〔衛生化学〕
EISEI KAGAKU
35 (6) 433-443 (1989)

芍薬成分のベンゾ [*a*] ピレンに対する抗変異原性作用

坂井至通,^a 小瀬洋喜,^b 永瀬久光,^c 鬼頭英明,^c

佐藤孝彦,^c 河合 信,^a 水野瑞夫^c

岐阜県衛生研究所,^a 岐阜市立女子短期大学,^b 岐阜薬科大学^c

Effects of Constituents of Paeony Root on the Mutagenicity of Benzo [*a*] pyrene

YOSHIMICHI SAKAI,^a YOUKI OSE,^b HISAMITSU NAGASE,^c HIDEAKI KITO,^c

TAKAHIKO SATO,^c MAKOTO KAWAI^a and MIZUO MIZUNO^c

Gifu Prefectural Institute of Public Health,^a 4-6-3 Noishiki, Gifu 500, Japan,

Gifu City Womens' College,^b 2693 Nagara-fukumitsu, Gifu 502, Japan and

Gifu Pharmaceutical University,^c 5-6-1 Mitahora-higashi, Gifu 502, Japan

(Received May 22, 1989)

Ethyl acetate, *n*-butanol and water extracts were prepared from a hot-water extract of Paeony root, which shows strong antimutagenic activity for benzo[*a*]pyrene (B[*a*]p). Among them, ethyl acetate and *n*-butanol extracts showed the antimutagenicity. The ethyl acetate extract was fractionated to 20 fractions (Fr.1-20) with Sephadex LH-20, and the *n*-butanol extract to 6 fractions (Fr.21-26) with preparative high performance liquid chromatography (HPLC). Antimutagenic activity was observed in Fr.2, Fr.9-12, and Fr.22. Gallic acid (GA) was found in Fr.2 and Fr.22, and pentagalloyl glucose (PGG) in Fr.9-12. The amounts of GA and PGG in Paeony root extract were determined by HPLC, and the antimutagenic activity of these extracts were attributable to GA and PGG.

Antimutagenic effects of GA and PGG were explored in the following points. They are (I) reaction and adsorption of B[*a*]p with GA and PGG, (II) inhibition of the enzymatic activity of S9mix by GA and PGG, (III) inactivation of the metabolites of B[*a*]p by GA and PGG, and (IV) bio-antimutagenic effect of GA and PGG on DNA damaged bacteria.

GA and PGG inactivated the metabolites of B[*a*]p, and PGG inhibited the enzymatic action of S9mix. Their inhibitory effect was recognized as desmutagenic action.

Keywords — paeony root; gallic acid; pentagalloyl glucose; *Salmonella typhimurium* TA98; benzo[*a*]pyrene; antimutagenicity; desmutagenic effect

緒 言

近年、環境中に存在する化学物質の人体に対する発ガン性、変異原性など遺伝毒性が問題となっている。このため、変異原性を抑制する物質の検索が注目されている。Arimoto らが血液中のビリルビン¹⁾や野菜中のクロロフィリン、²⁾ 賀田 らが種々の野菜ジュース³⁾や胎盤エキス⁴⁾など、動植物中に抗変異原性成分の存在を認めて以来、オレイン酸、⁵⁾ リボフラビン、⁶⁾ ビタミン A⁷⁾ などに抗変異原性作用が見いだされている。また、生薬中の抗変異原性成分と

して、coumarin と umbelliferone,⁸⁾ gingerol,⁹⁾ protoanemonine,¹⁰⁾ enmein,¹¹⁾ cinnamaldehyde,¹²⁾ glabrene,¹³⁾ vanillin¹⁴⁾ 等が報告されている。著者ら¹⁵⁾ は、漢方薬に繁用されている 18 種の生薬エキスや中国で扶正固本薬として使用される 63 種の中草薬エキスについて、benzo[*a*]pyrene (以下 B[*a*]p と略す) に対する抗変異原性作用をスクリーニングし、芍薬、茯苓、桂皮などに抗変異原活性を認めた。そこで本報では、芍薬エキス中の抗変異原性成分の分離とその作用機構について検討した。

芍薬の有効成分としては、ガロタンニン、ペオニ

フロリン (以下 Pf と略す) など¹⁶⁾ が知られており、前者の分離には酢酸エチル¹⁷⁾ が、後者には *n*-ブタノール¹⁸⁾ による抽出が利用されている。そこで、これらの溶媒を用いて、芍薬エキスを酢酸エチルエキス、*n*-ブタノールエキス、水エキスを分離し、それぞれの抗変異原活性を試験し、更に抗変異原性成分の確認を行った。

実験方法

1. 試薬及び試料 没食子酸 (以下 GA と略す、半井化学薬品製)、タンニン酸 (以下 TA と略す、小宗化学薬品製) は試薬一級品を、Pf (和光純薬工業製) は生薬成分分析用標品を、安息香酸 (以下 BA と略す、東京化成工業製)、B[a]p (和光純薬工業製) は、試薬特級をそれぞれ用いた。ペンタガロイルグルコース (以下 PGG と略す) は、西沢らの方法¹⁹⁾ により TA より分離精製した。芍薬 (*Paeonia lactiflora* PALLAS) は、アルプス薬品工業 (株) より局方適合品を購入した。

2. 芍薬エキスの調製 芍薬約 500 g を蒸留水 2 l に 30 分浸したのち、95–100°C で 3 時間加熱し、冷後東洋ろ紙 No. 2 で吸引ろ過した。この操作を 2 回繰り返して、得られた熱水抽出液をロータリーエバポレーター (減圧下、20–25 mmHg, 水温 45°C 以下) で水分を留去し芍薬エキスとした。

3. 芍薬エキスの溶媒分画 芍薬エキス約 50 g を蒸留水 100 ml に溶解したのち、分液ロートに 100 ml 酢酸エチル 500 ml を加えて約 1 時間振盪した。酢酸エチル層を分取し、残った水層に新たに酢酸エチル 500 ml を加えて同様に操作した。酢酸エチル層が無色透明になるまで抽出操作を繰り返した。酢酸エチル処理後の水層に *n*-ブタノール 500 ml を加えて、酢酸エチル抽出の場合と同様に繰り返し抽出した。集めた酢酸エチル層及び *n*-ブタノール層は、それぞれロータリーエバポレーター (減圧下 20–25 mmHg, 水温 20°C 以下) で溶媒を留去して酢酸エチルエキス及び *n*-ブタノールエキスを得た。*n*-ブタノール抽出を繰り返したのちの水層は、凍結乾燥して水エキスとした。

4. セファデックス LH-20 による酢酸エチルエキスの分画 セファデックス LH-20 (Pharmacia) 100 g を脱イオン蒸留水 300 ml で数回攪拌、洗浄したのち吸引ろ過 (東洋ろ紙 No. 2) した。次いでエタノール 300 ml で 2 回洗浄したのち、エタノール中に懸濁させ、減圧下で脱気した。これをガラスカラム (25 mm i.d. × 380 mm) に充填してセファデッ

クスカラムを調製した。酢酸エチルエキス約 3 g をエタノール 50 ml に溶解し、セファデックス LH-20 カラムに入れ、吸着させたのち、エタノール、ついで Table I に示す混合比のエタノール–蒸留水、更にエタノール–蒸留水–アセトンの混液で順次溶出し 20 のフラクション (Fr.1–20) を得た。各々のフラクションは、ロータリーエバポレーター (減圧下 20–25 mmHg, 水温 45°C 以下) で溶媒を留去した。

5. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による *n*-ブタノールエキスの分画 HPLC 装置としては、ガスクロ工業 (株) の分取用 HPLC システム (送液ポンプ; モデル 572, 検出器; UV-VIS ディテクター, モデル 502 u) を用いた。分離カラムには、Inertsil-ODS (26 mm i.d. × 300 mm, 粒子径 10 µm, ガスクロ工業製) を用いた。溶離液としては、アセトニトリル–水 (2:8) 混液に、最終濃度が 0.1% となるようにシュウ酸を添加し、超音波発生装置により減圧下で脱気したものを用いた。

n-ブタノールエキス 3 g を蒸留水 30 ml に溶解し、その 200 µl を注入し、流速 10 ml/min で溶離させ、検出波長 254 nm を用いフルスケール (0.16 a.u. f.s.) の 25% 以下をカットして検出したピークを、フラクションコレクター (オートフラクションコレクター, モデル 1593, ガスクロ工業製) で分取し 6 フラクション (Fr.21–26) を得た。この操作を繰り返し、各フラクションを集めたのち、ロータリーエバポレーターで減圧 (20–25 mmHg, 水温 20°C 以下) 下、溶媒を留去し、ソーダ石灰を入れたデシケーターで一昼夜減圧乾燥した。

6. HPLC による Pf, PGG, GA 及び BA の定量 PGG, GA, Pf 及び BA の各々 10 mg を精密に量り蒸留水にとかし、正確に 50 ml として標準溶液を調製した。また、芍薬エキス 50 mg, 酢酸エチルエキス 10 mg, *n*-ブタノールエキス 10 mg, 及び水エキス 10 mg をそれぞれ精密に量り、同様に蒸留水に溶解し試料溶液 50 ml を調製した。各溶液 10 µl について、GA と PGG は Nishizawa ら¹⁷⁾ の方法に準じて、LiChrosorb RP 18 カラム (4.6 mm i.d. × 250 mm, 粒子径 5 µm, Merck), 移動相としてアセトニトリル–水混液 (22:78, シュウ酸, 1 g/l) を用い、流速は 1.0 ml/min, 検出波長 254 nm で、また Pf と BA は、浅川ら¹⁸⁾ の方法に準じて、Inertsil-ODS カラム (4.6 mm i.d. × 250 mm, 粒子径 5 µm, ガスクロ工業製), 移動相としてアセトニトリル–水–酢酸混液 (15:85:1), 流速は 1.0 ml/min, 検出波長 254 nm で測定しピーク面積より定量した。

7. 抗変異原性試験 前報¹⁵⁾に従って実施した。すなわち、各エキス約5 gを0.1 M-リン酸緩衝液(pH 7.4) (以下、特に調製法を述べるとき以外単にリン酸緩衝液とする) 10 mlに溶解したのち希釈して、50, 20, 5, 0.5 mg/0.1 mlの溶液を調製した。GAとBAは各10 mgを精密に量り、リン酸緩衝液に溶解し1.0 mlとしたのち、1, 0.5, 0.1, 0.01 mg/0.1 mlの溶液を、また、PGGとPfは各5 mgを精密に量り、リン酸緩衝液に溶解して1.0 mlとしたのち、0.5, 0.25, 0.05, 0.005 mg/0.1 mlの溶液を、更にFr.1-26は1 mg/0.1 mlの溶液を調製した。各エキス又は標準溶液0.1 mlについて、5 μ gのB[a]pを用い、*Salmonella typhimurium* TA 98にS9 mix 0.5 mlを加え、プレインキュベーション法によって変異原性試験を行い、復帰変異コロニー数を求めた。S9 mixは、PCB処理したラット肝より調製して使用した。

なお復帰変異コロニー数の減少が、殺菌作用によるものでないことを確認するため、希釈した菌懸濁液をB-2培地で37°C、一晚培養し生菌数を測定した。

8. 作用機作の検討 8.1 有効成分との反応によるB[a]pの減少——PGG, GAのリン酸緩衝液(各5 mg/ml) 1 ml及び対照としてリン酸緩衝液1 mlを、それぞれネジロ遠沈管(10 ml)に取り、B[a]p 50 μ gを加えた。遠沈管は37°Cで20分間振盪した。各溶液に酢酸エチル2 mlを加え、十分に混合した。約1時間放置したのち、3000 rpmで10分間遠心分離し、-20°Cで静置して水層を凍結させ、上層の酢酸エチル層を分取した。更に解凍した水層に、酢酸エチル2 mlを加え、同様に操作した。酢酸エチル層を合わせ、無水硫酸ナトリウム1 gを加え脱水した。これを試料溶液とし、ガスクロマトグラフ(GC)法でB[a]p量を測定した。

GC分析は、3%SE-30で被覆したクロモソルブW(AW-DMCS, 60-80メッシュ)を充填したガラスカラム管(3 mm i.d. $\times$ 2 m)を用い、キャリアガスとして窒素ガス(1.5 kg/cm²)、カラム温度249°CでF.I.D.(島津4 BM)を用いて分析した。各試料溶液は5 μ lを注入した。

8.2 B[a]p代謝抑制試験——PGG, GAのリン酸緩衝液(各5 mg/ml) 1 ml及び対照としてリン酸緩衝液1 mlに、それぞれB[a]p 50 μ g添加したのち、S9 mix 5 mlずつを加え、8.1と同様に操作し未代謝のB[a]p量をGC法により測定した。

8.3 ラット肝ミクロソーム(S9 mix)に対する作

用——GA, PGGを精密に量り、それぞれ1 mg/mlになるようリン酸緩衝液に溶解した。また、酢酸エチルエキス、*n*-ブタノールエキス、水エキスを50 mg/mlになるようリン酸緩衝液に溶解した。それぞれミリポアフィルターによってろ過滅菌して試料溶液とし、その0.1 mlにS9 mix 5 mlを添加したものの、及び対照として滅菌したリン酸緩衝液0.1 mlにS9 mix 5 mlを添加したものをそれぞれ2本ずつ作成し、滅菌した超高速遠心分離用チューブに入れ、105000 $\times g$ で60分遠心分離した。遠心分離後の上清は、沈澱物が混入しないようにピペットで分取し、1本の試料溶液の上清を、対照液の沈澱物と合わせた。また、対照液の上清を、試料溶液の沈澱物と合わせた。それぞれの混合液をピペットで穏やかにかき混ぜ沈澱物を再溶解し、B[a]p 5 μ gを加え抗変異原性試験を行った。

また、別に遠心分離した対照液の上清をそのまま使用して、沈澱物にはS9 mix調製時のS9以外のコファクターで再溶解して、それぞれにB[a]p 5 μ gを加え抗変異原性試験を行った。これらの再溶解操作は氷水中で行った。

8.4 B[a]p代謝物に対する作用——B[a]pをあらかじめS9 mixで代謝させたのち、試料を添加し20分インキュベートし、7. 抗変異原性試験に準じて操作した。

また、20分インキュベート後の未代謝B[a]p量は、B[a]p 50 μ gに、S9 mix 5 mlずつを加え37°C、20分インキュベートし、それぞれにPGG, GAのリン酸緩衝液(各5 mg/ml) 1 ml及び対照としてリン酸緩衝液1 mlを添加し、8.1と同様に操作して未代謝のB[a]p量をGC法により測定した。

8.5 DNA損傷変異菌に対する試験——i) *Salmonella typhimurium* 菌の培養：L字管を用い、*Salmonella typhimurium* TA 98菌を37°Cで振盪しながら15-16時間培養した。この菌懸濁液120 mlを4500 rpmで、10分間遠心分離し上清を除去した菌体に、リン酸緩衝液(pH 6.9) 100 mlを加え攪拌洗浄し、4500 rpmで10分間遠心分離を行い、沈澱した菌体を得た。この操作を2回繰り返して前培養液を洗い落としたのち、リン酸緩衝液を60 ml加え菌懸濁液(A)を得た。

ii) B[a]p代謝産物の分離：B[a]pの3000 μ g/1.0 ml DMSO溶液とS9 mix 30 mlをポリエチレン製遠沈管に入れ、37°Cで1時間振盪培養し、これを4°C、105000 $\times g$ で60分遠心分離し、B[a]pの代謝産物を含む上清(B)を得た。

iii) DNA 損傷変異菌の調製：上記の操作を行った菌懸濁液 (A) に、上清 (B) を 30 ml 加え、37°C で 80 分間、インキュベートした。これに、リン酸緩衝液 30 ml を加え、4500 rpm で 10 分間遠心分離し、S9 mix, B[a]p 及びその代謝物を除いた。この操作を 3 回繰り返し、菌懸濁液 30 ml を得た。ここで得られた菌懸濁液に、全体の 10% の量となるようにグリセリンを加え、使用するまで -80°C で凍結保存した。また別に、B[a]p を含まない菌懸濁液につき同様に操作し、自然復帰変異を観察した。

DNA 損傷変異菌は試験前に解凍して菌懸濁液とし、その 0.3 ml ずつを用い、7. 抗変異原性試験に準じて操作し、B[a]p を添加しないものと同様に操作した。DNA 損傷変異菌及び自然復帰変異菌をそれぞれ 30 万分の 1 に希釈し、B-2 培地で培養し生菌数を調べた。

結果及び考察

1. 抗変異原性物質の同定

酢酸エチル、ブタノール及び水エキスについて抗変異原活性の用量-反応曲線を Fig. 1 に示した。

酢酸エチルエキス及び *n*-ブタノールエキスはいずれも TA 98, 100 に対して、B[a]p の抗変異原性を認めた。そこで、両エキス中の抗変異原性成分の分離同定を試みた (Fig. 2)。酢酸エチルエキスについては、セファデックス LH-20 を用い、20 のフラクション (Fr. 1-20) に分画した。

また、*n*-ブタノールエキスは、分取 HPLC を用い 6 フラクション (Fr. 21-26) に分画した。各フラクションの収量を、Table I に示した。

これらのフラクションの抗変異原活性を調べたところ、酢酸エチルエキスの Fr. 2 と Fr. 9-12 及び *n*-ブタノールエキスの Fr. 22 に、それぞれ強い活性を

Fig. 1. Effects of Ethyl Acetate Extract (A), *n*-Butanol Extract (B) and Water Extract (C) on the Mutagenicity of Benzo[a]pyrene (5 µg/plate)

●—● TA98, ■—■ TA100: revertant colonies, ○—○ TA98, □—□ TA100: survival colonies, ———: spontaneous revertant colonies.

認めた (Fig. 3). そこで HPLC によりこれらフラクション中の抗変異原性成分を分析した.

Fig. 4 に示したように, 酢酸エチルエキスの Fr.2 には GA と保持時間 (2.0 分) が一致するピークを認めた. Fr.9-12 には PGG と保持時間 (4.5 分) が一致するピークを認めた. また, Fig. 5 に示したように *n*-ブタノールエキスの Fr.22 のピークは, GA と保持時間 (6.6 分) が一致し, Fr.25 (保持時間 14.7 分) と Fr.26 (保持時間 28.8 分) は, 芍薬の有効成分として知られている Pf と, BA のピークとそれぞれ一致した.

そこで, GA, PGG について, 用量-反応曲線を調べた (Fig. 6). 両化合物はいずれも抗変異原性を示した. しかし, 有効成分として知られる Pf, BA には活性が認められなかった. これは, それぞれ相当する Fr.25 と Fr.26 に抗変異原性を認めなかったことと一致した.

同定した各化合物について芍薬エキス及び溶媒抽出エキス中の成分含量を求め Table II に示した. 前報¹⁵⁾で, B[a]p の変異原活性を 100% 抑制するために, 芍薬エキス 50 mg を必要とすることを認めた. このエキス中には GA 1 mg, PGG 0.5 mg を含有していた. GA 及び PGG の標準物質で 100% 抑制するには, GA ではおよそ 1 mg, PGG ではおよそ 0.5 mg が必要である. また, 酢酸エチルエキスにより

100% 抑制する場合には約 4 mg を必要とし (Fig. 1), これに含まれる GA 量が 0.23 mg, PGG 量が 0.23 mg であることから, GA 及び PGG による抑制率はそれぞれ約 70% 及び約 90% と考えられた. 更に, *n*-ブタノールエキスでは 100% 抑制に約 20 mg を必要とし (Fig. 1), これに含まれる GA 量は 0.16 mg, PGG 量は 0.07 mg であり, 抑制率はそれぞれ約 50%, 約 80% となる. これらの結果から, いずれのエキスにおいても, B[a]p の変異原活性に対する抑制効果の大部分は GA と PGG によるものと考えられた.

2. 抗変異原性物質の作用機序

B[a]p が変異原性を発現するためには, 4 つの作用点 (I-IV) が考えられたのでそれぞれの過程での抗変異原性作用を検討した.

すなわち (I) 試料と B[a]p との反応又は吸着による B[a]p 濃度の減少, (II) B[a]p の代謝抑制作用, (III) B[a]p 代謝物に対する作用, (IV) bioantimutagen 作用 (DNA 損傷変異菌に対する修飾作用) について検討した.

1) B[a]p との反応 B[a]p と GA 又は PGG を混合し, 37°C で 20 分振盪したのち, 酢酸エチル (2 ml, 2 回) で遊離の B[a]p を抽出し, GC 法でその含量を測定した. その結果, Fig. 7 に点線で示したように GA 又は PGG による B[a]p 量の減少は

Fig. 2. Fractionation of Paeony Root Extract by Organic Solvents, Sephadex LH-20 and Preparative High Performance Liquid Chromatography

The numbers in parentheses show the yield (g) from 100 g of powder.

TABLE I. Yields of Fractions from Ethyl Acetate and *n*-Butanol Extracts

Ethyl acetate extract (6.26 g) ^{a)}					<i>n</i> -Butanol extract (3.05 g) ^{b)}		
Fr. No.	Eluent EtOH-water-acetone(ml)			Yield (mg)	Fr. No.	Retention time (min)	Yield (mg)
1	100 :	0 :	0 (200)	4080.9	21	5.8	79.1
2	100 :	0 :	0 (200)	446.5	22	7.4	90.2
3	100 :	0 :	0 (100)	22.1	23	9.5	19.7
4	90 :	10 :	0 (100)	37.7	24	11.2	194.8
5	90 :	10 :	0 (100)	40.0	25	15.2	244.3
6	80 :	20 :	0 (100)	26.0	26	31.5	89.0
7	80 :	20 :	0 (100)	27.7			
8	70 :	30 :	0 (100)	21.9			
9	70 :	30 :	0 (100)	17.1			
10	60 :	40 :	0 (100)	— ^{c)}			
11	60 :	40 :	0 (100)	27.8			
12	55 :	35 :	10 (100)	20.2			
13	55 :	35 :	10 (100)	12.5			
14	50 :	30 :	20 (100)	14.2			
15	50 :	30 :	20 (100)	21.1			
16	40 :	30 :	30 (100)	95.8			
17	40 :	30 :	30 (100)	102.1			
18	35 :	25 :	40 (100)	208.0			
19	35 :	25 :	40 (100)	57.0			
20	30 :	30 :	40 (100)	29.0			

a) Fractionated with Sephadex LH-20.

b) Fractionated with preparative HPLC.

(mobile phase, acetonitril - water (2 : 8), contained 0.1% oxalic acid)

c) The amount was not determined because the glass container was broken.

Fig. 3. Antimutagenic Activity of Fr.1-20 from Ethyl Acetate Extract and Fr.21-26 from *n*-Butanol Extract for Mutagenicity of Benzo[*a*]pyrene

認められなかった。

2) S9 mix の代謝抑制 B[a]p と S9 mix を加えたものに GA 又は PGG を混合し 37°C で 20 分振盪したのち、酢酸エチル (2 ml, 2 回) で未代謝の B[a]p を抽出し GC 法で含量を測定した。その結果, Fig. 7 に実線で示したように GA ではいずれの添加量でも顕著な代謝抑制を認めなかったが, PGG では添加量に比例して代謝抑制効果を認めた。そこで, この抑制が PGG による S9 mix の吸着沈澱によるものか否かを検討した。S9 mix を 105000×*g*, 60 分で遠心分離を行い, 上清と沈澱物について B[a]p の代謝活性を測定し, Table III に示した。

遠心分離後直ちに再溶解した S9 mix の B[a]p の変異原活性は, 遠心分離しないものとはほぼ同程度であった。ミクロソームは, 9000×*g* では沈澱しないが 105000×*g* で遠心すると赤色の沈澱物として得られ, この沈澱物には B[a]p の代謝に重要なアリルヒドラーゼが共沈し, 上清にはその活性が存在しないことが報告されている。¹⁹⁾ところが, 本実験では遠心分離した沈澱物が上清より 1.8 倍高い B[a]p の変異原活性を示したことから, 105000×*g* の遠心分

Fig. 4. High Performance Liquid Chromatogram of Fr.2, Fr.9, and Fr.12 from Ethyl Acetate Extract

Conditions

column : LiChrosorb RP18 (5 μ m, 4.6 mm i.d. $\times$ 250 mm).
 mobile phase : acetonitrile:water (22:78, oxalic acid 1 g/l).
 flow rate : 1.0 ml/min.
 detector : UV254 nm, sensitivity, 0.08 a.u.f.s.
 sample : Fr.2, Fr.9, Fr.12.
 standards : gallic acid (GA), pentagalloyl glucose (PGG).

離で上清にも溶解していることが観察された。しかし、遠心分離しない場合に比べ活性は半分程度に低下していた。

GAとS9mixとの沈澱物によるB[a]pに対する抗変異原活性は、Fig. 8に示すようにほとんどないのに対し(7%抑制)、上清における抑制作用は強く(47%抑制)、GAとS9mixとの共沈変性は認め難かった。

これに対しPGGは、上清(58%抑制)のみならず沈澱物(67%抑制)にも抑制作用を認めた。このように沈澱物が抗変異原活性を示したことは、PGGがS9mixの成分と共沈しB[a]pの代謝を抑制している事が考えられた。また、酢酸エチル(A)、*n*-ブタノール(B)、水(C)の各エキスの沈澱物及び上清での抑制作用を比較すると酢酸エチルエキスでは、沈澱物が74%抑制、上清が68%抑制、また*n*-ブタノールエキスでは43%抑制と59%抑制で、両エキスにおいても沈澱物と上清の抑制作用は同じ程度で、

Fig. 5. High Performance Liquid Chromatogram of *n*-Butanol Extract Conditions

Conditions

column : Inertsil ODS (5 μ m, 4.6 mm i.d. $\times$ 250 mm).
 mobile phase : acetonitrile:water:acetic acid (15:85:1).
 flow rate : 1.0 ml/min.
 detector : UV254 nm, sensitivity, 0.08 a.u.f.s.
 sample (a) : *n*-butanol extract.
 standards (b) : gallic acid (GA), paeoniflorin (Pf) benzoic acid (BA).

Fig. 6. Antimutagenic Effect of Gallic Acid and Pentagalloyl Glucose

—: revertant colonies,: survival colonies, - - - -: spontaneous revertant colonies.

TABLE II. Determination of Identified Compounds in Paeony Root Extract and Its Separated Extracts

	Paeony root extract (A)	Ethyl acetate extract (B ₁)	<i>n</i> -Butanol extract (B ₂)	Water extract (B ₃)	Recovery (%) [(B ₁) + (B ₂) + (B ₃)] / (A) * 100]
Starting material (g)	100.00				
Extract yields (g)		18.78	40.98	37.24	97.0
Gallic acid (g)	2.05 ± 0.08 ^{a)}	1.08 ± 0.14	0.33 ± 0.02	N.D. ^{b)}	68.8
Pentagalloyl glucose (g)	1.13 ± 0.09	1.05 ± 0.22	0.11 ± 0.01	N.D.	102.6
Paeoniflorin (g)	14.91 ± 3.51	7.62 ± 1.30	4.62 ± 0.96	N.D.	82.1
Benzoic acid (g)	0.49 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.11 ± 0.02	N.D.	77.6

^{a)} Results of 5 replicates (mean ± S.D.)^{b)} not detected (gallic acid and pentagalloyl glucose < 1 mg/g water extract, paeoniflorin and benzoic < 2 mg/g water extract).

Fig. 7. Interaction Between Gallic Acid, or Pentagalloyl Glucose and Benzo[a]pyrene

.....: benzo[a]pyrene and gallic acid (○) or pentagalloyl glucose (□) were mixed without S9mix.
 —: benzo[a]pyrene and gallic acid (●) or pentagalloyl glucose (■) were mixed with S9mix.
 - - - -: after incubation with S9mix, gallic acid (⊕) or pentagalloyl glucose (⊞) was added.

TABLE III. Mutagenic Activity of Benzo [*a*] pyrene with S9mix and Its Ultracentrifuged Fractions

	Number of Colonies	
	His ⁺ revertants	Survivors ^{a)}
S9mix	620 (440,738,682)	247 (265,231,245)
Re-mixed S9mix ^{b)}	601 (631,584,588)	265 (286,256,254)
Supernatant	192 (222,148,203)	265 (277,253,264)
Precipitate ^{c)}	290 (290,279,304)	252 (240,265,251)

a) diluted to 40000 folds.

b) After ultracentrifugation, supernatant and precipitate were re-mixed.

c) Cofactor is added to precipitate.

Fig. 8. Effect of Pentagalloyl Glucose (PGG), Gallic Acid (GA), Ethyl Acetate Extract (A), *n*-Butanol Extract (B) and Water Extract (C) for Supernatant and Precipitate of S9mix by Ultracentrifugation (105000×g, 60 min)

////// supernatant, ■■■■ precipitate.

PGG と類似した抑制パターンが認められた。また、水エクスでは、沈澱物が 14%抑制、上清が 39%抑制で上清の抗変異原活性が高く、PGG 及び GA の HPLC 測定 (Table II) では、両化合物が水エクス中で検出されなかったことから、これら化合物以外の抗変異原性成分の存在が示唆された。

3) B[*a*]p 代謝物に対する作用 B[*a*]p を S9 mix であらかじめ代謝活性化したものに GA 及び PGG を添加し、20 分インキュベート後、Ames 法で抗変異原活性を調べた。その結果、Fig. 9 に示すように両者とも抗変異原活性を認めた。

また、この時の未代謝 B[*a*]p 量は、Fig. 7 に一点

鎖線で示したように PGG 及び GA のいずれの添加量でも試料無添加の場合と変わらないことから、PGG 及び GA は、B[*a*]p の代謝物に対して抑制作用を示すことが明らかとなった。この結果は、Okuda ら²¹⁾ が、B[*a*]p-7,8-ジオール-9,10-エポキシイドを用いた実験結果と一致した。

4) Bioantimutagen 作用 DNA 損傷変異菌をテスト菌として、PGG 及び GA の bioantimutagen 作用を検討した。その結果、Fig. 10 に示すように、GA、PGG いずれにも、その作用を認めることができなかった。

Fig. 9. Inactivation of Metabolites of Benzo[*a*]pyrene by Gallic Acid and Pentagalloyl Glucose

—: revertant colonies,: survival colonies, - - - -: spontaneous revertant colonies.

Fig. 10. Bioantimutagenic Effect by Gallic Acid and Pentagalloyl Glucose

—: revertant colonies,: survival colonies, - - - -: spontaneous revertant colonies.

結 論

芍薬にみられる抗変異原活性は、鎮静作用成分として知られる Pf²²) ではなく、加水分解型タンニンの PGG とその構成成分の GA に認められることを明らかにした。また、その抗変異原活性の発現機構として、PGG が S9 mix の B[*a*]p 代謝活性に影響して抗変異原活性を示し、更に GA 及び PGG は S9 mix によって代謝された変異原性物質に対しても

抑制的作用を及ぼすことを認めた。また DNA 損傷変異菌に対して作用しないことから、bioantimutagen 作用をもたないことを確認し、GA 及び PGG はいずれも desmutagen として作用していることを明らかにした。

謝辞 本研究を行うのに当たり、実験の補助をして頂いた犬飼昭俊氏、清水千佐登氏に深謝致します。

引 用 文 献

- 1) S. Arimoto, V. Ohta, T. Namba, T. Negishi, H. Hayatsu, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **92**,

- 662 (1980).
- 2) S. Arimoto, T. Negishi, H. Hayatsu, *Cancer Lett.*, **11**, 29 (1980).
 - 3) T. Kada, K. Morita, T. Inoue, *Mutat. Res.* **53**, 351 (1978).
 - 4) T. Kada, H. Mochizuki, *J. Radiat. Res.* **22**, 297 (1981).
 - 5) H. Hayatsu, K. Hamasaki, K. Togawa, S. Arimoto, T. Hayatsu, M. Makita, Y. Wataya, *Mutat. Res.*, **91**, 437 (1981).
 - 6) A.W. Wood, I.M. Sayer, H.L. Newmark, H. Yagi, D.P. Michaud, D.M. Jerina, A.H. Conney, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 5122 (1982).
 - 7) L. Busk, B. Sjostrom, U.G. Ahlborg, *Food Chem. Toxicol.*, **22**, 725 (1984).
 - 8) T. Ohta, K. Watanabe, M. Moriya, Y. Shirasu, T. Kada, *Mutat. Res.*, **117**, 135 (1982).
 - 9) H. Nakamura, T. Yamamoto, *Mutat. Res.*, **122**, 87 (1983).
 - 10) H. Minakata, H. Komura, K. Nakanishi, T. Kada, *Mutat. Res.*, **116**, 317 (1983).
 - 11) K. Kakinuma, Y. Okada, N. Ikegawa, T. Kada, M. Nomoto, *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1647 (1984).
 - 12) K. Kakinuma, J. Koike, K. Kotani, N. Ikegawa, T. Kada, M. Nomoto, *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1905 (1984).
 - 13) L.A. Mitscher, S. Drake, S.R. Gollapudi, J.A. Harris, D.H. Shankel, *Basic Life Sci.*, **39**, 153 (1986).
 - 14) A. Tzagoloff, M. Wu, M. Cirellone, *J. Biol. Chem.*, **261**, 17163 (1986).
 - 15) Y. Sakai, H. Nagase, Y. Ose, T. Sato, A. Yamada, M. Hibi, F. Yamada, *Mutat. Res.*, **174**, 1 (1986).; Y. Sakai, H. Nagase, Y. Ose, T. Sato, M. Kawai, M. Mizuno, *Mutat. Res.*, **177**, 327 (1988); 孟 正木, 坂井至通, 小瀬洋喜, 佐藤孝彦, 永瀬久光, 鬼頭英明, 松田浩明, 佐藤元泰, 水野瑞夫, 日本環境変異原学会講演要旨集, 京都, 1987年, p.88.
 - 16) 日本公定書協会 (編), 第十一改正日本薬局方解説書, 広川書店, 東京, 1986, D-428.
 - 17) M. Nishizawa, T. Yamagishi, G. Nonaka, I. Nishioka, T. Nagasawa, H. Oura, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 2593 (1983).
 - 18) 浅川直樹, 服部禎一, 上山政昭, 篠田愛信, 三宅康夫, 薬誌, **99**, 598 (1979).
 - 19) M. Nishizawa, T. Yamagishi, G. Nonaka, I. Nishioka, *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 2850 (1980).
 - 20) D.W. Nebert, H.V. Gelboin; *J. Biol. Chem.*, **243**, 6242 (1986); 今井嘉朗, 蛋白質核酸酵素, **10**, 170 (1972).
 - 21) T. Okada, K. Mori, H. Hayatsu, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 3755 (1984).
 - 22) 高木敬次郎, 木村正康, 原田正敏, 大塚恭男 (編), “和漢薬物学,” 南山堂, 東京, 1982, pp.286—289.