

20010093

厚生科学研究費補助金

厚生科学特別研究事業

既存天然添加物等の変異原性を中心とした
安全性研究

平成 13 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 林 真

平成 14 (2002) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告書

林 真（国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部長）	1
--------------------------	---

II. 分担研究報告

1. 本間 正充（国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部 室長）	11
2. 中嶋 圓（(財)食品農医薬品安全性評価センター 主席研究員）	33
3. 野口 忠（日本バイオアッセイ研究センター 室長）	64
4. 安心院 祥三（(財)化学物質評価研究機構 副長）	80
5. 松元 郷六（(財)残留農薬研究所 室長）	98
6. 岸 美智子（神奈川県衛生研究所 科長）	113
7. 宮川 誠（(株)三菱化学安全科学研究所 主任研究員）	121
8. 田中 憲穂（(財)食品薬品安全センター 副部長）	132

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）
総括研究報告書

既存天然添加物等の変異原性を中心とした安全性研究

主任研究者名 林 真
国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部長

分担研究者氏名

本間 正充（国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部 室長）
中嶋 圓（（財）食品農医薬品安全性評価センター 主席研究員）
野口 忠（日本バイオアッセイ研究センター 室長）
安心院 祥三（（財）化学物質評価研究機構 副長）
松元 郷六（（財）残留農薬研究所 室長）
岸 美智子（神奈川県衛生研究所 科長）
宮川 誠（（株）三菱化学安全科学研究所 主任研究員）
田中 憲穂（（財）食品薬品安全センター 副部長）

研究要旨

1) 平成 8 年度厚生科学研究において、既存の天然添加物 489 品目に関し、既存の安全性試験成績、国際的な評価結果等の情報、欧米での取扱等の情報をもとに基本的な安全性について考察を行ったところ、当時情報が不十分であった 139 の天然添加物以外については、安全性は問題ない、あるいは安全性に関する危惧は少ないとの結論が得られている。

しかしながら、その後得られた知見を以てしても、現に流通が確認されている既存天然添加物のうち、現段階においても安全性に関する知見がほとんど得られていない状況にあるものがあり、本研究においてはそれらの内今回入手可能であった 16 品目に関して遺伝毒性試験を実施し、その安全性の評価を行った。

16 品目のうちコメヌカ油抽出物（酸化防止剤）、ヒメマツタケ抽出物（苦味料）ホホバロウ（ガムベース）等 9 品目に関して細菌を用いる復帰突然変異試験を、ガイドラインで定める標準的な方法により検討した。その結果、ラット肝 S9mix を用いた代謝活性化系の有無に係わらず全て陰性の結果であった。

また、コメヌカ油抽出物（酸化防止剤）、モンタンロウ（ガムベース）等 5 品目に関しては、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験をチャイニーズハムスター肺由来細胞株 CHL/IU を用いて実施し、全て陰性の結果を得た。

アウレオバシジウム培養液（増粘安定剤）、エラグ酸（酸化防止剤）、ログウッド色素（着色料）等全 16 品目については、*in vivo* 試験系であるマウスを用いる小核試験を行い、これらの天然添加物が生体内で染色体異常誘発性を示す可能性について検討した。その結果、充分高用量まで試験されたが、全て陰性の結果となった。

2) タール色素の安全性検討については、米国において発がん性が疑われた当時 70 年代後半から 80 年代前半にかけては盛んに検討が行われたものの、その後の検討は十分行われてきていない。

本研究では食用赤色2号等のタール系色素に関して、DNA 損傷性が認められたとする報告がなされたことをうけ、単細胞ゲル電気泳動法（コメット試験）での陽性結果を確認する目的で、ほぼ同一条件で試験を行った。その結果、コメット試験で陽性の傾向は示したものの弱い反応しか得られず、また実験条件による反応のちがいにしても報告されているものと異なったものであった。また、コメット試験での陽性結果が、生体内のDNAに損傷を与え、さらにそれが固定されて遺伝子突然変異を誘発するものか否かを明確にするためにトランスジェニックマウスを用いる試験を実施した。その結果突然変異が誘発することを確認できなかった。このことは、食用赤色2号によるDNA傷害がほぼ完全に修復されるか、実際にはDNAに傷害を与えていないがある種の人工産物により陽性の結果を与えてしまったのではないか、等の可能性が考えられるが、これらの点が今後に残された課題であろう。

A. 研究目的

平成7年の食品衛生法改正時に、既に流通されていたことから、その後も流通が認められている既存の天然添加物489品目についての安全性の確認は重要な課題であり、昨年度、日本生協連合会が国会に提出した請願事項6項目の中でも添加物の取扱の見直しが指摘されている。

本研究の第一の目的は、現在流通が確認されているにもかかわらず、安全性に関する知見がほとんど得られていない天然添加物の安全性について、変異原性に関する情報を得ることにより、網羅的な安全性評価を行うことである。

食品添加物に対する安全性に関しては、食事を通じての長期曝露に伴う発がん性が最大の懸念であり、DNA損傷性、遺伝子突然変異誘発性、染色体異常誘発性などに関するデータから、被験物質の発がん性リスクを類推することが可能となる。情報が無いことから、消費者が漠然と抱く不安に対して、これら基本的データに基づき、網羅的に天然添加物の安全性を確認・類推することにより、一定の安心感を与えることの意義は大きい。

一方、食用赤色2号（着色料）を含むタール系色素については、かつて米国において発がん性を疑う騒動があったことがある。また、最近ではDNA損傷性を示唆する文献が発表され¹⁾、その安全性に関して不安がもたれている状況にある。そこで、本研究の第二の目的として、タール色素のDNA

傷害性の有無、またその後の修復の可能性を含めた作用メカニズムの解明・考察を行うことにより、これらの発がん性および次世代への遺伝的影響に対する不安を解消することにある。

B. 研究方法

1) 既存食品添加物16品目について変異原性試験を各分担研究者で分担して行う。試験は、食品添加物ガイドラインで示された基本的な変異原性試験、すなわち、「細菌を用いる復帰突然変異試験」、「ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験」、「げっ歯類を用いる小核試験」を実施する。ただし、生体内での遺伝毒性をみる試験系の一つである「げっ歯類を用いる小核試験」は、全16品目について実施する。今回試験を実施したものは以下のとおり（かっこ内は試験項目、「細菌を用いる復帰突然変異試験」：A、「ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験」：C、「げっ歯類を用いる小核試験」：M）。

増粘安定剤:

アウレオバシジウム培養液 (M)

アマシードガム (M)

キダチアロエ抽出物 (M)

アグロバクテリウムサクシノグリカン (A, C, M)

ガムベース:

コーパル樹脂 (M)

サンダラック樹脂 (A, M)
ホホバロウ (A, M)
マスチック (A, C, M)
モンタンロウ (A, C, M)

酸化防止剤：

エラグ酸 (M)
コメヌカ油抽出物 (A, C, M)
コメヌカ酵素分解物 (A, C, M)

着色料：

アルカネット色素 (M)
ログウッド色素 (M)

苦味料等：

ヒメマツタケ抽出物 (A, M)

製造用剤：

メバロン酸 (A, M)

各分担研究者とは連絡を密にし、試験計画書の確認、試験実施場所の確認のための査察、情報交換等を通して各物質群毎の試験が適切に行われるよう充分配慮する。

2) 食用赤色 2 号等タール系食用色素に関する変異原性試験については、最近発表された単細胞ゲル電気泳動法 (コメット法) での陽性結果を再検討するため、ほぼ同一条件の試験計画書を作り、再現性の確認等を行う。また、同時にラットを用いたコメット法を実施し、ラットでの DNA 傷害性を検討する。本試験に関しては、実際の試験を本試験に精通している研究者と協同で実施する。また、コメット法で検出される DNA 上の傷が、実際に遺伝子突然変異として固定されるか否かをトランスジェニックマウスを用いる試験 (TG 試験) で検証する。TG 試験は国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部で実施する。試験法は、現時点において最もバリデーションが進んでいると考えられる *lacZ* をマウスに導入した系 (MutaTMMouse) を用いた。また、塩基配列の決定がより容易に行える系として開発²⁾された *cII* も同時に標的遺伝子として用い、プロトコールも国際的に最も受け入

れられるものをできる限り用いて実施した。さらに染色体異常誘発性を検討するため、遺伝子突然変異試験と同一個体を用いて末梢血小核試験³⁾を同時に実施した。

倫理面への配慮

実験動物に対する倫理面は、国立医薬品食品衛生研究所を始め各試験研究機関に於ける実験動物倫理委員会等の指針を遵守し、出来る限り動物に苦痛を与えない方法で屠殺するなど、動物愛護上の配慮をする。

なお、本研究においては細菌、培養細胞、げっ歯類のみを用いて試験を行い、ヒトの資料を用いることはしないので、ヒトの倫理面で問題となることはない。

C. 研究結果

1) 既存食品添加物 16 種の変異原性試験結果の概要を表 1 に示し、以下に概説する。

増粘安定剤：

アウレオバシジウム培養液：小核試験が実施されており、技術的に投与可能な量まで試験されたが、結果は陰性であった。

アマシードガム：小核試験が実施されており、毒性兆候が認められない場合の限量である 2000mg/kg まで検討されたが、小核誘発性は認められなかった。

キダチアロエ抽出物：本品も小核試験が実施されており、2000mg/kg まで試験されているが、陰性の結果であった。

アグロバクテリウムサクシノグリカン：本品に関しては細菌を用いる復帰突然変異試験、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験、小核試験が全て実施された。復帰突然変異試験は標準的な菌株の組み合わせ、すなわちネズミチフス菌 TA100、TA1535、TA98、TA1537、大腸菌 WP2uvrA/pKM101 の 5 菌株を用い、限界用量である 5000 μg/plate まで試験されたが、結果は陰性であった。*In vitro* 染色体異常試験は限界濃度である 5mg/ml まで試験されており、結果は陰性であった。小核試験は限量である 2000mg/kg まで試験されて陰性であった。

表1 食品添加物遺伝毒性試験結果

品名	試験項目/施設		
	Ames 試験	Chromosome 試験	小核試験
アウレオバシジウム培養液 (増粘安定剤)	nt	nt	-
アマシードガム (増粘安定剤)	nt	nt	-
キダチアロエ抽出物 (増粘安定剤)	nt	nt	-
アグロバクテリウム サクシノグリカン (増粘安定剤)	-	-	-
コーパル樹脂 (ガムベース)	nt	nt	-
サンダラック樹脂 (ガムベース)	-	nt	-
ホホバロウ (ガムベース)	-	nt	-
マスチック (ガムベース)	-	±	-
モンタンロウ (ガムベース)	-	-	-
エラグ酸 (酸化防止剤)	nt	nt	-
コメヌカ油抽出物 (酸化防止剤)	-	-	-
コメヌカ酵素分解物 (酸化防止剤)	-	-	-
アルカネット色素 (着色料)	nt	nt	-
ログウッド色素 (着色料)	nt	nt	-
ヒメマツタケ抽出物 (苦味料等)	-	nt	-
メバロン酸 (製造用剤)	-	nt	-

nt : not tested

ガムベース :

コーパル樹脂 : 小核試験が実施されており、2000mg/kg まで試験されているが、陰性の結果であった。

サンダラック樹脂 : 本品に関しては細菌を用いる復帰突然変異試験および小核試験が実施された。復帰突然変異試験は標準的

な菌株の組み合わせで行われており、5000 μ g/plate まで (TA1535、TA98、WP2uvrA) または菌の生育阻害が認められる用量まで (TA100、TA1537) 実施されたが、結果は陰性であった。小核試験は限量である2000mg/kg まで試験されて陰性であった。

ホホバロウ : 細菌を用いる復帰突然変異

試験および小核試験が実施された。復帰突然変異試験は標準的な菌株の組み合わせで、5000 μ g/plate まで実施されており、結果は陰性であった。また、小核試験は限量である 2000mg/kg まで実施されており、結果は陰性であった。

マスチック：本品に関しては細菌を用いる復帰突然変異試験、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験、小核試験が全て実施された。復帰突然変異試験は標準的な菌株の組み合わせ、すなわちネズミチフス菌 TA100、TA1535、TA98、TA1537 及び大腸菌 WP2uvrA/pKM101 の 5 菌株を用い、限界用量である 5000 μ g/plate または菌の生育阻害が認められる用量まで試験されたが、結果は陰性であった。*In vitro* 染色体異常試験は細胞毒性が認められる用量まで行われた。その結果、代謝活性化系の存在下において、統計学的に有意な増加が観察された。ただし、構造異常を有する細胞の出現頻度は 6% と、高いものではなかった。また、他の試験条件では陰性の結果であった。小核試験に関しては限量である 2000mg/kg まで試験されており、結果は陰性であった。

モンタンロウ：本品に関しても細菌を用いる復帰突然変異試験、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験、小核試験が全て実施された。復帰突然変異試験は標準的な菌株の組み合わせが用いられており、方法、結果共に問題はない。また、*In vitro* 染色体異常試験についても標準的な方法で試験されており、結果は陰性であった。また、小核試験に関しても限量用量である 2000mg/kg まで試験されており、結果は陰性であった。

酸化防止剤：

エラグ酸：げっ歯類を用いる小核試験が実施された。投与量は限界用量である 2000mg/kg であり、結果は陰性であった。

コメヌカ油抽出物：細菌を用いる復帰突然変異試験、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験、および小核試験が実施された。復帰突然変異試験は WP2uvrA/pKM101 を含む標準的な試験菌株の組み合わせで、5000 μ g/plate まで実施されており、結果は陰性であった。*In vitro* 染色体異常試験は、限界用量である 5mg/ml まで試験されており、結

果は陰性であった。また、小核試験は限量である 2000mg/kg まで実施されており、結果は陰性であった。

コメヌカ酵素分解物：細菌を用いる復帰突然変異試験、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験、および小核試験の 3 試験が実施された。復帰突然変異試験は標準的な菌株の組み合わせで行われており、5000 μ g/plate まで実施されており、結果は陰性であった。*In vitro* 染色体異常試験は、限界用量である 5mg/ml まで試験されており、結果は陰性であった。また、小核試験に関しても限量用量である 2000mg/kg まで実施されており、結果は陰性であった。

着色料：

アルカネット色素：本品に関してはげっ歯類を用いる小核試験が実施された。試験方法、結果共に問題はなく、陰性であった。

ログウッド色素：本品に関してもげっ歯類を用いる小核試験が行われ、限界用量の 2000mg/kg まで検討された結果、小核の誘発は認められなかった。

苦味料等：

ヒメマツタケ抽出物：本品に関しては細菌を用いる復帰突然変異試験および小核試験が実施された。復帰突然変異試験は標準的な菌株の組み合わせで行われており、5000 μ g/plate まで試験されたが、結果は陰性であった。小核試験は限量を越えた 6667mg/kg まで試験されて陰性であった。

製造用剤：

メバロン酸：本品に関しても細菌を用いる復帰突然変異試験および小核試験が実施された。復帰突然変異試験、小核試験共に標準的な方法で限量用量まで試験されており、結果は共に陰性であった。

2) 食用赤色 2 号等タール系食用色素に関する変異原性試験

食用赤色 2 号に関しては、DNA 傷害性を評価するためマウスおよびラットを用いて単細胞ゲル電気泳動法（コメット法）を行った。また、生体内における遺伝子突然変異誘発性をトランスジェニックマウスを用

いて検討した。さらに染色体異常誘発性を検討するため、遺伝子突然変異試験と同一個体を用いて末梢血小核試験を同時に実施

した。それぞれの結果の概要を表2、表3、および表4に示す。

表2 食用赤色2号のコメット法結果のまとめ

投与回数	標本作製時期	マウス				ラット	
		胃		腸		胃	腸
		テイル長	テイルモーメント	テイル長	テイルモーメント	テイル長	テイル長
単回投与	3時間	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	24時間	ns	ns	ns	ns	ns	ns
3回投与	24時間	***a)	ns	ns	ns	nt	nt

a) 用量反応相関は認められなかった

コメット法に関しては最近公表された論文¹⁾の再現性を確認することを目的とするため、論文で用いられた方法を出来るだけ踏襲した。また、標的臓器としては論文で陽性を示した胃と腸管を用いた。指標としてはテイル長のほかにテイルモーメントを用いて比較した。胃のテイル長の場合1mg/kg投与群(単回投与、3時間)では陰性対照と変化はなかったが、10mg/kg投与群では平均値で陰性対照群の約2倍の値を示し、100、1000mg/kgで少し落ち込み2000mg/kgでは10mg/kg群とほぼ同様の値を示した。さらに、単回投与24時間後、3回連日投与24時間後での標本においてもテイル長の伸長傾向が観察された。これらの内、統計学的に有意差(有意水準5%)が認められたのは3回連日投与後24時間での標本のみであったが、その標本においても明確な用量反応相関性は認められなかった。さらに、テイル長と同様広く用いられているテイルモーメント(どれくらいの量のDNAが流れたかを示す指標)で比較すると、3回連日投与後24時間での標本においても統計学的には有意とならなかった。

腸管に関しては、単回投与3時間後の標本では2000mg/kgで初めて陰性対照群の2倍程度のテイル長を観察している。単回投与24時間後、3回連日投与24時間後の標本でもテイル長の伸長傾向は認められるが陰性対照の2倍前後であり、統計学的には有意とならなかった。また、ラットを用いたコメット試験においては、腸管および胃共に全ての条件下で陰性の結果となった。

表3 トランスジェニックマウスを用いた *in vivo* 遺伝子突然変異試験結果

	<i>lacZ</i>	<i>cII</i>
胃	陰性	陰性
腸	陰性	陰性
肺	陰性	陰性
肝臓	陰性	陰性

一方、遺伝子突然変異誘発性を見るために行ったトランスジェニックマウスを用いた試験では、腸管、胃、肝臓、肺について検討した。標的遺伝子としては、*lacZ*および*cII*を用いた。さらにその一部についてはDNA塩基配列の解析を行って遺伝子突然変異誘発性に関して詳細に検討した。その結果、2000mg/kgを週1回、4週にわたり投与したが、試験した臓器での突然変異の誘発は認められなかった。また、同時に行った末梢血を用いる小核試験の結果も陰性であることを確認した。

D. 考 察

1) 既存食品添加物16品目についての変異原性 今回検討した16品目のうち、5品目(アグロバクテリウムサクシノグリカン、マスチック、モンタンロウ、コメヌカ油抽出物、コメヌカ酵素分解物)については細菌を用いる復帰突然変異試験、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験、げっ歯類を用いる小核試験の試験が全て実施され、充分高用量まで評価された結果、全て陰性で

あった。医薬品規制国際ハーモナイゼーション国際会議 (ICH S2) において、適正に実施された上記の3試験が全て陰性であった場合には、当該被験物質に遺伝毒性は無いものと考えることが合意されている⁶⁾。従って、これらの5品目に関しては、遺伝毒性に関する限り問題ないものと考えることが出来る。また、7品目 (アウレオバシジウム培養液、アマシードガム、キダチアロエ抽出物、コーパル樹脂、エラグ酸、アルカネット色素、ログウッド色素) については、今回は小核試験の結果のみが得られているが、細菌を用いる復帰突然変異試験およびほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験が現在別途実施されている。残りの4品目 (サンダラック樹脂、ホホバロウ、ヒメマツタケ抽出物、メバロン酸) に関しては、細菌を用いる復帰突然変異試験と小核試験のみが今回検討され、全て陰性の結果が得られた。ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験についてのデータは得られないが、小核試験によって *in vivo* における染色体異常誘発性が検討されており、陰性の結果が得られているので、今後確認のため実際の試験を実施する必要はあるが、現時点でこれらの品目について問題となるような遺伝毒性は無いものとする。

化学物質の遺伝毒性を評価するのに、*in vivo* 試験系での結果が重要な意味を持つ。現在最も一般的に行われている *in vivo* 試験系がげっ歯類を用いる小核試験⁴⁾であり、今回用いた方法は充分バリデートされた信頼性の高い方法である。ただし、今回実施した小核試験での標的臓器は骨髄の造血組織であり、その他の各種臓器での安全性を保證するものではない。この意味からも骨髄以外を標的とする試験系での評価も重要である。また、*in vitro* で染色体異常誘発性が認められ、骨髄を標的とした小核試験で陰性の場合に標的細胞が充分被験物質で暴露されなかった結果であることを示す必要があるとの議論があり、医薬品の場合には標的細胞の暴露証明が要求されている⁵⁾。しかし、骨髄はかなり暴露されやすい臓器であり、被験物質の血中濃度の上昇が暴露証明と出来ることが ICH でも認められている。従って、限界用量、最大耐量まで試験されている場合の陰性結果は、かなり信頼

性の高いものと考えられることができる。

2) 食用赤色2号等タール系食用色素に関する変異原性試験

食用赤色2号は、かつて米国において、発がん性が疑われたことから米国では使用が禁止されている。また、近年、いわゆるコメット試験という生体内で DNA 損傷性をみる試験系 (単細胞ゲル電気泳動法) の開発が進んでおり、この方法により、食用赤色2号を含むタール系色素の一部で陽性との結果が報告されている¹⁾。本物質を含め、タール系色素についての発がん性については、現段階において慢毒・発がん性試験成績等から問題ないことが確認されては

表4 食用赤色2号の小核試験結果

投与量 mg/kg	動物 数	観察細 胞数	小核を有 する幼若 赤血球 (%)	検 定
1 週目				
0	5	10000	0.29	-
500	5	10000	0.37	ns
1000	5	10000	0.39	ns
2000	5	10000	0.29	ns
PC	2	4000	0.91	**
2 週目				
0	5	10000	0.25	-
500	5	10000	0.32	ns
1000	5	10000	0.28	ns
2000	5	10000	0.33	ns
PC	2	4000	0.94	**

投与48時間後にアクリジンオレンジ超生体染色法にて標本作製

PC: 陽性対照は Streptozotocin 100mg/kg を腹腔内投与

検定は Kastenbaum-Bowman の検定表を使用
ns: not significant, **: $p < 0.01$

いるものの、コメット試験での陽性報告があることから、遺伝毒性の有無、あるいは修復の可能性を含めた作用メカニズムを検討する試験が求められている。本研究では、食用赤色2号についてマウスおよびラットを用いたコメット試験を行い、マウスの胃でテイル長に関して弱いながらも統計学的に有意な陽性結果を得た。ただし、他の指

標であるテイルモーメントで検討した場合には統計学的な有意差は認められなかった。一方、腸管に関しては、テイル長の増加傾向を認めたものの、統計学的に有意なものではなかった。また、ラットを用いて検討した結果は全て陰性であった。詳細に関しては分担研究報告を参照されたい。

今回の試験結果は、Tsuda らが報告¹⁾している食用赤色 2 号のコメット試験で陽性の結果を再現することができなかった(表 5)。一部陽性傾向を示した部分もあるが、報告されている内容と比較すると、その強さにかかなりの差がある。両試験間差異を厳密に

説明することは現時点で出来ない。可能性としては、被験物質のロットが異なるため、不純物等の種類およびそれらの含量が異なることが考えられる。ロットの差による影響はほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験でも認められている⁷⁾。すなわち、純度 91%の食用赤色 2 号を用いて試験した場合には 24、48 時間の連続処理において異常誘発性が認められた。一方、純度は不明であるが、色素試験用標準品を用いると、これらの反応はほとんど認められなくなった。このように被験物質のロット差が影響していることが考えられる。

表 5 食用赤色 2 号試験結果の比較

Dose Mg/kg	Colon			Stomach	
	Tsuda et al.		Present study	Tsuda et al.	Present study
0	5.6±0.9		8.1±3.5	5.9±0.7	9.7±1.9
1	13.0±2.0	Ns	13.8±4.7	8.6±1.5	9.2±1.6 ns
10	25.6±1.7	**	13.6±6.6	8.3±1.3	19.6±4.2 ns
100	29.4±3.2	**	7.9±4.1	13.1±1.2	13.7±4.7 ns
1000	34.4±1.9	**	14.2±4.5	32.6±1.2	13.2±5.9 ns
2000	40.4±3.5	**	16.3±5.1	9.3±2.0	17.7±9.1 ns
2000	10.3±0.7	Ns	9.7±3.3	16.2±1.1	17.8±4.3 ns

**：p<0.01, *：p<0.05, ns: not significant

食用赤色 2 号の規格値（第七版食品添加物公定書規格）、今回試験に用いた試料の分析結果、ならびに現在流通しているその他のロット例についての分析結果を表 5 に示す。残念ながら Tsuda らが用いた試料の分析結果が不明であるので、厳密な比較は出来なかった。ただし、食品添加物公定書規格は 1999 年に改訂された第七版から改訂されており、新たに「未反応原料及び反応中間体」及び「非スルホン化芳香族第一級アミン」に関する項目が追加されており、それ以前の試料に関してはこれらの分析は行われていなかったことになる。今回試験に供した試料の純度は 91.7%のものであり、特に高純度のものを用いた訳ではない。ただし、非スルホン化芳香族第一アミン（ α -ナフチルアミンとして）が $0.01 \mu\text{g/g}$ とかなり低い特徴を持つ（規格値は $1.0 \mu\text{g/g}$ 以下）。 α -ナフチルアミンはコメット試験で陽性になることが知られている⁸⁾が、 400mg/kg での陽性結果であり、規格値の上限である $1.0 \mu\text{g/g}$ の混入があったとしても食用赤色 2 号の陽性結果を α -ナフチルア

ミンで説明することは不可能であった。他の微量混入物の相乗効果等も考慮する必要があるかも知れないが、試験系自体の持つ限界についても考える必要があるだろう。すなわち、コメット法のみで見られる変化が、被験物質が DNA に直接作用した結果としての反応か否かについての証明が必要であると考えられる。特に、今回問題となっているような粘膜細胞は単細胞（核）浮遊液になりやすく、標本調製過程における人為的、物理的な傷による影響についても検討する必要があるものとする。

次に、この問題の一つを解決するため、コメット法での陽性結果が、DNA に損傷を与え、その傷が実際に突然変異の誘発に結びつくものか否かを、トランスジェニックマウスを用いて検討した。その結果、腸管、胃、肺、肝臓においては被験物質による遺伝子突然変異の誘発は確認できなかった。この結果は重要であり、コメット法で認められた食用赤色 2 号の陽性反応が、遺伝子突然変異誘発に関与しない可能性を示唆するものであった。

表6 食用赤色2号規格値ならびに分析結果

試験項目	規格値*	今回使用試料	その他のロット例
含量 (%)	85.0 以上	91.7	90.8
性状	適合	合格	合格
水溶液中での色調	適合	合格	合格
溶状	適合	合格	合格
極大吸収波長	518-522 nm	521	521
水不要物 (%)	0.20 以下	0.01	0.01
塩化物及び硫酸鉛 (%)	5.0 以下	0.05	2.9
重金属 ($\mu\text{g/g}$)	20 以下	5	5
ヒ素 ($\mu\text{g/g}$)	4.0 以下	0.1	0.1
他の色素	適合	合格	合格
未反応原料及び反応中間体 (%)	0.5 以下	0.001 以下	0.03
非スルホン化芳香族第一級アミン (アミンとして) (%)	0.01 以下	0.0001	0.0001
非スルホン化芳香族第一級アミン (α -ナフチルアミンとして) ($\mu\text{g/g}$)	1.0 以下	0.01 以下	0.1
乾燥減量 (%)	10.0 以下	7.0	3.9

*規格値は第七版食品添加物公定書規格

食用赤色2号の遺伝毒性に関しては、細菌を用いる復帰突然変異試験⁹⁾、マウスリンフォーマTK試験¹⁰⁾チャイニーズハムスター肺由来細胞株 CHL/IU を用いた染色体異常試験⁷⁾、マウスを用いた小核試験¹¹⁾、およびラットを用いる優性致死試験¹⁰⁾がこれまでに実施されている。細菌を用いる復帰突然変異試験では、TA100、TA1535、TA1537、TA92、TA94 および TA98 菌株を用いて検討され、全ての試験菌株において陰性であり、微生物に対する遺伝子突然変異誘発性はないものと考えられた。マウスリンフォーマTK試験で陽性との報告¹⁰⁾があるが、今回行ったトランスジェニックマウスを用いた *in vivo* での遺伝子突然変異誘発性は認められず、*in vitro* で見られた現象が生体内では発現しないことを示唆する結果となった。ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験は、ロットの異なる食用赤色2号を用いて2回試験が行われており、第一回目の試験において24、48時間の連続処理の条件で陽性の結果が得られている。ただし、異なるロットを用いた確認試験においては48時間処理の細胞毒性の見られる最高用量でも明確な陽性反応は得られなかった¹¹⁾。この、*in vitro* での染色体異常

誘発性が生体内でも同様に発現するか否かを確認するため、マウスを用いた小核試験を行った。その結果、食用赤色2号を2g/kgまで経口投与しても小核誘発性は認められず¹¹⁾、*in vitro* で見られた染色体異常誘発性は生体内においては発現に至らないことが示唆されている。この結果は、今回トランスジェニックマウスを用いた末梢血小核試験によっても確認された。さらに、ラットを用いた優性致死試験で生殖細胞に於ける染色体異常誘発性が検討されているが、陰性結果であることが報告されている¹⁰⁾。

これらの結果を総合的に評価すると、今回のコメット法の試験結果、トランスジェニックマウスを用いた遺伝子突然変異試験での陰性結果を考え合わせると、生体にとって特に問題となる遺伝毒性は認められないものと考えることができ、特段の措置が必要なものではないと考える。

E. 結 論

1) 既存食品添加物16品目、5品目（アグロバクテリウムサクシノグリカン、マスチック、モンタンロウ、コメヌカ油抽出物、コメヌカ酵素分解物）については細菌を用

いる復帰突然変異試験、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験、げっ歯類を用いる小核試験の試験が全て実施され、充分高用量まで評価された結果、全て陰性であった。また残りの、11品目（アウレオバシジウム培養液、アマシードガム、キダチアロエ抽出物、コーパル樹脂、エラグ酸、アルカネット色素、ログウッド色素、サンダラック樹脂、ホホバロウ、ヒメマツタケ抽出物、メバロン酸）については小核試験のみが実施され、全て陰性の結果が得られた。一部、細菌を用いる復帰突然変異試験やほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験についてのデータが得られていないものもあるが、小核試験は全て陰性の結果であり、今後確認のため *in vitro* の試験を実施する必要はあるが、現時点で今回評価した全ての品目について生体内で問題となるような遺伝毒性は無いものとする。

2) 食用赤色2号に関しては、報告のあった *in vivo* のコメント試験の陽性結果を再現することが出来なかった。さらに、トランスジェニックマウスを用いた生体内遺伝子突然変異試験において陰性の結果を示した。これまでの知見を総合的に判断すれば、本色素は生体にとって特段問題となるような遺伝毒性を示すものではないとの結論に達した。

F. 参考文献

- 1) Tsuda, S., M. Murakami, N. Matsusaka, K. Kano, K. Taniguchi and Y.F. Sasaki: DNA damage induced by Red Food Dyes orally administered to pregnant and male mice, *Toxicol. Sci.*, 61, 92-99 (2001).
- 2) Suzuki, T., X. Wang, Y. Miyata, K. Saeki, A. Kohara, Y. Kawazoe, M. Hayashi and T. Sofuni: Hepatocarcinogen quinoline induces G:C to C:G transversions in the *cH* gene in the liver of lambda/*lacZ* transgenic mice (MutaTMMouse), *Mutat. Res.*, 456, 73-81 (2000).
- 3) Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T and Ishidate, M. Jr.: The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange coated slides, *Mutat. Res.*, 245, 245-249 (1990).
- 4) Hayashi, M., Tice, R.R., MacGregor, J.T., Anderson, D., Blakey, D.H., Kirsh-Volders, M, Oleson, F.B., Pacchierotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B.: *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, *Mutat. Res.*, 312, 293-304 (1994)
- 5) 医薬品毒性試験法ガイドライン, 医薬審第1604号 (1999).
- 6) ICH Steering Committee: S2A Genotoxicity: Guidance on specific aspects of regulatory genotoxicity tests for pharmaceuticals (1995); ICH Steering Committee: S2B Genotoxicity: A standard battery for genotoxicity testing of pharmaceuticals (1997).
- 7) 祖父尼俊雄監修, 染色体異常試験データ集 1998年版, LIC, 東京 (1998).
- 8) Sasaki, Y.F., K. Fujikawa, K. Ishida, N. Kawamura, Y. Nishikawa, S. Ohta, M. Satoh, H. Madarame, S. Ueno, N. Susa, N. Matsusaka and S. Tsuda: The alkaline single cell gel electrophoresis assay with mouse multiple organs: results with 30 aromatic amines evaluated by the IARC and U.S. NTP, *Mutat. Res.*, 440, 1-18 (1999).
- 9) Ishidate, M. Jr., T. Sofuni and K. Yoshikawa: A primary screening for mutagenicity of food additives in Japan, *変異原と毒性*, 3, 82-90 (1980).
- 10) Palmer, K.A., C.W. Sheu and S. Green: Mutagenicity studies of R-amino salt, a metabolite of amaranth (FD & C Red No. 2), in mouse lymphoma cells heterozygous at the thymidine kinase locus and in the rat dominant lethal test, *Food and Cosmetic Toxicol.*, 17, 5-10 (1979).
- 11) Hayashi, M., S. Honda et al.: Micronucleus induction with synthesized food colors, *Annual Report of Toyama Institute of Health*, 4, 265-267 (1981).

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）

分担研究報告書

既存天然添加物等の変異原性を中心とした安全性研究

分担研究者 本間 正充（国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部 室長）
協力研究者 鈴木 孝昌（国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子細胞医薬部 室長）
麻野間正晴（名古屋市衛生研究所 主任研究員）
本田 幸子（富山県衛生研究所・がん研究部）
坂本 浩子（国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部）
小原 有弘（国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部）
小泉 朋子（国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部）

研究要旨

天然食品添加物の安全性確保の一環として、以下の既存天然添加物（3種）について、遺伝毒性試験を実施した。

1. アグロバクテリウムサクシノグルカン：増粘安定剤（エームス試験）
2. アマシードガム：増粘安定剤（小核試験）
3. コメヌカ抽出物：酸化防止剤（染色体異常試験、小核試験）

その結果、3種の天然食品添加物について遺伝毒性は認められなかった。

また、タール系色素である食用赤色2号(アマランス)の遺伝子突然変異誘発性に関して、トランスジェニックマウス(MutaTMMouse)を用いて、大腸を中心に解析したが、in vivoでの遺伝子突然変異誘発性は認められなかった。

キーワード：遺伝毒性試験、エームス試験、染色体異常試験、小核試験、トランスジェニックマウス遺伝子突然変異試験、天然食品添加物、タール系色素

A. 研究目的

加工食品の普及および消費者の天然物志向等により天然添加物は広範囲の食品に使用され、その種類および使用量はともに増加している。天然物中には変異・発がん性を有する物質の存在が知られており、天然物から抽出・精製される天然添加物がこのような物質を主成分あるいは微量成分として保有する可能性が考えられる。しかしながら食品衛生法により成分規格、使用基準の定められている天然添加物は少なく、その安全性についても十分な検討がなされていない。

そこで、現在国内で汎用されている以下の既存天然添加物（3種）について、変異原性を中

心とした安全性について研究を行った。

1. アグロバクテリウムサクシノグルカン：増粘安定剤（エームス試験）
2. アマシードガム：増粘安定剤（小核試験）
3. コメヌカ抽出物：酸化防止剤（染色体異常試験、小核試験）

また、これとは別に最近、コメットアッセイにおいて、大腸で遺伝子傷害性を示すことが指摘されているタール系色素である食用赤色2号(アマランス)について、大腸における遺伝子突然変異誘発性を中心に、トランスジェニックマウス(MutaTMMouse)を用いて検討した。

B. 研究方法

1. 被検物質

日本食品添加物協会から提供された以下の食品添加物を被検物質とした¹⁾。

a) アグロバクテリウムサクシノグルカン (増粘安定剤)

ロット番号 : No. 9818252

供給元 : ローディア日華

b) アマシードガム (増粘安定剤)

ロット番号 : 不明

供給元 : 大日本製菓

c) コメぬか油抽出物 (酸化防止剤)

ロット番号 : 不明

供給元 : 藤沢薬品

d) 食用赤色 2 号 : アマランス (着色料)

ロット番号 : 011228、含量 (91.7%)

供給元 : 三栄源 エフ・エフ・アイ (株)

2. 試薬

Bacto Agar : Difco社製、Nutrient Broth No.2 : Oxoid社製、ジメチルスルホオキシライド (蛍光分析用、以下DMSO) : 梯同仁化学研究所製、Cofactor-I : オリエンタル酵母工業(株)製、S9 : キッコーマン(株)製、9-アミノアクリジン : Aldrich chemical Co., Inc. 製を使用し、その他の試薬は、すべて和光純薬工業(株)製の特級試薬を使用した。

3. 遺伝毒性試験法

a) エームス試験 (復帰突然変異試験)

Salmonella typhimurium TA100、*Salmonella typhimurium* TA1535、*Salmonella typhimurium* TA98、*Salmonella typhimurium* TA1537および*Escherichia coli* WP2uvrA/pKM101 (以下それぞれTA100株、TA1535株、TA98株、TA1537株およびWP2uvrA/pKM101株) の5種類の菌株を使用し、「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」²⁾および「新・微生物を用いる変異原性試験ガイドブック」³⁾に準じ、37℃、20分間のプレインキュベーション法を用いて以下の

方法で行った。

復帰突然変異試験に対する被検物質の最適用量を決めるため、プレート当たり5,000μgを最高用量として公比4で希釈し、7段階の用量について用量設定試験を行った。その結果、試験菌株に対する生育阻害が確認されなかったため、プレート当たり5,000μgを最高用量として公比2で希釈し、6段階の用量について本試験を行った。また必要に応じて試験結果確認のための確認試験を実施した。各試験とも用量毎に2プレート以上を使用し、溶媒対照は5プレートを、陽性対照は1プレート以上を使用した。

S9はフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンで酵素誘導したSprague-Dawleyラットの肝臓より調製したものを、1プレート当たり50μl使用した。

S9 mixはCofactor-Iを蒸留水に溶解し、ろ過除菌 (MILLEX-HV 0.45μm : MILLIPORE) 後、S9を加え、S9 mix 1 ml中にS9 : 100μl、MgCl₂·6H₂O : 8μmol、KCl : 33μmol、G-6-P : 5μmol、NADHP : 4μmol、NADH : 4μmol、Na₂HPO₄ : 84.2μmol、NaH₂PO₄·2H₂O : 15.8μmolになるように調製した。

1種類以上の試験菌株に対し、溶媒対照の2倍以上の復帰変異コロニーを誘発し、用量依存性を示したものを陽性、1.5倍以上2倍未満の復帰変異コロニーを誘発し、用量依存性を示したものを疑陽性、それ以外を陰性とした。

a) 染色体異常試験

チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株(CHL/1U)を用い、代謝活性化系の存在/非存在下での6時間処理法、および代謝活性化系非存在下での24、48時間連続処理法による染色体異常試験を行った⁴⁾⁵⁾。

6時間処理法においては、細胞20,000個を6cmのプラスチックシャーレに播き、細胞播種後3日目に被検物質をS9mixまたは培養液と共に6時間処理し、洗浄後さらに18時間培養した後、染色体標本を作製した。S9はフェノバルビタール

および 5,6-ベンゾフラボンで処理したSDラットの肝から調製したものを、キッコマン(株)より購入して用いた。24、48 時間連続処理法においては、細胞播種後3日目に検体を加え、24時間および48時間後に染色体標本を作製した。

検体濃度は予備試験によって、細胞増殖が明らかに抑制される濃度を最高に、原則として5濃度(公比2で段階希釈)を設定した。予備試験で毒性が観察されない場合には、5 mg/mlを最高濃度とした。

染色体標本は全てコード化し、処理の条件が分からない状態で、濃度当り 200個の分裂中期像について観察し、染色分体型あるいは染色体型の構造異常(ギャップ、切断、交換など)をもつ細胞の出現頻度を記録した。結果が明白な陽性または陰性を示さなかった検体について、用量範囲を最適化して確認試験を行い、最終判定を下した。さらに、数的異常の誘発性を評価するために倍数体(染色体数が倍化した細胞)についても併せて記録した。結果の判定は、未処理及び溶媒処理の対照群では通常4%以上の異常はみられないため、原則として、5%未満を陰性(-)、5%以上10%未満を疑陽性(±)、10%以上を陽性(+)とし、用量依存性等を考慮して総合的に行った。なお、必要に応じて追加再実験を行い、結果の確認を行った。

a) 小核試験

4または6週令雄ddYマウスを日本SLCより購入し、1週間の馴化期間の後、実験に使用した。一群当たり5匹のマウスを体重が平均化するように群分けし、使用した。

アマシードガムはオリーブオイルに懸濁し、10ml/kgの容量で経口投与した。陰性対照群として、溶媒(オリーブオイル)のみを投与し、陽性対照群としてシクロフォスファミド(生理食塩水に溶解)を100mg/kgの用量にて投与した。投与は18時間の間隔で2回行い、2回目の投与から30時間後(初回より48時間後)に一度採血を行い標本を作製した。コメヌカ油抽出物もオ

リーブオイルに懸濁し、10ml/kgの容量で経口投与した。陰性対照群として、溶媒(オリーブオイル)のみを投与し、陽性対照群としてマイトマイシンC(生理食塩水に溶解)を1mg/kgの用量にて腹腔内投与した。投与は24時間の間隔で2回行い、2回目の投与から24時間後(初回より48時間後)に一度採血を行い標本を作製した。

林らにより開発されたアクリジンオレンジ超生体染色法を用いた末梢血小核試験を用いた⁶⁾⁷⁾。マウス尾部血管を、注射針にて突き出血させ、5 μ lの血液を計り取り、アクリジンオレンジを塗布したスライドグラス上にて超生体染色し、蛍光顕微鏡にて幼若赤血球中に出現する、小核を有する血球数をカウントした。観察は二人の観察者が各1000個の幼若赤血球を観察し、個体当たり2000個の幼若赤血球における小核を有する血球の頻度を求めた。

a) トランスジェニックマウス遺伝子突然変異試験

5週令雄 MutaTMMouseを日本SLCより購入し、12日間の馴化期間の後、実験に使用した。一群当たり5匹(陽性対照群は2匹)のマウスを体重が平均化するように群分けし、使用した。被験物質は蒸留水に懸濁し、10ml/kgの容量で経口投与した。陰性対照群として、溶媒(蒸留水)のみを投与し、陽性対照群としてストレプトゾトシン(生理食塩水に溶解)を100mg/kgの用量にて腹腔内投与した。投与は1週間の間隔で4回行い、最終投与から7日後(初回より28日後)に解剖を行い臓器を回収した。

大腸をはじめ解剖して摘出した臓器は、内容物などを生理食塩水で良く洗った後、液体窒素にて急速凍結し、-80℃にて保存した。凍結した臓器の一部を取り、3mlのダウンスバッファーを加えてダウンス型ホモジナイザーにて軽くホモジナイズ後、蛋白質分解酵素(プロテナーゼK)3mlを加えて50℃にて2時間程度消化を行った。そして、等量のフェノール:クロロホルム(1:1)溶液をおよびクロロホルム溶液にて2回DNAの

抽出を行った後、エタノールを加えてDNAを沈殿させ、70%エタノールにて洗浄後、20 μ lのトリス-EDTAバッファーを加え、溶解させる。このDNA溶液10 μ lに、パッケージングエクストラクト（名古屋市立大学にて調整されたものを提供された）を2度加えて、1.5時間ごとのin vitroパッケージング反応を行い、導入遺伝子をラムダファージへと回収した。このパッケージング溶液を、指示大腸菌に感染させプラークアッセイを行うことにより、*lacZ*遺伝子および*cII*遺伝子の変異頻度の解析を行った⁹⁾¹⁰⁾。

パッケージング溶液の半量を、*E. coli C* (*lac*⁻, *galE*)株培養液へ加え、ファージを大腸菌へ感染させ、変異体検出のための選択試薬である phenyl- β -D-galactoside (P-gal) を含むLB-アガーを加えて、4枚のLBプレート上に播いた。同時に感染効率を調べるため、ファージ/菌液の一部を希釈して選択培地を含まないLB-アガープレート4枚に播いた。一晚、37 $^{\circ}$ Cにて培養後、生成したプラークの数を数え、突然変異頻度を算出した。

パッケージング溶液の半量を、*E. coli* G1225 (*hfI*)株培養液へ加え、ファージを大腸菌へ感染させ、一部を希釈して感染効率を調べるため2枚のLBプレートに播くとともに、残りを変異体選択のため6枚のLBプレートに播いた。そして、の選択試薬であるP-galを含むLB-アガーを加えて、感染効率算出用のプレートは37 $^{\circ}$ Cにて一晚培養し、変異体選択用のプレートは24.5 $^{\circ}$ Cにて2晩培養し、生成したプラーク数より突然変異頻度を算出した。

*cII*変異体プラークをパスツールピペットで分取し、SMバッファー中に保存した。この溶液の一部を、以下のプライマーを用いたPCR反応にかけた。

P1; 5'-AAAAAGGGCATCAAATTAACC-3'

P2; 5'-CCGAAGTTGAGTATTTTGCTGT-3'

目的とする*cII*遺伝子を含む446塩基対の断片を得、このPCR産物をセファクリル S-400カラム

にて精製後、さらに片側のプライマーを用いてサイクルシークエンシング反応を行い変異箇所を同定した¹¹⁾¹²⁾。

C. 試験結果および考察

1. アグロバクテリウムサクシノグルカン（エームス試験）

最高用量を5,000 μ g/プレートとして用量設定試験および本試験（表1-1、2）を行った。その結果、アグロバクテリウムサクシノグルカンは代謝活性化の有無に関わらず、TA100株、TA98株および WP2*uvrA* /pKM101株の3種類の試験菌株に対して復帰変異コロニー数は、すべてのプレートで溶媒対照の1.5倍未満であった。しかし、TA1535株およびTA1537株に対しては1.5倍以上の復帰変異コロニーを誘発したプレートがあった。いずれも復帰変異コロニー数は溶媒対照の2倍未満で、2プレートの平均値は1.5倍未満であったが、これら2菌株について本試験と同様の条件下で確認試験（表1-3）を行った。ただし、1用量当たり3プレートを使用した。その結果、TA1535株に対しては代謝活性化の有無に関わらず、すべてのプレートで溶媒対照の1.5倍未満であった。TA1537株に対しては本試験の場合と同様、1.5倍以上2倍未満の復帰変異コロニーを誘発したプレートがあった。しかし、いずれも3プレートの平均値は溶媒対照の1.5倍未満であった。以上の結果から、アグロバクテリウムサクシノグルカンの微生物に対する復帰突然変異原性は陰性とした。

被検物質を試験するに当たり、溶媒として蒸留水およびリン酸緩衝液を用いた場合、最高用量を5,000 μ g/プレートとする供試用量では粘性が高く、試験管への分注およびその後の操作も困難であった。そこでDMSOに懸濁させた後、攪拌機で攪拌しながら供試量をマイクロピペットで採り、試験管へ分注した。被検物質がリン酸緩衝液またはS9 mixに溶解または懸濁するように、その後の操作は速やかに行った。しかし、

すべての用量において、透明性のある固形物がプレート上で確認された。しかし、復帰変異コロニーの計測には影響はなかった。また、試験に供した最高用量の2倍量の試験溶液を軟寒天と共に最少グルコース寒天平板上に重層し、試験結果に影響を与える汚染物のないことを確認した。

TA1535株に対して代謝活性化を行った場合に（以下+S9 mix）、用量設定試験および本試験（表1-1、2）の1、250 μ g/プレートの用量において、1プレートから溶媒対照の1.5倍以上2倍未満の復帰変異コロニーを得た。しかし確認試験（表1-3）の結果、設定した6用量のすべてのプレートが溶媒対照の1.5倍未満の復帰変異コロニー数を示した。

なお、被検物質は試験した用量範囲内では、代謝活性化の有無に関わらず5種類の試験菌株のいずれに対しても生育阻害を示さなかった。

試験に使用した5種類の菌株は、いずれも各菌株の特性を保持しており、陰性対照および陽性対照に対する復帰変異コロニー数もすべての試験で適正な範囲であった。

2. アマシードガム（小核試験）

アマシードガムに関して、あらかじめLD₅₀の検討を行った結果、1500および2000mg/kgにて毒性徴候が認められなかったため、最高用量を2000mg/kgとし、公比2にて3用量（500、1000、2000 mg/kg）を設定した（表2-1）。アマシードガム投与群において、いずれの用量に置いても陰性対照群に対して統計的に有意な小核誘発頻度の上昇は認められなかった。これに対し、陽性対照群（シクロフォスファミド）では、強い小核誘発性が見られた。なお、陽性対照に置いた場合は、強い骨髄抑制のため幼若赤血球数の顕著な現象が認められ、観察細胞数は所定の数に達しなかった。（データは表2-2、3に示す）

3. コメヌカ抽出物（染色体異常試験、小核試

験）

a) 染色体異常試験：

コメヌカ抽出物は白色粉末で、生理食塩水、およびDMSOには懸濁できなかつた。培養液中に直接懸濁しても懸濁は分離、浮遊してしまうため、1%カルボキシメチルセルロース(CMC)に懸濁して調整した。

試験検体処理時から標本作製時まで、すべての用量で、肉眼で確認できる程度の沈殿・浮遊物が観察された。

コメヌカ抽出物の代謝活性化系の存在/非存在下で6時間処理法による染色体異常試験の試験結果と、代謝活性化系非存在下での24、48時間連続処理法の試験結果を表3-1に示す。すべての処理群において最高濃度(5mg/ml)まで試験を実施したが染色体異常の明らかな誘発は認められなかった。また、細胞増殖性を指標とし、細胞毒性を評価したが、すべての用量において細胞毒性は認められなかった。

以上のことから、コメヌカ抽出物は明らかな細胞毒性も、染色体異常誘発性も認められなかった。

b) 小核試験：

小核試験を実施するにあたり、毒性を検討したところ、2000mg/kgにて毒性徴候が認められなかったため、最高用量を2000mg/kgとし、公比2にて3用量（500、1000、2000 mg/kg）を設定した。小核試験においても、いずれの用量でも陰性対照群に対して統計的に有意な小核誘発頻度の上昇は認められなかった。これに対し、陽性対照群（マイトマイシンC）では、強い小核誘発性が見られた。（データは表3-2、3に示す）

4. 食用赤色2号（トランスジェニックマウス遺伝子突然変異試験、小核試験）

これまでの研究で、食用赤色2号（アマランス）の遺伝毒性、および発がん性についてははっきりとした結論はでていない。1987年のIARCで

の再評価においても”inconclusive (結論づけられない)”としている¹³⁾。米国においては1976年にアマランスの食品添加物としての使用を禁じている。最近、津田らはDNA損傷試験の一つであるコメット試験を用いて、アマランスがマウスの大腸、および胃に対してDNA損傷を誘発することを報告している¹⁴⁾。しかしながら、このDNA損傷はラットでは認められないこと、マウスでも連続投与では認められないこと、さらにコメット試験自体が遺伝毒性試験としての評価が十分ではなく、ここで観察されるDNA損傷と発癌性との関係が不明であることなどから、依然としてその遺伝的影響に関しては疑問が残っている。そこで今回我々は、彼らの報告を検証する目的で、アマランスがマウスの大腸に対して遺伝子突然変異を誘発するかどうかを、トランスジェニックマウス(Muta™Mouse)を用いた *in vivo* 遺伝子突然変異試験により検討した。

大腸における *lacZ* および *cII* 遺伝子の変異頻度を解析した結果を表4-1、2、3、4に示す。*lacZ*、*cII*ともに最高用量のみを用いて追加試験を行った。まず、*lacZ* 遺伝子に関しては、一回目の検討においては、多少の用量相関性が認められたものの、コントロール群の変異頻度よりも低かった。コントロール群に置いては1匹のマウスが特に高い変異頻度を示すことが影響して平均の頻度を上げているが、このマウスは再試験においても高い頻度を示したことから、他の臓器でも同じ様に高い頻度を示したことから、発生初期におけるクローナルな変異が影響していると考えられる。これを除外すれば、コントロール群の変異頻度は他の処理群とほぼ等しい。*cII* 遺伝子の変異頻度に関しては、最高用量群において、1.5倍を越える変異頻度の上昇が見られた。再試験においてもこの変異頻度の上昇は再現された。

このわずかな変異頻度の上昇が、生物学的に有意であるかを検討するため、得られた変異体のシーケンス解析を行った。(表4-5)突

然変異の誘発頻度が十分に高くなくても、その被験物質が極めて特徴的な遺伝的影響を与える場合、生じる突然変異にも特徴的パターンが見られることがある。変異頻度の高かった個体にはクローナルな変異が見られ、独立した変異体の数で変異頻度を補正すると、コントロール群との間に差は認められなくなった。最高用量にて得られた変異体のシーケンス解析の結果からも、得られた変異のパターンにコントロール群との差はなかった。このことは、わずかに見られた変異頻度の上昇も、生物学的には有意な結果であるとは言えないことを示している。これに対して、陽性対照であるストレプトゾトシン投与群では、アマランス同様に変異頻度の上昇はあまり大きくなかったが、変異スペクトルは、表5に示したようにCpGサイト以外のGCからATへのトランジション変異が明らかに増加しており、ストレプトゾトシンによる特異的な変異が示唆された。

大腸以外の臓器に関しても、最高用量に関して前胃、腺胃、肝臓、肺について *lacZ* および *cII* 遺伝子の変異頻度を解析したが、いずれの臓器においても、赤色2号処理による変異頻度の上昇は認められなかった(表4-6、4-7)。

最高投与量である、2000mg/kgは、津田らの報告しているコメット試験では十分にDNA損傷を誘発する用量であるが、我々の試験では遺伝子突然変異の誘発は認められなかったことは、アマランスによって生じるDNA損傷が、発がんに至る可能性は極めて低いことを示すものである。

また、小核試験の結果(表4-8)に関しても、アマランス処理による影響は認められなかった。津田等は、アマランスは最高用量

(2000mg/kg)で、骨髄においてもDNA損傷が観察されると報告しているが、大腸での突然変異同様、彼らのデータを指示する結果は得られなかった。

D. 結 論

3種類の既存天然添加物、アグロバクテリウムサクシノグルカン、アマシードガム、コメヌカ抽出物について、遺伝毒性を検討した結果いずれの添加物についても遺伝毒性は認められなかった。

タール系色素である食用赤色2号に関してもマウス大腸等における有意な遺伝子突然変異誘発性は認められなかった。また、マウス骨髄に対する染色体異常誘発性も認められなかった。食用赤色2号は、コメットアッセイによるDNA初期損傷は観察されると報告されているが、それが遺伝子突然変異や、染色体異常として固定される可能性は低いと考えられる。ただし、今回用いた検体は、その精製度が比較的高く、混入する不純物がコメットアッセイにより遺伝子傷害性を起こしたとも考えられるため、その危険性についても今後充分検討する必要があると考えられる。

E. 参考資料、参考文献

- 1) 食品添加物協会監修、既存添加物名簿収載品目リスト注解書、東京、1999.
- 2) 厚生省生活衛生局食品化学課監修、食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針—英訳版つき—、日本食品添加物協会、東京、1996.
- 食品添加物協会監修、既存添加物名簿収載品目リスト注解書、東京、1999.
- 3) 労働省安全衛生部化学物質調査課編、新・微生物を用いる変異原性試験ガイドブック、中央労働災害防止協会、東京、1986
- 4) Ishidate, M., Jr. and S. Odashima
Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells in vitro--a screening for chemical carcinogens. *Mutat. Res.*, **48**, 337 (1977)
- 5) 染色体異常試験データ集、石館基監修 p.363, エル・アイ・シー、東京 (1987)
- 6) Hayashi, M., T. Sofuni and M. Ishidate, Jr.
An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutat. Res.*, **120**, 241-247. (1983)
- 7) Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T and Ishidate, M. Jr. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange coated slides. *Mutat. Res.*, **245**, 245-249 (1990)
- 8) Hayashi, M., Kodama, Y., Awogi, T., Suzuki, T., Asita, A. O. and Sofuni, T. The micronucleus assay using peripheral blood reticulocytes from mitomycin C- and cyclophosphamide-treated rats. *Mutat. Res.*, **278**, 209-213 (1992)
- 9) Suzuki, T., Hayashi, M., Sofuni, T. and Brian C. Myhr The concomitant detection of gene mutation and micronucleus induction by mitomycin C in vivo using lacZ transgenic mice. *Mutat. Res.*, **285**, 219-224 (1993)
- 10) Suzuki, T., M. Itoh, M. Hayashi, Y. Nishikawa, S. Ikezaki, F. Furukawa, M. Takahashi and T. Sofuni Organ variation in the mutagenicity of dimethylnitrosamine in Big Blue mice. *Environ. Mol. Mutagen.*, **28**, 348-353 (1996)
- 11) Kohara, A., Suzuki, T., Honma, M., Oomori, T. Ohwada, T., Hayashi, M., .Dinitropyrenes induce gene mutations in multiple organs of the lambda/lacZ transgenic mouse (MutaTMMouse). *Mutat. Res.* **515**, 73-83 (2002)
- 12) Kohara, A., Suzuki, T., Honma, M., Ohwada, T., Hayashi, M., Mutagenicity of aristolochic acid in the lambda/lacZ transgenic mouse (MutaTMMouse). *Mutat. Res.* **515**, 63-72 (2002)
- 13) IARC. Overall evaluation of carcinogenicity. An updating of IARC monographs volume 1 to 42. Supplement No. 7, P.56, International Agency for Cancer Research, World Health Organization, Geneva.

- 14) Tsuda, S., Murakami, M., Matsusaka, N., Kano, K., Taniguchi, K. and Sasaki, YF DNA Damage Induced by Red Food Dyes Orally Administered to Pregnant and Male Mice. Toxicological Sciences 61, 92-99 (2001)

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし