

表3 エラグ酸の試験結果（確認試験）

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)	(####)	7 10 9 9 9 11 ( 9 )	109 98 100 98 94 ( 100 )	(####)	(####)
	0.078	(####)	10 10 9 ( 10 )	125 95 ( 110 )	(####)	(####)
	0.156	(####)	7 10 9 ( 9 )	98 143 ( 121 )	(####)	(####)
	0.313 \$	(####)	10 7 6 ( 8 )	124 119 ( 122 )	(####)	(####)
	0.625 \$	(####)	11 8 9 ( 9 )	107 111 ( 109 )	(####)	(####)
	1.25 \$	(####)	12 9 10 ( 10 )	108 131 ( 120 )	(####)	(####)
	2.5 \$	(####)	8 9 6 ( 8 )	90 77 ( 84 )	(####)	(####)
	5 \$	(####)	9 4 7 ( 7 )	83 101 ( 92 )	(####)	(####)
	10 \$	(####)	10 6 11 ( 9 )	56 70 ( 63 )	(####)	(####)
S9 mix (+)	陰性対照 (溶媒対照)	(####)	10 13 9 11 13 15 ( 12 )	131 107 100 126 121 ( 117 )	(####)	(####)
	0.0049	(####)	10 13 9 ( 11 )	(####)	(####)	(####)
	0.0098	(####)	10 15 13 ( 13 )	(####)	(####)	(####)
	0.0195	(####)	9 9 11 ( 10 )	(####)	(####)	(####)
	0.039	(####)	16 11 13 ( 13 )	(####)	(####)	(####)
	0.078	(####)	14 17 14 ( 15 )	119 106 ( 113 )	(####)	(####)
	0.156	(####)	12 14 9 ( 12 )	102 140 ( 121 )	(####)	(####)
	0.313 \$	(####)	10 12 13 ( 12 )	108 147 ( 128 )	(####)	(####)
	0.625 \$	(####)	12 13 10 ( 12 )	116 127 ( 122 )	(####)	(####)
	1.25 \$	(####)	12 7 12 ( 10 )	113 107 ( 110 )	(####)	(####)
	2.5 \$	(####)	7 12 10 ( 10 )	101 124 ( 113 )	(####)	(####)
	5 \$	(####)	12 10 10 ( 11 )	98 64 ( 81 )	(####)	(####)
10 \$	(####)	11 8 9 ( 9 )	57 48 ( 53 )	(####)	(####)	
陽性対照	名称	AF-2	NaN <sub>3</sub>	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	(####)	359 413 ( 386 )	1596 1452 ( 1524 )	(####)	(####)
	試験実施期間		2004.12.17~2004.12.20	2004.10.15~2004.10.18		
	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	(####)	294 268 ( 281 )	2040 1968 ( 2004 )	(####)	(####)	
試験実施期間		2004.12.17~2004.12.20	2004.10.15~2004.10.18			

【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. 陰性対照物質の名称、AF-2:2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、NaN<sub>3</sub>: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4 ホウセンカ抽出物の試験結果 (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			WP2 <sup>uvrA</sup> /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 )
	0.02	133			7			106			24			8		
		129		( 131 )	13		( 10 )	125		( 116 )	21		( 23 )	7		( 8 )
	0.10	142			15			94			31			6		
		132		( 137 )	11		( 13 )	108		( 101 )	28		( 30 )	9		( 8 )
	0.39	138			13			102			24			7		
		130		( 134 )	13		( 13 )	133		( 118 )	27		( 26 )	4		( 6 )
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 )
	0.02	150			16			120			38			16		
		136		( 143 )	13		( 15 )	149		( 135 )	32		( 35 )	15		( 16 )
	0.10	133			19			116			39			12		
		138		( 136 )	14		( 17 )	162		( 139 )	33		( 36 )	9		( 11 )
	0.39	134			12			127			42			15		
		137		( 136 )	9		( 11 )	137		( 132 )	32		( 37 )	11		( 13 )
S9 mix (+)	1.56	140			14			113			39			11		
		133		( 137 )	14		( 14 )	137		( 125 )	35		( 37 )	11		( 11 )
	6.25	125			14			159			40			12		
		130		( 128 )	17		( 16 )	125		( 142 )	32		( 36 )	14		( 13 )
	25.0	127			15			140			33			10		
		136		( 132 )	13		( 14 )	133		( 137 )	33		( 33 )	14		( 12 )
	100.0	143			13			126			36			10		
		134		( 139 )	13		( 13 )	107		( 117 )	31		( 34 )	7		( 9 )
陽性対照	名称	AF-2			NaN <sub>3</sub>			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	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		
	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、NaN<sub>3</sub>: 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5 ホウセンカ抽出物の試験結果（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)	155	132	137	13	8	11	109	98	94	20	30	20	10	8	11
		143	156	( 145 )	17	17	( 13 )	100	98	( 100 )	31	28	( 26 )	9	6	( 9 )
	3.1	139			10			94			28			9		
		144		( 142 )	13		( 12 )	103		( 99 )	24		( 26 )	9		( 9 )
	6.3	119			19			105			31			10		
		158		( 139 )	16		( 18 )	101		( 103 )	23		( 27 )	10		( 10 )
	12.5	131			9			109			25			9		
		163		( 147 )	12		( 11 )	96		( 103 )	23		( 24 )	6		( 8 )
25.0	156			10			106			25			7			
	155		( 156 )	11		( 11 )	102		( 104 )	15		( 20 )	15		( 11 )	
50.0	150			11			106			28			9			
	147		( 149 )	7		( 9 )	106		( 106 )	39		( 34 )	13		( 11 )	
100.0	138			8			85			24			9			
	164		( 151 )	9		( 9 )	110		( 98 )	27		( 26 )	14		( 12 )	
S9 mix (+)	陰性対照 (溶媒対照)	147	160	135	13	9	12	131	107	121	33	41	36	13	10	13
		122	143	( 141 )	12	19	( 13 )	100	126	( 117 )	43	40	( 39 )	19	19	( 15 )
	3.1	146			9			144			35			10		
		133		( 140 )	12		( 11 )	121		( 133 )	39		( 37 )	17		( 14 )
	6.3	161			6			117			47			12		
		172		( 167 )	10		( 8 )	93		( 105 )	40		( 44 )	18		( 15 )
	12.5	189			12			133			50			10		
		161		( 175 )	10		( 11 )	113		( 123 )	36		( 43 )	21		( 16 )
25.0	129			18			134			43			13			
	189		( 159 )	15		( 17 )	126		( 130 )	53		( 48 )	20		( 17 )	
50.0	138			15			109			49			25			
	179		( 159 )	13		( 14 )	143		( 126 )	55		( 52 )	14		( 20 )	
100.0	161			16			112			43			11			
	184		( 173 )	15		( 16 )	119		( 116 )	40		( 42 )	13		( 12 )	
陽性対照	名称	AF-2			NaN <sub>3</sub>			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	556			440			1596			523			221		
		578		( 567 )	429		( 435 )	1452		( 1524 )	490		( 507 )	159		( 190 )
	試験実施期間	2004.10.15~2004.10.18			2004.10.15~2004.10.18			2004.10.15~2004.10.18			2004.10.15~2004.10.18			2004.10.15~2004.10.18		
	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	1548			311			2040			238			508			
	1536		( 1542 )	313		( 312 )	1968		( 2004 )	243		( 241 )	501		( 505 )	
試験実施期間	2004.10.15~2004.10.18			2004.10.15~2004.10.18			2004.10.15~2004.10.18			2004.10.15~2004.10.18			2004.10.15~2004.10.18			

[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、NaN<sub>3</sub>: 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6 ホウセンカ抽出物の試験結果（確認試験）

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)	(####)	10 12 14 13 16 12 ( 13 )	(####)	22 26 29 25 27 30 ( 27 )	7 12 13 9 9 5 ( 9 )
	12.5	(####)	13 13 17 ( 14 )	(####)	29 25 24 ( 26 )	6 9 8 ( 8 )
	18.8	(####)	15 13 12 ( 13 )	(####)	25 21 30 ( 25 )	7 12 7 ( 9 )
	25.0	(####)	11 11 19 ( 14 )	(####)	25 29 23 ( 26 )	10 12 6 ( 9 )
	37.5	(####)	14 17 16 ( 16 )	(####)	28 24 35 ( 29 )	14 7 6 ( 9 )
	50.0	(####)	19 13 9 ( 14 )	(####)	33 23 25 ( 27 )	8 11 9 ( 9 )
	75.0	(####)	13 15 15 ( 14 )	(####)	29 30 28 ( 29 )	10 8 8 ( 9 )
	100.0	(####)	16 14 14 ( 15 )	(####)	26 28 26 ( 27 )	8 12 10 ( 10 )
	S9 mix (+)	陰性対照 (溶媒対照)	(####)	(####)	(####)	(####)
12.5		(####)	(####)	(####)	(####)	16 12 14 ( 14 )
18.8		(####)	(####)	(####)	(####)	12 16 18 ( 15 )
25.0		(####)	(####)	(####)	(####)	30 11 16 ( 19 )
37.5		(####)	(####)	(####)	(####)	14 13 14 ( 14 )
50.0		(####)	(####)	(####)	(####)	18 22 15 ( 18 )
75.0		(####)	(####)	(####)	(####)	20 17 15 ( 17 )
100.0		(####)	(####)	(####)	(####)	18 11 13 ( 14 )
陽性対照		名称	AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2
	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	(####)	362 309 ( 336 )	(####)	439 483 ( 461 )	189 220 ( 205 )
	試験実施期間	2004.11.19~2004.11.22			2004.11.19~2004.11.22	
	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	(####)	(####)	(####)	(####)	341 309 ( 325 )	
試験実施期間	2004.11.19~2004.11.22					

【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、NaN<sub>3</sub>: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

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

ヒスチジン等の変異原性試験に及ぼす影響に関する研究

分担研究者 中嶋 圓 食品農医薬品安全性評価センター 主席研究員  
研究協力者 益森 勝志 食品農医薬品安全性評価センター グループ長補佐  
多田 敦子 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 主任研究官  
荒木 明宏 日本バイオアッセイ研究センター 室長  
加藤 典代 日本バイオアッセイ研究センター

研究要旨

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及び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及び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ダーゼで切断して、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。

## A. 研究目的

本研究においては、サルモネラ試験系へのヒスチジン及びヒスチジンを配列構造に持つ合成ジ、トリペプチド及びオリゴペプチド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、限外ろ過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。

## B. 研究方法

### 1. 被験物質及び試薬等

#### アミノ酸

L-ヒスチジン塩酸塩一水和物(His)

和光純薬工業 Lot No. ASM1067 99%

L-トリプトファン(Trp)

和光純薬工業 Lot No. ESN2290 99%

#### 合成ペプチド

Pyr-His (pGlu-His)

生化学工業 Lot No. B960670 99.5%

His-Ala

国産化学 Lot No. F558154

Ala-His

国産化学 Lot No. F558144

His-Pro 塩酸塩(His-Pro)

国産化学 Lot No. C558364

Tyr-His

国産化学 Lot No. C558374

Gly-His-Lys

シグマ Lot No. 073K1502 99%

Pyr-His-Pro (pGlu-His-Pro)

生化学工業 Lot No. 801/00 99%

Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-

Lys-Pro-Val

生化学工業 Lot No. 980917D 99%

Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-

Val-Ile-His

ペプチド研究所 Lot No. 390515 99%

Asp-Met-His-Asp-Phe-Phe-Val-Gly-Leu-Met

生化学工業 Lot No. M960671 99%

Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly

生化学工業 Lot No. 22011552 99%

Pyr-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Phe-Met

生化学工業 Lot No. 24040372 99%

His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met

生化学工業 Lot No. 24072952 99%

His-Cys-Lys-Phe-Trp-Trp

シグマ Lot No. 113K1243 99%

#### 酵素

パパイン 0.5 units/mg

和光純薬工業 Lot No. CEN1169

ペプシン(ブタ胃由来) 3400 units/mg

和光純薬工業 Lot No. CEM7051

フィターゼ(*Aspergillus niger*由来)

スミチーム PHY 新日本化学工業

Lot No. 021128S3-13 9000 units/g

Lot No. S-030701 11000 units/g

Lot No. 020320R3-12 10800 units/g

キシラナーゼ (*Trichoderma sp.*由来)

スミチーム X 新日本化学工業

Lot No. 021111S3-15 36500 units/g

Lot No. 040901S 55600 units/g

試料名	Lot No.	遊離ヒスチジン含量 (mg/100g)	プロテアーゼ活性 CFA3* (u/g)	プロテアーゼ活性 CFA6** (u/g)
スミチーム PHY	021128S3-13	289	68000	9300
	S-030701	39	79000	9600
	020320R3-12	98	5400	1900
スミチーム X	021111S3-15	50	200	1100
	040901S	30	320	2050

\* ミルクカゼイン基質、pH3

\*\* ミルクカゼイン基質、pH6

スミチーム PHY Lot No. S-030701 は Lot No. 021128S3-13 を、スミチーム X Lot No. 040901S は Lot No. 021111S3-15 をザルトコン UF モジュール 10000 cut off を使用して脱灰濃縮したもの。なお、無菌試験においてスミチーム PHY とスミチーム X に、雑菌の混入は確認されなかった。

#### プロテアーゼ阻害剤

アンチパイン

がん特試料 Lot No. SHF2001

ペプスタチン

がん特試料 Lot No. MEB-182M

ロイペプチン・硫酸塩

日本化薬 Lot No. 23-25

## キモスタチン

萬有製薬 Lot No. MJA-020

## EDTA・2Na

同仁化学研究所 Lot No. EM143 99.5%

## プロテアーゼ阻害剤ミックス(動物細胞用)

和光純薬工業

AEBSF・HCl	100 mmol/L
Aprotinin, Bobine Lung	0.08 mmol/L
Bestain	5 mmol/L
E-65	1.5 mmol/L
Leupeptin, Hemisulfate	2 mmol/L
Pepstatin A	1 mmol/L

## プロテアーゼ阻害剤ミックス(細菌抽出液用)

和光純薬工業

AEBSF・HCl	20mmol/L
Bestain	1.7 mmol/L
E-65	0.2 mmol/L
EDTA	85 mmol/L
Pepstatin A	2 mmol/L

被験物質は、滅菌蒸留水に溶解して試験に用いた。被験物質溶液のプレート当たりの量は0.05mlまたは0.1 mlとした。被験物質溶液は、試験の実施直前に調製した。

## 2. 微生物を用いる復帰突然変異試験

微生物を用いる復帰突然変異試験は、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「微生物を用いる復帰突然変異試験」の基準に従い、Amesら(Ames et al., 1975)及びMaronら(Maron and Ames, 1983)の方法に準拠し、プレインキュベーション法(Matsushima et al., 1980)またはプレート法(Ames et al., 1975)で実施した。

### 2-1. 試験菌株

試験菌株は、サルモネラ (*Salmonella typhimurium*) TA98, TA100, TA1535, TA1537, 大腸菌(*Escherichia coli*) WP2uvrA 及び WP2uvrA/pKM101 の6菌株を用いた。入手した菌株は、Amesら(Ames et al., 1975)及びMaron and Ames (Maron and Ames, 1983)の方法に従い遺伝的性質を調べた後、遺伝的

性質が適切である菌株を保存した。保存は、静止期まで培養した菌前培養液にDMSOを8.2%になるように加え、凍結用バイアルに小分けし-80°Cで保存した。

試験には、小分けした保存菌株を解凍し、解凍菌液をニュートリエントブロス(OXOID #2)に培地の1/500の接種量で植え、37°Cで10時間振盪培養(静止期の初期に相当する)した菌前培養液を用いた。

### 2-2. 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(Matsushima et al., 1976) Sprague-Dawley ラットの肝臓より調製したラット肝 S9の市販品(キッコマン株式会社製造)を購入して用いた。S9 mixは、4mM NADPH、4mM NADH、5mM G-6-P、8mM MgCl<sub>2</sub>、33mM KCl、100mM ナトリウムリン酸緩衝液(pH7.4)、10% S9の組成濃度になるように調製した。

### 2-3. 陽性対照物質

直接法及び代謝活性化法における陽性対照物質の名称及び用いた用量(µg/プレート)を下表に示した。陽性対照物質は、DMSOに溶解して試験に用いた。陽性対照物質溶液の1プレート当たりの量は0.05 mlとした。

菌株	代謝活性化によらない場合(-S9 mix)		
	名称	入手先	用量 (µg/7°プレート)
TA100	AF-2	和光純薬工業株式会社	0.01
菌株	代謝活性化による場合(+S9 mix)		
	名称	入手先	用量 (µg/7°プレート)
TA100	2-AA	和光純薬工業株式会社	1.0

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、  
2-AA: 2-アミノアントラセン

### 2-4. プレインキュベーション法

被験物質溶液または溶媒0.1mlまたは陽性対照物質溶液0.05 mlとS9 mixあるいは0.1M Na-リン酸緩衝液0.5 mlとテスト菌株の前培養液0.1 mlを試験管に入れ、良く混合し37°Cで20分間、恒温槽中で振盪した(プレインキュベーション)。プレインキュベーションした後、2 mlのトップアガー

を加え、直ちに最少グルコース寒天平板培地(プレート)上に広げて固めた。固化したプレートを37°Cで48時間、恒温培養器で上下を転倒し遮光して培養した。培養後、バックグラウンドローンの生育状況を調べた後、復帰変異コロニー数を測定した。

#### 2-5. プレート法

被験物質溶液または溶媒 0.1ml または陽性対照物質溶液 0.05 ml と S9 mix あるいは 0.1M Na-リン酸緩衝液 0.5 ml とテスト菌株の前培養液 0.1 ml を試験管に入れ、良く混合した後、2 ml のトップアガーを加え、直ちに最少グルコース寒天平板培地(プレート)上に広げて固めた。固化したプレートを37°Cで48時間、恒温培養器で上下を転倒し遮光して培養した。培養後、バックグラウンドローンの生育状況を調べた後、復帰変異コロニー数を測定した

#### 2-6. バックグラウンドローン(アミノ酸要求性株)の生育状況の観察

バックグラウンドローンの生育状況の確認は、実体顕微鏡を用い 40 倍の倍率で、プレート中に持ち込まれた微量なヒスチジン、トリプトファン、ヒスチジン含有ペプチド等を利用して生育したアミノ酸要求性株(非復帰変異株)の微細なコロニーを観察して実施した。

生育の促進の判定は、アミノ酸要求性株の微細なコロニーを陰性対照(溶媒対照)のプレートと被験物質処理群のプレートと比較して、形状が大きくなり、厚くなる場合に生育の促進があると、判定した。

抗菌作用(生育阻害)の判定は、陰性対照(溶媒対照)のプレートにおけるアミノ酸要求性株の微細なコロニーと比較して、被験物質処理群の微細なコロニーの数が減少してまばらになり、その形状が大きくなる場合に、被験物質が試験菌株に毒性を示すと判定した。

#### 3. 試料中のヒスチジン分析

フィターゼをリン酸緩衝液または S9 mix でインキュベーションし、遊離してくるヒスチジンを定量することで、37°C、20 時間のブレインキュベーション中または 37°C、48 時間の培養中にフィターゼから遊離されるヒスチジン量を推定した。

試料 10mg に蒸留水 0.4ml を加えて溶解後、1ml の S9 mix または 0.1M ナトリウムリン酸緩衝液(pH7.4)を加えて 37°Cで 0, 10, 20, 30 分間振盪した。振盪後、0.6ml の蒸留水と 0.6ml の 50%スルホサリチル酸水溶液を加えた後、蒸留水で 3ml にメスアップし、10000rpm で 3 分間遠心した。遠心後、上澄 1ml を採り、飽和水酸化ナトリウム溶液で pH3.1 に調製後、5.1 を LC/MS に導入しヒスチジン、フェニルアラニン、チロシンを定量した。

なお、長時間処理の場合は、37°Cで 2, 17, 24, 48, 72 時間振盪後、ヒスチジンの含有量を調べた。

#### 分析条件

カラム : Supelcosil ABZ<sup>+</sup>Plus 150 x 4.6 mm

溶媒 :

- A) 1mM TDFHA (Tridecafluoroheptanoic acid)
- B) acetonitrile 0→4 min, 0 %; 4→8min, 0→35 %; 8→16min, 35 %; (16→19min, 35%→0 %; 19→40min, 0 %)

カラム温度 : 30°C

流速 : 1 mL / min

スプリット : 1/2

検出 : PDA: UV 200 ~ 400 nm

MS: Scan *m/z* 70 ~ 450

SIR Histidine *m/z* 156.1

Phenylalanine *m/z* 166.2

Tyrosine *m/z* 182.2

#### 4. アミノ酸(ヒスチジン・トリプトファン)添加の影響

ガイドラインで規定され、国内で広く用いられているサルモネラ TA98, TA100, TA1535, TA1537 及び大腸菌 WP2uvrA, WP2uvrA/pKM101 におけるアミノ酸の添加によるバックグラウンドローンと復帰変異コロニー数への影響を調べた。試験は、サルモネラにはヒスチジンを、大腸菌にはトリプトファンをプレート当たり 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 1.0 . mol の濃度になるように添加し、代謝活性化による場合及びよらない場合についてブレインキュベーション法で実施した。37°Cで48時間培養後、アミノ酸添加によるバックグラウンドローン及び復帰突然変異コロニー数の変化を調べた。



## 5. 遊離ヒスチジン除去の効果

既存添加物の調査において、フィターゼ、キシラナーゼが復帰変異コロニー数を増加させ、バックグラウンドローンを濃くすることから、復帰変異コロニー数の増加は、遊離ヒスチジンによる影響と考えられている。そこで、遊離ヒスチジンを限外ろ過で除いた試料(Lot No. S-030701) と除いていない試料(Lot No. 021128S3-13) について試験を実施し、遊離ヒスチジンの除去効果を確認した。試験には、アミノ酸の添加により復帰変異コロニー数の明確な増加が認められるサルモネラ TA100 を用い、ブレインキュベーション法で代謝活性化による場合及びよらない場合について試験を実施した。37°Cで 48 時間培養後、バックグラウンドローン及び復帰突然変異コロニー数の変化を調べた。また、フィターゼについては、除去したヒスチジンに相当するヒスチジンを添加した試験も実施した。

低分子分画の復帰変異コロニー数とバックグラウンドローンへの影響を確認するため、フィターゼを 5000 $\mu$ g/プレート(500mg/10ml)の濃度に調製し、0.22 ミクロンのフィルターろ過後、市販の遠心限外ろ過装置(ピバスピン 20, ピバサイエンス)を用いて、分子量 10000 以上、分子量 3000-10000、分子量 3000 以下の 3 分画に分画した。分子量 10000 以上、分子量 3000~10000 の分画は、10ml の蒸留水で 1 回洗浄後、ろ過前の液量(10ml)となるよう蒸留水で再希釈した。それぞれの分画についてサルモネラ TA100 を用い、プレート法で代謝活性化による場合及びよらない場合について試験を実施した。

## 6. プロテアーゼ活性の影響及び不活性化の効果

フィターゼ、キシラナーゼ試料は、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。プロテアーゼ活性により、試料中の蛋白質や S9 mix 中の蛋白質が分解され、ヒスチジンが遊離してくることも考えられた。そこで、パパイン、ペプシンをモデル物質とし、サルモネラ TA100 を用い、ブレインキュベーション法で代謝活性化による場合及びよらない場合について試験を実施し、復帰突然変異コロニー数及びバックグラウンドローンの変化を調べた。また、パパインについては、パパインの阻害剤であるアンチパインを添加し、バックグラウンドローンの生育促

進を抑制できるかについても調べた。

フィターゼについては、加熱処理(100°C、1分)した場合、及び酸性プロテアーゼの可逆的阻害剤であるペプスタチンまたは数種のプロテアーゼ阻害剤を混合した阻害剤ミックス(0.1ml/プレート)を添加した場合について、復帰突然変異コロニー数及びバックグラウンドローンの生育促進を抑制できるかを調べた。また、低分子ペプチドの影響を除去するために、フィターゼ Lot No. 021128S3-13 と Lot No. 020320R3-12 をピバスピン 20 で分子量 10000 未満の分画を除去した試料を用いて、ペプスタチン、ロイペプチン、キモスタチン及び EDTA によるプロテアーゼ活性阻害効果も調べた。試験には、サルモネラ TA100 を用い、ブレインキュベーション法で代謝活性化による場合及びよらない場合について実施した。

## 7. ヒスチジン含有ペプチド添加の影響

ヒスチジンを含有する、合成ジペプチドまたはトリペプチドを被験物質として、プレート当たり 0.2, 0.4, 0.6, 0.8. mol の濃度で、代謝活性化による場合及びよらない場合について、サルモネラ TA100 を用いブレインキュベーション法により試験を実施した。37°Cで 48 時間培養後、ペプチド添加によるバックグラウンドローン及び復帰突然変異コロニー数の変化を調べた。また、アミノ酸数が 6~13 個のオリゴペプチドについても、プレート当たり 0.6 または 0.8. mol の濃度で代謝活性化によらない場合で、サルモネラ TA100 を用いて同様に試験した。

(倫理面の配慮): 本研究においては、細菌を用いて試験を行うので、ヒトの倫理面での問題となることはない。なお、購入したラット肝 S9 は、必要最低限を試験に用い、有効利用することで動物愛護上の配慮をする。

## C. 研究結果

### 1. アミノ酸(ヒスチジン・トリプトファン)添加の影響

アミノ酸添加による復帰突然変異コロニー数の変化を表-1 及び図-1 に、バックグラウンドローンの生育状況を写真に示した。

プレート当たり 0.1. mol 以上のアミノ酸(サルモ

ネラの場合はヒスチジン 15.5. g/プレート以上、大腸菌の場合はトリプトファン 20.4. g/プレート以上)の添加により、サルモネラ TA98, TA100, TA1535, TA1537 及び大腸菌 WP2uvrA, WP2uvrA/pKM101 のバックグラウンドローンは陰性対照のプレートと比較して濃くなった。

プレート当たり 0.2~0.3. mol 以上のアミノ酸の添加により、陰性対照値の 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加が、TA98, TA100, TA1535 において認められた。しかし TA1537, WP2uvrA 及び WP2uvrA/pKM101 において復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、いずれの菌株においても復帰変異コロニーは、アミノ酸が 1.0 . mol の濃度になると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、数えられる復帰変異コロニー数が減少した。

これらのことから、アミノ酸による復帰変異コロニー数の増加は、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、復帰変異コロニー数の増加がアミノ酸による増加か否かを判別できることが確認された。

## 2. 遊離ヒスチジン除去の効果

### 2-1. フィターゼ

遊離ヒスチジンを 289mg/100g 含有するフィターゼ Lot No. 021128S3-13 とその限外ろ過試料 Lot No. S-030701(遊離ヒスチジン含有量 39mg/100g) 及び遊離ヒスチジンを 98mg/100g 含有するフィターゼ Lot No. 020320R3-12 の試験結果を表-2 及び図-2 に示した。

代謝活性化によらない場合において、遊離ヒスチジンを 289mg/100g 含有するフィターゼ Lot No. 021128S3-13 は、1250µg/プレート以上の濃度でバックグラウンドローンが濃くなるのに対し、限外ろ過して遊離ヒスチジン量を 39mg/100g まで減らしたフィターゼ Lot No. S-030701 は、5000µg/プレートで濃くなった。その結果は、遊離ヒスチジンを 98mg/100g 含有するフィターゼ Lot No. 020320R3-12 とほぼ同じであり、代謝活性化によらない場合において、ヒスチジンを除去した効果が認められた。しかし、代謝活性化による場合においては、限外ろ過の有無にかかわらず 2500µg/プレート以上の濃度でバックグラウンドローンが濃くなった。また、遊離ヒスチジンを 98mg/100g

含有するフィターゼ Lot No. 020320R3-12 は、1250µg/プレート以上の濃度でバックグラウンドローンが濃くなり、フィターゼ試料の遊離ヒスチジンの除去効果は代謝活性化によらない場合において認められた。これは、フィターゼ Lot No. S-030701 とフィターゼ Lot No. 020320R3-12 にヒスチジンを 289mg/100g になるように添加した試料を試験した結果において、代謝活性化によらない場合の 1250µg/プレート以上の濃度でバックグラウンドローンが濃くなることから確認された。

フィターゼ試料のうち 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んでいる(14.15. g/プレート)。最高用量である 5000µg/プレートに含有される各フィターゼ中のヒスチジン量に相当するヒスチジンを試験して(ヒスチジンコントロール)、復帰変異コロニー数とバックグラウンドローンを比較した。その結果、フィターゼを試験した場合における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、フィターゼ試料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が明らかとなった。

低分子分画の復帰変異コロニー数の増加影響を確認するため、0.22 ミクロンのフィルターろ過したフィターゼを、分子量 10000 以上、分子量 3000 ~10000、分子量 3000 以下の 3 分画に分画した。それぞれの分画について、プレート法で試験した結果を表-3、図-3 に示した。Lot No. 021128S3-13 は、代謝活性化によらない場合に 2500µg/プレートで復帰変異コロニー数を増加させ、5000µg/プレートで生育阻害を示す。Lot No. 021128S3-13 の限外ろ過試料 Lot No. S-030701 は、5000µg/プレートで復帰変異コロニー数の増加が認められるものの生育阻害は示さない。このことから、ザルトコン UF モジュール 10000 cut off 限外ろ過によって除去された成分に復帰変異コロニー数を増加させ、生育阻害を示す物質の存在が疑われた。しかし、Lot No. 021128S3-13 の遠心限外ろ過分画において、復帰変異コロニー数を増加させ生育阻害を示すのは、分子量 10000 以上の分画にあることが明らかとなった。また、ザルトコン UF モジュール 10000 cut off を使用して脱灰濃縮した Lot No. S-030701 では、分子量 10000 以上の分画に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、

生育阻害を示す性質が失われていた。Lot No. 021128S3-13 及び Lot No. 020320R3-12 とともに分子量 3000 以下の分画と 10000 以上の分画で、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を示す。このことより、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、分子量 10000 以上の分画にもあることから、フィターゼ試料に元々含まれる遊離のヒスチジン・低分子のペプチドの影響だけによるものではないことが明かとなった。

## 2-2. キシラナーゼ

遊離ヒスチジンを 50mg/100g 含有するキシラナーゼ Lot No. 021111S3-15 とその限外ろ過試料 Lot No. 040901S (遊離ヒスチジン含有量 30mg/100g) の試験結果を表-4 及び図-4 に示した。

キシラナーゼ Lot No. 021111S3-15 は、代謝活性化によらない場合の 5000 $\mu$ g/プレートの濃度と代謝活性化による場合の 625 $\mu$ g/プレート以上の濃度でバックグラウンドローンが濃くなった。また、その限外ろ過試料 Lot No. 040901S は、代謝活性化によらない場合の 5000 $\mu$ g/プレートの濃度で、代謝活性化による場合の 313 $\mu$ g/プレート以上の濃度でバックグラウンドローンが濃くなった。キシラナーゼ試料においては、含有される遊離ヒスチジン量が少なく限外ろ過試料と非ろ過試料とで大差がないため、ヒスチジン除去の効果は観察されなかった。

アミノ酸分析により、キシラナーゼ試料のいずれにおいて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を含有していない。最高用量である 5000 $\mu$ g/プレートに含有されるキシラナーゼ中のヒスチジン量に相当するヒスチジン量で試験して(ヒスチジンコントロール)、復帰変異コロニー数とバックグラウンドローンを比較した。その結果、フィターゼ試料の場合と同様に、キシラ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が明かとなった。

## 3. フィターゼ試料中の遊離ヒスチジン含有量の変化

フィターゼを試験した場合における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、フィターゼ試料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。このことから、フィターゼ試料からヒスチジンが遊離してくることが考えられたので、ブレインキュベーション条件下でのヒスチジン含有量の変化を調べ、その結果を表-5 及び図-5 に示した。代謝活性化によらない場合は、いずれの試料においても 20 分でわずかなヒスチジンの増加が認められたが、代謝活性化による場合は Lot No. 020320R3-12, Lot No. S-030701 でヒスチジンの増加が認められたが、Lot No. 021128S3-13 では逆に減少傾向が認められた。これは、フェニルアラニン、チロシンでは、20 分のブレインキュベーションにより、代謝活性化の有無にかかわらず、増加が認められる(表-6、7 及び図-6、7)ことより、ヒスチジンに特異的な現象と考えられた。さらに長時間インキュベーション後のヒスチジン含有量を測定し、表-8、図-8 に示した。代謝活性化によらない場合は、いずれの試料においても 24 時間でヒスチジンの増加が認められたが、代謝活性化による場合は、Lot No. 020320R3-12 で明らかな増加が認められず、Lot No. S-030701、Lot No. 021128S3-13 では逆に減少傾向が認められた。その結果、フィターゼを試験した場合における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、フィターゼ試料に含まれている遊離ヒスチジンの含有量と時間経過とともに遊離されるヒスチジン量だけでは説明できないことが明かとなった。

## 4. プロテアーゼ活性の影響及び不活性化の効果

### 4-1. プロテアーゼの影響

フィターゼ、キシラナーゼ試料は、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。そのためプロテアーゼ活性により、試料中の蛋白質や S9 mix 中の蛋白質が分解してヒスチジンが遊離してくることも考えられた。そこで、サルモネラ TA100 を用いて、パバイン(最適 pH 6.5-8.0)とブタ胃由来ペプシン (最適 pH3.0-4.0)を試験し、バックグラウンドローンと復帰変異コロニー数に及ぼすプロテアーゼの影響を調べた。

パバインの代謝活性化による場合において、バックグラウンドローンが 313 $\mu$ g/プレートで濃くなった。しかし、pH6.0 以上で失活するペプシン

を pH7.4 の条件下で試験した場合においては、5000 $\mu$ g/プレートの濃度までバックグラウンドローンは濃くならなかった。代謝活性化によらない場合においても、ペプシンは 5000 $\mu$ g/プレートの濃度までバックグラウンドローンが濃くなることはなかったが、パパインは 1250 $\mu$ g/プレート以上の濃度で生育阻害が観察された(表-9 及び図-9)。

#### 4-2. プロテアーゼ活性阻害の効果

パパインが、S9 mix 中の蛋白質を分解することによってバックグラウンドローンが濃くなることを確認するために、アンチパインでプロテアーゼ活性を阻害した場合に抑制効果が認められるかについて試験した。

1000 $\mu$ g/プレートの濃度のパパインに、阻害剤であるアンチパインをプレート当たり 100 $\mu$ g 以上加えるとバックグラウンドローンは濃くならなくなった。しかし、5000 $\mu$ g/プレートの濃度のパパインの場合、阻害剤であるアンチパインは、プレート当たり 5000 $\mu$ g 加えないとバックグラウンドローンの生育促進を抑制する効果は得られなかった(表-10 及び図-10)。このことから、プロテアーゼによって S9 mix 中の蛋白質が分解して、ヒスチジン要求性株の生育に利用され、バックグラウンドローンが濃くなることが考えられた。

フィターゼ Lot No. 021128S3-13 を加熱処理すると、2500 $\mu$ g/プレートでの復帰変異コロニー数の増加が緩和され、5000 $\mu$ g/プレートでの生育阻害も認められなくなった。しかし、いずれのロットにおいても、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、加熱処理してもほぼ同様であった(表-11 及び図-11)。これはフィターゼ 5000 $\mu$ g/プレートに相当する量の分子量 3000 以下の分画において、バックグラウンドローンの生育促進が認められることから(表-3、図-3)、プロテアーゼ活性の失活による効果が認められなかったものと考えられた。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、フィターゼ Lot No. 020320R3-12 と Lot No. S-030701 の 5000 $\mu$ g/プレートの濃度に、酸性プロテアーゼの阻害剤であるペプスタチンを添加した試験を実施した。また、フィターゼ Lot No. 021128S3-13 に、市販の 2 種類の阻害剤ミックスを添加した試験を実施し、プロ

テアーゼ活性のある物質の試験手法の開発を試みた。しかし、フィターゼ Lot No. 020320R3-12 と Lot No. S-030701 の 5000 $\mu$ g/プレートの濃度にペプスタチンをプレート当たり 5000 $\mu$ g 添加しても、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効果は得られなかった(表-12 及び図-12)。また、市販のプロテアーゼ阻害剤も、明確な抑制効果は認められなかった(表-13 及び図-13)。フィターゼ 5000 $\mu$ g/プレートに相当する量の分子量 3000 以下の分画において、バックグラウンドローンの生育促進が認められることから(表-3、図-3)、フィターゼ 2500 $\mu$ g/プレートに相当する量の分子量 10000 以上の分画を用いてペプスタチン、ロイペプチン、キモスタチン、EDTA によるプロテアーゼ活性の阻害効果を調べた。その結果、いずれの阻害剤においても、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効果は得られなかった(表-14 及び図-14)。

#### 5. ヒスチジン含有ペプチド添加の影響

ヒスチジン含有ジ・トリペプチド添加による復帰突然変異コロニー数の変化を表-15 及び図-15 に示した。

ヒスチジンの N 末端側または C 末端側のいずれかにヒスチジン以外のアミノ酸が結合したジペプチド His-Ala、Ala-His、His-Pro、Tyr-His 及びヒスチジンの N 末端側及び C 末端側にヒスチジン以外のアミノ酸が結合したトリペプチド Gly-His-Lys は、ヒスチジンと同様にサルモネラに利用され、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も増加することが確認された。また、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 Pyr-His とトリペプチド Pyr-His-Pro は、栄養源として利用できなくなることも明らかとなった。ヒスチジン含有オリゴペプチド(アミノ酸数が 6~13 個)添加による復帰突然変異コロニー数の変化を表-16 及び図-16 に示した。N 末端にヒスチジンがあるオリゴペプチドのうち、アミノ酸 6 個では、復帰変異コロニー数は増加しないもののバックグラウンドローンが濃くなったが、アミノ酸 10 個ではバックグラウンドローンは濃くならなかった。また、ヒスチジンが C 末端に入っている分子量大きいと、バックグラウンドローンは濃くならなかった。このことから、分子量

が 1000 を超えると、ペプチド中のヒスチジンを利用しにくくなることが明らかとなった。

#### D. 考察

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くて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 (Aeschbacher et al., 1983) らの TA98, TA100, TA1535, TA1537 での結果、Nylund and Einisto (Nylund and Einisto, 1993) の TA98, TA100, TA1535 での結果、Busch and Bryan (Busch and Bryan, 1987) の TA100 での結果とほぼ同じであり、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数は、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(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(佐々木 et al., 1992)は、カゼインをトリプ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, Ala-His, His-Pro, Tyr-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 (Aeschbacher et al., 1983) らと Busch and Bryan (Busch and Bryan, 1987) による His-Ala, Ala-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、ペプチダ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ため、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たと考えられた。これは、Albertini and Gockeh(Albertini and Gockeh, 1993)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、アンチパイニ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も利用するため、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

アミノ酸を添加したときの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、ヒスチジン含有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. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

## G. 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

## H. 参考資料

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) Maron, D. M. and B. N. Ames (1983) : Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutation Res.*, 113, 173-215.
- 6) Matsushima, T., M. Sawamura, K. Hara and T. Sugimura (1976) : Safe substitute for polychlorinated biphenyls as an inducer of metabolic activation system, In : F.J. de Serres, J.R. Fouts, J.R. Bend and R.M. Philpot (Eds.), "In vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing", Elsevier / North-Holland, Amsterdam, pp. 85-88.
- 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) Nylund, L. and P. Einisto (1993) Mutagenicity testing of protein-containing and biological samples using the Ames /*Salmonella* plate incorporation test and the fluctuation test, *Mutation Res.*, 272, 205-214.
- 9) 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
- 10) 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.

表-1-1

## ヒスチジン添加による陰性対照値の変化

TA98 (-S9)								
ヒスジンの添加量 ( $\mu\text{mol}$ /プレート)	一回目			二回目			平均	S.D.
	plate1	plate2	plate3	plate1	plate2	plate3		
陰性対照	10	8	14	16	15	21	14	4.6
0.1	22	22	16	20	22	34	23	6.0
0.2	21	21	32	25	33	28	27	5.2
0.3	23	34	28	18	32	38	29	7.4
0.4	37	22	20	44	41	29	32	10.0
0.5	14	18	24	39	40	29	27	10.7
0.6	14	17	16	25	36	34	24	9.6
0.7	15	30	21	33	25	21	24	6.6
0.8	17	22	7	18	20	23	18	5.8
0.9	10	11	8	20	31	13	16	8.6
1	17	3	21	20	16	17	16	6.5

TA98 (+S9)								
ヒスジンの添加量 ( $\mu\text{mol}$ /プレート)	一回目			二回目			平均	S.D.
	plate1	plate2	plate3	plate1	plate2	plate3		
陰性対照	11	21	13	23	18	20	18	4.7
0.1	32	28	17	26	28	31	27	5.4
0.2	18	23	21	22	29	37	25	6.9
0.3	36	22	31	44	39	47	37	9.1
0.4	26	30	25	37	18	40	29	8.1
0.5	21	23	31	33	38	54	33	11.9
0.6	23	29	21	32	36	34	29	6.0
0.7	33	40	17	23	36	30	30	8.5
0.8	10	17	25	26	20	30	21	7.2
0.9	2	1	10	11	26	15	11	9.2
1	5	9	25	30	23	45	23	14.5

TA100 (-S9)								
ヒスジンの添加量 ( $\mu\text{mol}$ /プレート)	一回目			二回目			平均	S.D.
	plate1	plate2	plate3	plate1	plate2	plate3		
陰性対照	99	116	109	106	111	109	108	5.6
0.1	145	142	113	170	174	163	151	22.8
0.2	183	142	149	177	177	156	164	17.2
0.3	119	185	258	206	276	249	216	58.2
0.4	272	272	163	313	310	214	257	58.4
0.5	155	176	206	276	252	320	231	62.9
0.6	165	179	166	326	331	344	252	90.0
0.7	190	316	173	314	452	280	288	101.2
0.8	75	159	138	293	240	274	197	85.8
0.9	83	123	158	250	292	272	196	86.5
1	180	199	387	347	481	582	363	156.9

TA100 (+S9)								
ヒスジンの添加量 ( $\mu\text{mol}$ /プレート)	一回目			二回目			平均	S.D.
	plate1	plate2	plate3	plate1	plate2	plate3		
陰性対照	107	105	136	104	111	121	114	12.4
0.1	143	148	146	162	165	141	151	10.1
0.2	181	145	150	155	176	188	166	18.0
0.3	178	195	198	235	225	220	209	21.6
0.4	254	216	181	245	228	258	230	28.9
0.5	179	213	269	249	235	290	239	39.7
0.6	177	205	214	291	285	262	239	46.8
0.7	216	305	194	389	361	332	300	78.7
0.8	155	114	138	338	378	273	233	112.2
0.9	129	153	162	275	255	278	209	67.8
1	184	227	295	269	443	452	312	111.8



表-1-2

## ヒスチジン添加による陰性対照値の変化

TA1535 (-S9)								
ヒスチジンの添加量 ( $\mu\text{mol}/\text{プレート}$ )	一回目			二回目			平均	S.D.
	plate1	plate2	plate3	plate1	plate2	plate3		
陰性対照	8	9	9	6	6	11	8	1.9
0.1	16	10	23	9	13	18	15	5.3
0.2	15	8	7	23	17	16	14	6.0
0.3	16	25	20	24	33	24	24	5.7
0.4	25	20	16	8	18	5	15	7.5
0.5	22	14	18	20	23	26	21	4.2
0.6	20	11	18	28	33	33	24	8.9
0.7	26	20	16	17	36	21	23	7.4
0.8	10	15	9	22	14	21	15	5.4
0.9	3	8	11	18	33	30	17	12.2
1	14	14	36	23	31	38	26	10.6

TA1535 (+S9)								
ヒスチジンの添加量 ( $\mu\text{mol}/\text{プレート}$ )	一回目			二回目			平均	S.D.
	plate1	plate2	plate3	plate1	plate2	plate3		
陰性対照	10	6	6	7	9	13	9	2.7
0.1	13	13	11	10	14	18	13	2.8
0.2	17	15	5	11	16	16	13	4.6
0.3	14	20	13	16	24	25	19	5.1
0.4	21	13	8	28	25	22	20	7.6
0.5	11	14	25	17	30	22	20	7.1
0.6	14	9	25	23	23	21	19	6.3
0.7	16	16	23	21	28	41	24	9.4
0.8	11	14	13	29	31	24	20	8.8
0.9	8	8	16	28	24	18	17	8.2
1	14	23	34	31	38	63	34	16.7

TA1537 (-S9)								
ヒスチジンの添加量 ( $\mu\text{mol}/\text{プレート}$ )	一回目			二回目			平均	S.D.
	plate1	plate2	plate3	plate1	plate2	plate3		
陰性対照	6	9	8	6	7	5	7	1.5
0.1	10	5	8	8	13	7	9	2.7
0.2	6	7	5	3	6	8	6	1.7
0.3	7	6	7	7	13	10	8	2.7
0.4	6	5	9	9	3	7	7	2.3
0.5	1	2	2	10	7	8	5	3.8
0.6	3	0	3	3	3	5	3	1.6
0.7	2	5	2	3	3	3	3	1.1
0.8	0	1	0	5	6	3	3	2.6
0.9	0	1	0	0	0	0	0	0.4
1	0	5	1	6	0	0	2	2.8

TA1537 (+S9)								
ヒスチジンの添加量 ( $\mu\text{mol}/\text{プレート}$ )	一回目			二回目			平均	S.D.
	plate1	plate2	plate3	plate1	plate2	plate3		
陰性対照	16	10	8	14	14	6	11	3.9
0.1	11	10	7	10	11	10	10	1.5
0.2	6	7	8	7	8	14	8	2.9
0.3	5	7	14	14	13	14	11	4.1
0.4	8	2	6	13	11	9	8	3.9
0.5	1	3	6	9	9	9	6	3.5
0.6	8	6	6	9	5	7	7	1.5
0.7	3	6	5	2	11	13	7	4.4
0.8	0	1	1	3	7	8	3	3.4
0.9	1	3	5	3	9	8	5	3.1
1	1	0	2	9	2	7	4	3.6

表-1-3

## トリプトファン添加による陰性対照値の変化

WP2uvrA (-S9)								
トリプトファンの添加量 ( $\mu\text{mol}/\text{プレート}$ )	一回目			二回目			平均	S.D.
	plate1	plate2	plate3	plate1	plate2	plate3		
陰性対照	36	32	39	28	25	31	32	5.1
0.1	57	39	44	43	31	39	42	8.6
0.2	34	31	38	26	18	18	28	8.3
0.3	25	34	54	18	34	22	31	12.9
0.4	24	37	20	28	14	2	21	12.0
0.5	24	34	32	0	16	24	22	12.4
0.6	14	10	10	14	10	10	11	2.1
0.7	1	15	10	0	3	5	6	5.8
0.8	5	13	5	0	1	0	4	5.0
0.9	7	7	5	0	0	0	3	3.5
1	5	6	1	5	0	0	3	2.8

WP2uvrA (+S9)								
トリプトファンの添加量 ( $\mu\text{mol}/\text{プレート}$ )	一回目			二回目			平均	S.D.
	plate1	plate2	plate3	plate1	plate2	plate3		
陰性対照	39	33	33	37	37	46	38	4.8
0.1	54	54	48	39	39	34	45	8.5
0.2	44	47	53	37	38	45	44	5.9
0.3	44	38	48	40	31	41	40	5.8
0.4	26	36	43	56	32	20	36	12.8
0.5	32	23	40	13	17	21	24	10.0
0.6	13	13	18	26	10	23	17	6.3
0.7	20	18	24	10	9	10	15	6.3
0.8	5	14	13	5	1	1	7	5.7
0.9	1	0	13	1	1	1	3	5.0
1	0	1	3	0	0	0	1	1.2

WP2uvrA/pKM101 (-S9)								
トリプトファンの添加量 ( $\mu\text{mol}/\text{プレート}$ )	一回目			二回目			平均	S.D.
	plate1	plate2	plate3	plate1	plate2	plate3		
陰性対照	57	52	60	61	72	69	62	7.5
0.1	84	92	97	96	92	90	92	4.7
0.2	64	48	115	67	71	64	72	22.7
0.3	55	79	69	40	54	34	55	17.0
0.4	40	29	39	41	37	40	38	4.5
0.5	37	18	41	24	30	24	29	8.7
0.6	11	16	0	6	6	0	7	6.3
0.7	14	11	6	9	11	16	11	3.5
0.8	0	6	3	0	0	1	2	2.4
0.9	0	0	1	0	0	0	0	0.4
1	0	0	2	0	0	0	0	0.8

WP2uvrA/pKM101 (+S9)								
トリプトファンの添加量 ( $\mu\text{mol}/\text{プレート}$ )	一回目			二回目			平均	S.D.
	plate1	plate2	plate3	plate1	plate2	plate3		
陰性対照	96	86	85	98	90	101	93	6.6
0.1	112	106	117	123	142	133	122	13.4
0.2	78	87	77	119	145	116	104	27.4
0.3	130	92	96	105	76	114	102	18.7
0.4	84	54	53	92	77	55	69	17.3
0.5	57	51	63	48	41	43	51	8.4
0.6	8	28	17	16	13	21	17	6.9
0.7	9	5	8	7	9	10	8	1.8
0.8	11	2	1	2	2	1	3	3.9
0.9	0	0	6	0	0	0	1	2.4
1	0	0	0	0	0	0	0	0.0

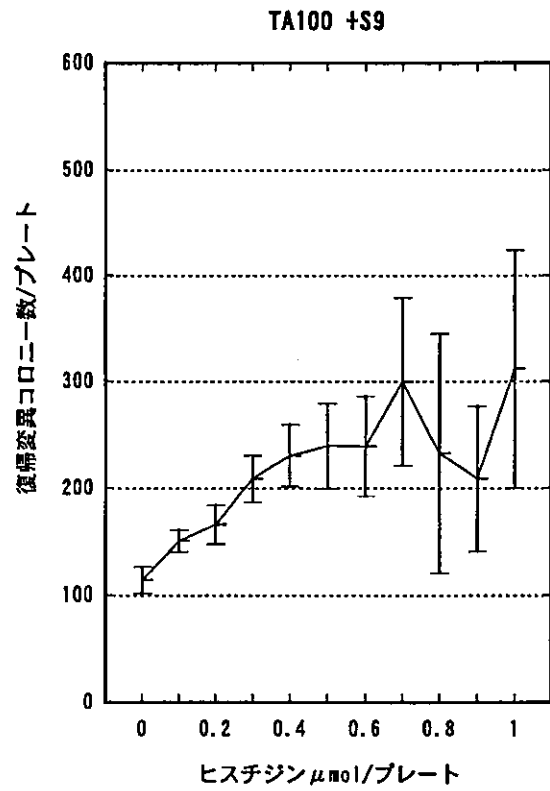
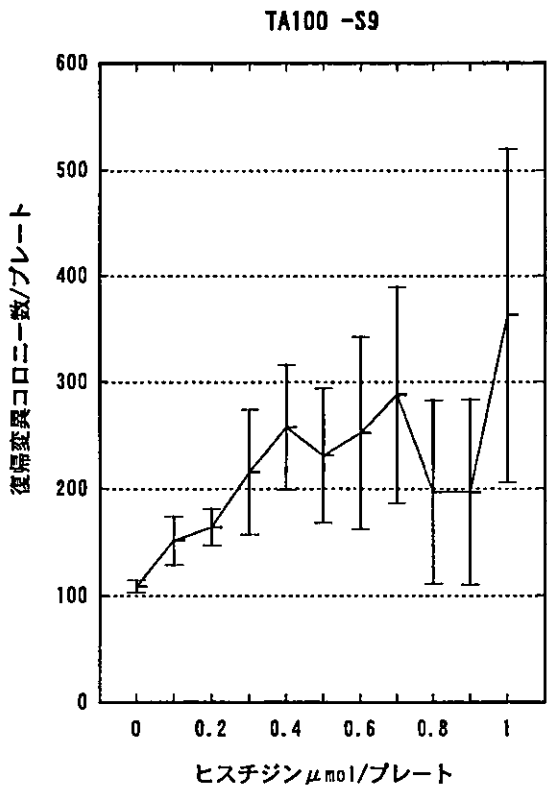
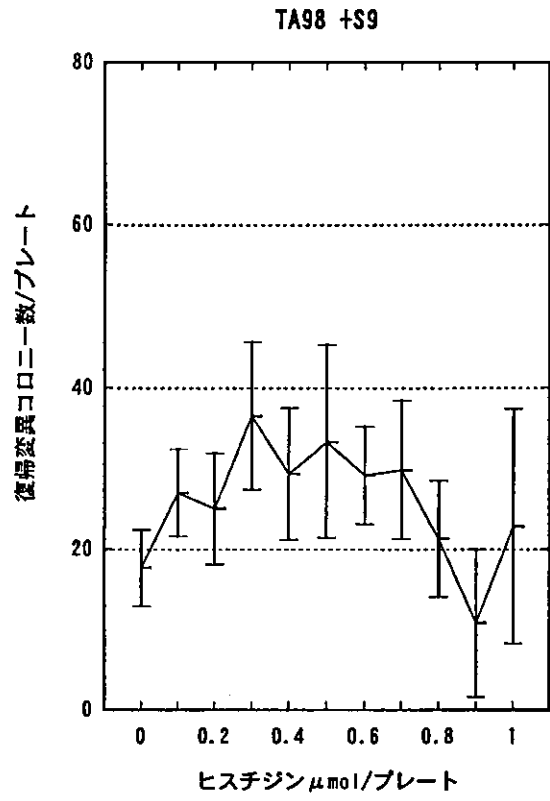
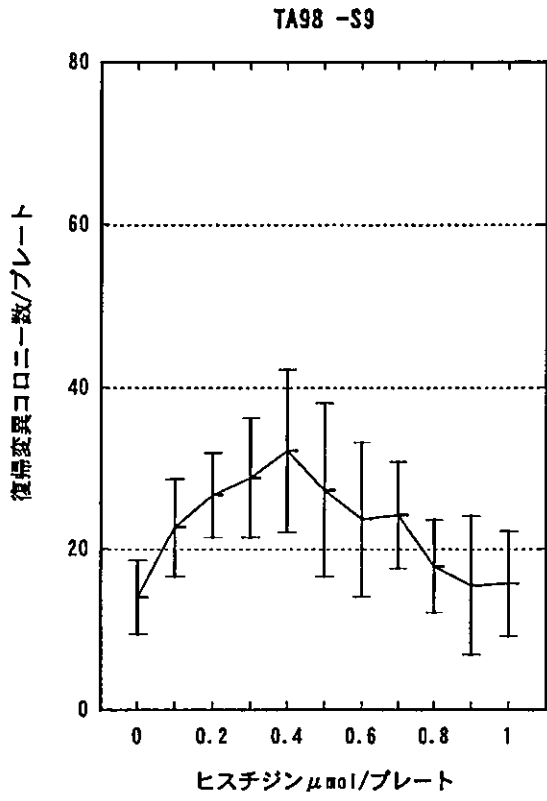


図-1-1 ヒスチジン添加による陰性対照値の変化

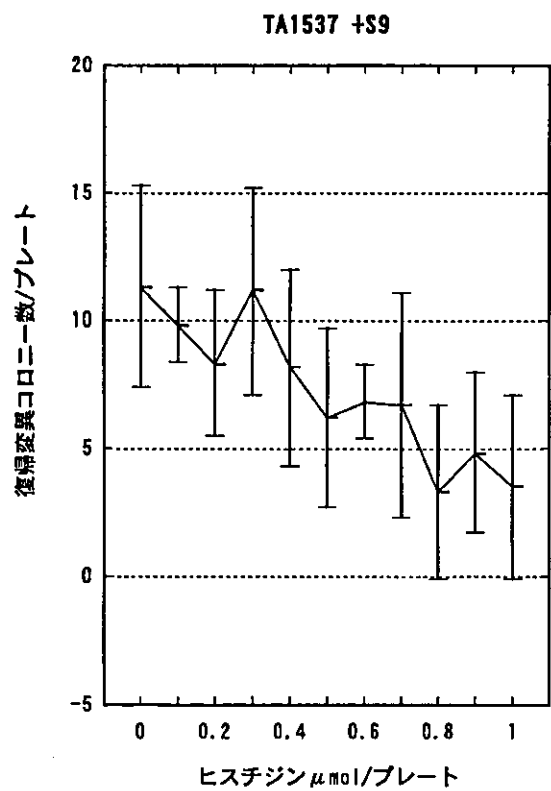
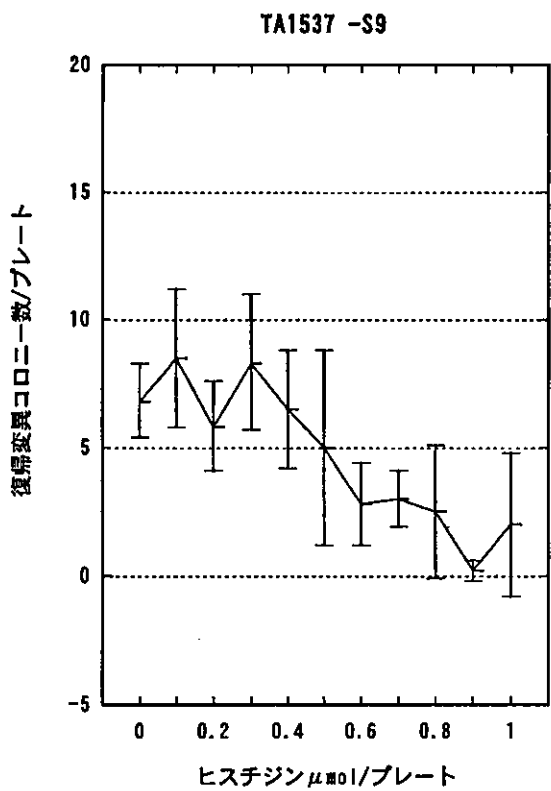
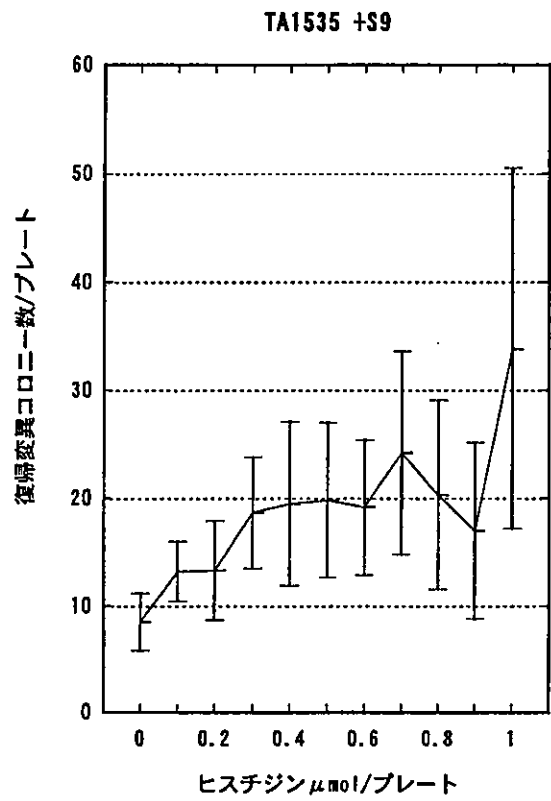
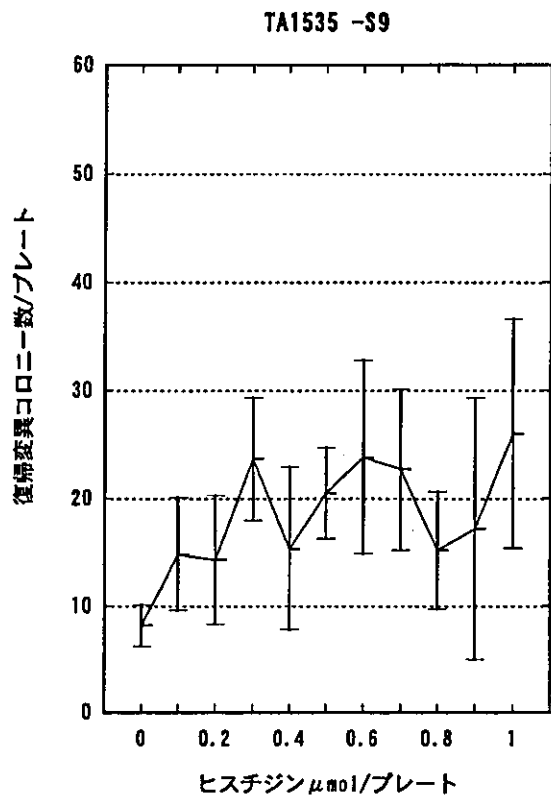


図-1-2 ヒスチジン添加による陰性対照値の変化