研究ノート

ユーゲニインの変異原抑制活性について

小原 章 裕, 竹 原 学

兵庫女子短期大学食物栄養学科

Antimutagenic Activities of *Eugenin*

Akihiro OHARA and Manabu TAKEHARA

Department of Nutrition and Food Science, Hyogo
Women's College, Kakogawa 675-01

J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci., **50**, 372~374 (1997)

Several tannins such as (+)-catechin, (-)-epicatechin and penta-*O*-galloyl glucose (PGG) have been well characterized as antimutagens or anticarcinogens in previous studies. The present studies were carried out to examine the antimutagenic activities of a hydrolysable tannin, *eugenin*, which is contained in certain crude drugs and has high antiviral activity. The antimutagenic activity was tested by the Ames method against the respective mutagenicity of Trp-P-1, Trp-P-2 and an activated form of Trp-P-2 (act. Trp-P-2), which were metabolized by S9 Mix, or 1-nitropyrene (1-NP) toward *Salmonella typhimurium* TA98. Addition of 65 μ g of *eugenin* or 50 μ g PGG into each plate caused a decrease of about 50% in the mutagenicity on Trp-P-1, respectively. *Eugenin* also markedly suppressed the mutagenicity of Trp-P-1, Trp-P-2, act. Trp-P-2 or 1-NP. The antimutagenicity against act. Trp-P-2 and 1-NP was higher than that against Trp-p-1 or Trp-P-2 (+S9 Mix). Therefore, it was concluded that *eugenin* reacted directly against each of the mutagens used, and strongly interfered with their mutagenic activities. These results suggest that the antimutagenic activity of *eugenin* is essentially due to desmutagenicity.

Key Words desmutagen, tannin, *eugenin*, penta-*O*-galloyl glucose (PGG).

(Received December 28, 1996)

タンニン類は、広く植物界に分布する生薬成分として多種多様な活性を有し、これまで多くの報告がなされてきた。これらの生化学的な活性としては、タンパク質や

塩基性物質、さらには、重金属との結合性や共存物質に対する還元作用および過酸化抑制作用などがあげられる。さらに、生理学的活性については、種々の酵素に対する不活化作用、活性酸素障害に対する阻害作用、宿主介入性抗がん作用、抗微生物作用、ヒスタミン遊離抑制作用（抗アレルギー作用）などが報告されている¹⁾。

最近、これらのタンニン類のうち、とくにカテキン、エピカテキンおよびエピガロカテキン²⁾などの縮合型タンニンや、ペンタ-*O*-ガロイル- β -D-グルコース (PGG)³⁾⁴⁾などの加水分解型タンニンが、アミノ酸の加熱分解産物できわめて変異原性の高いヘテロサイクリックアミン類に対して著しく強い変異原抑制活性を示すことが報告されている。

著者らは、丁子、芍薬、牡丹皮等の薬用植物に含まれる抗ヘルペスウイルス性物質の研究中に分離された^{5)~7)}加水分解型タンニン類の一種、ユーゲニイン (*eugenin*, Fig. 1) について、変異原抑制活性について調べ、その活性発現のメカニズムに関して若干の検討を行った。

実験方法

1. 試料の調製法

丁子、芍薬、牡丹皮等の薬用植物に含まれ、かつ抗ヘルペスウイルス性物質として高度に精製された⁵⁾ユーゲニインおよびペンタ-*O*-ガロイル- β -D-グルコース (PGG, Fig. 1) を DMSO に溶解し、変異原抑制活性について比較検討した。

変異原物質としては、アミノ酸の加熱分解産物である Trp-P-1, Trp-P-2 [薬物代謝酵素群で活性化されることによって変異原性を示す (+S9)] やすでに薬物代謝酵素群によって変異原性を発現した activated form of Trp-P-2 (以下 act. Trp-P-2 と略す)、1-ニトロピレン (以下 1-NP と略す) [直接変異原性を示す (-S9)] を用いた。

2. 変異原抑制試験

変異原抑制活性の測定は、Ames test の変法であるブレインキュベーション法⁸⁾によって行った。

変異原物質溶液 0.1 ml に試料溶液 0.1 ml を 37°C で、30 分間インキュベートした。さらに、薬物代謝系酵素群を含む S9Mix またはリン酸緩衝液 0.5 ml および、前培養した菌懸濁液 (*S. typhimurium* TA98) 0.1 ml を加え、37°C で再び 20 分間インキュベートした。これら試料溶液にソフトアガーを 2 ml 加え、最少グルコース寒天培地に重層し、37°C で 48 時間培養後、生じた復帰変異コロニーの数を計測した。

各タンニンに対する変異原抑制活性の測定は、1 回当

Fig. 1. Chemical structures of *eugenin* and PGG.

り3枚のプレートを用いて行った。それぞれ3回ずつ測定をし、すべてのプレートの復帰コロニー数を平均した。

変異原抑制活性は次の式によって算出した。

$$\text{変異原抑制率 (\%)} = (1 - B/A) \times 100$$

A: 変異原物質のみの復帰コロニー数, B: 変異原物質と試料溶液の混液の復帰コロニー数

なお、変異原性を抑制する活性物質が、変異原物質に直接作用している (desmutagen) のか、または薬物代謝系酵素、あるいは *Salmonella* 菌に直接作用している (bio-antimutagen) のかも合わせて検討した⁹⁾。

また、サンプルの毒性の有無を調べるために変異原試験による生菌数測定も同時に行った。

結果および考察

1. タンニンの変異原抑制活性

2種類のタンニン (ユーゲニンと PGG) の各濃度における Trp-P-1 (150 ng/plate) に対する変異原抑制率を Fig. 2, および Fig. 3 に示した。

ユーゲニンおよび PGG の Trp-P-1 に対する抑制率は、濃度依存的に上昇した。それぞれのタンニンの Trp-P-1 の変異原性を 50% 抑制する一プレート当りの用量 (ID_{50}) は、PGG が 50 $\mu\text{g}/\text{plate}$ であった。一方、ユーゲニンは 63 $\mu\text{g}/\text{plate}$ と、PGG とほぼ同じ程度の抑制効果を示した。

Fig. 2. Desmutagenic activity of *eugenin* against Trp-P-1 (150 ng/plate).

Fig. 3. Desmutagenic activity of PGG against Trp-P-1 (150 ng/plate).

なお、変異原抑制効果を示したユーゲニンおよび PGG は、それ自体まったく変異原性を示さず、かつ生菌数を測定した結果、試験した投与量範囲では何らの毒性も示さなかった。

2. タンニンの変異原抑制活性の作用機序

供試したタンニンの変異原抑制活性の作用機序を明らかにするために若干の検討を行った。アミノ酸の加熱分解産物である Trp-P-2 (+S9) および S9Mix により代謝活性化させた Trp-P-2 (以下 act. Trp-P-2 と略) と 1-NP (ともに -S9) の変異原性に対する抑制活性を測定した結果を Table 1 に示す。

なお、PGG およびユーゲニンともに測定濃度範囲内で薬物代謝酵素群存在下 (+S9) では、*Salmonella* 菌に何ら影響を与えなかったが、薬物代謝酵素群非存在下 (-S9) では高濃度 (100 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 程度) で若干の影響を示したので、まったく影響のない低濃度、プレート当たり 30 μg で検討した。

Table 1 に示したように、Trp-P-2 に対する変異原抑制率は、PGG 10.5% に対してユーゲニン 8.7% と

Table 1. Desmutagenic activities of *eugenin* and PGG against several mutagens.

Mutagen	Dose (ng/plate)	Desmutagenic activity			
		<i>Eugenin</i> *	Survivals ($\times 10^6$)	PGG*	Survivals ($\times 10^6$)
1-NP	160	33.1	233	5.1	263
Activated Trp-P-2	20	60.4	223	56.9	275
Trp-P-2	20	8.7	278	10.5	244

* Thirty μg of each tannin was added into one plate. Revertants of each mutagen were about 800.

PGG と同程度の活性を示した。また、ユーゲニンおよび PGG の抑制活性は、両者とも act. Trp-P-2 に対する活性のほうが Trp-P-2 に対する活性よりも強く、ユーゲニンが 60.4% に対して、PGG は 56.9% であった。これらデータを総合すると、ユーゲニンの変異原抑制活性は、PGG やカテキン等の他のタンニン類と同様に直接変異原物質に作用することによって起こっている desmutagenicity であると考えられた²⁾³⁾。

また、ヘテロサイクリックアミン類と異なったタイプの直接変異原物質、1-NP、に対してもこれらタンニンは強く抑制し、その作用は PGG と同様にユーゲニンが直接変異原物質に作用しているものと思われる。このようにユーゲニンの変異原抑制活性は、*Salmonella* 菌や、ラットの薬物代謝系酵素に作用するのではなく、変異原物質に直接作用するため、ひろく「がんの予防」という観点からもきわめて重要である。今後、これらの詳細なメカニズムの解析については、さらに検討する必要がある。

要 約

生薬に含まれ、抗ヘルペスウイルス作用を有する加水分解型タンニン-ユーゲニンの変異原抑制活性について検討した。変異原抑制率は、変異原物質である Trp-P-1, Trp-P-2, 薬物代謝系酵素群を含む S9Mix によって代謝活性化された act. Trp-P-2 や 1-NP を *Salmonella typhimurium* TA 98 株に作用させ、生じた復帰コロニー数の差によって算出した。

Trp-P-1 の変異原性はユーゲニン 65 μg により 50% 抑制され、その他の変異原物質、Trp-P-2, act. Trp-P-2 や直接変異原物質である 1-NP の変異原性も強く抑制された。また、この活性は、代謝活性によって変異原

性を生じる Trp-P-1, Trp-P-2 よりも直接変異原性を示す act. Trp-P-2 に強く示された。以上の結果より、ユーゲニンは薬物代謝系酵素群に作用して変異原性を抑制するのではなく、直接、変異原物質に作用することによって抑制し、その活性はすでに同様の活性を有している PGG³⁾⁴⁾ と同程度であることがわかった。

ユーゲニンおよび PGG を含む、種々のタンニンサンプルをご分与下さった近畿大学薬学部生薬学教室の田中教授、武智助教授ならびに九州大学名誉教授西岡五夫先生に厚く感謝いたします。また、岡山大学名誉教授奥田拓男先生には、多数の文献とご教示をいただき、重ねて厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Okuda, T., Yoshida, T. and Hatano, T.: Economic and Medicinal Plant Research (Wagner, H. and Fransworth, N.R., eds.), Vol. 5, 129 (1991), Academic Press (London)
- 2) 富田 勲: 抗変異原・抗発がん物質とその検索法 (黒田行昭編), 115 (1995), 講談社サイエンティフィック (東京)
- 3) 奥田拓男, 毛利和子, 早津彦哉: 和漢医薬誌, **2**, 168 (1985)
- 4) Okuda, T., Mori, K. and Hayatsu, H.: *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 3755 (1984)
- 5) Takechi, M. and Tanaka, Y.: *Planta Med.*, **42**, 69 (1981)
- 6) Takechi, M. and Tanaka, Y.: *Planta Med.*, **45**, 252 (1982)
- 7) Takechi, M., Tanaka, Y., Takehara, M., Nonaka, G. and Nishioka, I.: *Phytochemistry*, **24**, 2245 (1985)
- 8) 矢作多紀江: 蛋白質 核酸 酵素, **20**, 1178 (1975)
- 9) 太田敏博: 食品中の生体機能調節物質研究法 (川岸舜朗編), 21 (1996), 学会出版センター (東京)

(1996 年 12 月 28 日受理)