及び30回のAmes変異原性試験を行い、それぞれ7526枚及び3176枚のプレートを用いて得た試験結果に対して著者等が提案した方法を適用し、検出限界を求めた。その結果、陰性対照試験に2枚のプレートを用い、TA100株を用いて行った試験結果に対しては、検出限界をMR値で1.7と判断できた。一方、陰性対照試験に4枚のプレートを用い、TA100株を用いて行った実験者Aの試験結果に対しては、検出限界をMR値で1.4と判断できた。陰性対照試験に2枚のプレートを用いた場合と比較して検出限界が0.82倍になったことから、陰性対照試験に用いるプレートの数を2枚から4枚に増やすことはAmes変異原性試験を高感度化するのに有効であり、非常に簡易で優れた方法であることが明らかになった。正確な検出限界は実験者ごとに求める必要があるが、Table 2に示した分散と同程度の分散となる試験結果が得られる実験者の検出限界は本研究で例を示した検出限界と同程度になると考えられる。

記号	単位
MR : MR 値	—
n : プレートの枚数	[plate]
Nn : 陽性と判断されなかったデータセット数	[data set]
Np : 陽性と判断されたデータセット数	[data set]
Rp : 陽性率	—
s : 母標準偏差	[rev. · plate ⁻¹]
t : 統計量	—
\bar{x} : プレートあたりの復帰コロニー数の平均値	[rev. · plate ⁻¹]

添字

- D : 検体試験
 i : i 番目の Ames 変異原性試験
 j : j 組目の検体試験
 S : 陰性対照試験

参 考 文 献

- Barry, H. M., Kaplan, N. and Zeiger, E. (1981). Statistical analysis of the Ames *Salmonella*/microsome test, *Proceeding of National Academic Science USA*, **78**(6), 3779–3787.
- Bernstein, L., Kaldor, J. and Pike, M. (1982). An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test, *Mutation Research*, **97**, 267–281.
- Bogen, K. T. (1994). Applicability of alternative model of revertant variance to Ames-test data for 121 mutagenic carcinogens, *Mutation Research*, **322**(4), 265–273.
- Chu, K. C., Patel, K. M., Lin, A. H., Tarone, R. E., Linhart, M. S. and Dunkel, V. C. (1981). Evaluating statistical analyses and reproducibility of microbial mutagenicity assays, *Mutation Research*, **85**, 119–132.
- Hamada, C., Wada, T. and Sakamoto, Y. (1994). Statistical characterization of negative control data in the Ames *Salmonella*/microsome test, *Environmental Health Perspectives Supplements*, **102**, 115–119.
- Margolin, B. H., Kaplan, N. and Zeiger, E. (1981). Statistical analysis of the Ames *Salmonella*/microsome test, *Proceeding of National Academic Science USA*, **78**(6), 3779–3783.
- 松原 聡 (1992) 『がんの生物学』, 裳華房, 東京.
- 労働省化学物質調査課 (1991). 『安衛法における変異原性試験』, 中央労働災害防止協会, 東京.
- Snee, R. D. and Irr, J. D. (1984). A procedure for the statistical evaluation of Ames *Salmonella* assay results comparison of results among 4 laboratories, *Mutation Research*, **128**, 115–125.
- Stead, A. G., Hasselblad, V., Creason, J. P. and Claxton, L. (1981). Modeling the Ames test, *Mutation Research*, **85**, 13–27.
- Takanashi, H. and Urano, K. (1998). Statistical procedures for estimating the detection limit and determination limit of the Ames *Salmonella* mutagenicity assay, *The Science of the Total Environment*, **221**, 31–42.
- Takanashi, H., Mayumi, M., Kato, M., Hirata, M. and Hano, T. (2002). Removal of mutagen precursor from wastewater by activated sludge and oxidation treatment, *Water Science and Technology*, **46**(11–12), 389–394.
- Weinstein, D. and Lewinson, T. M. (1978). A statistical treatment of the Ames mutagenicity assay, *Mutation Research*, **51**, 433–434.

A Procedure for Statistical Evaluation of Ames *Salmonella* Mutagenicity Assay Results Based on Two Sample *t*-test

Hirokazu Takanashi

Department of Bioengineering, Kagoshima University

The detection limit for the Ames *Salmonella* mutagenicity assay, which is very widely used all over the world to evaluate the genotoxicity of environmental samples, was determined in the present study. *Salmonella typhimurium* TA100 strain was used and exogenous activation S9 was not used in the study, because these test conditions are sensitive to detection of mutagen in chlorinated water samples. To determine the detection limit, 100 accumulated results from the assay conducted by two experimenters A and B were taken as examples. The total number of base-agar plates used in the assay was up to 10,702. The distribution function was considered to be a normal distribution by the chi-squared test, so that the two sample *t*-test was employed to determine it. The mean and variance of the negative control test conducted by using 45 base-agar plates (45 recurrences) were 127 rev. plate⁻¹ and 117 rev. plate⁻¹, respectively. The detection limit was determined at 1.7 as the MR value (the number of revertant colonies in the sample test divided by those in the negative control test) at a level of significance of 0.05 when duplicate plates were used in the negative control test. However, it decreased to 1.4 as MR level when quadruple plates were used in the negative control test. Therefore, it was found that the sensitivity of the Ames *Salmonella* mutagenicity assay was improved very easily by increasing the number of plates in the negative control test from two to four. The application of the conventional two-fold rule to the data obtained with the strain TA100 was considered too conservative. It was proved by comparing the data of the two students that the detection limit determined in the present study was acceptable to well trained students. However, the accurate detection limit should be determined for each experimenter.