報 文

酸加水分解エキスの変異原性

(平成9年8月25日受理)

林 哲仁^{*1} 任 恵峰^{*1,2} 田口誠治^{*1}
後藤純雄^{*3} 遠藤英明^{*1} 渡辺悦生^{*1}

Mutagenicity of Hydrolyzed Proteins

Tetsuhito HAYASHI^{*1}, Huifeng REN^{*1,2}, Seiji TAGUCHI^{*1}, Sumio GOTO^{*3},
Hideaki ENDO^{*1} and Etsuo WATANABE^{*1}

(^{*1}Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Fisheries: 4-5-7, Konan, Minato-ku, Tokyo 108-8477, Japan; ^{*2}Heilongjiang Commercial College, 50 Tongda Street, Harbin, 150076, People's Republic of China; ^{*3}Department of Community Environmental Science, National Institute of Public Health: 4-6-1, Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8638, Japan)

The presence of 3-chloro-1,2-propanediol (MCP) in hydrolyzed proteins (HPs) was reported, due to the reaction of excessive hydrochloric acid in the system with glycerine derived from neutral fat triglyceride. Since MCP induced immobility of rat sperm and showed mutagenicity against some bacterial test strains, its concentration should be kept as low as possible. Here we report the distribution of MCP in HPs commercially available during 1990-91. The mutagenicity of MCP in these HPs was below the detection limit of the microbiological assay system we employed. Owing to efforts made by manufacturers, no MCP is detectable in HPs currently manufactured in Japan. However, microbiological mutagenic studies indicated that weak, but significant, mutagenicity still exists in some HPs.

(Received August 25, 1997)

Key words: 酸加水分解エキス protein hydrolysate; 3-クロロ-1,2-プロパンジオール 3-chloro-1,2-propanediol (MCP); モノクロロヒドリン monochlorohydrin; 変異原性 mutagenicity; 前進突然変異試験法 forward mutation test

はじめに

酸加水分解エキスは、原料中のタンパク質を分解して構成アミノ酸を遊離状とし、それらに含まれる呈味成分を食品の調味、加工に利用することを目的とした製品¹⁾である。原料に動物性素材を用いれば hydrolyzed animal protein (HAP)、植物性の場合には hydrolyzed vegetable protein (HVP) と呼ぶが、両者を合わせて

HP と略称する。この場合分解条件が適切であれば、タンパク質がすべて遊離のアミノ酸となり、それ以外の反応は起こらないと思われる。

しかし、実際には素材中のタンパク質量が原料によって異なるため、聞き取り調査によれば各メーカーは、アミノ酸回収率を確保する目的で大過剰の酸を投入する傾向がある。その結果、タンパク質のペプチド結合以外でも加水分解が起こり、中性脂質トリアシルグリセリンでは、グリセリンの水酸基にエステル結合している脂肪酸を切断する。生じたグリセリンと遊離脂肪酸のうち、前者は3位に塩素イオンが付いたモノクロロヒドリン、3-chloro-1,2-propanediol (MCP) を生じる^{2)~4)}。これが変異原性を有していたため、市販 HP 中に分布する

^{*1} 東京水産大学食品生産学科: 〒108-8477 東京都港区港南 4-5-7

^{*2} 黒竜江商学院: 中華人民共和国 〒150076 黒竜江省ハルビン市道里区通達街 50

^{*3} 国立公衆衛生院地域環境衛生学部: 〒108-8638 東京都港区白金台 4-6-1

MCP の濃度を自主的に規制しようとする動きが起きたのは、1990 年代初頭のことであった。その結果、HAP を製造している各社は製品中の MCP 濃度 1 ppm 未満を目標値として定め、製造法の改良に努めた。分解後の中和過程で製品の pH をいったんアルカリ側とする操作を行うこと⁹⁾により、問題発生から 1~2 年以内に目標値の 1 ppm をほぼ達成した。1990 年当時収集した HP の大部分からは、目標値をはるかに上回る MCP が検出されたが、1997 年に入手した大手企業製の HAP では規制値を越える試料は当然のことながら皆無となり、懸命な企業努力の跡が明瞭に示されている。しかし、このような努力は諸外国では必ずしも実行されていない場合も多く、韓国では 1996 年 2~3 月にアミノ酸配合醬油中の MCP の存在が指摘され、「化学醬油」の不買運動にまで発展する大きな社会問題⁹⁾となった。

著者らは食品の安全性に関する研究の一環として、HAP 製造工程と変異原性の関係について検討した結果、MCP 対策済みとされる市販 HAP の中でも、依然としてある強度以上の変異原性を示す製品が多数あることを見出し、MCP 以外の変異原性が存在することを検討する必要があると思われた。

そこで本報ではまず第 1 に、1990 年代初頭の市販天然調味料（熱水抽出エキス、酸加水分解エキス、酵素分解エキス及びそれらの配合調味料）80 余種における MCP 濃度の分析結果を報告する。第 2 に、微生物試験による MCP 標準品の単位重量当たりの変異原性の強さ（比活性）を測定したので、その結果を述べる。第 3 に、1990~91 年当時収集し自主規制値以上の濃度の MCP が検出された HP 試料のうち、主要メーカーの HAP 製品数種を対象として、微生物試験法による変異原性の強さを測定し、それらの変異原性に占める MCP の寄与の程度を検討したので報告する。最後に、現在市販されている MCP 対策済みの HAP（品名が 90 年当時と同一の製品、数検体を含む）における変異原性を微生物試験によって測定したので、その結果を報告する。

変異原性試験には、食品のように遊離ヒスチジンを常在成分として含む試料の測定にも適している前進突然変異試験を用い、変異原性の強さを測定した。

実験方法

1. 試料

1) MCP 分析用試料

1990~91 年に入手した市販品で、その内訳は熱水抽出エキス 36 検体（アサリ、ホタテ、ズワイガニ、マイワシ、エソ、マグロ、カツオ、かつお節、イカ、ポーク、ビーフ、チキン、シイタケ、タマネギ）、酸加水分解エキス（HP）18 検体（小麦グルテン、脱脂加工大豆、コーンミール、醬油粕、ビール酵母、ポーク、ビーフ、チキン、クジラ）、酵素分解エキス 28 検体（マイワシ、かつお煮汁、サバ、廃糖蜜、ビール酵母、ポーク煮汁）、

合計 82 検体である。製品の形状（ペースト、液体、粉末）に関わらず、入手後直ちに数本の 100 mL 容のポリ容器に小分けし、密栓して -30℃ で保存した。

2) 微生物試験用試料

- (1) MCP 未対策 HAP: 冷凍保存した MCP 分析用試料を使用した。
- (2) MCP 対策済 HAP: 現在市販されている MCP 対策済み HP、4 社 10 検体を供試した。なお、このうち 2 社 3 検体は、1990~91 年当時と同一の商品名で市販されていた。

2. 試料溶液の調製

1) MCP 分析

試料 1 g を蒸留水に溶かし 10 mL に定容後、その 1 mL をエキストレルートカラム（メルク社、担体 1g 充てん）に注入した後、室温で 10 分間放置した。その後ジエチルエーテル 25 mL を数回に分け、このカラムをゆっくりと自然流下させ、流出液に無水硫酸ナトリウム 5 g を加えて脱水後、クデルナダニッシュの装置で濃縮、乾固した。これにジエチルエーテル 1 mL を加えて溶かし、GC-ECD 分析用試料とした。

2) 微生物試験

- (1) 既知変異原性物質：ベンツピレン（B[a]P）、トリプ-P-2（Trp-P-2）、2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド（AF-2）及び MCP の 4 化合物をまず少量のジメチルスルフォキシド（DMSO）に溶かし、これを最終的に DMSO を 5% 含むようにろ過滅菌水で希釈した。
- (2) HAP 試料：HAP 250 mg を 5% DMSO 水溶液 5 mL に溶かし、メンブランフィルター（Toyo Advantec, 0.45 μ m）でろ過滅菌を行った。これを最高濃度とし、ろ過滅菌済 5% DMSO 水溶液で 2 倍希釈を繰り返し、合計 5 段階濃度の試料液を調製した。

3. 試薬

MCP 標準品は東京化成工業の試薬 1 級（純度 98%）を用いた。変異原性試験に用いた既知変異原性物質、一般試薬及び培地類は、特に記したものの以外は和光純薬、国産化学、東京化成工業製の生化学用、精密分析用又は特級を、DMSO は同仁化学の蛍光試験用を、調製済補酵素類はオリエンタル酵母製のコファクター I を用いた。S9 は既報⁷⁾のとおり Sprague-Dawley 系雄ラットに PCB を投与して誘導し、9,000 $\times$ g で 20 分間遠沈して無菌的に調製したものを、使用直前まで -80℃ に保存した。

4. 機器

MCP 分析用のガスクロマトグラフには、⁶³Ni-ECD 検出器を装備した島津製作所製の GC-9A を用い、カラムはフューズドシリカキャピラリーカラム（PEG-20M, 0.35 mm $\times$ 50 m）を使用した。

Table 1. 3-Chloro-1,2-propanediol (MCP) Found in Hydrolyzed Proteins Commercially Distributed in Japan in 1990

Maker	Raw materials	Munufacturing method	Form	MCP conc. (ppm)
A	Wheat gluten	HCl hydrolysis	Liquid	47.7
B-1-3	Soy bean*	HCl hydrolysis	Powder (+dextrin)	53.6**
B-4	Soy bean*	HCl hydrolysis	Liquid	15.4
C-1	Yeast	Enzymolysis	Powder (+HAP)	57.9
C-2	Yeast	HCl hydrolysis	Powder	33.2
D-1	Pork	HCl hydrolysis	Paste (+HVP)	100.9
D-2-3	Pork	HCl hydrolysis	Paste (+MSG)	50.5***
D-4	Pork	HCl hydrolysis	Powder	30.1
D-5	Pork	HCl hydrolysis	Powder (+sugar, K ₄ O ₇ P ₂)	24.6
D-6	Pork	HCl hydrolysis	Liquid	20.4
E-1	Crab	Hot water extraction	Liquid (+HVP, salt)	15.1
E-2	Sea scallop	Hot water extraction	Liquid (+HVP, HAP)	13.1
F-1	Yeast	Enzymolysis	Powder (+HVP, bonito extract)	15.0
F-2	Pork + Beef	Enzymolysis	Powder (+HAP, bonito extract)	7.4
G-1	Beef	HCl hydrolysis	Powder	21.2
G-2	Beef	HCl hydrolysis	Liquid	8.5
H-1	Whale	HCl hydrolysis	Paste	88.0

* Soy bean, corn meal, and soy sauce residue; ** Average of 3 samples; *** Average of 2 samples

5. MCP 定量法

荒木らの方法⁸⁾に準じたが、前後のピークとの分離が不十分であったため、昇温速度等を次のように改変した。すなわちキャリアに N₂ ガス (50 mL/分, スプリット比 1:90), メイクアップガスにも N₂ (60 mL/分) を用い、検出器温度は 260°C とした。カラムオーブンは 70°C で 4 分間保持後、毎分 4°C 昇温し、210°C で 30 分間保持した。分析には 2.1) で調製した試料 2 μ L を注入したが、この条件下では MCP の保持時間は 39.3 分で、検量線は 0~300 ppm の範囲で直線を示し、検出限界は 0.2 ppm であった。各試料とも標準品添加試験で MCP であることを確認後、2 回の分析の平均値を採用した。

6. 前進突然変異 (FM) 試験法

エイムス法⁹⁾は、試料中に遊離ヒスチジンが混在すると陰性対照値が高くなり、正確な試験結果の判定に支障を来すが、被検物質の前処理過程で変異原性の一部が失われることは既に報告⁷⁾した。本報で用いた FM 法は共存する遊離ヒスチジンの影響を受けない¹⁰⁾ので、調味料の分析には適している。試験菌には、8-アザグアニン (8-AG) 抵抗性検出に優れた *Salmonella typhimurium* TA 1535 に、変異原性物質検出感度を高める目的で TA 2000 のプラスミド pKM101 を導入した TM677 株¹¹⁾を用い、保存菌株は試験直前まで -80°C で貯蔵した。実際の FM 試験に当たっては、TM677 株を試験菌として用いる Skopek らの標準 FM 法^{11, 12)}の改良法¹³⁾を、更に縮小しかつ実験系を簡易化した方法¹⁴⁾を用いた。変異コロニー出現数が陰性対照の 2 倍以上の用量域で、か

Table 2. Mutagenicity of Authentic Mutagenic Compounds by forward Mutation Assay Using *Salmonella typhimurium* TM677 (Mutation frequency*/mg/plate)

Compound	+S9	-S9
MCP	0.00078	0.0055
B[a]P	1.4688	**
Trp-P-2	4.5169	**
AF-2	**	194.000

* (Number of colonies of mutants—number of colonies on negative control plate)/number of colonies on plates without 8-AG

** Not tested

つ用量曲線が直線性を示している部分の傾きから最小二乗法を用い、比活性 (プレート 1 枚当たり、単位重量当たりの変異率¹⁴⁾) を算出した。

結果及び考察

1. 1990~91 年に市販されていた市販天然エキスにおける MCP の分布

分析に供した熱水抽出エキス、酵素分解エキス、酸加水分解エキス (HP) など合計 82 検体のうち 20 検体から MCP が検出された。MCP が検出されたエキスの製造原料、製造方法、形状及び MCP 濃度は、一括して Table 1 に示した。これらはいずれも HP そのもの (15 検体, 8.5~100.9 ppm) か、又は HP を配合した製品 (5 検体, 7.4~57.9 ppm) であった。しかし熱水抽出エキス (34 検体) 及び酵素分解エキス (28 検体)

Table 3. Concentration of MCP and Mutagenicity of Hydrolyzed Animal Protein Manufactured in 1990~91

Sample No.	Materials	Form	MCP conc.	+S9	-S9
A-1	Pork	Power	30.1	—	+
A-2	Pork	Liquid	20.4	—	±
B-1	Beef	Powder	21.2	±	+
B-2	Beef	Liquid	8.5	—	+
C-1	Whale	Paste	88.0	—	+

+: Positive (number of mutants was more than double of spontaneous colonies)

±: Pseudo-positive (number of mutants was less than double, but over 1.5 times)

—: Negative (number of mutants was less 1.5 times of spontaneous colonies)

Concentration of MCP was determined by GC-ECD after Araki *et al.* Mutagenicity was measured by the forward mutation assay using *Salmonella typhimurium* TM677.

Table 4. Mutagenicity Found Currently Commercially Available Hydrolyzed Animal and Vegetable Proteins (Mutation Frequency* $\times 10^{-5}$ /g/plate)

Sample	Materials	Form	+S9	-S9
A-1**	Pork	Powder	—	24.19
-2**	Pork	Liquid	—	±***
B-1**	Beef	Powder	6.27	7.65
-2	Beef	Liquid	—	11.84
C-1	Gluten	Liquid	—	11.46
D-1	Pork	Paste	5.94	8.61
-2	Chicken + Vegetable extract	Paste	—	±***
-3	Chicken	Paste	3.86	6.42
-4	Beef	Paste	2.88	13.47
-5	Pork + Beef	Paste	—	10.14

* (Number of colonies of mutants—number of colonies on negative control plate)/number of colonies on plates without 8-AG

** These three samples were sold under the same trade names as that of manufactured in 1990~91 by the companies, however, being treated to remove MCP in the final process.

*** ±: Pseudo-positive

のみからなる製品では、MCP は全く検出されなかった。検出された HP 製品の原料や形状は様々であるが、いずれも塩酸を用いた加水分解法で作られていることが共通している。MCP 濃度は一般に液体製品よりもペーストあるいは粉末製品で高い傾向が見られた。粉末 HP の大半は液体 HP の水分をスプレードライ法で除去して製造されるので、製品の単位重量当たりの変異原性は液体製品より高くなると思われる。塩酸加水分解製品の中には MCP が検出限界以下の製品もあったが、この原因は前駆体である中性脂質の含量が低かったため、又は添加した塩酸量がタンパク質の分解でほぼ消費される量であったためと推察される。

2. 市販 HP (1990 年) 中の変異原性に占める MCP の割合

1) MCP 標準品の変異原性

9 段階の濃度 [各段階相互間の濃度差は 2 倍, 最高濃度は +S9; 320 ($\mu\text{g}/\text{plate}$), -S9; 160] に調製した MCP

標準品溶液を試料とし、FM 法で測定した結果を Table 2 に示す。この表から MCP の突然変異誘発率の比活性は +S9 条件下では 7.8×10^{-4} と、-S9 条件下の約 $1/10 (5.5 \times 10^{-3})$ であった。この +S9 の結果を間接変異原性物質である B[a]P や Trp-P-2 と、また -S9 条件下での値を直接変異原性物質である AF-2 のそれと比べる、いずれもおおよそ数万分の一程度の強さであった。以上のことから MCP は直接変異原性を示すが、代謝されると MCP 自身よりやや弱い間接変異原性を持つことを示している。また仮に製品中の MCP 濃度が暫定的自主規制値を超えても、深刻な問題を引き起こす可能性はそれほど大きくないと思われる。

2) 1990 年当時の市販 HAP 中の変異原性に占める MCP の割合

GC の結果、HAP エキス中には最高で 101 ppm の MCP が含まれることが分かった。今回 FM 法で用いたプレート 1 枚当たりで供試される HP の最高濃度は

625 $\mu\text{g}/\text{plate}$ であるから、したがって、この中に含まれる MCP 量は最高でも $625 \times 101 \times 10^{-6} \mu\text{g}/\text{plate}$ となり、FM 法における MCP の検出限界 15 mg/plate をはるかに下回るため、もし変異原性がすべて MCP によるものであると仮定すれば、これらの結果は陰性しか示さないはずである。しかし実際に、MCP 対策がとられていなかった 90~91 年当時の製品数検体を FM 試験にかけたところ、Table 3 に示したように MCP の含有量とは関係なく、+S9 条件下では 1 検体のみが弱い変異原性を示したが、-S9 条件下では 5 検体のすべてが陽性（1 検体は擬陽性）であった。この結果から、市販 HAP の示す変異原性の大半は、MCP 以外の変異原性物質によるものと判断された。

3. MCP 対策済 HAP の変異原性

そこで次に 1996~97 年に大手数社が製造した、MCP 対策済みとされる HAP 計 10 種を収集し、変異原性分布の実態を FM 試験法により測定した結果を Table 4 に示した。この表に示したとおり 10 検体のうち、間接変異原性（+S9 条件下）は 4 検体から 2.9~6.3/g/plate の変異原性が検出されたのみであったが、直接変異原性（-S9 条件下）は $6.4 \sim 24.2 \times 10^{-5}/\text{g}/\text{plate}$ の変異原性が 8 検体から検出され、残る 2 検体は擬陽性であった。供試した検体がそれほど多くないため、原料や製品の形状などと変異原性の多寡との相関性は見出すことができなかった。

MCP はげっし類の精子運動性に影響を及ぼすなどの National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) における動物実験結果^{15), 16)}から、数年前に HP 業界でもその生成抑制が深刻な問題となったが、変異原性そのものはそれほど強くないことを、公定法のエイムス試験法¹⁷⁾のみならず、FM 法でも確かめることができた。また改良型 HP の微生物試験結果から、多くのエキス製造会社で実施された酸分解エキス改良法は、中和過程におけるアルカリ処理のため MCP は存在しないが、高濃度の酸を用いて高温/高圧下などの厳しい環境条件下で処理するため、MCP 以外の変異原性物質が依然として生成していることが明らかになった。このことから、今後、酸加水分解エキス中に含まれているこれら MCP 以外の変異原性物質の化学構造の決定、分解条件との関連の解明などを追究するとともに、それらが生成しにくい、もしくは一度生成しても確実に除去又は破壊できるような、安全な HP 製造条件の確立が急務であると思われる。

謝 辞

本研究は日本学術振興会外国人特別研究員任 恵峰

と、その受け入れ研究者である林 哲仁が中心になって行ったもので、費用の一部は文部省科学研究費によりました。此処に記して深謝します。

文 献

- 1) 越智宏倫: “天然調味料の原料「天然調味料」” p. 40~42 (1993) 光琳, 東京.
- 2) Velisek, J., Davidek, J., Hajslova, J., Kubelka, V., Janicek, G., Monkova, B.: *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **167**, 241~244 (1978).
- 3) Silhankova, L., Smid, F., Cerna, M., Davidek, J., Velisek, J.: *Mutation Res.* **103**, 77~81 (1992).
- 4) Velisek, J., Davidek, J., Kubelka, V., Janicek, G., Svoboda, Z., Simicova, Z.: *J. Agric. Food Chem.* **28**, 1,142~1,144 (1980).
- 5) 犬飼太彦: “タンパク加水分解物の製造方法” 日本国公開特許公報. 平 4-88951, p. 315~321 (1992).
- 6) 落合慶一郎, 林 哲仁, 李 秉武, 劉 永濟: 経実連セミナー「化学醬油の危険性」講演・討論記録, 経済正義 30 号, p. 214~233 (1996). (原典は韓国語)
- 7) 任 恵峰, 林 哲仁, 大久保忠利, 後藤純雄, 渡辺悦生: 日水誌. **63**, 90~96 (1997).
- 8) 荒木恵一, 新家淳治, 早川修二, 金丸 豪: 三重県環境科学センター研究報告 **8**, 123~125 (1988).
- 9) 労働省安全衛生部化学物質調査課: “安衛法における変異原性試験—テストガイドラインと GLP” 第 1 版, p. 29~63 (1991) 中央労働災害防止協会, 東京.
- 10) Hayashi, T., Ren, H., Goto, S., Endo, H., Watanabe, E.: *J. Sci. Food Agric.* **70**, 16~24 (1996).
- 11) Skopek, T., Liber, H. L., Krolewski, J. J., Thilly, W. G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 410~414 (1978).
- 12) Skopek, T., Liber, H. L., Kaden, D. A., Thilly, W. G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4,465~4,469 (1978).
- 13) 高木敬彦, 後藤純雄, 村田元秀, 松下秀鶴, Lewtas, J.: 大気汚染学会誌 **23**, 9~19 (1988).
- 14) 任 恵峰, 林 哲仁, 後藤純雄, 遠藤英明, 渡辺悦生: 食衛誌. **37**, 301~307 (1996).
- 15) National Institute for Occupational Safety and Health: Health hazard data on 3-chloro-1,2-propanediol (RTECS number; TY4025000), Data of last updated, 91/07.
- 16) WHO Technical Report Series 837: Evaluation of certain food additives and contaminants, 3-chloro-1,2-propanediol and 1,3-dichloro-2-propanol, p. 31~32 (1993).
- 17) 大久保忠利, 林 哲仁, 渡辺悦生, 遠藤英明, 後藤純雄, 遠藤 治, 溝口次夫, 森 康明: 日水誌. **61**, 596~601 (1995).