

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 年度協力研究報告書
ホウセンカ抽出物の哺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 毒性部遺伝毒性研究室長
和田 邦生 (財)残留農薬研究所 毒性部遺伝毒性研究室
阿部 美咲樹 (財)残留農薬研究所 毒性部遺伝毒性研究室

研究要旨

ホウセンカ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」の基準に従って実施した。その結果、ホウセンカ抽出物の哺乳類培養細胞における染色体異常誘発性は、代謝活性化系の有無に関わらず、陰性であると結論した。

A. 研究目的

既存天然添加物であるホウセンカ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。

ホウセンカ抽出物はツリガネソウ科ホウセンカ (*Impatiens balsamina* LINNE) の全草より、室温時含水エタノールで抽出して得られるもので、通常、酸化防止剤として利用される。

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ホウセンカ抽出物を試験に用いた。外観は淡黄色液体であった。受領した被験物質は被験物質保管庫（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 プレートを用いて培養した。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

被験物質は水と容易に混和するため、生理食塩水（大塚製薬株式会社）を溶媒として用いた。被験物質溶液の添加量は、培地量の 1/100 とした。

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) はジメチルスルホキシド (DMSO, 東京化成工業株式会社) に溶解させた。

5. S9 Mix の調製

フェノバルビタールと 5,6-ベンゾフラボンと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-512, 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) 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

細胞増殖抑制試験は 5000 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) 対照群には生理食塩水のみを 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/プレートの割合で組織培養用 6 cm プレートに播種し、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/プレートの割合で組織培養用 10 cm プレートに播種した。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、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。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。陰性対照群には生理食塩水のみを 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/プレートの割合で 10 cm プレートに播種した。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，1250, 2500, 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 3 用量を設定した。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，陰性対照群には生理食塩水のみを 1% 添加した。すべて処理後 24 時間目に染色体標本作製した。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 に示す。さらに用量と細胞増殖率との関係を図 1 に示す。

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。

短時間処理は代謝活性化系の有無にかかわらず，すべての用量で細胞毒性は認められなかった。連続処理においては若干の毒性は認められたが，50%以上の細胞毒性は認められなかった。

以上の結果から，染色体異常試験の最高用量は，短時間処理および連続処理ともに 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。

2. 染色体異常試験

短時間処理法：

結果を表 2 に示す。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。

連続処理法：

結果を表 3 に示す。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。

D. 考察

短時間処理および連続処理のいずれの方法においても、構造的あるいは数的染色体異常の誘発は認められなかった。よって、ホウセンカ抽出物は哺乳類培養細胞において染色体異常を誘発しないものと考えられる。

なお、溶媒対照群および陽性対照群における染色体異常誘発頻度は、当研究所の管理範囲内であり、試験は適切に実施されたことが示された。

E. 結論

本実験条件下では、ホウセンカ抽出物の哺乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性は陰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. 知的財産権の出願・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： ホウセンカ抽出物

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 (生理食塩水 1%)	100	溶媒対照 (生理食塩水 1%)	100	溶媒対照 (生理食塩水 1%)	100
19.5	101	19.5	96	19.5	96
39.1	101	39.1	101	39.1	94
78.1	99	78.1	94	78.1	93
156	105	156	105	156	90
313	106	313	103	313	88
625	102	625	100	625	87
1250	103	1250	96	1250	82
2500	109	2500	96	2500	79
5000	105	5000	96	5000	76

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: ホウセンカ抽出物

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		染色体交換	観察細胞数	倍体	総異常細胞数 (%)	
6-18	-	陰性対照 (生理食塩水) 1%	100	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0
			100	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0
			200	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	0	0 (0)
6-18	-	1250	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	0	0 (0)	
6-18	-	2500	100	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	1	1	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
			200	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	1	1 (0.5)	
6-18	-	5000	100	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
			100	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	100	1	1	
			200	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	200	1	1 (0.5)	
6-18	-	陽性対照 (MMC) 0.1	100	17	32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
			100	25	47	2	1	1	0	0	0	0	0	0	100	1	1	
			200	42	79	2	1	1	0	0	0	0	0	0	200	1	1 (0.5)	
6-18	+	陰性対照 (生理食塩水) 1%	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
			100	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
			200	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	0	0 (0)	
6-18	+	1250	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
			100	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
			200	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	0	0 (0)	
6-18	+	2500	100	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	100	1	1	
			100	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	100	1	1	
			200	3	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	200	2	2 (1.0)	
6-18	+	5000	100	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
			100	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	100	1	1	
			200	1	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	200	2	2 (1.0)	
6-18	+	陽性対照 [B(a)P] 40	100	16	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
			100	15	42	1	0	0	0	0	0	0	0	0	100	1	1	
			200	31	82	1	3	0	0	0	0	0	0	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: ホウセンカ抽出物

処理時間 (h)	被験物質の用量 (ug/mL) (生理食塩水)	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	観察細胞数	倍数体	総異常細胞数 (%)				
24・0	陰性対照 (生理食塩水) 1%	100	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		200	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2 (1.0)	
24・0	1250	100	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		200	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1 (0.5)	
24・0	2500	100	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		200	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2 (1.0)	
24・0	5000	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		100	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		200	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2 (1.0)	
24・0	陽性対照 (MMC) 0.1	100	33	61	2	2	2	2	2	2	2	74	74	74	74	74	74	74	74	
		100	27	54	3	3	3	3	3	3	3	64	64	64	64	64	64	64	64	64
		200	60	115	5	5	5	5	5	5	5	138	138	138	138	138	138	138	138	138 (69.0)

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, $p \leq 0.001$

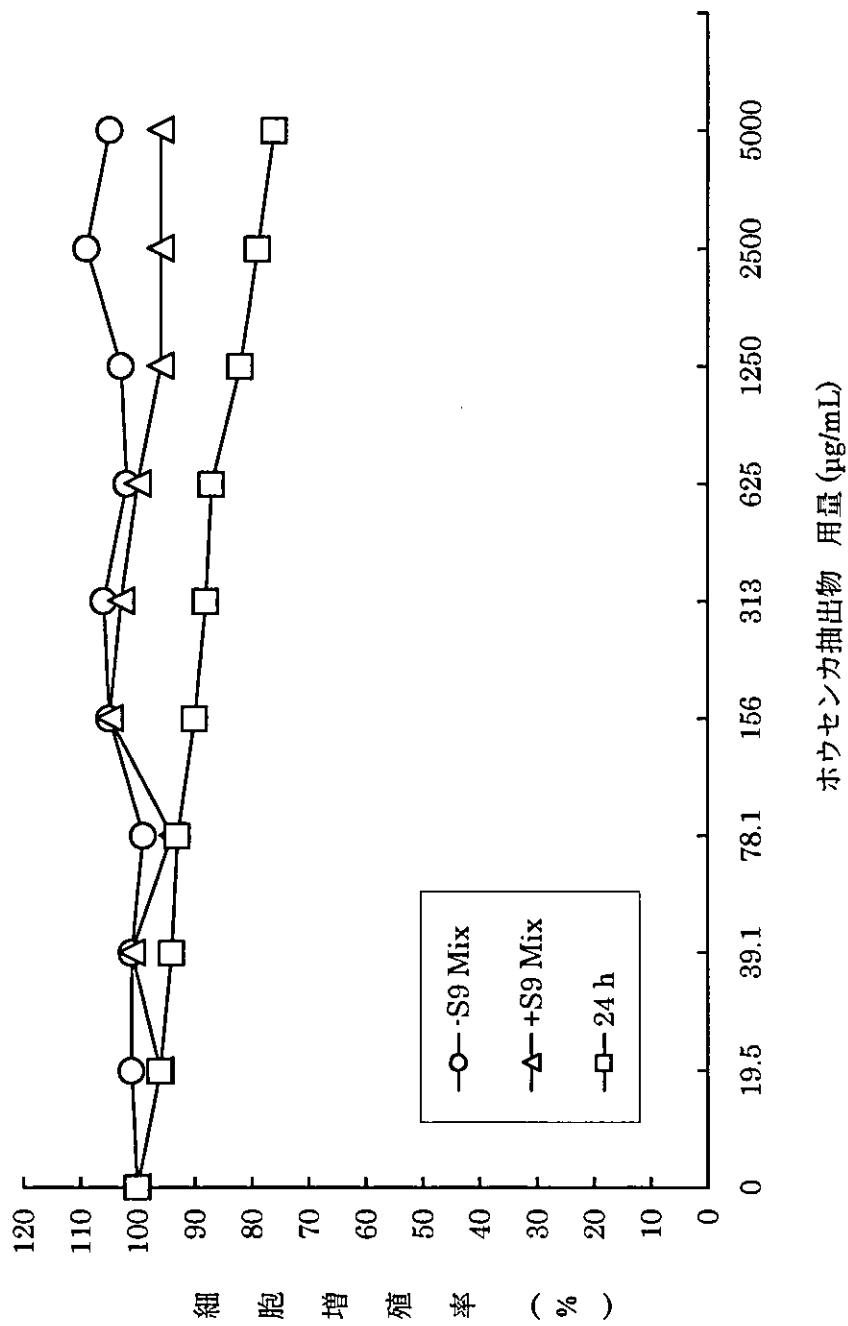


図1 用量と細胞増殖率

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 年度協力研究報告書
ホウセンカ抽出物のマウスを用いる小核試験

研究協力者	松元 郷六	(財)残留農薬研究所	毒性部遺伝毒性研究室長
	和田 邦生	(財)残留農薬研究所	毒性部遺伝毒性研究室
	竹澤 祐造	(財)残留農薬研究所	毒性部遺伝毒性研究室
	阿部 美咲樹	(財)残留農薬研究所	毒性部遺伝毒性研究室

研究要旨

ホウセンカ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」の基準に従って実施した。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 回強制経口投与した。2 回投与後 24 時間目に骨髄塗抹標本を作製し, 赤血球における小核の有無を顕微鏡観察した。その結果, ホウセンカ抽出物の小核誘発性は陰性であると結論した。

A. 研究目的

既存天然添加物であるホウセンカ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。

ホウセンカ抽出物はツリガネソウ科ホウセンカ (*Impatiens balsamina* LINNE) の全草より, 室温時含水エタノールで抽出して得られるもので, 通常, 酸化防止剤として利用される。

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ホウセンカ抽出物を試験に用いた。外観は淡黄色液体であった。受領した被験物質は被験物質保管庫 (4°C) で保管した。

2. 使用動物

SPF の ICR 系 (Crj:CD-1) 雄マウス (6 週齢) 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 34.0g および 33.1g 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113）で飼育した。

温度： 22±3°C

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

被験物質は水と容易に混和することから，溶媒として純水を用いた。被験物質溶液は投与日ごとに調製し，残余はそのつど廃棄した。なお，被験物質溶液は褐色透明液体であった。

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 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 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。

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

回投与終了から 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 に示す。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、供試動物のホウセンカ抽出物 2 回連続投与に対する最大耐量は 2000 mg/kg 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 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 0.13%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。

D. 考察

被験物質の物性に関する情報が少なく、

成分濃度や抽出溶媒の含有量などが不明であった。したがって、今回の試験では、抽出溶媒をある程度含んだハウセンカ抽出物製剤そのものの遺伝毒性を評価したと解釈される。

被験物質投与群の一般状態に異常はなく、また、骨髄抑制も認められなかったことから、被験物質の毒性が極めて低いか、あるいは被験物質が骨髄に到達していなかったかのどちらかと思われる。しかし、エタノール抽出によって得られる有効成分が、体内吸収の悪い物質であるとは考えにくいため、被験物質は十分骨髄に到達していたが、毒性は低かったと考えるべきであろう。

なお、溶媒対照群および陽性対照群における小核誘発頻度は当研究所の背景値と合致し、試験は適切に実施されたことが示された。

E. 結論

本実験条件下では、ハウセンカ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。

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

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. ホウセンカ抽出物の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
ホウセンカ抽出物	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)	投与回数	投与間隔	標本作製時間 ^{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)}				
ホウセンカ抽出物	0 ×2	24h	24h	24h	5	59.0 ± 1.1 (57.3 / 60.1)	—	10000	13	0.13 ± 0.06 (0.05 / 0.20)	—
	500 ×2	24h	24h	24h	5	55.9 ± 4.7 (49.0 / 60.8)	N.S.	10000	17	0.17 ± 0.14 (0.05 / 0.40)	N.S.
	1000 ×2	24h	24h	24h	5	57.7 ± 7.1 (46.2 / 65.6)	N.S.	10000	19	0.19 ± 0.11 (0.05 / 0.30)	N.S.
	2000 ×2	24h	24h	24h	5	59.9 ± 2.8 (57.5 / 64.1)	N.S.	10000	19	0.19 ± 0.10 (0.05 / 0.30)	N.S.
マイトマイシンC	10 ×1	—	24h	24h	5	50.7 ± 11.3 (33.1 / 62.0)	N.S.	10000	633	6.33 ± 2.60 (3.55 / 9.65)	***

^{a)} : 最終投与後からの時間

^{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. 個体別成績
 試験番号 : IET 04-0066
 被験物質名 : ホウセンカ抽出物
 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	投与回数	動物番号	MNPCE : %	PCE/(PCE+NCE):%	体重:g	コード
0 媒体 (純水)	×2, 24hr	111	0.15	58.6	34.8	98-416
		112	0.10	59.1	33.6	98-307
		113	0.05	60.1	35.1	98-652
		114	0.20	57.3	33.2	98-473
		115	0.15	60.0	35.9	98-459
		Mean	0.13	59.0	34.5	
		Std	0.06	1.1	1.1	
		Min	0.05	57.3	33.2	
		Max	0.20	60.1	35.9	
		Total No.	13			
500	×2, 24hr	116	0.10	49.0	34.0	98-630
		117	0.40	58.0	31.8	98-343
		118	0.05	53.1	30.0	98-489
		119	0.20	58.4	31.2	98-703
		120	0.10	60.8	36.1	98-261
		Mean	0.17	55.9	32.6	
		Std	0.14	4.7	2.4	S ^K
		Min	0.05	49.0	30	判定
	Max	0.40	60.8	36.1	—	
	Total No.	17				
1000	×2, 24hr	121	0.15	59.6	30.4	98-041
		122	0.30	58.2	31.7	98-405
		123	0.15	46.2	32.0	98-593
		124	0.05	65.6	32.2	98-195
		125	0.30	58.8	32.3	98-825
		Mean	0.19	57.7	31.7	
		Std	0.11	7.1	0.8	S ^K
		Min	0.05	46.2	30.4	判定
	Max	0.30	65.6	32.3	—	
	Total No.	19				
2000	×2, 24hr	126	0.15	58.2	31.1	98-636
		127	0.25	57.5	36.4	98-391
		128	0.20	64.1	30.9	98-374
		129	0.30	61.6	33.0	98-807
		130	0.05	58.3	34.0	98-085
		Mean	0.19	59.9	33.1	
		Std	0.10	2.8	2.3	S ^K
		Min	0.05	57.5	30.9	判定
	Max	0.30	64.1	36.4	—	
	Total No.	19				
MMC 10	×1, 24hr	131	3.55	53.9	31.9	98-645
		132	9.65	33.1	32.8	98-920
		133	8.50	46.9	33.1	98-674
		134	4.95	57.5	35.1	98-532
		135	5.00	62.0	35.2	98-742
		Mean	6.33	50.7	33.6	
		Std	2.60	11.3	1.5	χ ²
		Min	3.55	33.1	31.9	判定
	Max	9.65	62.0	35.2	+	
	Total No.	633				

体重：投与1日目の体重を示す

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

協力研究報告書

エラグ酸およびホウセンカ抽出物の細菌を用いる復帰突然変異試験

研究協力者 麻野間 正晴 名古屋市衛生研究所 主任研究員

研究要旨 エラグ酸およびホウセンカ抽出物を被験物質として、5種類の菌株を用いて復帰突然変異試験を行った。その結果、いずれの被験物質も代謝活性化の有無に関わらずすべての菌株に対して、試験した濃度範囲内では変異原性を示さなかった。エラグ酸および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陰性であった。

A. 研究目的

既存添加物は長年使用されていた実績があるものとして厚生労働大臣が認めたものを「既存添加物名簿」に記載し、使用が許可されてきた。しかし食品衛生法による成分規格、使用基準は定められておらず、その安全性についての検討も十分とは言い難い。その基原となる天然物中には変異・発がん性を有する物質の存在も知られており、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エラグ酸およびホウセンカ抽出物に対し、その安全性を評価する目的で細菌を用いる変異原性試験(Ames試験)を行った。

B. 研究方法

1. 被験物質

日本添加物協会を通じて提供されたエラグ酸およびホウセンカ抽出物を被験物質とした。

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

キサイド（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

エラグ酸は0.1Mナトリウム-リン酸緩衝液(pH7.4)に懸濁後、一定容量としたものを試験溶液とした。ホウセンカ抽出物はフィルター(MILLEX-HV 0.45 μ m; MILLIPORE社製)で除菌した溶液および滅菌蒸留水で希釈溶液としたものを試験溶液とした。

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。

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、エラグ酸はプレート当たり10mgを、ホウセンカ抽出物はプレート当たり100mg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用量設定試験の最高用量を公比2で希釈し、6段階の用量について本試験を行った。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。

ブ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0.1Mナトリウム-リン酸緩衝液(pH7.4)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℃で20分間ブレインキュベーションした。その後、ソフトアガーを2ml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℃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測定した。

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を使用した。

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 1ml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。

なお、S9は動物愛護上の配慮が十分になされ製造販売されていることを製造元(キッコーマン株式会社)に確認の上購入し、哀悼、感謝の気持ちを持って試験に供した。

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、用量依存性および再現性が確認できたものを陽性、それ以外を陰性とした。

C. 研究結果

エラグ酸はプレート当たり10mgを、ホウセンカ抽出物はプレート当たり100mg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(表1~6)、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、エラグ酸および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。

D. 考 察

エラグ酸は各種溶媒に難溶であったため、加熱等の処理を行わずに、攪拌のみで上澄が最も着色した0.1Mナトリウム-リン酸緩衝液(pH7.4)に懸濁して試験した。ホウセンカ抽出物は水可溶溶液であったため、必要に応じ滅菌蒸留水で希釈した。

被験物質の最高用量は労働安全衛生法等で規定されたプレート当たり5mgではなく、技術的に可能な範囲とし、エラグ酸はプレート当たり10mgを、ホウセンカ抽出物はプレート当たり100mgをそれぞれ最高用量として試験を行った。

あらかじめ試験結果に影響を与える汚染物のないことを確認するため、最高用量の試験溶液を軟寒天と共に最少グルコース寒天平板上に重層した。その結果、ホウセンカ抽出物は微生物による汚染が確

認められたため、試料溶液をフィルターで除菌した後、試験に供した。

エラグ酸は用量設定試験（表1）においてプレート当たり0.625 mg以上の用量で培地上に沈殿物が確認された。しかしコロニー数の測定には影響がないと判断し、本試験も最高用量をプレート当たり10 mgとした。用量設定試験および本試験（表2）の結果、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、復帰変異コロニーは溶媒対照の2倍未満であった。ただし、本試験においてWP2uvrA/pKM101株はプレート当たり2.5 mg以上の用量で復帰変異コロニー数の用量依存的な減少が認められた。しかし、沈殿物の影響によりバックローン（ヒスチジン要求性非復帰変異株）の生育状況が分からず、試験菌株に対する生育阻害の確認は出来なかった。WP2uvrA/pKM101株については10 mgを最高用量とし、濃度段階を増やして確認試験を行った。また、溶媒対照の1.5倍以上2倍未満の復帰変異コロニーが得られたTA1535株についても確認試験を行った。その結果（表3）、WP2uvrA/pKM101株では本試験と同様に復帰変異コロニー数の用量依存的な減少が認められたが、両菌株とも復帰変異コロニーは全ての用量で溶媒対照の2倍未満であった。以上の結果からエラグ酸に対する細菌を用いる変異原性試験結果は陰性とした。

ホウセンカ抽出物は用量設定試験（表4）および本試験（表5）において代謝活性化の有無に関わら

ず5種類の菌株すべてにおいて溶媒対照の2倍未満であった。しかしTA1535株、TA98株およびTA1537株において溶媒対照の1.5倍以上のプレートがあり、これらについて確認試験（表6）を行った。その結果、いずれの菌株においても復帰変異コロニーは全ての用量で溶媒対照の2倍未満であった。以上の結果から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陰性とした。

なお、ホウセンカ抽出物による試験菌株に対する生育阻害作用は認められなかった

試験に使用した5種類の菌株は、すべて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

エラグ酸および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陰性であった。

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 エラグ酸の試験結果 (用量設定試験)

代謝活性化系の有無	被検物質の用量 (mg/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/pKM101		TA98		TA1537						
S9 mix (-)	陰性対照 (溶媒対照)	148	132	144	18	17	21	157	141	175	36	26	28	9	11	12
		144	130	(140)	16	20	(18)	153	186	(162)	23	32	(29)	8	8	(10)
	0.0024	122			16			138			28			8		
		144		(133)	14		(15)	154		(146)	36		(32)	11		(10)
	0.0098	145			19			117			28			2		
		132		(139)	14		(17)	124		(121)	27		(28)	7		(5)
	0.039	138			19			105			34			5		
		123		(131)	26		(23)	117		(111)	29		(32)	14		(10)
0.156	140			18			135			26			11			
	164		(152)	20		(19)	123		(129)	29		(28)	9		(10)	
0.625 \$	142			21			104			31			9			
	155		(149)	17		(19)	109		(107)	27		(29)	8		(9)	
2.5 \$	150			16			112			26			6			
	134		(142)	22		(19)	111		(112)	27		(27)	7		(7)	
10 \$	133			12			97			17			5			
	116		(125)	13		(13)	101		(99)	23		(20)	4		(5)	
S9 mix (+)	陰性対照 (溶媒対照)	117	121	118	18	17	11	210	198	233	52	50	48	11	18	18
		134	132	(124)	14	14	(15)	203	206	(210)	44	40	(47)	19	23	(18)
	0.0024	134			16			210			30			13		
		148		(141)	17		(17)	183		(197)	50		(40)	12		(13)
	0.0098	121			14			213			45			14		
		129		(125)	24		(19)	189		(201)	40		(43)	12		(13)
	0.039	133			10			207			42			14		
		120		(127)	27		(19)	177		(192)	46		(44)	12		(13)
0.156	128			16			145			31			15			
	119		(124)	20		(18)	187		(166)	46		(39)	10		(13)	
0.625 \$	120			21			131			46			15			
	144		(132)	25		(23)	185		(158)	42		(44)	18		(17)	
2.5 \$	146			17			123			49			10			
	136		(141)	18		(18)	136		(130)	44		(47)	13		(12)	
10 \$	130			21			119			33			10			
	128		(129)	13		(17)	107		(113)	30		(32)	10		(10)	
陽性対照	名称	AF-2		NaN ₃		AF-2		AF-2		9AA						
	用量(μg/プレート)	0.01		0.5		0.005		0.1		80						
	コロニー数/プレート	515		312		2580		288		170						
		526 (521)		308 (310)		2316 (2448)		328 (308)		137 (154)						
	試験実施期間	2004.10.1~2004.10.4		2004.10.1~2004.10.4		2004.10.1~2004.10.4		2004.10.1~2004.10.4		2004.10.1~2004.10.4						
	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	1082		255		1644		271		374							
	1185 (1134)		228 (242)		1464 (1554)		269 (270)		406 (390)							
試験実施期間	2004.10.1~2004.10.4		2004.10.1~2004.10.4		2004.10.1~2004.10.4		2004.10.1~2004.10.4		2004.10.1~2004.10.4							

[備考]

1. 菌の生育阻害が認められる場合は、該当する数値の右に*印を付した。
2. 復帰変異数は各プレートのコロニー数の実測値を記入し、()内にはその平均値を記入した。ただし(####)は未試験。
3. プレート上に沈殿物が析出した場合は、その用量に\$印を付した。
4. 被検物質の復帰変異数が該当する菌株の陰性対照の平均値の2倍以上になった場合、その数値に■印を付した。
5. 陽性対照物質の名称、AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、NaN₃: ナトリウム・アジド、9AA: 9-アミノアクリジン、2AA: 2-アミノアントラセン

表2 エラグ酸の試験結果（本試験）

代謝活性化系の有無	被検物質の用量 (mg/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/pKM101		TA98		TA1537						
S9 mix (-)	陰性対照 (溶媒対照)	144	130	138	16	13	12	108	106	111	21	32	26	5	5	10
		140	129	(136)	9	7	(11)	123	96	(109)	27	29	(27)	5	7	(6)
	0.313 \$	148			12			133			32			5		
		128		(138)	8		(10)	128		(131)	25		(29)	4		(5)
	0.625 \$	169			14			117			26			6		
		189		(179)	20		(17)	130		(124)	32		(29)	7		(7)
	1.25 \$	204			13			107			29			5		
		188		(196)	15		(14)	128		(118)	33		(31)	5		(5)
2.5 \$	196			11			96			29			5			
	215		(206)	8		(10)	77		(87)	34		(32)	4		(5)	
5 \$	208			14			48			33			6			
	185		(197)	13		(14)	59		(54)	26		(30)	2		(4)	
10 \$	213			8			39			27			9			
	185		(199)	14		(11)	33		(36)	29		(28)	5		(7)	
S9 mix (+)	陰性対照 (溶媒対照)	133	128	140	10	15	14	129	118	121	32	37	39	9	17	13
		127	135	(133)	15	18	(14)	137	153	(132)	40	33	(36)	13	17	(14)
	0.313 \$	148			12			148			34			19		
		117		(133)	16		(14)	160		(154)	34		(34)	6		(13)
	0.625 \$	159			10			136			37			4		
		148		(154)	13		(12)	119		(128)	30		(34)	12		(8)
	1.25 \$	150			12			109			42			7		
		164		(157)	14		(13)	148		(129)	30		(36)	9		(8)
2.5 \$	143			7			77			37			9			
	163		(153)	10		(9)	100		(89)	41		(39)	5		(7)	
5 \$	145			19			46			42			8			
	167		(156)	9		(14)	81		(64)	37		(40)	5		(7)	
10 \$	181			12			21			40			7			
	156		(169)	8		(10)	10		(16)	33		(37)	8		(8)	
陽性対照	名称	AF-2		NaN ₃		AF-2		AF-2		9AA						
	S9mixを必要としないもの 用量(μg/プレート)	0.01		0.5		0.005		0.1		80						
	コロニー数/プレート	660		333		2208		378		202						
		654	(657)	407	(370)	2088	(2148)	430	(404)	177	(190)					
	試験実施期間	2004.10.8~2004.10.12		2004.10.8~2004.10.12		2004.10.8~2004.10.12		2004.10.8~2004.10.12		2004.10.8~2004.10.12						
	名称	2AA		2AA		2AA		2AA		2AA						
	S9mixを必要とするもの 用量(μg/プレート)	1		2		2		0.5		2						
	コロニー数/プレート	1154		245		1200		315		287						
		1118	(1136)	233	(239)	1188	(1194)	324	(320)	308	(298)					
	試験実施期間	2004.10.8~2004.10.12		2004.10.8~2004.10.12		2004.10.8~2004.10.12		2004.10.8~2004.10.12		2004.10.8~2004.10.12						

[備考]

1. 菌の生育阻害が認められる場合は、該当する数値の右に*印を付した。
2. 復帰変異数は各プレートのコロニー数の実測値を記入し、()内にはその平均値を記入した。ただし(####)は未試験。
3. プレート上に沈殿物が析出した場合は、その用量に\$印を付した。
4. 被検物質の復帰変異数が該当する菌株の陰性対照の平均値の2倍以上になった場合、その数値に ■印を付した。
5. 陽性対照物質の名称、AF-2:2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、NaN₃:ナトリウム・アジド、9AA:9-アミノアクリジン、2AA:2-アミノアントラセン