

厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）
既存添加物の安全性確保上必要な品質問題に関する研究

分担研究報告書

変異原性試験の総括ならびにアオイ花抽出物等の変異原性試験

分担研究者 林 真（国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 部長）
協力研究者 松元郷六（(財)残留農薬研究所 毒性第二部変異原性研究室長）
協力研究者 麻野間正晴（名古屋市衛生研究所 主任研究員）

研究要旨

既存添加物の安全性評価の一環として変異原性試験を実施し、遺伝毒性について検討した。アオイ花抽出物に関する変異原性について検討する予定であったが、被験物質の入手が出来なかったため、ヒキオコシ抽出物に関する変異原性試験（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、およびげっ歯類を用いる小核試験）を実施することとなった。また、サンダラック樹脂に関するほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験を実施した。さらに、木酢液の複数の試料に関して細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。

さらに、本研究事業ではヒメマツタケ抽出物、メバロン酸（以上、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験）、ログウッド色素（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）、グレープフルーツ種子抽出物（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）および没食子酸（げっ歯類を用いる小核試験）について変異原性試験を実施した。一部の試験で弱い陽性結果を示すものもあったが、生体内において問題となるような遺伝毒性とは考えがたく、現時点において早急に対処が必要と考えられるものはなかった。

A. 研究目的

既存添加物の安全性評価の一環として変異原性試験を以下の検体について実施し、遺伝毒性について検討する。ヒキオコシ抽出物に関する変異原性試験（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）およびサンダラック樹脂のほ乳類培

養細胞を用いる染色体異常試験を実施する。また、木酢液の複数の試料に関して細菌を用いる復帰突然変異試験を実施し、製造方法の違いについても検討する。

さらに、他の分担研究者によって実施された、ヒメマツタケ抽出物、メバロン酸（以上、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験）、ログウッド色素（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），グレープフルーツ種子抽出物（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）および没食子酸（げっ歯類を用いる小核試験）の結果を総合的に考察する。なお，詳細に関しては本報告書の別添ならびにそれぞれの分担研究者の報告書を参照されたい。

B. 研究方法

試験に供した検体は全て日本食品添加物協会から提供されたものを用いた。また，試験方法に関しては厚生省生活衛生局食品化学課（現厚生労働省医薬局食品保健部基準課）監修の「食品添加物の指定および使用基準改正に関する指針」(1996)に掲載されている「安全性に関する試験の標準的実施方法」¹⁾に従って行うことを原則とした。

細菌を用いる復帰突然変異試験

1. ヒキオコシ抽出物：ネズミチフス菌 TA98, TA100, TA1535, TA1537 および大腸菌 WP2uvrA/pKM101 の5菌株を用いて，ブレインキュベーション法による試験を実施した。ヒキオコシ抽出物はジメチルスルホキシドに溶解させて用いた。被験物質の適切な用量を設定するために，代謝活性化による場合とよらない場合で用量設定試験を行った。用量設定試験では 5000 µg/プレート を最高用量として公比4で7用量を設定した。試験は用量あたり2枚のプレートを用いた。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50 µl 使用した。

本試験では代謝活性化による場合とよらない場合で 5000 µg/プレート を最高用量とし，公比2で5用量を設定する。

2. 木酢液：9種類の木酢液を試料とし，原液あるいは DMSO による希釈液を試験溶液として試験した。ヒキオコシ抽出物と同様 *Salmonella typhimurium* (TA100 株, TA1535 株, TA98 株, TA1537 株) および *Escherichia coli* (WP2uvrA/pKM101) の5種類の菌株を使用した。ただし供試菌株は試料により異なるため試料毎の供試菌株を表1に示した。試験は「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」¹⁾および「新・微生物を用いる変異原性試験ガイドブック」²⁾に準じ，37 °C，20 分間のブレインキュベーション法を用い，プレート当たり 100 mg を最高用量として試験した。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 50 µl 使用した。

ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

チャイニーズハムスター培養細胞 CHL/IU³⁾ を用いて，「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」¹⁾に従い，短時間処理法と連続処理法による試験を行った。ヒキオコシ抽出物およびサンダラック樹脂はジメチルスルホキシドに溶解させて用いた。短時間処理法では代謝活性化系存在下および非存在下で被験物質を6時間処理し，その18時間後に染色体標本を作製した。ヒキオコシ抽出物の用量は細胞増殖抑制試験の結果に基づき，19.5, 39.1, 78.1, 156 µg/mL (代謝活性化系なし)，および 156, 313, 625, 1250 µg/mL の4用量 (代謝活性化系あり) を設定した。一方，サン

ダラック樹脂は、39.1, 78.1, 156, 313, 625, 1250 µg/mL(代謝活性化系なし)の6用量、および39.1, 78.1, 156 µg/mLの3用量(代謝活性化系あり)を設定した。

連続処理法では代謝活性化系非存在下で被験物質を24~48時間連続処理した後、染色体標本を作製した。ヒキオコシ抽出物の用量は細胞増殖抑制試験の結果に基づき、19.5, 39.1, 78.1, 156 µg/mLの4用量を設定した。一方、サンダラック樹脂は、39.1, 78.1, 156, 313, 625 µg/mL(代謝活性化系なし)の5用量を設定した。なお、用量あたり200個の中期分裂細胞を観察した。

げっ歯類を用いる小核試験

げっ歯類を用いる小核試験に関しても「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」¹⁾に従って実施した。試験には7週齢の雄のCD-1マウスを用いた。ヒキオコシ抽出物は水に懸濁させて用いた。先ず始めに用量設定のための毒性試験を行った。500, 1000, および2000 mg/kgの用量で1群3匹の動物に被験物質溶液を24時間間隔で2回連続経口投与を行った。本試験(小核試験)は、同じく500, 1000, および2000 mg/kgの3用量を設定し、1群5匹の動物に2回連続経口投与を行った。最終投与後24時間目に骨髓塗抹標本を作製し、ギムザ染色を行った。スライド標本はコード化した後、顕微鏡下で動物あたり2000個の多染性赤血球を観察し、小核を有する多染性赤血球の出現頻度を求めた。

その他の遺伝毒性試験のまとめ

その他の遺伝毒性試験結果として、ヒメマツタケ抽出物(ほ乳類培養細胞を用いる

染色体異常試験)、メバロン酸(ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験)、ログウッド色素(細菌を用いる復帰突然変異試験、染色体異常試験、小核試験)、グレープフルーツ種子抽出物(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)、没食子酸(小核試験)およびサンダラック樹脂(ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験)が他の分担研究者により実施された。それらの結果を総合的に考察する。

C. 研究結果

1. ヒキオコシ抽出物

細菌を用いる復帰突然変異試験：用量設定試験の結果、代謝活性化系の有無にかかわらず、すべての用量において被験物質の析出は観察されなかった。また、すべての菌株において生育阻害も観察されなかった。

復帰変異コロニー数に関しては、代謝活性化系の有無にかかわらず、いずれの菌株においても溶媒対照群に比べて2倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験：短時間処理および連続処理のいずれにおいても、被験物質の析出や培地の色の变化などは認められなかった。

現在、スライド標本をすべてコード化し、顕微鏡観察を行っているところであるが、現時点で陽性を示す傾向が認められている。

小核試験：用量設定試験の結果、すべての用量において、試験期間中に死亡した動物は認められず、また、一般症状においても全く異常は認められなかった。

小核出現頻度については、現在、顕微鏡

観察を続けているところであるが、現時点で陽性を示す傾向は認められていない。

2. サンダラック樹脂

ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験：染色体の構造異常は代謝活性化系の存否にかかわらず陰性であった。しかし、48時間連続処理法において被験物質の析出・沈殿が認められるような高用量において数的染色体異常（倍数体）が誘発された。

3. 木酢液

木酢液に関しては、以下の9種類の異なる試料について試験を実施した。

1) 木酢液製品

-S9 mix 条件下で TA100 株および TA1535 株に、+S9 mix 条件下で TA1535 株および WP2uvrA/pKM101 株に対して陽性、それ以外は陰性であった。

2) 濃縮木酢-1

-S9 mix 条件下で TA100 株および TA1535 株に、+S9 mix 条件下で TA1535 株および WP2uvrA/pKM101 株に対して陽性、それ以外は陰性であった。

3) 濃縮木酢-2

-S9 mix 条件下で TA100 株および TA1535 株に、+S9 mix 条件下で TA1535 株および WP2uvrA/pKM101 株に対して陽性、それ以外は陰性であった。

4) 木酢A社蒸留液

S9 mix の有無にかかわらず TA100 株および TA98 株の2種類の菌株に対し陰性であった。

5) 木酢B社蒸留液

S9 mix の有無にかかわらず TA100 株および TA98 株の2種類の菌株に対し陰性であ

った。

6) 木酢C社蒸留液

S9 mix の有無にかかわらず TA100 株に対しては陽性、TA98 株に対しては陰性であった。

7) 木酢A社原液

S9 mix の有無にかかわらず TA100 株に対しては陽性、TA98 株に対しては陰性であった。

8) 木酢B社原液

S9 mix の有無にかかわらず TA100 株に対しては陽性、TA98 株に対しては陰性であった。

9) 木酢C社原液

S9 mix の有無にかかわらず TA100 株に対しては陽性、TA98 株に対しては陰性であった。

4. その他の既存添加物に対する変異原性試験結果を表2にまとめると共に、以下に概説する。

1) ヒメマツタケ抽出物に関しては、チャイニーズハムスター細胞株 CHL/IU を用いた染色体異常試験が実施された。ガイドラインでの限界量である 5mg/ml まで試験されたが、代謝活性化の存否にかかわらず染色体異常誘発性は認められなかった。

2) メバロン酸に関しては、チャイニーズハムスター細胞株 CHL/IU を用いた染色体異常試験が実施された。代謝活性化系非存在下 4mg/ml および存在下の 2.5mg/ml で染色体の構造異常誘発性が認められた。しかし、観察可能な最高用量のみにみられた反応であり、次の用量では染色体異常誘発性は認められなかった。

3) ログウッド色素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，およびげっ歯類を用いる小核試験が実施されている．細菌を用いる復帰突然変異試験では代謝活性化系の存否にかかわらず陰性であった．染色体異常誘発性に関しては *in vitro*, *in vivo* 共に陽性の結果となったが，強いものではなかった．

4) グレープフルーツ種子抽出物に関しては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実施された．細菌を用いる復帰突然変異試験においてかなり低用量まで菌の生育阻害が認められた．検討した結果検体に抗菌作用のある混在物が確認されたため，当該試験の結果は安全性の評価に使用すべきではないと判断した．従って，同一ロットを使用したほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験の結果も評価の対象としないこととした．

5) 没食子酸に関しては，げっ歯類を用いる小核試験が行われており，ガイドラインで示されている限界用量である 2000mg/kg を経口的に 2 回投与した結果，小核誘発性は認められなかった．

D. 考察

ヒキオコシ抽出物に関しては検体の入手が非常に遅れ，現時点において予備試験のみが終了した状況にある．予備試験から結果を予測することは避けるべきであるが，現時点までに得られている本試験の結果から，強い変異原性を示すものではないと考えられる．

サンダラック樹脂はチャイニーズハムスター細胞株 CHL/IU 細胞に対して染色体の

構造異常は誘発しなかったが，連続処理法において被験物質の析出・沈殿が認められる高用量において数的染色体異常（倍数体）の誘発が観察された．なお，サンダラック樹脂に関しては平成 13 年度の厚生労働科学研究費補助金を受けた安全性研究として細菌を用いる復帰突然変異試験とげっ歯類を用いる小核試験が行われており，いずれも陰性の結果であった⁴⁾．今回のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験で染色体の数的異常の誘発が見られたが，総合的に評価すると，*in vitro* において染色体異常誘発性を示すものの，十分高用量まで試験された小核試験が陰性であり，生体にとって特段問題となるものではないと考える．

9 種類の木酢液検体に対し最高用量を 100 mg/プレートとした復帰突然変異試験を行い，7 種類で陽性結果を得た．しかし最大用量を国内外のガイドラインで推奨されている限界用量である 5mg/プレートとした場合，陽性を示した検体は木酢 B 社原液および木酢 C 社原液の 2 試料であった．陽性を示した菌株から木酢液中に含まれる変異原物質は塩基対置換型の変異を引き起こす物質であることが示唆された．

各検体の変異原性比活性の平均値を表 1 に示した．TA100 株に対する比活性は S9 mix の有無にかかわらず木酢 C 社原液が最も高かった (-S9 mix 条件下：270 復帰変異コロニー/mg, +S9 mix 条件下：53 復帰変異コロニー/mg)．木酢 C 社原液を原料とした木酢 C 社蒸留液は蒸留液中で最も高い比活性を示し，原料の変異原活性がその後の製品に影響を与えることが示唆された．

木酢液の変異原性は陽性対照として試験した (2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)ア

クリルアミド (AF-2) および 2-アミノアントラセンの比活性 (それぞれ 5.0×10^7 復帰変異コロニー/mg および 1.2×10^6 復帰変異コロニー/mg) と比較すると非常に弱いものであった。また、代謝活性化の系を導入することにより、変異原性は弱まる傾向を示しており、生体にとって特段問題となるような遺伝毒性作用はほとんど無いものと考えることが出来る。しかし、ガイドライン^リで設定されている限界用量を上回る高用量においては、陽性の結果が得られる試料数が増え、潜在的には変異原性を有するものであろう。従って、実際の使用に際してはそれなりの注意が必要であらう。

ヒメマツタケ抽出物の染色体異常誘発性は認められなかった。なお、ヒメマツタケ抽出物に関しては平成13年度の厚生労働科学研究費補助金を受けた安全性研究として細菌を用いる復帰突然変異試験とげっ歯類を用いる小核試験が行われており、いずれも陰性の結果であった⁴⁾。今回のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験の結果が陰性であったことを総合的に評価すると、現在流通しているヒメマツタケ抽出物に関する遺伝毒性は問題ないものと考えることが出来る。

メバロン酸は、チャイニーズハムスター細胞株 CHL/IU に染色体の構造異常を誘発した。しかし、観察可能な最高用量のみに見られた反応であり、それより低い用量では陰性対照との間に差異はなかった。なお、メバロン酸に関しても平成13年度の厚生労働科学研究費補助金を受けた安全性研究として細菌を用いる復帰突然変異試験とげっ歯類を用いる小核試験が行われており、いずれも陰性の結果であった⁴⁾。今回のほ乳類

培養細胞を用いる染色体異常試験の結果が陽性であったことを総合的に評価すると、*in vitro* において染色体異常誘発性を示すものの、十分高用量まで試験された小核試験が陰性であり、生体にとって特段問題となるものではないと考える。

ログウッド色素はネズミチフス菌および大腸菌に遺伝子突然変異を誘発しなかった。しかし、遺伝毒性他の重要な指標である染色体異常誘発性に関しては *in vitro*、*in vivo* 共に陽性の結果となった。ただし、*in vitro* 試験系においては細胞毒性のため異常の観察が不能になる直前の用量においてのみ見られた反応で、強いものではないと考えられた。また、*in vivo* での小核誘発性に関しても限界用量の 2000mg/kg を 2 回投与群においてのみ統計学的な有意差が観察された。しかし、その出現頻度は 0.36% と低く (通常マウスで観察される陰性対照の上限程度の値)、生物学的意義は低いものと考えられる。

グレープフルーツ種子抽出物に関しては用いた検体の混在物により、細菌の生育阻害が強くてため、当該試験の結果は安全性の評価に使用すべきではないと判断した。従って、同一ロットを使用したほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験の結果は、数的異常の誘発を示唆するものであったが、これも評価の対象とすべきではないものと判断した。

没食子酸は雄の ddY 系マウスに対して十分高用量まで小核誘発性を検討したが、陰性の結果であり、生体内において染色体異常誘発性はないものと判断した。なお、没食子酸に関しては細菌を用いる復帰突然変異試験とほ乳類培養細胞を用いる染色体異

常試験が評価されており⁵⁾、復帰突然変異試験は陰性であったが、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験では陽性の結果が報告されている。今回のげっ歯類を用いる小核試験における陰性結果は、生体内では染色体異常誘発性が発現しないことを示しており、生体にとって特段問題となる遺伝毒性はないものと考えることが出来る。

E. 結論

ヒキオコシ抽出物の細菌を用いる復帰突然変異試験およびげっ歯類を用いる小核試験は陰性で、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験では高用量で弱い陽性であると考えられるが、最終判定は本試験の完了を待つ必要がある。

サンダラック樹脂の哺乳類培養細胞に対する構造的染色体異常誘発性は陰性であったが、被験物質の析出・沈殿が認められるような高用量においては数的染色体異常(倍数体)が誘発された。

木酢液に関しては、9種類の試料について細菌を用いる復帰突然変異試験を行った。非常に高用量で陽性の結果を示すものがあったが、ガイドラインで規定されている5000 mg/plateを最高用量とした場合には2検体のみが陽性の結果となった。

ヒメマツタケ抽出物のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験は陰性であった。

メバロン酸のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験では、高用量で弱い陽性の結果が得られた。

ログウッド色素の細菌を用いる復帰突然変異試験は陰性、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験およびげっ歯類を用いる小核試験では弱い陽性が観察された。

グレープフルーツ種子抽出物については、細菌を用いる復帰突然変異試験とほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験が行われたが、検体の混在物に問題があり、評価不能となった。

没食子酸のげっ歯類を用いる小核試験は陰性であった。

以上、本年度検討した既存添加物の中には弱い遺伝毒性を示すものも認められたが、生体内で強い影響が想定されるものはなく、現時点において早急に対処しなければならないようなものはなかった。

F. 引用文献

- 1) 食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針，日本食品添加物協会，(監修)厚生省生活衛生局食品化学課(1996年)
- 2) 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
- 3) Ishidate, M. Jr. and Odashima, S., Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cell *in vitro*: a screening for chemical carcinogens. *Mutation Res.*, 48: 337-354 (1977)
- 4) 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年4月)
- 5) 林 真，松井道子，石井健二，川崎通昭，厚生省等による食品添加物の変異原性評価データシート(昭和54年度～平成10年度分)，環境変異原研究，22，27-44(2000)

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hamada, S., K. Nakajima, T. Serikawa and M. Hayashi (2003) The effect of aging on the results of the rat micronucleus assay, *Mutagenesis*, 18, 273-275
- 2) Hamada, S., K. Nakajima, C. Namiki, T. Serikawa, and M. Hayashi (2003) Sex differences in the chemical induction of micronuclei in the rat, *Environ. Mutagen. Res.*, 25, 33-37.
- 3) Kirkland, D.J., M. Hayashi, J.T. MacGregor, L. Müller, L.M. Schechtman, and T. Sofuni (2003) Summary of major conclusions—the 3rd International Workshop on Genotoxicity Testing—, *Mutat. Res.*, 540, 123-125.
- 4) Müller, L., D. Blakey, K.L. Dearfield, S. Galloway, P. Guzzie, M. Hayashi, P. Kasper, D. Kirkland, J.T. MacGregor, J.M. Parry, L. Schechtman, A. Smith, N. Tanaka, D. Tweats, and H. Yamasaki (2003) Strategy for genotoxicity testing and stratification of genotoxicity test results—report on initial activities of the IWGT Expert Group, *Mutat. Res.*, 540, 177-181.

2. 学会発表

- 1) M. Honma, M. Izumi, M. Sakuraba, S.

Tadokoro, H. Sakamoto, W. Wang, F. Yatagai, and M. Hayashi: Deletion, rearrangement, and gene conversion; the genetic consequences of chromosomal double strand breaks in human cells. EEMS, Aberdeen, 2003.

- 2) M. Hayashi: Advantages and limitations of micronucleus assay- validation studies on in vivo micronucleus assay using other than haemopoietic cells-. 5th International Symposium on Chromosomal aberrations, Essen, 2003.
- 3) M. Hayashi: Plenary lecture—In vivo micronucleus assay: historical review and current improvement. JEMS-KEMS Joint Symposium, Seoul, 2003.
- 4) M. Hayashi: Some topics on risk assessment of carcinogenic chemicals- Mutagenicity testing-. 第30回日本トキシコロジー学会, 神奈川, 2003.
- 5) 林 真: 小核試験. 第17回日本動物実験代替法学会, 神奈川, 2003.

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

表1 結果の一覧表

試料名	試験に供した 用量範囲 (mg/プレート)	溶媒	突然変異誘発性											
			TA100		TA1535		WP2uvrA/pKM101		TA98		TA1537			
			-S9 mix	+S9 mix	-S9 mix	+S9 mix	-S9 mix	+S9 mix	-S9 mix	+S9 mix	-S9 mix	+S9 mix		
木酢液製品	0.02 ~ 100	DMSO	(+) 6.2*	(+) 0.67	(+) 0.68	-	(+) 2.7	-	-	-	-	-	-	-
濃縮木酢-1	0.02 ~ 100	DMSO	(+) 7.1	(+) 0.38	(+) 0.68	-	(+) 3.4	-	-	-	-	-	-	-
濃縮木酢-2	0.02 ~ 100	DMSO	(+) 3.4	(+) 0.22	(+) 0.42	-	(+) 2.2	-	-	-	-	-	-	-
木酢A社蒸留液	0.02 ~ 100	DMSO	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
木酢B社蒸留液	0.02 ~ 100	DMSO	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
木酢C社蒸留液	0.02 ~ 100	DMSO	(+) 7.8	(+) 3.6	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
木酢A社原液	0.02 ~ 100	DMSO	(+) 40	(+) 7.8	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
木酢B社原液	0.02 ~ 100	DMSO	+ 240	+ 40	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
木酢C社原液	0.02 ~ 100	DMSO	+ 270	+ 53	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

+ : 陽性 (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)
 (+) : ガイドラインでの限界用量である5mg/plate以上の用量のみで2倍以上の復帰変異コロニーを誘発

- : 陰性 (上記以外のもの)

/ : 未試験

DMSO : ジメチルスルホキシド

*比活性 = $\frac{[\text{当該用量におけるプレート当たりの復帰変異コロニー数}] - [\text{陰性対照の復帰変異コロニー数}]}{[\text{当該用量 (mg/プレート)}]}$

表2 今回検討した既存添加物の遺伝毒性に関する試験結果のまとめ

検体	試験系	使用菌株、細胞、動物	試験用量	結果		分担研究者
				-S9	+S9	
ヒキオコシ抽出物	細菌を用いる復帰突然変異試験	TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2uvrA/pKM101	1.2-5000 μ g/plate	陰性(未)	陰性(未)	林真 協力:松元郷六
ヒキオコシ抽出物	ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験	CHL/1U	-S9:19.5-156 μ g/ml +S9:156-1250 μ g/ml 24h:19.5-156 μ g/ml	陽性(未)	陽性(未)	林真 協力:松元郷六
ヒキオコシ抽出物	げっ歯類を用いる小核試験	CD-1雄マウス, 7wk	500, 1000, 2000 \times 2 mg/kg, po	陰性(未)	陰性(未)	林真 協力:松元郷六
サンダラック樹脂	ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験	CHL/1U	-S9:39.1-1250 μ g/ml +S9:39.1-156 μ g/ml 24, 48h:39.1-625 μ g/ml	数的異常	陰性	林真 協力:松元郷六
木酢液製品	細菌を用いる復帰突然変異試験	TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2uvrA/pKM101	0.02-100mg/plate	(陽性)	(陽性)	林真 協力:麻野間正晴
濃縮木酢-1	細菌を用いる復帰突然変異試験	TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2uvrA/pKM101	0.02-100mg/plate	(陽性)	(陽性)	林真 協力:麻野間正晴
濃縮木酢-2	細菌を用いる復帰突然変異試験	TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2uvrA/pKM101	0.02-100mg/plate	(陽性)	(陽性)	林真 協力:麻野間正晴
木酢A社蒸留液	細菌を用いる復帰突然変異試験	TA98, TA100	0.02-100mg/plate	陰性	陰性	林真 協力:麻野間正晴
木酢B社蒸留液	細菌を用いる復帰突然変異試験	TA98, TA100	0.02-100mg/plate	陰性	陰性	林真 協力:麻野間正晴
木酢C社蒸留液	細菌を用いる復帰突然変異試験	TA98, TA100	0.02-100mg/plate	(陽性)	(陽性)	林真 協力:麻野間正晴
木酢A社原液	細菌を用いる復帰突然変異試験	TA98, TA100	0.02-100mg/plate	(陽性)	(陽性)	林真 協力:麻野間正晴
木酢B社原液	細菌を用いる復帰突然変異試験	TA98, TA100	0.02-100mg/plate	陽性	陽性	林真 協力:麻野間正晴
木酢C社原液	細菌を用いる復帰突然変異試験	TA98, TA100	0.02-100mg/plate	陽性	陽性	林真 協力:麻野間正晴

(未):結果が未確定

(陽性):ガイドラインでの限界用量である5mg/plate以上で2倍以上の復帰変異コロニーを誘発

検体	試験系	使用菌株、細胞、動物	試験用量	結果		分担研究者
				-S9	+S9 連続処理	
ヒメマツタケ抽出物	ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験	CHL/1U	±S9:1.25, 2.5, 5mg/ml 24h:1.25, 2.5, 5mg/ml	陰性	陰性	中嶋 圓
メバロン酸	ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験	CHL/1U	-S9:3, 3.5, 4mg/ml +S9:0.625, 1.25, 2.5mg/ml	陽性	陽性	中嶋 圓
ログウツド色素	細菌を用いる復帰突然変異試験	TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2uvrA	最高用量5000 µg/plate	陰性	陰性	中嶋 圓
ログウツド色素	ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験	CHL/1U	-S9:0.087, 0.11, 0.14, 0.17mg/ml	陽性	陽性	中嶋 圓
ログウツド色素	げっ歯類を用いる小核試験	BDF1雄マウス, 9wk	500, 1000, 2000 × 2 mg/kg, po	陽性		中嶋 圓
グレープフルーツ種子抽出物	細菌を用いる復帰突然変異試験	TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2uvrA		不能	不能	中嶋 圓
グレープフルーツ種子抽出物	ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験	CHL/1U		不能	不能	浅倉眞澄
没食子酸	げっ歯類を用いる小核試験	ddy雄マウス, 8wk	500, 1000, 2000 × 2 mg/kg, po	陰性		宮澤眞紀

別添

厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）

協力研究報告書

ヒキオコシ抽出物の細菌を用いる復帰突然変異試験

協力研究者 松元郷六（財）残留農薬研究所 毒性第二部変異原性研究室長

研究要旨

ヒキオコシ抽出物の細菌における復帰突然変異誘発性の有無を検索した。5000 µg/プレートを最高用量にして用量設定試験を行った。その結果、いずれの菌株においても生育阻害は観察されなかった。また、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての用量において溶媒対照群に比べて2倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。本試験は完了していないが、ヒキオコシ抽出物の細菌に対する復帰突然変異原性は陰性であると推定される。

A. 研究目的

既存天然添加物であるヒキオコシ抽出物の細菌における復帰突然変異誘発性の有無を検索した。

B. 研究方法

試験方法はAmesら¹⁾および平成8年3月22日付け、衛化第29号厚生省生活衛生局通知「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針について」の「安全性試験に関する標準的実施方法（微生物を用いる復帰突然変異試験）」の基準²⁾に従い、以下の条件で実施した。

1. 被験物質

日本食品添加物協会から提供されたヒキオコシ抽出物を試験に用いた。受領した被験物質は室温で保管した。

2. 試験菌株

試験菌株はネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA98, TA100, TA1535, TA1537 及び大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2uvrA/pKM101 の5菌株を用いた。テスト菌株は以下の遺伝的特性およびその他の諸性質について検査を行い、これらの特性を有することを確認した。

- ① ヒスチジン要求性（ネズミチフス菌）
トリプトファン要求性（大腸菌）
- ② 紫外線感受性
- ③ ネズミチフス菌におけるクリスタルバイオレット感受性
- ④ TA100, TA98 株および WP2uvrA/pKM101 株におけるアンピシリン耐性
- ⑤ 自然突然変異体数
- ⑥ 既知変異原物質に対する反応性

以上の特性を保有している菌株を分注し、-80°Cで凍結保存した。試験開始時には保存菌液を解凍し、ニュートリエントブロス

液体培地 (Oxoid nutrient broth No. 2, Oxoid Ltd., Lot No. 218041) に接種し、37°Cで 8 時間振盪培養した。分光光度計で吸光度 (OD₆₆₀) を測定し、1×10⁹ 生菌数/ml 以上の菌懸濁液であることを確認した。

3. S9 Mix の調製

S9 はフェノバルビタール及び 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された市販品 (キッコーマン株式会社, Lot No. RAA-496) を購入して用いた。

S9 mix は、S9 にコファクター (オリエンタル酵母工業株式会社, Lot No. 999305) を加えて、4 mM NADPH, 4 mM NADH, 5 mM グルコース-6-リン酸, 8 mM MgCl₂, 33 mM KCl, 100 mM ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH7.4), 10% S9 の組成に調製した。

4. 被験物質溶液の調製

被験物質は水よりもジメチルスルホキシドに易溶であるため、DMSO (東京化成工業株式会社, ロット番号: FGK01) に溶解して用いた。最高濃度 (50 mg/mL) の溶液を調製後、フィルター滅菌し、段階希釈により各濃度の溶液を調製した。

5. 陰性対照および陽性対照

陰性対照 (溶媒対照) 物質として DMSO を用いた。また、陽性対照物質として以下の既知変異原物質を用いた。

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (和光純薬工業株式会社)

2-AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬

工業株式会社)

NaN₃ : アジ化ナトリウム (和光純薬工業株式会社)

9-AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩 (Aldrich Chemical Co., Inc.)

AF-2, 9-AA および 2-AA は DMSO に、NaN₃ は滅菌水に溶解させて用いた。

6. 用量設定試験

被験物質の適切な用量を設定するために、代謝活性化による場合とよらない場合で用量設定試験を行った。用量設定試験では、毒性試験指針で定められた最高用量である 5000 µg/プレート を最高用量として、公比 4 で 7 用量 (1.2, 4.9, 19.5, 78.1, 313, 1250, 5000 µg/プレート) を設定した。試験は被験物質処理群、溶媒対照群および陽性対照群のすべての用量について 2 枚のプレートで実施した。

7. 本試験

本試験は代謝活性化による場合とよらない場合で行う。用量は、用量設定試験の結果から判断して、1250 または 5000 µg/プレートを最高用量とし、公比 2 で 5 用量を設定する。本試験は被験物質処理群、溶媒対照群および陽性対照群のすべての用量について 2 枚のプレートで実施する。

8. 処理方法

ブレインキュベーション法を実施した³⁾。代謝活性化によらない場合は滅菌小試験管に 100 mM ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 ml, 前培養した菌懸濁液 0.1 ml および被験物質溶液 0.1 ml を分注し、37°C

で20分間振盪した。一方、代謝活性化による場合はS9 Mix 0.5 ml, 菌懸濁液 0.1 ml および被験物質溶液 0.1 ml を分注し、37°C で20分間振盪した。いずれも45°Cで保温したアミノ酸添加軟寒天液2 ml を加え、良く混合した後、最少グルコース寒天平板培地（クリメディア AM-N 培地，オリエンタル酵母工業株式会社）に広げた。37°Cで48時間培養後，コロニーアナライザー（システムサイエンス株式会社）を用いて復帰変異コロニー数を計測した。同時に，被験物質の析出を肉眼で観察し，菌に対する生育阻害を実体顕微鏡下で観察した。

9. 判定基準

次の3つの条件が満たされた場合，最終的に「陽性」と判定した：①復帰変異コロニー数が陰性対照値の2倍以上に増加した。②その増加に用量相関性が見られた。③用量設定試験と本試験の結果に再現性が見られた。

一方，上記の条件が満たされない場合は「陰性」と判定した。

C. 研究結果

1. 用量設定試験

用量設定試験の結果を表1に示した。代謝活性化系の有無にかかわらず，すべての用量において被験物質の析出は観察されなかった。

代謝活性化によらない場合の TA1537, TA98, および TA1537 株で，1250 µg/プレート以上の用量に生育阻害が観察された。その他の菌株・用量では生育阻害は観察されなかった。

復帰変異コロニー数に関しては，代謝活

性化によらない場合の WP2 *uvrA*/pKM101 株で，最高用量群でやや増加傾向が認められたが，代謝活性化系の有無にかかわらず，いずれの菌株においても溶媒対照群に比べて2倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

2. 本試験

現時点で本試験は完了していない。実施後，復帰変異コロニー数の結果を表にまとめて示す。

D. 考察

復帰突然変異試験において，通常，用量設定試験と本試験の結果が大きく異なることは少ない。用量設定試験の結果，使用した5菌株のすべてにおいて，復帰変異コロニー数の明らかな増加が認められなかったことから，本試験でも同様な結果が期待される。よって，ヒキオコシ抽出物は少なくとも高い変異原性を示す物質ではないと推定される。

E. 結論

用量設定試験を終えた段階で，ヒキオコシ抽出物の細菌に対する復帰突然変異原性は陰性であると推定されるが，最終的な結論は本試験の結果を待たなければならない。

F. 引用文献

- 1) Ames, B.N., J. McCann and E. Yamasaki (1975): Method for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian microsome mutagenicity test, *Mutation Res.*, 31, 347-364.

2) 厚生省生活衛生局食品化学課監修
(1996)：食品添加物の指定及び使用基
準改正に関する指針、日本食品添加物協
会

3) Matsushima, T., T. Sugimura, M.
Nagao, T. Yahagi, A. Shirai and M.
Sawamura, Factors Modulating
Mutagenicity in Microbial Tests, in:
K.H. Norpoth and R.C. Garner (Eds.),
Short-term Test Systems for Detecting
Carcinogens. Springer-Verlag, pp.
273-285, 1980.

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

表 1

試 験 結 果 表 (用量設定試験)

被験物質の名称：ヒキオコシ抽出物

試験実施期間		2004年3月9日より2004年3月11日										
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg /プレート)	復 帰 変 異 数						コロニー数/プレート				
		塩 基 対 置 換 型						フ レ ー ム シ フ ト 型				
		TA100		TA1535		WP2 <i>uvrA</i> /pKM101		TA98		TA1537		
- S9 mix	溶媒対照 (滅菌水)	115	97	5	7	83	78	13	14	7	12	
		(106)		(6)		(81)		(14)		(10)		
	1.2	88	91	8	6	91	101	19	21	7	14	
		(90)		(7)		(96)		(20)		(11)		
	4.9	85	110	8	7	95	80	17	20	4	3	
		(98)		(8)		(88)		(19)		(4)		
	19.5	88	104	6	5	109	102	15	13	6	5	
		(96)		(6)		(106)		(14)		(6)		
78.1	109	96	7	11	98	77	13	13	7	6		
	(103)		(9)		(88)		(13)		(7)			
313	103	91	5	6	73	100	14	13	6	4		
	(97)		(6)		(87)		(14)		(5)			
1250	101	100	5*	8*	94	121	12*	15*	7*	5*		
	(101)		(7)		(108)		(14)		(6)			
5000	122	122	5*	7*	130	133	15*	14*	3*	4*		
	(122)		(6)		(132)		(15)		(4)			
+ S9 mix	溶媒対照 (滅菌水)	109	98	12	8	157	144	20	13	13	9	
		(104)		(10)		(151)		(17)		(11)		
	1.2	107	114	5	5	158	104	17	20	13	6	
		(111)		(5)		(131)		(19)		(10)		
	4.9	102	97	8	10	142	143	23	19	4	13	
		(100)		(9)		(143)		(21)		(9)		
	19.5	104	97	10	11	139	135	16	22	11	10	
		(101)		(11)		(137)		(19)		(11)		
78.1	98	124	5	6	122	140	23	23	7	13		
	(111)		(6)		(131)		(23)		(10)			
313	133	114	11	7	133	151	15	19	6	14		
	(124)		(9)		(142)		(17)		(10)			
1250	127	120	6	7	151	148	18	28	13	10		
	(124)		(7)		(150)		(23)		(12)			
5000	128	117	7	6	175	149	19	20	10	11		
	(123)		(7)		(162)		(20)		(11)			
陽性対照	S9 mixを必要としないもの	名称	AF2		NaN ₃		AF2		AF2		9AA	
		用量 (μg /プレート)	0.01		0.5		0.005		0.1		80	
		コロニー数/プレート	433	511	406	404	971	1032	472	499	427	352
			(472)		(405)		(1002)		(486)		(390)	
陰性対照	S9 mixを必要とするもの	名称	2AA		2AA		2AA		2AA		2AA	
		用量 (μg /プレート)	1		2		2		0.5		2	
		コロニー数/プレート	709	816	116	132	606	686	242	248	80	82
			(763)		(124)		(646)		(245)		(81)	

() 内は各プレートのコロニー数の平均値

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

NaN₃: Sodium azide

9AA: 9-Aminoacridine

2AA: 2-Aminoanthracene

*: 菌株の生育阻害を認める

別添

厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）
協力研究報告書
ヒキオコシ抽出物のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

協力研究者 松元郷六（財）残留農業研究所 毒性第二部変異原性研究室長

研究要旨

ヒキオコシ抽出物の哺乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性を検討した。細胞増殖抑制試験の結果に基づき、染色体異常試験は 156 µg/mL または 1250 µg/mL を最高用量として実施した。現在、染色体標本を観察中であるが、現時点で陽性を示す傾向が認められている。

A. 研究目的

既存天然添加物であるヒキオコシ抽出物の哺乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性の有無を検索した。

B. 研究方法

試験方法は Ishidate ら¹⁾および平成 8 年 3 月 22 日付け、衛化第 29 号厚生省生活衛生局通知「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針について」の「安全性試験に関する標準的実施方法（哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験）」の基準²⁾に従い、以下の条件で実施した。

1. 被験物質

日本食品添加物協会から提供されたヒキオコシ抽出物を試験に用いた。受領した被験物質は室温で保管した。

2. 細胞

チャイニーズハムスター肺由来の細胞株 CHL³⁾を用いた。供試細胞は、37°C、5%二酸化炭素濃度を維持する炭酸ガスインキュ

ベーターで組織培養用ファルコン 10 cm シャーレを用いて培養した。培地は、新生仔牛血清（Gibco BRL）10%を含む MEM 培地（Gibco BRL）に、ペニシリン-ストربتマイシン（100 IU/mL, 100µg/mL, Gibco BRL）、L-グルタミン（2 mM, Gibco BRL）を添加したものをを用いた。

3. 被験物質溶液の調製

溶解性検査を行ったところ、被験物質は水への溶解性は低く、懸濁状態となった。それに対してジメチルスルホキシド（DMSO、東京化成工業株式会社）には溶解したので、DMSO を溶媒として用いた。被験物質溶液添加後の DMSO の培地中の濃度は 1%以下であった。

4. 陽性対照物質

非代謝活性化系における陽性対照物質マイトマイシン C（MMC、協和醗酵工業株式会社）は生理食塩水に溶解させ、代謝活性化系におけるベンツ(a)ピレン（B(a)P、和光純薬工業株式会社）は DMSO に溶解さ

せた。

5. S9 Mix の調製

フェノバルビタールと 5,6-ベンゾフラボンとを投与されたラット肝臓ホモジネート 9000×g 上清分画 (S9, Lot No. RAA-491, キッコーマン株式会社) を用いた。冷凍保存 (-80°C) された S9 を試験直前に解凍し、直ちにコファクター (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社またはオリエンタル酵母工業株式会社) を加えて S9 Mix を調製した。S9 Mix の組成は、次の通りであった: 8 mM 塩化マグネシウム, 33 mM 塩化カリウム, 5 mM グルコース・6-リン酸, 4 mM NADH, 4 mM NADPH, 100 mM ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4), 30% S9。

6. 細胞増殖抑制試験

被験物質溶液の調製可能な最高濃度は 250 µg/mL であった。よって、細胞増殖抑制試験は 2500 µg/mL を最高用量とし、公比 2 で 9 用量を設定した。陰性 (溶媒) 対照群には DMSO のみを 1% 添加した。試験は各用量あたり 2 枚のプレートを用いた。

細胞を 1×10^5 個/シャーレの割合で組織培養用 6 cm シャーレに播種し、48 時間培養した。短時間処理法の場合、新鮮な培地または S9 Mix を含む培地 (新鮮な培地: S9 Mix = 5 : 1, 培地中の S9 量は 5%) と交換した後、被験物質溶液を添加した。6 時間後、新鮮な培地に交換してさらに 18 時間培養した。

連続処理法の場合、短時間処理法と同様の条件で CHL 細胞を播種した。48 時間後、被験物質溶液を添加し、24 時間連続処理した。

各処理法とも培養終了後に培地を捨て、エタノールで 5 分間固定し、5% ギムザ液 (メルク社製ギムザ液を pH 6.8 リン酸緩衝液で希釈) にて 30 分間 (室温) 染色した。染色後、単層培養細胞密度計 (オリンパス光学株式会社) を用いて細胞密度を計測し、溶媒対照群に対する細胞増殖率を求めた。

7. 染色体異常試験

短時間処理法:

細胞を 3×10^5 個/シャーレの割合で組織培養用 10 cm シャーレに播種した。48 時間後、新鮮な培地または S9 Mix を含む培地 (新鮮な培地: S9 Mix = 5 : 1, 培地中の S9 量は 5%) と交換し、被験物質溶液を添加した。用量は細胞増殖抑制試験の結果に基づき、19.5, 39.1, 78.1, 156 µg/mL (非代謝活性化系) および 156, 313, 625, 1250 µg/mL (代謝活性化系) に設定した。また、陽性対照群には MMC (最終濃度 0.1 µg/mL, 非代謝活性化系) および B(a)P (最終濃度 40 µg/mL, 代謝活性化系) を処理した。陰性対照群には DMSO のみを 1% 添加した。

被験物質または対照物質添加 6 時間後、新鮮な培地に交換し、さらに 18 時間培養した後、染色体標本を作製した。なお、試験は各処理用量あたり 2 枚のプレートを用いて行った。

連続処理法:

短時間処理の場合と同様、細胞を 3×10^5 個/シャーレの割合で 10 cm シャーレに播種した。48 時間後、被験物質溶液を添加した。用量は、細胞増殖抑制試験の結果に基づき、19.5, 39.1, 78.1, 156 µg/mL に設定した。また、陽性対照群には MMC (最終濃

度 0.1 µg/mL) を処理し、陰性対照群には DMSO のみを 1% 添加した。すべて処理後 24 時間目に染色体標本を作製した。なお、試験は各処理用量あたり 2 枚のプレートをを用いた。

8. 染色体標本の作製および染色

標本作製の 2 時間前にコルセミド (和光純薬工業株式会社) を最終濃度 0.2 µg/mL で培地中に添加した。細胞は 0.075M 塩化カリウム水溶液で低張処理を行った後、カルノア液 (メタノール : 酢酸 = 3 : 1) で固定した。各プレートあたり 2 枚のスライドグラスに滴下し、空気乾燥させた。作製した染色体標本は、暗号化したコード番号を付し、2% ギムザ液で 15 分間 (室温) 染色した。

9. 染色体異常の分析

染色体構造異常については、各プレートあたり 100 個、用量あたり 200 個の中期分裂細胞を顕微鏡観察した。同時に倍数体 (染色体数 37 以上) の出現数を記録した。

なお、ギャップの判定基準として、「非染色性部分のうち、その長さが染色分体幅より短く、染色体中軸線がずれていないもの」とした。

C. 研究結果

1. 細胞増殖抑制試験

細胞増殖抑制試験の結果を表 1 に示した。さらに用量と細胞増殖率との関係を図 1 に示した。

短時間処理法および連続処理法のいずれの場合でも、被験物質の析出や培地の色の変化などは認められなかった。

短時間処理の代謝活性化による場合の毒性は、代謝活性化によらない場合よりも大きく低下した。毒性を示す含有物質が代謝・分解されて、毒性の低いものに変化したことが窺える。代謝活性化による場合の 9.8~156 µg/mL で細胞増殖率に用量相関性が認められなかったが、総じて細胞毒性がほとんどなかったことを意味しているものと考えられた。

短時間処理法および連続処理法で明確に 50% 以上の細胞増殖抑制を示した用量はそれぞれ、156 µg/mL 以上 (短時間処理, -S9 Mix), 1250 µg/mL 以上 (短時間処理, +S9 Mix), 156 µg/mL 以上 (連続処理) であった。よって、上記の用量を染色体異常試験の最高用量に設定し、公比 2 で 4 用量を設けた。

2. 染色体異常試験

短時間処理および連続処理のいずれの場合でも、被験物質の析出や培地の色の変化などは認められなかった。標本作製時、短時間処理法と連続処理法の最高用量群では回収された細胞が少なく、かなりの細胞毒性があった。

現在、染色体標本を観察中であるが、現時点で陽性を示す傾向が認められている。

D. 考察

スライド標本全体の約 7 割の観察を終えた段階で、染色体異常出現頻度が 10% を超える標本が幾つかあったことから、ヒキオコシ抽出物処理群にも染色体異常が誘発されているものと推測される。しかし、細胞毒性の高い標本 (分裂細胞数が少なく、核の形が異常な標本) においてのみ染色体異常が観察さ

れているため、最高用量群に限って染色体異常が誘発されている可能性が高く、遺伝毒性としては高いものではないと考えられる。

総合的な変異原性の判定は、他の変異原性試験（復帰突然変異試験や小核試験）の結果を考慮して行う必要がある。

E. 結論

現段階で、ヒキオコシ抽出物の哺乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性は「陽性」であると推定されるが、最終的な結論はすべての標本観察が終了するまで待たなければならない。

F. 引用文献

- 1) Ishidate, M. Jr. and Odashima, S., Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cell *in vitro* : a screening for chemical carcinogens. *Mutation Res.*, 48 : 337-354 (1977)
- 2) 食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針, (監修) 厚生省, 衛化第 29 号 (平成 8 年 3 月 22 日)
- 3) Koyama, H. et al., A new cell derived from newborn Chinese hamster lung tissue. *Gann*, 61 : 161-167 (1970)

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