

研究論文

## 抗変異原活性をもつ宮崎県産農産物の探索

岩田喬子<sup>1)</sup>・榊原陽一<sup>1),2)</sup>・赤松絵奈<sup>1)</sup>・酒井美穂<sup>3)</sup>・柚木崎千鶴子<sup>3)</sup>・  
山崎正夫<sup>1),4)</sup>・西山和夫<sup>4)</sup>・水光正仁<sup>1),2)</sup>

<sup>1)</sup> 宮崎県産業支援財団結集型研究推進室, <sup>2)</sup> 宮崎大学農学部応用生物科学科生物機能科学講座,  
<sup>3)</sup> 宮崎県食品開発センター, <sup>4)</sup> 宮崎大学農学部応用生物科学科食品機能化学講座

(2007年10月16日 受理)

## Antimutagenic Activities of Farm Products Cultivated in Miyazaki Prefecture

Takako IWATA<sup>1)</sup>, Yoichi SAKAKIBARA<sup>1),2)</sup>, Ena AKAMATSU<sup>1)</sup>, Miho SAKAI<sup>3)</sup>,  
Chizuko YUKIZAKI<sup>3)</sup>, Masao YAMASAKI<sup>1),4)</sup>, Kazuo NISHIYAMA<sup>4)</sup>, Masahito SUIKO<sup>1),2)</sup>

<sup>1)</sup> Miyazaki Prefectural Industrial Support Foundation  
<sup>2)</sup> Department of Biochemistry and Applied Biosciences, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki  
<sup>3)</sup> Miyazaki Prefectural Food Research and Development Center  
<sup>4)</sup> Division of Food Science and Nutrition, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki

**Summary :** Forty four different farm products which are grown in Miyazaki prefecture were studied for antimutagenic activities. The selected samples are ethanol extracts from grains, vegetables, fruits and herbs. The Ames test and novel antimutagenic test using phase II conjugation enzyme (sulfotransferase) were used to determine the antimutagenic activities. Stalk of sweet potato, soybean, burdock, pericarp of mango and labiate herb had strong antimutagenic activities. While, when sulfate conjugation method is employed, soybean, burdock and mango pericarp showed remarkable antimutagenic activities than the Ames test. The antimutagenic activity of the food was able to be widely detected by using two methods.

**Key words :** Ames Test, Antimutagenic Activity, Farm Products, Sulfotransferase

### 緒言

発癌過程におけるイニシエーションは、癌遺伝子や癌抑制遺伝子に生じる様々な突然変異であることが知られている(篠原他 1996)。従って、突然変異の抑制は発癌抑制へとつながる。食品中の変異原物質としては、野菜、キノコ、香辛料、嗜好飲料など植物性食品の成分、カビ毒などの汚染物質、亜硝酸と二級アミンの反応により生じるニトロソアミン系の変異原物質、食品の加熱調理過程でタンパク質やアミノ酸の加熱分解により生じ

る複素環アミン系の変異原物質などがあり、これら食品中の変異原物質はヒトの発癌に関与している要因の一つと考えられている(吉元他 1998)。しかし一方、食品にはこれら変異原物質の作用を抑制する物質(抗変異原物質)も含まれていることがわかり、これら抗変異原物質を含む食品の探索には大きな関心が寄せられている。

抗変異原試験としては、サルモネラ菌を用いるAmes法を利用した方法が広く用いられている。Ames法は、アミノ酸の一種であるヒスチジンの

生合成系に欠損のあるサルモネラ変異株を用いて、ヒスチジン要求性から非要求性になる復帰突然変異を効率よく簡便にプレート上で検出することで変異原性を試験する方法である。しかしながら、このAmes法では、前駆変異原物質を第I相反応に関与するP450酵素群により代謝活性化するためにS9-mix（ラット肝臓ホモジネートのミクロソーム含有画分に補酵素を添加したもの）を添加しており、第II相反応によって代謝活性化される変異原物質については検出できない。この第II相反応では、第I相反応により官能基導入された物質が極性の高い官能基と抱合反応し、その結果、体外へ排出されることになる。しかし一方で、N-Hydroxy-2-Acetylaminofluoreneや9-Hydroxymethylanthraceneなどのように、抱合反応が生体異物の生物学的活性化を増強する物質の存在が報告されていることから（Glatt 1997）、この第II相反応を考慮することは極めて重要である。

そこで当研究室では、抗変異原試験としてAmes法を利用した抗変異原試験と、さらにこの第II相反応を考慮した新規変異原試験を用いた抗変異原試験の2つの方法を用いている。この新規変異原試験とは、第II相反応を行うヒト硫酸転移酵素11種類の中から、内因性のヒドロキシステロイドの代謝や、9-Hydroxymethylanthraceneの変異原代謝活性化に関与する硫酸転移酵素（SULT2A1）に分類されるデヒドロエピアンドロステロン硫酸転移酵素（DHEA ST : Dehydroepiandrosterone Sulfotransferase）（Glatt *et al.* 1995 ; Glatt & Meinel 2004）を用い、硫酸化による変異原代謝活性化を特異的に検出する方法である（榊原他 2003）。

本研究では、Ames法を利用した抗変異原試験と新規変異原試験を用いた抗変異原試験の2つの試験を用いて抗変異原作用をもつ農産物の探索を行った。用いた農産物はすべて宮崎県内で生産されたものであり、穀類やいも類、宮崎県で高い生産量をほこるピーマンをはじめとする野菜類、宮崎の特産品であるマンゴーやヒュウガナツなどの果実類、そしてハーブ類やお茶などである。また、農産物加工残渣、廃材等を有効利用する目的から、可食部だけでなく非可食部である皮、種子についても試験を行った。

## 材料および方法

### 1. 抗菌試験

#### 1) 試料の調製

宮崎県産農産物44種98品目の凍結乾燥品約1gに適量の80%エタノール溶液を加えてスターラーで攪拌しながら10分間抽出した。その後、抽出液をエバポレーターで濃縮、凍結乾燥後、DMSO（Dimethyl Sulfoxide）に溶解し、ポアサイズ0.45  $\mu\text{m}$ のフィルターで濾過滅菌したものを試料とした。

#### 2) 抗菌試験

*Salmonella typhimurium* TA98株を20 mlのBroth液体培地 [0.8% (w/v) Nutrient broth, 0.5% (w/v) NaCl] で37°C、14時間遮光振とう培養した。試験管を用意し、培養した菌液を100  $\mu\text{l}$ 加え（OD<sub>600</sub>=1.5）、濃度調製した試料をそれぞれ20  $\mu\text{l}$ 加えた。37°Cで20分間振とう培養を行った後、45°Cに保温してあるTop Agar [0.5 mM L-Histidine, 0.5 mM Biotin, 0.6% (w/v) NaCl, 0.8% (w/v) Bacto Agar] を反応液に2 ml加え、よく混和し、あらかじめ作製しておいたBroth寒天培地 [0.8% (w/v) Nutrient broth, 0.5% (w/v) NaCl, 1.5% (w/v) Bacto Agar] のプレートに重層した。37°Cで24±2時間倒置培養し、生育してきたコロニー数をカウントした。コントロールとして試料を添加していない菌液のみの場合についても同様に行った。

### 2. Ames法を用いた抗変異原試験

*S. typhimurium* TA98株をBroth液体培地20 mlで37°C、14時間遮光培養した。試験管を用意し、S9-mix（8 mM MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 33 mM KCl, 5 mM Glucose-6-phosphate, 4 mM NADH, 4 mM NADPH, 5 mM ATP, 200 mM Phosphate buffer pH 7.4）を100  $\mu\text{l}$ 添加後、培養した菌液を100  $\mu\text{l}$ 、変異原物質としてDMSOに溶かしたTrp-P-1（0.189  $\mu\text{g/ml}$ ）を10  $\mu\text{l}$ 添加し、そして調製した試料を20  $\mu\text{l}$ ずつ加えた。37°Cで20分間振とう培養を行った後、45°Cに保温してあるTop Agarを反応液に2 ml加え、よく混和し、あらかじめ作製しておいた最小グルコース寒天培地 [2.0% (w/v) D(+)-Glucose, 0.2% (w/v) MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 2.0% (w/v) Citric acid, Anhydrous, 10% (w/v) K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3.5% (w/v)

$\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1.5 % (w/v) Bacto Agar] のプレートに重層した。37 °Cで48 ± 2 時間倒置培養し、復帰してきたコロニー数をカウントした。試験は2回行い、抗変異原活性は、コントロールの突然復帰コロニー数を抑制する値 (%) として示した。また変異原物質を添加しない菌液のみの場合についても同様に試験を行い、自然復帰コロニー数としてバックグラウンドの補正に使用した。

### 3. 硫酸転移酵素を用いた新規抗変異原試験

#### 1) リコンビナント硫酸転移酵素精製

リコンビナントヒトSULT2A1の精製は、当研究室で既に確立している方法に準じて行った (Sakakibara *et al*, 1998)。まず、DHEA STを組み込んだ大腸菌を1 mlのLB液体培地 [1.0 % (w/v) Bacto Tryptone, 0.5 % (w/v) Yeast extract, 1.0 % (w/v) NaCl, 1.5 % (w/v) Agar, Ampicillin 0.1 mg/ml] で5時間、37 °Cで培養した。その後、100 mlのLB液体培地に移し、2時間、37 °Cで培養を行い、 $\text{OD}_{600} = 0.6$ まで増えたら誘導物質として0.1 mM IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside) を加え、9時間、25 °Cで培養した。50 ml用ファルコンチューブに移し、1,000 xgで10分間遠心分離により菌体を回収し、Lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 150 mM NaCl] を10 ml加え、菌を懸濁した。フレンチプレスで菌体を破壊した後、エッペンドルフチューブに分注し、15,000 xgで15分間、4 °Cで遠心した。この間に15 ml用ファルコンチューブでグルタチオンセファロースビーズ 500  $\mu$  lをLysis bufferで平衡化しておいた。ビーズを平衡化したものに遠心後の上清を加え、30分間転倒混和した。1,000 xgで3分間遠心し、ビーズを沈殿させ、上清は廃棄した。Lysis bufferとThrombin buffer [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ ] でビーズの洗浄を各3回ずつ繰り返した。ビーズに1 mlのThrombin bufferを加え、エッペンドルフチューブに移し、Thrombin (5 unit/ $\mu$  l) を5  $\mu$  l加え、2時間反応させた。2,500 xgで10分間、4 °Cで遠心し上清を精製酵素とした。タンパク質濃度を測定し、冷蔵保存した。各作業は低温状態で行った。

#### 2) 硫酸転移酵素を用いた抗変異原試験

*S. typhimurium* TA98株をBroth液体培地20 mlで37 °C、14時間遮光培養した。試験管を用意し、Buffer B [10 mM Phosphate buffer (pH 7.4), 150 mM KCl, 15 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 15 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50  $\mu$  M PAPS (3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate)] を40  $\mu$  l加え、60  $\mu$  g/mlになるように調製した酵素液 (希釈はThrombin bufferを用いた) を60  $\mu$  l加えた。培養した菌液 ( $\text{OD}_{600} = 1.5$ ) を100  $\mu$  l加え、変異原物質として9HMA (9-Hydroxymethylanthracene) (20 mM) を2  $\mu$  l添加、そして調製した試料を20  $\mu$  lずつ加えた。37 °Cで20分間振とう培養を行った後、45 °Cに保温してあるTop Agarを反応液に2 ml加え、よく混和し、あらかじめ作製しておいた最小グルコース寒天培地のプレートに重層した。37 °Cで48 ± 2 時間倒置培養し、復帰してきたコロニーをカウントした。試験は2回行い、抗変異原活性は、コントロールの突然復帰コロニー数を抑制する値 (%) として示した。また変異原物質を添加しない菌液のみの場合についても同様に試験を行い、自然復帰コロニー数としてバックグラウンドの補正に使用した。

### 結果および考察

#### 1. 抗菌試験

宮崎県産農産物の多くは、*S. typhimurium* TA98株に対する抗菌作用を示した。抗菌作用の強さは、試料作物の種類および部位によってさまざまであり、穀類、いも類、野菜類に比べ果実類、茶、ハーブ類は抗菌作用が高いものが多いと見いだされた。抗変異原試験は、抗菌作用のない濃度にて条件を設定し試験した。またその濃度はプレートあたりの添加量 ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ ) として表中に示した (表1 ~ 2)。

#### 2. Ames法を用いた抗変異原試験

突然復帰コロニー数を顕著に抑制したのは、いも類のカンショの茎、ハーブ類のレモンバーム、ペパーミント、ステビアであり (表1 ~ 3)、高い抗変異原作用を有することが示唆された。今回使用した変異原物質は、トリプトファンの加熱分解物から単離同定されたTrp-P-1で、肉や魚の焦げなどに生成すると考えられる物質である (平本

表1 宮崎県産農産物の抗変異原活性

作物名	品種	部位	添加量 ( $\mu$ g/プレート)	抗変異原活性 (%)		
				Ames <sup>a)</sup>	SULT <sup>b)</sup>	
<b>穀類</b>						
イネ	黒美人	可食部	50	38.6 $\pm$ 11.9	47.3 $\pm$ 0.3	
<b>いも類</b>						
カンショ	アヤムラサキ	可食部	100	23.2 $\pm$ 27.7	23.4 $\pm$ 3.8	
		茎	400	81.2 $\pm$ 1.5	83.6 $\pm$ 5.2	
サトイモ	泉南中野早生	葉	100	31.8 $\pm$ 1.5	60.8 $\pm$ 0.3	
		可食部	40	25.0 $\pm$ 18.8	75.7 $\pm$ 1.2	
		皮	50	24.2 $\pm$ 11.9	32.5 $\pm$ 8.9	
<b>豆類</b>						
ダイズ	九州134	可食部	400	52.5 $\pm$ 5.9	99.0 $\pm$ 0.8	
		可食部	100	0 $\pm$ 0	85.0 $\pm$ 0.6	
		可食部	200	33.6 $\pm$ 14.4	93.1 $\pm$ 0.7	
エンドウマメ	フクユタカ	可食部	50	11.1 $\pm$ 7.9	35.8 $\pm$ 6.3	
		可食部	200	49.1 $\pm$ 0.3	31.6 $\pm$ 6.3	
		茎・葉	200	41.5 $\pm$ 2.1	19.1 $\pm$ 17.2	
<b>葉茎菜類</b>						
ミズナ		可食部	100	11.0 $\pm$ 2.3	26.7 $\pm$ 1.6	
ハウレンソウ		可食部	100	40.5 $\pm$ 1.1	11.0 $\pm$ 6.1	
コマツナ		可食部	100	12.8 $\pm$ 18.0	11.4 $\pm$ 14.3	
ニラ		可食部	200	37.7 $\pm$ 0.2	12.4 $\pm$ 6.1	
ハクサイ		可食部	80	13.2 $\pm$ 16.0	5.7 $\pm$ 8.1	
キャベツ		可食部	50	5.6 $\pm$ 7.0	16.0 $\pm$ 4.8	
レタス		可食部	100	45.8 $\pm$ 16.9	6.9 $\pm$ 6.2	
タマネギ		可食部	200	17.8 $\pm$ 0.2	19.7 $\pm$ 3.3	
		葉	100	2.7 $\pm$ 3.7	4.0 $\pm$ 5.7	
<b>果菜類</b>						
スイートコーン	味来	可食部	200	35.6 $\pm$ 3.2	0.7 $\pm$ 1.0	
		芯	50	0 $\pm$ 0	28.6 $\pm$ 0.1	
ピーマン	橙	可食部	40	9.0 $\pm$ 2.3	10.0 $\pm$ 8.5	
		可食部	200	18.1 $\pm$ 0.5	7.7 $\pm$ 1.3	
		胎座	200	22.3 $\pm$ 2.2	3.9 $\pm$ 1.8	
トウガラシ	赤	可食部	15	0 $\pm$ 0	34.8 $\pm$ 0.4	
		胎座・種子	15	4.2 $\pm$ 6.0	41.9 $\pm$ 12.0	
		可食部	20	8.0 $\pm$ 7.9	0 $\pm$ 0	
	AC - 2258(完熟)	種子	10	0 $\pm$ 0	16.8 $\pm$ 0.9	
ナス	佐土原ナス	可食部	50	10.5 $\pm$ 7.2	6.1 $\pm$ 6.8	
キュウリ	シャープ1	可食部	200	30.1 $\pm$ 1.2	6.7 $\pm$ 1.7	
ミニトマト	千果	可食部	80	27.8 $\pm$ 6.5	0 $\pm$ 0	
カボチャ	黒皮	可食部	400	8.4 $\pm$ 11.8	23.8 $\pm$ 1.1	
		種子・ワタ	50	14.3 $\pm$ 20.3	12.6 $\pm$ 4.4	
ズッキーニ		可食部	200	36.6 $\pm$ 3.6	23.2 $\pm$ 2.7	
ニガウリ	こいみどり	可食部	30	0 $\pm$ 0	28.7 $\pm$ 8.2	
		胎座	10	0 $\pm$ 0	33.9 $\pm$ 1.8	
		種子	10	0 $\pm$ 0	31.1 $\pm$ 0.6	
		可食部	30	0 $\pm$ 0	31.9 $\pm$ 1.5	
		胎座	10	0 $\pm$ 0	21.8 $\pm$ 10.0	
		佐土原3号	種子	10	0 $\pm$ 0	9.1 $\pm$ 8.0
	トクセン	可食部	30	0 $\pm$ 0	49.9 $\pm$ 0.5	
		胎座	10	0 $\pm$ 0	37.0 $\pm$ 5.8	
		種子	10	0 $\pm$ 0	9.6 $\pm$ 6.1	
		可食部	30	0 $\pm$ 0	9.7 $\pm$ 12.0	
胎座		10	1.1 $\pm$ 1.6	0 $\pm$ 0		
	月美	種子	10	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	
	CM-5AS-24	可食部	30	6.0 $\pm$ 8.4	15.6 $\pm$ 0.2	
		胎座	10	2.9 $\pm$ 4.1	10.3 $\pm$ 1.3	
		種子	10	0 $\pm$ 0	1.8 $\pm$ 2.6	

a) : Ames法を用いた抗変異原性試験

b) : 硫酸転移酵素を用いた抗変異原性試験

表2 宮崎県産農産物の抗変異原活性 (つづき)

作物名	品種	部位	添加量 ( $\mu$ g/プレート)	抗変異原活性 (%)	
				Ames <sup>a)</sup>	SULT <sup>b)</sup>
<b>果菜類</b>					
	緑王	可食部	30	3.1 $\pm$ 4.4	31.9 $\pm$ 6.9
		胎座	10	0 $\pm$ 0	13.7 $\pm$ 9.5
		種子	10	0.8 $\pm$ 1.1	4.4 $\pm$ 6.2
イチゴ	とよのか	可食部	200	35.1 $\pm$ 4.4	35.7 $\pm$ 3.9
メロン	185株/a	可食部	400	26.2 $\pm$ 4.3	24.4 $\pm$ 1.5
		皮	20	23.8 $\pm$ 2.7	30.5 $\pm$ 2.7
		種子・ワタ	400	35.6 $\pm$ 2.9	9.8 $\pm$ 2.8
<b>根菜類</b>					
ダイコン	冬自慢	可食部	200	30.0 $\pm$ 14.4	16.0 $\pm$ 8.5
		葉	200	40.2 $\pm$ 8.8	8.2 $\pm$ 4.0
ニンジン	向陽2号(きたの)	可食部	200	43.1 $\pm$ 11.0	1.5 $\pm$ 2.1
		葉	200	67.9 $\pm$ 8.1	15.0 $\pm$ 4.0
ゴボウ	川柳理想	可食部	40	33.1 $\pm$ 15.4	79.9 $\pm$ 2.6
<b>果実類</b>					
マンゴー	アーウィン	可食部	200	16.6 $\pm$ 10.8	19.1 $\pm$ 1.1
		皮	200	45.6 $\pm$ 4.8	95.0 $\pm$ 0.2
ソヨミズ		可食部	1	7.1 $\pm$ 1.8	43.0 $\pm$ 4.4
		皮	50	38.5 $\pm$ 14.2	30.8 $\pm$ 2.8
		種子	2	2.3 $\pm$ 3.2	60.3 $\pm$ 2.8
へべズ		可食部	2	0 $\pm$ 0	57.8 $\pm$ 1.0
		皮	40	42.1 $\pm$ 7.2	40.5 $\pm$ 4.2
ヒュウガナツ		可食部	8	8.3 $\pm$ 2.2	42.4 $\pm$ 4.1
		皮	100	0 $\pm$ 0	38.3 $\pm$ 0
ウメ	南高ウメ	可食部	0.4	14.0 $\pm$ 1.9	35.9 $\pm$ 0
		種子	50	0 $\pm$ 0	28.9 $\pm$ 3.8
キンカン (完熟)		可食部	100	7.6 $\pm$ 0.5	24.3 $\pm$ 0.7
		種子	2.5	0 $\pm$ 0	49.0 $\pm$ 2.3
キンカン (未熟)		可食部	2	0 $\pm$ 0	60.5 $\pm$ 4.8
		種子	50	0 $\pm$ 0	33.5 $\pm$ 3.0
ブルーベリー	ホームベル	葉	25	21.8 $\pm$ 0.9	45.1 $\pm$ 8.4
	ティフブルー	葉	25	18 $\pm$ 1.3	73.5 $\pm$ 3.1
	フローダブルー	葉	25	24.1 $\pm$ 5.1	61.3 $\pm$ 1.7
	シャープブルー	葉	25	27 $\pm$ 3.3	54.1 $\pm$ 5.6
	スパルタン	葉	25	18.3 $\pm$ 6.6	55.1 $\pm$ 1.8
	パトリオット	葉	25	10.1 $\pm$ 8.1	47.9 $\pm$ 3.6
<b>茶類</b>					
釜炒茶 (一番)		葉	40	0 $\pm$ 0	22.8 $\pm$ 0
釜炒茶 (三番)		葉	40	0 $\pm$ 0	50.2 $\pm$ 6.4
煎茶 (一番)		葉	40	0 $\pm$ 0	25.7 $\pm$ 12.0
煎茶 (二番)		葉	40	0 $\pm$ 0	36.1 $\pm$ 3.2
煎茶 (三番)		葉	40	0 $\pm$ 0	58.4 $\pm$ 5.9
<b>ハーブ類</b>					
イタリアンパセリ		茎・葉	50	33.7 $\pm$ 14.5	35.3 $\pm$ 5.2
スベアミント		葉	50	67.5 $\pm$ 1.0	83.9 $\pm$ 2.5
スイートバジル		葉	50	28.6 $\pm$ 5.9	76.2 $\pm$ 1.2
ペパーミント		葉	200	79.5 $\pm$ 3.2	93.4 $\pm$ 2.2
ステビア		葉	100	69.9 $\pm$ 0.7	78.0 $\pm$ 1.0
レモンバーム		葉	200	79.9 $\pm$ 0.4	94.4 $\pm$ 0.4
ローズマリー		茎・葉	0.4	0.9 $\pm$ 1.3	29.3 $\pm$ 4.5
カモミール		花	8	28.7 $\pm$ 9.1	37.1 $\pm$ 0.6

a) : Ames法を用いた抗変異原性試験

b) : 硫酸転移酵素を用いた抗変異原性試験

他 1988; 黒田他 1993). Trp-P-1に対する抗変異原作用はこれまでも報告があり, 緑黄色野菜や果物において高く, 特にホウレンソウ, キャベツ, ナス, ゴボウなどに顕著な作用があることが

報告されている (賀田 1980; 黒田他1993). しかしながら, 今回は野菜類や果実類よりもむしろハーブ類において高い作用を示した. 江藤他 (2001) は, Trp-P-1と同じくトリプトファンの加熱分

表3 強い抗変異原活性のみられた宮崎県産農産物

Ames <sup>a)</sup>				SULT <sup>b)</sup>			
作物名	品種	部位	抗変異原活性 (%)	作物名	品種	部位	抗変異原活性 (%)
カンショ	すいおう	茎	81.2± 1.5	ダイズ	九州134	可食部	99.0±0.8
レモンバーム		葉	79.9± 0.4	マンゴー	アーウィン	皮	95.9±0.2
ペパーミント		葉	79.5± 3.2	レモンバーム		葉	94.4±0.4
ステビア		葉	69.9± 0.7	ペパーミント		葉	93.4±2.2
ニンジン		葉	67.9± 8.1	ダイズ	フクユタカ	可食部	93.1±0.7
スペアミント		葉	67.5± 1.0	ダイズ	キヨミドリ	可食部	85.0±0.6
ダイズ	九州134	可食部	52.5± 5.9	スペアミント		葉	83.9±2.5
エンドウマメ	混合	茎・葉	49.1± 0.3	カンショ	すいおう	茎	83.3±5.2
レタス		可食部	45.8±16.9	ゴボウ		可食部	79.9±2.6
マンゴー	アーウィン	皮	45.6± 4.8	ステビア		葉	78.0±1.0

a) : Ames法を用いた抗変異原性試験

b) : 硫酸転移酵素を用いた抗変異原性試験

解物の中から単離同定された変異原物質である Trp-P-2 に対するハーブ類の高い抗変異原作用を確認し報告している。中でも特に高い作用を示したものは、レモンバーム、ペパーミント、スペアミントなどのシソ科の植物であり、Trp-P-1を用いた今回の結果と一致していた。同じくシソ科の植物であるローズマリーとカモミールについては、他のハーブ類に比べ抗菌作用が強くプレートあたりの添加量が少なかったため、抗変異原作用が確認できなかった可能性が考えられた。今回変異原物質として Trp-P-1 についてのみ検討を行ったが、今回作用の低かったナス、コマツナ、ホウレンソウ、キュウリでは Trp-P-2 を用いた抗変異原試験にて高い作用を持つことが報告されており (Shinohara *et al.* 1991; Shinohara 1992)、特にホウレンソウでは、Trp-P-2 に対する抗変異原物質と予想されるフラボノイドが分離されている (Edenhaeder *et al.* 2001)。Trp-P-1 以外の変異原物質についても検討を行った場合また異なる結果が期待されるであろう。

また、今回試験に用いた農産物の試料はエタノール抽出物であったが、水抽出や熱水抽出、メタノール抽出によって高い抗変異原作用を示すものも知られている (Ohara *et al.* 2000; Negi *et al.* 2003)。ゴボウやキャベツ、タマネギ、ダイコン、ニンジンなどについては、その繊維物質に変異原物質が付着することにより抗変異原作用を示すことが確認されている (黒田他 1993)。このことから、試料抽出・調製方法によってもその効果が異なることが予想された。

なお、試料のみの添加による自然復帰コロニー数にはほとんど変化なく、今回試験した試料においては、試料そのものの変異原作用は見られなかった。

### 3. 硫酸転移酵素を用いた抗変異原試験

突然復帰コロニー数を顕著に抑制したのは、ダイズ九州134、フクユタカ、キヨミドリの可食部、マンゴー皮、ハーブ類のレモンバーム、ペパーミント、スペアミントであり、高い抗変異原作用を有することが示唆された (表1~3)。Ames法を用いた抗変異原試験において効果の高かったハーブ類に加え、豆類ダイズが高い抗変異原作用を示した。その他野菜類、果実類については、Ames法を用いた抗変異原試験と同様、ほとんど抗変異原作用を示すものはなかったが、ゴボウとマンゴーの皮のみ顕著な抗変異原作用を示した。このゴボウとマンゴーの皮、またハーブ類については、同じく宮崎県産農産物を用いて抗酸化作用の試験を行った柚木崎他 (2003) によって、高い抗酸化作用をもつことが報告されている。同様に高い抗酸化作用を示す緑茶ポリフェノールであるカテキン類の主要成分GCG (Gallocatechin gallate)、ECG (Epicatechin gallate)、EGCG (Epigallocatechin gallate) については、この手法を用いた試験によって顕著な抗変異原作用がすでに報告されている (榊原他 2003; 水野 2004)。これら2つの作用の相関関係までは確認できないが、抽出物に含まれるポリフェノール含量が大きく関係しているのではないかと考えられる

(下位 1995 ; 柚木崎他 2003). 今回試験した茶類に関しては、それほど高い抗変異原作用を確認することができなかったが、これはお茶そのものの抗菌作用が高かったため、プレートあたりの添加量が低く (40  $\mu\text{g}$ /プレート), 最終的に高い抗変異原作用を持つカテキン類の含量が低くなってしまったためと考えられた. 水野 (2004) の試験と同等の抗変異原作用を示すためには、茶葉のカテキン含量が10~20%であることを考慮すると、今回の試験の2~3倍の添加量が必要であると予想された.

なお、試料のみの添加による自然復帰コロニー数にはほとんど変化なく、試料そのものの変異原作用は見られなかった.

この第II相反応を重視した抗変異原試験では、ダイズ、ゴボウ、マンゴーの皮などAmes法を用いた抗変異原試験においてそれほど作用を示さなかった農産物において、顕著な抗変異原作用を確認することができた. 今回2つの抗変異原試験を用いて抗変異原作用をもつ農産物の検索を行うことにより、食品のもつ抗変異原活性を幅広く検出することができたと考えられる.

今回、サルモネラ菌を用いた簡便な抗変異原試験2種類を用いて、宮崎県産農産物44種98品目のエタノール抽出物について抗変異原作用に関して探索を行った. 原核生物であるサルモネラ菌を用いた比較的手間と時間のかからない一次スクリーニング的な手法ではあるが、多くの農産物の抗変異原作用を確認することができた. また、硫酸転移酵素を用いた抗変異原試験は、第II相解毒代謝機構を考慮した新しい手法であり、従来のAmes法を用いた試験では検出できなかった抗変異原物質をスクリーニングできる画期的方法である. これら二つの方法を組み合わせて使用することで、第I相から第II相解毒代謝機構まで幅広い代謝経路で作用する抗変異原物質を適切に評価できることが示唆された. さらに今後は、哺乳動物細胞を用いた組織培養実験や実験動物を用いたin vivoでの作用の確認 (田島他 1982 ; 黒田 1995) へと展開していくことが重要と考えられた.

## 要約

宮崎県産の穀類、野菜類、果物類、ハーブ類な

どの農産物44種98品目のエタノール抽出物について、Ames法を利用した抗変異原試験、第II相反応の硫酸抱合に注目した抗変異原試験の2つの試験を行った. 高い抗変異原作用を示したものは、カンショの茎、ダイズ、ゴボウ、マンゴー果皮、シソ科ハーブ類であり、中でもダイズ、ゴボウ、マンゴー果皮は、Ames法を利用した抗変異原試験よりも第II相反応の硫酸抱合を重視した抗変異原試験において顕著な抗変異原作用を示した. 今回2つの抗変異原試験を用いて抗変異原作用をもつ農産物の検索を行うことにより、食品のもつ抗変異原活性を幅広く検出することができた.

キーワード：抗変異原活性、農産物、硫酸転移酵素、Ames試験

## 謝辞

本研究は、科学技術振興機構 (JST) の支援による宮崎県地域結集型共同研究事業、厚生労働科学研究費「萌芽的先端医療技術推進研究事業」(トキシコゲノミクス) などの支援により実施された.

## 引用文献

- Edenhaeder, R., Keller, G., Platt, K.L., Unger, K.K. (2001) Isolation and Characterization of Structurally Novel Antimutagenic Flavonoids from Spinach (*Spinacia oleracea*). *J. Agric. Food Chem.* **49**, 2767-2773.
- 江藤義春, 藤居彩子, 西岡茂子, 伊藤友美 (2001) Trp-P-2の変異原性に及ぼすハーブ熱湯抽出液の抗変異原活性について. 中京女子大学研究紀要 **35**, 81-87.
- Glatt, H., Pauly, K., Czich, A., Falany, J.L., Falany, C.N. (1995) Activation of benzylic alcohols to mutagens by rat and human sulfotransferases expressed in *Escherichia coli*. *Eur. J. Pharmacol.* **293**, 172-181.
- Glatt, H. (1997) Bioactivation of mutagens via sulfation. *FASEB J.* **11**, 314-321.
- Glatt, H., Meinel, W. (2004) Pharmacogenetics of soluble sulfotransferases (SULTs). *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **369**, 55-68.
- 平本一幸, 根岸和雄, 綿矢有佑, 早津彦哉

- (1988) 食品の加熱で生じる発癌物質と活性酸素. 蛋白質核酸酵素 **33**, 2869-2874.
- 賀田恒夫 (1980) 自然因子による変異原の抑制. 遺伝 **34** (6), 49-54.
- 黒田行昭 (1993) 食品中の抗変異原物質. 食品工業 **1** (30), 16-27.
- 黒田行昭 (1995) 培養細胞による検出法. 抗変異原・抗発がん物質とその検索法. 講談社. 東京. pp. 278-291.
- 水野貴之 (2004) 硫酸転移酵素を用いた変異原試験法による食品の機能性評価. 学位論文
- Negi, PS., Jayaprakasha, GK., Jena, BS. (2003) Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food Chem.* **80**, 393-397.
- Ohara, A., Matsuhisa, T., Mori, K. (2000) Antimutagenicity of Herbs and Spices Used as Yakumi against Different Mutagens. *J. Home. Ecom. Jpn.* **51**, 725-729.
- Sakakibara, Y., Takami, Y., Nakayama, T., Suiko, M., Liu, M.-C. (1998) Localization and functional analysis of the substrate specificity/catalytic domains of human M-form and P-form phenol sulfotransferases. *J. Biol. Chem.* **273**, 6242-6247.
- 榊原陽一, 水野貴之, Liu, M.-C., 水光正仁 (2003) 硫酸転移酵素を用いた変異原試験法における食品の機能性評価に関する研究. *New Food Industry* **45** (10), 60-64.
- 下位香代 (1995) 野菜・果物の抗変異原物質. 抗変異原・抗発がん物質とその検索法. 講談社. 東京. pp. 278-291.
- Shinohara, K., Kong, ZL., Fukuda, T., Iino, K. (1991) Desmutagenic Actions of Partially Fractionated Dialyzate of Spinach on Trp-P-2. *J. Food Sci. Tech.* **38**, 242-248.
- Shinohara, K. (1992) Desmutagenicity of Vegetables and Fruits. *JARQ.* **26**, 62-66.
- 篠原和毅 (1996) 化学発がんにおけるイニシエーション過程の抑制. 栄養と健康のライフサイエンス **1** (4), 4-9.
- 田島彌太郎, 賀田恒夫, 近藤宗平, 外村晶 編 (1982) 動物個体を用いる実験系と検出法. 環境変異原実験法. 講談社. 東京. pp. 168-244.
- 吉元誠, 山川理, 須田郁夫 (1998) 紫サツマイモの生理機能. 食品と開発 **33** (8), 15-17.
- 柚木崎千鶴子, 小村美穂, アシोक・クマル・サーカー, 岡部玲二 (2003) 県内産農産物の抗酸化活性. 宮崎県工業技術センター・宮崎県食品開発センター研究報告書 **48**, 91-98.