

# 環境変異原研究

**Environmental  
Mutagen  
Research**

**Vol.22 No.1 2000**



トランスジェニックマウスを用いる変異原性試験に！

## DNAシークエンシング受託サービス

株アイシン・コスマ研究所では、お客様の研究をサポートするためにDNAシークエンシングの受託サービス業務を行っております。

### ◆Single Primer Extensionによるシークエンシング

基本料金：¥12,000/run（納期：お問い合わせ下さい）

一度にお受けするサンプル数に応じて割り引き致します！  
(サンプルの本数や状態に応じて別途お見積り致します。)

### ◆変異解析のためのgpt遺伝子(全長456bp)のシークエンシングの場合に限り累計注文数に応じ、価格をディスカウント!!

《累計注文数》	1run～50runまで	定価 ¥12,000	→	¥10,200/run 15% off
	51run～100runまで	定価 ¥12,000	→	¥9,600/run 20% off
	101run～	定価 ¥12,000	→	¥9,000/run 25% off

### ◆変異解析のためのcII遺伝子(全長300bp)のシークエンシングの場合

1runからでも¥7,200/run

突然変異部位の解析も別途料金にて承ります！

サンプルは、精製DNA・PCR産物の状態でクール宛配便にてお送り下さい(電気泳動のデータの添付をお願いいたします)。

なお、プラスミドは菌体の状態でも別途料金にて受け付けております。

その他、cDNAクローンなどのFull lengthシークエンシングも承っておりますので、お気軽にご相談下さい。

# 環境変異原研究

## Environmental Mutagen Research



蛍光検出の未来を拓く  
株式会社アイシン・コスマ研究所

本社：〒448-8650 愛知県刈谷市八軒町5丁目50番地

TEL.0566 (62) 1606 FAX.0566 (62) 1607  
Home Page URL : <http://www.ai-c.co.jp>

## 目 次

## 一般論文

サルモネラ TA 102 および TA 104 株を用いた活性酸素産生系の変異原性に及ぼす抗酸化剤の影響 今枝 厚宗, 青木 朋訓, 近藤 靖, 堀 正樹	1
Development of a micronucleus assay in the root tips of <i>Allium cepa</i> seedlings as a detector of chemical clastogens Elma A. Alcaide, Aki Tanaka, Hideo Ikeda and Kazuo Fujikawa	9
A micronucleus study of 2-methyl aziridine (propyleneimine) in rat peripheral blood and bone marrow by 4-week repeated exposure Tomonori Aoki, Norihide Asano, Atsumune Imaeda and Yasushi Kondo	15
塩素処理した水試料中に含まれる変異原物質を捕捉するための前処理方法の検討 高橋美津子, 斎藤治子, 磯田信一	19

## 資料・情報

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) 林 真, 松井道子, 石井健二, 川崎通昭	27
日本環境変異原学会 会則, 細則 平成 12 年度役員名簿, 平成 12～13 年度評議員名簿 入会手続きのご案内 入会申込書 学生会員申込書 投稿規定 執筆規定	

## 複写される方に

本誌(書)に掲載された著作物を複写したい方は、著作権者から複写権の委託をうけている下記の協会から許諾を受けて下さい。著作物の転載・翻訳のような複写以外の許諾は、直接日本環境変異原学会へご連絡下さい。

学術著作権協会

〒107-0052 東京都港区赤坂 9-6-41 乃木坂ビル Tel: 03-3475-5618 Fax: 03-3475-5619

## サルモネラ TA102 および TA104 株を用いた活性酸素産生系の変異原性に及ぼす抗酸化剤の影響

今枝 厚宗<sup>1</sup>, 青木 朋訓<sup>1</sup>, 近藤 靖<sup>2</sup>, 堀 正樹<sup>1</sup>

<sup>1</sup>田辺製薬株式会社 安全性研究所 〒532-8505 大阪市淀川区加島 3-16-89

<sup>2</sup>田辺製薬株式会社 先端医学研究部 〒532-8505 大阪市淀川区加島 3-16-89

Effects of antioxidants on the mutagenicity of reactive oxygen species-generating systems toward *Salmonella typhimurium* TA102 and TA104 strains

Atsumune Imaeda<sup>1</sup>, Tomonori Aoki<sup>1</sup>, Yasushi Kondo<sup>2</sup> and Masaki Hori<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Safety Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co., Ltd., 3-16-89, Kashima, Yodogawa-ku, Osaka 532-8505, Japan

<sup>2</sup> Advanced Medical Research Department, Tanabe Seiyaku Co., Ltd., 3-16-89, Kashima, Yodogawa-ku, Osaka 532-8505, Japan

## Summary

The effects of antioxidants on the mutagenicity of reactive oxygen species (ROS) was examined using the Ames test with *Salmonella typhimurium* TA102 and TA104 tester strains. In this study, adriamycin, t-butyl hydroperoxide (BHP), and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were used as generating systems of oxygen-derived radicals. Also, ascorbic acid, thiourea, and mannitol were added as the antioxidants.

The number of adriamycin-, BHP-, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced revertant colonies of TA102 and TA104 showed dose-related increases. Then, ascorbic acid reduced adriamycin- and BHP-induced reversion in TA102, and reduced adriamycin-, BHP-, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced reversions in TA104. Thiourea reduced the number of revertant TA102 colonies induced in all 3 ROS-generating systems, and reduced BHP- and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced reversion in TA104. Mannitol reduced adriamycin-induced reversion in TA102.

These results not only indicate that this test system using TA102 and TA104 tester strains can detect the mutagenicity of active oxygen, but also suggest that this test system could be used to screen for the antimutagenicity of antioxidants which suppress the oxidative damage of DNA by scavenging active oxygen.

Keywords : antioxidants, active oxygen, *Salmonella typhimurium* TA102, *Salmonella typhimurium* TA104, mutagenicity

## 緒 言

酸素は生体にとり不可欠なものであり、生体内に取り込まれた酸素は還元されて水になる。しかし、その過程で生じる活性酸素すなわち一電子還元によるスーパーオキシド(O<sub>2</sub><sup>·-</sup>)、二電子還元による過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、三

電子還元によるヒドロキシラジカル(HO<sup>·</sup>)はいずれも生体内で DNA, 脂質, タンパク質, 糖などの有機物と反応することで、脂質, 糖質の酸化, タンパク質の変性, 酶の不活性化, DNA 鎮の切断, 塩基の修飾を起こし, 生体膜の損傷や遺伝子の傷害を引き起こして、種々の細胞機能を障害する(萩田・大浦, 1987)。

活性酸素による酸化的 DNA 損傷は、癌、老化、その他多くの疾病の一因と推察されている。発癌の主因とされるのが DNA 損傷に基づく変異原性であり、変異原性と

受付: 1999年9月1日 受理: 1999年10月28日

©日本環境変異原学会

活性酸素との関連について種々の検討がなされている。変異原性の指標としては、遺伝子突然変異、DNA修復、不定期DNA合成、染色体異常、姉妹染色分体交換などさまざまな検出系が用いられており、さらに、生物系も微生物からヒトにいたるまで多様なものが用いられている(祖父尼・石館, 1988)。

DNAに酸化的損傷を引き起こす活性酸素産生剤の変異原性は、サルモネラ試験菌株TA 102およびTA 104を用いた復帰突然変異試験(Ames test)で検出されることが知られている。TA 102株およびTA 104株は、his G 428遺伝子中にアデニンとチミン塩基対の変異を持つため、アデニンまたはチミンを標的とする酸化型の変異原性に対して感受性を示し(Levin et al., 1982, 1984; Chesis et al., 1984; Marnett et al., 1985; Jung et al., 1992), また、TA 104株は、多くの活性酸素産生系の変異原性に対してTA 102株より高感受性であることが報告されている(羽倉ら, 1996)。

今回、活性酸素産生系の変異原性物質であるadriamycin, *t*-butyl hydroperoxide (BHP)およびH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を用いて、両菌株の感受性を確認した。さらに、抗酸化剤であるascorbic acid, HO<sup>·</sup>スカベンジャーであるthioureaおよびmannitolを添加する系を加え、活性酸素産生系の変異原性に及ぼす抗酸化剤の影響を検討した。

## 実験材料および方法

### 1. 化合物

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(CAS No 7722-84-1), mannitol(CAS No 69-65-8)およびBHP(CAS No 75-91-2)は片山化学工業株式会社、ascorbic acid(CAS No 50-81-7)およびthiourea(CAS No 62-56-6)は和光純薬工業株式会社、adriamycin(CAS No 25316-40-9)は協和醸酵工業株式会社から購入した。

### 2. 試薬調製

活性酸素産生系には、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>·-</sup>産生系としてadriamycin, 有機過酸化物としてBHPを用いた。一方、抗酸化剤にはascorbic acidを、HO<sup>·</sup>スカベンジャーにはthioureaおよびmannitolを用いた。これらすべての試薬の溶媒には注射用蒸留水を用い、それぞれ所定濃度に調製した。

### 3. 試験菌株

*Salmonella typhimurium* TA 102およびTA 104株を用いた。指示菌は液体培地(Oxoid nutrient broth No. 2)に接種し、37°Cで一夜振盪培養した後、菌懸濁液0.8 mlに対してDMSOを0.07 mlの割合で加えたものを小バイアルに分注して-80°Cで凍結保存した。

試験には、保存株の各1バイアルを融解し、菌浮遊液

10 μlを10 mlの液体培地に接種して37°Cで10時間振盪培養(1.6~1.8×10<sup>9</sup> cells/ml)したものを使用した。

なお、TA 102には25 μg/mlのampicillinと2 μg/mlのtetracyclineを、TA 104には25 μg/mlのampicillinを添加して培養した(Maron and Ames, 1983; Wilcox et al., 1990)。

## 4. 培地

最少グルコース寒天平板培地は、Vogel-Bonnerの最少培地Eにグルコースと細菌用寒天を最終濃度がそれぞれ2%および1.5%になるように加え、直径90 mmのプラスチックシャーレに30 mlずつ分注して作製された市販品を用いた。

重層用軟寒天(トップアガード)は、塩化ナトリウムを0.5%加えた0.6%軟寒天溶液を高压蒸気滅菌後、0.5 mMヒスチジン-0.5 mMビオチン溶液を1/10容量混合して調製した。

## 5. 復帰突然変異試験

試験は20分のpre-incubationを併用したAmes法に従って行った(Maron and Ames, 1983)。小試験管に活性酸素産生系溶液を0.1 ml入れ、0.1 Mナトリウム・リン酸緩衝液(pH 7.4)を0.5 ml加えた。これに抗酸化剤溶液を0.1 ml添加し、ただちに指示菌懸濁液0.1 mlを加え、37°Cの恒温水槽中で20分間振盪培養した。ついで、45°Cに保溫したトップアガード2 mlを添加・混合し、素早く最少グルコース寒天平板上に重層した。

寒天平板はトップアガードが固化後、上下転倒させ37°Cのふ卵器で約48時間静置培養し、生じたHis<sup>+</sup>の復帰変異コロニーを計数した。各用量につきプレートは2枚使用し、実験は2回以上行った。

また、生菌数測定のため抗酸化剤を添加した菌懸濁液を0.1 ml取り、生理食塩水を用い100倍希釈を3回行い、最終希釈培養液0.1 mlを2 mlのニュートリエントプロストップアガード最少グルコース寒天平板培地に重層し、37°Cで24時間培養後、コロニーを計数した。

Table 1 Effects of antioxidant on survival in *S. typhimurium* TA102 and TA104

Antioxidant (μmol/plate)	Viable cells/plate	
	TA102 mean±S.D.	TA104 mean±S.D.
water	207±15	247±25
ascorbic acid	239±6	211±6
thiourea	—	217±19
mannitol	200	229±4
	200	—
	400	—
	400	248±8

The numbers represent the average of 3 plates

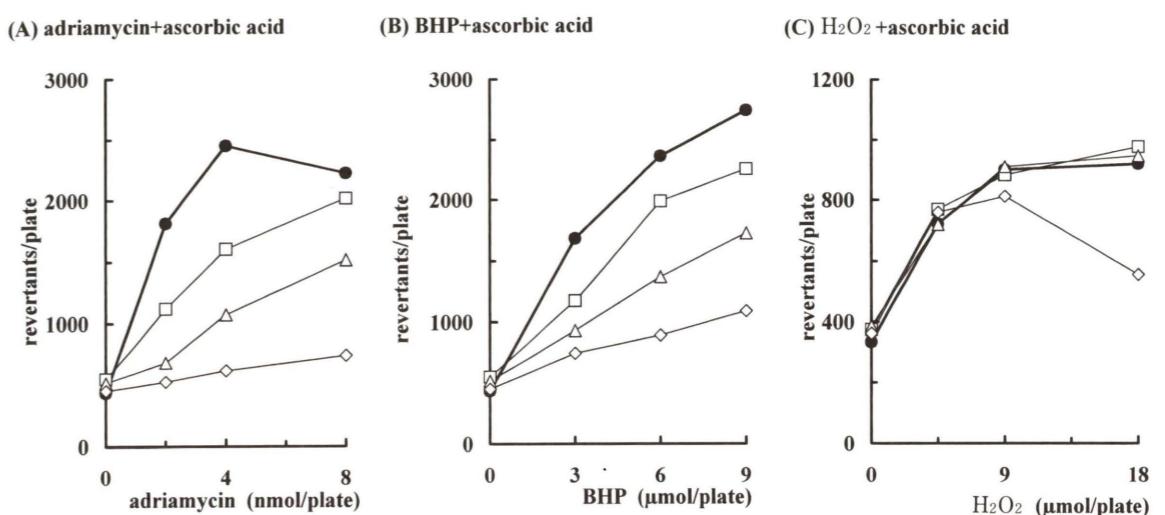


Fig. 1 Effects of ascorbic acid on mutations induced by reactive oxygen species in *S. typhimurium* TA102  
A : The mutation induced by adriamycin in the absence (●) or presence of ascorbic acid 10 μmol/plate (□), 20 μmol/plate (△), and 40 μmol/plate (◇). B : The mutation induced by BHP in the absence (●) or presence of ascorbic acid 10 μmol/plate (□), 20 μmol/plate (△), and 40 μmol/plate (◇). C : The mutation induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the absence (●) or presence of ascorbic acid 10 μmol/plate (□), 20 μmol/plate (△), and 40 μmol/plate (◇).

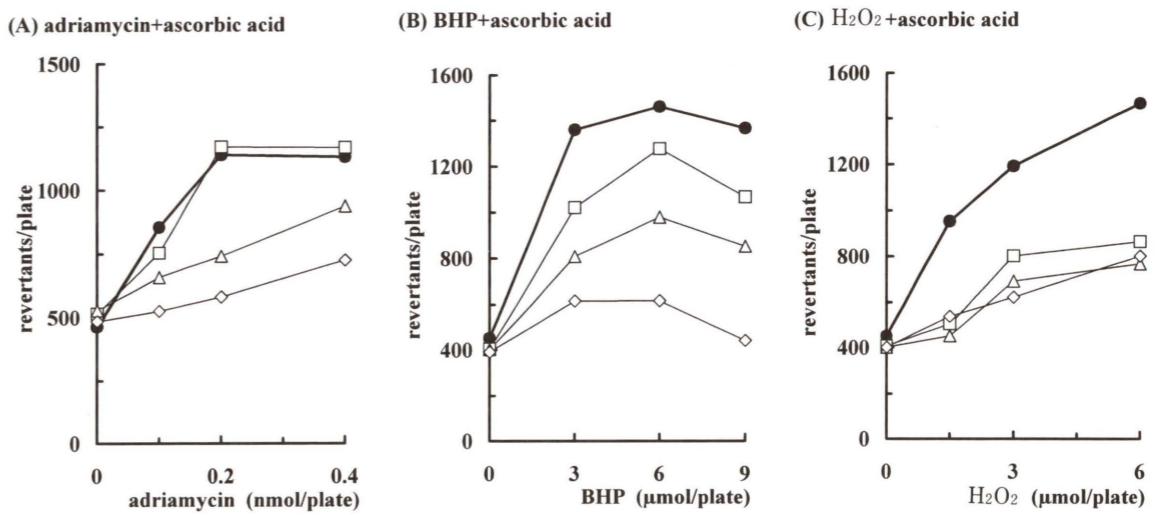


Fig. 2 Effects of ascorbic acid on the mutation induced by reactive oxygen species in TA104  
A : The mutation induced by adriamycin in the absence (●) or presence of ascorbic acid 10 μmol/plate (□), 20 μmol/plate (△), and 40 μmol/plate (◇). B : The mutation induced by BHP in the absence (●) or presence of ascorbic acid 10 μmol/plate (□), 20 μmol/plate (△), and 40 μmol/plate (◇). C : The mutation induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the absence (●) or presence of ascorbic acid 10 μmol/plate (□), 20 μmol/plate (△), and 40 μmol/plate (◇).

## 結果および考察

本研究では、TA 102株およびTA 104株を用いた復帰突然変異試験を指標にして、活性酸素産生系の変異原性に及ぼす抗酸化剤の影響を調べた。

すなわち、活性酸素産生系の変異原性物質を用いて、TA 102株およびTA 104株の感受性を確認するとともに、抗酸化剤またはHO<sup>·</sup>スカベンジャーを添加する系を加え、抗酸化作用に基づく酸化的DNA損傷に対する抑制効果を有する物質の変異原性抑制効果を検証した。

今回抗酸化剤として用いたascorbic acid, thioureaおよびmannitolが、サルモネラTA 102株およびTA 104株に細胞毒性を示さないことを確認するため、本研究で用いた最高用量に対する生菌数を求めTable 1に示した。その結果、両菌株に対する生育阻害はいずれの抗酸化剤においても認められなかった。

### 各種活性酸素産生系の変異原性の検出

活性酸素産生系には、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>·-</sup>産生系としてadriamycin, 有機過酸化物としてBHPを用いて、TA 102株およびTA 104株に対する各種活性酸素産生

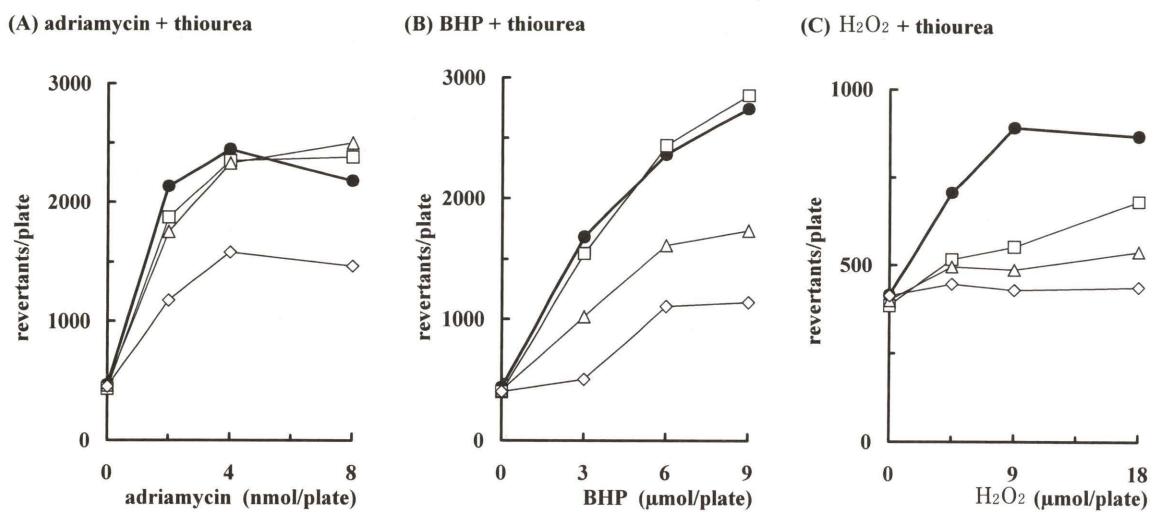


Fig. 3 Effects of thiourea on the mutation induced by reactive oxygen species in TA102

A : The mutation induced by adriamycin in the absence (●) or presence of ascorbic acid 100  $\mu\text{mol}/\text{plate}$  (□), 200  $\mu\text{mol}/\text{plate}$  (△), and 400  $\mu\text{mol}/\text{plate}$  (◇). B : The mutation induced by BHP in the absence (●) or presence of ascorbic acid 50  $\mu\text{mol}/\text{plate}$  (□), 100  $\mu\text{mol}/\text{plate}$  (△), and 150  $\mu\text{mol}/\text{plate}$  (◇). C : The mutation induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the absence (●) or presence of ascorbic acid 25  $\mu\text{mol}/\text{plate}$  (□), 50  $\mu\text{mol}/\text{plate}$  (△), and 100  $\mu\text{mol}/\text{plate}$  (◇).

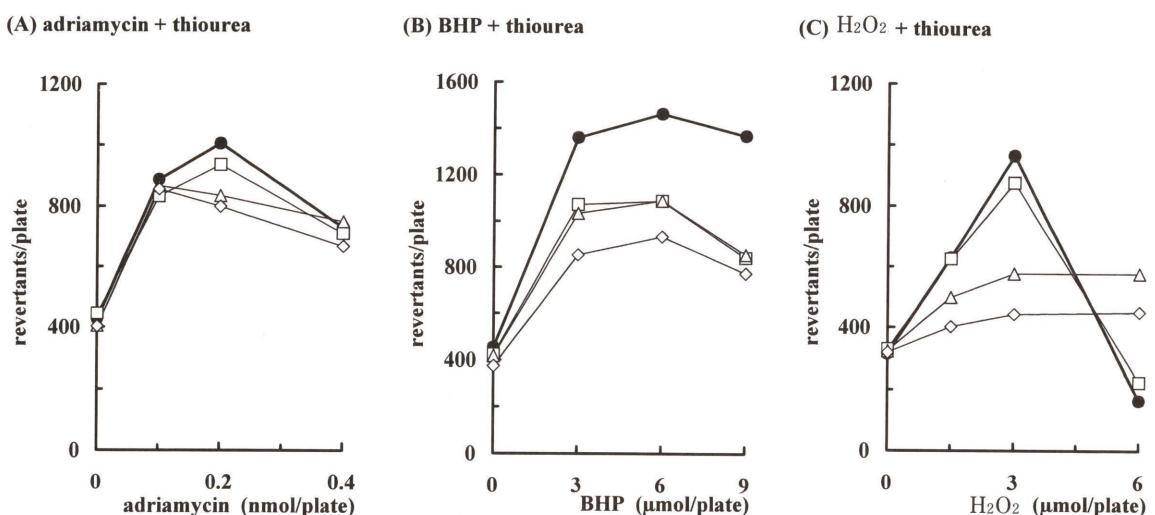


Fig. 4 Effects of thiourea on the mutation induced by reactive oxygen species in TA104

A : The mutation induced by adriamycin in the absence (●) or presence of ascorbic acid 50  $\mu\text{mol}/\text{plate}$  (□), 100  $\mu\text{mol}/\text{plate}$  (△), and 200  $\mu\text{mol}/\text{plate}$  (◇). B : The mutation induced by BHP in the absence (●) or presence of ascorbic acid 12.5  $\mu\text{mol}/\text{plate}$  (□), 25  $\mu\text{mol}/\text{plate}$  (△), and 50  $\mu\text{mol}/\text{plate}$  (◇). C : The mutation induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the absence (●) or presence of ascorbic acid 1  $\mu\text{mol}/\text{plate}$  (□), 5  $\mu\text{mol}/\text{plate}$  (△), and 10  $\mu\text{mol}/\text{plate}$  (◇).

系の変異原性を確認した。Adriamycin, BHP および H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は TA 102 株および TA 104 株で変異原性陽性であり、各産生系の復帰変異コロニー数は両菌株とも用量依存的な増加が示された。また、用量で比較した場合、adriamycin, BHP および H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> における変異原性の強さは ADR>BHP>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の順であり、O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の各産生系および有機過酸化物の変異原性に対し TA 104 株は TA 102 株より高感受性であった。これと同様の成績は羽倉ら(1996)によって報告されており、TA 104 株が TA 102 株より高感受性である一因に除去修復能の欠損

があげられている。

#### 活性酸素の変異原性に対する抗酸化剤の影響

各種活性酸素産生系に ascorbic acid を添加し、活性酸素による復帰変異コロニー数の増加に対する抗酸化剤の影響を検討した。その結果を Fig. 1 および Fig. 2 に示した。

Ascorbic acid を単独で用いた場合、両菌株とも復帰変異コロニー数の増加傾向が観察された。

Ascorbic acid は水溶性の抗酸化剤として有効であるが、その一方で、銅、鉄などの重金属イオンの共存下で

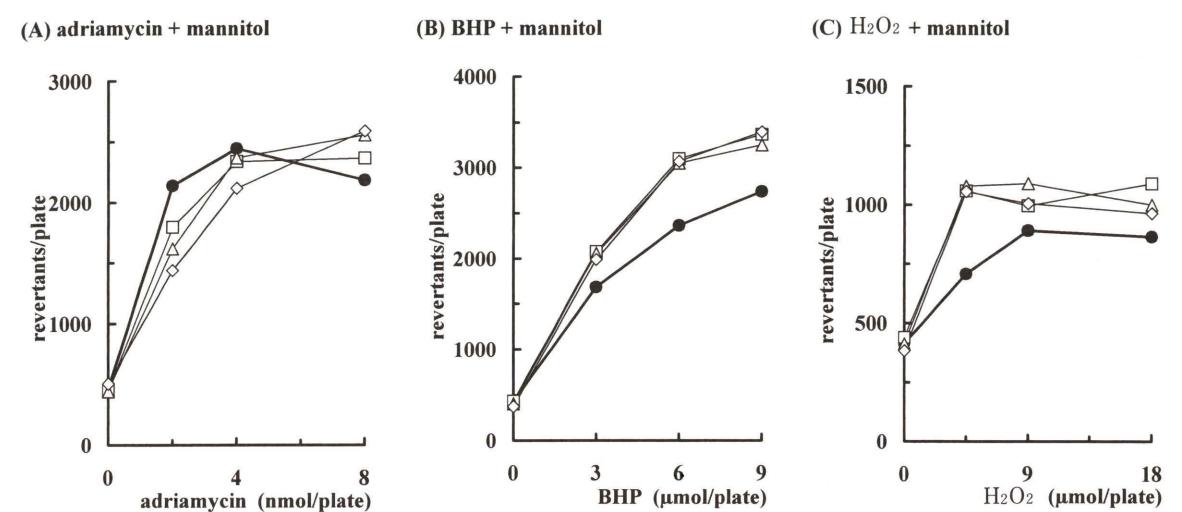


Fig. 5 Effects of mannitol on the mutation induced by reactive oxygen species in TA102

A : The mutation induced by adriamycin in the absence (●) or presence of ascorbic acid 100  $\mu\text{mol}/\text{plate}$  (□), 200  $\mu\text{mol}/\text{plate}$  (△), and 400  $\mu\text{mol}/\text{plate}$  (◇). B : The mutation induced by BHP in the absence (●) or presence of ascorbic acid 25  $\mu\text{mol}/\text{plate}$  (□), 50  $\mu\text{mol}/\text{plate}$  (△), and 100  $\mu\text{mol}/\text{plate}$  (◇). C : The mutation induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the absence (●) or presence of ascorbic acid 25  $\mu\text{mol}/\text{plate}$  (□), 50  $\mu\text{mol}/\text{plate}$  (△), and 100  $\mu\text{mol}/\text{plate}$  (◇).

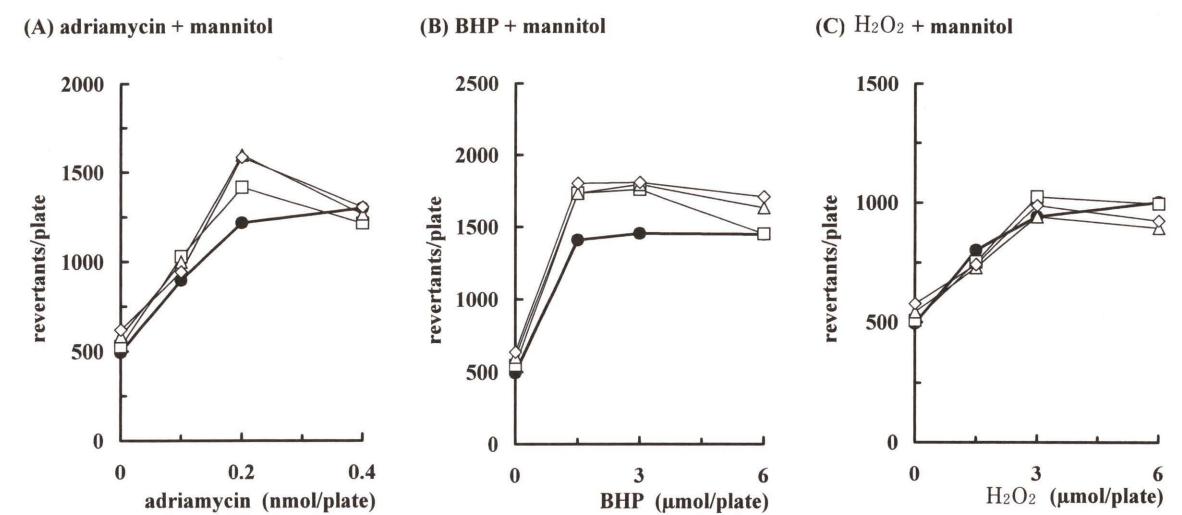


Fig. 6 Effects of mannitol on the mutation induced by reactive oxygen species in TA104

A : The mutation induced by adriamycin in the absence (●) or presence of ascorbic acid 50  $\mu\text{mol}/\text{plate}$  (□), 100  $\mu\text{mol}/\text{plate}$  (△), and 200  $\mu\text{mol}/\text{plate}$  (◇). B : The mutation induced by BHP in the absence (●) or presence of ascorbic acid 25  $\mu\text{mol}/\text{plate}$  (□), 50  $\mu\text{mol}/\text{plate}$  (△), and 100  $\mu\text{mol}/\text{plate}$  (◇). C : The mutation induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the absence (●) or presence of ascorbic acid 50  $\mu\text{mol}/\text{plate}$  (□), 100  $\mu\text{mol}/\text{plate}$  (△), and 200  $\mu\text{mol}/\text{plate}$  (◇).

は、活性酸素種を生成し酸化を促進することが知られている(倉田ら, 1994)。今回の実験系において、ascorbic acid を単独で用いた場合に復帰変異数の増加傾向が観察されたのは、菌体内に存在する遷移金属の影響を受けた ascorbic acid の酸化促進効果によるものと考えられる。

活性酸素の変異原性に対する ascorbic acid の抑制効果は、TA 102 株および TA 104 株とも ADR および BHP を用いた産生系において明確に示され、用量依存的に復帰変異コロニー数の増加が抑制された。とくに、

生成量を減少した可能性が考えられる。また、BHP で誘発された復帰変異コロニー数の著しい減少が認められたことから、ascorbic acid は有機過酸化物の酸化的 DNA 損傷に対して強い抑制効果を示すことが推測される。

しかし、 $H_2O_2$  の変異原性に対する ascorbic acid の抑制効果は、TA 104 株で顕著であったのに対し、TA 102 株では ascorbic acid の  $40 \mu\text{mol}/\text{plate}$  で軽度な抑制が認められたものの、その効果は明確でなく、菌株により差が認められた。

#### 活性酸素の変異原性に対する $\text{HO}^\cdot$ スカベンジャーの影響

各種活性酸素产生系に thiourea または mannitol を添加し、活性酸素による復帰変異コロニー数の増加に対する  $\text{HO}^\cdot$  スカベンジャーの影響を検討した。その結果を thiourea は Fig. 3 および Fig. 4 に、mannitol は Fig. 5 および Fig. 6 に示した。

Thiourea は BHP および  $H_2O_2$  で誘発される復帰変異コロニー数の明確な增加抑制効果を示した。しかし、ADR に対しては TA 102 株で抑制効果を示したもの、TA 104 株ではその効果を認めなかった。Thiourea の抑制効果は、 $H_2O_2$  で最も強く、 $H_2O_2$  の  $9 \mu\text{mol}/\text{plate}$  に対する TA 102 株の復帰変異コロニー数は thiourea の 25, 50 および  $100 \mu\text{mol}/\text{plate}$  を添加することにより、それぞれ 29, 16 および 3 % となった。また、 $H_2O_2$  の  $3 \mu\text{mol}/\text{plate}$  に対する TA 104 株の復帰変異コロニー数は、thiourea の 5 および  $10 \mu\text{mol}/\text{plate}$  で、それぞれ 41 および 20 % となった。この著しい効果は、 $H_2O_2$  が菌体内に存在する遷移金属と Fenton 反応を起こし、そこから生じた  $\text{HO}^\cdot$  による酸化的 DNA 損傷をも抑制したことによるものと思われる。

Mannitol を用いた場合、ADR の  $2 \text{ nmol}/\text{plate}$  に対する TA 102 株の復帰変異コロニー数は mannitol の 100, 200 および  $400 \mu\text{mol}/\text{plate}$  添加によりそれぞれ 80, 69 および 58 % に抑制された。しかし、ADR の  $4 \text{ nmol}/\text{plate}$  ではほぼ変化がみられず、 $8 \text{ nmol}/\text{plate}$  ではむしろ増加傾向が示されたことから、mannitol の効果は弱いものであった。また、他の活性酸素产生系では全く抑制効果を示さず、逆に、TA 102 株における BHP および  $H_2O_2$ 、TA 104 株における ADR および BHP では mannitol により復帰変異コロニー数が増加する傾向が観察された。Mannitol は  $\text{HO}^\cdot$  スカベンジャーであるが、その作用を示すにはかなりの高濃度を要するといわれており(大柳, 1989)、変異原性に対する影響も弱いと考えられる。しかし、glyoxal や glyceraldehyde の TA 100 株に対する変異原性を mannitol は最適量で 59 % 抑えると報告(Yamaguchi and Nakagawa, 1983)されていることから、mannitol は菌株や活性酸素产生系によりその変異原性抑制効果に著しい差が生じると思われる。

本研究結果から、活性酸素の変異原性に対する抗酸化剤および  $\text{HO}^\cdot$  スカベンジャーの抑制効果は TA 102 株および TA 104 株とともに認められ、本試験系は活性酸素の変異原性を指標とした抗酸化作用のスクリーニング系確立の一助になると考えられる。なお、菌株または活性酸素产生系により変異原性抑制効果の程度に差がみられたのは、今回用いた ADR, BHP および  $H_2O_2$  から產生される活性酸素種は単一のものではなく、 $\text{O}_2^\cdot$ ,  $H_2O_2$  および  $\text{HO}^\cdot$  など種々の活性酸素が非酵素的に產生されることによるものと思われる。すなわち、活性酸素種により生じる酸化的 DNA 損傷の機序が異なり、これら DNA 損傷のサルモネラ DNA 修復機構に対する反応の差が、変異原性抑制効果に違いが生じた一因であると考えられる。

#### 謝 詞

*S. typhimurium* TA 102 および TA 104 株は国立医薬品食品衛生研究所の能美健彦博士から供与頂いたもので、ここに厚く感謝いたします。

#### 参 考 文 献

- Chesis, P. L., D. E. Levin, M. T. Smith, L. Ernster and B. N. Ames (1984) Mutagenicity of quinones : Pathways of metabolic activation and detoxification, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 1696-1700.
- Hakura, A., Y. Tsutsui, H. Mochida, Y. Sugihara, T. Mikami and F. Sagami (1996) The mutagenicity of activated oxygen species-generating systems towards *Salmonella* TA102 and TA104 tester strains, Environ. Mutagen Res., 18, 35-40.
- 萩田善一, 大浦彦吉(編)(1987)活性酸素—その臨床医学への応用一, 共立出版, 東京.
- Jung, R., G. Engelhart, B. Herboldt, R. Jackh and W. Muller (1992) Collaborative study of mutagenicity with *Salmonella typhimurium* TA102, Mutat. Res., 278, 265-270.
- 倉田忠男(1994)：“ビタミンの抗酸化作用—ビタミンCの抗酸化性”(二木鉄雄, 島崎弘幸, 美濃 真編)抗酸化物質, 学会出版センター, 東京, 79-86.
- Levin, D. E., M. Hollstein, M. F. Christman, E. A. Schwiers and B.N.Ames (1982) A new *Salmonella* tester strain (TA102) with A-T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 7445-7449.
- Levin, D. E., L. J. Marnett and B. N. Ames (1984) Spontaneous and mutagen-induced deletions : Mechanistic studies in *Salmonella* tester strain TA102, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 4457-4461.
- Marnett, L. T., H. K. Hurd, M. C. Hollstein, D. E. Levin, H. Esterbauer and B. N. Ames (1985) Naturally occurring carbonyl compounds are mutagens in *Salmonella* tester strain TA104, Mutat. Res., 148, 25-34.
- Maron, D. M., and B. N. Ames (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, Mutation Res., 113, 173-215.
- 大柳喜彦(編)(1987)SOD と活性酸素調節剤—その薬理作用と臨床応用一, 日本医学館, 東京.
- 祖父尼俊雄, 石館 基(1988)変異原性と活性酸素, 蛋白質核酸酵素, 33, 16, 2830-2837.
- Yamaguchi, T., Nakagawa, K. (1983) Mutagenicity and formation of oxygen radicals by trioses and glyoxal derivatives, Agric. Biol. Chem., 47(11), 2461-2465.
- Wilcox, P., A. Naidoo, D. J. Wedd and D. G. Gatehouse (1990) Comparison of *Salmonella typhimurium* TA102 with *Escherichia coli* WP2 tester strains, Mutagenesis, 5, 285-291.

## Development of a micronucleus assay in the root tips of *Allium cepa* seedlings as a detector of chemical clastogens

Elma A. Alcaide<sup>1</sup>, Aki Tanaka<sup>1</sup>, Hideo Ikeda<sup>1</sup> and Kazuo Fujikawa<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Education, Hiroshima University,  
Higashihiroshima 739-8523, Japan

<sup>2</sup>Atomic Energy Research Institute, Kinki University,  
Higashiosaka 577-8502, Japan

### Summary

Micronuclear frequencies in the root-tip cells of *A. cepa* (onion) seedlings were scored at various times from 0 to 120 hr after X-irradiation. The resultant time course curve showed a clear peak at 24 hr after irradiation, irrespective of the dose applied. Similarly, after continual treatment of onions from the dormant to seedling stages (germinating seeds) with methylmethanesulfonate, the frequency of micronuclei reached a peak at 24 hr or a plateau at 48 to 72 hr and then decreased with time. A mitotic cycle duration of about 21 hr was deduced for the meristems from available time course data. CoCl<sub>2</sub> was registered as a metal compound with higher genotoxic potency than As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in germinating onion seeds as assayed for micronuclei at 24 hr after treatment. For all of the agents used, a clear dosage effect on the frequency of micronuclei was seen at the 24-hr sampling time when mitotic indexes of the meristems were at normal or subnormal levels. These results support the conclusion that the root-tip micronucleus assay in onion seedlings can be used as a simple detector of chemical clastogens.

Keywords : onion seedling, micronucleus, X-rays, methylmethanesulfonate, CoCl<sub>2</sub>

### Introduction

The frequency of micronuclei induced in cells by ionizing radiation and chemicals is widely used as a simple measure of chromosome damage. In plants, three systems have been established for the micronucleus assay. These are the root-tip cells of *Vicia faba* seedlings (Evans et al., 1959; Arora et al., 1969), those of *Allium cepa* bulbs (Dash et al., 1988) and *Tradescantia* pollen mother cells (Ma, 1979). The validity of these systems has been demonstrated for the initial identification of genotoxic hazards in the environment (Fomin and Hafner, 1998; Ma et al., 1984; Dash et al., 1988; Ruiz et al., 1992; Sandhu et al., 1989). Recently, a version of the onion assay, which uses seedlings instead of bulbs,

has been developed as a sensitive dosimeter of fast neutrons (Himit et al., 1996; Fujikawa et al., 1999). A biological system that can measure radiation dose with a high degree of accuracy may be useful for analysis of chemically induced chromosome damage. The present study was carried out as a first step for deploying the biodosimeter as a detector of chemical clastogens.

For chromosome aberration assay, Sax and Sax (1968) reported that continual treatment of onions from the dormant seed to seedling stages, i.e. germinating seeds, with a chemical agent was effective in detecting evidence of clastogenicity in the root-tip cells of seedlings. For biodosimetry, Fujikawa and coworkers (Himit et al., 1996; Fujikawa et al., 1999) reported that micronuclear yields could easily be monitored in the roots of onion seedlings one day after acute exposure to ionizing radiation. Thus, a main issue pursued in the present study concerns

the timing suitable for the root-tip micronucleus assay in onion seedlings after chemical treatment of the germinating seeds. For this issue, we examined variations in the frequency of micronuclei and mitotic cells in the roots of onions with time after acute X-irradiation of the seedlings and continual treatment of the germinating seeds with methyl-methanesulfonate (MMS). Subsequently, cobaltous chloride ( $\text{CoCl}_2$ ) and arsenic trioxide ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) were comparatively assayed for genotoxic potency in the germinating seeds. In this report, we describe results from these experiments and discuss the implications for proper use of the micronucleus assay as a detector of chemical clastogens.

## Materials and Methods

### Chemicals and onion seeds

MMS (purity >99 %, CAS No., 66-27-3) was purchased from Aldrich Chemical Co. (WI, USA) and  $\text{CoCl}_2$  (>99 %, 7646-79-9) and  $\text{As}_2\text{O}_3$  (ca. 90 %, 1327-53-3) were from Katayama Chemical Ind., Co. (Kyoto, Japan). MMS was dissolved in distilled water (DW) at appropriate concentrations immediately before use.  $\text{CoCl}_2$  and  $\text{As}_2\text{O}_3$  were dissolved in DW at 100 mM and kept as stock solutions at 4°C. Test solutions of these agents were prepared by diluting a sample of the stocks to desired concentrations with DW immediately before use. The concentrations of these chemicals in the test solutions define the doses used.

Seeds of *Allium cepa* var. OK Yellow, which were harvested in July, 1997, were purchased from Takii Seed Co. (Kyoto, Japan) and stored at 4°C under dry conditions until use.

### X-irradiation

The seeds were sown on paper beds soaked with DW and cultured at 25°C; resulting seedlings with roots about 5 mm in length were sampled 2 days later and transferred onto freshly prepared, DW-soaked beds in 100 mm × 15 mm polystyrene dishes. The seedlings in the covered dishes were irradiated with 0.5 or 2.0 Gy of X-rays. A Hitachi X-ray generator used was operated at 140 kV and 4 mA with 1.0 mm Al filter. The dose rate was 50 cGy/min as measured with a Victrex chamber.

Irradiated seedlings were cultured at 25°C in the same dishes, and five seedlings were harvested and fixed for micronucleus assay from each of irradiated dishes at 12-hr intervals from 0 to 48 hr and then at 24-hr intervals to 120 hr postirradiation. The intervals 12 and 24 hr corresponded roughly to 12.7 and 23 hr, respectively, that were the smallest and the greatest values reported as the mitotic cycle dura-

tions for the root meristem of *Allium cepa* (Bryant, 1969; Van't Hof, 1965; Arcara and Nuti Ronchi, 1967; Nuti Ronchi and Arcara, 1967; Matagne, 1968).

### Chemical treatment

A 560 mg piece of tissue paper was soaked with 6 ml of a solution containing MMS,  $\text{CoCl}_2$  or  $\text{As}_2\text{O}_3$  in a 100 mm × 15 mm dish. Seeds were sown on the treated beds, where they were allowed to germinate at 25°C for 48 hr (Sax and Sax, 1968). Resulting seedlings were harvested and washed free of the test solution with DW. They were then transferred to dishes containing DW-soaked beds and cultured at 25°C. From each of the MMS-treated groups, 7 to 10 seedlings were harvested and fixed for micronucleus assay at 24-hr intervals from 0 to 120 hr after treatment. The  $\text{CoCl}_2$ - and the  $\text{As}_2\text{O}_3$ -treated groups were subjected to the assay at 24 hr after treatment.

In this report, we conventionally use the terms *germinating seeds* for onions from 0 to immediately before 48 hr after seeds were sown, and *seedlings* for those at 48 hr and later.

### Micronucleus assay

Roots of treated or control seedlings were fixed, stained and macerated simultaneously in a 7 : 3 mixture of acetic dahlia solution and 1 M HCl for 15 min (Hamamoto, 1988). The dye solution was prepared by dissolving a 0.5 g sample of dahlia violet (Wako Pure Chemical Ind., Osaka, Japan) into 100 ml of 30 % acetate. The treated roots were washed free of the fixative in DW for 10 min. Terminal 1 to 2 mm of the roots were mounted using 50 % glycerol as medium and squashed on slides, one root each. Preparations made in this way were microscopically inspected at a magnification of 400× for the presence of more than one nuclei in the root-tip meristematic cells at interphase. The additional nuclei, which showed up the coloration of normal nuclei stained by dahlia violet (deep violet) and were smaller than the normal, were scored as micronuclei. The number of interphase cells inspected for micronuclei per root was about 500 in all the treated series, except that for  $\text{As}_2\text{O}_3$  in which about 1000 cells were examined in each root. The index averaged for all roots examined in the treated group relative to that in control was used as a measure of the toxicity on mitosis.

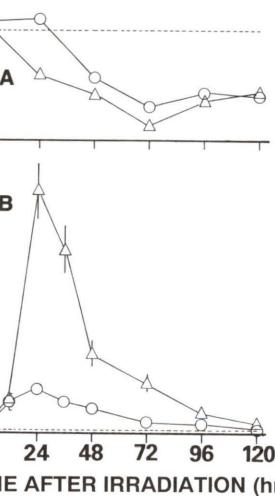


Fig. 1 Variations in the relative mitotic index (A) and the frequency of micronuclei (B) in the roots of onion seedlings with time after X-irradiation at 0.5(○) or 2.0 Gy(△). Vertical lines in B represent standard errors of the frequencies (N=5). Error bars masked by the symbols are not shown. Dotted lines in A and B represent the mitotic index of  $10.7 \pm 0.3\%$  and the micronuclear yield of  $0.15 \pm 0.04\%$  obtained as controls averaged for all the sampling times (N=30 for both), respectively.

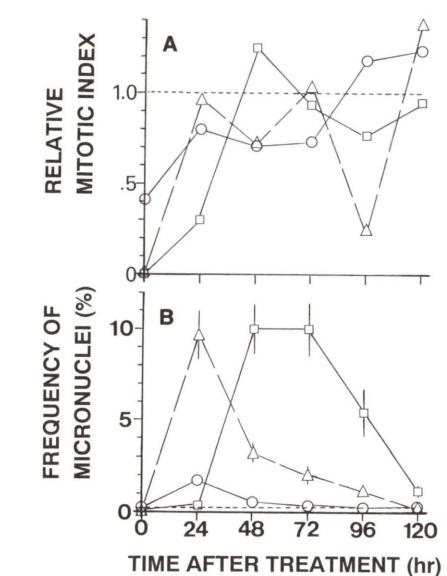


Fig. 2 Variations in the relative mitotic index (A) and the frequency of micronuclei (B) in onion seedlings with time after MMS treatment of germinating seeds at 0.12(○), 0.35(△) or 1.17 mM(□). Vertical lines in B represent standard errors of the frequencies (N=7–10). Error bars masked by the symbols are not shown. Dotted lines in A and B represent the mitotic index of  $5.6 \pm 0.5\%$  (N=46) and the micronuclear yield of  $0.16 \pm 0.03\%$  (N=52) obtained as controls averaged for all the sampling times, respectively.

Gy to 0.2 % and to 1 %, respectively, at 120 hr postirradiation. The dose dependency of micronuclear yields was evident at 24 hr and later fixation times.

### Time course of micronuclear frequency after treatment of germinating seeds with MMS

As shown in Fig. 2A, mitotic indexes determined immediately after treatment with 0.12, 0.35 and 1.17 mM MMS for 48 hr were 40, 1 and 0 % of the control value, respectively. Zero frequencies at 0 hr were also recorded for micronuclei after treatment at 0.35 and 1.17 mM (Fig. 2B).

Within 24 hr after treatment, the mitotic index in the 0.12 mM-treated group and that in the 0.35 mM group increased from 40 to 77 % and from 1 to 96 % of the control level, respectively (Fig. 2A). The increase in the 0.35 mM group was accompanied with a sharp elevation of the micronuclear frequency from zero to 10 % (Fig. 2B). Similarly, the frequency in the 0.12 mM group clearly increased from the control level to 2 %. These increases were followed by continual time-dependent decreases in the frequencies to the control level at 120 hr after treatment (Fig. 2B).

The mitotic index in the 1.17 mM-treated group increased from zero to 30 % of the control level

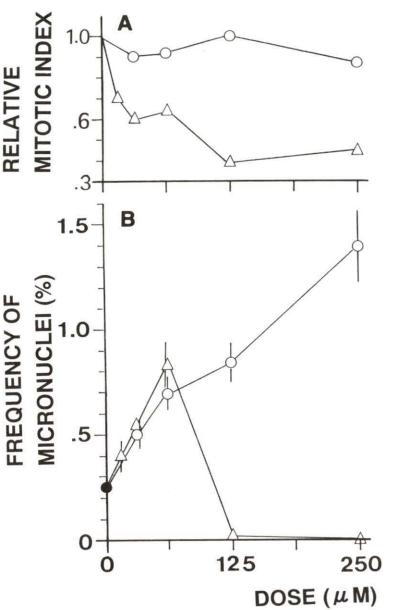


Fig. 3 Dose-dependent variations in the relative mitotic index (A) and the frequency of micronuclei (B) at 24 hr after treatment of germinating seeds with CoCl<sub>2</sub> (○) and As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (△). Vertical lines in B represent standard errors of the frequencies (N=10 for CoCl<sub>2</sub> and 5 for As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). Error bars masked by the symbols are not shown. The mitotic index and the micronuclear yield in control roots were 10.4±0.5% (N=15) and 0.25±0.03% (N=30), respectively, the latter of which is shown in B by ●.

within 24 hr after treatment (Fig. 2A). This increase was not accompanied with a significant increase in the micronuclear yield (Fig. 2B). A marked increase in the frequency of micronuclei to 10 % occurred from 24 to 48 hr after treatment in parallel with an increase in the mitotic index over the control level. The frequency remained high at 72 hr and then continually decreased to 1% at 120 hr posttreatment.

A dosage effect of MMS on the frequency of micronuclei was clear up to 0.35 mM at the 24-hr sampling time and in the whole dose range used at later sampling times (Fig. 2A).

#### Comparative induction of micronuclei by CoCl<sub>2</sub> and As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

As shown in Fig. 3A, mitotic indexes in the CoCl<sub>2</sub>-treated series did not deviate markedly from the control level in the dose range used, whereas the indexes in the As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-treated series decreased to 40 % of the control level as the dose increased up to 125 μM and remained at a low level at 250 μM.

As shown in Fig. 3B, the frequencies of micronuclei increased over the control of 0.25 % in a dose-dependent manner to 1.4 % in the dose range used

for CoCl<sub>2</sub>, i.e. up to 250 μM. Treatment with As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> also increased the micronuclear yields at doses up to 62.5 μM. The increment rate was similar to that by CoCl<sub>2</sub> in the comparable dose range. However, the increase in the As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-treated series was followed by a sharp decrease below the control level at 125 μM.

#### Discussion

The time course curves of the frequency of micronuclei in onion seedlings after X-irradiation with two different doses consistently showed a clear peak at 24 hr (Fig. 1B). Similarly, the frequencies peaked at 24 hr or plateaued at 48 hr after MMS treatment of germinating seeds (Fig. 2B). Increases in the frequency of MMS-induced micronuclei occurred concomitantly with marked increases in the mitotic index from a low to normal or subnormal levels (Fig. 2A), demonstrating that mitotic division is essential for production of micronuclei. If X-rays and MMS do not exert a delayed genetic effect in onion seedlings, the first mitotic divisions of mutagenized cells would produce micronuclei and accumulate them in interphase cells in the second round of the cell cycle, and the density of micronuclei per interphase cell would be continually diluted by normal cells produced by the second and subsequent cell divisions. This seems to have been the case, as discussed below.

Since all the mitotic indexes concerned are at normal or subnormal levels, except that at 96 hr after moderate dosing (probably due to partial synchronization) (Fig. 2A), the time-dependent decreases of micronuclear yields after MMS treatment (Fig. 2B) can be approximated by the following equation :

$$F = F_p \times 2^{-(\Delta t/T)}, \quad (1)$$

where  $F(\%)$  is the frequency of micronuclei;  $p$  denotes the posttreatment time for the peak frequency, i.e. 24 hr, or the terminal time for the plateaued frequency, i.e. 72 hr;  $\Delta t$  (hr) is the time elapsed after  $p$ ;  $T$  is the duration of the mitotic cycle (hr). The  $T$  values ( $\pm 1SD$ ) obtained as experimental values from the observed micronuclear frequencies, using Eq.(1), are 22±9, 19±4 and 21±8 hr in the meristems treated with 0.12, 0.35 and 1.17 mM MMS, respectively. We shall take the average, i.e. 21 hr, as the duration of the mitotic cycle. Considering a possible mitotic delay shortly after treatment, this duration seems to correspond to the time for the peak micronuclear yields (24 hr). In other words, the majority of micronuclei detected with high frequencies at the 24-hr recovery time would have been produced by the first posttreatment cell division. Taken together with the marked delay in the onset

of mitotic division after high MMS dosing, micronuclei detected with high frequencies at 48 and 74 hr posttreatment can be interpreted in the same way.

The present results suggest that, for evaluation of genotoxicity, the time for micronucleus assay in onion seedlings can be fixed at a time point around 24 hr after treatment of germinating seeds for 48 hr with test agent, if the agent is used at various doses and mitotic index of treated meristem is monitored at each dose. In the present study, a clear dosage effect on the frequency of micronuclei was seen at the 24-hr posttreatment time for all of the agents used when mitotic indexes of treated meristems were equivalent to or higher than 60 % of the control level. When the indexes were as low as 40 % of the control level at the assay time, virtually no evidence of genotoxicity was detected as micronucleus production for MMS nor As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

There was ample evidence in the results on mitotic indexes that the meristems, mitosis of which was close to completely suppressed during MMS treatment, could restore a normal level of mitotic activity within one or two days after treatment (Fig. 2A), whereas X-irradiated meristems with a decreased mitotic activity at 24 or 48 hr post-irradiation could not regain a normal state up to the final sampling time at 120 hr (Fig. 1A). Since other chemical agents also exerted a similar reversible effect on mitosis without inducing micronucleus formation when applied to germinating onion seeds (A. Tanaka, unpublished), mitotic suppression occurring during MMS treatment may be a response triggered by non-DNA damage to retain the proliferating potential of meristem under nonphysiological conditions evoked by the treatment. On the other hand, we may assume DNA damage or rearrangement as a cause of the irreversible mitotic suppression seen after X-irradiation of seedlings. Irreversible growth arrest after certain types of DNA damage has been documented in mammalian cells (see Evan and Littlewood, 1998).

As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and CoCl<sub>2</sub> were effective as inducers of micronuclei when assayed at 24 hr after treatment of germinating onion seeds (Fig. 3B). As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> has been reported to be an effective inducer of micronuclei in the root-tip cells of *Vicia faba* seedlings, those of *Allium cepa* bulbs and *Tradescantia* pollen mother cells (Steinkeller et al., 1998). CoCl<sub>2</sub> has been reported to be clastogenic in rodents (Farah, 1983; Palit et al., 1991) and mutagenic in *Drosophila* (Ogawa et al., 1994). The present data show that CoCl<sub>2</sub> is also genotoxic in a plant system. This metal compound increased the frequency of micronuclei over the control level at a rate similar to that by As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in a

comparable low dose range, and the low toxicity on mitosis allowed the dose-dependent increase up to the highest dose used (Fig. 3A, B). On the other hand, the high toxicity of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> restricted the dose-dependent increase in micronuclear yields in the low dose range and suppressed the yields below the control level of 0.25 % in the high dose range in contrast to the increase over 1 % level of micronuclear yield in the comparable dose range of CoCl<sub>2</sub> (Fig. 3A, B). Assaying the seedling roots at 48 hr after treatment, we confirmed the nearly equal yields of micronuclei after moderate dosing of CoCl<sub>2</sub> and As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and the considerably lower production of micronuclei by As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> than by CoCl<sub>2</sub> at a high dose. That is to say that, the frequencies of micronuclei (and the total numbers of interphase cells observed) at 48 hr after treatment of the germinating seeds with CoCl<sub>2</sub> at 62.5 and 125 μM were 0.39 % (2829) and 0.44 % (2730), respectively; the frequencies after treatment with As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> at the same doses were 0.38% (5202) and 0.06 % (5284), respectively. Hence, we register CoCl<sub>2</sub> as a metal compound with higher genotoxic potency than As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in germinating onion seeds. Because of its higher genotoxic potency, CoCl<sub>2</sub> rather than As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> would be a better choice as a positive or reference compound, when metal compounds are being tested in the root-tip micronucleus assay. In fact, routine use of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> is problematic, if we consider the acute toxicity and carcinogenicity of As<sup>3+</sup> in humans (IARC, 1980), and use of CoCl<sub>2</sub> may circumvent these problems.

In summary, the present study has shown that continual treatment of onions from the dormant seed to seedling stages with a chemical agent is effective in detecting evidence of clastogenicity as micronucleus formation in the root-tip cells of seedlings and that the timing for the micronucleus assay can be fixed at a time point around 24 hr after treatment. We thus may conclude that the root-tip micronucleus assay in onion seedlings can be used as a simple detector of chemical clastogens. However, further experiments and analyses are needed in order to develop the root-tip micronucleus assay as a sensitive test for the initial identification of clastogens in the environment. Use of the seedling roots as subjects of chemical treatment, either chronic or acute, will be an important issue for further studies.

#### Acknowledgements

We thank Drs. Yoshihiko Yonezawa and Kenji Taniguchi for advice during the course of the present study.

## References

- Arcara, P. G. and V. Nuti Ronchi (1967) Effect of ethyl alcohol on the mitotic cycle of *Allium cepa* root meristems, *Caryologia*, 20, 229-232.
- Arora, O. P., V. C. Shah and S. R. V. Rao (1969) Studies on micronuclei induced by mitomycin-C in the root cells of *Vicia faba*, *Expt. Cell Res.*, 56, 443-448.
- Bryant, T. R. (1969) DNA synthesis and cell division in germinating onions II. Mitotic cell cycle and DNA content, *Caryologia*, 22, 139-148.
- Dash, S., K. K. Panda and B. B. Panda (1988) Biomonitoring of low levels of mercurial derivatives in water and soil by *Allium* micronucleus assay, *Mutat. Res.*, 203, 11-21.
- Evan, G. and T. Littlewood (1998) A matter of life and cell death, *Science*, 281, 1317-1322.
- Evans, H. J., G. J. Nearly and F. S. Williamson (1959) The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma-rays on *Vicia faba* roots and the effect of oxygen Part II. Chromosome damage : the production of micronuclei, *Int. J. Rad. Biol.*, 3, 216-229.
- Farah, S. B. (1983) The *in vivo* effect of cobaltous chloride on chromosome, *Rev. Brazil. Genet.*, VI, 433-442.
- Fomin, A. and C. Hafner (1998) Evaluation of genotoxicity of emission from municipal waste incinerators with *Tradescantia*-micronucleus bioassay (Trad-MCN), *Mutat. Res.*, 414, 139-148.
- Fujikawa, K., S. Endo, T. Itoh, Y. Yonezawa and M. Hoshi (1999) Dose estimations of fast neutrons from a nuclear reactor by micronuclear yields in onion seedlings, *J. Rad. Res.*, 40, Suppl., 28-35.
- Hanmoto, H. (1988) Daily rhythm of mitosis in root tip cells of *Allium cepa* and *Vicia faba*, *Jpn. J. Biol. Education*, 28, 52-55 (in Japanese).
- Himit, M., T. Itoh, S. Endo, K. Fujikawa and M. Hoshi (1996) Dosimetry of mixed neutron and gamma radiation with paired Fricke solutions in light and heavy water, *J. Rad. Res.*, 37, 97-106.
- IARC (1980) Some metals and metallic compounds. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man, Vol. 23, International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- Ma, T. H. (1979) Micronuclei induced by X-rays and chemical mutagens in meiotic pollen mother cells of *Tradescantia*, A promising mutagen test system, *Mutat. Res.*, 64, 307-313.
- Ma, T. H., M. M. Harris, V. A. Anderson, I. Ahmed, K. Mohammad, J. L. Bare and G. Lin (1984) *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) test on 140 health-related agents, *Mutat. Res.*, 138, 157-167.
- Matagne, R. (1968) Duration of mitotic cycle and pattern of DNA replication in chromosomes of *Allium cepa*, *Caryologia*, 21, 209-224.
- Nuti Ronchi, V. and P. G. Arcara (1967) The chromosome breaking effect of 6-methylcoumarin in *Allium cepa* in relation to the mitotic cycle, *Mutat. Res.*, 4, 791-796.
- Ogawa, H. I., T. Shibata, H. Iwata, T. Okada, S. Tsuruta, K. Kakimoto, K. Sakata, Y. Kato, H. Ryo, T. Itoh and K. Fujikawa (1994) Genotoxic activities *in vivo* of cobaltous chloride and other metal chlorides as assayed in the *Drosophila* wing spot test, *Mutat. Res.*, 320, 133-140.
- Palit, S., A. Sharma and G. Talikder (1991) Chromosomal aberrations induced by cobaltous chloride in mice *in vivo*, *Biol. Trace Elem. Res.*, 29, 139-145.
- Ruiz, E. F., V. M. E. Rabago, S. U. Leccona, A. B. Perez and T. H. Ma (1992) *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) bioassay on clastogenicity of wastewater and *in situ* monitoring, *Mutat. Res.*, 270, 45-51.
- Sandhu, S. S., T. H. Ma, Y. Peng and X. Zhou (1989) Clastogenicity evaluation of seven chemicals commonly found at hazardous industrial waste sites, *Mutat. Res.*, 224, 437-445.
- Sax, K. and H. L. Sax (1968) Possible mutagenic hazards of some food additives, beverages and insecticides, *Jpn. J. Genet.*, 43, 89-94.
- Steinkeller, H., K. Mun-Sik, C. Helma, S. Ecker, T. H. Ma, O. Horak, M. Kundi and S. Knasmuller (1998) Genotoxic effects of heavy metals : comparative investigation with plant bioassays, *Environ. Molec. Mutagen.*, 31, 183-191.
- Van't Hof, J. (1965) Relationship between mitotic cycle duration, S period duration and the average rate of DNA synthesis in the root meristem cells of several plants, *Expt. Cell Res.*, 39, 48-58.

*Environ. Mutagen Res.*, 22 : 15 - 18(2000)

## A micronucleus study of 2-methyl aziridine (propyleneimine) in rat peripheral blood and bone marrow by 4-week repeated exposure

Tomonori Aoki<sup>1</sup>, Norihide Asano<sup>2</sup>, Atsumune Imaeda<sup>1</sup> and Yasushi Kondo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Safety Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co., Ltd., 16-89 Kashima 3-Chome, Yodogawa-ku, Osaka 532-0031, Japan

<sup>2</sup>Biomedical Research Laboratory, Nitto Denko Corporation, 1-1-2 Shimohozumi, Ibaraki, Osaka 567-8680, Japan

### Summary

Micronucleus induction in rat peripheral blood and bone marrow cells was studied after a 4-week repeated exposure to 2-methyl aziridine (2MA). 2MA was administered daily at 0, 2.5, 5, 10, and 20 mg/kg/day by oral gavage for 28 consecutive days. The peripheral blood samples were prepared on days 2, 3, 7, 14, 21, and 28 after the first administration, and bone marrow samples were prepared at 24 hours after the last administration. 2MA significantly induced micronucleated reticulocytes (MNRET) at 20 mg/kg/day and with two peaks at days 2 and 21. The time course and absolute values of the frequency of these MNRET were the same for micronucleated bone marrow cells. These findings therefore suggest that the micronucleus test with peripheral blood may be used as an alternative to the bone marrow micronucleus test in long-term toxicological assays in rats.

**Keywords :** micronucleus, bone marrow, peripheral blood, 4-week repeated exposure, 2-methyl aziridine

### Introduction

Mice are widely used for detection of micronucleus in *in vivo*. The method in which the bone marrow samples are collected 24 hours after single dose is most widely employed in the micronucleus test. In general toxicity studies, on the other hand, such as single dose toxicity, repeated dose toxicity, and toxicokinetic studies, rats are used rather than mice. At our laboratory, repeated dose toxicity in rats by daily dosing for 2- or 4-week is routinely conducted to obtain preliminary toxicity information about the test compound in the early stage of drug discovery.

Recently, it is reported that the rat bone marrow and peripheral blood micronucleus assay can be used as well as the mouse micronucleus assay in short-term exposure (Wakata et al., 1998). However,

the feasibility of rat bone marrow and peripheral blood micronucleus assay in long-term exposure is not well validated.

In the present study, the possibility of micronucleus induction in rats by 4-week repeated exposure was evaluated with 2-methyl aziridine. This study was performed as a part of the 13th Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT).

### Materials and Methods

4-week-old male Slc : SD rats were purchased from Japan SLC Co., (Hamamatsu, Japan) and used for the experiments after a 1-week quarantine and acclimatization period. Commercial chow pellets in a basket and tap water were provided *ad libitum* throughout the periods of animal acclimatization and experimentation.

2-methyl aziridine (2MA, CASRN 75-55-8) was obtained from Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd. (Tokyo, Japan). Dose levels for the test were based on a prior carcinogenicity study (Ulland et al., 1971).

2MA was diluted in distilled water, and administered at 0 (vehicle), 2.5, 5, 10 (5 animals per group), and 20 (7 animals per group) mg/kg/day. The test formulation of 10 mL/kg of body weight was administered to rats via the gastric tube orally daily for 28 days.

Body weight was measured weekly. Peripheral blood was collected from the ventral tail vessels on Days 2, 3, 7, 14, 21, and 28 after the first administration. Bone marrow smears were also prepared 24h after the last administration. Peripheral blood was diluted with an equal volume of fetal bovine serum and placed on an acridine orange (AO)-coated glass slide. 2000 reticulocytes (RET) per rat were examined for micronuclei by fluorescence microscopy (Hayashi et al., 1992). Bone marrow smears were stained with Giemsa. 1000 polychromatic erythrocytes (PCE) per rat were examined for micronu-

clei. The percentage of PCE (% PCE) versus all erythrocytes (PCE+NCE : normochromic erythrocytes) was determined when the total number of PCE and NCE became 1000 or more.

The statistical analysis for the body weight change was conducted using *t*-test. For % PCE, data was analyzed by Dunnett test. And for the frequency of RET and PCE with micronuclei, the statistical significance of the differences between the vehicle group and exposed group were evaluated by the binomial test.

## Results and Discussion

The highest dose, 20 mg/kg/day, was too toxic in the dose for the ordinary 4-week repeated exposure toxicity study because one of seven rats died on Day 18 and four of remaining six rats died on Day 24. And there was significant inhibition of body weight gain in the 20 mg/kg/day group on Days 7 and 21 compared with that of vehicle group (Fig. 1). The

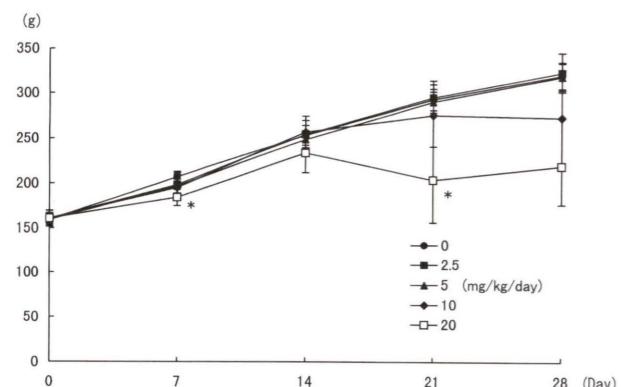


Fig. 1 Body weight change of 2MA-exposed rats for 4 weeks  
Values are means $\pm$ SD.

0, 2.5, 5, 10 mg/kg/day : n=5

20 mg/kg/day : n=7 (Day 21 : n=6, Day 28 : n=2)

\* : Significantly different from vehicle control group at p<0.05 (*t*-test)  
(The data of 20 mg/kg/day group on Day 28 was not analyzed)

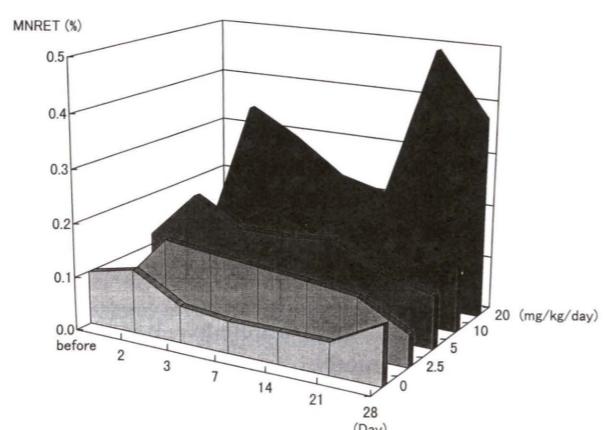


Fig. 2 Induction of MNRET in peripheral blood by 4-week repeated exposure of 2MA  
Values are means

0, 2.5, 5, 10 mg/kg/day : n=5

20 mg/kg/day : n=7 (Day 21 : n=6, Day 28 : n=2)

Table 1 Induction of MNRET in peripheral blood by 4-week repeated exposure of 2MA

Treatment	No. of animals	% MNRET (mean $\pm$ SD)						
		before	Day 2	Day 3	Day 7	Day 14	Day 21	
Vehicle Control	5	0.10 $\pm$ 0.07	0.12 $\pm$ 0.10	0.07 $\pm$ 0.03	0.06 $\pm$ 0.05	0.06 $\pm$ 0.20	0.06 $\pm$ 0.07	0.11 $\pm$ 0.10
2MA 2.5 mg/kg/day	5	0.05 $\pm$ 0.04	0.15 $\pm$ 0.11	0.14 $\pm$ 0.08	0.13 $\pm$ 0.10	0.12 $\pm$ 0.12	0.11 $\pm$ 0.08	0.06 $\pm$ 0.02
5 mg/kg/day	5	0.12 $\pm$ 0.03	0.21 $\pm$ 0.10	0.16 $\pm$ 0.17	0.16 $\pm$ 0.14	0.17 $\pm$ 0.08*	0.12 $\pm$ 0.22	0.10 $\pm$ 0.11
10 mg/kg/day	5	0.07 $\pm$ 0.10	0.12 $\pm$ 0.10	0.18 $\pm$ 0.06	0.14 $\pm$ 0.10	0.21 $\pm$ 0.09**	0.11 $\pm$ 0.17	0.16 $\pm$ 0.05
20 mg/kg/day	7	0.07 $\pm$ 0.06	0.34 $\pm$ 0.15**	0.29 $\pm$ 0.16**	0.23 $\pm$ 0.10**	0.21 $\pm$ 0.09**	0.49 $\pm$ 0.23**	0.38 $\pm$ 0.25

Treatment : Compound and dosage

Vehicle : Distilled water

MNRET : Reticulocytes with micronuclei

\* : n=6 (1 of 7 rats died)

\*\* : n=2 (4 of 6 rats died)

Significantly different from vehicle control group \* : p<0.05, \*\* : p<0.01 (binomial test)

(The data of 20 mg/kg/day group on Day 28 was not analyzed)

Table 2 Induction of MNPCE in bone marrow by 4-week repeated exposure of 2MA

Treatment	No. of animals	PCE observed	% MNPCE mean $\pm$ SD (range)	% PCE mean $\pm$ SD (range)
Vehicle Control	$\times 28$	5	10000 0.16 $\pm$ 0.05 (0.10–0.20)	43.39 $\pm$ 2.54 (39.85–46.20)
2MA 2.5 mg/kg/day	$\times 28$	5	10000 0.14 $\pm$ 0.09 (0.05–0.25)	45.60 $\pm$ 5.62 (38.40–51.19)
5 mg/kg/day	$\times 28$	5	10000 0.16 $\pm$ 0.08 (0.10–0.30)	46.43 $\pm$ 6.39 (37.86–53.42)
10 mg/kg/day	$\times 28$	5	10000 0.33 $\pm$ 0.08 (0.25–0.45)*	35.48 $\pm$ 4.06 (30.17–41.10)*
20 mg/kg/day	$\times 28$	#2	4000 0.38 $\pm$ 0.11 (0.30–0.45)	36.00 $\pm$ 1.41 (35.00–37.00)

Treatment : Compound, dosage, and multiplicity

Vehicle : Distilled water

PCE : Polychromatic erythrocytes

NCE : Normochromic erythrocytes

MNPCE : PCE with micronuclei

% PCE : PCE/(PCE+NCE)  $\times$  100

\* : n=2 (5 of 7 rats died)

Significantly different from vehicle control group \* : p<0.05 (% MNPCE : binomial test, % PCE : Dunnett test)

(The data of 20 mg/kg/day group was not analyzed)

results of the peripheral blood assay are shown in Table 1 and Fig. 2. The frequencies of micronucleated reticulocytes (MNRET) were significantly increased on any sampling days from Day 2 to Day 21 in the 20 mg/kg/day group and on Day 14 in the 5 and 10 mg/kg/day group. But the frequency of MNRET did not show clear serial changes on repeated exposure. The results of the bone marrow assay are shown in Table 2. The percentages of PCE versus all erythrocytes in the 2.5 and 5 mg/kg/day group were similar to that in the vehicle control group. Meanwhile the 10 mg/kg/day group was significantly lower than that in the vehicle control group as well as the 20 mg/kg/day group. The frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) in the 10 mg/kg/day groups was significantly higher (0.33 %) than that in the vehicle control group (0.16 %) and the 20 mg/kg/day group also showed high frequency (0.38 %). These results suggest that it is possible to use rat peripheral blood and bone marrow in 4-week repeated exposure study for the assessment of micronuclei.

2MA has been classified in group 2B (probable human carcinogen) by IARC (1975). 2MA was carcinogen in rats following oral administration producing a variety of malignant tumors (Ulland et al., 1971). Genotoxicity studies have also revealed the ability to induce sister chromatid exchanges in the Bloom syndrome B-lymphoblastoid cell line *in vitro* (Shiraishi, 1986) and mutagenic to bacteria (Dunkel et al., 1984). Furthermore, the positive results of the mouse (Morita et al., 1997) and the rat micronucleus assays (Wakata et al., 1998) have been shown by short term exposure.

In rats, it is reported that the frequencies of MNRET in peripheral blood and MNPCE in bone

marrow by oral administration at 20 mg/kg of 2MA were about 0.2 % and 0.5 %, respectively. Our data of 4-week exposure presented here were similar to their results at the same dosage of 2MA. Asanami et al. (1995, 1996) and Henderson et al. (1993) showed increase in the incidences of MNRET and MNPCE by subchronic exposure in some compounds. In this study, however, the peak of micronucleus induction in 2MA was observed at Day 2 and 21 after the first administration, and the incidence of micronucleus induction reached a plateau during the period of repeated exposure. There is some possibility that the resemblance in peripheral blood assay was caused by rat spleen which captures and destroys circulating micronucleated erythrocytes (Schlegel and MacGregor, 1984), and accumulation of MNRET did not occur in peripheral blood. However, it is still difficult to interpret the reason for the difference in the pattern of time-course micronucleus induction among the clastogens.

In conclusion, the micronucleus assay using peripheral blood and bone marrow from rats in long-term exposure study is possible. Further studies using many chemicals are needed, however, to integrate the micronucleus assay into a 4-week toxicological assay for rats.

## References

- Asanami, S., K. Shimono, O. Sawamoto, K. Kurisu and M. Uejima (1995) The suitability of rat peripheral blood in subchronic studies for the micronucleus assay, Mutat. Res., 347, 73-78.
- Asanami, S. and K. Shimono (1996) Detection of micronuclei in rat peripheral blood following oral administration of benzene for 14 days, MMS commun., 4, 1-5.
- Director, A. E., J. Nath, M. J. Ramsey, R. R. Swiger and J. D. Tucker (1996) Cytogenetic analysis of mice chronically

- fed the food mutagen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b] pyridine, Mutat. Res., 359, 53-61.
- Dunkel, V. C., E. Zeiger, D. Brusick, E. McCoy, D. McGregor, K. Mortelmans, H. S. Rosenkranz and V. F. Simmon (1984) Reproducibility of mutagenicity assay. I. Test with *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* using a standard protocol, Environ. Mutagen., 6, Suppl. 2, 1-254.
- Hayashi, M., Y. Kodama, T. Awogi, T. Suzuki, A. O. Asita and T. Sofuni (1992) The micronucleus assay using peripheral blood reticulocytes from mitomycin C-and cyclophosphamide-treated rats, Mutat. Res., 278, 209-213.
- Henderson, L., J. Fedyk., S. Windebank and M. Smith (1993) Induction of micronuclei in rat bone marrow and peripheral blood following acute and subchronic administration of azathioprine, Mutat. Res., 291, 79-85.
- ICRC (1975) ICRC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to man, Vol. 9, Some azilidine, N-, S- & O-mustards and selenium, International Agency for Research on Cancer, Lyon (France).
- MacGregor, J. T., J. D. Tucker, D. A. Eastmond and A. J. Wyrobek (1995) Integration of cytogenetic assays with toxicology studies, Environ. Mol. Mutagen., 25, 328-337.
- Morita, T., N. Asano, T. Awogi, YF. Sasaki, S. Sato, H. Shimada, S. Sutou, T. Suzuki, A. Wakata, T. Sofuni and M. Hayashi (1997) Evaluation of the rodent micronucleus assay in the screening of IARC carcinogens (groups 1, 2A and 2B) the summary report of the 6th collaborative study by CSGMT/JEMS MMS. Collaborative Study of the Micronucleus Group Test. Mammalian Mutagenicity Study Group, Mutat. Res., 389(1), 3-122.
- Kondo, Y., E. Nakajima, S. Nito, Y. Asano, F. Ariyuki and T. Higashiguchi (1994) Assessment of the human carcinogens arsenic acids and arsenic trichloride in the mouse micronucleus assay, MMS commun., 2, 117-121.
- Jauhar, P. P., P. R. Henika, J. T. MacGregor, C. M. Wehr, M. D. Shelby, S. A. Murphy and B. H. Margolin (1988) 1, 3-Butadiene : induction of micronucleated erythrocytes in the peripheral blood of B6C3F<sub>1</sub> mice exposed by inhalation for 13 weeks, Mutat. Res., 209, 171-176.
- Tice, R. R., R. Boucher, C. A. Luke and M. D. Shelby (1987) Comparative cytogenetic analysis of bone marrow damage induced in male B6C3F<sub>1</sub> mice by multiple exposures to gaseous 1, 3-Butadiene, Environ. Mutagen., 9, 235-250.
- Schlegel, R. and J. T. MacGregor (1982) The persistence of micronuclei in peripheral blood erythrocytes : detection of chronic chromosome breakage in mice, Mutat. Res., 104, 367-369.
- Schlegel, R. and J. T. MacGregor (1984) The persistence of micronucleated erythrocytes in the peripheral circulation of normal and splenectomized Fischer 344 rats : Implications for cytogenetic screening, Mutat. Res., 127, 169-174.
- Schlegel, R., J. T. MacGregor and R. B. Everson (1986) Assessment of cytogenetic damage by quantitation of micronuclei in human peripheral blood erythrocytes, Cancer Res., 46, 3717-3721.
- Shiraishi, Y. (1986) Hypersensitive character of Bloom syndrome B-lymphoblastoid cell lines usable sensitive carcinogen detection, Mutat. Res., 175, 179-187.
- Ulland, B., M. Finkelstein, E. K. Weisburger, J. M. Rice and J. H. Weisburger (1971) Carcinogenicity of industrial chemicals propylene imine and propane sulfone, Nature, 230, 460-461.
- 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 : Summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS · MMS, Environ. Mol. Mutagen., 32, 84-100.

Environ. Mutagen Res., 22 : 19 - 25(2000)

## 塩素処理した水試料中に含まれる変異原物質を捕捉するための前処理方法の検討

高橋美津子<sup>1</sup>, 斎藤治子<sup>2</sup>, 磯田信一<sup>1</sup>

<sup>1</sup>横浜市衛生研究所検査研究課 ☎ 235-0012 横浜市磯子区滝頭1-2-17

<sup>2</sup>横浜市保健所衛生課 ☎ 247-0005 横浜市栄区桂町303-19

### Studies on pretreatment methods for trapping mutagens in chlorinated water samples

Mitsuko Takahashi<sup>1</sup>, Haruko Saito<sup>2</sup>, and Shin'ichi Isoda<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Inspection and Research in Environmental Hygiene, Yokohama City Institute of Health, 1-2-17 Takigashira, Isogo-ku, Yokohama 235-0012, Japan

<sup>2</sup>Division of Environmental Hygiene, Sakae Health Center of Yokohama city, 303-19 Katura-cho, Sakae-ku, Yokohama 247-0005, Japan

#### Summary

The pretreatment procedures for measuring the mutagenic activity of water samples were examined. In order to remove the residual chlorine, N<sub>2</sub> gas bubbling and sodium thiosulfate addition were performed. The former was not effective on the mutagenic activity in the Ames test, but the latter reduced such activity. The storage methods before and after concentration were compared. The mutagenic activity of the sample, which had no chlorine removed and was kept at 4°C for 1 month before concentration, was greater than that of chlorine was not stored. There was no difference in the mutagenicity between the sample treated with N<sub>2</sub> gas and kept at -80°C for 1 month after concentration, and the control sample. The solvents for elution of the adsorbents on a XAD-2 column were also evaluated and discussed. The extract eluted with ethyl acetate showed higher mutagenic activity than the extract eluted with dichloromethane. From these results, we recommend that water after chlorination is first treated with N<sub>2</sub> gas and then applied to an XAD-2 resin column ; the adsorbents are then best removed by eluting with ethyl acetate.

Keywords : mutagenic activity, chlorinated by-products, Ames test

#### 緒言

現在、原水の汚濁とさまざまな化学物質の環境水中への混入により、水道原水の水質悪化が懸念されている。また、消毒に使用されている塩素と水中の有機化合物の反応によって、さまざまな消毒副生成物が生成されることが報告されている(Rook et al., 1974 ; Beller et al., 1974 ; Erdinger et al., 1990)。消毒副生成物の中には、MXを代表とするハロゲン化フラノンやジクロロアセ

トニトリルなどの強変異原性物質もあるが、これらの物質を含め、これまでに同定された変異原性を持つ消毒副生成物によって、水道水の変異原性は十分に説明できないのが現状である。そこで、水道水等の安全性確保のため、変異原性試験を指標とした水の総括的な毒性評価が求められている。変異原性試験の中でも Ames 試験は、比較的簡易であり再現性も良いことから、水試料への適用例が多い。水試料の Ames 試験を行う場合、水中の変異原性物質はごく微量にしか存在しないため、これらの物質を効率的に濃縮するための前処理が必要である。

濃縮方法については、XAD や CSP-800 などによる樹脂吸着法、溶媒抽出法、ブルーレーションまたはブルーコ

受付：1999年12月28日 受理：2000年2月29日

©日本環境変異原学会

ットン法、凍結乾燥法などが知られている(中室ら, 1989)。溶媒抽出について Meier ら(1985)は、pH 2 調整時のエーテルによる抽出で変異原性物質が効率よく抽出されると報告している。一方、中室ら(1989)は、XAD-2 樹脂を用いた方法はエーテルによる溶媒抽出よりも変異原性が高かったと報告している。また、Ames 試験を系統的に行う場合、水試料の1回の濃縮倍数が非常に大きくなるため、溶媒抽出法は濃縮効率が悪く、適していないと考えられる。吸着樹脂を用いた方法についての報告は、多孔質ポリスチレン樹脂の XAD-2,4,8などをはじめ、CSP 800 を用いる方法(浦野ら, 1987)、銅フタロシアニン系のブルーレーションを用いる方法(中室ら, 1989)などがある。ブルーレーション法は河川水中の平面構造をもつベンツ(a)ピレンなどの変異原物質を検出するために用いられているが、水道水などの変異原物質を検出するためには、XAD-2 を用いた水試料の前処理法が、これまでに多く報告されている(佐谷戸ら, 1991, 1993, 中室ら, 1989, 1992; Backlund et al., 1989; Kool et al., 1981; 金澤ら, 1991; Virtainen et al., 1987)。しかし保存方法、残留塩素除去方法および溶離溶媒の選択などの条件は、いまだ明確にされていない。

本研究では、これら前処理方法の確立されていない条件、方法について検討を行った。さらに、樹脂から変異原性物質を溶出するものが含まれていないか、あるいは塩酸で pH 2 に調整した時に塩酸酸性時に残留塩素と樹脂が反応し、新たな変異原性物質が生成されるかどうか懸念されるため、吸着時における樹脂からの影響の有無を確認した。

## 実験材料および方法

### 1. 試薬および試薬の調製

変異原性試験に使用した試薬は、以下の通りである。

- 1) 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acryl-amide (AF-2; CAS No. 3688-53-7) : 和光純薬工業(株) : 特級
- 2) 2-aminoanthracene (2-AA; CAS No. 613-13-8) : 和光純薬工業(株) : 特級
- 3) dimethylsulfoxide (DMSO; CAS No. 67-68-5) : 和光純薬工業(株) : 生化学用
- 4) nutrient broth No.2(N.B.No. 2) : Oxoid Co. Ltd.

5) Ames 試験培地: クリメディア AM-N; オリエンタル酵母(株)

6) S 9: キッコーマン(株): phenobarbital および 5,6-benzoflavone の腹腔内投与による誘発ラット肝ホモジネート

7) cofactor: Cofactor-I オリエンタル酵母(株)

8) S 9 mix: cofactor 水溶液に対し、S 9 濃度を 10 %になるように用時調製した。

9) biotin(以下 Bio): 和光純薬工業(株) : 特級

- 10) histidine(以下 His) : 和光純薬工業(株) : 特級
- 11) 塩化ナトリウム : 和光純薬工業(株) : 特級
- 12) bacto agar : Difco Laboratories
- 13) top agar : bacto agar および sodium chloride に精製水を加え、高压蒸気滅菌後用時 Bio および His 水溶液を加えて調製した。
- 14) XAD-2 : 精製アンバーライト XAD-2; ジーエルサイエンス
- 15) N<sub>2</sub> ガス : 99.9999 %純窒素ガス

### 2. Ames 試験

Ames 試験は、労働省の労働安全衛生法による変異原性試験(1995)に準じた。試験菌株は、*Salmonella typhimurium* TA 98 および TA 100(日本バイオアッセイ研究センター由来)を使用し、プレインキュベーション法で、S 9 mix 無添加(直接法、以下-S 9)および添加(間接法、以下+S 9)の両条件で行った。

陽性対照として TA 98 および TA 100(-S 9)では AF-2 をそれぞれ 0.1 および 0.01 µg/plate 添加し、TA 98 および TA 100(+S 9)では 2-AA をそれぞれ 0.5 および 1.0 µg/plate 添加した。

前培養は、培地に nutrient broth No.2 を使用し、30 mL 三角フラスコを用いた S 字振盪式で行った。

変異原性の判定は労働安全衛生法に準じて、溶媒対照に対して 2 倍以上の復帰コロニー(単位は revertants、以下 rev.)が出現したときを試験陽性とし、かつ、量-反応性がある場合、変異原性陽性とした。上述の条件に当てはまらない場合はすべて変異原性陰性とした。また、各試験ごとに溶媒対照および陽性対照における変異コロニー数の許容範囲を確認した。

### 3. 基本的な濃縮操作について

#### 1) 吸着樹脂の選択

水試料からの変異原性物質の抽出には、XAD-2,4,8 および CSP-800 等の樹脂が多く使用されているが、その中でも XAD-2 樹脂を使用した方法が圧倒的に多く用いられている。また、得られた水試料の Ames 試験データをこれまで報告されている結果と比較が可能であることを考慮して、XAD-2 樹脂を用いる方法を採用した。今回使用した樹脂はすでに EPA の方法に従って、精製水で 8 時間ソックスレーで 1 回洗浄した後、methanol, acetone, dichloromethane の順で 1 回 22 時間ずつ洗浄する方法で精製されているが、さらに使用時には樹脂 35 mL に対し methanol 150 mL で 30 分間振盪する方法で 2 回洗浄した。

#### 2) 試料水の pH 調整

水試料の Ames 試験を行う場合、pH 2 において試料の前処理を行っている報告例が多い(Kito et al., 1988; 佐谷戸ら, 1993), 中室ら(1992), 金澤ら(1991)らおよび

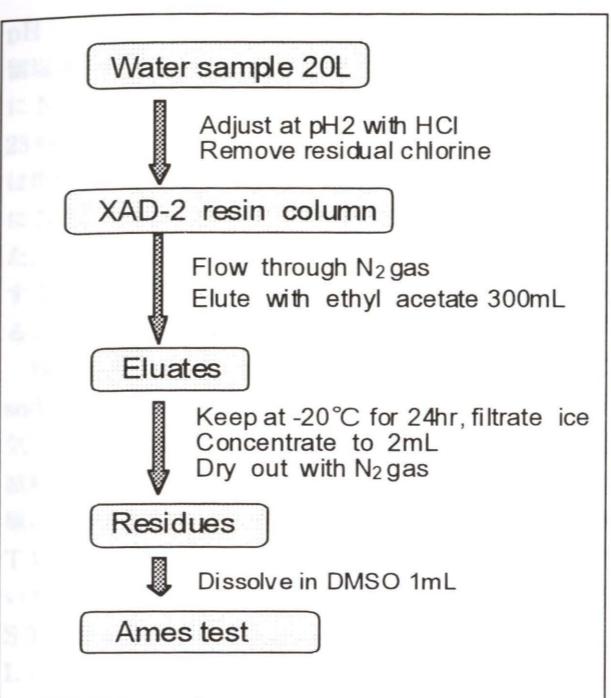


Fig. 1 Pretreatment method of water sample for Ames test

浦野ら(1994)は樹脂で濃縮処理した水道水を TA 100 菌株あるいは TA 98 菌株を用いて変異原活性値を比較したところ、pH 2 に調整したものが最も高く、pH が高くなるに従って、変異原活性値が低くなったと報告している。これは、試料水の pH を低くすることにより水中に機物の弱酸性基の解離が抑えられ、樹脂に吸着されやすくなり回収率が高くなるためと考察している。このことから、採水後、水試料は pH 2 に調整し、水中に機物の弱酸性基の解離を抑え、試料の前処理をすることにした。

#### 3) 水試料の基本的な濃縮操作

1) および 2) の結果を含め、水試料の基本的な濃縮操作を Fig.1 のように設計した。あらかじめ methanol で洗浄しておいた精製 XAD-2 樹脂を、内径 20 mm 長さ 300 mm のカラムに XAD-2 樹脂 35 mL を湿式充填した。この樹脂を充填したカラムに精製水約 5 L をガラス製の微量定量ポンプを用いて 20 mL/min の上行流で通水し、コンディショニングを行った。次に濃塩酸で pH 2 に調整した水試料 20 L を残留塩素を除去した後、このカラムに流速 20 mL/min の上行流で通水した。通水後、カラムに N<sub>2</sub> ガスを 30 分間下行通気して水分を除去した後、溶離溶媒 300 mL を流速 10 mL/min でカラムに流し、樹脂に吸着している有機物を溶離した。この溶離液を -20°C で 24 時間以上放置し、水分を凍結除去した後、ロータリーエバポレーターで 2 mL に濃縮後、Ames 試験用試料とした。

### 4. 濃縮操作時の吸着樹脂が Ames 試験に及ぼす影響

XAD-2 樹脂そのものから変異原性物質を溶出するものが含まれていないか、塩酸で pH 2 に調整した時に試料に残留する塩素と樹脂とが反応し、新たな変異原性物質が生成されないかどうか確認をするため、以下の 2 項目について確認試験を行った。

1) 樹脂からの変異原性物質の溶出に関する検討: 洗浄後の樹脂をコンディショニングし、N<sub>2</sub> ガスを 30 分間通気して脱水した後、酢酸エチル 300 mL を 20 mL/min の流量で流した。これを -20°C で 24 時間以上放置し、水分を凍結法により除去した。この液をロータリーエバボレーターで 2 mL 程度まで濃縮し、さらに N<sub>2</sub> ガス中で乾固した後、DMSO 1 mL に再溶解し、Ames 試験に供した。

2) pH 2 調整水の残留塩素共存下における吸着樹脂からの変異原性物質の溶出の検討: 濃塩酸で pH 2 に調整し、さらに濃度 0.7 ppm になるように次亜塩素酸を添加した精製水 20 L をカラムに通水し、以後 1) 樹脂からの変異原性物質の溶出と同様に操作し、Ames 試験に供した。

### 5. 前処理法の検討

Ames 試験に供する水試料の前処理法について、以下の 3 項目の検討を行った。

1) 残留塩素除去の検討: 水試料の変異原性を調査する場合、残留塩素が水試料の変異原性に影響を及ぼすと考えられるため、残留塩素の除去が必要である。これまでに、残留塩素を除去するには、還元剤を用いる方法およびバブリングによる方法が知られている。Sodium sulfate や ascorbic acid は、瞬時に残留塩素を除去できるため、一般的な残留塩素除去のための還元剤として用いられている。しかし、これらを添加することにより残留塩素除去を行うと、水試料の変異原性を減少させることが報告されている(亀井ら, 1989; 鈴木ら, 1992)。そこで、これまであまり報告のない還元剤の sodium thiosulfate を残留塩素濃度と等量および 2 倍量添加する方法および N<sub>2</sub> ガスバブリングによる残留塩素除去方法について検討を行った。N<sub>2</sub> ガスバブリングによる残留塩素除去は、N<sub>2</sub> ガスポンペとエアストーンをチューブでつなぎ、水試料中にエアストーンを入れ、N<sub>2</sub> ガスを 1000 mL/min でバブリングした。

また、N<sub>2</sub> ガスバブリングによる残留塩素除去について検討するにあたり、予備実験として、pH 未調整の水試料および塩酸で pH 2 に調整した水試料に N<sub>2</sub> ガスを通気し、残留塩素の消失時間を比較した。

2) 水試料の保存方法の検討: 実験スケジュールや試験菌のトラブル等が生じた場合、ただちに Ames 試験が行えない場合がある。そこで試料の保存方法について検

Table 1 The results of test on the solvents passed through XAD-2 resin

Samples	Mutagenic activity (rev./plate)			
	TA98-S9	TA98+S9	TA100-S9	TA100+S9
Dose 1 <sup>a</sup>	31	30	161	181
Dose 2 <sup>b</sup>	31	32	124	182
Negative control	32	36	132	139
Positive control	490	440	951	823

Ethyl acetate (300mL) was passed through the XAD-2 column and the eluent was evaporated. The residual substances were dissolved in 1mL<sup>a</sup> or 2mL<sup>b</sup> of DMSO, and then 50μL of each sample was applied to the Ames test.

Table 2 The results of control test on the adjusted pH2 distilled water sample

Samples	Mutagenic activity (rev./L)			
	TA98-S9	TA98+S9	TA100-S9	TA100+S9
Sample (0.5L/plate)	36	47	188	215
Sample(1.0L/plate)	31	52	194	226
Negative control	28	43	143	198
Positive control	530	333	1123	529

The distilled water was adjusted to pH2 with conc. HCl, and passed through the XAD-2 column.

討を行った。本調査では、試料の保存期間を1ヵ月とし、以下に示した通りの条件で保存方法を検討した。

①採水後ただちにN<sub>2</sub>ガスで試料水中の残留塩素を除去し、濃縮処理後ただちにAmes試験を行う方法(対照実験)

②採水後ただちにN<sub>2</sub>ガスで試料水中の残留塩素を除去し、濃縮処理後溶離液を-80°Cで1ヵ月間冷凍保存する方法

③採水後ただちにN<sub>2</sub>ガスで試料水中の残留塩素を除去し、水試料として4°Cで1ヵ月間冷蔵保存した後、濃縮処理する方法

④採水後試料水中の残留塩素を除去せず、水試料として4°Cで1ヵ月間冷蔵保存した後、濃縮処理する方法

3) 溶離溶媒の検討：溶離溶媒の中で、dichloromethane, ethyl acetate, methanol, acetoneなどが多く使用されている。

しかし、分析においても健康影響および環境影響を考慮したクリーンアナリシスが求められている。現在、dichloromethaneは健康および環境影響が懸念される物質である。そこで溶離溶媒としてdichloromethaneの代替溶媒としてethyl acetateが使用可能であるかを比較検討した。

## 結果および考察

### 1. 濃縮操作時の吸着樹脂がAmes試験に及ぼす影響

吸着樹脂からの変異原性物質溶出の検討結果を

Table 1に示した。TA 98およびTA 100菌株のすべての場合において陰性対照と比較して変異原活性値に差なく、量一反応性もみられなかったことから変異原性は陰性であることを確認した。また、顕微鏡下で試験菌の生育状態を観察したところ、生育阻害(killing)はみられなかった。この結果から、XAD-2樹脂からは変異原性物質が溶出されないことが確認された。

pH 2 残留塩素共存下における樹脂からの変異原性物質の溶出に関する検討結果をTable 2に示した。水試料のAmes試験を行う場合の最高作用濃度として設定した1.0 L/plateおよびこれを2倍希釈した0.5 L/plateのサンプルとともに、TA 98およびTA 100菌株のすべての場合において変異原性は陰性であった。また、試験菌の生育阻害(killing)もみられなかった。浦野ら(1994)はCSP-800樹脂と濃度32 ppmの残留塩素を作用させても、吸着樹脂から変異原性物質を生成することはないと報告している。本調査では、この報告のように塩素を高濃度には添加しておらず、また使用している樹脂も異なるが、同様な結果を得た。一方、Sweeney et al.(1985)は残留塩素とXAD樹脂とが反応し、変異原性物質を生成すると報告しているが、本調査では異なる結果を得た。われわれの前処理方法においては、水道水に残留している程度の塩素濃度では、変異原性には影響を与えないと考えられた。

### 2. 残留塩素除去に関する検討

予備実験として、pH未調整の水試料および塩酸で

pH 2に調整した水試料にN<sub>2</sub>ガスでバーリングして残留塩素の消失時間を比較した結果、pH未調整の水試料にN<sub>2</sub>ガスを通気したところ、残留塩素を除去するのに23時間要した。一方、塩酸でpH 2に調整した水試料は塩酸を加えると0.7 ppmから0.45 ppmとなり、これにN<sub>2</sub>ガスを通気すると4時間弱で残留塩素が消失した。この結果から、pH 2に調整してからN<sub>2</sub>ガスを通気する方法は、残留塩素を短時間で除去でき、効率的であることが示された(Fig.2)。

残留塩素を除去するため、pH 2に調整した水試料にsodium thiosulfateを添加する方法およびN<sub>2</sub>ガスを通気する方法を検討した結果をTable 3の1に示した。水試料は、1方法について2検体用意し、それぞれの変異原活性値を計算し、その平均値で表した。TA 98およびTA 100の両菌株においてsodium thiosulfateを等量用いたものは、N<sub>2</sub>ガスを通気する方法よりもTA 100(-S9)における変異原活性値が1800 rev./Lから790 rev./Lに大幅に低下した。さらにsodium thiosulfateの添加

量を2倍に増加した場合、さらに変異原活性値が約1/2に低下し、変異原活性値は360 rev./Lになった。また、TA 98(-S9)においてはsodium thiosulfateを添加することによって、変異原性陰性となった。Sodium thiosulfateのような還元剤を用いると変異原性活性値が低下したという結果は、sodium sulfateによって変異原性物質が分解するという報告(鈴木ら、1992; Holmbom et al., 1998; 浦野ら、1994)と同様であり、水道中の変異原性物質の抽出を目的とした試験を行う場合、還元剤を用いる方法は残留塩素除去方法として適当でないことが確認できた。

また、Table 3の2に示したようにpH 2に調整後、残留塩素を除去せずに濃縮処理した水試料は、TA 98(-S9)およびTA 100(-S9)においてN<sub>2</sub>ガスを通気する方法より変異原活性値が高くなった。特にTA 98(-S9)においては2倍以上の活性値を示し、470 rev./Lであった。TA 98およびTA 100(+S9)においては、残留塩素を除去せずに濃縮処理した水試料で変異原性陽性が認められた。本調査で使用した前処理方法では、20 Lの水試料の通水が完了するのに約17時間要するため、その間に残留塩素と水中の有機化合物の反応が進み、新たな変異原性物質が生成し、その結果変異原活性値が高くなつたと考えられた。今回の検討結果から、水試料はpH 2に調整し、残留塩素の除去が必要であると考えられた。また、残留塩素を除去するには、N<sub>2</sub>ガスバーリングによる方法が適当であると考えられた。

### 3. 保存方法の検討

残留塩素除去方法の検討結果から、N<sub>2</sub>ガスを通気して残留塩素を除去する方法が適すると考えられたため、pH 2に調整後N<sub>2</sub>ガスで残留塩素を除去し、ただちに濃縮処理し、すみやかにAmes試験を行う方法を対照実験

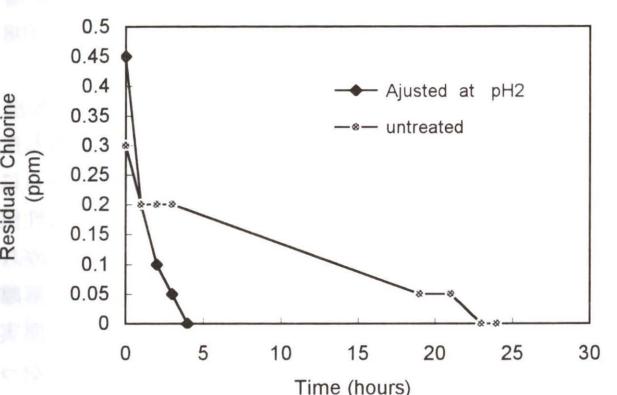


Fig. 2 Vanishing curves of residual chlorine removed by N<sub>2</sub> gas

Table 3 Comparison of mutagenic activity of water samples removed residual chlorine with several procedures

#### 1. Remove of residual chlorine

Methods	Mutagenic activity (rev./L)			
	TA98-S9	TA98+S9	TA100-S9	TA100+S9
Aeration of N <sub>2</sub> gas	160	— <sup>a</sup>	1800	—
Addition of Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (equivalent)	—	—	790	—
Addition of Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (over dose)	—	—	360	—

(n=2)  
a : Negative

#### 2. With and without residual chlorine

Methods	Mutagenic activity (rev./L)			
	TA98-S9	TA98+S9	TA100-S9	TA100+S9
Aeration of N <sub>2</sub> gas	200	— <sup>a</sup>	2300	—
Untreated	470	53	3000	220

(n=2)  
a : Negative

Table 4 Mutagenic activity of several samples stored under different conditions

Storage Method	Existence of residual chlorine	Mutagenic activity (rev./L)			
		TA98-S9	TA98+S9	TA100-S9	TA100+S9
Non-storage (control)	×	200	— <sup>c</sup>	2300	—
-80°C/1 month in eluant condition (After concentration)	×	260	—	2400	220
4°C/1 month in water condition (Before concentration)	×	170	—	1600	—
4°C/1 month in water condition (Before concentration)	○ <sup>b</sup>	420	55	3300	290

a : Absence of residual chlorine (removed residual chlorine by N<sub>2</sub> gas aeration) (n=2)

b : Existence of residual chlorine (untreated)

c : Negative

Table 5 Mutagenic activity of extracts with different solvents

Eluents	Mutagenic activity (rev./L)			
	TA98-S9	TA98+S9	TA100-S9	TA100+S9
Ethyl acetate	230	— <sup>a</sup>	1400	—
Dichloromethane	130	—	920	—

a : Negative

(n=2)

とし、各保存方法について比較検討した。水試料は、1つの保存方法について2検体用意し、それぞれの変異原活性値を計算し、その平均値をTable 4に示した。N<sub>2</sub>ガスで残留塩素を除去した水試料をただちに濃縮し、溶離溶媒中-80°Cで保存した場合は、TA 98およびTA 100(-S 9)において対照実験値とほぼ同等の変異原活性値を得た。その値はそれぞれ260 rev./Lおよび2400 rev./Lであった。水試料を濃縮せず1ヵ月間4°Cの条件下で水試料として保存した場合は、TA 98およびTA 100(-S 9)において変異原活性値がそれぞれ170 rev./Lおよび1600 rev./Lに低下した。一方、残留塩素を除去せずに1ヵ月間4°Cの条件下で水試料として保存した場合は、TA 98およびTA 100(-S 9)において変異原活性値が上昇し、それぞれ420 rev./Lおよび3300 rev./Lであった。

水試料の保存方法についてMeierら(1987)は、TA 100においてpH 2に調整した水試料を冷蔵保存した場合、14日間安定だと報告している。また、岡部ら(1992)はTA 100において採水後未処理のまま放置しておいた水試料より5°Cの冷蔵保存を行った試料の方が安定であり、さらにpH 2に調整した水試料においては2日後でも変異原活性値の変化はほとんどなかったと報告している。本調査では、pH 2に調整することにより1ヵ月間保存することを試みた。N<sub>2</sub>ガスで残留塩素を除去した水試料は残留塩素が存在しないため、4°Cで1ヵ月間保存した場合でもすでに生成されていた変異原物質が保存中に分解し、その結果対照と比較して変異原活性値が

低下したものと考えられた。一方、残留塩素を除去しない場合は、保存の間に水中の残留塩素が有機物とさらに反応し、変異原性物質の生成が促進され、変異原活性値が対照と比較して上昇したと考えられた。また、N<sub>2</sub>ガスで残留塩素除去した水試料をただちに濃縮処理し、溶離液として1ヵ月間-80°Cで冷凍保存したものと、対照実験との間に変異原活性値の差はほとんど認められなかつたことから、水試料の保存は、採水後N<sub>2</sub>ガスで残留塩素除去した後ただちに濃縮処理し、溶離溶媒中-80°Cで保存する方法が適していると考えられた。

#### 4. 溶離溶媒の検討

溶離溶媒としてdichloromethaneおよびethyl acetateを用いて比較検討を行った結果をTable 5に示す。水試料は、1つの方法について2検体用意し、それぞれの変異原活性値を計算し、その平均値を表わした。Ethyl acetateで溶離したものは、dichloromethaneで溶離したものよりTA 98およびTA 100(-S 9)において変異原活性値が高いことが示された。これは、ethyl acetateの極性( $\epsilon=6.02$ )がdichloromethaneの極性( $\epsilon=8.93$ )よりも若干極性が低いため、XAD-2に吸着しやすく非極性の変異原性物質を効率よく回収できたと考えられる。これらの結果をふまえ、クリーンアナリシスの考慮から人体および環境に影響が少ないethyl acetateをdichloromethaneの代替溶媒として使用可能であることがわかった。

## 結語

水道水のAmes法による変異原性試験の前処理法についての検討を行い、以下のことが明らかになった。

1. 残留塩素を除去しないで水試料を濃縮処理した場合、試料をXAD-2樹脂に吸着している間に残留塩素との反応が起り、結果として水試料の変異原活性値を高めてしまうことから、濃縮前の残留塩素除去は必要である。また、塩素除去方法としては、水試料中の変異原性物質に影響を及ぼさないN<sub>2</sub>ガス通気による除去方法が適していると考えられた。

2. 水試料の保存は、水試料として1ヵ月間4°Cの条件下で保存した場合、残留塩素を除去するしないに関わらずTA 98およびTA 100(-S 9)の変異原性に影響を与えた。一方N<sub>2</sub>ガスで残留塩素除去した水試料をただちに濃縮処理し、溶離液として1ヵ月間-80°Cで冷凍保存したものについては、変異原活性値の変動が認められなかつたことから、水試料の保存は、採水後N<sub>2</sub>ガスで残留塩素除去した後ただちに濃縮処理し、溶離溶媒中-80°Cで保存する方法が適していると考えられた。

3. 溶離溶媒は、人体および環境に影響が少なく、抽出効率が良いethyl acetateを使用可能であると考えられた。

## 参考文献

- Backlund P., E. Wondergem., K. Voogd. and Ad. De Jong (1989) Influence of chlorination pH and chlorine dose on the formation of mutagenic activity and the strong bacterial mutagen 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-franone (MX) in water, Chemosphere, 18(9-10), 1903-1911.
- Beller, T. A., J. J. Lichtenberg and R. C. Kromer (1974) Occurrence of organohalides in chlorinated drinking waters, J. Am. Water Works Assoc., 66, 703-706.
- Erdinger, L. and H. G. Stonntag (1990) Schwer-fluechtige halogenorganische Verbindungen als nebenprodukte der schwimmbadwasser-aufbereitung, Forum Staedte-hygiene, 41, 185-188.
- 亀井翼、丹保憲仁、金子篤(1989)遊離塩素、クロラミン及び二酸化塩素処理によって水中のフミン質から生成する成分の環境変異原性、水道協会雑誌、58(2): 21-29。
- 金澤伸浩、高梨啓和、藤江幸一、浦野紘平(1991)水中変異原性物質の濃縮回収方法の改良、第25回水質汚濁学会講演集、204-205。
- Kito, K., T. Otsuki, N. Suzuki and J. Nakanishi (1988) Utagenicity of drinking water and the relation to total organic halogen, Chemosphere, 17, 2219-2232.
- Kool, H. J., C. F. van Kreijl and H. J. van Kranen (1981) The use of XAD-resins for the detection of mutagenic activity in water II. Study with drinking water, Chemosphere, 10, 99-108.
- Meier J. R., H. P. Ringhand, W. E. Coleman, J. W. Munch., R. P. Streicher, W. H. Kaylor and K. M. Schenck (1985) Identification of mutagenic compounds formed during chlorination of humic acid, Mutat. Res., 157, 111-122.
- Meier, J. R., R. B. Knohl, W. E. Coleman, H. P. Ringhand, J. W. Munch, W. H. Kaylor, R. P. Streicher and F. C. Kopfler (1987) Studies on the potent bacterial mutagen, 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-franone: aqueous stability, XAD recovery and analytical determination in drinking water and in chlorinated humic acid solutions, Mutat. Res., 189, 363-373.
- 中室克彦、後藤里花、長谷川達也、上野仁、佐谷戸安好(1989)水中変異原物質の濃縮方法とその検出に関する一考察、水質汚濁学会抄録、405-406。
- 中室克彦、佐谷戸安好(1992)水道水中変異原物質の濃縮方法とその変異原性、第43回全国水道研究発表会抄録、705-707。
- 岡部文枝、高梨啓和、藤江幸一、浦野紘平(1992)水道水中の変異原性物質の特性、第26回日本水環境学会抄録、96-97。
- Rook, J. J. (1974) Formation of haloforms during chlorination of natural waters, Water Treat. Exam., 23, 234-243.
- 佐谷戸安好、中室克彦、上野仁、丈達泰史、後藤里花、長谷川達也、早津彥哉、坂本博(1991)水中変異原物質のブルーレーションおよびXAD-2樹脂による前処理濃縮法の比較検討及び濃縮物の変異原特性、衛生化学、37(3): 197-204。
- 佐谷戸安好、中室克彦、上野仁(1993)Ames試験による水質評価、用水と排水、35(4): 13-21。
- 鈴木規之、中西準子、松尾友矩(1992)水道水の変異原性原因物質の分画および還元剤との反応性に関する研究、水環境学会誌、15(11): 814-821。
- Sweeney, A. G. and A. M. Cheh (1985) Production of mutagenic artifacts by the action of residual chlorine on XAD-4 resin, J. Chromat., 325, 95-102.
- 浦野紘平、芳賀伸之、江本ふで子(1987)水道水等の変異原性試験方法、水道協会雑誌、57(3): 36-49。
- 浦野紘平、高梨啓和、金澤伸浩、岡部文枝、藤江幸一(1994)水道水のAmes変異原性に関する研究 第2報:高性能吸着剤を用いた変異原生成物の濃縮・回収方法、水環境学会誌、17(7): 461-469。
- Vertiainen T., A. Liimatainen, S. Jaaskelainen and P. Kauranen (1987) Comparison of solvent extractions and resin absorption for isolation of mutagenic compounds from chlorinated drinking water with high humus content, Water Res., 21 (7), 773-779.

## 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)

林 真<sup>1</sup>, 松井 道子<sup>1</sup>, 石井 健二<sup>2</sup>, 川崎 通昭<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 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

<sup>2</sup> 日本食品添加物協会 〒103-0012 東京都中央区日本橋堀留町 1-3-9

### 1. はじめに

本資料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 年度より毎年、既存の食品添加物を対象に、変異原性試験を行った結果の結論部分を表にまとめたものである。試験は指定添加物およびその他の添加物について実施され、一部は既に報告書として公表されている。

しかし何分にもデータの数が多く、個々の物質の試験結果の検索や未実施の品目の検索など調査するには困難を伴う。試験結果の結論や未検討の品目の検索にはこれら報告書のデータをデータベース化することが有用である。日本食品添加物協会は昭和 60 年に日本菓子 BB 協会の協力を得て昭和 54 年度から昭和 58 年度迄の試験について整理し、その後日本食品添加物協会によってその後のデータをまとめ平成 2 年に要約集を作成したが、その後の整理は行われていなかった。今回のまとめは前報では収載されていなかった平成 3 年度以降の試験結果も含めてデータを集大成したもので、簡潔な表により結果が一覧出来る。

試験は厚生省生活衛生局食品化学課が国立医薬品食品衛生研究所に委託し、国立医薬品食品衛生研究所が一部の試験を秋田大学医学部、名古屋市衛生研究所食品部、残留農薬研究所毒性第二部、神奈川県衛生研究所食品薬品部、食品農医薬品安全性評価センター、横浜市衛生研究所、大阪市環境科学研究所、茨城県衛生研究所に再委託する形で行われた。試験検体は日本食品添加物協会が協会会員会社を中心に協力を得て入手し提供したものである。変異原性データは昭和 54 年度報告分から平成 10 年度までの報告書における結果に基づいている(昭和 54 年度分報告書には昭和 48 年から同 53 年の間に厚生省がん研究班試験として実施された若干の変異原性試験も記されている)。また、平成 3 年度以降に関しては個別の報告書としては公表されていないが、食品化学課に提出さ

れた最終報告書よりデータを抽出した。また、東京都立衛生研究所年報(1986 年度以降)に発表されたデータも本データベースに収載した。食品添加物としては当初化学的合成品の指定食品添加物を中心に行われ、主な指定食品添加物の試験が終了すると共に、いわゆる天然添加物が試験対象になり現在は専ら天然添加物で試験が行われている。

現在、変異原性試験法は、試験管内試験(*in vitro*)である、細菌を用いる復帰突然変異試験(サルモネラ菌、大腸菌、遺伝子突然変異試験、“Ames 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(“染色体異常試験”), および生体内試験(*in vivo*)であるマウス骨髄細胞の小核試験(“小核試験”)が行われている。その他、枯草菌を用いる DNA 修復試験(賀田法、DNA 損傷試験, “Rec-assay 法”)や *in vitro* 小核試験が行われる場合がある。

本資料では試験の結果を出来るだけ単純に示すことを意図した。実際に行われた試験は試験方法、結果の判定基準・表記法において報告書や試験実施機関間および経時的に若干の違いが見られるため、一連の試験を統括する国立医薬品食品衛生研究所の変異遺伝部が中心となりデータ集化の為の統一的な作成基準を定め、この基準に従って供試検体別に原則としてプラス(陽性)またはマイナス(陰性)の記号で結果を記した。この基準および表の説明は、次の「データ集作成基準および要領」を参照されたい。

### 食品添加物の変異原性試験データシートの 作成基準及び要領

- (1) 対象報文  
厚生省・食品化学課による食品添加物(天然添加物を含む)の安全性再評価計画に基づき、厚生省科学研究費により実施された変異原性試験及び東京都立衛生研究所において実施され、同研究所の研究年表(1986 年以降)に公表された変異原性試験報告書をデータシート作成の対象報文とする。(添付資料リスト参照。)
- (2) 「変異原性試験」の欄

受付：1999 年 8 月 18 日 受理：1999 年 8 月 27 日

©日本環境変異原学会

1) Ames 試験：試験菌株及び S-9 mix 添加区分を問わず、下記の基準により試験結果を整理し表記する。5000 µg/ml 以上まで試験したデータもあるが、今回は 5000 µg/plate までの結果について評価し、判定を下した。

報文の判定結果	→ データシートの結果表記
+ (陽性)	+
[対照の 2 倍以上のコロニーが出現し、且つ用量依存性あり。]	[対照の 2 倍以上のコロニーが出現し、且つ用量依存性あり。]
± (疑陽性)	
[対照の 1.5 倍以上 2 倍未満のコロニーが出現し、且つ用量依存性あり。]	
- (陰性)	-
[対照の 1.5 倍未満のコロニーが出現し、又は用量依存性なし。]	[対照の 2 倍未満のコロニーが出現し、又は用量依存性がないか、最大被験量でも抗菌性なし。]
(-)	
[陰性の中、最大被験量で抗菌性なし。]	

2) 染色体異常試験：検体最高濃度、S-9 mix 添加区分(昭和 61 年以降は直接法に加えて S-9 mix 法も併用)を問わず、下記の基準により試験結果を整理し表記する。

報文の判定結果	→ データシートの結果表記
+ (陽性)	
[異常細胞(主に構造、又は倍数体)の出現頻度が 10 %以上]	
+	[異常細胞の出現頻度が 10 %以上]
+ <sup>w</sup> (弱陽性)	
[陽性であるが、用量依存性不明]	
± (疑陽性)	
[異常細胞の出現頻度が 5 %以上 10 %未満]	
- (陰性)	
[異常細胞の出現頻度が 5 %未満]	
構造異常倍数体が共に陽性(疑陽性を含めず)の場合(主に、昭和 59 年以前の報文について)	+ <sup>p</sup> [構造異常、倍数体共に陽性である。]
構造異常は陰性で、倍数体が陽性(疑陽性を含めず)の場合(主に、昭和 59 年以前の報文について)	- <sup>p</sup> [構造異常は陰性、倍数体は陽性である。]
3) 小核試験：マウス系統、投与経路を問わず、下記の基準により試験結果を整理し表記する。	
報文の判定結果	→ データベースの結果表記
+ (陽性)	+
[PCE(多染性赤血球)1,000 個中の小核細胞(MNPCE)の出現率が対照に比し有意に増加。(且つ用量依存性あり。)]	[同左]
- (陰性)	-
[PCE(多染性赤血球)1,000 個中の小核細胞(MNPCE)の出現率に対照との有意差なし。]	[同左]

4) Rec-assay 法：S-9 mix の添加区分を問わず、下記の基準により試験結果を整理し表記する。

報文の判定結果 (プレート拡散法)	→ データシートの結果表記
+ (陽性)	+
[阻止帯差 4 mm 以上、又は阻止帯比 1.2 以上で且つ阻止帯差 2 mm 以上]	[阻止帯差が 2 mm 以上]
+ <sup>w</sup> (弱陽性)	
[阻止帯差が 2 mm 以上で 4 mm 未満]	
± (疑陽性)	
[阻止帯比 1.2 以上で、且つ阻止帯差 1 mm 以上 2 mm 未満]	[阻止帯差が 2 mm 未満]
- (陰性)	
[阻止帯比 1.2 以上で且つ阻止帯差 1 mm 未満、又は阻止帯比 1.2 未満、及び阻止帯差 2 mm 未満]	
(-) (未確認陰性)	(-)
[両菌株共に生育阻害なし。]	[未確認陰性で抗菌性なし。]

報文の判定結果(液体法)	→ データシートの結果表記への付記
+ (陽性)	-*
[阻止帯比が 2 段階以上]	[液体法では陽性である。]
+ <sup>w</sup> (弱陽性)	
[阻止帯比が 1 段階以上]	
- (陰性)	
[阻止帯比が 1 段階以下]	[液体法でも陰性である。]

(3) 「備考」の欄  
被験物質の性状あるいは別名、Rec-assay の結果、*in vitro* 小核試験の結果等、必要に応じて追加情報を記入する。

食品添加物の法的区分に従い以下 4 種類の表を作成した：

- 表 1 指定添加物
- 表 2 既存添加物(天然添加物)
- 表 3 天然香料
- 表 4 一般飲食物添加物

なお、指定添加物(表 1)の番号は現行のものと現在検討中の(平成 11 年 12 月 21 日食品衛生調査会毒性・添加物合同部会資料 2)食品衛生法施行規則、表 2 の番号を併記、また、既存添加物(表 2)の番号は既存添加物名簿(平成 8 年厚生省告示第 120 号)の番号を用いた。また、指定添加物の名称は上記別表 2 の名称を、既存添加物の名称は上記、既存添加物名簿収載の名称を、また、天然香料基原物質および一般飲食物添加物(一般に食品として飲食に供されている物であって添加物として使用される品目リスト)は、「食品衛生法に基づく添加物の表示等について」(平成 8 年 5 月 23 日厚生省生活衛生局長通知、衛化第 56 号；一部改正 平成 10 年 12 月 3 日 生衛発第

表 1 指定添加物

新番号	No	食品添加物		変異原性試験			備考
		名称	用途	Ames 試験	染色体異常試験	小核試験	
1	1.2	亜鉛塩類(硫酸亜鉛)	強化剤	- <sup>19)</sup>			
2	2	亜塩素酸ナトリウム	漂白剤ほか	+ <sup>2)</sup> , - <sup>18)</sup>	+ <sup>2)</sup>	+ <sup>11)</sup>	
3	3	アジピン酸	酸味料	- <sup>21)</sup>			
4	4	亜硝酸ナトリウム	発色剤	+ <sup>1), -22)</sup>	+ <sup>1)</sup>	- <sup>11)</sup>	
5	5	L-アスコルビン酸	酸化防止剤ほか	- <sup>1), 16)</sup>	- <sup>1)</sup>		
6	6	L-アスコルビン酸ステアリン酸エステル	酸化防止剤ほか	- <sup>4), 22)</sup>	- <sup>4)</sup>		
7	7	L-アスコルビン酸ナトリウム	酸化防止剤ほか	+ <sup>21)</sup>			
8	7.2	L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル	酸化防止剤ほか	- <sup>23)</sup>			
9	8	L-アスパラギン酸ナトリウム	調味料ほか	- <sup>3, 23)</sup>	- <sup>3)</sup>		
10	9	アスパルテーム	甘味料	- <sup>22)</sup>			
削除	10	アセチルシノール酸メチル	ガムベース	- <sup>2, 25)</sup>	- <sup>2)</sup>		
11	11	アセト酢酸エチル	香料	- <sup>3, 18)</sup>	- <sup>3)</sup>		
12	12	アセトフェノン	香料	- <sup>18)</sup>			
13	13	アセトン	製造用剤	- <sup>1, 23)</sup>	+ <sup>1)</sup>		
14	14	アニスアルデヒド	香料	- <sup>2, 18)</sup>	- <sup>2)</sup>		
15	15	α-アミルシンナムアルデヒド	香料	- <sup>18)</sup>			
16	16	DL-アラニン	調味料ほか	- <sup>3, 23)</sup>	- <sup>3)</sup>		
17	17	亜硫酸ナトリウム(結晶)	保存料ほか	- <sup>1)</sup>	- <sup>1)</sup>		
17	18	亜硫酸ナトリウム(無水)	保存料ほか	- <sup>18)</sup>			
18	19	L-アルギニンレーグルタミン酸塩	調味料ほか	- <sup>4, 26)</sup>	- <sup>4)</sup>		
19	20	アルギン酸ナトリウム	糊料	- <sup>2, 10, 24)</sup>	- <sup>2)</sup>		
20	21	アルギン酸プロピレングリコールエステル	糊料	- <sup>2, 19)</sup>	- <sup>2)</sup>		
21	22	安息香酸	保存料	- <sup>2, 17)</sup>	- <sup>2)</sup>		
22	23	安息香酸ナトリウム	保存料	- <sup>1, 25)</sup>	+ <sup>1)</sup>		
23	24	アントラニル酸メチル	香料	- <sup>18)</sup>			
24	25	アンモニア	製造用剤	- <sup>24)</sup>			
25	26	イオノン	香料	- <sup>26)</sup>			
27	28	イソオイゲノール	香料	- <sup>18)</sup>			
28	29	イソ吉草酸イソアミル	香料	- <sup>3, 18)</sup>	- <sup>3)</sup>		
29	30	イソ吉草酸エチル	香料	- <sup>3, 18)</sup>	- <sup>3)</sup>		
30	31	イソチオシアネット類	香料	- <sup>25)</sup>			Ethyl isothiocyanate
31	32	イソチオシアノ酸アリル	香料	- <sup>18)</sup>			
32	33	L-イソロイシン	強化剤	- <sup>3, 21)</sup>	- <sup>3)</sup>		
33	34	5'-イノシン酸二ナトリウム	調味料ほか	- <sup>1, 23)</sup>	+ <sup>1)</sup>		
34	34.2	イマザリル	防かび剤	- <sup>26)</sup>			
35	35	インドール及びその誘導体	香料	- <sup>25)</sup>			
36	36	5'-ウリジル酸二ナトリウム	調味料	- <sup>1, 23)</sup>	+ <sup>1)</sup>		
37	37	γ-ウンデカラクトン	香料	- <sup>3, 18)</sup>	- <sup>3)</sup>	- <sup>11)</sup>	
38	38	エステルガム	ガムベース	- <sup>2)</sup>	- <sup>2)</sup>		
39	39	エステル類	香料				
		アントラニル酸シンナミル	香料(エステル類)	- <sup>2)</sup>	- <sup>2)</sup>		
		カプリル酸エチル	香料(エステル類)	- <sup>2)</sup>	- <sup>2)</sup>		
		カプロン酸アリル	香料(エステル類)	- <sup>4)</sup>	- <sup>4)</sup>		
		カプロン酸エチル	香料(エステル類)	- <sup>4)</sup>	- <sup>4)</sup>		
40	40	エチルバニリン	香料	- <sup>2, 18)</sup>	- <sup>p, 2)</sup>		
41	41	EDTAカルシウム二ナトリウム	酸化防止剤	- <sup>19)</sup>			

表1 指定添加物(つづき)

新番号	No	食品添加物		変異原性試験			備考
		名称	用途	Ames試験	染色体異常試験	小核試験	
42	42	EDTA二ナトリウム	酸化防止剤	- <sup>19)</sup>			
44	44	エリソルビン酸	酸化防止剤	+ <sup>2)</sup> , - <sup>23)</sup>	- <sup>2)</sup>	- <sup>11)</sup>	
45	45	エリソルビン酸ナトリウム	酸化防止剤	- <sup>1, 20)</sup>	- <sup>1)</sup>		
46	46	エルゴカルシフェロール	強化剤	- <sup>1, 26)</sup>	- <sup>1)</sup>		
47	47	塩化アンモニウム	膨張剤	- <sup>2, 22)</sup>	+ <sup>2)</sup>	- <sup>11)</sup>	
48	48	塩化カリウム	調味料	- <sup>23)</sup>			
49	49	塩化カルシウム	豆腐用凝固剤ほか	- <sup>1, 18)</sup>	- <sup>1)</sup>		
50	50	塩化第二鉄	強化剤	- <sup>4, 21)</sup>	- <sup>4)</sup>		
51	51	塩化マグネシウム	豆腐用凝固剤ほか	- <sup>4, 5, 24)</sup>	- <sup>4)</sup>		
52	52	塩酸	製造用剤	- <sup>22)</sup>			
53	53	オイゲノール	香料	- <sup>2, 20)</sup>	+ <sup>2)</sup>	- <sup>11)</sup>	
54	55	オクタナール	香料	- <sup>20)</sup>			
55	56	オクタン酸エチル	香料	- <sup>20)</sup>			
56	57	OPP Na	防かび剤	- <sup>26)</sup>			
56	57.2	OPP	防かび剤	- <sup>1, 16)</sup>	- <sup>1)</sup>		
57	58	オレイン酸ナトリウム	被膜剤	- <sup>20)</sup>			
58	59	過酸化水素	殺菌剤	- <sup>1, 22)</sup>	+ <sup>1)</sup>		
59	60	過酸化ベンゾイル（希釈過酸化ベンゾイ ル）	小麦粉処理剤	- <sup>1, 18)</sup>	- <sup>1)</sup>		
60	61	カゼインナトリウム	製造用剤	- <sup>5, 24)</sup>	- <sup>5)</sup>		
61	62	過硫酸アンモニウム	小麦粉処理剤	- <sup>2, 18)</sup>	- <sup>2)</sup>		
62	63	カルボキシメチルセルローズカルシウム	糊料	- <sup>4)</sup>	- <sup>4)</sup>		
63	64	カルボキシメチルセルローズナトリウム	糊料	- <sup>1, 19)</sup>	- <sup>1)</sup>		
64	65	β-カロテン	着色料ほか	- <sup>1, 19)</sup>	- <sup>1)</sup>		
	かんすい	製造用剤	- <sup>2)</sup>	- <sup>2)</sup>	- <sup>11)</sup>		
65	66	ギ酸イソアミル	香料	- <sup>3, 22)</sup>	- <sup>3)</sup>		
66	67	ギ酸ゲラニル	香料	- <sup>20)</sup>			
67	68	ギ酸シトロネリル	香料	- <sup>26)</sup>			
69	69	5'-グアニル酸二ナトリウム	調味料	- <sup>3, 23)</sup>	- <sup>3)</sup>		
70	70	クエン酸(結晶)	酸味料	- <sup>1)</sup>	- <sup>1)</sup>		
70	71	クエン酸(無水)	酸味料	- <sup>21)</sup>			
71	72	クエン酸イソプロピル	酸化防止剤	- <sup>19)</sup>			
72	72.2	クエン酸一カリウム	調味料ほか	- <sup>23)</sup>	- <sup>10)</sup>	Rec-assay : + <sup>10)</sup>	
72	72.2	クエン酸三カリウム	酸味料	- <sup>23)</sup>			
73	73	クエン酸カルシウム	強化剤ほか	- <sup>5, 19)</sup>	- <sup>5)</sup>		
75	75	クエン酸鉄	強化剤	- <sup>4, 21)</sup>	- <sup>4)</sup>		
76	76	クエン酸鉄アンモニウム	強化剤	- <sup>4, 21)</sup>	- <sup>4)</sup>		
77	77	クエン酸三ナトリウム	酸味料	- <sup>1, 23)</sup>	- <sup>1)</sup>		
78	78	グリシン	調味料ほか	- <sup>3, 25), [-3)</sup>	- <sup>3), [-3)</sup>	結晶品、粉末品	
79	79	グリセリン	製造用剤	- <sup>2, 25)</sup>	- <sup>2)</sup>		
80	80	グリセリン脂肪酸エステル	乳化剤	- <sup>1)</sup>	- <sup>1)</sup>		
81	81	グリセロリン酸カルシウム	強化剤	- <sup>2, 18)</sup>	- <sup>2)</sup>		
82	82	グリチルリチン酸二ナトリウム	甘味料	- <sup>1)</sup>	+ <sup>1)</sup>	- <sup>11)</sup>	
83	84	グルコノデルタラクトン	酸味料	- <sup>1, 21)</sup>	- <sup>1)</sup>		
84	85	グルコン酸(52.1% w/w液)	酸味料	- <sup>4, 21)</sup>	- <sup>4)</sup>		
85	85.2	グルコン酸カリウム	酸味料		- <sup>10)</sup>	Rec-assay : - <sup>10)</sup>	
86	86	グルコン酸カルシウム	強化剤	- <sup>5, 18)</sup>	- <sup>5)</sup>		
88	87	グルコン酸第一鉄	強化剤ほか	- <sup>25)</sup>			

表1 指定添加物(つづき)

新番号	No	食品添加物		変異原性試験			備考
		名称	用途	Ames試験	染色体異常試験	小核試験	
89	88	L-グルタミン酸	調味料	- <sup>5, 25)</sup>	- <sup>5)</sup>		
90	88.2	L-グルタミン酸カリウム	調味料ほか	- <sup>23)</sup>			
92	89	L-グルタミン酸ナトリウム	調味料ほか	- <sup>1, 25)</sup>	- <sup>1)</sup>		
94	90	ケイ皮酸	香料	- <sup>20)</sup>			
95	91	ケイ皮酸エチル	香料	- <sup>2, 20)</sup>	- <sup>2)</sup>		
96	92	ケイ皮酸メチル	香料	- <sup>20)</sup>			
98	94	ゲラニオール	香料	- <sup>2, 20)</sup>	- <sup>2)</sup>		
99	95	高度サラシ粉	漂白剤ほか	+ <sup>3), -<sup>26)</sup></sup>	+ <sup>3)</sup>	- <sup>4)</sup>	
100	96	コハク酸	酸味料ほか	- <sup>1, 21)</sup>	- <sup>1)</sup>		
101	97	コハク酸ナトリウム	調味料ほか	- <sup>25)</sup>			
102	98	コハク酸二ナトリウム	調味料ほか	- <sup>1, 25)</sup>	- <sup>1)</sup>		
103	100	コレカルシフェロール	強化剤	- <sup>3, 26)</sup>	- <sup>3)</sup>		
104	101	コンドロイチン硫酸ナトリウム	保水剤ほか	- <sup>3, 20)</sup>	- <sup>3)</sup>		
105	102	酢酸イソアミル	香料	- <sup>3, 20)</sup>	- <sup>3)</sup>		
106	103	酢酸エチル	香料ほか	- <sup>1, 22)</sup>	+ <sup>1)</sup>	- <sup>11)</sup>	
107	104	酢酸ゲラニル	香料	- <sup>20)</sup>			
108	105	酢酸シクロヘキシリル	香料	- <sup>20)</sup>			
109	106	酢酸シトロネリル	香料	- <sup>20)</sup>			
110	107	酢酸シナミル	香料	- <sup>20)</sup>			
111	108	酢酸テルペニル	香料	- <sup>20)</sup>			
112	109	酢酸ナトリウム(結晶)	酸味料ほか	- <sup>2)</sup>	- <sup>2)</sup>		
112	110	酢酸ナトリウム(無水)	酸味料ほか	- <sup>24)</sup>			
113	111	酢酸ビニル樹脂	ガムベースほか	- <sup>3, 20)</sup>	- <sup>3)</sup>		
114	112	酢酸エチル	香料	- <sup>21)</sup>			
115	113	酢酸ブチル	香料	- <sup>3, 21)</sup>	- <sup>3)</sup>		
116	114	酢酸ベンジル	香料	- <sup>4, 21)</sup>	- <sup>4)</sup>		
117	115	酢酸イーメンチル	香料	- <sup>21)</sup>			
118	116	酢酸リナリル	香料	- <sup>21)</sup>			
119	117	サッカリン	甘味料	- <sup>2, 20)</sup>	- <sup>2)</sup>		
120	118	サッカリンナトリウム	甘味料	- <sup>1, 17)</sup>	+ <sup>1)</sup>		
121	120	サリチル酸メチル	香料	- <sup>2, 21)</sup>	- <sup>2)</sup>		
122	121	酸化マグネシウム	吸着剤ほか	- <sup>19)</sup>			
123	122	三ニ酸化鉄	着色料	- <sup>4, 6, 25)</sup>	- <sup>4)</sup>	- <sup>10)</sup>	Rec-assay : - <sup>6)</sup>
124	124	次亜塩素酸ナトリウム	殺菌剤ほか	+ <sup>1), -<sup>18)</sup></sup>	+ <sup>1)</sup>	- <sup>11)</sup>	
125	125	次亜硫酸ナトリウム	漂白剤ほか	- <sup>2, 18)</sup>	- <sup>2)</sup>		
126	126	シクロヘキシリプロピオン酸アリル	香料	- <sup>21)</sup>			
127	127	L-システィン塩酸塩	酸化防止剤ほか	+ <sup>4, 20)</sup>	+ <sup>4)</sup>	- <sup>11)</sup>	
128	128	5'-シチジル酸二ナトリウム	調味料	- <sup>1, 25)</sup>	+ <sup>1)</sup>		
129	129	シトラール	香料	- <sup>3, 4, 20)</sup>	- <sup>4, 3)</sup>		
130	130	シトロネラール	香料	- <sup>21)</sup>	- <sup>5)</sup>	- <sup>10)</sup>	
131	131	シトロネロール	香料	- <sup>21)</sup>			
132	132	1, 8-シネオール	香料	- <sup>21)</sup>			
133	133	ジフェニール	防かび剤	- <sup>1, 16)</sup>	- <sup>1)</sup>		
134	134	ジブチルヒドロキシトルエン(BHT)	酸化防止剤	- <sup>16)</sup>	- <sup>1)</sup>		
135	135	ジベンゾイルチアミン	強化剤	- <sup>5, 18)</sup>	- <sup>5)</sup>		
136	136	ジベンゾイルチアミン塩酸塩	強化剤	- <sup>1)</sup>	- <sup>1)</sup>		

表1 指定添加物(つづき)

新番号	No	食品添加物		変異原性試験			備考
		名称	用途	Ames試験	染色体異常試験	小核試験	
143	143	DL-酒石酸	酸味料	- <sup>21)</sup>			
144	144	L-酒石酸	酸味料	- <sup>2, 21)</sup>	- <sup>2)</sup>		d-酒石酸
146	146	L-酒石酸水素カリウム	膨張剤	- <sup>2, 25)</sup>	- <sup>2)</sup>		d-酒石酸水素カリウム
148	148	L-酒石酸ナトリウム	調味料	- <sup>1, 25)</sup>	+ <sup>1)</sup>	- <sup>11)</sup>	d-酒石酸ナトリウム
149	149	硝酸カリウム	発酵調整剤ほか	- <sup>4, 19)</sup>	- <sup>4)</sup>		
150	150	硝酸ナトリウム	発酵調整剤ほか	- <sup>1, 19)</sup>	+ <sup>1)</sup>		
151	151	食用赤色2号	着色料	- <sup>1, 24)</sup>	+ <sup>1)</sup>		
152	152	食用赤色3号	着色料	- <sup>1, 24)</sup>	+ <sup>1)</sup>	- <sup>2)</sup>	
153	152	食用赤色40号	着色料	- <sup>26)</sup>			
154	153	食用赤色102号	着色料	- <sup>1, 24)</sup>	+ <sup>1)</sup>	- <sup>2)</sup>	
155	154	食用赤色104号	着色料	- <sup>1, 24)</sup>	- <sup>1)</sup>		
156	155	食用赤色105号	着色料	- <sup>1, 24)</sup>	- <sup>1)</sup>		
157	156	食用赤色106号	着色料	- <sup>1, 24)</sup>	+ <sup>1)</sup>	- <sup>2)</sup>	
158	157	食用黄色4号	着色料	- <sup>1, 24)</sup>	+ <sup>1)</sup>	- <sup>11)</sup>	
159	158	食用黄色5号	着色料	- <sup>1, 24)</sup>	+ <sup>1)</sup>		
160	159	食用緑色3号	着色料	[ <sup>-1)</sup> , - <sup>24)</sup>	[ <sup>-1)</sup> ]	- <sup>2)</sup>	[高純度品]
161	160	食用青色1号	着色料	- <sup>1, 24)</sup>	+ <sup>1)</sup>		
162	161	食用青色2号	着色料	- <sup>1, 24)</sup>	- <sup>p.1)</sup>		
163	162	ショ糖脂肪酸エステル	乳化剤	- <sup>1, 26)</sup>	- <sup>1)</sup>		
164	163	シリコーン樹脂	消泡剤	- <sup>2)</sup>	- <sup>2)</sup>		
165	164	シンナミルアルコール	香料	- <sup>22)</sup>			
166	165	シンナムアルデヒド	香料	+ <sup>3)</sup> , - <sup>20)</sup>	+ <sup>3)</sup>	- <sup>11)</sup>	
167	165.2	水酸化カリウム	製造用剤	- <sup>23)</sup>			
168	166	水酸化カルシウム	製造用剤ほか	- <sup>5, 20)</sup>	- <sup>5)</sup>		
169	167	水酸化ナトリウム	製造用剤	- <sup>22)</sup>			
171	169	ステアロイル乳酸カルシウム	乳化剤	- <sup>3)</sup>	- <sup>3)</sup>		
172	170	ソルビタン脂肪酸エステル	乳化剤	- <sup>1, 26)</sup>	- <sup>1)</sup>		
173	171	D-ソルビトール	甘味料ほか	- <sup>1, 17)</sup> , [ <sup>-1)</sup> ]	- <sup>1)</sup> , [ <sup>-1)</sup> ]		[D-ソルビットWP]
174	172	ソルビン酸	保存料	- <sup>2, 22)</sup>	- <sup>2)</sup>		
175	173	ソルビン酸カリウム	保存料	- <sup>1, 17)</sup>	+ <sup>1)</sup>		
176	174	炭酸アンモニウム	製造用剤ほか	- <sup>25)</sup>			
177	175	炭酸カリウム(無水)	製造用剤ほか	- <sup>4, 25)</sup>	- <sup>4)</sup>		
178	176	炭酸カルシウム	製造用剤ほか	- <sup>18)</sup>			
179	177	炭酸水素アンモニウム	膨張剤ほか	- <sup>4, 25)</sup>	- <sup>4)</sup>		
180	178	炭酸水素ナトリウム	膨張剤ほか	- <sup>2, 25)</sup>	- <sup>2)</sup>		
181	179	炭酸ナトリウム(結晶)	製造用剤	- <sup>3)</sup>	- <sup>3)</sup>		
181	180	炭酸ナトリウム(無水)	製造用剤	- <sup>25)</sup>			
182	181	炭酸マグネシウム	製造用剤	- <sup>5, 19)</sup>	- <sup>5)</sup>		
183	182	チアベンダゾール(TBZ)	防かび剤	- <sup>1, 16)</sup>	- <sup>p.1)</sup>		
184	183	チアミン塩酸塩	強化剤	- <sup>2, 17)</sup>	- <sup>2)</sup>		
185	184	チアミン硝酸塩	強化剤	- <sup>5, 21)</sup>	- <sup>5)</sup>		
186	185	チアミンセチル硫酸塩	強化剤	- <sup>1)</sup>	- <sup>1)</sup>		
188	187	チアミンナフタレン-1, 5-ジスルホン酸塩	強化剤	- <sup>2)</sup>	- <sup>2)</sup>		
189	190	チアミンラウリル硫酸塩	強化剤ほか	- <sup>2)</sup>	- <sup>2)</sup>		
192	193	L-テアニン	調味料ほか	- <sup>4, 25)</sup>	- <sup>4)</sup>		
193	194	デカナール	香料	- <sup>3, 22)</sup>	- <sup>3)</sup>		

表1 指定添加物(つづき)

新番号	No	食品添加物		変異原性試験			備考
		名称	用途	Ames試験	染色体異常試験	小核試験	
194	195	デカノール	香料	- <sup>22)</sup>			
195	196	デカン酸エチル	香料	- <sup>22)</sup>			
196	197	鉄クロロフィリンナトリウム	着色料	- <sup>1)</sup>	- <sup>1)</sup>		
削除	198	デヒドロ酢酸	保存料	- <sup>2, 22)</sup>	- <sup>2)</sup>		
197	199	デヒドロ酢酸ナトリウム	保存料	- <sup>1, 17)</sup>	+ <sup>1)</sup>	+ <sup>11)</sup>	
198	200	テルピネオール	香料	- <sup>22)</sup>			
200	202	デンブングリコール酸ナトリウム	糊料	- <sup>3)</sup>	- <sup>3)</sup>		
201	203	デンブンリン酸エステルナトリウム	糊料	- <sup>3)</sup>	- <sup>3)</sup>		
202	204	銅塩類(グルコン酸銅)	強化剤	- <sup>19)</sup>			
202	204	銅塩類(硫酸銅)	強化剤	- <sup>19)</sup>			
203	205	銅クロロフィリンナトリウム	着色料	- <sup>1, 19)</sup>	- <sup>1)</sup>		
204	206	銅クロロフィル	着色料	- <sup>1)</sup>	- <sup>1)</sup>		
205	207	dl-α-トコフェロール	酸化防止剤	- <sup>1, 16)</sup>	- <sup>1)</sup>		
206	208	DL-トリプトファン	強化剤ほか	- <sup>2, 21)</sup>	- <sup>2)</sup>		
207	209	L-トリプトファン	強化剤ほか	- <sup>2, 21)</sup>	- <sup>2)</sup>		
208	210	DL-トレオニン	強化剤ほか	- <sup>2, 21)</sup>	- <sup>2)</sup>		
209	211	L-トレオニン	強化剤ほか	- <sup>2, 21)</sup>	- <sup>2)</sup>		
210	212	ナトリウムメキシド	製造用剤	- <sup>20)</sup>			
211	213	ニコチン酸	強化剤ほか	- <sup>3, 17)</sup>	- <sup>3)</sup>	- <sup>11)</sup>	
212	214	ニコチン酸アミド	強化剤ほか	- <sup>2, 17)</sup>	- <sup>2)</sup>		
213	215	二酸化硫黄	保存料ほか				
214	216	二酸化塩素	小麦粉処理剤	[+ <sup>4)</sup> , (- <sup>4)</sup> ]	[ <sup>-4)</sup> , (- <sup>p.4)</sup> ]	+ <sup>11)</sup>	[液剤], [粉剤]
215	217	二酸化ケイ素	製造用剤	- <sup>26)</sup>			
217	219	二酸化チタン	着色料	- <sup>25)</sup>			
218	220	乳酸	酸味料	- <sup>3, 24)</sup> , [- <sup>3)</sup> ]	- <sup>3)</sup> , [- <sup>3)</sup> ]		ガラス容器入り, [ポリ容器入り]
219	221	乳酸カルシウム	強化剤	- <sup>19)</sup>			
220	222	乳酸鉄	強化剤	- <sup>10, 24)</sup> , + <sup>5)</sup>	+ <sup>5)</sup>	- <sup>9)</sup>	
221	223	乳酸ナトリウム	酸味料ほか	- <sup>4, 25)</sup>	- <sup>4)</sup>		
222	224	γ-ノナラクトン	香料	- <sup>22)</sup>			
223	225	ノルビキシンカリウム	着色料	- <sup>1)</sup>	- <sup>1)</sup>		
224	226	ノルビキシンナトリウム	着色料	- <sup>1)</sup>	- <sup>1)</sup>		
225	227	バニリン	香料	- <sup>2, 22)</sup>	- <sup>2)</sup>		
226	228	パラオキシ安息香酸イソブチル	保存料	- <sup>1, 22)</sup>	- <sup>1)</sup>		
227	229	パラオキシ安息香酸イソプロピル	保存料	- <sup>1, 22)</sup>	- <sup>1)</sup>		
228	230	パラオキシ安息香酸エチル	保存料	- <sup>1, 22)</sup>	+ <sup>1)</sup>		
229	231	パラオキシ安息香酸ブチル	保存料	- <sup>1, 16)</sup>	- <sup>1)</sup>		
230	232	パラオキシ安息香酸プロピル	保存料	- <sup>22)</sup>			
231	233	パラメチルアセトフェノン	香料	- <sup>22)</sup>			
232	234	L-バリン	強化剤ほか	- <sup>3, 24)</sup>	- <sup>3)</sup>		
233	235	パントテン酸カルシウム	強化剤	- <sup>3, 18)</sup>	- <sup>3)</sup>		
234	236	パントテン酸ナトリウム	強化剤	- <sup>5, 17)</sup>	- <sup>5)</sup>		
235	237	L-ヒスチジン塩酸塩	強化剤	- <sup>5)</sup>	- <sup>5)</sup>		
237	239	ビタミンA	強化剤	- <sup>26)</sup>			Retinol
238	240	ビタミンA脂肪酸エステル	強化剤	[ <sup>-1)</sup> ]	[ <sup>-1)&lt;/sup</sup>		

表1 指定添加物(つづき)

新番号	No	食品添加物		変異原性試験			備考
		名称	用途	Ames試験	染色体異常試験	小核試験	
243	245	氷酢酸	酸味料	—4, 23)	—4)		
244	246	ビリドキシン塩酸塩	強化剤	—2, 17)	—2)		
245	247	ピロ亜硫酸カリウム	保存料ほか	—1, 18)	—1)		
246	248	ピロ亜硫酸ナトリウム	保存料ほか	—3, 25)	—3)		
247	249	ピロリン酸四カリウム	製造用剤	—21)			
248	250	ピロリン酸ニ水素カルシウム	強化剤ほか	—26)			
249	251	ピロリン酸ニ水素二ナトリウム	製造用剤	—4, 26)	—4)		
250	253	ピロリン酸第二鉄	強化剤ほか	—4, 17)	—4)		
251	255	ピロリン酸四ナトリウム(無水)	品質改良剤ほか	—5, 21)	—5)		
252	256	L-フェニルアラニン	強化剤ほか	—2, 24)	—2)		
253	257	フェニル酢酸イソアミル	香料	—22)			
254	258	フェニル酢酸イソブチル	香料	—25)			
255	259	フェニル酢酸エチル	香料	—2, 22)	—2)		
258	262	ブチルヒドロキシアニソール(BHA)	酸化防止剤	—1, 16)	—1)	—3)	
259	263	フマル酸	酸味料	—4, 23)	—4)		
260	264	フマル酸ナトリウム	酸味料	—5, 25)	—5)		
261	265	フルフラール及びその誘導体	香料	—23)			
262	266	プロピオン酸	香料ほか	—22)			
263	267	プロピオン酸イソアミル	香料	—3, 22)	—3)		
264	268	プロピオン酸エチル	香料	—3, 22)	—3)		
265	269	プロピオン酸カルシウム	保存料	—2, 22)	—2)		
266	270	プロピオン酸ナトリウム	保存料	—1, 17)	—1)		
267	271	プロピオン酸ベンジル	香料	—22)			
268	272	プロピレングリコール	品質保持剤ほか	—1, 20)	+ <sup>1)</sup>	—11)	
269	273	プロピレングリコール脂肪酸エステル	乳化剤	—2, 26)	—2)		
270	274	ヘキサン酸	香料	—18)			
271	275	ヘキサン酸アリル	香料	—23)			
272	276	ヘキサン酸エチル	香料	—23)			
273	277	ヘプタン酸エチル	香料	—18)			
274	278	I-ペリルアルデヒド	香料	—3, 25)	+ <sup>3)</sup>	—11)	
275	279	ペンジルアルコール	香料	—3, 23)	—3)	—11)	
276	280	ベンズアルデヒド	香料	—23)			
279	283	没食子酸プロピル	酸化防止剤	—1, + <sup>19)</sup>	+ <sup>1)</sup>		
280	284	ポリアクリル酸ナトリウム	糊料ほか	—2, 19)	—2)		
281	285	ポリイソブチレン	ガムベース	—3)	—3)		
283	287	ポリブテン	ガムベース	—4, 26)	—4)		
284	288	ポリリン酸カリウム	製造用剤	—26)			
285	289	ポリリン酸ナトリウム	製造用剤	—5, 21), [—3)]	—5), [—3)]	[トリポリリン酸ナトリウム]	
286	290	d-ボルネオール	香料	—23)			
287	291	マルトール	香料	—4, + <sup>23)</sup>	+ <sup>4)</sup>	—11)	
288	292	D-マンニトール	粘着防止剤ほか	—3, 19)	—3)		
289	293	メタリン酸カリウム	製造用剤	—2, 21)	—2)		
290	294	メタリン酸ナトリウム	製造用剤	—3, 21)	—3)		
291	295	DL-メチオニン	強化剤ほか	—24)			
292	296	L-メチオニン	強化剤	—24)			
293	297	N-メチルアントラニル酸メチル	香料	—23)			
294	298	メチルセルロース	糊料ほか	—3, 5, 20)	—3)		
295	299	メチルβ-ナフチルケトン	香料	—23)			

表1 指定添加物(つづき)

新番号	No	食品添加物		変異原性試験			備考
		名称	用途	Ames試験	染色体異常試験	小核試験	
296	300	メチルヘスペリジン	強化剤	—3, 18)	—3)		Vitamin P
297	301	dl-メントール	香料	—1, 26)	—1)		
298	302	I-メントール	香料	—4, 23)	—4)		
299	303	モルホリン脂肪酸塩	被膜剤	—2)	—2)		
300	304	葉酸	強化剤	—5, 17)	—5)		
301	305	酪酸	香料	—3, 23)	—3)		
302	306	酪酸イソアミル	香料	—3, 4, 23)	—3, 4)		
303	307	酪酸エチル	香料	—3, 4, 23)	—3, 4)		
304	308	酪酸シクロヘキシリ	香料	—23)			
305	309	酪酸ブチル	香料	—23)			
307	311	L-リシンL-アスパラギン酸塩	強化剤ほか	—5)	—5)		
308	312	L-リシン塩酸塩	強化剤ほか	—5, 24)	—5)		
309	313	L-リシンL-グルタミン酸塩	強化剤ほか				
310	314	リナオール	香料	—3, 23)	—3)		
312	316	5'-リボヌクレオチド二ナトリウム	調味料	—3)	—3)		
313	317	リボフラビン	強化剤ほか	—1, 6, 17)	+ <sup>1)</sup>	—11)	Rec-assay : —6)
314	318	リボフラビン酪酸エステル	強化剤ほか	—4, 24)	—4)		
315	319	リボフラビン5'-リン酸エステルナトリウム	強化剤ほか	—3, 24), + <sup>5)</sup>	—3)	—9)	
316	320	硫酸	製造用剤	—22)			
317	321	硫酸アルミニウムアンモニウム	膨張剤ほか	—20)			
318	323	硫酸アルミニウムカリウム	膨張剤ほか	—3, 20)	—3)		
319	325	硫酸アンモニウム	製造用剤	—24)			
320	326	硫酸カルシウム	豆腐用凝固剤ほか	—19)			
321	327	硫酸第一鉄(乾燥)	強化剤ほか	—3, 25)	+ <sup>3)</sup>	—11)	
322	329	硫酸ナトリウム	製造用剤	—24)			
323	330	硫酸マグネシウム	豆腐用凝固剤ほか	—3, 24), [—3)]	—3), [—3)]		[乾燥]
324	331	DL-リンゴ酸	酸味料	—2, 23)	—2)		
325	332	DL-リンゴ酸ナトリウム	酸味料ほか	—4, 25)	—4)		
326	333	リン酸	酸味料	—24)			
327	334	リン酸三カリウム	製造用剤	—25)			
328	335	リン酸三カルシウム	製造用剤ほか	—19)			
329	336	リン酸水素二アンモニウム	製造用剤	—24)			
330	337	リン酸二水素アンモニウム	製造用剤	—5, 24)	+ <sup>5)</sup>	—9)	
331	338	リン酸水素二カリウム	製造用剤	—25)			
332	339	リン酸二水素カリウム	製造用剤	—24)			
333	340	リン酸一水素カルシウム	製造用剤	—5, 18)	—5)		
334	341	リン酸二水素カルシウム	製造用剤	—3, 20)	—3)		
335	342	リン酸水素二ナトリウム(結晶)	製造用剤	—3)	—3)		
335	343	リン酸水素二ナトリウム(無水)	製造用剤	—25)			
336	345	リン酸二水素ナトリウム(無水)	製造用剤	—24)			
337	346	リン酸三ナトリウム(結晶)	製造用剤	—25)			

結果の表記に関してはデータシートの作成基準及び要領を参照

表2 既存添加物(天然添加物)

No	食品添加物		変異原性試験			備考
	名称	用途	Ames試験	染色体異常試験	小核試験	
4	アカネ色素	着色料	+ <sup>6)</sup>		- <sup>8)</sup>	Rec-assay(液体法) : - <sup>6)</sup>
9	アシラーゼ	酵素	+ <sup>6)</sup>	- <sup>7)</sup>	- <sup>15)</sup>	Rec-assay : - <sup>6)</sup>
12	L-アスパラギン酸	強化剤	- <sup>8)</sup>	- <sup>8)</sup>		
15	N-アセチルグルコサミン	甘味料	-	-		Rec-assay : -
19	アナト一色素	着色料	- <sup>1, 19)</sup>	- <sup>1)</sup>		
22	$\alpha$ -アミラーゼ	酵素	- <sup>6)</sup>	- <sup>5)</sup>		Rec-assay : - <sup>6)</sup>
23	$\beta$ -アミラーゼ	酵素	- <sup>6)</sup>			Rec-assay : + <sup>6)</sup>
24	アーモンドガム(セドウガム)	増粘安定剤	- <sup>6)</sup>			Rec-assay : - <sup>6)</sup>
26	アラビアガム	増粘安定剤	- <sup>9)</sup>	- <sup>9)</sup>		Rec-assay : - <sup>9)</sup>
31	アルギン酸	増粘安定剤	- <sup>10), +<sup>9)</sup></sup>	+ <sup>9)</sup>	- <sup>10)</sup>	Rec-assay : - <sup>9)</sup>
39	イタコン酸	酸味料	-	-		Rec-assay : -
43	イヌリン型ポリフラクタン	製造用剤	-	-		
48	ウコン色素(クルクミン)	着色料		+ <sup>1)</sup>		
58	エルウェニアミツエンシスガム	増粘安定剤	- <sup>14)</sup>	- <sup>14)</sup>		Rec-assay : - <sup>14)</sup>
59	エレミ樹脂	増粘安定剤	- <sup>14)</sup>	- <sup>14)</sup>		Rec-assay : - <sup>14)</sup>
73	オリゴガラクチュロン酸	製造用剤	- <sup>29)</sup>		(-) <sup>30)</sup>	(in vivo CA)
75	$\gamma$ -オリザノール	酸化防止剤	-	-		Rec-assay : -
77	オレンジ色素	着色料	-	+	-	in vitro MM : -
80	カオリン(白陶土)	製造用剤	- <sup>26)</sup>			
81	カカオ色素	着色料	+ <sup>2, 8)</sup> , - <sup>8, 27)</sup>	+ <sup>1, 2, 8)</sup>	- <sup>13</sup> , (-) <sup>28)</sup> , + <sup>6)</sup>	Rec-assay : - <sup>8), +<sup>8)</sup> (in vivo CA)</sup>
83	カキ色素	着色料		+ <sup>7)</sup>	- <sup>10)</sup>	
88	活性炭	製造用剤	- <sup>26)</sup>			
91	カテキン	酸化防止剤	+	+	-	in vitro MM : +
92	カードラン	増粘安定剤ほか	-	-		Rec-assay : - in vitro MM : -
94	カフェイン(抽出物)	苦味料等	- <sup>6)</sup>	+ <sup>1)</sup>		Rec-assay : + <sup>6)</sup>
95	カラギナン	増粘安定剤	- <sup>9)</sup>	- <sup>9)</sup>		Rec-assay : - <sup>9)</sup>
98	カラシ抽出物	製造用剤	- <sup>29)</sup>			
99	カラメル I	製造用剤		+ <sup>1)</sup>		
103	カラヤガム	増粘安定剤	- <sup>8)</sup>	- <sup>8)</sup>		Rec-assay : - <sup>8)</sup>
104	カルナウバロウ	ガムベース	- <sup>8)</sup>	- <sup>8)</sup>		Rec-assay : - <sup>8)</sup>
104	カルナウバワックス				-	カルナバロウ
106	カロブ色素	着色料	- <sup>6)</sup>	- <sup>4)</sup>		Rec-assay : - <sup>6)</sup>
107	カロブビーンガム(ローカストビーンガム)	増粘安定剤	- <sup>9)</sup>	- <sup>9)</sup>		Rec-assay : - <sup>9)</sup>
110	カンゾウ抽出物	甘味料	- <sup>2)</sup>	+ <sup>2), [-7)]</sup>	- <sup>9)</sup>	[甘草色素]
111	カンゾウ油性抽出物	酸化防止剤	-			Rec-assay : +
112	カンデリラロウ	ガムベース	- <sup>10)</sup>	- <sup>10)</sup>		Rec-assay : - <sup>10)</sup>
113	キサンタンガム	増粘安定剤	- <sup>9)</sup>	- <sup>9)</sup>		Rec-assay : - <sup>9)</sup>
115	D-キシロース	甘味料	- <sup>2, 14, 17)</sup>	- <sup>2, 14)</sup>		Rec-assay : - <sup>14)</sup>
118	キチン	増粘安定剤	-	-	-	in vitro MM : -
120	キトサン	増粘安定剤ほか	-	-		Rec-assay : -
123	魚鱗箔	着色料		-	-	
124	キラヤ抽出物	乳化剤	-	-		Rec-assay : -
127	グアーガム	増粘安定剤	- <sup>9)</sup>	- <sup>9)</sup>		Rec-assay : - <sup>9)</sup>

表2 既存添加物(天然添加物)(つづき)

No	食品添加物		変異原性試験			備考
	名称	用途	Ames試験	染色体異常試験	小核試験	
129	グアヤク脂	酸化防止剤	- <sup>19)</sup>			
130	グアヤク樹脂	ガムベース	-	-	-	Rec-assay : -
133	クサギ色素	着色料	-	-	-	
134	クチナシ青色素	着色料	+ <sup>6), -2)</sup>	- <sup>2)</sup>	- <sup>13, 14)</sup>	Rec-assay : - <sup>6)</sup>
135	クチナシ赤色素	着色料		+ <sup>7)</sup>	- <sup>13)</sup>	
136	クチナシ黄色素	着色料	- <sup>6)</sup>	- <sup>6)</sup>	- <sup>10)</sup>	Rec-assay : - <sup>6)</sup>
139	グッタペルカ	ガムベース	- <sup>15)</sup>	- <sup>15)</sup>	-	Rec-assay : - <sup>15)</sup>
144	グルコアミラーゼ	酵素	- <sup>6)</sup>	- <sup>3)</sup>	- <sup>6)</sup>	Rec-assay : - <sup>6)</sup>
150	グルコースイソメラーゼ	酵素	+ <sup>12)</sup>	- <sup>12)</sup>		Rec-assay : - <sup>12)</sup>
155	クーロー色素	着色料	+	-	-	
156	クローブ抽出物	酸化防止剤	-	-	-	Rec-assay : +
158	クロロフィル	着色料	- <sup>6)</sup>	- <sup>1)</sup>		Rec-assay : - <sup>6)</sup>
160	くん液	製造用剤	+ <sup>6), -6, 29)</sup>	- <sup>5), +5)</sup>	- <sup>9, (-)30)</sup>	Rec-assay : - <sup>6), +6) (in vivo CA)</sup>
161	ケイソウ土([A1], [A2])	製造用剤	- <sup>19)</sup>			
164	ゲンチアナ抽出物	苦味料等	+ <sup>12)</sup>	- <sup>12)</sup>	- <sup>13)</sup>	Rec-assay : - <sup>12)</sup>
166	コウジ酸	製造用剤	+, + <sup>29)</sup>	-	-(-) <sup>30)</sup>	in vitro MM : - (in vivo CA)
167	香辛料抽出物	苦味料等				
167-08	オールスパイス	苦味料等			- <sup>7)</sup>	
167-09	オレガノ	苦味料等	- <sup>6)</sup>		- <sup>13)</sup>	Rec-assay : + <sup>6)</sup>
167-15	カルダモン	苦味料等	- <sup>6)</sup>		- <sup>12)</sup>	Rec-assay : + <sup>6)</sup>
167-18	キャラウェー	苦味料等	- <sup>12)</sup>	+ <sup>12)</sup>	- <sup>15)</sup>	Rec-assay : + <sup>12)</sup>
167-20	クミン	苦味料等	- <sup>6)</sup>	- <sup>4)</sup>	- <sup>8)</sup>	Rec-assay : + <sup>6)</sup>
167-22	クローブ	苦味料等	- <sup>6)</sup>	- <sup>4)</sup>	- <sup>10)</sup>	Rec-assay : + <sup>6)</sup>
167-25	コショウ(ペッパー油)	苦味料等	- <sup>6)</sup>		- <sup>8)</sup>	Rec-assay : + <sup>6)</sup>
167-27	コリアンダー	苦味料等	- <sup>6)</sup>	- <sup>4)</sup>	- <sup>8)</sup>	Rec-assay : + <sup>6)</sup>
167-30	サボリー(セイボリー油)	苦味料等	- <sup>10)</sup>	+ <sup>10)</sup>	- <sup>13)</sup>	Rec-assay : + <sup>10)</sup>
167-31	サルビア(セージ油)	苦味料等	- <sup>6)</sup>	- <sup>4)</sup>	- <sup>8)</sup>	Rec-assay : + <sup>6)</sup>
167-32	サンショウ	苦味料等		+ <sup>p,3)</sup>		
167-33	シソ	苦味料等	- <sup>6)</sup>	- <sup>4)</sup>	- <sup>8)</sup>	Rec-assay : + <sup>6)</sup>
167-37	ショウガ	苦味料等	- <sup>6)</sup>	- <sup>3)</sup>	- <sup>8)</sup>	Rec-assay : + <sup>6)</sup>
167-38	スターアニス	苦味料等	- <sup>10)</sup>	+ <sup>10)</sup>	- <sup>15)</sup>	Rec-assay : + <sup>10) スターアニス香料</sup>
167-40	セイヨウワサビ(マスター)	苦味料等	- <sup>6)</sup>	- <sup>p,4)</sup>		Rec-assay : + <sup>6)</sup>
167-43	タイム	苦味料等	- <sup>6)</sup>	- <sup>4)</sup>	- <sup>10)</sup>	Rec-assay : + <sup>6)</sup>
167-49	デイル	苦味料等	- <sup>10)</sup>	+ <sup>10)</sup>	- <sup>14)</sup>	Rec-assay : + <sup>10)</sup>
167-50	トウガラシ	苦味料等	- <sup>6), [-2)</sup>	[-2)	[-10)	Rec-assay : - <sup>6) [カプサイシン]</sup>
167-51	ナツメグ	苦味料等	- <sup>6)</sup>	- <sup>4)</sup>	- <sup>10)</sup>	Rec-assay : + <sup>6) メース油, Rec-assay : +</sup>
167-55	ニンニク(ガーリック油)	苦味料等	- <sup>6)</sup>	- <sup>p,3)</sup>	- <sup>8)</sup>	Rec-assay : - <sup>6)</sup>
167-56	バジル	苦味料等	-	+		バジル精油 Rec-assay : +
167-62	フェネグリーク	苦味料等	[+ <sup>6)</sup>		- <sup>8)</sup>	[Rec-assay : - <sup>6)], [フェネグリーク油]</sup>

表2 既存添加物(天然添加物)(つづき)

No	食品添加物		変異原性試験			備考
	名称	用途	Ames試験	染色体異常試験	小核試験	
167-65	マジョラム	苦味料等	- <sup>15)</sup>	- <sup>15)</sup>		Rec-assay : + <sup>15)</sup>
167-71	ローズマリー	苦味料等	- <sup>12)</sup>	- <sup>12)</sup>		Rec-assay : + <sup>12)</sup>
167-72	ローレル	苦味料等	- <sup>6)</sup>			Rec-assay : + <sup>6)</sup>
174	酵素処理ルチン(抽出物)	酸化防止剤	+	+	-	Rec-assay : -
175	酵素処理レシチン	乳化剤	-	-		Rec-assay : -
176	酵素分解カンゾウ	甘味料	-	-		Rec-assay : +
181	コウリヤン色素	着色料	- <sup>6)</sup>	+ <sup>5)</sup>	- <sup>9)</sup>	Rec-assay(液体法) : - <sup>6)</sup>
182	コチニール色素	着色料		+ <sup>1)</sup>	- <sup>9)</sup>	
189	ゴマ油抽出物	酸化防止剤	-	-		Rec-assay : +
194	コメヌカラウ	ガムベース	- <sup>10)</sup>	- <sup>10)</sup>		Rec-assay : - <sup>10)</sup>
195	サイリウムシードガム	増粘安定剤	-	-		Rec-assay : -
198	サバクヨモギシードガム	増粘安定剤ほか		-		
199	酸性白土	製造用剤	- <sup>19)</sup>			
203	シアナツト色素	着色料	- <sup>10)</sup>	- <sup>10)</sup>		Rec-assay : - <sup>10)</sup>
205	シェラツク	光沢剤ほか	- <sup>2)</sup>	- <sup>2)</sup>	- <sup>13)</sup>	
207	ジェランガム	増粘安定剤	-	-		Rec-assay : -
209	シクロデキストリン	製造用剤	- <sup>2)</sup>	- <sup>2)</sup>	-	
213	シソ抽出物(シソ色素)	製造用剤	-,- <sup>6)</sup>	-,+ <sup>3)</sup>	-,- <sup>6)</sup>	Rec-assay : - <sup>6)</sup>
214	シタン色素(サンダルウッドオイル)	着色料	-	-,- <sup>p,7)</sup>	-	in vitro MM : -
218	焼成カルシウム	強化剤	- <sup>8)</sup>	- <sup>8)</sup>		Rec-assay : - <sup>8)</sup>
223	しらこたん白抽出物	保存料	- <sup>14, 27)</sup>	- <sup>14)</sup>	(-) <sup>28)</sup>	Rec-assay : - <sup>14)</sup> (in vivo CA)
227	ステビア抽出物	甘味料		(+ <sup>1)</sup> ), [- <sup>1)</sup> ]		(50%品), [85%品]
230	スピルリナ色素	着色料	[ - <sup>6)</sup> ], - <sup>27)</sup>	- <sup>7)</sup>	-,-(-) <sup>28)</sup>	Rec-assay : [- <sup>6)</sup> ], [スピルリナ色素], (in vivo CA)
234	セイヨウワサビ抽出物	製造用剤	-,- <sup>29)</sup>	+ <sup>p</sup>	-,-(-) <sup>30)</sup>	(in vivo CA)
239	セージ抽出物	酸化防止剤	-	-	-	Rec-assay : -
244	セルラーーゼ	酵素	- <sup>2)</sup>	+ <sup>2)</sup>	- <sup>12, 15)</sup>	Rec-assay : - <sup>6)</sup>
251	ダイズサポニン	乳化剤	-	+	-	in vitro MM : -
253	タウマチン	甘味料	- <sup>6)</sup>	- <sup>7)</sup>		Rec-assay : - <sup>6)</sup>
254	タウリン(抽出物)	調味料	- <sup>8)</sup>	- <sup>8)</sup>		Rec-assay : - <sup>8)</sup>
256	タマネギ色素	着色料	+	-	-	in vitro MM : -
257	タマリンド色素	着色料	-,- <sup>27)</sup>	-	-	Rec-assay : + in vitro MM : -
258	タマリンドシードガム	増粘安定剤	-	- <sup>7)</sup>		Rec-assay : -
259	タラガム	増粘安定剤	-	-		Rec-assay : -
260	タルク	製造用剤ほか	- <sup>15, 19)</sup>	+ <sup>15)</sup>	-	Rec-assay : - <sup>15)</sup>
264	タンニン(抽出物)	製造用剤	- <sup>8, 29)</sup>	+ <sup>8)</sup>	(-) <sup>30)</sup>	タンニン酸, Rec assay : + <sup>8)</sup> (in vivo CA)
265	ダンマル樹脂	ガムベースほか		-	-	
266	チクル	ガムベース	- <sup>15)</sup>	- <sup>15)</sup>	-	Rec-assay : - <sup>15)</sup>
270	チャ抽出物	製造用剤ほか	+ <sup>14)</sup> , - <sup>29)</sup>	+ <sup>14)</sup>	- <sup>15</sup> , (-) <sup>30)</sup>	Rec-assay : + <sup>14)</sup> (in vivo CA)
274	ツヤプリシン(抽出物)	保存料	- <sup>14), -<sup>27)</sup></sup>	+ <sup>14)</sup>	-,-(-) <sup>28)</sup>	ヒキチオール, (in vivo CA) Rec-assay : + <sup>14)</sup>
275	5'-デアミナーゼ	酵素	- <sup>6)</sup>	- <sup>5)</sup>		Rec-assay : - <sup>6)</sup>

表2 既存添加物(天然添加物)(つづき)

No	食品添加物		変異原性試験			備考
	名称	用途	Ames試験	染色体異常試験	小核試験	
281	デュナリエラカロテン	着色料など	-	-		Rec-assay : -
286	トウガラシ色素	着色料	- <sup>6)</sup>			Rec-assay : - <sup>6)</sup>
289	トウモロコシ色素(コーン色素)	着色料	+ <sup>6)</sup>			Rec-assay : - <sup>6)</sup>
291	トコトリエノール	酸化防止剤		-	-	
292	d-α-トコフェロール(抽出トコフェロール)	酸化防止剤	- <sup>6)</sup>	- <sup>7)</sup>	- <sup>10)</sup>	Rec-assay : - <sup>6)</sup>
297	トラガントガム	増粘安定剤	- <sup>6)</sup>		- <sup>10)</sup>	Rec-assay : - <sup>6)</sup>
305	トロロアオイ	増粘安定剤	- <sup>6)</sup>	- <sup>7)</sup>		Rec-assay : - <sup>6)</sup>
308	納豆菌ガム	増粘安定剤	-	-	-	in vitro MM : -
312	ナリンジナーゼ	酵素	- <sup>6)</sup>	- <sup>7)</sup>		Rec-assay : - <sup>6)</sup>
313	ナリンジン	苦味料等	- <sup>6)</sup>	- <sup>3)</sup>	- <sup>15)</sup>	Rec-assay : - <sup>6)</sup>
314	ニガキ抽出物	苦味料等	-	-	-	
321	ニンジンカロテン(ニンジン色素)	着色料	- <sup>10)</sup>	- <sup>10)</sup>		Rec-assay : - <sup>10)</sup>
324	ノルジヒドログアヤレチツク酸	酸化防止剤	- <sup>22)</sup>			
325	ばい煎コメヌカ抽出物	製造用剤		-	-	
330	パパイン	酵素	- <sup>6)</sup>	- <sup>3)</sup>	- <sup>6)</sup>	Rec-assay : - <sup>6)</sup>
332	パーム油カロテン	着色料ほか	+	+	-	Rec-assay : - in vitro MM : +
341	微小纖維セルローズ	増粘安定剤	-	-		Rec-assay : -
344	ビートレッド	着色料	+ <sup>2)</sup>	- <sup>2)</sup>	- <sup>9)</sup>	Rec-assay : - <sup>6)</sup>
350	氷核菌細胞質液	製造用剤		-	-	
353	ファーセレラン	増粘安定剤	- <sup>9)</sup>	- <sup>9)</sup>		Rec-assay : - <sup>9)</sup>
355	ファフィア色素	着色料	-	-	-	
358	フィチン酸	製造用剤	[ - <sup>2)</sup> ]	[ - <sup>2)</sup> ]	- <sup>10)</sup>	[50%水溶液]
361	フェルラ酸	酸化防止剤		-	-	
362	フクロノリ抽出物	増粘安定剤	-	-	-	
365	ブドウ果皮色素	着色料	+ <sup>6), -<sup>2)</sup></sup>	+ <sup>2)</sup>	- <sup>13), -<sup>6)</sup></sup>	Rec-assay : - <sup>6)</sup>
373	ブルラン	増粘安定剤ほか	-,- <sup>6)</sup>	-,- <sup>7)</sup>	- <sup>10)</sup>	Rec-assay(液体法) : - <sup>6)</sup>
374	プロテアーゼ	酵素	- <sup>6)</sup>	- <sup>5)</sup>	- <sup>p</sup>	Rec-assay : - <sup>6)</sup>
383	ペカンナッツ色素	着色料	-	- <sup>p</sup>	-	
384	ヘキサン	製造用剤	- <sup>1, 23)</sup>	- <sup>p, 1)</sup>		
385	ペクチナーゼ	酵素	- <sup>6)</sup>	- <sup>5)</sup>	- <sup>15)</sup>	Rec-assay : - <sup>6)</sup>
386	ペクチン	増粘安定剤	- <sup>9)</sup>	- <sup>9)</sup>		Rec-assay : - <sup>9)</sup>
387	ペクチン分解物	保存料	+,- <sup>27)</sup>	+	-,-(-) <sup>28)</sup>	Rec-assay : -, (in vivo CA), in vitro MM : -
390	ヘスペリジン	強化剤	-	-	-	Rec-assay : -
393	ベニコウジ黄色素	着色料	-			Rec-assay : -
394	ベニコウジ色素	着色料	+ <sup>6), -<sup>27)</sup></sup>	- <sup>1)</sup>	- <sup>13), (-<sup>28)</sup></sup>	Rec-assay : - <sup>6), Rec-assay : +, (in vivo CA)</sup>
396	ベニバナ赤色素	着色料	-	+	-	Rec-assay : -
397	ベニバナ黄色素	着色料	- <sup>6), [+<sup>6)], -<sup>29)</sup></sup></sup>	- <sup>1)</sup>	- <sup>14)</sup>	Rec-assay : - <sup>6)</sup> [粉末品]
403	ヘマトコッカス藻色素	着色料	-	-	-	
405	ヘム鉄	強化剤		-		Rec-assay : -
408	ベントナイト	製造用剤	- <sup>19)</sup>			
411	ホコシ抽出物	製造用剤		+	-	

表2 既存添加物(天然添加物)(つづき)

No	食品添加物		変異原性試験			備考
	名称	用途	Ames試験	染色体異常試験	小核試験	
414	没食子酸	酸化防止剤	—	+ <sup>7)</sup>		Rec-assay : +
418	ε-ポリリシン	保存料	— <sup>14, 27)</sup>	— <sup>14)</sup>	—, (—) <sup>28)</sup>	Rec-assay : — <sup>14)</sup> (in vivo CA)
425	マリーゴールド色素	着色料	—	—		Rec-assay : — in vitro MM : —
428	未焼成カルシウム	強化剤	— <sup>8)</sup>	— <sup>8)</sup>		Rec-assay : — <sup>8)</sup>
429	ミカン種子抽出物(柑橘種子抽出物)	製造用剤	— <sup>14)</sup>	— <sup>14)</sup>	—	Rec-assay : + <sup>14)</sup>
429	ミカン種子抽出物	製造用剤			—	
431	ミツロウ	ガムベース	— <sup>10)</sup>	+ <sup>10)</sup>	— <sup>13), — 15)</sup>	Rec-assay : — <sup>10)</sup>
435	ムラサキトウモロコシ色素	着色料	+, — <sup>27)</sup>	—		Rec-assay : —
442	モウソウチク乾留物	製造用剤	— <sup>29)</sup>		(—) <sup>30)</sup>	(in vivo CA)
444	モウソウチク抽出物	製造用剤	—, — <sup>29)</sup>	—	—, (—) <sup>30)</sup>	(in vivo CA)
452	モリン	酸化防止剤	+	+	—	
457	ユッカフォーム抽出物	乳化剤ほか	—, — <sup>29)</sup>	—	— <sup>30)</sup>	Rec-assay : + (in vivo CA)
459	ラカンカ抽出物	甘味料		— <sup>7)</sup>	— <sup>14)</sup>	
462	ラック色素	着色料	— <sup>27)</sup>	+ <sup>1)</sup> , [+ <sup>1)</sup> ]	— <sup>9), (—)<sup>28)</sup></sup>	[ラックイソ酸・液] (in vivo CA)
463	ラノリン	光沢剤	—	—		Rec-assay : — in vitro MM : —
466	卵黄レシチン	乳化剤	— <sup>26)</sup>			
468	リゾチーム	酵素	— <sup>6)</sup>	— <sup>3)</sup>		Rec-assay : — <sup>6)</sup>
472	流動パラフィン	製造用剤	— <sup>26)</sup>			
475	ルチン酵素分解物	酸化防止剤		+ <sup>1, 11)</sup>	— <sup>11)</sup>	ケルセチン
476	ルチン(抽出物)	酸化防止剤	+ <sup>6), [+<sup>14)</sup>]</sup>	— <sup>11), [+<sup>14)</sup>]</sup>	— <sup>9), —</sup>	Rec-assay : — <sup>6), [—<sup>14)</sup>] [ルチン分解物]</sup>
480	レバパン	増粘安定剤	—	—	—	
483	レンネット	酵素	— <sup>6)</sup>	— <sup>7)</sup>	— <sup>12, 15)</sup>	Rec-assay(液体法) : — <sup>6)</sup>
487	ロシン	ガムベース		—	—	
488	ローズマリー抽出物	酸化防止剤	— <sup>12, 14)</sup>	— <sup>12), +<sup>14)</sup></sup>	—	Rec-assay : — <sup>12, 14)</sup>

結果の表記に関してはデータシートの作成基準及び要領を参照

1711号)の別添2および別添3品目リストの名称を用いた。通用している別名がある場合備考欄に記した。用途に関しては、代表的なものを一つだけ挙げ、用途が複数あるものについては代表的な用途の後に「ほか」を付けて了。

本資料の利用に当たり、ここに記した試験は厚生省研究費で実施されたものおよび東京都立衛生研究所で独自に行われた試験結果のみを集めたものであること、変異原性試験は一般に化学物質の発がん性、遺伝毒性検索の予備的な試験として行われるものであること、相当数の添加物においては実験動物を用いた長期毒性試験などが実施され、安全性が既に確認されているものがあること、さらに、使用実績の長い天然添加物については規格が定められているものは未だ少なく、したがって現在市場に流通している製品と試験に供された検体の化学的同一性

の保証はないこと、などに留意されたい。したがって、いずれかの試験で陽性になっているものがあつても、そのことだけですぐに人体に悪影響がでる、と短絡的に考えないで頂きたい。最終的な評価が困難な場合は追加の試験を行うことが必要であるし、試験結果の内容を十分検討することにより心配するようなものでないことが判明する場合もある。生体内で陽性結果を示した物質を中心にコメントしたので参照していただきたい。

## 2. コメント

結果表の中に陽性を示す添加物が散見されるが、*in vitro*のみで陽性、特に*in vitro*染色体異常試験において陽性で、*in vivo*小核試験において陰性のものに関しては、生体にとって問題となるような変異原性はないものと考えられるので、コメントの対象としなかった。また、微生物を用いる復帰変異試験における陽性反応は、*in*

表3 天然香料

名称	食品添加物			備考
	用途	Ames試験	染色体異常試験	
アニス	香料	— <sup>6)</sup>	— <sup>4)</sup>	— <sup>8)</sup> Rec-assay(液体法) : — <sup>6)</sup>
アーモンド(ピターハーモンド)	香料	— <sup>10)</sup>	+ <sup>10)</sup>	— <sup>12)</sup> Rec-assay : + <sup>10)</sup>
アルテミシア(ヨモギ)	香料	+ <sup>6)</sup>	+ <sup>5)</sup>	— <sup>9)</sup> Rec-assay : — <sup>6)</sup>
イチゴ	香料	+ <sup>6)</sup>	— <sup>5)</sup>	— <sup>10)</sup> Rec-assay : — <sup>6)</sup>
イチジク	香料	+ <sup>6)</sup>	— <sup>5)</sup>	
エビ	香料	+ <sup>6)</sup>	— <sup>5)</sup>	Rec-assay : — <sup>6)</sup>
オオムギ(抽出物)	香料	+ <sup>6)</sup>	— <sup>5)</sup>	Rec-assay : — <sup>6)</sup>
オールスパイス	香料	+ <sup>6)</sup>	+ <sup>11)</sup>	— <sup>11)</sup> Rec-assay : + <sup>6)</sup>
オレンジ	香料	+ <sup>6)</sup>	— <sup>3)</sup>	Rec-assay : — <sup>6)</sup>
オレンジフラワー	香料	— <sup>12)</sup>	— <sup>12)</sup>	— <sup>12)</sup> Rec-assay : + <sup>12)</sup>
カカオ	香料	— <sup>12)</sup>	— <sup>12)</sup>	Rec-assay : — <sup>12)</sup>
カツオブシ(カツオ抽出物)	香料	[+ <sup>6)</sup> ] [— <sup>5)</sup> ]	— <sup>15)</sup>	Rec-assay : (— <sup>6)], [カツオ油], [カツオ油抽出物]</sup>
ガラナ	香料	— <sup>12)</sup>	— <sup>12)</sup>	Rec-assay : + <sup>12)</sup>
グレープフルーツ	香料	+ <sup>6)</sup>	— <sup>4)</sup>	— <sup>9)</sup> Rec-assay : + <sup>6)</sup>
ケード	香料	+ <sup>6)</sup>		— <sup>9)</sup> Rec-assay : + <sup>6)</sup>
コウチャ	香料	— <sup>15)</sup>	+ <sup>15)</sup>	Rec-assay : + <sup>15)</sup>
コーヒー	香料	+ <sup>6)</sup>	— <sup>4)</sup>	— <sup>6)</sup> Rec-assay : + <sup>6)</sup>
コーラ	香料	+ <sup>6)</sup>	— <sup>4)</sup>	— <sup>14)</sup> Rec-assay : — <sup>6)</sup>
サクラ(桜葉)	香料	+ <sup>6)</sup>	— <sup>5)</sup>	Rec-assay : — <sup>6)</sup>
サケカス	香料	+ <sup>6)</sup>	— <sup>3)</sup>	— <sup>6)</sup> Rec-assay : — <sup>6)</sup>
シトロネラ	香料	+ <sup>6)</sup>		Rec-assay : + <sup>6)</sup>
ジュニパーべリー	香料			Rec-assay : —
シンナモン	香料	+ <sup>6)</sup>	— <sup>4)</sup>	— <sup>9)</sup> Rec-assay : + <sup>6)</sup>
スペアミント	香料	+ <sup>6)</sup>	— <sup>4, 11)</sup>	— <sup>8, 11)</sup> Rec-assay : + <sup>6)</sup>
セロリー	香料	— <sup>12)</sup>	— <sup>12)</sup>	— <sup>12)</sup> Rec-assay : + <sup>12)</sup>
タマゴ(卵黄抽出物)	香料	+ <sup>6)</sup>	— <sup>5)</sup>	Rec-assay : — <sup>6)</sup>
タマネギ	香料	+ <sup>6)</sup>	— <sup>4, 11)</sup>	— <sup>7, 11)</sup> Rec-assay : + <sup>6)</sup>
チコリ	香料	+ <sup>15)</sup>	+ <sup>15)</sup>	— <sup>15)</sup> Rec-assay : — <sup>15)</sup>
トンカ	香料	— <sup>15)</sup>	— <sup>15)</sup>	Rec-assay : — <sup>15)</sup>
ニンジン	香料			—
パイナップル	香料	+ <sup>6)</sup>	— <sup>5)</sup>	— <sup>12)</sup> Rec-assay : — <sup>6)</sup>
麦芽	香料		— <sup>11)</sup>	— <sup>11)</sup>
ハチミツ	香料	+ <sup>6)</sup>	— <sup>5)</sup>	Rec-assay : — <sup>6)</sup>
ハツカ	香料	— <sup>15)</sup>	— <sup>15)</sup>	Rec-assay : + <sup>15)</sup>
ハッコウニュウ	香料	+ <sup>6)</sup>		Rec-assay : — <sup>6)</sup>
パニラ	香料	+ <sup>6)</sup>	— <sup>4)</sup>	Rec-assay : — <sup>6)</sup>
パルマローザ	香料	— <sup>12)</sup>	— <sup>12)</sup>	Rec-assay : + <sup>12)</sup>
ピーナッツ	香料	+ <sup>5)</sup>	— <sup>5)</sup>	— <sup>12)</sup> Rec-assay : — <sup>6)</sup>
フェンネル	香料	+ <sup>6)</sup>	— <sup>4)</sup>	Rec-assay : — <sup>6)</sup>
ブドウ	香料	— <sup>15)</sup>	— <sup>15)</sup>	Rec-assay : — <sup>15)</sup>
ペパーミント	香料	+ <sup>6)</sup>	— <sup>3)</sup>	Rec-assay : + <sup>6)</sup>
ベルガモット	香料	— <sup>15)</sup>	— <sup>15)</sup>	Rec-assay : + <sup>15)</sup>
ボアドローズ	香料	— <sup>12)</sup>	— <sup>12)</sup>	— <sup>12)</sup> Rec-assay : + <sup>12)</sup>
ホップ	香料	+ <sup>6)</sup>	— <sup>3)</sup>	Rec-assay : — <sup>6)</sup>
ユーカリ	香料			Rec-assay : +

表3 天然香料(つづき)

食品添加物		変異原性試験			備考
名称	用途	Ames試験	染色体異常試験	小核試験	
ユズ	香料	+	- <sup>3)</sup>	- <sup>6)</sup>	Rec-assay : - <sup>6)</sup>
ライム	香料	- <sup>6)</sup>	- <sup>4)</sup>	- <sup>9)</sup>	Rec-assay : + <sup>6)</sup>
リンゴ	香料	- <sup>6)</sup>	- <sup>4)</sup>		Rec-assay : - <sup>6)</sup>
レモン	香料	- <sup>6)</sup>	- <sup>3)</sup>		Rec-assay : - <sup>6)</sup>

結果の表記に関してはデータシートの作成基準及び要領を参照

表4 一般飲食物添加物

食品添加物		変異原性試験			備考
名称	用途	Ames試験	染色体異常試験	小核試験	
アカキヤベツ色素	着色料		- <sup>7)</sup>		
アマチャ抽出物	甘味料	- <sup>6)</sup>		- <sup>12)</sup>	Rec-assay : + <sup>6)</sup>
果汁	着色料				
エルダーベリー果汁	着色料		+ <sup>11)</sup>	- <sup>11), [-7]</sup>	[エルダーベリー類色素]
カゼイン	製造用剤	- <sup>9, 24)</sup>	- <sup>9)</sup>		Rec-assay : - <sup>9)</sup>
カンゾウ末	甘味料	-			Rec-assay : +
ストロベリー色素	着色料				Rec-assay : -

結果の表記に関してはデータシートの作成基準及び要領を参照

vivo 小核試験によって充分生体内の状況を評価したとは言い難いが、現時点において *in vivo* で遺伝子突然変異を的確に評価する試験系が無い。したがって、*in vivo* の試験系として最も良くバリデーションが行われており、かつ、検出感度が高いと考えられている小核試験の結果を参考に評価せざるを得ない。今後、トランスジェニックマウス等を用いる *in vivo* 試験系が確立された時点において再評価することも重要と考えられる。なお、*in vitro* の試験系の結果が陽性(特に複数の試験系で陽性)で、かつ、*in vivo* の試験がなされていない添加物に関しては、今後優先的に試験を行い、生体内での評価を進める必要がある。以下に、*in vivo* 小核試験または*in vivo* 染色体異常試験で陽性となったものについて変異原性に関するコメントを加える。なお、平成7年、8年に厚生科学研究補助金を用いて、林裕造北里大学薬学部客員教授を主任研究者とする研究班が平成10年4月に既存添加物の安全性評価報告書を出している<sup>31)</sup>。ここでは、該当する添加物がある場合にはその報告書を引用する。

カカオ色素：細菌を用いた復帰変異試験では、5 mg/ml 以上の高用量で陽性、弱陽性と判断された報告がある。また、ロットによって異なる結果が得られたとの報告もある。細菌を用いたDNA修復試験においてもロットによって異なる結果が得られ、15 mg/disk という高用量で陽性結果が得られている。培養細胞を用いた染色体異常試験においても異なるロットについて試験が行われ、比較的高用量(D<sub>20</sub> 値が 0.7-1.83 mg/ml)で陽性の結果が得られている。マウスを用いた小核試験では、統計

学的に有意差のある結果が得られたが、その出現頻度は非常に低い(0.28 %)もので、異なるロットでは陰性の結果が得られている。したがって、色素として用いる用量範囲において、生体内での変異原性は問題となるようなものではない。

亜塩素酸ナトリウム：細菌を用いた復帰変異試験では TA 100 株を用い、代謝活性化系の存在下のみで陽性の反応を示しているが、TA 97 および TA 102 株を含むその他の条件では陰性であった。また、チャイニーズハムスター肺由来細胞株 CHL/IU を用いる染色体異常試験結果は陽性であった。マウス骨髄を用いる小核試験において腹腔内に投与した場合に(15 mg/kg 以上)陽性を示したが、強制経口投与では 300 mg/kg まで試験可能であり、陰性の結果であった。亜塩素酸ナトリウムには対象食品、使用濃度上限が定められており、かつ、最終食品完成前に分解・除去の使用制限があることを考え合わせると、本品の染色体異常誘発性は生体にとって問題となるものではない。

臭素酸カリウム：細菌を用いた復帰変異試験、チャイニーズハムスター肺由来細胞株 CHL/IU を用いる染色体異常試験結果およびマウス骨髄を用いる小核試験において陽性に結果が得られている。1990 年にラットで発がん性が認められたため、魚肉練り製品には使用禁止、パンには使用上限が 50 から 30 ppm に下げられると共に、最終食品完成前に分解・除去の使用制限がもうけられた。

デヒドロ酢酸ナトリウム：細菌を用いた復帰変異試験はすべて陰性であったが、チャイニーズハムスター肺由来細胞株 CHL/IU を用いる染色体異常試験結果および

マウス骨髄を用いる小核試験において陽性に結果が得られている。本品に関しても亜塩素酸ナトリウムと同様腹腔内に投与した場合に弱い小核誘発性が認められるが、強制経口投与では致死量である 2500 mg/kg まで試験されているが明瞭な陽性反応が認められず、用量反応性も無いので陰性と判定されている。対象食品や使用上限濃度に関する使用基準が設けられていること、経口的に暴露した場合に小核誘発性が認められないことを考え合わせると、本品に関しても生体にとっての変異原性は問題ないものと考えられる。

二酸化塩素：液剤において細菌を用いた復帰変異試験、TA 100、代謝活性化系非存在下においてのみ弱い陽性反応が観察されているが、その他の条件ならびに粉剤を用いた場合には復帰変異コロニーの誘発は認められない。チャイニーズハムスター肺由来細胞株 CHL/IU を用いる染色体異常試験においては粉剤のみに弱い倍数体誘発作用が認められる。また、マウス骨髄を用いる小核試験においても腹腔内投与により陽性結果が得られている。わが国で使用実績がほとんどないこと、小麦粉改良剤であり加熱することにより消失することを考えると、暴露量は非常に少なく、ここで認められた反応も問題無いものと考えられる。

没食子酸プロピル：細菌を用いた復帰変異試験では TA 102、代謝活性化系存在下において非常に弱い陽性反応が認められたが、標準的な細菌を用い、500 µg/plate まで処理した試験の結果は陰性であった。また、チャイニーズハムスター肺由来細胞株 CHL/IU を用いる染色体異常試験において陽性の結果が得られている。しかし、ラット、マウスを用いた長期毒性、発がん性試験において有意な腫瘍誘発は認められておらず、JECFA で評価されADI が設定されており、生体にとって問題ないものと考えられる。しかし、さらなる安全性確保のため今後、*in vivo* における変異原性の評価を検討することが望ましいと考える。

マルトール：細菌を用いた復帰変異試験において TA 97、代謝活性化系非存在下において統計学的に有意となる点が一ヵ所あるが、用量依存性も認められず、他の条件ではすべて陰性であった。しかし、チャイニーズハムスター肺由来細胞株 CHL/IU を用いる染色体異常試験結果およびマウス骨髄を用いる小核試験において陽性(250 mg/kg 以上)の結果が得られている。本品の用途は香料に限られており、小核試験で陽性となるような高用量暴露の危険性は無いものと考えられる。また、天然にも多く存在し、天然物の摂取量が合成品のそれを大きく上回っている。

### 3. あとがき

このデータ集のまとめ作業に支持と助言をいただきました厚生省生活衛生局食品化学課ならびに実際の試験に

携わっていた多くの関係者に厚く御礼を申し上げます。入手した資料に基づいてまとめ作業を行いましたが、今後も本計画に基づく試験の追加データやチェック漏れの資料のデータを得て追補・改訂を行って参ります。お気付きの点がありましたらお知らせ下さい。

### 参考文献

- 石館 基、吉川邦衛、祖父尼俊雄(1980)食品添加物の変異原性試験成績—昭和 54 年度厚生省試験研究費による第一次スクリーニングデータ(第一回)—、変異原と毒性、第 12 集: 82-90.
- 石館 基、吉川邦衛、祖父尼俊雄(1981)食品添加物の変異原性試験成績(その 2)—昭和 55 年度厚生省試験研究費による第一次スクリーニングデーター、変異原と毒性、4: 80-89.
- 石館 基、吉川邦衛、祖父尼俊雄(1982)食品添加物の変異原性試験成績(その 3)—昭和 56 年度厚生省試験研究費による一、変異原と毒性、5: 579-587.
- 石館 基、吉川邦衛、祖父尼俊雄(1983)食品添加物の変異原性試験成績(その 4)—昭和 57 年度厚生省試験研究費による一、トキシコロジーフォーラム、6: 671-678.
- 石館 基、吉川邦衛、祖父尼俊雄(1984)食品添加物の変異原性試験成績(その 5)—昭和 58 年度厚生省試験研究費による一、トキシコロジーフォーラム、7: 634-643.
- 峰谷紀之、滝沢行雄、河村太郎、ほか(1985)天然添加物の急性毒性および各種変異原性試験成績の概要(昭和 56 年-58 年分より)、トキシコロジーフォーラム、8: 91-105.
- 石館 基、祖父尼俊雄、岸 美智子(1985)食品添加物の変異原性試験成績(その 6)—昭和 59 年度厚生省試験研究費による一、トキシコロジーフォーラム、8: 705-708.
- 石館 基、滝沢行雄、坂部美雄、ほか(1986)食品添加物の変異原性試験成績(その 7)—昭和 60 年度厚生省試験研究費による一、トキシコロジーフォーラム、9: 628-633.
- 石館 基、滝沢行雄、坂部美雄、ほか(1987)食品添加物の変異原性試験成績(その 8)—昭和 61 年度厚生省試験研究費による一、トキシコロジーフォーラム、10: 649-654.
- 石館 基、滝沢行雄、坂部美雄、ほか(1988)食品添加物の変異原性試験成績(その 9)—昭和 62 年度厚生省試験研究費による一、トキシコロジーフォーラム、11: 663-669.
- Hayashi, M., M. Kishi, T. Sofuni, M. Ishidate (1988) Micronucleus tests in mice on 39 food additives and eight miscellaneous chemicals, Fd. Chem. Toxicol., 26, 485-500.
- 祖父尼俊雄、山本勝彦、石崎睦雄、ほか(1992)食品添加物の変異原性試験成績(その 10)—昭和 63 年度厚生省試験研究費による一、変異原性試験、1: 46-52.
- 峰谷紀之、滝沢行雄(1992)天然添加物についての小核試験、変異原性試験、1: 13-17.
- 祖父尼俊雄、宮部正樹、石崎睦雄、ほか(1993)食品添加物の変異原性試験成績(その 11)—平成元年度厚生省試験研究費による一、変異原性試験、2: 19-28.
- 祖父尼俊雄、山本勝彦、石崎睦雄、ほか(1994)食品添加物の変異原性試験成績(その 12)—平成 2 年度厚生省試験研究費による一、変異原性試験、3: 206-215.
- 藤田 博、小嶋昭江、佐々木美枝子、平賀興吾(1985) *Salmonella typhimurium* TA 97 a, TA 102 を用いた酸化防止剤およびかび防止剤の変異原性試験 東京都立衛生研究所年報, Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H., 36, 413-417.
- 藤田 博、佐々木美枝子(1986) *Salmonella typhimurium* TA 97 a, TA 102 を用いた食品添加物の変異原性試験(第 1 報) 東京都立衛生研究所年報, Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab.

- P. H., 37, 447-452.
18. 藤田 博, 佐々木美枝子(1987) *Salmonella typhimurium* TA 97, TA 102 を用いた食品添加物の変異原性試験(第2報) 東京都立衛生研究所年報, Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H., 38, 423-430.
19. 藤田 博, 中野 雅行, 佐々木美枝子(1988) *Salmonella typhimurium* TA 97, TA 102 を用いた食品添加物の変異原性試験(第3報) 東京都立衛生研究所年報, Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H., 39, 343-350.
20. 藤田 博, 佐々木美枝子(1989) *Salmonella typhimurium* TA 97, TA 102 を用いた食品添加物の変異原性試験(第4報) 東京都立衛生研究所年報, Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H., 40, 355-362.
21. 藤田 博, 佐々木美枝子(1990) *Salmonella typhimurium* TA 97, TA 102 を用いた食品添加物の変異原性試験(第5報) 東京都立衛生研究所年報, Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H., 41, 315-322.
22. 藤田 博, 佐々木美枝子(1991) *Salmonella typhimurium* TA 97, TA 102 を用いた食品添加物の変異原性試験(第6報) 東京都立衛生研究所年報, Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H., 42, 267-275.
23. 藤田 博, 角 千代, 佐々木美枝子(1992) *Salmonella typhimurium* TA 97, TA 102 を用いた食品添加物の変異原性試験(第7報) 東京都立衛生研究所年報, Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H., 43, 219-227.
24. 藤田 博, 佐々木美枝子(1993) *Salmonella typhimurium* TA 97, TA 102 を用いた食品添加物の変異原性試験(第8報) 東京都立衛生研究所年報, Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H., 44, 278-287.
25. 藤田 博, 青木直人, 佐々木美枝子(1994) *Salmonella typhimurium* TA 97, TA 102 を用いた食品添加物の変異原性試験(第9報) 東京都立衛生研究所年報, Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H., 45, 191-199.
26. 藤田 博, 青木直人, 佐々木美枝子(1995) *Salmonella typhimurium* TA 97, TA 102 を用いた食品添加物の変異原性試験(第10報) 東京都立衛生研究所年報, Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H., 46, 258-264.
27. 藤田 博, 広門雅子, 平田恵子, 植松洋子, 貞升友紀, 安田和男, 青木直人(1996) 天然食品添加物の Ames 試験における変異原性 東京都立衛生研究所年報, Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H., 47, 309-313.
28. 吉田誠二, 青木直人(1997) 天然食品添加物のチャイニーズハムスターにおける染色体異常誘発性の検討 東京都立衛生研究所年報, Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H., 48, 342-344.
29. 藤田 博, 植松洋子, 平田恵子, 広門雅子, 安田和男, 青木直人(1998) 天然食品添加物の Ames 試験における変異原性(第2報), 東京都立衛生研究所年報, Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H., 49, 291-296.
30. 吉田誠二, 青木直人(1998) 天然食品添加物のチャイニーズハムスターにおける染色体異常誘発性の検討(2), 東京都立衛生研究所年報, Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H., 49, 289-290.
31. 林 裕造(1998) 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一, pp.1-111.

## 1. 國際環境変異原学会会則

# 日本環境変異原学会会則

(平成 11 年 12 月 2 日改定)

研究に必要な知識と経験を有し, 定められた会費を納入した者とする。

第8条 学生会員は, 大学または大学院等に在籍し, 每年所定の手続きを経て, 定められた会費を納入した者とする。

第9条 賛助会員は, 本会の目的に賛同し, 本会の事業を後援するために, 定められた会費を納入した個人または法人とする。

第10条 購読会員は, 学会誌「環境変異原研究」および会報「Jems News」の購読のみを行う個人または法人とする。

第11条 名誉会員は, 変異原の研究または本会の発展に特に功績のあった者で, 理事会が推薦し, 評議員会の承認を得た者とする。また, 名誉会員は会費の納入を免除される。

第12条 本会に入会を希望するものは, 正会員 1 名の推薦書付きの所定の申込書に記入の上, 年会費の納入とともに, 本会事務所に申込むものとする。正式の入会の可否は, 理事会および評議員会において決定する。

第13条 会員は毎年年会費を納入しなければならない。次年度の年会費の額は理事会において審議し, 評議員会において定める。

第14条 会員は次の事由によって会員, 役員および評議員の資格を喪失する。

1. 退会の届け出をしたとき。
2. 会費を滞納し, かつ催促に応じないとき。
3. 死亡, または法人が解散したとき。
4. 本会の名誉及び信用を甚だしく傷つけ, あるいは本会則に違反し, 評議員会で除名の決議がなされたとき。

## 第5章 役員および評議員

第15条 本会には次の役員 (理事および監事) および評議員を置く。

1. 理事 11 名(うち, 会長 1 名, 会長指名理事 2 名)
2. 監事 2 名
3. 評議員 40 名以上

第16条 評議員のうち 30 名は正会員の選挙により, 正会員から選出する。それ以外の評議員 (推薦評議員と称す) は, 正会員 3 名以上, 評議員, または理事の推薦により, 理事会で正会員歴ならび

## 第1章 名 称

第1条 本会は日本環境変異原学会と称する。

第2条 本会の英語の名称は The Japanese Environmental Mutagen Society と称し, JEMS と略称する。

第3条 本会は事務所を〒170-0003 東京都豊島区駒込1-43-9 駒込 TS ビル 財団法人口腔保健協会内に置く。

## 第2章 目 的

第4条 本会は人間・生物・地球環境における変異原, とくに公衆の健康に重大な関係を有する変異原とこれに関連する基礎研究の推進, ならびに関連情報・技術の伝達を目的とする。

## 第3章 事 業

第5条 本会は前章の目的を達成するために, 次の事業を行う。

1. 年1回大会を開催し, 総会, ならびに学術上の研究成果の発表および知識・情報の交換を行う。
2. 学会誌「環境変異原研究」および会報「Jems News」を発行し, 会員に配布する。
3. 学会賞 (学術賞, 研究奨励賞) を設け, 環境変異原の分野ですぐれた研究を行った会員および将来の成果が期待される会員 (原則として個人) に授与する。
4. 国際環境変異原学会連合に加入し, 国際協力に必要な活動を行う。
5. Mutation Research 等の英文誌をまとめ購入配付する。
6. その他公開シンポジウムの開催, 研究会の支援など本会の目的を達成するために必要な活動を行う。

## 第4章 会 員

第6条 本会の会員は, 正会員, 学生会員, 賛助会員, 購読会員および名誉会員とする。

第7条 正会員は, 本会の目的に賛同し, 環境変異原の

- に学会活動歴を審査の上、評議員会で承認を得て選出される。
- 第17条 理事のうち9名および監事2名は選挙で選出された評議員（推薦評議員は除く）の選挙により、正会員から選出する。会長は理事（会長指名理事）2名を指名する。
- 第18条 会長は選出された理事9名の互選によって定める。
- 第19条 会長は本会を代表し、会務を掌握し、理事会、評議員会および総会を招集する。また、評議員会および総会において主たる会務について報告をしなければならない。
- 第20条 会長および理事は理事会を構成し、会務を執行する。会務執行のために理事会には、総務、会計、広報、国際協力、企画、編集、表彰人事、および書記担当理事を置く。
- 第21条 監事は本会の財産の状況、および理事の業務執行の状況を監査し、不整の廉あることを発見したときにはこれを評議員会および総会において報告する。また、監事は理事会、および評議員会に出席して意見を述べることができる。ただし、理事、各種委員会委員を兼ねることはできない。
- 第22条 評議員は評議員会を構成し、会務を審議する。
- 第23条 役員および評議員の任期は選出された年の翌年の1月1日から2年間とする。ただし、補欠または増員により選任された役員および評議員の任期は、補欠の場合は前任者の残任期間とし、増員の場合は現任者の残任期間とする。
- 第24条 役員および評議員は、再任されることができる。ただし、会長は原則として1期をもって限度とする。また、選挙で、得票数上位9名に入った前理事は5名以内まで、第25条の限度内で再任することができる。
- 第25条 理事および監事は連続2期、生涯4期をもって限度とする。ただし、会長指名理事は生涯1期しか指名されず、この1期は生涯4期に含まれる。
- 第26条 会長は必要に応じ、理事会の承認を得て、会長または担当理事を含む委員会を設けることができる。委員は理事会の承認を得て会長が委嘱する。委員の任期は会長の任期に合わせて2年とし、再任は妨げない。委員会委員長には、会長が就任するか、または会長が担当理事か適当な委員に委嘱する。
- 第27条 大会会長は理事会の推薦に基づき評議員会の承認を得て選出される。
- 第28条 大会会長は大会を主宰し、総会の議長となる。

## 第6章 会議

- 第29条 本会の会議は、総会、評議員会、および理事会とする。
- 第30条 総会は、正会員をもって構成し、大会開催時に年1回開催される。
- 第31条 総会において会則の改廃制定、予算・決算の承認、その他評議員会において審議した重要事項の承認を行う。
- 第32条 評議員会は原則として年2回開催する。評議員会（臨時評議員会を含む）は評議員総数の過半数（委任状を含む）をもって成立し、出席者の過半数の賛否をもって議決する。評議員会の議長は、会長または会長が指名した者が務める。理事は評議員会に出席できるが、議決には参加できない。
- 第33条 会長は総数の1/3以上の評議員の要請があるときは臨時評議員会を開催しなければならない。
- 第34条 理事会は理事の過半数の出席をもって成立し、出席者の過半数の賛否をもって議決する。

## 第7章 会務

- 第35条 総務担当理事の担当事項は次の通りとする。
- 会員の入退会に関すること。
  - 会則等制度、規則に関すること。
  - 総会、評議員会、および理事会に関すること。
  - 役員および評議員の選挙に関すること。
  - 事務所との連絡。
  - 研究会等関連事業全般にわたること。
  - 関係委員会に関すること。
  - その他、他の理事担当事項に入らない事項。
- 第36条 会計担当理事の担当事項は次の通りとする。
- 予算、決算に関すること。
  - 旅費の算出。
  - Mutation Research 等英文誌購入、配布に関すること。
  - 関係委員会に関すること。
- 第37条 広報担当理事の担当事項は次の通りとする。
- インターネット「ホームページ」の開設等広報に関すること。
  - 各種団体との連絡調整に関すること。
  - 学会誌の広告に関すること。
  - 名簿の作成、配布に関すること。
  - 会員数の増強に関すること。
  - 関係委員会に関すること。
- 第38条 国際協力担当理事の担当事項は次の通りとする。

- 国際環境変異原学会連合および国際会議事務局との連絡に関すること。
  - 関係委員会に関すること。
- 第39条 企画担当理事の担当事項は次の通りとする。
- 公開シンポジウムの企画、開催に関すること。
  - 本会の事業全般の企画に関すること。
  - 関係委員会に関すること。
- 第40条 編集担当理事の担当事項は次の通りとする。
- 学会誌等の企画、編集、出版および配布に関すること。
  - 著作権に関すること。
  - 関係委員会に関すること。
- 第41条 表彰人事担当理事の担当事項は次の通りとする。
- 学会賞およびMutation Research Award の公募、審査、選考、推薦に関すること。
  - 名誉会員の選考、その他表彰に関すること。
  - 関係委員会に関すること。
- 第42条 書記担当理事の担当事項は次の通りとする。
- 理事会の議事を記録し、会長および理事の承認後、公表すること。

- 評議員会および総会の議事を記録し、公表すること。
- 関係委員会に関すること。

## 第8章 会計

- 第43条 本会の会計年度は1月1日に始まり、12月31日に終わる。
- 第44条 本会の経費は、本会会費、各種補助金、寄付金、事業に伴う収入、財産から生ずる収入等をもって充てる。
- 第45条 収支の予算および決算は、評議員会および総会の承認を得なければならない。

## 付則

- 本会則は平成12年1月1日より施行する。
- 正会員、学生会員、賛助会員、および購読会員の会費は、それぞれ年額7,000円、5,000円、50,000円、および10,000円とする。ただし、Mutation Research等の英文誌の配布を希望するものは、会費の他に別途定める購読料を本会へ前納するものとする。

## 日本環境変異原学会細則

(平成11年5月27日承認)

は1期と計算しない。

## 第3章 評議員の選出

- 第6条 評議員の選舉に関する事務は選舉管理委員会が行う。
- 第7条 選舉管理委員会は選舉人（正会員）名簿および被選舉人（正会員）名簿を作成し、公表しなければならない。
- 第8条 投票は、被選舉人の中から6名、または6名以下を連記し、無記名小封筒に入れ、さらに記名した封筒で郵送することによって行う。
- 第9条 当選は得票数順に30名とし、得票同数のときは選舉管理委員による抽選により決定する。
- 第10条 当選者はやむをえない理由のある場合、選舉管理委員会宛にその旨を書面に付して提出し、辞退することができる。辞退の申し出は告示を受けてから1週間以内にしなければならない。
- 第11条 当選者が辞退した場合は次点者を繰り上げて当選とする。
- 第12条 選舉で選出された評議員の定数に欠員が生じた
- 第1章 総則
- 第1条 日本環境変異原学会細則（以下細則という）は日本環境変異原学会会則（以下会則という）の目的を遂行するために必要な細目を定める。
- 第2条 細則の改廃制定は理事会で審議・議決し、評議員会の承認を得るものとする。
- 第2章 選挙
- 第3条 会則に基づく選挙に関する事務は、会則第26条によって決められた選舉管理委員会委員（総務担当理事を含む）4名が行う。開票には当該委員3名以上と監事1名以上が立ち会う。
- 第4条 まず評議員の選挙を行い、30名を選出し、新評議員によって原則として先ず理事を選出し、次に監事を選出する。
- 第5条 会長、理事、監事には会則第24、25条により就任任期数に制限があるが、任期途中に、やむをえず辞任したり、補充就任した場合、その期間

場合には任期途中に補充はしない。ただし、推薦評議員を加えて合計 40 名未満になったときには、推薦評議員を追加することにより 40 名以上にする。

#### 第4章 理事の選出

- 第13条 理事の選挙に関する事務は選挙管理委員会が行う。  
第14条 投票は、選挙で選出された 30 名の評議員が、正会員の中から 3 名連記無記名で行う。  
第15条 当選は得票数順に 9 名とし、得票同数のときは選挙管理委員による抽選により決定する。  
第16条 当選者が辞退した場合は次点者を繰り上げて当選とする。次点者が 2 名以上のときは選挙管理委員による抽選により決定する。  
第17条 理事の定数に欠員が生じた場合には、会長の指名により補充する。

#### 第5章 監事の選出

- 第18条 監事の選挙に関する事務は選挙管理委員会が行う。  
第19条 投票は、選挙で選出された 30 名の評議員が、正会員の中から単記無記名で行う。  
第20条 当選は得票数順に 2 名とし、得票同数のときは選挙管理委員による抽選により決定する。  
第21条 当選者が辞退した場合は次点者を繰り上げて当選とする。  
第22条 監事の定数に欠員が生じた場合には、評議員による投票により補充する。

#### 第6章 会長の選出

- 第23条 会長は選出された理事 9 名の互選によって決定するが、原則として、単記無記名の投票によって過半数を得たものが就任する。過半数を得たものがいない場合には上位 2 名の決選投票を行い、最高得票者が就任する。ただし、上位 3 名以上が同数の場合は、同数得票者の投票を繰り返し、過半数得票者がいれば決定とするが、過半数を得たものがいない場合には上位 2 名の決

選投票を行う。

#### 第7章 委員会の運営

- 第24条 委員および委員長は会則第 26 条によって会長が委嘱する。委員会委員長は委員会を招集、主催する。  
第25条 委員長は委員会開催通知を委員全員、会長、総務担当理事、および会計担当理事に送付する。  
第26条 委員長は委員会開催に必要な最小の経費を会計担当理事に要求することができるが、その採否は会計担当理事により、本学会の予算の範囲内とする。

#### 第8章 表彰人事委員会の運営

- 第27条 表彰人事担当理事を除いた委員は 6 名とし、1 期毎に半数が入れ替わり、任期は 2 期 4 年とする。  
第28条 会長は本委員会に出席し、意見を述べることができるが、議決には参加できない。  
第29条 学会賞の英文名は学術賞を JEMS Award、研究奨励賞を JEMS Achievement Award とする。必要に応じ、JEMS のあとに (Japanese Environmental Mutagen Society)、また Award のあとに (西暦年号) を付すことができる。

#### 第9章 編集委員会の運営

- 第30条 編集委員会委員長は原則として編集担当理事が就任し、編集委員会を召集、主催する。  
第31条 編集委員会は委員長および 6 名の委員より構成される。委員は委員長の意見を参考にし、理事会の承認を得て会長が委嘱する。委員の任期は 1 期 2 年とし、原則として連続 2 期とする。

#### 付 則

1. 本細則は平成 12 年 1 月 1 日より施行する。ただし、第 3—6 章は新会則に基づき平成 11 年 6 月 1 日より施行する。

## 日本環境変異原学会

### 役員名簿(平成 12 年度)

会長 理事	木苗直秀
総務担当	能美健彦
会計担当	下位香代子
広報担当	若林敬二
国際協力担当	山添康哉
企画担当	早津彦哉
編集担当	長尾美奈子
表彰人事担当	大西克成
書記担当	林西真也

監事	菊川清見
	常磐寛

企画委員	大西克成(委員長)
	長尾美奈子
	島田弘康
	瀧谷徹
	望月正隆(平成 12 年度まで)
	布柴達男(平成 13 年度から)

編集委員	林真(委員長)
	荒木明宏
	森田健
	鈴木勇司
	矢嶋信浩
	山田雅巳
	赤沼三恵

表彰人事委員	鎌滝哲也(委員長)
	太田敏博
	葛西宏
	早津彦哉
	長尾美奈子
	祖父尼俊雄
	清水英佑

広報委員	山添康(委員長)
	荒木明宏(委員長)
	能美健彦
	下位香代子
	降旗千恵

### 評議員名簿(平成 12~13 年度)

赤沼三恵	荒木明宏	宇野芳文
太田敏博	大塚雅也	大西克祐
葛西宏	鎌滝哲也	大川正祐
菊池基	木苗直秀	後藤純雄
佐々木有	瀧谷徹	島田弘康
清水英佑	下位香代子	須藤鎮世
祖父尼俊雄	高橋和彦	田中憲穂
出川雅邦	寺尾良好志	長尾美奈子
中嶋圓	中村和雄	糠谷東雄
布柴達男	根岸和雄	能美健彦
林真	吉原和雄	平山晃久
藤川和男	早津彦哉	森秀樹
宮川誠	降旗千恵	森矢信浩
森幸雄	望月正隆	若田明裕
山添康	森田健	(五十音順)
若林敬二		

## 日本環境変異原学会入会申込書

年 月 日

### 入会手続きのご案内

入会申込書に必要事項をご記入の上、年会費とともに現金書留にて事務局宛てお送り下さい。

年会費 7,000円(正会員)

5,000円(学生会員)

事業年度 (1月1日~12月31日)

#### (お申し込みについて)

1. 入会申込書に必要事項を楷書でご記入の上、年会費とともに現金書留にて事務局までお送り下さい。
2. 正会員は評議員の推薦を必要とします。推薦者がおられない場合は、事務局にご相談ください。
3. 学生会員は指導教官の推薦と在学証明書を必要とします。翌年の3月31日まで会員として登録されます。
4. 年度末に入会申込みをされる場合で、翌年度から入会希望の場合は、その旨お知らせください。
5. 学会誌は入会後に発行した号からお送りしますが、当該年度で入会前の学会誌をご希望の場合は事務局までご連絡ください。それ以前のバックナンバーは有料になります。
6. 住所変更(学会誌送付先の変更)の際は、会員番号(学会誌等送付する際、宛名ラベルに印刷されています)、氏名、新・旧住所をご記入の上、事務局宛、書面にてご連絡ください。

日本環境変異原学会  
〒170-0003 東京都豊島区駒込1-43-9  
駒込TSビル3F 財団法人 口腔保健協会内  
電話 03-3947-8891(代) FAX 03-3947-8341

#### 日本環境変異原学会長 殿

貴学会に入会いたしたく評議員の署名を添えて申し込みます。

フリガナ:		
氏名:	(印)	
Name (ローマ字つづり)		
生年月日(性別)	年 月 日	(男・女)
所属機関名:		
住所:	〒	
TEL:	FAX:	
電子メール:		
Affiliation		
Address		
Belong		
自宅住所:		
電話:		
Home address		
学会誌送付先:	(1)所属機関	(2)自宅
学年:	年取得	
研究領域(複数可)		
加入学会名:		

\_\_\_\_\_の本学会への入会を推薦致します。

日本環境変異原学会評議員

(署名)  
日付

印

入会申込書の送付先: 〒170-0003 東京都豊島区駒込1-43-9 駒込TSビル  
(財)口腔保健協会内 日本環境変異原学会事務局  
Tel. 03-3947-8891 Fax 03-3947-8341

日本環境変異原学会 学生会員申込書  
[1年間(翌年の3月31日まで)のみ有効です]

年 月 日

日本環境変異原学会長 殿

貴学会に学生会員として入会いたしたく貴学会員である指導教官の署名および在学証明書  
(裏面に添付)を添えて申し込みます。

フリガナ:		
氏 名:	印	
Name (ローマ字つづり)		
生年月日 (性別)	19 年 月 日	(男・女)
校名/学部:		
住 所:	〒	
TEL:	FAX:	
電子メール:		
Affiliation		
Address		
Belong		
自宅住所:		
電 話:		
Home address		
学会誌送付先:	①大 学	②自 宅
研究領域 (複数可)		
指導教官名:		
連絡先:		

\_\_\_\_\_の本学会への学生会員としての入会を推薦致します。

指導教官

(署名)  
日付

印

入会申込書の送付先: 〒170-0003 東京都豊島区駒込1-43-9 駒込TSビル  
(駒口腔保健協会内) 日本環境変異原学会事務局  
Tel. 03-3947-8891 Fax 03-3947-8341

日本環境変異原学会  
The Japanese Society for Environmental Mutagenesis and Toxicology

環境変異原研究 投稿規定

4. 論文原稿の送付

論文原稿は正1部コピー3部の計4部を、下記に(簡易)書留便で送付すること。

〒170-0003

東京都豊島区駒込1-43-9 駒込TSビル

インテルナ出版

日本環境変異原学会誌編集係

Tel. 03-3944-2591

Fax. 03-3947-8073

5. 著作権

本誌に掲載された記事、論文などの著作権は日本環境変異原学会に帰属するものとする。従って、本会が必要と認めた場合は転載し、また外部から引用の申請があった場合には、編集委員会において検討の上許可があることがある。ただし、著者自身が自分の記事、論文など一部の複製、翻訳などの形で利用することを妨げるものではない。しかし、著者自身であっても、全文を複製の形で他の著作物に利用する場合には、事前に文書にて申し出を行い、許諾を求めなければならない。

6. 校正

著者校正は原則として原稿に対する誤植の訂正に限る。原稿にない加筆・変更はしないこと。

7. 著者負担金

- 1) 投稿料は無料とする。ただし規定の頁数を超ることが明らかな場合、頁数の削減を求めることがある。
- 2) カラー印刷等の特殊印刷のため附加的に発生する費用は著者負担とする。
- 3) 別刷りは招待寄稿の場合も含め、すべて著者負担とする。別刷り希望者は著者校正時に添付する申し込み書に50部単位で申し込むこと。

1. 掲載論文

環境変異原研究に関する未発表の「総説」、「一般論文」、「短報」、および「特別企画(受賞講演)」、「論説」、「資料・情報」などを掲載する。なお、投稿論文の採否は編集委員会の審査により決定する。

「総説」は、一つのテーマに関連する多くの研究論文の総括、評価、解説などである。原則として編集委員会より寄稿を依頼する。

「一般論文」は、変異原に関する独創的研究の原著論文で、それ自身独立して価値ある結論あるいは事実を含むものとする。陰性データも受付ける。

「短報」は、新しい技術の紹介や価値あるデータを含む短い報告とする。陰性データも受付ける。

「論説」は、一つのテーマに関連する多くの研究論文の総括、評価、解説などで、会員からの投稿によるものとする。

「資料・情報」は、環境変異原に関する調査の結果などをまとめたもの、および公開シンポジウム、研究会の要旨などとする。

(Letter to Editorも受付けます。)

2. 投稿資格

共著者のうちの1人は日本環境変異原学会会員でなければならない。ただし、招待寄稿の場合にはこの限りではない。

3. 論文原稿の書き方

論文原稿の用語は日本語または英語とし、最新の執筆規定に従い簡潔にわかりやすく書く。総説、一般論文、論説は、写真・図表を含めて刷り上がり8頁以内。短報は4頁以内とする。頁数の超過分や多額の経費を要する図表の実費は著者負担とする。

# 日本環境変異原学会の概要

The Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS)

## 環境変異原研究 執筆規定

1. 用語は日本語または英語とする。
2. 原稿は原則としてワープロを用い、左横書きで作成する。  
日本文の原稿：  
原稿はA4判用紙に1行約40字、1頁30~31行で印字する(刷り上がりの約1/2頁に相当する)。ただし、要約は英文(300語以内)とする。また、別に英文の題名、著者名(フルネーム)、所属機関名ならびに所在地を付ける。
3. 論文の記述は、第1頁は表題、著者名、所属および所在地、第2頁は英文の要約(Summary)およびキーワード(英文5語以内、固有名詞や遺伝子名などで大文字の使用が必要な場合を除き、原則として小文字表記とする)、第3頁以下、緒言(Introduction)、実験材料および方法(Materials and Methods)、結果(Results)、考察(Discussion)または結果および考察、結語(Conclusion)、謝辞(Acknowledgments)、参考文献(References)、表、図の説明および図の順序とする。ただし、総説の記述は、第3頁以下、緒言、1.……、2.……、結語、謝辞、参考文献、表、図の説明および図の順序とする。なお図と表の説明文はすべて英文とする。
4. 学名、遺伝子記号などはイタリックとし、その他まぎらわしい記号については原稿に適宜指示を与える。
5. 化学物質名は原則として英語とし、一般名を用いる。また、化学物質のCAS登録番号を記載する。文中に用いる英語の単語あるいは句は固有名詞を除いて小文字で書きはじめる(文頭の場合は大文字)。
6. 数字は算用数字を用い、単位は英文の慣用による省略記号を用いる。
7. 略字を使用するときは、論文中にはじめて使用するときに完全な語とその略字を括弧内に示す。
8. 句読点はカンマ(,)およびピリオド(.)とする。
9. 表、図(写真)は本文と別にし、それらの挿入箇所を本文の右余白に明示する。グラフ、写真、線画等はすべて図とし、一連の番号Fig.1,2…を付し、原則として英文の説明文を別紙に添える。
10. 図と写真は原図またはキャビネ大の光沢写真版とし、裏面にFig.1,2…および上下を鉛筆書きし、A4

判の台紙に一枚づつ軽く糊付けする。台紙の下部にFig.(一連番号)を付す。

11. 表は上部に一連の番号Table 1,2…と原則として英文の説明を記入すること(文頭のみ大文字)。表には縦罫を使用せず、また各語句の始めは原則として大文字とする。脚注を要するときに表示の語句の右肩にa, b, c…を付記し、表の下欄外にそれぞれの説明を記す。
12. 本文中の文献引用は著者名および年号をもってする。
13. 参考文献は筆頭著者名のアルファベット順に配列し、雑誌の省略名はChemical Abstractsの記載方法に従う。記載順序は著者氏名、年号、題名、雑誌名、巻、頁(單行本の一部引用の場合は著者氏名、年号、題名、編者名、書名、発行所、発行地、頁)の順とする。単行本そのものを引用する場合は、編者名あるいは著者名、年号、書名、発行所、発行地の順とする。文献の記載方法は下記の例に従う。

Ames, B. N., J. MaCann and E. Yamasaki (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test, *Mutat. Res.*, 31, 347-364.

Ashby, J., F. J. de Serres, M. Draper, M. Ishidate Jr., B. H. Margolin, B. Matter and M. D. Shelby (1985) Overview and conclusion of the IPCS collaborative study on in vitro assay systems, In : J. Ashby, F. J. de Serres et al. (Eds), *Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens*, Elsevier, Amsterdam, pp. 117-174.

Friedberg, E. C., G. C. Walker and W. Siede (1995) *DNA Repair and Mutagenesis*, ASM Press, Washington, D. C.

藤川和男, 梁 治子, 近藤宗平(1984)ハエの翅毛スポットテスト—近ごろ注目されている短期試験法, 環境変異原研究, 6: 107-113.

佐々木正夫(1983)環境変異原と染色体異常, 外村晶(編), 染色体異常, 朝倉書店, 東京, pp. 107-113.

松影昭夫(編)(1996)DNA複製, 修復と発癌, 羊土社, 東京。

(改訂 2000年3月)

所在地 〒170-0003 東京都豊島区駒込1-43-9駒込TSビル(財)口腔保健協会内日本環境変異原学会

TEL 03 (3947) 8891 FAX 03 (3947) 8341

会長 木苗直秀(静岡県立大学食品栄養科学部教授)

設立 昭和47年8月21日

創設経緯・沿革 昭和47年8月21日に下記の目的に賛同する研究者が集り研究会を組織した。その後会員数が増大し、昭和58年1月1日より学会に改組された。昭和56年には国際環境変異原大会の開催、その運営に当たった。なお、2001年10月に第8回国際環境変異原学会が静岡で開催予定で現在その準備が進められている。

目的 人間・生物・地球環境における突然変異原、とくに公衆の健康に重大な関係を有する変異原と、これに関連する基礎研究の推進ならびに関連情報技術の伝達を目的とする。

会員数 正会員912 学生会員58 名誉会員7 賛助30団体

集会 年次大会(1回/年) シンポジウム、ワークショップ(1回/年)

刊行物 ①環境変異原研究 Environmental Mutagen Research (3回/年, 350頁/年, 1000部/回) ②JEMS News (3回/年, 50頁, 1000部/回)

顕彰事業 ①日本環境変異原学会学術賞 創設 平成5年11月25日(1件/年) ②日本環境変異原学会研究奨励賞 創設 平成5年11月25日(2件程度/年)

国際学術団体への加入 国際変異原学会連合 Int. Assoc. of Environmental Mutagen Soc.(IAEMS) オランダ(正会員 分担金450ドル 1972年加入)

関係国際学術団体 国際環境変異原学会・癌原防御委員会 Int. Commission for Protection Against Environmental Mutagen and Carcinogen (ICPEMC) オランダ

国際会議の国内開催 第3回国際環境変異原学会(東京, 三島, 1981年), 第8回国際環境変異原学会(静岡, 2001年予定)

国際会議への派遣 第6回国際環境変異原学会 6th International Conference on Environmental Mutagen (1993年2月オーストラリア12名)

国際人物交流等 <外国人科学者の招へい等> ①第22回大会の特別講演者、シンポジストとして平成5年11月 アメリカ3人、イギリス1人、カナダ1人 ②環境変異原学会・放射線影響学会・合同シンポジウムの特別講演者として 平成6年 特別11月アメリカ2人 ③第23回大会の特別講演者として 平成6年11月 アメリカ1人 ④環境変異原学会・放射線影響学会・合同シンポジウムの特別講演者として 平成7年5月 アメリカ2人 ⑤第24回大会の特別講演者として 平成7年11月 フィンランド1人、イギリス1人 ⑥第25回大会の特別講演者として 平成8年11月 オランダ1人 ⑦第26回大会のシンポジストとして 平成9年12月 ドイツ1人、アメリカ2人 ⑧第27回大会のパネルディスカッション、シンポジストとして 平成10年11月 カナダ1人、ドイツ1人、イギリス1人、フランス1人、アメリカ2人 ⑨第28回大会のシンポジストとして 平成11年12月 アメリカ2人

国際文献交流等 <定期刊行物の海外送付>環境変異原研究(Environmental Mutagen Research),

JEMS News <海外学術誌の受入>4種4カ国

# KIKKOMAN S-9

このS-9は、キッコーマン研究本部で調製されたものです。

## 変異原性試験用凍結S-9

**S-9調製法** 家田貿易のS-9は7週令のSDラットの雄に誘導剤としてフェノバルビタール及び5、6-ベンゾフラボンを腹腔内投与した肝臓から調整したものを標準としていますが、その他の動物種及び誘導剤についても御相談に応じております。

**保存** S-9は活性の高い酵素系となっておりますので、-80°Cで保存して下さい。まれに解凍後分離することがありますか活性には異常ありませんので、よく攪拌して御使用下さい。

●包装単位：1.5ml × 12本詰 ●特注品、S-9に関して詰容量は4.5mlまでお受けいたします。

### ●活性データ

ロット毎に下記の生化学的活性データを添付致します。

分 画	測 定 デ ー タ
S-9 (9,000×g分画)	タンパク質含量 チトフロームP-450含量 DMN脱メチル酵素活性 アニリン水酸化酵素活性 ベンゾ(a)ピレン水酸化酵素活性
ミクロソーム (105,000×g分画)	タンパク質含量 チトフロームP-450含量

薬 物	菌 株*
ベンゾ(a)ピレン	TA-100, TA-98, TA-1537
2-アミノアントラセン	TA-100, TA-98, TA-1537
9,10-ジメチルアントラセン	TA-100, TA-98, TA-1537
自然発生突然変異株数	TA-100, TA-98, TA-1537

\* Salmonella typhimurium

## エームス試験用凍結S-9MIX

**特長** ①エームス試験がより手軽になりました。  
②S-9にコファクターミックスを加え無菌的に調整しました。  
③解凍後、直ちにエームス試験にご使用いただけます。

④S-9が1mlとコファクターミックスが9ml入っており、20プレート分の試験が可能です。

●包装単位：10ml × 8本、5ml × 4本

Salmonella typhimurium TA-100,  
Benzo(a)pyrene 5µg/plate



## 染色体異常試験用凍結S-9MIX

**特長** ①染色体異常試験がより簡単になりました。  
②S-9にコファクターミックスを加え無菌的に調整しました。  
③解凍後、直ちに染色体異常試験にご使用いただけます。  
④S-9が1.05mlとコファクターミックスが2.45ml入っており、7プレート分の試験が可能です。

●包装単位：3.5ml × 3本

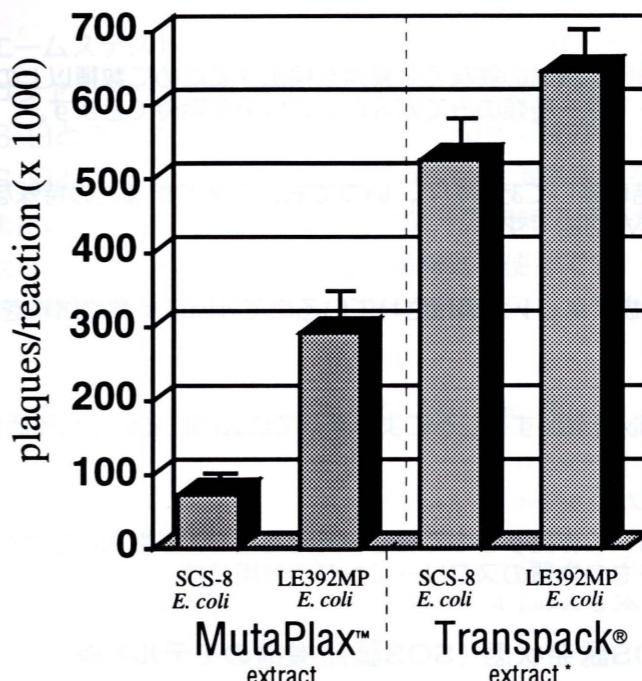
カタログNo.	品 名	包 装	価 格
S-9	変異原性試験用凍結S-9	1.5ml × 12本	¥36,000
S-9 MIX	エームス試験用凍結S-9 MIX	10ml × 8本	¥43,200
S-9 MIXTS	染色体異常試験用凍結S-9 MIX	3.5ml × 3本	¥12,000

 **家田貿易株式会社**

東京：〒113-0033 東京都文京区本郷3-14-16 EKビル  
TEL.03(3816)2861 FAX.03(3814)5347  
大阪：〒564-0044 大阪府吹田市南金田1-14-5  
TEL.06(6338)1518 FAX.06(6338)5626

# Make No Mistake!

**Transpack® λ Packaging Extract\***  
**outperforms MutaPlax™ extract**  
**5 to 1 for transgene recovery\***



**Legend**  
Method - manufacturers recommended packaging protocol  
DNA Source - Big Blue® homozygous C57BL/6 mouse liver with 80 copies of transgene per cell  
DNA Amount - 4 µg per reaction

Now available to researchers using Muta™ Mouse  
with proof of Muta Mouse purchase.

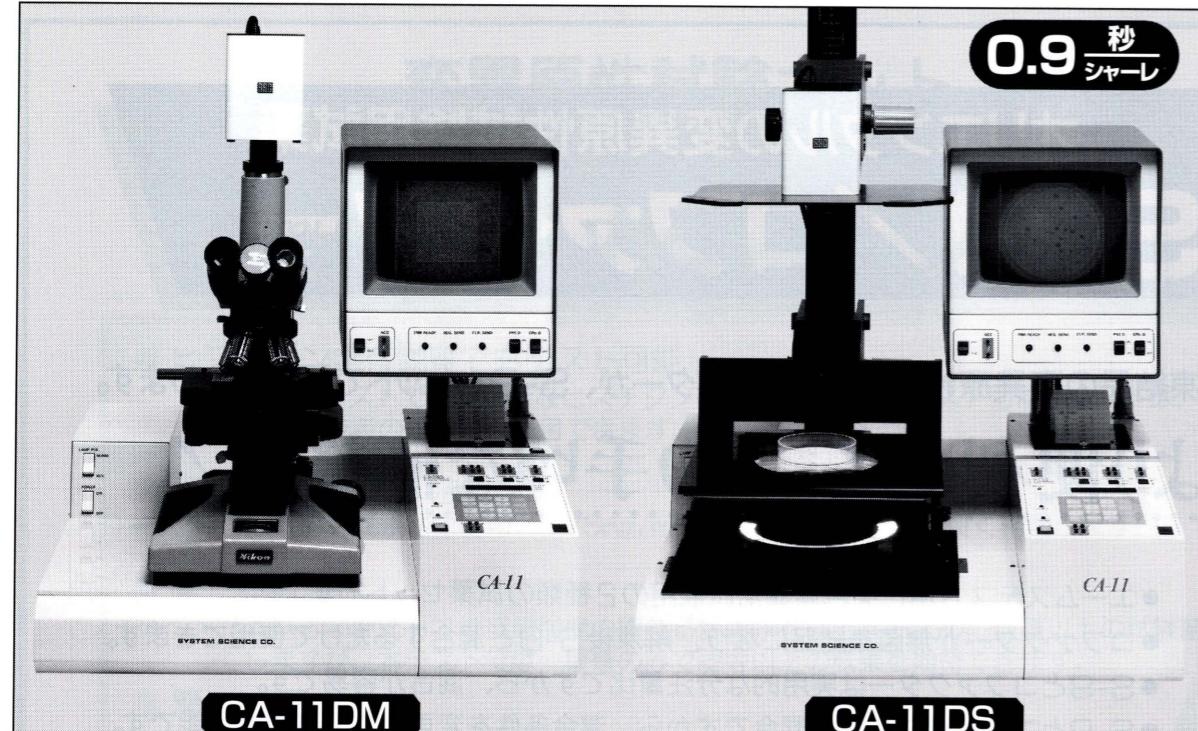
 **STRATAGENE®**  
pioneering the future of in vivo mutation research

お問い合わせ先：

**KASHO 加商株式会社**  
ライフサイエンスグループ

〒103-0024 東京都中央区日本橋2丁目14番9号  
電話 03-3276-7676 FAX.03-3276-7626  
E-mail : Tsumoru\_Miyano@kasho.co.jp

\* U.S. Patent No. 5,188,957  
◆ Using SCS-8 E.coli host cells  
Big Blue® and Transpack® are registered trademarks of Stratagene.  
Muta™ Mouse is a trademark of HRP Inc.  
MutaPlax™ is a trademark of Epicentre Technologies Corp.



CA-11DM

CA-11DS

高速画像積算機能を持つた **D** シリーズ

阻止円計測

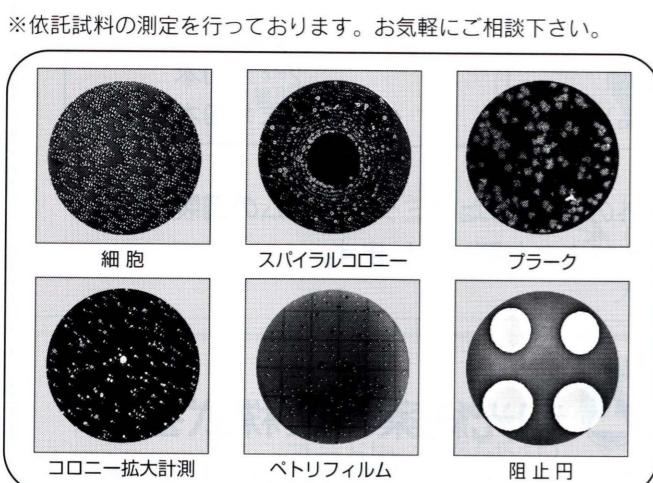
コロニー分離計測

自動エリア  
スパイラルコロニー

検出感度強化  
画像積算機能

試料の均一化  
シェーディング補正

コロニー  
アナライザ  
CA-11DSF



製造発売元

**SSC** システムサイエンス株式会社

本社・工場／〒197-0011 東京都福生市福生1253-16  
TEL 042(552)5956 (代表)

# 変異原性試験画像解析支援システム

各種変異原性試験をサポートする画像解析システムをご用意しております。

## SCG画像解析システム

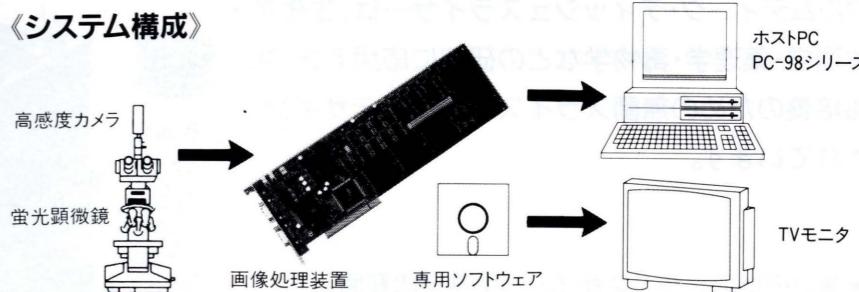
SCG試験に必要なデータを計測します。

高感度カメラの使用及び画像強調処理により細胞の不鮮明な箇所も計測が可能です。

### 《計測内容》

- Tail Length
- Shape Factor
- Nuclear Diameter
- Tail Intensity
- DNA Migration
- Ratio
- Tail Moment

### 《システム構成》



## UDS画像解析システム

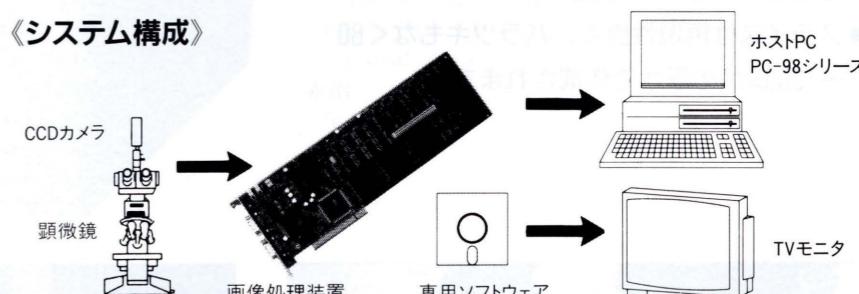
UDS試験に必要なデータを計測します。

フィルタ処理により画像強調を行ない、核と細胞質の各エリア内グレイン数及びNETグレイン数の計測が行なえます。

### 《計測内容》

- 核グレイン数(1エリア)
- 細胞質グレイン数(3エリア)
- NETグレイン数

### 《システム構成》



## 小核画像解析システム

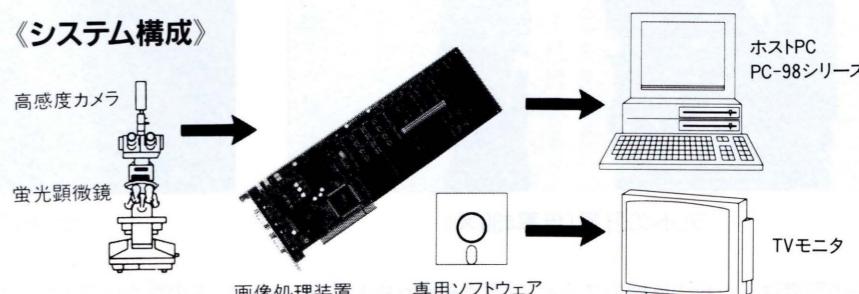
小核試験に必要なデータを計測します。

フルカラー画像解析装置に取込まれた画面内の核を抽出し、小核、主核のカウントやサイズを解析できます。

### 《計測内容》

- 小核カウント
- 小核サイズ
- 主核カウント
- 主核サイズ

### 《システム構成》



特許出願中

実績が保証します!

\* 常設デモルームをご用意しておりますので、  
お気軽に立ち寄り下さい。

開発製造元  
(株)日本システムハウス協会会員)

**ImageTech®**

 ケイオ一電子工業株式会社

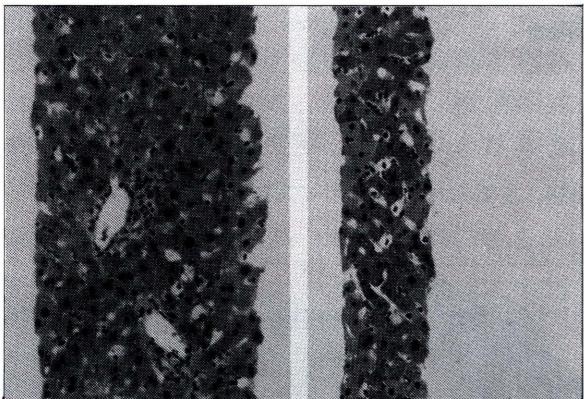
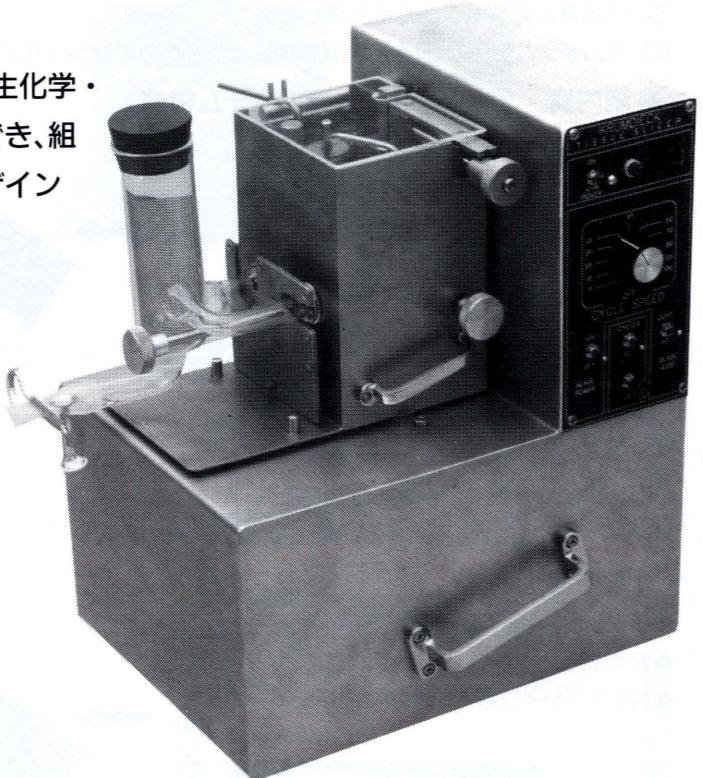
〒567-0828 大阪府茨木市舟木町5番12号 TEL.0726-34-1022  
FAX.0726-34-1018

# THE KRUMDIECK TISSUE SLICER

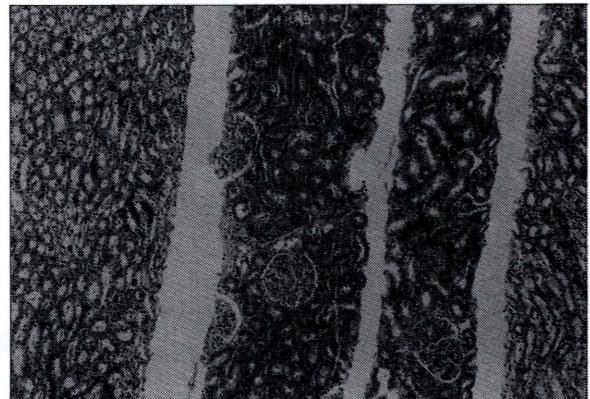
生きた組織の無菌スライスができます。

クルムディーク・ティッシュスライサーは、生化学・生理学・薬理学・毒物学などの研究に応用でき、組織培養のための無菌スライス作成用にデザインされています。

- 薄い円形のスライスが、5~15mm直径の範囲で作成できます。
- ボタンを押すだけで、2~3秒に一枚の割合で(最高スピードの場合)作成でき、初心者でも取扱いは簡単です。
- スライスは再現性良く、バラツキもなく60~1000μmの厚さで作成されます。



ラットの肝臓(倍率430×)



ラットの腎臓(倍率100×)

右の写真はラットの肝臓のスライス(厚さ60μmおよび135μm)で、左の写真はラットの腎臓のスライス(135~200μm)です。どちらも切片面の平行性と美しさ(ダメージがない)に注目して下さい。



販売元  
**ショーシンEM株式会社**

〒444-0241 愛知県岡崎市赤浜町蔵西1番地14(ショーシンビル)  
TEL. (0564) 54-1231番(代表)  
FAX. (0564) 54-3207番

## 編集後記

本号には、一般投稿論文4編と資料・情報1編を掲載することができました。皆様の御協力に感謝いたします。編集業務も年々整備され、充実しております。本号より、投稿規定及び執筆規定が一部改訂されましたので、御注意下さい。

学会の発展には、本誌の充実が不可欠です。本誌のさらなる発展のため、ふるって御投稿ください。

担当編集委員 荒木 明宏

## 編集委員

林 真 (2000-)

〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1  
国立医薬品食品衛生研究所  
安全性生物試験研究センター変異遺伝部  
Tel: 03-3700-9872 Fax: 03-3700-2348  
E-mail: hayashi@nihs.go.jp

荒木 明宏 (1997-)

〒257-0015 神奈川県秦野市平沢字大芝原2445  
日本バイオアッセイ研究センター・変異原性試験部  
Tel: 0463-82-3911 Fax: 0463-82-3860  
E-mail: akiaraki@da2.so-net.ne.jp

鈴木 勇司 (1998-)

〒105-8461 東京都港区西新橋3-25-8  
東京慈恵会医科大学・環境保健医学教室  
Tel: 03-3433-1111 Fax: 03-5472-7526  
E-mail: suzuki@jikei.ac.jp

森田 健 (1998-)

〒300-4247 茨城県つくば市和台43  
グラクソ・ウェルカム株式会社 築波研究所  
Tel: 0298-64-5532 Fax: 0298-64-8558  
E-mail: tm28417@gloxowellcome.co.uk

矢嶋 信浩 (1999-)

〒329-0512 栃木県下都賀郡石橋町下石橋519  
雪印乳業株式会社・生物科学研究所  
Tel: 0285-52-1322 Fax: 0285-53-1314  
E-mail: n-yajima@snowbrand.co.jp

山田 雅巳 (1999-)

〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1  
国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部  
Tel: 03-3700-1141(ext 282)  
Fax: 03-3707-6950  
E-mail: myamada@nihs.go.jp

赤沼 三恵 (2000-)

〒187-0011 東京都小平市鈴木町2-772  
財留農薬研究所試験企画部  
Tel: 042-382-2146 Fax: 042-383-7640  
E-mail: ietm@linet.ne.jp

## 評議員

赤沼 三恵	荒木 明宏	宇野 芳文	太田 敏博	大塚 雅則
大西 克成	葛西 宏	鎌瀧 哲也	川西 正祐	菊池 康基
木苗 直秀	後藤 純雄	佐々木 有	濫谷 徹	島田 弘康
清水 英佑	下位香代子	須藤 鎮世	祖父尼俊雄	高橋 和彦
田中 憲穂	出川 雅邦	寺尾 良保	長尾美奈子	中嶋 圓
中村 好志	糠谷 東雄	布柴 達男	根岸 和雄	能美 健彦
林 真	早津 彦哉	平山 晃久	藤川 和男	降旗 千恵
本間 正充	宮川 誠	望月 正隆	森 秀樹	森 幸雄
森田 健	矢嶋 信浩	山添 康	吉川 邦衛	若田 明裕
若林 敏二	(五十音順)			

環境変異原研究 第22巻 第1号 2000年

平成12年4月21日 印刷  
平成12年4月28日 発行

発行者 日本環境変異原学会  
発行責任者 木苗直秀  
製作 インテルナ出版

## 目 次

### 一般論文

- サルモネラ TA 102 および TA 104 株を用いた活性酸素産生系の  
変異原性に及ぼす抗酸化剤の影響 ..... 今枝厚宗, 青木朋訓, 近藤 靖, 堀 正樹 1

- Development of a micronucleus assay in the root tips of  
*Allium cepa* seedlings as a detector of chemical  
clastogens ..... Elma A. Alcaide, Aki Tanaka, Hideo Ikeda and Kazuo Fujikawa 9

- A micronucleus study of 2-methyl aziridine (propyleneimine)  
in rat peripheral blood and bone marrow by 4-week repeated  
exposure ..... Tomonori Aoki, Norihide Asano, Atsumune Imaeda and Yasushi Kondo 15

- 塩素処理した水試料中に含まれる変異原物質を捕捉するための  
前処理方法の検討 ..... 高橋美津子, 斎藤治子, 磯田信一 19

### 資料・情報

- 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）  
..... 林 真, 松井道子, 石井健二, 川崎通昭 27

### 付 記

- |                |         |      |
|----------------|---------|------|
| 日本環境変異原学会 会則   | 環境変異原研究 | 投稿規定 |
| 細則             |         | 執筆規定 |
| 平成 12 年度 役員名簿  |         |      |
| 12～13 年度 評議員名簿 |         |      |
| 入会申込書          |         |      |
| 学生会員申込書        |         |      |