

表一3 小核試験結果 (総括表)

被験物質	投与量 mg/kg/day	投与回数	投与間隔	サンプリング 時間 <sup>a)</sup>	動物 数	多染性赤血球頻度			多染性赤血球			
						%	SD	(Min / Max)	観察 数	検定 <sup>b)</sup> %	SD	(Min / Max)
アルカナネト色素 (Olive oil)	0	×2	24h	24	5	35.7 ± 1.7	(32.9 / 37.3)	10000	4244	—	42.44 ± 1.42	(40.20 / 44.00)
	500	×2	24h	24	5	35.8 ± 1.9	(33.6 / 38.6)	10000	4472	N.S.	44.72 ± 2.80	(40.90 / 48.10)
	1000	×2	24h	24	5	35.7 ± 1.9	(33.2 / 38.4)	10000	4582	N.S.	45.82 ± 3.16	(41.50 / 49.50)
	2000	×2	24h	24	5	35.8 ± 1.3	(34.3 / 37.1)	10000	4218	N.S.	42.18 ± 3.42	(38.10 / 46.90)
MMC	0.5	×1		24	5	35.8 ± 2.0	(33.9 / 39.1)	10000	3942	**	39.42 ± 5.43	(33.40 / 45.80)

a) : 最終投与後のサンプリング時間

b) : Kastenbaum-Bowmanの数表による検定 (p<0.01, \*\*)

MMC : Mitomycin C

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

分担研究者 安心院 祥三（財団法人化学物質評価研究機構・日田事業所）  
協力研究者 小椋 正造（財団法人化学物質評価研究機構・日田事業所）  
若松 伸哉（財団法人化学物質評価研究機構・日田事業所）  
川口 潤子（財団法人化学物質評価研究機構・日田事業所）  
梶原 昭彦（財団法人化学物質評価研究機構・日田事業所）

研究要旨

流通している天然添加物のうち489品目については、安全性試験データや国際的な評価等が行われている。しかし、アマシードガム(増粘安定剤)、アルカネット色素(着色料)及びカワラタケ抽出物(苦味料)等の23品目の天然添加物については、変異原性試験データを含め、安全性試験データがないまま使用されている。そこで今回安全性の知見が得られていない天然添加物について、*in vivo*試験を中心に変異原性試験を実施し、既存天然添加物についての基本的な安全性について検討した。

当所では、苦味料等のヒメマツタケ抽出物、ガムベースのホホバロウおよびマスチックの3物質を”微生物を用いる復帰突然変異試験(Ames試験)”で実施し、増粘安定剤のアウレオバシジウム培養液及びガムベースのコパール樹脂の2物質を”マウスを用いる*in vivo*小核試験(MN試験)”で実施した。その結果、ヒメマツタケ抽出物、ホホバロウおよびマスチックは実施した試験条件下では突然変異を誘発せず、アウレオバシジウム培養液及びコパール樹脂は骨髄細胞に小核を誘発しないことが明らかになった。

キーワード：遺伝毒性試験、Ames試験、*in vivo*小核試験、ヒメマツタケ抽出物、ホホバロウ、マスチック、アウレオバシジウム培養液、コパール樹脂

A. 研究目的

本共同研究の目的は、流通している天然添加物のうち現在までに安全性の評価が確定していない物質について、変異原性を検討し遺伝毒性による安全性を評価すること目的とした。

B. 研究方法

当所では、安全性の評価がされていない天然添加物のうち苦味料等のヒメマツタケ抽出物、ガムベースのホホバロウおよびマスチックの3物質(表1)については”Ames試験”、増粘安定剤のアウレオバシジウム培養液及びガムベースの

コパール樹脂の2物質(表1)についてはMN試験を実施することで、それぞれの遺伝毒性を評価した。各試験とも表2に示す陽性対照物質を用いた。

表1 被験物質

被験物質名	用途	提供源
ヒメマツタケ抽出物	苦味料等	(株)岩出菌学研究所
ホホバロウ	ガムベース	日本食品添加協会
マスチック	ガムベース	(株)ロッテ
アウレオバシジウム培養液	増粘安定剤	(株)ソフィ
コパール樹脂	ガムベース	日本シエラック工業(株)

表2 陽性対照物質

試験	化合物名	製造元
Ames試験	AF-2	和光純薬工業(株)
	7β 化ナトリウム (NaN <sub>3</sub> )	和光純薬工業(株)
	ICR-191	Polysciences, Inc.
	2-アミノアノリン(2AA)	和光純薬工業(株)
MN試験	マイトマイシンC(MMC)	協和発酵工業(株)

AF-2: -(2-フリル)-3-(5-エトキシ-フリル)アクリルアミド

ICR-191: 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノプロピルアミド]アクリジン・2HCL

## 1. Ames試験

### 1) 試験材料

*Salmonella typhimurium* (ネズミチフス菌) TA100、TA1535、TA98及びTA1537と *Escherichia coli* (大腸菌) WP2 *uvrA*を用いた。プレートには最小グルコース寒天平板培地(テスメディア AN、ロット番号: ANI700JQ オリエンタル酵母工業(株))を、軟寒天には寒天(Bacto Agar、ロット番号0130004、Difco Laboratories) 0.6 w/v%及び塩化ナトリウム0.5 w/v%を含む溶液に、ネズミチフス菌にはヒスチジン0.5 mM及びビオチン0.5 mMの溶液を、大腸菌にはトリプトファン0.5 mM溶液を容量比10:1で混合して用いた。

S9 mixは、S9mix用cofactor(オリエンタル酵母工業(株))に、Phenobarbital及び5,6-benzoflavoneを投与したラットの肝臓より調製したS9(オリエンタル酵母工業(株))を10v/v%添加した。

### 2) 試験方法

S9 mix存在下及び非存在下でプレインキュベーション法により実施した。

ヒメマツタケ抽出物は注射用蒸留水(ロット番号K0J72、(株)大塚製薬工場)に溶解させ、ホホバロウおよびマスチックは特級アセトン(ロット番号DWP7546、和光純薬工業(株))に溶解あるいは懸濁させた。

0.05 mLの被験物質又は0.1 mLの陽性対照物質の調製液、0.5 mLの0.1 Mナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)又はS9 mix、0.1 mLの菌培養液を試験管に加えて37±0.5°Cで20分間振とうした後、

軟寒天2 mLを入れ混合したものをプレートに重層した。

被験物質および陽性対照の用量は、表3~8に示した用量を設定した。37±0.5°Cで48時間培養した後、出現した復帰変異コロニー数を計数した。同時に被験物質の沈殿の有無を肉眼で観察し、生育阻害の有無を実体顕微鏡で観察した。陰性対照には3枚のプレートを用い、陽性対照及び被験物質処理群には2枚のプレートを用いた。

また、用量設定試験および本試験を実施し、試験結果の再現性を確認した。

### 3) 結果の判定基準

復帰変異コロニー数が用量に依存して陰性対照の2倍以上に増加し、しかも再現性が認められた場合を陽性とし、それ以外の場合を陰性とした。統計学的処理は行わなかった。

## 2. MN試験

### 1) 使用動物および飼育環境

予備試験では6週齢、本試験では5週齢のCrj: CD-1 (ICR) SPF雄マウス(日本チャールス・リバー株式会社)を購入し、予備試験及び本試験ともに8日間の検疫、本試験では7日間の馴化を行った後、順調に発育した一般状態の良好な動物を、体重層別無作為抽出法で群分けし、予備試験では1用量当り3匹、本試験では1用量当り5匹を使用した。動物はピクリン酸飽和エタノール溶液で識別した。

動物は温度23±2°C、相対湿度55±10%、換気回数10~15回/時間、明暗サイクル12時間間隔(7時点灯-19時消灯)に設定したバリアーシステムの飼育室内で、床敷(サンフレイク、日本チャールス・リバー株式会社)を入れたポリカーボネート製ケージ(265 W×426 D×150 H mm)で飼育した。飼料は固型飼料(MF、オリエンタル酵母工業株式会社)を、飲料水は日田市上水道水をそれぞれ自由に摂取させた。

### 2) 試験方法

アウレオバシジウム培養液は、注射用生理食塩水(ロット番号K1D93、(株)株式会社大塚製薬工

場)に溶解させ、コーパル樹脂は、0.5w/v%メチルセルロース(ロット番号ELP3767、和光純薬工業(株))に懸濁させた。

被験物質および媒体を、ディスポーザブルマウス胃ゾンデを付けたディスポーザブルシリンジを用い、ヒトへの曝露経路である強制経口投与した。投与は20 mL/kgで24時間間隔の2回連続投与した。小核試験での被験物質の投与用量は、被験物質の毒性を調べるために実施した予備試験の結果を基に設定した。陽性対照物質は、ディスポーザブル注射針を付けたディスポーザブルシリンジを用い、2 mg/kgで単回腹腔内投与(10 mL/kg)した。最終投与1日後まで一般状態観察および体重測定した。

最終投与24時間後に動物を頸椎脱臼により安楽死させた後、大腿骨を摘出し、牛胎仔血清で遠沈管に骨髓細胞を洗い出した。1,000 rpm(185×g)で5分間遠心分離し、細胞沈渣をスライドガラス上に塗抹・風乾させた後、メタノールで固定した。3%ギムザ溶液(ゼーレンゼン緩衝液、pH6.8)で染色し、0.004%クエン酸溶液で分染した。1個体につき、2枚の標本作製した。すべてコード化し1個体につき2,000個(1標本当たり1,000個)の多染色赤血球(polychromatic erythrocyte: PCE)を観察し、小核を有する多染色赤血球(micronucleated polychromatic erythrocyte: MNPCE)の出現頻度(MNPCE/PCE)を求めた。また、1個体につき1,000個(1標本当たり500個)の全赤血球(TE)を観察し、PCEの占める割合(PCE/TE)を求め骨髓細胞の増殖抑制の指標とした。

### 3) 結果の判定基準

条件付二項検定(Kastenbaum and Bowman)により、陰性対照群と被験物質投与群及び陽性対照群との間で、上側5%及び1%水準での有意差検定を行った。被験物質投与群のMNPCE/PCEが、陰性対照と比べ有意に増加し、かつ、その増加に用量依存性あるいは再現性がみられた場合を陽性とした。

PCE/TEはt検定により、陰性対照群と被験物質

投与群及び陽性対照群との間で、両側5%及び1%水準での有意差検定を行った。

## C. 研究結果

### 1. Ames試験

#### 1) ヒメマツタケ抽出物

用量設定試験結果を表3に、本試験結果を表4に示す。

用量設定試験および本試験ともいずれの試験菌株においても、被験物質のすべての用量での復帰変異コロニー数は、各陰性対照の2倍未満を示し、ヒメマツタケ抽出物により突然変異は増加しないと評価された。

従って、本試験条件下においてヒメマツタケ抽出物は突然変異誘発能を有さないものと判断された。

生育阻害及び被験物質の沈殿はいずれも菌株のすべての用量において認められなかった。

#### 2) ホホバロウ

用量設定試験結果を表5に、本試験結果を表6に示す。

用量設定試験および本試験ともいずれの試験菌株においても、被験物質のすべての用量での復帰変異コロニー数は、各陰性対照の2倍未満を示し、ホホバロウにより突然変異は増加しないと評価された。

従って、本試験条件下においてホホバロウは突然変異誘発能を有さないものと判断された。

生育阻害はいずれも菌株のすべての用量において認められなかったが、S9 mix非存在下では78.1 µg/plate以上で、S9 mix存在下では313 µg/plate以上で被験物質の沈殿が観察された。

#### 3) マスチック

1回目の用量設定試験で、S9 mix非存在下のTA100、TA1535およびTA1537で生育阻害が認められ、生育阻害を示さない用量が4用量以上確保できなかったため、これらの菌株については、2回目の用量設定試験を実施した。1回目の用量設定試験結果を表7に、2回目の用量設定試験結果を表8に、本試験結果を表9に示す。

用量設定試験および本試験ともいずれの試験菌株においても、被験物質のすべての用量での復帰変異コロニー数は、各陰性対照の2倍未満を示し、マスチックにより突然変異は増加しないと評価された。

従って、本試験条件下においてマスチックは突然変異誘発能を有さないものと判断された。

生育阻害はS9 mix非存在下のTA100およびTA1535では19.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上、TA1537では78.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上で観察された。被験物質の沈殿はいずれも菌株ともS9の有無に関わらず313  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上で観察された。

## 2. MN試験

### 1) アウレオバシジウム培養液

小核試験の用量には、毒性を調べた予備試験において、設定したすべての用量(最高用量は投与可能な最大量の420 mg/kg/day)においても、毒性徴候を示さなかったことから(表10)、420 mg/kg/dayを最高用量とし、公比2で除した210及び105 mg/kg/dayの計3用量を設定した。

アウレオバシジウム培養液の105、210及び420 mg/kg/dayにおけるMNPCE/PCEは、0.09、0.15及び0.15%を示し、陰性対照群(0.14%)との間に5%水準で統計学的な有意差はみられずアウレオバシジウム培養液投与によりMNPCE/PCEは増加しなかったと評価された。陽性対照ではMMC投与により、1%水準で陰性対照と比較し有意な増加がみられた。一方、PCE/TEはアウレオバシジウム培養液の105、210及び420 mg/kg/dayでは、51.1、58.6及び54.3%を示し、いずれの用量でも、陰性対照(50.0%)との間に5%水準で有意差はみられなかった。陽性対照では、1%水準で有意差がみられた(表11、12)。

したがって、本試験条件下においてアウレオバシジウム培養液は小核誘発能を有さないものと判断された。

### 2) コーパール樹脂

小核試験の用量には、毒性を調べた予備試験において、設定したすべての用量(最高用量は

2,000 mg/kg/day)においても、毒性徴候を示さなかったことから(表13)、2,000 mg/kg/dayを最高用量とし、公比2で除した1,000及び500 mg/kg/dayの計3用量を設定した。

コーパール樹脂の500、1,000及び2,000 mg/kg/dayにおけるMNPCE/PCEは、0.17、0.15及び0.14%を示し、陰性対照群(0.10%)との間に5%水準で統計学的な有意差はみられずコーパール樹脂投与によりMNPCE/PCEは増加しなかったと評価された。陽性対照ではMMC投与により、1%水準で陰性対照と比較し有意な増加がみられた。一方、PCE/TEはコーパール樹脂の500、1,000及び2,000 mg/kg/dayでは、61.8、60.0及び56.4%を示し、いずれの用量でも、陰性対照(57.4%)との間に5%水準で有意差はみられなかった。陽性対照では、1%水準で有意差がみられた(表14、15)。

したがって、本試験条件下においてコーパール樹脂は小核誘発能を有さないものと判断された。

## D. 考 察

苦味料等のヒメマツタケ抽出物、ガムベースのホホバロウおよびマスチックの3物質を”微生物を用いる復帰突然変異試験(Ames試験)”で実施し、増粘安定剤のアウレオバシジウム培養液及びガムベースのコパール樹脂の2物質を”マウスを用いるin vivo小核試験(MN試験)”で実施した結果、ヒメマツタケ抽出物、ホホバロウおよびマスチックは実施した試験条件下では突然変異を誘発せず、アウレオバシジウム培養液及びコパール樹脂は骨髓細胞に小核を誘発しないことが明らかになった。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

表3 ヒメマツタケ抽出物の Ames 試験の用量設定試験結果

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		
		TA 100	TA 1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA 98	TA 1537	
-S9 mix	陰性対照	132	7	29	22	7	
		110 (120)	7 (8)	35 (31)	22 (22)	6 (7)	
		118	9	29	21	8	
	4.88	103 (113)	5 (8)	23 (25)	17 (18)	4 (6)	
		123	10	27	18	7	
	19.5	122 (127)	6 (5)	26 (25)	21 (20)	6 (6)	
		132	4	24	19	6	
78.1	130 (128)	10 (10)	29 (25)	17 (19)	7 (6)		
	126	10	21	20	4		
313	134 (128)	8 (8)	21 (20)	20 (18)	5 (7)		
	121	7	19	16	8		
1250	104 (109)	5 (6)	35 (27)	20 (19)	7 (8)		
	113	7	19	17	9		
5000	103 (115)	8 (8)	18 (18)	18 (19)	5 (6)		
	127	7	18	20	7		
+S9 mix	陰性対照	137	5	19	23	24	
		125 (128)	7 (8)	26 (22)	26 (28)	13 (17)	
		122	11	22	36	14	
	4.88	139 (127)	8 (8)	21 (19)	31 (27)	11 (12)	
		115	8	17	22	12	
	19.5	111 (118)	9 (7)	19 (24)	34 (27)	15 (15)	
		124	5	28	19	14	
78.1	143 (131)	10 (10)	28 (24)	31 (26)	12 (13)		
	119	9	19	20	13		
313	133 (141)	8 (7)	32 (26)	28 (25)	17 (15)		
	148	6	20	22	12		
1250	127 (136)	16 (11)	21 (20)	23 (25)	20 (20)		
	145	6	18	26	19		
5000	130 (136)	5 (10)	22 (25)	27 (33)	18 (17)		
	141	14	27	39	15		
陽性対照	S9 mix を必要としないもの	名称	AF-2	$\text{NaN}_3$	AF-2	AF-2	ICR-191
		用量 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	0.01	0.5	0.01	0.1	0.5
		コロニー数/ プレート	318 (322)	324 (340)	122 (126)	369 (376)	210 (207)
	S9 mix を必要とするもの	名称	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
		用量 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	1	2	10	0.5	2
		コロニー数/ プレート	773 (726)	174 (182)	571 (593)	453 (446)	302 (305)

[備考] ・( ): 各プレートのコロニー数の平均値。  
 ・AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド  
 ・ $\text{NaN}_3$ : アジ化ナトリウム  
 ・ICR-191: 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl  
 ・2AA: 2-アミノアントラセン

表4 ヒメマツタケ抽出物の Ames 試験の本試験結果

代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ( $\mu\text{g}$ /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	
		TA 100	TA 1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA 98	TA 1537
-S9 mix	陰性対照	108 107 (109) 112	14 7 (9) 6	37 22 (32) 38	30 20 (24) 23	7 8 (8) 8
	313	121 117 (119)	12 10 (11)	31 22 (27)	20 23 (22)	5 6 (6)
	625	124 90 (107)	7 11 (9)	26 31 (29)	17 17 (17)	3 4 (4)
	1250	108 102 (105)	9 5 (7)	27 28 (28)	19 30 (25)	7 8 (8)
	2500	96 116 (106)	9 12 (11)	24 24 (24)	20 15 (18)	8 10 (9)
	5000	115 112 (114)	12 7 (10)	23 27 (25)	20 21 (21)	8 8 (8)
+S9 mix	陰性対照	106 126 (115) 113	7 9 (8) 8	32 38 (34) 33	24 25 (28) 35	21 15 (18) 17
	313	114 106 (110)	15 7 (11)	38 24 (31)	36 28 (32)	28 18 (23)
	625	116 132 (124)	9 7 (8)	28 26 (27)	24 27 (26)	25 23 (24)
	1250	119 95 (107)	9 6 (8)	24 33 (29)	34 25 (30)	16 22 (19)
	2500	115 113 (114)	12 6 (9)	26 26 (26)	36 38 (37)	11 18 (15)
	5000	120 133 (127)	12 11 (12)	23 27 (25)	33 24 (29)	24 16 (20)
陽性対照	名称	AF-2	$\text{NaN}_3$	AF-2	AF-2	ICR-191
	用量 ( $\mu\text{g}$ /プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	0.5
	コロニー数/ プレート	286 290 (288)	290 313 (302)	152 136 (144)	370 364 (367)	173 207 (190)
	名称	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
	用量 ( $\mu\text{g}$ /プレート)	1	2	10	0.5	2
	コロニー数/ プレート	509 491 (500)	145 140 (143)	724 716 (720)	257 292 (275)	300 304 (302)

[備考] ・( ): 各プレートのコロニー数の平均値。

・AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

・ $\text{NaN}_3$ : アジ化ナトリウム

・ICR-191: 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl

・2AA: 2-アミノアントラセン

表5 ホホバロウの Ames 試験の用量設定試験結果

代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/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		
		TA 100	TA 1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA 98	TA 1537	
-S9 mix	陰性対照	129	8	21	24	8	
		124 (119)	6 (7)	29 (24)	21 (21)	5 (8)	
		104	8	22	19	10	
	4.88	136 (131)	11 (9)	24 (24)	18 (23)	6 (6)	
		125	7	23	28	6	
	19.5	107 (111)	7 (8)	18 (18)	22 (22)	8 (6)	
		115	8	17	22	3	
+78.1	150 (141)	4 (7)	23 (25)	19 (23)	11 (10)		
	131	9	26	26	9		
+313	144 (129)	8 (8)	31 (28)	25 (22)	10 (9)		
	113	8	25	19	7		
+1250	133 (125)	9 (9)	21 (22)	21 (20)	9 (8)		
	116	9	23	19	7		
+5000	120 (127)	9 (6)	32 (32)	16 (17)	10 (8)		
	133	2	32	18	6		
+S9 mix	陰性対照	136	9	23	27	17	
		108 (123)	10 (9)	24 (26)	34 (29)	17 (16)	
		124	8	31	25	15	
	4.88	119 (118)	7 (7)	34 (34)	21 (22)	19 (18)	
		117	7	33	23	17	
	19.5	140 (141)	7 (5)	24 (24)	28 (28)	19 (17)	
		141	3	24	27	14	
78.1	146 (138)	6 (7)	23 (25)	27 (24)	14 (17)		
	129	8	27	21	20		
+313	147 (137)	8 (8)	32 (36)	31 (29)	13 (19)		
	126	8	39	27	24		
+1250	167 (149)	13 (12)	29 (29)	24 (26)	15 (15)		
	130	11	29	27	15		
+5000	148 (150)	4 (7)	34 (28)	34 (32)	8 (10)		
	151	10	22	29	11		
陽性対照	S9 mix を必要としないもの	名称	AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2	ICR-191
		用量 (μg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	0.5
		コロニー数/プレート	318 (322)	324 (340)	122 (126)	369 (376)	210 (207)
	S9 mix を必要とするもの	名称	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
		用量 (μg/プレート)	1	2	10	0.5	2
		コロニー数/プレート	773 (726)	174 (182)	571 (593)	453 (446)	302 (305)

[備考] ・( ): 各プレートのコロニー数の平均値。  
 ・+: プレート上に沈殿が認められた。  
 ・AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド  
 ・NaN<sub>3</sub>: アジ化ナトリウム  
 ・ICR-191: 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl  
 ・2AA: 2-アミノアントラセン



表6 ホホバロウの Ames 試験の本試験結果

代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (µg/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		
		TA 100	TA 1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA 98	TA 1537	
-S9 mix	陰性対照	116	11	26	19	10	
		114 (111)	8 (9)	34 (28)	31 (23)	9 (9)	
		104	8	25	19	7	
	+156	130 (133)	11 (12)	28 (30)	26 (27)	14 (14)	
		136	12	31	28	13	
	+313	127 (120)	9 (9)	25 (25)	25 (24)	8 (7)	
		113	8	25	22	5	
+625	125 (131)	7 (8)	29 (32)	21 (23)	9 (12)		
	137	8	34	25	14		
+1250	131 (136)	5 (7)	25 (30)	22 (24)	10 (10)		
	140	9	35	25	9		
+2500	134 (135)	11 (9)	41 (35)	20 (25)	11 (8)		
	135	7	29	29	5		
+5000	119 (125)	10 (10)	32 (36)	27 (21)	13 (10)		
	131	10	39	14	7		
+S9 mix	陰性対照	116	11	25	45	17	
		125 (120)	10 (9)	30 (30)	29 (35)	18 (22)	
		119	7	34	31	30	
	156	127 (124)	11 (10)	38 (31)	42 (35)	21 (25)	
		121	8	23	27	29	
	+313	140 (138)	6 (9)	30 (31)	36 (42)	20 (20)	
		135	12	31	47	20	
+625	144 (142)	10 (10)	27 (35)	30 (33)	27 (30)		
	140	9	42	35	33		
+1250	120 (122)	12 (13)	35 (34)	36 (37)	15 (19)		
	123	13	32	38	23		
+2500	141 (140)	8 (8)	41 (37)	24 (34)	15 (17)		
	138	8	32	43	19		
+5000	117 (111)	10 (11)	35 (35)	21 (29)	12 (15)		
	105	12	34	36	17		
陽性対照	S9 mix を必要としないもの	名称	AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2	ICR-191
		用量 (µg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	0.5
		コロニー数/プレート	286 (288)	290 (302)	152 (144)	370 (367)	173 (190)
	S9 mix を必要とするもの	名称	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
		用量 (µg/プレート)	1	2	10	0.5	2
		コロニー数/プレート	509 (500)	145 (143)	724 (720)	257 (275)	300 (302)
		491	140	716	292	304	

[備考] ・( ): 各プレートのコロニー数の平均値。  
 ・+: プレート上に沈殿が認められた。  
 ・AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド  
 ・NaN<sub>3</sub>: アジ化ナトリウム  
 ・ICR-191: 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl  
 ・2AA: 2-アミノアントラセン

表7 マスチックの Ames 試験の用量設定試験結果(1回目)

代謝活性化系の有無	被験物質の用量(μg/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		
		TA 100	TA 1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA 98	TA 1537	
-S9 mix	陰性対照	100	10	41	32	9	
		110 (103)	6 (8)	31 (40)	24 (28)	10 (8)	
		100	8	47	29	6	
	4.88	113 (107)	11 (10)	47 (38)	22 (28)	13 (13)	
		101	9	29	34	13	
	19.5	108* (105)	10* (13)	48 (43)	32 (25)	9 (8)	
		101*	15*	37	18	7	
78.1	98* (94)	7* (8)	38 (38)	29 (25)	4* (5)		
	89*	9*	37	21	6*		
+313	73* (79)	7* (7)	39 (43)	30 (30)	3* (6)		
	84*	7*	46	30	9*		
+1250	70* (63)	7* (4)	41 (43)	24 (29)	4* (4)		
	56*	0*	45	33	3*		
+5000	0* (0)	0* (0)	44 (43)	31 (29)	0* (0)		
	0*	0*	42	26	0*		
+S9 mix	陰性対照	114	13	48	36	30	
		145 (124)	14 (11)	34 (41)	39 (39)	21 (25)	
		112	7	42	41	24	
	4.88	125 (124)	8 (9)	41 (47)	47 (44)	29 (29)	
		122	10	52	40	29	
	19.5	129 (122)	11 (14)	50 (43)	43 (48)	34 (32)	
		114	17	36	52	30	
78.1	143 (136)	18 (15)	34 (37)	52 (48)	24 (27)		
	128	12	39	43	30		
+313	155 (151)	15 (17)	55 (48)	50 (43)	27 (32)		
	146	18	40	36	37		
+1250	129 (120)	7 (9)	54 (51)	34 (40)	34 (36)		
	110	10	47	45	37		
+5000	117 (114)	8 (12)	48 (50)	38 (42)	35 (32)		
	111	15	52	45	29		
陽性対照	S9 mix を必要としないもの	名称	AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2	ICR-191
		用量(μg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	0.5
		コロニー数/プレート	212 (226)	359 (387)	178 (180)	411 (398)	241 (243)
	S9 mix を必要とするもの	名称	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
		用量(μg/プレート)	1	2	10	0.5	2
		コロニー数/プレート	798 (880)	165 (182)	823 (802)	349 (377)	312 (308)

[備考] ・( ): 各プレートのコロニー数の平均値。

・+: プレート上に沈殿が認められた。

・\*: 菌の生育阻害が認められた。

・AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

・NaN<sub>3</sub>: アジ化ナトリウム

・ICR-191: 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl

・2AA: 2-アミノアントラセン

表8 マスチックの Ames 試験の用量設定試験結果(2回目)

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	
		TA 100		TA 1535	
-S9 mix	陰性対照	115 96 (106) 106	7 13 (9) 8	4 7 (5) 3	
	0.0763	102 139 (121)	7 14 (11)	—	
	0.305	103 106 (105)	5 11 (8)	6 6 (6)	
	1.22	104 102 (103)	11 7 (9)	6 7 (7)	
	4.88	105 87 (96)	7 5 (6)	6 7 (7)	
	19.5	84* 107* (96)	4* 10* (7)	9 3 (6)	
	78.1	101* 84* (93)	4* 13* (9)	1* 4* (3)	
	+313	66* 70* (68)	3* 5* (4)	3* 3* (3)	
	+1250	—	—	4* 2* (3)	
	陽性対照	S9 mix を必要としな いもの	名 称	AF-2	$\text{NaN}_3$
用 量 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )			0.01	0.5	0.5
コロニー数/ プレート			218 241 (230)	382 325 (354)	245 269 (257)

[備 考] ・( ): 各プレートのコロニー数の平均値。

・+: プレート上に沈殿が認められた。

・\*: 菌の生育阻害が認められた。

・AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

・ $\text{NaN}_3$ : アジ化ナトリウム

・ICR-191: 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl

表9 マスチックの Ames 試験の本試験結果

代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (µg/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		
		TA 100	TA 1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA 98	TA 1537	
-S9 mix	陰性対照	123 99 (112) 115	13 7 (11) 12	22 22 (24) 28	17 16 (17) 19	8 6 (6) 4	
	1.22	105 99 (102)	5 11 (8)	—	—	—	
	2.44	85 110 (98)	11 10 (11)	—	—	—	
	4.88	94 82 (88)	11 6 (9)	—	—	7 4 (6)	
	9.77	112 97 (105)	8 16 (12)	—	—	9 9 (9)	
	19.5	88* 102* (95)	10* 5* (8)	—	—	8 6 (7)	
	39.1	83* 90* (87)	6* 10* (8)	—	—	3 3 (3)	
	78.1	87* 117* (102)	10* 7* (9)	—	—	3* 5* (4)	
	156	—	—	23 28 (26)	15 24 (20)	5* 7* (6)	
	+313	—	—	30 35 (33)	17 22 (20)	4* 5* (5)	
	+625	—	—	23 24 (24)	19 20 (20)	—	
	+1250	—	—	29 23 (26)	16 17 (17)	—	
	+2500	—	—	29 23 (26)	13 17 (15)	—	
	+5000	—	—	27 21 (24)	14 15 (15)	—	
	+S9 mix	陰性対照	116 132 (123) 121	8 7 (8) 9	31 28 (28) 25	47 37 (37) 27	12 15 (15) 19
156		109 125 (117)	9 10 (10)	33 38 (36)	25 41 (33)	17 25 (21)	
+313		114 117 (116)	10 9 (10)	31 36 (34)	23 21 (22)	18 21 (20)	
+625		126 94 (110)	10 9 (10)	30 36 (33)	24 30 (27)	18 18 (18)	
+1250		99 93 (96)	5 8 (7)	31 28 (30)	35 31 (33)	15 15 (15)	
+2500		99 91 (95)	5 5 (5)	34 32 (33)	27 30 (29)	13 16 (15)	
+5000		104 92 (98)	9 7 (8)	28 38 (33)	26 21 (24)	10 16 (13)	
陽性対照	S9 mix を必要としないもの	名称	AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2	ICR-191
		用量 (µg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	0.5
	S9 mix を必要とするもの	名称	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
		用量 (µg/プレート)	1	2	10	0.5	2
		コロニー数/プレート	236 237 (237)	357 332 (345)	156 170 (163)	470 452 (461)	163 190 (177)
		コロニー数/プレート	962 1129 (1046)	188 185 (187)	462 507 (485)	360 298 (329)	313 307 (310)

[備考] ・( ): 各プレートのコロニー数の平均値。

・+: プレート上に沈殿が認められた。

・\*: 菌の生育阻害が認められた。

・AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

・NaN<sub>3</sub>: アジ化ナトリウム

・ICR-191: 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl

・2AA: 2-アミノアントラセン

表10 アウレオバシジウム培養液の小核試験の予備試験での体重測定結果

動物種・系統: マウス・Crj:CD-1  
 性 : 雄  
 週 齢: 7週齢

投与回数: 24時間間隔の2回連続投与  
 投与経路: 強制経口投与  
 投与容量: 20 mL/kg

試験群	投与量 (mg/kg/day)	動物 番号	体 重 (g)		
			初回投与時	2回目投与時	最終投与1日後
陰性対照 [生理食塩水]	0	1	33.1	33.8	33.4
		2	32.1	32.1	32.6
		3	34.7	34.9	34.6
	平均値±標準偏差		33.3 ± 1.31	33.6 ± 1.41	33.5 ± 1.01
被験物質 [アウレオバシ ジウム培養液]	105	4	32.8	32.8	31.7
		5	33.9	34.1	33.1
		6	31.8	31.8	31.8
	平均値±標準偏差		32.8 ± 1.05	32.9 ± 1.15	32.2 ± 0.78
	210	7	33.7	34.8	34.0
		8	33.3	33.7	33.0
		9	31.2	30.9	30.6
	平均値±標準偏差		32.7 ± 1.34	33.1 ± 2.01	32.5 ± 1.75
	420	10	33.8	33.2	33.6
		11	33.3	33.1	33.2
12		31.6	32.0	31.5	
平均値±標準偏差		32.9 ± 1.15	32.8 ± 0.67	32.8 ± 1.12	

表11 アウレオバシジウム培養液のMN試験の本試験での体重測定結果

動物種・系統：マウス・Crj:CD-1 投与回数：24時間間隔の2回連続投与  
 性：雄 投与経路：強制経口投与  
 週齢：7週齢 投与容量：20 mL/kg

試験群	投与用量 (mg/kg/day)	動物 番号	体 重 (g)		
			初回投与時	2回目投与時	最終投与1日後
陰性対照 [生理食塩水]	0	1	34.6	35.6	35.5
		2	32.5	34.2	33.6
		3	36.1	37.2	37.7
		4	33.2	35.1	34.4
		5	35.1	35.6	34.8
	平均値±標準偏差		34.3 ± 1.45	35.5 ± 1.09	35.2 ± 1.56
被験物質 [アウレオバシジウム 培養液]	105	6	36.2	36.7	36.0
		7	35.2	35.6	36.2
		8	33.9	35.6	35.2
		9	31.8	32.7	32.4
		10	33.4	33.7	34.0
	平均値±標準偏差		34.1 ± 1.69	34.9 ± 1.62	34.8 ± 1.58
	210	11	32.9	34.2	33.3
		12	35.2	36.9	36.3
		13	34.7	35.6	35.8
		14	33.2	33.3	33.3
		15	35.7	35.8	35.4
	平均値±標準偏差		34.3 ± 1.23	35.2 ± 1.42	34.8 ± 1.42
420	16	36.8	38.0	36.9	
	17	32.9	33.9	33.0	
	18	34.3	34.9	34.7	
	19	34.7	35.4	34.8	
	20	31.0	32.3	31.5	
平均値±標準偏差		33.9 ± 2.16	34.9 ± 2.10	34.2 ± 2.04	
陽性対照 [マイトマイシンC]	2	21	—	34.8	—
		22	—	32.1	—
		23	—	35.5	—
		24	—	31.3	—
		25	—	37.7	—
	平均値±標準偏差		—	34.3 ± 2.60	—

陽性対照群は被験物質の2回目投与時に腹腔内へ単回投与した。

表12 アウレオバシジウム培養液のMN試験の本試験結果

動物種・系統 : マウス・C<sub>7</sub>CD-1  
 性 : 雄  
 週 齢 : 7週齢  
 投与回数 24時間間隔で2回連続投与(陽性対照は単回)  
 投与経路 強制経口投与(陽性対照は腹腔内投与)  
 投与容量 20 mL/kg

試験群	投与量 (mg/kg)	標本作製 <sup>a)</sup> 時期(hr)	動物 番号	全赤血球中の多染性 <sup>b)</sup> 赤血球の割合 (%)	小核有する多染性 赤血球の割合 (%)	
媒体対照 [生理食塩水]	0	24	1	52.5	0.10	
			2	59.3	0.30	
			3	43.7	0.05	
			4	42.9	0.05	
			5	51.7	0.20	
			平均±標準偏差	50.0 ± 6.81	0.14 ± 0.108	
			最大値/最小値	59.3 / 42.9	0.30 / 0.05	
被験物質 [アウレオバシジウム培養液]	105	24	6	56.2	0.05	
			7	44.7	0.10	
			8	47.3	0.00	
			9	56.7	0.15	
			10	50.5	0.15	
				平均±標準偏差	51.1 ± 5.32	0.09 ± 0.065
				最大値/最小値	56.7 / 44.7	0.15 / 0.00
	210	24	11	57.4	0.30	
			12	57.1	0.05	
			13	66.5	0.20	
14			60.5	0.10		
15			51.6	0.10		
			平均±標準偏差	58.6 ± 5.45	0.15 ± 0.100	
			最大値/最小値	66.5 / 51.6	0.30 / 0.05	
420	24	16	50.1	0.00		
		17	54.1	0.10		
		18	58.6	0.20		
		19	56.2	0.20		
		20	52.3	0.25		
			平均±標準偏差	54.3 ± 3.31	0.15 ± 0.100	
			最大値/最小値	58.6 / 50.1	0.25 / 0.00	
陽性対照 [MMC]	2	24	21	41.4	5.00	
			22	36.9	5.95	
			23	27.3	5.05	
			24	33.4	9.55	
			25	25.6	4.60	
						平均±標準偏差
			最大値/最小値	41.4 / 25.6	9.55 / 4.60	

MMC: マイトマイシンC

a) 最終投与後の時間

b) 赤血球2,000個/動物を観察

\* 媒体対照との間に有意差(P<0.01)が認められた

表13 コーパール樹脂のMN試験の予備試験での体重測定結果

動物種・系統: マウス・Crj:CD-1

投与回数: 24時間間隔の2回連続投与

性: 雄

投与経路: 強制経口投与

週齢: 7週齢

投与容量: 10 mL/kg

試験群	投与量 (mg/kg/day)	動物 番号	体 重 (g)		
			初回投与時	2回目投与時	最終投与1日後
陰性対照 [0.5 w/v%MC]	0	1	34.1	34.0	34.2
		2	31.8	32.9	32.8
		3	32.9	33.4	32.9
	平均値±標準偏差		32.9 ± 1.15	33.4 ± 0.55	33.3 ± 0.78
被験物質 [コーパール樹脂]	500	4	32.4	33.5	32.6
		5	32.8	33.4	33.9
		6	34.5	35.6	34.9
	平均値±標準偏差		33.2 ± 1.12	34.2 ± 1.24	33.8 ± 1.15
	1,000	7	35.1	35.0	35.1
		8	32.8	32.9	33.2
		9	33.1	33.8	34.1
	平均値±標準偏差		33.7 ± 1.25	33.9 ± 1.05	34.1 ± 0.95
	2,000	10	33.9	34.4	33.6
		11	34.9	34.7	35.2
12		31.6	31.8	31.2	
平均値±標準偏差		33.5 ± 1.69	33.6 ± 1.59	33.3 ± 2.01	



表14 コーパール樹脂の小核試験の本試験での体重測定結果

動物種・系統: マウス・Crj:CD-1 投与回数: 24時間間隔の2回連続投与  
 性: 雄 投与経路: 強制経口投与  
 週 齢: 7週齢 投与容量: 10 mL/kg

試験群	投与用量 (mg/kg/day)	動物 番号	体 重 (g)		
			初回投与時	2回目投与時	最終投与1日後
陰性対照 [0.5 w/v%MC]	0	1	32.2	32.7	32.3
		2	34.5	34.3	33.8
		3	37.4	35.3	35.5
		4	36.3	34.3	34.9
		5	34.8	35.4	34.8
	平均値±標準偏差		35.0 ± 1.97	34.4 ± 1.09	34.3 ± 1.25
被験物質 [コーパール樹脂]	500	6	34.7	35.3	34.6
		7	34.3	35.5	34.8
		8	34.7	35.3	35.2
		9	37.3	38.0	37.0
		10	33.0	33.0	33.2
	平均値±標準偏差		34.8 ± 1.56	35.4 ± 1.77	35.0 ± 1.37
	1,000	11	35.3	36.3	35.9
		12	34.3	35.0	33.9
		13	34.9	35.9	34.4
		14	33.2	33.5	33.4
		15	36.9	38.0	37.7
	平均値±標準偏差		34.9 ± 1.36	35.7 ± 1.66	35.1 ± 1.75
2,000	16	34.8	35.9	35.9	
	17	36.3	37.2	36.7	
	18	34.2	34.4	33.4	
	19	36.3	37.4	36.8	
	20	32.4	33.8	32.8	
平均値±標準偏差		34.8 ± 1.63	35.7 ± 1.62	35.1 ± 1.89	
陽性対照 [マイトマイシンC]	2	21	—	35.1	—
		22	—	37.8	—
		23	—	35.9	—
		24	—	35.0	—
		25	—	36.9	—
	平均値±標準偏差		—	36.1 ± 1.20	—

陽性対照群は被験物質の2回目投与時に腹腔内へ単回投与した。

表15 コーパール樹脂のMN試験の本試験結果

動物種・系統 : マウス・Cj:CD-1

投与回数 24時間間隔で2回連続投与(陽性対照は単回)

性 : 雄

投与経路 強制経口投与(陽性対照は腹腔内投与)

週齢 : 7週齢

投与容量 10 mL/kg

試験群	投与量 (mg/kg)	標本作製 <sup>a)</sup> 時期(hr)	動物 番号	全赤血球中の多染性 <sup>b)</sup> 赤血球の割合 (%)	小核有する多染性 赤血球の割合 (%)
媒体対照 [0.5%MC]	0	24	1	55.2	0.10
			2	61.8	0.00
			3	59.3	0.05
			4	56.9	0.25
5	53.7		0.10		
		平均±標準偏差	57.4 ± 3.23	0.10 ± 0.094	
		最大値/最小値	61.8 / 53.7	0.25 / 0.00	
被験物質 [コーパール樹脂]	500	24	6	58.1	0.30
			7	62.5	0.15
			8	78.7	0.15
			9	58.1	0.15
			10	51.8	0.10
				平均±標準偏差	61.8 ± 10.17
			最大値/最小値	78.7 / 51.8	0.30 / 0.10
	1,000	24	11	62.0	0.05
			12	52.4	0.20
			13	68.2	0.20
			14	61.6	0.15
			15	56.0	0.15
			平均±標準偏差	60.0 ± 6.07	0.15 ± 0.061
		最大値/最小値	68.2 / 52.4	0.20 / 0.05	
2,000	24	16	58.3	0.30	
		17	56.4	0.10	
		18	51.8	0.05	
		19	61.1	0.00	
		20	54.5	0.25	
			平均±標準偏差	56.4 ± 3.55	0.14 ± 0.129
		最大値/最小値	61.1 / 51.8	0.30 / 0.00	
陽性対照 [MMC]	2	24	21	33.3	9.15
			22	38.1	4.20
			23	37.9	6.40
			24	41.5	5.55
			25	41.6	6.75
				平均±標準偏差	38.5 ± 3.40*
		最大値/最小値	41.6 / 33.3	9.15 / 4.20	

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

分担研究者 松元 郷六（財団法人 残留農薬研究所 変異原性研究室長）  
協力研究者 竹澤 祐造（財団法人残留農薬研究所 技師補）  
阿部美咲樹（財団法人残留農薬研究所 技師補）

研究要旨

コメヌカ酵素分解物とメバロン酸の変異原性を調べるため研究を行った。まず、コメヌカ酵素分解物の突然変異誘発性を検索するため、ネズミチフス菌4株（TA100, TA1535, TA98, TA1537）と大腸菌1株（WP2 *uvrA*/pKM101）を用いて復帰突然変異試験を行った。用量設定試験の結果より、5000 µg/プレートを最高用量として公比2で6用量を設定して本試験を行った。その結果、代謝活性化系の有無にかかわらず、すべての用量において溶媒対照群に比べて2倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。用量設定試験においても復帰変異コロニー数の増加は認められていなかったことから再現性が確認された。以上の結果より、本実験条件下におけるコメヌカ酵素分解物の細菌に対する突然変異誘発性は陰性であると考えられた。

次に、メバロン酸の *in vivo* 染色体異常誘発性を検索するため、雄のICR系Crj:CD-1マウスを用い、骨髄細胞における小核試験を実施した。毒性試験の結果より、500, 1000および2000 mg/kg/dayの3用量を設定して本試験を行った。本試験では1群5匹のマウスに24時間間隔で2回の強制経口投与を行い、2回目投与後24時間目に骨髄塗抹標本作製した。標本観察の結果、メバロン酸のいずれの用量群においても、小核を有する多染性赤血球の出現頻度に有意な増加は認められず、また、全赤血球に対する多染性赤血球の割合にも有意な減少は認められなかった。以上の結果より、本実験条件下では、メバロン酸はICR系（Crj:CD-1）マウスの骨髄細胞において小核を誘発しないものと考えられた。

ド：コメヌカ酵素分解物，メバロン酸，復帰突然変異試験，小核試験，  
ネズミチフス菌，大腸菌，マウス

第1章

A. 研究目的

本研究の目的はコメヌカ酵素分解物の突然変異誘発性の有無を検索することであった。その目的のため、細菌を用いた復帰突然変異試験を実施した。

B. 研究方法

1) 被験物質

被験物質名： コメヌカ酵素分解物

提供先： 宝酒造(株)

用途： 酸化防止剤

主成分： ペプチドおよびフィチン酸

性状： 淡褐色粉末

溶解性： 水に易溶

保存条件： 冷暗所（4℃）

試験番号： IET 02-0002

2) テスト菌株

ネズミチフス菌TA100, TA1535, TA98, TA1537株および大腸菌WP2 *uvrA*/pKM101株を用いた。TA100株は平成12年9月5日に日本バイオアッセイ研究センター(秦野市)より入手した。TA98株は昭和50年3月6日に、TA1535株とTA1537株は昭和48年3月26日に、国立遺伝学研究所変異遺伝部(三島市)より入手した。WP2 *uvrA*/pKM101株は昭和48年3月26日に国立遺伝学研究所より入手した大腸菌WP2 *uvrA*株に、当研究所において平成5年3月31日にプラスミドpKM101を導入し、作製した。

### 3) テスト菌株の検査

テスト菌株は以下の遺伝的特性およびその他の諸性質について検査を行い、これらの特性を有することを確認した。

- ① ネズミチフス菌におけるヒスチジン要求性  
大腸菌におけるトリプトファン要求性
- ② 紫外線感受性 (*uvrA*, *uvrB*)
- ③ ネズミチフス菌におけるクリスタルバイオレット感受性 (*rfa*)
- ④ TA100, TA98株およびWP2 *uvrA*/pKM101株におけるアンピシリン耐性 (pKM101)
- ⑤ 自然突然変異体数
- ⑥ 陽性対照の既知変異原物質に対する反応性

### 4) テスト菌株の前培養

-80℃超低温槽(MDF-382AT, 三洋電機株式会社)で保存している保存菌液をニュートリエントブロス液体培地(Oxoid nutrient broth No. 2, Oxoid Ltd., Lot No. 219916)に接種し、37℃で8時間振盪培養した。分光光度計

(SPECTRONIC21, BAUSCH&LOMB)で測定した吸光度(OD<sub>660</sub>)は0.85~1.10であり、1.2~2.1×10<sup>9</sup>生菌数/mlの菌懸濁液を得た。

### 5) S9 Mixの調製

代謝活性化系としてS9 Mixを用いた。代謝酵素誘導物質であるフェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボンとを投与されたラットの肝臓ホモジ

ネート9000×g上清分画(S9)をキッコーマン株式会社より購入した。購入後、-80℃超低温槽に保存した。製造後6カ月以内のS9分画(Lot No. RAA-451)を試験直前に解凍し、直ちにコファクター(ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社, Lot No. 730)を加えて、以下の組成になるようにS9 Mixを調製した。

塩化マグネシウム	8 mM
塩化カリウム	33 mM
グルコース-6-リン酸	5 mM
NADH	4 mM
NADPH	4 mM
トリウム-リン酸緩衝液 pH 7.4	100 mM
S9分画	10%

### 6) 被験物質溶液の調製

被験物質は滅菌水(Simpli Lab, 日本ミリボア・リミテッド)を用いて製造し、溶解させて用いた。調製後、色、臭いおよび発熱等の変化は認められなかった。なお、被験物質溶液は純度換算を行わず、試験の直前に調製した。

### 7) 陰性対照および陽性対照

陰性対照(溶媒対照)物質として滅菌水を用いた。また、陽性対照物質として以下の既知変異原物質を用いた。

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド(和光純薬工業株式会社, 99.4%, Lot No. SAJ0748)

2-AA: 2-アミノアントラセン(和光純薬工業株式会社, 96.5%, Lot No. DSJ3206)

アジ化ナトリウム(和光純薬工業株式会社, 92.2%, Lot No. DSG1561)

9-AA: 9-アミノアクリジン塩酸塩(Aldrich Chemical Co., Inc., 98%, Lot No. 16322JR)

AF-2, 9-AAおよび2-AAはDMSO(東京化成工業株式会社, 特級, >99.0%)に、またNaN<sub>3</sub>は滅菌水に溶解した。調製した陽性対照物質溶液は