短 報

umu-試験キットによる化学変異原の
SOS 反応誘導能の検出Detection of SOS Function Induced
by Chemical Mutagens Using
umu-Test Kit

Key word: carcinogen; mutagen; screening test kit; SOS-response

化学物質の癌原性・変異原性の簡易検索法として大腸菌の DNA 損傷時に誘導される SOS 反応¹⁾を検出する系が開発されている^{2,3)}。これらのいわゆる SOS 試験により検出可能な化学物質は Ames 試験⁴⁾のそれとほぼ一致しており、またその検出感度も同程度であることが報告されている^{5,6)}。このうち umu-試験は *umu-lac* 融合遺伝子を持つプラスミドをラクトースオペロンを欠くネズミチフス菌に導入したものを試験菌株とするものであり、種々の化学物質の DNA 損傷性が試験菌の産生する β -ガラクトシダーゼの酵素活性を指標として測定されるものである^{7,8)}。最近、この umu-試験がキット化された⁹⁾。我々は、この試験キット（以下キットとする）により種々の化学物質の SOS 反応誘導能（DNA 損傷性）を測定し、Ames 試験の結果と比較することによりキットの有用性を検討した。

実験方法

umu-試験（キット）：umu-試験をキット化した“ウムラック®”（大塚製薬、徳島）はネズミチフス菌（*Salmonella typhimurium* TA 1535/pSK 1002）²⁾を用いて DNA 損傷時に誘導される SOS 反応を検出する系である⁶⁾。このキットを使用し、以下の手順により試験を行った；菌凍結乾燥品に培養液 2 ml を加え、37°C で 3 時間培養する。一方、検体を溶媒（10% DMSO）に溶かし適当な濃度に調製、その 10 μ l をマイクロプレートの well に分注する。先に培養しておいた菌液にさらに 18 ml の培養液を加え、この 100 μ l を各 well に分注する（代謝活性化が必要な場合は、菌液に別に調製した S9-Mix を 10% の割で加え、その 100 μ l を各 well に分注）。37°C で 2 時間インキュベートした後、100 μ l の発色基質を加え、さらに 1 時間インキュベートすると SOS 反応により菌体内に産生された β -ガラクトシダーゼにより基質が分解されて青く着色する。100 μ l の反応停止液を加えた後、分光光度計で比色定量（OD₆₃₀）し酵素活性を求める。

Fig. 1. SOS-inducing activity vs. dose of chemicals.

Ames 試験：ネズミチフス菌（*S. typhimurium* TA100）を用い、ブレインキューベーション法により行った⁴⁾。S9 および補酵素はオリエンタル酵母製を使用した。

結果と考察

種々のタイプの化学変異原物質の SOS 反応誘導能（ β -ガラクトシダーゼ活性）と試験物質の濃度との関係を調べた。その結果、代謝活性化を必要とする物質、しない物質共、 β -ガラクトシダーゼ活性は濃度と共に高くなるが、さらに高濃度では生育阻害等により酵素活性は低下した（Fig. 1）。反応に濃度依存性がある物質について、basal level の 2 倍の反応を示すのに要する試験物質質量（最小検出量）を求めた。また、これらの物質について Ames 試験を行い、同様に最小検出量を求めた。キットにおける最小検出量は Af B1、Trp-p-2 等 7 物質で Ames 試験とほぼ同レベル、2-AA、AF-2、4NQO 等 12 物質では Ames 試験の 1/5～1/100 の値を示す等、1-NP を除く多くの物質でより小さな値を示した（Table 1）。しかし、キットで高い値を示した物質は Ames 試験でも高い値を示しており、SOS 反応誘導能は変異原活性を反映している事が示された（Fig. 2）。

umu-試験の最小検出濃度と Ames 試験のそれとはほぼ等しい事が報告されているが^{2,5)}、今回のキットによる SOS 反応誘導能試験は Ames 試験に比べより少量の検体での試験が可能であることがわかった。これはキットの場合、試験の総量が小さいためであり、試験に必要な検体量は umu-試験、Ames 試験の 1/10 以下ですむ事が確認された。

SOS 反応の誘導を指標とした発癌物質検索法としてはプロファージの誘発をみる Induc test⁷⁾、*sfiA-lacZ* 融合遺伝子による SOS クロモテスト⁸⁾ 等がある。このうち、SOS クロモテストは原理的に umu-試験に近くまたキット化もされている。SOS クロモテストは SOS 調節をうけている *sfiA* 遺伝子の発現を検出するものである。

Table 1. Minimum detectable amounts of umu-test (kit) as compared to Ames test.

chemicals		minimum detectable amounts	
		umulac(test-kit) µg/well	Ames test µg/plate
Aflatoxin B ₁ *	(AF B ₁)	0.002	0.001
2-Aminanthracene *	(2-AA)	0.01	0.4
Benzo(a)pyrene *	(BaP)	0.2	1.1
Δ-Butyrolactone	(BL)	4.3	2.6
Epichlorhydrin	(EH)	80	23
Furylframide	(AF-2)	0.0005	0.009
Glu-p-1 *		0.06	0.35
ICR-191		0.025	0.7
IQ *		0.0025	0.025
MeIQ _x *		0.009	0.65
Methylmethanesulfonate	(MMS)	7	50
N-Methyl-N'-nitro-n-nitrosoguanidine	(MNNG)	0.04	0.9
N-Methyl-N-nitrosourea	(MNU)	1.2	140
5-Nitroacenaphthen	(5-NA)	0.25	0.8
2-Nitronaphthalene	(2-NN)	0.62	2
1-Nitropyrene	(1-NP)	12	0.22
4-Nitroquinoline-1-oxide (4NQO)		0.001	0.03
Streptozotocin	(SZ)	0.01	0.012
Trp-p-1 *		0.007	0.5
Trp-p-2 *		0.026	0.014

* : S9(+)

が, *sfiA* 遺伝子は DNA の損傷を受けた細胞が分裂を停止するという機能に関与しているものであり, SOS 反応以外の調節を受ける可能性も否定できない。これに対し, umu-試験は突然変異生成に直接関与する遺伝子である umu 遺伝子を利用したものであり, umu 遺伝子は突然変異の SOS ボックスの構造からみても SOS 反応における最も鋭敏な調節を受けるものと思われる⁵⁾。

SOS 試験に共通した利点は、一つの試験菌株で種々の型の発癌物質・変異原物質を検出できることと、ヒスタジンの存在に影響されない事である。特に umu-試験は検出可能な化学物質のスペクトルが Ames 試験のそれとはほぼ一致しており、無菌操作の必要もなく、より短時間(所用時間約6時間)での試験が可能となる等の利点を持っている。従って, umu-試験および試験キットは産業現場で使われている多くの化学原料, 開発段階にある化学物質, 化学製品等を Ames 試験より手軽に検討することができるものと思われる。しかし, benzidine, 1,2,3,4-dibenzanthracene 等 Ames 試験陽性物質でも反応しないものもあり⁶⁾, 試験系の改良, 等の検討も必

Fig.2. SOS-inducing activity in umu-test kit vs. mutagenicity in Ames test.

要である。

文 献

- 1) Witkins EEM. Ultraviolet mutagenesis and inducible repair in *Escherichia coli*. Bacteriol Rev 1976; 40: 867-909.
- 2) 杉田一之, 品川日出夫, 牧野耕三ほか. umu-lac 融合遺伝子を用いた変異原検出系の開発. 大阪府立公衆衛生研究所所報 1982; 21: 91-94.
- 3) Quillardet P, Huisman O, D'ari R et al. SOS chromotest—a direct assay of an SOS function in *Escherichia coli* K12 to measure genotoxicity. Proc Natl Acad Sci USA 1982; 79: 5971-5975.
- 4) Ames BN, McCann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/animal microsome mutagenicity test. Mutat Res 1975; 31: 347-364.
- 5) Oda Y, Nakamura S, Oki I, et al. Evaluation of the new system (umu-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. Mutat Res 1985; 147: 219-229.
- 6) 柴原俊一, 小平 司, 吉田 茂ほか. umu-Test キットによる変異原の検出. 日本環境変異原学会第14回大会講演要旨集 1985; 72.
- 7) Moreau P, Bailone A, Devoret R. Prophage λ induction in *Escherichia coli* K12 *envA uvrB*: a highly sensitive test for potential carcinogens. Proc Natl Acad Sci USA 1976; 73: 3700-3704.
- 8) 中村清一, 小田美光, 沖岩四郎ほか. umu-lac 融合遺伝子を用いた変異原検出系(V). 日本環境変異原学会第14回大会講演要旨集 1985; 71.

中村清一, 小田美光, 小坂 博, 杉本寛治

大阪府立公衆衛生研究所

Sei-ichi NAKAMURA, Yoshimitsu ODA,

Hirosaki KOSAKA and Kanji SUGIMOTO

Osaka Prefectural Institute of Public Health, Nakamichi-1, Higashinari-ku, Osaka, 537 Japan

昭和61年4月19日受付

通信先: 中村あて, Reprint requests to S. Nakamura