

## 輸入レモンに付着する化学物質の変異原性について

平岡幸夫, 平原幸枝

(1991年10月9日 受理)

### Mutagenicity of Residual Chemicals on the Skin of Imported Lemon

Yukio HIRAOKA and Sachiye HIRAHARA

#### Abstract

Mutagenicity of residual chemicals on the skin of imported lemons was investigated by using the Ames test.

Their outer surface was rinsed with either acetone or dichloromethane. These solvents were evaporated and dried. To this, dimethyl sulfoxide was added to prepare for the Ames test. Experimental strains, TA 98 and TA 100, were obtained from the National Institute of Hygiene.

In the case of dichloromethane, both TA 98 and TA 100 showed positive reaction in both with and without S9 mix. On the other hand, in acetone, a similar tendency was observed, but not as distinct.

#### 結 言

日本の食糧自給率は年々低下し、反面外国からの農産物の輸入量は増加している。オレンジ、レモン、牛肉、サクランボなどが大量に輸入されているが、農産物の輸入の自由化にともない、今後さらにそれらの輸入量が増加することは必至である。

輸入される農産物では長期間鮮度を保持するためや品質の劣化を防止するため、収穫後の農産物に数種の農薬が使用されている。それらはポストハーベストと言われ、日本の農薬安全使用基準では許可されていない使用方法である。

また一部農産物では、購買意欲を高めるためにワックスや色づけなど農薬以外の化学物質も使用されている可能性が高いとも言われている。

現在わが国ではそのような農産物が大量に輸入され、消費されているのが実状である。この

ような状況に対して、多くの消費者はそれらの人体影響について大きな不安を抱き、さまざまに憂慮している。しかし、そのことについての情報や公開された実験データは極めて少ない。そこで著者らはこのような事実を鑑み、輸入レモンを実験材料に変異原性を検討した。

## 実験材料及び方法

### 1) 試料及び試料の調製

広島市内のスーパーマーケットで購入した輸入レモン10個を1実験区の実験材料とした。

1個のレモンにつき約20mlのアセトンを使用してその皮に付着している化学物質を洗い流した。合計200mlのアセトンを減圧蒸留器を用いて約60°Cの温浴中で内容物を乾固したのち、それにDMSO(dimethyl sulfoxide)を添加してAmes Testのための試料原液2mlを調製した。次にジクロロメタンを使用して同様な操作を繰り返し、2種類のAmes Test用の試験原液を調製した。これらの試験原液からアセトン抽出液の場合は2倍希釈の段階希釈を5段階作製し、またジクロロメタン抽出液の場合は4段階作製し、各々試験液とした。

### 2) 培地及び試薬

培地：クリメディア AM 培地(日清製粉<sup>(株)</sup>製)を使用した。

上層寒天培地：Bactro Agar 0.6% 及び塩化ナトリウム0.6%の割合の水溶液を調製し、高圧蒸気滅菌器により滅菌した。L-Histidine 0.5 mM 及び D-Biotine 0.5 mM の割合の水溶液を調製し、ろ過滅菌器により滅菌したのち、使用時にこの溶液を1/10用量加え混和した。

S9 Mix:S9 Mix cofactor(オリエンタル酵母工業<sup>(株)</sup>製)1gに滅菌精製水9ml及びS9(オリエンタル酵母工業<sup>(株)</sup>製)1mlを加え10mlとした。

### 3) 供試菌株

試験菌株としては国立衛生試験所から譲渡された *Salmonella typhimurium* TA 98 及び TA 100 (以下 TA 98 及び TA100 と略す) を用いた。前培養として、あらかじめ滅菌しておいた2.5% Nutrient broth (Difco 社製) に、凍結保存した TA 98 及び TA 100 を接種し、37°C で16時間振とう培養を行い、変異原性試験用の供試菌液とした。

### 4) 実験操作

Ames<sup>1)</sup> 法の変法である矢作<sup>2)</sup> のプレインキュベーション法により TA 98 及び TA 100 を使用して行った。すなわち、試験液 0.1 ml, 供試菌液 0.1 ml, 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) あるいは代謝活性化を行う場合には、S9 Mix 0.5 ml を加え 37°C で20分間プレインキュベーションし、あらかじめ 45°C に保温した上層寒天培地 2 ml を加え、クリメディア AM 培地に重層した。37°C 48時間培養後、復帰変異コロニー数を計算した。数値は試験液各濃度について2回ずつ行いその平均を取った。

## 結 果

輸入レモンのアセトンエキス及びジクロロメタンエキスの TA 98 及び TA 100 に対する変異原性を Table 1・Fig. 1 及び Table 2・Fig. 2 に各々示した。

Ames Test では一般に、①化学物質の濃度の増加とともに復帰コロニー数が増加する（量－反応関係）<sup>3)</sup>、②復帰コロニー数が溶媒対照の2－3倍以上になるときその化学物質は変異原性陽性と判断される。

アセトンエキスは S9 Mix 非存在下では TA 100 の場合、上記の①及び②の条件を満たしておらず、変異原性は陰性と判断できる。また TA 98 の場合は①②の条件を満足しているが、溶媒対照の復帰コロニー数が5と少ないため、陽性と判断するためには3倍以上の復帰コロニー性が必要と考えられる。したがってこの場合疑陽性と判断できる。

S9 Mix 存在下では、TA 100 の場合①の条件は満足しているものの、100  $\mu\text{L}/\text{plate}$  で復帰コロニー数が11%不足しており、この場合も明確な陽性とはいえない。また、TA 98 の場合も①の条件は満足しているものの、50  $\mu\text{L}/\text{plate}$  で復帰コロニー数が7%不足しており、この

**Table 1** Results of Mutagenicity Tests with Aliquots of Skin-Rinse-Extracts of Lemon extracted by acetone

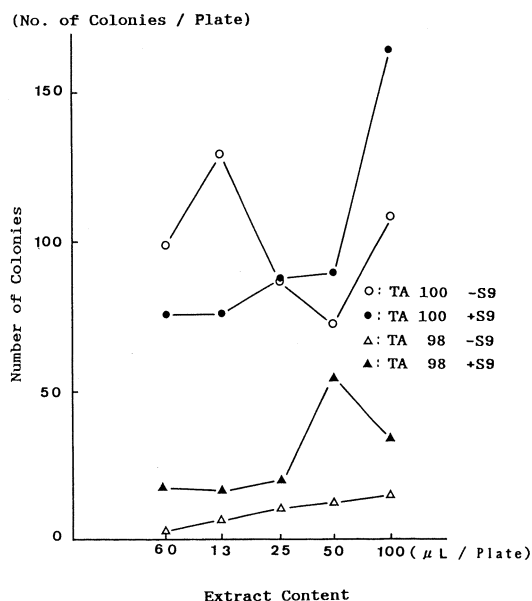
Extract Used* ( $\mu\text{L}$ )	No. of Revertant Colonies**			
	TA 98		TA 100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
6.0	3	28	98	75
13	7	26	128	76
25	10	30	86	88
50	13	54	72	88
100	14	34	108	163
NC***	5	29	96	92
PC****	129	4381	770	773

\* : 10 lemons were used for extraction.

\*\* : Average of the replicate plates.

\*\*\* : DMSO (dimethyl sulfoxide) was used as negative control.

\*\*\*\* : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide and 2-aminoanthracene were used in -S9 and +S9, respectively as positive control.



**Fig. 1** Dose-effect relationship for extract content.

**Table 2** Results of Mutagenicity Tests with Aliquots of Skin-Rinse-Extracts of Lemon extracted by dichloromethane

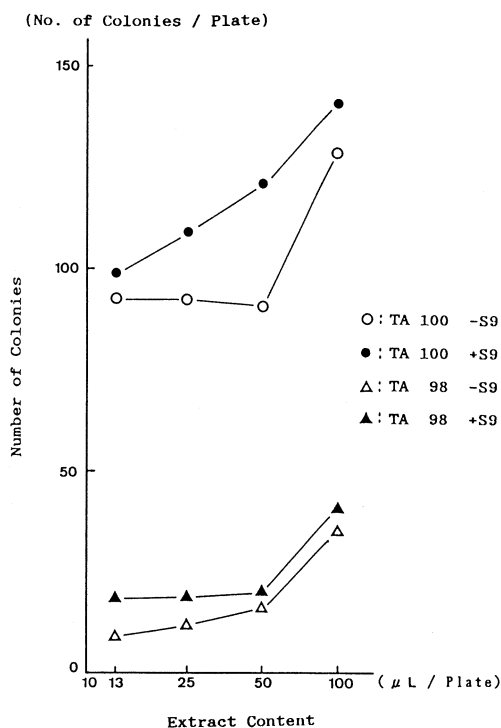
Extract Used* ( $\mu$ L)	No. of Revertant Colonies**			
	TA 98		TA 100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
13	9	19	92	99
25	12	19	92	109
50	17	20	91	121
100	35	41	128	141
NC***	12	14	98	90
PC****	180	1491	894	804

\* : 10 lemons were used for extraction.

\*\* : Average of the replicate plates.

\*\*\* : DMSO (dimethyl sulfoxide) was used as negative control.

\*\*\*\* : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide and 2-aminoanthracene were used in -S9 and +S9, respectively as positive control.



**Fig. 2** Dose-effect relationship for extract content.

場合も疑陽性といわざるを得ない。

一方、ジクロロメタンエキスは S9 Mix 存在下の TA 100 及び S9 Mix 非存在下の TA 98 の場合、①と②の条件を満足しており、陽性と判断された。

以上のことから、輸入レモンの皮に付着した化学物質の変異原性は、疑陽性ないしは陽性であると判断できた。

## 考 察

食品と発ガンの因果関係が問われて以来<sup>3)</sup>、食品の変異原性に対する知見が多く報告されている<sup>4,5)</sup>。

最近わが国では多種類の農産物を大量に海外から輸入し、国民に供給しているが、これらに対する変異原性についての知見はまだ少ない。

本研究では農薬の抽出溶媒としてよく利用されるアセトンやジクロロメタンを使用して輸入レモンの皮に付着する化学物質の変異原性を検討した。その結果そのアセトンエキスの変異

原性は S9 Mix を加えた場合とそうでない場合との両方で疑陽性と判断された。そしてジクロロメタンエキスの場合はやはり両方で陽性と認められた。従ってアセトンエキス及びジクロロメタンエキスに含有される変異原性を示す物質は S9 Mix の酵素系により代謝を受け、不活性化しないものと推測される。

アセトンエキス及びジクロロメタンエキスが 50-100  $\mu$ L/plate の時、S9 Mix 存在下の TA 100 でともに復帰コロニー数が高くなった。これはレモン2.5-5個分の皮を抽出したことに相当する。私たちがレモンの皮を利用する場合でも、通常1回にそれだけの量は取らないし、アセトンやジクロロメタンのような溶媒を使用することはないので、健康障害は起こりそうにないと考えられるかも知れない。

しかしアセトンエキスあるいはジクロロメタンエキスに含有される変異原性を示す物質の具体的な名称が明確になり、その物質の蓄積性や生物学的半減期などが明らかにされない限り、それらを安易に利用すべきではないと考えなければならない。

従って今後は変異原性を示す物質の検索、その蓄積性や生物学的半減期の究明を検討課題としたい。

本研究は文部省科学研究費補助金（課題番号02670220）を受けて行われた。

#### 参 考 文 献

- 1) Ames, B. N., Durston, W. E., Yamasaki, Lee, F. D.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 70, 2281-2285 (1973).
- 2) 矢作多貴子：蛋白質・核酸・酵素, 20, 1178-1182 (1975).
- 3) Wynder, E. L., Gori, G. B.: J. Natl. Cancer Inst. 58, 825-832 (1977).
- 4) Nagao, M., Takahashi, Y., Yamanaka, H., Sugimura, T.: Mutation Res. 68, 101-106 (1979).
- 5) 菊川清見, 加藤哲太, 早津彦哉：食衛誌, 26, 432-436 (1985).