

## 発がん性ニトロソ化合物の染色体異常誘発能に対するビールの影響

木村 幸子<sup>1)</sup>, 黒川 恵理<sup>1)</sup>, 渡邊 敏明<sup>1)</sup>, 有元 佐賀恵<sup>2)</sup>  
(<sup>1)</sup>兵庫県立大学環境人間学部\*, (<sup>2)</sup>岡山大学薬学部\*\*)

### Inhibitory Effect of Beer on the Clastogenicity of *N*-nitroso Compounds

Sachiko KIMURA<sup>1)</sup>, Eri KUROKAWA<sup>1)</sup>, Toshiaki WATANABE<sup>1)</sup> and Sakae ARIMOTO-KOBAYASHI<sup>2)</sup>  
<sup>1)</sup>*School of Human Science and Environment, University of Hyogo*  
<sup>2)</sup>*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University*

#### Summary

We investigated the effect of beer on the clastogenicity of *N*-nitroso compounds, such as *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) and *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU). To evaluate the clastogenicity and anticlastogenicity, we employed in vitro micronucleus (MN) assay in Chinese hamster V79 cells. MNNG (0.5, 1, 3, and 5  $\mu$ M) or MNU (0.05, 0.1, 0.3, and 0.5 mM) lead to a dose-dependent increase in the frequency of MN cells in V79 cells. Two types of beer, Lager and Black, were tested for their anticlastogenicity, and both beer were found to reduce the frequency of MN cells induced by 5  $\mu$ M MNNG or 0.3 mM MNU. Furthermore, we performed fractionation of beer components by column chromatography on cation- and anion-exchange resins, and fractions obtained were tested for their anticlastogenicity against 5  $\mu$ M MNNG. In the presence of bases fraction (53  $\mu$ g/mL) or ampholytes fraction (7  $\mu$ g/mL), the MN frequency significantly decreased compared to MNNG alone. These results suggest that certain base(s) and ampholyte(s), but not phenolic compounds, are responsible for the anticlastogenicity of beer.

がんの発生原因の約8割は環境因子であり、中でも食事と喫煙が約3割ずつでその大半を占める<sup>1)</sup>。食事由来の発がん因子は、食品に元来含まれているものの他に調理や加工、貯蔵の過程で生成するもの、食品を摂取後生体内での反応により生成するものなど様々である。ニトロソ化合物は食品、煙草など環境中に広く分布する発がん物質の一つで、生体内でも肉や魚に含まれるアミンと亜硝酸との反応によって生成することが知られている。*N*-メチル-*N*-ニトロ-*N*-ニトログアニジン (MNNG) や *N*-メチル-*N*-ニトロソ尿素 (MNU) は胃、大腸、小腸等に多臓器発がんを引き起こすことが実験動物で確認されている<sup>2, 3)</sup>。偏った食事による発がん物質の過剰摂取とがんの発生との関わりが指摘される一方、食物繊維、抗酸化ビタミン、カロチン、クロロフィル、フェノール化合物などの食品成分によるがん予防効果に関する研究も数多く報告されている。これらの成分を含む緑茶、野菜・果物のジュース、赤ワインなど飲料によるがん予防効果の報告例も多い<sup>4-6)</sup>。ビールは世界中で最も消費量の多いアルコール飲料で、麦芽、ホップを主原料として製造され、炭水化物、たんぱく質、アミノ酸の他、ミネラル、有機酸、フェノール化合物、苦み成分のイソフムロン類等の多様な成分で構成されている。フェノール化合物をはじめがん予防食品成分も含有しており、ビールによるがん予防の可能性が期待されている。

細胞のがん化の第1段階は、遺伝子や染色体上に起こる突然変異であると多段階発癌説で説明されている。これらの変異を検出する種々の短期試験法があり、発がん性をより正確に予測するためには複数の試験系を実施し、総合的に判

\*所在地：兵庫県姫路市新在家本町1-1-12 (〒670-0092)

\*\*所在地：岡山県岡山市津島中1-1-1 (〒700-0082)

断することが推奨されている。また、がん予防食品成分のスクリーニングにもこれらの短期試験法は有用である。その1つであるネズミチフス菌を使ったエイムステストにおいて、ビールがMNNG, MNUによる遺伝子突然変異を抑制することが既に報告されている<sup>7)</sup>。本研究では培養細胞を用いた小核試験によってMNNG, MNUの染色体異常誘発能に対するビールの影響について検討した。またビール中の染色体異常抑制成分の分画を行った。

## 実験方法

### 1. 細胞

チャイニーズハムスター肺由来繊維芽細胞株V79細胞(理研セルバンク, 茨城)を試験に用いた。細胞は、10%仔牛血清(Biological Industries, Israel)を添加したイーグルMEM培地(日水製薬, 東京)中、37℃、5%炭酸ガス条件下で培養した。

### 2. ビール4倍濃縮液およびビール画分の調製

ビール4倍濃縮液は、国産ラガービールおよび黒ビール100 mLを凍結乾燥後、残渣を滅菌蒸留水25mLに溶解して調製した。

ビール画分は以下の通りに調製した。ラガービールを凍結乾燥した後、蒸留水60 mLに溶解し、塩酸を加えて溶液をpH2に調整した。この溶液を陽イオン交換カラム(ダウエックス50W×4, 10×120 mm, ムロマチテクノス, 東京)に導入し、その後カラムに0.01 N塩酸50 mLを流し、得られた溶出液をフラクションNo. 1とした。カラムを水50 mLで洗浄後、カラムに吸着した成分を5%アンモニア溶液で溶出し、洗液と溶出液を合わせ凍結乾燥した。得られた残渣を5%アンモニア溶液に溶解し、陰イオン交換カラム(ダウエックス1×8, 10×120 mm, ムロマチテクノス, 東京)に導入した。カラムに5%アンモニア溶液60 mLを流し、得られた溶出液をフラクションNo. 2とした。次にカラムを水50 mLで洗浄後、0.05 N塩酸70 mLでカラムに吸着した成分を溶出し、洗液と溶出液を合わせてフラクションNo. 3とした。最後に、カラムに0.2 N塩酸50 mLを流して溶出したものをフラクションNo. 4とした。各フラクションは凍結乾燥後、残渣を滅菌蒸留水50 mLに溶解して試験に用いた。

### 3. *In vitro*小核試験

$4.0 \times 10^4$ 個のチャイニーズハムスターV79細胞をプラスチックシャーレに播種して37℃、5% CO<sub>2</sub>下で1日培養し、2日目に培地(3 mL)にニトロソ化合物MNNG(ナカライテスク, 京都)またはMNU(Sigma-Aldrich, USA)を添加した。添加後の最終濃度はMNNGが0.5, 1, 3, 5 μM, MNUが0.05, 0.1, 0.3, 0.5 mMとなるようにした。2日間培養後、細胞を回収しスライド標本作製した。ビールを用いた小核形成抑制試験には、MNNG, MNUをそれぞれ最終濃度5 μM, 0.3 mMとなるように培地(3 mL)に添加し、同時にビール4倍濃縮液またはビール画分を添加し、2日間培養後スライド標本作製した。培地への添加量はビール4倍濃縮液については5, 20, 40, 60 μL(ビール20, 80, 160, 240 μL相当)、ビール画分については10, 40 μL(ビール20, 80 μL相当)である。シャーレは各条件につき2枚ずつ作製した。

スライド標本作製および顕微鏡観察は以下の通りに行った。シャーレから培地を取り除き、0.02% EDTAを含むトリプシン溶液を2, 3滴添加して細胞をシャーレから剥離後、遠沈管に移し1000回転で3分間遠心した。沈渣の細胞に75 mM塩化カリウム溶液4 mLを加えて懸濁し室温で10分間放置した。その後、固定液(酢酸:メタノール=1:3)数滴を加え、1000回転5分間遠心した。沈渣の細胞に固定液4 mLを加えて懸濁して室温で数分間放置した後遠心した。固定液4 mLを加えて遠心する操作をさらに2回繰り返して得られた細胞沈渣に1%酢酸を含むメタノール溶液を数滴加えて細胞懸濁液を調製した。スライドグラスに細胞懸濁液を滴下して、一晚乾燥させた。観察直前に40 μg/mLアクリジンオレンジ溶液をスライドグラスに滴下し、カバーグラスをかけてB励起の蛍光顕微鏡下400倍で細胞を観察した。1標本あたり約1500個の細胞を観察し、細胞1000個当たりの小核を有する細胞数を算出して小核誘発性を評価した。統計的な解析は、マンホイットニーのU検定による。

## 実験結果

### 1. ニトロソ化合物の小核誘発性

チャイニーズハムスターV79細胞をMNNGまたはMNUを添加した培地中で2日間培養し、細胞中の小核出現頻度を観察した。細胞1000個当たりの小核を有する細胞数は、両化合物共に濃度依存的に増加した。MNNGでは1  $\mu$ M以上で増加は緩やかとなり、MNUでは0.1 mM以上で平衡に達した。この結果より、MNNGおよびMNUがV79細胞に対して小核誘発性を示すことが確認された。(Fig. 1A, 1B)

### 2. ビールによる小核形成抑制

ニトロソ化合物の小核誘発性に対するビールの影響について検討した。ビールは予め凍結乾燥によって揮発性成分やアルコールを除去し、残渣に元の4分の1量の蒸留水を加えた濃縮液として試験に用いた。Fig. 2AにMNNGの小核誘発性に対するラガービール、黒ビールの効果を示した。グラフの横軸は、培地に添加したビール濃縮液の量を元のビール量に換算した数値を示している。ラガービール、黒ビール共に有意な抑制効果を示しており、ラガービール80  $\mu$ L添加で小核出現頻度はMNNGのみの処理と比較して63% ( $p < 0.05$ ) に減少した。しかし、ビール添加量を80  $\mu$ Lより増加してもそれ以上の抑制効果は示さなかった。Fig. 2BにはMNUに対するそれぞれの効果を示している。MNNGの場合と同様、ラガービール、黒ビール共にMNUによる小核形成を有意に抑制した。ラガービール80  $\mu$ L添加、黒ビール20  $\mu$ L添加で小核出現頻度は共に63% ( $p < 0.05$ ) に減少した。

つぎにラガービールの成分を陽イオン交換樹脂および陰イオン交換樹脂を用いて分画し、得られたフラクションの小核誘発性に対する効果を検討した。フラクション1は糖類、フェノール化合物、有機酸、非電解質等、フラクション2は塩基性物質、フラクション3はアミノ酸等の両性電解質、フラクション4はその他の成分を含んでおり、ビール100 mLから得られる乾燥重量はそれぞれ、3.7 g, 0.2 g, 0.1 g, 0.09 gであった。Table 1にMNNGの小核誘発性に対する各フラクションの効果を示した。表に示す通り、塩基性物質を含むフラクション2においてビール80  $\mu$ L相当添加(乾燥重量0.16 mg)でMNNGのみの処理と比較して65% ( $p < 0.05$ ) まで小核出現頻度を減少させた。また両性電解質を含むフラクション3のビール20  $\mu$ L相当添加(乾燥重量0.02 mg)により小核出現頻度は74% ( $p < 0.05$ ) に減少した。フラクション1と4では有意な抑制効果は認められなかった。

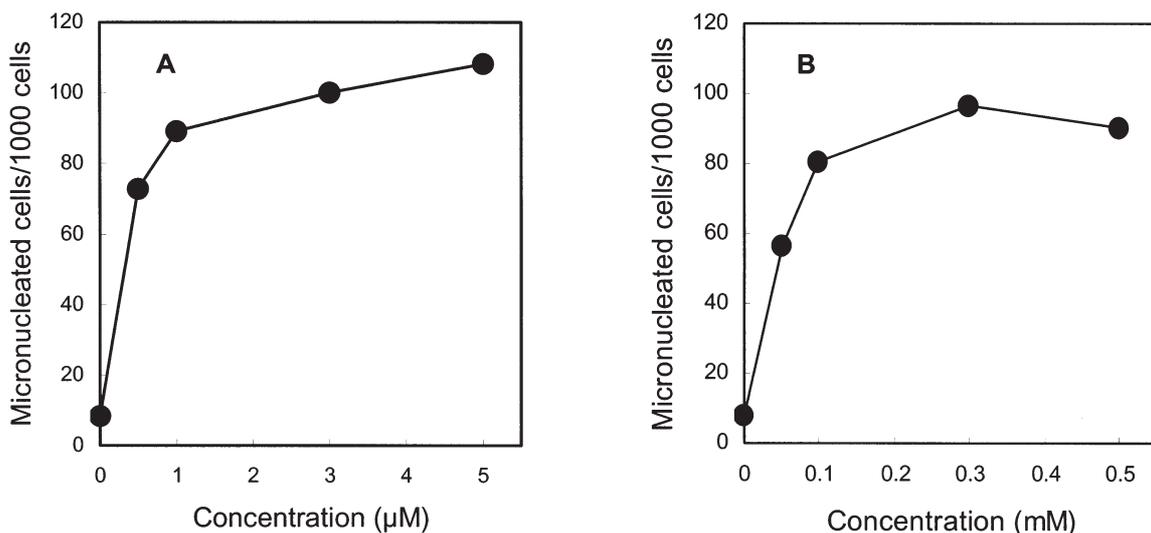
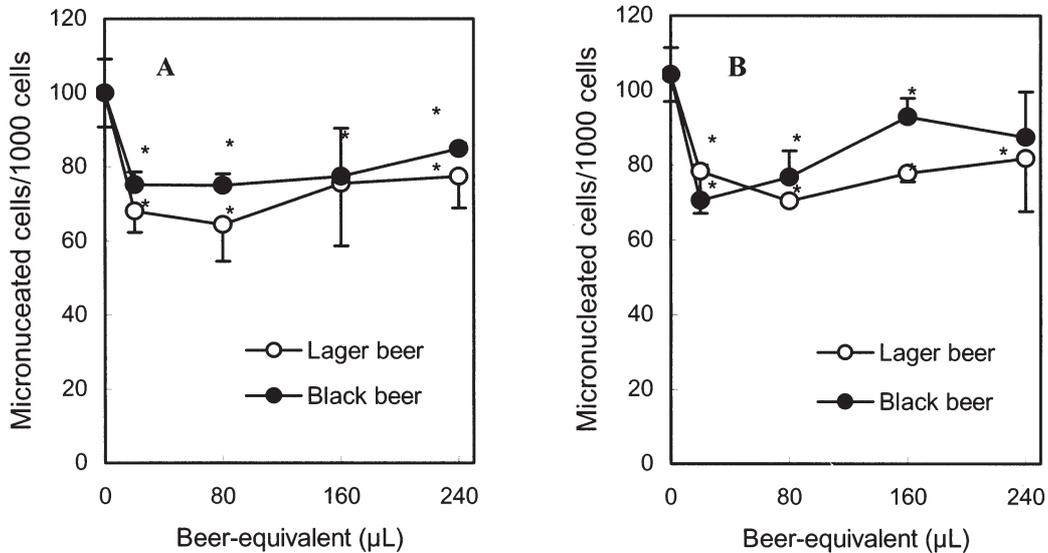


Fig. 1 Frequencies of micronucleated cells induced by MNNG (A) or MNU (B).



**Fig. 2** Effect of beer on the frequency of micronucleated cells induced by MNNG or MNU. Micronucleus assays were done with 0.5 μM MNNG (A) or 0.3 mM MNU (B) in V79 cells. Lager beer (○) or Black beer (●), previously lyophilized and dissolved in water (one-fourth of the original beer volume), was added to the culture medium (3 mL) at the beer-equivalent dose of 20, 80, 160, or 240 μL. Results were obtained in three independent experiments. Statistically significant from the control treated with *N*-nitroso compound alone, \* $p < 0.05$ .

**Table 1** Effects of beer-fractions on the frequency of micronucleated (MN) cells induced by MNNG

Beer-fraction added (μL)	Beer-equivalent (μL)	Net weight <sup>a</sup> (mg)	Number of MN cells/1000 cells (mean ± S.D.; $n = 3$ )	% of positive control
Negative control			4.1 ± 0.6	
MNNG 5 μM			100.1 ± 20.8	100.0
No. 1	10	20	87.0 ± 28.6	86.4
	40	80	78.7 ± 17.4	77.7
No. 2	10	20	76.8 ± 13.1	75.7
	40	80	66.9 ± 4.8*	65.4
No. 3	10	20	75.0 ± 9.9*	73.9
	40	80	93.4 ± 32.7	93.0
No. 4	10	20	87.8 ± 26.3	87.2
	40	80	84.5 ± 21.9	83.8

<sup>a</sup>These weights were determined from a large-scale experiment (100-mL beer), in which these fractions were evaporated to dryness to weigh the residues.

\*Statistically significant ( $p < 0.05$ ) using Mann-Whitney U-test.

## 考 察

MNNG, MNU等のメチル化剤は、中性溶液中で非酵素的に求電子性のメチルカチオンにまで分解し、これが核酸塩基の求核部位から攻撃されて塩基のメチル化を引き起こしDNAを損傷する。このDNA損傷が原因となり、遺伝子突然変異や染色体異常等が誘発されると考えられている。小核試験は、染色体異常の結果として細胞内に生じる小さな核を観察して被検物質の染色体異常誘発性を検出する試験法である。本実験の結果、ビール添加によりMNNG, MNUによる小核出現頻度が減少しており、染色体異常が抑制されたことを示している。また、ラガービール、黒ビール間で抑

制効果に大きな違いが観察されなかった。黒ビールは、その製造工程において原料の麦芽をラガービールよりも高温、長時間焙焦しているため、アミノ・カルボニル反応が進行しメラノイジン含量等が多くなっている。ビール中の小核形成抑制成分は麦芽の焙焦条件により含量変化を起こさないと考えられる。

本研究ではさらに、イオン交換樹脂を用いてビール中の小核形成抑制成分の分画を行った。エイムステストによる変異原性試験では、ビールに含まれるカフェ酸、バニリン酸、フェルラ酸等のフェノール化合物がMNNGによる遺伝子変異を抑制することが報告されている<sup>7,8)</sup>。また、核酸化合物の一種であるシュードウリジンにも抑制効果があることが報告されている<sup>7)</sup>。しかし、本研究ではフェノール化合物やシュードウリジンを含むフラクションには有意な小核形成抑制効果は認められず、塩基性物質や両性電解質を含むフラクションに抑制効果が認められた。ビール中の塩基性物質には、麦芽由来のコリン、ホルデニン、チラミン、*N*-メチルチラミンやホップ由来のヒスタミン等がある。両性電解質としては種々のアミノ酸が含まれているが、そのほとんどがビール酵母により資化されないプロリンである<sup>9,10)</sup>。サンマ由来の変異原物質2-クロロ-4-メチルチオ酪酸に対する抗変異原であるグリシンベタインもビールに含まれる両性電解質の1つであるが、MNNG, MNUに対しては遺伝子変異抑制効果を示さないことを以前の報告で明らかにしている<sup>11)</sup>。

MNNG, MNUによるDNA損傷は、求電子性のメチルカチオンが生成することによるため、メチルカチオンのスカベンジャーとして働く物質には小核形成抑制効果をもつ可能性が考えられる。スカベンジャーとして働く可能性のある物質(窒素原子を含む化合物、ビタミンC, SH化合物等)を用いて、MNNGによるDNA損傷の指標である $O^6$ -メチルデオキシグアノシン( $O^6$ -MedG)の生成量への影響を検討した報告では、 $O^6$ -MedG生成をこれらの物質が抑制することを明らかにしている。また、同物質による遺伝子変異抑制効果も報告している<sup>12)</sup>。これらのことから、本研究においても何らかのメチルカチオンスカベンジャーがビールの塩基性、両性電解質フラクションに含まれており、小核形成を抑制した可能性が考えられる。

遺伝子変異や染色体異常は発がんの第1段階(イニシエーション)であり、第2段階(プロモーション)、第3段階(プログレッション)を経てがんが進行する。ビール中の遺伝子変異、染色体異常抑制成分のヒトのがん予防への有効性についても今後の検討課題である。

## 参考文献

- 1) Kee, M. (1983) Cancer causation in booklet form. *Nature*, 303: 648.
- 2) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Supplement 7. Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42. (1987) International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- 3) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 17. Some *N*-nitroso compounds. (1978) International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- 4) Yamane, T., Nakatani, H., Kikuoka, N., Matsumoto, H., Iwata, Y., Kitao, Y., Oya, K., Takahashi, T. (1996) Inhibitory effects and toxicity of green tea polyphenols for gastrointestinal carcinogenesis. *Cancer*, 77: 1662-1667.
- 5) Steinmetz, K. A., Potter, J. D. (1991) Vegetables, fruit, and cancer. I. *Epidemiology. Cancer Causes Control*, 2: 325-357.
- 6) Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. V., Thomas, C. F., Beecher, C. W., Fong, H. H., Farnsworth, N. R., Kinghorn, A. D., Mehta, R. G., Moon, R. C., Pezzuto, J. M. (1997) Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275: 218-220.
- 7) Arimoto-Kobayashi, S., Sugiyama, C., Harada, N., Takeuchi, M., Takemura, M., and Hayatsu, H. (1999) Inhibitory effects of beer and other alcoholic beverages on mutagenesis and DNA adduct formation induced by several carcinogens. *J. Agric. Food Chem.*, 47: 221-230.

- 8) Francis, A. R., Shetty, T. K., and Bhattacharya R. K. (1989) Modification of the mutagenicity of aflatoxin B<sub>1</sub> and *N*-methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine by certain phenolic compounds. *Cancer Letters*, 45: 177 - 182.
- 9) 日本醸造協会編 (1999) 醸造物の成分, 日本醸造協会, 東京.
- 10) 吉澤 淑編 (1995) 酒の科学, 朝倉書店, 東京.
- 11) Kimura, S., Hayatsu, H., and Arimoto-Kobayashi, S. (1999) Glycine betaine in beer as an antimutagenic substance against 2-chloro-4-methylthiobutanoic acid, the sanma-fish mutagen. *Mutat. Res.*, 439: 267 - 276.
- 12) 平山晃久, 片山 康, 笠井映江, 渡辺徹志 (1994) 水溶性ビタミン類及びSH化合物による抗変異原性効果. *衛生化学*, 40 : 34 - 38.