

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）
分担研究報告書

既存天然添加物等の変異原性を中心とした安全性研究

分担研究者 本間 正充（国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部 室長）
協力研究者 鈴木 孝昌（国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子細胞医薬部 室長）
麻野間正晴（名古屋市衛生研究所 主任研究員）
本田 幸子（富山県衛生研究所・がん研究部）
坂本 浩子（国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部）
小原 有弘（国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部）
小泉 朋子（国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部）

研究要旨

天然食品添加物の安全性確保の一環として、以下の既存天然添加物（3種）について、遺伝毒性試験を実施した。

1. アグロバクテリウムサクシノグルカン：増粘安定剤（エームス試験）
2. アマシードガム：増粘安定剤（小核試験）
3. コメヌカ抽出物：酸化防止剤（染色体異常試験、小核試験）

その結果、3種の天然食品添加物について遺伝毒性は認められなかった。

また、タール系色素である食用赤色2号（アマランス）の遺伝子突然変異誘発性に関して、トランスジェニックマウス（Muta™Mouse）を用いて、大腸を中心に解析したが、in vivoでの遺伝子突然変異誘発性は認められなかった。

キーワード：遺伝毒性試験、エームス試験、染色体異常試験、小核試験、トランスジェニックマウス遺伝子突然変異試験、天然食品添加物、タール系色素

A. 研究目的

加工食品の普及および消費者の天然物志向等により天然添加物は広範囲の食品に使用され、その種類および使用量はともに増加している。天然物中には変異・発がん性を有する物質の存在が知られており、天然物から抽出・精製される天然添加物がこのような物質を主成分あるいは微量成分として保有する可能性が考えられる。しかしながら食品衛生法により成分規格、使用基準の定められている天然添加物は少なく、その安全性についても十分な検討がなされていない。

そこで、現在国内で汎用されている以下の既存天然添加物（3種）について、変異原性を中

心とした安全性について研究を行った。

1. アグロバクテリウムサクシノグルカン：増粘安定剤（エームス試験）
2. アマシードガム：増粘安定剤（小核試験）
3. コメヌカ抽出物：酸化防止剤（染色体異常試験、小核試験）

また、これとは別に最近、コメットアッセイにおいて、大腸で遺伝子傷害性を示すことが指摘されているタール系色素である食用赤色2号（アマランス）について、大腸における遺伝子突然変異誘発性を中心に、トランスジェニックマウス（Muta™Mouse）を用いて検討した。

B. 研究方法

1. 被検物質

日本食品添加物協会から提供された以下の食品添加物を被検物質とした¹⁾。

a) アグロバクテリウムサクシノグルカン (増粘安定剤)

ロット番号 : No. 9818252

供給元 : ローディア日華

b) アマシードガム (増粘安定剤)

ロット番号 : 不明

供給元 : 大日本製薬

c) コメぬか油抽出物 (酸化防止剤)

ロット番号 : 不明

供給元 : 藤沢薬品

d) 食用赤色 2 号 : アマランス (着色料)

ロット番号 : 011228、含量 (91.7%)

供給元 : 三栄源 エフ・エフ・アイ (株)

2. 試薬

Bacto Agar : Difco社製、Nutrient Broth No.2 : Oxoid社製、ジメチルスルホオキサイド (蛍光分析用、以下DMSO) : 榊同仁化学研究所製、Cofactor-1 : オリエンタル酵母工業(株)製、S9 : キッコーマン(株)製、9-アミノアクリジン : Aldrich chemical Co., Inc. 製を使用し、その他の試薬は、すべて和光純薬工業(株)製の特級試薬を使用した。

3. 遺伝毒性試験法

a) エームス試験 (復帰突然変異試験)

Salmonella typhimurium TA100、

Salmonella typhimurium TA1535、

Salmonella typhimurium TA98、*Salmonella typhimurium* TA1537および

Escherichia coli WP2uvrA/pKM101 (以下それぞれTA100株、

TA1535株、TA98株、TA1537株および

WP2uvrA/pKM101株) の5種類の菌株を使用し、「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」²⁾および「新・微生物を用いる変異原性試験ガイドブック」³⁾に準じ、37℃、20分間のプレインキュベーション法を用いて以下の

方法で行った。

復帰突然変異試験に対する被検物質の最適用量を決めるため、プレート当たり5,000 μ gを最高用量として公比4で希釈し、7段階の用量について用量設定試験を行った。その結果、試験菌株に対する生育阻害が確認されなかったため、プレート当たり5,000 μ gを最高用量として公比2で希釈し、6段階の用量について本試験を行った。また必要に応じて試験結果確認のための確認試験を実施した。各試験とも用量毎に2プレート以上を使用し、溶媒対照は5プレートを、陽性対照は1プレート以上を使用した。

S9はフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンで酵素誘導したSprague-Dawleyラットの肝臓より調製したものを、1プレート当たり50 μ lを使用した。

S9 mixはCofactor-1を蒸留水に溶解し、ろ過除菌 (MILLEX-HV 0.45 μ m : MILLIPORE) 後、S9を加え、S9 mix 1 ml中にS9 : 100 μ l、MgCl₂·6H₂O : 8 μ mol、KCl : 33 μ mol、G-6-P : 5 μ mol、NADHP : 4 μ mol、NADH : 4 μ mol、Na₂HPO₄ : 84.2 μ mol、NaH₂PO₄·2H₂O : 15.8 μ molになるように調製した。

1種類以上の試験菌株に対し、溶媒対照の2倍以上の復帰変異コロニーを誘発し、用量依存性を示したものを陽性、1.5倍以上2倍未満の復帰変異コロニーを誘発し、用量依存性を示したものを疑陽性、それ以外を陰性とした。

a) 染色体異常試験

チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株 (CHL/IU) を用い、代謝活性化系の存在/非存在下での6時間処理法、および代謝活性化系非存在下での24、48時間連続処理法による染色体異常試験を行った⁴⁾⁵⁾。

6時間処理法においては、細胞20,000個を6 cmのプラスチックシャーレに播き、細胞播種後3日目に被検物質をS9mixまたは培養液と共に6時間処理し、洗浄後さらに18時間培養した後、染色体標本を作製した。S9はフェノバルビタール

および 5,6-ベンゾフラボンで処理したSDラットの肝から調製したものを、キッコーマン(株)より購入して用いた。24、48 時間連続処理法においては、細胞播種後3日目に検体を加え、24時間および48時間後に染色体標本を作製した。

検体濃度は予備試験によって、細胞増殖が明らかに抑制される濃度を最高に、原則として5濃度(公比2で段階希釈)を設定した。予備試験で毒性が観察されない場合には、5 mg/mlを最高濃度とした。

染色体標本は全てコード化し、処理の条件が分からない状態で、濃度当り 200個の分裂中期像について観察し、染色分体型あるいは染色体型の構造異常(ギャップ、切断、交換など)をもつ細胞の出現頻度を記録した。結果が明白な陽性または陰性を示さなかった検体について、用量範囲を最適化して確認試験を行い、最終判定を下した。さらに、数的異常の誘発性を評価するために倍数体(染色体数が倍化した細胞)についても併せて記録した。結果の判定は、未処理及び溶媒処理の対照群では通常4%以上の異常はみられないため、原則として、5%未満を陰性(-)、5%以上10%未満を疑陽性(±)、10%上を陽性(+)とし、用量依存性等を考慮して総合的に行った。なお、必要に応じて追加再実験を行い、結果の確認を行った。

a) 小核試験

4または6週令雄ddYマウスを日本SLCより購入し、1週間の馴化期間の後、実験に使用した。一群当たり5匹のマウスを体重が平均化するように群分けし、使用した。

アマシードガムはオリーブオイルに懸濁し、10ml/kgの容量で経口投与した。陰性対照群として、溶媒(オリーブオイル)のみを投与し、陽性対照群としてシクロフォスファミド(生理食塩水に溶解)を100mg/kgの用量にて投与した。投与は18時間の間隔で2回行い、2回目の投与から30時間後(初回より48時間後)に一度採血を行い標本を作製した。コメヌカ油抽出物もオ

リーブオイルに懸濁し、10ml/kgの容量で経口投与した。陰性対照群として、溶媒(オリーブオイル)のみを投与し、陽性対照群としてマイトマイシンC(生理食塩水に溶解)を1mg/kgの用量にて腹腔内投与した。投与は24時間の間隔で2回行い、2回目の投与から24時間後(初回より48時間後)に一度採血を行い標本を作製した。

林らにより開発されたアクリジンオレンジ超生体染色法を用いた末梢血小核試験を用いた⁶⁾⁷⁾⁸⁾。マウス尾部血管を、注射針にて突き出血させ、5 μ lの血液を計り取り、アクリジンオレンジを塗布したスライドグラス上にて超生体染色し、蛍光顕微鏡にて幼若赤血球中出现する、小核を有する血球数をカウントした。観察は二人の観察者が各1000個の幼若赤血球を観察し、個体当たり2000個の幼若赤血球における小核を有する血球の頻度を求めた。

a) トランスジェニックマウス遺伝子突然変異試験

5週令雄 MutaTMMouseを日本SLCより購入し、12日間の馴化期間の後、実験に使用した。一群当たり5匹(陽性対照群は2匹)のマウスを体重が平均化するように群分けし、使用した。被験物質は蒸留水に懸濁し、10ml/kgの容量で経口投与した。陰性対照群として、溶媒(蒸留水)のみを投与し、陽性対照群としてストレプトゾトシン(生理食塩水に溶解)を100mg/kgの用量にて腹腔内投与した。投与は1週間の間隔で4回行い、最終投与から7日後(初回より28日後)に解剖を行い臓器を回収した。

大腸をはじめ解剖して摘出した臓器は、内容物などを生理食塩水で良く洗った後、液体窒素にて急速凍結し、-80℃にて保存した。凍結した臓器の一部を取り、3mlのダウンスバッファーを加えてダウンス型ホモジナイザーにて軽くホモジナイズ後、蛋白質分解酵素(プロテナーゼK)3mlを加えて50℃にて2時間程度消化を行った。そして、等量のフェノール:クロロホルム(1:1)溶液をおよびクロロホルム溶液にて2回DNAの

抽出を行った後、エタノールを加えてDNAを沈殿させ、70%エタノールにて洗浄後、20 μ lのトリス-EDTAバッファーを加え、溶解させる。このDNA溶液10 μ lに、パッケージングエクストラクト（名古屋市立大学にて調整されたものを提供された）を2度加えて、1.5時間ごとの*in vitro*パッケージング反応を行い、導入遺伝子をラムダファージへと回収した。このパッケージング溶液を、指示大腸菌に感染させプラークアッセイを行うことにより、*lacZ*遺伝子および*cII*遺伝子の変異頻度の解析を行った⁹⁾¹⁰⁾。

パッケージング溶液の半量を、*E. coli C (lac, galE)*株培養液へ加え、ファージを大腸菌へ感染させ、変異体検出のための選択試薬である phenyl- β -D-galactoside (P-gal) を含むLB-アガーを加えて、4枚のLBプレート上に播いた。同時に感染効率を調べるため、ファージ/菌液の一部を希釈して選択培地を含まないLB-アガープレート4枚に播いた。一晩、37 $^{\circ}$ Cにて培養後、生成したプラークの数を数え、突然変異頻度を算出した。

パッケージング溶液の半量を、*E. coli G1225 (hfl)*株培養液へ加え、ファージを大腸菌へ感染させ、一部を希釈して感染効率を調べるため2枚のLBプレートに播くとともに、残りを変異体選択のため6枚のLBプレートに播いた。そして、の選択試薬であるP-galを含むLB-アガーを加えて、感染効率算出用のプレートは37 $^{\circ}$ Cにて一晩培養し、変異体選択用のプレートは24.5 $^{\circ}$ Cにて2晩培養し、生成したプラーク数より突然変異頻度を算出した。

*cII*変異体プラークをパスツールピペットで分取し、SMバッファー中に保存した。この溶液の一部を、以下のプライマーを用いたPCR反応にかけた。

P1: 5'-AAAAAGGGCATCAAATTAACC-3'

P2: 5'-CCGAAGTTGAGTATTTTGCTGT-3'

目的とする*cII*遺伝子を含む446塩基対の断片を得、このPCR産物をセファクリル S-400カラム

にて精製後、さらに片側のプライマーを用いてサイクルシーケンシング反応を行い変異箇所を同定した¹¹⁾¹²⁾。

C. 試験結果および考察

1. アグロバクテリウムサクシノグルカン（エームス試験）

最高用量を5,000 μ g/プレートとして用量設定試験および本試験（表1-1、2）を行った。その結果、アグロバクテリウムサクシノグルカンは代謝活性化の有無に関わらず、TA100株、TA98株および WP2*uvrA* /pKM101株の3種類の試験菌株に対して復帰変異コロニー数は、すべてのプレートで溶媒対照の1.5倍未満であった。しかし、TA1535株およびTA1537株に対しては1.5倍以上の復帰変異コロニーを誘発したプレートがあった。いずれも復帰変異コロニー数は溶媒対照の2倍未満で、2プレートの平均値は1.5倍未満であったが、これら2菌株について本試験と同様の条件下で確認試験（表1-3）を行った。ただし、1用量当たり3プレートを使用した。その結果、TA1535株に対しては代謝活性化の有無に関わらず、すべてのプレートで溶媒対照の1.5倍未満であった。TA1537株に対しては本試験の場合と同様、1.5倍以上2倍未満の復帰変異コロニーを誘発したプレートがあった。しかし、いずれも3プレートの平均値は溶媒対照の1.5倍未満であった。以上の結果から、アグロバクテリウムサクシノグルカンの微生物に対する復帰突然変異原性は陰性とした。

被検物質を試験するに当たり、溶媒として蒸留水およびリン酸緩衝液を用いた場合、最高用量を5,000 μ g/プレートとする供試用量では粘性が高く、試験管への分注およびその後の操作も困難であった。そこでDMSOに懸濁させた後、攪拌機で攪拌しながら供試量をマイクロピペットで採り、試験管へ分注した。被検物質がリン酸緩衝液またはS9 mixに溶解または懸濁するよりに、その後の操作は速やかに行った。しかし、

すべての用量において、透明性のある固形物がプレート上で確認された。しかし、復帰変異コロニーの計測には影響はなかった。また、試験に供した最高用量の2倍量の試験溶液を軟寒天と共に最少グルコース寒天平板上に重層し、試験結果に影響を与える汚染物のないことを確認した。

TA1535株に対して代謝活性化を行った場合に(以下+S9 mix)、用量設定試験および本試験(表1-1、2)の1、250 μ g/プレートの用量において、1プレートから溶媒対照の1.5倍以上2倍未満の復帰変異コロニーを得た。しかし確認試験(表1-3)の結果、設定した6用量のすべてのプレートが溶媒対照の1.5倍未満の復帰変異コロニー数を示した。

なお、被検物質は試験した用量範囲内では、代謝活性化の有無に関わらず5種類の試験菌株のいずれに対しても生育阻害を示さなかった。

試験に使用した5種類の菌株は、いずれも各菌株の特性を保持しており、陰性対照および陽性対照に対する復帰変異コロニー数もすべての試験で適正な範囲であった。

2. アマシードガム(小核試験)

アマシードガムに関して、あらかじめLD₅₀の検討を行った結果、1500および2000mg/kgにて毒性徴候が認められなかったため、最高用量を2000mg/kgとし、公比2にて3用量(500、1000、2000mg/kg)を設定した(表2-1)。アマシードガム投与群において、いずれの用量に置いても陰性対照群に対して統計的に有意な小核誘発頻度の上昇は認められなかった。これに対し、陽性対照群(シクロフォスファミド)では、強い小核誘発性が見られた。なお、陽性対照に置いた場合は、強い骨髄抑制のため幼若赤血球数の顕著な現象が認められ、観察細胞数は所定の数に達しなかった。(データは表2-2、3に示す)

3. コメヌカ抽出物(染色体異常試験、小核試

験)

a) 染色体異常試験:

コメヌカ抽出物は白色粉末で、生理食塩水、およびDMSOには懸濁できなかつた。培養液中に直接懸濁しても懸濁は分離、浮遊してしまうため、1%カルボキシメチルセルロース(CMC)に懸濁して調整した。

試験検体処理時から標本作製時まで、すべての用量で、肉眼で確認できる程度の沈殿・浮遊物が観察された。

コメヌカ抽出物の代謝活性化系の存在/非存在下で6時間処理法による染色体異常試験の試験結果と、代謝活性化系非存在下での24、48時間連続処理法の試験結果を表3-1に示す。すべての処理群において最高濃度(5mg/ml)まで試験を実施したが染色体異常の明らかな誘発は認められなかった。また、細胞増殖性を指標とし、細胞毒性を評価したが、すべての用量において細胞毒性は認められなかった。

以上のことから、コメヌカ抽出物は明らかな細胞毒性も、染色体異常誘発性も認められなかった。

b) 小核試験:

小核試験を実施するにあたり、毒性を検討したところ、2000mg/kgにて毒性徴候が認められなかったため、最高用量を2000mg/kgとし、公比2にて3用量(500、1000、2000mg/kg)を設定した。小核試験においても、いずれの用量でも陰性対照群に対して統計的に有意な小核誘発頻度の上昇は認められなかった。これに対し、陽性対照群(マイトマイシンC)では、強い小核誘発性が見られた。(データは表3-2、3に示す)

4. 食用赤色2号(トランスジェニックマウス遺伝子突然変異試験、小核試験)

これまでの研究で、食用赤色2号(アマランス)の遺伝毒性、および発がん性に関してははっきりとした結論はでていない。1987年のIARCで

の再評価においても“inconclusive (結論づけられない)”としている¹³⁾。米国においては1976年にアマランスの食品添加物としての使用を禁じている。最近、津田らはDNA損傷試験の一つであるコメット試験を用いて、アマランスがマウスの大腸、および胃に対してDNA損傷を誘発することを報告している¹⁴⁾。しかしながら、このDNA損傷はラットでは認められないこと、マウスでも連続投与では認められないこと、さらにコメット試験自体が遺伝毒性試験のとしての評価が十分ではなく、ここで観察されるDNA損傷と発癌性との関係が不明であることなどから、依然としてその遺伝的影響に関しては疑問が残っている。そこで今回我々は、彼らの報告を検証する目的で、アマランスがマウスの大腸に対して遺伝子突然変異を誘発するかどうかを、トランスジェニックマウス(Muta™Mouse)を用いた *in vivo* 遺伝子突然変異試験により検討した。

大腸における *lacZ* および *cII* 遺伝子の変異頻度を解析した結果を表4-1、2、3、4に示す。*lacZ*、*cII*ともに最高用量のみを用いて追加試験を行った。まず、*lacZ* 遺伝子に関しては、一回目の検討においては、多少の用量相関性が認められたものの、コントロール群の変異頻度よりも低かった。コントロール群に置いては1匹のマウスが特に高い変異頻度を示すことが影響して平均の頻度を上げているが、このマウスは再試験においても高い頻度を示したことから、他の臓器でも同じ様に高い頻度を示したことから、発生初期におけるクローナルな変異が影響していると考えられる。これを除外すれば、コントロール群の変異頻度は他の処理群とほぼ等しい。*cII* 遺伝子の変異頻度に関しては、最高用量群において、1.5倍を越える変異頻度の上昇が見られた。再試験においてもこの変異頻度の上昇は再現された。

このわずかな変異頻度の上昇が、生物学的に有意であるかを検討するため、得られた変異体のシーケンス解析を行った。(表4-5)突

然変異の誘発頻度が十分に高くなくても、その被験物質が極めて特徴的な遺伝的影響を与える場合、生じる突然変異にも特徴的パターンが見られることがある。変異頻度の高かった個体にはクローナルな変異が見られ、独立した変異体の数で変異頻度を補正すると、コントロール群との間に差は認められなくなった。最高用量にて得られた変異体のシーケンス解析の結果からも、得られた変異のパターンにコントロール群との差はなかった。このことは、わずかに見られた変異頻度の上昇も、生物学的には有意な結果であるとは言えないことを示している。これに対して、陽性対照であるストレプトゾトシン投与群では、アマランス同様に変異頻度の上昇はあまり大きくなかったが、変異スペクトルは、表5に示したようにCpGサイト以外のGCからATへのトランジション変異が明らかに増加しており、ストレプトゾトシンによる特異的な変異が示唆された。

大腸以外の臓器に関しても、最高用量に関して前胃、腺胃、肝臓、肺について *lacZ* および *cII* 遺伝子の変異頻度を解析したが、いずれの臓器においても、赤色2号処理による変異頻度の上昇は認められなかった(表4-6, 4-7)。

最高投与量である、2000mg/kgは、津田らの報告しているコメット試験では十分にDNA損傷を誘発する用量であるが、我々の試験では遺伝子突然変異の誘発は認められなかったことは、アマランスによって生じるDNA損傷が、発がんに至る可能性は極めて低いことを示すものである。

また、小核試験の結果(表4-8)に関しても、アマランス処理による影響は認められなかった。津田等は、アマランスは最高用量(2000mg/kg)で、骨髄においてもDNA損傷が観察されると報告しているが、大腸での突然変異同様、彼らのデータを指示する結果は得られなかった。

D. 結 論

3種類の既存天然添加物、アグロバクテリウムサクシノグルカン、アマシードガム、コメヌカ抽出物について、遺伝毒性を検討した結果いずれの添加物についても遺伝毒性は認められなかった。

タール系色素である食用赤色2号に関してもマウス大腸等における有意な遺伝子突然変異誘発性は認められなかった。また、マウス骨髄に対する染色体異常誘発性も認められなかった。食用赤色2号は、コメットアッセイによるDNA初期損傷は観察されると報告されているが、それが遺伝子突然変異や、染色体異常として固定される可能性は低いと考えられる。ただし、今回用いた検体は、その精製度が比較的高く、混入する不純物がコメットアッセイにより遺伝子傷害性を起こしたとも考えられるため、その危険性についても今後充分検討する必要があると考えられる。

E. 参考資料、参考文献

- 1) 食品添加物協会監修、既存添加物名簿収載品目リスト注解書、東京、1999.
- 2) 厚生省生活衛生局食品化学課監修、食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針—英訳版つき—、日本食品添加物協会、東京、1996.
- 食品添加物協会監修、既存添加物名簿収載品目リスト注解書、東京、1999.
- 3) 労働省安全衛生部化学物質調査課編、新・微生物を用いる変異原性試験ガイドブック、中央労働災害防止協会、東京、1986
- 4) Ishidate, M., Jr. and S. Odashima
Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells in vitro--a screening for chemical carcinogens. *Mutat. Res.*, **48**, 337 (1977)
- 5) 染色体異常試験データ集, 石館基監修 p.363, エル・アイ・シー, 東京 (1987)
- 6) Hayashi, M., T. Sofuni and M. Ishidate, Jr.
An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutat. Res.*, **120**, 241-247. (1983)
- 7) 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)
- 8) Hayashi, M., Kodama, Y., Awogi, T., Suzuki, T., Asita, A. O. and Sofuni, T. The micronucleus assay using peripheral blood reticulocytes from mitomycin C- and cyclophosphamide-treated rats. *Mutat. Res.*, **278**, 209-213 (1992)
- 9) Suzuki, T., Hayashi, M., Sofuni, T. and Brian C. Myhr The concomitant detection of gene mutation and micronucleus induction by mitomycin C in vivo using lacZ transgenic mice. *Mutat. Res.*, **285**, 219-224 (1993)
- 10) Suzuki, T., M. Itoh, M. Hayashi, Y. Nishikawa, S. Ikezaki, F. Furukawa, M. Takahashi and T. Sofuni Organ variation in the mutagenicity of dimethylnitrosamine in Big Blue mice. *Environ. Mol. Mutagen.*, **28**, 348-353 (1996)
- 11) Kohara, A., Suzuki, T., Honma, M., Oomori, T. Ohwada, T., Hayashi, M., Dinitropyrenes induce gene mutations in multiple organs of the lambda/lacZ transgenic mouse (MutaTMMouse). *Mutat. Res.* **515**, 73-83 (2002)
- 12) Kohara, A., Suzuki, T., Honma, M., Ohwada, T., Hayashi, M., Mutagenicity of aristolochic acid in the lambda/lacZ transgenic mouse (MutaTMMouse). *Mutat. Res.* **515**, 63-72 (2002)
- 13) IARC. Overall evaluation of carcinogenicity. An updating of IARC monographs volume 1 to 42. Supplement No. 7, P.56, International Agency for Cancer Research, World Health Organization, Geneva.

- 14) Tsuda, S., Murakami, M., Matsusaka, N., Kano, K., Taniguchi, K. and Sasaki, YF DNA Damage Induced by Red Food Dyes Orally Administered to Pregnant and Male Mice. Toxicological Sciences 61, 92-99 (2001)

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし