森田和良 石垣美津子 安部 隆

Mutagenicity of Materials related with Cosmetics

Kazuyoshi Morita, Mitsuko Ishigaki and Takashi Abe

We reexamined safety of some cosmetic materials on a hereditary toxicity.

The cosmetic materials tested were preservatives, Sunscreens, antioxidants, hormones and surfactants.

Mutagenicity assay were carried out for Rec-assay using Wild and Recombination-deficient strains of *B. Subutilis* and Reversion assay using *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 with or without the microsomal activation ($\pm$ S-9_{mix}). In addition to the above-described procedures, Rec-assay with irradiating fluorescent lump or cold incubation were carried out to some materials, such as sunscreens and antioxidants.

Irg-DP300, a preservative, was weak rec-positive at very high concentration such as 5 mg/disk, but negative on reversion assay.

Both 8-MOP and O-201 newly found out as positive control of photo-rec assay were clearly rec-positive by irradiation of fluorescent lump, but all of sunscreens and antioxidants were negative.

Estradiol, a hormone, induced slightly more revertants than control with S-9_{mix} and three anion surfactants of sulfate derivatives (Surf-1,2,4) and two nonion surfactants of cetyl ether and lanolin alcohol derivatives (Surf-13, 14) also exhibited the same effects with or without S-9_{mix}, but we couldn't sufficiently recognize these mutagenicity. These phenomena are yet obscure whether due to any reasons.

1. 緒 言

化粧品に関係した安全性試験としては、大別すると、局所毒性と全身毒性に分けられる。この内、化粧品は皮膚と接触するものであることから、従来より、皮膚刺激性、眼粘膜刺激性、アレルギー性試験等の局所毒性試験が第一義的なものとなっている。しかしながら、化粧品の長期連用による全身への影響も看過できない。そのため、化粧品原料の急性、亜急性、慢性等の一般毒性試験も広く研究されている。

最近、更に発癌性との関連から突然変異原性に関心をもたれて来ている。小動物を利用した発癌性試験は、コスト、時間、労力、設備等の点で限度があり、実際応用

面において、困難があるため、短期予測試験として突然変異性試験が広く利用されている。

突然変異原性と発癌性との間の因果関係は必ずしも、明確ではないが、既知の発癌物質の大部分に、突然変異原性が確認されており、一方突然変異原物質として見つかったAF-2⁽⁴⁾やトリプトフェンの加熱分解物 Trp-p-1 や Trp-p-2 等⁵⁻⁷⁾が最終的には、小動物により癌原性が確かめられている。そして、多くの突然変異原物質は、発癌プロセスにおける Initiation の役割を果たしているのではないかと考えられている。

そこで、細菌系による突然変異原性試験を用いて、化粧品関連物質の変異原性を検討することは、化粧品関連物質の安全性の一環として意義があると考えられる。

既に、化粧品原料の突然変異原性については、いくつかが検討がなされており、酸化染料^{10,11)}色素^{12,13)}酸化防止剤¹⁴⁾界面活性剤^{15,16)}並びに防腐剤¹⁷⁾等の一部が取り上げられている。

今回、我々は、前記の既に検討されている物質を含

鐘紡(株)化粧品研究所：〒250 神奈川県小田原市寿町5丁目3番28号
Cosmetics Laboratory, Kanebo Ltd., 3-28, Koto-buki-5-chome, Odawara-shi, Kanagawa-ken, 250.

め、更に未検討の化粧品関連物質（一部、本研究では比較物質として癌原物質や起炎物質を置く）を系統的に取り上げ、賀田⁸⁾等が開発した DNA 損傷性を調べる DNA 修復試験と、Ames 等⁹⁾が開発した細菌の栄養要求性を指標とした復帰変異試験によって突然変異原性を検討した。取り上げた物質は防腐剤、紫外線吸収剤、酸化防止剤、ホルモン並びに各種界面活性剤等である。

2. 実 験

2-1 被検試料並びに対照試料

2-1-1 被検試料

被検試料は、Table-1 に示した様に防腐剤 9 種、紫外線吸収剤 6 種、酸化防止剤 8 種、ホルモン 7 種、並びに界面活性剤として、アニオン系 5 種、カチオン系

Table-1. Test materials. Common Name & Chemical Name.

Preservatives		Antioxidants	
Pre - 1	Methyl-P-hydroxybenzoate	Anti - 1	3,5-di-tert-butylhydroxy toluene (BHT)
Pre - 2	Ethyl-P-hydroxybenzoate	Anti - 2	Butylhydroxy anisol (BHA)
Pre - 3	Propyl-P-hydroxybenzoate	Anti - 3	Normal-propylgallate *
Pre - 4	Butyl-P-hydroxybenzoate	Anti - 4	Guaiaconic acid $C_{22}H_{26}O_6$ & Guaiaretic acid $C_{20}H_{24}O_4$ (Resine Guaiac) *
Pre - 5	Sodium dehydroacetate	Anti - 5	Isoamyl gallate *
Pre - 6	Sorbic acid	Anti - 6	Nordihydroguaiaretic acid *
Pre - 7	3-trifluoro-methyl-4,4'-dichloro carbanilide (Irgasan-CF3)	Anti - 7	Ascorbyl-di-palmitate
Pre - 8	2,4,4'-trichloro-2'-hydroxy-diphenyl ether (Irgasan-DP300)	Anti - 8	Tocopherol (Vitamin E)
Pre - 9	Sodium benzoate	Hormones	
Sunscreens		Horm - 1	3,17 β -dihydroxy- $\Delta^{1,3,5,(10)}$ -estra- triene (β -Estradiol)
Sun - 1	Amlyl-P-dimethylamino benzoate & Amlyl-P-methylamino benzoate (Escarol 506)	Horm - 2	17 α -ethynyl- $\Delta^{1,3,5,(10)}$ estratriene- 3,17 β -diol (Etynyl-estradiol)
Sun - 2	2-ethyl-hexyl-P-dimethylamino benzoate (Escarol 507)	Horm - 3	1,4-pregnandiene-3,20-dione-11 β ,17 α - 21-triol (Predonizolone)
Sun - 3	2-hydroxy-4-methoxy-benzophenon	Horm - 4	3-hydroxy-17-keto- $\Delta^{1,3,5,(10)}$ -estr- atriene (Estrone) **
Sun - 4	2,2,4,4-tetrahydroxy-benzophenon	Horm - 5	Δ^4 -androsterone-17 -propionate-3- one (Teststeronepropionate) **
Sun - 5	Isopropyl-4-methoxy cinnamate(main) Methyl-2,5-diisopropyl cinnamate (5-10%) (Neoheriopan)	Horm - 6	Δ^4 -pregnen-17 ,21-diol-3,11,20-tri- one (Cortisone) ***
Sun - 6	4-imidazoleacrylic acid ethyl ester	Horm - 7	4,4'-dihydroxy- α,β -trans-diethylstil- bestrol (Diethylstilbestrol) **
Surfactants			
Anion			
Surf - 1	Polyoxyethylene(3) lauryl ether sulfate		
Surf - 2	Triethanolamine lauryl ether sulfate		
Surf - 3	Sodium-N-methyl-N-cocoyl taurate		
Surf - 4	Sodium lauryl sulfate		
Surf - 5	Polyoxyethylene(12) Lauryl ether Phosphate (Trilaureth-4 phosphate)		
Cation			
Surf - 6	Stearyl trimethylammonium chloride		
Surf - 7	Benzalkonium chloride		
Surf - 8	Lauryl Isoquinolium Bromide		
Nonion			
Surf - 9	Sorbitan Sesquioleate		
Surf -10	Coconut fatty acid diethanolamide		
Surf -11	Polyoxyethylene(20) Sorbitan monostearate (Polysorbate 60)		
Surf -12	Polyoxyethylene(20) Sorbitan monooleate (Polysorbate 80)		
Surf -13	Polyoxyethylene(15) Cetyl ether		
Surf -14	Polyoxyethylene(16) Lanolin Alcohol (Laneth-16)		
Surf -15	Polyoxyethylene(60) Hydrogenated Caster oil		
Amphoteric			
Surf -16	Lauryl dimethylamino acetic acid Betaine		
Surf -17	2-Alkyl-N-carboxymethyl-N-hydroxy-ether imidazorium Betaine (Amphoteric 2 -the Alkyl is derived with the coconut fatty radical)		

* : Wako Chem. Co.

** : Tokyo Kasei Co.

*** : Shigma Chem. Co.

Table-2. Positive control

Abbreviation	Chemical Name	Source
M-C	Mitomycin C	Wako Chem. Co.
O-201	4,5-dibromofluorescein	Thomasset colors.
8-MOP	8-methoxy psoralen	Shigma Chem.
2-NF	2-nitrofluorene	Wako Chem. Co.
AF-2	2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide	N.I.G.
2AA	2-amino anthracene	Wako Chem. Co.

3種, ノニオン系7種, 両性界面活性剤2種の計17種を取り上げ検討した。和光純薬(株), 東京化成(株), シグマケミカル購入試料は, 試薬特級又は試薬純度品であり, その他の全ての原料は, 粧原基グレードの市販品である。

2-1-2 対照試料

対照試料は, Table-2 に示した。各種 Rec-assay の比較対照品として用いた4, 5-ジブロムフルオレッセン(O-201) は, トマセット製を使用し, 8-メトキシプソラレン(8-MOP) は, シグマケミカルより購入し, マイトマイシン-C(M-C) は, 和光純薬(株)より購入した。また, 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド(AF-2) は, 国立遺伝研変異遺伝部より分与を受けた。復帰変異試験の比較対照品として用いた2-アミノアントラセン(2AA)及び2-ニトロフルオレン(2NF)は, 和光純薬(株)より購入した。

2-1-3 S-9 誘導物質

S-9 誘導物質として使用した PCB (ジクロルビフェニル, approx $C_{12}H_8Cl_2=233$ 10) は, 和光純薬(株)より購入した。PCB をコーンオイルに溶解して用いた。

2-2 指標菌株

各種 Rec-assay には, DNA 損傷を細胞酵素によって組換え修復可能な変異株 *Bacillus Subtilis* H 17 (Rec⁺) と組換え修復能を欠損した変異株 M-45 (Rec⁻) の2株を供試した。また, 復帰変異試験 (Reversion-assay) には *Salmonella typhimurium* TA 98 (フレームシフト変異型) と TA 100 (塩基交換変異型) を供試した。尚, これらの指標菌株は, 国立遺伝研変異遺伝部より分与を受けた。

2-3 指標菌株の前培養

Rec-assay 用使用する *Bacillus Subtilis* H 17 または M 45 の菌株を, 1.0%牛肉エキス (極東製薬(株)製) 1.0%ポリペプトン (大五栄養化学(株)製), 0.5%食塩の組成からなる B-2 broth に殖菌し, 37°C, 1晩振盪培養した。その菌増殖した培養液に最終濃度 12.5% になる様にグリセリンを加え, 使用まで, -80°C に保存した。

復帰変異試験に使用する *Salmonella typhimurium* TA 98 または TA 100 のそれぞれの菌株を, あらかじめ最終濃度 33 μ g/ml のアンピシリンナトリウム (三共(株)製) を加えてある前記 B-2 broth に殖菌後, 37°C, 1晩静置培養した。その増殖した菌液を 3500 rpm, 10分遠心集菌した。集菌後, 1/15Mリン酸緩衝液で2度洗浄をくり返し, 再度集菌した。その菌を MM broth (0.1%(NH₄)₂SO₄, 1%KH₂PO₄, 0.01% MgSO₄·7H₂O, 0.05%クエン酸ナトリウムの組成で, KOH で pH7.0 に調製した塩培地) に再懸濁した。この菌液に最終濃度 12.5% になる様にグリセリンを加えて, 使用まで -80°C に保存した。

2-4 試験用培地

Rec-assay 用培地としては, 以下の B-2 寒天培地 (前記 B-2 broth に寒天末 15g を加え, pH7.0 に調製後, 高圧蒸気滅菌して作成した) を使用した。

復帰変異試験用培地としては, Vogel Bonner E 培地を改変した Salt Mixture を含む, 以下の組成の MBB 培地を用いた。

MBB 寒天培地: 40%グルコース 10ml, MM broth (X20) 50ml, Difco Nutrient Broth (0.8%) 10ml, ビオチン (100 μ g/ml) 1ml, 寒天末 (Difco) 15g, 蒸留水 930ml。

重層用軟寒天は, 寒天 (Difco) 0.6% と食塩 0.6% で作成した。

2-5 突然変異原性試験

2-5-1 修復試験 (Rec-assay)

Bacillus Subtilis H 17 と M 45 両株の -80°C 保存株を融解後, 小型ピペットを用いて B-2 寒天培地上に起点が接触しないようにストリークした。被検試料は DMSO (ジメチルスルフォキシド) または蒸留水に溶解した。直径 8mm のディスクに 0.05ml 浸ませ, ストリークした菌株の開始点をおおう様に置き, 37°C で一夜培養後, 両株の成長阻止帯の長さを測定した。陽性対照として, マイトマイシン C または AF-2 を用いた。

2-5-2 Cold-incubation 併用修復試験 (Cold-Rec)

前記 Rec-assay と同様、*Bacillus Subtilis* H 17 と M 45 両株を B-2 寒天培地にストリークし、被検試料を浸ませたディスクをストリークした菌株の開始点をおおう様に置いた。この寒天平板を 0°C 、一夜静置し、被検試料を十分拡散させた。その後、 37°C で一夜培養後、両株の成長阻止帯の長さを測定した。

2-5-3 光照射併用修復試験 (Photo-Rec)

前記 Rec-assay と同様、*Bacillus Subtilis* H 17 と M45 両株を B-2 寒天培地にストリークし、被検試料を浸ませたディスクをストリークした菌株の開始点をおおう様に置いた。この寒天平板を白色蛍光灯 (東芝 FLR, 20 S・W/M) で 10 cm の距離で連続照射し、 37°C 、一夜培養後、両株の成長阻止帯の長さを測定した。陽性対照としては、我々が各種化学物質の突然変異原性をスクリーニングする中で見いだした 8 MOP (Fig.-1 参照) を用いた。

2-5-4 復帰変異試験 (-S-9 mix)

復帰変異試験には、ヒスチジン要求性株の *Salmonella* Typhimurium TA 98 (フレームシフト変異型) と TA 100 (塩基交換変異型) を用いた。 -80°C に保存してある TA 株を融解後、使用した。

保存菌 0.1 ml と被検試料溶液 0.1 ml を 3 ml の重層用軟寒天に加え、予め作成しておいた選択培地の MBB 培

地上に重層し、均一に拡げ固化した。 37°C で 2 日間培養後、復帰変異コロニー数を計数した。陽性対照として、2-ニトロフルオレンを用いた。尚、試験に用いた菌液、被検試料液は雑菌の混入のない事を確認した。

2-5-5 代謝活性化併用による復帰変異試験 (+S-9mix)

日本クレア (株) より購入した S D 系雄ラット (8 weeks, 188 g) に PCB 500mg/kg を 1 回腹腔内に投与し、投与 4 日後の晩より絶食させ、5 日目に肝臓を摘出した。動物を断頭屠殺し、充分放血後、摘出した肝臓を、直ちに氷冷した 0.15M KCl 溶液にて洗浄した。2 ml/g 肝の割合で KCl 溶液を加えて、ホモジナイズし、 $9000\times g$ で 10 分間遠心後、その得られた上清を実験に用いた。尚、全ての操作は 5°C 以下で行った。実験に用いた反応液 (S-9 mix) 1 ml 中の組成は、肝臓ホモジネート上清 0.3 ml, MgCl_2 8 mM, KCl 33 mM, グルコース-6-リン酸 5 mM, NADP^+ 4 mM 並びに Na-リン酸緩衝液 (pH 7.4) 100mM から成る。

軟寒天液に菌液 0.1 ml, S-9 mix 0.3 ml, 被検試料液 0.1 ml を加えて良く混合し、選択培地の MBB 培地上に拡げた。 37°C で 2 日間培養後、復帰変異コロニー数を計数した。陽性対照として 2-アミノアントラセンを用いた。尚、試験に用いた菌液、試料溶液並びに S-9mix は、

Fig.-1 Comparison of various Rec-assay.

雑菌の混入のない事を確認した。

それぞれの被検試料に対して、実施した試験方法を **Table-3** にまとめて表わした。防腐剤、ホルモン並びに界面活性剤は Rec-assay と代謝活性化を含む復帰変異試験($\pm$ S-9 mix) により、紫外線吸収剤並びに酸化防止剤については、通常の Rec-assay の他に、Cold-Rec, Photo-Rec, 並びに代謝活性化を含む復帰変異試験により突然変異原性を検討した。

Table-3. List of assays tested

Materials	Rec	Cold-Rec	Photo-Rec	Reversion
Preservatives	○	—	—	○
Sunscreens	○	○	○	○
Antioxidants	○	○	○	○
Hormones	○	—	—	○
Surfactants	○	—	—	○

Rec : Rec-assay.

Cold-Rec : Rec-assay with cold incubation.

Photo-Rec: Rec-assay with photo-irradiation.

Reversion: Reversion-assay with or without metabolic activation.

3. 結果

今回、突然変異原性試験を実施するに当り、我々は、Photo-Rec assay の陽性対照物質について、いくつか検討を進めて来た。その結果、Fig. -1 に示す様に色素の O-201 では、光照射をして初めて、陽性を示し、Photo-dynamic effect による DNA 損傷性を起こすことを認めた。8 MOP では Cold-Rec において明らかな陽性を示し、更に、光照射でより顕著な陽性を示して、その DNA 損傷性を認めた。特にこの 8 MOP が、顕著な結果を示したことから、Photo-Rec assay の陽性対照として取り上げた。

3-1 防腐剤の突然変異原性

3-1-1 DNA 修復試験結果

防腐剤について、DNA 修復試験の結果を **Table-4** に示した。溶媒として用いた DMSO では、H 17, M 45 の両株に対し、全く生育阻止帯差を認めない。しかし、陽性対照として用いた既知変異原性物質の AF-2 (5 μ g/disk) 並びに M-C (0.5 μ g/disk) では、両株の間に著明な生育阻止帯の差を示し、DNA 損傷性を認めた。それに対し、試験に供した 9 種の防腐剤中、Irg-DP 300 (Pre-8) を除く、8 種の防腐剤では被検濃度内で両株に対し、生育阻止帯の差をほとんど示さず、陰性の結果であった。一方、Irg-DP 300 では、高濃度の 5 mg/disk で、両株の間に生育阻止帯の差があり、弱い陽性と考え

Table-4. Rec-assay of Preservatives.

Chemical	concentrs. (mg/disk)	B.Subutilis.		Difference of inhibition
		H17(Rec ⁺)	M45(Rec ⁻)	
Pre - 1	5.0	2.6	2.6	0
	0.5	0	0	0
	0.05	0	0	0
Pre - 2	5.0	2.4	2.9	0.5
	0.5	0	0	0
	0.05	0	0	0
Pre - 3	5.0	2.6	2.9	0.3
	0.5	2.5	2.8	0.3
	0.05	0	0	0
Pre - 4	5.0	3.7	4.1	0.4
	0.5	3.0	3.6	0.6
	0.05	0	0	0
Pre - 5	5.0	0	0	0
	0.5	0	0	0
	0.05	0	0	0
Pre - 6	5.0	3.2	3.2	0
	0.5	0.9	0.9	0
	0.05	0	0	0
Pre - 7	5.0	5.3	6.6	1.3
	0.5	5.8	6.8	1.0
	0.05	6.3	6.4	0.1
Pre - 8	5.0	12.3	15.7	3.4*
	0.5	11.5	14.2	2.7
	0.05	11.8	12.8	0.6
Pre - 9	5.0	0	0	0
	0.5	0	0	0
	0.05	0	0	0
DMSO	—	0	0	0
AF-2	5 μ g/disk	8.9	17.4	8.5
M-C	0.5 μ g/disk	4.3	13.6	9.3

* We evaluated to be negative at less than 3mm of inhibition zone and weak positive at 3mm-5mm.

Table-5. Reversion assay of Preservatives with or without S-9 mix.

Chemical	Concentrs. (μ g/P)	His ⁺ revertants per plate			
		TA98		TA100	
		-S-9 mix	+S-9 mix	-S-9 mix	+S-9 mix
Pre - 1	100	34	33	193	186
	10	34	36	184	159
	1	42	43	181	164
Pre - 2	100	48	30	186	184
	10	39	40	192	184
	1	49	43	185	172
Pre - 3	10	39	41	211	180
	1	49	41	184	180
	0.1	38	45	185	182
Pre - 4	10	42	44	194	182
	1	40	43	192	179
	0.1	49	34	183	182
Pre - 5	100	43	40	214	179
	10	41	33	184	193
	1	38	39	185	184
Pre - 6	10	45	47	182	175
	1	42	39	188	178
	0.1	39	44	196	178
Pre - 7	10	kill	NT	kill	NT
	1	24	kill	178	138
	0.1	33	38	186	176
Pre - 8	0.01	40	39	190	181
	1	kill	22	kill	174
	0.1	33	35	174	166
Pre - 9	0.01	37	41	193	177
	100	45	37	193	189
	10	32	43	175	174
	1	36	44	191	183
DMSO	—	41	40	191	175
2-NF	10	3128	—	940	—
2AA	5	—	2019	—	1506

NT : not tested

られた。しかし、0.5 mg/disk 以下の濃度では、両株の阻止帯の差は dose に対応して徐々に低下した。

3-1-2 復帰変異試験結果

防腐剤の復帰変異試験結果は Table-5 に示した。陽性対照物質の 2-ニトロフルオレン(10 μ g/plate)では、サルモネラ TA 98 および TA 100 の両株に対し、対照(DMSO)と比較して著明な復帰変異コロニー数の増加があった。また、代謝活性化を必要とする突然変異原性物質2-アミノアントラセン(5 μ g/plate)では、ラット肝ミクロゾームの代謝酵素系を使用することにより(+S-9 mix), TA 98 並びに TA100 の両株に対し、著明な復帰変異コロニー数の増加を示し、その突然変異原性が認められた。それに対し、9 種の防腐剤については本試験の濃度範囲内で突然変異原性を調べたが、取り上げた防腐剤についてはいずれも突然変異原性は見られなかった。Rec-assay で弱い陽性を示したIrg-DP300についても、その突然変異原性を認めることができなかった。

3-2 紫外線吸収剤の突然変異原性

3-2-1 DNA 修復試験結果

紫外線吸収剤について DNA 修復試験を検討した結果を Table-6 に示した。

Table-6. Rec-assay of Sunscreens

Chemical	Concns. (mg/disk)	Rec			Cold-Rec			Photo-Rec		
		H17/M45	inhibit.*	H17/M45	inhibit.*	H17/M45	inhibit.*	H17/M45	inhibit.*	H17/M45
Sun - 1	5.0	2.3/2.3	0	2.0/2.5	0.5	2.2/2.6	0.4			
	0.5	2.5/2.6	0.1	0.3/1.6	1.3	0/1.2	1.2			
	0.05	1.9/2.2	0.3	2.0/2.0	0	1.9/2.9	1.0			
Sun - 2	5.0	0.3/2.9	2.6	1.9/2.5	0.6	0/1.6	1.6			
	0.5	0.7/2.8	2.1	0/1.3	1.3	0/0	0			
	0.05	1.1/2.6	1.5	0/1.6	1.6	0/0	0			
Sun - 3	5.0	0/0	0	1.7/1.7	0	0/1.6	1.6			
	0.5	0/0	0	0/2.1	2.1	0.7/2.9	2.2			
	0.05	1.8/1.8	0	0/0.6	0.6	0/0.4	0.4			
Sun - 4	5.0	0/0	0	0/0	0	0/0	0			
	0.5	0/0	0	0/0	0	0/0	0			
	0.05	0/0	0	0/0	0	0/0	0			
Sun - 5	5.0	2.8/2.9	0.1	2.0/3.3	1.3	2.1/2.7	0.6			
	0.5	2.3/3.5	1.2	1.6/2.5	0.9	1.5/2.2	0.7			
	0.05	0/0	0	0/0	0	0/0	0			
Sun - 6	5.0	2.4/3.0	0.6	1.9/3.5	1.6	0/2.5	2.5			
	0.5	0.8/2.0	1.2	0/0	0	0/0	0			
	0.05	0/0	0	0/0	0	0/0	0			
DMSO	-	0/0	0	0/0	0	0/0	0			
M-C	0.5 μ g/disk	4.1/13.5	9.4	3.0/23.5	20.5	3.5/16.5	12.8			
S-MOP	0.5mg/disk	-	-	-	-	0/10.6	10.6			

* inhibit. : Difference of Growth Inhibition Zone.

陽性対照物質のマイトマイシン-C(0.5 μ g/disk)では、通常の Rec-assay と Cold incubation を併用した Rec-assay (Cold-Rec) において、両株の間に著明な生育阻止帯の差を示し、DNA 損傷性を認めた。特に Cold-Rec においては、Fig.-1 に示した様に、より感度が増強し、顕

著な結果を示している。また、光照射併用の Rec-assay (Photo-Rec) における陽性対照の 8 MOP も、両株の間に顕著な生育阻止帯の差を示し、いわゆる Photo-dynamic effect が観察された。それに対し、6 種の紫外線吸収剤では、Rec-assay, Cold-Rec, 並びに Photo-Rec いずれの試験においても、両株の間に生育阻止帯の差がほとんど認められず、全て陰性であった。

3-2-2 復帰変異試験結果

紫外線吸収剤の復帰変異試験結果を Table-7 に示した。

Table-7. Reversion assay of Sunscreens with or without S-9mix.

Chemical	Concns. (μ g/p)	His ⁺ revertants per plate			
		TA98		TA100	
		-S-9 mix	+S-9 mix	-S-9 mix	+S-9 mix
Sun - 1	1,000	43	41	Kill	185
	100	32	40	218	186
	10	41	44	218	181
	1	NT	NT	210	NT
	0.1	NT	NT	210	NT
Sun - 2	1,000	47	42	201	180
	100	45	42	188	178
	10	39	43	191	179
	1	NT	NT	NT	NT
	0.1	NT	NT	NT	NT
Sun - 3	1,000	17(Kill)	42	NT	NT
	100	33	41	175(Kill)	184
	10	43	41	202	188
	1	40	NT	200	191
	0.1	NT	NT	212	NT
Sun - 4	1,000	29	45	205	192
	100	35	46	203	191
	10	29	46	202	181
	1	36	44	Kill	170
	0.1	37	47	206	176
Sun - 5	1,000	31	45	183	177
	100	46	44	205	182
	10	34	49	213	182
	1	35	49	202	189
	0.1	35	49	202	189
DMSO	-	41	46	205	194
2-NF	10	2286	-	2474	-
2AA	5	-	2304	-	2540

NT : not tested

陽性対照物質の 2-ニトロフルオレン (10 μ g/plate) 並びに 2-アミノアントラセン (5 μ g/plate) では、対照(DMSO)と比較して、それぞれ著明な復帰変異コロニー数の増加を、TA 98 並びに TA 100 の両株に対し認めた。しかし、6 種の紫外線吸収剤では、本試験の濃度範囲内で突然変異原性を調べたが、S-9 mix 添加、無添加にかかわらず、いずれにおいても、突然変異原性は認められなかった。

3-3 酸化防止剤の突然変異原性

3-3-1 DNA 修復試験結果

8 種の酸化防止剤について、DNA 修復試験の検討結果を Table-8 に示した。

陽性対照物質として、Rec-assay 並びに Cold-Rec

Table-8. Rec-assay of Antioxidants.

Chemical	Concns.	Rec.		Cold-Rec		Photo-Rec	
		(mg/disk)	H17/M45 inhibit.*	H17/M45 inhibit.*	H17/M45 inhibit.*	H17/M45 inhibit.*	H17/M45 inhibit.*
Anti - 1	5.0	4.8/6.2	1.4	4.5/4.6	0.1	5.6/5.6	0
	0.5	0/1.1	1.1	0/0	0	0/0	0
	0.05	0/0	0	0/0	0	0/0	0
Anti - 2	5.0	9.9/10.5	0.6	8.7/9.3	0.6	9.5/10.9	0
	0.5	6.2/6.8	0.6	3.8/4.8	1.0	5.1/5.5	0.4
	0.05	0/0	0	0/0	0	0/0	0
Anti - 3	5.0	5.0/6.5	1.5	7.3/8.2	0.9	4.9/5.4	0.5
	0.5	0/0	0	0/0	0	0/0	0
	0.05	0/0	0	0/0	0	0/0	0
Anti - 4	5.0	3.0/4.7	1.7	1.1/1.1	0	0.3/0.3	0
	0.5	3.5/3.9	0.4	1.2/1.3	0.1	0.5/0.5	0
	0.05	2.9/3.8	0.9	0/0.3	0.3	0/0	0
Anti - 5	5.0	6.9/8.8	1.9	9.9/10.5	0.6	6.5/6.6	0.1
	0.5	6.0/7.3	1.3	6.0/6.8	0.8	2.9/3.0	0.1
	0.05	1.2/2.4	1.2	0/0	0	0/0	0
Anti - 6	5.0	7.8/9.0	1.2	5.8/6.6	0.8	4.5/4.5	0
	0.5	6.7/9.3	2.6	5.5/6.5	1.0	2.9/3.1	0.2
	0.05	3.4/4.6	1.2	1.0/2.2	1.2	0/0	0
Anti - 7	5.0	0/0	0	0/0	0	0/0	0
	0.5	0/0	0	0/0	0	0/0	0
	0.05	0/0	0	0/0	0	0/0	0
Anti - 8	5.0	0/1.5	1.5	0/0	0	0/0	0
	0.5	0/2.2	2.2	0/0	0	0/0	0
	0.05	0/0	0	0/0	0	0/0	0
DMSO	-	0/0	0	0/0	0	0/0	0
M-C	0.5µg/disk	4.3/15.0	10.7	2.3/17.9	15.6	-	-
8-MOP	0.5mg/disk	2.0/4.9	2.9	-	-	0/8.6	8.6

* inhibit. : Difference of Growth Inhibition Zone.

は、マイトマイシン-C を使用し、Photo-Rec には、8-MOP を使用した。それぞれの陽性対照では、いずれも H 17 と M 45 の両株の間に顕著な生育阻止帯の差を認めた。それに対し、8 種の酸化防止剤については、Rec-assay, Cold-Rec 並びに Photo-Rec いずれの試験においても、両株の間に生育阻止帯の差をほとんど認めず、全て陰性であった。

3-3-2 復帰変異試験結果

酸化防止剤についての復帰変異試験結果は Table-9 に示した。

陽性対照物質の2-ニトロフルオレン並びに代謝活性化の必要な2-アミノアントラセンでは、いずれも対照と比較し、それぞれ著明な復帰変異コロニー数の増加を、TA98 並びに TA100 の両株に対して認めた。一方、8 種の酸化防止剤では、本試験の濃度範囲内で突然変異原性を検討したが、S-9 mix 添加、無添加にかかわらず、いずれにおいても突然変異原性は陰性であった。

3-4 ホルモンの突然変異原性

3-4-1 DNA 修復試験結果

7 種のホルモンについての検討結果を Table-10 に示した。

陽性対照物質のマイトマイシン-C では両株の間に顕著な生育阻止帯の差を示した。それに対し、癌原物質を含む 7 種のホルモンについては、両株の間に生育阻止帯

Table-9. Reversion assay of Antioxidants with or without S-9_{mix}.

Chemical	Concns.	His ⁺ revertants per plate			
		TA98	TA100	-S-9 _{mix}	+S-9 _{mix}
Anti - 1	1,000	29	27	194	218
	100	30	23	194	225
	10	26	20	196	235
Anti - 2	100	32	32	187	224
	10	39	27	200	227
	1	31	22	193	221
Anti - 3	100	31	23	202	218
	10	28	22	190	220
	1	32	18	212	205
Anti - 4	1,000	34	35	kill	kill
	100	40	26	203	218
	10	36	35	207	228
Anti - 5	100	28	21	196	218
	10	35	27	207	228
	1	33	26	198	226
Anti - 6	100	30	27	kill	210
	10	39	29	208	226
	1	32	28	199	218
Anti - 7	0.1	NT	NT	193	NT
	1,000	28	24	192	227
	100	30	27	192	227
Anti - 8	10	36	25	203	223
	1,000	22	31	194	219
	100	34	31	189	264
	10	34	26	199	223
DMSO	-	34	27	197	220
2-NF	10	3,290	-	3,492	-
2AA	20	-	2,764	-	3,394

NT : not tested

Table-10. Rec-assay of Hormones.

Chemical	Concns.	B.Subutilis.		Difference of Inhibition
		(mg/disk)	H17(Rec ⁺)	M45(Rec ⁻)
Horm - 1	5.0	0	0	0
	0.5	1.5	1.5	0
	0.05	0.9	1.2	0.3
Horm - 2	5.0	0	0	0
	0.5	0	0	0
	0.05	0	0	0
Horm - 3	5.0	0	0	0
	0.5	0	0	0
	0.05	0	1.5	1.5
Horm - 4	5.0	0	0	0
	0.5	0	0	0
	0.05	0	0	0
Horm - 5	5.0	0	0	0
	0.5	0	0	0
	0.05	0.9	0.9	0
Horm - 6	5.0	0	0	0
	0.5	0.5	1.0	0.5
	0.05	0	0	0
* Horm - 7	5.0	1.8	1.9	0.1
	0.5	0.9	0.9	0
	0.05	0	0	0
DMSO	-	0	0	0
M-C	0.5µg/disk	3.5	12.5	9.0

* This material are carcinogen and used for reference.

の差をほとんど認めず、全て陰性であった。

3-4-2 復帰変異試験結果

ホルモンの復帰変異試験結果を Table-11 に示した。陽性対照についての2-ニトロフルオレン並びに代謝活性化の必要な2-アミノアントラセンでは、いずれも TA

Table-11. Reversion assay of Hormones with or without S-9_{mix}.

Chemical	Concns. (μ g/P)	His ⁺ revertants per plate			
		TA98		TA100	
		-S-9 _{mix}	+S-9 _{mix}	-S-9 _{mix}	+S-9 _{mix}
Horm - 1	1,000	30	43*	205	212
	100	29	32	205	212
	10	27	21	202	192
Horm - 2	1,000	26	kill	162	kill
	100	27	31	190	208
	10	27	31	191	200
Horm - 3	1,000	28	22	214	186
	100	31	29	200	192
	10	22	29	196	203
Horm - 4	1,000	30	33	205	210
	100	24	26	214	208
	10	26	25	204	176
Horm - 5	1,000	23	26	kill	kill
	100	25	24	170	194
	10	31	24	168	162
Horm - 6	1	NT	NT	175	190
	1,000	30	32	kill	209
	100	24	29	213	226
Horm - 7	10	31	24	202	204
	10	30	39	208	200
	1	25	25	162	229
	0.1	28	23	162	203
DMSO	-	28	29	208	215
2-NF	2	755	-	413	-
2AA	5	-	1,773	-	2,872

* : The number of revertants represents to be slightly more than the controls.
NT : not tested.

98並びに TA100 の両株において、顕著な復帰変異コロニー数の増加が見られた。一方、7種のホルモン中、エストラジオール (Horm-1) のみに、高濃度で、対照 (DMSO) より、わずかに高い復帰変異コロニー数の増加が、サルモネラ TA 98株(+S-9 mix)で、見られた。しかしその突然変異原性を認めるには到らなかった。その他の癌原性物質を含む6種のホルモンについてもまた、全て陰性であった。

3-5 界面活性剤の突然変異原性

3-5-1 DNA 修復試験結果

界面活性剤については、アニオン系、カチオン系、ノニオン系界面活性剤、両性界面活性剤等、代表的な各種界面活性剤17種について、DNA 修復試験を検討した。その結果を **Table-12** に示した。

陽性対照物質のマイトマイシン-C では両株の間に顕著な生育阻止帯の差を認めたのに対し、17種全ての界面活性剤には、いずれも両株の間に、生育阻止帯の差をほとんど認めず、陰性であった。

3-5-2 復帰変異試験結果

17種の界面活性剤の復帰変異試験結果を **Table-13** に示した。

陽性対照物質の2-ニトロフルオレンならびに代謝活性化の必要な2-アミノアントラセンでは、いずれも対照

Table-12. Rec-assay of Surfactants.

Chemical	Solvent	Concns. (mg/disk)	B. Subtilis.		Difference of inhibition
			H17(Rec ⁺)	M45(Rec ⁻)	
Surf - 1	DMSO	5.0	1.0	1.7	0.7
		0.5	0.9	1.1	0.2
		0.05	0	0.3	0.3
Surf - 2	DMSO	5.0	3.3	4.1	0.8
		0.5	1.0	1.4	0.4
		0.05	0	0.5	0.5
Surf - 3	H ₂ O	5.0	2.6	3.1	0.5
		0.5	0	2.3	2.3
		0.05	0	1.5	1.5
Surf - 4	DMSO	5.0	5.4	6.3	0.9
		0.5	3.0	3.0	0
		0.05	0.3	0.5	0.2
Surf - 5	DMSO	5.0	0	0	0
		0.5	0	0	0
		0.05	0	0	0
Surf - 6	H ₂ O	5.0	7.5	7.8	0.3
		0.5	4.7	4.7	0
		0.05	3.2	3.5	0.3
Surf - 7	DMSO	5.0	11.6	12.1	0.5
		0.5	6.3	6.7	0.4
		0.05	3.3	3.3	0
Surf - 8	DMSO	5.0	13.5	13.6	0.1
		0.5	12.2	12.6	0.4
		0.05	7.5	7.9	0.4
Surf - 9	DMSO	5.0	1.0	0.9	0.1
		0.5	0.4	0.7	0.3
		0.05	0.5	0.5	0
Surf -10	H ₂ O	5.0	1.5	1.3	0.2
		0.5	2.5	2.5	0
		0.05	2.2	2.4	0.2
Surf -11	DMSO	5.0	1.9	2.0	0.1
		0.5	0	0	0
		0.05	0	0	0
Surf -12	DMSO	5.0	0	0	0
		0.5	0	0	0
		0.05	0	0	0
Surf -13	DMSO	5.0	0	0	0
		0.5	0	0	0
		0.05	0	0.6	0.6
Surf -14	DMSO	5.0	0	0	0
		0.5	0	0.3	0.3
		0.05	0.3	0.3	0
Surf -15	DMSO	5.0	0	0	0
		0.5	0	0	0
		0.05	0	0	0
Surf -16	DMSO	5.0	8.0	8.1	0.1
		0.5	3.1	3.1	0
		0.05	1.4	1.5	0.1
Surf -17	H ₂ O	5.0	3.4	3.4	0
		0.5	2.5	2.9	0.4
		0.05	0	0	0
DMSO	-	-	0	0	0
H ₂ O	-	-	0	0	0
M-C	0.5 μ g/disk	3.6	12.7	7.6	7.6

(DMSO) に比較し、TA 98 と TA 100 の両株の系で、顕著な復帰変異コロニー数の増加があった。しかるに、TA98株系での代謝活性化 (+S-9 mix) による復帰変異試験の結果、アニオン系界面活性剤のポリオキシエチレン (3) ラウリルエーテルサルフェート (Surf 1)、トリエタノールアミンラウリルエーテルサルフェート (Surf-2)、ソジウムラウリルサルフェート (Surf-4) の3種とノニオン系界面活性剤のポリオキシエチレン (15) セチルエーテル (Surf-13)、ポリオキシエチレン (16) ラノリンアルコール (Surf-14) の2種については、高濃度領域で対照 (DMSO) より、そのコロニー数

Table-13. Reversion assay of Surfactants with or without S-9_{mix}.

Chemical	Solvent	Concns. (μ g/p)	His ⁺ revertants per plate			
			TA98	TA100		
			-S-9 _{mix}	+S-9 _{mix}	-S-9 _{mix}	+S-9 _{mix}
Surf - 1	DMSO	1,000	28	43*	199	171
		100	20	41*	218	168
		10	23	21	215	171
Surf - 2	DMSO	1,000	Kill	46*	228	NT
		100	24	45*	220	139
		10	20	29	169	178
		1	20	30	NT	169
Surf - 4	DMSO	1,000	Kill	42*	216	Kill
		100	27	48*	251	169
		10	24	38	210	166
		1	25	31	NT	165
Surf - 7	DMSO	10	26	28	215	148
		1	26	32	200	178
		0.1	23	35	216	179
Surf - 8	DMSO	5	23	26	208	96Kill
		1	26	27	214	130
		0.1	29	29	214	145
Surf - 9	DMSO	1,000	30	25	229	177
		100	33	28	210	177
		10	28	27	208	175
Surf - 11	DMSO	1,000	31	31	205	163
		100	29	33	203	166
		10	32	26	214	172
DMSO		-	28	29	213	178
2-NF		2	755	-	413	-
2AA		5	-	1,773	-	960
Surf - 3	H ₂ O	1,000	31	38	199	197
		100	32	33	204	212
		10	27	33	207	214
Surf - 5	DMSO	1,000	35	38	201	213
		100	29	33	210	198
		10	33	36	191	198
Surf - 6	H ₂ O	10	32	33	207	207
		1	24	29	206	204
		0.1	30	24	205	191
Surf -10	H ₂ O	100	17Kill	34	196	198
		10	26	27	195	202
		1	26	29	196	201
Surf -12	DMSO	1,000	27	36	203	204
		100	28	38	205	208
		10	26	34	201	190
Surf -13	DMSO	1,000	25	49*	196	199
		100	30	47*	205	199
		10	19	42*	200	198
Surf -14	DMSO	1,000	37*	48*	200	205
		100	29	37	206	210
		10	20	32	205	210
Surf -15	DMSO	1,000	32	31	208	193
		100	29	31	208	199
		10	29	36	199	219
Surf -16	DMSO	100	27	34	193	186
		10	28	33	207	209
		1	26	33	203	207
Surf -17	H ₂ O	1,000	Kill	Kill	Kill	204
		100	31	28	190	200
		10	32	24	207	207
		1	27	27	207	207
DMSO		-	29	33	202	204
H ₂ O		-	27	32	199	202
2-NF		2	657	-	275	-
2AA		5	-	1,680	-	1,383

* : The number of revertants represents to be slightly more than the controls.

NT : not tested.

は少ないが、わずかに高い復帰変異コロニー数を示した。ポリオキシエチレン(16)ラノリンアルコールでは、また代謝活性化なし(-S-9 mix)で、TA 98 株に、対照よりわずかに高値の復帰変異コロニー数が見られた。し

かしこれらの結果は、突然変異原性を認める程には到らなかった。

その他のアニオン系2種、カチオン系3種、ノニオン系5種の活性剤に加え、両性界面活性剤の2種では、全て陰性であった。

TA 100 株の場合、S-9 mix 添加、無添加にかかわらず、17種全ての界面活性剤に、いずれも復帰変異コロニー数の増加がほとんど認められず、陰性であった。

4. 考 察

厚生省がん研究班は¹⁷⁾、防腐剤について、突然変異原性を検討しておりメチル、エチル、ブチル-p-オキシ安息香酸エステルでの Rec-assay 並びにサルモネラ菌による復帰変異試験結果は、いずれも陰性であると報告している。ところが、プロピル-p-オキシ安息香酸エステルでは、Rec-assay において陽性を示し、復帰変異試験結果は陰性であった。しかし、我々の検討では4種のp-オキシ安息香酸エステル(Pre-1,2,3,4)については、Rec-assay、復帰変異試験のいずれにおいても、陰性の結果を得た。但し、我々が取り上げた9種の防腐剤中、Irg-DP 300 のみに、実用濃度の約100倍に相当する高濃度において弱いRec陽性を認めた。他の全ての防腐剤では、Rec-assay 並びに復帰変異試験において陰性であった。

紫外線吸収剤は、太陽光線遮断剤として使用されることから、通常の Rec-assay、Cold-Rec および復帰変異試験に加え光照射条件下の Rec-assay (Photo-Rec) により、その突然変異原性を検討した。その結果取り上げた紫外線吸収剤6種は、いずれも陰性であった。

今回、Photo-Rec の陽性対照物質として用いた 8-MOP は植物界に広く分布しているフロクマリンの一種として知られ、ヒト皮膚上で紫外線暴露により炎症を起こして、色素沈着を起こす光毒物質として知られている。また、8-MOP については、M. J. Ashwood-Smith 等により、¹⁸⁾近紫外(320~380nm)照射下、E. Coli WP2(Try⁻)株に、突然変異原性を誘発することが報告されている。我々は、8-MOP の DNA 損傷性について蛍光灯照射下、検討した。その結果、Fig.-1 に示した様に H 17 と M 45 の両株の間に顕著な生育阻止帯の差を認めた。そして同様な現象が O-201 でも見出された。このような Photo-dynamic effect は、賀田等によって¹⁹⁾、フロキシシン B にも認められている。しかし、若干光毒性の報告^{20,21)}もあるエスコロール 506 については、光照射

下においても DNA 損傷性は確認できなかった。

酸化防止剤については、厚生省がん研究班によっていくつかが検討されており¹⁷⁾、石館が総説として詳しく報告している¹⁴⁾。BHT, BHA, 没食子酸プロピル, *dl*- α -トロフェロール, L-アスコルビル酸は、復帰変異試験では、全て陰性であるが、Rec-assay においては、BHA, BHT および没食子酸プロピルに陽性が認められたと報告している。我々の結果では、いずれの試験法でも、全て陰性であった。賀田等は、代謝活性化を併用したり、液体プレート法等の検討より、これらの3種の酸化防止剤に陽性を認めたとしているが、本実験では、これらの方法は未検討である。

合成女性ホルモンとして知られているジェチルスチルベステロールは癌原物質として知られており、この突然変異原性については、厚生省がん研究班においても検討されている¹⁷⁾。すなわち、Rec-assay で陽性を示し、復帰変異試験においては陰性と報告している。H. R. Glatt 等²²⁾、種々の代謝系を併用した復帰変異試験により、ジェチルスチルベステロールについて検討しているが、いずれも突然変異原性は陰性であると報告している。我々の試験でも、Rec-assay, 復帰変異試験いずれの方法でも陰性であった。

また、M. F. El. Etreby は²³⁾、エストラジオール、エチニルエストラジオールが、高濃度で、マウス、ラットに腫瘍発生を促進すると報告している。しかし R. Lang 等²³⁾、その突然変異原性は陰性であったと報告している。

エチニルエストラジオールについては、我々の結果でも陰性であった。また、エストラジオールについては、医薬部外品規制値 (0.002%)²⁴⁾の約50倍に相当する高濃度において、対照 (DMSO) に比較し、やや復帰変異コロニー数の増加が認められる。しかしコロニー数の増加および Dose-Response の関係は、突然変異原性を認めるには必ずしも充分でないことから、陰性と判断した。その他の4種のホルモンについては、全て陰性であった。

界面活性剤については、厚生省がん研究班や¹⁷⁾、井上等^{15,16)}の報告がある。Polysorbate 60 は弱い助癌物質といわれ^{25,26)}、マウス皮膚に塗布することにより、若干ではあるが、腫瘍発生がみられるといわれている²⁷⁾。この Polysorbate 60 の突然変異原性について、厚生省がん研究班は、復帰変異試験では陰性であるが、Rec-assay では陽性であると報告している¹⁷⁾。しかし、井上

等は、^{15,16)}、同様の Rec-assay, 復帰変異試験のいずれにおいても陰性であったと報告している。我々も同様に粧原基グレードの Polysorbate 60 で Rec-assay および復帰変異試験を検討したところ、いずれの方法でも陰性であり、井上等の結果と全く同じであった。さらに、Polysorbate 80 についても、ラットに皮下連続投与により線維肉腫を認めるという報告があるが、²⁹⁾我々の突然変異原性試験の結果は、陰性であった。

一方、他の界面活性剤については、サルフェート系のアニオン界面活性剤3種とセチルエーテル及びラノリンアルコール系ノニオン界面活性剤の2種において、1~10mg/ml で、サルモネラ TA98 に対照(DMSO)よりわずかに高い復帰変異コロニー数の増加がみられた。しかし、エストラジオールと同様に、突然変異原性を認めるには到っていない。その他の界面活性剤アニオン系2種、カチオン系3種、ノニオン系3種並びに両性界面活性剤2種もまた、いずれの試験においても、突然変異原性は陰性であった。

5. 総 括

5-1 防腐剤9種の内、Irg-DP 300 に、弱い DNA 損傷性を認めたものの復帰変異試験では陰性であった。その他の防腐剤の突然変異原性は、全て陰性であった。

5-2

紫外線吸収剤6種の突然変異原性は、全て陰性であった。

5-3

酸化防止剤8種の突然変異原性は、全て陰性であった。

5-4

ホルモン7種の内、エストラジオールのみサルモネラ TA 98 (+S-9 mix)に、高濃度でわずかに高い復帰変異コロニー数の増加を認めたが、突然変異原性を認めるに到らなかった。一方、一部癌原物質を含む他のホルモンの突然変異原性は、全て陰性であった。

5-5

界面活性剤の場合、サルフェート系のアニオン界面活性剤3種とセチルエーテル及びラノリンアルコール系ノニオン界面活性剤2種が、1~10mg/ml でサルモネラ TA 98 に、対照 (DMSO) よりわずかに高い復帰変異誘発を示したが突然変異原性を認めるに到っていない。

その他の界面活性剤12種の突然変異原性は全て陰性であった。

引用文献

- 1) S. Kondo and H. Ichikawa, Japan, J. Genetics, 48, 295~300 (1973)
- 2) T. Kada, Japan, J. Genetics, 48, 301~305 (1973)
- 3) A. Tonomura and T. Sasaki, Japan, J. Genetics, 48, 291~294 (1973)
- 4) Y. Ikeda, Report to Food Sanitary Committee of the ministry of Health and Welfare, (1974)
- 5) T. Sugimura, T. Kawachi, M. Nagao, Y. Seino, T. Okamoto, K. Shudo, T. Kosuge, K. Isugi, K. Wakabayashi, Y. Iitake and A. Itai, Proc, Japan, Acad, 53, 58~61 (1977)
- 6) S. Takayama, Y. Katoh, M. Tanaka, M. Nagao, K. Wakabayashi and T. Sugimura, Proc, Japan, Acad, 53, Ser, B, 126~129 (1977)
- 7) 松倉則夫, 河内卓, 内田英二, 森野一英, 大垣比呂子, 杉村隆, 高山昭三, 第39回日本癌学会総会記事(東京) 5, November, 32 (1980)
- 8) 賀田恒夫編, “遺伝毒性突然変異実験法” 日本衛生技術研究会
- 9) B. N. Ames, J. MacCann, and E. Yamasaki, Mutation, Res, 31, 347~364 (1975)
- 10) B. N. Ames, H. O. Kammen and E. Yamasaki, Proc, Nat, Acad, Sci, USA, 72 [6], 2423~2427, June (1975)
- 11) C. E. Searle, D. G. Harden, S. Venitt and O. H. B. Gyde, Nature, 255, June, 5, 306~307 (1975)
- 12) T. Kada, K. Tutikawa and Y. Sadaie, Mutation Res, 16, 165~174 (1972)
- 13) 松島泰次郎 et al, 日本環境変異原研究会第5回研究発表会要旨(東京) 16, October (1976)
- 14) 石館基, フレグランスジャーナル。No.12, 66~70 (1980)
- 15) K. Inoue, T. Sunagawa and S. Takayama, 10 th, I. F. S. C. C. Congress, Australia Vol.1, 139~178 (1978)
- 16) 井上邦夫, 砂隆, 高山昭三, J. Soc. Cosmet, Chem, Japan, Vol.13, No.2, 50~60 (1979)
- 17) 厚生省がん研究報告書(下)(Annual Report of the Cancer Research Ministry of Health and Welfare) 河内班, (1973~1978)
- 18) M. G. Ashwood-Smith, G. A. Poulton, M. Barker and Mildnerberger, Nature, 285, 5, June 407~409 (1980)
- 19) K. Yoshikawa, H. Kurata, S. Iwahara and T. Kada, Mutation, Res, 56, 359~362 (1978)
- 20) E. A. Emmett, B. R. Taphorn and J. R. Kominsky, Arch Dermatol, 113, June, 770~775 (1977)
- 21) K. H. Kaidbey & A. M. Kligman, Arch Dermatol, 114, April, 547~549 (1978)
- 22) H. R. Glatt, M. Metzler and F. Oesch, Mutation, Res, 67, No.2, 113~121 (1976)
- 23) R. Lang and U. Redmann, Mutation, Res, 67, 361~365 (1979)
- 24) 化粧品原料基準第1版追補II注解, 薬事日報社, p.718
- 25) H. Setälä, Acta, Acta, Pathol, Microbial, Scand, Supp, 115, 1 (1956)
- 26) K. Setälä, H. Setälä and P. P. Holsti, Science, 120, 1075 (1954)
- 27) G. Dellaporta, P. Shubik, K. Dammert and B. Terracini, J. Natl, Cancer Inst, 25, 607 (1960)
- 28) M. F. El, Etreby, A short review, in W. I. P. Mainwaring, E. Genazzani, F. Dicarlo (Eds), Pharmacological Modulation of steroid Action, Raven, New York, in Press.
- 29) P. Grasso et al, Food & Cosmet, Toxicol, 9, 463 (1971)

(昭和56年9月18日受理)