

## ニンニクの変異原性試験および細胞毒性試験

吉田 進, 平尾 勇造, 中川 静紀

湧永製薬株式会社 中央研究所

### Mutagenicity and cytotoxicity tests of garlic

Susumu YOSHIDA, Yuzo HIRAO and Shizutoshi NAKAGAWA

Central Research Laboratories, Wakunaga Pharm. Co., Ltd.

1624 Shimokotachi Koda-cho, Takata-gun Hiroshima, 729-64

Accepted November 7, 1983

**Abstract**.....Mutagenicity and cytotoxicity of fresh juice and alcohol extract from garlic were studied by Ames' test, Rec assay, Micronucleus test and the check of the influence to HEP-2 and chinese hamster embryo (CHE) primary cultured cells.

No evidence of mutagenicity of these samples were observed in Ames' test and Rec assay, while there was dose dependent increase of micronucleated cells and polychromatocytes on the bone marrow cells of mice and chinese hamsters treated with garlic juice.

There were severe damages, e. g. growth inhibition and morphological changes of both cultured cells due to garlic juice, but no or slightly cytotoxic signs were observed even in high concentration of garlic extract.

A higher sensitivity to the cytotoxic effects of garlic was seen by the present findings with CHE primary cells than HEP-2 cell line.

**Key words:** Mutagenicity test, cytotoxicity test, fresh garlic juice, garlic extract.

### 緒 言

サリドマイド禍あるいはスモン病等に端を発し合成薬の副作用が問題化し久しいが, 近年, 生薬の安全性についてもその使用が長期間におよぶが故に検討され様々な副作用が報告されるに至った (小西, 1977, 日本東洋医学会編, 1981, 山本ら, 1982, Morimoto et al, 1982)。

ニンニクも古来から調味香辛料として, また, 民間薬として強精強壯の目的で, あるいは種々の薬効を期待して汎用されてきた。しかし, 生ニンニクの多量摂取や使用法の誤りにより胃粘

膜障害、赤血球数およびヘモグロビン量の減少あるいは多染性や大小不同性の赤血球が出現するとともに脾臓、肝臓が肥大し、血清成分も変動することが知られている(葛谷, 1934, 宮本, 1935, 宮本, 1938, 中川ら, 1980)。

著者らは生ニンニクから希エタノールで抽出したニンニク抽出液(以下GEと略記)は既報の如くの薬効(荒川ら, 1975, 永井ら, 1975)を有するとともに、生ニンニクジュース(以下GJと略記)でみられるような有害物質をほとんど含んでいないことを報告した(中川ら, 1980, 中川ら, 1984, 住吉ら, 1984)。

今回、更にGJとGEの安全性および両者の違いを比較する為に細菌による修復試験、復帰変異試験を始め、培養細胞への影響および*in vivo*での小核試験を実施した。

### 実験材料および方法

#### 1) 被検物質および対照物質

生ニンニクを剥皮後ジューサーで搾汁し、同量の蒸留水と混合、 $10,000\times g$ , 30分遠心上清をGJとして用いた。GJは $0.45\mu$ のミリポアフィルターで濾過、分注し密栓後使用時まで $-20^{\circ}\text{C}$ に保存した。

GEとは生ニンニクの鱗茎より、希エタノールで長期間かけ抽出したもので、ニンニク特有の臭気を有し、刺激臭なく、0.3~1.0%の硫黄を含み、水に溶けるがエーテル、クロロホルムにはほとんど不溶性の茶褐色、甘みのある軟エキスである。

対照物質はN-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine (MNNG), 3,4-benzopyren (BP), mitomycin C (MMC), methylmetansulfonate (MMS)およびKanamycin sulfate (KM)を用いた。尚、BPのみdimethylsulfoxide (DMSO)に溶解し、その他は使用時に蒸留水に溶解して使用した。

#### 2) 修復試験 (Rec assay)

菌株は国立遺伝学研究所、賀田恒夫博士から分与を受けた*Bacillus subtilis* M45 *rec*<sup>-</sup>株、およびH17 *rec*<sup>+</sup>株を用い、平野(1978)による孢子法により行った。すなわち、90 mm径のシャーレに $2\sim 5\times 10^6$ となるようにそれぞれの孢子および10 mlの寒天培地を加え十分に混和する。乾固後、検体あるいは対照物質を含んだ濾紙を置き、 $37^{\circ}\text{C}$ , 24時間培養後、生じた発育阻止帯の幅を測定した。尚、成績は各群2枚のシャーレの平均値で示し、M45株の阻止帯がH17よりも3 mm以上大きく、かつ用量依存性のあるものを陽性と判定した。

#### 3) 復帰変異試験 (Ames' test)

菌株は賀田恒夫博士から分与を受けた*Salmonella typhimurium* TA100, TA98およびTA1537株を用い、矢作(1975)のプレインキュベーション法により行った。すなわち、0.1 mlの被検溶液を含む試験管に0.5 mlのS-9 mixture (オリエンタル酵母)あるいはリン酸緩衝液および上述菌の懸濁液0.1 mlをそれぞれ加え混和し、 $37^{\circ}\text{C}$ で20分間振とうする。

これにヒスチジン-ビオチンを含む軟寒天2 mlを加え混和し、あらかじめ作製してあるVB寒天平板上に均一に撒き、 $37^{\circ}\text{C}$ で2日間遮光下に培養し、増殖した平板上のHis<sup>+</sup>のコロニーを数

## Mutagenicity and cytotoxicity tests of garlic

えた。判定は各群2枚のシャーレの平均値を対照群と比較し、2倍以上のコロニー数の増加を示し、かつ用量依存性のみられる場合を陽性とした。

### 4) 小核試験 (Micronucleus test)

1群5匹の8週齢のICRマウスおよびチャイニーズハムスターにGJあるいはGEを100, 500および2500 mg/kg (乾燥重量換算) ずつ経口投与した。Schmid (1975) の方法に準じ24~26時間後に大腿骨を摘出、骨髓細胞の塗抹染色標本を作製後、1標本当り赤血球を1000個以上観察し、小核を有する赤血球および多染性赤血球数を記録した。小核保有赤血球が対照群よりも有意に多い場合を陽性と判定した。

### 5) 培養細胞への影響

ヒト喉頭癌由来細胞HEp-2およびチャイニーズハムスター胎仔初代培養細胞 (以下CHEと略記) を使用した。HEp-2は広島県衛生研究所から分与を受けたもので対数増殖期のものを、また、CHEは妊娠18日目の胎仔を摘出し、四肢、頭部および内臓などを除去後細切し1 mm以下の組織片とし、培養後遊走する線維芽様細胞を実験に供した。

培地はEagle MEM (日水製薬) を用い、Tryptose phosphate broth (DIFCO) 0.5%, ペニシリン100単位/ml, ストレプトマイシン100  $\mu$ g力価/mlおよび仔牛血清 (GIBCO) をHEp-2には5%, CHEには10%添加した。

細胞の増殖におよぼす両物質の影響を検討する為に、細胞数を $1\sim 2\times 10^5$ /mlに調整し、3オンス小角瓶 (池本理化) に3 mlずつ分注、密栓し培養した。その後、経日的に細胞を分散、浮遊させ、トリパンブルーの排除能を有する生細胞数を算出し、増殖曲線を作成した。また、短冊状カバーガラス上に細胞を同様に培養し、経日的にヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、光顕的に形態を観察した。

## 実験成績

### 1) 修復試験

修復試験の成績をTable 1に示した。GJ 600  $\mu$ g/discの添加でH17株のみに発育阻止帯が、また、1200  $\mu$ g/disc以上の濃度では両菌株の発育を強く抑制したが、M45株に比べH17株の阻止帯の方が大きく、陰性であった。一方、GEでは両株への発育阻止は全く認められず、これも陰性と判定された。尚、陽性対照として用いたMMCおよびMNNGはともにM45株の阻止帯の方が大であった。

### 2) 復帰変異試験

Table 2にGJの復帰変異試験の成績を示した。GJの添加量を種々変化させても、コロニー数は対照とほとんど差がなく、また、S-9 mixtureを加えてもコロニー数が増加することもなく、変異原性は全く認められなかった。一方、陽性対照として用いたMNNGは対照に比べコロニー数を著しく増加させ、また、S-9 mixture添加によりTA100株のコロニー数は減少した。BPではS-9 mixtureの添加で、3菌株のコロニー数をともに増加させ、いずれも陽性を示した。

**Table 1** Rec assay of garlic juice and garlic extract by spore-method

Samples	Dose ( $\mu\text{g}/\text{disc}$ )	Inhibition zone(mm)		Judge**
		H 17 (rec+)	M 45 (rec-)	
garlic juice	0*	0	0	—
	600	5.5	0	
	1200	7.5	5.5	
	2400	12.0	11.0	
garlic extract	300	0	0	—
	600	0	0	
	1200	0	0	
	2400	0	0	
	4800	0	0	
KM	0.075	11.0	12.0	—
MMC	0.038	1.0	11.75	+
	0.075	4.0	13.0	
	0.150	5.25	14.0	
MNNG	15	0.25	8.0	+
	30	1.75	9.25	
	60	2.5	10.75	
water	(30 $\mu\text{l}$ )	0	0	—

\* Values are average of two plates.

\*\* + : positive, — : negative

The abbreviations used are KM : kanamycin sulfate, MMC : mitomycin C and MNNG : N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine.

**Table 2** Reverse mutation test of garlic juice by pre-incubation method

Samples	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Strains of <i>Sal. typhimurium</i>					
		TA 100		TA 98		TA 1537	
		S-9*		S-9		S-9	
		(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
garlic juice	0	122**	109	22	14	7	6
	60	111	113	26	16	6	3
	600	108	106	19	7	6	3
	6000	100	134	22	9	6	4
MNNG	1	824	3655	39	40	22	39
BP	5	538	177	197	24	85	6

\* Experiment was done with (+) and without (-) S-9 mixture.

\*\* Values are average of two plates.

The abbreviations used are MNNG : N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and BP : 3,4-Benzopyrene.

# Mutagenicity and cytotoxicity tests of garlic

## 3) 小核試験

小核試験の成績をTable 3および4に示した。GJをマウスおよびチャイニーズハムスターに投与したところ、小核保有赤血球 (photo. 1) の出現率が用量依存的に有意に増加した。また、多染性赤血球も増加する傾向を示した。しかし、GEにはこのような作用は全く認められなかった。陽性対照として用いたMMCおよびMMSは、小核保有赤血球を著しく増加させた。

**Table 3** Micronucleus test of garlic juice and garlic extract on bone marrow cells of mice

Samples	Dose (mg/kg)	No. of animals	Micronucleated cells (‰)	Polychromatic cells (%)
garlic juice	100	5	7.8±1.9*	39.3±2.5
	500	5	16.0±3.5	41.2±2.9
	2500	5	25.0±6.7	50.6±6.1
garlic extract	100	5	4.2±2.4	39.2±1.8
	500	5	3.4±1.8	41.3±3.0
	2500	5	4.0±1.6	40.2±3.4
MMC	2	5	28.0±6.4	33.0±2.2
MMS	300	5	20.2±3.4	43.1±3.5
Intact	—	5	4.6±1.1	39.0±1.6

\* Values are mean ± S.D. in 5 mice.

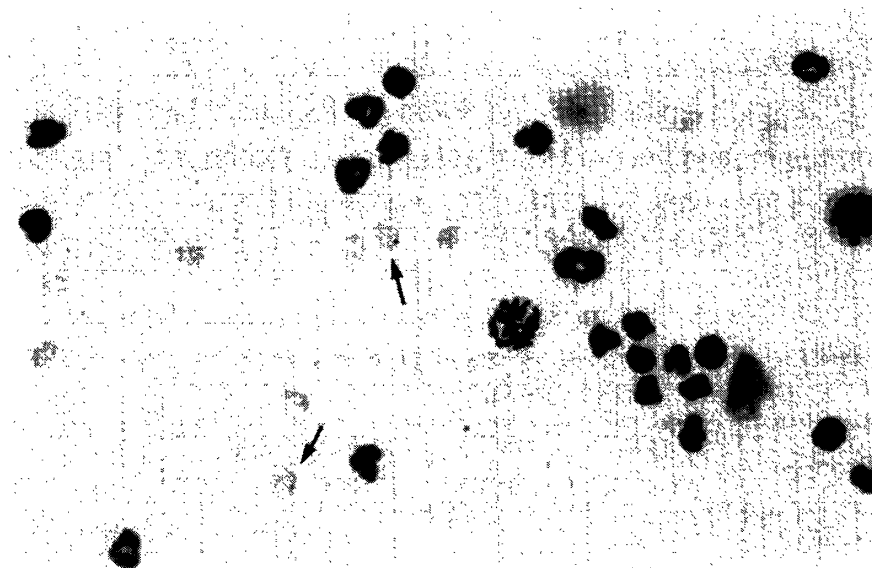
The abbreviations used are MMC: mitomycin C and MMS: methylmethanesulfonate.

**Table 4** Micronucleus test of garlic juice and garlic extract on bone marrow cells of chinese hamsters

Samples	Dose (mg/kg)	No. of animals	Micronucleated cells (‰)	polychromatic cells (%)
garlic juice	100	5	5.2±1.5*	48.3±3.6
	500	5	14.9±2.8	53.0±6.6
	2500	5	25.7±5.2	60.5±5.4
garlic extract	100	5	6.2±1.6	48.9±3.4
	500	5	5.8±1.3	49.0±5.4
	2500	5	6.0±1.6	51.7±4.6
MMC	2	5	25.6±6.4	43.8±5.6
MMS	50	5	34.4±5.5	41.2±2.0
Intact	—	5	6.7±1.5	49.7±0.8

\* Values are mean ± S.D. in 5 chinese hamsters.

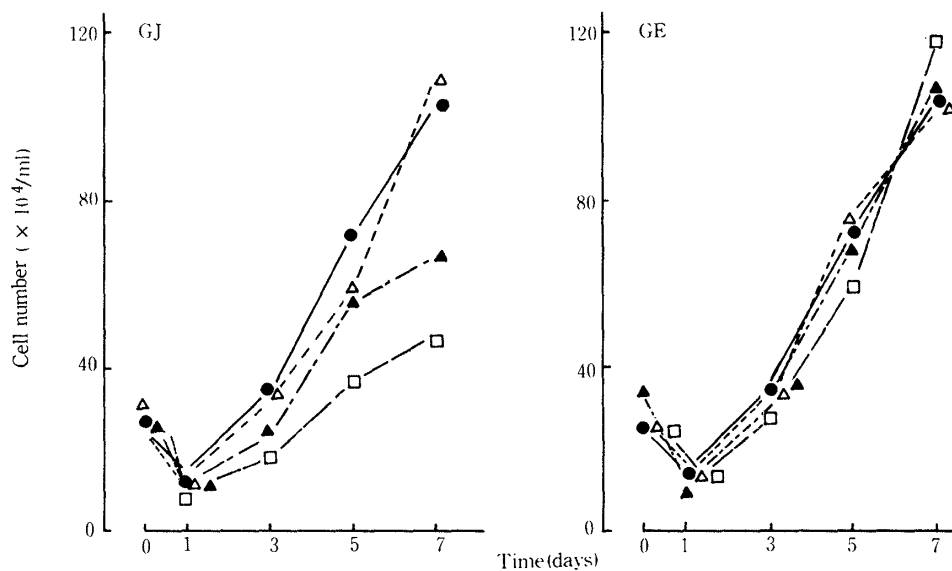
The abbreviations used are MMC: mitomycin C and MMS: methylmethanesulfonate.



**Photo. 1** Bone marrow cells from a chinese hamster treated with 2500 mg/kg of garlic juice. Polychromatocytes with micronucleous (arrows) are observed. Giemsa stain,  $\times 1500$ .

4) 細胞の増殖および形態への影響

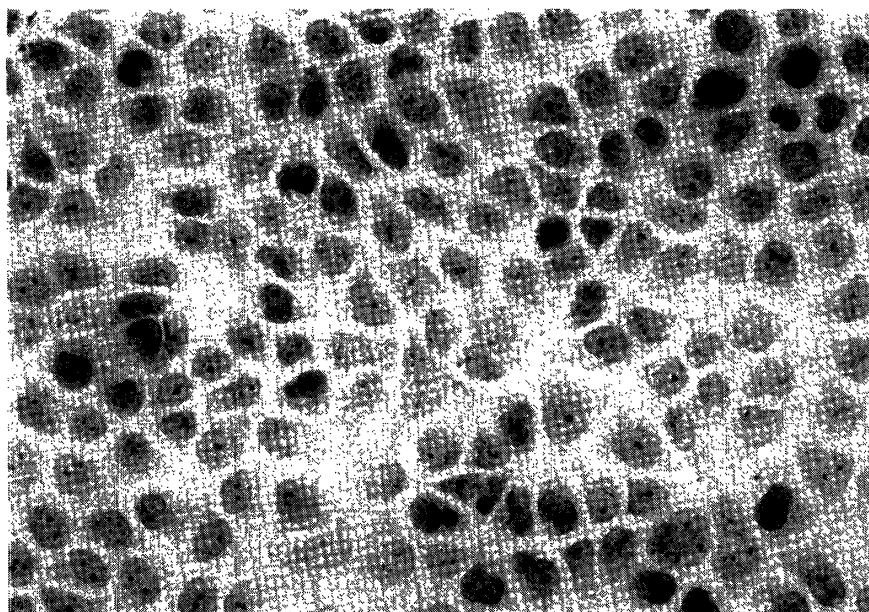
Fig. 1にHEp-2の増殖におよぼすGJあるいはGEの作用を示した。GE添加群では供試した12～1200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ のいずれの用量でも対照と同様な増殖を示し、また、顕微鏡観察でも形態学的変化はみられなかった (Photo. 2)。



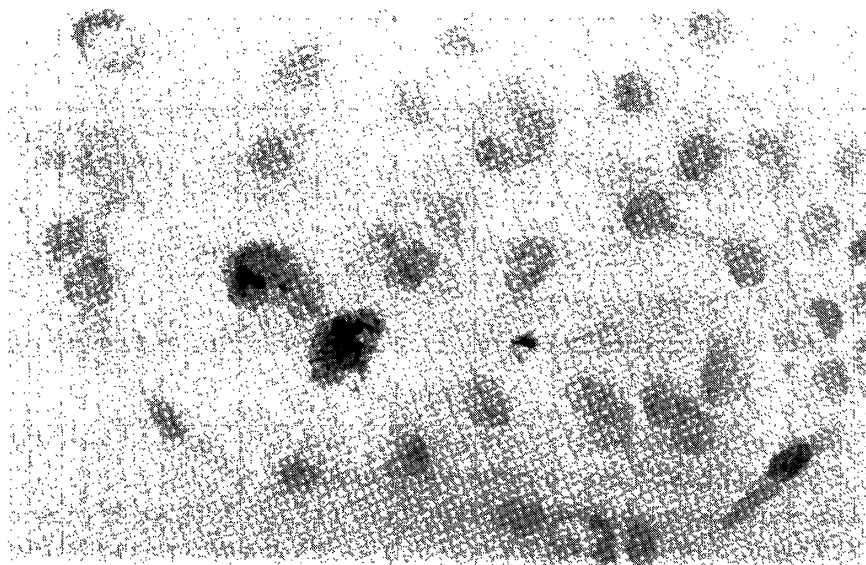
**Fig. 1** Effects of garlic juice (GJ) and garlic extract (GE) on the proliferation of HEp-2 cells

Cells were seeded into medium containing GJ or GE at 0.012 mg/ml : ( $\Delta$ — $\Delta$ ), 0.12 mg/ml : ( $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ ), 1.2 mg/ml : ( $\square$ — $\square$ ), and cells number were counted for the times indicated.

Distilled water were added into medium as control : ( $\bullet$ — $\bullet$ ).



**Photo. 2** Control culture of HEP-2 cells for 7 days. Hematoxyline & Eosin stain,  $\times 900$ .

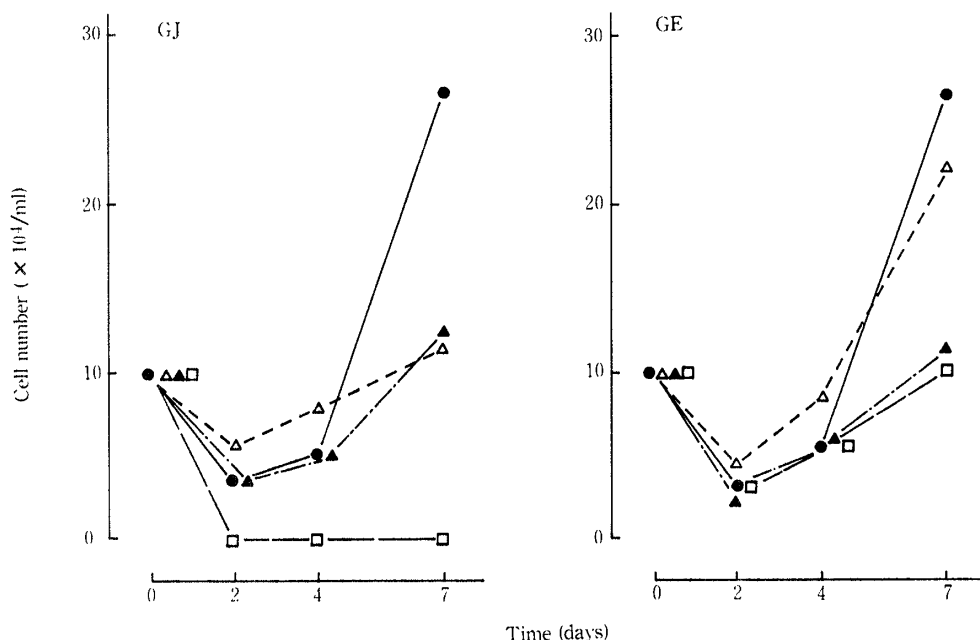


**Photo. 3** HEP-2 cells treated with 0.25 mg/ml of garlic juice for 7 days. Morphological changes of nucleus (Karyopycnosis, karyorrhexis or polymorphic changes), polynucleous or prolonged cells are observed. Some of them also have large amorphous region in cytoplasm. Hematoxyline & Eosin stain,  $\times 900$ .

一方、GJの120および1200  $\mu\text{g/ml}$ の添加でHEp-2細胞の用量依存的な増殖抑制がみられたが、12  $\mu\text{g/ml}$ では対照群との差はなかった。形態的には120  $\mu\text{g/ml}$ 以下ではほとんど変化が認められなかったが、添加量を1200  $\mu\text{g/ml}$ とすると細胞質の細長化、空胞形成、核の濃縮、崩壊などの異常所見が得られた (Photo. 3)。

Fig. 2はCHEの増殖へのGJおよびGEの影響を検討した成績である。12  $\mu\text{g/ml}$ のGJ添加で増殖抑制が著しく、1200  $\mu\text{g/ml}$ では移植した細胞はガラス面へ附着することなくほとんどが死滅していた。形態的には12  $\mu\text{g/ml}$ 以上のGJ添加で細胞質の空胞化、網状化、核の変形、濃縮、崩壊などがみられた。

GEの12  $\mu\text{g/ml}$ 添加では対照と同様の増殖を示したが、120  $\mu\text{g/ml}$ 以上で増殖抑制がみられ、HEp-2細胞とは感受性に差がみられた。しかし、形態学的な変化は1200  $\mu\text{g/ml}$ のGEの添加においても顕微鏡レベルでは観察されなかった。



**Fig. 2** Effects of garlic juice (GJ) and garlic extract (GE) on the proliferation of primary cultured chinese hamster embryo cells.

Cells were seeded into medium containing GJ or GE at 0.012 mg/ml: ( $\Delta$ --- $\Delta$ ), 0.12 mg/ml: ( $\Delta$ --- $\Delta$ ), 1.2 mg/ml: ( $\square$ --- $\square$ ), and cells number were counted for the times indicated.

Distilled water were added into medium as control: ( $\bullet$ — $\bullet$ ).

## 考 察

ニンニクの安全性に関して著者らは種々報告している (中川ら, 1980, 中川ら, 1984, 住吉ら, 1984) が, その一環としてニンニクの変異原性試験および培養細胞への影響について検討した。

変異原性物質がワラビ, ソテツを始め, トウモロコシ, コムギ, 茶, マッシュルームなど食品中にも存在することが知られ, また, 本来安全性が高いと一般的に考えられていた生薬から



## Mutagenicity and cytotoxicity tests of garlic

も検出されている (山本ら, 1982, Kada et al 1982)。しかしながら, ニンニクにおける調査報告は少なく, 清水ら (1980) がニンニク中の含流アミノ酸アリイン, メチインなどの加熱タールに突然変異原性を認めているものの, これはアミノ酸の熱分解物の変異原性であって, ニンニクそのものを論じたものではない。

今回の微生物を用いた実験ではGJおよびGEのいずれからの変異原性物質は検出されなかった。しかし, GJ中には陽性対照として用いたMMCおよびMMSと同様 *in vivo* で骨髓中の小核保有赤血球数を増加させる作用のあることが明らかとなり, 微生物を用いた試験成績と相反する結果が得られた。また, GJ投与で多染性赤血球の増加がみられたが, これは生ニンニクの多量投与でみられる貧血による骨髓細胞の分裂増殖促進の結果と考えられる。あるいはGJ投与後にみられた小核保有赤血球の増加にこの溶血因子が関与している可能性もある。これに対し, GEにはこのような作用は全く認められず, GJに含まれている小核試験陽性物質あるいは溶血性物質を含まないことが判明した。

培養細胞へのGJの作用は激烈で, 両細胞の増殖を強く抑制し, 中および高濃度で細胞質, 核の変形, 破壊などを伴う致死的な影響を与えた。一方, GEを添加しても中, 高濃度でCHE細胞の増殖が若干抑制されるのみでGJでみられたような形態学的な変化は観察されず, 両者で細胞障害作用に著しい差があった。

また, 用いた細胞間でGJおよびGEに対する感受性に可成りの差が存在した。

## 結 論

培養細胞の増殖および形態への影響, あるいは小核試験の結果から, GJ (生ニンニクジュース) には細胞障害作用が認められた。しかし, DNAへの直接的な修飾作用は今回実施した修復および復帰変異試験の結果からはGJおよびGE (ニンニク抽出液) のいずれにも認められなかった。

GEではGJで観察された種々の細胞障害作用は認められず, 抽出過程で有害物質の大部分が除去されたものと考えられた。

## 謝 辞

稿を終わるに臨み, 本実験に使用した菌株および培養細胞を心よく分与して下さった国立遺伝学研究所, 賀田恒夫博士, 広島県衛生研究所, 武井直己博士に深謝致します。

## 参 考 文 献

- 荒川 清二, 松岡 秀一 他 (1975): ニンニクアルコール抽出液及びその製剤の生体細胞活性化作用, 日本細菌学雑誌, **30**(1), 226.
- Cavallito C. J. & J. H. Bailey (1944): Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. I. Isolation, physical properties and antibacterial action., J. Am. Chem. Soc., **66**(11), 1950~1951.
- 平野 光一 (1978): 微生物による最新の変異原検出試験諸改良点, 変異原と毒性, 第2集, 54~57.
- 葛谷 貞彦 (1934): 大蒜の貧血作用に就いて, 臨床病理血液学, **3**, 1175~1233.
- 小西孝之助 (1977): グリチルリチンによる偽性アルドステロン症の研究, 慶応医学, **54**(5), 491~502.

- 宮本 田守 (1935) : ニンニク成分の血液像に及ぼす影響, 満州医, **22**, 379~386.
- 宮本 田守 (1938) : 大蒜水溶液にして酒精不溶解性成分及び大蒜揮発油の血清蛋白質及び残余窒素に及ぼす影響, 満州医, **28**, 285~296.
- Morimoto I, Kada T. et al. (1982) : Mutagenicity screening of crude drugs with *Bacillus subtilis* rec-assay and Salmonella/microsome reversion assay, Mutation Res., **97**, 81~102.
- 永井 勝次, 中川 静紀 他 (1975) : 実験的貧血ラットに及ぼすニンニク抽出液製剤(キョーレオピン)の影響, 薬理と治療, **3**(4), 659~666.
- 中川 静紀, 政本 浩二 他 (1980) : 生ニンニク及びニンニク抽出液の経口投与による若齢ラットの発育, 諸臓器などへの影響, J. Toxicol. Sci., **5**, 91~112.
- 中川 静紀, 政本 浩二 他 (1984) : ニンニク抽出液の急性毒性試験, J. Toxicol. Sci., **9**, 57~60.
- 住吉 博道, 兼沢 敦 他 (1984) : ニンニク抽出液のラットにおける6ヵ月慢性毒性試験, J. Toxicol. Sci., **9**, 61~75.
- 日本東洋医学会編 (1981) : 漢方と健康保健に関するアンケート回答まとめ, 日本東洋医学会雑誌, **32**(1), 55~79.
- 清水 英佑, 永山 和之 他 (1980) : 野菜としょう油の加熱分解物の突然変異原, 日衛誌, **35**, 774~781.
- Schmid W. (1975) : The micronucllus test., Mutation Res., **31**, 9~15.
- 矢作多貴江 (1975) : 環境中の発ガン物質を微生物を使ってスクリーニングする実験法について, 蛋, 核, 酵, **20**(13), 1178~1189.
- 山本 久子, 水谷 民雄 他 (1982) : 生薬の突然変異誘発性に関する研究 (第1報), 薬学雑誌, **102**(6), 596~601.