The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	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
Author(s)	尾花, 裕孝
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3108053
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

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

尾　花　裕　孝

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

尾花　裕孝

目　次

諸　論……1

本　論……4

第1章　ショウジョウバエDNA修復試験におけるDNA損傷性物質の検出とハエ体内での代謝……4
第1節　ショウジョウバエDNA修復試験による変異原物質の検出……4
第2節　ショウジョウバエ幼虫S9画分による変異原物質の活性化および不活性化……8
第3節　小括……12

第2章　ショウジョウバエDNA修復試験によるDNA損傷性マイコトキシン検出……13
第1節　カビによって産生されるDNA損傷性マイコトキシンの検索……13
第2節　DNA損傷性マイコトキシンの確認……18
第3節　*A. ochraceus*が産生するDNA損傷性マイコトキシンの解明……25
第4節　小括……30

第3章　5,6-ジヒドロペニシリン酸の変異原性試験……31
第1節　5,6-ジヒドロペニシリン酸のin vitro変異原性試験……31
第2節　5,6-ジヒドロペニシリン酸のin vivo変異原性試験……33
第3節　小括……37

第4章　5,6-ジヒドロペニシリン酸の衛生学的研究……38
第1節　*A. ochraceus*およびその近縁種による5,6-ジヒドロペニシリン酸の産生……38
第2節　細菌によるペニシリン酸から5,6-ジヒドロペニシリン酸への変換……42
第3節　*A. ochraceus*による食品中での5,6-ジヒドロペニシリン酸の産生……47
第4節　小括……51

総　括……53

結　論……55

謝　辞……56

引用文献……57

諸　論

ヒトの発がんの約80%は環境発がん物質に起因するであろうと推察されている（1）。日本人の死亡原因の第一位が悪性新生物即ちがんであることから、がんに関する研究は国をあげての最重要課題として取り組まれている。

発がんの第一段階が細胞の突然変異であることから（2,3）、実際にヒトにがんを起こしている発がん物質の発見などを目的として、Amesテストなどの*in vitro*微生物試験法が開発され、それによる変異原物質の検索が精力的に行われた（4）。その結果魚や肉の焼け焦げから検出されるヘテロサイクリックアミン類や（5）、ディーゼル排ガス中などに含まれるニトロアレン類の変異原性が確認され（6,7）、さらにこれらの物質の発がん性も確認された（8,9）。そして、簡便性や迅速性の点から、現在も医薬品や農薬など化学物質開発の際の安全性試験のひとつとして、Amesテストなどの微生物による変異原性試験法が第一段階のスクリーニングとして採用されている（10,11,12）。

しかし一方、Amesテストなどの微生物試験法にはいくつかの問題点も指摘されている。例えばAmesテスト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、微生物変異原性試験だけでは発がん性は予見できないことが通説になりつつある（13）。Amesテストが開発された初期段階では既知発がん物質の中でも強力なものがAmesテストの精度試験対象として選ばれたために、Amesテストと発がん試験の一致率は90%近かった。しかしその後被検物質の数が多くなるにつれて一致率は低下し現在は60-70%程度であるとされている。

日本人のがんを臓器別にみると胃がんなど消化器がんが多いのが特徴である（14）。日系移民と日本人との比較から胃がんなど消化器がんが日本人に多いことは疫学的によく知られた研究である（14,15）。さらに大腸がんの発生と動物性脂肪摂取量との関係についても指摘されている。国立がんセンターががん予防に関して提言している12か条中、食品に関することが8か条と最も多い（16）。通常食品中に含まれる発がん物質の検索はAmesテストなどの微生物試験法が用いられている。しかし食品を対象とする場合、経口的な投与や体内での代謝を考える必要があり、微生物変異原性試験のみの評価では不十分である。しかし発がん物質の検索の最初の段階から発がん試験を行うことは、その検出感度、必要な労力および費用から考えて事実上不可能である。

そのために*in vitro*微生物試験と発がん試験の間を埋めるさまざまな*in vivo*変異原性試

験が開発されてきた（17）。ショウジョウバエDNA修復試験はそのような目的で開発された試験法のひとつで優れた検出感度と簡単な実験操作をその特徴とする*in vivo*変異原性試験である(18）。また被験物質は餌と共に経口投与され、食品成分などの試験法としてはより動物実験に近い。

しかし、ショウジョウバエDNA修復試験については、検出感度および精度など変異原検出系としての基礎的研究はなされているが、実際に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。そこで、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して以下の応用研究を行った。

第一章では食品から検出される既知変異原物質をショウジョウバエDNA修復試験に供し、Amesテストによる検出結果との整合性について検討した。またショウジョウバエDNA修復試験でのDNA損傷性検出と、ハエ幼虫による被検物質の活性化および不活性化との関連性をumuテストにより検証した。

第二章ではカビによるDNA損傷性マイコトキシン産生の有無を、ショウジョウバエDNA修復試験により簡便に検出する方法（以下直接検出法と呼ぶ）を考案した。すなわちカビが増殖する培地中でハエ幼虫を飼育することにより、幼虫にマイコトキシンを含む餌を摂取させ、カビが産生するマイコトキシンのDNA損傷性を判定するものである。この直接検出法では通常天然物の生物活性測定に必要である活性物質の抽出や濃縮操作を必要としない。直接検出法による検出とカビを培養した培地抽出液をショウジョウバエDNA修復試験に供した場合を比較し、直接検出法の試験法としての適合性を検証すると共に、直接検出法により検出された*A. ochraceus*が産生するDNA損傷性マイコトキシンの同定を試みた。

第三章では第二章において同定された5,6-ジヒドロペニシリン酸の変異原性試験を行った。変異原性試験は*in vitro*および*in vivo*の2段階で行った。

第四章では5,6-ジヒドロペニシリン酸の衛生学的性状の解明を試みた。*A. ochraceus*による5,6-ジヒドロペニシリン酸産生と栄養条件の関連性および既知マイコトキシンであるペニシリン酸産生との関連性について検討した。また環境中の細菌によるペニシリン酸から5,6-ジヒドロペニシリン酸への変換についても検討した。さらに*A. ochraceus*を食品に接種した場合の5,6-ジヒドロペニシリン酸の産生など食品汚染の可能性についても検討した。

ショウジョウバエDNA修復試験の概要

ショウジョウバエDNA修復試験の概要をFig.0-1に示した。試験系統である*Drosophila melanogaster sc* z^1 $w^{+(TE)}$ mei^{-9a} mei^{-41D5}/*C(1)DX, y f*の雄はX染色体上に位置するDNA除去修復遺伝子であるmei^{-9a}およびDNA複製後修復遺伝子mei^{-41D5}を欠損している。一方雌は正常なDNA修復能を有している。細胞分裂が盛んな幼虫期に被検物質を投与すると、DNA修復能を持たない雄は損傷を受けたDNAを修復できないために、そのDNA損傷性の強さに比例して致死するが、正常な修復能を持つ雌は羽化して成虫になる。成虫における雄に対する雌の性比（雄/雌）を計算することにより、投与物質のDNA損傷性の判定をすることができる。通常は性比はほぼ1-1.5の間の範囲に収まっているが、DNA損傷性物質を投与すると、その値が1より小さい値に減少する。成虫の雄と雌の判別を容易にするために雄はz^1 $w^{+(TE)}$変異により眼色が黄色に標識され、一方雌は正常の赤色の眼色を有する。雄に対して特異的に毒性を示すと性比が減少するために、見かけ上DNA損傷性を示すような結果が得られるが、それを区別するために、雄雌両者が正常なDNA修復能を持つ*Drosophila melanogaster sc* z^1 $w^{+(TE)}$ /*C(1)DX, y f*系が対照系として用いられる。以下、雄がDNA修復能を持たない系をRec-系と表し、また雄雌両者が修復能を有する系をRec+系と表す。投与物質がRec+系においては性比を減少させず、Rec-系においてのみ被検物質の容量に応じて性比を減少さた時その物質をDNA損傷性と判定する。したがってショウジョウバエDNA修復試験は微生物等で変異原物質検出に用いられているRec-assayのショウジョウバエ版と言えるものである。

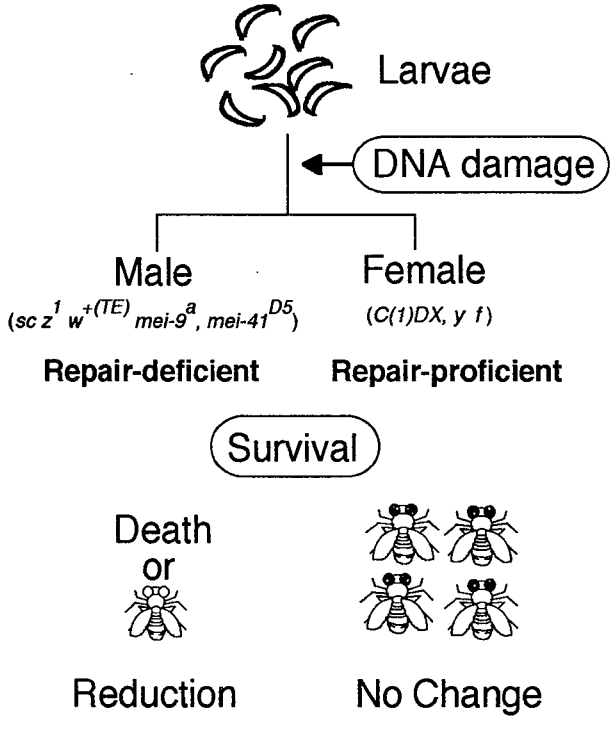


Fig. 0-1
Diagram of the *Drosophila* DNA-repair test

本　論

第1章　ショウジョウバエDNA修復試験におけるDNA損傷性物質の検出とハエ体内での代謝

第1節　ショウジョウバエDNA修復試験による変異原物質の検出

1. 緒言

ショウジョウバエDNA修復試験については、既知変異原物質を試験することにより検出感度および精度など変異原検出系としての基礎的研究はなされているが、開発されてからまだ日が浅く、実際に環境中に存在する新規変異原物質の検出などの応用的研究については未だ報告されていない。これまでに示された既知変異原物質の試験結果は、ベンゾ（a）ピレンなど多環芳香族炭化水素やニトロソアミン類が陽性であり（18, 19）、さらにAmesテストでは陰性である発がん物質のウレタンも陽性を示すことが明らかになっている（18）。本節ではAmesテストなど変異原性が確認されている13化合物をショウジョウバエDNA修復試験に供し、そのDNA損傷性について検討した。またその結果のAmesテストとの比較を試みた。

2. 材料および実験方法

化合物：アフラトキシンB1およびステリグマトシスチンはMakor Chemical社（イスラエル）から購入した。2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide（AF-2）は上野製薬（大阪）から購入した。2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline（IQ）、2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline（MeIQ）、2-amino-3,8-dimethylimidazozo-[4,5-f]quinoxaline（MeIQx）、3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole（Trp-P-1）、3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole（Trp-P-2）、1,8-dinitropyrene（1,8-DNP）、ホルムアルデヒドおよび過酸化水素は和光純薬工業（大阪）から購入した。メチルグリオキサールおよびコウジ酸はSigma社（ST. Louis, アメリカ）から購入した。ショウジョウバエDNA修復試験用餌としてCarolina Biological Supply 社（Burlington, NC, アメリカ）のインスタント培地Formula 4-24を用いた。

ショウジョウバエ産卵用餌：鍋に水1L、ブドウ糖70g,、粉末寒天（和光純薬、大阪）8gおよび乾燥酵母粉末（エビオス、田辺製薬、大阪）70gを加えガスコンロで加熱溶解した。鍋を水で冷却し、均一な泥状になったもの約50mLを牛乳ビンに移し、室温まで放置冷却し固化したものを餌として使用した。

ショウジョウバエ：ショウジョウバエは藤川博士（近畿大学）より分与されたものを使用した。使用した系統はRec-系として*Drosophila melanogaster sc* z^1 $w^{+(TE)}$ mei^{-9a} mei^{-41D5}/ *C(1)DX, y f*を、またRec+系として *sc* z^1 $w^{+(TE)}$/*C(1)DX, y f*を使用した。成熟したショウジョウバエを産卵用餌の入ったビン中で飼育することにより産卵させた。18時間後親ハエを除き、産卵させた餌ビンは25℃で培養し産卵後72-90時間の幼虫（3齢幼虫）を得た。幼虫を飼育している餌ビンに20%砂糖水を加え撹拌し幼虫を砂糖水液面付近に浮遊させることにより餌と分離した。その後幼虫が浮遊する砂糖水をガラス製クロマト管に移し、徐々に砂糖水を下から流出させさらに上から20%砂糖水を加えた。この操作を繰り返すことにより産卵用餌を洗い流し、3齢幼虫のみを採取した（20）。

ショウジョウバエDNA修復試験：所定量の変異原物質をまずエタノールおよびTween80の混液（2：1）に完全に溶解させ、その後混液の割合が3%になるように水を加えた。変異原物質の投与用量は、その細胞毒性によりRec+系における投与群の成虫数が無投与対照群の1/2以下にならない範囲で設定した。インスタント培餌1.1ｇと変異原溶液3mLを内径1.1cm高さ9.5cmのプラスチック製飼育ビン中で素早く混和し、そこへ約200-300匹の3齢幼虫を加え成虫になるまで25℃で約10日間飼育した。飼育中は幼虫および成虫が逃げないように飼育ビンにスポンジ栓でふたをした。雄に対する雌の性比（雄/雌）は、成虫をジエチルエーテル麻酔下で雄雌別に成虫数をカウントすることにより算出した。また変異原物質の濃度は餌（インスタント培地+変異原溶液）１ｇ当たりのmole数で表記し、実験はRec-およびRec+系についてそれぞれ2連で行いその平均値で示した。

3. 結果

本研究では被検物質がRec-系において雄/雌の性比を被検物質の濃度依存的に減少させ、さらに性比を0.1以下に減少させたとき陽性と判定した。被検物質による性比の濃度依存的減少は、性比を縦軸に取った片対数グラフにおける直線的な性比の減少を目安に

判断した。最もDNA損傷性の強かったアフラトキシンB1のDNA修復試験の結果をFig.1-1-1に示した。Rec-系における雄／雌の性比はアフラトキシンB1用量の増大と共に減少し、右下がりのほぼ直線を示した。一方Rec+系における性比にはアフラトキシンB1用量のいかんにかかわらず変動は認められなかった。Rec-系の性比を0.1に減少させるアフラトキシンB1用量は用量作用関係から判断して0.12nmole/g餌であった。他の被検物質の結果をFig.1-1-2に示したが、すべて用量作用関係を示し、また用いた用量の範囲内でRec-系の性比を0.1以下に減少させたことから、DNA修復試験において陽性と判断した。図には示していないが、これらの物質を同時にRec+系ショウジョウバエに投与しても性比の変動を認めなかった。Rec-系の性比を0.1に下げる変異原物質の用量で比較すると、陽性物質のDNA損傷強度は2群に分類された。すなわちDNA損傷強度の強い群には(A)に示した1,8-DNP、MeIQ、IQ、MeIQx、およびステリグマトシスチンの5物質が分類され、性比を0.1に減少させる用量は順に9、10、11.5、22、45nmole/g餌であった。一方DNA損傷強度の弱い変異原物質は(B)に示したTrp-P-1、AF-2

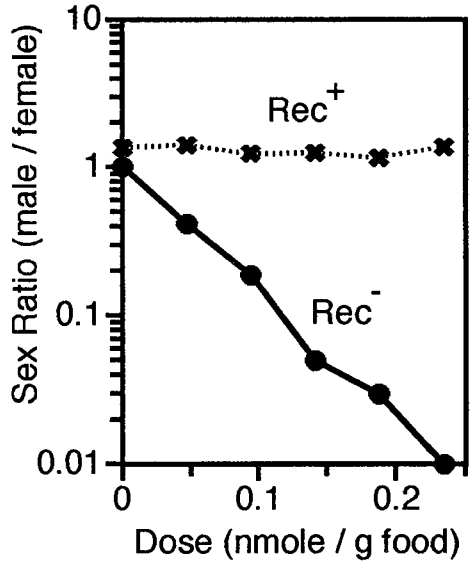
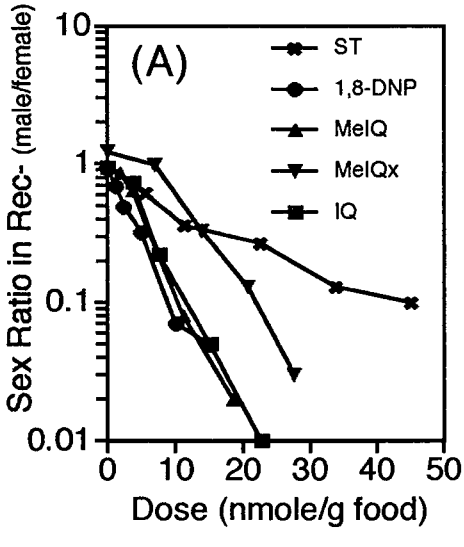


Fig.1-1-1
DNA Damaging Effect of aflatoxin B1



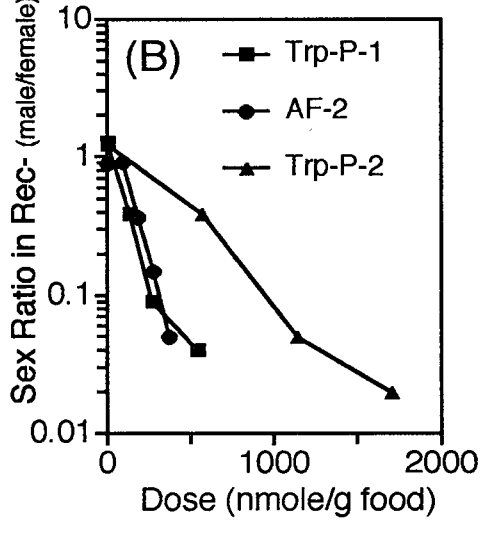


Fig.1-1-2
DNA Damaging Effect of Mutagens in the Rec⁻ Stock
Abbreviations of the tested compounds are shown in the text. Sex ratios of male to female in the Rec+ stock were around 1.0 in the tested ranges of chemicals.

およびTrp-P-2であり、これらの物質がRec-系の性比を0.1に減少させた用量はそれぞれ260、320、950nmole/g餌であった。

ショウジョウバエDNA修復試験において陰性を示した物質の結果をTable1-1-1に示した。陰性を示したのは、ホルムアルデヒド、過酸化水素、コウジ酸およびメチルグリオキサールであった。各物質の最高用量はRec-系及びRec+系両系において重篤な致死作用が認められない用量を用いた。これらの最高用量は、先に陽性を示した変異原物質の中で最も弱かったTrp-P-2の性比を0.1に減少させた用量である950nmole/g foodの約35から500倍の濃度であった。

Table 1-1-1. Negative compounds in Drosophila DNA-repair test

Compounds	Tested range (μmole/g food)
Formaldehyde	12 − 73
Hydrogen peroxide	6 − 86
Kojic acid	7 − 35
Methylglyoxal	102 − 508

4. 考察

ショウジョウバエDNA修復試験は、DNA修復能を持たない雄と修復能を持つ雌との被検物質に対する致死感度の差を利用した変異原物質検出法である。本研究においては、Rec-系の性比を0.1に下げる変異原物質の用量を指標に被検物質のDNA損傷性の強度を比較した。通常他の変異原性試験においても一定の指標により被検物質の突然変異誘発強度を比較している。例えば変異原性試験として最も広く使用されているAmesテストでは、1μg当たりの被検物質によって誘発される変異コロニーや、1000個のコロニーを誘発させる被検物質の濃度を指標に用いている（4, 19）。DNA修復能のない雄の致死数ではなく、性比を指標にすることの理由のひとつは試験に供する幼虫数を一定数に調節できないことに起因する。幼虫は体長約3mm程度でありその個体数を計測することは困難であり、また幼虫段階での雌雄の区別はできない。したがって正確に雌雄の投与数を調節することは事実上不可能である。しかし成虫の性比はほぼ1付近であることから（18）、通常実験では一定量の幼虫（例えば小スパーテルに山盛り一杯で200-300匹）が使用される。雌雄の致死感度の差を幼虫の致死数（成虫の生存数）ではなく、共通の尺度である成虫の性比で表わすことにより各実験のデータの互換性を確保できると考えられる。

したがってFig.1-1-1およびFig.1-1-2において陽性を示した被検物質のDNA損傷性強度は、アフラトキシンB1≫IQ≒MeIQ≒MeIQx≒1,8-DNP≒ステリグマトシスチン＞Trp-P-1

≒AF-2≒Trp-P-2と判断できる。このようなDNA損傷性強度の順位はAmesテストやumuテストなどの微生物を使用した*in vitro*変異原性試験の結果とは一致しない。例えばAmesテストでのこれらの突然変異誘発強度の順位は1,8-DNP≒MeIQ≒IQ≒MeIQx＞Trp-P-1≒Trp-P-2≒アフラトキシンB1＞AF-2＞ステリグマトシスチンである（4, 21, 22）。ショウジョウバエDNA修復試験において検出感度の低かったAF-2は微生物変異原性試験においては強い変異原性を示し、陽性対照として使用されている物質である（23）。しかしAF-2の発がん性はさほど強力ではなく、50%のラットにがんを生じる用量であるTD50値は29mg/kgであるが、アフラトキシンB1のTD50値は0.003mg/kgである（24）。両者のTD50値には約9700倍の差がある。Amesテストで1000個のコロニーを誘発させるアフラトキシンB1の濃度は0.03μg/プレートであり、同じくAF-2の濃度は0.12μg/プレートであり両者の差は4倍であった（21）。一方ショウジョウバエDNA修復試験での性比0.1を目安にした時の強度差は2700倍であり、発がん強度の指標であるTD50値の差にかなり近い値であった。

一方ショウジョウバエDNA修復試験において陰性を示した4物質中、ホルムアルデヒドおよび過酸化水素は反応性が高く薬物代謝酵素系などによって容易に不活性化されることが想像される。ホルムアルデヒドは*in vivo*ではAmesテストにおいてもS9（+）の条件下では変異原性が減少する（25）。また過酸化水素もカタラーゼによって容易に分解され変異原性が大きく減少する（20）。ショウジョウバエはその体内にP-450などの代謝系をもつことが知られている（26, 27）。したがってこれらの物質がショウジョウバエDNA修復試験で陰性であった結果は、ハエ体内でのこれら物質の代謝不活性化を総合的に反映した結果ではないか推測される。ショウジョウバエ幼虫による被検物質の代謝活性化あるいは不活性化と、ショウジョウバエDNA修復試験での検出感度の関連性については次節において考察する。

第2節　ショウジョウバエ幼虫S9画分による変異原物質の活性化および不活性化

1. 緒言

前節において*in vitro*変異原性試験で変異原性有と判定された13種物質をショウジョウバエDNA修復試験に供したところ、陽性を示した物質と陰性を示した物質に二分され

た。また陽性を示した物質のDNA損傷性の相対的な強度は、Amesテストの結果とは一致しなかった。この原因のひとつとしてショウジョウバエ幼虫による被検物質の代謝活性化あるいは不活性化が考えられた。

本節ではumuテストを用いてショウジョウバエ幼虫S9画分による変異原物質の代謝活性化あるいは不活性化について検討し、ショウジョウバエDNA修復試験での検出感度との関連性について考察する。これまで*in vitro*での変異原物質の代謝活性化および不活性化試験では、Amesテストにおける被検物質の変異原性を指標にすることが多かった。Amesテストでは判定まで48時間の試験菌の培養が必要であり、また試験は無菌的条件下で行わなければならない。しかしumuテストでは突然変異に直接関与するumu遺伝子の発現をβ-ガラクトシダーゼ活性として検出するために、試験菌の培養時間は2時間と短く無菌操作を必要としない。そこで本研究ではumu遺伝子の発現を指標に幼虫S9画分による被検物質の代謝活性化および不活性化を検討した。なおショウジョウバエ成虫ではなく幼虫S9画分を用いるのは、修復試験において被検物質の代謝活性化あるいは不活性化は幼虫体内で起こるためである。

2. 材料および実験方法

化合物：アフラトキシンB1、AF-2、IQ、Trp-P-1、Trp-P-2およびメチルグリオキサールは、前節と同じものをジメチルスルホキシドに溶解し使用した。

ショウジョウバエ幼虫S9画分溶液の調製：Rec-系のショウジョウバエ3齢幼虫約5gを10mLの1.15%KCl溶液中で氷冷しながら高速ホモゲナイザー（Polytron PT10/35型, Kinematika AG社, Lucerne, スイス）によりホモゲナイズした。ホモゲナイズけん濁液を4重に重ねたガーゼを用いてろ過し幼虫のカラを除去した。ろ過液を4℃において9000 x *g*で10分間遠心分離し、その上清を幼虫S9画分とした。幼虫S9画分にYahagiらによって示された補酵素類を加え（28）、さらに0.1Mリン酸緩衝液 (pH 7.4) を適宜加えて溶液のタンパク質濃度を4mg/mLになるように調整した。この溶液をショウジョウバエ幼虫S9画分溶液としてumuテストにおいて使用した。

umuテスト：umuテストは既法に従って行った（29, 30）。試験菌株には*Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002を使用した。対数増殖期の試験菌を含むTGA液体培地

2mLに変異原物質溶液0.1mLを加え、さらに0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.4)あるいは幼虫S9画分溶液のどちらかを0.4 mL加え37℃で2時間振とう培養した。被検物質の代謝活性化を検出する場合は被検物質の濃度を10μMとした。また被検物質の代謝不活性化を検出する場合は、AF-2およびメチルグリオキサールにより十分なumu遺伝子を発現させる用量が必要となる。そこでAF-2およびメチルグリオキサールの濃度をそれぞれ0.2および550μMとした。被検物質によるumu遺伝子の発現はβ-ガラクトシダーゼ活性として検出し、β-ガラクトシダーゼ活性はMilarの方法により測定した(31)。

3. 結果

ショウジョウバエ幼虫S9画分によりアフラトキシンB1、IQ、Trp-P-1およびTrp-P-2はumu遺伝子を発現させた。つまり、これら4物質がショウジョウバエ幼虫S9画分により活性化されることが*in vitro*でも確認された(Fig.1-2-1)。4物質によるumu遺伝子の発現強度はアフラトキシンB1>IQ>Trp-P-1>Trp-P-2であり、前節で示したショウジョウバエDNA修復試験におけるDNA損傷強度の順位と一致した(Fig.1-1-1、1-1-2)。

一方AF-2およびメチルグリオキサールによるumu遺伝子の発現はショウジョウバエ幼虫S9画分の添加によりそれぞれ45%と13%と大幅に減少した(Fig.1-2-2)。これらの結果は幼虫S9画分による変異原物質の不活性化を示唆し、またショウジョウバエDNA修復

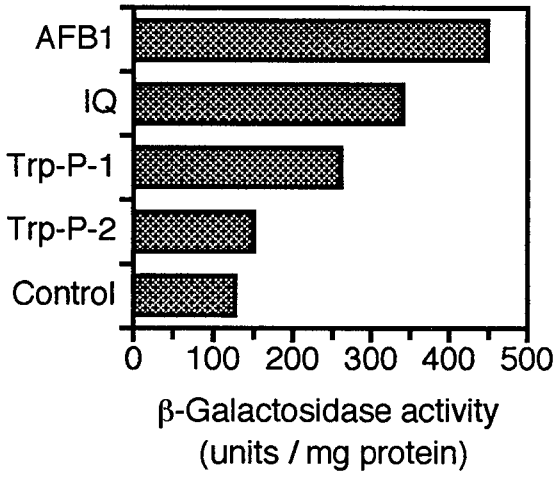


Fig.1-2-1
Metabolic activation of mutagens by the *Drosophila* larval S9 fraction in the umu test
Umu gene expression was expressed as β-galactosidase activity. The concentration of each mutagen in the umu test was 10 mM.

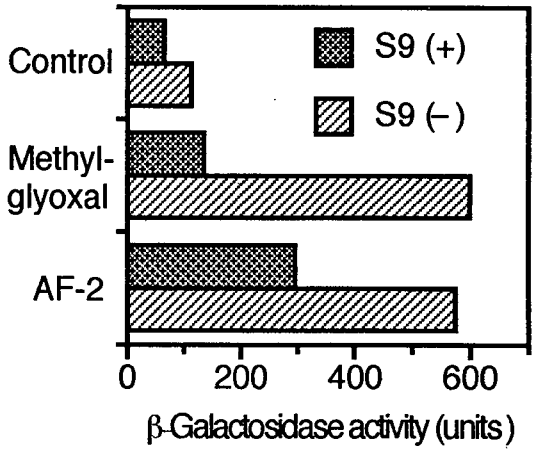


Fig.1-2-2
Metabolic inactivation of mutagens by the *Drosophila* larval S9 fraction in the umu test
Umu gene expression was expressed as ß-galactosidase activity.

試験においても同様の不活性化が起こりうることを推察させるものであった。

4. 考察

ショウジョウバエDNA修復試験における被検物質の活性化あるいは不活性化は、ショウジョウバエ幼虫体内の内在性の代謝系によって行われる。本節ではumuテストを用いることにより、ショウジョウバエ幼虫の代謝系により被検物質が活性化あるいは不活性化されることを*in vitro*系で検証した。被検物質の活性化の場合、幼虫S9画分による活性化の順位とショウジョウバエDNA修復試験におけるそれらのDNA損傷強度が同じ順位を示した。しかしこれらの強度順位はAmesテストでの変異原性強度とは異なるものであった。通常Amesテストにおいて用いられるラットS9は薬物代謝酵素誘導剤の前投与により代謝活性を大幅に増大させたものである（23, 32）。その結果各種の変異原物質を高感度に検出することを可能としている。一般に薬物代謝酵素はP-450群を含む複数の酵素から成り立ち、Amesテストにおいて用いられるラットS9は各酵素の構成割合や基質特異性がラットの内在性のものとは大きくかけ離れている（33）。したがってAmesテストにおいて定性的に変異原物質の検索を高感度に行うには適しているが、得られる変異原性強度をそのままに発がん予測の定量的評価に結び付けるのには適さない。一方ショウジョウバエ幼虫は被検物質の投与前は無処理であり、被検物質の活性化および不活性化は幼虫体内で通常の代謝反応により行われる。さらに本節において示された*in vitro*でのショウジョウバエ幼虫S9画分による変異原物質の活性化順位（アフラトキシンB1＞IQ＞Trp-P-1＞Trp-P-2）は、ヒトおよびラット肝臓のミクロゾームによる同物質の活性化と同一の順位であった（34）。ショウジョウバエがP-450などの薬物代謝酵素を持つことは知られているが（26, 27）、本研究はハエ幼虫がヒトおよびラットに類似する発がん物質活性化能を持つ可能性を示したものである。

メチルグリオキサールおよびAF-2の幼虫S9画分による*in vitro*での変異原物質の不活性化も、DNA修復試験においてメチルグリオキサールが陰性であり、AF-2のDNA損傷性が比較的弱かった結果と矛盾しない。*in vitro*試験のS9(-)の条件下におけるメチルグリオキサールの突然変異誘発力は強力なものではない（35）。したがって投与されたメチルグリオキサールが完全に不活性化されなかったとしてもそのDNA損傷性は検出されない程度の可能性がある。マウスを用いた*in vivo*変異原性試験系ではメチルグリオキサールは陰性であり（36）、また発がん試験でも陰性であった（37）。他方AF-2はAmesテスト

などではS9(-)の条件下において強力な変異原であるが（21）、ラット肝臓により急速に分解されることが報告されている（38）。またAF-2はラットにおいて発がん性を示すことが確認されているが、その発がん性は*in vitro*変異原性試験での突然変異誘発力に比べればさほど強い発がん物質としては認識されていない（24）。ショウジョウバエDNA修復試験での陰性結果あるいは弱いDNA損傷性は、試験法の検出感度が低いと考えるよりも、被検物質の発がん性予測においては代謝性を加味した場合はむしろ危険度の低いことを示すデータかもしれない。

ショウジョウバエは昆虫であるが、動物に相当する体内での被検物質の代謝活性化および不活性化機構を持ち、また被検物質の経口投与と併せて十分に*in vivo*変異原物質試験法としてその特性を持つと考えられる。さらにAmesテストなど*in vitro*試験では代謝活性化は試験菌の細胞外で行われるために、活性化された被検物質の膜透過性や安定性も問題として残る。ショウジョウバエDNA修復試験の結果は、ハエ体内での変異原物質の代謝を総合的に反映した結果であると考えられる。つまり、得られる結果は*in vitro*変異原性試験に比べより発がん実験の結果に近いことが確認された。またアフラトキシンB1などを*in vitro*変異原性試験にひけをと取らない感度でそのDNA損傷性を検出しており、被検物質を経口投与できる特性と併せて利用できれば、特に食品中の変異原性物質検索の試験系として活用しうる可能性が示された。

第4節　小括

1. 既知変異原物質をショウジョウバエDNA修復試験に供して得られた結果は、Amesテストとの比較において一部相違が認められたが、発がん試験の結果とは整合性が認められた。
2. ハエ幼虫による変異原物質の活性化および不活性化を*in vitro*レベルで確認した。
3. ハエの内在性の代謝系による変異原物質の活性化はラットおよびヒトの活性化能と同等の作用を示した。
4. 既知変異原物質をショウジョウバエDNA修復試験に供して検出された結果はハエの持つ代謝系により被検物質が代謝・解毒された総合的な結果を反映したものであった。

第2章　ショウジョウバエDNA修復試験によるDNA損傷性マイコトキシン検出

第1節　カビによって産生されるDNA損傷性マイコトキシンの検索

1. 緒言

通常マイコトキシンや食品中に含まれる微量物質の変異原性試験では、対象物質を試験系に適する形状や濃度にするための抽出操作などの前処理が必要である。また粗抽出の段階ではきょう雑成分が多く、そのような成分を除く最小限度の精製を行わないと正確な結果が得られない。例えばAmesテストは試験菌である*S. typhimurium*のヒスチジン要求性を指標にするので、食品中に含まれる変異原物質を試験する場合は試料からのヒスチジンの除去が必須である（32）。そのため肉や魚の焼け焦げ成分であるヘテロサイクリックアミン類を特異的に抽出する手段としてブルーコットンを用いる方法などが開発されている（39）。また一般に*in vitro*変異原性試験系は特定の微生物や培養細胞を使用するために試験系の無菌操作を必要とする。

ショウジョウバエDNA修復試験は幼虫に処理を行い、幼虫の致死性を成虫の生存数で判定する試験系であるために、幼虫が成虫まで成長できる条件であればさまざまな条件下でのDNA損傷性物質の検出が可能である。そこでカビによる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、カビが成育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損傷性を簡便に検出する方法を考えた。ショウジョウバエDNA修復試験に用いる3齢幼虫はサナギになる前の成長が非常に盛んな時期であるために餌をよく摂取する。そのために餌中に含まれるものはよほどの忌避成分でない限り餌として摂取する。ショウジョウバエDNA修復試験はもともと被検物質を培地に混ぜて餌と共に経口投与する試験系であるので、幼虫の生育に影響がでなければ本質的には餌にカビが生えていても問題はない。培地にDNA損傷性マイコトキシンが産生されていればそれを摂取したDNA修復能を持たない雄が致死し、成虫の性比を計測することによりDNA損傷性マイコトキシンの産生を検出できるると考えられる（直接検出法）。本節では直接検出法とカビ培地抽出液のショウジョウバエDNA修復試験の結果を比較することにより、カビが産生するマイコトキシンのDNA損傷性の簡便検出法としての直接検出法の有効性を検討する。

2. 材料および実験方法

カビ菌株：実験に使用した菌株は*Aspergillus*属13種、*Penicillium*属12種、*Fusarium*属4種の合計29種である。使用した菌株名はTable2-1-1およびTable2-1-2に示した。菌株は食品薬品安全センター泰野研究所の高鳥博士より分与されたもの、あるいは発酵研究所（大阪市）より購入したものを使用した。被検菌株は試験管中のポテトデキストロース寒天培地（PDA培地）にて室温で保存した。

ショウジョウバエ：第1章第1節で述べた*Drosophila melanogaster sc* z^1 $w^{+(TE)}$ mei^{-9a} mei^{-41D5}/*C(1)DX, y f*（Rec-系）および *sc* z^1 $w^{+(TE)}$ /*C(1)DX, y f*（Rec+系）のそれぞれの3齢幼虫を使用した。

ショウジョウバエ飼育培地：ショウジョウバエ飼育培地は、鍋に水1L、粉末寒天（和光純薬、大阪）10g、乾燥酵母粉末（エビオス、田辺製薬、大阪）70g、黒砂糖100g、コーンミール30g、米ヌカ15gを加え、ガスコンロで加熱し泥状になるまで溶解させ調製した。ショウジョウバエ飼育培地の約50mLを牛乳ビンに移し、綿栓をしたのちオートクレーブにより121℃で15分間滅菌した。

ショウジョウバエDNA修復試験によるDNA損傷性マイコトキシン直接検出法：PDA培地上で培養したカビ菌体を白金耳により約1mm³の培地と共に牛乳ビン中のショウジョウバエ培地表面の中心部に接種した。カビを接種した培地は25℃にてカビが培地の表面を完全に覆うまで培養した。培養期間は菌種によって異なるが通常は5-10日間であった。カビは培地の表面付近に良く増殖するので、マイコトキシンを産生していれば培地表面にマイコトキシンが高濃度

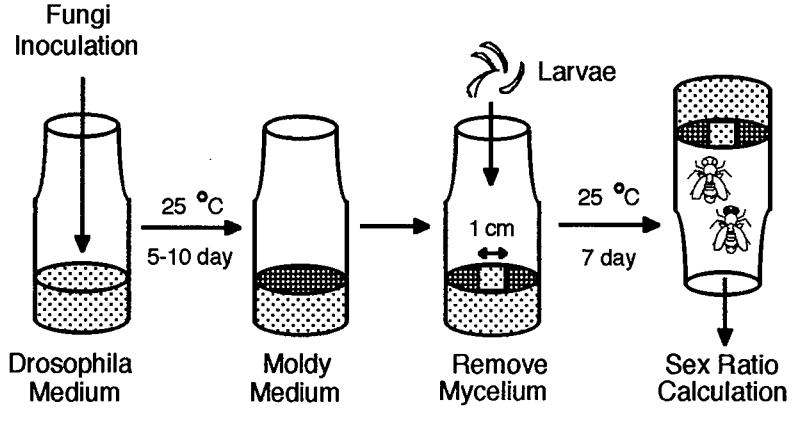


Fig. 2-1-1
Diagram of direct detection of DNA damaging mycotoxin in the fungal culture with the DNA-repair test

に蓄積されると考えられる。そのような培地を餌として幼虫に摂取させるために、カビ菌体を1cmの幅で除去し培地をむき出しにした。むき出しになった培地部分に約400-500匹の3齢幼虫を移し、ハエ成虫になるまで25℃で約7日間飼育した。予備実験において菌体を除去せずに幼虫を加えた時には、幼虫はカビ菌体を忌避し、その下の培地まで達せずほとんど成虫にならなかった。そのためにカビ菌体の一部を除去し幼虫を直接培地の上に置いた。成虫数はエーテル麻酔下で雌雄の別にカウントし、その性比を算出した。実験はRec-およびRec+系についてそれぞれ2試行行い、その平均値を表わした。カビの接種、カビ菌体の切除および成虫数のカウントは安全キャビネット（SCV型、日立製作所、東京）内で行った。一連の操作の概要をFig.2-1-1に示した。

カビを培養した培地抽出液のショウジョウバエDNA修復試験：直接検出法においてハエのカウントが終了したカビ培養培地は、オートクレーブ滅菌後、培地中に産生されたマイコトキシンを抽出した。すなわち、培地の入った牛乳ビンにアセトニトリル80mLを加え高速ホモゲナイザー（Polytron PT10/35型, Kinematika AG社, Lucerne, スイス）により高速撹拌抽出した。抽出液は3000回転10分間の遠心分離により固形成分を除去したのち分液ロートに移し、クロロホルム80mLを加えて激しく振とうした。クロロホルム層をナス型フラスコへ移したのち、水層にさらにクロロホルム80mLを加え同様の操作を繰り返した。クロロホルム層はロータリーエバポレータにより5mLに濃縮した。この抽出液0.41mLをメオウ乳鉢に取り、温風を吹き付けてクロロホルムを除去し、エタノールおよびTween80の混合液（2：1）0.09mLに溶解した。そこへ水を加えよく混和して全量を3mLとし、ショウジョウバエDNA修復試験用試験液とした。以下第1章第1節で述べた操作によりショウジョウバエDNA修復試験を行った。培地抽出液の用量作用反応を試験する場合は抽出液量を適宜増減させた。

3. 結果

カビが産生するマイコトキシンのDNA損傷性を直接検出法とカビ増殖培地の抽出液を用いた通常のDNA修復試験法で比較検討した。Table2-1-1に*Aspergillus*属13種を試験した結果を示した。*Aspergillus*属の直接検出法において*A. ochraceus*、*A. parasiticus*、*A. versicolor*のRec-系の性比がそれぞれ0.06、0、0.05と対照の性比1.25に比べて大幅に低い値を示した。一方これらの菌種のRec+系の性比は1.34、1.30、1.34であり、対照の性比

1.30と同レベルであった。他の*Aspergillus*属についてはRec-系の性比が対照に比べ大幅な減少を示したものはなかった。一方培地の抽出液を通常のDNA修復試験に供した場合も*A. ochraceus*、*A. parasiticus*、*A. versicolor*のRec-系の性比はそれぞれ対照の性比に比べて大幅に低い値を示した。またこれらのRec+系の性比は対照の性比と同レベルであった。なお*A. fumigatus*抽出液ではRec-系の性比は0.98でRec+系の性比1.88の約1/2であったが、Rec-系の性比はほぼ1であり、また再度DNA修復試験を行ったがRec-系の性比は減少しなかったことから、陰性と判断した。他の*Aspergillus*属については直接検出の場合と同様にRec-系およびRec+系の両系統で性比が対照に比べ大幅に変動したものはなかった。つまり、これら3菌種以外の*Aspergillus*属についてはDNA損傷性マイコトキシンの産生はなかったと判断した。

Table 2-1-1. Detection of DNA damaging mycotoxins of cultured *Aspergillus* fungi using the *Drosophila* DNA-repair test

Fungi	Sex ratio (Male/Female)			
	Direct detection		Extract[a]	
	Rec-	Rec+	Rec-	Rec+
Control	1.25	1.30	1.22	1.46
A. candidus	1.11	1.06	1.68	1.38
A. clavatus	2.90	2.35	1.39	1.32
A. flavus	1.00	1.22	1.39	1.19
A. fumigatus	1.28	1.30	0.98	1.88
A. melleus	1.03	1.24	1.54	1.41
A. ochraceus	0.06	1.34	0.06	1.40
A. oryzae	1.27	1.13	1.20	1.28
A. ostianus	1.26	1.08	1.16	1.40
A. parasiticus	0	1.27	0.03	1.54
A. restrictus	1.13	1.15	1.85	1.65
A. sulphureus	1.13	1.09	1.57	1.34
A. terreus	1.40	1.07	1.33	1.61
A. versicolor	0.05	1.34	0.21	1.41

a: Extract was administered at a dose of 0.1 mL/g .

Table2-1-2に*Penicillium*属12種および*Fusarium*属4種について、直接検出法とカビ培養培地の抽出液を用いた通常のDNA修復試験の結果を示した。直接検出法においてRec-系の性比は1.05から1.37の範囲であり、対照の性比1.25と同レベルであった。またRec+系の性比においてもも1.03から1.59の範囲であり、対照の性比1.30と同レベルであった。一方培地の抽出液を通常のDNA修復試験に供した場合もRec-系およびRec+系の両系統にお

いて性比の減少は認められなかった。したがってTable2-1-2において検討した*Penicillium*属12種および*Fusarium*属4種によるDNA損傷性マイコトキシンの産生はなかったと判断した。

Table 2-1-2. Detection of DNA damaging mycotoxins of cultured *Penicillium* and *Fusarium* fungi using the *Drosophila* DNA-repair test

Fungi	Sex ratio (Male/Female)			
	Direct detection		Extract[a]	
	Rec-	Rec+	Rec-	Rec+
Control	1.25	1.30	1.22	1.46
P. brevi-compactum	1.09	1.16	1.61	1.28
P. brunneum	1.07	1.59	1.74	3.47
P. citrinum	1.28	1.26	1.48	1.35
P. cyclopium	1.34	1.25	1.34	1.62
P. digitatum	1.29	1.26	1.48	1.42
P. expansum	1.35	1.25	2.24	2.32
P. frequentans	1.31	1.15	1.62	1.46
P. funiculosum	1.30	1.28	1.56	1.50
P. martensii	1.30	1.32	1.18	1.28
P. puberulum	1.16	1.09	1.30	1.75
P. roqueforti	1.25	1.14	1.42	1.54
P. viridicatum	1.12	1.45	1.35	1.33
F. oxysporum	1.08	1.03	1.33	1.66
F. oxysporum	1.05	1.05	1.50	1.41
F. roseum	1.37	1.21	1.63	1.62
F. solani	1.33	1.46	1.50	1.57

a: Extract was administered at a dose of 0.1 ml/g.

Rec-系において性比を大きく減少させた*A. ochraceus*、*A. parasiticus*、*A. versicolor*の3菌種についてDNA損傷性陽性と判断するためには、性比の減少が用量作用性を示す必要がある（18、19）。そこでこれら*Aspergillus*属3

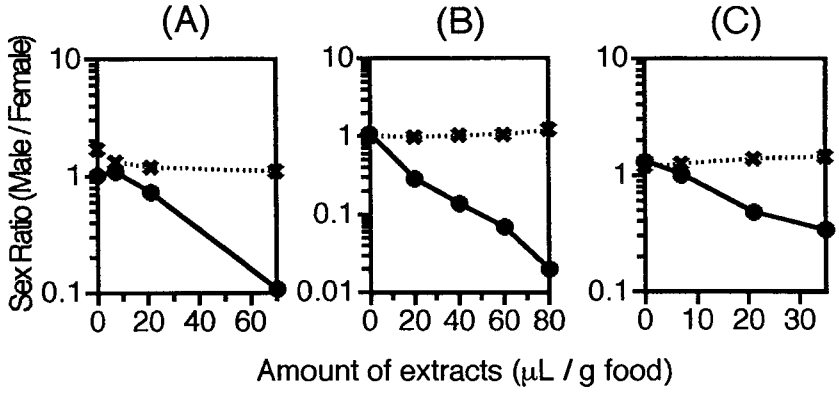


Fig. 2-1-2
DNA damaging effect of fungal extracts
(A):*A. ochraceus*; (C):*A. versicolor*. (B):*A. parasiticus*; (●): Sex ratio in the Rec⁻ stock. (x): Sex ratio in the Rec⁺ stock.

種の抽出液について通常のショウジョウバエDNA修復試験を行った（Fig.2-1-2）。その結果3菌種の抽出液すべてにRec-系において用量の増加に伴い性比の減少が認められたが、Rec+系ではそのような性比の減少は認められなかった。すなわち、これら*Aspergillus*属3種の抽出液はDNA損傷性成分を含むと断定した。

4. 考察

本節で述べた直接検出法は被検物質の抽出・精製を必要とせず、さらに被検物質を餌と共に経口投与する*in vivo*試験であり、従来の変異原性マイコトキシン産生の検索法に比べ大幅に簡便化された検出法である（40）。その簡便化法である直接検出法とカビ培養培地の抽出液を用いた通常のDNA修復試験法の結果を比較したが、両者の検出結果はよく一致した（Table2-1-1、2-1-2）。一部の菌種を試験した場合性比が通常の性比である1から1.5の範囲を大幅に超える値を示した。その最大の原因はマイコトキシンの細胞毒性にあると考えられる。性比の乱れは抽出液を通常のショウジョウバエDNA修復試験に供したときの方が多い傾向を示し、直接検出法においてのみ観察される現象ではなかった。直接検出法において性比が大きかったのは*A. clavatus*であるがRec-およびRec+の両系統において性比が大きくなっており、DNA修復に関係なく雌に対して毒性が強い物質が産生されたことが推察される。

直接検出法は定性的な検出法であるために被検物質のDNA損傷性強度については厳密には予測できない。またショウジョウバエDNA修復試験としてDNA損傷性を明らかにするためにはFig. 2-1-1に示したような用量作用反応を得ることが必要である。しかし直接検出法は成虫数を正確にカウントしなくても牛乳ビンの外から肉眼でビン中に赤い目のショウジョウバエが多いことを観察するだけでDNA損傷性マイコトキシンが産生されたことを確認できる簡便迅速法である。直接検出法をカビによるDNA損傷性マイコトキシン産生の検索法として使用するならば、被検物質の抽出・精製を必要としないために直接検出法は*in vitro*試験系よりも簡便かつ実用的な*in vivo*試験系であると考えられる。

ショウジョウバエDNA修復試験において陽性を示した*A. ochraceus*、*A. parasiticus*、*A. versicolor*の3菌種が産生するDNA損傷性マイコトキシンの確認ついては次節で検討する。

第2節　DNA損傷性マイコトキシンの確認

1. 緒言

これまでにカビが産生するマイコトキシンの変異原性については多くの研究がなされている（4, 41）。例えば*A. flavus*および*A. parasiticus*はアフラトキシンB1を産生し、また*A. versicolor*はステリグマトシスチンを産生する（42）。これらのマイコトキシンは変異原性だけでなく発がん性を示すことも明らかになっている（41）。また第1章第1節においてこれらの物質はショウジョウバエDNA修復試験で陽性を示すことも確認した。しかし*A. flavus*は第2章第1節のショウジョウバエDNA修復試験では陰性であったが、これはショウジョウバエDNA修復試験の検出感度と本条件下でのアフラトキシンB1の産生量の問題であろう。

*A. ochraceus*はオクラトキシンAやペニシリン酸などの複数のマイコトキシンを産生することが知られている（42）。しかし両物質の変異原性についてはその評価が定まっておらず（40, 41, 43, 44, 45, 46）、*A. ochraceus*が産生したマイコトキシンがDNA損傷性を示したことは、*A. ochraceus*が産生するマイコトキシンに関して新知見を見い出せるかもしれない。本節は第1節において陽性を示した3菌種抽出液のDNA損傷性マイコトキシンの本体を分析化学的に明らかにすることを目的に行った。

2. 材料および実験方法

化合物：アフラトキシンB1およびステリグマトシスチンはMakor Chemical社（イスラエル）より購入した。アフラトキシンB1はメタノールに溶解し、標準溶液として10.4 μg/mL溶液を使用した。ステリグマトシスチンはジメチルスルホキシドに溶解し、標準溶液として1mg/mL溶液を使用した。ペニシリン酸は和光純薬（大阪）より購入した。

薄層クロマトグラフィー（TLC）：メルク社製TLCプレートKieselgel 60 Art. 5721（20cm x 20cm）を活性化せずにそのまま使用した。カビ培養培地抽出液中のマイコトキシンの測定には蛍光検出器付TLCクロマトスキャナ（CS-910型、島津製作所製、京都）を用いた。

アフラトキシンB1およびステリグマトシスチンの分析：アフラトキシンB1の分析には

衛生試験法注解に従い展開溶媒としてクロロホルム：アセトン混液（9：1）を使用した（47）。アフラトキシンB1の定量は励起波長365nmおよび蛍光波長420nmによりTLCプレートを走査し、アフラトキシンB1標準と同一のRf値を示すスポットの蛍光強度を測定した。

ステリグマトシスチンの分析も衛生試験法注解に従い展開溶媒としてベンゼン：メタノール：酢酸混液（90:5:5）を用いて分析した（47）。ステリグマトシスチンの定量は展開したTLCプレートに20%$AlCl_3$溶液を噴霧後80℃で30分間放置し、その後励起波長365nmおよび蛍光波長500nmによりTLCプレートを走査し、ステリグマトシスチン標準と同一のRf値を示すスポットの蛍光強度から定量した。

***A. ochraceus*培養培地抽出液のTLCによる分離**：*A. ochraceus*培養培地抽出液0.5mLをTLCプレートの下から1cmの部分に水平に線状にスポットし、ベンゼン：メタノール：酢酸混液（90:5:5）を用いて展開した。展開後TLCプレートに紫外線ランプ照射下に青白い蛍光バンドの存在を確認したのち、TLCプレートの展開した部分を下から水平方向に1cmの幅でかき取った。かき取った各画分はクロロホルムで抽出し、ショウジョウバエDNA修復試験に供した。本実験は展開したTLCプレート上のどの部分にDNA損傷性物質が分離されたかを確認することを目的としたため、Rec-系の試験のみ行った。

高速液体クロマトグラフィー（HPLC）：HPLCは以下の条件により行った。ポンプ：L-6000型（日立製作所、東京）、カラム：YMC-A312（充填剤：C18、内径4.6mm x 15cm；ワイエムシー、京都）、検出器：4200型（日立製作所、東京）、検出波長：225nm、移動相：20%アセトニトリルを含む10mMリン酸緩衝液（pH4.0）、流速：0.8mL/分、試料注入量：20μL。

3. 結果および考察

*A. parasiticus*培養培地抽出液をTLCにより分離し、その蛍光スポットをクロマトスキャナにより測定した結果をFig.2-2-1に示した。図の横軸はRf値を表わし、また縦軸はスポットの蛍光強度を表わす。その結果アフラトキシンB1はRf値0.44にピークとして検出された。*A. parasiticus*培養培地抽出液もRf値0.43にピークを示し、アフラトキシンB1が存在することを確認した。両者のピーク高から*A. parasiticus*培養培地抽出液は1.2μg/mLのア

フラトキシンB1を含むことがわかった。他にもピークが検出されたが、これらのRf値は他のアフラトキシン類のRf値とは一致しなかった。第1節のFig.2-1-1において*A. parasiticus*培養培地抽出液がRec-系の性比を0.1に減少させた用量は50μL/g餌であった。この用量でのアフラトキシンB1濃度は約60ng/g餌となる。一方第1章第1節においてアフラトキシンB1がRec-系の性比を0.1に減少させた用量は0.12nmole/g餌すなわち40ng/g餌であった（Fig.1-1-1）。これらの値は生物試験から算出される値としてはほぼ同レベルの濃度であると考えられる。つまり、*A. parasiticus*培養培地抽出液中に含まれていたDNA損傷性物質はアフラトキシンB1であると結論した。

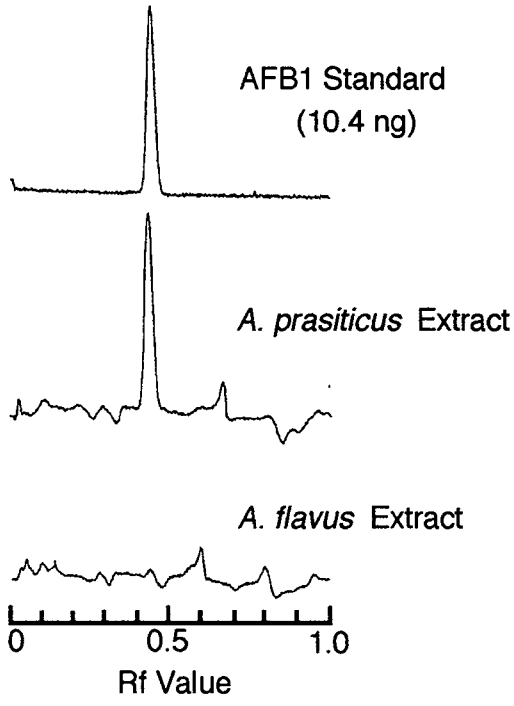


Fig. 2-2-1
Detection of aflatoxin B1 in the *A. parasiticus* and *A. flavus* extracts by TLC

*A. flavus*培養培地抽出液においてもクロマトのRf値0.44に低いピーク様形状を示した。しかし*A. flavus*培養培地抽出液とアフラトキシンB1標準液をTLCプレートに重ね打った時、両者は一本のピークとはならずショルダーを持つピークとなった。したがってRf値0.44のピークはアフラトキシンB1ではなく、本培養条件では*A. flavus*によるアフラトキシンB1の産生はなかった判断した。*A. flavus*は常にアフラトキシンB1を産生するとは限らず（48）、Table2-1-1において*A. flavus*がDNA損傷性陰性であった結果と合致する。

*A. versicolor*培養培地抽出液のTLC分析の結果をFig.2-2-2に示した。ステリグマトシスチンはRf値0.83にピークとして検出された。*A. versicolor*培養培地抽出液もRf値0.83にピークを示し、ステリグマトシスチンが存在することを確認した。両者のピーク高から*A. versicolor*培養培地抽出液は約460μg/mLのステリグマトシスチンを含むことがわかった。

第1節のFig.2-1-1において*A. versicolor*培養培地抽出液がRec-系の性比を0.3に減少させた用量は50μL/g餌であった。この用量をステリグマトシスチン濃度に換算すると約23μg/g餌となる。一方Fig.1-1-2においてステリグマトシスチンがRec-系の性比を0.3に減少さ

せた用量は23nmole/g餌すなわち7.3μg/g餌であった。ステリグマトシスチンの定量はTLCプレートに20%AlCl3溶液を噴霧後にクロマトスキャナにより測定したために、共存物質によりその値が変動しやすいと思われる。またショウジョウバエDNA修復試験におけるステリグマトシスチンの用量作用の反応性が特に鋭敏でないことから（Fig.1-1-2）、アフラトキシンB1に比べDNA損傷強度の誤差は大きくなると予想される。*A. versicolor*培養培地抽出液中のDNA損傷性はステリグマトシスチンにより説明できると考え、抽出液中に含まれていたDNA損傷性物質はステリグマトシスチンであると判定した。

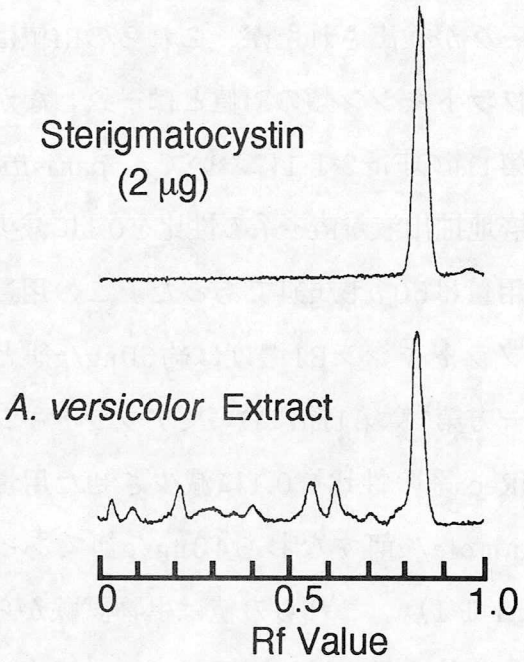


Fig. 2-2-2
Detection of the sterigmatocystin in *A. versicolor* extracts by TLC

オクラトキシンAは本実験で用いたTLC条件では、紫外線ランプ照射下においてRf0.75付近に青白い強い蛍光成分として検出される（47）。*A. ochraceus*培養培地抽出液をTLCにより分離し、紫外線ランプを照射するとRf値0.5-0.7付近に青白い強い蛍光成分が検出された（Fig.2-2-3）。この蛍光成分がDNA損傷性成分であるかを確認するために、TLCプレートを下から水平方向に1cmの幅でかき取

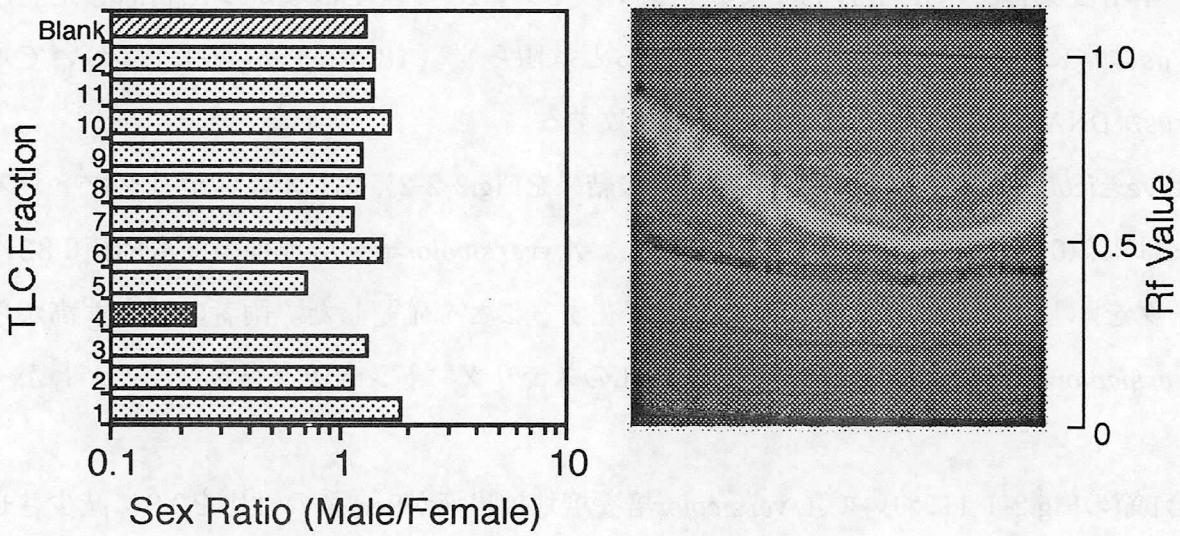


Fig. 2-2-3
Effects of different fractions of the *A. ochraceus* extracts separated by TLC on the sex ratio in the Rec⁻ stock

り、クロロホルムで抽出後ハエDNA修復試験に供した。その結果下から4番目の画分がRec-系の性比を減少させ、この画分（Rf値0.3付近）にDNA損傷性物質が存在した。DNA損傷性物質は青白い強い蛍光成分とは異なる物質であり、オクラトキシンAのような発蛍光物質ではないことが判明した。

*A. ochraceus*が産生するマイコトキシンの中で、上記TLC条件で活性画分に近いRf値を示す物質としてペニシリン酸が報告されている（42）。ペニシリン酸は225nm付近に極大吸収を持つスペクトル示すので、活性画分の紫外部吸収スペクトルを測定したところペニシリン酸と同一のスペクトルであった（Fig. 2-2-4）。

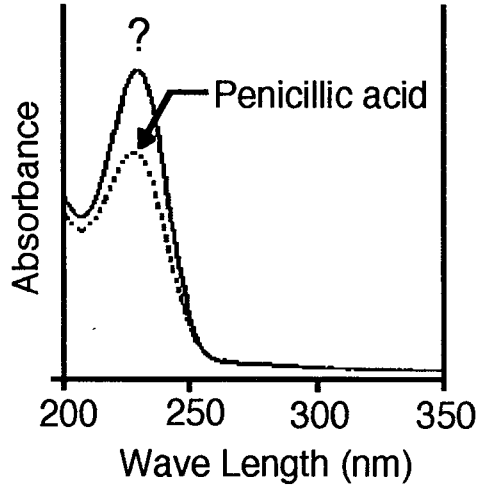


Fig. 2-2-4
UV absorption spectra of penicillic acid and the fourth fraction isolated by TLC from the *A. ochraceus* extracts

DNA損傷性物質がペニシリン酸であるかを確認するために、これまでに報告されているペニシリン酸の分析法により活性画分の確認を試みた。まず活性画分を*A. ochraceus*培養培地抽出液の分離と同条件のTLCにより分離し、Scottらの方法に従いペニシリン酸の検出法であるフェニルヒドラジン溶液を噴霧し、紫外線ランプ照射下においける黄色スポットの検出を試みた（49）。ペニシリン酸はRf値0.35に黄色スポットとして検出されたが、活性画分は黄色スポットを示さなかった。しかしフェニルヒドラジン溶液を噴霧したTLCプレートをヨード蒸気に暴露するとペニシリン酸より少し小さいRf値にスポットを検出した。活性画分はまだ精製が不十分であるため

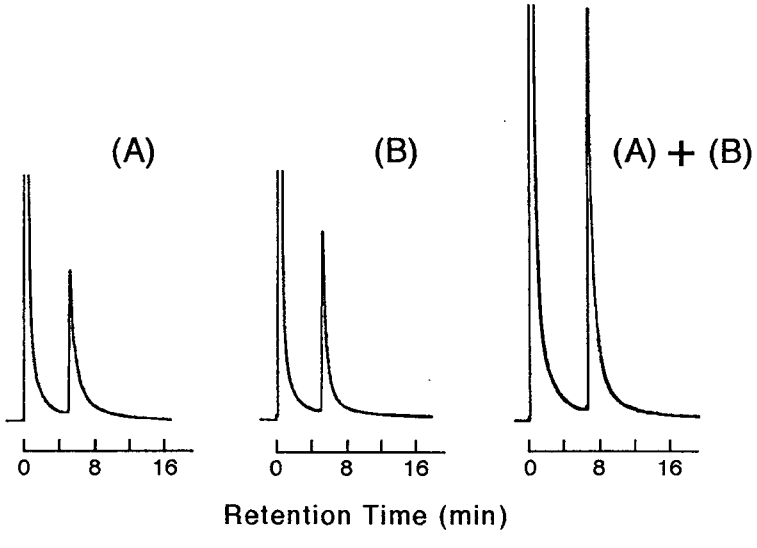


Fig. 2-2-5
Gas chromatographic detection of penicillic acid and the fourth fraction isolated by TLC from the *A. ochraceus* extracts
(A):penicillic acid, (B):the fourth fraction.

にフェニルヒドラジン溶液との反応性が悪かったことも考えられた。次にガスクロマトグラフィーによる確認を試みた（50, 47）。ガスクロマトグラフィーにおける分離では、活性画分はペニシリン酸と同じ保持時間にピークを示した（Fig. 2-2-5）。しかしガスクロマトグラフィーにおけるペニシリン酸のピーク形状はテーリングが顕著で十分な分離とは言えなかった。

分析対象物質がガスクロマトグラフィーにおける分離が不良な場合でも、HPLCにおける分離では良好なピークとして検出されることがある。そこで活性画分をHPLCに注入するとペニシリン酸も検出されたが、ペニシリン酸とは異なる保持時間に大きなピークが検出された（Fig.2-2-6）。活性画分には少なくともまだ2成分の物質が存在することが判明した。

この2成分以外にはピークが検出されなかったので、まずペニシリン酸標準品をハエ修復試験に供したが試験した濃度の範囲では陰性であった（Fig.2-2-7）。活性画分のペニシリン酸濃度からDNA修復試験でのペニシリン酸用量を算出すると0.11mg/g餌であった。この用量はFig.2-2-7のペニシリン酸の修復試験では明らかに陰性であり、ペニシリン酸がDNA損傷性物質である可能性は否定された。また活性画分中のペニシリン酸濃度から考えると、極大吸収波長における吸光強度はペニシリン酸だけでは説明できなかった。活性画分の紫外部吸収スペク

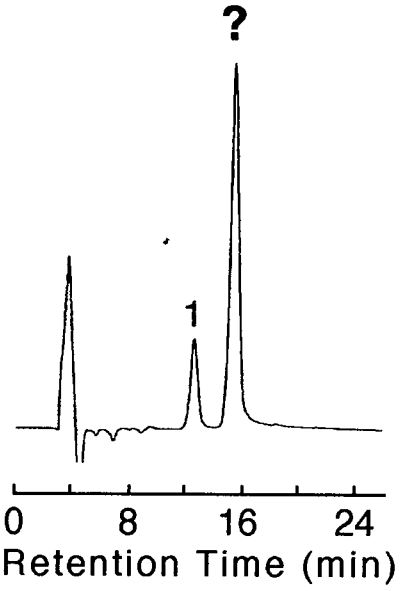


Fig. 2-2-6
HPLC chromatograms of the fourth fraction isolated by TLC from the *A. ochraceus* extracts 1: penicillic acid.

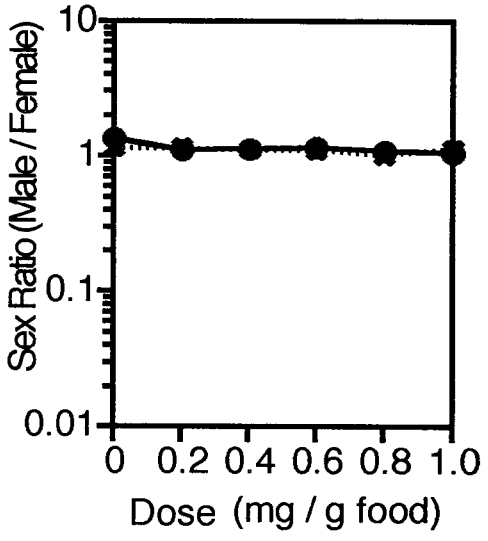


Fig. 2-2-7
DNA damaging effect of penicillic acid
(●): Sex ratio in the Rec⁻ stock. (x): Sex ratio in the Rec⁺ stock.

トルがペニシリン酸のそれと同一であることも考え合わせると、DNA損傷性物質もペニシリン酸と同一の吸収スペクトルを示すことが推測された。HPLC分析においてペニシリン酸の後の大きなピークを分取し紫外部吸収スペクトルを測定すると225nm付近に極大吸収を示した。また分離が不十分ではあったが活性画分のガスクマトグラフィー分析において同一の保持時間を示したことから、活性画分中の2成分は類似性の高い物質である推察された。*A. ochraceus*が産生するDNA損傷性物質はHPLCクロマト上でペニシリン酸の後に検出されるピーク成分ではないかと推察されるが、これまでに*A. ochraceus*がこのような物質を産生することは知られておらず、この物質を明らかにする必要があると考え次節においてその解明を試みた。

第3節　*A. ochraceus*が産生するDNA損傷性マイコトキシンの解明

1. 緒言

第1節において*A. ochraceus*がDNA損傷性マイコトキシンを産生すること明らかにした。*A. ochraceus*はペニシリン酸、オクラトキシンAなどのマイコトキシンを産生することが知られている（42）。第2節において*A. ochraceus*が産生したDNA損傷性マイコトキシンの解明を試みた。*A. ochraceus*培養抽出液のTLC分離によりオクラトキシンAはDNA損傷性マイコトキシンではないことを示した。またTLC分離において挙動が近かったペニシリン酸をショウジョウバエDNA修復試験により試験したが陰性であった。これらの結果を明らかにする過程で*A. ochraceus*が産生するDNA損傷性マイコトキシンは新規物質である可能性が示唆された。本節では*A. ochraceus*を多量培養し、産生されるDNA損傷性マイコトキシンの分離・精製および化学構造の解明を行った。

2. 材料および実験方法

***A. ochraceus*の培養**：第1節で述べたショウジョウバエ培地中でのカビの培養と同様の操作により、30本の牛乳ビン中のショウジョウバエ培地に*A. ochraceus*を接種し、25℃で20日間培養した。

活性炭カラム：カラムクロマト用活性炭（和光純薬、大阪）を水で十分に洗浄し、不純物や粒子サイズの小さいものを除去した。内径1.5cmのガラス製クロマト管に洗浄した

活性炭を水にけん濁させながら高さ20cmになるように充填した。

DNA損傷性成分の分離・精製：*A. ochraceus*を培養した培地をオートクレーブにより滅菌後、アセトニトリル30mLを加え高速ホモゲナイザーにより撹拌抽出した。抽出液は3000回転10分間の遠心分離により可溶性画分と沈殿物とを分離した。沈殿物にさらにアセトニトリル30mLを加えホモゲナイザーにより再度高速撹拌抽出した。アセトニトリル抽出液中に浮遊する菌体をNo.5Aろ紙により除いたのち、150mLごとに500mL分液ロートに移し、そこへ水130mLおよびクロロホルム100mLを加え激しく振とうした。クロロホルム層をナス型フラスコへ移し、水層にさらにクロロホルム100mLを加え同様の操作を繰り返した。牛乳ビン30本分のクロロホルム層をロータリーエバポレータにより約150mLに濃縮し、再び分液ロートに移し100mLの水でクロロホルム層を洗浄した。クロロホルム層は無水硫酸Naにより脱水後ナス型フラスコへ移し、ロータリーエバポレータによりほぼ乾固するまで濃縮し、粗抽出物を得た。

粗抽出物を0.1N水酸化カリウム溶液180mLに溶解し、約30mLごとに6本の活性炭カラムに吸着させた。まず水150mLを流出させてこん濁成分を除去した。さらに20%メタノール溶液を流出させ、溶出液を50mLごとに第2節と同様の条件下のHPLCに注入し、目的成分の溶出画分を採取した。溶出画分をロータリーエバポレータにより濃縮乾固したのち水60mLを加えて溶解した。この溶液をメタノール100mLおよび水150mLにより前処理したC_{18}メガボンドエルート(5g, Analitichem International CA、アメリカ）に負荷した。水60mLを流出させることにより色素およびペニシリン酸を溶出させ、その後20%メタノール溶液を150mL流出させることにより目的成分を溶出させた。ボンドエルート溶出液をロータリーエバポレータにより濃縮乾固したのち、析出物を少量のアセトンに溶解し、さらに石油エーテルを加え冷蔵庫内に放置することにより無色針状の結晶様析出物を得た。

核磁気共鳴装置（NMR）と分析条件：NMRはXL-300型（Varian Associates, Inc. CA、アメリカ）を使用した。測定条件は^{1}Hおよび^{13}C-NMRの測定はそれぞれ299.945MHzおよび75.429MHzで行った。NMRシグナルの帰属は^{1}Hおよび^{13}C-NMR、Distortionless Enhancement by Polarization Transfer （DEPT）、^{1}H-^{13}C Correlation Spectroscopy（COSY）、long range ^{1}H-^{13}C COSY.法により得られた情報を基に行った。

3. 結果

*A. ochraceus*が産生するDNA損傷性マイコトキシンの培地からの抽出は、基本的には第1節で行ったカビを培養した培地抽出液の調製法と同様の操作により行った。その結果30本の牛乳ビン培地から7.47gの粗抽出物を得た。この粗抽出物はペニシリン酸に加え多量の色素を含んでいた。第2節のTLCによる*A. ochraceus*培養培地抽出液の分離においては活性画分は無色であり、色素はきょう雑成分と考えられた。そこで粗抽出物を活性炭カラムクロマトに供し、色素を活性炭に吸着させることを試みた。粗抽出物は水には溶けにくかったが、0.1N水酸化カリウム溶液には溶解したので、水酸化カリウム溶液として負荷した。目的成分はHPLCにより確認しながら20%メタノール溶液により溶出させた。ペニシリン酸などのきょう雑成分がなるべく混入しない範囲を採取したところ、カラム1本当たりの溶出量は300mLであった。この20%メタノール溶出画分をロータリーエバポレータにより濃縮乾固したところ1.25gの析出物を得た。この析出物はまだペニシリン酸を重量換算で約1%含み、また水に溶けたがその水溶液はまだ薄い茶色を呈した。目的成分がペニシリン酸でないことを示すにはペニシリン酸を完全に除く必要があると考え、さらにC_{18}メガボンドエルートによる精製を行った。メガボンドエルートによる精製ではペニシリン酸は水と共に溶出し、目的成分は20%メタノール溶液150mLにより溶出した。この溶出液をHPLCに注入するとFig.2-3-1に示すような単一ピークを示した。そこでこの画分を濃縮乾固後、析出物を少量のアセトンに溶解させ、さらに石油エーテルを加えて再結晶を試みたところ無色の針状結晶が析出した。風乾後結晶の重量を測定したところ0.25gであった。

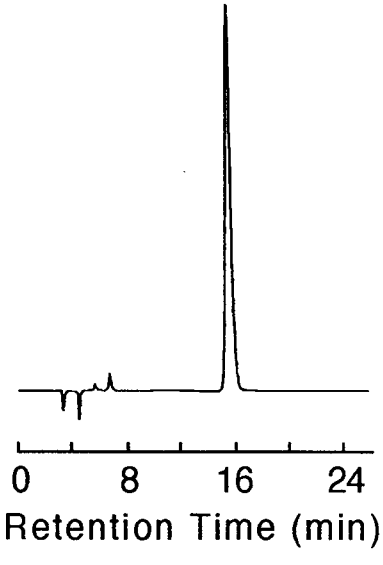


Fig. 2-3-1
HPLC chromatograms of the purified 5,6-dihydropenicillic acid in 20% methanol fraction with Mega Bond Elut separation

この針状結晶のNMRスペクトルを測定したところTable2-3-1に示すような結果を得た。得られた値はSetoらによって報告されたペニシリン酸の帰属とほぼ一致したが（52）、ペニシリン酸には存在しないイソプロピル基の存在を示した。1次元NMRではイソプロピル

Table 2-3-1. NMR data for 5,6-dihydropenicillic acid

	^{1}H	^{13}C
1	—	171.5(s)
2	5.06(s)	89.3(d)
3	—	180.0(s)
4	—	105.7(s)
5	2.21(sep,j = 6.9Hz)	33.2(d)
6－Me	0.91(br-d,j = 6.9Hz)	16.4(q)
7－Me	1.10(br-d,j = 6.9Hz)	15.5(q)
8－OMe	3.92(s)	59.7(q)
－OH	1.64(br-s)	

Values of chemical shifts (d) are shown in ppm, relative to tetramethylsilane used as internal standard in $CDCl_3$ at 25℃.

基が広幅のシグナルとして観測されたが、D_2Oを添加するとシャープな二重線として観察された。NMRスペクトルから推察された目的物質はFig.2-3-2にその構造を示す5-hydroxy-4-methoxy-5-(1-methyl)-2(5H)-furanoneであった。この構造はペニシリン酸の5,6位炭素間の2重結合が水素原子で飽和したものであり、その一般名は5,6-ジヒドロペニシリン酸と称すべき物質であった。高分解能質量分析により得られた目的物質の質量は172.0731であった（Table2-3-2）。この値はNMRスペクトルより推定された構造から算出される質量172.0734と一致した。したがって目的成分は分子式$C_8H_{12}O_4$で表される5,6-ジヒドロペニシリン酸であると結論した。

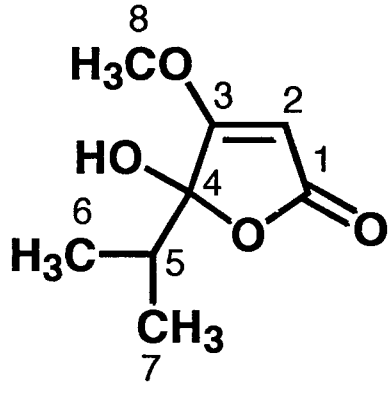


Fig. 2-3-2
Structure of 5,6-dihydropenicillic acid

5,6-ジヒドロペニシリン酸をショウジョウバエDNA修復試験に供したところ、この物質

Table 2-3-2. High resolution mass spectrum data of 5,6-dihydropenicillic acid

Ion	Found	Calculated
$C_8H_{12}O_4$ (M^+)	172.0731	172.0734
$C_8H_{13}O_4$ ($M^+ + H^+$)	173.0811	173.0812

はDNA損傷性を示した（Fig.2-3-3）。DNA損傷性の強度指標であるRec-系において性比を0.1に減少させる用量は約0.65mg/g餌であった。また第1節Fig.2-1-1において*A. ochraceus*培養培地抽出液がRec-系の性比を0.1に減少させた用量は70μL/g餌であった。*A. ochraceus*培養培地抽出液には5,6-ジヒドロペニシリン酸が10.9mg/mL含まれており、性比を0.1に減少させた用量は0.75mg/g餌と計算される。この値は5,6-ジヒドロペニシリン酸純品による値と同レベルの用量である。以上のことから*A. ochraceus*培養培地抽出液中に含まれていたDNA損傷性物質は5,6-ジヒドロペニシリン酸であると結論した。

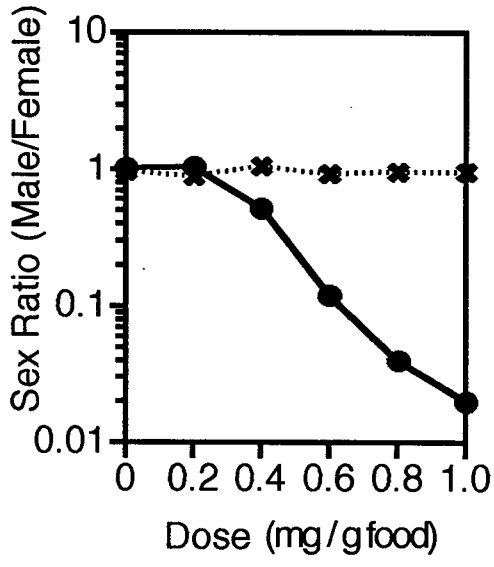


Fig. 2-3-3
DNA damaging effect of 5,6-dihydro-penicillic acid
(●): Sex ratio in the Rec⁻ stock. (x): Sex ratio in the Rec⁺ stock.

4. 考察

*A. ochraceus*培養培地抽出液には変異原性を示す可能性のあるペニシリン酸、オクラトキシンAなどを含むことが推察された（42）。しかし第2節においてこれらの物質がショウジョウバエDNA修復試験において陽性成分である可能性は否定された。

そこで本節では*A. ochraceus*培養培地抽出物に含まれるDNA損傷性物質の分離・精製を行い、その物質が5,6-ジヒドロペニシリン酸であることを明らかにした。5,6-ジヒドロペニシリン酸はペニシリン酸関連物質の合成の一環としてペニシリン酸を化学的に還元したときに生じることが報告されている（53）。またSassaらはマイコトキシン検索の中で、菌種が特定されていない*Aspergillus*属のカビによる5,6-ジヒドロペニシリン酸の産生を報告している（54）。しかしその中では5,6-ジヒドロペニシリン酸は生物活性を示さないだろうと予測した。したがって、本研究が初めて特定された菌種（*A. ochraceus*）による5,6-ジヒドロペニシリン酸の産生を明らかにし、またそのDNA損傷性を明らかにしたことになる。

第4節　小括

1. ショウジョウバエ培地にカビを接種し、カビが産生したマイコトキシンを含む培地を餌として幼虫に摂取させることにより、DNA損傷性マイコトキシン産生を簡便に検出する方法（直接検出法）を開発した。
2. 直接検出法により*A. pareasiticus*によるアフラトキシンB1産生など、カビによる変異原性マイコトキシン産生が検出された。
3. 直接検出法は*in vitro*試験法よりも操作が簡単な*in vivo*検出法であった。
4. 直接検出法により*A. ochraceus*が既知マイコトキシンとは異なるDNA損傷性マイコトキシンを産生することを見いだした。
5. *A. ochraceus*が産生したDNA損傷性マイコトキシンは5,6-ジヒドロペニシリン酸であることを明らかにした。5,6-ジヒドロペニシリン酸の生物活性は本研究において初めて明らかになった。

第3章　5,6-ジヒドロペニシリン酸の変異原性試験

第1節　5,6-ジヒドロペニシリン酸の*in vitro*変異原性試験

1. 緒言

第2章において*A. ochraceus*が産生するDNA損傷性物質が5,6-ジヒドロペニシリン酸であることを明らかにした。本研究はショウジョウバエDNA修復試験の応用的研究であるために、まず*in vivo*レベルで5,6-ジヒドロペニシリン酸がDNA損傷性を示すことが確認された。しかし通常の変異原性試験では*in vitro*変異原性試験を第一次スクリーニングとして行う（10, 11, 12）。5,6-ジヒドロペニシリン酸はショウジョウバエDNA修復試験においてDNA損傷性を示したが、DNA損傷性物質すなわち変異原性物質であるとは断言できない。そこで本節では5,6-ジヒドロペニシリン酸の変異原性試験を細菌を用いた*in vitro*レベルで行った。試験系としては*in vitro*変異原性試験として最も広く行われているAmesテストと、第1章第1節で述べたumuテストの2試験法を用いた。

2. 材料および実験方法

化合物：5,6-ジヒドロペニシリン酸は第2章第2節において精製したものをジメチルスルホキシドに溶解して使用した。ペニシリン酸は和光純薬（大阪）より購入した。ラット肝臓S9はオリエンタル酵母製（東京）を使用した。

Amesテスト：Amesテストはプレインキュベーション法により行った（23）。試験菌株には*Salmonella typhimurium*TA100およびTA98を用いた。被検物質溶液0.1mLおよび一夜培養した試験菌液0.1mLの混液に、S9混合液または0.1Mリン酸緩衝液（pH7.0）のどちらかを0.5mL加えて37℃で20分間振とう培養した。この培養液にさらにソフトアガー液2mLを加え、ただちに全量をシャーレ中の寒天培地上に均一に広げた。シャーレは37℃で48時間培養し、出現した変異コロニー数をカウントした。実験結果は独立した4試行の平均値で表わし、陽性対照としてAF-2（0.01μg/プレート）および2-アミノアントラセン（0.1mg/プレート）を用いた。

umuテスト：umuテストは第1章第2節において述べた方法と同様の方法により行った。

第1章第2節では代謝活性化にショウジョウバエS9を使用したが、本節ではAmesテストと同様にラット肝臓S9混合液を使用した。対数増殖期にある試験菌*Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002を含むTGA培地2mLに変異原物質溶液0.1mLを加え、さらに0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.4) あるいはS9混合液のどちらかを0.4 mL加えて37℃で2時間振とう培養した。被検物質によるumu遺伝子の発現はβ-ガラクトシダーゼ活性として検出し、β-ガラクトシダーゼ活性はMilarの方法により測定した（31）。

3. 結果および考察

Amesテストによる5,6-ジヒドロペニシリン酸の変異原性試験の結果をTable3-1-1に示した。5,6-ジヒドロペニシリン酸は試験に用いたTA100株およびTA98両菌株においてS9(+)(-)の両条件下で最高濃度5mg/プレートまで陰性であった。TA98株においてはS9(+)条件で0.1mg/プレートのコロニー数が陰性対照（0mg/プレート）に比べやや増加しているが、高濃度での用量作用関係がなくまた増加率も陰性対照の1.6倍程度であるので陰性と判断した。

次に5,6-ジヒドロペニシリン酸およびペニシリン酸のumuテストの結果をTable3-1-2に示した。試験に供した範囲の濃度では両化合物によるumu遺伝子の発現は認められず陰性と判断した。

2種の微生物変異原性試験の結果、5,6-ジヒドロペニシリン酸は共に陰性であった。5,6-ジヒドロペニシリン酸がショウジョウバエDNA修復試験と微生物変異原性試験で異なっ

Table 3-1-1. Mutagenic potency of 5,6-dihydropenicillic acid in Ames test

Dose (mg/plate)	Number of revertant colonies[a]			
	TA100		TA98	
	S9(+)	S9(-)	S9(+)	S9(-)
0	129	107	32	25
0.1	118	99	53	33
0.5	122	110	50	32
1.0	122	109	48	25
5.0	103	89	40	24
AF-2[b]	—	465	—	117
2-AA[c]	296	—	208	—

a: Values are the average of 4 experiments.
b: Positive control for S9(-) at the dose of 0.01μg/plates.
c: Positive control for S9(+) at the dose of 0.1μg/plates.

Table 3-1-2. Induction of umu gene expression by penicillic acid and 5,6-dihydropenicillic acid

Dose (mg/ml)	β-Galactosidase activity (units)[a]			
	PA		DHPA	
	S9(-)	S9(+)	S9(-)	S9(+)
0	76	65	76	65
0.5	46	50	86	59
1	55	49	79	47
2	54	48	61	38
3	58	39	52	33

a: Values are the average of duplicate experiments.
Positive Control : AF-2 (0.032 μg/mL, S9(-)) 585 units.
2-AA (0.08 μg/mL, S9(+)) 269 units.

た結果を生じた理由として試験形態の差が考えられる。ショウジョウバエDNA修復試験では投与された5,6-ジヒドロペニシリン酸は幼虫にとっては異物であり、体内でなんらかの代謝反応を受けると考えられる。第1章においてショウジョウバエDNA修復試験の結果は、ハエ体内での変異原物質の代謝を総合的に反映した結果であること示した。一方*in vitro*試験では通常試験菌による代謝活性化は、細胞外の試験菌培養液に加えられたラット肝臓S9によって活性化を行う。5,6-ジヒドロペニシリン酸が*in vitro*系で陰性であったことの理由として、活性体の膜透過性や安定性が低い可能性が推察される。詳細な実験は行っていないが、5,6-ジヒドロペニシリン酸は水溶性が高く、n-ヘキサンなどの無極性溶媒には溶けにくい。一般に脂溶性の低い物質の細胞膜透過性は低いので（55）、5,6-ジヒドロペニシリン酸の活性体が試験菌に吸収されにくいことが想像される。

第2節　5,6-ジヒドロペニシリン酸の*in vivo*変異原性試験

1. 緒言

本章第1節において5,6-ジヒドロペニシリン酸は微生物試験での変異原性陰性という結果を得た。この結果は5,6-ジヒドロペニシリンが*in vivo*でDNA損傷性であったことは相いれないようにも考えられる。しかしこれまでにもウレタンのように微生物変異原性試験

は陰性であるが、*in vivo*試験では陽性を示した変異原物質は知られている（56）。衛生学的な立場から考えれば、より発がん実験に近い*in vivo*変異原性試験性の結果が重要である。そこで本節ではショウジョウバエを用いる翅毛スポットテストにより、5,6-ジヒドロペニシリンの*in vivo*変異原性試験を行った。この方法は、ショウジョウバエDNA修復試験と同様の処理により幼虫に被検物質を投与し、ハエ成虫の羽に生じる変異体である多翅毛および炎毛を顕微鏡下で観察する試験法である。標識遺伝子である*mwh*あるいは*flr*は通常トランスヘテロ状態の劣勢遺伝子であるために、それぞれがホモまたはヘミ状態になった場合にだけ標識遺伝子が発現される。正常な翅毛は1個の細胞から1本のまっすぐな毛が出ている。突然変異によりホモの状態になった時に、多翅毛のみまたは炎毛のどちらかからなるシングルスポット、あるいは多翅毛と炎毛変異体が隣接するふたごスポットを生じる。スポットの大きさは細胞の分裂回数が多いほど大きくなる。ショウジョウバエ翅毛スポットテストでは体細胞の染色体組換えを検出するという真核細胞特有な現象を観察するので、細菌の系では検出されないような変異原活性を検出できる可能性がある。発がんの第一歩は体細胞の突然変異であり、体細胞突然変異の検出系であるショウジョウバエ翅毛スポットテストは発がん物質のスクリーニング系として重要である（18, 20, 57）。

2. 材料および実験方法

化合物：5,6-ジヒドロペニシリン酸は第2章第2節において精製したものを、エタノールおよびTween80の混液（2：1）を3%含む水溶液に溶解した。

ショウジョウバエ：ショウジョウバエは梁博士（大阪大学）より分与されたものを使用した。使用した系統は、雄に*Drosophila melanogaster* $flr^3/TM3, Ser$を、また雌に*Drosophila melanogaster mwh jv;spa*^{pol}を使用した。標識遺伝子*mwh*およびflr^3をトランスヘテロ状態にもつ幼虫を作るために、バージンの雌80匹と雄100匹を別々に成熟させたのち、第2章第1節で述べた牛乳ビンに入った培地中で24時間飼育し交配させた。幼虫の採取は第1章第1節で述べた方法により行い、3齢幼虫を試験幼虫として使用した。

ショウジョウバエ翅毛スポットテスト：3齢幼虫に対する5,6-ジヒドロペニシリン酸の処理は第1章第1節で述べたショウジョウバエDNA修復試験と同様の操作により行った。

5,6-ジヒドロペニシリン酸試験溶液3mLをショウジョウバエインスタント培地1.1gとよく混ぜ合わせ、そこへ約200匹の3齢幼虫を加えて25℃で成虫になるまで飼育した。陽性対照としては0.03%メチルメタンスルフォン酸水溶液を0.3mL使用した。成虫の中から野性型羽を指標に標識遺伝子（*mwh*,+/+,*flr*^{3}）をトランスヘテロに持つハエだけを採取した。標識遺伝子がトランスヘテロでないハエは、突然変異を検出できないが、Ser遺伝子により羽の先に切り込みが入っており区別できる。採取したハエは実体顕微鏡下で羽を体から切り離し、羽をFaure液（抱水クロラール50g、アラビアゴム30g、グリセリン20mL、水285mL）に浸した。Faure液にしばらく浸した羽はスライドガラス上に広げ、乾燥後さらにFaure液を塗布し、カバーガラスをかけ顕微鏡観察用プレパラートとした。顕微鏡下の観察は150-300倍の拡大倍率により行った。得られた結果はKastenbaum-Bowmanの表により有意差検定を行った（58）。

3. 結果および考察

5,6-ジヒドロペニシリン酸のショウジョウバエ翅毛スポットテスト結果をTable3-2-1およびTable3-2-2に示した。5,6-ジヒドロペニシリン酸は10mg/g餌の用量で変異スポットを持つ羽の割合を増加させた（Table3-2-1）。羽一枚当たりのスポット頻度で比較すると、無処理対照群の0.27から0.65へと有意な増加を示した。増加したスポットをその種類ごとに分類すると、5,6-ジヒドロペニシリン酸は10mg/g餌の用量でシングル小スポット頻度を対照群の0.23から約3倍の0.63に有意に増加させ、また双子スポット頻度も同様に0.01から14倍の0.14に増加させた。5,6-ジヒドロペニシリン酸の3mg/g餌の用量におい

TABLE 3-2-1. Frequency of mutagenic spots in the wing treated by 5,6-dihydropeniciilc acid in the *Drosophila*

Treatment	No. of wings examined	Wings with spots	
		Number	Frequency
DHPA 10 (mg/g)	65	42	0.65[a]
3	60	22	0.37
Control	74	20	0.27
MMS (0.03%)	30	27	0.90[a]

a: Values were significantly different from control by means of the Kastenbaum-Bowman test. P=0.05

Table 3-2-2. Mutagenicity of 5,6-dihydropenicillic acid in the *Drosophila* wing spot test

Treatment	Frequencies of spot type		
	Single		Twin [c]
	Small [a]	Large [b]	
DHPA 10 (mg/g)	0.63 [d]	0.08	0.14 [d]
3	0.43	0.08	0.03
Control	0.23	0.05	0.01
MMS (0.03%)	1.77 [d]	1.93 [d]	1.40 [d]

a: Small single spots (one or two cells).
b: Large single spots (three or more cells).
c: Twin spots.
d: Values were significantly different from control by means of the Kastenbaum-Bowman test. P=0.05

てもシングル小スポット頻度が0.43と増加傾向を示した（Table3-2-2）。双子スポットは染色体の組換えのみにより引き起こされることがわかっており（57）、5,6-ジヒドロペニシリン酸がショウジョウバエ体細胞において染色体の組換え変異を生じることが確認された。

5,6-ジヒドロペニシリン酸の変異原性は微生物試験では陰性、ショウジョウバエDNA修復試験および翅毛スポットテストでは陽性であった。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（56）。ウレタンも5,6-ジヒドロペニシリン酸と同様に比較的質量が小さくまた水溶性の高い物質であり、5,6-ジヒドロペニシリン酸の変異原性を考える上で興味深い。

5,6-ジヒドロペニシリン酸は翅毛スポットテストにおいて染色体の組換え変異を誘発した。翅毛スポットテストは主に染色体の組換え変異を検出する系であるが、細菌を用いる変異原性試験はDNAのひとつの塩基の欠失や置換を検出しているにすぎない（23, 32）。おおまかに例えれば翅毛スポットテストは大きな遺伝子の損傷を引き起こす物質を主に検出するのに対して、細菌を用いる変異原性試験は小さな損傷を引き起こす物質を主に検出すると言える。明らかに翅毛スポットテストによって検出される変異原性は危険度が高く、発がん予測の精度も高い評価を得ている由縁である。5,6-ジヒドロペニシリン酸が染色体の組換え変異を誘発したことから、発がん性を示す確率は高いと思われ、

今後さらに詳細な発がん試験などを行うべき物質であると考えられる。

ショウジョウバエ翅毛スポットテストとショウジョウバエDNA修復試験は共にショウジョウバエを用いる変異原物質検出試験である。ショウジョウバエDNA修復試験は開発されて日が浅く蓄積されたデータはまだ多くはない。一方ショウジョウバエ翅毛スポットテストは*in vivo*変異原性試験としては確立された実験系であり発がん予測の精度も高い（18, 57）。しかし実験に要する労力はショウジョウバエDNA修復試験の方がはるかに少ない。成虫の雄雌を肉眼でカウントするDNA修復試験に対して、翅毛スポットテストではプレパラートに固定した羽の翅毛を顕微鏡下で一本づつ観察する必要がある。また5,6-ジヒドロペニシリン酸の変異原性検出感度においても翅毛スポットテストでは10mg/g餌の用量が必要であったが、DNA修復試験では性比を0.1に減少させる用量は0.65mg/g餌であり、約15倍の感度差がある（第2章第3節）。また翅毛スポットテストにおける用量作用関係はDNA修復試験ほど明確な直線性を示しにくく、通常データの統計処理により有意性を判定する必要がある（59）。したがって食品成分など環境物質の変異原性試験としての翅毛スポットテストの位置付けは、第2次スクリーニングということになる。これまでのショウジョウバエDNA修復試験に関する研究は、試験法としての評価のための既知変異原物質の検出感度が中心であり（18, 19）、この方法による新規変異原物質の検出例はなかった。第2章において検出した5,6-ジヒドロペニシリン酸はショウジョウバエDNA修復試験によって検索された最初の変異原物質である。ショウジョウバエDNA修復試験は第2章において示したような、特定の条件下においては*in vitro*試験よりも優れた第1次スクリーニング系として活用されることが期待される。

第3節　小括

1. 5,6-ジヒドロペニシリン酸は*in vitro*変異原性試験であるAmesテストおよびumuテストでは陰性であった。
2. ショウジョウバエ翅スポットテストにおいて5,6-ジヒドロペニシリン酸は変異原性を示し、染色体の組み換えを誘発することが明らかにした。
3. ショウジョウバエDNA修復試験は*in vitro*変異原性試験で陰性の変異原物質をも陽性に検出し、その検出感度が優れていることを示した。

第4章　5,6-ジヒドロペニシリン酸の衛生学的研究

第1節　*A. ochraceus*およびその近縁種による5,6-ジヒドロペニシリン酸の産生

1. 緒言

5,6-ジヒドロペニシリン酸については、これまで変異原性など生物活性に関する報告は全くない。またカビによる5,6-ジヒドロペニシリン酸産生についても、Sassaらによる正確には菌種が同定されていない*Aspergillus*属による産生が報告されているだけである（54）。本節では*A. ochraceus*による5,6-ジヒドロペニシリン酸産生の基礎的知見を得るために以下の実験を行った。まず*A. ochraceus*が普遍的に5,6-ジヒドロペニシリン酸を産生するかを検討した。また*A. ochraceus*が5,6-ジヒドロペニシリン酸を産生する際の基礎的データとして、異なった栄養条件下での5,6-ジヒドロペニシリン酸の産生状態をペニシリン酸の産生と比較しながら観察した。

2. 材料および実験方法

***A. ochraceus*およびその近縁種**：第2章第1節で述べた高鳥博士より分与された*A. ochraceus*他に、坪内博士（名古屋市衛生研究所）から分与された10種の*A. ochraceus*、3種の*A. elegans*および*A. sclerotirum*（60）を使用した。また*A. melleus*および*A. ostianus*は発酵研究所（大阪市）より購入したものである。

化合物：5,6-ジヒドロペニシリン酸は第2章第2節において精製したものを、またペニシリン酸は和光純薬（大阪）より購入した。酵母抽出物はDifco社製（Michigan、アメリカ）を使用した。

培地：ポテトデキストロース寒天培地（PDA培地）は市販品（日水製薬、東京）を使用した。その組成はポテト抽出物を0.4%、ブドウ糖を2%、寒天を1.5%含む。酵母抽出物ショ糖培地（YES培地）は衛生試験法注解にしたがって調製し、酵母抽出物を2%、ショ糖を20%および1%の寒天を含む（47）。ショウジョウバエ培地は第2章第2節と同じ組成のものを使用した。これらの培地は10mLごとに内径3.6cm高さ12.5cmのガラスビンに分

注し、オートクレーブにより121℃で15分間滅菌したものを使用した。

培地での*A. ochraceus*の培養：白金耳によりPDA培地上で培養した17種の*A. ochraceus*およびその近縁種のカビ菌体を、約1mm立方の培地と共にショウジョウバエ培地表面の中心部に接種した。カビを接種した培地は28℃で10日間培養した。栄養成分の異なった培地での培養の場合は、*A. ochraceus*を1mL当たり1.3×10^4個の胞子を含むように0.1%Tween80水溶液にけん濁させ、1mLずつ各培地に接種し28℃で培養した。

***A. ochraceus*培養培地中の5,6-ジヒドロペニシリン酸の分析**：ガラスビン中の*A. ochraceus*を培養した培地にアセトニトリルを30mL加え、高速ホモゲナイザーにより撹拌抽出した。抽出液はNo.5Aろ紙（アドバンテック、東京）によりろ過し、さらに遠心分離により固形成分を除去した。遠心上清は水により希釈後HPLCに注入し、5,6-ジヒドロペニシリン酸およびペニシリン酸を測定した。HPLC条件は第2章第2節で述べた条件を使用した。

3. 結果

10種の*A. ochraceus*およびその近縁種の*Aspergillus*属によるショウジョウバエ培地中での5,6-ジヒドロペニシリン酸およびペニシリン酸の産生結果をFig.4-1-1に示した。その結果産生量の多少に差はあるが、すべての菌株で5,6-ジヒドロペニシリン酸およびペニシリン酸の産生が認められた。10日間の培養では5,6-ジヒドロペニシリン酸の産生量はペニシリン酸の産生量と

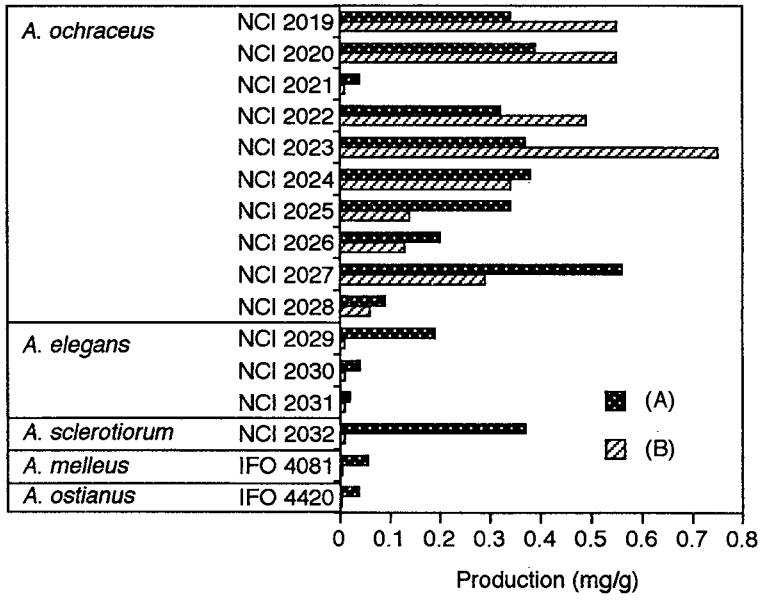


Fig. 4-1-1
Production of 5,6-dihydropenicillic acid and penicillic acid by *A. ochraceus* and its related strain in the *Drosophila* medium
(A): 5,6-dihydropenicillic acid, (B): penicillic acid.

同等かそれ以上のレベルを示した。産生された5,6-ジヒドロペニシリン酸濃度は最高0.56mg/g、平均で0.23mg/gであった。またペニシリン酸濃度は最高0.75mg/g、平均で0.17mg/gであった。*A. ochraceus*以外の菌種は株数が少ないため断定はできないが、*A. ochraceus*による5,6-ジヒドロペニシリン酸およびペニシリン酸の産生量が他の菌種より多い傾向を示した。

次に栄養条件の異なる3種の培地での*A. ochraceus*による5,6-ジヒドロペニシリン酸の産生について検討した（Fig.4-1-2）。栄養分の少ないPDA培地ではペニシリン酸の産生は5日間の培養で1.2mg/gに達し、その後培養を続けても生産の増加を認めなかった。一方5,6-ジヒドロペニシリン酸は培養期間中ほとんど検出されず、最高検出濃度は0.04mg/gであった。栄養分の多い培地であるYES培地ではまずペニシンリン酸の産生が認められ、7日目にPDA培地での最高産生量の2倍の2.4mg/gに達し、その後なだらかに減少した。そしてペニシンリン酸の減少に伴って5,6-ジヒドロペニシリン酸の産生が認められた。5,6-ジヒドロペニシリン酸の最高濃度は0.8mg/gであった。ショウジョウバエ培地では、より顕著な傾向を示した。急激なペニシンリン酸の産生は3日目に最高濃度2.6mg/gを示し、その後急激に減少し13日目以降はほとんど検出されなくなった。一方、5,6-ジヒドロペニシリン酸の産生は9日目で1.1mg/gに達したが、ペニシンリン酸が検出されなくなってからはその増加は認められなかった。ペニシリン酸がまず産生され、その後ペニシリン酸の減少と共に5,6-ジヒドロペニシリン酸の増加が認められたことから、5,6-ジヒドロペニシリン酸

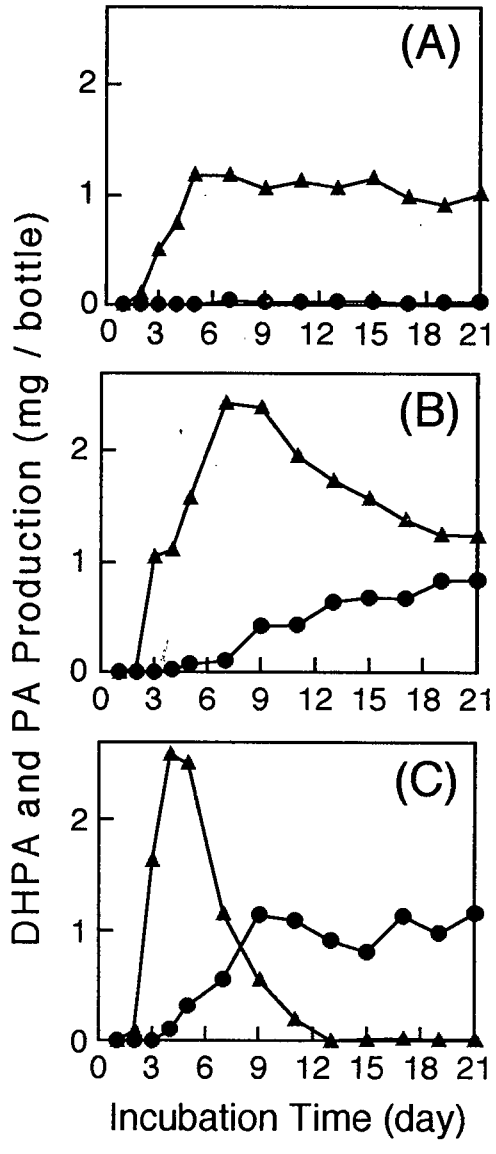


Fig. 4-1-2
Production of 5,6-dihydropenicillic acid and penicillic acid by *A. ochraceus* in the various medium
(A): PDA medium, (B): YES medium, (C): *Drosophila* medium. (●):5,6-dihydropenicillic acid, (▲):penicillic acid

はペニシンリン酸に由来することが示唆された

5,6-ジヒドロペニシリン酸の産生は栄養分の多いYES培地などでは多く認められたが、栄養分の少ないPDA培地ではほとんど産生されずペニシリン酸のみが産生された。そこでYES培地の酵母抽出物濃度を増減させて*A. ochraceus*による5,6-ジヒドロペニシリン酸の産生が変化するかを10日間の培養で検討した（Fig.4-1-3）。酵母抽出物を含まない条件では5,6-ジヒドロペニシリン酸およびペニシリン酸は産生されなかった。5,6-ジヒドロペニシリン酸は酵母抽出物の濃度2.0%までは濃度の増加と共にその産生が増加したが、それ以上の酵母抽出物濃度では逆に産生が減少した。ペニシリン酸の産生も同様の傾向を示したが、高濃度酵母抽出物を含む培地でのペニシリン酸産生の減少は、5,6-ジヒドロペニシリン酸の減少に比べはるかに顕著であった。

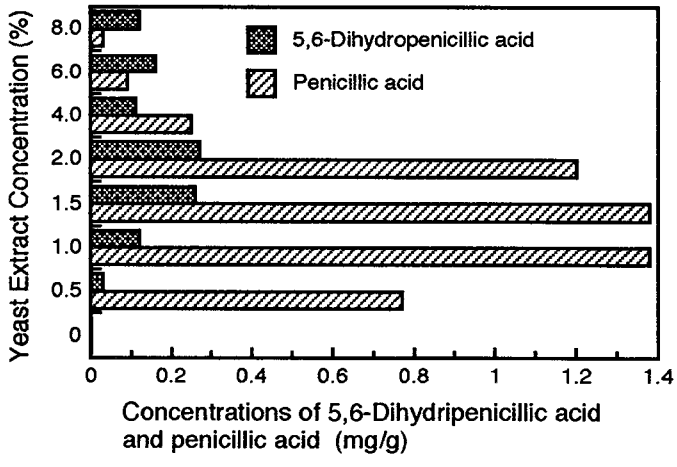


Fig. 4-1-3
Effect of yeast extract concentration on the production of 5,6-dihydropenicillic acid and penicillic acid by *A. ochraceus*

4.考察

ペニシリン酸は1913年に*P. puberulum*から分離され、その構造がBirkinshawらによってが明らかにされたマイコトキシンである（53）。*A. ochraceus*がペニシリン酸を産生することは1960年代から知られていた（61）。しかしその構造が類似した5,6-ジヒドロペニシリン酸については、産生する菌種や変異原性などの生物活性がこれまで報告されていなかった。その理由としては以下のことが考えられる。

ペニシリン酸についての研究の多くは1960年代および1970年代になされた。その当時のペニシリン酸の検出法は、TLC分離後フェニルヒドラジン溶液を噴霧して蛍光スポットを検出する方法や（49）、ガスクロマトグラフィーによる検出であった（50, 51）。しかし5,6-ジヒドロペニシリン酸はフェニルヒドラジン溶液を噴霧しても蛍光を発せず、またFig2-2-5で示したようにガスクロマトグラフィーにおいても5,6-ジヒドロペニシリン酸とペニシリン酸は同じ保持時間を示し両者を分離できなかった。さらに通常カビの培養

に多く用いられるPDA培地では5,6-ジヒドロペニシリン酸の産生は極めて少量である。これらの理由によりペニシリン酸を対象に分析した場合ペニシリン酸は検出されても、同時に共存していた可能性のある5,6-ジヒドロペニシリン酸についての報告がなかったものと思われる。

しかしショウジョウバエ培地中では、試験に供した*A. ochraceus*およびその近縁カビのすべてがペニシリン酸と共に5,6-ジヒドロペニシリン酸を産生したことから（Fig.4-1-1）、一定の栄養条件がそろえばこれらのカビは5,6-ジヒドロペニシリン酸を産生すると推察される。さらにFig.4-1-2において、まずペニシリン酸が産生されて、その後ペニシリン酸の減少と共に5,6-ジヒドロペニシリン酸の増加が始まったことから、5,6-ジヒドロペニシリン酸はペニシンリン酸に由来するものと推察される。またショウジョウバエ培地中では、ペニシンリン酸が減少し、検出されなくなると5,6-ジヒドロペニシリン酸の産生が止まった。YES培地においても酵母抽出物の割合に応じてペニシンリン酸と5,6-ジヒドロペニシリン酸の産生は相関した（Fig.4-1-3）。これらのことも5,6-ジヒドロペニシリン酸の由来に関する推察を支持する結果である。したがって*A. ochraceus*はまずペニシンリン酸を産生し、その後ペニシリン酸の5,6位炭素二重結合を飽和し、5,6-ジヒドロペニシリン酸が生成すると思われる。栄養条件の乏しい培地での培養で5,6-ジヒドロペニシリン酸がほとんど検出されなかったため、この反応過程が進行するにはある程度の栄養条件が必要と思われる。

第2節　細菌によるペニシリン酸から5,6-ジヒドロペニシリン酸への変換

1. 緒言

本節では細菌によるペニシリン酸から5,6-ジヒドロペニシリン酸への変換について研究した。第1節において*A. ochraceus*による5,6-ジヒドロペニシリン酸産生はペニシリン酸に由来すると推察した。ペニシリン酸から5,6-ジヒドロペニシリン酸への反応は5,6位炭素不飽和二重結合が水素原子により飽和される還元反応であるので、比較的単純にその反応が進行すると考えた。そこで*in vitro*レベルでの酵素反応により説明できるのではないかと考えて、5,6-ジヒドロペニシリン酸産生に必要と思われた酵母抽出物およびペニシリン酸を含むリン酸緩衝液に、*A. ochraceus*抽出液を加えて反応を試みた。ところが期待したような変換は認められなかった。しかし反応液を一夜放置するとペニシリン酸の一部

が5,6-ジヒドロペニシリン酸に変換されたことを見いだし、さらに細菌の増殖によると思われる混濁が認められた。この反応液から変換を行った細菌を分離し、その同定を試みた。

2. 材料および実験方法

化合物：ペニシリン酸は和光純薬（大阪）より購入した。市販のペニシリン酸は5,6-ジヒドロペニシリン酸を0.1%含んでいた。ペニシリン酸から5,6-ジヒドロペニシリン酸への変換を検出する基質としてはその純度に問題があると考え、メガボンドエルート（5g、C18、Analitichem International、CA、アメリカ）により精製した。10mg/mLのペニシリン酸水溶液をメガボンドエルートに負荷し、水1Lでペニシリン酸だけを溶出させ、5,6-ジヒドロペニシリン酸が含まれていないことを確認したうえで使用した。

細菌同定キット：API20NE（Api Bio Merieux S.A.、フランス）を使用した。

細菌：*Pseudomonas cepacia* (IFO 14595)、*P. aeruginosa* (IFO 13275)、および*Bacillus subtilis* (IFO 3134) は発酵研究所（大阪市）より購入した。細菌は酵母抽出物1mg、ショ糖10mgを含む50mMリン酸緩衝液（pH7.0）1mL中にて培養した。

***A. ochraceus*抽出液とペニシリン酸の反応**：20cmシャーレ中のPDA培地中で培養した*A. ochraceus*に100mLのリン酸緩衝液（10mM、pH6.0）を加え、高速ホモゲナイザーにより撹拌抽出した。抽出液を透析用セロファンチューブに移し、20Lの水により低温室にて2日間透析した。この透析内液を*A. ochraceus*抽出液として使用した。反応はペニシリン酸溶液（60μg/mL）、酵母抽出物溶液（1mg/mL）、ショ糖溶液（10mg/mL）、0.1Mリン酸緩衝液（H7.0）をそれぞれ1mLづつ混合した溶液に*A. ochraceus*抽出液または水を1mL加え、25℃に静置して行った。反応液中のペニシリン酸はHPLCにより測定した。

細菌によるペニシリン酸の変換：50mMリン酸緩衝液（pH7.0）1mL中にペニシリン酸20μg、酵母抽出物1mg、ショ糖10mgを溶かし培養液とした。この培養液に*P. aeruginosa*、*P. cepacia*あるいは*B. subtilis*のうち一種の菌を一白金耳加え25℃にて一日培

養した。培養液中のペニシリン酸および5,6-ジヒドロペニシリン酸はHPLCにより測定した。

*P. cepacia*菌体成分によるペニシリン酸の変換：*P. cepacia*をペニシリン酸を含まない前述の培養液中で一夜培養し、その遠心分離上清液（12000 x *g*、5分間）0.8mLと100ppmペニシリン酸溶液0.2mLを混合し25℃で3.5時間保温した。*P. cepacia*培養液を遠心分離し沈殿させた菌体は、その内容物を取り出すために培養液と等量の50mMリン酸緩衝液（pH7.0）にけん濁させ超音波処理した。このけん濁液0.8mLを同様にペニシリン酸と反応させた。

また*P. cepacia*培養液の遠心分離上清液0.8mLを100℃で15分間加熱し、100ppmペニシリン酸溶液0.2mLを加え25℃で5時間保温した。次に未処理の*P. cepacia*培養上清液を分子量10000で分画する遠心限外ろ過膜（ミニセント10型、東ソー、東京）により分画した。二分された上清液のそれぞれ0.8mLを同様にペニシリン酸と反応させた。反応液中のペニシリン酸および5,6-ジヒドロペニシリン酸はHPLCにより測定した。

3. 結果および考察

ペニシリン酸を*A. ochraceus*抽出液と5時間反応させたが、ペニシリン酸に変化は認められなかった（Fig4-2-1）。念のためにこの反応液をさらに放置し、24時間後の反応液をHPLCで測定すると、5,6-ジヒドロペニシリン酸の小さなピークが*A. ochraceus*抽出液を加えた反応液と無添加の反応液の両液で検出された。このとき両反応液には混濁が認められた。当初は5時間程度の反応時間しか予想していなかったので反応液は滅菌していなかった。そのため、この混濁は細菌の増殖によ

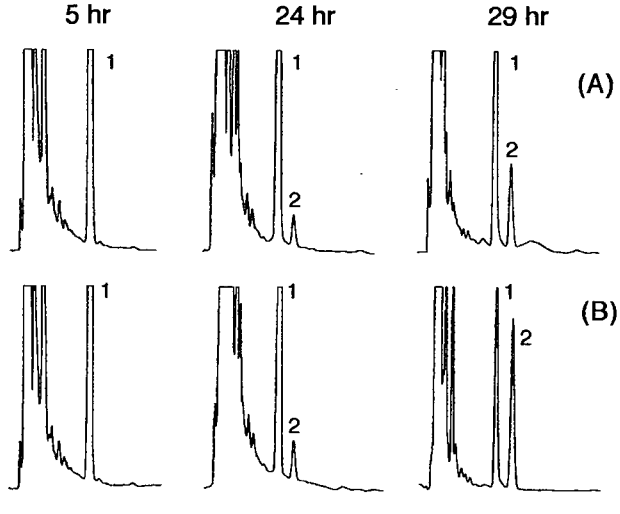


Fig. 4-2-1
HPLC chromatograms of penicillic acid incubated with the extract of *A. ochraceus* cells
(A): with the extract of *A. ochraceus* cells. (B) : Blank (without the extract of *A. ochraceus* cells).
1 : penicillic acid, 2 : 5,6-dihydropenicillic acid.

るものではないかと考え、さらに反応液を振とうしながらさらに5時間放置した。その結果反応液中のペニシリン酸は減少し、5,6-ジヒドロペニシリン酸の増加が認められた。また反応液の混濁度合は増しており、*A. ochraceus*抽出液を加えなかったブランク反応液の方が混濁が大きかった。*A. ochraceus*抽出液を含まないブランク反応液において5,6-ジヒドロペニシリン酸の増加がより多かったので、この混濁は反応液成分に由来する雑菌ではないかと考えた。すべての反応液成分を滅菌した条件下では5,6-ジヒドロペニシリン酸の増加は認められず、酵母抽出物溶液を滅菌しなかったときにだけ5,6-ジヒドロペニシリン酸が増加したことから、反応液中のペニシリン酸から5,6-ジヒドロペニシリン酸への変換は、酵母抽出物に含まれていた細菌による反応によって生じたと判断した。

次にどのような細菌が変換反応を行ったか確認するために、混濁した反応液を一般細菌用寒天プレートに塗布し、25℃で2日間培養したところ2種類のコロニーを検出した。コロニーは粘着性があり、腐敗臭を放っていた。シングルコロニーを得るためにそれぞれのコロニーをさらに培養したのち、Gram染色したところGram陰性の小さい桿菌とGram陽性の大きい桿菌とに分類された。それぞれの菌を先の組成の反応液に加え48時間培養したところ、Gram陰性菌を加えた場合のみペニシリン酸の減少と5,6-ジヒドロペニシリン酸の増加が認められた（Fig4-2-2）。

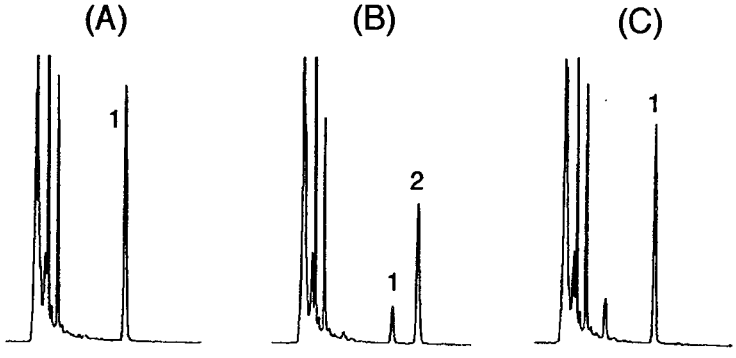


Fig. 4-2-2
HPLC chromatogram of penicillic acid incubated with the contaminated bacteria
(A) :penicillic acid alone, (B) :penicillic acid + Gram negative bacteria, (C) : penicillic acid + Gram positive bacteria. 1:penicillic acid, 2 : 5,6-dihydropenicillic acid.

Gram陰性菌を同定するために細菌同定用キットAPI20NEにより試験したところ、このGram陰性菌は*Agrobacterium radiobactor*であると結論された。*A. radiobactor*は植物の根に付着した土壌などから分離される、Gram陰性の桿菌である。その培養培地は腐敗臭を生じ、酵母抽出物の添加により生育が促進される（62）。これらの知見は本研究において観察された結果とよく一致した。

*A. radiobactor*は環境中に存在する腐敗菌であるので、他の腐敗菌によっても同様の反応を生じるかを確かめるために、手持ちのストックの中から*P. cepacia*および*P. aeruginosa*

Table 4-2-1. Conversion of penicillic acid to 5,6-dihydropenicillic acid by environmental bacteria

	Incubation Period			
	Initial		1 day	
	PA[a]	DHPA[b]	PA[a]	DHPA[b]
Control	17.09	0		
P. cepacia			0	16.73
P. aeruginosa			0	16.78
B. subtilis			12.56	0

a: penicillic acid (μg/mL).
b: 5,6-dihydropenicillic acid (μg/mL).

についてもペニシリン酸存在下で培養した（Table4-2-1）。対照菌として*B. subtilis*を用いた。24時間*P. cepacia*および*P. aeruginosa*と培養するとペニシリン酸は消失し、反応開始前のペニシリン酸濃度とほぼ同レベルの5,6-ジヒドロペニシリン酸が検出された。対照菌の*B. subtilis*は全く変換しなかった。

変換は細菌が産生する酵素によって行われたと想像されたので、その可能性について検討した（Table4-2-2)。*P. cepacia*を一夜培養した液体培地を遠心分離し、菌体を除いた上清液をペニシリン酸と3.5時間反応すると、半分以上のペニシリン酸が5,6-ジヒドロペニシリン酸へ変換された。一方遠心分離した菌体を超音波抽出し、その抽出液をペニシリン酸と反応しても5,6-ジヒドロペニシリン酸への変換はほとんど認められなかった。

次に加熱処理した上清液をペニシリン

Table 4-2-2. Conversion of penicillic acid to 5,6-dihydropenicillic acid by the supernatant of *P. cepacia*[a]

	PA[a]	DHPA[a]
Supernatant	44.1	55.9
Sonicated *P. cepacia*	97.0	3.0

a: Relative peercentages of PA (penicillic acid) and DHPA (5,6-dihydropenicillic acid in the incubation mixture.

Table 4-2-3. Conversion of penicillic acid to 5,6-dihydropenicillic acid by the supernatant of *P. cepacia*

Supernatant	PA[a]	DHPA[a]
Intact	63.2	36.8
Heated [b]	100	0
MW ‹ 10000 [d]	100	0
MW › 10000 [d]	69.5	30.5

a: Relative percentages of PA (penicillic acid) and DHPA (5,6-dihydropenicillic acid in the incubation mixture.
b: The supernatant was heated at 100°C for 15 min.
c: The supernatant was ultrafiltrated.

酸と5時間反応したが、5,6-ジヒドロペニシリン酸への変換は認められなかった（Table4-2-3)。また未処理の上清液を限外ろ過により分子量10000を境に二分し、それぞれをペニシリン酸と反応させたところ、分子量10000以下の画分は5,6-ジヒドロペニシリン酸への変換を示さなかったが、分子量10000以上の画分は上清液と同等の変換を示した。

これらの結果は*P. cepacia*が産生した高分子で熱に不安定な成分、すなわち酵素がペニシリン酸から5,6-ジヒドロペニシリン酸への変換を行ったことを示すものである。

4.考察

*Penicilium*属のカビによるペニシリン酸の生合成経路はBentleyらによって明らかにされている（63, 64）。しかし彼等はペニシリン酸を最終産物として想定しているために、その経路ではペニシリン酸から先の反応については全く言及していない。

マイコトキシンの代謝研究は、変異原性および発がん性発現のための活性化あるいはその逆の解毒分解機構の解明に関するものが多い（41, 65）。本節において示された結果の重要性は変異原性陰性の物質から陽性物質への変換が*A. radiobactor*によってなされたことにあると考えられる。しかもその変換は*A. radiobactor*に特異的な反応ではなく*P. cepacia*および*P. aeruginosa*のような環境中に存在する腐敗菌によっても進行した。このような変換は変異原性の観点から見れば毒性化反応とみなすことができる。微生物によるマイコトキシンの分解・不活性化については研究がなされてはいたが（66, 67）、環境中の細菌による変異原性物質への変換については注目されておらず、今後は食品衛生上考慮すべき反応形態であると思われる。

第3節　*A. ochraceus*による食品中での5,6-ジヒドロペニシリン酸の産生

1. 緒言

毒性を示すマイコトキシンの食品衛生上最も問題となる点は、そのマイコトキシンによる食品汚染があるかどうかである。アフラトキシンは環境発がん物質の中では最強の発がん力を示し、さらにトウモロコシやナッツ類などの食品で汚染事例が報告されている（68, 69, 70）。そのためにナッツ類や穀類においてppbレベルでの残留検査が日常的に行われている（71）。その他にもマイコトキシン汚染による食品中毒事例は過去何度かあり（65, 72）、食品衛生上重要な監視項目のひとつである。

*A. ochraceus*は通常の環境下においても検出される一般的なカビであり、米など多くの食品から*A. ochraceus*が分離され（60, 73）、*A. ochraceus*が産生するマイコトキシンによる食品の汚染の可能性がある。Gouramaらは米に*A. ochraceus*を接種したときにペニシリン酸を産生することを報告している（74）。ペニシリン酸は*A. ochraceus*だけでなく多くの*Penicilium*属のカビによっても産生される。Kurtzmanらはトウモロコシに*P. martnsii*を接種したときにペニシリン酸を産生することを報告している（75）。しかし実際の食品からペニシリン酸を検出した例は極めて少ない（51）。その理由はペニシリン酸は安定性が低く、食品中に残留しにくいためと考えられる（76, 77）。本節では食品に*A. ochraceus*を接種し、5,6-ジヒドロペニシリン酸が産生されるかを確認し、さらに5,6-ジヒドロペニシリン酸による食品汚染の可能性を検討した。食品汚染を考える上で重要である5,6-ジヒドロペニシリン酸の安定性を、SH化合物との反応性を指標としてペニシリン酸と比較検討した。

2. 材料および実験方法

食品：市販されている精白米、玄米、上新粉、小麦粉、大麦、コーンミール、大豆、小豆、味噌、粒状アーモンド、メザシを使用した。これらの食品は過去に*A. ochraceus*による汚染が報告されている（73）。

食品中での*A. ochraceus* による5,6-ジヒドロペニシリン酸の産生：食品20gを200mL三角フラスコに入れさらに水10mLを加えてからオートクレーブにより滅菌した。そこへ*A. ochraceus*胞子をけん濁させた0.1%Tween80溶液（1.3x10^{4}個/mL）を1mL加え28℃で10日および20日間培養した。上新粉中での*A. ochraceus* の培養は、8、16、20、24、28、32℃の異なった温度条件下で20日および40日間行った。

カビを培養した食品にアセトニトリル100mLを加え、高速ホモゲナイザーにより撹拌抽出した。以下第1節で述べた方法により食品中に産生された5,6-ジヒドロペニシリン酸およびペニシリン酸を分析した。

5,6-ジヒドロペニシリン酸のSH化合物との反応性：1mM5,6-ジヒドロペニシリン酸溶液0.1mL、1 mMペニシリン酸溶液0.1mLおよび100mMリン酸緩衝液（pH7.0）0.7mLの混合溶液に、2mM L-システイン溶液または2mM還元型グルタチオン溶液を0.1mL混合し、

室温で3時間静置した。5,6-ジヒドロペニシリン酸およびペニシリン酸濃度の変化はHPLCにより測定した。

3. 結果

11種類の食品に*A. ochraceus*を接種したとき、6種の食品中で5,6-ジヒドロペニシリン酸およびペニシリン酸の産生を認めた（Table4-3-1）。*A. ochraceus*の生育はメザシ以外の食品では良好であった。10日間の培養で5,6-ジヒドロペニシリン酸の産生が最も高かったのは、上新粉すなわち米の粉で104μg/g産生された。その他米、小麦粉など穀類においても5,6-ジヒドロペニシリン酸の産生が認められた。一方ペニシリン酸の産生も穀類などにおいて認められ、5,6-ジヒドロペニシリン酸よりは高濃度であった。上新粉中の5,6-ジヒドロペニシリン酸濃度は20日間の培養により104μg/gから324μg/gに増加したのに対して培養期間が2倍の20日間ではペニシリン酸の濃度は1370μg/gから1020μg/gに減少した。同様の傾向は低レベルではあるが他の食品においても認められた。

*A. ochraceus*による上新粉中での5,6-ジヒドロペニシリン酸およびペニシリン酸の産生に対する培養温度の影響を検討した（Table4-3-2）。検討した8℃から32℃の範囲ではそれぞれの産生最適温度は20℃および24℃であった。8℃ではカビの生育は認められずまた2化合物も検出されなかった。産生の多かった20℃および24℃での培養では、5,6-ジヒド

Table 4-3-1. Production of DHPA and PA by *A. ochraceus* in foods

	Incubation Period (days)			
	10		20	
	PA[a]	DHPA[b]	PA[a]	DHPA[b]
Well-milled rice	260	20	13	11
Brown rice	51	20	8	52
Non-glutius rice flour	1370	104	1020	324
Soft flour	479	6	113	15
Barley	75	ND	18	7
Powdered maize	9	ND	24	25
Soybeans	ND	ND	10	ND
Azuki beans	ND	ND	ND	ND
Rice-koji Miso	ND	ND	ND	ND
Crashed almond	ND	ND	ND	ND
Salted and dried sardines	ND	ND	ND	ND

a: penicillic acid (μg/g of Food, ND ‹ 5 ppm).
b: 5,6-dihydropenicillic acid(μg/g of Food, ND ‹ 5 ppm).

Table 4-3-2. The effect of incubation temperature on the production of 5,6-dihydropenicillic acid and penicillic acid in rice flour by *A. ochraceus*

Temperature (℃)	Incubation Period (days)			
	20		40	
	DHPA[a]	PA[b]	DHPA[a]	PA[b]
8	ND	ND	ND	ND
16	6	79	76	470
20	420	2400	538	1290
24	360	988	533	300
28	243	725	238	160
32	138	143	10	ND

a: 5,6-dihydropenicillic acid(μg/g, ND ‹ 5 ppm).
b: penicillic acid (μg/g, ND ‹ 5 ppm).

ロペニシリン酸濃度は培養期間が長くなると高くなったのに対して、ペニシリン酸は逆に減少した。

*A. ochraceus*によるペニシリン酸の産生は培養期間が長くなるにつれて減少した。この減少度合は5,6-ジヒドロペニシリン酸への変換をはるかに上回った。一方5,6-ジヒドロペニシリン酸の濃度は増加傾向を示した。両化合物の安定性にはかなり差があると考えられたので、SH化合物との反応性を指標に両化合物の安定性の差を検討した。ペニシリン酸および5,6-ジヒドロペニシリン酸を含む溶液にL－システインを加えると、3時間の反応でペニシリン酸は反応前の18％に減少した。同様にグルタチオンを加えると、3時間の反応でペニシリン酸は30％のレベルまで減少した。しかし5,6-ジヒドロペニシリン酸の濃度は、どちらのSH化合物を加えても変化は認められなかった（Fig.4-3-1）。したがって5,6-ジヒドロペニシリン酸はペニシリン酸

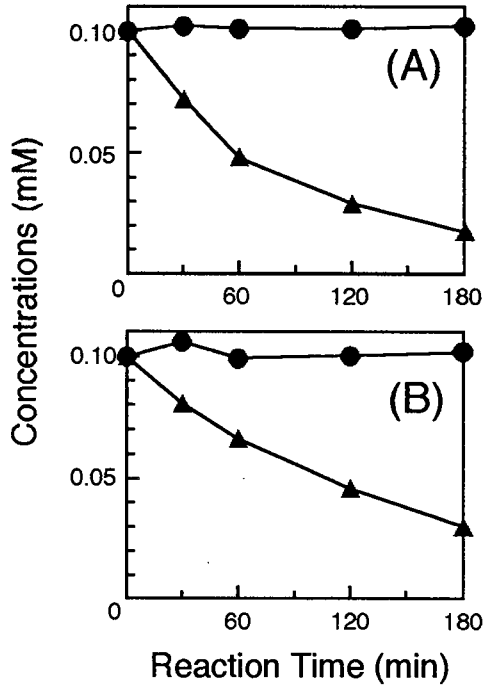


Fig. 4-3-1
The degradation of penicillic acid and 5,6-dihydropenicillic acid by the treatment with L-cysteine (A) and glutathione (B)
(●) : 5,6-dihydropenicillic acid, (▲) : penicillic acid.

に比べSH化合物との反応性は低いと判断した。

4.考察

カビによるマイコトキシンの産生は、その生育にとって不都合な条件下の方がより多いとされている（78）。Ciegler らは*Penicillium*属のカビによるペニシリン酸の産生は穀類では多いが、タンパク質の多い食品では産生がなく、また培養温度が低い方が産生が多いことを示した（79）。Bacon らも*A. ochraceus*によるペニシリン酸の産生は、その生育に最適温度である30℃よりもより低い22℃において産生が多かったと報告している（80）。本研究における上新粉での*A. ochraceus*による5,6-ジヒドロペニシリン酸の産生の場合も、最適産生温度は20℃から24℃であり、豆類などタンパク質の多い食品においては*A. ochraceus*の生育は盛んであったが5,6-ジヒドロペニシリン酸の産生は認められなかった。

上新粉中での*A. ochraceus*による5,6-ジヒドロペニシリン酸の産生においても、5,6-ジヒドロペニシリン酸の産生はペニシリン酸の産生に遅れたことから、ペニシリン酸から5,6-ジヒドロペニシリン酸への変換が培養中に起こったものと推定される。そのために*A. ochraceus*がペニシリン酸を産生しやすい穀類においてのみ5,6-ジヒドロペニシリン酸が検出された思われる。上新粉中でのペニシリン酸の減少は5,6-ジヒドロペニシリン酸への変換だけでは説明できない量であった。ペニシリン酸はSH化合物と反応しやすいことから（81, 82）、その差はSH化合物と反応したものと推察される。一方5,6-ジヒドロペニシリン酸はSH化合物とは反応しにくく、上新粉中での培養期間が長くなったときもその濃度は増加傾向を示した。さらに5,6-ジヒドロペニシリン酸の分離・精製過程の最初で行ったオートクレー滅菌では分解せず、食品中に多い酸性条件下でも変化しなかった。食品中での5,6-ジヒドロペニシリン酸の残留性を考える場合、高い安定性を十分注意する必要があると思われる。

第4節　小括

1. *A. ochraceus*およびその近縁のカビは、栄養分が富んだ条件下では試験したすべての菌株が5,6-ジヒドロペニシリン酸を産生した。
2. *A. ochraceus*による5,6-ジヒドロペニシリン酸の産生はペニシリン酸に由来すると推察

された。

3. ペニシリン酸から5,6-ジヒドロペニシリン酸への変換はカビだけでなく環境中に存在する細菌によっても行われた。
4. *A. ochraceus*は米などの食品においても5,6-ジヒドロペニシリン酸を産生した。
5. 5,6-ジヒドロペニシリン酸はSH化合物とは反応せず、また安定性が高いことから食品に残留しやすく食品を汚染する可能性が示された。

総　括

ショウジョウバエDNA修復試験は、*in vivo*レベルにおいて変異原物質を手軽に検出する手段として開発された変異原性試験である。ショウジョウバエを用いた変異原性試験法としては伴性劣勢致死法や（83）、翅毛スポットテストが多く用いられている（20, 57）。これらの試験法における変異原性と動物での発がん性が極めて高い相関性を示すことが知られている。しかしこれらの方法は結果を得るのに多くの労力と日数を要するために、抽出・精製操作が繁雑な食品などに存在する微量変異原物質の検出などの応用的研究についてはほとんどなされていない。そこで本研究はショウジョウバエ変異原性試験を食品衛生分野において活用することを目的に、ショウジョウバエDNA修復試験の特性および変異原性マイコトキシンの検出などについて検討を行った。

既知変異原物質13種類をショウジョウバエDNA修復試験に供したところ、Amesテストとの比較において一部異なった結果であったが、発がん試験の結果とは整合性が認められた。ハエの内在性の代謝系による変異原物質の活性化はラットおよびヒトの活性化能と同等の作用を示した。一方ショウジョウバエDNA修復試験において陰性を示したメチルグリオキサールなどは内在性の代謝系により不活性化されることを確認した。したがってショウジョウバエDNA修復試験の検出結果は、ハエ体内での変異原物質の代謝を総合的に反映した結果であると考えられる。つまり、得られる結果は*in vitro*変異原性試験に比べより発がん実験の結果に近いことが確認された。

次にショウジョウバエDNA修復試験を応用的に用いることを試みた。その結果カビが産生したマイコトキシンを含む培地を餌として幼虫に摂取させることにより、DNA損傷性マイコトキシン産生を簡便に検出する方法（直接検出法）を開発した。この方法によりアフラトキシンB1などの産生を検出した。直接検出法はカビを増殖させた培地からのマイコトキシンの抽出および精製操作を必要とせず、*in vitro*試験法よりも操作が簡単な検出法であった。直接検出法により*A. ochraceus*が既知マイコトキシンとは異なるDNA損傷性マイコトキシンを産生することが示された。その物質を解明した結果5,6-ジヒドロペニシリン酸であることを明らかにした。5,6-ジヒドロペニシリン酸の構造は、既知マイコトキシンであるペニシリン酸の5,6位の炭素不飽和二重結合が飽和した構造であるが、*A. ochraceus*が5,6-ジヒドロペニシリン酸を産生することはこれまで知られていなかった。また5,6-ジヒドロペニシリン酸の生物活性は本研究において初

めて明らかになった。

5,6-ジヒドロペニシリン酸は変異原性をショウジョウバエ翅スポットテストに供したところ陽性を示し、染色体の組み換え変異を誘発することが明らかになった。しかしこの物質は2種の*in vitro*変異原性試験では陰性であり、ショウジョウバエDNA修復試験の検出感度が優れていることが示された。

5,6-ジヒドロペニシリン酸は、変異原性マイコトキシンでありながらこれまで全く注目されていなかった。そこでその衛生学的な知見を得るために検討を行った。まず*A. ochraceus*が普遍的に5,6-ジヒドロペニシリン酸を産生するかを検討したところ、*A. ochraceus*およびその近縁のカビは、栄養分が富んだ条件下では試験したすべての菌株が5,6-ジヒドロペニシリン酸を産生した。また*A. ochraceus*による5,6-ジヒドロペニシリン酸の産生はペニシリン酸に由来すると推察された。ペニシリン酸と極めて構造の類似した5,6-ジヒドロペニシリン酸がこれまで注目されなかった理由として、旧来のペニシリン酸検出法では（49, 50 51）、5,6-ジヒドロペニシリン酸が検出できないかペニシリン酸との判別が困難でなったことが推察された。

ペニシリン酸を化学的に還元すると5,6-ジヒドロペニシリン酸を生じることは知られていたが（53）、ペニシリン酸から5,6-ジヒドロペニシリン酸への変換は細菌である*A. radiobactor*によっても行われることを明らかにした。さらにこの反応は環境中に存在する他の細菌、たとえば*P. cepacia*のような腐敗菌によっても進行し、*P. cepacia*の産生する酵素によりその反応が進行したと推察された。環境中の細菌による変異原性マイコトキシンの不活性化については報告があるが（66, 67）、細菌による活性化については注目されておらず、今後検討すべき課題であると思われる。

*A. ochraceus*を食品に接種したときに、米などの穀類においてペニシリン酸と共に5,6-ジヒドロペニシリン酸が産生された。米の粉における*A. ochraceus*による5,6-ジヒドロペニシリン酸の産生は、*A. ochraceus*の生育最適温度よりは低い通常の室温において最も多かった。また5,6-ジヒドロペニシリン酸はペニシリン酸に比べ安定性が高かった。これらの結果は穀類などの食品で*A. ochraceus*が増殖した場合5,6-ジヒドロペニシリン酸が産生され、さらにそれが食品に残留する可能性があることを明らかにするものであった。

結　論

本研究の成果は、ショウジョウバエ変異原性試験が優れた変異原物質検出能力を有し、経口投与であり、簡便なことから、特に食品衛生分野においても有用であることを以下の成果から示した。

1. 既知変異原物質をショウジョウバエDNA修復試験に供して得られた結果は、Amesテストとの比較において一部相違が認められたが、発がん試験の結果とは整合性が認められた。ハエの内在性の代謝系による変異原物質の活性化はラットおよびヒトの活性化能と同等の作用を示した。
2. ショウジョウバエ培地にカビを接種し、カビが産生したマイコトキシンを含む培地を餌として幼虫に摂取させることにより、DNA損傷性マイコトキシン産生を簡便に検出する方法（直接検出法）を開発した。
3. 直接検出法は*in vitro*試験法よりも操作が簡単な検出法であった。
4. 直接検出法により*A. ochraceus*が既知マイコトキシンとは異なるDNA損傷性マイコトキシンを産生することが示された。その物質を解明した結果5,6-ジヒドロペニシリン酸であることを明らかにした。
5. ショウジョウバエ翅毛スポットテストにおいて5,6-ジヒドロペニシリン酸は変異原性を示し、染色体の組み換えを誘発することが明らかになった。
6. *A. ochraceus*による5,6-ジヒドロペニシリン酸の産生はペニシリン酸に由来すると推察されたが、ペニシリン酸から5,6-ジヒドロペニシリン酸への変換は環境中に存在する細菌によっても行われることを明らかにした。
7. *A. ochraceus*を米などの穀類に接種したときにペニシリン酸と共に5,6-ジヒドロペニシリン酸が産生され、またその安定性が高いことから5,6-ジヒドロペニシリン酸が食品を汚染する可能性が示された。

謝　辞

本論文の作成にあたり、終始親切な御指導、御鞭撻を賜わりました大阪大学薬学部教授 西原 力 先生に謹んでお礼申し上げます。

ショウジョウバエ変異原性試験を御指導していただきました大阪大学医学部 梁 治子博士に心からの感謝の意を表します。

さらに、本研究の遂行に際しまして御協力、御支援いただきました大阪府立公衆衛生研究所 所員の皆様に感謝致します。

引 用 文 献

1. Kee,M., Nature, 303, 648, (1983).
2 Zarbl,H., Suzumar,S., Arthur,A.V., Martin-Zanca, D., Barbacid,M., Nature, 315, 382 (1985).
3. 杉村隆, 環境変異原研究, 14, 1 (1992).
4. Hayatsu,H. Mutagens in food:detection and prevention, CRC Press, 1991.
5. Sugimura,T., Cancer, 49, 1970 (1984).
6. Claxton,L.D., Environm. Mutagen., 7, 1 (1985).
7. Tokiwa,H., Ohnishi,Y., CRC Crit. Rev. Toxicol., 17, 23 (1986).
8. 大垣比呂子, 若林敬二, 代謝, 26, 3 (1989).
9. Tokiwa, H., Otofuji,T., Horikawa,K., Kitamori,S., Otsuksa,H., Manabe,Y., Kinouchi,T., Ohnishi,Y., J. Natl. Cancer Inst., 73, 1359 (1984).
10. 馬場恒夫, 環境変異原研究, 16, 79 (1994).
11. 原正樹, 環境変異原研究, 16, 91 (1994).
12. 大内田昭信, 環境変異原研究, 16, 97 (1994).
13. 小木曽重文, 三宅幸雄, 環境変異原研究, 15, 83 (1993).
14. 廣畑富雄, がんとライフスタイル, 日本公衆衛生協会, 1992.
15. 佐藤茂秋, 食衛誌, 28, 1 (1987).
16. Sugimura,T., Science, 233, 312 (1986).
17. 近藤宗平, 松島泰次郎, 梁治子, 一ツ町晋也, 林真, 山下克美, 降旗千恵, 環境変異原研究, 9, 53 (1992).
18. 藤川和男, 食衛誌,29, 115 (1998).
19. Negishi,T., Shiotani,T., Fujikawa,K., Hayatsu,H., Mutat. Res., 252, 119 (1991).
20. 早津彦哉, 変異原物質試験法, p65-67, 廣川書店, 1990.
21. McCann, J., Spingarn,N.E., Kobori,J., Ames,B.N., Proc. Nal. Acad. Sci., 72, 979 (1975).
22. Rosenkranz,H., Mermelstein,R., Mutat. Res., 114, 217 (1983).
23. 労働省安全衛生部化学物質調査課編, 微生物を用いる変異原性試験ガイドブック, 中央労働災害防止協会, 1980.
24. Ames,B.N., Magaw,R., Gold,L.S., Science, 236, 271 (1987).

25. Sasaki,Y., Endo,R., Mutata. Res., 54, 251 (1978).

26. Marunsson,J., Ramel,C., Mutat. Res., 57, 307 (1978).

27. Frolich,A., Wurgler,F.E., Mutat. Res., 216, 179 (1989).

28. Yahagi,T., Nagao,M., Seino,Y., Matsushima,T., Sugimura,T., Okada,M., Mutat. Res., 48, 121 (1977).

29. Oda,Y., Nakamura,S., Oki,I., Kato,T., Shinagawa,H., Mutat. Res., 147, 219 (1985).

30. Nakamura,S., Oda,Y., Shimada,T., Oki,I., Sugimoto,K., Mutat. Res., 192, 239 (1987).

31. Miller,J.H., Experiments in Molecular Genetics, p352, Cold Spring Harbor Laboratyry, 1972.

32. Maron,D.M., Ames,B.N., Mutat. Res. 113, 173 (1983).

33. Shimada,T., Nakamura,S., Biochem. Pharmacol. 36, 1979 (1987)

34. Shimada,T., Iwasaki,M., Martin,M.V., Guengerich,P., Cancer Res., 49, 3218 (1989).

35. Fujita,Y., Wakabayashi,K., Nagao,M., Sugimura,T., Mutat. Res., 142, 145 (1985).

36. Migliore,L., Barale,R., Bosco,E., Giorgelli,F., Minunni,M., Carcinogenesis, 11, 1503 (1990).

37. IARC, IARC Monographs, 51, 447 (1976).

38. Shimada,T., Yamazaki,H., Shimura,H., Tanaka,R., Guengerich,F.P., Carcinogenesis, 11, 103 (1990).

39. Hayatsu,H., J. Chromatogrphy, 487, 37 (1992).

40. Ueno,Y., Kubota,K., Ito,T., Nakamura,Y., Cancer Res., 38, 536 (1978).

41. Chu,F.S., Mutat. Res., 259, 291 (1991).

42. Cole,R.J., Cox,R.H., Handbook of Toxic Fungal Metabolites, Academic Press, 1981.

43. Ueno,Y., Kubota,K., Cancer Res., 36, 445 (1976).

44. Auffray,A., Boutibonnes,P., Mutation Res., 171, 79 (1986) .

45. Wurgler, F.E., Friederich,U., Schlatter,J., Mutat. Res., 261, 209 (1991).

46. Rodricks,J.V., Hesseltine,C.W., Mehlan,M.A., Mycotoxins in human and animal health, Pathotox, 1977.

47. 日本薬学会, 衛生試験法注解, p401, 金原出版, 1990.

48. 宇田川俊一, 鶴田理, かびと食物, p361, 医歯薬出版, 1975.

49. Scott,P.M., Somers,E., J. Agr. Food Chem., 16, 483 (1968).

50. Snow,J.P., Lucas,G.B., Harvan,D., Pero,R.W., Owens,R.G., Appl. Microbiol., 24, 34 (1972).

51. Thorpe,C.W., Johnson,R.L., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 57, 861 (1974).

52. Seto,H., Cary,L.W., Tanabe,M., J. Antibiot., 27, 558 (1974).

53. Birkinshaw,J.H., Oxford,A.E., Raistrick,H., Biochemical J., 30, 394 (1936).

54. Sassa,T., Hayakari,S., Ikeda,M., Miura,Y., Agr. Biol. Chem., 35, 2130 (1971) .

55. ハーパー・生化学原書21版, 上代淑人訳, p484, 丸善株式会社, 1988.

56. Zimmerli,B., Schlatter,J., Mutat. Res., 259, 325 (1991).

57. 梁治子, ショウジョウバエのスポットテスト, 遺伝毒性, 石館編p107, 地人書舘, 1991.

58. Kastenbaum,M.A., Bowman,K.O., Mutat. Res., 9, 9527 (1970).

59. Frei,H., Wurgler,F.E., Mutat. Res., 203, 297 (1988).

60. Tsubouchi,H., Terada,H., Yamamoto,K., Hisada,K., Sakabe,Y., Mycopathologia, 90, 181 (1985).

61. Stecher, P.G., The Merk Index, 8th ed., p790, Merk &Co., 1968

62. Kersters,K., Ley,J.D., Krieg,N.R. (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol 1 p244, Williams & Willkins, 1984.

63. Bentley,R., Bhate,D.S., Keil,J.G., J. Bio. Chem., 237, 859 (1962).

64. Bentley,R., Keil,J.G., J. Bio. Chem., 237, 867 (1962).

65. 上野芳夫, 川村理, 衛生化学, 39, 173 (1993).

66. Ciegler,A., Liiehoji,B., Peterson,R.E., Hall,H.H., Appl. Microbiol., 14, 934 (1966).

67. Line,J.E., Brackett,R.E., Wilkinson,R.E., J. of Food Prot., 57, 788 (1994).

68. IARC, IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemical to man. some naturallyoccurring substances, p.51, IARC,1976.

69. Jelinek,C.F., Pohland,A.E., Wood,G. E., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 72, 223 (1989).

70. Atawodi,S.E., Atiku,A.A., Lamorde,A.G., Food and Chemical Toxicology, 32, 61 (1994).

71. Taguchi,S., Fukushima,S., Sumimoto,T., Yoshida,S., Nishimune,T., J. of AOAC Inter., 78, 325 (1995).

72. 粟飯原景昭, 一戸正勝, 真鍋勝, 山崎幹夫, 微生物, 2, 48 (1986).

73. Natori,S., Sakaki,S., Kurata,H., Udagawa,S. Ichinoe,M., Saito,M., Umeda,M., Chem. Pharm. Bull., 18, 2259 (1970).

74. Gourama,H., Bullerman,L.B., Inter. J. of Food Microbio., 6, 81 (1988).

75. Kurtzman,C.P., Ciegler,A., Appl. Microbiol., 20, 204 (1970).

76. Ciegler,A., Mintzlaff,H.J., Weisleder,D., Leistner,L., Appl. Microbiol., 24, 114 (1972).

77. Scott,P.M., van Walbeed,W., Kennedy,B., Anyeti,D., J. Agr. Food. Chem., 20, 1103 (1972).

78. ディコンJ.W., 山口英世, 河合康夫訳, 現代真菌学入門, 基礎生物学 7, p.100, 培風館, 1980.

79. Ciegler,A., Kurtzman,C.P., Appl. Microbiol. 20, 761 (1970).

80. Bacon,C.W., Sweeney,J.G., Robbins,J.D., Burdick,D., Appl. Microbiol., 26, 155 (1973).

81. Dickens,F., Cooke,J. Br. J. Cancer, 19, 404 (1965).

82. Chan,P.K., Hayes,A.W., Meydrech,M., Ciegler,A., Toxicol. Appl. Pharmacol., 55, 291 (1980).

83. Foureman,P., Mason,J.M., Valencia,R., Zimmering,S., Environm. Mol. Mutagen., 23, 208 (1994).