

変異原性試験方法

【抗変異原性物質 スクリーニング試験】

(1) クルクミン ウコンの黄色色素（天然着色料として汎用されている）

umu テスト菌 対数増殖期状態

菌 洗浄 1/15M リン酸緩衝液(pH6.8) 2回 遠心操作

再度 懸濁 同一液量とする 1/15M リン酸緩衝液(pH6.8)

容器に移しかえ ガラスシャーレ

UV 照射 UV254nm 3 J/m²

TGA 培地に置換 #1 遠心操作

菌液 2 ml + クルクミン 20 μl

培養（反応） 37 120分間 振とう

菌 洗浄 #2 1/15M リン酸緩衝液(pH6.8) 2回 冷却遠心操作

-ガラクトシド-ゼ 活性測定

#1 TGA 培地

バクトトリプトン 10 g、塩化ナトリウム 5 g、精製水 1L

これらを高圧滅菌後、別滅菌した20%グルコースを10ml、滅菌蒸留水に溶解したアンピシリンナトリウムを終濃度20 μg/mlになるように添加する

#2 次の操作で、-ガラクトシド-ゼ 活性を ONPG 基質で反応した黄色を呈する o-ニトロフェノールの発色を測定するため、同じ色を呈するクルクミン溶液を置き換える操作と考える。

ONPG : 2-ニトロフェニル -D-ガラクトピラニド

(2) 食品中の抗変異原因子の検索

突然変異誘発機構の反応である SOS 反応を利用した *umu* テスト

| SOS 反応誘発剤 (UV 照射) | | SOS 反応誘発剤 (AF-2, Trp-P-1) | |
|-------------------|---|---------------------------|--|
| <i>umu</i> テスト菌 | 対数増殖期状態/TGA 培地 | <i>umu</i> テスト菌 | 対数増殖期状態/TGA 培地 |
| 菌 洗淨 | M9 Buffer ^{#1} 遠心操作 | | |
| 再度 懸濁 | M9 Buffer ^{#1} | | |
| 容器に移しかえ | ガラスシャーレ | | |
| UV 照射 | UV 5 J/m ² | | |
| 菌液 2 ml + | 20%カザミノ酸 0.022ml + 20%グルコース 0.022ml + 試料液 ^{#2} 0.2ml | 菌液 2 ml + | AF-2 0.04 µg 又は (+ Trp-P-1 10nmol) + 試料液 ^{#2} 0.2ml |
| 培養 (反応) | 37 120 分間 振とう | 培養 (反応) | 37 120 分間 振とう |
| 反応停止 | 氷冷 | 反応停止 | 氷冷 |
| 菌 洗淨 | 冷却遠心操作 3000rpm, 10 分間 | 菌 洗淨 | 冷却遠心操作 3000rpm, 10 分間 |
| 沈さ 置換え | 生理食塩水 | 沈さ 置換え | 生理食塩水 |
| -ガラクトサ'-セ' 活性測定 | | -ガラクトサ'-セ' 活性測定 | |

#1 M9 Buffer

0.042M リン酸二ナトリウム、0.022M リン酸一加水、

0.009M NaCl, 0.002M NH₃Cl, 0.001M MgSO₄, 0.0001M CaCl₂

#2 試料液の調製

大根、きゅうり、にんじん、白ねぎ、きゃべつなどは、水を加えずに家庭用ミキサーで粉碎する。

更に、10,000 x g で 10 分間遠心し、その上清を 100,000 x g で 60 分間遠心した上清を用いる。