

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2006～2009
 課題番号：18602003
 研究課題名（和文）紫外線照射した食品添加物、農薬の遺伝毒性発現機構の解析とその抑制に関する研究
 研究課題名（英文）Mechanism of photomutagenicity of UV-irradiated food additives and pesticides
 研究代表者
 太田 敏博 (OHTA TOSHIHIRO)
 東京薬科大学・生命科学部・教授
 研究者番号：10266893

研究成果の概要（和文）： マルトールはカラメル臭のある香料で食品添加物として使用されている。マルトール自体には変異原性はないが、紫外光を照射すると細菌細胞に対し変異原性を示すようになる。そのメカニズムを解析し、変異原物質の分離を行った結果、ホルムアルデヒドの生成が検出された。しかしながら、ホルムアルデヒドで説明できる変異原活性は全体の活性の10%以下であると推定され、未同定の新規変異原が関与していると考えられた。

研究成果の概要（英文）： Maltol are used as a flavor enhancer in breads and cakes. It became mutagenic to bacteria, when the solution was irradiated with UV. Formaldehyde was detected in a crude fraction containing mutagenic photoproduct from UVC-irradiated maltol. However, formaldehyde contributed less than 10% of mutagenicity of the mutagenic fraction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,000,000	0	1,000,000
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
総計	3,600,000	780,000	4,380,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：光遺伝毒性、変異原性、紫外線、食品添加物、農薬

1. 研究開始当初の背景

最近、輸入農産物における農薬の残留量や、国内産農産物における未登録あるいは登録が失効した農薬の使用などが問題となっている。農薬のなかでも収穫後の輸送期間中の防腐効果を目的として用

いられているポストハーベスト農薬は、輸入かんきつ類に高濃度で散布されるため、その残留量は一般の農薬に比べてはるかに高い。わが国においては、ポストハーベストは農薬の使用区分の対象となっていないため、ポストハーベスト農薬類は農薬とし

てではなく食品添加物としての規制を受けていることも問題を複雑にしている。農薬および食品添加物については、変異原性を含む各種毒性試験が適切な手法で行われ評価を受けているが、これらは原体の有効成分単独についてのものである。また、光分解や安定性については化学的な分析に基づく評価が行われているが、光分解物などの生物影響に関しては全く調べられていないのが現状である。近年オゾン層破壊による紫外線(UVB, UVA)の増大が懸念されており、光照射による遺伝毒性の発現の簡易試験法の開発やメカニズム解明は、益々重要になってきている。

これまでにフルオロキノリン類などの特殊な用途の医薬品や、化粧品に使用する紫外線吸収剤、ニトロソピロリジンなどの発がん物質についての研究報告はあるが、食品に関連した化学物質を対象にした研究は国内外でも我々の TBZ の報告を除いてはまったく行われていない。研究が進んでいない理由としては、光活性化の要因としてラジカルや活性酸素など短寿命の中間体が関与しているものがほとんどと考えられていたことが大きい。我々が見いだした香料マルトールの UVA 活性化体は水溶液中で数時間も変異原性の活性を失わないことから、かなり安定した物質と考えられる。このように、従来考えられていたものとは異なった性質の光活性化体ができることは興味深いが、同時にそのメカニズムを明らかにして、必要な対策を考える必要もあると考えられる。

2. 研究の目的

ポストハーベスト農薬であるチアベンダゾール(TBZ)が、それ自体には変異原性はないが、近紫外光(波長320nm以上)の照射で強力な変異原性を示すようになることを見だし、そのメカニズムの研究を続けている。最近、香料として用いられている食品添加物のマルトールにも近紫外光照射による変異原性の出現を見いだしている。このマルトールの光活性化体は安定性が高く、その作用メカニズムはTBZの場合とはまったく異なるものであることが示唆された。研究ではマルトールを中心に申請期間中に以下の項目について明らかにすることを目的とした。

(1) UVA 活性化機構の解明と活性体の分離同定

(2) 微生物細胞における誘発突然変異の特異性の解析

(3) ヌクレオチドやDNAとの作用特性の *in vitro* 解析とDNA付加体の検出

マルトールとTBZの作用機構の異なるUVA活性化体の解明からは、遺伝子の損傷(付加体形成、DNA鎖切断など)の実態がわかり、細胞における遺伝子突然変異の誘発機構が明らかになると考えられる。これは、同様な作用を持ちうる物質の検索のための試験手法の標準化に寄与できるものと期待される。さらに、作用機構の解明をもとに、UVA活性化のプロセスを効果的に抑制する因子、また、いったん生成されたUVA活性化体を効果的に失活させるような因子の検索ができると考えられる。特に食品成分、天然成分による抑制は実際面からも有用である。

3. 研究の方法

(1) UVA 活性化機構の解明と活性体の分離同定

UVA照射時の溶媒として、トリス緩衝液などカチオン性とリン酸緩衝液などアニオン性の場合の違い、リン酸緩衝液の濃度、pHの影響、さらに、生理食塩水、純水などの場合での変化を調べた。UVA照射マルトールのHPLCによる分画について変異原性の原因物質をバイオアッセイで調べた。ODSカラムを用いたHPLC分析により、UVC照射マルトール水溶液から変異原物質を含む分画を見出した。LC-TOF/MS分析を行った。さらにアルデヒド類に注目して、変異原分画を2,4-ジニトロフェニルヒドラジン(DNPH)-シリカカートリッジを用いて誘導体を作りHPLCで分析した。

(2) 微生物細胞における誘発突然変異の特異性の解析

誘発される突然変異の種類について微生物を用いて網羅的に解析した。微生物では種々のDNA修復欠損株が利用できるため、得られたデータからUVA照射マルトールで生じるDNA損傷の概要を推定した。また、UVA照射TBZの場合との相違点を明らかにするため、塩基対置換型変異に加え、フレームシフト型の突然変異の誘発についても解析を進めた。さらに、塩基付加体などのDNA損傷を乗り越えて複製を行うTLS型のDNAポリメラーゼR1をコードする *mucAB* 遺伝子をもつプラスミド導入菌株で、変異が増強されるかどうかを調べた。誘発された塩基対置換型の変異はどのようなタイプのものであるか解析を行った。これは6種の大腸菌株WP3101~WP3106を用いて、マルトール

の UVA 照射で生じる突然変異のスペクトルを解析することで行った。各々の菌株で Lac⁺ 復帰突然変異を指標に 6 種類の塩基対置換変異 (G→A、G→C、G→T、A→G、A→C、A→T) の誘発を特異的に別々に測定できるため、標的遺伝子のシークエンスを行わなくても、誘発された突然変異の種類を知ることができる。

(3) ヌクレオチドや DNA との作用特性の *in vitro* 解析

活性化体はかなり安定なものと考えられ、短寿命の活性酸素種が変異原性の主要な要因とは思われない。しかし、活性化体が 1 種類とは限らず、照射時には活性酸素種も関与している可能性はある。そこで、DNA に生じた 8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OHdG) の生成量を定量した。Salmon sperm DNA 溶液を用いてマルトールを添加し UVA 照射を行った。透析してマルトールを除いた後、ヌクレアーゼ P1 処理、アルカリホスファターゼ処理を行ってヌクレオチドに分解した。限外濾過で除タンパクを行って測定用サンプルとした。HPLC-ECD 分析により 8-OHdG の検出・定量を行った。

4. 研究成果

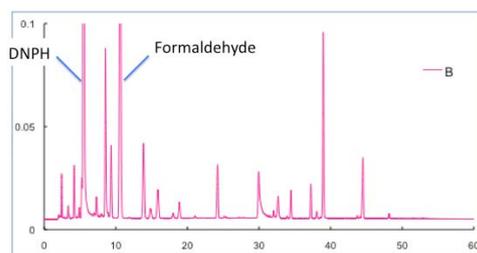
(1) UVA 活性化機構の解明と活性体の分離同定

マルトール水溶液そのものは変異原性を示さないが、UVA (ブラックライト) や UVC (殺菌灯) を照射した後にサルモネラ菌 TA100 株及び TA97 株に作用させると変異原性を示す。UVA 照射時の溶媒として、トリス緩衝液などカチオン性とリン酸緩衝液などアニオン性の場合の違い、リン酸緩衝液の濃度、pH の影響、さらに、生理食塩水、純水などの場合での変化を調べた結果、リン酸緩衝液 (pH6.0~8.0) や炭酸水素ナトリウム溶液 (pH9.0) 中での生成が多く、生理食塩水、純水中ではほとんど生成しないことが判明した。また、UVA 照射したマルトール溶液の変異原性は室温でも 1 時間は安定であることから、不安定な活性酸素種の関与は少ないと考えられた。

ODS カラムを用いた HPLC 分析により、UVC 照射マルトール水溶液から変異原物質を含む分画を見出し、LC-TOF/MS 分析を行った結果、変異原物質は分子量 162 (水が 2 分子付加した量) であると推測された。加水分解によるアルデヒドの存在が示唆されたため、変異原分画を 2, 4-ジニ

トロフェニルヒドラジン (DNPH)-シリカカートリッジを用いて誘導体を作り HPLC で分析した。多種類のアルデヒド類が生成していることが判明したが、用いた 27 種の標準品と一致したものはホルムアルデヒドとアセトアルデヒドのみであった。ホルムアルデヒドには TA100 株に対する変異原性が知られているが、UVC 照射マルトールの変異原活性の 10%程度に相当する検出量 (5~9 μg/mL) であった。したがって、ホルムアルデヒド以外の物質が主要な変異原物質と考えられ、今後、未同定のアルデヒド化合物の構造について調べていく必要がある。

図 1. UV 照射マルトール溶液中に検出され



たホルムアルデヒド

(2) 微生物細胞における誘発突然変異の特異性の解析

マルトール溶液を紫外線 (UVA または UVC) 照射することで変異原物質が生じた。サルモネラ菌 TA100 株と TA97 株に対する変異原性が強いことから、塩基対置換変異とフレームシフト変異が誘発されていると考えられた。一方、ヌクレオチド除去修復活性に関して野生株である TA92 株、TA102 株、TA1975/pKM101 株では変異原性が検出されなかったことから、塩基付加体形成が予想された。サルモネラ菌 TA7001~7006 株を用いて突然変異スペクトルの解析を実施した結果、UVA 照射マルトールは G:C→T:A および G:C→A:T 変異を強く誘発し、GC→C:G 変異をわずかに誘発するが、A:T→G:C, A:T→T:A および A:T→C:G 変異は誘発しなかった。

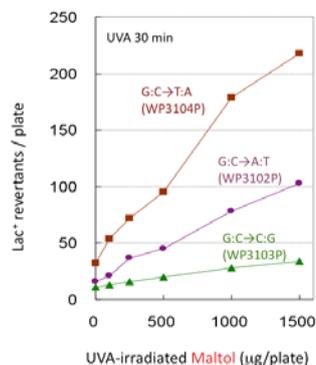


図 2. UVA 照射マルトールで誘発される突然変異の種類

(3) ヌクレオチドや DNA との作用特性の *in vitro* 解析と DNA 付加体の検出

活性酸素の作用で生じる 8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OHdG) の生成量を定量した結果、生成量にわずかな増加が認められたが、変異原性の強さを説明できる生成量ではなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Watanabe-Akanuma M, Inaba Y, Ohta T, Photomutagenic property of a flavoring maltol following UV-irradiation in *S. typhimurium*. *Mutagenesis*, 22, 43-47 (2007).
- ② Ohta, T., Additive mutagenic effects of DNA damages induced by multiple mutagens at virtually non-mutagenic dose level of each. *Genes Environ.*, 29, 141- 145 (2007).
- ③ Watanabe-Akanuma, M., Y, Inaba, T. Ohta, Analysis of photomutagenicity of thiabendazole with UVA irradiation: absence of 8-hydroxyguanosine formation. *Genes Environ.*, 28, 103-107 (2006)
- ④ Ohta, T., Mutagenic activity of a mixture of heterocyclic amines at doses below the biological threshold level of each. *Genes Environ.*, 28, 181-184 (2006)

[学会発表] (計 8 件)

- ① 越田英史、荒井理沙、稲葉洋平、太田敏博、Photomutagenicity of sidestream smoke condensate of cigarette with UVA- irradiation、第 38 回日本環境変異原学会、2009/11、清水
- ② 赤沼三恵、中島大介、稲葉洋平、内山茂久、太田敏博、Formation of formaldehyde from UV-irradiated maltol and ethylmaltol solution、

第 38 回日本環境変異原学会、2009/11、清水

- ③ Ohta, T., Watanabe-Akanuma, M., Nakajima, D., Inaba, Y., Uchiyama, S., Formation of formaldehyde from UV-irradiated maltol and ethylmaltol solution, 10th International Conference on Environmental Mutagens, 2009/8, Firenze, Italy.
- ④ 赤沼三恵、中島大介、山田樹里、角田真澄、太田敏博、Maltol および Ethylmaltol 水溶液への UV 照射で生成する変異原の解析、第 37 回日本環境変異原学会大会、2008/12、沖縄
- ⑤ Ohta, T., Additive mutagenic effects of DNA damages formed by multiple mutagens at virtually non-mutagenic dose level of each. International Symposium on Genotoxic and Carcinogenic Thresholds, 2008/7, Tokyo, Japan
- ⑥ Watanabe-Akanuma, M., Takagi, R., Hirai, K., Ohta, T., Mechanism of Photomutagenicity of UV-irradiated maltol solution. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens, 2007/11, Kokura, Japan
- ⑦ 坂平昌英、太田敏博、山形秀夫、貝瀬利一、角田真澄、中島大介、後藤純雄、赤沼三恵、マルトールの UV 照射により生成する変異原物質の分離、日本環境変異原学会、2006/11、堺
- ⑧ 赤沼三恵、太田敏博、角田真澄、中島大介、後藤純雄、マルトールおよびその構造類似体の UVA あるいは UVC 照射による変異原性の発現、日本環境変異原学会、2006/11、堺

[その他]

ホームページ等

<http://www.ls.toyaku.ac.jp/~lomb-5/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 敏博 (OHTA TOSHIHIRO)
東京薬科大学・生命科学部・教授
研究者番号：10266893

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：