

きた。

$$I_E = (I_A + I_B) - (I_A \times I_B / 100)$$

しかしながら、Fractional product method では、個々の化合物が独立して作用し、且つその反応が双曲線型に当てはまる場合にしか適用できないという制限がある。そこで、さらに有効な併用効果の解析法を模索し、薬剤の併用効果解析法として用いられてきた『Median effect analysis』を抗酸化食品成分併用効果の新規解析法として新たに提案した。

本法は、Chou ら³⁾が考案した方法であり、実験結果をもとに薬剤の反応型を推定し、反応型に応じた併用効果の解析を行うため、汎用性が極めて高い。さらに、本法により阻害割合に応じた CI (Combination Index) 値を算出することにより、併用効果を詳細に検討することが可能となる。平成 20、21 年度の研究では、「既存添加物名簿収載品目リスト」に記載されている天然物酸化防止剤の中で単一の成分からなる添加物を数種用い、DPPH 法及び WST-1 法により活性測定を行い、その結果を Median effect analysis により解析した。その結果、DPPH 法と WST-1 法では概ね一致した結果が得られ併用効果の判定が可能であった。さらに、Median effect analysis による反応型の検証により、酸化防止剤両者が排他的 (拮抗的) に反応していることが明らかになり、併用効果の解析に使用実績のある Fractional product method が適用困難であることが判明した。さらに Median effect analysis では濃度レベルに応じた判定も可能であり、本法の有用性が示唆された。

今年度は、さらに対象となる化合物を増やし、Median effect analysis の有用性を詳細に検証した。特に、今年度は酸化防止剤として重要な α -トコフェロールを中心とした併用効果を検討するとともに、昨年度までの研究で相殺効果を示す傾向が認められたエラグ酸の併用効果を詳細に検討した。さらに、DPPH ラジカルの経

時的消去挙動を観察することにより、相殺・相乗効果の原因因子の解明を試みた。

B. 研究方法

(1) 対象化合物

抗酸化物 (酸化防止剤) として、 α -トコフェロール、エラグ酸、カテキン、エピカテキン (EC)、エピガロカテキン (EGC)、エピガロカテキンガレート (EGCg)、ケンフェロール、ミリセチン、ケルセチン、ルチン、モリン、セサモール、フェルラ酸、没食子酸、アスコルビン酸を用いた。

(2) DPPH ラジカル消去活性測定法

Choi らの方法を一部変更して行った⁴⁾。試験管に試料溶液 200 μ L、100 mM Tris-HCl buffer (pH7.4) 800 μ L、0.20 mM DPPH エタノール溶液 1 mL を添加し、10 秒間激しく攪拌した後、暗所で常温にて 30 分間静置した。30 分後、反応溶液の 517 nm における吸光度 (A_s) を測定した。試料溶液の代わりにエタノールを添加した場合の吸光度をコントロール (A_c) とした。また、DPPH 溶液の代わりにエタノールを添加した場合の吸光度をブランクとした。コントロールの吸光度に対する、試料添加時の吸光度の減少の割合から阻害率 (%) を求めた (下式)。

$$\text{阻害率(\%)} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100$$

(3) 併用効果の判定

併用効果の判定は、以下の式 (Median effect equation) に基づく解析法である Median effect analysis により行った。解析法の詳細については平成 20 年度の厚生科研研究報告書に記載している。

$$fa/fu = (D/D_m)^m$$

本実験では、各酸化防止剤（単独使用）について DPPH 法による活性測定を行った後、2 種類の酸化防止剤を各々の IC₅₀ 濃度の比（モル比）に近い割合で混合して、再度測定を行った。得られた測定結果を基に Median effect plot を行い、Combination Index (CI) 値を算出した。なお本実験では、一連の解析 (Median effect plot の作成及び CI 値の算出) に、市販の解析ソフト (Biosoft 社 CalcuSyn ver. 2.0) を用いた。

(4) 経時的 DPPH ラジカル消去挙動の観察

キュベットに試料溶液 300 μ L、100 mM Tris-HCl buffer (pH7.4) 1.2 mL、0.20 mM DPPH エタノール溶液 1.5 mL を添加し、回転子で攪拌しながら 517 nm における吸光度を 30 分間測定した。なお、各試料溶液の濃度は、平衡状態における吸光度が 0.5 となる濃度に設定した。

C. 研究結果及び考察

まず、 α -トコフェロールとの併用効果を明らかにするために、14 種類の化合物（カテキン、エピカテキン (EC)、エピガロカテキン (EGC)、エピガロカテキンガレート (EGCg)、ケンフェロール、ミリセチン、ケルセチン、ルチン、モリン、セサモール、エラグ酸、フェルラ酸、没食子酸、アスコルビン酸) を用い、DPPH 法により測定を行い、Median effect analysis により併用効果を解析した。判定結果は、表 1 にまとめて示した。表に示したように、明らかな相乗効果が認められたのは、ルチン及びケルセチンとの 2 種類の組合せであった。アスコルビン酸に関しては、fa 値が小さい、すなわち添加濃度が低い場合には相加効果であったが、fa 値の増加に伴い僅かに相乗効果を示す傾向が認められた。ケンフェロール、セサモール及びモリンとの組合せでは、fa < 0.5 で相殺効果、0.5 < fa で相乗効果を示し、抗酸化物の濃度範囲により相互作用が大きく変化する傾向が認められた。以

上、相乗効果が認められた組合せは計 6 通りであり、その他 8 通りの組合せでは相加効果しか認められなかった。

α -トコフェロールとの相乗作用に関しては、アスコルビン酸をはじめとして、クロロゲン酸⁵⁾、ケルセチン⁶⁾、カテキン⁶⁾、カロテノイド類⁷⁾などで相乗効果を示すことが *in vitro* 試験の結果として報告されている。特に、 α -トコフェロールとアスコルビン酸との相乗効果に関しては、古くから生体内での抗酸化作用メカニズムの面から注目されている。すなわち、 α -トコフェロールは生体膜において抗酸化作用を発揮した後、 α -トコフェロキシラジカルに変換されるが、細胞外のアスコルビン酸によって再生される⁸⁾。この再生効果により、相乗効果が生じると考えられている。本実験では、カテキン類との相乗効果は確認できなかったが、ルチン、ケルセチン、アスコルビン酸等において一部相乗効果が確認されている。これら化合物は、 α -トコフェロールの再生作用を有している可能性があり、今後詳細な検討が必要と考えられた。

続いて、エラグ酸との併用効果を詳細に検討した。エラグ酸との併用では、13 種類の化合物（カテキン、エピカテキン (EC)、エピガロカテキン (EGC)、エピガロカテキンガレート (EGCg)、ケンフェロール、ミリセチン、ケルセチン、ルチン、モリン、セサモール、フェルラ酸、没食子酸、 α -トコフェロール) を用い、DPPH 法により測定を行い、Median effect analysis により併用効果を解析した。判定結果は、表 2 にまとめて示した。表に示したように、 α -トコフェロール、ケンフェロール (高 fa 側)、及びカテキン類 (EC, EGC, EGCg の高 fa 側) で相加効果が認められた以外は、いずれも相殺効果を示すことが判明した。なお、ケンフェロール及びカテキン類 (EC, EGC, EGCg) においても、fa 値が小さい、すなわち添加濃度が低い

場合には相殺効果を示した。また、相殺効果の程度は化合物によって異なり、特にルチン、モリン、フェルラ酸の3化合物では、CI値が2-4.5と極めて強い相殺効果を示すことが判明した(図1)。なお、相殺効果を示したその他化合物のCI値は1.1-1.5程度であった。

表1及び2に示したように、Median effect プロットにおける傾き(m)は、今回供試した組合せにおいては、いずれも $m_1 \approx m_2 \approx m_{1,2}$ となった。各化合物単独時の傾き (m_1 , m_2) が、併用時の傾き ($m_{1,2}$) とほぼ等しい結果となったことから、本実験における化合物の反応様式は、Median effect analysis のI型あるいはIII型に該当することが判明した。このことは、個々の抗酸化物が排他的に作用し、DPPH ラジカルを拮抗(競争)的に消去することを示唆している。この結果から、今回得られた併用効果に関して、個々の抗酸化物の DPPH ラジカル消去速度が大きく影響を及ぼしていると推察されたことから、今回供試した15化合物の DPPH ラジカル消去挙動を経時的に測定した。図2は、典型的な3種類のラジカル消去挙動を示している。 α -トコフェロール、アスコルビン酸、ケンフェロール、セサモールは反応速度が極めて速く、DPPH 溶液添加後速やかに紫色が退色した。一方、カテキン類4種はいずれも反応が遅く、反応開始後30分まで緩やかな吸光度の低下が認められた。エラグ酸を含む残りの7化合物は、両者の中間的な挙動を示した。すなわち、吸光度はDPPH 溶液添加後数分以内にかなり低下するものの、以降は緩やかな減少を示した。この結果と上述の Median effect analysis の判定結果をあわせて検討した。まず α -トコフェロールとの併用効果では、相乗効果が認められた6種化合物の内3種類が α -トコフェロールとラジカル消去挙動が類似したものであった。エラグ酸との併用効果に関しては、相殺効果を示した化合物は、図3に示したようなエラグ酸と反応挙

動が類似した化合物であった。反応速度が速い α -トコフェロール、反応が遅いカテキン類(EC, EGC, EGCg)では相加効果を示す傾向が認められた。以上の結果、Median effect analysis で相乗あるいは相殺効果と判定された組合せでは、DPPH ラジカル消去挙動が類似した化合物の組合せが多いことが判明し、個々の抗酸化物のラジカル消去速度が併用効果に大きく関与していることが示唆された。

D. 結論

昨年度に引き続き、薬剤の併用効果判定に汎用されている Median effect analysis の適用性を検討した。 α -トコフェロールと14種類の抗酸化物の併用効果を解析した結果、5種類の化合物で相乗効果が認められたが、その他は相加効果しか得られなかった。次に、エラグ酸と14種類の抗酸化物の併用効果を解析した結果、8通りの組合せで相殺効果が認められた。続いて、個々の化合物の DPPH ラジカル消去挙動を経時的に測定し、Median effect analysis の判定結果とあわせて考察した結果、ラジカル消去挙動の類似した化合物間で相乗あるいは相殺効果が生じる可能性が高いこと、すなわちラジカル消去反応の速度論的類似性が相乗・相殺効果を生じる一因となっていることが判明した。

相乗・相殺効果のメカニズムに関しては不明な点が多く、各化合物の構造要因も含めて今後詳細な検討が必要と考えられるが、Median effect analysis では、その効果を簡便に判定できる点で有用性は高いと考えられる。抗酸化物の添加濃度に応じた解析が可能である点も利点である。今後、さらに検討を重ね、本法を抗酸化物・酸化防止剤の併用効果解析法として確立していくことが望まれる。

E. 研究発表

(1) 論文発表

1. 石川洋哉、松本清、受田浩之 島村智子、松藤寛、山崎壮、食品の抗酸化能評価法、FFI ジャーナル、215(1), 5-16, 2010
2. 石川洋哉、抗酸化食品成分の成分間相互作用の解析 ～相乗・相殺効果をどのように判定するか～、フードリサーチ 9月号、50-53, 2010

(2) 学会発表

なし

参考文献

- 1) J. L. Webb *Enzyme and Metabolic Inhibitors*, Vol 1, pp 55-79, Academic press, New York (1963).
- 2) J. Shi et al., *J. Food Comp. Anal.*, **20**, 603-608 (2007).
- 3) T. C. Chou and P. Talalay *Adv. Enzyme Regul.*, **22**, 27-55(1984)
- 4) H-S. Choi et al., *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 4156-4161 (2000).
- 5) W. L. S. Sim, M. Y. Han, and D. Huang, *J. Agric Food Chem.*, **57**, 3409-3414 (2009).
- 6) P. Pedrielli, and L. H. Skibsted, *J. Agric Food Chem.*, **50**, 7138-7144 (2002).
- 7) M. T. Schroeder, E. M. Becker, and L. H. Skibsted, *J. Agric Food Chem.*, **54**, 3445-3453 (2009).
- 8) 山内 亮, FFI ジャーナル, 215, 17-23 (2010).

表1 α -トコフェロールとの併用効果 (判定結果のまとめ)

併用物質	添加割合 (トコフェロールを1)	Median effect		効果判定
		plot	傾き (m^*)	
カテキン	0.24	$m_1 \approx m_2 \approx m_{1,2}$		相加
EC	0.17	$m_1 \approx m_2 \approx m_{1,2}$		相加
EGC	0.2	$m_1 \approx m_2 \approx m_{1,2}$		相加
EGCg	0.2	$m_1 \approx m_2 \approx m_{1,2}$		相加
ケンフェロール	0.7	$m_1 \approx m_2 \approx m_{1,2}$		相殺 ($fa < 0.5$) 相乗 ($0.5 < fa$)
ミリセチン	0.24	$m_1 \approx m_2 \approx m_{1,2}$		相加
ケルセチン	0.2	$m_1 \approx m_2 \approx m_{1,2}$		相乗
ルチン	0.6	$m_1 \approx m_2 \approx m_{1,2}$		相乗
セサモール	0.32	$m_1 \approx m_2 \approx m_{1,2}$		相殺 ($fa < 0.5$) 相乗 ($0.5 < fa$)
モリン	0.74	$m_1 \approx m_2 \approx m_{1,2}$		相殺 ($fa < 0.5$) 相乗 ($0.5 < fa$)
エラグ酸	0.17	$m_1 \approx m_2 \approx m_{1,2}$		相加
フェルラ酸	0.6	$m_1 \approx m_2 \approx m_{1,2}$		相加
没食子酸	0.15	$m_1 \approx m_2 \approx m_{1,2}$		相加
アスコルビン酸	0.5	$m_1 \approx m_2 \approx m_{1,2}$		相加 ($fa < 0.4$) 相乗 ($0.4 < fa$)

* m_1 : α -トコフェロール (単独), m_2 : 併用物質 (単独), $m_{1,2}$: 2成分併用

表2 エラグ酸との併用効果 (判定結果のまとめ)

併用物質	添加割合 (エラグ酸を1)	Median effect plot 傾き(m*)	効果判定
カテキン	1.5	$m_1 \approx m_2 \approx m_{1,2}$	相殺
EC	1	$m_1 \approx m_2 \approx m_{1,2}$	相殺 (fa<0.6) 相加 (0.6<fa)
EGC	1	$m_1 \approx m_2 \approx m_{1,2}$	相殺 (fa<0.6) 相加 (0.6<fa)
EGCg	1	$m_1 \approx m_2 \approx m_{1,2}$	相殺 (fa<0.6) 相加 (0.6<fa)
ケンフェロール	0.25	$m_1 \approx m_2 \approx m_{1,2}$	相殺 (fa<0.6) 相加 (0.6<fa)
ミリセチン	4	$m_1 \approx m_2 \approx m_{1,2}$	相殺
ケルセチン	1	$m_1 \approx m_2 \approx m_{1,2}$	相殺
ルチン	1.25	$m_1 \approx m_2 \approx m_{1,2}$	相殺
セサモール	1.6	$m_1 \approx m_2 \approx m_{1,2}$	相殺
モリン	1	$m_1 \approx m_2 \approx m_{1,2}$	相殺
フェルラ酸	1.8	$m_1 \approx m_2 \approx m_{1,2}$	相殺
没食子酸	1	$m_1 \approx m_2 \approx m_{1,2}$	相殺
α -トコフェロール	5.9	$m_1 \approx m_2 \approx m_{1,2}$	相加

* m_1 : エラグ酸 (単独) , m_2 : 併用物質 (単独) , $m_{1,2}$: 2成分併用

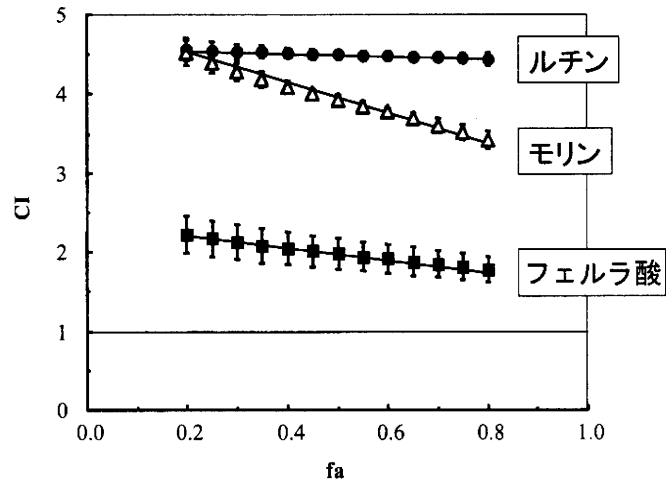


図1 エラグ酸との併用効果 (CIプロット)

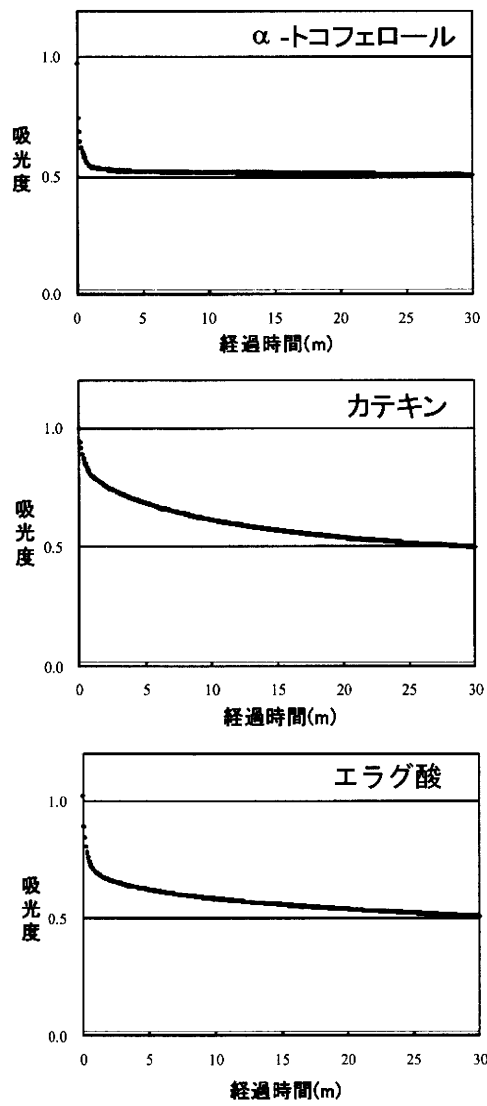


図2 DPPH ラジカル消去反応の経時変化

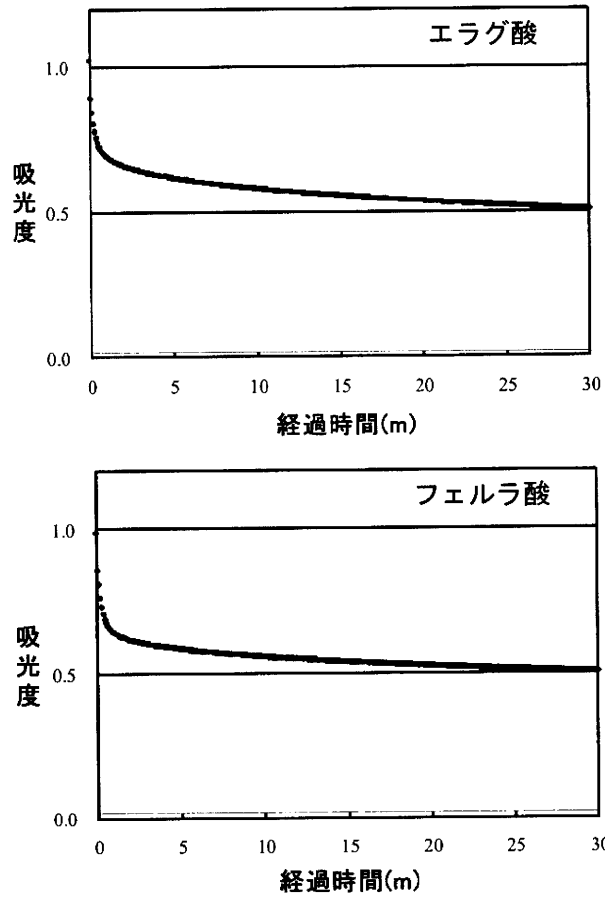


図3 エラグ酸とフェルラ酸の DPPH ラジカル消去挙動

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）
既存添加物の有効性と品質を確保するための規格試験法の開発
平成 22 年度分担研究報告書
天然酸化防止剤の品質劣化及び過剰使用の有害影響に関する研究

研究分担者 松藤 寛 日本大学生物資源科学部 准教授

研究要旨

天然酸化防止剤であるローズマリー抽出物の加熱処理により顕著に生成する化合物 5 つ (A~E) のうち、化合物 A はデヒドロロスマリキノン、化合物 C はデヒドロロスマリパラキノン、化合物 E はデヒドロネオクリプトタンシノンであることが判明した。化合物 C はこれまでに報告例のない新規化合物であった。化合物 A はヒトリンパ芽球細胞株 TK6 を用いた遺伝毒性試験において、0~2 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で濃度依存的に小核誘発を示し、遺伝毒性を示した。一方、化合物 C と E は 20 $\mu\text{g/ml}$ でも遺伝毒性を示さなかった。15 mg/ml のローズマリー抽出物を 29 時間加熱 (95 $^{\circ}\text{C}$) した試料中には 3.6% の化合物 A が存在し、観察された遺伝毒性は化合物 A の生成による寄与が大きいと推察された。コーン油中にローズマリー抽出物を 500, 5000, 15000 ppm 添加し、150 $^{\circ}\text{C}$ で加熱したところ、500 ppm では 2 時間加熱しても化合物 A の生成は認められなかったが、過剰量である 5000, 15000 ppm の添加では加熱 30 分後から化合物 A が検出され、加熱時間の増加に伴い、その生成量は増大した。一方、ブドウ種子抽出物を加熱処理し、生成する分解物の特定化と加熱分解物の遺伝毒性についても検討した。本研究で使用したブドウ種子抽出物は、バニリン塩酸法により、その含有成分のほぼ 100% がフラバノール類であり、うち 92% はプロアントシアニジン類、残りはカテキン類と見積もられた。10 mg/ml の試料溶液を 95 $^{\circ}\text{C}$ で加熱したところ、時間と共に、プロアントシアニジン類、カテキン類のピークは減少し、それに伴い、新たないくつかのピークが検出された。これらの一部は没食子酸、プロトカテキ酸、エピカテキンガラートであった。未処理ブドウ種子抽出物並びにその加熱分解物の遺伝毒性を検討したところ、いずれの試料も遺伝毒性は示さなかった。

A. 研究目的

天然酸化防止剤の過剰使用や劣化による有害物質生成の可能性を調べると共に、有害物質生成を防ぐための成分規格、使用基準、適正使用に資する基礎的情報を得ることは、食品添加物としての天然酸化防止剤の安全性のみならず、天然酸化防止剤を食品として利用するに当たっても極めて有益となる。また、有害物質の特定化は、その食品のハザードマーカースとなり、ハザード特性を解析する上で重要となる。

本研究では、過剰濃度で天然酸化防止剤を強

制的に酸化劣化させ、一次スクリーニングとして有用なヒトリンパ芽球細胞株 TK6 による *in vitro* 遺伝毒性を用いて有害物質生成の可能性について検討した。

なお、化学物質の安全性評価 (リスク評価) は、ハザード評価 (有害性) と摂取量の両方によってなされ、ハザード評価は一般毒性試験や特殊毒性試験によって評価される。言い換えると、これらの評価を踏まえた上で披験物質が有害物質かどうか決定される。また、遺伝毒性物質も *in vitro* 試験で陽性を示した物質は *in*

vivo 試験で確認され、さらに発ガン試験等の特殊毒性試験により評価されなければならないが、本研究ではその可能性を見出すことを目的とすることから、昨年度同様、遺伝毒性物質という文言を使用することとした。

昨年度までの検討から、天然酸化防止剤の一つであるローズマリー抽出物を過剰濃度で加熱すると、ローズマリー抽出物そのものでは認められなかった小核誘発性が、熱分解物では認められ、何らかの遺伝毒性物質が生成している可能性が示唆された。また、その遺伝毒性物質は、ヘキササン・酢酸エチル・1-ブタノールによる順次液液分配して精製すると、ヘキササン層へ移行する成分であることが判明した (図 1)。そこで、今年度は遺伝毒性物質の特定化と実サンプルでの生成の可能性について検討した。また、他の酸化防止剤としてブドウ種子抽出物について、同様の試験を試みた。

B. 実験方法

(1) 試料調製

ローズマリー抽出物は DMSO、流動パラフィンまたはコーン油に溶解した (15 mg/ml または 15000 ppm)。ブドウ種子抽出物は DMSO に 10 mg/ml となるように溶解した。

(2) 熱分解

スクリーキャップ付きの試験管に試料(10 mL)を入れ、ヒートブロック (95°C : DMSO 溶解試料、150 °C : 流動パラフィン、コーン油溶解試料) で加熱した。これらを適宜希釈後、経時的に HPLC に供した。流動パラフィンまたはコーン油に溶解した試料は、同量のメタノールを加え、遠心(2000 rpm, 5 分)後、メタノール層を採取し、これを乾固後、HPLC 移動相に溶解し、分析用試料とした。

(3) ブドウ種子抽出物の総フラバノール、プ

ロシアニジン、カテキン類の定量

既存の方法⁹⁾に従い、試料中の総フラバノール量はバニリン塩酸法、カテキン類は HPLC 法により求め、総フラバノール量からカテキン量を減じることにより、プロアントシアニジン量を算出した。ただし、カテキン類の HPLC 条件は、熱分解物の検出を行うため、以下に記したように変更した。また、プロアントシアニジンは、重合度によって分離しうる順相蛍光 HPLC²⁾により分析した。

(4) HPLC 分析

ローズマリー抽出物の HPLC 条件 : カラム : Waters XBridge C18 (4.6×150 mm, 5 μm)、溶媒 : (A) 0.1%ギ酸、(B) 0.1%ギ酸含有アセトニトリル、30%B (0 分)→80% B (20 分)→80% B (10 分)、流速 : 1.0 mL/min、検出波長 : 285 nm、温度 : 40°C。

ブドウ種子抽出物の順相蛍光 HPLC 条件 : カラム : Develosil 100Diol-5 (4.6×150 mm, 5 μm)、溶媒 : (A) 2%酢酸含有アセトニトリル、(B) 2%酢酸含有 95%メタノール、7% B (0 分)→38% B (60 分)→100% B (10 分)、流速 : 1.0 mL/min、検出 : 励起波長 230 nm、検出波長 321 nm。

ブドウ種子抽出物の逆相 HPLC 分析 : カラム : Waters XBridge C18 (4.6×150 mm, 5 μm)、溶媒 : (A) 0.1%ギ酸、(B) 0.1%ギ酸含有メタノール、5% B (0 分)→30% B (30 分)→100% B (20 分)→100% B (5 分)、流速 : 1.0 mL/min、検出波長 : 280, 250 nm、温度 : 40°C。

(5) TK 遺伝毒性試験

TK 遺伝毒性試験は昨年同様、既報³⁾に従い行った。すなわち、ヒトリンパ芽球細胞 TK6 に種々の濃度の試料を加えて 37°C で 4 時間処理した。新鮮な培地 (RPMI1640) で洗浄後、37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。処理直後

から3日間の生細胞数をカウントし、無添加区と比較することにより細胞増殖率を求めた(細胞毒性として評価)。また処理直後から48時間後に小核が出現した細胞数を蛍光顕微鏡下でカウントすることにより小核誘発頻度を、処理直後から72時間後にトリフルオロチミジン(Thymidine)を添加し薬剤耐性を獲得したtk遺伝子変異体を検出することにより遺伝子突然変異頻度を評価した。

遺伝毒性の評価は、濃度依存性があり、試料無添加区に対して2倍以上の小核誘発頻度あるいは遺伝子突然変異頻度を示したとき、遺伝毒性陽性と判定した。

(5) 熱分解物の精製および構造決定

加熱処理したローズマリー抽出物からの熱分解物は、ヘキサンで抽出後、分取HPLCまたはTLCを繰り返し行い単離した。化合物は、質量分析(ESI-MS/MS)並びに核磁気共鳴(NMR)スペクトルにより構造を決定した。

分取HPLC条件: カラム: Inertsil ODS-3 JET (10×50 mm, GL Sciences Inc.)またはXBridge C18 (10×250 mm, Waters)、移動相: 0.1%ギ酸含有75%メタノール、流速: 3 ml/min、波長: 285 nm、温度: 40°C。

TLC条件: 固定相: MERCK Silica gel 60 (20×20 cm)、展開溶媒: ヘキサン:酢酸エチル=9:1、ベンゼン:アセトン=20:1、ヘキサン:クロロホルム=4:1。

C. 研究結果及び考察

(1) ローズマリー抽出物の熱分解により生成する遺伝毒性物質の特定化

1-1 精製画分の遺伝毒性

加熱処理したローズマリー抽出物のヘキサン抽出画分(Fr. H)を分取HPLCにより、Fr.H-1~Fr.H-6に分画し、その遺伝毒性を調べた(図2)。結果として、Fr.H-1は主として

クロマトグラム上の13~17分に溶出する成分、Fr.H-2はピークAを、Fr.H-3はピークBを、Fr.H-4はピークCを、Fr.H-5はピークDを、Fr.H-6はピークEを主成分として含んでいた。これらの遺伝毒性を調べたところ、Fr.H-1、Fr.H-2、Fr.H-5において、濃度依存的な細胞増殖の抑制と小核誘発が認められた。中でも、Fr.H-2は5 µg/mlと低濃度で強い小核誘発を示した。

1-2 熱分解物の精製と構造決定

15 mg/mlに調製したローズマリー抽出物150 mlを95°Cで約30時間加熱後、ヘキサンで抽出し(740 mg)、分取HPLCでFr. H-2を38 mg得た。これをリサイクル分取HPLCに供することにより、化合物Aを10 mg得た。

化合物AはUVスペクトルにおいて467 nmに吸収極大を示した(CHCl₃, log ε 3.71)。また、ESI-MS(+)スペクトルにおいて分子関連イオンピーク m/z 281 [M+H]⁺を示し、分子量は280と推定された。ローズマリー抽出物の主成分であるカルノシン酸とNMRスペクトルを比較、解析した(表1)。これらの結果、化合物Aは既存の化合物であるデヒドロロスマリキノンであると考えられた。¹H-NMRの化学シフト値の文献値⁴⁻⁶⁾との一致により、本化合物Aはデヒドロロスマリキノンであると決定した(図3)。

その他の化合物においては、本精製ではNMRに供する量が得られず、また化合物Bや化合物Dは精製中に分解した。移動相に水系を使用すると、すなわち含水アルコールや含水アセトニトリルを使用すると化合物Bや化合物Dは分解しやすいことが判明した(データは示していない)。そこで、TLCを用いて精製することとした。

ローズマリー抽出物10 gを150 mlのDMSOに溶解し、120°Cで14時間加熱した。

本試料の分解物ピークは前試料と概ね一致した。これをヘキサンで抽出し (2.51 g)、TLC (ヘキサン：酢酸エチル=9:1) に供したところ、赤色の Fr.H-T-1 (Rf=0.38, 93 mg)、山吹色の Fr.H-T-2 (Rf=0.45, 43 mg)、黄色の Fr.H-T-3 (Rf=0.61, 35 mg)、山吹色の Fr.H-T-4 (Rf=0.69, 67 mg) のバンドが観察された。Fr.H-T-1 は A を主に含むことから以後の精製を行わず、B を主に含む Fr.H-T-2、C を含む Fr.H-T-3、E を主に含む Fr.H-T-4 をさらに TLC で精製した。結果として、化合物 C を 6.1 mg、化合物 E を 9.2 mg 単離することができた。

化合物 E は UV スペクトルにおいて、364 と 284 nm に吸収極大を示した (CHCl₃, log ε 3.77 と 3.99)。また、ESI-MS(+) スペクトルにおいて分子関連イオンピーク m/z 299 [M+H]⁺ を示し、分子量は 298 と推定された。NMR 解析 (表 1) 並びに ¹H-NMR の化学シフト値の文献値^{7,8)}との一致から、化合物 E は既存のデオキシネオクリプトタンシノンであると決定した (図 3)。

化合物 C は UV スペクトルにおいて 415 nm に吸収極大を示した (CHCl₃, log ε 3.99)。また、ESI-MS(+) スペクトルにおいて分子関連イオンピーク m/z 297 [M+H]⁺ を示し、分子量は 296 と推定された。NMR スペクトルを解析、並びに化合物 A と E との比較 (表 1) により、化合物 C は化合物 E のデヒドロ酸化体であった。本化合物は、これまでに報告例のない化合物であり、デヒドロスマリパラキノンと命名した (図 3)。

1-3 単離した化合物の遺伝毒性

化合物 A、C、E を遺伝毒性試験に供した結果を図 3 に示す。化合物 A のデヒドロスマリキノンは 0~2 μg/ml の範囲で濃度依存的に細胞増殖の抑制、並びに小核誘発を示した。図

2 において、A を含む Fr.H-2 が 0~5 μg/ml の範囲で遺伝毒性を示したことから、精製された化合物 A がより強い遺伝毒性を示したことは妥当であると考えられた。一方、化合物 C (デヒドロスマリパラキノン) と E (デオキシネオクリプトタンシノン) は、図 2 の Fr.H-4 と Fr.H-6 と同様、20 mg/ml においても遺伝毒性を示さなかった。

構造を比較すると、強力な遺伝毒性を示したデヒドロスマリキノンはオルトキノン構造、遺伝毒性を示さなかったデヒドロスマリパラキノンとデオキシネオクリプトタンシノンはパラキノン構造であることから、遺伝毒性の発現はオルトキノン構造によるものではないかと推察された。

一方、デヒドロスマリキノンと類似した構造で、オルトキノン構造を持つ市販品のタンシノン IIA は、デヒドロスマリキノンのような遺伝毒性は示さなかった。タンシノン IIA はデヒドロスマリキノンのイソプロピル基部分が、フラン環状構造であることより、イソプロピル基も遺伝毒性発現に重要であると考えられた。今後、類似化合物等入手し、遺伝毒性発現部位を明らかにすることが必要であろう。

単離したデヒドロスマリキノンをを用いて検量線を作成し、加熱処理したローズマリー抽出物中の含量を調べたところ、95°C で 29 時間加熱した試料中にデヒドロスマリキノンは 3.6% 存在した。同一条件下での遺伝毒性試験結果ではないため、単純な比較はできないが、加熱処理したローズマリー抽出物の小核誘発が認められる 25 μg/ml 中のデヒドロスマリキノンの濃度は 0.9 μg/ml であり、その遺伝毒性の多くは化合物 A の生成によって引き起こされていると推察された。

1-4 流動パラフィン及びコーン油中での熱分解について

流動パラフィンにローズマリー抽出物を添加し、150℃で加熱した。一方、油を直接 HPLC に注入することを避けるため、分解物を抽出しうる溶媒についても検討した。いくつかの溶媒を検討した結果、メタノールで油との分離が認められ、分解物も抽出できた(結果は示さない)。ただ、後述するように回収率は50%前後であることから、抽出溶媒については、今後さらなる検討が必要である。

流動パラフィン及びコーン油にローズマリー抽出物を 500 ppm 添加した場合、2 時間加熱してもデヒドロスマリキノン は 検出されなかったが、5000 や 15000 ppm の過剰量のローズマリー抽出物を添加し加熱すると、デヒドロスマリキノン は 顕著に生成していることが確認された(図 4)。

DMSO に溶解したデヒドロスマリキノンのピーク面積を 100%として、流動パラフィン及びコーン油に溶解し、メタノールで抽出したとき、流動パラフィンからは 57.5%、コーン油からは 42.8%の回収率であった。

ローズマリー抽出物は食用油の酸化防止剤として使用されることが多く、またローズマリーを用いた健康食品やローズマリーエキス・オイルは数多く市販されている。一方、食品添加物としてのローズマリー抽出物は、使用基準は設けられていない⁹⁾。一般的な使用量については不明であるが、酒井は 100~200 ppm の添加範囲でトコフェロールや BHA よりも強い抗酸化性を示すこと¹⁰⁾、また城戸は自社製品(RM21Bbase)が非常に少ない添加量(50~100 ppm)で油脂の日持ちを向上させることを報告している¹¹⁾。従って、一般的な使用量は数百 ppm 程度と予想される。そのため、通常の使用方法ではデヒドロスマリキノン は 生成しないか、してもかなり微量と考えられた。一方、

健康食品については、その含有量は不明である。ローズマリー抽出物そのものの加熱や過剰に添加した食用油など誤った使用をすると、遺伝毒性物質デヒドロスマリキノンが生成することが示唆された。今後、デヒドロスマリキノンが S9 存在下で陽性を示すかどうか、また *in vivo* 遺伝毒性試験において陽性を示すかどうか検討する必要がある。

(2) ブドウ種子抽出物の熱処理と遺伝毒性について

2-1 ブドウ種子抽出物中の成分について

バニリン塩酸法により試料 1 g 中の総フラバノール量は 1001.3±4.3 mg となり、ほぼ 100%がフラバノール類であると考えられた。また、HPLC 分析の結果、エピカテキン(EC; 4.1%)、カテキン(CT; 3.2%)、エピガロカテキンガレート(EGCg; 0.35%)が検出され(図 5)、結果としてカテキン類は 7.6%、プロアントシアニジン類は 92.4%と見積もられた。Diol カラムを用いたプロアントシアニジンの分析は Khanal ら²⁾により報告されており、重合度によって成分が分離する。図 6 にクロマトグラムを示す。標準品がなく、定量できなかったが、カテキン類などの単量体、そして二量体からポリマー(十量体以上)のプロアントシアニジンが検出された。

2-2 加熱処理したブドウ種子抽出物の遺伝毒性

95℃で 120 時間まで加熱したときの HPLC クロマトグラムを図 7 に示す。加熱により、プロアントシアニジン類のピークは減少し、48 時間で消失した。また単量体(DP1)のピーク検出も小さくなった(図 7 左)。一方、逆相 HPLC を用いて、分解物の生成挙動を調べたところ、数多くのピークが新たに生成、あるいは増加した(図 7 右)。その一部は、没食子酸、プロト

カテキ酸、エピカテキンガラートであった。その他、40分前後に重合物と推定されるブロードなピークが検出され、加熱時間と共に増加したが、これについては不明である。

未処理及び加熱処理したブドウ種子抽出物の遺伝毒性を図8及び図9に示す。未処理ブドウ種子抽出物は0~100 µg/mlの範囲で細胞増殖を抑制せず、小核誘発並びに遺伝子突然変異を引き起こさなかった。また、種々の時間で加熱処理したブドウ種子抽出物の遺伝毒性を、最大の100 µg/mlと比較したところ、いずれの試料も未処理と変わらず、遺伝毒性を示さなかった。

D. 結論

本研究により、過剰濃度のローズマリー抽出物を加熱すると、デヒドロスマリキノン、デヒドロスマリパラキノン、デオキシネオクリプトタンシノンが生成することが判明した。これらの中で、デヒドロスマリキノンは強い遺伝毒性を示した。また、高濃度のローズマリー抽出物の加熱や過剰に添加した食用油を熱するなど誤った使用をすると、デヒドロスマリキノンが生成することが示唆された。ローズマリーは古くから香辛料として、また食品の保存に使用されており、また最近では様々な優れた生理機能が見出され、健康食品素材としてとても注目されている。そのため、その有効利用がととても期待される。しかし誤った使用も考えられることから、今後デヒドロスマリキノンをローズマリー含有食品のハザードマーカーとして分析することにより、ローズマリー含有食品の安全性確保に貢献できると考えられた。

一方、ブドウ種子抽出物そのものは遺伝毒性を示さず、また加熱処理したのもも遺伝毒性を示さないことが判明した。従って、高濃度での加熱による有害物質生成という観点からは、その可能性が低い試料と考えられた。昨年度、報

告したが、高濃度のカテキン類は培地中で過酸化水素を発生し、結果として *in vitro* 遺伝毒性は陽性を示す。また、主成分が完全に分解した熱分解物も同様に遺伝毒性を示すが、これも培地中で過酸化水素が発生していることに起因していることを明らかにしている。カテキン類が重合したプロアントシアニジンでは、同様の結果が得られなかったことから判断すると、熱による分解過程はカテキン類とプロアントシアニジン類では異なることが示唆された。

なお、本研究は天然酸化防止剤の有害性を調べるためではなく、それが意図しない使用の際のハザード特性の解析、メカニズムの解析を目的とすることを付記する。

E. 研究発表

- (1) 発表論文
なし
- (2) 学会発表

松藤寛、丸山千明、高橋明日香、千野誠、山形一雄、山崎壮：高濃度ローズマリー抽出物の加熱により生成する分解物と遺伝毒性、日本食品化学学会第17回総会・学術大会、2011年5月 [発表予定]

参考文献

- 1) 「第4版 既存添加物自主規格」日本食品添加物協会 (2008).
- 2) R.C. Khanal et al., J. Food Sci., 74, H174-H182 (2009).
- 3) 本間ら、Environ. Mutagen. Res., 18, 107-111 (1996).
- 4) X.C. Weng et al., J. Agric. Food Chem., 40, 1331-1336 (1992).
- 5) G.J. Wang et al., J. Food Lipids, 6, 173-179 (1999).
- 6) T. Masuda et al., J. Sci. Food Agric., 84, 1421-1427 (2004).

- 7) T. Hayashi et al., J. Chem. Soc. Chem. Commun., 5, 299 (1970)
- 8) Y. Ikeshiro et al., Phytochemistry, 30, 2791-2792 (1991).
- 9) 「既存添加物名簿収載品目リスト注解書」 (1999).
- 10) 酒井、月刊フードケミカル, 10, 72-81 (2001).
- 11) 城戸、月刊フードケミカル, 3, 36-39 (2003).

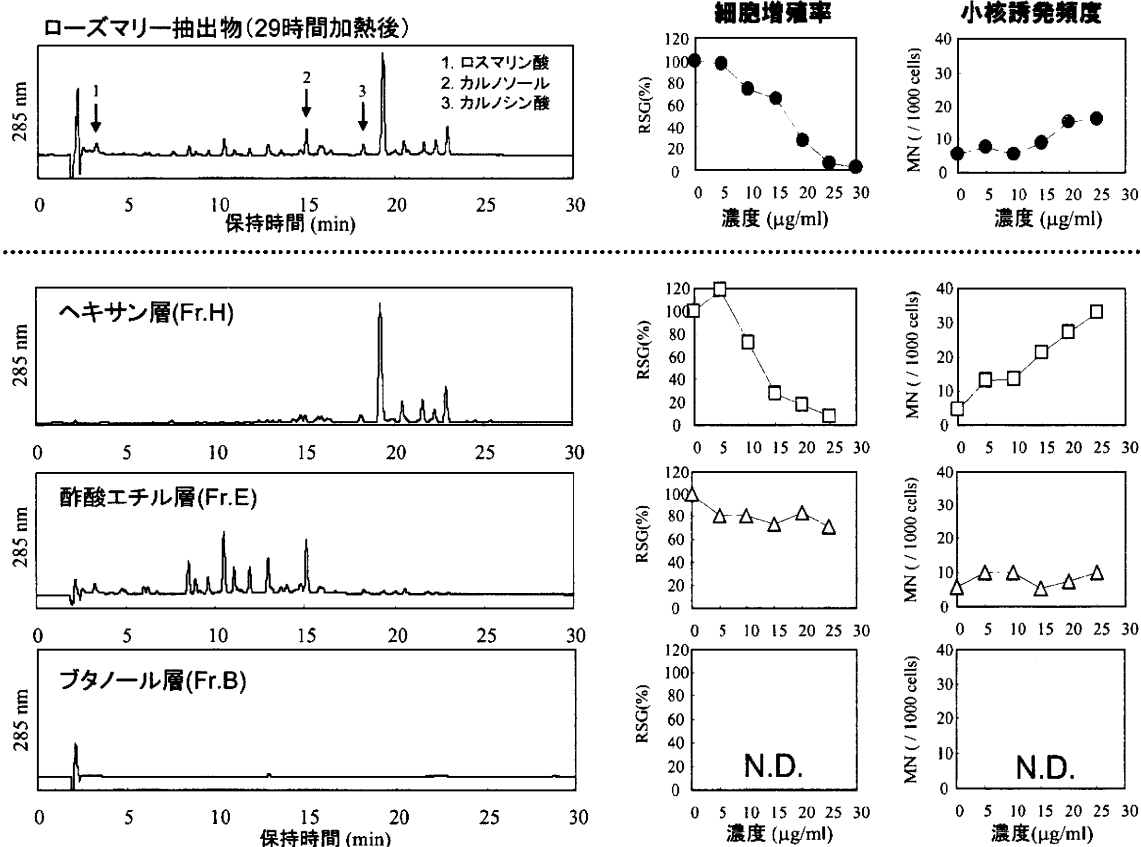


図1 加熱したローズマリー抽出物の各画分のクロマトグラムと遺伝毒性

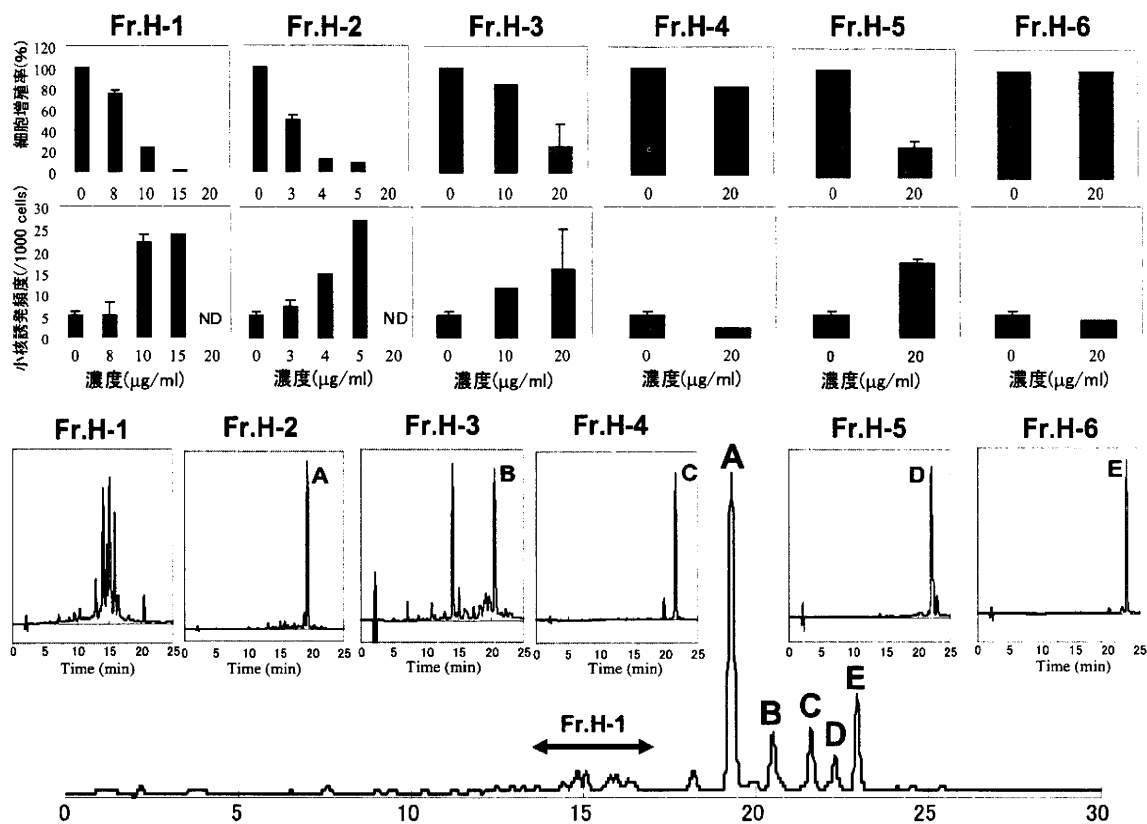


図2 Fr.Hからの粗精製画分(Fr.H-1~Fr.H-6)のクロマトグラムと遺伝毒性

表1 カルノシン酸と単離された化合物A, C, Eの¹Hおよび¹³C-NMRデータ

	カルノシン酸		化合物A		化合物C		化合物E	
	δ _C	δ _H (mult, J in Hz)	δ _C	δ _H (mult, J in Hz)	δ _C	δ _H (mult, J in Hz)	δ _C	δ _H (mult, J in Hz)
1	34.36	1.24 (dt, 3.1, 13.8), 3.30 (brd, 13.8)	124.7	7.86(brd, 10)	124.6	8.02 (brd, 10)	29.9	3.26 (t, 6.5)
2	20.3	1.61 (m), 1.76 (m)	134.5	6.34 (dt, 4.6, 10)	133.9	6.35 (dt, 4.6, 10)	19.1	1.84 (m)
3	41.8	1.32 (dt, 4.2, 13.8), 1.49 (brd, 13.8)	38.0	2.28 (dd, 1.6, 4.6)	37.7	2.30 (dd, 1.5, 4.6)	37.7	1.67 (m)
4	34.39		34.1		34.4		34.8	
5	53.9	1.58 (dd, 1.5, 13.0)	148.0		150.9		152.5	
6	18.8	1.88(m), 2.36 (m)	130.6	7.50 (d, 7.7)	130.2	7.66 (d, 8.4)	133.4	7.74 (d, 8.4)
7	31.4	2.82 (m)	129.2	7.12 (d, 7.7)	126.7	8.03 (d, 8.4)	125.0	8.00 (d, 8.4)
8	128.9		134.3		132.5		132.7	
9	122.0		124.7		122.5		126.4	
10	48.7		137.3		134.2		140.7	
11	142.1		183.3		183.8		183.4	
12	141.4		181.6		153.3	(12-OH) 7.76 (s)	153.2	(12-OH) 7.75 (s)
13	133.8		145.0		126.6		126.1	
14	119.4	6.57 (s)	140.0	7.09 (s)	184.5		184.7	
15	27.1	3.18 (sept, 6.9)	26.9	3.03 (sept, 6.9)	24.5	3.37 (sept, 6.9)	24.4	3.36 (sept, 6.9)
16	22.1	1.21 (d, 6.9)	21.5	1.17 (d, 6.9)	19.8	1.29 (d, 6.9)	19.8	1.29 (d, 6.9)
17	22.5	1.20 (d, 6.9)	21.5	1.17 (d, 6.9)	19.8	1.29 (d, 6.9)	19.8	1.29 (d, 6.9)
18	21.7	0.90 (s)	28.4	1.29 (s)	28.2	1.31 (s)	31.8	1.32 (s)
19	32.6	1.01 (s)	28.4	1.29 (s)	28.2	1.31 (s)	31.8	1.32 (s)
20	182.8		---		---		---	

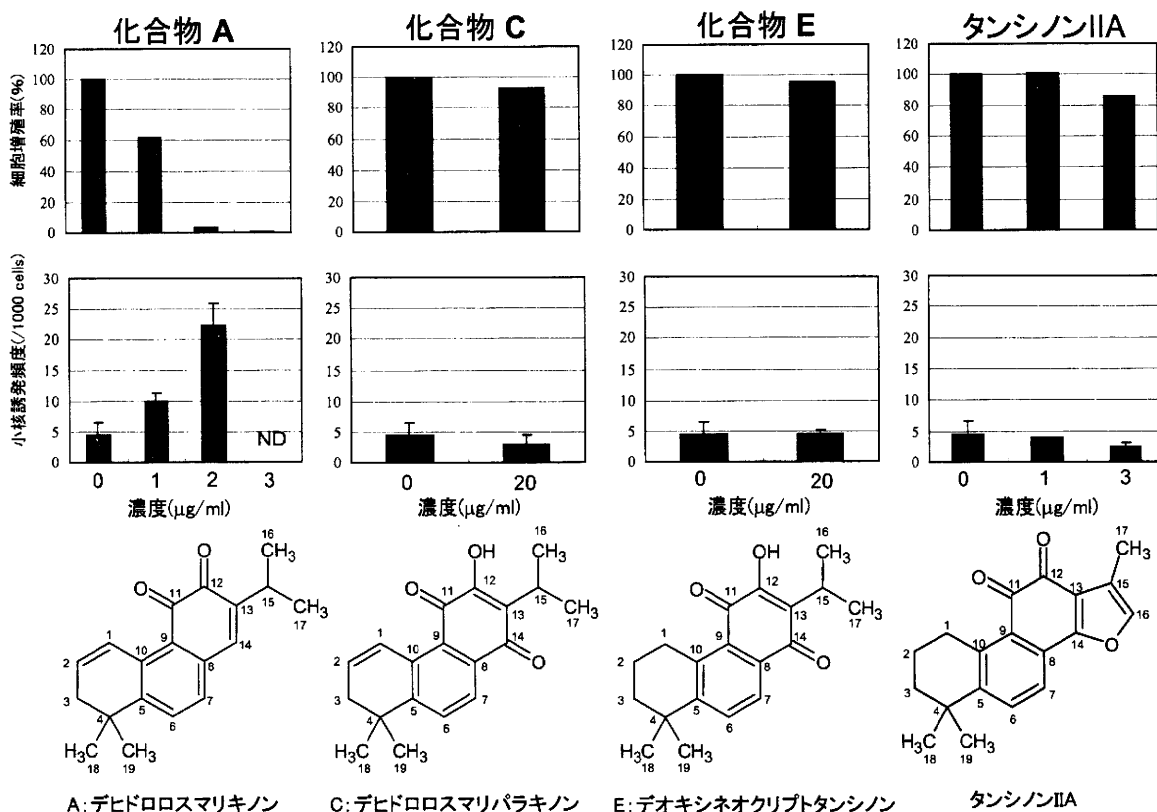
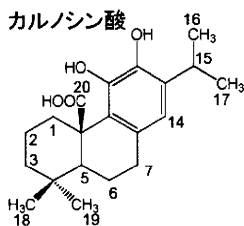


図3 単離された化合物A, C, Eおよび類似化合物の化学構造と遺伝毒性

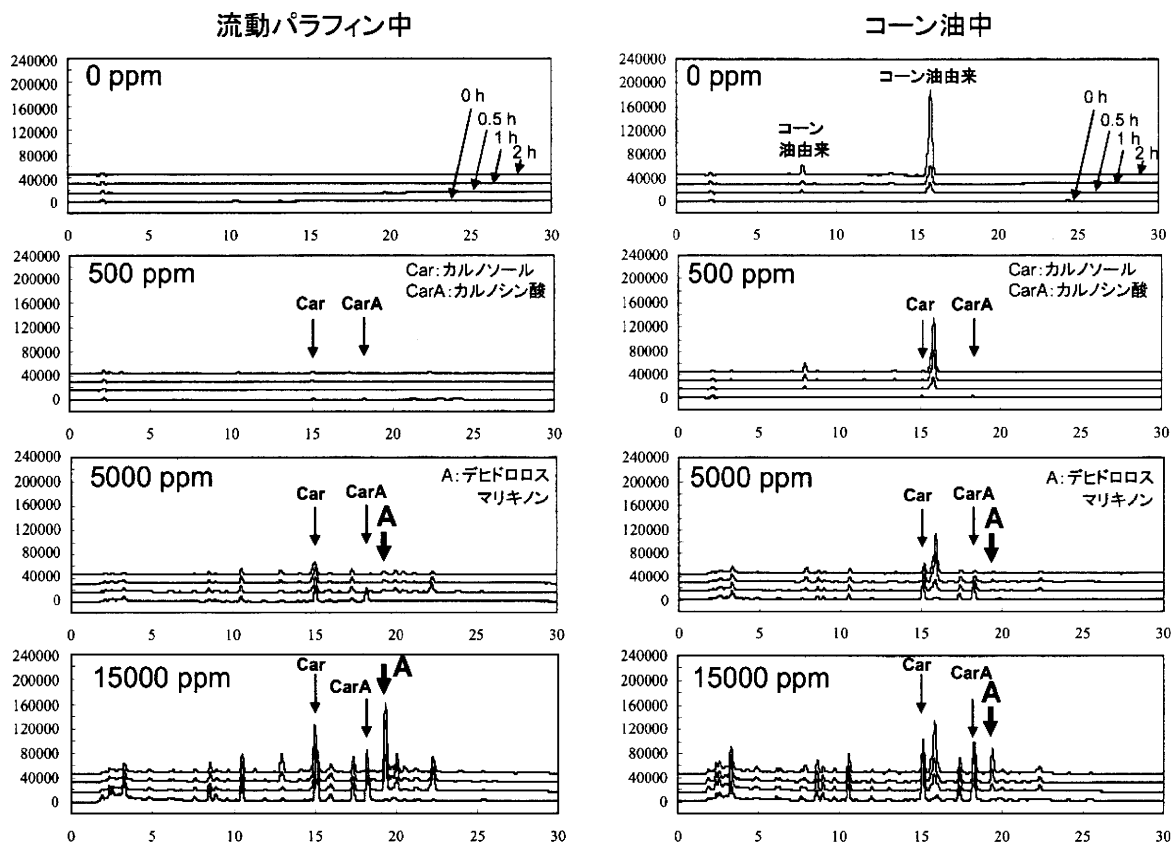


図4 流動パラフィン及びコーン油中で加熱した際のローズマリー抽出物のクロマトグラム

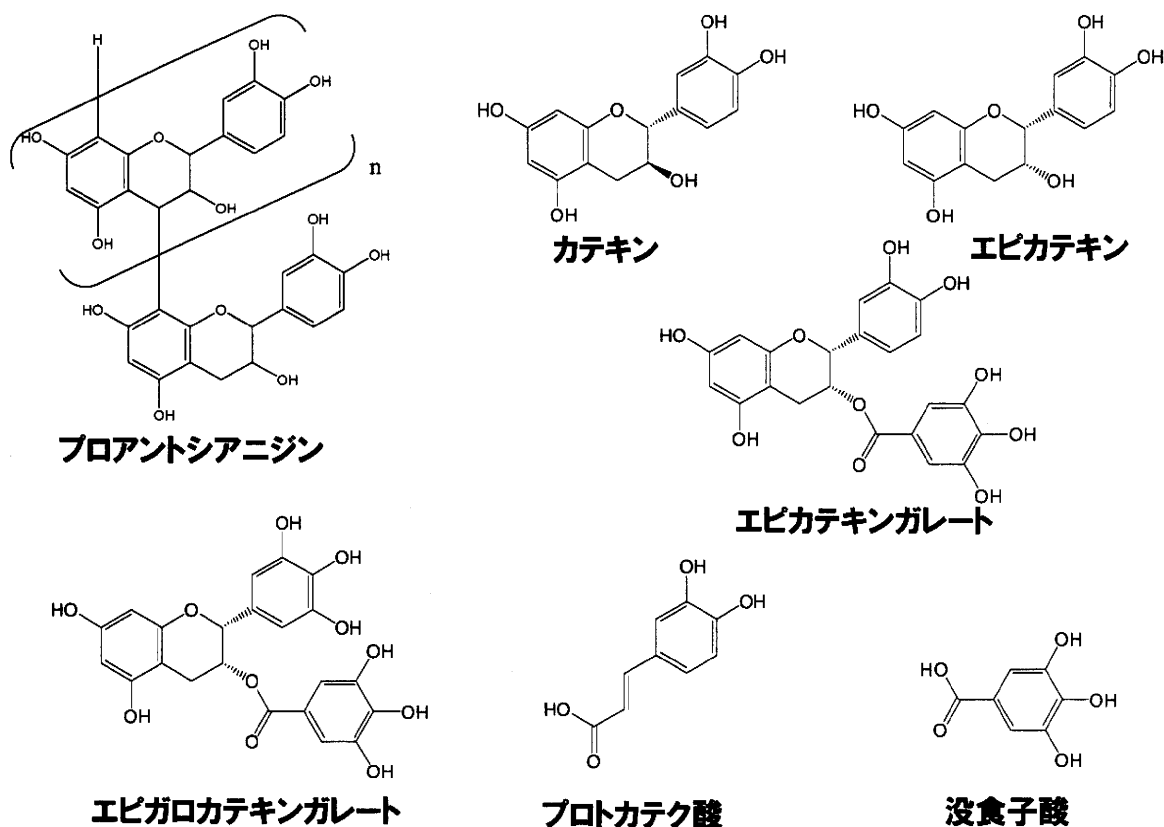


図5 未処理及び加熱処理したブドウ種子抽出物に見出された化合物

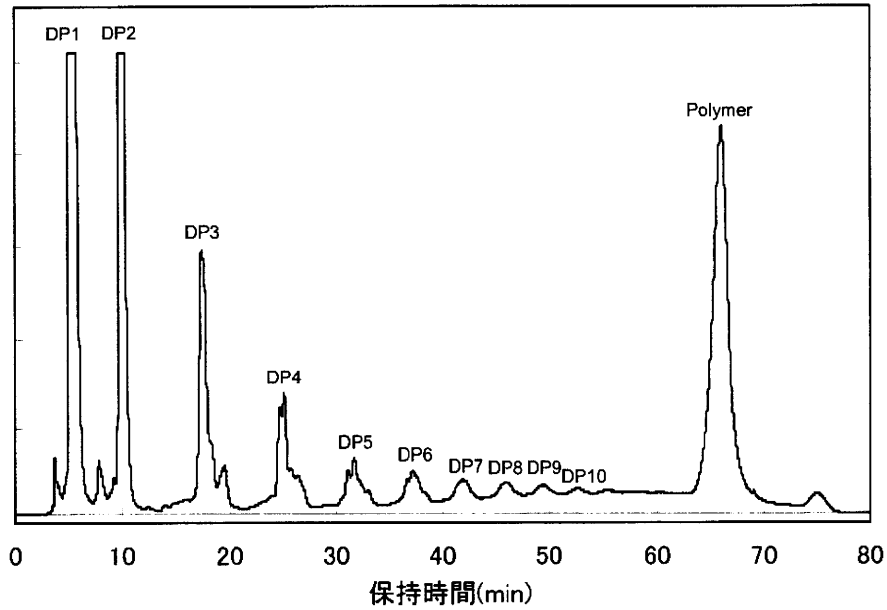
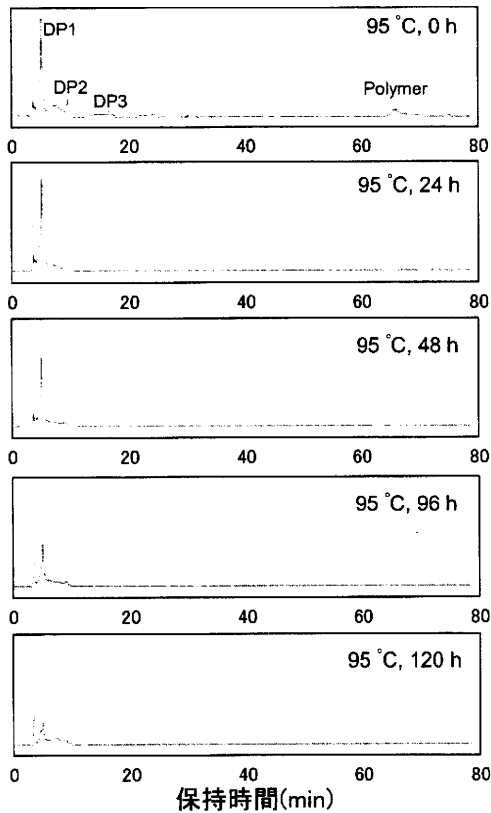


図6 Diolカラムを用いたブドウ種子抽出物のクロマトグラム
 DP: プロアントシアニジンの重合度、DP1: 単量体、DP2: 二量体、DP3: 三量体など

プロアントシアニン類(Ex 230 nm, Em 321 nm)



カテキン類(UV 280 nm)

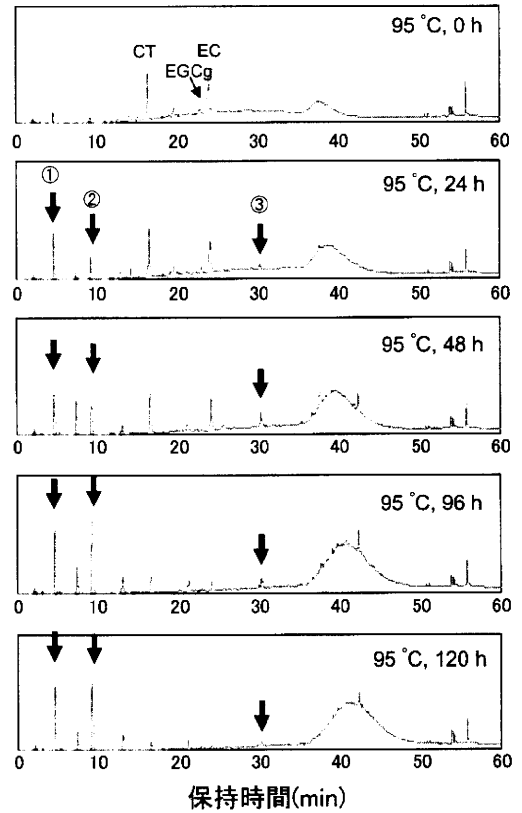


図7 加熱した際のブドウ種子抽出物の順相(左)及び逆相(右)HPLCクロマトグラム

①没食子酸、②プロトカテキ酸、③エピカテキンガレート

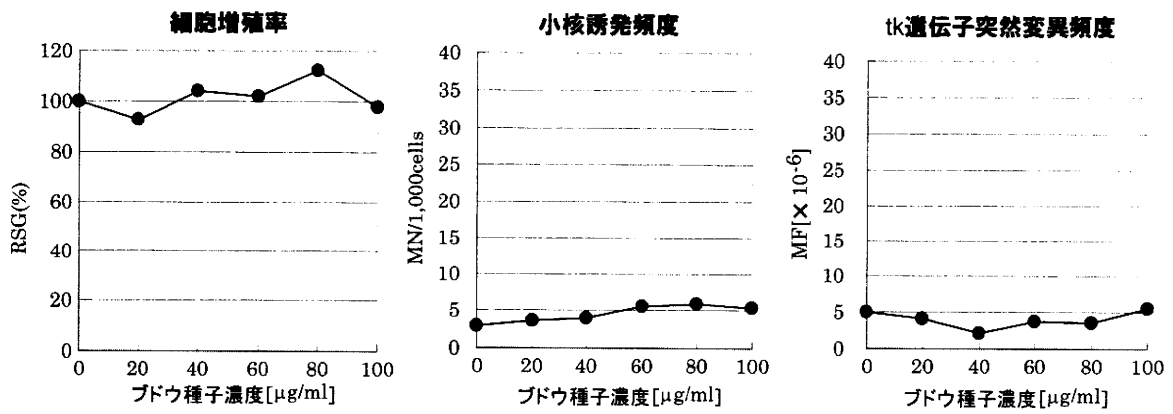


図8 未処理ブドウ種子抽出物の遺伝毒性

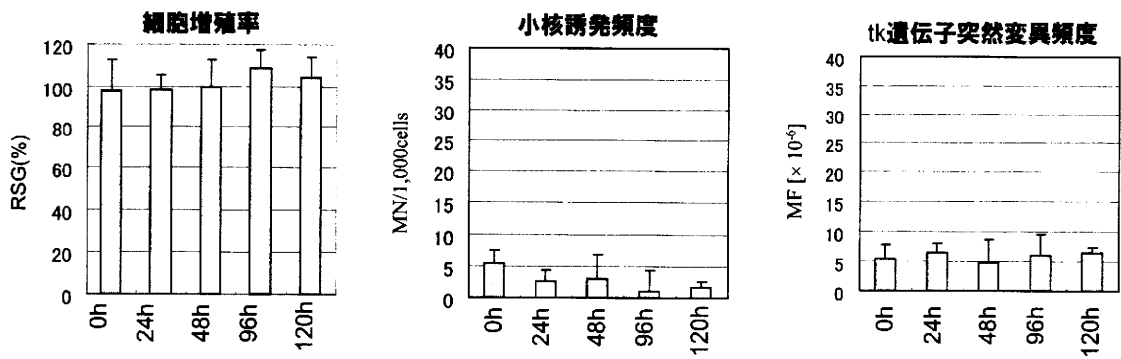


図9 加熱処理したブドウ種子抽出物(100 µg/ml)の遺伝毒性