

図12-1 濃縮木酢-2のWP2uvrA/pKM101(+S9 mix)における量-反応曲線 (確認試験-2)

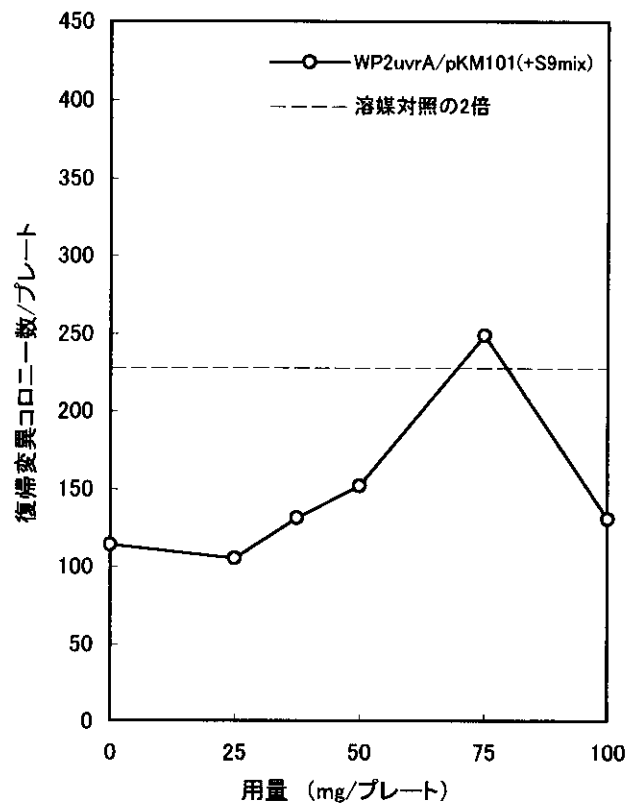


図12-2 濃縮木酢-2のWP2uvrA/pKM101(+S9 mix)における量-反応曲線 (確認試験-3)

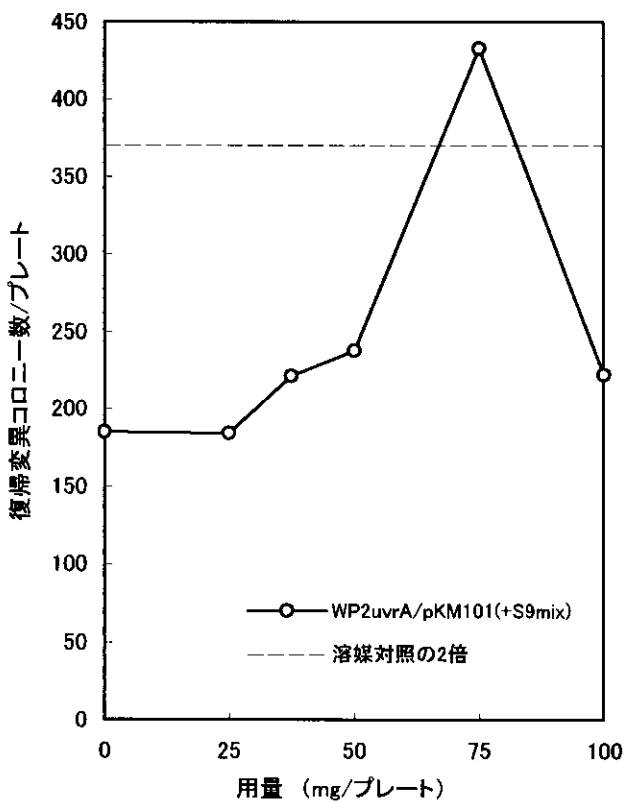


図12-3 濃縮木酢-2のWP2uvrA/pKM101(+S9 mix)における量-反応曲線 (確認試験-4)

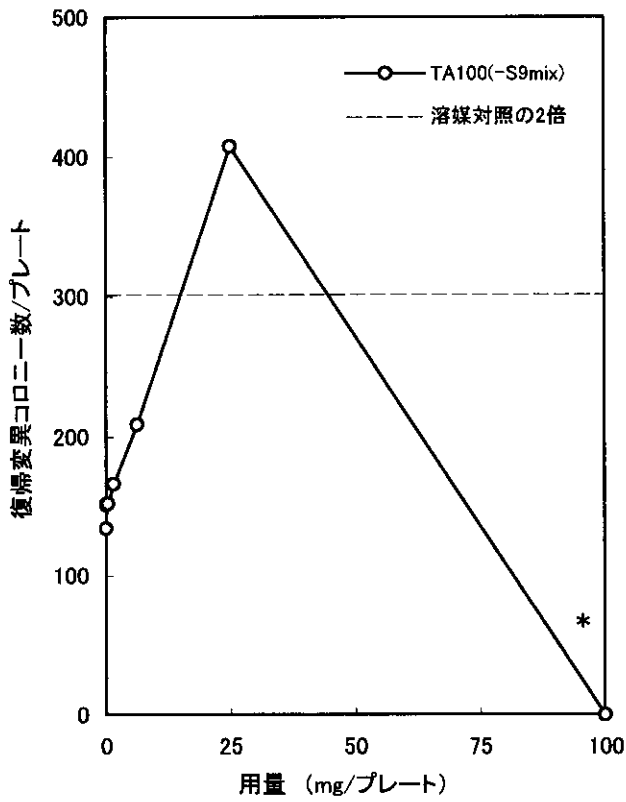


図13-1 木酢C社蒸留液のTA100(-S9 mix) における量-反応曲線 (用量設定試験)
*: 生育阻害あり

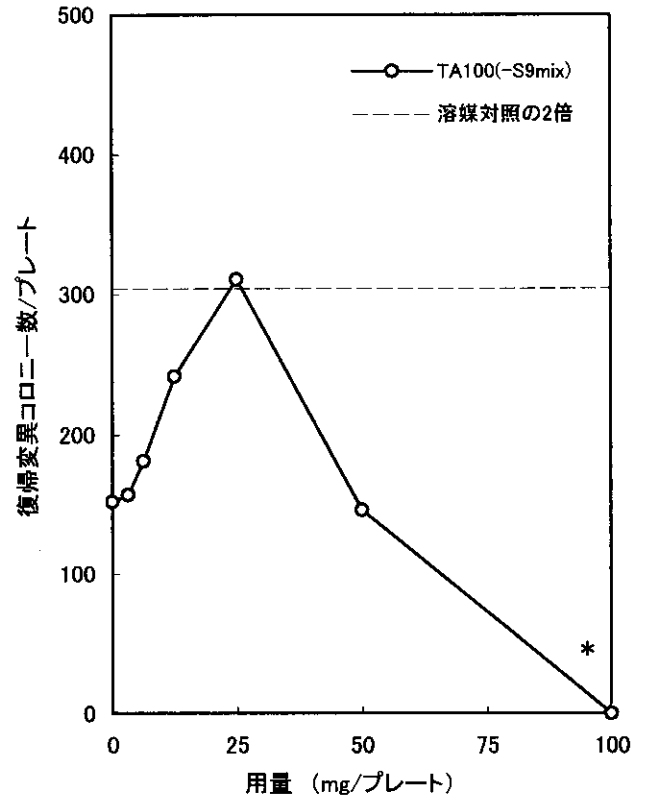


図13-2 木酢C社蒸留液のTA100(-S9 mix) における量-反応曲線 (本試験)
*: 生育阻害あり

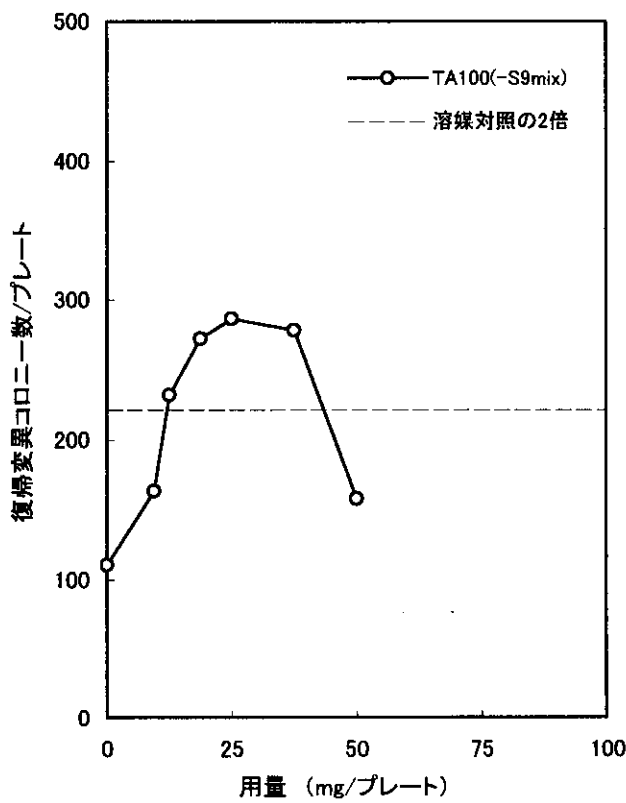


図13-3 木酢C社蒸留液のTA100(-S9 mix) における量-反応曲線 (確認試験-1)

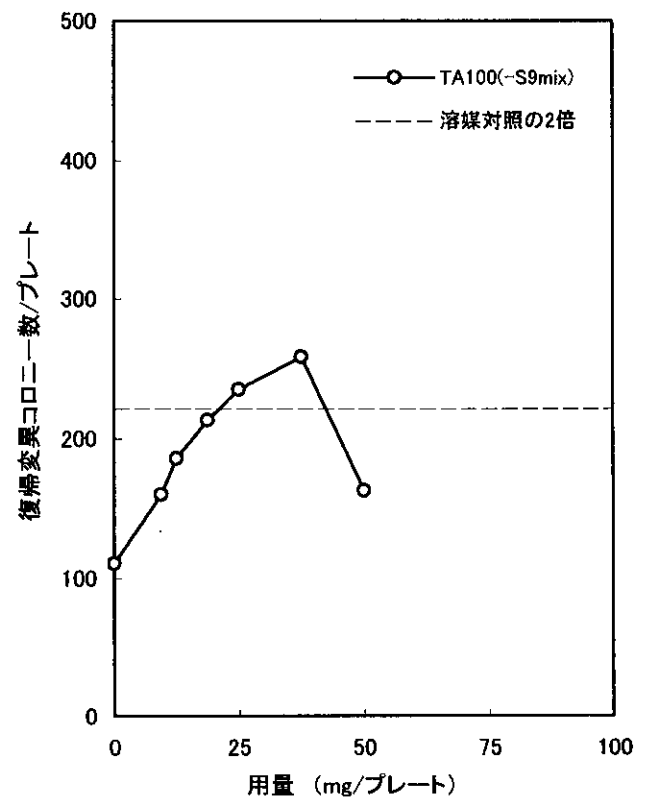


図13-4 木酢C社蒸留液のTA100(-S9 mix) における量-反応曲線 (確認試験-2)

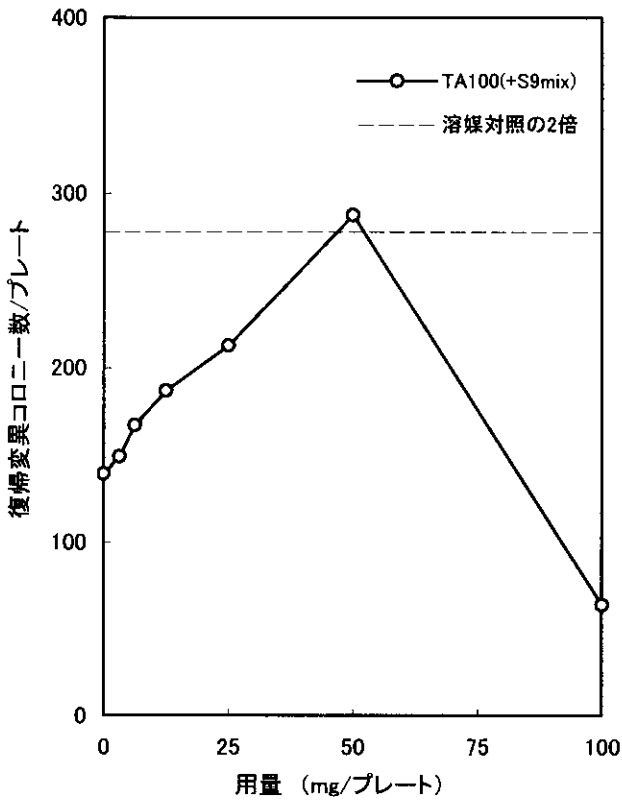


図14-1 木酢(C社蒸留液)のTA100(+S9 mix)における量-反応曲線 (本試験)
*: 生育阻害あり

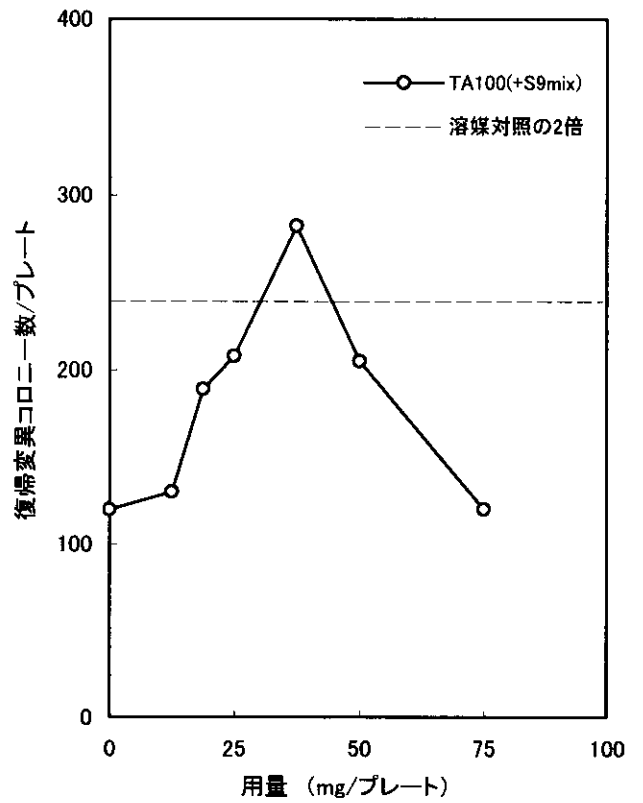


図14-2 木酢(C社蒸留液)のTA100(+S9 mix)における量-反応曲線 (確認試験-1)

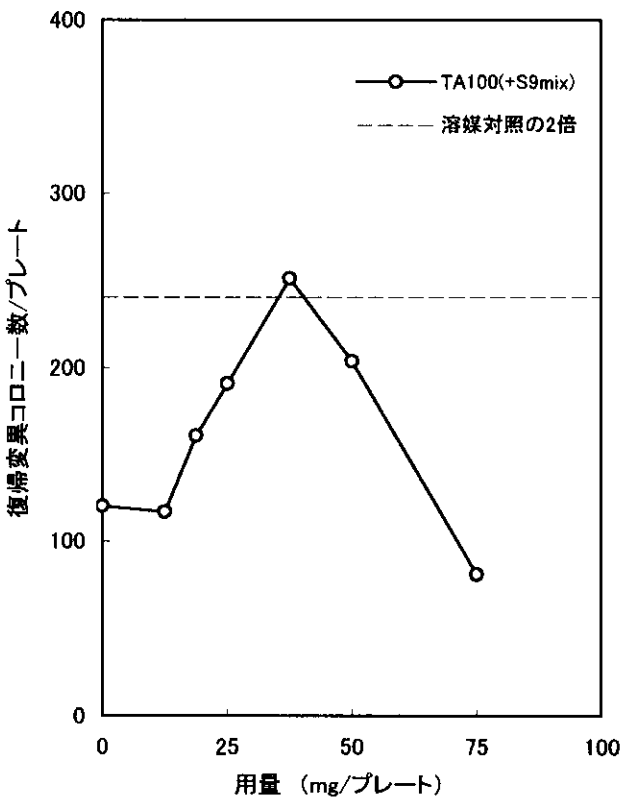


図14-3 木酢(C社蒸留液)のTA100(+S9 mix)における量-反応曲線 (確認試験-2)

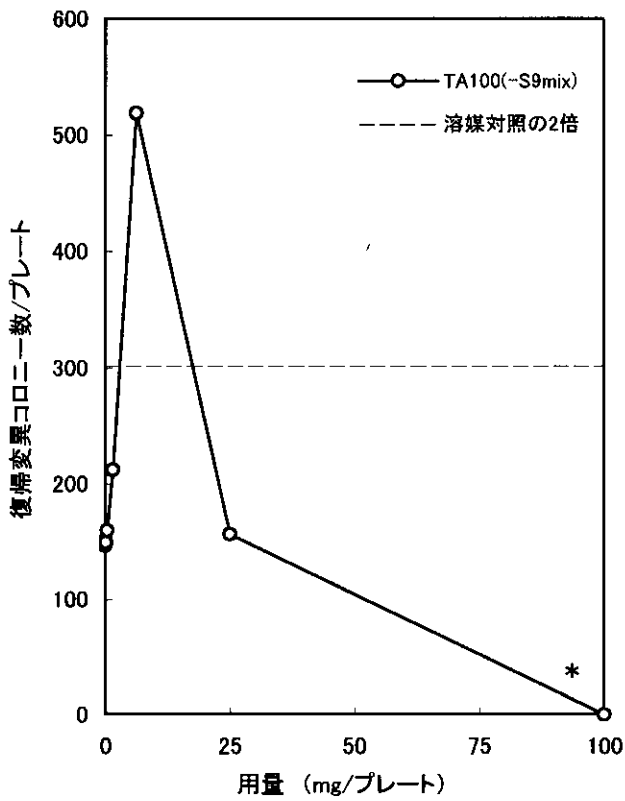


図15-1 木酢A社原液のTA100(-S9 mix) における
量-反応曲線 (用量設定試験)
*: 生育阻害あり

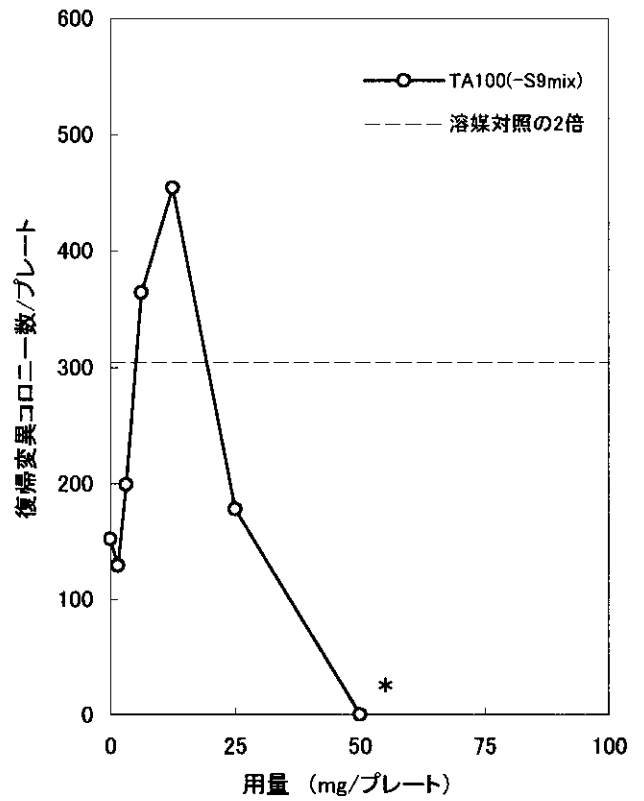


図15-2 木酢A社原液のTA100(-S9 mix) における
量-反応曲線 (本試験)
*: 生育阻害あり



図15-3 木酢A社原液のTA100(-S9 mix) における
量-反応曲線 (確認試験)

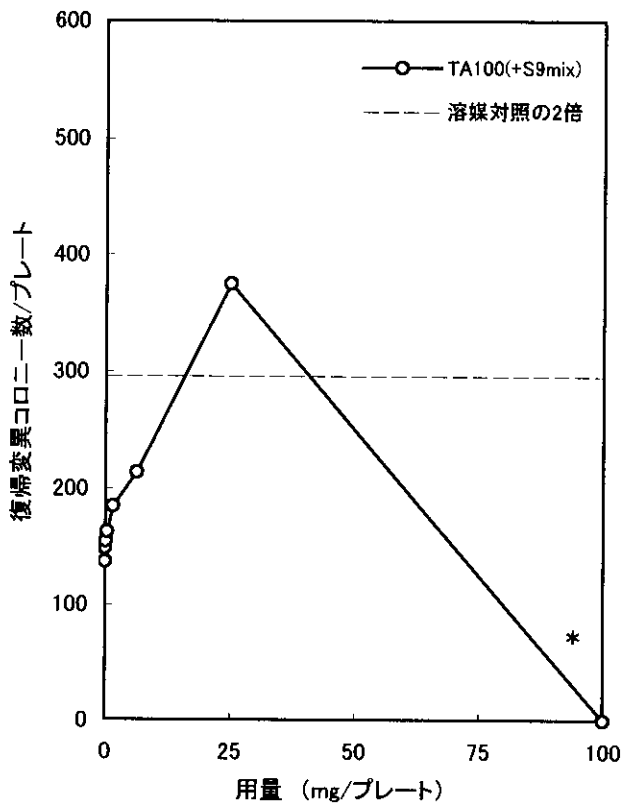


図16-1 木酢A社原液のTA100(+S9 mix) における
量-反応曲線 (用量設定試験)
*: 生育阻害あり

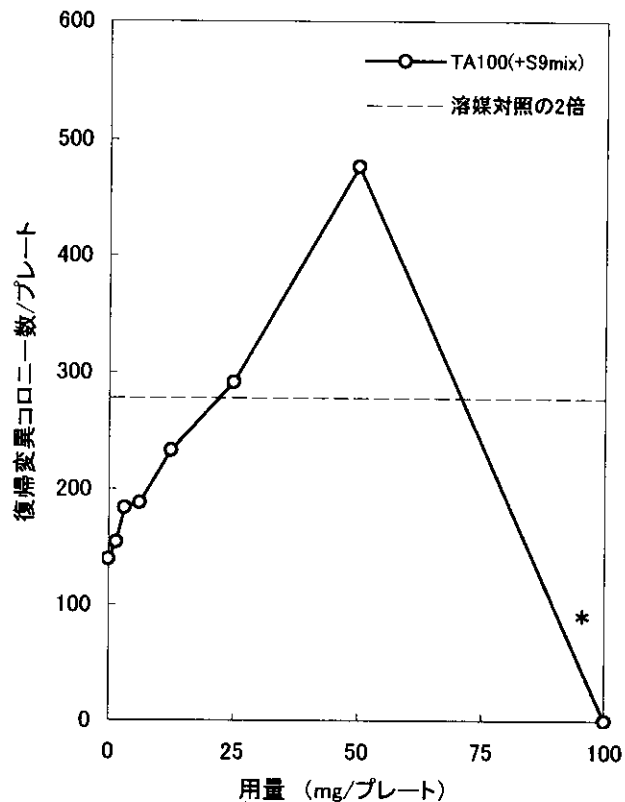


図16-2 木酢A社原液のTA100(+S9 mix) における
量-反応曲線 (本試験)
*: 生育阻害あり

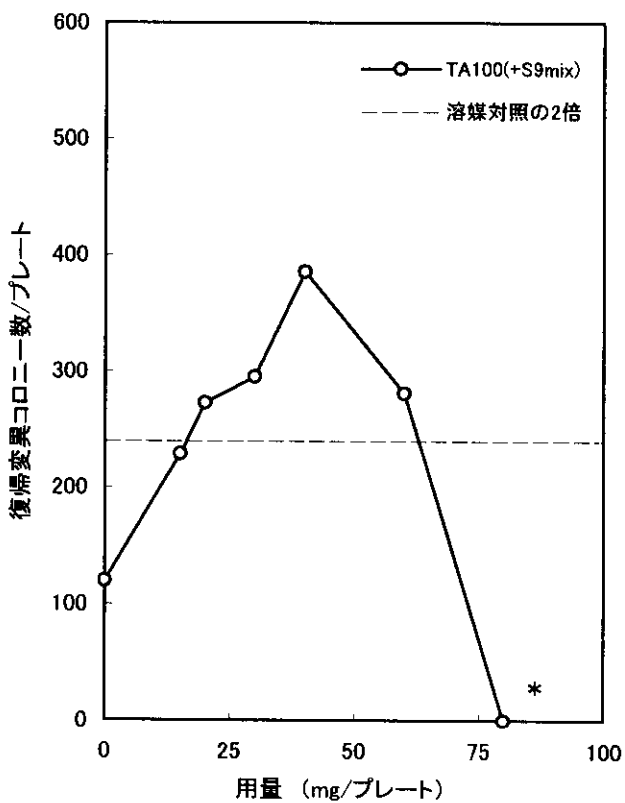


図16-2 木酢A社原液のTA100(+S9 mix) における
量-反応曲線 (確認試験)
*: 生育阻害あり

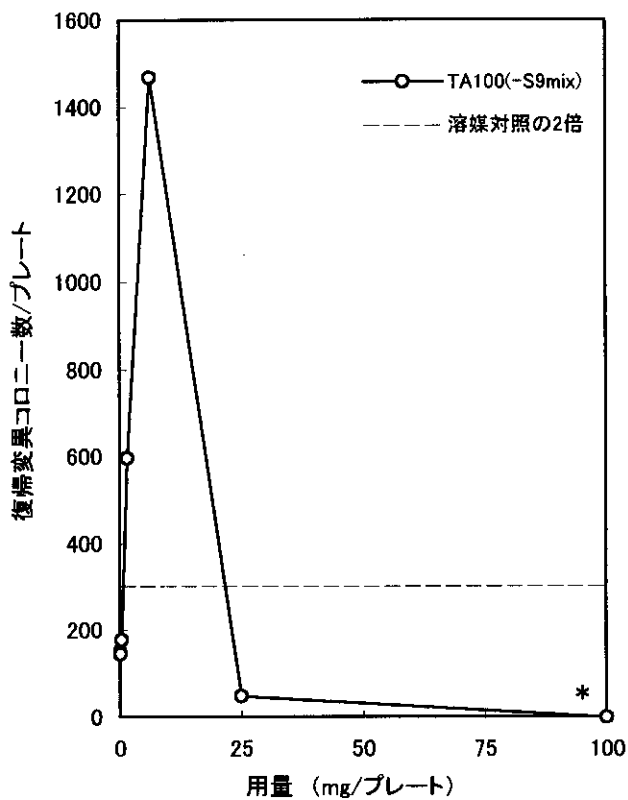


図17-1 木酢B社原液のTA100(-S9 mix)における
量-反応曲線 (用量設定試験)
*: 生育阻害あり

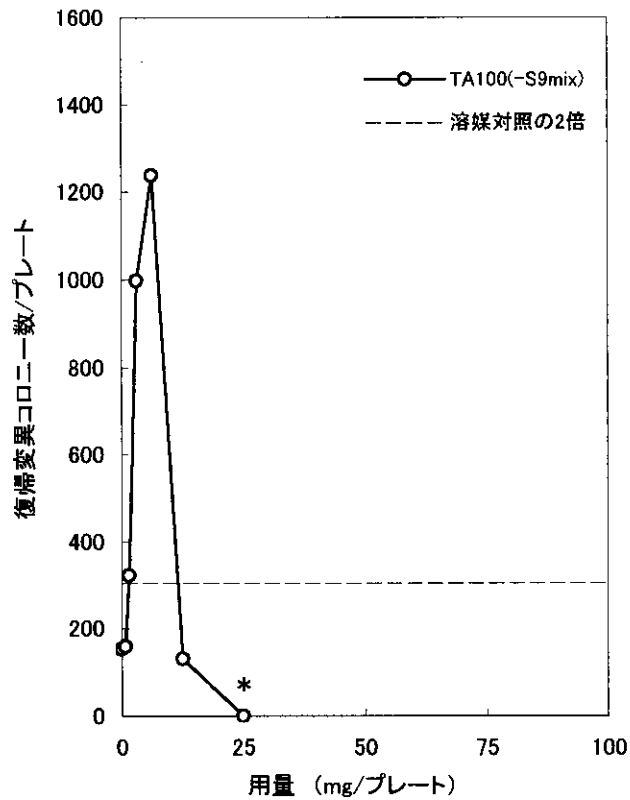


図17-2 木酢B社原液のTA100(-S9 mix)における
量-反応曲線 (本試験)
*: 生育阻害あり

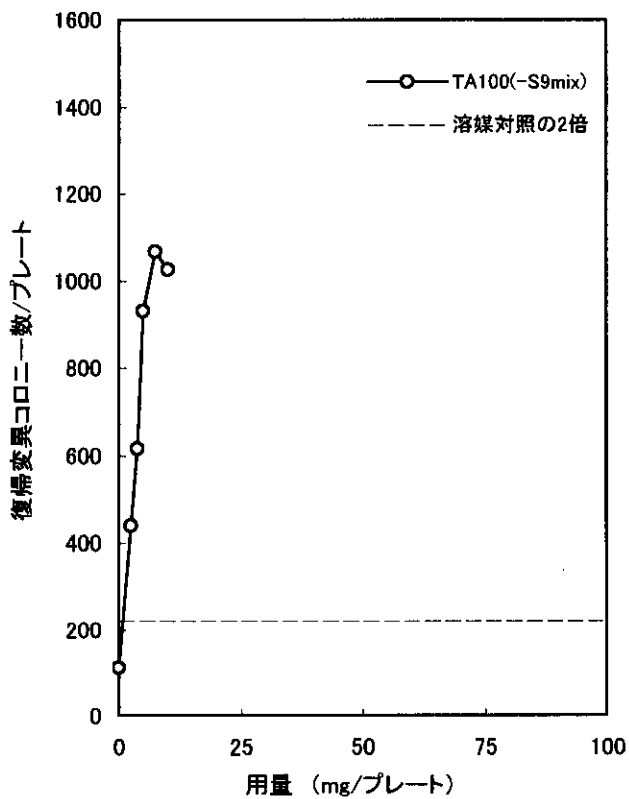


図17-3 木酢B社原液のTA100(-S9 mix)における
量-反応曲線 (確認試験-1)

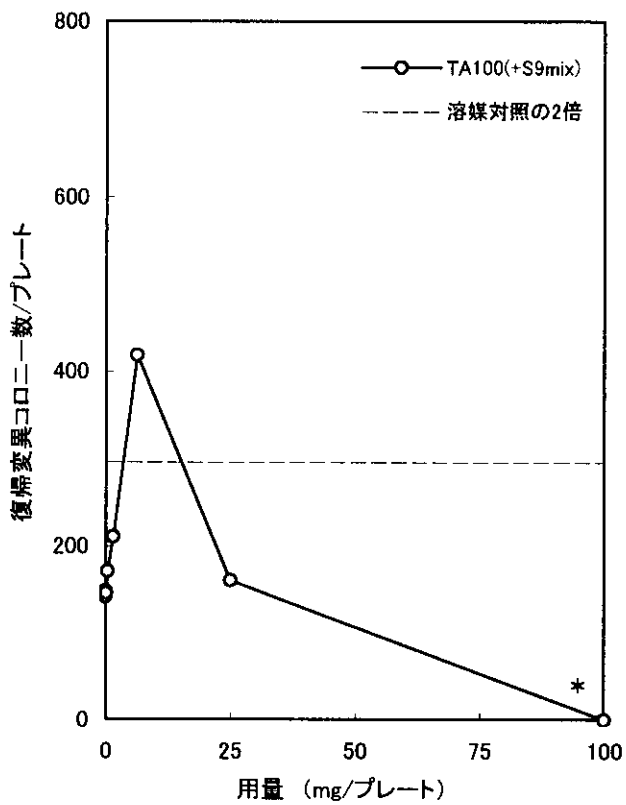


図18-1 木酢B社原液のTA100(+S9 mix) における
量-反応曲線 (用量設定試験)
*: 生育阻害あり

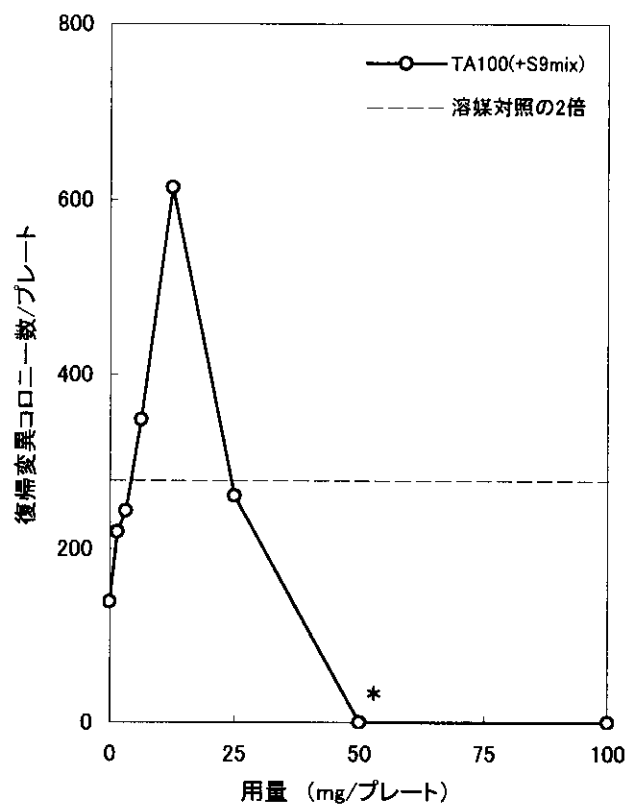


図18-2 木酢B社原液のTA100(+S9 mix) における
量-反応曲線 (本試験)
*: 生育阻害あり

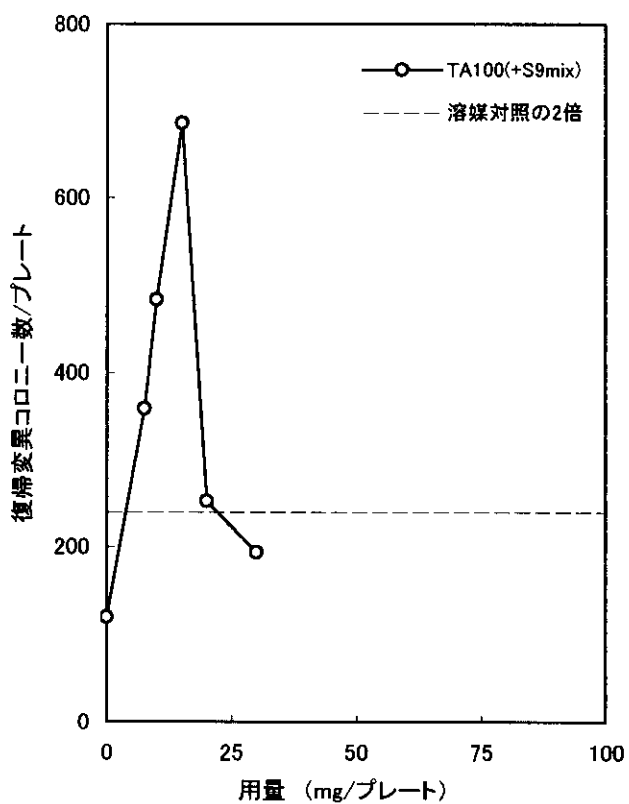


図18-3 木酢B社原液のTA100(+S9 mix) における

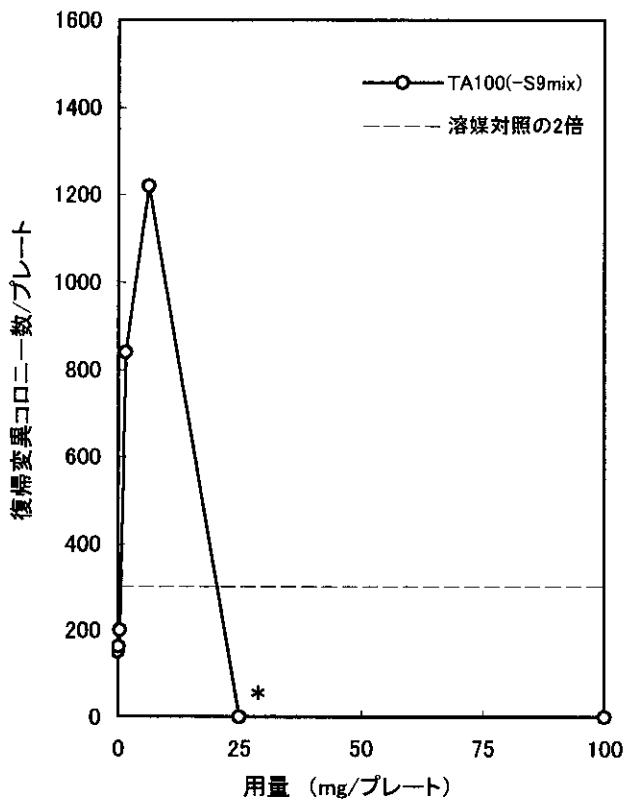


図19-1 木酢C社原液のTA100(-S9 mix) における
量-反応曲線 (用量設定試験)
*: 生育阻害あり

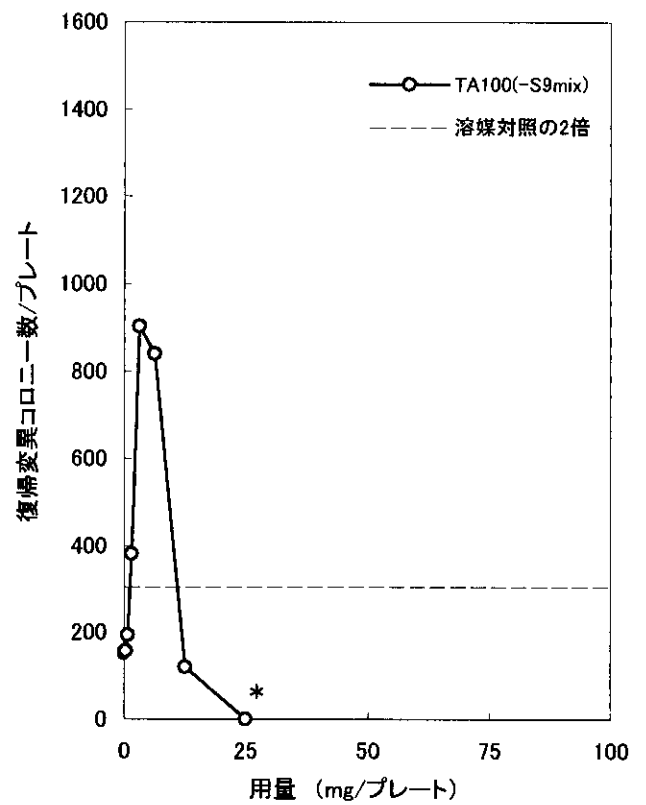


図19-2 木酢C社原液のTA100(-S9 mix) における
量-反応曲線 (本試験)
*: 生育阻害あり

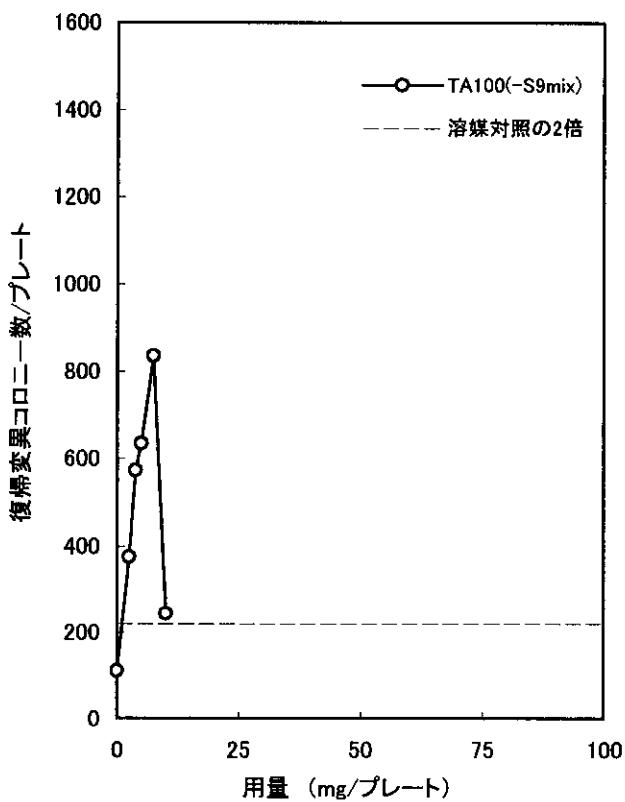


図19-3 木酢C社原液のTA100(-S9 mix) における
量-反応曲線 (確認試験-1)

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

分担研究者 中嶋 圓 財団法人 食品農医薬品安全性評価センター
遺伝毒性グループ グループリーダー
試験責任者 益森 勝志 財団法人 食品農医薬品安全性評価センター
遺伝毒性グループ グループリーダー補佐
試験担当者 赤星 まゆみ 財団法人 食品農医薬品安全性評価センター
遺伝毒性グループ

要旨

本研究の目的は、既存添加物であるヒメマツタケ抽出物のほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性の有無を検索することを目的とした。試験は、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「安全性に関する試験の標準的実施方法（哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験）」の基準に従い実施した。その結果、ヒメマツタケ抽出物のほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性は認められなかった。

A.目的

既存添加物であるヒメマツタケ抽出物は、担子菌ヒメマツタケ (*Agaricus blazei* MURR.) の菌子体若しくは子実体又はその培養液より、水で抽出して得られたものである。苦味料として食品に添加する。

本試験は、ヒメマツタケ抽出物のほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性の有無を検索することを目的とした。

B.方法

1. 既存添加物

ヒメマツタケ抽出物は、日本食品添加物協会から提供されたものを用いた。提供されたヒメマツタケ抽出物は室温、気密条件下で保管した。

2. 細胞

試験には、チャイニーズ・ハムスター肺由来の CHL/IU 細胞を用いた。CHL/IU 細胞を、国立医薬品食品衛生研究所より入手（1984年11月入手）し、継代後、液体窒素（-196℃）中に凍結保存した。その細胞（倍加時間約18時間、マイコプラズマの汚染なし）を、解凍後、継代9および13代で試験に用いた。

培養には、仔牛血清（CS、Invitrogen Corp.）を10%添加したイーグル MEM 培養液を用い、CO₂ インキュベーター（5% CO₂、37℃）内で培養した。

3. S9 及び S9 mix

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 S9 に、補酵素を添加した市販品 (S9 mix : キッコーマン株式会社製造) を購入して用いた。

S9 mix 1 mL 中の組成は、G-6-P が 5 $\mu\text{mol}/0.1\text{ mL}$ 、NADP が 4 $\mu\text{mol}/0.1\text{ mL}$ 、 MgCl_2 が 5 $\mu\text{mol}/0.1\text{ mL}$ 、KCl が 33 $\mu\text{mol}/0.1\text{ mL}$ 、HEPES (pH7.2) が 4 $\mu\text{mol}/0.2\text{ mL}$ 、S9 が 0.3 mL、蒸留水が 0.1 mL である。

4. 溶媒および被験物質溶液の調製

ヒメマツタケ抽出物は、水に可溶であり、生理食塩液に溶解したことから、溶媒として生理食塩液を用い、連続希釈により被験物質液を調製した。プレートあたり被験物質液を 10 vol% 添加した。

5. 処理方法

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「安全性に関する試験の標準的実施方法 (哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験)」¹⁾ の基準に従い、石館ら²⁾ の方法に準拠して以下に示した手順で実施した。

細胞増殖抑制試験では CHL/IU 細胞を細胞培養用マルチプレート 12 ウェルに播種 (8×10^3 個/well) し、染色体異常試験では組織培養用シャーレに播種 (4×10^4 個/dish、直径 6 cm) した。それぞれ 3 日間培養した後、短時間処理法および連続処理法による処理を行った。短時間処理法では、培地交換したのち、S9 mix 非添加および添加条件下で既存天然添加物を加えて 6 時間処理した。処理終了後、細胞をダルベッコリン酸緩衝液

で洗浄し、培養液でさらに 18 時間培養した。また、連続処理法では、被験物質を加えて 24 時間連続処理した。

6. 細胞増殖抑制作用の測定

細胞増殖抑制作用測定の各ウェルについては、10 vol%ホルマリン溶液で固定し、0.1%クリスタルバイオレット液で染色した。色素溶出液 (30%エタノール+1%酢酸) を各ウェルに加えて 5 分間放置した後、分光時計を用いて 580 nm の吸光度を測定した。陰性 (溶媒) 対照群と比較した各処理群の相対増殖率を計測算出し、増殖率の指標とした。染色体異常試験においては ATP フォトメーターを用いて細胞増殖に関するデータを採取した。

7. 染色体標本の作製

培養終了の 2 時間前にコルセミドを最終濃度が 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加した。培養終了後、0.25%トリプシン液をプレートあたり 2 mL 加えて細胞をはがし、遠心分離 (1000 rpm、5 分) 後、37°C に暖めておいた 5 mL の 0.075 mol/L KCl 水溶液を加え、約 16 分間低張処理を行った。低張処理後、固定液 (メタノール : 酢酸 = 3 : 1 (v/v)) を加えて細胞を固定した。細胞浮遊液をスライドガラス上に滴下し、乾燥させた。スライド標本を 1.2 %ギムザ液 (pH 6.8 の 1/100 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液で希釈調製) で染色し、水洗後、乾燥させた。

8. 染色体分析

染色体異常の分析は、標本をコード化して、処理条件が分からない状態で行った。

プレートあたり 100 個の分裂中期像を顕

微鏡下で観察し、染色体の構造異常の有無を分析し、異常の種類別に記録した。ギャップについては、染色分体幅よりも狭い非染色性部位と定義し、構造異常誘発性の判定には含めないこととした。

また、プレートあたり 100 個の分裂中期像を観察し、倍数性細胞の出現数についても計数した。

9. 判定基準

染色体異常をもつ細胞の出現頻度が陰性対照群に比較して明らかに増加し、濃度依存性又は再現性が得られる場合に、陽性と判定した。

(倫理面の配慮)：本研究では株化されたげっ歯類の細胞のみを用い *in vitro* 条件下で試験を行っていることから、動物愛護上の配慮ならびにヒト組織利用の倫理上問題になることはない。

C. 結果

染色体異常試験に用いる濃度を決定するため、ヒメマツタケ抽出物の細胞増殖抑制作用を調べた結果、ヒメマツタケ抽出物は CHL/IU 細胞の増殖を阻害せず、むしろ促進した(表 1、2)。これらの結果を基に処理濃度を設定し、染色体異常試験を実施した。

染色体分析の結果、ヒメマツタケ抽出物は、いずれの処理条件においても染色体異常の誘発は認められなかった(表 3、4)。

D. 考察

ヒメマツタケ抽出物について、ガイドラインで定められた 5000 µg/mL まで試験したが、短時間処理法および連続処理法のいずれの

試験系においても染色体異常の誘発頻度は陰性対照群と同等の値であり、明らかに染色体異常誘発作用は認められなかった。一方、陽性対照物質については、明らかに染色体異常が誘発され、その出現頻度は当センターの背景値の範囲内であった。このことより試験は適切に実施されたものと判断した。以上のことより、ヒメマツタケ抽出物のほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と判定した。

E. 引用文献

- 1) 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
- 2) 石館 基 監修 (1987): <改定> 染色体異常試験データ集、エル・アイ・シー

表 1 細胞増殖抑制試験の結果（短時間処理法）

被験物質の名称：ヒメマツタケ抽出物

測定方法：分光光度計による吸光度測定

試験番号： 7589 (079-155)

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)	
用量 (mg/mL)	細胞増殖率 (%)	用量 (mg/mL)	細胞増殖率 (%)
0	100	0	100
0.00977	112.7	0.00977	107.9
0.0195	98.8	0.0195	98.8
0.0391	97.4	0.0391	96.1
0.0781	101.4	0.0781	102.6
0.156	117.7	0.156	108.1
0.313	125.0	0.313	108.1
0.625	123.8	0.625	106.9
1.25	119.4	1.25	107.2
2.5	122.8	2.5	105.4
5	123.2	5	108.5

【備考】括弧内には処理時間及び回復時間を記入すること。

細胞増殖率は溶媒処理群を 100 %とし、濃度の低い順に記録すること。

表 2 細胞増殖抑制試験の結果（連続処理法）

被験物質の名称：ヒメマツタケ抽出物

測定方法：分光光度計による吸光度測定

試験番号： 7589 (079-155)

代謝活性化法によらない場合 (24-0 h)			
用量 (mg/mL)	細胞増殖率 (%)		
0	100		
0.00977	106.6		
0.0195	104.6		
0.0391	107.7		
0.0781	106.2		
0.156	110.8		
0.313	115.7		
0.625	122.7		
1.25	124.7		
2.5	142.3		
5	137.6		

【備考】括弧内には処理時間及び回復時間を記入すること。

細胞増殖率は溶媒処理群を 100 %とし、濃度の低い順に記録すること。

表3 染色体異常試験の結果(短時間処理法)

被験物質の名称: ヒメマツタケ抽出物

試験番号: 7589 (079-155)

処理時間 (h)	S9 mix	被験物質の用量 (mg/mL)	染色体構造異常の細胞数(出現頻度%)				細胞増殖率 (%)	ギャップ 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		観察細胞数	倍數体	その他	観察細胞数	倍數体	その他
6 - 18	-	陰性対照 (Saline) 0	100	1	0	0	100.0	1	0	0	100	0	0
			100	0	0	0	100.0	1	0	0	100	0	0
			200	1	0	0	1 (0.5)	2	0	0	200	0	0 (0.0)
6 - 18	-	1.25	100	0	0	0	135.2	0	0	0	100	1	0
			100	2	1	0	146.7	1	0	0	100	0	0
			200	2	1	0	141.0	1	1	0	200	1	1 (0.5)
6 - 18	-	2.5	100	0	0	0	133.0	2	0	0	100	0	0
			100	0	0	0	134.2	0	0	0	100	1	0
			200	0	0	0	133.6	2	0	0	200	1	1 (0.5)
6 - 18	-	5	100	0	0	0	187.6	0	0	0	100	0	0
			100	0	1	0	162.1	1	0	0	100	1	0
			200	0	1	0	174.9	1	1	0	200	1	1 (0.5)
6 - 18	-	陽性対照 (MMC) 0.0001	100	20	27	0	100.9	4	0	0	100	1	0
			100	23	36	0	99.4	6	0	0	100	1	0
			200	43	63	0	100.2	10	0	0	200	2	2 (1.0)
6 - 18	+	陰性対照 (Saline) 0	100	0	0	0	100.0	0	0	0	100	0	0
			100	0	0	0	100.0	0	0	0	100	1	0
			200	0	0	0	100.0	0	0	0	200	1	1 (0.5)
6 - 18	+	1.25	100	0	0	0	90.7	1	0	0	100	0	0
			100	1	0	0	99.5	1	0	0	100	1	0
			200	1	0	0	95.1	2	0	0	200	1	1 (0.5)
6 - 18	+	2.5	100	2	0	0	102.1	1	0	0	100	0	0
			100	3	1	0	109.6	1	0	0	100	2	0
			200	5	1	0	105.9	2	0	0	200	2	2 (1.0)
6 - 18	+	5	100	0	1	0	99.6	0	0	0	100	0	0
			100	0	0	0	106.7	0	0	0	100	1	0
			200	0	1	0	102.7	0	0	0	200	1	1 (0.5)
6 - 18	+	陽性対照 (CP) 0.0125	100	9	35	0	83.8	3	0	0	100	1	0
			100	17	30	1	76.6	6	0	0	100	0	0
			200	26	65	1	80.2	9	0	0	200	1	1 (0.5)

Saline: 生理食塩液

MMC : Mitomycin C

CP : Cyclophosphamide

表 4 染色体異常試験の結果 (連続処理法)

被験物質の名称：ヒメマツタケ抽出物

処理時間 (h)	S9 mix	被験物質の用量 (mg/mL)	染色体構造異常の細胞数 (出現頻度%)			染色体切断		染色体交換		ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%)	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	観察細胞数	倍數体			その他	総異常細胞数 (%)			
24 - 0	-	陰性対照 (Saline) 0	100	1	0	0	0	0	0	2	100.0	100	1	0	1	
			100	2	0	0	0	0	2	0	0	100.0	100	0	0	0
			200	3	0	0	0	0	3 (1.5)	0	2	100.0	200	1	0	1 (0.5)
24 - 0	-	1.25	100	0	1	0	0	0	0	0	94.3	100	0	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	118.8	100	0	0	0
			200	0	1	0	0	0	1 (0.5)	0	0	106.6	200	0	0	0 (0.0)
24 - 0	-	2.5	100	0	0	0	0	0	0	0	150.7	100	0	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	1	140.0	100	2	0	2
			200	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0	1	145.4	200	2	0	2 (1.0)
24 - 0	-	5	100	0	0	0	0	0	0	0	185.1	100	0	0	0	
			100	1	0	0	0	0	1	0	0	187.4	100	2	0	2
			200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0	0	186.3	200	2	0	2 (1.0)
24 - 0	-	陽性対照 (MMC) 0.00005	100	15	25	0	0	0	0	3	82.6	100	1	0	1	
			100	23	27	0	0	0	39	0	4	69.3	100	1	0	1
			200	38	52	0	0	0	74 (37.0)	0	7	76.0	200	2	0	2 (1.0)

Saline : 生理食塩液
MMC : Mitomycin C

メバロン酸のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

分担研究者 中嶋 圓 財団法人 食品農医薬品安全性評価センター
遺伝毒性グループ グループリーダー
試験責任者 同上
試験担当者 古屋 有佳子 財団法人 食品農医薬品安全性評価センター
遺伝毒性グループ

要旨

本研究の目的は、既存添加物であるメバロン酸のほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性の有無を検索することを目的とした。試験は、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「安全性に関する試験の標準的実施方法（哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験）」の基準に従い実施した。その結果、メバロン酸のほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性が認められた。

A.目的

既存添加物であるメバロン酸は、酵母 (*Saccharomycopsis fibuligera*) によるコーンスチープリカー又はカゼイン由来のペプトンを主原料とする発酵培養液より、有機溶剤で抽出して得られたものである。成分はメバロン酸である。動物や植物中に広く含まれている生体物質であり、分子内に不斉炭素を持ち天然には R(-)体が存在する。本品は酵母菌 *Saccharomycopsis fibuligera* を用いる醗酵法により得られる R(-)-メバロン酸が、還元したラクトン構造をとる。食品の栄養強化や、乳酸菌等の有用腸内細菌の活性化のために使用されている。

本試験は、メバロン酸のほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性の有無を検索することを目的とした。

B.方法

1. 既存天然添加物

日本食品添加物協会より提供されたメバロン酸を試験に用いた。提供されたメバロン酸は室温、気密条件下で保管した。

2. 細胞

試験には、チャイニーズ・ハムスター肺由来の CHL/IU 細胞を用いた。CHL/IU 細胞を、国立医薬品食品衛生研究所より入手（1984年11月入手）し、継代後、液体窒素（-196℃）中に凍結保存した。その細胞（倍加時間約18時間、マイコプラズマの汚染なし）を、解凍後、継代7（確認試験）、20、26および29代で試験に用いた。

培養には、仔牛血清（CS、Invitrogen Corp.）を10%添加したイーグル MEM 培養液を用

い、CO₂インキュベーター (5% CO₂、37°C) 内で培養した。

3. S9 及び S9 mix

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 S9 に、補酵素を添加した市販品 (S9 mix : キッコーマン株式会社製造) を購入して用いた。

S9 mix 1 mL 中の組成は、G-6-P が 5 μmol/0.1 mL、NADP が 4 μmol/0.1 mL、MgCl₂ が 5 μmol/0.1 mL、KCl が 33 μmol/0.1 mL、HEPES (pH7.2) が 4 μmol/0.2 mL、S9 が 0.3 mL、蒸留水が 0.1 mL である。

4. 溶媒および被験物質溶液の調製

メバロン酸は、水に極めて解けやすいことから、溶媒として生理食塩液を用い、連続希釈により被験物質液を調製した。プレートあたり被験物質液を 10 vol% 添加した。

5. 処理方法

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「安全性に関する試験の標準的実施方法 (哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験)」¹⁾ の基準に従い、石館ら²⁾ の方法に準拠して以下に示した手順で実施した。

細胞増殖抑制試験では CHL/IU 細胞を細胞培養用マルチプレート 12 ウェルに播種 (8×10^3 個/well) し、染色体異常試験では組織培養用シャーレに播種 (4×10^4 個/dish、直径 6 cm) した。それぞれ 3 日間培養した後、短時間処理法による処理を行った。短時間処理法では、培地交換したのち、S9 mix 非添加および添加条件下で既存天然添加物を加

えて 6 時間処理した。処理終了後、細胞をダルベッコリン酸緩衝液で洗浄し、培養液でさらに 18 時間培養した。

6. 細胞増殖抑制作用の測定

細胞増殖抑制作用測定の各ウェルについては、10 vol%ホルマリン溶液で固定し、0.1%クリスタルバイオレット液で染色した。色素溶出液 (30%エタノール+1%酢酸) を各ウェルに加えて 5 分間放置した後、分光光時計を用いて 580 nm の吸光度を測定した。陰性 (溶媒) 対照群と比較した各処理群の相対増殖率を計測算出し、増殖率の指標とした。染色体異常試験においては ATP フォトメーターを用いて細胞増殖に関するデータを採取した。

7. 染色体標本の作製

培養終了の 2 時間前にコルセミドを最終濃度が 0.2 μg/mL となるように添加した。培養終了後、0.25%トリプシン液をプレートあたり 2 mL 加えて細胞をはがし、遠心分離 (1000 rpm、5 分) 後、37°C に暖めておいた 5 mL の 0.075 mol/L KCl 水溶液を加え、約 16 分間低張処理を行った。低張処理後、固定液 (メタノール : 酢酸 = 3 : 1 (v/v)) を加えて細胞を固定した。細胞浮遊液をスライドガラス上に滴下し、乾燥させた。スライド標本を 1.2 %ギムザ液 (pH 6.8 の 1/100 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液で希釈調製) で染色し、水洗後、乾燥させた。

8. 染色体分析

染色体異常の分析は、標本をコード化して、処理条件が分からない状態で行った。

プレートあたり 100 個の分裂中期像を顕微鏡下で観察し、染色体の構造異常の有無

を分析し、異常の種類別に記録した。ギャップについては、染色分体幅よりも狭い非染色性部位と定義し、構造異常誘発性の判定には含めないこととした。

また、プレートあたり 100 個の分裂中期像を観察し、倍数性細胞の出現数についても計数した。

9. 判定基準

染色体異常をもつ細胞の出現頻度が陰性対照群に比較して明らかに増加し、濃度依存性又は再現性が得られる場合に、陽性と判定した。

(倫理面の配慮)：本研究では株化されたげっ歯類の細胞のみを用い *in vitro* 条件下で試験を行っていることから、動物愛護上の配慮ならびにヒト組織利用の倫理上問題になることはない。

C. 結果

染色体異常試験に用いる濃度を決定するため、メバロン酸の細胞増殖抑制作用を調べた結果、メバロン酸は 2.5-5.0 mg/mL の用量範囲で CHL/IU 細胞の増殖を阻害した(表 1、2)。これらの結果を基に処理濃度を設定し、染色体異常試験を実施した。

染色体分析の結果、メバロン酸は、明確な用量依存性はみられないものの、いずれの処理条件においても染色体異常の誘発が認められた(表 3)。S9 mix 添加群では高用量の 2.5 mg/mL においてのみ染色体構造異常が誘発されていたことから、2.0、2.25 および 2.5 mg/mL の 3 用量を用いた確認試験を実施した。同試験においても 2.5 mg/mL でのみ染色体構造異常の誘発が確認された(表 4)。

また、処理終了時、S9 mix 非添加の 4.0 mg/mL で pH が 6.1、S9 mix 添加の 2.5 mg/mL で pH が 6.3 に低下していた。

D. 考察

メバロン酸について、細胞の増殖を 50%以上抑制する用量まで試験した。その結果、短時間処理法の S9 mix 非添加および添加条件下いずれでも染色体構造異常の出現頻度が増加しており、S9 mix 添加では確認試験においても陽性反応が見られ再現性も確認された。また、いずれの試験においても高用量群では処理終了時に培養液の pH が低下していたが、森田ら³⁾の報告を鑑み染色体異常試験に影響しなかったものと判断した。

一方、陽性対照物質については、明らかに染色体異常が誘発され、その出現頻度は当センターの背景値の範囲内であった。このことより試験は適切に実施されたものと判断した。以上のことより、メバロン酸のほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と判定した。

E. 引用文献

- 1) 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
- 2) 石館 基 監修 (1987): <改定> 染色体異常試験データ集、エル・アイ・シー
- 3) T. Morita, *et al.*: Clastogenicity of low pH various cultured mammalian cells, *Mutat. Res.*, 268, 297-305, 1992

表 1 細胞増殖抑制試験の結果（短時間処理法）

被験物質の名称：メバロン酸

測定方法：分光光度計による吸光度測定

試験番号： 7590 (079-156)

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)	
用量 (mg/mL)	細胞増殖率 (%)	用量 (mg/mL)	細胞増殖率 (%)
0	100	0	100
0.0391	106.8	0.0391	106.7
0.0781	103.3	0.0781	115.8
0.156	105.7	0.156	114.7
0.313	107.2	0.313	112.5
0.625	114.3	0.625	126.0
1.25	108.3	1.25	118.7
2.5	112.3	2.5	54.4
5	53.4	5	65.1

[備考] 括弧内には処理時間及び回復時間を記入すること。

細胞増殖率は溶媒処理群を 100 %とし、濃度の低い順に記録すること。

表 2 細胞増殖抑制試験の結果（連続処理法）

被験物質の名称：メバロン酸

測定方法：分光光度計による吸光度測定

試験番号： 7590 (079-156)

代謝活性化法によらない場合 (24-0 h)			
用量 (mg/mL)	細胞増殖率 (%)		
0	100		
0.0391	106.7		
0.0781	114.9		
0.156	115.2		
0.313	109.5		
0.625	115.9		
1.25	111.0		
2.5	88.8		
5	5.5		

[備考] 括弧内には処理時間及び回復時間を記入すること。

細胞増殖率は溶媒処理群を 100 %とし、濃度の低い順に記録すること。

処理時間 (h)	S9 mix	被験物質の用量 (ng/ml)	染色体切断			染色体交換			染色体構造異常の細胞数(出現頻度%)			細胞増殖率 (%)	ギャップ の出現数	観察細胞数	染色体の数的異常の細胞数(出現頻度%)	その他	観察細胞数	倍數体	その他	総異常細胞数 (%)		
			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	染色体交換	染色体交換	染色体交換	染色体交換										染色体交換	染色体交換
6 - 18	-	陰性対照 (Saline) 0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	100.0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	100.0	1	100	0	0	0	0	0	0	0	0
			200	0	0	0	0	0	0	0	0	100.0	1	200	0	0	0	0	0	0	0	0
6 - 18	-	3	100	0	1	0	0	0	0	0	109.8	1	100	3	0	0	0	3	0	0	3	
			100	0	0	0	0	0	0	0	102.2	0	100	2	0	0	0	2	0	0	2	
			200	0	1	0	0	0	0	0	106.0	1	200	5	0	0	0	5	0	0	5	2.5
6 - 18	-	3.5	100	2	5	0	1	0	0	6	100.3	1	100	0	0	0	0	0	0	0	0	
			100	1	0	0	0	0	0	0	112.5	0	100	1	0	0	0	1	0	0	1	
			200	3	5	0	1	0	0	0	7 (3.5)	106.4	1	200	1	0	0	1	0	0	1	0.5
6 - 18	-	4	100	16	27	0	0	0	0	1	46.9	6	100	1	0	0	0	1	0	0	1	
			100	15	18	0	0	0	0	0	26	48.9	6	100	0	0	0	0	0	0	0	0
			200	31	45	0	0	0	0	0	6	47.9	12	200	1	0	0	1	0	0	1	0.5
6 - 18	-	4.5	NE	-	-	-	-	-	-	-	20.5	-	NE	-	-	-	-	-	-	-		
			NE	-	-	-	-	-	-	-	-	25.0	-	NE	-	-	-	-	-	-	-	
			-	-	-	-	-	-	-	-	-	22.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
6 - 18	-	陽性対照 (MMC) 0.0001	100	7	21	0	1	0	0	25	83.5	5	100	0	0	0	0	0	0	0		
			100	12	28	0	0	0	0	0	34	97.8	7	100	0	0	0	0	0	0	0	
			200	19	49	0	1	0	0	0	59 (29.5)	90.7	12	200	0	0	0	0	0	0	0	0
6 - 18	+	陰性対照 (Saline) 0	100	1	0	0	0	0	0	1	100.0	0	100	1	0	0	0	1	0	0	1	
			100	0	1	0	0	0	0	0	1	100.0	1	100	0	0	0	0	0	0	0	0
			200	1	1	0	0	0	0	0	2 (1.0)	100.0	1	200	1	0	0	1	0	0	1	0.5
6 - 18	+	0.625	100	0	0	0	0	0	0	0	104.8	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	112.4	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
			200	0	0	0	0	0	0	0	0	108.6	0	200	0	0	0	0	0	0	0	0
6 - 18	+	1.25	100	0	0	0	0	0	0	0	90.6	1	100	0	0	0	0	0	0	0		
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	67.6	0	100	0	0	0	0	0	0	0	
			200	0	0	0	0	0	0	0	0	79.1	1	200	0	0	0	0	0	0	0	0
6 - 18	+	2.5	100	7	19	0	0	0	0	23	35.9	5	100	0	0	0	0	0	0	0	3	
			100	8	17	0	0	0	0	0	18	34.1	1	100	3	0	0	0	0	0	3	
			200	15	36	0	0	0	0	0	41 (20.5)	35.0	6	200	3	0	0	0	0	0	6	3.0
6 - 18	+	5	TOX	-	-	-	-	-	-	-	0.0	-	TOX	-	-	-	-	-	-	-		
			TOX	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0	-	TOX	-	-	-	-	-	-	-	
			-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
6 - 18	+	陽性対照 (CP) 0.0125	100	5	25	0	0	0	0	29	104.4	6	100	0	0	0	0	0	0	0		
			100	11	19	0	1	0	0	0	27	103.2	6	100	2	0	0	0	0	0	2	
			200	16	44	0	1	0	0	0	56 (28.0)	103.8	12	200	2	0	0	0	0	2	2	1.0

MMC : Mitomycin C

CP : Cyclophosphamide

NE : Not examined

表 4 染色体異常試験の結果 (短時間処理法；確認試験)

被験物質の名称：メバロン酸

処理時間 (h)	S9 mix	被験物質の用量 (mg/ml)	染色体構造異常の細胞数 (出現頻度%)			ギャップ の出現数			細胞増殖率 (%)	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	観察細胞数	倍率	その他	総異常細胞数 (%)		
6 - 18	+	陰性対照 (Saline) 0	100	0	0	0	0	0	1	100.0	100	0	0	0		
			100	0	0	0	0	0	0	1	100.0	100	0	0	0	
			200	0	0	0	0	0	0 (0.0)	2	100.0	200	0	0	0 (0.0)	
6 - 18	+	2	100	1	0	0	0	0	3	78.4	100	1	0	0	1	
			100	2	0	0	0	0	2	0	106.0	100	1	0	0	1
			200	3	1	0	0	0	4 (2.0)	3	92.2	200	2	0	2 (1.0)	
6 - 18	+	2.25	100	0	0	0	0	0	1	67.3	100	0	0	1	1	
			100	0	0	0	0	0	0	1	76.6	100	0	0	0	0
			200	0	0	0	0	0	0 (0.0)	2	72.0	200	0	0	1 (0.5)	
6 - 18	+	2.5	100	4	15	0	0	0	2	45.3	100	1	0	0	1	
			100	5	9	1	0	0	11	2	50.2	100	1	1	2	
			200	9	24	1	0	0	26 (13.0)	4	47.8	200	2	1	3 (1.5)	
6 - 18	+	陽性対照 (CP) 0.0125	100	9	23	0	0	0	1	62.5	100	0	0	0	0	
			100	3	18	0	0	0	21	2	72.1	100	0	0	0	
			200	12	41	0	0	0	50 (25.0)	3	67.3	200	0	0	0 (0.0)	

CP : Cyclophosphamide