

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）
総括研究報告書

既存天然添加物等の変異原性を中心とした安全性研究

主任研究者名 林 真
国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部長

分担研究者氏名

本間 正充（国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部 室長）
中嶋 圓（（財）食品農医薬品安全性評価センター 主席研究員）
野口 忠（日本バイオアッセイ研究センター 室長）
安心院 祥三（（財）化学物質評価研究機構 副長）
松元 郷六（（財）残留農薬研究所 室長）
岸 美智子（神奈川県衛生研究所 科長）
宮川 誠（（株）三菱化学安全科学研究所 主任研究員）
田中 憲徳（（財）食品薬品安全センター 副部長）

研究要旨

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

しかしながら、その後得られた知見を以てしても、現に流通が確認されている既存天然添加物のうち、現段階においても安全性に関する知見がほとんど得られていない状況にあるものがあり、本研究においてはそれらの内今回入手可能であった 16 品目に関して遺伝毒性試験を実施し、その安全性の評価を行った。

16 品目のうちコメヌカ油抽出物（酸化防止剤）、ヒメマツタケ抽出物（苦味料）ホホバロウ（ガムベース）等 9 品目に関して細菌を用いる復帰突然変異試験を、ガイドラインで定める標準的な方法により検討した。その結果、ラット肝 S9mix を用いた代謝活性化系の有無に係わらず全て陰性の結果であった。

また、コメヌカ油抽出物（酸化防止剤）、モンタンロウ（ガムベース）等 5 品目に関しては、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験をチャイニーズハムスター肺由来細胞株 CHL/IU を用いて実施し、全て陰性の結果を得た。

アウレオバシジウム培養液（増粘安定剤）、エラグ酸（酸化防止剤）、ログウッド色素（着色料）等全 16 品目については、*in vivo* 試験系であるマウスを用いる小核試験を行い、これらの天然添加物が生体内で染色体異常誘発性を示す可能性について検討した。その結果、充分高用量まで試験されたが、全て陰性の結果となった。

2) タール色素の安全性検討については、米国において発がん性が疑われた当時 70 年代後半から 80 年代前半にかけては盛んに検討が行われたものの、その後の検討は十分行われてきていない。

本研究では食用赤色2号等のタール系色素に関して、DNA 損傷性が認められたとする報告がなされたことをうけ、単細胞ゲル電気泳動法(コメット試験)での陽性結果を確認する目的で、ほぼ同一条件で試験を行った。その結果、コメット試験で陽性の傾向は示したものの弱い反応しか得られず、また実験条件による反応のちがいにしても報告されているものと異なったものであった。また、コメット試験での陽性結果が、生体内のDNAに損傷を与え、さらにそれが固定されて遺伝子突然変異を誘発するものか否かを明確にするためにトランスジェニックマウスを用いる試験を実施した。その結果突然変異が誘発することを確認できなかった。このことは、食用赤色2号によるDNA傷害がほぼ完全に修復されるか、実際にはDNAに傷害を与えていないがある種の人工産物により陽性の結果を与えてしまったのではないか、等の可能性が考えられるが、これらの点が今後に残された課題であろう。

A. 研究目的

平成7年の食品衛生法改正時に、既に流通されていたことから、その後も流通が認められている既存の天然添加物489品目についての安全性の確認は重要な課題であり、昨年度、日本生協連合会が国会に提出した請願事項6項目の中でも添加物の取扱の見直しが指摘されている。

本研究の第一の目的は、現在流通が確認されているにもかかわらず、安全性に関する知見がほとんど得られていない天然添加物の安全性について、変異原性に関する情報を得ることにより、網羅的な安全性評価を行うことである。

食品添加物に対する安全性に関しては、食事を通じての長期暴露に伴う発がん性が最大の懸念であり、DNA損傷性、遺伝子突然変異誘発性、染色体異常誘発性などに関するデータから、被験物質の発がん性リスクを類推することが可能となる。情報が無いことから、消費者が漠然と抱く不安に対して、これら基本的データに基づき、網羅的に天然添加物の安全性を確認・類推することにより、一定の安心感を与えることの意義は大きい。

一方、食用赤色2号(着色料)を含むタール系色素については、かつて米国において発がん性を疑う騒動があったことがある。また、最近ではDNA損傷性を示唆する文献が発表され¹⁾、その安全性に関して不安がもたれている状況にある。そこで、本研究の第二の目的として、タール色素のDNA

傷害性の有無、またその後の修復の可能性を含めた作用メカニズムの解明・考察を行うことにより、これらの発がん性および次世代への遺伝的影響に対する不安を解消することにある。

B. 研究方法

1) 既存食品添加物16品目について変異原性試験を各分担研究者で分担して行う。試験は、食品添加物ガイドラインで示された基本的な変異原性試験、すなわち、「細菌を用いる復帰突然変異試験」、「ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験」、「げっ歯類を用いる小核試験」を実施する。ただし、生体内での遺伝毒性をみる試験系の一つである「げっ歯類を用いる小核試験」は、全16品目について実施する。今回試験を実施したものは以下のとおり(かっこ内は試験項目、「細菌を用いる復帰突然変異試験」：A、「ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験」：C、「げっ歯類を用いる小核試験」：M)。

増粘安定剤:

アウレオバシジウム培養液 (M)
アマシードガム (M)
キダチアロエ抽出物 (M)
アグロバクテリウムサクシノグリカン (A, C, M)

ガムベース:

コーパル樹脂 (M)

サンダラック樹脂 (A, M)
 ホホバロウ (A, M)
 マスチック (A, C, M)
 モンタンロウ (A, C, M)

酸化防止剤：

エラグ酸 (M)
 コメヌカ油抽出物 (A, C, M)
 コメヌカ酵素分解物 (A, C, M)

着色料：

アルカネット色素 (M)
 ログウッド色素 (M)

苦味料等：

ヒメマツタケ抽出物 (A, M)

製造用剤：

メバロン酸 (A, M)

各分担研究者とは連絡を密にし、試験計画書の確認、試験実施場所の確認のための査察、情報交換等を通して各物質群毎の試験が適切に行われるよう充分配慮する。

2) 食用赤色 2 号等タール系食用色素に関する変異原性試験については、最近発表された単細胞ゲル電気泳動法 (コメット法) での陽性結果を再検討するため、ほぼ同一条件の試験計画書を作り、再現性の確認等を行う。また、同時にラットを用いたコメット法を実施し、ラットでの DNA 傷害性を検討する。本試験に関しては、実際の試験を本試験に精通している研究者と協同で実施する。また、コメット法で検出される DNA 上の傷が、実際に遺伝子突然変異として固定されるか否かをトランスジェニックマウスを用いる試験 (TG 試験) で検証する。TG 試験は国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部で実施する。試験法は、現時点において最もバリデーションが進んでいると考えられる *lacZ* をマウスに導入した系 (MutaTM Mouse) を用いた。また、塩基配列の決定がより容易に行える系として開発²⁾された *cII* も同時に標的遺伝子として用い、プロトコールも国際的に最も受け入

れられるものをできる限り用いて実施した。さらに染色体異常誘発性を検討するため、遺伝子突然変異試験と同一個体を用いて末梢血小核試験³⁾を同時に実施した。

倫理面への配慮

実験動物に対する倫理面は、国立医薬品食品衛生研究所を始め各試験研究機関に於ける実験動物倫理委員会等の指針を遵守し、出来る限り動物に苦痛を与えない方法で屠殺するなど、動物愛護上の配慮をする。

なお、本研究においては細菌、培養細胞、げっ歯類のみを用いて試験を行い、ヒトの資料を用いることはしないので、ヒトの倫理面で問題となることはない。

C. 研究結果

1) 既存食品添加物 16 種の変異原性試験結果の概要を表 1 に示し、以下に概説する。

増粘安定剤：

アウレオバシジウム培養液：小核試験が実施されており、技術的に投与可能な量まで試験されたが、結果は陰性であった。

アマシードガム：小核試験が実施されており、毒性兆候が認められない場合の限量である 2000mg/kg まで検討されたが、小核誘発性は認められなかった。

キダチアロエ抽出物：本品も小核試験が実施されており、2000mg/kg まで試験されているが、陰性の結果であった。

アグロバクテリウムサクシノグリカン：本品に関しては細菌を用いる復帰突然変異試験、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験、小核試験が全て実施された。復帰突然変異試験は標準的な菌株の組み合わせ、すなわちネズミチフス菌 TA100、TA1535、TA98、TA1537、大腸菌 WP2uvrA/pKM101 の 5 菌株を用い、限界用量である 5000 μ g/plate まで試験されたが、結果は陰性であった。*In vitro* 染色体異常試験は限界濃度である 5mg/ml まで試験されており、結果は陰性であった。小核試験は限量である 2000mg/kg まで試験されて陰性であった。

表1 食品添加物遺伝毒性試験結果

品名	試験項目/施設		
	Ames 試験	Chromosome 試験	小核試験
アウレオバシジウム培養液 (増粘安定剤)	nt	nt	-
アマシードガム (増粘安定剤)	nt	nt	-
キダチアロエ抽出物 (増粘安定剤)	nt	nt	-
アグロバクテリウム サクシノグリカン (増粘安定剤)	-	-	-
コーパル樹脂 (ガムベース)	nt	nt	-
サンダラック樹脂 (ガムベース)	-	nt	-
ホホバロウ (ガムベース)	-	nt	-
マスチック (ガムベース)	-	±	-
モンタンロウ (ガムベース)	-	-	-
エラグ酸 (酸化防止剤)	nt	nt	-
コメヌカ油抽出物 (酸化防止剤)	-	-	-
コメヌカ酵素分解物 (酸化防止剤)	-	-	-
アルカネット色素 (着色料)	nt	nt	-
ログウッド色素 (着色料)	nt	nt	-
ヒメマツタケ抽出物 (苦味料等)	-	nt	-
メバロン酸 (製造用剤)	-	nt	-

nt : not tested

ガムベース:

コーパル樹脂: 小核試験が実施されており、2000mg/kg まで試験されているが、陰性の結果であった。

サンダラック樹脂: 本品に関しては細菌を用いる復帰突然変異試験および小核試験が実施された。復帰突然変異試験は標準的

な菌株の組み合わせで行われており、5000 μ g/plate まで (TA1535、TA98、WP2uvrA) または菌の生育阻害が認められる用量まで (TA100、TA1537) 実施されたが、結果は陰性であった。小核試験は限量である 2000mg/kg まで試験されて陰性であった。

ホホバロウ: 細菌を用いる復帰突然変異

試験および小核試験が実施された。復帰突然変異試験は標準的な菌株の組み合わせで、5000 μ g/plate まで実施されており、結果は陰性であった。また、小核試験は限量である 2000mg/kg まで実施されており、結果は陰性であった。

マッシュク：本品に関しては細菌を用いる復帰突然変異試験、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験、小核試験が全て実施された。復帰突然変異試験は標準的な菌株の組み合わせ、すなわちネズミチフス菌 TA100、TA1535、TA98、TA1537 及び大腸菌 WP2uvrA/pKM101 の 5 菌株を用い、限界用量である 5000 μ g/plate または菌の生育阻害が認められる用量まで試験されたが、結果は陰性であった。*In vitro* 染色体異常試験は細胞毒性が認められる用量まで行われた。その結果、代謝活性化系の存在下において、統計学的に有意な増加が観察された。ただし、構造異常を有する細胞の出現頻度は 6%と、高いものではなかった。また、他の試験条件では陰性の結果であった。小核試験に関しては限量である 2000mg/kg まで試験されており、結果は陰性であった。

モンタノロウ：本品に関しても細菌を用いる復帰突然変異試験、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験、小核試験が全て実施された。復帰突然変異試験は標準的な菌株の組み合わせが用いられており、方法、結果共に問題はない。また、*In vitro* 染色体異常試験についても標準的な方法で試験されており、結果は陰性であった。また、小核試験に関しても限量である 2000mg/kg まで試験されており、結果は陰性であった。

酸化防止剤：

エラグ酸：げっ歯類を用いる小核試験が実施された。投与量は限界用量である 2000mg/kg であり、結果は陰性であった。

コメヌカ油抽出物：細菌を用いる復帰突然変異試験、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験、および小核試験が実施された。復帰突然変異試験は WP2uvrA/pKM101 を含む標準的な試験菌株の組み合わせで、5000 μ g/plate まで実施されており、結果は陰性であった。*In vitro* 染色体異常試験は、限界用量である 5mg/ml まで試験されており、結

果は陰性であった。また、小核試験は限量である 2000mg/kg まで実施されており、結果は陰性であった。

コメヌカ酵素分解物：細菌を用いる復帰突然変異試験、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験、および小核試験の 3 試験が実施された。復帰突然変異試験は標準的な菌株の組み合わせで行われており、5000 μ g/plate まで実施されており、結果は陰性であった。*In vitro* 染色体異常試験は、限界用量である 5mg/ml まで試験されており、結果は陰性であった。また、小核試験に関しても限量である 2000mg/kg まで実施されており、結果は陰性であった。

着色料：

アルカネット色素：本品に関してはげっ歯類を用いる小核試験が実施された。試験方法、結果共に問題はなく、陰性であった。

ログウッド色素：本品に関してもげっ歯類を用いる小核試験が行われ、限界用量の 2000mg/kg まで検討された結果、小核の誘発は認められなかった。

苦味料等：

ヒメマツタケ抽出物：本品に関しては細菌を用いる復帰突然変異試験および小核試験が実施された。復帰突然変異試験は標準的な菌株の組み合わせで行われており、5000 μ g/plate まで試験されたが、結果は陰性であった。小核試験は限量を越えた 6667mg/kg まで試験されて陰性であった。

製造用剤：

メバロン酸：本品に関しても細菌を用いる復帰突然変異試験および小核試験が実施された。復帰突然変異試験、小核試験共に標準的な方法で限量まで試験されており、結果は共に陰性であった。

2) 食用赤色 2 号等タール系食用色素に関する変異原性試験

食用赤色 2 号に関しては、DNA 傷害性を評価するためマウスおよびラットを用いて単細胞ゲル電気泳動法（コメット法）を行った。また、生体内における遺伝子突然変異誘発性をトランスジェニックマウスを用

いて検討した。さらに染色体異常誘発性を検討するため、遺伝子突然変異試験と同一個体を用いて末梢血小核試験を同時に実施

した。それぞれの結果の概要を表2、表3、および表4に示す。

表2 食用赤色2号のコメット法結果のまとめ

投与回数	標本作製時期	マウス				ラット	
		胃		腸		胃	腸
		テイル長	テイルモーメント	テイル長	テイルモーメント	テイル長	テイル長
単回投与	3時間	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	24時間	ns	ns	ns	ns	ns	ns
3回投与	24時間	***a)	ns	ns	ns	nt	nt

a) 用量反応相関は認められなかった

コメット法に関しては最近公表された論文¹⁾の再現性を確認することを目的とするため、論文で用いられた方法を出来るだけ踏襲した。また、標的臓器としては論文で陽性を示した胃と腸管を用いた。指標としてはテイル長のほかにテイルモーメントを用いて比較した。胃のテイル長の場合1mg/kg投与群(単回投与、3時間)では陰性対照と変化はなかったが、10mg/kg投与群では平均値で陰性対照群の約2倍の値を示し、100、1000mg/kgで少し落ち込み2000mg/kgでは10mg/kg群とほぼ同様の値を示した。さらに、単回投与24時間後、3回連日投与24時間後での標本においてもテイル長の伸長傾向が観察された。これらの内、統計学的に有意差(有意水準5%)が認められたのは3回連日投与後24時間での標本のみであったが、その標本においても明確な用量反応相関性は認められなかった。さらに、テイル長と同様広く用いられているテイルモーメント(どれくらいの量のDNAが流れたかを示す指標)で比較すると、3回連日投与後24時間での標本においても統計学的には有意とならなかった。

腸管に関しては、単回投与3時間後の標本では2000mg/kgで初めて陰性対照群の2倍程度のテイル長を観察している。単回投与24時間後、3回連日投与24時間後の標本でもテイル長の伸長傾向は認められるが陰性対照の2倍前後であり、統計学的には有意とならなかった。また、ラットを用いたコメット試験においては、腸管および胃共に全ての条件下で陰性の結果となった。

表3 トランスジェニックマウスを用いた *in vivo* 遺伝子突然変異試験結果

	<i>lacZ</i>	<i>cII</i>
胃	陰性	陰性
腸	陰性	陰性
肺	陰性	陰性
肝臓	陰性	陰性

一方、遺伝子突然変異誘発性を見るために行ったトランスジェニックマウスを用いる試験では、腸管、胃、肝臓、肺について検討した。標的遺伝子としては、*lacZ*および*cII*を用いた。さらにその一部についてはDNA塩基配列の解析を行って遺伝子突然変異誘発性に関して詳細に検討した。その結果、2000mg/kgを週1回、4週にわたり投与したが、試験した臓器での突然変異の誘発は認められなかった。また、同時に行った末梢血を用いる小核試験の結果も陰性であることを確認した。

D. 考 察

1) 既存食品添加物16品目についての変異原性 今回検討した16品目のうち、5品目(アグロバクテリウムサクシノグリカン、マスチック、モンタンロウ、コメヌカ油抽出物、コメヌカ酵素分解物)については細菌を用いる復帰突然変異試験、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験、げっ歯類を用いる小核試験の試験が全て実施され、充分高用量まで評価された結果、全て陰性で

あった。医薬品規制国際ハーモナイゼーション国際会議 (ICH S2) において、適正に実施された上記の3試験が全て陰性であった場合には、当該被験物質に遺伝毒性は無いものと考えることが合意されている⁶⁾。従って、これらの5品目に関しては、遺伝毒性に関する限り問題ないものと考えることが出来る。また、7品目 (アウレオバシジウム培養液、アマシードガム、キダチアロエ抽出物、コーパル樹脂、エラグ酸、アルカネット色素、ログウッド色素) については、今回は小核試験の結果のみが得られているが、細菌を用いる復帰突然変異試験およびほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験が現在別途実施されている。残りの4品目 (サンダラック樹脂、ホホバロウ、ヒメマツタケ抽出物、メバロン酸) に関しては、細菌を用いる復帰突然変異試験と小核試験のみが今回検討され、全て陰性の結果が得られた。ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験についてのデータは得られないが、小核試験によって *in vivo* における染色体異常誘発性が検討されており、陰性の結果が得られているので、今後確認のため実際の試験を実施する必要はあるが、現時点でこれらの品目について問題となるような遺伝毒性は無いものとする。

化学物質の遺伝毒性を評価するのに、*in vivo* 試験系での結果が重要な意味を持つ。現在最も一般的に行われている *in vivo* 試験系がげっ歯類を用いる小核試験⁴⁾ であり、今回用いた方法は充分バリデートされた信頼性の高い方法である。ただし、今回実施した小核試験での標的臓器は骨髄の造血組織であり、その他の各種臓器での安全性を保証するものではない。この意味からも骨髄以外を標的とする試験系での評価も重要である。また、*in vitro* で染色体異常誘発性が認められ、骨髄を標的とした小核試験で陰性の場合に標的細胞が充分被験物質で暴露されなかった結果であることを示す必要があるとの議論があり、医薬品の場合には標的細胞の暴露証明が要求されている⁵⁾。しかし、骨髄はかなり暴露されやすい臓器であり、被験物質の血中濃度の上昇が暴露証明と出来ることが ICH でも認められている。従って、限界用量、最大耐量まで試験されている場合の陰性結果は、かなり信頼

性の高いものと考えられる。

2) 食用赤色2号等タール系食用色素に関する変異原性試験

食用赤色2号は、かつて米国において、発がん性が疑われたことから米国では使用が禁止されている。また、近年、いわゆるコメット試験という生体内で DNA 損傷性をみる試験系 (単細胞ゲル電気泳動法) の開発が進んでおり、この方法により、食用赤色2号を含むタール系色素の一部で陽性との結果が報告されている¹⁾。本物質を含め、タール系色素についての発がん性については、現段階において慢毒・発がん性試験成績等から問題ないことが確認されては

表4 食用赤色2号の小核試験結果

投与量 mg/kg	動物 数	観察細 胞数	小核を有 する幼若 赤血球 (%)	検 定
1 週目				
0	5	10000	0.29	-
500	5	10000	0.37	ns
1000	5	10000	0.39	ns
2000	5	10000	0.29	ns
PC	2	4000	0.91	**
2 週目				
0	5	10000	0.25	-
500	5	10000	0.32	ns
1000	5	10000	0.28	ns
2000	5	10000	0.33	ns
PC	2	4000	0.94	**

投与48時間後にアクリジンオレンジ超生体染色法にて標本作製

PC: 陽性対照は Streptozotocin 100mg/kg を腹腔内投与

検定は Kastenbaum-Bowman の検定表を使用
ns: not significant, **: $p < 0.01$

いるものの、コメット試験での陽性報告があることから、遺伝毒性の有無、あるいは修復の可能性を含めた作用メカニズムを検討する試験が求められている。本研究では、食用赤色2号についてマウスおよびラットを用いたコメット試験を行い、マウスの胃でテイル長に関して弱いながらも統計学的に有意な陽性結果を得た。ただし、他の指

標であるテイルモーメントで検討した場合には統計学的な有意差は認められなかった。一方、腸管に関しては、テイル長の増加傾向を認めたものの、統計学的に有意なものではなかった。また、ラットを用いて検討した結果は全て陰性であった。詳細に関しては分担研究報告を参照されたい。

今回の試験結果は、Tsuda らが報告¹⁾している食用赤色 2 号のコメット試験で陽性の結果を再現することができなかった(表 5)。一部陽性傾向を示した部分もあるが、報告されている内容と比較すると、その強さにかなりの差がある。両試験間差異を厳密に

説明することは現時点で出来ない。可能性としては、被験物質のロットが異なるため、不純物等の種類およびそれらの含量が異なることが考えられる。ロットの差による影響はほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験でも認められている⁷⁾。すなわち、純度 91%の食用赤色 2 号を用いて試験した場合には 24、48 時間の連続処理において異常誘発性が認められた。一方、純度は不明であるが、色素試験用標準品を用いると、これらの反応はほとんど認められなくなった。このように被験物質のロット差が影響していることが考えられる。

表 5 食用赤色 2 号試験結果の比較

Dose Mg/kg	Colon			Stomach	
	Tsuda et al.		Present study	Tsuda et al.	Present study
0	5.6±0.9		8.1±3.5	5.9±0.7	9.7±1.9
1	13.0±2.0	Ns	13.8±4.7	8.6±1.5	9.2±1.6 ns
10	25.6±1.7	**	13.6±6.6	8.3±1.3	19.6±4.2 ns
100	29.4±3.2	**	7.9±4.1	13.1±1.2	13.7±4.7 ns
1000	34.4±1.9	**	14.2±4.5	32.6±1.2	13.2±5.9 ns
2000	40.4±3.5	**	16.3±5.1	9.3±2.0	17.7±9.1 ns
2000	10.3±0.7	Ns	9.7±3.3	16.2±1.1	17.8±4.3 ns

** : p<0.01, * : p<0.05, ns: not significant

食用赤色 2 号の規格値 (第七版食品添加物公定書規格)、今回試験に用いた試料の分析結果、ならびに現在流通しているその他のロット例についての分析結果を表 5 に示す。残念ながら Tsuda らが用いた試料の分析結果が不明であるので、厳密な比較は出来なかった。ただし、食品添加物公定書規格は 1999 年に改訂された第七版から改訂されており、新たに「未反応原料及び反応中間体」及び「非スルホン化芳香族第一級アミン」に関する項目が追加されており、それ以前の試料に関してはこれらの分析は行われていなかったことになる。今回試験に供した試料の純度は 91.7%のものであり、特に高純度のものを用いた訳ではない。ただし、非スルホン化芳香族第一アミン (α -ナフチルアミンとして) が $0.01 \mu\text{g/g}$ とかなり低い特徴を持つ (規格値は $1.0 \mu\text{g/g}$ 以下)。 α -ナフチルアミンはコメット試験で陽性になることが知られている⁸⁾が、 400mg/kg での陽性結果であり、規格値の上限である $1.0 \mu\text{g/g}$ の混入があったとしても食用赤色 2 号の陽性結果を α -ナフチルア

ミンで説明することは不可能であった。他の微量混入物の相乗効果等も考慮する必要があるかも知れないが、試験系自体の持つ限界についても考える必要がある。すなわち、コメット法のみで見られる変化が、被験物質が DNA に直接作用した結果としての反応か否かについての証明が必要であると考えられる。特に、今回問題となっているような粘膜細胞は単細胞 (核) 浮遊液になりやすく、標本調製過程における人為的、物理的な傷による影響についても検討する必要があるものと考えられる。

次に、この問題の一つを解決するため、コメット法での陽性結果が、DNA に損傷を与え、その傷が実際に突然変異の誘発に結びつくものか否かを、トランスジェニックマウスを用いて検討した。その結果、腸管、胃、肺、肝臓においては被験物質による遺伝子突然変異の誘発は確認できなかった。この結果は重要であり、コメット法で認められた食用赤色 2 号の陽性反応が、遺伝子突然変異誘発に関与しない可能性を示唆するものであった。

表6 食用赤色2号規格値ならびに分析結果

試験項目	規格値*	今回使用試料	その他のロット例
含量 (%)	85.0 以上	91.7	90.8
性状	適合	合格	合格
水溶液中での色調	適合	合格	合格
溶状	適合	合格	合格
極大吸収波長	518-522 nm	521	521
水不要物 (%)	0.20 以下	0.01	0.01
塩化物及び硫酸鉛 (%)	5.0 以下	0.05	2.9
重金属 ($\mu\text{g/g}$)	20 以下	5	5
ヒ素 ($\mu\text{g/g}$)	4.0 以下	0.1	0.1
他の色素	適合	合格	合格
未反応原料及び反応中間体 (%)	0.5 以下	0.001 以下	0.03
非スルホン化芳香族第一級アミン (7-リソとして) (%)	0.01 以下	0.0001	0.0001
非スルホン化芳香族第一級アミン (α -ナフチルアミンとして) ($\mu\text{g/g}$)	1.0 以下	0.01 以下	0.1
乾燥減量 (%)	10.0 以下	7.0	3.9

*規格値は第七版食品添加物公定書規格

食用赤色2号の遺伝毒性に関しては、細菌を用いる復帰突然変異試験⁹⁾、マウスリンフォーマTK試験¹⁰⁾、チャイニーズハムスター肺由来細胞株 CHL/U を用いた染色体異常試験⁷⁾、マウスを用いた小核試験¹¹⁾、およびラットを用いる優性致死試験¹⁰⁾がこれまでに実施されている。細菌を用いる復帰突然変異試験では、TA100、TA1535、TA1537、TA92、TA94 および TA98 菌株を用いて検討され、全ての試験菌株において陰性であり、微生物に対する遺伝子突然変異誘発性はないものと考えられた。マウスリンフォーマTK試験で陽性との報告¹⁰⁾があるが、今回行ったトランスジェニックマウスを用いた *in vivo* での遺伝子突然変異誘発性は認められず、*in vitro* で見られた現象が生体内では発現しないことを示唆する結果となった。ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験は、ロットの異なる食用赤色2号を用いて2回試験が行われており、第一回目の試験において24、48時間の連続処理の条件で陽性の結果が得られている。ただし、異なるロットを用いた確認試験においては48時間処理の細胞毒性の見られる最高用量でも明確な陽性反応は得られなかった¹¹⁾。この、*in vitro* での染色体異常

誘発性が生体内でも同様に発現するか否かを確認するため、マウスを用いた小核試験を行った。その結果、食用赤色2号を2g/kgまで経口投与しても小核誘発性は認められず¹¹⁾、*in vitro* で見られた染色体異常誘発性は生体内においては発現に至らないことが示唆されている。この結果は、今回トランスジェニックマウスを用いた末梢血小核試験によっても確認された。さらに、ラットを用いた優性致死試験で生殖細胞に於ける染色体異常誘発性が検討されているが、陰性結果であることが報告されている¹⁰⁾。

これらの結果を総合的に評価すると、今回のコメット法の試験結果、トランスジェニックマウスを用いた遺伝子突然変異試験での陰性結果を考え合わせると、生体にとって特に問題となる遺伝毒性は認められないものと考えることができ、特段の措置が必要なものではないと考える。

E. 結 論

1) 既存食品添加物16品目、5品目(アグロバクテリウムサクシノゲリカン、マッシュク、モンタンロウ、コメヌカ油抽出物、コメヌカ酵素分解物)については細菌を用

いる復帰突然変異試験、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験、げっ歯類を用いる小核試験の試験が全て実施され、充分高用量まで評価された結果、全て陰性であった。また残りの、11品目（アウレオバシジウム培養液、アマシードガム、キダチアロエ抽出物、コーパル樹脂、エラグ酸、アルカネット色素、ログウッド色素、サンダラック樹脂、ホホバロウ、ヒメマツタケ抽出物、メバロン酸）については小核試験のみが実施され、全て陰性の結果が得られた。一部、細菌を用いる復帰突然変異試験やほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験についてのデータが得られていないものもあるが、小核試験は全て陰性の結果であり、今後確認のため *in vitro* の試験を実施する必要はあるが、現時点で今回評価した全ての品目について生体内で問題となるような遺伝毒性は無いものと考えられる。

2) 食用赤色2号に関しては、報告のあった *in vivo* のコメット試験の陽性結果を再現することが出来なかった。さらに、トランスジェニックマウスを用いた生体内遺伝子突然変異試験において陰性の結果を示した。これまでの知見を総合的に判断すれば、本色素は生体にとって特段問題となるような遺伝毒性を示すものではないとの結論に達した。

F. 参考文献

- 1) Tsuda, S., M. Murakami, N. Matsusaka, K. Kano, K. Taniguchi and Y.F. Sasaki: DNA damage induced by Red Food Dyes orally administered to pregnant and male mice, *Toxicol. Sci.*, 61, 92-99 (2001).
- 2) Suzuki, T., X. Wang, Y. Miyata, K. Saeki, A. Kohara, Y. Kawazoe, M. Hayashi and T. Sofuni: Hepatocarcinogen quinoline induces G:C to C:G transversions in the *cII* gene in the liver of lambda/*lacZ* transgenic mice (MutaTMMouse), *Mutat. Res.*, 456, 73-81 (2000).
- 3) Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T and Ishidate, M. Jr.: The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange coated slides, *Mutat. Res.*, 245, 245-249 (1990).
- 4) Hayashi, M., Tice, R.R., MacGregor, J.T., Anderson, D., Blakey, D.H., Kirsh-Volders, M, Oleson, F.B., Pacchierotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B.: *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, *Mutat. Res.*, 312, 293-304 (1994).
- 5) 医薬品毒性試験法ガイドライン, 医薬審第1604号 (1999).
- 6) ICH Steering Committee: S2A Genotoxicity: Guidance on specific aspects of regulatory genotoxicity tests for pharmaceuticals (1995); ICH Steering Committee: S2B Genotoxicity: A standard battery for genotoxicity testing of pharmaceuticals (1997).
- 7) 祖父尼俊雄監修, 染色体異常試験データ集 1998年版, LIC, 東京 (1998).
- 8) Sasaki, Y.F., K. Fujikawa, K. Ishida, N. Kawamura, Y. Nishikawa, S. Ohta, M. Satoh, H. Madarame, S. Ueno, N. Susa, N. Matsusaka and S. Tsuda: The alkaline single cell gel electrophoresis assay with mouse multiple organs: results with 30 aromatic amines evaluated by the IARC and U.S. NTP, *Mutat. Res.*, 440, 1-18 (1999).
- 9) Ishidate, M. Jr., T. Sofuni and K. Yoshikawa: A primary screening for mutagenicity of food additives in Japan, *変異原と毒性*, 3, 82-90 (1980).
- 10) Palmer, K.A., C.W. Sheu and S. Green: Mutagenicity studies of R-amino salt, a metabolite of amaranth (FD & C Red No. 2), in mouse lymphoma cells heterozygous at the thymidine kinase locus and in the rat dominant lethal test, *Food and Cosmetic Toxicol.*, 17, 5-10 (1979).
- 11) Hayashi, M., S. Honda et al.: Micronucleus induction with synthesized food colors, *Annual Report of Toyama Institute of Health*, 4, 265-267 (1981).

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし