

表17 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 moment [平均±S.D.]	体重[平均±S.D.] (g)	標本 番号	
陰性対照 (D.W.) 0	1回/3h	1001	2.3	35.5 32.8 36.7 31.1 [34.0 ± 2.5]	49	
		1002	2.5		31	
		1003	1.7		27	
		1004	1.2		22	
Amaranth 1		1101	1.6	36.9 35.0 32.3 33.6 [34.5 ± 2.0]	23	
		1102	1.4		25	
		1103	2.4		55	
		1104	1.4		11	
10		1201	5.0	34.0 33.2 32.8 35.5 [33.9 ± 1.2]	13	
		1202	3.5		44	
		1203	2.4		58	
		1204	4.5		30	
100		1301	3.7	36.8 35.6 35.1 32.8 [35.1 ± 1.7]	3	
		1302	1.4		41	
		1303	3.0		65	
		1304	1.2		14	
1000	1401	1.7	36.1 36.2 32.9 35.1 [35.1 ± 1.5]	1		
	1402	1.1		36		
	1403	1.5		9		
	1404	4.7		34		
2000	1501	2.5	36.4 32.2 34.7 34.2 [34.4 ± 1.7]	61		
	1502	9.0		28		
	1503	1.6		48		
	1504	2.8		29		
陽性対照 DAAB ^{c)} 10	1601	4.5	32.1 35.3 33.4 34.3 [33.8 ± 1.4]	62		
	1602	2.6		54		
	1603	4.2		18		
	1604	5.7		15		
陽性対照 EMS ^{d)} 300	1701	7.6	34.0 32.2 32.7 36.9 [34.0 ± 2.1]	20		
	1702	7.5		24		
	1703	7.0		51		
	1704	13.3		2		
陰性対照 (D.W.) 0	1回/24h	2001	1.3	36.2 35.4 36.9 33.5 [35.5 ± 1.5]	35	
		2002	1.3		37	
		2003	1.6		8	
		2004	3.7		26	
Amaranth 2000		2101	2.0	35.7 33.7 36.8 34.4 [35.2 ± 1.4]	17	
		2102	4.3		47	
		2103	5.8		4	
		2104	3.4		38	
DAAB ^{c)}			全例死亡			
10		3回/24h	2201	3.2	32.3 36.5 38.5 36.1 [35.9 ± 2.6]	6
			2202	3.6		52
			2203	1.3		57
			2204	4.7		33
100			2301	3.6	35.4 36.4 34.0 34.9 [35.2 ± 1.0]	19
			2302	4.8		40
			2303	10.1		64
	2304		6.3	59		
1000	2401		9.7	36.8 36.5 35.5 35.2 [36.0 ± 0.8]	45	
	2402		2.7		12	
	2403		3.8		50	
	2404		7.2		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

表18 コメット試験結果(腸管：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	7.6	35.5 32.8 36.7 31.1 [34.0 ± 2.5]	1	
		1002	6.9		38	
		1003	4.8		31	
		1004	13.1		8	
Amaranth 1		1101	13.7	36.9 35.0 32.3 33.6 [34.5 ± 2.0]	54	
		1102	20.5		19	
		1103	10.6		46	
		1104	10.4		45	
10		1201	23.0	34.0 33.2 32.8 35.5 [33.9 ± 1.2]	56	
		1202	9.8		16	
		1203	13.1		27	
		1204	8.3		24	
100		1301	10.3	36.8 35.6 35.1 32.8 [35.1 ± 1.7]	4	
		1302	4.3		21	
		1303	12.5		9	
		1304	4.5		12	
1000	1401	17.4	36.1 36.2 32.9 35.1 [35.1 ± 1.5]	28		
	1402	18.6		59		
	1403	11.4		26		
	1404	9.4		65		
2000	1501	17.5	36.4 32.2 34.7 34.2 [34.4 ± 1.7]	35		
	1502	23.0		5		
	1503	12.9		42		
	1504	11.8		49		
陽性対照 DAAB ^{c)} 10	1601	13.9	32.1 35.3 33.4 34.3 [33.8 ± 1.4]	11		
	1602	8.6		13		
	1603	17.8		36		
	1604	13.7		50		
陽性対照 EMS ^{d)} 300	1701	35.7	34.0 32.2 32.7 36.9 [34.0 ± 2.1]	14		
	1702	36.3		34		
	1703	33.0		15		
	1704	32.6		2		
陰性対照 (D.W.) 0	1回 /24h	2001	4.1	36.2 35.4 36.9 33.5 [35.5 ± 1.5]	37	
		2002	5.2		44	
		2003	9.0		23	
		2004	3.3		58	
Amaranth 2000		2101	10.3	35.7 33.7 36.8 34.4 [35.2 ± 1.4]	10	
		2102	9.7		6	
		2103	5.4		29	
		2104	13.3		33	
DAAB ^{c)}		全例死亡				
10		3回 /24h	2201	4.1	32.3 36.5 38.5 36.1 [35.9 ± 2.6]	3
			2202	21.2		17
			2203	12.9		25
			2204	6.0		51
100			2301	17.9	35.4 36.4 34.0 34.9 [35.2 ± 1.0]	61
			2302	8.4		20
			2303	12.2		48
	2304		20.6	41		
1000	2401		15.0	36.8 36.5 35.5 35.2 [36.0 ± 0.8]	30	
	2402		14.4		57	
	2403		5.2		47	
	2404		19.2		64	

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)

表19 コメット試験結果(腸管：マウス)

試験用量 (mg/kg)	投与回数 ^{a)} / 処理時間 ^{b)}	動物番号	tail moment [平均±S.D.]	体重[平均±S.D.] (g)	標本 番号			
陰性対照 (D.W.) 0	1回/3h	1001	1.0	[1.1 ± 0.8]	35.5	1		
		1002	0.7		32.8	38		
		1003	0.5		36.7	31		
		1004	2.2		31.1	8		
Amaranth 1		1101	1.7	[2.0 ± 0.9]	36.9	54		
		1102	3.3		35.0	19		
		1103	1.4		32.3	46		
		1104	1.4		33.6	45		
10		1201	4.6	[2.4 ± 1.6]	34.0	56		
		1202	1.3		33.2	16		
		1203	2.3		32.8	27		
		1204	1.2		35.5	24		
100		1301	2.1	[1.4 ± 0.9]	36.8	4		
		1302	0.7		35.6	21		
		1303	2.2		35.1	9		
		1304	0.5		32.8	12		
1000		1401	2.9	[2.4 ± 1.0]	36.1	28		
		1402	3.5		36.2	59		
		1403	1.5		32.9	26		
		1404	1.5		35.1	65		
2000		1501	2.9	[2.6 ± 1.2]	36.4	35		
		1502	4.2		32.2	5		
		1503	2.1		34.7	42		
		1504	1.3		34.2	49		
陽性対照 DAAB ^{c)} 10		1601	2.7	[2.3 ± 0.9]	32.1	11		
		1602	1.0		35.3	13		
		1603	3.1		33.4	36		
		1604	2.5		34.3	50		
陽性対照 EMS ^{d)} 300		1701	10.8	[10.3 ± 1.1]	34.0	14		
		1702	11.5		32.2	34		
		1703	8.9		32.7	15		
		1704	10.0		36.9	2		
陰性対照 (D.W.) 0		1回/24h	2001	0.4	[0.8 ± 0.5]	36.2	37	
			2002	0.8		35.4	44	
			2003	1.4		36.9	23	
			2004	0.5		33.5	58	
Amaranth 2000			2101	1.9	[1.6 ± 0.7]	35.7	10	
			2102	1.5		33.7	6	
			2103	0.7		36.8	29	
			2104	2.3		34.4	33	
DAAB ^{c)}			全例死亡					
10			3回/24h	2201	0.6	[1.9 ± 1.4]	32.3	3
				2202	3.8		36.5	17
				2203	1.9		38.5	25
				2204	1.1		36.1	51
100				2301	2.9	[2.5 ± 1.5]	35.4	61
				2302	1.1		36.4	20
				2303	1.7		34.0	48
	2304			4.4	34.9		41	
1000	2401			2.3	[2.0 ± 1.0]	36.8	30	
	2402			1.9		36.5	57	
	2403			0.7		35.5	47	
	2404			3.2		35.2	64	

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

表20 コメット試験結果(胃：ラット)

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	21.9	286 295 [289 ± 4.9] 284 290	24
		1002	12.9		26
		1003	8.4		19
		1004	18.4		12
Amaranth 1		1101	20.3	290 281 [283 ± 5.1] 278 284	6
		1102	15.3		27
		1103	18.2		9
		1104	25.9		1
10		1201	23.8	277 298 [290 ± 9.1] 292 293	3
		1202	21.7		32
		1203	14.3		47
		1204	25.4		17
100		1301	20.2	286 290 [286 ± 3.3] 282 285	7
		1302	24.6		45
		1303	11.7		21
		1304	33.9		38
1000	1401	20.3	295 288 [287 ± 6.1] 281 284	29	
	1402	21.3		40	
	1403	13.6		23	
	1404	14.8		49	
2000	1501	28.5	290 296 [288 ± 7.9] 287 277	30	
	1502	16.8		4	
	1503	19.9		44	
	1504	27.0		8	
陽性対照 DMH ^{c)} 100	1601	34.3	281 288 [282 ± 4.2] 278 281	33	
	1602	35.3		5	
	1603	34.3		41	
	1604	21.4		16	
陰性対照 (D.W.) 0	1回 /24h	2001	19.7	289 285 [292 ± 6.0] 293 299	22
		2002	17.7		18
		2003	9.9		28
		2004	28.2		46
Amaranth 2000		2101	21.4	289 292 [293 ± 5.2] 300 289	15
		2102	23.7		13
		2103	16.1		50
		2104	23.7		48
陽性対照 DMH ^{c)} 50		2201	14.5	283 299 [288 ± 9.9] 277 293	42
		2202	25.5		11
		2203	38.1		31
		2204	27.2		35

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) : 1,2-Dimethylhydrazine 2HCl

** : $p < 0.01$ (Aspin-Welchのt検定)

表21 コメット試験結果(腸管：ラット)

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	8.5	286 295 284 [289 ± 4.9]	24
		1002	5.8		26
		1003	10.4		19
		1004	6.9		12
Amaranth 1		1101	8.4	290 281 278 [283 ± 5.1]	6
		1102	19.2		27
		1103	12.7		9
		1104	6.8		1
10		1201	5.5	277 298 292 [290 ± 9.1]	3
		1202	14.4		32
		1203	7.2		47
		1204	11.1		17
100		1301	6.3	286 290 282 [286 ± 3.3]	7
		1302	9.0		45
		1303	5.0		21
		1304	4.5		38
1000	1401	14.2	295 288 281 [287 ± 6.1]	29	
	1402	14.7		40	
	1403	12.1		23	
	1404	6.4		49	
2000	1501	9.5	290 296 287 [288 ± 7.9]	30	
	1502	8.8		4	
	1503	8.3		44	
	1504	8.8		8	
陽性対照 DMH ^{c)} 100	1601	15.0	281 288 278 [282 ± 4.2]	33	
	1602	19.8		5	
	1603	11.7		41	
	1604	25.8		16	
陰性対照 (D.W.) 0	1回/24h	2001	7.4	289 285 293 [292 ± 6.0]	22
		2002	10.3		18
		2003	5.3		28
		2004	4.9		46
Amaranth 2000		2101	8.6	289 292 300 [293 ± 5.2]	15
		2102	11.4		13
		2103	4.6		50
		2104	3.2		48
陽性対照 DMH ^{c)} 50		2201	12.1	283 299 277 [288 ± 9.9]	42
		2202	13.6		11
		2203	7.9		31
		2204	19.4		35

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) : 1,2-Dimethylhydrazine 2HCl

* : $p < 0.05$ (Aspin-Welchのt検定)

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）
分担研究報告書

既存天然添加物等の変異原性を中心とした安全性研究
コメヌカ油抽出物の微生物に対する復帰突然変異原性試験

分担研究者 野口 忠（日本バイオアッセイ研究センター・試験管理部 室長）
協力研究者 荒木 明宏（日本バイオアッセイ研究センター・変異原性試験部 室長）
上垣外智之（日本バイオアッセイ研究センター・変異原性試験部 研究員）
田代 翼（日本バイオアッセイ研究センター・試験管理部 研究員）

研究要旨

本研究の目的は、既存天然添加物であるコメヌカ油抽出物の微生物に対する復帰突然変異原性、及びアルカネット色素のマウス骨髄の多染性赤血球に対する小核誘発性の有無を検索することを目的とした。試験は、平成8年3月22日付け、衛化第29号厚生省生活衛生局通知「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針について」の「安全性試験に関する標準的実施方法（微生物を用いる復帰突然変異試験及びげっ歯類を用いる小核試験）」の基準に従い実施した。その結果、コメヌカ油抽出物の微生物に対する復帰突然変異原性、及びアルカネット色素のマウス骨髄の多染性赤血球に対する小核誘発性は共に認められなかった。

キーワード：遺伝毒性試験、復帰突然変異試験、*in vivo*小核試験、コメヌカ油抽出物、アルカネット色素

第1章 コメヌカ抽出物の微生物に対する復帰突然変異試験

A. 研究目的

本共同研究の目的は、既存天然添加物であるコメヌカ油抽出物の微生物に対する復帰突然変異原性、及びアルカネット色素のマウス骨髄の多染性赤血球に対する小核誘発性の有無を検索することを目的とした。

B. 研究方法

微生物を用いる復帰突然変異試験は、平成8年3月22日付け、衛化第29号厚生省生活衛生局通知「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針について」の「安全性試験に関する標準的実施方法（微生物を用いる復帰突然変異試験）」¹⁾の基準に従い、Amesら²⁾及びMaronら³⁾の方法に準拠し、代謝活性化による、よらない場合についてプレイ

ンキュベーション法⁴⁾で実施した。

あらかじめ用量設定試験を最高用量 5000 µg /プレートから公比 4 で 7 用量段階実施し、被験物質の抗菌作用及び復帰変異コロニー数の上昇の有無を調べた後に、本試験を実施した。本試験の用量は用量設定試験において抗菌作用並びに復帰変異コロニー数の増加が認められないことより、最高用量を 5000 µg /プレートとし、公比 2 で 7 用量段階に設定した。試験に使用したプレート数は、被験物質の各用量と陽性対照で 2 プレート、溶媒対照で 4 プレートとした。試験結果の最終判定は、用量設定試験の結果と本試験の結果との再現性を確認して実施した。

1. 被験物質

被験物質は日本食品添加物協会より配布された、コメヌカ油抽出物を用いた。被験物質の提供元とロット番号を以下に示した。

被験物質名	コメヌカ油抽出物
ロット番号	01-10-12
純度	100%
提供元	藤沢薬品株式会社

2. 試験菌株

試験菌株はネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA98, TA100, TA1535, TA1537 及び大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2uvrA/pKM101 の 5 菌株を用いた。入手した菌株は Ames ら²⁾ 及び Maron ら³⁾ の方法に従い遺伝的性質を調べた後、遺伝的性質が適切である菌株を保存した。保存は、静止期まで培養した菌前培養液に DMSO を 8.2% になるように加え、凍結用バイアルに小分けし -80℃ で保存した。試験には小分けした保存菌株を解凍し、解凍菌液をニュートリエントブロス (OXOID #2) に 1/500 の接種量で植え、37℃ で 10 時間振盪培養 (静止期の初期に相当する) した菌前培養液を用いた。

直接法及び代謝活性化法における陽性対照物質の名称及び用いた用量

菌株	代謝活性化によらない場合 (-S9 mix)			代謝活性化による場合 (+S9 mix)		
	名称	入手先	用量 (µg/プレート)	名称	入手先	用量 (µg/プレート)
TA100	AF-2	和光純薬工業株式会社	0.01	2-AA	和光純薬工業株式会社	1.0
TA1535	NaN ₃	同上	0.5	2-AA	同上	2.0
TA98	AF-2	同上	0.1	2-AA	同上	0.5
TA1537	9-AA	Aldrich chemical Co., Inc.	80	2-AA	同上	2.0
WP2uvrA/pKM101	AF-2	和光純薬工業株式会社	0.005	2-AA	同上	2.0

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、NaN₃ : ナトリウム・アジド、
9-AA : 9-アミノアクリジン、2-AA : 2-アミノアントラセン

3. S9 及び S9 mix

S9 はフェノバルビタール及び 5,6-ベンゾフラボンで酵素誘導した⁵⁾ Sprague-Dawley ラットの肝臓より調製された市販品 (キッコーマン株式会社製造) を購入して用いた。

S9 mix は、4mM NADPH、4mM NADH、5mM G-6-P、8mM MgCl₂、33mM KCl、100mM ナトリウムリン酸緩衝液 (pH7.4)、10% S9 の組成濃度になるように調製した。

4. 被験物質溶液の調製

コメヌカ油抽出物は、DMSO に懸濁して最高用量を調製し試験に用いた。被験物質溶液のプレート当たりの量は 0.1 ml とした。被験物質溶液は、試験の実施直前に調製した。

5. 陽性対照物質

直接法及び代謝活性化法における陽性対照物質の名称及び用いた用量 (µg/プレート) を以下に示した。陽性対照物質は DMSO に溶解して試験に用いた。陽性対照物質の溶液の 1 プレート当たりの量は 0.05 ml とした。

6. プレインキューベーション法

被験物質溶液または溶媒 0.1ml、陽性対照物

質溶液 0.05 ml と S9 mix あるいは 0.1M Na-リン酸緩衝液 0.5 ml とテスト菌株の前培養液 0.1 ml を試験管に入れ、良く混合し 37°C で 20 分間、恒温槽中で振盪した(プレインキュベーション)。プレインキュベーションした後、2 ml のトップアガーを加え、直ちに最少グルコース寒天平板培地 (プレート) 上に広げて固めた。固化したプレートを 37°C で 48 時間、恒温培養器で上下を転倒し遮光して培養した後、被験物質の試験菌株への抗菌作用 (生育阻害) 並びに被験物質の沈殿状況を調べ、復帰変異コロニー数を測定した。

7. 抗菌作用 (生育阻害) の観察と判定

被験物質による試験菌株への抗菌作用 (生育阻害) は、コロニー数の計数時にトップアガーによりプレート中に持ち込まれた微量なヒスチジンもしくはトリプトファンを利用して生育したアミノ酸要求性株 (非復帰変異株) の微細なコロニーの生育を実体顕微鏡を用い 40 倍の倍率で観察して実施した。抗菌作用 (生育阻害) の有無の判定は、被験物質が試験菌株に毒性を示す場合に、溶媒対照のプレートにおけるアミノ酸要求性株の微細なコロニーと比較して被験物質処理群の微細なコロニーの数が減少してまばらになり、その形状が大きくなることから、判定した。

8. 判定基準

判定基準は陰性対照値の 2 倍以上の復帰変異コロニー数が誘発される場合に陽性と判定則的

に、復帰変異数が用量依存的に上昇しかつ陰性対照値の 2 倍以上に復帰変異コロニー数が誘発され、再現性が得られる場合に、陽性と判定した。上記の条件が満たされない場合は陰性と判定した。

C. 研究結果

用量設定試験の結果を表-1、本試験の結果を表-2、図-1~10 に示した。

用量設定試験及び本試験を最高用量 5000 µg/プレートまで実施したが、溶媒対照値の 2 倍以上の復帰変異コロニー数の上昇はネズミチフス菌 TA98、TA100、TA1535、TA1537 及び大腸菌 WP2uvrA/pKM101 の代謝活性化による場合、及びよらない場合のいずれの場合においても認められなかった。

D. 考察

被験物質溶液の最高用量溶液について無菌試験を実施したが、被験物質溶液からの微生物汚染は認められなかった。また、ネズミチフス菌 TA98、TA100、TA1535、TA1537 及び大腸菌 WP2uvrA/pKM101 のそれぞれの試験での溶媒対照値と陽性対照値は、試験施設 (日本バイオアッセイ研究センター) のヒストリカルデータの範囲内であった。このことより試験は適切に実施されたものと判断した。以上のことより、コメヌカ油抽出物の微生物に対する復帰突然変異原性は陰性と判定した。

判定結果を以下にまとめて示した。

被験物質名	TA98		TA100		TA1535		TA1537		WP2uvrA/pKM101	
	-S9	+S9	S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
コメヌカ油抽出物	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

特になし

H. 参考資料

- 1) 厚生省生活衛生局食品化学課監修 (1996) :
食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指
針、日本食品添加物協会

- 2) Ames, B.N., J. McCann and E. Yamasaki
(1975) : Method for detecting carcinogens and
mutagens with the *Salmonella* / mammalian
microsome mutagenicity test, *Mutation Res.*,
31, 347-364.

- 3) Maron, D.M. and B.N. Ames (1983) :
Revised methods for the *Salmonella*
mutagenicity test, *Mutation Res.*, 113, 173-
215.

- 4) Matsushima, T., M. Sawamura, K. Hara
and T. Sugimura (1976) : Safe substitute for
polychlorinated biphenyls as an inducer of
metabolic activation system, In : F.J. de
Serres, J.R. Fouts, J.R. Bend and R.M. Philpot
(Eds.), "In vitro Metabolic Activation in
Mutagenesis Testing", Elsevier / North-
Holland, Amsterdam, pp. 85-88.

- 5) Matsushima, T., T. Sugimura, M. Nagao, T.
Yahagi, A. Shirai and M. Sawamura (1980) :
Factors modulating mutagenicity in microbial
tests, In : K.H. Norpoth and R.C. Garner
(Eds.), "Short-term Test Systems for Detecting
Carcinogens", Springer-Verlag, Berlin,
Heidelberg, New York, pp. 273-285.

表-1

試験結果表 (用量設定試験)

被験物質の名称: コメヌカ油抽出物

試験実施期間		2002年 1月15日より 2002年 1月18日									
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)									
		塩基対置換型						フレームシフト型			
		TA100		TA1535		WP2uvrA/pKM101		TA98		TA1537	
S9 mix (-)	陰性対照 (溶媒対照)	109	116	14	14	71	81	13	16	8	6
		96	106 (107)	16	11 (14)	85	84 (80)	20	13 (16)	9	6 (7)
	1.22	106		7		68		16		11	
		102	(104)	7	(7)	79	(74)	15	(16)	2	(7)
	4.88	96		16		89		17		6	
		113	(105)	7	(12)	92	(91)	11	(14)	7	(7)
	19.5	133		17		90		15		6	
		97	(115)	14	(16)	72	(81)	10	(13)	2	(4)
	78.1	98		8		90		14		6	
	124	(111)	6	(7)	83	(87)	18	(16)	6	(6)	
313 †	106		10		99		12		1		
	109	(108)	5	(8)	95	(97)	17	(15)	4	(3)	
1250 †	86		9		62		10		5		
	81	(84)	8	(9)	65	(64)	13	(12)	2	(4)	
5000 †	94		6		56		11		4		
	82	(88)	7	(7)	81	(69)	12	(12)	4	(4)	
S9 mix (+)	陰性対照 (溶媒対照)	101	119	14	11	123	104	24	16	5	5
		133	136 (122)	9	11 (11)	111	112 (113)	16	25 (20)	7	9 (7)
	1.22	119		9		100		23		8	
		107	(113)	10	(10)	119	(110)	28	(26)	14	(11)
	4.88	129		11		101		29		9	
		116	(123)	15	(13)	99	(100)	18	(24)	11	(10)
	19.5	141		15		104		26		6	
		127	(134)	6	(11)	131	(118)	28	(27)	8	(7)
	78.1	158		5		128		23		3	
	142	(150)	15	(10)	112	(120)	18	(21)	7	(5)	
313 †	131		6		109		25		7		
	117	(124)	10	(8)	114	(112)	19	(22)	8	(8)	
1250 †	102		8		110		18		4		
	95	(99)	6	(7)	109	(110)	22	(20)	7	(6)	
5000 †	93		9		104		13		5		
	98	(96)	8	(9)	91	(98)	18	(16)	2	(4)	
陽性対照	S9 mixを必要とするもの	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA				
	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.5	0.005	0.1	8.0					
対照	S9 mixを必要とするもの	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA				
	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	1.0	2.0	2.0	0.5	2.0					
対照	S9 mixを必要とするもの	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA				
	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	1531	209	987	447	216					
	1469	(1500)	211	(210)	899	(943)	445	(446)	204	(210)	

【備考】

- () 内には各プレートのコロニー数の平均値を記入した。
- 復帰変異数は、被験物質用量の低い順に実測値及び平均値を記入した。
- 陽性対照物質の名称 AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、NaN₃: ナトリウム・アジド、2-AA: 2-アミノアントラセン、9-AA: 9-アミノアクリジン
- 著しい沈澱が認められる場合は、その被験物質用量に†印を付した。

表-2

試験結果表 (本試験)

被験物質の名称: コメヌカ油抽出物

試験実施期間		2002年 1月22日より 2002年 1月25日									
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)									
		塩基対置換型					フレームシフト型				
		TA100		TA1535		WP2uvrA/pKM101	TA98		TA1537		
S9 mix (-)	陰性対照 (溶媒対照)	116	115	13	14	72	38	18	13	9	7
		121	106 (115)	14	20 (15)	60	77 (62)	20	21 (18)	11	10 (9)
	78.1	113		16		74		15		10	
		117 (115)	10	(13)	52	(63)	14	(15)	8	(9)	
	156	107		8		77		17		13	
		111 (109)	11	(10)	82	(80)	20	(19)	5	(9)	
	313 †	118		17		65		12		6	
		102 (110)	18	(18)	70	(68)	15	(14)	9	(8)	
	625 †	91		9		57		14		4	
	103 (97)	11	(10)	61	(59)	12	(13)	6	(5)		
1250 †	101		10		63		16		3		
	95 (98)	12	(11)	62	(63)	19	(18)	4	(4)		
2500 †	86		5		48		12		5		
	84 (85)	13	(9)	45	(47)	12	(12)	3	(4)		
5000 †	86		8		55		7		5		
	90 (88)	10	(9)	68	(62)	7	(7)	2	(4)		
S9 mix (+)	陰性対照 (溶媒対照)	117	106	18	13	109	116	26	18	7	14
		104	116 (111)	13	13 (14)	98	112 (109)	24	21 (22)	9	13 (11)
	78.1	116		9		101		21		9	
		124 (120)	14	(12)	113	(107)	22	(22)	9	(9)	
	156	141		15		87		23		6	
		128 (135)	20	(18)	107	(97)	26	(25)	8	(7)	
	313 †	128		15		126		10		8	
		130 (129)	13	(14)	124	(125)	29	(20)	10	(9)	
	625 †	101		12		84		24		8	
	118 (110)	13	(13)	96	(90)	19	(22)	7	(8)		
1250 †	133		13		78		21		7		
	116 (125)	7	(10)	92	(85)	22	(22)	6	(7)		
2500 †	94		7		65		19		8		
	107 (101)	13	(10)	70	(68)	19	(19)	7	(8)		
5000 †	80		15		67		18		5		
	78 (79)	4	(10)	75	(71)	12	(15)	4	(5)		
陽性対照	S9 mixを必要としないもの	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA				
		用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.5	0.005	0.1	80				
		コロニー数/プレート	803	454	1303	480	316				
			761 (782)	336 (395)	1193 (1248)	430 (455)	395 (356)				
対照	S9 mixを必要とするもの	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA				
		用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	1.0	2.0	2.0	0.5	2.0				
		コロニー数/プレート	1300	272	874	511	233				
			1442 (1371)	260 (266)	771 (823)	575 (543)	163 (198)				

【備考】

- () 内には各プレートのコロニー数の平均値を記入した。
- 復帰変異数は、被験物質用量の低い順に実測値及び平均値を記入した。
- 陽性対照物質の名称 AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、NaN₃: ナトリウム・アジド、2-AA: 2-アミノアントラセン、9-AA: 9-アミノアクリジン
- 著しい沈澱が認められる場合は、その被験物質用量に†印を付した。

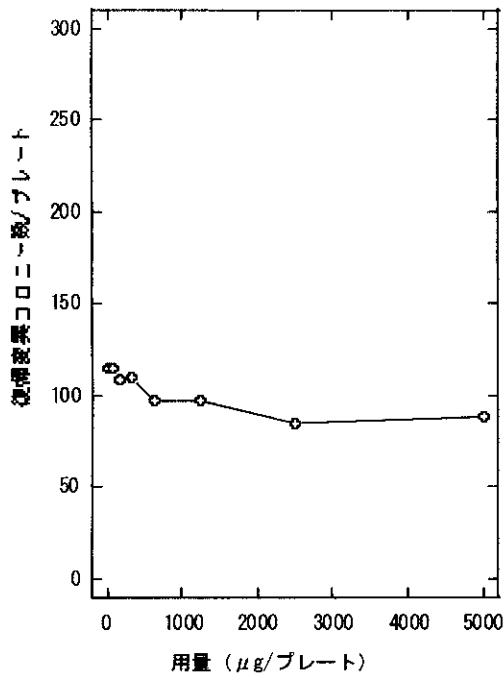


図-1 TA100 における量-反応曲線
代謝活性化法によらない場合 (本試験)

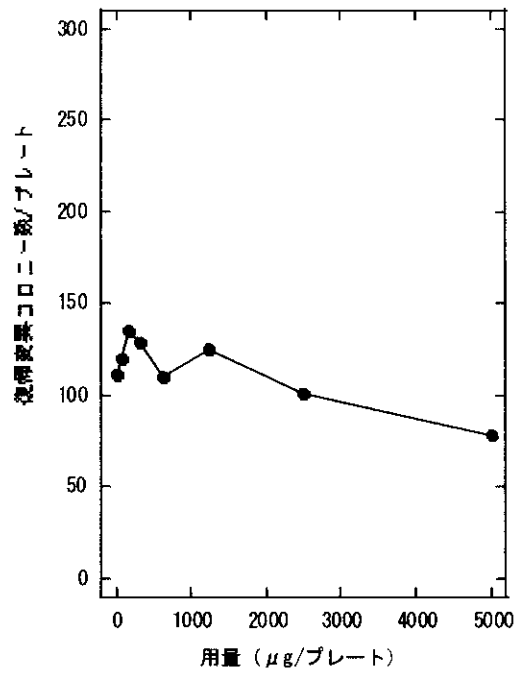


図-2 TA100 における量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)

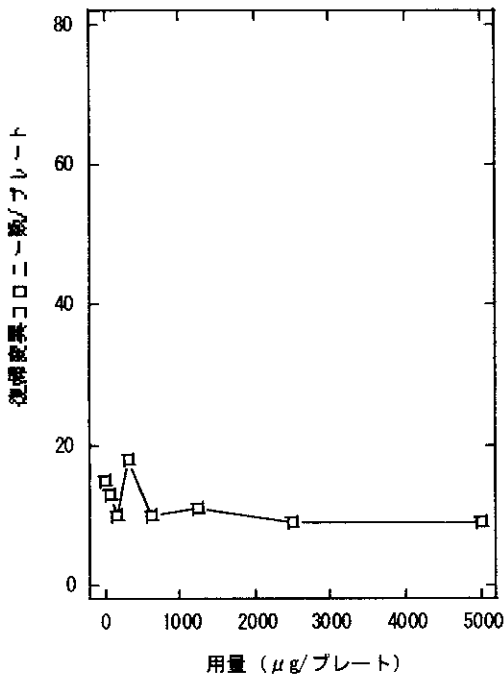


図-3 TA1535 における量-反応曲線
代謝活性化法によらない場合 (本試験)

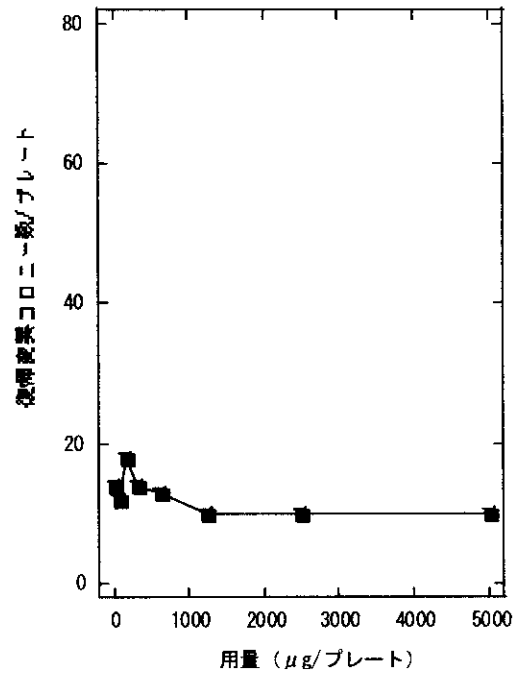


図-4 TA1535 における量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)

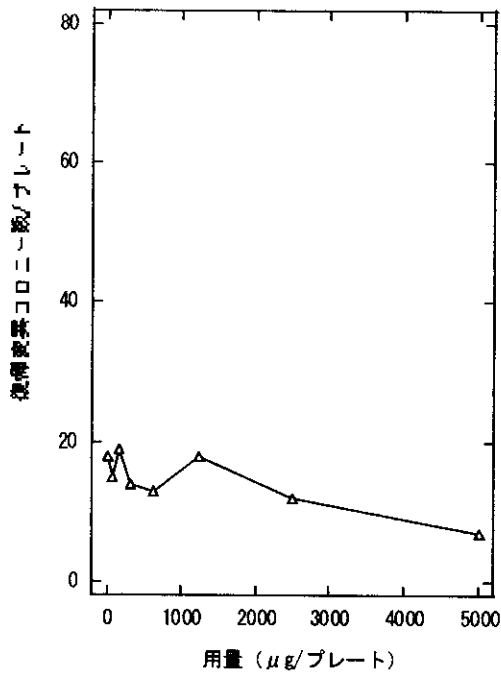


図-5 TA98 における量-反応曲線
代謝活性化法によらない場合 (本試験)

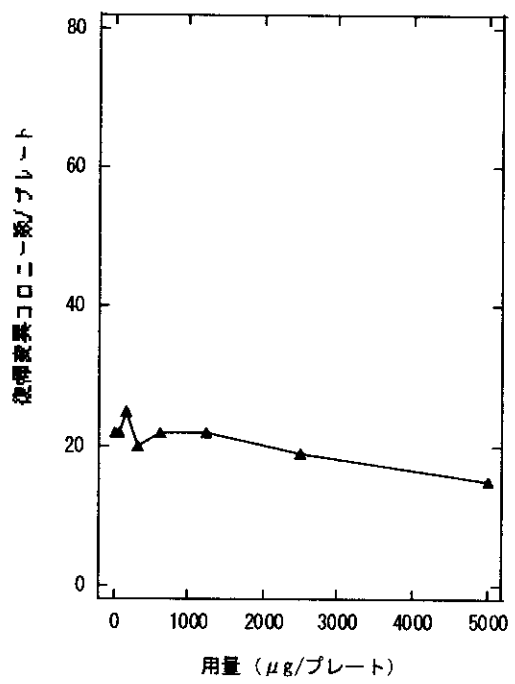


図-6 TA98 における量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)

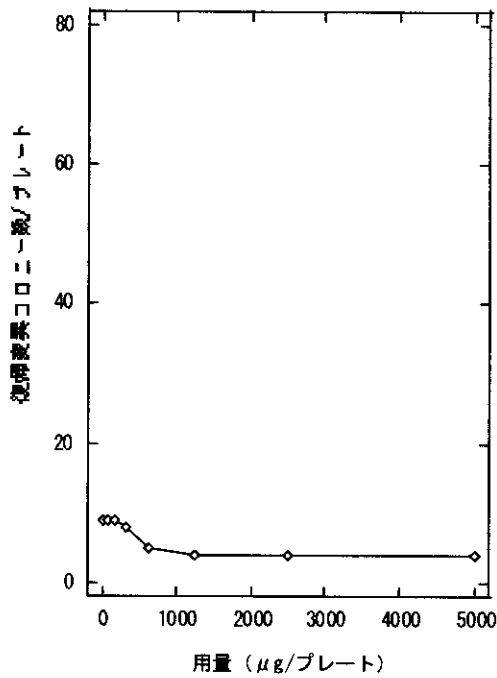


図-7 TA1537 における量-反応曲線
代謝活性化法によらない場合 (本試験)

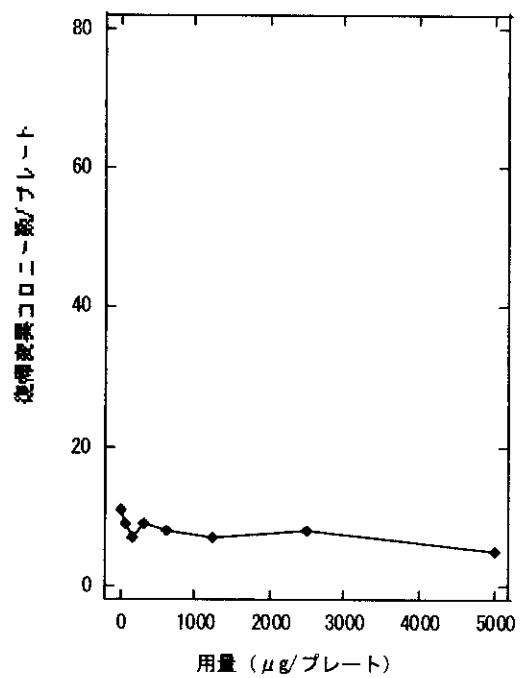


図-8 TA1537 における量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)

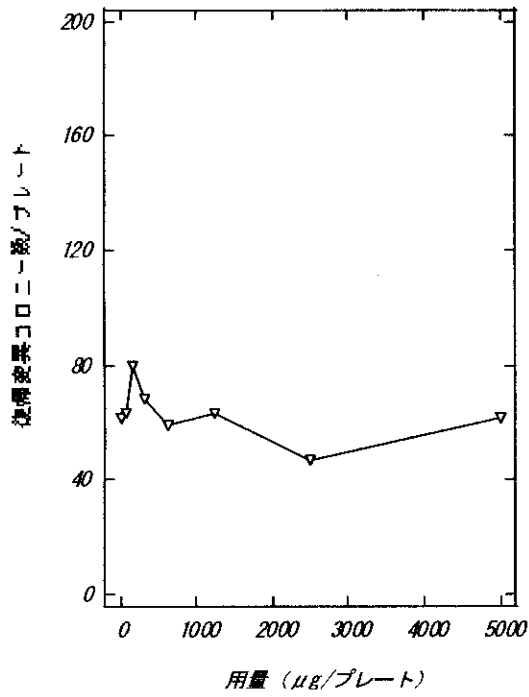


図-9 WP2vrA/pKM101 における量-反応曲線
代謝活性化法によらない場合 (本試験)

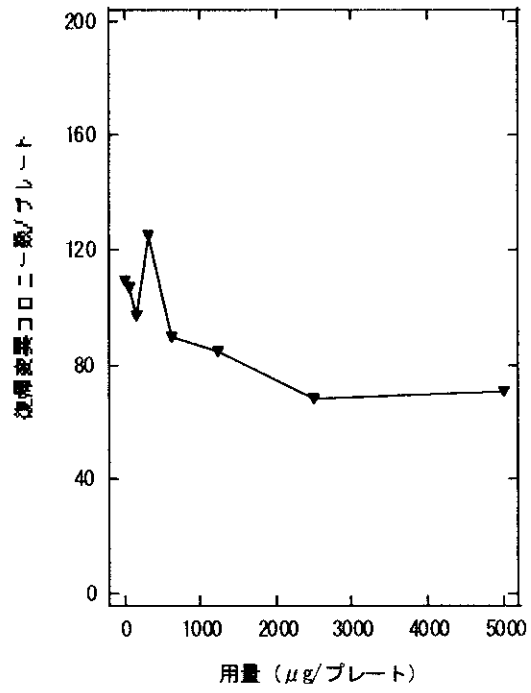


図-10 WP2vrA/pKM101 における量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)

第2章 アルカネット色素のマウス骨髄の多染性赤血球に対する小核誘発性試験

A. 研究目的

本共同研究の目的は、既存天然添加物であるアルカネット色素のマウス骨髄の多染性赤血球に対する小核誘発性の有無を検索することを目的とした。

B. 研究方法

平成8年3月22日付け、衛化第29号厚生省生活衛生局通知「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針について」の「安全性試験に関する標準的実施方法（げっ歯類を用いる小核試験）」¹⁾（以下「試験ガイドライン」という）に従い実施した。

予備試験

小核試験における最高投与用量を決定するために予備試験として、急性毒性試験を実施した。雄の8週齢CD-1(ICR)マウスに被験物質を24時間間隔で2回強制経口投与した。被験物質投与群4群（250mg/kg投与群、500mg/kg投与群、1000mg/kg投与群、2000mg/kg投与群）を設定し、各群3匹の動物を用い試験を実施した。最終投与後24時間後に動物の一般状態の観察及び体重測定を行った。

小核試験

予備試験結果より求めた最大耐量を小核試験の最高投与用量とし、公比2で3群を設定し、その他に溶媒対照群及び陽性対照群を設定し、各群5匹の動物を使用した。溶媒対照群及び被験物質投与群は24時間間隔で2回強制経口投与し、陽性対照群は単回腹腔内投与した。最終投与後24時間後に骨髄細胞の塗抹標本を作製し、多染性赤血球中の小核出現頻度及び全赤血球中の多染性赤血球の割合を求めた。

1. 被験物質

被験物質は日本食品添加物協会より配布された、アルカネット色素を用いた。被験物質の提供元とロット番号を以下に示した。

被験物質名	アルカネット色素
ロット番号	31024
純度	93.7%*
提供元	大阪化学合金株式会社

*：固形分重量（110℃、2.5時間加熱）

2. 被験物質溶液の調製

被験物質は、オリーブ油に懸濁し、調製した。なお、被験物質溶液の調製は純度換算し、投与直前に行った。

3. 陽性対照物質

陽性対照物質は、マイトマイシンC（協和醗酵株式会社）を使用し、注射用水及び生理食塩液で希釈し、0.5mg力価/10mLとした。なお、MMC溶液の調製は投与直前に行った。

4. 使用動物

動物は日本チャールス・リバー(株)(繁殖所：神奈川県厚木市下古沢795番地)より購入した。

Crj:CD-1(ICR)マウス(SPF)の雄を使用した。

マウス雄を生後7週齢で導入し、1週間の検疫・馴化を経た後、発育順調で異常を認めなかった動物(投与開始時体重範囲、予備試験 34.4～37.7g、小核試験 32.9～39.1g)を試験に供した。

5. 動物の飼育管理

動物は全飼育期間を通して、温度23±2℃（実測値：予備試験 22.8～23.4℃、小核試験 23.0

～23.4℃)、湿度55±15% (実測値: 予備試験 49～58%、小核試験 51～56%)、明暗サイクル:12時間点灯(8:00～20:00)/12時間消灯(20:00～8:00)、換気回数15～17回/時に設定した環境下で飼育した。

動物は単飼ケージ(ステンレス製二連網ケージ:112W×212D×120H mm)に収容した。

飼料は、オリエンタル酵母工業(株) (千葉工場:千葉県千葉市美浜区新港2-8)のCRF-1固型飼料(30KGy- γ 線照射滅菌飼料)を固型飼料給餌器により、自由摂取させた。飼料の栄養成分についてはオリエンタル酵母工業(株)、夾雑物については(財)日本食品分析センターの分析データを使用ロット毎に入手した。

飲水は、全飼育期間を通して、フィルターろ過した市水(秦野市水道局供給)に紫外線を照射し、自動給水装置で、自由摂取させた。飲水は(財)食品薬品安全センター秦野研究所(神奈川県秦野市落合729-5)に水道法に準拠した項目について分析を委託した。

なお、飼料の夾雑物及び飲水については、それぞれの分析項目において試験計画書に規定した範囲内であることを確認した。

6. 投与方法

被験物質溶液は、マウス用胃ゾンデを装着した1mL容量のプラスチック製ディスポーザブルシリンジを使用し、10mL/kgの投与容量で強制経口投与した。

陽性対照物質溶液は、25G注射針を装着した1mL容量のプラスチック製ディスポーザブルシリンジを使用し、10mL/kgの投与容量で腹腔内投与した。

7. 標本の作製及び観察²⁾

(1) 標本の作製

頸椎脱臼により動物を安楽死させ、できるだけ出血させないように大腿骨を取り出し、約1mLの牛胎児血清を用い、骨髓細胞を10mL容量の遠

沈管に洗い出した。1000rpmで5分間遠心し、上清を除去した後、少量の血清で細胞懸濁液を作った。細胞懸濁液を2枚のスライドガラスに塗抹し、室温で乾燥した後、メタノールで5分間固定し骨髓塗抹標本を作製した。そのうち1枚を1週間以内に染色し、染色直後に観察した。染色は蛍光染色法により行った。すなわち40 μ g/mLのアクリジン・オレンジ溶液(磷酸緩衝生理食塩液)を塗抹部に20 μ L滴下し、カバーガラスをかけ広げた。

(2) 標本の観察

1) 標本の観察

標本の観察は染色直後に行った。塗抹状態のよい領域を2ヶ所選び、それぞれの領域で多染性赤血球を1000個観察し、小核を有する細胞を計数し、また全赤血球(多染性赤血球及び正染性赤血球)500個を観察し、その内の多染性赤血球を計数した。

なお、標本の観察は盲検法で行い、顕微鏡はブルー励起フィルターを使用した蛍光顕微鏡を用い、正染性赤血球の観察の場合、正染性赤血球の像が判別できる程度の透過光を照射し、観察倍率は500倍で観察した。

2) 多染性赤血球と正染性赤血球の識別

赤い蛍光を発する無核細胞を多染性赤血球とし、蛍光を発しない無核細胞を正染性赤血球とした。

3) 小核の識別

大きさ: 上限は正染性赤血球の直径の1/2で、下限は識別できる範囲とした。

形態: 円形が主であるが、その他に楕円、三日月、ドーナツ、半円形などの形態をとる。

色調: 近接する有核細胞の核と同一であること。

輪郭: 小核は核膜を持っているので輪郭ははっきりしていること。

フォーカス: 小核と思われる顆粒が細胞内にあることをフォーカスを上下させて確認した。

8. 試験に用いた統計学的手法及び判定

溶媒対照群に対する被験物質投与群の小核出現頻度は有意水準1%のKastenbaumらの方法³⁾を、用量依存性の判定は有意水準5%のCochran-Armitageの傾向検定法⁴⁾を用いた。

Kastenbaumらの方法で有意な増加が認められ、かつCochran-Armitageの傾向検定法で有意な用量依存性が認められた場合、小核の誘発性を陽性とした。

C. 研究結果

1. 予備試験

雄の8週齢CD-1(ICR)マウスに被験物質を24時間間隔で2回強制経口投与した。予備試験の結果を表-1に示した。

被験物質投与群4群(250mg/kg投与群、500mg/kg投与群、1000mg/kg投与群、2000mg/kg投与群)を設定し、各群3匹の動物を用い試験を実施したが、最終投与後24時間までに死亡した動物は見られず、臨床症状についても異常は見られなかった。

予備試験の結果より、使用動物に対する最大耐量は2000mg/kg以上であった。従って、小核試験の最高投与用量は2000mg/kgに設定した。

2. 小核試験

被験物質投与群3群(500mg/kg投与群、1000mg/kg投与群、2000mg/kg投与群)を設定し、その他に溶媒対照群及び陽性対照群を設定し、各群5匹の動物を使用した。溶媒対照群及び被験物質投与群は24時間間隔で2回強制経口投与し、陽性対照群は単回腹腔内投与した。最終投与後24時間後に骨髓細胞の塗抹標本作製し、多染性赤血球中の小核出現頻度及び全赤血球中の多染性赤血球の割合を求めた。小核試験結果を表-2、3及び図-1に示した。

骨髓の多染性赤血球に対する小核誘発率は溶媒対照群の場合 $0.11 \pm 0.08\%$ (平均 \pm SD)、陽

性対照群(MMC 0.5mg力価/kg)の場合 $1.15 \pm 0.14\%$ であった。当センターの雄8週齢CD-1(ICR)マウスにおけるバックグランドデータは陰性対照の場合 $0.15 \pm 0.13\%$ (N=165)、また、陽性対照(MMC 0.5mg力価/kg)の場合 $1.68 \pm 0.65\%$ (N=49)であり、本試験の結果はバックグランドデータの平均 \pm SDの範囲(陰性対照:0.03%から0.19%、陽性対照:1.01%から1.29%)内であった。

被験物質投与群の小核誘発率は、500mg/kg投与群の場合 $0.11 \pm 0.07\%$ 、1000mg/kg投与群の場合 $0.10 \pm 0.05\%$ 、2000mg/kg投与群の場合 $0.12 \pm 0.08\%$ であった。有意水準1%のKastenbaumらの方法により被験物質投与群を溶媒対照群と比較したが、小核誘発率の有意な増加を示す投与群は認められなかった。また、有意水準5%のCochran-Armitageの傾向検定法による投与量に対応した有意な増加傾向も認められなかった。全赤血球に対する多染性赤血球の割合の変化は認められなかった。

以上より、本被験物質のマウス骨髓に対する小核誘発性は陰性と判定した。

D. 考 察

被験物質の最高投与用量2000mg/kgは試験ガイドラインで規定されている最高投与用量であり、十分に高い用量まで実施されていた。また、骨髓の多染性赤血球に対する溶媒対照群の小核誘発率は当センターにおけるバックグランドデータの範囲内で、MMC 0.5mg力価/kgの陽性対照群の小核誘発率は有意に増加し、当センターにおけるバックグランドデータの範囲内であり、試験は適正に実施されていた。被験物質の投与群における小核誘発率を溶媒対照群と比較した結果、有意な増加を示す投与群は認められず、また、投与量に対応した小核誘発率の増加傾向も認められなかった。

以上より、本試験条件下では被験物質のマウスに対する骨髓多染性赤血球の小核誘発性は無い

ものと判定した。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

特になし

G. 参考資料

- 1) 厚生省生活衛生局食品化学課監修（1996）：
食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針、日本食品添加物協会
- 2) 林 真（1991），小核試験，サイエンティスト社
- 3) Kastenbaum, M. A. and K. O. Bowman (1970)
Tables for determining the statistical significance of
mutation frequencies. Mutation Res., 9, 527-549.
- 4) 吉村 功編（1987），毒性・薬効データの統計解析 - 事例研究によるアプローチ - ，サイエンティスト社

表1. 被験物質についての2回投与による50%致死量 (LD₅₀²)

被験物質	1回あたりの投与量 (mg/kg)	投与回数	生存数/投与数 (2日間)	推定LD ₅₀ ²
アルカネット色素	250	×2	3/3	>2000mg/kg
	500	×2	3/3	
	1000	×2	3/3	
	2000	×2	3/3	

表-2 小核試験結果 (個体別表)

STUDY No. : 7025
 検体名 : アルカネット色素
 機関名 : 日本バイオアッセイ研究センター
 動物 : マウス/Crj: (CD-1)ICR /雄/8週齢(投与開始時)
 備考 : 強制経口投与、LD₅₀>2000mg/kg(24時間間隔、2回投与)

mg/kg/day	SCHEDULE	MOUSE	MNPCE : %	PCE/(PCE+NCE): %	BW : g	CODE
0mg/kg Vehicle (Olive oil)	×2, 24hr	7025- 1001	0.05	42.3	36.1	7025- 12
		7025- 1002	0.25	42.5	32.9	7025- 16
		7025- 1003	0.10	40.2	36.7	7025- 2
		7025- 1004	0.05	43.2	35.4	7025- 6
		7025- 1005	0.10	44.0	37.3	7025- 25
		Mean	0.11	42.4	35.7	
	Std	0.08	1.4	1.7		
	Min	0.05	40.2	32.9		
	Max	0.25	44.0	37.3		
	Total No.	11				
	500mg/kg	×2, 24hr	7025- 1101	0.15	45.8	35.6
7025- 1102			0.05	48.1	36.3	7025- 22
7025- 1103			0.10	40.9	33.6	7025- 13
7025- 1104			0.20	43.0	38.6	7025- 14
7025- 1105			0.05	45.8	34.8	7025- 23
Mean			0.11	44.7	35.8	
Std		0.07	2.8	1.9	S ^K	
Min		0.05	40.9	33.6		
Max		0.20	48.1	38.6	判定	
Total No.		11			-	
1000mg/kg		×2, 24hr	7025- 1201	0.10	44.9	33.2
	7025- 1202		0.05	41.5	35.7	7025- 19
	7025- 1203		0.15	48.3	34.8	7025- 1
	7025- 1204		0.15	44.9	36.4	7025- 24
	7025- 1205		0.05	49.5	38.4	7025- 17
	Mean		0.10	45.8	35.7	
	Std	0.05	3.2	1.9	S ^K	
	Min	0.05	41.5	33.2		
	Max	0.15	49.5	38.4	判定	
	Total No.	10			-	
	2000mg/kg	×2, 24hr	7025- 1301	0.05	43.2	34.8
7025- 1302			0.05	39.7	35.9	7025- 5
7025- 1303			0.20	43.0	34.3	7025- 4
7025- 1304			0.20	38.1	37.1	7025- 20
7025- 1305			0.10	46.9	37.1	7025- 7
Mean			0.12	42.2	35.8	
Std		0.08	3.4	1.3	S ^K	
Min		0.05	38.1	34.3		
Max		0.20	46.9	37.1	判定	
Total No.		12			-	
MMC 0.5mg力価/kg		×1, 24hr	7025- 1401	1.25	45.8	36.2
	7025- 1402		1.25	35.5	35.5	7025- 3
	7025- 1403		0.95	33.4	33.9	7025- 15
	7025- 1404		1.05	44.3	34.5	7025- 11
	7025- 1405		1.25	38.1	39.1	7025- 21
	Mean		1.15	39.4	35.8	
	Std	0.14	5.4	2.0	S ^K	
	Min	0.95	33.4	33.9		
	Max	1.25	45.8	39.1	判定	
	Total No.	115			+	

B.W.: Body weight at the 1st day of dosing.

MNPCE: Frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes.

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

S^K: Kastenbaum-Bowmanの教表による検定