

緑黄色野菜の抗変異原性について

— 栽培条件による抗変異原活性の違い —

玉置 ミヨ子
堀野 成代

緒言

野菜はVA, B, C等のビタミン類、K, Na, Mg, Ca, Fe等のミネラル類、カロテン等の橙黄色色素類や食物繊維等、多くの栄養成分を含み、私達の健康を維持、増強する上で欠くことの出来ない食品であることはよく知られている。近年、野菜類にはこのような栄養機能のほかに、特に緑黄色野菜には発ガンあるいは老化予防に関連している抗変異原性、制ガン性、抗酸化性等の優れた生理的機能を有していることが示され、その重要性が注目されている¹⁾。日本人の食生活と発ガンのリスクを比較した平山²⁾は緑黄色野菜を多食している人は肉類を多食する人よりもガンになる率が低いこと、また喫煙している人でも緑黄色野菜を毎日食べるとガン発症のリスクが低くなることを明らかにしている。米国でも古くからガン発生と食物摂取の相関性に関する調査が行われ、その結果、国立科学アカデミーより1982年に発表された報告書「食と栄養とガン」³⁾によると、カロリーや脂肪、食塩の過剰な摂取が発ガンに大きな影響を与えると警告する一方、カロテンやビタミン類 (A, C, E) の多い緑黄色野菜の摂取が発ガン率を低下させることを指摘している。このように疫学的研究からも野菜の有用性が証明されており、このことは野菜中に発ガン予防機能を有する成分が存在することを示唆するものである。既に野菜中の抗変異原物質としてビタミン類、食物繊維、カロテノイド類、テルペン類、ポリフェノール類、フラボン類、含硫化物などの種々の成分が明らかにされ^{4, 5)}、ガン予防効果の期待が持たれている。

野菜は元来、野草であったものを長年の栽培の歴史で育種選抜し、収量、栽培適応性、輸送性、加工特性、外見的品質など生産者や消費者にとって都合の良いように改良し育てられてきたものである。品種改良や栽培方法によってその成分も質的あるいは、量的にも変化し、本来備えていた生理活性物質にも変化をきたしているのではないかと想像される。村上ら⁶⁾は比較的野生種に近いタイ産の食用植物や非栄養的食用植物に発ガン抑制活性の強いものが多くみられたことや、同種植物間でも日本産とタイ国産間で活性が大きく異なっていることを報告している。また、江幡ら^{7, 8)}は野菜の生育時期や生育環境(露地栽培とハウス栽培)によって抗変異原作用が異なることを明らかにしている。そこで私達は、野菜の種類、栽培条件とくに自然農法(有機栽培)と化学肥料主体の慣行農法により栽培

されたシュンギク、コマツナ、ホウレンソウの三種の緑黄色野菜について抗変異原活性に与える影響を検討すべく、サルモネラ菌を用いるAmes法⁹⁾を利用した抗変異原試験法により、N-ニトロソジメチルアミン (NDMA) の変異原抑制効果を調べた結果、若干の知見を得たので報告する。

実験方法

1、実験材料

1) 野菜の栽培方法

シュンギクの栽培は奈良県農業試験場内の水田転換畑に設置した簡易雨除け栽培施設で木質堆肥を3年にわたって連年投与した圃場で有機質肥料のみを施用した有機栽培と毎年有機質資材を施用して土壌改良を行った圃場に化学肥料のみを施用した慣行栽培によった。有機栽培、慣行栽培とも窒素成分換算で同量の肥料を作付前に全層施用し、無農薬で栽培管理した。供試品種は「冬の精」で、1993年、9月中旬播種し、11月2日収穫した。

ホウレンソウについては一試料は、静岡県大仁農場（金山重信氏による栽培）に於いて設置した10アール当たり2tの培養土（成分量合計 N 21.2kg P 34.8kg K 15.4kg/10a）を施肥した自然農法区で栽培した自然農法と化学肥料主体（成分量合計 N 15kg P 25kg K 15kg/10a）の慣行農法により栽培した。尚、供試品種は「トライ」で、1993年3月2日、播種し、4月8日収穫した。他方の試料は上記の奈良県農業試験場の同施設内において木質堆肥を4年連年投与した圃場に有機質肥料区と化学肥料区を設け、更に施肥量を変えた3区（Tab.1）に分けて有機栽培と慣行栽培によった。両肥料区ともそれぞれ対応する肥料区には窒素成分換算で同量の肥料を基肥として播種10日前に全層に施用した。供試品種は「アクティブ」で、1995年9月26日播種し、11月13日収穫した。

コマツナについては一試料は、大仁農場において10アール当たり牛糞堆肥800kg施肥した自然農法区で栽培した自然農法と化学肥料主体（成分量合計 N 22.5kg P 26kg K 22.6kg/10a）の慣行農法により栽培した。尚、供試品種は「みすぎ」で、1993年4月28日播種し、5月26日収穫した。他方の試料は

Table 1. Components of Chemical and Organic fertilizer

試験区	肥料名	施肥量 kg/a	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	kg/a
有機質肥料 N1kg	綿実油 骨粉 (合計)	16.0	0.96	1.32	0.21	
		1.5	0.06	0.32	0.00	
有機質肥料 N2kg	綿実油 骨粉 (合計)	32.0	1.92	0.64	0.42	
		3.0	0.12	0.63	0.00	
有機質肥料 N3kg	綿実油 骨粉 (合計)	48.0	2.88	0.96	0.62	
		4.5	0.18	0.95	0.00	
化学肥料 N1kg	磷酸安加里S604	6.3	1.01	0.63	0.88	
化学肥料 N2kg	磷酸安加里S604	12.6	2.02	1.26	1.76	
化学肥料 N3kg	磷酸安加里S604	18.9	3.02	1.89	2.65	

上記の奈良県農業試験場で栽培したハウレンソウと全く同様の施肥方法、栽培方法、栽培日数で、コマツナ「みすぎ」について有機栽培と、化学肥料主体の慣行栽培を行った。

2) 野菜試料の調製

圃場で収穫したハウレンソウ、コマツナ、シュンギク等の野菜は、直ちに水道水で洗浄し、2℃の冷蔵庫で一夜保存した後、翌日保冷車で搬送したものをプラスチック製冷凍用バッグに入れ、空気を抜いてシールをし、-30℃で凍結保存した。これらを凍結乾燥し、家庭用ミキサーで細粉し(12,000 rpm/min. 2分)、脱酸素剤を加えて褐色容器に入れ、-30℃の冷凍庫に保存した。

3) 水抽出液の作成

変異原性の測定のために水抽出液を使用した。上記凍結乾燥試料 0.50gを秤取し、試料の80倍の精製水40ccを加えて20,000rpm/min. 20分ホモジナイズした。その後、高速冷却遠心分離器で、10,500rpm/min. 10分遠心分離し、得られた上清を0.45 μmのメンブランフィルターで濾過し、濾液を滅菌済みマイクロチューブに分注し、-30℃で保存した。使用にあたって、必要量解凍し、水抽出液として変異原に対する抑制実験に用いた。

2、抗変異原性試験

Ames テスト⁹⁾を応用して次に述べる手順で抗変異原性試験を実施した。

1) 使用菌株と前培養菌懸濁液の調整

使用菌株はサルモネラ菌変異株で、ヒスチジンがないと生育出来ないヒスチジン要求菌である *Salmonella typhimurium* TA100を用いた。静止期の初期まで培養した菌懸濁液に滅菌済みのディフコパクトグリセロールを終濃度が16%になるように加えて滅菌済みマイクロチューブに分注し、-80℃で凍結し、種菌保存液とした。実験の都度この種菌保存液を室温で融解し20 μl (2.5×10^7 cells / 20 μl) を前培養培地 (Tab. 2) 10ccに植菌し、恒温水槽 (37℃) にL字管をセットして振とう培養 (80往復/min. 水平振とう) を行った。約4時間振とう培養の後、比色計を用いてOD 660nm ≒ 0.2 ($2 \sim 3 \times 10^8$ cells / cc) であることを確認し、前培養菌懸濁液とし、1時間以内に抗変異原性試験に使用した。

Table 2. Composition of Precultivation medium

Oxoid nutrient broth No.2	1.25g
H ₂ O	50ml

2) N-ニトロソジメチルアミン (NDMA) の変異原性の測定方法

NDMA の変異原性測定法はAmesテスト⁹⁾の原理に基づき、江幡らが開発した感度の高い改良法^{10, 11)}を用いた。測定に使用したヒスチジン要求菌 (His⁻) である *Salmonella typhimurium* TA100 は S9 (アセトン投与と絶食で誘導をした雄 S P F Sprague-Dauley系ラット肝ミクロソーム画分) で代謝活性化された NDMA によってヒスチジン非要求性 (His⁺) に復帰突然変異する。

滅菌済みの褐色試験管に一平板当たり50 μ gを含むNDMA 溶液100 μ l、S9 Mix (NADPH 産生系を含むコファクター溶液に、S9 を加えて全量を10mlにしたもの、Tab. 3) を500 μ l、2-1) の項で調整した前培養菌懸濁液100 μ lを加えてよく混和する。この混合液を代謝活性化 (37°C、60分、pH 6.4 水平振とう160rpm/min.) した後、菌が数回分裂するだけの0.5mM-ヒスチジン・ビオチンを添加したソフトアガー (Tab. 4) 2 mlを加えて、フラッシュミキサーで充分混和した後、事前に作成した最小グルコース寒天平板培地 (Tab. 5) 上に注ぎ手早く広げる。寒天が固まったら37°Cの恒温器に入れ、48時間培養し、平板上に現れた復帰突然変異菌 (His⁺) のコロニー数を測定した。尚、NDMAを除いた対照試験を同様に行い、両者のコロニーの差を変異原性の強さとした。

Table 3. Composition of S9 Mix (10ml)

A.	0.4M	MgCl ₂ ·6H ₂ O	200 μ l
	1.65M	KCl	200 μ l
	1.0M	G6P	50 μ l
	100unit/ml	G6PDH	50 μ l
	0.1M	β -NADPH	400 μ l
	0.1M	β -NADH	400 μ l
	0.25M	Na-Pi Buffer(pH 6.4)	4000 μ l
		Sterile water	3479 μ l
B.		S9 _{AC-F2} (1.5mg protein/plate)	1221 μ l

Table 4. Composition of Soft agar

Agar	1.0g
NaCl	1.2g
0.5mM Histidine-Botin sol.*	20ml
H ₂ O	200ml
*0.5mM Histidine-Botin sol.	
L-Histidine	7.8mg
D-Biotin	12.2mg
H ₂ O	100ml

Table 5. Composition of Minimum glucose and agar medium

A.	Glucose	20.0g
	Agar	15.0g
	H ₂ O	700ml
B.	(Minimum Vogel-Bonner medium)	
	MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2g
	Citric acid·H ₂ O	2.0g
	K ₂ HPO ₄	10.0g
	NaNH ₄ HPO ₄ ·4H ₂ O	3.5g
	H ₂ O	300ml

3) 野菜試料による抑制試験法

滅菌済みの褐色試験管に、一平板当たり50 μ gを含むNDMA 溶液50 μ lと1-3)の項で準備した野菜試料液を必要濃度に調整したものを50 μ l加え、以下上記2-2)の実験と全く同様にS9 Mix、菌懸濁液を加えて、代謝活性化を行った後、ソフトアガーに混和しアガープレートに重層した。37°C、48時間培養後、生じた変異コロニー数を測定した。測定は3連で行い、平均値と標準偏差を表示した。NDMAの変異原性に対する抑制率は下の式によって算出した。尚、野菜試料のみの添加による自然復帰コロニー数と2-2)の対照試験のコロニー数とは殆ど差が無く、試料そのものの変異原性、試料の試験菌株に対する毒性は見られなかった。

$$\text{抑制率 (\%)} = 100 \times \frac{A - B}{A - C}$$

A：NDMA 添加時のコロニー数

B：野菜試料とNDMA 添加時のコロニー数

C：NDMA を除いた対照試験のコロニー数

結果 及び 考察

1、野菜の添加量が NDMA 変異原抑制に及ぼす影響

大仁農場において栽培したコマツナ、ホウレンソウと奈良農業試験場で栽培したシュンギクについて 野菜の添加量とNDMA 50 μ gの変異原に対する 変異コロニー数の関係を調べた結果、Fig. 1、2、3に示したように実験に使用した三種の野菜共添加量の増加とともにコロニー数は減少しており、NDMAの代謝活性化による変異抑制が認められた。しかし、一定の Dose 以上では、抑制作用に限界があった。これらの結果は従来よりなされてきた癌発症と食物との関連を示した多くの調査結果や実験報告と一致していた。その抑制因子、作用機構等については、今後の課題としたい。

緑黄色野菜の抗変異原性について

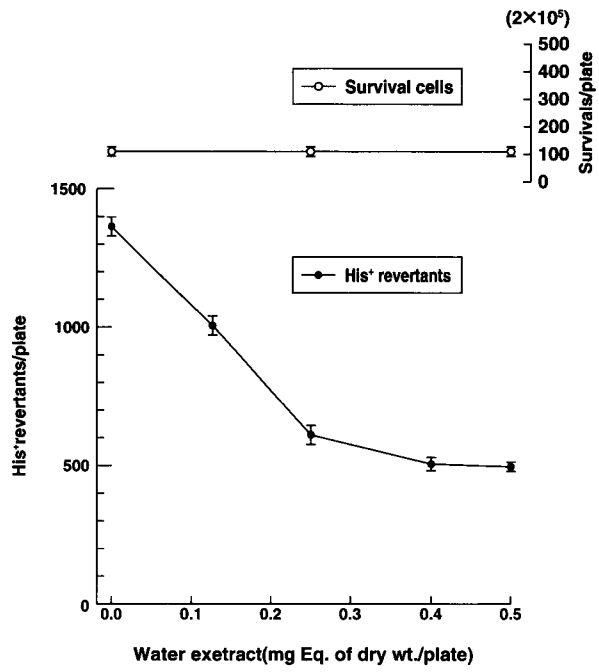


Fig.1 Suppression of NDMA-induced mutagenesis in *S.typhimurium* TA 100 with "Shungiku"

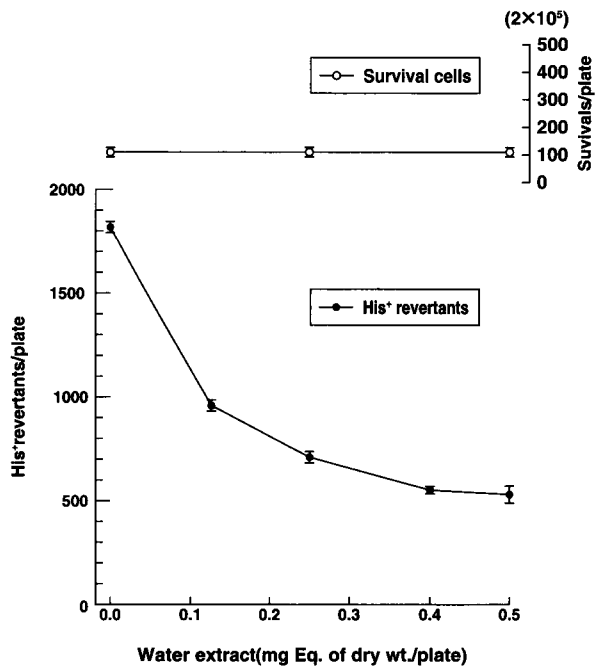


Fig.2 Suppression of NDMA-induced mutagenesis in *S.typhimurium* TA 100 with "Komatsuna"

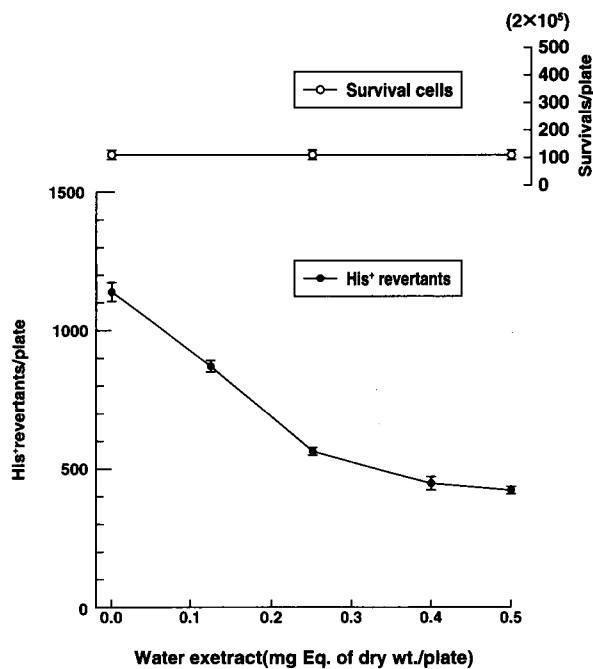


Fig.3 Suppression of NDMA-induced mutagenesis in *S.typhimurium* TA 100 with "Spinach"

2、野菜の種類による抑制率の比較

大仁農場において慣行農法により栽培したコマツナ、ホウレンソウと奈良農業試験場で化学肥料を主体にして栽培したシュンギクの乾燥重量0.25mgを用いた時のNDMA 50 μ gの変異原に対する抑制率を比較してみた結果、Fig. 4 に示したようにシュンギクでは80%、コマツナでは74%、ホウレンソウ57%で、三種の野菜のなかではシュンギク、次いでコマツナの抑制率が高く、ホウレンソウが最も低かった。この傾向は野菜の種類による特異性によるものか、あるいは用いた野菜試料の偶然性によるものかを検討すべく、1993年、大仁農場において慣行栽培により栽培したコマツナ、ホウレンソウと1995年、奈良農業試験場において化学肥料により栽培したコマツナ、ホウレンソウについて、抑制率を比較検討してみた結果、Fig. 5 に示したように、ホウレンソウよりコマツナの方が常に抑制活性が高く、野菜の種類による特異性と判断した。

緑黄色野菜の抗変異原性について

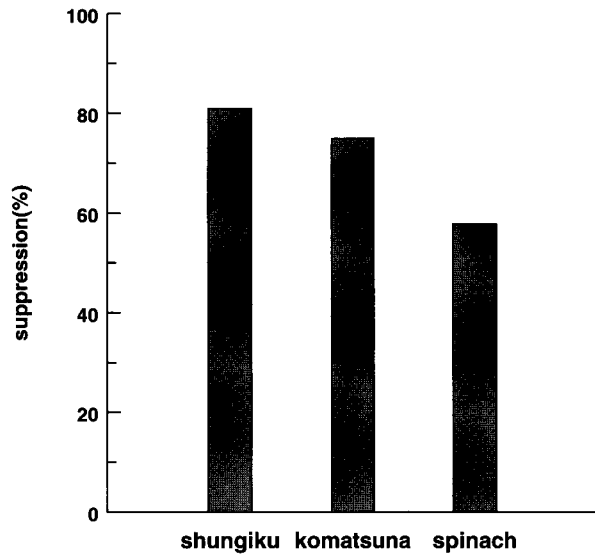


Fig.4 Mutagenic suppression of NDMA with three species of vegetables
water extracts : 0.25mg Eq. of dry wt./plate

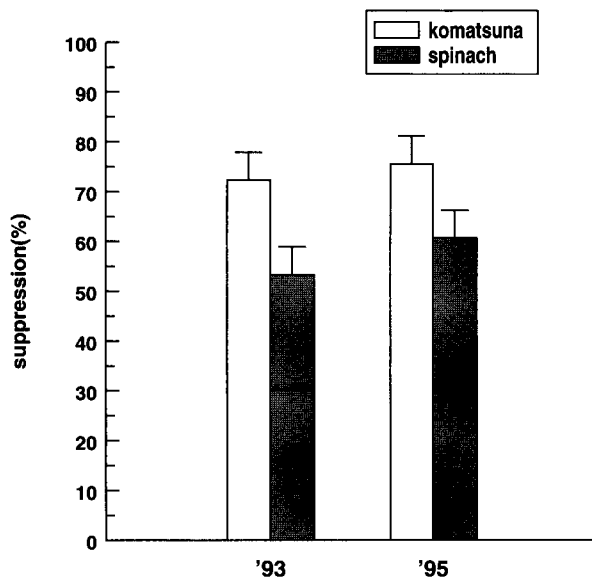


Fig.5 Mutagenic suppression of NDMA with two species of vegetables cultivated in 1993 and 1995
water extracts : 0.25mg Eq. of dry wt./plate

3、有機栽培野菜と慣行栽培野菜におけるNDMA変異原抑制効果の比較

大仁農場で培養土を主体にして栽培した自然農法と化学肥料を主体にした慣行農法により栽培したホウレンソウ、コマツナと奈良農業試験場で有機及び化学肥料で栽培したシュンギクの各試料（乾燥重量0.25mg）を用いた時のNDMA変異原抑制率はFig. 6 に示されるようにシュンギクで1.32倍、コマツナで1.10倍、ホウレンソウで1.23倍と僅かの差ではあるが共に自然農法に較べて慣行農法による野菜がいずれも抑制活性は高い傾向を示した。

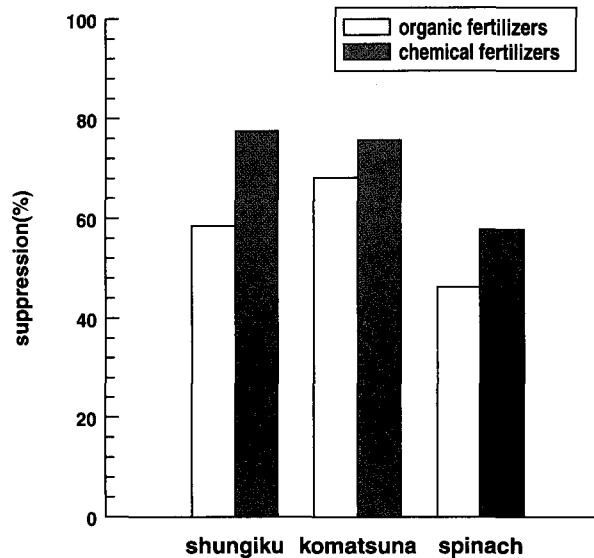


Fig.6 Mutagenic suppression of NDMA with each vegetable cultivated with organic and chemical fertilizers
water extracts : 0.25mg Eq. of dry wt./plate

4、有機及び慣行栽培における施肥量（窒素成分含量）がNDMA 変異原性に及ぼす影響

奈良県農業試験場において有機肥料区と化学肥料区に分け、更にそれぞれに窒素成分含有量（Tab.1）を変えて栽培したコマツナとホウレンソウの各試料（乾燥重量0.25mg）を用いた時の変異原抑制に及ぼす影響をみた結果はFig.7、8に示されるように両野菜ともNDMA に対する抗変異原性は化学肥料区の方が有機肥料区より1.1~1.4倍高く、先に述べた大仁農場で栽培したコマツナ、ホウレンソウと同様の傾向を示した。又、各肥料中の窒素成分含量が多くなるにつれて抑制効果は僅かではあるが、一定限度の窒素量までは正の相関が見られた。古川ら¹²⁾は野菜に含まれる硝酸含量は窒素施肥量に比例して増加したと報告していることから本実験に使用したホウレンソウ、コマツナ共に窒素肥料を多く添加して栽培した野菜ほど硝酸含量も多く含まれているものと思われる。従来から野菜に含まれる硝酸塩が体内で発ガン性ニトロソアミン化合物の材料となることが問題視されてきたが微生物による変異テストの結果では、逆に、硝酸含量の高いものほど NDMAに対する抑制活性が高くなり、その不安要因は打ち消されたと言える。江幡ら¹³⁾も同様の報告をしている。

施肥量（窒素成分含量）と変異原抑制活性の間に正の相関が認められたことは、植物体の成長に必要な窒素成分は抗変異原物質の生成に寄与していると考えられる。窒素をはじめとする植物に必要な生体構成成分を土壌から吸収して育つ野菜は、長い時間を要して土壌微生物による有機質資材の分解により得られた窒素成分を利用する自然農法に較べて、既に利用し易い形で十分な窒素成分を含む化学肥料を施肥した慣行農法の方が即効的である。栽培法の違いによる変異原性抑制活性の差はこの点にあったのではないかと思われる。

自然食嗜好、自然栽培嗜好が高まっている中で、食品科学の立場から環境汚染その他を考慮して、今後、土地の窒素分解に要する時間と諸条件を検討し、微生物活用の有機栽培、有機肥料による変異原抑制活性のより高い野菜の出現を望むところである。

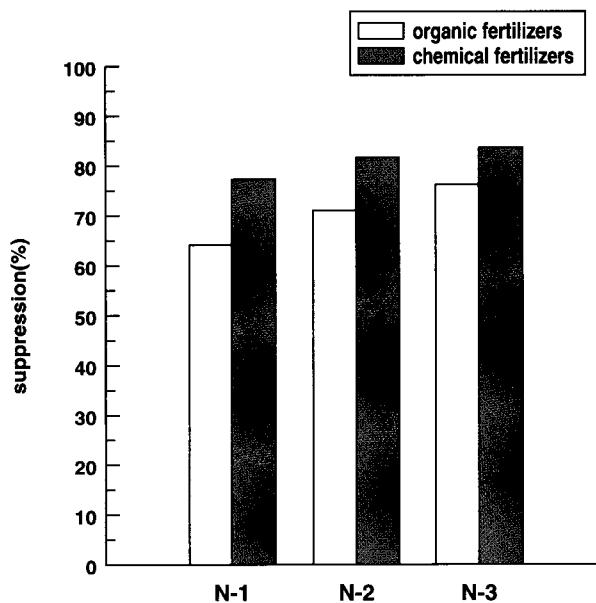


Fig.7 Mutagenic suppression of NDMA with “Komatsuna” cultivated with organic and chemical fertilizers
water extracts : 0.25mg Eq. of dry wt./plate
N : contents of nitrogenous fertilizer

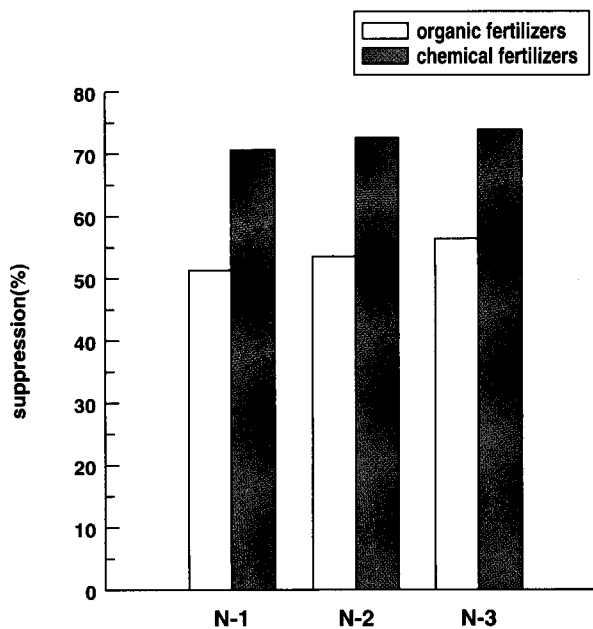


Fig.8 Mutagenic suppression of NDMA with “Spinach” cultivated with organic and chemical fertilizers
water extracts : 0.25mg Eq. of dry wt./plate
N : contents of nitrogenous fertilizer

要 約

Salmonella typhimurium TA100 株を用い、栽培条件を変えたシュンギク、コマツナ、ホウレンソウの水抽出画分について、N-ニトロソジメチルアミン (NDMA) 50 $\mu\text{g}/\text{plate}$ に対する抗変異原性の影響を検討した。

1、三種の野菜共にNDMA の変異原性を用量依存的に抑制し、本試料中に変異原抑制作用のあることを認めた。野菜の乾燥物0.25mg相当量添加した場合は、シュンギク 80%、コマツナ 74%、ホウレンソウ 57%の抑制率を示した。

2、有機質肥料主体の自然農法と化学肥料による慣行農法による野菜のNDMA の変異原性抑制活性は、三種の野菜とも慣行農法の方が自然農法より高い傾向を示した。

3、自然農法、慣行農法ともに施肥量（窒素成分含量）が多いほど抗変異原性は強い傾向を示した。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、野菜の栽培に協力し、試料提供して下さった元奈良県農業試験場高原分場の泰松恒夫博士、静岡県大仁農場の金山重信氏、アセトン絶食誘導ラット肝S9を提供して下さった名城大学総合研究所の古川秀之教授並びに研究上の御指導をいただいた元大阪市立大学生活科学部 江幡淳子教授に謝意を表します。

文 献

- 1) 藤巻正生監修、「食品機能」、学会出版センター (1988)
- 2) T.Hirayama, Nutrition and Cancer ,1,67 (1978)
- 3) Committee on Diet, Nutrition and Cancer, National Academy press, Washington D.C. (1982)
- 4) 大澤俊彦監修、「ガン予防食品の開発」、シーエムシー (1995)
- 5) 黒田行昭編集、「抗変異原・抗発がん物質とその検索法」、講談社サイエンティフィック (1995)
- 6) A.Murakami et al., Biosci. Biotech. Biochem., 57, 1971 (1993)
- 7) J.Ebata, Mutation Res., 216, 359, (1989)
- 8) 江幡淳子他、日本環境変異原学会第23回大会プログラム・要旨集、p.120 (1994)
- 9) Maron D.M.N. Ames Revised methods for Salmonella mutagenicity test. Mutation Res, 113, 173-215 (1983)
- 10) 江幡淳子他、日本環境変異原学会第21回大会プログラム・要旨集、p.63 (1992)
- 11) J.Ebata et al., Mutation Res. Supplement, 379, p.175 (1997)
- 12) 古川他、M.O.A.健康科学センター研究報告集、Vol.1 (1993)
- 13) 江幡淳子他、日本環境変異原学会第22回大会プログラム・要旨集、p.114 (1993)