

焼き魚の変異原性に対する植物性食品の  
変異原性抑制効果に関する研究

1998年2月

長崎大学大学院海洋生産科学研究科

古 場 久 代

# 目次

第1章 序論	2
第2章 焼き魚の変異原性とそれに及ぼす野菜汁、調味液の影響	8
第3章 焼き魚の変異原性に及ぼすキャベツ汁分画液の抑制効果	33
第4章 ヘテロサイクリックアミンの変異原活性に及ぼすキャベツ汁分画液、ペルオキシダーゼ、ヘムタンパク質、糖およびL-アスコルビン酸の影響	
第1節 ヘテロサイクリックアミンの変異原活性に及ぼすキャベツ汁分画液の抑制効果	49
第2節 化学変異原物質に対するキャベツ汁の高分子画分 (F-I) の変異原活性抑制因子	71
第3節 化学変異原物質の変異原活性に及ぼすヘムタンパク質の抑制効果	89
第4節 ヘテロサイクリックアミンの変異原活性に及ぼす糖およびL-アスコルビン酸の影響	107
第5章 トリプトファンの焼き処理過程へのキャベツ汁分画液および数種化合物の添加効果	111
第6章 総合考察	132
謝辞	142
文献	143

## 第1章 序 論

がんの撲滅をめざして臨床医学はもちろん、基礎医学、生化学、分子生物学や薬学等多種多様な領域およびこれらの境界領域において、多くの研究者により多角的な研究が行われているが、現在依然として悪性腫瘍による死亡率は全死亡率の中で1位を占めている<sup>1)</sup>。がん撲滅をスローガンとした上記の領域の多くの研究の結果、“がんの治療”を目的とした研究だけでは限界があると考えられるようになり、近年では多くの疫学的研究結果から生活環境、なかでも食習慣を中心とした生活習慣ががん発生の重要な因子になっていると推論されるに至っている。従って食生活の過ごし方によってがん発生を抑え、また遅らせることが可能であると期待されている。このような推論がなされるに至ったのは、主にアメリカにおける免疫学的研究結果であった。アメリカは生活習慣や食習慣が異なる多民族国家であり、また宗教的な理由により特異な食習慣を守っている集団も多く、疫学的な研究の基礎が整っている。

ところで、長崎県におけるがん罹患率の年次別推移は、漸次増加の傾向を示している。長崎市腫瘍組織登録委員会の報告（昭和53年調査）<sup>2)</sup>によると、がん罹患率が他県よりも高く（全国値との比が1.5倍）、特に肝がん、子宮がんの罹患率は全国値の2倍近い高値を示している。このことより、地域特異的要因（被爆都市、漁業県）があるのではないかと考えられている。食習慣の面からみると、長崎県は有数の漁業県であり、魚介類を主なタンパク質源としている者が多い。漁獲量が多ければ、魚食文化が発達し、必然的に焼き魚を食べる機会が多くなる。昭和56年に行われた「長崎地区におけるがん患者と他疾患患者の食習慣について」の調査結果<sup>3)</sup>においても、がん患者の魚介類の多食傾向が示されている。

魚を焼く調理過程では数種の化学変異原物質が生成することが知られており<sup>5~12)</sup>、焼き魚を食べる機会が多い程、それに起因する化学変異原物質の摂取量が増大することは確かであろう。一方、このようなある種の化学物質が有する変異原性と発がん性との間には非常に高い相関があることが知られている<sup>13~15)</sup>。

このことが本県におけるがん発生率を高めているのではないかと推論される。以上のことは疫学的調査からの推論であるが、いずれにしろ食生活において変異原物質の摂取を出来るだけ少なくすることは重要なことと考える。

環境中のがん発生要因となる化学物質による発がんは、多段階を経て起こるが、基本的には変異原物質や発がん物質（イニシエーター）により細胞内染色体に修復不能な損傷が生じて、がん細胞に発がんするイニシエーション過程と、この細胞がプロモーターと呼ばれる化学物質によってがん化が促進されるプロモーション過程を経て進行すると考えられている<sup>16,17)</sup>。前者のイニシエーション過程を誘起する化学物質が、変異原物質の短期検出法として世界的に広く用いられている Ames 法<sup>18,19)</sup>によって、環境中や食品中から検索されている。食品中にも天然、添加および汚染による変異原物質以外に、食品の加工、保蔵、調理中に生成する変異原物質の存在が明らかにされ、発がん性の面から食品の安全性についての問題が提起されている。がん発生の大部分は環境要因、特に食品と喫煙の関与は大きく、全体の3分の2にも及ぶという有名な Doll と Peto の論文が提出され<sup>20,21)</sup>、またそれと同じ頃アメリカ国立アカデミーより「食と栄養とがん」報告書が発行され、食習慣ががん発生に大きく影響するとの警告と同時に、野菜や果物などの植物性食品にがん予防の効果が期待されると報告された<sup>21~24)</sup>。食品中の発がん物質としては、亜硝酸とアミン化合物によって生成するニトロソ化合物、ワラビに含まれるプタキロサイド、ソテツの実のサイカシン、かびが生産するアフラトキシン等があるほか、近年、焼き肉や焼き魚あるいはアミノ酸やタンパク質等の加熱分解（焼き処理）物から、ヘテロサイクリックアミン系の強力な変異原物質がみいだされ、その発がん性も確認されている<sup>25~33)</sup>。

以上のように、多くの食品中から種々のイニシエーターが見出されてきたが、一方、先にも述べたように野菜や果物中には変異原物質や発がん物質の活性を抑制する成分が含まれていることが明らかにされてきた。賀田らはホウレン草、キャベツ、ナス、ゴボウその他の野菜ジュースがトリプトファンの加熱分解物で発がん物質である Trp-P-1 (3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole) の

変異原活性を抑制することを見い出した<sup>13)</sup>。この研究を契機に、野菜や果物から種々の抗変異原成分やがん発生抑制物質が検索されている。ニトロソアミンに対するビタミンC<sup>34)</sup>、皮膚がんの発生のイニシエーションを抑制するβ-カロチンとヒジキやワカメ等の海草に多いフコキサンチン等のビタミンA関連物質<sup>35)</sup>、ヘテロサイクリックアミンのTrp-P-1、Trp-P-2 (3-amino-1-methyl-5*H*-pyrido [4,3-*b*] indole) に対するキャベツ汁、ブロッコリー、西洋ワサビ、ダイコンから分離されたペルオキシダーゼ<sup>36~40)</sup> やゴボウから分離されたリグニン様化合物<sup>41,42)</sup> や植物繊維<sup>43,44)</sup>、Trp-P-1 や Glu-p-1 (2-amino-6-methyldipyrido- [1,2-*a*:3',2'-*d*] imidazole) に対する紅茶のある種の成分<sup>45)</sup>、過酸化水素に対する紅茶のテアフラビン<sup>46)</sup>、紫外線照射された大腸菌の修復作用をもつ茶のカテキンやタンニン等のポリフェノール化合物等の抗変異原成分等が確認されている<sup>47)</sup>。その他、十字花科植物 (西洋ワサビ、キャベツ、ブロッコリー等) の組織を磨砕したときにグルコシノレートより生成する強い刺激をもつイソチオシアナートが大腸の発がん予防に関与すること<sup>48)</sup>、甘草 (中国、ロシア、中央アジアに分布) に含まれるサポニンの一種であるグリチルリチン (グリチルレチン酸に2分子のグルクロン酸が結合して生成) が強い発がん性をもつ12-*o*-テトラデカノイルホルボール13-アセテートの誘発する皮膚の炎症を抑制すること<sup>49)</sup>、ディフェノールを基本構造にもつフラボノイド (一種のポリフェノール化合物である場合も多い) のがん細胞の増殖抑制効果<sup>50)</sup>、ニンニクに多く含まれるアリウム属硫化アリル類の作用と考えられている多くのがん細胞の増殖抑制効果<sup>51,52)</sup>、その他、生体内の抗酸化作用に関与しているがん発生を抑制すると推論されているビタミンC、Eやシステイン<sup>53~59)</sup>等、植物性食品とがん抑制に関する研究は近年非常に活発に行なわれている。

以上のように植物性食品には多種の変異原活性抑制成分 (因子) や発がんを抑制する成分が存在することが報告されているが、このうち、魚肉やタンパク性食品を焼き処理した時に生成するヘテロサイクリックアミン系の変異原物質 (発がん物質) の活性を抑制するものとしては、高分子物質のペルオキシダーゼ<sup>36~40)</sup>、リグニン様物質<sup>41,42)</sup> および植物繊維<sup>43,44)</sup>の報告はあるが、ヘテロサイ

クリックアミンに対する低分子の変異原性抑制因子に関する研究は非常に遅れているのが現状である。これまでに、多くの植物性食品中に種々の変異原活性抑制物質（抗変異原物質）の存在が確認されているが、これらは全てある種の変異原物質に抗変異原物質と思われる物質を作用させ、その変異原活性抑制効果を調べて見出されたものである。即ち、既に生成している変異原物質の変異原活性を抑制する作用を調べたものであり、食品の調理・加工過程での変異原物質の生成を抑制する作用に関する植物性食品の影響に関する研究は全く行われていないのが現状である。

筆者は、長崎におけるがん罹患率の増加現象と、地域的に多食傾向にある魚介類の加熱調理（焼き処理）によって生じる変異原物質との関連性に着目し、魚の焼き処理による変異原物質の生成および生成した変異原物質の活性を、調理の工夫や食品材料の配合によって、減少させる可能性を求めて研究を行った。なお、本研究では変異原活性の測定は全て Ames 法の変法で行った。環境中や食品中の発がん性物質を検出する方法には種々の方法がある。例えば、微生物の突然変異による変異原活性を測定する方法、動物の細胞培養による方法、生体高分子とがん原因子の相互作用を分子生物学的手法で調べる方法および実験動物による長期発がん試験による方法等がある。以上のように種々の発がん性物質の検出方法があるが、本研究は焼き魚が実験対象物であり、焼き魚の焦げには変異原活性をもち、かつ発がん性をもつ数種のヘテロサイクリックアミンが生成することが既に知られている<sup>5~12)</sup>。それ故、本研究では変異原活性を測定することにより、発がん性についても異論なく論議できるものとし、Ames 法の変法を採用した。なお、この方法によって検出された変異原活性と発がん性の間には非常に高い相関があることが認められ<sup>13~15)</sup>、この方法は発がん性物質の検出および発がん機構の解明に現在広く利用されている<sup>62~69)</sup>。

そこで本研究では、まず、(1)通常調理法による焼き魚中にも変異原活性が検出されるか否かについて調べ、通常調理加工においてありうる程度の焼き魚中から変異原活性を検出する条件を決定した（これまで、焼き肉や焼き魚から変異原物質を検出している実験は、実際の食生活ではありえない過度の焼き

処理を行っている場合が多い)。次いで、(2)この焼き魚の変異原活性を抑制するための調理加工としてキャベツ汁等の数種の野菜汁や調味液の影響を調べた。その結果、それらに変異原性抑制効果と変異原物質の生成を抑制する働きがあることを示唆する結果を得た(第2章)。さらに、(3)キャベツ汁をゲルろ過して得た高分子画分には、焼き処理によって発現した変異原活性を強く抑制する作用があること、また低分子画分には、焼き処理過程での変異原物質の生成を強く抑制する作用がある画分と上記の両方の作用をもった画分があることを見出した。即ち、調理方法の工夫により、キャベツ汁中の異なる成分の性質を利用し、焼き魚の変異原性を抑制することができることが示唆された(第3章)。そこで次に、この焼き魚を用いた実験で得た知見の化学的な証明を試みた。即ち、タンパク質を焼いたときに生成することが明らかにされている化学変異原物質の Trp-P-1、Trp-P-2 および IQ (2-amino-3-methylimidazo [4, 5-f] quinoline) の変異原活性に対するキャベツ汁分画液の影響を調べた。その結果、キャベツ汁の高分子画分には化学変異原物質のヘテロサイクリックアミンに対し強い変異原活性抑制効果があることを確認し(第4章 第1節)、その作用はペルオキシダーゼによることを確認した(第4章 第2節)。さらに、第3章の知見として前述した両方の作用をもつ低分子画分には、グルコース、フラクトース、シュクロース等の糖やL-アスコルビン酸が存在することに注目し、これらの化合物のヘテロサイクリックアミンに対する変異原活性抑制効果を調べた。その結果、これらの化合物にはいずれも Trp-P-1 に対する抑制作用があることを見出した(第4章 第4節)。次いで、先に述べたキャベツ汁の低分子画分の作用、即ち、魚の焼き処理過程での変異原物質の生成を抑制する作用をより化学的な実験により確認するため、Trp-P-1 や Trp-P-2 の前駆物質であるトリプトファンを用い、これにキャベツ汁分画液を加えた後に焼き処理し、変異原活性を測定した。その結果、第3章で確認したキャベツ汁の2つの低分子画分に高い抑制効果が認められた。一方、トリプトファンを焼いた物質の変異原活性に対してはキャベツ汁の高分子画分に強い抑制効果があることを確認した。即ち、実際の調理における焼き魚で得られた実験結果と化学変異原物質やその前駆体のトリ

プトファンを用いた実験結果がよく一致することを確認し、焼き魚での現象を化学的に立証することに成功した（第5章）。以上のように、キャベツ汁の高分子画分には焼き魚に生成したヘテロサイクリックアミンの変異原活性を強く抑制する効果があること、また低分子画分には焼き処理による変異原物質の生成を抑制する効果があること画分と、上記の両効果がある画分があることを明らかにした。このうち、後者の効果についてはこれまで全く見いだされていなかった効果であり、植物性食品の新たな効力を明らかにすることができた。

以上のように本研究は、魚の加熱調理過程（焼き処理過程）での変異原物質の生成とその変異原活性を、調理法の工夫により抑制する方法を見出し、かつその効果を化学的に証明したものである。本研究で得られた知見は食生活における調理加工の簡単な工夫により、がん予防に役立ち、さらに魚食普及の一助となるものと考えている。

なお、本論文中には「変異原活性」と「変異原性」、「変異原活性抑制効果」と「変異原性抑制効果」など非常に類似した語句が多用されている。これらの語句は従来論文では明確に区別されずに、ほぼ同意語として用いられているが、本論文では出来る限り区別して用いた。各々の前者の語句「変異原活性」および「変異原活性抑制効果」は、既に生成している変異原物質の活性の強さと、その変異原物質の活性を抑制する強さを表現する場合に使用した。各々の後者の語句「変異原性」および「変異原性抑制効果」は前者の意味より広義（曖昧）の意味をもつ場合に使用したほか、以下のような場合に使用した。例えば、変異原性を示さない（変異原活性を示さない）物質 A があり、この物質 A に処理 B を施すと物質 A が変異原性（変異原活性）をもった物質に変化するような場合に、予め物質 A に物質 C を加えて処理 B を施すと変異原活性が低下したとする。このような場合の物質 C の効果を表現する場合“物質 C の変異原性抑制効果”という言葉で表現した。



## 第2章 焼き魚の変異原性とそれに及ぼす野菜汁、調味液の影響

### 緒言

これまで、肉類や魚を焼いた場合に生成する化学変異原物質に対する天然の変異原活性抑制物質（抗変異原物質ともいう）に関する多くの研究があるが<sup>53~56,70~86</sup>、実際の調理加工に近い状態での変異原活性の変化や変異原物質の生成抑制に関して研究した例は非常に少ない<sup>87~89</sup>。特に後者の変異原物質の生成を抑制する現象に関する研究は皆無である。肉類や魚のようなタンパク質性食品を焼いた場合に、変異原活性をもつ発がん物質である種々のヘテロサイクリックアミンが生成することはよく知られているが<sup>25~33</sup>、これらの実験は、魚粉や肉粉を用いてかなり極端な焼き処理を行い、その焦げの中から変異原物質を分離精製している実験が多く、実際の調理の条件とは多少異なっている。そこで本章では、初めに1. 焼き魚の変異原活性の発現に及ぼす加熱条件（焼き処理条件）の影響を調べ、一定の大きさに切った養殖ブリの肉片を用い、通常の調理に近い焼き処理によっても変異原活性が検出されることを確認した。次いで、2. 焼きブリの変異原物質の生成および生成した変異原物質の活性に及ぼす（1）野菜汁、果汁、アスコルビン酸液の影響、（2）調味液の影響、について2つの処理方法により検討した。1つは、ブリの肉片を前記の各種の溶液に浸漬した後、焼き処理を行う方法、他は肉片を焼き処理した後に浸漬する処理方法である。本研究では前者の処理を「浸漬後焼き処理」と呼び、後者の処理を「浸漬前焼き処理」と呼ぶ。この両処理方法で処理した肉片から抽出液（変異原活性測定試料液）を調製し、その変異原活性を測定した。その結果、上記の（1）、（2）の液を用いた上記の両処理方法で焼きブリの変異原活性が著しく減少することを確認した。即ち、焼き魚の調理加工の工夫によりその変異原(活)性を低減させることができることが示唆されたので、それらの結果を本章にまとめた。

## 実験材料ならびに実験方法

### 1. 変異原活性測定試料液（焼きブリ抽出液）の調製

試料の魚として、年間体脂肪量の変動が少ない養殖ブリ（体長約 65cm）を実験材料とした。この背部筋肉を鋭利なメスで切り 2×5×0.5cm の肉片（重量 5 g）にし焼き処理実験に用いた。この養殖ブリの肉片を、(1) 野菜汁（キャベツ、だいこん、しょうが）、果汁（レモン）、0.1% L-アスコルビン酸液、(2) 調味液（50% シュクロース、しょうゆ、50% シュクロース・しょうゆの 1:1 混合液）の各 20 ml に室温で 20 分間浸漬した後、焼き処理した。このように特定の溶液に浸漬後に焼き処理をする場合を、「浸漬後焼き処理」実験と呼ぶ。一方、養殖ブリ肉片を焼き処理した後、各液 20 ml に 20 分間浸漬した場合を、「浸漬前焼き処理」実験と呼ぶ。上記の「浸漬後焼き処理」および「浸漬前焼き処理」した試料に、少量のジメチルスルホキシドを加え、ホモジナイザーで 5 分間磨砕し、ジメチルスルホキシドを合計 15 ml 用いて秤量ビンに移した。これを 37℃ に 24 時間放置後、Whatman ろ紙 No. 2 を用い、吸引ろ過して焼き魚の抽出液を得た。これを変異原活性の測定試料とした。焼き処理の方法は、肉片の表面中央部に熱電対センサーの先端を接着させ、ロースター（ナショナル製 NF-730 型）により行った。その条件は、普通一般に食する程度として 200℃ および 260℃、また、炭化状態になる 400℃ および 600℃ に設定し、この温度に達するまで加熱した。肉片は 1 片ごと上記の焼き処理を行い、各回ロースターを室温まで冷却して使用した。対照試験は、「浸漬後焼き処理」実験の場合には肉片を室温にて 20 分間蒸留水に浸漬した後、焼き処理し（この場合、単に焼き処理しても結果はほぼ同じであった<sup>89)</sup>）、「浸漬前焼き処理」実験の場合は、ロースターによる焼き処理後に 20 ml の蒸留水に 20 分間浸漬した。野菜汁液等の調製は、新鮮な野菜 200 g あるいはレモン 3 個を用い、水洗後水分を十分ふきとり、それぞれジューサーやレモン絞り器により採取した。なお、しょうゆは、チョーコーこいくち（株）長工醤油製、本醸造）を用いた。

## 2. 変異原活性の測定

変異原活性は Ames 法の変法<sup>60, 61)</sup>により測定した。

### 1) 使用菌株およびその前培養

変異原活性の検出にはフレイムシフト型の変異株である *Salmonella typhimurium* TA98 と塩基置換型変異株である *Salmonella typhimurium* TA100 を使用した。これを前培養して使用した。前培養は ニュートリエントプロス (Difco 製) 4 g、塩化ナトリウム 2.5 g を蒸留水 500 ml に溶解し、これを 7.5 ml ずつシリコン栓付 L 字試験管に分注し、オートクレーブにより 121℃ で 20 分間滅菌し、使用時まで冷蔵保存した。次いで、上記の L 字試験管に、予め -80℃ に分注し凍結保存しておいた菌懸濁液 15  $\mu$  l を接種し、これを 37℃ で 16 時間振とう培養した。

### 2) 培 地

(i) 最少グルコースアガー培地 : (a) Vogel Bonner 最少培地 (硫酸マグネシウム・7 水塩 0.2 g、クエン酸・1 水塩 2.0 g、無水リン酸二カリウム 10.0 g、リン酸水素アンモニウム・ナトリウム 4 水塩 3.5 g を蒸留水 100 ml に溶解)、(b) Difco Agar Powder 15 g を蒸留水 800 ml に溶解、(c) D-グルコース 20 g を蒸留水 100 ml に溶解。以上(a)、(b)、(c)をオートクレーブで滅菌した後に混合し、1 プレート (直径 10cm) 当りその 20 ml を用いて最少グルコースアガープレートを作成した。

(ii) ソフトアガー : 0.7% Difco Agar Powder - 0.6% 塩化ナトリウム溶液をオートクレーブで滅菌し、これに 1/20 容量の予め滅菌処理しておいた 0.5 mM L-ヒスチジンおよび 0.5 mM ビオチン溶液を添加後、使用時まで 45℃ に保温し、実験には 1 プレート当り 2 ml を用いた。

### 3) S-9 Mix の調製

S-9 (オリエンタル酵母工業製) は Ames 法で供試菌の代謝活性を高めるため

に加えられるものであり、ラット肝のホモジネートの S-9 分画<sup>61,90)</sup> である。一般に発がん物質は、動物体内で代謝されて直接発がん物質となり、さらに究極発がん物質に活性化される場合が多いと言われており、微生物ではこの代謝経路を欠くものが多い。そのため微生物を用いた突然変異検出実験系に代謝活性化をはかるために、哺乳類の肝ホモジネートが用いられている<sup>61)</sup>。本実験では、ラット肝から調製した S-9 分画を用い、Ames 法の変法に従い、これに以下に示すような化合物を加え S-9Mix とした。

ラット肝ホモジネートの S-9 分画 1 ml に、0.4 M 塩化マグネシウム 0.2 ml、1.65M 塩化カリウム 0.2 ml、1M グルコース-6 リン酸 0.05 ml、0.1M NADPH 0.4 ml、0.1M NADH 0.4 ml、0.25 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.4) 4 ml を加え、蒸留水にて全量を 10 ml とした。S-9Mix は試験ごとに毎回調製し、ろ過滅菌して使用した。

#### 4) 変異原活性の検出

Ames の変法<sup>60,61)</sup>にもとづき、*S. typhimurium* TA98 および TA100 において誘発されたヒスチジン非要求性への復帰突然変異菌数を指標とした。変異原活性測定試料液 (焼きブリ抽出液) およびそれを滅菌水で希釈した検液 (2~20 倍希釈) 0.1 ml を滅菌した小試験管にとり、これに S-9 Mix または 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) 0.5 ml、および前培養した菌懸濁液 (*S. typhimurium* TA98, TA100) 0.1 ml を加え、滅菌水で総量 1.0 ml になるように調整した。これを 37°C で 20 分間振とう保温した後、45°C に保存しておいたソフトアガー 2.0 ml を加え、予め作成しておいた最少グルコースアガープレートに重層した。これを 37°C で 48 時間培養後、プレート上のヒスチジン非要求性の復帰突然変異コロニー数 (His+ 復帰突然変異のコロニー数または復帰突然変異コロニー数と表現) を計測した。なお、次式により、変異原(活)性抑制効果を求めた。

$$\text{変異原(活)性抑制効果 (\%)} = [ (A - B) / A ] \times 100$$

A は対照試験の復帰突然変異コロニー数であり、肉片を焼き処理する前または後に蒸留水に浸漬した試料から抽出液を調製し、その活性測定に使用した液量

ごとの復帰突然変異コロニー数である。Bは蒸留水以外の液に肉片を浸漬した試料から抽出液を調製し、その活性測定に使用した液量ごとの復帰突然変異コロニー数である。なお、AおよびBは各々自然突然変異コロニー数（焼きブリ抽出液に替えて滅菌蒸留水を用いた）を差し引いた数値である。以上の実験は1実験につき、各3プレートを用いて実験し、その平均値で算出した。

## 結 果

### 1. 焼きブリ抽出液の変異原活性

肉片をロースターで焼いた場合の、焼き処理温度およびその温度に到達するまでの所要時間と焼きブリの状態は図 2-1 に示すとおりである。また、各種焼き処理条件における養殖ブリの変異原活性（*S. typhimurium* TA98 に対する変異原活性、S-9 Mix 添加）を図 2-2 に示した。横軸は1プレートあたりの焼きブリ抽出液の $\mu\text{l}$ 数を、縦軸は1プレートあたりの復帰突然変異コロニー数を示している。焼き処理を施さない生養殖ブリの変異原活性は全く認められなかった。普通一般に食する最も理想的な焼き状態を与える（薄べっ甲色の焼き状態を与える）200℃焼き処理の場合、抽出試料液量を増加させても復帰突然変異コロニー数の増加は認められず、変異原活性は認められなかった。しかし、260℃の焼き処理（魚肉の周囲に焦げ目が現われる程度の焼き状態で、家庭の調理加工時にしばしばみられる状態。本章では中間焼とも呼ぶ）の場合は、抽出試料液の増加に伴い復帰突然変異コロニー数は増加し、変異原活性が明瞭に検出された。400℃および600℃の焼き処理（肉片の内部まで炭化した完全炭化状態）では、それぞれ260℃の焼き処理の場合の約2倍および約6倍の変異原活性が認められた。しかし、S-9 Mix 無添加の場合には600℃の焼き処理をしても変異原活性は認められなかった（図 2-3）。また、*S. typhimurium* TA100 用いた場合はS-9 Mix 添加、無添加にかかわらず600℃の焼き処理でも変異原活性はほとんど検出されなかった（図 2-4）。

## 2. 焼きブリの変異原性に及ぼす野菜汁、果汁、L-アスコルビン酸および数種調味液の影響

前項の実験により、260℃以上の焼きブリでは S-9Mix 存在下で *S. typhimurium* TA98 を用いた場合には明らかに突然変異を起こし、変異原活性が検出されることを確認した。この S-9 Mix 存在下の *S. typhimurium* TA98 の復帰突然変異を利用して、野菜汁や調味液等の 260℃での焼きブリの変異原性に及ぼす影響を調べた。

### 1) 野菜汁、果汁、L-アスコルビン酸液の影響

#### (i) キャベツ汁の影響

260℃の焼き処理をした中間焼き養殖ブリの変異原性は、キャベツ汁に浸漬後焼き処理した「浸漬後焼き処理」およびキャベツ汁に浸漬前に焼き処理した「浸漬前焼き処理」の両試料ともにキャベツ汁によって抑制された(図 2-5)。その変異原(活)性抑制効果は、「浸漬後焼き処理」の場合には特に顕著であり 90%以上であった。一方、「浸漬前焼き処理」の場合は 60%程度であった。なお、変異原(活)性抑制効果の算出は復帰突然変異のコロニー数が高い値を示した抽出試料液 50  $\mu$  l/プレートおよび 100  $\mu$  l/プレートの場合の数値を用い、その平均値で示した。また、図には示していないが 200℃の焼き処理の場合は、生魚と同様に変異原活性を示さなかったため、キャベツ汁浸漬処理の影響も認められなかった。400℃の焼き処理をした炭化養殖ブリでは、「浸漬後焼き処理」の検体のみに弱い抑制効果が認められた。600℃の焼き処理をした完全炭化状態の場合は、強力な変異原活性が検出され、キャベツ汁による抑制効果は認められなかった。なお、蒸留水による「浸漬後焼き処理」および「浸漬前焼き処理」した検体について、同様の検出実験を行った結果、蒸留水による浸漬処理を行わなかった検体の変異原活性との差異が全くみられなかったため、260℃焼き処理の対照試験としては蒸留水による浸漬処理を行わずに 260℃焼き処理した検体の結果のみを示した。

次に、上記の 260℃の焼き処理で認められたキャベツ汁の変異原(活)性抑制因子が、加熱変性しやすい、例えばタンパク質等によるものか否かを推定するため、20 分間加熱沸騰させたキャベツ汁を使用して、「浸漬後焼き処理」試料を調製しキャベツ汁の加熱処理の影響を調べた。その結果、加熱したキャベツ汁に浸漬しても変異原性は抑制され、生キャベツ汁の抑制効果との差異は認められなかった(図 2-6)。

#### (ii) ダイコン汁、ショウガ汁、レモン汁およびL-アスコルビン酸の影響

260℃焼き処理の養殖ブリの変異原性に対するダイコン、ショウガ、レモン等の汁液および、L-アスコルビン酸の 0.1%溶液(レモン汁中のビタミンC含量に近似した濃度)の影響について、「浸漬後焼き処理」と「浸漬前焼き処理」の両実験により調べた。その結果、いずれの場合にも変異原(活)性抑制効果が認められた(図 2-7~10)。ダイコン汁、ショウガ汁、レモン汁および 0.1%L-アスコルビン酸液の「浸漬後焼き処理」および「浸漬前焼き処理」試料の 50  $\mu$  l / プレートと 100  $\mu$  l / プレートの平均値で計算した変異原(活)性抑制効果はそれぞれダイコン汁の場合 95%および 72%、ショウガ汁の場合 92%および 72%、レモン汁の場合 80%および 48%、0.1%L-アスコルビン酸液の場合 91%および 82%であり、「浸漬前焼き処理」よりも「浸漬後焼き処理」において、変異原性を抑制する効果は大きかった。

## 2) 調味液の影響

### (i) 「浸漬後焼き処理」の影響

養殖ブリを数種の調味液に浸漬した後に 260℃の焼き処理を行なった場合の TA98 (S-9 Mix 存在下) に対する変異原活性を図 2-11 に示した。調味液としては 50%シュクロース液、しょうゆ、50%シュクロース液としょうゆ混合液(1:1) を用いた。その結果、50  $\mu$  l / プレートと 100  $\mu$  l / プレートの平均値では対照試験に比べて変異原活性は、しょうゆ浸漬の場合約 74%、シュクロース液浸漬の場合約 69%、シュクロースとしょうゆ混合液に浸漬の場合は約 56%抑制さ

れ、いずれの調味液処理によっても、浸漬処理の効果が認められた。

## (ii) 「浸漬前焼き処理」の影響

260℃の焼き処理した養殖ブリを、各種調味液に浸漬した場合の変異原活性を図 2-12 に示した。先と同様 50  $\mu$ l/プレートと 100  $\mu$ l/プレートの平均値では、しょうゆ浸漬の場合約 90%、シユクロース液浸漬の場合約 84%、シユクロースとしょうゆ混合液浸漬の場合約 81%の抑制効果が認められた。これらの調味液は焼き魚に生成した変異原物質の変異原活性を、著しく抑制する効果をもつことが確認された。

## 考 察

養殖ブリの焼き処理温度の違いによる変異原活性の差異、並びに焼きブリの変異原物質の生成および焼きブリに生成した変異原物質の活性に及ぼす野菜汁、果汁、アスコルビン酸および調味液の影響を *S. typhimurium* TA98 および TA100 を用いて Ames の変法により検討した。また、同時に S-9Mix の添加、無添加の影響を調べた。

初めに、焼きブリから抽出した試料液（変異原性測定試料液）の Ames 法に対する適用性について考察する。Ames 法はヒスチジン要求性の菌株を用い、ヒスチジン非要求性への復帰突然変異を検出する方法である。しかしながら Ames 法では、培地中に一定量のヒスチジンを添加する方法が採用されている。一方、本実験での変異原活性測定試料液（焼きブリ抽出液）には、当然魚肉中の遊離のヒスチジンが含まれていると考えられる。従って、この試料液中のヒスチジンが Ames 法の結果に影響を及ぼすことが考えられるが、本章および次章（第 3 章）の実験は、焼き処理したブリ肉片の変異原活性の強弱を、他の魚種や他の食品と比較したものではなく、試料中のヒスチジン含量に関しては同一条件下で比較した実験であるため、判定結果にはほとんど影響を与えないものと判断



した。また、Ames 法では抽出試料液中にヒスチジンが多くなると、自然突然変異コロニー数は増加するといわれている<sup>61)</sup>。このことは、本実験のように抑制効果を調べる実験においては、抑制効果を負（ネガティブ）の方向に動かす因子にはなっても、正（ポジティブ）の方向に動かす因子にはなり得ないことを意味している。さらに、図 2-2~4 に示したように、生魚の抽出液の復帰突然変異コロニー数が 1 プレート当りの抽出液の増加に伴って増加するような傾向は全く認められなかった。これらのことから本実験の範囲では、魚肉中の遊淮のヒスチジン量は変異原活性の測定にほとんど影響していないことは明らかである。

200℃の焼き処理の場合（調理加工として最も理想的に焼けた状態になる）は、焼き処理を施さない養殖ブリの場合と同じく、TA98、TA100 に対する変異原活性は S-9 Mix の有無に関係なく全く認められなかった。肉片に焦げが生じ始める 260℃の焼き処理の場合は、TA98（S-9 Mix 添加）に対しては、測定に使用した抽出試料液の増加に伴い復帰突然変異のコロニー数は明らかに増加し、抽出試料液 50  $\mu$  l および 100  $\mu$  l / プレーートの平均値では生魚の場合の約 10 倍になった。さらに、焼き処理温度の上昇に伴い、変異原活性は増加し、400℃および 600℃の焼き処理（炭化状態になる）では復帰突然変異コロニー数は生魚の約 20 倍および約 60 倍になった。なお、S-9 Mix 無添加の場合は、TA98 に対して 600℃の焼き処理した試料でも変異原性は認められなかった。また、TA 100 に対しては S-9 Mix の有無に関係なく、焼きブリの変異原活性は検出されなかった。以上のように、復帰突然変異を起こすために S-9 Mix が必要であったこと、および塩基置換型の突然変異を起こす TA 100 では変異原活性が検出されなかったことは、焼き処理中に、代謝活性化を必要とするフレームシフト型（TA98 はこの型に属す）の変異原物質が生成され、塩基置換型の変異原物質は生成されていないことを示唆している。以上の結果より、焼き魚の変異原活性は S-9 Mix 存在下で TA98 を用いることにより検出できることが明らかになった。なお、タンパク質の加熱分解物は、S-9 Mix による代謝活性化を必要とし、フレームシフト型の TA-98 に強い活性を示すことが報告されており<sup>62)</sup>、本実験はこれら

の報告と一致していた。また、魚の焼き状態と変異原活性の関係は、実際の調理加工であり得る程度の焼き状態、即ち肉表面に焦げ目が現れる程度の焼き状態（本実験では260℃の焼き処理）で、変異原活性をもった物質が生成していることが明らかになった。

以上の結果を基に以下の実験はTA98を用い、S-9 Mix 0.5 mlを添加して焼き魚の変異原活性を調べた。

タンパク質やアミノ酸のトリプトファンを高温加熱したときに生成するTrp-P-1やTrp-P-2等の化学変異原物質に対する野菜抽出液の変異原活性抑制効果については、既に報告されている<sup>25~33, 79~81)</sup>が、ここでは、養殖ブリ肉片を用い、実際の調理加工に近い焼き魚を作り、その過程で野菜汁やL-アスコルビン酸および数種の調味液を用いて肉片の浸漬処理を行い、焼き魚の変異原性に及ぼすそれらの浸漬処理の影響を調べた。

260℃の焼き処理をした中間焼き養殖ブリの変異原性は、「浸漬後焼き処理」および「浸漬前焼き処理」の両処理方法においてキャベツ汁によって抑制された。その変異原性抑制効果は1プレート当りの抽出試料液50  $\mu$  lと100  $\mu$  lの場合の平均値では、「浸漬後焼き処理」の場合が約90%、「浸漬前焼き処理」の場合が約60%であり、前者の処理方法の方がより効果的であった。また予め加熱処理（20分間沸騰処理）したキャベツ汁を用い、変異原性抑制効果が高かった「浸漬後焼き処理」実験によりキャベツ汁の加熱沸騰処理の影響を調べた。その結果、生キャベツ汁と同程度の変異原性抑制効果を示す結果を得た。このことにより、キャベツ汁中の「浸漬後焼き処理」における変異原性抑制因子には耐熱性の物質が存在することが示唆された。

260℃の焼き処理の養殖ブリの変異原性に対するダイコン汁、ショウガ汁およびL-アスコルビン酸液の抑制効果はキャベツ汁と同様に「浸漬後焼き処理」および「浸漬前焼き処理」の両処理によって認められた。両処理法による変異原性抑制効果は抽出試料液50  $\mu$  lと100  $\mu$  lの場合の平均値でみると、それぞれダイコン汁浸漬で95%および72%、ショウガ汁浸漬で92%および72%、レモン汁浸漬で80%および48%、0.1%アスコルビン酸液（キャベツ汁中のビタミン

C含有量とほぼ同等) 浸漬で91%および82%となり、「浸漬前焼き処理」よりも「浸漬後焼き処理」において抑制効果は高かった。各野菜汁等の両処理方法における変異原性抑制因子が同一物質によるか否かについては全く不明であるが(この点に関しキャベツ汁については第3章~第5章で明らかにした)、これまで、タンパク質を焼き処理した場合に生成する Trp-P-1 や Trp-P-2 およびその他の数種の化学変異原物質に対して、種々の野菜汁が変異原活性抑制効果を示すことが報告されている<sup>36~44)</sup>。しかしながら、これらの報告を本実験にあてはめると、「浸漬前焼き処理」実験に相当するものであって、「浸漬後焼き処理」実験に相当する報告は皆無である。「浸漬前焼き処理」に相当するこれまでの多くの研究の中で、植物性食品の特定成分の変異原活性抑制効果を明らかにした研究は以外に少ない。序論にも述べたように緑黄色野菜中のペルオキシダーゼの効果<sup>36~40)</sup>、ゴボウのリグニン様高分子化合物の効果<sup>41, 42)</sup>、植物繊維が変異原物質を吸着することによる効果<sup>43, 44)</sup> および紅藻中のある種の成分<sup>94)</sup>の報告がある程度である。その他、生体内の抗酸化作用に関与している物質として、ビタミンE、ビタミンC(L-アスコルビン酸)などの効果が推定されているが、Ames 法等による具体的な変異原活性抑制効果を証明した研究はない。これらの既報の研究結果から推察すると、本実験での「浸漬前焼き処理」実験における野菜汁の抑制効果をもたらす因子としてペルオキシダーゼが考えられる。その他の因子として、本実験ではL-アスコルビン酸単独でもこの効果が認められた。このことより野菜汁中の抑制因子の1つはL-アスコルビン酸であると推察した。しかしながら、ビタミンC含有量の少ないショウガ汁(食品成分表ではキャベツの1/20程度)でも強い抑制効果が認められたこと、また、ビタミンC含量の多いレモン汁の「浸漬前焼き処理」の場合の抑制効果があまり高くないことなどより、アスコルビン酸の影響が大きいとは考えられない。また、先にも述べたように植物性食品の変異原性抑制作用の1つとして繊維質への吸着も報告されている<sup>43, 44)</sup>が、本実験結果は、野菜、果物の汁液を使用したものであるため、少なくとも不溶性の繊維物質の影響はないと推察した。一方、前述したように、本実験の結果より野菜汁には「浸漬後焼き処理」効果をもたらす

因子が含まれていることが明らかになった。即ち、焼き処理過程での変異原物質の生成を抑制する因子が野菜汁に存在することが示唆された。

次に、焼きブリの変異原性に及ぼす調味液の影響を、つけ焼き、照り焼に広く用られる砂糖およびしょうゆについて検討した。なお、実験では砂糖に替えてシュクロースを用いた。50%シュクロース液、しょうゆ、および50%シュクロース液としょうゆ混合液(1:1)を用いたが、いずれの調味液でも養殖ブリを「浸漬前焼き処理」した場合、強い変異原活性抑制効果が認められた。また、「浸漬後焼き処理」した場合も変異原活性抑制効果が認められた。しかし、野菜汁やレモン汁の場合と異なり「浸漬前焼き処理」の場合の方が「浸漬後焼き処理」の場合よりもその抑制効果はやや強く現れた。シュクロースやしょうゆの影響の1つにメイラード反応(アミノカルボニル反応)の生成物が考えられる。この点に関し、魚肉を焼き処理することによって生成するヘテロサイクリックアミンに対して、アミノカルボニル反応により生成されるメラノイジンが、変異原活性抑制効果をもつことが報告されている<sup>91)</sup>。従って、本実験で確認した調味液の抑制効果には、メラノイジンの影響があるとも考えられる。しかし一方、Hanaokaの研究報告<sup>92)</sup>によると、メラノイジンの褐色色素に、ある種の菌の生育阻害効果も認められている。また、牛肉を焼いた時に生成するIQに対してはメイラード反応によって生成する2-メチルまたは2.5-ジメチルピラジンがIQの変異原活性を増強するとの逆の効果の報告もある<sup>93)</sup>。本実験で確認したシュクロースやしょうゆの浸漬効果にメイラード反応物質が関与しているか否か不明であるが、シュクロースやしょうゆは魚肉の焼き調理の過程で使うものであり、調理加工の工夫により焼き魚の変異原活性がある程度抑制できることが示唆された。

以上の結果から、焼き魚におろしただいこんを添える、しょうがしょうゆで食す、レモン汁をかけるなど、古くからの食習慣として用いられている「浸漬前焼き処理」の手法に加え、本章の実験で初めて明らかとなった「浸漬後焼き処理」による変異原活性抑制効果は、“照り焼”等の調理法に応用できることであり、調理法の工夫により焼き魚の変異原性をさらに抑制しうることを示してお

り、その効用の普及が期待される。

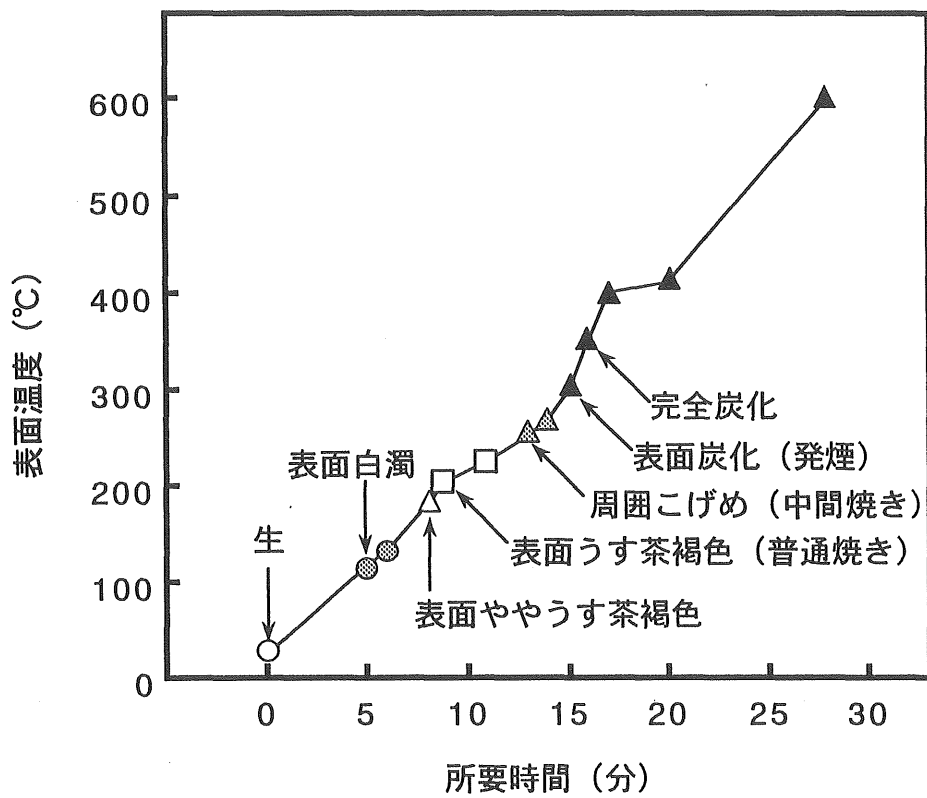


図 2-1. 焼き処理時の所要時間と肉表面の到達温度と肉片の状態

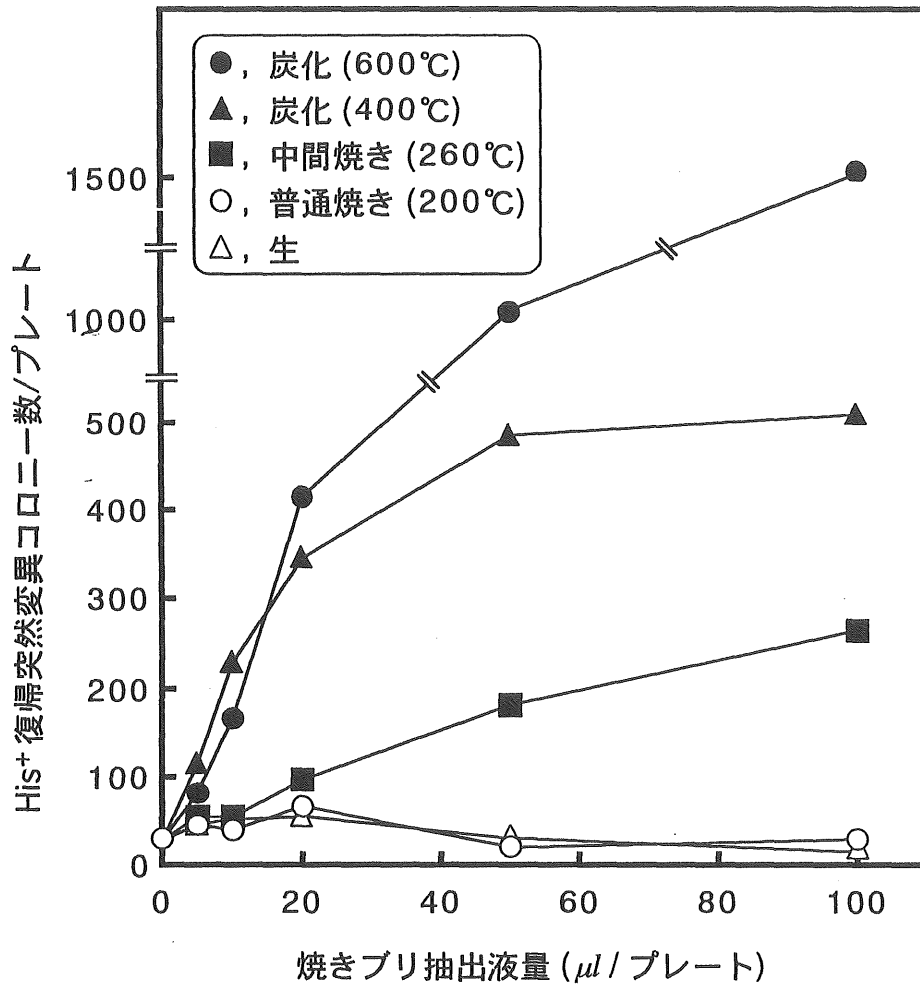


図 2-2. 各種焼き処理条件におけるブリの変異原活性  
(*S. Typhimurium* TA98 使用, S-9 mix 添加)

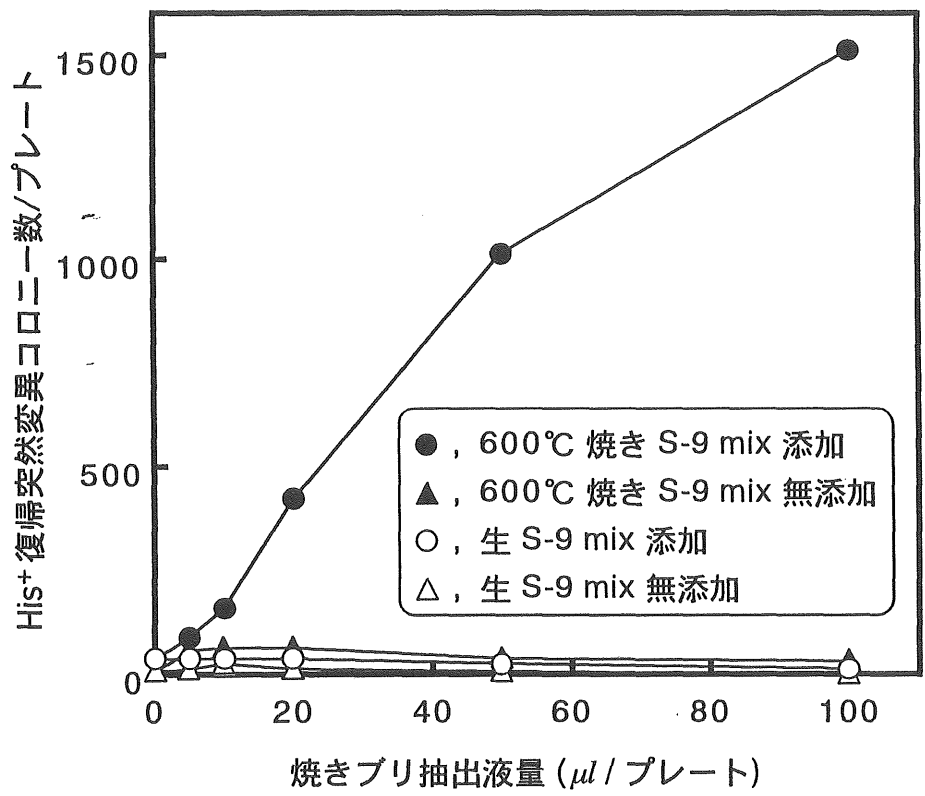


図 2-3. 炭化ブリの変異原活性  
(*S. Typhimurium* TA98 使用, S-9 mix 添加または無添加)



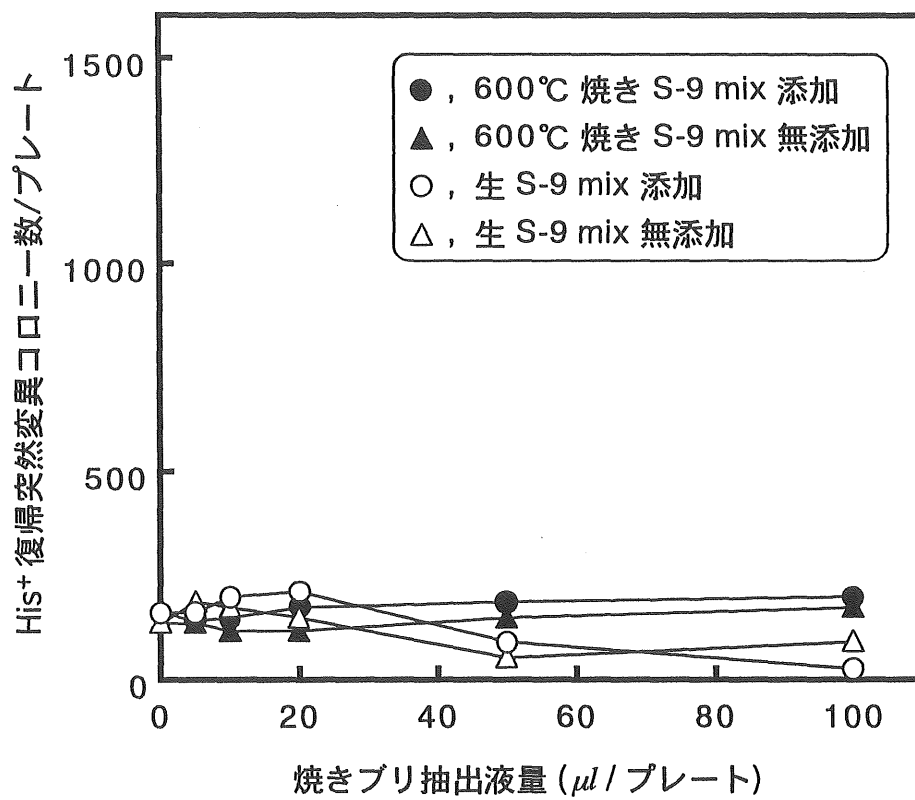


図 2-4. 炭化ブリの変異原活性  
(*S. Typhimurium* TA100 使用, S-9 mix 添加または無添加)

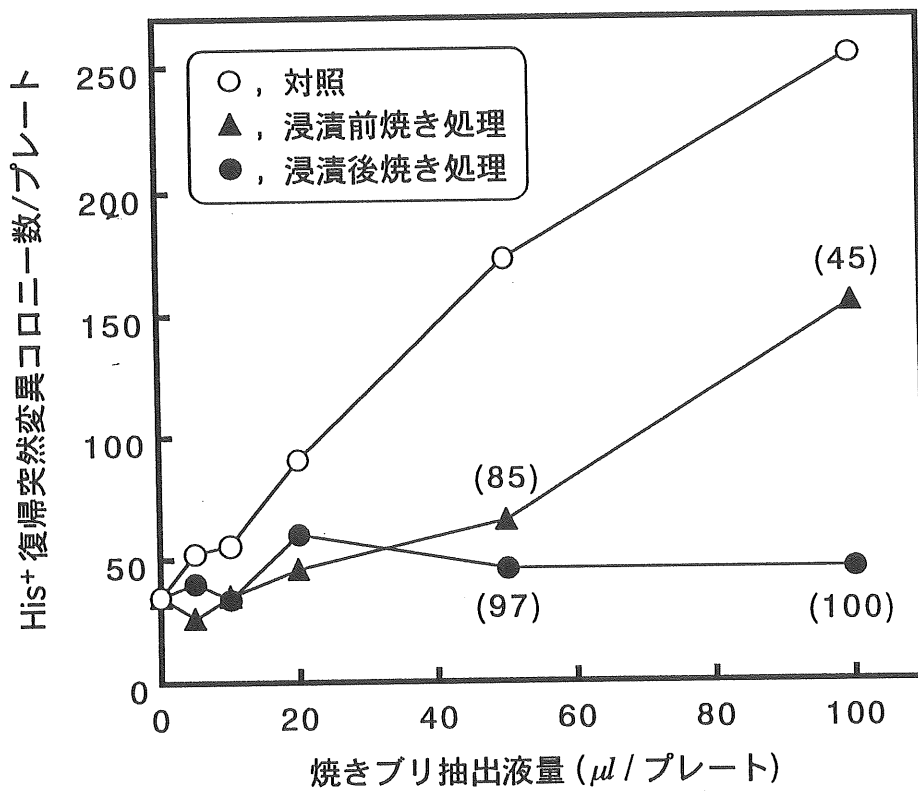


図 2-5. 中間焼き (260℃) ブリの変異原性に及ぼす  
生キャベツ汁浸漬の影響  
(*S. Typhimurium* TA98 使用, S-9 mix 添加)  
( ) 内の数値は変異原活性抑制効果 (%)

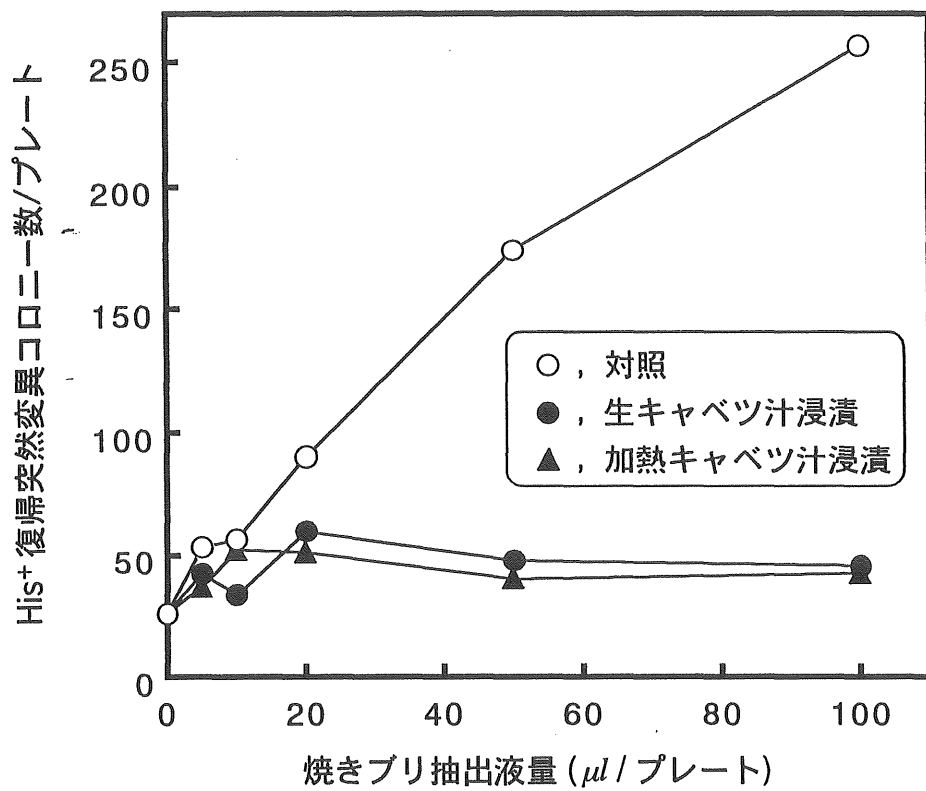


図 2-6. 「浸漬後焼き処理」実験による中間焼き (260℃) ブリの変異原性に及ぼす加熱キャベツ汁浸漬の影響 (*S. Typhimurium* TA98 使用, S-9 mix 添加)

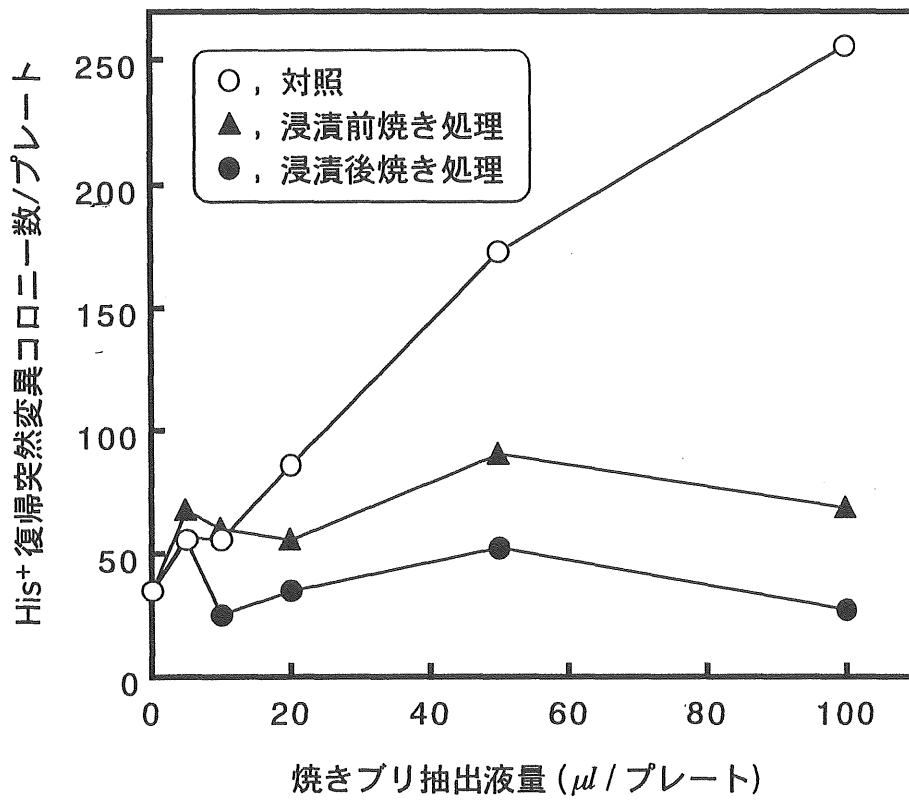


図 2-7. 中間焼き (260℃) ブリの変異原活性に及ぼす  
ダイコン汁浸漬の影響  
(*S. Typhimurium* TA98 使用, S-9 mix 添加)

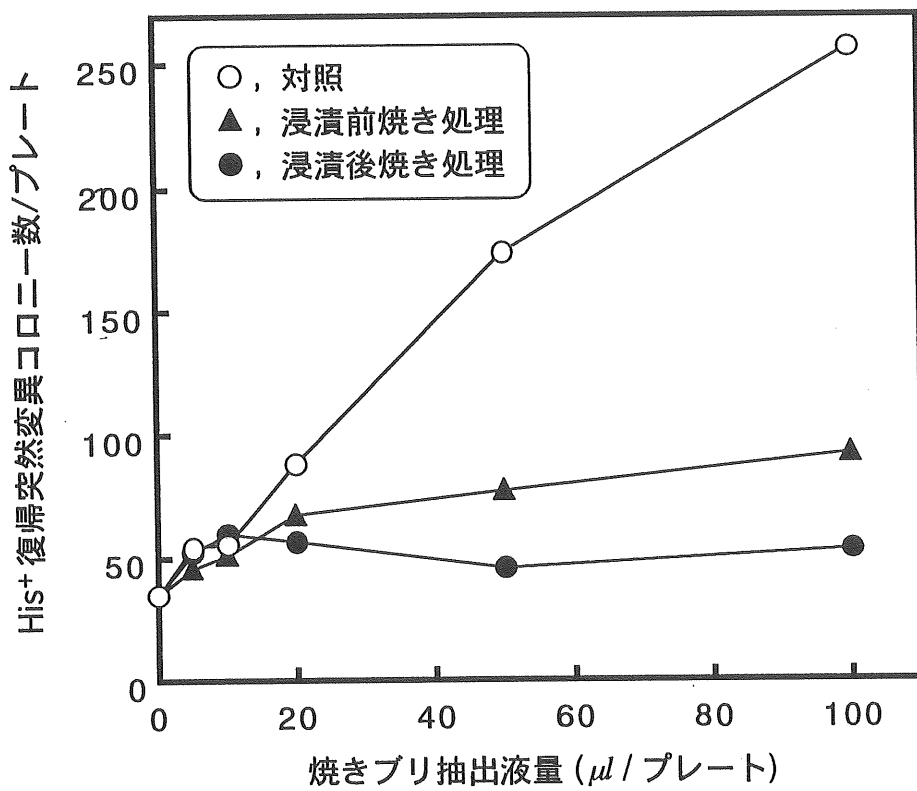


図 2-8. 中間焼き (260℃) ブリの変異原活性に及ぼす  
 ショウガ汁浸漬の影響  
 (*S. Typhimurium* TA98 使用, S-9 mix 添加)

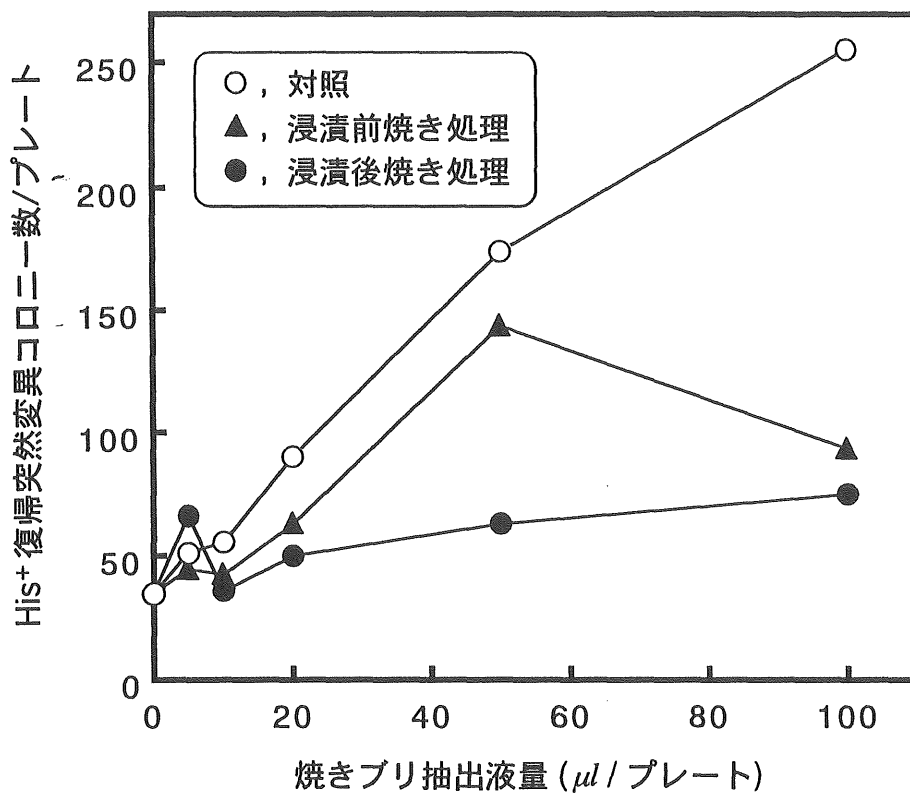


図 2-9. 中間焼き (260℃) ブリの変異原活性に及ぼす  
レモン汁浸漬の影響  
(*S. Typhimurium* TA98 使用, S-9 mix 添加)

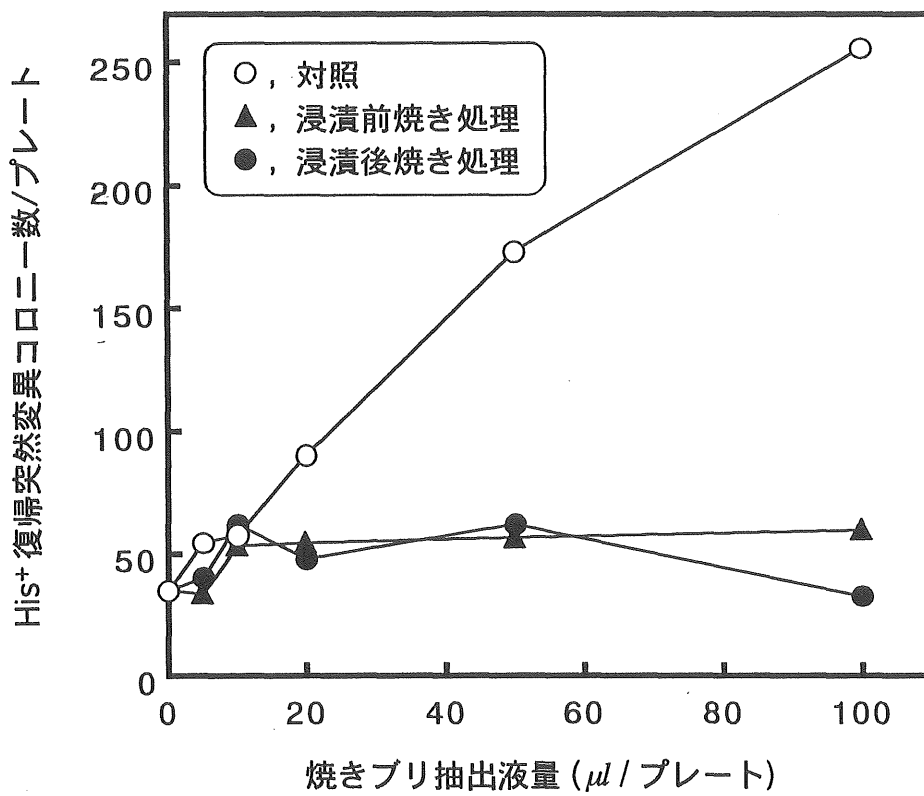


図 2-10. 中間焼き (260°C) ブリの変異原活性に及ぼす 0.1% L-アスコルビン酸溶液浸漬の影響 (*S. Typhimurium* TA98 使用, S-9 mix 添加)

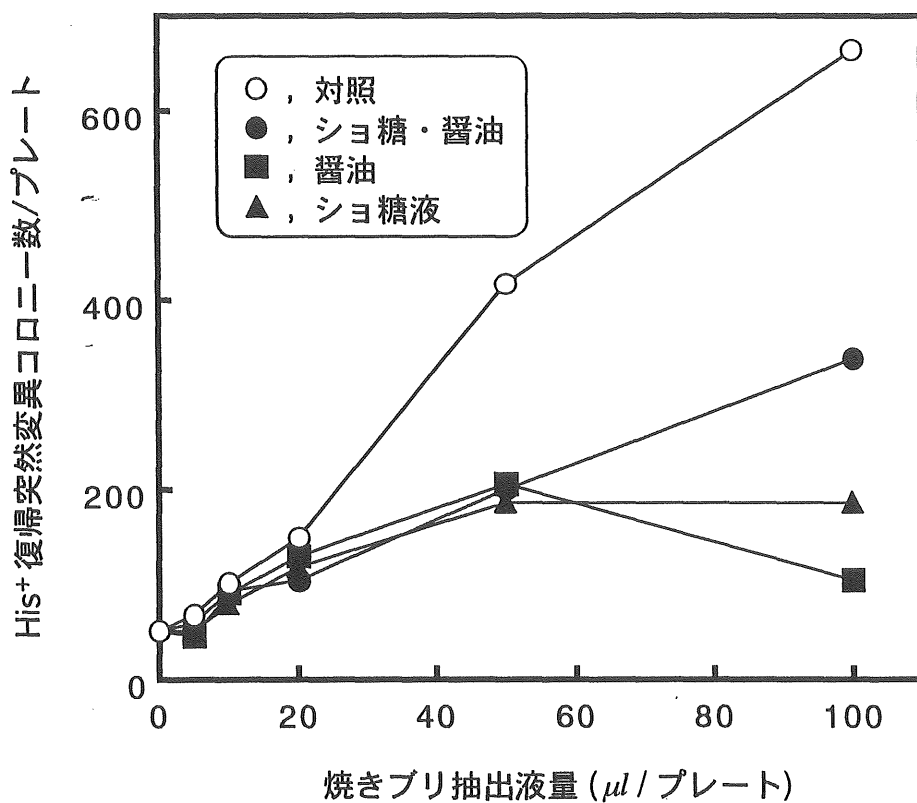


図 2-11. 「浸漬後焼き処理」実験による中間焼き (260℃) ブリの変異原活性に及ぼす各種調味液の影響 (*S. Typhimurium* TA98 使用, S-9 mix 添加)



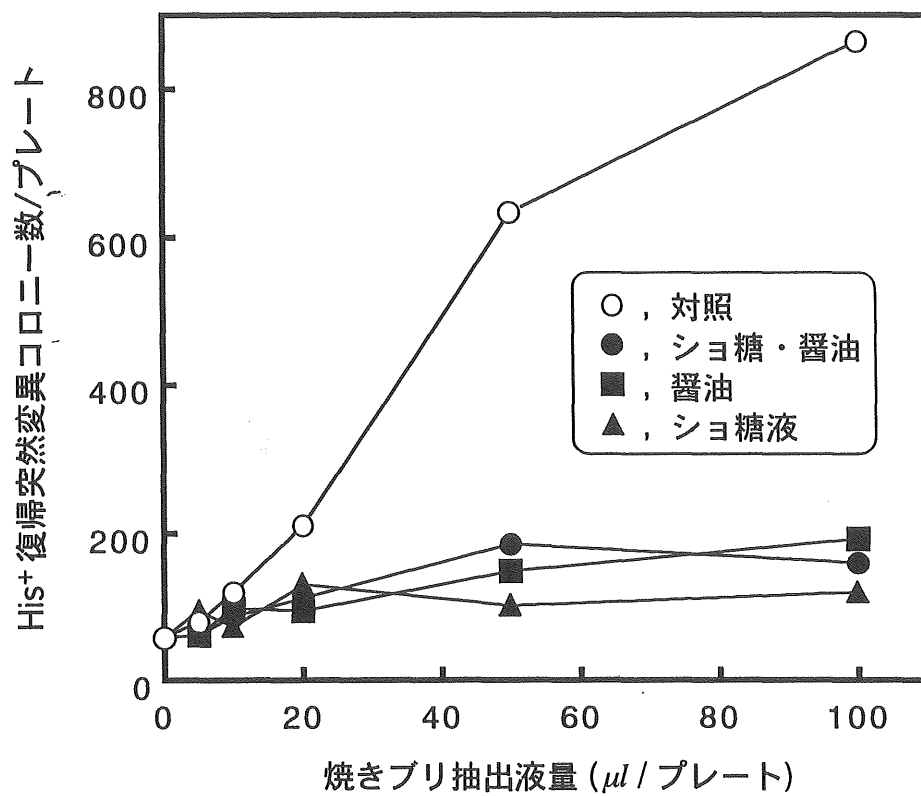


図 2-12. 「浸漬前焼き処理」実験による中間焼き (260℃) ブリの変異原活性に及ぼす各種調味液の影響 (S. Typhimurium TA98 使用, S-9 mix 添加)

### 第3章 焼き魚の変異原性に及ぼすキャベツ汁分画液の抑制効果

#### 緒言

第2章では養殖ブリを焼き処理することによって生じる変異原性を調理加工の工夫により低減させることを目的として野菜汁、果汁等による浸漬実験を行い変異原性抑制効果を調べた。即ち、ブリ肉片を焼き処理（260℃）する前または後にこれらの液に浸漬した試料から調製した抽出液を用いて、*S. typhimurium* TA98 に対する変異原(活)性抑制効果を調べた。その結果キャベツ汁、ダイコン汁、ショウガ汁およびレモン汁には「浸漬後焼き処理」でも「浸漬前焼き処理」でも焼き魚の変異原(活)性を低下させる作用があることを明らかにした。このことにより、これらの汁液には焼き処理により生成した変異原物質の活性を抑制する作用以外に、焼き処理時における変異原物質の生成を抑制する作用があることが推察された。

第3章では、第2章で焼き魚の変異原(活)性を強く抑制したキャベツ汁の効果をさらに究明するために、キャベツ汁をゲルろ過によりいくつかの画分に分画し、各画分の焼き魚の変異原物質の活性に及ぼす影響および変異原物質の生成を抑制する作用について検討した。

#### 実験方法

##### 1. ゲルろ過によるキャベツ汁の分画

新鮮なキャベツ（全体）を洗浄した後、表面の水分を除きジューサー（ナショナル製 MT-C 22）にかけ、採取した汁液を遠心分離（20,000×*g*、20 分間）し、上清（キャベツ汁）を得た。この液を凍結乾燥後、少量の蒸留水に溶解し不溶物を遠心除去（20,000×*g*、20 分間）し、蒸留水で平衡化した Sephadex G-100 または Sephadex G-25 のカラムでゲルろ過した。溶出は蒸留水で行ない、そ

の 280nm の吸光度をめやすに分画試料液を得た。なおゲルろ過の詳細は各実験結果の項に記した。

## 2. 変異原活性測定試料液（焼きブリの抽出液）の調製

変異原活性の測定試料液は、ブリ肉片を、第 2 章の方法に準じて処理し調製した。養殖ブリの背部筋肉を  $2 \times 5 \times 0.5$  cm の肉片（重量としては約 5.0 g）にし、これを 260℃ 焼き処理する前または後にキャベツ分画液 20 ml に室温で 20 分間浸漬した。前者の処理を「浸漬後焼き処理」、後者を「浸漬前焼き処理」と呼ぶ。各焼き処理はロースター（ナショナル製 NF-730 型）中央部の特定位置に 1 片のブリ肉片を置き、その中央部に熱電対センサーの先端部を接着させ、260℃ になるまで加熱した。なお、第 2 章の結果で、焼きブリの変異原活性は、200℃ 焼き処理では非加熱の生ブリと同程度の復帰突然変異コロニー数を示し、変異原活性は検出されないこと、260℃ の焼き処理では明らかに検出され、かつ変異原活性が活性測定に使用した抽出試料液（焼きブリの抽出液）の増加に伴い増大すること、400℃ 以上では肉内面が炭化し、変異原活性が著しく高くなりキャベツ汁等の変異原性抑制効果の確認がし難くなることを認めた。そこで第 3 章では焼き処理温度を 260℃ に設定した。肉片は 1 片ごとにキャベツ汁分画液に浸漬前または後に上記の焼き処理を行い、各回ロースターを室温まで冷却して焼き処理した。この条件で肉片の周囲に焦げ目が現れる程度の焼き状態になった。所定の方法で処理した肉片に 15 ml のジメチルスルホキシドを加え、5 分間ホモジナイズし、これを 37℃ の恒温槽中で 24 時間保温後、Whatman ろ紙 No.2 を用い吸引ろ過して変異原活性測定試料液（焼きブリの抽出液）を得た。対照試験としては、「浸漬後焼き処理」の場合は、肉片を室温にて 20 分間蒸留水に浸漬処理した後、焼き処理した（この場合、蒸留水に対する浸漬処理を省いて焼き処理しても結果はほぼ同じであった）。「浸漬前焼き処理」の場合は、焼き処理後に 20 ml の蒸留水に 20 分間浸漬した。以上の実験の他、「浸漬前焼き処理」に相当する実験として、対照試験と同じ方法により焼き処理して調製した抽出試料液にキャベツ汁の各分画液を加えて変異原活性の抑制効果を調べた。

### 3. 変異原活性の測定

前章と同様、Ames 法の変法<sup>60,61)</sup>に基づき、誘発された *S. typhimurium* TA 98 のヒスチジン非要求性復帰突然変異のコロニー数を変異原活性の指標とした。通常、焼きブリ抽出液の 5~100  $\mu$  l に第 2 章の場合と同様に調製した S-9 Mix を 0.5 ml および前培養した *S. typhimurium* TA 98 菌懸濁液 0.1 ml を加え、次いで、ジメチルスルホキシドで総液量を 0.7 ml にし、さらに滅菌蒸留水 0.3 ml 加え 37°C で 20 分間振とう保温した。これに第 2 章に記した方法で調製したソフトアガーを 2 ml 加え、予め作成しておいた最少グルコースアガープレート (径 10cm) に重層した。これを 37°C、48 時間培養後、プレート上の復帰突然変異コロニー数を計測した。また、変異原活性測定試料液 (ブリ抽出液) の各試験液量ごとの変異原活性抑制効果は第 2 章に記した計算式により求めた。なお、Ames 法

(Ames 法の変法) は微生物およびラット肝ホモジネートの特定分画の S-9 を用いる実験であるため、実験日時や S-9 のロットが異なれば、同一量の変異原物質に対して復帰突然変異のコロニー数が異なることが多い。従って本実験では、復帰突然変異のコロニー数では直接比較せず、各回の「対照試験」の試料液の復帰突然変異コロニー数を基にして第 2 章に示した計算式により算出した「変異原(活)性抑制効果 (%)」で比較した。

## 結 果

### 1. キャベツ汁の濃度による変異原性抑制効果の比較

焼き魚の変異原性に及ぼすキャベツ汁の濃度の影響を「浸漬後焼き処理」実験で調べた。キャベツ汁の原液とこれを蒸留水で 2 倍または 4 倍に希釈したキャベツ汁の各々 20 ml にブリ肉片を 20 分間浸漬し、次いで 260°C の焼き処理後、常法により焼きブリ抽出液を調製した。なお対照試験はキャベツ汁の代りに蒸留水を用いて行った。これらの抽出液の 5~100  $\mu$  l を用い Ames 法の変法によ

り復帰突然変異のコロニー数を計測し、その結果を図 3-1 に示した。なお、括弧内の数値は第 2 章に示した計算式より算出した変異原性抑制効果 (%) である。対照試験では、抽出液量の増加にともない復帰突然変異のコロニー数の増加がみられたが、キャベツ汁原液に浸漬した場合、その変異原性は強く抑制 (75~89%) された。また、2 倍希釈キャベツ汁液を用いて処理した試料でも同様に強い変異原性抑制効果 (50~67%) を示したが、4 倍希釈では抑制効果は弱くなり、22~27% 程度であった。

## 2. キャベツ汁の高分子画分と低分子画分の変異原性抑制効果の比較

約 95 g の新鮮なキャベツからキャベツ汁 50 ml (20,000×g、20 分間遠心澄清) を得た。これを Sephadex G-100 のカラム (3.6×50 cm) でゲルろ過した結果を図 3-2 に示した。フラクション No. 11~27 を高分子画分 (F-I)、それ以後の溶出部 (フラクション No. 28~67) を低分子画分 (F-II) とした。各画分を凍結乾燥後、各々 25 ml の蒸留水に溶解して浸漬用試料液とした。その 20 ml を用い、第 2 章の実験方法に記した「浸漬後焼き処理」の方法によりブリ肉片を 260℃ 焼き処理を行い、その抽出液を 5~100 μl 用い、Ames 法の変法により復帰突然変異のコロニー数を計測して変異原活性を調べた (図 3-3)。キャベツ汁分画液で処理した場合には、両試料とも対照試験に比べ明らかに復帰突然変異のコロニー数は減少していたが、高分子画分より低分子画分で処理した試料の方が低い変異原活性を示した。即ち「浸漬後焼き処理」の場合、変異原性抑制効果は高分子画分 (24~40%) より低分子画分 (58~66%) の方で顕著であった。このような傾向は数回の実験で繰り返し認められ、再現性が確認された。

## 3. 低分子画分の細分画試料の変異原性抑制効果の比較

前項の「浸漬後焼き処理」実験で高分子画分より低分子画分の方が変異原性抑制効果が高いことを確認した。そこで低分子画分をさらに細分画して変異原性抑制効果を調べた。約 620 g のキャベツから 350 ml キャベツ汁を得た。これを凍結乾燥後 75 ml の蒸留水に溶解後、遠心分離 (10,000×g、20 分間) し、上

清液を Sephadex G-25 カラム (4.0×60 cm) でゲルろ過し、図 3-4 の結果を得た。フラクション No. 23~42 を高分子画分 (F-I) とし、それ以後の溶出部を 3 画面し、それぞれ F-II-1、F-II-2 および F-II-3 とした。各画分を凍結乾燥後、各々 55 ml の蒸留水に溶解し、その内 20 ml を用いて常法によりブリ肉片を「浸漬後焼き処理」実験に供し、得られた焼きブリ抽出液の変異原活性を調べた (図 3-5)。その結果、低分子画分の F-II-3 で処理した試料の変異原活性が最も低く、次いで F-II-2 画分で処理したものが低かった。一方高分子画分の F-I で処理したものは、対照試験より変異原活性は低かったものの、F-II-2 および F-II-3 で処理のものよりも高値を示した。F-I および F-II-3 についてはさらに数回実験し、図 3-5 の傾向を再確認した。なお、図 3-4 には 280nm の吸光度以外に Lowry 法による 600nm の吸光度 (チロシン量に換算)、フェノール硫酸法による糖の検出位置、およびアスコルビン酸とシステインを単独に流した場合の溶出位置を示した。糖、アスコルビン酸、システイン等の低分子物質は F-II-2 画分の位置に溶出した。

#### 4. F-II-3 画分の熱処理による変異原(活)性抑制効果の変化

F-II-3 画分を 20 分間煮沸処理後、液量をもとにもどし、変異原(活)性抑制効果に及ぼす熱処理の影響を調べた。なお本項では「浸漬後焼き処理」と「浸漬前焼き処理」の両処理方法で実験し、その変異原活性を図 3-6 に示した。「浸漬後焼き処理」の場合、即ちブリ肉片を F-II-3 画分に浸漬後 260℃ の焼き処理を行った試料からの抽出液では F-II-3 の加熱、非加熱にかかわらず、両試料とも低い復帰突然変異のコロニー数を示した。即ち、両試料とも対照試験と比較すると変異原性は強く抑制 (66~82%) されていた。一方、「浸漬前焼き処理」の場合、即ち、ブリ肉片を 260℃ の焼き処理後に F-II-3 画分に浸漬して得た焼きブリ抽出液では、F-II-3 を非加熱の場合には「浸漬後焼き処理」ほどではないが 50~56% 変異原活性は抑制されていたのに対し、熱処理した F-II-3 に浸漬した場合には、その抑制効果はほぼ完全に消失した。

## 5. 焼きブリ抽出液の変異原活性に及ぼすキャベツ汁分画液の影響

前項の実験で「浸漬後焼き処理」におけるキャベツ汁の各分画液の影響を調べたが、本項では「浸漬前焼き処理」に相当する実験として、以下の方法により各分画液の変異原活性抑制効果を調べた。対照試験と同じ方法で260℃の焼き処理をし、抽出液を調製した。1 プレート当り、抽出液 100  $\mu$  l とキャベツ汁の各分画液を 5~100  $\mu$  l 添加し常法により変異原活性を調べた。その結果を図 3-7 に示した。なお、この場合の対照試験は、キャベツ汁の分画液の代りに蒸留水 100  $\mu$  l を加えて復帰突然変異コロニー数を調べた。「浸漬前焼き処理」の場合、変異原活性抑制効果は F-I 画分で最も強く、次いで F-II-1 画分であった。しかし、「浸漬後焼き処理」で最も高い変異原性抑制効果を示した F-II-3 画分には強い抑制効果は認められなかった。F-II-2 画分についても F-II-3 画分と同様の傾向が認められた。なお、F-I 画分にはペルオキシダーゼ活性が検出された。

## 考 察

キャベツ汁により、焼き魚の変異原性物質の生成が抑制されたり、また生成した変異原物質の活性が抑制されれば、魚肉の焼き処理等の調理加工にとって有益な知見となりうる。キャベツ汁から焼き魚の変異原性抑制因子を見いだすことを目的とし、第3章ではキャベツ汁を Sephadex G-100 または Sephadex G-25 により分画し、ブリ肉片を 260℃の焼き処理する前または後に各分画液に浸漬し、焼きブリの変異原活性および変異原性の発現に及ぼす影響を調べた。

キャベツ汁を Sephadex G-100 により高分子画分と低分子画分に2分し、両試料の「浸漬後焼き処理」における変異原性抑制効果を調べた。その結果、低分子画分の方が変異原性抑制効果が高いことを確認した。即ち、低分子画分には焼き処理過程で起こる変異原性物質の生成を抑制する効果があることが推察された。さらに、低分子画分を細分画するためキャベツ汁を Sephadex G-25 により分画して同様の実験を行った。その結果、最も遅く溶出した F-II-3 画分で浸漬

処理した場合に変異原性が最も低く、次いで F-II-2 画分で低値を示した。これらの結果より、(1) キャベツ汁中の低分子画分には焼き魚の変異原物質の生成を抑制する因子が存在すること、(2) 低分子画分の中のある種の成分が、260℃の焼き処理により強い変異原活性抑制物質に変化し、この物質が結果的に後処理効果（浸漬前焼き処理による効果）をもたらしている可能性があること、(3) 焼き処理過程で生成する変異原物質に対して、焼き処理前の浸漬時に吸着した成分が残存していて、その変異原性を抑制したことなどが考えられる。しかしながら、F-II-3 を予め熱処理（100℃、20分）すると「浸漬後焼き処理」の場合には強い変異原性抑制効果が認められたが、「浸漬前焼き処理」の場合にはその効果は認められなかった。このことは、ブリ肉片のみを焼き処理した場合に生成する変異原物質を不活性化する作用は F-II-3 を 100℃で熱処理すると消失することを意味している。このことより、上記(2)の仮定は否定される。また上記(3)の仮定があるとするならば、「浸漬後焼き処理」の場合よりも「浸漬前焼き処理」の抑制効果が高くなるはずである。しかしながら、F-II-3 画分にはそのような性質は認められていない。以上のことより、F-II-3 画分には(1)の仮定の因子が存在することが強く示唆された。即ち、第2章の実験でキャベツ汁には焼きブリの変異原物質の生成を抑制する因子が存在すると推察したが、それは主に低分子物質であることが示唆された。一方、キャベツ汁各分画液の「浸漬前焼き処理」（本章では 260℃で焼き処理したブリ肉片から抽出した液に対してキャベツ汁の分画液を反応させた実験方法によったため、第2章の「浸漬前焼き処理」実験と多少方法は異なるが、理論的にはほぼ同じであると考えられる）と「浸漬後焼き処理」の効果について比較した結果、「浸漬前焼き処理」では高分子画分（F-I）が最も強い抑制効果を示し、次いで低分子画分の F-II-1 であった。このうち、F-I 画分の抑制効果にはペルオキシダーゼが寄与していると推察した（この画分にペルオキシダーゼが存在することは第4章で述べる）。「浸漬後焼き処理」で強い効果を示した F-II-3 画分と F-II-2 画分の「浸漬前焼き処理」効果はかなり低かった。即ち、焼きブリで生成した変異原物質の活性を抑制する効果はキャベツ汁の高分子画分の方が強く、焼き処理過程での変異原物



質の生成を抑制する力は低分子画分の方が強いことが明らかとなった。

タンパク質やアミノ酸の高温加熱分解時に生成する変異原物質（発がん性物質）としては、トリプトファン由来の Trp-P-1、Trp-P-2、グルタミン酸由来の Glu-P-1 (2-amino-6-methyl-dipyrido [1, 2-*a*: 3', 2'-*d*] imidazole)、Glu-P-2 (2-amino-dipyrido [1, 2-*a*: 3', 2'-*d*] imidazole)、タンパク質由来の 2-amino- $\alpha$ -carboline、焼き魚や焼き肉由来の IQ (2-amino-3-methylimidazo [4, 5-*f*] quinoline) や MeIQ (2-amino-3, 4-dimethyl-imidazo [4, 5-*f*] quinoline) 等が知られている。ブリ肉片を 260℃の焼き処理した過程では上記のような変異原物質が生成していることが考えられる。第3章の結果から、キャベツ汁に含まれる高分子画分 (F-I) はこれらの物質の変異原活性を抑制する作用が強く、低分子画分 (F-II-3 および F-II-2) はこれらの変異原物質の生成を抑制する作用が強いことが示唆された。これまでに、植物性食品についてタンパク質やアミノ酸の高温加熱分解時に生成した変異原物質の活性を抑制する因子に関する報告は多いが<sup>53-56, 70-86)</sup>、高温加熱分解時の変異原物質の生成を抑制する因子に関する研究は皆無であり、本実験で認めた低分子画分に含まれる変異原物質生成抑制因子の同定に興味をもたられる。第2章と本章の結果より、キャベツ汁による「浸漬後焼き処理」はタンパク性食品の焼き処理過程での変異原物質の生成を抑制する優れた手段であることが示唆された。このことは、種々の植物性食品を用いた調理加工方法の工夫により、タンパク質やアミノ酸の高温加熱分解により生成する変異原物質の生成を抑制できることを意味している。一方、Shinohara ら (1991) がホーレン草の 40% エタノール抽出物の透析内液を Sephadex G-100 でゲルろ過し、低分子画分に、Trp-P-2 に対する変異原活性抑制効果があることを報告している。この実験は著者らの「浸漬前焼き処理」実験に相当するものであり、非加熱の F-II-3 を用いた「浸漬前焼き処理」試料で、あまり強くはないが変異原活性抑制効果が検出された結果 (図 3-6、3-7) と類似している。

植物性食品中の高分子の変異原活性抑制因子としては、吸着作用による植物繊維の作用<sup>43, 44)</sup> やヘテロサイクリックアミンに対するペルオキシダーゼ<sup>36-40)</sup> の報告およびゴボウのリグニン様物質の報告があり、低分子の変異原活性抑制

因子としてはニトロソアミン類に対するアスコルビン酸<sup>34)</sup>、システイン等の還元物質<sup>53~59)</sup>やフェノール化合物<sup>59)</sup>、ビタミンAおよびビタミンE<sup>53,54)</sup>などにも効果があることが推察されている。しかし、タンパク性食品由来の変異原物質に対する植物性食品由来の低分子化合物による抑制効果についての報告<sup>80)</sup>は非常に少ない。図3-4に示したように、アスコルビン酸やシステインはF-II-2画分の位置に溶出した。F-II-3画分は、標準物質として使用したアスコルビン酸やシステインより遅れて溶出したが、「浸漬後焼き処理」では最も高い変異原性抑制効果を示した。この画分にはSephadex G-25に弱い吸着をおこしたものが遅れて溶出したとも考えられる。またキャベツ汁の試料によって異なるが、F-II-2画分はわずかに赤色を帯びている場合があった。これはカロチノイド色素と考えられるが詳細は不明である。しかし、この色調はF-II-3画分にはほとんど認められなかった。このことより、F-II-3画分の「浸漬後焼き処理」効果にビタミンA関連物質が関与している可能性は否定的である。その他、ビタミンEおよびクロロフィルは脂溶性物質であるためF-II-3画分に含まれている可能性は非常に少ない。実験結果には示さなかったが、F-II-3画分はニンヒドリン反応に陰性でLowry法に陽性であった。従って、この画分には低分子のフェノール化合物が含まれている可能性が推察された。

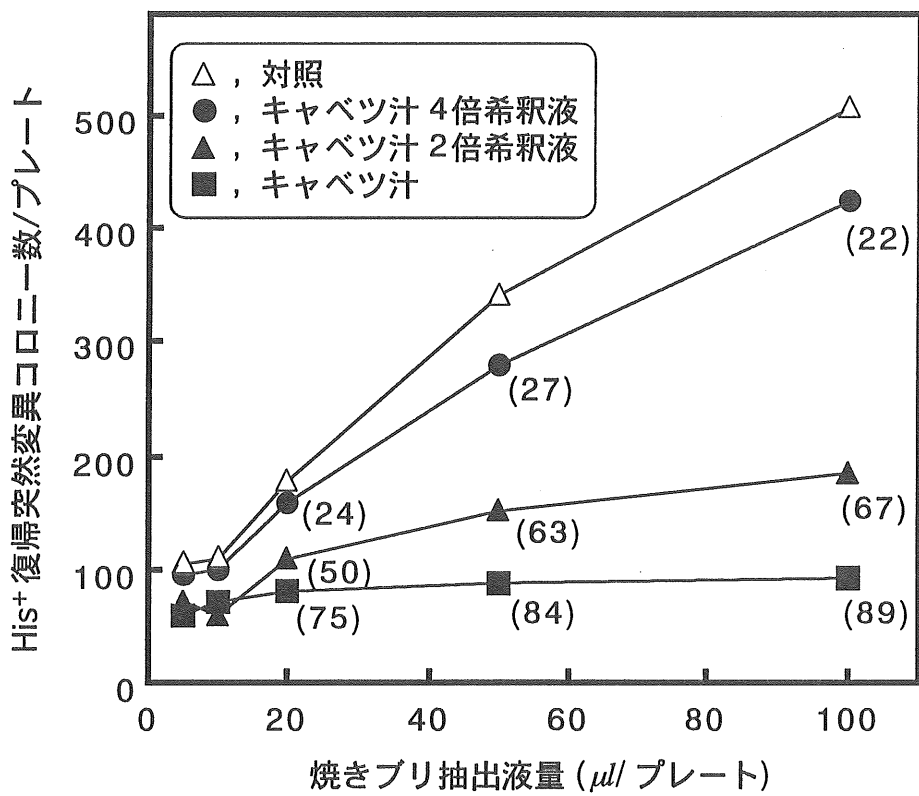


図 3-1. 「浸漬後焼き処理」実験による焼きブリの変異原性に及ぼすキャベツ汁の影響  
 (S. Typhimurium TA98 使用, S-9 mix 添加)  
 ( ) 内の数値は変異原活性抑制効果 (%)

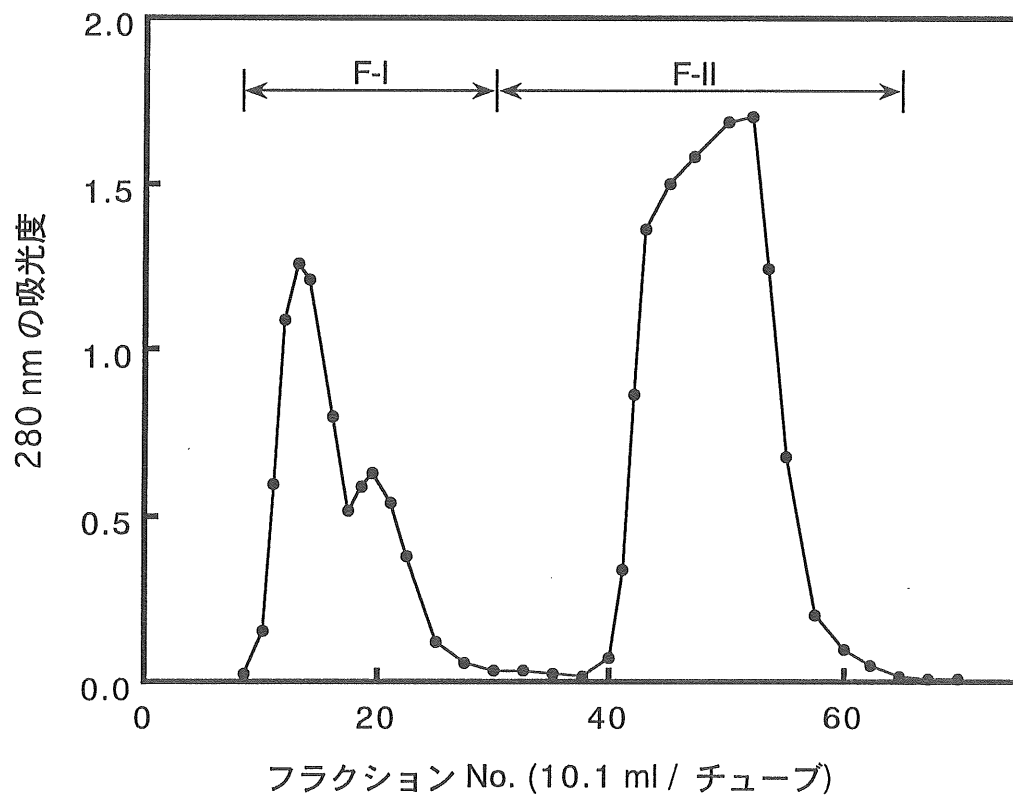


図 3-2. キャベツ汁の Sephadex G-100 カラム (3.6×50 cm) によるゲルろ過の溶出パターン (溶出溶液：蒸留水)

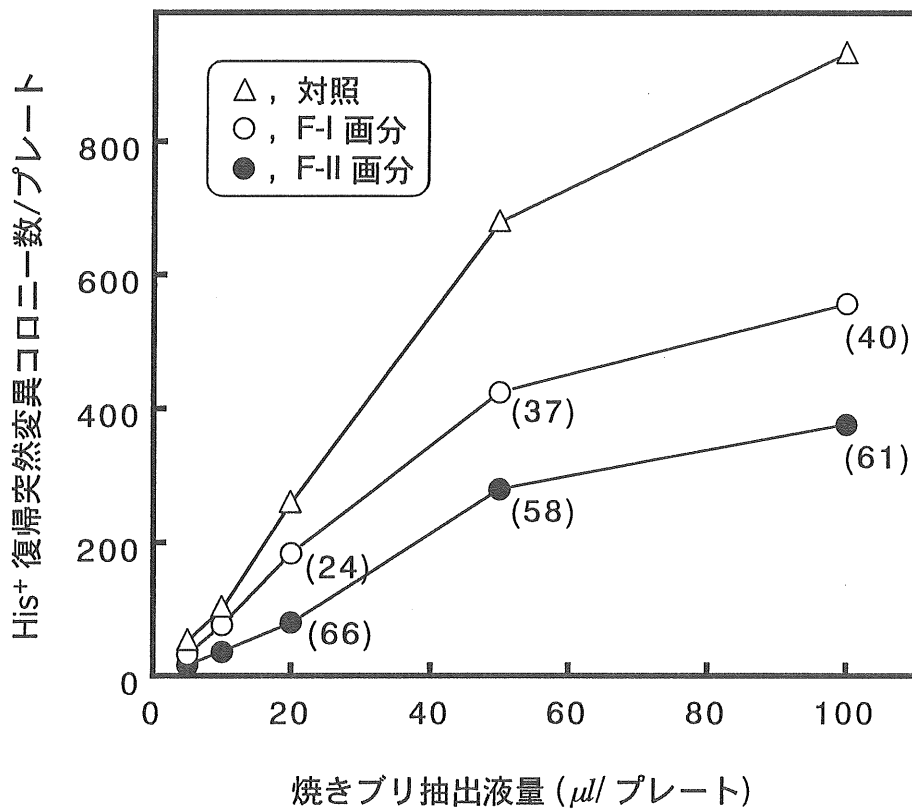


図 3-3. 「浸漬後焼き処理」実験による焼きブリの変異原性に及ぼすキャベツ汁分画液の影響  
 (*S. Typhimurium* TA98 使用, S-9 mix 添加)  
 ( ) 内の数値は変異原活性抑制効果 (%)

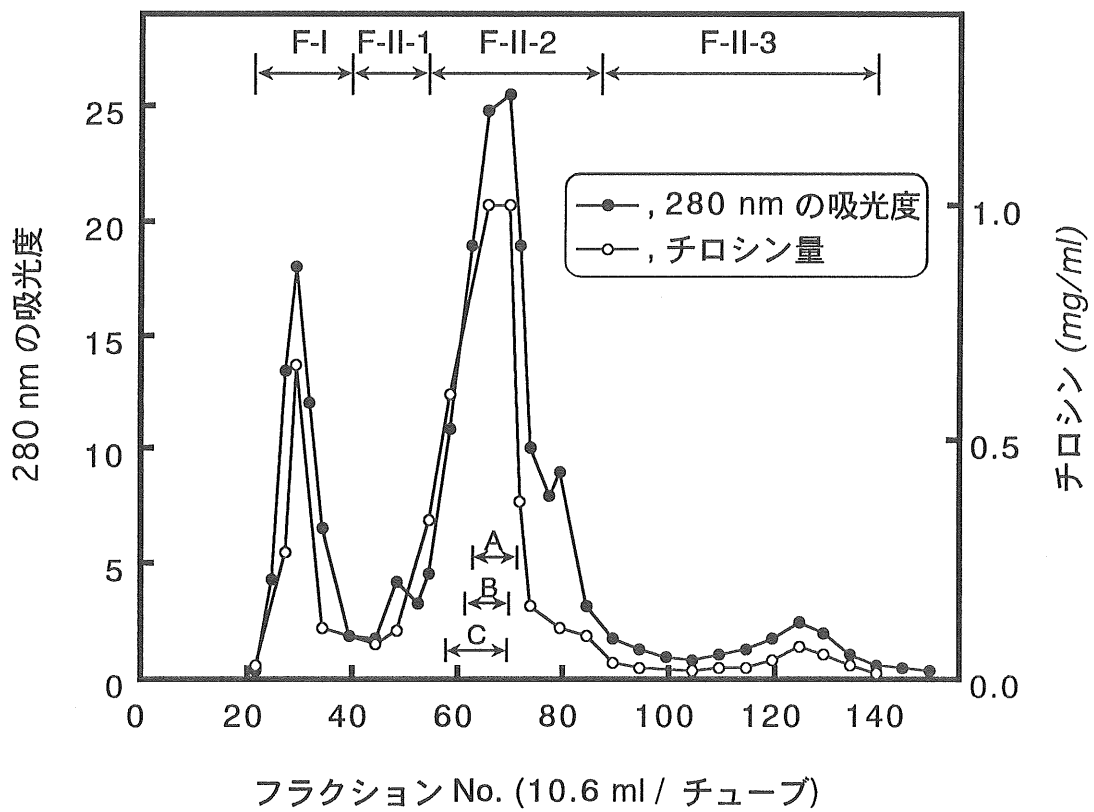


図 3-4. キャベツ汁の Sephadex G-25 カラム (4 × 60 cm) によるゲルろ過の溶出パターン

溶出溶液：蒸留水

A: L-アスコルビン酸溶出域、B: システイン溶出域、

C: フェノール-硫酸反応 陽性域

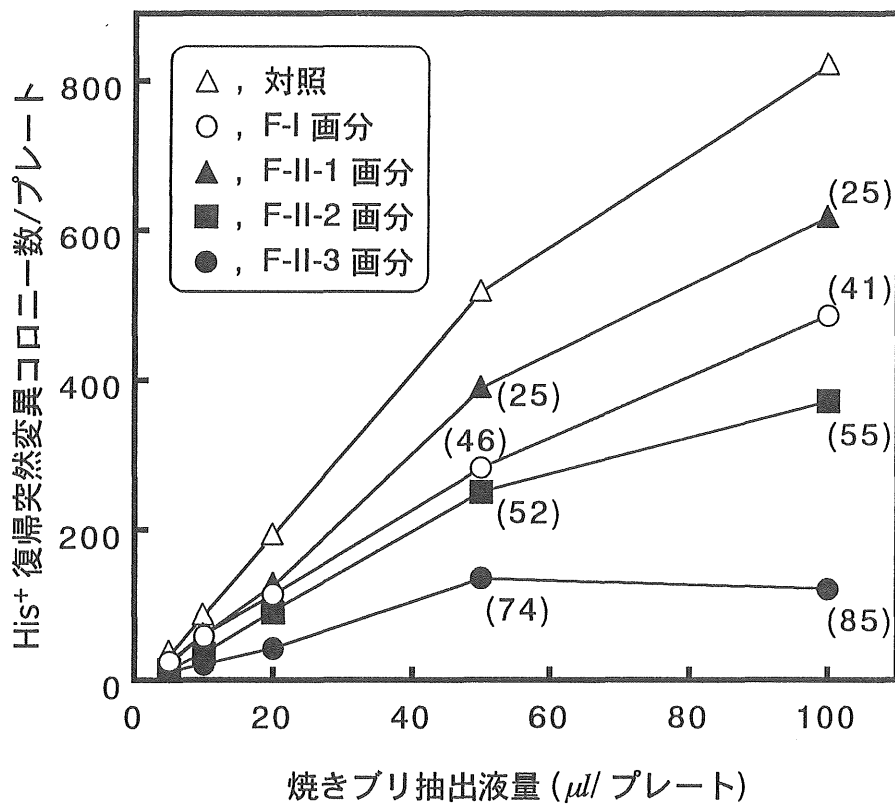


図 3-5. 「浸漬後焼き処理」実験による焼きブリの変異原性に及ぼすキャベツ汁分画液の影響  
 (*S. Typhimurium* TA98 使用, S-9 mix 添加)  
 ( ) 内の数値は変異原活性抑制効果 (%)

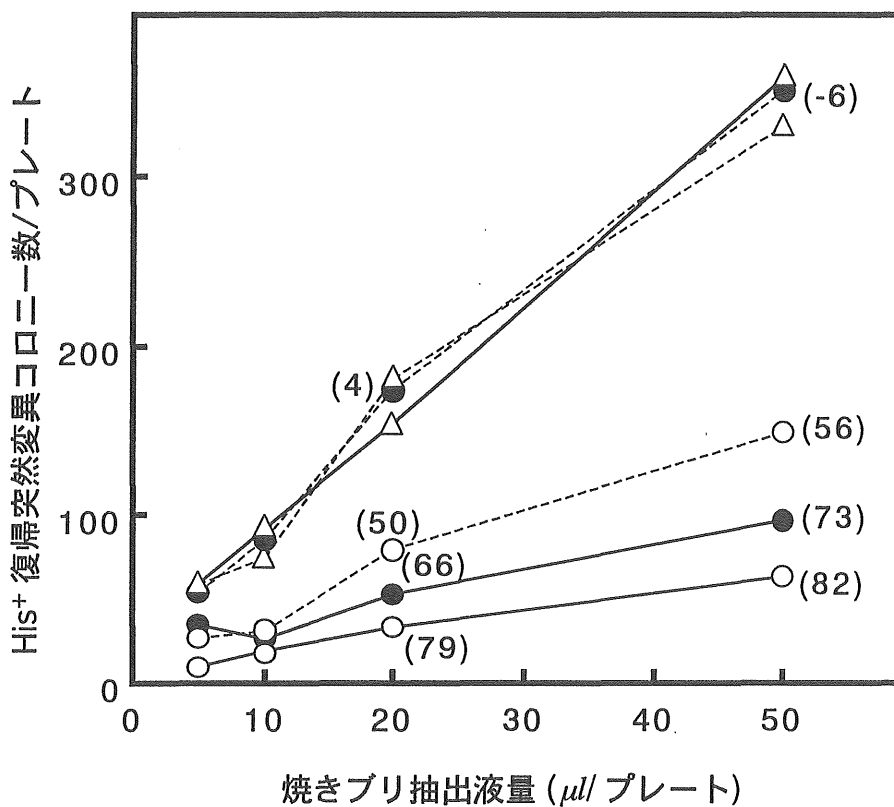


図 3-6. 「浸漬前焼き処理」および「浸漬後焼き処理」実験による焼きブリの変異原性に及ぼすキャベツ汁F-II-3 画分の影響 (*S. Typhimurium* TA98 使用, S-9 mix 添加)

-----, 浸漬前焼き処理; ———, 浸漬後焼き処理;  
 Δ, 対照; ●, 100°C, 20分間加熱処理; ○, 加熱処理なし  
 ( ) 内の数値は変異原活性抑制効果 (%)



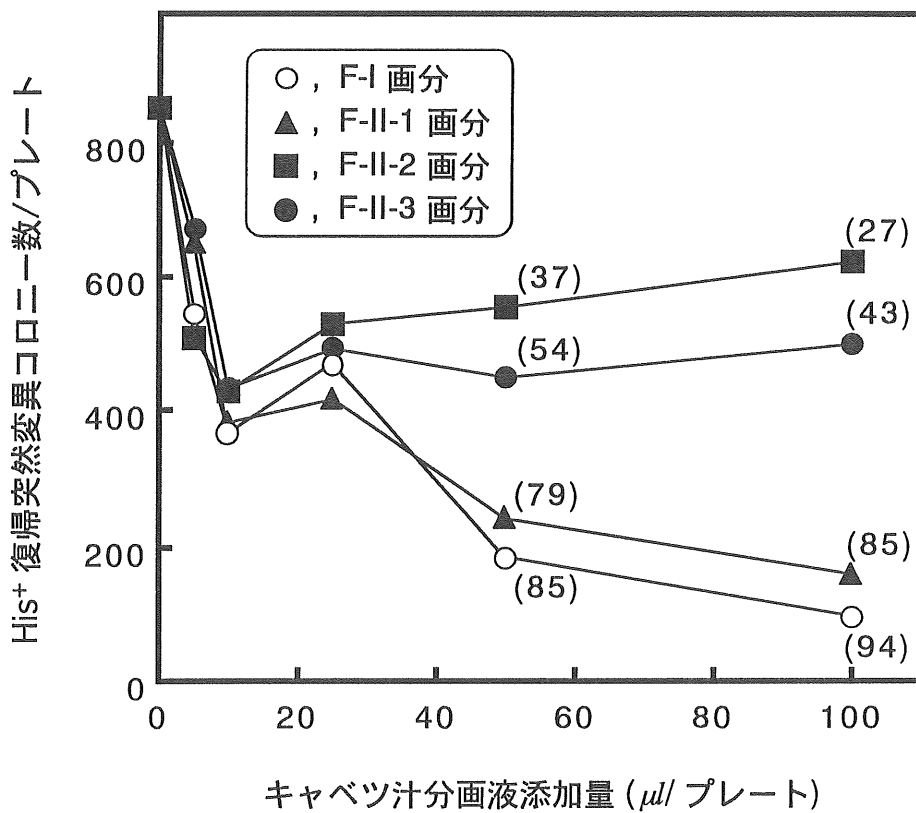


図 3-7. 焼きブリの変異原活性に及ぼすキャベツ汁分画液の影響  
「浸漬前焼き処理」実験  
(*S. Typhimurium* TA98 使用, S-9 mix 添加)  
( ) 内の数値は変異原活性抑制効果 (%)

## 第4章 ヘテロサイクリックアミンの変異原活性に及ぼす キャベツ汁分画液、ペルオキシダーゼ、ヘムタンパク質、 糖およびL-アスコルビン酸の影響

### 第1節 ヘテロサイクリックアミンの変異原活性に及ぼす キャベツ汁分画液の抑制効果

## 緒言

発がんおよび変異原性に影響を及ぼす環境因子の中で、食物由来の因子の影響は大きく、これまでに多くの研究が報告されている<sup>20~24, 95~99</sup>。一方、植物性食品中から化学変異原物質に対し変異原活性抑制作用（抗変異原活性）を示す種々の物質が発見されている<sup>35~44, 53~58, 70~83, 91, 95, 96</sup>。筆者も第2章でキャベツ汁を初め、2、3の野菜汁やレモン汁には、焼き魚に発現した変異原物質の活性を抑制する作用（「浸漬前焼き処理」効果）があるほか、焼き魚の変異原性の発現を抑制する作用（「浸漬後焼き処理」効果）があることを確認した。さらに前章（第3章）においては、キャベツ汁のゲルろ過分画液を用いて上記の2つの作用（効果）について調べた。その結果、「浸漬前焼き処理」効果をもたらす因子は高分子画分と低分子画分の初めに溶出する物質であること、また「浸漬後焼き処理」効果をもたらす因子は最も遅く溶出する物質（ただし、分画範囲が非常に広いので詳細な溶出位置は不明である）と低分子画分の初めに溶出する物質であった。即ち、キャベツ汁中には焼き魚に生成した変異原物質の活性を抑制する高分子物質と低分子物質が存在する以外に焼き処理における変異原物質の生成を抑制する低分子物質が存在することが示唆された。このうち、後者の効果（高分子物質・低分子物質にかかわらず、焼き魚の変異原物質の生成を抑制する効果）は、これまで植物性食品で全く確認されていない効果であ

る。しかし第3章までの実験は焼き魚を用いた実験であるため、実際的な実験であるが、その半面非常に繁雑であり、かつ個体差も生じやすいと考えられる。そこで焼き魚の実験系を単純な実験系に置き換えて、第2章および第3章で確認したキャベツ汁の「浸漬前焼き処理」効果と「浸漬後焼き処理」をより化学的に立証することを試みた。そのうち本章（第4章）では、「浸漬前焼き処理」実験に相当するモデル実験を行なった。即ち、焼き魚の代わりに、その変異原物質として既に明らかにされている数種のヘテロサイクリックアミン（Trp-P-1、Trp-P-2 および IQ）を用い、それらの変異原活性に及ぼすキャベツ汁分画液およびその関連物質の影響を調べた。なお、「浸漬後焼き処理」実験に相当するモデル実験は第5章で行なった。

まず初めに、本節（第4章第1節）では、ヘテロサイクリックアミンの Trp-P-1、Trp-P-2 および IQ の変異原活性検出条件を検討し、次いで、「浸漬前焼き処理」の実験系を想定して上記化学変異原物質の変異原活性に及ぼすキャベツ汁並びにそのゲルろ過分画液の変異原活性抑制効果を調べた。なお、Trp-P-1、Trp-P-2 は、トリプトファンの加熱分解物で、IQ は、クレアチンとプロリンの反応により生成される物質である。これらの変異原物質は DNA にフレームシフト型の突然変異を起こさせる物質として知られている<sup>74)</sup>。なお、焼き魚の変異原物質はフレームシフト型の突然変異を起こさせる物質であることは前章の実験により証明した。

## 実 験 方 法

### 1. キャベツ汁とその分画液の調製

新鮮なキャベツを用い、第3章に記載した方法によりキャベツ汁を調製した。これを凍結乾燥後、蒸留水に溶解し超遠心分離後その上清を Ssphadex G-25 を用いてゲルろ過し3分画に分け、つづいて各画分を凍結乾燥後一定量の蒸留水に溶解して使用した。なお実験の詳細は実験結果の項に記載した。

## 2. タンパク質の測定

カラムクロマトグラフィー溶出液のタンパク質の測定は、280nmの吸収によるUV法により行った。

## 3. 変異原活性測定試料液の調製

### 1) 化学変異原物質溶液の調製

3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-1)、3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-2)、および2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) は和光純薬工業社製を用いた。

① Trp-P-1：ジメチルスルホキシドを用い50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶液 (Trp-P-1原液、凍結保存) を調製し、これをジメチルスルホキシドで10倍に希釈後、さらに滅菌水で希釈し、0.05 および0.1  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$  溶液を調製した。

② Trp-P-2 および IQ：ジメチルスルホキシドを用い5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶液 (凍結保存) を調製し、これをジメチルスルホキシドで10倍に希釈後、さらに滅菌水で希釈し0.005 および0.01  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$  溶液を調製した。

### 2) 変異原活性の測定方法

変異原活性は、第2章および第3章と同様のAmes法の变法<sup>60,61)</sup>で検出した。変異原物質の変異原活性のみを調べるときは、前項のように各濃度に調製した化学変異原物質の溶液100  $\mu\text{l}$  にS-9Mixを10~200  $\mu\text{l}$  加え、総量0.6 mlになるよう0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)を加え、これに前培養した菌懸濁液0.1 mlを加え、滅菌水で総量1.0 mlになるよう調整した。これを37°Cで20分間振とう保温後、ソフトアガー2.0 mlを加え常法に従って最少グルコース寒天培地上に重層し、37°Cで48時間培養し、His+復帰突然変異コロニー数を測定した。

キャベツ汁分画液の変異原活性抑制効果を調べるときは、各濃度に調製した化学変異原物質の溶液100  $\mu\text{l}$  にキャベツ汁分画液を2~50  $\mu\text{l}$  加え、次いでS-9MixをTrp-P-1とTrp-P-2に対する抑制効果を調べるときは25  $\mu\text{l}$ 、IQに対

する抑制効果を調べるときは 100  $\mu\text{l}$  加え、総量を 0.6 ml になるよう 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.4) を加え、以下は上記と同様に行った。なお、前章までの実験では変異原活性および変異原活性抑制効果を図示する場合、全て縦軸に His<sup>+</sup> の復帰突然変異コロニー数を表示したが、Ames 法は突然変異によって起こる微生物の発育を利用した方法であるため、使用した微生物の生理状態の微妙な差や、S-9Mix もラットの肝のホモジネートであるためロットによる差が若干あり、一定量の変異原物質に対しても実験日時が異なれば復帰突然変異のコロニー数が変化する。そこで本章では変異原活性の抑制効果を全て第 2 章に示した計算式により求め図示した。

## 結 果

### 1. 化学変異原物質の変異原活性に及ぼす S-9Mix の添加量の影響

初めに Trp-P-1、Trp-P-2 および IQ の変異原活性に及ぼす S-9Mix の添加量の影響を調べた。なお化学変異原物質は、1 プレート当り Trp-P-1 は 0.05  $\mu\text{g}$  と 0.1  $\mu\text{g}$ 、Trp-P-2 および IQ は 0.005  $\mu\text{g}$  と 0.01  $\mu\text{g}$  用い、これに対して S-9Mix を 1 プレート当り 10~200  $\mu\text{l}$  添加した。Trp-P-1 では S-9Mix の添加量の差異により、復帰突然変異コロニー数が大きく変動した。最大の変異原活性を示したのは 25  $\mu\text{l}$  添加時であり、75  $\mu\text{l}$  添加では活性は著しく減少した (図 4-1)。Trp-P-2 でも Trp-P-1 と同様 S-9Mix 25  $\mu\text{l}$  添加時が最大の復帰突然変異コロニー数を示したが、S-9Mix の添加量による影響は Trp-P-1 ほど大きくなかった (図 4-2)。また、IQ は S-9Mix の 50~100  $\mu\text{l}$  添加で高い活性を示し、復帰突然変異コロニー数が最大となったのは 100  $\mu\text{l}$  添加した場合であった (図 4-3)。なお、3 種の化合物とも S-9Mix の最適添加量は、1 プレート当りの化学変異原物質の量には関係していなかった。上記のように Trp-P-1 をはじめある種の化学変異原物質の変異原活性が S-9Mix の量により大きく変動することは長尾らも報告している<sup>61)</sup>。以上の結果、S-9Mix の最適添加量の条件下で測定しやすい復

帰突然変異コロニー数になる化学変異原物質の濃度は Trp-P-1 では  $0.05 \mu\text{g}/\text{プレート}$ 、Trp-P-2、IQ では  $0.005 \mu\text{g}/\text{プレート}$  であった。従って、以後の実験は、1 プレート当りの化学変異原物質は上記の濃度に設定し、S-9Mix の添加量は Trp-P-1 と Trp-P-2 に対しては  $25 \mu\text{l}$ 、IQ に対しては  $100 \mu\text{l}/\text{プレート}$  に設定して実験した。

## 2. 化学変異原物質の変異原活性に及ぼすキャベツ汁の抑制効果

Trp-P-1 ( $0.05 \mu\text{g}/\text{プレート}$ ) および IQ ( $0.005 \mu\text{g}/\text{プレート}$ ) にキャベツ汁を  $0.8\sim 8.0 \mu\text{l}/\text{プレート}$  添加し、キャベツ汁の変異原活性抑制効果を調べた (図 4-4)。なお、キャベツ汁は予め滅菌濾膜 (Millipore 製  $0.22 \mu\text{m}$ ) によりろ過滅菌した。(ろ過滅菌しない場合は、プレートが白濁し、コロニーカウントが困難になる) S-9 Mix 添加量は、前述したように Trp-P-1 に対しては  $25 \mu\text{l}/\text{プレート}$ 、IQ に対しては  $100 \mu\text{l}/\text{プレート}$  とした。 $0.05 \mu\text{g}$  の Trp-P-1 の変異原活性に対し、キャベツ汁は  $0.8 \mu\text{l}$  添加で 45%、 $2 \mu\text{l}$  で約 80%、 $4 \mu\text{l}$  で約 90% 以上の変異原活性抑制効果を示し、微量でも強い抑制効果をもつことが確認された。 $0.005 \mu\text{g}$  の IQ の変異原活性に対してはキャベツ汁の添加量の増加に伴い変異原性抑制効果は増加する傾向は認められたが、 $8 \mu\text{l}$  の添加で約 50% の抑制効果を示すにとどまった。しかし、図より明らかなようにキャベツ汁の添加量の増加に伴い、変異原活性抑制効果は上昇しており、さらに添加量を増加させれば漸次 100% に近づく と推察した。これは、後述の実験結果 (図 4-8、表 4-1) からも推察できる。

## 3. 化学変異原物質の変異原活性に及ぼすキャベツ汁分画液の抑制効果

780 g の新鮮なキャベツから得たキャベツ汁 440 ml を凍結乾燥後、130 ml の蒸留水に溶解し、その超遠心 ( $74,000 \times g$ , 60 min) 上清液を Sephadex G-25 のカラム ( $4.0 \times 78\text{cm}$ ) でゲルろ過した (図 4-5)。フラクション No.16~32 を高分子画分 (F-I) とし、それ以降の溶出部を 2 分画 (F-II、F-III) した。各画分を凍結乾燥後、各々 130 ml に溶解して、凍結保存し、使用時に融解した。なお、前章 (第

3章)の図3-4に示したキャベツ汁のゲルろ過の溶出パターンとここに示した図4-5の溶出パターンはカラムサイズおよびフラクションの液量が異なるため比較しにくい、各ピークの高さの関係はかなり異なっていた。これは試料のキャベツの違いによるものと判断した。しかしながら、全体的には似ていると言える。カラムサイズと分画液量から計算すると、F-I画分は両ゲルろ過でほぼ一致しているが、第3章の図3-4のF-II-1画分は本節図4-5のF-II画分の前半約4分の1の位置に相当し、また、図3-4のF-II-2画分は本節の図4-5のF-II画分の中央部に、図3-4のF-II-3画分は図4-5のF-II画分の後半4分の1の位置とF-III画分に相当すると判断した。

Trp-P-1 (0.05  $\mu$ g/プレート)、Trp-P-2 (0.005  $\mu$ g/プレート) および IQ (0.005  $\mu$ g/プレート) に対して、キャベツ汁分画液 (F-I、F-II、F-III) を1プレート当たり2~50  $\mu$ l 添加し、常法により実験し、復帰突然変異のコロニー数を計測して変異原活性抑制効果を調べた (図4-6、7、8)。いずれの化学変異原物質に対しても、F-I画分が最も強い変異原活性抑制効果を示し、次いでF-II画分であった。これに対し、F-III分画液では抑制効果は認められなかった。F-Iは0.05  $\mu$ gのTrp-P-1、0.005  $\mu$ g Trp-P-2に対して、5  $\mu$ lの添加で90%近い変異原活性抑制効果を示した。IQに対しても添加量に比例して抑制効果は増大し、25  $\mu$ l添加で90%以上の抑制効果を示した。F-IIはF-Iよりは弱い、いずれの変異原物質に対しても、F-IIの添加量の増加に伴い抑制効果は高くなり、50  $\mu$ l添加で3種の変異原物質に対し80%程度の抑制効果を示した。先にも述べたが、F-IIIは3種の変異原物質に対し抑制効果はほとんど認められず、添加量によっては促進する場合もあったが、全体的にみて抑制効果は全くないと判断した。

#### 4. キャベツ汁およびキャベツ汁分画液の加熱処理による変異原活性抑制効果の変化

Trp-P-1 (0.05  $\mu$ g/プレート) および IQ (0.005  $\mu$ g/プレート) の溶液にキャベツ汁 (50  $\mu$ l/プレート) を加えた。キャベツ汁は前項実験2と同様、滅菌

ろ過膜によりろ過滅菌したものをを用いた。 Trp-P-1 の変異原活性に対するキャベツ汁の加熱処理（100℃、20 分間）の影響は、加熱、非加熱処理にかかわらず、共に 96～98% の高い変異原活性抑制効果を示し、加熱処理の影響は認められなかった（表 4-1）。一方、IQ に対しては加熱処理により抑制効果が若干低下した（85～88%→74～75%）（表 4-1）。次に、キャベツ汁のゲルろ過分画液（F-I～F-II）を 100℃で 10 分間加熱処理し、1 プレート当たりその 2～25  $\mu\text{l}$  を用い、Trp-P-1（0.05  $\mu\text{g}$ /プレート）および IQ（0.005  $\mu\text{g}$ /プレート）に対する変異原活性抑制効果を調べた。その結果を、図 4-9、10 に示した。

F-1 分画を加熱処理した場合、1 プレート当たりの F-1 画分の添加量により実験データにかなりの差はあるものの、いずれの変異原物質に対しても変異原活性抑制効果は著しく減少していた。しかし、その効力は完全に消失することはなかった。一方、F-II 分画では Trp-P-1 に対する変異原活性抑制効果は熱処理によってもほとんど変らなかった。しかし、IQ に対しては、1 プレート当たりの F-II の添加量によりかなりの差があるが、全体的にみて 40% 程度抑制効果が減少したと判断した。F-1 と F-II の熱安定性を比較すると、F-II 画分中の変異原抑制因子の方が熱に対して安定であることが推察された。

## 考 察

第 4 章第 1 節では第 2 章および第 3 章で得た「浸漬前焼き処理」におけるキャベツ汁の変異原活性抑制効果をより明らかにするため、焼き魚の焦げに含まれることが知られており、化学変異原物質としてその性質がある程度明らかにされているヘテロサイクリックアミンの Trp-P-1、Trp-P-2 および IQ を用い、その変異原活性に及ぼすキャベツ汁およびキャベツ汁分画液の抑制効果を調べた。

まず初めに、これらの化学変異原物質の変異原活性の測定条件を決意するため、S-9 Mix の添加量の影響を調べた。その結果、1 プレート当たりの化学変異原物質の添加量には関係なく、S-9 Mix の添加量は Trp-P-1、Trp-P-2 に対しては 1



プレート当り 25  $\mu$ l、IQ に対しては 100  $\mu$ l が最適であった (図 4-1~3)。  
この結果は既に報告されている結果<sup>74,97)</sup> とほぼ一致していた。

以上のように 3 種の化学変異原物質の変異原活性が最も高くなる S-9Mix の添加量を決定後、その条件下でこれらの化学変異原物質に対するキャベツ汁およびそのゲルろ過分画液の変異原活性抑制効果を調べた。その結果、キャベツ汁には Trp-P-1 に対して非常に強い変異原活性抑制効果が検出できた。また、IQ に対しは、添加量が少なかったためか、弱い抑制効果が認められた (図 4-4)。一方、キャベツ汁の分画液では高分子画分の F-I に 3 種の化学変異原物質に対する強い変異原活性抑制効果が認められ、次いで低分子画分の F-II にも、かなりの抑制効果が確認された。しかしながら、F-III 画分には、その効果は認められなかった。

次に、キャベツ汁の各分画液を 100°C で 10 分間加熱処理して、その変異原活性抑制効果の変化を調べた。F-I 画分を加熱処理すると Trp-P-1 および IQ に対する変異原活性抑制効果は 60~70% 低下した (図 4-9、10)。このことより、F-I 画分の変異原活性抑制因子は加熱変性しやすいタンパク質などである可能性が示唆された。即ち、この画分にはヘテロサイクリックアミンの変異原活性を抑制することが既に報告されているペルオキシダーゼ<sup>36~40)</sup> が存在し、それによる抑制であると推察した。この点に関しては次節で詳細に実験した。一方、F-II 画分を加熱すると、Trp-P-1 に対する抑制効果はあまり変らなかったが、IQ に対する抑制効果は若干低下する傾向が認められた。このことより、F-I 中の主たる抑制因子と F-II 中の主たる抑制因子の熱に対する安定性は異なることが示唆された。また、本章の実験では F-III 画分には Trp-P-1、IQ に対する変異原活性抑制効果は検出されなかった。この結果は前章の図 3-6 の「浸漬前焼き処理」で得た結果と若干異なっていた。前章の図 3-4 と本節の図 4-5 の各分画の関係を各図のカラムサイズと 1 フラクション当りの液量から算出し図 4-11 に示した。前章の図 3-4 の F-II-3 画分 (本章の F-II 画分の後半 4 分の 1 と F-III に相当) に弱い抑制効果が検出されたのに対し、本章の F-III には上記したようにほとんど抑制効果は認められなかった。これは、両実験のゲルろ過の分画範囲のずれの

ためであると考えた。本節の結果と前章の結果で最も異なった点は、図 3-6 に示した F-II-3 画分の「浸漬前焼き処理」実験における F-II-3 画分の熱安定性であった。即ち、F-II-3 画分は 100℃で加熱処理すると、その「浸漬前焼き処理」効果はほとんど消失したのに対し、本節の F-II 画分は 100℃の熱処理に対してかなり安定であった点である。この点に関して考察すると、先にも述べたように、本節の F-II 画分は前章図 3-4 の F-II-1、F-II-2 画分に加え、さらに F-II-3 の一部を含む非常に広い範囲をプールしているとみなせる画分であり、この画分の中に性質を異にする複数の低分子の変異原活性抑制因子が存在するためではないかと考えられる。以上のことより、キャベツ汁中にはヘテロサイクリックアミンの変異原活性を抑制する高分子物質と低分子物質が存在し、前者は比較的熱に不安定な物質であり、後者には熱に対してかなり安定な物質が含まれていることが示唆された。ところで、キャベツ汁を用いて熱安定性を調べた実験（表 4-1）では IQ に対しては若干抑制効果が低下したが、Trp-P-1 に対してはほとんど低下しない結果を得た。この結果は F-I の熱安定性の結果と異なるようにみえるが、表 4-1 の実験では、変異原活性抑制試験に用いた液量が過多であったこと、さらに前述したように、キャベツ汁中には熱に対して感受性の異なる抑制因子が複数存在するためであると推察した。即ち、キャベツ汁での実験（表 4-1）は加熱により失活するものはあってもまだ十分量の抑制因子が残存していたためであると推察した。

本章で得た化学変異原物質に対するキャベツ汁およびその分画液の変異原抑制効果の結果が、前章までの焼き魚で得た結果と完全には一致してないが、大筋ではほぼ一致した傾向を得ることができた。実際の焼き魚の場合には、さらに複雑な反応によっているものと考えられる。長尾ら<sup>74)</sup>は、トリプトファン<sup>74)</sup>の加熱分解生成物であるノルハルマンが、魚や肉の焦げにも多く存在し、それ自身は変異原性を示さないが、種々の変異原物質に複雑な影響を与えると報告している。このノルハルマン存在下では S-9 の量に関係なく変異原物質の種類によって変異原活性が抑制されたり、促進されたり、また非突然変異原物質が変異原性を示すようになる場合がある<sup>98)</sup>と報告されている。このようなことが事実

だとすると、焼き魚での実験系は結果は非常に重要であるが、一方、非常に複雑であり、本章の実験系のような比較的単純な系と細部にわたって一致するのは困難なのかもしれない。

本節（第4章第1節）の実験は、第2章および第3章の焼き魚の「浸漬前焼き処理」実験に相当するものとして計画した。即ち、魚の焼き処理により生じた変異原物質の活性をキャベツ汁のどのような因子によって抑制できるかを、純粋な化学変異原物質を用いた単純な実験系で調べた。その結果、キャベツ汁の高分子画分が Trp-P-1、Trp-P-2 および IQ に対し最も強い抑制効果を示したことは、第3章の結果と一致した。また低分子画分に関しては、第3章のゲルろ過の分画と本節のゲルろ過の分画範囲のずれがあり、詳細な比較は困難であったが、低分子画分にも高分子画分よりは弱いながらも、化学変異物質の活性を抑制する作用が確実にあることを確認した。この点も第3章の結果と一致していた。なお、高分子画分の強い変異原活性抑制作用はペルオキシダーゼによるものと推定し、この点に関し次節で検討した。

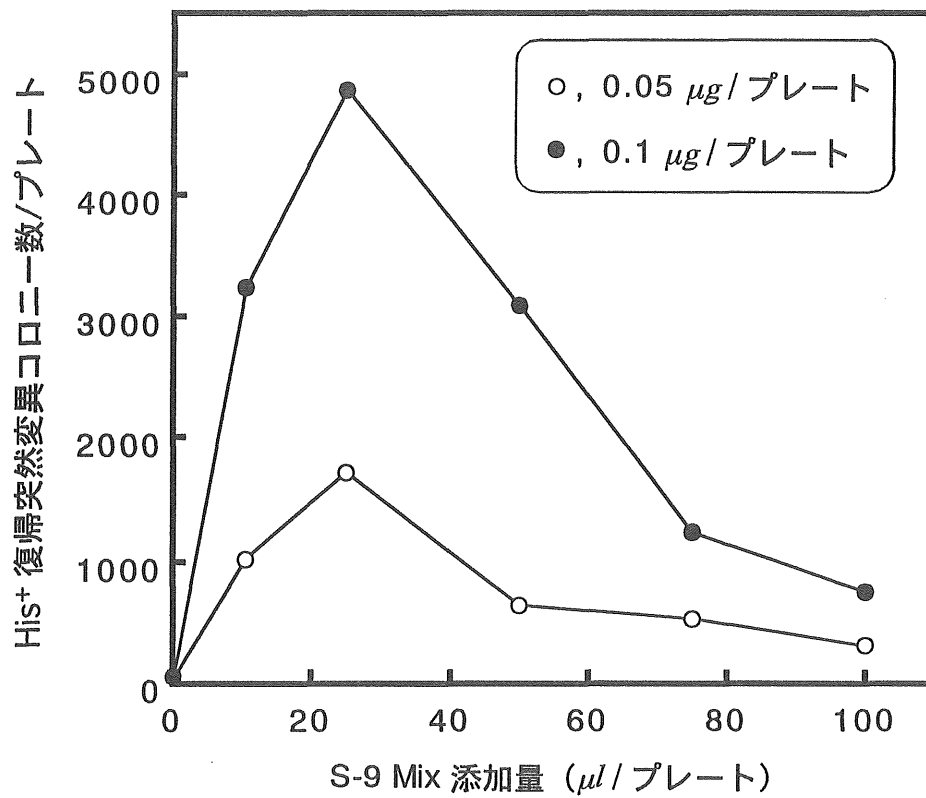


図 4-1. Trp-P-1 の変異原活性に及ぼす S-9 Mix 添加量の影響

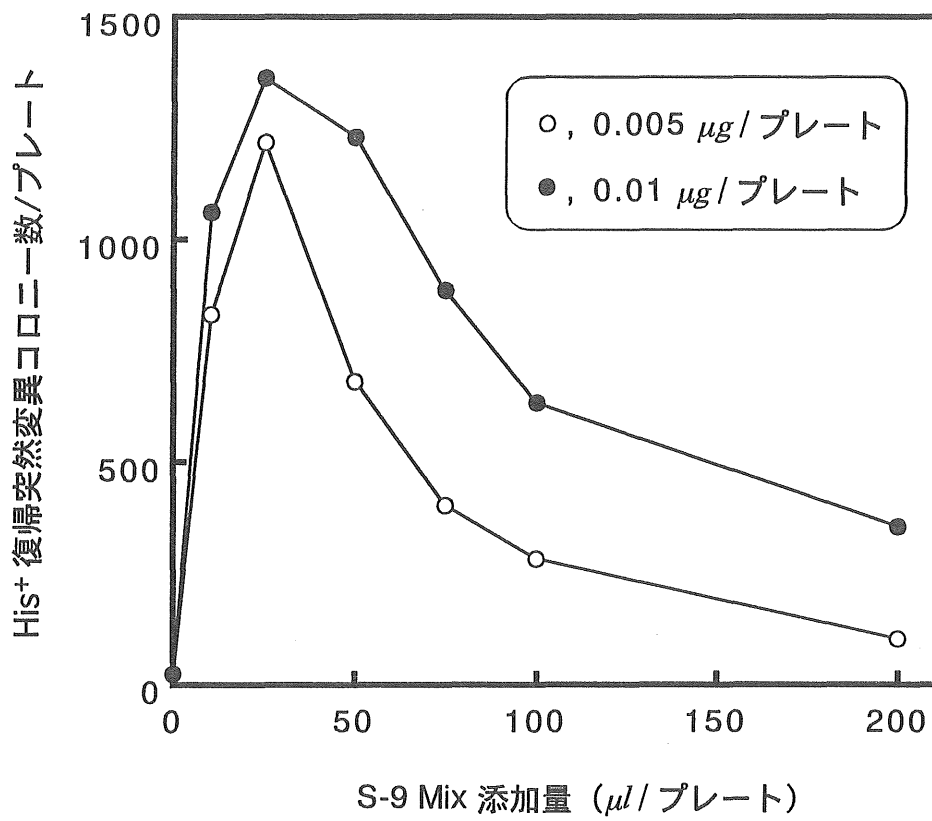


図 4-2. Trp-P-2 の変異原活性に及ぼす S-9 Mix 添加量の影響

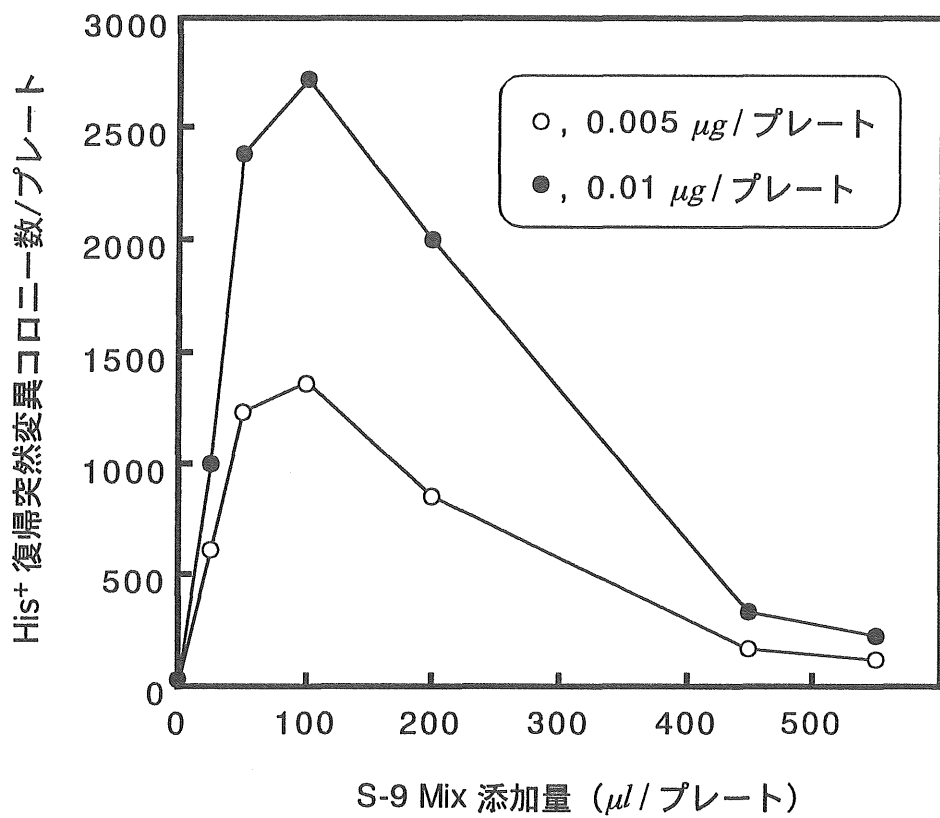


図 4-3. IQ の変異原活性に及ぼす S-9 Mix 添加量の影響

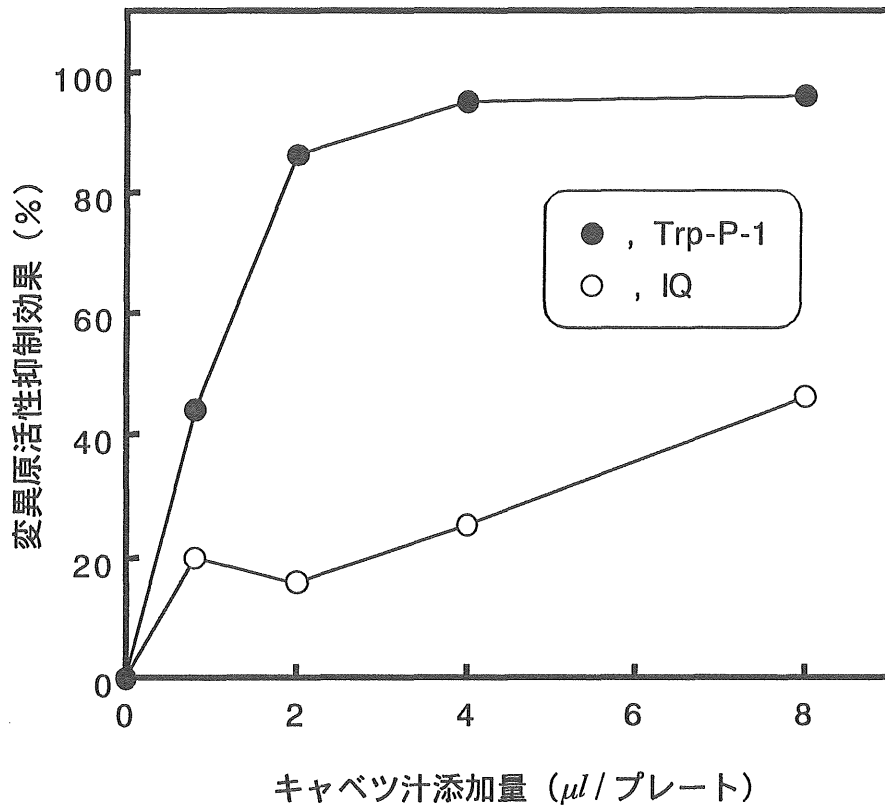


図 4-4. Trp-P-1 および IQ に対するキャベツ汁の変異原活性抑制効果  
 (Trp-P-1 0.05 μg/プレート, IQ 0.005 μg/プレート)

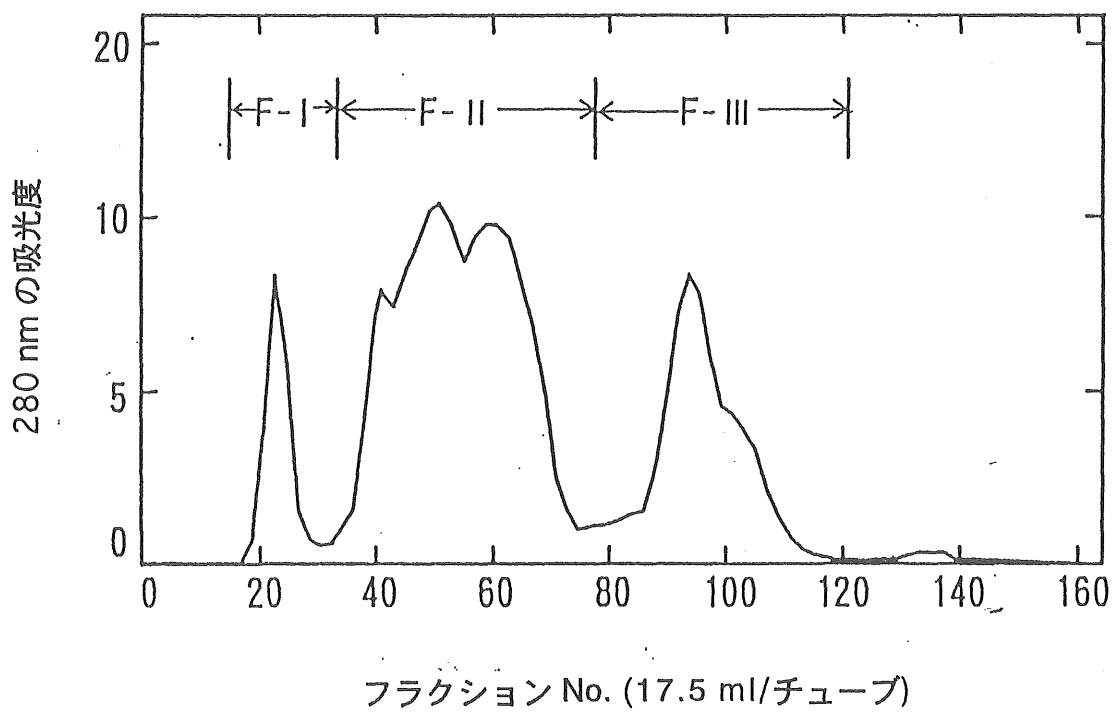


図 4-5. キャベツ汁の Sephadex G-25 によるゲルろ過の  
 溶出パターン  
 (カラムサイズ : 4.0×78 cm、溶出溶液 : 蒸留水)



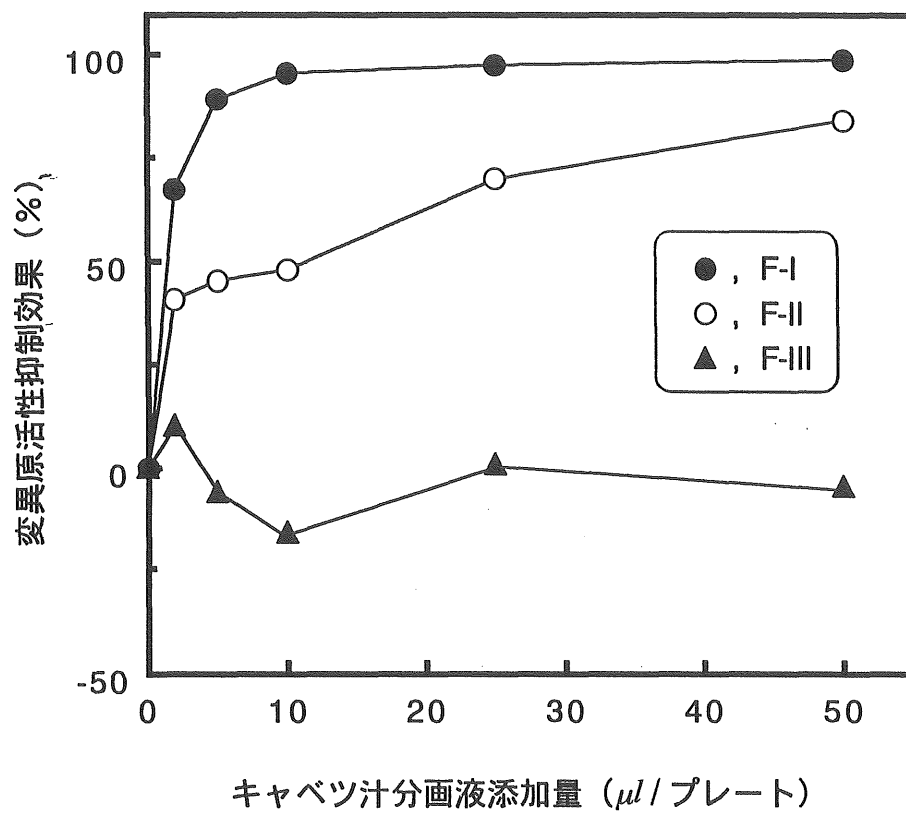


図 4-6. Trp-P-1 に対するキャベツ汁分画液の変異原活性抑制効果  
(Trp-P-1 0.05 μg/プレート)

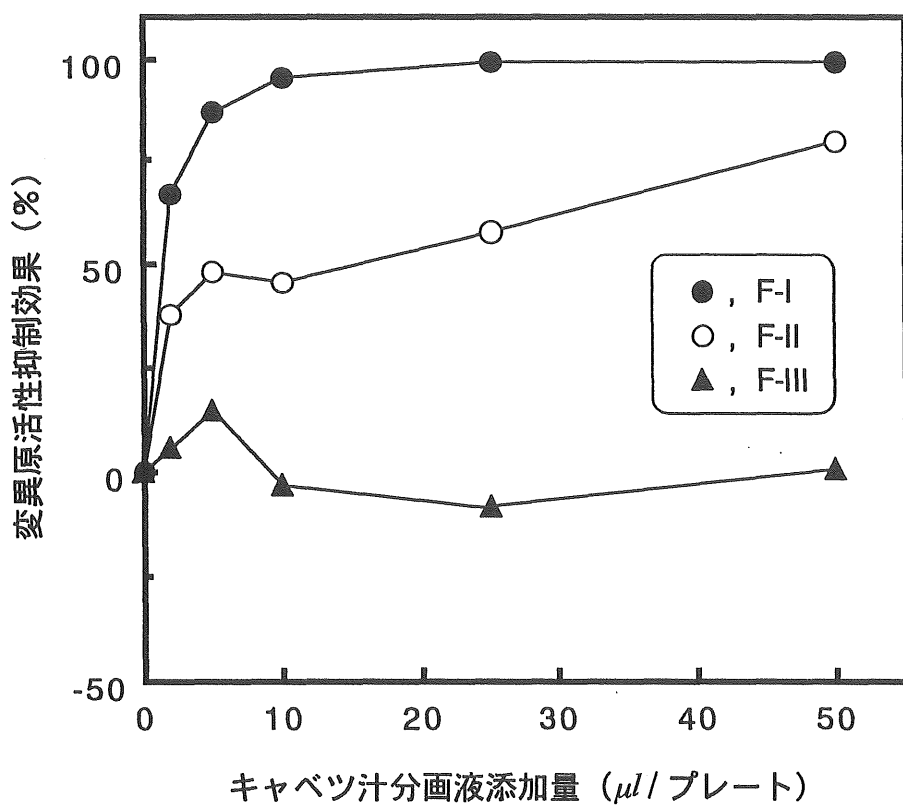


図 4-7. Trp-P-2 に対するキャベツ汁分画液の変異原活性抑制効果  
(Trp-P-2 0.005 μg/プレート)

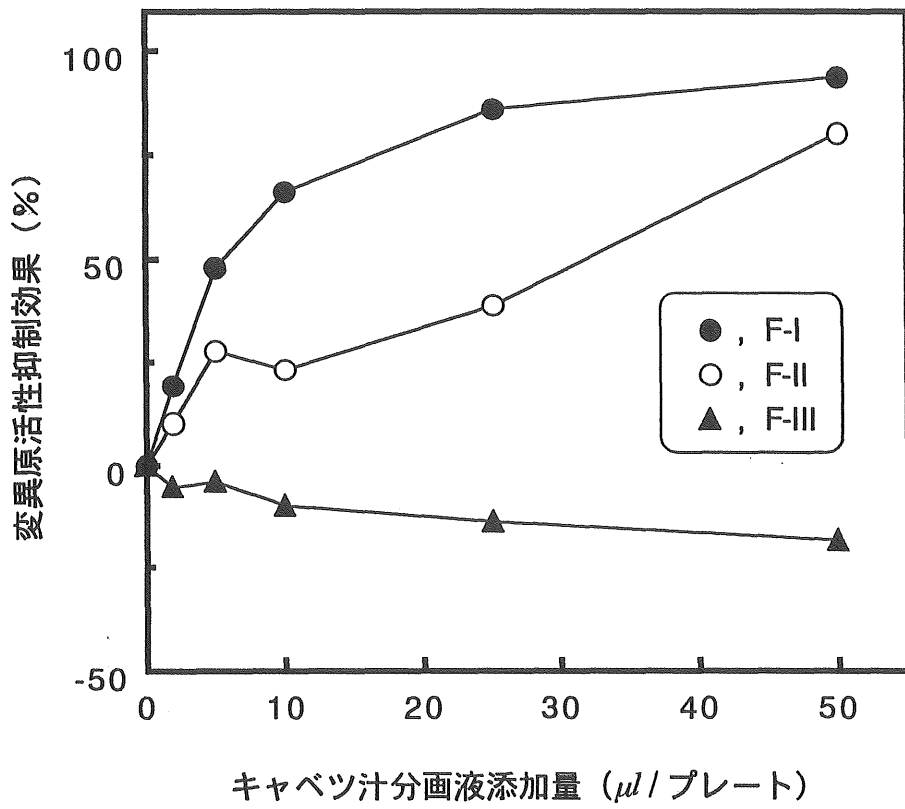


図 4-8. IQ に対するキャベツ汁分画液の変異原活性抑制効果  
(IQ 0.005  $\mu\text{g}$ /プレート)

表 4-1. キャベツ汁の変異原活性抑制効果に及ぼす加熱処理の影響

加熱処理 (100℃、20 分間)	変異原活性抑制効果 (%)	
	Trp-P-1 (0.05 µg/プレート)	IQ (0.005 µg/プレート)
非加熱キャベツ汁	98	88
加熱キャベツ汁	93	79
加熱キャベツ汁* <sup>1</sup>	96	85
加熱キャベツ汁* <sup>2</sup>	97	66

\*<sup>1</sup>非加熱キャベツ汁を化学変異原物質に添加後、加熱処理した。

\*<sup>2</sup>加熱キャベツ汁を化学変異原物質に添加後、再度同条件で加熱処理した。

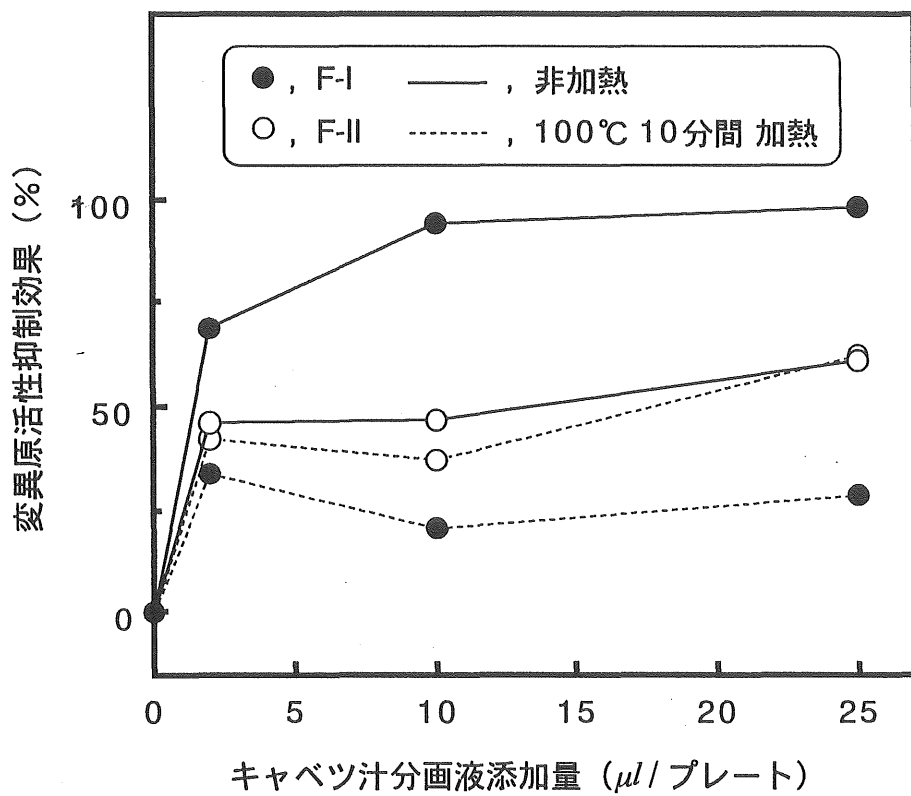


図 4-9. Trp-P-1 に対する加熱処理キャベツ汁分画液の変異原活性抑制効果  
(Trp-P-1 0.05 μg / プレート)

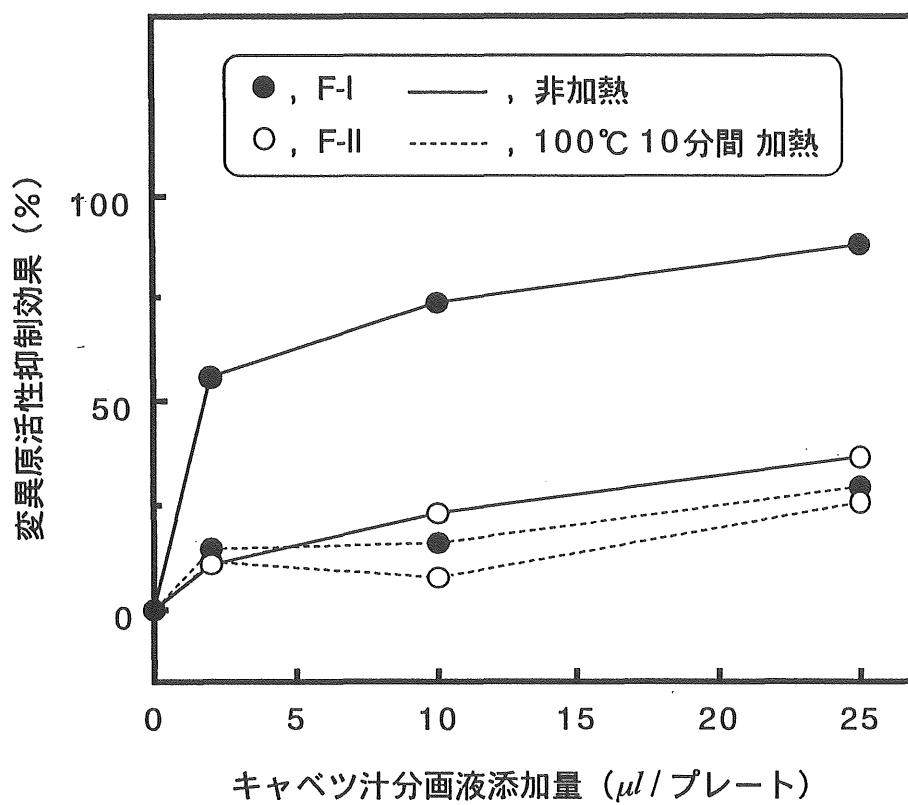


図 4-10. IQ に対する加熱処理キャベツ汁分画液の変異原活性抑制効果  
(IQ: 0.05 μg / プレート)

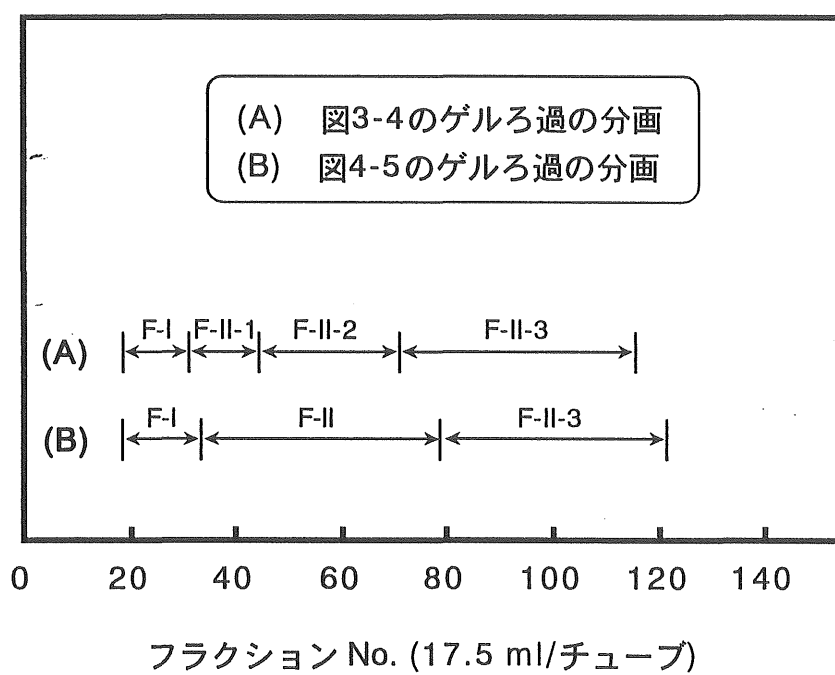


図 4-11. 図3-4のキャベツ汁のゲルろ過と図4-5のゲルろ過の各分画の関係  
(カラムサイズ：4.0×78 cm、溶出溶液：蒸留水)

## 第2節 化学変異原物質に対するキャベツ汁の高分子画分 (F-I) の変異原活性抑制因子

### 緒言

本章第1節で、焼き魚の焦げに含まれる発がん性物質であるヘテロサイクリックアミン類として知られている Trp-P-1、Trp-P-2 および IQ の変異原活性に対するキャベツ汁分画液の抑制効果を調べた。その結果、高分子画分 (F-I) に最も強い変異原活性抑制効果を認めた。さらにこの高分子画分を 100℃で 20 分間加熱処理しても、その変異原活性抑制効果が 20%程度残存していることを確認した。これらのことより、キャベツ汁の高分子画分には熱に対してかなり不安定ではあるが、完全にはその活性を消失しないような変異原活性抑制因子が存在するか、または熱に対し感受性の異なる複数の抑制因子が存在することが推察された。一方、Inoue はキャベツ汁より Trp-P-1 や Trp-P-2 の変異原活性を抑制する因子としてペルオキシダーゼを分離している<sup>38)</sup>。また筆者も、この画分にペルオキシダーゼ活性があることを確認している。これらのことより、前節までの実験で確認した、キャベツ汁 F-I 画分 (高分子画分) のヘテロサイクリックアミンや焼き魚の変異原活性に対する強い抑制効果は主にペルオキシダーゼ活性によると推察されるが、先に述べたように 100℃、20 分間の加熱処理によっても約 20%程度の変異原活性抑制効果が存在していることより、その他の因子が存在することも考えられる。そこで本節では Trp-P-1 および IQ の変異原活性に及ぼすキャベツ汁の F-I 画分とペルオキシダーゼの影響を調べ、F-I 画分の変異原活性抑制因子がペルオキシダーゼによるものか否かを検討した。



## 実 験 方 法

### 1. 試薬

西洋ワサビのペルオキシダーゼ (Horseradish Peroxidase: HRP と略す、東洋紡績社製) を 0.2 mg/ml の濃度に調整し、-80℃ で凍結保存した。ペルオキシダーゼ活性測定用の発色剤として使用した *o*-ジアニジンは和光純薬工業社製を用い、ジメチルスルホキシドで 0.5% 溶液を調製した。

### 2. タンパク質の測定、化学変異原物質の調製

第 4 章第 1 節の方法に準じた。

### 3. 変異原活性の測定

第 4 章第 1 節の方法に準じて測定した。なお、S-9Mix は Trp-P-1 に対しては 25  $\mu$  l / プレート、IQ に対しては 100  $\mu$  l / プレートの濃度で測定した。

### 4. ペルオキシダーゼ活性の測定

ペルオキシダーゼ活性は過酸化水素を基質とし、酵素反応により生成した酸素と *o*-ジアニジンとの反応により生成した酸化物を 460nm の吸収により測定する方法によった<sup>99)</sup>。

0.05M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.4) 2.82 ml、0.05M 過酸化水素 0.1 ml および 0.5% *o*-ジアニジン 0.05 ml をキュベットにとり、これに、凍結保存しておいた酵素を蒸留水で 500~1000 倍に希釈し、その 30  $\mu$  l を加え酵素反応を開始した。酵素添加後はすばやく攪拌して分光光度計にセットし、同時に測定開始時間とした。反応は室温 (23~25℃) で 5 分間行った。酵素活性は反応開始 2 分後の 460nm の吸光度から反応開始直後の吸光度を差し引き、1 分間当たりの 460nm の吸光度差より算出した。酵素活性は、上記の条件下で 1 分間に 1.0 の吸光度差を与える力を 1 単位とした。

## 結 果

### 1. 化学変異原物質に対するキャベツ汁の F-I 画分の変異原活性抑制効果

初めに前節で得た結果 (F-I 画分の強い変異原活性抑制効果と 100°C、20 分加熱処理により、F-I 画分の抑制効果が完全には消失しない結果) を再確認する実験を行った。前節と同様な方法により、620 g のキャベツから得たキャベツ汁 340 ml を凍結乾燥後 100 ml の蒸留水に溶解し、その超遠心分離 (74,000×g、60 min) の上清を Sephadex G-25 のカラム (4.0×65cm) にかけて、F-I 画分を得た。これを凍結乾燥し、100 ml の蒸留水に溶解し F-I 画分の溶液を調製した。この F-I 画分を用い、Trp-P-1 および IQ に対する変異原活性抑制効果に及ぼす加熱処理 (100°C、20 分) の影響を調べた。その結果を図 4-12、13 に示した。

F-I 画分は、非加熱の場合、Trp-P-1 (0.05 μg) および IQ (0.005 μg) に対し 1 プレート当たり 10 μl の添加で 76% 程度の抑制効果を示した。この結果は前節の図 4-9、10 の結果とほぼ一致していた。一方、加熱処理をした場合、Trp-P-1 に対しては 10 μl/プレートの添加量では抑制効果は著しく低下 (残存抑制効果は 20%) していたが、50 μl/プレートの添加量では 46% の抑制効果を保持していた。また IQ に対してもほぼ同様な傾向の結果を得た (なお、正しい値は、変異原抑制効果が 50~60% の値を与えるような条件での実験値、即ち、変異原抑制効果はその濃度に対し直線的に変動している範囲での実験値が正しい)。このことにより、F-I 画分の変異原性抑制効果は加熱処理によりかなり低下するが、その効果は完全には消滅しないことが判明した。これらの結果は前節の結果と一致していた。

### 2. キャベツ汁および F-I 画分のペルオキシダーゼ活性の検出

キャベツ汁中のペルオキシダーゼ活性を測定した。前項の実験で調製したキャベツ汁の超遠心分離の上清 (初めのキャベツ汁より約 3.4 倍濃縮液になる) を 100~1000 倍に蒸留水で希釈し、実験方法(4)によりペルオキシダーゼ活性を測定した。その結果、500 倍と 1000 倍希釈液での活性測定が最適であった (図 4-

14)。この結果より本実験で用いたキャベツ汁（超遠心分離の上清）1 ml当りのペルオキシダーゼ活性は、約 466 単位であった。上記同様に F-I 画分を 500 倍に希釈してペルオキシダーゼ活性を測定した。その結果を図 4-14 に併せて記した。F-I 1 ml当りのペルオキシダーゼは 383 単位であった。また、キャベツ汁の各分画液のペルオキシダーゼ活性を測定した結果、ペルオキシダーゼ活性は F-I 画分のみ検出された。なお、別途にキャベツ 500 g から得たキャベツ汁を常法により凍結乾燥後 Sephadex G-25 のカラム（2.64×45cm）にかけ、各フラクションのペルオキシダーゼ活性を測定した結果を図 4-15 に示した。ペルオキシダーゼはポイドポリウムの位置に溶出し、フラクション No.13 以降の活性は微弱であった。

次にキャベツ汁（超遠心分離の上清）を 100℃で 0～20 分間加熱処理後、加熱変性して生じた沈殿物を遠心除去し、上清液のペルオキシダーゼ活性を測定した。加熱処理 1 分間の試料は 5～10 倍希釈でしか活性は測定できず、その残存活性は約 4%であった。5 分間の加熱処理では活性は完全に消失していた（図 4-16）。次に、F-I 画分を用いて前記同様加熱処理しペルオキシダーゼ活性を測定した結果、キャベツ汁の場合と変わらない結果を得た（図 4-16）。なお、図 4-16 には HRP の結果も併せて記載した。

### 3. 化学変異原物質に対する西洋ワサビのペルオキシダーゼ（HRP）の変異原活性抑制効果

前項までの実験により、F-I 画分にはペルオキシダーゼが存在することを確認した。次にペルオキシダーゼが F-I 画分の主たる変異原活性抑制因子であるか否かを知るため、市販の HRP を用いて、その酵素活性の強さと Trp-P-1 と IQ に対する変異原性抑制効果の関係を調べた。

#### 1) HRP の Trp-P-1 および IQ に対する変異原活性抑制効果

HRP を 1 プレート当り 0.02～2  $\mu$ g 添加し、常法により Trp-P-1（0.05  $\mu$ g/プレート）と IQ（0.005  $\mu$ g/プレート）に対する変異原活性抑制効果を調べた。

その結果を図 4-17 に示した。HRP は 0.05  $\mu\text{g}$  の Trp-P-1 に対して、0.02  $\mu\text{g}$  で 52%、0.2  $\mu\text{g}$  で 89%、2  $\mu\text{g}$  で 100% の抑制効果を示した。0.005  $\mu\text{g}$  の IQ に対してもほぼ同程度の抑制効果を示し、強い変異原活性抑制効果をもつことを確認した。

## 2) HRP の変異原活性抑制効果に及ぼす加熱処理の影響

前節に示したようにキャベツ汁を加熱処理 (100°C、20 分) しても Trp-P-1 に対する変異原活性抑制効果はほとんど低下しなかった (表 4-1)。この結果に関しては前節の考察の項で、実験に用いたキャベツ汁には、熱安定性の異なる複数の変異原活性抑制因子が存在し、しかも、実験に使用したキャベツ汁が多かったためと考察した。また、F-I 画分を同様に加熱処理すると変異原活性抑制効果は 80% 程度減少した。一方、前述したように F-I 画分の、ペルオキシダーゼ活性は加熱処理すると 5 分後には完全に消失していた。以上のことをふまえ、この F-I 画分の抑制効果がペルオキシダーゼによるものかを検討するため、市販の HRP を熱処理しその変異原活性抑制効果を調べた。

非加熱の HRP と 100°C で 0~10 分間加熱処理した HRP (加熱処理時の濃度は 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を 1 プレート当たり 0.02、0.2 および 2  $\mu\text{g}$  用い、Trp-P-1 (0.05  $\mu\text{g}$  /プレート) および IQ (0.005  $\mu\text{g}$  /プレート) に対する変異原活性抑制効果を調べ、その結果を図 4-18、19 に示した。

加熱処理時間の経過に伴う HRP の変異原活性抑制効果の変化を、HRP の添加量ごとにみると、1 プレート当たり 2  $\mu\text{g}$  添加したときには、0.05  $\mu\text{g}$  の Trp-P-1 に対しては非加熱の HRP と大きな差はなく、いずれも 100% 近い抑制効果を示した。しかし、0.02  $\mu\text{g}$  添加では、加熱処理時間の経過に伴い変異原活性抑制効果はゆるやかに減少した (図 4-18)。一方、IQ に対しては加熱処理により変異原活性抑制効果が低下する傾向は Trp-P-1 に対するよりも顕著に現れ、0.2  $\mu\text{g}$  添加でも認められた。即ち、IQ 0.2  $\mu\text{g}$  /プレートの場合でも、加熱時間に伴い変異原活性抑制効果が減少する傾向が認められた。しかし、HRP を 2  $\mu\text{g}$  添加したときには、いずれも 90% 以上の抑制効果を示した (図 4-19)。なお、図

には示さなかったが、別途に行った実験で、60 分間加熱処理した HRP の 0.2  $\mu$  g が Trp-P-1 (0.05  $\mu$  g) に対して約 40%、IQ に対して 50%程度の抑制効果を示した結果も得ている。これらの結果により、HRP を 100°C で加熱処理しても、ヘテロサイクリックアミンに対する変異原活性抑制効果はかなり残存していることが明らかになった。

### 3) HRP の酵素活性に及ぼす加熱処理の影響

次に HRP の酵素活性と変異原活性抑制作用との関係を明らかにするため、HRP を 100°C で所定の時間加熱処理し、その残存酵素活性を測定した。HRP の 20  $\mu$  g/ml の水溶液を調製し、100°C で 0~30 分間加熱処理した後、氷水中で急冷し、蒸留水で 100 倍に希釈し残存酵素活性を実験方法の項に記した方法により 460nm の吸光度で測定した。その結果を図 4-20、4-16 に示した。HRP は 5 分間の加熱処理後には約 20%、10 分後には 5%の活性が残存していたが、20 分間の加熱では完全に失活した。この結果と F-I 画分のペルオキシダーゼを比較すると、F-I 画分のペルオキシダーゼの方が熱に対してはより不安定であった。なお、HRP 1  $\mu$  g の酵素力価は、非加熱の酵素を用いた実験結果 (図 4-20) より計算し約 4.0 であった。

## 考 察

焼き魚の焦げに含まれるといわれているヘテロサイクリックアミンの変異原活性を抑制する因子を明らかにするために、トリプトファンやタンパク質を焼き処理したときに生成することが明らかにされている化学変異原物質 (Trp-P-1 および IQ) を用いて実験し、これらに対するキャベツ汁 F-I 画分の強い変異原活性抑制作用が主にペルオキシダーゼによるものであるか否かを検討した。

初めに、キャベツ汁 (超遠心分離の上清) およびその F-I 画分には高いペルオキシダーゼ活性が存在することを確認した (図 4-14)。一方、市販の HRP を用

い、HRPには高い変異原活性抑制効果があることを確認した(図4-17~19)。このことより、キャベツ汁のF-I画分の強い変異原活性抑制作用の一因はペルオキシダーゼによるものであることが明らかになった。次にF-I画分の抑制効果が主にペルオキシダーゼによっているか否かについてさらに検討した。市販のHRPの変異原活性抑制効果は図4-17、18より0.05  $\mu\text{g}$ のTrp-P-1の変異原活性を約50%抑制(生化学反応や酵素反応等において阻害力を求める場合、50%程度の阻害力を示す力を基にすることが多い)するのに0.02  $\mu\text{g}$ のHRPが必要であった。この結果により、1.0  $\mu\text{g}$ のTrp-P-1の変異原活性を0.8  $\mu\text{g}$ のHRPで抑制できると計算できる。一方、本実験で用いたHRPの力価は、数回の酵素活性の測定結果より1  $\mu\text{g}$ 約4.0単位であった。これより、HRPにおいては3.2単位の酵素が1.0  $\mu\text{g}$ のTrp-P-1の変異原活性を抑制することが出来ると計算される(1.0  $\mu\text{g}$ のTrp-P-1に対してはHRP 4.5単位必要)。一方、F-I画分についてみると、図4-12より外挿法により約3  $\mu\text{l}$ のF-Iが0.05  $\mu\text{g}$ のTrp-P-1の変異原活性を約50%抑制することができると推定した。この値より推定すると、F-Iの約12  $\mu\text{l}$ で0.1  $\mu\text{g}$ のTrp-P-1の変異原活性を完全に抑制できることになる。この値を先のHRPの場合と比較するため、1.0  $\mu\text{g}$ のTrp-P-1に対するF-I量で算出すると、120  $\mu\text{l}$ になる。そこで、F-I画分のペルオキシダーゼ活性の測定結果より、F-I 120  $\mu\text{l}$ のペルオキシダーゼ活性を求めると、46.0単位であった。従って、F-Iにおいてはペルオキシダーゼの46.0単位で1.0  $\mu\text{g}$ のTrp-P-1の変異原活性を抑制できると計算される。即ち、一定量のTrp-P-1の変異原活性を抑制するにはペルオキシダーゼ活性で比較するとF-I画分はHRPに比べ、14.4倍(46/3.2)のペルオキシダーゼ活性が必要であった。以上の推定計算結果より、キャベツのペルオキシダーゼと西洋ワサビのペルオキシダーゼの1分子当りのペルオキシダーゼ活性および変異原活性を抑制する活性が等しいと仮定すると、F-I画分にペルオキシダーゼ以外の強力な変異原活性抑制因子が含まれている可能性は否定的である。井上らはキャベツの変異原抑制効果は、分子量43,000のタンパクで、ヘムタンパク特有の吸収スペクトルを示し、ペルオキシダーゼ活性を有することを確認している<sup>38)</sup>。これらのことから、F-I画分のヘテロ

サイクリックアミンに対する抑制作用はペルオキシダーゼによるものであると推察した。

次に、F-I の変異原性抑制作用が酵素タンパク質のペルオキシダーゼによるものとするれば、F-I を加熱処理することにより変異原抑制作用は消失すると推定し、HRP と F-I の変異原活性抑制効果とペルオキシダーゼ活性に及ぼす加熱処理の影響を調べた（この内、F-I 画分の 100℃、20 分間加熱処理後の変異原活性抑制効果については既に前節でも実験済み）。その結果、HRP の酵素活性は 100℃、5 分間の加熱処理により、約 80% 減少したが、10 分間の加熱でも 5% 程度活性は残存しており、完全に活性が消失するには 20 分以上の加熱が必要であった。一方、Trp-P-1 に対する変異原活性抑制効果は 10 分間加熱処理しても 80% 程度残存していた（HRP 0.02  $\mu$ g/プレートの実験結果）。即ち、HRP は 100℃ 10 分間の加熱処理により 95% の酵素活性を消失しても、Trp-P-1 の変異原活性抑制効果はかなり保持されていた（図 4-18）。一方、キャベツ汁および F-I 画分のペルオキシダーゼ活性は、5 分間の加熱処理によりほぼ完全に消失した。これより熱安定性は F-I 画分のペルオキシダーゼの酵素活性は HRP より低いことが明らかとなった。しかしながら、F-I 画分を 100℃、10 分間加熱処理してもその Trp-P-1 に対する変異原活性抑制効果は完全には消失しなかった（F-I 10  $\mu$ l/プレートの実験では 20% 残存、F-I 25  $\mu$ l/プレートの実験では 46% 残存）。これらの実験結果により、F-I 画分は加熱処理によりそのペルオキシダーゼ活性は完全消失しても、Trp-P-1 に対する変異原活性抑制効果はある程度保持していたことが明らかになった。このことは先の HRP の傾向と同じであった。これらの結果からも、F-I 画分の主たる変異原抑制因子がペルオキシダーゼであると推定した。一方、これらの加熱処理実験により、ペルオキシダーゼの活性と変異原抑制効果は直接的には関係していないこと、即ち、ペルオキシダーゼの変異原活性抑制作用には活性をもった酵素であることは必ずしも必要でないことが明らかとなった。布柴らは、人の唾液のペルオキシダーゼと HRP の変異原性抑制効果について研究し、ペルオキシダーゼは Trp P-1 をはじめとする種々のヘテロサイクリックアミンの変異原活性を不活性化すると述べたうえで、HRP（1 分子中に 1

個のプロトヘムを有する) のヘムが解離すること、また、実験系に HRP の基質である過酸化水素の存在する可能性は少ないことから、ペルオキシダーゼの変異原活性抑制能は本来のペルオキシダーゼとしてではなく、他の機構による抑制効果であると推察している<sup>100)</sup>。今回の結果は、これらの報告を支持するものである。HRP の変異原活性抑制効果には、HRP の酵素として活性を発現する構造自体は必ずしも必須条件ではないことが示唆された。



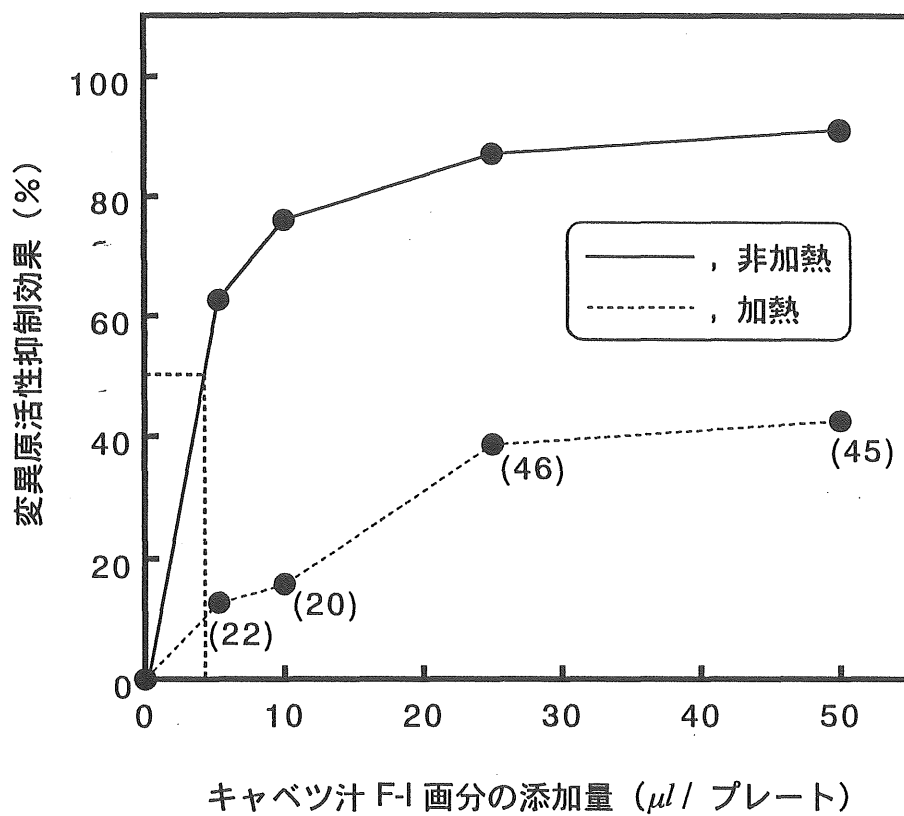


図 4-12. Trp-P-1 に対するキャベツ汁 F-I 画分の  
 変異原活性抑制効果  
 (Trp-P-1 0.05  $\mu\text{g}$  / プレート)  
 ( ) 内の数値は残存抑制効果 (%)

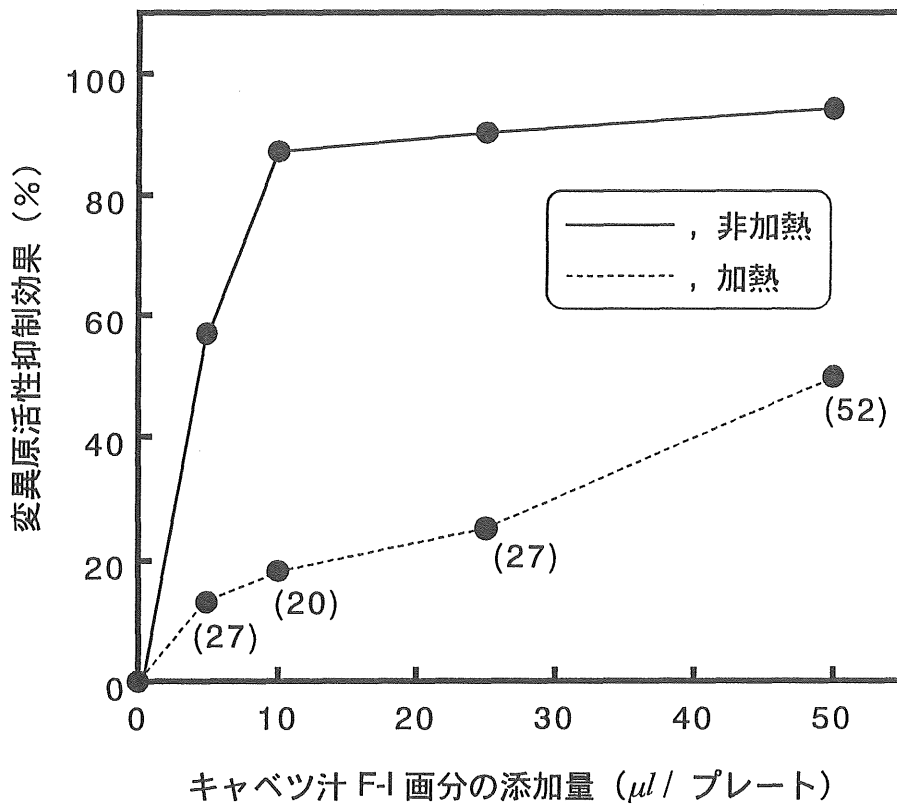


図 4-13. IQ に対するキャベツ汁 F-I 画分の  
 変異原活性抑制効果  
 (IQ: 0.005  $\mu\text{g}$  / プレート)  
 ( ) 内の数値は残存抑制効果 (%)

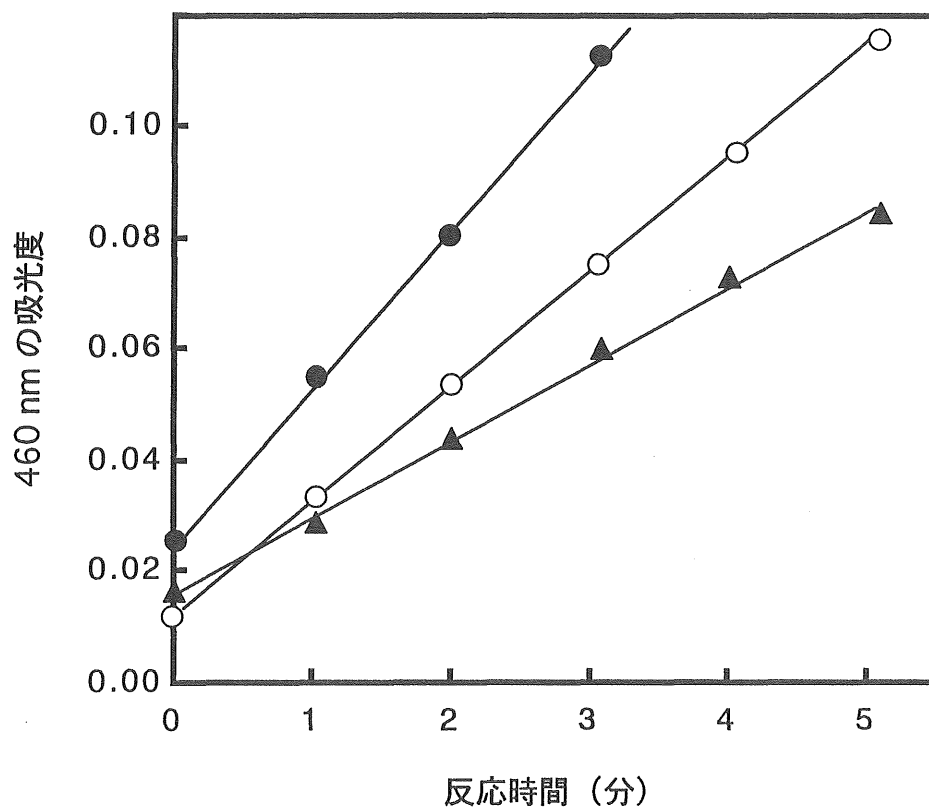


図 4-14. キャベツ汁のペルオキシダーゼ活性

- , 500 倍希釈 キャベツ汁 (超遠心上清)
- ▲, 1000 倍希釈 キャベツ汁 (超遠心上清)
- , 500 倍希釈 F-I 分画液

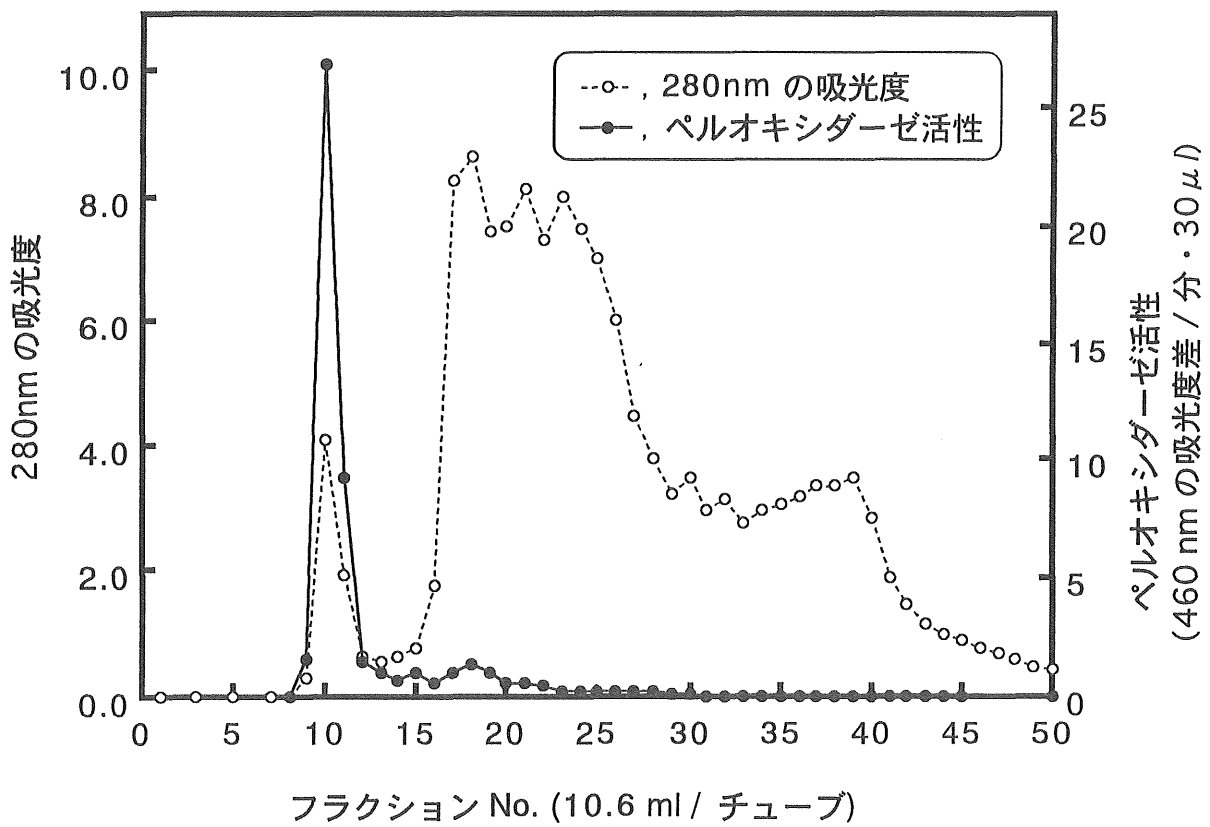


図 4-15. キャベツ汁の Sephadex G25 によるゲルろ過とペルオキシダーゼ活性

カラムサイズ : 2.64 × 45 cm、溶出溶液 : 蒸留水

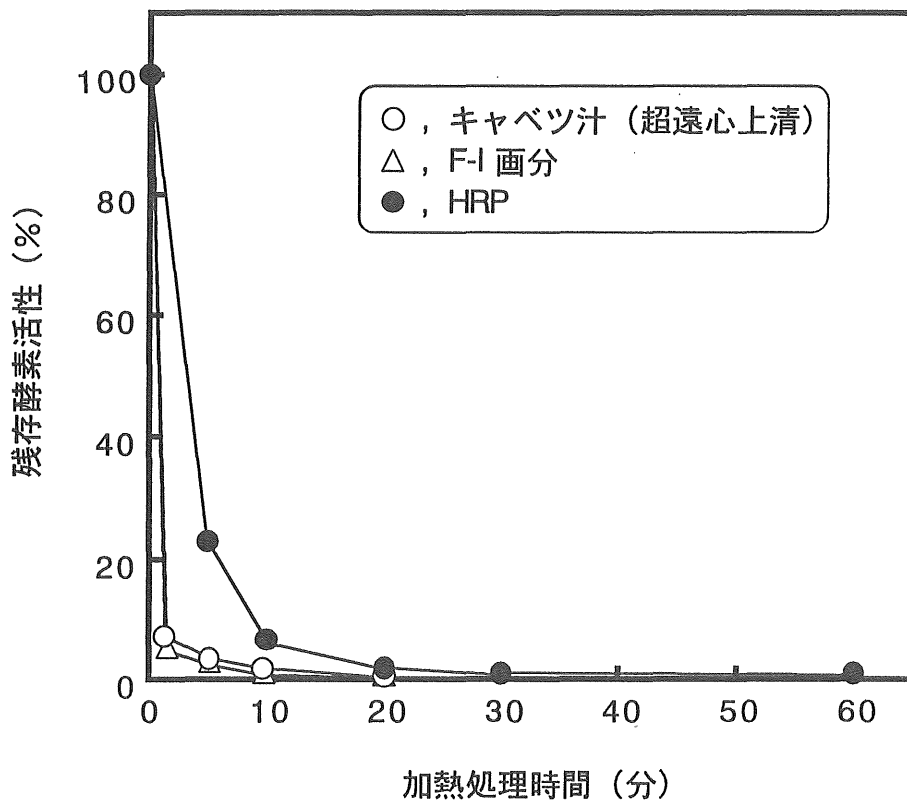


図 4-16. ペルオキシダーゼの熱安定性

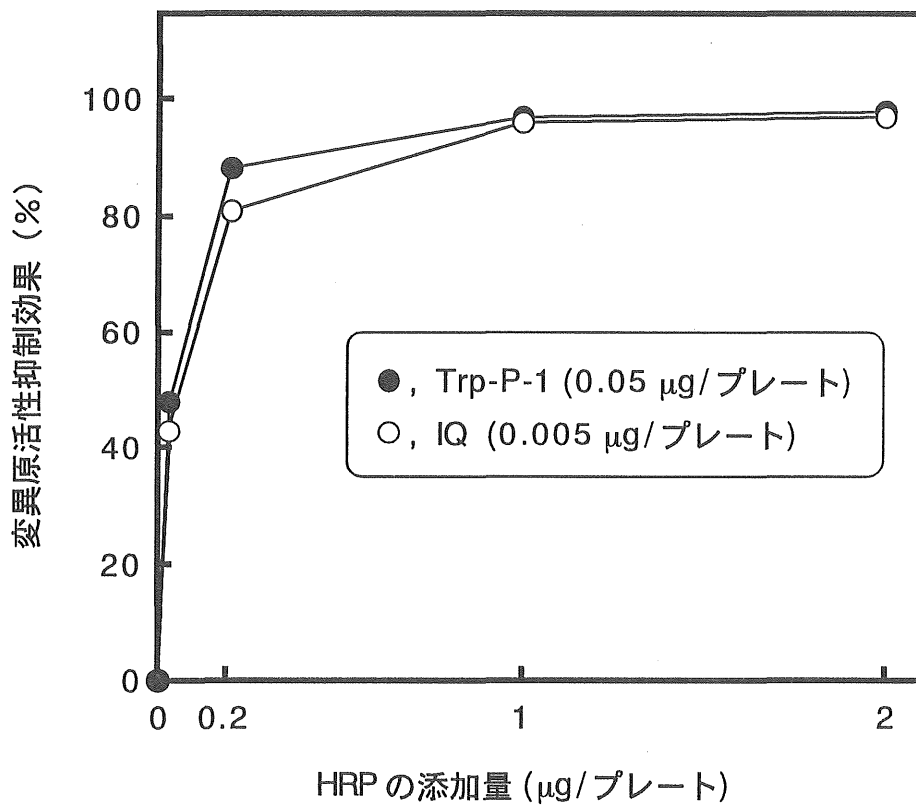


図 4-17. Trp-P-1、IQ に対する HRP の変異原活性抑制効果

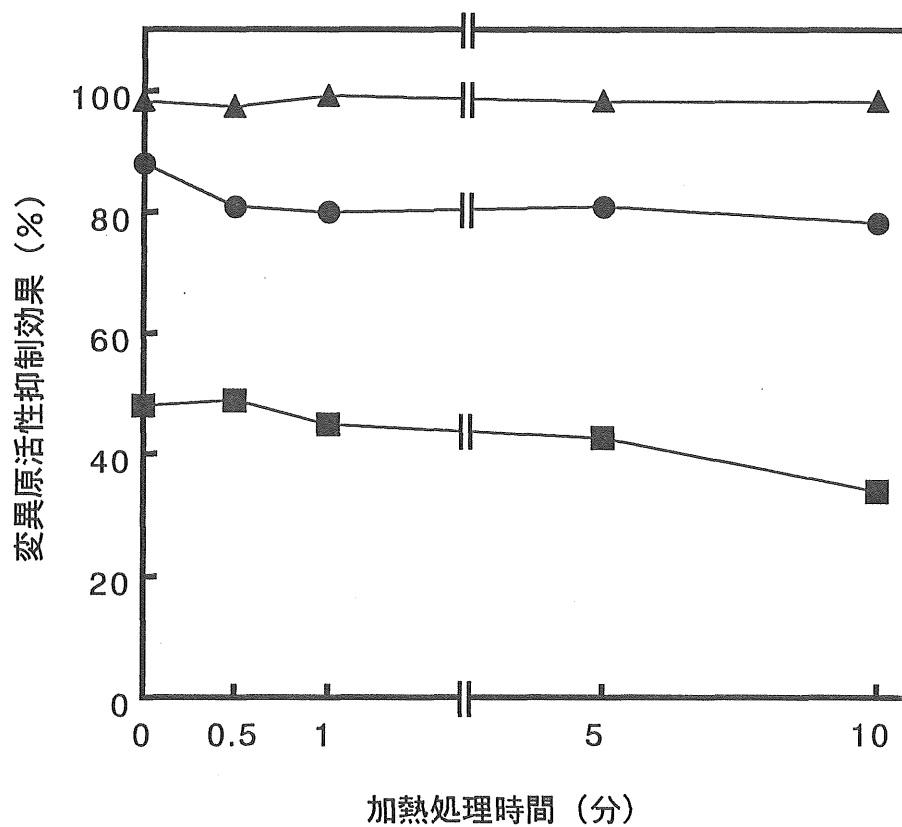


図 4-18. Trp-P-1 に対する加熱処理した HRP の  
変異原性抑制効果の変化  
(Trp-P-1 0.05  $\mu\text{g}$  / プレート)

■, HRP 0.02  $\mu\text{g}$  / プレート; ●, 0.2  $\mu\text{g}$  / プレート; ▲, 2  $\mu\text{g}$  / プレート

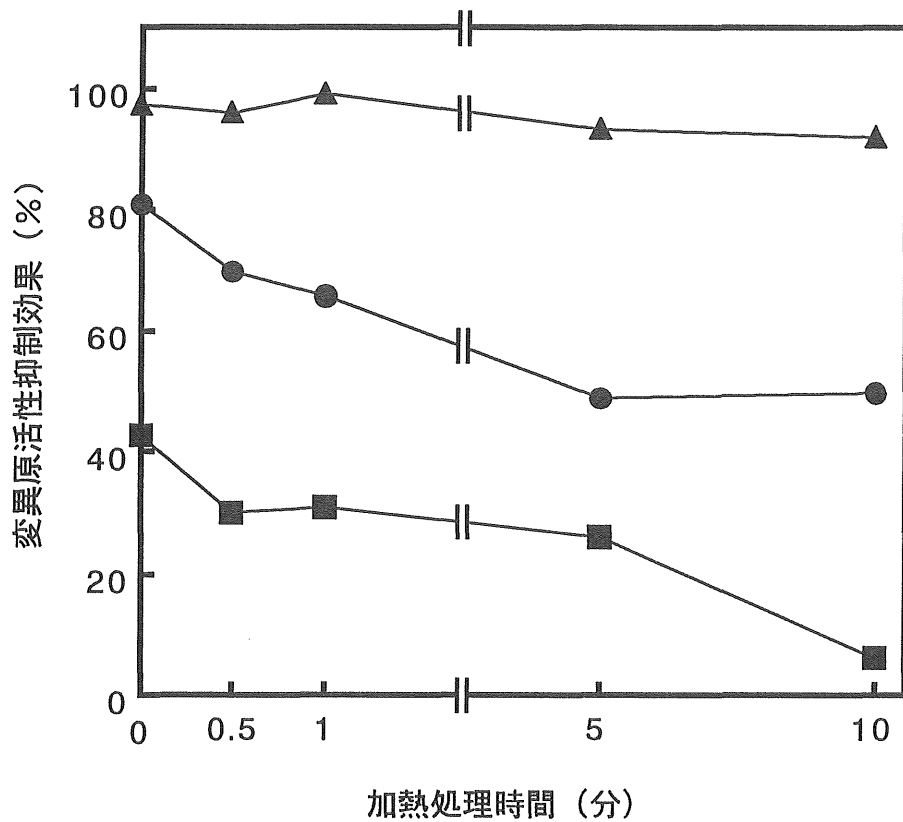


図 4-19. IQ に対する加熱処理した HRP の  
変異原性抑制効果の変化  
(IQ 0.005  $\mu\text{g}$  / プレート)

■, HRP 0.02  $\mu\text{g}$  / プレート; ●, 0.2  $\mu\text{g}$  / プレート; ▲, 2  $\mu\text{g}$  / プレート



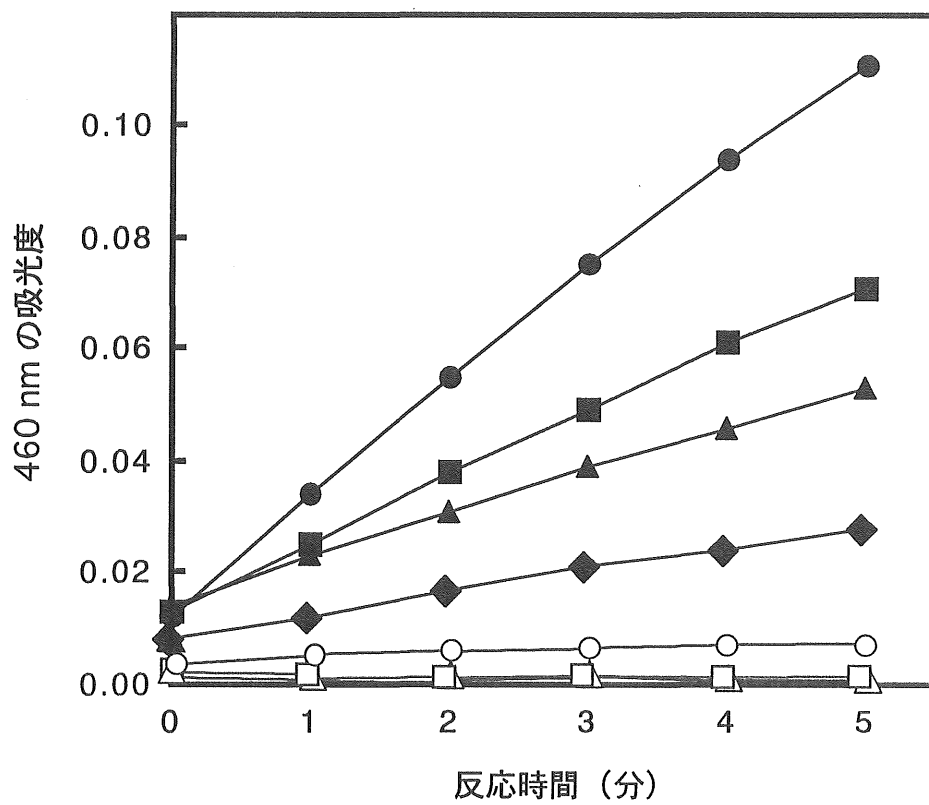


図 4-20. 加熱処理 (100°C) による HRP の活性の変化

●, 非加熱;    ■, 30秒加熱;    ▲, 60秒加熱;    ◆, 5分加熱  
 ○, 10分加熱;    □, 20分加熱;    ▲, 60分加熱;

### 第3節 化学変異原物質の変異原活性に及ぼすヘムタンパク質の抑制効果

#### 緒言

第4章の第1節および第2節において、焼き魚に含まれるヘテロサイクリックアミン類の Trp-P-1、Trp-P 2 および IQ に対するキャベツ汁の変異原活性抑制効果を調べた。その結果、これらのヘテロサイクリックアミンの変異原活性が、キャベツ汁のゲルろ過高分子画分によって強く抑制されることを認めた。このゲルろ過高分子画分 (F-I) には、ペルオキシダーゼが含まれており、この画分の変異原活性抑制効果は主にペルオキシダーゼによることを明らかにした。一方、西洋ワサビのペルオキシダーゼ (HRP) は、その本来の酵素活性を加熱失活させても変異原活性抑制効果をかなり保持していることから、この変異原活性抑制作用はペルオキシダーゼの酵素活性に直接関係しているのではなく、ペルオキシダーゼ中のヘムにその抑制効果があると推察した。仮に、ヘム部にその抑制効果があるとすれば、ペルオキシダーゼ以外のヘムタンパク質にも変異原活性抑制効果があることが予想される。また、キャベツ汁中のヘムタンパク質としては、ペルオキシダーゼ以外にカタラーゼやチトクローム等が F-I 画分にも微量存在していると考えられる。一方、ヘモグロビンやミオグロビン等のヘムタンパク質は動物の細胞中に広く分布していることより、当然魚肉中にも存在する。そこで、本節では数種類のヘムタンパク質およびヘムタンパク質をプロテアーゼで加水分解した物質を用いてヘテロサイクリックアミンに対する変異原性抑制効果を調べた。

## 実験方法

### 1. 試料、試薬および実験機器

#### (1) ヘムタンパク質および非ヘムタンパク質溶液の調製

ヘムタンパク質として用いたチトクロム C、カタラーゼは、Boehringer Mannheim GmbH 社の分子量マーカー用のものを蒸留水で 2 mg/ml に調整した。ヘモグロビンは、Sigma 社製ウシヘモグロビンを少量の蒸留水に溶解し 24 時間蒸留水に対し透析後、2 mg/ml 溶液を調製した。また、ヘモグロビンにプロテアーゼを作用させた試料を調製する場合は、ヘモグロビンの 2.5% 水溶液を調製し、これを上記のように透析後、0.1N 塩酸で pH2.0 に調整し 20 mg/ml 溶液を調整した。非ヘムタンパク質として、カゼインは Merck 社製の Casein nach HAMMARSTEN を 0.2M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.5) で 2 mg/ml に調製した。また、血清アルブミン、卵アルブミンは蒸留水に溶解し 2 mg/ml 溶液にした。なお、これらの試料は、全て -20℃ で凍結保存した。

#### (2) 試薬

タンパク質の加水分解酵素には、Sigma 社製のブタペプシン A、ウシトリプシン、ウシキモトリプシンを用いた。それぞれ結晶製品で、純度の高い標品である。カラムクロマトグラフィーには、Pharmacia 社製 Sephadex G-50 を用いた。変異原物質および変異原性試験用試薬は前章に示したとおりである。

#### (3) 実験機器

紫外および可視分光光度計には、Perkin-Elmer 社製の Lambda 11 を用いた。吸収スペクトル測定には、日立 Spectrophotometer U-3000 を用いた。

### 2. タンパク質の測定、化学変異原物質の調製

第 4 章第 2 節の方法に準じた。

### 3. 変異原活性の測定

各種タンパク質溶液またはタンパク質を処理した溶液の一定量 (0~100  $\mu$  l) に 100  $\mu$  l の Trp-P-1 (0.05  $\mu$  g) または IQ (0.005  $\mu$  g) を加え、前者では S-9Mix を 25  $\mu$  l、後者では S-9Mix を 100  $\mu$  l 加え総量 0.6 ml になるよう 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.4) を加え、これに前培養した菌懸濁液 0.1 ml を加え、滅菌水で 1.0 ml になるよう調整した。これを 37°C で 20 分間振とう保温後、常法に従い変異原活性を測定した。

## 結 果

### 1. 各種タンパク質の変異原活性抑制効果

種々のヘムタンパク質と非ヘムタンパク質について、Trp-P-1 と IQ の変異原活性に対する抑制効果を比較した。ヘムタンパク質として HRP、チトクローム C、カタラーゼの他にヘモグロビンを用いた。非ヘムのタンパク質として、カゼイン、ウシ血清アルブミンおよび卵アルブミンを用いた。なお、ヘモグロビンはブタのペプシンで分解処理したものについても実験した。20 mg/ml のヘモグロビン溶液 0.5 ml にブタペプシン A (0.4mg/ml) を 0.5 ml、0.5M 酢酸-HCl 緩衝液 (pH2.0) 4.0 ml を添加し、37°C で 5 時間反応させ、0.1N NaOH で中和後、初めのヘモグロビン量に換算し 2 mg/ml 溶液を調製した。各種タンパク質試料を各々 1 プレート当たり 100  $\mu$  g 用い、常法により Trp-P-1 (0.05  $\mu$  g/プレート) および IQ (0.005  $\mu$  g/プレート) に対する変異原活性抑制効果を調べた。その結果を表 4-2 に示した。Trp-P-1 (0.05  $\mu$  g) に対しては、ヘムタンパク質はいずれも 50% 以上の変異原活性抑制効果を示した。これに対し、ヘムをもたないカゼイン、ウシ血清アルブミンおよび卵アルブミンは 40% 程度以下の抑制効果しか示さなかった。IQ (0.005  $\mu$  g) に対しては全体的に Trp-P-1 に対する抑制効果より低くなったが、上記と同様の傾向が認められ、ヘムタンパク質の方が抑制

効果が高かった。ここでは各タンパク質とも1プレート当たり100  $\mu$ g添加して比較したが、HRPは本章第2節に示したように2  $\mu$ gでTrp-P-1 (0.05  $\mu$ g) およびIQ (0.005  $\mu$ g) に対し100%近い抑制効果を示した (HRP 0.2  $\mu$ gでも0.05  $\mu$ gのTrp-P-1に対し90%、0.005  $\mu$ gのIQに対し80%程度の抑制効果を示した) ことと比較すると、チトクロームC、ヘモグロビンおよびカタラーゼの抑制効果は強いとは言えなかった。また、ヘモグロビンをペプシンで消化した試料でも未分解のヘモグロビンとほぼ同等の抑制効果を示した。

## 2. チトクロームC、カタラーゼの変異原活性抑制効果

HRPは、ヘム構造をもつタンパク質であり、このヘム部位が変異原活性抑制効果に関与していると推察されている<sup>38)</sup>。そこで、同じヘムタンパクであるチトクロームC、カタラーゼの添加量と変異原活性抑制効果の関係を調べた。

チトクロームCおよびカタラーゼの水溶液 (2 mg/ml) を用い、これを1プレート当たり5~100  $\mu$ g添加し、Trp-P-1 (0.05  $\mu$ g) とIQ (0.005  $\mu$ g) に対する変異原活性抑制効果を調べた。なお、比較のためにHRPについても実験し、図4-21、22に示した。チトクロームC、カタラーゼともTrp-P-1 (0.05  $\mu$ g) に対しては、5~10  $\mu$ g添加時に約30~50%程度の抑制効果を示したが、20  $\mu$ g添加では、いずれの場合も抑制効果は低下し、さらにチトクロームC、カタラーゼの添加量が増加すると抑制効果が上昇する傾向を示した。この20  $\mu$ g添加による減少傾向は数回の同様の実験によっても認められた。しかし、100  $\mu$ g添加によっても著しく抑制効果が高くなることはなかった。この100  $\mu$ g添加時の抑制効果は、先に示した表4-2の結果とほぼ一致していた。IQ (0.005  $\mu$ g) に対しても、図4-22に示すように、全体的にはTrp-P-1の場合と類似した傾向が認められた。しかし、HRPでは20  $\mu$ gで抑制効果が減少するような傾向は全く認められなかった。また、チトクロームCを用い、100°Cで10分間加熱し、タンパク質を熱変性した試料についても実験したが、結果には大きな差は認められなかった。

### 3. ヘモグロビンおよびヘモグロビンのプロテアーゼ分解物の変異原活性抑制効果

先の実験により、ヘムタンパク質は他の非ヘムタンパク質に比べ、Trp-P-1 および IQ に対し変異原活性抑制効果が高い傾向を示した（表 4-2）。また、ヘモグロビンにおいてはそれをペプシンにより加水分解した試料でも抑制効果を保持していた。これらのことより、ヘムタンパク質のヘム部位に抑制効果があることが推察される。そこで本項では、ヘモグロビンをプロテアーゼ（ペプシン、トリプシン、キモトリプシン）で加水分解した試料の変異原活性抑制効果についてさらに検討した。

#### 1) ヘモグロビンのペプシン分解物の変異原活性抑制効果

未分解のヘモグロビンとペプシン処理したヘモグロビンの変異原活抑制効果を調べた。

2%ヘモグロビン (pH2.0) 0.5 ml、0.5M 塩酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH2.0) 1.5 mlと 0.2 mg/mlブタペプシン A (pH2.0) 0.5 mlを 37℃で 24 時間反応させた後、1N NaOH で pH 7.5 に調整し、0.5M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) でもとのヘモグロビン量に換算して 2 mg/mlになるように調整した。対照実験のヘモグロビン未分解物は、ブタペプシン A を 100℃で 20 分間加熱し失活させたものを添加後、上記と同様の操作で 2 mg/ml溶液を調製した。変異原活性抑制試験では、この試料を蒸留水で適当に希釈し、その 50  $\mu$  l を用い 1 プレート当り、ヘモグロビン量を 5~100  $\mu$  g 添加して変異原活性抑制効果を調べ、その結果を図 4-23、24 に示した。なお、Trp-P-1 および IQ の添加量は前項と同様である。

Trp-P-1 に対して、ヘモグロビン未分解物の変異原活性抑制効果は、ヘモグロビン量 20  $\mu$  g/プレート で一旦は低下したが、その後、濃度の増加に伴い抑制効果は高くなり、最大で約 70%であった。ヘモグロビン分解物では、未分解物と同様に変異原活性抑制効果がヘモグロビン量 20  $\mu$  g/プレート で一旦は低下した。それ以上の濃度では、濃度の増加に伴い抑制効果はゆるやかに上昇してヘモグロビン量 100  $\mu$  g/プレート で約 90%の抑制効果を示し、分解物の方

が若干変異原活性抑制効果が高くなった。なお、20  $\mu$ g 添加で一旦減少する傾向は先のチトクローム C、カタラーゼの場合と類似していた。IQ に対しては、Trp-P-1 に対するよりも全体的に抑制効果は低かった。

## 2) ヘモグロビン分解物のゲルろ過分画液の変異原活性抑制効果

### (i) ヘモグロビン分解物のゲルろ過

ヘモグロビンのペプシンによる分解物と未分解物とでは、変異原活性抑制効果に大きな差はなかった。このことより、ヘモグロビンはプロテアーゼの作用を受けて断片化しても、ヘム部位が存在すれば、変異原活性抑制効果があることが推察された。そこで、ペプシンによるヘモグロビン分解物に、さらにトリプシン、キモトリプシンを順次作用させ、ヘモグロビンをできるだけ加水分解して、ゲルろ過によるヘム色素部の分離を試み、変異原活性抑制効果を調べた。ヘモグロビンのプロテアーゼによる加水分解の方法は、図 4-25 に示すように、各酵素をヘモグロビン量の約 1/80 量加え、各酵素添加毎に 37°C で 90 分間加水分解反応を行った。なお、新たに酵素を加える前に、前段階で使用した酵素を pH 処理または 100°C の加熱処理により失活させた。この分解物を Sephadex G-50 カラム (2.6×85cm) を用いてゲルろ過し、ヘム色素とタンパク質分解物との分離を試みた。なお、ゲルろ過の溶出緩衝液には 0.2M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5) を用いた。ゲルろ過によって得られた溶出パターンを図 4-26 に示した。

393.5nm の吸収は、ゲルろ過を行う前のヘモグロビン分解物の吸収極大波長であり、ヘムの鉄分子が酸化され、ヘムがヘマチンになったときの極大吸収 (約 390 nm とほぼ同じであった。そこで、393.5nm をヘマチンの吸収として用いた。

ゲルろ過では 393.5nm の吸収に 4 つのピークが見られたので、この 4 つのピークを挟んで高分子側からそれぞれ F-I、F-II、F-III および F-IV 画分としてプールした。なお、280 nm の吸収も測定し図中に示した。プール後のそれぞれの分画液量は、F-I が 72 ml、F-II が 182 ml、F-III が 236 ml、F-IV が 461 ml であった。

### (ii) 各ゲルろ過分画液の吸収スペクトル

ゲルろ過によって得られた分画液に含まれる成分を吸収スペクトルによって推定した (図 4-27)。

F-I 画分と F-IV 画分は約 390nm に吸収極大を示しヘマチンが多く含まれることが分かった。また、F-III 画分は約 280 nm に吸収極大が見られたので、この分画液には低級のペプチドが多く含まれることが推察された。

### (iii) 各ゲルろ過分画液の変異原活性抑制効果

ゲルろ過によって得られた各分画液を 50  $\mu$  l 用いて、Trp-P-1 と IQ に対する変異原活性抑制効果を常法により調べた。その結果を図 4-28 に示した。

その結果、Trp P-1 および IQ のいずれに対してもヘマチンを多く含む画分である F-I および F-IV 画分が、他の分画に比べ変異原活性を強く抑制することが明らかになった。F-II および F-III 画分にも若干の変異原活性抑制効果が認められたが、これは、これらの画分にも多少のヘマチンが含まれているためであると推察した。図 4-28 は各画分の 50  $\mu$  l が示した変異原活性抑制効果であるが、この値と各画分の液量より、全抑制力に対する各画分の占める割合を概算すると、F-I が 6.7%、F-II が 17.4%、F-III が 13.0% および F-IV が 63.3% であった。即ち、変異原活性抑制効果の大半がゲルろ過で最も遅く溶出する低分子画分にあることが判明した。

## 考 察

Ames 法および Ames 法の変法による変異原性抑制効果の定義には、変異原活性抑制効果 (%) が 50% 以上であったときに抑制効果があると判断する場合と、30% 以上あったときに抑制効果があると判断する場合の 2 通りがある<sup>101)</sup>。今回用いたヘモグロビン、シトクロム C、カタラーゼでは 20  $\mu$  g 添加時にみられた



抑制効果の減少する現象を除くと全てがこの両方の域に達しており、これらのタンパク質は変異原活性抑制作用を有するものと判断した。

前節で、ペルオキシダーゼの Trp-P-1 や IQ に対する変異原活性抑制効果は、加熱によりタンパク質を変性させペルオキシダーゼ活性を失活させた場合にも、かなり維持されていることを明らかにした。この傾向は、同じヘムタンパク質であるシトクロム C およびカタラーゼを加熱変性させた場合においても認められた。従って、これら酵素の変異原活性抑制効果は、酵素活性やタンパク質の生理活性に直接関係しているのではなく、これらのタンパク質中のヘム部にその抑制効果があると推察した。そこで、本節において、代表的なヘムタンパク質であるヘモグロビンを用い、ペプシン、トリプシンおよびキモトリプシンの3種のプロテアーゼを作用させ、タンパク質を断片化しゲルろ過により分画して、各画分の変異原活性抑制効果を調べた。その結果、全変異原活性抑制効果の63%がゲルろ過で最も遅く溶出した画分 (F-IV) に分布していた。この画分は280 nmの吸収は小さいが、ヘミンの吸収が高い画分であった。これらのことより、ヘムタンパク質のヘモグロビンがプロテアーゼによって断片化されても、そのヘム部には変異原活性抑制効果が保持されていることが示唆された。

ヘモグロビン中のヘムは、ピロール環が4つ結合したポルフィリンの鉄錯体である。ヘモグロビンおよびカタラーゼ中のヘムは、プロトヘム (ヘム b) と呼ばれ、シトクロム C 中のヘムは、ヘム c と呼ばれている。通常、プロトヘムなどのヘムは、ヘム中の鉄分子とタンパク質が結合しているが、ヘム c の場合は、タンパク質がポルフィリンの側鎖部分で結合している。また、ヘモグロビン中のヘムは、通常、2価の鉄分子を持つが、この2価の鉄分子を持つヘムは、自動酸化能が高く、容易に酸化され、3価の鉄分子を持つようになる。このため、本節に用いたヘモグロビン中のヘムは、いずれの場合も、酸化されて3価鉄のヘムとなったものである。ヘムが酸化されケロール基が結合したヘミンには、変異原活性抑制効果があることが報告されている<sup>59,102)</sup>。実験で用いたヘモグロビンの場合、ヘムに水酸基が結合し、ヘマチンになっていると考えられるので、ヘマチンにも変異原活性抑制作用があることが示唆された。一方、ポルフィリ

ンのマグネシウム錯体のクロロフィルにも変異原活性抑制効果があることが報告されており<sup>59, 102)</sup>、変異原活性抑制効果には鉄分子やマグネシウム分子は必ずしも関与せず、ポルフィリンのみが関与しているとも考えられるが、逆に錯体を形成する金属が必須である可能性もある。現在、ポルフィリンは医学の分野でがんの治療に用いられている<sup>103)</sup>が、今回の結果を考慮すると、ポルフィリンにはがんの発現を抑制する効果があることが考えられた。

以上のように、Trp-P-1 や IQ の変異原活性に対するヘムタンパク質の抑制効果は、ヘム構造に由来することが強く示唆された。一方、カタラーゼやチトクローム系タンパク質は広く各種の細胞に存在する酵素であり、当然キャベツ汁にも存在すると考えられる。しかし、カタラーゼやチトクローム C の Trp-P-1 や IQ に対する変異原活性抑制効果は HRP に較べると著しく低かった。このことより推察すると、前節で確認した F-I 画分の強い変異原活性抑制効果に果たすカタラーゼやチトクローム C 等の役割は少ないものと推察される。

表 4-2. 各種タンパク質の変異原活性抑制効果

タンパク質 (100 µg/プレート)	変異原活性抑制効果 (%)	
	Trp-P-1 (0.05 µg/プレート)	IQ (0.005 µg/プレート)
HRP	98.3	99.7
Cytochrome C	64.2	57.8
Hemoglobin (未分解)	71.0	58.0
Hemoglobin (分解)* <sup>1</sup>	90.5	57.8
Hemoglobin 分解物の分画液* <sup>2</sup>		
F-I (100 µl/プレート)	80.8	53.7
F-IV (100 µl/プレート)	75.8	49.9
Catalase	50.3	41.3
Casein	46.0	35.3
BSA	16.6	-11.0
Ovalbumin	24.6	15.7

\*<sup>1</sup>pH 2.0 のヘモグロビン溶液 (20 mg/ml) にタンパク質量で 1/100 量のブタペプシン A を添加し、37℃で 5 時間反応後、pH 7.5 に調整した。

\*<sup>2</sup>第 4 章第 3 節の実験結果：3-ii)-(1) で調製した試料

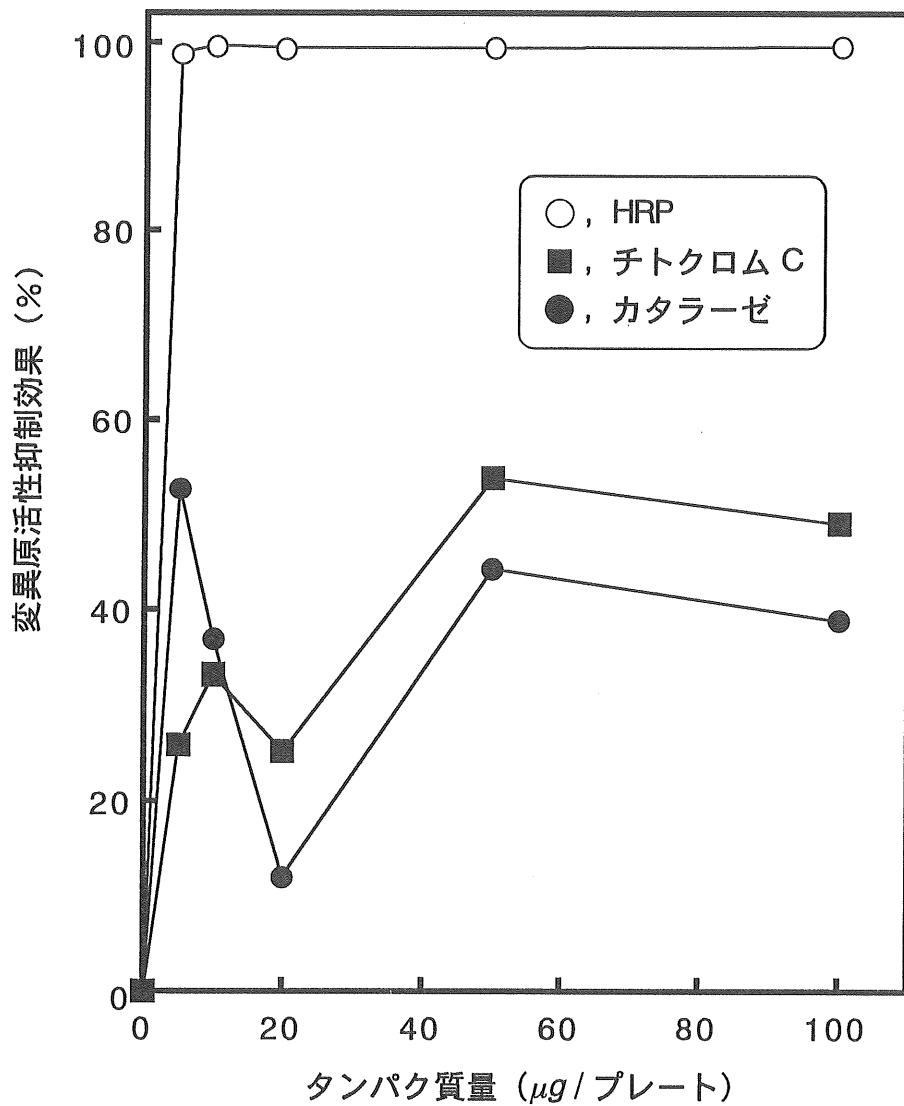


図 4-21. Trp-P-1 に対するチトクロム C およびカタラーゼの変異原活性抑制効果 (Trp-P-1 0.05 μg/プレート)

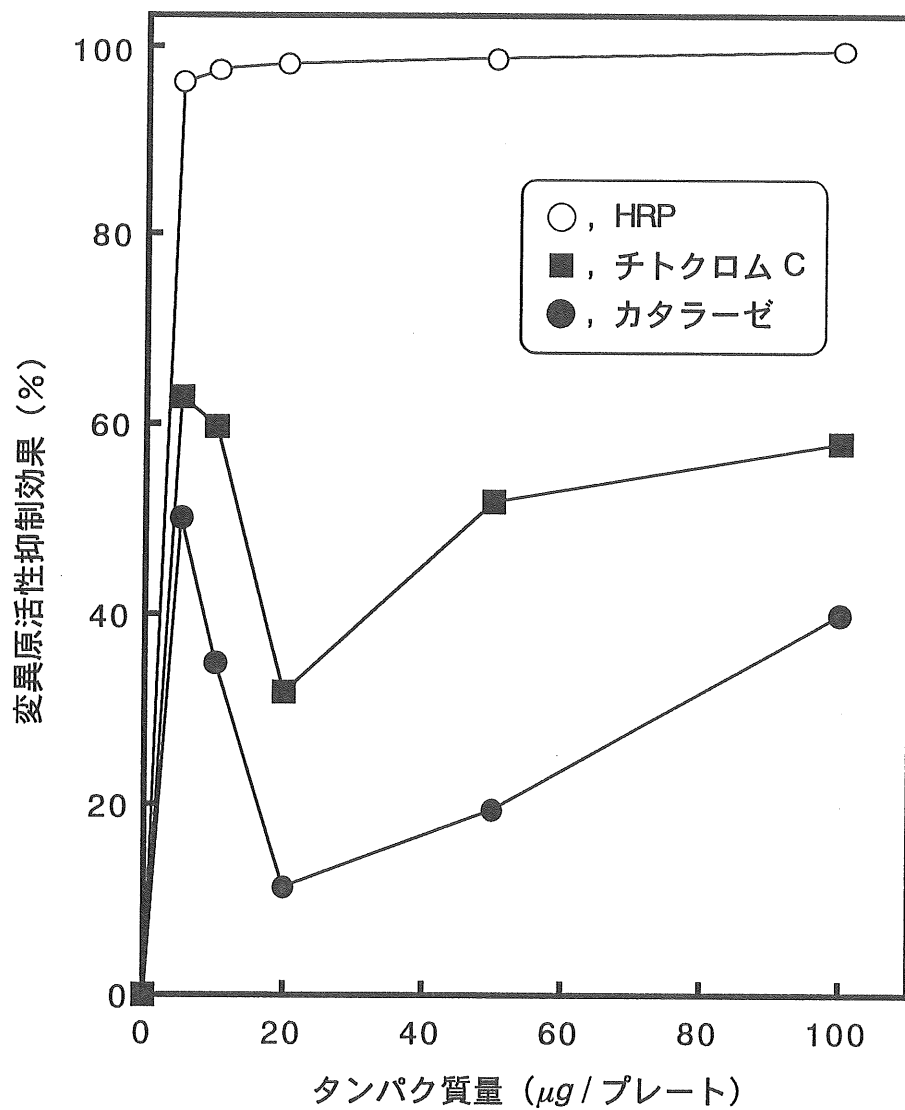


図 4-22. IQ に対するチトクロム C およびカタラーゼの変異原活性抑制効果 (IQ 0.005 μg/プレート)

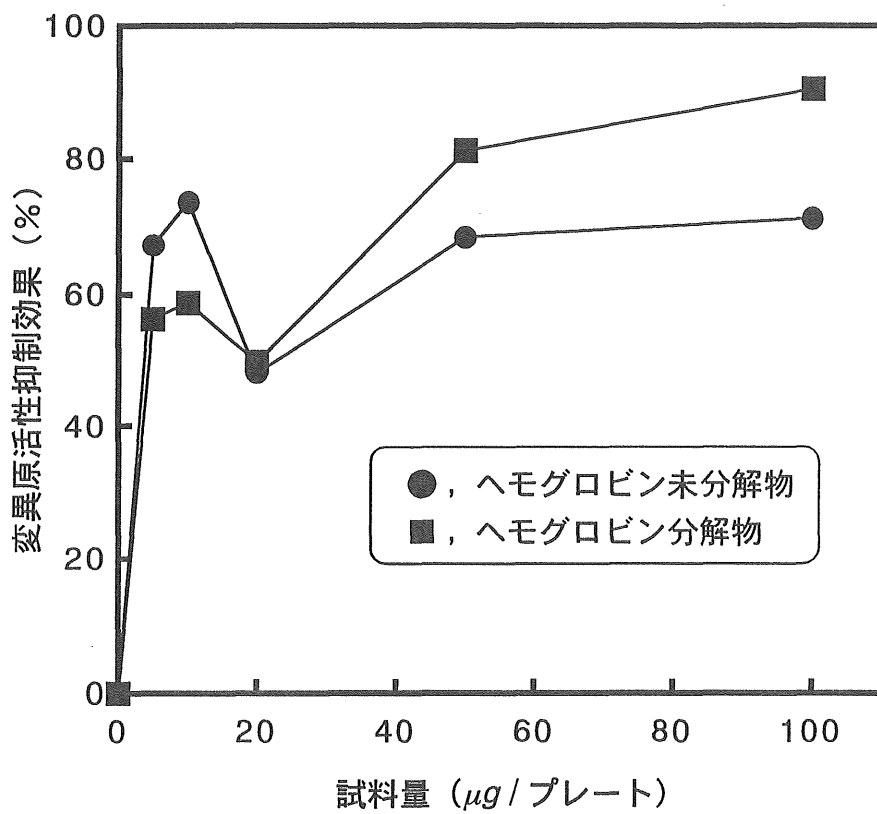


図 4-23. Trp-P-1 に対するヘモグロビンおよびヘモグロビン分解物の変異原活性抑制効果  
(Trp-P-1 0.05 μg/プレート)

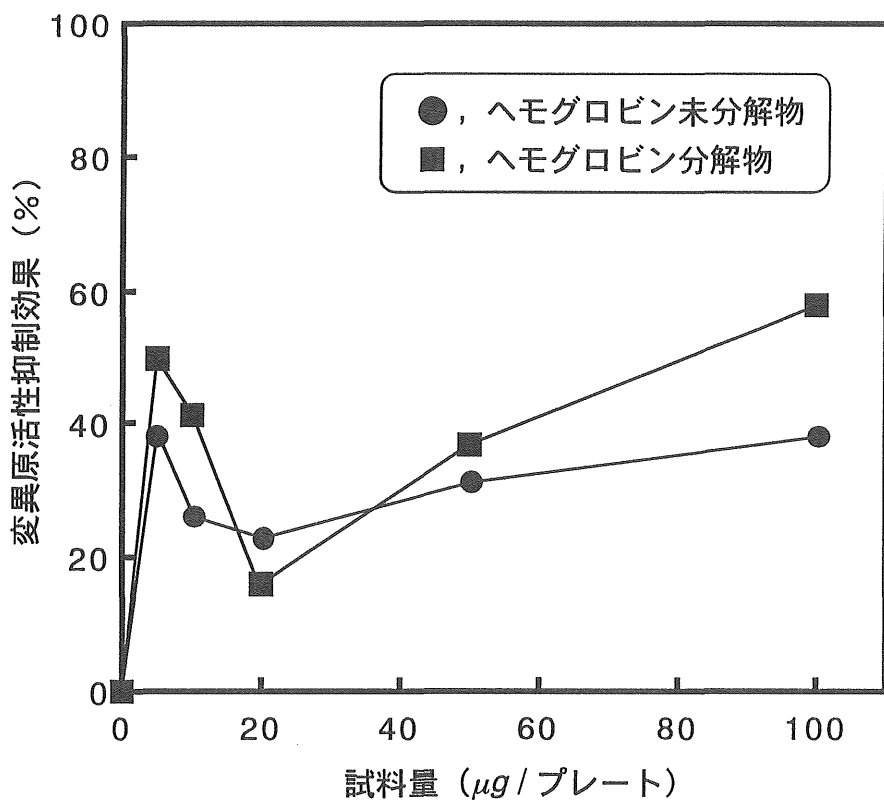


図 4-24. IQ に対するヘモグロビンおよびヘモグロビン分解物の変異原活性抑制効果 (IQ 0.005 μg/プレート)

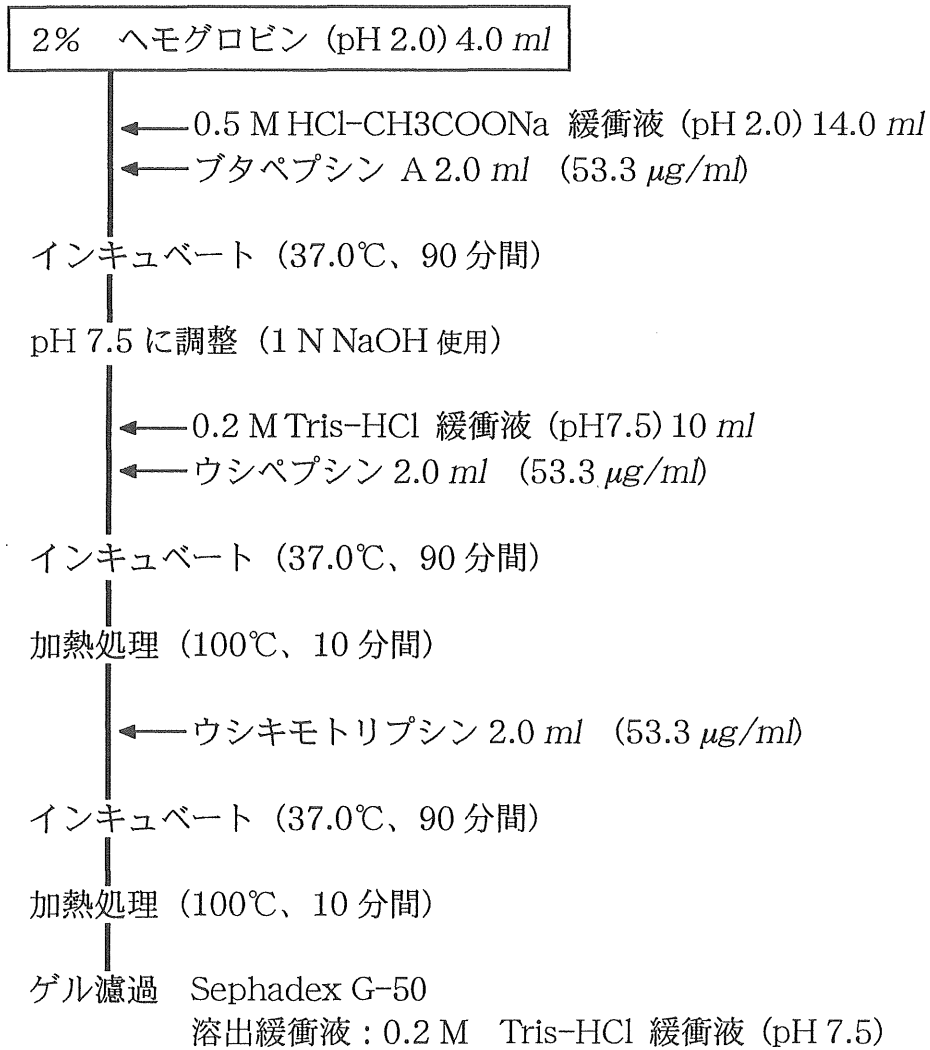


図 4-25. ペプシン、トリプシンおよびキモトリプシンによるヘモグロビンの分解



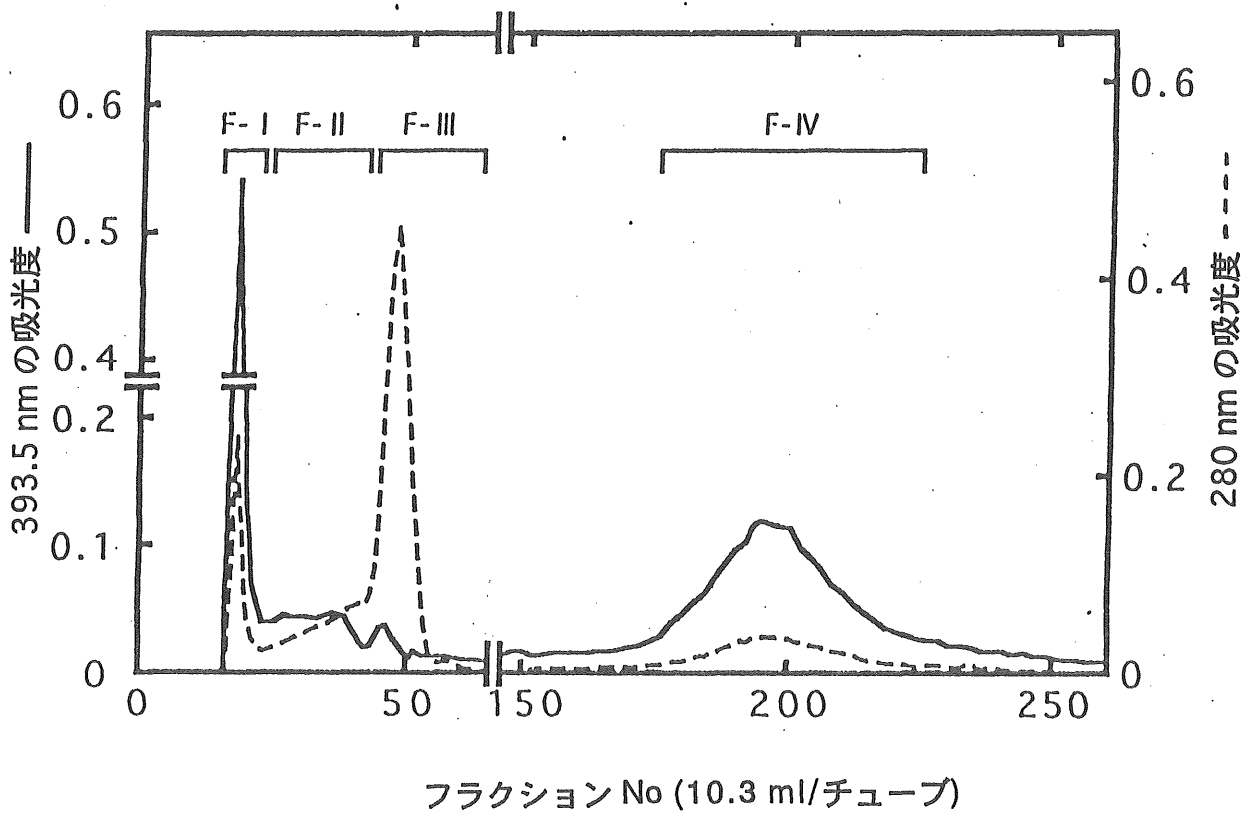


図 4-26. Sephadex G-50 によるヘモグロビン分解物のゲルろ過  
 カラムサイズ : 2.6×85 cm  
 溶出緩衝液 : 0.2 Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)

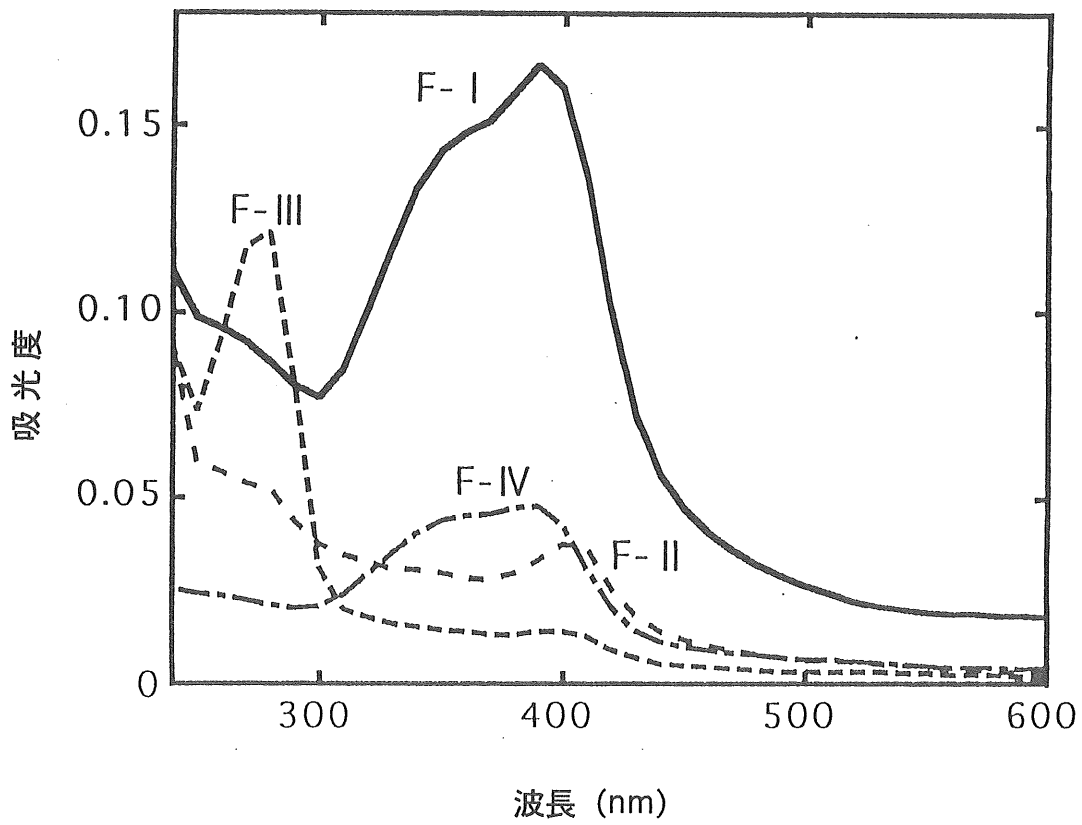


図 4-27. ゲルろ過分画液の吸収スペクトル

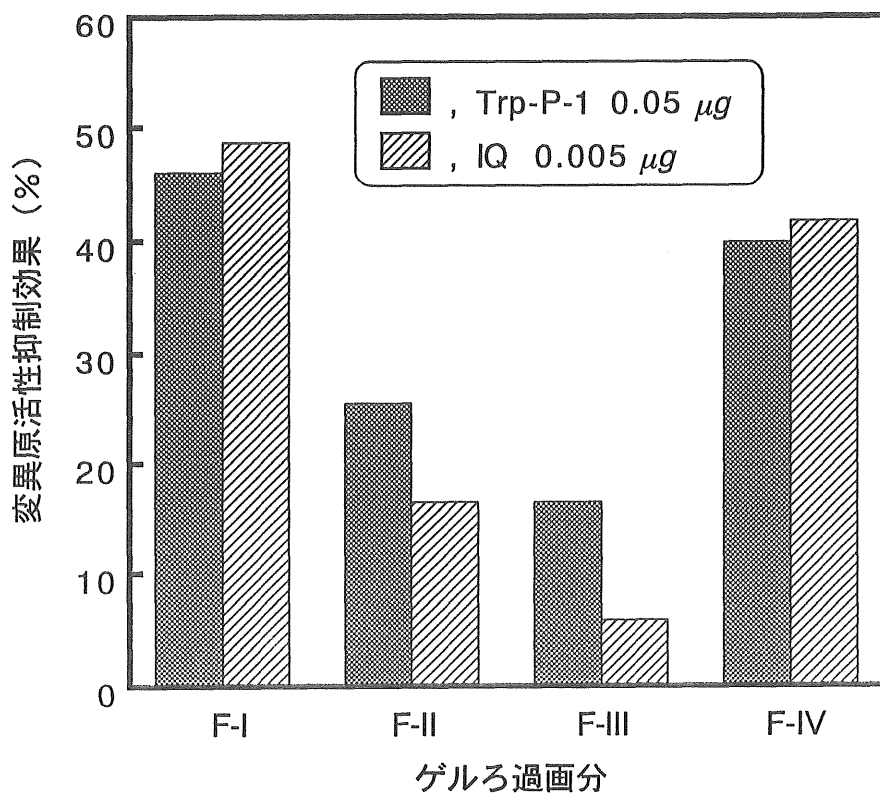


図 4-28. 化学変異原物質 に対するプロテアーゼ処理ヘモグロビンのゲルろ過分画液 (50  $\mu$ l/プレート) の変異原活性抑制効果

## 第4節 ヘテロサイクリックアミンの変異原活性に及ぼす糖 およびL-アスコルビン酸の影響

### 緒 言

本章第1節でキャベツ汁の「浸漬前焼き処理」効果を明らかにするため、ヘテロサイクリックアミンの変異原活性に及ぼすキャベツ汁分画液の抑制効果を調べた。その結果、Trp-P-1、Trp-P-2 及びIQ に対してF-I画分が最も強い抑制効果を示し、次いでF-II画分にもかなりの抑制効果が認められた(図4-6~8)。一方、図4-11に示したように、F-II画分は前章(第3章)の実験におけるF-II-2画分を完全に含んでいる。このF-II-2画分にはグルコースやL-アスコルビン酸が含まれている(図3-4)。これらのことより第4章第1節の実験で調製したF-II画分はグルコースやL-アスコルビン酸を含む画分であると言える。このことは次章の実験でも明らかにした(表5-1)。そこでF-II画分の「浸漬前焼き処理」効果をもたらす変異原活性抑制因子を明らかにするため、この画分に含まれているグルコース、フラクトース、シュクロースおよびL-アスコルビン酸のヘテロサイクリックアミンに対する変異原活性抑制効果を調べた。

### 実 験 方 法

#### 1. F-II画分の調製

第4章第1節で調製した(図4-5)F-II画分を用いた。

#### 2. 化学変異原物質溶液の調製

第4章第1節の方法に準じた。

### 3. 変異原活性の測定方法

第4章第1節および第3節の方法にほぼ準じて測定した。Trp-P-1 (0.05  $\mu$ g/プレート) に対しては S-9Mix 25  $\mu$ l/プレート、IQ (0.005  $\mu$ g/プレート) に対しては S-9Mix を 50  $\mu$ l/プレート添加し、これに1プレート当り糖では1~20% 溶液を 100  $\mu$ l、L-アスコルビン酸では0.1~1%溶液を 100  $\mu$ l 添加し、所定の方法で前培養した菌懸濁液を加え、復帰突然変異コロニー数を測定した。なお、L-アスコルビン酸は予め 1N NaOH で中和して使用した。

## 結 果

### 1. Trp-P-1 および IQ の変異原活性に及ぼすグルコース、フラクトース、シュクロースおよび L-アスコルビン酸の影響

実験方法に記した方法により、3種の糖の Trp-P-1 (0.05  $\mu$ g) および IQ (0.005  $\mu$ g) に対する変異原活性抑制効果を調べ、その結果を図 4-29 に示した。Trp-P-1 に対しては、3種の糖とも抑制効果を示したが、グルコースの抑制効果が最も高かった。フラクトースとシュクロースは低濃度 (10 mg/プレート以下) ではグルコースの 60% 程度の抑制効果しか示さなかったが、25 mg/プレートではグルコースの値に接近していた。一方、IQ に対してはグルコースが 25 mg/プレートで 50% の抑制効果を示したが、他の糖はそれより弱かった。また、L-アスコルビン酸については、結果は示していないが、Trp-P-1 に対しては抑制効果が認められたが、IQ に対しては全く抑制効果は認められなかった。

## 考 察

グルコース、フラクトース、シュクロースおよび L-アスコルビン酸の Trp-P-1、IQ に対する変異原活性抑制効果を調べた。3種の糖はいずれも Trp-P-1 に対

しては抑制効果を示し、特にグルコースは抑制効果が強かった。しかし、IQに対する抑制効果は弱かった。このような Trp-P-1 に対するよりも IQ に対する抑制効果が弱い性質は、図 4-6、8 および図 4-9、10 の F-II 画分の性質にほぼ類似していた。本実験で用いた F-II 画分の糖の量は定量していないが、第 5 章で用いたキャベツ汁の各分画液の糖の定量値（表 5-1）から推察すると、F-II 中のグルコースは 100 mg/ml 以上、フラクトースは 90 mg/ml に近いと考えられる。従って、F-II 画分を 100  $\mu$  l/プレート用いた実験の場合には、グルコースでは図 4-29 の 10 mg/プレートの実験に近いと考えられる。従って、Trp-P-1 (0.05  $\mu$  g) に対しては 65% 以上の抑制効果をもたらすことになる。また、焼き魚をキャベツ汁に浸漬した実験の場合は、糖の混合溶液としては 4~5% の糖液（主にグルコース、フラクトース、シュクロースの混液）に浸漬したことになる。これは、図 4-29 の 20 mg/プレート以上の実験に相当する。従って、実際の焼き魚の「浸漬前焼き処理」の場合には、キャベツ汁中のグルコース含量が最も大きな影響を与えるが、糖の混合液としての抑制効果も期待できる。第 1 章で認めた焼きブリに対するキャベツ汁の「浸漬前焼き処理」効果の一因には、糖が関与していることも推察された。また、第 1 章で 50% シュクロース液を用いた「浸漬前焼き処理」効果も本実験の Trp-P-1 に対するシュクロースの効果（図 4-29）から裏付けられると考えた。

第 4 章第 1 節及び第 2 節の実験で、F-I および F-II 画分の加熱処理の影響を調べ、F-II 画分は F-I 画分よりも加熱処理に対して安定であることを報告した。本節の実験結果から、F-II の抑制効果が上記の糖の影響であるとする、F-II 画分が 100°C の加熱に対して安定であったことは理解できる。従来より、グルコースや L-アスコルビン酸については、還元力やその抗酸化剤としての性質より、がんに対する抑制効果が期待されているが、特定化合物の変異原活性に関する実験は行われていなかった。本節の実験により、ヘテロサイクリックアミンの Trp-P-1 の変異原活性に対して糖は抑制効果をもつことが明らかになった。

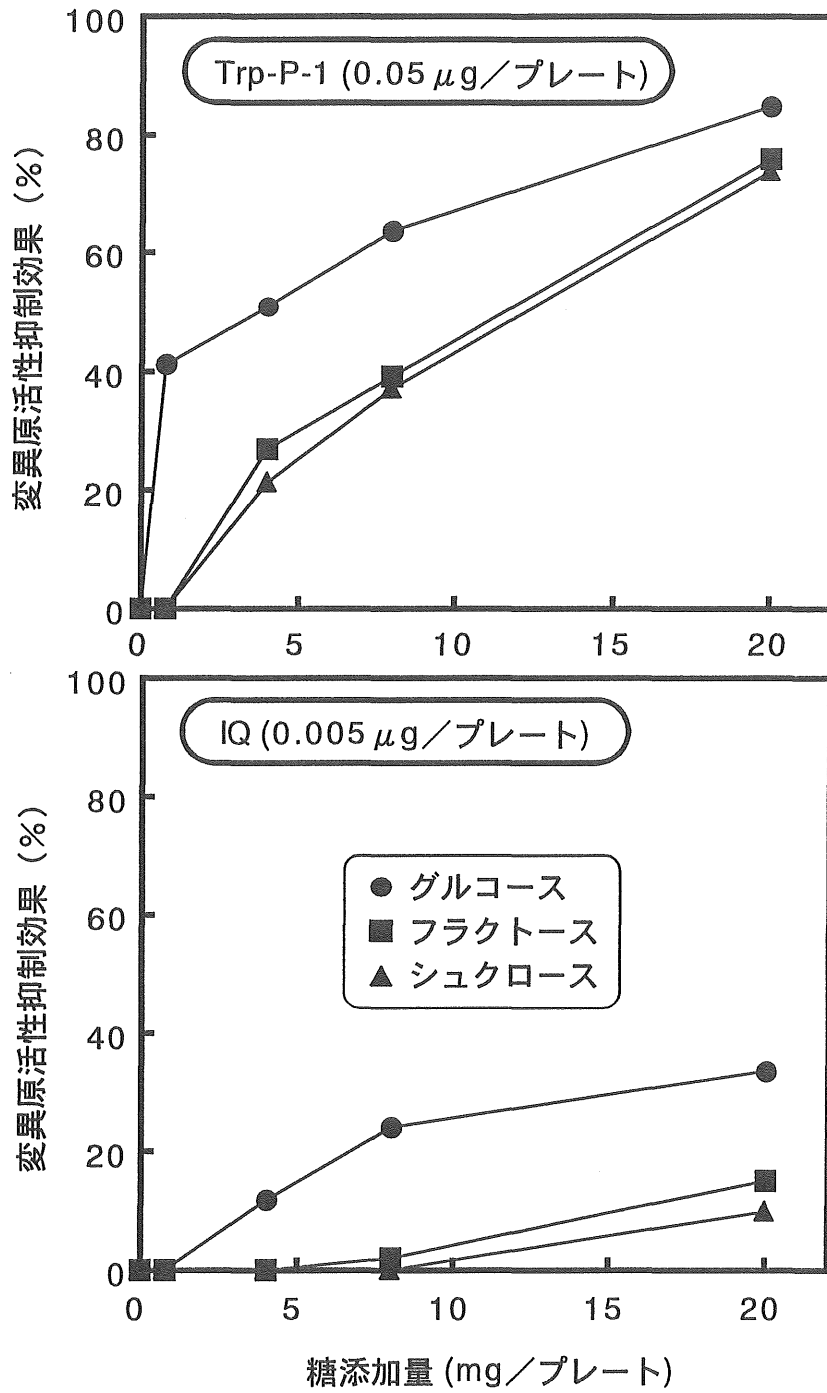


図4-29. Trp-P-1 および IQ に対する糖の変異原活性抑制効果

## 第5章 トリプトファンの焼き処理過程へのキャベツ汁分画液 および数種化合物の添加効果

### 緒 言

第2章の焼き魚を用いた実験において、「浸漬前焼き処理」と「浸漬後焼き処理」におけるキャベツ汁の変異原(活)性抑制効果を調べた結果、キャベツ汁には上記の両処理法において変異原性を抑制する効果があることを確認した。次に、第3章では焼き魚の変異原性に及ぼすキャベツ汁分画液の影響を調べた。その結果、「浸漬前焼き処理」効果をもたらすのは、高分子画分が最も強く、次いでグルコース等が溶出する低分子画分であった。一方、「浸漬後焼き処理」効果をもたらすのは、上記の低分子画分と、さらにそれより遅れて溶出する低分子画分であり、この場合後者の低分子画分の方が強い抑制効果を保持していた。即ち、キャベツ汁は3つの異なる分画でそれぞれ特徴をもった変異原性抑制作用を示した。このうち、「浸漬前焼き処理」効果をより化学的な実験により実証するため、第4章において、獣肉や魚肉の焦げの中に存在することが既に知られている数種の化学変異原物質 (Trp-P-1、Trp-P-2 および IQ) を用い、これらに対するキャベツ汁分画液の抑制効果を調べた。その結果、高分子画分に強い抑制効果があることを確認した。この結果は、第3章に記した「浸漬前焼き処理」実験において、キャベツ汁の高分子画分が強い抑制効果を示した結果と完全に一致するものであった。

そこで、本章(第5章)では、第3章で確認したキャベツ汁の低分子画分の「浸漬後焼き処理」実験における高い変異原性抑制効果、即ち、焼き魚の変異原物質の生成を抑制する効果を化学的に証明する実験を主に行った。そのため、焼き魚に替えて焼き魚の化学変異原物質である Trp-P-1 や Trp-P-2 の前駆物質であるアミノ酸のトリプトファンを用い、これを焼き処理する過程でキャベツ汁の分画液を加え、各分画液の効果を比較した。その結果、2つの低分子画分にそ



の作用が強いことを確認した。そこで、キャベツ汁低分子画分に存在するL-アスコルビン酸や還元糖の影響等について検討した。次に、第3章の焼き魚の実験で確認したキャベツ汁の高分子画分の「浸漬前焼き処理」における高い抑制効果を化学的に実証するため、トリプトファンを焼き処理して得た抽出検液にキャベツ汁の分画液を加え変異原活性抑制効果を調べた。

## 実 験 方 法

### 1. キャベツ汁分画液の調製

第4章に準じた。

### 2. L-アスコルビン酸、糖および鉄の定量

L-アスコルビン酸は 2-4 ジニトロフェニルヒドラジン法<sup>104)</sup>、還元糖の定量は *Somogy-nelson* 法<sup>105)</sup>、グルコースとフラクトースの分別定量は示差屈折計付高速液体クロマトグラフィー法<sup>106)</sup>により定量分析した。また、鉄の定量は、1%硝酸下湿式灰化後、フレイムレス原子吸光光度法によった。

### 3. トリプトファンの焼き処理試料の調製

#### 1) トリプトファンの「浸漬後焼き処理」試料の調製

るつばにトリプトファン 750 mgを秤量し、これに蒸留水（対照試験用）またはキャベツ汁分画液（F-I~F-IV）を 1 ml加えて、るつばの外底部に軽く振動を与えながら均一化した。これにふたをして予め 350℃に調整しておいたマッフル炉の中央に置き、同温で 30 分間加熱処理（焼き処理）後取り出し室温まで冷却した。次に、生成した炭化物（焦げ）をガラス棒で丁寧に削り落とし、これを小型秤量ビンに移してジメチルスルホキシド 6 mlを加え、3 分間ホモゲナイズした。次いで、ジメチルスルホキシド 4 mlを用いてホモジナイザーシャフトの先端部に付着している試料を洗いとり、秤量ビンにふたをして 37℃に 24 時間放置し、

炭化物中の成分を可溶化した。これを吸引ろ過し、このろ液をトリプトファン  
の「浸漬後焼き処理」の変異原性測定試料液とし、使用時まで-80℃に凍結保存  
した。また、グルコースや、フラクトースおよびL-アスコルビン酸等の「浸漬  
後焼き処理」における変異原活性抑制効果を調べる実験では、キャベツ汁分画  
液に替え同量の上記溶液を用いた。

## 2) トリプトファンの「浸漬前焼き処理」試料の調製

トリプトファン 750 mgに蒸留水 1 mlを添加し、350℃で 30 分間焼き処理し、  
前記同様ジメチルスルホキシドによる抽出液を調製した。この液にキャベツ汁  
分画液 (F-I~F-IV) や糖液およびL-アスコルビン酸等を添加し、変異原活性抑  
制効果を調べた。

## 4. 変異原活性の測定

第4章第1節の方法にほぼ準じて行ったが、S-9Mixの添加量を1プレート当  
り 500  $\mu$ lにした。なお、トリプトファンや魚や肉の焦げにはノルハルマンが  
生成し<sup>74)</sup>、それ自身は変異原活性をもたないが、ノルハルマン存在下で Trp-P-1  
の変異原活性を Ames 法で測定する場合には S-9Mix が多量に必要であることが  
報告されている<sup>61)</sup>。

## 結 果

### 1. トリプトファンの焼き処理条件と変異原活性

初めにトリプトファンの焼き処理温度と変異原活性の関係を調べた。実験方  
法の項に記載した方法に従い、トリプトファン 750 mgに蒸留水 1 mlを加え、第2  
章の焼き魚の実験で採用した 260℃、30 分間の焼き処理と、H.Milon<sup>107)</sup> がトリ  
プトファンの焼き処理条件と変異原活性の関係を調べた実験で採用している  
350℃、30 分間の焼き処理を行い、ジメチルスルホキシドを用い変異原活性測定

試料を調製した。この試料液を1プレート当たり10~100  $\mu\text{l}$  用い、S-9Mixを25  $\mu\text{l}$  および100  $\mu\text{l}$  添加して、常法により変異原活性を測定したところ、結果には示していないが両試料の変異原活性は非常に低かった。そこで、S-9Mixの1プレート当たりの添加量をAmes法の原法<sup>90)</sup>に従い、500  $\mu\text{l}$  添加して変異原活性を測定した。その結果、図5-1に示すように、350°C、30分間の焼き処理試料液を100  $\mu\text{l}$  用いた場合に適度のHis<sup>+</sup>復帰突然変異コロニー数を得ることができた。そこで以下の実験はこの条件を採用した。なお、本実験においてS-9Mixが500  $\mu\text{l}$  必要であったことについては考察の項で述べる。

## 2. トリプトファンの「浸漬後焼き処理」実験におけるキャベツ汁分画液の変異原性抑制効果

まず変異原試験に先立ち、キャベツ汁のゲルろ過分画液を調製した。800 gのキャベツから得た450 mlのキャベツ汁を凍結乾燥後60 mlの蒸留水に溶解し、その超遠心(74,000×g、60min)上清液をSephadex G-25のカラム(4.0×66cm)でゲルろ過し、図5-2-(A)の結果を得た。なお、図5-2-(B)、(C)には、入手時の異なるキャベツ800 gを前記と同様に処理した場合のゲルろ過の結果を示した。図5-2-(A)のフラクションNo.37~60を高分子画分(F-I)とし、それ以後の溶出部(低分子画分)を4分画(F-II、F-III-1、F-III-2およびF-IV)した。各分画液を凍結乾燥後、各々45 ml(初めのキャベツ汁液の1/10量)の蒸留水に溶解した。なお、F-I~F-IVの分割は280nmの吸収および微妙な色調の変化を参考にして行った。F-Iはポイドポリウムに近い位置で、高分子のタンパク質等が溶出した位置までとし、F-IIはその次に溶出する280nmの大きなピークの部分とした。F-III-1とF-III-2の区切りは判断が最もむずかしい位置であるが、微妙な淡い赤黄色が消失し始める位置をめやすとした。

上記のように調製した各分画液の1 mlを750 mgのトリプトファンに添加し、350°C、30分の焼き処理後、ジメチルスルホキシドを用いて変異原活性測定試料液を調製した。この試料液を1プレート当たり100  $\mu\text{l}$  用い変異原活性を測定し、対照試験の変異原活性から抑制効果を求め図5-3に示した。最も強い抑制効果を

示したのは低分子画分の F-III-1 (98%抑制) であり、次いで F-II (85%抑制) であった。高分子画分の F-I では約 40%、低分子画分の F-III-2 および F-IV はいずれも 30%以下の低い抑制効果しか示さなかった。

上記と同様の実験を入手時の異なるキャベツ(ゲルろ過の結果は図 5-2 に示した)を用いて、さらに 2 回行い、その結果を図 5-3 に併せて示した。キャベツ汁のゲルろ過の溶出パターンは試料毎に異なるため、分画が必ずしも一致しているとは言えないが、いずれの試料においても、F-III-1 画分の変異原性抑制効果が最も高く、次いで F-II 画分であり、高分子画分の F-I の効果は低かった。図 5-3 の結果をみると F-III-1 画分で処理した試料では、いずれも 100%近い変異原性抑制効果を示した。このことはトリプトファン 750 mg を焼き処理する場合に F-III-1 画分を 1 ml 添加すれば(キャベツ汁に換算すると 10 ml に相当)ほぼ完全に変異原物質の生成を抑えることができることを意味している。そこでトリプトファンを焼き処理する場合に F-III-1 画分を蒸留水で 2~10 倍希釈し、その 1 ml を 750 mg のトリプトファンに添加し、350℃で 30 分間焼き処理し、所定の方法で抽出液を調製し、その 100  $\mu$  l を用いて変異原活性を測定した。その結果を F-II 画分の結果と併せて図 5-4 に示した。各分画液の原液 1 ml を用いた場合には、F-III-1 は 100%、F-II は 84%の抑制効果を示したが、各分画液の 2~10 倍希釈液を用いた実験結果(図 5-4)から推察すると両者の抑制効果に大きな差が認められた。即ち、50%の抑制効果を示すには、F-II は F-III-1 の約 3~4 倍必要であった。

### 3. トリプトファンの「浸漬前焼き処理」実験におけるキャベツ汁分画液の変異原活性抑制効果

トリプトファンに蒸留水を加えて焼き処理した試料から調製した変異原活性測定試料液(対照試験の測定用試料液) 100  $\mu$  l に対して、キャベツ分画液(F-I~F-IV)を 100  $\mu$  l 添加し常法により変異原活性を測定した。その結果、トリプトファンの焼き処理によって生じた変異原活性に対して強い抑制効果を示したものは F-I (95%) および F-II (87%) 分画液であった(図 5-5)。特に F-I (高

分子) 画分に強い変異原活性抑制効果が認められた。この結果は、第3章の焼きブリの「浸漬前焼き処理」の結果および第4章第1節で行った化学変異原物質の Trp-P-1、Trp-P-2 および IQ に対してキャベツ汁分画液の F-I 画分が最も強い変異原活性抑制効果を示し、次いで F-II 画分が強い変異原活性抑制効果を示した結果と完全に一致するものであった。次に、F-I および F-II 分画液について、その濃度による影響を調べた。即ち、対照試験の測定用試料液 100  $\mu$  l に対し、F-I および F-II 分画液を 5~100  $\mu$  l 添加し変異原活性を調べた。その結果を図 5-6 に示した。F-I 画分は 5  $\mu$  l 添加でも 60% の抑制効果を示し、非常に強い抑制効果があることが判明した。一方、F-II 画分は 50  $\mu$  l 以下の添加では全く抑制効果を示さなかったが、100  $\mu$  l 添加では 80% の抑制効果を示した。50  $\mu$  l ~100  $\mu$  l の中間の実験を行っていないので、明らかでないが、F-II が抑制効果を示すためには、ある一定以上の量が必要であることが推察された。この結果は前章第4節の図 4-29 に示した Trp-P-1 と IQ に対する糖の濃度による影響から推察し、あり得る現象と思われた。

#### 4. キャベツ汁分画液の L-アスコルビン酸、還元糖および鉄の定量

L-アスコルビン酸、L-システイン等の還元物質がある種の変異原物質の活性を抑制することが知られている<sup>53~64</sup>。そこで図 5-2(A)、(B) に示したキャベツ汁のゲルろ過の各分画液中のグルコース、フラクトースおよび L-アスコルビン酸を定量した。その結果を表 5-1 に示した。グルコース、フラクトースは F-II 画分に最も多く、次いで F-III-1 画分であった。F-II 画分のグルコースは F-III-1 画分のグルコース量の 6~10 倍、フラクトースは 3.8~4.5 倍であった。これに対し、L-アスコルビン酸は F-II 画分に最も多く含まれている点では、還元糖の場合と同じであったが、F-II 画分の含有量は F-III-1 画分の 2.1~2.5 倍にとどまった。なお、F-II および F-III-1 画分以外の画分にはこれらの物質はほとんど含まれていなかった。また、結果には示していないが図 5-2 に示したゲルろ過のカラムにグルコース、フラクトースおよびシュクロースを流したところ、F-II 画分の中央部前部 (フラクション No.72 前後) に溶出した。また、L-アスコルビン

酸を流した場合には糖の場合より少し広い範囲に溶出した。その他、結果には示していないが、図 5-2-(A)の試料を用い Lowry 法による発色試験を行った結果、F-II 画分の範囲で強い発色があったが、F-III-1 画分の試料の発色は非常に低かった。

次にアスコルビン酸や糖の還元作用に関与するといわれている鉄に注目し、キャベツ汁の各分画液の鉄を定量した。その結果は表 5-1 に示すように、鉄は F-II 画分に最も多く、次いで F-I、F-III-1 の順であった。F-I に多く存在したのは高分子物質に結合した鉄であると推察した。以上の種々の物質の発色および定量結果からは、トリプトファンの「浸漬後焼き処理」実験で最も強い変異原活性抑制効果を示した F-III-1 に最も多く含まれる物質を見出すことはできなかった。

#### 5. トリプトファンの「浸漬後焼き処理」実験におけるフラクトース、グルコースおよび L-アスコルビン酸の変異原性抑制効果

前項 2 の実験により、トリプトファンの「浸漬後焼き処理」には F-III-1 が最も強い変異原性抑制効果を示し、次いで F-II であった。一方、キャベツ汁中のフラクトースやグルコースおよび L-アスコルビン酸は主に F-II 画分に溶出していた。そこで F-II 画分の「浸漬後焼き処理」における変異原性抑制因子を推定するために、これらの物質のトリプトファンの「浸漬後焼き処理」における変異原性抑制効果を調べた。なお、これらの物質の添加量は本実験の分析結果および食品分析結果を考慮して決定した。トリプトファン 750 mg に 20% フラクトース、20% グルコース溶液、1% L-アスコルビン酸および 3 者を等量ずつ混合した溶液を 1 ml 添加し、実験方法の項に記した方法により焼き処理後ジメチルスルホキシドを用い抽出液を調製し、その 100  $\mu$  l を用い、変異原活性を調べ、対照試験に対する変異原性抑制効果を求め図 5-7 に示した。グルコースでは 86% の抑制効果を示し、フラクトースでは 63% の抑制効果を示した。しかし、L-アスコルビン酸の抑制効果はほとんど認められなかった。

## 6. トリプトファンの「浸漬前焼き処理」実験におけるグルコース、フラクトースおよびL-アスコルビン酸の変異原活性抑制効果

前項の実験3でトリプトファンの「浸漬前焼き処理」におけるキャベツ汁分画液の変異原活性抑制効果を調べた。その結果、F-IおよびF-II画分の抑制効果が強いことを明らかにした。このうち、F-I画分の抑制効果は第4章第2節の実験結果によりペルオキシダーゼによると判断した。一方、F-II画分の抑制効果は、第4章第4節の実験結果よりその画分に含まれる還元糖やL-アスコルビン酸によると推察した。そこで、これらの物質のトリプトファンの「浸漬前焼き処理」における変異原活性抑制効果を調べた。実験は前項実験3と同様、トリプトファンに蒸留水を加えて焼き処理した試料から調製した抽出液100  $\mu$  lに20%糖液、または1%L-アスコルビン酸100  $\mu$  lを加え変異原活性抑制効果を調べた。その結果は図示していないが、いずれの化合物によっても全く抑制効果は認められなかった。

## 7. トリプトファンの焼き処理実験におけるイソチオシアナートの変異原性抑制効果

イソチオシアナート ( $R-N=C=S$ ) は十字花科植物の組織を磨砕したときに、グリコシノレート ( $\text{Glucose}-S-\overset{R}{C}=N-\text{OSO}_3^-$ ) からミロシナーゼの作用を経て生成される物質であり<sup>108)</sup>、近年がんの抑制に関与していることが明らかにされている物質である。その前駆物質のグリコシノレートは十字花科のアブラナ属の植物(キャベツ、カリフラワー、ブロッコリー、その他)を中心に十数属にわたって広く分布している。

本実験では、キャベツ汁からイソチオシアナートを検出していないが、標準物質としてイソチオシアナートの1種のメチルイソチオシアナートの約0.1%の水溶液を用い、図5-2で用いたSephadex G-25のカラムに流し、240nmの吸収によりその溶出位置を調べた。その結果、F-III-1画分のところに肩をもった1つのピークと、それよりさらに遅れた位置に小さなピークとなって溶出することを確認した(図5-8)。なお、結果には示していないが、2つのピーク(フラク

シオン No.91 と 138) の紫外部の吸収曲線は異なっていた。この 2 つのピークが不純物によるものか、実験中に分解して生じたものか不明であるが、いずれにしろそのうちの 1 つは、F-III-1 の分画域に溶出した。そこで、この化合物のトリプトファンの「浸漬前焼き処理」実験における変異原性抑制効果を調べた。

「浸漬前焼き処理」実験としては、前項の実験 6 と同様な方法により 0.2~2% メチルイソチオシアナートを 1 プレート当り 100  $\mu$  l 添加し、Trp-P-1 に対する抑制効果を調べた。その結果は図示していないが、0.2% 溶液の添加では 76%、1% 溶液以上では 90% の抑制効果が認められた。

## 考 察

焼きブリの変異原性とキャベツ汁の変異原性抑制効果について検討した実験の中で、第 2 章ではキャベツ汁には「浸漬後焼き処理」の効果、即ち、焼き処理過程での変異原物質の生成を抑制する効果があることを示唆する結果を得た。次いで、第 3 章では、焼きブリの実験により「浸漬後焼き処理」の効果はキャベツ汁の主に 2 つの低分子画分の作用であることを明らかにした。そこで本章 (第 5 章) では、焼きブりに替えてトリプトファンを焼き処理する過程でキャベツ汁分画液を加え、キャベツ汁のゲルろ過分画液のどの画分にその効果があるのかを検討した。初めにトリプトファンの焼き処理条件および変異原活性測定時の S-9Mix の添加量を検討した。その結果、350℃で 30 分間焼き処理し、1 プレート当りその抽出を 100  $\mu$  l と S-9Mix を 500  $\mu$  l 添加して変異原活性を測定すると適当な His<sup>+</sup>復帰突然変異コロニー数が得られることがわかった。S-9 Mix の添加量は焼きブリの変異原活性を測定する場合と同量であったが、Trp-P-1 や IQ 単独の変異原活性を測定する場合よりも多量の添加量が必要であった。これに近い現象を長尾<sup>61)</sup>も報告している。これは肉の焦げやトリプトファンを焼いたときに多量のノルハルマン ( $\beta$ -カルピン) が生成し、ノルハルマンの存在下では微生物 (本実験では *S. Typhimurium* TA98) の活性化に多量の S-9Mix



が必要であることが認められている。本実験でも、結果には示していないが、S-9Mix 100  $\mu$ l 添加では、強い変異原活性が検出されなかったことと一致している。

次に、「浸漬後焼き処理」実験によりキャベツ汁のゲルろ過分画液の影響を上記の条件(350℃、30分間のトリプトファンの焼き処理、1プレート当り S-9Mix を 500  $\mu$ l 添加して変異原活性を測定する)で調べた。その結果、低分子画分の F-III-1 が最も強い抑制効果を示し、次いで F-II 画分であった(図 5-3)。この結果は、第 3 章の焼きブリを用いた実験結果とよく符合していた。

トリプトファンの「浸漬後焼き処理」実験において、強い変異原性抑制効果を示した F-III-1 および F-II について、さらにその濃度による影響を調べた(図 5-4)。その結果、50~60%の抑制効果を示す濃度で比較すると、F-III-1の方が F-II より約 3~4 倍強い抑制効果をもつことが明らかになった。これらの画分の F-II 画分にはキャベツ汁中のフラクトース、グルコース、L-アスコルビン酸等の低分子化合物が溶出していた。一方、F-III-1 はそれより少し遅れて溶出する画分であるがこの画分中の成分は現段階では不明である。上記の「浸漬後焼き処理」の効果は F-III-1 で最も強かったことより、トリプトファンの焼き処理により生成する変異原物質の生成を最も強く抑制するものはキャベツ汁中の、還元糖や L-アスコルビン酸ではないことが明らかとなった。

一方、F-II 画分にも F-III-1 よりは弱かったが、かなり強い「浸漬後焼き処理」における抑制効果が認められた(図 5-4)。このことより、この画分中に含まれるグルコース、フラクトースおよびアスコルビン酸の「浸漬後焼き処理」効果が期待されたのでこの点を確認する実験を行った(なお、これらの化合物の「浸漬前焼き処理」に相当する実験は前章第 4 節で実験している)。その結果、グルコースおよびフラクトースには抑制効果を認めることができたが、アスコルビン酸の抑制効果は非常に弱かった。

また、トリプトファンを用いた「浸漬前焼き処理」実験に相当する実験として、焼き処理したトリプトファンにキャベツ汁分画液を加え、変異原活性抑制効果を調べた。その結果、F-I 画分が最も強く、次いで F-II 画分であった。この

結果は、焼き魚を用いた第3章の実験結果および化学変異物質を用いた第4章第1節の実験結果とよく符合する結果であった。しかし、F-IおよびF-IIを希釈してその効果を比較すると(図5-6)、F-Iは20倍希釈でも60%程度の抑制効果を示したのに対し、F-IIは2倍希釈で抑制効果は消失した。この点に関してはさらにF-IIの濃度による影響を詳細に調べることが必要である。また、F-II画分に含まれるグルコース、フラクトースおよびL-アスコルビン酸について一定濃度で「浸漬前焼き処理」実験に相当する実験として、トリプトファンを焼き処理した溶液に加えてその効果を調べたが、抑制効果は認められなかった。この点は第4章第4節で行ったヘテロサイクリックアミンに対してグルコース、フラクトースがTrp-P-1に対して変異原活性抑制効果を示した結果と異なっていた。さらに濃度を変えて検討する必要があるが、トリプトファンを焼き処理した場合には、先にも述べたように多量のノルハルマンが生成し、この物質が変異原活性に複雑な影響を与えることが報告されている<sup>74)</sup>。従って、本実験のように多量のトリプトファンを焼き処理した生成物に対する変異原活性抑制効果を調べる場合には、ノルハルマンの影響等を十分に考慮した実験が必要なのかもしれない。しかしながら、先にも述べたように、第4章第4節の実験では明らかにグルコースおよびL-アスコルビン酸には、Trp-P-1に対する変異原活性抑制効果を確認することが出来た。その他、第2章の焼きブリの「浸漬前焼き処理」実験によっても、高濃度のシュクロースやL-アスコルビン酸の「浸漬前焼き処理」効果を確認した。今後さらにこれらの化合物の濃度の影響を詳細に検討する必要もあるが、実際の生のキャベツ汁のこれらの化合物の濃度は、糖に関しては本実験で行った濃度範囲に含まれており、焼きブリの「浸漬前焼き処理」にある程度、効果をもたらすものと推察した。

一方、先にも述べたように、F-III-1画分の「浸漬後焼き処理」効果をもたらす因子は、現段階では全く不明であり、今後の最大の研究テーマになると考える。筆者はその1つの因子として、イソチオシアナート(アブラナ属の植物から約100種類に近いイソチオシアナートが見い出されている<sup>132)</sup>に注目し、その1種であるメチルイソチオシアナートをSephadex G-25のカラムに流し、溶出位

置を 240nm の吸収により調べた。その結果、F-III-1 画分の位置に大きなピークとそれより遅く溶出するピークを確認した。後者のピークは試薬中の不純物または水が付加された化合物であると推察した。このようなメチルイソチオシアナートを用い、「浸漬前焼き処理」実験に相当する実験として Trp-P-1 に対する変異原活性抑制効果を調べた。その結果、高い抑制効果を確認することができた。イソチオシアナートは  $R-N=C=S$  なる構造をもつ分子であり、その C 原子は電子不足となり、求核試薬のアミン、アルコール、水などの付加を受けやすい化合物である。このような性質から推察すると、この化合物の「浸漬前焼き処理」効果はヘテロサイクリックアミンとの付加反応によると推察した。しかし、キャベツ汁中のこの種の化合物の含有量が不明であるため、キャベツ汁の浸漬効果におけるイソチオシアナートの役割については、現段階ではこれ以上の考察は出来ない。イソチオシアナートのがん抑制効果に関しては、ラットのニトロソアミンによって誘発する食道がんはイソチオシアナートの 1 種であるフェネルイソチオシアナートの投与により顕著に抑制されること<sup>129)</sup> が報告されているほか、スルフォラファン ( $CH_3-S-(CH_2)_n-N=C=S$ ,  $CH_3-SO-(CH_2)_n-N=C=S$ 、ブロッコリーより単離されたイソチオシアナートの 1 種) は種々の組織の中で発がん性物質の不活性化反応に関するフェーズ II 酵素 (キノンレダクターゼやグルタチオン S-トランスフェラーゼ等) を誘導することなどが報告されている<sup>130, 131)</sup>。本研究ではイソチオシアナートの一種であるメチルイソチオシアナートを用い、ゲルろ過したところ、F-II-1 画分に溶出することを確認した。従って、キャベツ汁中のこの種の化合物が、F-III-1 画分に溶出する可能性が高いことが示唆された。今後、キャベツ汁中のイソチオシアナートの主成分が何であるかを明らかにし、その化合物の抑制効果を明らかにすることが必要である。

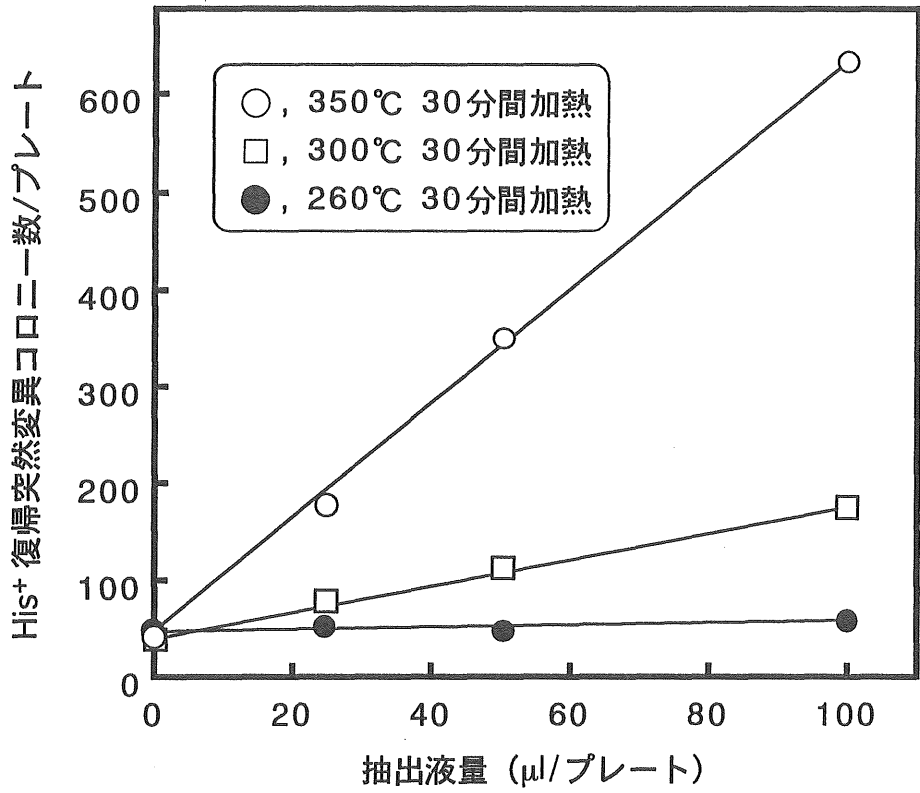


図 5-1. トリプトファンの焼き処理による変異原活性の生成 (S-9 Mix 500 μl 添加)

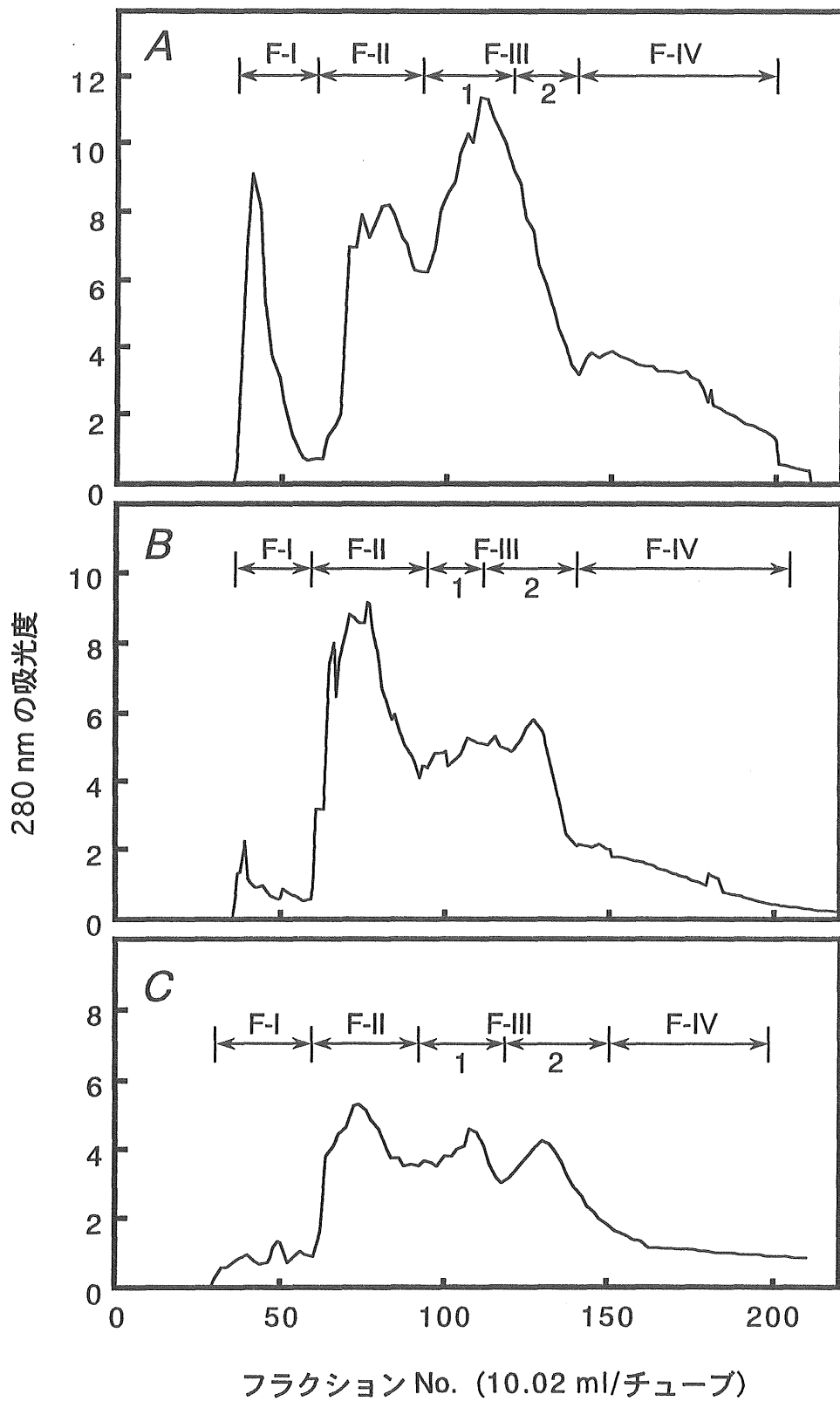


図 5-2. キャベツ汁の Sephadex G-25 によるゲルろ過の溶出パターン

(カラムサイズ : 4.0×66 cm、溶出溶液 : 蒸留水)

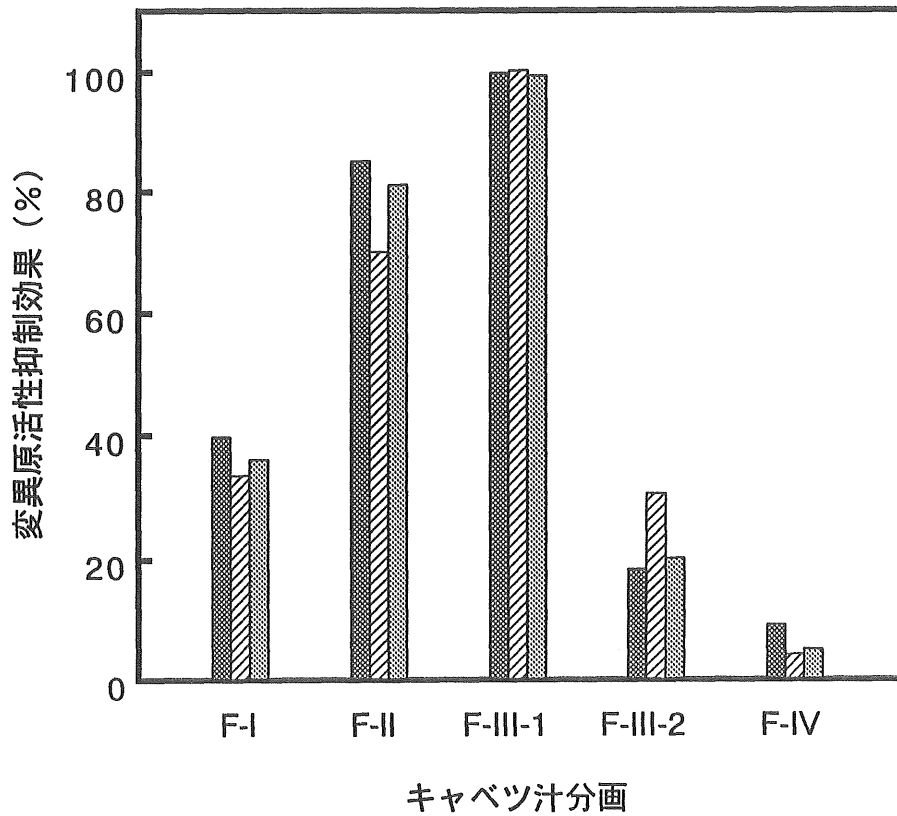


図 5-3. トリプトファンの焼き処理による変異原性発現に及ぼすキャベツ汁分画液の抑制効果 「浸漬後焼き処理」実験

■, 図5 2-A のキャベツ汁分画液  
 ▨, 図5 2-B のキャベツ汁分画液  
 ▩, 図5 2-C のキャベツ汁分画液

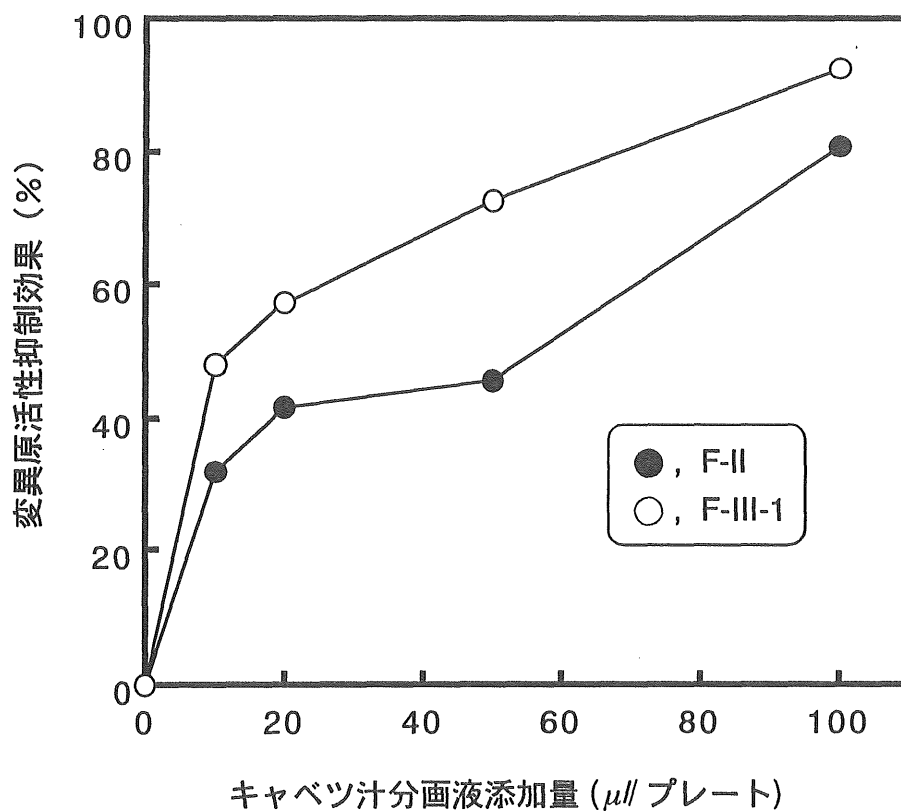


図 5-4. トリプトファンの焼き処理による変異原性の発現に及ぼす  
キャベツ汁分画液の抑制効果 「浸漬後焼き処理」実験

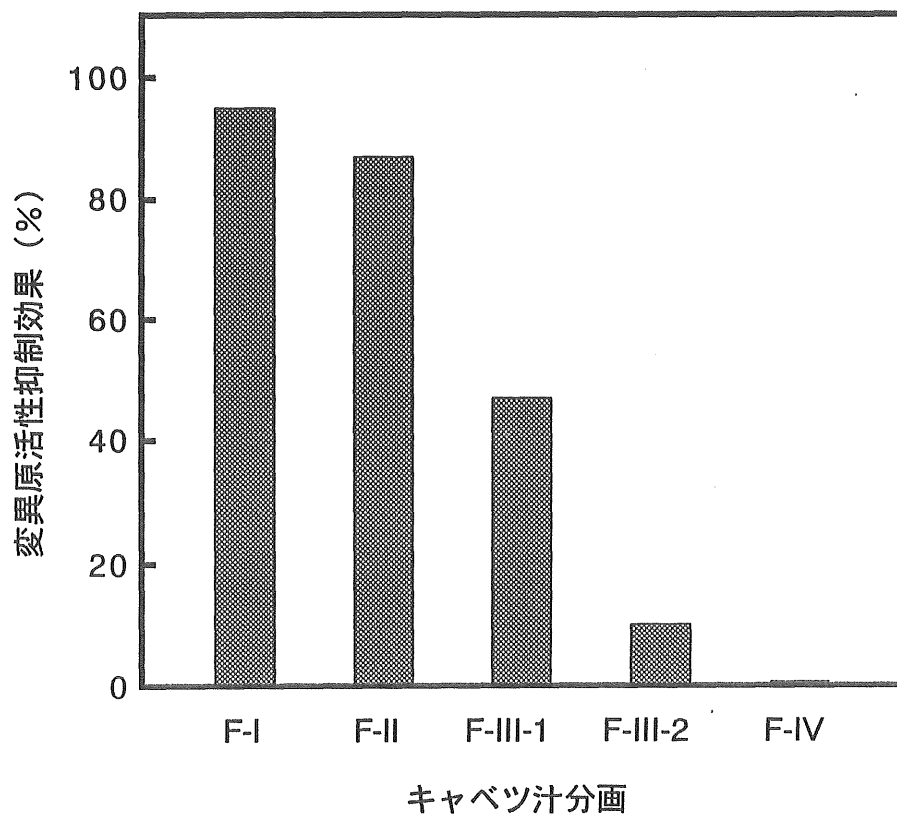


図 5-5. トリプトファンの焼き処理により生じる変異原性に対するキャベツ汁分画液の抑制効果  
「浸漬前焼き処理」実験



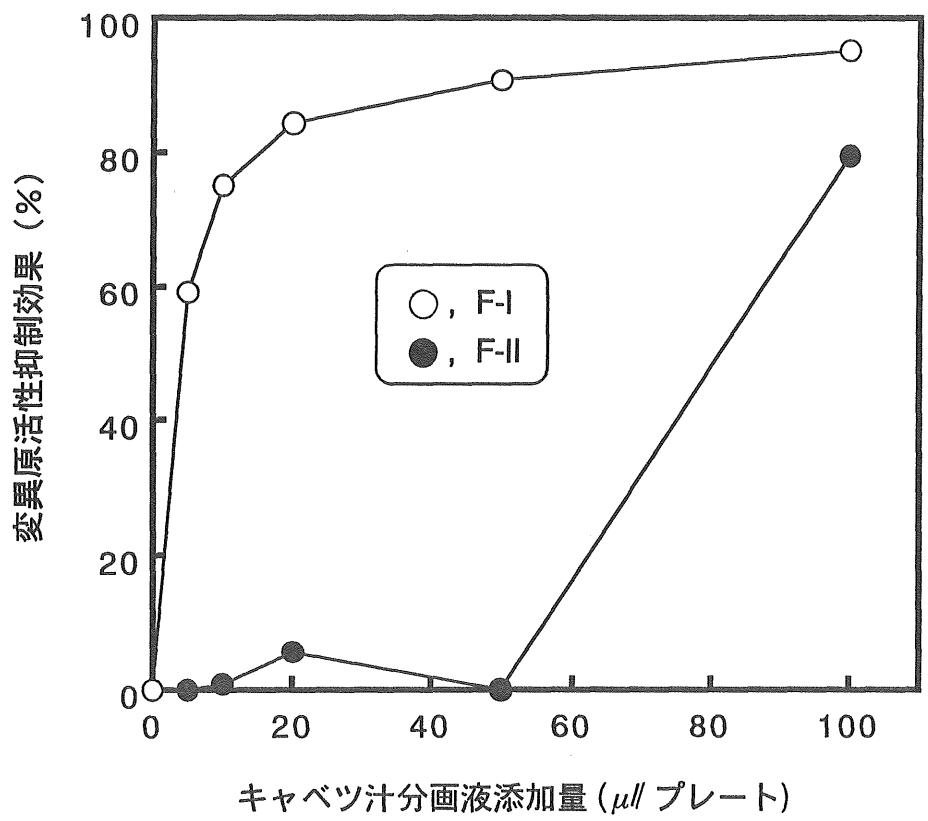


図 5-6. トリプトファンの焼き処理により生じる  
変異原活性に対する F-I、F-II 画分の抑制効果  
「浸漬前焼き処理」実験

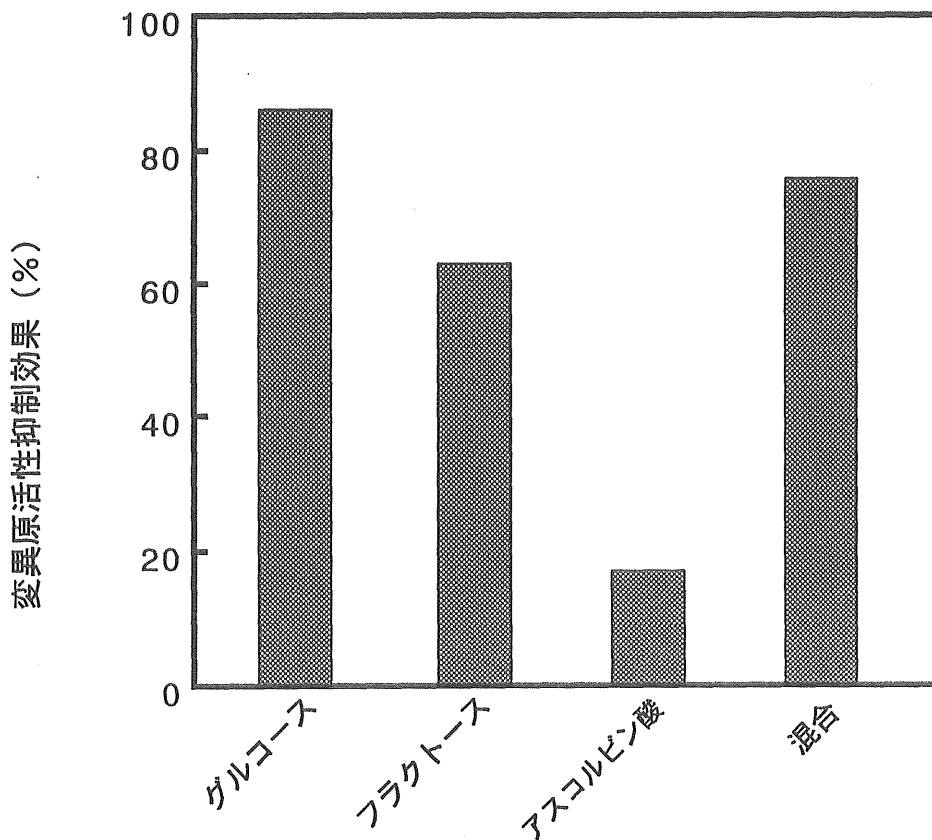


図 5-7. トリプトファンの焼き処理による変異原性の発現に及ぼす  
 グルコース、フラクトースおよびアスコルビン酸の抑制効果  
 「浸漬後焼き処理」実験

表 5-1. キャベツ汁ゲルろ過分画液中の糖、L-アスコルビン酸および鉄含有量

分画 No.	グルコース (mg/ml)		フラクトース (mg/ml)		L-アスコルビン酸 (mg/100ml)		鉄 (mg/l)
	A	B	A	B	A	B	A
F-I	0.4	0.4	0.2	0.2	-	-	0.51
F-II	116	141	91	89	16	25	0.68
F-III-1	22	14	20	23	7.5	9.9	0.34
F-III-2	0.4>	0.4>	0.2>	0.2>	0.4	1.2	0.09
F-IV	-	0.4>	-	0.2>	0.6	-	0.08
F-V	-	0.4>	-	0.2>	-	-	0.05

A: 図 5-2A のキャベツ汁分画液、 B: 図 5-2B のキャベツ汁分画液

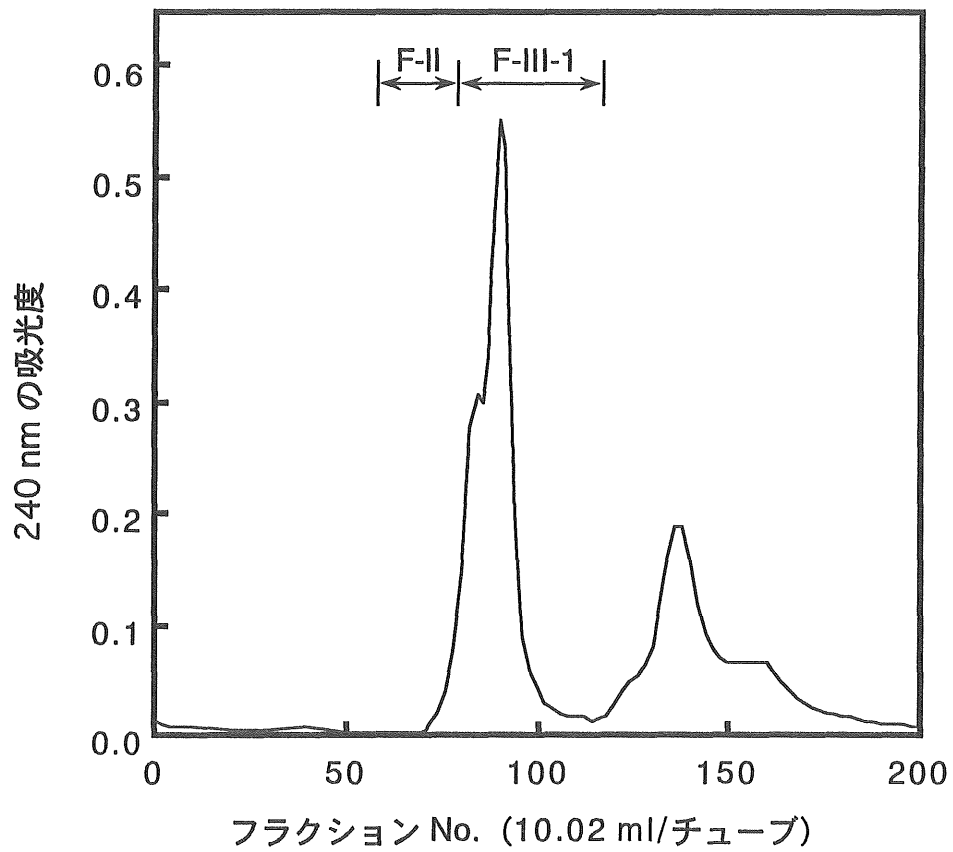


図 5-8. メチルイソチオシアナートの Sephadex G-25 による  
 ゲルろ過の溶出パターン  
 (カラムサイズ : 4.5×65cm, 溶出溶液 : 蒸留水)

## 第6章 総合考察

人のがんの原因は、主として環境因子、特に食品に起因するところが非常に大きいという報告が出されて<sup>20~24, 86, 95~99)</sup>、既に20年になる。一方、この間、環境中からがん原物質や変異原物質を検出する方法がバクテリアや動物培養細胞を用いて研究されてきた。このうちバクテリアを用いる方法として、突然変異を検出する優れた方法がAmes等により開発された<sup>18, 19, 60~69)</sup>。そして変異原性と発がん性間には非常に高い相関があることも多くの研究によって証明されている<sup>13~15)</sup>。それと同時に我々が直接摂取する食品中には、保存中の汚染や添加化合物に起因する変異原物質のみならず、食品の加工・調理中に変異原物質が生成することも明らかにされ、食品の安全性について発がん性の側面から問題が提起されている。このような中であって、多くの研究者ががんに関する疫学的研究や動物実験および変異原試験を重ねてきた。そして、これらのデータを集約した米国アカデミーの報告<sup>21)</sup>によると、野菜の成分は各部位のがんの全てにわたって発生を減少させるとしている。日本においても、加美山<sup>115)</sup>は秋田県のA村と岩手県のB町の食生活と胃がんによる死亡年齢に関する疫学的研究の結果、栄養素ではビタミンC、ビタミンAおよび鉄以外には両地区に有意差はなかったが、野菜類の摂取頻度はB町で高いことが特徴的であったとし、総合的に野菜の摂取の多いことが胃がん死亡率の低下につながると結論づけられた。この他多くの研究によりがんに対する野菜摂取の効用が報告されている<sup>36, 37, 81, 82)</sup>。また、これらの研究とは別に、野菜や果実等の植物性食品には変異原活性を抑制する種々の物質が存在することが報告されてきた<sup>21~24, 36~38, 41~44, 70~73)</sup>。

一方、食品成分には、それ自身には変異原性が無くても、食品の調理・加工・保存、さらには食品成分の相互反応などにより、場合によっては強い発がん性物質や変異原物質を生成する場合があることも知られてきた。よく知られた例として、亜硝酸とアミン類の反応により生成するニトロソ化合物や、タンパク性食品を加熱調理するときに生成するベンツ(a)ピレン<sup>75)</sup>や種々のヘテロサイクリックアミンがあり、その発がん性も確認されている<sup>25~33)</sup>。

以上のような背景の中で賀田らの研究を契機に、多くの植物性食品の変異原性抑制効果について活発な研究が行なわれている。

筆者は、長崎県におけるがん罹患率（特に肝がん、子宮がん）が他県よりも高く、また年次推移は漸次増加傾向にあることに着目し、地域特異的要因があるのではないかと考えた。長崎県は有数の漁業県であり、必然的に焼き魚を食べる機会が多くなり、それに伴ってベンツ(a)ピレンやヘテロサイクリックアミンの摂取量が多くなることが考えられる。一方、魚は栄養学的にはタンパク性食品として優れた食品であり、かつ n-3 系列の高度不飽和脂肪酸の DHA や EPA、その他タウリン等種々の有効成分を多量に含んでいる。長崎県におけるがん罹患率が高い原因が焼き魚の摂取と関係しているか否かは別として、魚食をより安全な形で普及させることが必要である。

そこで、筆者は植物性食品の変異原性抑制効果に注目し、これを利用した焼き魚の調理・加工の工夫により変異原性物質の生成を抑制する方法または生成した変異原物質の活性を抑制する方法をみいだすことを目的として本研究を行なった。本研究はその目的のための基礎となる研究である。

本研究では、まずはじめに焼き魚からの変異原活性を検出する方法を検討した（第2章）。その検出方法として、現在、変異原活性の検出にその有効性が認められているバクテリアの突然変異を利用した Ames 法の変法を採用した。フレームシフト型の突然変異を起こす *Salmonella typhimurium* TA98 と塩基置換型の突然変異を起こす *Salmonella typhimurium* TA100 を使用し、通常の調理によって焼き魚に変異原活性が検出されるか否かを試験した。実験材料の魚は、年間を通して入手でき、かつ組成の変動が少ないものとして養殖ブリを用いた。その結果、TA100 を使用した場合には、炭化状態まで焼き処理をしても、S-9Mix（細菌の代謝を活性化するために加えるものであり、ラットの肝ホモジネートの S-9 画分に種々の補酵素等を加えたもの）の有無に関係なく変異原活性は検出されなかった。一方、TA98 を使用すると、S-9Mix の存在下で 260℃ の焼き処理（肉片の表面温度が 260℃ になるまで焼く、通常の調理でありうる程度の焼き処理）で変異原活性が検出できることを確認した。このことより、通常の焼き

魚には S-9Mix による代謝活性化が必要なフレームシフト型の変異原物質が生成していることが明らかになった。これらの性質は、タンパク質やアミノ酸のトリプトファン、グルタミン酸の焼き処理時に、その焦げの中に生成することが既に明らかにされているヘテロサイクリックアミンの Trp-P-1、Trp-P-2、IQ、I MeQ、Glu-P-1 および Glu-P-2 等の性質と同じであった<sup>116)</sup>。従って、焼き魚にはこれらの化学変異原物質が生成していることが推察された。

次いで、この焼き魚の変異原性を抑制したり、または変異原性の生成を抑制する調理・加工の方法を模索するため、ヘテロサイクリックアミンの変異原性を抑制することが確認されている野菜汁を用いて、焼き魚の浸漬実験を行なった(第2章)。野菜汁として、キャベツ、ダイコン、ショウガを用い、これらの汁液に魚を焼き処理(260℃の焼き処理)する前か後に20分間浸漬した。前者の処理を「浸漬後焼き処理」、後者の処理を「浸漬前焼き処理」と呼ぶ。その結果、全ての汁液で上記の両処理において変異原性抑制効果が認められた。以上の実験により、実際の調理に近い状態で焼き魚の変異原性を抑制できることが確認できたが、その結果は「浸漬後焼き処理」の方が顕著であった(図2-5、7~9)。これまで多くの植物性食品や種々の化合物の変異原性抑制効果が報告されているが、それらは、ごく一部の実験を除けば全て変異原物質に対する抑制効果であり、変異原物質の生成を抑制する研究は非常に遅れている。本研究で見出した「浸漬後焼き処理」実験におけるキャベツ汁の低分子画分の強い変異原性抑制効果は変異原物質の生成を抑制したためと考えられ、非常に興味深い結果であった。

一方、食品の変異原性抑制効果については賀田らの一連の研究<sup>13, 37, 44, 48, 63~66, 68, 70, 73)</sup>により、食品をはじめとする天然物中に種々の変異原性抑制物質が存在することが見い出され、さらに賀田らは変異原性抑制物質をその作用面から図6-1に示すように3つに大別することを提案している。

1つ目のグループは変異原物質の生成を抑制する因子であり、このグループに上げられる例はビタミンC(アスコルビン酸)である。食品中の亜硝酸とアミン類との反応により発がん性のニトロソアミンが生成されるが、ビタミンCは

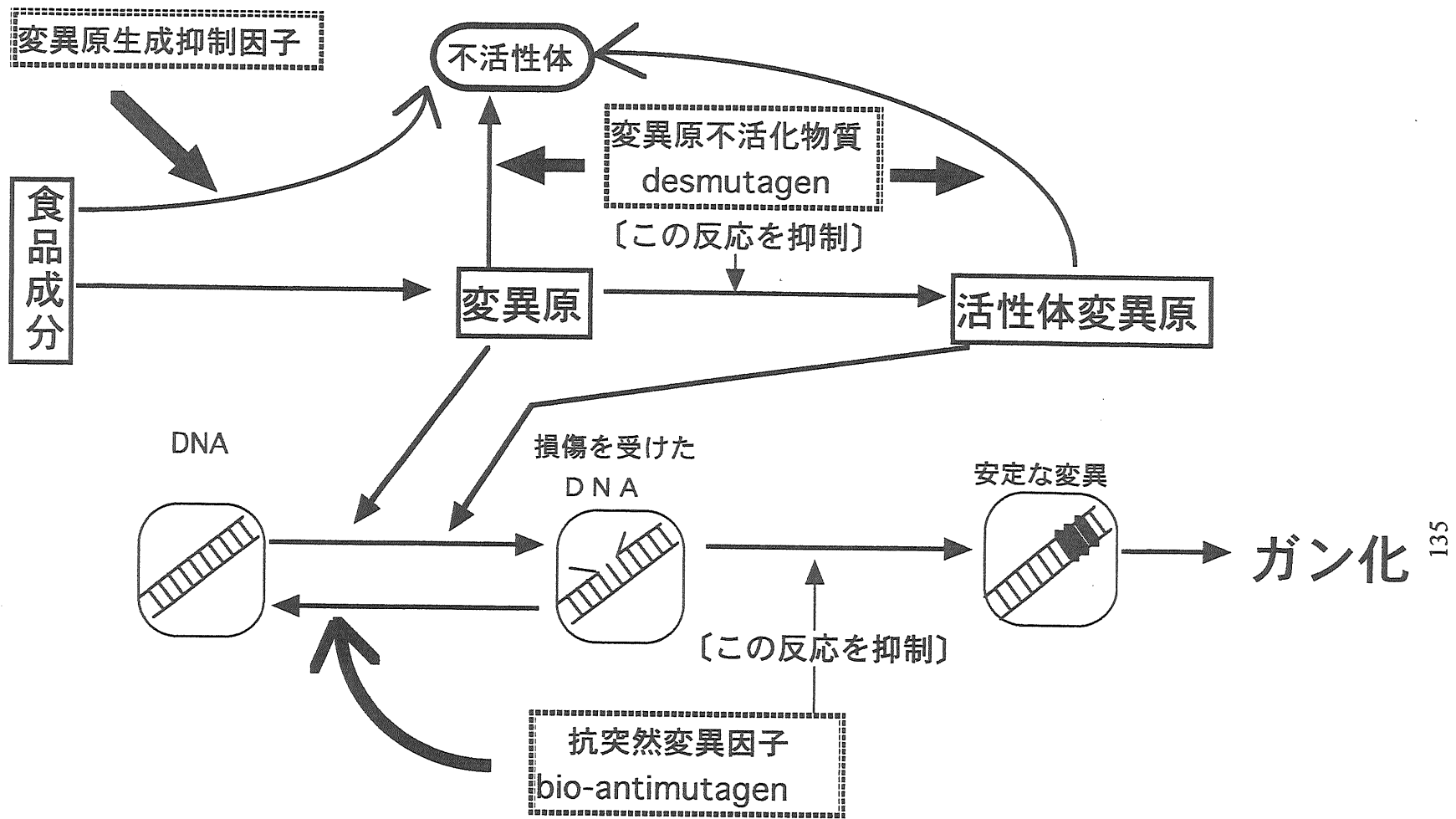


図6-1. 変異原性不活性化機構



亜硝酸を還元分解し、このニトロソ化反応を阻害する<sup>118)</sup>。同様の効果が抗酸化物質であるビタミンEやAにもあると推察されている<sup>35, 55~59)</sup>。動物実験においてもプロリンを投与し、アスコルビン酸、コーヒー酸、フェラル酸等の植物フェノール類により尿中のN-ニトロソプロリンの生成が抑制されていることが確認され、抗酸化成分がニトロソ化反応を生体内で抑制する働きをもつことが推定されている<sup>118)</sup>。従って、アスコルビン酸の他、抗酸化能をもつシステイン、ビタミンAおよびビタミンE等の食品成分は上記の作用をもつとされている。以上のようなことより、食品の加工・調理の条件をうまくコントロールすることにより、変異原物質の生成を抑制することは可能であるといわれている<sup>119)</sup>。

2つ目のグループは変異原不活性化物質(因子) des-mutagen と呼ばれている。これは変異原物質がDNAに損傷を与える前に、変異原物質または代謝活性化された変異原物質に直接作用(分解、化学修飾反応等)して不活性化したり、変異原物質を代謝活性体に変える反応を阻害する因子である。このグループの因子として初めて発見されたのは、亜硝酸とソルビン酸から生成する変異原物質の1, 4-ジニトロ-2メチルピロールにビタミンCが温和な条件で作用し、還元失活させる反応である<sup>54)</sup>。その他、ヘテロサイクリックアミン類に対する野菜のペルオキシダーゼの作用<sup>36~40)</sup>や変異原物質を吸着除去する高分子の不活性化因子(リグニン様物質)がゴボウやニンジンから見いだされている<sup>41, 42)</sup>。また、脂肪酸がベンツ(a)ピレンやヘテロサイクリックアミンと複合体を形成して抑制する機構も推定されている<sup>120)</sup>。その他、抗酸化物質がこのグループの抑制効果をもつことが推察されている<sup>59, 91, 121~126)</sup>。一般的に、抗酸化物質は不飽和脂肪酸の過酸化を抑制するので、その意味では広義の変異原生成抑制因子の範ちゅうにはいるが、その機構としては、変異原性発現のための酸化的な代謝活性化の過程に関与するフリーラジカルを抗酸化剤が消去するものと推察されている<sup>126~128)</sup>。

3つ目のグループは、抗突然変異原因子、bio-antimutagen とよばれる因子である。変異原物質によりDNAが損傷を受け、これが細胞内で固定化され突然変異を起こす。この細胞内での固定化される過程に作用し、突然変異の頻度を低下

させる因子である。その機構（DNAの修正・修復機構）には複数のパターンがあると考えられている。この分野の研究は前1および2のグループよりも新しい研究分野であり、近年そのスクリーニング法が確立され、いくつかの因子が見いだされている。しかしながら、DNAの修正・修復機構の全容が明らかでない現在、確実にこのグループに属す変異原性抑制物質であることを証明するには詳細な研究が必要である。

以上、変異原性抑制作用の3つの機構について述べたが、筆者はキャベツをはじめダイコン、ショウガ汁には焼き魚の「浸漬前焼き処理」と「浸漬後焼き処理」の両処理により変異原性抑制効果を認めたことから、これらの汁液には上記の1グループの因子の他に、2または3のグループの因子が存在するものと推察した。そこで、これらの点も含めて野菜汁の焼き魚の変異原性抑制因子を明らかにするため、第3章ではキャベツ汁をSephadex G-100およびSephadex G-25でゲルろ過し、各画分の変異原性抑制効果を焼きブリを用いた「浸漬前焼き処理」と「浸漬後焼き処理」で調べた。はじめにSephadex G-100で高分子画分と低分子画分に2分し、各画分の抑制効果を調べた。その結果、高分子画分は「浸漬前焼き処理」効果が著しく強いこと、低分子画分は「浸漬前焼き処理」と「浸漬後焼き処理」の両効果があるが、後者の効果の方が強いことを確認した。そこで、低分子画分を細分画するため、キャベツ汁をSephadex G-25でゲルろ過し、上記同様の実験を行なった。その結果、高分子画分は前記同様の強い「浸漬前焼き処理」効果を示し、グルコースやアスコルビン酸が溶出する低分子画分は「浸漬前焼き処理」と「浸漬後焼き処理」効果の両作用を示すこと、さらに、上記の低分子画分より少し遅れて溶出する画分には「浸漬後焼き処理」効果が強いことを確認した。これらのことより、キャベツ汁には少なくとも3種の異なる変異原性抑制因子が存在することが推察された。

これまで、ヘテロサイクリックアミンに対する野菜汁の変異原性抑制効果は全て化学変異原物質に作用させその効果を調べている研究であり、タンパク質やアミノ酸、魚や肉等を野菜汁で処理した後に焼き処理して、その変異原性を調べた研究は皆無である。本研究は調理・加工の工夫により焼き魚の変異原性

を抑制することを出発点としているため、調理の一方法として予め野菜汁で処理する方法を試みたところ、その効果が著しいことが判明し、かつその効果は野菜汁の低分子物質によることが示唆された。しかしながら、以上の研究は焼き魚の実験結果であるため、その現象をより生化学的な方法で証明することが必要である。

そこで、第4章では、第3章で確認された高分子画分の「浸漬前焼き処理」効果、即ち、焼き処理によって生成した変異原物質の活性を高分子画分が強く抑制した効果を立証するため、タンパク質やアミノ酸のトリプトファンを焼き処理したときに生成するヘテロサイクリックアミンの Trp-P-1、Trp-P-2 および IQ を用い、その変異原活性をキャベツ汁のどの画分が強く抑制するかを調べた。その結果は、焼き魚で得た結果とほぼ同じであった。即ち、高分子画分 (F-I 画分) には Trp-P-1、Trp-P-2 および IQ に対する強い変異原活性抑制効果があり、次いで溶出するグルコース等を含む画分には F-I 画分よりは弱いかなりの抑制効果が認められた。しかし、最後に溶出する画分にはこれらの化学変異原物質に対する抑制効果は認められなかった。次に、高分子画分のヘテロサイクリックアミンに対する強い変異原性抑制効果はキャベツ汁のペルオキシダーゼによるものであることを、市販の西洋ワサビのペルオキシダーゼの酵素活性およびその変異原活性抑制効果 (活性)、さらに、それらの活性に及ぼす熱処理 (100℃) の影響などから明らかにした。また、ペルオキシダーゼの酵素活性と変異原活性抑制効果 (活性) に及ぼす加熱処理の影響を調べた結果、本質的にはその変異原活性抑制作用は酵素活性と関係しないこと、むしろ、ヘム鉄をもつ構造自身による作用であることが推定された。このことは、ペルオキシダーゼを加熱失活させても変異原活性抑制効果はかなり高いレベルで維持されていたこと、他のヘムタンパク質 (ヘモグロビン、カタラーゼ、チトクローム C) にも弱い抑制効果があること、また、ヘモグロビンのプロテアーゼによる加水分解物にも弱い抑制効果があること、さらに、その加水分解物をゲルろ過したとき、ヘム部を多く含む画分の変異原性抑制効果が高いことなどからも示唆された。従って、従来より知られている des-mutagen としてのペルオキシダーゼの

作用は酵素作用が直接関与していないことが明らかになった。

次に、キャベツ汁中のグルコースやフラクトースが溶出する画分（第4章のF-II画分(高分子画分に次いで溶出する低分子画分)の変異原活性抑制因子(「浸漬前焼き処理」効果をもたらす因子)を推定するために、この画分に含まれることが明らかなグルコース、フラクトース、シュクロースおよびL-アスコルビン酸(第5章で定量して、その存在を確認した)のTrp-P-1およびIQに対する変異原活性抑制効果を調べた。その結果、Trp-P-1に対しては3種の糖とも抑制効果を示し、特にグルコースは比較的強い抑制効果を示した。IQに対しては、グルコースが弱い抑制効果を示した程度であった。また、L-アスコルビン酸は、結果には示していないが、Trp-P-1に対してはかなりの抑制効果を示したが、IQに対しては全く抑制効果を示さなかった。

これらの結果より、F-II画分の「浸漬前焼き処理」効果は上記の糖およびアスコルビン酸による影響があるものと推察した。糖とヘテロサイクリックアミンの反応についての報告はなく、グルコース、フラクトースはその還元性による作用とも考えられるが、シュクロースによる抑制効果は還元力では説明出来ない。今後、これらの化合物とヘテロサイクリックアミンとの化学的な反応に関して詳細な研究が必要であると考えられる。

第5章では、焼き魚の実験で強い「浸漬後焼き処理」効果が確認された低分子画分の変異原性抑制効果をより化学的な実験系で立証することを主な目的として、焼き魚をトリプトファンに置き換えて実験した。即ち、トリプトファンにキャベツ汁の分画液を添加後350℃で30分間焼き処理し、その変異原活性を測定することにより、各分画液の変異原物質の生成に与える影響を調べた。その結果、最も強い抑制効果を示したのは、グルコースやフラクトースよりも遅れて溶出する低分子(F-III-1)画分であった。次いで、グルコースやフラクトースが溶出する画分(F-II画分)の抑制効果が強く、高分子画分の抑制効果は非常に弱かった。この結果は第3章の焼き魚の結果と良く一致していた。以上の結果より、キャベツ汁には変異原物質の生成を抑制する少なくとも2種以上のゲルろ過によって溶出位置が異なる低分子の因子が存在することが強く示唆され

た。即ち、先に変異原性抑制物質は3グループに分けられることを述べたが(図6-1)、キャベツ汁には2つ目のグループに属すと言われるペルオキシダーゼ以外に、ヘテロサイクリックアミンの生成を抑制する、1つ目のグループに属すと考えられる低分子因子が Sephadex G-25 によるゲルろ過により2つの異なった画分に存在することが判明した。植物性食品の変異原性抑制物質に関して多くの研究があるが、変異原の生成を抑制する物質(1つ目のグループに属する因子)に関する研究は非常に少ないのが現状である。先に1つ目のグループの例として、亜硝酸とアミン類とのニトロソ化反応を阻害するアスコルビン酸の例をあげたが、タンパク質やアミノ酸を焼き処理したときに生成するヘテロサイクリックアミンの生成を抑制する因子に関する研究は全く行われていないのが現状である。本研究ではその因子を同定するために、キャベツ汁の低分子画分(F-II画分、グルコースやフラクトースが溶出する画分)に含まれていた2、3の化合物の抑制効果をトリプトファンの焼き処理前に加えて(「浸漬後焼き処理」実験に相当)調べた。その結果、グルコースやフラクトースに抑制効果があることを確認した。この結果は第2章の焼き魚の「浸漬後焼き処理」実験におけるシュクロースの抑制効果と共通していると考えられる。しかしながら、L-アスコルビン酸には抑制効果は認められなかった。従って、グルコース等が溶出する画分の「浸漬後焼き処理」による抑制効果はこれらの糖類によるものと推察した。一方、焼き魚やトリプトファンの「浸漬後焼き処理」実験で最も強い抑制効果を示したグルコースよりも遅れて溶出する画分(F-II-1)の因子に関しては現時点では不明である。

以上、第3章から第5章の実験により、キャベツ汁のもつ焼き魚の変異原性抑制効果について、そのゲルろ過分画液ごとの性質について検討した。その結果、第2章に示した実際の焼き魚で認められたキャベツ汁の変異原性抑制効果は、ほぼそのまま受け止めてよいことが明らかになった。即ち、焼き魚の変異原性を出来るだけ低減するには、「浸漬後焼き処理」が効果的であり、キャベツの個体差の影響があるとしても、第2章における数回の実験結果より判断して、この処理によりほぼ完全に変異原性をもたない焼き魚を得ることが出来る

と推察した。勿論、実際の調理・加工では「浸漬前焼き処理」と「浸漬後焼き処理」の併用が可能であるため、両処理方法を併用する調理加工により、その効果をより高めることが出来ると考えられる。今後はこの処理方法を一般家庭への調理加工に普及させることに全力を尽す必要がある。

## 謝 辞

本研究のご指導ならびに本論文のご懇篤なるご校閲を賜りました長崎大学水産学部 石原 忠教授に深く感謝申し上げます。

本論文のご校閲と研究内容のご検討ならびにご助言を賜りました長崎大学水産学部 野口玉雄教授、野崎征宣教授、原 研治教授ならびに橘 勝康助教授に厚く御礼申し上げます。

本研究で用いた変異原試験法を伝授し、菌株を提供し、終始研究にご協力と御励ましをいただきました活水女子短期大学 松岡麻男教授に深く感謝申し上げます。

本研究の出発点となった ”ガンと食生活研究会” のメンバーとしてご協力いただきました活水女子短期大学 長谷川幸雄教授、中里富美子教授、左 篤子教授、久木野睦子助教授、塩田教子教授ならびに同研究会の皆様感謝申し上げます。

機器の使用に際し、ご配慮とご助言をいただきました長崎大学大学院海洋生産科学研究科 長富 潔助手に厚く御礼申し上げます。

本研究に直接ご協力いただきました長崎大学水産学部海洋生物化学研究室の川端悦子、蒲池和美、山本妙子、藤田義文、馬渡聡美の諸氏ならびに同研究室の皆様厚く御礼申し上げます。

本研究を承認し、ご援助いただきました活水女子短期大学 広畑 譲学長に深く感謝申し上げます。

長崎大学で研究する道を開いて下さいました元長崎大学学長 故保田正人博士ならびに同大学大学院海洋生産科学研究科長 榎本六良教授に心より感謝申し上げます。

最後に、本研究を始めるにあたり、貴重なアイデアと方向づけをご教示賜りました元長崎大学医学部教授 故山下一邦博士に心より感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) 厚生省編：厚生白書，人口動態統計 327 (1996)
- 2) 厚生省編：地域ガン登録による予防医療活動の評価に関する研究，(1978)
- 3) 森本和枝，小川英理子，井上寿子，内野チト，片寄真木子，中里富美子，左篤子，古場久代，田中玲子：第 33 回 日本家政学会要旨集 (1981)
- 4) Ikeda, M., Yoshimoto, K., Yoshimura, T., Kono, S., Kato, H., and Kuratsune, M. : *Radiation Effects Research Foundation, Gann*, 74, 640 (1983)
- 5) Yoshida, D. and Okamoto, H. : *Agric. Biol. Chem.*, 44, 2521 (1980)
- 6) Kasai, H., Nishimura, S., Wakabayashi, K., Nagao, M., and Sugimura, T. : *Proc. Jap. Acad.*, 56, 382 (1980)
- 7) N. E. Spingarn., Kasai. H., Vuolo, L. L., Nishimura, S., Sugimura, T., Matsushima, T., and Weisburger, J. H., : *Cancer Lett.*, 9, 177 (1980)
- 8) Miller, A. J. : *Food Tech.*, 75 (1985)
- 9) Sugimura, T. : *Cancer*, 49, 1970 (1982)
- 10) 葛西 宏：発がん，(西村 進編，化学同人) , p. 9 (1985)
- 11) Sugimura, T. : *Mutation Res.*, 150, 33 (1985)
- 12) Kasai, H., Yamaizumi, Z., Wakabayashi, K., Nagao, M., Sugimura, T., Yokoyama, S., Miyazawa, T., Spingarn, N. E., Weisburger, J. H., and Nishimura, S. : *Proc. Japan Acad.*, 56, B 278 (1980)
- 13) 賀田恒夫：環境変異原研究, 5, 26 (1983)
- 14) McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E., and Ames, B. N. : *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 72, 5135 (1975)
- 15) McCann, J., Spingarn, N. E., Kobori, J., and Ames, B. N. : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 72, 979 (1975)



- 16) Sugimura, T., Terada, M., Yokota, J., et al. : *Environ. Health Pdrspect.*, 98, 5 (1992)
- 17) Berenblum, I. : *Cancer Res.*, 1, 44 (1991)
- 18) Ames, B. N. : Principles and Methods for Their Detection(ed. A. Hollaender), 1, 267, Plenum Press, New York (1971)
- 19) Ames, B. N., McCann, J., and Yamasaki, E. : *Mutation Res.*, 31, 347, (1975)
- 20) Doll, R. and Peto, R. : *J. Natl. Cancer inst.*, 66, 1191 (1981)
- 21) 全米科学アカデミー, 食物, 栄養とがんに関する特別委員会 : がん予防と食生活, 厚生省公衆衛生局栄養課監訳, 日本栄養食品協会, p. 312, (1983)
- 22) 並木 満夫, 中村 良, 川岸 舜朗, 渡辺 乾二編 : 「現代の食品化学」, 三共出版, p.186. (1985)
- 23) 広畑 富雄 : 食物とがん予防, CRC, 1 : 155 (1992)
- 24) Wynder, E. L. and Gori, G. B. : *J. Natl. Cancer Inst.*, 58, 825 (1978)
- 25) Yoshida, D., Nishigata, H., and Matsumoto, T. : *Agric Biol, Chem.* 43, 1769 (1979)
- 26) Sugimura, T., Kawachi, T., Nagao, M., Yahagi, T., Seino, Y., Okamoto, T., Shudo, K., Kosuge, T., Tsuji, K., Wakabayashi, K., Iitaka, Y., and Itai, A. : *Proc. Japan Acad.*, 53, 58 (1977)
- 27) Takeda, K., Ohta, T., Shudo, K., Okamoto, T., Tsuji, K., and Kosuge, T. : *Chem. Pharm. Bull.*, 25, 2145 (1977)
- 28) Kosuge, T., Tsuji, K., Wakabayashi, K., Okamoto, T., Shudo, K., Iitaka, Y., Itai, A., Sugimura, T., Kawachi, T., Nagao, M., Yahagi, T., and Seino, Y. : *Chem. Pharm.*, 26, 611 (1978)
- 29) Sugimura, T. and Sato, S. : *Cancer. Res.*, 43, 2451 (1983)

- 30) Matsukura, N., Kawachi, T., Morino, K., Ohgaki, H., Sugimura, T., and Takayama, S. : *Science*, 213, 346 (1981)
- 31) Hosaka, S., Matsushima, T., Hirono, I., and Sugimura, T. : *Cancer Lett.*, 13, 23 (1981)
- 32) Ishikawa, T., Takayama, S., Kitagawa, T., Kawachi, T., Kinebuchi, M., Matsukura, N., Uchida, E., and Sugimura, T. : University Park Press; 159 (1979)
- 33) Hashimoto, Y., Shudo, K., and Okamoto, T. : *Acc. Chem. Res.*, 17, 403 (1984)
- 34) Simic, M. G. and Karel, M. : Plenum Press. 387 (1980)
- 35) Okuzumi, J. : *J. Kyo To Pref. Univ. Med.*, 100, 551 (1991)
- 36) Morita, K., Hara, M., and Kada, T. : *Agric. Biol. Chem.*, 42, 12 (1978)
- 37) Kada, T., Morita, K., and Inoue, T. : *Mutation Res.*, 53, 351 (1978)
- 38) Inoue, T., Morita, K., and Kada, T. : *Agric. Biol. Chem.*, 45, 345 (1981)
- 39) Yamada, M., Tsuda, M., Nagao, M., Mori, M., and Sugimura, T. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 90, 769 (1979)
- 40) Yamaguchi, T., Yamashita, Y., and Abe, T. : *Agric. Biol. Chem.*, 44, 959 (1980)
- 41) Morita, K., Kada, T., and Namiki, M. : *Mutation Res.*, 129, 25 (1984)
- 42) Morita, K., Nishijima, Y., and Kada, T. : *Agric. Biol. Chem.*, 49, (1985)
- 43) Kada, T., Kato, M., Akikawa, K., and Kiriyama, S. : *Mutation Res.*, 141, 149 (1984)

- 44) Takeuchi, M., Hara, M., Inoue, T., and Kada, T. : *Mutation Res.*, 204, 263 (1988)
- 45) Yen, G. and Chen, H. : *J. Agric. Food Chem.*, 43, 27 (1995)
- 46) Shiraki, M. Hara, Y. Osawa, T. Kumon, H. Nakayama, T., and Kawakishi, S. : *Mutat, Res.*, 323, 29 (1994)
- 47) Kada, T. Kaneko, K. Matsuzaki, S. Matsuzaki, T., and Hara, Y. : *Mutation, Res.*, 150, 127 (1985)
- 48) Betz, J. M. and Fox, W. D. : ACS Symposium Series 546, p.181 (1994)
- 49) Nishino, H., Yoshioka, K., Iwashima, A., Takizawa, H., Konishi, S., Okamoto, H., Okabe, H., Shibata, S., Fujiki, H., and Sugimura, T. : *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)* 77, 33~38 (1986)
- 50) Hosokawa, N., Hosokawa, Y., Sakai, T., Yoshida, M., Marui, N., Nishino, H., Kawai, K., and Aoike, A. : *Int. J. Cancer*, 45, 1119 (1990)
- 51) Mei, X. *et al.* : *Acta Nutr. Sinica*, 4, 53 (1982)
- 52) Buiatti, E., Palli, D., Decarli, A., Amadori, D., Avellini, C., Bianchi, S., Biserni, R., Cipriani, F., Cocco, P., Giacosa, A., Marubini, E., Puntoni, R., Vindigni, C., Fraumeni, J., and Blot, W. : *Int, J. Cancer*, 44, 611 (1989)
- 53) 太田 俊博, 並木 満夫 : 化学と生物, 26, 161 (1988)
- 54) Osawa, T., Ishibashi, H., Namiki, M., and Kada, K. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 95, 835 (1980)
- 55) Neill, I. K. O., Borstel, R. C., Miller, C. T., Long, J., and Bartsch, H. ed. : International Agency for Research on Cancer p.213 (1984)
- 56) Stich, H. F.: Vol. III, CRC Press p.109 (1983)
- 57) Beckman, C., Roy, R. M., and Sproule, A. : *Mutation Res.*, 105, 73 (1982)

- 58) Namiki, M. : *Adv. Food Res.*, 32, 115 (1988)
- 59) 大澤 俊彦 : 日食工誌, 37, 311 (1990)
- 60) 矢作 多貴江 : 蛋白・核酸・酵素, 20, 1178 (1975)
- 61) 労働省化学物質調査課編 : 安衛法における変異原性試験 pp. 29-63 (1991)
- 62) Kato, R., Yamazoe, Y., Ishii, K., Mita, S., Kamataki, T., and Sugimura, T. : *Biological Reactive Intermediates*, vol. 2 (eds. Snyder, R., Parke, D. V., Kocsis, J. J. and Jollow, D. J.) Plenum Publishing (1981)
- 63) Kada, T., Moriya, M., and Shirasu, Y. : *Mutation Res.*, 26, 243 (1974)
- 64) 賀田 恒夫 : 化学物質の突然変異性検出法 (田島, 吉田, 賀田編), p.31, 講談社, 東京 (1973)
- 65) 賀田 恒夫 : 新しい毒性試験と安全性の評価 (白須, 松岡編), p.333, ソフトサイエンス社, 東京 (1975)
- 66) Nagao, M. and Sugimura, T. : *Cancer Res.*, 32, 2369 (1972)
- 67) Kada, T. : *Mutation Res.*, 38, 340 (1976)
- 68) Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W., and Ramel, C. : Elsevier (1977)
- 69) 賀田 恒夫 : 遺伝毒性・突然変異実験法, 日本衛生技術研究会 (1978)
- 70) 小清水 弘一, *Health Digest*, 7 (No. 5 Oct. ), 1 (1992)
- 71) 小清水 弘一, *Health Digest*, 7 (No. 6 Dec. ), 1 (1992)
- 72) 賀田 恒夫 : トキシコロジーフォーラム, 6, 580 (1983)
- 73) Shinohara, K., Kuroki, S., Miwa, M., M, Kong., Z. L., and Hosoda, H. : *Biol. Chem.*, 52, 1369 (1988)

- 74) 長尾美奈子：蛋白質・核酸・酵素, 23, 435 (1978)
- 75) Nagao, M., Honda, M., Seino, Y., Yahagi, T., and Sugimura, T. : *Cancer Lett.*, 2, 221 (1977)
- 76) Hashimoto, Y., Shudo, K., and Okamoto, T. : *Acc chem, Res.*, 17, 403 (1984)
- 77) Morita, K., Yamada, H., Iwamoto, S., Sotomura, H., and Suzuki, A. : *J. Food Safety*, 4, 139 (1982)
- 78) 平山 雄：癌の臨床, 36, 233 (1990)
- 79) Yamada, T., Tomita, Y., and Fukuda, K. : *Agric. Biol. Chem.*, 52, 2893 (1988)
- 80) Shinohara, K., Kong, Z. L., Fukuda, T., and Iino, K. : *Nippon Syokuhin Kogyo Gakkaishi*, 38, 242 (1991)
- 81) 上田成子、桑原祥浩、平位信子、佐々木弘子、菅原龍幸：日食工誌、38, 507 (1991)
- 82) 江幡淳子：大阪市立大学生活科学部紀要, 38, 1 (1990)
- 83) Bertram, J. S. *et al.* : *Cancer Res.*, 47, 3012 (1987)
- 84) Munzer, R. : *Food Chem. Toxic.*, 24, 847 (1986)
- 85) Stohs, S. J., Lawson, T., Anderson, L., and Bueding, E. : *Mech. Ag. Devel.*, 37 : 137 (1986)
- 86) 小清水弘一：化学と生物, 29, 598 (1991)
- 87) Shinohara, K., Fukuda, T., Iino, K., and Kong, Z.-L. : *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 38, 235 (1991)
- 88) 古場久代、長谷川幸雄、松岡麻男、左 篤子、原 研治、長富 潔、石原 忠：長崎大学水産学部研究報告、74-75, 45 (1993)
- 89) 古場久代、長谷川幸雄、松岡麻男、中里富美子、左 篤子、久木野睦子、塩

- 田教子：日本家政学会誌, 39, 1105 (1988)
- 90) Ames, B. N., Durston, W. E., Yamasaki, E., and Lee, F. D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 70, 2281 (1973)
- 91) 並木満夫、林 建樹：化学と生物, 21, 368 (1983)
- 92) Hanaoka, Y.: *J. Ferment. Tech.*, 46, 909 (1968)
- 93) Jagerstad, M., Reutersward, A. L., Oste, R., Dahlqvist, A., Olsson, K., Grvas, S., and Nyhammar, T.: *ACS Symposium Series*, 215 (1983)
- 94) Fujimoto, K. Ohmura, H., and Kaneda, T.: *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 51, 1139 (1985)
- 95) Van Etten, C. H., Daxenbichler, M. E., Williams, P. H., and Kwolek, W. F.: *J. Agric. Food Chem.*, 24, 452 (1976)
- 96) Sparnins, V. L., Venegas, P. L., and Wattenberg, L. W.: *J. Natl. Cancer Inst.*, 68, 493 (1982)
- 97) 長尾美奈子：癌原物質実験法. 癌の科学, 第2巻, 環境と発癌(杉村隆 編), pp.61-75, 南江堂 東京, (1979)
- 98) Nagao, M., Yahagi, T., Honda, M., Seino, Y., Matsusima, T., and Sugimura, T.: *Proc. Japan Acad.*, 53, Ser, B, 34
- 99) Shannon, L. M., Kay, E., and Lew, J. Y.: *J. Biol. Chem.*, 241 (1966)
- 100) 布柴達男、大塚敦宏、南迫一範、西岡一：同志社大学理工学部研究報告, 25, 2 (1984)
- 101) Koshimizu, K. Ohigashi, H. Tokuda, H. Kondo, A., and Yamaguchi, K.: *Cancer Lett.*, 39, 247 (1988)
- 102) Arimoto, S., Ohata, Y., Namuba, T., Negishi, T., and Hayatsu, H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 92, 662 (1980)
- 103) ポルフィリン研究会編：ポルフィリン・ヘムの生命科学、現代科学増刊、

27, 205 東京化学同人

- 104) 日本ビタミン学会編：ビタミン学実験法Ⅱ（東京化学同人） p.3（1985）
- 105) Nelson, N.: *J. Biol. Chem.*, 153, 375 (1944)  
Somogyi, M.: *J. Biol. Chem.*, 195, 19 (1952)
- 106) 厚生省生活衛生局食品保険課新開発食品保険対策室長通知：衛新第 47 号
- 107) Milon, H., Bur, H., and Turesky, R. : *J. Chromatography*, 349, 201 (1987)
- 108) Nagashima, Z. and Uchiyama, M. : *Bull. Agric. Chem. Soc. Japan*, 23, 555 (1959)
- 109) Gmelin, R. and Virtanen, A. I. : *Acta Chem. Scand.*, 16, 1378 (1962)
- 110) Bjorkman, R. and Lonnerdal, B. : *Biochem, Biophys. Acta*, 327, 121 (1973)
- 111) Wattenberg, L. W. : *Cancer Res.*, 43, 2488 (1983)
- 112) 大澤俊彦：日本農芸化学会誌, 60, 943 (1986)
- 113) Betz, J. M. and Fox, W. D. : *ACS Symposium Series*, 546, 181 (1994)
- 114) Stoner, G. D., Galati, A. J., Schmidt, C. J., and Morse, M. A. : *ACS Symposium Series*, 546, 173 (1994)
- 115) 加美山茂利：秋田医学, 7, 227 (1981)
- 116) Nagao, M., Honda, M., Seino, Y., Yahagi, T., Kawachi, T., and Sugimura, T. : *Cancer Lett.*, 2, 335 (1977)
- 117) Mergens, W. J. and Newmark, H. L. in “Autoxidation in Food and Biological Systems” Simic, M. G. and Karel, M. eds. (New York), p.387 (1980)
- 118) Stich, H. F., Dunn, B. P., Pignatelli, B., Ohshima, H., and Bartsch, H. : International Agency for Research, Cancer, France, 213 (1984)

- 119) Miller, A. J. : *Food Tech.*, 75 (1985)
- 120) Nemoto, N. and Takayama, S. : *Carcinogenesis*, 4, 1253 (1983)
- 121) Osawa, T., Namiki, M., and Kawakishi, S. : Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms II, p139 (1990)
- 122) Shamberger, R. J., Corlett, C. L., Beaman, K. D., and Kasten, B. L. : *Mutation Res.*, 66, 349 (1979)
- 123) Calle, L. M., Sullivan, P. D., Nettleman, M. D., Ocasio, I. J., Blazyk, J., and Jollick, J. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 85, 351 (1978)
- 124) Gutterplan, J. B. : *Nature*, 268, 368 (1977)
- 125) Hughes, R. E. : Vitamin C ed. by Birch, G. G., Parker, K. J., Applied Science Publishers Ltd., p.68 (1974)
- 126) 大澤俊彦、並木満夫 : 変異原と毒性, 5, 243 (1982)
- 127) Osawa, T., Namiki, M., and Kawakishi, S. : in “Mechanisms of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis II” Y. Kuroda, DM. Shankel, and M. D. Watar eds (Plenum Press, New York), (in press).
- 128) 中村 良、川岸舜朗、渡邊乾二、大澤俊彦 : 食品機能化学, 30-41, 54-70 (1990)
- 129) Stoner, G. D., Morrissey, D. T., Heur, Y. H., Daniel, E. H., Galati, A. J., and Wagner, S. A. : *Cancer Res.*, 51, 2063 (1991)
- 130) Pochaska, H. J., Santamaria, A. B., and Talalay, P. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 2394 (1992)
- 131) Zhang, Y., Talalay, P., Cho, C. G., and Posner, G. H. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 2399 (1992)
- 132) 川岸舜朗 : がん予防食品の開発 (大澤俊彦監修) p.110, シーエムシー (1995)