

表2 試験結果表

被験物質の名称： グレープフルーツ種子抽出物

試験番号： 7588 (079-154)

代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	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	WP2uvrA	TA98	TA1537
- S 9 m i x	陰性対照	102 103 (103)	10 12 (11)	37 34 (36)	24 26 (25)	5 4 (5)
	0.977	103 98 (101)	7 8 (8)	/	20 26 (23)	5 4 (5)
	1.95	116 116 (116)	11 8 (10)	34 35 (35)	25 28 (27)	7 7 (7)
	3.91	97 96 (97)	14 13 (14)	21 32 (27)	28 32 (30)	6 6 (6)
	7.81	97 92 (95)	11 13 (12)	33 35 (34)	26 24 (25)	7 5 (6)
	15.6	100* 104* (102)	12* 10* (11)	31 35 (33)	29 32 (31)	4* 4* (4)
	31.3	93* 87* (90)	7* 6* (7)	16* 17* (17)	21* 18* (20)	5* 4* (5)
	62.5	/	/	17* 16* (17)	/	/
	+ S 9 m i x	陰性対照	119 127 (123)	7 7 (7)	31 30 (31)	31 35 (33)
15.6		120 129 (125)	9 11 (10)	/	35 38 (37)	15 18 (17)
31.3		128 123 (126)	9 12 (11)	34 31 (33)	36 33 (35)	20 22 (21)
62.5		120 123 (122)	6 8 (7)	29 24 (27)	37 31 (34)	20 18 (19)
125		123 121 (122)	9 11 (10)	31 26 (29)	35 36 (36)	21 17 (19)
250		121* 114* (118)	7* 8* (8)	23 20 (22)	33* 24* (29)	13* 12* (13)
500		121* 124* (123)	7* 8* (8)	25 28 (27)	32* 28* (30)	13* 9* (11)
1000		/	/	12* 17* (15)	/	/
陽性対照		名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2
	S 9 m i x を必要としないもの 用量($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	陰性対照 / プレート	320 323 (322)	369 401 (385)	113 107 (110)	639 678 (659)	197 210 (204)
	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	S 9 m i x を必要とするもの 用量($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	1	2	10	0.5	2
	コロニー数 / プレート	1084 1017 (1051)	432 319 (376)	680 723 (702)	275 244 (260)	206 224 (215)

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

NaN₃ : Sodium azide

9-AA : 9-Aminoacridine hydrochloride

2-AA : 2-Aminoanthracene

* : 菌の生育阻害が認められた

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

グレープフルーツ種子抽出物の哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験責任者 浅倉 眞澄 中央労働災害防止協会 日本バイオッセイ研究センター 室長
試験担当者 杉山 淑江 中央労働災害防止協会 日本バイオッセイ研究センター 室長補佐
試験担当者 佐々木俊明 中央労働災害防止協会 日本バイオッセイ研究センター 主任研究員

要旨

本研究は、既存添加物であるグレープフルーツ種子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、グレープフルーツ種子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と判断した。

A. 目的

既存添加物であるグレープフルーツ種子抽出物は、グレープフルーツの種子から水またはエタノールで抽出して得られたものであり、抗菌作用があるため日持ち向上剤として使用される。

本試験は、グレープフルーツ種子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することを目的とした。

B. 方法

1. 既存添加物

日本食品添加物協会より提供されたグレープフルーツ種子抽出物を試験に用いた。提供されたグレープフルーツ種子抽出物は使用時まで冷蔵、遮光で保管した。

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、国立衛生試験所(現国立医薬品食品衛生研究所)より入手(1985年11月入手、入手時の継代数16)し、継代後、液体窒素(-196℃)中に凍結保存(凍結保存時の継代数20)した。その細胞(倍加時間約15時間、マイコプラズマの汚染なし)を解凍後、継代15から21代で試験に用いた。

培養には、非働化した仔牛血清(CS、ロット番号:1J0518、JRH Biosciences社)を10%添加したイーグル MEM (GIBCO BRL) 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

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、「染色体異常試験用凍結 S-9Mix」として市販(キッコーマン株式会社製造)されているものを購入して用いた[調製時組成/濃度: 0.83 mM G-6-P、0.67 mM NADP、0.83 mM MgCl₂、5.5 mM KCl、0.67 mM HEPES (pH7.3)、5% S9]。

4. 溶媒及び被験物質溶液の調製

グレープフルーツ種子抽出物は、水に可溶であるため、溶媒として超純水(ミリ-Q水)を用い、超純水に溶解した後、培養液の1/9容を添加して処理を行った。

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、祖父尼ら²⁾の方法に準拠して以下に示した手順で実施した。

CHL/IU 細胞をポリスチレン製ディッシュに播種(2×10⁴個/6 cm dish)し、3日間培養後、短時間処理法及び連続処理法による処理を行った。短時間処理法では、培地を除去したのち、S9 mix 非添加及び添加条件下で被験物質溶液を添加して6時間処理した。処理終了後、細胞をPBS(リン酸緩衝生理食塩水)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、培地を除去したのち、被験物質溶液を添加して24時間及び48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ためのディッシュについては、細胞をPBSで洗浄後、エタノール

で固定し、0.1%クリスタルバイオレット液で染色した。単層培養細胞密度計(Monocellater、オリンパス光学工業)を用い、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し、増殖率の指標とした。

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、培養液を遠沈管に移し、0.1%トリプシン溶液[0.036%EDTA2Na 含有 PBS (Ca²⁺及びMg²⁺不含)]をディッシュあたり2 mL 加えて細胞をはがし、遠沈(1000 rpm、約5分)後、4 mLの0.075 mol/L KCl水溶液を加え、約20分間低張処理を行った。低張処理後、固定液[エタノール:酢酸=3:1 (v/v)]を加えて細胞を固定した。その後細胞固定を3回繰り返した後に、細胞浮遊液をスライドガラス上に滴下し、乾燥させた。作製したスライド標本を2.5%ギムザ液(pH 6.8の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。

ディッシュあたり100個の分裂中期細胞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、ディッシュあたり100個以上の分裂中期細胞を観察し、数的異常を持つ細胞の出現数についても計数した。

9. 判定基準

構造異常、数的異常ともに、染色体異常を持つ細胞の出現頻度が10%以上を示し、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。

C. 結果

染色体異常試験に用いる濃度を決定するため、グレープフルーツ種子抽出物の増殖抑制作用を調べた結果、短時間処理法の-S9処理では0.078 mg/mLから0.31 mg/mLの濃度範囲で増殖抑制が認められ、+S9処理では0.16 mg/mLから1.3 mg/mLの濃度範囲で増殖抑制が認められた(表1)。連続処理法の24時間処理では0.013 mg/mLから0.1 mg/mLの濃度範囲で増殖抑制が認められ、48時間処理では0.0063 mg/mLから0.1 mg/mLの濃度範囲で増殖抑制が認められた(表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、短時間処理法において、いずれの処理条件においても構造異常及び数的異常の誘発は認められなかった(表3、4)。連続処理法の24時間処理では、構造異常の誘発は認められなかったが、数的異常の誘発率は0.04 mg/mlで5.2%を示した。48時間処理では、構造異常の誘発は認められなかったが、数的異常の誘発率は、0.02、0.04、0.06、0.08、0.1mg/mlでそれぞれ、7.8、12.3、16.0、14.9、7.8%を示した(表5)。数的異常誘発の D_{20} 値(染色体異常を20%誘発する用量)²⁾は、0.091mg/mLであった。

D. 考察

グレープフルーツ種子抽出物について、短時間処理法では細胞増殖が抑制される濃度まで試験したが、染色体異常の誘発頻度は5%未満であり、明らかな染色体異常誘発作用は認められなかった。一方、連続処理法の48時間処理においては、数的異常の誘発率が陽性の判定である10%以上を示し、かつ用量に依存して上昇した。

なお、陰性(溶媒)対照及び陽性対照の値は、当センターのヒストリカルデータの範囲内であり、試験は適切に実施されたものと判断した。

以上の結果から、グレープフルーツ種子抽出物は、CHL/IU細胞に対して染色体異常誘発性を有する(数的異常誘発)と判断した。

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) 祖父尼俊雄 監修(1999):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：グレープフルーツ種子抽出物

測定方法：モノセレーターによる細胞密度測定

代謝活性化法によらない場合(-S9:6-18h)		代謝活性化法による場合(+S9:6-18h)	
用量 (mg/mL)	細胞増殖率(%)	用量 (mg/mL)	細胞増殖率(%)
0	100	0	100
0.02	94	0.02	100
0.039	91	0.039	101
0.078	81	0.078	99
0.16	60	0.16	88
0.31	1	0.31	69
0.63	0	0.63	63
1.3	9	1.3	4
2.5*	12	2.5*	19
5.0*	25	5.0*	29

[備考]括弧には処理時間及び回復時間を記入した。

細胞増殖率は溶媒処理群を100%とし、濃度の低い順に記録した。

細胞増殖率は2枚のシャーレの平均値を表示した。

*：沈殿

表2 細胞増殖抑制試験結果（連続処理法）

被験物質の名称：グレープフルーツ種子抽出物

測定方法：モノセレーターによる細胞密度測定

(24-0h) 処理による場合		(48-0h) 処理による場合	
用量 (mg/mL)	細胞増殖率(%)	用量 (mg/mL)	細胞増殖率(%)
0	100	0	100
0.0031	99	0.0031	95
0.0063	102	0.0063	88
0.013	86	0.013	77
0.025	82	0.025	68
0.05	65	0.05	43
0.1	19	0.1	13
0.2	0	0.2	0
0.4	0	0.4	0

[備考]括弧には処理時間及び回復時間を記入した。

連続処理法は代謝活性化法によらない方法による。

細胞増殖率は溶媒処理群を100%とし、濃度の低い順に記録した。

細胞増殖率は2枚のシャーレの平均値を表示した。

表3 染色体異常試験の結果（短時間処理法、実験I）

被験物質の名称：グレープフルーツ種子抽出物

処理時間(h)	SS 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 (%)	染色体数的異常の細胞数（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	倍染色体	その他	総異常細胞数											
6-18	-	阴性対照 [超純水] (10%)	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
6-18	-	0.04	100	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6-18	-	0.08	200	2(1.0)	1(0.5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6-18	-	0.12	100	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6-18	-	0.16	100	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6-18	-	0.2	200	3(1.5)	2(1.0)	2(1.0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6-18	-	0.24	100	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6-18	-	阴性対照 [MMC] (0.0001)	100	8	45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6-18	+	阴性対照 [超純水] (10%)	100	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6-18	+	0.2	100	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6-18	+	0.4	100	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6-18	+	0.6	200	0(0.0)	3(1.5)	3(1.5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6-18	+	0.8	100	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6-18	+	1.0	200	0(0.0)	2(1.0)	2(1.0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6-18	+	阴性対照 [B[a]P] (0.01)	100	1	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6-18	+		100	9	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6-18	+		200	10(5.0)	75(37.5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

[備考] 1. 処理時間の欄には、処理時間一回復時間の順に記入した。
 2. 各群のプレートごとのデータを1及び2行目に記入し、その合計を3行目に記入し、その平均値を括弧内に記入した。
 TOX：分裂中期細胞が観察されなかった。
 超純水：ミリ-Q水
 MMC：マイトマイシンC
 B[a]P：ベンゾ[a]ピレン

表 4 染色体異常試験の結果（短時間処理法、実験II）

被験物質の名称：グレープフルーツ種子抽出物

処理時間 (h)	39 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 (%)	染色体数的異常の細胞数 (出現頻度%)						
			染色体切断					染色体交換						観察細胞数	倍數体	その他	總異常細胞数			
			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	観察細胞数	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 [超純水] (10%)	100	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	101	1	0	1
6-18	+	0.55	100	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	101	1	0	1	
6-18	+	0.6	200	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	202	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	
6-18	+	0.65	100	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	102	2	0	2		
6-18	+	0.65	100	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	103	2	1	3		
6-18	+	0.7	200	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	205	4 (2.0)	1 (0.5)	5 (2.4)		
6-18	+	0.7	100	1	0	3	0	0	0	0	0	0	0	4	104	4	0	4		
6-18	+	0.75	100	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	104	3	1	4		
6-18	+	0.75	200	1 (0.5)	0 (0.0)	5 (2.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (3.0)	208	7 (3.4)	1 (0.5)	8 (3.8)		
6-18	+	0.75	100	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	3	102	2	0	2		
6-18	+	0.75	100	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	100	0	0	0		
6-18	+	0.75	200	1 (0.5)	0 (0.0)	4 (2.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (2.5)	202	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)		
6-18	+	0.75	TOX												TOX					
6-18	+	0.75	TOX												TOX					
6-18	+	0.75	TOX												TOX					
6-18	+	0.75	TOX												TOX					
6-18	+	陽性対照 [B[a]P] (0.01)	100	2	0	24	0	1	0	0	0	0	0	26	101	1	0	1		
6-18	+	陽性対照 [B[a]P] (0.01)	100	4	0	19	0	0	0	0	0	0	21	101	1	0	0	1		
6-18	+	陽性対照 [B[a]P] (0.01)	200	6 (3.0)	0 (0.0)	43 (21.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	47 (23.5)	202	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)			

[備考] 1. 処理時間の欄には、処理時間一回復時間の順に記入した。
 2. 各群のプレートごとのデータを1及び2行目に記入し、その合計を3行目に記入し、その平均値を括弧内に記入した。
 超純水：ミリ-Q水 B[a]P：ベンゾ[a]ピレン

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

既存添加物の安全性確保上必要な品質問題に関する研究
没食子酸のげっ歯類を用いた小核試験による遺伝毒性の評価

分担研究者 宮澤 真紀（神奈川県衛生研究所・理化学部 主任研究員）
協力研究者 土井 佳代（神奈川県衛生研究所・理化学部 専門研究員）
熊坂 謙一（神奈川県衛生研究所・理化学部 技師）

研究要旨

平成8年度厚生科学研究報告書「既存天然添加物の安全性評価に関する調査研究」で、安全性試験実施も含めその安全性について検討する必要があるとされた138品目の既存添加物のうち、没食子酸の安全性を再評価するため、マウス骨髄細胞の小核出現頻度を指標とするマウス小核試験を行い、染色体の構造異常及び数的異常を起こす性質があるか否かを検討した。その結果、没食子酸での変異原性は認められなかった。

A. 研究目的

平成8年度厚生科学研究報告書「既存天然添加物の安全性評価に関する調査研究」で、138品目の既存天然添加物が、安全性試験実施も含めその安全性について検討する必要があると報告されている。そのうち、酸化防止剤として使用されている没食子酸については、変異原性の有無について異なる多数の論文が発表されている。そこで、没食子酸の安全性を再評価するため、マウス骨髄細胞の小核出現頻度を指標としたマウス小核試験を行い、染色体の構造異常及び数的異常を起こす性質があるか否かを判定した。

B. 研究方法

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・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）¹⁾に従い実施した。

1. 検体

没食子酸は、日本食品添加物協会より提供されたものを使用した。本品は、マメ科タラ（*Caesalpinia spinosa*）の実の莢より温時水で抽出したタンニンをアルカリにより加水分解し、

精製したもので、白色の針状結晶性粉末であり、賦形剤は入っていなかった。

2. 試験溶液の調製

1) 没食子酸

検体を0.5%CMCナトリウム溶液で懸濁し、試験溶液とした。

2) 陰性対照

陰性対照は、精製水を用いた。

3) 陽性対照

陽性対照は、マイトマイシンC 2mg（マイトマイシン協和S、協和発酵工業株式会社）に生理食塩水を10mL加えて溶解した溶液を試験液とした。

3. 動物

8週齢のddY系雄マウス（日本SLC）を、温度23±3°C、湿度50±10%、明暗12時間のconventional環境下で固形飼料（CE-2 日本クレア）及び水（水道水）を自由摂取させ、1週間の観察期間を経た後、試験に使用した。

4. 急性毒性試験

検体の投与量を決定するために急性毒性試験を行った。没食子酸は50、100及び200mg/mLになるよう試験溶液を調製した。各試験液あたり1群3匹のマウスに10mL/kg/dayの容量で経

口ゾンデを用いて経口投与を行った。24時間間隔で2回投与を行った後、2週間にわたり症状及び体重変化を観察した。

陰性対照には精製水を用い、24時間間隔で、2回経口投与を行った。

5. 小核試験

1) 群

マウスは1群5匹とし、検体投与群3群、陰性対照群および陽性対照群を設けた。試験開始直前に体重を測定し、実験群の平均体重に偏りが生じないように、群分けを行った。

2) 投与量および投与濃度

没食子酸は、500mg、1000mg及び2000mg/10mL/kgを、24時間間隔で2回経口投与した。陰性対照として、精製水10mL/kgを24時間間隔で2回経口投与した。

陽性対照としてマイトマイシンC 2mg/10mL/kgを、検体投与群及び陰性対照群の採材前日に、1回腹腔内投与を行った。

3) 採取時間

実験群、陰性対照群及び陽性対照群は、最終投与の24時間後に頸椎脱臼により屠殺し、大腿骨を採取した。

4) 標本作製

片側の大腿骨を取り出し、0.4mLの牛胎仔血清を用い、骨髓細胞を遠沈管に洗い出した。1000 rpmで10分間遠沈し、上清をすて少量の上澄み液で細胞懸濁液を作り、塗抹標本作製した。塗抹標本は十分風乾した後、5分間メタノールで固定した。標本は、Sorensenリン酸緩衝液(pH 6.8)で希釈した3%ギムザ液で30分間染色し、水洗後、0.4%クエン酸溶液に数秒間浸し、再度水洗後送風下で乾燥させた。

5) 観察方法

標本はコード化し、多染性赤血球(PCE)および正染赤血球(NCE)を盲検法により観察した。1匹あたりPCEを2000個観察し、多染性赤血球中の小核出現頻度(MNPCE)および多染性赤血球比(PCE)を求めた。

PCEについては χ^2 検定を、MNPCEは条件付2項検定(Kastenbaum and Bouman)²⁾を行った。

C. 研究結果

1. 急性毒性試験

急性毒性試験の結果を表1に示した。没食子酸のいずれの濃度群においても検体の投与による死亡や体重の減少は認められなかった。この結果に基づき、小核試験における検体の1回あたりの最高投与量を2000mg/kgとした。

2. 小核試験

没食子酸の小核試験の結果を表2に、各検体における結果詳細を付表に示した。

多染性赤血球中の小核保有細胞の出現頻度は、陽性対照群では2.09%、陰性対照群では0.10%、試験溶液投与群の2000mg/kg群、1000mg/kg群、500mg/kg群でそれぞれ0.09%、0.06%、0.12%であった。いずれの試験溶液投与群でも、陰性対照群と比較して小核保有細胞の出現頻度に有意差は認められず、また多染性赤血球比(PCE)の減少も認められなかった。以上により没食子酸の小核試験は、陰性の結果であった。

D. 考 察

既存添加物“没食子酸”は、ウルシ科ヌルデ(*Rhus javanica* LINNE)に発生する五倍子、ブナ科(*Quercus infectoria* OIIV.)に発生する没食子より、水、エタノールまたは有機溶剤で抽出したタンニン、又はマメ科カラ(*Caesalpinia spinosa* (MOLINA)KUNTZE)の実の莢より、温時水で抽出したタンニンを、アルカリ又はタンナーゼにより加水分解して得られたものであり、成分は、没食子酸である。酸化防止剤として、魚油、油脂、煮干し、鰹節、プレミックス等に使用される。

没食子酸のマウス急性毒性試験でのNOAELは、5000mg/kg³⁾、ラット亜慢性毒性試験での

NOAELは、雄で119mg/kg/day、雌で128mg/kg/day⁴⁾であることが報告されている。今回の急性毒性試験においても、LD₅₀は2000mg/kg以上であり、既知のデータを裏付けるものであった。

没食子酸は、AMES testでは陰性を示し⁵⁾、腫瘍細胞増殖抑制作用^{6, 7)}や*in vivo*での抗腫瘍作用⁸⁾が報告されている。しかし、一方で、細胞毒性作用があり、チャイニーズハムスター由来細胞株で染色体異常を起したという報告もある^{9,10)}。没食子酸のマウス骨髄細胞での小核試験は行われておらず、安全性評価のためのbatteryの一部として実施する必要があった。今回の小核試験では、MNPCE及びPCEで全く有意差を認めなかったことから、マウスの骨髄細胞に対して、没食子酸は変異原性はないものと考えられる。

E. 結 論

今回の研究で用いた既存天然添加物である没食子酸では変異原性は認められなかった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

特になし

H. 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 (1996)

2) Kastenbaum, M.A. and Bowman, K.O. : Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies, *Mutat. Res.*, 9, 529-549 (1970)

3) Rajalakshmi, K., Devaraj, H., and Niranjali Devaraj S. : Assessment of the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) of gallic acid in mice, *Food Chem. Toxicol.*, 39, 1919-22 (2001)

4) Niho, N., Shibutani, M., Tamura, T., Toyoda, K., Ueyama, C., Takahashi, N. and Hirose, M. : Subchronic toxicity study of gallic acid by oral administration in F344 rats, *Food Chem. Toxicol.*, 39, 1063-70 (2001)

5) Chen, S.C. and Chung, K.T. : Mutagenicity and antimutagenicity studies of tannic acid and its related compounds, *Food Chem. Toxicol.*, 38, 1-5 (2000)

6) Salucci, M., Stivala, L.A., Maiani, G., Bugianesi, R. and Vannini, V. : Flavonoid uptake and their effect on cell cycle of human colon adenocarcinoma cells, *Br. J. Cancer*, 86, 1645-51 (2002)

7) Serrano, A., Palacios, C., Poy, G., Cespon, C., Villar, M.L., Nocito, M. and Gonzalez-Porque, P. : Derivatives of gallic acid induce apoptosis in tumoral cell lines and inhibit lymphocyte. *Arch. Biochem. Biophys.*, 350, 49-54 (1998)

8) Chen, G., Perchellet, E.M., Gao, X.M., Newell, S.W., Hemingway, R.W., Bottari, V. and Perchellet, J.P. : Ability of m-chloroperoxybenzoic acid to induce the ornithine decarboxylase marker of skin tumor promotion and inhibition of this response by gallotannins, oligomeric proanthocyanidins, and their monomeric units in mouse epidermis *in vivo*, *Anticancer*

Res., 15, 1183-9(1995)

9) Labieniec, M., and Gabryelak, T. : Effect of tannins on Chinese hamster cell line B14., Mutat. Res. , 539, 127-35 (2003)

10) Tayama, S. and Nakagawa, Y. : Cytogenetic effect of propyl gallate in CHO-K1 cells, Mutat. Res., 498, 117-27 (2001)

表1. 被験物質についての2回投与による50%致死量 (LD₅₀²)

品目	1回あたりの 投与量 (mg/kg)	投与回数	生存数/投与数 (2週間)	推定LD ₅₀ ²
没食子酸	500	×2	3/3	
	1000	×2	3/3	
	2000	×2	3/3	>2000mg/kg

表2. 小核試験成績

被験物質	投与量 mg/kg/day	投与回数 投与間隔	動物 リング 時間 ^{a)}	多染性赤血球頻度		多染性 赤血球 観察数	小核含有多染性赤血球	
				% ± SD (Min / Max)	検定 ^{b)}		検定 ^{c)} % ± SD (Min / Max)	
没食子酸	0	×2	24	5	57.5 ± 2.8 (54.8 / 61.6)	10000	10	0.10 ± 0.08 (0.00 / 0.20)
	500	×2	24	5	57.0 ± 1.2 (55.4 / 58.2)	10000	12	N.S. 0.12 ± 0.08 (0.10 / 0.25)
	1000	×2	24	5	56.5 ± 3.6 (52.0 / 62.0)	10000	6	N.S. 0.06 ± 0.07 (0.00 / 0.15)
	2000	×2	24	5	58.4 ± 3.9 (53.6 / 62.4)	10000	9	N.S. 0.09 ± 0.07 (0.00 / 0.20)
MMC	2	×1	24	5	50.7 ± 4.0 (44.2 / 54.6)	10000	209	2.09 ± 0.42 (1.65 / 2.75)

^{a)} : 最終投与後のサンプルリング時間

^{b)} : Wilcoxonの順位和検定による検定 (** p < 0.01)

^{c)} : MMCはカイ二乗検定による検定 (** p < 0.01), それ以外はKastenbaum-Bowmanの数表による検定

MMC : Mitomycin C

N.S. : Not significantly different from the vehicle control. (p > 0.05)

附表
 IET No. :
 検体名 : 没食子酸
 機関名 : 神奈川県衛生研究所
 動物 : マウス/ddY /雄/8週齢/経口投与

mg/kg/day	SCHEDULE	MOUSE	MNPCE : %	PCE/(PCE+NCE): %	BW: g	CODE
0 Vehicle (0.5%CMC)	×2, 24hr	G0-1	0.10	55.8	36.4	15139
		G0-2	0.05	54.8	35.2	15127
		G0-3	0.00	59.2	35.9	15112
		G0-4	0.15	56.0	34.8	15177
		G0-5	0.20	61.6	37.0	15190
		Mean	0.10	57.5	35.9	
		Std	0.08	2.8	0.9	
		Min	0.00	54.8	34.8	
		Max	0.20	61.6	37.0	
		Total No.	10			
500	×2, 24hr	GL-1	0.10	57.2	35.0	15105
		GL-2	0.15	58.2	36.1	15148
		GL-3	0.05	55.4	34.0	15156
		GL-4	0.05	56.0	35.8	15186
		GL-5	0.25	58.0	35.9	15104
		Mean	0.12	57.0	35.4	
		Std	0.08	1.2	0.9	S ^K
		Min	0.05	55.4	34	
		Max	0.25	58.2	36.1	判定
		Total No.	12			-
1000	×2, 24hr	GM-1	0.00	56.6	36.4	15138
		GM-2	0.05	56.0	35.3	15136
		GM-3	0.15	52.0	35.4	15185
		GM-4	0.00	62.0	34.4	15123
		GM-5	0.10	56.0	35.0	15160
		Mean	0.06	56.5	35.3	
		Std	0.07	3.6	0.7	S ^K
		Min	0	52.0	34.4	
		Max	0.15	62.0	38.7	判定
		Total No.	6			-
2000	×2, 24hr	GH-1	0.20	54.8	34.1	15117
		GH-2	0.10	62.4	35.8	15199
		GH-3	0.05	60.6	35.0	15159
		GH-4	0.10	60.4	35.3	15184
		GH-5	0.00	53.6	33.0	15143
		Mean	0.09	58.4	34.6	
		Std	0.07	3.9	1.1	S ^K
		Min	0.00	53.6	33	
		Max	0.20	62.4	35.8	判定
		Total No.	9			-
MMC 2 (i.p.)	×1, 24hr	PC-1	2.75	54.6	35.4	15174
		PC-2	2.15	51.2	34.6	15166
		PC-3	1.65	50.4	34.2	15175
		PC-4	2.05	53.0	35.2	15189
		PC-5	1.85	44.2	36.5	15152
		Mean	2.09	50.7	35.2	
		Std	0.42	4.0	0.9	χ ²
		Min	1.65	44.2	34.2	
		Max	2.75	54.6	36.5	判定
		Total No.	209			++

B.W. : Body weight at the 1st day of dosing.

MNPCE : Frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes.

PCE/(PCE+NCE) : Ratio of polychromatic erythrocytes to total erythrocytes.

S^K : Kastenbaum-Bowmanの数表による検定

χ² : カイ二乗検定による検定 (p<0.01)

MMC : Mitomycin C

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
杉本直樹, 佐藤恭子, 山崎 壮, 棚元憲一	天然苦味料ジャマイカカクシ ア抽出物の成分分析	食品衛生学 雑誌	44(6)	328-331	2003
Hamada, S., K. Nakajima, T. Serikawa and M. Hayashi	The effect of aging on the results of the rat micronucleus assay	Mutagenesis	18	273-275	2003
Hamada, S., K. Nakajima, C. Namiki, T. Serikawa, and M. Hayashi	Sex differences in the chemical induction of micronuclei in the rat	Environ. Mutagen. Res.	25	33-37	2003
Kirkland, D.J., M. Hayashi, J.T. MacGregor, L. Müller, L.M. Schechtman, and T. Sofuni	Summary of major conclusions—the 3rd International Workshop on Genotoxicity Testing—	Mutat. Res.	540	123-125	2003
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	Strategy for genotoxicity testing and stratification of genotoxicity test results—report on initial activities of the IWGT Expert Group	Mutat. Res.	540	177-181	2003

20031191

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。