



# Studies on mutagenicity and desmutagenicity of oxidized and dimerized derivatives of butylated hydroxyanisole

水野, 雅史

---

(Degree)

博士 (学術)

(Date of Degree)

1989-03-31

(Date of Publication)

2007-10-11

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0817

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000817>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	水野雅史 (広島県)
学位の種類	学術博士
学位記番号	学博い第135号
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
学位授与の日付	平成元年3月31日
学位論文題目	STUDIES ON MUTAGENICITY AND DESMUTAGENICITY OF OXIDIZED AND DIMERIZED DERIVATIVES OF BUTYLATED HYDROXYANISOLE (ブチルヒドロキシアニソールの酸化誘導体及び二量化誘導体 の変異原性及び脱変異原性に関する研究)
審査委員	主査 教授 名 武昌 人 教授 藤 井 聰 教授 岩 崎 照 雄

### 論 文 内 容 の 要 旨

抗酸化剤ブチルヒドロキシアニソール (BHA) は、その能力が強いため食品の添加物としても多く使用されている。ところが近年伊東らは、BHA 及びブチルヒドロキシルエンがラットの前胃に腫瘍を発生させると報告している。一方ワッテンベルグは、古くから BHA の経口摂取が人体の老化を抑え、ベンツピレンやジメチルアントラセンによる腫瘍の発生を抑制すると主張している。この相反する BHA の両刃の剣のような生理活性が BHA そのものによるのではなく、BHA が動物の消化管内で食品成分と相互作用して、あるいは体内で代謝されて生じた生成物によるものであると考えた。亜硝酸塩は、ハムやソーセージなどの加工肉に食品添加物として加えられたり、野菜に含まれている硝酸塩が腸管から吸収され唾液に入り口腔内微生物によって還元され、かなりの量再び胃の中に入ることが分かっている。酸性条件下では亜硝酸は、反応性に富み例えば第2級アミンと反応して強力な発ガン物質であるニトロソアミンを生成する。一方また亜硝酸は、第1級アミンと反応して化学発ガン物質の発ガン性を抑制するという報告もあり、その反応性は複雑である。そこで亜硝酸と BHA を酸性下で反応させ、BHA を前駆体とする生成物を単離しそれらの生理活性、特に変異原性及び脱変異原性について調べた。さらにこの反応系及び生成量についても検討した。

本論文は、次の7章より構成されている。

第1章では人における発癌と食品の相関について従来の知見を概説し、本研究の目的について述

べている。

第2章では、BHAに亜硝酸を酸性条件下で作用させた際に生じる変異原物質の同定を行った。この反応混液中には少なくとも9個のスポットが存在することが、薄層クロマトグラフィーの分析より分かった。これらのうち、2個のスポットがDNA損傷性試験 (Rec-assay) 及び変異原性試験 (Ames test) に陽性であった。これらの変異原性を有する物質を単離・精製し、各種機器分析に供して構造解析を行った結果、それぞれの構造は2-*tert*-ブチル-*p*-キノン (BQ) とその二量体である3, 3'-ジ-*tert*-ブチル-ビフェニールジキノン-(2, 5, 2', 5') (BBDQ) と決定された。これら両物質は、変異原性ばかりでなく致死効果も有していたので通常の Ames test ではその活性を正確に測定することはできなかった。そこで突然変異誘発頻度 (IMF) を求めることで、それらの活性を測定した。BQは、塩基置換型の変異原物質を検出するサルモネラ TA100株に対して顕著な作用を有し、その活性はプレート当たり52  $\mu$ gでIMF値が $1.9 \times 10^{-4}$ であった。一方BBDQの活性は同様にTA100株に対して顕著でプレート当たり95  $\mu$ gでIMF値が $8.3 \times 10^{-5}$ であったが、この活性はBQに比べて約20分の1でしかなかった。またBQ及びBBDQのDNA損傷性は、ナノモル当りそれぞれ3.8mmと1.5mmであった。

BHAと亜硝酸の反応から生じる変異原物質の1つであるBBDQは、光のもとで非常に不安定であった。そこで、第3章ではBBDQの光分解物について調べた。BBDQのエーテル溶液を太陽光のもとに5日間放置すると黄色から赤色へと変化した。この光分解物を構造解析した結果、その構造は2, 6-ジ-*tert*-ブチル-8-ヒドロキシ-ジベンゾフラン-1, 4-キノン (BHDQ) であると決定した。その変化の際に少なくとも2種類のラジカルが生成していることが、電子スピン共鳴スペクトルより明らかになった。そして2つのうち1つのラジカルは酸素と反応しやすいラジカルであったことから、この反応はBBDQのセミキノンラジカル体を経てBHDQに変化すると推定した。またこのBHDQには、タンパク質とくにトリプトファンの加熱分解物であるTrp-P-1やTrp-P-2といった化学発ガン物質の変異原性を抑制する効果があることも分かった。

第4章ではTrp-P-2の変異原性に対するBHDQの抑制効果について詳しく調べた。Trp-P-2 (0.2 nmol) の変異原性は、BHDQ 3nmolの添加で約25%に減少した。また0.2 nmolのTrp-P-2から調整した活性本体であるN-OH-Trp-P-2に対しては、BHDQ 0.8 nmolの添加でその活性を約20%にまで減少させた。Trp-P-2に対するBHDQの作用機構を高速液体クロマトグラフィーで調べた結果、Trp-P-2の活性本体であるN-OH-Trp-P-2に作用して再びTrp-P-2に戻すことによってその変異原性を抑制していることが分かった。さらに、活性体がTrp-P-2と同じN-OH体でありフレームシフト型の変異原物質であるベンツピレンや1-ニトロピレンに対しても強く抑制効果を示し、その強さはそれぞれ60%と40%であった。しかしながら活性体はTrp-P-2同様N-OH体であるが塩基置換型の変異原物質であるアセチルアミノフルオレンに対しては、抑制効果は認められなかった。このようにBHDQには脱変異原性があるので、おそらくワッテンベルグが主張するBHAの発ガン抑制効果はBHDQの作用によるものと考えられた。

第5章では、より強い活性を示したBQに対する脱変異原性を示すものを野菜や果物の中から捜した。するとトマト、ピーマン、オレンジ、レモン、メロン、キウイ、イチゴからのジュースに活性が認められた。また、既知物質についても同様のことを調べると還元型グルタチオン (GSH)、パンテテイン (PaSH)、ジチオスレイトール (DTT) 等のチオール化合物にBQの活性を抑制するものがあった。そしてその強さは、BQ5  $\mu$ gによるIMF値が $10^{-5}$ であったのがGSH、PaSH、DTTそれぞれ100  $\mu$ gの添加によってIMF値が $10^{-7}$ に下がった。そこで活性が認められた食品中のSH基含量を測定してみると相対的に活性が認められなかった食品に比べて高かった。チオール化合物が脱変異原物質として働くことが分かったので、その機構を調べるために生体内に多く存在するGSHとBQを反応させてみた。すると2molのBQに対して1molのGSHが反応することが判明し、その反応速度は、非常に速く約2分であった。また反応生成物は、BQとGSHの抱合体である2-*tert*-ブチル-6(5)-*S*-グルタチオニール-*p*-キノンとBQが還元された2-*tert*-ブチル-ヒドロキノンであった。このことより、例えば人間の胃の中でBQが出来ても食品中のチオール化合物によってすばやく解毒され排泄されると考えられる。伊東らがラットの前胃にのみ腫瘍を認めたのは、前胃のように食物が留まらないところではBQが生成してもチオール化合物によって解毒されないためと推定した。

第6章では、変異原物質と脱変異原物質以外のBHAと亜硝酸の反応から生成される物質を同定すると共に、それらの生成量及び反応経路を調べた。まず一つめはBHAが亜硝酸によってニトロ化された6-ニトロブチルヒドロキシアニソール (ニトロ-BHA) であった。おそらくニトロ-BHAの前駆体は、ニトロソ-BHAだと推定される。もう一つの物質は、BHAが重合して出来た2, 2'-ジ-*tert*-ブチル-3, 3'-ジ-*tert*-ブチル-5, 5'-ジメトキシ-ビフェニール (di-BHA) であった。di-BHAの生成経路は、二段階よりなっていると思われた。すなわち最初にBHAがニトロソ化され、次にジアゾ化したジアゾ-BHAが生じる。このジアゾ-BHAと未反応のBHAが重合してdi-BHAを生成すると考えた。またこのdi-BHAは、さらに亜硝酸とpH2で反応させるとBBDQに変化することからBBDQの前駆体であることも分かった。以上のことを総合すると、BHAと亜硝酸の反応には三つの経路があると考えられた。一つめは、BHAが酸化されBQになる経路。反応混液中のBQの量をガスクロマトグラフィーで測定すると約70%を占めていたので、この反応系において主経路はこのBHAからBQへの経路であることが分かった。二つめは、BHAがニトロソ体を経てニトロ-BHAに至る経路。三つめは、BHAがニトロソ化とそれに続くジアゾ化によってまずdi-BHAを生成する。このdi-BHAが、BHAからBQが生成したのと同じようにして酸化されてキノン体となってBBDQになる。このBBDQは、さらに一電子還元をうけてセミキノンラジカル体を経てBHDQに変化するという経路であった。つまりBHAと亜硝酸の反応においては最終産物は、BQとニトロ-BHAとBHDQの三種類であった。

第7章では以上のことを総合してBHAの安全性についてを考えた。BQは生体内においてはチオール化合物によってすばやく代謝される。ニトロ-BHAは、変異原性も脱変異原性もない。BHDQは、強い脱変異原性を有しており発ガン抑制に有効である。このことから、BHAを抗酸化剤とし

て使用することは、発ガンを抑制するうえでも大いに意義のあることであり安全であるだろうと考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

ブチルヒドロキシアニソール (BHA) は食品用の抗酸化剤として多量に使用されている。BHA は肝臓に取り込まれミクロソーム P-450 薬物代謝系から発生する活性酸素類を解毒する故に、動物の老化を抑えたり、生体内過酸化に原因する疾患を防ぐと考えられている。特に化学発癌物質による発癌を強く抑制すると報告されている。ところが最近、BHA の多量投与が F344 系ラットの前胃に癌を発生させることが明らかになり、BHA が発癌作用を有するのか、抗癌作用を有するのかの議論が起こった。本研究はこの論議に終止符を打ちたいと考えて着手されたものである。

本論文は7章からなり、第1章は緒言であり、人間の食生活と発癌との関係について言及し、本研究の目的を述べている。食品には天然及び人工の発癌物質が含まれていると同時に発癌抑制物質も含まれている。本研究では BHA の先に述べた相反する生理活性に焦点を絞った。すなわち、経口投与した BHA は胃及び生体内で様々な誘導体に変化するので、その生理活性は BHA そのものの作用によるだけでなく、その誘導体の作用も含まれていると考えた。そこで BHA を前駆体とする生成物を単離し、それらの生理活性、特に変異原性及び脱変異原性について調べている。

第2章では胃の酸性条件下で、BHA と野菜中の硝酸塩に由来して唾液と共にかなりの量が胃に入る亜硝酸を反応させ、その生成物の変異原性を検討している。薄層クロマトグラフィー上で9つの化合物が検出され、この内2つに変異原活性が認められたので、機器分析によってそれらを同定した。2-*tert*-butyl-*p*-quinone (BQ) とその二量体である 3, 3'-di-*tert*-butyl-biphenyldiquinone - (2, 5, 2', 5') (BBDQ) である。BQ の変異原性は BBDQ の20倍であった。

BBDQ は光に不安定で容易にその変異原性を失ったので、第3章では BBDQ の光分解物を同定し、その分解機構を明らかにするとともに、生成物に変異原抑制作用があることを見出している。この分解物は 2, 6-di-*tert*-butyl-8-hydroxy-dibenzofuran-1, 4-quinone (BHDQ) で、これは BBDQ のセミキノンラジカルとなり、5' 位に生じたもう一つのラジカルと反応し、閉環して生じることを解明している。また、BHDQ は強い発癌物質であるトリプトファンの熱分解物 (Trp-P-1 及び Trp-P-2) の活性を抑制したことを示している。

第4章では、BHDQ の Trp-P-2 に対する変異原抑制作用の機構について研究している。BHDQ は Trp-P-2 に対して変異原抑制効果を示したが損傷 DNA の固定化防止効果 (抗変異原性) は示さなかったので、BHDQ は脱変異原物質と考えた。また BHDQ の作用は Trp-P-2 に対するよりもその生理活性体である N-OH-Trp-P-2 に対してより強かった。そして、BHDQ を N-OH-Trp-P-2 に作用させると Trp-P-2 が生じた。したがって BHDQ は Trp-P-2 の活性体を非活性体である Trp-P-2 に戻す作用があると結論している。また同じ機構で活性

化され変異原性を示すベンツピレンや1-ニトロピレンに対してもBHDQは脱変異原効果を示すことを明らかにしている。

第5章では、BHAから生じる誘導体の内もっとも強い変異原物質であるBQの解毒の機構を食品及び生体内での反応を仮定して解明している。BQの変異原性は多種の野菜や果実のジュースによって抑えられた。この作用はジュース類に含まれるSH化合物によるものであることを示し、モデルとして動物の血中に多く含まれるグルタチオン(GSH)をpH7.0でBQに作用させ、その反応機構を解析した。その結果、一分子のGSHは一分子のBQと抱合体(2-*tert*-butyl-6(5)-*S*-glutathionyl-*p*-quinone)を生成し、もう一分子のBQを2-*tert*-butyl-hydroquinoneに還元して変異原性を失わせることを明らかにした。

第6章では、上述の誘導体以外にまだ同定していないBHAの反応中間体の構造を決定し、BHAと亜硝酸との反応機構とかね合わせて、BHAから生じる酸化誘導体及び二量体の生理活性について総合的に論じている。BHAは胃の酸性条件下では主に酸化誘導体であるBQ(収量70%)を生じる。また少量のBBDQ(1.4%)も生成し、これらは変異原性を有する。この他にBHAの二量体(2.0%)とニトロBHA(8.6%)も生成するが、これらは生理活性を示さない。一方、pH5.0では変異原物質は生成せず、二量体とニトロ体が生じる。二量体はBBDQの前駆体であるが、BBDQは速やかに脱変異原物質であるBHDQに変化することを述べている。

第7章は結論であり、本研究に基づいてBHAの生理活性について次のように結論している。BHAや経口摂取した場合、胃内でBQを生じるが、BQは胃内の分泌物や食品成分のSH化合物によって速やかに解毒される。BQが体内に吸収されても血中のGSHにより解毒される。BBDQは生体内でも酵素的に一電子還元を受けてBHDQとなる。このようにBHAから生じる変異原物質は生体内では容易に解毒される。またBHAが生体内に吸収された時は変異原物質は生成せず、脱変異原物質であるBHDQを生じる。したがってBHAは生体に有毒ではないであろう。

以上のように本研究は、食品添加物として広く用いられるブチルヒドロキシアニソールの相反する生理活性を、その誘導体の変異原性を中心に明らかにした独創的研究であると認めることができ、一般に食品添加物の安全性を評価する場合の新しい方法論の開発と実験結果において重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。また本研究は、生化学、栄養化学、食品化学、有機化学の分野に関連する総合的な研究である。

よって、論文提出者水野雅史は学術博士の学位を得る資格があると認める。