

医療用具の製品化を目的とした 前臨床試験



田中 憲穂*

JJSB

Pre-clinical studies for the production of medical device

前臨床における生物学的安全性試験のガイドラインについては、国際基準である ISO10993 にハーモナイズさせるべく平成 15 年 2 月に改正され、さらに試験データの信頼性を確保すべく、平成 15 年 9 月より医療用具 GLP も施行された。

本稿では、ISO10993 および国内ガイドラインに準じて試験を実施する場合の問題点、および医療用具の分野で最近活発に進められている再生医療関係の規制関連について、試験を実施する立場から解説した。

Noriho Tanaka*

Key words: 生物学的安全性試験, GLP, ISO10993, 再生医療, リスク評価

医療用具安全性確認の重要性

医療用具の開発・設計・製品化の過程で、いかに機能的にすぐれた医療用具を開発したとしても、臨床で人に適用する前に、前臨床試験によって、その生物学的安全性を確認・評価しておかなければならない。厚生労働省ではガイドラインを定め、安全性確認のための具体的な試験の種類と、その試験実施の具体例を示している。国際的には、ISO10993において医療用具の安全性を確認するための基準が示され、米国FDA(食品医薬品局)においても細かな基準が提示されている。

秦野研究所で実施した平成 15 年度の医療用具試験に関わる前臨床試験データのうち、細胞毒性試験では、試験した医療用具のうち、約 11.7% でなんらかの毒性があることが示された。感作性試験では 11.2% が陽性と判定されている(図 1, 2)。一方、染色体異常試験では、試験した(原)材料のうち構造異常が検出された(原)材料の割合は、材料の培地抽出

物では 6%、有機溶媒抽出物では 33%、原材料においても同じく 33% となっている(内部資料)。

これらの陽性結果はハザードの可能性を示すもので、ただちに用具として不適を意味するものではない。リスク評価により、総合的な医療用具の安全性を評価することになるが、これらの毒性の程度がリスク評価の結果、使用上問題になるかどうかはさておき、前臨床試験の段階で約 10% 以上の医療用具に毒性がみられることについては留意すべきであり、開発する段階でのマテリアルの安全性チェックを充分行うことが、人への安全性を考慮するうえで重要だといえる。

ちなみに、上記の安全性試験の結果と直接の関係はないと思われるが、市販後安全対策の統計資料によれば、医療用具の不具合・感染症報告数は、平成 11 年度の 643 件にくらべ、平成 12 年度は 2,922 件、回収件数も平成 11 年の 52 件にくらべ、平成 12 年度では 207 件と 4~5 倍程度増えており(特に国内製造よりも輸入品において著しく増加)、安全性に対する一層の配慮が望まれる。

* Division of Genetic Toxicology, Hatano Research Institute (HRI), Food and Drug Safety Center (FDSC) 財団法人食品薬品安全センター秦野研究所細胞遺伝部

【略歴】 1972年 鹿児島大学大学院水産学修士修了。1973年 鹿児島大学医学部助手。1976年 財団法人食品薬品安全センター秦野研究所。1984年 米国NIH/NIEHS客員研究員。1986年 財団法人食品薬品安全センター秦野研究所細胞毒性学研究室長。2001年 同 研究部副部長。2004年 同 遺伝毒性部部長。専門：細胞遺伝、細胞毒性。趣味：写真、音楽録音、建築

わが国の医療用具ガイドライン

医療用具の生物学的安全性試験の国際的な基準として ISO10993 シリーズがある。

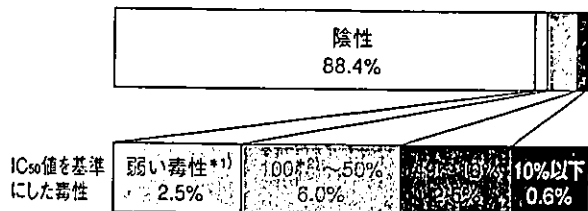


図1 細胞毒性試験におけるIC₅₀値を基準にした試験結果 (2003年度, 秦野研究所データ)

- *1) IC₅₀値が求められない(100%以上), もしくはコロニー数は変わらないが大きさが小さいなどの毒性兆候を示したもの
- *2) 抽出原液(100%)における細胞生存率が陰性対照に対し50%であることを意味する。

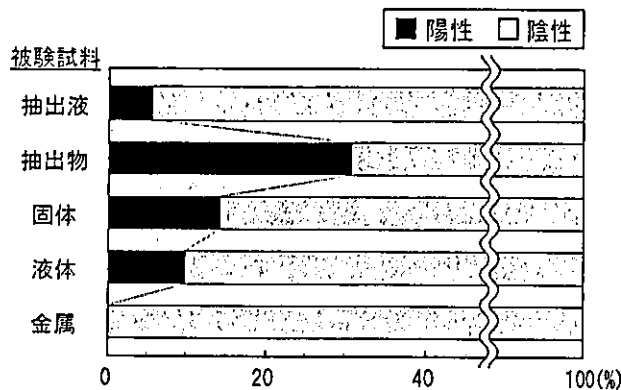


図2 感作性試験における陽性率 (2003年度, 秦野研究所データ)

これを受けて, わが国でも horizontal standard として, 平成7年6月(薬機第99号)に「医療用具の製造(輸入)承認に必要な生物学的試験のガイドライン」が課長通知として策定・発出された。内容的にはすべての医療用具を網羅し, 評価すべき安全性試験項目の選択とその考え方, 具体的な試験方法について示された。

その後, 上記ガイドラインの改訂版として, 平成15年2月(医薬審発第0213001号)に「医療用具の製造(輸入)承認に必要な生物学的安全性試験の基本的考え方について」が課長通知として発出された。この基本的考え方の骨子は, 前ガイドラインと原則的には変わらず, 国際基準 ISO10993 に準拠すべきことの明確化, 安全性評価としてのリスク分析手法による評価の重視(ISO14971), 試験法選択の考え方などの原則が示されている。一方, 具体的な試験法の例示は, 事務連絡として「生物学的安全性試験の基本的考え方について」が平成15年3月(医療機器審査No.36)に発出され, 各試験法の具体例と部分的な変更が示されている。

GLP (good laboratory practice) 試験の適用

平成15年10月1日より, 下記の二つの通知に基づき, 医療用具の試験においても GLP (good laboratory practice) が適用された。

「医療用具の安全性に関する非臨床試験の実施の基準の施行について」: 平成14年9月(医薬発第0930001号)医薬局長通知

「医療用具の安全性に関する非臨床試験の実施

の基準の施行について」: 平成14年9月(医薬発第0930001号)審査管理課課長通知
適用後, まもなく一年をむかえることとなり, 平成17年3月末には医療機器 GLP の省令化が予定されている。

医療用具は, その種類が多岐にわたり, 種類によって使用実態やリスクが異なることから, 医療用具の安全対策を抜本的に見直すための諸基準整備の一環としてGLP化がすすめられた。他の医薬品, 化学物質, 労働環境における化学物質, 農薬, 動物医薬, 飼料添加物などの分野では, すでに早くからGLPが施行されていた。

どのGLPであってもGLPの基本理念は異なるものではないが, 医薬や化学物質の場合と異なり, 医療用具固有の実施上の問題点や, 適合性の調査の方法が違う部分などもある。下記に, GLP試験の要点などを述べる。

1. GLP試験

一言でいえば, 安全性試験結果について, 実施したすべての試験内容とその試験過程の信頼性を保証することによって, 試験データの信頼性を確保するシステムである。GLPは下記の主な項目で構成される。

- ① GLP組織体制と責任体制の明確化: 運営管理者, 試験責任者, 信頼性保証部門(QAU)責任者, 資料保存施設管理責任者をおき, おのおのの役割分担と責任の所在を明確にする。

- ② 試験操作手順の標準化：試験の方法や使用機器の取り扱いに関して標準操作手順書(SOP)を整備することによって、試験の再現性を保証する。
- ③ 計画・操作手順に従った試験の実施：試験計画書やSOPの記載どおりに試験を実施する。
- ④ 標本・記録の保存：試験のプロセスはすべて忠実に記録しておかなければならない。保存可能な標本や生データの記録は、後日の検証のためにも必要である。
- ⑤ 自主的な信頼性の保証：試験施設自身がデータの信頼性を保証する。

一方、GLP施設運用の立場からは、①組織は役割分担と責任体制どおりに円滑に動いているか、②施設や設備機器の整備と点検は充分か、③試験計画書、最終報告書の記載や生データの確認、SOPなどの整備状況は充分か、④生データや標本の保管状況は充分か、⑤QAUの活動状況は、などに配慮して、常にスムーズに試験が流れるシステムにしておかねばならない。

2. 医薬品GLPと医療用具GLPの相違点

医療用具GLPは、基本的には医薬品GLP(平成9年厚生省令21号)に準じている。しかしながら、医療用具固有の試験方法に対する配慮が必要である。厚生労働省の説明資料(日本医療機器関係団体協議会主催、平成15年3月)によれば、医薬品GLPと医療用具GLPの相違点としてつぎの3点があげられている。

- ① 医薬品と医療用具の相違点を考慮し、被験物質の範囲に、医療用具の原材料、医療用具からの抽出液・抽出物が含まれることの明確化
- ② 被験物質などの特性に関し確認すべき項目のうち、力価の測定など、不要な項目の簡素化
- ③ 医薬品機構による適合性調査を義務化せず、承認申請後、必要に応じ、厚生労働省の担当職員または指定する者が査察すること(医薬品通知GLPと同様の運用)

3. 医療用具GLPに対する各界の意見

一方、医療用具GLPに関しては、業界およびGLP試験実施団体よりいくつかの意見が提出されているが、医療用具の特殊性を理解できることから、その一部を紹介する。

(1) 適用される試験範囲

局長通知(0930001号)、記の「(1)適用される試験範囲」に関しては、つぎのことが要望されている。

“プロトコール設定のための予備試験”のなかに、たとえば感作性試験、遺伝毒性試験での抽出溶媒を決定するために行う抽出率試験が含まれることを(なんらかの形で)明確にしてほしい。理由としては、最終的に決定された抽出プロトコールに従う抽出操作は、本試験のための試料作成操作の一部で、GLPの対象だと考えるが、抽出溶媒を決定するための抽出率試験は生物学的安全性試験ではないので、対象から除外すべきと考えられるからである。

また、適用範囲は、“医療用具の生物学的安全性に関する非臨床試験に関わるもの”にしていきたい。理由は、医療用具の安全性に関する非臨床試験には、多くの規格試験的なものが含まれており、GLPの適用には、生物学的安全性試験のみで充分であるとえられるからである。米国FDA/PCRにおいてもGLP試験はtoxicological profileを調べるための試験としている。

(2) 抽出液や抽出物質

抽出液や抽出物も被験物質に含まれているが、これは除外してほしい要望が強い。理由としては、医療用具そのものを被験物質とするほうが自然であり、米国GLP/FDAにおいても、抽出物はsample preparationの項に記載されていることから、国際的にハーモナイズできる。

また、医薬審発第0213001号(平成15年2月13日)、課長通知「……基本的考え方」の「7. 試験試料」の項に示す試験試料には、最終製品、最終製品の一部、原材料があげられており、これはGLP通知の被験物質と同義と考えられ、抽出物とは一致しない。抽出物を得る操作は被験物質に入れず、事務連絡No.36(平成15年3月19日)に示す試験操作の一部、すなわち試験プロトコールの一部分として考えるのが自然である。

ることは避けねばならないので、リスク・ベネフィットを考慮した、十分なリスク評価が必要である。

3. 抽出法

処理条件の項でも述べたが、わが国の感作性試験と遺伝毒性試験ガイドラインでは、メタノールとアセトンの2種の有機溶媒を用いて抽出率を求め、抽出物が多く得られるほうの溶媒で抽出物を得る。この抽出物を用いて、染色体異常試験などを実施するわけであるが、小さなデバイスでも、試験に必要な抽出物を得るために多量の材料が必要となることから、国内外からコメントをいただく場合が多い。

昨年のガイドライン改正により、感作性試験では従来の方法に加え、第2法として、抽出液を試験試料1g当り1mLに濃縮するか、適切な溶媒に溶解して1mLに調製し、Maximization法により感作性試験を行う方法が加わった。このことにより、試験法選択の幅が広げられ、これまで粉末を用いてAdjuvant & Patch試験をしていたものが、抽出液を用いて、感度の高いMaximization法を実施できるようになった。また、試験試料が従来よりもかなり少なくて済むようになった。

一方、OECDガイドラインやISO基準では、オリーブオイルや生理食塩液などによる抽出液を用いて試験を行う場合もある。

再生医療などに関連した安全性試験

最近の再生医療に関する学会発表や研究論文の数はおびただしいものがある。しかしながら、医療用具として実用化するにはクリアすべき問題も多く、安全面で予測がつかない点もあり、行政側としても安全性に関して厳しくせざるをえない状況もある。

再生医療の分野では、ヒト組織から採取して培養した細胞に、なんらかの加工を加えて増殖させたのち、細胞そのもの、もしくは、担体とともに再び人体組織に戻して、組織の機能や損傷を回復させる場合が多い。したがって、① ドナーから原材料を採取する段階、② 細胞の採取・保存・運搬の過程、③ 製品化に伴う細胞の培養・加工過程など、おのおの

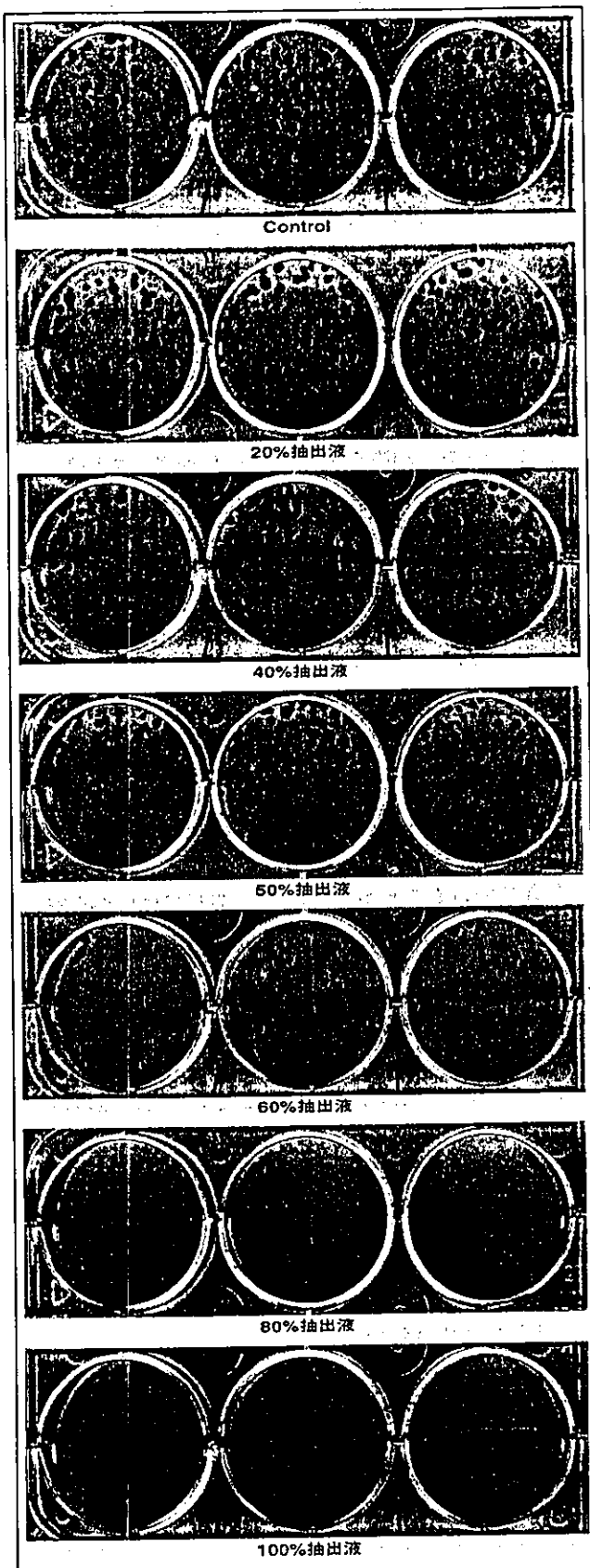


図4 陽性標準材料(0.25%ZDBC含有ポリウレタンフィルム)のコロニー形成試験

の段階で、医療用具としての安全性確保と品質管理の面から検査が要求される(医薬発第1314号、平成12年12月)。

それ以前に、倫理的な問題も充分考慮し、患者さんへのインフォームド・コンセントが必要であることはいままでもない。

- ① 患者さんから細胞を採取する場合、ドナーのヒト由来ウイルス(HBV, HCV, HIVなど)検査は必須となる。
- ② 細胞を培養する過程でなんらかの加工を加えて製品化する場合、培養期間中に細菌やウイルスなどに感染していないかを最終製品(場合によっては原料も)で無菌試験やエンドトキシン試験、マイコプラズマ検査などの汚染検査をしなければならない。
- ③ 細胞が、培養過程でなんらかの要因、たとえば、培地に添加される抗生物質やgrowth factorなどにより細胞がトランスフォームし、がん化していないかの可能性をみるために、培養初期と培養後期(最終製品)の細胞について、分染法による染色体の核型変化(数的な変化も)、細胞の足場依存性の消失やヌードマウスへの皮下移植による造腫瘍性試験などによって確認することが要求されている。ヌードマウスを用いる造腫瘍試験の場合、相当数の細胞数を確保しなければならないことから、実施には困難が伴う。
- ④ そのほか、細胞の特殊性に応じて、各種サイトカインや関連生理活性物質を定量する場合もある。これらの試験は細胞を用いて医薬品を生産する場合もほぼ同様である。
- ⑤ ヒト上皮細胞の培養において、3T3細胞などの異種の細胞をフィーダー細胞として用いる場合がある。

最近、移植する患者さんへ異種動物由来感染症の感染を防ぐために、3T3細胞をフィーダー細胞として利用する場合の指針が出された(平成16年7月)。これによれば、移植患者、医療従事者などの関係者に対して、血清学的な検査による定期的なモ

ニタリングの実施、ヒト細胞へのフィーダー細胞の存在確認、細胞株の同一性確認、細胞の同定試験、細菌、カビ、マイコプラズマ、ウイルスの否定試験が要求される。軟寒天培養による細胞の腫瘍原性の確認試験なども行わねばならない。

- ⑥ 培地成分、資材や試薬に由来する成分についての純度試験を要求されることもある。培養に用いるウシ血清に関しては、BSE(ウシ海綿状脳症)への汚染がないことはもちろんである。
- ⑦ 一方、細胞をデバイスに付着させて培養しそれを生体に移植する場合は、デバイスそのものについては、従来の医療用具に関する安全性試験を実施すると同時に、動物を用いた埋植試験も実施する可能性も考えておかなければならない。

このように、生体から取り出した細胞を一定期間体外培養して再移植する場合、細胞に関するさまざまな性状解析が要求される。これらの試験は、ルーチン化した試験でなく、かなり専門化した試験であること、また、細胞の性質として初代細胞に近い性質を有していることから、培養に関してはいつも安定して増殖するとは限らず、不安定な要素がある。

生物由来原料について

バイオゲノムの世紀に対応した安全対策確保の観点から、医療用具製品に使用される生物由来原料(細胞などを含む)に関しては、感染因子の混入防止、除去や不活化など種々の安全対策が現在検討されており、先に開催されたISO10993のトロムソ会議(2004年6月)でも、ワーキンググループが新たに設けられ、討議がはじめられた。

BSE感染の拡大に伴い、ウシ由来原材料を使用して製造される製品(ゼラチンやコラーゲンなど)の場合は、これまで類回の行政通知が発出され、安全性確保の強化が指示されている。しかしながら、予測を超えた感染などの事故発生は、現在の科学技術レベルでは事前に予知することが困難で、安全性を担保できるとはいきれない面があり、今後も充分な

安全対策が望まれる。

おわりに

高齢化社会をむかえ、社会からの要求もあり、医療用具開発の重要性はますます高まる状況にある。また、この分野は、バイオベンチャーの企業や分野外からの参入もあり、大変活発である。

医療用具の開発から承認申請に至るまでの過程で

は、GLPによる前臨床試験のみならず、GCPでの臨床試験の実施、さらには市販後の安全性モニタリングなど、クリアすべき多くの関門がある。したがって、開発する企業にとっては安全性についての配慮や、それにかかる費用や期間は予想以上なものとなるが、人の健康を維持促進するために役立つ、多くのすぐれた医療機器が開発されることを願ってやまない。

さらに、課長通知(医薬審発第0930001号)では被験物質を保存することになっているが、抽出液(物)を保存することは意味がない。また、局長通知(0930001号)13条で被験物質の管理規定があるが、抽出液(物)をこの項のとおり扱うのは現実的ではない。

医療用具の安全性試験を実施するに当たって

1. 試験の目的に応じた安全性試験

申請データとして用いる試験を行う医療用具は、試験後に、素材や含まれる材料の比率や組成、製造工程、滅菌方法、使用目的などを変更できないので、最終製品、すなわち、個々の材料の吟味が終わり、製品化が最終的に決定した状態のものについて試験しなければならない。当然、試験はGLPで実施しなければならない。

安全性の高い材料を選択するためのスクリーニング試験が目的の場合、簡便で精度の高い試験系であれば、非GLPで試験を実施するほうが早く結果が得られ、費用も抑えることができる。

2. 試験項目の選択と試験試料の調整

生物学的試験の項目としては、細胞毒性、感作性、刺激性、急性毒性、亜急性毒性、遺伝毒性、発熱性、埋植、血液適合性のなかから、接触部位と接触時間の分類により試験を選択する。場合によっては、慢性毒性、発がん性、生殖発生毒性などの試験も実施する場合がある。

医療用具の発がん性試験に関しては、以下の点に留意せねばならない。すなわち、プラスチック材料の齧歯類皮下埋植による埋植局所の発がん現象は異物発がん現象と称され、発がん性化学物質(ニトロサミン、エチレンオキシドなど)による化学発がんとは区別されており、この現象がヒトでも起こりうるかは未解決の研究課題である。

ISO/TC194/WG6では、「埋植実験で局所の発がん性が認められても、それからなんらの結論も得られない現状では、長期埋植による発がん試験を強制することを正当化はできない」としている。また、トランスフォーメーション(形質転換)試験が発がん試

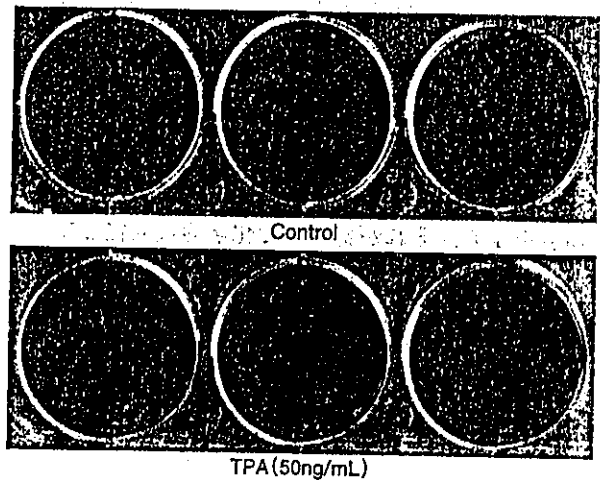


図3 *ras* 遺伝子を導入した Bhas 42 細胞を用いた形質転換試験プロモーターである TPA (50 ng/mL) 処理により形質転換果が誘発されている。

験の代替法として ISO10993-3 にあげられているが、プラスチック材料のような固形物の試験の意義についてさらなる検討が必要と思われる(図3)。

実際に安全性試験を実施する場合、多種の複合的な素材で構成されている医療用具の安全性試験は、どんな試験を適用したらよいのか、どの部分をどうやって試験するのか悩む場面も多い。特に、抽出液や抽出物を得て試験に用いる場合が多いので、用具の使用条件ごとに、ガイドラインや ISO 基準に従いつつ、ケースバイケースで検討し、試験計画書を作成する。試験によっては、まず有機溶媒での抽出率を調べ、用いる抽出溶媒を決定する。抽出は、デバイスの生体内外との接触部分の面積比で基準に従った抽出割合で、抽出液を得て試験に用いる場合が多い。抽出方法は、溶媒に材料を浸ける、用具内に溶媒を満たし静置する、ペリスタポンプで循環して抽出液を得るなどさまざまである。実使用の条件を超える過酷な条件で試験を実施しておく場合が多い。

開発に要する時間短縮や費用を抑えるためにも、事前に、試験を実施する施設に相談されることを勧める。

3. 原材料と最終製品での試験

試験試料は、最終製品についての安全性を評価できる試料でなければならない。通常は、最終製品、またはその一部を用いる。

しかし、その形状などによりそのまま試験に適用できないケースもあり、その場合は最終製品と同じ条件で製造した模擬試料を作製して試験に用いる。製造過程に成分変化がない場合には原材料を試験試料として用いることもできる。原材料の一部の化学物質を変え、それが材料中で化学的に変化していないようであれば、原材料や最終製品に代え、原料化学物質について実施する選択もある。

国内ガイドラインとISO10993などの国際基準のハーモナイズ

わが国で用いられている医療用具は、平成12年度の統計によれば、国内生産が金額ベースで約64%、外国からの輸入は約36%の比率となっており(クラス別では、クラスI、クラスIIは国産が、クラスIII、クラスIVは輸入製品が多い)、外国での試験データが国内申請で使用できるか、また日本のデータが外国で受け入れられるかは、申請者にとっては大きな問題である。

ISO10993では国際間での試験法のハーモナイズが討議されており、適用する試験法については日、米、欧ともほぼ同じ分類表(ISO10993: Part 1)を適用している。しかしながら、個々の試験法については、安全性に関する行政当局の考え方が国によって異なる部分もあり、各試験法まですべてハーモナイズするには時間が必要である。たとえば、細胞毒性試験に用いる試験法や、感作性試験や遺伝毒性試験における試験試料の作成法などである。以下にその個々の例を示す。

1. 処理条件

わが国のガイドラインの特徴として、医療用具のみならず医薬品の場合などでもいえることであるが、かなり過酷な試験条件でのデータが要求される場合が多い。これはおそらく、その用具の安全性に対してシロかクロかの判定をするよりも、どのような条件で毒性が出てくるのかを知ることにより、リスク評価における安全性の許容範囲を知ることが要求されているように思う。また、ハザード検出が主体であることから、毒性未知の物質については、可能なかぎり高い濃度にし、その物質の特性として毒性発現

の限界を調べるのがねらいと思われる。

医薬品のガイドラインでは、*in vitro*の試験に適用する最高濃度は5 mg/mLや10 mMの濃度で、通常その薬の生体での血中濃度をはるかに超える濃度での試験が要求される。溶解しない場合は懸濁して処理することになる。医療用具の遺伝毒性試験ガイドラインでは、有機溶媒で用具からどの程度溶出物が得られるかをまず調べ、得られる場合、その抽出物を用いて試験をする。

諸外国からは非生理的な条件で過酷すぎるとの批判もあるが、生体内に長期間留置して使用するような医療用具におけるハザード検出において、24時間または48時間程度のマイルドな培地抽出の試験結果で安全性が担保できるかという問題がある。事実、筆者らの背景データでは、陽性に検出される被験物質の割合は、培地抽出の場合は6%であるのに対し、有機溶媒抽出では33%、原材料の試験においても33%の陽性率を示しており、結果的に培地抽出では陽性率は低く、有機溶媒抽出物と原材料での陽性率はほぼ同じとなっている。今後、研究データをベースにして適正な抽出条件について論議する必要がある。

2. 適用する試験法

医療用具の試験で細胞毒性の場合を例にあげると、わが国ではより感度の高い定量的な試験法として、コロニー形成試験法(図4)を推奨している(新ガイドラインではこれ以外の試験方法を用いた海外データも受け入れ可能)。一方、アメリカではUSP/MEM Elution法とAgar diffusion法が実施されている。

わが国の場合、コロニー形成試験でなんらかの毒性兆候がみられれば、その毒性の程度や他の試験結果も考慮して、安全性を評価することになる。アメリカでのAgar diffusion法のように、定性的でむしろ感度の低い試験を実施してシロかクロかの判定をするほうが開発はスムーズかもしれないが、感度の高い試験法を適用し、仮にそれで弱い毒性が検知された場合、その素材の見直しや使用方法の変更などでリスクを回避することを考えたほうが、あとで予期しない事故をまねくよりも慎重な方法かもしれない。

しかし、問題にならない程度の毒作用によって、患者さんにとって重要な医療用具の開発が中止され

【総説】

日本における照射食品の遺伝的安全性試験

田中憲穂

財団法人食品薬品安全センター秦野研究所 (〒 257-8523 神奈川県秦野市落合 729-5)

Genotoxicity test of irradiated foods

Noriho TANAKA

Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center, 729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa 257-8523, Japan

はじめに

わが国で照射食品の健全性/安全性などの総合的な研究が開始されたのは、1967年に一連の研究が原子力特定総合研究に指定されてからである。この研究班では、殺菌、殺虫、発芽防止などの目的で放射線照射された食品に関して、国立試験研究機関(当時の栄養研究所、予防衛生研究所、衛生試験所)が中心となり、栄養成分の変化、慢性毒性試験、世代試験などの試験がスタートした。その後、発がんや次世代での遺伝的障害の予知にかかわる遺伝毒性の重要性が一般に認識され始めるようになったのは1970年代に入ってからである。秦野研究所では、1977年より照射食品に関して細菌、培養細胞、動物個体を用いた総合的な遺伝毒性試験を開始した¹⁾。その中には、現在では多数の動物を用いることから動物愛護の観点より実施が難しい次世代(生殖細胞への影響)への遺伝毒性を調べる慢性致死試験といった大規模な試験も含まれている。照射食品による遺伝学的影響に関して、このような多種の試験系を用いたバイオアッセイによる総合的な研究は国際的にも例を見ないことから、いくつかの研究班報告書をまとめここに紹介する。

ここで試験された食品そのものは、通常我々が食している農産物および食肉加工食品であり、長い食経験から食品としては経験的に安全性が確認されているものである。遺伝的安全性を調べるには、対照として用いる非照射食品の毒性反応との比較になる

が、非照射の食品そのものにおいても動物を用いた毒性試験の実施は、投与量、食品の形態、投与経路、栄養的なバランスなどで様々な困難が伴う。遺伝毒性試験では、放射線照射に伴って生じるかもしれない食品中の放射線分解生成物による遺伝的な有害性の可能性について検討する事になる。

1. 遺伝毒性試験とは?

遺伝毒性とは、工業原料、医薬、農薬、環境汚染物質などの化学物質や、放射線、紫外線など物理化学的な要因によりDNAなどに傷害を与え遺伝形質を変化させる事象で、DNA損傷、突然変異、染色体異常までを包含する(注:変異原性(Mutagenicity)の用語が一般に用いられてきたが、近年、国際的にまた行政のガイドラインにおいても広義の意味で遺伝毒性(Genotoxicity)が使われている)。標的は主としてDNAであるが、DNAに限らずタンパクなどが修飾される事により、結果として染色体の切断や再結合、数的異常などを生じる場合もある。このようなDNAや染色体の傷害は、体細胞ではがんの誘発要因となり、生殖細胞で生じそれが受精にあずかると胚死亡や流産、奇形、そして転座や遺伝子異常を有する個体を出産する可能性がある。

2. 照射食品の遺伝的安全性を調べる為に実施した試験

遺伝毒性の検出はそのエンドポイントにより試験系は様々である。表1に試験の種類と細胞などの材

料を示した。1977年から1981年にかけて原子力特定総合研究で試験された食品は、タマネギ、コメ、コムギ、ウインナーソーセージ、かまぼこ、ミカン、ジャガイモの7品目で、表2に試験項目と実施年度を示した。

通常、細菌や細胞を用いる遺伝子突然変異試験としては、細菌を用いる復帰変異試験やV79細胞やマウスリンフォーマ細胞を用いる薬剤抵抗性をマーカーとする試験があるが、照射食品では細菌を用いる復帰変異試験とV79細胞を用いる試験が実施された。生体内で代謝され変異原性を示す物質の検出に関しては、最近では薬物誘導をかけたラット肝臓から得られた肝ホモジネートを用いる代謝活性化試験が実施されているが、当時は宿主経由法も行われた。この試験は検体をマウスに投与し、その後腹腔内に試験菌株を短時間注入して回収し、その突然変異を調べる方法である。培養細胞を用いる試験としては、V79細胞を用いる遺伝子突然変異試験、チャイ

ニーズ・ハムスター細胞やヒトリンパ球を用いる染色体異常試験が行われた。動物個体を用いる試験としては、マウスおよびチャイニーズ・ハムスターなどの動物を用いて染色体異常試験、小核試験、優性致死試験などが実施された。優性致死試験では、各群30頭の雄マウスを用い、毎週1頭の雄に対し2頭の雌マウスと交配しこれを8週間続けると、計算上480頭の妊娠雌マウスが得られる。1試験で1非照射群、2照射群、1溶媒対照群、1陽性対照群の全5群構成であることから、 $(30 + 480) \times 5$ 群で2550頭のマウスを用いたことになる。本研究では、上記の試験条件で実施するフル優性致死試験と、検体を長期処理し交配を1週間のみ実施する簡便法の二つの方法で実施した(表3)。

タマネギ、ミカン、ジャガイモ、コムギ粉の優性致死試験では8週間連続交配のフルテストを実施した。8週間もの長期にわたって交配する理由は、マウスの場合、精子の幹細胞(stem cell)であ

表1. 遺伝毒性試験の種類と試験材料

変異のタイプ	試験材料	指 標
DNAの初期傷害	細胞	不定期DNA合成
	細胞	DNA鎖切断, コメットアッセイ
突然変異	サルモネラ菌	ヒスチジン要求性
	マウスリンフォーマ細胞	薬剤抵抗性 (TK)
染色体異常	V79細胞	薬剤抵抗性 (HGPRT)
	CHL細胞	構造異常, 数的異常
	ヒトリンパ球細胞	構造異常, 数的異常
	マウス骨髄, 血液細胞	小核形成
形質転換	マウス生殖細胞	優性致死 (流産, 胎児死亡)
	培養細胞	フォーカス形成

表2. 照射食品の試験項目と実施年度

食品名	細菌		培養細胞			動物個体	
	遺伝子突然変異	宿主経由	遺伝子突然変異	染色体異常	染色体異常	小核	優性致死
タマネギ	'77	'77	'78	'77	'77	—	'77
コメ	'78	'78	'78	'78	'78	—	'78
コムギ	'79	'78		'79		'79	'79
ウインナー	'80	'80		'80		'80	'80
かまぼこ	'80	'80		'80		'80	'80
ミカン	'81			'81		'81	'81
ジャガイモ	'81						'81

表 3. 優性致死試験の飼料投与方法と交配計画

食 品	投与方法	交 配	
		様式	期間
タマネギ (FD)	経口: 1回/day, 5日	2匹/week,	8週間
コメ	混飼: 8週間	2匹/week,	1週間
コムギ	混飼: 8週間	2匹/week,	1週間
ウインナー (FD)	混飼: 8週間	1匹/4days,	8日間
かまぼこ (FD)	混飼: 8週間	1匹/4days,	8日間
ミカン (濃縮ジュース)	経口: 2回/day, 5日	1匹/4days,	8週間
ジャガイモ (EtOH抽出物)	経口: 2回/day, 7日	1匹/4days,	8週間

FD: 凍結乾燥物

る精祖細胞から精子になるまでの精子形成過程 (spermatogenesis) はおよそ6週間かかることから、照射食品の影響を精子分化の全過程と幹細胞となる精祖細胞の増殖期にも作用させて調べる為に長期にわたって交配した。マウスは秦野研究所で常に使用し、背景データのある BDF₁ マウス (C57BLと DBAの近交系間交配 F₁ マウス) を用いた。

原子力特定総合研究が終了した後、1986年から1991年にかけて、日本アイソトープ協会・食品照射委員会では、当時国際的に論点となっていた幾つかの研究に関して試験を行った。インドで報告^{2,3)}された倍数性細胞の誘発を確認するため、ガンマ線照射した小麦粉をチャイニーズ・ハムスターとラットに給餌し骨髄細胞での倍数性細胞誘発と末梢血赤血球での小核誘発をみる試験を実施した。また、細菌などの汚染が多いスパイスに関しては、ガンマ線照射によるスパイスの突然変異誘発を細菌を用いる復帰変異試験を用いて検討した。

3. 照射と試験条件など

試験した食品の照射目的と照射時の試料の状態、

照射線量などの試験条件を表4に示した。線源はミカンの電子線照射を除き、すべてコバルト60によるγ線照射によった。

(1) タマネギ

タマネギは発芽防止の目的であるが、実用上限の線量である0.15kGyで照射後、5ヶ月間、5℃の冷暗所で貯蔵したものをを用いた。

細菌を用いる復帰変異試験及び宿主経由試験ではTA1535, TA100, TA1537, TA98の菌株を用いた。照射タマネギの試料はタマネギをミキサーでジュースにしてろ過した後、減圧濃縮し、-20℃下で凍結保存した。in vitro 染色体異常試験では同様にして作製した凍結乾燥粉末を用いた。in vivo の試験においても、試料を家庭用のジュース、さらにホモブレンドで粉碎し、このホモジネートを凍結乾燥して試料とした。

9週齢 BDF₁ 雄マウスを用いる染色体異常試験と優性致死試験では、投与は凍結乾燥試料に蒸留水を加えて混和し、照射タマネギ投与群では1日あたり2g/kg (染色体異常試験のみ)、4g/kg、および8g/kg、非照射タマネギ投与群では8g/kg、陰性対照

表 4. 食品別の照射条件など

食品名	目的	形態	線源	線量	保存条件
タマネギ	発芽防止	そのまま	コバルト 60	0.15 kGy	5℃
コメ	殺虫	玄米	同上	0.5 kGy	5℃
コムギ	殺虫	皮つき	同上	0.5 kGy	5℃
ウインナー	殺菌	そのまま	同上	6 kGy	凍結乾燥, 5℃
かまぼこ	殺菌	そのまま	同上	6 kGy	凍結乾燥, 5℃
ミカン	殺菌	そのまま	電子加速装置	1.5 kGy	濃縮ジュース, -20℃
ジャガイモ	発芽防止	そのまま	コバルト 60	0.15 kGy	24h, EtOH抽出後投与

では蒸留水を、5日間、胃ゾンデを用いて連続投与した。陽性対照はMMS(メチルメタンсульフォネート), 100 mg/kgを1回腹腔投与した。染色体異常試験では各群5頭の雄マウスを用い、最終投与の20時間後に骨髓細胞の染色体標本を作成した。優性致死試験では各群15-19頭の雄マウスを用い、最終投与後8週にわたり、毎週1頭の雄マウスあたり2頭の雌マウスと交配した。交尾確認後、雌マウスは妊娠13日に解剖するまで別ケージで飼育した。妊娠13日目に解剖して黄体数(排卵数の推定)や着床数、生存胚、死胚などを調べた。

(2) コメ

コメの照射は殺虫の目的である。玄米を実用上限の線量である0.5 kGy照射した。細菌を用いる復帰変異試験ではTA100およびTA98の菌株を用いた。これらの菌株ではヒスチジン要求性から非要求性への復帰変異を指標として調べるため、ヒスチジンを含有する試料での試験は問題があることから、試験に用いた80%メタノール抽出液の減圧濃縮物についてアミノ酸分析をした。その結果100gの玄米あたりのアミノ酸の全量は4.275g、そのうちヒスチジンは0.06mgと非常に少ない量であったことからその影響はないと判断した。

宿主経路試験では、1群5頭のマウスを用い、1日1回、上記の試料0.5mLを3日間連続経口投与した。3回目の投与と同時に検定菌液1mLを腹腔内に投与し、3時間後に頸椎脱臼後、生理食塩水1mLを腹腔内に投与して腹腔内の検定菌液を回収して突然変異を調べた。V79細胞を用いる突然変異試験では、100%または80%のメタノール、または水で抽出したものを減圧濃縮して試料原液とした。これらの試料を細胞に16時間作用させ、144時間の発現時間で突然変異の誘発を調べた。in vitro 染色体異常試験ではCHL/IU細胞を用いた。80%メタノールを用いて抽出した玄米エキスを種々の濃度で、24及び48時間処理して標本作製した。チャイニーズ・ハムスターを用いる急性のin vivo 染色体異常試験では、1群5頭(8週齢、平均体重33G、雄)の動物を用い、照射米の高用量投与群ではコメ粉末1gを水1.5 ml、低用量群では1gを水3mlに懸濁し動物体重(g)あたり0.05 mLを胃ゾンデを用いて経口的に1回投与した。一方、混餌投与の試験では、照射米を40%含有する固形餌料を5日間自由に摂食させた。

マウスを用いる優性致死試験では、1群30頭の雄マウスを用い、照射米40%含有固形餌料を6週齢から14週齢までの8週にわたり摂食させた。交配は、投与後1週間の感受性の高い時期に、1頭の雄に対して2頭の雌マウスと交配した。

(3) コムギ

米国産(Dark Northern Spring)のコムギに、実用上限の線量である0.5 kGyを照射し試料を作製した。細菌を用いる突然変異誘発試験ではコムギを70%メタノールに100mg/mLの割合に浮遊させ、室温に4時間放置後試験に用いた。染色体異常試験と宿主経路試験では、コムギ2kgを6Lの70%のメタノールで抽出し、減圧濃縮後、凍結乾燥したものをを用いた(照射コムギ1kg当りの凍結乾燥物重量は58.2gである)。

動物を用いる染色体異常試験では、マウスを用いる小核試験を代替試験として実施した。試料は照射コムギ抽出物を0.5% CMC-Na液に懸濁し、マウス体重あたりそれぞれ72.5、145、290mg/kgを1日1回、5日間にわたって経口投与した。非照射コムギは283mg/kg、陽性対照はMTX(メソトレキセート)、2.5mg/kgをそれぞれ5日間連投した。優性致死試験では、コメの場合と同様に混餌により8週間摂食させ、簡便法により投与後1週間交配した。

(4) ウィンナーソーセージおよびかまぼこ

ウィンナーソーセージおよびかまぼこはそのままの状態を実用上限の約2倍にあたる6kGy照射し、凍結乾燥したものを全ての試験に用いた。in vitro 染色体異常試験では凍結乾燥物のメタノール抽出物をヒトリンパ球およびチャイニーズ・ハムスター細胞に処理した。in vivo でのマウス骨髓細胞の小核試験と優性致死試験試験では、凍結乾燥物を用いて簡便法により試験した。

(5) ミカン

ミカンは1.5kGyで電子線滅菌し、濃縮ジュース(5倍)の状態で-20℃に保存し試験に用いた。細菌を用いる試験では、濃縮ジュースを平板当り、0.5mLおよび1.0mL添加して試験に用いた。マウス小核試験では、各群5頭のマウスに濃縮ジュースを1日2回、5日間経口投与し、最終投与の20時間後に小核標本を作製した。優性致死試験では1群30匹の雄マウスに濃縮ジュースを1日2回、5日間経口投与し、その後4日に1回、8週間にわたり1頭の雌マウス

と交配した。

(6) ジャガイモ

ジャガイモはエタノール抽出物を用いて各試験を実施した。ジャガイモは、わが国において発芽防止の目的で0.15kGy以下の γ 線照射が許可された唯一の食品である。1972年、Kuzinら⁴⁾により照射ジャガイモのエタノール抽出物がマウスにおいて優性致死を誘発するとの報告がなされた事から、照射条件等はその論文に合わせ、照射24時間後エタノール抽出し、抽出物を1日2回、7日間経口投与した。その後、4日に1回、それぞれ1頭の雌マウスと交配し、投与後8週間にわたり交配を続けた。各群30頭の雄マウスを用いた。

(7) 照射コムギ粉による倍数性細胞誘発

照射コムギ粉を動物に長期間与えると倍数性細胞を誘発するというRenner⁵⁾の報告、また栄養失調の子供に照射コムギを与えると倍数性細胞が高くなるというBhaskaramらの報告⁶⁾があることから、照射コムギ粉を照射直後に給餌した場合と、長期間給餌した場合の細胞遺伝的影響について、チャイニーズ・ハムスターとラットを用いて調べた。

i) チャイニーズ・ハムスター

チャイニーズ・ハムスターを用いる実験では、照射コムギ粉の照射条件はRennerの照射滅菌飼料の条件に近い、7.5kGy、15kGy、30kGyを照射した。照射時のラジカル産生による影響を見るため、脱気して窒素ガスに置換した群と置換しない群を設けた。ハムスターへの給餌は、各群6頭のハムスターに、照射8時間後に粉末飼料として8-72時間以内に与えた。給餌開始72時間後に

標本作製し骨髓細胞の倍数性細胞の分析に用いた。また、48時間後および72時間後の末梢血を尾部から採血し、林らの方法⁷⁾により末梢赤血球の小核標本作製した。染色はアクリジンオレンジ染色によった。

ii) ラット

ラットを用いる実験では、コムギ粉の照射はVijayalaxmiら²⁾の線量にあわせ、0.75kGyとした。照射コムギは照射2日後に粉末飼料として、各群9頭のラットに6週間および12週間給餌し、その後骨髓細胞から染色体標本作製した。末梢血からは小核標本作製した。

(8) 照射スパイスの変異原性

試験は、TA100、TA98およびTA102の3菌株を用いる復帰変異試験を実施した。スパイスは黒コショウ、赤トウガラシ、ナツメグ、パプリカを用いた。照射線量は1kGyと10kGyで照射し、超臨界流体抽出により抽出物を作成した。黒コショウについては、50%抽出物も併せて作製した。

5. 試験結果と考察

原子力特定総合研究で実施した7品目の照射食品についての遺伝毒性試験結果を表5に示した。試験した全ての照射食品において、どの試験系においても全て陰性の結果が得られた。それぞれのデータについて述べる。

(1) タマネギ

細菌を用いる復帰変異試験では、試験に用いた4菌株全てにおいて、照射、非照射ともに、また代謝活性化の有無に限らず、変異コロニーの増加は見ら

表5. 7種の照射食品の遺伝毒性試験結果

食品名	細菌		培養細胞			動物個体	
	遺伝子突然変異	宿主経路	遺伝子突然変異	染色体異常	染色体異常	小核	優性致死
タマネギ	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	—	陰性
コメ	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	—	陰性
コムギ	陰性	陰性	—	陰性	—	陰性	陰性
ウィンナー	陰性	陰性	—	陰性	—	陰性	陰性
かまぼこ	陰性	陰性	—	陰性	—	陰性	陰性
ミカン	陰性	—	—	陰性	—	陰性	陰性
ジャガイモ	陰性	—	—	—	—	—	陰性

*全て陰性の結果が得られた

れなかった。また、宿主経路試験においても、同様に全ての用量において対照群との差は見られず、細菌を用いる系では照射タマネギの変異原性は認められないと判断した。

培養細胞を用いる染色体異常試験では、ヒト胎児由来細胞 (HE2144) とチャイニーズ・ハムスター由来 (Don-6) 細胞を用いて、染色体異常と SCE 及び小核の誘発が調べられた。その結果、照射タマネギエキスの凍結粉末は、ヒト細胞に対して照射および非照射群ともに 2mg/ml で著しい分裂抑制が見られた。ハムスター細胞では、照射群では 4mg/ml, 非照射群では 2mg/ml で同様の分裂抑制が見られた。染色体切断に関しては、チャイニーズ・ハムスターでは染色体切断の増加が見られたが、照射群よりむしろ非照射群でやや高く異常が誘発された。ヒト細胞では殆んど影響がなかった。小核の誘発に関しても同様な傾向が見られたが、照射による差はみられなかった。SCE の誘発に関しては、照射、非照射ともに SCE が誘発されたが、照射による差は見られなかった。

マウス (BDF₁) を用いた *in vivo* 染色体異常試験の結果を表 6 に示した。タマネギの凍結乾燥粉末に水に懸濁した照射検体投与のいずれの群においても、対照群と比べて染色体異常の有意な増加は見られなかった。特に、8000mg/kg を 5 日間連続経口投与 (体重 50kg のヒトが生タマネギ 4kg を 5 日間毎日食べる量に相当) するという過酷な条件においても、照射による影響はみられなかった。一方、ラット (Long-Evans 系) の骨髓細胞を用いた染色体異常試験では、経口投与と腹腔内投与の試験をおこなったが、いずれの試験でも照射群と非照射群で有意な

異常誘発は見られなかった。優性致死試験の結果を図 1 に示したが、照射および非照射ともに、黄体数、着床数、生存胚数、死胚数などに、有意な変化はみられず、照射による優性致死の誘発は認められなかった。

(2) コメ

細菌を用いる復帰変異試験では、TA100, TA98 の両菌株共に照射・非照射を問わず変異コロニーの増加は見られなかった。また、宿主経路試験でも照射・非照射において変異誘発は認められなかった。V79 細胞を用いる突然変異誘発試験では、100%, 80%, 水の 3 種の玄米抽出物について照射、非照射および代謝活性化の有無にかかわらず突然変異の有意な増加は認められなかった (表 7)。チャイニーズ・ハムスターの CHL/IU 細胞を用いる染色体異常試験では、照射・非照射の 24 時間および 48 時間処理の何れの条件においても、染色体異常の誘発は認められなかった。

チャイニーズ・ハムスターにコメ粉末を胃ゾンデを用いて経口的に 1 回投与した *in vivo* 染色体異常試験では、高用量、中用量群共に照射および非照射米での有意な染色体異常の増加は見られなかった。一方、照射米 40% 含有の固形餌料を 5 日間自由に摂食させた混餌投与群においても、有意な染色体異常誘発は認められなかった。マウスを用いる優性致死試験では、照射米 40% 含有固形餌料を 6 週齢から 14 週齢までの 8 週にわたり摂食させ、投与後 1 週間に 1 頭の雄に対して 2 頭の雌マウスと交配した結果、照射および非照射群ともに黄体数、着床数、生存胚数、死胚数などに対照群と差がみられず、照射による優性致死の誘発は認められなかった (表 8)。

表 6. 照射タマネギのマウス骨髓細胞における染色体異常試験結果

群	投与量 mg/kg	動物数	分析した 細胞数	構造異常数 (%)	異数性細胞数 (%)
対照		5	500	14 (2.8)	20 (4.0)
照射	2000	5	500	12 (2.4)	18 (3.6)
照射	4000	5	500	9 (1.8)	9 (1.8)
照射	8000	5	500	10 (2.0)	19 (3.8)
非照射	8000	5	500	6 (1.2)	18 (3.6)
MMS	100	5	500	51 (10.2)	23 (4.6)

* 陽性対照として、MMS (メチルメタンсульフォネート) を用いた。
** 凍結乾燥物の水懸濁物を 5 日間連続経口投与、20 時間後に標本作成

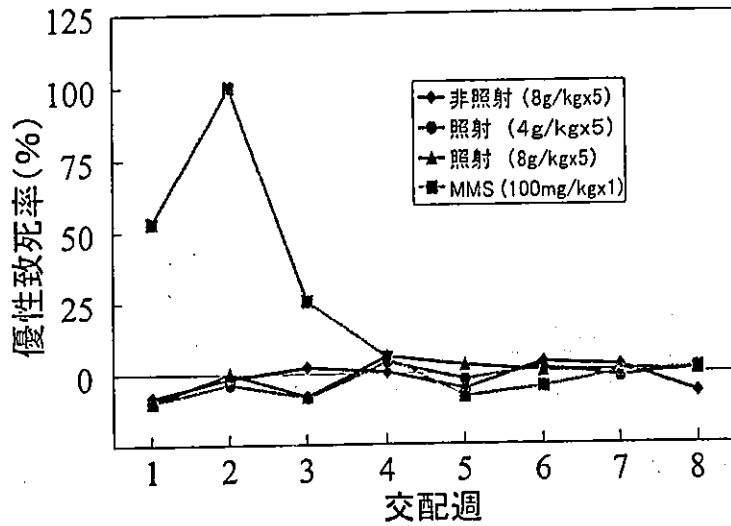


図1. 照射タマネギの優性致死試験結果

表7. 照射コメ抽出物の V79 細胞を用いる突然変異試験結果

抽出物濃度* (ul/mL)	播種細胞数	変異コロニー数 平均 (/dish)	生存率	突然変異頻度 (x 10 ⁵)
対照 (非照射コメ)	2 x 10 ⁵	2.0	63.7	1.57
0.1	2 x 10 ⁵	1.8	52.9	1.66
0.5	2 x 10 ⁵	1.6	61.7	1.21
1.0	2 x 10 ⁵	2.5	58.2	2.15
2.0	2 x 10 ⁵	2.3	66.5	1.69
(照射コメ)				
0.1	2 x 10 ⁵	1.5	63.8	1.18
0.2	2 x 10 ⁵	2.3	65.4	1.72
1.0	2 x 10 ⁵	3.7	69.3	2.65
2.0	2 x 10 ⁵	1.8	58.6	1.49

* 80%メタノールで抽出し、減圧濃縮した。

表8. 照射コメの優性致死試験結果

群	投与雄数	妊娠雌数 / 交配雌数	妊娠雌あたりの			優性致死率 (%)
			黄体数	着床数	生存胎児数(平均)	
対照	30	55/60	9.4	9.2	8.7	—
非照射 コメ	30	58/60	9.6	9.0	8.7	— 0.2
照射 コメ	27	50/54	9.5	9.0	8.8	— 0.8
MMS*	15	28/30	9.5	7.7	5.1	40.9

* 陽性対照として、MMS (メチルメタンсульフォネート, 10.0mg/kg x 14) を用いた。
** 玄米粉末を飼料に40%加え、8週間給餌後、1匹の雄に対し2匹の雌と1週間交配した。

(3) コムギ

細菌を用いる突然変異試験では、試験に用いた6菌株全てにおいて、照射・非照射を問わず突然変異の誘発はみられなかった。マウス宿主経路試験では、1群6頭のマウスに1% CMC-Na水溶液にコムギエキスを懸濁して、3日間経口投与したが、腹腔内より回収した検定菌液において照射・非照射ともに変異コロニーの誘発は認められなかった。培養細胞 (CHL/1U) を用いる染色体異常試験では、コムギ抽出物を0.8mg/mL, 1.0mg/mL, 1.5mg/mLの3濃度を24時間および48時間処理したが、照射・非照射群ともに染色体異常の有意な誘発は認められなかった。マウスを用いる小核試験ではコムギ抽出物を72.5mg/kg, 145mg/kg, 290mg/kg, 5日間経口投与し、骨髓細胞の小核を観察した。マウスへの投与量290mg/kgは、体重50kgのヒトの場合、コムギ250gに相当する量である。小核を有する多染色赤血球の出現頻度は照射、非照射ともに有意な上昇

は認められなかった(表9)。照射コムギを40%含む固形飼料を8週間与えた照射・非照射群においても有意な優性致死誘発率は認められなかった(表10)。Bhaskaramら⁶⁾は、栄養失調の子供達に照射コムギを与えた実験では、リンパ球の倍数性細胞が6週目にピークになり、その原因として、貯蔵すると分解するようなコルヒチン様の物質がガンマ線照射により生成される可能性をあげている。仮にその考えが正しいと仮定すると、小核試験や優性致死試験においても何らかの作用が見られても良いと考えるが、何れの試験も陰性の結果となった

(4) ウィンナーソーセージおよびかまぼこ

ウィンナーソーセージおよびかまぼこは実用線量上限の約2倍にあたる6kGy照射し、メタノール抽出物の凍結乾燥物を得た。細菌を用いる突然変異試験、マウスによる宿主経路試験、ヒトリンパ球およびチャイニーズ・ハムスター細胞を用いるin vitro染色体異常試験では何れも陰性の結果が得られた。

表9. 照射コムギ抽出物のマウス小核試験結果

群	投与量** (mg/kg)	動物数	分析細胞数	小核保有 細胞数	誘発頻度 (1000個あたり)
対照 (0.5% CMC Na)	x 5	5	7500	13	1.73
照射コムギ	72.5 x 5	5	7500	14	1.86
照射コムギ	145 x 5	5	7500	18	2.4
照射コムギ	290 x 5	5	7500	19	2.53
非照射コムギ	283 x 5	5	7500	20	2.66
MTX *	2.5 x 5	5	7500	91	12.13

* 陽性対照として、MTX (メソトレキセート) を用いた。

** 70%メタノール抽出物を凍結乾燥して調整した。

表10. 照射コムギの優性致死試験結果

群	投与雄数	妊娠雌数 / 交配雌数	妊娠雌あたりの			優性致死率 (%)
			黄体数	着床数	生存胎児数(平均)	
対照	30	55/60	10.4	10.0	9.5	—
非照射 コムギ	30	53/60	10.3	9.8	9.3	— 2.2
照射 コムギ	30	50/60	10.5	9.9	9.4	— 0.8
MC *	10	15/20	9.3	7.3	6.5	22.6

* 陽性対照として、MC (マイトマイシン-C, 0.5mg/kg x 14) を用いた。

** 粉末を飼料に加え、8週間給餌後、1匹の雄に対し2匹の雌と1週間交配した。

また、動物を用いたマウス骨髄細胞の小核試験においても陰性となった。ウインナーソーセージおよびカマボコの凍結乾燥物をそれぞれ飼料に加えて8週間給餌した優性致死試験においては、両試験ともに、照射による優性致死の作用は認められなかった(表11, 12)。

(5) ミカン

細菌を用いる復帰変異試験では6菌株を用いたが、S9(-), S9(+)のいずれの条件下においても変異の誘発は認められなかった。ただし、TA100においては照射の有無にかかわらず突然変異率がやや増加(約2倍程度)したが、これはミカンに含まれるある種の成分により変異が誘発されるることが知られていることから、照射に起因するものではないと判断した。染色体異常試験においても陰性となった。マウス小核試験、優性致死試験では、ミカン濃縮ジュース(5倍)を1日2回、5日間経口投与したが、何れの試験においても照射・非照射群ともに有意な誘発は見られなかった(図2)。

(6) ジャガイモ

実施した全ての試験で陰性の結果が得られた。照射食品の中で陽性の結果が報告されている優性致死試験では、照射ジャガイモのエタノール抽出物で照射・非照射両群共に、精子形成過程の全過程において陽性の結果を示すような傾向は見られなかった(図3)。Kuzinら⁴⁾は、照射ジャガイモのエタノール抽出物がマウスに対して優性致死を誘発すると報告した。これが照射食品で遺伝学的な危険性を指摘した唯一の報告である。照射により毒物(ラジオトキシン)ができるためと説明されたが、1群あたりの雄マウスも5頭と少なく(通常は、15~30頭)、また、マウスの系統も定かでない事から、試験の再現性に問題があった事が考えられる。その後彼らは、加熱貯蔵中にラジオトキシンは消滅する事を報告した。また、分析化学的な方法でも検出できなかった。その後、IFIP(International Project in the Field of Food Irradiation, Karlsruhe, Germany)がカナダのBio-Research Laboratories Ltd.に依頼して

表11. 照射ウインナーソーセージの優性致死試験

群	投与雄数	妊娠雌数 / 交配雌数	妊娠雌あたりの			優性致死率 (%)
			黄体数	着床数	生存胎児数(平均)	
対照 非照射	30	56/60	10.9	9.8	9.1	—
ソーセージ 照射	30	60/60	11.1	10.6	10.2	— 12.1
ソーセージ MMS*	30 10	54/60 17/20	11.0 8.7	10.4 6.6	10.0 4.0	— 9.9 56.0

*陽性対照として、MMS(メチルメタンスルフォネート, 12.5mg/kg x 14)を用いた。
*凍結乾燥物を飼料に加え、8週間給餌後、8日間、1匹の雄に対し2匹の雌と交配した。

表12. 照射かまぼこの優性致死試験結果

群	投与雄数	妊娠雌数 / 交配雌数	妊娠雌あたりの			優性致死率 (%)
			黄体数	着床数	生存胎児数(平均)	
対照 非照射	30	56/60	10.9	9.8	9.1	—
かまぼこ 照射	30	58/60	11.2	10.5	10.1	— 11.0
かまぼこ MMS*	30 10	57/60 17/20	11.3 8.7	10.3 6.6	9.8 4.0	— 7.7 56.0

*陽性対照として、MMS(メチルメタンスルフォネート, 12.5mg/kg x 14)を用いた。
*凍結乾燥物を飼料に加え、8週間給餌後、8日間、1匹の雄に対し2匹の雌と交配した。

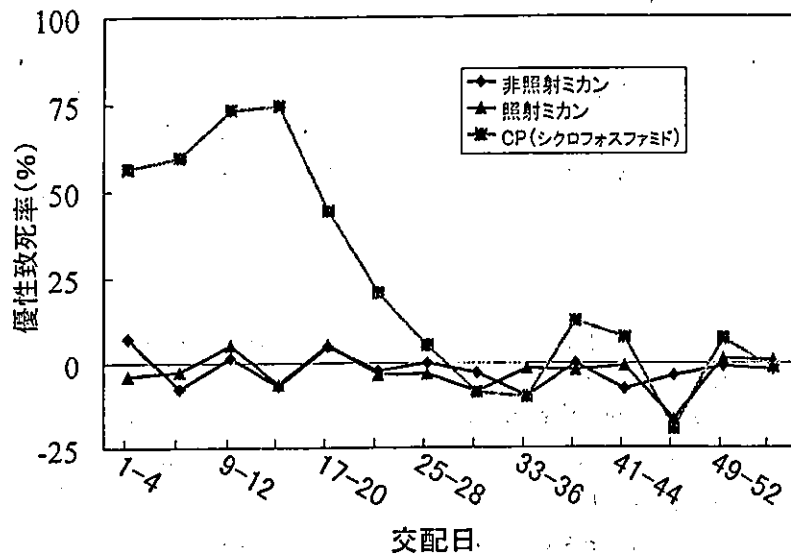


図2. 照射ミカンの優性致死試験結果

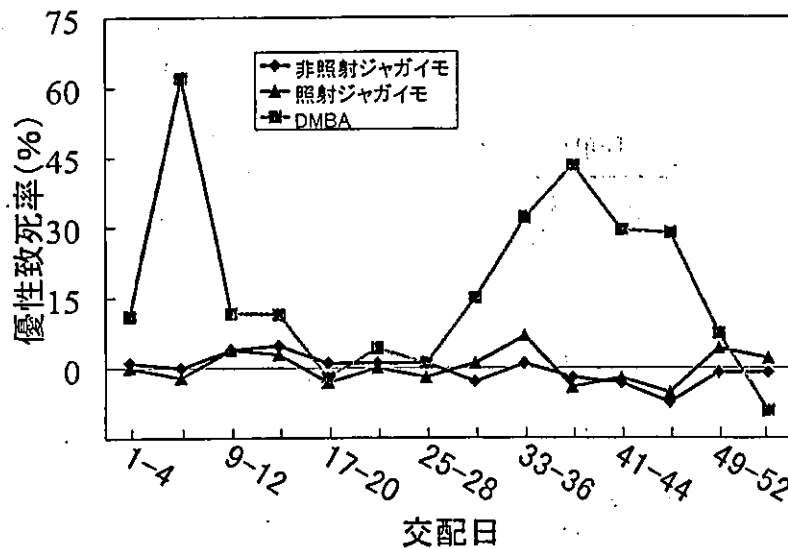


図3. 照射ジャガイモの優性致死試験結果

行った試験⁶⁾でも陰性の結果が得られているが、その試験においても1群5頭の雄マウスしか用いてなく、投与後の交配期間は5週間と十分な条件ではなかった。一方、本研究で実施した優性致死試験では、動物は常に安定した結果の得られるBDF₁マウス(C57BLとDBAの近交系間交配F₁マウス)を用い、1群30頭の雄に対し、4日に1回、連続8週間の交配を行っており、実験の信頼度も極めて高いと考える。以上の結果より、先に報告された陽性の報告に関する再現性は得られず、照射ジャガイモに関

しては遺伝毒性の可能性はないと結論した。

(7) 照射コムギ粉による倍数性細胞の誘発

i) チャイニーズ・ハムスター

照射コムギ粉の給餌開始48時間および72時間後の末梢血中の小核分析では何れの照射群においても小核の有意な増加はみられなかった。活性酸素の生成を抑制する目的で空気を窒素ガスに置換した群と置換しない群それぞれにおいて、非照射群との間で検定の繰り返しによる多重性を考慮してFischerの確立計算法により検定を行った結

果、どの処理群においても倍数性細胞の有意な増加や、線量依存的な倍数性細胞の誘発は見られなかった⁹⁾ (表 13, 14)。

ii) ラット

照射コムギ粉の給餌開始6週と12週後の末梢血中の小核については、何れの条件においても有意な増加は見られなかった。また、12週後のラット骨髓細胞における倍数性細胞についても非照射群との間に有意な増加は見られなかった。

本実験では動物飼料の殺菌線量レベルである30kGyを含み、7.5kGy, 15kGy, 30kGyの線量で照射したコムギ粉を、照射8時間後に飼料に加えて3日間ハムスターに給餌した。しかしながら、骨髓細胞において明らかな倍数性細胞の誘発は見られなかった (表 15, 16)。また、本実験と同様

に Tesh ら (1977) も、倍数性細胞と小核誘発に関して照射による影響はないことを報告¹⁰⁾している。Renner⁵⁾は、照射後3日以内に照射飼料を与えた場合、非照射群に比べて倍数性細胞が増加し、照射6週間保存した後に飼料を与えた場合にはその影響がないことを報告している。このことは、照射によってラジカルが生成され、倍数性細胞を誘発するような成分の変化をきたしている可能性が示唆された。そこで本実験では、ガンマ線照射によるH₂O₂その他の活性酸素種の生成を抑える目的で、照射時のコムギ粉中の空気を窒素に置換した群と置換しない群を設けて実験を行った。しかしながら、何れの条件下においても倍数性細胞の生成に顕著な差は見られず、倍数性細胞に影響を及ぼすような変化はみられなかった。

表 13. 照射コムギ粉の経口投与によるチャイニーズ・ハムスター末梢血での小核誘発

照射線量(kGy)	給餌期間 (hrs)	動物数	分析細胞数	小核を有する細胞	%
非照射	48	6	6000	8	0.13
	72	—	6000	21	0.35
7.5 in N ₂	48	6	6000	14	0.23
	72	—	6000	15	0.25
15 in N ₂	48	6	6000	14	0.23
	72	—	6000	15	0.25
30 in N ₂	48	6	6000	14	0.23
	72	—	6000	15	0.25
7.5 in air	48	6	6000	14	0.23
	72	—	6000	15	0.25
15 in air	48	6	6000	14	0.23
	72	—	6000	15	0.25
30 in air	48	6	6000	14	0.23
	72	—	6000	15	0.25

表 14. 照射コムギ粉の経口投与によるチャイニーズ・ハムスター骨髓細胞でのポリプロロイド誘発

照射線量(kGy)	給餌期間 (hrs)	動物数	分析細胞数	小核を有する細胞	%
非照射	72	6	13200	10	0.076
7.5 in N ₂	72	6	13200	5	0.038
15 in N ₂	72	6	13200	20	0.152
30 in N ₂	72	6	13200	21	0.159
7.5 in air	72	6	13200	7	0.053
15 in air	72	6	13200	24	0.182
30 in air	72	6	13200	20	0.152

表 15. 照射コムギ粉の経口投与によるラット末梢血中の小核誘発

照射線量 (kGy)	給餌期間 (週)	動物数	分析細胞数	小核を有する細胞	%
0.00	6	9	9000	10	0.11
0.75	6	8	8000	10	0.13
0.00	12	9	9000	14	0.16
0.75	12	8	8000	5	0.06

表 16. 照射コムギ粉の経口投与によるラット骨髓細胞でのポリプロイド誘発

照射線量 (kGy)	給餌期間 (週)	動物数	分析細胞数	小核を有する細胞	%
0.00	12	9	10800	5	0.05
0.75	12	8	9479	9	0.09

表 17. TA98, TA100, TA102 株におけるガンマ線照射クロコショウ 50%エタノール抽出物の変異原性誘発

抽出物量 (μ L/plate)	S9	TA98			TA100			TA102		
		0 kGy	1 kGy	10 kGy	0 kGy	1 kGy	10 kGy	0 kGy	1 kGy	10 kGy
0	—	21	26	26	121	129	128	316	256	256
5	—	20	19	19	145	81	85	181	150	115
10	—	11	20	20	142	100	93	168	142	84
20	—	11	20	20	103	102	94	79*	63*	40
50	—	16	23	23	121	101	77	30*	7*	5
100	—	12	26	36	120*	82*	67*	4*	0*	0
0	+	20	29	29	137	98	98	358	273	273
5	+	47	55	58	119	124	121	326	252	220
10	+	68	48	54	128	116	115	304	215	194
20	+	69	46	49	107	95	124	251	176	125*
50	+	19	43	33	114	97	109	71*	32*	26*
100	+	11	25	20	105	106	102	18*	0*	0*

*: 生育阻害がみられた

Vijayalaxmi ら²⁾ は、0.75kGy の放射線を照射したコムギを含む飼料をマウス、ラット、サルなどに長期間与えると倍数性細胞を誘発するという報告をしている。そこで本実験では、ラットに12週間給餌し、骨髓細胞の倍数性細胞誘発と、末梢赤血球中の小核誘発を調べた。その結果、12週後のラット骨髓でも倍数性細胞の誘発は見られず、6週後と12週後に調べた末梢赤血球の小核についても有意な増加は認められなかった (表 16)。

以上の結果より、前述の原子力特定総合研究で実施した照射コムギの遺伝毒性試験結果がすべて陰性である事も考慮し、国外で報告されている初期の陽

性結果^{2), 3), 5), 6)} については再現性が得られず、照射コムギ粉による遺伝毒性作用はないものとする。

(8) 照射スパイスの変異原性

黒コショウでは、エタノール抽出物と超臨界流体抽出による抽出法の違いによる変異原性の比較をしたところ、いずれの抽出物でも TA98 においてのみ代謝活性化法で照射、非照射ともに弱い変異コロニー数の増加が認められたが、照射によって増加することはなく (表 17)、また抽出法による差も認められなかった。赤トウガラシでは、非照射の TA98 の代謝活性化法において、対照の2倍程度の変異コロニー数増加が認められたが、照射群については変