化粧品用アゾ系色素の変異原性に関する研究¹⁾

宮越 護, 早川ゆみ子, 永山富雄
東京薬科大学

Studies on the Mutagenicity of Cosmetic Azo-Dyes¹⁾

MAMORU MIYAGOSHI, YUMIKO HAYAKAWA
and TOMIO NAGAYAMA
Tokyo College of Pharmacy, 1432-1, Horinouchi,
Hachioji, Tokyo 192-03, Japan

(Received February 18, 1983)

Fourteen kinds of commercial cosmetic azo-dyes and their authentic compounds which were synthesized and purified were tested for their mutagenic activities in Ames test. Total number of commercial samples tested was 65.

Orange 203 was mutagenic to *S. typhimurium* TA98 and TA100 without S9 mix. and Red 228 was highly mutagenic after it was treated with S9 mix. Red 201, 202, 219 and 220 showed the weak mutagenic activities to *S. typhimurium* TA98 which would be due to impurities contained in these azo-dyes. Red 203, 204, 207, 221, 505, Orange 205, 403 and Yellow 401 showed no mutagenic activities to both strains of bacteria with or without S9 mix.

Keywords — mutagenicity; Ames test; *S. typhimurium* TA98 and TA100; cosmetic azo-dye; impurity

緒 言

色素の変異原性に関するこれまでの報告²⁾をみると, 流通している市販色素のみを検討し, 純品色素と比較検討した例は少ない. 近年, 米国では赤色 207 号中に原料のトビアス酸由来の β -ナフチルアミンが検出され, 暫定使用が中止された.³⁾ 我国では化粧品による接触皮膚炎の一因が, 赤色 219号に夾雑する 1-フェニルアゾ-2-ナフトールに起因することが小塚ら⁴⁾によって解明された. こうした例からも判るように, 色素の有害性試験を行うにあたっては, 色素本体とその夾雑物を明確に分けて検討する必要がある.

本研究はこれらの点を考慮して, 14種のアゾ系色素を合成, 精製して薄層クロマトグラフィー (TLC) で単一スポットであることを確認して基準色素とし, 対応する市販色素65製品とともに変異原性について検討した. その結果, 赤色 228 号, 橙色 203 号では基準色素, 市販品ともに変異原性が認められ, また, 赤色 201, 202, 219, 220 号では一部の市販品にのみ認められ, 夾雑物による変異原性が示唆されたので結果を報告する.

実 験 方 法

1. 基準色素の合成 Fig. 1 に示した色素 14種を, ジアゾカップリング反応により合成し, それぞれの化合物に適した溶媒で再結晶を 3 回繰り返して基準色素とした. 不溶性色素では, 2 種以上の極性の異なる溶媒で夾雑物を除去後基準色素とした.

2. 試料 Fig. 1 に示した色素について市販品各 3 種以上計 65 製品を入手し, 基準色素とともに変異原性試験に用いた.

3. 試薬 ジメチルスルホキシド (DMSO) は同仁化学研究所製吸収スペクトル用純溶媒, 寒天は Difco 社製 Bacto Agar, D-グルコース-6-リン酸ナトリウム (G6P), グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PDH), 還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸 (NADPH) はオリエンタル酵母社製, その他はすべて特級品を用いた.

4. 変異原性試験 4-1) 使用菌株——*Salmonella typhimurium* TA 98 及び TA 100 株.

4-2) ラット肝 S 9 mix の調製——Ames ら⁵⁾の方法

Name	Structure	Name	Structure
1. R-201 Lithol rubine B C. I. 15850 ^{a)}		8. R-221 Toluidine red C. I. 12120	
2. R-202 Lithol rubine BCA C. I. 15850 : 1		9. R-228 Parmatone red C. I. 12085	
3. R-203 Lake red C C. I. 15585		10. R-505 Oil red XO C. I. 12140	
4. R-204 Lake red CBA C. I. 15585 : 1		11. O-203 Parmanent orange C. I. 12075	
5. R-207 Lithol red BA C. I. 15630 : 1		12. O-205 Orange II C. I. 15510	
6. R-219 Brilliant lake red R C. I. 15800 : 1		13. O-403 Orange SS C. I. 12100	
7. R-220 Deep maroon C. I. 15880 : 1		14. Y-401 Hanza yellow C. I. 11680	

Fig. 1. Chemical Structures and Names of Azo-Dyes Used in This Study

^{a)} colour index number.

に従い、PCB を 500 mg/kg (体重) の割合で 1 回腹腔内投与した SD 系雄性ラット (6 週齢, 体重約 200 g) の肝臓を投与後 5 日目に摘出, ホモジナイズし, 9000 × *g*, 10 分間遠心分離した上澄を S 9 画分とした. なお, すべての操作は氷冷下無菌的に実施した. S 9 mix は, 1 ml 中に S 9 画分 0.1 ml, 8 mM MgCl₂, 33 mM KCl, 5 mM G6P, 1.0 unit G6PDH, 4 mM NADPH 及び 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) を含む.

4-3) 試験方法—Ames ら⁵⁾ の方法にブレインキューベーションを組み入れた矢作⁶⁾ の方法に従った. すなわち, 試料溶液 0.1 ml, 菌懸濁液 0.1 ml, 100 mM リン酸緩衝液あるいは代謝活性化を行う場合には S 9 mix 0.5 ml を加え, よく混和後, 37°C で 20 分間ブレインキューベーションを行い, あらかじめ 45°C に保温した軟寒天 (50 μM L-histidine-HCl と 50 μM biotin を含む) 2 ml を加え, Vogel-Bonner 最小寒天培地に重層した. 37°C 48 時間培養後, His⁺ 復帰変異コロニー数を計数した. 陽性対照としては, 4-ニトロキノリン-1-オキシド (4NQO) 及び代謝活性化時にはベンゾ [*a*] ピレン (B [*a*] P) を用いた. なお試料は, DMSO に溶解あるいは懸濁させた. dose は, プレート 1 枚につき, 5, 50, 500, 1000 μg とし, 各 dose とも 2 枚のプレートを用い, 2 回繰り返して実験を行った. 判定基準は, 自然変異コロニー数の 2 倍以上を誘発した場合に変異原性陽性と判定した.

結果及び考察

Table I に, 赤色 201, 202, 219, 220 号の基準色素並びに市販品 24 製品についての結果を示した. これらの基準色素には変異原性は認められなかったが, 市販品では TA 98 株に対して S 9 mix 無添加で, 赤色 201 号の 5 製品すべて, 赤色 202 号の 9 製品中 2 品, 赤色 219 号の 5 製品中 1 品, 赤色 220 号では 5 製品中 1 品が変異原性を示した. 赤色 202 号の 7 では, TA 98 株に対して, S 9 mix による代謝活性化時にも変異原性が認められた.

Table II に, 赤色 228 号と橙色 203 号の各基準色素及び市販品 10 製品についての結果を示した.

赤色 228 号では, 基準色素, 市販品とも代謝活性化により変異原性を示し, 特に TA 98 株では S 9 mix による代謝活性化時に, 基準色素の場合で, 5 μg/plate の濃度で 1341 個の変異コロニー数が認められた. 市販品でも同様多数の復帰コロニー数が認められた. これらの結果は, Brown ら^{2c)} 及び Green ら^{2e)} の報告と同様であった. Muzzall ら^{2d)} の報告では陰性となっているが, 試験濃度や色素純度などのデータは示されていない.

橙色 203 号では, TA 98 株において 5 μg/plate の低濃度時, 基準色素の場合で 952 個の変異コロニー数が, 市販品の 1 では 1266 個の変異コロニー数が認められた. 他の市販品でも同様, 約 1000 個前後のコロニー数が認められ, 基準色素, 市販品ともに変異原性を示した. S 9 mix による代謝活性化後においては, 変異コロニー数は減少の傾向を示した. この結果は, Brown ら^{2c)} Muzzall ら^{2d)} 及び Green ら^{2e)} の報告とほぼ一致した.

データは示さなかったが, Table I, II 以外の赤色 203, 204, 207, 221, 505 号, 橙色 205, 403 号及び黄色 401 号の各基準色素並びに市販品 31 製品では変異原性は認められなかった.

以下, これらの所見に若干の考察を加える.

アゾ色素の構造式とその変異原性との関連について, Combes らは, 最近の総説⁷⁾ において, 色素の変異原性が構造式中のアゾ発色団に起因すると考えることは不可能であるとし, 構造式と変異原性との関連を予測するために, 発色助団としての官能置換基の貢献度を調査し, 特に, ニトロ基の存在がアゾ色素において最も明白な変異原性を示す事が多いと述べている. 本研究で基準色素, 市販品の両者で変異原性の認められた赤色 228 号と橙色 203 号も構造式中にニトロ基を含有している.

赤色 228 号について, その原料である 2-クロロ-4-ニトロアニリンの変異原性を予試験的に検討したところ, 代謝活性化時, TA 98 株において, プレートあたり 1000 μg の濃度で約 150 個の His⁺ コロニーが観察され, 変異原性が認められた. しかしながら, 赤色 228 号が 5 μg で強い変異原性を示したことに比較すれば, 非常に弱い変異原性に過ぎない. なお, 原料の 1 つである β-ナフトールでは, 変異原性は認められていない.^{2d)} Garner ら⁸⁾ は TA 1538 株を用いてアニリン化合物の変異原性を調査し, アニリンのアミノ基の *o*, *m*, *p* 位をモノクロル化した化合物には変異原性がなく, モノニトロ化した場合には, 代謝活性化時に弱いながらも変異原性を認めている. この結果は, 原料の予試験結果の説明の 1 つとなるものと考えられるが, これだけで色素の強い変異原性を説明することはできない. しかし, ニトロ基の存在が色素の変異原性に少なからず影響しているものと推察される.

橙色 203 号では, その合成原料である 2,4-ジニトロアニリンは, 強い直接変異原性を有することが知られている.^{2d,8)} 前述のごとく, β-ナフトールには変異原性がないことから, 橙色 203 号の直接変異原性は, Combes ら⁷⁾ の述べているように, アゾ基由来でなく, ニトロ基の存在によるものと考えられる. 著者らは, 原料の類似化合

TABLE I. Mutagenic Activities of Cosmetic Azo-dyes

Test compound	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of His ⁺ revertants/plate			
		TA 98		TA 100	
		-S9 ^{a)}	+S9 ^{b)}	-S9	+S9
DMSO ^{e)}	-	28 $\pm$ 3 [55] ^{d)}	38 $\pm$ 5 [55]	113 $\pm$ 18 [55]	111 $\pm$ 20 [50]
4NQO ^{e)}	0.05	-	-	361 $\pm$ 32 [26]	-
	0.1	155 $\pm$ 12 [22]	-	513 $\pm$ 89 [24]	-
	0.2	179 $\pm$ 55 [20]	-	-	-
B(a)P ^{e)}	2	-	183 $\pm$ 49 [20]	-	497 $\pm$ 118[24]
	5	-	773 $\pm$ 196[27]	-	784 $\pm$ 144[26]
R-201-Syn. ^{f)}	5	21	43	111	109
	50	26	33	106	107
	500	23	34	109	116
	1000	23	29	122	103
R-201-1	5	20	36	124	107
	50	27	40	117	117
	500	73 ^{g)}	44	98	113
	1000	115	48	119	118
R-201-2	5	16	44	107	111
	50	20	39	128	102
	500	44	46	116	105
	1000	58	39	103	112
R-201-3	5	21	34	96	122
	50	26	53	117	128
	500	67	54	113	103
	1000	99	48	120	87
R-201-4	5	24	33	83	125
	50	38	35	93	115
	500	58	29	84	109
	1000	115	31	71	112
R-201-5	5	23	24	101	115
	50	29	33	92	121
	500	30	37	89	83
	1000	78	35	91	84
R-202-Syn.	5	29	50	123	134
	50	30	43	108	118
	500	36	45	130	116
	1000	42	39	128	119
R-202-1	5	27	40	115	121
	50	29	57	109	106
	500	49	50	114	105
	1000	86	47	97	107
R-202-2	5	22	31	107	91
	50	19	43	96	133
	500	26	37	119	120
	1000	43	36	79	85

Test compound	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of His ⁺ revertants/plate			
		TA 98		TA 100	
		-S9	+S9	-S9	+S9
R-202-3	5	24	39	127	122
	50	21	54	132	93
	500	26	40	115	127
	1000	28	43	96	76
R-202-4	5	27	28	108	106
	50	22	40	119	121
	500	20	43	105	104
	1000	22	37	91	76
R-202-5	5	26	42	100	83
	50	26	50	107	106
	500	28	35	95	79
	1000	26	28	58	56
R-202-6	5	24	47	104	119
	50	24	56	107	107
	500	27	41	109	115
	1000	19	58	106	85
R-202-7	5	24	44	107	91
	50	31	51	103	108
	500	<u>110</u>	<u>114</u>	113	131
	1000	<u>163</u>	<u>135</u>	145	121
R-202-8	5	25	51	116	101
	50	22	48	113	103
	500	28	34	107	100
	1000	31	29	110	100
R-202-9	5	28	41	99	93
	50	24	46	104	116
	500	27	39	103	131
	1000	26	28	154	101
R-219-Syn.	5	24	43	103	106
	50	26	46	110	105
	500	25	32	113	159
	1000	26	36	113	157
R-219-1	5	23	36	96	96
	50	22	51	110	124
	500	32	49	103	149
	1000	31	50	100	181
R-219-2	5	23	38	80	98
	50	25	46	95	113
	500	24	42	87	155
	1000	28	44	101	172
R-219-3	5	24	44	101	111
	50	23	45	102	99
	500	39	43	95	175
	1000	42	46	119	160

Test compound	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of His ⁺ revertants/plate			
		TA 98		TA 100	
		-S9	+S9	-S9	+S9
R-219-4	5	21	38	105	93
	50	25	47	110	103
	500	38	44	124	142
	1000	41	32	120	130
R-219-5	5	27	37	102	110
	50	31	43	97	83
	500	77	33	104	115
	1000	<u>209</u>	20	142	162
R-220-Syn.	5	25	34	111	128
	50	21	46	114	124
	500	23	33	118	136
	1000	29	39	116	105
R-220-1	5	30	41	108	96
	50	21	47	105	108
	500	28	38	158	112
	1000	25	32	126	139
R-202-2	5	28	39	104	139
	50	26	38	93	141
	500	50	42	118	129
	1000	<u>73</u>	41	125	143
R-220-3	5	22	38	139	103
	50	24	48	136	124
	500	56	53	121	103
	1000	49	57	127	106
R-220-4	5	23	49	124	114
	50	24	45	125	119
	500	36	38	162	104
	1000	25	40	123	101
R-202-5	5	18	33	113	83
	50	19	42	116	86
	500	21	37	109	76
	1000	24	42	122	105

a) -S9; without S9 mix.

b) +S9; with S9 mix.

c) DMSO; solvent control.

d) Mean $\pm$ SD. (number of experiments).

e) 4NQO; reference compound without S9 mix., B[a]P; reference compound with S9 mix.

f) Dyes synthesized and highly-purified.

g) Data underlined indicate that the dye was mutagenic at the concentration tested.

物である 2,4-ジニトロトルエンとその代謝物の変異原性について検討し、推定代謝物と考えられる 2,4-ジニトロベンズアルデヒドが強い変異原性を有していることを確認し、2,4-ジニトロトルエンの発癌性との関連性を示唆した。⁹⁾

このように、アゾ色素にかぎらず、ニトロ基を有する

化合物は、変異原性を示す場合が多い。変異原性をただちに発癌性に結びつけることはできないが、原料や色素自身が変異原性を示すような赤色 228^{g)}号や橙色^{g)}203 号は要注意色素として分類できよう。

一方、赤色 221 号、黄色 401 号もニトロ基を有しているが、変異原性は認められなかった。その理由の 1 つと

TABLE II. Mutagenic Activities of Cosmetic Azo-dyes

Test compound	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of His ⁺ revertants/plate			
		TA 98		TA 100	
		-S9 ^{a)}	+S9 ^{b)}	-S9	+S9
R-228-Syn. ^{c)}	5	59	<u>1341</u> ^{d)}	118	<u>218</u>
	50	58	<u>1540</u>	120	186
	500	<u>71</u>	<u>1628</u>	115	141
	1000	55	<u>1271</u>	128	141
R-228-1	5	63	<u>1094</u>	112	<u>259</u>
	50	63	<u>1474</u>	128	<u>273</u>
	500	62	<u>1188</u>	130	176
	1000	<u>86</u>	<u>715</u>	132	139
R-228-2	5	72	<u>1344</u>	139	<u>261</u>
	50	<u>97</u>	<u>1293</u>	102	<u>254</u>
	500	60	<u>755</u>	133	<u>210</u>
	1000	63	<u>591</u>	120	193
R-228-3	5	<u>79</u>	<u>966</u>	129	<u>297</u>
	50	59	<u>1186</u>	103	<u>224</u>
	500	<u>83</u>	<u>932</u>	134	<u>218</u>
	1000	<u>72</u>	<u>764</u>	109	194
O-203-Syn.	5	<u>952</u>	86	154	172
	50	<u>1308</u>	<u>158</u>	160	<u>239</u>
	500	<u>1488</u>	<u>245</u>	170	<u>235</u>
	1000	<u>1617</u>	<u>326</u>	156	<u>266</u>
O-203-1	5	<u>1266</u>	82	170	145
	50	<u>1141</u>	<u>207</u>	172	<u>222</u>
	500	<u>1553</u>	<u>377</u>	216	<u>265</u>
	1000	<u>1475</u>	<u>677</u>	<u>233</u>	<u>291</u>
O-203-2	5	<u>1113</u>	67	166	156
	50	<u>1158</u>	167	182	201
	500	<u>1553</u>	<u>377</u>	191	<u>243</u>
	1000	<u>400</u>	<u>412</u>	<u>236</u>	<u>292</u>
O-203-3	5	<u>1185</u>	80	164	129
	50	<u>928</u>	<u>225</u>	172	205
	500	<u>1281</u>	<u>439</u>	191	<u>243</u>
	1000	<u>1234</u>	<u>666</u>	<u>225</u>	<u>267</u>
O-203-4	5	<u>919</u>	66	150	125
	50	<u>762</u>	<u>233</u>	142	173
	500	<u>1090</u>	<u>285</u>	145	186
	1000	<u>1373</u>	<u>462</u>	<u>242</u>	<u>250</u>
O-203-5	5	<u>1196</u>	71	152	158
	50	<u>1141</u>	<u>241</u>	112	197
	500	killing	<u>436</u>	128	209
	1000	killing	<u>487</u>	78	<u>256</u>

Test compound	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of His ⁺ revertants/plate			
		TA 98		TA 100	
		-S9	+S9	-S9	+S9
O-203-6	5	<u>885</u>	75	156	134
	50	<u>1087</u>	<u>287</u>	125	199
	500	<u>903</u>	<u>706</u>	<u>275</u>	<u>304</u>
	1000	<u>875</u>	<u>1259</u>	<u>380</u>	<u>437</u>
O-203-7	5	<u>1214</u>	88	119	158
	50	<u>326</u>	<u>300</u>	84	188
	500	killling	<u>594</u>	34	<u>225</u>
	1000	killling	<u>691</u>	killling	<u>271</u>

a) -S9; without S9 mix.

b) +S9; with S9 mix.

c) Dyes synthesized and highly-purified.

d) Data underlined indicate that the dye was mutagenic at the concentration tested.

して両色素の原料である 2-ニトロ-*p*-トルイジンに変異原性が認められない⁹⁾ことがあげられる。また、この原料からメチル基の取れた *o*-ニトロアニリンは変異原性を示す⁹⁾ことから、メチル基の存在が変異原性に少なからず影響していると考えられる。

以上は、置換基の種類、位置などが色素中のニトロ基の変異原性に大きく影響していることを推定させる。ニトロ基のようにその役割が明らかにされつつあるものもあるが、現在のところ、色素全般にわたり、その構造と変異原性との間に系統的な関連性を求めることは困難である。今後、色素個々のデータを蓄積することにより、近い将来何らかの見解が示されるものと思われる。

以上を総括して、今回検索した色素を大別すると次の3つのグループに分類することが可能である。すなわち、1) 基準色素、市販品ともに変異原性を有するグループ。2) 市販品のみ変異原性を示すグループ。3) 変異原性の認められないグループである。

1) に属する赤色 228 号と橙色 203 号では、その変異原性は色素本体に起因するものと考えられ、安全性について癌原性試験などのさらに検討を要するグループといえる。

2) に属する色素では、その変異原性は市販品中に夾雑した不純物に起因するものと推察される。市販品では純色素以外に、合成原料、反応中間体及び副色素などの混入が考えられ、実際、小塚ら⁴⁾は市販赤色 219 号中に多数の不純物を検出している。変異原性についてのみ考えれば、色素本体には問題がないので、市販品でも純度の高い色素を製品化することによって安全性を確保することが可能であり、そうした努力がなされるグループと

考える。

今回、赤色 201 号の市販品すべてが変異原性を示すのに対して、カルシウムレーキとした赤色 202 号では市販品 9 製品中 2 製品しか変異原性を示さなかった。レーキ化が変異原性に対して抑制的に作用するのか、あるいは、レーキ形成による溶解度の低下によって変異原性が抑制されたかは不明であるが、興味ある事実である。

3) に属する色素は、今回試験した菌株と試験濃度範囲内では変異原性は認められなかった。本実験ではスクリーニングを主体としたため、適用濃度を一律に 4 段階にとったが、色素によっては濃度範囲を拡大した検討が必要なることを付言しておく。また、色素の精製法の違いからくる成分組成の変化など今後さらに検討を要する。

結 論

化粧品用アゾ系色素 14 種類を合成し、それらの市販品 65 製品とともに変異原性試験を行い、次の結果を得た。

1) 赤色 228 号及び橙色 203 号では、基準色素、市販品ともに変異原性が認められた。

2) 赤色 201, 202, 219, 220 号では、市販品の一部に変異原性を示す製品があり、その作用は色素中の夾雑物に起因するものと考えられる。

3) 赤色 203, 204, 207, 221, 505 号、橙色 205, 403 号及び黄色 401 号では変異原性は認められなかった。

謝辞 本研究を行うにあたり、菌株の分与並びに実験の御指導を賜りました静岡薬科大学、富田勲教授及び中村好志博士に深謝致します。また、実験に際し、協力を得た小林恵美子、高田博司、萩原弘則、内田裕行、安達真理子、堀越由美子、渡辺美穂子、前村奈緒子、阿保

洋司, 杉浦弘行の諸氏に感謝します.

引用文献及び注

- 1) 日本薬学会第 101 年会において発表. 熊本. 1981 年 4 月.
- 2) a) A.E. Auletta, J.M. Kuzava, A.S. Parmar, *Mutat. Res.*, **31**, 347 (1975); b) J.P. Brown, G.W. Roehm, R.J. Brown, *Ibid.*, **56**, 249 (1978); c) J.P. Brown, P.S. Dietrich, C.M. Bakner, *Ibid.*, **66**, 181 (1979); d) J.M. Muzzall, W.L. Cook, *Ibid.*, **67**, 1 (1979); e) M.R. Green, J.V. Postewka, *J. Natl. Cancer Inst.*, **64**, 665 (1980).
- 3) 坂野憲司, フレグランスジャーナル, **44**, 29 (1980); 神蔵美枝子, *Ibid.*, **30**, 48 (1978); 池本 猛, *Ibid.*, **30**, 59 (1978).
- 4) 小塚雄民, 田代 実, 奥村雄司, 藤本圭一, 中村由美, 橋本誠一, 中南 元, 皮膚, **19**, 191 (1977); T. Kozuka, M. Tashiro, S. Sano, K. Fujimoto, Y. Nakamura, S. Hashimoto, G. Nakaminami, *Contact Dermatitis*, **5**, 297 (1979).
- 5) B.N. Ames, J. McCann, E. Yamasaki, *Mutat. Res.*, **98**, 101 (1975).
- 6) 矢作多貴江, 蛋白質・核酸・酵素, **20**, 1179 (1975).
- 7) R.D. Combes, R.B. Haveland-Smith, *Mutat. Res.*, **98**, 101 (1982).
- 8) R.C. Garner, C.A. Nutman, *Mutat. Res.*, **44**, 9 (1977).
- 9) M. Mori, T. Miyahara, T. Taniguchi, K. Hasegawa, H. Kozuka, M. Miyagoshi, T. Nagayama, *Toxicol. Lett.*, **13**, 1 (1982).