

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

平成 16 年度分担研究報告書

ニガキ抽出物の苦味成分の分析

分担研究者 尹 永淑 東京薬科大学 助手

研究要旨 ニガキ (*Picrasma quassioides* BENN.) 抽出物よりクアシン、ネオクアシン および 2 種のアルカロイドが単離された。今回入手したニガキ抽出物製品の HPLC クロマトグラムは、ジャマイカカссия抽出物製品と非常に似通っており、区別不可能であった。

A. 研究目的

ニガキ抽出物は、ニガキ(*Picrasma quassioides* BENN.)の水又はメタノールにより抽出されたもので、その強い苦味と刺激を利用し、苦味料として使われている。しかし、原材料の基原や産地、また製法の違いなどから製品の成分組成や含量が必ずしも一定でないと考えられ、また、有効成分以外の不純物が全て解明されているわけでもない。よって、ニガキ抽出物について、既存添加物としての公的品質規格が未整備のままであり、有効成分及び有害な不純物等についての規格を策定することが求められている。したがって、食品添加物としてのニガキ抽出物の安全性を確保するために分析を行った。

B. 研究方法

1. 分離・精製：

ニガキ抽出物製品は、日本食品添加物協会を通じて入手したものをを用いた。ニガキ抽出物 1204.36 g を HP-20 カラムクロマトグラフィー(0-100% MeOH と Acetone)を行い、6つの分画を得た。その内、80% MeOH 溶出分画 (223.7 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃:MeOH= 10:1 と 9:1) に付し、化合物 1 および 2 を単離した。また、Acetone 分画 (2.45 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分離し、次いで、ODS-HPLC (50 および 75% MeOH) に付し、化合物 3 および 4 を単離した。これらの構造を NMR および MS によりを同定した。

2. クアシン(1)とネオクアシン(2)の含量：

2-1. 試料の調整

ニガキ抽出物 50 mg を正確に量り取り、メタノール 10 mL に溶かしたものを試料溶液とした。また、

別に、ジャマイカカッシア抽出物(平成14年度報告試料。クアシン21.4%、ネオクアシン55.5%)を同様に溶かしたものを比較溶液とした。

2-2. HPLC 条件:

装置: Waters HPLC system (HPLC: Alliance 2695. PDA: 2996). 条件: カラム, Atlantis dC18 (2.1 x 150 mm); 移動相; H₂O:MeOH = 60:40 (0 min)→50:50 (25 min)→0:100 (35 min); 流速, 0.2 mL/min; 注入量, 2 μ L; 検出波長, 255 nm.

C. 研究結果

1. 化合物(1, 2)の化学構造

80% MeOH 溶出分画 (223.7 g) を用い、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃:MeOH=10:0 と 9:1) を行ったところ、2種類の化合物が単離された(化合物1と2)。これらは高分解 ESR-MS スペクトルより 388.1964 と 390.2121 を示し、分子式 C₁₇H₁₃O₄ および C₁₇H₁₀O₄ を示した。また、NMR スペクトルデータを文献値と比較した結果、化合物1と2をそれぞれクアシンとその誘導体と推測した。2は1次元の NMR スペクトルからも2種類のコンフォーマーが観測され、そこで詳細な ¹³C-NMR スペクトル解析を行った。その結果、2において、クアシン(1)に観察された 169.1 ppm の C=O に由来するシグナルが消滅し、新たに 90.8 ppm と 95.7 ppm のシグナルが観測されたことより、2は1の16位のC=Oが還元されたものと推定した。さらに、このような化学シフトは文献値との比較により、溶液中において2は、16位のOH基が α -体と β -体に平衡異性化している

ことが示唆された。従って、化合物2は16位が還元されたネオクアシンであると同定した。

化合物3は高分解 ESI-MS により、C₁₄H₉N₃O を与え、アルカロイドであることが示唆された。¹H-NMR スペクトルにより、7.5 ppm から 8.5 ppm 間にインドール由来のシグナルが観測され、特に 8.01 ppm と 8.71 ppm のシグナルの結合定数が 5.0 Hz を示したことより、 β -carbolin 骨格を有すると推測した。また 7.98 ppm と 6.92 ppm のシグナルとの結合定数が 9.7 Hz が観測された。一方、¹³C-NMR スペクトルにより、160.9 ppm にアミドカルボニルカーボンが観測された。したがって、 β -carbolin 誘導体と考え、文献値と比較した結果、cathin-6-one と同定した。

化合物4は高分解 ESI-MS により、C₁₅H₁₃N₃O₂ を与え、化合物3と同様にアルカロイドであると示唆された。¹H-NMR スペクトルにより、2本の MeO 基由来のシグナルが観測され、また、5.54 ppm、6.67 ppm および 7.32 ppm に AMX パターンのシグナルが観測されたため、vinyl 基であると推測した。HMBC スペクトルから、2本のメキシトシル由来のシグナル内、4.03 ppm から 152.8 ppm に遠隔相関が見られたが、4.17 ppm の MeO 基ほどの炭素との遠隔相関が見られないことより、インドール上の窒素に結合していると考えられた。3のスペクトルデータを文献値と比較した結果、picrasidine D、即ち 4, 9-dimethoxy-1-vinyl- β -carboline と同定した(Fig.1)。

2. クアシン(1)とネオクアシン(2)の含量

ニガキ抽出物とジャマイカカッシア抽出物の成分

組成の比較をHPLCにより行った(Fig. 2)。その結果、今回入手したニガキ抽出物の HPLC クロマトグラムは、クアシン(1)とネオクアシン(2)を主構成成分とし、平成14年度に報告したジャマイカカussia抽出物のクロマトグラムに非常に類似したパターンを示した。ジャマイカカussia抽出物中の1と2の含量(ピーク面積)をそれぞれ1とした場合、ニガキ抽出物中の1の含量は0.12、2の含量は0.18に相当した。よって、ジャマイカカussia抽出物中の1が21.4%、2が55.5%であることから、ニガキ抽出物中には、1が2.7%、2が10.1%含有されると算出された。

D. 考察

平成14年度にジャマイカカussia抽出物の成分組成をニガキ(*Picrasma quassioides* EENN.) 細木片より調製したニガキ抽出物(水抽出物及び MeOH 抽出物)と比較した際には、ニガキ抽出物はジャマイカカussia抽出物と明らかに異なったパターンを示し、ニガキ抽出物中にはクアシン(1)とネオクアシン(2)は殆ど含まれず、他の未同定の成分の複雑な混合物であった。しかし、今回入手したニガキ抽出物中には、ジャマイカカussia抽出物と同様に、カシノイドの一種であるクアシン(1)とネオクアシン(2)が多く含まれていた。また、両者のクロマトグラムが非常に似通っており、区別することは不可能と思われ、むしろ、同一の基原植物に由来し、倍散率のみが異なるものと考えられた。したがって、今回入手したニガキ抽出物の基原植物については、再検討されることが妥当と考えられた。また主に、クア

シンとネオクアシンが苦味成分とされているが、今回得られたアルカロイドと苦味の関係についても検討が必要である。

E. 結論

今回入手したニガキ抽出物の構成成分について分析した結果、クアシンおよびネオクアシンが主構成成分であることを明らかとした。ただし、そのクロマトグラムは、平成14年度報告のジャマイカカussia抽出物と非常に似通っており、倍散率のみが異なるものと考えられるものであった。したがって、ニガキ抽出物の構成成分および基原植物については、今後、再検討されることが妥当だと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

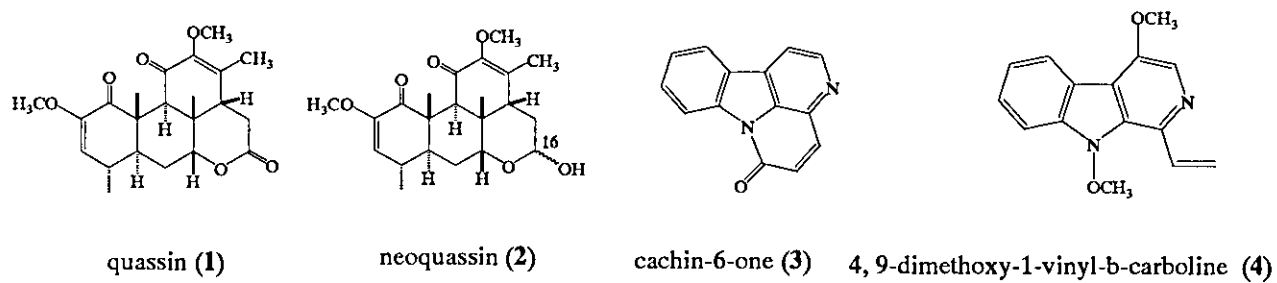


Fig. 1. Some compounds from *Picrasma quassioides* Benn

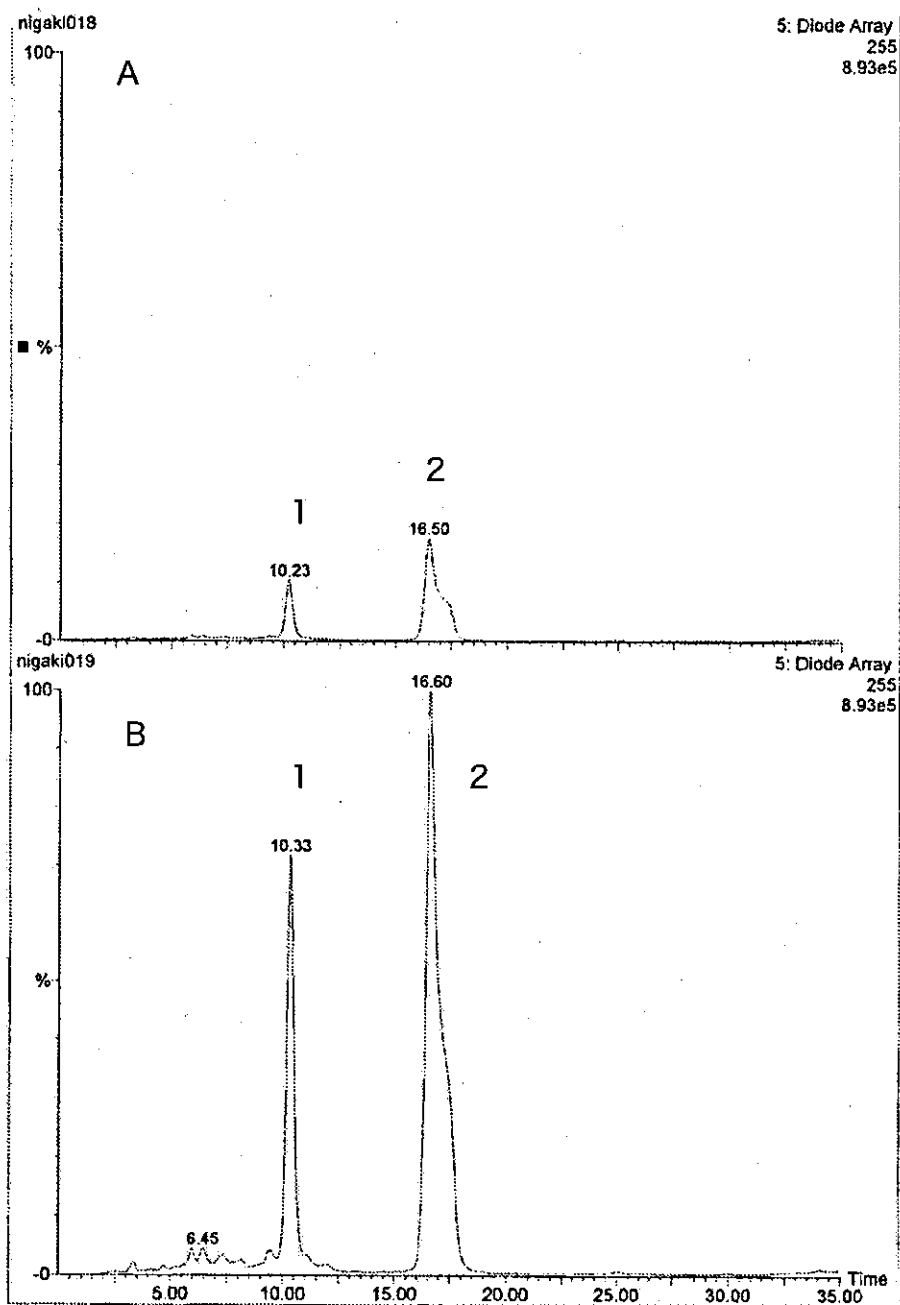


Fig. 2 HPLCによるニガキ抽出物とジャマイカカッシア抽出物の比較
 A) ニガキ抽出物, B) ジャマイカカッシア抽出物.
 1 = クアシン, 2 = ネオクアシン.

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）

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

平成 16 年度分担研究報告書

変異原性試験の総括ならびにヒキオコシ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
研究協力者 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
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ヒキオコシ抽出物、ハウセンカ抽出物、エラグ酸、およびエレミ樹脂に関して標準的な変異原性試験を実施し、遺伝毒性について検討した。ヒキオコシ抽出物、ハウセンカ抽出物およびエラグ酸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を、エレミ樹脂に関してはげっ歯類を用いる小核試験を実施した。今回行った遺伝毒性試験においては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において陽性の結果が得られたが、げっ歯類を用いる小核試験で陰性であったことを含め、その他の試験結果は *in vitro* での代謝活性化系の有無にかかわらず全て陰性の結果が得られた。従って、ヒキオコシ抽出物を含め、今回検討した既存添加物には問題となるような遺伝毒性は無いものと考えられる。

さらに、本研究事業では既存添加物の復帰突然変異原性試験の結果に影響を与える諸要因についての検討も行った。芳香族アミノ・ニトロ化合物の変異原性の検出に高感度である YG1041 とリボフラビン添加ハムスター肝 S9 との組み合わせによるアゾ色素の高感度な変異原性検出法は、食用アゾ色素の変異原性評価に有用であることが判明した。また、ヒスチジン及びヒスチジンを配列構造に持つ合成ジ・トリペプチドのサルモネラ試験系への添加による復帰変異コロニー数の増加と、ヒスチジン要求性菌（バックグラウンドローン）への影響、また、プロテアーゼ活性を持つ酵素を用い、透析によるヒスチジン除去の効果とプロテアーゼ活性を不活化した場合の効果等についても検討し、復帰突然変異試験の限界について考察した。

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験体について実施し、遺伝毒性について検討する。ヒキオコシ抽

出物、ハウセンカ抽出物およびエラグ酸に関して標準的な変異原性試験の組み合わせである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し、遺伝毒性の有無について検討する。さらに、エレミ樹脂に関してはげっ歯類を用いる小核試験を実施し、生体内での染色体異常誘発性について検討する。

既存添加物の復帰突然変異原性試験の結果に影響を与える諸要因のうち最も重要な要因として、サルモネラ試験系でのヒスチジン混入による復帰突然変異コロニー数の増加が挙げられる。本研究においては、ヒスチジン及びヒスチジンを配列構造に持つ合成ジ・トリペプチドのサルモネラ試験系への添加による復帰突然変異コロニー数の増加と、ヒスチジン要求性菌（バックグラウンドローン）への影響を調べ、既存添加物に混雑するヒスチジン等の影響について考察する。

なお、ヒキオコシ抽出物、ハウセンカ抽出物、エラグ酸（一部）等の個別データに関しては、本報告書の添付資料を、また、エラグ酸のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験とげっ歯類を用いる小核試験、エレミ樹脂の小核試験に関する個別データならびに細菌を用いる復帰突然変異試験結果に影響を与える要因に関しては、他の分担研究者によって実施されたので、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

試験に供した験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「食品添加物の指定及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^{1,2)}：ネズミチフス菌 TA98, TA100, TA1535, TA1537 及び大腸菌 WP2uvrA/pKM101 の 5 菌株を用いて、ブレインキュー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. L 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 用量を設定した。

ハウセンカ抽出物に関しては、標準的な 5 菌株を用い、100mg/プレート を最高用量として試験を行った。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、ハウセンカ抽出物はプレート当たり 100 mg を最高用量として、いずれも公比 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、最高用量を公比 2 で希釈し、6 段階の用量について本試験を行った。

エラグ酸に関しても、標準的な 5 菌株を用いて試験を行った。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、エラグ酸はプレート当たり 10mg を最高用量と

して、公比4で希釈し、7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最高用量を公比2希釈し、6段階の用量について本試験を行った。

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作製した。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 (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。

連続処理法では代謝活性化系非存在下で被験物質を24時間連続処理した後、染色体標本作製した。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の4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。

ハウセンカ抽出物についても、ヒキオコシ抽出物と同様にCHL/IU細胞を用いて染色体異常誘発性を検討した。予備試験の結果を参考に、代謝活性化系の有無にかかわらず、1250, 2500, 5000 µg/mLの3用量を設定した。さらに、24時間の連続処理についても短時間処理と同様に1250, 2500, 5000 µg/mLの3用量を設定した。

エラグ酸についても、HL/IU細胞を用いて染色体異常誘発性を検討した。予備試験

の結果を参考に、代謝活性化系の非存在下では0.08 µg/mL、存在下では0.16 µg/mLを最高用量に、また、24時間の連続処理に関しては0.02 µg/mLを最高用量として公比2で4用量を設定した。

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。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、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のマウスの平均体重はそれぞれ34.1gおよび35.7gだった。ヒキオコシ抽出物は水に懸濁させて用いた胃ゾンデを用いて2回(24時間間隔)の強制経口投与を行った。被験物質は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。陰性対照群には純水を、陽性対照群はマイトマイシンCを10 mg/kgの用量で投与した。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単回投与24時間後に行った。

ハウセンカ抽出物に関しては、ヒキオコシ抽出物と同様に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、入荷後8日間の馴化期間を設け、7週齢で試験に供した。毒性試験の結果に基づき、投与用量は500, 1000, および2000 mg/kg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 10 mL/kg の容量で投与した。陽性対照群はマイトマイシン C を 10 mg/kg の用量で投与した。

エラグ酸に関しては、8 週齢の雄の BDF₁ (C57BL/6×DBA/2) マウス (SPF) を日本エスエルシー株式会社より購入し、1 週間の検疫・馴化ののち、9 週齢のマウスを試験に用いた。エラグ酸は、水、エタノールに難溶であるが注射用水での懸濁性が良好であることから、媒体として 0.5w/v% メチルセルロース溶液 (0.5w/v% MC, 400 cP 溶液：和光純薬工業株式会社) を用い、連続希釈により被験物質懸濁液を調製した。10 mL/kg の投与用量で被験物質懸濁液を強制経口投与した。用量設定試験の結果、ガイドラインで定められている 2000 mg/kg においても死亡例が認められなかった。これらの結果に基づき 500, 1000 および 2000 mg/kg/day の 3 用量で小核試験を実施した。

その他の遺伝毒性に関する検討事項のまとめ

既存添加物の復帰突然変異原性試験の結果に影響を与える諸要因として、検体のヒスチジン含有または混入による復帰変異コロニー数の増加や、アルカロイド、アゾ色素、配糖体化合物等の試験での試験手法、試験菌株、代謝活性化系の選択が不適切であるための陰性結果などが挙げられる。また、OECD, FDA のテストガイドラインにおいても、ヒスチジンを含有する検体においては、ヒスチジンの除去やヒスチジンの影響を受けない試験系の選択を考慮することが、また、アゾ色素の試験にお

いては、リボフラビンまたは FMN 添加をした試験系を考慮すること及び配糖体の試験方法においては、配糖体切断酵素を添加した試験系を考慮することが記載されている。今回は、既存添加物に混在するヒスチジンの影響およびアゾ色素の細菌を用いる復帰突然変異試験に影響すると考えられているリボフラビンの添加について検討したので、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変化などは認められなかった。S9非存在下の最高用量群 (156 µg/mL) における構造的異常細胞 (ギャップを除く) の出現頻度は 12.5% であり、溶媒対照群に比べて有意な増加が認められた。同様に、S9存在下の最高用量群 (1250 µg/mL) における構造的異常細胞の出現頻度は 31.5% であり、やはり溶媒対照群に比べて有意な増加が認められた。しかし、倍数体の出現頻度には有意な増加

は認められなかった。

染色体異常試験連続処理法に関しては78.1および156 µg/mLの用量における構造的異常細胞の出現頻度はそれぞれ16.5および28.5%であり、溶媒対照群に比べて有意な増加が認められた。その増加には明らかな用量相関性が認められた。また、倍数性細胞の出現頻度に関しても有意な増加がみられ、最高用量（156 µg/mL）における倍数性細胞の出現頻度は4.2%であった。

げっ歯類を用いる小核試験：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。溶媒対照群における小核出現頻度は0.18%であった。それに対して被験物質投与群の小核出現頻度は0.13～0.20%であり、有意な増加は認められなかった。また、多染性赤血球の割合においても有意な減少は認められず、ヒキオコシ抽出物に骨髓増殖抑制効果および小核誘発性はないものと考えられた。

2. ホウセンカ抽出物

細菌を用いる復帰突然変異試験：ホウセンカ抽出物はプレート当たり100 mgをそれぞれ最高用量として試験を行った。その結果、これらの被験物質はS9 mixによる代謝活性化の有無に関わらず5種類の菌株すべてに対し、溶媒対照の2倍以上の復帰変異コロニーを誘発せず、試験した濃度範囲内では変異原性を示さなかった。したがって、ホウセンカ抽出物に対する細菌を用いる変異原性試験結果はいずれも陰性と判断した。

ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験：短時間処理法のS9非存在下のすべての

用量群において、構造的異常細胞（ギャップを除く）の出現頻度は0～2.0%であり、溶媒対照群に比べて有意な増加は認められなかった。同様に、S9存在下のすべての用量群においても構造的異常細胞の出現頻度は1.0～3.0%であり、溶媒対照群に比べて有意な増加は認められなかった。また、倍数体の出現頻度においても有意な増加は認められなかった。また、連続処理のすべての用量群において、構造的異常細胞の出現頻度は0.5～1.0%であり、溶媒対照群に比べて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。

げっ歯類を用いる小核試験：2000mg/kgを高用量とした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。溶媒対照群における小核出現頻度は0.13%であった。それに対して被験物質投与群の小核出現頻度は0.17～0.19%であり、有意な増加は認められなかった。また、多染性赤血球の割合においても有意な減少は認められず、ホウセンカ抽出物に骨髓増殖抑制効果はないものと考えられた。

3. エラグ酸

細菌を用いる復帰突然変異試験：エラグ酸はプレート当たり10 mgを最高用量として試験を行った。その結果、これらの被験物質はS9 mixによる代謝活性化の有無に関わらず5種類の菌株すべてに対し、溶媒対照の2倍以上の復帰変異コロニーを誘発せず、試験した濃度範囲内では変異原性を示さなかった。したがって、エラグ酸に対す

る細菌を用いる変異原性試験結果はいずれも陰性と判断した。

ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験：染色体異常試験に用いる濃度を決定するため、エラグ酸の細胞増殖抑制作用を調べた。その結果、短時間処理法-S9 処理および同+S9 処理では 0.0781 mg/mL 以上、連続処理法 24 時間処理では 0.039 mg/mL 以上の用量で CHL/IU 細胞の増殖が 50%以上抑制された。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、エラグ酸は、短時間処理法-S9 処理で高用量の 0.04 μ g/mL においてのみ非常に弱い (5%) 染色体構造異常の増加が観察されたが、その他の実験条件下での異常細胞の増加は観察されず、偶発的なものであったと考えられた。従って、エラグ酸の染色体異常の誘発は無いものと考えられた。

げっ歯類を用いる小核試験：小核を有する多染性赤血球頻度は、陰性対照値 (0.17%) と比較して、500, 1000 および 2000 mg/kg/day でそれぞれ 0.28, 0.26 および 0.20% であり、いずれの処理群とも統計学的に有意な増加は認められなかった。また、全赤血球に対する多染性赤血球の割合については、2000 mg/kg でのみ有意な減少が認められ、被験物質が骨髓細胞に暴露したことを示した。一方、マイトマイシン C (MMC) を投与した陽性対照群では、小核を有する多染性赤血球の頻度に有意な増加が認められ、試験が技術的に成立していることを示した。

4. エレミ樹脂

げっ歯類を用いる小核試験：用量設定のための急性毒性試験の結果、2000mg/kg まで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。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 3.28%、陰性対照群では 0.14%、試験溶液投与群の 2000mg/kg 群、1000mg/kg 群、500mg/kg 群でそれぞれ 0.16, 0.16, 0.15% 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。以上によりエレミ樹脂の小核誘発性は無いものと考えた。

5. その他の遺伝毒性に関する検討事項のまとめ

既存添加物の復帰突然変異原性試験の結果に影響を与える諸要因として、検体のヒスチジン含有または混入による復帰変異コロニー数の増加や、アルカロイド、アゾ色素、配糖体化合物等の試験での試験手法、試験菌株、代謝活性化系の選択が不適切であるための陰性結果などが挙げられる。また、OECD, FDA のテストガイドラインにおいても、ヒスチジンを含有する検体においては、ヒスチジンの除去やヒスチジンの影響を受けない試験系の選択を考慮することが、またアゾ色素の試験においては、リボフラビンまたは FMN 添加をした試験系を考慮すること及び配糖体の試験方法においては、配糖体切断酵素を添加した試験系を考慮することが記載されている。

本研究においては、復帰突然変異原性試験の結果に影響を与える諸要因のうち、試験菌株、代謝活性化系の選択の重要性を確

認するために、アゾ色素[アマランス（赤色 2 号）及び陽性物質としてボンソー3R]をモデル化合物として、芳香族アミノ・ニトロ化合物の変異原性の検出に高感度である試験菌株 YG1041, YG1042 とリボフラビン添加ハムスター肝 S9 との組み合わせによるアゾ色素の高感度な変異原性検出法について検討した。

アマランスは、ラット肝 S9 にリボフラビン (0.5. mol/plate) を添加してアゾ基の切断を促進したが TA98, TA100, YG1041, YG1042 のいずれの菌株においても変異原性を示さなかった。しかし、ハムスター肝 S9 にリボフラビン (0.5 . mol/plate) を添加した場合は、YG1041 において溶媒対照の 2 倍以上の復帰突然変異コロニーが出現し、陽性の結果を示した。その強さはボンソー 3R を同じ条件で試験した場合の約 1/19 程度であった。アマランスは陰性の物質とされてきたが、従来の代謝活性化系では、変異原性を示す活性化体の生成量が少なく TA98, TA100 で、検出できなかったものと考えられた。この結果より、試験手法、試験菌株及び代謝活性化系の適切な選択をすることが復帰突然変異試験の結果評価において重要であることが確認された。

なお、芳香族アミノ・ニトロ化合物の変異原性の検出に高感度である試験菌株 YG1041 とリボフラビン添加ハムスター肝 S9 との組み合わせによる変異原性試験は、アゾ色素の高感度な変異原性検出法であり、食用アゾ色素の変異原性評価に有用である。

既存添加物の復帰突然変異原性試験の結果に影響を与える諸要因のうち最も重要な要因として、サルモネラ試験系でのヒスチジン混入による復帰変異コロニー数の増加

が挙げられる。本研究においては、ヒスチジン及びヒスチジンを配列構造に持つ合成ジ・トリペプチドのサルモネラ試験系への添加による復帰変異コロニー数の増加と、ヒスチジン要求性菌（バックグラウンドローン）への影響を調べた。また、プロテアーゼ活性を持つ酵素を用い、透析によるヒスチジン除去の効果とプロテアーゼ活性を不活化した場合の効果等についても検討し、復帰突然変異試験の限界について考察した。

アミノ酸（サルモネラの場合はヒスチジン、大腸菌の場合はトリプトファン）の添加試験により、アミノ酸による復帰変異コロニー数の増加が、全ての菌株において認められる現象ではないことが明らかとなった。また、バックグラウンドローンを観察することで、アミノ酸による復帰変異コロニー数の増加か否かを判別できることが確認された。

サルモネラ TA100 におけるパパイン（最適 pH6.5~8.0）とブタ胃由来ペプシン（最適 pH3.0~4.0）を用いた試験及び、プロテアーゼ活性のある酵素中の遊離ヒスチジンを限外ろ過によって減少させたプロテアーゼ混入試料の試験において、プロテアーゼ活性のある試料を試験した場合にバックグラウンドローンが濃くなり復帰変異コロニー数の増加を示すことから、プロテアーゼによって試料の蛋白質の一部または S9 蛋白質が分解されてサルモネラに利用されていることがうかがわれた。

ヒスチジンを配列構造に持つ合成ジ・トリペプチドのサルモネラ TA100 試験系への添加試験において、ヒスチジンの N 末端側のアミノ酸をピログルタミン化することでジペプチド・トリペプチドを利用できなく

なることから、テスト菌が菌体内に取り込んだペプチドをペプチターゼで切断して、ペプチド中のヒスチジンを利用していると考えられた。また、短鎖のペプチド中のヒスチジンを利用できることも明らかとなった。このことから、復帰突然変異原性試験において、ヒスチジンを配列構造に持つ短鎖のペプチド及びプロテアーゼ活性のある試料を試験するには限界があり、アミノ酸の影響を受けない試験系の選択が必要であること、さらに、試験結果の評価はバックグラウンドローンの濃くなる濃度以下で実施する必要があると結論された。

D. 考察

既存添加物の遺伝毒性に関してはこれまでに総説が公表されているので、それらも参照されたい^{4, 5, 6)}。

ヒキオコシ抽出物に関しては、細菌を用いる復帰突然変異試験において陰性、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験において一部陽性の結果が得られたが、高用量まで試験したげっ歯類を用いる小核試験において陰性の結果であった。従って、*in vitro*で観察された染色体異常誘発性は生体内では発現することはないものと考えられた。ホウセンカ抽出物に関しては、標準的な遺伝毒性試験の組み合わせにおいて、全て陰性の結果であったことから、生体内において遺伝毒性を示す可能性はないものと考えた。エラグ酸に関しては、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験の一部で非常に弱い異常細胞の増加が観察されたが、他の条件下での増加はなく、さらに高用量まで試験されたげっ歯類を用いる小核試験において陰性の結果であったことから、エラグ酸にお

ける遺伝毒性試験は問題ないものと考えられた。エレミ樹脂に関しては、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では陰性結果がすでに報告されており、今回げっ歯類を用いる小核試験において陰性の結果であったので、問題となるような遺伝毒性は無いものと考ええる。

アゾ色素類の多くは、アゾ基が切断されて変異原性を示す⁷⁾。また、アマランス、ボンソーSX、サンセットイエローなどの水溶性アゾ色素のアゾ基の開裂が、腸内細菌によることが報告されている(新村, 1986)。ラット S9 mix を用いた場合、アゾ還元酵素の働きが弱いために効率よく切断することができない。そこで、アゾ基を効率よく切断する方法として、S9 mix にリボフラビン⁷⁾または FMN⁸⁾ を添加した試験系が推奨されている。アマランスの変異原性は、従来の TA98, TA100 を用いた試験において、リボフラビン添加ラット及びハムスター S9 mix を用いてもその変異原性を検出することができない。

一方、YG1041 と YG1042 は、TA98 及び TA100 にニトロ還元酵素と O-アセチル転移酵素を過剰生産するように改変して芳香族アミノ・ニトロ化合物の変異原性を高感度に検出できるように改良した菌株である⁹⁾。アマランスの変異原性は、YG1041 を用いることで検出できる。これは、S9 中のアゾ還元酵素の働きで、アマランスのアゾ基が切断されて生成した 2 種類の芳香族モノアミンの代謝活性化に菌体内のニトロ還元酵素と O-アセチル転移酵素が関与している為と考えられる。従来の TA98 と TA100 のニトロ還元酵素と O-アセチル転移酵素活性では、

活性化体が充分量できず、突然変異を検出できなかったものと思われる。

フェナセチンの変異原性は、TA100 においてラット S9 では変異原性を検出できないが、ハムスター S9 を用いることで変異原性を検出できる。また、ハムスター S9 と YG1042 菌株と組み合わせることで感度よくフェナセチンの変異原性を検出できる¹⁰⁾。

ボンソー3R は、ハムスター S9 においてリボフラビン添加なしで変異原性を示すが、アマランスは、リボフラビン添加がないと変異原性を示さない。これは、ボンソー3R とアマランスのアゾ還元酵素によるアゾ基の切れやすさに関連しているように思われる。モノアゾ化合物のアゾ基の切れやすさは、母核構造とスルホン酸基による水溶性に関連していると考えられる。

Prival ら¹¹⁾は、ジチオナイトで還元したアマランスのエーテル抽出物を FMN 添加したハムスター S9 で試験すると、TA98、TA100 に変異原性を示すことを報告している。また、250mg 相当のアマランスのエーテル抽出物を S9 なしで試験すると TA98 で陽性を示し、これが不純物に起因するのであろうと報告している。今回、われわれが検出したアマランスの変異原性が不純物に起因するかは不明であり、今後の検討課題でもある。

YG1041 とリボフラビン添加ハムスター肝 S9 との組み合わせにより検出されたボンソー3R とアマランスの変異原性の強さは、比変異原活性 (revertants/mg) で 18.5 倍の差があった。今後、食用アゾ色素の変異原性と発がん性のあるアゾ色素の結果を定量的に比較することで YG1041 の結果を適正に評価することが可能と考えられる。

YG1041 とリボフラビン添加ハムスター肝 S9 との組み合わせによるアゾ色素の高感度な変異原性検出法において、リボフラビンを添加することで陰性対照値が上昇する現象が生じた。リボフラビンの代わりに FMN や FAD の添加することによって陰性対照値の上昇が押さえることができるか、今後の課題である。また、YG1041、YG1042 がリボフラビンの変異原性を検出している可能性もあり検討を要するところである。

微生物を用いる復帰突然変異試験は、アミノ酸の要求性を指標にし、プレート中に数回分裂する量のアミノ酸 (プレート当たり 0.1. mol) を加えることで、化学物質等によって DNA についた傷を突然変異として固定する方法である。試験菌株は、アミノ酸要求性であるため、加えるアミノ酸量を一定にすることで、プレート中の最終的な菌数を一定にすることができる。このことから、被験物質で処理する菌数を一定にしながらも再現性のあるデータが得られ、また、最終的な生菌数 (生存菌数) を計測して突然変異率を計算しなくても、プレート当りの復帰変異コロニー数で突然変異の強さを表示できる簡便な試験法でもある。これらの試験系の特徴から、加えるアミノ酸量を増やすと試験菌の母数が増えることで、自然復帰変異コロニー数 (陰性対照値) のわずかな増加が、全ての菌株において認められるものと予想された。しかし、アミノ酸の添加による復帰変異コロニー数の増加は、TA98、TA100、TA1535 において認められるのに対して、TA1537、WP2uvrA、WP2uvrA/pKM101 において認められなかった。ヒスチジン添加試験での復帰変異コロニー数の増加は、Aeschbacher らの TA98、

TA100, TA1535, TA1537 での結果¹²⁾, Nylund and Einisto の TA98, TA100, TA1535 での結果¹³⁾, Busch and Bryan の TA100 での結果¹⁴⁾とほぼ同じであり, 実験室間を超えて再現性が得られた。

TA1537 で, 復帰変異コロニー数が増加しないのは, もともと自然復帰変異の低い菌であるため, プレート当たり 0.5. mol 程度のヒスチジンを加えても復帰変異コロニー数が顕著に増加せず, それ以上添加すると自然復帰変異コロニーは, バックグラウンドローンの菌 (アミノ酸要求性の菌) と一体化して数えられなくなるためと考えられた。また, 大腸菌で復帰変異コロニー数の増加が認められないのは, トリプトファン量 (0.1. mol/プレート) が, サルモネラにおけるヒスチジン量と同量であるにもかかわらず, 大腸菌の場合は, 突然変異の固定のために用いられているトリプトファン量がサルモネラの場合の 2 倍量に相当し, 更にトリプトファンを加えると, 自然復帰変異コロニーがバックグラウンドローンの菌 (アミノ酸要求性の菌) と一体化して数えられなくなるためと考えられた。

復帰突然変異試験は, 生菌数を計測しない簡便法であるので, 菌数が毒性で減少する濃度またはアミノ酸で増加する濃度における試験は適切に実施されていないことを意味する。したがって, バックグラウンドローンが濃くなるような物質の試験結果の評価は, バックグラウンドローンが濃くなる濃度までにとどめるべきである。また, このような物質を高用量まで評価するには, アミノ酸の影響を受けない試験系 (薬剤耐性を指標にした試験系) を用いないと, 適切に評価できないと考えられる。

今回試験したフィターゼとキシリナーゼ試料のうち, フィターゼ Lot No. 021128S3-13 のみが, バックグラウンドローンを濃くする量の遊離ヒスチジンを含有している。その他の試料はアミノ酸分析により, いずれもバックグラウンドローンを濃くする量の遊離ヒスチジンは含有されていない。しかし, フィターゼ及びキシリナーゼを試験した場合のバックグラウンドローンの生育促進と復帰変異コロニー数の増加は, 試料中に含まれている遊離ヒスチジンの含有量だけでは説明できないことから, 37°C で 48 時間の培養中に遊離アミノ酸が増加するものと考えられた。このことは, 試料中の遊離ヒスチジンを限外ろ過, イオン交換, ヒスチジンデカルボキシラーゼ等で処理して除去しても, 試験実施中に遊離アミノ酸が増加するような試料の試験には限界があることを示している。佐々木ら¹⁵⁾は, カゼインをトリブシン処理したペプチド (試料 5mg 当たり総ヒスチジン 0.83. mol, 遊離型ヒスチジン 0.0003. mol, S9 との加温後に生成する遊離型ヒスチジン 0.11. mol) の変異原性試験におけるヒスチジンの影響を検討し, 復帰変異コロニー数の増加が試料中のヒスチジン量に一致することから, サルモネラがペプチドを利用することを報告している。

ジペプチド His-Ala, Aia-His, His-Pro, Try-His 及びトリペプチド Gly-His-Lys は, ヒスチジンと同様にサルモネラに利用される。この結果は Aeschbacher ら¹²⁾と Busch and Bryan¹⁴⁾による His-Ala, Aia-His での報告と一致する。生理活性ペプチドは, N 末端がピログルタミン化することで, ペプチターゼによる失活から保護されていると考えら

れている。サルモネラ菌株は、ヒスチジンの *N* 末端側のアミノ酸をピログルタミン化したジペプチドとトリペプチドを利用できないが、ピログルタミン化していなければ利用できる。菌体内に取り込まれたペプチドをペプチダーゼで切断して、ヒスチジンの供給原としていと考えられた。これは、Albertini and Gockeh¹⁶⁾による、Gly-His-OMe、Ile-His-Ome はヒスチジンと同様に利用されるが、*N* 末端を *tert*-butoxycarbonyl 化した Boc-Val-His-OMe、Boc-Phe-His-Ava が利用されないという報告とも一致する。本調査においては、*N* 末端にヒスチジンが存在すれば、アミノ酸数 6 個ほどのペプチド中のヒスチジンを利用することができることも明らかとなった。

プロテアーゼであるパパインの試験において、アンチパインでプロテアーゼ活性を阻害すると、バックグラウンドローンが濃くなるのを防ぐことができる。これはプロテアーゼによって S9 mix 中の蛋白質が分解して、ヒスチジンまたは短鎖のペプチドが遊離してヒスチジン要求性株の生育に利用されるのを防いだためと考えられる。今回試験したフィターゼ、キシリナーゼ試料は、本来の酵素活性のほかに生産菌由来のプロテアーゼ活性を有している。フィターゼ試料のプロテアーゼ活性は、*Aspergillus niger* 由来の酸性プロテアーゼと考えられたので、酸性プロテアーゼの阻害剤であるペプスタチンで抑制効果を調べたが、明らかな抑制効果はなかった。また、キモスタチン、ロイペプチン、EDTA、阻害剤ミックスのプロテアーゼ抑制によるバックグラウンドローンの生育抑制と復帰変異コロニー数の増加抑制も認められなかった。プロテアーゼ活

性を有する試料の試験手法として、阻害剤を添加する試験系の開発を試みたが、現段階では加熱処理による阻害方法以外は成功していない。また、この阻害剤を用いる方法は、うまくいったとしても、低分子のペプチドを含む酵素には不適當である。

フィターゼ及びキシリナーゼを試験した場合のバックグラウンドローンの生育促進と復帰変異コロニー数の増加が、試料中に含まれている遊離ヒスチジンの含有量だけでは説明できないことから、プロテアーゼによって S9 mix 中の蛋白質が分解され、またはフィターゼ試料中の蛋白質が分解されてヒスチジンまたは短鎖のペプチドを生成したためと考えられた。

テスト菌株が、ペプチド中のヒスチジンを利用するため、微生物を用いる復帰突然変異試験は、ヒスチジンを配列構造にもつ短鎖のペプチドを含有する試料、または試験の過程でアミノ酸、ペプチドを生成する試料には、適していないことが明らかとなった。

E. 結 論

ヒキオコシ抽出物には遺伝毒性はないものと考えられた。ホウセンカ抽出物に関してはほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験で陽性結果が認められたが、げっ歯類を用いる小核試験で陰性であり、また、細菌を用いる復帰突然変異試験でも陰性であることから、遺伝毒性試験が問題となることはないものと考えられた。エラグ酸およびエレミ樹脂に関しても生体で問題となるような遺伝毒性試験は無いものと考えられる。

芳香族アミノ・ニトロ化合物の変異原性の検出に高感度である YG1041、YG1042 とり

ボフラビン添加ハムスター肝 S9 との組み合わせによるアゾ色素の高感度な変異原性検出法は、食用アゾ色素の変異原性評価に有用である。この方法により、今まで変異原性の報告されていなかったアマランスの変異原性を検出することができるようになった。アゾ色素の高感度な変異原性検出法は、高感度な試験菌株の選択と、被験物質に対応した適切な試験手法と代謝活性化系の選択が、復帰突然変異試験において重要である。

復帰変異コロニー数の増加は、TA98, TA100, TA1535 において認められるが、TA1537, WP2uvrA, WP2uvrA/pKM101 においては認められないことより、全ての菌において観察される現象ではないことが明らかとなった。しかし、アミノ酸の混入によるバックグラウンドローンの生育促進は、試験に用いた TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2uvrA 及び WP2uvrA/pKM101 の全ての菌株において認められ、アミノ酸の混入による復帰変異コロニー数の増加は、バックグラウンドローンを観察することで判別できることが確認された。

プロテアーゼ活性のある蛋白質試料を試験した場合、試料の蛋白質の一部または S9 蛋白質から遊離されるヒスチジン、ペプチドをテスト菌株が利用するため、あらかじめ遊離ヒスチジンを除去してもバックグラウンドローンが濃くなり、復帰変異コロニー数の増加を示すことがある。したがって、試験の結果を正しく評価するには、バックグラウンドローンの濃くなる濃度以下で評価を実施すべきである。

試験系がアミノ酸の要求性から非要求性を指標にしていることと、試験菌株がペプチド中のアミノ酸も利用するため、ヒスチジン

(サルモネラの場合) またはトリプトファン (大腸菌の場合) を配列構造に持つ短鎖のペプチドを含有する試料、または試験実施中にアミノ酸、ペプチドを生成する試料を試験するには限界がある。この場合は、アミノ酸の影響を受けない他の試験系の選択が必要である。

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)
- 6) 井上 達, 既存添加物の安全性の見直しに関する調査研究—平成 15 年度厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課食品添加物安全性確認費による報告書— (2004)

- 7) Matsushima, T., T. Sugimura, M. Nagao, T. Yahagi, A. Shirai and M. Sawamura (1980) Factors modulating mutagenicity in microbial tests, In : K.H. Norpoth and R.C. Garner (Eds.), "Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens", Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 273-285.
- 8) Prival, M. J. and V. D. Mitchell (1982) Analysis of a method for testing azo dyes for mutagenic activity in *Salmonella typhimurium* in the presence of flavine mononucleotide and hamster, Mutation Res., 97, 103-116.
- 9) Hagiwara, Y., M. Wartanabe, Y. Oda, T. Sofuni and T. Nohmi (1993) Specificity and sensitivity of *Salmonella typhimurium* YG1041 and YG1042 strains possessing levels of both nitroreductase and acetyltransferase activity, Mutation Res., 291, 171-180.
- 10) 荒木明宏 (1997) 農薬, 医薬品の変異・がん原性, Environ. Mutagen Res., 19, 55-61.
- 11) Prival, M. J., V.M. Davis, M.D. Peiperl and S.J. Bell (1988) Evaluation of azo food dyes for mutagenicity and inhibition of mutagenicity by methods using *Salmonella typhimurium*, Mutation Res., 206, 247-259.
- 12) Aeschbacher, H.U., P.A. Finot and U. Wolleb, (1983) Interactions of histidine-containing test substances and extraction methods with the Ames mutagenicity test. Mutation Res., 113, 103-116.
- 13) Nylund, L., and P. Einsistö (1993) Mutagenicity testing of protein-containing and biological samples using the Ames/*Salmonella* plate incorporation test and the fluctuation test, Mutation Res., 136, 33-47.
- 14) Busch D. B. and G. T. Bryan (1987) Presence and measurement of sample histidine in the Ames test: Quantification and possible elimination of a source of false-positive mutagenicity test results, Environmental and Molecular Mutagenesis, 10, 397-410.
- 15) 佐々木一郎、打和秀世、村上梅司(1992) カゼイン由来ペプチドの変異原性テストにおけるヒスチジンの影響について, Jpn. J. Toxicol. Environ. Health, 3, 295-299.
- 16) Albertini S. and E. Gocke (1993) Renin inhibitors as an example of presumptive irrelevant positive findings in the *Salmonella* /mammalian microsome assay (Ames test), Mutation Res., 298, 237-246.

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

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

研究協力者 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

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。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、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った。

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 法および平成 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（ロット番号：IY0383）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 (OD_{660}) を測定し、 1×10^9 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 MgCl_2 , 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)

NaN_3 : 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、 NaN_3 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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$) 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

代謝活性化による場合とよらない場合で本試験を行った。用量設定試験の結果 (後述) を基に、最高用量は 1250 または 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とし、公比 2 で 5 用量を設定した。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した。

8. 確認試験

本試験の結果より (後述), TA1535, TA98, TA1537, および WP2 *uvrA/pKM101* 株を