

【研究報告】

生体成分のオゾン処理と変異原性

中室克彦

日本医療オゾン研究会会報, Vol.5, No.3, 1-5. (1998)

研究報告

生体成分のオゾン処理と変異原性

摂南大学薬学部環境衛生学研究室 中室克彦

要約 クレアチン、クレアチニン、尿酸、キサンチン、トリプトファンなどの生体成分である含窒素化合物14種類について、これら水溶液をオゾン処理した場合に生成するオゾン酸化生成物の変異原性をSalmonella typhimurium TA100とTA98を用いたAmes試験によって検討した。その結果、ピロール骨格を有するピロールおよびピリルピンのオゾン酸化生成物が塩基対置換型直接変異原性を示した。また、インドール骨格を有するインドール、スカトールおよびトリプトファンのオゾン酸化生成物がフレームシフト型間接変異原性を示した。とくにトリプトファンのオゾン酸化生成物にそれが強いことが認められた。さらに、トリプトファンのオゾン酸化生成物をHPLCで分画し、分取した18画分の変異原性をアミノアレン感受性株であるYG1024 + S9mixを用いて検討した結果、12画分に変異原性が認められた。これら画分中の強い変異原性を有するトリプトファンのオゾン酸化生成物は、官能基検出反応の結果からアミノ基、カルボキシル基およびカルボニル基を含有する芳香族化合物であることが考えられた。

キーワード : 生体内含窒素化合物、オゾン処理、変異原性、Ames 試験

1. はじめに

我が国におけるオゾン療法は進展しつつあるが、ヨーロッパにおいてはドイツ、イタリア、ロシアなどにおいてすでかなりの普及が見られる。これらオゾン療法には、オゾン水を用いる方法、オゾン-酸素混合ガス療法、体腔のオゾンガス治療、関節内・筋肉・皮内・皮下注射による治療および自家血療法などがある。このようなオゾン療法においては、いずれもオゾンが体液、体細胞などの生体成分と接触し反応することは明らかである。オゾン療法の作用機序に関する研究では、血液とオゾンの反応によって免疫系が賦活化されることなどが報告されつつある。しかし、オゾン療法の立場から、生体成分とオゾンとの反応生成物の解明した例やこれらオゾン反応生成物の変異原性に関して検討した例はほとんど報告がない。

ここでは、水中化学物質のオゾン反応生成物に関する情報、著者らの行った生体成分である含窒素化合物のオゾン処理反応生成物の検索、およびこれらオゾン反応生成物の毒性評価手法の一つである変異原性に関して検討した結果を記述する。

2. 生体成分のオゾン反応生成物

環境汚染物質や合成化学物質のオゾン処理によるオゾン酸化生成物に関する報告は多いが、生体成分のオゾン反応生成物に関する情報は少ない。ここではオゾンのアミノ酸や生体成分などとの反応を中心に述べる。

アミノ酸0~10 μ molesとオゾン0~10 μ molesを反応させた時の反応生成物について表1に示す。生体内SH化合物として典型的な還元型グルタチオン(GSH)

表1 アミノ酸等のオゾン反応生成物で構造既知のもの

化合物	オゾン反応生成物
還元型グルタチオン (GSH)	酸化型グルタチオン (GSSG)
システイン	システイン酸、シスチン
メチオニン	メチオニンスルホキシド
トリプトファン	キヌレニン、N-ホルミルキヌレニン
チロシン	ジヒドロキシフェニルアラニン
ヒスチジン	アンモニア

は容易に酸化され酸化型グルタチオン (GSSG) を生成する。また、システインは、オゾン酸化でシステイン酸とシスチンを同程度生成する。メチオニン、オゾン酸化でメチオニンスルホキシドだけを生成するが、メチオニンスルホキシドからメチオニンスルホンへの酸化は起こらないようである。トリプトファンはオゾン酸化を受け、キヌレニンやN-ホルミルキヌレニンを生成するが、この生成はアルカリ性より酸性の方が起こりやすい。チロシンのオゾン酸化は酸性よりアルカリ性の方が進行しやすい。このときのチロシンからの同定可能なオゾン反応生成物はジヒドロキシフェニルアラニンである。さらに、ヒスチジンの主要なオゾン反応生成物はアンモニアである。一方、これらアミノ酸の混合物のオゾン処理の実験から、水中アミノ酸とオゾンとの反応は、システイン、メチオニン、トリプトファン、チロシン、ヒスチジン、シスチン、フェニルアラニンの順に速く進行すると報告されている。

不飽和脂肪酸であるオレイン酸 ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$) は、オゾン酸化を受け、中間体のオレイン酸オゾニドを経てペラルゴン酸 ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$) とアゼライン酸 ($\text{HOOC}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$) を生成する。またマレイン酸はグリオキシル酸、ギ酸および二酸化炭素にオゾン酸化される。クロトンアルデヒドは、オゾン酸化によってグリオキサール、ギ酸とアセトアルデヒドを生成する。さらに、アセトアルデヒドは酸化が進行すると酢酸と過酢酸を生成する。また、第一級および第二級脂肪族アミンはオゾン分解を受ける。第四級アミンはこれに相当するアミノキシドにオゾン酸化される。

表2 オゾン処理含窒素化合物のTA98およびTA100に対する変異原性

化合物	変異原性			
	TA98		TA100	
	-S9mix	+S9mix	-S9mix	+S9mix
クレアチニン	-	-	-	-
クレアチン	-	-	-	-
クレアチンリン酸	-	-	-	-
プロリン	-	-	-	-
尿酸	-	-	-	-
馬尿酸	-	-	-	-
ビリルビン	+	-	+	+
ピロール	-	-	+	-
アラントイン	-	-	-	-
イミダゾール	-	-	-	-
キサンチン	-	-	-	-
スカトール	+	-	+	+
インドール	-	-	+	+
トリプトファン	+	+	+	-

3. 生体内含窒素化合物のオゾン酸化生成物の変異原性

著者らは生体内に存在するもののうち、特に14種類の含窒素化合物に着目し、これらの変異原性ならびにオゾン処理による変異原性の消長に関してAmes Salmonella/microsome assayを用いて検討するとともに、高い変異原性を示したトリプトファンのオゾン酸化生成物に関する変異原性の性状ならびにこれらオゾン酸化生成物の理化学的性状について検討を行った。

14種類の含窒素化合物 (10000 mg/L) を、オゾン濃度10mg/L、酸素流量1.0 L/minの条件でオゾン処

理した時の変異原性の結果を表2に示す。これら含窒素化合物そのものには、いずれも変異原性は認められなかったが、オゾン処理を行った場合、ピロール骨格を有するビリルビンとピロールと、さらにインドール骨格を持つスカトール、インドールおよびトリプトファンに変異原性が出現することが認められた。

ピロール骨格を有するピロールおよびビリルビンのうち、特にビリルビンのオゾン酸化生成物において、TA100-S9mixに対する塩基対置換型の強い直接変異原性の出現することが認められた。

また、インドール骨格を有するインドール、スカトールおよびトリプトファンにおいては、トリプトファンのオゾン酸化生成物が TA98+S9mix に対して強いフレームシフト型の間接変異原性を示すことが認められた (図1)。

以上のことから、生体成分としての含窒素化合物をオゾン処理した場合、比較的強い変異原性を有するオゾン酸化生成物を生成するものはスカトール、ビリルビン、トリプトファンであることが認められた。特に、トリプトファンのオゾン酸化生成物は、特徴的にフレームシフト型間接変異原性の性状を有するためトリプトファンに着目し、各種オゾン処理条件が変異原性に及ぼす影響について検討した。

変異原性を有するトリプトファンのオゾン酸化生成物の生成状態を把握するために、オゾン処理10分におけるpH変化、ならびにオゾン処理時間の変化が変異原性に及ぼす影響について検討を行った。その結果、オゾン処理時のpHが5付近で変異原性が最大となった。さらにpH5でオゾン処理時間を変化させたとき、オゾン処理10分後に変異原活性が最大となり、その後、低下することが認められた (図2)。このことから

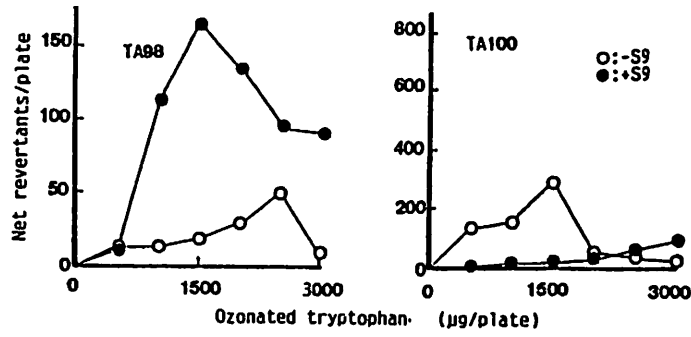


図1 オゾン処理トリプトファンのTA98±S9mixとTA100±S9mixに対する変異原性

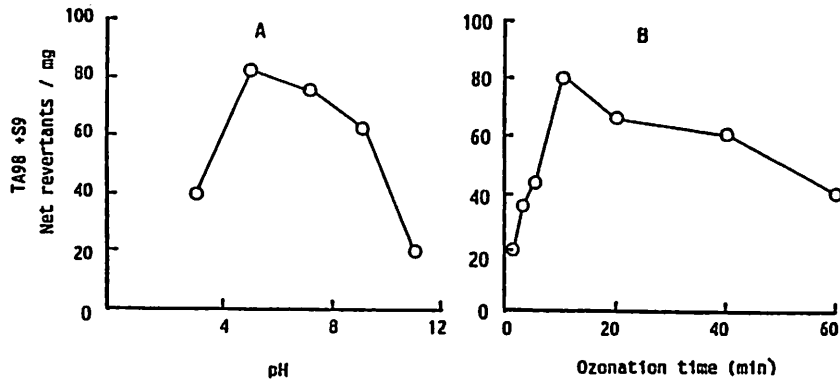


図2 トリプトファンのオゾン処理時間および処理pHの変化によるTA98+S9mixに対する変異原性に及ぼす影響

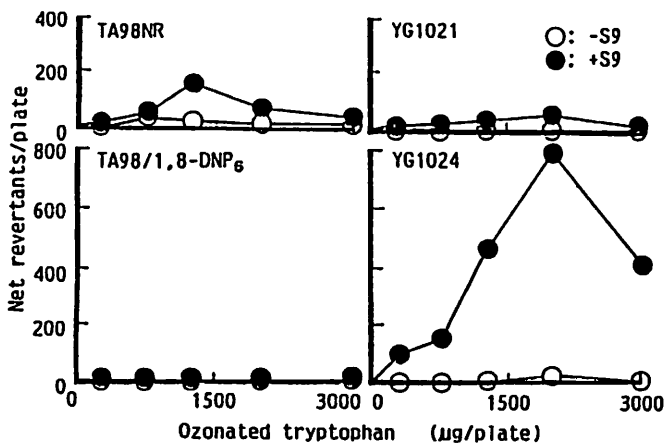


図3 オゾン処理トリプトファンのTA98NR、YG1021、TA98/1,8-DNP6とYG1024に対する変異原性

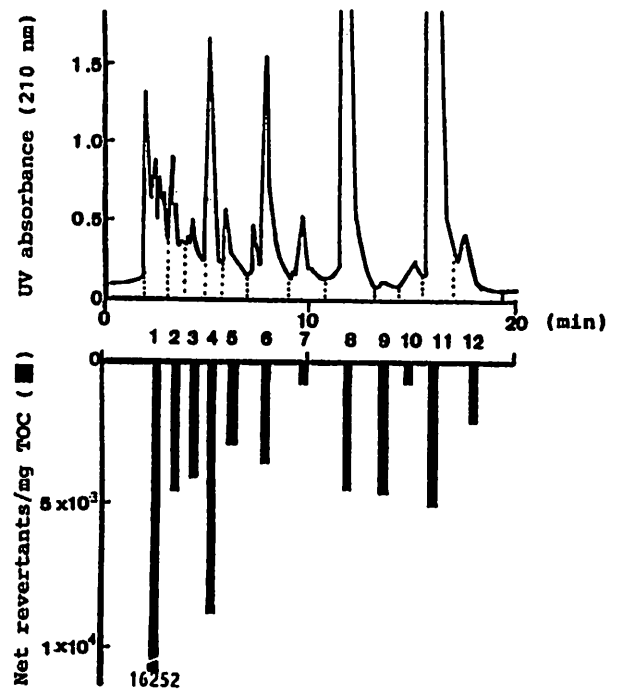


図4 オゾン処理トリプトファンのHPLCクロマトグラムとそのHPLC画分のYG1024+S9mixに対する変異原性

トリプトファンのオゾン酸化生成物中に含まれるフレームシフト型の間接変異原物質はpH 5でオゾン処理10分後にその生成が最大になることが考えられた。

つぎに、トリプトファンのオゾン酸化生成物の変異原性の性状をさらに追究するために、ニトロアレンやアミノアレン検出菌株を用いて検討を行った。トリプトファンのオゾン酸化生成物をTA98を親株としたニトロアレンおよびアミノアレン検出菌株を用いて調べた時のdose-response curveの結果を図3に示す。すなわち、ニトロレダクターゼ欠損株であるTA98NRに変異原性の出現が示されたが、この高生産株であるYG1021の±S9mixいずれにも変異原性の出現は認められないことから、ニトロアレンに起因する変異原性は出現しないことが考えられた。一方、O-アセチルトランスフェラーゼ欠損株であるTA98/1,8-DNP₆には変異原性が認められないが、この高生産株であるYG1024+S9mixのみに強い変異原性を示すことが認められた。この変異原性はO-アセチルトランスフェラーゼ高生産株によって生じることから、トリプトファンのオゾン処理によって生成する変異原物質は、アミノアレンである可能性が示唆された。そこで、これら変異原性を有するトリプトファンのオゾン酸化生成物についての理化学的性状を把握するために、トリプトファンがほとんど分解するオゾン処理10分後のオゾン酸化生成物のHPLCクロマトグラムおよびこのクロマトグラムに従って分取した画分の変異原性をYG1024+S9mixを用いて検討した。その結果、図4に示すように、保持時間20分までにすべてのピークが出現し、少なくとも18種類以上のオゾン酸化生成物の出現することが認められた。

さらに、HPLCクロマトグラフィーから得られた変異原性を示す12画分についてAmes Salmonella/microsome assayを行ったところ、TOC(全有機炭素)mgあたりの変異原性は、保持時間の最も短い画分1ならびに画分4に変異原性が極めて高いことが認められた。このことから、全ての画分に変異原性が認められ、その中でも特に保持時間初期の画分のオゾン酸化生成物に変異原性の高い可能性が考えられた。

表3 トリプトファンのオゾン反応生成物の官能基検出反応の結果

HPLC フラクション	UV (254nm)	置換基					
		ニトロ、ニトロ基 ^a	アミノ基 ^b	芳香族アミノ基 ^c	カルボキシル基 ^d	カルボニル基 ^e	インドール基 ^f
1	+	-	+	+	+	+	-
2	+	+	+	+	+	+	-
3	+	-	+	+	+	+	-
4	+	-	+	+	+	+	-
5	+	-	+	+	+	-	-
6	+	-	+	+	+	-	-
7	+	-	+	+	+	+	-
8	+	+	+	+	+	-	-
9	+	-	+	+	+	-	-
10	+	-	+	+	+	-	-
11	+	+	+	+	+	-	-
12	+	-	+	+	+	-	-
トリプトファン	+	-	+	+	-	+	+

a:ジフェニルアミンによる呈色反応,

b:ニトロリン試薬による呈色反応,

c:グリオキシム酸による呈色反応,

d:2,6-ジクロロインドールフェノールによる呈色反応,

e:2,4-ジニトロフェニルピラジンによる呈色反応,

f:プロピル試薬による呈色反応

トリプトファンのこれらオゾン酸化生成物の構造を推定するため、HPLCで分画した12画分について行った各種の官能基検出反応の結果を表3に示す。トリプトファンのオゾン酸化生成物はアミノ基、芳香族アミンならびにカルボキシル基に対する反応がすべての画分に認められた。さらに、画分2、8ならびに11はニトロ、ニトロソ基に対する反応を示し、また1、2、3、4ならびに7の画分では、カルボニル基に対する反応が認められた。

ところで、前述したようにトリプトファンのオゾン反応生成物として明らかになっているキヌレニンやN-ホルミルキヌレニンには、変異原性が認められないことが示されている。

これらの事実から、トリプトファンのオゾン酸化生成物の変異原性を有する物質は少なくとも18種類あり、しかも、変異原性の高かった画分1ならびに4中のトリプトファンのオゾン酸化生成物は、いずれもアミノ基、カルボシキル基、カルボニル基を有する芳香族環を含有すると考えられた。

4. おわりに

オゾン療法をヒトに対して適用することを考えるとき、治療としての有効性に関する作用メカニズムを明らかにすることは重要なことである。ところで、昨今、医薬品の患者に対する種々の副作用が社会問題になっている。オゾン療法においても同様にこの様な観点からの検討がもちろん必要である。すなわち、オゾン療法において実際に用いる低濃度オゾンそのものの生体影響の有無を把握、および低濃度オゾンと生体構成成分との酸化反応によって生成するオゾン反応生成物の詳細な毒性情報が今後益々必要になるものと考えられる。

参考文献

- 1) J.B.Mudd, R.Leavitt, A. Ongun and T.T.McManus : Reaction of ozone with amino acids and proteins, *Atmospheric Environment*, 3, 669-682 (1969).
- 2) 中室克彦, 篠原政良, 佐谷戸安好 : 水中含窒素化合物のオゾン酸化による変異原性発現, 第2回日本オゾン協会年次研究講演会講演集, pp.48-51(1993).
- 3) 神力就子 : ヨーロッパにおけるオゾン療法, *医療オゾン研究*, 増刊1, pp.15-28 (1996).
- 4) H.F.Oehlschlaeger : Reaction of ozone with organic compounds, in Ed. R.G.Rice and J.A.Cotruvo "Ozone/Chlorine Dioxide Oxidation Products of Organic Materials", pp. 20-37 (1978).
- 5) Y.Sayato, K.Nakamuro and H.Ueno: Ozonolysis of naphthoresorcinol in water, *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, 34(5), 451-458 (1988).
- 6) 佐谷戸安好, 中室克彦, 上野 仁 : 水中有機物質のオゾン処理生成物の生体影響, *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, 39(4), 251-265 (1993).

(解説)

変異原性 変異原性とは、遺伝子あるいは染色体に変化をもたらす性質のことで、狭義には突然変異原性を指す。突然変異には、点突然変異や多数塩基の変化など核での染色体の内容変化、および2,3倍体の増加や特定の染色体の増加などの染色体数の変化なども含まれる。遺伝子は細胞が増殖するときの情報を有し、その本体はDNAである。二重螺旋構造を有するDNA鎖には4種の塩基（アデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、チミン(T)）が情報の担い手として結合している。ここで、各塩基は対となる相手が決まっており、A-T、G-C、T-A、C-Gなどの塩基対で存在する。この塩基対がもとになって、正常に遺伝子が複製したり、タンパク質合成の情報が伝達される。もし、DNAの塩基配列に変化が起こると、タンパク合成が正しく行われず、タンパク質の機能も失われる。このDNAの塩基配列の変化の異常を狭義の「突然変異」といい、塩基対置換（Base-pair change）とフレームシフト（Frame shift）の2種の点突然変異がある。この点突然変異を検出するのがAmes試験で代表される変異原性試験である。

変異原性試験の位置づけ Ames試験などの変異原性試験は、初期の頃はこれら結果が動物実験による発がん性と高い相関性を示すことから、発がん性の重要なスクリーニング手法として位置づけられていた。しかし、最近では発がん性との相関率が50%付近であるため、変異原性試験の結果の解釈が変わってきている。すなわち、発がんのメカニズムにはDNA傷害が必須であることから、これら変異原性試験は遺伝子（DNA）傷害性のスクリーニング（広い意味での発がん性のスクリーニング）として用いられ、遺伝毒性試験ともいわれる。

Ames試験 米国カリフォルニア大学のB.N.Amesらによって開発された方法である。試験に用いるネズミチフス菌（*Salmonella typhimurium*）はヒスチジン合成能を欠損し、ヒスチジンがないと増殖できない突然変異株である。この菌株が変異原物質の作用により本来のDNAに復帰すると、ヒスチジンがなくても増殖できるようになる。Ames試験は変異原物質の作用によりヒスチジン合成能を有する菌に復帰する程度を形成コロニー数（revertants）で判定するものである。変異原性の検出菌株には、塩基対交換型変異原性を検出するTA100株、フレームシフト型変異原性を検出するTA98株、活性酸素感受性株であるTA102とTA104、さらにニトロアレンやアミノアレン高感受性株のYG1021、YG1024、YG1026とYG1029などがある。