

Ⅱ 研 究 報 告

フリルフラマイド (AF-2) の Bio-assay の試み

春日 徳彦
金子 通知

金丸 佳郎
日原 政彦*

ニトロフラン系薬剤の食品添加物としての歴史は古く、昭和25年ニトロフラゾーンが氷菓、あん類、魚肉ねり製品などに殺菌料として使用が認められたことに始まる。昭和29年にはニトロフリルアクリル酸アミドが、ニトロフラゾーンの改良剤として食品添加物に指定され、食肉製品、魚肉練り製品、魚介乾製品、あん類、豆腐などに限り使用が認められることとなった。

これらは昭和40年7月に食品添加物の指定から除かれそれにかわるものとして、フリルフラマイドが指定された。その使用基準は魚肉ハム、魚肉ソーセージに20ppm/kg以下、食肉ハム、食肉ソーセージ、食肉ベーコンおよびあん類に5ppm/kg以下、豆腐には、豆汁5kgにつき5ppm以下、魚肉練り製品に2.5ppm/kg以下となっている。

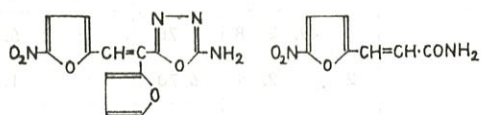
ところでニトロフラン系薬剤は、その性質上、DNAとの親和性が強いと考えられていたが、事実これらの化合物の中には、溶原化フェージの誘発¹⁾、突然変異率の増大²⁾³⁾、発癌性⁴⁾など、その可能性を強く示唆する報告がなされている。食品添加物は、われわれの意途しないままに摂取される機会が多いという点で、その安全性が特に重視されなければならない。1970年、国立遺伝学研究所を中心として発足した環境変異原研究会は、その観点から、ニトロフラン化合物を特に重視した。研究会によってなされた報告を以下に要約する。

(1) 人間の培養細胞における染色体異常の誘発⁵⁾

健康な成人の末梢血中から得たリンパ球を培養し、その培養液中にニトロフラン化合物を添加することによって生ずる染色体異常を観察した。染色体異常誘発能の強さは Furamizol > Nitrofurylacrylamide >

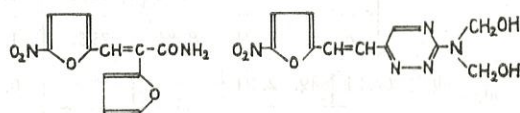
Furpyrinol > Furfylfuramide の順で、

Nitrofurazone, Furazolidone, Nitrofurantoin では異常誘発性は認められていない。この結果は明らかに化学構造と関係があり、染色体異常誘発能を示した化合物は、アクリル酸構造を持つもので、示さなかったものは、二重結合のCがNに置きかわっている化合物である(図1)。



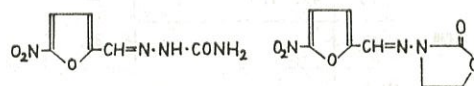
Furamizol

Nitrofurylacrylamide



Furfylfuramide
(AF-2)

Panfuran-S



Nitrofurazone

Furazolidone

図1 ニトロフラン系薬剤の化学構造

(2) バクテリアにおける突然変異の誘発能⁶⁾

アルギニン要求性から、非要求性の Reversion を、*exc*, *pol*, *rec*. などの DNA の代謝に関係する遺伝子と組み合わせることによって、よい感度で突然変異を検出することに成功した。*exc*. との組み合わせがもっともすぐれていた。この系を用いて市販の豆腐や魚肉ソーセージ中に、突然変異誘発能をもった物質(当然AF-2)と考えられる)が含有されていることが証明された。

(3) Rec-assay⁷⁾

賀田は組み換え修復能を欠く変異株 (Recombination deficient mutant: *rec*.) を用いて、感度の高い突然変異検出系を開発した。この系を用いて、AF-2 がトリプトファン要求性から非要求性への変異を増大させることを証明した。

以上の事実から AF-2 は DNA と強い親和性があり、その結果として、突然変異誘起能を有することは疑がう余地がない。しかし正常細胞は DNA の修復機構を持っているので、AF-2 による DNA の傷害は表現されず、修復機能を欠く変異株 (例えば *rec*) においてのみ、それが拡大されて表現されると考えられる。人間では極め

* 機械金属工業指導所

て僅かの例外を除いては細胞が傷害に対して正常な修復機構を有していると考えられるとはいえ、DNA に傷害を及ぼす可能性のある物質の摂取は当然避けられるべきである。AF-2 の使用制限に向う現状から、食品における使用実態の把握が急務であるが、その化学的検出法の現状には、この物質が紫外線に鋭敏で trans から cis に変化し易いことを含めていくつかの問題がある。そこでわれわれは AF-2 に敏感な微生物を用い、Bio-assay によって食品中の AF-2 をスクリーニングする方法の開発を目指した。後報⁸⁾ に記した様に、われわれは Cyclic AMP を添加すると Nitroフラン感受性が增大する大腸菌の変異株を得ている。その変異株 Gp1/R₁₀₀ rev-1 を用い、又 rec 変異株がすでに報告されているように AF-2 感受性が高いことからこの変異株をも併用して AF-2 の Bioassay をおこなった。

材料と方法

用いた菌株は、大腸菌 Gp1/R₁₀₀ rev-1⁹⁾ および rec 株として AB2463¹⁰⁾ である。AB2463 は群馬大学微生物学教室を通じて分与を受けた。ブドウ球菌 MS 353¹¹⁾ も併せて用いた。cyclic AMP は第 1 薬品化学の製品を、AF-2 は上野製薬より分与されたものを使用した。

培地は L-Broth, L-Agar 及び L-soft agar である。液体培養はいずれも振盪培養をおこなった。

AF-2 の定量は Cup 法によった。

結果と考察

図 2 および 図 3 に AF-2 を種々の濃度で添加した液体培地中での用いた菌株の増殖曲線を示した。図 2 にみられるように Gp1/R₁₀₀rev-1 株は AF-2 濃度が 0.1 μg/ml のとき、その増殖がほぼ完全に抑制される。この菌株は培地中に Cyclic AMP を添加しない場合には、パンフランに対して、他の大腸菌の菌株と同様に感受性

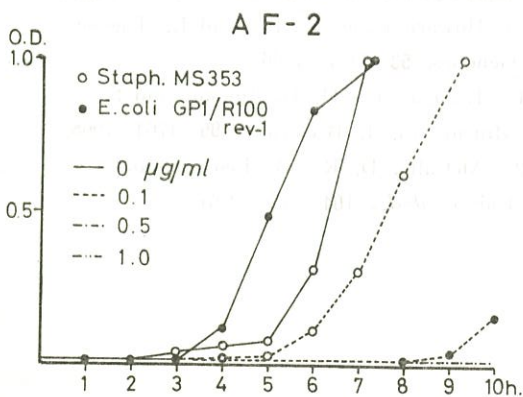


図 2 フリルフラマイド (AF-2) の増殖抑制効果

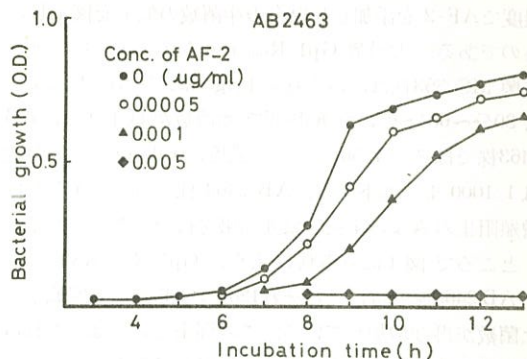


図 3 フリルフラマイド (AF-2) の増殖抑制効果

を示すので⁸⁾、ここに示された Gp1/R₁₀₀rev-1 株の AF-2 に対する感受性値は、ほぼ一般の大腸菌株のそれと考えてよい。ブドウ球菌 MS-353 株は、0.1 μg/ml の濃度で AF-2 を添加した場合にも対照より、ややおくれるが増殖することから、大腸菌より AF-2 に対する感受性がやや低いことがわかる。しかし 10 時間以上、完全に増殖を阻止する濃度は、大腸菌、ブドウ球菌、いずれの場合も 0.5 μg/ml であるから、その感受性に大差はない。図 3 に AF-2 を添加した培地中での、大腸菌 AB 2463 株の増殖曲線を示した。この菌株は前述したように DNA が傷害を受けた場合の修復機構に欠陥があり、そのため DNA が傷害を与えるような原因に対して、極めて鋭敏な感受性を示す。この菌株が完全に増殖を阻止される AF-2 の濃度は 0.05 μg/ml と非常に低く、正常な菌株と比較して、その感受性はほぼ 100 倍高いことがわかる。ついで用いた各菌株について、AF-2 による致死曲線を図 4 に示した。これは適当に増殖した菌液に、種々の

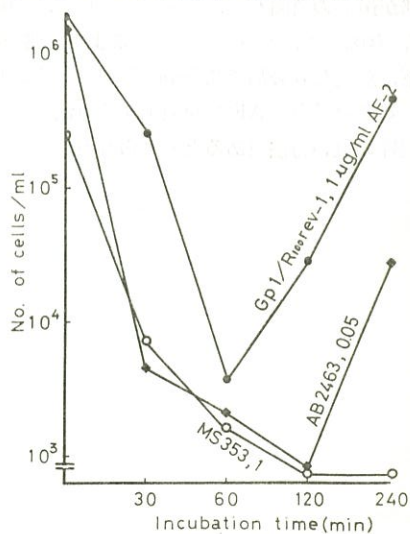


図 4 フリルフラマイド (AF-2) の致死効果

濃度でAF-2を添加した場合の生菌数の低下を図示したものである。大腸菌 Gp1/R₁₀₀ rev-1 菌、およびブドウ球菌 MS 353株は、いずれも1 μg/ml のAF-2によって30分~60分という短時間で生菌数が低下する。AB 2463株ではその1/50という低濃度、0.05 μg/ml で菌数は1/1000まで低下する。AB 2463株に対してAF-2は増殖阻止のみならず強い致死効果を持つことがわかる。

ところで図4にみられるようにGp1/R₁₀₀-rev1 およびAB 2463株では、それぞれ120分、240分に一度低下した菌数が再び増加している。この理由としては、これらの菌株のAF-2に対する耐性の獲得が考えられる。しかし McCalla の報告¹²⁾にみられるようにニトロフラン系薬剤に対する耐性は、植え継ぎによってのみ4~8倍の耐性を獲得させることができたことから、このような短時間にこれらの菌株が耐性化したときは考え難い。他の理由として、菌によってAF-2の不活性化が考えられる。ブドウ球菌では、一度低下した菌数が、時間の経過にともなって回復することはない。AF-2の不活性化の要因として、もっとも強く考えられるのは、ニトロ基の還元であろうが、大腸菌とブドウ球菌のこの差異は、それぞれの菌種のNitroreductaseの産生量の差によるものと考えられる。

最後に、大腸菌 AB 2463 および Gp1/R₁₀₀rev-1 株を指示菌とした場合のCup法によるAF-2の検量線を図5に示す。

Gp1/R₁₀₀rev-1株を使用した場合は、培地中に1 mMの濃度でCyclic AMPを添加した。この2種の菌株を用いることで、AF-2を、0.1~32 μg/mlの濃度範囲で定量することができた。この定量範囲は、AF-2の使用許可規準が最高の魚肉ハム、ソーセージ類で、20ppm/kg以下、食肉ハム、ソーセージ類、および豆腐で5ppm/kg以下、魚肉ねり製品で2.5ppm/kgであることを考えると、対象食品中のAF-2を検出する方法として、極めて実用性の高い方法であると考えられる。

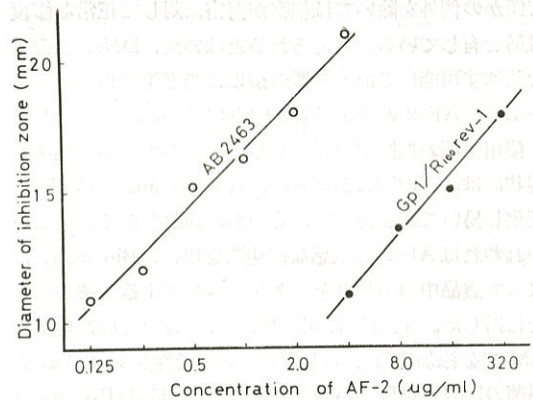


図5 フソルフラマイド (AF-2) のCUP法による検量線

引用文献

- 1) Endo, H., M. Ishizawa, T. Kamiya, and M. Kuwano. *Biochem. Biophys. Acta*, **68**, 502 (1963)
- 2) Zampieri, A., and J. Greenberg. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **14**, 172 (1964)
- 3) Cook, T. M., W. A. Goss, and W. H. Deits. *J. Bacteriol.*, **91**, 780 (1966)
- 4) Stein, R. J., D. Yost, F. Petrolinnas, and A. von Esch. *Federation Proc.*, **25**, 291 (1966)
- 5) Tonomura, A., and M. Sasaki. *Japan. J. Genetics*, **48**, 291 (1973)
- 6) Kondo, S., and M. Ichikawa-Ryo. *ibid.*, **48**, 295 (1973)
- 7) Ka da, T. *ibid.*, **48**, 301 (1973)
- 8) 春日徳彦, 岩間まつ子, 山梨衛研年報, **18**, 28 (1974)
- 9) Kaneko, M., Y. Kanemaru, and T. Kasuga. *Japan. J. Bacteriol.*, **27**, 206 (1972) (in Japanese)
- 10) Howard-Flanders, P., and L. Theriot. *Genetics*, **53**, 1137 (1966)
- 11) Kasuga, T., H. Hashimoto, and S. Mittsubashi. *J. Bacteriol.*, **95**, 1764 (1968)
- 12) McCalla, D. R., A. Reuvers, and C. Kaizer. *ibid.*, **104**, 1126 (1970)