

# 野菜の抗変異原性について

— ネギの調理加工処理による抗変異原活性の違い —

玉置 ミヨ子  
堀野 成代

## 緒言

最近の疫学的研究や多くの実験結果から野菜や果物の中にガンを引き起こす変異原物質の生成や活性を抑制する抗変異原性成分が多数含まれていることが明らかにされ、これらを積極的に摂取することによってガンを予防することも可能であると考えられるようになった。アメリカでは、1990年に米国立がん研究所により、食品によるガン予防として「デザイナーフーズ・プログラム」がスタートした。「デザイナーフーズ」とは「ガン予防の目的にデザインされた植物性食品を基礎的に含む食品」ということで、「デザイナーフーズ・プログラム」を支援しているアメリカのシンクタンク「アーサーDリトル社」のカラゲイ女史は、今までに発表された多くの研究報告を基盤にして、「ガン予防」に期待される野菜や果物をガーリックを頂点に重要度の順に40種近くピラミッド型に並べている<sup>1)</sup>。「デザイナーフーズ・プログラム」の基本的考えは、野菜や果物の持つガン予防効果に着目し、その科学的根拠を明らかにし、あくまでも食品の形態を保ちながら実際の食生活に取り入れる可能性を求めようというものである。

わが国においても食品の持つ三次機能である生体調節機能に着目した「機能性食品」研究を背景に抗酸化性食品、発ガン予防食品などについて多くの研究がなされ、報告されている<sup>2) 3) 4)</sup>。しかしながら、研究報告の大半は、食品に含まれるガン抑制に有効な成分を単一に抽出し、あるいは試薬を用いて動物試験や試験管レベルで、研究されているのが実状と思われる。食品というのは単一の成分から構成されているのではなく、多種多様な成分が含まれている。これらの成分は加工保蔵や調理の過程で食品間の相互反応などによる化学変化を起こし、複雑な物質が二次的に生成しうることもあり、その結果、植物体に本来含まれていた成分が消失・減少あるいは生成・増加することも起こり得ると考えられる。又、逆に変異原性やガンを誘発するような物質が生成されることもあり得る。そこで、著者等は実際に台所で食素材を扱う立場から比較的、日常購入頻度の高い野菜類の中から無作為に数種選び、それぞれ野菜ジュースの上清についてサルモネラ菌を用いるAmes法<sup>5)</sup>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) の変異原抑制活性を比較し、その中で最も活性が大きく現れたアリウム属野菜に着目し、その一つである

ネギについて加熱処理、凍結乾燥、水晒し等の調理加工処理を行い、変異原抑制活性に与える影響を検討し、若干の知見を得たので報告する。

## 実 験 方 法

### 1、実験材料

#### 1) 試料

大阪市内のスーパーマーケットで市販されている野菜類を供試材料として用いた。日常購入頻度の高い野菜の中から無作為に抽出した野菜類は、国内産のネギ (*Allium fistulosum* L.)、サヤインゲン (Field snap beans:*Phaseolus vulgaris* L. var *humilis* Alef.)、キュウリ (Cucumber:*Cucumis sativus* L.)、アスパラガス (*Asparagus officinalis* L.)、トマト (Tomato:*Lycopersicon esculentum* Mill.)、ミニトマト (*Lycopersicon esculentum* Mill., cv. *suncherry*) の6種類である。アリウム属(ネギ類)の野菜としては、先のネギに加えて国内産のワケギ (*Allium fistulosum* L., var. *caespitosum* Makino)、高知産のニラ (Chinese chive:*Allium tuberosum* Rottler)、中国産のニンニクの芽 (Stem of garlic:*Allium sativum* L.) の4種類である。

#### 2) 試料溶液の調製

これらの野菜は十分に水洗し、水気をふき取った後、各野菜の可食部20gを小口切りし、試料の重さの倍量の水と共にホモジナイザーで破碎し(20000r.p.m.10分)、搾汁液を高速冷却遠心分離器(国産H-500D)で遠心分離(10500r.p.m.10分)して得られた上清と、更に残渣を洗った洗液と合わせて100mlに定容した。これを0.45 $\mu$ mのメンブランフィルターで濾過し、鮮野菜試料溶液とした。これを滅菌済みマイクロチューブに分注し、-30℃で保存し、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鮮試料液として変異原抑制実験に用いた。

調理加工処理野菜の試料はネギの軟白部分のみ20gを用い、下記に示す調理加工処理を行った後、鮮野菜の場合と同様にホモゲナイズ、遠心分離を行って調製した。それぞれの処理方法は次の通りである。

加熱処理：沸騰水80ml中に2~3mm巾に小口切りしたネギ20gを入れ、100℃3分間加熱後、直ちに冷却し、ゆで汁と共にホモゲナイズ、遠心分離を行った後、得られた上清と洗液を合わせて100mlに定容し、滅菌濾過を行ってゆで加熱試料液とした。

尚、ネギの組織破壊前加熱試料液は筒状の白ネギ20gをラップフィルムに包み電子レンジ(SANYO EMO-A52)で500w、2分間通電加熱した後、小口切りし、以下、鮮野菜と同様に所定の水を加え、ホモゲナイズ、遠心分離を行った後、100mlに定容し、滅菌濾過を行って用いた。

ネギの組織破碎後加熱試料液は、先に述べた鮮ネギ試料液を100℃60秒間加熱した後、定容し、濾過滅菌を行って用いた。

晒し処理：小口切りしたネギ20gを木綿の晒し布に包み、1000mlの水中で揉みながら水にさらし、脱水後、更に水を替えて同様の処理を繰り返し、元の重さの0.65倍位まで脱水した「サラシネギ」に蒸留水を元の鮮ネギと同重量になるまで加えて、以下、鮮野菜の試料調製と同様にホモゲナイズ、遠心分離、滅菌濾過等を行って試料液とした。

凍結乾燥処理：小口切りしたネギ20gを凍結乾燥機（IWAKI FRD-82M）で約15時間、乾物量として約2gになるまでパリパリに乾燥した凍結乾燥ネギを得、これに水を加えて元の鮮ネギと同量重になるまで蒸留水を加えた後、室温で30分間放置、水にもどした後、以下、鮮野菜の試料調製と同様にホモゲナイズ、遠心分離、滅菌濾過等を行って試料液とした。

## 2、抗変異原性試験

*Salmonella typhimurium* TA100株を用いたAmes テスト<sup>5)</sup>の原理に基づき江幡らが開発した改良法<sup>6) 7)</sup>を用いて抗変異原性試験を実施した。変異原物質としてN-ニトロソジメチルアミン (NDMA) を水に溶解し、一定濃度の溶液 (50  $\mu$ g / 200  $\mu$ l) を調製して使用した。肝ミクロゾーム画分 (S9) はアセトン投与と2日間絶食で誘導をした雄SPF Sprague-Dauley系ラットから調製した。試験に際しては、cofactor (MgCl<sub>2</sub> 0.4M、KCl 1.65M、G-6-P 1.0M、G6PDH 100unit/ml、 $\beta$ -NADPH 0.1M、 $\beta$ -NADH 0.1M、Na-Pi Buffer 0.25M：最終濃度) と合わせ、S9 Mixとして代謝活性化のために使用した。試験は次のようにして実施した。即ち、滅菌済み褐色試験管に試料溶液200  $\mu$ l、NDMA溶液 200  $\mu$ l、S9 Mix 2000  $\mu$ l、前培養菌懸濁液 400  $\mu$ lを加え、プレインキュベーション (37℃、60分、pH 6.4、水平しんとう160r.p.m.、振幅25mm)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 2mlを加えてフラッシュミキサーで充分混和した後、事前に作製した最小グルコース寒天平板培地に重層した。シャーレーは37℃の恒温器に入れ、48時間培養し、生じたコロニー数を計測した。測定は3連で行い、平均値と標準偏差を表示した。抗変異原性 (%) は下式により求めた。尚、野菜試料のみの添加による自然復帰コロニー数と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。

$$\text{抗変異原性 (\%)} = \left[ 1 - \frac{S - N}{P - N} \right] \times 100$$

S: 試料とNDMA添加時の復帰変異コロニー数

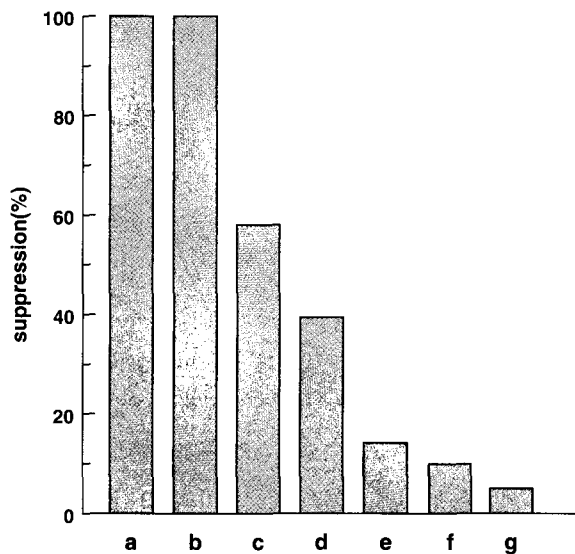
P: NDMAのみ添加時の復帰変異コロニー数

N: 自然突然変異コロニー数

## 結果及び考察

### 1、数種の野菜類に於ける水抽出画分の変異原抑制作用

スーパーマーケットの野菜売場で購入した青ネギ、白ネギ、サヤインゲン、キュウリ、アスパラガス、トマト、ミニトマトについて加熱などの調理操作を加えない生の状態で一平板当たり10mg相当の水抽出溶液を添加した時の、NDMA 50 $\mu$ gの変異原に対する抑制効果を比較してみた結果、Fig.1に示されるように、ネギ>サヤインゲン>キュウリ>アスパラガス>トマト>ミニトマトの順であった。本実験の試料は水溶性画分に含まれる変異原抑制活性を見たので、この結果から野菜のガン抑制効果の順位づけをすることは出来ないが、白ネギ、青ネギ共に水溶性画分に100%に等しい抑制率を示したことは注目に値するものと思われる。ネギは、早くからガン予防効果が検討され、その有効性が報告されているニンニクやタマネギと同属のアリル基を持つアリウム属野菜（ネギ類野菜）であることから、今回実験した野菜試料の中では最もガン抑制効果を有している食品と考えられる。事実、ネギ類野菜の摂取とガン発生率の低下との関連性についてはイタリアと中国でネギ類野菜をたくさん食べる人に胃ガンの発生率が低いことが見いだされ<sup>8)</sup>、注目されている。ネギ類に共通した成分である含硫化合物が発ガン防止に関与していることは研究結果から明らかにされており、ニンニク、タマネギ、ネギ以外の他のアリウム属野菜にも同様のガン抑制効果の可能性を示唆している。



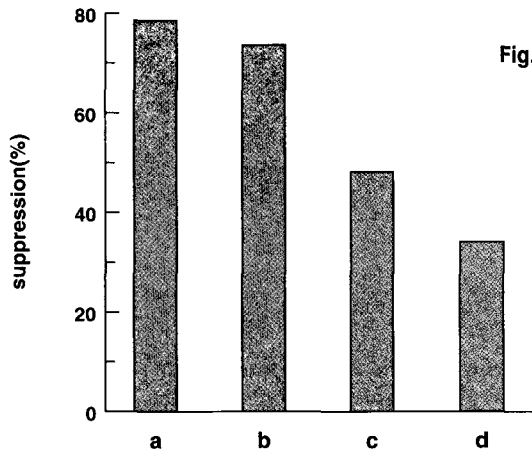
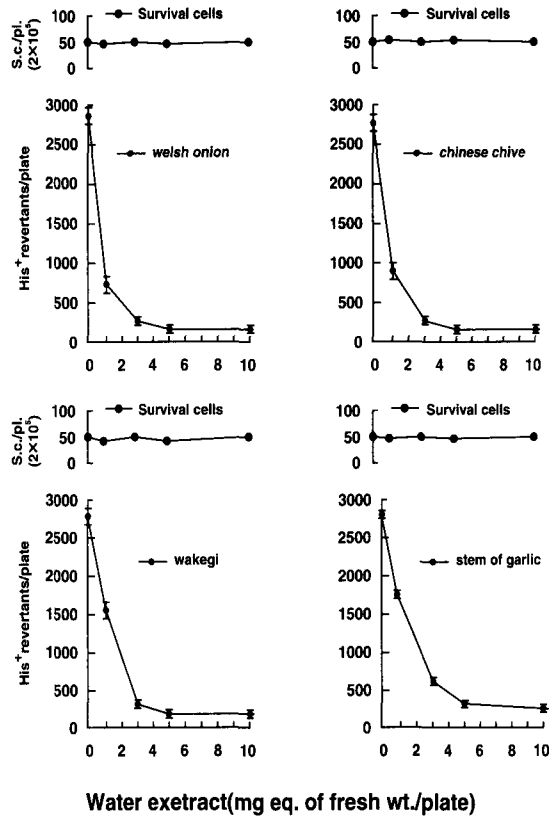
**Fig.1 Mutagenic suppression of NDMA with several vegetables**

water extract : 10mg eq. of fresh wt./plate

- a : welsh onion (green)
- b : welsh onion (white)
- c : field snap beans
- d : cucumber
- e : asparagus
- f : tomato
- g : mini tomato

2、数種のアリウム属野菜のNDMA変異原抑制活性

ニンニク、タマネギ、ラッキョウなどの地下の鱗茎を食用とするネギ類とは異なり、茎や葉柄を食用とする白ネギ、ニラ、ニンニクの芽、ワケギなどのネギ類を対象に、それぞれの水抽出液について変異原抑制効果を調べた結果、Fig.2に示されるように、各試料の添加量とNDMA50 $\mu$ gの変異原に対する変異コロニー数の関係は、いずれの野菜も添加量の増加と共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原抑制が認められた。一平板当たり10mg相当の水抽出溶液を添加した時の抑制率は、ニラ、ニンニクの芽、ワケギ、白ネギ共に大差なく、いずれも100%に等しい抑制率を示したが、濃



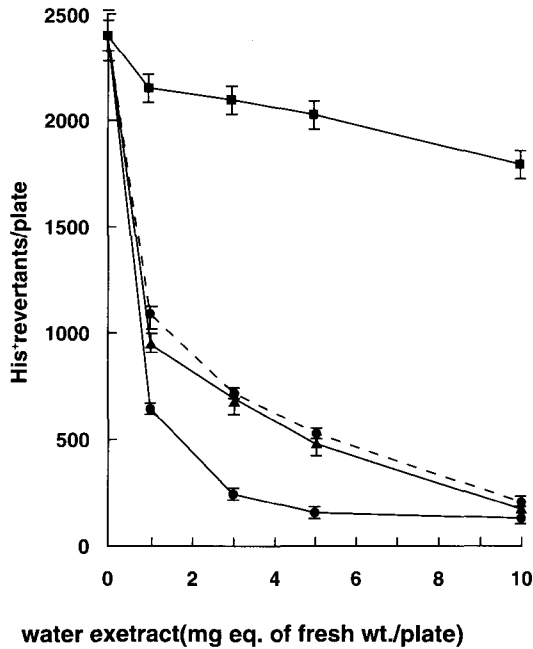
**Fig.3 Mutagenic suppression of NDMA with a few allium family vegetables**  
 water extract : 1mg eq. of fresh wt./plate  
 a : welsh onion  
 b : chinese chive  
 c : wakegi  
 d : stem of garlic

**Fig.2 Suppression of NDMA-induced mutagenesis in *S.typhimurium* TA-100 with allium family vegetables**

度を10分の1に希釈した一平板当たり1mg相当の水抽出溶液を添加した場合は、Fig.3に示されるように、白ネギ78%、ニラ71%、ワケギ48%、ニンニクの芽42%で、白ネギ、ニラが少量添加でも高い抑制率を示した。水溶画分における変異原抑制活性の違いは品種間の本質的な有効成分の違いによるものか、あるいは栽培条件の違いや収穫後の成分変化などの違いによるものかは今後の検討課題としたい。

### 3、ネギの調理加工処理とNDMA変異原抑制活性との関係

先の実験結果で最も高い抑制率を示したネギについて加熱処理、水晒し、凍結乾燥などの調理加工処理を行った後、鮮ネギ試料と同様に調製した水抽出画分のNDMA変異原抑制活性を調べた結果をFig. 4及びFig. 5に示した。鮮ネギ>凍結乾燥ネギ>サラシネギ>加熱ネギの順に調理加工処理後の抑制率は小さくなった。それぞれの現象について、次のように考察した。

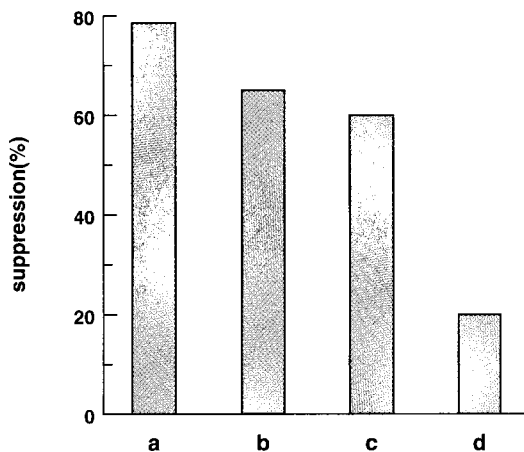


**Fig.4 Effects of cooking processes on the suppression of NDMA-induced mutagenesis in *S.typhimurium* TA-100 with welsh onion**

- ——— ● : fresh welsh onion
- ▲ ——— ▲ : freeze-dried welsh onion
- - - - - ○ : sarashi welsh onion
- ——— ■ : boiled welsh onion (including soup)

## 1) サラシネギ

サラシネギに於けるNDMA変異原抑制活性は鮮ネギに比して小さくなった。これは、水晒しにより水溶性の発ガン抑制に有効な成分が流出した為と思われる。一般にネギは特有の「ぬめり」を有し、薬味として用いられる場合は「ぬめり」を除くために「サラシネギ」にして利用されることが多いが、水晒しとともに水溶性の変異原抑制物質の流出を考えると必要以上に過度の水で洗い流すことは避けたい方がよいが、しかし、布巾に包んで十分に揉み、野菜の組織を破壊することは次に述べる実験結果からより効果的であることも判明した。



**Fig.5 Mutagenic suppression of NDMA with fresh welsh onion and cooking processes welsh onions**

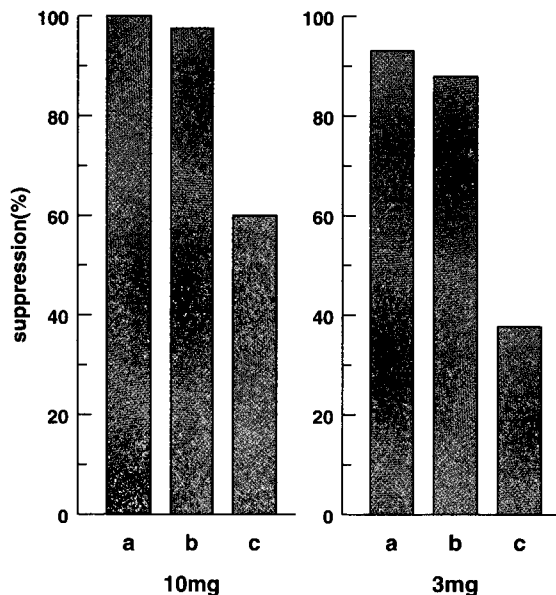
water extract : 1mg eq. of fresh wt./plate

- a : fresh welsh onion
- b : freeze-dried welsh onion
- c : sarashi welsh onion
- d : boiled welsh onion (including soup)

## 2) 加熱ネギ

変異原抑制率が最も低かったのは煮汁を含む加熱ネギ（組織破壊前加熱）であった。前田らは野菜は加熱することによって細胞壁がこわれ、有効成分も外部へ流出しやすく、生野菜よりも煮汁を含む加熱野菜の方が、ガン抑制効果が期待できると報告<sup>9)</sup>していることから、加熱による抑制率の低下は、本来ネギに含まれるガン抑制に有効な成分が加熱により変質・減少したと見るよりは、ネギの成分（有効成分の前駆体）とネギの酵素作用による生成物が間接的に発ガン抑制作用に参与しているのではないかと考えられる。これを明らかにする為Fig. 6 に示されるように、鮮試料液(a)及び鮮試料液を100℃30秒間加熱した組織破壊後加熱試料液(b)とネギの組織を傷つけず丸のまま電子レンジで500w 2分間加熱し酵素破壊した後、試料液調製のためにホモゲナイズした組織破壊前加熱試料液(c)について変異原抑制率を比較した。その結果は、組織破壊後加熱した試料液は、非加熱の鮮試料液と大きな差は無かったが、組織破壊前加熱した試料は加熱による影響を大きく受け、鮮試料3mg相当添加した実験ではその抑制率は組織破壊後加熱試料の半分以下であった。このことから、ガン抑制に有効な成分の一部は酵素反応の結果、生成されるものであり、生成後は短時間加熱で変異原抑制活性に大きく影響を受けないと判明した。

ニンニク中の発ガン抑制成分としてジアリルスルフィド、ジアリルジスルフィド、ジアリルトリスルフィド、アリルメチルトリスルフィド、S-アリルシステインなどの含硫化合物が関与していることは既に多くの研究者によって証明されている<sup>2) 3)</sup>。同属であるネギにも含硫化合物は含まれていることから発ガン抑制機構も同様の傾向を示すものと思われる。しかし、これらの含硫化合物は野菜を切断したり、磨砕した時に直ちに酵素作用が起こって分解生成するものであり、酵素作用を起こす以前に加熱して用いた時の効果は明らかにされていなかったが、今回行った我々の実験結果により、酵素作用を起こす以前に加熱した場合は含硫化合物由来の発ガン抑制効果は十分に発揮されないことが判った。



water extract (mg eq. of fresh wt./plate)

**Fig.6 Differences of mutagenic suppression of heated and unheated welsh onions, before and after homogenizing**

- a : unheated welsh onion
- b : heated welsh onion after homogenizing
- c : heated welsh onion before homogenizing

### 3) 凍結乾燥ネギ

凍結乾燥ネギのNDMA変異原抑制率もFig. 4、5に示されるように鮮ネギより落ちている。富田らは組織の破壊によって生成する含硫化合物のS-メチルメタンチオホルネート(MMTS)を十字花科植物やネギ類を含むユリ科植物から紫外線変異原抑制物質として単離・同定<sup>10)</sup>、MMTSの生成には酵素の至適PHなどの作用条件が関係していたことを報告している<sup>11)</sup>。これらの報告から、凍結乾燥処理したネギのNDMA変異原抑制活性が低い値となったのも発ガン抑制に有効な含硫化合物の生成を導く酵素反応の条件が最適でなかったことが原因と思われる。酵素活性は食品中の利用可能な自由水の量に関係があると考えられており、水分活性値の高いものほど酵素活性が大きくなる<sup>12)</sup>ことから、乾燥により基質や生成物の移動に利用されるだけの自由水が十分に含まれず、酵素反応が抑制された結果であると推察される。しかし、凍結乾燥の場合は、酵素活性は失われていないので、充



分な時間をかけて水にもどし、酵素反応の最適条件を整え、その扱いに留意すれば、凍結乾燥処理をしたネギにおいても発ガン予防食品として期待出来るものと思われる。

### 要約

市販の野菜類数種の水抽出画分についてAmes法を用いて変異原物質 N-ニトロソジメチルアミン (NDMA) 50  $\mu$ g/plate に対する変異原抑制作用を比較し、そのうち特に活性の強かったアリウム属野菜 (ネギ類) 数種について同様に検討した。更に白ネギについて加熱、水晒し、凍結乾燥等の調理加工処理と変異原抑制率との関係について調べた。

- 1、ネギ類、トマト類、サヤインゲン、アスパラガス、キュウリ等の野菜類の中では、アリウム属の野菜が変異原抑制作用を最も強く示し、フレッシュな状態で10mg相当量添加した場合は、青ネギ、白ネギ共にほぼ100%に等しい抑制率を示した。
- 2、ニラ、ニンニクの芽、ワケギ等のアリウム属野菜は用量依存的にNDMAの変異原性を抑制し、鮮試料10mg相当添加した場合はいずれもネギと同様に100%に等しい抑制率を示し、3種類間に抑制率の差は認められなかったが、添加濃度を10分の1にした場合の抑制率は、ネギに続いて、ニラ、ワケギ、ニンニクの芽の順に低くなった。
- 3、白ネギにおける調理加工処理とNDMA変異原抑制活性の関係は鮮試料1mg相当量の水抽出液の添加では、鮮ネギ>凍結乾燥ネギ>晒しネギ>ゆで加熱ネギ (含煮汁) の順に抑制率は小さくなり、最も最小のゆで加熱ネギ (含煮汁) の抑制率は、鮮ネギの約4分の1であった。しかし、ネギの組織を破壊した後、加熱した試料 (鮮試料液を加熱) では加熱による変異原抑制活性の低下は殆ど見られず、鮮ネギと変わらない抑制活性を示した。このことは発ガン抑制物質の一部はネギの組織破壊により起こる酵素反応の結果、生成されることを示唆しており、ネギ類の調理に際しては酵素反応の最適条件を考慮した上で処理することが、発ガン抑制により有効であると思われる。

### 謝辞

本研究を遂行するにあたり、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助言をいただいた元大阪市立大学生活科学江幡淳子教授に謝意を表します。

### 文献

- 1) Caragay, A.B.: 食品と開発, 26, 45 (1991)
- 2) 大澤俊彦監修, 「ガン予防食品の開発」、シーエムシー (1995)
- 3) 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)

野菜の抗変異原性について

- 4) 荒井宗一監修、「機能性食品の研究」、学会出版センター (1995)
- 5) Maron D.M.N.Ames Revised methods for Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res*,113,p.173 (1983)
- 6) 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)
- 7) J.Ebata et al.,*Mutation Res.Supplement*,379,p.175 (1997)
- 8) M.J.Wargovich," Cancer Prevention", L. Wattenberg, M. Lipkin, C. W. Boon and G. J. Kelloff, eds., CRC Press, Boca Raton, FL, p.195 (1992)
- 9) H.Maeda et al.,*Jpn.J.Cancer Res.*, 83, p.923 (1992)
- 10) I.Tomita et al., *Biol. Pharm. Bull.*,16,p.207 (1993)
- 11) I.Tomita et al., *Biosci.Biotech. Biochem.*,60 (9) ,p.1439 (1996)
- 12) 木村進編集、「乾燥食品辞典」、朝倉書店 (1984)