

有する試料を試験する場合には、ヒスチジンを除去するなどの工夫が必要であることがすでに知られていた。ヒスチジン及びヒスチジン含有ジペプチドの影響についての具体的な報告は、Aeschbacher (Aeschbacher et al., 1983)らの報告がある。また、Prival ら(Prival, 1991)は、食品原材料49検体の変異原性を調べたところ、パルバインとペプシンにはヒスチジンの混入が認められ、復帰変異コロニー数の増加は変異原性によるものではないことを報告している。これらのことから、FDA の復帰変異原性試験ガイドライン(IV.C.1.a. Bacterial Reverse Mutation Test, Redbook 2000)では、生物由来の試料を標準的な方法(プレート法またはプレインキュベーション法)で試験した場合に、復帰変異コロニー数の増加が認められた場合は、試料中のヒスチジン(ネズミチフス菌の場合)やトリプトファン(大腸菌の場合)の影響でないことを確認する必要があるとされている。また、試験は、試料中のフリーのアミノ酸を除去した試料、適切な対照(アミノ酸添加群)を含めることが述べられている。また、復帰変異原性試験に影響を及ぼす量のアミノ酸及びペプチドを含む植物、動物由来の試料の場合、ヒスチジンの影響を受けない試験系(Hera and Pueyo, 1986; Skopek et al., 1978)と手法(Mitchell, 1978; Nylund and Einsistö, 1993)について考慮する必要があることも述べられている。今後、蛋白質、ペプチド、アミノ酸含有試料について、サルモネラ TA 菌株、大腸菌 WP2 菌株を用いた試験系の限界を明らかとし、これらの試験方法が用いることのできない場合の具体的な対応方法が食品関連物質の試験に必要と考えられる。

蘇鉄の実に含まれる配糖体、サイカシンは、そのまま変異原性試験を実施しても変異原性を示さないが、試験系に β -グルコシダーゼを加えることでサイカシンの変異原性を検出できることを松島ら(Matsushhima et al., 1979)は報告している。また、Brown ら(Brown et al., 1979)は、フラボノール配糖体、フラバノン配糖体等の植物由来の配糖体はそのままでは変異原性を示さないが、酸により配糖体を加水分解した試験系、腸内細菌のグリコシダーゼ、市販の β -グルコシダーゼ、ナリンギナーゼ、 β -グルクロニダーゼを添加した試験系で変異原性を検出できることを報告している。Tamura ら(Tamura et al., 1980)は、糞便中のバクテリア粉碎物からセファデックスカラムで分離したフェカラールゼのグリコシダーゼ活性は、ヘスベリジナーゼ、セカラールゼよりも糖の異なった配糖体に対して広い加水分解能を有し、生体において天然

物由来の配糖体の変異原性発現に腸内細菌が重要な役割をしていることを明らかとした。また、XAD-2カラムでヒスチジンを除去した赤ワインなどの天然試料において、フェカラールゼ処理によって感度良く変異原性が検出できることも報告している。

通常のプレインキュベーション法で検出できないベンジジン系のアゾ色素の変異原性は、試験系にリボフラビンを添加することで検出できることを松島ら(Matsushima et al., 1980)は報告している。Prival (Prival et al., 1982)らは、アゾ色素の変異原性を効率よく検出する試験系としてハムスターS9 と FMN を用いる方法を提唱した。Reid ら(Reid et al., 1984)は、ベンジジン系アゾ色素の変異原性試験法の検討として、腸内細菌による還元体(ラット腸内細菌で処理したものを酢酸エチルで抽出)を代謝活性化で試験する方法、またはハムスターS9 と FMN を用いる方法による還元的な処理のステップを代謝活性化系と組み合わせることで感度よく検出できることを示し、生体においてアゾ色素の変異原性発現に腸内細菌が重要な役割をしていることを明らかとした。

復帰変異原性試験で結果に影響を及ぼす要因については、1993年にメルボルンで開催された遺伝毒性試験法の標準化における国際会議(第6回国際環境変異原学会のサテライトミーティング)でも議論され、Getehouse ら(Getehouse et al., 1994)によりまとめられている。これらの成果は、その後の OECD テストガイドラインの改訂に生かされている。OECD の復帰突然変異試験ガイドライン(Bacterial Reverse Mutation Test, OECD/OCDE, 471, 1997)の、復帰突然変異試験の標準的な試験手法(プレート法及びプレインキュベーション法)では、アゾ化合物、ジアゾ化合物、ガスまたは揮発性物質、配糖体の変異原性を適切に検出できないので、その物質にあった適切な改良法を用いること。また、細菌に強い毒性を示す抗生物質、哺乳類細胞の分裂を阻害するヌクレオシド誘導體やトポイソメラーゼ阻害剤などは、微生物を用いる復帰突然変異試験に限界があること。プレート法とプレインキュベーション法は同等の方法とされているが、短鎖のニトロソアミン、金属類、アルデヒド、アゾ色素、ジアゾ化合物、ピロリチジンアルカロイド、アリル化合物、ニトロ化合物のあるものは、プレインキュベーション法で変異原性が検出できることも述べられている。日本においては、プレインキュベーション法が普及しており、プレート法で試験が実施されたことにより、変異原性を見落とした物質は少ないと思われる。しかし、

現在のスクリーニング法において、香料などの揮発性物質、配糖体含有試料等について、必ずしも物性にあった感度の良い改良法や菌株が標準的な方法と併用されているわけではない。本研究においては、アゾ色素を例に物質に応じた適切な方法と菌株を用いることの重要性を提示したい。

b) アゾ色素の高感度な変異原性検出法の検討

ラット及びハムスターS9 mix に添加するリボフラビンの量を検討するために、YG1041 と YG1042 を用いて 1250. g/プレート濃度のボンソー3R 及びアマランスにリボフラビンを 0.1, 0.2, 0.5. mol /プレートの濃度になるように添加して、復帰変異コロニー数の誘発を調べた(表-1 及び図-1)。

ボンソー3R は、YG1041 においてリボフラビンの濃度に依存して復帰変異コロニー数が増加し、リボフラビン添加の効果が認められたが、YG1042 においては、リボフラビンを添加しても復帰変異コロニー数の増加は著しくはなかった。アマランス(食用赤色 2 号)は、YG1041, YG1042 のいずれにおいても、リボフラビンの濃度に依存して復帰変異コロニー数が増加し、リボフラビン添加の効果が認められた。リボフラビンのみを添加した試験において、リボフラビンを 0.5. mol/プレートまで添加すると YG1041 では濃度に依存して 5 倍ほどの増加が認められたが、YG1042 では陰性対照値の 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。このことから、YG1041 と YG1042 を用いる場合のリボフラビンの添加量は、YG1041 の陰性対照値への影響とアマランスの変異原性検出を考慮して 0.5. mol/プレートとした。

アマランス(食用赤色 2 号)の変異原性を、TA98、TA100、YG1041、YG1042 によって、ラット及びハムスターS9 mix とリボフラビン添加(0.5. mol/プレート)ラット及びハムスターS9 mix を用いて調べた(表-2、3 及び図-2、3)。

アマランスは、ラット及びハムスターS9 mix を用いた代謝活性化による場合及び代謝活性化によらない場合のいずれの場合においても TA98、TA100、YG1041、YG1042 で、陰性対照値の 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加は、最高用量 5000. g/プレートの濃度まで認められなかった。

リボフラビン添加ラット及びハムスターS9 mix

を用いた場合において、アマランスは TA98、TA100、YG1042 で、復帰変異コロニー数の増加を示さなかった。しかし、YG1041 において、リボフラビン添加ラット S9 mix では、復帰変異コロニー数の増加が認められ、リボフラビン添加ハムスターS9 mix で陰性対照値の約 4 倍の復帰変異コロニー数の増加が観察され、陽性の結果が得られた。

アマランスの変異原性の強さを評価するために、リボフラビンを添加することで変異原性を示すことがわかっているボンソー3R の変異原性を TA98、TA100、YG1041、YG1042 を用いてハムスターS9 mix とリボフラビン添加(0.5. mol/プレート)ハムスターS9 mix を用いて比較した(表-4 及び図-4)。

ボンソー3R はハムスターS9 mix を用いた代謝活性化法で YG1041 と YG1042 に対してリボフラビンなしで陰性対照値の 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加を示した。また、リボフラビンを添加することで、YG1041 の変異原性は増強されたが YG1042 では増強されなかった。リボフラビン添加ハムスターS9 mix における YG1041 でのボンソー3R とアマランスの変異原性の強さを比変異原活性(revertants/mg)で比較すると、アマランスの 403 に対してボンソー3R は 7490 となり、18.5 倍の差があることが明らかとなった。

D. 考察

アゾ色素類の多くは、アゾ基が切断されて変異原性を示す(Matsushima et al., 1980)。また、アマランス、ボンソーSX、サンセットイエローなどの水溶性アゾ色素のアゾ基の開裂が、腸内細菌によることが報告されている(新村, 1986)。ラット S9 mix を用いた場合、アゾ還元酵素の働きが弱いために効率よく切断することができない。そこで、アゾ基を効率よく切断する方法として、S9 mix にリボフラビン(Matsushima et al., 1980)または FMN (Prival and Mitchell, 1982)を添加した試験系が推奨されている。アマランスの変異原性は、従来の TA98、TA100 を用いた試験において、リボフラビン添加ラット及びハムスターS9 mix を用いてもその変異原性を検出することができない。

一方、YG1041 と YG1042 は、TA98 及び TA100 にニトロ還元酵素と O-アセチル転移酵素を過剰生産するように改変して芳香族アミノ・ニトロ化合物の変異原性を高感度に検出できるように改良した菌株である(Hagjwara et al., 1993)。アマランスの変異原性は、

YG1041, YG1042を用いることで検出できる。これは、S9 中のアゾ還元酵素の働きで、アマランスのアゾ基が切断されて生成した 2 種類の芳香族モノアミンの代謝活性化に菌体内のニトロ還元酵素と *O*-アセチル転移酵素が関与している為と考えられる。従来の TA98 と TA100 のニトロ還元酵素と *O*-アセチル転移酵素活性では、活性化体が充分量できず、突然変異を検出できなかつたものと思われる。

フェナセチンの変異原性は、TA100 においてラット S9 では変異原性を検出できないが、ハムスター-S9 を用いることで変異原性を検出できる。また、ハムスター-S9 と YG1042 菌株と組み合わせることで感度よくフェナセチンの変異原性を検出できる(荒木, 1997)。

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

Prival ら(Prival et al., 1988)は、ジチオナイトで還元したアマランスのエーテル抽出物を FMN 添加したハムスター-S9 で試験すると、TA98, TA100 に変異原性を示すことを報告している。また、250mg 相当のアマランスのエーテル抽出物を S9 なしで試験すると TA98 で陽性を示し、これが不純物に起因するのであろうと報告している。今回、われわれが検出したアマランスの変異原性が不純物に起因するかは不明であり、今後の検討課題でもある。

YG1041, 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り検出されたボンソー-3R とアマランスの変異原性の強さは、比変異原活性(revertants/mg)で 18.5 倍の差があった。今後、食用アゾ色素の変異原性と発がん性のあるアゾ色素の結果を定量的に比較することで YG1041, YG1042 の結果を適正に評価することが可能と考えられる。

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おいて、リボフラビンを添加することで陰性対照値が上昇する現象が生じた。リボフラビンの代わりに FMN や FAD の添加することによって陰性対照値の上昇が押さえることができるか、今後の課題である。また、YG1041, YG1042 がリボフラビンの変異原性を検出してい

る可能性もあり検討を要するところである。

E. 結論

芳香族アミノ・ニトロ化合物の変異原性の検出に高感度である YG1041, YG1042 とリボフラビン添加ハムスター-肝 S9 との組み合わせによるアゾ色素の高感度な変異原性検出法は、食用アゾ色素の変異原性評価に有用である。この方法により、今まで変異原性の報告されていなかったアマランスの変異原性を検出することができるようになった。アゾ色素の高感度な変異原性検出法は、高感度な試験菌株の選択と、被験物質に対応した適切な試験手法と代謝活性化系の選択が、復帰突然変異試験において重要である。

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

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) 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.
- 3) Brown, J.P., and P.S. Dietrich (1979) Mutagenicity of plant flavonoides by mixed glycosidase from rat cecal bacteria and other sources, *Mutation Res.*, 66, 223-240.
- 4) Getehouse, D., S. Howorth, T. Cebula, E. Gocke, L. Kier, T. Matsushima, C. Melcion, T. Nohomi, T. Ohta, S. Venitt, E. Zeiger (1994) Recommendations for the performance of bacterial mutation assays, *Mutation Res.*, 312, 217-233.

- 5) Gocke, E., and S. Albertini, (1996) Synergistic/comutagenic action in the Ames test as an indication of irrelevant positive findings, *Mutation Res.*, 350, 51-59.
- 6) Hagiwara, Y., M. Watanabe, Y. Oda, T. Sofuni and T. Nohmi (1993) Specificity and sensitivity of *Salmonella typhimurium* YG1041 and YG1042 strains possessing levels of both nitroreductase and acetyltransferase activity, *Mutation Res.*, 291, 171-180.
- 7) Hera, C., and C. Pueyo (1986) Conditions for the optimal use of the L-arabinose-resistance mutagenesis test with *Salmonella typhimurium*, *Mutagenesis* 1, 267-273.
- 3) Maron, D.M., and B.N. Ames (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutation Res.*, 113, 173-215.
- 4) 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.
- 8) 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.
- 9) Matsushima, T., H. Matsumoto, A. Shirai, M. Sawamura and T. Sugimura (1979) Mutagenicity of the naturally occurring carcinogen cycasin and synthetic methylazoxymethanol conjugates in *Salmonella typhimurium*, *Cancer Res.*, 39, 3780-3782.
- 10) Michell, I deG. (1978) Microbial assays for mutagenicity: A modified liquid culture method compared with the agar plate system for precision and sensitivity, *Mutation Res.*, 54, 1-16.
- 11) Nylund, L., and P. Einsistö (1993) Mutagenicity testing of protein-containing and biological samples using the Ames/*Salmonella* plate incorporation test and the fluctuation test, *Mutation Res.*, 136, 33-47.
- 12) Prival, M. J. and V. D. Mitchell (1982) Analysis of a method for testing azo dyes for mutagenic activity in *Salmonella typhimurium* in the presence of flavine mononucleotide and hamster, *Mutation Res.*, 97, 103-116.
- 13) Prival, M. J., V.M. Davis, M.D. Peiperl and S.J. Bell (1988) Evaluation of azo food dyes for mutagenicity and inhibition of mutagenicity by methods using *Salmonella typhimurium*, *Mutation Res.*, 206, 247-259.
- 14) Prival, M.J., V.F. Simmon, and K.E. Mortelmans (1991) Bacterial Mutagenicity testing of 49 food ingredients gives very few positive results, *Mutation Res.*, 260, 321-329.
- 15) Reid, T.M., K.C. Morton, C.Y. Wang and C.M. King (1984) Mutagenicity of azo dyes following metabolism by different reductive/oxidative system, *Environmental Mutagenesis*, 6, 705-717.
- 16) Skopek, T.R., H.L. Liber, J.J. Krolewski and W.G. Thilly (1978) Quantitative forward mutation assay in *Salmonella typhimurium* using 8-azaguanine resistance as a genetic marker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 410-414.
- 17) Tamura, G., C. Gold, A. Ferro-Luzzi and B.N. Ames (1980) Fecalase: A model for activation of dietary glycosides to mutagens by intestinal flora, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 4961-4965.
- 18) Yamasaki, E., and B.N. Ames (1977) Concentration of mutagens from urine by adsorption with the nonpolar resin XAD-2: Cigarette smokers have mutagenic urine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 3555-3559
- 19) 荒木明宏 (1997) 農薬, 医薬品の変異・がん原性, *Environ. Mutagen Res.*, 19, 55-61.
- 20) 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
- 21) 新村寿夫 (1986) 食品添加物の代謝と活性発現, *トキシコロジーフォーラム*, 9, 138-150.

表-1

アマランスとボンソー3Rの変異原性発現におけるリボフラビン添加の効果

色素添加量	リボフラビン ($\mu\text{mol}/$ プレート)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)				
		YG1041		YG1042		
		S9 (ラット肝)	S9 (ハムスター肝)	S9 (ラット肝)	S9 (ハムスター肝)	
0 $\mu\text{g}/$ プレート	0	32 29 (31)	29 29 (29)	111 79 (95)	100 102 (101)	
	0.1	52 54 (53)	49 68 (59)	111 116 (114)	99 102 (101)	
	0.2	69 66 (68)	62 59 (61)	112 100 (106)	101 102 (102)	
	0.5	183 156 (170)	134 141 (138)	133 184 (159)	134 142 (138)	
ボンソー 3R 1250 $\mu\text{g}/$ プレート	0	194 169 (182)	156 124 (140)	643 549 (596)	370 266 (318)	
	0.1	323 355 (339)	367 367 (367)	332 488 (410)	335 268 (302)	
	0.2	533 571 (552)	449 541 (495)	372 528 (450)	417 429 (423)	
	0.5	1311 1313 (1312)	736 1049 (893)	589 577 (583)	434 419 (427)	
アマランス 1250 $\mu\text{g}/$ プレート	0	32 34 (33)	34 30 (32)	105 104 (105)	116 101 (109)	
	0.1	107 101 (104)	195 220 (208)	113 137 (125)	163 177 (170)	
	0.2	174 207 (191)	362 389 (376)	172 152 (162)	214 261 (238)	
	0.5	570 643 (607)	953 1102 (1028)	304 314 (309)	395 521 (458)	
陽性対照	S9 mixを必要とするもの	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		用量($\mu\text{g}/$ プレート)	0.05	0.05	0.05	0.05
		コロニー数/プレート	2561 1968 (2265)	2771 2558 (2665)	2675 2663 (2669)	2314 2685 (2500)

【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. 2-AA: 2-アミノアントラセン

表-2

アマランスのラット肝S9とリボフラビンを用いた変異原性試験結果

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)								
		食用赤色2号								
		TA98		TA100		YG1041		YG1042		
S9 mix (-)	陰性対照 (溶媒対照)	11	14 (13)	114	134 (124)	46	57 (52)	144	107 (126)	
	78.1	15	17 (16)	121	143 (132)	69	45 (57)	105	114 (110)	
	156	15	18 (17)	134	134 (134)	53	47 (50)	106	93 (100)	
	313	17	21 (19)	121	135 (128)	49	45 (47)	111	116 (114)	
	625	16	23 (20)	119	130 (125)	46	45 (46)	115	112 (114)	
	1250	10	16 (13)	107	102 (105)	31	44 (38)	105	123 (114)	
	2500	20	20 (20)	128	123 (126)	16	31 (24)	102	87 (95)	
	5000	10	23 (17)	112	128 (120)	15	14 (15)	91	102 (97)	
	ラット S9 (+)	陰性対照 (溶媒対照)	21	14 (18)	124	138 (131)	29	31 (30)	113	112 (113)
		78.1	16	21 (19)	130	138 (134)	28	32 (30)	108	101 (105)
156		15	22 (19)	136	134 (135)	38	24 (31)	114	83 (99)	
313		16	15 (16)	145	139 (142)	22	24 (23)	119	99 (109)	
625		21	25 (23)	114	142 (128)	21	15 (18)	86	114 (100)	
1250		23	17 (20)	105	136 (121)	28	25 (27)	104	94 (99)	
2500		18	28 (23)	142	117 (130)	16	16 (16)	105	117 (111)	
5000		11	16 (14)	106	114 (110)	20	23 (22)	86	83 (85)	
ラット S9 (+) リボフラビン添加 0.5 μmol/プレート		陰性対照 (溶媒対照)	56	53 (55)	174	172 (173)	172	164 (168)	178	191 (185)
		78.1	64	57 (61)	170	162 (166)	177	164 (171)	184	178 (181)
	156	59	61 (60)	184	160 (172)	177	166 (172)	172	157 (165)	
	313	55	59 (57)	163	156 (160)	166	199 (183)	142	144 (143)	
	625	59	74 (67)	165	131 (148)	186	209 (198)	159	157 (158)	
	1250	67	63 (65)	133	160 (147)	280	256 (268)	133	137 (135)	
	2500	52	49 (51)	145	163 (154)	303	278 (291)	167	148 (158)	
	5000	57	47 (52)	143	157 (150)	265	207 (236)	139	158 (149)	
	陽性対照	名 称	AF-2		AF-2		2-NF		3-NA	
		用量 (μg/プレート)	0.1		0.01		0.005		50	
コロニー数/プレート		407	371 (389)	686	658 (672)	1478	1450 (1464)	248	247 (248)	
名 称		2-AA		2-AA		2-AA		2-AA		
ラット S9 (+)	用量 (μg/プレート)	0.5		1.0		0.05		0.05		
	コロニー数/プレート	433	396 (415)	1199	1202 (1201)	1902	1821 (1862)	2308	2273 (2291)	

【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、2-NF: 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

表-3

アマランスのハムスター肝S9とリボフラビンを用いた変異原性試験

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)											
		食用赤色2号				食用赤色2号							
		TA98		TA100		YG1041		YG1042					
S9 mix (-)	陰性対照(溶媒対照)	8	124	41	104	17	(13)	137	(131)	62	(52)	92	(98)
	4.88	11	99	52	133	15	(13)	128	(114)	30	(41)	120	(127)
	19.5	21	134	39	126	20	(21)	142	(138)	53	(46)	122	(124)
	78.1	15	104	34	102	17	(16)	134	(119)	45	(40)	128	(115)
	313	15	120	46	100	14	(15)	122	(121)	32	(39)	112	(106)
	1250	21	144	24	100	20	(21)	152	(148)	37	(31)	109	(105)
	5000	11	108	17	94	15	(13)	121	(115)	16	(17)	92	(93)
		16	155	24	115	18	(17)	137	(146)	22	(23)	112	(114)
ハムスター S9 (+)	陰性対照(溶媒対照)	25	139	31	100	26	(26)	134	(137)	30	(31)	123	(112)
	4.88	28	149	33	128	24	(26)	136	(143)	26	(30)	115	(122)
	19.5	16	114	25	117	18	(17)	137	(126)	23	(24)	97	(107)
	78.1	17	135	34	107	20	(19)	150	(143)	22	(28)	116	(112)
	313	14	153	21	135	18	(16)	159	(156)	29	(25)	111	(123)
	1250	14	155	17	97	18	(16)	142	(149)	11	(14)	98	(98)
	5000	43	162	109	134	41	(42)	157	(160)	106	(108)	157	(146)
		46	153	170	141	44	(45)	143	(148)	176	(173)	143	(142)
ハムスター S9 (+) リボフラビン添加 0.5 μmol/プレート	陰性対照(溶媒対照)	41	157	106	157	46	(45)	143	(148)	176	(173)	143	(142)
	4.88	41	146	146	150	40	(41)	153	(150)	127	(137)	155	(153)
	19.5	40	153	124	145	40	(41)	153	(150)	124	(137)	145	(153)
	78.1	28	166	174	153	28	(34)	166	(160)	174	(149)	153	(149)
	313	37	160	225	159	39	(38)	165	(163)	242	(234)	137	(148)
	1250	29	150	423	180	28	(29)	134	(142)	457	(440)	219	(200)
	5000	26	144	303	174	29	(28)	122	(133)	279	(291)	171	(173)
		29	144	279	171	29	(28)	122	(133)	279	(291)	171	(173)
陽性対照	名稱	AF-2		AF-2		2-NF		3-NA					
	用量(μg/プレート)	0.1		0.01		0.005		50					
	コロニー数/プレート	478	660	2388	273	406	(442)	631	(646)	2244	(2316)	249	(261)
	名稱	2-AA		2-AA		2-AA		2-AA					
	用量(μg/プレート)	0.5		1.0		0.05		0.05					
	コロニー数/プレート	1383	4001	2229	2123	1355	(1369)	3650	(3826)	2498	(2364)	2138	(2131)

【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、2-NF: 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

表-4

ポンソー3Rのハムスター肝S9とリボフラビンをを用いた変異原性試験

代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)							
		ポンソー 3R				ポンソー 3R			
		TA98		TA100		YG1041		YG1042	
S9 mix (-)	陰性対照 (溶媒対照)	17		105		43		108	
		11	(14)	123	(114)	64	(54)	92	(100)
	4.88	21		116		54		97	
		11	(16)	102	(109)	53	(54)	101	(99)
	19.5	21		134		56		106	
		13	(17)	115	(125)	43	(50)	124	(115)
	78.1	11		127		37		121	
		20	(16)	124	(126)	31	(34)	114	(118)
ハムスター S9 (+)	陰性対照 (溶媒対照)	22		119		24		111	
		29	(26)	109	(114)	23	(24)	120	(116)
	4.88	23		134		46		172	
		21	(22)	138	(136)	31	(39)	148	(160)
	19.5	30		157		33		220	
		15	(23)	133	(145)	38	(36)	239	(230)
	78.1	26		135		37		275	
		22	(24)	162	(149)	54	(46)	262	(269)
ハムスター S9 (+) リボフラビン添加 0.5 $\mu\text{mol}/\text{プレート}$	陰性対照 (溶媒対照)	43		131		112		137	
		60	(52)	186	(159)	108	(110)	153	(145)
	4.88	48		156		207		197	
		45	(47)	160	(158)	290	(249)	178	(188)
	19.5	51		173		218		256	
		44	(48)	164	(169)	294	(256)	301	(279)
	78.1	72		178		349		325	
		55	(64)	206	(192)	546	(448)	366	(346)
陽性対照	名 称	AF-2		AF-2		2-NF		3-NA	
	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.1		0.01		0.005		50	
	コロニー数/プレート	478		660		2388		273	
		406	(442)	631	(646)	2244	(2316)	249	(261)
	名 称	2-AA		2-AA		2-AA		2-AA	
	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.5		1.0		0.05		0.05	
	コロニー数/プレート	1383		4001		2229		2123	
		1355	(1369)	3650	(3826)	2498	(2364)	2138	(2131)

【備考】

1. 菌の生育阻害(抗菌作用)が認められる場合は、該当する数値の右に*印を付した。
2. () 内には各プレートのコロニー数の平均値を記入した。
3. 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。
4. 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、2-NF: 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

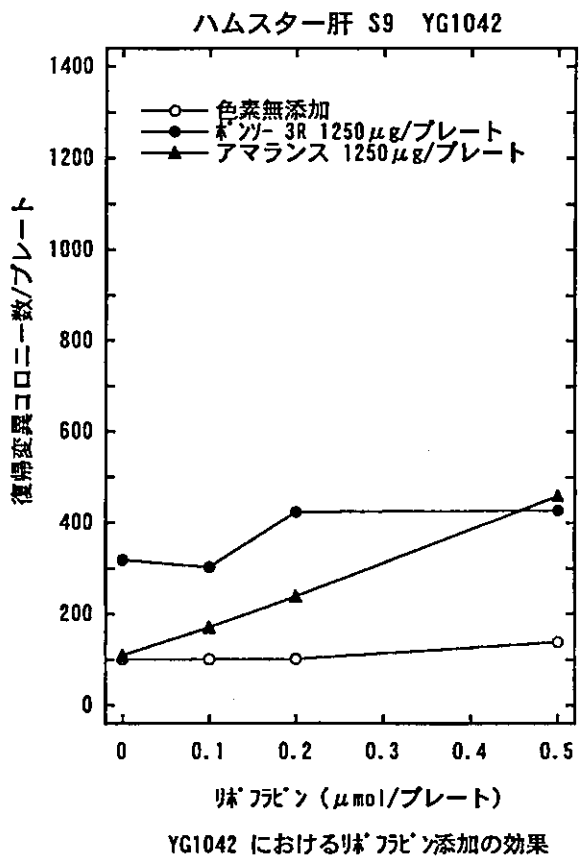
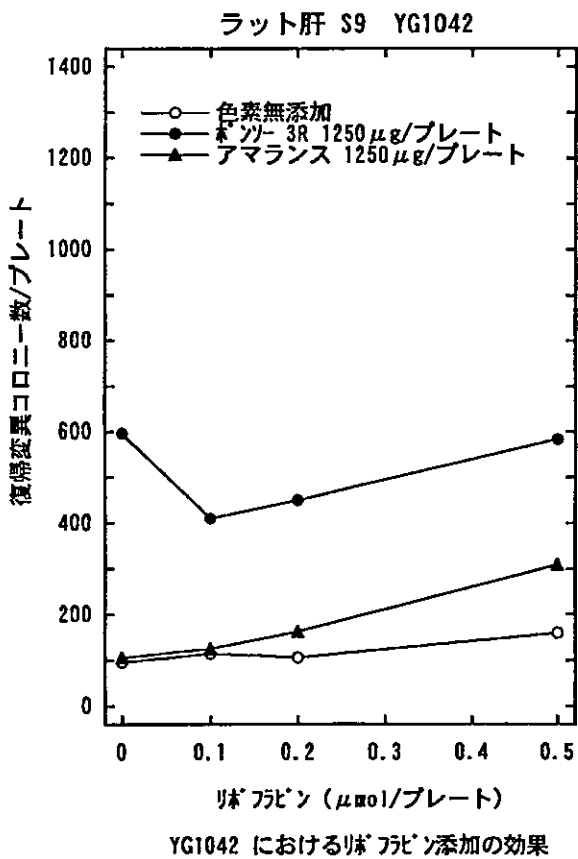
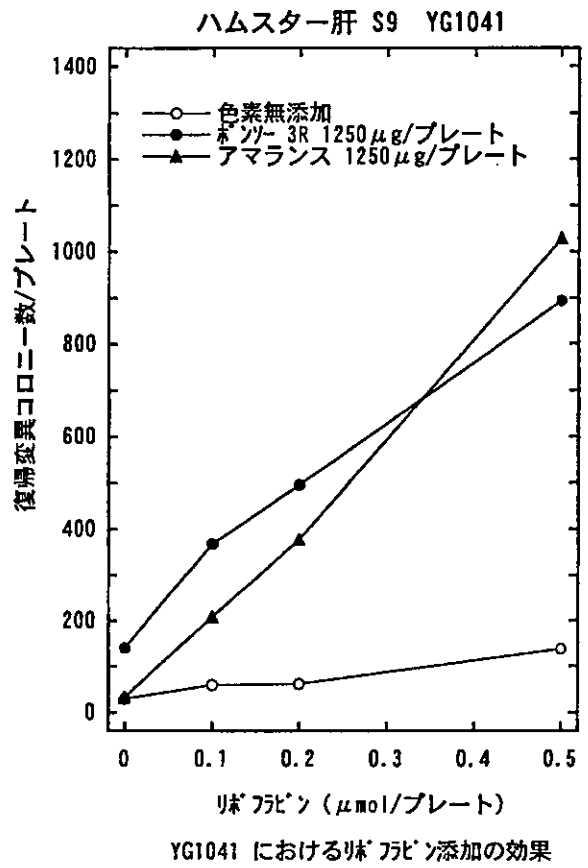
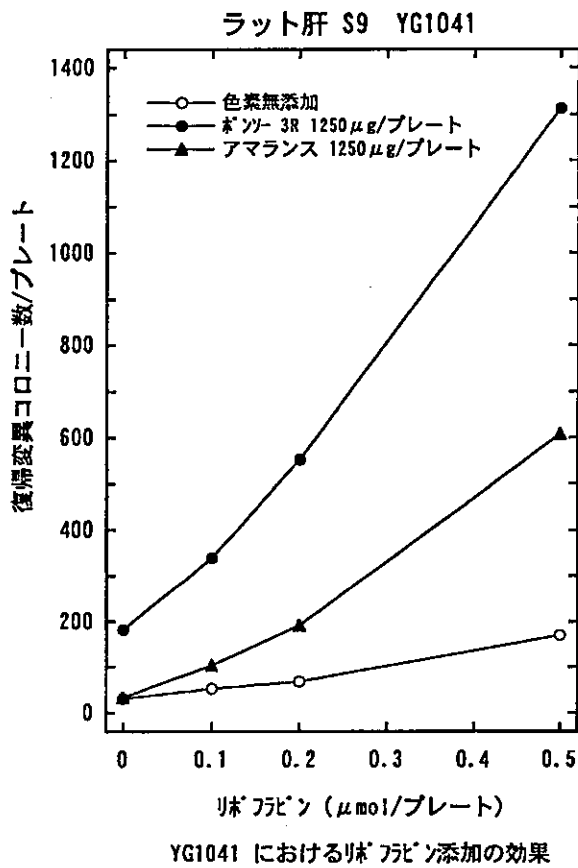
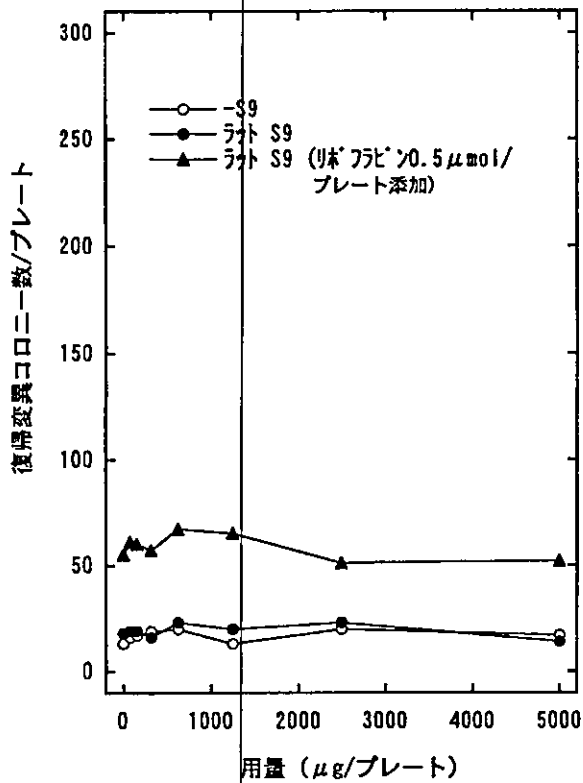
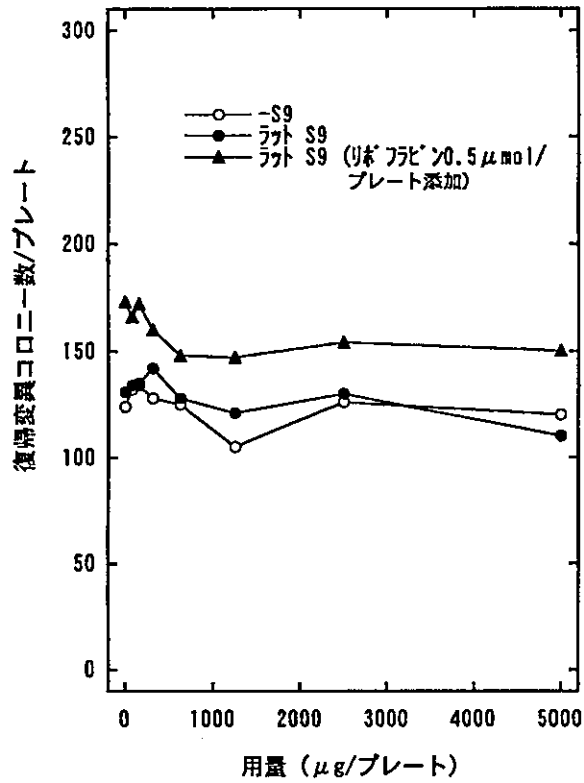


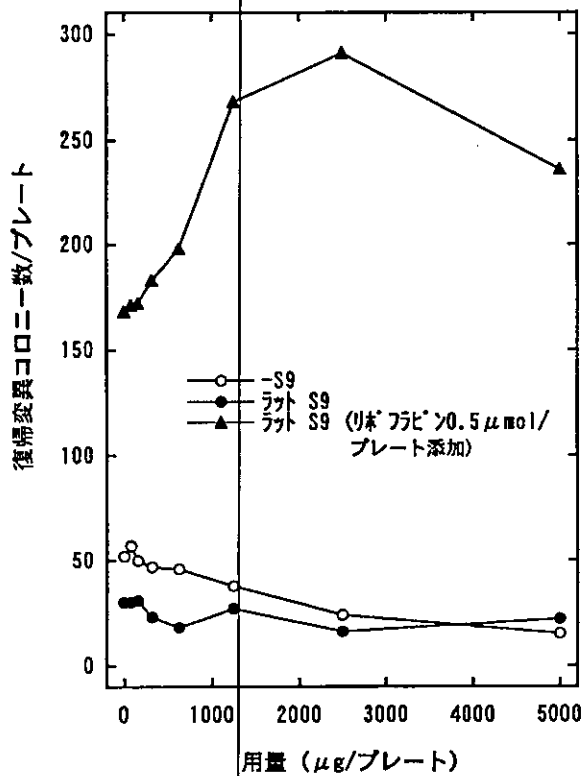
図-1 アマランスとポンソー3Rの変異原性発現におけるリボフラビン添加の効果



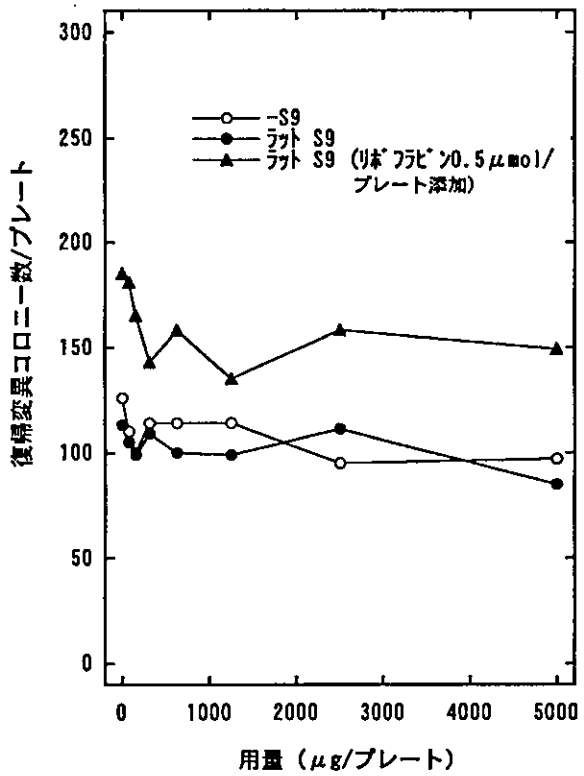
TA98 における用量-反応曲線



TA100 における用量-反応曲線

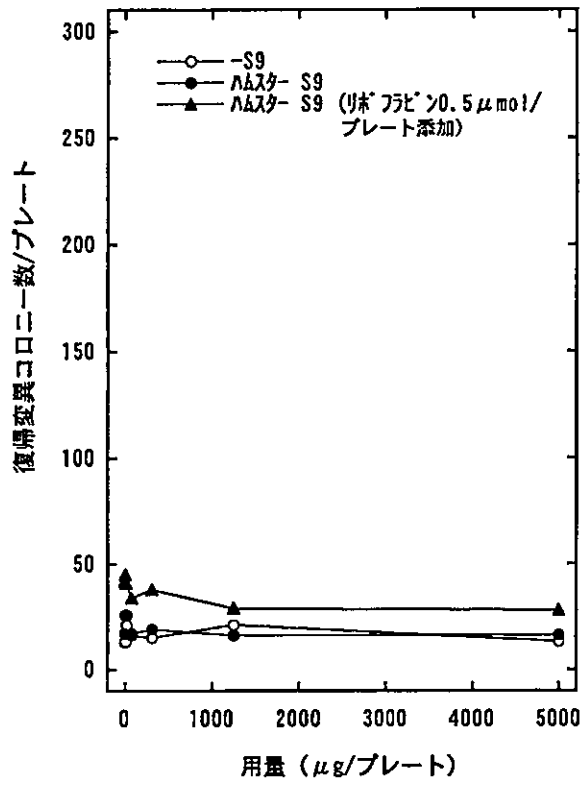


YG1041 における用量-反応曲線

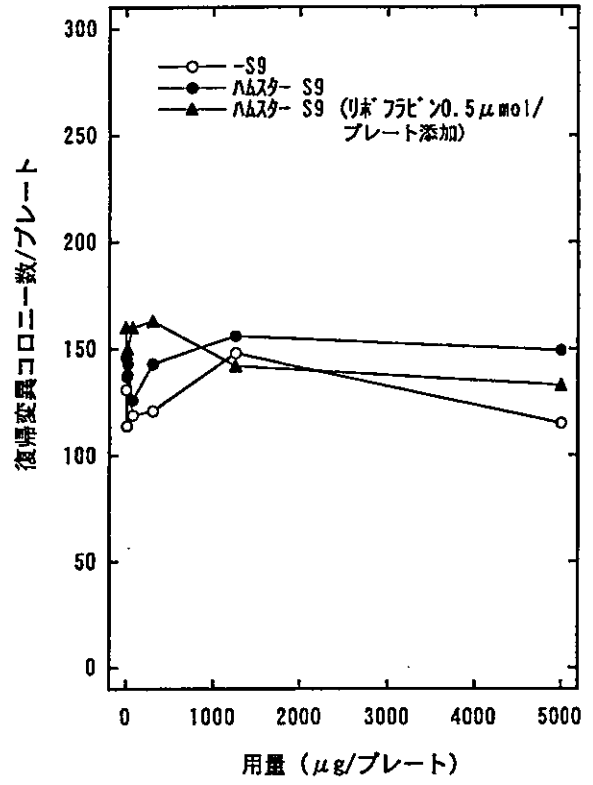


YG1042 における用量-反応曲線

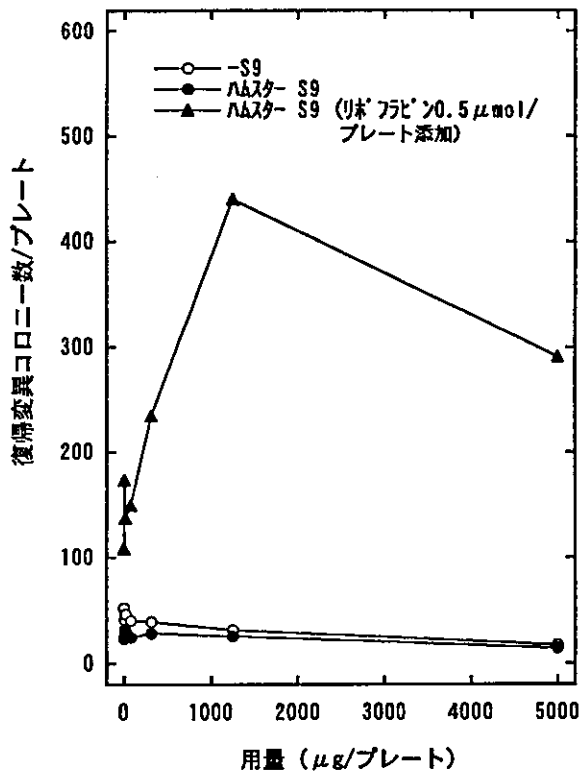
図-2 アマランスのラット肝S9とリボフラビンを用いた変異原性試験結果



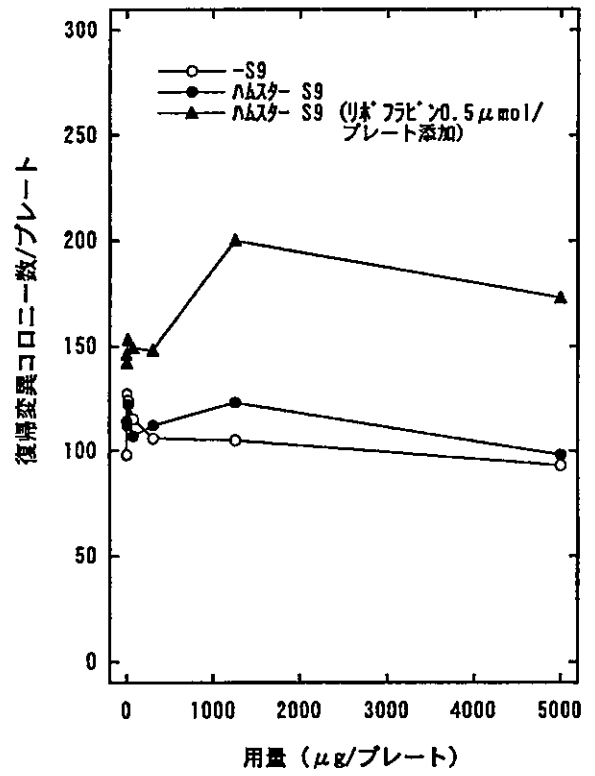
TA98 における用量-反応曲線



TA100 における用量-反応曲線

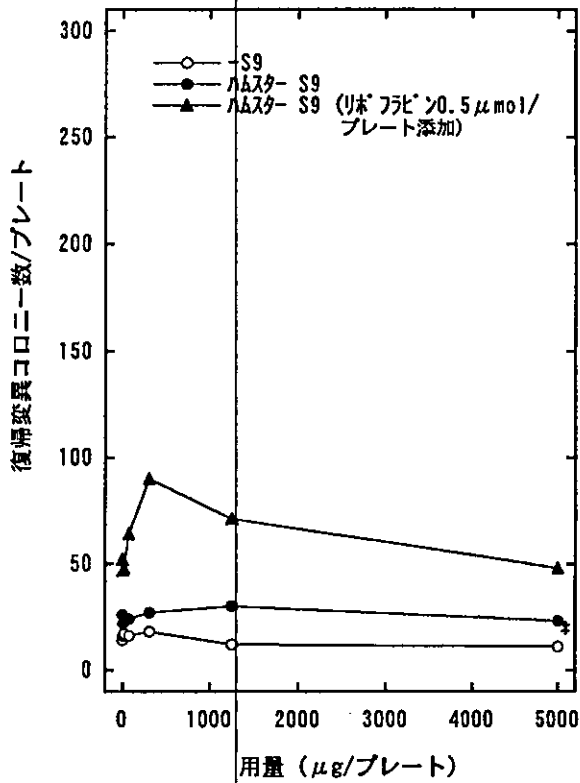


YG1041 における用量-反応曲線

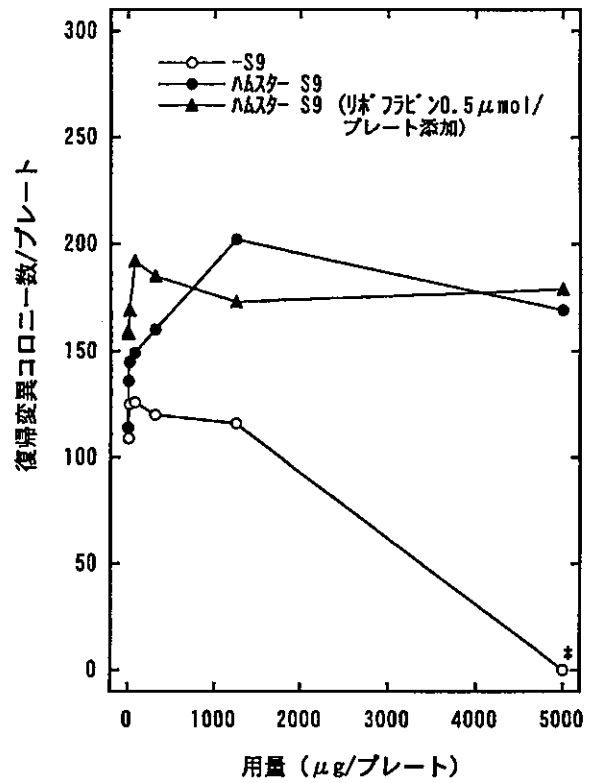


YG1042 における用量-反応曲線

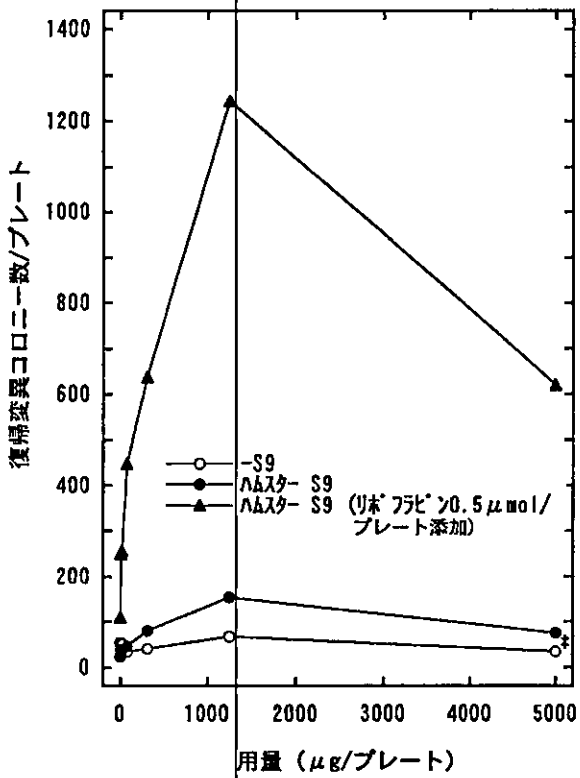
図-3 アマランスのハムスター肝S9とリボフラビンを用いた変異原性試験



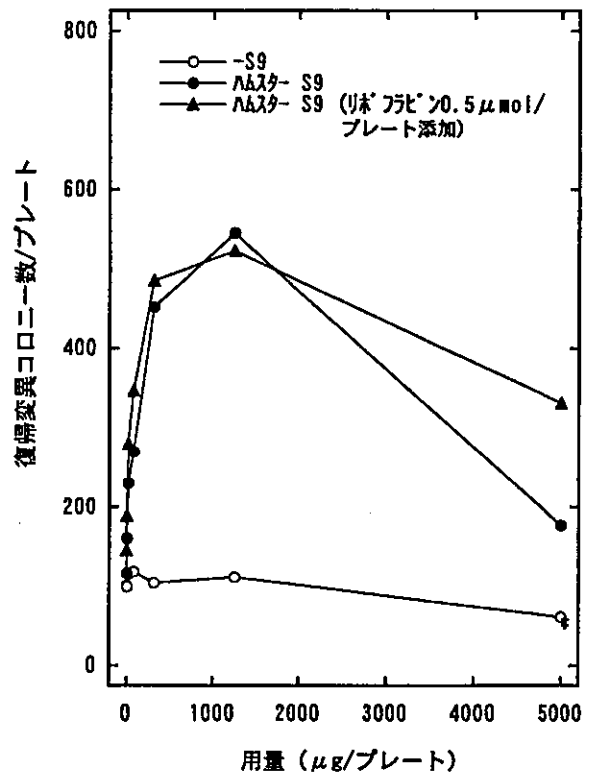
TA98 における用量-反応曲線



TA100 における用量-反応曲線



YG1041 における用量-反応曲線



YG1042 における用量-反応曲線

注：生育阻害(抗菌作用)が認められる場合は、該当するPointの右上に*を付した。

図-4 ポンソー3Rのハムスター肝S9とリボフラビンを用いた変異原性試験

別 添

アミノ酸等の影響

文献	概要
Aeschbacher, H.U., P.A. Finot and U. Wolleb (1983) Interactions of histidine-containing test substances and extraction methods with the Ames mutagenicity test. <i>Mutation Res.</i> , 113, 103-116.	ヒスチジンは TA1537 以外の TA98, TA100, TA1535, TA1538 の自然復帰変異コロニー数を増加させる。また、TA100 で His-Ala, Ala-His は自然復帰変異コロニー数を増加させるが、1-メチルヒスチジン、3-メチルヒスチジンは自然復帰変異コロニー数を増加させない。また、ヒスチジンをヒスチジンデカルボキシラーゼで処理すると復帰変異コロニー数の増加を防ぐことができるが、パンクレアチンで加水分解したウェイパウダーを処理しても復帰変異コロニー数を減少させることはできず、ペプチド含有試料をヒスチジンデカルボキシラーゼで処理する方法には限界がある。
Albertini, S., and E. Gocke (1993) Renin inhibitors as an example of presumptive irrelevant positive findings in the <i>Salmonella</i> /mammalian microsome assay (Ames test). <i>Mutation Res.</i> , 298, 237-246.	ある種のヒスチジン含有レニンインヒビターは、TA1538 のプレート法で、復帰変異コロニー数を増加させる。また、ヒスチジンまたはヒスチジン含有レニンインヒビターの添加により、TA1538 や TA100 における 2-AA で誘発される復帰変異コロニー数を増加させる。
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. <i>Environmental and Molecular Mutagenesis</i> , 10, 397-410.	ヒスチジン要求性 NS1135 株の生育を指標にヒスチジンと各種ヒスチジン含有ジペプチドが栄養源として利用されることを示した。ヒスチジンと His-Ala 添加は、TA100 における自然復帰変異コロニー数の増加の影響を示した。また、XAD カラムで尿を処理することでヒスチジンの混入を 0.19% 以下におさえることができる。ヒスチジノール、ヒスチジンデカルボキシラーゼによるヒスチジン除去が、ジペプチドに適応できないことにも言及している。
Grüter, A., U. Friederich and F.E. Würzler (1991) The Mutagenicity of edible mushrooms in a histidine-independent bacterial test system. <i>Fd. Chem. Toxic.</i> , 29, 159-165.	きのこ粉砕物にはヒスチジンが含まれるので、サルモネラ TA テスト菌は用いず、サルモネラ TM677(8-アザグアニン感受性株)を用いて、きのこに変異原性物質が含まれていないかを調べた。40 検体のうち 13 種に変異原性が認められた。
Kirkland, D.J., and N. Kim (1995) Special consideration for conducting genotoxicity test with protein materials. <i>Mutagenesis</i> 10, 393-398.	蛋白質製剤に含まれる不純物の遺伝毒性試験において、蛋白質はしばしばシャーレ、ビペットなどのガラス、プラスチックに吸着するので、吸着の少ない材質を使用するべきである。また、サルモネラ TA 菌株、大腸菌 WP2 菌株を用いた試験ではヒスチジン、トリプトファンが復帰変異コロニー数を増加させるので、検体の処理後に菌を洗浄してアミノ酸を取り除く必要がある。培養細胞を用いる試験系では、血清に含まれるプロテアーゼの影響をさけるために血清をぬいて検体と処理することを考慮する必要がある。
Kuroda, K., Y.S. Yoo, T. Yoshikura and T. Ishibashi (1984) Mutagenicity of natural food additives. <i>Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences</i> , 47, 24-30.	添加物 16 品目について変異原性試験を実施した。この中には酵素剤 7 品目、蛋白質 2 品目が含まれ、アシラーゼが復帰変異コロニー数を増加させた。考察にヒスチジンの影響についての記載はない。
Nylund, L., and P. Einistö (1993) Mutagenicity testing of protein-containing and biological samples using the Ames/ <i>Salmonella</i> plate incorporation test and the fluctuation test. <i>Mutation Res.</i> , 272, 205-214.	TA100, TA98, TA1535 におけるヒスチジン添加による自然復帰変異コロニー数の増加を示すとともに、1-メチルまたは 3-メチルヒスチジンが栄養源として利用されないことを示した。また、フラクチュエーションテストにおけるヒスチジンの影響を示すとともに、XAD-2、Sep-PakC ₁₈ カラムで尿中の遊離ヒスチジンを効率よく除去できることを示した。
Prival, M.J., V.F. Simmon and K.E. Mortelmans (1991) Bacterial mutagenicity testing of 49 food ingredients gives very few positive results. <i>Mutation Res.</i> , 260, 321-329.	食品原材料 49 検体の変異原性を調べたところ亜硝酸カリウムと過酸化水素で変異原性が認められ、β-カロテンは擬陽性であった。パバインとペプシンにはヒスチジンの混入が認められ、復帰変異コロニー数の増加は変異原性によるものではない。
Sasaki, I., H. Uchiwa and U. Murakami (1992) Effects of histidine on the mutagenicity of casein tryptic peptides as food ingredient. <i>Jpn. J. Toxicol. Environ. Health</i> , 38, 295-299.	カゼイン由来ペプチドの TA100 におけるコロニー数の増加は S9 によって試験菌株に取り込めるようになったヒスチジン含有ペプチドまたは遊離のヒスチジン含有ペプチドによることをアミノ酸分析により示した。
Shibata, K., K. Matsuda, T. Ohta, Y. Sasaki and S. Sutou (1991) Mutagenicity studies on catena(S)-[μ-[N-(3-aminopropionyl)histidinato(2-)-N ¹ ,N ² ,O-N]-zink]. <i>Arzneim-Forsch./Drug Res.</i> , 41, 1053-1057.	検体はヒスチジン構造を持つので、サルモネラ TA テスト菌は用いずに大腸菌 WP2uvrA とサルモネラ SD100(ストレプトマイシン依存性株, TM677(8-アザグアニン感受性株)を用いた。
Shin, M., B. Kim, W. Mar, M. Fang, J. Son, M. Kim, H. Kwak, M. Bae, T. Byun, S. Park, B. Chun, J. Byun, G. An, B. Lee and M. Cho (2000) Mutagenicity of recombinant antihemophilic factor (GC. AHF). <i>Arzneim-Forsch./Drug Res.</i> , 50, 316-321.	検体にヒスチジンが含まれていてサルモネラ TA テスト菌で復帰変異コロニー数の増加が認められたが、ヒスチジンを含まない検体では復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

Silverman, S.H., D.C. Turnell, D.J. Youngs and M.R.B.K. Keighley (1986) What is the role of histidine in studies of fecal mutagenicity? <i>Mutation Res.</i> , 173, 99-104.	糞便中の変異原性を調べる場合において、炎症性腸疾患の患者の糞便抽出物にはヒスチジンが含まれ疑似陽性を示す。
Verhagen, H., G.C.D.M. Bruijntjes-Rozier, T.M.M. Coenen and J. Oosterom (1994) Modified suspension Ames test for testing proteinaceous substances: An initial step. <i>Fd Chem. Toxic.</i> , 32, 1161-1166.	カゼイン加水分解物 (ヒスチジン 2.76g/100g) は TA100, TA98, TA1535, TA1537 において S9 存在下でバックグラウンドを増加させ、TA1537 をのぞく TA100, TA98, TA1535 の復帰変異コロニー数を増加させた。サスペンション法による Ames 試験の改良法を検討した。

アゾ色素

文献	概要
Brown, J.P., and P.S. Dietrich (1983) Mutagenicity of selected sulfonated azo dyes in the <i>Salmonella</i> /microsome assay: Use of aerobic and anaerobic activation procedures. <i>Mutation Res.</i> , 116, 305-315.	16 のアゾ色素のうち 5 つが好氣的な条件下で変異原性を示し、6 つがリボフラビン添加の好氣的条件下で変異原性を示した。嫌氣的な条件下にするとトリバンブルーは変異原性が増強され、メチルオレンジ、ボンソー 3R は変異原性を示さなくなった。これらはアゾアニオンラジカル、ヒドラゾ中間体の生成の差によるものと思われる。
Cameron, T.P., T.J. Hughes, P.E. Kirby, V.A. Fung and V.C. Dunkel (1987) Mutagenic activity of 27 dyes and related chemicals in the <i>Salmonella</i> /microsome and mouse lymphoma TK ⁺ assay. <i>Mutation Res.</i> , 189, 223-261.	27 のアゾ色素の変異原性を、サルモネラ TA 菌株を用いるラットおよびハムスター-S9 を用いるプレート法、FMN とハムスター-S9 を用いる改良法とマウスリンフォーマ試験を用いて調べた。また、その結果を UDS 試験と発がん性試験の結果と比較した。FMN とハムスター-S9 を用いる試験法はアゾ色素の変異原性を感度良く検出できる。
De France, B.F., M.H. Carter and P.D. Josephy (1986) Comparative metabolism and mutagenicity of azo and hydrazone dyes in the Ames test. <i>Fd. Chem. Toxic.</i> , 24, 165-169.	ヒドラゾン体をとるアゾ色素は FMN とハムスター-S9 による還元的試験系では陰性である。
Dillon, D., R. Combes and E. Zeiger (1994) Activation by caecal reduction of the azo dye D & C Red No.9 to a bacterial mutagen. <i>Mutagenesis</i> 9, 295-299.	発がん性のあるアゾ色素 D & C Red No.9 は FMN 還元系ではサルモネラ TA98, TA100 に変異原性を示さないが、腸内細菌還元物を酢酸エチル抽出して試験すると変異原性を示した。
Gregory, A.R., J. Elliott and P. Kluge (1981) Ames testing of direct black 38 parallels carcinogenicity testing. <i>Journal of Applied Toxicology</i> , 1, 308-313.	がん原性のあるダイレクトブラック 38 と構造類似のベンジジン系アゾ色素はリボフラビン添加や窒素添加による還元的な試験条件下では変異原性を示さないが、ナトリウムジチオナートで還元すると変異原性を示す。
Prival, M.J., and V.D. Mitchell (1982) Analysis of a method for testing azo dyes for mutagenic activity in <i>Salmonella typhimurium</i> in the presence of flavin mononucleotide and hamster liver S9. <i>Mutation Res.</i> , 97, 103-116.	ラット S9 とリボフラビンを用いる方法を改変したハムスター-S9 と FMN を用いる方法でアゾ色素 (コンゴレッドなどのベンジジン系アゾ色素) の変異原性を感度良く検出することができる。
Prival, M.J., S.J. Bell, V.D. Mitchell, M.D. Peiperl and V.L. Vaughan (1984) Mutagenicity of benzidine and benzidine-congener dyes and selected monoazo dyes in a modified <i>Salmonella</i> assay. <i>Mutation Res.</i> , 136, 33-47.	ハムスター-S9 と FMN を用いる方法でベンジジン系、o-トリジン系、o-ジアニジン系のアゾ色素の変異原性を感度良く検出することができる。しかし、ダイレクトブルー-218、ピグメントイエロー-12 の変異原性は検出できなかった。モノアゾ色素ではハムスター-S9 と FMN を用いる方法でメチルオレンジが明らかな変異原性を示したが、アシドレッド 26 とアシドレッド (ボンソー 3R) は弱い変異原性であった。
Rastogi, P.B., and R.E. Levin (1996) Metabolic activation and inactivation of metanil yellow and orange II in the <i>Salmonella typhimurium</i> his ^r reversion assay. <i>J. of Food Protection</i> , 59, 244-248.	アゾ色素であるメタニルイエローとオレンジ II の変異原性をプレート法、ブレインキューベーション法、アゾ色素の試験法として、ラット S9 とリボフラビンを用いる方法、ハムスター-S9 と FMN を用いる方法と比較した。その結果、ハムスター-S9 と FMN を用いる方法でメタニルイエローとオレンジ II の変異原性が検出できた。
Reid, T.M., K.C. Morton, C.Y. Wang and C.M. King (1984) Mutagenicity of azo dyes following metabolism by different reductive/oxidative system. <i>Environmental Mutagenesis</i> , 6, 705-717.	ベンジジン系アゾ色素の変異原性試験法の検討として、腸内細菌による還元体 (ラット腸内細菌で処理したものを酢酸エチルで抽出) を代謝活性化で試験する方法またはハムスター-S9 と FMN を用いる方法と通常ハムスターまたはラット S9 を用いる方法と比較した。その結果、ベンジジン系アゾ色素の変異原性は腸内細菌または FMN による還元的な処理のステップを代謝活性化系と組み合わせることで感度良く検出できる。
Sweeney, E.A., J.K. Chipman and S.J. Forsythe (1994) Evidence for direct-acting oxidative genotoxicity by reduction products of azo dyes. <i>Environmental Health Perspectives</i> 102, 119-122.	腸内細菌の還元システムで還元したアマランスとサンセットイエローはスーパーオキシドラジカルを生成し、サルモネラ TA102 に変異原性を示した。

配糖体

文献	概要
Tamura, G., C. Gold, A. Ferro-Luzzi B.N. and Ames (1980) Fecalase: A model for activation of dietary glycosides to mutagens by intestinal flora. Proc. Natl. Acad. Sci., 77, 4961-4965.	糞便中のバクテリア粉砕物からセファデックスカラムで分離したフェカラゼを用いて配糖体の試験におけるフェカラゼ添加の効果を調べた。糖のことになった配糖体に対してフェカラゼのグリコシダーゼ活性はヘスペリジナーゼ、セカラゼよりも広い加水分解能を有していた。XAD-2 カラムでヒスチジンを除去した赤ワインなどの天然試料において、フェカラゼ処理によって変異原性が検出できる。
Nagao, M., N. Morita, T. Yahagi, M. Shimizu, M. Kuroyanagi, M. Fukuoka, K. Yoshihira, S. Natori, T. Fujino and T. Sugimura (1981) Mutagenicities of 61 flavonoids and 11 related compounds. Environmental Mutagenesis 3, 401-419.	6種のフラボノール配糖体(ケンフェロール配糖体、ケルセチン配糖体)は、ヘスペリジナーゼを添加した試験系で変異原性を示す。
Matsushima, T., H. Matsumoto, A. Shirai, M. Sawamura and T. Sugimura (1979) Mutagenicity of the naturally occurring carcinogen cycasin and synthetic methylzoxymethanol conjugates in <i>Salmonella typhimurium</i> . Cancer Res., 39, 3780-3782.	サイカシンの変異原性は、 β -グルコシダーゼを添加した試験系で変異原性をしめす。
Brown, J.P., and P.S. Dietrich (1979) Mutagenicity of plant flavonoides by mixed glycosidase from rat cecal bacteria and other sources. Mutation Res., 66, 223-240.	フラボノール配糖体、フラバノン配糖体等の植物由来の配糖体は、そのままでは変異原性を示さないの、酸により配糖体を加水分解した試験系と、腸内細菌のグリコシダーゼ、市販の β -グルコシダーゼ、ナリンギナーゼ、 β -グルクロニダーゼ添加した試験系を比較した。

その他

文献	概要
Albertini, S., and E. Gocke (1992) Dose the positive result in TA1535 indicate genotoxic properties?. Environmental and Molecular Mutagenesis., 19, 161-166.	フェノバルビタールやメタピリレンは TA1535 においてわずかな復帰変異コロニー数の増加を示す。フェノバルビタールやメタピリレンは 4-ニトロキノリン-N-オキシド、2-ニトロフルオレンの変異原性を増強しないが、アジ化ナトリウム、2-アミノアントラセンの変異原性を増強させた。フェノバルビタールの復帰変異コロニー数の増加はフェノバルビタール自身の変異原性によるものではなく増強作用によるものと推察される。
Albertini, S., and E. Gocke (1988) Plasmid copy number and mutant frequencies in <i>S. typhimurium</i> TA102. Environmental and Molecular Mutagenesis., 12, 353-363.	テトラサイクリン、クロラムフェニコールは TA102 において標的遺伝子の入ったプラスミドのコピー数を増加させることで、自然復帰突然変異コロニー数を増加させ、擬似陽性を示す。
Gocke, E. (1989) Reduction of the translation fidelity by kanamycin: effects on growth and mutant frequencies in <i>S. typhimurium</i> TA102. Environmental and Molecular Mutagenesis., 12, 353-363.	カナマイシンは TA102 における転写の正確さを低下させることで、ヒスチジン添加と同様の働きをし、復帰変異コロニー数を増加させる。
Gocke, E., and S. Albertini (1996) Synergistic/comutagenic action in the Ames test as an indication of irrelevant positive findings. Mutation Res., 350, 51-59.	ヒスチジン、イソヒスチジン、ヒスチジン含有レニンインヒビターは試験に用いる菌数を増加させ、TA100 における 2-アミノアントラセン、アジ化ナトリウム、TA1538 における 2-ニトロフルオレンで誘発される変異原性を増強させる。テトラサイクリン、クロラムフェニコールは TA102 において標的遺伝子の乗ったプラスミドのコピー数を増加させることで、マイトマイシン C で誘発される変異原性を増強させる。また、カナマイシンは TA102 において標的遺伝子の乗ったプラスミドの転写活性の正確さを低下させることでヒスチジン様の働きをする。フェノバルビタールやメタピリレンは TA1535 において 2-アミノアントラセンで誘発される変異原性を増強させる。

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

エレミ樹脂のげっ歯類を用いた小核試験による遺伝毒性の評価

分担研究者 宮澤 真紀（神奈川県衛生研究所・理化学部 主任研究員）

研究協力者 小島 尚（神奈川県衛生研究所・理化学部 主任研究員）

研究要旨

平成8年度厚生科学研究報告書「既存天然添加物の安全性評価に関する調査研究」で、安全性試験実施も含めその安全性について検討する必要があるとされた138品目の既存添加物のうち、エレミ樹脂の安全性を再評価するため、マウス骨髄細胞の小核出現頻度を指標とするマウス小核試験を行い、染色体の構造異常及び数的異常を起こす性質があるか否かを検討した。その結果、エレミ樹脂での変異原性は認められなかった。

キーワード：遺伝毒性試験、*in vivo*小核試験、既存天然添加物、エレミ樹脂

A. 研究目的

平成8年度厚生科学研究報告書「既存天然添加物の安全性評価に関する調査研究」で、138品目の既存天然添加物が、安全性試験実施も含めその安全性について検討する必要があると報告されている。そのうち、ガムベース、増粘安定剤として使用されているエレミ樹脂については、変異原性の有無についての論文は多くない。そこで、エレミ樹脂の安全性を再評価するため、マウス骨髄細胞の小核出現頻度を指標としたマウス小核試験を行い、染色体の構造異常及び数的異常を起こす性質があるか否かを判定した。

B. 研究方法

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・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）¹⁾に従い実施した。

1. 検体

エレミ樹脂(Lot.No.2K9027)は、高砂香料(株)より提供されたものを使用した。本品は、芳香を有する黄白色の塊状固体であった。

カンラン科エレミ(*Canarium luzonicum*

A.GRAY)の分泌液を凝固させたゴム樹脂(マニラ・エレミ)から水溶成分とモノテルペン系の精油(マニラ・エレミ油)を水蒸気蒸留等で除去後、精製されたもので、 α -アミリン、 β -アミリン等のトリテルペン系樹脂を主成分とする。

2. 試験溶液の調製

1) エレミ樹脂

検体を粉碎後、日局オリーブ油で溶解し、試験溶液とした。

2) 陰性対照

陰性対照は、日局オリーブ油用いた。

3) 陽性対照

陽性対照は、マイトマイシンC 2mg (マイトマイシン協和S、協和発酵工業株式会社)に生理食塩水を10mL加えて溶解した溶液を試験液とした。

3. 動物

週齢のddY系雄マウス(日本SLC)を、温度 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50\pm 10\%$ 、明暗12時間のconventional環境下で固形飼料(CE-2 日本クレア)及び水(水道水)を自由摂取させ、1週間以上の観察期間を経た後、試験に使用した。

4. 急性毒性試験

検体の投与量を決定するために急性毒性試験を行った。エレミ樹脂は50、100及び200mg/mLになるよう試験溶液を調製した。各試験液あたり1群3匹のマウスに10mL/kg/dayの容量で経口ゾンデを用いて経口投与を行った。24時間間隔で2回投与を行った後、2週間にわたり症状及び体重変化を観察した。

陰性対照には精製水を用い、24時間間隔で、2回経口投与を行った。

5. 小核試験

1) 群

マウスは1群5匹とし、検体投与群3群、陰性対照群および陽性対照群を設けた。試験開始直前に体重を測定し、実験群の平均体重に偏りが生じないように、群分けを行った。

2) 投与量および投与濃度

エレミ樹脂は、500mg、1000mg及び2000mg/10mL/kgを、24時間間隔で2回経口投与した。陰性対照として、日局オリーブ油10mL/kgを24時間間隔で2回経口投与した。

陽性対照としてマイトマイシンC 2mg/10mL/kgを、検体投与群及び陰性対照群の採材前日に、1回腹腔内投与を行った。

3) 採取時間

実験群、陰性対照群及び陽性対照群は、最終投与の24時間後に頸椎脱臼により屠殺し、大腿骨を採取した。

4) 標本作製

片側の大腿骨を取り出し、0.4mLの牛胎仔血清を用い、骨髓細胞を遠沈管に洗い出した。1000 rpmで10分間遠沈し、上清をすて少量の上澄み液で細胞懸濁液を作り、塗抹標本作製した。塗抹標本は十分風乾した後、5分間メタノールで固定した。標本は、Sorensenリン酸緩衝液(pH 6.8)で希釈した3%ギムザ液で30分間染色し、水洗後、0.4%クエン酸溶液に数秒間浸し、再度水洗後送風下で乾燥させた。

5) 観察方法

標本はコード化し、多染性赤血球(PCE)および正染赤血球(NCE)を盲検法により観察した。1匹あたりPCEを2000個観察し、多染性赤血球中の小核出現頻度(MNPCE)および多染性赤血球比(PCE)を求めた。

PCEについては χ^2 検定を、MNPCEは条件付2項検定(Kastenbaum and Bouman)²⁾を行った。

C. 研究結果

1. 急性毒性試験

急性毒性試験の結果を表1に示した。エレミ樹脂のいずれの濃度群においても検体の投与による死亡や体重の減少は認められなかった。この結果に基づき、小核試験における検体の1回あたりの最高投与量を2000mg/kgとした。

<表1 挿入>

2. 小核試験

エレミ樹脂の小核試験の結果を表2に、各検体における結果詳細を付表に示した。

多染性赤血球中の小核保有細胞の出現頻度は、陽性対照群では3.28%、陰性対照群では0.14%、試験溶液投与群の2000mg/kg群、1000mg/kg群、500mg/kg群でそれぞれ0.16%、0.16%、0.15%であった。いずれの試験溶液投与群でも、陰性対照群と比較して小核保有細胞の出現頻度に有意差は認められず、また多染性赤血球比(PCE)の減少も認められなかった。以上によりエレミ樹脂の小核試験は、陰性の結果であった。

<表2 及び付表挿入>

D. 考 察

既存添加物“エレミ樹脂”は、東南アジアに分布するカンラン科エレミの分泌液を凝固させた

ゴム樹脂(マニラ・エレミ)から水溶成分とモノテルペン系の精油(マニラ・エレミ油)を水蒸気蒸留等で除去後、精製されたもので、 α -アミリン、 β -アミリン等のトリテルペン系樹脂を主成分としている。

α -アミリンや β -アミリンについては、抗炎症作用があることが報告されている³⁻⁵⁾が、毒性に関する報告はない。エレミ樹脂については、ヒトでのアレルギー性接触皮膚炎の報告がある⁶⁾他は、枯草菌孢子によるDNA修復試験の結果、変異原性が認められなかったという上野らの報告⁷⁾があるのみで、毒性学的なデータはほとんど無い。今回行ったマウスを使った経口急性毒性試験では、2000mg/kgの投与で死亡及び異常症状が認められなかったことから、エレミ樹脂は、ほとんど無毒であった。また、マウスの骨髓細胞における小核試験でも、MNPCE及びPCEで全く有意差を認めなかったことから、エレミ樹脂には変異原性はないものと考えられる。

E. 結 論

今回の研究で用いた既存天然添加物であるエレミ樹脂では変異原性は認められなかった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1.論文発表

特になし

H. 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(1996)

2) Kastenbaum, M.A. and Bowman, K.O. : Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies, *Mutat.*

Res., 9, 529-549 (1970)

3) Chaturvedi, A.K., Parmar, S.S., Bhatnagar, S.C., Misra, G., Nigam, S.K. : Anticovulsant and anti-inflammatory activity of natural plant coumarins and triterpenoids, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 9, 11-22(1974)

4) Kweifio-Okai G., De Munk, F., Rumble B.A., Macrides, T.A., Cropley, M. : Antiarthritic mechanisms of amyirin triterpenes, *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, 85, 45-55 (1994)

5) Otuki M.F., Ferreira J., Vieira-Lima F., Meyre-Silva C., Malheiros A., Muller L.A., Cani G.S., Santos A.R., Yunes R.A., Calixto J.B. : Antinociceptive properties of mixture of alpha-amyirin and beta-amyirin triterpenes.: evidence for participation of PKC and PKA pathways, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, e-pub(2004)

6) Jost T, Sell Y, Fousereau J. : Contact allergy to Manilla resin. Nomenclature and physico-chemistry of Manilla, kauri, damar and copal resins., *Contact Dermatitis*, 21, 228-38(1989)

7) Ueno, S., Ishizaki, M. : The DNA-damaging activity of Natural food additives(VI), *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 33, 378-383 (1992)

表1. 被験物質についての2回投与による50%致死量 (LD₅₀²)

品目	1回あたりの 投与量 (mg/kg)	投与回数	生存数/投与数 (2週間)	推定LD ₅₀ ²
エレミ樹脂	500	×2	3/3	>2000mg/kg
	1000	×2	3/3	
	2000	×2	3/3	

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	動物 リング 時間 ^{a)}	多染性赤血球頻度		多染性赤血球		小核含有多染性赤血球		
				%	± SD (Min / Max)	観察数	検定 ^{b)}	検定 ^{c)}	%	± SD (Min / Max)
エレミ樹脂 (オリーブ油)	0	×2	24	5	61.0 ± 4.0 (55.2 / 66.2)	10000	—	14	—	0.14 ± 0.07 (0.05 / 0.25)
	500	×2	24	5	60.0 ± 4.3 (54.8 / 65.2)	10000	N.S.	15	N.S.	0.15 ± 0.13 (0.00 / 0.30)
	1000	×2	24	5	57.7 ± 5.5 (53.4 / 63.8)	10000	N.S.	16	N.S.	0.16 ± 0.07 (0.10 / 0.25)
	2000	×2	24	5	61.0 ± 2.4 (57.2 / 63.8)	10000	N.S.	16	N.S.	0.16 ± 0.09 (0.10 / 0.25)
MMC (i.p.)	2	×1	24	5	56.8 ± 4.6 (49.8 / 61.8)	10000	N.S.	328	**	3.28 ± 0.65 (2.70 / 4.35)

^{a)} : 最終投与後のサンプリング時間

^{b)} : Wilcoxonの順位和検定による検定

^{c)} : MMCはカイ二乗検定による検定 (** p < 0.01), それ以外はKastenbaum-Bowmanの数表による検定

MMC : Mitomycin C

N.S. : Not significantly different from the vehicle control. (p > 0.05)