

Salmonella typhimurium TA97, TA102を用いた 食品添加物の変異原性試験(第9報*)

藤田 博**, 青木直人**, 佐々木 美枝子**

Mutagenicity Test of Food Additives with *Salmonella typhimurium* TA97 and TA102(IX*)

HIROSHI FUJITA**, NAOTO AOKI** and MIEKO SASAKI**

The mutagenicity of 34 food additives, including 10 seasonings, 6 bases for processing, 5 flavoring agents and 13 others were examined in Ames' tester strains, *Salmonella typhimurium* TA97 and TA102. The mutation test was carried out by the preincubation procedure described by Ames et al.¹⁾. The test chemicals were preincubated with S9mix or a phosphate buffer (pH 7.4) for 20 min. The 34 chemicals showed no mutagenicity in TA97 and TA102.

Keywords : 変異原性 mutagenicity, 食品添加物 food additives, サルモネラ *Salmonella typhimurium* TA97, *Salmonella typhimurium* TA102

化学物質の遺伝毒性を明らかにするために種々の変異原性試験が実施されている。その中でも Ames ら¹⁻³⁾が開発した、いわゆる Ames 試験は最も多用されている試験系であり、多くの変異原の検出に貢献してきた。Ames らは、様々な変異原を検出するためには *Salmonella typhimurium* TA97, TA98, TA100 および TA102 の4株を試験に用いるよう提案している³⁾。

食品添加物の変異原性についての Ames 試験による検討には、主に TA98 および TA100 が用いられてきた。TA97 および TA102 を用いた試験報告は少ないため、これらの菌株による試験を実施する必要があると考えられた。試験開始にあたり TA98 および TA100 における試験結果の報告がある食品添加物も含めた全食品添加物について行うことにした。既報⁴⁻¹²⁾において245種の試験結果を報告してきたが、それらのうち21種の食品添加物に TA97 または TA102 に対する変異原性が見いだされた。

本報告では、調味料(10種)、食品製造用アルカリ剤(6種)、着色料(5種)、膨張剤(4種)、着色料(2種)、発色剤(2種)、溶剤(1種)、チューインガム基礎剤(1種)、防虫剤(1種)、保存料(1種)、漂白剤(1種)の計

34種の食品添加物について行った追加試験の結果について述べる。

実験材料および方法

試料 以下の試料化合物は、特に表示されたものの以外は全て和光純薬製である。

調味料 : 5'-シチジル酸二ナトリウム (CAS No. 6757-06-8, LOT No. TWE6691), コハク酸二ナトリウム (CAS No. 150-90-3, LOT No. WDJ8980), L-グルタミン酸 (CAS No. 56-86-0, LOT No. APP3683), グリシン (CAS No. 56-40-6, LOT No. WDN1337), フマル酸一ナトリウム (CAS No. 5873-57-4, LOT No. PTN0889), コハク酸一ナトリウム (CAS No. 2922-54-5, 東京化成, LOT No. AV01), L-グルタミン酸ナトリウム (CAS No. 142-47-2, LOT No. WDJ0189), 乳酸ナトリウム(溶液) (CAS No. 72-17-3, LOT No. WDG9833), DL-リンゴ酸ナトリウム (CAS No. 676-46-0, LOT No. APJ1865), L-酒石酸ナトリウム (CAS No. 868-18-8, LOT No. PTQ1148)。

食品製造用アルカリ剤 : リン酸水素二カリウム (CAS No. 7758-11-4, LOT No. PTK3940), リン酸水素二ナトリウム 無水 (CAS No. 7558-79-4, LOT No. APJ

* 第8報, 東京衛研年報, 44, 278-287, 1993.

** 東京都立衛生研究所毒性部病理研究科 169 東京都新宿区百人町3-24-1

** The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan

3697), 炭酸ナトリウム 無水 (CAS No. 497-19-8, LOT No. PTH3569), 炭酸カリウム 無水 (CAS No. 584-08-7, LOT No. PTJ3402), リン酸三カリウム (CAS No. 7778-53-2, LOT No. PTL2769), リン酸三ナトリウム (CAS No. 10101-89-0, LOT No. PTK3091).

着香料: イソチオシアン酸エチル (CAS No. 542-85-8, LOT No. WDJ5863), インドール (CAS No. 120-72-9, LOT No. APK2040), フェニル酢酸イソブチル (CAS No. 102-13-6, LOT No. AWH3658), 1-ペリルアルデヒド (CAS No. 18031-40-8, 東京化成, LOT No. AX01), L-テアニン (CAS No. 3081-61-6, 東京化成, LOT No. FIB02).

膨張剤: 炭酸水素アンモニウム (CAS No. 1066-33-7, LOT No. PTK3136), 炭酸アンモニウム (CAS No. 506-87-6, LOT No. PTM2580), L-酒石酸水素カリウム (CAS No. 868-14-4, LOT No. DSE3264), 炭酸水素ナトリウム (CAS No. 144-55-8, LOT No. PTJ3381).

着色料: 三二酸化鉄 (CAS No. 1309-37-1, LOT No. PTP2230), 二酸化チタン (CAS No. 13463-67-7, Aldrich, LOT No. H-180).

発色剤: グルコン酸第一鉄 (CAS No. 22830-45-1, Aldrich), 硫酸第一鉄 (CAS No. 7782-63-0, LOT No. PTM2692).

溶剤: グリセリン (CAS No. 56-81-5, LOT No. APH3844).

チューインガム基礎剤: アセチルリシノール酸メチル (CAS No. 140-03-4, 東京化成, LOT No. AP01).

防虫剤: ピペロニルブトキシド (CAS No. 51-03-6, LOT No. LAP5620).

保存料: 安息香酸ナトリウム (CAS No. 532-32-1, LOT No. LAE0691).

漂白剤: ピロ亜硫酸ナトリウム (CAS No. 7681-57-4, LOT No. APH4211).

陽性対照物質: 2-アミノアントラセン, 9-アミノアクリジン, マイトマイシン C (協和発酵).

試料は, 溶解性によって蒸留水, リン酸緩衝液 (pH 7.4) またはジメチルスルホキシド (同仁化学, 吸収スペクトル用) に溶解した.

菌株 *Salmonella typhimurium* TA97¹³⁾ および TA102^{14,15)} を普通ブイヨン (Nutrient broth No. 2, OXOID) で一夜培養し用いた. これらの株は, B. N. Ames 教授 (カリフォルニア大) より分与を受けたものである.

変異原性試験 Ames 法の変法であるプレインキューベーション法^{3,16)}により行った. 代謝活性化には, ア

ロクロール1254 (ジーエルサイエンス) により薬物代謝酵素を誘導した雄性CD系ラット (Crj: CD 日本チャールス・リバー) の肝臓ホモジネートから調製した S9³⁾ を用いた. S9mix^{3,16)} 中の S9 量は, 10% (50 μ l/プレート) とした.

試料溶液 0.1ml を小試験管に入れ, 代謝活性化する場合には S9mix 0.5ml, 代謝活性化しない場合にはリン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5ml を加え, さらに一夜培養した菌液を 0.1ml 加え, 37°C で 20 分間の前培養を行った. これに 45°C に保温した軟寒天³⁾ 2 ml を加え混合後, 最少グルコース寒天培地³⁾ に重層した. 37°C で 2 日間培養後, プレートに生じた復帰コロニーを自動コロニーカウンターで計数した.

各濃度にプレート 3 枚を用い, 結果は, 平均値で示した. 統計解析は, Kruskal-Wallis 検定¹⁷⁾ を行い, さらに Moore ら¹⁸⁾ のプログラムによる回帰分析を行った. 両検定において有意な場合変異原性陽性とした.

結果および考察

34 種の食品添加物の TA97 および TA102 を用いた試験の結果を用途別に分類し, Table 1 に示した. 10mg/プレート を最高濃度とした予備試験を行い, 試料が溶解している濃度または試験菌株の増殖が認められる濃度を調べ, 本試験の最高濃度とした. 本試験は 5 濃度段階で行った.

今回試験した 34 種の試料は, いずれも復帰コロニー数に有意な増加は認められなかった. 従って, これらの化合物の TA97 および TA102 に対する変異原性は, 陰性と判断された.

今回試験を行った化合物の中には Ames 試験において陽性の報告がされているものがある. ピロ亜硫酸ナトリウムは, 水に溶かすと亜硫酸水素ナトリウムとなる. 亜硫酸水素ナトリウムは, 弱酸性条件下の S9 無添加において Ames の開発した菌株である G46, D3052 および TA97 などに弱い変異原性を示した¹⁹⁾. また, イソチオシアン酸エチルは, TA100 の S9 無添加において変異原性陽性である²⁰⁾. ただし, プレインキューベーション時間は 60 分であった. 今回の両化合物の結果は陰性であり, 一致しなかった. これは, 報告されている実験の実験条件が標準的な方法とは少し異なっていたのが陽性の結果となった原因かもしれない.

次に以下の化合物, 5'-シチジル酸二ナトリウム, コハク酸二ナトリウム, L-グルタミン酸, グリシン, L-グルタミン酸ナトリウム, 乳酸ナトリウム (溶液), DL-リンゴ酸ナトリウム, L-酒石酸ナトリウム, リン酸水素二ナトリウム, 炭酸ナトリウム, 炭酸カリウム, 1-ペ

Table 1. Results of Mutation Test on Food Additives

Chemical	Solvent	Dose mg/plate	No. of Revertants/plate ^{a)}			
			TA97		TA102	
			-S9	+S9	-S9	+S9
Seasonings						
Disodium 5'-Citidilate [6757-06-8] ^{b)}	DW	10	157	186	203	335
		5	136	196	242	326
		1	123	177	215	346
		0.5	174	203	225	349
		0.1	145	184	214	361
		0	162	189	228	345
Disodium Succinate [150-90-3]	DW	10	132	211	246	325
		5	137	194	234	317
		1	97	184	176	334
		0.5	149	190	212	319
		0.1	138	184	235	341
		0	118	177	205	363
L-Glutamic Acid [56-86-0]	PBS	1	164	204	205	326
		0.5	149	201	217	312
		0.1	167	213	194	318
		0.05	169	212	203	321
		0.01	169	211	181	337
		0	145	207	209	342
Glycine [56-40-6]	DW	10	162	196	177	302
		5	145	189	202	344
		1	158	201	156	324
		0.5	150	189	170	350
		0.1	158	187	196	355
		0	142	202	233	343
Monosodium Fumarate [5873-57-4]	PBS	10	156	231	198	307
		5	156	206	202	323
		1	160	197	179	309
		0.5	156	213	189	305
		0.1	147	215	191	298
		0	145	207	209	342
Monosodium Succinate [2922-54-5]	DW	10	161	207	273	380
		5	156	197	278	379
		1	155	216	261	396
		0.5	157	206	275	387
		0.1	148	217	291	426
		0	151	233	261	377
Sodium L-Glutamate [142-47-2]	DW	10	142	179	201	309
		5	165	198	204	350
		1	179	201	232	319
		0.5	139	213	227	326
		0.1	122	204	223	321
		0	142	202	233	343

Continued on

Table 1. Continued

Chemical	Solvent	Dose mg/plate	No. of Revertants/plate ^{a)}			
			TA97		TA102	
			—S9	+S9	—S9	+S9
Sodium Lactate (Solution) [72-17-3]	DW	10	144	195	224	339
		5	150	211	205	358
		1	152	197	227	363
		0.5	152	196	222	341
		0.1	143	216	223	339
		0	162	189	228	345
Sodium DL-Malate [676-46-0]	DW	10	167	224	206	266
		5	196	202	249	285
		1	176	238	237	316
		0.5	184	205	255	315
		0.1	182	231	242	297
		0	173	212	255	280
Sodium L-Tartrate [868-18-8]	DW	10	136	168	190	339
		5	130	174	195	321
		1	100	189	166	336
		0.5	119	178	200	346
		0.1	113	190	196	331
		0	118	177	205	363
Bases for processing						
Dipotassium Hydrogen Phosphate [7758-11-4]	DW	10	147	194	247	353
		5	174	219	256	361
		1	169	196	276	342
		0.5	176	215	238	335
		0.1	169	189	259	369
		0	152	192	257	344
Disodium Hydrogen Phosphate, Anhydrous [7558-11-4]	DW	10	165	232	281	406
		5	195	238	293	417
		1	185	253	292	383
		0.5	183	239	274	357
		0.1	200	236	280	393
		0	197	231	258	390
Sodium Carbonate, Anhydrous [497-19-8]	DW	10	48	93	103	219
		5	91	112	103	238
		1	131	216	169	306
		0.5	133	196	184	328
		0.1	126	200	183	328
		0	143	180	186	308
Potassium Carbonate, Anhydrous [584-08-7]	DW	10	115	140	122	240
		5	163	205	203	315
		1	157	203	209	326
		0.5	157	221	209	345
		0.1	173	217	189	335
		0	168	235	211	333

Continued on

Table 1. Continued

Chemical	Solvent	Dose mg/plate	No. of Revertants/plate ^{a)}			
			TA97		TA102	
			−S9	+S9	−S9	+S9
Tripotassium Phosphate [7778-53-2]	DW	10	104	128	169	234
		5	166	241	264	494
		1	157	203	233	338
		0.5	158	190	248	336
		0.1	157	218	241	335
		0	152	192	257	344
Trisodium Phosphate [10101-89-0]	DW	10	152	167	200	328
		5	195	258	277	384
		1	199	239	228	402
		0.5	192	212	278	389
		0.1	202	243	269	382
		0	197	231	258	390
Flavoring agents						
Ethyl Isothiocyanate [542-85-8]	DMSO	0.1	169	185	127	373
		0.05	161	200	140	371
		0.01	148	202	208	374
		0.005	140	184	201	370
		0.001	138	204	248	370
		0	147	196	247	370
Indole [120-72-9]	DMSO	1	92	164	76	295
		0.5	117	232	169	400
		0.1	139	185	236	376
		0.05	142	215	240	356
		0.01	137	217	227	345
		0	147	196	247	370
Isobutyl Phenylacetate [102-13-6]	DMSO	0.1	123	202	146	418
		0.05	129	208	202	396
		0.01	154	229	246	380
		0.005	170	217	255	382
		0.001	139	231	282	380
		0	148	225	241	391
l-Perillaldehyde [18031-40-8]	DMSO	0.1	139	185	198	413
		0.05	150	213	216	390
		0.01	152	217	263	396
		0.005	146	215	259	402
		0.001	149	231	254	411
		0	148	225	241	391
L-Theanine [3081-61-6]	DW	10	187	212	283	389
		5	170	216	258	390
		1	175	203	255	361
		0.5	175	229	288	370
		0.1	152	221	267	371
		0	151	233	261	377

Continued on

Table 1. Continued

Chemical	Solvent	Dose mg/plate	No. of Revertants/plate ^{a)}			
			TA97		TA102	
			-S9	+S9	-S9	+S9
Leavening agents						
Ammonium Bicarbonate [1066-33-7]	DW	10	103	183	188	228
		5	137	196	192	236
		1	117	209	186	323
		0.5	125	202	181	335
		0.1	152	220	205	306
		0	147	207	208	328
Ammonium Carbonate [506-87-6]	DW	10	152	279	215	466
		5	160	223	224	247
		1	153	221	212	297
		0.5	172	218	200	324
		0.1	165	231	202	328
		0	168	235	211	333
Potassium L-Bitartrate [868-14-4]	DW	1	177	213	230	389
		0.5	178	219	270	373
		0.1	177	225	265	352
		0.05	175	224	253	361
		0.01	188	252	269	377
		0	184	232	260	392
Sodium Bicarbonate [144-55-8]	DW	10	117	201	167	295
		5	120	198	191	304
		1	133	195	170	335
		0.5	128	189	177	298
		0.1	148	187	205	321
		0	147	207	208	328
Food colors						
Iron (III) Oxide [1309-37-1]	DW	1	173	225	261	393
		0.5	165	211	248	437
		0.1	145	241	275	410
		0.05	166	219	278	384
		0.01	163	251	252	415
		0	160	229	277	405
Titanium Dioxide [13463-67-7]	DW	1	161	246	305	427
		0.5	169	248	266	400
		0.1	179	223	281	407
		0.05	156	211	260	378
		0.01	172	231	253	361
		0	160	229	277	405
Color fixatives						
Iron (II) Sulfate [7782-63-0]	DW	1	155	255	244	332
		0.5	149	273	221	342
		0.1	186	226	254	293
		0.05	172	236	221	313
		0.01	171	229	259	299
		0	173	212	255	280

Continued on

Table 1. Continued

Chemical	Solvent	Dose mg/plate	No. of Revertants/plate ^{a)}			
			TA97		TA102	
			−S9	+S9	−S9	+S9
Gluconic Acid Iron (II) Salt Dihydrate [22830-45-1]	DW	1	192	248	244	372
		0.5	187	251	222	425
		0.1	182	218	263	375
		0.05	205	217	235	372
		0.01	206	228	229	353
		0	190	242	226	379
Other agents						
Glycerin [56-81-5]	DW	10	151	223	217	340
		5	135	208	194	345
		1	149	177	185	293
		0.5	149	187	211	331
		0.1	133	191	183	326
		0	143	180	186	308
Methyl Acetyl Ricinoleate [140-03-4]	DW	1	150	168	219	205
		0.5	146	175	218	199
		0.1	153	194	204	395
		0.05	167	194	201	356
		0.01	153	192	213	387
		0	148	204	235	367
Piperonyl Butoxide [51-03-6]	DMSO	1	143	193	186	421
		0.5	159	173	198	409
		0.1	155	175	182	419
		0.05	139	172	199	394
		0.01	157	220	233	365
		0	143	226	220	400
Sodium Benzoate [532-32-1]	DW	10	13	6	49	68
		5	42	88	153	214
		1	155	199	241	304
		0.5	159	174	223	314
		0.1	165	229	212	361
		0	161	203	230	371
Sodium Pyrosulfite [7681-57-4]	DW	10	140	152	164	239
		5	131	183	204	271
		1	133	152	201	324
		0.5	139	174	205	309
		0.1	169	191	213	341
		0	161	203	230	371
Positive controls						
9-Aminoacridine	DMSO	50 (μg)	1,000±205 ^{c)}			
Mitomycin C	DMSO	0.5 (μg)	3,142±309			
2-Aminoanthracene	DMSO	5 (μg)	3,545±396		1,090±195	

a) Mean of three plates.

b) CAS registry number.

c) Mean and standard deviation ($n=17$).

リルアルデヒド, L-テアニン, 炭酸水素アンモニウム, L-酒石酸水素カリウム, 炭酸水素ナトリウム, 三酸化鉄, グリセリン, アセチルリシノール酸メチル, ピペロニルブトキシドおよび安息香酸ナトリウムについては, TA98およびTA100において変異原性陰性の報告^{21,22)}が見られ, 今回の試験結果と合わせ4菌株以上の菌株による結果が一致した。従って, これらの化合物は, Ames 試験においては陰性と結論できるであろう。

なお, 上記化合物の内いくつかの化合物には, 他の変異原性試験系における陽性の報告が見られた。5'-シチジル酸二ナトリウムおよびL-酒石酸ナトリウムはチャイニーズハムスターの培養細胞に染色体異常を誘発した²²⁾。グリシンは, ヒト末梢血リンパ球およびタマネギ根端細胞においてSCEを誘発した²³⁾。ピペロニルブトキシドは, マウスのL5178Y細胞のtk遺伝子に突然変異を誘発し²⁴⁾, シリアンハムスターの胎児細胞のトランスフォーメーションを増加させた²⁵⁾。安息香酸ナトリウムは, ヒト末梢血リンパ球およびタマネギ根端細胞においてSCEを誘発した²⁶⁾。さらに, チャイニーズハムスターの培養細胞に染色体異常を誘発した^{22,27)}。1-ペリルアルデヒドは, rec-assayにおいて陽性の結果を示し²⁸⁾, チャイニーズハムスターの培養細胞に染色体異常を誘発した²²⁾。いずれも変異原性は陽性となったが, 様々な試験方法による結果のため比較は困難である。

また, 以下の化合物, フマル酸一ナトリウム, コハク酸一ナトリウム, リン酸水素二カリウム, リン酸三カリウム, リン酸三ナトリウム, インドール, フェニル酢酸イソブチル, 炭酸アンモニウム, 二酸化チタン, グルコン酸第一鉄および硫酸第一鉄では, これまでにAmes 試験における結果は明らかではなく, 今回のTA97およびTA102を用いた試験においての陰性が確認されたものである。ただし, 硫酸第一鉄は, マウスから取り出した脾臓細胞における小核試験において陽性を示し, 紫外線を照射する事によりさらに多くの小核を誘発することが報告されている²⁹⁾。

今回試験した34種の化合物の中には, 発ガン性に関する実験結果が報告されているものがある。炭酸カリウム³⁰⁾および炭酸水素ナトリウム³¹⁾は, ラットの餌に混入して投与した場合, 膀胱上皮細胞のDNA合成が促進され, 膀胱の発ガンの促進に関係していることが推定されている。インドールは, マウスに皮下投与した場合肺に腫瘍が発生した³²⁾。三酸化鉄は, ラットに皮下投与したときに, 投与部位に腫瘍が発生した³³⁾。また, 二酸化チタンは, ラットに微粒子として曝露し

たところ肺の腫瘍が発生した³⁴⁾。これらの化合物の内, Ames 試験および染色体異常試験において陰性の結果が報告^{21,22)}されている化合物は, 変異原性と発ガン性とに相関が見られない化合物のようである。

食品添加物のTA97およびTA102を用いた変異原性試験は, 前報⁴⁻¹²⁾に報告したように245種類が終了しており, 今回の34種を加えると279種類となった。これまでの結果を総合すると, TA97, TA102の両株かどちらかにおいて変異原性が見いだされた化合物は, 亜硝酸ナトリウム¹⁰⁾, アスコルビン酸⁴⁾, L-アスコルビン酸ナトリウム⁹⁾, エリソルビン酸¹¹⁾, エリソルビン酸ナトリウム⁸⁾, 塩化マグネシウム¹²⁾, 塩酸ピリドキシン⁵⁾, オルトフェニルフェノール⁴⁾, 過酸化水素¹⁰⁾, L-システインー塩酸塩⁸⁾, 食用青色2号¹²⁾, 臭素酸カリウム⁶⁾, チアベンダゾール⁴⁾, ニコチン酸アミド⁵⁾, ピペロナール¹⁰⁾, 没食子酸プロピル⁷⁾, マルトール¹¹⁾, DL-メチオニン¹²⁾, L-メチオニン¹²⁾, リボフラビン⁵⁾, リボフラビン5'-リン酸エステルナトリウム¹²⁾の21種類であった。これらの化合物には, TA98およびTA100では変異原性が検出されていない化合物が多い。ただし, これらの化合物のTA97またはTA102に対する変異原性は, 陽性対照に用いている変異原物質に比べるといずれもかなり弱いものであった。

ま と め

34種の食品添加物についてAmesの試験株TA97, TA102を用いた変異原性試験を行った。いずれも復帰コロニー数が増加しなかったことから, 変異原性陰性と判断した。

文 献

- 1) McCann, J., Spingarn, N. E., Ames, B. N., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 979-983, 1975.
- 2) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E.: *Mutation Res.*, **31**, 347-364, 1975.
- 3) Maron, D. M. and Ames, B. N.: *Mutation Res.*, **113**, 173-215, 1983.
- 4) 藤田 博, 小嶋昭江, 平賀興吾: 東京衛研年報, **36**, 413-417, 1985.
- 5) 藤田 博, 佐々木美枝子: 東京衛研年報, **37**, 447-452, 1986.
- 6) 藤田 博, 佐々木美枝子: 東京衛研年報, **38**, 423-430, 1987.
- 7) 藤田 博, 中野雅行, 佐々木美枝子: 東京衛研年報, **39**, 343-350, 1988.
- 8) 藤田 博, 佐々木美枝子: 東京衛研年報, **40**, 355-362, 1989.

- 9) 藤田 博, 佐々木美枝子: 東京衛研年報, **41**, 315-322, 1990.
- 10) 藤田 博, 角 千代, 佐々木美枝子: 東京衛研年報, **42**, 267-275, 1991.
- 11) 藤田 博, 角 千代, 佐々木美枝子: 東京衛研年報, **43**, 219-227, 1992.
- 12) 藤田 博, 佐々木美枝子: 東京衛研年報, **44**, 278-287, 1992.
- 13) Levin, D. E., Yamasaki, E. and Ames, B. N. : *Mutation Res.*, **94**, 315-330, 1982.
- 14) Levin, D. E., Hollstein, M., Ames, B. N., et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7445-7449, 1982.
- 15) Levin, D. E., Marnett, L. J. and Ames, B. N. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 4457-4461, 1984.
- 16) 矢作多貴江: 蛋白質核酸酵素, **20**, 1178-1189, 1975.
- 17) 石居 進: 生物統計学入門, 133-137, 1975, 培風館.
- 18) Moore, D. and Felton, J. S. : *Mutation Res.*, **119**, 95-102, 1983.
- 19) Pagano, D. A. and Zeiger, E. : *Mutation Res.*, **179**, 159-166, 1987.
- 20) Yamaguchi, T. : *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 3017-3018, 1980.
- 21) 石館 基: 微生物を用いる変異原性試験データ集, 1991, エル・アイ・シー.
- 22) Ishidate, M. Jr., Sofuni, T., Yoshikawa, K., et al. : *Fd Chem. Toxic.*, **22**, 623-636, 1984.
- 23) Zhang, Z. and Yang, J. : *Mutation Res.*, **280**, 279-283, 1992.
- 24) McGregor, D. B., Brown, A., Caspary, W. J. et al. : *Environ. Mol. Mutagen.*, **12**, 85-154, 1988.
- 25) Amacher, D. E. and Zelljadt, I. : *Carcinogenesis*, **4**, 291-295, 1983.
- 26) Xing, W. and Zhang, Z. : *Mutation Res.* **241**, 109-113, 1990.
- 27) Ishidate, M. Jr. and Odashima, S. : *Mutation Res.*, **48**, 337-354, 1977.
- 28) 兪 榮植 : 阪市医誌, **34**, 267-288, 1986.
- 29) Dreosti, I. E., Baghurst, P. A., Partick, E. J. et al. : *Mutation Res.*, **244**, 337-343, 1990.
- 30) Shibata, M. -A., Tamano, S., Fukushima, S. et al. : *Fd Chem. Toxic.* **27**, 403-413, 1989.
- 31) Fukushima, S., Tamano, S., Ito, N. et al. : *Carcinogenesis*, **9**, 1203-1206, 1988.
- 32) Dzioev, F. K. : *Voprosy Onkologii*, **20** (8), 75-81, 1974.
- 33) Maltoni, C. : *Prog. biochem. Pharmacol.*, **14**, 47-56, 1978.
- 34) Lee, K. P., Trochimowicz, H. J. and Reinhardt, C. F. : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **79**, 179-192, 1985.

tert-ブチルヒドロキノンのラット遊離肝細胞に及ぼす毒性

中 川 好 男*, 市 川 久 次*, 佐々木 美枝子*

Cytotoxicity of *tert*-Butylhydroquinone on Isolated Rat Hepatocytes

YOSHIO NAKAGAWA*, HISATSUGU ICHIKAWA*
and MIEKO SASAKI*

Keywords: *tert*-ブチルヒドロキノン *tert*-butylhydroquinone, 細胞毒性 cytotoxicity, 抗酸化剤 antioxidant, 遊離肝細胞 isolated rat hepatocyte, ラット rat

tert-ブチルヒドロキノン(tBHQ)は、ブチルヒドロキシアニソール(BHA)の代謝中間体の一つであり、かつまた両物質とも酸化防止剤として加工食品、石油製品等に使用されている。生体内において、BHAはミクロゾームのチトクロムP-450により酸化的脱メチル化反応をうけてtBHQを生成する¹⁾。生成したtBHQは、グルクロニド、硫酸抱合体等に代謝されるが、tBHQの一部は自動酸化を受けることにより反応性が極めて高いキノン体、つまり*tert*-ブチルキノン(t-BQ)になる²⁾。現在、BHAによる発癌性³⁾、催奇形性⁴⁾、遺伝毒性⁵⁾などがヒドロキノン体及びキノン体等の代謝中間体と生体成分との相互作用に起因すると推察されている。

tBHQの毒性については短期、長期及び発癌性試験等^{6,7)}により検討されているが、組織器官の構成単位である細胞に及ぼす影響についての情報は少ない。今回ここで用いた遊離細胞系は、薬物の取り込み、代謝、排泄などの動態、細胞膜及び細胞生理機能への影響、細胞内成分の消長等をカイネティックスの面から分析することができるため、化学物質による毒性発現の機序を考察する上で有益な情報を与える⁸⁾。前報⁹⁾において、著者らはBHAによる急性の肝細胞障害が、細胞内アデニンヌクレオチド、グルタチオン(GSH)、蛋白質SH濃度等の枯渇を伴って惹起し、ミトコンドリアの酸化的燐酸化系がその標的部位のひとつであることを明らかにした。今回の実験では、ラット遊離肝細胞におけるtBHQの毒性とキノン還元酵素であるDT-ジアホラーゼの阻害剤、ジクマロールとの作用を検討し、tBHQ毒性の発現機序を考察した。

実験材料及び方法

試薬 tBHQ(純度>98%)は東京化成社製、GSHと牛血清アルブミンはSigma社製、コラゲナーゼとジクマロールは和光純薬社製を用いた。このほかの試薬は市販の特級規格以上を使用した。

遊離肝細胞の調製と反応 遊離肝細胞は雄性Fischer-344系ラット(240-280g)の肝臓をMoldeusら⁸⁾のコラゲナーゼ灌流法により用時調製した。遊離した肝細胞は12.5mM Hepesと0.1%アルブミンを含有したKrebs-Henseleit緩衝液(pH7.4)にけん濁(10⁶細胞/ml)した。生細胞は0.16%トリパンブルーの排除能で確認し、調製直後の生細胞率は約90%であった。95%酸素-5%二酸化炭素気流下、37℃に加温した細胞けん濁液にtBHQ(終濃度0.5mM)を加えて反応を開始した。また、ジクマロール(終濃度30μM)は反応開始10分前に細胞けん濁液に加えた。tBHQとジクマロールは、各々ジメチルスルホキシドに溶かし、細胞反応液に加えたジメチルスルホキシドの終濃度は0.5%以下とした。反応開始後、経時的に分取した細胞液は細胞死及びアデニンヌクレオチド、GSH、蛋白質SHの各濃度について測定した。

細胞成分の定量 細胞内アデニンヌクレオチドはJonesによるHPLC法¹⁰⁾、還元型蛋白質SHはEllman試薬によるAlbanoらの方法¹¹⁾、GSHはReedらによるHPLC法¹²⁾、蛋白質はLowryらの方法¹³⁾によりそれぞれ測定した。プレップを伴う生細胞数は顕微鏡下で計数した。

結 果

Fig. 1は遊離肝細胞に及ぼすtBHQ及びジクマロー

*東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科 169 東京都新宿区百人町3-24-1

*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan

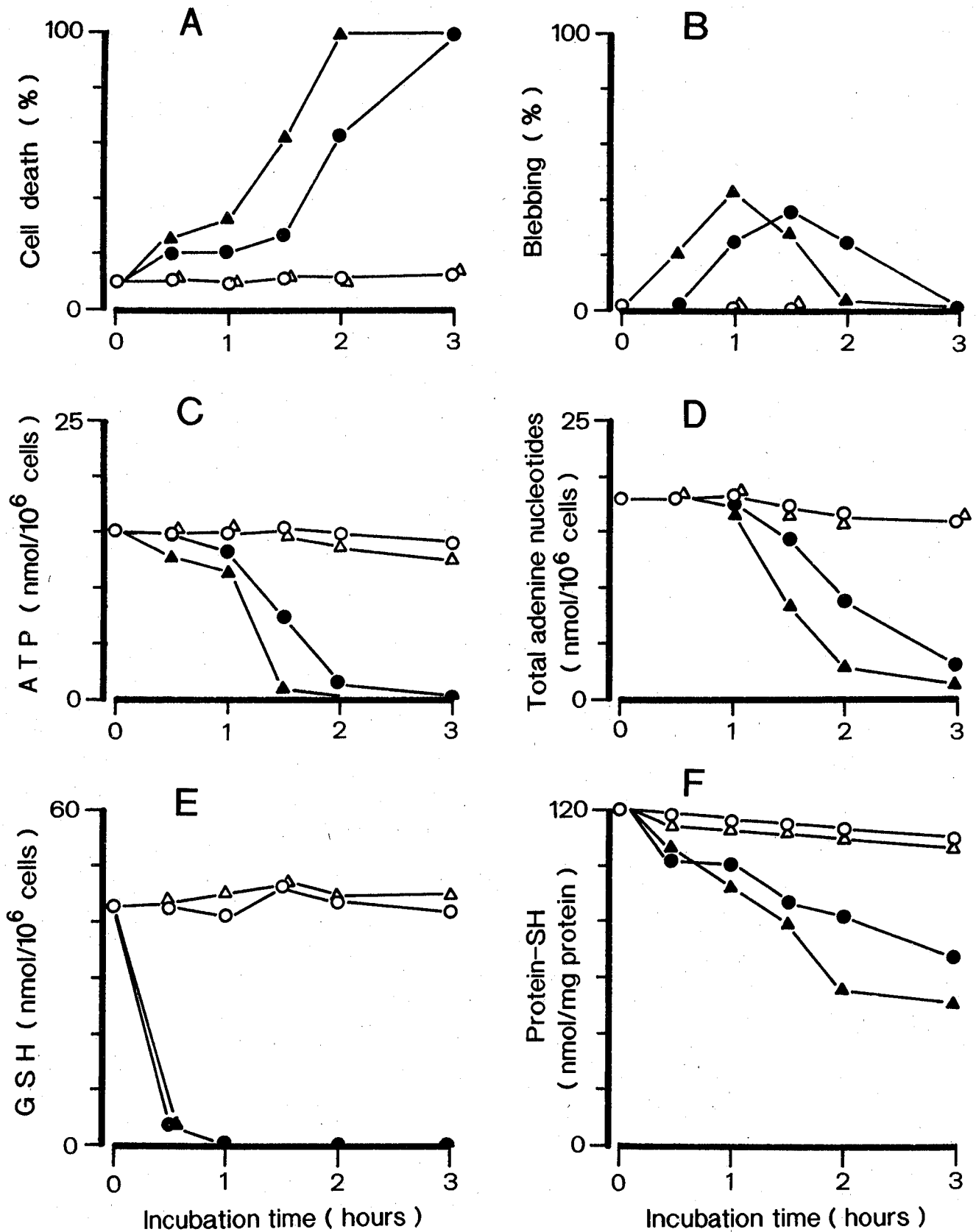


Fig.1. Effects of dicumarol on tBHQ-induced cytotoxicity: cell death (A), blebbing (B), ATP (C), total adenine nucleotides (D), GSH (E) and protein thiols (F). Hepatocytes (10^6 cells/ml) pretreated with or without $30 \mu\text{M}$ dicumarol were incubated in Krebs-Henseleit buffer containing 0.5 mM tBHQ: (○) nontreated cells, (△) dicumarol-treated cells, (●) tBHQ-treated cells, (▲) dicumarol and tBHQ-cotreated cells. One experiment typical of three.

ル併用による毒作用を示す。ここで用いた tBHQ の濃度は前報⁹⁾に基づき 0.5mM とした。また 30 μ M ジクマロールは細胞内 DT-ジアホラーゼ活性をほぼ 95% 阻害する濃度である¹⁴⁾。tBHQ 暴露は死細胞数の経時的な増加つまり細胞毒性を惹起した。細胞死に先立ち細胞内 ATP, GSH 及び蛋白質 SH 濃度が減少した。Fig. 1 には示してはいないが、ATP の減少は一時的な ADP と AMP の増加を伴っており、インキュベーション時間の経過とともにアデニンヌクレオチドプールは枯渇した。またブレップを伴った細胞数は細胞死の誘導に先立って増加した。一方、ジクマロール前処理は、tBHQ による細胞死の誘導、ATP 及び蛋白質 SH 濃度の減少を増強させた。また tBHQ による細胞のブレップ形成がジクマロール処置により早期に発現した。しかしジクマロールの単独暴露は 3 時間のインキュベーション中、これらのパラメーターになんら影響を及ぼさなかった。

考 察

ここで得られた結果は、tBHQ が急性の肝細胞毒性を惹起し、さらに DT-ジアホラーゼ阻害剤であるジクマロールとの併用により、この細胞毒性が増強することを示している。ハイドロキノン類の毒性は、そのもの自体よりむしろ自動酸化により生成する、セミキノン体、キノン体、及び活性酸素種などが重要な役割を担っている¹⁵⁾。事実、tBHQ の酸化体である *tert*-ブチルキノン (tBQ) は、細胞毒性及びミトコンドリア呼吸阻害とも tBHQ より強い作用を示した⁹⁾。キノンは 1 電子還元及び 2 電子還元酵素系でそれぞれセミキノンまたはハイドロキノンに還元される¹⁵⁾。セミキノン自体の生体成分に対する反応性は高く、さらにセミキノンの再酸化の過程で生じるスーパーオキシドもまた細胞傷害を誘発する一因である。一方、DT-ジアホラーゼは NADH あるいは NADPH₂ を介してキノンを 2 電子還元させるため、キノンからセミキノンとスーパーオキシドの生成を間接的に抑制する。それゆえに、ジクマロールによる DT-ジアホラーゼ活性の阻害時、tBHQ の細胞毒性が増強したことは (Fig. 1 A, C)、tBHQ 本体よりむしろ自動酸化により生成した tBQ あるいは tBHQ のセミキノン体等が、毒性の発現に関与していることを示唆している。

Orrenius ら¹⁶⁾ は、化学物質による細胞膜ブレップの形成が、細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇に起因すると報告した。ミクロフィラメント及び微小管等の細胞骨格の維持には、細胞内 ATP が必須である。ジクマロールがミトコンドリアの酸化的磷酸化を脱共役させると報告されている¹⁷⁾、この実験系では、インキュベーション期

間中細胞内 ATP 濃度に対してなんら有意な影響を及ぼさなかった (Fig. 1 C, D)。ジクマロールによる肝細胞の前処理は、tBHQ 依存性のブレップ形成と ATP 濃度の減少速度を早め、さらにこれらの両パラメーターの消長は細胞死に先行した。ATP 濃度の急激な枯渇はミトコンドリア呼吸系が tBHQ の重要な標的部位であることを示している。なお、tBHQ による ATP の枯渇は、細胞死に依存した二次的な現象ではなく、むしろ細胞内の主要なエネルギー産生部位であるミトコンドリア呼吸系の障害に起因するものであり、その結果として ATP の減少と細胞死が生じたと思われる。

前報⁹⁾において、細胞反応液中で tBHQ-GSH 抱合体が経時的に増加することを報告した。これは、細胞内 GSH による活性中間体の解毒代謝を示している。活性中間体による蛋白質 SH の酸化またはアルキル化は、蛋白質構造、細胞骨格の変化及び SH 基を活性中心にもつ酵素の失活を導き、細胞の生理機能に負の影響を及ぼす原因である¹¹⁾。また GSH の長期的枯渇は、化学物質由来の酸化的ストレスに対する細胞の防御能を弱め、結果的に還元型蛋白質 SH の濃度を低下させる一因でもある。本研究において、tBHQ による蛋白質 SH の減少がジクマロールで高進したことは (Fig. 1 F)、1 電子酸化還元系で生じるセミキノン及びスーパーオキシドによる酸化的ストレスがこの減少に関与することを示唆するものである。

要 旨

tBHQ (0.5mM) は、ラット遊離肝細胞に急性の細胞傷害を惹起した。細胞死に先行して、細胞内 ATP と GSH の枯渇、細胞膜ブレップの形成がみられた。tBHQ の細胞毒性は DT-ジアホラーゼ阻害剤、ジクマロール (30 μ M) により増強し、その毒性発現にセミキノン体及びキノン体 (tBQ) の関与が示唆された。

文 献

- 1) Armstrong, K. E. and Wattenberg, L. W. : *Cancer Res.*, **45**, 1507-1510, 1985.
- 2) Morimoto, K., Tsuji, K., Iio, T., et al. : *Carcinogenesis*, **12**, 703-708, 1991.
- 3) Ito, N., Fukushima, S., Tamano, et al. : *J. Natl. Cancer Inst.*, **77**, 1261-1265, 1986.
- 4) Tsuchiya, T., Ishida, N., Miyata, A., et al. : *Toxicol. In Vitro*, **2**, 291-296, 1988.
- 5) Rogers, C. G., Boyers, B. G., Matula, et al. : *Mutation Res.*, **299**, 9-18, 1993.
- 6) Ito, N., Fukushima, S., Hagiwara, A., et al. : *J. Natl. Cancer Inst.*, **70**, 343-349, 1983.

- 7) Van Esch, G.J. : *Food Chem. Toxic.*, **24**, 1063-1065, 1986.
- 8) Moldeus, P., Hogberg, J. and Orrenius, S : Isolation and use of liver cells. In Fleisher, S. and Packer, L. (eds.), *Methods in Enzymology*, vol. 52, 60-71, 1978, Academic press, New York.
- 9) Nakagawa, N., Nakajima, K., Moore, G. and Moldeus, P. : *Eur. J. Pharmacol.*, in press.
- 10) Jones, D. P. : *J. Chromatogr.*, **215**, 446-449, 1980.
- 11) Albano, E., Rundgren, P. J., Harvison, S. D., et al. : *Mol. Pharmacol.*, **28**, 306-311, 1985.
- 12) Reed, D. J., Babson, J. R., Beatty, P. W., et al. : *Anal. Biochem.* **106**, 55-62, 1980.
- 13) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, et al. : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, 1951.
- 14) Rundgren, M., Porubek, P. J., Harvison, P. J., et al. : *Mol. Pharmacol.*, **34**, 566-572, 1988.
- 15) O'Brien, P. J. : *Chem.-Biol. Interact.*, **80**, 1-41, 1991.
- 16) Orrenius, S., McConkey, D. J., Bellomo, G., et al. : *Trends Pharmacol. Sci.*, **10**, 281-285, 1989.
- 17) Stockdale, M and Selwyn, M.J. : *Eur. J. Biochem.* **21**, 565-570, 1971.