

用いて確認試験を実施した。試験はすべて代謝活性化によらない場合で行った。用量は、5000 µg/プレートを最高用量とし、公比1.5で8用量(293, 439, 658, 988, 1481, 2222, 3333, 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。

9. 処理方法

ブレインキュベーション法を用いた³⁾。代謝活性化によらない場合は滅菌小試験管に100 mM ナトリウムーリン酸緩衝液(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。

10. 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。すなわち、①復帰変異コロニー数が溶媒対照値の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。よって、本試験の最高用量は、代謝活性化によらない場合のTA1537, TA98, およびTA1537株では1250 µg/プレートに、その他では5000 µg/プレートに設定した。

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、最高用量群にやや増加傾向が認められたが、その他の菌株においては、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。

2. 本試験

本試験の結果を表2に示した。代謝活性化によらない場合のWP2 *uvrA*/pKM101株において、5000 µg/プレートで溶媒対照群に比べて2.01倍の復帰変異コロニー数の増加が認められた。用量設定試験では2倍を超えなかったことから、明確な判定を行うため、確認試験を行った。

代謝活性化によらない場合のTA1535,

TA98, および TA1537 株で, 設定した最高用量の 1250 µg/プレートで生育阻害が観察されなかった。そこで用量を上げて確認試験を行った。

3. 確認試験

本試験の結果を表 3 に示した。やはり, WP2 *uvrA*/pKM101 株の高用量群で復帰変異コロニーのわずかな増加が認められたが, 2 倍以上の増加には至らなかった。

本確認試験では TA1535, TA98, および TA1537 株において 1481 または 2222 µg/プレート以上の用量で生育阻害が観察された。生育阻害が現われるような高い用量で試験を行っても 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。

D. 考察

用量設定試験を含め, 延べ 3 回の試験を行ったが, いずれの試験でも代謝活性化によらない場合の WP2 *uvrA*/pKM101 株において, 復帰変異コロニー数の増加が認められた。しかし, その増加は溶媒対照群に対して 2 倍またはそれ以下であり, 明らかな陽性反応を示さなかった。

以上の結果から総合的に判断して, ヒキオコシ抽出物の細菌における突然変異誘発性は陰性であると考えられた。

E. 結論

本実験条件下において, 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結論した。

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 (μ g/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 (DMSO)	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 (DMSO)	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 (μ g/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)	
S9 mixを 必要とす るもの	名称	2AA	2AA		2AA		2AA	2AA			
用量 (μ g/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

表 2

試 験 結 果 表 (本試験)

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17日より2004年3月19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 (DMSO)	104 (110)	116	5 (9)	12	86 (73)	59	10 (14)	17	6 (6)	5
	78.1	/	/	11 (10)	8	/	/	13 (15)	16	4 (3)	1
	156	/	/	8 (9)	10	/	/	14 (13)	12	5 (4)	2
	313	101 (104)	106	4 (6)	7	68 (71)	74	19 (18)	16	7 (5)	3
	625	106 (117)	128	10 (11)	11	83 (83)	83	23 (16)	8	8 (5)	2
	1250	110 (111)	112	1 (4)	7	65 (64)	63	20 (19)	17	8 (7)	5
	2500	124 (110)	96	/	/	97 (87)	77	/	/	/	/
	5000	176 (167)	158	/	/	137 (147)	156	/	/	/	/
+ S9 mix	溶媒対照 (DMSO)	120 (109)	98	4 (5)	6	86 (90)	93	24 (22)	20	12 (10)	8
	313	125 (123)	121	5 (6)	6	129 (119)	108	23 (23)	23	7 (8)	8
	625	128 (121)	113	8 (9)	10	115 (112)	109	26 (26)	25	12 (11)	10
	1250	120 (122)	124	6 (6)	5	92 (93)	94	25 (29)	32	12 (10)	8
	2500	136 (115)	93	5 (5)	5	117 (121)	125	23 (23)	23	10 (12)	13
	5000	119 (118)	116	6 (7)	8	151 (131)	111	25 (25)	25	10 (13)	16
陽 性	S9 mixを 必要とし ないもの	名称	AF2	SA	AF2	AF2	9AA				
	用量 (μg /プレート)	0.01	0.5	0.005	0.1	80					
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	436 (450)	464	350 (347)	344	1096 (1068)	1040	368 (380)	392	301 (314)	327
	コロニー数/ プレート	682 (694)	705	133 (132)	131	680 (681)	682	223 (234)	244	58 (64)	69

() 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

SA: Sodium azide

9AA: 9-Aminoacridine

2AA: 2-Aminoanthracene

表 3

試 験 結 果 表 (確認試験)

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31日より2004年4月2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							
		塩 基 対 置 換 型				フ レ ー ム シ フ ト 型			
		TA1535		WP2 <i>uvrA</i> /pKM101		TA98		TA1537	
- S9 mix	溶媒対照 (DMSO)	6	4	112	127	18	13	4	7
		(5)		(120)		(16)		(6)	
	293	8	4	103	108	9	11	8	5
		(6)		(106)		(10)		(7)	
	439	1	4	116	124	17	15	2	9
		(3)		(120)		(16)		(6)	
	658	2	6	135	126	14	8	1	5
		(4)		(131)		(11)		(3)	
	988	12	5	116	128	5	14	3	5
	(9)		(122)		(10)		(4)		
1481	10	3	136	116	13*	14*	4	5	
	(7)		(126)		(14)		(5)		
2222	4*	8*	131	135	16*	19*	5*	8*	
	(6)		(133)		(18)		(7)		
3333	7*	5*	128	161	13*	11*	4*	5*	
	(6)		(145)		(12)		(5)		
5000	5*	4*	133	167	20*	15*	0*	5*	
	(5)		(150)		(18)		(3)		
陽性対照	S9 mixを必要としないもの	名称		SA		AF2		9AA	
		用量 (μg /プレート)		0.5		0.005		0.1	
		コロニー数/プレート		421 424		1027 1084		422 410	
		(423)		(1056)		(416)		(417)	

() 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

SA : Sodium azide

9AA: 9-Aminoacridine

*: 菌株の生育阻害を認める

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ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

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
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

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。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哺乳類培養細胞における染色体異常誘発性は、代謝活性系の有無に関わらず、陽性であると結論した。

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（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. 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 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醗母工業株式会社) 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に設定した。また、陽性対照群にはMMC（最終濃度0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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は、「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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上（短時間処理、-S9 Mix）、1250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上（短時間処理、+S9 Mix）、156 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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

染色体異常試験短時間処理法：

結果を表2に示した。S9非存在下の最高用量群（156 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）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：

結果を表 3 に示した。78.1 および 156 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$) における倍数性細胞の出現頻度は 4.2%であった。

D. 考察

短時間処理で観察された染色体異常は比較的細胞毒性の高い用量でのみ誘発されているが、連続処理では細胞増殖率が約 50% の用量 (78.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) でも染色体構造異常が観察されていることから、ヒキオコシ抽出物は構造的染色体異常を誘発する性質を持つものと考えられる。

代謝活性化系の有無に関わらず、染色体異常が誘発されたことから、異常誘発には代謝活性化系は必要ないものと推測される。

なお、連続処理法で倍数体が有意に増加したが、その出現頻度は低く、本被験物質に数的染色体異常誘発作用があるとは結論付け難い。

比較的高用量において染色体異常が誘発されており、遺伝毒性としては危険性が高いものではないと考えられる。事実、本研究で実施されたマウス小核試験では陰性であったことから、これら陽性反応は *in vitro* 培養細胞で高用量処理において引き起こされる

現象であろう。

E. 結論

本実験条件下では、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結論された。

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, (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

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

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: ヒキオコシ抽出物

処理時間 (h)	S9 mix	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	染色分体切断	染色分体交換	染色体切断	染色体交換	その他	総異常細胞数 (%)	観察細胞数	倍細胞		総異常細胞数 (%)			
6-18	-	陰性対照 (DMSO) 1%	100	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	100	0	0
			100	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	100	2	2
			200	3	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	200	2	2 (1.0)
6-18	-	19.5	100	1	1	0	0	0	0	0	0	2	0	100	0	0	
			100	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	100	0	0	
			200	1	2	0	0	0	0	0	0	3	0	200	0	0 (0)	
6-18	-	39.1	100	2	0	1	0	0	0	0	0	3	1	100	2	2	
			100	0	1	0	0	0	0	0	1	0	100	1	1		
			200	2	1	1	0	0	0	0	4	1	200	3	3 (1.5)		
6-18	-	78.1	100	2	1	0	0	0	0	0	3	0	100	1	1		
			100	0	1	0	0	0	0	1	0	100	3	3			
			200	2	2	0	0	0	0	4	0	200	4	4 (2.0)			
6-18	-	156	100	9	9	1	0	0	1	13	1	13	3	100	3	3	
			100	9	4	0	0	0	0	12	0	100	6	6			
			200	18	13	1	0	1	1	25	1	200	5	5 (2.5)			
6-18	-	陽性対照 (MMC) 0.1	100	19	29	1	1	1	42	1	42	3	100	0	0		
			100	14	28	2	0	1	38	0	100	0	0				
			200	33	57	3	1	2	80	1	200	0	0 (0)				
6-18	+	陰性対照 (DMSO) 1%	100	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	100	1	1	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	1	1		
			200	0	0	1	0	0	1	1	0	1	2	2 (1.0)			
6-18	+	156	100	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	100	0	0	
			100	1	0	0	0	0	0	1	0	1	2	2 (1.0)			
			200	1	1	1	0	0	0	2	0	200	0	0 (0)			
6-18	+	313	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	100	1	1	
			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	200	1	1 (0.5)	
6-18	+	625	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
			100	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	100	2	2	
			200	0	1	0	0	0	0	1	0	1	2	2 (1.0)			
6-18	+	1250	100	16	15	3	0	0	29	7	7	29	8	100	0	0	
			100	16	23	4	0	0	4	34	0	100	2	2			
			200	32	38	7	0	0	11	63	0	200	2	2 (1.0)			
6-18	+	陽性対照 [B(a)P] 40	100	9	28	2	0	0	32	0	0	32	6	100	0	0	
			100	5	25	1	2	0	30	0	100	1	1				
			200	14	53	3	2	0	62	0	200	1	1 (0.5)				

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

***: 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: ヒキオコシ抽出物

処理時間 (h)	被験物質 の用量 ($\mu\text{g/mL}$)	染色体構造異常の細胞数(出現頻度%)										ギャップ の出現数	染色体の数的異常の細胞数(出現頻度%)		
		観察細胞数	染色体分体切断	染色体分体交換	染色体分体切断	染色体分体交換	染色体交換	その他	総異常細胞数(%)	観察細胞数	倍數体		総異常細胞数(%)		
24・0	陰性対照 (DMSO) 1%	100	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	100	0	0
		100	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	100	1	1
		200	2	1	0	0	0	0	2	(1.0)	1	200	1	1 (0.5)	
24・0	19.5	100	0	0	1	0	0	0	1	0	0	100	0	0	
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
		200	0	0	1	0	0	0	1	(0.5)	1	200	0	0 (0)	
24・0	39.1	100	0	1	0	0	0	0	1	0	0	100	0	0	
		100	1	2	0	0	0	1	4		0	100	1	1	
		200	1	3	0	0	0	1	5	(2.5)	0	200	1	1 (0.5)	
24・0	78.1	100	9	4	1	0	4	14		4	100	3	3		
		100	10	4	0	0	0	6	19	***	100	3	3		
		200	19	8	1	0	10	33	(16.5)	10	200	6	6 (3.0)		
24・0	156	100	13	10	2	0	3	19		3	100	5	5		
		89	28	15	0	0	5	38	***	12	91	3	3 *		
		189	41	25	2	0	8	57	(28.5)	17	191	8	8 (4.2)		
24・0	陽性対照 (MMC) 0.1	100	18	58	1	0	0	61		0	100	0	0		
		100	38	59	1	2	0	76	***	1	100	0	0		
		200	56	117	2	2	0	137	(68.5)	7	200	0	0 (0)		

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

***: カイ二乗検定において, $p \leq 0.05$ および 0.001

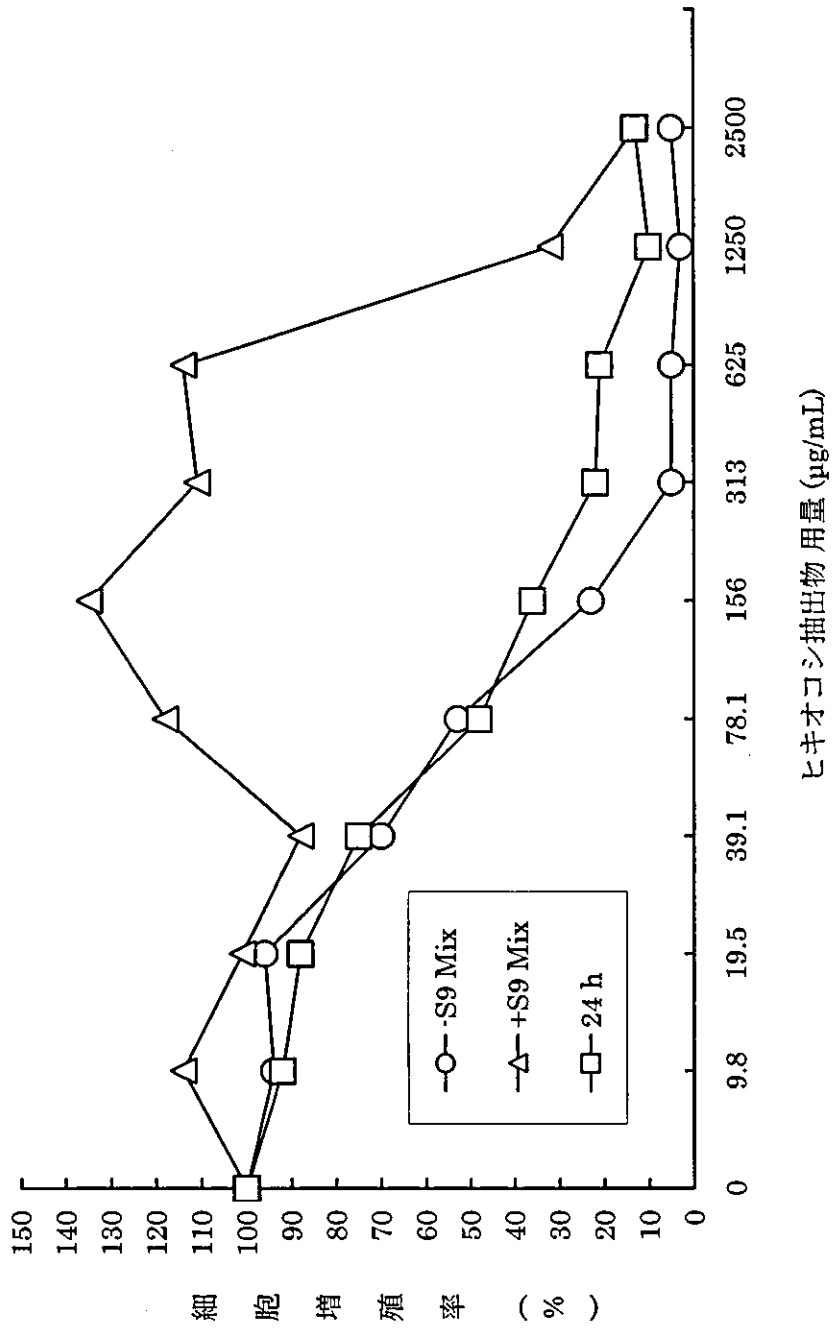


図1 用量と細胞増殖率

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げっ歯類を用いる小核試験

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
竹澤 祐造 (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マウス骨髄における小核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」の基準に従った。小核試験の用量は 500, 1000, および 2000 mg/kg とし、24 時間間隔で 2 回の強制経口投与後 24 時間目に骨髄塗抹標本作製した。顕微鏡観察の結果、ヒキオコシ抽出物の小核誘発性は陰性であった。

A. 研究目的

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

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。

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。

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のマウスの平均体重はそれぞれ 34.1g および 35.7g だった。

1. 被験物質

日本食品添加物協会から提供されたヒキ

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
±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（2mg力価マイトマ
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
対照群は 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。

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。

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。一方、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。

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はないものと考えられた。

D. 考察

培養細胞を用いた染色体異常試験では陽性の結果が得られたが、動物個体を用いたマウス小核試験では陰性であったことから、ヒキオコシ抽出物は動物個体において、染色体異常を誘発しないものと考えられる。細菌を用いた復帰突然変異試験でも

陰性の結果が得られたことから、ヒキオコシ抽出物がヒトに対して遺伝毒性を引き起こす可能性は極めて低いものと言える。

2. 学会発表
なし

E. 結論

本実験条件下では、ヒキオコシ抽出物のマウス骨髄細胞における小核誘発性は陰性であると結論した。

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし

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.

2. 実用新案登録
なし

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. その他
なし

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 statistical significance of mutation frequencies, Mutation Res., 9 ; 527~549.

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

表1. ヒキオコシ抽出物の2回投与による50%致死量 (LD₅₀²)

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	

投与方法:強制経口投与

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	標本 製作 時間 ^{a)}	動物 数	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)}		% ± SD (Min / Max)	検定 ^{c)}			
ヒキオコシ抽出物	0 ×2	24h	24h	24h	5	61.4 ± 4.9	(55.3 / 68.5)	—	10000	18	0.18 ± 0.13	(0.00 / 0.30)	—
	500 ×2	24h	24h	24h	5	56.0 ± 3.2	(50.9 / 59.2)	N.S.	10000	13	0.13 ± 0.08	(0.05 / 0.25)	N.S.
	1000 ×2	24h	24h	24h	5	53.8 ± 4.4	(46.5 / 57.1)	N.S.	10000	20	0.20 ± 0.11	(0.05 / 0.35)	N.S.
	2000 ×2	24h	24h	24h	5	61.2 ± 7.4	(55.2 / 72.0)	N.S.	10000	19	0.19 ± 0.12	(0.05 / 0.35)	N.S.
マイトマイシンC	10 ×1	—	—	24h	5	56.3 ± 8.7	(42.7 / 63.4)	N.S.	10000	561	5.61 ± 2.04	(2.40 / 7.50)	***

^{a)} : 最終投与後のサンプリング時間

^{b)} : Wilcoxonの順位和検定

^{c)} : 被験物質処理群はKastenbaum-Bowmanの数表による検定, マイトマイシンC処理群はカイ二乗検定

N.S. : 有意差なし (p > 0.05)

*** : 有意差あり (p < 0.001)

付表 1. 個別成績
 試験番号 : IET 03-0107
 被験物質名 : ヒキオコン抽出物
 試験機関名 : (財)残留農薬研究所
 動物種 : マウス/ICR (CD-1) /雄/7週齢/経口投与
 備考 : 既存天然添加物

mg/kg/day	SCHEDULE	MOUSE	MNPCE : %	PCE/(PCE+NCE):%	BW:g	CODE
0 媒体 (純水)	×2, 24hr	111	0.25	61.1	36.3	92-171
		112	0.30	59.2	32.8	92-412
		113	0.10	68.5	35.3	92-323
		114	0.25	55.3	36.6	92-293
		115	0.00	63.0	34.1	92-647
		Mean	0.18	61.4	35.0	
		Std	0.13	4.9	1.6	
		Min	0.00	55.3	32.8	
		Max	0.30	68.5	36.6	
		Total No.	18			
500	×2, 24hr	116	0.25	55.7	36.9	92-573
		117	0.15	57.9	37.2	92-715
		118	0.05	50.9	35.5	92-913
		119	0.10	59.2	39.7	92-789
		120	0.10	56.5	35.5	92-812
		Mean	0.13	56.0	37.0	
		Std	0.08	3.2	1.7	S ^K
		Min	0.05	50.9	35.5	判定
	Max	0.25	59.2	39.7	—	
	Total No.	13				
1000	×2, 24hr	121	0.20	56.6	33.0	92-298
		122	0.20	46.5	36.9	92-054
		123	0.05	55.9	37.6	92-927
		124	0.20	53.1	35.6	92-039
		125	0.35	57.1	33.9	92-212
		Mean	0.20	53.8	35.4	
		Std	0.11	4.4	1.9	S ^K
		Min	0.05	46.5	33.0	判定
	Max	0.35	57.1	37.6	—	
	Total No.	20				
2000	×2, 24hr	126	0.20	55.3	37.4	92-292
		127	0.05	57.7	36.6	92-369
		128	0.35	72.0	36.8	92-094
		129	0.25	55.2	36.5	92-759
		130	0.10	65.8	37.0	92-852
		Mean	0.19	61.2	36.9	
		Std	0.12	7.4	0.4	S ^K
		Min	0.05	55.2	36.5	判定
	Max	0.35	72.0	37.4	—	
	Total No.	19				
MMC 10	×1, 24hr	131	5.15	59.0	35.3	92-487
		132	2.40	63.4	33.3	92-507
		133	5.80	63.3	34.6	92-176
		134	7.20	52.9	32.4	92-626
		135	7.50	42.7	35.6	92-252
		Mean	5.61	56.3	34.2	
		Std	2.04	8.7	1.4	χ ²
		Min	2.40	42.7	32.4	判定
	Max	7.50	63.4	35.6	+	
	Total No.	561				

B.W. : 投与1日目の体重

MNPCE : 小核含有多染性赤血球頻度

PCE/(PCE+NCE) : 多染性赤血球頻度

S^K : Kastenbaum-Bowmanの数表による検定

χ² : カイ二乗検定 (p<0.001)

MMC : マイトマイシンC