

- peripheral blood of nine mouse strains: the results of the 7th collaborative study organized by CSGMT/MMS, *Mutat. Res.*, 338, 51-57.
- Suzuki, T., M. Hayashi, B. Myhr and T. Sofuni (1995) Diethylnitrosamine is mutagenic in liver but not in bone marrow of *lacZ* transgenic mice (MutaTMMouse), *MMS Commun.*, 3, 33-39.
- Suzuki, T., M. Hayashi and T. Sofuni (1994) Initial experiences and future directions for transgenic mouse mutation assays, *Mutat. Res.*, 307, 489-494.
- Suzuki, T., M. Hayashi, T. Sofuni and B.C. Myhr (1993) The concomitant detection of gene mutation and micronucleus induction by mitomycin C in vivo using *lacZ* transgenic mice, *Mutat. Res.*, 285, 219-224.
- Suzuki, H., T. Shirotori and M. Hayashi (2004) A liver micronucleus assay using young rats exposed to diethylnitrosamine: methodological establishment and evaluation, *Cytogenet. Genome. Res.*, 104, 299-303.
- Wakata, A., Y. Miyamae, S. Sato, T. Suzuki, T. Morita, N. Asano, T. Awogi, K. Kondo and M. Hayashi (1998) Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: The summary of the 9th collaborative study by CSGMT/MMS·JEMS, *Environ. Mol. Mutagen.*, 32, 84-100.

既存添加物 43 品目の遺伝毒性試験

林 真^{*1,†} 田中憲穂^{*2}

Genotoxicity of 43 Existing Food Additives

Makoto HAYASHI^{*1,†} and Noriho TANAKA^{*2}(*¹ Division of Genetics and Mutagenesis, Biological Safety Research Center, National Institute of Health Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan;*² Division of Genetic Toxicology, Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center: 729-5, Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa 257-8523, Japan; † Corresponding author)

要 約

既存添加物 43 検体について、細菌を用いる復帰突然変異試験 (Ames 試験)、細胞を用いる染色体異常試験、および、マウスを用いる小核試験を実施した。その結果、43 検体中 12 検体 (およそ 30%) に何らかの試験で陽性の反応が得られた。そのうち 6 検体 (50%) は酵素剤であった。

陽性となった検体の中で、Ames 試験でのみ陽性となったものが、 β -アミラーゼ、キシラナーゼ、グルタミナーゼの 3 検体であり、染色体異常試験のみで陽性となったものが、酵素分解カンゾウ、3 種のクチナシ黄色素、トウガラシ水性抽出物、ササ色素、2 種の β -グルコシダーゼ (*Aspergillus niger* と *Trichoderma* sp.) の 8 検体であった。誘発された染色体異常の内容としては、(A) 構造異常と倍数性細胞の両方を誘発したものが 3 検体 (2 種のクチナシと β -グルコシダーゼ)、(B) 構造異常のみを誘発したものが 4 検体 (酵素分解カンゾウ、クチナシ黄色素 (サンプル C)、フィターゼ、2 種の β -グルコシダーゼ (*Aspergillus niger* と *Trichoderma* sp.)), (C) 倍数性細胞のみを誘発したものが 1 検体 (トウガラシ水性抽出物) であった。また、フィターゼに関しては Ames 試験と染色体異常試験の両方で陽性を示した。細菌を用いる Ames 試験で陽性結果を示した添加物の誘発頻度に関しては、フィターゼがコントロール値の 5 倍程度を示した以外、ほとんどの検体では 2 倍程度の弱い誘発頻度であった。一方、染色体異常の頻度に関しては、3 種のクチナシ黄色素では 11~46% の範囲で構造異常が認められた。酵素分解カンゾウでは 11% の構造異常が誘発された。また、トウガラシ水抽出物での倍数性細胞の誘発は 10% と高い値を示した。2 種の β -ガラクトシダーゼとフィターゼに関しても 10% 以上の構造異常誘発が観察された。これらの高い染色体異常誘

発の濃度域では細胞毒性も強く現れる傾向にあった。

一方、動物個体を用いる小核試験では、すべての添加物が陰性を示した。このことは、*in vitro* で認められた染色体異常誘発性が、生体内で発現する可能性は低いものと考えられる。また、Ames 試験での弱い陽性反応は、被験物質に混在しているヒスチジンによる可能性がある点、また、陽性反応は使用実態と比較して非常に高用量で認められる点等を考慮すると、陽性反応が認められたものについても、早急に行政的処置が必要なものではないものと考えられる。

はじめに

食品、食品添加物などの食品関連物質に関する安全・安心が大きな社会問題となり、内閣府に食品安全委員会が設立された。委員会の設立により、リスクアナリシスとリスクマネジメントが切り離され、さらに専門の見地から食品行政が行われることになった。本稿では、リスクアナリシスの最初の段階であるハザード同定の部分に関する話題を提供する。化学物質の安全性評価において、遺伝毒性の果たす役割は大きい。特にがん原性との組み合わせにおいて、その発現機構が遺伝毒性に基づくものであることが判明した場合には、しきい値の存在がないものと見なされる。したがって、一日摂取許容量 (ADI) を設定できないものとの評価が下され、その結果使用が認められなくなるのが現状である。しかし、この考え方に関しても、がん原性や遺伝毒性のしきい値の存在が見直され始めており、今後はさらに定量的評価も含めたアセスメントが行われるものと思われる。

食品添加物の安全性に関しては、平成 8 年度厚生科学研究において、既存の天然添加物 489 品目に関し、既存の安全性試験成績、国際的な評価結果などの情報、欧米での取扱いなどの情報をもとに基本的な安全性について考察を行ったところ、当時情報が不十分であった 139 の天然添加物以外については、安全性は問題ない、あるいは安全性に関する危惧は少ないとの結論が得られている¹⁾。ま

† 連絡先

*¹ 国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部：東京都世田谷区上用賀 1-18-1*² 財団法人食品薬品安全センター・秦野研究所・遺伝毒性部：神奈川県秦野市落合 729-5

た、厚生労働省（開始当時は厚生省）が食品添加物の安全性再評価の一環として昭和54年度より日本食品添加物協会（日添協）の協力を得て、既存の食品添加物を対象に変異原性試験を行っている。その報告書を基に結果の部分をまとめたものが、2000年に林らによって「厚生省等による食品添加物の変異原性評価データシート（昭和54年度～平成10年度分）」として公表された²⁾。遺伝毒性に関する試験結果の一覧表とともに、一部陽性を示した添加物に関しては解説が加えられている。

しかしながら、その後得られた知見をもってしても、現に流通が確認されている既存天然添加物の中に、現段階においても安全性に関する知見がほとんど得られていないものがある。本研究では、そのうち入手可能であった46品目に関して遺伝毒性試験を実施し、その安全性の評価を行った。

本研究は厚生労働省（医薬局食品保健部基準課）と（財）食品薬品安全センター秦野研究所（以下、「秦野研」）との委託契約に基づいて実施した。試験の実施にあたっては、厚生労働省、国立医薬品食品衛生研究所（国立衛研）変異遺伝部、同食品添加物部、日添協の指導と協力の下に、遺伝毒性試験に関して十分実績のある14機関に試験を依頼して行った。試験実施にあたり、厚生労働省、国立衛研、日添協、各試験実施機関の代表、および秦野研で説明会を開催し、試験方法についての具体的説明と被験物質の配布を行い、平成14年度末までの報告書提出を目的に試験を開始した。

材料および方法

被験物質：43種類の添加物は、各製造メーカーの協力により提供を受けたものを、日添協を通じて試験実施機関に配布した。

化学分析：秦野研化学試験室の安生孝子が試験責任者となり、すべての検体について成分分析を実施した。その結果、提供者から提示された試験成績とおおむね同様の結果を得、特に問題となる値は得られなかった。

試験実施：試験は可能な限りGLPに準拠する形で行った。

試験方法：試験の方法は「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」（平成8年3月22日衛化第29号生活衛生局長通知）のV「安全性に関する標準的実施方法」、いわゆる食品添加物のガイドラインに準拠し、微生物を用いる復帰突然変異試験、チャイニーズハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験、マウスを用いる小核試験を行った。

結 果

結果のまとめを表1に示す。陽性の結果を示したものに関しては、それぞれについて詳述するが、陰性の結果に

ついては表1に結果のみを記載する。陰性の評価がなされたものは、すべてガイドラインで定められている手法にのっとり、試験された最高用量としては限界用量である5 mg/plate（Ames試験）、5 mg/mL（染色体異常試験）、2,000 mg/kg bw（小核試験）を満たすことを基準とするが、細胞毒性の強いものに関しては、指標の観察が可能な最大耐量まで試験を実施した結果である。

実施機関（50音順）

旭川：旭川医科大学

イナ：（株）イナリサーチ

化評研：（財）化学物質評価研究機構

バイリス：（株）環境バイリス研究所

残農：（財）残留農薬研究所

秦野：（財）食品薬品安全センター秦野研究所

安評：（財）食品農医薬品安全性評価センター

畜安研：（財）畜産生物科学安全研究所

東薬：東京薬科大学

富山衛：富山県衛生研究所

食分析：（財）日本食品分析センター

バイオ：日本バイオアッセイ研究センター

BML：（株）ビー・エム・エル

ボゾ：（株）ボゾリサーチセンター

安科研：（株）三菱化学安全科学研究所

陽性を示した既存添加物についての解説

試験した43物質のうち陽性の結果が得られた12種の既存添加物については、表1に示すように、それらのすべてで動物個体を用いる小核試験では陰性の結果が得られたことから、*in vitro*で観察された遺伝毒性が生体内で発現することはないものと考えられる。したがって、最終的にヒトへの影響はないことが示唆される。また、陽性を示した個々の検体については、その原因を究明するため、異なる指標での追加試験などを実施する必要性もある。染色体異常誘発性に関しては、小核試験によって生体内での評価がなされているが、細菌を用いる復帰突然変異試験の陽性結果に関しては生体内でそれらが発現しないというデータは得られていない。したがって、細菌を用いる復帰突然変異試験で陽性となったものに関しては、陽性結果をもたらした原因が明白にならない限り、生体内での発現に関して検討する必要がある。

(I) 酵素分解カンゾウ

本物質は、カンゾウのアルコール抽出物の成分であるグリチルリチンをβ-グルクロニダーゼで酵素分解し、加水分解して得られたグリチルレチン酸-3-グルクロニドである。

試験結果および考察

Ames試験および小核試験では陰性の結果が得られた。染色体異常試験では、短時間処理の-S9, 5 mg/mLの濃度で構造異常11.5%（細胞増殖率80%）、+S9の2.5 mg/mLで6%（細胞増殖率88%）、5.0 mg/mLで7%の（細胞増殖率78%）構造異常を誘発した。確認試験と

表 1. 遺伝毒性試験結果のまとめ

| No. | 番号 | 既存 No. | 添加物名 | Ames 試験 | 染色体異常試験 | 小核試験 |
|-----|----|--------|--|---------------|-----------------------|----------|
| 1 | 1 | 23 | L-アラビノース | - (東薬) | - (バイオ) | - (バイオ) |
| 2 | 2 | 176 | 酵素分解カンゾウ | - (安評) | +, s=11% (安評) | - (安評) |
| 3 | 3 | 465 | L-ラムノース | - (安評) | - (安評) | - (安評) |
| 4 | 4 | 471 | D-リボース | - (安評) | - (安評) | - (安評) |
| 5 | 5 | 136 | クチナシ黄色素 (サンプル A) | - (秦野) | +, s=11, p=5.4% (秦野) | - (秦野) |
| 6 | 5 | 136 | クチナシ黄色素 (サンプル B) | - (秦野) | +, s=46%, p=1.8% (秦野) | - (秦野) |
| 7 | 5 | 136 | クチナシ黄色素 (サンプル C) | - (秦野) | +, s=7% (秦野) | - (秦野) |
| 8 | 6 | 287 | トウガラシ水性抽出物 | - (秦野) | +, p=10% (秦野) | - (秦野) |
| 9 | 8 | 196 | ササ色素 | - (秦野) | + -, p=2.9% (秦野) | - (秦野) |
| 10 | 9 | 27 | アラビノガラクトン | - (秦野) | - (秦野) | - (秦野) |
| 11 | 10 | 47 | ウェランガム | - (化評研) | - (化評研) | - (化評研) |
| 12 | 11 | 180 | 酵母細胞壁 | - (化評研) | - (化評研) | - (化評研) |
| 13 | 12 | 240 | セスバニアガム | - (化評研) | - (化評研) | - (化評研) |
| 14 | 13 | 279 | デキストラン | - (化評研) | - (化評研) | - (化評研) |
| 15 | 14 | 464 | ラムザンガム | - (バイオ) | - (バイオ) | - (バイオ) |
| 16 | 16 | 293 | d-γ-トコフェロール | - (バイオ) | - (バイオ) | - (バイオ) |
| 17 | 17 | 294 | d-δ-トコフェロール | - (バイオ) | - (バイオ) | - (バイオ) |
| 18 | 25 | 10 | アスコルビン酸オキシダーゼ (ウリ) | - (バイオ) | - (バイオ) | - (バイオ) |
| 19 | 26 | 23 | β-アミラーゼ (小麦) | - (安科研) | - (安科研) | - (安科研) |
| 20 | 26 | 23 | β-アミラーゼ (大麦) | - (安科研) | - (安科研) | - (安科研) |
| 21 | 27 | 23 | β-アミラーゼ (<i>Aspergillus oryzae</i>) | +w* (安科研) | - (安科研) | - (安科研) |
| 22 | 29 | 35 | アントシアナーゼ (<i>Aspergillus oryzae</i>) | - (安科研) | - (安科研) | - (安科研) |
| 23 | 30 | 36 | イソアミラーゼ (<i>Flavobacterium odoratum</i>) | - (畜安研) | - (畜安研) | - (畜安研) |
| 24 | 32 | 369 | フルクトシルトランスフェラーゼ | - (畜安研) | - (畜安研) | - (畜安研) |
| 25 | 33 | 114 | キシラナーゼ (<i>Trichoderma</i> sp.) | +w* (イナ) | - (イナ) | - (イナ) |
| 26 | 34 | 117 | キチナーゼ (<i>Aspergillus niger</i>) | - (残農) | - (化評研) | - (化評研) |
| 27 | 35 | 119 | キトサナーゼ (<i>Aspergillus niger</i>) | - (バイリス) | - (バイリス) | - (バイリス) |
| 28 | 36 | 119 | キトサナーゼ (<i>Bacillus subtilis</i>) | - (バイリス) | - (バイリス) | - (バイリス) |
| 29 | 37 | 146 | α-グルコシダーゼ (<i>Aspergillus niger</i>) | - (BML) | - (BML) | - (残農) |
| 30 | 38 | 147 | β-グルコシダーゼ (<i>Aspergillus niger</i>) | - (BML) | +, s=11% (BML) | - (残農) |
| 31 | 39 | 147 | β-グルコシダーゼ (<i>Trichoderma</i> sp.) | - (BML) | +, s & p=9~11% (BML) | - (残農) |
| 32 | 40 | 152 | グルタミナーゼ (<i>Bacillus</i> sp.) | +w* (BML) | - (BML) | - (残農) |
| 33 | 42 | 200 | 酸性ホスファターゼ (<i>Aspergillus niger</i>) | - (残農) | - (化評研) | - (化評研) |
| 34 | 43 | 263 | タンナーゼ (<i>Aspergillus oryzae</i>) | - (ボゾ) | - (旭川) | - (安科研) |
| 35 | 44 | 298 | トランスグルコシダーゼ (<i>Aspergillus niger</i>) | - (ボゾ) | - (旭川) | - (安科研) |
| 36 | 45 | 357 | フィターゼ (<i>Aspergillus niger</i>) | +* (×5) (食分析) | +, s=15%, tox (食分析) | - (秦野) |
| 37 | 53 | 61 | 塩水湖水低塩化ナトリウム液 | - (食分析) | - (食分析) | - (秦野) |
| 38 | 59 | 172 | 酵素処理ナリンジン | - (食分析) | - (BML) | - (富山衛) |
| 39 | 60 | 245 | 粗製海水塩化カリウム | - (食分析) | - (BML) | - (富山衛) |
| 40 | 61 | 219 | 植物性ステロール | - (食分析) | - (BML) | - (富山衛) |
| 41 | 66 | 183 | 骨炭 | - (東薬) | - (秦野) | - (安評) |

表 1. つづき

| No. | 番号 | 既存 No. | 添加物名 | Ames 試験 | 染色体異常試験 | 小核試験 |
|-----|----|--------|--------------|---------|---------|--------|
| 42 | 67 | 246 | 粗製海水塩化マグネシウム | - (東葉) | - (安評) | - (安評) |
| 43 | 69 | 461 | ラクトフェリン濃縮物 | - (東葉) | - (安評) | - (安評) |

+: 陽性, -: 陰性, +w: 対照群の2倍程度の弱い陽性, *: きょう雑物として含まれていたヒスチジンによると考えられるコロニーの増加, s: 構造異常, p: 倍数性, tox: 強い細胞毒性

して、+S9 の S9 濃度を 2% にした場合、5.0 mg/mL で構造異常を 10% 誘発した。

評 価

代謝活性化の有無に限らず、高濃度の処理で 10% ほどの染色体異常を誘発するが、*in vivo* の小核試験で陰性であることから、生体での作用はないかあっても無視できる程度に低いものと考えられる。しかしながら、細胞の系で明らかな陽性結果が得られたことから、その要因についての検討が必要であろう。

本品は抽出物を酵素処理したものであるが、グリチルレチン酸-3-グルクロニド以外の成分も含まれることから、きょう雑物による可能性もある。一方、カンゾウ抽出物に含まれるグリチルリチンについては、培養細胞の系で染色体異常陽性の報告³⁾がある。

(2) 3種のクチナシ黄色素 (サンプル A, B, C)

クチナシ色素は、クチナシの果実より水または含水エタノールで抽出して得たもの、もしくは加水分解して得られたもので、主色素はクロシンおよびクロセチンで黄色を呈する。試験した3種のクチナシ黄色素サンプル A, B, C は、それぞれ精製法が異なるサンプルで、サンプル A は、膜ろ過により脱ゲニポシドしたもの (色価 6926)、サンプル B はイオン交換樹脂により脱ゲニポシドしたもの (色価 4272)、サンプル C は未精製品 (色価 963) である。

試験結果と考察

Ames 試験では、判定は3種のクチナシ黄色素とも陰性であった (ただし、TA98 株の -S9, 5,000 μ g/plate の最高濃度で3種のクチナシともにコントロールの2倍以下ではあるが、やや復帰変異コロニーの増加傾向が見られた)。

染色体試験では、サンプル A は短時間処理、-S9 の 5 mg/mL の濃度で 11.0% の構造異常を、また -S9 および +S9 の 5 mg/mL でそれぞれ 5.4% と 1.9% の倍数性細胞を誘発した。

サンプル B は短時間処理、-S9 の 2.5 mg/mL および 5 mg/mL の濃度で、それぞれ 5.5% および、46.5% の構造異常を誘発し、-S9 および +S9 の 2.5 mg/mL および 5 mg/mL で倍数性細胞を 1.8% および 1.4% 誘発した。サンプル C は、短時間処理 -S9 の 5 mg/mL 濃度で 7% の構造異常を誘発した。

以上の結果より、試験した3種のクチナシ黄色素はそれぞれ染色体異常の誘発頻度が異なり、同一処理条件下で

の染色体異常値を比較すると、未精製品では 7%、膜ろ過したものでは 11.05%、イオン交換樹脂を通したものでは 46.5% の染色体異常 (細胞増殖率 52%) が誘発された。この異常頻度はそれぞれの色価と対応しなかった。また、代謝活性化系の存在で不活性化される傾向が認められた。

このように、クチナシ黄色素の染色体異常誘発作用は、黄色素の量 (色価) とは無関係であることから、その染色体異常誘発物質は主色素であるクロシンまたはクロセチン以外の物質であることが推定された。脱ゲニポシド処理されていないクチナシ黄色素 (今回のサンプル C に相当) および genipin は姉妹染色分体交換 (sister chromatid exchange; SCE) を誘発し、精製したゲニポシドや色素成分であるクロセチンは SCE を誘発しないことが報告⁴⁾されていることから、クチナシ黄色素に含まれる主色素成分以外の物質が原因であると推察される。また、クチナシには果実、葉等植物に一般的に存在するクロロゲン酸やカフェ酸などいくつかのフェノール類が含まれているが、これらの物質は変異原作用や抗変異原作用を有するものが多く^{5)~7)}、これらの相互作用により染色体異常が誘発された可能性もある。ゲニポシド除去の際、遺伝毒性物質を示す画分は膜ろ過よりもイオン交換で精製された画分に存在していることが推定されるが、実際に試験したサンプルは異なる施設から提供されたものであり、各施設の精製過程の影響も考えられることから、この差が精製法による違いによるものかどうかについてはさらに確認する必要がある。本試験においては、色価換算ではなく、試験法ガイドラインに基づいての処理濃度、すなわち、Ames 試験では 5,000 μ g/plate、染色体異常試験では 5 mg/mL、小核試験では 2,000 mg/kg を最高濃度として試験していることから、試験サンプルは一般市販品の濃度 (色価 100~200) に比べて高い濃度である。しかしながら、52% の細胞増殖率を示す濃度で 46.5% の染色体異常が誘発されたことには留意する必要がある。一方、クチナシ黄色素 3 サンプルの Ames 試験の判定は陰性であったが、3 サンプルともに TA98 株の -S9 条件でコントロールの2倍弱の復帰変異コロニーが出現することから、染色体異常誘発物質と同一の遺伝毒性物質である可能性がある。また、マウスを用いる小核試験の結果は、3 サンプルとも陰性であった。

評 価

培養細胞で染色体異常を誘発する濃度は生理的限界である 5 mg/mL と高濃度であり、しかも代謝活性化系の導入

により染色体異常誘発性が減弱されること、小核試験の投与濃度は、2,000 mg/kg/day×2 回投与と十分に高い濃度であるにもかかわらず陰性の結果が得られていることなどから、生体内での染色体異常誘発の可能性は少ないものと考えられる。

(3) トウガラシ水性抽出物

トウガラシ水性抽出物は、トウガラシから含水エタノールで抽出し、濃縮して得たものである。

試験結果および考察

Ames 試験は陰性であるが TA98 株の -S9 の 5,000 μ g/plate でやや増加傾向があり、*in vivo* 小核試験では、2,000 mg/kg/day×2 の投与条件においても陰性の結果となった。

染色体異常試験では、いずれの投与条件においても構造異常は誘発されなかった。しかしながら、-S9 での短時間処理および 24 時間処理で、濃度に依存して倍数性細胞が増加 (4.0~10.0%) し、陽性となった。倍数性の誘発メカニズムはさまざま考えられるが、少なくとも本実験では構造異常が全く検出されないことから、トウガラシ水性抽出物の中に DNA でなくタンパク質を標的とする遺伝毒性物質が含まれている可能性がある。本試験で誘発された倍数性細胞の発がんには及ぼす可能性としては、多段階発がん過程におけるプロモーターの役割の可能性もある。培養細胞で倍数性細胞が誘発されたことから、理論的に数的異常も検出できる小核試験において何らかの作用が出ることも考えられたが、陰性の結果が得られている。倍数性細胞誘発の影響として、プロモーターとしての長期発がんの可能性を見るには、細胞を用いる形質転換試験など、さらに他の試験系で確認する必要がある。トウガラシについては、これまで多くの報告があるので下記に解説する。

評 価

トウガラシ水性抽出物は構造異常を誘発せず、倍数性細胞を高頻度 (10%) 誘発させた。ただし、小核試験は陰性であったことから、生体内において染色体の数的異常誘発性が発現することはないものと考えられる。ただし、倍数体誘発の機構を明確にするための追加試験を考慮することも必要であろう。

解 説

トウガラシには辛味成分の 1 つであるカプサイシンが含まれ、発がんや抗がんの観点から、各種の遺伝毒性試験や発がん試験が行われている。カプサイシンはトウガラシに多く含まれている辛味成分で、鎮痛、発汗、血行促進、興奮作用などを示す⁸⁾。このような多様な生理活性作用を持つ一方で、刺激性があり、多量摂取は胃腸障害の危険因子と考えられていることなどから⁹⁾、カプサイシン、トウガラシ、トウガラシ抽出物質を使って多くの発がん試験が行われたが、実験条件によって異なった結果が得られている。例えば、マウスに混餌投与した実験では、十二指腸¹⁰⁾ および盲腸¹¹⁾ に腫瘍が誘導された。また、ラット胃¹²⁾ およびマウス胃・肝¹³⁾ の二段階発がん試験では、プロモ-

ーターとして働くことが示された。逆に、マウスにおいて benzo[a]pyrene および 9,10-demethyl-1,2-benzanthracene により誘導された肺がん¹⁴⁾、vinyl carbamate および *N*-nitrosodimethylamine により誘導された皮膚がん¹⁵⁾、さらにラットにおいて azoxymethane により誘導された大腸がん¹⁶⁾ および 4-nitroquinoline 1-oxide により誘導された舌がん¹⁵⁾ は阻害された。また、マウス皮膚の二段階発がん試験では、カプサイシン処理後に TPA を処理、および 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) 処理後にカプサイシンを処理しても発がんは見られなかったが^{17), 18)}、DMBA+TPA の実験において TPA 処理前にカプサイシンを処理した場合は TPA によるプロモーション作用が阻害された¹⁷⁾。そのほかに、マウスにおいて 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone により誘導された肺がんには影響を与えなかったという報告もある¹⁹⁾。

このように動物を用いた発がん試験からは、カプサイシンが発がんにどのように影響を与えるのか、明確な同一結果は得られていない。ほとんどのイニシエーターは突然変異を誘発することから、細菌および培養細胞を用いてカプサイシンの突然変異原性が調べられているが、その結果も発がん試験と同様にまちまちである^{20)~22)}。近年、カプサイシンが転写制御因子 NF-kappaB や AP-1 の TPA による活性化を阻害することが見いだされた¹⁸⁾。また、形質転換細胞に対し、選択的にアポトーシスを誘導することが示された^{24)~26)}。培養細胞を用いて得られたこれらの知見は、動物を用いた発がん試験に見られたカプサイシンの抗プロモーション作用を支持している。

一方、カプサイシンは、ヒト胃癌の原因となっている可能性が示唆されている。メキシコ市民²⁷⁾、およびアメリカに住んでいるケージャン人、クレオール人、メキシコ系アメリカ人²⁸⁾ は、トウガラシ料理を多く食べるが、疫学調査の結果、高い胃癌発生率を示しているのがその理由である。

(4) ササ色素

ササ色素はササの葉を乾燥・粉碎したもので、クロロフィルを主成分とする緑色の色素である。

試験結果および考察

Ames 試験および小核試験では陰性の結果であった。

染色体異常試験では、5 mg/mL の最高濃度まで実施したがいずれの処理条件においても構造異常は見られなかった。しかしながら倍数性細胞に関しては、-S9 で短時間処理した低濃度、中濃度、24 時間処理したすべての群において統計学的に有意に増加 (2.1~2.9%) した。一方、+S9 で処理した群では倍数性細胞はいずれの群においても誘発されなかった。ササ色素の倍数性細胞のメカニズムに関しては、全く不明であるが、ササ色素粉末中の成分による可能性や、ささの固形成分が細胞の貪食作用によって細胞内に取り込まれ、その物理的な分裂阻害により倍数性細胞が誘発された可能性も考えられる。

評 価

ササ色素によって -S9 条件下で数的異常が誘発されたが、+S9 群では影響が見られないことより、ササ色素に含まれる倍数性誘発物質は、代謝を受けてその活性を失うことが示唆された。また、小核試験では最高処理濃度である 2,000 mg/kg/day×2 でも陰性結果が得られていることから、生体にとっての安全性の面では問題はないものと考えられる。

(5) β-アミラーゼ (*Aspergillus oryzae*)

本研究では製法によって由来の異なる 3 種の β-アミラーゼを試験した。すなわち、小麦より水で抽出したもの、大麦麦芽の抽出物を原料としたもの、糸状菌 *Aspergillus oryzae* の培養液から抽出したものの 3 種である。

試験結果および考察

小麦および大麦麦芽由来の β-アミラーゼは、すべての試験系において陰性の結果を示した。一方、*Aspergillus oryzae* を培養して得られた β-アミラーゼについては、染色体異常試験および小核試験では陰性の結果が得られたが、Ames 試験で弱いながらも陽性となった。用量設定および本試験の 2 回の試験で、TA-100 菌株の -S9 および +S9 の条件下で、コントロールの 2 倍程度の復帰変異コロニーの増加が見られた。なお、アミノ酸非添加のプレート上においても、菌の生育が認められたことから、微量のヒスチジンが含まれ利用されていることが推定されたが、ヒスチジンの含量*を測定していないので変異コロニーの増加とどのような関係があるかは断定できなかった。

評 価

Aspergillus oryzae 由来の β-アミラーゼは Ames の系で弱い変異原性を示したが、これは培養液に含まれるヒスチジンなど*よることが考えられた。染色体異常試験および小核試験では陰性であることから、ヒトに対する影響はほとんどないものと推定される。

(*後日、アミノ酸分析により被験物中にヒスチジンが含まれていることが判明し、混在物による反応であった可能性が高まった。)

(6) キシラナーゼ (*Trichoderma koningii*)

本酵素原体は、原料の小麦ふすまに糸状菌 *Trichoderma koningii* を培養して酵素液を抽出し、濃縮-無菌ろ過後、アルコール沈殿して減圧乾燥することにより製造されたものである。

試験結果および考察

染色体異常試験および小核試験では、陰性の結果を得た。Ames 試験の用量設定試験において、-S9 では WP2uvrA、+S9 では TA100、TA1535、TA98 の最高処理濃度 (5,000 μg/plate) でコントロールの 2 倍前後の復帰変異コロニー数が認められた。本試験では S9mix 非存在下の TA1535 のみ 2 倍程度のコロニー数の増加が認められたため、追加試験を実施した結果、S9mix 存在下の最高用量のみで 2 倍をわずかに超える程度の復帰変異コロニー数の増加が認められたため、弱い陽性と判定し

た。しかしながら、復帰変異コロニーの出現頻度などから、試験に供した被験物質にヒスチジン*が含まれている可能性が示唆された。

評 価

染色体異常試験、および小核試験では陰性の結果が得られており、Ames 試験の結果も対照の 2 倍程度の弱い変異誘発であり、ヒトに対する影響はほとんどないものと推定される。

(*後日、アミノ酸分析により被験物中にヒスチジンが含まれていることが判明した。)

(7) β-グルコシダーゼ (*Aspergillus niger*) および (*Trichoderma reesei*)

本試験では、2 種の異なる菌株 (*Aspergillus niger*) および (*Trichoderma reesei*) を用いて製造された β-グルコシダーゼを、それぞれ別の施設で試験を行った。本酵素はオリゴ糖の精製に使われており、色素、フラボン配糖体の改変やフレーバーの配糖体をきるような作用がある。

試験結果および考察

由来の異なる菌株を用いて製造された 2 種の β-グルコシダーゼは、Ames 試験、小核試験とも陰性であった。β-グルコシダーゼ (*Aspergillus niger*) は、短時間処理のいずれの試験条件下でも染色体異常の誘発は認められなかったが、48 時間処理において 5 mg/mL で 5.5% の異常が見られたため、追加試験を実施したところ、3.75 mg/mL で 6.0%、5 mg/mL で 11.5% の構造異常が誘発され弱い陽性と判定された。倍数性細胞の誘発は認められなかった。

β-グルコシダーゼ (*Trichoderma reesei*) については、短時間処理では -S9 で 2.25~2.75 mg/mL の濃度範囲で 6.0~9.0% の構造異常が誘発され、倍数性細胞も 3.0~5.0% 誘発された。一方、24 時間処理においても 1.8~3.1 mg/mL の濃度で 5.5~9.5% の構造異常と、7.5~12.5% の頻度で倍数性細胞が誘発された。また、48 時間処理においても、1.8~3.1 mg/mL の濃度で 3.6~7.7% の倍数性細胞が誘発された。なお、これらの異常を誘発する際の細胞増殖率は、59% を下回る場合が多かった。

β-グルコシダーゼ (*Aspergillus niger*) および (*Trichoderma reesei*) とともに、染色体異常を誘発したが、染色体異常の誘発濃度、異常頻度とその種類などの内容は両者で少し異なった。異なる菌株で生産された両酵素は、それぞれ基質特異性も異なることから含まれている成分も多少異なることが考えられる。これらの酵素剤は天然食品に含まれている物質であることから、その染色体異常誘発の原因については、十分な理由づけが難しいところである。構造異常と同時に倍数性細胞も誘発されていることから、細胞の分裂機構に作用するような物質の関与も示唆される。別のロットでは陰性の報告 (1997) もあり、培養系での生産であることから製造ロットにより結果が異なる可能性がある。

評 価

由来の異なる菌株を用いて製造された2種の β -グルコシダーゼは、Ames試験、小核試験ともに陰性であった。一方、染色体異常試験では陽性の結果が得られた。 β -グルコシダーゼそのものが直接細胞内のDNAに作用して染色体異常を起こすことは考えにくく、細胞の増殖に作用しその2次的な要因による可能性や、低分子の培養生産物の存在が挙げられ、低分子を除去した場合の活性などについてもさらに確認する必要があるものと考えられる。

(8) グルタミンナーゼ (*Bacillus* sp.)

グルタミンナーゼは枯草菌 (*Bacillus subtilis*) の培養液を抽出して得られたもので、グルタミンからうまみ成分であるグルタミン酸を生成する。

試験結果および考察

TA98 および TA1535 においてのみ、+S9 の条件下、1,250 μ g/plate 以上の濃度で、コントロールに比べて2倍程度の復帰変異コロニーの増加が見られた。ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験および小核試験は陰性の結果であった。

評 価

染色体異常試験および小核試験では陰性の結果が得られており、Ames試験の陽性結果も対照の2倍程度の弱いものである。したがって、染色体異常誘発性に関しては問題なく、遺伝子突然変異性の誘発についても、ヒトに対する影響が懸念させるように強いものではない。

(9) フィターゼ (*Aspergillus niger*)

フィターゼは小麦ふすまに酵素生産菌を植えて得られた培養物より抽出して得られる酵素原体である。

試験結果および考察

細菌を用いる復帰突然変異試験では-S9のTA100、TA98の系において、対照の5倍程度の変異コロニーがみられ、他の菌株でも陽性結果を示した。また、+S9の系ではTA100、TA98、TA1535で対照の2倍以上の変異コロニーの増加が見られた。一方、染色体異常試験においても-S9の条件下で、0.16、0.25 および 0.37 mg/mL の濃度でそれぞれ9%、12.5% および 15.4% の構造異常が誘発された。別ロットによるフィターゼ原体のアミノ酸分析(私信, 1994)によれば、ヒスチジンが1.34%程度含まれており、これと同量のヒスチジン含量でAmes試験を実施すると、フィターゼと同等の復帰変異コロニー数の増加が認められたことから、フィターゼによる変異コロニーの誘発は被験物質に含まれるヒスチジンによるものであるものと考えられる(私信, 1995)。また、Ames試験菌株を1時間本酵素で処理し、その後洗浄することにより変異コロニーが出ないとの報告があった(私信, 1995)。

評 価

フィターゼは微生物を用いる試験と染色体異常試験で陽性となったが、小核試験では陰性であった。フィターゼによる変異コロニーの誘発は、含まれているヒスチジン*に

よることが示唆された。一方、別ロットの標品において染色体異常試験で陰性の結果も得られている、との報告もあり(私信 1995)、生体にとって特段問題となるものではないものとする。

(*後日、アミノ酸分析により被験物中にヒスチジンが含まれていることが確認され、細菌を用いる復帰突然変異試験の陽性結果はヒスチジンによるものである可能性が高まった。)

陰性を示した既存添加物について

試験した43物質のうち、31物質は3種の試験系ですべて陰性の結果が得られた。甘味料、増粘安定剤として用いられているL-アラビノース、L-ラムノース、D-リボース、アラビノラクタン、ウレランガム、酵母細胞壁、セスバニアガム、デキストラン、ラムザンガムなどの糖類を主成分とする物質はすべて陰性であった。また、酸化防止剤として用いられている2種のd- γ -トコフェロールとd- δ -トコフェロールも陰性であった。すでに述べたように19種の酵素剤のうち6種は陽性となったが、残りの13種は陰性となった。原料の異なる物質、例えば、大麦または小麦を原料とするものと *Aspergillus oryzae* の培養から得られた3種の β -アミラーゼに関しては、*Aspergillus oryzae* を原料として得られたものだけが弱い陽性結果を示した。しかし、大麦または小麦を原料とする β -アミラーゼでは陰性であったことから、培養物に微量のヒスチジンが含まれている可能性も考えられた。一方、由来菌株の異なる2種の β -グルコシダーゼは染色体異常を誘発し陽性となったが、 α -グルコシダーゼはすべての3種の試験系で陰性となったことから、基本構造を有するグルコシダーゼでも、 α -体と β -体により生物活性が異なる結果となった。キチンやキトサンを加水分解する酵素であるキチナーゼや2種の由来の異なる菌株より得られたキトサナーゼも陰性となった。

ま と め

以上の結果より、試験した天然添加物43物質のうち、Ames試験で弱いながら陽性となったものが4検体、染色体異常試験で陽性となったものが8検体あった。Ames試験で弱陽性となったものはすべて微生物培養由来の酵素剤であり、Ames試験における選択剤であるヒスチジンが微量混在したための反応として説明できる可能性がある(実際、最終報告書の提出後に、アミノ酸分析により被験物中にヒスチジンがきょう雑していることが認められた)。また、*in vitro*での染色体異常誘発性に関しては、十分高用量まで試験したげっ歯類を用いる小核試験がすべて陰性であったことを考慮すれば、生体にとって特段問題となるものではないと考えられる。しかしながら、陽性結果を示した12物質に関しては、その活性体の同定、異常誘発機構の解明などさらなる詳細な検討が望まれる。

謝 辞

本遺伝毒性試験の実施にあたり、終始ご指導ならびに報告書の査読をしていただいた国立衛研食品添加物部の山崎壮室長、同・佐藤恭子主任研究官に、また、トウガラシ水性抽出物の考察に関しては、食品薬品安全センターの佐々木澄志博士に協力をいただき厚く感謝申し上げます。また、被験物質と資料の取りまとめにご尽力いただいた日本食品添加物協会の鈴木宏侖氏、ならびに被験物質を提供いただいた関連各社、そして短期間での試験実施にご協力いただいた各試験機関の方々に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 林 裕造 “既存天然添加物の安全性評価に関する調査研究—平成8年度厚生科学研究報告書—” 日本食品添加物協会, 1998, p. 1-111.
- 2) 林 真, 松井道子, 石井健二, 川崎通昭, 厚生省等による食品添加物の変異原性評価データシート (昭和54年~平成10年度分). 環境変異原研究, 22, 27-44 (2000).
- 3) 祖父尼俊雄監修 “染色体異常試験データ集” Life-science Information Center, 1998.
- 4) Ozaki, K., Kitano, M., Furusawa, N., Yamaguchi, H., Kuroda, K., Endo, G., Genotoxicity of gardenia yellow and its components. Food Chem. Toxicol., 40, 1,603-1,610 (2002).
- 5) Stich, H. F., Rosin, M. P., Wu, C. H., Powrie, W. D., A comparative genotoxicity study of chlorogenic acid (3-O-caffeoylquinic acid). Mutat. Res., 90, 201-212 (1981).
- 6) Fung, V. A., Cameron, T. P., Hughes, T. J., Kirby, P. E., Dunkel, V. C., Mutagenic activity of some coffee flavor ingredients. Mutat. Res., 204, 219-228 (1988).
- 7) Stich, H. F., The Beneficial and hazardous effects of simple phenolic compounds. Mutat. Res., 259, 307-324 (1991).
- 8) Szallasi, A., Vanilloid (capsaicin) receptors in health and disease. Am. J. Clin. Pathol., 118, 110-121 (2002).
- 9) Tanaka, T., Kohno, H., Sakata, K., Yamada, Y., Hirose, Y., Sugie, S., Mori, H., Modifying effects of dietary capsaicin and rotenone on 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. Carcinogenesis, 23, 1,361-1,367 (2002).
- 10) Toth, B., Rogan, E., Walker, B., Tumorigenicity and mutagenicity studies with capsaicin of hot peppers. Anticancer Res., 4, 117-119 (1984).
- 11) Toth, B., Gannett, P., Carcinogenicity of lifelong administration of capsaicin of hot pepper in mice. In Vivo, 6, 59-63 (1992).
- 12) Kim, J. P., Park, J. G., Lee, M. D., Han, M. D., Park, S. T., Lee, B. H., Jung, S. E., Co-carcinogenic effects of several Korean foods on gastric cancer induced by *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine in rats. Jpn. J. Surg., 15, 427-437 (1985).
- 13) Agrawal, R. C., Wiessler, M., Hecker, E., Bhide, S. V., Tumour-promoting effect of chilli extract in BALB/c mice. Int. J. Cancer, 38, 689-695 (1986).
- 14) Jang, J. J., Kim, S. H., Yun, T. K., Inhibitory effect of capsaicin on mouse lung tumor development. In Vivo, 3, 49-53 (1989).
- 15) Surh, Y. J., Lee, R. C., Park, K. K., Mayne, S. T., Liem, A., Miller, J. A., Chemoprotective effects of capsaicin and diallyl sulfide against mutagenesis or tumorigenesis by vinyl carbamate and *N*-nitrosodimethylamine. Carcinogenesis, 16, 2,467-2,471 (1995).
- 16) Yoshitani, S. I., Tanaka, T., Kohno, H., Takashima, S., Chemoprevention of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by dietary capsaicin and rotenone. Int. J. Oncol., 19, 929-939 (2001).
- 17) Park, K. K., Surh, Y. J., Effects of capsaicin on chemically-induced two-stage mouse skin carcinogenesis. Cancer Lett., 114, 183-184 (1997).
- 18) Park, K. K., Chun, K. S., Yook, J. I., Surh, Y. J., Lack of tumor promoting activity of capsaicin, a principal pungent ingredient of red pepper, in mouse skin carcinogenesis. Anticancer Res., 18, 4,201-4,205 (1998).
- 19) Teel, R. W., Huynh, H. T., Lack of the inhibitory effect of intragastrically administered capsaicin on NNN-induced lung tumor formation in the A.J. mouse. In Vivo, 13, 231-234 (1999).
- 20) Surh, Y. J., Lee, S. S., Capsaicin, a double-edged sword: toxicity, metabolism, and chemopreventive potential. Life Sci., 56, 1,845-1,855 (1995).
- 21) Surh, Y. J., Lee, S. S., Capsaicin in hot chili pepper: carcinogen, co-carcinogen or anticarcinogen? Food Chem. Toxicol., 34, 313-316 (1996).
- 22) Singh, S., Asad, S. F., Ahmad, A., Khan, N. U., Hadi, S. M., Oxidative DNA damage by capsaicin and dihydrocapsaicin in the presence of Cu(II). Cancer Lett., 169, 139-146 (2001).
- 23) Han, S. S., Keum, Y. S., Chun, K. S., Surh, Y. J., Suppression of phorbol ester-induced NF-kappaB activation by capsaicin in cultured human promyelocytic leukemia cells. Arch. Pharm. Res., 25, 475-479 (2002).
- 24) Morré, D. J., Chueh, P. J., Morre, D. M., Capsaicin inhibits preferentially the NADH oxidase and growth of transformed cells in culture. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 1,831-1,835 (1995).
- 25) Macho, A., Calzado, M. A., Munoz-Blanco, J., Gomez-Diaz, C., Gajate, C., Mollinedo, F., Navas, P., Munoz, E., Selective induction of apoptosis by capsaicin in transformed cells: the role of reactive oxygen species and calcium. Cell Death Differ., 6, 155-165 (1999).
- 26) Kang, H. J., Soh, Y., Kim, M. S., Lee, E. J., Surh, Y. J., Kim, H. R., Kim, S. H., Moon, A., Roles of JNK-1 and p38 in selective induction of apoptosis by capsaicin in ras-transformed human breast epithelial cells. Int. J. Cancer, 103, 475-482 (2003).
- 27) Lopez-Carrillo, L., Hernandez, A. M., Dubrow, R., Chili pepper consumption and gastric cancer in Mexico: A case-control study. Am. J. Epidemiol., 139, 263-271 (1994).
- 28) Archer, V. E., Jones, D. W., Capsaicin pepper, cancer and ethnicity. Med. Hypotheses, 59, 450-457 (2002).

遺伝毒性：DNA直接作用物質に閾値は存在するのか!?

祖父尼 俊雄^{1*}, 能美 健彦², 太田 敏博³, 林 真²

¹元国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部, ²国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部

〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

³東京薬科大学生命科学部 〒192-0392 東京都八王子市堀之内 1432-1

Genotoxicity: Is a threshold concept applicable to evaluate the mutagenic activity of DNA-targeting substances!?

Toshio Sofuni¹, Takehiko Nohmi², Toshihiro Ohta³ and Makoto Hayashi²

¹Ex-Director,

²Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan

³School of Life Science, Tokyo University of Pharmacy and Life Science
1432-1, Horinouchi, Hachioji, Tokyo 192-0392, Japan

Summary

The concept of a "biological threshold" is attracting interest as an evaluation criterion for the mutagenic activity of DNA-targeting mutagens. In this context, the concept is defined as "a concentration of a chemical which does not produce any damage through its inability to perform the necessary biochemical reactions, even though present at the target in finite amount". To clarify whether this criterion is indeed applicable to DNA-targeting mutagens, we re-evaluated the reverse mutation assay data using DNA repair-deficient bacterial strains, such as *S. typhimurium* strains lacking the *O*⁶-methylguanine DNA methyltransferase genes (*ada*_{ST} and *ogt*_{ST}), the nucleotide excision repair gene (*uvrB*) or the 8-hydroxyguanine DNA glycosylase gene (*mutM*_{ST}), and *E. coli* strains lacking the nucleotide excision repair gene (*uvrA*). Mutagenic responses of 20 test chemicals including alkylating and non-alkylating agents were compared between the repair-deficient and their wild-type strains.

All the alkylating agents, such as MNNG, ENNG, EMS, ENU, DMN and DEN, exhibited more sensible mutagenic responses in strains YG7108 (Δ *ada*_{ST}, Δ *ogt*_{ST}) and YG7113 (same as YG7108 but containing the plasmid pKM101) than in the parental strains TA1535 and TA100 (same as TA1535 but containing the pKM101), respectively. Upon applying MNNG, YG7108 showed about 2–100 fold increase in the number of His⁺ revertants above the spontaneous level over the range of 0.00025–0.25 μ g/plate, whereas TA1535 did not show any significant increase in the number of His⁺ revertants over the same dose range. On TA1535, an increasing tendency of the number of revertants was observed at 0.5 μ g/plate or above. This indicates an approximate 2,000-fold difference at the mutagenic concentration level between the wild-type and the repair-deficient strains. Other alkylating agents also showed significant differences in mutagenic responses

* E-mail: toshi_sofu@yahoo.co.jp

Present address: 916-3 Kokuki, Shiraoka, Minami-Saitama, Saitama 349-0217, Japan

受付: 2005年4月5日 受理: 2005年4月5日

©日本環境変異原学会

本稿は第33回日本環境変異原学会, 第18回日本動物実験代替法学会合同学術会議, JEMS & JSAAE 合同シンポジウム1「発がん性と遺伝毒性の閾値—リスクアセスメントにおける問題点—」で発表された。
This paper was presented to the JEMS & JSAAE combination symposium 1 "Threshold of carcinogenicity and genotoxicity — issues for risk assessment —" at the 33rd JEMS annual meeting and the 18th JSAAE annual meeting, 2004.

between YG7108 and TA1535, or between YG7113 and TA100 respectively, with some variations among test chemicals. On the other hand, non-alkylating agents, such as 4-NQO, AF-2, 2-NF and MX, did not show any differences in the dose-response relationships between YG7113 and TA100. When non-alkylating agents, such as 4-NQO, 2-NF and MX were applied to TA1535 ($\Delta uvrB$), TA1538 ($\Delta uvrB$) and WP2uvrA ($\Delta uvrA$), clearly different mutagenic responses, i.e. about 30- to 60-fold, were observed between the repair-deficient and the parental strains (TA1975, TA1978 and WP2, respectively). 4-NQO showed different mutagenic responses between YG3002 ($\Delta mutM_{ST}$) and TA1975 (about 10-fold), though the application of other oxidative agents such as hydrogen peroxide resulted in less than 10-fold differences. The present results indicate that the wild-type strains having normal repair capacity show no gene mutation induction at the concentrations at which gene mutations are clearly induced in the repair-deficient strains through DNA damage. Thus, the present results suggest the existence of a "biological threshold" below which no mutagenic response is induced by DNA-targeting mutagenic substances.

Keywords: threshold, biological threshold, DNA-targeting mutagens, DNA repair-deficient strains, alkylating agents

緒 言

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 (Elhajouji et al., 1995; 1997)。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 (Kirsch-Volders et al., 2000) が、その中に生物学的な閾値 (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) の発現に必要な全ての生物学的なプロセスが完遂できない (例えば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。細菌を用いる復帰変異試験では *Salmonella typhimurium* (以下サルモネラ菌と略) の TA1535, TA1537, TA1538 が用いられるが、これらはいずれもヌクレオチド除去修復欠損株 ($\Delta uvrB$) であり、それらの野生株である TA1975, TA1977, TA1978 に比べ変異原物質に対する感受性が高いことは一般に知られていることである。また、アルキル化DNA損傷を修復する *O*⁶-methylguanine methyltransferase (MGT) を欠損した菌株が作製され、その野生株との比較から欠損株が野生株に比べてアルキル化剤に高感受性を示すことが認められている (Hakura et al., 1991; Yamada et al., 1995; 1997; 山田, 1999)。このようなDNA損傷修復欠損株を用いた研究では、多くの場合変異原物質の高感度検出や修復機構解明に視点が向けられ、必ずしも閾値の概念に結び付けようとするものではなかった。しかし、このような

DNA損傷修復欠損株と野生株の感受性の違いそのものが、上述の生物学的閾値の存在を意味しているものとして捉えるようになってきた (Sofuni et al., 2000)。DNAの酸化的損傷を修復する 8-hydroxyguanine (8-OH-G) DNA glycosylase を欠損する菌株が作製され、野生株との酸化的損傷に対する感受性が検討されており (Suzuki et al., 1997; Kim et al., 2004)、これらの菌株も含めて改めてこの問題について検討した結果を報告する。用いた菌株、被験物質、変異コロニー数のデータなどはここで引用した文献に基づいており、閾値の議論に必要な場合には、より低用量または高用量について同様の条件で追加実験を行っている。ヌクレオチド除去修復欠損株については本研究で得られた新たな実験結果を示している。

実験材料および方法

1) 使用菌株

細菌を用いる復帰突然変異試験に供した試験菌株を Table 1 に示す。サルモネラ菌にはアルキル化DNA損傷修復酵素 (*O*⁶-methylguanine DNA methyltransferase : MGT) として2つの遺伝子 *ogt_{ST}* と *ada_{ST}* があり、これらを欠損した菌株 YG7104 (Δogt_{ST}) と YG7108 (Δogt_{ST} , Δada_{ST}) およびその野生株 TA1535、並びに TA1535 株に pKM101 プラスミドを導入した TA100 とその MGT 欠損株 YG7112 (Δogt_{ST}) と YG7113 (Δogt_{ST} , Δada_{ST}) を用いてアルキル化剤について突然変異誘発性を比較した。

非アルキル化剤については、ヌクレオチド除去修復欠損株を用いた。サルモネラ菌では、TA1535 ($\Delta uvrB$) とその野生株 TA1975, TA1538 ($\Delta uvrB$) とその野生株 TA1978、並びに大腸菌株では WP2uvrA ($\Delta uvrA$) とその野生株 WP2 との間で比較検討した。

酸化的DNA損傷については、サルモネラ菌の 8-hydroxyguanine DNA glycosylase の遺伝子欠損株を用いた。YG3001 ($\Delta mutM_{ST}$) とその野生株 TA1535, YG3002 ($\Delta mutM_{ST}$) とその野生株 TA1975、並びに YG3003

Table 1 Tester strains used in the present study

| Strain | Description | Reference |
|-------------------------------|--|------------------------|
| <i>Salmonella typhimurium</i> | | |
| TA1975 | <i>hisG46, rfa</i> | Maron and Ames, 1983 |
| TA1535 | as TA1975, but $\Delta uvrB$ | Maron and Ames, 1983 |
| YG7104 | as TA1535, but Δogf_{ST} , Km ^r | Yamada et al., 1995 |
| YG7108 | as TA1535, but Δada_{ST} and Δogf_{ST} , Km ^r and Cm ^r | Yamada et al., 1995 |
| YG3001 | as TA1535, but $\Delta mutM_{ST}$, Km ^r | Suzuki et al, 1997 |
| YG3002 | as TA1975, but $\Delta mutM_{ST}$, Km ^r | Suzuki et al, 1997 |
| TA100 | as TA1535, but harboring pKM101, Ap ^r | McCann et al., 1975 |
| YG7112 | as TA100, but Δogf_{ST} , Cm ^r | Yamada et al., 1997 |
| YG7113 | as TA100, but Δada_{ST} and Δogf_{ST} , Km ^r and Cm ^r | Yamada et al., 1997 |
| TA102 | <i>hisG428, rfa</i> , harboring pKM101, Ap ^r | Suzuki et al, 1997 |
| YG3003 | as TA102, but $\Delta mutM_{ST}$, Km ^r | Suzuki et al, 1997 |
| TA1978 | <i>hisD3052, rfa</i> | Maron and Ames, 1983 |
| TA1538 | as TA1978, but $\Delta uvrB$ | Maron and Ames, 1983 |
| <i>Escherichia coli</i> | | |
| WP2 | <i>trpE65</i> | Gatehouse et al., 1994 |
| WP2 <u>uvrA</u> | as WP2, but $\Delta uvrA$ | Gatehouse et al., 1994 |

Km^r: resistant to kanamycin, Cm^r: resistant to chloramphenicol, Ap^r: resistant to ampicillin

Table 2 List of 20 test compounds

| Abbreviation | Test compound | Source | Solvent |
|--------------|--|--|-------------------------------|
| MNNG | <i>N</i> -Methyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine | Dr. M. Nakadate, NIHS, Tokyo | Dimethyl sulfoxide |
| ENNG | <i>N</i> -Ethyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine | Dr. M. Nakadate, NIHS, Tokyo, and Sigma-Aldrich | Dimethyl sulfoxide |
| PNNG | <i>N</i> -Propyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine | Dr. M. Nakadate, NIHS, Tokyo | Dimethyl sulfoxide |
| BNNG | <i>N</i> -Butyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine | Dr. M. Nakadate, NIHS, Tokyo | Dimethyl sulfoxide |
| MMS | Methyl methanesulfonate | Tokyo Kasei Kogyo, Tokyo | Dimethyl sulfoxide |
| EMS | Ethyl methanesulfonate | Aldrich Chemical, Milwaukee | Dimethyl sulfoxide |
| MNU | <i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -nitrosourea | Sigma Chemical Co., St. Louis | Dimethyl sulfoxide |
| ENU | <i>N</i> -Ethyl- <i>N</i> -nitrosourea | Sigma Chemical Co., St. Louis | Dimethyl sulfoxide |
| EDB | Ethylene dibromide | Wako Pure Chemical Industries, Osaka | Dimethyl sulfoxide |
| DMN | Dimethylnitrosamine | Wako Pure Chemical Industries, Osaka | Water |
| DEN | Diethylnitrosamine | Wako Pure Chemical Industries, Osaka | Water |
| 4-NQO | 4-Nitroquinoline 1-oxide | Tokyo Kasei Kogyo, Tokyo | Dimethyl sulfoxide or ethanol |
| AF-2 | 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (Furylfuramide) | Wako Pure Chemical Industries, Osaka | Dimethyl sulfoxide |
| 2-NF | 2-Nitrofluorene | Tokyo Kasei Kogyo, Tokyo, and Wako Pure Chemical Industries, Osaka | Dimethyl sulfoxide or ethanol |
| MX | 3-Chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone | Dr. N. Kinae, Shizuoka Prefectural Univ., and Wako Pure Chemical Industries, Osaka | Dimethyl sulfoxide |
| NPD | <i>p</i> -Nitro- <i>o</i> -phenylenediamine (1,2-diamino-4-nitrobenzene) | Wako Pure Chemical Industries, Osaka | Dimethyl sulfoxide |
| AZ | Sodium azide | Wako Pure Chemical Industries, Osaka | Water |
| HP | Hydrogen peroxide | Wako Pure Chemical Industries, Osaka | Water |
| MB (+light) | Methylene blue (+visible light) | Sigma Chemical Co., St. Louis | Water |
| NR (+light) | Neutral red (+visible light) | Junsei, Tokyo | Water |

($\Delta mutM_{ST}$)とその野生株 TA102 をそれぞれ用いた。

これらの変異原物質の入手先と用いた溶媒の種類を Table 2 に示した。

2) 被験物質

DNAを直接標的とする代表的な物質として主にアルキル化剤を、また、その比較対照として塩基置換変異やフレームシフトを誘発する変異原物質や酸化的DNA損傷をもたらすものなど、20種類について検討した。そ

3) 試験方法

復帰突然変異試験は通常のプレインキュベーション法を用い、主に非代謝活性化法で行ったが、必要に応じてラット肝S9 mixによる代謝活性化法で行った。保存菌

Table 3 Number of His⁺ revertants per plate in TA1535, YG7104 and YG7108 treated with MNNG in the absence of S9 mix

| Experiment-1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|------|------|------|------|--------|------|------|---------|------|------|--------|------|------|-------|------|------|--------|------|------|-------|------|--|
| Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | | 0 | | | 0.1 | | | 0.25 | | | 0.5 | | | 1 | | | | | | | | |
| Plate No. | #1 | #2 | Mean | #1 | #2 | Mean | #1 | #2 | Mean | #1 | #2 | Mean | #1 | #2 | Mean | | | | | | | |
| TA1535 | 12 | 10 | 11 | 11 | 7 | 9 | 4 | 9 | 7 | 21 | 14 | 18 | 361 | 489 | 425 | | | | | | | |
| YG7104 | 11 | 14 | 13 | 480 | 400 | 440 | 1344 | 1120 | 1232 | 1752 | 1920 | 1836 | 4000 | 2568 | 3284 | | | | | | | |
| YG7108 | 23 | 26 | 25 | 2704 | 2568 | 2636 | 3656 | 3968 | 3812 | 5520 | 5664 | 5592 | 4160 | 7024 | 5592 | | | | | | | |
| Experiment-2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | | 0 | | | 0.01 | | | 0.025 | | | 0.05 | | | 0.1 | | | 0.25 | | | 0.5 | | |
| Plate No. | #1 | #2 | Mean | #1 | #2 | Mean | #1 | #2 | Mean | #1 | #2 | Mean | #1 | #2 | Mean | #1 | #2 | Mean | #1 | #2 | Mean | |
| TA1535 | 6 | 8 | 7 | 8 | 6 | 7 | 6 | 2 | 4 | 2 | 4 | 3 | 4 | 4 | 4 | 8 | 2 | 5 | 18 | 34 | 26 | |
| YG7104 | 10 | 10 | 10 | 78 | 87 | 83 | 162 | 152 | 157 | 342 | 350 | 346 | 620 | 588 | 604 | 1601 | 1620 | 1611 | 5004 | 5508 | 5256 | |
| YG7108 | 37 | 46 | 42 | 824 | 962 | 893 | 1432 | 1346 | 1389 | 1230 | 1492 | 1361 | 1808 | 1846 | 1827 | 4008 | 5706 | 4857 | 5922 | 4888 | 5405 | |
| Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | | 1 | | | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Plate No. | #1 | #2 | Mean | #1 | #2 | Mean | | | | | | | | | | | | | | | | |
| TA1535 | 860 | 986 | 923 | 2116 | 2126 | 2121 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| YG7104 | 5718 | 6066 | 5892 | 6218 | 8706 | 7462 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| YG7108 | 6006 | 6186 | 6096 | 7626 | 7326 | 7476 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Experiment-3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | | 0 | | | 0.0001 | | | 0.00025 | | | 0.0005 | | | 0.001 | | | 0.0025 | | | 0.005 | | |
| Plate No. | #1 | #2 | Mean | #1 | #2 | Mean | #1 | #2 | Mean | #1 | #2 | Mean | #1 | #2 | Mean | #1 | #2 | Mean | #1 | #2 | Mean | |
| TA1535 | 7 | 5 | 6 | 10 | 11 | 11 | 7 | ND | 7 | 8 | 4 | 6 | 5 | 5 | 5 | 10 | 7 | 9 | 9 | 9 | 9 | |
| YG7104 | 22 | 20 | 21 | 27 | 27 | 27 | 37 | 25 | 31 | 24 | 23 | 24 | 36 | 29 | 33 | 38 | 39 | 39 | 71 | 76 | 74 | |
| YG7108 | 35 | 19 | 27 | 40 | 38 | 39 | 49 | 61 | 55 | 46 | 80 | 63 | 116 | 75 | 96 | 173 | 173 | 173 | 348 | 376 | 362 | |
| Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | | 0.01 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Plate No. | #1 | #2 | Mean | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| TA1535 | 8 | 9 | 9 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| YG7104 | 103 | 122 | 113 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| YG7108 | 452 | 488 | 470 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

(ND: No data)

液を解凍し、5~6 mLのニュートリエントブロスに5 μL の接種量で植え、37°Cで15~16時間振盪培養した菌液を用いた。被験物質溶液 0.1 mLと0.1 M Na-リン酸緩衝液 0.5 mL(またはS9 mix)とテスト菌株の培養液0.1 mLを試験管に入れ、よく混合し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または72時間培養した後、His⁺またはTrp⁺復帰変異コロニー数を測定した。各用量毎に2~3枚のプレート(対照群は2~5枚)を用い、その平均値を求めた。

結 果

1) MGT欠損株($\Delta\text{ogt}_{\text{ST}}$, $\Delta\text{ada}_{\text{ST}}$)による比較

代表的なアルキル化剤であるMNNGの結果をTable 3に示す。ここにはMGT欠損株であるYG7104($\Delta\text{ogt}_{\text{ST}}$)とYG7108($\Delta\text{ogt}_{\text{ST}}$, $\Delta\text{ada}_{\text{ST}}$)、及びそれらの野生株TA1535についての3回の実験結果を示してある。TA1535の突然変異誘発に比べるとYG7104よりもYG7108の方がその

差が大きいので、以後はYG7108のデータを用いて比較することにした。Fig. 1にYG7108とTA1535についての3回の実験結果をグラフで示してある。ここでは低用量域での反応を見やすくするため、X軸およびY軸共に対数で表示してある。YG7108では0.00025 $\mu\text{g}/\text{plate}$ より明らかな変異コロニー数の増加がみられ、それ以後用量依存的に変異コロニー数が増加している。一方、TA1535の0.00025~0.25 $\mu\text{g}/\text{plate}$ では陰性対照と同等の値を示し、0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ でようやく変異コロニー数の増加傾向がみられ、1.0 $\mu\text{g}/\text{plate}$ より顕著な増加がみられている。YG7108で突然変異が誘発される用量域(0.00025~0.25 $\mu\text{g}/\text{plate}$)において、TA1535では ogt_{ST} と ada_{ST} の2つ遺伝子が正常に機能していることによって、突然変異の誘発が完全に抑えられていることが示されている。

ENNGについても同様の結果が得られている(Fig. 2)。YG7108では0.00025 $\mu\text{g}/\text{plate}$ で変異コロニー数の増加傾向がみられ、それ以後用量依存的に変異コロニー数が増加している。一方、TA1535の0.01~0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ では陰性対照と同等の値を示し、1.0 $\mu\text{g}/\text{plate}$ で変異コロニー数の増加傾向がみられ、2.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ で明らかな増加が

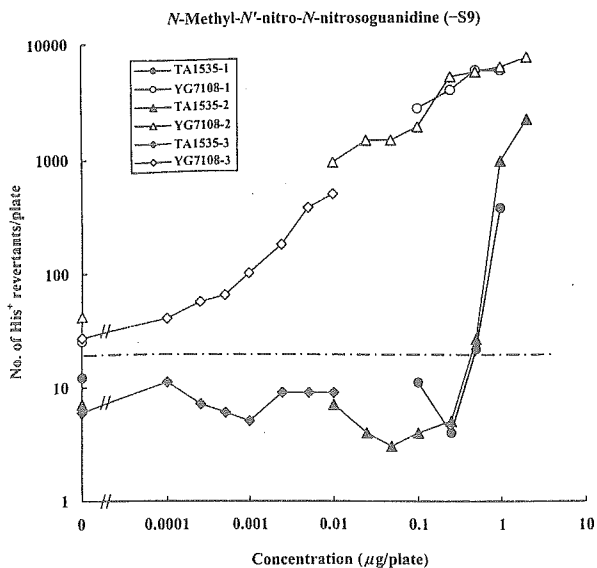


Fig. 1 Comparison of mutagenic responses of MNNG in TA1535 and YG7108 without S9 mix (3 experiment's data)

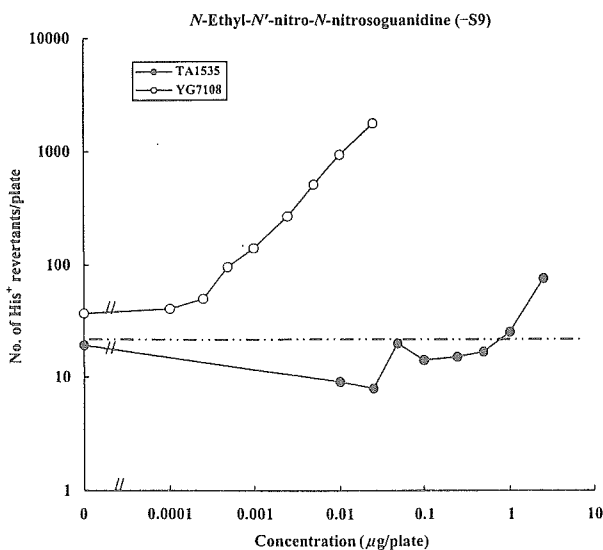


Fig. 2 Comparison of mutagenic responses of ENNG in TA1535 and YG7108 without S9 mix

Table 4 Number of His⁺ revertants per plate in TA100, YG7112 and YG7113 treated with EMS in the absence of S9 mix

| Experiment-1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|------|------|------|------|------|------|------|-----|------|------|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Dose (µg/plate) | 0 | | | 5 | | | 10 | | | 25 | | | 50 | | | 100 | | | 250 | | |
| Plate No. | #1 | #2 | Mean | #1 | #2 | Mean | #1 | #2 | Mean | #1 | #2 | Mean | #1 | #2 | Mean | #1 | #2 | Mean | #1 | #2 | Mean |
| TA100 | 71 | 69 | 70 | 73 | 72 | 73 | 71 | 66 | 69 | 79 | 69 | 74 | 76 | 65 | 71 | 61 | 85 | 73 | 89 | 80 | 85 |
| YG7112 | 78 | 70 | 74 | 240 | 216 | 228 | 328 | 320 | 324 | 800 | 880 | 840 | 1248 | 1232 | 1240 | 2304 | 1920 | 2112 | 2400 | 3040 | 2720 |
| YG7113 | 70 | 79 | 75 | 216 | 236 | 226 | 448 | 456 | 452 | 1008 | 784 | 896 | 1280 | 1360 | 1320 | 2368 | 2784 | 2576 | 3040 | 3584 | 3312 |
| Experiment-2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Dose (µg/plate) | 500 | | | 1000 | | | 2500 | | | 5000 | | | | | | | | | | | |
| Plate No. | #1 | #2 | Mean | #1 | #2 | Mean | #1 | #2 | Mean | #1 | #2 | Mean | #1 | #2 | Mean | | | | | | |
| TA100 | 88 | 88 | 88 | 86 | 87 | 87 | | | | | | | | | | | | | | | |
| YG7112 | 3264 | 3456 | 3360 | 4160 | 4800 | 4480 | | | | | | | | | | | | | | | |
| YG7113 | 4224 | 3750 | 3987 | 4832 | 5824 | 5328 | | | | | | | | | | | | | | | |

認められている。2つの菌株で突然変異の誘発傾向のみられる用量で比較するとTA1535(1.0 µg/plate)はYG7108(0.00025 µg/plate)のおよそ4,000倍も高い用量となる。なお、MNNGでのこの差異はおよそ2,000倍である。

PNNGとBNNGについてもYG7108とTA1535との間で明らかな違いがみられているが、MNNGやENNG程の大きな違いではなく、突然変異の誘発傾向のみられる用量の差異はおよそ100倍程度と判断された(データを省略)。

EMSとMMSについてはTA100とそのMGT欠損株であるYG7112(Δogf_{ST})とYG7113(Δogf_{ST} , Δada_{ST})とで比較した。Table 4にEMSでの2回の実験結果を示す。1回目の実験でYG7113の方がYG7112より変異コロニーの

誘発頻度が高い傾向にあるので、2回目の実験ではTA100とYG7113とで比較した。Fig. 3に両菌株での1回目と2回目の実験結果をグラフで示してある。YG7113では5.0 µg/plateで明らかな変異コロニー数の増加がみられ、それ以後用量依存的に変異コロニー数が増加している。一方、TA100では2,500 µg/plateから明らかな変異コロニー数の増加がみられており、その用量の差異は少なくとも500倍程になる。MMSではEMS程顕著な違いはみられておらず、およそ20倍程度の用量差にすぎなかった(データを省略)。

MNUおよびENUについてはTA1535とYG7108で比較を行い、ENUでは100倍を超える用量差があるものと判断され(Fig. 4)、MNUでも100倍に近い用量差があるものと判断された(データを省略)。EDBについて同

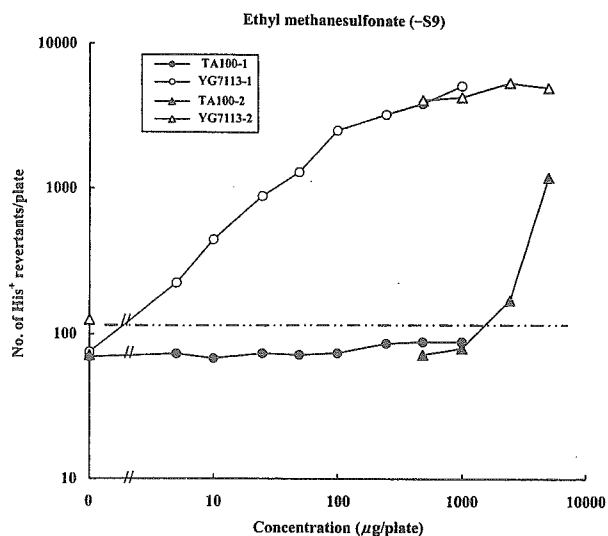


Fig. 3 Comparison of mutagenic responses of EMS in TA100 and YG7113 without S9 mix (2 experiment's data)

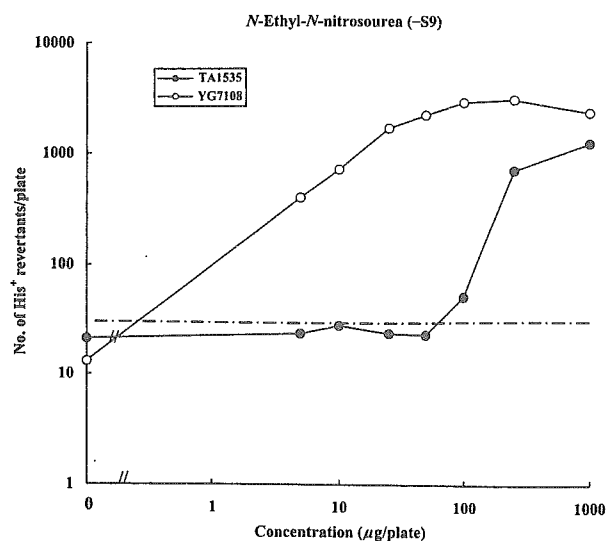


Fig. 4 Comparison of mutagenic responses of ENU in TA1535 and YG7108 without S9 mix

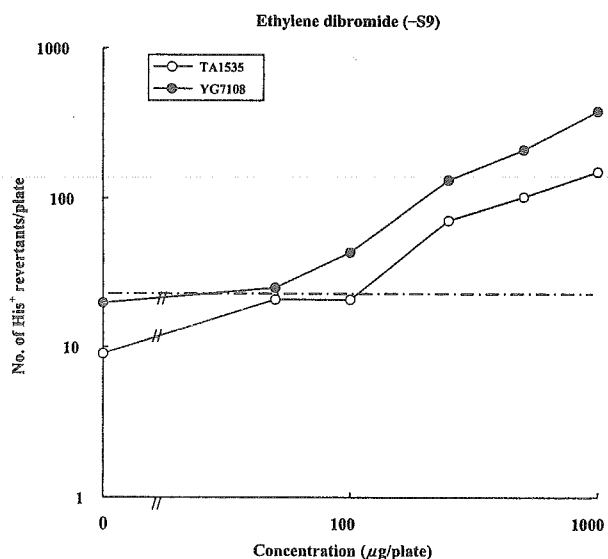


Fig. 5 Comparison of mutagenic responses of EDB in TA1535 and YG7108 without S9 mix

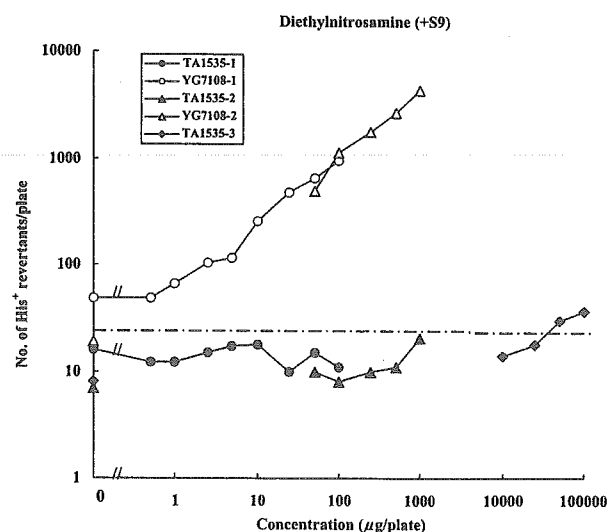


Fig. 6 Comparison of mutagenic responses of DEN in TA1535 and YG7108 with S9 mix (3 experiment's data)

様の比較を行ったが、両菌株での用量依存性には違いがあるものの、その用量差は10倍以下で明らかなものではなかった (Fig. 5)。

これまでは非代謝活性化法での実験であるが、代謝活性化法 (ラット S9) を用いて DMN と DEN について TA1535 と YG7108 で比較検討した。DMN では明らかに 100 倍を超える用量差があるものと判断された (データを省略)。DEN の YG7108 では 2.5 µg/plate より変異コロニー数の明らかな増加がみられ、それ以後用量に依存して変異コロニー数が増加している (Fig. 6)。一方、YG1535 では 50,000 µg/plate という高用量で変異コロニー数の明らかな増加が認められている。これを直接比較すると 20,000 倍という極めて大きな違いになる。

非代謝活性化法を用いて 4-NQO (Table 5)、AF-2 (Fig. 7)、2-NF および MX について TA100 と YG7113 とで比較したところ、両菌株の変異コロニー数の用量依存性はほとんど同じで、なんらの違いもみられなかった (2-NF と MX についてはデータを省略)。

2) スクレオチド除去修復欠損株 (*uvrA* または *uvrB*) による比較

Ames 試験に用いられている TA1535 ($\Delta uvrB$) および TA1538 ($\Delta uvrB$) は除去修復の欠損株として知られており、それぞれの野生株である TA1975 と TA1978 とで比較を行った。さらに大腸菌株 WP2 *uvrA* ($\Delta uvrA$) とその野生株 WP2 との比較も行った。用いた被験物質は、

Table 5 Number of His⁺ revertants per plate in TA100, YG7112, YG7113, TA1978, TA1538, TA1975 and YG3002 treated with 4-NQO in the absence of S9 mix

| Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | 0 | | | 0.01 | | | 0.025 | | | 0.05 | | | 0.1 | | | 0.25 | | | 0.5 | | |
|-------------------------------------|-----|-----|-----|------|-----|-----|-------|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|
| Plate No. | #1 | #2 | Av. | #1 | #2 | Av. | #1 | #2 | Av. | #1 | #2 | Av. | #1 | #2 | Av. | #1 | #2 | Av. | #1 | #2 | Av. |
| TA100 | 100 | 132 | 116 | 175 | 158 | 167 | 286 | 270 | 278 | 474 | 462 | 468 | 740 | 870 | 805 | 1338 | 1188 | 1263 | 1238 | 1194 | 1216 |
| YG7112 | 184 | 154 | 169 | 212 | 226 | 219 | 324 | 284 | 304 | 462 | 454 | 458 | 742 | 684 | 713 | 1230 | 1234 | 1232 | 1618 | 1634 | 1626 |
| YG7113 | 180 | 142 | 161 | 114 | 134 | 124 | 236 | 278 | 257 | 370 | 366 | 368 | 600 | 630 | 615 | 1192 | 1444 | 1318 | 1614 | 1526 | 1570 |

| Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | 0 | | | | | | 0.0003 | | | | 0.001 | | | | 0.003 | | | |
|-------------------------------------|----|----|----|----|----|------|--------|----|----|------|-------|----|----|------|-------|----|----|------|
| Plate No. | #1 | #2 | #3 | #4 | #5 | Mean | #1 | #2 | #3 | Mean | #1 | #2 | #3 | Mean | #1 | #2 | #3 | Mean |
| TA1978 | 11 | 10 | 10 | 11 | 9 | 10 | 10 | 9 | 14 | 11 | 9 | 9 | 10 | 9 | 11 | 12 | 7 | 10 |
| TA1538 | 12 | 12 | 8 | 15 | 9 | 11 | 10 | 11 | 11 | 11 | 12 | 12 | 13 | 12 | 8 | 16 | 9 | 11 |

| Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | 0.01 | | | | 0.03 | | | | 0.1 | | | | 0.3 | | | | 0.5 | | | |
|-------------------------------------|------|----|----|------|------|----|----|------|-----|----|----|------|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|------|
| Plate No. | #1 | #2 | #3 | Mean | #1 | #2 | #3 | Mean | #1 | #2 | #3 | Mean | #1 | #2 | #3 | Mean | #1 | #2 | #3 | Mean |
| TA1978 | 12 | 7 | 13 | 11 | 8 | 12 | 10 | 10 | 10 | 12 | 14 | 12 | 13 | 13 | 7 | 11 | 15 | 11 | 10 | 12 |
| TA1538 | 13 | 14 | 12 | 13 | 30 | 22 | 23 | 25 | 75 | 72 | 69 | 72 | 169 | 197 | 170 | 179 | 246 | 236 | 243 | 242 |

| Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | 1 | | | | 2 | | | |
|-------------------------------------|----|-----|-----|------|------|------|------|------|
| Plate No. | #1 | #2 | #3 | Mean | #1 | #2 | #3 | Mean |
| TA1978 | 10 | 12 | 17 | 13 | 21 | 22 | 25 | 23 |
| TA1538 | 94 | 120 | 106 | 107 | (21) | (25) | (28) | (25) |

| Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | 0 | | | 0.5 | | | 1 | | | 2.5 | | | 5 | | | 10 | | |
|-------------------------------------|----|----|------|-----|----|------|----|----|------|-----|----|------|-----|-----|------|-----|-----|------|
| Plate No. | #1 | #2 | Mean | #1 | #2 | Mean | #1 | #2 | Mean | #1 | #2 | Mean | #1 | #2 | Mean | #1 | #2 | Mean |
| TA1975 | 1 | 0 | 1 | 2 | 1 | 2 | 3 | 0 | 2 | 3 | 2 | 3 | 21 | 17 | 19 | 32 | 25 | 29 |
| YG3002 | 1 | 2 | 2 | 8 | 7 | 8 | 8 | 21 | 15 | 92 | 84 | 88 | 630 | 600 | 615 | 630 | 563 | 597 |

(Parentheses indicate that apparent antibacterial activity was observed)

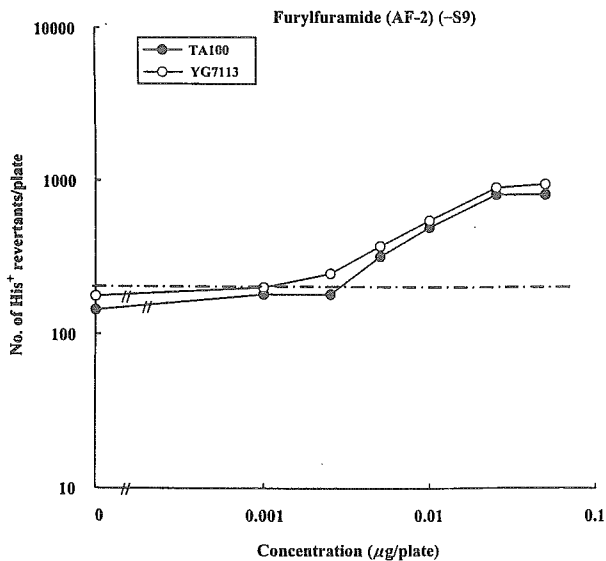


Fig. 7 Comparison of mutagenic responses of AF-2 in TA100 and YG7113 without S9 mix

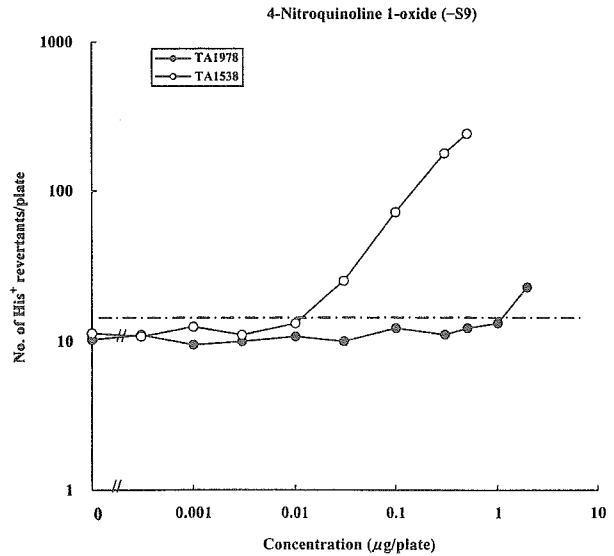


Fig. 8 Comparison of mutagenic responses of 4-NQO in TA1978 and TA1538 without S9 mix

TA100とYG7113との間で全く違いのみられなかった4-NQO, MX, 2-NFと、新たにNa₃NとNPDとを加えた5物質である。いずれも非代謝活性化法を用いた。

4-NQOについてTA1978とTA1538とで比較すると、TA1538では0.03 $\mu\text{g}/\text{plate}$ より変異コロニー数の増加がみられ、以後用量依存的に増加した。一方、TA1978では2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ より変異コロニー数の明らかな増加がみら

れており、60倍程の用量差があった(Table 5, Fig. 8)。同様の菌株の組み合わせで2-NFとNPDについて比較したところ、前者ではその差異が少なくなり、およそ30倍程度であったが、後者では両菌株の違いが大きくなり、100倍程度の差がみられた(2-NFとNPDについてはデータを省略)。MXについてはWP2とWP2uvrAとで比較したところ、WP2uvrAでは0.03 $\mu\text{g}/\text{plate}$ より明らかな変

Table 6 Number of Trp⁺ revertants per plate in WP2 and WP2^{uvrA} treated with MX in the absence of S9 mix

| Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | 0 | | | | 0.0001 | | | | 0.001 | | | | 0.003 | | | | 0.01 | | | |
|-------------------------------------|------|-----|-----|------|--------|-----|-----|------|-------|-----|-----|------|-------|-----|-----|------|------|-----|-----|------|
| Plate No. | #1 | #2 | #3 | Mean | #1 | #2 | #3 | Mean | #1 | #2 | #3 | Mean | #1 | #2 | #3 | Mean | #1 | #2 | #3 | Mean |
| WP2 | 19 | 23 | 19 | 19 | 15 | 15 | 14 | 15 | 23 | 13 | 19 | 18 | 20 | 21 | 18 | 20 | 17 | 22 | 15 | 18 |
| WP2 ^{uvrA} | 19 | 17 | 17 | 19 | 19 | 12 | 22 | 18 | 15 | 19 | 22 | 19 | 24 | 19 | 24 | 22 | 23 | 23 | 24 | 23 |
| Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | 0.03 | | | | 0.1 | | | | 0.3 | | | | 1 | | | | 3 | | | |
| Plate No. | #1 | #2 | #3 | Mean | #1 | #2 | #3 | Mean | #1 | #2 | #3 | Mean | #1 | #2 | #3 | Mean | #1 | #2 | #3 | Mean |
| WP2 | 11 | 21 | 20 | 17 | 20 | 23 | 14 | 19 | 22 | 25 | 24 | 31 | 42 | 44 | 39 | 99 | 102 | 88 | 96 | |
| WP2 ^{uvrA} | 81 | 85 | 81 | 82 | 222 | 202 | 228 | 217 | 852 | 755 | 843 | 817 | 796 | 812 | 836 | 815 | (0) | (0) | (0) | (0) |
| Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | 10 | | | | 30 | | | | | | | | | | | | | | | |
| Plate No. | #1 | #2 | #3 | Mean | #1 | #2 | #3 | Mean | | | | | | | | | | | | |
| WP2 | 319 | 286 | 295 | 300 | 427 | 448 | 574 | 483 | | | | | | | | | | | | |
| WP2 ^{uvrA} | (0) | (0) | (0) | (0) | ND | ND | ND | ND | | | | | | | | | | | | |

(Parentheses indicate that apparent antibacterial activity was observed, ND: No data)

Table 7 Number of His⁺ revertants per plate in TA1975 and TA1535 treated with AZ in the absence of S9 mix

| Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | 0 | | | | 0.0001 | | | | 0.0003 | | | | 0.001 | | | | 0.003 | | | |
|-------------------------------------|------|------|------|------|--------|----|----|------|--------|----|----|------|-------|-----|-----|------|-------|-----|-----|------|
| Plate No. | #1 | #2 | #3 | Mean | #1 | #2 | #3 | Mean | #1 | #2 | #3 | Mean | #1 | #2 | #3 | Mean | #1 | #2 | #3 | Mean |
| TA1975 | 1 | 1 | 0 | 0.7 | 2 | 0 | 1 | 1 | ND | ND | ND | ND | 1 | 0 | 2 | 1 | ND | ND | ND | ND |
| TA1535 | 5 | 6 | 8 | 6.3 | 6 | 7 | 8 | 7 | 2 | 5 | 8 | 5 | 9 | 5 | 11 | 8 | 12 | 12 | 15 | 13 |
| Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | 0.01 | | | | 0.03 | | | | 0.1 | | | | 0.3 | | | | 1 | | | |
| Plate No. | #1 | #2 | #3 | Mean | #1 | #2 | #3 | Mean | #1 | #2 | #3 | Mean | #1 | #2 | #3 | Mean | #1 | #2 | #3 | Mean |
| TA1975 | 0 | 0 | 2 | 0.7 | ND | ND | ND | ND | 2 | 1 | 1 | 1.3 | 1 | 2 | 4 | 2.3 | 2 | 3 | 3 | 2.7 |
| TA1535 | 12 | 13 | 16 | 13.7 | 25 | 26 | 27 | 26 | 66 | 83 | 87 | 79 | 247 | 246 | 243 | 245 | 607 | 670 | 594 | 624 |
| Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | 3 | | | | 10 | | | | 30 | | | | 100 | | | | | | | |
| Plate No. | #1 | #2 | #3 | Mean | #1 | #2 | #3 | Mean | #1 | #2 | #3 | Mean | #1 | #2 | #3 | Mean | | | | |
| TA1975 | 7 | 4 | 4 | 5 | 16 | 19 | 20 | 18 | 37 | 35 | 26 | 33 | 62 | 49 | 56 | 56 | | | | |
| TA1535 | 1278 | 1171 | 1319 | 1256 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | | | | |

(ND: No data)

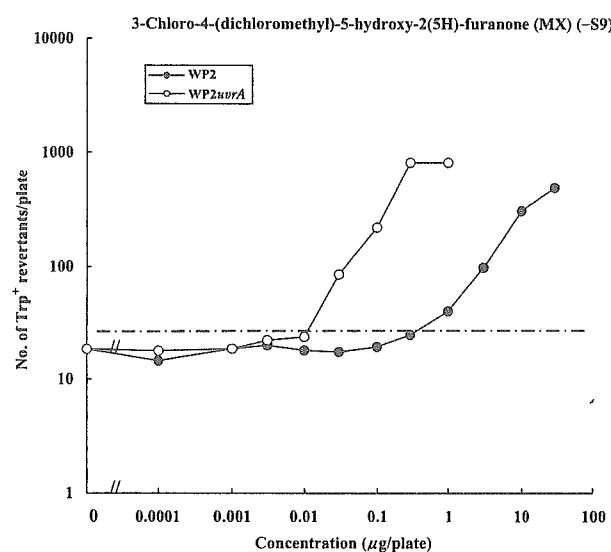


Fig. 9 Comparison of mutagenic responses of MX in WP2 and WP2^{uvrA} without S9 mix

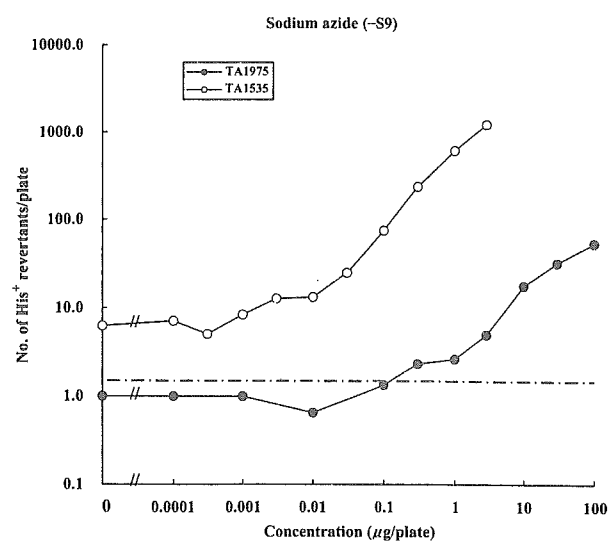


Fig. 10 Comparison of mutagenic responses of AZ in TA1975 and TA1535 without S9 mix

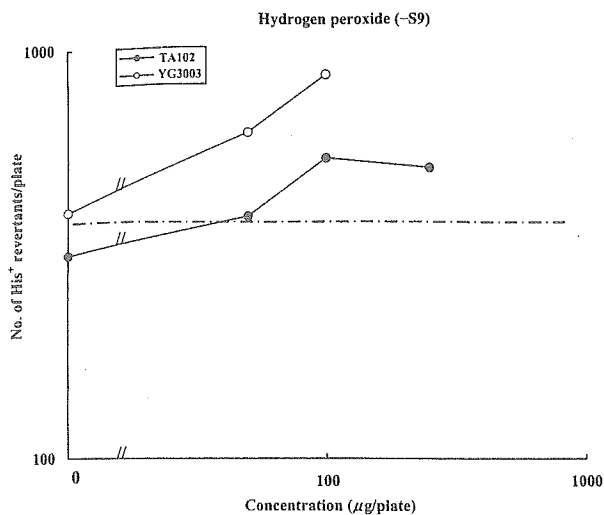


Fig. 11 Comparison of mutagenic responses of HP in TA102 and YG3003 without S9 mix

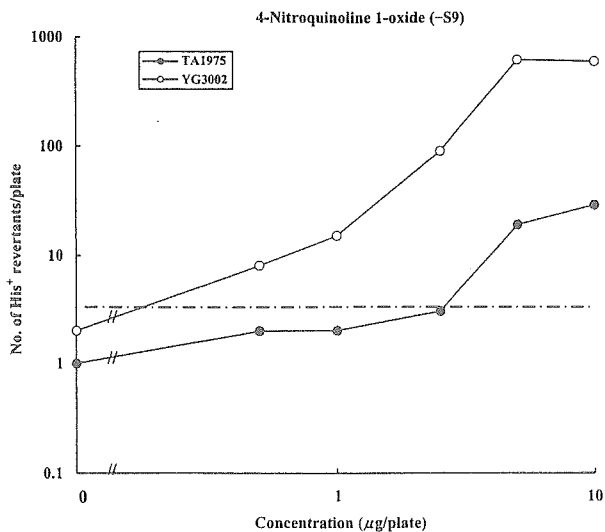


Fig. 12 Comparison of mutagenic responses of 4-NQO in TA1975 and YG3002 without S9 mix

異コロニー数の増加がみられ、WP2では1.0 µg/plateよりみられており、その用量差はおよそ30倍程度であった (Table 6, Fig. 9). AZについてTA1975とTA1535とで比較すると、両菌株での用量差はNPDと同様に100倍程度であった (Table 7, Fig. 10). なお、ENNGについてはTA1975とTA1535とで近似した用量依存性が得られたこと、およびTA1535とYG7104とでは突然変異の誘発に大きな違い (およそ3,000倍) のあることを別途確認している (データを省略).

3) 酸化的損傷修復欠損株 (*mutM_{ST}*) による比較

DNA損傷の重要なものの1つである酸化的損傷について、YG3001 ($\Delta mutM_{ST}$) とその野生株TA1535、YG3002 ($\Delta mutM_{ST}$) とその野生株TA1975、YG3003 ($\Delta mutM_{ST}$) とその野生株TA102を用いて検討した。HPについては非代謝活性化法を用いてTA102とYG3003とで比較したが、その反応性に違いはあるものの、10倍以下であった (Fig. 11). 代謝活性化法を用いてMB + 可視光、NR + 可視光についてTA1535とYG3001およびTA1975とYG3002とでそれぞれ比較したが、いずれもHPと類似した反応を示した (データを省略). 一方、4-NQOについてTA1975とYG3002を用いて比較したところYG3002では0.5 µg/plateで変異コロニー数の増加がみられるのに対して、TA1975では5 µg/plateより変異コロニー数の増加がみられており、10倍程度の用量差がみられた (Table 5, Fig. 12). 2-NFについてもTA1535とYG3001で比較したが、HPにおける反応と類似したものであった (データを省略).

考 察

本研究結果のまとめをTable 8に示す。代表的なアルキル化剤であるMNNGやENNGでは、MGT欠損株YG7108で突然変異が誘発されている用量においても、その野生株TA1535では突然変異の誘発は全くみられず、両菌株間で突然変異の誘発傾向のみられる用量で比較すると、野生株では数千倍もの高い用量となる。このことは野生株においてはDNA損傷によって突然変異が生じる場が十分にありながら、その修復系の存在によって突然変異に固定されるまでの過程を完遂できない用量域、即ち生物学的な閾値が存在していることを示している。

PNNGとBNNGでも同様に明らかな違いがみられるが、MNNGやENNGに比べると、野生株と欠損株での違いの程度は低くなっているが、これは側鎖が大きくなるにつれてMGTによる修復が低下する一方で、他の修復系例えばヌクレオチド除去修復系が関与してくるなどが考えられる。ENUではMNNGやENNGとほぼ同様に野生株と欠損株とに違いがみられたが、MNUではPNNGやBNNGと同程度の違いがみられている。EDBでは、両菌株での用量依存性に差異はあるものの、その違いは10倍以下であり、突然変異の誘発にMGTが関与するDNA損傷の占める割合は少ないものと考えられる。

代謝活性化法を用いた場合にも同様の結果が得られている。DMNとDENは共に野生株と欠損株で比較すると100倍以上の差異がみられている。特に、DENの場合には直接的に比較すると20,000倍もの違いになっている。但し、野生株で変異コロニーが明らかに増加している用量は著しく高用量で、そのような高用量での代謝産

Table 8 Summary of the results in 20 test compounds compared with different tester strains

| Deficient marker | <i>ogt_{ST}</i> and <i>ada_{ST}</i> | | <i>uvrA</i> or <i>uvrB</i> | | | <i>mutM_{ST}</i> | | |
|------------------|---|--------|----------------------------|--------|-----------------|--------------------------|--------|--------|
| | YG7108 | YG7113 | TA1535 | TA1538 | WP2 <i>uvrA</i> | YG3001 | YG3002 | YG3003 |
| Wild strain | TA1535 | TA100 | TA1975 | TA1978 | WP2 | TA1535 | TA1975 | TA102 |
| MNNG - S9 | ◎ | | | | | | | |
| ENNG - S9 | ◎ | | × | | | | | |
| PNNG - S9 | ○ | | | | | | | |
| BNNG - S9 | ○ | | | | | | | |
| MMS - S9 | | ○ | | | | | | |
| EMS - S9 | | ◎ | | | | | | |
| MNU - S9 | ○ | | | | | | | |
| ENU - S9 | ◎ | | | | | | | |
| EDB - S9 | △ | | | | | | | |
| DMN + S9 | ◎ | | | | | | | |
| DEN + S9 | ◎ | | | | | | | |
| 4-NQO - S9 | | × | | ○ | | | ○ | |
| AF-2 - S9 | | × | | | | | | |
| 2-NF - S9 | | × | | ○ | | △ | | |
| MX - S9 | | × | | | ○ | | | |
| NPD - S9 | | | | ○ | | | | |
| AZ - S9 | | | ○ | | | | | |
| HP - S9 | | | | | | | | △ |
| MB+light + S9 | | | | | | △ | | |
| NR+light + S9 | | | | | | | △ | |

Differences of the lowest effective concentration between two tester strains were, ◎: more than 100-fold, ○: about 10- to 100-fold, △: less than 10-fold, ×: no difference

物の生成が低用量と同じ効率であるとは考えがたく、実際の差異はもっと小さいものと推測される。

TA1535で突然変異の誘発が認められない物質については、TA100(野生株)とYG7113(欠損株)とで比較したところ、EMSでは100倍以上、MMSでは10倍以上の違いがみられ、MGTが関与する生物学的な閾値が存在するものと考えられる。一方、4-NQO、AF-2、MXおよび2-NFではTA100とYG7113の変異コロニーの用量依存性に全く違いがみられず、これらの物質ではMGTが関与するようなDNA損傷が突然変異の誘発要因とはなっていないものと考えられる。

TA100とYG7113で全く違いのみられなかったもののうち、塩基置換変異を誘発するAZとMXについては、ヌクレオチド除去修復欠損株のTA1535($\Delta uvrB$)、WP2*uvrA*($\Delta uvrA$)とそれらの野生株TA1975、WP2株を用いて、フレームシフトを誘発する4-NQO、2-NF、NPDについてはTA1538($\Delta uvrB$)株とその野生株TA1978株を用いて比較したところ、いずれの場合も修復欠損株と野生株とは30~100倍程の差異がみられており、これらの変異原物質では除去修復系が生物学的閾値に寄与しているものと考えられる。

酸化的損傷については、*mutM_{ST}*欠損株YG3001($\Delta mutM_{ST}$)、YG3002($\Delta mutM_{ST}$)、YG3003($\Delta mutM_{ST}$)とそれらの野生株TA1535、TA1975、TA102を用いて比較したところ、HP、MB+可視光、NR+可視光ではいず

れも差異はあるものの、その違いは10倍以下であった。酸化的損傷修復には*mutM_{ST}*に加えて*mutY_{ST}*も関与している。また、活性酸素などによるDNAの酸化的損傷は構造的に極めて多様であり、他の修復系が関与していることも考えられ、単一の修復酵素欠損株と野生株との比較ではその違いが明確には把握しにくい可能性が考えられる。一方、4-NQOではYG3002とTA1975との間に10倍以上の差異があり、*mutM_{ST}*による生物学的な閾値の存在を示唆している。4-NQOについては付加体形成に加えて8-OH-Gの生成が知られていることから、酸化的損傷修復系が寄与する生物学的閾値が存在する可能性がある。今後より適切な実験系を組み立てることにより、酸化的損傷修復系による生物学的閾値の存在をより明確に確認できるものと考えられる。

チャイニーズ・ハムスター卵巣由来の細胞株CHOの亜株であるCHO-9ではMGT活性が検出限界以下であり、この細胞にヒトのMGTのcDNAおよび大腸菌の*ada*を導入したクローンが作られている(Kaina et al., 1993)。これらの細胞を用いて1 μ M MNNGによるHPRT突然変異(6-TG抵抗性)を調べたところ、CHO-9では突然変異の誘発がみられているが、ヒトのMGTが発現している細胞では突然変異の誘発がほとんどみられていない。同様に2 mM ENUでの処理の場合、ヒトのMGTを発現している細胞では突然変異の誘発はあるものの、CHO-9での誘発のおよそ1/5に低下していた。

20 μ M MNNGによる染色体異常誘発についても検討しており、CHO-9では70%以上の細胞に染色体異常がみられたが、ヒトのMGTを発現している細胞では40%近くに低下し、さらに大腸菌 *ada* 導入細胞では染色体異常の誘発がほとんど抑えられていた(4%)。これらの結果はほ乳類培養細胞においても、細菌と同様の修復機構が存在し、それが遺伝子突然変異のみならず染色体異常にも生物学的閾値をもたらす可能性を示唆するものと考えられる。

ほ乳類では細菌の *MutM* 遺伝子に相当するものとして *Ogg1* が知られており、この遺伝子のノックアウトマウスが作製され、突然変異検出系である *gpt* トランスジェニックマウスと交配させて、*gpt/Ogg1*^{-/-}マウスが作製されている。このマウスに腎臓がん物質である臭素酸カリ (KBrO₃) 2 g/L を飲水で12週間投与したところ、*Ogg1*^{-/-}マウスの腎臓における8-OH-Gのレベルは *Ogg1*^{+/+}マウスの70倍程高く、*gpt* 遺伝子の突然変異頻度も3倍程高まっていた(Arai et al., 2002)。この報告では1用量のみであるが、さらに低い用量段階をとると *Ogg1*^{-/-}マウスでは突然変異の誘発がみられる用量で、*Ogg1*^{+/+}マウスでは突然変異の誘発がみられない生物学的な閾値用量が見出される可能性が考えられる。

遺伝毒性発がん物質として知られているMeIQxについて *gpt delta* トランスジェニックマウスを用いて突然変異の誘発が検討されている(Masumura et al., 2003)。3, 30, 300 ppmのMeIQxを12週間混餌で投与したところ、肝臓での *gpt* の突然変異頻度は30, 300 ppmで有意な増加が認められたが、3 ppmでは陰性対照と同等の突然変異頻度で有意な差異は認められなかった。さらに変異体について塩基配列を解析したところ、30, 300 ppmではMeIQx特有のG:C→T:Aトランスポージョンの増加がみられたが、3 ppmでは陰性対照にみられるものと同様であった。一方、MeIQxについてのラットを用いた実験では0.01 ppmよりDNA付加体の増加がみられるとの報告がある(Fukushima, 1999)。これらの報告は実験動物でも、DNA損傷をもたらすような用量においても種々の修復系によって突然変異に固定されない生物学的な閾値が存在することを示唆している。

変異原物質の閾値の問題についてはかなり以前からたびたび議論が繰り返されてきているが、その中でも日本環境変異原学会が1984年に開催した国際シンポジウムは注目に値する(Tazima et al., 1984; 黒田, 1984)。ここでは生殖細胞を経由して次世代に現れる突然変異と投与効果(単回高用量 vs. 複数回低用量)や代謝活性化による影響の問題等に加えて、DNA修復能の影響も論議されている。DNA修復と細胞交替についての論文(Kondo et al., 1984)では、ショウジョウバエの除去修復欠損系 (*mus201/mus201*) とその野生系とで紫外線照射による眼色突然変異の誘発を比較しており、欠損系で突然変異

の誘発がみられる照射量の40倍の照射量においても、野生系では明らかな突然変異の誘発はみられないことが報告されている。この論文では大腸菌でのデータに加えて、種々のヒトがん細胞株のうちO⁶-methylguanine DNA methyltransferase 欠損株(Mer⁻)と野生株(Mer⁺)とでMNNGによる姉妹染色分体交換(sister chromatid exchange: SCE)の誘発を比較した論文(Day et al., 1980)をも引用し(欠損株でSCEが誘発される用量において、野生株ではSCEの誘発がみられず、その10倍以上の用量からようやくSCEの誘発がみられている)、生物学的障害をもたらすDNA損傷を「完全に」取り除ける高効率な修復系が発現している場合には閾値効果が認められるものと論じている。

このシンポジウム開催の基点となったと考えられる論文がシンポジウム開催2年前に報告されている(田島, 1982)。この論文では閾値の可能性が考えられるものとして4つの場合を提示し、その1つがDNA損傷の完全な修復としている。また、変異原物質の投与から生物学的障害が成立するまでにさまざまな段階があるのに、どの段階なのかの区別がないままに閾値の議論がされていることの問題点を指摘しており、今日なおそれに近い状況にあるといえよう。さらに、自然発生レベルの生物学的障害に妨げられて低用量での閾値を明確にできないような場合においても、「risk-benefit balanceを良く考えて」(原文引用)判定すべきで、「こうした実際的方法を非科学的と非難することは必ずしも当たらないと思う」(原文引用)とも述べており、ヒトへのリスク評価に向けて閾値を適用すべきスタンスを示している。20年以上も前に既にこのような見解が示されていることに改めて注目すると共に、科学的な実証をベースにしながらも、具体的に社会的な貢献ができる道筋を明確にしていくことが重要であると考える。

生物学的閾値とほぼ同様の考え方が本邦において既に提示されている(田島, 1980)。この論文では、標的に物質が到達していながらも無作用域がある場合を真の閾値とし、標的に物質が到達していないことによる無作用域を見かけ上の閾値と定義している。前者については農薬(シメトリン)による染色体異常誘発の例を引用し、ある用量以下では染色体異常の誘発がみられないが、そのような用量でもSCEの誘発がみられていることから、物質が標的に到達していながらも染色体異常の誘発がみられない、つまり染色体異常において真の閾値の存在を示す例として述べている。さらに、防かび剤(methyl-2-benzimidazolyl carbamate)による小核誘発の例が紹介されており、腹腔内投与と経口投与による小核誘発の違いが血中濃度の違いに依存している、つまり腹腔内投与ではあるレベル以上に血中濃度が上がらずしかも小核の誘発がないが、経口投与ではその倍以上に血中濃度が上がり小核の誘発がみられている。これは標的が暴露されて