

本試験結果

結果を表5に示した。

メバロン酸処理での復帰突然変異コロニー数は、-S9処理および+S9処理とも各試験菌株のいずれの用量においても陰性対照と同等の値であり、増加傾向は認められなかった。また、-S9処理および+S9処理のいずれの試験用量においても試験菌株に対する生育阻害作用は観察されなかった。一方、陽性対照物質はそれぞれの菌株において、陰性対照の2倍以上の復帰突然変異コロニーを誘発した。なお、コロニー数計測時において被験物質析出等の特筆すべき変化は観察されなかった。

C. 考 察

サンダラック樹脂の場合、最高用量としてガイドライン上定められた最高用量である5000 µg/プレートあるいは試験菌株に対して生育阻害作用を示す用量まで検討した。メバロン酸の場合、最高用量としてガイドライン上定められた最高用量である5000 µg/プレートまで検討した。その結果、どちらの化合物においても代謝活性化系非存在下 (-S9処理) および代謝活性化系存在下 (+S9処理) とともに陰性対照と比較し復帰突然変異コロニー数の増加は認められなかった。これら両試験系での試験結果は、用量設定試験、および本試験において再現性が確認された。

なお、陰性対照群あるいは陽性対照群でのコロニー数はいずれも当施設での背景データの範囲内であり、本試験は適切な条件でなされたと判断された。

D. 結 論

本試験条件下においてサンダラック樹脂およびメバロン酸の微生物に対する遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

E. 健康危険情報

特になし

F. 参考資料

- 1) Ames, B. N., Lee, F. D. and Durston, W. E. : An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens, Proc. Nat. Acad. Sci., 70, 782~786, 1973.
- 2) Ames, B. N. *et al.* Carcinogens are mutagens : A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection, Proc. Nat. Acad. Sci., 70, 2281~2285, 1973.
- 3) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. : Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test, Mutat. Res., 31, 347~364, 1975.
- 4) 矢作多貴江 : 環境中の発ガン物質を微生物を使ってスクリーニングする実験法について, 蛋白質・核酸・酵素, 20 (13), 16~27, 1975.
- 5) 労働省 安全衛生部 化学物質調査課編 : 安衛法における変異原性試験—テストガイドラインとGLP—, 中央労働災害防止協会, 1991.
- 6) 石館 基 監修 : 微生物を用いる変異原性試験データ集, エル・アイ・シー, 東京, 1991.
- 7) Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B.N. : Compatibility of organic solvents with the salmonella/microsome test, Mutat. Res., 88, 343~350, 1981.

第二章 染色体異常試験

A. 研究方法

現在流通している既存天然添加物23品目のうち、コメヌカ酵素分解物およびモンタンロウを担当することとした(表1)。陽性対照物質として、マイトマイシンC (MMC) およびシクロホスファミド (CP) を用いた。

試験菌株および培地等の準備 :

試験細胞株としてチャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株 (CHL/IU細胞) を使用した。Eagle-MEM液体培地 (IWAKI : 旭テクノグラス株式会社) に非働化済みの仔牛血清

(Invitrogen Corp.)を最終濃度で10%になるよう は、製造後6ヵ月以内のS9 mix 添加したものを培養液とした。S9 mix について

表4 用繊設定試験結果表

被験物質の名称： メバロン酸

試験番号： 6272 (079-120)

試験実施期間		2002年1月17日 より 2002年1月21日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μ g/プレート)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)					
					フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9 mix	陰性対照	91 99 (95)	9 9 (9)	31 32 (32)	27 25 (26)	10 10 (10)	
	8.19	103 112 (108)	11 9 (10)	26 27 (27)	36 37 (37)	9 5 (7)	
	20.5	89 87 (88)	11 12 (12)	33 31 (32)	31 26 (29)	7 11 (9)	
	51.2	105 112 (109)	11 12 (12)	29 25 (27)	33 23 (28)	10 7 (9)	
	128	99 106 (103)	14 15 (15)	24 23 (24)	35 31 (33)	8 9 (9)	
	320	107 111 (109)	10 10 (10)	33 30 (32)	27 31 (29)	6 7 (7)	
	800	102 111 (107)	13 11 (12)	21 26 (24)	22 23 (23)	8 10 (9)	
	2000	108 97 (103)	11 7 (9)	24 19 (22)	27 20 (24)	12 10 (11)	
	5000	87 96 (92)	12 13 (13)	24 22 (23)	27 29 (28)	6 10 (8)	
	+S9 mix	陰性対照	111 99 (105)	6 9 (8)	26 30 (28)	35 30 (33)	18 17 (18)
		8.19	114 117 (116)	12 10 (11)	30 33 (32)	43 40 (42)	20 20 (20)
		20.5	104 120 (112)	11 8 (10)	31 30 (31)	38 38 (38)	12 13 (13)
		51.2	116 100 (108)	11 11 (11)	30 26 (28)	36 33 (35)	21 23 (22)
		128	106 84 (95)	7 9 (8)	28 26 (27)	30 32 (31)	21 26 (24)
320		112 110 (111)	11 13 (12)	32 34 (33)	37 34 (36)	17 18 (18)	
800		116 101 (109)	10 11 (11)	29 28 (29)	28 32 (30)	23 24 (24)	
2000		117 98 (108)	11 8 (10)	31 27 (29)	24 25 (25)	14 18 (16)	
5000		119 119 (119)	9 12 (11)	22 26 (24)	32 34 (33)	19 23 (21)	
陽性対照		名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA
	用量(μ g/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
	コロニー数/プレート	540	513	151	513	472	
		565 (553)	512 (513)	155 (153)	504 (509)	534 (503)	
	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	
	用量(μ g/プレート)	1	2	10	0.5	2	
S9 mixを必要とするもの	コロニー数	838	380	639	432	181	
	/プレート	757 (798)	387 (384)	668 (654)	392 (412)	181 (181)	

AF 2 : 2-(2-Furyl) 3 (5-nitro-2-furyl)acrylamide
9-AA : 9-Aminoacridine hydrochloride

NaN₃ : Sodium azide
2-AA : 2-Aminoanthracene

表5 本試験結果表

被験物質の名称: メパロン酸

試験番号: 6272 (079-120)

試験実施期間		2002年1月29日 より 2002年2月1日				
		復帰変異数 (コロニー数/プレート)				
		代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg /プレート)	フレームシフト型		
TA100	TA1535			WP2uvrA	TA98	TA1537
- S 9 m i x	陰性対照	115	16	29	26	8
		93 (104)	14 (15)	29 (29)	23 (25)	8 (8)
	156	118	8	29	26	9
		127 (123)	11 (10)	33 (31)	23 (25)	8 (9)
	313	123	12	28	24	10
		108 (116)	12 (12)	29 (29)	29 (27)	12 (11)
	625	129	9	16	27	9
		115 (122)	12 (11)	20 (18)	24 (26)	10 (10)
	1250	124	12	17	26	11
		114 (119)	10 (11)	22 (20)	18 (22)	8 (10)
	2500	102	19	21	22	9
		98 (100)	15 (17)	24 (23)	19 (21)	11 (10)
	5000	99	11	23	21	13
		104 (102)	14 (13)	22 (23)	24 (23)	11 (12)
+ S 9 m i x	陰性対照	103	11	33	30	20
		104 (104)	16 (14)	30 (32)	33 (32)	17 (19)
	156	88	12	28	29	24
		97 (93)	16 (14)	32 (30)	37 (33)	20 (22)
	313	101	12	33	33	20
		93 (97)	11 (12)	29 (31)	37 (35)	24 (22)
	625	111	10	29	28	23
		106 (109)	13 (12)	25 (27)	35 (32)	22 (23)
	1250	123	7	31	31	28
		120 (122)	11 (9)	26 (29)	27 (29)	23 (26)
2500	112	8	23	32	16	
	106 (109)	11 (10)	20 (22)	28 (30)	23 (20)	
5000	94	14	20	29	24	
	108 (101)	13 (14)	25 (23)	31 (30)	22 (23)	
陽性対照	名称	AF-2	NaN ₃	AF 2	AF-2	9-AA
	用量(μg /プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	コロニー数	473	562	183	621	325
	/プレート	453 (463)	574 (568)	183 (183)	599 (610)	347 (336)
	名称	2-AA	2-AA	2 AA	2-AA	2 AA
	用量(μg /プレート)	1	2	10	0.5	2
S 9 m i x を必要とするもの	コロニー数	979	379	573	377	201
	/プレート	915 (947)	349 (364)	608 (591)	396 (387)	197 (199)

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide
 9-AA : 9-Aminoacridine hydrochloride

NaN₃ : Sodium azide
 2-AA : 2-Aminoanthracene

(キッコマン株式会社) を試験に使用した。

試験細胞株の培養：

CO₂ インキュベーターで、CO₂ 濃度 5%、37°C の条件で細胞を培養した。

被験物質等の処理：

細胞増殖抑制試験においては 12 ウェルのプレート (住友ベークライト株式会社) の各ウェルに培養液を用いて 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し、3 日間培養した。短時間処理法-S9 処理では被験物質液を加え、6 時間培養を続けた後、培養液を新鮮なものに交換して、さらに 18 時間培養を続けた。短時間処理法+S9 処理では被験物質および S9 mix を加え、6 時間培養を続けた後-S9 処理と同様に培養を続けた。連続処理法 24 時間処理では被験物質を添加した状態で 24 時間培養した。

染色体異常試験においては直径 60 mm のプレート (住友ベークライト株式会社) に 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL (4×10^4 細胞) を播種し、3 日間培養した。以下の処理方法は細胞増殖抑制試験に準じた。

4) 50%細胞増殖抑制濃度の算出

細胞増殖抑制試験に供した各プレートに 10% 中性緩衝ホルマリン液 (組織固定用：和光純薬工業株式会社) を加えて約 10 分間細胞を固定した後、0.1%クリスタル・バイオレット (関東化学株式会社) 水溶液で 10 分間染色した。各プレートを水洗し、乾燥させた後、各ウェルに色素溶出液 (30%エタノール、1%酢酸水溶液) を適量加えた。5 分程度放置した後、分光光度計を用いて 580 nm での吸光度を測定した。陰性対照群での吸光度に対する比 (=細胞生存率) を各用量群について求め、さらにプロビット法を用いて 50%細胞増殖抑制濃度を算出した。

染色体標本の作製：

染色体標本作製の 2 時間前に最終濃度で 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるようコルセミド溶液 (Invitrogen Corp.) を添加した。次いで、0.25%トリプシン

溶液 (Invitrogen Corp.) を用いて細胞を剥離した。細胞懸濁液を 1000 r/min で 5 分間遠心分離して培養液を除いた後、75 mmol/L 塩化カリウム水溶液を加え、37°C 中で 16 分間低張処理を行った。遠心分離により低張液を除いた後、4°C に冷却した固定液 (メタノール 3 容：酢酸 1 容) で細胞を固定した。細胞浮遊液をスライドガラス上に 1~2 滴ずつ滴下した後、乾燥させた。1/100 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液 (pH 6.8 : Merck KGaA) を用いて希釈した 1.2%ギムザ染色液 (Merck KGaA) で 12 分間染色し、軽く水洗した後、乾燥させた。

染色体の観察：

各プレート当たり 100 個の分裂中期像を顕微鏡下 ($\times 600$) で観察し、染色体の形態的变化としてギャップ (gap)、染色分体切断 (ctb)、染色体切断 (csb)、染色分体交換 (cte)、染色体交換 (cse) およびその他 (oth) の構造異常に分類した。ただし、染色分体あるいは染色体上に非染色性領域が存在し、染色体切断様の像が認められる場合、その非染色性領域が当該染色体の分体幅未満、かつ本来の位置からずれていない場合にのみギャップとして計数した。また、数的異常として 1 用量当たり 200 個の分裂中期像を観察し、倍数体等の出現数についても計数した。

全ての標本をコード化した後、マスキング法で観察した。

B. 研究結果

それぞれの化合物についての用量設定試験と染色体異常試験の結果を表6~表11に示す。

1) コメヌカ酵素分解物 (表6、表7および表8) 用量設定試験結果

結果を表6に示した。

50%細胞増殖抑制濃度は、短時間処理法+S9 処理で 4642 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。短時間処理法-S9 処理では明確な細胞増殖抑制作用は観察されず、連続処理法 24 時間処理では高用量群で僅

かな同作用が観察された。被験物質暴露終了時、pH の変動、析出等の特筆すべき変化は、いずれの試験用量においても観察されなかった。

表6 細胞増殖抑制結果

試験用量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	細胞生存率 (%)		
	-S9処理	+S9処理	24時間処理
0	100.0	100.0	100.0
671	102.5	100.5	100.3
839	103.3	96.8	104.1
1049	100.8	98.6	98.6
1311	101.8	91.5	97.9
1638	99.2	99.2	96.2
2048	99.7	102.1	87.9
2560	94.9	103.1	94.6
3200	98.0	88.8	78.0
4000	95.9	68.5	77.7
5000	73.7	41.9	57.1

本試験結果

結果を表7および表8に示した。

コメヌカ酵素分解物処理群での染色体構造異常および倍数性細胞の出現頻度は短時間処理法-S9処理、同+S9処理ならびに連続処理法24時間処理のいずれの用量とも陰性対照群と同等であり、明確な増加傾向は観察されなかった。

一方、陽性対照物質 MMC あるいは CP で処理した細胞では染色体構造異常が多数観察された。被験物質暴露終了時、pH の変動、析出等の特筆すべき変化は、いずれの試験用量においても観察されなかった。

2) モンタンロウ (表9、表10および表11)

用量設定試験結果

結果を表9に示した。

短時間処理法-S9処理ならびに同+S9処理では明確な細胞増殖抑制作用は観察されなかった。連続処理法24時間処理において高用量群で僅かな増殖抑制作用が観察された。被験物質暴露終了時、懸濁液での処理であったことから培養液中に被験物質が残存していた。

表9 細胞増殖抑制結果

試験用量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	細胞生存率 (%)		
	-S9処理	+S9処理	24時間処理
0	100.0	100.0	100.0
389 +	101.6	96.1	103.6
648 +	93.8	93.4	101.6
1080 +	95.1	95.9	98.1
1800 +	93.9	93.1	93.0
3000 +	88.4	97.5	76.4
5000 +	83.6	96.5	61.5

+ : 処理終了時、残存被験物質が観察された。

本試験結果

結果を表10および表11に示した。

モンタンロウ処理群での染色体構造異常および倍数性細胞の出現頻度は-S9処理、+S9処理ならびに連続処理法24時間処理のいずれの用量とも陰性対照群と同等であり、明確な増加傾向は観察されなかった。

一方、陽性対照物質 MMC あるいは CP で処理した細胞では染色体構造異常が多数観察された。被験物質暴露終了時、懸濁液での処理であったことから培養液中に被験物質が残存していた。

C. 考 察

コメヌカ酵素分解物およびモンタンロウのいずれについても、最高用量としてガイドライン上定められた最高用量である5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ まで検討した。その結果、どちらの化合物とも短時間処理法-S9処理、同+S9処理ならびに連続処理法24時間処理のいずれの試験系においても染色体異常の誘発頻度は陰性対照群と同等の値を示し、明確な染色体構造異常の誘発は認められなかった。なお、陰性対照群あるいは陽性対照群での染色体異常出現頻度はいずれも当施設での背景データの範囲内であり、本試験は適切な条件でなされたと判断された。

D. 結 論

本試験条件下においてコメヌカ酵素分解物およびモンタロウのほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と判定した。

E. 健康危険情報

特になし

F. 参考資料

- 1) Ishidate, M. Jr. and Odashima, S. : Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro* -A screening for chemical carcinogens, *Mutat. Res.*, 48, 337-354, 1977.
- 2) 石館基 : 培養細胞を用いる染色体異常の検出法, *組織培養*, 5 : 115-122, 1979
- 3) Evans, H. J. : Cytological methods of detecting chemical mutagens. In A. Hollander (Ed.), *Chemical Mutagens*, Vol. 4 : 1-25, Plenum, New York, 1976.
- 4) Matsuoka, A., *et al.* : Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*, *Mutat. Res.*, 66 : 277-290, 1979.
- 5) 石館基監修 : 〈改訂〉染色体異常試験データ集, エル・アイ・シー, 東京, 1987.
- 6) Evans, H. J. and O' Riordan, M. L. : Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberration in mutagens tests, *Mutat. Res.*, 31 : 135-148, 1975.
- 7) Report of the Ad Hoc Committee of the Environmental Mutagen Society and the Institute for Medical Research, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 22, 269-275, 1972.

表7 染色体異常試験の結果 (短時間処理法)

試験番号: 6373 (079-132)

被験物質の名称: コメヌカ酵素分解物

処理時間 (h.)	S9 mix	被験物質の用量 (μg/ml)	染色体構造異常の細胞数 (出現頻度%)				染色体数異常の細胞数 (出現頻度%)				ギャップの出現数	染色体の数的異常の細胞数 (出現頻度%)			
			観察細胞数	染色体切断	染色体交換	染色体切断	染色体交換	染色体切断	染色体交換	染色体切断		染色体交換	観察細胞数	倍數体	その他
6 - 18	-	陽性対照 (D.W.) 0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2
			100	0	1	0	0	0	0	0	0	0	100	2	0
6 - 18	-	1800	200	0	1	0	0	0	0	0	0	0	4	0	4 (2.0)
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
6 - 18	-	3000	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2
			200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3 (1.5)
6 - 18	-	5000	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)
6 - 18	-	陽性対照 (MMC) 0.1	100	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0
6 - 18	+	1800	200	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)
			100	24	47	0	0	0	0	56	0	0	100	0	0
6 - 18	-	陽性対照 (D.W.) 0	100	35	47	1	0	0	62	0	0	100	2	0	2
			200	59	94	1	0	0	118 (59.0)	0	0	200	2	0	2 (1.0)
6 - 18	+	3000	100	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
			100	1	1	0	0	0	0	2	0	0	100	1	0
6 - 18	+	5000	200	1	2	0	0	0	3 (1.5)	0	0	0	2	0	2 (1.0)
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	1	0
6 - 18	-	陽性対照 (CP) 12.5	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			200	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0	0	200	1	0
6 - 18	+	1800	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0
6 - 18	+	3000	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			200	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0	0	200	2	0
6 - 18	-	5000	100	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
			100	0	1	1	0	0	0	2	0	0	100	0	0
6 - 18	+	1800	200	0	1	2	0	0	3 (1.5)	0	0	0	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0
6 - 18	+	3000	100	12	38	0	1	0	43	0	0	1	0	0	1
			100	6	40	0	0	0	44	0	0	100	0	0	0
6 - 18	-	5000	200	20	78	0	1	0	87 (43.5)	0	0	1	0	0	1 (0.5)
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	200	1	0	1 (0.5)

D.W. : 蒸留水
MMC : Mitomycin C
CP : Cyclophosphamide

表10 染色体異常試験の結果 (短時間処理法)

試験番号: 6374 (079-133)

被験物質の名称: エンタノロ

処理時間 (h)	S9 mix	被験物質の用量 (μg/ml)	染色体構造異常の細胞数 (出現頻度%)				染色体交換 (出現頻度%)				ギャンプの出現数	染色体の数的異常の細胞数 (出現頻度%)		
			観察細胞数	染色体切断	染色体交換	染色体切断	染色体交換	染色体交換	染色体交換	染色体交換		倍率体	その他	総異常細胞数 (%)
6 - 18	-	陰性対照 (MEM) 0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
			200	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0 (0.0)
6 - 18	-	1250 -	100	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			100	1	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0
			200	3	2	0	0	0	5	0	0	0	0	0 (0.0)
6 - 18	-	2500 -	100	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			200	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0 (0.0)
6 - 18	-	5000 +	100	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			200	2	1	0	0	0	3	0	0	0	0	0 (0.0)
6 - 18	-	陽性対照 (MMC) 0.1	100	24	61	0	2	0	60	0	7	0	0	0
			100	24	57	0	0	62	0	7	0	0	0	0
			200	48	108	0	2	0	122	0	14	0	0	0 (0.0)
6 - 18	+	陰性対照 (MEM) 0	100	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			200	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0 (0.0)
6 - 18	-	1250 -	100	1	1	0	0	0	2	0	1	0	0	0
			100	1	1	0	0	0	2	0	1	0	0	0
			200	2	2	0	0	0	4	0	1	0	0	1 (0.5)
6 - 18	+	2500 -	100	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
			100	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0
			200	0	1	0	0	0	1	0	3	0	0	0 (0.0)
6 - 18	+	5000 -	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			100	0	2	0	0	0	2	0	1	0	0	0
			200	0	2	0	0	0	2	0	1	0	0	0 (0.0)
6 - 18	+	陽性対照 (CP) 12.5	100	24	55	0	1	0	61	0	3	0	0	0
			100	20	54	0	1	0	58	0	3	0	0	0
			200	44	109	0	2	0	119	0	6	0	0	0 (0.0)

+ : 暴露終了時、被験物質の析出が認められた。
MEM : Eagle-MEM + 10% 仔牛血清 + 1% エタノール
MMC : Mitomycin C
CP : Cyclophosphamide

表11 染色体異常試験の結果 (連続処理法)

試験番号: 6374 (079-133)

被験物質の名称: ミンダシロロ

処理時間 (h)	S9 mix	被験物質の用量 (μg/ml)	染色体構造異常の細胞数 (出現頻度%)				染色体分体交換 (出現頻度%)				ギャンプの出現数	染色体の数的異常の細胞数 (出現頻度%)				
			観察細胞数	染色体分体切断	染色体分体交換	染色体交換	染色体分体切断	染色体分体交換	染色体交換	染色体分体切断		染色体分体交換	染色体交換	倍率体	その他	総異常細胞数 (%)
24	-	-	100	1	0	0	0	0	0	0	0	1	100	0	0	0
			100	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	100	1	0
24	-	-	200	1	0	0	0	0	0	0	0	1	200	1	0	1 (0.5)
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0
24	-	-	100	0	0	0	0	0	0	0	0	1	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	100	0	0
24	-	-	200	0	0	0	0	0	0	0	0	2	200	0	0	0 (0.0)
			100	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0
24	-	-	100	0	0	0	0	0	0	0	0	1	100	0	0	0
			200	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	200	0	0
24	-	-	100	1	0	0	0	0	0	0	0	1	100	1	0	1
			100	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0
24	-	-	200	1	1	0	0	0	0	0	0	1	200	1	0	1 (0.5)
			100	23	42	0	0	0	0	0	0	0	6	100	0	0
24	-	-	100	14	28	0	1	0	0	0	4	4	100	0	0	0
			200	37	70	0	1	0	0	0	10	10	200	0	0	0 (0.0)

~ : 暴露終了時、被験物質の析出が認められた。

MEM : Eagle-MEM + 10% 仔牛血清 + 1% エタノール

MMC : Mitomycin C

第三章 小核試験

A. 研究方法

現在流通している既存天然添加物23品目のうち、コメヌカ酵素分解物およびモンタンロウを担当することとした(表1)。陽性対照物質として、マイトマイシンC (MMC) を用いた。

試験動物：

生後8週の雄のBDF₁ (C57BL/6×DBA/2) [SPF] マウスを購入し、9週齢で被験物質等の投与を実施した。各動物について疾病の有無を8日間観察すると共に、動物を飼育環境に馴化させた。

飼育管理：

換気回数1時間当たり18回、照明12時間(午前7時点灯、午後7時消灯：150～300 lux)、温度 24.5±2.5°C、湿度 55±20%に設定したマウス飼育室で動物を飼育した。動物には固型飼料(MF：オリエンタル酵母工業株式会社)を自由に摂取させた。動物には水道水を自動給水ノズルより自由に摂取させた。

被験物質等の投与：

媒体および被験物質の投与経路は経口とし、マイクロシリンジとテフロン製ゾンデを用いて1日1回、24時間間隔で2日間連続投与した。投与容量は体重10g当たり0.1mLとし、群分け時の体重から投与液量(mL)を求めた。陽性対照物質の場合、マイクロシリンジと25G注射針を用いて腹腔内に1回投与した。投与容量は体重10g当たり0.1mLとし、群分け時の体重から投与液量(mL)を求めた。

骨髓塗抹標本等の作製：

最終投与後24時間(陽性対照群は投与後24時間)に動物を炭酸ガス吸入法で安楽死させた。大腿骨を摘出し少量のウシ胎児血清を用いて骨髓細胞を洗い出した。遠心分離法(1000 r/min, 5分)により余剰血清を除き、塗抹標本作製した。十分に乾燥させた塗抹標本を99.6%メタノールで固定した後、3%ギムザ液(Merck KGaA)で30分間染色した。1/100 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液(pH 6.8)および精製水で洗浄し、乾燥させた。さらに0.004%ク

エン酸水溶液および精製水で洗浄した後、再び乾燥させた。

小核を有する多染性赤血球の観察：

すべての標本をコード化した後、マスキング法で観察した。動物1匹当たり2000個の多染性赤血球(Polychromatic erythrocyte:PCE)を顕微鏡下(×1000程度)で観察した。小核多染性赤血球(Micronucleated polychromatic erythrocyte:MNPCE)数を計測するとともに、骨髓に対する影響を調べるため全赤血球500個中の多染性赤血球数についても計測した。

統計：

各試験群の小核多染性赤血球の出現頻度は条件付き二項検定(Kastenbaum and Bowmanの推計学的方法：有意水準0.05)を用い、また、全赤血球中の多染性赤血球の割合についてはDunnettのt-検定法を用いて有意差(有意水準0.05)を判定した。

B. 研究結果

それぞれの化合物についての用量設定試験と小核試験の結果を表12～15に示す。

1) コメヌカ酵素分解物(表12および表13) 用量設定試験結果

結果を表12に示した。

各投与群において死亡例は観察されなかった。また、明確な体重増加抑制傾向ならびに一般状態の変化は認められなかった。

表12 2回投与による50%致死量(LD₅₀²)

1回あたりの投与量(mg/kg)	投与回数	生存数/投与数	推定LD ₅₀ ²
		最終投与後24時間	
1024	×2	3/3	> 2000mg/kg
1280	×2	3/3	
1600	×2	3/3	
2000	×2	3/3	

本試験結果

結果を表13に示した。

個体別に多染性赤血球2000個を観察した結

果、陰性対照群では小核の出現頻度は 0.28% であった。また、全赤血球中における多染性赤血球の割合は 52.0% であった。

コメヌカ酵素分解物投与による小核の出現頻度は、500 mg/kg で 0.23%、1000 mg/kg で 0.22% および 2000 mg/kg で 0.23% であり、陰性対照群と比較して統計学的に有意な差は認められなかった。また、骨髓細胞（赤芽球）に対する影響の指標である多染性赤血球の割合は、各群それぞれ 50.1、50.4 および 51.8% であり、統計学的に有意な差は認められなかった。

なお、標本作製時においては各被験物質投与群とも明確な体重増加抑制傾向ならびに一般状態の変化は認められなかった。

一方、陽性対照群の小核出現頻度は 7.87% と、明確な増加を示し、陰性対照群に比べて有意な差 ($p \leq 0.05$) が認められた。さらに、多染性赤血球の割合が 36.1% と有意に減少しており

($p \leq 0.05$)、骨髓細胞の分裂抑制作用が確認された。

1) モンタンロウ (表14および表15)

用量設定試験結果

結果を表 14 に示した。

各投与群において死亡例は観察されなかった。また、明確な体重増加抑制傾向ならびに一般状態の変化は認められなかった。

表14 2回投与による50%致死量 (LD₅₀)

1回あたりの投与量 (mg/kg)	投与回数	生存数/投与数	推定LD ₅₀
		最終投与後24時間	
1024	×2	3/3	> 2000mg/kg
1280	×2	3/3	
1600	×2	3/3	
2000	×2	3/3	

本試験結果

結果を表15に示した。

個体別に多染性赤血球 2000 個を観察した結果、陰性対照群では小核の出現頻度は 0.11% であった。また、全赤血球中における多染性赤血球の割合は 55.1% であった。

モンタンロウ投与による小核の出現頻度は、500 mg/kg で 0.20%、1000 mg/kg で 0.15% および 2000 mg/kg で 0.11% であり、陰性対照群と比較して統計学的に有意な差は認められなかった。また、骨髓細胞（赤芽球）に対する影響の指標である多染性赤血球の割合は、各群それぞれ 55.5、58.5 および 56.2% であり、統計学的に有意な差は認められなかった。

なお、標本作製時においては各被験物質投与群とも明確な体重増加抑制傾向ならびに一般状態の変化は認められなかった。

一方、陽性対照群の小核出現頻度は 6.68% と、明確な増加を示し、陰性対照群に比べて有意な差 ($p \leq 0.05$) が認められた。さらに、多染性赤血球の割合が 41.1% と有意に減少しており

($p \leq 0.05$)、骨髓細胞の分裂抑制作用が確認された。

C. 考 察

コメヌカ酵素分解物およびモンタンロウにおいてガイドライン上定められた最高用量である 2000 mg/kg を高用量とし、以下 1000, 500 mg/kg の 3 用量を投与した後、

表 13 小核試験結果

検体名 : コメヌカ酵素分解物

Exp. No.: 6273 (079-121)

mg/kg/day	SCHEDULE	MOUSE	MNPCE : %	PCE/(PCE+NCE): %	BW: g	CODE
0 Vehicle (D.W.)	×2, 24hr	2001	0.20	57.2	26.4	17
		2002	0.25	49.8	26.7	8
		2003	0.40	52.2	25.7	20
		2004	0.35	49.0	26.5	12
		2005	0.20	51.8	26.2	24
		Mean	0.28	52.0	26.3	
		Std	0.09	3.20	0.38	
		Min	0.20	49.0	25.7	
		Max	0.40	57.2	26.7	
		Total No.	28			
500	×2, 24hr	2101	0.10	49.8	25.3	30
		2102	0.25	45.6	26.4	21
		2103	0.20	50.8	26.6	18
		2104	0.50	47.2	25.7	3
		2105	0.10	57.2	26.6	29
		Mean	0.23	50.1	26.1	
		Std	0.16	4.46	0.59	S ^K
		Min	0.10	45.6	25.3	
		Max	0.50	57.2	26.6	判定
		Total No.	23			—
1000	×2, 24hr	2201	0.25	51.8	24.7	1
		2202	0.35	41.0	24.0	4
		2203	0.20	57.0	25.2	16
		2204	0.25	55.8	24.3	27
		2205	0.05	46.4	24.6	28
		Mean	0.22	50.4	24.6	
		Std	0.11	6.69	0.45	S ^K
		Min	0.05	41.0	24.0	
		Max	0.35	57.0	25.2	判定
		Total No.	22			—
2000	×2, 24hr	2301	0.20	49.2	26.9	14
		2302	0.25	51.8	26.7	22
		2303	0.30	50.4	25.0	15
		2304	0.20	55.6	27.3	23
		2305	0.20	52.2	25.8	7
		Mean	0.23	51.8	26.3	
		Std	0.04	2.41	0.93	S ^K
		Min	0.20	49.2	25.0	
		Max	0.30	55.6	27.3	判定
		Total No.	23			—
MMC	×1, 24hr	2401	7.35	36.0	26.6	25
		2402	10.20	41.2	26.8	19
		2403	7.75	38.2	25.1	13
		2404	7.85	31.8	25.3	9
		2405	6.20	33.4	25.0	26
		Mean	7.87	36.1 *	25.8	
		Std	1.46	3.75	0.87	S ^K
		Min	6.20	31.8	25.0	
		Max	10.20	41.2	26.8	判定
		Total No.	787			+

B.W. : Body weight at 24 hours after the final dose.

MNPCE : Frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes.

PCE/(PCE+NCE) : Ratio of polychromatic erythrocytes to total erythrocytes.

S^K : Kastenbaum-Bowmanの数表による検定 * : p≤0.05 (Dunnnett検定)

表 15 小核試験結果
 検体名 : モンダンロウ

Exp. No.: 6274 (079-122)

mg/kg/day	SCHEDULE	MOUSE	MNPCE : %	PCE/(PCE+NCE):%	BW:g	CODE
0 Vehicle (Corn oil)	×2, 24hr	2001	0.15	58.0	26.9	8
		2002	0.10	47.8	24.6	13
		2003	0.05	59.4	27.6	2
		2004	0.10	52.4	25.6	11
		2005	0.15	58.0	24.8	20
		Mean	0.11	55.1	25.9	
		Std	0.04	4.90	1.31	
		Min	0.05	47.8	24.6	
		Max	0.15	59.4	27.6	
		Total No.	11			
500	×2, 24hr	2101	0.15	61.6	26.1	9
		2102	0.15	60.6	26.8	26
		2103	0.15	53.2	26.9	12
		2104	0.15	57.8	25.3	14
		2105	0.40	44.2	25.6	6
		Mean	0.20	55.5	26.1	
		Std	0.11	7.10	0.71	S ^K
		Min	0.15	44.2	25.3	判定
		Max	0.40	61.6	26.9	—
		Total No.	20			
1000	×2, 24hr	2201	0.20	65.2	27.0	23
		2202	0.15	63.8	26.1	10
		2203	0.05	47.4	26.9	17
		2204	0.10	53.2	23.9	30
		2205	0.25	63.0	25.2	22
		Mean	0.15	58.5	25.8	
		Std	0.08	7.82	1.29	S ^K
		Min	0.05	47.4	23.9	判定
		Max	0.25	65.2	27.0	—
		Total No.	15			
2000	×2, 24hr	2301	0.10	67.4	26.6	18
		2302	0.20	56.2	23.6	16
		2303	0.10	52.0	27.0	3
		2304	0.05	51.8	27.1	5
		2305	0.10	53.8	26.3	29
		Mean	0.11	56.2	26.1	
		Std	0.05	6.48	1.44	S ^K
		Min	0.05	51.8	23.6	判定
		Max	0.20	67.4	27.1	—
		Total No.	11			
MMC	×1, 24hr	2401	7.55	48.0	26.3	1
		2402	6.20	45.6	26.6	28
		2403	6.15	48.8	25.0	19
		2404	8.50	26.6	26.4	7
		2405	5.00	36.6	24.6	24
		Mean	6.68	41.1 *	25.8	
		Std	1.36	9.46	0.91	S ^K
		Min	5	26.6	24.6	判定
		Max	8.50	48.8	26.6	+
		Total No.	668			

B.W. : Body weight at 24 hours after the final dose.

MNPCE : Frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes.

PCE/(PCE+NCE) : Ratio of polychromatic erythrocytes to total erythrocytes.

S^K : Kastenbaum-Bowmanの数表による検定 * : p<0.05 (Dunnett検定)

第四章 コメットアッセイ

A. 研究方法

現在流通している人工着色料のうち、Amaranth (赤色2号) を担当することとした (表 1)。陽性対照物質として、マウスでは

ジメチルアミノアゾベンゼン (DAAB) およびメタンスルホン酸エチル (EMS)、ラットでは1, 2-ジメチルヒドラジン二塩酸塩 (DMH) を用いた。

試験動物：

マウスは生後7週の雄の:CD-1(ICR) [SPF]を購入し、8週齢で被験物質等の投与を実施した。ラットは生後7週の雄の:CD(SD) IGS [SPF]を購入し、8週齢で被験物質等の投与を実施した。各動物について疾病の有無を6日間観察すると共に、動物を飼育環境に馴化させた。

飼育管理：

換気回数1時間当たり18回、照明12時間(午前7時点灯、午後7時消灯:150~300 lux)、温度24.5±2.5°C、湿度55±20%に設定したマウス飼育室あるいはラット飼育室で動物を飼育した。動物には固型飼料(MF:オリエンタル酵母工業株式会社)を自由に摂取させた。動物には水道水を自動給水ノズルより自由に摂取させた。

被験物質等の投与：

媒体および被験物質の投与経路はTsuda等の試験に準じて経口とし、マイクロシリンジとテフロン製ゾンデを用いて単回あるいは1日1回、24時間間隔で3日間連続投与した。投与容量は体重10g当たり0.1mLとし、群分け時の体重から投与液量(mL)を求めた。陽性対照物質EMS(マウスに使用)の場合、マイクロシリンジと25G注射針を用いて腹腔内に1回投与し、DAAB(マウスに使用)あるいはDMH(ラットに使用)の場合は単回経口投与した。投与容量は体重10g当たり0.1mLとし、群分け時の体重から投与液量(mL)を求めた。

単細胞液の調製：

腸管および胃を摘出した後切開し、表層をナイフ等で剥離させた。次いで適量のホモジナイ

小核の観察を実施した。その結果、小核多染性赤血球の出現頻度は各被験物質処理群とも陰性対照群と同等の値を示し、統計学的に有意な増加は認められなかった。また、全赤血球中の多染性赤血球の割合についても統計学的に有意な減少は認められなかった。

なお、陰性対照ならびに陽性対照での小核出現頻度、多染性赤血球の割合はいずれも当施設での背景データの範囲内であり、本試験が適切な条件下でなされたと判断された。

D. 結論

本試験条件下においてコメヌカ酵素分解物およびモンタンロウのマウスに対する小核の誘発性、すなわち染色体異常ないし紡錘体形成阻害誘発性は陰性と判定した。

E. 健康危険情報

特になし

F. 参考資料

- 1) Schmid W. The micronucleus test. *Mutat Res*; 31: 9-15, 1975.
- 2) Schmid W. The micronucleus test for cytogenetic analysis. In: Hollaender A, editor. *Chemical Mutagens*. Vol. 4. New York: Plenum press; p. 31-53, 1976..
- 3) Salamone M, Heddle J, Stuart E, Katz M. Towards an improved micronucleus test: Studies on 3 model agents, mitomycin C, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene. *Mutat Res*, 74: 347-56, 1980.
- 4) Kastenbaum MA, Bowman KO. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat Res*, 9: 527-49. 1970.
- 5) Dunnett, C. W.: New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 483-91, September, 1964.

ズ用緩衝液を加えダウンス型ホモジナイザーを用いてホモジナイズした。ただし、胃についてはホモジナイズせず、ホモジナイズ用緩衝液中で軽く攪拌した。5分間遠心分離(800 r/min)し、上清を捨て適量のホモジナイズ用緩衝液に懸濁して単細胞液とした。

標本の作製：

スーパーフロストガラスに 0.6%アガロースゲル 60 μL を滴下し均一に塗抹し、表面が乾燥した後、0.6%アガロースゲル 100 μL を重層し第1層とする。単細胞液 10 μL を分注したマイクロチューブに 1%低融点アガロースゲル 75 μL を添加し攪拌したのち、75 μL を第1層上に重層し第2層とした。第2層が固化した後、1%低融点アガロースゲル 100 μL を重層し第3層とした。第3層が固化した後、各標本を核融液の入ったバットに入れ遮光、冷蔵下で1時間以上静置した。各標本をサブマリン型電気泳動槽 (BE-520 あるいは BE-540) を用いて 1 V/cm (25V < BE-520 の場合) あるいは 36V < BE-540 の場合) の定電圧で 15 分間電気泳動を行なった後、中和液中で中和した。エタノールを用い泳動後の標本を脱水した。

細胞の観察：

全ての標本をコード化した後、マスキング法で観察した。20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のエチジウムブロマイド液 (ニッポンジーン) 50 μL を標本に滴下し、カバーガラスを載せた。IG 励起 (励起フィルター ; BP520-550) および補助吸収フィルター (BA580IF) を備えた落射蛍光顕微鏡に CCD カメラを装着したコメットアッセイ解析装置 (Rainbow Star システム : 東洋紡績株式会社) に画像を取り込み tail length (μm) を計測した。1 器官当たり 100 細胞 (50 細胞 / スライド)、すなわち 1 群 (4 匹) 当たり 400 細胞の泳動像を解析した。

統計：

陰性対照とその他の群 (陽性対照群を除く) の tail length (マウスではさらに olive's tail moment) について、最初に一元配置分散分析

(one-way ANOVA : 有意水準 0.05) を実施した。同検定で有意となった場合に Dunnett 検定 (有意水準 0.05 および 0.01) を用いて陰性対照群と各被験物質投与群との平均値の差の検定を行った。陰性対照群と陽性対照群との比較については、tail length を Aspin-Welch の t 検定 (有意水準 0.05 および 0.01) により平均値の差の検定を行った。検定の有意水準は片側 5% および 1% とした。

B. 研究結果

コメットアッセイのマウスの結果を表16~19に、ラットの結果を表20および表21に示す。

本試験結果 (胃 : マウス)

結果を表16および表17に示した。

個別別に100細胞を解析した結果、陰性対照での平均 tail length および tail moment は3時間群で 9.7 μm および 1.9、24時間群で 11.2 μm および 2.0 であった。Amaranth 投与による tail length あるいは tail moment は単回投与の各群いずれも 19.6 μm あるいは 4.0 以下であり、陰性対照と比較して統計学的に有意な差は認められなかった。3回連続投与群での tail length は 10.0 mg/kg で 16.4 μm 、100 mg/kg で 25.5 μm 、1000 mg/kg で 23.2 μm を示し、中用量および高用量で統計学的に有意 ($p \leq 0.05$) な増加が観察された。しかしながら同群での tail moment は 10.0 mg/kg で 3.2、100 mg/kg で 6.2、1000 mg/kg で 5.9 と増加を示したが、統計学的に有意な増加ではなかった。

なお、標本作製時において明確な体重増加抑制傾向ならびに一般状態の変化は認められなかった。

一方、陽性対照 DAAB の場合、3時間群では tail length は 20.1 μm を示し、有意 ($p \leq 0.05$) な増加が見られたが、24時間群 (500 mg/kg) では全例が死亡した。EMS 投与の3時間での tail length は 31.9 μm を示し有意 ($p \leq 0.01$) な増加が確認された。

本試験結果（腸管：マウス）

結果を表18および表19に示した。

陰性対照での平均tail lengthおよびtail momentは3時間群で8.1 μm および1.1、24時間群で5.4 μm および0.8であった。Amaranth投与によるtail lengthあるいはtail momentは単回投与および3回連続投与の各群いずれも16.3 μm あるいは2.6以下であり、陰性対照と比較して統計学的に有意な増加は認められなかった。

なお、標本作製時において明確な体重増加抑制傾向ならびに一般状態の変化は認められなかった。

一方、陽性対照DAABの場合、3時間群でtail lengthは13.5 μm を示し、有意 ($p \leq 0.05$) な増加が見られたが、24時間群では全例が死亡した。EMS投与の3時間でのtail lengthは34.4 μm を示し有意 ($p \leq 0.01$) な増加が確認された。

本試験結果（胃：ラット）

結果を表20に示した。

個体別に100細胞を解析した結果、陰性対照での平均tail lengthは3時間群で15.4 μm 、24時間群で18.9 μm であった。Amaranth投与によるtail lengthは単回投与の各群いずれも23.1 μm 以下であり、陰性対照と比較して統計学的に有意な増加は認められなかった。

なお、標本作製時において明確な体重増加抑制傾向ならびに一般状態の変化は認められなかった。

一方、陽性対照DMHの場合、3時間群ではtail lengthは31.3 μm を示し、有意 ($p \leq 0.01$) な増加が見られたが、24時間群では26.3 μm を示し有意ではないが増加傾向が見られた。

本試験結果（腸管：ラット）

結果を表21に示した。

陰性対照での平均tail lengthは3時間群で7.9 μm 、24時間群で7.0 μm であった。Amaranth投与によるtail lengthは単回投与の各群い

ずれも11.9 μm 以下であり、陰性対照と比較して統計学的に有意な差は認められなかった。

なお、標本作製時において明確な体重増加抑制傾向ならびに一般状態の変化は認められなかった。

一方、陽性対照DMHのtail lengthは、3時間群で18.1 μm 、24時間群で13.3 μm を示し、有意 ($p \leq 0.05$) な増加が見られた。

C. 考 察

マウスの胃および腸管においてAmaranthは初期型DNA損傷を誘発することがTsuda等によって報告されている。本実験の再現性ならびに種差を確認するため、1.00、10.0、100、1000および2000 mg/kgの5用量を設定しマウスならびにラットへ単回投与したのち、3時間後に、さらに2000 mg/kgでは24時間後に標本作製し次いで、tail lengthを計測した。さらに、マウスについてはtail momentを計測した。また、連続投与での影響を見るため、10.0、100および1000 mg/kgの3用量についてマウスに3回連続投与した後、24時間後に標本作製し次いで、tail lengthおよびtail momentを計測した。その結果、3回連続投与、100および1000 mg/kgの胃においてのみ、陰性対照と比較して統計学的に有意な平均tail lengthの上昇が観察されたが、tail momentで再評価した場合、その上昇は有意ではなかった。コメントアッセイ自体、動物個体間あるいは施設間によってデータに大きなバラツキが認められ、特に今回実施した胃や腸管においては、その傾向が著しいことが知られている。従って、臓器によっては安全性評価に適していない面もあると考えられる。

D. 結 論

本試験条件下においてAmaranthのマウスおよびラットに対するコメント誘発性、すなわち初期DNA損傷の誘発性は明確に陽性と判断できなかった。

E 健康危険情報

特になし

F. 参考文献

- 1) Tsuda, S., Murakami, M., Matsusaka, N., Kano, K., Taniguchi, K. and Sasaki, Yu. F. : DNA damage induced by red food dyes orally administered to pregnant and male mice, *Toxicological Sciences*, 61, 92-99, 2001.

G. 参考資料

- 1) Tice, R. R., Andrews, P. W., Hirai, O. and Singk, N. P. : The single cell gel (SCG) assay: An electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cells. Plenum Press, New York, pp. 157~164, 1990.
- 2) 平井収, Tice, R. R. : 細胞レベルでの高感度な DNA 損傷検出法, 変異原性試験, 3, 1~11, 1994.
- 3) Anderson, D., Yu, T.-W., Phillips, B. J. and Schmezer, P. : The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay, *Mutat. Res.*, 307, 261~271, 1994.
- 4) 佐々木有 他 : マウス多臓器アルカリ SCG 法による臓器特異的遺伝子毒性の検出, 環境変異原研究, 20, 51~62, 1998.

表16 コメット試験結果(胃：マウス)

試験用量 (mg/kg)	投与回数 ^{a)} / 処理時間 ^{b)}	動物番号	tail length [平均±S.D.] (μm)	体重[平均±S.D.](g)	標本 番号	
陰性対照 (D.W.) 0	1回/3h	1001	11.2	35.5 32.8 [34.0 ± 2.5]	49	
		1002	11.4		31	
		1003	8.6		27	
		1004	7.7		22	
Amaranth 1		1101	8.5	36.9 35.0 [34.5 ± 2.0]	23	
		1102	8.4		25	
		1103	11.6		55	
		1104	8.3		11	
10		1201	23.3	34.0 33.2 [33.9 ± 1.2]	13	
		1202	18.2		44	
		1203	14.3		58	
		1204	22.5		30	
100		1301	19.3	36.8 35.6 [35.1 ± 1.7]	3	
		1302	9.9		41	
		1303	15.9		65	
		1304	9.8		14	
1000	1401	10.8	36.1 36.2 [35.1 ± 1.5]	1		
	1402	8.5		36		
	1403	11.7		9		
	1404	21.9		34		
2000	1501	14.1	36.4 32.2 [34.4 ± 1.7]	61		
	1502	31.0		28		
	1503	10.7		48		
	1504	14.9		29		
陽性対照 DAAB ^{c)} 10	1601	22.0	32.1 35.3 [33.8 ± 1.4]	62		
	1602	12.6		54		
	1603	20.5		18		
	1604	25.3		15		
陽性対照 EMS ^{d)} 300	1701	29.5	34.0 32.2 [34.0 ± 2.1]	20		
	1702	27.0		24		
	1703	28.1		51		
	1704	42.8		2		
陰性対照 (D.W.) 0	1回/24h	2001	8.2	36.2 35.4 [35.5 ± 1.5]	35	
		2002	7.6		37	
		2003	10.5		8	
		2004	18.3		26	
Amaranth 2000		2101	12.2	35.7 33.7 [35.2 ± 1.4]	17	
		2102	19.0		47	
		2103	22.6		4	
		2104	17.2		38	
DAAB ^{c)}		全例死亡				
10		3回/24h	2201	17.5	32.3 36.5 [35.9 ± 2.6]	6
			2202	19.5		52
			2203	9.1		57
			2204	19.4		33
100			2301	17.6	35.4 36.4 [35.2 ± 1.0]	19
			2302	23.0		40
			2303	35.9		64
	2304		25.4	59		
1000	2401		32.0	36.8 36.5 [36.0 ± 0.8]	45	
	2402		16.4		12	
	2403		18.2		50	
	2404		26.1		63	

a) : 24時間間隔で投与

b) : 最終投与後、標本作製までの時間

c) : *p*-Dimethylaminoazobenzene

d) : Ethylmethanesulfonate

* : $p < 0.05$ (Aspin-Welchのt検定)

** : $p < 0.01$ (Aspin-Welchのt検定)

: $p < 0.05$ (Dunnett検定)

: $p < 0.01$ (Dunnett検定)