

## 4. 未利用海藻の食品安全性試験

食産業技術支援グループ ○青木 央

### 1. はじめに

今回は、食習慣の少ない未利用海藻のなかから、ウガノモクを例にあげて、食品の安全性を知るには、どのような試験方法があるのか、その手法を紹介する。

このウガノモクはヒジキと同じホンダワラ科である。ヒジキは国内に食習慣の伝統があるなじみ深い食材であるが、ヒ素の含有量が他の一般的な食材と比較して高値であることから、海外では食品としての規制を実施している国がある。日本では、伝統的な食べ方をしている限りにおいてヒ素の影響はないとして、ここに海外との見解が相違している。このヒ素がウガノモクに含まれる量は、食用の乾燥ヒジキと同等もしくはそれよりも高い値を示す。ヒ素含有量が高いのはホンダワラの仲間にも共通の特徴である。

では、このウガノモクはヒジキのように食べても大丈夫といえるだろうか。

このウガノモクのヒ素を低減するには、食品添加物のクエン酸溶液への浸漬とクエン酸Na水での加熱加工を実施する効果的で簡単な方法が工夫されている<sup>1)</sup>。この低減加工後のヒ素含有量は、ヒジキより低く、WHOが示す暫定的耐用週間摂取量(PTWI、無機ヒ素15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/週)からみて、リスクは低いと考えることもできるが、一方、無機ヒ素に関しては $\text{ng}/\text{ml}$ 以下の低濃度であっても染色体異常を引き起こすなどの内容を含む総合的な調査がある<sup>2)</sup>。ヒ素の存在形態は、無機態以外に有機態があり、化学構造が多岐にわたるので、分析値はどのような方法による数値かも考慮して見るほうがよい。

食習慣のないウガノモクに関しては、一般食材として新規普及するにあたりヒ素以外のリスク評価についても確認が必要ではないかと指摘を受けるのは、

現在の食品の安全と安心からみても、自然な成り行きと思われる。基本的に安全性の試験計画は、衛生上のリスクや化学分析可能な重金属のリスクを評価したうえで、最終的には、ヒトの代替として小動物を用いた試験が行われる。この小動物試験の計画も愛護、研究倫理の関係から十分な事前検証が行われることが必要で、*in vitro* (試験管内)での安全性試験が事前に計画される。さて、ヒ素低減加工後のウガノモク粉末の成分等は、上記3つの表に示した。この試料に、以下の5つの安全性試験が実施されたので、その試験内容、仕組みを詳しく見てみたい<sup>3)</sup>。

項目	100g中
水分	4.3g
たんぱく質	16.4g
脂質	6.0g
灰分	12.7g
糖質	3.9g
食物繊維	56.7g
エネルギー	181kcal
ナトリウム	4.37g
食塩相当量	11.1g

鉛	2.29ppm
カドミウム	0.08ppm
クロム	0.257mg/100g
ヒ素酸化物換算量	44ppm
無機ヒ素(As)	16ppm
ヨウ素	22.8mg/100g

一般細菌数	300以下/g
大腸菌群	陰性
カビ数	陰性
酵母数	70/g

### 2. 方法と結果

#### 2.1 *in vitro* での安全性試験

##### 2.1.1 細菌を用いる復帰突然変異試験

Ames試験ともいう遺伝毒性試験方法で、サルモネラ菌(ネズミチフス菌)4株と大腸菌1株を用い、乾燥試料粉末の用量は0~313 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で実施した。結果、反応曲線は平坦であって、陰性(突然変異性はない)と判断された。

##### 2.1.2 哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

チャイニーズハムスタ肺由来繊維芽細胞(CHL/IU)を用いて、染色体異常を引き起こすかどうかの遺伝毒性を試験する。最初に細胞増殖抑制試験を実施した。このとき、 $\text{IC}_{50}$ (50%以上の細胞増殖抑制作用を引き起こす濃度)は、短時間処理法の非代謝活性化で396 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、代謝活性化で928 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、そして連続処理法で346 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となった。

この結果を受けて設定した染色体異常試験の用量区のうち、短時間処理法の非代謝活性化及び連続処理法の最高用(444 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )と次用量(296 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )の試験区に、披験物質の暴露時間の延長に伴って倍数体の出現率の増加が認められた。さらに、連続処理法では、用量の増加に伴って倍数体の出現率の増加が認められた。以上の結果から、この試験は陽性、すなわち、染色体数の異常(数的異常のうち倍数性異常)を誘発すると結論された。ただし、染色体の構造異常は認められていない。(表2.1.2)

##### 2.2 *in vitro* での安全性試験を受けての機器分析

2.1.2の染色体数異常は、細胞分裂時の紡錘体の働きとの関わりが指摘される。このような作用のある有用物質に、痛風患者に投与される医薬品「コルヒチン」( $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{NO}_6$ )がある。コルヒチンの中毒症状はヒ素の中毒症状と似ている。このコルヒチンの類縁物質がウガノモクに含有するか日本薬局法所定の方法(メタノール抽出物をHPLCのC8カラムで分離、成分をUV254nmの吸収で評価)により分析した。その結果、コルヒチン類縁物質の量は、0.4%程度であった。しかし、UVスペクトルの同一性を考えると化学構造上の類似性の高いコルヒチン様物質の含有量は、25 $\mu\text{g}/\text{g}$ を超えないと判断された。

##### 2.3 *in vivo* での安全性試験

###### 2.3.1 マウスを用いた小核試験

経口投与した8週齢の雄のマウスを用いて、骨髄における小核の誘発性を試験する。小核とは、遺伝子に損傷がおこると細胞核に生じる断片のことである。250mg/kg、500mg/kg、1000mg/kgの3用量を実施し、各群6匹に24時間間隔で2回経口投与し、骨髄塗抹標本を作製する。陰性対照群は注射用水、陽性対照群はシクロフォスアミドを使用している。個体あたり2000個の多染性赤血球の小核を観察し、1000個の全赤血球に対する多染性赤血球の比率をもとめ、陰性陽性の両対照のそれと比較することで遺伝毒性を検査する。

試験期間中のマウスには一般状態、体重に異常はなく、小核出現頻度は陰性と有意な差がなかった。その結果、この試験は陰性、すなわち、遺伝毒性がないと判断された。

### 2.3.2 ラットにおける単回経口投与毒性試験

6週齢のラット雌雄に単回(一度)経口投与したときの所見を観察する。低用量群は1000mg/kg、高用量群は2000mg/kgを与えている。この試験では雌雄の別と対照群を含め全6群で各群5匹計30匹が用いられている。

14日間の観察期間中に死亡した個体はなく、高用量群の雄に若干の体重差異が認められたが、その他の区群の雌雄とも順調に体重を増加させて正常であった。続いて実施された病理解剖学的検査でも異常を認めなかった。この結果、この試験は陰性、すなわち、この試験で急性毒性はないと判断された。

### 2.3.3 ラットにおける28日間反復経口投与毒性試験

5週齢のラット雌雄に28日間にわたり繰り返し経口投与したときの所見を観察する。50mg/kg/day、200mg/kg/day、1000mg/kg/dayを実施している。

この試験では雌雄の別と対照群を含め4群の全8群で各群10匹計80匹を用いているが、観察期間中に死亡した個体はなく、一般状態観察 体重 摂餌量、尿検査(14項目) 血液学的検査(16項目)、血液化学的検査(19項目)、病理解剖学的検査、そして病理組織学的検査に異常がなかった。

この結果、この試験は陰性、無毒性量は、1000mg/kg/dayを超えると判断された。

## 3. まとめ

表やスライドで示したように安全性試験の内容を詳しく見ると、異常の有無の判定だけではなく、そこに示唆される事象、それから予見されることなどを十分に洞察する必要のあることがわかる。ここでは、主に遺伝毒性試験と呼ばれる方法を中心に見てきたが、それ以外にもさまざまな試験方法が考案されており、必要に応じて選択し、検証することで安全性を担保することが可能である。例えば、食べたヒ素はどこへいったかとの問いかけがあれば、毒性試験終了後の試料から更に詳しい分析を実施、計画することも可能であると思われるので、安心が獲得できるまで検証されるべきものと思われる。

表 2.1.2 染色体異常試験の観察結果一覧(代謝活性なし、連続 24 時間処理のとき)

N-G033

Table 3 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster (CHL/IU) cells treated with Cystoseira Hakodatensis Powder [Continuous treatment: 24hr]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (µg/mL)	Number of cells with structural chromosome aberration (%)										RPD (%)	Number of cells with numerical chromosome aberration (%)					
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g	TAG(%)	Judgement		Cells observed	Polyploid cells	other	Total (%)	Judgement	
24-0	NC	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	-
		200	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-
	132	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	80	3	0	3	3	-
		200	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	6(3.0)	0(0.0)	6(3.0)	6(3.0)	-
	198	100	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	80	2	0	2	2	-
			200	100	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	100	7	0	7	7
296		100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	73	8	0	8	8	±
		200	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	14(7.0)	0(0.0)	14(7.0)	14(7.0)	±
444		100	100	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	43	14	0	14	14	+
		200	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	10	0	10	10	+
PC	100	100	3	30	0	0	0	0	33	0	33	0	100	24(12.0)	0(0.0)	24(12.0)	24(12.0)	+	
	200	100	0	36	0	0	0	36	0	36	0	+	100	0	0	0	0	-	
			200	3(1.5)	66(33.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	69(34.5)	0(0.0)	69(34.5)	0(0.0)	69(34.5)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, other: including fragmentation  
 TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap  
 NC: Negative control (water for injection)  
 PC: Positive control (mitomycin C, 0.050 µg/mL)  
 RPD: relative population doubling  
 RPD(%) showed PD of test article treatment group against the one of negative control.

### 【参考文献】

- 1) 青木央: 脱ヒ素加工した海藻ウガノモクの食品としての安全性の考察、北海道立工業技術センター研究報告 第13号 p43-46 (2014)
  - 2) 中西準子: 化学物質の初期リスク評価書 砒素及びその無機化合物、独立行政法人製品評価技術基盤機構、財団法人化学物質評価研究機構(独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構委託事業) No. 130 (2008) p112-138
  - 3) 日本薬学会編: 衛生試験法注解 2010「1.3 遺伝毒性試験法」金原出版株式会社(東京) (2010) p137-157
- \* 本件の発表内容は、文部科学省函館マリバイオクラスター事業の資金を受けて実施されました。