umu テストによる尿の SOS 反応抑制作用の検討

— 日内及び日間変動について —

山 本 信 弘^{*1}, 杉 浦 渉^{*2}, 小 坂 博^{*3}
中 村 清 一^{*3}

^{*1}大阪教育大学・養護教室

^{*2}大阪府立公衆衛生研究所・公衆衛生部

^{*3}大阪府立公衆衛生研究所・労働衛生部

The SOS-inhibition activity of human urine investigated by umu-test —diurnal and daily changes of SOS-inhibition activity of urine—

Nobuhiro YAMAMOTO^{*1}, Wataru SUGIURA^{*2}, Hiroshi KOSAKA^{*3}
and Sei-ichi NAKAMURA^{*3}

^{*1}*Department of School Nurse, Osaka Kyoiku University*

^{*2}*Department of Public Health, Osaka Prefectural Institute of Public Health, Osaka*

^{*3}*Department of Industrial Health, Osaka Prefectural Institute of Public Health, Osaka*

Abstract We found that human urine suppressed SOS-responses induced by furylfuramide (AF-2), as detected by the umu test using *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002. In the present report, we studied the time stability of the SOS-inhibition activity in urine. The diurnal and daily changes of SOS-inhibition in the urine were also observed.

Results obtained were as follows;

- 1) SOS-inhibition activity of the urine remained stable more than one month after the urine was frozen.
- 2) Individual variation was observed in the SOS-inhibition activity of the urine.
- 3) Total SOS-inhibition activity of per a day showed relatively small variation during experimental days.
- 4) The SOS-inhibition activity of urine was higher early in the morning than in the daytime. The activity fell gradually with time in the daytime and showed the lowest value in the evening. Then, it rose again at night. Therefore, it is necessary to collect urine at specific times to avoid the differences caused by diurnal changes in SOS-inhibition activity.

Key Words: urine (尿), umu test (umu テスト), diurnal changes (日内変動), daily changes (日間変動), SOS-inhibition activity (SOS 反応抑制作用), anti-mutagenicity (抗変異原性)

緒 言

尿の生成と排泄は一生を通じて営まれる重要な生体の調節機能の一つである。尿に溶解している成分のほとん

どは身体から排泄される老廃物であるが、いくつかの成分はそのときの体調に応じて変化する。従って、尿は身体状況や疾病に関する情報を示しており、その組成の変化から、症状の明らかでないような早期の疾病も発見す

Reprint requests to: Sei-ichi Nakamura. Osaka Prefectural Institute of Public Health, 1-3-69, nakamichi, higashinari-ku, Osaka(537), Japan

ることができる。

我々は、ここ数年、変異原の作用を修飾する成分の検索を行っていたが、人の尿に抗変異原作用を予想させるSOS反応抑制作用のあることを見いだした¹⁻³⁾。これまでの研究結果から、尿の抑制成分は比較的低分子の安定な親水性の有機物であると推定されている²⁾。また、この尿のSOS反応抑制作用には個人差があること、尿の抑制活性と尿中クレアチニン量との間に弱いながらも相関関係のあることを示唆する結果を得ている³⁾。

しかしながら、尿のSOS反応抑制作用の生理学的意義については明らかにされておらず、この点の検討のため、より詳細な調査が要求される。

そこで本研究では、集団を対象として尿のSOS反応抑制作用を調査する際の基礎資料を得ることを目的として、検体の保存方法を検討すると共に、採尿との関係で排尿回数など試料尿における性、年齢別の特徴および尿のSOS反応抑制活性の日内変動及び日間変動について調べた。

材料と方法

1. 試料:

- (i) 尿のSOS反応抑制作用と日間変動尿は成人男子4名(A:20歳, B:28歳, C:40歳, D:45歳), 成人女子3名(E:21歳, F:22歳, G:23歳)および幼児4名(H:4歳 女児, I:6歳, J:8歳, K:8歳以上男児)より得た。このうち成人男子A,Cは喫煙の習慣があり、それ以外の者はすべて非喫煙者である。尿は起床時から翌日の起床までの24時間、排尿毎に採取し、その尿量と排尿時刻を記録し、尿は翌日まで冷蔵保存した後、冷凍保存した。なお、採尿は7月から9月の間に幼児は1日、成人男子は3日、成人女子は5日行った。
- (ii) 保存方法の検討

被験者Dのスポット尿を採取し、その半分を遠心分離し、その上清を、残りの半分はそのままの尿を、それぞれ室温(22°C)、冷蔵(4°C)、冷凍(-15°C)で保存し、各々の尿について、AF-2のSOS反応誘導性に対する抑制作用を40日間にわたって調べた。

(iv) SOS反応抑制作用の日内変動

男子被験者Bおよび女子被験者Fについて、7時より23時まで2時間毎に採尿し、尿は翌日まで冷蔵保存した後、冷凍保存した。

2. SOS反応抑制作用の測定:

試験菌株としてネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002を用い、umu試験⁴⁾の

標準法を一部改変して行い、尿のSOS反応抑制率は次式により算定した。

$$\text{SOS 反応抑制率} = \left(1 - \frac{A-C}{B-D}\right) \times 100(\%)$$

- A: 変異原に尿を加えた場合の β -ガラクトシダーゼ活性
B: 変異原により誘導された β -ガラクトシダーゼ活性
C: 尿により誘導された β -ガラクトシダーゼ活性
D: 試験菌による β -ガラクトシダーゼ活性(ペースレベル)

また、尿のSOS反応抑制活性は、0.024 $\mu\text{g/ml}$ のfurfuramide (AF-2)のSOS反応誘導性を50%抑制するものを1ユニット(unit)として表わした。試験は各々の濃度毎に2本の試験管を用いて行い、その平均値を実験値とした。実験結果の検定はt-testにより行った。

結 果

1. 尿のSOS反応抑制作用の安定性

尿のSOS反応抑制作用は尿を室温で保存した場合はその活性は急速に減少したが、尿を冷蔵で保存した場合は数日間、冷凍保存の場合は1カ月以上ほとんど変化せず、安定して保たれた。さらに、尿を遠心分離しておくで冷蔵保存でもその抑制活性はかなりの期間保たれることがわかった(図1)。

2. 試料尿の検討

一日の排尿回数、一回の排尿量、一日の量など、試料尿の基本的な検討を行った(表1)。成人男子では一日の排尿回数の平均は7.2回で平均尿量は一日1,231 mlであった。このうち、排尿回数には個人差は見られなかったが、一回の尿量および一日の尿量には個人差がみられた。成人女子では、一日の排尿回数は平均3.6回と成人男子に比較し少なかった。しかし、成人女子の一回の平均尿量252 mlは成人男子、幼児に比較して多かった。また、幼児の一日の平均排尿回数は6.8回と成人男子とほぼ同じであったが、成人男子に比べて大きな個人差を示した。成人男子の一日の尿量は成人女子、幼児に比較して多かった(表2)。

3. 尿のSOS反応抑制活性

単位尿量当りのSOS反応抑制活性の強さは、成人男子、成人女子、幼児の順で尿のSOS反応抑制活性には年齢差があることをうかがわせる結果が得られた。一方、一日当りの総抑制活性は成人男子が高く、成人女子、幼

Fig.1 Effects of storage on SOS-inhibition activity of urine. The urine was collected from donor D between 10 A.M. and 11 A.M. An aliquot of the urine sample was centrifuged at 3,000 rpm for 5 min. The centrifuged urine (●) and the untreated urine (■) were kept at 22°C (a), 4°C (b) or -15°C (c).

Table 1 Frequency of urination and urine volume

age	frequency of urination (time/day)	volume of urine (ml/time) (ml/day)	
male			
A 20 (♂)	7.5±1.2	248± 83	1,860±250
B 28 (♂)	7.0±0.5	210±117	1,470±221
C 40 (♂)	7.0±0.5	94± 53	658± 66
D 45 (♂)	7.0±1.0	134± 88	935±191
mean	7.2±0.9**	171±114**	1,231±518*
female			
E 21 (♀)	3.0±0.6	329± 97	988±111
F 22 (♀)	4.0±0.6	213± 97	852±190
G 23 (♀)	3.8±0.8	223±108	847±164
mean	3.6±0.7	252±113	897±171
child			
H 4 (♀)	5	164±114	820
I 6 (♂)	10	130± 37	1,300
J 8 (♂)	5	212± 49	1,060
K 8 (♂)	7	100± 67	700
mean	6.8±2.0	144± 77	970±226

The urine samples were collected and were stored at -15°C.

The values represent the mean ± SD. Significantly different from the female: *p<0.05, **p<0.001

児の順であったが、成人女子、幼児の間にはほとんど差は見られなかった(表2)。

Table 2 SOS-inhibition activity of urine

	urine volume (ml/day)	inhibition activity (unit/ml)		(unit/day)
male	1,231±518*	2.8±0.7**	3,406±885**	
female	897±171	1.6±0.4	1,446±183	
child	970±226	1.4±0.1	1,358±374	

Legends are the same as those in Table 1.

4. 尿の SOS 反応抑制活性の日内および日間変動

尿の SOS 反応抑制活性の日内変動を被験者 B (成人男子) および F (成人女子) について調べた。尿の SOS 反応抑制活性は、成人男子、成人女子とも朝、高く、午後に低下、夜また上昇した(図2)。すなわち、一日を通して早朝に採取した尿に最も高い SOS 反応抑制活性があり、昼に低下するが、夜間には再び高まる傾向にあった。

次に、尿の SOS 反応抑制作用の日間変動を調べた。図3、4に示すとおり、尿の SOS 反応抑制活性の一日当りの総抑制活性は、個人差がみられるものの、比較的安定していた。

考 察

我々は、人の尿に抗変異原性を予想させる SOS 反応抑制作用のあることを見いだした¹⁻³⁾。生体成分の抗変異原性については西岡らによる唾液や血清についての報告がある⁷⁾。また、早津らは尿に抗変異原物質が存在している可能性のあることを指摘している⁸⁾。

Fig. 2 Diurnal changes of SOS-inhibition activity of the urine. The urine was collected from donor B (●) and F(○) every 2 hr between 7 A.M. and 11 P.M. on the same day. The urine samples were stored at 4°C.

Fig. 3 Daily changes of SOS-inhibition activity of urine in males. The urine was collected from donors A (●), B (▲), C (●) and D (×) between 10 A.M. and 11 A.M. The urine samples were centrifuged at 3000 r.p.m. and were stored at -15°C.

本研究では、人の尿の SOS 反応抑制作用について集団を対象とした調査を行うために必要な基礎データを得ることを目的に、尿の保存方法、SOS 反応抑制活性の日内及び日間変動などについて調べた。その結果、尿の SOS 反応抑制作用は冷凍により 1 カ月以上保存が可能であることがわかった。一日の排尿回数は成人女子では平均 3.6 回と成人男子、幼児に比較し少なかった。しかし、成人女子の一回の平均尿量 252 ml は成人男子、幼児に比較して多かった。一日の尿量は成人男子が 1,231 ml と成人女子、幼児に比較して多かった。尿の SOS 反応抑制作用には朝、高く、午後に低下、夜また上昇すると

Fig. 4 Daily changes of SOS-inhibition activity of urine in females. The urine was collected from donors E (□), F (○) and G (△) between 10 A.M. and 11 A.M. The urine samples were centrifuged at 3000 r.p.m. and were stored at -15°C.

いう日内リズムがみられた。一方、一日当りの尿の総抑制活性には個人差がみられるものの採取日による大きな変動はなく、前記の日内変動により示された採尿時間の影響を避けるため、一日尿を取ることが望ましいことが示された。しかしながら、集団を対象とした調査では、一日尿の採取は難しく、スポット尿にならざるを得ない。従って、スポット尿により SOS 反応抑制活性を調べる場合には、採尿の時間を適正に定めるとともに、なんらかの補正の方法を検討する必要がある。

尿中成分の解析時によく行われる補正法としてはクレアチニンによる補正がある。青木らは種々の成分についてのクレアチニン補正の評価を行っており、排泄機構が単純な成分についてはクレアチニン補正が有用であるが摂取量や代謝で変動するような成分については有効でないとしている⁹⁾。また、川崎らは尿中クレアチニン排泄量に影響をおよぼす諸因子の検討を行っており、尿中の諸変数の排泄量の評価をクレアチニン補正により行う場合の問題点を指摘している^{10,11)}。我々は、尿の SOS 反応抑制活性と尿中クレアチニン量との間に弱いながらも相関関係のあることを示唆する結果を得ているが³⁾、さらに他の生体成分も含めた詳細な検討が必要である。

尿中成分の生体リズムについては、多くの報告がある。荒記らは金属及び有機物など多くの物質についてそのサーカディアンリズムを観察しており、また、その排泄機構についても考察している¹²⁾。米山らは尿成分の分析により Na, K, クレアチニンなどの生体リズムを¹³⁾、また、田畑らは尿中ステロイドホルモンの動態について¹⁴⁾

検討している。しかし、これらの変動のリズムは、今回、尿の変異抑制作用で見られたパターンとは異なっており、従って、排泄機構も異なったものであることが予想される。また、尿のSOS反応抑制作用は被験者の活動時には低下し、安静時には上昇していたが、どのような生体活動と関係があるかを解析することによって、SOS反応抑制物質の排泄機構がある程度判明するものと思われる。いずれにせよ、尿の抑制物質がどのような機構によって排泄されているかを知ることが必要であり、それによって補正の必要性、補正の方法が示されるものと思われる。

結 論

尿の生成と排泄は重要な生体の調節機能の一つであり、いくつかの成分はそのときの体調に応じて変化する。すなわち、尿は身体の変化を鋭敏に反映しており、尿を観察することにより、初期の状態でも疾病を発見することが期待できる。今回観察された尿の抗変異原活性の検査は早期の身体的変化を知る手段となり得る可能性がある。そのため、この生理学的意義の解明は重要な問題である。

一方、尿の濃度あるいは成分比は、食物や水の摂取量や気温などの影響を受けて変化する。さらに、尿の抗変異原活性には、朝、高く、午後に低下、夜また上昇するという生体リズムがみられた。従って、集団を対象とした調査では採尿の時期や時間の決定と共に、補正が必要か否かが重要な問題となってくる。

謝 辞

本研究の一部は平成5年度文部省化学研究費補助金一般(C) (課題番号05670376)による。実験に協力頂いた大阪教育大学 阿原美佳、入沢珠美、長野有里子氏に深謝する。

引用文献

- 1) Nakamura, S., Sugiura, W. and Obana, H.: Modifying effects of human urine on the SOS-responses induced by chemical mutagens, *Chem. Express*, **4**, 817-820 (1989).
- 2) 中村清一, 小坂博, 杉浦渉: 化学変異原のSOS反応誘導性に対する尿の抑制作用(I), 大阪府立公衛研所報労働衛生編, **29**, 7-12 (1991).
- 3) 中村清一, 小坂博, 青木太郎, 青野豊文, 金藤公人, 森本兼義: 化学変異原のSOS反応誘導性に対する尿の抑制作用(II), 大阪府立公衛研所報労働衛生編, **29**, 13-16 (1991).
- 4) Oda, Y., Nakamura, S., Oki, I., Kato, T. and Shinagawa, H.: Evaluation of the new system (*umu*-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens, *Mutat. Res.*, **147**, 219-229 (1985).
- 5) Nakamura, S., Oda, Y., Shimada, T., Oki, I. and Sugimoto, K.: SOS-inducing activity of chemical carcinogens and mutagens in *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002: examination with 151 chemicals, *Mutat. Res.*, **192**, 239-246 (1987).
- 6) 中村清一: 変異原物質の短期試験法の開発, 科学と工業, **62**, 142-148 (1988).
- 7) Nishioka, H., Nishi, K. and Kyokane, K.: Human saliva inactivates mutagenicity of carcinogens, *Mutat. Res.*, **85**, 323-333 (1981).
- 8) Hayatsu, H., Hayatsu, T., Zheng, Q.L., Ohara, O. and Arimoto, S.: Problems in monitoring mutagenicity of human urine, In "Methods for Detecting DNA damaging Agents in Humans: Applications in Cancer Epidemiology and Prevention" (Editors: Bartsch, H., Hemminki, K. and O'Neill, J.K.), pp.401-404, IARC Scientific Publications No.89, Lyon (1988).
- 9) 青木哲雄, 榊原長二, 下之園一郎, 西脇加代子: クレアチニン補正に関する検討(第2報) クレアチニン補正の評価, 衛生検査, **38**, 160-166 (1989).
- 10) 川崎晃一, 上園慶子, 吉川和利, 小室史恵, 中牟田澄子, 川副信行, 村谷博美, 尾前昭雄: 尿中クレアチニン排泄量に関する研究 I 24時間排泄量に及ぼす年齢, 性, 運動および食塩摂取量の影響と日周変動, 健康科学, **6**, 1-8 (1984).
- 11) 川崎晃一, 上園慶子, 宇都宮弘子, 今村京子, 吉川和利, 上野道雄, 藤島正敏: 24時間尿中カリウム排泄量推定法に関する研究 尿中クレアチニン排泄量予測値と分割量を用いた推定法の基礎的検討, 健康科学, **9**, 133-136 (1987).
- 12) 荒記俊一, 村田勝敏, 横山和仁, 榊原進, 新沼幸子, 山本れい子, 石原信夫: 金属(必須, 非必須)及び有機物質の尿中排出のサーカディアンリズム 腎臓機能リズムとの関連, 医学のあゆみ, **128**, 157-158 (1984).

- 13) 米山京子, 池田順子, 永田久紀: 尿中 Na/クレアチニン, Na/Kの日内変動及び24時間尿中 Na, Na/Kとの関連, 日本公衛誌, **37**, 45-52 (1990).
- 14) 田畑克子, 井辻泰子, 坂口博保, 田辺津紀江, 村田

健次郎: 正常ヒト尿中ステロイドホルモンの各種状態における動態について, 臨床病理, **30**, 1023-1028 (1982).

(受付 1993年8月30日 受理 1994年6月13日)