クロロヒドリン化合物の変異原性

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

(1994年9月16日受付)

Mutagenicity of Chlorohydrins

Tadamichi Ohkubo,*¹ Tetsuhito Hayashi,*¹ Etsuo Watanabe,*¹ Hideaki Endo,*¹
Sumio Goto,*² Osamu Endo,*² Tsuguo Mizoguchi,*² and Yasuaki Mori*³

The mutagenicity of 19 chlorohydrins, including 3-chloro-1,2-propanediol, and 4 protein hydrolysates which contained 3-chloro-1,2-propanediol, were demonstrated with two *Salmonella* mutation assays, ultramicro forward-mutation assay using TM677 in the presence and absence of a metabolic activation system (S9mix) and preincubation assay using TA100 and TA98 in the presence and absence of S9mix.

As a result, 11 chlorohydrins and 3 protein hydrolysates showed mutagenicity. Three dichloroalkanol were more mutagenic than 3-chloro-1,2-propanediol. Eight monochloroalkanol showed mutagenicity. Optical isomers of 3-chloro-1,2-propanediol and 2-chloro-1-propanol showed different mutagenic activities. It was suggested that the hydrolysates contained not only 3-chloro-1,2-propanediol but also other mutagens.

キーワード: クロロヒドリン化合物, 調味用エキス, 変異原性, 3-chloro-1,2-propanediol

近年, 食生活の多様化, 食品の長期保存及び消費者への安定供給などのため, インスタント食品やレトルト食品に代表されるような各種加工食品の需要が増加している。これら食品の加工には消費者の好みに応えるべく, 各種調味液が呈味成分として使用されている。これらの調味液のうちタンパク質の加水分解物であるエキスがしばしば使用されている。このエキスは, 動物または植物タンパク質を酵素等を用いて加水分解し, 熱水等で抽出したものであるが, その原料としてクジラやカツオ等の魚肉や他の海産物を多く使用している。これらエキスのうち塩酸を用いて加水分解したものに, 変異原性を示す 3-chloro-1,2-propanediol などの若干のクロロヒドリン化合物が検出¹⁻³⁾され報告されている。また, これらの化合物はエキスの原料である動植物タンパク質中の脂質

(トリグリセリド)と塩酸との反応で生成^{4,5)}することが示唆されているが, 現在までに報告されている化合物数は少なく, かつ, その他の類縁化合物についての詳細な報告は現在のところ見当たらない。

そこで, 本研究ではこの 3-chloro-1,2-propanediol と構造が類似しているクロロヒドリン化合物の市販品を出来るだけ多く (19 種) 集め, その変異原性を検索すると共に, GC/ECD 分析により 3-chloro-1,2-propanediol の存在が示唆された調味用エキス 4 種⁴⁾の変異原性を検索した。

実験方法

クロロヒドリン化合物⁴⁾ 2,3-dichloro-1-propanol (98%), 4-chloro-1-butanol (85%), 3-chloro-1,2-

*¹ 東京水産大学食品生産学科 (Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Fisheries, Konan, Minato, Tokyo 108, Japan).

*² 国立公衆衛生院地域環境衛生学部 (Department of Community Environmental Sciences, National Institute of Public Health, Shirokanedai, Minato, Tokyo 108, Japan).

*³ 神奈川県衛生研究所生活環境部 (Department of Environmental Health, Kanagawa-Prefectural Public Health Laboratories, Nakao, Asahi, Yokohama, Kanagawa 241, Japan).

*⁴ 林 哲仁, 田口誠治, 後藤純雄, 遠藤英明, 渡辺悦生: 食品中の変異原物質に関する研究—I, 平成4年度日本水産学会春季大会要旨集, 1992, p. 335.

*⁵ 表記は化合物名(純度)の順とする。ただし, 純度は百分率とし, 一部各製造元による等級を用いた。また, 3-chloro-1,2-propanediol については本文および図表中において, 3-chloro-1,2-propanediol と記した場合, ラセミ体を意味する。

propanediol (98%), R-(−)-3-chloro-1,2-propanediol (98%), 1,3-dichloro-2-propanol (95%), 1,4-dichloro-2-butanol (95%), 1-chloro-2-propanol (ca. 25% containing 2-chloro-1-propanol), 5-chloro-1-pentanol (80%), 6-chloro-1-hexanol (95%), 1-chloro-2-methyl-2-propanol (95%), 2,2,2-trichloro-ethanol (98%) および 1,1,1-trichloro-2-methyl-2-propanol (特級) は東京化成工業製のものを、3-chloro-2,2-dimethyl-1-propanol (99%), 2,2-dichloroethanol (99%), 2-chloroethanol (99%) および S-(+)-2-chloro-1-propanol (97%) は Aldrich Chemical Company Inc. 製のものを、R-(−)-2-chloro-1-propanol (98%) と 3-chloro-1-propanol (98%) は Janssen Chimica 製のものを、また、S-(+)-3-chloro-1,2-propanediol (一級) は和光純薬工業製のものをを用いた。

調味用エキス クジラ、酵母、豚肉の加水分解物および豚肉と植物タンパク質エキス (HVP) の混合物を加水分解したものをを用いた。

代謝活性化酵素 代謝活性化作用により変異原性を示す化合物の変異原性測定のため、PCB (Kanechlor-500) で酵素誘導した Sprague-Dawley 系雄ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素 P-450 を含む上清液 S9 と補酵素類 (Cofactor-I, オリエンタル酵母製) で調製⁶⁾した S9 mix をを用いた。

エキス試料の変異原性画分抽出方法 エキス 4 g を蒸留水 10 ml で溶解し、この全量をエキストレートルカラム (Merck 社製、担体ケイソウ土 5 g, 試料溶液 2 ml 当り 1 g) に注入し、吸着させた。10 分間放置後、ジエチルエーテル 125 ml (担体 1 g 当り 25 ml) を用いて成分を溶出させ、無水硫酸ナトリウムで脱水後、エバポレーターで濃縮し、N₂ ガス気流下で溶媒を留去し被験試料を調製した。これにジクロロメタン 4 ml を加えて再溶解し試料濃度 1 g/ml として、変異原性試験用試料とした。

変異原性試験法 エキス試料およびクロロヒドリン化合物の変異原性測定には、*Salmonella typhimurium* TM677 株⁷⁾ を用いる ultramicro forward-mutation 法⁸⁾ (以下、UMF 法) を S9 mix の添加および無添加の両条件下で実施した。ただし、試験反応容器には底を加熱して平にしたダーラム管 (7×30 mm) にパラフィルム (American National Can 製) を覆ったものをを用いた。

また、クロロヒドリン化合物に関しては、*Salmonella typhimurium* TA100 および TA98 株を用いた Ames 法⁹⁾ の変法である preincubation 法⁹⁾ (以下、PI 法) を S9 mix の添加および無添加の両条件下で実施した。

変異原性試験結果判定 変異原性試験の判定は次の基

準に従って行った。すなわち、dose (投与量) と response (UMF 法の場合は変異コロニー数、生菌コロニー数及び希釈率より算出した突然変異誘発頻度: Mutation frequency: Mut. freq., PI 法の場合は復帰変異コロニー数: Revertants: Rev.) との間に比例 (dose-response) 関係があり、しかも response が自然変異コロニー数 (投与量 0 での変異コロニー数: control) の 2 倍以上あった場合は変異原性が陽性 (positive) とし、dose-response 関係は認められるが response が control の 1.5 倍以上 2 倍未満の場合は疑陽性 (psuedopositive)、さらに dose-response 関係が認められない場合や response が control の 1.5 倍未満の場合は陰性 (negative) とした。

結果および考察

若干の調味用エキス中から 3-chloro-1,2-propanediol が検出されているが、これ以外に 2,3-dichloro-1-propanol も検出されている。^{4,5)} この 2,3-dichloro-1-propanol の変異原性試験結果を Fig. 1 に例として示してある。また、検出された報告はないが 4-chloro-1-butanol の結果も併せて Fig. 1 に示してある。Fig. 1 から 2,3-dichloro-1-propanol は UMF 法および PI 法共に良好な dose-response 関係が認められ、TM677 株、TA100 及び TA98 株のいずれの菌株に対しても変異原性を示すこと、S9mix 添加および無添加の両条件下で変異原性を示すことが認められた。また、TA100 株と TA98 株の場合を比較すると塩基対置換型化合物に検出能の高い TA100 株の方が、フレームシフト型化合物の検出能の高い TA98 株よりも 2,3-dichloro-1-propanol の変異原性検出能の高いことが認められた。従って、2,3-dichloro-1-propanol は塩基対置換型化合物に属することが示唆された。また、4-chloro-1-butanol の場合は UMF 法の TM677 株、PI 法の TA100 株に良好な dose-response 関係が認められ、PI 法の TA98 株には認められなかった。4-chloro-1-butanol も 2,3-dichloro-1-propanol と同様に塩基対置換型化合物であることが示唆された。

変異原性が比較的強い 4-chloro-1-butanol と 2,3-dichloro-1-propanol について例示しましたが、次に同種の実験によって得られた 4-chloro-1-butanol と 2,3-dichloro-1-propanol を含むクロロヒドリン化合物 19 種全ての変異原性試験結果を Table 1 に示してある。また、既に試験されている化合物については各文献^{10~14)} の値から算出した変異原活性も併せて示してある。Table 1 から、UMF 法では 19 種中 11 種に、PI 法では 19 種中 10 種に変異原性が認められた。このうち、文献と今回の試験結果から、変異原活性の強さは若干異なる

Fig. 1. Mutagenicity of 2,3-dichloro-1-propanol and 4-chloro-1-butanol by ultramicro forward-mutation (left) and preincubation assay (right).

Symbols indicate strain TM677 (Δ), TA100 ($\circ$), and TA98 ($\square$) without S9mix (–S9), and TM677 ($\blacktriangle$), TA100 ($\bullet$), and TA98 ($\blacksquare$) with S9mix (+S9).

ものの、2,3-dichloro-1-propanol, 3-chloro-1, 2-propanediol (TA100の親株であるTA1535で試験したもの)、1,3-dichloro-2-propanolの3種はAmes法およびその変法であるPI法の両試験で変異原活性が認められた。逆に、2-chloroethanolおよび3-chloro-1-propanolでは文献値と同様、今回の試験でもその変異原性が認められなかった。また、文献値で陽性又は陰性と分れた1-chloro-2-propanolに関しては、今回のPI法では陰性であったが、比較的感受度の良いUMF法では陽性となることが判った。また、今回用いたクロロヒドリン化合物中には食品中から検出された代表的な変異原性物質であるTrp-p-1 (39,000 rev./ μ g)やTrp-p-2 (104, 200 rev./ μ g)¹⁵⁾に比較し得るような強い物質は検出されなかった。次に、今回供試したクロロヒドリン化合物は前述の4-chloro-1-butanolおよび2,3-dichloro-1-propanolと同様にPI法のTA100株、UMF法のTM677株に対して高い変異原性を示すものの、PI法のTA98株に対しては殆ど変異原性を示さないことが認められた。従っ

て、これらクロロヒドリン化合物は塩基対置換型の変異、即ち、DNA鎖中のヌクレオチドの塩基において、プリン塩基間またはピリミジン塩基間での置換(トランジション)及びプリン塩基とピリミジン塩基との間の置換(トランスバージョン)の塩基対置換型変異を起こさせ易い物質であることが示唆された。逆に、TA98株に見られるようなフレームシフト型変異、即ち、DNA鎖中のヌクレオチドの塩基において、一個または数個の塩基が付加されたり欠損したりすることにより起こるフレームシフト型変異を起こさせ易い物質でないことが示唆された。

次に検索した物質数は多くないが、被験クロロヒドリン化合物の構造と変異原活性との関係を調べた。シクロロ体で直鎖に近い2,3-dichloro-1-propanolの両試験法において3-chloro-1,2-propanediolよりも高い変異原活性を示し、また、これ以外のシクロロ体である1,3-dichloro-2-propanolおよび1,4-dichloro-2-butanolはUMF法のS9mix添加条件下で比較的高い変異原性を与えることが認められた。しかし、分子の大きいと考えられるトリクロロ体の2,2,2-trichloroethanolおよび1,1,1-trichloro-2-methyl-1-propanol、更に、シクロロ体の2,2-dichloroethanol、メチル基が導入された3-chloro-2,2-dimethyl-1-propanolや1-chloro-2-methyl-1-propanolには変異原性が認められなかった。この他、モノクロロ体では4-chloro-1-butanol、3-chloro-1,2-propanediol、R(–)-3-chloro-1,2-propanediol、S(+)-3-chloro-1,2-propanediol、R(–)-2-chloro-1-propanol、S(+)-2-chloro-1-propanolおよび若干純度の低い5-chloro-1-pentanolは両試験法において変異原性を示し、1-chloro-2-propanolはUMF法で変異原性を示すことが認められた。しかし、炭素6個の直鎖状の6-chloro-1-hexanolや3個の直鎖状の3-chloro-1-propanol、2個の直鎖状の2-chloroethanolの変異原性は認められなかった。これらの原因は現在のところ明らかではないが、細胞膜透過性やDNAとの化学反応性の相違によるものと考えられ、今後詳細な検討を要する。

次に光学異性体についても検討を加えた。Fig. 2の3-chloro-1,2-propanediol、R(–)-3-chloro-1,2-propanediolおよびS(+)-3-chloro-1,2-propanediolの試験結果から、変異原活性は、S9 mix無添加条件下で、PI法ではTA100株においてS(+)-3-chloro-1,2-propanediol > R(–)-3-chloro-1,2-propanediol > 3-chloro-1,2-propanediolの順となるのに対して、UMF法ではS(+)-3-chloro-1,2-propanediolに変異原性が認められず、3-chloro-1,2-propanediol > R(–)-3-chloro-1,2-propanediolの順となることが判った。S9 mixを添加した場合には、PI法では3物質共、それらの変異原

Table 1. Mutagenic activities of 19 chlorohydrins

Compound	Ultramicro forward-mutation		Preincubation assay				Ames assay ^{*1, 6)}	
	Mut. freq. ($\times 10^{-5}$)/ μ g		Rev./ μ g				Rev./ μ g ^{*2}	
	TM677		TA100		TA98		TA100 (TA1535)	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
2,3-dichloro-1-propanol	3.55	20.3	1.68	0.49	0.04	0.03	4.60 15.6	3.45 ¹⁰⁾ 0.49 ¹¹⁾
4-chloro-1-butanol	0.13	1.70	0.33	0.34	—	—	—	—
3-chloro-1,2-propanediol	1.18	(0.06)	0.27	0.08	0.01	—	0.08	0.07 ¹²⁾
<i>R</i> -(-)-3-chloro-1,2-propanediol	0.78	(0.07)	0.18	0.10	—	—	—	—
<i>S</i> -(-)-3-chloro-1,2-propanediol	—	0.52	0.82	0.07	0.04	—	—	—
1,3-dichloro-2-propanol	—	4.16	0.15	0.11	—	—	0.06	0.14 ¹¹⁾ 0.94 ¹³⁾
1,4-dichloro-2-butanol	—	2.65	0.04	0.06	—	—	—	—
1-chloro-2-propanol	0.02	0.11	—	—	—	—	—	— ¹⁰⁾
							—	— ¹¹⁾
							0.01	0.01 ¹⁴⁾
5-chloro-1-pentanol	0.10	7.59	0.03	0.03	—	—	—	—
6-chloro-1-hexanol	—	—	—	—	—	—	—	—
3-chloro-2,2-dimethyl-1-propanol	—	—	—	—	—	—	—	—
1-chloro-2-methyl-2-propanol	—	—	—	—	—	—	—	—
2,2,2-trichloroethanol	—	—	—	—	—	—	—	—
2,2-dichloroethanol	—	—	—	—	—	—	—	—
2-chloroethanol	—	—	—	—	—	—	—	— ¹¹⁾
<i>R</i> -(-)-2-chloro-1-propanol	0.03	0.07	(0.01)	(0.01)	—	—	—	—
<i>S</i> -(+)-2-chloro-1-propanol	0.09	0.06	0.02	(0.02)	—	—	—	—
1,1,1-trichloro-2-methyl-2-propanol	—	—	—	—	—	—	—	—
3-chloro-1-propanol	—	—	—	—	—	—	—	— ¹⁰⁾
							—	— ¹¹⁾

(), pseudopositive; —, negative; ¹⁰⁾, reference number.^{*1} Most of tests were done on TA100 with and without S9mix. 3-chloro-1,2-propanediol only was tested on TA1535 with and without S9mix.^{*2} All value were calculated with results of the tests (revertants and compound weight).

性が大きく減少したが、UMF 法では 3-chloro-1,2-propanediol, *R*-(-)-3-chloro-1,2-propanediol が大きく減少するのに対して、*S*-(+)-3-chloro-1,2-propanediol に強い変異原性が認められる。また、*R*-(-)-2-chloro-1-propanol および *S*-(+)-2-chloro-1-propanol の試験結果から、UMF 法において変異原性が認められており、S9 mix を添加した場合、*R*-(-)-2-chloro-1-propanol の変異原性を上昇するのに対して、*S*-(+)-2-chloro-1-propanol では低下することが判った。これらの結果から、光学異性体はその立体構造による代謝活性化の影響および変異原活性の差があることが認められた。

最後に、GC/ECD 分析により 3-chloro-1,2-propane-

diol の存在が認められたエキス 4 試料の UMF 法による変異原性試験結果を Table 2 および Fig. 3 に示してある。この表および図から、酵母および豚肉加水分解物エキ스는 S9mix 添加および無添加の両条件下で変異原性を示すこと、クジラ加水分解物エキ스는 S9min 無添加条件下でのみ変異原性を示すこと、および豚肉と植物タンパク質の混合物の加水分解エキ스는両条件下で変異原性を示さないことなどが認められた。また、酵母および豚肉加水分解エキスの変異原性は S9mix 無添加条件下で強く表れ、S9mix を添加するとその変異原性が大幅に減少することも認められた。更に、クジラ加水分解エキスでは S9mix 無添加条件下で強い変異原性を示すこ

Fig. 2. Mutagenicity of 3-chloro-1,2-propanediol and its optical isomers, *R*-(-)-3-chloro-1,2-propanediol, and *S*-(+)-3-chloro-1,2-propanediol by ultramicro forward-mutation (above) and preincubation assay (below).

Symbols indicate 3-chloro-1,2-propanediol (○), *R*-(-)-3-chloro-1,2-propanediol (Δ), and *S*-(+)-3-chloro-1,2-propanediol (□) in TM677 and TA100 (above and below), and 3-chloro-1,2-propanediol (●), *R*-(-)-3-chloro-1,2-propanediol (▲), and *S*-(+)-3-chloro-1,2-propanediol (■) in TA98 (below).

Fig. 3. Mutagenicity of protein hydrolysates by ultramicro forward-mutation.

Symbols indicate whale (○), yeast (Δ), pork (□), and pork + HVP (×).

Table 2. Mutagenic activities of protein hydrolysates by ultramicro forward-mutation

Protein hydrolysates	Mut. freq. ($\times 10^{-5}/\text{mg}^{*1}$)	
	-S9	+S9
whale	14.3	—
yeast	22.5	3.56
pork	22.9	7.02
pork + HVP ^{*2}	—	—

—, negative.

^{*1} mg is equivalent of protein hydrolysates.

^{*2} hydrolyzed vegetable protein.

とが認められたものの、S9mix 添加条件下ではその変異原性が認められなくなった。これらの結果から、変異原性を示した3種の調味用エキスは動物の代謝酵素系(S9mix)の影響を受け易い変異原性物質を含むことが示唆された。今回検討したエキスの種類は極めて少なかったが、これらに含まれる3-chloro-1,2-propanediolはGC/ECDによる分析の結果から、数十～数百ppmと微量であった。従って、これら調味用エキス中には3-chloro-1,2-propanediol以外の複数の類縁変異原性物質の存在も考えられ、今後、更に研究を進める必要がある。

文 献

- 1) J. Velisek, J. Davidek, J. Hajslova, V. Kubelka, G. Janicek, and B. Monkova: Chlorohydrins in protein hydrolysates. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **167**, 241-244 (1978).
- 2) J. Velisek, J. Davidek, V. Kubelka, G. Janicek, Z. Svoboda, and Z. Simicova: New chlorine-containing organic compounds in protein hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.*, **28**, 1142-1144 (1980).
- 3) W. V. Rillaer and H. Beernaert: Determination of residual 1,3-dichloro-2-propanol in protein hydrolysates by capillary gas chromatography. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **188**, 343-345 (1989).
- 4) J. Velisek, J. Davidek, V. Kubelka, J. Bartosova, A. Tuckva, J. Hajslova, and G. Janicek: Formation of volatile chlorohydrins from glycerol (triacetin, tributyrin) and hydrochloric acid. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, **12**, 234-236 (1979).
- 5) J. Davidek, J. Velisek, V. Kubelka, G. Janicek, and Z. Simicova: Glycerol chlorohydrins and their esters as products of the hydrolysis of tripalmitin, tristearin and triolein with hydrochloric acid. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **171**, 14-17 (1980).
- 6) D. M. Maron and B. N. Ames: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.*, **113**, 173-215 (1983).
- 7) T. R. Skopek, H. L. Liber, J. J. Krolewski, and W. G. Thilly: Quantitative forward mutation assay in *Salmonella typhimurium* using 8-azaguanine resistance as a genetic marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 410-414 (1978).
- 8) 高木敬彦, 後藤純雄, 郭 錦堂, 杉田佐和子, 村田元秀,

- J. Lewtas, 松下秀鶴: Ultramicro forward-mutation 法を用いた微量室内空気浮遊粒子の変異原性. 大気汚染学会誌, **24**, 244-251 (1989).
- 9) T. Yahagi, M. Nagao, Y. Seino, T. Matsushima, T. Sugimura, and M. Okada: Mutagenicities of N-nitrosamines of *Salmonella*. *Mutat. Res.*, **48**, 121-130 (1977).
- 10) H. S. Carr and H. S. Rosenkranz: Mutagenicity of Derivatives of the flame retardant tris (2,3-dibromopropyl) phosphate: halogenated propanols. *Mutat. Res.*, **57**, 381-384 (1978).
- 11) A. Nakamura, N. Tateno, S. Kojima, M. Kaniwa, and T. Kawamura: The mutagenicity of halogenated alkanols and their phosphoric acid esters for *Salmonella typhimurium*. *Mutat. Res.*, **66**, 373-380 (1979).
- 12) L. Silhankova, F. Smid, M. Cerna, J. Davidek, and J. Velisek: Mutagenicity of glycerol chlorohydrines and of their esters with higher fatty acids present in protein hydrolysates. *Mutat. Res.*, **103**, 77-81 (1982).
- 13) M. D. Gold, A. Blum, and B. N. Ames: Another flame retardant, tris-(1,3-dichloro-2-propyl)-phosphate, and its expected metabolites are mutagens. *Science*, **200**, 785-787 (1978).
- 14) R. W. Biles and C. E. Piper: Mutagenicity of chloropropanol in a genetic screening battery. *Fund. Appl. Toxicol.*, **3**, 27-33 (1983).
- 15) T. Sugimura: Studies on environmental chemical carcinogenesis in Japan. *Science*, **233**, 312-318 (1986).