アスコルビン酸に由来する赤色色素の DNA 損傷性と変異原性

(平成 2 年 6 月 29 日受理)

野中美智子* 満生昌太*
児玉哲史** 大村浩久***

DNA-Damaging Activity and Mutagenicity of Red-Pigment Derived from Ascorbic Acid

Michiko NONAKA, Masata MITSUIKI, Tetsushi KODAMA and Hirohisa OMURA

(Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Kyushu University:
6-10-1, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka, Japan)

Red-pigment [2,2'-nitrolo-di-2(2')-deoxy-L-ascorbic acid monoammonium salt (NDA)] was synthesized by the reaction of dehydroascorbic acid with L-phenylalanine. The DNA-damaging activity and the mutagenicity of NDA were assayed by means of DNA-repair and two different gene mutation assays using bacteria. NDA was positive in the spore rec-assay system using *Bacillus subtilis* without S9 mix, showing that its DNA-damaging index was relatively weak. NDA was positive in both the Ames test and the induced mutation frequency (IMF) assay using *Salmonella typhimurium* strain TA100 or TA98 with or without S9 mix, revealing that the mutagenic potential was relatively weak. These results suggested that further *in vivo* tests should be carried out to predict whether NDA might be a carcinogenic or genetic hazard to man.

(Received June 29, 1990)

Key words: アスコルビン酸 ascorbic acid; ストレッカー分解 Strecker degradation; 赤色色素 red-pigment; レックアッセイ rec-assay; エームス試験 Ames test; 誘発突然変異頻度試験 induced mutation frequency test; DNA 損傷性 DNA-damaging activity; 変異原性 mutagenicity; アミノカルボニル反応 amino-carbonyl reaction

緒 言

L-アスコルビン酸 (AsA) は新鮮な果実、野菜などの食品に本来含まれているのみならず、抗酸化、褐変防止、肉製品の発色促進などの目的で食品の加工、保蔵の際に広く添加、使用されている。しかし、AsA はそれほど安定な物質ではないため、その一部は食品の貯蔵、加工、調理などの過程における酸化反応、他の食品成分との反応などにより変化し種々の生成物を与える¹⁾。AsA を添加した食品にしばしば見られる赤変現象では、Scheme 1 のように、酸化型アスコルビン酸 (DHA) とアミノ酸の縮合物がストレッカー分解によってスコルバミン酸

(ScA) を与え、これが DHA や酸素によって酸化されてデヒドロ-ScA となり、さらにこのデヒドロ-ScA と ScA との縮合反応によって赤色色素 (2,2'-nitrolo-di-2(2')-deoxy-L-ascorbic acid monoammonium salt, NDA) が生成すると考えられている^{2), 3)}。本研究では、NDA を合成し、その安全性を検討するために枯草菌胞子を用いる DNA 修復試験 (Rec-assay)、サルモネラを用いる復帰突然変異試験のエームス試験及び誘発突然変異頻度試験 (Induced Mutation Frequency Test: IMF テスト) を実施したので報告する。

実験方法

1. 赤色色素 (NDA) の合成

DHA の合成は Kurata ら⁴⁾の方法に従った。すなわち、100 ml 容の栓付き三角フラスコにアスコルビン酸 10 g 及びジメチルアセトアミド 35 ml を入れ、50° に加温して溶解した。さらに室温冷却した後、氷水を使用し

* 九州大学農学部: 福岡市東区箱崎 6-10-1

† 現在、味の素(株)中央研究所: 川崎市川崎区鈴木町 1-1

** 現在、ニッカウキスキー(株)生産技術研究所: 柏市増尾字松山 967

*** 現在、中村学園大学: 福岡市城南区別府 5-7-1

Scheme 1. Possible formation mechanism of the red-pigment.
From Kurata *et al.*²⁾

冷却下で

-ベンゾキノン 6.1 g を添加した。沈殿が生成してきたらかくはんし、数時間放置した。この沈殿物を G-3 ガラスフィルターで吸引ろ過し、 -20° であらかじめ冷却した微量のアセトン及びエーテルで洗った。残留物を集め、エーテル中で時々かくはんしながら 1 時間放置した後、吸引ろ過した。この残留物を真空乾燥し、DHA の結晶 17.6 g を得た。

NDA の合成は Namiki ら⁵⁾ の方法を一部改変して行った。すなわち、300 ml 容三角フラスコに DHA 0.5 mol 及び L-フェニルアラニン 1 mol を入れ、特級エタノール 150 ml を加えて懸濁した後、還流管を装着して $90 \sim 100^\circ$ のオイルバスで 30~60 分間の還流加熱を行った。この反応液をろ紙 (東洋ろ紙 No. 1) でろ過し、このろ液をエバポレーターで濃縮後、エーテルを飽和するまで加えた。 -20° で 1 晩放置して沈殿を熟成させた後、エーテルをエバポレーターで完全に除去後、粗 NDA 14.64 g を得た。次にイオン交換クロマトグラフィーを行った。カラムは Bio-rad エコノカラム (内径 10 mm, ベッド体積 10 ml), 陰イオン交換体は DEAE-Toyopearl 650M, 開始緩衝液は 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0), 展開緩衝液は塩化ナトリウムを 100 mM あるいは 500 mM 含む 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) を用い、開始緩衝液と展開緩衝液とのグラジエント溶出を行った。流速は 0.2 ml/min, カラム温度は室温, 検出は NDA の極大吸収波長 510 nm を用いた。得られた溶出液は、シリカゲル薄層クロマトプレート (Merck 社製, HPTLC Kieselgel 60F₂₅₄, 0.2 mm) にスポットした後、酢酸エチル-ピリジン-水 (10:4:3) 及びブタノール-酢酸-水 (2:1:1) で展開した結果、それぞれ単一スポット ($R_f=0.61$, $R_f=0.54$) が得られたことから不純物を

含まない NDA であることを確認した²⁾。

2. Rec-assay

平野ら⁶⁾の孢子法 (S9 mix 非共存下) に従って行った。指標菌株は *Bacillus subtilis* 組み換え修復欠損株 M45(Rec⁻) 及び野生株 H17(Rec⁺) を用いた。B-2 液体ブ罗斯は、肉エキス 10 g, ポリペプトン 10 g 及び塩化ナトリウム 5 g を水 1,000 ml に溶解し、pH 7.0 に調整した。MM 培地は、硫酸アンモニウム 16 g, リン酸第一カリウム 10 g, 硫酸マグネシウム・7 水塩 0.1 g 及びクエン酸三ナトリウム 0.5 g を水 1,000 ml に溶解し、水酸化カリウム約 1.94 g で pH 7.0 に調整した。孢子形成用平板は、Nutrient broth (Difco 社製) 16 g, 塩化カリウム 2 g, 硫化マグネシウム・7 水塩 0.5 g, 塩化マンガン・4 水塩 19.8 mg, 硫酸第一鉄・7 水塩 278 μ g, 硝酸カルシウム・4 水塩 236 mg, グルコース 1 g, 寒天 (Difco 社製) 15 g 及び水 1,000 ml の混合液を 30 ml ずつペトリ皿に分注した。孢子寒天平板の調製は M45 及び H17 について、Nutrient broth 8 g 及び寒天 15 g を水 1,000 ml に混合してオートクレーブで滅菌後、約 50° にまで冷えてから孢子保存液 10 ml を加え、これを 10 ml ずつペトリ皿に分注した。ただし孢子保存液の調製は以下のとおりに行った。M45 及び H17 について、L 字管に B-2 液体ブ罗斯 10 ml を加え少量の菌を接種して 37° で 1 夜振盪培養した。20 枚の孢子形成用平板に菌液を 0.2 ml ずつ接種後、M45 は 5 日間、H17 は 3 日間 37° で培養した。形成した孢子を無菌的にかき取り MM 培地中に集菌した。孢子の塊をピペットでほぐし MM 培地で 2 回洗浄後、20 ml の MM 培地に懸濁した。リゾチーム溶液 (10 mg/ml・MM) を 10 分の 1 量加えて 37° で 30 分間処理した後、10% デオキシコール酸ナトリウム溶液を 10 分の 1 量加えて 37° で 30 分間処理した。これを 15° で 3,000 rpm, 10 分間の遠心分離を行い、この沈殿を 30 ml の滅菌水で 5 回洗浄した後、10 ml の水に懸濁した。生菌数を測定して M45 は 1×10^7 spores/ml, H17 は 1×10^6 spores/ml になるようそれぞれ滅菌水で調製した。これらを孢子保存液として冷蔵庫に保存した。

試験方法は M45 及び H17 の孢子寒天平板の上に直径 8 mm の円形ろ紙を 3 枚置き、これに 30 μ l の検体溶液をしみ込ませた後、 37° で 1 日培養して阻止帯の直径を測定した。陽性対照は変異原物質の *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) 及び 4-nitro-quinoline-1-oxide (4NQO) を用いた。

3. エームス試験

矢作⁷⁾のプレインキュベーション法 (37° , 20 分間) に従って行った。指標菌株は *Salmonella typhimurium* TA98 及び TA100 を用いた。液体培地は Nutrient broth No. 2 (Oxoid 社製) 25 g, 食塩 5 g 及び水 1,000 ml の混合液を pH 7.5 に調整した。最少グルコース寒天

Table 1. Spore Rec-Assay on Positive Controls and Red-Pigment (NDA)

Chemicals	Dose ($\mu\text{g}/\text{disk}$)	Inhibition zone (mm)*		MIC ($\mu\text{g}/\text{disk}$)		Indices of DNA damaging effect
		H17	M45	H17	M45	
NDA(-S9)	188	8.0	10.0			
	375	9.8	12.0			
	750	12.0	14.8			
	1,500	14.0	20.0			
	3,000	16.3	23.8			
	6,000	18.8	27.0			
				220	110	2.09
MNNG(-S9)	3	8.0	17.0			
	30	12.5	33.5			
	300	25.0	46.5			
				13	0.74	17.6
4NQO(-S9)	0.3	8.0	22.0			
	3	13.5	31.5			
	30	20.5	39.0			
				0.47	0.007	67.1

* Averages of 3 plates.

平板は Vogel-Bonner medium E に 1.5% の寒天と 2% のグルコースを添加し、30 ml ずつペトリ皿に分注した。軟寒天は食塩 5 g、寒天 6 g 及び水 1,000 ml の混合液に L-histidine·HCl·H₂O 52.4 mg、D-biotin 61.1 mg 及び水 500 ml の混合液を 10 分の 1 量添加した。リン酸緩衝液は 0.1 M リン酸一ナトリウム及び 0.1 M リン酸二ナトリウムを混和し、pH 7.4 に調整した。検体は水に溶解した後、ミリポアフィルターで除菌した。

4. IMF テスト

「細菌を用いる誘発突然変異頻度試験プロトコール」⁸⁾に従って行った。指標菌株は、*Salmonella typhimurium* TA100 及び TA98 を用いた。普通寒天平板は、液体培地に 1.5% の寒天を添加し、20 ml ずつペトリ皿に分注した。S9 mix は、フェノバルビタール及び 5,6-ベンゾフラボンで誘導したラット肝のミクロゾーム分画 (S9) 及び変異原性試験用コファクター (いずれもオリエンタル酵母工業(株)製) を用いて調製した。その他の材料はエームス試験と同様に調製した。本試験の用量設定を検討するため、本試験に準じて、生存菌の減少を測定する予備試験を行い、処理後の生存率が 10~50% となる用量を求めて本試験の最高用量とした。

試験方法は以下のとおりである。凍結保存した種菌を新しい液体培地 10 ml に接種し、37° で 1 夜振盪培養した。3,000 rpm、15 分間の遠心分離により培地を除き、リン酸緩衝液 10 ml に懸濁した。菌液 0.4 ml、リン酸緩衝液 (代謝活性化試験では S9 mix) 0.5 ml 及び検体溶液 0.1 ml を混合し、37° で 20 分間、緩やかに振盪し、菌と検体を反応させた。3,000 rpm、15 分間の遠心分離を

2 回行って検体を除去した。リン酸緩衝液 1 ml で再懸濁した。0.2 ml の再懸濁液をリン酸緩衝液で希釈し、その 0.2 ml を 2 ml の軟寒天 (約 45°) と混ぜて普通寒天平板 (生存菌計数用平板) 上に重層した。各用量群につき 4 枚の平板を用いた。平板は 37° で約 16 時間培養した。残りの再懸濁液 0.8 ml を 2 ml の軟寒天 (約 45°) と混ぜて最少グルコース寒天平板 (復帰変異菌計数用平板) 上に重層した。各用量群につき 2 枚の平板を用いた。各平板は 37° で約 48 時間培養した。生存菌計数用平板は生存菌コロニーを計測して平板あたりの平均値を求め、その値に希釈率を乗じて復帰変異菌計数用平板への接種量あたりの生存菌数を算出した。復帰変異菌計数用平板は復帰変異菌コロニーを計数し、各用量群の平板あたりの平均値を求めた。さらに検体処理群の復帰変異菌数から溶媒対照群の復帰変異菌数を差し引いた値、つまり誘発変異菌数を検体処理群の生存菌数で割った値 (IMF) を算出した。陽性対照には過酸化水素水を用いた。

結 果

1. Rec-assay

Table 1 は NDA 及び陽性対照物質に対する試験結果を示す。NDA は M45 と H17 の生育阻止帯の直径の差が 2 mm 以上で、かつ阻止帯比が 1.2 以上であり、弱陽性と判定された。また Fig. 1 に示す量的関係から最少生育阻止濃度 (Minimal Inhibition Concentration, 以下 MIC と略) を求めた結果、H17 の MIC は 220 $\mu\text{g}/\text{disk}$ 、M45 の MIC は 110 $\mu\text{g}/\text{disk}$ であった。さらに、H17 の MIC の、M45 の MIC に対する比をとることにより、

Fig. 1. Dose-response curve for red-pigment (NDA) evaluated in the spore rec-assay system using *Bacillus subtilis* M45 and H17

NDA の枯草菌 DNA に与える損傷指数⁹⁾を算出した結果、その値は 2.0 と低値を示した。従って、NDA の DNA 損傷能は弱いと考えられる。なお、陽性対照の MNNG と 4NQO の DNA 損傷指数はそれぞれ 17.6, 67.1 であった。

2. エームス試験

NDA は Fig. 2 及び Fig. 3 に示すように S9 mix のない条件下で TA100, TA98 に対して抗菌性及び復帰突然変異を示した。TA100 において変異体コロニー数の最大出現数は溶媒対照の 1.4 倍に過ぎなかったが、用量依存性が認められた。TA98 において変異体コロニー数の最大出現数は溶媒対照の 1.8 倍で、かつ、用量依存性が認められた。従って、NDA は代謝活性化なしに細菌に対する抗菌性、塩基交換型及びフレームシフト型の変異原性を有することが示唆された。

3. IMF テスト

NDA は Table 2 に示すように S9 mix による代謝活性化法を用いない場合は TA100 及び TA98 に対して抗菌性を示したが、代謝活性化法を用いた場合は示さなかった。いずれの場合も、ほとんどの NDA 処理群で溶媒対照群よりも復帰変異菌数がわずかながら増加し、IMF 値は 0.5~8 µg/ml あるいは 0.5~128 µg/ml の範囲で用量依存性が認められた。また、IMF 値の大きさは代謝活性化によって減少する傾向があった。陽性対照の過酸化水素水を TA100, S9 mix 非共存下でテストした結果、明確な誘発復帰株数の増大並びに IMF 値の上昇が確認された。従って、NDA は代謝活性化なしに TA100, TA98 に対して抗菌性及び変異原性を示し、それらの活性は代謝活性化によって減少することが認められ

Fig. 2. Dose-response curve for red-pigment (NDA) evaluated in the Ames test using *S. typhimurium* strain TA100 without S9 mix. All values indicate the average of duplicate plates.

Fig. 3. Dose-response curve for red-pigment (NDA) evaluated in the Ames test using *S. typhimurium* strain TA98 without S9 mix. All values indicate the average of duplicate plates.

た。

以上のように、NDA は細菌に対して DNA 損傷性並びに塩基交換型及びフレームシフト型変異原性を有することが示唆された。

考 察

近年、魚や肉の焦げた部分から強力な変異原活性物質として、2-アミノ-3-メチルイミダゾ [4,5-f] キノリン (IQ), 2-アミノ-3,4-ジメチルイミダゾ [4,5-f] キノリン

Table 2. Induced Mutation Frequency Tests on Red-Pigment (NDA) and Hydrogen Peroxide

Chemicals	Strain	Dose ($\mu\text{g/ml}$)	Survivals ($\times 10^8/0.8 \text{ ml}$)	Revertants* (/plate)	Induced revertants (/plate)	Induced mutation frequency ($\times 10^{-8}$)
Red-pigment (NDA)	TA100 (-S9 mix)	0	18.8	152	0	
		0.5	18.2	155	3	0.2
		2	18.4	183	31	1.7
		8	13.2	198	46	3.5
		32	12.2	194	42	3.4
		128	14.1	185	33	2.3
		256	12.7	175	23	1.8
		512	8.7	174	22	2.5
		1,024	0.3	38		
	TA100 (+S9 mix)	0	19.8	172	0	
		0.5	19.8	175	3	0.2
		2	19.8	190	18	0.9
		8	19.8	219	47	2.4
		32	19.8	189	17	0.9
		64	19.8	222	50	2.5
		128	19.8	218	46	2.3
		256	19.8	220	48	2.4
		512	19.8	249	77	3.9
		1,024	19.8	151		
	TA98 (-S9 mix)	0	25.1	176	0	
		0.5	25.2	181	5	0.2
		2	24.4	209	33	1.4
		8	24.9	226	50	2.0
		32	24.8	207	31	1.3
		64	23.3	182	6	
		128	14.7	112		
		256	5.9	26		
		512	4.7	27		
		1,024	2.6	51		
	TA98 (+S9 mix)	0	65.1	124	0	
		0.5	65.1	132	8	0.1
		2	65.1	159	35	0.5
		8	65.1	153	29	0.5
		32	65.1	176	52	0.8
		64	65.1	199	75	1.2
		128	65.1	212	88	1.4
		256	65.1	171	47	0.7
		512	65.1	200	76	1.2
		1,024	65.1	172	48	0.7
Hydrogen peroxide	TA100 (-S9 mix)	0	18.8	152	0	
		50	15.4	163	11	0.7
		100	15.2	304	152	10.0
		200	15.2	365	213	14.0
		300	12.2	469	317	26.0
		400	13.0	568	416	32.0

* Averages of 2 plates.

Fig. 4. Dose-response curve for hydrogen peroxide evaluated in the induced mutation frequency test using *S. typhimurium* strain TA100 without S9 mix

(MeIQ) が分離同定された^{10, 11)}ことなどから、食品成分間のアミノカルボニル反応による変異原生成が注目されてきた。一方、AsA から容易に生成するジカルボニル化合物の DHA とアミノ酸のアミノカルボニル反応では、まず褐変中間体として NDA が生成し²⁾、ついで R-B ラジカルや黄色物質を経て褐変化へ進むことが明らかにされた¹²⁾。さらに、AsA などの還元性物質の生成量が多くなると、この褐変化の主反応ルートが抑えられ、NDA から R-C ラジカルや R-A ラジカルを経て R-A 前駆体を生成するルートが主になってくることが推定された¹³⁾。また、R-A 前駆体は、AsA よりも強いフェージ不活性効果が見いだされた^{*}。DHA とトリプトファンのアルコール系反応液には強い抗酸化性が認められ⁵⁾、抗酸化物質が分離同定された¹⁴⁾が、R-A ラジカル、R-A 前駆体、黄色物質、NDA などには抗酸化性が見られなかった⁵⁾。NDA は、本研究において初めてその変異原性が認められた。Ames は食品素材中に多種多様な変異原物質が存在することを挙げているが、それらのほとんどはラジカルを形成しうる形のものである¹⁵⁾。また、老化や発ガン機構のいずれかの段階においてラジカルのかかわりがあると推定されている¹⁵⁾。しかし、食品中の変異原物質を摂取することにより生体内で起こりうる老化や発ガンなど、ヒトに対する毒性については、動物の長期試験を含むさらに詳細な実験結果から判断する必要がある。従って、NDA の生体内における生物活性を検討するために、著者らは今後、マウスを用いる *in vivo* 小核試験を実施し報告する予定である。

ま と め

酸化型アスコルビン酸と L-フェニルアラニンとの反応によって赤色色素(NDA)を合成し、それについて DNA 損傷性及び変異原性を検討した。

1) *Bacillus subtilis* M45 及び H17 を用いた Rec-assay の結果、NDA は S9mix 非共存下で弱いながら DNA 組換え修復の対象となる DNA 損傷性を示した。

2) *Salmonella typhimurium* TA98 及び TA100 を用いたエームス試験の結果、NDA は S9 mix 非共存下で弱いながら変異原性を示した。

3) *Salmonella typhimurium* TA98 及び TA100 を用いた IMF テストの結果、NDA は S9 mix 共存下及び非共存下で明確な変異原性陽性結果が得られた。

従って、NDA のヒトに対する毒性を予知するために *in vivo* 系の試験を行う必要がある。

文 献

- 1) 並木満夫, 松下雪郎編: “食品成分の相互作用” p. 282~284 (1980), 講談社サイエンティフィク。
- 2) Kurata, T., Fujimaki, M., Sakurai, Y.: Agric. Biol. Chem. **37**, 1,471~1,477 (1973).
- 3) 林 建樹: 農化誌. **58**, 53~59 (1984).
- 4) Kurata, T., Sakurai, Y.: Agric. Biol. Chem. **31**, 177~184 (1967).
- 5) Namiki, M., Shigetani, A., Hayashi, T.: Agric. Biol. Chem. **46**, 1,199~1,206 (1982).
- 6) 平野光一: 変異原性と毒性 **1**, 54~57 (1978).
- 7) 矢作多貴江: 蛋白質, 核酸, 酵素 **20**, 1,178~1,182 (1975).
- 8) 日本製薬工業協会・医薬品評価委員会・基礎研究部会・第3分科会・変異原性試験検討グループ・MF テスト検討サブグループ: トキシコロジーフォーラム **9**, 531~539 (1986).

* 林 建樹, 上田信二, 並木満夫: 日本農芸化学会昭和 57 年大会講演要旨集 p. 506 (1982).

-
- 9) Hirano, K., Hagiwara, T., Ohata, Y., Matsumoto, H., Kada, T.: *Mutat. Res.* **97**, 339~347 (1982).
 - 10) Kasai, H., Nishimura, S., Nagao, M., Takahashi, Y., Sugimura, T.: *Cancer Lett.* **7**, 343~348 (1979).
 - 11) Kasai, H., Yamaizumi, Z., Wakabayashi, K., Nagao, M., Sugimura, T., Yokoyama, S., Miyazawa, T., Nishimura, S.: *Chem. Lett.* 1,391~1,394 (1980).
 - 12) Hayashi, T., Hoshii, Y., Namiki, M.: *Agric. Biol. Chem.* **47**, 1,003~1,009 (1983).
 - 13) Hayashi, T., Namiki, M., Tsuji, K.: *ibid.* **47**, 1,955~1,960 (1983).
 - 14) Namiki, M., Hayashi, T., Shigeta, A.: *ibid.* **46**, 1,207~1,212 (1982).
 - 15) 松下雪郎: *化学と生物* **25**, 336~340 (1987).