

Salmonella typhimurium TA97, TA102を用いた 食品添加物の変異原性試験(第10報*)

藤 田 博**, 青 木 直 人**, 佐々木 美枝子**

Mutagenicity Test of Food Additives with *Salmonella typhimurium* TA97 and TA102 (X*)

HIROSHI FUJITA**, NAOTO AOKI** and MIEKO SASAKI**

The mutagenicity of 24 food additives, including 4 flavoring agents, 4 dietary supplements, 4 emulsifiers and 12 others were examined in *Salmonella typhimurium* TA97 and TA102. The mutation test was carried out by the preincubation procedure described by Ames *et al.*¹⁻³⁾. The test chemicals were preincubated with S9mix or phosphate buffer (pH7.4) for 20 min. Weak mutagenic activity in cholecalciferol was detected with TA97 in the absence of S9mix. Sodium *o*-phenylphenate showed weak mutagenicity in TA102 with S9mix. The other 22 chemicals showed no mutagenicity in TA97 or TA102.

Keywords : 変異原性 mutagenicity, 食品添加物 food additives, サルモネラ *Salmonella typhimurium* TA97, *Salmonella typhimurium* TA102

化学物質の遺伝毒性を明らかにするために種々の変異原性試験が実施されている。その中でもAmesら¹⁻³⁾が開発した、いわゆる Ames 試験は最も多用されている試験系であり、多くの変異原の検出に貢献してきた。Amesらは、様々な変異原を検出するためには *Salmonella typhimurium* TA97, TA98, TA100及びTA102の4株を試験に用いるよう提案している³⁾。

食品添加物の変異原性についての Ames 試験による検討は、主に TA98 及び TA100 が用いられ、TA97 及び TA102 を用いた試験報告は少ない。そこで Ames らの提案に従い TA97 及び TA102 を用いた試験を実施する必要があると考えられた。試験開始に当たり TA98 及び TA100 における試験結果の報告がある食品添加物も含めた全食品添加物について行うことにした。既報⁴⁻¹³⁾において277種の試験結果を報告してきたが、それらのうち21種の食品添加物に TA97 または TA102 に対する変異原性が見いだされた。

本報告では、着香料(4種)、強化剤(4種)、乳化剤(4種)、食品製造用剤(3種)、結着剤(2種)、保存料

(1種)、着色料(1種)、調味料(1種)、チューインガム基礎剤(1種)、離型剤(1種)、殺菌漂白剤(1種)、防虫剤(1種)の計24種の食品添加物について行った追加試験の結果について述べる。

実験材料及び方法

試料 以下の試料化合物は、特に表示されたもの以外は全て和光純薬製である。

着香料：ギ酸シトロネリル(CAS No. 105-85-1, Lot No. TWE3179), ヒドロキシシトロネラル(CAS No. 107-75-5, Lot No. TWE3189), イオノン(CAS No. 8013-90-9, Lot No. KCF4497), dl-メントール(CAS No. 15356-70-4, Aldrich)。

強化剤：ピロリン酸二水素カルシウム(CAS No. 14866-19-4, Lot No. TWM6168), コレカルシフェロール(CAS No. 67-97-0, Lot No. KCL7925), エルゴカルシフェロール(CAS No. 50-14-6, Lot No. CAH1829), ビタミンA(CAS No. 68-26-8, Aldrich Lot No. 14H5015)。

乳化剤：レシチン(CAS No. 8002-43-5, Lot No.

*第9報, 東京衛研年報, 45, 191-199, 1994.

**東京都立衛生研究所毒性部病理研究科 169 東京都新宿区百人町3-24-1

**The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan

CAL1473), プロピレングリコール脂肪酸エステル (CAS No. 1323-39-3, 東京化成 Lot No. GA01), ソルビタン脂肪酸エステル (CAS No. 1338-41-6, Lot No. KCG5555), ショ糖脂肪酸エステル (東京化成 Lot No. GC01).

食品製造用剤: 活性炭 (CAS No. 7440-44-0, Lot No. CAK1692), カオリン (CAS No. 1332-58-7, Lot No. CAJ2878), 二酸化ケイ素 (Lot No. CAR2838).

結着剤: ピロリン酸二水素二ナトリウム (CAS No. 7758-16-9, ナカライテスク Lot No. M4K3247), ポリリン酸カリウム (CAS No. 68956-75-2, ナカライテスク Lot No. M4B6188).

保存料: オルトフェニルフェノールナトリウム (CAS No. 132-27-4, 東京化成 Lot No. GA01).

着色料: 食用赤色40号 (CAS No. 25956-17-6, Lot No. KCF5928).

調味料: L-アルギニンL-グルタミン酸塩 (ナカライテスク Lot No. M4A9599).

チューインガム基礎剤: ポリブテン (CAS No. 9003-29-6, Aldrich Lot No. 03005TY).

離型剤: 流動パラフィン (CAS No. 8012-95-1, Lot No. AWE7011).

殺菌漂白剤: 高度さらし粉 (CAS No. 7778-54-3, 関東化学 Lot No. 608E1655).

防虫剤: イマザリル (CAS No. 35554-44-0, Lot No. YLK9134).

陽性対照物質: 2-アミノアントラセン, 9-アミノアクリジン, マイトマイシン C (協和発酵).

試料は, 溶解性によって蒸留水, エタノール, 50%エタノールまたはジメチルスルホキシドに溶解した. ただし, 活性炭, カオリン及び二酸化ケイ素は, 何れの溶媒にも溶けなかったことから蒸留水に懸濁した状態で試験を行った.

菌株 *Salmonella typhimurium* TA97¹⁴⁾ 及び TA102^{15,16)} を普通ブイヨン (Nutrient broth No. 2, OXOID) で一夜培養し用いた. これらの株は, B. N. Ames教授 (カリフォルニア大) より分与を受けたものである.

変異原性試験 Ames 法の変法であるプレインキューベーション法^{3,17)} により行った. 代謝活性化には, アロクロール1254 (ジーエルサイエンス) により薬物代謝酵素を誘導した雄性CD系ラット (Crj: CD日本チャールス・リバー) の肝臓ホモジネートから調製したS9³⁾ を用いた. S9mix^{3,17)} 中のS9量は, 10% (50 μ l/プレート) とした.

試料溶液0.1mlを小試験管に入れ, 代謝活性化する場

合にはS9mix0.5ml, 代謝活性化しない場合にはリン酸緩衝液 (pH7.4) 0.5mlを加え, 更に一夜培養した菌液を0.1ml加え, 37℃で20分間の前培養を行った. これに45℃に保温した軟寒天³⁾ 2mlを加え混合後, 最少グルコース寒天培地³⁾ に重層した. 37℃で2日間培養後, プレートに生じた復帰コロニーを自動コロニーカウンターで計数した.

各濃度にプレート3枚を用い, 結果は, 平均値で示した. 統計解析は, Kruskal-Wallis検定¹⁸⁾ を行い, 更にMooreら¹⁹⁾ のプログラムによる回帰分析を行った. 両検定において有意な場合変異原性陽性とした.

結果及び考察

24種の食品添加物のTA97及びTA102を用いた試験の結果を用途別に分類し, Table 1に示した. 10mg/プレートを最高濃度とした予備試験を行い, 試料が溶解している濃度または試験菌株の増殖が認められる濃度を調べ, 本試験の最高濃度とし, 5濃度段階を設定した. ただし, 活性炭, カオリン及び二酸化ケイ素は, 全く溶解しないため, 懸濁液として10mg/プレートからの試験を行った.

コレカルシフェロールのTA97 S9無添加の場合に復帰コロニーが増加し, 1mg/プレートでコントロールの1.8倍であった. コレカルシフェロールnmole当たりでは0.045個の復帰コロニーが誘発された. この変異原性は, 陽性対象に用いた9-アミノアクリジンに比べると非常に弱いものであるが, 統計的には有意であり, 再現性のある増加であった.

コレカルシフェロールの変異原性に関する報告としては, Ishidateら²⁰⁾ が, TA98, TA100などを用いた試験において変異原性陰性, 更に染色体異常試験においても陰性の報告をしている. 今回の試験において陽性となったのは, コレカルシフェロールの変異原性がTA97においてのみ検出されるのかもしれない.

オルトフェニルフェノールナトリウムのTA102 S9添加において復帰コロニーが増加した. 10 μ g/プレートにおいてコントロールの1.2倍であり, 極めてわずかであるが, オルトフェニルフェノールナトリウムnmole当たりでは1.23個の復帰コロニーが誘発された. 10 μ g/プレート以上の濃度では抗菌作用によるものと思われる復帰コロニーの減少が起こる.

オルトフェニルフェノールナトリウムの変異原性については, コウジカビの分生子において体細胞分離の増加が報告²¹⁾ されているが, ナトリウム塩ではないオルトフェニルフェノールについては, Haworthら²²⁾ が,

Table 1. Results of Mutation Test on Food Additives

Chemical	Solvent	Dose mg/plate	No. of Revertants／plate ^{a)}			
			TA97		TA102	
			—S9	+S9	—S9	+S9
Flavoring agents						
Citronellyl Formate [105-85-1] ^{b)}	DMSO	0.1	107	182	27	324
		0.05	97	183	129	346
		0.01	115	173	210	332
		0.005	134	199	197	300
		0.001	120	184	210	333
		0	122	169	263	320
Hydroxycitronellal [107-75-5]	DMSO	1	104	165	85	314
		0.5	146	184	156	335
		0.1	125	173	208	309
		0.05	130	171	216	338
		0.01	126	183	214	344
		0	122	169	212	320
Ionone [8013-90-9]	DMSO	0.1	115	158	13	247
		0.05	122	189	73	310
		0.01	122	158	153	309
		0.005	111	183	142	299
		0.001	119	173	160	315
		0	134	155	171	304
dl-Menthol [15356-70-4]	DMSO	0.1	149	178	156	287
		0.05	148	185	167	301
		0.01	136	205	199	299
		0.005	136	203	203	326
		0.001	143	210	196	324
		0	145	203	206	304
Dietary supplements						
Calcium Dihydrogen Pyrophosphate [14866-19-4]	DW	1	133	176	159	235
		0.5	160	180	164	246
		0.1	137	208	164	254
		0.05	151	188	170	249
		0.01	160	180	201	286
		0	151	193	185	278
Cholecalciferol [67-97-0]	DMSO	1	261 ^{c)}	254	218	305
		0.5	216	213	210	325
		0.1	141	180	201	295
		0.05	142	181	211	284
		0.01	154	200	174	269
		0	145	190	166	279
Ergocalciferol [50-14-6]	DMSO	1	130	180	281	320
		0.5	145	191	223	312
		0.1	131	184	194	284
		0.05	145	194	196	280
		0.01	131	182	185	297
		0	132	190	166	279

Continued on

Table 1. Continued

Chemical	Solvent	Dose mg/plate	No. of Revertants/plate ^{a)}			
			TA97		TA102	
			−S9	+S9	−S9	+S9
Retinol [68-26-8]	DMSO	0.1	184	164	176	327
		0.05	140	178	167	302
		0.01	152	191	159	340
		0.005	152	179	190	350
		0.001	150	185	192	303
		0	145	203	206	304
Emulsifiers						
Lecithin [8002-43-5]	50%EtOH	1	139	204	96	319
		0.5	155	204	98	333
		0.1	177	211	104	348
		0.05	134	178	115	321
		0.01	155	211	125	331
		0	155	189	135	318
Propylene Glycol Fatty Acid Ester [1323-39-3]	DMSO	10	152	163	129	348
		5	139	177	233	379
		1	141	186	207	347
		0.5	131	208	194	335
		0.1	124	192	194	342
		0	158	197	213	326
Sorbitan Fatty Acid Ester [1338-41-6]	DMSO	1	137	181	166	328
		0.5	135	178	141	300
		0.1	115	161	140	306
		0.05	127	180	129	261
		0.01	130	168	151	298
		0	134	155	171	304
Sucrose Fatty Acid Ester [-]	DMSO	0.1	106	195	48	328
		0.05	159	209	132	352
		0.01	144	210	205	347
		0.005	149	190	191	338
		0.001	144	199	206	330
		0	158	197	213	326
Other agents						
Activated Carbon [7440-44-0]	DW	10	131	133	187	291
		5	129	147	203	295
		1	134	179	214	325
		0.5	138	184	216	344
		0.1	147	193	241	359
		0	141	208	219	341
L-Arginine L-Glutamate [-]	DW	1	137	191	121	280
		0.5	151	183	185	334
		0.1	142	175	168	303
		0.05	151	196	167	290
		0.01	146	189	202	290
		0	134	192	168	285

Continued on

Table 1. Continued

Chemical	Solvent	Dose mg/plate	No. of Revertants/plate ^{a)}			
			TA97		TA102	
			—S9	+S9	—S9	+S9
Chlorinated Lime [7778-54-3]	DW	0.1	0	200	0	286
		0.05	0	193	0	315
		0.01	151	172	175	301
		0.005	125	167	188	297
		0.001	129	155	166	301
		0	124	180	187	295
Disodium Dihydrogen Pyrophosphate [7758-16-9]	DW	10	132	159	201	183
		5	156	189	209	196
		1	155	192	203	282
		0.5	154	205	179	305
		0.1	160	185	179	321
		0	137	199	164	280
Food Red No.40 [25956-17-6]	DW	10	116	148	209	319
		5	115	158	188	310
		1	145	163	205	302
		0.5	125	174	176	305
		0.1	138	205	178	314
		0	146	199	184	308
Imazalil [35554-44-0]	DMSO	0.1	116	208	67	283
		0.05	112	176	130	315
		0.01	118	192	172	292
		0.005	105	168	174	284
		0.001	120	173	170	291
		0	113	163	163	296
Kaolin [1332-58-7]	DW	10	128	189	162	271
		5	141	194	206	269
		1	141	166	187	285
		0.5	135	184	169	273
		0.1	127	188	175	285
		0	151	193	185	278
Liquid Paraffin [8012-95-1]	EtOH	1	131	188	133	293
		0.5	141	197	113	321
		0.1	131	184	118	310
		0.05	152	178	118	290
		0.01	128	205	111	302
		0	149	205	128	293
Polybutene [9003-29-6]	EtOH	1	125	188	119	309
		0.5	129	193	130	298
		0.1	126	164	124	255
		0.05	125	198	118	285
		0.01	145	179	125	308
		0	149	205	128	293

Continued on

Table 1. Continued

Chemical	Solvent	Dose mg/plate	No. of Revertants/plate ^{a)}			
			TA97		TA102	
			−S9	+S9	−S9	+S9
Potassium Polyphosphate [68956-75-2]	DW	10	141	168	156	168
		5	131	202	170	145
		1	148	187	171	280
		0.5	133	181	175	298
		0.1	133	185	178	304
		0	134	192	168	285
Silicon Dioxide [-]	DW	10	150	207	149	267
		5	154	201	162	276
		1	146	188	145	276
		0.5	144	191	161	262
		0.1	135	196	157	277
		0	145	213	160	274
Sodium <i>o</i> -Phenylphenate [132-27-4]	DW	0.1	124	186	68	297
		0.05	150	168	125	315
		0.01	134	173	200	343 ^{c)}
		0.005	152	198	175	328
		0.001	139	207	185	301
		0	146	199	184	279
Positive controls						
9-Aminoacridine	DMSO	50 (μg)	836 ± 248 ^{d)}			
Mitomycin C	DMSO	0.5 (μg)			2,256 ± 292	
2-Aminoanthracene	DMSO	5 (μg)	2,813 ± 650		944 ± 169	

a) Mean of three plates.

b) CAS registry number.

c) Statistically significant difference by Kruskal-Wallis test ($P < 0.05$) and dose-related increase by regression analysis ($P < 0.01$).d) Mean and standard deviation ($n = 13$).

TA1535 S9無添加において変異原性陽性、人胎児由来細胞においてウアバイン耐性突然変異の増加が報告²³⁾されている。われわれも TA102 S9添加において陽性の報告⁴⁾を行った。また、オルトフェニルフェノールナトリウムには発ガン性の報告²⁴⁾も見られる。

試験した24種のうち上記2種以外の22種の試料については、いずれも復帰コロニー数に有意な増加は認められなかった。したがって、これらの化合物の TA97及び TA102に対する変異原性は、陰性と判断された。

今回、陰性となった化合物の内、イオノンにはRec-assayにおいて陽性²⁵⁾、ビタミン A には SCE 誘発及び染色体異常試験において陽性の報告²⁶⁾が見られた。また、高度サラシ粉には S9添加の TA100において陽性の報告²⁰⁾があり、染色体異常試験陽性の結果も報告²⁰⁾されている。これらの化合物については、今回の試験結果と

は一致しなかった。TA 株での詳細な検討が必要かもしれない。

次に、dl-メントール、エルゴカルシフェロール、プロピレングリコール脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステル、ピロリン酸二水素二ナトリウム、L-アルギニンL-グルタミン酸塩及びポリブテンは、Ishidateら^{20,27)}による TA98及び TA100などにおける陰性の報告があり、今回の TA97及び TA102に対する陰性の結果とも一致し、サルモネラに対しては変異原性陰性と結論出来るであろう。

また、ギ酸シトロネリル、ヒドロキシシトロネラール、ピロリン酸二水素カルシウム、レシチン、活性炭、カオリン、二酸化ケイ素、ポリリン酸カリウム、食用赤色40号、流動パラフィン及びイマザリルに関しては、サルモネラに対する試験報告が十分ではない化合物もあると考

えられ、更に検討する必要があるかもしれない。

食品添加物の TA97 及び TA102 を用いた変異原性試験は、前報⁴⁻¹³⁾に報告したように277種類が終了しており、今回の24種を加えると301種類となった。これまでの結果を総合すると、TA97、TA102の両株かどちらかにおいて変異原性が見いだされた化合物は、亜硝酸ナトリウム¹⁰⁾、アスコルビン酸⁴⁾、L-アスコルビン酸ナトリウム⁹⁾、エリスルビン酸¹¹⁾、エリスルビン酸ナトリウム⁸⁾、塩化マグネシウム¹²⁾、塩酸ピリドキシン⁵⁾、オルトフェニルフェノール⁴⁾、オルトフェニルフェノールナトリウム、過酸化水素¹⁰⁾、コレカルシフェロール、L-システイン-塩酸塩⁸⁾、食用青色2号¹²⁾、臭素酸カリウム⁶⁾、チアベンダゾール⁴⁾、ニコチン酸アミド⁵⁾、ピペロナル¹⁰⁾、没食子酸プロピル⁷⁾、マルトール¹¹⁾、DL-メチオニン¹²⁾、L-メチオニン¹²⁾、リボフラビン⁵⁾、リボフラビン 5'-リン酸エステルナトリウム¹²⁾の23種類であった。これらの化合物には、TA98及びTA100では変異原性が検出されていない化合物が多い。ただし、これらの化合物の TA97 または TA102 に対する変異原性は、陽性対照に用いている変異原物質に比べるといずれもかなり弱いものであった。

ま と め

24種の食品添加物について Ames の試験株 TA97、TA102 を用いた変異原性試験を行った。コレカルシフェロール及びオルトフェニルフェノールナトリウムで復帰コロニーが増加し、変異原性陽性と判断した。その他の22種の化合物では、いずれも復帰コロニー数が増加しなかったことから、変異原性陰性と判断した。

文 献

- McCann, J., Spingarn, N. E., Ames, B. N., *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 979-983, 1975.
- Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. : *Mutation Res.*, **31**, 347-364, 1975.
- Maron, D. M. and Ames, B. N. : *Mutation Res.*, **113**, 173-215, 1983.
- 藤田 博, 小嶋昭江, 平賀興吾 : 東京衛研年報, **36**, 413-417, 1985.
- 藤田 博, 佐々木美枝子 : 東京衛研年報, **37**, 447-452, 1986.
- 藤田 博, 佐々木美枝子 : 東京衛研年報, **38**, 423-430, 1987.
- 藤田 博, 中野雅行, 佐々木美枝子 : 東京衛研年報, **39**, 343-350, 1988.
- 藤田 博, 佐々木美枝子 : 東京衛研年報, **40**, 355-362, 1989.
- 藤田 博, 佐々木美枝子 : 東京衛研年報, **41**, 315-322, 1990.
- 藤田 博, 角 千代, 佐々木美枝子 : 東京衛研年報, **42**, 267-275, 1991.
- 藤田 博, 角 千代, 佐々木美枝子 : 東京衛研年報, **43**, 219-227, 1992.
- 藤田 博, 佐々木美枝子 : 東京衛研年報, **44**, 278-287, 1992.
- 藤田 博, 青木直人, 佐々木美枝子 : 東京衛研年報, **45**, 191-199, 1994.
- Levin, D. E., Yamasaki, E. and Ames, B. N. : *Mutation Res.*, **94**, 315-330, 1982.
- Levin, D. E., Hollstein, M., Ames, B. N., *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7445-7449, 1982.
- Levin, D. E., Marnett, L. J. and Ames, B. N. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 4457-4461, 1984.
- 矢作多貴江 : 蛋白質核酸酵素, **20**, 1178-1189, 1975.
- 石居 進 : 生物統計学入門, 133-137, 1975, 培風館.
- Moore, D. and Felton, J. S. : *Mutation Res.*, **119**, 95-102, 1983.
- Ishidate, M. Jr., Sofuni, T., Yoshikawa, K., *et al.* : *Fd Chem. Toxic.*, **22**, 623-636, 1984.
- Georgopoulos, S. G., Kappas, A. and Hastie, A. C. : *Phytopathology*, **66**, 217-220, 1976.
- Haworth, S., Lawlor, T., Mortelmans, C., *et al.* : *Environmental Mutagenesis*, Supplement 1, 3-142, 1983.
- 鈴木英子, 中尾順子, 平賀興吾 : 東京衛研年報, **35**, 399-400, 1984.
- Hiraga, K. and Fujii, T. : *Fd Cosmet. Toxicol.*, **19**, 303-310, 1981.
- 兪 榮植 : 阪市医誌, **34**, 267-288, 1986.
- Mohr, U. Jr. and Emura, M. : *Mutation Res.*, **246**, 67-73, 1991.
- 石館 基 : 微生物を用いる変異原性試験データ集, 1991, エル・アイ・シー.