

Title	シヨウジョウバエ変異原性試験の食品衛生分野への活用
Author(s)	尾花, 裕孝
Citation	
Issue Date	
oaire:version	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3108053
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	尾花裕孝
博士の専攻分野の名称	博士（薬学）
学位記番号	第 1 2 1 2 8 号
学位授与年月日	平成 7 年 10 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	ショウジョウバエ変異原性試験の食品衛生分野への活用
論文審査委員	(主査) 教授 西原 力 (副査) 教授 前田 正知 教授 溝口 正 教授 田中 慶一

論文内容の要旨

化学物質の変異原性試験には Ames テストなど *in vitro* 試験が最も多く使用されている。しかし Ames テストなどの *in vitro* 試験法には様々な問題点がある。例えば微生物による変異原性試験の結果と発がん性試験の結果が必ずしも一致せず、*in vitro* 変異原性試験だけでは発がん性を予測できないことが通説になりつつある。

そこで *in vitro* 変異原性試験と発がん試験の間を埋める目的でショウジョウバエ DNA 修復試験が開発された。ショウジョウバエ DNA 修復試験においては、遺伝的形質により雄は DNA 修復遺伝子を欠損しているが、雌は正常な DNA 修復能を有している。従って幼虫に被験物質を餌と共に経口投与し、成虫の雌雄の性比を計算することにより投与物質の DNA 損傷性を簡単に判定することができる。ショウジョウバエ DNA 修復試験については、環境中に存在する新規変異原物質の検出など応用的研究についてはなされていない。本研究はショウジョウバエ DNA 修復試験を食品衛生分野へ活用することを目的とする応用研究である。

まず食品中に存在する既知変異原物質 13 種類をショウジョウバエ DNA 修復試験に供し、Ames テストなど既存の変異原性試験との整合性について検討した。その結果一部変異原物質はハエ体内の代謝系により不活性化され陰性であった。このことは *in vitro* 検出系で行われている細胞外での代謝活性化とは異なり、ショウジョウバエ DNA 修復試験の方がより現実に近いことを示す結果であると考えられる。つまり、ショウジョウバエ DNA 修復試験により得られる結果は *in vitro* 変異原性試験に比べてより発がん実験の結果に近いことが確認された。

次にカビによる DNA 損傷性マイコトキシン産生を簡便に検出することを目的とし、ハエの培地にカビを接種しカビが育成した状態でハエ幼虫を飼育することにより、カビの産生するマイコトキシンの DNA 損傷性を検出することを試みた。この検出系では活性物質の抽出操作を必要とせず、幼虫が餌と共に DNA 損傷性マイコトキシンを摂取すれば、Rec⁻ の雄が致死すると考えられる（直接検出法）。29 種のカビについて、直接検出法とカビ増殖培地の抽出液を通常の DNA 修復試験に供した場合を比較した。直接検出法において *A.ochraceus*, *A.parasiticus*, *A.versicolor* の 3 種が陽性であった。この 3 種はカビ増殖培地抽出液の DNA 修復試験でも陽性を示した。他の菌種については直接検出法及び培地の抽出液共に陰性であり、今回検索した 29 種のカビについては、直接検出法と抽出液の検出が同一の結果を示した。

*A.ochraceus*が産生したDNA損傷性成分は未知物質であると推定されたので、このDNA損傷性成分の分離同定を試みた。TLCおよびHPLC分析から、既知物質であるペニシリン酸に類似した性質を持つが別の物質であることが確認された。この物質を分離精製し、NMR、Massスペクトルなどの測定からこの物質が5,6-ジヒドロペニシリン酸（以下DHPAと略す）であることを同定した。DHPAをショウジョウバエDNA修復試験に供したところ、そのDNA損傷強度と培地中に含まれていた濃度が相関したことから、*A.ochraceus*が産生するDNA損傷性マイコトキシンはDHPAであると結論した。これまで*A.ochraceus*によるDHPAの産生に関する報告はない。

DHPAの変異原性試験を *in vitro* 及び *in vivo* の2段階で行った。まず5,6-ジヒドロペニシリン酸を *in vitro* 系であるAmesテスト及びumuテストに供したが陰性であった。次に *in vivo* での変異原性試験をショウジョウバエ翅毛スポット試験により行った。DHPAは10mg/gの用量で変異原性を示し、翅毛および炎毛からなる双子スポットを出現させたことから染色体の組み換えを生じることが示された。DHPAの変異原性は *in vitro* 試験の結果と *in vivo* 試験が一致しない一例と考えられる。これまでに同様の結果を示した発がん物質としてはウレタンが知られている。

5,6-ジヒドロペニシリン酸については、これまで生物活性に関する報告は全くない。そこでこの物質による食品汚染の可能性を含む衛生的な知見を得ることを目的に以下の実験を行った。まず *A.ochraceus* が普遍的にDHPAを産生するかを検討したところ、10種の *A.ochraceus* 及びその近縁種の *Aspergillus* 属による産生を確認した。続いて栄養条件の異なる培地での *A.ochraceus* によるDHPAの産生について検討した。栄養分の少ない培地ではペニシリン酸の産生は認められたが、DHPAはほとんど検出されなかった。栄養分の多い培地ではまずペニシリン酸の産生が認められ、その後ペニシリン酸の減少に伴ってDHPAの産生が認められた。このことからDHPAはペニシリン酸に由来するものと推察した。この変換は環境中の細菌によっても行われることを確認した。

次に食品でのDHPA汚染の可能性を知るために、*A.ochraceus* による汚染が報告された11種類の食品に *A.ochraceus* を接種し、その産生の有無を検討した。DHPAの産生が最も高かったのは上新粉、すなわち米の粉で、20日間の培養で324ppm検出された。その他米、小麦など穀類においてもDHPAの産生が認められた。穀類以外の食品ではDHPAの産生は認められなかった。DHPAは加熱により分解せずまた食品中に多い酸性条件下でも安定であった。またDHPAはグルタチオンあるいはL-システインなどのSH化合物によっても分解されず、*A.ochraceus* が穀類などの食品で増殖した場合DHPAが産生され、さらにその食品に残留しやすい可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

尾花裕孝君は、ショウジョウバエ変異原性テストの食品衛生分野での有用性を確認したのち、これを用いてカビ産生物質のDNA損傷性を直接検出する方法を考案し、各種のカビについて試験した。その結果、*Aspergillus ochraceus* が既知のマイコトキシンとは異なる陽性物質を産生していることを認め、その物質を5,6-ジヒドロペニシリン酸と同定した。さらに、本物質は *in vitro* 変異原性テストでは陰性であるが、*in vivo* のテストでは陽性であることを確認すると共に、その食品中での安定性および穀類などで産生される可能性などについても明らかにした。

これらの研究成果は学術的にも高く評価されるだけでなく、食品衛生上も有益な知見であり、博士（薬学）論文として価値あるものと認められる。