

SOS 反応抑制を利用した 香辛料および生薬の抗変異原性の検索

江 崎 秀 男 ・ 小野崎 博 通

Screening of Antimutagenic Capacities of Spices and Crude Drugs
based on the Suppression of SOS Responses

Hideo ESAKI and Hiromichi ONOZAKI

The bio-antimutagenic and desmutagenic capacities of spices and crude drugs were assayed by monitoring the suppressive effect on the SOS-function-inducing activity in *Escherichia coli* PQ 37.

The extracts from "sansho", "eijitsu", hop and "kujin" showed moderate bio-antimutagenic activities. In addition, it was found that caraway, oregano, sage and thyme possessed considerable capacities of inactivating the mutagenicity of *tert*-butyl hydroperoxide.

緒 言

社会の高齢化が進むにつれ、癌死亡率は年々増加しており、新しい癌対策が社会的にも切望されている。現在、癌の発生原因としては、食事、喫煙、放射線、日光、アルコール等の環境要因が考えられるが、Wynder¹⁾も食物および食生活が発癌に大きく関与しており、40~60%の癌は食生活を改善することにより、未然に抑制することが可能であると推定している。

ところで、発癌に関わる環境因子の検索は、非常に長時間を要し、またコストもかかる。しかし、近年、微生物を用いた変異原性試験法²⁾の進歩により、発癌性と高い相関性を示す³⁾変異原性物質(突然変異誘発作用物質)の検索が容易となった。その結果、多種多様な変異原性物質が、食品系をはじめとする生活環境中に存在することが明らかになってきた⁴⁾。また、食品の調理や加工・保蔵中に二次的に生成する変異原性物質も数多く報告されるにつれて^{5)~9)}「食品の安全性」が社会的にも問題視されるようになった。

ところが、最近、これらの変異原性物質に対して、その活性を抑制あるいは軽減させる突然変異抑制物質が、食品をはじめとする天然物中に広く存在することも明らかになってきた。1978年、賀田ら¹⁰⁾は、加熱食品中の変異原として問題視されるトリプトファン熱分解物(Trp-P)に対して、キャベツ、大根、生姜等の生ジュースが変異原性物質の不活性化(Desmutagen作用¹¹⁾)に有効に作用することを認めるとともに、我々の食生活において、焼魚や焼肉を食べる場合に、同時にこれらの生野菜を摂取することの有用性を説い

ている。また森田ら¹²⁾は、野菜、果物をはじめとする59種類の食品のスクリーニングテストより、キャベツ、ブロッコリー、ピーマン、なす、ごぼう、エシャロット、生姜、ハッカの葉、リンゴおよびパイナップル等が強い Desmutagen 作用を有することを報告した。さらに井上ら¹³⁾は、キャベツを材料として変異原不活性化因子 (Desmutagen) の分離・精製を行い、NADPH-オキシダーゼ活性を有するパーオキシダーゼが不活性化因子であることを確認した。現在、その他の Desmutagen 作用としては、ごぼう等に含まれる繊維による変異原物質の吸着作用、^{14)~16)} アスコルビン酸、システインあるいはトコフェロール等による変異原物質の還元作用^{17)~19)} などが報告されている。

また更には、いったん変異原によって DNA に損傷が生じた細胞の DNA 修復や複製プロセスに作用して突然変異誘発頻度を低下させる働きをもつ抗突然変異物質 (Bio-antimutagen¹¹⁾) の研究も活発に行われてきた。Bio-antimutagen の報告としては、1977年の Meyn らによるアンチパイン、²⁰⁾ 1978年の賀田、兼松による塩化コバルト²¹⁾ に始まる。その後、日常我々が利用している食品、香料、生薬、その他の天然物から検索が行われ、カフェイン (コーヒー)、²²⁾ 桂皮アルデヒド (生薬)、²³⁾ エンメイ (生薬)、²⁴⁾ タンニン酸 (植物)、²⁵⁾ エピガロカテキンガレート (日本茶)、²⁶⁾ バニリン (香料)、²⁷⁾ 没食子酸 (植物)、²⁸⁾ ベンズアルデヒド類 (植物)²⁹⁾ 等が活性物質として報告され、同時にその作用機構等も解明されつつある。³⁰⁾

本実験においては、抗菌性や抗酸化性³¹⁾ についてはよく知られているが、抗変異原性についてはあまり検討されていない香辛料を実験材料として、そのスクリーニングテストを SOS 反応の抑制を指標として行った。また、香辛料は古来よりある種の薬理効果が期待され、一部は生薬として珍重されてきた事実を考慮して、同時に生薬の抗変異原性をも検討した。

実験方法

1) 試薬類

アンピシリンは明治製薬(株)の注射用ピクシリンを使用した。Bacto tryptone および Bacto yeast extract は DIFCO 製を、*tert*-ブチルヒドロパーオキシド (BHPO) は片山化学工業(株)製を、また *o*-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド (ONPG) はシグマ社製の試薬を用いた。その他の試薬はすべて和光純薬工業(株)の特級品を使用した。

2) 試料および試料溶液の調製

本実験に使用した香辛料22種 (Table 1) および生薬26種 (Table 2) は、主に高砂香料工業(株)より供与された物である。一部の試料は小売店より直接購入した。試料は乳パチおよびコーヒーミルで粉末化した。各粉末試料1.0gを秤量し、これに50%エタノール溶液5.0mlを加え、時々攪拌しながら20℃で2週間放置することにより抽出を行った。遠心分離 (4000rpm 15分間) 後、上澄液の1.0mlを減圧濃縮し、得られたシラップに殺菌済の50%ジメチルスルホキシド (DMSO) 溶液1.0mlを加え、可溶画分を試料溶液として実験に供した。

Table 1 Spices assayed in this study

No	Common name	Botanical name
1	Allspice	<u>Pimenta dioica</u> (L.) Merr.
2	Caraway	<u>Carum carvi</u> L.
3	Cardamon	<u>Elettaria cardamomum</u> (L.) Maton
4	Cinnamon	<u>Cinnamomum zeylanicum</u> Blume
5	Clove	<u>Eugenia caryophyllata</u> Thunb
6	Coriander	<u>Coriandrum sativum</u> L.
7	Cumin	<u>Cuminum cyminum</u> L.
8	Dill	<u>Anethum graveolens</u> L.
9	Fennel	<u>Foeniculum vulgare</u> Mill
10	Garlic	<u>Allium sativum</u> L.
11	Laurel	<u>Laurus nobilis</u> L.
12	Mace	<u>Myristica fragrans</u> Houtt
13	Marjoram	<u>Origanum majorana</u> L.
14	Nutmeg	<u>Myristica fragrans</u> Houtt
15	Oregano	<u>Origanum vulgare</u> L.
16	Paprika	<u>Capsicum frutescens</u> L. var <u>grosom</u> Bailey
17	Red pepper	<u>Capsicum annum</u> L.
18	Sage	<u>Salvia officinalis</u> L.
19	SANSHO	<u>Zanthoxylum piperitum</u> (L.) DC
20	Star anise	<u>Illicium verum</u> Hook. f.
21	Thyme	<u>Thymus vulgaris</u> L.
22	White pepper	<u>Piper nigrum</u> L.

3) 抗変異原性試験

抗変異原性測定のための供試菌としては、残留農薬研究所の太田敏博博士から提供を受けた *Escherichia coli* PQ 37 株 (PQ 37 菌) を用いた。抗変異原性の測定としては、太田ら³²⁾が報告した PQ 37 菌の SOS 反応を指標とした変異原性物質の検出法を応用することにした。

まず、PQ 37 菌は、20 μ g/ml のアンピシリンを含む LB 培地 (1 % Bacto tryptone, 0.5 % Bacto yeast extract, 1 % NaCl, pH 7.2) にて一夜振とう培養した。この菌液を再び、新たな LB 培地にて培養することにより、対数増殖期の菌液 (OD₆₀₀=0.3~0.4) を得た。

抗変異原性の測定は、この対数増殖期の菌液を用いて、最終的には Fig. 1 に示す方法にて行った。Bio-antimutagen 活性測定には変異原として紫外線 (UV) を使用した。菌液に UV (15W 殺菌灯, 照射時間 20 秒, 照射距離 33cm) を照射した後、その 0.5ml を L 字型試験管に分注した。この菌液にサンプル溶液 50 μ l および新たな LB 培地 4.5ml を加え、37℃ で 2 時間培養した。その後、600nm で菌濃度を測定するとともに、 β -ガラクトシダーゼおよびアルカリホスファターゼ活性を測定した。

また、Desmutagen 活性測定には BHPO を変異原として使用した (Fig. 1)。対数増殖期

Table 2 Crude drugs assayed in this study

No	Common name	Botanical name
1	AMACHA	<u>Hydrangea serrata</u> var. <u>thunbergii</u>
2	BOTANPI	<u>Paeonia suffruticosa</u> Andr.
3	Cashew	<u>Anacardium occidentale</u>
4	CHINPI	<u>Citrus unshiu</u> Marcov.
5	DAIOU	<u>Rheum officinale</u> Baill.
6	DOMOKUKOU	<u>Inula helenium</u> L.
7	EIJITSU	<u>Rosa multiflora</u> Thunb.
8	Galangal	<u>Alpinia officinarum</u> Hance
9	GOBAISHI	<u>Rhus javanica</u> L.
10	Guarana roast	<u>paullinia cupana</u> H.B. et K.
11	HISHI	<u>Trapa japonica</u> Flerov
12	Hop	<u>Humulus lupulus</u> L.
13	Hyssop	<u>Hyssopus officinalis</u> L.
14	KAIKA	<u>Sophora japonica</u> L.
15	KAMITSURE	<u>Matricaria chamomilla</u> L.
16	KIKOKU	<u>Poncirus trifoliata</u> (L.) Rafin.
17	KOUKIKUKA	<u>Chrysanthemum morifolium</u> Hemsl.
18	KUJIN	<u>Sophora flavescens</u> Aiton
19	KYOUNIN	<u>Prunus armeniaca</u> L. var. <u>ansu</u> Maxim.
20	RESENSOU	<u>Glechoma hederacea</u> L. var. <u>grandis</u>
21	SOUHAKUHI	<u>Morus alba</u> L.
22	SOUZUKU	<u>Alpinia katsumadai</u> Hayata
23	TOCHUU	<u>Eucommia ulmoides</u> Oliv.
24	TOUKI	<u>Angelica sinensis</u> (Oliv.) Diels
25	UWAURUSHI	<u>Arctostaphylos uva-urusi</u> (L.) Sprengel
26	YAKUCHI	<u>Alpinia oxyphylla</u> Miq.

の菌液1.0mlを試験管に分注し、ここに変異原溶液50 μ l (BHPO, 30 μ g) とサンプル溶液50 μ lを同時に加えた。37℃で1時間培養を行った後、その0.5mlをL字型試験管に移し、ここに新たなLB培地4.5mlを加えた。37℃で2時間培養後、Bio-antimutagen 活性測定時と同様に、菌濃度および酵素活性の測定を行った。なお、これらの操作法においても、同時に変異原処理を行わない場合、またサンプル溶液の代わりにサンプルを溶解した溶媒のみを加えた場合の操作を対照試験として行った。

β -ガラクトシダーゼ活性の測定³³⁾は、2時間培養後の菌液0.1mlを用いて行った。この菌液0.1mlにZ-緩衝液 (60mM Na₂HPO₄, 40mM NaH₂PO₄, 10mM KCl, 1 mM MgSO₄, pH 7.0) 0.9mlを加え、更に0.1% SDS 溶液50 μ lとクロロホルム50 μ lを添加し、ミキサーにて激しく攪拌することにより細胞膜を破壊した。28℃で10分間温置した後、基質となる ONPG (4 mg/ml) 0.2mlを加え、28℃で30分間酵素反応を行った。1 M 炭酸ナトリウム溶液1.0ml

SOS 反応抑制を利用した香辛料および生薬の抗変異原性の検索

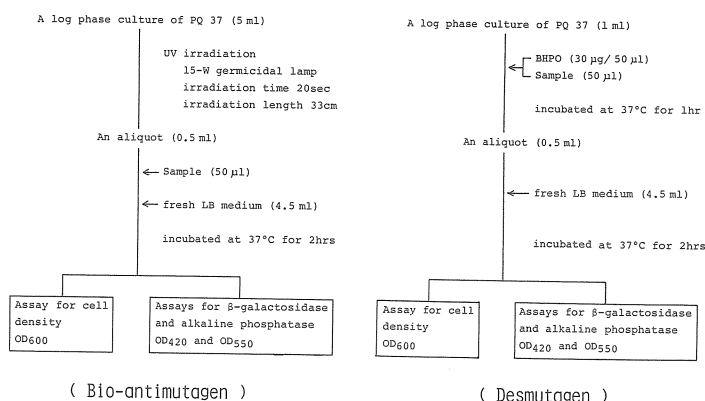


Fig. 1 Assays for antimutagenic capacities of spices and crude drugs.

を加えて反応を停止させ、420nm および550nm での吸光度を測定した。

またアルカリホスファターゼ活性の測定³⁴⁾は、Z-緩衝液の代りにトリス緩衝液 (1M Tris-HCl, pH 8.8) を用い、*p*-ニトロフェニルりん酸 2 ナトリウム塩 (PNPP, 4 mg/ml) を基質として、 β -ガラクトシダーゼ活性測定の場合と同様の操作を行った。2 M 塩酸0.5ml にて反応を停止させ、5 分後に 2M Trizma base 溶液0.5mlを加えた後、同様に吸光度を測定した。

β -ガラクトシダーゼおよびアルカリホスファターゼの酵素量 (Unit) は、次式に示す Miller の計算式³³⁾よりそれぞれ算出した。

$$\text{Unit} = 1000 \times \frac{\text{OD}_{420} - 1.75 \times \text{OD}_{550}}{t \times V \times \text{OD}_{600}}$$

t : 酵素反応時間 (30分間)
V : 酵素反応に用いた菌液量 (0.1ml)

結 果

1) 培養条件の検討

変異原処理に使用する供試菌液は、対数増殖期のものを必要とする³²⁾が、その培養条件を先ず検討した。LB 培地にて一夜前培養した定常期の PQ 37 菌は、さらにその0.1mlを、LB 培地5.0mlを分注した内径16mmの試験管に接種し、37℃で振とう培養を行った。一定時間毎に培養液の600nm における吸光度を測定したところ、目的の供試菌液を得るには4 時間以上の培養時間を要した。そこで、坂口フラスコによる培養を試みた。LB 培地50ml ずつを分注した後、この中に定常期の PQ 37 菌1.0ml, 2.0ml および4.0ml を接種した。一定時間毎に吸光度を測定し、その結果を Fig. 2 に示した。この図から明らかなように、前培養液4.0ml を接種した坂口フラスコにおいては、約90分間の培養にて対数増殖期の菌液 ($\text{OD}_{600}=0.3\sim0.4$) を得ることができた。

2) 変異原処理条件の検討

Bio-antimutagen 活性測定には変異原として UV を用いた。対数増殖期の菌液 5 ml ずつを内径8.5cmのシャーレに分注し、シャーレを回転させながら UV (15W 殺菌灯, 照射距

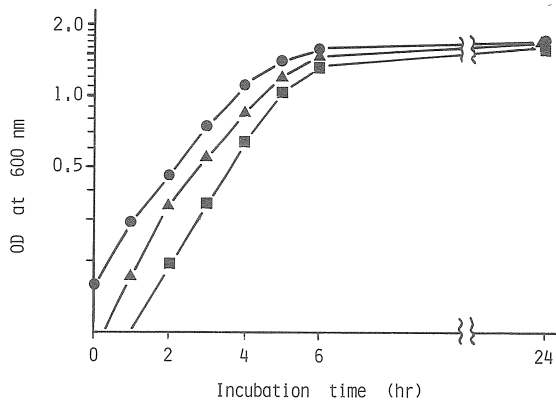


Fig. 2 Growth curves of *Escherichia coli* PQ 37 cultured in LB medium.

Volume of PQ 37 precultured solution : (□—■ 1.0 ml, △—△ 2.0 ml, ●—● 4.0 ml)

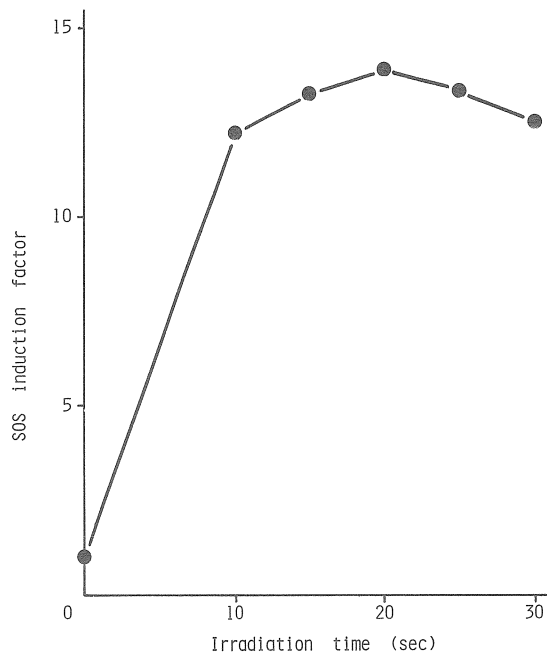


Fig. 3 Effect of UV irradiation time on the SOS function inducing activity.

離33cm)を0, 15, 20, 25および30秒間それぞれの菌液に照射した。照射済みの菌液0.5mlをLB培地4.5ml(L字型試験管)に加え, 37℃で2時間培養し *lac Z* 遺伝子の発現を行わせた。600nmで菌の濁度を測定するとともに, 0.1mlずつを用いて β -ガラクトシダーゼおよびアルカリホスファターゼの活性を測定した。Millerの計算式より β -ガラクトシダーゼの単位菌体当たりの酵素量(β 値)を求め, また構成酵素であるアルカリホスファター

ぜの単位菌体当たりの酵素量 (P 値) も求めた。次にこの両者の比 (β /P 値) を計算し、UV 照射を行わなかった対照群での β /P 値を 1 として、UV 照射した処理群の β /P 値を SOS induction factor として算出した。この結果を Fig. 3 に示した。この図から明らかなように、SOS 反応の誘発活性は、照射時間とともに増大し、照射時間20秒が極大を示し、その後多少減少した。従って、以後の Bio-antimutagen 活性測定においては、SOS induction factor 値が最も高い条件、すなわち UV 照射時間20秒を変異原処理の条件とした。

Desmutagen 活性測定には変異原として BHPO を用いた。そこで、BHPO を変異原とした場合の SOS 反応の誘発活性を測定することにした。対数増殖期の PQ 37菌1.0mlずつを内径1.8cmの試験管に分注し、ここに DMSO に溶解した種々の濃度の BHPO を50 μ lずつ添加した。37℃で1時間インキュベートすることにより、PQ 37菌の SOS 反応を誘発させた。その後、各試験管より0.5mlずつを取り出し、UV を変異原とした場合と同様の方法で各 BHPO 濃度における SOS induction factor 値を求め、その結果を Fig. 4 に示した。BHPO の最終濃度が30 μ g/mlになるとほぼ一定の SOS induction factor 値が得られたので、この濃度を以後の Desmutagen 活性測定における変異原処理の条件とした。

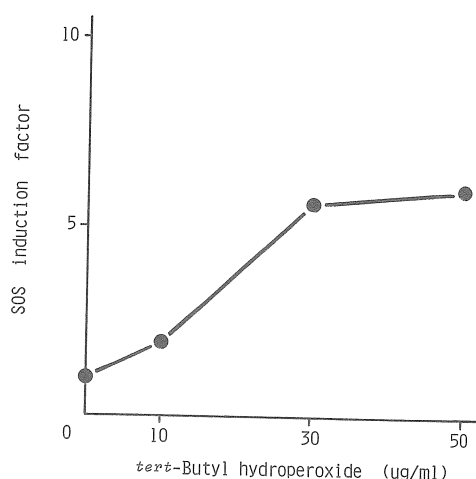


Fig. 4 Effect of *tert*-butyl hydroperoxide concentration on the SOS function inducing activity.

3) Bio-antimutagen 作用

Table 1 に示される香辛料22種類の抽出物を試料として、Fig. 1 に示す方法にて、Bio-antimutagen 活性を測定した。サンプル溶液の代りに50% DMSO 50 μ lを添加した場合の SOS induction factor 値を100% (Control 値) として、各サンプルの Relative SOS induction factor 値を算出し、その結果を Fig. 5 に示した。すなわち棒グラフの値が Control 値より小さいほど、より強い Bio-antimutagen 活性を有していることになる。この図から明らかなように、強い活性を示すものは認められなかったが、山椒抽出物においては、約30%の抑制効果が認められた。なお、Fig. 5 にその活性値が示されていないオールスパイス、シナモン、クローブ、ローレル、ナツメグおよびスターアニスの6種類の香辛料抽出物は、600nm で菌濃度を測定する際、菌凝集物を形成し沈殿を生成していた。そこで、

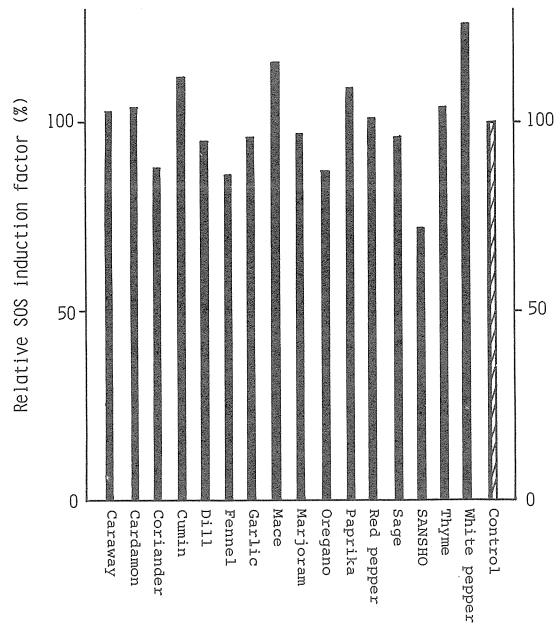


Fig. 5 Bio-antimutagenic capacities of different kind of spices.

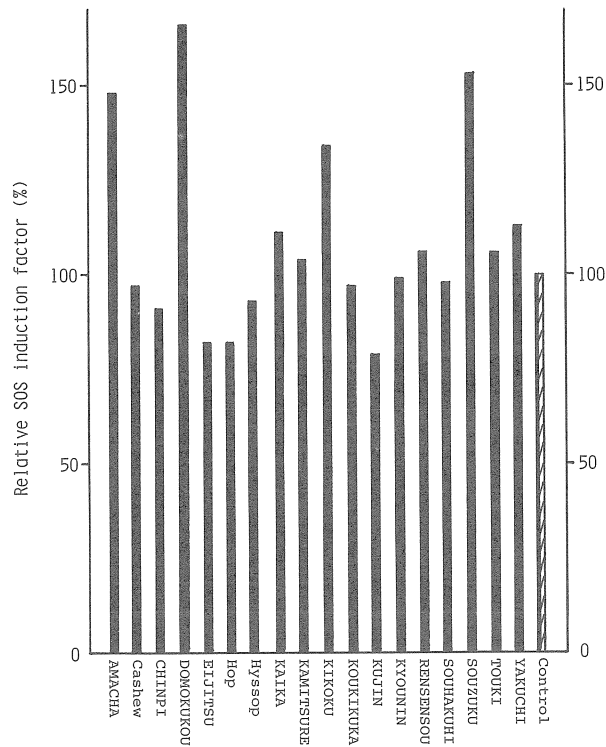


Fig. 6 Bio-antimutagenic capacities of different kind of crude drugs.

正確な菌濃度を測定することが不可能となり，Fig. 5 の結果より除去した。

次に，生薬26種類（Table 2）の抽出物を用いて，同様 Bio-antimutagen 活性を測定し，その結果を Fig. 6 に示した。菌凝集物を形成して活性の評価を行うことができなかったサンプルは，8 種類であった。活性測定が可能であった18種類のなかでは，宮実，ホップおよび苦参が約20%の抑制効果を示した。

4) Desmutagen 作用

香辛料22種類の抽出物の Desmutagen 活性を Fig. 1 に示す方法にて測定し，その結果を Fig. 7 に示した。Bio-antimutagen 活性測定の場合と同様に，6 種類の香辛料抽出物は，強い菌凝集作用を示し，600nm での正確な菌濃度を測定することが不可能になり，単位菌体当たりの酵素量を求めることができなかった。活性測定ができた香辛料のなかでは，キャラウェイ，デイル，マージョラム，オレガノ，セージおよびタイムが Desmutagen 効果を示した。特にセージは約40%の変異原不活性化作用を示した。

また，生薬の抽出物の Desmutagen 活性の結果を Fig. 8 に示した。活性の評価が可能であったサンプルは，26種類の生薬中12種類であり，活性が認められたのは，カシューおよび桑白皮であった。

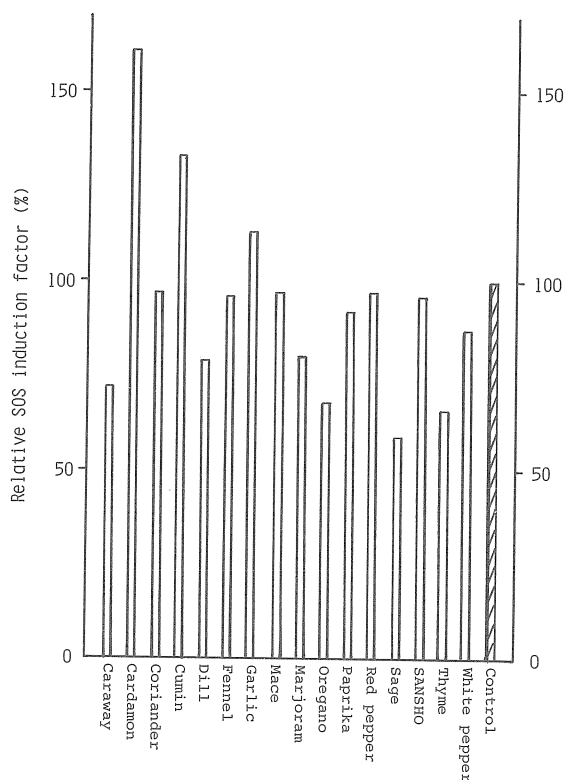


Fig. 7 Desmutagenic capacities of different kind of spices.

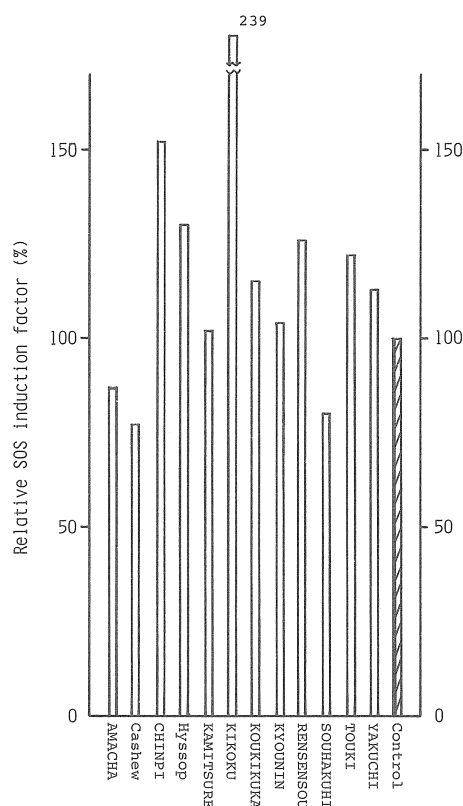


Fig. 8 Desmutagenic capacities of different kind of crude drugs.

考 察

変異原物質の検索^{5)~9)}に代り、1980年代からは主に抗変異原物質（突然変異抑制物質）の研究^{12)~30)}が活発に進んできた。賀田¹¹⁾は、この抗変異原物質を作用機構の面から2つのグループに分類することを提案した。1つは、変異原不活性化物質（Desmutagen）であり、これは変異原がDNAに損傷を与える前に、この変異原に直接作用してそれを不活性化させる物質である。また、もう1つは、抗突然変異物質（Bio-antimutagen）であり、これは変異原によってすでにDNAに損傷を受けた細胞のDNA修復や複製過程に作用して、突然変異誘発頻度を低下させる物質である。そこで著者らは、今回香辛料および生薬の抗変異原性を検索する際、DesmutagenおよびBio-antimutagenとしての可能性を調べることにした。

活性の測定法としては、種々の方法が考えられたが、今回のスクリーニングテストにおいては、試料溶液中にアミノ酸類が混在することも予測されたので、ヒスチジンをはじめとするアミノ酸類の影響を受けない活性測定法、すなわち「大腸菌のSOS反応を利用した方法」³²⁾を用いることにした。一般に、大腸菌をはじめとする微生物から哺乳動物にいたるまで、その細胞のDNAが損傷を受けると、これに対処するために「SOS反応」と呼

ばれる様々な応答反応が起る。本実験に用いた大腸菌 PQ 37 株も、正常細胞においては、SOS 遺伝子群の発現は、リプレッサー蛋白 (*lex A* 遺伝子産物) によって抑制されている。しかし、変異原物質等により DNA が損傷を受けると、これがシグナルとなって Rec A 蛋白 (*rec A* 遺伝子産物) が活性化されてプロテアーゼ活性を有することになる。その結果、この Rec A 蛋白がリプレッサー蛋白を分解し、SOS 遺伝子群の発現をひき起こすことになるのである。この場合、SOS 修復に直接関与する *umu C, D* 遺伝子の発現も同時に起り、DNA 修復が開始されるのである。しかし、この SOS 修復では応急の DNA 修復が行われる反面、その DNA 修復過程では誤りも生じやすく、結果として突然変異が高頻度になることになる。従って、この SOS 修復の誘導を阻止 (抑制) する物質が、Bio-antimutagen になりうると考えられる。

ところで、この PQ 37 菌 (*sul A :: lac Z, rfa, uvr A, Pho^C*) は、SOS 遺伝子の 1 つ (*sul A* 遺伝子) に β -ガラクトシダーゼの構造遺伝子 (*lac Z* 遺伝子) を連結させた大腸菌の変異株であり、従って変異原処理を受けると、リプレッサー蛋白の分解に伴い *sul A* 遺伝子の発現が起り、同時に β -ガラクトシダーゼ活性が発現することになる。すなわち、 β -ガラクトシダーゼ量を測定することにより、SOS 修復遺伝子の発現量を知ることが可能である。また、本実験においては、試料中に含まれる物質が、SOS 遺伝子発現後の蛋白質合成段階において阻害作用を示すために β -ガラクトシダーゼ量 (β) を低下させることも十分に考えられたので、PQ 37 菌の構成酵素であるアルカリホスファターゼ量 (P) も同時に測定し、両者の比 ($\frac{\beta}{P}$) より SOS 反応の誘発活性を評価した。

本実験においては、この SOS 反応を利用した抗変異原活性測定のための諸条件を先ず検討した。活性測定のための PQ 37 供試菌液は、坂口フラスコを用いた培養法の利用により、試験管培養法の約 1/3 の培養時間にて調製することができた。次に、この供試菌液を用いて、変異原による SOS 反応誘発条件を検討した。Bio-antimutagen 活性測定のための UV 変異原処理においては (Fig. 3), SOS induction factor 値が最も高い、すなわち DNA 損傷率が最も高い UV 照射時間 20 秒を用いることにした。また、Desmutagen 活性測定のための変異原としては、「近年生体内において脂質類の過酸化物が、或いはこれに由来するラジカル類が DNA 傷害を起す」³⁵⁾ といわれているので、そのモデル化合物を使用することにした。先ず、リノール酸およびリノール酸メチルの過酸化物を調製し、これらの PQ 37 菌に及ぼす影響を調べた。しかし、これらの過酸化物は、種々の過酸化物濃度においても SOS 反応を誘発しなかった。そこで市販の BHPO を用いて同様の実験を行った。その結果、リノール酸およびリノール酸メチルでは SOS 反応を誘発しなかった過酸化物濃度において、BHPO は十分に SOS 反応を誘発することが判明した。(この原因としては、リノール酸およびリノール酸メチルの過酸化物は、この実験条件下では、PQ 37 菌の膜透過することが不可能であったことが考察されるが、詳細については検討を要する。) そこで、BHPO の各濃度における SOS induction factor を測定したところ (Fig. 4), Desmutagen 活性測定のための BHPO 添加量は、最終濃度で 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ が適当であると考えられた。

変異原処理条件を以上のように決定した後、Bio-antimutagen として報告されている塩化コバルト²¹⁾を用いて、その活性を調べた。UV 照射 (20 秒間) した菌液 0.5 mL に塩化コバルトを 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mg を加え、Fig. 1 に示される方法にて Bio-antimu-

tagen 活性を測定したところ、それぞれの添加量における Relative SOS induction factor 値は、100, 84, 59, 33, 5.9, 3.2%を示した。この結果は、塩化コバルト添加量が多くなると、より強い Bio-antimutagen 活性が発揮されることを示している。そこで、実際に、香辛料および生薬より50%エタノール抽出物を調製し、この抽出物の50% DMSO 可溶部の Bio-antimutagen 活性を測定した。香辛料抽出物においては (Fig. 5), サンプル22種類中、その Bio-antimutagen 活性を測定することができたのは16種類であり、残り6種類は PQ 37菌凝集作用が観察され、正確な活性を求めることは不可能であった。測定可能な16種類の中では、山椒に活性が認められた。また、生薬抽出物26種類においては (Fig. 6), 18種類が活性測定可能であり、この中では、宮実、ホップおよび苦参が Bio-antimutagen 活性を有していた。

Desmutagen 活性においては、活性測定可能な香辛料16種類の中で、キャラウェイ、ディール、マージョラム、オレガノ、セージおよびタイムが変異原不活性化作用を示した (Fig. 7)。特に、抗酸化性が強いと報告されているセージ³¹⁾は、有効的に変異原 (BHPO) の不活性化に作用したように考察される。生薬の Desmutagen 活性測定においては、非常に多くのサンプルが菌凝集作用を示したため、12種類の抽出物のみ活性を測定することが可能であった。Fig. 8の結果より、カシューおよび桑白皮が変異原不活性化作用を有することが判明した。(なお、Fig. 5 から Fig. 8 の中で、Relative SOS induction factor 値がコントロールの100%より高い値を示しているサンプルが認められるが、特に、Fig. 8 の枳殻においては、その値が239%を示している。この事実は、逆に、枳殻をはじめとする数種類のサンプルの中には、変異原性を示す物質が存在する可能性を示唆しているが、この点についても研究を進める必要がある。)

以上のスクリーニングテストより、香辛料および生薬中にも Bio-antimutagen 作用或いは Desmutagen 作用を示す物質が存在することが判明した。今後、特に活性の強かったサンプルを用いて、活性物質の分離・精製を行い、その化学構造を解明するとともに、作用機構等の解明も必要とされる。なお、本実験において菌凝集作用を示し、活性測定不可能であったサンプルについては、活性測定法を改良することにより、その抗変異原性を検討したい。

終わりに、本研究を行うにあたり、実験に協力いただいた高木奈緒美、安田万里子氏、サンプルの供与をいただいた高砂香料工業(株)の山口雄三氏、また PQ 37菌の分与をいただいた残留農薬研究所の太田敏博氏に謝意を表します。

引用文献

- 1) E. L. Wynder and G. B. Gori: *J. Natl. Cancer Inst.*, **58**, 825 (1977).
- 2) B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols and C. Ramel: "Handbook of Mutagenicity Test Procedures", Elsevier (1977).
- 3) J. McCann, E. Choi, E. Yamasaki and B. N. Ames: *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **72**, 5135 (1975).
- 4) 賀田恒夫, 石館基: "環境変異原データ集", サイエンティスト社 (1980).

- 5) S. S. Mirvish: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **31**, 325 (1975).
- 6) T. Sugimura, T. Kawachi, M. Nagao, T. Yahagi, Y. Seino, T. Okamoto, K. shudo, T. Kosuge, K. Tsuji, K. Wakabayashi, Y. Iitaka and A. Itai: *Proc. Jpn. Acad.*, **53**, 58 (1977).
- 7) H. Kasai, Z. Yamaizumi, K. Wakabayashi, M. Nagao, T. Sugimura, S. Yokoyama, T. Miyazawa, N. E. Spingarn, J. H. Weisburger and S. Nishimura: *Proc. Jpn. Acad.*, **56B**, 278 (1980).
- 8) Y. Kito, M. Namiki and K. Tsuji: *Tetrahedron*, **34**, 505 (1978).
- 9) T. Yamaguchi and Y. Yamashita: *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 2225 (1979).
- 10) T. Kada, K. Morita and T. Inoue: *Mutat. Res.*, **53**, 351 (1978).
- 11) T. Kada: "Environmental Mutagens and Carcinogens," ed. by T. Sugimura, University of Tokyo press, Tokyo, p 355 (1982).
- 12) K. Morita, M. Hara and T. Kada: *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 1235 (1978).
- 13) T. Inoue, K. Morita and T. Kada: *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 345 (1981).
- 14) W. S. Barnes: *J. Nat. Cancer Inst.*, **70**, 757 (1983).
- 15) W. F. B. Moorman, N. J. Moon and R. E. Worthington: *J. Food Sci.*, **48**, 1010 (1983).
- 16) T. Kada, M. Kato, K. Aikawa and S. Kiriya: *Mutat. Res.*, **141**, 149 (1984).
- 17) M. Moriya, K. Kato and Y. Shirasu: *Mutat. Res.*, **57**, 259 (1978).
- 18) T. Osawa, H. Ishibashi, M. Namiki and T. Kada: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **95**, 835 (1980).
- 19) C. Beckman, R. M. Roy and A. Sproule: *Mutat. Res.*, **105**, 73 (1982).
- 20) M. S. Meyn, T. Rossman and W. Troll: *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **74**, 1152 (1977).
- 21) T. Kada and N. Kanematsu: *Proc. Jpn. Acad.*, **54B**, 234 (1978).
- 22) H. Y. Ryo and S. Kondo: *Mutat. Res.*, **72**, 311 (1980).
- 23) K. Kakinuma, J. Koike, K. Kotani, N. Ikekawa, T. Kada and M. Nomoto: *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1905 (1984).
- 24) K. Kakinuma, Y. Okada, N. Ikekawa, T. Kada and M. Nomoto: *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1647 (1984).
- 25) K. Shimoi, Y. Nakamura, I. Tomita and T. Kada: *Mutat. Res.*, **149**, 17 (1985).
- 26) T. Kada, K. Kaneko, S. Matsuzaki, T. matsuzaki and Y. Hara: *Mutat. Res.*, **150**, 127 (1985).
- 27) T. Ohta, M. Watanabe, K. Watanabe, Y. Shirasu and T. Kada: *Food Chem. Toxicol.*, **24**, 51 (1986).
- 28) K. Shimoi, Y. Nakamura, I. Tomita, Y. Hara and T. Kada: *Mutat. Res.*, **173**, 239 (1986).
- 29) K. Watanabe, T. Ohta and Y. Shirasu: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1041 (1988).
- 30) 太田敏博, 並木満夫: 化学と生物, **26**, 161 (1988).
- 31) 岩井和夫・中谷延二編: "香辛料成分の食品機能", 光生館, 東京, p 69 (1989).
- 32) T. Ohta, N. Nakamura, M. Moriya, Y. Shirasu and T. Kada: *Mutat. Res.*, **131**, 101 (1984).
- 33) J. H. Miller: "Experiments in molecular genetics", Cold Spring Harbor Laboratory, New York, p 352 (1972).
- 34) P. Quillardet, O. Huisman, R. D'Ari and M. Hofnung: *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **79**, 5971 (1982).
- 35) 内山充, 松尾光芳, 嵯峨井勝編: "過酸化脂質と生体", 学会出版センター, 東京, p 261 (1985).