

表-16

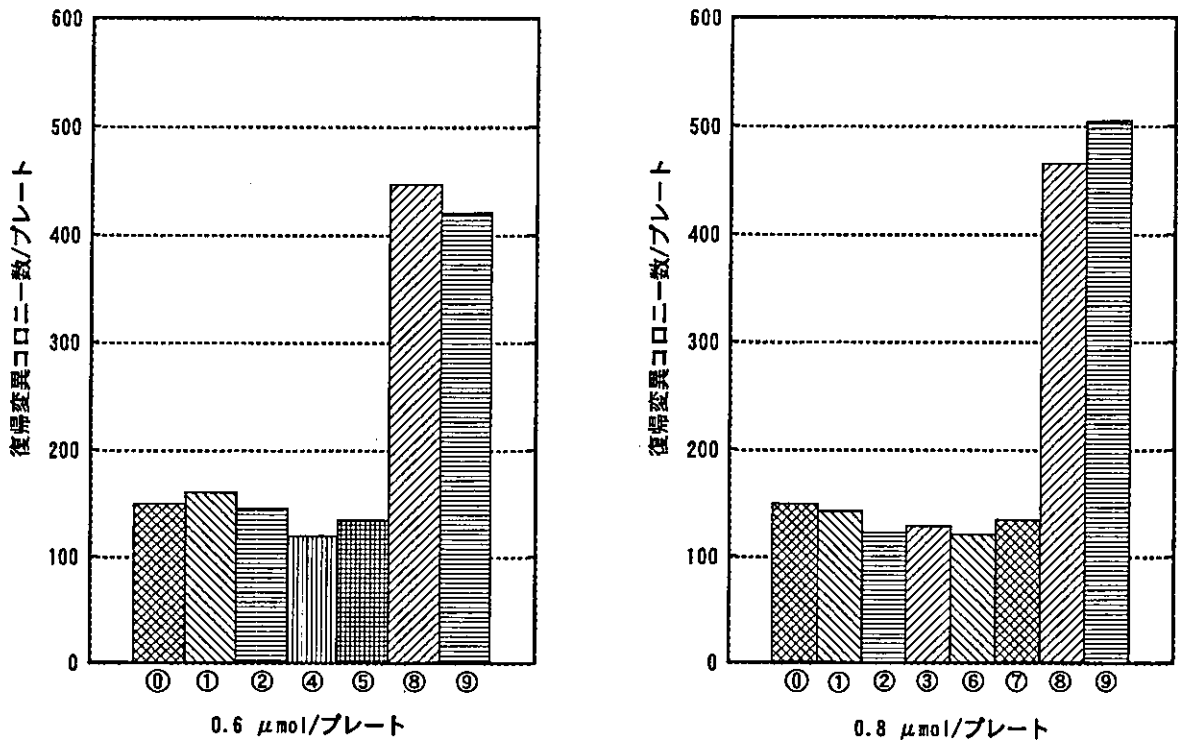
ヒスチジン含有ペプチド添加による陰性対照値の変化

代謝活性化系の有無	被験物質の用量(μmol/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		TA100				
		① Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly	② His-Cys-Lys-Phe-Trp-Trp	③ Pyr-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Phe-Met	④ Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val	⑤ Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His
S9 mix (-)	陰性対照(溶媒対照)	148 149 ( 149 )				
	0.6	148 171 ( 160 )	146 144 ( 145 )	/	126 111 ( 119 )	141 126 ( 134 )
	0.8	137 146 ( 142 )	126 117 ( 122 )	123 133 ( 128 )	/	/
陽性対照	名称	AF-2				
	用量(μg/プレート)	0.01				
	コロニー数/プレート	745 717 ( 731 )				

代謝活性化系の有無	被験物質の用量(μmol/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)			
		TA100			
		⑥ His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met	⑦ Asp-Met-His-Asp-Phe-Phe-Val-Gly-Leu-Met	⑧ His·HCl·H <sub>2</sub> O	⑨ Gly-His-Lys
S9 mix (-)	陰性対照(溶媒対照)	148 149 ( 149 )			
	0.6	/	/	478 414 ( 446 )	423 416 ( 420 )
	0.8	106 134 ( 120 )	129 139 ( 134 )	533 397 ( 465 )	504 504 ( 504 )

【備考】

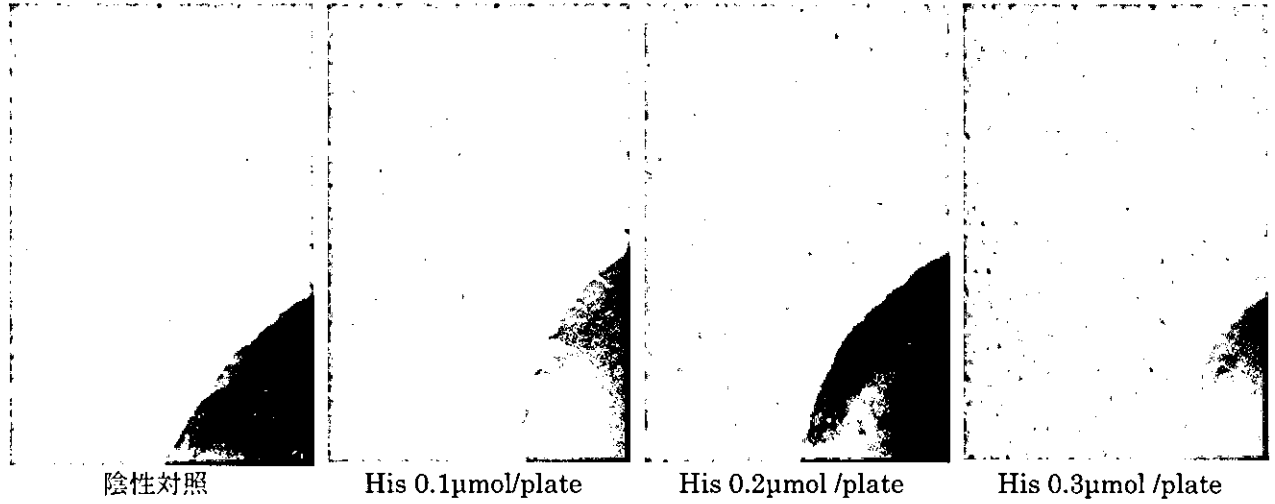
1. ( ) 内には各プレートのコロニー数の平均値を記入した。
2. 復帰変異数は、被験物質用量の低い順に実測値及び平均値を記入した。
3. 陽性対照物質の名称 AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
4. バックグラウンドローンが濃いものには、網掛けをした。



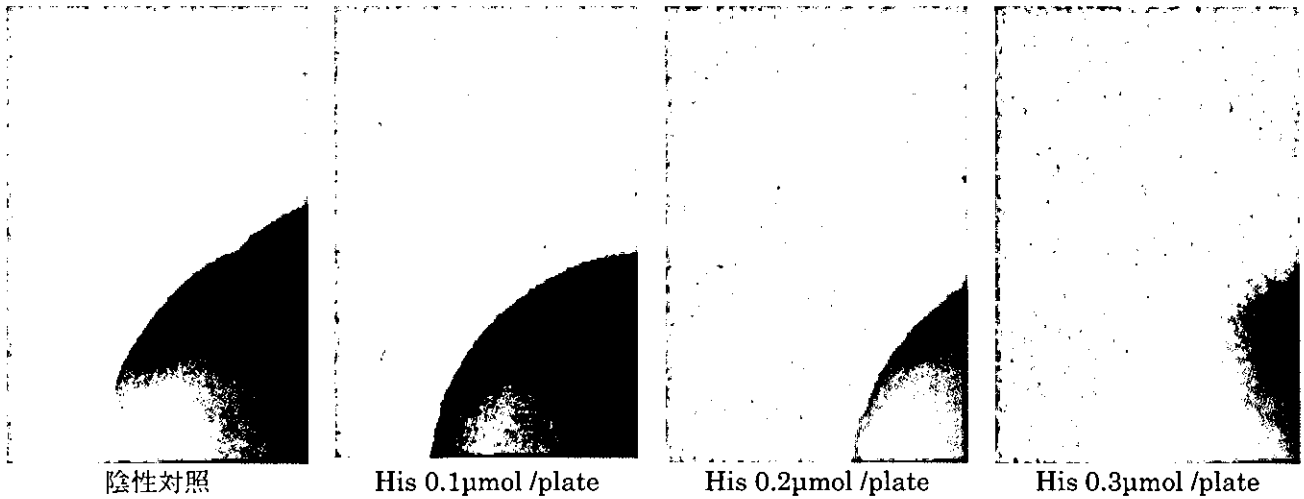
- 凡例：
- ① 陰性対照
  - ① Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly
  - ② His-Cys-Lys-Phe-Trp-Trp
  - ③ Pyr-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Phe-Met
  - ④ Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val
  - ⑤ Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His
  - ⑥ His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met
  - ⑦ Asp-Met-His-Asp-Phe-Phe-Val-Gly-Leu-Met
  - ⑧ His·HCl·H<sub>2</sub>O
  - ⑨ Gly-His-Lys

図-16 ヒスチジン含有ペプチド添加による陰性対照値の変化(TA100 -S9 mix)

TA98 (×60)



TA100 (×60)



TA1535 (×60)

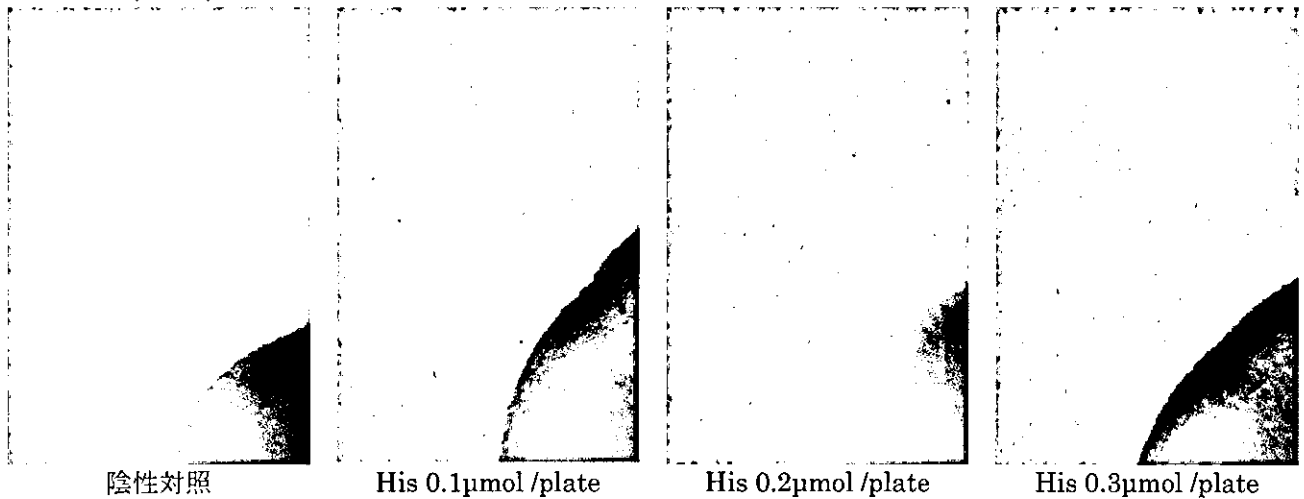
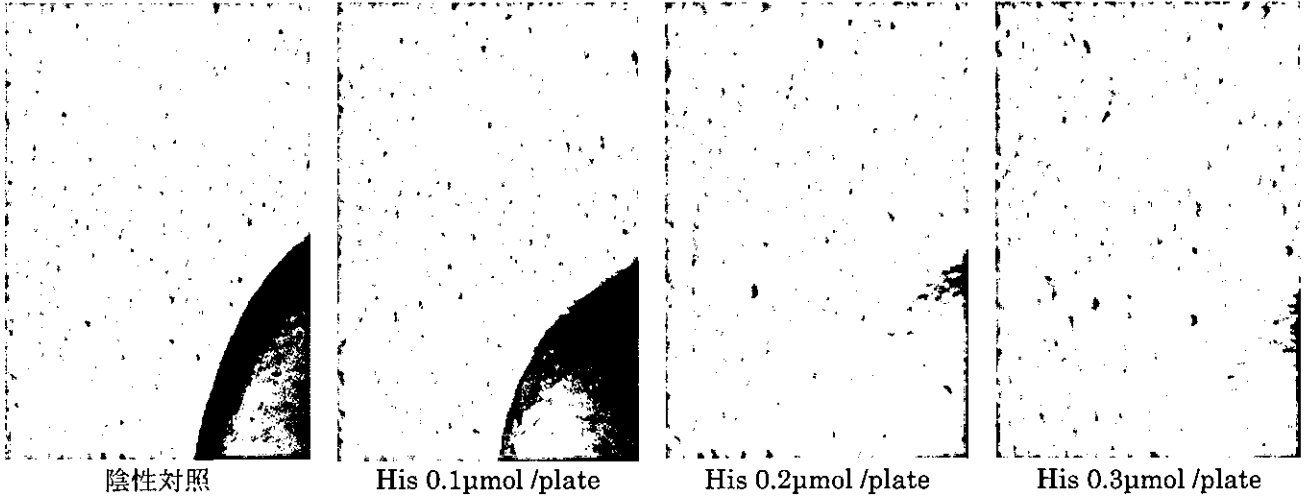
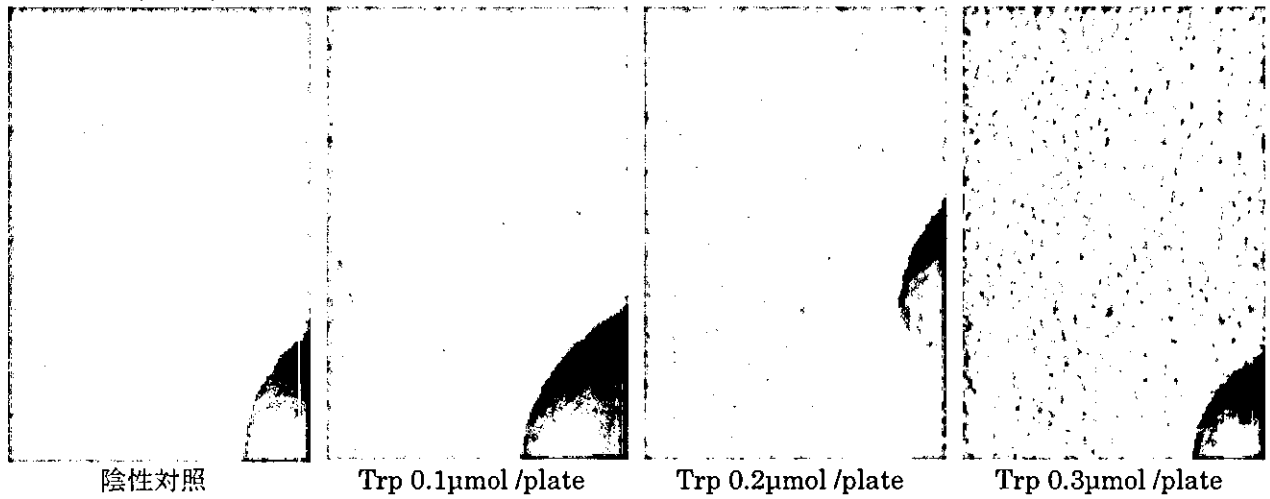


写真1 代謝活性化によらない場合におけるアミノ酸添加によるバックグラウンドローンの変化

TA1537 (×60)



WP2uvrA (×60)



WP2uvrA/pKM101 (×60)

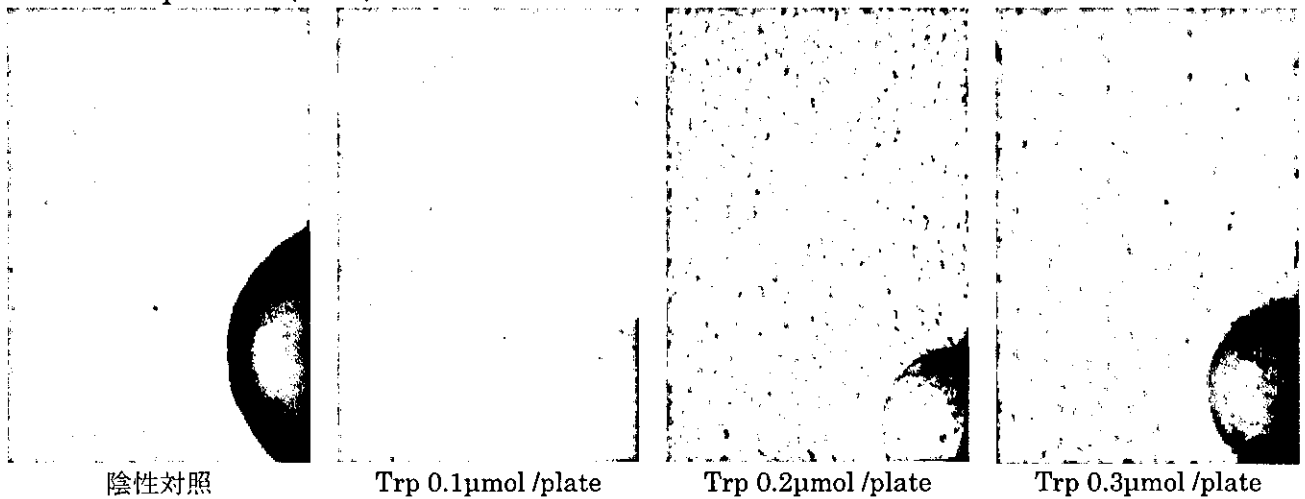


写真2 代謝活性化によらない場合におけるアミノ酸添加によるバックグラウンドローンの変化

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

エラグ酸のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

分担研究者 中嶋 圓 財団法人 食品農医薬品安全性評価センター  
第三試験室長  
試験責任者 同上  
試験担当者 上田 摩弥 財団法人 食品農医薬品安全性評価センター  
遺伝毒性グループ

要旨

本研究の目的は、既存添加物であるエラグ酸のほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性の有無を検索することを目的とした。試験は、平成 8 年 3 月 22 日付け、衛化第 29 号厚生省生活衛生局通知「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針について」の「安全性に関する試験の標準的実施方法（哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験）」の基準に従い実施した。その結果、エラグ酸のほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と判断された。

A. 目的

既存天然添加物であるエラグ酸は、ウルシ科ヌルデ (*Rhus javanica* LINNE) に発生する五倍子、ミロバン (*Terminalia chebula* RETZ.) の実、ヒシ科ヒシ (*Trapa japonica* FLEROV.) の実、フトモモ科ユーカリ (*Eucalyptus globulus* LABILL.) の葉等を脱脂後、水又はエタノール抽出して得られたものである。酸化防止剤として使用されている。

本試験は、エラグ酸のほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性の有無を検索することを目的とした。

B. 方法

1. 既存天然添加物

国立医薬品食品衛生研究所より配布されたエラグ酸 (Ellagic acid) を試験に用いた。エラグ酸は白～微黄色の粉末又は液体であり、耐熱性で融点は 360°C 以上、かつ、150°C、6 時間の加熱でも安定である。従って、提供されたエラグ酸は室温下で保管した。

2. 細胞

試験には、チャイニーズ・ハムスター肺由来の CHL/IU 細胞を用いた。CHL/IU 細胞を、国立医薬品食品衛生研究所より入手 (1984 年 11 月入手) し、継代後、液体窒素 (-196°C) 中に凍結保存した。その細胞 (倍加時間約 18 時間、マイコプラズマの汚染なし) を、解凍後、継代 2 および 8 代で試験

に用いた。

培養には、仔牛血清 (CS、Invitrogen Corp.) を 10% 添加したイーグル MEM 培養液を用い、CO<sub>2</sub> インキュベーター (5% CO<sub>2</sub>, 37°C) 内で培養した。

### 3. S9 及び S9 mix

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 S9 に、補酵素を添加した市販品 (S9 mix: キッコーマン株式会社製造) を購入して用いた。

S9 mix 1 mL 中の組成は、G-6-P が 5 µmol/0.1 mL、NADP が 4 µmol/0.1 mL、MgCl<sub>2</sub> が 5 µmol/0.1 mL、KCl が 33 µmol/0.1 mL、HEPES (pH7.2) が 4 µmol/0.2 mL、蒸留水が 0.1 mL、S9 が 0.3 mL である。

### 4. 溶媒および被験物質溶液の調製

エラグ酸は、水、エタノールに難溶であるが生理食塩液での懸濁性が良好であることから、溶媒として生理食塩液を用い、連続希釈により被験物質液を調製した。プレートあたり被験物質液を 10 vol% 添加した。

### 5. 処理方法

平成 8 年 3 月 22 日付け、衛化第 29 号厚生省生活衛生局通知「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針について」の「安全性に関する試験の標準的実施方法 (哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験)」<sup>1)</sup> の基準に従い、石館ら<sup>2)</sup> の方法に準拠して以下に示した手順で実施した。

細胞増殖抑制試験では CHL/IU 細胞を組織培養用 T 型フラスコに播種 ( $4 \times 10^4$  個/6 cm flask) し、染色体異常試験では組織培養用

シャーレに播種 ( $4 \times 10^4$  個/6 cm dish) した。それぞれ 3 日間培養した後、短時間処理法および連続処理法による処理を行った。短時間処理法では、培地交換したのち、S9 mix 非添加および添加条件下で既存天然添加物を加えて 6 時間処理した。処理終了後、細胞をダルベッコリン酸緩衝液で洗浄し、培養液でさらに 18 時間培養した。また、連続処理法では、被験物質を加えて 24 時間連続処理した。

### 6. 細胞増殖抑制作用の測定

各プレートから低張処理した細胞液を 50 µL 分取し、1% Tween 80 水溶液 2 mL と混合させた。混合液を 100 µL 小試験管に分注し、ATP 測定用試薬キット (ルシフェール 250: キッコーマン株式会社) の発光試薬を 100 µL 添加した後、相対発光量 (Relative Light Unit: RLU) を ATP フォトメーター (ルミテスター C-100LU: キッコーマン株式会社) を用いて測定した。陰性対照群における RLU に対する比 (= 相対細胞生存率) を各用量群について求め、相対細胞増殖率とした。染色体異常試験においても同様に相対細胞増殖率を算出した。

### 7. 染色体標本の作製

培養終了の 2 時間前にコルセミドを最終濃度が 0.2 µg/mL となるように添加した。連続処理法では培養終了後、ダルベッコリン酸緩衝液を用いて 1 回洗浄し、残余の被験物質を除いた後にコルセミドを添加した。培養終了後、0.25% トリプシン液をプレートあたり 2 mL 加えて細胞をはがし、遠心分離 (1000 rpm、5 分) 後、37°C に暖めておいた 5 mL の 0.075 mol/L KCl 水溶液を加え、約

16 分間低張処理を行った。低張処理後、固定液 (メタノール : 酢酸 = 3 : 1 (v/v)) を加えて細胞を固定した。細胞浮遊液をスライドガラス上に滴下し、乾燥させた。スライド標本を 1.2 % ギムザ液 (pH 6.8 の 1/100 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液で希釈調製) で染色し、水洗後、乾燥させた。

## 8. 染色体分析

染色体異常の分析は、標本をコード化して、処理条件が分からない状態で行った。

プレートあたり 100 個の分裂中期像を顕微鏡下で観察し、染色体の構造異常の有無を分析し、異常の種類別に記録した。ギャップについては、染色分体幅よりも狭い非染色性部位と定義し、構造異常誘発性の判定には含めないこととした。

また、プレートあたり 100 個の分裂中期像を観察し、倍数性細胞の出現数についても計数した。

## 9. 判定基準

染色体異常をもつ細胞の出現頻度が陰性対照群に比較して明らかに増加し、濃度依存性又は再現性が得られる場合に、陽性と判定した。

(倫理面の配慮) : 本研究では株化されたげっ歯類の細胞のみを用い *in vitro* 条件下で試験を行っていることから、動物愛護上の配慮ならびにヒト組織利用の倫理上問題になることはない。

## C. 結果

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 (表 1、2)。これらの結果を基に処理濃度を設定し、染色体異常試験を実施した。

染色体分析の結果、エラグ酸は、短時間処理法-S9 処理で高用量の 0.04  $\mu$ g/mL においてのみ染色体構造異常を誘発し、その出現頻度は 5% であった。短時間処理法+S9 処理ならびに連続処理法 24 時間処理では染色体異常の誘発は観察されなかった (表 3)。

## D. 考察

エラグ酸について、細胞の増殖が抑制される用量まで試験した結果、短時間処理法-S9 処理で染色体異常誘発頻度が 5% を示したが、同+S9 処理ならびに 24 時間処理では染色体異常の誘発は認められなかった。-S9 処理での異常の誘発には用量依存性もみられず、僅かな増加であり石館ら<sup>2)</sup>の判定基準である 10% にも達していないことから、明確な陽性反応とは考えられなかった。一方、陽性対照物質については、明らかに染色体異常が誘発され、その出現頻度は当センターの背景値の範囲内であった。このことより試験は適切に実施されたものと判断した。以上のことより、エラグ酸のほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と判定した。

## E. 引用文献

- 1) 厚生省生活衛生局食品化学課監修 (1996) : 食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針、日本食品添加物協会
- 2) 石館 基 監修 (1987) : <改定> 染色体異常試験データ集、エル・アイ・シー

表 1 相対細胞増殖率 (短時間処理法)

被験物質の名称：エラグ酸

測定方法：ATPフォトメーターによる測定

試験番号： 8493 (079-228)

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)	
用量 (mg/mL)	細胞増殖率 (%)	用量 (mg/mL)	細胞増殖率 (%)
0	100	0	100
0.0391 +	52.9	0.0391 +	60.6
0.0781 +	45.8	0.0781 +	40.5
0.156 +	34.4	0.156 +	57.8
0.313 +	36.4	0.313 +	54.1
0.625 +	31.3	0.625 +	54.0
1.25 +	32.3	1.25 +	50.8
2.5 +	43.1	2.5 +	50.1
5 +	48.0	5 +	58.0

【備考】 括弧内には処理時間及び回復時間を記入すること。

細胞増殖率は溶媒処理群を 100%とし、濃度の低い順に記録すること。

+ : 暴露終了時、被験物質の懸濁物の残存が認められた。



表 2 相対細胞増殖率 (連続処理法)

被験物質の名称：エラグ酸

測定方法：ATP フォトメーターによる測定

試験番号： 8493 (079-228)

代謝活性化法によらない場合 (24-0 h)			
用量 (mg/mL)	細胞増殖率 (%)		
0	100		
0.0391 +	38.8		
0.0781 +	31.2		
0.156 +	21.1		
0.313 +	17.1		
0.625 +	26.7		
1.25 +	29.8		
2.5 +	23.1		
5 +	11.0		

[備考] 括弧内には処理時間及び回復時間を記入すること。  
 細胞増殖率は溶媒処理群を 100 %とし、濃度の低い順に記録すること。  
 + : 暴露終了時、被験物質の懸濁物の残存が認められた。



別表 4 染色体異常試験の結果 (連続処理法)

被験物質の名称：エラゲ酸

処理時間 (h)	被験物質の用量 (ng/ml)	観察細胞数			染色体切断			染色体交換			染色体異常の細胞数 (出現頻度%)			細胞増殖率 (%)	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	染色体異常細胞数 (%)	染色体異常細胞数 (%)	染色体異常細胞数 (%)	染色体異常細胞数 (%)	染色体異常細胞数 (%)	染色体異常細胞数 (%)	染色体異常細胞数 (%)		染色体異常細胞数 (%)	染色体異常細胞数 (%)	染色体異常細胞数 (%)	染色体異常細胞数 (%)
24 - 0	陰性対照 (Saline) 0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100.0	100	0	0	0
		100	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100.0	100	0	0	0
		200	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100.0	200	0	0	0
24 - 0	0.0025	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	89.0	100	0	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	87.4	100	0	0	0	0
		200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	88.2	200	0	0	0	0
24 - 0	0.005 d)	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	72.0	100	0	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	68.0	100	1	0	1	
		200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	70.0	200	1	0	1	
24 - 0	0.01 d)	100	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	46.2	100	0	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	52.0	100	0	0	0	
		200	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	49.1	200	0	0	0	
24 - 0	0.02 d)	NE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	37.6	NE	-	-	-	-
		NE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	40.7	NE	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	39.2	-	-	-	-	-
24 - 0	陽性対照 (MMC) 0.00005	100	8	18	0	0	0	0	0	0	23	0	61.1	100	0	0	0	0
		100	6	24	0	0	0	0	0	0	27	0	57.3	100	0	0	0	0
		200	14	42	0	0	0	0	0	0	50	0	59.2	200	0	0	0	0

MMC : Mitomycin C

d) : 暴露終了時、被験物質の析出が認められた

NE : Not examined

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  
エラグ酸のげっ歯類を用いる小核試験

分担研究者 中嶋 圓 財団法人 食品農医薬品安全性評価センター  
第三試験室長  
試験責任者 同上  
試験担当者 古屋 有佳子 財団法人 食品農医薬品安全性評価センター  
遺伝毒性グループ

**要旨**

本研究は、既存天然添加物であるエラグ酸のマウス骨髄の多染性赤血球に対する小核誘発性の有無を検索することを目的とした。試験は、平成 8 年 3 月 22 日付け、衛化第 29 号厚生省生活衛生局通知「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針について」の「安全性に関する試験の標準的実施方法（げっ歯類を用いる小核試験）」の基準に従い実施した。その結果、エラグ酸のマウス骨髄の多染性赤血球に対する小核誘発性が認められなかった。

**A. 目的**

既存天然添加物であるエラグ酸は、ウルシ科ヌルデ (*Rhus javanica* LINNE) に発生する五倍子、ミロバン (*Terminalia chebula* RETZ.) の実、ヒシ科ヒシ (*Trapa japonica* FLEROV.) の実、フトモモ科ユーカリ (*Eucalyptus globulus* LABILL.) の葉等を脱脂後、水又はエタノール抽出して得られたものである。酸化防止剤として使用されている。

本試験は、エラグ酸のマウス骨髄の多染性赤血球に対する小核誘発性の有無を検索することを目的とした。

**B. 方法**

1. 既存天然添加物

国立医薬品食品衛生研究所より配布され

たエラグ酸 (Ellagic acid) を試験に用いた。エラグ酸は白～微黄色の粉末であり、耐熱性で融点は 360°C 以上、かつ、150°C、6 時間の加熱でも安定である。従って、提供されたエラグ酸は室温下で保管した。

2. 使用動物

8 週齢の雄の BDF<sub>1</sub> (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。

3. 飼育条件

動物は全飼育期間を通して、温度 24.5±2.5°C、湿度 55±20%、照明 12 時間 (7:00 点灯、19:00 消灯)、換気回数 1 時間あたり 8 回に設定した環境下で飼育した。

動物を 1~3 匹ずつケージに収容し、MF 固型飼料（オリエンタル酵母工業株式会社）を自由摂取させた。また、水道水を自動給水ノズルより自由摂取させた。

#### 4. 溶媒および被験物質溶液の調製

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。

#### 5. 投与方法

平成 8 年 3 月 22 日付け、衛化第 29 号厚生省生活衛生局通知「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針について」の「安全性に関する試験の標準的実施方法（げっ歯類を用いる小核試験）」<sup>1)</sup> の基準に従い、以下に示した手順で実施した。

マウス用胃ゾンデを用いて被験物質溶液を 1 日 1 回、24 時間間隔で 2 日間の強制経口投与を行った。

用量設定試験では 1 群 3 匹、小核試験では 1 群 6 匹（評価数は 5 匹）のマウスを用いた。

#### 6. 小核標本の作製

炭酸ガス吸入法で動物を安楽死させて、大腿骨を摘出し、少量の非働化済みウシ胎児血清を用いて洗い出し、遠心（1000 rpm、5 分）し余剰血清を除き、塗抹標本作製した。室温で乾燥させた標本をメタノールで固定した。作製したスライド標本を 3%ギム

ザ液（pH 6.8 の 1/100 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液で希釈調製）で染色し、ナトリウム・リン酸緩衝液（pH 6.8）および精製水で洗浄し、乾燥させた。さらに 0.001%クエン酸水溶液および精製水で洗浄した後、再び乾燥させた。

#### 7. 小核標本の観察

標本の観察は、コード化し処理条件等が分からない状態で行った。光学顕微鏡下で多染性赤血球を 1 匹あたり 2000 個観察し、小核を有する細胞を計数した。また、全赤血球（多染性赤血球および正染性赤血球）500 個を観察し、多染性赤血球の数を計数した。

#### 8. 統計方法

各試験群の小核多染性赤血球の出現頻度は条件付き二項検定（Kastenbaum and Bowman の推計学的方法<sup>2)</sup>；有意水準上側 0.025）を用い、また、観察赤血球中の多染性赤血球の割合についてはエラグ酸処理群では Dunnett の t-検定法<sup>3)</sup>を用いて有意差（有意水準 0.05）を判定した。また、陽性対照群については Aspin-Welch の t-検定法<sup>4)</sup>を用いて有意差（有意水準 0.05）を判定した。

#### 9. 判定基準

被験物質処理群において統計学的な有意差が認められた場合、陽性と判定した。ただし、最終的な判定は試験条件下での生物学的な妥当性も考慮して行った。

（倫理面の配慮）：本研究では実験動物としてマウスを用いているが、「動物の愛護

及び管理に関する法律（昭和 48 年 10 月 1 日法律第 105 号，平成 11 年 12 月 22 日改正）、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準（昭和 55 年 3 月 27 日総理府告示第 6 号，平成 14 年 5 月 28 日一部改正）」および「財団法人食品農医薬品安全性評価センター 動物実験に関する指針（平成 15 年 12 月 1 日）」を遵守しており、動物愛護上の配慮が十分になされている。また、ヒト組織利用の倫理上問題となることはない。

### C. 結果

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（表 1）。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。

標本観察の結果、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（表 2、付表 1）。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た。

### D. 考察

エラグ酸について、ガイドラインで定められた 2000 mg/kg を高用量とした用量設定試験を実施した結果、いずれの投与群においても死亡例が認められなかった。このことから

小核試験では 2000 mg/kg まで検討した。その結果、いずれの処理群においても陰性対照に比較して小核誘発率の統計学的に有意な増加は認められなかった。また、2000 mg/kg においては多染性赤血球の割合が有意に減少し、骨髄細胞の分裂抑制作用が確認された。一方、陽性対照群については、小核誘発率が明らかに増加し、その出現頻度は当センターの背景値の範囲内であった。また、陰性対照群の小核誘発率も当センターの背景値の範囲内であった。このことより試験は適切に実施されたものと判断した。以上のことより、エラグ酸のマウス骨髄多染性赤血球に対する小核誘発性は陰性と判定した。

本被験物質のエラグ酸についてはほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験およびマウスを用いる小核試験において陰性の結果が得られている。したがって、*in vitro* あるいは *in vivo* においてエラグ酸が遺伝毒性を示す可能性はないものと推察された。

### E. 引用文献

- 1) 厚生省生活衛生局食品化学課監修（1996）：食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針、日本食品添加物協会
- 2) Kastenbaum, M.A., and K. O. Bowman (1970): Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutation Res.*, 9, 527-549.
- 3) Dunnett CW. (1964): New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, 482-491.
- 4) Snedecor, G.W. and Cochran, W.G. (1980): *Statistical methods*, 7th ed. Iowa State University Press.

表1 エラグ酸の2回投与による50%致死量 (LD<sub>50</sub><sup>2</sup>)

Exp. No. 8494 (079-229)

品目	1回あたりの投 与量 (mg/kg)	投与回数	生存数/投与数 (3日間)	推定LD <sub>50</sub> <sup>2</sup>
エラグ酸	1024	×2	3/3	
	1280	×2	3/3	
	1600	×2	3/3	
	2000	×2	3/3	>2000mg/kg

投与法:経口投与

表2 小核試験成績

Exp No. 8494 (079-229)

被験物質	投与量 mg/kg/day	投与方法	投回数	投与間隔	サンプ リング 時間 <sup>a)</sup>	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	%	± SD	(Min / Max)	検定 <sup>d)</sup>	%	± SD
エラグ酸 (0.5w/v% MC)	0	p.o	×2	24h	24	5	62.4 ± 3.8	(57.8 / 66.6)	—	10000	17	—	0.17 ± 0.08	(0.10 / 0.30)	
	500	p.o	×2	24h	24	5	57.6 ± 3.4	(53.0 / 61.6)	N.S.	10000	28	N.S.	0.28 ± 0.06	(0.20 / 0.35)	
	1000	p.o	×2	24h	24	5	59.4 ± 5.6	(54.0 / 67.0)	N.S.	10000	26	N.S.	0.26 ± 0.09	(0.15 / 0.40)	
	2000	p.o	×2	24h	24	5	53.9 ± 5.7	(46.8 / 61.8)	* <sup>b)</sup>	10000	20	N.S.	0.20 ± 0.09	(0.15 / 0.35)	
MMC	0.5	i.p.	×1	—	24	5	54.4 ± 4.7	(49.6 / 60.8)	* <sup>c)</sup>	10000	113	*	1.13 ± 0.17	(0.90 / 1.35)	

a) : 最終投与後のサンプリング時間

b) : Dunnettのt検定による検定 (\*: P≤0.05)

c) : Aspin-Welchのt検定による検定 (\*: P≤0.05)

d) : Kastenbaum and Bowmanの推計学的方法による検定 (\*: P≤0.025)

0.5w/v% MC: 0.5w/v% Methylcellulose solution

MMC: Mitocycin C

N.S.: Not significantly different from the vehicle control. (p &gt; 0.05)



付表 1.

Exp No. : 8494 (079-229)  
 検体名 : エラグ酸  
 機関名 : (財)食品農医薬品安全性評価センター  
 動物 : マウス/BDF<sub>1</sub> /雄/9週齢/経口投与  
 備考 :

mg/kg/day	SCHEDULE	MOUSE	MNPCE : %	PCE/(PCE+NCE):%	BW:g	判定
0 Vehicle (0.5w/v% MC)	×2, 24hr	2001	0.15	58.8	27.2	
		2002	0.10	64.2	27.0	
		2003	0.30	57.8	25.7	
		2004	0.15	64.4	27.3	
		2005	0.15	66.6	25.7	
		Mean	0.17	62.4	26.6	
		Std	0.08	3.8	0.8	
		Min	0.1	57.8	25.7	
		Max	0.30	66.6	27.3	
		Total No.	17			
500	×2, 24hr	2101	0.30	60.2	25.6	
		2102	0.25	61.6	27.3	
		2103	0.35	56.8	28.0	
		2104	0.30	56.2	26.3	
		2105	0.20	53.0	28.1	
		Mean	0.28	57.6	27.1	
		Std	0.06	3.4	1.1	
		Min	0.2	53.0	25.6	
		Max	0.35	61.6	28.1	
		Total No.	28			
1000	×2, 24hr	2201	0.25	54.0	26.2	
		2202	0.25	57.2	25.0	
		2203	0.25	55.4	27.6	
		2204	0.40	63.4	25.9	
		2205	0.15	67.0	27.4	
		Mean	0.26	59.4	26.4	
		Std	0.09	5.6	1.1	
		Min	0.15	54.0	25	
		Max	0.40	67.0	27.6	
		Total No.	26			
2000	×2, 24hr	2301	0.15	52.0	25.6	
		2302	0.35	46.8	21.4	
		2303	0.20	52.2	24.4	
		2304	0.15	61.8	25.4	
		2305	0.15	56.8	25.4	
		Mean	0.20	53.9	24.4	
		Std	0.09	5.7	1.8	
		Min	0.15	46.8	21.4	
		Max	0.35	61.8	25.6	
		Total No.	20			
MMC 0.5	×1, 24hr	2401	0.90	49.6	27.3	
		2402	1.35	50.0	25.6	
		2403	1.15	56.8	28.2	
		2404	1.05	54.8	26.5	
		2405	1.20	60.8	25.2	
		Mean	1.13	54.4	26.6	
		Std	0.17	4.7	1.2	
		Min	0.90	49.6	25.2	
		Max	1.35	60.8	28.2	
		Total No.	113			

B.W. : Body weight at 24 hours after the final dose.

MNPCE : Frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes.

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

0.5w/v% MC: 0.5w/v% Methylcellulose solution

MMC : Mitomycin C

S<sup>K</sup> : Kastenbaum and Bowman の推計学的方法による検定

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  
復帰突然変異原性試験に影響を与える諸要因の研究

分担研究者 荒木明宏 日本バイオアッセイ研究センター 室長  
研究協力者 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、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, 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。

## A. 研究目的

微生物を用いる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、文献的調査、抽出を行なうとともに、変異原性の知られた合成化学物質(アゾ色素)をモデル化合物として試験を実施し、試験方法、菌株、代謝活性化系の選択の重要性について考察した。

## B. 研究方法

### a) 文献的調査

国外医学情報データベース MEDLINE と国内医学情報データベース JMEDPlus を用い、Ames 試験、復帰突然変異試験におけるヒスチジン・蛋白質・ペプチド、配糖体、アゾ色素、誤った陽性結果・予測し得ない結果などについて広範囲の検索を行い、復帰突然変異原性試験の結果に影響を与える諸要因を抽出した。

### b) アゾ色素の高感度な変異原性検出法の検討

#### 1. 被験物質

ボンソー3R (CAS 3564-09-8)

Lot No. DU01 東京化成工業 85%以上

アマランス (CAS 915-67-3)

Lot No. GD41 東京化成工業 添加物用

色素は、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0.1 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原性試験

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 and Ames (Maron and Ames, 1983)の方法に準拠しブレインキューベーション法(Matsushima et al., 1980)及びリボフラビンをを用いるアゾ色素の試験手法(Matsushima et al., 1980)で実施した。

#### 2-1. 試験菌株

試験菌株は、ネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*) TA98, TA100, YG1041, YG1042の4菌株を用いた。入手した菌株は、Amesら(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。なお、YG1041, YG1042の場合は、菌の前培養用のニュートリエントブロスにアンピシリンとカナマイシンを25. g/mlになるように添加した。

#### 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 と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Syrianハムスターの肝臓より調製したハムスター肝 S9 の市販品(キッコーマン株式会社製造)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。なお、リボフラビン(シグマ Lot No. 22F-0353)添加 S9 を作製する場合は上記の S9 にリボフラビンを所定量になるように添加した。リボフラビン含有 S9 の作製は遮光条件下で実施し、試験に使用する場合は、紫外線遮光フィルムをはったガラスを透過した黄色灯下で取り扱った。

#### 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)を次ページに示した。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 ( $\mu\text{g}/7^\circ\text{レ-t}$ )
TA100	AF-2	和光純薬工業株式会社	0.01
TA98	AF-2	同上	0.1
YG1041	2-NF	Aldrich Chemical Co., Inc.	0.005
YG1042	3-NA	東京化成	50
菌株	代謝活性化による場合(+S9 mix)		
	名称	入手先	用量 ( $\mu\text{g}/7^\circ\text{レ-t}$ )
TA100	2-AA	和光純薬工業株式会社	1.0
TA98	2-AA	同上	0.5
YG1041	2-AA	同上	0.05
YG1042	2-AA	同上	0.05

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、  
2NF : 2-ニトロフルオレン  
3-NA : 3-ニトロアニリン、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、被験物質の試験菌株への抗菌作用(生育阻害)と被験物質の沈殿状況を調べた後、復帰変異コロニー数を測定した。

#### 2-5. 抗菌作用(生育阻害)の観察と判定

被験物質による試験菌株への抗菌作用(生育阻害)は、コロニー数の計数時にトップアガー中の微量なヒスチジンを利用して生育したアミノ酸要求性株(非復帰変異株)の微細なコロニーの生育を実体顕微鏡を用い 40 倍の倍率で観察して実施した。抗菌作用(生育阻害)の有無の判定は、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

きくなることから、被験物質が試験菌株に毒性を示すと判定した。

#### 2-6. 判定基準

判定基準は陰性対照値の 2 倍以上の復帰変異コロニー数が誘発される場合に陽性と判定する 2 倍法 (Ames et al., 1975) を用いた。復帰変異コロニー数が用量依存的に増加しかつ陰性対照値の 2 倍以上に復帰変異コロニー数が誘発され、再現性が得られる場合に、陽性と判定した。上記の条件が満たされない場合は陰性と判定した。

(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、購入したラット及びハムスター肝 S9 は、必要最低限を試験に使い、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

#### a) 文献的調査

国外医学情報データベース MEDLINE と国内医学情報データベース JMEDPlus を用い、Ames 試験・復帰突然変異試験とヒスチジン・蛋白質・ペプチド、配糖体、アゾ色素、誤った陽性結果・予測し得ない結果などの組み合わせで文献を抽出し、関連する文献とその内容を別表にまとめた。

誤った陽性結果・予測しえない結果については、Gocke ら(Gocke and Albertini, 1996)の報告がある。ヒスチジン構造を持つ化合物がバックグラウンドロンの生育を促進することで自然復帰変異コロニー数を増加させ、誤った陽性結果を与えること。ヒスチジンやこれらのヒスチジンを構造に持つ化合物が、既知の変異原物質の復帰変異コロニー数を増加させる作用があること。ネズミチフス菌 TA102 においては蛋白質合成阻害作用を持つ抗生物質が標的遺伝子に入ったプラスミドのコピー数を増加させることで自然復帰変異コロニー数を増加させ、誤った陽性結果を与えること。転写活性を不正確にする物質はヒスチジン添加と同様の結果を生じて、誤った陽性結果を与えることも報告している。

ネズミチフス菌 TA 菌株におけるヒスチジンの影響については、Yamasaki ら(Yamasaki and Ames, 1977)が、ヒト尿中の変異原性物質の試験においてヒスチジンの除去と変異原物質の濃縮に XAD-2 カラムを用いる方法を報告していることより、ヒスチジン含