

市販健康茶の突然変異原性について

吉田 誠二^{*}, 藤田 博^{*}, 小縣 昭夫^{*}, 上村 尚^{*}

Mutagenicity of Commercial Tea

Seiji YOSHIDA^{*}, Hiroshi FUJITA^{*}, Akio OGATA^{*} and Hisashi KAMIMURA^{*}

Keywords : 花紅柳緑茶 kakoryuryokucha , 変異原性 mutagenicity, エームス試験 Ames test , 染色体分析 chromosome analysis , チャイニーズハムスター chinese hamster

はじめに

近年の健康食品ブームにより、消費者の需要は増す傾向にあるが、御芝堂減肥膠囊、茶素減肥等一連の中国製ダイエット用健康食品摂取により肝障害が誘発され、死亡例を含む重篤な健康被害が相次ぎ、社会問題化した¹⁾。これらの製品には、フェンフルラミン、N-ニトロソ-フェンフルラミン、甲状腺末などの医薬品成分やその類似化合物が添加されていたが、厚生労働省は、肝障害の原因をN-ニトロソ-フェンフルラミンと断定した²⁾。さらに、中国製ダイエット茶である花紅柳緑茶を飲んでいた女性が重篤な肝障害に陥ったと厚生労働省は報じた³⁾。原因は先のダイエット食品同様、上述した医薬品成分やその類似化合物添加によるものと考えられたが、花紅柳緑茶の成分検査⁴⁾において、フェンフルラミン、N-ニトロソ-フェンフルラミン、甲状腺ホルモンは検出されず、未だに原因物質は特定されていない。

一方、上述した肝障害等、臨床症状が顕著に現れるものについては、その危険性を察知することが比較的容易であり、原因となった健康食品も特定しやすいが、突然変異性のように、DNAに作用がおよび、突然変異を誘発している場合においては、症状はなく、現時点ですぐ判断は出来ないものがあり、この突然変異が重篤な遺伝的障害を惹起する危険性がある。種々の体細胞において突然変異が誘発されると発癌の原因になることは良く知られており、また、生殖細胞での突然変異は次世代まで伝達され、胎児死亡や催奇形性を誘発する可能性もあることから、突然変異性の誘発の有無を調べておくことは重要である。

近年の健康食品ブームを考慮し、突然変異誘発性を含めた生体影響に関する情報の蓄積は必須であると考えられる。

これらの事を考慮し、健康食品の安全性再確認の一環として、市販健康茶の中で健康被害が報告された、花紅柳緑茶の変異原性をエームス試験、哺乳動物を用いての染色体異常誘発性をチャイニーズハムスターの骨髄細胞で調べ、その遺伝的安全性の検討を行ったので報告する。

実験方法

1. 試料

エームス試験では、花紅柳緑茶の熱湯抽出物を試験に用いた。熱湯抽出物は、花紅柳緑茶製品1包(約2g)を200mLの純水に入れ加熱、5分間沸騰後冷却し、45℃で減圧濃縮した。1包から約650mgの抽出物が得られた。抽出物は純水に溶解後ろ過滅菌を行った。

染色体試験では、花紅柳緑茶の熱湯抽出物を試験に用いた。熱湯抽出物は、花紅柳緑茶製品1包を約90℃に熱した200mLの純水に浸漬し、30分放置後、包を取り出し、使用時まで冷蔵庫保存した。

2. エームス試験

Salmonella typhimurium TA98, TA100, TA97及びTA102⁵⁾を用いた。試験はエームス法の变法であるプレインキュベーション法⁶⁾により行った。代謝活性化には、フェノバルビタール及びβ-ナフトフラボンを投与した雄性SD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S9⁵⁾を用いた。S9 mix^{5,6)}中のS9量は、10%(50mL/プレート)とした。

試料溶液0.1mLを小試験管に入れ、S9 mix 0.5mLまたはリン酸緩衝液(pH 7.4)0.5mLを加えた。一夜培養菌液を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⁵⁾2mLを加え混合後、最少グルコース寒天培地⁵⁾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3枚のプレートを用い、統計解析は、Kruskal-Wallis検定を行い、更に、Mooreら⁷⁾のプログラムによる回帰分析を行い、両検定において有意な場合に突然変異原性陽性と判断した。

3. チャイニーズハムスターを用いた単回投与染色体試験

当部動物室で繁殖・維持を行っている、8週令のチャイニーズハムスターの雄を用いた。投与の際は、冷蔵庫より、

* 東京都健康安全研究センター環境保健部病理研究科 169-0073 新宿区百人町 3-24-1

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

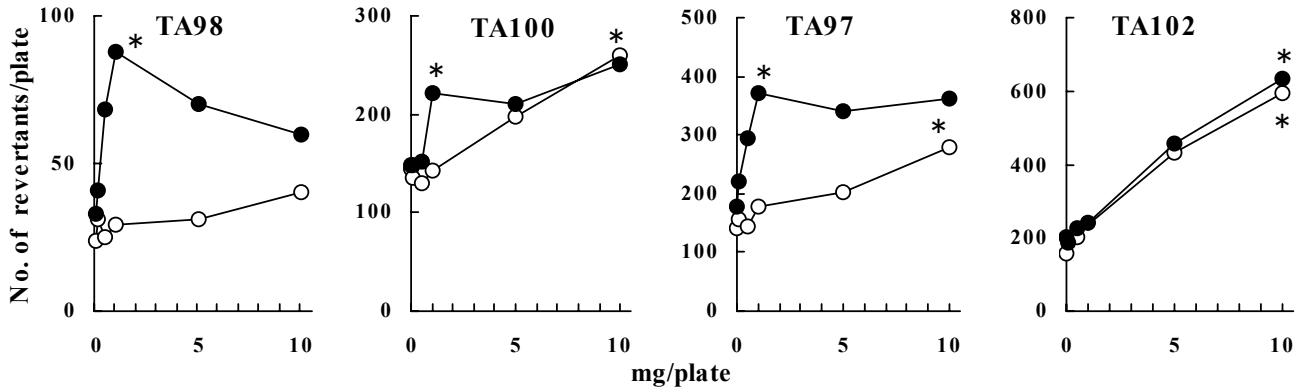


図1. 花紅柳緑茶のエームス試験.

○ : S9無添加, ● : S9添加. * : 有意な用量相関の見られた増加の最高濃度.

先の花紅柳緑茶溶液を室温に戻してから経口投与した。投与量は、20 mL/kg, 10 mL/kg, 5 mL/kg の3段階を設け、陰性対照は純水のみを試験群と同量投与したものとした。なお、20 mL/kgの用量は、成人(体重60 kgとして)が一日に花紅柳緑茶1200 mL相当を摂取する量である。

投与後、24時間および48時間目に動物をエーテル麻酔下にてと殺し、常法^{8,9)}に従い、大腿骨より骨髓細胞の染色体標本を作製した。染色体分析はよく広がった分裂中期細胞を1匹について100個観察し、染色体の構造異常及び数的異常の有無について調べた。染色体異常誘発の有無の判定は染色体異常誘発頻度が5%以上を示したものを陽性(+)とし、それ以下を陰性(-)とした。

4. チャイニーズハムスターを用いた連続投与染色体試験

上記の花紅柳緑茶溶液を20 mL/kg, 10 mL/kg, 5 mL/kgの用量で週5回の割合で4週間経口投与し、各週ごとに染色体標本を作製し、染色体分析を行った。染色体異常誘発の有無の判定は上記同様である。

結果および考察

エームス試験

結果を図1に示す。

最高濃度を10 mg/プレートで試験を行った。S9無添加の場合は、4菌株において10 mg/プレートまで復帰コロニー数が増加した。TA97, TA100及びTA102では有意な用量相関が見られたがTA98は有意ではなかった。S9添加の場合は、TA98, TA100及びTA97においては1 mg/プレートまで用量相関を持つ増加が見られたが、これ以上の濃度では復帰コロニー数は同じかやや減少した。TA102では10 mg/プレートまで有意な増加であった。TA98のS9無添加をのぞき増加の倍率も2-3倍で統計的に有意であることから変異原陽性と判断した。

花紅柳緑茶の変異原性が、S9無添加の3菌株、S9添加の4菌株で見られた。熱湯抽出物は1包から約650 mg得られたことから用法通りに服用した場合、かなりの変異原を摂取していると思われる。S9添加において変異原性が低濃

度で高くなることから、代謝後に変異原性が強まると考えられる。

S9添加時の高濃度での復帰コロニー数のプラトーまたは減少は、lawnの観察から増殖阻害、致死性によるものではなく復帰コロニー数そのものが抑制されていると考えられ、抽出したものをそのまま用いていることからS9添加によって変異原性の抑制物質が生成している可能性も考えられる。また、TA102においては、S9添加の有無にかかわらず比較的高い変異原性が検出された。これは、TA102が反応する変異原の特長から過酸化物質が含まれているのではないかと推察された。

植物抽出物には、フラボノイド系の物質が多く含まれていると言われている。フラボノイド類(例えばケルセチン)の変異原性はS9添加によって増加する¹⁰⁾ことや、フラボノイドの変異原性には過酸化水素やヒドロキシラジカルとの関与¹¹⁾が指摘されており、花紅柳緑茶の変異原性との類似性が見られた。

チャイニーズハムスターを用いた単回投与染色体試験

表1に示した投与後24時間目の結果、いずれの花紅柳緑茶投与群も染色体の構造異常および数的異常の出現頻度は、0~1%と低く、誘発性ありと判断する5%に達しておらず、染色体への影響は認められなかった。同様に、表2に示したように、48時間目においても染色体の構造異常および数的異常細胞の増加は観察されず、その頻度も誘発性ありと判断する5%以下であることから、花紅柳緑茶単回投与の24および48時間目における染色体異常誘発はないものと思われる。

チャイニーズハムスターを用いた連続投与染色体試験

次に、1~4週間投与の結果を表3に示す。

花紅柳緑茶投与群は5匹、純水のみを与えた陰性対照は4匹の動物を用い、染色体観察は単回投与試験と同様に行った。

1週間投与群の観察結果では、いずれの花紅柳緑茶投与群も陰性対照と同頻度の染色体異常誘発頻度であり、花紅柳緑茶によると思われる異常細胞の増加は見られず、誘発性ありと判断する5%に達していなかった。また、花紅柳

表 1. 花紅柳緑茶 24 時間投与試験

用量	動物	細胞数	異常数	異常%
20 mL/kg	1	100	0	0
	2	100	1	1
	3	100	0	0
	4	100	0	0
	5	100	0	0
判定 (-)		500	1	0.2
10 mL/kg	1	100	1	1
	2	100	0	0
	3	100	0	0
	4	100	0	0
	5	100	0	0
判定 (-)		500	1	0.2
5 mL/kg	1	100	0	0
	2	100	0	0
	3	100	0	0
	4	100	0	0
	5	100	0	0
判定 (-)		500	0	0
0 mL/kg	1	100	0	0
	2	100	0	0
	3	100	0	0
	4	100	1	1
判定 (-)		400	1	0.25

表 2. 花紅柳緑茶 48 時間投与試験

用量	動物	細胞数	異常数	異常%
20 mL/kg	1	100	0	0
	2	100	0	0
	3	100	0	0
	4	100	0	0
	5	100	0	0
判定 (-)		500	0	0
10 mL/kg	1	100	0	0
	2	100	0	0
	3	100	0	0
	4	100	0	0
	5	100	1	1
判定 (-)		500	1	0.2
5 mL/kg	1	100	0	0
	2	100	0	0
	3	100	0	0
	4	100	1	1
	5	100	1	1
判定 (-)		500	2	0.4
0 mL/kg	1	100	0	0
	2	100	0	0
	3	100	0	0
	4	100	0	0
判定 (-)		400	0	0

緑茶群および陰性対照において、染色体の数的異常は一例も観察されなかった。

2~4 週間投与群の結果においても、花紅柳緑茶投与群の、いずれの投与量・投与時間でも、染色体異常細胞の増加は全く見られず、その頻度は誘発性ありと判断する 5%よりも低いものであった。わずかに観察された異常細胞も染色体の構造異常としては軽度であり、自然発生でも見られる、シングルクロマチッドギャップのみであり、染色体異常として考慮すべきブレイクや染色体交換を保有する細胞は一例も観察されなかった。同様に、倍数体などの数的異常を保有する細胞も全群を通じて一例も観察されなかった。

これらの結果、花紅柳緑茶投与により誘発された染色体異常誘発頻度は、0~0.8%の範囲であり、誘発性ありと判断する 5%よりも低く、また、観察された異常も自然発生においても見られる軽度のシングルクロマチッドギャップのみであることを考慮すると、本実験条件下において花紅柳緑茶は、チャイニーズハムスター骨髄細胞染色体へ影響をおよぼさないと結論した。

変異原性試験は被検物質の突然変異誘発性の有無を決定するものであり、種々の試験方法があるが、今回、DNA の突然変異誘発作用の観察が簡便であり、かつ感度の高い試験系であるエームス試験を行った。一方、哺乳動物の染色体への影響を染色体観察が容易なチャイニーズハムスター骨髄細胞を用いた試験で調べた。

エームス試験の結果、S9 無添加の場合において、用いた 4 菌株の全てが、10 mg/プレート用量で復帰コロニー数

が増加し、そのうちの 3 菌株では有意な用量相関が見られた。同様に、S9 添加の場合においても陽性の結果を示し、花紅柳緑茶熱湯抽出物の変異原性が明らかになった。

一方、哺乳動物を用いた染色体試験では、単回および連続投与での全ての結果が陰性であり、染色体への影響は見られなかった。これらの結果から、染色体試験では陰性の結果であり、直ちに遺伝的障害に結びつくようなものではないが、発癌性を示す物質の多くが DNA に突然変異を誘発することを考えると、花紅柳緑茶摂取による遺伝的危険度を考慮しなくてはならない。

90 年代中盤からの健康ブームにより、多種多様な健康食品が製造され、インターネットを通して容易に購入出来るようになった。また、健康食品への過信から、表示されている使用量を参考程度にしか考慮せず、過剰な摂取が予想され、長期摂取の可能性もある。実際、変異原性、染色体異常誘発性を示す健康食品の情報^{12,13)}もあることから、遺伝的安全性の検討は更に必要になってくる。これらのことを考え、健康食品・健康茶等の変異原性の有無を含めた安全性に関する情報の蓄積は必須である。

ま と め

市販中国製健康茶である花紅柳緑茶の変異原性を検討するため、エームス試験および哺乳動物を用いた染色体試験を行った。

エームス試験では、S9 無添加の場合、4 菌株において 10 mg/プレートまで復帰コロニー数が増加し、TA97、TA

表 3. 花紅柳緑茶 1~4 週間投与試験

用量	動物	細胞数	1 週間投与群		2 週間投与群		3 週間投与群		4 週間投与群		
			異常数	異常%	異常数	異常%	異常数	異常%	異常数	異常%	
20 mL/kg	1	100	1	1	2	2	0	0	0	0	
	2	100	1	1	1	1	0	0	0	0	
	3	100	0	0	0	0	2	2	1	1	
	4	100	0	0	0	0	1	1	1	1	
	5	100	0	0	1	1	1	1	1	1	
	判定 (-)		500	2	0.4	4	0.8	4	0.8	3	0.6
10 mL/kg	1	100	0	0	1	1	0	0	0	0	
	2	100	0	0	0	0	1	1	1	1	
	3	100	1	1	0	0	1	1	0	0	
	4	100	0	0	0	0	1	1	0	0	
	5	100	0	0	0	0	1	1	1	1	
	判定 (-)		500	1	0.2	1	0.2	4	0.8	2	0.4
5 mL/kg	1	100	1	1	2	2	0	0	1	1	
	2	100	1	1	0	0	1	1	0	0	
	3	100	1	1	1	1	1	1	1	1	
	4	100	0	0	1	1	1	1	0	0	
	5	100	1	1	0	0	1	1	0	0	
	判定 (-)		500	4	0.8	2	0.4	1	0.8	2	0.4
0 mL/kg	1	100	1	1	1	1	0	0	0	0	
	2	100	0	0	1	1	1	1	0	0	
	3	100	0	0	1	1	1	1	0	0	
	4	100	1	1	1	1	0	0	2	2	
	判定 (-)		400	2	0.5	4	1	2	0.5	2	0.5

100 及び TA102 では有意な用量相関が見られた。S9 添加の場合、TA98、TA100 及び TA97 においては 1 mg/プレートまで用量相関を伴う増加が見られた。

チャイニーズハムスターの雄に花紅柳緑茶の種々用量を投与した染色体試験において、いずれの投与量・投与期間においても染色体異常の有意な増加は認められず、染色体への影響はないものと判断した。

文 献

- 平成 14 年 7 月 12 日付け厚労省報道発表
- 平成 15 年 2 月 12 日版毎日新聞
- 平成 14 年 10 月 5 日版日本経済新聞
- 平成 14 年 10 月 9 日埼玉県政ニュース
- Maron, D. M. and Ames, B. N.: *Mutation Res.*, **113**, 173-215, 1983.
- 矢作多貴江: 蛋白質核酸酵素, **20**, 1178-1189, 1975.
- Moore, D. and Felton, J. S.: *Mutation Res.*, **119**, 95-102, 1983.
- Seller, M. J. and A.A. Mends: *Stain Technol.*, **46**, 285, 1971.
- Hope, J.: *Mut. Res.*, **56**, 47-50, 1977.
- Bjeldans, L. F. and Chang, G. W.: *Science*, **197**, 577-578, 1977.
- Formica, J. V. and Regelson, W.: *Fd Chem. Toxic.*, **33**, 1061-1080, 1995.
- 野坂富雄, 松元明世, 宮澤法政: 埼玉県衛生研究所報, **26**, 89-96, 1992.
- 山田さゆり, 只木晋一, 野坂富雄: 埼玉県衛生研究所報, **28**, 31-35, 1994.