加熱羊肉中の直接作用性の変異原及び亜硝酸処理を必要とする前変異原物質の検索

(平成2年7月9日受理)

橋爪 崇^{*1} 辻澤 広^{*1} 横山 剛^{*2} 小澤敬弘^{*3}
 斉藤 優^{*3} 木苗直秀^{*4} 富田 勲^{*3}

Detection of Direct-Acting Mutagens and Compounds Mutagenic after Nitrite Treatment from Broiled Mutton

Takashi HASHIZUME^{*1}, Hiroshi TSUJISAWA^{*1}, Tsuyoshi YOKOYAMA^{*2}, Takahiro OZAWA^{*3},
 Masaru SAITO^{*3}, Naohide KINAE^{*4} and Isao TOMITA^{*3}

(^{*1}Wakayama Prefectural Research Center of Environment and Public Health: 3-3-45, Sunayama-minami, Wakayama, Japan; ^{*2}Hyogo Prefecture Pharmaceutical Association Inspection Center: 6-4-3, Shimoyamate, Chuo-ku, Kobe, Japan; ^{*3}School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka: 395, Yada, Shizuoka, Japan; ^{*4}School of Food and Nutritional Sciences, University of Shizuoka: 395, Yada, Shizuoka, Japan)

We previously reported the mutagenic activities of daily foodstuffs classified into 13 groups (I-XIII) by a market basket method. The mutagenic activities were generally increased by nitrite treatment under acidic conditions. In this study, methanol extracts of seven foodstuffs in group XI (meats, egg), which showed weak direct mutagenic activity and high mutagenic activity after nitrite treatment, were subjected to the Ames test using *S. typhimurium* TA100 strain without metabolic activation. The mutagenic activity of group XI was mainly due to meats such as chicken, pork, beef and mutton. In particular, the mutagenic activity of mutton treated with nitrite increased to 3.9 times that of the untreated sample. It was demonstrated that the mutagens were produced during heating of the meat.

From studies on the detection of mutagens in broiled mutton by using gas chromatography, high performance liquid chromatography, and gas chromatography-mass spectrometry, three α -dicarbonyl compounds (glyoxal, methylglyoxal and diacetyl) were identified as direct-acting mutagens. Furthermore, four tryptophan-related compounds (5-hydroxyindole, tryptamine, L-tryptophan and 5-hydroxytryptamine) and two β -carboline derivatives ((1R, 3S)- and (1S, 3S)-1,2,3,4-tetrahydro-1-furyl-9H-pyrido [3,4-b] indole-3-carboxylic acid) were identified as premutagens which show an increase of mutagenic activity after nitrite treatment.

(Received July 9, 1990)

Key words: 羊肉 mutton; 変異原性 mutagenicity; 亜硝酸 nitrite; エームス試験 Ames test; サルモネラ TA 100 株 *Salmonella typhimurium* TA100 strain; α -ジカルボニル化合物 α -dicarbonyl compounds; トリプトファン関連化合物 tryptophan-related compounds; β -カルボリン誘導体 β -carboline derivatives

緒言

近年、食物がヒトのガン発生に深くかかわっているこ

とは衆知のことである。1975年、Amesらが微生物を用いてガン原物質を変異原物質として検出する方法を開発して以来¹⁾、加熱食品をはじめとして日常食品の変異原性に関する研究報告が数多くなされている^{2)~6)}。日本人のガン死亡のおよそ3分の1を占める胃ガンの場合、その原因物質については未だ十分に明らかにされていない

^{*1} 和歌山県衛生公害研究センター：和歌山県和歌山市砂山南3-3-45

^{*2} 兵庫県薬剤師会検査センター：神戸市中央区下山手通6-4-3

^{*3} 静岡県立大学薬学部：静岡県静岡市谷田395

^{*4} 静岡県立大学食品栄養科学部：静岡県静岡市谷田395

が、野菜や漬物を通して硝酸塩及び亜硝酸塩を多量摂取する⁷⁾に伴い、胃内で N -ニトロ化合物が生成することが大きな要因と考えられている⁸⁾。このような観点から、食品を酸性条件下で亜硝酸と反応させた場合に、変異原性を発現する前変異原物質が生成するか否かに関する研究が特に注目されている⁹⁾。

著者らは、マーケット・バスケット方式^{10), 11)}により13群に分類した食品群のメタノール抽出物についてネズミチフス菌 (*S. typhimurium*) を用いて変異原性を検定し、X群の魚介類とXI群の肉・卵類が強い変異活性を示すこと、また酸性条件下、亜硝酸で処理した場合、XI群の変異活性が最も上昇することを報告した^{12), 13)}。今回、このXI群の変異活性がどのような食品あるいは食品成分に起因するのかを明らかにする目的で、XI群に含まれる牛肉、豚肉、鶏肉、鯨肉、羊肉、プレスハム、鶏卵の7食品について直接及び亜硝酸処理後に変異活性を検定した。本実験で直接変異活性を示し、さらに亜硝酸処理により最も変異活性が上昇した加熱羊肉について、直接作用性の変異原物質及び前変異原物質の検索を試み、いくつかの知見を得たので報告する。

実験方法

1. 材料

羊肉は、和歌山市内の食肉小売店及び静岡市内の食肉卸店より購入した。鯨肉（缶詰製品）を含む肉類及び鶏卵は和歌山市内のスーパーマーケットあるいは食肉小売店より購入した。

2. 試薬・試液

Bacto agar, Nutrient-broth: Difco 社製

D-グルコース（日本薬局方）：第一製薬(株)製

S9（フェノバルビタール及び5,6-ベンゾフラボン誘導 Sprague-Dawley ラット肝）、D-グルコース-6-リン酸（G-6-P）、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ（G-6-P DH）、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリオン酸（還元型、 β -NADPH）：オリエンタル酵母(株)製

S9 ミックス：矢作¹⁴⁾の方法により調製した。

ジエチルエーテル（以下エーテルと略称）、メタノール：特級試薬を蒸留後、ただちに用いた。

その他の試薬は、すべて特級試薬を使用した。

3. 試料の調製

購入した食品を日常行われている方法に従って可食状態に調理した。すなわち、牛肉、豚肉はフライパンで3分間焼き、鶏肉は沸騰水中で2分間ゆで、羊肉は金網上で8分間焼き、鶏卵はフライパンでいり卵にした。鯨肉の缶詰とプレスハムは、市販品をそのまま用いた。

各食品を粉碎して均一化した後、ペトリ皿に薄く広げ、五酸化リンを入れたデシケーター中で減圧下一夜放置するか、または精製水を加えて混合した後、凍結乾燥して水分を完全に除去した。残留物をかきとり、乳鉢で粉碎後、ガラスウール製円筒ろ紙に入れ、メタノールで

12時間ソックスレー抽出した。ついでロータリーエバポレーターでメタノールを留去して変異原性試験用の試料とした。

なお、羊肉の変異原性を検討する場合には、メタノールでソックスレー抽出する前に、エーテルで8時間ソックスレー抽出して脱脂した。

4. 亜硝酸処理

試料 100 mg を 0.2 M 酢酸緩衝液（pH 4.0、以下酢酸緩衝液と略称）400 μ l に溶かし、酢酸緩衝液で調製した 0.3 M 亜硝酸ナトリウム溶液 300 μ l を加えて、遮光下、37 $^{\circ}$ 、60 分間加温した。ついで、酢酸緩衝液で調製した 0.3 M スルファミン酸アンモニウム溶液 300 μ l を加え、10 分間放置して過剰の亜硝酸ナトリウムを分解した後、変異原性試験用溶液とした。また、亜硝酸処理を行わない場合は、試料 100 mg を酢酸緩衝液 700 μ l に溶かし、遮光下、37 $^{\circ}$ 、60 分間加温した後、同様にスルファミン酸アンモニウム溶液 300 μ l で処理した。

なお、羊肉抽出物を亜硝酸処理する場合には、試料量及び溶解性を考慮して、一定量の試料（0.001~10 mg）をジメチルスルホキシド（DMSO）100 μ l に溶解し、酢酸緩衝液 200 μ l を加え混合した後、0.9 M 亜硝酸ナトリウム溶液 100 μ l を加えて反応を行い、0.9 M スルファミン酸アンモニウム溶液 100 μ l を加えて反応を停止した。

5. 亜硫酸水素ナトリウム処理

羊肉のメタノール抽出物 24 mg を DMSO 0.5 ml に溶解した後精製水 0.25 ml を加えた。ついで亜硫酸水素ナトリウム水溶液（40 mg/10 ml）0.25 ml を加えて 10 分間室温に放置した後、変異原性試験の試料とした。

6. 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン（2,4-DNPH）処理

Amberlite XAD-2（オルガノ社製）に Takami らの方法¹⁵⁾に準じて硫酸酸性下で、2,4-DNPH を吸着させた。十分に水洗いした後ガラスカラム（ ϕ 1 cm $\times$ 30 cm）に充てんし、羊肉のメタノール抽出物を通過させ、溶出液を凍結乾燥して変異原性試験の試料とした。

7. 変異原性試験

変異原性試験用溶液 100 μ l を用いて、Ames 法¹⁾を改良した矢作¹⁴⁾のプレインキュベーション法により変異原性を試験した。菌株は *Salmonella typhimurium* TA 100 株を用い、S9 ミックスの添加及び無添加で試験した。なお、羊肉抽出物は S9 ミックスを添加すると変異活性が低下したので、以後の羊肉の実験には S9 ミックスを添加しなかった。

8. 変異原物質検索のための方法、装置及び測定条件

i) 加熱羊肉の Sephadex LH-20 によるゲルろ過

加熱羊肉のメタノール抽出物 250 mg をメタノール 2.5 ml に溶かし、Sephadex LH-20 カラム（ ϕ 2.2 cm $\times$ 30 cm）にのせ、溶出液にメタノールを用いて、流速 1.0 ml/min で溶出した。溶出液を 4 ml ずつ分取して 254

nm における吸光度を測定し、5 画分 (fr. 1~5) を得た。

ii) ガスクロマトグラフィー・質量分析 (GC/MS) 法による α -ジカルボニル化合物の同定

加熱羊肉のメタノール抽出物を精製水 5 ml に溶かし、2.5% α -フェニレンジアミン (OPD) 溶液 1 ml を加え室温で 3 時間放置した。ついで、酢酸エチル 5 ml で 3 回抽出し、抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水後、溶媒を留去した。残留物をクロロホルム 1 ml に溶かし Sep-pak シリカカートリッジ (ウォーターズ社製) に通し、クロロホルム 8 ml で溶出した後溶媒を留去した。残留物をクロロホルム 200 μ l に溶かし、その 0.2 μ l をカラムに注入し、次の条件で GC/MS 法により分析した。

装置: 日立 M-80B

カラム: ウルトラ 1 (ϕ 0.32 mm $\times$ 25 m, 膜厚 0.52 μ m)

カラム温度: 100° (1 分) $\rightarrow$ 280°, 10°/分

注入モード: クールオンカラム, スプリットレス, 100°

インターフェース温度: 280°

キャリアガス: He, 0.6 kg/cm²

イオンソース: 70 eV, 180°

iii) ガスクロマトグラフィー・多重イオン検出 (GC/MID) 法による α -ジカルボニル化合物の定量

キノキサリン, 2-メチルキノキサリン, 2,3-ジメチルキノキサリンのイオンピーク (m/z) をそれぞれ, (130, 103), (144, 117), (117, 158) に設定し, 次の条件で GC/MID 法により分析した。

装置: 日立 M-80B

カラム: ウルトラ 1 (ϕ 0.32 mm $\times$ 25 m, 膜厚 0.52 μ m)

カラム温度: 125° (7 分) $\rightarrow$ 280°, 20°/分

注入モード: クールオンカラム, スプリットレス, 100°

インターフェース温度: 280°

キャリアガス: He, 0.6 kg/cm²

イオンソース: 70 eV, 180°

モード: MID

iv) ガスクロマトグラフ (GC) 法によるトリプトファン関連化合物の分析

加熱羊肉メタノール抽出物のゲルろ過画分 fr. 3 (10~50 μ g) に *N*, *O*-ビス-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミド (BSTFA) 300 μ l を加え, 20° で 12 時間反応させてトリメチルシリル (TMS) 化した。ついで, *N*-メチルビストリフルオロアセトアミド (MBTFA) 200 μ l を加え, 80°, 5 分間反応させてトリフルオロアセチル (TFA) 化した。反応液 1~2 μ l を用いて, 次の条件で GC 法により分析した。

装置: 島津 GC-4CM

カラム: OV-17 (ϕ 3 mm $\times$ 2 m)

カラム温度: 150° $\rightarrow$ 230° (10°/分)

検出器: FID

キャリアガス: N₂, 40 ml/min

注入口温度: 280°

v) 高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法による β -カルボリン誘導体の分析

加熱羊肉メタノール抽出物のゲルろ過画分 fr. 3 を次の条件で HPLC 法により分析した。

装置: 日立 633

カラム: Inertsil ODS (ϕ 4.6 $\times$ 250 mm)

溶離液: メタノール-10 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) (35:65)

流量: 1.0 ml/min

検出器: U. V. 254 nm

標品の β -カルボリン化合物の溶出位置に相当する保持時間 17~21 分に溶出する画分¹⁰⁾を分取した。溶媒を留去した後, カラムを YMC-Pack AM312-ODS (ϕ 6 $\times$ 150 mm) にかえて同一条件で再度 HPLC 法により分析した。

vi) GC/MS 法によるトリプトファン関連化合物及び β -カルボリン誘導体の同定

加熱羊肉メタノール抽出物のゲルろ過画分 fr. 3 (50 μ g) または fr. 3 の HPLC 法による分析で得られた β -カルボリン溶出画分をアセトニトリル 100 μ l に溶解後, *N*-(*tert*-ブチルジメチルシリル)-*N*-メチルトリフルオロアセトアミド (MTBSTFA) 100 μ l を加え, 室温で 1 時間放置してシリル化した後, 次の条件で GC/MS 法により分析した。

装置: 日立 M-80B

カラム: ウルトラ 1 (ϕ 0.32 mm $\times$ 25 m, 膜厚 0.52 μ m)

カラム温度: 150° $\rightarrow$ 260°, 10°/分

注入モード: クールオンカラム, スプリットレス, 125°

インターフェース温度: 280°

キャリアガス: He, 0.6 kg/cm²

イオンソース: 70 eV, 180°

結果及び考察

1. XI群 (肉・卵類) の変異活性

XI群に含まれる 7 種の食品のメタノール抽出物について *S.typhimurium* TA100 を用いて変異原性試験を行い, その結果を Fig. 1 に示した。S9 ミックス無添加の場合, プレートあたり 10 mg で鶏肉は 261, 豚肉は 215, 牛肉は 198, 羊肉は 152 revertants を誘発した。しかし, プレスハムと鶏卵には変異活性が認められず, 既に報告した XI群の変異活性は鶏, 豚, 牛, 羊からの肉類に由来することが明らかになった。S9 ミックスを添加した場合, 鶏肉を除いて変異活性が減弱するかあるいは変わらない状態であった。また, 酸性条件下で亜硝酸処理すると, S9 ミックス無添加の場合, プレスハムを除

Fig. 1. Mutagenic activity of methanol extracts from foodstuffs in group XI before and after nitrite treatment

□ before nitrite treatment; ■ after nitrite treatment

*: Spontaneous revertants have been subtracted.

Table 1. Mutagenic Activity of Ether and Methanol Extracts from Broiled Mutton before and after Nitrite Treatment

Extraction with	Fraction	Amount (mg/plate)	TA100, Net His ⁺ revertants	
			Nitrite treatment	
			before	after
Methanol* ¹	Methanol	10	152	597
Ether, followed by methanol* ²	Ether	10	10	25
	Methanol	4	186	708

*¹: Broiled mutton was dehydrated and extracted with methanol using a Soxhlet's extractor for 12 hr.

*²: Broiled mutton was dehydrated and extracted with diethylether using a Soxhlet's extractor for 8 hr, and then the residue was similarly extracted with methanol.

Each methanol or ether extract was incubated at 37°C for 60 min in the dark with or without nitrite treatment. After the addition of ammonium sulfamate to the reaction solution, the mixture was subjected to the Ames test by using *S. typhimurium* TA100 strain. Spontaneous revertants have been subtracted.

き、いずれも変異活性の上昇がみられた。特に、羊肉は復帰変異コロニー数が445増加し、変異活性がおよそ3.9倍に上昇した。S9ミックスを添加した場合には、亜硝酸処理によりすべての食品で変異活性の上昇を認め、特にプレスハムが344と最も多い変異コロニー数の増加がみられた。

そこで抽出物が変異原性を示し、さらに亜硝酸処理により最も高い変異活性の上昇を示した羊肉を用いて直接作用性の変異原物質及び前変異物質の検索を試みた。な

お、以下の変異原性試験は、高い感受性が認められたS9ミックス無添加で行った。

2. 加熱羊肉からの変異活性画分の分離

加熱羊肉中に多量含まれる脂肪分が、変異原性に与える影響をみるために脱水した羊肉を直接メタノールで12時間ソックスレー抽出する方法と、エーテルで8時間ソックスレー抽出して脱脂した後、メタノール抽出する方法を用いて比較検討した。それぞれの抽出物の変異活性をTable 1に示した。

その結果、エーテル抽出物はプレートあたり 10 mg で亜硝酸処理の有無にかかわらず変異活性を示さなかった。一方、エーテル抽出後のメタノール抽出物はプレートあたり 4 mg で復帰変異コロニー数が亜硝酸処理なし

Fig. 2. Mutagenic activity of methanol extracts from mutton samples before and after nitrite treatment

Before nitrite treatment: raw mutton, □—□; boiled mutton, △—△; boiled mutton, ○—○

After nitrite treatment: raw mutton, ■—■; boiled mutton, ▲—▲; boiled mutton, ●—●

で 186, 亜硝酸処理すると 708 と、いずれも直接メタノールで抽出した場合に比べて変異活性が上昇しており、エーテルで脱脂する操作が必要であることを認めた。そこで、以下の実験では、エーテル抽出後のメタノール抽出物を用いた。なお、エーテル抽出物及びメタノール抽出物の収量は、生羊肉 100 g あたりそれぞれ 8.35 ± 2.47 g, 2.34 ± 0.27 g ($n=45$) であった。

3. 生の羊肉と加熱羊肉の変異活性の比較

加熱羊肉に認められた変異活性が調理の過程で発現したものかどうかをみるために、生の羊肉、5 分間沸騰水中でゆでた羊肉、8 分間金網上で焼いた羊肉の 3 種の試料からメタノール抽出物を調製し、それらの変異活性を調べ、その結果を Fig 2 に示した。横軸はメタノール抽出物の生羊肉相当量で示した。焼いた場合に最も高い変異活性がみられ、ついでゆでた羊肉であり、また、いずれも亜硝酸処理により変異活性が上昇した。しかし、生の羊肉には変異活性が認められなかった。この実験から、加熱羊肉中に認められた変異原物質は生の羊肉には存在せず、調理時の加熱操作により生成したものと推定した。

4. 羊肉中の変異原物質の検索

i) ゲルろ過法による分画

加熱羊肉中の直接作用性の変異原物質及び亜硝酸処理により変異活性を示す前変異原物質を検索する目的で、

Fig. 3. Gel-filtration pattern of methanol extract from broiled mutton on a Sephadex LH-20 column and mutagenic activity of five fractions separated

□ before nitrite treatment; ▨ after nitrite treatment

The methanol extract (250 mg) was loaded on a Sephadex LH-20 column (ϕ 2.2×30 cm) and eluted with methanol. Number in parentheses show the yield (mg) of each fraction.

Fig. 4. Total ion chromatogram (TIC) of quinoxaline derivatives from mutton methanol extract

a: quinoxaline (glyoxal); b: 2-methylquinoxaline (methylglyoxal); c: 2,3-dimethylquinoxaline (diacetyl)

Quinoxaline derivatives were prepared by the reaction of mutton methanol extract with OPD (at room temperature, 3 hrs) and the determination was conducted by GC/MS method. GC/MS conditions: column, Ultra-1; column temp., 100°C (1 min) → 280°C (10°C/min); injection, cooled on column injector, splitless, 100°C

メタノール抽出物を Sephadex LH-20 を用いてゲルろ過した。254 nm における吸収スペクトルより分離した 5 画分 (fr. 1～fr. 5) の変異活性と収量を Fig. 3 に示した。fr. 1, fr. 2, fr. 3, fr. 5 はピーク部分であり, fr. 4 は fr. 3 のテーリング部分とした。fr. 1～fr. 5 は, 4 mg あたり 4～127 の復帰変異コロニーを誘発した。亜硝酸で処理すると, fr. 1 及び fr. 2 はコロニー数の変化がほとんどみられないが, fr. 3, fr. 4, fr. 5 はプレートあたり 4 mg でそれぞれ 347, 391, 537 と 10～40 倍の復帰変異コロニー数が増加することを認めた。

以上の実験結果を考慮して, 亜硝酸処理を必要としない直接作用性の変異原物質の検索には fr. 1, 2 を使用し, また亜硝酸処理により変異活性が上昇する前変異原物質の検索には収量の多い fr. 3 を用いた。

ii) 直接作用性の変異原物質の検索

加熱調理した獣肉や魚肉からは, 変異原物質として数種のヘテロサイクリックアミンが分離されており^{17)～19)}, それらの多くにガン原性が認められている^{20)～24)}。著者らは, 既に加熱した羊肉中から Trp-P-2 や MeIQx などのヘテロサイクリックアミンを分離定量した²⁵⁾。しかし, これらのヘテロサイクリックアミンはいずれも代謝活性化を必要とする間接作用性の変異原物質であるので, 本実験ではまず, 加熱羊肉中に存在すると考えられる直接作用性の変異原物質の検索を試みた。

加熱羊肉のメタノール抽出物に亜硫酸水素ナトリウム溶液を加えて反応させたところ 2.4 mg あたり 157 rev-

ertants から 86 revertants へとその変異活性が約 50% 低下した。また, この加熱羊肉のメタノール抽出物を精製水に溶解して, 2,4-DNPH カラムを通過させたところ, 変異復帰コロニー数は 2.4 mg あたり 157 から 0 となり, 変異活性は完全に消失した。これら二つの実験結果は, メタノール抽出物中に変異原性を有するカルボニル化合物が存在する可能性を示唆するものであった。そこで, 既にコーヒー^{26)～30)}, アルコール³¹⁾, 茶³⁰⁾, みそ²⁷⁾, しょう油²⁷⁾に含まれていることが報告されている α -ジカルボニル化合物の検索を行うため, OPD との縮合反応を行い, 生成するキノキサリン誘導体を GC/MS 法により分析する方法³²⁾を用いた。

加熱羊肉のメタノール抽出物をキノキサリン誘導体とした後, GC/MS 法により分析した場合のガスクロマトグラムを Fig. 4 に示した。質量数 117, 130 のマスプロマトグラムより, a, b, c の 3 ピークを検出した。それぞれのマススペクトルと標準物質のキノキサリン誘導体のマススペクトルとの比較から, a がグリオキサールの OPD 誘導体 (キノキサリン), b がメチルグリオキサールの OPD 誘導体 (2-メチルキノキサリン), c がジアセチルの OPD 誘導体 (2,3-ジメチルキノキサリン) であると同定した。また, GC/MID 法により加熱羊肉のメタノール抽出物及び fr. 1, fr. 2 の α -ジカルボニル化合物の定量を行った。その結果, グリオキサール, メチルグリオキサール, ジアセチルの含量は, それぞれメタノール抽出物 1 mg 中に 0.2 ng, 6.7 ng, 11.6 ng, fr. 1 の 1 mg 中

Fig. 5. Gas-chromatogram of TMS-TFA derivatives of fr. 3 obtained by gel-filtration
1: 5-hydroxyindole; 2: tryptamine; 3: tryptophan; 4: 5-hydroxytryptamine
Trimethylsilylation (TMS) and trifluoroacetylation (TFA) of fr. 3 were achieved with *N,O*-bis-trimethylsilyltrifluoroacetamide (20°C, 12 hrs) and *N*-methyl-bis-trifluoroacetamide (80°C, 5 min), respectively.
GC conditions: column, OV-17; column temp., 150~230°C (10°C/min); detector, FID

に 0.5 ng, 0.5 ng 1.4 ng, fr. 2 の 1 mg 中に N.D. (検出せず), 7.7 ng, 28.2 ng であった。また、メタノール抽出物, fr. 1 及び fr. 2 の総変異活性に対する α -ジカルボニル化合物の寄与率は、それぞれ 2.2%, 0.1%, 45.3% であった。メタノール抽出物の総変異活性に対する 3 種の α -ジカルボニル化合物の寄与率は 2.2% と低かったが、2,4-DNPH カラム処理により変異活性が消失したことなどから、さらに別のカルボニル化合物が存在する可能性が考えられた。

5. 前変異原物質の検索

fr. 3 は、シリカゲル薄層クロマト (展開溶媒: *n*-ブタノール-酢酸-水=4:1:5) 上でニンヒドリン陽性のスポットを生じ、標準品の *R_f* 値 (0.48) との比較から *L*-トリプトファンであることが判明した。そこで、アミノ酸分析計で定量したところ、加熱羊肉 1 g には *L*-トリプトファンが 1.8 μ g 含まれていた。*L*-トリプトファンは亜硝酸処理すると TA100 株に対して 1 mg あたり 4,900 revertants を誘発し、前変異原物質の一つと考えられた。しかし、この *L*-トリプトファンの定量値では、加熱羊肉メタノール抽出物の亜硝酸処理後に示す変異活性のおよそ 0.1% を説明できるに過ぎない。従って、羊肉中に存在する *L*-トリプトファンが加熱処理過程で分解し、さらに変異活性の強い他の化合物に変化している可能性が考えられた。そこで fr. 3 を BSTFA, MBTFA で TMS-TFA 化した後、トリプトファン関連化合物を GC 法により検索した。そのガスクロマトグラムを Fig. 5 に示した。

その結果、co-injection 法により、標準物質と比較検

討したところ、5-ヒドロキシインドール、トリプタミン、*L*-トリプトファン、5-ヒドロキシトリプタミンとそれぞれ保持時間が一致するピークを検出した。さらに、fr. 3 を MTBSTFA でシリル化した後、GC/MS 法により分析したところ、これら 4 種のトリプトファン関連化合物を同定することができた。5-ヒドロキシインドール、トリプタミン、5-ヒドロキシトリプタミンは、亜硝酸処理すると TA100 株に対して、それぞれ 1 mg あたり 85,000, 11,000, 29,000 revertants を誘発し、いずれも *L*-トリプトファンよりも強い前変異原物質であった。

著者は、*L*-トリプトファンが糖または脂質由来の炭素数 2~3 個のアルデヒド類と反応すると、亜硝酸処理後に変異原性を示す β -カルボリン誘導体を生成すること¹⁶⁾をすでに認めており、*L*-トリプトファンを含む羊肉が加熱処理により β -カルボリン誘導体を生成する可能性も十分に考えられた。そこで、fr. 3 について、2 種類の逆相カラムを用いる HPLC 法により β -カルボリンを分析した。そのクロマトグラムを Fig. 6 に示した。

その結果、(1*R*, 3*S*)-1,2,3,4-tetrahydro-1-furyl-9*H*-pyrido[3, 4-*b*]indole-3-carboxylic acid とその異性体の (1*S*, 3*S*)-1,2,3,4-tetrahydro-1-furyl-9*H*-pyrido[3, 4-*b*]indole-3-carboxylic acid と保持時間が一致するピークを認めた。さらに、両ピーク溶出画分を MTBSTFA でシリル化した後、GC/MS 法により分析して両化合物を同定した。この化合物は、亜硝酸処理で TA100 株に対して、-S9 mix で 1 mg あたり (1*R*, 3*S*) 体が 18,000, (1*S*, 3*S*) 体が 27,000 revertants を誘発した。

さらに、これら化合物とは異なる前変異原物質を検索

Fig. 6. HPLC elution patterns of fr. 3 obtained by gel-filtration

5a: (1R, 3S)-1,2,3,4-tetrahydro-1-furyl-9H-pyrido[3,4-b] indole-3-carboxylic acid

5b: (1S, 3S)-1,2,3,4-tetrahydro-1-furyl-9H-pyrido[3,4-b] indole-3-carboxylic acid

The fr. 3 was analyzed under condition A and the eluates showing 17~21 min of the retention time were pooled. The collected eluate was concentrated and then analyzed under condition B.

HPLC conditions: [A] column, Inertsil ODS ($\phi 4.6 \times 250$ mm); eluant, MeOH-10 mM acetate buffer (pH 5.0) (35 : 65); [B] column, YMC-Pack AM 312-ODS ($\phi 6 \times 150$ mm); eluant, MeOH-10 mM acetate buffer (pH 5.0) (35 : 65)

する目的で亜硝酸処理後の変異原性を指標にして HPLC 法により 3 種のカラムを順次用いて分画を試みた。まず, fr. 3 を逆相カラム (YMC-Pack A314-ODS) を用いてメタノール-水系で 4 分画した後, 最も変異活性の強かった第 4 画分を順相カラム (Lichrosorb Si-60) を用いてクロロホルム-メタノール系で 5 分画し, ついでこの 5 画分のうち最も変異活性の強かった第 2 画分を逆相カラム (YMC-Pack D-ODS-5) を用いてグラジエント法 (30% メタノールから 100% メタノール) により 21 分画した。この 21 画分のうち第 4 画分から第 11 画分の 8 画分はいずれも亜硝酸処理すると比較的強い変異活性を示した。また, 最初に用いた逆相カラム, ついで用いた順相カラムによる分画で, いずれの画分も強弱の差があるものの, 亜硝酸処理により変異活性を示していることから, 加熱羊肉中に含まれる前変異原物質は活性が強い特定の化合物と考えるよりも, 活性が弱い多くの化合物の集合体と思われた。なお, GC/MS 法によりグラジエント分画で最も変異活性の強かった第 4 画分には, 分子量 420 及び 430 の前変異原物質の存在が推

Direct-acting Mutagens

Premutagens

Fig. 7. Structures of mutagens and premutagens identified from broiled mutton

The numbers in parenthesis show the mutagenic activity (His^+ revertant colonies/1 mg) with or without nitrite treatment.

定できたが, 構造を決定するまでには至っていない。

以上, 加熱した羊肉中には, 直接変異原性を示すカルボニル化合物の他, 酸性条件下で亜硝酸と反応するとニトロソ化³³⁾, ジアゾ化^{34), 35)}, 水酸化³⁶⁾などを受けて変異原物質へと変化すると思われる上記前変異原物質が含まれていることが明らかとなった。

まとめ

マーケット・バスケット法により 13 群に分類した食品群の中で強い変異活性を示し, かつ酸性条件下, 亜硝酸処理により変異活性の上昇がみられた XI 群に含まれる個々の食品の変異活性を比較検討した。

その結果, XI 群の変異活性は肉類に由来するものであり, S9 ミックス無添加でプレスハムを除いた食品は亜硝酸処理により変異活性が上昇した。特に, 羊肉は亜硝酸処理した場合, 3.9 倍も変異活性が上昇し, 生成した前変異原物質は加熱処理により生じてくるものであった。

そこで、GC法、HPLC法、GC/MS法などにより加熱羊肉中の変異原物質の検索を試みた。その結果、直接作用性の変異原物質として、グリオキサール、メチルグリオキサール、ジアセチルの3種の α -ジカルボニル化合物を同定することができた。定量の結果、加熱羊肉メタノール抽出物の変異活性に対する寄与率は2.2%程度であり、さらに他のカルボニル化合物などの存在が考えられた。亜硝酸処理により変異活性の上昇を示した前変異原物質として、5-ヒドロキシインドール、トリプタミン、トリプトファン、5-ヒドロキシトリプタミンの4種のトリプトファン関連化合物、(1R,3S)-1,2,3,4-tetrahydro-1-furyl-9H-pyrido[3,4-b]indole-3-carboxylic acid 及び(1S,3S)-1,2,3,4-tetrahydro-1-furyl-9H-pyrido[3,4-b]indole-3-carboxylic acidの2種の β -カルボリン誘導体を同定した(Fig. 7)。この他にも、分子量420,430の構造未知の化合物をはじめ多くの前変異原物質の存在が推定された。

これら加熱により生成する変異原物質が羊肉に特異的なものかどうかは現時点ではわからないが、変異活性の弱い物質が多数存在することや、牛肉、豚肉、鶏肉でも亜硝酸処理により変異活性の上昇がみられたことなどから考えると、獣肉類に共通した物質と思われる。肉類の加熱という、人間が日常行っている調理法により、知らず知らずのうちに変異原物質が生成すること、また直接変異原性を示さなくても胃内で亜硝酸との反応により変異原性を示す前変異原物質が生成していることは重要な問題であり、さらに詳細な検討が必要である。

文 献

- Ames, B. N., McCann, J., Yamasaki, E.: *Mutat. Res.* **31**, 347~364 (1975).
- Ames, B. N.: *Science* **221**, 1,256~1,263 (1983).
- Sugimura, T.: *ibid.* **233**, 312~318 (1986).
- 佐藤茂秋: 食衛試 **28**, 1~12 (1987).
- Mazaki, M., Takuma, N., Takebayashi, I., Uyeta, M., Ohnishi, Y.: *J. Food Hyg. Soc. Japan* **28**, 336~347 (1987).
- 森田 徹, 早乙女京子, 中川友夫, 木川 寛, 河村太郎: 横浜衛研年報 **27**, 99~100 (1988).
- 石綿 肇, 谷村顕雄: 衛生化学 **28**, 171~183 (1982).
- Correa, P.: *Cancer Surveys* **2**, 437~450 (1983).
- 若林敬二: 環境変異原研究 **8**, 1~5 (1986).
- 内山 充: 食品衛生研究 **30**, 327~340 (1980).
- 内山 充: 食衛試 **21**, 344~348 (1980).
- 橋爪 崇, 横山 剛, 神木照雄, 中村好志, 木苗直秀, 富田 勲: 同上 **24**, 369~375 (1983).
- 橋爪 崇, 山東英幸, 辻沢 広, 小西敏夫, 横山 剛: 和歌山県衛公研年報 **33**, 36~41 (1987).
- 矢作多貴江: 蛋白質 核酸 酵素 **20**, 1,178~1,189 (1975).
- Takami, K., Kuwata, K., Sugimae, A., Nakamoto, M.: *Anal. Chem.* **57**, 243~245 (1985).
- Kinae, N., Yamashita, M., Takahashi, M., Ooishi, H., Tomita, I., Kanamori, H.: *Develop. Food Sci.* **13**, 343~352 (1986).
- Yamaizumi, Z., Shimoi, T., Kasai, H., Nishimura, S., Takahashi, Y., Nagao, M., Sugimura, T.: *Cancer Lett.* **9**, 75~83 (1980).
- Kasai, H., Nishimura, S., Wakabayashi, K., Nagao, M., Sugimura, T.: *Proc. Jpn. Acad.* **56(B)**, 382~384 (1980).
- Kasai, H., Yamaizumi, Z., Shimoi, T., Yokoyama, S., Miyazawa, T., Wakabayashi, K., Nagao, M., Sugimura, T., Nishimura, S.: *Chem. Lett.* 485~488 (1981).
- 若林敬二: 代謝 **19**, 939~948 (1982).
- Takahashi, S., Masuda, M., Mogami, M., Ohgaki, H., Sato, S., Sugimura, T.: *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)* **75**, 207~213 (1984).
- Takahashi, S., Nakatsuru, Y., Masuda, M., Ohgaki, H., Sato, S., Sugimura, T.: *ibid.* **75**, 467~470 (1984).
- 木苗直秀: 実験医学 **5**, 86~88 (1987).
- Kato, T., Ohgaki, H., Hasegawa, H., Sato, S., Takayama, S., Sugimura, T.: *Carcinogenesis* **9**, 71~73 (1988).
- 高橋 真, 木苗直秀, 富田 勲: 環境変異原研究 **8**, 51~54 (1986).
- Bjeldanes, L. F., Chew, H.: *Mutat. Res.* **67**, 367~371 (1979).
- Hayashi, T., Shibamoto, T.: *J. Agric. Food Chem.* **33**, 1,090~1,093 (1985).
- Friederich, U., Hann, D., Albertini, S., Schlatter, Ch., Wurgler, F. E.: *Mutat. Res.* **156**, 39~52 (1985).
- Shane, B. S., Troxclair, A. M., McMillin, D. J., Henry, C. B.: *Environ. Mol. Mutagen.* **11**, 195~206 (1988).
- Nagao, M., Takahashi, Y., Yamanaka, H., Sugimura, T.: *Mutat. Res.* **68**, 101~106 (1979).
- Nagao, M., Takahashi, Y., Wakabayashi, K., Sugimura, T.: *ibid.* **88**, 147~154 (1981).
- Moree-Testa, Saint-Jalm: *J. Chromatogr.* **217**, 197~208 (1981).
- 石館守三編: “生活環境と発がん” p. 1~92 (1979) 朝倉書店.
- Ochiai, M., Wakabayashi, K., Nagao, M., Sugimura, T.: *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)* **75**, 1~3 (1984).
- Kikugawa, K., Kato, T.: *Food Chem. Toxicol.* **26**, 209~214 (1988).
- Yang, D., Tannenbaum, S. R., Buchi, G., Lee, G. C. M.: *Carcinogenesis* **5**, 1,219~1,224 (1984).