変異原の生成・低減と抗酸化剤

菊川 清見*, 加藤 哲太

東京薬科大学薬学部 〒192-0392 東京都八王子市堀之内1432-1

Effects of antioxidants on the formation and the reduction of mutagens

Kiyomi Kikugawa and Tetsuta Kato

School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Science
1432-1 Horinouchi, Hachioji, Tokyo 192-0392, Japan

Summary

Food antioxidants or reductones, ascorbic acid and its derivatives, monophenolics including α -tocopherol, polyphenolics in tea leaves and red wine, SH compounds including cysteine, carotenoids including β -carotene and other reductones, can scavenge reactive oxygen species, reactive nitrogen oxide species and lipid peroxy radicals. By contrast, these antioxidants or reductones can be converted into prooxidants in the presence of oxygen or act to produce harmful compounds. Formation of heterocyclic amine mutagens in the model system is inhibited by scavenging pyrazine cation radical with monophenolics, polyphenolics, ascorbate and SH compounds, and the mutagenicity in cooked hamburger is effectively inhibited by ascorbate. Formation of nitrosamines is effectively inhibited by ascorbate, but inhibited or stimulated by polyphenolics and monophenolics. Monophenolics are converted into possibly harmful nitroso-, nitro- and diazo-compounds by reaction with N_2O_3 . Hydroxyfuranones found in the Maillard reactions and hydroxyhydroquinone found in coffee cause DNA single strand breaks by generation of reactive oxygen species, and cause lung lipid peroxidation and increased type IV and I allergy responses by oral administration to experimental animals. On the other hand, food polyunsaturated fatty acids, which has been so far considered to give deterioration effect, are found to be protective against oxidative stress-induced DNA damage.

Keywords: antioxidant, prooxidant, heterocyclic amine, nitrosamine, polyunsaturated fatty acid

緒 言

食物中の antioxidant および reductone には ascorbate およびその誘導体, α -tocopherol などの monophenolic, 茶葉や赤ワインの polyphenolic, cysteine などの SH 化合物, β -carotene のような carotenoid などがある。これらは活性酸素種, 活性窒素酸化物, 脂質 peroxy radical を消去する作用があるが, その一方で prooxidant としては

たらく厄介な側面をもち合わせている。Antioxidant の作用は一樣ではなく, その種類, 作用する環境, 作用する相手, 酸素の有無によって異なる。一般に, antioxidant は変異原の生成やその発現に抑制的にはたらく因子と考えられているが, 場合により prooxidant として有害的にはたらくことがある。また, 高度不飽和脂肪酸 (PUFA) は酸化によって脂質 peroxy radical を生成し, 生成する radical が連鎖反応を繰り返すため有害と考えられてきたが, PUFA の酸化が DNA の酸化傷害を保護する面ももっている。ここでは, antioxidant とその prooxidant 作用, および antioxidant としての PUFA が, 変異原の生成や低減とどのような関わりをもっているか

* E-mail: kikugawa@ps.toyaku.ac.jp

受付: 2003 年 7 月 15 日 受理: 2003 年 7 月 15 日

© 日本環境変異原学会

本稿は日本環境変異原学会第31回大会シンポジウム「食品中の抗変異原・抗発がん物質のヒトへの有効性」で発表された。
This paper was presented to the symposium "The effectiveness of anti-mutagen and anti-carcinogen in food to human beings" at the 31st JEMS annual meeting, 2002.

について、筆者らの研究を中心に紹介する。

1. 発がん物質の代謝に影響する antioxidant

食物や環境由来の発がん物質、aflatoxin, benzo[a]pyrene, heterocyclic amine (HCA), nitrosamineはそれ自身にはDNAに対する反応性はないが、代謝を受けることによってDNAに反応性をもつ究極発がん物質に変換する。代謝の最初の段階は主として肝ミクロソームに存在するシトクロムP450 (CYP)/NADPH-CYP還元酵素による酸化反応である。Benzo[a]pyreneはCYP1A1によって反応性の高いdiolepoxide体に、aflatoxinはCYP3A4によってepoxide体に酸化され、HCAは環外のアミノ基がCYP1A2により酸化されてhydroxylamine体となりさらにアセチルトランスフェラーゼの作用によってアセチル化されて活性化される。NitrosamineはCYP2A6によって α 位の炭素が水酸化されて活性化される。このように変異・発がん物質の代謝的活性化は酸化を伴うことから、antioxidantが代謝の抑制剤として検討されてきた。茶葉polyphenolicのcatechinを始め多くの植物の抗酸化成分がP450による酸化反応を拮抗的に阻害することが報告されているし(木苗, 増田, 2002), 茶葉polyphenolicは多くの物質の変異原作用を低減する作用があることも報告されている(黒田, 原, 1999a, b)。また、発がんプロモーションのプロセス、たとえばTPA型のプロモーターによる発がんは、同時に細胞の活性酸素産生を促進し、抗酸化成分の茶葉polyphenolicのEGCGはプロモーション過程を抑制することが認められている(菅沼ら, 1996)。しかし、ヒトの緑茶の摂取量と各種がんの発生率や死亡率との間に相関性があるとする疫学調査結果、ないとする調査結果があるなど、矛盾する点もある。Carotenoidは植物にもヒトの体内にも存在する物質であり、有用なantioxidantと考えられており、実験動物において制がん作用があるとの多くの報告がある。しかし、その一方で、10年前にアメリカ、フィンランドで実施された β -caroteneのヒトへの介入試験が、喫煙者の肺がんによる死亡率を上昇させたという予期しない結果であったことも忘れることができない。予期しない結果がでたのは、用いた β -caroteneの品質が悪かったためではないか、用量が多すぎたためではないか、と推定されているが、その原因は今のところ明らかではない。未だcarotenoidの科学が十分に解明されていないことを物語っている。

2. HCAの生成と antioxidant

焼肉、焼魚に生成する変異原HCA類は、肉や魚に含まれるglucose/amino acid/creatinineの混合物の加熱によって生成するが、glucoseとamino acidのMaillard反応物にさらにcreatinineが反応して生成する。HCAとヒトのがんとの関連性が色々な角度から検討されており、

分析疫学によって、よく焦がした肉を頻繁に食べる人は大腸がんや乳がんに罹りやすいことが示されている(長尾, 2001)。

HCAが煮た肉や煮魚には生成せず、焼肉、焼魚に生成するのは、加熱温度の違いと考えられるが、それだけではなく、焼肉、焼魚では水分のロスもHCAの生成に関係している(菊川, 1992)。筆者らは、glucose/glycine/creatinineのモデル系における変異原の生成に、中間体としてpyrazine cation radicalが存在していることを明らかにした。Glucose/glycine混合物の若干の水を含むdiethyleneglycol溶液を加熱したとき生成するradicalのESRシグナル強度とglucose/glycine/creatinineの溶液から生成する変異原性の強さは、いずれもglucoseとglycineのモル比が1:2のとき最大になり、radicalの生成とHCAの生成ともにglucoseの量依存性が認められた(菊川ら, 1996; 菊川ら, 2000; 平本, 2002)。これをハンバーグ調理における変異原の低減に応用することを試みた(菊川, 2003; 菊川ら, 2000; 平本, 2002)。もともと0.07%の還元糖を含んでいる牛ひき肉に、異なる量の還元糖を添加しハンバーグを調理してその変異原性を調べたところ、0.3%の還元糖の終濃度では変異原性は2倍に増強し、終濃度約0.7%以上では変異原性は約1/2に減少した。牛ひき肉に33%の赤ワインまたは白ワインを添加すると糖の終濃度は0.3%となり、調理したハンバーグの変異原性は2倍に上昇した。33%のタマネギを加えると糖の終濃度は0.9%に上昇し、変異原性は1/2に低下した。日本で行われている多量のタマネギを添加するハンバーグの調理法は変異原を低減するのに好ましい方法といえる。

Polyphenolicなどのantioxidantをglucose/amino acid/creatinineのモデル系に添加することによって変異原物質の生成が抑えられることが報告されているが(Weisburger et al., 1994; Oguri et al., 1998)、筆者らはantioxidantのBHA, sesamol, EGCGを添加するとpyrazine cation radicalを消去するとともに、変異原物質の生成を抑えることを見出し、radicalの生成と変異原物質の生成が関連していることを確かめた(Kato et al., 1996; Kikugawa, 1999)。反応系にcysteine, N-acetylcysteineなどのSH化合物やascorbate, erythorbateなどのreductoneを添加することによっても、radicalの生成と変異原物質の生成ともに抑えられた(Kikugawa et al., 1999d)。EGCGを多量に含む茶葉抽出液をかつおぶしの変異原低減に応用を試みた。かつおの小さい肉片を用いればEGCGの効果が認められたが(Kato et al., 1996)、かつおぶしの製造工程においては、肉片にしみ込まないため、実用的な濃度ではほとんど効果がなかった(Kato and Kikugawa, 1999)。EGCG, cysteine, ascorbate, erythorbateをハンバーグの変異原低減に試みた。EGCG, cysteineは高濃度用いれば変異原低減効果はあり、茶葉

Fig. 1 Mutagenicity of 1.5 g equivalent amount of cooked hamburger prepared by addition of sodium ascorbate (●) and sodium erythorbate (▲). Mutagenicity was tested on *Salmonella typhimurium* TA98 with S9 mix.

抽出物がハンバーグの変異原生成を阻止するとの報告 (Kinae et al., 1997; Weisburger et al., 2002) と一致した。しかし, EGCG, cysteine は実用的に用いられる程度の 0.33% では効果が認められなかった。これに対して, ascorbate, erythorbate は 0.33% の実用的低濃度で変異原性を 1/2 程度にまで低減させた (Fig. 1) (Kato et al., 2000)。食肉の加熱調理において生成する変異原の低減には, Maillard 反応における pyrazine cation radical の生成を抑制するための糖濃度の調節, あるいは radical を消去する antioxidant の ascorbate, erythorbate の添加が実用的に用いられることが分かった。HCA の低減において antioxidant は効果的にはたらくといえよう。

3. 硝酸塩と antioxidant

硝酸塩が直接的にヒトに害を及ぼすことは少ないが, ヒトの硝酸塩の摂取量と胃がんによる死亡率に正の相関があるという疫学結果がある。日本人は西欧人に比べて硝酸塩の摂取量が高く, 胃がんによる死亡率もこれに伴って高いことが示されている (菊川, 2003)。日本人の硝酸塩摂取量が高いのは, 日本で栽培される野菜の硝酸塩含量が高いことにある。経口的に摂取された硝酸塩は口腔内の細菌によって還元されて亜硝酸塩になり (式 1), 亜硝酸塩が胃に達するとその酸性条件により遊離の亜硝酸になり (式 2), さらに脱水して化学的に活性な N_2O_3 になる (式 3)。化学反応性に富んだ N_2O_3 は種々の食物成分と化学反応を起こし, 酸化, nitroso 化, nitro

Fig. 2 Proposed scheme for nitrosamine formation in a system containing TBHQ, nitrite and secondary amines

化, diazo 化などによって, 変異・発がん物質を生成することがある。硝酸塩と食べ合せて変異・発がん物質を生成する代表的なものが dimethylamine などの dialkylamine である。胃内に生じた N_2O_3 は容易に dialkylamine と反応して, 変異・発がん性をもつ dialkyl nitrosamine を生じる (式 4)。動物実験において亜硝酸塩と dialkylamine を同時に経口投与することにより, がんが誘発することが示されている。

胃内の酸性条件を想定した試験管内で, dialkylamine と亜硝酸塩との反応による nitrosamine の生成に影響を及ぼす食物成分が検索されてきた (Kikugawa and Kato, 1991)。Nitrosamine の生成を促進する代表的な食物成分は ethanol であり, ethanol は有機溶媒であるため, 式 2 を右に進め, nitrosamine を生成しやすくしていると考えられている。Nitrosamine の生成を阻害する代表的な食物因子は antioxidant の ascorbate であり, 酸性条件下で N_2O_3 を還元して NO に変換し, 自身は酸化されて dehydroascorbate になる。Polyphenolic 類およびこれらを含む野菜のジュースの影響が調べられているが, 条件によって, 促進したり阻害したり様々な複雑な反応を示することが示されており, 好ましい影響だけとはいえない。一般的に, polyphenolic と亜硝酸の反応は, polyphenolic が酸化されて quinone 体になり, NO を発生するのが

Fig. 3 Possible mechanism of generation of reactive oxygen species from nitrosos sesamol

主な作用のようであるが、化合物の種類によっては、より複雑な反応をすることがある。人工的な polyphenolic antioxidant の *tert*-butylhydroquinone (TBHQ) は、dimethylamine と亜硝酸の共存下、酸化されて quinone 体になり、これに dimethylamine が付加して赤色色素をつくるという複雑な反応をする (Fig. 2)。この反応は亜硝酸と dimethylamine を消費するので、結果的に dimethylnitrosamine の生成を阻害することになる (Urano et al., 1994)。

Antioxidant 作用をもつ monophenolic 類は nitrosamine の生成を抑えるが、その代償として、自身が nitroso 化、nitro 化、diazo 化を受け、様々な活性を示す物質になる場合が多い (Kikugawa and Nagao, 1991)。Nitroso 体は nitrosamine 生成の触媒となり、良い影響は与えない。ゴマ油に含まれる monophenolic の sesamol は、他の monophenolic とは異なり独特の性質をもっている。試験管内で赤血球とインキュベートすると、hemoglobin を酸化して methemoglobin を生じ (Kurechi et al., 1980)、赤血球膜糖タンパク質の凝集と自己抗体の結合をきたす (Ando et al., 2000c)。これは無酸素下でも起こるので、タンパク質の変性を介して起こる反応のようである。このような性質に加えて、sesamol は dimethylamine と亜硝酸の反応に関与し、nitroso 化を受けて変異原性をもつ nitrosos sesamol になる。Nitrosos sesamol は nitrosamine の生成に触媒的にはたらく (Kurechi et al., 1979) とともに、有酸素条件下、cysteine などの存在下で活性酸素を発生して DNA 鎖切断を起こす (Fig. 3) (Kikugawa et al., 1995)。

醤油中 monophenolic の tyramine と亜硝酸の反応によって生成する diazotyramine、燻煙に含まれる phenol の反応から生成する diazoquinone などの diazo 体は直接的な変異原性を示す。Diazoquinone は非酵素的に炭素中心ラジカルを発生して、DNA の adenine, guanine 塩基を修飾し、DNA の鎖切断を起こす。Diazoquinone の DNA 傷害反応は ethanol によって阻害されるが、炭素中

Fig. 4 Structures of hydroxyfuranones and HHQ

心ラジカルが消去されるためと考えられる。このように、monophenolic のなかには亜硝酸塩との反応において nitrosamine の生成に影響を与えるものがあるが、自身が有害な物質に変化するものが多い。

タンパク質、タンパク質加水分解物およびアミノ酸は、dimethylamine と亜硝酸との反応による dimethylnitrosamine の生成、phenol と亜硝酸との反応による diazoquinone の生成を阻害した (Kikugawa and Kato, 1992)。この反応においては、タンパク質は tyrosine 残基と lysine 残基の反応によると思われる架橋を生成し、tyrosine は diazo 体および nitro 体を、cysteine は S-nitroso 体を、tryptophan は nitroso 体を与え、多くのアミノ基は脱アミノ化反応を受けていると考えられた。胃内では、食物中に多量に存在するタンパク質やその消化物によって、亜硝酸の反応が複雑に影響を受ける可能性がある。これらの事実から、硝酸塩との食べ合せにおける変異原の低減において、polyphenolic, monophenolic の利点は少ないようであり、むしろ有害の面がありそうである。

4. Maillard 反応により生成する reductone の prooxidant 作用

Maillard 反応によって生成する還元性 hydroxyfuranone 類には antioxidant と prooxidant としての作用がある。醤油を supercoil 状の plasmid DNA の中性溶液にたらすと、DNA 鎖切断が観察された。鎖切断を引き起こす成分は Fig. 4 に示す還元性をもつ hydroxyfuranone 誘導体の DMHF, HMF, HEMF であった。これらは醤油の中で Maillard 反応によって生成し、醤油の芳香をかもしだしている芳香成分であった。モデル系の glucose/glycine の Maillard 反応によっても DNA 鎖切断を起こす同種の HHMF, DDMP が単離された (菊川ら, 1996; Kikugawa et al., 1999b; 菊川ら, 2000; 平本, 2002)。これらは、醤油や Maillard 反応溶液中では弱酸性であるために安定に存在するが、中性溶液中では加水分解を起こし、鉄イオンを還元し、自動酸化を起こして過酸化水素さらには hydroxyl radical を発生して DNA 鎖切断を引き起こす。ここでは、reductone が有酸素条件下、prooxidant としてはたらくことになる。これら hydroxyfuranone 類は Ames 試験による変異原性試験でも弱いな

Fig. 5 Levels of TBARS obtained by -EDTA assay (slashed bars) and +EDTA assay (white bars) in lung of mice supplemented with a normal diet (C), a diet containing DMHF (DMHF) and a diet containing HHQ (HHQ)

Fig. 6 Effect of DMHF and HHQ supplementation on draining auricular lymph node cell proliferation of mouse induced by painting DNCB on ears

が陽性を示した。ところが、HEMFは鉄や銅イオンで惹起される赤血球膜やLDLの脂質過酸化に対しては抑制的にantioxidantとしてはたらいだ (Ando et al., 2000b)。In vitroでは、hydroxyfuranone類はDNAに対してはprooxidantとして、脂質に対してはantioxidantとしてはたらき、対象によって作用が全く異なることを示している。

Hydroxyfuranone類はいずれも、マウスに経口投与すると、血中に速やかに吸収され、末梢血に小核が出現した (菊川ら, 2000)。また、DMHFをマウスに経口投与すると、酸素分圧が比較的高い肺に脂質過酸化が誘導され、in vivoでは脂質に対してprooxidantとしてはたらくことを示している (Fig. 5) (Mi et al., 2001)。さらに、DMHFの投与はマウスのallergenで誘発されるIおよびIV型アレルギー反応を増悪するという結果が得られた。マウスにDMHFを経口投与することによって耳に2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) を塗布することによる

Fig. 7 Effect of DMHF and HHQ supplementation on serum IgE of mouse induced by painting DNCB and TMA on flanks

リンパ球増殖を亢進し、IV型アレルギー反応を増悪した (Fig. 6)。さらに、マウスの横腹にDNCBまたはtrimellitic anhydride (TMA) を塗布することによる血清IgEの増大も亢進し、I型アレルギー反応も増悪した (Fig. 7)。

5. Polyphenolicのprooxidant作用

Hydroxyhydroquinone (HHQ) (Fig. 4) は最も低分子で還元性の強いpolyphenolicであり、強いprooxidant作用を示す。コーヒーを部分精製し、supercoil状のDNAに添加したところ、DNAの鎖切断が認められた。切断活性をもつ成分はHHQであった。HHQはコーヒー煎り豆や弱酸性のコーヒー中では安定であるが、中性溶液では自動酸化を起こし、1 molのHHQから0.5-0.6 molの過酸化水素を発生し、容易にDNA鎖を切断し傷害的にはたらいだ (菊川ら, 2000; 平本, 2002)。

コーヒー中に過酸化水素が発生することは以前から知られており、その量は他の飲食物に比べて極めて多く、一杯のコーヒーに約400 μmol発生することが分かっている。シンガポール (Long and Halliwell, 2000) や、筆者らの実験 (平本, 2002) で、一杯のコーヒーを飲むと30分から2時間の間に10%の過酸化水素が尿中に排泄されることが分かった。コーヒー飲用後、尿に排泄されなかった過酸化水素は体内で酸化的ストレスを与えたのか、それとも体内の過酸化水素消去系によって消去されたのかは不明である。加工食品の殺菌剤として用いられる過酸化水素は、かつて発がん性があるとの理由から、最終食品に残存しないという使用基準が設定され、現在では事実上禁止になっている。それにもかかわらず、通

常の食生活におけるコーヒーの飲用によって多量の過酸化水素を摂取していることになる。

HHQはbenzeneの代謝物でもあることから、その毒性が調べられているが、変異原性陽性 (Lin and Lee, 1992), ヒトリンパ球のin vitro小核試験なども陽性 (Erexson et al., 1985; Chung et al., 2002) とされている。筆者らがマウスに経口投与し末梢血の小核試験を行った結果では陰性であった (加藤ら, 2003)。しかし、マウスの投与によって肺の脂質過酸化の亢進がみられ (Fig. 5) (Mi et al., 2001), ラットの経口投与においても、肺、心臓の脂質過酸化が亢進し (Yasuhara et al., 2002), 酸化的ストレスが惹起されていることが認められた。8-OHdGを指標としたラット肺、心臓のDNA傷害の亢進はなく、HHQで誘導される酸化的ストレスの影響はDNAまで到達していないことを示している。大気下でのHHQのDNA傷害性はin vivoでは必ずしも現れないことを示している。

HHQはDMHFと同様に、その投与がマウスのallergenで誘発されるIおよびIV型アレルギー反応を増悪した。マウスにHHQを経口投与することによって、耳にDNCBを塗布することによる所属リンパ節のリンパ球増殖を亢進し、IV型アレルギー反応を増悪した (Fig. 6)。また、マウスの横腹にDNCBまたはTMAを塗布することによる血清IgEの増大も亢進し、I型アレルギー反応をも増悪した (Fig. 7)。この結果はDMHFと全く同様であった。構造的に類似性はないが、prooxidantとして作用するreductoneとしての共通性をもつHHQとDMHFが、ともにアレルギー反応を増悪するのは、reductoneがアレルギーの増悪反応に関係していることを示唆している。

活性酸素hydroxyl radicalはmonophenolicやpolyphenolicによって消去されるが、polyphenolicがhydroxyl radicalを産生するという報告もある。EGCやEGCGなどの茶葉polyphenolicはhydroxyl radicalによるDNA鎖切断作用を増強し、hydroxyl radicalを増産している可能性がある (Hiramoto et al., 1996)。また、EGCGなどはin vitroの中性溶液中で過酸化水素を発生することも示されている (Long et al., 2000; Yang et al., 2000)。HHQだけでなく、他のpolyphenolicも酸化的ストレスを与えるprooxidantとしてはたらくことがありそうである。

6. β -Caroteneの活性窒素酸化物捕捉作用

β -Caroteneなどのcarotenoidは1重項酸素を捕捉するantioxidantであり、がん予防の面から検討が進められているが、 β -caroteneの臨床介入試験では、喫煙者の肺がんの死亡率を上昇させた。 β -Caroteneの酸化的分解についてはよく分かっていない点が多いが、筆者らの若干の知見を紹介する。 β -Caroteneは黄色の酸化に弱い成分で、

他のantioxidantやPUFAに比較して、空気中で容易に分解して退色する。空気中に保存またはNO₂に曝すと、PUFAの酸化によって生じるaldehyde類からなるthio-barbituric acid陽性物質を生じ (Kikugawa et al., 1999a), 他のantioxidantに比べて、効率よくNO₂やperoxynitrite (ONOO⁻)の活性窒素酸化物種を捕捉した (Kikugawa et al., 1997)。 β -CaroteneはONOO⁻による細胞内DNAの分解を阻害したが (Hiramoto et al., 1999), その一方で、NO₂との反応によって生成するnitrotyrosineの分解を促進する (Kikugawa et al., 1999c)などの破壊的な作用も示した。 β -Caroteneは1重項酸素や活性窒素酸化物を捕捉するが、その結果生成する成分の有害性についてさらなる検討が必要であろう。

7. PUFAのantioxidant作用

これまでの報告では、PUFAは活性酸素などによる酸化的ストレスによって反応性の高いPUFA peroxy radicalとなって、酸化的ストレスを増幅し、DNA傷害を亢進することを印象づけていた。これに対し、筆者らは、PUFAは活性酸素などによる酸化的ストレスを減弱し、DNA傷害を保護しているとの結果を得た。筆者らは、大気下で相対的に酸化を受けにくいn-6系のサフラワー油と、酸化を受けやすいn-3系の魚油を十分量の α -tocopherolとともにラットに投与した。とりだした組織の脂肪酸組成はそれぞれn-6およびn-3 richであった。組織をとりだした直後の脂質過酸化度は、両食餌群間で相違はなく、生体内の通常の酸化的ストレスではn-3系魚油の摂取が脂質過酸化を亢進することはなかった (Ando et al., 1998; Ando et al., 2000a)。酸素分圧が低くなると脂質過酸化が抑えられ、 α -tocopherolの効果も増強するというin vitroの実験結果 (Hiramoto et al., 2002) から、酸素分圧が低いin vivoでは大気下と同様には脂質過酸化が亢進することはないと解釈された。もちろん、とりだした組織を大気下で酸化的ストレスに曝すと、n-3系の組織の方が、n-6系組織より脂質過酸化が亢進した。

両食餌群のラットの肝細胞をとりだした後in vitroで過酸化水素処理して酸化的ストレスを惹起した場合 (Kikugawa et al., 2003a) も、腹腔に鉄を投与してin vivoで強制的に酸化的ストレスを惹起した場合 (Kikugawa et al., 2003b) もともに、魚油群の方がサフラワー油群より肝細胞の脂質過酸化が亢進し、コメットアッセイおよび8-HO-dGの生成でみた肝細胞のDNA傷害は逆に抑制された。裸のDNAを用いたin vitroの実験でも同様であった (Hiramoto et al., 2003)。これまでの報告にあるようにPUFA hydroperoxideはDNA鎖切断活性を示した。しかし、未酸化のPUFAは活性酸素種などのfree radicalによるDNA鎖切断を阻害し、自身が酸化されることによって、free radicalによるDNA鎖切断活性を減

弱していることが分かった。In vitroでも、PUFAは酸化的ストレスによって酸化されるが、DNA傷害を保護していることを示している。体内のPUFAの酸化によって生じるPUFA peroxy radicalは α -tocopherolから水素を供与されてPUFA hydroperoxideとなることによって、DNAの酸化的傷害に対してantioxidantとしてはたらくことが示された。

結 語

Antioxidantは酸化的ストレスを軽減する作用、亜硝酸による有害物質生成を阻止するなどの有益な作用を示すことが多い。しかし、antioxidantは条件によってprooxidantとして酸化的ストレスを惹起したり、亜硝酸との反応によって別の有害物質をつくることもある。Prooxidant作用があるものは酸素分圧が低い生体内でもprooxidantとしてはたらく可能性がある。また、大気下では酸化を起こしやすく有害な過酸化物をつくるPUFAも生体内では酸化的ストレスからDNAを保護するantioxidantとしてはたらく側面ももっている。Antioxidantはこのように多様な作用をもっているため、その評価においてはより慎重に対処すべきであろう。

参考文献

- Ando, K., K. Nagata, M. Beppu, K. Kikugawa, T. Kawabata, K. Hasegawa and M. Suzuki (1998) Effect of n-3 fatty acid supplementation on lipid peroxidation and protein aggregation in rat erythrocyte membranes, *Lipids*, 33, 505-512.
- Ando, K., K. Nagata, R. Yoshida, K. Kikugawa and M. Suzuki (2000a) Effect of n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on lipid peroxidation of rat organs, *Lipids*, 35, 401-407.
- Ando, K., K. Ogawa, X. Li and K. Kikugawa (2000b) Inhibition of iron ion-induced oxidative damage of erythrocyte membranes and low density lipoprotein by a Maillard product 4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3 (2H)-furanone (HEMF), *Biol. Pharm. Bull.*, 23, 689-694.
- Ando, K., K. Sako, M. Takahashi, M. Beppu and K. Kikugawa (2000c) Increased band 3 protein aggregation and anti-band 3 binding of erythrocyte membranes on treatment with sesamol, *Biol. Pharm. Bull.*, 23, 159-164.
- Chung, H.W., S.J. Kang and S.Y. Kim (2002) A combination of micronuclei assay and FISH evaluation of the genotoxicity of 1,2,4-benzene triol, *Mutat. Res.*, 516, 49-56.
- Erexson, G.L., J. Wilmer, L. James and A.D. Kligerman (1985) Sister chromatid exchange induction in human lymphocytes exposed to benzene and its metabolites in vitro, *Cancer Res.*, 45, 2471-2477.
- 平本一幸 (2002) フリーラジカルを経由する環境変異・発がん物質の生成と発現に関する研究, *環境変異原研究*, 24, 91-98.
- Hiramoto, K., R. Mochizuki and K. Kikugawa (2002) Mouse liver microsomal lipid peroxidation and antioxidant effect of α -tocopherol at the low oxygen concentration, *J. Oleo Sci.*, 51, 577-581.
- Hiramoto, K., N. Ojima, K. Sako and K. Kikugawa (1996) Effect of plant polyphenolics on the formation of the spin adduct of hydroxyl radical and the DNA strand breaking by hydroxyl radical, *Biol. Pharm. Bull.*, 19, 558-563.
- Hiramoto, K., S. Tomiyama and K. Kikugawa (1999) Effective inhibition by β -carotene of cellular DNA breaking induced by peroxynitrous acid, *Free Rad. Res.*, 30, 21-27.
- Hiramoto, K., Y. Yasuhara, K.-I. Sako, K. Aoki and K. Kikugawa (2003) Suppression of free radical-induced DNA strand breaks by linoleic acid and low density lipoprotein in vitro, *Biol. Pharm. Bull.*, 26, 1129-1134.
- Kato, T., T. Harashima, N. Moriya, K. Kikugawa and K. Hiramoto (1996) Formation of the mutagenic/carcinogenic imidazoquinoline-type heterocyclic amines through the unstable free radical Maillard intermediates and its inhibition by phenolic antioxidants, *Carcinogenesis*, 17, 2400-2470.
- Kato, T., K. Hiramoto and K. Kikugawa (2000) Mutagenicity of cooked hamburger is reduced by addition of ascorbate and erythorbate to ground beef, *J. Health Science*, 46, 389-392.
- Kato, T. and K. Kikugawa (1999) Attempt to decrease the mutagenicity of smoked and dried bonito (katsubushi) in green tea extract, *J. Health Sci.*, 45, 130-133.
- 加藤哲太, 佐々木善信, 平本一幸, 菊川清見 (2003) コーヒーに存在するhydroxyhydroquinoneは小核を誘発するか, *日本薬学会第123年会*.
- 菊川清見 (1992) 食品・医薬品由来の変異原物質の分離・同定とその生成機構, *環境変異原研究*, 14, 25-32.
- Kikugawa, K. (1999) Involvement of free radicals in the formation of heterocyclic amines and prevention by antioxidants, *Cancer Lett.*, 143, 123-126.
- 菊川清見 (2003) 食品中の変異・発がん物質を低減する, *FFIジャーナル*, 208, 174-183.
- 菊川清見, 平本一幸, 加藤哲太 (1996) 食品におけるフリーラジカル性変異原の生成とその阻止, *環境変異原研究*, 18, 47-51.
- 菊川清見, 平本一幸, 加藤哲太 (2000) フリーラジカルを経由する変異・発がん物質の生成と発現, *環境変異原研究*, 22, 149-154.
- Kikugawa, K., K. Hiramoto and A. Hiramoto (1999a) β -Carotene generates thiobarbituric acid-reactive substances by interaction with nitrogen dioxide in air, *Free Rad. Res.*, 31, 517-523.
- Kikugawa, K., K. Hiramoto and T. Kato (1999b) Generation of oxygen-derived radicals in the Maillard reaction that induce DNA strand cleavage, *Recent Res. Devel. Agric. Food Chem.*, 2, 237-257.
- Kikugawa, K., K. Hiramoto, N. Ojima, H. Ni-yama and T. Kato (1995) Mutagenicity and DNA strand breaking activity of nitrosos sesamol derived from sesamol, *J. Jpn Oil Chem. Soc.*, 44, 1041-1049.
- Kikugawa, K., K. Hiramoto, S. Tomiyama and Y. Asano (1997) β -Carotene effectively scavenges toxic nitrogen oxides: nitrogen dioxide and peroxynitrous acid, *FEBS Lett.*, 404, 175-178.
- Kikugawa, K., K. Hiramoto, S. Tomiyama and K. Nakauchi (1999c) Effect of β -carotene on the transformation of tyrosine by nitrogen dioxide and peroxynitrous acid, *Free Rad. Res.*, 30, 37-43.
- Kikugawa, K. and T. Kato (1991) Prevention of nitrosamine formation, In: H. Hayatsu (Ed), *Mutagens in Food: Detection and Prevention*, CRC Press, Boca Raton, pp. 205-217.
- Kikugawa, K. and T. Kato (1992) Proteins and amino acids as scavengers of nitrite: Inhibitory effect on the formation of nitrosodimethylamine and diazoquinone, *Fd. Chem. Toxicol.*, 30, 617-626.
- Kikugawa, K., T. Kato, K. Hiramoto, C. Takada, M. Tanaka, Y. Maeda and T. Ishihara (1999d) Participation of the pyrazine cation radical in the formation of mutagens in the reaction of glucose/glycine/creatinine, *Mutat. Res.*, 444, 133-144.

- Kikugawa, K. and M. Nagao (1991) Nitrosatable precursors of mutagens in foods, In: H. Hayatsu (Ed), *Mutagenes in Food: Detection and Prevention*, CRC Press, Boca Raton, pp. 67-85.
- Kikugawa, K., Y. Yasuhara, K. Ando, K. Koyama, K. Hiramoto and M. Suzuki (2003a) Effect of supplementation of n-3 polyunsaturated fatty acids on oxidative stress-induced DNA damage of rat hepatocytes, *Biol. Pharm. Bull.*, 26, 1239-1244.
- Kikugawa, K., Y. Yasuhara, K. Ando, K. Koyama, K. Hiramoto and M. Suzuki (2003b) Protective effect of supplementation of fish oil with high n-3 polyunsaturated fatty acids against oxidative stress-induced DNA damage of rat liver in vivo, *J. Agric. Food Chem.*, 51, 6073-6079.
- Kinae, N., M. Furugori, H. Takemura, M. Iwazaki, K. Shimoi and K. Wakabayashi (1997) Inhibitory effect of tea extracts on the formation of heterocyclic amines during cooking of hamburger, In: H. Ohigashi, T. Osawa, J. Terao, S. Watanabe, T. Yoshikawa (Eds), *Food Factors for Cancer Prevention*, Springer, Tokyo, pp. 142-146.
- 木苗直秀, 増田 修 (2002) 抗変異原に関する研究, *環境変異原研究*, 24, 129-144.
- Kurechi, T., K. Kikugawa and T. Kato (1979) C-Nitrosation of sesamol and its effects on N-nitrosamine formation in vitro, *Chem. Pharm. Bull.*, 27, 2442-2449.
- Kurechi, T., K. Kikugawa and A. Nishizawa (1980) Transformation of hemoglobin A into methemoglobin by sesamol, *Life Sci.*, 26, 1675-1681.
- 黒田行昭, 原 征彦 (1999a) 茶カテキン類の抗変異原性および抗発がん性 (I), *環境変異原研究*, 21, 1-10.
- 黒田行昭, 原 征彦 (1999b) 茶カテキン類の抗変異原性および抗発がん性 (II), *環境変異原研究*, 21, 85-94.
- Lin, L.K. and S.F. Lee (1992) Enhancement of the mutagenicity of polyphenols by chlorination and nitrosation in *Salmonella typhimurium*, *Mutat. Res.*, 269, 217-224.
- Long, L.H. and B. Halliwell (2000) Coffee drinking increases levels of urinary hydrogen peroxide detected in health human volunteers, *Free Rad. Res.*, 32, 463-467.
- Long, L.H., C. Veronique and B. Halliwell (2000) Artifacts in cell culture: Rapid generation of hydrogen peroxide on addition of (-) epicatechin, (+) epicatechin gallate, (-) catechin and quercetin to commonly used cell culture medium, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 273, 50-53.
- Mi, H., K. Hiramoto, K. Kujirai, K. Ando, Y. Ikarashi and K. Kikugawa (2001) Effect of food reductones, 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3 (2H)-furanone (DMHF) and hydroxyhydroquinone (HHQ), on lipid peroxidation and type IV and I allergy responses of mouse, *J. Agric Food Chem.*, 49, 4950-4955.
- 長尾美奈子 (2001) 食品中のHCAはヒトの発がん物質か? FFI ジャーナル, 194, 25-32.
- Oguri, A., M. Suda, Y. Totsuka, T. Sugimura and K. Wakabayashi (1998) Inhibitory effects of antioxidants on formation of heterocyclic amines, *Mutat. Res.*, 402, 237-245.
- 菅沼雅実, 岡部幸子, 藤木博太 (1996) 茶ポリフェノールによる発がん抑制機構, *環境変異原研究*, 19, 193-198.
- Urano, M., M. Tateyama, M. Sakai, T. Kato, K. Kikugawa and T. Kurechi (1994) Effect of tert-butylhydroquinone (TBHQ) on the formations of nitrosamines in the reactions of secondary amines and nitrite, *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, 40, 504-512.
- Yang, J.Y., J. Liao, C. Li, J. Chung, E.J. Yurkow, C.-T. Ho and C.S. Yang (2000) Effect of black and green tea polyphenolics on c-jun phosphorylation and H₂O₂ production in transformation and non-transformed human bronchial cell lines. Possible mechanisms of cell growth inhibition and apoptosis inhibition, *Carcinogenesis*, 21, 2035-2039.
- Yasuhara, Y., K. Ando, K. Koyama, K. Hiramoto and K. Kikugawa (2002) Effect of supplementation of a reduction e in coffee, hydroxyhydroquinone, on lipid peroxidation and DNA damage of rat organs, *J. Oleo Sci.*, 51, 669-675.
- Weisburger, J.H., M. Nagao, K. Wakabayashi and A. Oguri (1994) Prevention of heterocyclic amine formation by tea and tea polyphenols, *Cancer Lett.*, 83, 143-147.
- Weisburger, J.H., E. Veliath, E. Larios, B. Pittman, E. Zabg and Y. Hara (2002) Tea polyphenols inhibit the formation of mutagens during the cooking of meat, *Mutat. Res.*, 516, 19-22.