

200636002B

別添1

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

食品中化学物質の複合毒性に関する実験的研究

平成16～18年度 総合研究報告書

主任研究者 広瀬雅雄

平成19(2007)年3月

別添2

目 次

総合研究報告書

I. 食品中化学物質の複合毒性に関する実験的研究 広瀬雅雄	-----	1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	124
III. 研究成果の刊行物・別冊	-----	129

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
食品中化学物質の複合毒性に関する実験的研究

総合研究報告書

食品中化学物質の複合による遺伝毒性に関する実験的研究

分担研究者	松元 郷六	(財)残留農薬研究所	毒性部遺伝毒性研究室長
研究協力者	和田 邦生	(財)残留農薬研究所	毒性部遺伝毒性研究室
	竹澤 祐造	(財)残留農薬研究所	毒性部遺伝毒性研究室
	阿部 美咲樹	(財)残留農薬研究所	毒性部遺伝毒性研究室

研究要旨

Ames 試験（突然変異誘発性）、*in vitro* 染色体異常試験（染色体異常誘発性）、*in vitro* コメットアッセイ（DNA 損傷性）の 3 つの遺伝毒性試験を用いて、亜硝酸ナトリウム（NaNO₂）を中心に食品中化学物質（アスコルビン酸、カテコール、アクリルアミド、茶カテキン）との複合的遺伝毒性を評価した。それぞれ単独での遺伝毒性を調査したところ、アスコルビン酸はすべての遺伝毒性において陰性であったが、NaNO₂ は突然変異誘発性を示し、カテコールおよびアクリルアミドは染色体異常誘発性を示した。茶カテキンの有効成分である(-)-epigallocatechin-gallate (EGCG)は代謝活性化系存在下で染色体異常誘発性を示し、その他の有効成分である(-)-epigallocatechin(EGC)は DNA 損傷性を示した。次に、各物質と NaNO₂ との複合的効果を調べた。その結果、アスコルビン酸は NaNO₂ と複合的に作用して染色体異常を誘発した。また、弱酸性条件下では突然変異誘発性が顕著に増強された。カテコールおよびアクリルアミドは NaNO₂ との複合的作用により、その染色体異常誘発性が増大した。EGCG は NaNO₂ と複合的に作用して DNA 損傷を誘発し、さらに染色体異常誘発性も増大した。EGC は NaNO₂ と同時処理した場合、DNA 損傷性が増強された。以上のように、NaNO₂ は食品中化学物質と共存することによって遺伝毒性を新たに発現または増強した。

A. 研究目的

野菜などに多く含まれる硝酸塩は口腔細菌によって亜硝酸となる。一方、食品中には抗酸化作用を持つさまざまな化合物が含まれている。例えば、アスコルビン酸、

カテコール、茶カテキンなどが良く知られている。これら抗酸化剤が亜硝酸と複合した場合、どのような複合作用が起こるかを調べることは食品の安全を確保する上で重要である。ラットに亜硝酸とアスコルビン

酸またはカテコールを同時投与すると、前胃に強い過形成や乳頭腫が発生することが報告されている^{1,2)}。そこで本研究では、これら前胃に発生する前がん病変が遺伝毒性に起因するものであるかどうかを調査するため、以下の組み合わせにおける複合遺伝毒性試験（細菌を用いる復帰突然変異試験、培養細胞を用いる染色体異常試験、培養細胞を用いるコメットアッセイ）を行った。

①亜硝酸塩とアスコルビン酸

②亜硝酸塩とカテコール

③亜硝酸塩と茶カテキン

さらに、芋類を高温で調理したときに生成されるアクリルアミドも注目すべき食品中の化合物である。よって、次の組み合わせも調査した。

④亜硝酸塩とアクリルアミド

通常、これらの試験は pH が中性条件下で行う。しかし、動物の胃内は酸性である。したがって、実際の生体条件に近づけるため、亜硝酸塩＋アスコルビン酸、亜硝酸塩＋カテコール、および亜硝酸塩＋茶カテキン EGCG の組み合わせでは、酸性条件下における複合遺伝毒性についても検討した。

B. 研究方法

1. 試薬

亜硝酸ナトリウム (NaNO₂, CAS No. 7632-00-0、純度 98.5%)、アスコルビン酸 (CAS No. 50-81-7、純度 99.5%)、カテコール (CAS No. 120-80-9、純度 99.0%)、アクリルアミド (CAS No: 79-06-1、純度 95%)、(-)-epigallocatechin-gallate (EGCG, CAS No: 989-51-5、純度>90%)、(-)-epicatechin (EC, CAS No: 490-46-0、純度 98%)、

(-)-epigallocatechin (EGC、CAS No: 970-74-1、純度 98%)、(-)-epicatechin-gallate (ECG, CAS No: 1257-08-5、純度 98%) はすべて和光純薬工業株式会社製造のものを使用した。これらは滅菌水または生理食塩液（大塚製薬株式会社）に溶解または懸濁して用いた。

復帰突然変異試験 (Ames 試験) では 100 mM ナトリウムーリン酸緩衝液 (pH 7.4) と 100 mM ナトリウムー酢酸緩衝液 (pH 5.0、6.0) を用いた。

2. 菌株

Ames 試験ではネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100、および大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2uvrA/pKM101 の 2 菌株を用いた。試験開始時に保存菌液を解凍し、ニュートリエントブロス液体培地 (Oxoid nutrient broth No. 2, Oxoid Ltd.) に接種し、37°C で 8 時間前培養した。試験開始前に 1×10⁹ 生菌数/mL 以上であることを確認した。

3. 培養細胞

染色体異常試験やコメットアッセイはチャイニーズハムスター肺由来の細胞株 CHL³⁾ を用いた。細胞は新生仔牛血清 (Gibco BRL) 10% を含むイーグル MEM 培地 (Gibco BRL) を用いて 37°C、5% 二酸化炭素濃度を維持する炭酸ガスインキュベーター内で培養した。

4. Ames 試験

試験は非代謝活性化系で実施した。被験物質処理群、溶媒対照群および陽性対照群のすべての用量について 3 枚のプレートを

用いた。陽性対照物質には AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (和光純薬工業株式会社) を用いた。

処理はプレインキュベーション法にしたがって実施した⁴⁾。滅菌小試験管に緩衝液 0.5 mL、前培養した菌懸濁液 0.1 mL および被験物質溶液 0.1 mL を分注し、37°C で 20 分間振盪処理した。処理後、45°C で保温したアミノ酸添加軟寒天液 2 mL を加え、良く混合した後、最少グルコース寒天平板培地 (クリメディア AM-N 培地、オリエンタル酵母工業株式会社) に広げた。37°C で 48 時間培養後、コロニーアナライザー (システムサイエンス株式会社) を用いて復帰変異コロニー数を計測した。

5. *In vitro* 染色体異常試験

組織培養用 60 mm プレートに細胞を播種した。約 24~48 時間後、種々の濃度の被験物質溶液を添加した。被験物質添加から 3 時間後、培養液を捨て、PBS で 2 回洗浄後、通常の増殖培養液と交換した。さらに 21 時間培養した後、染色体標本作製した。陰性対照群には被験物質の溶媒である生理食塩水のみを添加した。

標本作製の 2 時間前にコルセミド (和光純薬工業) を最終濃度 0.2 µg/mL で培養液中に添加した。細胞は 0.075M 塩化カリウム水溶液で低張処理を行った後、カルノア液 (メタノール : 酢酸 = 3 : 1) で固定した。各濃度あたり 2 枚のスライドグラスに滴下し、空気乾燥させた。作製した染色体標本には暗号化したコード番号を付し、2% ギムザ液 (メルク、pH 6.8 リン酸緩衝液で希釈) で約 15 分間 (室温) 染色した。

スライドグラスあたり 100 個、濃度あた

り 200 個の中期分裂細胞を顕微鏡観察した。同時に倍数体の出現数を記録した。ギャップの判定基準は、「非染色性部分のうち、その長さが染色分体幅より短く、染色体中軸線がずれていないもの」とした。一つの中期分裂細胞に切断型や交換型の異常が多数観察された場合、その中期細胞はその他 (Others) に分類した。

細胞毒性の指標として分裂頻度 (Mitotic index) を計測した。1000 個の細胞を観察し、分裂細胞の数をカウントした。

陰性対照群と処理群の間でカイニ乗検定を行った。構造的染色体異常を持つ細胞の統計解析では、-g (ギャップのみの異常を持つ細胞を除く) の集計について検定した。

6. *In vitro* コメットアッセイ

試験は Hartmann らのガイドライン⁵⁾ および Sasaki らの方法⁶⁾ を参考に、以下の条件で実施した。

組織培養用 60 mm プレートに細胞を播種した。48 時間後、種々の濃度の被験物質溶液を添加した。陽性対照物質として 4-ニトロキノリン-1 オキシド (4-NQO、和光純薬工業株式会社) をジメチルスルホキシドに溶解させて用いた。被験物質添加から 1 時間後、培養液を捨て、PBS で 2 回洗浄後、スライド標本作製するためトリプシンにより細胞を回収した。

細胞回収後、遠心し、上清を棄てた後、適量のコメット液 (75 mM NaCl、30 mM EDTA-2Na) で細胞を再浮遊させた。細胞浮遊液と低融点寒天 (PBS に Low melting point agar (ナカライテスク株式会社) を 0.75% で融解したもの) を 10:75 で混和し、あらかじめ Normal melting point agar (ナカ

ライテスク株式会社)をコーティングしておいたスライドグラス上に均等に広げた。スライドグラスに暗号化したコード番号を付与し、冷却により寒天を固めた後、冷却した細胞溶解液 (2.5M NaCl, 100 mM EDTA-2Na, 10 mM Tris base, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10)に浸した。1プレートあたり2枚のスライド標本を作製した。細胞溶解液に1時間以上浸した後、電気泳動槽 (株式会社マリソル) 上で4°Cに冷却した電気泳動液 (300 mM NaOH, 1 mM EDTA-2Na, pH>13)によりスライドグラスを20分間浸し、冷蔵暗所でアンワインディングを行った。その後直ちに電気泳動を開始した。泳動条件は25V、270~300 mA、4°C、20分、暗所であった。電気泳動終了後、中和液 (400mM Tris base pH7.5)に5分間浸し、過剰なアルカリを中和した。中和終了後、スライドグラスをエタノールに浸し、脱水し、エチジウムブロマイド (20 µg/mL)で染色し観察した。

スライドグラスあたり50個、濃度あたり200個のコメット像をCCDカメラでPCに画像を取り込み、Komet5.5 (Kinetic Imaging Limited)により画像解析を行った。計測したパラメーターは% Tail DNA、Tail length、Olive tail momentであった。

統計解析は陰性対照群と処理群の間でOne-way Anovaを用いた。被験物質処理群に有意な差が認められた場合はDunnnettの多重検定を行った。陰性対照群と陽性対照群および陰性対照群とカテキン単独処理群はAspin-Welchの*t*検定を行った。なお、いずれの検定法も有意水準を5%以下に設定した。

細胞毒性 (細胞生存率) はATP測定用試

薬キットのルシフェール250 (キッコーマン株式会社) を用いて細胞内ATPレベルを検出することによって求めた。回収した細胞を冷メタノールに15分処理しATPを抽出した。抽出したATPは純水で希釈し、ルミテスター (キッコーマン株式会社) を用いて発光量を測定し、陰性対照群と比較した。

C. 研究結果

1. NaNO₂とアスコルビン酸の複合

1-1. Ames試験 (pH 7.4)

NaNO₂単独処理でTA100およびWP2*uvrA*/pKM101の復帰コロニー数が用量に相関して増加し、明らかな突然変異誘発性が認められた (Table 1)。一方、アスコルビン酸単独処理では最高用量において僅かな増加が見られたものの、突然変異誘発性は陰性であった (Table 1)。

NaNO₂とアスコルビン酸 (5000 µg/plate)を同時に処理してみたところ、両菌株のNaNO₂単独処理と比べて大きな差は認められなかった (Fig. 1)。

1-2. Ames試験 (pH 6.0)

NaNO₂単独処理の場合、濃度が625 µg/plateまではほとんど変異コロニー数の増加が認められなかった (Table 2)。アスコルビン酸単独では僅かな増加が見られた (Table 2)。次にNaNO₂とアスコルビン酸 (5000 µg/plate)を同時に処理したところ、NaNO₂単独処理と比べて、変異コロニー数の顕著な増加がTA100およびWP2*uvrA*/pKM101の両菌株で認められた (Fig. 2)。

1.3. 染色体異常試験

NaNO₂ 単独およびアスコルビン酸単独処理では染色体異常は誘発されなかった (Table 3)。NaNO₂ (0.5 mg/mL) とアスコルビン酸 (1~2.5 mg/mL) を同時処理した。その結果、1.5 と 2.5 mg/mL で 7.5% の染色体異常が観察され、陰性対照に比べて有意な増加が認められた (Table 4)。

NaNO₂ 濃度を 10 倍に上げて同じ実験を行った。その結果、アスコルビン酸 1.5 mg/mL 以上で明らかに染色体異常を持った細胞が増加した (Table 4)。

2. NaNO₂ とカテコールの複合

2.1. Ames 試験 (pH 7.4)

カテコール単独では変異コロニー数の増加は認められなかった (Table 1)。NaNO₂ (0~5000 µg/plate) にカテコール (500 µg/plate) を同時処理した。その結果、NaNO₂ 単独処理と比べても、変異コロニー数に大きな変化は認められなかった (Fig. 3)。

2.2. Ames 試験 (pH 6.0)

弱酸性下で同様の実験を行った。しかし、カテコール単独では変異コロニー数の有意な増加は認められなかった (Table 2)。次に NaNO₂ (0~5000 µg/plate) にカテコール (500 µg/plate) を同時処理した。その結果、TA100 では NaNO₂ 単独処理に対してわずかに変異コロニー数が増加したが、WP2uvrA/pKM101 株では全く増加は認められなかった (Fig. 4)。

2.3. 染色体異常試験

カテコール単独では 50 µg/mL 以上で染色体異常が増加し、100 µg/mL では 14.0% の中期細胞に染色体異常が観察された (Table 5)。

次に、NaNO₂ (5 mg/mL) とカテコール (12.5~200 µg/mL) を同時に 3 時間処理した。すると、25 µg/mL 以上で染色体異常が明らかに増加し、50 および 100 µg/mL では中期細胞の約 20% に染色体異常が観察された (Table 5)。

3. NaNO₂ と EGCG の複合

3.1. コメットアッセイ

NaNO₂ 単独処理では DNA 損傷性が認められなかった (Table 6)。EGCG も単独処理では DNA 損傷性が認められなかった (Table 7)。

3.1.1. 同時処理

NaNO₂ (1.25、2.5、5 mg/mL) と EGCG (100 µM) を 1 時間同時処理した。その結果、すべての指標で有意に増加し、DNA 損傷が誘発された (Table 8)。

3.1.2. 時間差処理

EGCG (100 µM) を 1 時間処理し、取り除いた後に NaNO₂ (1.25、2.5、5 mg/mL) を 1 時間処理した。その結果、すべての用量で DNA 損傷は認められなかった (Table 9)。

逆に、NaNO₂ (1.25、2.5、5 mg/mL) を 1 時間処理し、取り除いた後に EGCG (100 µM) を 1 時間処理した。その結果、大きな変化は認められず、DNA 損傷性の誘発はなかった (Table 10)。

3.2. Ames 試験

通常の pH 条件下 (7.4) で行った試験の結果を Table 11 に示す。TA100、大腸菌ともに EGCG のみでは 39.1~2500 µg/プレート (公比 2、7 用量) で復帰変異コロニー

数の増加は認められなかった。陽性対照を除く全ての用量にNaNO₂を5000 µg/プレート加えたところ、復帰変異コロニー数の増加数は EGCG の有無にかかわらずほぼ一定であったことから、NaNO₂とEGCGに複合突然変異誘発性はないと判断した。

次にpH 6.0およびpH 5.0の酢酸バッファーを使用して同じ実験を行った。しかし、EGCGの濃度に依存した復帰変異コロニー数の増加は認められなかったことから、複合効果はなかったものと判断された (Table 12, 13)。

3.3. 染色体異常試験

3.3.1. 代謝活性化系によらない場合

結果を Table 14 に示す。EGCG 単独で3時間処理した場合、有意な染色体異常の増加は認められなかった。

0.5 mg/mL または 5 mg/mL の NaNO₂ と 50~400 µM の EGCG を同時に処理したところ、すべての濃度で染色体異常が誘発された。

3.3.2. 代謝活性化系による場合

結果を Table 15 に示す。EGCG 単独で3時間処理した場合、400 µM で明らかに染色体異常が誘発された。

0.5 mg/mL の濃度の NaNO₂ と 50~400 µM の EGCG を同時に処理したところ、EGCG が 200 µM 以上の濃度で染色体異常が有意に誘発された。さらに、5 mg/mL の NaNO₂ と同時処理したところ、すべての濃度で染色体異常が高頻度に誘発された。したがって、代謝活性化系非存在の場合と同様、代謝活性化系存在の下においても NaNO₂ と複合増強効果が明確に現われた。

4. NaNO₂ とその他のカテキンとの複合

4.1. EC

用量に依存した有意な増加は認められなかった。よって、NaNO₂ と EC の複合 DNA 損傷誘発性はなかった (Table 16)。

4.2. ECG

用量に依存した有意な増加は認められなかった。よって、NaNO₂ と ECG の複合 DNA 損傷誘発性はなかった (Table 17)。

4.3. EGC

EGC (100 µM) は全てのパラメーターで溶媒対照群に比べ有意差が認められた (Table 18)。細胞生存率が高くかつ DNA 損傷がみられていることから EGC 自身に DNA 損傷性があると判断できた。

NaNO₂ (1.25、2.5、5 mg/mL) と EGC (100 µM) の同時処理では NaNO₂ との複合処理によって EGC 単独の DNA 損傷よりも大きく値が上昇していることから複合 DNA 損傷誘発性があると判断した。

なお、NaNO₂ とカテキン類の複合処理における陽性対照群 (4NQO 0.25 µg/mL 500 細胞カウント) の値 (平均 ± 標準偏差) は以下の通りであった: % Tail DNA = 12.79 ± 1.84, Tail length = 33.41 ± 7.35, Olive tail moment = 2.40 ± 0.59。

5. NaNO₂ とアクリルアミドの複合

5.1. コメットアッセイ

アクリルアミドにおいては最高濃度 2 mg/mL 群で、溶媒対照群に比べて Tail length のみに有意な増加が認められた (Table 19)。しかし最高濃度のみで有意な差

であり、その値は小さく、その他のパラメーターには有意な差が認められないことから DNA 損傷性はないと判断した。したがってアクリルアミドは単独での DNA 損傷性はないと考えられた。

次に 5 mg/mL NaNO₂ と種々の濃度のアクリルアミドを同時処理した。その結果、DNA 損傷はまったく観察されなかった (Table 20)。

5.2. 染色体異常試験

5.2.1. 代謝活性化系によらない場合

結果を Table 21 に示す。アクリルアミド単独 3 時間処理した場合、1 mg/mL 以上で構造的染色体異常が有意に増加した。1 mg/mL 以上では倍数体も有意に増加した。

NaNO₂ との複合的な効果を調べるため、0.5 mg/mL NaNO₂ と種々の濃度のアクリルアミドを同時処理した。その結果、1 mg/mL 以上の濃度で構造的染色体異常が有意に増加した。また、1 mg/mL 以上では倍数体が有意に増加した。この結果はアクリルアミド単独処理の結果とほぼ同じであった。よって、この濃度の NaNO₂ との複合効果は特になかったことを示している。

次に、NaNO₂ 濃度を 10 倍に上げて同じ実験を行った。すなわち、5 mg/mL NaNO₂ と種々の濃度のアクリルアミドを同時処理した。その結果、0.5 mg/mL 以上で有意な増加が認められた。NaNO₂ を共存させなかった場合と比べると、1 mg/mL 処理群で著しい増強効果が現われた。

5.2.2. 代謝活性化系による場合

結果を Table 22 に示す。アクリルアミド単独 3 時間処理した場合、2 mg/mL で構造

的染色体異常が有意に増加した。さらに、1 mg/mL 以上では倍数体が有意に増加した。これは代謝活性化系によらない場合の結果とほとんど同じであった。

0.5 mg/mL または 5 mg/mL の NaNO₂ とアクリルアミドを同時処理した場合、やはり 2 mg/mL で構造的染色体異常が誘発されたが、その頻度はアクリルアミド単独処理に比べて 2 倍以上に増加した。

D. 考察

1. NaNO₂ とアスコルビン酸の複合

Ames 試験において複合効果を検討したところ、中性条件下では NaNO₂ の突然変異誘発性はアスコルビン酸と共存することによってわずかに上昇した。わずかに上昇した理由は、アスコルビン酸自身の (極めて弱い) 突然変異誘発性が相加的に作用したためであると考えられる。それに対して、緩衝液の pH をやや酸性 (6.0) にすると、複合突然変異誘発のレベルが飛躍的に増大した。動物の胃内は強酸性下なので、さらに強い突然変異誘発作用が引き起こされている可能性が高い。

CHL 細胞に NaNO₂ を 0.25 mg/mL 以上の濃度で連続 24 時間以上処理を行った場合、染色体異常が誘発される⁷⁾。しかし、ある薬物が体内においてある一定の高濃度で 24 時間以上も維持されることは考えにくい。そこで、本実験では被験物質の処理時間を 3 時間に設定した。その結果、5 mg/mL の高濃度においても染色体異常の誘発は認められなかった。アスコルビン酸も単独では染色体異常を誘発させなかった。ところが、NaNO₂ とアスコルビン酸を同時処理すると、染色体異常の誘発が明らかに認められた。それぞれ単独では

染色体異常を誘発させないものが、組み合わせることによって誘発されたことから、両者で何らかの複合作用があったものと考えられる。

強酸性条件下で NaNO_2 とアスコルビン酸を反応させると dehydroascorbic acid が生成される。しかし、ここで行った実験はいずれも処理中の培養液の pH は弱酸性であった。また、dehydroascorbic acid の変異原性についての報告はない。よって、dehydroascorbic acid が染色体異常の要因とは断定できない。

それ以外の要因として亜硝酸から生成される一酸化窒素 (NO) が疑われる⁸⁾。NO は不対電子を一つ持つフリーラジカルで、半減期は 3~6 秒程度と考えられている。この NO が引き金となって細胞 DNA に酸化損傷を引き起こしている可能性が高い。ただし、pH が 6~7 の条件下で NO がどの程度生成されるかは調査する必要がある。

NaNO_2 とアスコルビン酸の同時投与によって誘発されたラットの胃における前がん病変と、本実験で明らかになった突然変異増強作用と染色体異常誘発の間には大きな関連性があるものと考えられる。もし、同時投与によって胃内組織細胞に突然変異や染色体異常が誘発されると、それにより細胞の遺伝的安定性が大きく崩れ、それが要因となって核の異型が誘発されたり、細胞増殖活性が亢進されたりすることは当然考えられるからである。

本研究では NaNO_2 処理濃度を 7.2 mM (0.5 mg/mL) または 72 mM (5 mg/mL) に設定した。しかし、人は平均して亜硝酸を唾液から 1 日約 10 mg、食品から約 1.5 mg 摂取しており、胃内の亜硝酸濃度は 50 μM 以下と言われている⁹⁾。このような低濃度で長期間処理を

行った場合も染色体異常が誘発するかどうかは確認されていない。

一方、アスコルビン酸が胃内で高濃度になる確率は十分に高い。人は主に野菜や果実などからアスコルビン酸を摂取しているが、その他にサプリメントと称して健康ドリンク剤を飲む人々も多い。それらにはアスコルビン酸を 2 mg/mL 前後含有する商品が多い。これらを飲むことにより、一時的に胃内のアスコルビン酸濃度が本実験で染色体異常を誘発した濃度 (1.5~2.5 mg/mL) に達する。

2. NaNO_2 とカテコールの複合

カテコールはフェノール系抗酸化剤として用いられるが、*in vitro* および *in vivo* で小核を誘発し、染色体異常誘発性のあることが知られている^{10,11)}。本実験でもカテコールは弱い染色体異常誘発性を持つことが示された (Table 5)。しかし、Ames 試験では陰性であることから (Table 1, 2)、DNA 遺伝子に直接作用して染色体異常を引き起すのではなく、真核細胞特有の染色体構築に関する機能に障害を及ぼすものと考えられる。事実、*in vitro* 小核試験では染色体不分離の痕跡を示す動原体含有小核が観察されており¹⁰⁾、また、本研究でも 200 $\mu\text{g/mL}$ で倍数体が有意に増加していた。よって、カテコールは細胞分裂の紡錘体に作用し、染色体分離に障害を与えているものと示唆される。ラットに NaNO_2 とカテコールを同時投与した場合も前胃に過形成や乳頭腫が誘発される¹⁾。その原因の一つには、このような染色体異常誘発が関与しているものと推測される。

フェノールと亜硝酸の化学反応については既に調べられている。フェノールは酸性下

で亜硝酸と反応し、*in vitro* で変異原性を示す *p*-diazquinone が形成される¹²⁾。同様に、カテコールは亜硝酸と反応して変異原活性を持つ diazo 化合物が形成されることも知られている¹³⁾。また、ここでも亜硝酸との反応により NO が発生することが知られている。これらのいずれかが、あるいは複合的にカテコールの染色体異常誘発の増幅に関与していることも考えられる。しかし、本研究において実施したカテコール+NaNO₂ 同時処理は pH 中性域で実施されており、上述した diazo 化合物や NO が生成することは確認されていない。あるいは、中性条件下でもある程度生成されるかもしれない。この点も今後の検討項目である。

アスコルビン酸の場合と異なり、弱酸性条件下でも Ames 試験において複合突然変異は誘発されなかった。本研究班によって NaNO₂ とカテコールの複合により、酸化損傷の誘引を示すデータが示されているが、それを支持する結果にはならなかった。ただ、今回用いた試験菌株では検出できない酸化損傷である可能性も残っているため、異なる菌株を用いて追加検証する必要がある。

3. NaNO₂ と EGCG の複合

NaNO₂ と EGCG は単独では DNA 損傷性がないが、100 μM EGCG と NaNO₂ を同時に処理したところ、細胞生存率が高い用量（70%以上）においても DNA 損傷が認められた。よって、NaNO₂ との複合作用により DNA 損傷が引き起こされたと結論した。また、この複合作用は EGCG が NaNO₂ と共存した場合にのみ発現するものであり、それぞれを交互に処理しても複合効果は

現れないことが本実験より示された。

Ames 試験を用いて突然変異誘発性に関する複合毒性を検索した。通常の条件下（pH 7.4）では NaNO₂ と EGCG の複合効果は認められなかった。ラットにおける NaNO₂ と抗酸化剤の影響が胃で見られているため、低い pH が反応に影響している可能性がある。そこで緩衝液の pH を 6.0 および 5.0 に下げて実験を行ってみたが、やはり複合効果は認められなかった。

本研究で使用した大腸菌 WP2*uvrA*/pKM101 は過酸化水素などによる酸化損傷も検出できる試験菌株である。しかし、活性酸素を著しく生成することが知られているパラコートの突然変異誘発性は検出できない¹⁴⁾。NaNO₂ と EGCG の複合によって生じる酸化損傷がパラコートと同タイプであれば、WP2*uvrA*/pKM101 で検出できない可能性も否定できない。

EGCG の染色体異常誘発性に関して、代謝活性化系によらない場合では陰性であることが示された。しかし、ヒト B リンパ球 WIL2-NS 細胞に対し、100 μM の濃度で染色体異常が誘発される報告がある¹⁵⁾。また、本実験では代謝活性化系存在下で明らかな染色体異常の誘発が観察された。よって、EGCG は弱い染色体異常誘発性を有するものと考えられる。

EGCG を NaNO₂ と共存させることで、強い DNA 損傷作用が発現し、また、高頻度で染色体異常の誘発が認められた。EGCG と同じフェノール系抗酸化剤であるカテコールは NaNO₂ と複合させることにより、ヒドロキシラジカルが生成される¹⁶⁾。EGCG も同様にヒドロキシラジカルが生成される可能性があるが、この経路は酸性条

件下でNaNO₂からNOが生成することを必須としている。本研究は中性域で行われていたので、この仮説が適用されるかどうかは不明である。

代謝活性化系存在下の EGCG によって誘発された染色体異常は、NaNO₂と複合してその頻度が増大した。したがって、EGCGの代謝物にも染色体異常誘発性があり、かつ、NaNO₂により異常頻度が増大することも本実験から判明した。そのメカニズムは上述したものと同一であると推測する。

市販緑茶飲料水中のカテキン濃度はおよそ0.5~2.5 mg/mLである。その約50%がEGCGであるとすれば、それを飲用した場合、希釈されなければ胃内濃度は0.25~1.25 mg/mLである。したがって、本実験で設定した50~400 μM = 23~184 μg/mLという濃度は、十分に胃内で起こりうる濃度と言える。

4. NaNO₂とその他のカテキンとの複合

EGCに強い複合DNA損傷誘発性が認められたが、ECとECGには複合DNA損傷誘発性は認められなかった。EGCに複合DNA損傷誘発性が認められた原因は二つ考えられる。一つはNaNO₂の突然変異誘発性とEGCのDNA損傷誘発性の複合作用によるものである。NaNO₂はAmes試験で陽性であった。したがって、NaNO₂は弱いイニシエーション作用を持ち合わせていると考えられる。一方、コメットアッセイの結果からEGCはDNA損傷誘発性が認められた。したがって、遺伝毒性作用の違う二つの被験物質の複合作用によりDNA損傷が増強したと考えられる。

もう一つの原因として、ヒドロキシラジ

カルの関与が考えられる。フェノール系酸化剤であるカテコールは酸性条件下でNaNO₂と共存した場合、NaNO₂から生じる一酸化窒素(NO)によってヒドロキシラジカルが発生する¹⁶⁾。NaNO₂と酸化剤EGCの同時処理の場合もこれと同様に、中性条件下ではあるが、NaNO₂とEGCから産生されたNOがEGCとさらに反応し、ヒドロキシラジカルが産生されDNA損傷を強く誘発したと考えられる。また、EGCは他の3種のカテキン類に比べ、ヒドロキシラジカル除去能が格段に低い¹⁷⁾。よって、生成したヒドロキシラジカルをEGCは十分に除去できないためDNA損傷を引き起こしたと説明できる。一方、ECやECGはヒドロキシラジカル除去能が高いため、DNA損傷を引き起こさなかったと考えられる。

したがって今後は、①酸化剤とNaNO₂を複合処理した場合には中性条件下でもNOが産生される、②酸化剤とNOは中性条件下においてヒドロキシラジカルを産生する、という二つの仮定について検証を進める必要がある。

一方、市販緑茶飲料水中のカテキン濃度は緑茶の種類や、抽出条件、製造過程で異なるが、例えば梅垣ら¹⁸⁾のデータを参考にすると4種類の市販緑茶の平均でEGCGは87 μg/mL程度含まれており、EGCは63 μg/mL程度含まれている計算になる。したがって、本実験で設定したEGCG 100 μM = 45.8 μg/mL、EGC 100 μM = 36.3 μg/mLという条件は充分におこりうる。

5. NaNO₂とアクリルアミドの複合

コメットアッセイの結果より、アクリルアミドにDNA損傷性の無いことが明らか

となった。また、Ames 試験でも陰性であることが知られていることから¹⁹⁾、アクリルアミドが DNA へ直接的にダメージを与えることは無いものと考えられる。しかし、アクリルアミドが染色体異常を誘発することは既に知られており¹⁹⁾、本実験でも 1 mg/mL 以上の濃度で 3 時間処理することにより染色体異常が誘発された。このようなアクリルアミドの染色体異常誘発性が NaNO₂ と共存することによって、どのように変化するかを調べたが、本実験結果より、わずかな増強作用のあることが示唆された。例えば、代謝活性化系非存在下におけるアクリルアミド単独処理の場合、1 mg/mL での染色体異常誘発頻度は 4.0% であるが、5 mg/mL NaNO₂ と共存した場合、その頻度は 19.0% に増加した (Table 21)。代謝活性化系による場合では、共存した場合の方が、染色体異常誘発頻度が明らかに高くなった。

アクリルアミドがどのようなメカニズムで染色体異常を誘発するのかは明らかになっていない。アクリルアミドは DNA への結合性は低いようであるが²⁰⁾、ヘモグロビンやプロタミンなどタンパク質と結合することが知られている²¹⁾。このことから、恐らく染色体の構築等に関与するタンパク質や酵素類、例えばヒストンやトポイソメラーゼなどの働きを阻害し、染色体異常を誘発しているものと考えられる。今回の研究で観察された亜硝酸の弱い複合染色体異常増強作用は、アクリルアミドの染色体構築阻害効果をやや増強することによって現れているかもしれない。

アクリルアミドは生体内で代謝を受けた後、より反応性の高いグリシダミドに変

換されることが知られている。したがって、代謝活性化系存在下では染色体異常の誘発レベルが増大することが予想された。しかし本実験のアクリルアミド単独処理において、代謝活性化系による場合とよらない場合で染色体異常誘発のプロファイルはほとんど変わらなかった。その理由とし次のように考えられる。アクリルアミドは CYP2E1 によってグリシダミドに代謝されるが²²⁾、使用したラット S9 中には十分量の CYP2E1 が含有していなかったものと推測される。したがって、アクリルアミドからグリシダミドへ充分に変換されなかったため、S9 の有無で染色体異常頻度に差がなかったものと考えられる。

倍数体の誘発が認められたが、アクリルアミドが培養細胞に倍数体を誘発することは既に知られている²³⁾。原因はアクリルアミドがチューブリンへの結合能を有するためであると考えられる。本研究では 2 mg/mL よりも 1 mg/mL の方が高い出現頻度を示す場合が多かったが、これは、2 mg/mL 処理の細胞では細胞周期が延びて、倍数体出現ピークが後ろにずれるため、見かけ上、2 mg/mL 処理の倍数体頻度が低下したものと推測される。

ところで、市販されているポテトチップスは 1 袋 (70 g) あたり 0.1~0.25 mg のアクリルアミドを含有する。本実験で設定した 0.25~2 mg/mL という濃度は条件によっては胃内で起こりうる濃度と言える。

E. 結論

各化学物質と NaNO₂ との複合効果をまとめると以下の通りであった。

①アスコルビン酸 : NaNO₂ と複合的に作用

して強い染色体異常が誘発された。また、弱酸性条件下で NaNO_2 の突然変異誘発性が顕著に増強された。

②カテコールおよびアクリルアミド：
 NaNO_2 と複合的に作用してカテコールおよびアクリルアミドの染色体異常誘発性が増大した。

③EGCG： NaNO_2 と複合的に作用して明らかに DNA 損傷を誘発した。また、EGCG の染色体異常誘発性を増大させた（代謝活性化系において）。

④EGC： NaNO_2 と同時処理した場合、EGC の DNA 損傷性が増強された。

以上のように、調査したすべての食品中化学物質が NaNO_2 と複合することによって遺伝毒性が新たに発現または増強された。よって、ラットを用いた長・中期発がん性研究において前胃で認められた過形成等の前がん病変は、これら複合遺伝毒性が要因になっているものと考えられる。

F. 引用文献

- 1) Hirose, M., Tanaka, H., Takahashi, S., Futakuchi, M., Fukushima, S. and Ito, N. (1993) Effects of sodium nitrite and catechol, 3-methoxy-catechol, or butylated hydroxyanisole in combination in a rat multiorgan carcinogenesis. *Cancer Res.*, 53: 32-37.
- 2) Hirose, M., Fukushima, S., Hasegawa, R., Kato, T., Tanaka, H. and Ito, N. (1990) Effects of sodium nitrite and catechol or 3-methoxy-catechol in combination on rat stomach epithelium. *Jpn. J. Cancer Res.*, 81: 857-861.
- 3) Koyama, H., Utakoji, T. and Ono, T. (1970) A new cell derived from newborn Chinese hamster lung tissue. *Gann*, 61: 161-167.
- 4) Matsushima, T., T. Sugimura, M. Nagao, T. Yahagi, A. Shirai and M. Sawamura, (1980) Factors Modulating Mutagenicity in Microbial Tests, in: K.H. Norpoth and R.C. Garner (Eds.), *Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens*. Springer-Verlag, pp. 273-285.
- 5) Hartmann, A., E. Agurell, C. Beevers, S. Brendler-Schwaab, B. Burlinson, P. Clay, A. Collins, A. Smith, G. Speit, V. Thybaud and R.R. Tice (2003) 4th International Comet Assay Workshop. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis*, 18(1): 45-51.
- 6) Sasaki, YF., S. Tsuda, F. Izumiyama and E. Nishidate (1997) Detection of chemically induced DNA lesions in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow) using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay, *Mutation Res.*, 388(1):33-44.
- 7) 染色体異常試験データ集 改訂 1998 年版 (1999) 監修 祖父尼俊雄、株式会社 L.I.C.
- 8) Okazaki, K., Ishii, Y., Kitamura, Y., Maruyama, S., Umemura, T., Miyauchi, M., Yamagishi, M., Imazawa, T., Nishikawa, A., Yoshimura, Y., Nakazawa, H. and Hirose, M. (2006) Dose-dependent promotion of rat

- forestomach carcinogenesis by combined treatment with sodium nitrite and ascorbic acid after initiation with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine: possible contribution of nitric oxide-associated oxidative DNA damage. *Cancer Sci.*, 97:175-82.
- 9) 津田充宥, 倉島由紀子 (1991) 亜硝酸および窒素酸化物との相互作用による変異原の生成, 修飾とその抑制, 環境変異原研究, 13: 31-52.
- 10) Robertson, M.L., Eastmond, D.A. and Smith, M.T. (1991) Two benzene metabolites, catechol and hydroquinone, produce a synergistic induction of micronuclei and toxicity in cultured human lymphocytes. *Mutation Res.*, 249: 201-209.
- 11) Ciranni, R., Barale, R., Ghelardine, G. and Loprieno, N. (1988) Benzene and the genotoxicity of its metabolites. II. The effect of the route of administration on the micronuclei and bone marrow depression in mouse bone marrow cells. *Mutation Res.*, 209: 23-28.
- 12) Kikugawa, K. and Kato, T. (1988) Formation of a mutagenic diazoquinone by interaction of phenol with nitrite. *Food Chem. Toxicol.*, 26: 209-214.
- 13) Oshima, H., Friesen, M., Malaveille, C., Brouet, I., Hautefeuille, A. and Bartsch, H. (1989) Formation of direct-acting genotoxic substances in nitrosated smoked fish and meat products: identification of simple phenolic precursors and phenyldiazonium ions as reactive products. *Food Chem. Toxicol.*, 27: 193-203.
- 14) Watanabe, K., Sakamoto, K. and Sasaki, T. (1998) Comparisons on chemically-induced mutation among four bacterial strains, *Salmonella typhimurium* TA102 and TA2638, and *Escherichia coli* WP2/pKM101 and WP2*uvrA*/pKM101: collaborative study II. *Mutat Res.*, 412:17-31.
- 15) Sugisawa A and Umegaki K. (2002) Physiological concentrations of (-)-epigallocatechin-3-o-gallate (EGCg) prevent chromosomal damage induced by reactive oxygen species in WIL2-NS cells. *J. Nutr.*, 132: 1836-1839.
- 16) 中澤裕之ら (2005) 、食品中化学物質の複合反応と反応生成物に関する研究、厚生労働科学研究費補助金、食品の安全性高度化推進研究事業、平成 16 年度分担研究報告書
- 17) Guo, Q., Zhao, B., Li, M., Shen, S. and Xin, W. (1996) Studies on protective mechanisms of four components of green tea polyphenols against lipid peroxidation in synaptosomes. *Biochim Biophys Acta.*, 1304: 210-22.
- 18) 梅垣敬三, 江指隆年, 手塚雅勝, 小野明子, 佐野満昭, 富田 勲 (1996) 電気化学検出 HPLC による食品中の茶カテキン類の分析法, 食品衛生学雑誌 37-2: 77-82.
- 19) Dearfield, K.L., G.R. Douglas, U.H. Ehling, M.M. Moore, G.A. Sega and D.J. Brusick (1995) Acrylamide: A review of its

- genotoxicity and an assessment of heritable genetic risk, *Mutat. Res.*, 330: 71-99.
- 20) Segal, G., R.P. Valdivia Alcota, C.P. Tancongco and P.A. Brimer (1989) Acrylamide binding to the DNA and protamine of spermiogenic stages in the mouse and its relationship to genetic damage, *Mutat. Res.*, 216: 221-230.
- 21) Hashimoto, K. and W.N. Aldridge (1970) Biochemical studies on acrylamide, a neurotoxic agent, *Biochem. Pharmacol.*, 19: 2591-2604.
- 22) Sumner, S.C.J., T.R. Fennell, T.A. Moore, B. Chanas, F. Gonzalez, and B.I. Ghanayem (1999) Role of cytochrome P450 2E1 in the metabolism of acrylamide and acrylonitrile in mice, *Chem. Res. Toxicol.*, 12: 1110-1116.
- 23) Tsuda, H., C.S. Shimizu, M.K. Taketomi, M.M. Hasegawa, A. Hamada, K.M. Kawata and N. Inui (1993) Acrylamide; induction of DNA damage, chromosomal aberrations and cell transformation without gene mutations, *Mutagenesis*, 8: 23-29.
- チャイニーズハムスター培養細胞を用いた亜硝酸ナトリウムと抗酸化剤の複合処理による染色体異常誘発
日本環境変異原学会第34回大会（東京、2005年11月）
- 和田邦生ら
NaNO₂と主要な茶カテキン、エピガロカテキンガレートの *in vitro* 相乗遺伝毒性効果
日本環境変異原学会第35回大会（大阪、2006年11月）
- 松元郷六ら
細菌における NaNO₂と抗酸化剤の複合遺伝毒性
日本環境変異原学会第35回大会（大阪、2006年11月）

H. 知的財産権の出願・取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

松元郷六ら

Table 1 Mutagenicity of NaNO₂, ascorbic acid, and catechol in TA100 and WP2uvrA/pKM101

Chemical	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	TA100		WP2uvrA/pKM101	
		His ⁺ revertants/plate (Mean \pm SD)	Induced revertants	Trp ⁺ revertants/plate (Mean \pm SD)	Induced revertants
NaNO ₂	0	139 \pm 5	0	65 \pm 16	0
	78	147 \pm 10	8	73 \pm 7	8
	156	140 \pm 18	1	84 \pm 4	19
	313	173 \pm 6	34	80 \pm 13	15
	625	212 \pm 20	73	91 \pm 12	26
	1250	275 \pm 22	136	113 \pm 4	48
	2500	414 \pm 30	275	122 \pm 7	57
	5000	574 \pm 12	435	220 \pm 24	155
Ascorbic acid	0	122 \pm 11	0	94 \pm 5	0
	78	115 \pm 8	-7	102 \pm 5	8
	156	119 \pm 7	-3	103 \pm 21	9
	313	125 \pm 11	3	114 \pm 1	20
	625	144 \pm 9	22	120 \pm 8	26
	1250	151 \pm 6	29	103 \pm 9	9
	2500	150 \pm 10	28	125 \pm 8	31
	5000	183 \pm 33	61	128 \pm 12	34
Catechol	0	122 \pm 11	0	94 \pm 5	0
	250	169 \pm 6	47	110 \pm 13	16
	500	162 \pm 12	40	107 \pm 11	13
	1000	130 \pm 19	8	113 \pm 11	19
	2000	Toxic	-	Toxic	-

Triplicate plates were used for each dose.

The assays were conducted in the absence of metabolic activation.

Table 2 Mutagenicity of NaNO₂, ascorbic acid, and catechol in TA100 and WP2*uvrA*/pKM101 in pH 6.0 buffer

Chemical	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	TA100		WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	
		His ⁺ revertants/plate (Mean \pm SD)	Induced revertants	Trp ⁺ revertants/plate (Mean \pm SD)	Induced revertants
NaNO ₂	0	119 \pm 13	0	69 \pm 11	0
	78	116 \pm 7	-3	78 \pm 2	9
	156	115 \pm 9	-4	86 \pm 19	17
	313	130 \pm 17	11	85 \pm 22	16
	625	138 \pm 12	19	109 \pm 17	40
	1250	182 \pm 8	63	141 \pm 23	72
	2500	264 \pm 20	145	210 \pm 14	141
	5000	338 \pm 14	219	456 \pm 13	387
Ascorbic acid	0	108 \pm 9	0	73 \pm 3	0
	78	100 \pm 10	-8	80 \pm 13	7
	156	111 \pm 9	3	81 \pm 13	8
	313	121 \pm 14	13	75 \pm 5	2
	625	120 \pm 7	12	83 \pm 7	10
	1250	196 \pm 11	88	108 \pm 16	35
	2500	223 \pm 4	115	90 \pm 15	17
	5000	191 \pm 8 *	83	130 \pm 10	57
Catechol	0	125 \pm 6	0	62 \pm 5	0
	250	142 \pm 6	17	65 \pm 5	3
	500	140 \pm 8	15	71 \pm 2	9
	1000	144 \pm 22	19	69 \pm 12	7
	2000	143 \pm 12	18	65 \pm 4	3

Triplicate plates were used for each dose.

The assays were conducted in the absence of metabolic activation.

*: cytotoxicity

Table 3 No induction of chromosomal aberrations in Chinese hamster cells treated with sodium nitrite or ascorbic acid for 3 h

Treatment	Concentration (mg/mL)	No. of cells scored	Polyploid cells	No. of cells with structural chromosome aberrations										Mitotic index (%)	Relative mitotic index (%)	pH ^a
				Gap	Chromatid type			Chromosome type		Fragmen- tation	Others	Total				
					ctb	cte	csb	cse	+g			-g				
Physiological saline	1% (control)	200	0 (0)	3	1	0	0	0	0	0	0	7 (3.5)	4 (2.0)	6.8	100	8.1
	0.625	200	1 (0.5)	0	1	0	1	0	0	0	0	6 (3.0)	2 (1.0)	6.3	93	-
Sodium nitrite	1.25	200	2 (1.0)	1	0	2	2	0	0	0	0	7 (3.5)	5 (2.5)	5.6	82	-
	2.5	200	2 (1.0)	1	2	0	1	0	0	0	0	4 (2.0)	4 (2.0)	6.4	94	-
	5.0	200	2 (1.0)	0	8	3	0	0	0	0	0	11 (5.5)	11 (5.5)	5.6	82	-
Ascorbic acid	0.313	200	1 (0.5)	2	0	1	0	0	0	0	0	4 (2.0)	3 (1.5)	5.1	75	7.7
	0.625	200	0 (0)	0	2	0	1	0	0	0	0	7 (3.5)	3 (1.5)	5.5	81	7.5
	1.25	200	2 (1.0)	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (0.5)	0 (0)	4.7	69	7.0
	2.5	200	3 (1.5)	0	3	4	1	0	0	0	0	8 (4.0)	8 (4.0)	4.8	71	6.4
5.0	Toxic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.9

ctb, chromatid break ; cte, chromatid exchange ; csb, chromosome break ; cse, chromosome exchange ; +g, including gaps ; -g, excluding gaps
 The figures shown in parentheses are percentages.
^a : pH of the medium immediately after treatment

Table 4 Synergistic effects of sodium nitrite and ascorbic acid on cytogenetic toxicity in Chinese hamster cells

Treatment		No. of cells scored	Polyploid cells	No. of cells with structural chromosome aberrations										Mitotic index (%)	Relative mitotic index (%)	pH ^a
NaNO ₂ (mg/mL)	Ascorbic acid (mg/mL)			Gap	Chromatid type			Chromosome type		Fragmen-tation	Others	Total				
			ctb	cte	csb	cse						+g	-g			
0.5	0 (control)	200	1 (0.5)	2	0	2	1	0	0	0	0	7 (3.5)	5 (2.5)	7.2	100	8.0
	1.0	200	0 (0)	2	8	1	1	0	0	0	10 (5.0)	9 (4.5)	6.4	89	7.0	
	1.5	200	1 (0.5)	4	8	6	2	1	0	0	18 (9.0)	15 (7.5)*	4.7	65	6.7	
	2.0	200	1 (0.5)	4	7	2	1	0	1	1	14 (7.0)	11 (5.5)	4.8	67	6.3	
	2.5	200	1 (0.5)	1	10	1	2	0	0	0	16 (8.0)	15 (7.5)*	5.0	69	6.2	
5.0	0 (control)	200	1 (0.5)	2	5	2	1	0	0	0	11 (5.5)	10 (5.0)	6.7	100	8.3	
	1.0	200	2 (1.0)	5	3	0	0	0	0	0	10 (5.0)	5 (2.5)	5.4	81	7.0	
	1.5	200	3 (1.5)	10	8	6	1	0	3	39 (19.5)	38 (16.5)***	5.1	76	6.8		
	2.0	200	6 (3.0)	12	19	28	2	0	1	2	46 (23.0)	39 (19.5)***	5.2	78	6.1	
	2.5	200	1 (0.5)	13	25	38	6	2	1	1	66 (33.0)	57 (28.5)***	2.3	34	6.1	

NaNO₂, sodium nitrite

cte, chromatid break ; cte, chromatid exchange ; csb, chromosome break ; cse, chromosome exchange ; +g, including gaps ; -g, excluding gaps
The figures shown in parentheses are percentages.

^a : pH of the medium immediately after treatment

*, ***, : Significantly different from the concurrent control at p ≤ 0.05 and p ≤ 0.001, respectively.