

ウム溶液で殺菌処理を行った。

未殺菌試料、次亜塩素酸ナトリウム及び亜塩素酸ナトリウム殺菌処理試料のいずれからでも FA, AA 及び Pro の保持時間にピークが検出され、スキャンモードによるマススペクトル解析の結果、各化合物と同定された。各 Ald 含量は殺菌処理後、未処理試料に比して増加していた。(Fig. 5)。

#### 4) 塩素殺菌処理により生成する Ald 量の経時変化

次亜塩素酸ナトリウム溶液及び亜塩素酸ナトリウム溶液にカットキャベツを浸漬させ、殺菌処理後の Ald 類生成量の経時的な測定を行った(Fig. 6)。いずれの殺菌剤も殺菌処理直後より AA 量が増加し、10 分後には約 3.4 µg/g となり、その後徐々に減少した。また、亜塩素酸ナトリウム処理では 30 分後以降、再び増加する傾向が見られた。なお、微量であるが FA 及び Pro も AA と同様の挙動を示した。さらに、殺菌処理後の浸漬液について同様に Ald 量を測定したところ、殺菌処理後 30 分まで徐々に AA 量が増加し、その後、ほぼ一定の濃度となった(Fig. 7)。

#### 5) 殺菌温度による Ald 生成量の変化

次亜塩素酸ナトリウム溶液及び亜塩素酸ナトリウム溶液の殺菌温度を 4, 25, 35°C に設定し、カットキャベツを 10 分間殺菌処理した時の Ald 量の測定を行った(Fig. 8)。いずれの殺菌剤においても試料中の AA 及び FA 量は殺菌温度の上昇と共に減少したが、Pro 量に関しては明確な傾向は確認できなかった。また、殺菌処理後の浸漬液中の Ald 量は、試料中の結果とは反対に増加する傾向がみられた。

#### 6) 殺菌剤の pH による Ald 生成量の分析

次亜塩素酸ナトリウム溶液及び亜塩素酸ナトリウム溶液に 1 mol/L 塩酸及び 1 mol/L 水酸化ナトリウムを滴下し、pH をそれぞれ 2 ~ 12 に調整し、殺菌液の pH に対する Ald 生成量の変化を調べた(Fig. 9-10)。次亜塩素酸ナトリウム殺菌の場合、アルカリ性側において AA 量が若干減少したが、殺菌液の pH と各 Ald 量に明確な傾向を見出すことはできなかった。亜塩素酸ナトリウム殺菌の場合、AA 量は pH によらず、一定の濃度を示したが、FA 及び Pro に関しては、強酸性及び強アルカリ性条件下において生成量が増加する傾向が確認された。

#### 7) 塩素系殺菌剤への酸混和による Ald 生成能の検討

次亜塩素酸ナトリウムは塩基性の液体であるが、酸性側において殺菌力が増すため、殺菌液に有機酸を混和して殺菌効果を高め使用される場合がある<sup>21)</sup>。また、亜塩素酸ナトリウムでは、サクラソウなどの漂白を目的として使用する場合には、クエン酸を混和して使用する場合がある<sup>20)</sup>。さらに、米国では新たな殺菌剤として、亜塩素酸ナトリウムに GRAS の酸を加え pH を 2.3-3.9 に調製した酸性亜塩素酸ナトリウム溶液が認可されている。そこで次亜塩素酸ナトリウム溶液及び亜塩素酸ナトリウム溶液に有機酸を混和して殺菌液を調製したときの、Ald 生成量の経時的な変化を調べた(Fig. 11)。

次亜塩素酸ナトリウム・酒石酸混和した場合、時間経過とともに Gly の生成量が増加したが、亜塩素酸ナトリウム・酒石酸混液(pH 6.3)では、ピークは検出されなかった。しかし、亜塩素酸ナトリウム・酒

石酸混液を pH2.0 に調整し、Gly 量を分析したところ、酒石酸添加後 10 分以内に Gly 量が急激に増加し、その後、24 時間かけて徐々に減少した(Fig. 12)。

さらに、次亜塩素酸ナトリウムにフマル酸を混和した場合にも、微量の Gly の生成が確認された。その他の有機酸(クエン酸、リンゴ酸及びコハク酸)と殺菌料の混和では、Ald は生成しなかった。

#### D. 考察

##### 1) GC/MS 法によるカット野菜中の Ald 分析法の検討

カット野菜に含まれる Ald 類の分析法の検討を行った。Ald の誘導體化分析法としては、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン誘導體化による HPLC 法や水蒸気蒸留・アセチルアセトン法など、いくつかの方法が知られているが、PFBOA 誘導體化・溶媒抽出-GC/MS 法は、検出感度が高く、検出機として質量分析装置を用いるため、選択性にも優れており、食品中の Ald 分析法として有用な試験法と考えられる。

添加回収試験において、試料に Ald 標準液を添加した場合、回収率が著しく低下したが、試料抽出液に Ald 標準液を添加したときの回収率は 69.2~110.6%と比較的良好な回収率となった。このため、PFBOA による Ald 誘導體化は定量的に反応しているが、試料からの抽出において Ald の揮散や分解などの理由により回収率が著しく低下していることが考えられた。このため、試料中の Ald の正確な定量には抽出段階における試験法の改良が必要であるが、5 回試行における添加回収率の分析精度は比較的良好なことから、

相対的な Ald 量の増減をモニタリングすることは可能と考え、今回は半定量的な Ald 類の生成挙動解析を目的として検討を行っている。

##### 2) Ald の生成に関する因子の検討

カット野菜の殺菌処理後の Ald 生成について GC/MS により分析を行った。殺菌処理後、次亜塩素酸ナトリウム及び亜塩素酸ナトリウム処理試料のいずれも FA, AA, Pro 量が増加した。次亜塩素酸ナトリウム及び亜塩素酸ナトリウムは酸化力を有しており、食品成分の酸化により Ald が増加したと考えられる。

次に、カット野菜の殺菌処理にともなう Ald の生成に関する環境因子について解明するため、殺菌料との接触時間や温度、pH を変更し、Ald 生成量の変化を調べたところ、次亜塩素酸ナトリウム及び亜塩素酸ナトリウムにより殺菌処理した場合には、殺菌処理 10 分までに AA の生成量が増加したが、その後 30 分にかけて徐々に減少した。さらに、亜塩素酸ナトリウムは 30 分後以降、再び AA 量が増加に転じた。Ald は、食品成分由来の Ald 前駆物質が酸化されて AA が生成していると考えられるが、同時に AA が酸化され酢酸へと変化していることも考えられ、酸化による生成と分解反応が同時進行するため複雑な増減を引き起こしたと推察される。

また、殺菌料の温度上昇により、試料中の FA 及び AA 量が減少し、浸漬液中の FA, AA 量が増加する傾向が見られた。これは温度上昇により、カット野菜より浸漬液中へ Ald もしくは Ald 前駆体に移行していることを示している。この原因としては、温度上昇と共にカットキャベツの組織



の軟化が確認されており、試料中の Ald 又は Ald 前駆物質がカット野菜の切断面から浸漬液に移行しやすくなっていることが原因の一つとして考えられるが、詳細は不明である。

また、殺菌料の pH の影響については、一般に、次亜塩素酸ナトリウム及び亜塩素酸ナトリウムは、酸性条件下において、酸化力が強くなるため、pH の低下による Ald の生成量の増加が予想されたが、本実験において明確な傾向は認められなかった。Dąbrowska らは<sup>16)</sup>、河川水等の二酸化塩素処理による Ald の生成と pH の関係について調査し、pH との間に明瞭な関係性がないことを報告しており、本研究の結果と一致している。

今回、殺菌処理により Ald 量が増加することが明らかとなった。しかし、一方において、食品には天然由来の Ald を多く含むことが知られている<sup>22-23)</sup>。一般食品に含まれる天然 AA 量としては、ヨーグルト 0-17 µg/g、チーズ 0-39 µg/g、日本酒 93-270 µg/g などがあり、FA に関しては、冷凍タラ 4.6-48 µg/g、乾燥シイタケ 100-230 µg/g、キャベツ 1.8-32.5 µg/g など食品全般に広く含まれている。このため厚生省（当時）は、昭和 45 年に厚生省環境衛生局食品衛生課長通知<sup>24)</sup>「食品、添加物等の基準の一部改正について」において、「自然に含まれるホルムアルデヒドは人の健康をそこなうおそれがなく、かつ近時の環境汚染などに由来するものではないので、食品衛生法に基づき画一的に規制することは必ずしも適当でない」と判断している。

カット野菜の殺菌処理後に増加した

Ald 量を添加回収試験の回収率を基に補正した場合においても、一般的な食品に含まれる天然由来の Ald 量に比べ少ない量であり、カット野菜の殺菌処理により生成する Ald 類が健康に影響を及ぼす可能性はないと考えられる。

### 3) 酸共存下における Ald の生成

殺菌料に有機酸を混和したときの Ald 量の推移を調べた。殺菌料にクエン酸、リンゴ酸、コハク酸を添加した場合には、Ald は生成しなかった。Suh らは<sup>25)</sup>、クエン酸の二酸化塩素処理により、β-ケトグルタル酸を経てマロン酸が生成することを明らかとしており、このため Ald 類が検出されなかったと考えられる。

一方、殺菌料に酒石酸を混和した場合、次亜塩素酸ナトリウムとの混和により経時的に Gly 量が増加した。また、亜塩素酸ナトリウムと混和した場合、微酸性条件下では Gly は生成しないが、強酸性条件下では、混和後 10 分以内に Gly 生成量が急激に増加し、その後、徐々に減少した。Chang ら<sup>26)</sup>は、酒石酸への塩素処理による Gly の生成の可能性について指摘しており、そのメカニズムとして Fig. 13 において実線で示した反応スキームを提示している。それによれば、塩素による酸化力で酒石酸の 2 つの水酸基が酸化されジアルデヒドとなり、さらに脱炭酸を経て Gly を生成するとしている。しかし、このメカニズムでは、引き続き Gly が分解し FA が生成すると予想しているが、今回の実験では FA 量は増加しなかった。亜塩素酸ナトリウム・酒石酸混和において 20 分後以降の Gly 量が徐々に減少しているが、Gly の主な分解反応経路は FA ではなく、酸

化反応によってコハク酸やギ酸へと変化していると予想される。

また、次亜塩素酸ナトリウムと亜塩素酸ナトリウムでは、酒石酸混和時の pH 条件が微酸性の場合、Gly 生成反応量に違いが生じた。これは酸性条件下における化学種の存在形態の違いが理由として挙げられる。次亜塩素酸ナトリウムの酸解離定数は pKa 7.5 であるのに対し、亜塩素酸ナトリウムは pKa 1.9 である。このため、pH 6-7 の微酸性条件下では次亜塩素酸ナトリウムは分子型の次亜塩素酸となり反応性が高まるが、亜塩素酸ナトリウムは、pKa 1.9 付近までは、亜塩素酸あるいは亜塩素酸ナトリウムとして存在するため、次亜塩素酸に比べ酸化力が弱く、Gly を生成しないが、強酸性条件下では酸化力に優れた二酸化塩素へと化学形態を変化させるため、Gly が生成したと考えられる。

本研究では、主に微酸性～弱塩基性条件下において殺菌料がカット野菜に及ぼす影響について検討を進めたが、二酸化塩素が存在する強酸性条件では酸化力が強まることから、今回とは異なる結果が予想される。このため酸性化亜塩素酸ナトリウム等の二酸化塩素を含む製剤については、今後、別途の調査が必要と考えられる。

また、次亜塩素酸ナトリウムをフマル酸と混和した場合、Gly の生成が確認された。これはフマル酸の二重結合に対する酸化反応によりジオールが生成し、引き続き、酒石酸と同様のメカニズムに従い酸化反応が進行し、Gly が生成したと考えられる (Fig.14)。しかし、その生成量は酒石酸に比べ微量であった。これはフマル酸に対するジオールの付加反応が Gly 生成の律

速段階となるため、Gly 生成反応は酒石酸添加の場合に比べ進行速度が遅いと考えられる。

なお、次亜塩素酸ナトリウム及び亜塩素酸ナトリウムへの酒石酸及びフマル酸混和により Gly を生成するが、通例、殺菌料への酸混和にはクエン酸や塩酸などが使用されている。このため現状として殺菌料への酒石酸の混和の事例はないと考えられる。

## E. 結論

カット野菜の殺菌処理後の Ald 生成能について GC/MS により分析を行った。次亜塩素酸ナトリウム及び亜塩素酸ナトリウムによる殺菌処理より、FA, AA, Pro 等の Ald 類の生成量の増加が認められた。

昨年度の報告において、次亜塩素酸ナトリウム殺菌処理では THM 等の塩素系消毒副生成物が生成するが、亜塩素酸ナトリウム殺菌処理では THM を生成しないことを報告した。今回の研究により、亜塩素酸ナトリウム処理においても Ald など非塩素系の消毒副生成物の存在が明らかとなった。ただし、食品には天然由来の Ald が多く含まれており、今回、カット野菜の殺菌処理により生成した Ald 量は、一般食品に天然由来として含まれる Ald 量に比べ少ない量であり、健康への影響はないものと推察される。

また、次亜塩素酸ナトリウム及び亜塩素酸ナトリウムに酒石酸及びフマル酸を混和した場合、Gly を生成することが明らかとなったが、一般的に殺菌料と併用されるクエン酸との混和において Ald は生成しなかった。



次亜塩酸ナトリウム及び亜塩素酸ナトリウム等の殺菌料は、野菜や魚介類加工品など生鮮食品の微生物学的危害を防止する上で欠かすことのできない重要な役割を果たしている食品添加物である。今後とも微生物学的リスクを十分に考慮した上で、食品成分や食品添加物との相互作用による化学的リスク評価が必要と考えられる。

#### F. 参考論文

- 1) 厚生省:第8版食品添加物公定書,p 195 (2007)
- 2) Rook, J.J.: Water Treatment and Examination, 21(3), p259 (1972)
- 3) Rook, J.J.: Water Treatment and Examination, 23(2), p234-243 (1974)
- 4) WHO: Guidelines for Drinking-water Quality 3rd Ed. (2004)
- 5) Richardson S. D.: Trends in Analytical Chemistry, 22(10), p666-684 (2003)
- 6) Official Journal of the European Communities Council Directive 98/83/EC (1998)
- 7) 厚生労働省令第百一号:水質基準に関する省令 (2003)
- 8) Hidaka, T. et al.: 食品衛生学雑誌, 32(4), p308-314 (1991)
- 9) Hidaka, T. et al.: 食品衛生学雑誌, 33(3), p267-273 (1992)
- 10) Hidaka, T. et al.: 食品衛生学雑誌, 35(4), p357-364 (1994)
- 11) Tiefel, P., Guthy, K.: Milchwissenschaft, 52(12), p686-691 (1997)
- 12) Resch, P., Guthy, K.: Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 95, p418-523 (1999)
- 13) Resch, P., Guthy, K.: Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 96, p9-16 (2000)
- 14) Imaeda, K.. et al.: 衛生化学, 40(6), p527-533 (1994)
- 15) Richardson S. D. et. al. : Environ. Sci. Technol, 28, p592-599
- 16) Dąbrowska, A. J. et. al. : Water Research, 37, p1161-1169 (2003)
- 17) 官報 第3378号、厚生労働省令第七十五号、p1 (2002)
- 18) 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課長通知:食安基発第0825001号(2004)
- 19) FDA : Code of Federal Regulations Title 21, 173.325 (2003)
- 20) 廣川書店 : 食品添加物公定書解説書第8版,pD1 (2007)
- 21) 長谷川美典: カット野菜ハンドブック, p170-173 (2002)
- 22) 内山充 : 昭和54年度食品衛生研究 (1979)
- 23) 大森光明 : 化学,32(3), p184-189 (1977)
- 24) 厚生省環境衛生局食品衛生課長通知:環食第429号の2 (1970)
- 25) Suh, D. H. et. Al. : Fundamental and Applied Toxicology, 5, p305-313 (1985)
- 26) Chang, T. L. et. Al. : Analytical Letters, 21, p2049-2067 (1988)

G. 研究発表  
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

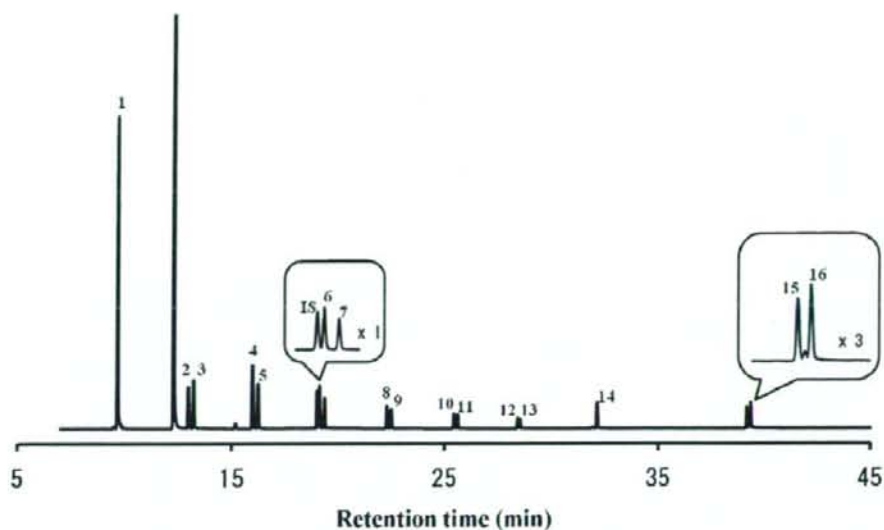


Fig.1. アルデヒド類混合標準液誘導体の GC/MS クロマトグラム  
 1: Formaldehyde oxime, 2,3: Acetaldehyde oxime, 4,5: Propanal oxime, 6,7: Butanal oxime, 8,9: Pentanal oxime, 10,11: Hexanal oxime, 12,13: Heptanal oxime, 14: Benzaldehyde oxime, 15,16: Glyoxal dioxime, IS: 1-Chlorodecane

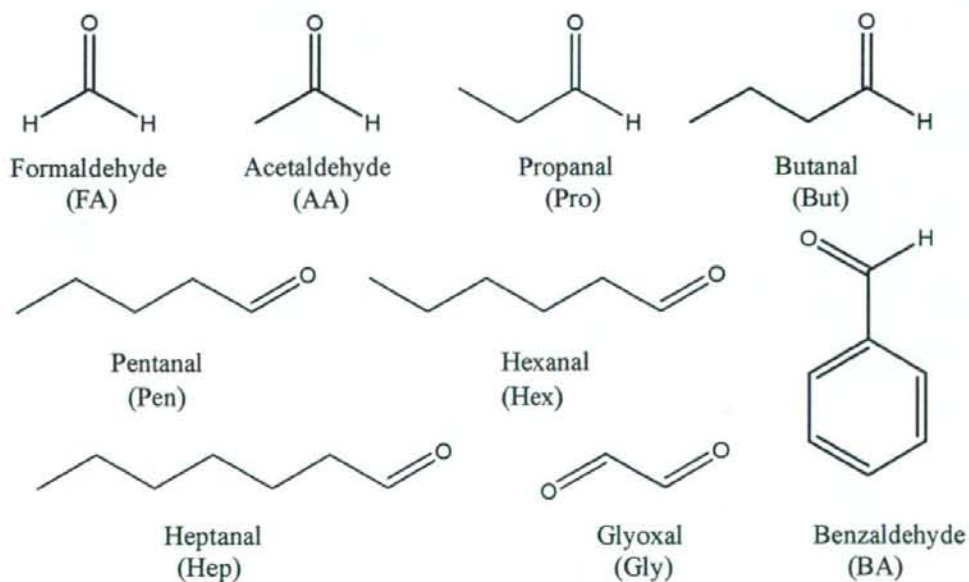


Fig.2. アルデヒド類の構造式

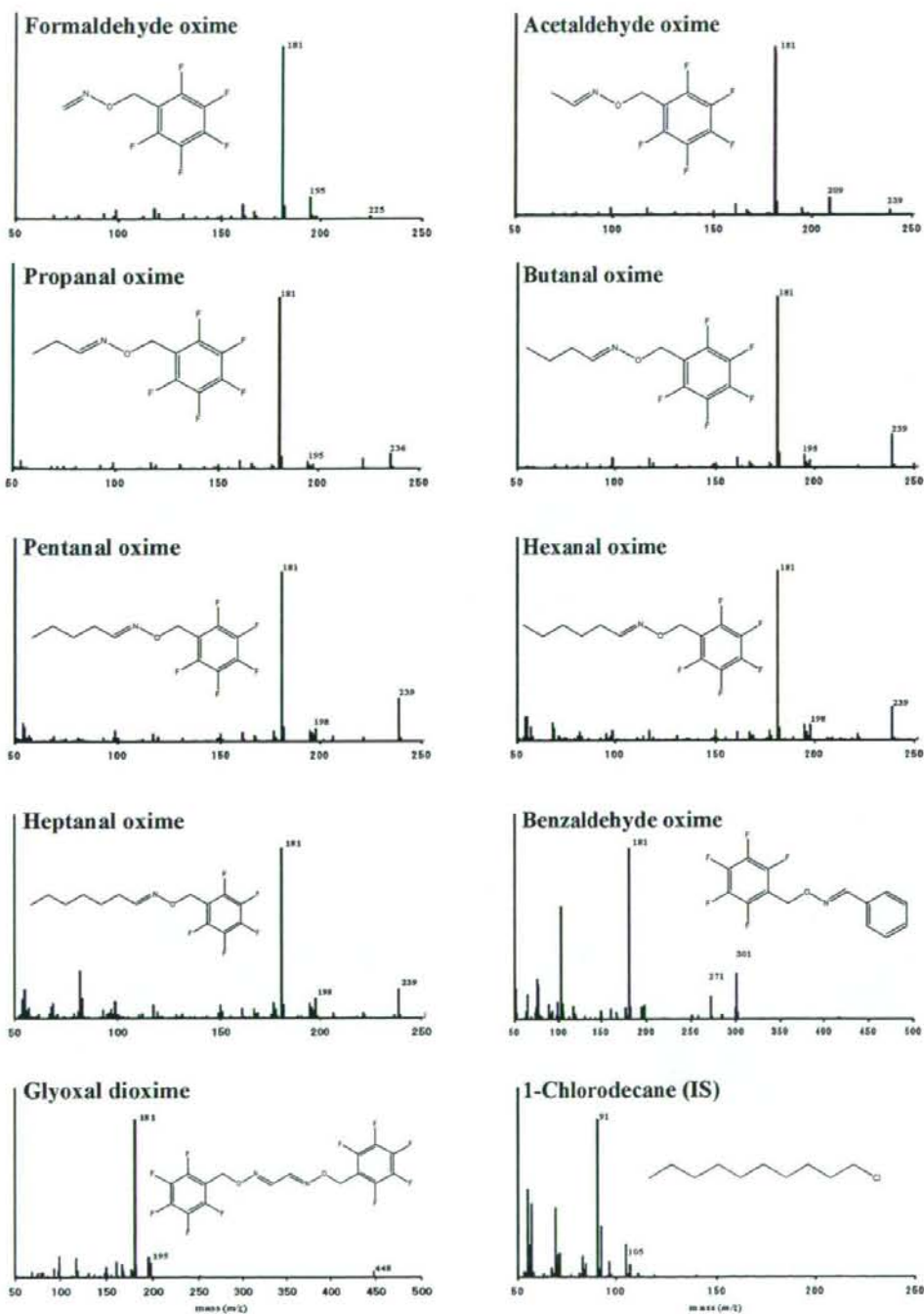


Fig.3. アルデヒド誘導体及び内部標準液のマススペクトル



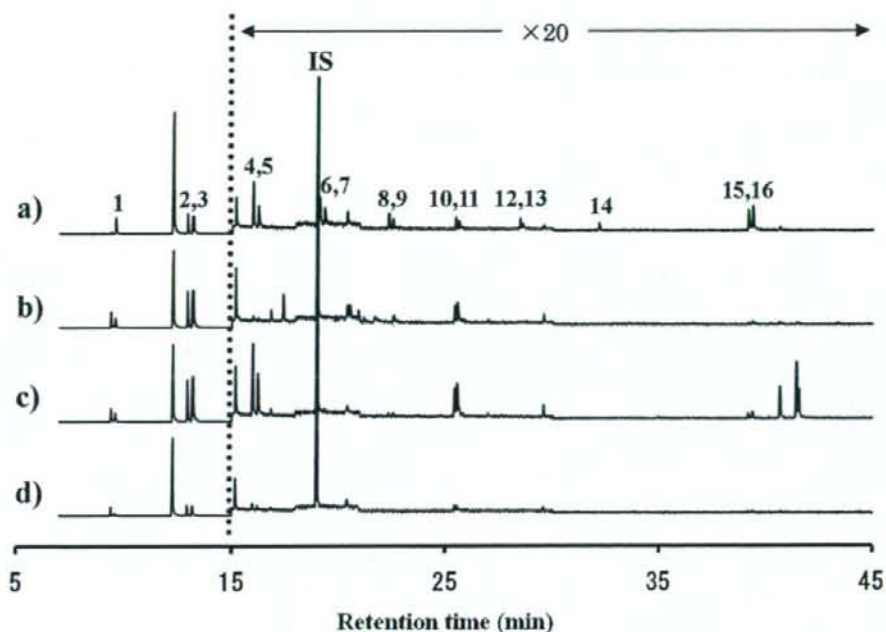


Fig.4. カット野菜試料液の GC/MS クロマトグラム

- a) アルデヒド類混合標準液誘導体 (10 ng/ml), b) 次亜塩素酸ナトリウム処理試料液,  
c) 亜塩素酸ナトリウム処理試料液, d) 未殺菌試料液

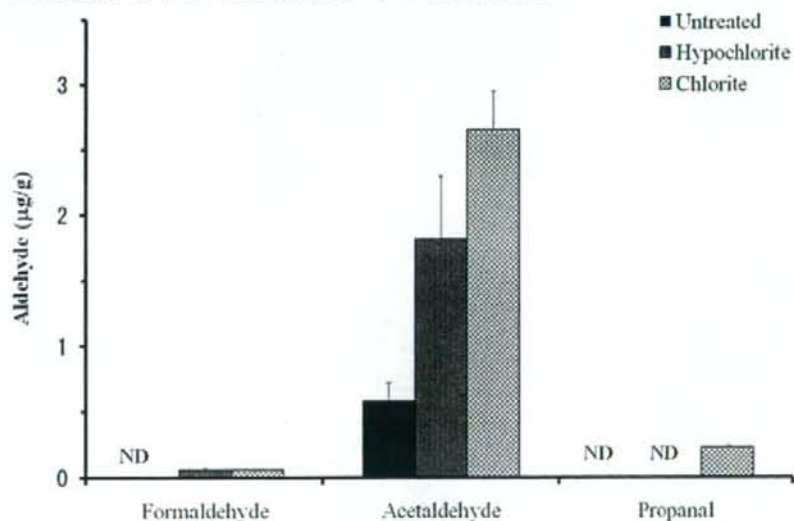


Fig.5. 塩素殺菌料の種類による殺菌処理前後のアルデヒド類生成量の比較

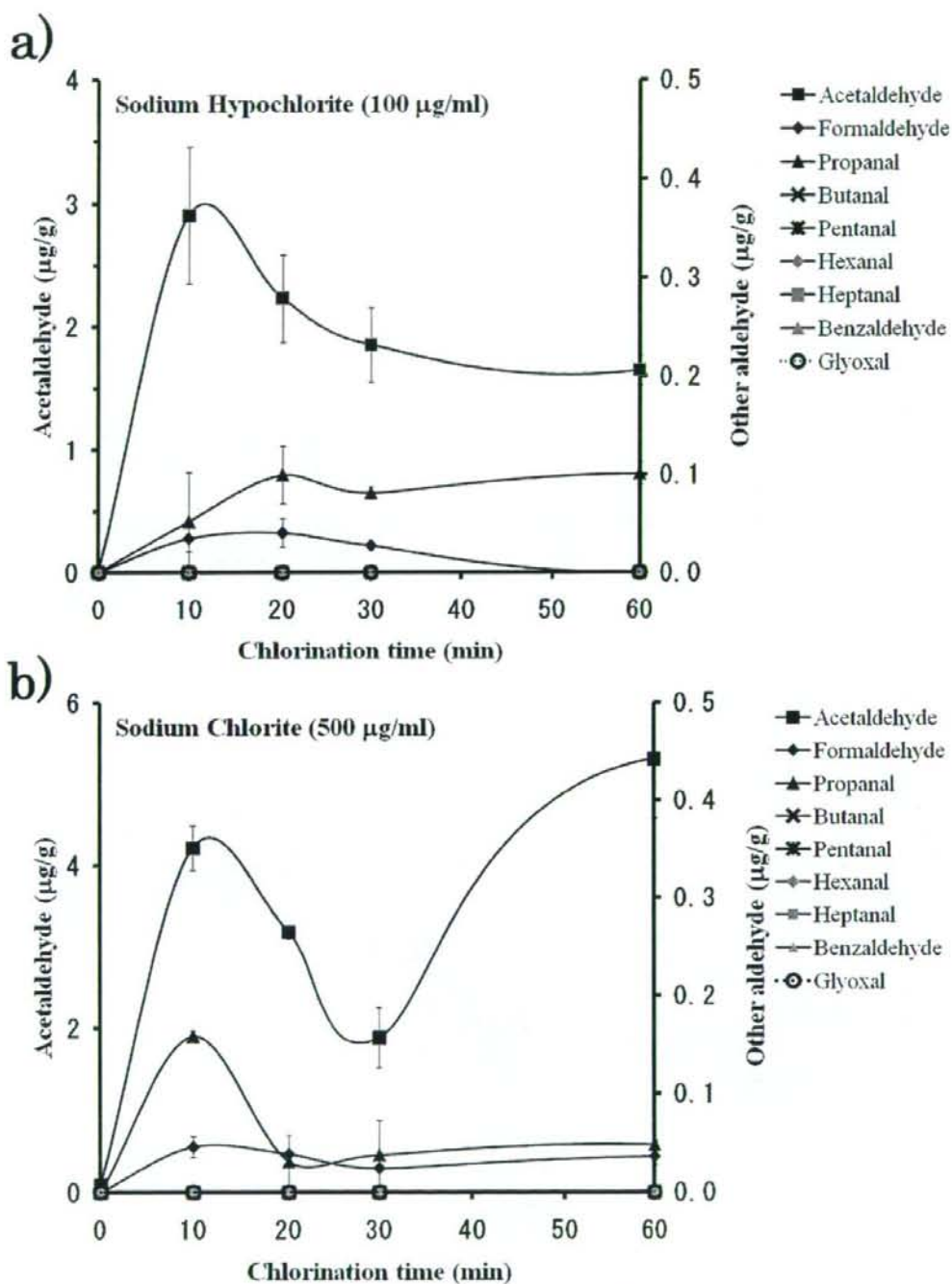


Fig.6. カット野菜の殺菌処理によるアルデヒド類生成量の経時変化.

- a) 次亜塩素酸ナトリウム殺菌処理したカット野菜に含まれるアルデヒド類の推移,  
 b) 亜塩素酸ナトリウム殺菌処理したカット野菜に含まれるアルデヒド類の推移

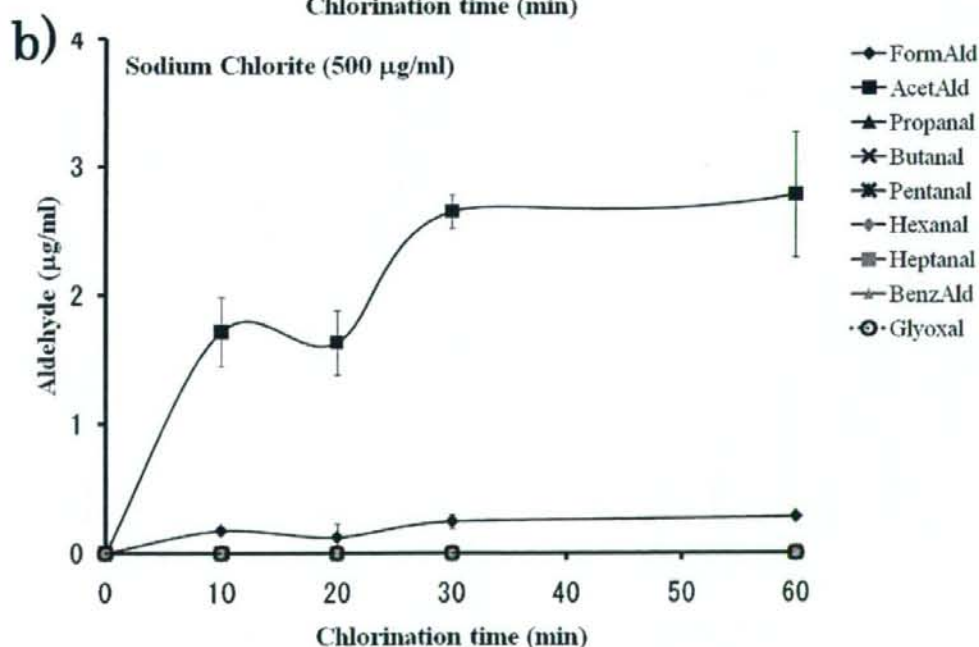
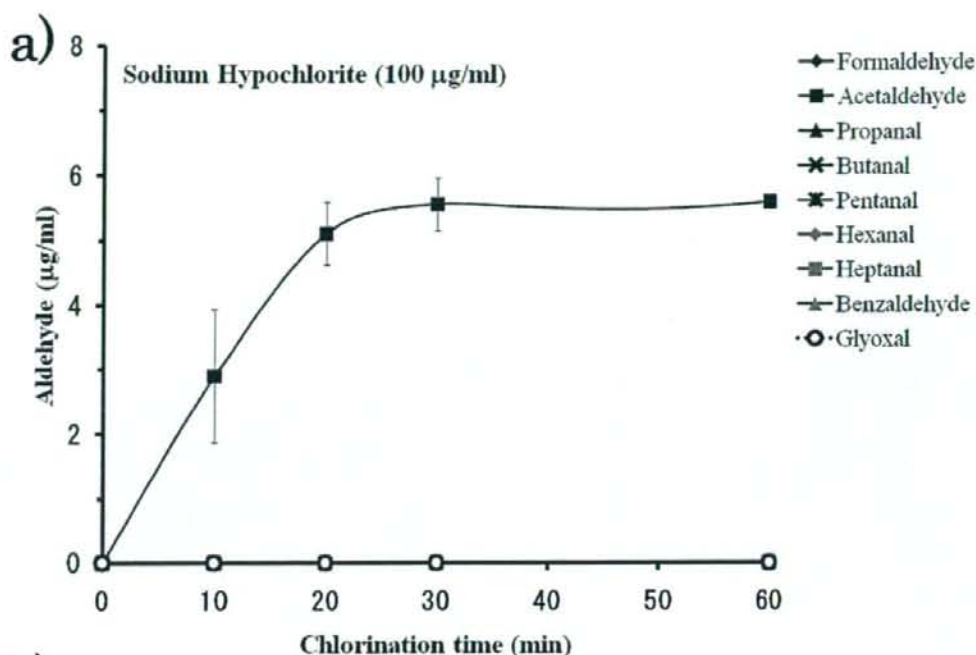


Fig.7. カット野菜の殺菌処理による浸漬液中のアルデヒド類含有量の経時変化。  
 a) 次亜塩素酸ナトリウム殺菌処理後の浸漬液中のアルデヒド類濃度の推移, b) 亜塩素酸ナトリウム殺菌処理後の浸漬液中のアルデヒド類濃度の推移



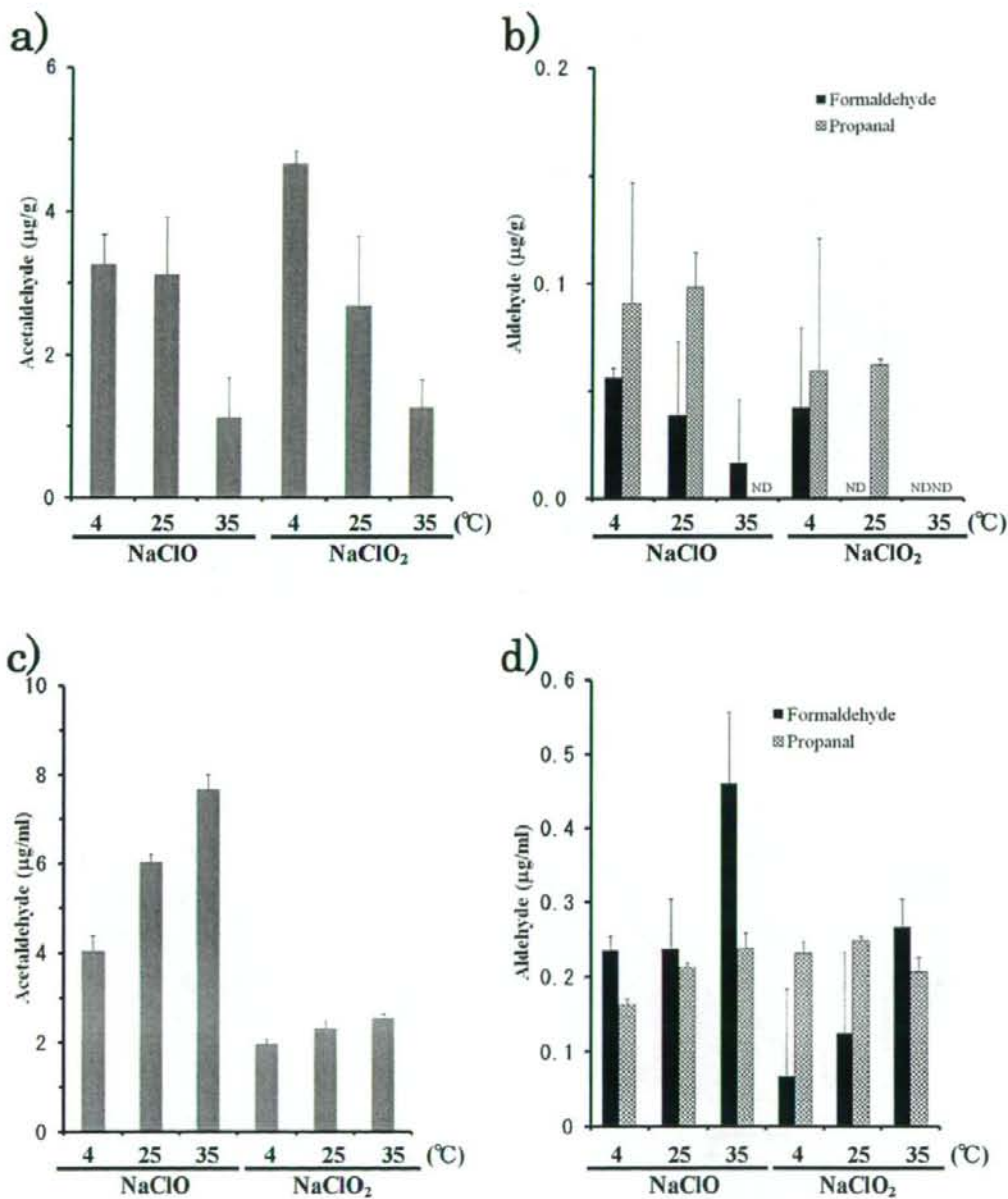


Fig.8. 塩素系殺菌料浸漬液の温度によるカット野菜中のアルデヒド量の変化。

- a) カット野菜中のAA量, b) カット野菜中のFA及びPro量,  
 c) 殺菌処理後浸漬液中のAA量, d) 殺菌処理後浸漬液中のFA及びPro量

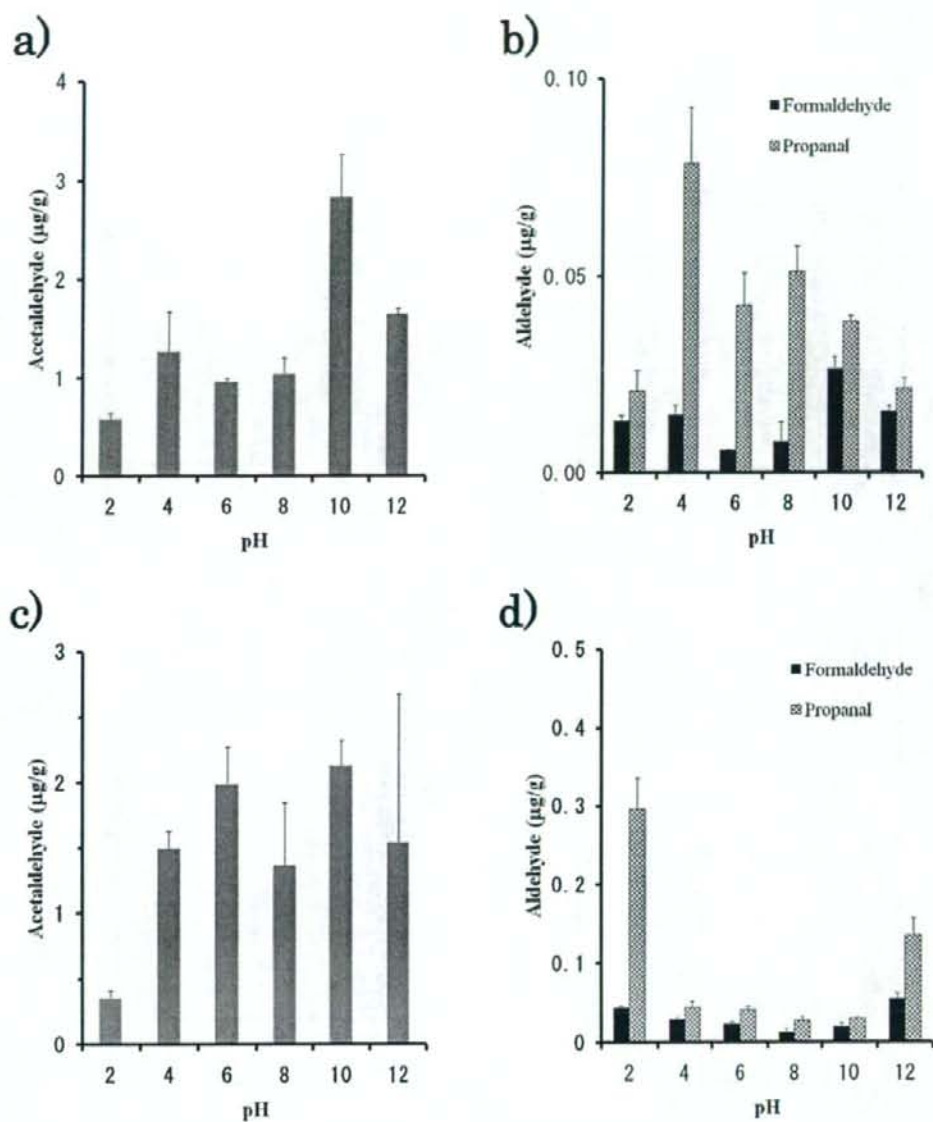


Fig.9. 塩素系殺菌料浸漬液の pH 変化による殺菌処理後のカット野菜中のアルデヒド類生成量の影響.

a) 次亜塩素酸ナトリウム殺菌処理後のカット野菜中の AA 量, b) 次亜塩素酸ナトリウム殺菌処理後のカット野菜中の FA 及び Pro 量, c) 亜塩素酸ナトリウム殺菌処理後のカット野菜中の AA 量, d) 亜塩素酸ナトリウム殺菌処理後のカット野菜の FA 及び Pro 量

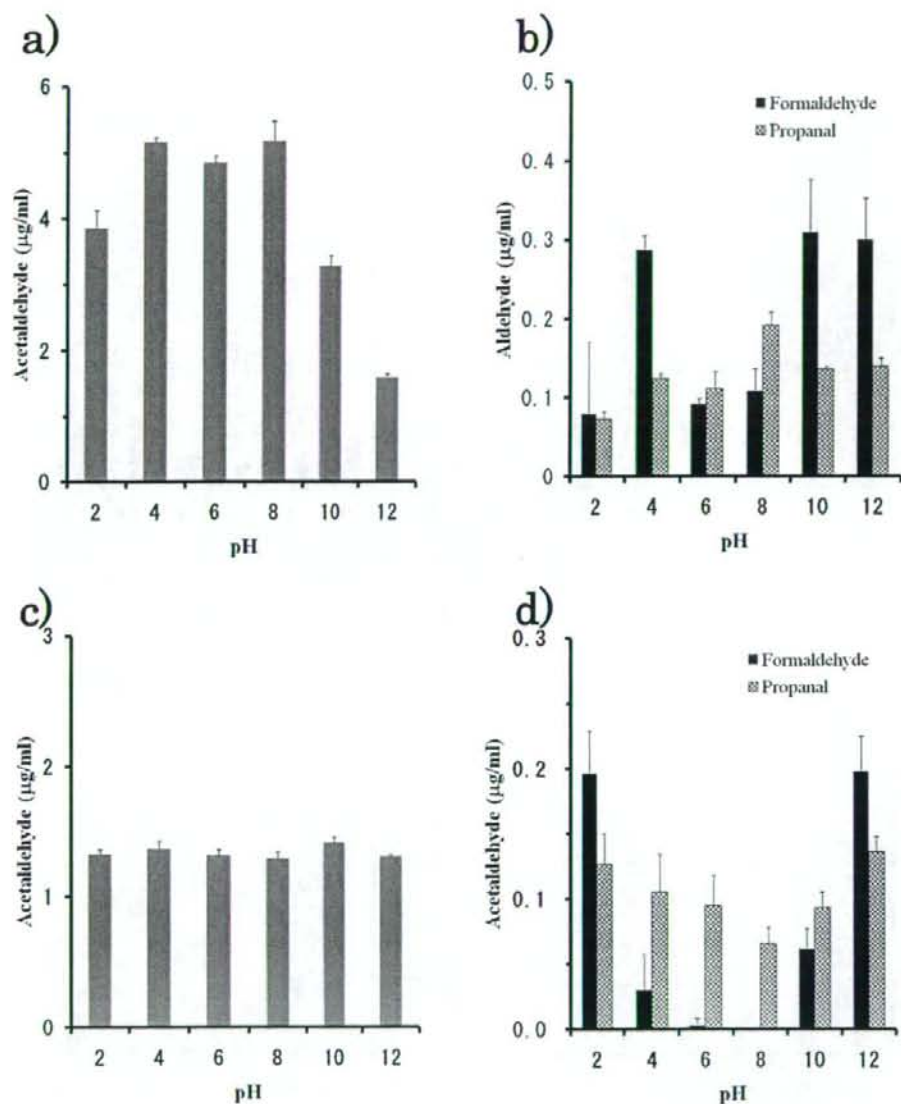


Fig.10. 塩素系殺菌料浸漬液のpH変化による殺菌処理後のカット野菜浸漬液中のアルデヒド類生成量の影響.

a) 次亜塩素酸ナトリウム殺菌処理後のカット野菜浸漬液中のAA量, b) 次亜塩素酸ナトリウム殺菌処理後のカット野菜浸漬液中のFA及びPro量, c) 亜塩素酸ナトリウム殺菌処理後のカット野菜浸漬液中のAA量, d) 亜塩素酸ナトリウム殺菌処理後のカット野菜浸漬液のFA及びPro量



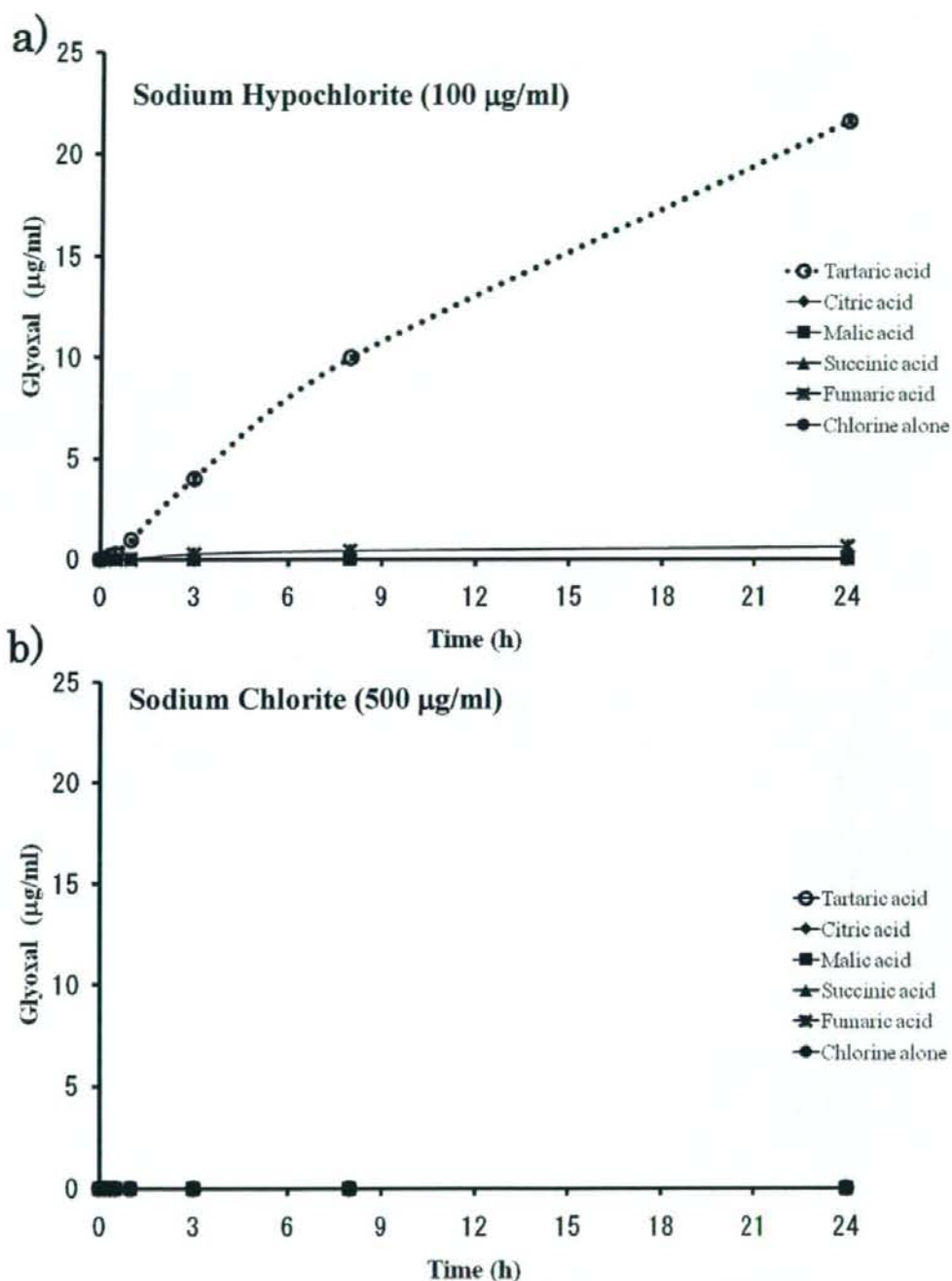


Fig. 11. 塩素系殺菌料・有機酸混合液における有機酸混和後のGly生成量の推移.

a) 次亜塩素酸ナトリウム・有機酸混合液(pH 6.9)におけるGly量, b) 亜塩素酸ナトリウム・有機酸混合液(pH 6.3)におけるGly量

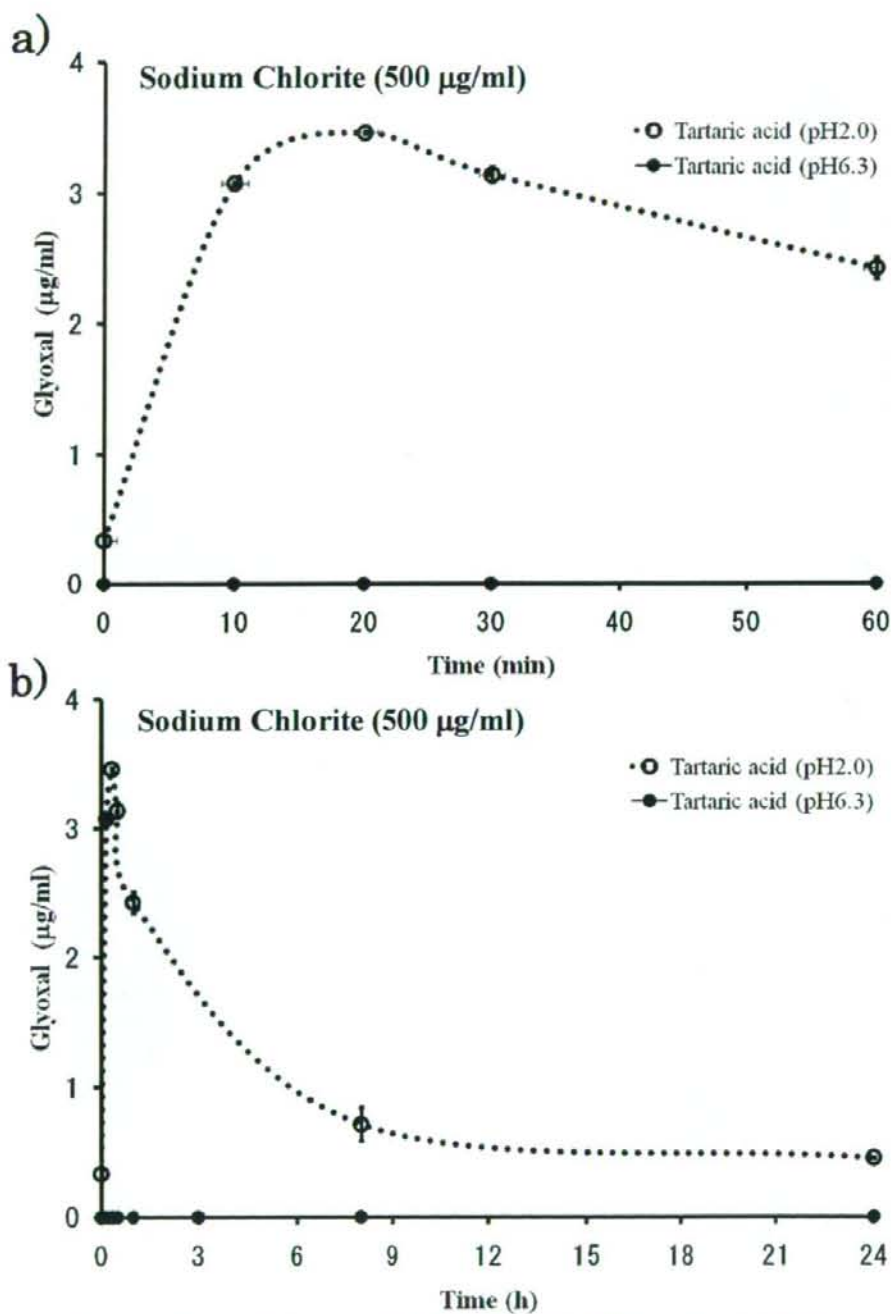


Fig. 12. 亜塩素酸ナトリウム・酒石酸混合液における混和後のGly量の推移。  
 a) 混和後1時間以内の経時変化, b) 混和後24時間後までの経時変化

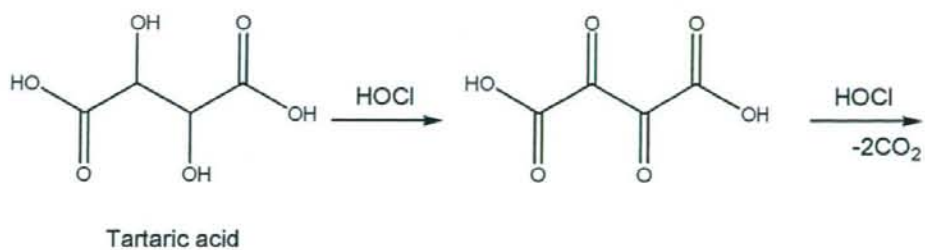


Fig.13. 酒石酸の次亜塩素酸ナトリウム及び亜塩素酸ナトリウムとの反応による Gly 生成メカニズム (仮説)

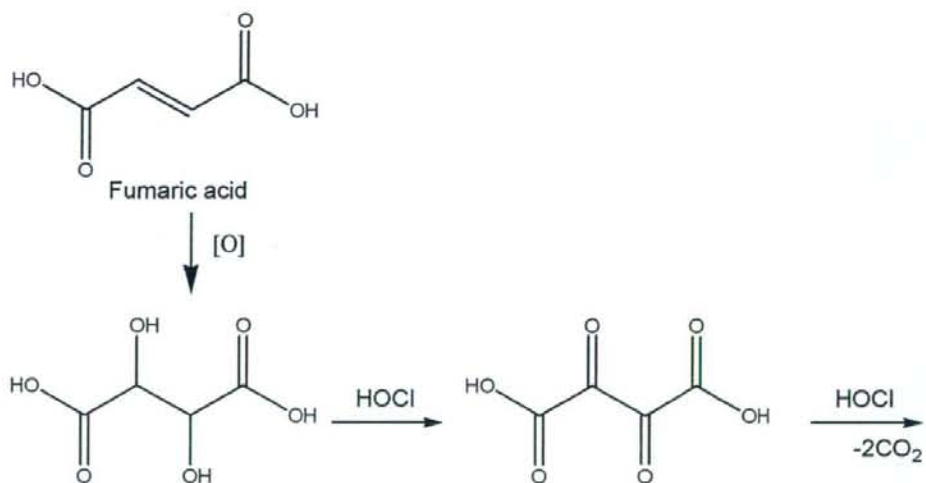


Fig.14. フマル酸の次亜塩素酸ナトリウムとの反応による Gly 生成メカニズム (仮説)



Table 1. アルデヒド類のカット野菜からの添加回収試験

No.	Compounds	Amount of added Aldehydes			
		50 ng/g		500 ng/g	
		平均(%)	標準偏差	平均(%)	標準偏差
1.	<sup>13</sup> C-Formaldehyde	51.8	4.5	53.2	2.3
2.	<sup>13</sup> C-Acetaldehyde	-		85.1	2.7
3.	Propanal	47.9	7.3	47.5	1.1
4.	Butanal	31.8	5.6	39.9	1.5
5.	Pentanal	ND		47.1	2.5
6.	Hexanal	ND		51.9	2.9
7.	Heptanal	58.0	6.2	52.6	1.9
8.	Benzaldehyde	100.1	5.7	81.9	4.3
9.	Glyoxal	55.5	4.6	60.8	2.1

\* n=5

Table 2. アルデヒド類のカット野菜抽出液からの添加回収試験

No.	Compounds	Amount of added Aldehydes			
		50 ng/g		500 ng/g	
		平均(%)*	標準偏差	平均(%)	標準偏差
1.	<sup>13</sup> C-Formaldehyde	91.8	3.2	107.7	1.8
2.	<sup>13</sup> C-Acetaldehyde	-		88.0	1.3
3.	Propanal	78.6	7.8	80.8	1.7
4.	Butanal	83.5	7.6	82.1	1.1
5.	Pentanal	ND		86.9	2.5
6.	Hexanal	ND		97.7	4.4
7.	Heptanal	93.2	4.6	98.2	4.8
8.	Benzaldehyde	104.4	2.8	110.6	3.4
9.	Glyoxal	69.2	3.8	72.5	6.0

\* n=5

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）  
国際的動向を踏まえた食品添加物の規格、基準の向上に関する調査研究  
平成 20 年度 分担研究報告書

食品添加物が動物消化管細胞機能へ及ぼす影響に関する研究

研究分担者 扇間昌規 武庫川女子大学薬学部

研究協力者 岡田安代 武庫川女子大学薬学部

研究要旨

ソルビン酸（以後 SA）及びそのカリウム塩は微生物に対する増殖抑制作用（静菌作用）により、食品添加物の保存料として汎用されている。一方、SA はヒトやモルモットの皮膚に塗布すると紅斑、浮腫、蕁麻疹等の症状を引き起こすとの報告があることから、食品とともに摂取された SA が消化管粘膜の細胞にも何らかの作用を及ぼすことは想像に難くない。消化管細胞機能への SA の影響を調べる手順としてまず今回、*in vitro* における動物培養細胞を対象とし、当研究室で培養・研究実績があり、特性の明確なマウス・マストサイトーマ P-815 細胞株（以後 P-815 細胞）を使用して基礎的データを求めた。P-815 細胞に添加された SA は細胞を殺すことなく、細胞周期を変化させることにより一過性の細胞増殖抑制作用を有することを明らかにした。

A. 研究目的

食品添加物は食品中の各種食品成分と相互作用しその機能を発揮することも、機能を損なうこともある。また食品添加物は食品を食した人の消化管内で様々な反応を進行させる能力を有している。SA の動物消化管細胞機能へ及ぼす影響に関する研究を達成するために、最初に *in vitro* 培養動物細胞に SA がどのように作用するかを知ること、今後の研究に有益な情報を得ることになる。まず、当方で培養・研究実績があり特性の明確なマウス・マストサイトーマ P-815 細胞株（以後 P-815 細胞）を使用し、基礎的データを集めることが今回の目的である。

B. 研究方法

培養条件など

(1) フィッシャー培地(pH7.4)中に、 $1 \times 10^5$ /mL のマウス・マストサイトーマ p-815 細胞を調整して通常のプラスチックシャーレで 37°C の CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養する。倍加時間は約 48 時間である。

(2) 少量の DMSO に溶解させた遊離型 SA 又は SA-K（いずれも最終濃度 2.5mM）を添加した P-815 細胞群と、無添加 P-815 細胞群を同時に培養した。SA の代わりにその代謝産物とされているムコン酸やクロトン酸を添加して同様に培養した。培養細胞は経時的に、細胞数や形態測定を行なった。

(3) 実験によっては、DNA 合成の際にチミジンの替わりに取り込まれる標識分子

BrDUを添加培養(1時間)した。培養後、細胞をエタノールで固定し、蛍光(FITC)標識マウス抗 BrdU 抗体を加えて BrdU と特異的に反応させた。同時に DNA と結合する蛍光物質(プロビジウムアイオダイド PI)を加え2重染色した。これらに紫外線照射すれば、それぞれ緑色および赤色蛍光を発する。

(4) 培養 P-815 細胞数や形態は、coulter counter で計測し、蛍光標識された個々の細胞は、フローサイトメトリーFACS で蛍光強度に基づく要因解析をした。

(5) 培養細胞を用いた各実験は3~5試行であった。

### C. 研究結果および考察

#### 1. SA は P-815 細胞を殺さず増殖を抑える

P-815 細胞を SA 2.5 mM 存在下で培養し経時的に細胞数を測定したところ、SA は一過性に P-815 細胞の増殖を抑制した。その抑制効果は SA 処理 1 日後に強く現れ、対照に比べ 30% ほどの増殖抑制であった。また細胞倍加時間を 12 時間から 15 時間に延長し、その後、再び元の増殖能の回復があることから、SA は P-815 細胞の増殖を一過性に抑制したが、細胞死を誘導しなかったことが分る。

SA の酸解離定数 (pKa) は 4.76 である。そこで、培養条件の pH 7.4 より酸性側に変化させて同様に SA の影響を調べた。pH 7.0 では、P-815 細胞は SA により最大 50% 程度の増殖抑制を受けた。これらのことから SA は、分子型の優勢下で細胞増殖抑制が強いこと、おそらく分子型が作用の本体であることを示唆している。これらを

Fig.1 に示す。

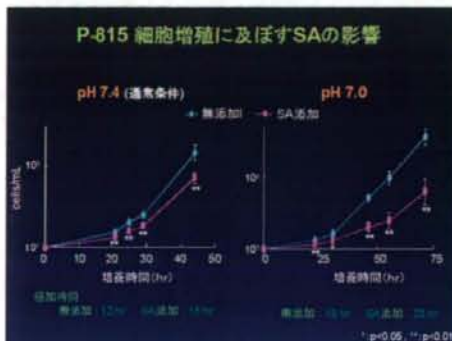


Fig. 1

#### 2. P-815 細胞増殖抑制作用は SA 分子自身によるもの

SA の代謝物としてムコン酸とクロトン酸がよく知られている。上で見た SA の P-815 細胞増殖抑制作用が、これらの代謝物によるものであるかどうかを、それらの物質の添加培養で同様に経時的な細胞数を調べた。Fig.2 から分かるように、SA と同濃度のムコン酸とクロトン酸を添加しても、SA 無添加の場合 (control) と同じで、P-815 細胞の増殖能は影響されなかった。

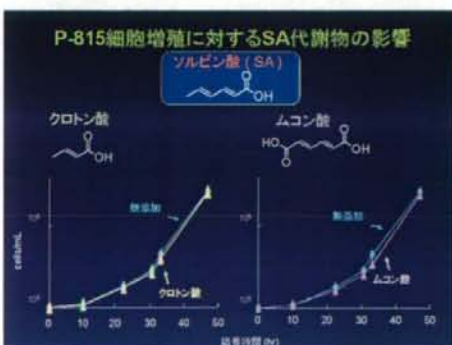


Fig.2

#### 3. SA は P-815 細胞の細胞周期を変動させる

##### (1) 細胞サイズ