

市販茶系飲料の抗変異原性と抗変異原性成分の定量

興津 佳子, 橋本 麻美, 水野 智子, 大江 武

Antimutagenicity and antimutagen concentrations in commercially available tea drinks

Yoshiko Okitsu, Asami Hashimoto, Tomoko Mizuno and Takeshi Ohe

Sep-pak C18 extracts of nineteen commercially available tea drinks were examined for inhibitory effects on the mutagenicity for three nitroarenes using *umu*-test. Antimutagenic activity of tea drinks increased in the following order: blend tea drinks < green tea drinks < oolong tea drinks. Furthermore, antimutagens (EGC, C, EGCG, EC, ECG, ascorbic acid, gallic acid and caffeine) concentrations of nineteen commercially available tea drinks were determined by HPLC combined with UV detector and electrochemical detector. Higher concentrations of EGCG and EGC were detected in green tea drinks than oolong tea drinks. Total mean concentration of five catechins in oolong tea drinks was less than half of one in green tea drinks. These results suggest that there is no correlation between antimutagenicity for nitroarenes and catechin concentrations in commercially available tea drinks.

1. 緒 言

茶の起源は古く、紀元前 3000 年頃の中国西南部に発祥したと伝えられており、その後中国から様々なルートを経て世界各地に伝わり、日本には平安初期 (約 1200 年前) 唐へ留学した僧侶たちによって持ち帰ったのが始まりといわれている¹⁾。現在、世界各地で親しまれている茶は、*Camellia sinensis* というツバキ科の常緑樹の葉から作られており、発酵法の違いによって、不発酵茶、半発酵茶、発酵茶のように分類されている。もともと茶は生産量も少なく、高価でもあり、嗜好飲料としてよりも気分を爽快にし、疲労を癒すなど薬として扱われてきたが、日本では鎌倉時代に入って喫茶としての関心が高まってきた。

日本のお茶といえば緑茶で代表されるが、煎茶、玉露、抹茶などの日本茶は蒸製緑茶である。茶にお湯をそそいで、色と味と香りを楽しむのが本来のわが国でのお茶の飲用形態であった。また、茶の種類に合った茶器を用いて茶をいれるのが本来の形式であるが、20 年ほど前から缶飲料やペットボトル飲料が使用されるようになり、消費者の簡便志向の高ま

りを背景に茶系飲料の市場は大きく成長し、2003 年度の生産量は、1986 年に比べて約 20 倍の 500 万 kl にも達している²⁾。また、図 1 に示した 2003 年の種別生産量からみても、緑茶飲料が約 4 割を占めてはいるもののウーロン茶飲料、紅茶飲料、ブレンド飲料など種々の茶飲料が飲まれている。このように、茶の飲用形態は大きく変化し、市販茶系飲料は私達の生活により密接なものとなってきている。

植物成分によるがん予防を目的として 1990 年に米国国立がん研究所を中心にスタートした“デザイナーフード計画”でのがん予防効果の可能性のある食品の中で“茶”は重要性の度合いの高い位置づけがされている³⁾。茶の中でも、とりわけ緑茶の摂取とがんに関連する研究は多く成されてきており、IARC (国際がん研究機関) による緑茶の消費量とがんの発生率についての疫学調査結果では明確な相関性が認められていなかったとの報告がある一方、緑茶を多く飲む人のがん発生の危険率が低いとの疫学調査が日本で報告されている。このほかにも緑茶摂取量と各種がんの発生率や死亡率に関する疫学調査では、相反する結果が見られている⁴⁾。

緑茶抽出物や緑茶の主要成分であるカテキン類は、抗酸化性、ラジカル消去活性などを有することから抗変異原性や抗発がん性に関する研究が多く行

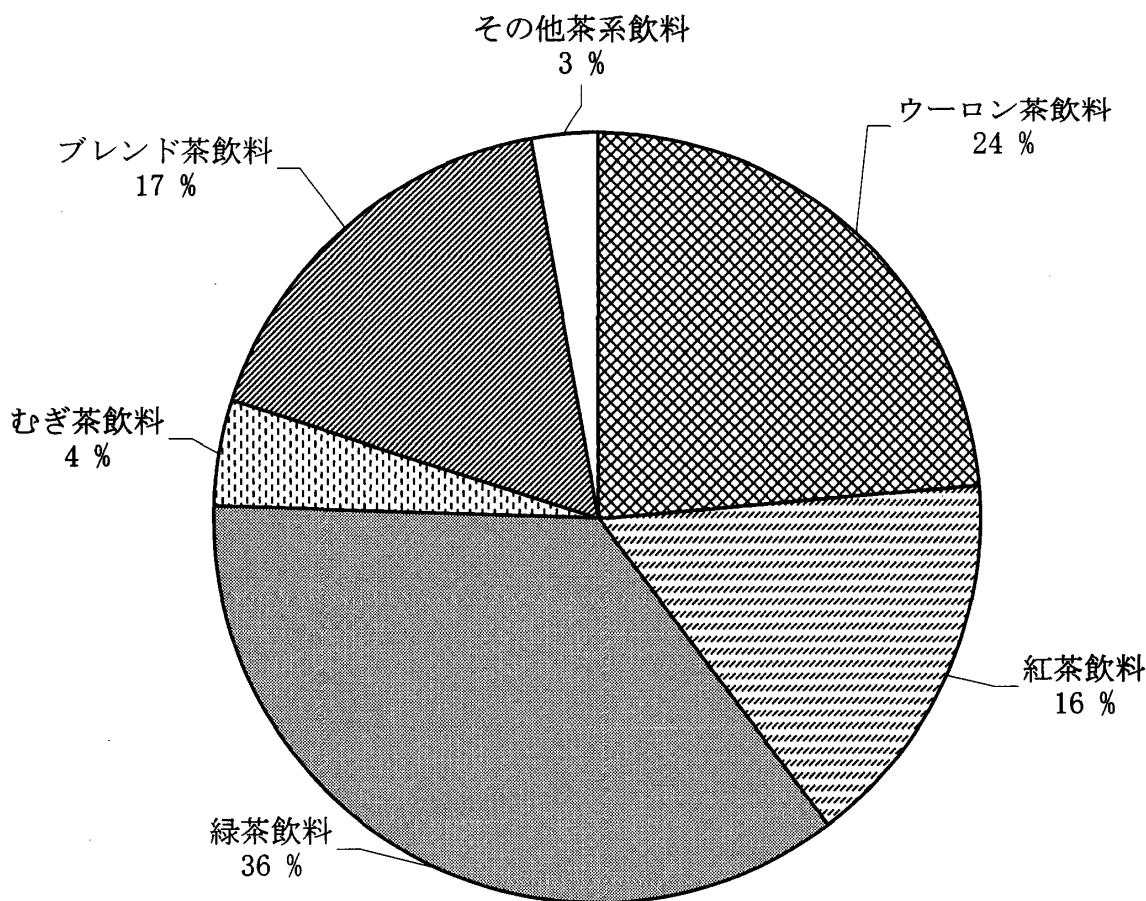


図1 わが国の市販茶系飲料の生産数量別の内訳 (2003年)
資料：社団法人全国清涼飲料工業会編：清涼飲料関係統計資料 (2004)

われてきた。さらに、緑茶のみならずウーロン茶、紅茶、白茶なども研究対象とされてきている^{4,9-13)}。茶ポリフェノールの変異原物質に対する抗変異原性についても多くの報告があり、カテキン類あるいはその熱異性化物にベンゾ (a) ピレン (BaP)、ヘテロサイクリックアミン (HCA)、過酸化水素、アフラトキシン B₁ (AFB₁)、ジメチルアミノベンズアントラセン、MNNG などの変異原性を抑制する作用が知られている。種々の茶葉抽出物についてもそれらの作用の違いが報告されており、茶葉の化学成分の違いによると思われる結果やカテキン類以外の成分の関与が報告されている¹⁴⁻²⁸⁾。一例として、Constable ら¹⁸⁾は、緑茶、紅茶抽出物を HPLC により分画し、カテキン類とは異なる画分が HCA の生成を抑制したことを報告している。著者ら²⁷⁾は、各種茶葉抽出物のニトロアレン類に及ぼす抗変異原性を検討し、茶葉中のカテキン類が必ずしも主要な抗変異原性成分ではないとの結果を報告した。一方、市販茶系飲料に関する報告は、岩井ら²⁹⁾による市販茶系飲

料の抗酸化活性とカテキン濃度との関連を検討した報告、中川ら³⁰⁾によるフリーラジカル消去作用に着目した市販茶系飲料の評価についての報告があるものの抗変異原性に関する報告は見られない。そこで本報では、近年幅広く普及してきているペットボトル型市販茶系飲料のニトロアレン類に対する抗変異原性並びに含まれる抗変異原性成分濃度の測定を行った結果について報告する。本実験で対象としたニトロアレン類は、物質の不完全燃焼、大気中での生成、化学工業界での大量使用、自然界での窒素循環過程での生成などにより広く環境に分布しており、自動車排ガス、大気、石油ストーブ燃焼室内空気、焼き鳥など我々の生活の身近に存在する物質で、特に肺がんの原因物質としても長年注目されている環境変異原物質である³¹⁾。

II. 実験方法

1. 試料

平成 14 年に京都市内で購入したペットボトル入

り市販茶系飲料 19 製品並びに平成 16 年度に京都市内で購入した 3 製品を使用した。平成 14 年に使用した茶系飲料は、原材料に使用されている茶を基準に、緑茶飲料 (GT-1~11)、ウーロン茶飲料 (OT-1~3)、複数の茶を使用しているブレンド茶飲料 (BT-1~5) に分類し、試験に供した。また、平成 16 年に購入した飲料は、緑茶系飲料 2 種及びウーロン茶系飲料 1 種を使用した。

2. 市販茶系飲料の抗変異原性の測定

1) 変異原物質

1-ニトロピレン (1-NP)、3-ニトロフルオランテン (3-NFT) 及びジニトロピレン (DNP, 1,6-DNP: 1,8-DNP=1:1 の混合物) は、和光純薬工業 (株) 製を用いた。

2) 試験液の調製

平成 14 年に購入した市販茶系飲料 200 ml を使用前にメタノール 20 ml、蒸留水 20 ml の順に注入して活性化した Sep-pak C18 (Millipore 社製) に毎分約 2 ml の速度で注入した。続いて、蒸留水 5 ml を同じ速度で注入した後、メタノール 20 ml で溶出した。溶出液をロータリーエバポレーターで濃縮、乾固し、ジメチルスルホキシド (DMSO) 800 μ l で再溶解し、抗変異原性試験に用いた。

3) umu テスト

Salmonella typhimurium TA1535/pSK1002 (大阪府立公衆衛生研究所小田美光博士より御恵与頂いた) を使用して、Oda ら³²⁾ の方法に準拠して行った。すなわち、LB 培地 (トリプトン 1%、酵母エキス 0.5%、食塩 0.5% にアンピシリン 25 μ g/ml の割合で加えたもの) にて一夜培養した菌液を TGA 培地 (トリプトン 1%、食塩 0.5%、グルコース 0.2% にアンピシリン 20 μ g/ml の割合で加えたもの) で 50 倍に希釈し、さらに 37°C で培養した。菌濃度が、0.25-0.30 (A_{600}) に達したとき、この菌液 2.36 ml に変異原物質 (20 μ l) および市販茶抽出物 (20 μ l) を加えて、さらに 2 時間培養した。この反応液 0.2 ml を菌体内に産生された β -ガラクトシダーゼ活性の測定に、残りを菌の濁度 (A_{600}) 測定に用いた。 β -ガラクトシダーゼ活性の測定は Miller の方法³³⁾ により測定し、次式により活性値を算出した。

$$\begin{aligned} & \beta\text{-ガラクトシダーゼ活性値 (unit)} \\ & = 1000 (A_{420} - 1.75 \cdot A_{550}) / t \cdot v \cdot A_{600} \\ & t = \text{反応時間 (分)} \\ & V = 0.1 \text{ (菌液希釈率)} \end{aligned}$$

抗変異原活性は、市販茶系飲料から得た Sep-pakC18 抽出物試料無添加におけるニトロアレン類 3

種の β -ガラクトシダーゼ値を 100% とした場合に、市販茶系抽出物試料添加により抑制される率から算出した。ニトロアレン類 3 種の濃度は、反応液 1 ml 当たりそれぞれ 1-NP: 0.2 μ g, 3-NFT: 0.1 μ g, DNP: 0.01 μ g とした。

3. 市販茶系飲料中の抗変異原性成分濃度の定量

1) 標準液

(-) -エピガロカテキン (EGC), (+) カテキン (C), (-) -エピガロカテキンガレート (EGCG), (-) -エピカテキン (EC) 及び (-) -エピカテキンガレート (ECG) のカテキン類 5 種はフナコシ製、カフェイン、没食子酸及びアスコルビン酸は、和光純薬工業 (株) 製を用いた。カテキン類、カフェイン及び没食子酸は 20% メタノール含有 100 mM リン酸に溶解して保存液とし、-20°C で冷凍保存したものを標準液として用いた。アスコルビン酸は、使用前に蒸留水に溶解して用いた。

2) 機器及び測定条件

HPLC 装置のポンプには (株) SHISEIDO FINE CHEMICALS セミマイクロ高速液体クロマトグラフ SI-1 を用いた。検出器には、(株) 島津製作所製紫外可視分光検出器 SPD-10A 及び (株) 医理化機器製電気化学検出器 Σ 871 (加電圧 700 mV) を用いた。分析カラムは、YMC-Pack ODS-A (4.6 \times 250 mm)、移動相にはメタノール: 蒸留水: 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 3.0) = 12: 33: 5 を用いた。カラム恒温槽は 30°C に設定し、移動相の流速は 700 μ l/min とした。

3) 試験溶液の調製

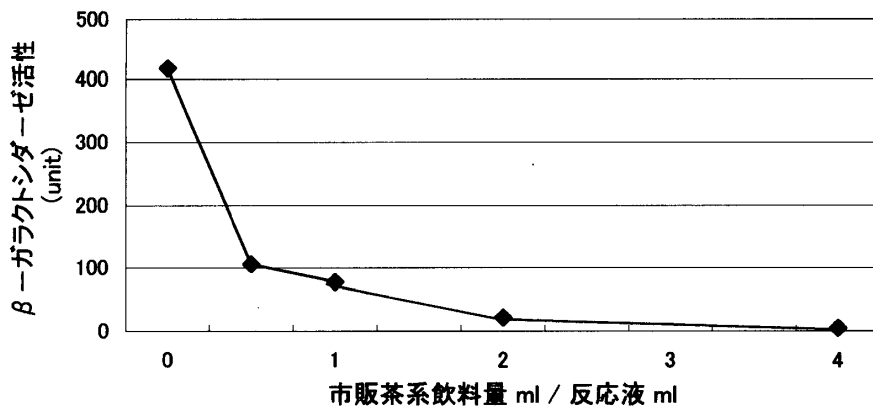
市販茶系飲料の一部をとり、20% メタノール含有 100 mM リン酸で 20~50 倍に希釈した後、0.45 μ m のフィルターを通して HPLC の試験溶液とした。

III. 実験結果および考察

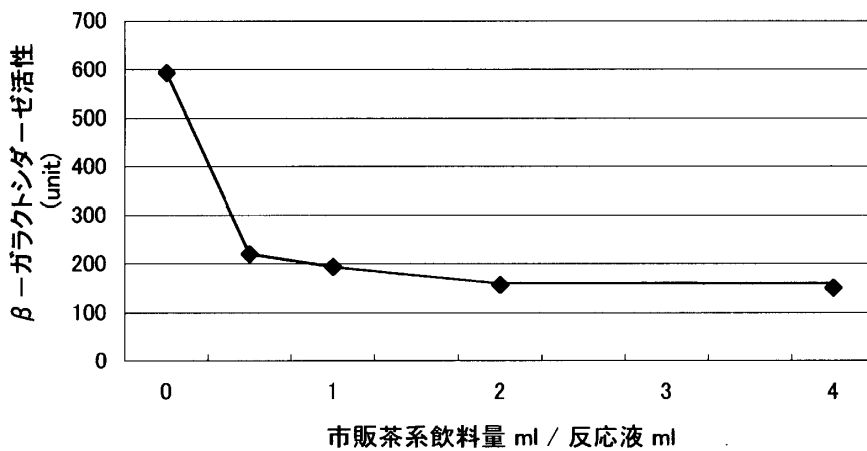
1. 市販茶系飲料の抗変異原性

市販茶系飲料の抗変異原性を見るための umu テストの用量-反応関係の一例を図 2 に示す。1-NP、3-NFT 及び DNP が誘導する β -ガラクトシダーゼ値は、市販茶系飲料抽出試料量 (反応液 1 ml 当りの添加抽出液に相当する飲料量で示している) の増加に伴って低下する傾向が認められている。図 2 に示す用量-反応関係を市販茶系飲料 19 種について観察し、それぞれの用量-反応関係から、最小二乗法で求めた直線回帰式から、市販茶抽出試料無添加におけるニトロアレン類 3 種の β -ガラクトシダーゼ値 50% 抑制量の平均値及び標準偏差を算出し、茶飲料種類別に図 3 に示した。変異活性 50% 抑制茶飲料量が少ない

1) 1-NP



2) 3-NFT



3) DNP

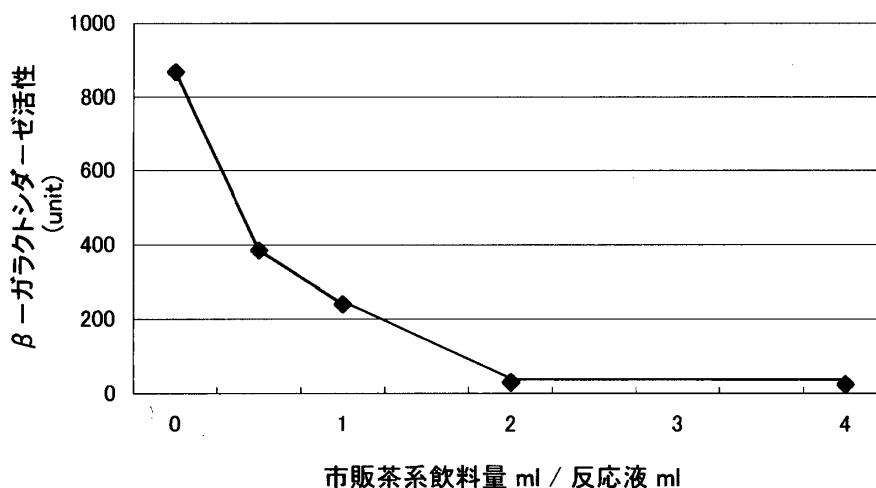


図2 市販茶系飲料 Sep-pak C18 抽出試料のニトロアレン類に対する抗変異原性の濃度反応効果

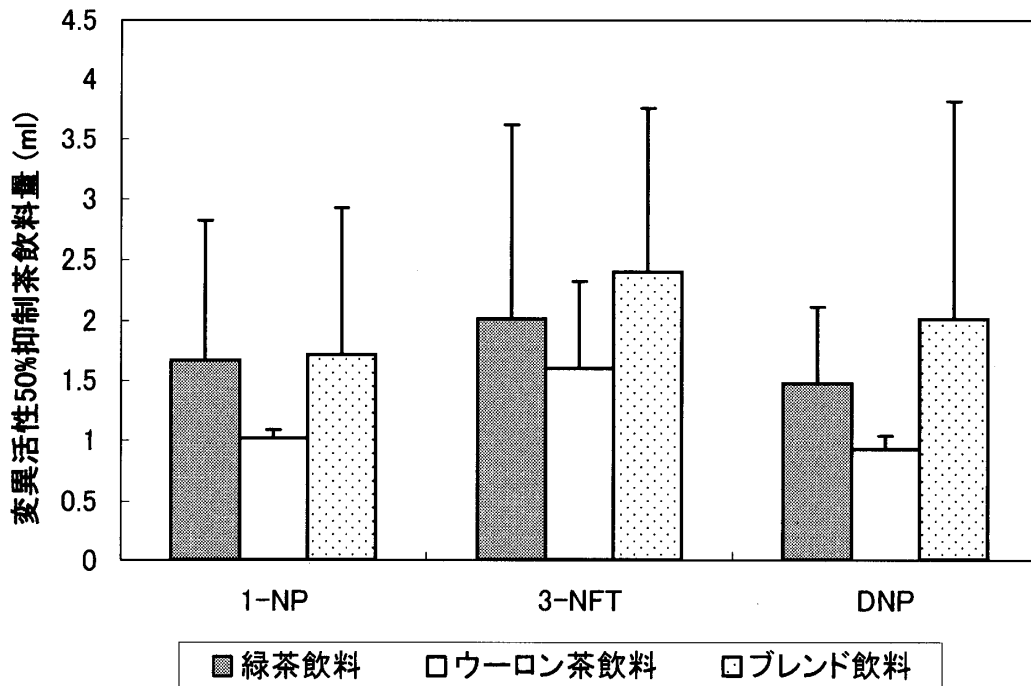


図3 市販茶系飲料のニトロアレンに対する変異活性 50%抑制量の茶系飲料別の比較

ほど、抗変異原活性が強いことを示している。図3の結果から市販茶系飲料の抗変異原活性は、3種のニトロアレンに対していずれもウーロン茶飲料>緑茶飲料>ブレンド茶飲料の順に強いことが認められた。著者等²⁷⁾は、既報で各種茶葉の40%メタノール抽出物のニトロアレン類に対する抗変異原性を検討し、ウーロン茶が最も強い結果を示したことを報告しており、本実験での結果と一致するものであった。

Yenら²⁰⁾は、IQやTrp-P-1などのHCA、BaP、AFB₁に対する変異原活性抑制率は、ウーロン茶より緑茶の方が強いこと、さらにそれらの抑制効果はカテキン濃度と関連があったことを報告している。一方、Constanbleら¹⁸⁾は、緑茶、紅茶抽出物のPhIP、IQ、MeIQxなどのHCAに対する抗変異原性は、カテキンとは異なる画分の関与を報告している。また、著者らも、ニトロアレン類に対する抗変異原性には、カテキン類とともに他の成分の関与が強いことを報告している²⁷⁾。このように茶葉の有する抗変異原性は、茶の種類により異なることが知られてきており、抗変異原性成分としてカテキン類とともに他の成分の関与することも報告されている。

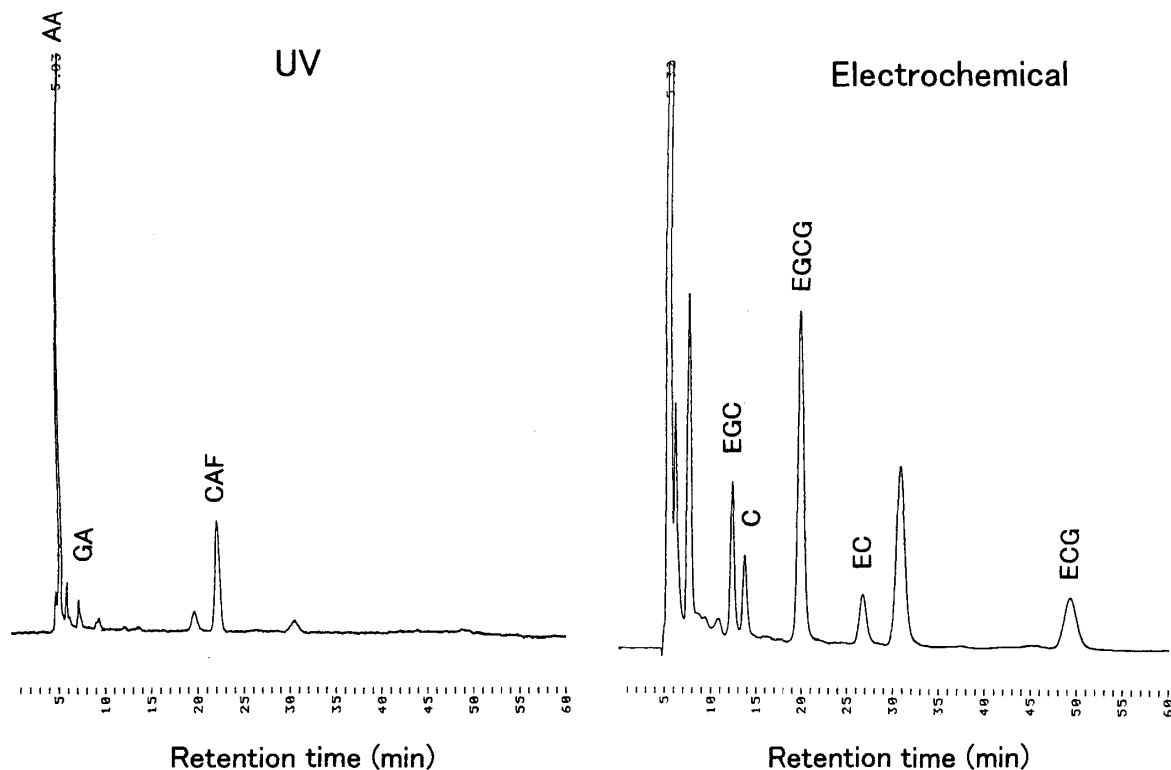
茶葉に含まれるカテキン類、野菜等に含まれるフラボノイドなどのポリフェノール、茶抽出物によるフリーラジカル捕捉能については膨大な報告がある^{9,11)}。変異原物質の有する活性の抑制作用には、フ

リーラジカル捕捉能による変異原物質のDNA損傷にいたる代謝過程の阻害の他に、変異原物質またはその活性体への直接作用、チトクロームP-450活性の阻害などが報告されている^{4,10,12,13)}。本実験での市販茶系飲料のニトロアレン類に対する抗変異原性のメカニズムは明らかでないが、緑茶飲料、ウーロン茶飲料の3種のニトロアレンに対する抗変異原活性の違いは化学成分の違いにあると思われる。

2. 市販茶系飲料の抗変異原性成分の測定結果

茶葉にはカテキン類などの他に、多量に含まれる成分として、メチルキサンチン類の一つであるカフェインやポリフェノールの一つである没食子酸がある。また、市販茶系飲料にはアスコルビン酸が一般に添加されている。そこで、本実験では茶葉に多量含まれる抗変異原性成分であるカテキン類5種、カフェイン、没食子酸及びアスコルビン酸を測定するために検出器としてUV検出器と電気化学検出器を連結したHPLCにより分析した。カフェインを除く7種の抗変異原性成分は、電気化学検出器での定量が可能であるが、本実験ではアスコルビン酸、カフェイン及び没食子酸の3種をUV検出器により、カテキン類5種を電気化学検出器により定量した(図4)。市販茶系飲料19種に含まれるこれら8種の成分を定量した結果を表1に示した。この結果から、市販茶系飲料19種に含まれる8種の成分量を平均

(a) 市販茶系飲料



(b) 標準物質

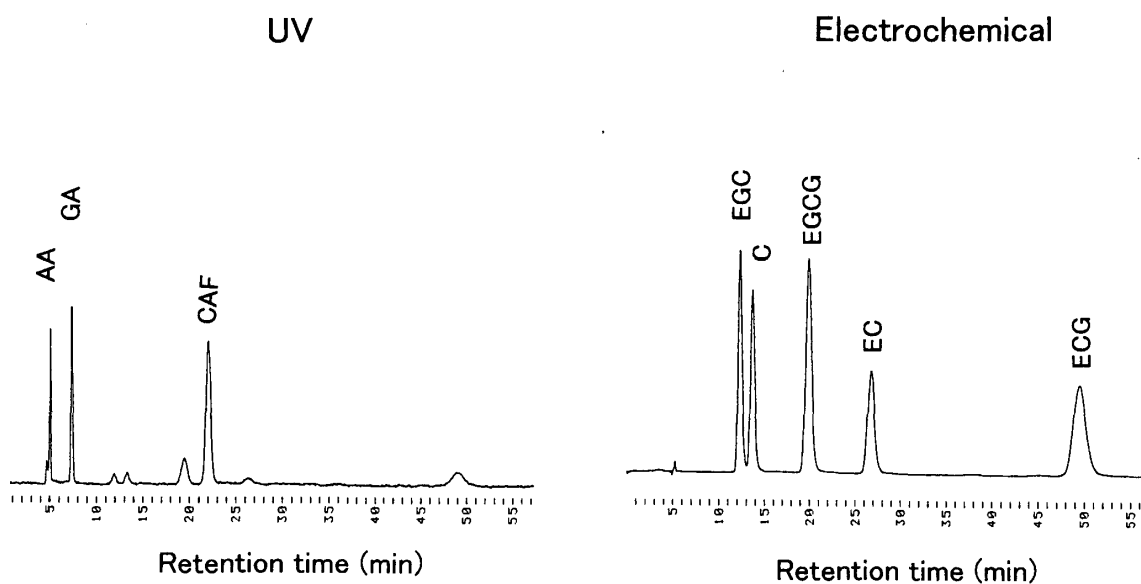


図 4 市販茶系飲料中抗変異原性成分の HPLC クロマトグラム

値で見るとアスコルビン酸>カフェイン>EGC>EGCG>EC>C>没食子酸>ECGの順に多い傾向にあった。茶葉に含まれるカテキン類の含有比率は、

EGC及びEGCGの両者でおよそ70~80%と多く、特にCは約1%前後と低い^{9,11)}。今回測定した市販茶系飲料19種に含まれるカテキン5種に占めるEGCG

表 1 市販茶系飲料に含まれる抗変異原性成分の測定結果 (単位: mg/100 ml)

		EGC	C	EGCG	EC	ECG	AA	GA	CAF
緑茶飲料	GT-1	4.7	3.4	6.0	2.0	1.1	43.7	1.1	16.9
	2	4.3	3.5	2.8	1.8	0.4	14.1	1.2	10.0
	3	5.3	2.6	5.4	1.8	0.5	30.0	1.3	10.1
	4	5.1	1.9	4.0	3.9	1.0	18.2	0.2	6.9
	5	3.6	3.0	9.8	2.1	0.5	29.3	2.1	11.6
	6	4.4	3.7	4.5	1.6	0.7	26.1	0.5	1.0
	7	15.3	0.3	9.2	5.2	1.5	20.0	5.0	11.4
	8	29.4	0.6	24.5	12.0	5.1	18.9	0.4	14.0
	9	7.9	1.8	6.3	5.1	1.0	13.1	0.4	9.1
	10	3.6	0.9	3.5	1.2	0.9	37.4	1.0	13.1
	11	3.2	2.3	4.3	2.9	0.7	33.9	0.7	11.1
	平均	7.89	2.18	7.30	3.60	1.22	25.88	1.26	10.47
	標準偏差	7.91	1.20	6.12	3.11	1.33	9.94	1.35	4.10
ウーロン茶飲料	OT-1	2.3	0.9	3.1	1.0	0.6	27.9	1.1	13.4
	2	3.0	1.3	2.9	1.6	0.6	15.6	2.2	14.9
	3	3.2	1.8	4.1	2.5	0.9	22.7	1.3	19.0
	平均	2.83	1.33	3.37	1.70	0.70	22.07	1.53	15.77
	標準偏差	0.47	0.45	0.64	0.75	0.17	6.17	0.59	2.90
ブレンド飲料	BT-1	1.9	1.7	3.8	1.1	1.1	22.0	0.7	9.6
	2	3.8	2.7	2.6	1.5	0.5	31.3	0.8	7.5
	3	1.7	nd	0.3	0.1	0.1	9.4	0.6	1.9
	4	0.7	0.5	0.7	0.4	0.2	10.3	1.8	7.4
	5	0.6	0.3	0.5	0.3	nd	8.7	0.7	1.7
	平均	1.74	1.30	1.58	0.68	0.48	16.34	0.92	5.62
	標準偏差	1.29	1.12	1.54	0.59	0.45	9.99	0.50	3.60

nd: 0.04 mg/100 ml 以下

及び EGC の両者の含有比率は、約 67%であったが、C の比率が約 12%と高く茶葉との違いが顕著であった。

ペットボトルタイプの茶系飲料は、日常生活では開栓後保存して使用されるケースが多い。開栓後の保存状態でカテキン類がどの程度分解するかを調べた結果を図 5 及び図 6 に示した。開栓後室温に 2 日放置した場合の抗変異原性成分の分解率は、AA が 50%と最も高く、CAF が 9%で最も低い傾向にあった (図 5 には、表 1 に示した市販茶系飲料 19 種の平均値及び標準偏差で示している)。カテキン類 5 種の分解率は、20~40%で、EGCG が最も高い分解率を示した。冷蔵保存 (4°C) した場合、5 日後のカテキン類の分解率は、C 26%、ECG 23%、EGCG 17%、EGC 14%、EC 14%と低く、以降 10 日後までの間に急激に分解する傾向が見られた (図 5 には、平成 16 年に購入した 3 種の平均値及び標準偏差で示している)。

3. 市販茶系飲料の抗変異原性と抗変異原性成分との関連性

市販茶系飲料の Sep-pak C18 抽出物のニトロアレン類 3 種に対する抗変異原性の強さは、茶系飲料種類別にみた場合、ウーロン茶飲料>緑茶飲料>ブレンド茶飲料の順に強かった。一方、市販茶系飲料に含まれるカテキン類 5 種の濃度は、緑茶飲料>ウーロン茶飲料>ブレンド茶飲料の順で、緑茶飲料の二分の一以下しかカテキン類を含まないウーロン茶飲料の方が強い抗変異活性を示すことから、ニトロアレン類の変異原性抑制の主要な成分がカテキン類であるとは必ずしも言えない。一方、本実験で使用した Sep-pak C18 抽出物の抗変異原性成分を測定した結果、回収率は EGC 11%、C 27%、EGCG 46%、EC 27%、ECG 74%、AA 3%、GA 8%、CAF 68%と、ECG と CAF を除きいずれも低い傾向にあった。従って、市販茶系飲料の抗変異原性と抗変異原性成分との関連性について、さらには CAF の抗変異原性への関与

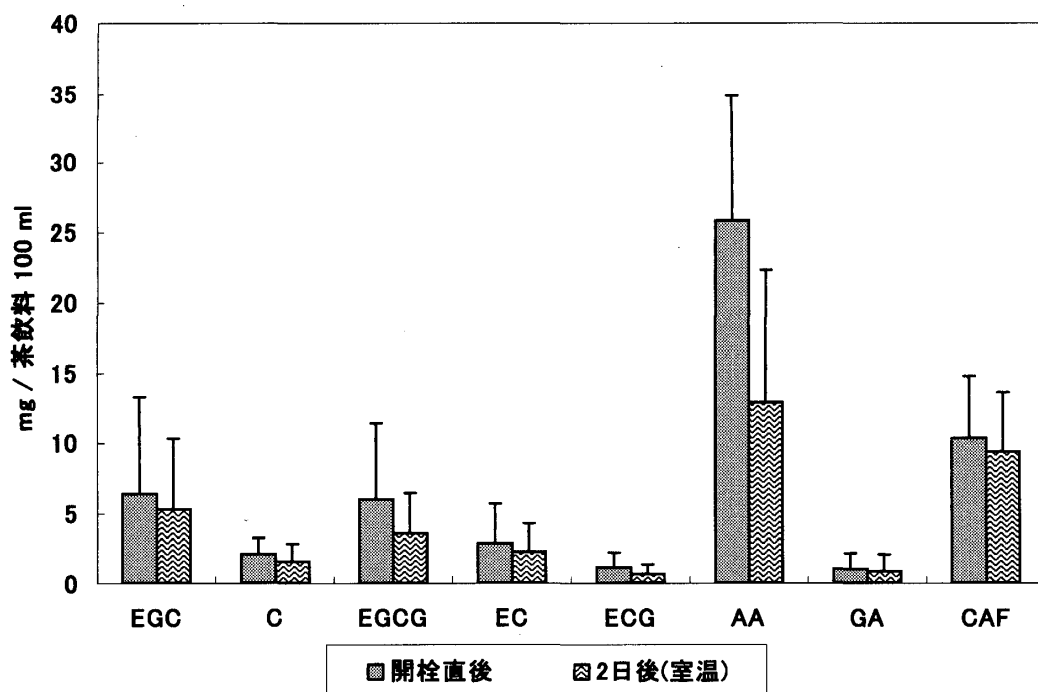


図 5 市販茶系飲料中抗変異原性成分 8 種の室温放置における分解性

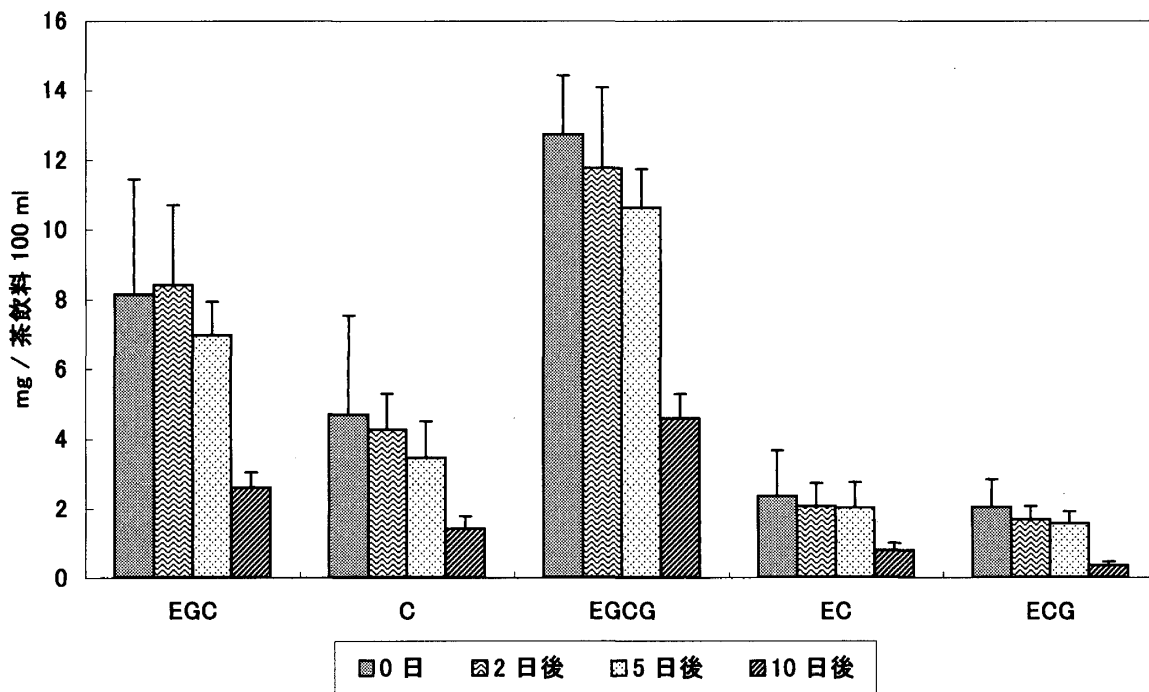


図 6 市販茶系飲料中カテキン類 5 種の冷蔵保存における分解性

についても今後検討する必要がある。

ニトロアレン類は、ニトロ還元酵素によって還元代謝を受け、ヒドロキシアミノ体となり、さらにアセチル転移酵素により究極活性体に代謝活性化され、DNA 付加体を形成するとされている肺がんの原因物質の一つである。茶の飲用と肺がんとの関連性

に関する疫学研究も発表されているが、明確な結論を得るには至っていない。緑茶並びに緑茶ポリフェノールが肺がんの誘発を抑制することは動物実験で報告されているが、ニトロアレン類に関する報告はみられない。本実験で対象とした変異原物質ニトロアレン類は、肺がんの原因物質の一つと考えられて

いることから、茶の飲用が肺がんの危険性を減少するかどうかを明らかにする研究の進展が期待される。

IV. 要 約

本報告では、市販茶系飲料19種のニトロアレン3種に対する抗変異原性並びにカテキン類、アスコルビン酸、没食子酸及びカフェインなどの抗変異原性成分の測定を行い、下記の結果を得た。

- (1)市販茶系飲料から得た Sep-pak C18 抽出物の3種のニトロアレン(1-NP, 3-NFT 及び DNP)に対する抗変異原性を *umu* テストにより測定した。抗変異原活性は、ウーロン茶飲料(3試料) > 緑茶飲料(11試料) > ブレンド飲料(5試料)の順に強さが認められた。
- (2)茶飲料中に含まれる抗変異原性成分の濃度測定を行った。測定を行った8種の抗変異原性成分量はアスコルビン酸 > カフェイン > EGC > EGCG > EC > C > 没食子酸 > ECG の順であった。カテキン5種に占めるEGCG及びEGCの両者の含有比率は、約67%であったが、Cの比率が約12%と高く茶葉抽出物との違いが顕著であった。
- (3)開栓後室温に2日放置した場合の抗変異原性成分の分解率は、AAが50%と最も高く、CAFが9%で最も低い傾向にあった。冷蔵保存(4°C)した場合、5日後の分解率は、C 26%, ECG 23%, EGCG 17%, EGC 14%, EC 14%と低く、以降10日後までの間に急激に分解する傾向が見られた。
- (4)緑茶飲料の二分の一以下しかカテキン類を含まないウーロン茶飲料が強い抗変異活性を示したことから、ニトロアレン類の変異原性抑制の主要な成分がカテキン類であるとは必ずしも言えない。しかし、本実験で使用した Sep-pak C18 抽出物のカテキン類の回収率は低く、市販茶系飲料の抗変異原性と抗変異原性成分との関連性については、さらに検討する必要がある。
- (5)本実験で対象とした変異原物質ニトロアレン類は、肺がんの原因物質の一つと考えられている。今後、茶の飲用が肺がんの危険性を減少させるかどうかを明らかにすることは重要な課題である。

引用文献

- 1) 山西貞著：お茶の科学，裳華房（1999）
- 2) 社団法人全国清涼飲料工業会編：清涼飲料関係

統計資料（2004）

- 3) 金 武祚, 二宮 学, 山根哲郎: 現代化学, 318, 44-49 (1997)
- 4) C.S. Yang and Z-Y. Wang: *J. Nat. Cancer Inst.*, 85, 1038-1049 (1993)
- 5) H. Fujiki, M. Suganuma, S. Okabe, N. Sueoka, A. Komori, E. Sueoka, T. Kozu, Y. Tada, K. Suga, K. Imai and K. Nakachi: *Mutat. Res.*, 402, 307-310 (1998)
- 6) H. Fujiki, M. Suganuma, S. Okabe, E. Sueoka, K. Suga, K. Imai, K. Nakachi and S. Kimura: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 220, 225-228 (1999)
- 7) J.H. Weisburger: *Mutat. Res.*, 402, 331-337 (1998)
- 8) C.S. Yang, J.Y. Chung, G-yu Yang, S.K. Chhabra and M-J. Lee: *J. Nutr.* 130, 472S-478S (2000)
- 9) 中林敏郎, 伊奈和夫, 坂田完三著: 緑茶・紅茶・烏龍茶の化学と機能, 弘学出版 (2001)
- 10) 木苗直秀, 増田修一: 環境変異原研究, 24, 129-144 (2002)
- 11) 伊奈和夫, 坂田完三, 富田 勲, 伊勢村守編: 茶の化学成分と機能, 弘学出版 (2002)
- 12) Y. Kuroda: *Mutat. Res.*, 361, 179-186 (1996)
- 13) Y. Kuroda and Y. Hara: *Mutat. Res.*, 436, 69-97 (1999)
- 14) A. K. Jain, K. Shimoi, Y. Nakayama, T. Kada, Y. Hara and I. Tomita: *Mutat. Res.*, 210, 1-8 (1989)
- 15) H. Kojima, N. Miwa, M. Mori, O. Masahiro and H. Konishi: *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 30, 37-41 (1989)
- 16) Z. Apostolides, D. A. Balentine, M. E. Harbowy and J. H. Weisburger, *Mutat. Res.*, 359, 159-163 (1996)
- 17) A. Bu-Abbas, X. Nunez, M. N. Clifford, R. Walker and C. Ioannides: *Mutagenesis*, 11, 597-603 (1996)
- 18) A. Constable, N. Varga, J. Richo and R. H. Stadler: *Mutagenesis*, 11, 189-194 (1996)
- 19) J. H. Weisburger, Y. Hara, L. Dolan, F-Q. Luo, B. Pittman and E. Zanfg: *Mutat. Res.*, 371, 57-63 (1996)
- 20) G. C. Yen and H. Y. Chen: *Mutagenesis*, 11, 37-41 (1996)
- 21) H. Y. Chen and G. C. Yen: *Mutat. Res.*, 393, 115-122 (1997)
- 22) C. Han: *Cancer Lett.*, 114, 153-158 (1997)
- 23) F. Catterall, E. Copeland, M. N. Clifford and C. Ioannides: *Mutagenesis*, 13, 631-636 (1998)
- 24) J. F. Hernaez, M. Xu and R. H. Dashwood: *Mutat.*

- Res.*, 402, 299–306 (1998)
- 25) K. Tanaka, T. Hayatsu, T. Negishi and H. Hayatsu: *Mutat. Res.*, 412, 91–98 (1998)
- 26) T. C. Hour, Y. C. Liang, I. S. Chu and J. K. Lin: *Food Chem. Toxicol.*, 37, 569–579 (1999)
- 27) T. Ohe, K. Marutani and S. Nakase: *Mutat. Res.*, 496, 75–81 (2001)
- 28) R. D. Dashwood: *Foods Food Ingredients J. Japan*, 200, 19–26 (2002)
- 29) 岩井邦久, 佐藤麻里母, 松江 一: 日食工誌, 47, 120–129 (2000)
- 30) 中川一夫, 仲村明子, 松永博絵: 本誌, 57, 33–37 (2002)
- 31) 大西克成, 木内武美, 真鍋芳樹, 筒井英士: 環境変異原研究, 6, 29–37 (1984)
- 32) Y. Oda, Y. S. Nakamura and I. Oki: *Mutat. Res.*, 147: 219–229 (1985)
- 33) J. H. Miller: *Experiments in molecular genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1972)
- 34) 梅垣敬三, 江指隆年, 手塚雅勝, 小野明子, 佐野満昭, 富田 勲: 食衛誌, 37, 77–82 (1996)
- 35) 斉藤和季, 加藤隆一: 環境変異原研究, 6, 73–80 (1984)