

- [2] H. Kasai, P.F. Crain, Y. Kuchino, S. Nishimura, A. Ootsuyama, H. Tanooka, Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair, *Carcinogenesis* 7 (1986) 1849–1851.
- [3] M.S. Cooke, M.D. Evans, K.E. Herbert, J. Lunec, Urinary 8-oxo-2'-deoxyguanosine: source, significance, and supplements, *Free Radic. Res.* 32 (2000) 381–397.
- [4] E. Mullaart, P.H. Lohman, F. Berends, J. Vijg, DNA damage metabolism and aging [review], *Mutat. Res.* 237 (1990) 189–210.
- [5] H. Kasai, A new automated method to analyze urinary 8-hydroxydeoxyguanosine by a high-performance liquid chromatography-electrochemical detector system, *J. Radiat. Res.* 44 (2003) 185–189.
- [6] S.B. Heymsfield, C. Arteaga, C. McManus, J. Smith, S. Moffitt, Measurement of muscle mass in humans: validity of the 24-hour urinary creatinine method, *Am. J. Clin. Nutr.* 37 (1983) 478–494.
- [7] Z.M. Wang, D. Gallagher, M.E. Nelson, D.E. Matthews, S.B. Heymsfield, Total-body skeletal muscle mass: evaluation of 24-hour urinary creatinine excretion by computerized axial tomography, *Am. J. Clin. Nutr.* 63 (1996) 863–869.
- [8] H. Topp, G. Schöch, Whole-body degradation rates of transfer-, ribosomal-, and messenger ribonucleic acids and resting metabolic rate in 3- to 18-year-old humans, *Pediatr. Res.* 47 (2000) 163–168.
- [9] M. Almar, J.G. Villa, M.J. Cuevas, J.A. Rodriguez-Marroyo, C. Avila, J. Gonzalez-Gallego, Urinary levels of 8-hydroxydeoxyguanosine as a marker of oxidative damage in road cycling, *Free Radic. Res.* 36 (2002) 247–253.
- [10] J. Delanghe, J.P. De Slypere, M. De Buyzere, J. Robbrecht, R. Wieme, A. Vermeulen, Normal reference values for creatine, creatinine, and carnitine are lower in vegetarians, *Clin. Chem.* 35 (1989) 1802–1803.
- [11] J.C. Waterlow, Observations on the variability of creatinine excretion, *Hum. Nutr. Clin. Nutr.* 40 (1986) 125–129.
- [12] S.A. Bingham, J.H. Cummings, The use of creatinine output as a check on the completeness of 24-hour urine collections, *Hum. Nutr. Clin. Nutr.* 39 (1985) 343–353.
- [13] H. Topp, R. Duden, G. Schöch, 5,6-Dihydrouridine: a marker ribonucleoside for determining whole body degradation rates of transfer RNA in man and rats, *Clin. Chim. Acta* 218 (1993) 73–82.
- [14] G. Sander, H. Topp, G. Heller-Schöch, J. Wieland, G. Schöch, Ribonucleic acid turnover in man: RNA catabolites in urine as a measure for the metabolism of each of the three major species of RNA, *Clin. Sci. (Lond)* 71 (1986) 367–374.
- [15] H. Topp, S. Armbrust, C. Lengger, G. Schöch, J. Davies, W. Stichler, F. Manz, C. Fusch, Renal excretion of 8-oxo-7,8-dihydro-2'(-)-deoxyguanosine: degradation rates of RNA and metabolic rate in humans, *Arch. Biochem. Biophys.* 402 (2002) 31–37.
- [16] W.G. Stillwell, J. Glogowski, H.X. Xu, J.S. Wishnok, D. Zavala, G. Montes, P. Correa, S.R. Tannenbaum, Urinary excretion of nitrate, *N*-nitrosoproline, 3-methyladenine, and 7-methylguanine in a Colombian population at high risk for stomach cancer, *Cancer Res.* 51 (1991) 190–194.
- [17] S.A. Kyrtopoulos, DNA adducts in humans after exposure to methylating agents [review], *Mutat. Res.* 405 (1998) 135–143.
- [18] M. Ikehara, H. Tada, K. Muneyama, Synthesis of 8-hydroxyguanine, *Chem. Pharmacol. Bull.* 13 (1965) 1140–1142.
- [19] H. Kasai, N. Iwamoto-Tanaka, T. Miyamoto, K. Kawanami, S. Kawanami, R. Kido, M. Ikeda, Lifestyle and urinary 8-hydroxydeoxyguanosine, a marker of oxidative DNA damage: effects of exercise, working conditions, meat intake, body mass index, and smoking, *Jap. J. Cancer Res.* 92 (2001) 9–15.
- [20] H. Kasai, S. Nishimura, Hydroxylation of deoxyguanosine at C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents, *Nucleic Acids Res.* 12 (1984) 2137–2145.
- [21] M.B. Bogdanov, M.F. Beal, D.R. McCabe, R.M. Griffin, W.R. Matson, A carbon column-based liquid chromatography electrochemical approach to routine 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine measurements in urine and other biologic matrices: a one-year evaluation of methods, *Free Radic. Biol. Med.* 27 (1999) 647–666.
- [22] S. Skupp, J.H. Ayvazian, Oxidation of 7-methylguanine by human xanthine oxidase, *J. Lab. Clin. Med.* 73 (1969) 909–916.
- [23] G. Sander, H. Topp, G. Heller-Schöch, J. Wieland, G. Schöch, Ribonucleic acid turnover in man: RNA catabolites in urine as a measure for the metabolism of each of the three major species of RNA, *Clin. Sci.* 71 (1986) 367–374.
- [24] D.E. Shuker, E. Bailey, S.M. Gorf, J. Lamb, P.B. Farmer, Determination of *N*-7-[2H3]methyl guanine in rat urine by gas chromatography-mass spectrometry following administration of trideutero-methylating agents or precursors, *Anal. Biochem.* 140 (1984) 270–275.
- [25] J. Thomale, G. Nass, Elevated urinary excretion of RNA catabolites as an early signal of tumor development in mice, *Cancer Lett.* 15 (1982) 149–159.
- [26] I. Holmberg, P. Stål, M. Hamberg, Quantitative determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in human urine by isotope dilution mass spectrometry: normal levels in hemochromatosis, *Free Radic. Biol. Med.* 26 (1999) 129–135.
- [27] M.K. Shigenaga, C.J. Gimeno, B.N. Ames, Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 9697–9701.
- [28] C. Lengger, G. Schöch, H. Topp, A high-performance liquid chromatographic method for the determination of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in urine from man and rat, *Anal. Biochem.* 287 (2000) 65–72.
- [29] J.C. Waterlow, Protein turnover with special reference to man, *Q. J. Exp. Physiol.* 69 (1984) 409–438.
- [30] H.J. Helbock, K.B. Beckman, M.K. Shigenaga, P.B. Walter, A.A. Woodall, H.C. Yeo, B.N. Ames, DNA oxidation matters: the HPLC electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 288–293.

[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<sup>1)</sup>。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優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)
	V79細胞	薬剤抵抗性 (HGPRT)
染色体異常	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
	マウス生殖細胞	優性致死 (流産, 胎児死亡)
形質転換	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BDF<sub>1</sub>マウス (C57BLとDBAの近交系間交配F<sub>1</sub>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<sup>2,3)</sup>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サー、さらにホモブレンダーで粉碎し、このホモジネートを凍結乾燥して試料とした。

9週齢BDF<sub>1</sub>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。

宿主経口試験では、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口試験では、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日間連続投与した。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で実用上限の約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)の状態での-20°C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 $\gamma$ 線照射が許可された唯一の食品である。1972年、Kuzinら<sup>4)</sup>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Renner<sup>5)</sup>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<sup>6)</sup>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

標本作製し骨髄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<sup>7)</sup>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<sup>2)</sup>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、その後骨髄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、宿主経由試験においても、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 (BDF<sub>1</sub>) 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) の骨髄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、宿主経由試験でも照射・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髄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

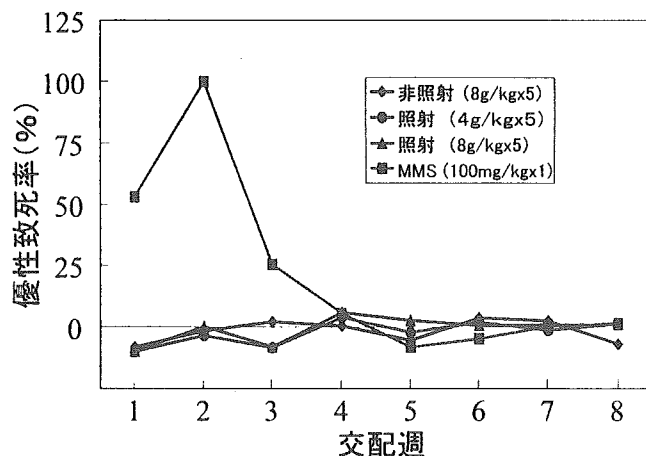


図1. 照射タマネギの優性致死試験結果

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 <sup>-5</sup> )
対照 (非照射コメ)	2 x 10 <sup>5</sup>	2.0	63.7	1.57
0.1	2 x 10 <sup>5</sup>	1.8	52.9	1.66
0.5	2 x 10 <sup>5</sup>	1.6	61.7	1.21
1.0	2 x 10 <sup>5</sup>	2.5	58.2	2.15
2.0	2 x 10 <sup>5</sup>	2.3	66.5	1.69
(照射コメ)				
0.1	2 x 10 <sup>5</sup>	1.5	63.8	1.18
0.2	2 x 10 <sup>5</sup>	2.3	65.4	1.72
1.0	2 x 10 <sup>5</sup>	3.7	69.3	2.65
2.0	2 x 10 <sup>5</sup>	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 非照射 コメ	30	55/60	9.4	9.2	8.7	—
照射 コメ	30	58/60	9.6	9.0	8.7	— 0.2
MMS*	27	50/54	9.5	9.0	8.8	— 0.8
	15	28/30	9.5	7.7	5.1	40.9

\*陽性対照として、MMS (メチルメタンサルフォネート, 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。マウス宿主経由試験では、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/IU) 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性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<sup>6)</sup>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由試験、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<sup>4)</sup>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	30	54/60	11.0	10.4	10.0	— 9.9
MMS *	10	17/20	8.7	6.6	4.0	56.0

\*陽性対照として、MMS(メチルメタンсуль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	30	57/60	11.3	10.3	9.8	— 7.7
MMS *	10	17/20	8.7	6.6	4.0	56.0

\*陽性対照として、MMS(メチルメタンсуль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。

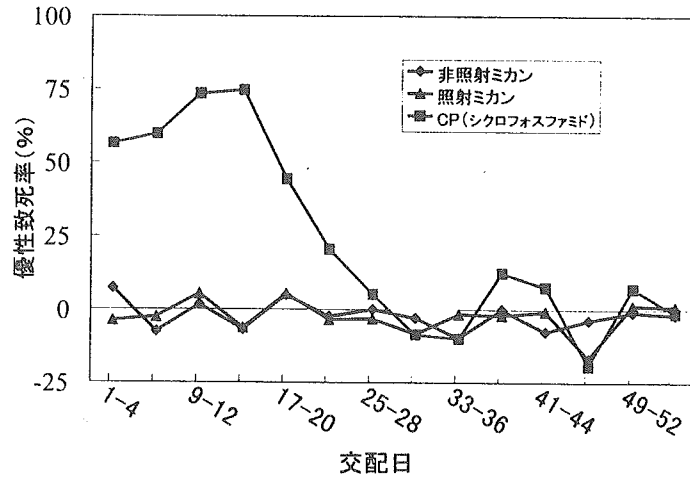


図2. 照射ミカンの優性致死試験結果

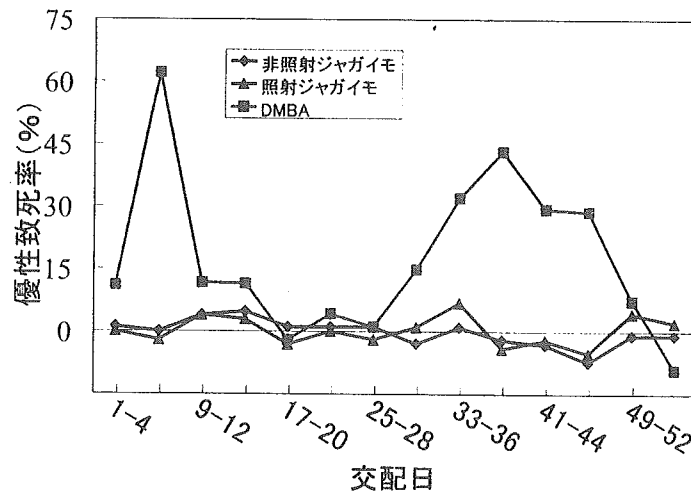


図3. 照射ジャガイモの優性致死試験結果

行った試験<sup>8)</sup>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BDF<sub>1</sub>マウス(C57BLとDBAの近交系間交配F<sub>1</sub>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<sup>9)</sup> (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<sup>10)</sup>している。Renner<sup>9)</sup> 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H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>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 <sub>2</sub>	48	6	6000	14	0.23
	72	—	6000	15	0.25
15 in N <sub>2</sub>	48	6	6000	14	0.23
	72	—	6000	15	0.25
30 in N <sub>2</sub>	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 <sub>2</sub>	72	6	13200	5	0.038
15 in N <sub>2</sub>	72	6	13200	20	0.152
30 in N <sub>2</sub>	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 ( $\mu$ 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*

\*: 生育障害がみられた

Vijayalaxmi ら<sup>2)</sup>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<sup>2), 3), 5), 6)</sup>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

表 18. TA98, TA100, TA102 株におけるガンマ線照射クロコショウの SFE (超臨界流体抽出物) による変異原性誘発

抽出物量 ( $\mu$ 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	—	24	24	24	148	148	148	395	395	395
0.01	—	23	14	28	117	104	112	344	304	292
0.03	—	22	17	30	129	108	113	389	320	317
0.1	—	23	15	24	115	123	97	389	357	315
0.3	—	25	19	20	123	115	115	351	345	335
1	—	23	15	28	122	122	122	313	312	339
3	—	13	10*	16*	51*	46*	89*	253	207	301
0	+	29	29	29	145	145	145	406	406	406
0.1	+	26	33	29	112	123	105	369	351	344
0.3	+	42	35	32	114	110	117	382	365	400
1	+	59	54	59	117	121	125	437	422	433
3	+	52	58	60	110	136	118	477	356	390
10	+	37	45	40	110	143	137	293	291	408
30	+	26*	51*	26*	93	85	79	208	215	330

\*: 生育阻害がみられた。

表 19. TA98, TA100, TA102 株におけるガンマ線照射赤トウガラシの SFE (超臨界流体抽出物) による変異原性誘発

抽出物量 ( $\mu$ 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	—	24	24	24	148	148	148	395	395	395
0.01	—	26	24	24	146	138	155	402	413	401
0.03	—	30	27	26	136	135	152	398	389	351
0.1	—	25	23	24	147	134	135	365	423	349
0.3	—	21	30	27	163	125	129	411	451	368
1	—	17	24	22	158	148	139	357	435	322
3	—	23	26	19	56*	86*	73	123*	106	127*
0	+	32	32	32	145	145	145	406	406	406
0.1	+	40	47	46	129	117	138	396	424	394
0.3	+	32	42	43	159	126	125	361	376	394
1	+	38	35	41	174	138	130	397	432	369
3	+	53	39	44	172	140	144	381	433	381
10	+	64	53	45	172	158	165	397	504	459
30	+	15*	20*	19*	73*	85*	56*	353*	368*	331*

\*: 生育阻害がみられた。

異コロニーの増加は認められなかった(表18, 19)。ナツメグ、パプリカについては、照射、非照射のいずれの抽出物も全ての用量で変異コロニーの増加は認められなかった。黒コショウと赤トウガラシの弱い変異コロニー誘発については、コショウはコウジカビが産生するアフラトキシンで汚染される事があることから、今回の抽出物に関して、アフラトキシンの存在を薄層クロマトグラフィーにより確認したがその存在を示すことはできなかった。このことから、弱い変異コロニーの誘発はコショウ成分中の物質によるものと考えられた<sup>11)</sup>。

スパイスは亜熱帯で生産される為、微生物や真菌、及び真菌の代謝産物であるマイコトキシンによる汚染を受けやすく、食品衛生上何らかの方法により殺菌する必要がある。これまでその微生物汚染を軽減する為、臭化メチル、EOガスや短時間の高温殺菌が行われてきた。しかし、臭化メチルは毒性が強く、オゾン層破壊物質で2005年には撤廃される予定であり、一方、EOガスは強い遺伝毒性物質であることから適切とはいえない。香辛料としての特性を失うことなく殺菌する方法として、放射線照射による殺菌が最も有効とされ、照射食品の中でもスパイスの照射が多くの国々で採用されている。したがって、食物の大部分を海外からの輸入に頼っているわが国では、我々の知らないうちに食している可能性も否定できないことから、検知法による識別も重要となる。スパイスは種類も多く、そのものの生理作用については多くの報告がある一方で、照射スパイスの安全性に関する報告は少ない。本研究では細菌を用いる復帰変異試験のデータを示したが、培養細胞や動物を用いた遺伝毒性試験は未だ行われておらず、リスク評価の観点から、各種の試験系のデータが必要とされる食品である。

#### おわりに

本項では、秦野研究所で実施した照射食品の遺伝毒性に関するデータをまとめ、網羅的に概説した。投与量としてはかなり過酷な試験条件にもかかわらず、試験した照射食品の全てに陰性の結果が得られ、問題となるような点はみられなかったことから、本試験条件下では、照射食品の遺伝毒性はないものとする。

我々が普段から食している自然食品や天然添加物

においても遺伝毒性を示す食品は数多くある。魚や肉の焼け焦げで知られるごとく加熱調理することで強烈な発がん物質が生成されることも分かってきたが、その後の研究により同時に野菜類を食べることで遺伝毒性作用が軽減・消失する事や、我々自身がその部分を食べない事でその毒作用を回避するようになってきた。食品照射は食品保存や食品衛生の面から極めて効果的であり、用いられる実用的な照射線量では、食感が損なわれず栄養成分の変化も少ないなどのメリットがあることから、多くの国で食品に照射されている。一方高線量では、グルコースのように特定の栄養成分の変化によって変異原性物質が生じ、それはまた果実中の成分で不活化される例も知られている<sup>12)10)</sup>。このように、照射によって起こりうる可能性のある未知の成分変化や生成物に対する生物作用に関しては、バイオアッセイによって照射線量の毒性学的な安全域を確認し、消費者が安心して食べられるような科学的なデータを提供する事が重要である。

#### 謝 辞

照射食品の健全性/安全性評価について早くからその重要性を唱えられ、本研究にご助言下さった松山晃博士に深く感謝申し上げます。なお本稿は、秦野研究所遺伝毒性部門の礎を作られこの研究の指揮をとられた(故)岩原繁雄博士と、現在は数名のメンバーしか秦野研究所に在籍していないが、当時先輩同僚として一緒に研究を行った、渋谷徹博士、高鳥浩介博士、室田哲郎博士、加藤基恵博士、山影康次博士、坂本(荒川)京子、金指(川上)久美子の各氏にささげたい。

#### 文 献

- 1) 岩原繁雄: 秦野研究所で実施された照射食品の遺伝毒性試験, 秦野研究所年報, 6, 77-88(1983).
- 2) Vijayalaxmi and G. Sadasivan: *Int. J. Radiat. Biol.*, 27, 135-142 (1975).
- 3) Vijayalaxmi and S. G. Srikantia: *India. Radiat. Phys. Chem.*, 34, 941-952 (1989).
- 4) V. A. Kopylov et al.: *Radiobiologia*, 12, 524 (1972).
- 5) H. W. Renner: *Toxicology*, 8, 213-222 (1977).
- 6) C. Bhaskaram and G. Sadasivan: *Am. J. Clin. Nutr.*, 28, 130-135 (1975).

- 7) 林真：「小核試験」—実験法からデータの評価まで—，サイエンティスト社（1991）。
- 8) H. V. Levinsky and M. A. Wilson: *Food Cosmet. Toxicol.*, **13**, 243 (1975).
- 9) J. M. Tesh et al.: Studies in rats fed a diet incorporating irradiated wheat, International project in the field of food irradiation, pp.1-64, Technical report series IFIP-R 45, October (1977).
- 10) 田中憲穂：照射コムギ粉飼料給餌によるチャイニーズ・ハムスターおよびラット骨髄細胞に置ける倍数性細胞の誘発と末梢赤血球中の小核誘発，食品照射委員会・研究成果最終報告書，日本アイソトープ協会，212-219（1992）。
- 11) 坂本京子：ガンマ線照射スパイス・マンゴーの変異原性，食品照射委員会・研究成果最終報告書，日本アイソトープ協会，205-211（1992）。
- 12) 川岸舜朗：ガンマ線照射糖液の変異原性およびその抑制，食品照射委員会・研究成果中間報告書，日本アイソトープ協会，119-130（1989）。
- 13) 祖父尼俊雄，石館基：照射グルコースのチャイニーズ・ハムスター細胞による染色体異常試験，食品照射委員会・研究成果中間報告書，日本アイソトープ協会，131-146（1989）。
- 14) 坂本京子，岩原繁雄：照射食品および照射グルコースのサルモネラを用いる変異原性試験，食品照射委員会・研究成果中間報告書，日本アイソトープ協会，147-162（1989）。
- 15) 祖父尼俊雄，石館基：ガンマ線照射グルコースについての変異原性試験，食品照射委員会・研究成果最終報告書，日本アイソトープ協会，150-181（1992）。
- 16) 坂本京子，岩原繁雄：ガンマ線照射グルコースの変異原性，食品照射委員会・研究成果最終報告書，日本アイソトープ協会，182-191（1992）。

（2004年8月9日受理）





## 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)

Shin Asada<sup>a,b</sup>, Kiyoshi Sasaki<sup>a</sup>, Noriho Tanaka<sup>a,\*</sup>,  
Ken Takeda<sup>b</sup>, Makoto Hayashi<sup>c</sup>, Makoto Umeda<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Cell Toxicology, Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center, Japan

<sup>b</sup> Department of Hygiene Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science, Japan

<sup>c</sup> Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences, Japan

Received 21 October 2004; received in revised form 7 July 2005; accepted 20 July 2005

### Abstract

Cell transformation assay using BALB/c 3T3 cells, C3H10T1/2 cells and others, can simulate the two-stage carcinogenesis utilized for formation of transformed foci. A sensitive cell transformation assay for tumor initiators as well as promoters has been developed using a v-Ha-*ras*-transfected BALB/c 3T3 cell line, Bhas 42; these cells are regarded as initiated in the two-stage paradigm of carcinogenesis. To distinguish between initiation and promotion, the initiation assay involves a 2-day treatment of low-density cells, obtained one day after plating, with a test chemical, and the promotion assay involves treatment of near-confluent cells with a test chemical for a period of 12 days (Day 3–14). When Bhas 42 cells were treated with tumor initiators, *N*-methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine and 3-methylcholanthrene, transformed foci were induced in the initiation assay but not in the promotion assay. In contrast, tumor promoters, 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate, lithocholic acid and okadaic acid, gave negative responses in the initiation assay but positive responses in the promotion assay. The results were reproducible with various treatment protocols. Sixteen polycyclic aromatic hydrocarbons were examined using both assays. Benzo[*a*]pyrene and 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene induced focus formation only in the initiation assay. Increase of focus formation was observed in the promotion assay with benzo[*e*]pyrene, benzo[*ghi*]perylene, 1-nitropyrene and pyrene. Benz[*a*]anthracene, benz[*b*]anthracene, chrysene and perylene showed positive responses in both initiation and promotion assays. Results of initiation and promotion assays of acenaphthylene, anthracene, coronene, 9,10-diphenylanthracene, naphthalene and phenanthrene were negative or equivocal. The present Bhas assays for the detection of either/both initiating and promoting activities of chemicals are sensitive and of high performance compared with other cell transformation assays.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Transformation; Bhas 42 cells; Complete carcinogen; Initiation and promotion

### 1. Introduction

Chemical carcinogens can be divided into two categories, i.e., initiators and promoters, based on the two-stage model of carcinogenesis [1,2]. Most initiators can be detected by various genotoxicity tests, the results

\* Corresponding author. Present address: 729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa 257-8523, Japan. Tel.: +81 463 82 0773; fax: +81 463 82 0773.

E-mail address: [tanaka.n@fdsc.or.jp](mailto:tanaka.n@fdsc.or.jp) (N. Tanaka).

of which are used for carcinogenicity prediction and for regulatory purposes by authorities [3,4]. In the case of tumor promoters, several methods have been proposed [5], but none of them have been routinely used for regulatory purposes. Therefore, to develop a method for detection of non-genotoxic carcinogens with various mechanisms of action is a major challenge for the safety evaluation of chemicals [5,6]. The utilization of additional screening tests covering a wide range of carcinogenic processes has advantage before contemplating *in vivo* long-term carcinogenicity experiments for chemical safety assessment.

The cell transformation assays using BALB/c 3T3 cells [7,8] and C3H10T1/2 cells [9,10] can simulate the process of two-stage animal carcinogenesis [11,12]. Formation of transformed foci is the consequence of the complex process of transforming cells to a malignant state. Since these assays can detect both initiating and promoting activities [13,14], their inclusion as screening tools is anticipated to be useful for detection of not only tumor initiators but also tumor promoters such as non-genotoxic carcinogens. In spite of this expectation, cell transformation assays have not been accepted as a routine screening method, because of the laborious and time-consuming procedure compared with the routine genotoxicity assays [15].

We have developed a sensitive cell transformation assay for detecting tumor promoters using Bhas 42 cells [16] that was established by Sasaki et al. [17]. The cells, *v-Ha-ras*-transfected BALB/c 3T3 cells, are considered as initiated in the two-stage transformation paradigm [18]. The assay method has many advantages, e.g., high sensitivity, short experimental period, use of smaller amounts of materials, and simplicity of the procedure.

After establishing the promotion assay using Bhas cells, various chemicals including tumor initiators were examined for their potency of tumor-promoting activity. Some initiators are known to have tumor promotion capacity in animal experiments (complete carcinogens). However, *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) and 3-methylcholanthrene (MCA), as examples of initiators, did not show clear positive response in our preliminary study. In the promotion assay, Bhas cells were treated with these chemicals when the cells were near confluence. Since initiators need several cell divisions for fixation of gene mutation [19–21], we designed a new treatment protocol in which cells were seeded at a lower density and allowed to divide several times in culture dishes after treatment with test chemicals.

In the present work, tumor initiators and promoters were examined in the newly developed protocol with various treatment schedules in order to define the most

effective protocol for detection of initiators and promoters. The effect of repeated treatment with MCA at initiating and/or promoting period with several time Schedules was compared with that of 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) as a model promoter. In addition, several polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) were tested with the novel protocol to validate the assay.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cell cultures

Minimum essential medium (MEM) was obtained from Nissui Pharmaceutical, Tokyo, Japan. Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F12 (DMEM/F12) was purchased from GIBCO Laboratories, Grand Island, NY. Fetal bovine serum (FBS) was obtained from Moredun, Bulimba, Australia.

Bhas 42 cells were routinely cultured in MEM supplemented with 10% FBS (M10F) in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C. The cells were subcultured using 0.25% trypsin (GIBCO) before reaching confluence. For transformation assays, Bhas 42 cells were cultured in DMEM/F12 supplemented with 5% FBS (DF5F).

### 2.2. Chemicals

Acenaphthylene, benzo[*a*]pyrene (B[*a*]P), benzo[*ghi*]perylene (B[*ghi*]P), coronene, 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene (DMBA), lithocholic acid (LCA), MCA, naphthalene, okadaic acid, perylene, phenanthrene and pyrene were obtained from Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan). Anthracene, benz[*a*]anthracene (B[*a*]A), benz[*b*]anthracene (B[*b*]A) and MNNG were obtained from Kanto Chemical (Tokyo, Japan). Aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), benzo[*e*]pyrene (B[*e*]P) and TPA were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Chrysene was obtained from Avocado Research Chemicals (Lancashire, UK), 1-nitropyrene (1-NP) from Aldrich (St. Louis, MO), and 9,10-diphenylanthracene (9,10-DPhA) from Merck (Rahway, NJ). These chemicals except for coronene were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO; Wako Pure Chemical Industries); coronene was suspended in 0.5% carboxymethylcellulose sodium salt solution (CMC-Na; Wako Pure Chemical Industries). Final concentrations of these solvents in experimental medium were adjusted to less than 0.1% in the case of DMSO or less than 1% in the case of CMC-Na.

### 2.3. Cell growth assay

Cell growth assays, using the standard crystal violet absorption method [22], were applied to dose range finding for initiation and promotion assays. Additionally, the cell growth assay was performed concurrently with every transformation assay. In the case of initiation assay, cell numbers were adjusted to  $2 \times 10^3$  cells/mL in M10F and the cell suspension was seeded onto 24-well microplates at 0.5 mL per well (Day 0). Three wells were prepared for each test concentration. After a 24 h

Table 1  
Results of initiation and promotion assays for initiators and promoters

Chemical	Concentration	S9 mix	Initiation assay		Promotion assay	
			Number of foci/well	Cell viability	Number of foci/well	Cell viability
MNNG	0 µg/mL	–	5.3 ± 1.8	100.0	1.5 ± 0.5	100.0
	0.002 µg/mL	–	N.E.		1.5 ± 1.2	96.4
	0.005 µg/mL	–	N.E.		1.2 ± 1.0	96.1
	0.01 µg/mL	–	N.E.		1.3 ± 1.5	95.8
	0.02 µg/mL	–	4.0 ± 1.8	90.6	1.2 ± 0.4	98.4
	0.05 µg/mL	–	5.8 ± 2.9	90.8	1.0 ± 1.3	97.4
	0.1 µg/mL	–	5.5 ± 1.9	88.7	1.7 ± 1.2	93.1
	0.2 µg/mL	–	6.7 ± 2.9	62.1		tox.
	0.5 µg/mL	–	10.0 ± 2.6	69.6		tox.
	1 µg/mL	–	12.0 ± 1.5	57.0		tox.
MCA	0 µg/mL	–	3.0 ± 1.1	100.0	1.5 ± 0.5	100.0
	0.002 µg/mL	–	N.E.		1.0 ± 0.9	93.6
	0.005 µg/mL	–	N.E.		1.3 ± 0.5	89.7
	0.01 µg/mL	–	N.E.		1.2 ± 0.4	85.5
	0.02 µg/mL	–	2.7 ± 2.0	61.6	1.8 ± 0.8	88.7
	0.05 µg/mL	–	3.7 ± 2.0	65.6	1.5 ± 1.0	84.7
	0.1 µg/mL	–	6.2 ± 2.6	62.7	2.0 ± 1.3	69.2
	0.2 µg/mL	–	8.2 ± 1.9	79.6		tox.
	0.5 µg/mL	–	9.7 ± 2.1	45.2		tox.
	1 µg/mL	–	11.8 ± 4.0	35.8		tox.
AFB1	0 µg/mL	–	3.0 ± 1.1	100.0	1.5 ± 0.5	100.0
	0.02 µg/mL	–	N.E.		1.5 ± 0.8	95.9
	0.05 µg/mL	–	2.5 ± 1.5	64.2	0.7 ± 1.2	91.5
	0.1 µg/mL	–	1.8 ± 1.2	48.8	0.7 ± 0.5	85.2
	0.2 µg/mL	–	3.0 ± 1.7	49.3	0.5 ± 0.8	87.4
	0.5 µg/mL	–	3.5 ± 1.5	44.7	0.7 ± 0.5	86.0
	1 µg/mL	–	2.5 ± 0.5	24.5	1.3 ± 0.8	73.4
	2 µg/mL	–	0.8 ± 1.0	12.5		tox.
AFB1	0 µg/mL	+	3.2 ± 1.5	N.E.	N.E.	
	0.05 µg/mL	+	3.7 ± 1.6	N.E.	N.E.	
	0.1 µg/mL	+	4.2 ± 1.5	N.E.	N.E.	
	0.2 µg/mL	+	4.8 ± 3.3	N.E.	N.E.	
	0.5 µg/mL	+	4.7 ± 1.8	N.E.	N.E.	
	1 µg/mL	+	14.3 ± 2.4	N.E.	N.E.	
TPA	0 ng/mL	–	4.3 ± 1.0	100.0	2.8 ± 0.4	100.0
	2 ng/mL	–	2.3 ± 0.5	97.5	9.0 ± 1.3	100.0
	5 ng/mL	–	2.7 ± 1.2	92.8	12.7 ± 1.0	92.7
	10 ng/mL	–	2.5 ± 1.0	93.8	17.2 ± 2.2	95.9
	20 ng/mL	–	1.3 ± 0.8	97.6	26.0 ± 3.0	105.5
	50 ng/mL	–	2.2 ± 0.8	96.8	28.7 ± 3.3	111.1
	100 ng/mL	–	0.8 ± 1.3	90.0	27.3 ± 2.9	112.2
	LCA	0 µg/mL	–	3.0 ± 1.1	100.0	4.2 ± 0.8
0.5 µg/mL		–	2.5 ± 2.2	91.2	6.5 ± 1.9	99.3
1 µg/mL		–	3.2 ± 1.6	84.1	7.8 ± 1.0	94.7
2 µg/mL		–	2.2 ± 1.8	89.4	7.2 ± 2.2	94.0
5 µg/mL		–	2.0 ± 1.3	125.7	11.7 ± 1.4	101.1
10 µg/mL		–	2.8 ± 1.2	117.7	16.5 ± 1.0	91.0
20 µg/mL		–	3.8 ± 1.9	109.7	31.8 ± 3.1	79.7
Okadaic acid	0 ng/mL	–	4.3 ± 1.4	100.0	4.2 ± 0.8	100.0
	0.2 ng/mL	–	2.0 ± 1.1	87.5	N.E.	
	0.5 ng/mL	–	3.0 ± 0.6	96.0	N.E.	
	1 ng/mL	–	3.3 ± 2.2	105.5	4.8 ± 2.5	97.1

Table 1 (Continued)

Chemical	Concentration	S9 mix	Initiation assay		Promotion assay	
			Number of foci/well	Cell viability	Number of foci/well	Cell viability
	2 ng/mL	–	3.5 ± 1.2	114.5	5.8 ± 1.6	90.1
	4 ng/mL	–	N.E.		4.3 ± 1.9	70.7
	5 ng/mL	–	3.0 ± 1.4	89.0	N.E.	
	6 ng/mL	–	N.E.		7.0 ± 3.1	56.8
	8 ng/mL	–	N.E.		7.7 ± 1.5	40.3
	10 ng/mL	–	3.5 ± 2.4	98.0	12.5 ± 1.4	37.0

N.E., not experimented; tox.: toxic.

cultivation, cells were treated with a fresh medium containing a test chemical. The cells were fixed with a 10% formalin on Day 3 and stained with a 0.1% crystal violet (CV) solution. CV was extracted from stained cells in each well with 0.5 mL of a solution containing 0.02 mol/L hydrochloric acid in 50% ethanol. Optical density of CV extracted from stained cells was measured at 540 nm, and the results were expressed as percentage of absorbance compared to the solvent control culture.

In the growth testing for the promotion assay, cell numbers were adjusted to  $2 \times 10^4$  cells/mL in DF5F and seeded onto 24-well microplates at 0.5 mL per well. After a 3-day cultivation, medium was replaced with the one containing a test chemical. Cells were then fixed and stained on Day 7, and optical density of CV extracted from stained cells was measured as above.

#### 2.4. Transformation assay for initiating activity (Bhas initiation assay)

The procedure for the initiation assay using BALB/c 3T3 cells [23] was adopted for the present Bhas initiation assay. Cell numbers were adjusted to  $2 \times 10^3$  cells/mL in M10F and the cells were seeded onto each well of six-well microplates in 2 mL amounts (Day 0). Six wells were prepared for each test concentration. After a 24 h cultivation, cells were treated with a fresh medium containing a test chemical. Culture medium was replaced with DF5F without test chemical on Day 3; thereafter, culture medium was changed twice a week with fresh DF5F without test chemical. On Day 24, the cells were fixed with methanol and stained with a 5% Giemsa solution. Transformed foci were judged from morphological characteristics: deep basophilicity, dense multilayering of cells, and random orientation of cells at the edge of foci.

#### 2.5. Transformation assay for promoting activity (Bhas promotion assay)

Bhas promotion assay was conducted according to the procedure reported by Ohmori et al. [16]. Cell numbers were adjusted to  $2 \times 10^4$  cells/mL in DF5F and seeded onto each well of six-well microplates in 2 mL amounts (six wells

per test concentration) (Day 0). Medium was replaced with fresh medium containing a test chemical on Day 3, Day 7 and Day 10, and then with fresh medium without the test chemical on Day 14. On Day 21, the cells were fixed with methanol and stained with a 5% Giemsa solution for focus counting.

#### 2.6. Metabolic activation in initiation assay

In the case of metabolic activation of AFB<sub>1</sub>, cultures of Bhas 42 cells were started under the same conditions as those of the initiation assay. Three wells were prepared for each test concentration. After a 24 h incubation, cells were treated with AFB<sub>1</sub> together with S9 mix which contained 5% rat S9 (Kikkoman, Chiba, Japan), 2 mM HEPES (Sigma Chemical Co.), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 33 mM KCl, 5 mM glucose-6-phosphatase (Sigma Chemical Co.) and 4 mM β-NADP<sup>+</sup> (Oriental Yeast, Osaka, Japan). After a 3 h treatment, all plates were washed with phosphate-buffered saline and provided fresh M10F. The culturing was continued until Day 24 and the cells were fixed and stained for focus counting.

#### 2.7. Transformation assay with various schedule of treatments

Cells were seeded onto six-well microplates as with the initiation assay. MCA (100 ng/mL) or TPA (50 ng/mL) was added at various time schedules during cell-growth phase (initiation stage) and/or stationary phase (promotion stage). Three wells were prepared for each set of conditions. Cells were cultivated until Day 24, and then fixed and stained for focus counting.

#### 2.8. Statistical analysis and criteria of judgment

Results of initiation and promotion assays were evaluated as follows. After *t*-test analysis, chemicals showing significant increase ( $p < 0.05$ ) of focus number at more than two consecutive concentrations were judged positive. Chemicals showing statistically significant effect at only one concentration were considered equivocal. Negatives were those which induced no statistically significant increase of transformed foci at any concentrations tested.