

食品添加物のエームス試験における既知変異原の変異原性に対する影響 (第3報)*

藤田 博**, 小 縣 昭 夫**, 青 木 直 人**

Modulation of Mutagenic Activity of the Known Mutagens by Food Additives in the Ames Test ()*

Hiroshi FUJITA **, Akio OGATA ** and Naoto AOKI **

Keywords : 抗変異原性 antimutagenicity, 助変異原性 co-mutagenicity, 食品添加物 food additives, エームス試験 ames test

化合物の遺伝毒性を明らかにするために様々な変異原性試験が行われ、多くの化合物に変異原性が見いだされてきた。一方、ある種の化合物には変異原性を変動させる効果があることも知られている。すなわち、変異原性を抑制する抗変異原や増強する助変異原である。我々を取り巻く環境中では多くの化合物が混在することから変異原の検出に加えて変動効果を示す化合物についての情報も重要である。

変異原性を変動させる化合物としては、植物中に含まれる様々な成分による変異原性の抑制効果がよく知られている¹⁻³⁾。一方、魚のこげの中に見いだされたノルハルマン⁴⁾は、変異原性を増強することが報告されている。食品添加物として利用されている化合物中にもアマランス⁵⁾、及びビタミンA^{6,7)}がサルモネラを用いた試験系(エームス試験)において変異原性の抑制を示し、シンナムアルデヒド⁸⁾及びバニリン⁹⁾が大腸菌を用いた試験系において変異原性の抑制効果を示すことが報告されている。食品添加物は、合成によるものだけでも300種類以上が許可されており、これらの中に変異原性の変動効果を示す化合物が他にも含まれている可能性があることからエームス試験を用い4種の既知変異原に対する変動効果の有無について検討することにした。

これまでに108種類の食品添加物について試験を行ってきたが^{10,11)}、12化合物に変異原性を変動させる効果が見られた。今回、58種類の食品添加物について追加試験を行ったところ6化合物に変動効果が見られたので報告する。

実験材料及び方法

試料 58種類の食品添加物は、表1に記載した。L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル、デカナール、デカノール、デヒドロ酢酸及びプロピオン酸カルシウムは東京化成製、

L-グルタミン酸カリウムはFluka製、その他の化合物は和光純薬製である。試料は、溶解性により蒸留水(DW)またはジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解した。

変異原物質: 4-ニトロキノリン-1-オキシド(4NQO, 岩井化学製), フリルフラマイド(AF-2, 上野製薬製), ベンツ(a)ピレン(BP, 和光純薬製)及びトリプ-P-1(T-P-1, 和光純薬製)をDMSOに溶解し用いた。

菌株 *Salmonella typhimurium* TA98 (*hisD*⁻, *uvrB*⁻, *bio*⁻, *gal*⁻, *rfa*⁻, pKM101)¹²⁾及びTA100 (*hisG*⁻, *uvrB*⁻, *bio*⁻, *gal*⁻, *rfa*⁻, pKM101)¹²⁾を普通ブイヨン(Nutrient broth No. 2, OXOID)で一夜培養し用いた。これらの株は、B. N. Ames 教授(カリフォルニア大)より分与を受けたものである。

TA98は、フレームシフト型の変異原に感受性が高いことから、今回の試験ではT-P-1の変異原性の検出に用いた。また、TA100は、塩基置換型の変異を持ち、比較的多くの変異原に感受性が高いことから、今回の試験においては、4NQO, AF-2及びBPの変異原性を検出するのに用いた。

変異原性試験 Ames法の变法であるプレインキュベーション法^{13,14)}により行った。代謝活性化には、アロクロール1254(ジールサイエンス)により薬物代謝酵素を誘導した雄性CD系ラット(Crj:CD 日本チャールス・リバー)の肝臓ホモジネートから調製したS9¹³⁾を用いた。S9mix^{13,14)}中のS9量は、10%(50 µl/プレート)とした。

変異原溶液0.1 ml及び試料溶液0.05 mlを小試験管に入れ、変異原がT-P-1及びBPの場合にはS9mix 0.5 ml, 4NQO及びAF-2の場合にはリン酸緩衝液(pH 7.4) 0.5 mlを加えた。更に4NQO, AF-2及びBPの場合にはTA100, T-P-1の場合にはTA98の一夜培養菌液を0.1 ml加え、37で20分間の前培養を行った。これに45 に保温した軟寒天¹³⁾ 2 mlを加え混合後、最少グルコース寒天培地¹³⁾に重層し

* 東京衛研年報, 50, 303-307, 1999

** 東京都立衛生研究所毒性部病理研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

** The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

表1. 食品添加物の既知変異原の変異原性に対する影響

化合物	最高濃度 ^{a)}	4NQO	AF-2	BP	T-P-1	化合物	最高濃度 ^{a)}	4NQO	AF-2	BP	T-P-1
亜硝酸ナトリウム	10	-	-	-	-	パラヒドロキシ安息香酸イソブチル	1	-	-	-	-
L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル	10	-	-	-	-	パラヒドロキシ安息香酸イソプロピル	1	-	-	-	-
アスパラギン酸ナトリウム	10	-	-	-	-	パラヒドロキシ安息香酸エチル	0.1	-	-	-	D
アスパルテーム	10	-	-	-	-	パラヒドロキシ安息香酸プロピル	1	-	-	-	-
DL-アラニン	10	-	-	-	-	パラメチルアセトフェノン	1	-	-	-	D
5'-イノシン酸二ナトリウム	10	-	-	-	-	ピペロナール	1	-	-	-	D
5'-ウリジル酸二ナトリウム	10	-	-	-	-	フェニル酢酸イソアミル	0.1	-	-	-	-
塩化アンモニウム	10	-	-	-	-	フェニル酢酸エチル	0.1	-	-	-	-
塩化カリウム	10	-	-	-	-	フマル酸	1	-	-	-	-
塩酸	1	-	-	-	-	プロピオン酸	1	-	-	-	-
過酸化水素	0.1	I	-	-	-	プロピオン酸イソアミル	0.1	-	-	-	-
ギ酸イソアミル	1	-	-	-	-	プロピオン酸エチル	1	-	-	-	-
クエン酸-カリウム	10	-	-	-	-	プロピオン酸カルシウム	10	-	-	-	-
5'-グアニル酸二ナトリウム	10	-	-	-	-	プロピオン酸ベンジル	0.1	-	-	-	-
クエン酸三カリウム	10	-	-	-	-	ヘキサン	1	-	-	-	-
クエン酸三ナトリウム	10	-	-	-	-	ヘキサン酸アリル	0.1	-	-	-	-
L-グルタミン酸カリウム	10	-	-	-	-	ヘキサン酸エチル	0.1	-	-	-	-
ケイ皮アルコール	1	-	-	-	-	ベンジルアルコール	1	-	-	-	-
酢酸	10	-	-	-	-	ベンズアルデヒド	1	-	-	-	-
酢酸エチル	1	-	-	-	-	d-ボルネオール	0.1	-	-	-	-
5'-シチジル酸二ナトリウム	10	-	-	-	-	N-メチルアントラニル酸メチル	0.1	-	-	-	-
ソルビン酸	1	-	-	-	-	l-メントール	0.1	-	-	-	I
デカナール	0.01	-	-	-	-	酪酸イソアミル	0.1	-	-	-	-
デカノール	0.1	-	-	-	-	酪酸エチル	1	-	-	-	-
デカン酸エチル	10	-	-	-	-	酪酸シクロヘキシル	0.1	-	-	-	-
デヒドロ酢酸	1	-	-	-	-	酪酸ブチル	0.1	-	-	-	-
テルピネオール	0.1	-	-	-	-	リナロオール	0.1	-	-	-	-
-ノナラクトン	1	-	-	-	-	硫酸	10	-	-	-	-
バニリン	10	D	D	D	D	DL-リンゴ酸	10	-	-	-	-

a): mg/プレート. D: 変異原性の抑制効果が見られた. I: 変異原性の増強効果が見られた. 4NQO: 0.1 µg/プレート, TA100. AF-2: 0.02 µg/プレート, TA100. BP: 5 µg/プレート, TA100. T-P-1: 0.1 µg/プレート, TA98.

た. 37 で2日間培養後, プレートに生じた復帰コロニーを自動コロニーカウンターで計数した. 同時に試験菌株の生存状況を知るためにローン (lawn) の観察を行った.

最初に3濃度段階, 1枚のプレートでスクリーニング試験を行い, 変動効果を持つ可能性がありそうな化合物を選定した. その後確認実験を各濃度にプレート2枚を用い, 5濃度段階で行った. 統計解析は, Mooreら¹⁵⁾のプログラムによる回帰分析を行い, 用量相関が有意な場合, 試料化合物に変異原性を変動させる効果があると判断した.

結 果

58種の食品添加物による4種の既知変異原(4NQO, AF-2, BP及びT-P-1)に対する影響について定性的に検討した試験結果を表1に示した. 変異原単独の時の復帰コロニー数が食品添加物を加えることにより増加または減少した化合物は6化合物であった. 過酸化水素は, 4NQOにお

いて復帰コロニー数が増加した. バニリンは, 4NQO, AF-2, BP及びT-P-1において復帰コロニー数が減少した. パラヒドロキシ安息香酸エチル, パラメチルアセトフェノン及びピペロナールはT-P-1において復帰コロニー数が減少した. l-メントールはT-P-1において復帰コロニー数が増加した. なお, 復帰コロニー数が減少した化合物は, さらに数種類見られたが, ローンを観察によっていずれも試験菌株に対する抗菌性が見られたことから変異原性の抑制ではないものと判断した.

次に変異原性に影響を与えた化合物について定量的にその効果を検討した結果を図1に示した. 過酸化水素は, 5 µg/プレート以上で4NQOの変異原性が1.3倍に増加した. バニリンは, 4NQO, AF-2, BP及びT-P-1の4変異原に対して明らかな抑制効果を示した. ただし, バニリンの量は1 mg/プレート以上の高用量が必要であった. パラヒドロキシ安息香酸エチル, パラメチルアセトフェノン及びピペ

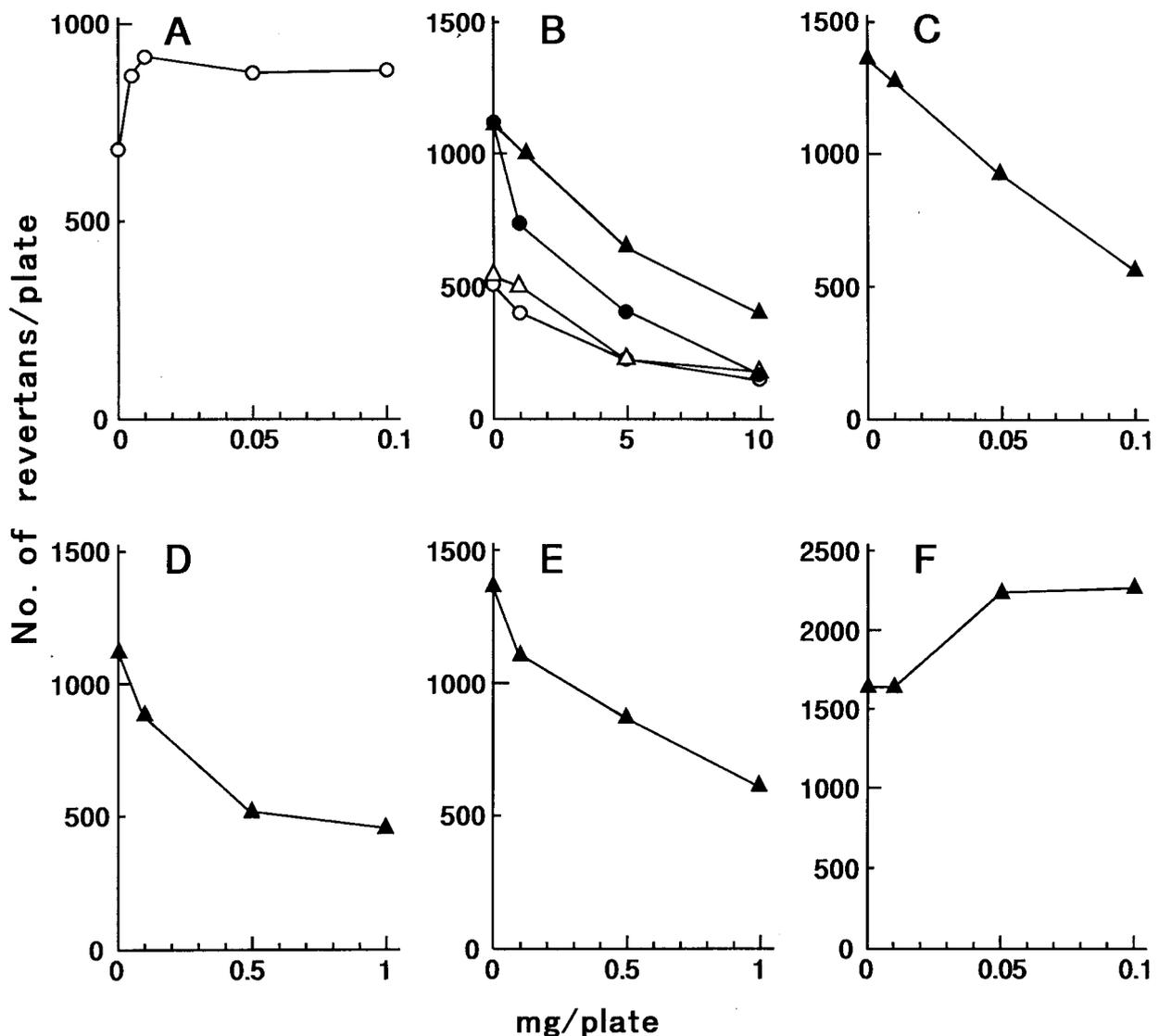


図1. 変異原性に対する影響.

A: 過酸化水素, B: バニリン, C: パラヒドロキシ安息香酸エチル, D: パラメチルアセトフェノン, E: ピペロナール, F: l-メントール. ○: 4NQO, 0.1 µg/プレート, TA100. △: AF-2 0.02 µg/プレート, TA100. ●: BP 5 µg/プレート, TA100. ▲: T-P-1 0.1 µg/プレート, TA98.

ロナールはT-P-1において変異原性が減少した。減少率は何れも50%程度であった。l-メントールはT-P-1において復帰コロニー数が増加し、T-P-1の変異原性が1.4倍に増加した。

考 察

58種の食品添加物について試験を行った結果、6化合物に変動効果が見られた。T-P-1の変異原性は、5化合物によって影響を受けたことから変異原性が影響を受けやすい変異原なのかもしれない。パラヒドロキシ安息香酸エチルは、T-P-1の変異原性を抑制した。エチルエステル以外に3種のエステルについても試験を行ったが、復帰コロニー数がエチルエステル同様減少した。しかし、3種のエステルでは抗菌性の方が強く変異原性の抑制効果としては検出できなかった。

今回用いた4種の変異原は、変異原としては大変よく知られた化合物であり、エームス試験など微生物を用いた試験系における変異原性を変動させる化合物についての報告も多い。例えば、4NQOの変異原性を抑制する化合物としてはTA100でスルフィドリル化合物¹⁶⁾、大腸菌でシナムアルデヒド⁸⁾、パニリン⁹⁾が報告されている。AF-2については、大腸菌を用いた試験系でシナムアルデヒド¹⁷⁾やショウガ抽出物による抑制¹⁸⁾の報告があり、BPについてはTA98でリポフラビン¹⁹⁾やBHT²⁰⁾による抑制の報告が見られる。T-P-1については、増強する化合物にはTA98においてノルハルマン⁴⁾が、抑制する化合物にはTA98においてメイラード反応生成物²¹⁾、ビタミンA²²⁾などの報告が見られる。これらの増強及び抑制の作用機構については、化合物相互の直接的反応²¹⁾、S9中の薬物代謝酵素の阻害¹⁹⁾及び菌株のDNA損傷を修復する酵素の阻害¹⁷⁾などが考えられてはいるが未解明な点が多い。

今回の試験でパニリンは4種の変異原の変異原性を抑制し、強い抗変異原であることが明らかとなった。パニリンについての変異原性の変動に関する報告は多く、大腸菌WP2株において4NQO、AF-2の突然変異の抑制⁹⁾。チャイニーズハムスターV79細胞においてUV、X線による突然変異の抑制²³⁾、in vivoではマウスのスポットテストでエチルニトロソウレアによる突然変異の抑制²³⁾などがある。一方、増強の報告も見られ、大腸菌CC102などにおいてニトロソグアニジンの変異原性の増強²⁴⁾、チャイニーズハムスターCHO細胞においてマイトマイシンC、エチルニトロソウレア、メチルニトロソウレアなどのアルキル化剤による姉妹染色分体交換(SCE)誘発の増強²⁵⁾、ヒト肝ガン由来細胞HEP-G2におけるアミノメチルイミダゾキノリン(IQ)、T-P-1などのヘテロサイクリックアミンによる小核誘発の増強²⁶⁾が報告されており、パニリンの変異原性に対する影響は抑制と増強の両面が見られ非常に複雑である。この変動の作用機構については、大腸菌ではDNA損傷を修復する酵素の誘導阻害により変異原性が増強²⁷⁾された

り、突然変異を起こしやすいSOS修復系の誘導により変異原性が増強²⁸⁾されることが示されているが、変異原性の抑制については突然変異を起こさないrecA遺伝子依存の修復系が活性化されることが報告²⁹⁾されている。今回のサルモネラの実験では抑制効果が明らかであったが、これはrecA遺伝子依存の修復系が関与しているのではないかと考えられる。

過酸化水素を4NQOに加えたときに突然変異が増強された。4NQOは4-ヒドロキシ-1-アミノキノリンに代謝されて変異原性を示すといわれているが、この時発生する過酸化水素も突然変異の発現に影響していると報告³⁰⁾されている。今回の実験で、4NQOに過酸化水素を加えることにより変異原が増加したことは、4NQOの変異原性に過酸化水素が関与していることを支持するものであると考えられる。ただし、過酸化水素にも弱い変異原性があることが報告³¹⁾されていることから、過酸化水素による4NQOの突然変異性の増強というよりも4NQOと過酸化水素による突然変異が相乗的に増加したとするのが正しいのかもしれない。

l-メントールは、サルモネラにおいてAF-2によるDNA損傷を修復する時に突然変異を起こしやすいSOS修復系の発現を阻害すると報告³²⁾されている。このことはAF-2による突然変異をl-メントールが抑制することが期待されるが、今回の試験ではl-メントールによるAF-2の変異原性に対する影響は検出できなかった。T-P-1の変異原性が増強されたのは全く反対の効果であり、l-メントールがたばこや食品中にも多用されている化合物であることから突然変異を変動させる機構について十分検討する必要があると考えられる。

パラヒドロキシ安息香酸エチル、パラメチルアセトフェノン及びピペロナールについては変異原性の変動効果に関する報告は見られず、今後多くの試験系での検討が効果の確認に必要であろう。

58種の食品添加物による変異原性の変動効果について検討したところ、変動効果の報告が多いパニリンに加え何らかの効果を示す5化合物が見いだされた。前報^{10), 11)}までに検討した108化合物中12化合物に変動効果が見いだされており、今回の6化合物を加えると18化合物(10%)となり、変異原性と関りがある化合物が食品添加物中にかなり存在することが明らかとなった。ただし、これらの変動効果は、エームス試験における反応であって、食品中や生体中での反応については明らかではなく、更にこれらの化合物による変異原性を変動させる作用機構についても今のところ明らかではない。変動の作用機構には、化合物相互反応、薬物代謝酵素阻害及びDNA修復酵素阻害または活性化などが考えられ、今後これらの点についても検討していきたい。

ま と め

58種の食品添加物の4NQO, AF-2, BP及び T-P-1 の変異原性に対する影響についてエームス試験を用い検討した。食品添加物を加えることにより変異原性が増加または減少した化合物は6化合物であった。過酸化水素は, 4NQOの変異原性を増強した。パニリンは, 4NQO, AF-2, BP及びT-P-1の変異原性を抑制した。パラヒドロキシ安息香酸エチル, パラメチルアセトフェノン及びピペロナルはT-P-1の変異原性を抑制した, トメントールはT-P-1の変異原性を増強した。

文 献

- 1) Morita, K., Hara, M. and Kada, T. : *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 1235-1238, 1978.
- 2) Vinitketkumnuen, U., Puatanachokchai, R., Kongtawelert, P., *et al.* : *Mutation Res.*, **341**, 71-75, 1994.
- 3) Uenobe, F., Nakamura, S. and Miyazawa, M. : *Mutation Res.*, **373**, 197-200, 1997.
- 4) Nagao, M., Yahagi, T., Kawachi, T., *et al.* : *Proc. Japan Acad.*, **53**, 95-98, 1977.
- 5) McCalla, D.R., Kaiser, C., Lu, C., *et al.* : *Mutation Res.*, **82**, 201-211, 1981.
- 6) Busk, L. and Ahlborg, U.G. : *Toxicology Letters*, **6**, 243-249, 1980.
- 7) Bhattacharya, R.K., Francis, A. R. and Shetty, T.K. : *Mutation Res.*, **188**, 121-128, 1987.
- 8) Kakinuma, K., Koike, J., Kotani, K., *et al.* : *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1905-1906, 1984.
- 9) Watanabe, K., Ohta, T. and Shirasu, Y. : *Mutation Res.*, **218**, 105-109, 1989.
- 10) 藤田博, 青木直人, 佐々木美枝子 : 衛研年報, **48**, 303-308, 1997.
- 11) 藤田博, 青木直人 : 衛研年報, **50**, 303-307, 1999.
- 12) McCann, J., Spingarn, N. E., Ames, B.N., *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 979-983, 1975.
- 13) Maron, D.M. and Ames, B.N. : *Mutation Res.*, **113**, 173-215, 1983.
- 14) 矢作多貴江 : 蛋白質核酸酵素, **20**, 1178-1189, 1975.
- 15) Moore, D. and Felton, J.S. : *Mutation Res.*, **119**, 95-102, 1983.
- 16) De Flora, S., Rosenkranz, H.S. and Klopman, G. : *Mutagenesis*, **9**, 39-45, 1994.
- 17) Ohta, T., Watanabe, K., Moriya, M., *et al.* : *Mutation Res.*, **107**, 219-227, 1983.
- 18) Nakamura, H. and Yamamoto, T. : *Mutation Res.*, **103**, 119-126, 1982.
- 19) Terwel, L., van der Hoeven, J.C.M. : *Mutation Res.*, **152**, 1-4, 1985.
- 20) Calle, L.M., Sullivan, P.D., Nettleman, M.D., *et al.* : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **85**, 351-356, 1978.
- 21) Yen, G.-C., Tsai, L.-C. and Lii, J.-D. : *Fd Chem. Toxic.*, **30**, 127-132, 1992.
- 22) Busk, L., Ahlborg, U.G. and Albanus, L. : *Fd Chem. Toxic.*, **20**, 535-539, 1982.
- 23) Imanishi, H., Sasaki, Y.F., Matsumoto, K., *et al.* : *Mutation Res.*, **243**, 151-158, 1990.
- 24) Watanabe, K. and Ohta, T. : *Mutation Res.*, **302**, 13-18, 1993.
- 25) Sasaki, Y.F., Imanishi, H., Ohta, T., *et al.* : *Mutation Res.*, **189**, 313-318, 1987.
- 26) Sanyal, R., Darroudi, F., Parzefall, W., *et al.* : *Mutagenesis*, **12**, 297-303, 1997.
- 27) Takahashi, K., Sekiguchi, M. and Kawazoe, Y. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **162**, 1376-1381, 1989.
- 28) Sato, T., Chikazawa, K., Yamamori, H., *et al.* : *Environ. Mol. Mutagen.*, **17**, 258-263, 1991.
- 29) Ohta, T., Watanabe, K., Shirasu, Y., *et al.* : *Mutation Res.*, **201**, 107-112, 1988.
- 30) Hozumi, M. : *GANN*, **60**, 83-90, 1969.
- 31) Ishidate Jr, M., Sofuni, T., Yoshikawa, K., *et al.* : *Fd Chem. Toxic.*, **22**, 623-636, 1984.
- 32) Miyazawa, M., Okuno, Y., Nakamura, S., *et al.* : *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 5440-5443, 2000.