

Nara Women's University

調理食品の変異原性に関する研究

メタデータ	言語: 出版者: 大下市子 公開日: 2011-11-22 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 大下,市子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10935/2869

調理食品の変異原性に関する研究

1993

大 下 市 子

目次

結 論	-----	1
第1章 調理食品の変異原活性の検索		
1-1 実験方法	-----	6
1-2 結果		
1-2-1 集団給食調理食品の変異原活性	-----	8
1-2-2 魚、肉料理の変異原活性	-----	17
1-3 考察	-----	19
第2章 しょうゆの加熱による変異原活性の変化		
2-1 実験方法	-----	21
2-2 結果		
2-2-1 しょうゆの加熱による変異原活性の変化	-----	24
2-2-2 しょうゆの変異原活性におよぼすヒスチジンの影響		34
2-3 考察	-----	37
第3章 しょうゆ中の β -カルボリン誘導体の加熱による変化		
3-1 実験方法	-----	41
3-2 結果		
3-2-1 しょうゆの変異原活性の変化	-----	43
3-2-2 しょうゆの亜硝酸処理による変異原活性の変化		44
3-2-3 しょうゆ中の β -カルボリン誘導体の含量	---	45
3-3 考察	-----	49

第4章	しょうゆ中の変異原活性を有する β -カルボリン誘導体の検索	
4-1	実験方法	54
4-2	結果	
4-2-1	化合物 I の分離	58
4-2-2	化合物 I の変異原活性	61
4-2-3	しょうゆ中の化合物 I の含量および加熱による変化	62
4-3	考察	63
第5章	しょうゆ醸造中の β -カルボリン誘導体の生成と保存中の変化	
5-1	実験方法	65
5-2	結果	
5-2-1	熟成、火入れ過程における β -カルボリン誘導体の生成	66
5-2-2	β -カルボリン誘導体の保存中の変化	68
5-3	考察	68
結 論		73
文 献		78
公表論文		83
謝 辞		85

結 論

近年、ガンの発生には多くの環境因子が関与し、中でも食物がその大きな部分を占めていることが、実験的、疫学的研究などから示唆されている¹⁾。最近ではそれらの報告に基づいたガン予防対策の勧告も出されている²⁻⁴⁾。食物中の物質で発ガン性が明らかにされているのは、ワラビのブタキロサイド⁵⁾、食品に発生するカビ毒のアフラトキシン⁶⁾、食品中のニトロソ化合物⁷⁾、タンパク質の加熱分解物であるヘテロサイクリックアミン類⁸⁾やジニトロピレン⁹⁾等である。一方では食品中のビタミンA、C、E¹⁰⁾、食物繊維¹¹⁾が発ガンに対して抑制的に作用することも知られている。日常、我々は数々の食品を用い、調理して食生活を営んでいる。食品の加工、調理の過程で発ガン物質が生成する可能性もあると考えられるので、個別の食品だけでなく、組み合わせて加工、調理した食品の安全性を確認することは、安全な食生活を営むためには重要なことと考えられる。

発ガン物質の検索、発ガン性実験には莫大な時間を要するため、第1段階のマスクリーニングの方法として突然変異原活性を検出する方法が多く用いられている。発ガンと突然変異原性の関係について、1960年代の初めには、突然変異原性を示す発ガン物質の数は非常に少なく、4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO)、nitrogen mustardなどが知られているにすぎなかった。しかし、1960年代の後半になると発ガン物質である nitrosoamines、N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)が突然変異原性をもつことが、また、Ames法の完成した1975年頃には、発ガン物質と突然変異原物質とは90%が一致していることが明らかにされた¹²⁻¹³⁾。その後、注意深く選ばれ、コード化された物質を用いた国際共同研究から、両者の一致率は60~70%の範囲であることが示された¹⁴⁾。

一般に突然変異原性の短期検出法としては、細菌を用いるAmes法が最も広く用いられている。Ames法はヒスチジン合成酵素の遺伝子に突然変異が起きヒスチジン非合成変異菌株(His⁻)となっているサルモネラ菌に検体を作用させ、突然変異によってヒスチジンを合成しうる性質(野性型、His⁺)に戻る性質(復帰変異)を利用した検出法である^{15)・16)}。中でもR因子プラスミド pKM101を組込んだ *Salmonella typhimurium* TA98はフレームシフト型の、TA100は塩基置換型の変異原活性を感度よく検出し¹⁷⁾、ほ乳動物の肝 9000gの上清(S9)を加えて代謝活性化し、生成する変異原性物質の検出を行なうこともできる方法である¹⁸⁾。

食品の変異原性に関する研究は、Ames法の発展と共に、Nagaoら¹⁹⁾が丸干しイワシの焼き焦げから、さらにはアミノ酸、タンパク質の加熱分解物から、強い変異原性を持つヘテロサイクリックアミン類を見出したことに端を発している。さらに、このヘテロサイクリックアミン類の一部は発ガン性があることも証明された⁸⁾。これらの研究に引き続き、日常食品、食品成分の変異原活性に関する多くの研究が行なわれた^{20)・22)}。しかし、日常食品、食品成分の変異原活性に関する研究は、日常の調理条件からかけ離れた極端な加熱条件での変異原活性の検出、また、食品成分の一部を用いたモデル反応系における変異原活性の検索であることも多い。食生活の安全を考える上では、最終的には変異原についても、栄養素と同じ様に、食事からどの程度摂取しているかを理解しておくことが必要であると考えられる。そのためには、実際に食卓で摂取する調理食品についての変異原活性を求めることが重要であると考えられる。実際に食品を調理し摂取する状態である調理食品(料理)の変異原活性については、幼稚園児食²³⁾、陰膳方式²⁴⁾、またマーケット・バスケット方式²⁵⁾で調理された食品の変異原活性が測定され、食品群の変異原活性の傾向を報告した例があるに過ぎない。より安全な食生活を営むために必要な資料として、調理食品の変異原活性について、食品素材、食品成分、調理方法、調味料等の条件を含め検

討する必要があると考えられる。

本論文では、調理食品の変異原活性を測定して、素材別、成分別、調理方法別、調味料別の項目との関係の解明をめざした。さらに、その解析の中で、調理過程中的変異原性物質の生成と関連があると考えられ、日本の伝統調味料の一つであるしょうゆに注目した。しょうゆの変異原性については、Linら²⁶⁾、Shibamoto²⁷⁾、Nagaharaら²⁸⁾の報告があるものの、しょうゆを加熱した時の変異原活性についての報告はない。しょうゆは1人1日当たり21.2gとその消費量は多く²⁹⁾、日本人の食卓に欠かすことのできない調味料であり、現在では、soy sauceとして世界中でも広く用いられるようになっている。そこで、加熱による変異原活性の変化、変異原性物質の検索等を通じて、その変異原活性を明らかにすることに重点をおいた。

第1章では、Ames法でTA98の検出系を用いて、調理食品(集団給食調理食品67品目)の変異原活性を測定して、素材別、成分別、調理方法別、調味料別の諸因子と変異原活性との関連について検討を行ない、変異原活性と関係のある因子をスクリーニングする。さらに、家庭料理23品目についても、同様に変異原活性と関連のある因子を抽出する。

第2章では、第1章の検討によって、調味料として用いたしょうゆが変異原性の発現に関与していることが示唆されたので、しょうゆについて常圧加熱(煮沸、焙焼)、加圧加熱と加熱処理したときの変異原活性の変化を、Ames法でTA98、TA100の検出系を用い測定する。さらに、調味料として同時に用いられることも多いショ糖を共存させた場合について、しょうゆの変異原活性におよぼす加熱の影響について合わせ検討する。

第3章では、しょうゆ中の変異原性物質は、 β -カルボリン誘導体の中で1-furyl- β -carboline(1-F-BC)³⁰⁾であり、また、その変異原性物質の前駆物質は1-methyl-1,2,3,4 tetrahydro-carboline-3-carboxylic acid (MTC

A)²¹⁾であることが報告されているので、本醸造、新式、アミノ酸液混合と製造方法の異なるしょうゆを用いて加熱による変異原活性およびこれら物質の含量の変化を測定する。

第4章では、本醸造しょうゆ中より変異原活性を有する β -カルボリン誘導体を単離し、構造決定 [1-(5-hydroxymethyl 2-furyl) 9H-pyrido [3,4-b] indole(1-hydroxymethyl-furyl- β -carboline)(1-HMF-BC)] すると共に、本醸造、新式、アミノ酸液混合と製造方法の異なるしょうゆ中の含量を測定し、加熱によるそれらの変化について検討する。

第5章では、第3、4章の検討によって、 β -カルボリン誘導体(MTCA、1-F-BC、1-HMF-BC)の含量は本醸造、新式、アミノ酸液混合の順に低下することから、これら誘導体は醸造中に生成すると考えられるので、しょうゆを実験室規模で醸造し、これら誘導体の醸造過程中的生成について検討する。さらに、保存中のこれら誘導体の生成の挙動を知るために、温度条件(4, 20, 30℃)を変えて、これら誘導体の保存中の消長を追跡する。

第 1 章 調理食品の変異原活性の検索

日常、種々の材料を組み合せ、さらに同じ材料でも異なる調理方法を用い、多種多様な食品を摂取し、食生活を営んでいる。食品、食品成分の変異原性に関する研究は多いが、調理された食品の変異原性についての研究は少ない。食生活の安全上、調理食品の変異原活性を知ることは重要であると考えられる。食品中の変異原性物質は他の成分に比べてきわめて微量であるため、それらを濃縮精製しなければ、変異原性の検定は困難であるところが多い。従って、その抽出方法が変異原性物質の存否の判定に大きな影響を与える。今まで、変異原性物質の抽出は Commoner法³²⁾が多く用いられていたが、混在する脂質、繊維質の影響で定量的な抽出は困難であった。Hayatsuら³³⁾は、trisulfo-copper-phthalocyanineを固定した脱脂綿を用いる青綿吸着法を開発し、食品中から変異原性物質を再現性高く抽出できることを、そして、その抽出は多環式変異原性物質を選択的に行うことを報告している³⁴⁾。また、Ames法では、検体にヒスチジンが含まれる場合に変異原活性が高く測定されることがある³⁵⁾。タンパク質性食品を試料とする場合、抽出方法によっては食品中のヒスチジンが検体に含まれ、その影響で変異原活性が高く測定されることが起こり得るが、青綿法ではヒスチジンを含まない検体を調製できるため、変異原活性の測定がより正確に出来る利点がある。

そこで、材料、調理方法の明確な集団給食実習で調製された調理食品中の変異原性物質の抽出を青綿吸着法を用いて行ない、*Salmonella typhimurium* TA98を用い、S9存在下での変異原活性の検索を行なった。さらに、その結果から変異原活性と関連ある因子をスクリーニングするために、食品素材別、食品成分別、調理方法別、調味料別の各因子と変異原活性との関係を検討した。

1-1 実験方法

(1) 試料

1982年5月から1984年2月にかけて、S短期大学集団給食室で成人女子昼食栄養基準量にそって大量調理された67品目、および家庭料理23品目を用いた。

(2) 試薬

フェノバルピタール(藤沢薬品製)、5,6,ベンゾフラボン(アルドリッチ社製)、G6P(シグマ社製)、NADP、NADPH(オリエンタル酵母工業社製)、アガーパウダー(ディフコ社製)、その他試薬はすべて和光純薬製の特級を用いた。

(3) 変異原物質の抽出

Hayatsuら³³⁾の青綿吸着法を調理食品の抽出に適するように変更した。すなわち、1食分の試料重量に対して、純水2容を加え、ホモジナイザーで均質液を作り、この液100mℓに対して100mgの乾燥青綿を加え、20℃で24時間振とう吸着させ、青綿を取り出す。さらに、同量の青綿を入れ、3時間振とう吸着させる。吸着青綿は、乾燥青綿100mgに対して蒸留水500mℓ以内で洗浄した後、乾燥青綿100mgに対して10mℓのメタノール-濃アンモニア(50:1)の抽出溶剤で、30分間振とうを2回繰返す。メタノール抽出液は減圧乾固し、0.1mℓのジメチルスルフォキシド(DMSO)に溶解して変異原活性測定試料とした。

青綿は岡山大学薬学部 早津彦哉教授より分与された。

(4) 変異原性試験

(1)菌株: *Salmonella typhimurium* TA98(フレームシフト型変異株)

この菌はヒスチジン合成酵素系にフレームシフト型の変異をもち、膜の透過

性が高い上に薬剤耐性因子 pKM101プラスミドが導入され、ヒスチジン要求性の復帰突然変異の検出しやすい菌である。

(2)寒天平板培地(アガープレート)および軟寒天(ソフトアガー)の作成

(A)アガープレート

① Vogel Bonner最小培地(硫酸マグネシウム・七水塩 0.2g、クエン酸・一水塩 2.0g、リン酸二カリウム・無水塩 10.0g、リン酸水素アンモニウム・ナトリウム 1.75gを蒸留水 100mℓに溶解) ② アガーパウダー 15gを蒸留水 800mℓに溶解 ③ D-グルコース 20gを蒸留水 100mℓに溶解。①、②、③をオートクレーブで滅菌した後、混ぜ合わせて滅菌シャーレに30mℓずつ分注し、1プレートとした。

(B)ソフトアガー

0.7% アガーパウダー、0.6% 塩化ナトリウム溶液をオートクレーブで滅菌後、使用時に1/10容量の 0.5mM L-ヒスチジン、0.5mM ビオチン溶液を添加して調整した。

(3)肝ミクロゾーム分画酵素系(S9)の誘導とS9 Mixの調整

フェノバルビタール(PB)および5,6,ベンゾフラボン(BF)でチトクローム P-450を雄ラット肝に誘導した。この肝のミクロゾーム分画(25%ホモジネートの 9000rpm、10分間遠心分離した上清)をとり、PB-BF S9分画を調整した。さらに、NADPH-産生系を添加し、薬物代謝活性化酵素系 S9 Mix³⁶⁾として用いた。

(4)変異原活性の測定

Ames法³⁷⁾のYahagiら³⁸⁾による変法である Preincubation法にもとづき、

S.typhimurium TA98において誘発されたヒスチジン非要求性(His⁺)への復帰突然変異菌数を指標とした。試験溶液 0.1mℓ に S9 Mixまたはりん酸緩衝液(100 μM, pH7.4) 0.5mℓ、および前培養した菌懸濁液(*S.typhimurium* TA98) 0.1mℓ を加え、37℃で20分間前処理した後、ソフトアガー 2mℓ を加え、アガープレートに重層した。37℃で48時間培養後、プレート上の His⁺ revertantのコロニー数を計測した。

自然突然変異コロニー数の2倍以上の変異コロニー数を誘発した場合に、TA 98、S9存在下では 60以上が陽性と判定されるが、本実験の調理食品では、1食分の試料の量が多いため 100以上を陽性と判定した。

1-2 結果

1-2-1 集団給食調理食品の変異原活性

成人女子昼食用に集団給食で調製された調理食品の変異原活性を TA98、S9存在下で測定した。調理食品の1食分の変異原活性を His⁺ revertants数で示し、あわせて用いた材料と分量を、主食(17品目)は Table 1に、主菜(16品目)は Table 2-1および Table2-2に、副菜(9品目)は Table 3に、スープ類(13品目)は Table 4に、デザート類(12品目)は Table 5に示す。これら調理食品 67品目の中で、主食、副菜、スープ類、デザート類では、変異コロニー数が 100を超えるものはなく、変異原活性が陽性であるものはないと判定された。主菜(Table 2)では変異コロニー数が 100を超えるものがいくつかあり、竜田揚げが 107、117で、カボチャのコロッケが 172で、ベティスコッチエッグが 182で、鶏肉団子の串焼(揚げ物)が 139で、同(焼き物)が 276で、肉団子の串焼(焼き物)が 178で、八宝菜が 144であった。

Table 1 Mutagenic activities of cooked foods toward TA98 with S9

Cooked foods	Weight (g)	His ⁺ revertants	Ingredients(g)
Control*		29	
Rice	130	38	Rice(60)
Rice ball	111	53	Rice(50), Dried bonito flakes(0.5), Seasoned and dried purple laver(0.5), Kizami-konbu(2), Perilla leaves(0.2), Soy sauce(1), Salt(0.5)
Rice ball	111	53	Rice with germs(45), Umeboshi(2), Dried bonito flakes(0.5), Seasoned and dried purple laver(0.5), Soy bean powder(0.2), Sugar(0.5), Salt(0.5)
Chirashi-sushi	128	96	Rice(40), Egg (10), Carrot(5), Dried shiitake(1), Kidney beans(immature pods)(5), Dried gourd shavings(2), Edible burdock(10), Canned wary crabs(10), Pickled ginger roots(1), Purple laver(0.5), Vinegar(8), Sugar(7), Salt(1), Vegetable oil(0.5), Sweet sake(2), Soy sauce(4)
Curry and rice	460	38	Rice(50), Chicken(30), Onion(15), Potato(30), Carrot(10), Canned pineapple slices(10), Curry powder(1), Soft flour(4), Milk(20), Butter(3), Vegetable oil(5), Dried consomme(2), Salt(1), Pepper
Fried rice	175	35	Rice(80), Sliced bacon (10), Bamboo shoots(20), Dried shiitake(1), Green peas(10), Vegetable oil(10), Salt(1), Pepper
Zoni	241	26	Rice cakes(75), Spinach(10), Carrot(10), Kamaboko(10), Quail eggs(15), Flavor seasoning(0.2), Soy sauce(3)
Bread type rolls	60	78	Bread type rolls(50), Margarine(10)
	58	38	Bread type rolls(50), Margarine(10)
	51	52	Bread type rolls(50)
	57	38	Bread type rolls(50)
Soft rolls bread	50	56	Soft rolls bread(50), Margarine(10)
Sandwiches	110	21	White bread(80), Butter(5), Carrot(25), Sugar(16), Lemon(8)
Dinner roll sandwiches	143	21	Soft rolls bread(60), Egg(25), Sliced ham(10), Tomato(15), Lettuce(5), Mayonnaise(10), Margarine(10)
Spaghetti meat ball sauce	254	44	Spaghetti noodles(50), Onion(20), Carrot(20), Mushrooms(10), Vegetable oil(8), Ground beef and ground pork(40), Egg(5), Milk(5), Tomato ketchup(15), Soft flour(3), Bread crumbs(2), Margarine(2), Worcestershire sauce(5), Salt(2), Pepper
Spaghetti with meat sauce	113	38	Spaghetti noodles(35), Ground beef and ground pork(20), Onion(20), Tomato(50), Green peas(2), Vegetable oil(4), Tomato ketchup(20), Soft flour(2), Butter(2), Worcestershire sauce(4), Salt(1), Pepper
Macaroni au gratin	140	40	Macaroni(20), Chicken(20), Onion(20), Shiitake(raw)(5), Carrot(5), Vegetable oil(2), Salt(1), Soft flour(5), Butter(8), Milk(100), Cheese spread(2), Bread crumbs(2)

* ; Solvent controls

Table 2-1 Mutagenic activities of cooked foods toward TA98 with S9

Cooked foods	Weight (g)	His ⁺ revertants	Ingredients(g)
Control*		29	
Tatsuta-age(1)	48	107	Merluce(50), Soy sauce(3), Sugar(2), Starch(5),
(2)	35	117	Vegetable oil(5)
Foil boied merluce	40	29	Merluce(30), Onion(10), Vegetable oil(3), Butter (3)
Short-necked clam chowder	251	42	Short-necked clam(30), Onion(20), Carrot(10), Sweet corn(10), Kidney beans(imature pods)(10), Milk (100), Butter(3), Soft flour(3), Salt(2), Pepper
Pumpkin croquette	139	172	Ground chicken(20), Pumpkin(80), Onion(25), Butter (5), Mushroom(5), Egg(2), Soft flour(2), Vegetable oil(10), Bread clumbs(2), Salt(1), Pepper
Grilled chichen with curry Sauce	107	91	Chicken wings(35), Salt(0.5), Pepper, Onion(20), Carrot(15), Kidney beans(10), Dried consomme(1), Curry powder(0.5), Vegetable oil(3), Soft flour (3), Butter(3), Starch(0.5), Tomato ketchup(1), Margarine(4), Salt(0.5)
Petit scotch egg	48	182	Quail eggs(9), Ground chicken(25), Onion(3), Bread clumbs(8), Egg(6), Soft flour(5), Salt(1), Vegetable oil(8), Tomato ketchup(10), Pepper
Tofu hamberg steak	121	32	Tofu(40), Ground beef(20), Onion(15), Carrot(5) Salt(1), Soft flour(6), Egg(2), Vegetable oil(4), Tomato ketchup(15), Cucumber(15), Tomato(20), Pepper
Pork and beans	94	42	Soy beans(15), Pork(10), Sliced bacon(15), Onion (10), Carrot(8), Green peas(3), Tomato ketchup(15) Sugar(1), Salt(1), Starch(1), Butter(1), Vegetable oil(1)
Mashed potatoes	170	65	Ground chicken(70), Potato(30), Egg(25), Canned cherries(5), Tomato(30), Lettuce(20), Tomato ketchup(7), Worcestershire sauce(3), Salt(1) Pepper
Brochette(Chicken dumpling)			
Fry	100	139	Ground chicken(70), Parsley(4), Lemon(4), Egg(10), Sweet pepper(15), Bread clumbs, (5), Soft flour(3)
Roast	104	276	Worcestershire sauce(3), Vegetable oil(4), Salt(2) Pepper

* ; Solvent controls

Table 2-2 Mutagenic activities of cooked foods toward TA98 with S9

Cooked foods	Weight (g)	His ⁺ revertants	Ingredients(g)
Control*		29	
Brochette(Beef dumpling)			
(1)	58	45	Beef(10),Pork(10),Onion(10),Carrrot(3),Egg(3),
(2)	58	178	Quil eggs(8),Sweet pepper(5),Bread clumbs(3), Salt(0.5),Soy sauce(3),Vegetable oil(5),Sweet sake(2),Pepper
Chop-suey	166	144	Pork(25),Shrimp(10),Onion(40),Dried shiitake(1) Carrot(10),Bamboo shoots(15),Kidney beans(pods immature)(15),Sake(3),Starch(2),Soy sauce(6), Vegetable oil(6),Salt(1)
Chicken liver flavored with ginger	41	42	Chicken liver(30),Sugar(3),Soy sauce(5),Ginger roots(1)

* ; Solvent controls

Table 3 Mutagenic activities of cooked foods toward TA98 with S9

Cooked foods	Weight (g)	His ⁺ revertants	Ingredients(g)
control*		29	
Vegetable and rice noodles with sesame dressing	83	43	Sliced ham(10),Egg(5),Cucumber(20),Rice noodles (7), Lettuce(20), Vegetable oil(2), Salt(0.5), Vinegar(8),Sesame seeds(1)
Sea food salad	98	58	Canned tuna(20),Dried wakame(1),Potato(20), Lettuce(10),Cucumber(20),Tomato(10),Vegetable oil(5),Vinegar(3),Salt(1)
Creamy Potatoes	84	43	Potato(50), Carrot(10), Green peas(5), Soft flour(3),Milk(50),Butter(7),Salt(1),Pepper
Stuffed eggs	57	38	Egg(25),Parsley(1),Mayonnaise(7),Worcestershire sauce(3),Lettuce(10),Tomato ketchup(3)
Tomato salad	48	48	Tomato(20),Lettuce(15),Vinegar(4),Vegetable oil (4),Salt(0.3),Pepper
Potato salad	57	38	Potatao(30), Canned tunas (15), Carrot(7), Mayonnaise(7), Lettuce(15)
Maccaroni salad	67	38	Maccaroni(5),Cucumber(10),Cabbage(7),Tomato(5) Mayonnaise(10),Parsley(1),Salt(0.5)
Mashed Potatoes	100	64	Potato(60), Sugar(2), Milk(20), Margarine(6), Canned cherries(6)
Lettuce salad	92	64	Lettuce(20), Tomato(40), Apples(10), Processed cheese(20),Mayonnaise(6),Pepper

* ; Solvent controls

Table 4 Mutagenic activities of cooked foods toward TA98 with S9

Cooked foods	Weight (g)	His ⁺ revertants	Ingredients(g)
Control*		29	
Clear soup with shrimp dumpling	108	59	Shrimp(30), Mitsuba(greens)(1), Starch(2), Soy sauce(2), Flavor seasoning(1), Salt(1)
Kentin soup	188	98	Chicken(sasami)(15), Edible burdock(10), Tofu(50), Carrot(10), Kidney beans(immature pods)(10), Miso (20), Vegetable oil(3), Flavor seasoning(1)
Kenchin soup	310	67	Chicken(sasami)(15), Tofu(20), Green peas(3), Japanese radish(20), Carrot(10), Milk(50), Miso (10), Flavor seasoning(1), Salt(1), Vegetable oil (2)
Green peas soup	169	58	Green peas(40), Onion(10), Milk(130), Butter(4), Soft flour(4), Dried consomme(1), Salt(1), Pepper
Chinese Tofu soup	121	78	Tofu(30), dried wakame(1), Tomato(40), Lettuce(20), Welsh onion(0.5), Chinese flavor seasoning(3), Vegetable oil(1)
Chinese cabbage soup	198	44	Chinese cabbage(40), Ground pork(30), Onion(5), Carrot(20), Bread crumbs(5), Chinese flavor seasoning(2), Salt(1)
Corn soup	126	37	Canned sweet corn(25), Milk(100), Onion(20), Soft flour(4), Dried consomme(1), Salt(0.5), Pepper
Corn soup	150	37	Canned sweet corn(40), Carrot(10), Milk(100), Margarine(3), Soft flour(2), Dried consomme(1), Parsley(1), Salt(1), Pepper
Creamy corn soup	118	36	Canned sweet corn(20), Milk(50), Butter(5), Soft flour(5), Cornflakes(2), Dried consomme(1), Salt (0.5), Pepper
Sausage soup	133	34	Sausage(12), Rice noodles(3), Kidney beans (immature pods)(5), Dried consomme(3), Pepper
Tamago-tofu soup	137	65	Tamago-tofu(40), Dried consomme(3), Parsley(1), Pepper
Spinach soup	188	48	Spinash(30), Milk(60), Butter(3), Soft flour(3), Dried consomme(2), Pepper
Vegetable soup	150	57	Spinash(10), Dried wakame(1), Tofu(15), Dried consomme(2), Pepper

* ; Solvent controls

Table 5 Mutagenic activities of cooked foods toward TA98 with S9

Cooked foods	Weight (g)	His ⁺ revertants	Ingredients(g)
Control*		29	
Sweet potatoes	57	34	Sweet potatoes(40), Sesame seeds(1), Vegetable oil(5), Sugar(3), Soy sauce(1)
Milk-kan	141	44	Milk(50), Canned mandarin oranges(10), Agar-agar (1), Sugar(15), Lemon(5)
Yogurt-kan	110	95	Yogurt(25), Peppermint(2), Agar-agar(1), Sugar (11)
Strawberry mousse	118	95	Strawberries(30), Egg(15), Milk(50), Sugar(5), Gelatin(3)
Custard pudding	59	33	Egg(20), Milk(50), Sugar(13), Vegetable oil (1)
Blanc manger	90	35	Milk(100), Corn starch(10), Coffee powder(0.5), Sugar(10)
Milk fruit jelly	70	85	Milk(50), Canned mandarin oranges(15), Banana(10), Canned cherries(5), Sugar(5), Gelatin(2)
Milk fruit jelly	96	82	Banana(10), Canned pineapple slices(10), Canned mandarin oranges(20), Milk(50), Sugar(8), Gelatin (2)
Yogurt jelly	76	44	Yogurt(27), Sugar(7), Gelatin(2), Canned cherries (3)
Green tea flavored milk	180	30	Milk(180), Green tea powder(1), Sugar(6)
Mixed juice	150	35	Milk(100), Banana(30), Strawberries(30), Sugar (3)
Lemon flavored yogurt jelly	148	48	Yogurt(50), Canned mandarin oranges(30), Lemon (2), Carbonated water(60), Sugar(5)

* ; Solvent controls

次に、調理した食品の変異原活性と関連する因子を検索するために、これら67品目の調理食品の変異原活性と素材別、成分別、調理方法別、調味料別の各因子との相関係数を求めた。使用した素材を6つの基礎食品群別³⁸⁾に分類して、使用した素材の量と変異原活性の間での相関係数を求め Table 6 に示す。1群の中では肉類が相関係数 0.528 ($p < 0.01$)で、3群の緑黄色野菜が相関係数 0.273($p < 0.05$)で、各々有意の相関が認められた。

Table 6 Correlation between mutagenic activities and food group

Food group	Correlation
1st group	
Fishes and shellfishes	0.115
Fish paste products	-0.104
Meats	0.528 **
Eggs	0.201
Soybean	0.036
2nd group	
Milk and dairy products	-0.220
Algae	-0.014
3rd group	
Green and yellow vegetables	0.273 *
4th group	
Other vegetables	0.030
Fruits	0.030
5th group	
Rice	-0.116
Breads	-0.066
Noodles	-0.109
Potatoes	0.103
6th group	
Fats and oils	0.156

* $p < 0.05$, ** $P < 0.01$

成分別については、献立作成時の1人分の材料について四訂食品成分表³⁹⁾を用いて栄養価の計算を行ない、各成分と変異原活性との相関係数を求め Table 7 に示す。ナイアシンが相関係数 0.455($p < 0.01$)で、たんぱく質が相関係数 0.409($p < 0.01$)で、脂質が相関係数 0.347($p < 0.01$)で、ビタミンCが相関係数 0.305($p < 0.01$)で、ナトリウムが相関係数 0.270($p < 0.05$)で、各々有意の相関が認められた。

Table 7 Correlation between mutagenic activities and nutrients

Nutrients	Correlation
Energy	0.143
Protein	0.409 **
Lipid	0.347 **
Non-fibrous carbohydrates	-0.167
Fiber	0.144
Calcium (Ca)	-0.117
Phosphorus (P)	0.071
Iron (Fe)	0.220
Sodium (Na)	0.270 *
Pottassium (K)	0.184
Vitamin A	-0.050
Vitamin B ₁	0.157
Vitamin B ₂	0.129
Niacin	0.455 **
Vitamin C	0.305 *

* $p < 0.05$, ** $P < 0.01$

調理方法別については、煮物、焼き物、炒め物、揚げ物、蒸し物、和え物、寄せ物、なま物に分類して、それらの因子と変異原活性との相関係数を求め Table 8 に示す。変異原活性と揚げ物が相関係数 0.430($p < 0.01$)で有意の相関が認められた。

Table 8 Correlation between mutagenic activities and cooking method

Cooking method	Correlation
Simmered food(Nimono)	-0.237
Grilled food(Yakimono)	0.166
Frizzled food(Itamemono)	0.010
Deep fried food(Agemono)	0.430 **
Steamed food(Mushimono)	-0.058
Dressed food(Aemono)	-0.084
Assorted food(Yosemono)	0.004
Sliced and served food (Namamono)	-0.101

* $p < 0.05$, ** $P < 0.01$

使用した調味料13種についての使用量と変異原活性の相関係数を Table 9 に示す。食塩が相関係数 0.328($p < 0.01$)で、植物油が相関係数 0.320 ($p < 0.01$)で、しょうゆが相関係数 0.271($p < 0.05$)で、各々有意の相関が認められた。

素材別、成分別、調理方法別、調味料別のいずれの因子においても、変異原活性と有意に負の相関が認められたものはなかった。変異原活性と有意に相関が認められた因子の中で、肉類はタンパク質、脂質、ナイアシンを含有していること、肉類の下味をつけるのに食塩、しょうゆを用いた調理食品が多かったこと、揚げ物に植物油が使用されていたことから、集団給食の調理食品の変異原活性と相関の高い因子をまとめると、肉類(タンパク質性食品)を用いた揚げ物という高温調理食品であることがわかった。

Table 9 Correlation between mutagenic activities and condiments

Condiments	Correlation
Vinegar	0.034
Alcoholic beverage	0.221
Soy sauce	0.271 *
Mirin	0.199
Miso	0.088
Salt	0.328 **
Sugar	-0.079
Starch	0.144
Tomato ketchup	-0.037
Worcester sauce	0.190
Mayonnaise	-0.155
Vegetable oils	0.320 **
Animal fats and oils	-0.074

* $p < 0.05$, ** $P < 0.01$

1-2-2 魚、肉料理の変異原活性

前項の結果から、素材別では肉類、調理方法別では揚げ物という調理方法が変異原活性と関連のあることが示唆された。本実験の試料として用いた集団給食の調理食品は成人女子昼食用(対象が主として女子短大生)であるため、タンパク質性食品の中でも魚介類を用いた焼き物という高温調理方法の使用が少なかった。そこで、変異原活性が高くなると考えられる焼き物、炒め物等の高温調理方法で魚介類を用いて調理して、その変異原活性を知る必要があると考えられる。家庭でよく行なわれる魚の塩焼き、照り焼き、豚肉ソテー等の調理食品の変異原活性を His⁺ revertants数で Table 10 に示す。塩焼きでは、いずれの魚類も変異コロニー数は 100以上と陽性であった。中でも、たいが 1520と最も高い活性を示した。また、照り焼きでは、ぶりが 100以下であることを除

いて、うなぎ、さわらとも陽性であった。豚肉ではソテー、しょう油ステーキと直接焼きの方法は 1000以上であったが、揚げ物でもトンカツの衣をつけた調理方法では 100以下とその活性は低かった。

Table 10 The mutagenic activities of cooked foods toward TA98 with S9

Cooked food	Weight (g)	His ⁺ revertants
Control*		29
Shio-yaki		
Horse mackerel	42	334
	74	529
Butterfly bream	46	427
Salmon	40	391
Pacific saury	77	114
Mackerel	64	466
	64	600
	91	268
Sea breams	60	1520
Yellowtail	88	131
	88	185
Teri-yaki		
Eel	69	369
	69	427
Spanish mackerel	47	780
	50	284
	55	194
Yellowtail	88	61
	88	99
Sauted pork	55	1668
	105	1835
Pork steak with soy sauce	105	1233
Pork cutlet	157	51
	157	81

* ; Solvent controls

1-3 考察

集団給食、魚料理で高い変異原活性を示したものは、タンパク質性食品(肉、魚類)の揚げ物(油の温度 160-180℃)、焼き物(表面温度 150-200℃)と高温調理したものであった(Table 2および 10)。変異原性物質の抽出に用いた青綿法では多環式変異原性物質を選択的に抽出すること^{3,4)}ができることから、これらの品目の変異原性物質はヘテロサイクリックアミン系の物質であると考えられる。一方、焼き物、揚げ物であっても、白身魚のホイル焼きで見られるように、ホイルに包む事により水分蒸発が抑えられた蒸し煮に近い調理方法での活性は 29、トンカツの衣を付けて揚げたときの活性は 51、81と低いことから、加熱時のタンパク質性食品の表面温度が100℃以上にならない場合はヘテロサイクリックアミン系の物質が生成されにくいことが示唆された。

また、魚の塩焼きでは食品の表面温度が 150-160℃になると、食品表面に焼きこげができ、タンパク質そのものが加熱されてヘテロサイクリックアミン系の物質の生成も多く変異原活性も高いと考えられる。一方、照り焼きでは食品の表面温度が 105-115℃で、魚そのものの表面はこげていないにもかかわらず、調味料として用いたしょうゆ、砂糖が加熱されこげ風味が生じている。照り焼きでは、魚そのものの焼きこげの生成は少ないものの、その変異原活性は塩焼きと同程度に高い。各種アミノ酸と糖を用いたモデル系の実験で、100℃付近の温度で TA98、S9存在下で変異原活性を示す物質がアミノ-カルボニル反応で生成することが報告されている^{40,41)}。しょうゆは大豆と小麦を原料とする醸造食品で、その成分中には各種アミノ酸、糖などが含まれている。しょうゆ、砂糖を調味料として用いた照り焼きは、塩焼きほど高温調理をしなくても、アミノ-カルボニル反応により変異原性物質の生成が起っているととも考えられる。

しょうゆは、集団給食で調製した調理食品の変異原活性との相関も認められ、

照り焼きにおいても変異原活性の増大に関与していると考えられる。しょうゆは、日本人の食卓に欠かすことのできない伝統調味料の一つであり、その使用範囲は広く、加熱して食べられることも多い。しょうゆを加熱した時の変異原活性の変化についての報告はなく、それらを検索することは重要なことと考えられる。

なお、実験的、疫学的に発癌に対して抑制的に働くとされるビタミンC¹⁸⁾、緑黄色野菜⁴²⁾と変異原活性との間に、食品成分の中でビタミンCが相関係数0.305($p < 0.05$)で、また、素材の中で緑黄色野菜が相関係数0.273 ($p < 0.05$)と有意の相関が認められた。これは変異原活性の高い主菜(Table 2)の中に、カボチャのコロッケのカボチャ、鶏肉団子の串焼のパセリ、ピーマン、肉団子の串焼の人参、ピーマン、八宝菜の人参、さやえんどうと緑黄色野菜がタンパク質性食品と混合してもちいられているためと考えられる。

第2章 しょうゆの加熱による変異原活性の変化

第1章で、調理食品を用いて変異原活性と関連のある因子のスクリーニングを行ない、タンパク質性食品を高温調理すると、変異原活性を増大させる可能性があることが示された。また、その際に調味料として用いたしょうゆが変異原活性の発現に関与していることが示唆された。

しょうゆは日本人の食卓に欠かすことのできない調味料であり、その使用は煮物、焼き物、揚げ物、炒め物と広く加熱して使用されることも多い。しょうゆの変異原活性については、Linら²⁶⁾、Shinohara²⁷⁾、Nagaharaら²⁸⁾の報告があるが、それらは変異原活性のみの報告であり、変異原性物質の同定およびしょうゆを加熱した時の変異原活性についての報告はない。そこで、常圧加熱(煮沸、焙焼)、加圧加熱の処理を行ない変異原活性の変化を、さらにショ糖を添加して同様の加熱を行いその影響を、しょうゆを加熱した液および加熱により生成したタール様成分の変異原活性を TA98(フレイムシフト型)および TA100(塩基置換型)の検出系で検討した。

2-1 実験方法

(1) 試料

しょうゆは市販濃口本醸造しょうゆを用いた。

(2) 試薬

ショ糖(和光純薬製)、他は第1章に準じた。

(3) 試験溶液の調製

常圧煮沸、加圧加熱の場合、しょうゆ 10m μ に水 40m μ を加え 50m μ としたものを、常圧焙焼加熱の場合、しょうゆ 10m μ を試料溶液とした。ショ糖は試料溶液に対して容量比率で、煮沸加熱では 1g(2%)、2.5g(5%)、5g(10%)、20g(40%)を、焙焼加熱では 2g(4%)、5g(10%)、10g(20%)、20g(40%)を、加圧加熱では 5g(10%)を添加して試料溶液とした。

常圧煮沸加熱の場合は、直径 15cmの蒸発皿に希釈試料溶液(50m μ)を入れ、時計皿で覆い一定火力で加熱した。加熱した後、蒸発皿に残る液量と液の温度は、それぞれ2分後には 45m μ で 98 $^{\circ}$ C、3分後には 30m μ で 100 $^{\circ}$ C、5分後には 10m μ で 105 $^{\circ}$ C、7分後には 3m μ で 110 $^{\circ}$ C、9分後には 0.5m μ で 115 $^{\circ}$ Cであった。これらを加熱後 50m μ にメスアップし、除菌濾過して試験溶液とした(以後加熱試料とする)。覆っている時計皿には、3分後では試料溶液から蒸気が発生し水滴となって付着する(時計皿温度 60 $^{\circ}$ C)が、徐々に蒸発し、5分後には試料溶液から煙が発生し時計皿(表面温度 100 $^{\circ}$ C)にタール様物質が付着し、7~9分後にはさらに煙が発生し、時計皿(110 $^{\circ}$ C)のタール様物質(加熱煙凝縮物)が増加し、10分後にはその付着物は炭状になった。時計皿に集められた付着物(以後タール試料とする)は、DMSO 2m μ に溶解して試験溶液とした。常圧焙焼加熱は、煮沸時と同様の条件で原試料溶液(10m μ)を加熱した。蒸発皿に残る液量、液の温度は、1分後には 5m μ で 105 $^{\circ}$ C、3分後には 0.5m μ で 115 $^{\circ}$ C、5分以後は炭状になった。覆っている時計皿には1分後から煙が発生し、3分を過ぎる(時計皿温度 110 $^{\circ}$ C)と、付着したタール様物質は流動性を失い炭状になった。加圧加熱では、三角フラスコに試料溶液をいれ、密栓をして加圧加熱(120 $^{\circ}$ C)を行ない、試験溶液とした。

(4) カラムクロマトによる分離

試験溶液 5m μ を強酸性カチオン交換樹脂カラム(Amberlite IR-120 H型、100~200mesh、 ϕ 3 \times 14cm)に加え、蒸留水 300m μ で溶出し、はじめの 100m μ の溶出画分をA、つづく200m μ の画分をBとした。次に同じカラムを 3N アンモニア水 160m μ で溶出し、はじめの 80m μ 溶出画分をC、次の 80m μ 溶出画分をDとした。C、D画分は減圧濃縮によりアンモニアを除去した。次に、C画分の濃縮液を弱塩基性アニオン交換樹脂カラム(Dowex1 [CH₃COO⁻], 100~200mesh、 ϕ 2 \times 10cm)に加え蒸留水 150m μ で溶出し、50m μ ずつの溶出画分を順にE、F、Gとし、次に 3N 酢酸 80m μ で溶出しH画分とした。これらの画分を減圧濃縮した。

(5) 定性試験

糖の定性(α -ナフトール-硫酸反応)

検液 0.5m μ を試験管にとり、 α -ナフトールの 5%アルコール溶液 2~3滴を加えてよく混合した。次に試験管をかたむけて、濃硫酸 1~2m μ を器壁をつたわらせ静かに加えた。試験管を静置し、検液と濃硫酸の界面の赤紫色の環の生成により、糖類の存在を確認した。

アミノ酸の定性(ニンヒドリン反応)

検液 0.5m μ を試験管にとり、1%ニンヒドリン溶液を少量加え、中性または弱酸性において加熱し、赤紫色の物質の生成により、アミノ酸の存在を確認した。

ヒスチジンの検出

アミノ酸の検出は、ろ紙(Whatman I、20 \times 20cm)に検体を 5 μ μ 添付し、n-ブタノール-酢酸-水(12:3:5)により展開し、よく風乾したのち、ニンヒドリン試薬を噴霧して 90~100 $^{\circ}$ Cで5分間加熱して発色させた。検体と同時にヒスチジンを添付し、展開させて、検体がヒスチジンの Rf値 0.26と同一のスポットを

示す場合に、ヒスチジンの存在を確認した。

(6) 変異原性試験

菌株は、*Salmonella typhimurium* TA98(フレームシフト型変異株)、TA100株(塩基置換型変異株)を用いた。寒天平板培地・軟寒天、S9 Mixの調製、および変異原活性の測定は、第1章に準じて行なった。自然突然変異コロニー数の2倍以上の変異コロニー数を誘発した場合、TA98、S9存在、非存在下では60以上を、TA100、S9存在下では270以上を、TA100、S9非存在下では240以上を陽性と判定した。

2-2 結果

2-2-1 しょうゆの加熱による変異原活性の変化

(1) しょうゆの加熱方法の相違による変異原活性の変化

常圧煮沸加熱

時計皿でふたをした蒸発皿に入れた希釈試料溶液を、一定火力で煮沸した時の蒸発皿内の加熱試料と時計皿に付着するタール試料の変異原活性の経時的変化を His⁺ revertants数で Table 11に示す。この表から明らかなように TA100、S9存在下では加熱試料、タール試料ともに、His⁺ revertants数の加熱中の変化は認められなかった。TA100、S9非存在下では、加熱7分後の加熱試料に320のHis⁺ revertants数が認められ、これは未加熱試料の活性の1.8倍であった。TA98では5分までの水分の多く残存する状態では加熱、タール試料とも変異原活性は認められなかった。加熱試料では焙焼状態に移行した9分後に TA98、

S9存在下で 128、タール試料では9分後に 2489と His⁺ revertants数が急増し、高い変異原活性が認められた。10分以後は加熱試料、タール試料いずれにおいても急激に水分が蒸発して乾いた炭様の状態になり、その変化に伴いタール試料で示された TA98、S9存在下の変異原活性は低下し、TA98、S9非存在下では菌に対する Killing effectが認められた。

Table 11 Mutagenic activities of the residue and tar samples of bioled soy sauce

	Time (min)	His ⁺ revertants/plate			
		TA100		TA98	
		+S9	-S9	+S9	-S9
Control*		134	121	29	28
Residue sample	0	168	176	41	38
	2	169	180	54	40
	3	175	182	62	50
	5	178	<u>269</u>	60	52
	7	192	<u>320</u>	66	50
	9	169	192	<u>128</u>	49
	10	142	k	38	29
Tar sample	2	138	129	31	40
	3	150	127	48	31
	5	147	182	<u>61</u>	30
	7	155	194	<u>63</u>	48
	9	167	181	<u>2489</u>	30
	10	169	172	<u>292</u>	k

Numbers underlined show positive results, i.e. numbers greater than twice of the background level.

*; Solvent controls, k; killing effect

Residue sample 0.1ml/plate, Tar sample 0.1ml/plate

常圧焙焼加熱

しょうゆを焙焼し、生成してきたタール試料の加熱時間による変異原活性の変化を Fig.1に示す。この加熱処理では水分が少ないため、1分後には焙焼状態に移行してタール様成分が生成し、その変異原活性は TA98、S9存在下で加熱後3分で 2040 His⁺ revertantsを示した。加熱時間が7分になるとタール様成分も煮沸時と同様に乾いた炭様の状態になり、その変化とともに変異原活性の低下が見られたが、煮沸加熱と異なり Killing effectは認められなかった。

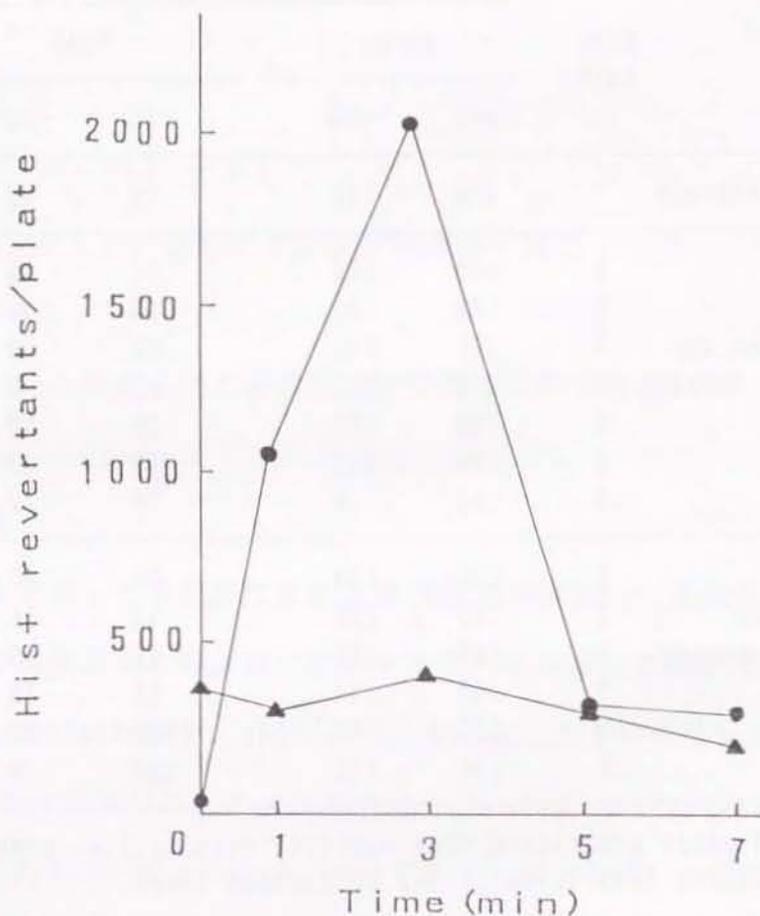


Fig.1 Mutagenic activities of the tar samples of baked soy sauce

● — ● TA98 with S9 ▲ — ▲ TA100 with S9

加圧加熱

加圧加熱し経過時間による変異原活性の変化を Fig.2 に示す。加熱溶液は、TA100、S9非存在下で加熱15分後に 270 His⁺ revertants で、弱いながらも陽性傾向を示した。TA100、S9存在、非存在下とも加熱30分以後は、大きな活性の増加は認められなかった。TA100、S9非存在下の加熱15分後の変異原活性の強さは、常圧煮沸加熱した場合の加熱5分後の活性に相当した。また、加圧加熱ではタール成分の生成は認められず、TA98での活性は示されなかった。

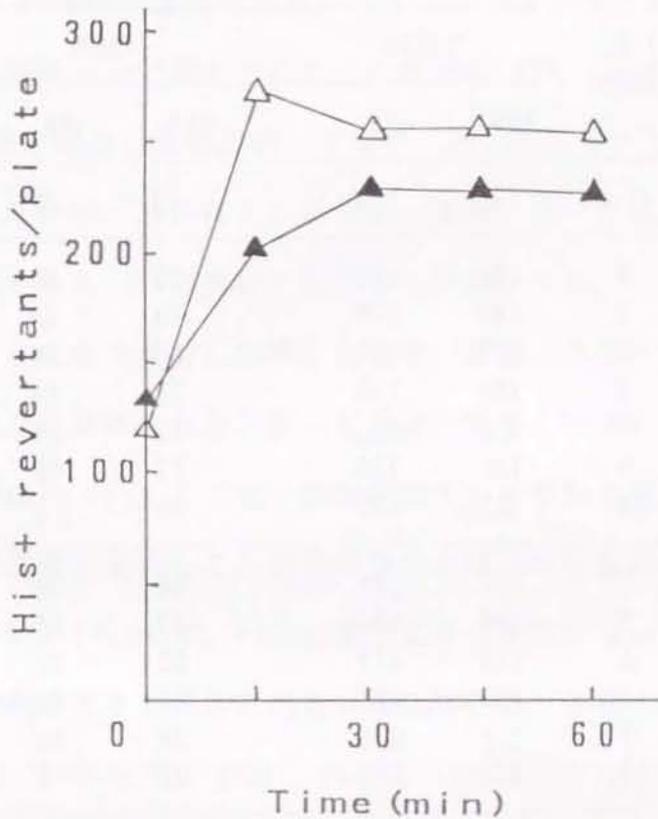


Fig.2 Mutagenic activities of the residue of heated soy sauce at 120°C

Residue sample 100 μ l/plate
▲ — ▲ TA100 with S9 △ — △ TA100 without S9

(2) ショ糖添加の影響について

常圧煮沸加熱

ショ糖を試料溶液に 10%添加し煮沸した場合の加熱試料、タール試料の変異原活性の変化を His⁺ revertants数で Table 12に示す。しょうゆのみを煮沸し

Table 12 Effect on the mutagenic activities of the residue and tar of boiled samples by the adding of 10% sucrose to soy sauce

	Time (min)	His ⁺ revertants/plate			
		TA100		TA98	
		+S9	-S9	+S9	-S9
Control*		134	121	29	28
Residue sample	0	164	176	42	36
	2	164	176	49	45
	3	174	181	<u>68</u>	46
	5	184	193	<u>71</u>	49
	7	212	<u>241</u>	39	<u>74</u>
	9	141	125	37	29
	10	132	122	36	k
Tar sample	2	136	125	40	30
	3	130	128	37	35
	5	146	211	52	51
	7	181	<u>421</u>	40	49
	9	<u>712</u>	<u>605</u>	34	50
	10	239	225	29	k

Numbers underlined show positive results, i.e. numbers greater than twice of the background level.

*; Solvent controls, k; killing effect

Residue sample 0.1ml/plate, Tar sample 0.1ml/plate

た場合、加熱試料5および7分で TA100、S9非存在下の変異原活性は、それぞれ 269、320(Table 11)であったが、ショ糖の添加により 193、241と、それぞれ活性は 28、25% 抑制されることがわかった。しかし、ショ糖を添加した場合、TA100、S9存在下でタール試料の9分で 712、S9非存在下でもタール試料の7分および9分に、それぞれ 421、605と、しょうゆのみの煮沸加熱では認められない高い変異原活性が示された。これら、しょうゆのみの加熱では認められず、ショ糖を添加し加熱した場合に認められる活性は、10分後には低下した。一方、TA98、S9存在、非存在下では加熱試料、タール試料とも大きな変異原活性は認められなかった。10分後には、しょうゆのみの加熱時と同様に TA98、S9非存在下で Killing effectが認められた。しょうゆのみの煮沸加熱の場合の加熱試料およびタール試料9分で認められた、それぞれ 128、2489の変異原活性(Table 11)は、ショ糖を添加し煮沸加熱した場合、37、34となった。しょうゆのみの加熱で認められるTA98、S9存在下の活性は、加熱、タール試料ともに、ショ糖を添加して加熱すると、100%抑制されることがわかった。

しょうゆにショ糖を添加し加熱した場合、生成したタール試料はしょうゆのみの煮沸加熱では認められない高い変異原活性を、TA100、S9存在、非存在下ともに示した(Table 12)。そこで、煮沸状態をしょうゆと同じにするためにショ糖に18% NaCl溶液を混合して、煮沸加熱した場合の変異原活性の His⁺ revertants数を Table 13に示す。NaCl溶液は変異原活性がないことを確かめた。ショ糖を煮沸加熱すると9分後に焙焼状態に移行し、生成したタール試料(9分)のみに TA100、S9存在下で 2428、TA100、S9非存在下で 803と高い変異原活性を示した。これより、しょうゆにショ糖を添加し煮沸後生成したタール試料に TA100、S9存在、非存在下で認められた変異原活性はショ糖が関与することが示唆された。また、このショ糖のみの煮沸加熱で示された高い活性は、しょうゆとショ糖をともに煮沸加熱する(Table 12)と TA100、S9存在下では 2428 His⁺

revertantsが 712となり 71%、TA100、S9非存在下では 803が 605となり 25%低下した。しょうゆにシヨ糖を添加して煮沸加熱して生成したタール様成分の変異原活性は、しょうゆ、シヨ糖それぞれをを単独で煮沸して生成したタール様成分の変異原活性より低下することがわかった。

Table 13 Mutagenic activities of the residue and tar of boiled samples of 10% sucrose-18% NaCl solution

		His ⁺ revertants/plate			
		TA100		TA98	
		+S9	-S9	+S9	-S9
Control*		134	121	29	28
Residue sample	0	160	140	30	28
	2	160	140	29	29
	3	160	141	30	28
	5	164	141	30	28
	7	164	144	30	28
	9	152	134	31	36
	10	139	134	38	40
Tar sample	2	137	126	35	29
	3	138	130	36	30
	5	145	133	38	33
	7	175	213	40	48
	9	<u>2428</u>	<u>803</u>	39	39
	10	<u>325</u>	<u>248</u>	k	36

Numbers underlined show positive results, i.e. numbers greater than twice of the background level.

*; Solvent controls, k; killing effect

Residue sample 0.1ml/plate, Tar sample 0.1ml/plate

また、しょうゆを煮沸し生成したタール試料で認められる TA98、S9存在下での高い変異原活性におよぼすショ糖の添加量による抑制効果の変化を Fig.3に示す。しょうゆの試料溶液に対してショ糖を、2%添加した場合、抑制効果は認められず、5%添加で活性は約 30%低下し、10%以上添加ではその活性は 100%抑制されることがわかった。

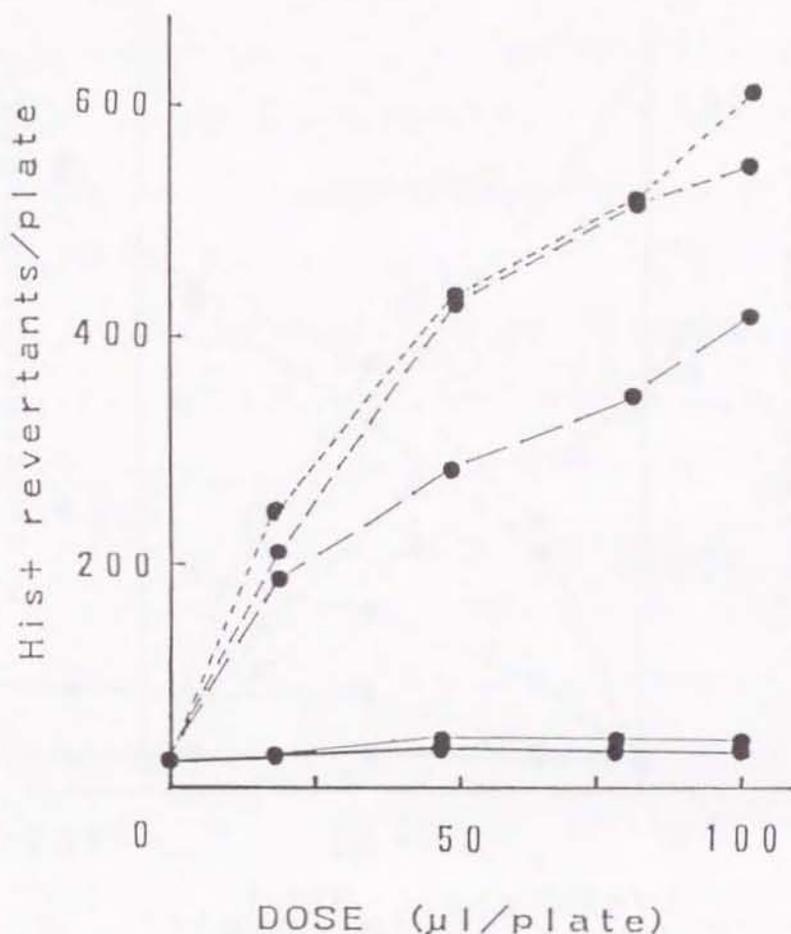


Fig.3 Effect of the amount of sucrose on the inhibition of the mutagenic activities of tar of boiled soy sauce toward TA98 with S9

100 μl/plate is equivalent to 125 μl of soy sauce

● - - - ● no sucrose	● - - - ● 2% sucrose
● - - - ● 5% sucrose	● - - - ● 10% sucrose
● - - - ● 40% sucrose	

常圧焙焼加熱

しょうゆに添加するショ糖の量を変えて加熱した場合のショ糖の抑制効果を Fig.4に示す。生成したタール試料の TA98、S9存在下で示された変異原活性は、試料溶液に対してショ糖 4%添加では抑制効果が認められず、10%添加で約 50% 低下し、20%以上添加で100%抑制されることがわかった。

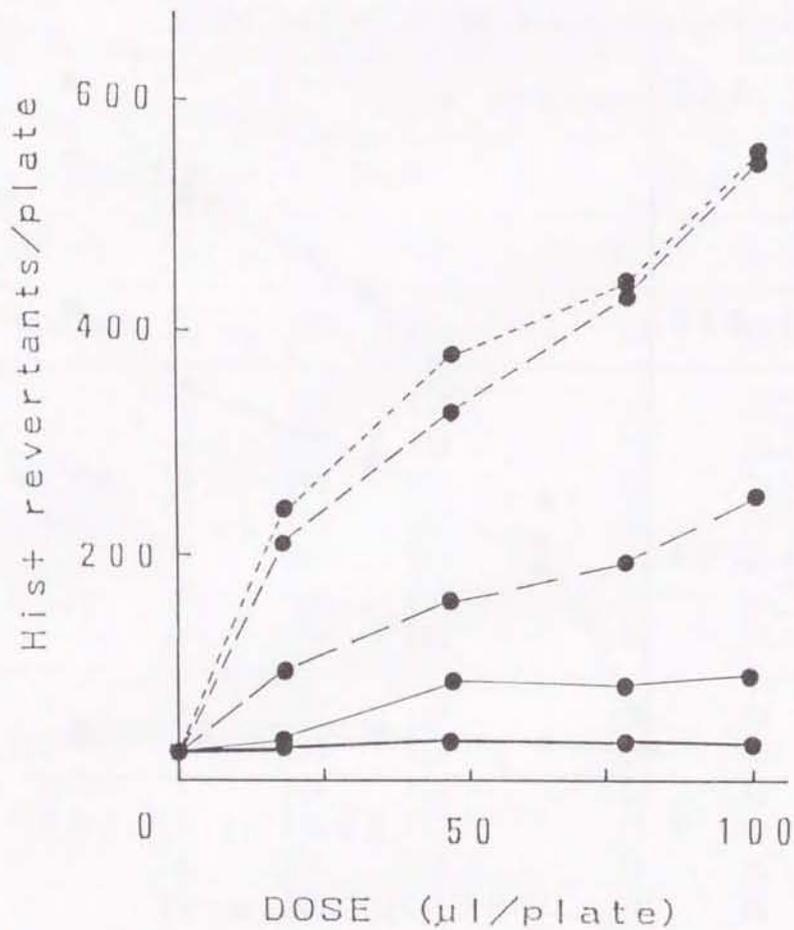


Fig.4 Effect of the amount of sucrose on the inhibition of the mutagenic activities of tar of baked soy sauce toward TA98 with S9

100 μl/plate is equivalent to 125 μl of soy sauce

● - - - ●	no sucrose	● - - - ●	4% sucrose
● - - ●	10% sucrose	● - - ●	20% sucrose
● - - ●	40% sucrose		

加圧加熱

シヨ糖を試料溶液に対し10%添加し加熱した時の変異原活性の変化を Fig.5に示す。しょうゆにシヨ糖を添加して加圧加熱した場合に認められた変異原活性は、TA100、S9存在、非存在下いずれもシヨ糖による抑制効果は認められなかった。シヨ糖の添加量を増加しても抑制効果は認められなかった。

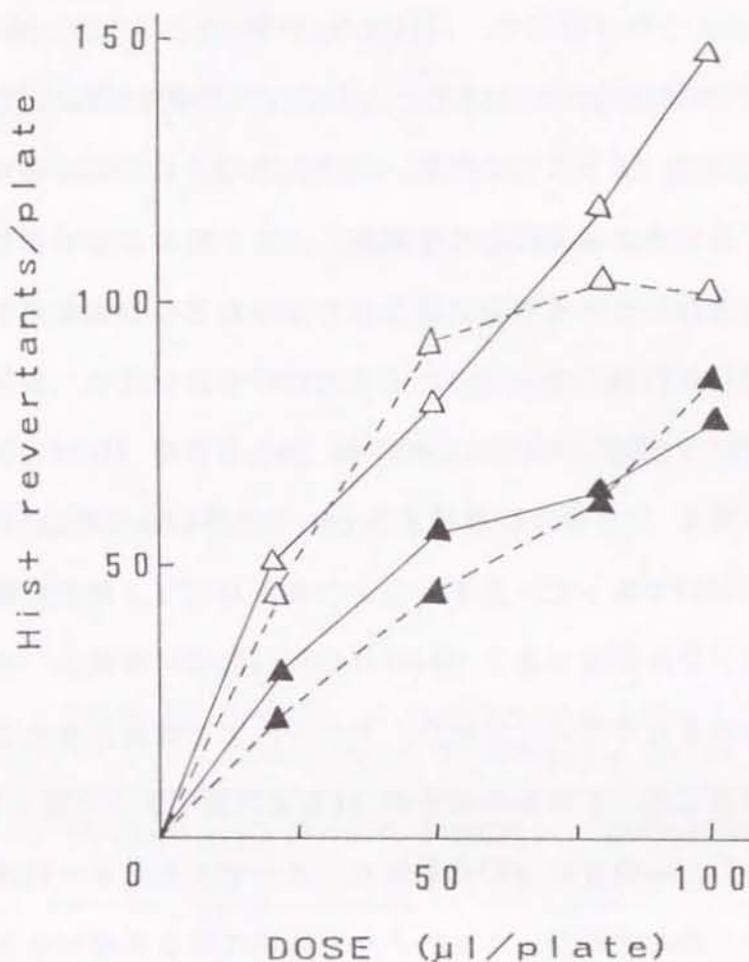


Fig.5 Effect of sucrose on the inhibition of the mutagenic activities of residue of heated soy sauce at 120°C toward TA100 with and without S9

100 μl/plate is equivalent to 20 μl of soy sauce

- ▲ — ▲ no sucrose, with S9
- ▲ - - ▲ 10% sucrose, with S9
- △ — △ no sucrose, without S9
- △ - - △ 10% sucrose, without S9

2-2-2 しょうゆの変異原活性におよぼすヒスチジンの影響

しょうゆを常圧、加圧条件下で加熱した場合、TA100(塩基置換型)、S9非存在下の変異原活性は、煮沸加熱した7分後では1.8倍(Table 11)に、加圧加熱した15分では1.3倍(Fig.2)と、弱いながらも増加が認められた。Ames法で変異原活性の測定を行う場合、試料中のヒスチジンが活性に影響をおよぼす可能性が考えられる³⁵⁾。しょうゆは濃口で、100g当り160mgのヒスチジンを含有しており³⁹⁾、変異原活性の測定時におよぼすヒスチジンの影響を検討する必要があると考えられる。そこで、カラムで未加熱、加熱した場合にしょうゆ中のヒスチジンを分離して、各画分の変異原活性を測定し、しょうゆの変異原活性および加熱による活性の増加にヒスチジンが関与しているかどうかを検討した。加熱試料は、タール試料が生成しないで、一定条件の得られやすい、加圧加熱15分の試料(Fig.2)を用い、変異原活性はしょうゆ1ml当りのHis⁺revertants数で示した。変異原活性を1ml当りに換算すると、未加熱しょうゆは8500で、加熱しょうゆのは11000であった。まず、しょうゆからアミノ酸を分離するために、強酸性カチオン交換樹脂であるAmberliteIR-120[H⁺]を用い、水で流出させた未吸着の画分をそれぞれA、B画分、アンモニアで溶出させたアミノ酸の分画をC、D画分とした。これらの画分のpHおよび糖・アミノ酸の定性分析を行なった(Table 14)。A画分はpH1.3と低く、 α -ナフトール-硫酸反応が強いことから糖を多く含んでおり、ニンヒドリン反応は示されないことからアミノ酸類は含まれていないことがわかった。C画分はニンヒドリン反応が強いことからアミノ酸類を多く含んでいると考えられる。未加熱、加熱しょうゆから得られた各画分の1ml当りの各画分の変異原活性をFig.6に示す。未加熱試料は、糖の分画であるA画分に1100と分画前の変異原活性の約13%が認められ、B画分に活性は示されなかった。C画分に3400で分画前の変異原活性の約42

%、D画分に600で約8%と、C画分、D画分を合せて、アミノ酸の画分に分画前の活性の約50%認められた。加熱試料は、A画分に3500で分画前の変異原活性の約31%、B画分に2000で分画前の約19%が示され、A画分、B画分合せて分画前の変異原活性の約50%が認められた。C画分に3500で分画前の変異原活性の約32%、D画分に1000と約10%で、アミノ酸の画分には分画前の変異原活性の約42%が認められた。アミノ酸の画分であるC画分は、未加熱、加熱試料とも、3400~3500と同じコロニー数を示した。

次に、アミノ酸を分画するために、C画分を弱塩基性アニオン交換樹脂Dowex 1カラムにかけ、水で流出した分画をE、F、G画分とした。ペーパークロマトグラムのアミノ酸定性からG画分のRf値0.26にヒスチジンの単一スポットが示された。E、F、G画分の変異原活性をFig.7に示す。未加熱、加熱しようゆとも、G画分に約2800で、これは先のC画分の変異原活性の約80%、E画分に約700で、C画分の約20%が認められた。酢酸で溶出させたH画分には変異原活性は認められなかった。

Table 14 Property of each fraction after fractionation by Amberlite IR-120

Fraction	pH	α -Naphthol -H ₂ SO ₄	Ninhydrine test
A	1.3	++	n.d.
B	3.3	+	n.d.
C	8.5	n.d.	++
D	8.0	n.d.	+

++,+ : detected

n.d. : none detected

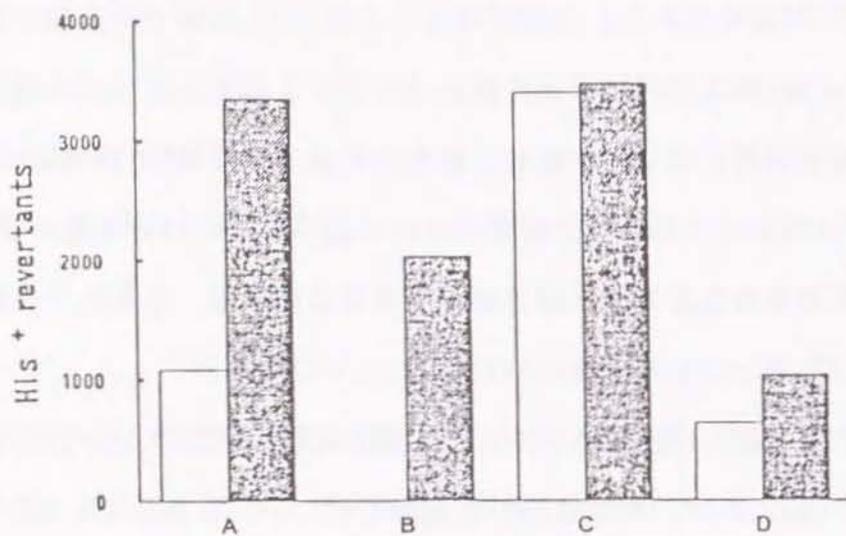


Fig.6 Mutagenic activities of A,B,C and D fractions separated from soy sauce (1ml) on Amberlite IR-120 toward TA100 without S9

□ before heat treatment
 ■ after heat treatment

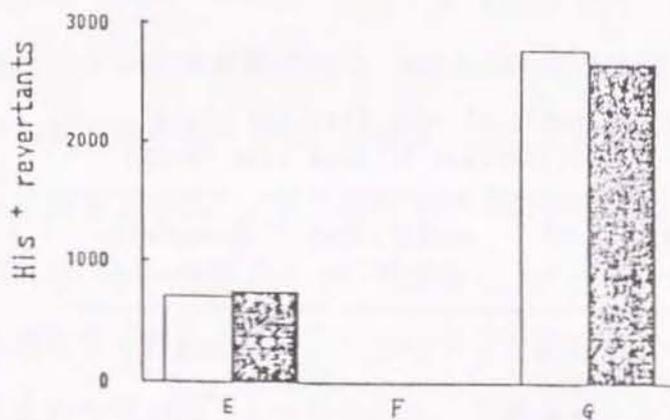


Fig.7 Mutagenic activities of E,F and G fractions separated from soy sauce(1ml) on Dowex toward TA100 without S9

□ before heat treatment
 ■ after heat treatment

2-3 考察

しょうゆを加熱し水分が蒸発し、焙焼状態に移行し生成したタール様物質は Fig.1および Table 11に示したように、加熱方法に依存しながらも、TA98、S9存在下で 2040ないし 2489 His+ revertantsの変異原活性が認められた。しょうゆの加熱によって生成するタール試料は、TA98、S9存在下、つまり酵素による代謝活性化を必要とするフレームシフト型の高い変異原活性を示した。一般に、各種アミノ酸を熱分解したタール様成分には TA98、S9存在下で強い変異原活性が認められることが報告されている⁴³⁾。しょうゆは各種アミノ酸を含有しているので、焙焼状態に移行したときに生成するタール様成分に高い変異原活性が認められたのは、アミノ酸由来の変異原物質が生成されたためと考えられる。これら、しょうゆのみの加熱で生成したタール試料に認められた TA98、S9存在下の変異原活性は、しょうゆとショ糖を混合して加熱すると、加熱条件によって異なり、煮沸加熱では Fig.3に示したように、10%ショ糖の添加で、焙焼加熱では Fig.4に示したように 20%ショ糖の添加により、変異原活性が 100%抑制されたことは重要なことと考えられる。アミノ酸と糖のアミノ-カルボニル反応により生成するメラノイジンの中には Trp-p-1などフレームシフト型(TA98)の変異原物質に対し抗変異原性をもつことも報告されており⁴⁴⁾、しょうゆにショ糖を添加して加熱した場合も同様の変化が起こり、変異原活性が抑制されたと考えられる。

一方、しょうゆにショ糖を添加して加熱すると Table 12に示したように、TA100、S9存在下、非存在下ともタール様成分に、しょうゆのみの加熱では示されない塩基置換型の変異原活性が認められた。グルコースなど糖の熱分解物は TA100、S9存在、非存在ともに変異原活性を有することが確認されている⁴⁵⁾。そこで、ショ糖のみを加熱すると Table 13に示すように、他の糖と同様にショ

糖もタール試料で TA100、S9存在、非存在下ともに変異原活性が認められた。これらから、しょうゆにシヨ糖を添加し、加熱して生成するタール試料の TA100での活性はシヨ糖の影響と考えられる。

モデル系では、アミノ酸熱分解により生成する変異原性物質は、アミノ酸に糖を共存させ熱分解すると変異原活性の減少が認められることから、変異原性物質生成の抑制、抗変異原性物質の生成が示唆される⁴⁶⁾。このような性質の成分が、しょうゆにシヨ糖を添加して加熱した場合に生成する可能性があり、そのために変異原活性が減少したとも考えられる。

しょうゆ、シヨ糖を単独で加熱して生成するタール様成分の、TA98、TA100のそれぞれで認められる高い変異原活性が、しょうゆにシヨ糖を添加し加熱すると、その変異原活性は低下することがわかった。これらのことは、食品の組み合わせ、調理条件により変異原性物質の生成を抑制することが可能であることを示唆していると考えられる。

しょうゆを加熱した加熱試料は、TA100、S9非存在下、つまり塩基置換型で代謝活性を必要としない変異原活性を示した。加熱試料の変異原活性は常圧下では Table 11に示したように、常圧煮沸加熱し7分後では未加熱に比べ 1.8倍に増加し、加圧加熱では Fig.2に示したように、15分後では 1.3倍に増加した。しょうゆは大豆と小麦を原料とする醸造食品で、その成分中には各種アミノ酸、糖、有機酸、塩分等が含まれている。各種アミノ酸とグルコースを反応させた褐変溶液は TA100の塩基置換型の変異原活性を示すことがすでに確認されている⁴⁷⁾。しょうゆを加熱した場合も褐変現象が認められ同様の変化が起り、その結果、変異原性物質が生成し、変異原活性が増加したと考えられる。

また、しょうゆ中には、トリプトファンとカルボニル化合物のアミノ-カルボニル反応によって生成する β -カルボリン誘導体が存在し、それら誘導体は変異原活性を有することが報告されている³⁸⁾。しかし、加熱により、それら誘

導体がどのような挙動を示すかは報告されていない。日常の食生活において、加熱したしょうゆ溶液を摂取することも多いので、加熱により増加する塩基置換型で代謝活性化を必要としない変異原性物質を検索することは重要なことと考えられる。これらについて検討した結果は、第3章で述べる。

なお、しょうゆはヒスチジンを含み、Ames法による活性の測定に影響すると考えられる³⁵⁾ので、未加熱、加熱しょうゆをカラムクロマトで分離し、変異原活性を測定したところ、加熱したしょうゆの変異原活性は、糖を含み、アミノ酸を含まない酸性画分 A、B に認められた。これらの活性は未加熱しょうゆでは認められないことから、加熱によるしょうゆの変異原活性の増加にはヒスチジンは直接関与せず、塩基置換型の代謝活性化を必要としない変異原活性を示す物質が新しく加熱によって生成されることが示唆された。

第3章 しょうゆ中のβ-カルボリン 誘導体の加熱による変化

第2章で、しょうゆ(濃口、本醸造)を加熱すると、TA100、S9非存在下、つまり塩基置換型で代謝活性化を必要としない変異原活性が増加し、この活性の増加は新たに変異原性物質が生成されることが示唆された。日常、我々は、しょうゆを加熱した液を摂取することも多いので、これら変異原性物質について検索することは重要であると考えられる。

しょうゆ中に、トリプトファンとカルボニル化合物のアミノ-カルボニル反応によって生成するβ-カルボリン誘導体が存在し、これらのβ-カルボリン誘導体はTA100、S9非存在下、つまり塩基置換型で代謝活性化を必要としない変異原活性を有することが報告されている³⁰⁾。さらに、β-カルボリン誘導体は自然界に広く存在するインドールアルカロイドの一つであり、中枢神経系に対する作用を持つことが知られているだけでなく、近年ではそれ自体は変異原性は示さないが、他の変異原性物質 Trp-P-1、Try-P-2やベンツ(a)ピレンなどの変異原活性を増強する作用を有するものも明らかになってきており²⁰⁾、その急性的および慢性的な生理作用が注目されてきている。これらから、しょうゆを加熱した時のTA100、S9非存在下の変異原活性の増加の要因を探る一つの目安として、これら誘導体がどのような挙動を示すかを検討することは必要であると考えられる。

食品に関する変異原性物質の問題の一つとして、食品中に含まれる硝酸塩が唾液中で容易に亜硝酸塩に還元され、これが消化管内で食品成分と反応し、変異原性および発ガン性を有するN-ニトロソ化合物を生成する可能性が示唆されている。また、日本人は主として野菜類、あるいは食品添加物として硝酸塩

と亜硝酸塩を摂取しており、硝酸塩と亜硝酸塩の総量は欧米人の約3～4倍(1人1日300～330mg)とされ、N-ニトロソ化合物の生成が高いと考えられている⁴⁸⁾。Wakabayashiら³¹⁾は、 β -カルボリン誘導体の中でも1-methyl-1,2,3,4 tetrahydro-carboline-3-carboxylic acid(MTCA)、およびチラミンがしょうゆ中に存在し、これらは亜硝酸処理することによりTA100、S9非存在下で高い変異原活性を生じると報告している。他の β -カルボリン誘導体の中にも亜硝酸処理によりTA100、S9非存在下の変異原活性を生じるものもある⁴⁹⁾が、MTCAを含め加熱によりどのような挙動を示すかは報告されていない。そこで、しょうゆを加熱することにより、亜硝酸処理した場合の変異原活性、変異原前駆体がどのように変化するか検討することも、食生活の安全上重要なことと考えられる。

そこで、 β -カルボリン誘導体のうち変異原性物質である1-furyl- β -carboline(1-F-BC)と変異原性の前駆物質であるMTCAの高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による定量分析を行なった。しょうゆは製造方法により、長い期間かけて醸造した本醸造しょうゆ、もろみまたは生しょうゆにアミノ酸液を加え発酵し熟成させた新式醸造しょうゆ、および本醸造、新式醸造しょうゆにアミノ酸液を混ぜ合わせたアミノ酸液混合しょうゆにわけられる。製造方法の異なるしょうゆを用いて、加熱した試料の亜硝酸未処理あわせて亜硝酸処理時の変異原活性と β -カルボリン誘導体の変化およびそれらの相互関係について検討した。

3-1 実験方法

(1) 試料

しょうゆは、濃口本醸造しょうゆ13銘柄、新式醸造しょうゆ10銘柄、アミノ

酸液混合しょうゆ2銘柄の計25銘柄を用いた。いずれも製造後2週間以内の物を購入し、しょうゆ成分(全窒素分、無塩可溶性固形分、アルコール分)および色度を分析し、JASの品質基準値に合致していることを確認後使用した。

加熱条件は、変異原活性が一定に達し、タール成分の生成しない加圧加熱(120℃,15分)とした。

(2) 試薬

MTCAはBobbittとWillisの方法⁵⁸⁾に準じ合成し、各種スペクトルデータがすべて一致することを確認し用いた。MTCA、1-F-BCの構造式をFig.8に示す。他の試薬はすべて特級を用いた。

1-F-BCは広島県衛生研究所理化学部 金森久幸博士より分与された。

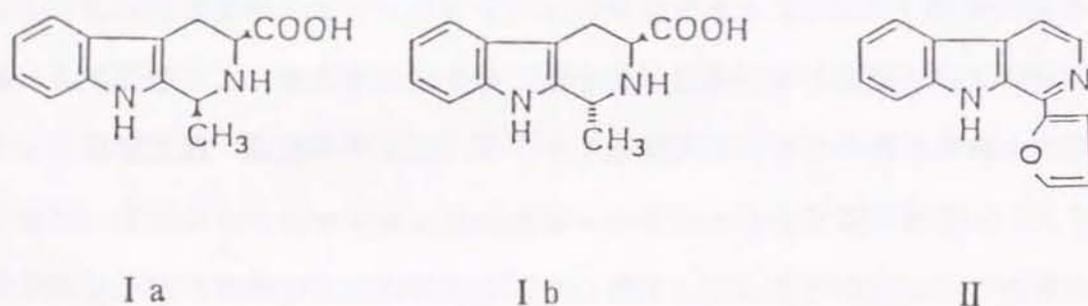


Fig.8 Structures of β -carboline derivatives

I a:(1S,3S)-1-methyl-1,2,3,4 tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid (MTCA)

I b:(1R,3S)-1-methyl-1,2,3,4 tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid (MTCA)

II :1-furyl- β -carboline(1-F-BC)

(3) M T C A および 1 - F - B C の定量、同定

しょうゆ 0.1m Ω に 75% メタノール 0.7m Ω を加え、沈澱物を混和し遠心してろ過後、メンブレンフィルター(0.45 μ m)でろ過したものを試料溶液とした。

M T C A の定量は H P L C 法により行った。Waters M-6000A を用いて、カラムに逆相系の TSKgel ODS-120T(4.6mm ϕ x 25cm 分析用)(7.8mm ϕ x 30cm 分取用)を、移動相はメタノール-水(20:80)で、流速は毎分 0.8m Ω 、検出は紫外吸収 270nm を用いて行なった。1 - F - B C の定量は同一のカラムを用い、移動相はメタノール-水(75:25)で、流速は毎分 0.8m Ω 、検出は日本分光 FP-110 蛍光検出器を用い、Ex. 370nm、Em. 410nm で行った。

M T C A、1 - F - B C の同定は、日本電子 JMS d-300 を用いて行った。

(4) 変異原活性の測定

菌株は、*Salmonella typhimurium* TA100(塩基置換型株)を用いた。

亜硝酸処理の条件は、試料 0.2m Ω に 60mM 亜硝酸ナトリウム溶液 1.0m Ω を加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間振とう後、60mM スルファミン酸アンモニウム溶液 1.0m Ω を加え、反応を停止させ、変異原活性の測定の試験溶液とした。

寒天平板培地・軟寒天および変異原活性の測定は第 1 章に準じて行った。

3-2 結果

3-2-1 しょうゆの変異原活性の変化

Table 15 に、しょうゆの未加熱、加熱時の TA100、S9 非存在下での変異原活性の測定を行ないその結果を示す。未加熱の本醸造しょうゆ 1m Ω 当りの変異原活性は 5300 \pm 1600 His⁺ revertants(平均 \pm SD)、新式醸造しょうゆは 4900

±1300、アミノ酸液混合しょうゆは 4500±200と、本醸造しょうゆが新式、アミノ酸液混合しょうゆに比べやや高い傾向を示した。加熱(120℃)による変化は、本醸造しょうゆで約 20%の変異原活性の増加が認められたが、他の2種の製造方法のしょうゆは、加熱による活性の変化は認められなかった。

Table 15 Mutagenic activities of soy sauce toward TA100 without S9

	n	His ⁺ revertants/ml	
		not heated	heated*
Koikuchi Shoyu (regular fermented)	13	5300±1600	6200±1700
Koikuchi Shoyu (semi fermented)	10	4900±1300	4100± 930
Koikuchi Shoyu (vegetable protein hydrolyzed by acid mixed)	2	4500± 200	4900± 800

MEAN±SD

* : 120℃,15min

3-2-2 しょうゆの亜硝酸処理による変異原活性の変化

未加熱および加熱後のしょうゆを亜硝酸処理した場合の TA100、S9非存在下での変異原活性を Table 16に示す。本醸造しょうゆは、未加熱で 1ml 当り 21000±3300 His⁺ revertants(平均±SD)であり、加熱後には 32800±4100と約 1.6倍に増加した。新式醸造しょうゆは未加熱で 13900±3300と、変異原活性は

本醸造しょうゆに比べ約 30%低いものの、加熱することにより約 1.7倍増加した。アミノ酸液混合しょうゆは未加熱 7000±1200、本醸造しょうゆの変異原活性の1/3であるが、加熱後に活性は2倍になった。

Table 16 Mutagenic activities of soy sauce after nitrite treatment toward TA100 without S9

	n	His ⁺ revertants/ml	
		not heated	heated*
Koikuchi Shoyu (regular fermented)	13	21000±3300	32800±4100
Koikuchi Shoyu (semi fermented)	10	13900±3300	23200±6400
Koikuchi Shoyu (vegetable protein hydrolyzed by acid mixed)	2	7000±1200	14600±3300

MEAN±SD

* : 120°C, 15min

3-2-3 しょうゆ中のβ-カルボリン誘導体の含量

未加熱および加熱後のしょうゆを1-F-BCの測定条件で分析した時のクロマトグラムを Fig.9に示す。しょうゆを分析した場合も、標準品の1-F-BCと一致する保持時間(12分)にピークが認められた。同様の条件で分取用カラムを用いてこのピークを分取し、マススペクトルを測定したところ、標準品の1-F-BCと同一のマススペクトル[m/z:234(m⁺)]を示したので、このピークを

1-F-BCと同定した。しょうゆ中の1-F-BCの含量を Table 17に示す。未加熱の場合、本醸造しょうゆは1mlあたり $0.159 \pm 0.082 \mu\text{g}$ (平均 \pm SD)、新式醸造しょうゆは $0.072 \pm 0.024 \mu\text{g}$ 、アミノ酸液混合しょうゆでは $0.026 \pm 0.018 \mu\text{g}$ であった。加熱後のしょうゆは、いずれの製造方法のしょうゆも未加熱と比べると、1-F-BCの量は約2倍に増加した。

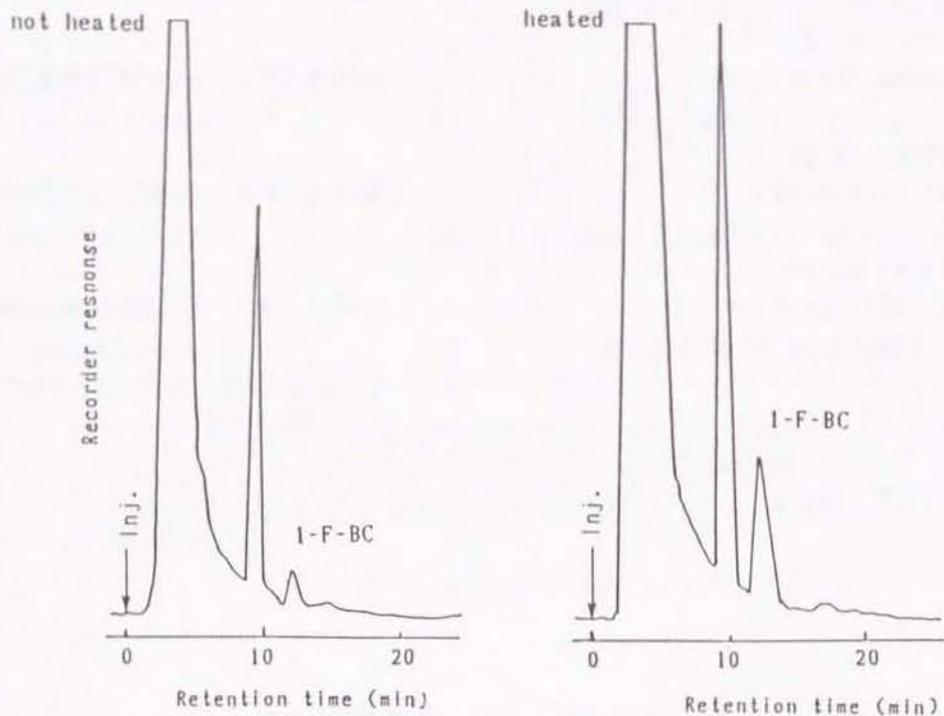


Fig.9 HPLC chromatograms of soy sauce

Apparatus: Waters 6000A. Column: TSK-gel ODS-120T. Mobile phase: MeOH-H₂O (75:25) Flow rate: 0.8 ml/min Detect: Fluorescence ex. 370nm em. 410nm Sample volume: 5 μ l

Table 17 Content of 1-furyl- β -carboline(1-F-BC) in soy sauce

	n	1-F-BC (μ g/ml)	
		not heated	heated*
Koikuchi Shoyu (regular fermented)	13	0.159 \pm 0.082	0.355 \pm 0.117
Koikuchi Shoyu (semi-fermented)	10	0.072 \pm 0.024	0.155 \pm 0.078
Koikuchi Shoyu (vegetable protein hydrolyzed by acid mixed)	2	0.026 \pm 0.018	0.047 \pm 0.027

MEAN \pm SD

* : 120°C, 15min

未加熱および加熱後のしょうゆをMTC Aの測定条件で分析した時のクロマトグラムを Fig.10に示す。しょうゆを分析した場合も、標準品のMTC Aの1S,3S体および1R,3S体に一致するそれぞれの保持時間18分、22分にピークが認められた。同様の条件で分取用カラムを用いてこれら画分を分取し、それぞれマススペクトルを測定し、標準品のMTC Aと同一のマススペクトル[m/z: 230(m⁺)]を示したので、このピークをMTC Aと同定した。しょうゆでは、1S,3S体と1R,3S体がほぼ4:1の比率で認められ、いずれの製造方法のしょうゆでも加熱により含量及び異性体の存在比は変化しなかったため、定量値は両者の合計をMTC A含量とした。しょうゆ中のMTC Aの含量を Table 18に示す。本醸造しょうゆでは1ml 当り 485.8 \pm 71.8 μ g(平均 \pm SD)、新式醸造しょうゆ

では $251.7 \pm 96.3 \mu\text{g}$ 、アミノ酸液混合しょうゆでは $126.5 \pm 51.50 \mu\text{g}$ であった。
新式醸造は本醸造の約半量、アミノ酸液混合は本醸造の約 1/4量と、1-F-B
Cと同様の傾向であった。

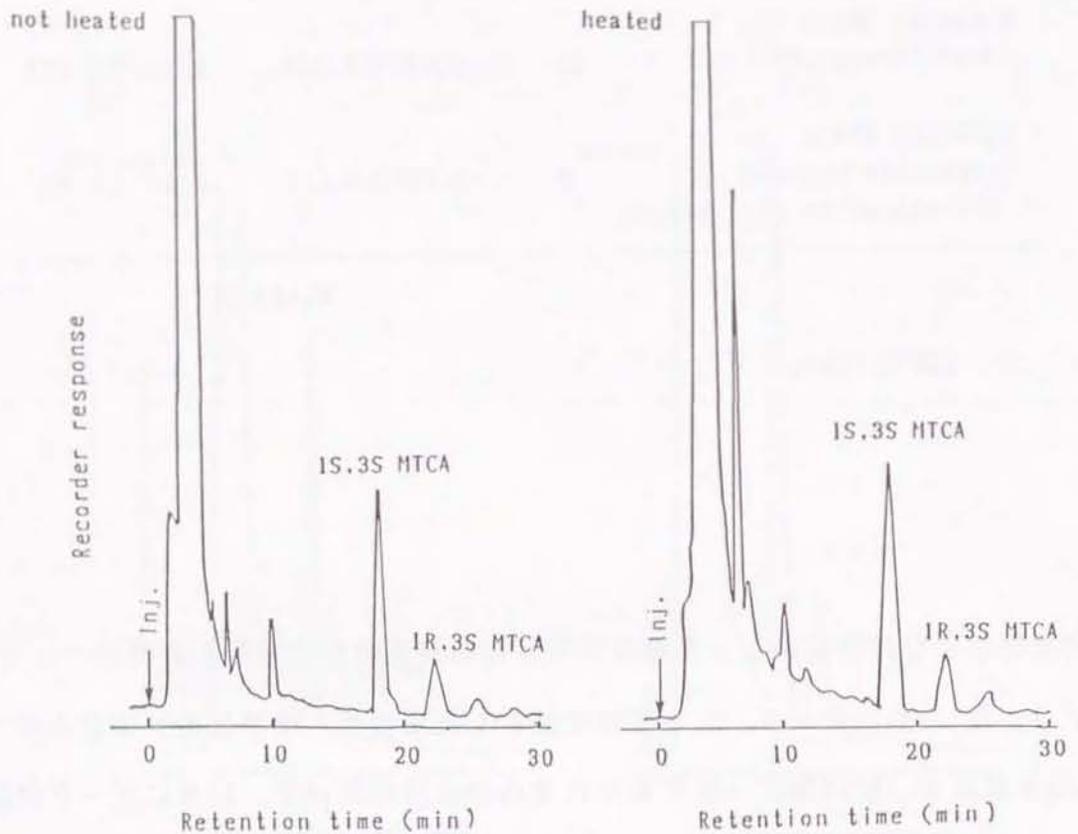


Fig.10 HPLC chromatograms of soy sauce

Apparatus:TOSO HLC-803DCH. Column:TSK-gel ODS-120T.Mobile phase:MeOH-
H₂O(20:80) Flow rate:0.8 ml/min Detect:UV.270nm Sample volume:5 μ l

Table 18 Content of 1-methyl-1,2,3,4 tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid (MTCA) in soy sauce

	n	MTCA (μ g/ml)	
		not heated	heated*
Koikuchi Shoyu (regular fermented)	13	485.8 \pm 71.8	484.4 \pm 64.4
Koikuchi Shoyu (semi-fermented)	10	251.7 \pm 96.3	251.7 \pm 94.5
Koikuchi Shoyu (vegetable protein hydrolyzed by acid mixed)	2	126.5 \pm 51.5	127.5 \pm 50.5

MEAN \pm SD

* : 120°C, 15min

製造方法の異なるしょうゆ中の、MTCAと1-F-BCの含量の相関関係を見たものを、Fig.11に示す。新式醸造しょうゆでは、相関係数 0.895と正の相関が認められた。

3-3 考察

しょうゆを加圧加熱すると、亜硝酸処理していない場合には、本醸造しょうゆ(n=13)のみで、変異原活性が平均して約 1.2倍に増加したが、新式醸造、アミノ酸液混合しょうゆでは、大きな変化は認められなかった。ところが加熱したしょうゆの亜硝酸処理した場合の変異原活性は、本醸造で 1.6倍、新式醸造で 1.7倍、アミノ酸液混合で2倍に増加した。

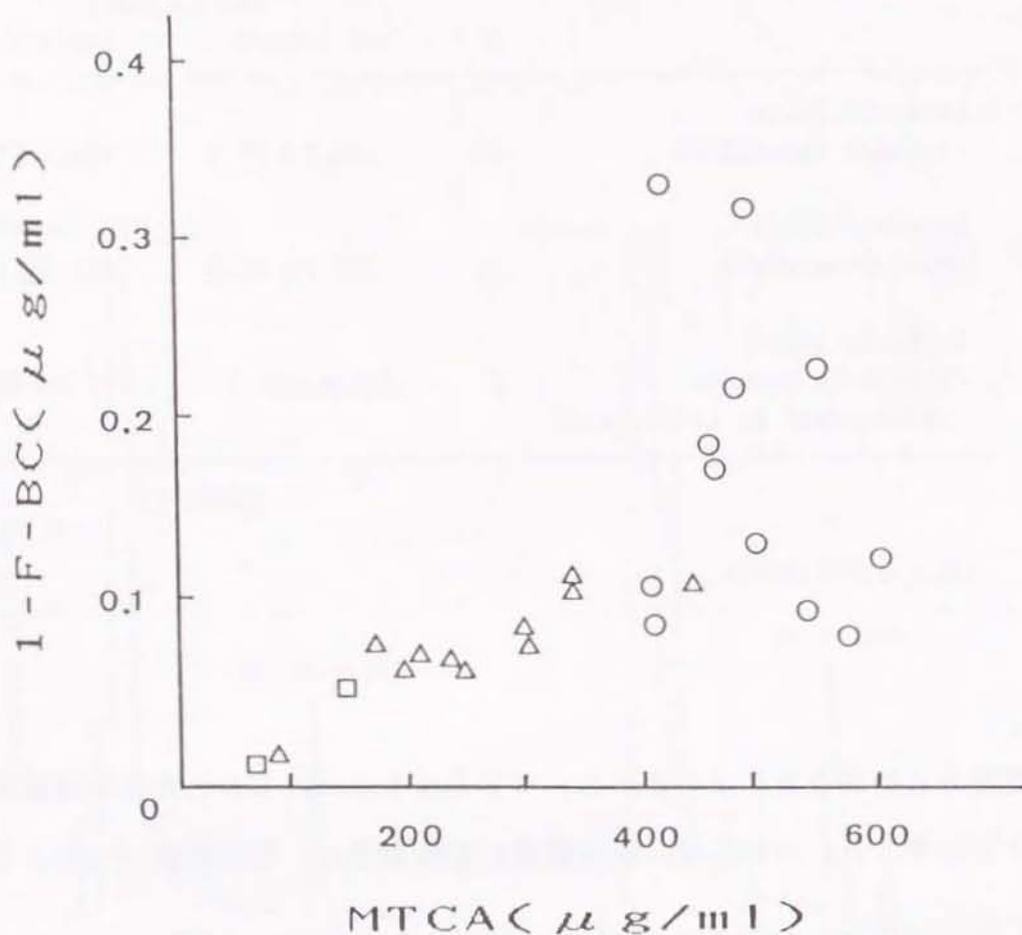


Fig.11 Correlation between 1-methyl-1,2,3,4 tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid (MTCA) and 1-furyl- β -carboline(1-F-BC) in soy sauce

○:Koikuchi Shoyu (regular fermented)

$$Y = -2.020E-0.4X + 0.259, R = -0.214, n = 13$$

△:Koikuchi Shoyu (semi-fermented)

$$Y = 2.255E-0.4X + 0.015, R = 0.895, n = 10$$

□:Koikuchi shoyu (vegetable protein hydrolyzed by acid mixed)

M T C A は、亜硝酸と反応してはじめて変異原活性を示す事が報告されている³¹⁾。未加熱のしょうゆ中の M T C A の含量としょうゆを亜硝酸処理した時の変異原活性の相関を見ると (Fig.12)、正の相関がみられた。しょうゆの場合と同じ条件で亜硝酸処理して M T C A の変異原活性を測定したところ μg 当り 7 His⁺ revertants であった。この活性量を基に計算すると、亜硝酸処理した場合の変異原活性について、本醸造しょうゆでは 18% を、新式醸造しょうゆでは 15% を、アミノ酸液混合しょうゆでは 13% を、各々のしょうゆ中の M T C A の含量で説明することができた。しかし、いずれの製造方法のしょうゆにおいても、加熱により M T C A 含量は増加しなかったため、亜硝酸処理した場合に加熱したしょうゆの変異原活性が増加するのは、M T C A によるものではないことがわかった。

1-F-B C の変異原活性は μg 当り亜硝酸処理しない場合、30 His⁺ revertants であるが、亜硝酸処理すると 150 His⁺ revertants である。しかし、しょうゆ中の 1-F-B C の含量は $1\mu\text{g}$ 以下であるため、亜硝酸未処理、処理時いずれのしょうゆの変異原活性を説明するにはいたらない。しかし、加熱により 1-F-B C はいずれの製造方法のしょうゆも 2 倍程度の増加が認められ、加熱により 1-F-B C が増加する事はその前駆物質で変異原活性を有するフルフラール³⁰⁾ の生成も予測される。また、しょうゆは大豆と小麦を原料とした醸造食品でその製品中には各種アミノ酸、糖、有機酸、塩分等が含まれており、 β -カルボリン誘導体である M T C A、1-F-B C とともに、糖とトリプトファンより容易に生成されること^{49, 51, 52)}、アミノ酸と糖のアミノ-カルボニル反応により、TA100、S9 非存在下、つまり代謝活性化を必要としない変異原活性を示す物質が生成すること^{47, 53)} も充分考えられる。しょうゆを加熱した後、亜硝酸未処理時の変異原活性が本醸造で約 1.2 倍に、亜硝酸処理時の変異原活性が本醸造、新式醸造、アミノ酸液混合で約 1.6~2 倍も増加するのは、他の β -カルボ

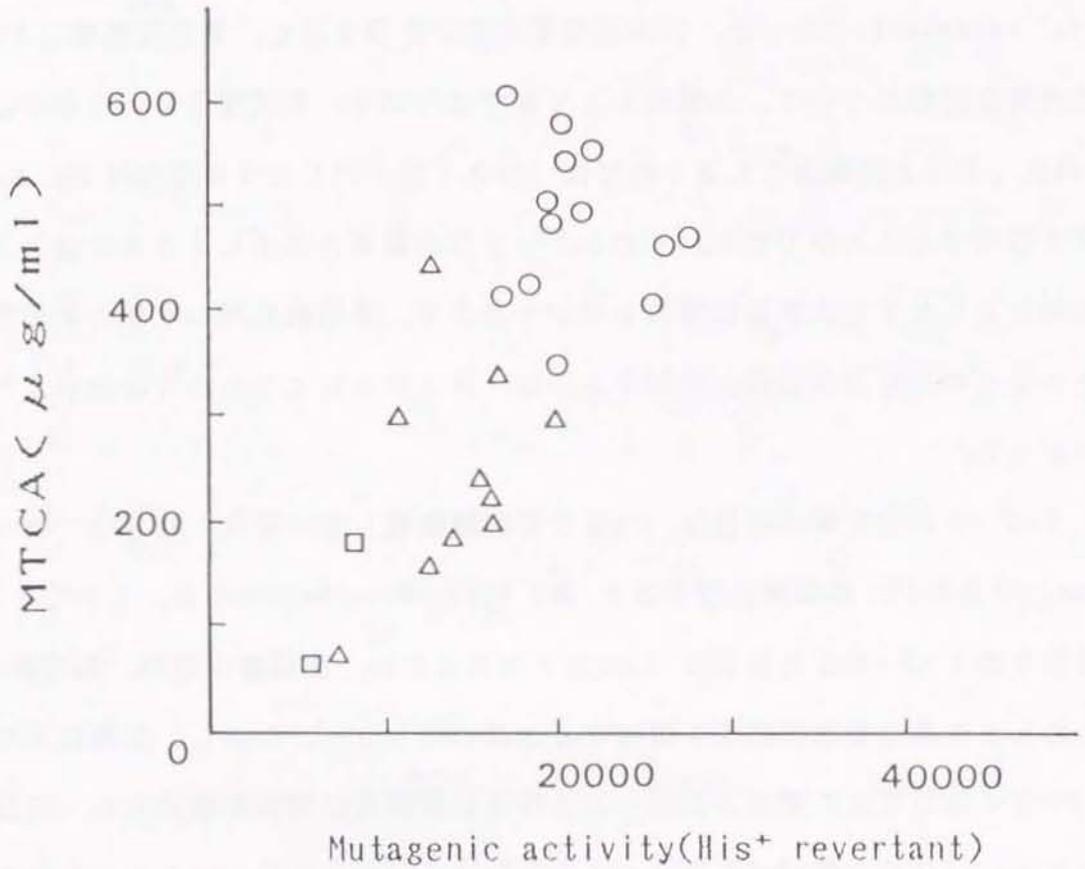


Fig.12 Correlation between 1-methyl-1,2,3,4 tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid (MTCA) and mutagenic activities of soy sauce after nitrite treatment toward TA100 without S9

○:Koikuchi Shoyu (regular fermented)

$$Y=-2.5578E-03X+539.522, R=-0.117, n=13$$

△:Koikuchi Shoyu (semi-fermented)

$$Y=9.4041E-03X+121.17, R=0.323, n=10$$

□:Koikuchi shoyu (vegetable protein hydrolyzed by acid mixed)

$$\text{Total: } Y=0.020X+19.251, R=0.722, n=25$$

リン誘導体⁵⁴⁾、アルデヒド類が生成していると考えられる。

1-F-BCをHPLCで分析したときに、加熱により増加する蛍光を有する物質(保持時間9分)のピークが認められた。このピークを示す物質も β -カルボリン誘導体と考えられ、この物質を同定することにより、しょうゆの変異原活性の加熱による増加を少しでも明らかにできると考えられる。

第4章 しょうゆ中の変異原活性を有するβ-カルボリン誘導体の検索

第3章において、しょうゆ中の変異原活性を有するβ-カルボリン誘導体である1-F-BCのHPLC分析を行なった際、1-F-BCのピーク(保持時間12分)の前に同様の蛍光を有する物質(保持時間9分)の溶出が検出された。また、しょうゆを加熱すると1-F-BCと同様にこのピークも増加した。この物質も1-F-BCと同類のβ-カルボリン誘導体と考えられたので、単離を試みたところ、Jeffreysら⁵⁵⁾が Rye-grass(*Lolium perenne* L.)から、Nakatsukaら⁵⁶⁾がしょうゆ中から分離した化合物と一致した。この化合物の変異原活性及び本醸造、新式醸造、アミノ酸液混合と製造方法の異なるしょうゆ中の含有量を測定し、加熱時の変化についても検討した。

4-1 実験方法

(1) 試料

第3章に準じた。

(2) 試薬

5-ヒドロキシメチルフルフラールは Bonnerらの方法⁵⁷⁾を用いてショ糖より調製した。

他の試薬はすべて市販特級品を用いた。

(3) 装置

融点は、柳本製作所微量融点測定装置で測定した未補正值である。赤外分光光度計(IR)は日本分光 A202、紫外分光光度計(UV)は日立 557、質量分析装置(MS)は日本電子 JMS D-300、核磁気共鳴装置(^1H -NMR 及び ^{13}C -NMR)は日本電子 JNM-PFT-100を用い、TMSを内部標準として測定した。NMRの記載は次の略号によった。一重線: s ; 二重線: d ; 三重線: t ; 四重線: q。シリカゲルカラムクロマトは Kieselgel 60(70-230 mesh)、TLCは Kiesel gel 60F-254 (いずれも Merck)を用いた。

(4) HPLCによる分析

高速液体クロマトグラフ(HPLC)は、Waters M-6000Aを用い、カラムは TSKgel ODS 120T(4.6mm ϕ \times 25cm分析用)(7.8mm ϕ \times 30cm分取用)、移動相はメタノール-水(75:25)混液で、流速は毎分 0.8m μ (分析用)、4m μ (分取用)、検出器は日本分光 FP-110蛍光検出器を用い、Ex.369nm、Em.408nmで行った。

(5) 化合物 I の抽出及び精製

しょうゆ(濃口本醸造)2 μ を酢酸エチル1 μ で2回抽出し、得られた酢酸エチル層を水洗後、エバポレーターで濃縮して、酢酸エチル抽出物(4.5g)を得た。酢酸エチル抽出物はシリカゲルカラムクロマト(6.5cm ϕ \times 50cm)に付し、酢酸エチル-ベンゼン(1:1)混液で溶出した。溶出液を(4)に示したHPLC法でチェックし、目的物質の溶出画分を集め約2m μ に濃縮後、分取用のHPLCを用いてさらに精製し、エタノール-水混液で再結晶して化合物 I (7mg)を得た。

(6) 化合物 I の性状

微黄色針状晶(エタノール-水)。mp 184-185 $^{\circ}\text{C}$ 。High-MS:Calcd: 264.0899.

Found: 264.0876. MS m/z : 264(M^+), 247(M^+-17). IR $\nu^{KBr} \text{ cm}^{-1}$: 3420, 1495, 1430, 1235. $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ_{ppm} : 6.56 (1H, d, $J=3.4\text{Hz}$, $-\text{CH}=\text{}$), 7.15 (1H, d, $J=3.2\text{Hz}$, $-\text{CH}=\text{}$), 8.33 (1H, d, $J=5.1\text{Hz}$, $-\text{CH}=\text{}$). $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) δ_{ppm} : 55.8 (t, CH_2OH), 108.6 (d, C-4'), 109.4 (d, C-3'), 112.2 (d, C-8), 113.2 (d, C-4), 119.4 (d, C-6), 120.5 (s, C-5a), 121.2 (d, C-5), 128.0 (d, C-7), 129.2 (s, C-4a), 130.4 (s, C-1a), 133.4 (s, C-8a), 138.0 (d, C-3), 140.7 (s, C-1), 151.8 (s, C-5'), 156.5 (s, C-2'). UV $\lambda_{\text{methanol}} \text{ nm}$ 237.4, 253.2, 273.8, 291.4, 380.2

(7) 化合物 I の合成

Kermackらの Harman合成法⁵⁸⁾に準じて行った。すなわち L-トリプトファン 60gを蒸留水 1.5 L に加熱溶解し、濃硫酸 10mL、5-ヒドロキシメチールフルフラール 60g を加え、80°Cで10分間加熱した。ついで 10% 重クロム酸カリウム 500mL を加えて室温で酸化し、冷却後 40% 水酸化ナトリウムでアルカリ性とし、酢酸エチル-ベンゼン(1:1) 混液で抽出、溶媒留去後シリカゲルカラムを用い酢酸エチル-ベンゼン(1:1) 混液で溶出した。TLCで検索し、 R_f 0.45に単一の蛍光スポットを示す部分を取り、エタノール-水混液で再結晶して、収量 40mgの結果を得た。

(8) 化合物 I の検量線の作成

合成した化合物 I 5mgを、メタノール 10mL に溶解し、10mL とし、標準原液とした(5mg/10mL)。この標準原液をメタノール-水(60:40)混液で希釈し、0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 $\mu\text{g/mL}$ のそれぞれの溶液を調整し、その 5 μL を HPLC に注入した。得られたクロマトグラムよりピーク高を求め、検量線 (Fig.13) を作成した。

(9) しょうゆ中の化合物 I の定量

しょうゆ 0.1ml に 75%メタノール 0.7ml を加え、混和し遠心分離後、メンブレンフィルター(0.45 μ m)でろ過したものを試料溶液とした。この試料溶液 5 μ l を HPLC に注入し、(8) で作成した検量線により定量した。

(10) 変異原活性の測定

第3章に準じた。

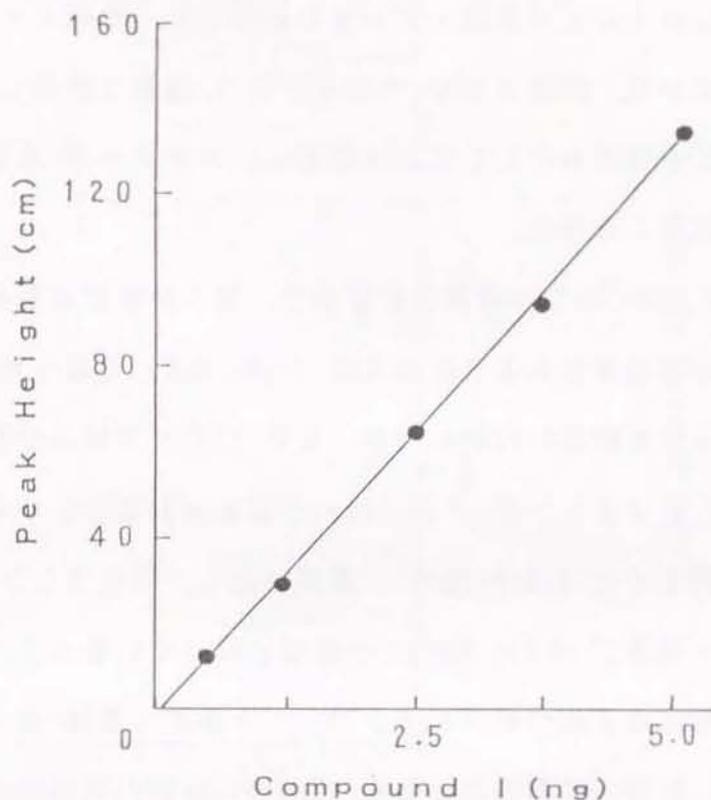


Fig.13 Calibration curve of compound I

Column:TSK-gel ODS-120T. Mobile phase:MeOH-H₂O (75:25)
Flow rate:0.8 ml/min. Detect:Flourescence ex.369nm em.408nm
Sample volume:5 μ l

4-2 結果

4-2-1 化合物 I の分離

しょうゆ中の 1-furyl- β -carboline(1-F-BC)の分析を行った際、1-F-BCのピーク(保持時間12分)の前に同様の蛍光を有する物質(保持時間9分)の溶出が認められ、1-F-BCと同様にしょうゆの加熱により量が増加した(Fig.9)。そこで、この物質も1-F-BCと同類の β -カルボリン誘導体と考えられたので、単離を試みた。しょうゆを酢酸エチルで抽出すると、1-F-BCとともに、そのほとんどが酢酸エチル層に移行した。酢酸エチル抽出物をシリカゲルカラムにかけ、酢酸エチル-ベンゼン(1:1)混液で溶出し、この物質の溶出画分をさらに分取用HPLCにより精製し、エタノール-水混液で再結晶化を繰り返し、化合物 I を得た。

化合物 I は mp 184-185°Cの微黄色針状晶で、MS分析により分子量は 264 (Fig.14)で、高分解能MSにより組成式は $C_{16}H_{12}N_2O_2$ であった。化合物 I は IRスペクトルより水酸基(3420cm^{-1})が、また ^{13}C -NMR分析(Table 19)より水酸基に結合したメチレン基(δ 55.8ppm)が認められることから、1-F-BCと相違して化合物 I では hydroxymethyl基が存在し、更にフラン環の C-5'に相当するオレフィン炭素が δ 151.8ppmに一重線になっていること、 ^1H -NMRでフラン環に帰属される二つのプロトンのシグナルが二重線(カップリングコンスタントが 3.4, 3.2Hz)であることから、hydroxymethyl基の結合位置はフラン環の C-5'であることがわかった。以上の分析から、化合物 I の化学構造を 1-(5-hydroxymethyl 2-furyl) 9H-pyrido [3,4-b]indole (1-hydroxymethyl-furyl- β -carboline)(1-HMF-BC)と結論した。Bonnerらの方法⁵⁷⁾により、

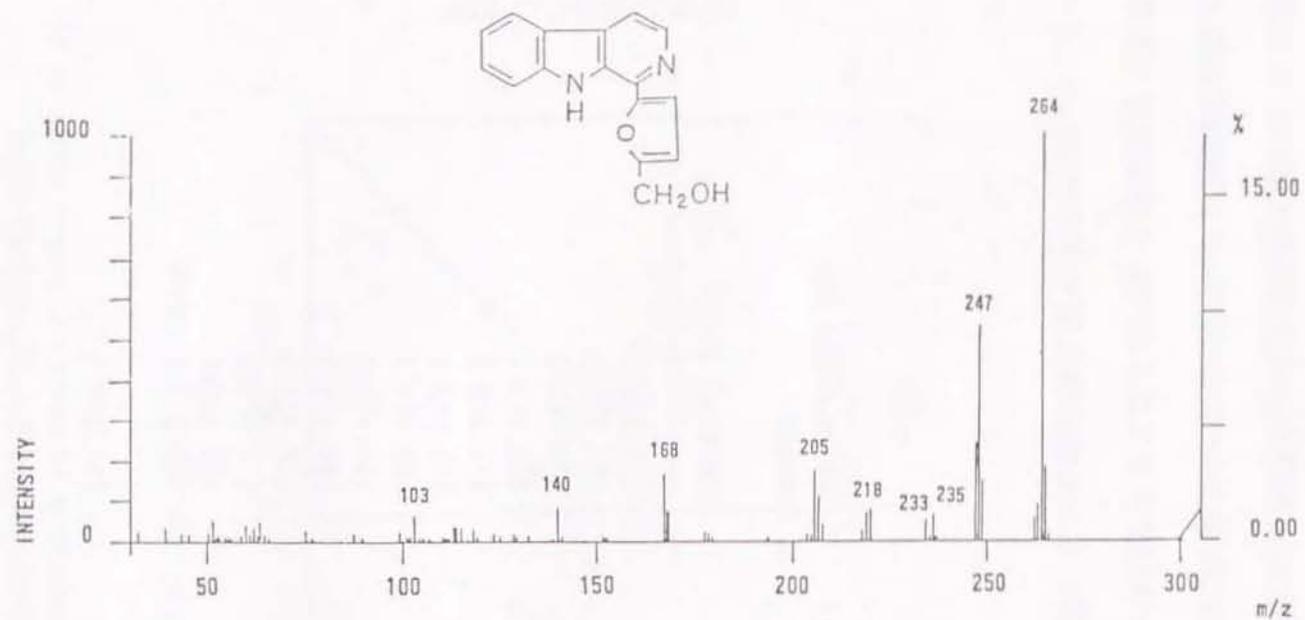


Fig.14 EI Mass spectrum of compound I

Mass conditions; Instrument: JMS D-300,
Ion source temp.: 200°
Ioniz.volt: 70 eV, ioniz.curr.: 300 μ A
Accel.volt: 3 kV
Mult.voil: 1.2 kV

ショ糖から調製した5-ヒドロキシメチルフルフラールとトリプトファンから Kermachらの Harman方法⁵⁵⁾に準じて別途合成し、得た合成品としょうゆより単離した化合物IのIR、UV、¹H-NMR、¹³C-NMRおよびMSの各スペクトルは一致した。この化合物は、Jeffreysら⁵⁵⁾が Rye-grass (Lolium perenne L.)から分離しており、各種のスペクトルデータはその文献値と一致した。また、化合物Iは Nakatsukaら⁵⁶⁾がすでに、しょうゆから蛍光物質YS (Yellow Substance)として分離している化合物と同一であった。

Table 19 ¹³C-NMR spectral data of compound I

Compound I	
-CH=	113.2(4)* 121.5(5) 119.4(6) 128.0(7) 112.2(8) 109.4(3') 108.6(4')
-C=	130.4(1a) 140.7(1) 138.0(3) 120.5(5a) 133.4(8a)
-C=	156.5(2')
HC=	151.8(5')
-CH ₂ OH	55.8

* :The figures in parentheses indicate the carbon number.

4-2-2 化合物 I の変異原活性

しょうゆから単離した化合物 I の変異原活性を調べた結果を Fig.15 に示す。化合物 I は TA100、S9 非存在下で弱い変異原活性を示し、2 His⁺ revertants/ μ g で、亜硝酸処理した場合の変異原活性は 15 His⁺ revertants/ μ g と増加した。なお、合成した 1-HMF-BC の変異原活性も同じであった。

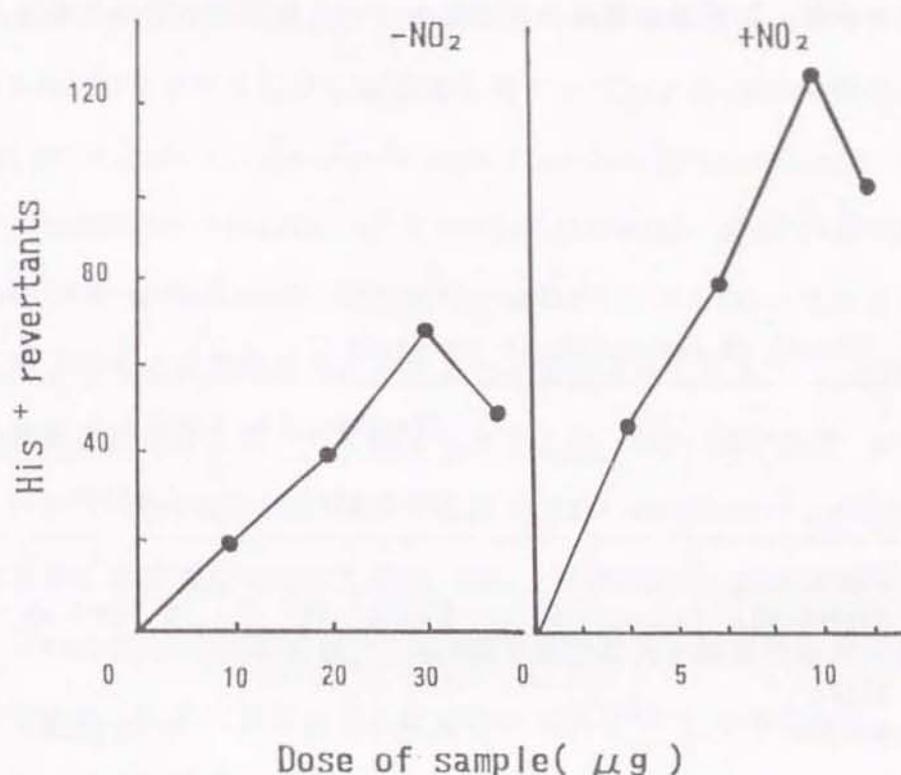


Fig.15 Dose-response curves of mutagenic potency on *S.typhimurium* TA100 without S9 of compound I before and after nitrite treatment

-NO₂:without nitrite treatment, +NO₂:with nitrite treatment

4-2-3 しょうゆ中の化合物 I の含量および加熱による変化

本醸造、新式醸造、アミノ酸液混合と製造方法の異なるしょうゆ中の未加熱、加熱後の化合物 I の含量を定量した。その定量値を Table 20 に示す。しょうゆ中の化合物 I は、それぞれ 1ml あたり本醸造しょうゆでは $2.0 \pm 0.77 \mu\text{g}$ (平均 \pm SD)、新式醸造しょうゆでは $0.79 \pm 0.087 \mu\text{g}$ 、アミノ酸液混合しょうゆでは $0.38 \pm 0.23 \mu\text{g}$ であった。そのしょうゆ中の含量は、新式醸造は本醸造の約 1/3 量、アミノ酸液混合は本醸造の 1/5 量であった。また、加熱後のしょうゆ中の化合物 I の含量は、いずれの製造方法のしょうゆも加熱前にくらべ約 2 倍に増加することがわかった。

Table 20 Content of compound I in soy sauce

	n	Compound I ($\mu\text{g/ml}$)	
		not heated	heated*
Koikuchi Shoyu (regular fermented)	5	2.02 ± 0.77	4.19 ± 0.96
Koikuchi Shoyu (semi-fermented)	4	0.79 ± 0.09	2.06 ± 0.45
Koikuchi Shoyu (vegetable protein hydrolyzed by acid mixed)	2	0.38 ± 0.23	0.56 ± 0.31

MEAN \pm SD

* : 120°C, 15min

4-3 考察

今回、しょうゆ中より分離した β -カルボリン誘導体である化合物 I は、Jeffreysら⁵⁵⁾が Rye-grass(*Lolium perenne* L.)から、Nakatsukaら⁵⁶⁾がしょうゆ中より分離した化合物と同一で、monoamine oxidase(MAO)を阻害する働きがあることが報告されている⁵⁹⁾。

化合物 I の変異原活性は TA100、S9非存在下で亜硝酸処理しない場合は、2 His⁺ revertants/ μ g、亜硝酸処理する場合は 15 His⁺ revertants/ μ gであった。変異原活性については、化合物 I、1-F-BC 及びハルマン (1-methyl- β -carboline) のテトラヒドロカルボン酸タイプである 1(5'-hydroxymethylfuryl)-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid、1-furyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid、及び 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-carboline-3-carboxylic acid(MTCA)はいずれも亜硝酸を処理する場合のみに変異原活性を示すことが報告されている³¹⁾。亜硝酸処理する場合の変異原活性は、第3章で測定したところ、furyl体である 1-F-BC は 150 His⁺ revertants/ μ g、MTCA は 7 His⁺ revertants/ μ gであった。これらの誘導体の変異原活性の強さを比べると、5-hydroxy-methylfuryl体の化合物 I は、furyl体 1-F-BC の 1/10程度で MTCA と同等である。また、ハルマンは変異原活性を示さないことが知られている⁶⁰⁾。これらから、TA100、S9非存在下における亜硝酸処理しない場合の変異原活性の発現にはフラン環が重要な役割を果たしており、亜硝酸処理する場合の変異原活性もテトラヒドロ3カルボン酸タイプとは異なる修飾を受けて発現するものと考えられる。

5-ヒドロキシメチルフルフラールはフルクトースなどの六炭糖が非酸化的に分解して生成すること^{61,62)}、六炭糖とアミノ酸の反応による褐変反応においても shiff baseを経て生成することが知られており、しょうゆ中にもその存在

が報告されている⁵³⁾。また、しょうゆ中での化合物 I 含量と 1-F-BC 含量との相関をみたところ (n=11)、その相関係数は 0.916であった。これらから、化合物 I は 1-F-BC と同様の経路で、トリプトファンと 5-ヒドロキシメチルフルフラールが付加反応の後縮合閉環して生成したものと考えられる。

しょうゆ中の化合物 I の含量は本醸造で 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、新式醸造で 0.79 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、アミノ酸液混合で 0.38 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と、いずれも 1-F-BC の含有量の 10 倍程度であった。また、その含量は本醸造しょうゆが新式醸造、アミノ酸混液しょうゆに比べいずれも高いこと、加熱により約 2 倍に増加することは、1-F-BC と同様の傾向であった。このことは、フルフラールの生成のもととなる五炭糖よりも 5-ヒドロキシメチルフルフラールの生成のもととなる六炭糖の方がしょうゆ中に存在する量が多いこと⁵⁴⁾によるものと考えられる。これら 1-F-BC、化合物 I 等の β -カルボリン誘導体が加熱により容易に生成されることが、しょうゆの亜硝酸未処理、処理時の変異原活性が加熱により増加する一因と考えられる。

しょうゆ中の MTC A、1-F-BC および化合物 I 1-(5-hydroxymethyl 2-furyl)9H-pyrido[3,4-b]indole(1-hydroxymethyl-furyl- β -carboline)(1-HMF-BC)の含量は製造方法により差が認められ、本実験結果からいずれも本醸造しょうゆが新式醸造、アミノ酸液混合しょうゆに比べて高い含量であったことから、これら物質は醸造中に生成されると考えられる。

第5章 しょうゆ醸造中の β -カルボリン誘導体の生成と保存中の変化

しょうゆ中の変異原活性を有する β -カルボリン誘導体(MTCA、1-F-B C、1-HMF-BC)の含量は、本醸造、新式醸造、アミノ酸液混合の順で低下することから、これらは醸造工程中に生成するものと考えられる。そこで、実験室規模で仕込、熟成さらに火入れを行ない、各過程におけるその生成の変化について観察した。また、保存中のこれら誘導体の生成のメカニズムを知るために、4, 20, 30℃と温度条件をかえて保存して、その変化の影響を検討した。

5-1 実験方法

(1) 試料

仕込、熟成

脱脂加工大豆、炒煎した小麦を原料重量1:1で混合し、工場規模で機械製麴した。その1kgに対し23%食塩水1.3 Ω を加えて実験室規模で仕込み、適温醸造法(まず30日間は10℃で、次の90日間は30℃で、さらに60日間は25℃で、合わせて180日間の熟成)⁶⁵⁾をもちい醸造した。

火入れ

180日間熟成後の生揚しょうゆを三角フラスコに密封後、65℃で2時間加熱した後、さらに80℃で1時間(A)、80℃で5時間(B)の2条件で加熱した後、急冷して火入れしょうゆとした。

保存

市販のしょうゆは、濃口本醸造しょうゆ5銘柄、新式醸造しょうゆ4銘柄、

アミノ酸液混合しょうゆ2銘柄を用いた。500mL褐色ビンに詰め、遮光して、4,20,30℃で60日間保存した。

加熱条件

前章に準じた。

(2) 試薬

試薬はすべて市販特級品を用いた。

(3) β -カルボリン誘導体の定量

熟成過程においては、30日ごとに諸味を攪拌後一部採取し、ろ過後ろ液を試験溶液とした。火入れしょうゆはろ過後ろ液を試験溶液とした。これら試験溶液を用いて第3、4章に準じ定量した。

(4) 直接還元糖分の定量

(3)と同様に調製した試験溶液を用いて、しょうゆ試験法⁶⁶⁾に従い、フェーリング・レーマン・ショール法により定量を行なった。

5-2 結果

5-2-1 熟成、火入れ過程における β -カルボリン誘導体の生成

適温醸造法⁶⁵⁾による熟成、火入れ過程での β -カルボリン誘導体および直接還元糖分の定量結果をTable 21に示す。MTC A、1-HMF-BCとも熟成30日目ではその生成は認められず、熟成60日目ではじめて検出された。その量

は熟成終了時(180日目)のそれぞれ 42.7%、6.5%であった。M T C Aはその後熟成 120日目まではほぼ直線的に増加し、以後の増加はわずかであった。一方 1-H M F-B Cも熟成 120日目まではほぼ直線的にゆっくり増加してたが、熟成 120~150日にかけて急激に増加した。これらのことから、M T C Aは熟成の中期に、1-H M F-B Cは後期にその大部分が生成されることがわかった。また、熟成終了後の火入れによって、M T C A、1-H M F-B Cの含量はいずれもさらに増加するが、高温で長時間行なった場合の増加率が高かった。1-F-B Cは熟成中にはわずかに検出できる程度しか生成せず、火入れをすることにより通常しょうゆに含まれている量(Table 17、18、20)と同じ程度となった。また、直接還元糖量は熟成 60~90日の間に約 20%、熟成 90~120日の間に約 5%の減少がみられ、それ以後はほとんど変化がなかった。

Table 21 The formation of β -carboline derivatives and the change of reducing sugar during the fermentation of soy sauce

Fermentation term (day)	MTCA (μ g/ml)	1-F-BC (μ g/ml)	1-HMF-BC (μ g/ml)	reducing sugar (%)
30	n.d.	n.d.	n.d.	8.19
60	109.8	n.d.	0.053	7.95
90	165.1	n.d.	0.190	6.02
120	212.5	n.d.	0.329	5.55
150	254.5	n.d.	0.723	5.55
180	257.1	tr	0.811	5.66
Pasteurized				
A	321.4	0.110	0.962	4.86
B	359.9	0.197	1.461	4.64

n.d. none detected, tr trace
 A: 60°C 2hr + 85°C 1hr, B: 80°C 5hr

5-2-2 β -カルボリン誘導体の保存中の変化

本醸造しょうゆ5銘柄(試料A~E)、新式醸造しょうゆ4銘柄(試料F~I)、アミノ酸液混合しょうゆ2銘柄(J、K)と製造方法の異なるしょうゆを4,20,30°Cで60日保存し、MTC A、1-HMF-BC、1-F-BC含量の変化を測定した。保存中のMTC Aは、本醸造しょうゆが $528 \pm 81 \mu\text{g}/\text{mL}$ で、新式醸造しょうゆが $293 \pm 58 \mu\text{g}/\text{mL}$ で、アミノ酸液混合しょうゆが $102 \pm 9 \mu\text{g}/\text{mL}$ で、いずれの製造方法のしょうゆも、いずれの保存温度においても、また、保存後に加熱した場合も、MTC Aの含量には大きな変化は認められなかった。

一方、1-HMF-BCの含量は Table 22に示すように、4,20°Cで保存したものでは大きな増加はないが、30°Cで保存したものでは保存前に比べ本醸造しょうゆが平均で約 1.7倍、新式醸造しょうゆが平均で約 1.6倍になった。しかしながら、保存後に加熱処理を行なった場合の増加率は、いずれの製造方法のしょうゆにおいても保存温度が高い程低くなっており、30°Cで保存したものは加熱しても処理前に比べ大きな増加はなかった。

次に、1-F-BCの含量の変化を Table 23に示す。保存温度による増加率の差は大きくなく、30°Cで保存したものでは保存前に比べ本醸造しょうゆで平均で約 1.4倍、新式醸造しょうゆで平均で約 1.3倍になった。1-HMF-BCと同様に30°Cで保存したものは、加熱しても処理前に比べ大きな増加はなかった。

5-3 考察

MTC Aはトリプトファンとアセトアルデヒドが付加反応の後閉環縮合したものであり、1-F-BCおよび1-HMF-BCはそれぞれフルフラールあるいは5-ヒドロキシメチルフルフラール(HMF)とトリプトファンが付加反応の後閉環縮合し脱水素化したものであり、これらはいずれもトリプトファンとア

Table 22 Changes of 1-HMF-BC in soy sauce during storage for 60 days and soy sauce by heating after storage

($\mu\text{g/ml}$)

Brand	before storage		after storage		
			Storage temperature($^{\circ}\text{C}$)		
			4	20	30
Koikuchi Shoyu (Regular fermented)					
A	not heated	1.7	1.8	2.0	2.8
	heated*	3.5	3.6	3.5	3.0
B	not heated	2.9	3.3	3.2	4.0
	heated*	4.6	5.2	4.6	4.0
C	not heated	2.8	2.9	2.9	4.1
	heated*	5.4	5.9	5.0	4.6
D	not heated	1.7	2.0	2.1	3.4
	heated*	4.8	4.9	4.7	4.1
E	not heated	0.9	1.0	1.3	1.8
	heated*	2.7	2.7	2.3	2.0
Koikuchi Shoyu (Semi-fermented)					
F	not heated	0.9	0.9	1.0	1.6
	heated*	2.7	2.7	2.2	1.9
G	not heated	0.7	0.7	0.7	1.1
	heated*	2.2	2.3	2.0	1.9
H	not heated	0.8	0.8	0.8	1.2
	heated*	1.5	1.6	1.5	1.5
I	not heated	0.8	0.8	0.9	1.3
	heated*	1.8	2.0	1.7	1.7
Koikuchi Shoyu (Vegetable protein hydrolyzed by acid mixed)					
J	not heated	0.6	0.7	0.6	0.8
	heated*	0.9	0.9	0.8	0.8
K	not heated	0.2	0.2	0.2	0.3
	heated*	0.2	0.3	0.3	0.2

* : 120 $^{\circ}\text{C}$, 15min

Table 23 Changes of 1-F-BC of soy sauce during storage for 60 days and soy sauce by heating after storage

(μ g/ml)

Brand		before storage	after storage		
			Storage temperature($^{\circ}$ C)		
			4	20	30
Koikuchi Shoyu (Regular fermented)					
A	not heated	0.17	0.17	0.19	0.25
	heated*	0.34	0.35	0.32	0.25
B	not heated	0.31	0.32	0.31	0.34
	heated*	0.40	0.48	0.39	0.33
C	not heated	0.19	0.26	0.25	0.24
	heated*	0.35	0.32	0.27	0.24
D	not heated	0.09	0.12	0.12	0.14
	heated*	0.17	0.19	0.16	0.13
E	not heated	0.05	0.07	0.08	0.07
	heated*	0.12	0.12	0.09	0.08
Koikuchi Shoyu (Semi-fermented)					
F	not heated	0.08	0.09	0.10	0.11
	heated*	0.21	0.20	0.15	0.12
G	not heated	0.08	0.08	0.09	0.10
	heated*	0.18	0.16	0.14	0.13
H	not heated	0.06	0.06	0.06	0.09
	heated*	0.10	0.11	0.10	0.08
I	not heated	0.07	0.08	0.08	0.08
	heated*	0.11	0.11	0.09	0.08
Koikuchi Shoyu (Vegetable protein hydrolyzed by acid mixed)					
J	not heated	0.04	0.05	0.06	0.06
	heated*	0.07	0.07	0.06	0.06
K	not heated	0.01	0.01	0.02	0.02
	heated*	0.02	0.02	0.02	0.02

* : 120 $^{\circ}$ C, 15min

ルデヒドの反応により生成する。橋場ら⁶⁷⁾はトリプトファンは諸味の熟成中に90%以上減少し、残存したトリプトファンの50%近くも火入れ工程で減少することを報告している。越山ら⁶⁸⁾アミノ酸は諸味になって急激に溶出し、仕込後1ヵ月を経過すると熟成した生揚しょうゆ中に存在するアミノ酸の約70%が溶出すると述べている。また、ぶどう糖などの遊離糖類は仕込初期から急激に増し、アルコール発酵直前に最高に達し、以後、急激に減少することも報告されている⁶⁹⁾。一般的には、適温醸造法では諸味温度が30℃位に達するとアルコール発酵が起る⁶⁵⁾とみなされている。従って今回の実験条件では30日以後、アルコール発酵が起り還元糖量が減少したと考えられる。これらのことから、原料中に含まれているアミノ酸、糖類が遊離の状態になる約1ヵ月後からMTC Aは生成が始まるものと考えられる。また、しょうゆ中に存在するフルフラール類の大半はフルフラールで、HMFおよびメチルフルフラールは通常しょうゆ中には存在せず、HMFの多くは火入れにより2次的に生成することが報告されている⁷⁰⁾。1-HMF-BCは熟成の後期、1-F-BCは火入れにより生成することから、褐変反応により生成したHMFとトリプトファンが反応し生成することが裏付けられた。また、1-F-BCも含めたβ-カルボリン誘導体が火入れにより増加する事は、残存するトリプトファンが、加熱により生成したアルデヒド類と反応するためと考えられる。このようにβ-カルボリン類がしょうゆの熟成過程で生成し、さらに火入れにより増加することが判明した。

第3、4章で、しょうゆの加熱によりMTC Aは増加しないが、1-HMF-BCおよび1-F-BCは約2倍に増加することを述べた。60日保存したしょうゆで同様の加熱処理をした結果、本醸造、新式醸造しょうゆでは保存温度が30℃になると1-HMF-BC、1-F-BCは増加するが、保存したしょうゆの加熱による増加は保存温度が高いほど少なかった。各温度で保存したしょうゆとそれらを加熱したしょうゆ中の1-HMF-BCと1-F-BC含量の総和は、

いずれのサンプルでもほぼ等しいことから、保存したしょうゆの1-HMF-BCと1-F-BC加熱による増加は醸造、火入れ中にすでに生成していた1,2,3,4-テトラヒドロ体の脱水素反応によって生成したもので、保存中に新たにトリプトファンとアルデヒドの反応によって生成したものはなかったと考えられる。また、MTC Aもテトラヒドロ体であるが、非常に安定な化合物であるので、加熱してもハルマンにはなりにくいものと考えられる。

結 論

食品や食品成分の変異原性に関する研究は、変異原性の短期検出法の中でもサルモネラ菌を用いる Ames法の開発に伴い、1970年代の後半から進展し、その成果も数多い。しかし、これらの研究の多くは、食品の成分を用いたモデル系での変異原活性の検出、食品素材中の変異原性物質の検索、極端な条件で加熱処理した食品の変異原活性等を対象にしたものである。健全な食生活を営む上では、これら既往の研究に加えて、日常の食品の加工・調理過程での変異原性物質の生成の可能性についても検討し、調理食品の安全性を確認することが重要である。そこで、本論文では、Ames法を用いて、調理食品の変異原活性を測定し、変異原活性と関係のある食事因子を明らかにするとともに、さらに、食事因子の中から変異原活性と関係があると考えられ、日本人の食卓に欠かすことのできない伝統調味料の一つであるしょうゆ中の変異原性物質の検索およびそれらの加工・調理過程における挙動を明らかにすることを目的として、詳細に解析を行った。

第1章では、調理食品の変異原活性の発現に関与する食事因子を明らかにするために、成人女子昼食用に調製した集団給食用調理食品の変異原活性の検索を *Salmonella typhimurium* 98(フレイムシフト型)、S9存在下で行ない、食品素材別、食品成分別、調理方法別、調味料別の諸因子と変異原活性との相関係数を求めた。変異原活性と正の相関を示した因子は、素材別では肉類、成分別ではタンパク質、脂質、調理方法別では揚げ物、調味料別では食塩、油、しょうゆであることを明らかにした。さらに、タンパク質性食品である魚類、肉類の高温調理方法である焼き物、炒め物の変異原活性を測定し、揚げ物と同様に高い変異原活性が認められること、調理中に用いたしょうゆ等の調味料が変異原活性の増加に関与していること等を明らかにした。

第2章では、前章で調理中に用いたしょうゆが変異原活性の発現に関与することが示唆されたので、日常の調理条件下、すなわち常圧加熱(煮沸、焙焼)ないし加圧加熱処理した場合のしょうゆの変異原活性の変化を TA98、TA100(塩基置換型)の検出系を用いて検討した。しょうゆを常圧で加熱した場合、液状部分では TA100、S9非存在下の変異原活性の増加が認められたが、水分が蒸発し焙焼状態に移行して生成したタール様成分(加熱煙凝縮物)では TA98、S9存在下の変異原活性の増大が認められた。焙焼状態で生成するタール様成分の TA98、S9存在下の変異原活性は、しょうゆにショ糖を添加して加熱すると抑制されるが、ショ糖の添加であらたに TA100での変異原活性が増加することが示された。これらから、しょうゆは加熱温度、共存物質によって種々の変異原性物質を生成することが示唆された。また、TA100、S9非存在下で変異原活性の増加が認められる加熱しょうゆ溶液をイオン交換クロマトグラフィで分画したところ、加熱しょうゆ溶液の変異原活性の1/2がアミノ酸を含まない酸性画分にあり、その酸性画分の活性は未加熱しょうゆ溶液に比べて大きいことを、つまり、しょうゆを加熱することにより、変異原活性が増加することを明らかにした。

第3章では、TA100、S9非存在下で認められるしょうゆの変異原活性の加熱による増加の要因を検討するために、しょうゆ中の変異原性物質あるいは変異原前駆物質として報告されている β -カルボリン誘導体の加熱による含量および変異原活性の変化を検討した。しょうゆを加熱すると、亜硝酸処理していない場合の変異原活性は、本醸造しょうゆのみで約1.2倍に増加したが、新式醸造、アミノ酸液混合しょうゆでは、大きな変化が認められなかった。ところが、加熱したしょうゆの亜硝酸処理後の変異原活性は、本醸造で1.6倍に、新式醸造で1.7倍に、アミノ酸液混合で2倍に増加した。一方、しょうゆ中の変異原性物質の1つである1-furyl- β -carboline(1-F-BC)は、未加熱しょうゆ中の含量が本醸造しょうゆ>新式醸造しょうゆ>アミノ酸液混合しょうゆの順序で

高く、最も高かった本醸造でも1ml当り平均0.16 μ gと微量であるが、いずれの製造方法のしょうゆも加熱により約2倍に増加した。また、亜硝酸で処理すると変異原活性を示す1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-carboline-3-carboxylic acid(MTCA)は、しょうゆ中の含量が本醸造しょうゆ>新式醸造しょうゆ>アミノ酸液混合しょうゆの順序であり、それぞれの含量は本醸造で1ml当り平均486 μ g、新式醸造で平均252 μ g、アミノ酸液混合で平均127 μ gであり、いずれ製造方法のしょうゆにおいても加熱によりその含量は変化しなかった。しょうゆ中のMTCAの含量は、1-F-BCに比べて高く、各製造方法のしょうゆとも、亜硝酸処理後の未加熱しょうゆの変異原活性の15~20%を、MTCAによって説明することができた。

第4章では、しょうゆ中より新たに変異原活性を有する β -カルボリン誘導体を単離して、IR、MS、NMR分析を行なって、その構造を[1-(5-hydroxymethyl 2-furyl) 9H-pyrido[3,4-b]indole (1-hydroxy-methyl-furyl- β -carboline)](1-HMF-BC)と同定した。この誘導体の変異原活性は、TA100、S9非存在下で亜硝酸未処理時2 His⁺ revertants、亜硝酸処理後15 His⁺ revertantsであった。この誘導体の未加熱しょうゆ中の含量は、本醸造しょうゆ>新式醸造しょうゆ>アミノ酸液混合しょうゆの順序で高かった。その含量は、本醸造しょうゆでは1ml当り2.0 μ gで、いずれの製造方法のしょうゆも加熱により約2倍に増加した。しょうゆの亜硝酸処理前および同処理後の変異原活性が加熱により増加する一因として、1-F-BC、1-HMF-BCなどの β -カルボリン誘導体が加熱により生成することが考えられた。

第5章では、3、4章でしょうゆ中の変異原物質として検討した3種の β -カルボリン誘導体は、いずれも本醸造に多く含まれていたため、その起源を知るために、実験室規模でしょうゆを醸造し、熟成、火入れ、さらに保存中のこれら誘導体の挙動について検討した。MTCAは熟成の中期に、1-HMF-B

Cは後期にその大部分が生成されるが、最終的には熟成後の火入れによって、3種の誘導体はいずれも通常しょうゆに含まれているのと同じ程度の含量となった。また、保存中にはトリプトファンとアルデヒドとのアミノ-カルボニル反応によって、これら誘導体は新たに生成されないことが示唆された。これらから、これらβ-カルボリン誘導体は熟成、火入れという醸造工程中にアミノ-カルボニル反応によって生成されることが明らかになった。

以上、日常よく食べられる調理食品の変異原活性の発現因子の一つは、タンパク質性食品の揚げ物、焼き物、炒め物等の高温加熱調理であること、また、調理の際に用いられる調味料のしょうゆが食品の変異原活性の増大に関与していることを明らかにした。さらに、日本の伝統調味料の一つであるしょうゆに注目し検討したところ、加熱操作条件および共存物質によって、種々の変異原性物質を生成することが明らかになった。特に、しょうゆ中の変異原性物質および前駆物質であるβ-カルボリン誘導体の加熱および亜硝酸処理後の変化を見たところ、アミノ-カルボニル反応で容易に生成する誘導体が加熱により増加し、亜硝酸処理後の活性も増大することを明らかにした。なお、本実験に用いた亜硝酸処理時の同濃度はNO₂濃度にして、約2000ppmであり、同濃度250ppm以下ではしょうゆの変異原活性の顕著な増大は認められないこと、通常人の唾液中の同濃度は100ppmを越えないことを考慮すると、極端な加熱の場合を除けば、加熱によるしょうゆの変異原活性の増大は安全性を著しくおびやかす程のレベルではないと考えられる。

すなわち、食生活の安全を考える上において、食品の調理過程に変異原性物質が生成するのを抑制するためには、特にタンパク質性食品は焼き過ぎないこと、また、調味料としてしょうゆ、みそ等のアミノ酸の多い食品および糖を添加する加熱調理操作では、アミノ-カルボニル反応が進行しやすいので、過度の加熱および焙焼状態を避けることが望ましいと考えられる。なお、今後、

しょうゆに糖を添加すると変異原活性によっては低下する場合があります、食品の組み合わせによっては、加工・調理過程に変異原性物質の生成抑制、変異原性を抑制する物質の生成が起こり得ることも示唆されたので、さらに多くの食品を組み合わせる場合について、加工・調理過程の変異原性物質の消長を検討する必要があると考えられる。

文 献

- 1) Doll, R. and Peto, R.: J. Natl. Cancer Inst., 66, 1191-1308 (1981)
- 2) Committee on Diet, Nutrition and Cancer Assembly of Life Sciences, National Research Council : Diet, Nutrition and Cancer, National Academy Press, Washington D.C., (1982) . 厚生省公衆衛生局栄養課監訳 : がん予防と食生活 - 全米アカデミー「食物、栄養とがん」に関する特別委員会報告 -、日本食物協会、東京(1983)
- 3) Palmer, S., Bakshi, K.: Diet, Nutrition and Cancer : Interim Dietary Guidelines: J. Natl. Cancer Inst., 70, 1151-1170 (1983). 柳 進訳: 食物、栄養と癌: 食物に関する中間目標、臨床栄養、64、233-255、(1984)
- 4) 厚生省公衆衛生局栄養課編: 循環器, がん, 糖尿病の予防と食生活 - 疾病予防と栄養に関する検討委員会報告 - 厚生省公衆衛生局栄養課編, (1983)
- 5) Hirono, I., Aiso, S., Yamaji, T., Mori, H., Yamada, K., Niwa, H., Ojika, M., Wakamatsu, K., Kigoshi, H., Niiyama, K. and Uosaki, Y.: Gann, 75, 833-836 (1984)
- 6) Wogan, G.N., Paglialunga, S. and Newberne, P.M.: Food Cosmet. Toxicol., 12, 681-685 (1974)
- 7) Magee, P.N. and Barnes, J.M.: Adv. Cancer Res., 10, 163-246 (1967)
- 8) Sugimura, T.: Cancer, 49, 1970-1984 (1982)
- 9) Ohgaki, H., Negishi, C., Wakabayashi, K., Kusama, K., Sato, S. and Sugimura, T.: Carcinogenesis, 5, 583-585 (1984)
- 10) 大島寛史: トキシコロジーフォーラム, 6, 624-632 (1983)
- 11) Kada, T., Kato, M., Aikawa, K. and Kiriya, S.: Mutation Res., 141, 149-152 (1984)

- 12) Nagao, M. and Sugimura, T.: *Ann Rev. Genet.*, 12, 117-159 (1978)
- 13) McCann, J., Chol, E., Yamasaki, E. and Ames, B. : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 72, 5135-5139 (1975)
- 14) 長尾美奈子: 癌 '80, 中山書店、東京、11-19 (1980)
- 15) Berenblum, I.: *Cancer Res.*, 1, 807-814 (1941)
- 16) 山崎洋: 代謝, 17, 1311-1322 (1980)
- 17) Ames, B., Durston, W.E., Yamassaki, E. and Lee, F.D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 70, 2281-2285 (1973)
- 18) Ames, B., Lee, F.D. and Durston, W.E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 70, 782-786 (1973)
- 19) Nagao, M., Honda, M., Seino, Y., Yahagi, T and Sugimura, T.: *Cancer Lett.*, 2, 335-340 (1977)
- 20) Sugimura, T. and Nagao, M.: *Critical Reviews in Toxicology*, 6, 189-209, (1979)
- 21) 佐藤茂秋: 環境と人体 II (中馬一郎、近藤宗平、武部啓編)、東京大学出版会、東京、165-181 (1982)
- 22) Sugimura, T.: *Science*, 233, 312-318 (1986)
- 23) 村岡知子、高橋仁美: 山陽学園短期大学研究論集、13、71-81 (1982)
- 24) 加美山茂利: 癌の臨床 別集 がん・日本と世界 - その動向と病因論 - (長与健夫、富永祐民編)、篠原出版、東京、257-278 (1980)
- 25) 橋爪崇、横山剛、神木照雄、中村好志、木苗直秀、富田勲: *食衛誌*、24、369-374 (1983)
- 26) Lin, J.Y., Wang, H.-I. and Yen, Y.-C.: *Fd Cosmet. Toxicol.*, 17, 329-331 (1979)
- 27) Shibamoto, T.: *Fd Chem. Toxic.*, 21, 745-747 (1983)

- 28) Nagahara,A.,Oshita,K. and Nasuno,S.: Proceedings of the 3rd International Symposium on the Maillard Reaction, 373-382, Kodansha Tokyo(1986)
- 29) 厚生省保健医療局健康増進栄養課編: 国民栄養の現状、第一出版、東京、(1992)
- 30) Kinae,N., Yamashita,M., Takanashi,M., Ooishi,H., Tomita,I. and Kanamori,H.: Proceedings of the 3rd International symposium on the Maillard Reaction,343-352,Kodansha Tokyo(1986)
- 31) Wakabayashi,k. ,Ochiai,M., Saito,H., Tsuda,M., Suwa,Y., Nagao,M., Sugimura,T.: Proc.Natl.Acad.Sci.,U.S.A.,80,2912-2916 (1983)
- 32) Commoner,B.,Vithathil,A.J.,Dolora,P.,Nair,S.,Madystha,P. and Cuca,G.C.:Science,201,913-916(1978)
- 33) Hayatsu,H., Oka,T., Wakata,A.,Ohara,T.,Hayatsu,T.,Kobayashi,H. and Arimoto,S.:Mutation Res.,119,233-238(1983)
- 34) 早津彦哉: 環境変異原研究、6、117-124(1984)
- 35) Maron,D.M., and Ames,B.N.: Mutation Res.,113,173-215(1983)
- 36) Yahagi,T.,Nagao,M.,Seino,Y.,Matsushima,T.,Sugimura,T. and Okada,M.:Mutation Res., 48,121-130(1977)
- 37) Ames,B.,McCann,J.,and Yamasaki,E.: Mutation Res.,31,347-364(1975)
- 38) 厚生省栄養課指導、社団法人日本栄養士会編: 6つの基礎食品 [第3版]、第一出版、東京(1987)
- 39) 科学技術庁資源調査会編: 四訂日本食品標準成分表、大蔵省印刷局(1982)
- 40) Spingarn,N.E., Garvie-Gould,C.T. and Slocum,L.A.: J. Agric. Food Chem.,31,301-304(1983)
- 41) Shinohara,K., Jahan,N.,Tanaka,M.,Yamamoto,K.,Wu,R.-T.,Murakami,H.

- and Omura, H.: *Mutation Res.*, 122, 279-286(1983)
- 42) 廣畑富雄: *CRC*, 1, 155-161(1992)
- 43) Kosuge, T., Tsuji, K., Wakabayashi, K., Okamoto, T., Shudo, K., Itai, A., Sugimura, T., Kawachi, T., Nagao, M., Yahagi, T. and Seino, Y.: *Chem. Pharm. Bull.*, 26, 611-619(1978)
- 44) Kato, H., Kim, S. B., Hayase, F., Van Chuyen, N. : *Agric. Biol. Chem.*, 49, 3093-3095(1985)
- 45) Nagao, M., Yahagi, T., Kawachi, T., Seino, Y., Honda, M., Matsukura, N., Sugimura, T., Wakabayashi, K., Tsuji, K. and Kosuge, T. : *Progress in Genetic Toxicology*(ed. Scott, D., Bridges, B.A., Sobels, F.H.), 259-264, Elsevier/North-Holland, Amsterdam(1977)
- 46) Sato, S., Ohka, T., Nagao, M., Tsuji, K. and Kosuge, K.: *Mutation Res.*, 60, 155-161(1979)
- 47) Shinohara, K., Rong-Tsun, W., Nazuma, J., Tanaka, M., Morinaga, N., Murakami, H. and Omura, H.: *Agric. Biol. Chem.*, 44, 671-672 (1980)
- 48) 石綿肇、谷村顕雄: *衛生化学*, 28, 171-183(1982)
- 49) Kanamori, H., Kinae, N., Saito, M., Tomita, I.: *Chem. Pharm. Bull.*, 32, 1980-1986 (1984)
- 50) Bobbitt, J M., Willis, J P.: *J. Org. Chem.*, 45, 1978-1984(1980)
- 51) 金森久幸、森本一義、木苗直秀、富田勲: *薬学雑誌*, 101, 596-604(1981)
- 52) Kinae, N., Saito, M., Sawada, S., Yamashita, M., Uto, H., Tomita, I. and Kanamori, H.: *Chem. Pharm. Bull.*, 33, 2438-2444(1985)
- 53) Secliff, J. A. and Moweer, H. F.: *Fed. Proc.*, 36, 304(1977)
- 54) 東元稔、半田八十三、俣野景典: *栄食誌*, 40, 43-46(1987)
- 55) Jeffreys, J, A, D.: *J. Chem. Soc. (C)*, 1091-1103(1970)

- 56) Nakatsuka, S., Feng, B., Goto, T. and Kihara, K.: *Tetrahedron Lett.*, 27, 3399-3402(1986)
- 57) Bonner, T.G., Bourne, E.J. and Ruzkiewicz, M. : *J.Chem.Soc.*, 787-791, (1960)
- 58) Kermack, W.O., Perkin, W.H. and Robinson, R.: *J.Chem.Soc.*, 119, 1602-1642 (1921)
- 59) Gessner, W.P., Brossi, A., Bembenek, M.E. and Abell, C.W : *Arch, Pharm (Weinheim)*, 321, 95-98(1988)
- 60) Nagao, M., Yahagi, T., Kawachi, T., Sugimura, T., Kosuge, T., Tsuji, K., Wakabayashi, K., Mizusaki, S and Matsumoto, T.: *Proc. Japan Acad.*, 53, 95-98(1977)
- 61) 加藤博通、市畑均、藤巻正生: *日本農芸化学会誌*, 37, 220-225(1963)
- 62) Anet, E.F.L, J.: *Australian J.Chem.*, 18, 240-248(1965)
- 63) 加藤博道、桜井芳人: *日本農芸化学会誌*, 38, 536-541(1964)
- 64) 西野隆三、小沢善徳、安井敦、逆井利夫: *農化*, 48, 291-296(1974)
- 65) 栃倉辰六郎: *醤油の科学と技術*、日本醸造協会、149(1988)
- 66) しょうゆ試験法編集委員会: *しょうゆ試験法*、日本醤油研究所、1-12 (1985)
- 67) 橋場弘長、渡辺真知子: *醬研*、10、131-133(1984)
- 68) 越山育則、鹿島春海、野村圀夫、井口信義: *醸協*、62、1437-1442 (1967)
- 69) 栃倉辰六郎: *醤油の科学と技術*、日本醸造協会、138(1988)
- 70) 大亦正次郎、上野照雄、中川泰: *農化*、29、215-219(1955)

公表論文

- (1) 村岡知子、大下市子：調理食品の変異原活性について－青綿法による
変異原活性の測定－
環境変異原研究、5、22-24(1983)
- (2) 村岡知子、大下市子、安田公子：調理食品の変異原活性について－青
綿法による変異原活性の測定Ⅱ－
環境変異原研究、6、125-128(1984)
- (3) 大下市子、村岡知子：しょうゆの加熱による変異原活性の変化と糖添
加の影響
日本家政学会誌、44、17-21(1993)
- (4) Oshita, I. and Mizuta, M.: Changes in the mutagenicity of soy
sauce upon heating and influence of L-Histidine
広島中央女子短期大学紀要、28、1-5(1991)
- (5) 大下市子、金森久幸、水田満里、坂本征則：しょうゆの変異原活性の
加熱による変化と β -カルボリン誘導体の分析
日本栄養・食糧学会誌、42、467-472(1989)
- (6) 大下市子、金森久幸、水田満里、坂本征則：しょう油の変異原活性を
有する β -カルボリン誘導体
食品衛生学雑誌、32、272-277(1991)

- (7) 大下市子、金森久幸、水田満里、坂本征則：しょう油醸造中の β -カルボリン誘導体の生成と保存中の変化
日本栄養・食糧学会誌、46、179-182(1993)

第1章に関する論文 (1) (2)

第2章に関する論文 (3) (4)

第3章に関する論文 (5)

第4章に関する論文 (6)

第5章に関する論文 (7)

謝 辞

本論文をまとめるにあたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました奈良女子大学家政学部 遠藤金次教授に心より感謝申し上げます。また、本論文を完成するに際し、ご指導、御助言を賜りました奈良女子大学理学部化学科池原健二教授、家政学部食物学科 河合弘康教授、的場輝佳教授に心より感謝申し上げます。

本研究を始めるきっかけを与えて下さり、終始御指導、御鞭撻を賜りました山陽学園短期大学 村岡知子教授に心から感謝申し上げます。

現在まで、研究を続けることができましたのも、昭和62年から平成元年度まで研究生として暖かく迎えて下さいました広島県衛生研究所 所長 海佐裕幸先生、理化学部部長 坂本征則先生をはじめ所員の方々のお陰と厚く御礼申し上げます。中でも、 β -カルボリン誘導体の分離、同定、定量に関しましては理化学部 金森久幸先生、変異原性試験に関しましては病理学部 水田満里先生に、終始御指導、御鞭撻を賜りましたこと心から感謝申し上げます。

奈良女子大学在学中から、御指導、御鞭撻を賜りました調理学教室 梶田武俊名誉教授(現 佐保女子短期大学教授)に心より感謝申し上げます。

本研究に御協力下さいました山陽学園短期大学元助手 永易(安田)公子氏、同卒業生 明石牧子氏に厚く御礼申し上げます。

なお、本研究に関しては、昭和57年度、平成元年度文部省科学研究費補助金奨励研究を受け、研究を進めることができました。