

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4報*)

藤田 博**, 小 縣 昭 夫**

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

Hiroshi FUJITA** and Akio OGATA**

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

化学物質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、多くの化学物質に変異原性が見いだされてきた。一方、ある種の化学物質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学物質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学物質中にもアマランス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、シナナムアルデヒド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種の既知変異原の変異原性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166種類の食品添加物について試験を行ってきたが¹⁰⁻¹²⁾、18化合物に変異原性を変動させる効果が見られた。今回、52種類の食品添加物について追加試験を行ったところ8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 52種類の食品添加物は、表1に記載した。ジフェニール、しょ糖脂肪酸エステル、チアベンダゾール、L-テアニン、プロピレングリコール脂肪酸エステル、*l*-ペリルアルデヒドは東京化成製、グルコン酸第一鉄、二酸化チタ

ン、ノルジヒドログアヤレチック酸はAldrich製、ピロリン酸二水素二ナトリウム、ポリリン酸カリウムはナカライテスク製、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)¹³⁾及びTA100(*hisG*⁻, *uvrB*⁻, *bio*⁻, *gal*⁻, *rfa*⁻, pKM101)¹³⁾を普通ブイヨン(Nutrient broth No. 2, OXOID)で一晩培養し用いた。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法の変法であるプレインキュベーション法^{14,15)}により行った。代謝活性化には、アロクロール1254(ジーエルサイエンス)により薬物代謝酵素を誘導した雄性SD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S9¹⁴⁾を用いた。S9 mix^{14,15)}中のS9量は、4%(20 μ L/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°Cで20分間の前培養を行った。これに45°Cに保

*第3報 東京衛研年報, **52**, 267-271, 2001

**東京都健康安全研究センター環境保健部病理研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

**Tokyo Metropolitan Institute 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
アセトン	10	—	—	—	—	乳酸鉄	1	—	—	—	D
アルギン酸ナトリウム	1	—	—	—	—	乳酸ナトリウム	10	—	—	—	—
イオン	0.1	—	—	—	—	ノルジヒドログアヤレチック酸	0.1	I	—	—	—
イソチオシアン酸エチル	0.1	—	—	D	—	パラヒドロキシ安息香酸ブチル	1	—	—	—	—
イマザリル	0.1	—	—	—	—	L-バリン	1	—	—	—	—
インドール	1	—	—	—	—	ヒドロキシシトロネラル	0.1	—	—	—	—
ギ酸シトロネリル	0.1	—	—	—	—	ピペロニルブトキシド	1	—	—	I	D
グリシン	10	—	—	—	—	ピロリン酸二水素二ナトリウム	10	—	—	—	—
グリセリン	10	—	—	—	—	ピロリン酸二水素カルシウム	1	—	—	—	—
グルコン酸第一鉄	1	—	—	—	—	L-フェニルアラニン	1	—	—	—	—
L-グルタミン酸	1	—	—	—	—	フェニル酢酸イソブチル	0.1	—	—	—	—
L-グルタミン酸ナトリウム	10	—	—	—	—	フマル酸ナトリウム	1	—	—	—	—
コレカルシフェロール	1	—	—	—	—	フルフラール	1	—	—	—	—
酢酸ナトリウム	10	—	—	—	—	プロピレングリコール脂肪酸エステル	1	—	—	—	—
サリチル酸メチル	0.1	—	—	—	—	l-ベリルアルデヒド	0.1	—	—	—	—
三酸化鉄	1	—	—	—	—	ポリリン酸カリウム	10	—	—	—	—
ジフェニール	1	—	—	—	—	DL-メチオニン	1	—	—	—	—
L-酒石酸水素カリウム	1	—	—	—	—	L-メチオニン	1	—	—	—	—
L-酒石酸ナトリウム	10	—	—	—	—	メチルβ-ナフチルケトン	0.1	D	—	—	D
しょ糖脂肪酸エステル	1	—	—	—	—	L-リジン塩酸塩	10	—	—	—	—
ソルビタン脂肪酸エステル	1	—	—	—	—	リボフラビン酪酸エステル	1	—	—	D	D
炭酸水素ナトリウム	1	—	—	—	—	リボフラビン5'-リン酸エステルナトリウム	10	—	—	D	D
チアベンダゾール	1	—	—	D	D	硫酸ナトリウム	10	—	—	—	—
L-テアニン	10	—	—	—	—	DL-リンゴ酸ナトリウム	10	—	—	—	—
二酸化チタン	1	—	—	—	—	リン酸	10	—	—	—	—
乳酸	10	—	—	—	—	リン酸水素二ナトリウム	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 : 0.1μg/プレート, TA100. AF-2 : 0.02μg/プレート, TA100. BP : 5μg/プレート, TA100. T-P-1 : 0.1 μg/プレート, TA98.

温した軟寒天¹⁴⁾ 2 mL を加え混合後、最少グルコース寒天培地¹⁴⁾ 重層した。37°C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¹⁶⁾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

52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、イソチオシアン酸エチル、チアベンダゾール、乳酸鉄、ノルジヒドログアヤレチック酸、ピペロニルブトキシド、メチルβ-ナフチルケトン、リボフラビン酪酸エステル、リボフラビン5'-リン酸エステルナトリウムの8化合物であった。その他の44化合物に変動効果は見られなかった。

変動効果があった化合物について容量段階を増やし定量的に行った実験の結果を図1に示した。イソチオシアン酸エチルは、BPにおいて復帰コロニー数が減少した。チア

ベンダゾールは、BP及びT-P-1において復帰コロニー数が減少した。乳酸鉄は、T-P-1において復帰コロニー数が減少した。ノルジヒドログアヤレチック酸は、4NQOにおいて復帰コロニー数が増加した。ピペロニルブトキシドは、BPにおいて復帰コロニー数が増加し、T-P-1において減少した。メチルβ-ナフチルケトンは、4NQO及びT-P-1において復帰コロニー数が減少した。リボフラビン酪酸エステル及びリボフラビン5'-リン酸エステルナトリウムは、BP及びT-P-1において復帰コロニー数が減少した。

考 察

52種の食品添加物について試験を行った結果、イソチオシアン酸エチル、チアベンダゾール、乳酸鉄、ノルジヒドログアヤレチック酸、ピペロニルブトキシド、メチルβ-ナフチルケトン、リボフラビン酪酸エステル、リボフラビン5'-リン酸エステルナトリウムの8化合物に変動効果が見られ、変動効果を示す化合物が多いことが明らかとなった。ピペロニルブトキシドのみがBPでは増加、T-P-1では減少と変異原に対する反応が異なっているのが見られた。リボフラビンは、酪酸エステル、リン酸ナトリウム塩ともにほぼ同様の反応を示した。

今回の試験対象とした化合物中には、リボフラビンのように変異原性の変動効果に関する報告が多いが、食品添加物として用いられている酪酸エステルやリン酸エステルナトリウム塩でも同様の効果が見られた。リボフラビンは、TA98 S9存在下において、BP、アセチルアミノフルオレ

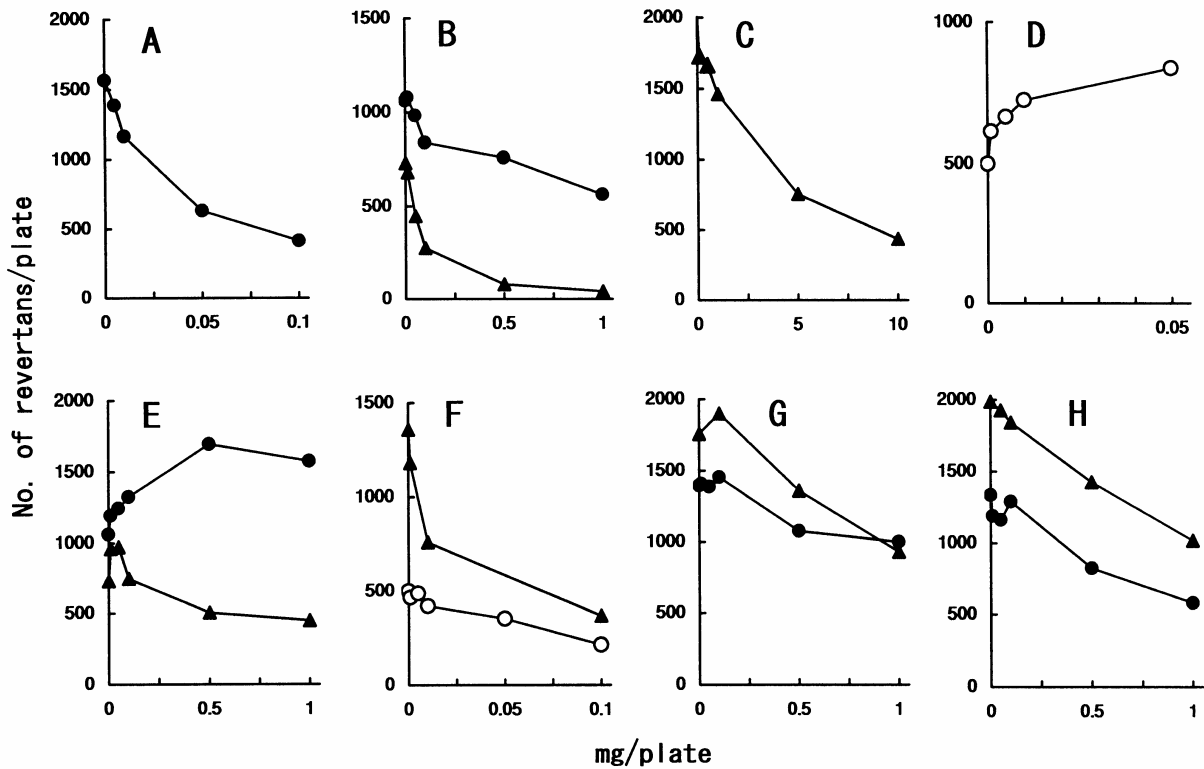


図1. 変異原性に対する影響.

A: イソチオシアン酸エチル, B: チアベンダゾール, C: 乳酸鉄, D: ノルジヒドログアヤレチック酸, E: ピペロニルブトキシド, F: メチルβ-ナフチルケトン, G: リボフラビン酪酸エステル, H: リボフラビン 5'-リン酸エステルナトリウム. ○: 4NQO, 0.1 ig/プレート, TA100. ●: BP 5 ig/プレート, TA100. ▲: T-P-1 0.1 ig/プレート, TA98.

ン, IQ, MeIQ, T-P-2 及びタバコの煙濃縮物などの変異原性を抑制する¹⁷⁻¹⁹. これらの反応は, S9 中の薬物代謝酵素に対する影響と考えられているが, リボフラビン 5'-リン酸エステルナトリウムでは BP の代謝産物である BP デイオールエポキシドに対して S9 非存在下で変異原性の抑制が見られ化合物間の反応との報告²⁰もあり, リボフラビンは多様な作用を示すようである.

酸化防止剤として用いられているノルジヒドログアヤレチック酸には 4NQO の変異原性の増加効果が見られた. 4NQO は 4-ハイドロキシ-1-アミノキノリンに代謝されて変異原性を示すが, この反応にはラジカルや過酸化水素の関与が示唆されている²⁰. したがってノルジヒドログアヤレチック酸の酸化防止効果が作用した場合過酸化物の生成が抑制され, 4NQO の変異原性は減少するのではないかと考えられるが, 結果は反対に増加であった. 過酸化物ではない変異原物質が生成しているのかもしれない. ノルジヒドログアヤレチック酸には, マウスの骨髄細胞に対するメチルメタンスルホネートの小核誘発を抑制し, 抗酸化作用によるとの報告²⁰もあことから, 多面的な反応が推察され詳細な検討が必要であろう.

ピペロニルブトキシドは, BP で増加, T-P-1 で減少の相反する効果を示した. ピペロニルブトキシドには, P450 などの薬物代謝酵素系の阻害作用が知られている²³. 今回

の変動効果がこの作用によるのは S9 添加の変異原に対してのみ見られたことから明らかであるが, BP と T-P-1 で反応が全く異なったことは, これらの変異原の代謝が異なっているためであろうと推察される.

その他の変動効果を示したイソチオシアン酸エチル, チアベンダゾール, 乳酸鉄及びメチルβ-ナフチルケトンについての変異原性の変動効果に関しての報告は見いだせなかったが, イソチオシアン酸エチルについては, イソチオシアン酸アリルで見られた変異原性抑制効果¹⁰と同様であろう. そして乳酸鉄, チアベンダゾール及びメチルβ-ナフチルケトンについては, 変異原性の変動効果について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. 特にチアベンダゾールでは催奇形性の報告²⁴が見られる反面, 変異原性の抑制効果が見られたことは注目しておきたい反応であると考えられる.

今回用いた変異原に対して変動効果を示さなかった 44 種類の化合物の中には, 生体中に存在するので注目されるのかアミノ酸に関する変異原性変動効果の報告が多い. グルタミン酸及びメチオニン, ヒトリンパ球においてトレニモンなどによる染色体異常の抑制²⁵, メチオニンには, 紫外線, 亜硝酸による酵母の突然変異の抑制^{26,27}, また, グリシンには, TA100 における N-メチル-N'ニトロ-N-ニトロソグアニジンの変異原性の抑制²⁸, TA102 においてド

キソルビシンの変異原性の抑制の報告²⁹が見られた。何れも生体成分として、変異原性の抑制に作用していることは有用な化合物なのであろう。今回これらの化合物に変動効果が見いだせなかったのは、用いた変異原及び使用菌株が異なったためであろう。

52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リボフラビンに加え何らかの効果を示す8化合物が見いだされた。前報¹⁰⁻¹²までに検討した166化合物中18化合物に変動効果が見いだされており、今回の8化合物を加えると26化合物(12%)となり、用いている既知変異原がかなり多くの化合物と同時に存在することにより変異原性が変化することが明らかとなった。このことは、変異原性をより正確に評価する場合他の化合物による影響まで検討する必要があるものと考えられる。また食品添加物の中に変異原性を増加させるものも存在するが抑制する化合物の方が多かった。特にT-P-1のように食品中に存在する変異原の変異原性を抑制する化合物が26化合物中16化合物もあり、本来の添加物の効果に加えて有効な効果が見いだされたことは有用であると考えられる。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いことから、これらの化合物による生体中での変異原性を変動させる作用についても検討していきたい。

ま と め

52種の食品添加物の4NQO, AF-2, T-P-1及びBP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8化合物であった。イソチオシアン酸エチルは、BPの変異原性を抑制した。チアベンダゾールは、BP及びT-P-1の変異原性を抑制した。乳酸鉄は、T-P-1の変異原性を抑制した。ノルジヒドログアヤレチック酸は、4NQOの変異原性を増強した。ピペロニルブトキシドは、BPの変異原性を増強し、T-P-1の変異原性を抑制した。メチルβ-ナフチルケトン、4NQO及びT-P-1の変異原性を抑制した。リボフラビン酪酸エステル及びリボフラビン5'-リン酸エステルナトリウムは、BP及びT-P-1の変異原性を抑制した。

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: 東京衛研年報, **48**, 303-308, 1997.
- 11) 藤田博, 青木直人: 東京衛研年報, **50**, 303-307, 1999.
- 12) 藤田博, 小縣昭夫, 青木直人: 東京衛研年報, **52**, 267-271, 2001.
- 13) McCann, J., Spingarn, N. E., Ames, B. N., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 979-983, 1975.
- 14) Maron, D. M. and Ames, B. N.: *Mutation Res.*, **113**, 173-215, 1983.
- 15) 矢作多貴江: 蛋白質核酸酵素, **20**, 1178-1189, 1975.
- 16) Moore, D. and Felton, J. S.: *Mutation Res.*, **119**, 95-102, 1983.
- 17) Edenharder, R., Wolf-Wandelburg, A., Decker, M., et al.: *Mutation Res.*, **444**, 235-248, 1999.
- 18) Ejchart, A., Chlopkiewicz, B., Czarnomska, A., et al.: *Pol. J. Pharmacol. Pharm.*, **42**, 159-164, 1990.
- 19) Terwel, L. and van der Hoeven, C. M.: *Mutation Res.*, **152**, 1-4, 1985.
- 20) Wood, A. W., Sayer, J. M., Newmark, H. L., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 5122-5126, 1982.
- 21) Hozumi, M.: *GANN*, **60**, 83-90, 1969.
- 22) Diaz Barriga, S., Madrigal-Bujaidar, E. and Marquez, P.: *Mutation Res.*, **441**, 53-58, 1999.
- 23) Cottrell, R. C., Blowers, S. D., Walters, D. G., et al.: *Carcinogenesis*, **4**, 311-314, 1983.
- 24) 小縣昭夫, 安藤弘, 久保喜一: 東京衛研年報, **29-2**, 112-115, 1978.
- 25) Gebhart, E., and Becher, R.: *Hum. Genet.*, **32**, 49-64, 1976.
- 26) Bronzetti, G., Croce, C. D., and Galli, A.: *Mutation Res.*, **267**, 193-200, 1992.
- 27) Clarke, C. H.: *J. Gen. Microbiol.*, **39**, 21-31, 1965.
- 28) Roy, M. K., Kuwabara, Y., Hara, K., et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 1400-1402, 2002.
- 29) Laidlaw, S. A., Dietrich, M. F., Lamtenzan, M. P., et al.: *Cancer Res.*, **49**, 6600-6604, 1989.