

Table 1. Migration of nuclear DNA from organs of mice treated with Food colors

Food color	Administration		Sampling time	Migration (μm , Mean \pm SEM of 4 animals)							
	Route	Number		Dose	Stomach	Colon	Liver	Kidney	Bladder	Lung	Brain
Food Red 2	Gavage	-	-	5.91 \pm 0.73	5.60 \pm 0.88	3.07 \pm 0.51	1.16 \pm 0.44	6.01 \pm 0.81	2.20 \pm 0.44	1.06 \pm 0.67	0.90 \pm 0.57
		1	2000 mg/kg	9.27 \pm 1.98	40.4 \pm 3.45*	8.78 \pm 3.20	1.29 \pm 0.49	8.92 \pm 2.52	6.07 \pm 1.28	5.78 \pm 1.61	1.11 \pm 0.64
		1	2000 mg/kg	16.2 \pm 1.13*	10.3 \pm 0.67	10.8 \pm 2.71	5.31 \pm 1.79	15.2 \pm 1.88*	6.47 \pm 1.50	2.79 \pm 1.16	3.44 \pm 0.41
Food Red 102	Drinking	-	-	6.07 \pm 0.56	3.98 \pm 0.97	1.91 \pm 0.77	1.94 \pm 0.22	6.24 \pm 0.76	1.99 \pm 0.31	0.98 \pm 0.62	1.65 \pm 0.61
		-	2.5%	18.2 \pm 1.54*	15.7 \pm 1.02*	0.95 \pm 0.36	2.09 \pm 0.45	5.40 \pm 0.80	1.86 \pm 0.62	0.98 \pm 0.35	0.54 \pm 0.37
		-	2.5%	27.0 \pm 3.11*	7.11 \pm 2.03	2.09 \pm 0.72	1.34 \pm 0.55	5.03 \pm 1.07	2.76 \pm 0.53	1.83 \pm 0.66	0.70 \pm 0.40
		-	2.5%	3.59 \pm 0.25	3.74 \pm 0.62	1.99 \pm 0.34	2.14 \pm 0.42	4.62 \pm 0.83	1.45 \pm 0.32	0.88 \pm 0.51	0.95 \pm 0.55
		-	2.5%	6.48 \pm 0.82	5.04 \pm 1.19	2.12 \pm 0.90	2.68 \pm 0.54	3.72 \pm 0.87	2.37 \pm 0.56	1.42 \pm 0.56	0.62 \pm 0.36
Food Red 102	Gavage	1	-	7.21 \pm 0.64	6.32 \pm 0.79	1.67 \pm 0.82	1.93 \pm 0.64	5.89 \pm 0.24	3.47 \pm 0.22	1.36 \pm 0.51	1.29 \pm 0.66
		1	2000 mg/kg	28.8 \pm 4.09*	38.2 \pm 3.18*	6.00 \pm 0.72	4.36 \pm 0.73	18.4 \pm 0.22*	5.83 \pm 1.08	3.67 \pm 1.03	0.72 \pm 0.42
		1	2000 mg/kg	15.0 \pm 1.51	15.4 \pm 2.11	12.8 \pm 1.81*	13.0 \pm 2.05*	24.2 \pm 3.08*	13.9 \pm 0.26*	3.15 \pm 0.76	3.59 \pm 1.38
DAB	Drinking	-	-	11.1 \pm 1.40*	9.60 \pm 0.24	1.96 \pm 0.66	2.87 \pm 0.78	6.68 \pm 0.72	2.87 \pm 0.61	0.70 \pm 0.46	0.72 \pm 0.43
		-	2.5%	3.90 \pm 0.65	4.23 \pm 0.89	2.40 \pm 0.69	0.96 \pm 0.48	3.20 \pm 0.20	2.48 \pm 0.51	1.55 \pm 0.61	0.67 \pm 0.46
		-	2.5%	4.49 \pm 0.84	4.75 \pm 0.71	1.19 \pm 0.40	0.96 \pm 0.58	4.26 \pm 0.57	1.19 \pm 0.09	1.42 \pm 0.58	0.60 \pm 0.36
		-	2.5%	4.44 \pm 0.66	3.98 \pm 0.70	2.32 \pm 1.08	1.19 \pm 0.48	4.39 \pm 0.34	2.22 \pm 0.39	0.98 \pm 0.54	0.70 \pm 0.43
	Gavage	1	-	6.37 \pm 0.57	4.78 \pm 0.60	1.94 \pm 0.36	2.54 \pm 0.46	3.00 \pm 0.55	2.89 \pm 0.43	1.26 \pm 0.45	1.14 \pm 0.55
Feeding		1	100 mg/kg	12.6 \pm 1.96	24.6 \pm 1.20*	2.74 \pm 1.74	2.94 \pm 1.70	17.8 \pm 1.36*	3.89 \pm 2.27	1.89 \pm 0.23	2.66 \pm 0.47
		1	100 mg/kg	26.4 \pm 2.00*	21.4 \pm 2.23*	1.42 \pm 0.33	3.07 \pm 0.79	11.0 \pm 1.34*	4.77 \pm 0.36	4.34 \pm 1.12	1.27 \pm 0.85
		3	100 mg/kg	9.00 \pm 2.11	10.3 \pm 2.49	20.5 \pm 5.17*	1.83 \pm 0.69	7.02 \pm 0.48	6.07 \pm 1.31	0.88 \pm 0.55	0.96 \pm 0.48
		-	560 ppm	5.19 \pm 0.45	4.29 \pm 0.62	0.80 \pm 0.52	1.01 \pm 0.37	8.05 \pm 2.16	1.24 \pm 0.49	1.19 \pm 0.25	0.98 \pm 0.42
		-	560 ppm	7.67 \pm 1.13	7.49 \pm 1.87	8.62 \pm 4.01*	1.37 \pm 0.64	5.65 \pm 1.40	3.02 \pm 0.40	1.01 \pm 0.20	0.52 \pm 0.39
	-	560 ppm	6.32 \pm 0.77	5.11 \pm 0.84	23.4 \pm 1.84*	0.88 \pm 0.36	4.67 \pm 0.89	1.16 \pm 0.28	1.68 \pm 0.33	2.76 \pm 1.60	
	-	560 ppm	6.81 \pm 1.13	6.06 \pm 1.49	21.7 \pm 1.32*	3.49 \pm 1.47	4.47 \pm 0.55	3.61 \pm 0.91	1.11 \pm 0.40	0.54 \pm 0.21	

Significant difference from control: * p<0.05.

における食用色素の摂取から標本作製までの時間間隔は強制経口投与における投与と標本作製の時間間隔ほぼ同等と考えられる。混水投与では一日当たりの最大摂取用量が 3125 mg/kg と強制経口投与の最高用量 2000 mg/kg よりも高いにも関わらず、Migration の値は混水投与のほうが強制経口投与よりも低い傾向にあった。

DABを560 ppmで混餌投与したときの摂取用量は114.4 mg/kg/dayであり、強制経口投与の用量である100 mg/kgとほぼ同程度であった。なお、DABを混餌投与したときも6日間の投与期間において体重の減少はみられなかった。DABの強制投与では、一回投与後に腺胃、結腸、肝等でMigrationの有意な増大がみられた。DABの混餌投与では、投与1日目に膀胱でMigrationの増大がみられた。しかしながら、癌原性標的臓器である肝では投与1日目ではMigrationの有意な増大は見られず、投与期間の延長とともにMigrationが増大する傾向がみられた。

D. 考 察

赤色2号、赤色 102 号は一回強制経口投与では消化管系を中心に投与 3 時間後に遺伝毒性を示した。混水投与では、癌原性が陰性とされている赤色2号、赤色 102 号は投与期間が2日程度と短い場合には消化管系を中心に遺伝毒性を示したが、投与期間の延長とともにその遺伝毒性は消失した。対照として用いた DAB はその肝癌原性から食用色素として使用が禁止されているが、癌

原性標的臓器である肝では食用色素の場合とは逆に投与期間の延長とともに遺伝毒性の増大がみられた。これらの結果から、遺伝毒性試験の結果には投与形態が重大な影響を及ぼすこと、1週間程度の自由摂取による遺伝毒性のデータのほうが1回の強制投与よりも癌原性試験の結果と乖離しない傾向にあることが示唆された。津田らはマウスにおいて赤色2号は経口、腹腔内のいずれの一回投与でも結腸に遺伝毒性がみられるが、総胆管結繫を施したマウスでは腹腔内投与では結腸に遺伝毒性がみられないことをコメントアッセイによって示し、腹腔内投与では腸管より吸収された赤色2号の腸内細菌代謝物が腸肝循環によって腸管に戻りDNA 損傷を誘発すると考察した(日本獣医学会口頭発表、2002、岐阜)。このことから、Azo 色素の遺伝毒性には腸内細菌による代謝が重要な役割を示すと考えられた。混水投与による投与期間の延長に伴う遺伝毒性の減弱は、このような代謝が投与期間の延長により変化する可能性を示すものとも考えられる。我々が食用色素に暴露される場合は、長期の混水・混餌投与の形態に類似するものである。このことから、今回の本研究の結果は急性的な投与での遺伝毒性陽性の結果をヒトに直接外挿して議論することができないことを示すものとも言える。また、津田らは赤色2号の強制経口投与によってマウスにおいては消化管を中心に遺伝毒性がみられるが、ラットでは遺伝毒性がみられないことを示した(日本獣医学会口頭発表、2002、岐阜)。このことから、Azo 色素の遺伝毒性に

重要な役割を果たすと考えられる腸内細菌代謝には種によって大きな相違があると考えられた。そのため、マウスでみられたことがヒトで必ずみられるとは限らない。癌原性試験が陰性であっても、急性的な投与で遺伝毒性がみられることも事実であり、これらの食用色素の安全性評価にはヒトにおける代謝等の検討も必要であると考えられる。

E. 結 論

投与形態は in vivo 遺伝毒性試験の結果にはが重大な影響を及ぼすこと、1週間程度の自由摂取による遺伝毒性のデータのほうが1回の強制投与よりも癌原性試験の結果と乖離しない傾向にあることが示唆された。

参考文献

- [1] Sasaki, Y.F., S. Kawaguchi, A. Kamaya, M. Ohshita, K. Kabasawa, K. Iwama, K. Taniguchi and S. Tsuda (2002) The comet assay with eight mouse organs: Results with 39 currently used food additives, *Mutation Res.*, 519, 103-119.
- [2] Yuan J.H. Goel T.J., Abdo K., Clark J., Espinosa O., Bugge C., Garcia D, Effects of gavage versus dosed feed administration on the toxicokinetics of benzyl acetate in rats and mice, *Food Chem., Toxicol.*, 33 (1995), 151-158.
- [3] Sasaki, Y.F., Tsuda, S., Izumiyama, F., and Nishidate, E. (1997) Detection of chemically induced DNA lesions in multiple

mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow) using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay. *Mutation Res.* 388, 33-44.

[4] IARC (1975a) Amaranth, in IARC Monographs on the Evaluation of the carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Some Aromatic Azo Compounds, vol. 8, pp.41-51, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Geneva.

[5] IARC (1987) Overall evaluation of carcinogenicity, An updating of IARC Monographs volumes 1 to 42, Supplement 7, p.56, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Geneva.

[6] IARC (1975) p-Dimethylaminoazobenzene, in: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenesis Risk of Chemicals to Man, Vol. 8, IARC, Lyon, (France), pp.125-139.

F. 健康危険情報

「なし」

G. 研究発表

「なし」

H. 知的財産権の出願・登録状況

「なし」

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）
分担研究報告書

化学物質の遺伝毒性における生物学的閾値に関する研究

分担研究者 太田 敏博 東京薬科大学・生命科学部・助教授

細菌を用いる復帰突然変異試験法で、食品関連の変異原であるヘテロサイクリックアミン類について、ヌクレオチド除去修復欠損 (uvrB) 変異株の TA98 株とその野生株である TA1978P 株を用いて、フレームシフト突然変異の誘発用量を比較した。

Trp-P-1, Trp-P-2, MeIQ について調べた結果、いずれの場合も DNA 修復欠損株で明らかに変異コロニーを誘発する用量、つまり DNA 損傷（付加体形成）により突然変異が生じる用量においても、正常な DNA 修復能をもつ株では変異コロニーの誘発が認められておらず、生物学的な閾値が存在することを示唆していた。

A. 研究目的

遺伝毒性には閾値が存在しないという考え方がこれまで一般的に受け入れられてきたが、近年 DNA を直接標的としない物質、例えば細胞分裂阻害剤や DNA 合成阻害剤など、DNA 以外の酵素や蛋白などへの影響によってもたらされる遺伝毒性には閾値が存在するとの考え方が国際的にも急速に受け入れられてきている。一方、DNA を直接標的とする物質には閾値が存在しないという考え方は依然として広く浸透しており、化学物質の安全性評価においてもこの考え方が支配的な状態にあるといえる。閾値という概念にはいくつかの定義付けがなされているが、最近生

物学的な閾値 (biological threshold) という考え方が提唱されている。これは DNA を直接標的とする物質が DNA と直接作用する場がありながら、最終的な影響（例えば突然変異）の発現に必要とする全ての生物学的なプロセスが完遂できない（例えば DNA 修復メカニズムにより）低用量域が存在する、という考え方である。昨年度の本研究ではアルキル化剤など直接変異原について、野生株と DNA 修復欠損株との間での突然変異頻度を比較した。今年度は代謝活性化を必要とする間接変異原について、ヘテロサイクリックアミン類を用いて調べた。

B. 研究方法

1. 変異原と代謝活性化系

変異原の Trp-P-1, Trp-P-2, MeIQ、および代謝活性化系 S9mix 調製のための S9 分画とコファクター混合液は和光純薬工業より購入した。変異原は dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解させて用いた。

2. 試験菌株

Salmonella typhimurium

TA1978P (pKM101): hisD3052, rfa

TA98 (pKM101): hisD3052, rfa, uvrB

両菌株は DNA 修復遺伝子 (uvrB) の欠損以外については isogenic である。

3. 復帰突然変異試験

被験物質溶液 0.05mL、S9mix 0.5 mL、テスト菌株の培養液 0.1 mL を試験管に入れ、良く混合し 37°C で 20 分間プレインキュベーションした。2 mL のトップアガーを加え、直ちに最少グルコース寒天プレート上に広げて固めた。プレートを 37°C で 48 時間培養した後、His+復帰変異コロニー数を測定した。試験には各用量に 2 枚のプレート (対照群は 6 枚) を用い、2~3 回の実験の平均値を求めた。

C. 研究結果

1. Trp-P-1 の変異原性

TA98 株に対しては 0.00005~0.0005 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の用量では変異原性は検出されず、0.001 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の用量で陰性対照値

よりも変異コロニー数の増加が認められた。一方、TA1978P 株に対しては 0.05 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以下の用量では変異原性はみられず、0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の用量から変異コロニー数の増加が認められた。変異原性が認められない最大用量に両株で 100 倍の差があった。(Fig.1)

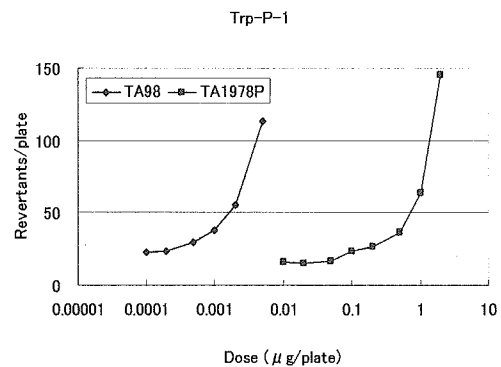


Fig. 1 Trp-P-1 の変異原性

2. Trp-P-2 の変異原性

TA98 株に対しては 0.00005~0.0002 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の用量では変異原性は検出されず、0.0005 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の用量で陰性対照値よりも変異コロニー数の増加が認められた。一方、TA1978P 株に対しては 0.02 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以下の用量では変異原性は認められず、0.05 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の用量から変異コロニー数の増加が認められた。変異原性が認められない最大用量に両株で 100 倍の差があった。(Fig.2)

3. MeIQ の変異原性

TA98 株に対しては 0.00001~0.0001 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の用量では変異原性は検出され

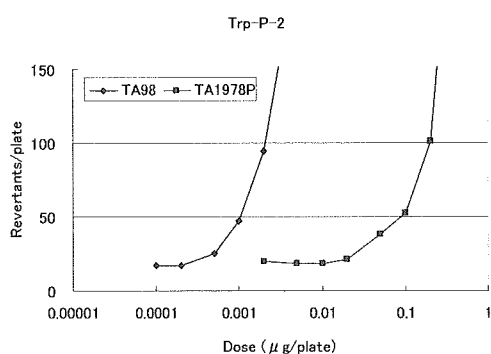


Fig. 2 Trip-P-2 の変異原性

ず、0.0002μg/plate 以上の用量で陰性対照値よりも変異コロニー数の増加が認められた。一方、TA1978P 株に対しては 0.005 μg/plate 以下の用量では変異原性はみられず、0.01 μg/plate 以上の用量から変異コロニー数の増加が認められた。変異原性が認められない最大用量に両株で 50 倍の差があった。(Fig.3)

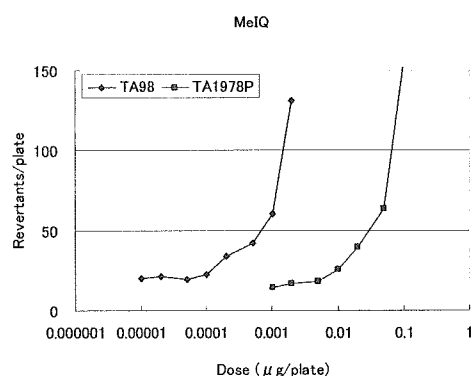


Fig 3 MeIQ の変異原性

D. 考察

代表的な突然変異検出系である細菌を用

いる復帰突然変異試験について、TA1975、TA1535 (*uvrB*) YG7104 (*uvrB, ogt*) を用い、アルキル化剤の突然変異誘発性を比較した。

また、非アルキル化剤で塩基置換変異を誘発する変異原については、ヌクレオチド除去修復欠損株の TA1535 (*uvrB*) および WP2*uvrA* (*uvrA*) とそれらの野生株である TA1975 および WP2 株を用いて、突然変異誘発性を比較した。一方、フレームシフト変異については TA1538 (*uvrB*) 株とその野生株である TA1978 株と比較した。

いずれの場合にも DNA 修復欠損株で明らかに変異コロニーを誘発する用量、つまり DNA の障害により突然変異が生じうる用量においても、正常な DNA 修復能をもつ株では変異コロニーの誘発が認められておらず、生物学的な閾値が存在することを示唆している。今後、このような考え方が細菌のみならず、他の生物種に拡大できる可能性について検討する必要があると考えられる。

E. 結論

DNA を直接標的とする変異原物質について細菌を用いる復帰突然変異試験で、DNA 修復能の有無による突然変異誘発の違いを調べた。DNA 修復欠損株で明らかに変異コロニーを誘発する用量においても DNA 修復能をもつ野生株では変異コロニーの誘発が認められておらず、生物学的な閾値が存在すると考えられる。

F. 健康危険情報

「なし」

G. 研究発表

1. Watanabe-Akanuma, M. and T. Ohta, Inhibitory effects of NADH/NADPH in S9mix on photo-mutagenicity of thiabendazole following UVA-irradiation in *E. coli*. Environ. Mutagen Res., 27, 7-12 (2005)

2. Watanabe-Akanuma, M., T. Ohta, and Y. F. Sasaki, A novel genotoxic aspect of thiabendazole as a photomutagen in bacteria

and cultured human cells. Toxicol. Lett., 158, 213-219 (2005)

3. 祖父尼俊雄, 能美健彦, 太田敏博, 林真, 遺伝毒性 : DNA 直接作用物質に閾値は存在するのか, 環境変異原研究, 27, 61-73 (2005)

H. 知的財産権の出願・登録状況

「なし」

アカネ色素のラット腎臓および肝臓における不定期 DNA 合成試験

分担研究者： 田中 憲徳 （財）食品薬品安全センター秦野研究所 遺伝毒性部長

アカネ色素は、セイヨウアカネ(*Rubia tinctorum* LINNE)の根から抽出される着色料で、アリザリンおよびルベリトンを主成分とする。本色素は「既存添加物名簿」に記載された（いわゆる天然の）添加物として、これまで使用が認められてきたが、平成16年7月に内閣府の食品安全委員会における食品健康影響評価、および厚生労働省の薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会における審議を経て、アカネ色素は、「食品に使用してはならない」とこととされた。本研究は、アカネ色素がこれまでの安全性試験の結果から、遺伝子に直接作用して発がん性が示唆されていることを考慮し、*in vivo* 標的臓器においてDNAの切断・修復が惹起されているかについて検索した。その結果、アカネ色素投与群では、投与3時間後の肝細胞および近位尿細管上皮細胞でUDS誘発細胞の有意な増加が認められた。遠位尿細管では、有意な差はなかったものの、溶媒対照群より3倍強の出現があった。一方、投与6および24時間後では、肝細胞、近位尿細管上皮細胞および遠位尿細管上皮細胞ともに有意な差は認められず、経時的に減少した。以上のことから、アカネ色素投与により肝臓および腎臓組織においてDNAに直接傷害を生じていることが示唆された。

A. 研究目的

天然着色料として使用されているアカネ色素は、ラットを用いた発がん試験により腎臓に発がん性を示す事が示唆されている。一方、アカネ色素は細菌を用いた復帰変異試験、枯草菌によるDNA修復試験、ラットおよびマウスの肝細胞を用

いたDNA adduct試験などの遺伝毒性試験において陽性結果を示す事から、発がんのメカニズムとしてアカネ色素による組織の遺伝的傷害に起因する可能性が示唆されている。一方、化学物質等により損傷を受けた組織DNAは、その後の修復過程において、一部は不定期DNA合

成 (unscheduled DNA synthesis:UDS) により修復されることから、オートラジオグラフィ (ARG) により、DNA 除去修復過程の指標である UDS を定量化して調べることが可能である。本実験では、アカネ色素投与によるラットの肝臓および腎臓における DNA 傷害の有無を確認するため、*in vivo* UDS 試験を実施した。

B. 研究方法

F-344 系雄性ラット (F-344:DuCrj, 厚木生産センター) 15 匹を 6 週齢で購入し、6 日間の検疫・馴化の後、1 群 3 匹からなる 5 群に分けた。第 1 群は対照群、第 2 群～第 4 群はアカネ色素投与群、第 5 群は陽性対照群とした。

群構成

群物番号	投与群	動物
第 1 群	対照群	1-3
第 2 群	アカネ色素投与 3 時間群	4-6
第 3 群	アカネ色素投与 6 時間群	7-9
第 4 群	アカネ色素投与 24 時間群	10-12
第 4 群	陽性対照群	13-15

第 1 群の対照群は溶媒である蒸留水を、第 2 群～第 4 群はアカネ色素 2000 mg/kg を、第 5 群の陽性対照群は Dimethylnitrosamine (DMN) 400 mg/kg をそれぞれ単回経口投与し、第 1、2 および 5 群は投与 3 時間後に、第 3 群は投与 6 時間後に、第 4 群は投与 24 時間後に屠殺剖検した。屠殺 30 分前に 18.5 MBq の ³H-thymidine ([methyl-³H]-thymidine、PerkinElmer, Inc.、specific activity: 2841 GBq/mmol、concentration 37.0 MBq/mL を

尾静脈内投与し、ペントバルビタール全身麻酔下で肝臓および腎臓を採取して 2%パラホルムアルデヒド・2.5%グルタルアルデヒド固定液で固定した。組織片を電子顕微鏡用 Quetol-651 樹脂に包埋後、約 1.5 μm の厚切り切片を作製し、ミクロオートラジオグラフィ標本を作製した。

肝臓では小葉中間帯肝細胞、腎臓では近位尿細管上皮細胞および遠位尿細管上皮細胞の核内グレインをそれぞれ 1 切片あたり 100 細胞、動物あたり 300 細胞カウントし、UDS 誘発細胞 (バックグラウンドグレイン + 2SD 以上の核グレインを有する細胞) を計数した。

C. 研究結果

溶媒対照群 3 匹の肝臓および腎臓それぞれの総計測数 600 細胞におけるバックグラウンドグレイン数は、肝臓および腎臓ともに平均が 1.2 個、SD が 0.4 であり、平均+2SD が 2.0 であった (Appendix 1)。従って、2 個以下をバックグラウンドグレインとし、3 個以上のグレインを有する細胞を UDS 誘発細胞と定義した。

アカネ色素投与群では、投与 3 時間後の肝細胞および近位尿細管上皮細胞で UDS 誘発細胞の有意な増加が認められた (5% および 1% 水準)。遠位尿細管では、有意な差はなかったものの、溶媒対照群より 3 倍強の出現があった。一方、投与 6 および 24 時間後では、肝細胞、近位尿細管上皮細胞および遠位尿細管上皮細胞ともに有意な差は認められず、経時的に減少した。

陽性対照の DMN 投与群では、肝臓およ

Table 1 Incidence of labeled cells in the hepatocyte and the renal tubular epithelium of rats after single oral administration of Madder coloring matter

Group	Liver		Kidney			
	No. of SLCs	SLCs (%) (Mean ± SD)	Proximal tubule		Distal tubule	
			No. of SLCs	SLCs (%) (Mean ± SD)	No. of SLCs	SLCs (%) (Mean ± SD)
Negative control ¹⁾	12	1.33 ± 0.00	6	0.50 ± 0.24	3	0.33 ± 0.47
Madder coloring matter 2000 mg/kg - 3hr	27	3.00 ± 0.88 *	20	2.22 ± 0.38 **	10	1.11 ± 0.51
Madder coloring matter 2000 mg/kg - 6hr	10	1.11 ± 0.51	11	1.22 ± 1.02	9	1.00 ± 1.20
Madder coloring matter 2000 mg/kg - 24hr	6	0.67 ± 0.58	4	0.56 ± 0.19	3	0.33 ± 0.33
Positive control ²⁾	39	4.33 ± 0.33 **	43	4.78 ± 1.02 **	18	2.00 ± 0.88 *

#: 300 cells counted/organ, thus 900 cells counted/group.

*: Significantly different from control, $p < 0.05$ (Aspin-Welch t -test, one-sided).

** : Significantly different from control, $p < 0.01$ (Aspin-Welch t -test, one-sided).

1) Distilled water

2) Dimethylnitrosamine, 400 mg/kg

Labeled cell: UDS induction cell

び腎臓のいずれも UDS 誘発細胞の有意な増加が認められた (5%および1%水準)。

以上の結果から、アカネ色素の高濃度単回投与によりラット腎尿細管上皮細胞および肝細胞において、UDS 誘発細胞の有意な増加が認められ、DNA の断片化が引き起こされることが明らかとなった。

D. 考察

昨年度の本研究において、アカネ色素単回投与により、腎近位尿細管上皮細胞の核の大小不同および肝臓では肝細胞のアポトーシスがいずれも投与後 2~3 時間の早期に認められた。一方、今回の実験では投与後 6 時間で UDS 誘発細胞の減少、投与 24 時間後には溶媒対照群と同程度となったことから、断片化された DNA 速やかに修復され、その後修復できない細胞はアポトーシスとして淘汰されるものと考えられ

た。アカネ色素のラットにおける発がんには、酸化ストレスが要因の1つとして関与していることが示されていることから、腎尿細管上皮細胞あるいは肝細胞の DNA の断片化が引き起こされた後の組織内環境も重要な要因である考えられる。

E. 結論

以上のことから、アカネ色素投与により、肝臓および腎臓組織において DNA に直接傷害を生じていることが示唆された。

F. 健康危険情報

「なし」

1. 研究発表

1. 論文発表

1) Ryo Kurihara, Fujio Shiraishi, Noriho

- Tanaka, Shinya Hashimoto, Presence and estrogenicity of anthracene derivatives in coastal Japanese waters, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 1984-1993 (2005)
- 2) Agneta Rosengren, Linda Faxälv, Noriho Tanaka, Mika Watanabe, Lars Magnus Bjursten, Comparison of implantation and cytotoxicity testing for initial toxic biomaterials, *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. 75A Issue 1, 115-122 (2005)
- 3) Shin Asada, Kiyoshi Sasaki, Noriho Tanaka, Ken Takeda, Makoto Hayashi and Makoto Umeda, Detection of initiating as well as promoting activity of chemicals by a novel cell transformation assay using v-Ha-ras-transfected BALB/c 3T3 Cells (Bhas 42 Cells), *Mutation Res.*, 588: 7-21 (2005)
- 4) Kiyomi Ohmori, Makoto Umeda, Noriho Tanaka, Hiroki Takagi, Isao Yoshimura, Kiyoshi Sasaki, Shin Asada, Ayako Sakai, Harumi Araki, Masumi Asakura, Hiroshi Baba, Youichi Fushiwaki, Shuichi Hamada, Nobuyuki Kitou, Tetsuo Nakamura, Yoshiyuki Nakamura, Hidetoshi Oishi, Satoshi Sasaki, Sawako Ahimada, Toshiyuki Tsuchiya, Yoshifumi Uno, Masataka Washizuka, Satoshi Yajima, Yasuhito Yamamoto, Eiji Yamaura and Tomoko Yatsushiro: An inter-laboratory collaborative study by the Non-Genotoxic Carcinogen Study Group in Japan, on a cell transformation assay for tumour promoters using Bhas 42 cells, *ATLA* 33, 619-639 (2005)
2. 学会発表
- 1) 田中憲穂、板垣宏、若栗忍、北垣雅人、中川ゆづき：単回投与毒性試験代替法の開発研究および皮膚モデルを用いる遺伝毒性試験法の開発研究、日本動物実験代替法学会、2005年12月、伊勢原
- 2) 浅田晋、佐々木澄志、田中憲穂、梅田誠：Bhas 42細胞を用いるイニシエーター/プロモーターの検出、日本動物実験代替法学会、2005年12月、伊勢原
- 3) 梅田誠、佐々木澄志、田中憲穂、：発ガン性試験の代替法：ECVAMでPrevalidation Studyの現状、日本動物実験代替法学会、2005年12月、伊勢原
- 4) 大森清美、梅田誠、田中憲穂、高木弘毅、吉村功、佐々木澄志、浅田晋、酒井綾子、浅倉真澄、馬場博、伏脇裕一、浜田修一、鬼頭暢子、中村哲、中村好志、大石英俊、佐々木聡、嶋田佐和子、土屋敏行、宇野芳文、鷺塚昌隆、矢嶋聡、山下康人、山村英二、八城友子：発ガン性プロモーター検出のためのBhas 42細胞を用いた細胞形質転換試験に関する共同研究結果について、日本動物実験代替法学会、2005年12月、伊勢原
- 5) 中川ゆづき、田中憲穂、：ラットFRSK細胞を用いたin vitro小核試験法、日本

- 動物実験代替法学会、2005年12月 伊勢原
- 6) 和田昌憲、本郷有克、若栗忍、石川陽一、梅田誠、田中憲穂：培地中グルコースの消費を指標とする毒性評価法の応用、日本動物実験代替法学会、2005年12月、伊勢原
- 7) 山影康次、高橋俊孝、浅田晋、田中憲穂：In vitro 光染色体異常試験における各種照射条件とその影響、日本動物実験代替法学会、2005年12月、伊勢原
- 8) 北垣雅人、若栗忍、田中憲穂、板垣宏：急性毒性試験代替法の検討（3）：2施設間における Collagen Gel Assay を用いた急性毒性試験予測性の評価、日本動物実験代替法学会、2005年12月、伊勢原
- 9) 若栗忍、大野泰雄、田中憲穂：細胞毒性による in vivo 全身毒性の予測について -代謝活性化の導入および処理条件の検討-、日本動物実験代替法学会、2005年12月、伊勢原
- 10) Noriho Tanaka: The Activity of JSAAE -past,present and future, 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, August, Berlin (Germany) 2005
- 11) Isao Yoshimura, Takashi Omori, Yasuo Ohno, Masatoshi Hoya, Masaki Mori, Takaaki Doi, Yuriko Fujita, Hiroshi Itagaki, Rumi Kawabata, Hajime Kojima, Seiji Hasegawa, Yuko Okamoto, Noriho Tanaka, Kouko Tanigawa and Shinobu Wakuri: Validation study on the battery system for prediction of phototoxicity in Japan: The overview of the results, 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, August, Berlin (Germany) 2005.
- 12) Shinobu Wakuri, Yutaka Matsumoto, Makoto Hayashi and Noriho Tanaka: Application of in vitro alternative methods to ecotoxicology, 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, August, Berlin (Germany) 2005
- 13) Kiyomi Omori, Makoto Umeda, Noriho Tanaka, Hiroki Takagi, Isao Yoshimura, Kiyoshi Sasaki, Ayako Sakai, Harumi Araki, Masumori Asakura, Hiroshi Baba, Yuichi Fushiwaki, Shuichi Hamada, Nobuko Kitou, Tetsu Nakamura Yoshiyuki Nakamura, Hidetoshi Oishi, Satoshi Sasaki, Sawako Shimada, Toshiyuki Tsuchiya, Yoshifumi Uno, Masataka Washizuka, Satoshi Yajima, Yasuhito Yamamoto, Eiji Yamamura and Tomoko Yatsushiro: Inter-laboratory collaborative study of cell transformation assay for tumour promoters using Bhas 42 cells by non-genotoxic carcinogen study group in Japan, 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, August, Berlin (Germany) 2005.
- 14) Makoto Umeda, Noriho Tanaka, Shin Asada, Kiyoshi Sasaki and Kumiko Hayashi: Detection of non-genotoxic

carcinogens using ras-transfected Bhas 42 cells, 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, August, Berlin (Germany) 2005

Science and Technology, Beijing (China), November 2005

15) Noriho Tanaka: Current activities of alternative research in Japan, Ist International Forum on Laboratory Animal

2. 知的財産権の出願・登録状況
「なし」

Appendix 1 Number of silver grains on background cells

Animal No.	Liver			Kidney		
	No. of cells	No. of grains	Grains / cell (Mean ± SD)	No. of cells	No. of grains	Grains / cell (Mean ± SD)
1	200	237	1.2 ± 0.4	200	223	1.1 ± 0.3
2	200	233	1.2 ± 0.4	200	231	1.2 ± 0.4
3	200	239	1.2 ± 0.4	200	234	1.2 ± 0.4

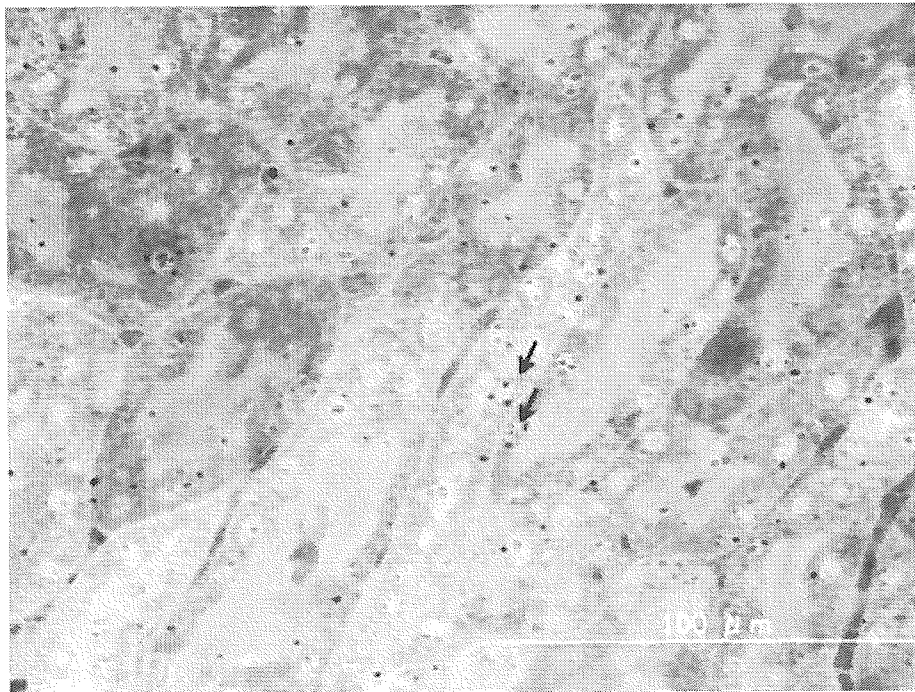
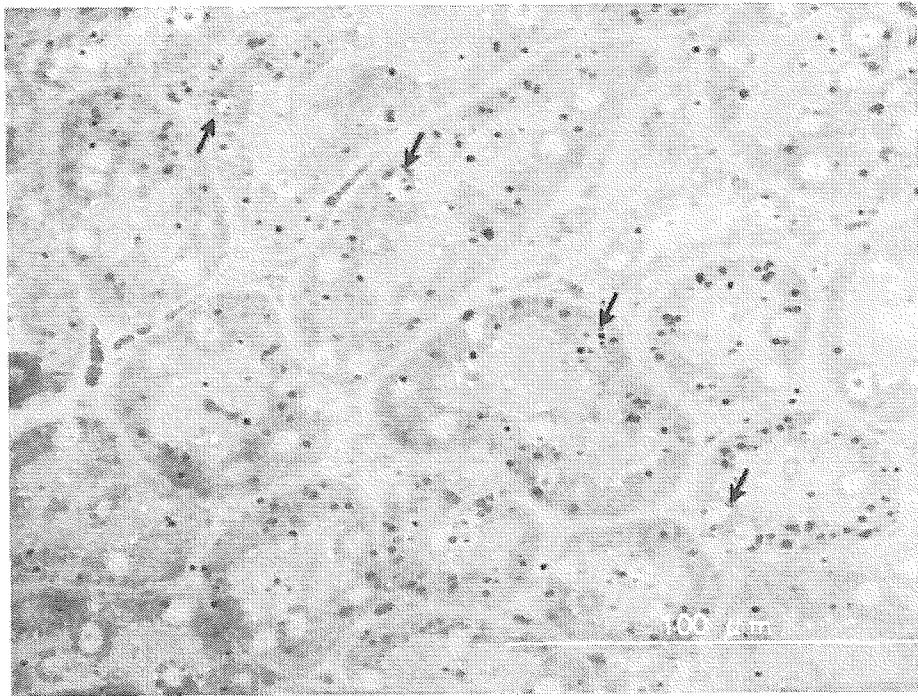
Appendix 2 Total number of labeled cells in the hepatocyte and the renal tubular epithelium of rats after single oral administration of madder coloring matter

Group	Animal No.	Liver			Kidney					
		Counted cells	SLCs	SLCs (%)	Counted cells	Proximal tubule		Distal tubule		
						SLCs	SLCs (%)	SLCs	SLCs (%)	
Negative control ¹⁾	1	300	4	1.33	300	1	0.33	0	0.00	
	2	300	4	1.33	300	2	0.67	2	0.67	
	3	300	4	1.33	300	3	1.00	1	0.33	
	Total	900	12		1200	6		3		
			Mean	1.33	Mean		0.50		0.33	
		SD	0.00	SD		0.24		0.47		
Madder coloring matter 2000 mg/kg 3 hr	4	300	8	2.67	300	8	2.67	5	1.67	
	5	300	12	4.00	300	6	2.00	2	0.67	
	6	300	7	2.33	300	6	2.00	3	1.00	
	Total	900	27		900	20		10		
			Mean	3.00	Mean		2.22		1.11	
		SD	0.88	SD		0.38		0.51		
		<i>t</i>	0.041	<i>t</i>		0.003		0.051		
Madder coloring matter 2000 mg/kg 6 hr	7	300	5	1.67	300	7	2.33	0	0.00	
	8	300	2	0.67	300	3	1.00	2	0.67	
	9	300	3	1.00	300	1	0.33	7	2.33	
	Total	900	10		900	11		9		
			Mean	1.11	Mean		1.22		1.00	
		SD	0.51	SD		1.02		1.20		
		<i>t</i>	0.264	<i>t</i>		0.225		0.220		
Madder coloring matter 2000 mg/kg 24 hr	10	300	4	1.33	300	2	0.67	2	0.67	
	11	300	1	0.33	300	2	0.67	1	0.33	
	12	300	1	0.33	300	1	0.33	0	0.00	
	Total	900	6		900	4		3		
			Mean	0.67	Mean		0.56		0.33	
		SD	0.58	SD		0.19		0.33		
		<i>t</i>	0.092	<i>t</i>		0.325		0.500		
Positive control ²⁾	13	300	14	4.67	300	15	5.00	9	3.00	
	14	300	12	4.00	300	17	5.67	4	1.33	
	15	300	13	4.33	300	11	3.67	5	1.67	
	Total	900	39		900	43		18		
			Mean	4.33	Mean		4.78		2.00	
		SD	0.33	SD		1.02		0.88		
		<i>t</i>	0.002	<i>t</i>		0.007		0.034		

t: Student's or Aspin-Welch *t*-test (one-sided)

1) Distilled water

2) Dimethylnitrosamine, 400 mg/kg



アカネ色素 2000 mg/kg 投与群、投与 3 時間後の腎臓

写真上:近位尿細管の UDS 誘発上皮細胞(↓)

写真下:遠位尿細管の UDS 誘発上皮細胞(↓)

ほ乳類培養細胞を用いる遺伝子突然変異誘発生に関する検討

分担研究者： 本間正充 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部第一室 室長

既存添加物であるアカネ色素の遺伝毒性リスクの評価、比較のため、ヒト培養細胞 TK6 を用いて、遺伝子突然変異誘発性、小核誘発性を検討した。アカネ色素は 4.0 mg/ml までの用量で、突然変異、小核誘発とも陽性を示した。突然変異を 2 倍増加させる濃度 (DMFD) 2.88mg/ml であった。日本人が一日に摂取しうる可能性あるアカネ色素の量はその生産量から最大 0.1mg/day と推定されており、これらから計算される Human Exposure Genotoxic Potency (HEGEP) は、0.034 であった。また、渋谷らの発がん性試験結果から計算される Human Exposure Rodent Potency (HERP) は 0.00012 であった。これらの値は、日常生活で暴露しうるピーナッツ類からのアフラトキシンや、焼けこげ食品中の IQ のそれら値より、10 分の 1 以下である。従って、日常生活において、これまでのようなアカネ色素の摂取がヒトの遺伝毒性、発がんリスクを特に増加させることはないと考えられる。

A. 研究目的

食品の安全性に対して、多くの国民が関心を寄せている今日、食品添加物等の食品中に含まれる微量の化学物質の安全性が問題となっている。特にその問題となる化学物質が発がん性を示す場合は、その評価が困難であることが多い。しかし、食品中の発がん化学物質の評価については未だ、基準値の設定はなされておらず、そのための戦略も明確になっていない。これまでに戦略が構築されなかつ

た理由の一つとして、ハザードがそのままリスクとして考えられ、その程度の評価にあまり注意が払われなかったことがあげられる。さらに、その化学物質の実際の暴露量を考慮したリスク評価は全く行われていない。

遺伝毒性化学物質のリスク評価のため、昨年度までは、かつて保存料として使用経験があり、天然由来であるため、日常の多くの食品中に含まれている「コウジ酸」を例にとり、文献的調査および、実

際の試験を行った。この中で、遺伝毒性のリスク評価(比較)の手段として Human Exposure Genotoxic Potency (HEGEP)を提唱した。これは、発がん性評価のための Human Exposure Rodent Potency (HERP)を応用したものであり、多くに遺伝毒性物質の生活中でのリスクを相対的に知ることができる。本年度は、既存添加物としてこれまで我が国で長年使われてきた「アカネ色素」について試験を行い、その遺伝毒性の強さを比較すると共に、暴露量から考えたそれら物質の遺伝毒性の相対リスクを比較した。

B. 研究方法

1) 被験物質

被験物質として用いたアカネ色素は、西洋アカネ粉末から 50%エタノールで抽出、濾過、濃縮し、デキストリン添加度、スプレードライ、混合、粉碎の過程を経て調整された、褐色の粉末である。色素成分は、主成分として Ruberythric acid、Lucidin-3-O-primerveroside、および Alzarin をそれぞれ、34.4%、53.0%、12.7%を含む。色素含量は Ruberythric acid 換算で 16.1%である。本品は生理食塩水に溶解後、速やかに試験に供した。

2) In Vitro 遺伝毒性試験

ヒトリンパ芽球細胞株 TK6 を用いた。対数増殖期にある細胞を、試験検体で 4 時間処理し、細胞毒性(Relative Survival; RS)を評価した。その 48 時間後に小核試験、72 時間後にチミジンキナーゼ(TK)遺

伝子をターゲットした遺伝子突然変異試験を定法に従って行った。

(倫理面への配慮)

本研究で用いたヒトリンパ芽球細胞株 TK6 は ATCC にも登録されている使用制限のない細胞株であり、倫理上問題はない。また、全ての実験は本研究所倫理規定に準拠して行った。

C. 研究結果

1) 細胞毒性試験、小核試験

用量設定試験の結果から、0.12-4mg/ml の用量で試験を行った。2mg/ml から強い細胞毒性を示し、同時に小核の誘発が観察された。小核は 1mg/ml 以上の用量で全て統計的に有意であった(図1)。

2) TK 遺伝子突然変異試験

TK 遺伝子突然変異も用量依存的に増加し、統計学的にも、試験は陽性と判定された(図1)。最高用量で自然突然変異頻度の 2.7 倍であり、突然変異を 2 倍増加させる用量(Double Mutation Frequency Dose; DMFD)は回帰により 2.88mg/ml と計算された。

D. 考察

アカネ色素は主として、ハム・ソーセージ等の畜肉加工品、菓子類に使用される着色料である。日本では食品添加物としてその使用が認められていたが、米国および EU では認められていない。国内生産量は平成 15 年までで 3~5 トンであ

In Vitro Cytotoxicity and Genotoxicity of Akane dye in TK6 Cells

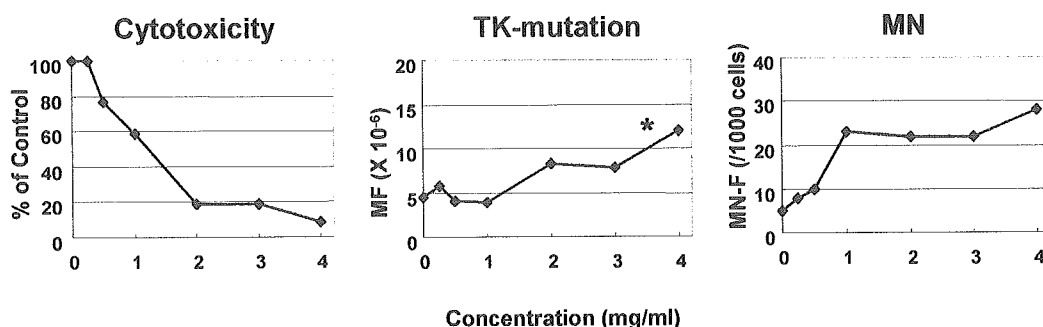


図1 アカネ色素の in vitro 遺伝毒性試験結果

り、単純に日本人人口で割った平均摂取量は 0.06~0.1mg/人/日と計算できる。アカネ色素は、主成分として Ruberythric acid、Lucidin-3-O-primerveroside、および Alzarin をそれぞれ、34.4%、53.0%、12.7% を含む。

これまでの遺伝毒性試験結果は、エームス試験では陽性との報告があるが、他の試験結果ははっきりしない。成分として Lucidin-3-O-primerveroside がエームス試験陽性、ラット肝初代培養細胞での UDS 試験で陽性の報告がある。Ruberythric acid、Alzarin に関しての遺伝毒性に関しては、はっきりしない。発がん性に関しては IARC では Group3 の評価をしている。

食品安全委員会は昨年7月に、アカネ色素の遺伝毒性および腎臓への発がん性が認められたことから ADI (一日摂取許容量) を設定できないとの見解を示し、これを受けて厚生労働省はアカネ色素を既存添加物名簿から削除し、これを含む食品の製造・販売・輸入等を禁止した。

発がん性の根拠となったのは、国立医薬品食品衛生研究所・病理部の渋谷らのラットを用いた発がん性試験である。彼らは、雌雄のラットに、2.5%、5%のアカネ色素を含む食餌で 104 週間飼育し、雌雄ともに腎臓での腺腫・腺がんの用量依存的かつ有意な増加を認めた。ラットの体重を 250g、平均食餌量を 14g として、2.5%、5%のアカネ色素は一日、1400mg、2800mg に相当する。実験結果より計算される TD50 (50%の動物にがんを発生させる 1 日摂取量は雄 1661mg/kg/day、雌 4502mg/kg/day である。

Ames らは、齧歯類発がん性試験で得られた、動物の半数にがんを引き起こす化学物質の濃度 (TD50) で、その物質の 1 日推定摂取量を割った値を Human Exposure Rodent Carcinogenic Potency (HERP) として、発がんリスクを評価している。この値により、生活関連化学物質の相対的な発がんの危険性を推測できるほか、絶対値としての数字は、1 が動物実験と同程度の暴露で半数にがんを引き

起こす濃度と同等であるため、数値からその発がんの程度を推測することができる。アカネ色素の HARP に関しては以下のように計算できる。1 日摂取量としては平成 14 年度の生産量 5 トンと、日本の人口 12,700 万人、365 日、平均体重 50kg から 0.002mg/kg/day である。これは実際の摂取量よりはかなり多めの予想である。

これより $HERP = (0.002/1661) \times 100 = 0.00012$ である (表 1)。同様に遺伝毒性の相対リスクとして我々の提唱する Exposure Genotoxic Potency (HEGEP) を計算した。TK 突然変異を 2 倍増加させる濃度 (DMFD) は 2880ug/ml であり、1 日平均摂取量を 100ug/day とすると、 $HEGEP = 100/2880 = 0.034$ である (表 1)。

表 1 Human Exposure Rodent Carcinogenic Potency (HERP) and Human Exposure Genotoxic Potency (HEGEP)

Compounds (Major origin)	IARC	Average daily intake ($\mu\text{g}/\text{day}$)	HERP	Genotoxicity			
				DMFD ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	HEGEP	Cell, Cond.	Ref
Saccharin (Artificial sweetener)	3	95000	0.06	12000	7.5	MLA	Clive et al., 1979
Dimethylnitrosamine (Beer)	2A	0.646	0.01	0.07	9.2	MLA, rat S9	McGregor et al., 1988
Acrylamide (Potato chips et al)	2A	40	0.01	100	0.4	WTK-1	Unpublished data
Aflatoxin B1 (Peanut et al)	1	0.018	0.008	0.0075	2.4	MLA, rat S9	Preisler et al., 2000
AF-2 (Preservative, -1975)	2B	4.8	0.0002	2.5	1.92	WTK-1	Unpublished data
IQ (Burnt foods)	2A	0.0064	0.00001	7.2	0.89	WTK-1	Unpublished data
Kojic acid (Miso, soy source)	2B	0.2	0.0000005	2500	0.00008	WTK-1, rat S9	Unpublished data
As (III) (Hijiki, cooked)	1	1.6	-	0.78	2.05	MLA	Matuura-Eisaki et al (2005)
As (V) (Hijiki, cooked)	1	4.4	-	39.5	0.11	MLA	Matuura-Eisaki et al (2005)
As (III) (Tap water and other natural sources, Max)	1	107	-	0.78	137.2	MLA	Matuura-Eisaki et al (2005)
Madder root, Akane dye	3 (2)	100	0.00012	2880	0.034	TK6	Present study

これらの値を他の食品から摂取する可能性のある発がん、遺伝毒性物質と比較すると、現在問題となっているポテトチップ等からのアクリルアミド、ピーナッツ等からのアフラトキシン、焼けこげ食品の IQ よりも 1 桁以上低い値である。従って、アカネ色素が遺伝毒性発がん物質

であったとしても、日常生活において、これまでのようなアカネ色素の摂取がヒトの遺伝毒性、発がんリスクを特に増加させることはないと考えられる。現時点では、発がん物質が遺伝毒性を持つことが明らかとなった場合、遺伝毒性物質には閾値がないという考えから、