

表1. 細胞増殖抑制試験結果

被験物質名: ヒキオコシ抽出物

代謝活性化法によらない場合 (6-18 h)		代謝活性化法による場合 (6-18 h)		(24-0 h) 処理による場合	
用量 (μg/mL)	細胞増殖率 (%)	用量 (μg/mL)	細胞増殖率 (%)	用量 (μg/mL)	細胞増殖率 (%)
溶媒対照 (DMSO)	100	溶媒対照 (DMSO)	100	溶媒対照 (DMSO)	100
9.8	94	9.8	114	9.8	92
19.5	96	19.5	101	19.5	88
39.1	70	39.1	88	39.1	75
78.1	53	78.1	118	78.1	48
156	23	156	135	156	36
313	5	313	111	313	22
625	5	625	114	625	21
1250	3	1250	32	1250	10
2500	5	2500	13	2500	13

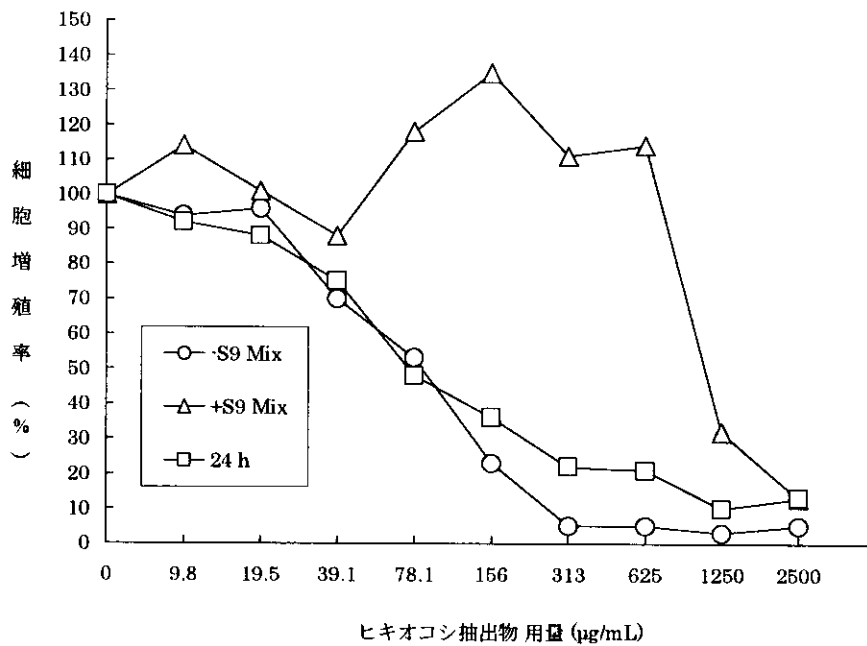


図1 用量と細胞増殖率

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げっ歯類を用いる小核試験

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マウス骨髄における小核誘発性の有無を検索した。用量設定試験の結果より、本試験は 500, 1000 および 2000 mg/kg/day の 3 用量を設定し、24 時間間隔で 2 回の強制経口投与を行い、最終投与後 24 時間目に骨髄塗抹標本を作製した。現在、塗抹標本を顕微鏡にて観察中であるが、現時点で陽性を示す傾向は認められていない。

A. 研究目的

既存天然添加物であるヒキオコシ抽出物のマウス骨髄における小核誘発性の有無を検索した。

B. 研究方法

試験方法は Schmid¹⁾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（げっ歯類を用いる小核試験）」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. 使用動物

SPF の ICR 系 (Crj:CD-1) の雄マウス

を日本チャールス・リバー株式会社厚木飼育センターより購入した。入荷後 8 日間の馴化期間を設け、7 週齢で試験に供した。毒性試験および小核試験における被験物質投与開始日（投与 1 日目）のマウスの平均体重はそれぞれ 34.1g および 35.7g だった。

3. 飼育条件

動物は以下の環境に設定された動物飼育室（動物室115）で飼育した。

温度： 22±3℃

湿度： 50±20%

換気回数： 10回以上/時間（オールフレッシュエアー方式）

照明時間：12時間/日（午前7時点灯、午後7時消灯）

金網床アルミニウム製ケージ（215W×330D×180H mm）に3または5匹の動物を収容した。各ケージはステンレス鋼製可動ラックに収容した。

動物の群分けは入荷時に動物を無作為に

各ケージに分配することで行った。ただし、投与開始日の各個体の体重が、平均体重の $\pm 20\%$ を超えないことを確認して用いた。ケージ内での各個体の識別は、ピクリン酸飽和70%エタノール溶液を用いて被毛の一部を染色することで行った。

供試動物には、保証飼料であるMF固型（オリエンタル酵母工業株式会社）を自由に摂取させた。また、急速濾過・活性炭吸着装置と次亜塩素酸ナトリウムにより浄化・殺菌した井戸水を、プラスチック製給水びんを用いて自由に摂取させた。

4. 溶媒および被験物質溶液の調製

被験物質は、水に均一に懸濁できることから、媒体として純水を用いた。被験物質溶液は純度換算を行わず、投与の直前に毎回調製した。被験物質溶液の外観は緑色懸濁液体であった。

5. 陽性対照物質溶液の調製

マイトマイシン注用（2 mg カ価マイトマイシン C/バイアル, Lot No. 416ACG, 協和醗酵工業株式会社）に純水を加えて溶解させ、1.0 mg/ml のマイトマイシン C 溶液を投与直前に調製した。

6. 投与方法

被験物質投与群および陰性対照群は 10 mL/kg の容量で胃ゾンデを用いて 2 回（24 時間間隔）の強制経口投与を行った。陽性対照群も 10 mL/kg の容量で胃ゾンデを用いて 1 回の強制経口投与を行った。個々の動物に対する投与容量は、投与 1 日目の体重から算出した。なお、投与前後、それぞれ約 3 時間の絶食を行った。

7. 毒性試験

供試動物の被験物質 2 回連続投与に対する最大耐量を求めるため毒性試験を行った。被験物質は 500, 1000, および 2000 mg/kg/day の 3 用量を設定した。用量あたり 3 匹の動物に投与し、2 回投与後 24 時間までの一般状態の観察を行った。

8. 小核試験

毒性試験の結果に基づき、投与用量は 500, 1000 および 2000 mg/kg/day の 3 用量を設定した。供試動物数は 1 群 5 匹の動物を用いた。陰性対照群および陽性対照群を設定した。陰性対照群には純水を強制経口投与した。陽性対照群はマイトマイシン C を 10 mg/kg の用量で単回強制経口投与した。

被験物質投与群および陰性対照群からの骨髓採取は、2 回目投与終了から 24 時間後に行った。陽性対照群からの骨髓採取は投与 24 時間後に行った。

9. 小核標本の作製

頸椎脱臼で動物を安楽死させ、両側大腿骨を摘出した。摘出した大腿骨の一端からウシ胎仔血清を注入し、骨髓細胞を遠沈管へ洗い出した。骨髓細胞浮遊液を遠心分離し、余分の血清を捨てた。遠沈管に残った少量の血清に細胞を再浮遊させ、骨髓細胞浮遊液の小滴をピペットでスライドグラスに取り、カバーグラスを用いて細胞を均等に塗抹した。標本には暗号化したコード番号を記載した。標本を室温で十分に空気乾燥させた後、メタノールで 5 分間固定し、3% ギムザ液（メルク社製ギムザ溶液を pH6.8 リン酸緩衝液で希釈）で 30 分間、室

温で染色した³⁾。

10. 小核標本の観察

1 動物につき 1 枚の塗抹標本について、光学顕微鏡下 1000 倍にて赤血球の観察を行った。小核を有する多染性赤血球の出現頻度を求めるため多染性赤血球を 2000 個観察した。また、多染性赤血球の割合を求めるため、赤血球を多染性と正染性に区別しながら 1000 個観察した。

11. 統計方法

小核を有する多染性赤血球の出現頻度についての統計学的解析には、Kastenbaum・Bowman の数表⁴⁾ (被験物質投与群) およびカイ二乗検定 (陽性対照群) を用いた。多染性赤血球の割合についての統計学的解析には Wilcoxon の順位和検定を行った。

12. 判定基準

少なくとも 1 つの被験物質投与群で、小核を有する多染性赤血球の出現頻度に有意な増加が認められれば陽性と判断した。一方、いずれの被験物質投与群においても、小核を有する多染性赤血球の出現頻度に有意な増加が認められなければ陰性と判定した。

C. 研究結果

1. 毒性試験成績

毒性試験の成績を表 1 に示した。2 回投与後 24 時間までに死亡した動物はみられず、一般症状においても全く異常は認められなかった。よって、供試動物のヒキオコシ抽出物 2 回連続投与に対する最大耐量は

2000 mg/kg/day 以上と考えられた。この結果より、小核試験の最高用量は毒性試験指針に従って 2000 mg/kg/day に設定した。

2. 小核試験成績

すべての被験物質投与群で試験期間中に死亡例の発生は認められず、また、一般状態においても全く異常は認められなかった。

現在、骨髓塗抹標本を観察中であるが、現時点で小核の誘発を示す傾向は認められていない。

D. 考察

塗抹標本全体の約 8 割の観察を終えた段階で、小核出現頻度の高い標本が多くないことから、陽性対照群以外の標本に小核の有意な誘発はないものと推測される。

染色体異常試験の細胞増殖抑制試験において、代謝活性化系存在下で細胞毒性が大きく減少したことから、ヒトがヒキオコシ抽出物を摂取した場合も体内でヒキオコシ抽出物に含まれる毒性成分の大部分が解毒されるものと考えられ、重大な遺伝毒性を引き起こす可能性は低いと考えられる。

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染色体異常試験) 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マウス骨髓細胞における小核誘発性は「陰性」と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) Schmid, W. (1976) The micronucleus test for cytogenetic analysis, in : A. Hollaender (Ed.) Chemical Mutagens, Principles and Methods for Their Detection, vol. 4, Plenum. New York, PP. 31~54. statistical significance of mutation frequencies, Mutation Res., 9 ; 527~549.
- 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) Gollapudi, B. and O.P. Kamra. (1979) Application of a simple Giemsa-staining method in the micronucleus test, Mutation Res., 64 ; 45~46
- 4) Kastenbaum, M.A. and K.O. Bowman. (1970) Tables for determining the
- 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. 被験物質についての2回投与による50%致死量 (LD_{50}^2)

被験物質	1回あたりの投与量 (mg/kg)	投与回数	生存数/投与数	推定 LD_{50}^2
ヒキオコシ抽出物	500	×2	3/3	>2000 mg/kg
	1000	×2	3/3	
	2000	×2	3/3	

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

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

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
和田 邦生 (財)残留農薬研究所 毒性第二部変異原性研究室
阿部 美咲樹 (財)残留農薬研究所 毒性第二部変異原性研究室
竹澤 祐造 (財)残留農薬研究所 毒性第二部変異原性研究室

研究要旨

既存天然添加物であるサンダラック樹脂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。試験は、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試験の標準的実施方法」の基準に従い実施した。その結果、サンダラック樹脂の構造的染色体異常誘発性は陰性である。しかし、析出が観察される高用量領域において倍数体が誘発される。

A. 研究目的

既存天然添加物であるサンダラック樹脂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。

サンダラック樹脂はアルジェリアやモロッコに分布するヒノキ科サンダラック (*Tetraclinis articulata*) の分泌液を原料とし、そのエタノール抽出により得られる天然物である。通常、ガムベースとして利用される。

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」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）」²⁾に従い、以下の条件で実施した。

1. 被験物質

サンダラック樹脂は日本食品添加物協会より提供されたものを使用した。外観は黄色～オレンジ色をしたガラス状固体であった。受領した被験物質は冷蔵暗所（4℃）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℃、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（ロット番号：404216, Gibco BRL）10%を含む MEM 培地（Gibco BRL）に、ペニシリン-ストレプトマイシン（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、被験物質は水に不溶でジメチルスルホキシド (DMSO) には可溶であった。よって DMSO (東京化成工業株式会社, ロット番号: FGK01) を溶媒として用いた。被験物質溶液添加後の DMSO の培地濃度は 1% 以下であった。

4. 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、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。これらは小分けして冷凍保存 (-80°C) し、試験の直前に解凍して用いた。

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 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, キッコマン株式会社) を用いた。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) 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 125 mg/mL であった。よって、細胞増殖抑制試験は 1250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高用量に設定し、公比 2 で 9 用量を設定した。

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 時間培養を続けた。一方、連続処理法の場合、細胞播種後 48 時間目に被験物質溶液を添加し、24 時間連続処理した。

いずれの処理法でも、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。

培養または処理終了後、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、陰性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、39.1~1250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (非代謝活性化系) および 39.1~156 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (代謝活性化系) に設定した (公比 2)。また、陽性対照群には MMC (最終濃度 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 非代謝活性化系) および B(a)P (最終濃度 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 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、39.1~625 $\mu\text{g/mL}$ に設定した（公比 2）。また、陽性対照群には MMC（最終濃度 0.1 $\mu\text{g/mL}$ -24 時間処理, 0.05 $\mu\text{g/mL}$ -48 時間処理）を処理し、陰性対照群には DMSO のみを 1% 添加した。処理開始から 24 および 48 時間後に染色体標本を作製した。なお、試験は用量あたり 2 枚のプレートを用いた。

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 $\mu\text{g/mL}$ 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。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%ギムザ液で約 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、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 本以上）の出現数を記録した。

ギャップの判定基準として、「非染色性部分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。なお、C-mitosis は異常細胞に含めなかった。

10. 倫理面への配慮

本研究の材料は樹立された株化細胞であり、人権擁護や動物愛護などの観点において問題はなかった。

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 78.1 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量では処理期間を通して被験物質の析出・沈殿が観察された。313 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量では著しい沈殿が見られ、その影響により、不規則な細胞増殖率を示した。

代謝活性化系によらない場合の短時間処理法では、最高用量の 1250 $\mu\text{g/mL}$ で 50% 以上の細胞増殖抑制を示した。一方、代謝活性化系による場合の短時間処理法では、すべての用量で 50% 以上の細胞増殖抑制を示さなかった。その中で、もっとも低い細胞増殖率を示した用量は 156 $\mu\text{g/mL}$ であった。

連続処理法においては 625 $\mu\text{g/mL}$ で 50% 以上の細胞増殖抑制を示した。さらに高い用量（1250 $\mu\text{g/mL}$ ）では逆に細胞増殖率が上昇した。これは、1250 $\mu\text{g/mL}$ においてプレートの底に付着した多量の被験物質の沈殿が染色されたことによる見かけ上の増加であった。

以上の結果より、染色体異常試験の最高用量は 1250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (短時間処理, 代謝活性化系によらない場合), 156 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (短時間処理, 代謝活性化系による場合), および 625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (連続処理) に決定した。

2. 染色体異常試験

染色体異常試験の結果を表 2(短時間処理法) および表 3 (連続処理法) に示した。

短時間処理法では代謝活性化系の有無にかかわらず, いずれの用量においても陰性対照群に比べて構造的染色体異常を有する細胞の出現頻度に有意な増加は認められなかった。また, 倍数性細胞の出現頻度においても有意な増加は認められなかった。

連続処理法においても 24 および 48 時間連続処理のいずれの用量においても構造的染色体異常を有する細胞の出現頻度に有意な増加は認められなかった。しかし, 24 時間処理では 156 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で C-mitosis が多く観察された (データは省く)。さらに 48 時間処理では 156 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で倍数体が多く観察された。これら倍数体の出現頻度に明確な用量相関性は認められず, 156~625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のすべて用量で出現頻度は約 40%であった。

細胞増殖抑制試験の場合と同様に, 短時間処理法および連続処理法のいずれの場合においても, 78.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量では処理期間を通して被験物質の沈殿が観察された。

D. 考察

48 時間連続処理で観察された倍数体は, C-mitosis を起した中期染色体が 2 本の染色分体に完全に分離した後, 細胞質分離を経ず

に間期核に戻ったことにより形成されたものと推測される。

一般にサンダラック樹脂の構成成分は, pimaric acid-80%, callitrolic acid-10%, sandaricinic acid-10%である。これら成分のいずれかに倍数体を誘発するような作用 (例えば, チューブリン重合阻害作用) を持つ可能性が示唆されるが, 現在のところ, これら個々の成分に対する染色体異常誘発性を調査した報告は見当たらない。

倍数体が出現した用量は, 多量の被験物質の沈殿が見られた用量であった。したがって, 細胞内に取り込まれた被験物質の微粒子が紡錘体形成に物理的影響を及ぼすことにより, 倍数体形成が引き起されているかもしれない。

これまでに, サンダラック樹脂の *in vivo* 染色体異常誘発性に関して小核試験が実施されている⁴⁾。最大用量 (2000 mg/kg) まで試験されたが, 結果は陰性であった。よって, 本 *in vitro* 染色体異常試験における析出用量領域での倍数体誘発は, 実際の生体内で起こり得る可能性は極めて低いものと考えられる。

E. 結論

本実験条件下では, 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。しかし, 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。

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, 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)
- 3) Koyama, H. et al., A new cell derived from newborn Chinese hamster lung tissue. Gann, 61 : 161-167 (1970)
- 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)

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. 細胞増殖抑制試験結果

被験物質名： サンダラック樹脂

代謝活性化法によらない場合 (6-18 h)		代謝活性化法による場合 (6-18 h)		(24-0 h) 処理による場合	
用量 (μg/mL)	細胞増殖率 (%)	用量 (μg/mL)	細胞増殖率 (%)	用量 (μg/mL)	細胞増殖率 (%)
溶媒対照 (DMSO)	100	溶媒対照 (DMSO)	100	溶媒対照 (DMSO)	100
4.9	82	4.9	107	4.9	105
9.8	84	9.8	105	9.8	109
19.5	83	19.5	110	19.5	93
39.1	84	39.1	106	39.1	96
78.1	82 ^{a)}	78.1	96 ^{a)}	78.1	107 ^{a)}
156	75 ^{a)}	156	69 ^{a)}	156	59 ^{a)}
313	63 ^{a)}	313	108 ^{a)}	313	53 ^{a)}
625	52 ^{a)}	625	103 ^{a)}	625	40 ^{a)}
1250	41 ^{a)}	1250	94 ^{a)}	1250	83 ^{a)}

a) : 被験物質の析出が観察された

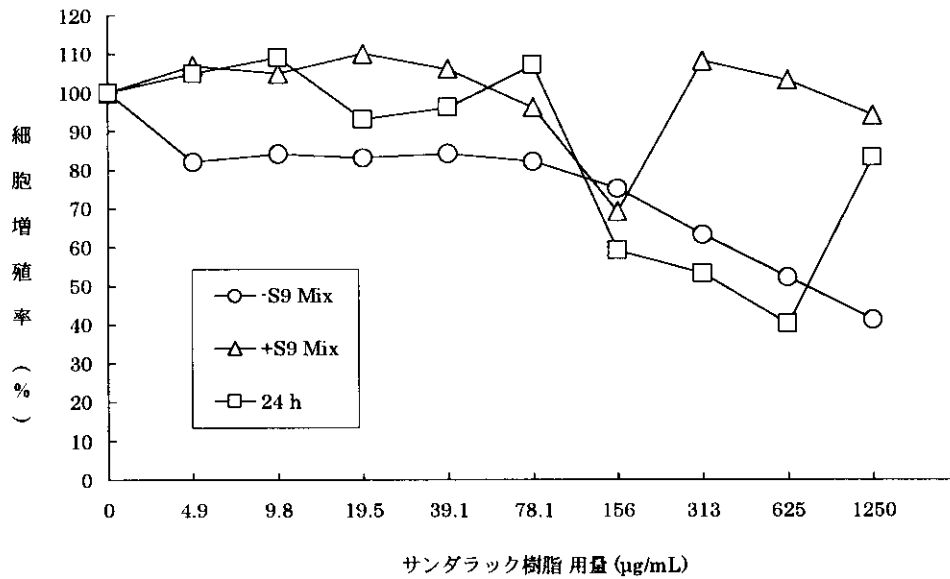


図1 用量と細胞増殖率

表 2. 染色体異常試験の結果 (短時間処理法)

被験物質の名称: サンダラック樹脂

処理時間 (h)	S9 mix	被験物質の用量 (µg/mL)	染色体構造異常の細胞数 (出現頻度%)										ギヤップの出現数	染色体の数的異常の細胞数 (出現頻度%)		
			観察細胞数	染色体切断	染色体交換	染色体切断	染色体交換	染色体切断	染色体交換	その他	総異常細胞数 (%)	観察細胞数		倍体	総異常細胞数 (%)	
6-18	-	陰性対照 (DMSO) 1%	100	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0
			100	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0
			200	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	200	0	0
6-18	-	39.1	100	0	1	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
			100	2	0	0	0	0	0	0	0	0	100	1	1	
			200	2	1	0	0	0	0	0	0	0	200	1	1	
6-18	-	78.1 ^{a)}	100	0	1	0	0	0	0	0	0	0	100	2	2	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
			200	0	1	0	0	0	0	0	0	0	200	2	2	
6-18	-	156 ^{a)}	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	1	1	
			200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	1	1	
6-18	-	313 ^{a)}	100	4	0	0	0	0	0	0	0	4	100	1	1	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	1	1	
			200	4	0	0	0	0	0	0	0	4	200	2	2	
6-18	-	625 ^{a)}	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	1	1	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
			200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	1	1	
6-18	-	1250 ^{a)}	100	2	0	0	0	0	0	0	0	2	100	1	1	
			100	2	0	0	0	0	0	0	0	0	100	1	1	
			200	2	0	1	0	0	0	0	0	2	200	2	2	
6-18	-	陽性対照 (MMC) 0.1	100	19	37	1	0	0	0	0	0	48	100	0	0	
			100	22	34	1	0	0	2	2	48	100	0	0		
			200	41	71	2	0	2	2	96	48.0	200	0	0		
6-18	+	陰性対照 (DMSO) 1%	100	1	0	0	0	0	0	0	0	1	100	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
			200	1	0	0	0	0	0	0	0	1	200	0	0	
6-18	+	39.1	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
			200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	0	0	
6-18	+	78.1 ^{a)}	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	1	1	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	2	2	
			200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	3	3	
6-18	+	156 ^{a)}	100	0	1	0	0	0	0	0	0	1	100	1	1	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
			200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	1	1	
6-18	+	陽性対照 [B(a)P] 40	100	11	37	1	0	0	0	0	0	41	100	0	0	
			100	11	31	1	0	0	0	0	0	38	100	0	0	
			200	22	68	2	0	0	0	0	0	79	200	0	0	

MMC, マイトマイシン C; B(a)P, ベンツ(a)ピレン

その他: 断片化および複合型染色体異常等

^{a)}: 被験物質の析出が観察された。

***: カイ二乗検定において, $p \leq 0.001$

表 3. 染色体異常試験の結果 (連続処理法)

被験物質の名称: サンダラック樹脂

処理時間 (h)	被験物質の用量 (ug/mL)	染色体構造異常の細胞数 (出現頻度%)										ギャップの出現数	染色体的な異常の細胞数 (出現頻度%)			
		観察細胞数	染色体切断	染色体分体切断	染色体交換	染色体分体交換	染色体切断	染色体分体切断	染色体交換	染色体分体交換	その他		総異常細胞数 (%)	観察細胞数	倍率体	総異常細胞数 (%)
24-0	陰性対照 (DMSO) 1%	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	100	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0
		200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	200	0	0
24-0	39.1	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	1	1
		100	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	100	1	1
		200	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	200	2	2
24-0	78.1 ^{a)}	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	100	1	1
		100	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	100	0	0
		200	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	200	1	1
24-0	156 ^{a)}	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0
		200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	4	4
24-0	313 ^{a)}	100	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	5	5
		200	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	5	5
24-0	625 ^{a)}	100	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	2	2
		100	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	2	2
		200	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	4	4
24-0	陽性対照 (MMC) 0.1	100	15	41	3	1	1	1	1	1	50	5	100	0	0	
		100	21	54	3	0	2	61	***	3	100	0	0			
		200	36	95	6	1	3	111	(55.5)	8	200	0	0			
48-0	陰性対照 (DMSO) 1%	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	100	0	0	
		100	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
		200	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	200	0	0	
48-0	39.1	100	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	100	0	0	
		100	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
		200	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	0	0
48-0	78.1 ^{a)}	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
		200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	0	0
48-0	156 ^{a)}	100	0	2	0	0	0	0	0	0	2	0	100	40	40	
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	43	43	
		200	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	200	83	83
48-0	313 ^{a)}	100	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	100	34	34	
		100	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	100	40	40	
		200	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	200	74	74	
48-0	625 ^{a)}	100	0	1	1	2	1	4	1	1	4	1	100	39	39	
		100	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	100	39	39	
		200	0	1	1	3	1	5	(2.5)	2	200	78	78			
48-0	陽性対照 (MMC) 0.05	100	21	56	0	1	0	63	1	0	63	3	100	1	1	
		100	24	52	1	0	1	63	***	2	100	0	0			
		200	45	108	1	1	1	126	(63.0)	5	200	1	1			

MMC, マイトマイシン C

その他: 断片化および複合型染色体異常等 a): 被験物質の折出が観察された。 ***: カイ二乗検定において, p ≤ 0.001

協力研究報告書

木酢液の細菌を用いる復帰突然変異試験

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 木酢液製品、濃縮木酢-1、濃縮木酢-2、木酢A社蒸留液、木酢B社蒸留液、木酢C社蒸留液、木酢A社原液、木酢B社原液および木酢C社原液の9種類の木酢液に対し細菌を用いた変異原性試験を行った。その結果、最高用量を100 mg/プレートとした場合、木酢A社蒸留液および木酢B社蒸留液を除く7種類の試料が変異原性陽性であった。しかし最大用量を労働安全衛生法等で規定された5 mg/プレートとした場合、陽性を示した試料は木酢B社原液および木酢C社原液の2試料であった。

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物を起源とする既存添加物は広範囲の食品に使用されている。しかし既存添加物の安全性については十分な検討がなされておらず、食品衛生法による成分規格、使用基準も定められていない。一方、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・精製される既存添加物がこれら有害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。

本研究は既存添加物である木酢液に対し、変異原性試験のうちの細菌を用いる変異原性試験（Ames試験）を行い、DNAに対し影響を与え、その結果、遺伝子突然変異を起こす物質が木酢液中に存在するか否かを判定し、その安全性を評価する目的で行った。

B. 研究方法

1. 試料

日本添加物協会を通じて提供された木酢液製品、濃縮木酢-1、濃縮木酢-2、木酢A社蒸留液、木酢B社蒸留液、木酢C社蒸留液、木酢A社原液、木酢B社原液および木酢C社原液の9種類の木酢液を試料とした（表1）。

2. 試薬

変異原性試験用培地（テスメディアAN）：オリエンタル酵母工業(株)製、Bacto Agar：Difco社製、Nutrient Broth No.2：Oxoid社製、ジメチルスルホオキシド（蛍光分析用、以下DMSO）：(株)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. 試験溶液の調製

各試料の原液あるいは各試料をDMSOにそれぞれ溶解または懸濁後、一定容量としたものを各試験溶液とした。

4. 試験菌株

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た。ただし使用した菌株は試料により異なり、各試料に対して使用した菌株を表1に示した。

5. 復帰突然変異試験

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℃、20分間のブレインキュベーション法を用いて行った。

復帰突然変異試験に対する試料の最適用量を決めるため、プレート当たり100 mg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

害が確認された場合には生育阻害を示す用量を、生育阻害が確認されなかった場合にはプレート当たり 100 mg 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 プレート以上を、陽性対照は 2 プレートを使用した。

プレインキュベーション法：試験溶液 100 μ l を滅菌試験管に分注し、これに Na-リン酸緩衝液 500 μ l (または S9 mix 500 μ l) および前培養した菌懸濁液 100 μ l を順次加え、37°C で 20 分間プレインキュベーションした。その後、ソフトアガーを 2 ml 加えて混合し、これを最少グルコース寒天平板培地に注いで一様に広げ、37°C で 48 時間インキュベーションし、得られたプレート上の復帰変異コロニー数を計数した。

6. S9 および S9 mix

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 μ l 使用した。

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

7. 試験結果の判定法

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、それ以外を陰性とした。ただし複数回の試験において判定結果が異なる場合には当該濃度における平均値および量-反応曲線より適宜判断した。

C. 研究結果

1. 木酢液製品

TA100 株に対し用量設定試験において S9 mix 無添加 (以下-S9 mix) 条件下、25 mg/プレートの用量で溶媒対照の 2.0 倍の復帰変異コロニーを示した (表 2、図 1-1)。しかし本試験では用量設定試験と同様に 25 mg/プレートの用量を頂点とする量

-反応曲線を示したが溶媒対照の 2 倍以上の復帰変異コロニーは得られなかった (表 3、図 1-2)。そこで確認試験を 4 回行ったところその内の 3 回が 2 倍以上の復帰変異コロニーを示した (表 4 ~ 7)。いずれも 25 mg/プレートをほぼ頂点とした用量依存性を有する量-反応曲線となり、再現性も確認された (図 1-3 ~ 1-6)。また、25 mg/プレートの用量における 6 回の試験の平均値も溶媒対照の 2.0 倍となった。一方 S9 mix を添加した場合 (以下+S9 mix) にはいずれの試験においても溶媒対照の 2 倍以上の復帰変異コロニーは示さなかった (表 2 ~ 5、表 7)。

TA1535 株に対し-S9 mix 条件下では本試験において 25 mg/プレートの用量で溶媒対照の 2.4 倍の復帰変異コロニーを誘発した (表 3、図 2-1)。しかし確認試験-1 では溶媒対照の 2 倍以上の復帰変異コロニーは得られなかった (表 4、図 2-2)。そこで用量間隔を細かく設定し、さらに確認試験を 2 回行ったところ、37.5 mg/プレートを頂点とした用量依存性を示し、溶媒対照の 2 倍以上の復帰変異コロニーを誘発し、再現性もあることが確認された (表 4 ~ 6、図 2-3、図 2-4)。また、+S9 mix 条件下でも本試験および 2 回の確認試験においていずれの試験も溶媒対照の 4 倍以上の復帰変異コロニーを誘発し、用量依存性および再現性が得られた (表 3 ~ 5、図 3-1 ~ 3-3)。

WP2uvrA/pKM101 株に対しては本試験において +S9 mix 条件下、50 mg/プレートの用量で溶媒対照の 2.2 倍の復帰変異コロニーを誘発し、2 回の確認試験においても同用量で溶媒対照の 2 倍以上の復帰変異コロニーを誘発し、用量依存性および再現性が確認された (表 3 ~ 5、図 4-1 ~ 4-3)。しかし-S9 mix 条件下ではいずれの試験においても溶媒対照の 2 倍以上の復帰変異コロニーは得られなかった (表 2 ~ 5)。

TA98 株および TA1537 株に対しては 3 回の試験でいずれも S9 mix の有無にかかわらず溶媒対照の 2 倍以上の復帰変異コロニーを誘発しなかった (表 2 ~ 4)。

以上の結果から木酢液製品の変異原性は-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、それ以外に対しては陰性と判断した。

2. 濃縮木酢-1

TA100 株に対し 100 mg/プレート を最高用量として公比 4 または 2 で希釈して試験した用量設定試験、本試験および確認試験-1 では S9 mix の有無にかかわらず、いずれの試験においても溶媒対照の 2 倍以上の復帰変異コロニーを示さなかった(表 8 ~ 10)。しかし用量間隔をさらに細かく設定した 3 回の確認試験では-S9 mix 条件下でいずれも 18.8 mg/プレート を頂点とした量-反応曲線を示した。18.8 mg/プレート における復帰変異コロニー数はそれぞれ溶媒対照の 1.9、2.3 および 2.1 倍となり、3 回の試験の平均値は溶媒対照の 2 倍以上となった(表 11 ~ 13、図 5-1 ~ 5-3)。一方、+S9 mix 条件下では用量間隔を細かく設定した試験においても溶媒対照の 2 倍以上の復帰変異コロニーは得られなかった(表 11、表 13)。

TA1535 株に対しては S9 mix の有無にかかわらず 5 回の試験すべてにおいて溶媒対照の 2 倍以上の復帰変異コロニーを誘発し、用量依存性および再現性も確認された(表 8 ~ 12、図 6-1 ~ 6-5、図 7-1 ~ 7-5)。復帰変異コロニー数は溶媒対照に対し-S9 mix 条件下では 25 mg/プレート で最高 2.5 倍、+S9 mix 条件下では 37.5 mg/プレート で最高 6.5 倍であった。

WP2uvrA/pKM101 株に対しては本試験において +S9 mix 条件下、50 mg/プレートの用量で溶媒対照の 2.3 倍の復帰変異コロニーを誘発し、2 回の確認試験において、いずれも溶媒対照の 2 倍以上の復帰変異コロニーを誘発し、用量依存性および再現性も確認された(表 9 ~ 11、図 8-1 ~ 8-3)。しかし-S9 mix 条件下ではいずれの試験においても溶媒対照の 2 倍以上の復帰変異コロニーは得られなかった(表 8 ~ 11)。

TA98 株および TA1537 株に対しては 3 回の試験でいずれも S9 mix の有無にかかわらず溶媒対照の 2 倍以上の復帰変異コロニーを誘発しなかった(表 8 ~ 10)。

以上の結果から濃縮木酢-1 の変異原性は-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、それ以外に対しては陰性と判断した。

3. 濃縮木酢-2

TA100 株に対し-S9 mix 条件下で本試験において 50 mg/プレートの用量で溶媒対照の 2.2 倍の復帰変異コロニーを示し、用量依存性も認められた(表 1

5、図 9-1)。しかし、確認試験では本試験と同様に 50 mg/プレート を頂点とし、用量依存性が認められた。しかし溶媒対照の 2 倍以上の復帰変異コロニーは得られなかった(表 16、図 9-2)。そこで用量間隔を細かく設定した 3 回の確認試験を行ったところ、いずれも 37.5 mg/プレート を頂点とした量-反応曲線を示し、37.5 mg/プレート における復帰変異コロニー数はそれぞれ溶媒対照の 1.9、2.2 および 2.0 倍となり、3 回の試験の平均値は溶媒対照の 2 倍以上となった(表 17、表 19、表 20、図 9-3 ~ 9-5)。一方、+S9 mix 条件下では用量間隔を細かく設定した試験も含めたすべての試験において溶媒対照の 2 倍以上の復帰変異コロニーは得られなかった(表 14 ~ 17、表 20)。

TA1535 株に対しては-S9 mix で 3 回、+S9 mix で 5 回のそれぞれすべての試験において溶媒対照の 2 倍以上の復帰変異コロニーを誘発し、用量依存性および再現性も確認された(表 15 ~ 19、図 10-1 ~ 10-3、図 11-1 ~ 11-5)。復帰変異コロニー数は溶媒対照に対し-S9 mix 条件下では 50 mg/プレート で最高 2.5 倍、+S9 mix 条件下では 75 mg/プレート で最高 5.6 倍であった。

WP2uvrA/pKM101 株に対し 100 mg/プレート を最高用量として公比 4 または 2 で希釈して試験した用量設定試験、本試験および確認試験-1 では S9 mix の有無にかかわらず、いずれの試験においても溶媒対照の 2 倍以上の復帰変異コロニーを示さなかった(表 14 ~ 16)。しかし用量間隔を細かく設定した場合、+S9 mix 条件下では 75 mg/プレート を頂点とした用量依存性を有する量-反応曲線を示し、いずれも溶媒対照の 2 倍以上となった(表 17 ~ 19、図 12-1 ~ 12-3)。しかし-S9 mix 条件下では用量間隔を細かく設定した場合も溶媒対照の 2 倍以上の復帰変異コロニーは得られなかった(表 17)。

TA98 株に対しては 3 回の試験でいずれも S9 mix の有無にかかわらず溶媒対照の 2 倍以上の復帰変異コロニーを誘発しなかった(表 14 ~ 16)。

TA1537 株に対しては-S9 mix 条件下で用量設定試験の 50 mg/プレート および本試験の 100 mg/プレート において溶媒対照の 2 倍以上の復帰変異コロニーを示すプレートがあった(表 14、表 15)。しかし 2 回の確認試験のいずれにおいても溶媒対照の 2 倍以上の復帰変異コロニーを示すプレートは認められなかった(表 16、表 17)。また+S9 mix

条件下では3回の試験でいずれも溶媒対照の2倍以上の復帰変異コロニーを誘発しなかった(表14~16)。

以上の結果から濃縮木酢-2の変異原性は-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、それ以外に対しては陰性と判断した。

4. 木酢A社蒸留液

TA100株およびTA98株の2種類の菌株により試験した。その結果、両菌株とも用量設定試験および本試験のいずれにおいてもS9 mixの有無にかかわらず溶媒対照の2倍以上の復帰変異コロニーを示さなかった(表21、表22)。TA100株に対しては用量間隔を細かく設定した試験も行ったがS9 mixの有無にかかわらず溶媒対照の2倍以上の復帰変異コロニー数は認められなかった(表23)。

以上の結果から木酢A社蒸留液の変異原性はTA100株およびTA98株の2種類の菌株に対し、S9 mixの有無にかかわらず陰性と判断した。

5. 木酢B社蒸留液

TA100株およびTA98株の2種類の菌株により試験した。その結果、両菌株とも用量設定試験および本試験のいずれにおいてもS9 mixの有無にかかわらず溶媒対照の2倍以上の復帰変異コロニーを示さなかった(表24、表25)。TA100株に対しては用量間隔を細かく設定した試験も行ったがS9 mixの有無にかかわらず溶媒対照の2倍以上の復帰変異コロニー数は認められなかった(表26)。

以上の結果から木酢B社蒸留液の変異原性はTA100株およびTA98株の2種類の菌株に対し、S9 mixの有無にかかわらず陰性と判断した。

6. 木酢C社蒸留液

TA100株およびTA98株の2種類の菌株により試験した。

TA100株に対しては-S9 mix条件下では用量設定試験および本試験で溶媒対照の2倍以上の復帰変異コロニーを誘発した。そこで2回の確認試験を行い、いずれも溶媒対照の2倍以上の復帰変異コロニーを得た。また、すべての試験で用量依存性を確認した(表27~30、図13-1~13-4)。各試験により得られた復帰変異コロニーは溶媒対照の2.7倍、2.0倍、2.6倍および2.3倍であった。+S9

mix条件下では用量設定試験においては溶媒対照の2倍以上の復帰変異コロニーを誘発しなかったが、本試験で溶媒対照の2倍以上の復帰変異コロニーを誘発した。そこで2回の確認検査を行い、いずれも溶媒対照の2倍以上の復帰変異コロニーを示し、用量依存性も確認した(表27~30、図14-1~14-3)。各試験により得られた復帰変異コロニーは溶媒対照の2.1倍、2.4倍および2.1倍であった。

TA98株に対してはS9 mixの有無にかかわらず用量設定試験および本試験ともに溶媒対照の2倍以上の復帰変異コロニーは認められなかった(表27、表28)。

以上の結果から木酢C社蒸留液の変異原性はTA100株に対してはS9 mixの有無にかかわらず陽性、TA98株に対してはS9 mixの有無にかかわらず陰性であると判断した。

7. 木酢A社原液

TA100株およびTA98株の2種類の菌株により試験した。

TA100株に対してはS9 mixの有無にかかわらず用量設定試験および本試験で溶媒対照の2倍以上の復帰変異コロニーを誘発した。確認試験においても溶媒対照の2倍以上の復帰変異コロニーを示した。また、すべての試験で用量依存性を確認した(表31~33、図15-1~15-3、図16-1~16-3)。各試験により得られた復帰変異コロニーは-S9 mix条件下では溶媒対照の3.4倍、3.0倍および3.1倍、+S9 mix条件下では溶媒対照の2.5倍、3.4倍および3.2倍であった。

TA98株に対してはS9 mixの有無にかかわらず用量設定試験および本試験ともに溶媒対照の2倍以上の復帰変異コロニーは認められなかった(表31、表32)。

以上の結果から木酢A社原液の変異原性はTA100株に対してS9 mixの有無にかかわらず陽性、TA98株に対してはS9 mixの有無にかかわらず陰性であると判断した。

8. 木酢B社原液

TA100株およびTA98株の2種類の菌株により試験した。

TA100株に対してはS9 mixの有無にかかわらず用量設定試験および本試験で溶媒対照の2倍以上

の復帰変異コロニーを誘発した。確認試験においても溶媒対照の2倍以上の復帰変異コロニーを示した。また、すべての試験で用量依存性を確認した(表34~36、図17-1~17-3、図18-1~18-3)。各試験により得られた復帰変異コロニーは-S9 mix条件下では溶媒対照の9.7倍、8.1倍および9.6倍、+S9 mix条件下では溶媒対照の2.8倍、4.4倍および5.7倍であった。

TA98株に対しては用量設定試験において-S9 mix条件下で溶媒対照の2.0倍の復帰変異コロニーを示した(表34)。しかし、同用量を含む本試験では溶媒対照の2倍以上の復帰変異コロニーは認められなかった(表35)。そこで用量間隔を細かく設定し、同用量を含む確認試験を2回行った。しかし、いずれの試験においても溶媒対照の2倍以上の復帰変異コロニーを誘発したプレートはなかった(表36、表37)。+S9 mix条件下においても確認試験を含む3回の試験を行ったが溶媒対照の2倍以上の復帰変異コロニーを誘発したプレートはなかった(表34~表36)。

以上の結果から木酢B社原液の変異原性はTA100株に対してS9 mixの有無にかかわらず陽性、TA98株に対してはS9 mixの有無にかかわらず陰性であると判断した。

9. 木酢C社原液

TA100株およびTA98株の2種類の菌株により試験した

TA100株に対してはS9 mixの有無にかかわらず用量設定試験および本試験で溶媒対照の2倍以上の復帰変異コロニーを誘発した。確認試験においても溶媒対照の2倍以上の復帰変異コロニーを示した。また、すべての試験で用量依存性を確認した(表38~40、図19-1~19-3、図20-1~20-3)。各試験により得られた復帰変異コロニーは-S9 mix条件下では溶媒対照の8.1倍、5.9倍および7.5倍、+S9 mix条件下では溶媒対照の3.9倍、4.1倍および6.3倍であった。

TA98株に対しては-S9 mix条件下で用量設定試験に、+S9 mix条件下で本試験においていずれも溶媒対照の2.0倍の復帰変異コロニーを示すプレートがあった(表38、表39)。そこで用量間隔を細かく設定して確認試験を行ったが、いずれの試験においても溶媒対照の2倍以上の復帰変異コロニーを誘発したプレートはなかった(表40、表41)。

以上の結果から木酢C社原液の変異原性はTA100株に対してS9 mixの有無にかかわらず陽性、TA98株に対してはS9 mixの有無にかかわらず陰性であると判断した。

D. 考 察

9種類の木酢液試料のうち木酢A社蒸留液および木酢B社蒸留液を除いた7種類で変異原性は陽性であった。陽性を示した菌株はいずれも塩基対置換型で、フレームシフト型の菌株を使用した試験はすべて陰性であった(表42)。この結果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。

各菌株が誘発した復帰変異コロニー数から試料毎の変異原性比活性を求め表43~49に示した。また試料毎に菌株別の変異原性比活性の平均値を求め表50に示した。変異原性比活性はS9 mixの有無にかかわらずTA100株で高く、中でも木酢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も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変異原性比活性(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。

木酢A社蒸留液以外の試料は供試用量の範囲内で菌の生育阻害が認められた。復帰変異コロニー数は供試用量の増加に伴い増加後、生育阻害の発現により急速に減少した(図1-1~図20-3)。このことは変異原性発現と生育阻害発現とが相互に微妙なバランスの上にあることを示唆しており、各試験結果に不安定さを与えた要因の一つであると考えられる。

メーカーから提供された検査成分書によると、木酢液製品、濃縮木酢-1、濃縮木酢-2、木酢A社蒸留液、木酢B社蒸留液および木酢C社蒸留液の水分含量は約85%以上であった。木酢液中の水以外の成分の変異原性を確認するためには、通常のAmes試験で可能な最大容量を負荷することが適当と考え、最大用量を労働安全衛生法等で規定された5

mg/プレートを超える 100 mg/プレートとして試験を行い判定した。今回の試験において 5 mg/プレート以下の用量で溶媒対照の 2 倍以上の復帰変異コロニー数を示した試料は木酢 B 社原液および木酢 C 社原液の 2 試料であった。

希釈溶媒として蒸留水を用いた場合には木酢 B 社原液および木酢 C 社原液に、リン酸緩衝液を用いた場合には木酢 A 社原液、木酢 B 社原液および木酢 C 社原液に沈殿が生じたため、希釈溶媒を DMSO とした。また、S9 mix の添加はリン酸緩衝液を添加した場合よりも低用量で沈殿が認められた。pH2~3 の酸性のためタンパク質の沈殿が起こったものと思われる。この沈殿は木酢 B 社原液および木酢 C 社原液で特に顕著であった。沈殿生成による代謝活性化への影響は不明である。

なお、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。

D. 結 論

9 種類の木酢液試料に対し、最高用量を 100 mg/プレートとし、細菌に対する復帰突然変異試験を行った。

木酢液製品、濃縮木酢-1 および濃縮木酢-2 の 3 試料は TA100 株、TA1535 株、TA98 株、TA1537 株および WP2uvrA/pKM101 株の 5 種類の菌株で試験した。その結果、3 試料とも -S9 mix 条件下で TA100 株および TA1535 株に対し、+S9 mix 条件下で TA1535 株および WP2uvrA/pKM101 株に対し変異原性陽性を示した。

木酢 A 社蒸留液、木酢 B 社蒸留液、木酢 C 社蒸留液、木酢 A 社原液、木酢 B 社原液および木酢 C 社原液の 6 試料は TA100 株および TA98 株の 2 種類の菌株で試験した。その結果、木酢 A 社蒸留液および木酢 B 社蒸留液以外の 4 試料は S9 mix の有無にかかわらず TA100 株に対し変異原性陽性を示した。

以上のことから最高用量を 100 mg/プレートとした場合、9 種類の木酢試料のうち木酢 A 社蒸留液および木酢 B 社蒸留液以外の 7 試料が変異原性陽性であった。しかし最大用量を労働安全衛生法等で規定された 5 mg/プレートとした場合、陽性を示した試料は木酢 B 社原液および木酢 C 社原液の 2 試料であった。

E. 参考資料

- 1) 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，p.44-45
- 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

表1 試料および試験使用菌株の一覧表

試料名	菌株名				
	TA100	TA1535	WP2uvrA /pKM101	TA98	TA1537
1. 木酢液製品	○	○	○	○	○
2. 濃縮木酢-1	○	○	○	○	○
3. 濃縮木酢-2	○	○	○	○	○
4. 木酢A社蒸留液	○	×	×	○	×
5. 木酢B社蒸留液	○	×	×	○	×
6. 木酢C社蒸留液	○	×	×	○	×
7. 木酢A社原液	○	×	×	○	×
8. 木酢B社原液	○	×	×	○	×
9. 木酢C社原液	○	×	×	○	×

○: 試験に使用した菌株

×: 試験に使用しなかった菌株