フローインジェクション-蛍光検出法による umu テスト法の検討

町井研士¹⁾, 矢萩則夫¹⁾, 後藤純雄¹⁾, 遠藤 治¹⁾, 峯本 茂²⁾
田辺 潔³⁾, 深井文雄⁴⁾, 片山 敬³⁾, 松下秀鶴⁵⁾

¹⁾国立公衆衛生院

(〒108 東京都港区白金台4-6-1)

²⁾東京理科大学理工学部

(〒278 千葉県野田市山崎2641)

³⁾国立環境研究所

(〒305 茨城県つくば市小野川16-2)

⁴⁾東京理科大学薬学部

(〒162 東京都新宿区船河原町12)

⁵⁾静岡県立大学大学院

(〒422 静岡県静岡市谷田52-1)

[平成7年10月11日受理]

A Study of the umu-test by a Flow-injection Fluorometric Method

Kenji MACHII¹⁾, Norio YAHAGI¹⁾, Sumio GOTO¹⁾, Osamu ENDO¹⁾,
Shigeru MINEKI²⁾, Kiyoshi TANABE³⁾, Fumio FUKAI⁴⁾, Takashi KATAYAMA⁴⁾,
and Hidetsuru MATSUSHITA⁵⁾

¹⁾National Institute of Public Health

(4-6-1, Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108)

²⁾Faculty of Science and Technology, Science University of Tokyo

(2641 Yamasaki, Noda, Chiba 278)

³⁾National Institute for Environmental Studies

(16-2, Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305)

⁴⁾Faculty of Pharmaceutical Science, Science University of Tokyo

(12 Funakawara-machi, Ichigaya, Shinjuku-ku, Tokyo 162)

⁵⁾University of Shizuoka

(52-1, Yada, Shizuoka, Shizuoka 422)

[Received October 11, 1995]

Summary

In order to develop sensitive and automatic determination method of the β -galactosidase activity in umu-test, a flow-injection fluorometric system has been applied. In this system, β -galactosidase induced by umu-test in the *Salmonella typhimurium* strain TA1535/pSK1002 was reacted with 4-methylumbelliferyl- β -D-galactopyranoside (4MUG) as a substrate. The activity was measured as the fluorescence intensity of 4-methylumbelliferon which was the reaction product. Detectability of this method was confirmed by measurement of the dose response rela-

tionship using typical 4 mutagens: 4-nitroquinoline-N-oxide (4NQO), benzo (a) pyrene (BaP), 2-aminoanthracene (2AA) and 2-[2-furyl]-3-[5-nitro-2-furyl] acrylamide (AF2).

Key words: flow-injection method, fluorometric detection, mutagenicity, umu-test

1. はじめに

我々を取り巻く環境中には多種多様な化学物質が存在し、それらの中には変異原性や発がん性を示す物質が微量ずつ含まれている。環境中の変異原性物質の存在実態は、Ames法¹⁾やその変法^{2),3)}などにより徐々に明らかとなりつつあるが、試験に要する時間や感度上の制約などから未だ不明な点が数多く残されている。近年開発された変異原性物質の短期検索法の一つにumuテスト^{4),5)}がある。この方法はAmes法などの様な突然変異の検出法とは異なり、DNA損傷によって誘導されるSOS反応を利用した方法で、試験に要する時間が数時間と短い点に特徴がある。このテストは、バクテリア細胞内でDNA損傷性物質の作用により誘導生産される酵素： β -ガラクトシダーゼ量から変異原性(～DNA損傷性)を見積る方法であり、通常、 β -ガラクトシダーゼの酵素反応生成物の吸光度を測定して酵素活性を求め、その値から β -ガラクトシダーゼ量を算出している。このため比較的多量の試料を要し、必ずしも高感度であるとは言いがたい点がある。現在まで、我々は、このumuテストを取り上げ、酵素反応生成物の検出法の高感度化のため、蛍光⁶⁾や化学発光(投稿準備中)を指標とする β -ガラクトシダーゼ活性測定法などについて検討してきた。

今回は、変異原性試験法の高感度化及び簡易化に関する研究の一環として、フローインジェクション法を蛍光検出によるumuテストと組合わせて検討したので報告する。

2. 実験方法

2.1 試薬

菌株の培養には、Bacto-Tryptone(Difco Labo.製;1%), Yeast Extract(Difco Labo.製;0.5%)及び試薬特級KCl(和光純薬工業製;0.5%)で調製したLuria-Bertani(LB)培地を用いた。

リン酸緩衝液(0.1M, pH7.0)は、試薬特級 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (国産化学製)と $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (国産化学製)を用いて調製した。

Z緩衝液は、上記 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, KClと特級 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (国産化学製)及び β -Mercaptoethanol(東京化成工業製)を用いて調製した。

標準酵素品には、Sigma Chemical社製の β -ガラクト

シダーゼ(EC 3.21.23;大腸菌由来)を用いた。

菌体内で生産された β -ガラクトシダーゼの基質には、Sigma Chemical社製の4-Methylumbelliferyl- β -D-galactopyranoside(4MUG)を用いた。

変異原性物質には、半井化学薬品社製の4-Nitroquinoline-N-oxide(4NQO)及びBenzo(a)pyrene(BaP), Koch-Light Laboratories社製の2-Aminoanthracene(2AA)を用いた。

なお、2-[2-furyl]-3-[5-nitro-2-furyl]acrylamide(AF2)は東京大学医科学研究所・松島教授より恵与されたものを用いた。

代謝活性化酵素系S9mixは、PCB(KC-500)で酵素誘導したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から得られたS9と市販の補酵素類混合物(Cofactor-I;オリエンタル酵母社製)を用いて調製した。

2.2 umu試験

試験菌株には、*Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002株⁴⁾を用いた。umu試験は原則として小田らの方法^{4),5)}に準拠した。即ちLB培地で37℃で16時間振盪培養し、OD₆₀₀が0.1になるようにLB培地で希釈した試験菌懸濁液を用いた。菌株と被験試料との反応はバッチ式で行い、 β -ガラクトシダーゼ活性測定にはフローインジェクション法を用いた。

2.3 装置類

フローインジェクション用の送液ポンプには、高速液体クロマトグラフィー用ポンプ(Shimadzu LC-3A)を用いた。 β -ガラクトシダーゼによる反応生成物である4-Methylumbelliferon(4MU)の蛍光測定には、フローセル付き蛍光光度計(Shimadzu RF-500LC)を用いた。

3. 結果及び考察

3.1 フローインジェクション法による標準 β -ガラクトシダーゼの活性測定

umuテストの基本操作は、(1)菌株の培養、(2)菌株と変異原性物質の反応、(3)細胞膜破壊、(4)酵素反応、(5)酵素反応生成物の検出の5つのステップによって実施される。今回は、後半の(4)酵素反応と(5)酵素反応生成物の検出の操作へのフローインジェクション法の適用について、まず大腸菌由来の標準 β -ガラクトシダーゼ(1.389 $\mu\text{g}/\text{mlPBS}$)を用いて検討した。

今回の検討に用いたフローインジェクション反応用の装置の構成図をFig.1に示した。4MUG 溶液 (0.01mM in PBS) を基質とした場合に得られた酵素反応生成物 (4MU) の蛍光強度をレコーダーのピーク高さと表し、Table 1 に示した。Table 1 から、標準 β -ガラクトシダーゼ注入量が増加すると蛍光強度が直線的に増加し酵素反応生成物量が増加していること、基質の送液速度を早くすると蛍光強度が減少し酵素反応生成物量が減少することが認められた。この結果から、0.3unit までの β -ガラクトシダーゼの活性が測定可能であること、酵素及び基質の流路であるテフロンチューブ (10m, 1mm ϕ) 内で酵素反応が進行すること、従って流路の正確な温度コントロール及び一定流速の維持が再現性のあるデータを得るのに重要であることが明かとなった。

3. 2 実試料への適用

作成したフローインジェクション反応用の装置を代表

的変異原性物質である4NQOと菌株との反応生成物に適用した。1mlの菌懸濁液 ($OD_{600} \approx 0.3$) 中に2, 1, 0.5及び0.25 μ gの4NQOのDMSO溶液5 μ lを添加して反応させた後、これに細胞膜破壊処理用の溶液として1.8mlの0.1M PBS, 0.1mlのSDS溶液及び0.1mlのCHCl₃を順次加えて細胞膜破壊処理をし、得られた溶液から5 μ lを抜き取りインジェクター部から装置に注入した。また、フローインジェクション反応チューブ内で酵素反応が進行しているかどうかを確認するため、加熱処理 (100 $^{\circ}$ C, 5 min) して酵素を失活させた細胞膜破壊処理溶液についても上記と同様に5 μ lを注入して検討した。得られた結果をFig.2に示した。なお、この測定における送液流速は0.2ml/minとした。

Fig.2から、加熱処理を施さなかった溶液5 μ lを注入した場合、4NQOの添加量が多くなるほど蛍光強度が高くなり、良好な濃度依存性の反応曲線が得られ、ことに1 μ g/tube 以下で直線性が示されること、加熱処理を施

Fig. 1 Schematic diagram of the flow-injection fluorometric system for automatic measurement of β -galactosidase activity.

Table 1 Activity measurement of the β -galactosidase by the flow injection-fluorescence system

flow rate (ml/min)	injection volume (μ l)	activity* ($\times 10^{-3}$ unit)	fluorescence intensity (peak height; mm**)(avg)		
0.4	5	2.615	11.4,	11.3,	11.2 (11.3)
0.4	3	1.569	6.8,	6.7,	7.2 (6.9)
0.4	1	0.523	2.4,	2.4,	2.3 (2.3)
0.3	5	2.615	16.2,	16.5,	16.3 (16.3)
0.3	3	1.569	9.5,	9.5,	9.6 (9.5)
0.3	1	0.523	3.8,	3.2,	3.2 (3.4)
0.2	5	2.615	5.9,	5.9,	6.2 (6.0)
0.2	3	1.569	3.5,	3.8,	3.5 (3.6)
0.2	1	0.523	1.1,	1.2,	1.1 (1.1)

* β -galactosidase activity was measured by using o-Nitrophenyl- β -galactopyranoside as substrate.

** recorder range: 50mV

した溶液5 μ lを注入した場合には4NQOの添加量が多くなっても蛍光強度は変わらないことが明かとなった。この結果から、実試料を用いた場合にもこの装置が適用し得ると考えられた。

次いで、作成した手法の適用性についてS9mixの処理で変異原性を示す promutagen について検討した。即ち、S9mix 処理系では2AA 及び BaP の2種、S9mix 無処理系ではAF2を用いて3.1と同様の操作を実施した。その結

Fig. 2 Fluorescence intensities of enzymatic reaction products by the flow-injection system.

injection volume: 5 μ l
flow rate: 0.2 ml/min
recorder range: 20mV
heating: 5min, 100°C

果Fig.3に示したとおり、S9mix 処理した場合に2AA 及び BaP は良好な濃度依存性の変異原活性が認められること、またS9mix 無処理の場合のAF2も良好な濃度依存性の変異原活性が認められることが明かとなった。

今回、umu テストにおいてフローインジェクション反応用の装置が応用できることを明らかにしたが、Fig.2又はFig.3のコントロール値（変異原性物質を添加しなかった場合の蛍光強度）が、使用した培地そのものの蛍光で比較的高くなることも認められた。従って、本手法を改良するためには無蛍光の合成培地で生育するような菌株の作成などが必要である。また、今後、細胞膜破壊操作の簡略化などを行うと共に、多くの種類の物質や環境試料に本手法を適用し評価していく必要がある。

謝 辞

本研究の費用の一部は環境庁国立研究機関公害防止等試験研究費及び（財）喫煙科学研究財団の助成金によってまかなわれた。関係各位に深謝の意を表します。

要 約

umu テストの簡易化に関する研究の一環としてフローインジェクションを利用する手法を検討した。*Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002株を用いたumu テストにおける変異原性測定指標である β -galactosidase の活性を測定するために、フローインジェクション反応蛍光検出装置を作成した。この装置で、酵素反応基質の4-Methylumbelliferyl- β -D-galactopyranoside 溶液を送液し、これにumu テストで生成した β -galactosidase を注入して、両者をテフロンチューブ内で酵素反応させ、その酵素反応生成物である4-Methylumbelliferon の蛍光を測定できることが確認された。本手法は、代謝活性化酵

Fig. 3 Dose-response relationships for 4 typical mutagens by the flow-injection fluorometric system.
mutagen: 4-nitroquinoline-N-oxide (4NQO), benzo(a)pyrene (BaP), 2-aminoanthracene (2AA)
2-[2-furyl]-3-[5-nitro-2-furyl] acrylamide (AF2)
sample: 1ml (bacterial soln. + mutagen $\pm$ S9mix)

素系S9mix添加系及び無添加系の変異原性物質にも有効であることが認められた。

文 献

- 1) Ames, B.N., McCann, J., Yamasaki, E.: Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.*, **31**, 347-364 (1975)
- 2) Yahagi, T., Nagao, M., Seino, Y., Matsushima, T., Sugimura, T., Okada, M.: Mutagenicities of N-nitrosamines on *Salmonella*. *Mutat. Res.*, **48**, 121-130 (1977)
- 3) Kado, N.Y., Langley, D., Eisenstadt E.: A simple modification of the *Salmonella* liquidincubation assay; Increased sensitivity for detecting mutagens in human urine. *Mutat. Res.*, **121**, 25-32 (1983)
- 4) 小田美光, 中村清一, 沖岩四郎, 中田葛男, 品川日出夫: umu-lac融合遺伝子を利用した環境変異原の短期検索法(umu-テスト)について, 環境変異研究, **6** 87-92 (1984)
- 5) Oda, Y., Nakamura, S., Oki, I., Kato, Sinagawa, H.: Evaluation of the new system (umu-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. *Mutat. Res.*, **147**, 219-229 (1985)
- 6) 後藤純雄, 加藤幸彦, 遠藤 治, 山内恒幸, 松下秀鶴: 蛍光検出法を用いるumu試験法の高感度化-マイクロumu試験-, 大気汚染学会誌, **23**, 92-96 (1988)