

## Ames test を用いるチーズの抗変異原性について

—日常食品の変異原性に関する研究 (VI)—

三好 康之・原田 知美\*

Desmutagenicity of Cheese against the Trp-p1-induced Mutagenicity  
to Histidine-dependent Strain of *Salmonella* Typhimurium TA-98

—Studies of the Mutagenicity of Daily Foods (VI)—

Yasutaka Miyoshi and Tomomi Harada\*

### Summary

Desmutagenicity of various types of cheese against the Trp-p1-induced mutagenicity to histidine-dependent strain of *Salmonella* Typhimurium TA98 was studied. All kinds of cheese showed high desmutagenicity. The desmutagenicity percentage of the Camembert cheese processed by us reached a maximum of 78%.

**key words:** [desmutagenicity Ames test Trp-p1 cheese]

### 緒 言

近年わが国における主要疾患別にみた死亡者の第一位はガン疾患で、1997年においては27万1千人に達し<sup>1)</sup>、ガンの予防・克服こそが国民の緊急課題の一つである。

今日、ガンを予防するための研究は世界各国で行われ、その発生原因は喫煙と並び食事によって摂取される食物によるものが多いことが分かってきた。このため毎日の食事で摂取する食品の組み合わせを改善することにより、ガンを予防しようという動きが活発となっている。こうした発がんや食物の成分や加熱調理により生成された物質との因果関係については、特定の微生物、人工培養細胞、昆虫などを用いて盛んに研究され、発がんを引き起こす物質の80～90%は変異原性<sup>2)</sup>をもち、逆に発がんを示さない物質の70～80%は変異原性を示さない<sup>3)</sup>など、変異原性は発がんや深い関係にあることがしだいに明らかにされ、筆者らも日常食品の変異原性に関する研究成果を報告してきた<sup>4,5)</sup>。

1990年アメリカ国立ガン研究所を中心にとりわけ植物性食品によるガン予防を目的とし、どのような食品成分が特に人間の健康維持機能を果たしているのかを研究する「デザイナーズ・フーズプログラム」がスタートし、早くも1998年にはニンニクを筆頭にガン予防に効果のある食用植物40種が発表された<sup>6)</sup>。1997年にはアメリカガン研究財団(AICR)と世界ガン研究基金(WCRF)が、「ガン予防に必要な食生活やライフスタイルの心がけに関する15か条」を発表し<sup>7)</sup>、それぞれ世界的な反響をよんだことは記憶に新しい。

Faculty of Life and Science, Hiroshima Bunkyo Women's College

\* Faculty of Food and Nutrition, Hiroshima Bunkyo Women's College

わが国でも国立ガンセンターの「ガンを防ぐ12条」<sup>8)</sup>で、野菜、果物などの構成成分であるビタミンや食物繊維がガンを予防し、脂肪やアルコールの過剰摂取、喫煙、肉や魚の焦げの部分の多食などがガンの危険因子となりうると警告している。

また日本人は外国人（例えば米国人）と比較すると新鮮な野菜や漬け物などを起源とする硝酸塩の摂取が多いため胃ガンの発生率が高いが、牛乳の飲用を習慣にしている日本人には胃ガンのそれが低く<sup>9)</sup>、ヨーグルトやチーズなど発酵乳の摂取によるガン予防効果の報告・総説<sup>10,11)</sup>もみられる。なお、チーズや発酵乳についての抗変異原性については既に信州大学農学部の細野らを中心としてサルモネラ菌を用いて実施され、これらの醗酵食品は顕著に抗変異原性を持ち、ガン予防に関わっていると報告されている<sup>12)</sup>。

ところで、B.N. Ames らが開発したサルモネラ菌を用いる変異原性試験法の Ames test<sup>13)</sup> は、ヒスチジン生合成酵素系を支配している DNA 上の異なった箇所、塩基対置換型変異の起こった変異株 (TA1535, TA100 など) とフレイムシフト型変異の起こった変異株 (TA1537, TA1538, TA98) を組み合わせて用いる、ヒスチジン要求性から非要求性に戻る復帰突然変異を調べる方法である。

この論文は、最近のワインブームで注目されつつある発酵乳の代表食品ともいえる各種チーズの抗変異原性について、Ames test で実験した結果をまとめたものである。

## 実験方法

一般試薬はすべて市販特級品、純水 (D.I.W.) は脱イオン後、蒸留して使用した。

### 1. カマンベールチーズの加工 (チーズ A, B 共通)

表1. カマンベールチーズの加工に使用した牛乳の成分組成

	チーズ A	チーズ B
使用牛乳	雪印 3.6 牛乳	〃
無脂乳固形分	8.4% 以上	〃
乳脂肪分	3.6% 以上	〃
殺菌	120°C 2 秒間	〃
分量	1,000 ml	〃
使用ヨーグルト	明治 ブルガリアヨーグルト	チチヤスヨーグルト
無脂乳固形分	9.5%	8.0%
乳脂肪分	3.0%	2.5%
乳酸菌	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> 2038 株 + <i>Streptococcus thermophilus</i> 1131 株	<i>L. bulgaricus</i>  <i>S. thermophilus</i>

- ① ビーカーに牛乳 1,000 ml を入れ、湯浴中で 70°C ~ 80°C で 30 分間加熱殺菌する。
- ② 40°C に冷却した後、牛乳に市販ヨーグルトをスプーン 2 杯加え、約 2 時間、35°C で乳酸発酵させる。
- ③ カビ由来レンニン粉末 200mg と 5% CaCl<sub>2</sub> 溶液 0.5ml を加え攪拌し、40°C の湯浴中で約 40 分放置し、カゼインを凝固させる。

Ames test を用いるチーズの抗変異原性について

- ④ カードを切るようにまぜながらつぶす。
- ⑤ チーズクロス上に、カードを入れ、ゆっくり絞る。
- ⑥ そのまま水が切れるようにして、一晚冷蔵庫中で自然濾過する。
- ⑦ アルコールで発泡スチロール箱のなかを拭いて殺菌し、両脇に2つずつ小さな穴を開けて空気の通りを良くした自作チーズ熟成器の中に、滅菌済みのシャーレいっぱい詰めたフレッシュチーズの表面に、*Penicillium candidum* 孢子懸濁液をスプレーする。さらに食塩を振り、シャーレのふたをしないうで13°Cの恒温槽内で2週間熟成させる。

熟成前のフレッシュチーズ (a, b), 熟成後のカマンベールチーズ (A, B) の4種類を以後の実験に使用した。

## 2. Ames test<sup>13)</sup>

### 供試菌株

*Salmonella* Typhimurium TA98 株を使用した。

### 培養培地組成

#### a. 前培養培地

nutrient broth (Difco)	8 g	NaCl	5 g
D.I.W.	1,000 ml		

以上を混合溶解して滅菌L字型試験管に10mlずつ分注し、高圧蒸気滅菌(120°C, 1気圧, 20分, 以下同条件)して冷蔵庫に保存し、用時使用する。

#### b. Vogel-Bonnerの最小培地(10倍濃度原液用)

MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2 g	citric acid · H <sub>2</sub> O	20 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	100 g	NaNH <sub>4</sub> HPO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	35 g
D.I.W.	1,000 ml		

MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>Oを除くすべての塩を溶かした後に、これを添加して白色沈殿の析出を防いだ。希釈後のpHが7.0になるか調べておき、ついで、高圧蒸気滅菌し冷蔵庫に保存する。

#### c. 最小グルコース・アガー培地

Vogel-Bonnerの最小培地(10倍濃度原液用)	100 ml/D.I.W.	100 ml
glucose	20 g/D.I.W.	100 ml
agar (Difco)	15 g/D.I.W.	700 ml

それぞれ別のフラスコに入れ、高圧蒸気滅菌後、50°Cになったら混合し、乾熱滅菌済みのシャーレに無菌的に50mlずつ分注し、放置固化する。

#### d. ヒスチジン/ビオチン溶液(0.5mM溶液)

L-ヒスチジン塩酸塩	19.2 mg	D-ビオチン	24.7 mg
D.I.W.	200 ml		

ヒスチジンとビオチンをそれぞれ0.5mM含有する水溶液100mlずつ各々を作製する。両者を混合し、濾過滅菌して冷蔵庫に保管する。

#### e. ソフトアガー

NaCl	6 g	agar	7 ~ 10 g (冬~夏季)
D.I.W.	1,000 ml		

トップアガーの調整に用いる。40mlずつ三角フラスコに分注し、高圧蒸気滅菌後冷蔵庫に保存する。

f. トップアガー (サルモネラ用)

使用前直前に加熱溶解したソフトアガーに、1/10 量の 0.05mM ヒスチジン / ビオチン溶液を混合して作製する。その後 50°C に保温する。

菌株の接種, 前培養

実験開始日前日に、冷蔵庫に保存しておいた高圧滅菌済みの前培養培地に TA98 菌株を接種し、37°C で振とう培養 (約 120 往復 / 分) を 16 時間行い、前培養菌懸濁液をうる。この培養試験管を実験開始直前まで水冷し、菌の分裂を防ぐ。

薬物代謝活性化酵素 S9

S9 は市販品を購入した。

a. 購入先 キッコーマン株式会社 研究本部 第 2 研究部

b. 凍結 S9 Mix の品質 (品質保証書より)

ラット肝ホモジネート 9000xg 上清画分

使用動物: Sprague-Dawley Rat (Slc: SD)	性別: 雄
週令: 7 週令	体重: 193~241 g
誘導物質: フェノバルビタール (PB: 和光純薬工業 (株) 製) 及び 5,6-ベンゾフラボン (BF: アルドリッチ社製) を腹腔内投与	
投与容量: 1 日目 PB 30mg/kg	2 日目 PB 60mg/kg
3 日目 PB 60mg/kg+BF 80mg/kg	4 日目 PB 60mg/kg
5 日目 S9 調製	

凍結 S9 Mix 1ml 中の組成

S9	(キッコーマン (株) 製 RAA-383)	0.3ml
MgCl <sub>2</sub>	(和光純薬工業 (株) PTN2433)	5 μmol/0.1ml
KCl	(和光純薬工業 (株) LEJ2556)	33 μmol/0.1ml
Glucose-6-Phosphate	(オリエンタル酵母工業 (株) 115709)	5 μmol/0.1ml
NADP	(オリエンタル酵母工業 (株) 040718)	4 μmol/0.1ml
HEPES 緩衝液	((株) 同仁化学研究所 MB266)	4 μmol/0.2ml
D.I.W.		0.1ml

S9 Mix は使用直前に冷水解凍し、よく混和して使用する。

供試試料

購入カマンベールチーズの購入先は広島のスーパーマーケット、他はオランダ アムステルダム空港売店である。表 4 に示すこれら 12 種類のチーズは保存のため冷凍 (-18°C) 保存し、使用時に自然解凍し用いた。

抗変異原性試験供試チーズ試料の調整

- ① チーズ 2g を蒸留水 98ml にいれ、ホモジナイザー (10,000rpm) に 15 分間かけ、その pH を計測し、pH を中性にちかづける。
- ② チーズのホモジナイザー溶液を濾過滅菌 (3ml の滅菌済み注射器で 0.45 μm Supor Acrodisc を使用) し、0.35ml ずつ試験管に分注する (チーズ量 7mg/plate)。

## Ames test を用いるチーズの抗変異原性について

- ③ さらに Trp-p1 (1.2mg/10ml) を試験管に 0.1ml 加える。(Trp-p1 量 12 $\mu$ g/plate)
- ④ 37°C の恒温シェーカーに試験管をつけ、S9 mix を 0.35ml 加え、振とうしながら 20 分間代謝反応させる。
- ⑤ 100°C の湯浴に 10 分間つけ、S9 mix を失活させる。
- ⑥ 40°C ぐらいまで冷ましたら、前培養した菌株 0.1ml、50°C に保った 3.5ml のトップアガーを順に加え、あらかじめクリーンベンチ内でブローし、寒天表面を乾かしておいたシャーレの表面に拡げる。
- ⑦ シャーレを 5°C で 24 時間放置後、37°C で 48 時間培養する。培養後表面にあらわれた TA98 の復帰体コロニー数を計測する。この操作を 3 回ずつ実施し、復帰体のコロニー数を平均する。

表 2. 実験のプレート内容と実験 1 回におけるシャーレ使用枚数

プレート番号	プレート内容	使用シャーレ (枚)	略号
1 (cont.1)	リン酸緩衝液 + TA98 + S9 Mix + Trp-p1	3	X
2	供試チーズ + TA98 + S9 Mix + Trp-p1	3	Y
3 (cont.2)	供試チーズ + TA98 + S9 Mix	3	Z

## 結果及び考察

### 1. カマンベールチーズの加工

自作したチーズ加工箱中で、*P. candidum* を大量に接種し、食塩をまんべんなくふりかけ、無菌に近い 13°C の冷蔵状態で管理しておいたので、コンタミなしに、*P. candidum* 特有の白カビがチーズ表面を深く覆って繁殖し、約 2 週間でカマンベールチーズが熟成した。

チーズ A は中心まで大変柔らかく、味も風味も良く、市販のカマンベールチーズに近いと高く評価された。しかし、チーズ B は中心まで柔らかいが、ヨーグルトの香りと甘さが少々残り、苦みもやや強く、市販チーズと比べるとやや劣ると評価された。これは乳酸醗酵時に使用した乳酸菌の影響が残っているものと思われる。

### 2. チーズの pH による *S. Typhimurium* TA98 復帰体コロニー形成に対する影響

表 4 に示すように、チーズの pH は、ブリーおよび研究室加工カマンベールを除き、弱酸性を示した。これは乳酸醗酵の際の乳酸が残存しているためと思われる。一般に、Ames test の pH は中性前後で実施されるので、0.1N-HCl、0.1N-NaOH で中和して、実験に使用し、pH による影響を防いだ。

### 3. *S. Typhimurium* TA98 に対する変異原 Trp-p1 の復帰体濃度の選定

- ① あらかじめ高圧蒸気滅菌した DMSO 10ml に Trp-p1 を 10mg、5mg、2.5mg、1.25mg、0.6mg それぞれ秤量、溶解する。
- ② pH 7.0 のリン酸緩衝溶液を濾過滅菌 (3ml の滅菌済み注射器で 0.45 $\mu$ m Supor Acrodisc 25 を使用) し、0.35ml ずつ滅菌試験管に分注する。
- ③ さらに各濃度の Trp-p1 を同じ試験管に順番に 0.1ml 加える。
- ④ 前培養した TA98 菌株の 0.1ml 及び 50°C に保った 3.5ml のトップアガーを順に加えすば

やく混合し、予めクリーンベンチ内でブローし、寒天表面を乾かしておいたシャーレの表面に拡げる。

⑤ シャーレを 5°C で 24 時間放置後、37°C で 48 時間培養する。培養後表面に出現した TA98 菌株の lawn 状態の観察および復帰体コロニー数を計測する。

その結果、表 3 に示すような結果が得られた。

表 3. Trp-p1 濃度の違いによる S. Typhimurium TA98 復帰体コロニー数

Trp-p1 濃度 ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	100	50	25	12	6
Lawn の状態	極々少ない	極少ない	良好	良好	良好
復帰体コロニー数 /plate	53	55	87	152	56

変異原 Trp-p1 の濃度が濃い (50 $\mu\text{g}/\text{plate}$  以上) 場合、シャーレ上に生育した S. Typhimurium TA98 の Lawn が大変少なく、反対にその濃度が薄く (25 $\mu\text{g}/\text{plate}$  以下) なるにつれて、シャーレ一面にみられた。また、復帰体コロニー数は濃度が濃い場合は Trp-p1 の毒性のため少なく、反対に濃度が薄い場合には変異が起こりにくく少なくなった。こうした観察結果から、DMSO 10ml に Trp-p1 1.25 mg を溶解した溶液の 0.1 ml を 1 枚のシャーレに添加 (12 $\mu\text{g}/\text{plate}$ ) する場合が最適と判断し、これを復帰体濃度に選定して、以後の実験を進めた。

#### 4. チーズの抗変異原性率の算定

コントロール 1 としてチーズの供試試料の代わりに pH 7.4 のリン酸緩衝液を使用し、Trp-p1 (12 $\mu\text{g}/\text{plate}$ ) によって誘発された変異コロニー数 (X) を観察した。またコントロール 2 として、Trp-p1 を加えない状態で、自然復帰体コロニー数 (Z) を計測した。さらに供試チーズと Trp-p1 を加え、復帰体コロニー数 (Y) を計測した。こうして、チーズにより阻止された復帰体コロニー数の減少割合、すなわち抗変異原性率を算出した。なお計算は次の式に従った<sup>14)</sup>。

$$\text{抗変異原性率} = [(A-B)/A] \times 100 \quad \text{ただし, } A=X, B=Y-Z \text{ (表 2 略号参照)}$$

表 4. チーズの pH 及び抗変異原性率

チーズ名	原産国	pH	抗変異原性率 (%)
1. フレッシュチーズ a	日本	4.85	75.2
2. フレッシュチーズ b	日本	5.16	56.9
3. カマンベールチーズ A	日本	7.68	64.2
4. カマンベールチーズ B	日本	7.18	78.9
5. カマンベールチーズ	日本	6.09	64.9
6. ブリー (購入)	フランス	7.19	64.9
7. ブルー (購入)	デンマーク	6.57	53.5
8. ゴーダ (購入)	オランダ	6.14	59.9
9. エメンタール (購入)	スイス	6.12	59.9
10. チェダー (購入)	ニュージーランド	5.67	30.4
11. エダム (購入)	オランダ	5.94	57.6
12. スモークチーズ (購入)	オーストラリア	5.95	52.2

## Ames test を用いるチーズの抗変異原性について

表4に示すように、実験に使用したチーズはすべて30.4~78.9%の高い抗変異原性率を示した。特にカマンベールチーズB(研究室加工)の78.9%、カマンベールチーズA(研究室加工)の64.9%、市販カマンベールチーズの64.9%と、カマンベールチーズ群が特別高い抗変異原性率を示した。これらの結果は、Yamadaらのチーズの抗変異原性試験に関する実験で、使用した菌株(Streptomycin-dependents Strain SD510 of *S. typhimurium* TA98)は異なるが、その実験結果の概要<sup>12)</sup>とよく一致している。

また、研究室加工のフレッシュチーズ(カテージチーズ)に*P. candidum* 胞子懸濁液を吹きかけ、2週間醗酵熟成加工したカマンベールチーズの抗変異原性率は、その値が減少したチーズ(a→A)、あるいは増加したチーズ(b→B)があり、これは牛乳の乳酸醗酵過程で用いた乳酸菌の違いと推測される。なお市販日本産カマンベールチーズと研究室加工のカマンベールチーズAとは、ほぼその値が64%と同程度の抗変異原性率を示していることは興味深い。

先人の報告や今回の実験結果からも明らかなように、カマンベールチーズなど特定のチーズには強い抗変異原性作用が認められるため、毎日の食事献立にチーズ類をうまく利用すれば、発ガンを防ぐ何らかの効果が期待される。

## 謝 辞

この実験を実施するにあたり、ご助言、指導をいただいた本学食物栄養学科 吉田暢夫教授、並びに信州大学農学部 細野明義教授に心から感謝いたします。

## 参 考 文 献

- 1) 国民衛生の動向・厚生指針、臨時増刊第44巻第9号(通巻688号)、厚生統計協会(1998)
- 2) 矢作多貴江:突然変異テストーサルモネラ菌、田島弥太郎、賀田恒夫、近藤宗平、外村相編、環境変異原実験法(講談社)、PP47-55(1980)
- 3) 河内卓:飲食に含まれる突然変異原生物質とがん原物質、食品衛生研究, **29**, 877-895(1979)
- 4) 三好康之:食品コゲのSpore rec-assay, 生活科学研究会誌, **12**, 7-12(1994)
- 5) 三好康之:日常食品の突然変異原性について(Ames test, Rec-assay), 日本農芸化学会関西・西日本支部合同大会(佐賀大学)発表, 要旨:農化, **72**, 154-154(1998)
- 6) 河智義弘:スパイスの機能性とその利用, 食の化学, **220**, 40-53(1996)
- 7) ビタミン広報センター:世界に向けたガン予防15か条の報告書—第23回VICプレスセミナーより—, 食の化学, **241**, 51-57(1998)
- 8) 国立がんセンターガン情報サービス:ガンを防ぐための12ヶ条, <http://www.info.jp/NCC-CIS/pup/Osj/010101.html> (1998)
- 9) 橋本英夫:乳酸菌の抗変異原性, 食品・食品添加物研究誌 FFI ジャーナル, **159**, 103-104(1998)
- 10) 細野明義:機能性食品としての醗酵乳, HEALTH DIGEST Food, **9**, 1-8(1994)
- 11) 細野明義:醗酵乳の抗変異原性, 乳技協資料, **37**, 19-32(1998)
- 12) Masako YAMADA, Yuji NAKAZAWA and Akiyoshi HOSONO: Desmutagenicity of Commercial Cheese against the Trp-p1-induced mutagenicity to Streptomycin-dependent Strain of SD 510 of *Salmonella typhimurium* TA98, Animal Science and Technology (Jpn.), **69**, 359-364(1998)
- 13) 石館基:毒性試験講座12 変異原性, 遺伝毒性, 9-42, 地人書房(1992)
- 14) 古場久代, 松岡麻生, 石原忠:焼き魚の変異原性に関するキャベツ分画の抑制効果, 日本調理科学会誌, **31**, 18-25(1998)

—平成11年9月30日 受理—