

小分けして冷凍保存（-80℃）し、試験ごとに解凍して使用した。

8) アミノ酸添加軟寒天液の調製

0.6%寒天粉末（和光純薬工業株式会社，Lot No. SEE7704）および0.5%塩化ナトリウムの組成の軟寒天を調製した。溶解した軟寒天液に、ネズミチフス菌株用には滅菌した0.5 mM D-ビオチンおよび0.5 mM L-ヒスチジン溶液，大腸菌株用には0.5 mM L-トリプトファン溶液を1/10容加え，アミノ酸添加軟寒天液を調製した。

9) 用量設定試験

被験物質の適切な用量を設定するために，代謝活性化による場合とよらない場合で用量設定試験を行った。用量設定試験では，毒性試験ガイドライン上定められた最高用量である5000 μg/プレートとして公比4で7用量を設定した。試験は被験物質処理群，溶媒対照群および陽性対照群のすべての用量について2枚のプレートで実施した。

10) 本試験

代謝活性化による場合とよらない場合で本試験を行った。用量設定試験の結果，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析出は観察されなかった。また，すべての菌株において生育阻害も観察されなかった。したがって，本試験では5000 μg/プレートとして公比2で6用量を設定した。本試験は被験物質処理群，溶媒対照群および陽性対照群のすべての用量について2枚のプレートで実施した。

11) 処理方法

ブレインキュベーション法を実施した。代謝活性化によらない場合は滅菌小試験管に100 mM ナトリウム-リン酸緩衝液（pH 7.4）0.5 ml，前培養した菌懸濁液0.1 mlおよび被験物質溶液0.1 mlを分注し，37℃で20分間振盪した。一方，

代謝活性化による場合はS9 Mix 0.5 ml，菌懸濁液0.1 mlおよび被験物質溶液0.1 mlを分注し，37℃で20分間振盪した。いずれも45℃で保温したアミノ酸添加軟寒天液2 mlを加え良く混合した後，最少グルコース寒天平板培地〔クリメディアAM-N培地，オリエンタル酵母工業株式会社，Lot No. ANI640JQ（平成13年10月2日製造）〕に広げた。最少グルコース寒天平板培地は塩類溶液（0.2%クエン酸・1水塩，1%リン酸2カリウム，0.192%リン酸1アンモニウム，0.066%水酸化ナトリウム，0.02%硫酸マグネシウム・7水塩）に1.5%寒天粉末（伊那寒天 BA-30A，伊那食品工業株式会社，Lot No. 00221），2%グルコースを加え，30 mlずつ分注したものであった。37℃で48時間培養後，コロニーアナライザー（MODEL CA-7 II，東洋測器株式会社）を用いて復帰変異コロニーを計数した。同時に，被験物質の析出を肉眼で，菌に対する生育阻害を実体顕微鏡下で観察した。

12) 無菌テスト

すべての試験において，最高用量の被験物質溶液およびS9 Mixについて，試験に用いた容量をニュートリエントブロス寒天平板培地（Oxoid nutrient broth No. 2）に滴下した。また，各菌懸濁液を最少グルコース寒天平板培地に100 μl滴下した。それらを37℃で48時間培養し，雑菌混入の有無を確認した。

13) 結果の判定

結果の判定にあたっては，統計学的解析を行わず，各用量におけるプレートでのコロニー数の平均値を基に以下の3基準をすべて満たす場合を陽性とした。

- ① 被験物質処理群において溶媒対照値の2倍以上の復帰変異コロニーが出現する。
- ② 被験物質の濃度の増加とともに復帰変異コロニー数が増加する（用量-反応効果）。
- ③ 用量設定試験と本試験で，復帰変異コロニー数の増加に再現性が認められる。

一方，用量設定試験と本試験のいずれの用量

においても、復帰変異コロニー数が溶媒対照群のコロニー数の2倍より少ない場合に陰性とした。

C. 研究結果

1) 用量設定試験

用量設定試験の結果を表1に示した。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被験物質の析出は観察されなかった。また、すべての菌株に対して生育阻害も観察されなかった。

復帰変異コロニー数に関しては、代謝活性化系の有無にかかわらず、いずれの菌株においても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。ただし、代謝活性化によらない場合のWP2 *uvrA*/pKM101株において、5000 µg/プレートの用量で1.60倍の増加がみられた。

2) 本試験

本試験の結果を表2に示し、用量-反応曲線を図1-(1)~(3)に示した。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被験物質の析出は観察されなかった。また、すべての菌株に対して生育阻害も観察されなかった。

復帰変異コロニー数に関しては、代謝活性化系の有無にかかわらず、いずれの菌株においても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。ただし、代謝活性化によらない場合のWP2 *uvrA*/pKM101株において、5000 µg/プレートの用量で1.79倍の増加がみられた。

D. 考察

代謝活性化によらない場合のWP2 *uvrA*/pKM101株において、5000 µg/プレートの用量で復帰変異コロニーのわずかな増加が認められた。しかし、溶媒対照群と比べて2倍以上の増加とはならず、当研究所の判定基準に従って陰性と判断した。

それ以外の菌株では復帰変異コロニーの増加はまったく認められなかったことから、全体として突然変異誘発性は陰性であると判定される。

試験に用いた菌液、被験物質溶液、S9 Mixに雑菌の汚染がないことを確認した。溶媒対照群では各菌株特有の復帰変異コロニー数が認められた。これらのコロニー数は、当研究所の背景値に基づく管理範囲内であった。また、AF-2、NaN₃、9-AAおよび2-AAを処理した陽性対照群では、十分に高い復帰変異コロニー数が認められた。これらのコロニー数も当研究所の背景値に基づく管理範囲内であった。したがって、用量設定試験および本試験は有効であると判断された。

E. 結論

本実験条件下において、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結論した。

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) Ames, B.N., J. McCann and E. Yamasaki : Mutation Res., 31, 347-364, 1975.
- 2) 安衛法における変異原性試験(労働省安全衛生部化学物質調査課編), 中央労働災害防止協会, 1991.
- 3) Gatehouse, D., S. Haworth, T. Cebula, E. Gocke, L. Kier, T. Matsushima, C. Melcion, T. Nohmi, S. Venitt and E. Zeiger : Mutation Res., 312, 217-233, 1994.
- 4) Matsushima, T., T. Sugimura, M. Nagao, T. Yahagi, A. Shirai and M. Sawamura, Factors Modulating Mutagenicity in Microbial Tests, in: K.H. Norpoth and R.C. Garner

(Eds.), Short-term Test Systems for
Detecting Carcinogens. Springer-Verlag,
pp. 273-285, 1980.

表1

試験結果表 (用量設定試験)

被験物質の名称: コメヌカ酵素分解物

| 試験実施期間 | | 2002年 2月 19日より | | | 2002年 2月 22日 | | |
|-----------|-------------------------|--------------------|--------------------|-------------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|
| 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 | | |
| | | TA100 | TA1535 | WP2 <i>uvrA</i> /pKM101 | TA98 | TA1537 | |
| -S9 Mix | 陰性対照 (H ₂ O) | 122 131 (127) | 10 7 (9) | 107 102 (105) | 22 12 (17) | 11 11 (11) | |
| | 1.2 | 122 101 (112) | 14 7 (11) | 125 141 (133) | 26 19 (23) | 11 8 (10) | |
| | 4.9 | 121 115 (118) | 10 7 (9) | 138 113 (126) | 17 15 (16) | 6 5 (6) | |
| | 19.5 | 151 125 (138) | 7 8 (8) | 135 118 (127) | 20 11 (16) | 14 7 (11) | |
| | 78.1 | 126 126 (126) | 10 8 (9) | 107 112 (110) | 23 12 (18) | 7 7 (7) | |
| | 313 | 118 115 (117) | 7 11 (9) | 125 91 (108) | 12 28 (20) | 11 10 (11) | |
| | 1250 | 93 128 (111) | 6 14 (10) | 138 126 (132) | 25 11 (18) | 14 5 (10) | |
| | 5000 | 148 142 (145) | 12 5 (9) | 171 165 (168) | 30 20 (25) | 11 7 (9) | |
| +S9 Mix | 陰性対照 (H ₂ O) | 142 111 (127) | 14 6 (10) | 158 150 (154) | 30 32 (31) | 8 17 (13) | |
| | 1.2 | 135 136 (136) | 11 9 (10) | 162 190 (176) | 29 34 (32) | 19 8 (14) | |
| | 4.9 | 140 130 (135) | 16 5 (11) | 158 170 (164) | 28 20 (24) | 12 13 (13) | |
| | 19.5 | 120 145 (133) | 8 7 (8) | 135 186 (161) | 24 25 (25) | 10 11 (11) | |
| | 78.1 | 161 112 (137) | 17 6 (12) | 166 146 (156) | 30 33 (32) | 17 7 (12) | |
| | 313 | 142 133 (138) | 11 10 (11) | 171 186 (179) | 39 31 (35) | 12 7 (10) | |
| | 1250 | 150 134 (142) | 11 10 (11) | 172 188 (180) | 33 20 (27) | 12 10 (11) | |
| | 5000 | 133 175 (154) | 12 10 (11) | 200 176 (188) | 37 33 (35) | 10 12 (11) | |
| 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 (μg/プレート) | 0.01 | 0.5 | 0.005 | 0.1 | 80 |
| | S9 Mixを必要とするもの | コロニー数/プレート | 509 483 (496) | 555 574 (565) | 1736 1725 (1731) | 553 533 (543) | 486 392 (439) |
| | | 名称 | 2-AA | 2-AA | 2-AA | 2-AA | 2-AA |
| | | 用量 (μg/プレート) | 1 | 2 | 2 | 0.5 | 2 |
| | | コロニー数/プレート | 827 913 (870) | 194 171 (183) | 584 579 (582) | 226 235 (231) | 103 105 (104) |

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

2-AA: 2-アミノアントラセン

NaN₃: ナジ化ナトリウム

9-AA: 9-アミノアクリジン塩酸塩

(): 内の数値は平均値

表 2

試験結果表 (本試験)

被験物質の名称 : コメヌカ酵素分解物

| 試験実施期間 | | 2002年 2月 26日より | | | 2002年 3月 1日 | | |
|-----------|-------------------------|--------------------|--------------------|-------------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|
| 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 | | |
| | | TA100 | TA1535 | WP2 <i>uvrA</i> /pKM101 | TA98 | TA 1537 | |
| -S9 Mix | 陰性対照 (H ₂ O) | 153 147 (150) | 10 5 (8) | 117 103 (110) | 15 27 (21) | 10 5 (8) | |
| | 156 | 162 147 (155) | 3 11 (7) | 118 127 (123) | 26 16 (21) | 11 3 (7) | |
| | 313 | 131 143 (137) | 3 6 (5) | 128 133 (131) | 24 22 (23) | 8 10 (9) | |
| | 625 | 134 189 (162) | 3 12 (8) | 153 134 (144) | 29 19 (24) | 10 8 (9) | |
| | 1250 | 177 195 (186) | 11 10 (11) | 107 144 (126) | 16 19 (18) | 7 8 (8) | |
| | 2500 | 157 161 (159) | 5 8 (7) | 156 147 (152) | 26 28 (27) | 13 5 (9) | |
| | 5000 | 172 170 (171) | 6 14 (10) | 195 198 (197) | 24 16 (20) | 6 12 (9) | |
| +S9 Mix | 陰性対照 (H ₂ O) | 141 190 (166) | 10 8 (9) | 171 156 (164) | 27 23 (25) | 16 17 (17) | |
| | 156 | 180 194 (187) | 9 6 (8) | 177 162 (170) | 29 26 (28) | 11 12 (12) | |
| | 313 | 159 155 (157) | 14 3 (9) | 163 162 (163) | 30 26 (28) | 15 10 (13) | |
| | 625 | 193 168 (181) | 5 7 (6) | 200 185 (193) | 26 25 (26) | 8 12 (10) | |
| | 1250 | 172 176 (174) | 7 11 (9) | 181 165 (173) | 39 32 (36) | 16 15 (16) | |
| | 2500 | 175 178 (177) | 7 10 (9) | 152 201 (177) | 43 30 (37) | 12 10 (11) | |
| | 5000 | 179 191 (185) | 12 8 (10) | 196 201 (199) | 30 34 (32) | 14 11 (13) | |
| 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 (µg/プレート) | 0.01 | 0.5 | 0.005 | 0.1 | 80 |
| | S9 Mixを必要とするもの | コロニー数/プレート | 517 519 (518) | 587 565 (576) | 1936 1822 (1879) | 493 563 (528) | 552 614 (583) |
| | | 名 称 | 2-AA | 2-AA | 2-AA | 2-AA | 2-AA |
| | | 用量 (µg/プレート) | 1 | 2 | 2 | 0.5 | 2 |
| | | コロニー数/プレート | 751 777 (764) | 188 172 (180) | 650 718 (684) | 229 231 (230) | 111 125 (118) |

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

2-AA : 2-アミノアントレン

NaN₃ : アジ化ナトリウム

9-AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩

() : 内の数値は平均値

第2章

A. 研究目的

本研究の目的はメバロン酸の*in vivo*染色体異常誘発性の有無を検索することであった。その目的のため、メバロン酸に対するマウス小核試験を実施した。

B. 研究方法

1) 被験物質

被験物質名： メバロン酸
提供先： 旭電化工業㈱
用途： 製造用剤（食品栄養強化）
分子量： 148
性状： 淡黄色透明粘性液体
溶解性： 水に易溶
保存条件： 冷暗所（4℃）
試験番号： IET 02-0006

2) 供試動物

SPFのICR系（Crj:CD-1）の雄マウスを日本チャールス・リバー株式会社厚木飼育センター（神奈川県厚木市）より購入した。入荷後7日間の馴化期間を設け、7週齢で試験に供した。余剰動物は各々の投与終了後、試験系より除外した。毒性試験および小核試験における被験物質投与開始日のマウスの平均体重（最小値～最大値）は、以下に示す通りだった。

供試動物の動物数と体重

| 試験 | 性 | 動物数 (匹) | 体重 (g) 平均 (最小～最大) |
|------|---|------------|----------------------|
| 毒性試験 | 雄 | 9 | 33.7 (31.9～35.3) |
| 小核試験 | 雄 | 25 | 33.2 (29.6～35.2) |

3) 動物飼育環境

動物は以下の環境に設定された動物飼育室（動物室115）で飼育した。

温度： 22±3℃

湿度： 30～70%

換気回数： 10回以上/時間（オールフレッシュエアー方式）

照明時間： 12時間/日（午前7時点灯，午後7時消灯）

4) 飼育ケージ

金網床アルミニウム製ケージ（215W×330D×180H mm，トキワ科学器械株式会社，東京都台東区）に3または5匹の動物を収容した。各ケージはステンレス鋼製可動ラックに収容した。ラックには被験物質名および試験番号を記入したテープを貼り，各ケージにはケージ番号，被験物質名，試験番号，用量，性別，試験の種類，解剖日および個体識別を示すカードを貼付した。

5) 動物の群分けおよび個体識別

入荷時に動物を無作為に各ケージに分配することで群分けを行った。ただし，投与開始日の各個体の体重が，平均体重の±20%を超えないことを確認して用いた。ケージ内での各個体の識別は，ピクリン酸飽和70%エタノール溶液を用いて被毛の一部を染色することで行った。

6) 飼料

保証飼料であるMF固型（オリエンタル酵母工業株式会社，東京都板橋区）を，ステンレス鋼製バスケット型給餌器（トキワ科学器械株式会社）により自由に摂取させた。

7) 飲水

供試動物には，急速濾過・活性炭吸着装置と次亜塩素酸ナトリウムにより浄化・殺菌した井戸水を，プラスチック製給水びん（トキワ科学器械株式会社）を用いて与え，自由に摂取させた。

8) 被験物質投与液の調製

メバロン酸は純水に溶解させて用いた。被験物質投与液は，投与日ごとに投与直前に調製し

た。残余はそのつど廃棄した。

9) 陽性対照物質投与液の調製

マイトマイシン協和S (2 mg力価マイトマイシンC/バイアル, Lot No. 318AJD, 協和醗酵工業株式会社) に純水を加えて溶解させ、1.0 mg/mlのマイトマイシンC溶液を投与直前に調製した。

10) 投与方法および投与回数

メバロン酸は10 ml/kgの容量で胃ゾンデを用いて1日1回、24時間間隔で2日間の強制経口投与を行った。ただし、陽性対照物質投与群は10 ml/kgの容量で単回の強制経口投与を行った。個々の動物に対する投与容量は、投与1日目の体重から算出した。なお、投与前後の絶食は行わなかった。

11) 毒性試験

供試動物の被験物質2回連続投与に対する最大耐量を求めるため毒性試験を行った。被験物質は500, 1000および2000 mg/kg/dayの3用量を設定した。1用量あたり3匹の動物に投与し、2回投与後24時間までの一般状態の観察を行った。

12) 小核試験

a) 用量

毒性試験の結果に基づき、投与用量は500, 1000および2000 mg/kg/dayの3用量を設定した。

b) 供試動物数

1群5匹の動物を用いた。

c) 対照群

陽性対照群および陰性対照群を設定した。陽性対照群はマイトマイシンCを10 mg/kgの用量で単回強制経口投与した。陰性対照群は被験物質投与液の溶媒である純水を10 ml/kg容量で2回連続強制経口投与した。

d) 標本作製時間

被験物質投与群および陰性対照群からの骨髓採取は、2回目投与終了から24時間後に行った。陽性対照群からの骨髓採取は投与24時間後に行った。

13) 塗抹標本の作製

頸椎脱臼で動物を安楽死させ、両側大腿骨を摘出した。摘出した大腿骨の一端からウシ胎仔血清を注入し、骨髓細胞を遠沈管へ洗い出した。骨髓細胞浮遊液を遠心分離し、余分の血清を捨てた。遠沈管に残った少量の血清に細胞を再浮遊させ、骨髓細胞浮遊液の小滴をピペットでスライドグラスに取り、カバーグラスを用いて細胞を均等に塗抹した。各動物あたり2枚の塗抹標本を作製し、標本には暗号化したコード番号を記載した。標本を室温で十分に空気乾燥させた後、メタノールで5分間固定し、3%ギムザ液(メルク社製ギムザ溶液をpH6.8リン酸緩衝液で希釈)で30分間、室温で染色した(ギムザ染色法)。

14) 塗抹標本の分析

1動物につき1枚の塗抹標本について、光学顕微鏡下1000倍にて赤血球の観察を行った(残りの1枚は予備標本とした)。分析はSchmidの方法に従った。すなわち、小核を有する多染性赤血球の頻度は多染性血球を2000個観察し、その中で小核を持った多染性赤血球を計数することにより求めた。また、骨髓毒性の指標となる多染性赤血球の割合は、赤血球を多染性と正染性に区別しながら1000個観察し、その中に占める多染性赤血球の数から求めた。

15) 小核の判定基準および多染性赤血球の識別基準

ギムザ染色による小核の判定は、赤血球中に存在している核で、大きさが成熟赤血球の直径の1/2以下で、近接する白血球の核と同じ染色性を示していることを基準とした。また、ギムザ

染色による多染性赤血球と正染性赤血球の識別方法は、多染性赤血球は青から紫がかかった色であるのに対して、正染性赤血球は少し濁った赤色をしているため、視野の中で明らかに赤味を帯びていると判断された赤血球を正染性赤血球とみなし、その他をすべて多染性赤血球として観察した。

16) 統計学的解析

小核を有する多染性赤血球の頻度についての統計学的解析には、Kastenbaum-Bowmanの数表（被験物質投与群）およびカイ二乗検定（陽性対照群）を用いた。多染性赤血球の割合についての統計学的解析にはWilcoxonの順位和検定を行った。

17) 結果の判定

少なくとも1つの被験物質投与群で、小核を有する多染性赤血球の出現頻度に有意な増加が認められれば陽性と判断した。一方、いずれの被験物質投与群においても、小核を有する多染性赤血球の出現頻度に有意な増加が認められなければ陰性と判定した。

C. 研究結果

1) 毒性試験成績

すべての投与群で最終投与後24時間までに死亡した動物はみられず、臨床症状においても異常は認められなかった。よって、供試動物のメバロン酸2回連続投与に対する最大耐量は2000 mg/kg/day以上と考えられた。以上の結果より、小核試験の最高用量は2000 mg/kg/dayに設定した。

2) 小核試験成績

小核試験における被験物質についての2回投与による50%致死量を表3に示し、付表1に個体別の成績を示した。小核試験の成績のまとめと統計学的解析の結果を表4に示した。

メバロン酸のいずれの用量においても、試験

期間中に死亡した動物は認められず、臨床症状においても異常は認められなかった。

メバロン酸のいずれの用量においても、小核を有する多染性赤血球の頻度に有意な増加は認められなかった（Kastenbaum-Bowmanの数表による検定において、 $p > 0.05$ ）。一方、マイトマイシンCを投与した陽性対照群では、小核を有する多染性赤血球の頻度に有意な増加が認められた。（カイ二乗検定において、 $p < 0.001$ ）。

多染性赤血球の割合については、メバロン酸のいずれの用量においても有意な減少は認められなかった（Wilcoxonの順位和検定において、 $p > 0.05$ ）。よって、被験物質による骨髄増殖抑制はないものと考えられた。

D. 考 察

メバロン酸投与によりマウスに毒性症状は観察されなかったが、被験物質の骨髄到達性については問題がないものと思われる。何故なら、メバロン酸は動物や植物中に広く含まれる比較的低分子の生体物質であることから、投与後すみやかに吸収され血中に移行し、全身に分布するものと考えられる。よって、骨髄にも当然に到達しているものと考えて間違いないであろう。

2回連続投与後の結果、メバロン酸はいずれの用量においても、小核を有する多染性赤血球の頻度に有意な増加は認められなかった。よって、本実験条件下では、メバロン酸の小核誘発性は否定されるものと考えられる。

なお、小核試験の陰性対照群において、小核を有する多染性赤血球の平均出現頻度は背景値に基づいた管理範囲内であった。また、陽性対照群において、小核を有する多染性赤血球の明らかな増加が観察された。この結果より、本小核試験系は有効であると判断された。

E. 結 論

メバロン酸は本実験条件下のICR系（Crj:CD-1）マウスの骨髄細胞において、小核の誘発性は陰性であるものと結論された。

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) 医薬品毒性試験法ガイドライン, 厚生省,
医薬審第1604号 (平成11年11月1日)
- 2) 食品添加物の毒性テストガイドライン, 厚生省,
衛化第29号 (平成8年3月22日)
- 3) Schmid, W. (1976) The micronucleus test for
cytogenetic analysis, in : A. Hollaender (Ed.)
Chemical Mutagens, Principles and Methods
for Their Detection, vol. 4, Plenum. New York,
PP. 31~54.
- 4) Gollapudi, B. and O.P. Kamra. (1979)
Application of a simple Giemsa-staining
method in the micronucleus test, Mutation Res.,
64 ; 45~46
- 5) Kastenbaum, M. A. and K. O. Bowman. (1970)
Tables for determining the statistical
significance of mutation frequencies, Mutation
Res., 9 ; 527~549.

表3. 被験物質についての2回投与による50%致死量 (LD_{50}^2)

| 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週間) | 推定 LD_{50}^2 |
|-------|-------------------|------|------------------|----------------|
| メバロン酸 | 500 | ×2 | 3/3 | >2000mg/kg |
| | 1000 | ×2 | 3/3 | |
| | 2000 | ×2 | 3/3 | |

表 4. 小核試験成績

| 被験物質 | 投与量 (mg/kg/day) | 投与回数 | 投与間隔 | 標本作製時間 ^{a)} | 動物数 | 多染性赤血球頻度 | | 多染性赤血球観察数 | 小核含有多染性赤血球 | | | | |
|----------|--------------------|------|------|----------------------|-----|--------------------|------------------|-----------|----------------------|------------------|-------------|---------------|------|
| | | | | | | % ± SD (Min / Max) | 検定 ^{b)} | | 数 % ± SD (Min / Max) | 検定 ^{c)} | | | |
| メバロン酸 | 0 × 2 | 24h | 24h | 24h | 5 | 50.7 ± 6.3 | (41.0 / 58.2) | — | 10000 | 10 | 0.10 ± 0.06 | (0.00 / 0.15) | — |
| | 500 × 2 | 24h | 24h | 24h | 5 | 55.2 ± 7.1 | (44.5 / 63.3) | N.S. | 10000 | 18 | 0.18 ± 0.06 | (0.10 / 0.25) | N.S. |
| | 1000 × 2 | 24h | 24h | 24h | 5 | 52.8 ± 3.4 | (46.9 / 55.6) | N.S. | 10000 | 20 | 0.20 ± 0.06 | (0.15 / 0.30) | N.S. |
| | 2000 × 2 | 24h | 24h | 24h | 5 | 53.1 ± 9.0 | (43.2 / 63.3) | N.S. | 10000 | 15 | 0.15 ± 0.05 | (0.10 / 0.20) | N.S. |
| マイトマイシンC | 10 | ×1 | — | 24h | 5 | 52.5 ± 7.7 | (40.3 / 59.7) | N.S. | 10000 | 480 | 4.80 ± 2.36 | (1.20 / 7.25) | *** |

a) : 最終投与後のサンプリング時間

b) : Wilcoxonの順位和検定による検定

c) : 被験物質処理群はKastenbaum-Bowmanの数表による検定, マイトマイシンC処理群はカイ二乗検定による検定

N.S. : 有意差なし (p > 0.05)

*** : 有意差あり (p < 0.001)

付表 1.
 試験番号 : IET 02-0006
 被験物質名 : メバロン酸
 試験機関名 : (財)残留農薬研究所
 動物種 : マウス/ICR (CD-1) /雄/7週齢/経口投与
 備考 : 既存天然添加物

| mg/kg/day | SCHEDULE | MOUSE | MNPCE : % | PCE/(PCE+NCE): % | BW :g | CODE |
|-----------------|----------|-----------|-----------|------------------|-------|----------------|
| 0 溶媒 (純水) | ×2, 24hr | 11-1 | 0.15 | 51.2 | 33.6 | 62-382 |
| | | 11-2 | 0.10 | 41.0 | 31.2 | 62-140 |
| | | 11-3 | 0.15 | 50.0 | 31.4 | 62-971 |
| | | 11-4 | 0.10 | 53.2 | 35.1 | 62-392 |
| | | 11-5 | 0.00 | 58.2 | 33.9 | 62-046 |
| | | Mean | 0.10 | 50.7 | 33.0 | |
| | | Std | 0.06 | 6.3 | 1.7 | |
| | | Min | 0.00 | 41.0 | 31.2 | |
| | | Max | 0.15 | 58.2 | 35.1 | |
| | | Total No. | 10 | | | |
| 500 | ×2, 24hr | 12-1 | 0.20 | 44.5 | 32.4 | 62-735 |
| | | 12-2 | 0.25 | 53.3 | 33.6 | 62-829 |
| | | 12-3 | 0.10 | 55.3 | 29.6 | 62-453 |
| | | 12-4 | 0.15 | 59.6 | 35.2 | 62-272 |
| | | 12-5 | 0.20 | 63.3 | 31.3 | 62-650 |
| | | Mean | 0.18 | 55.2 | 32.4 | |
| | | Std | 0.06 | 7.1 | 2.1 | S ^K |
| | | Min | 0.10 | 44.5 | 29.6 | |
| | | Max | 0.25 | 63.3 | 35.2 | 判定 |
| | | Total No. | 18 | | | - |
| 1000 | ×2, 24hr | 13-1 | 0.30 | 54.8 | 34.4 | 62-404 |
| | | 13-2 | 0.20 | 46.9 | 35.0 | 62-726 |
| | | 13-3 | 0.15 | 55.6 | 33.1 | 62-827 |
| | | 13-4 | 0.20 | 53.4 | 33.0 | 62-205 |
| | | 13-5 | 0.15 | 53.2 | 33.0 | 62-914 |
| | | Mean | 0.20 | 52.8 | 33.7 | |
| | | Std | 0.06 | 3.4 | 0.9 | S ^K |
| | | Min | 0.15 | 46.9 | 33.0 | |
| | | Max | 0.30 | 55.6 | 35.0 | 判定 |
| | | Total No. | 20 | | | - |
| 2000 | ×2, 24hr | 14-1 | 0.20 | 43.2 | 34.8 | 62-268 |
| | | 14-2 | 0.20 | 44.4 | 30.9 | 62-575 |
| | | 14-3 | 0.10 | 63.3 | 34.4 | 62-472 |
| | | 14-4 | 0.15 | 54.9 | 32.8 | 62-296 |
| | | 14-5 | 0.10 | 59.5 | 35.6 | 62-764 |
| | | Mean | 0.15 | 53.1 | 33.7 | |
| | | Std | 0.05 | 9.0 | 1.9 | S ^K |
| | | Min | 0.10 | 43.2 | 30.9 | |
| | | Max | 0.20 | 63.3 | 35.6 | 判定 |
| | | Total No. | 15 | | | - |
| MMC 10 | ×1, 24hr | 15-1 | 4.55 | 40.3 | 34.5 | 62-012 |
| | | 15-2 | 7.25 | 59.7 | 32.9 | 62-878 |
| | | 15-3 | 1.20 | 57.3 | 33.8 | 62-213 |
| | | 15-4 | 6.55 | 55.0 | 31.1 | 62-162 |
| | | 15-5 | 4.45 | 50.4 | 32.8 | 62-959 |
| | | Mean | 4.80 | 52.5 | 33.0 | |
| | | Std | 2.36 | 7.7 | 1.3 | χ ² |
| | | Min | 1.20 | 40.3 | 31.1 | |
| | | Max | 7.25 | 59.7 | 34.5 | 判定 |
| | | Total No. | 480 | | | + |

B.W. : 投与1日目の体重

MNPCE : 小核含有多染性赤血球頻度

PCE/(PCE+NCE) : 多染性赤血球頻度

S^K : Kastenbaum-Bowmanの数表による検定

χ² : カイニ乗検定による検定 (p < 0.001)

MMC : マイトマイシンC

| Control | 500 | 1000 | 2000 | MMC |
|---------|------|------|------|------|
| 51.2 | 44.5 | 54.8 | 43.2 | 40.3 |
| 41.0 | 53.3 | 46.9 | 44.4 | 59.7 |
| 50.0 | 55.3 | 55.6 | 63.3 | 57.3 |
| 53.2 | 59.6 | 53.4 | 54.9 | 55.0 |
| 58.2 | 63.3 | 53.2 | 59.5 | 50.4 |

<2002/3/18>

| Group | Samples | Mean | S.E. | S.D. | Variance |
|-------|---------|---------|--------|--------|----------|
| 1 | 5 | 50.7200 | 2.8047 | 6.2715 | 39.3320 |
| 2 | 5 | 55.2000 | 3.1865 | 7.1253 | 50.7700 |
| 3 | 5 | 52.7800 | 1.5357 | 3.4339 | 11.7920 |
| 4 | 5 | 53.0600 | 4.0121 | 8.9712 | 80.4830 |
| 5 | 5 | 52.5400 | 3.4232 | 7.6546 | 58.5930 |

| Method | vs | Side | Stat. | 0.05 | 0.01 | 0.001 | Prob. |
|-------------------|--------|------|-------|--------|--------|--------|---------------|
| Wilcoxon rank sum | 1 vs 2 | | 2 | 1.2534 | 1.9600 | 2.5758 | 3.2905 0.2101 |
| Wilcoxon rank sum | 1 vs 3 | | 2 | 0.7334 | 1.9600 | 2.5758 | 3.2905 0.4633 |
| Wilcoxon rank sum | 1 vs 4 | | 2 | 0.6267 | 1.9600 | 2.5758 | 3.2905 0.5309 |
| Wilcoxon rank sum | 1 vs 5 | | 2 | 0.4178 | 1.9600 | 2.5758 | 3.2905 0.6761 |

カイ2乗検定

雄

| | 正常 | 異常 | |
|--------------|------|-----|-------|
| Control | 9990 | 10 | 10000 |
| Posi control | 9520 | 480 | 10000 |

<2002/3/18>

| Method | vs | Side | Stat. | 0.05 | 0.01 | 0.001 | Prob. |
|---------------------|----|------|-------|----------|--------|--------|-----------|
| 2*2 Chi-Square test | | | 0 | 460.1743 | 3.8415 | 6.6349 | 10.8276 0 |

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
苦味料を中心とした遺伝毒性の評価

分担研究者 岸 美智子（神奈川県衛生研究所・食品薬品部 食品化学科長）
協力研究者 宮澤 眞紀 神奈川県衛生研究所・食品薬品部 主任研究員

研究要旨

平成8年度厚生科学研究報告書「既存天然添加物の安全性評価に関する調査研究」での報告で、安全性試験実施も含めその安全性について検討する必要があるとされた138品目の既存添加物のうち、ヒメマツタケ抽出物(苦味料)及びログウッド色素(着色料)の安全性を再評価するため、マウス骨髄細胞の小核出現頻度を指標としたマウス小核試験を行い、染色体の構造異常及び数的異常を起こす性質があるか否かを検討した。その結果、これらの既存添加物での変異原性は認められなかった。

キーワード：遺伝毒性試験、*in vivo*小核試験、既存天然添加物、ヒメマツタケ抽出物、ログウッド色素

A. 研究目的

平成8年度厚生科学研究報告書「既存天然添加物の安全性評価に関する調査研究」で、138品目の既存天然添加物が、安全性試験実施も含めその安全性について検討する必要があると報告されている。そのうちの、ヒメマツタケ抽出物(苦味料)及びログウッド色素(着色料)の安全性を再評価するため、マウス骨髄細胞の小核出現頻度を指標としたマウス小核試験を行い、染色体の構造異常及び数的異常を起こす性質があるか否かを判定した。

B. 研究方法

1. 検体

1) ヒメマツタケ抽出物(ABM-EG3 岩出菌学研究所(株))

担子菌ヒメマツタケ(*Agaricus blazei* Murriil)の菌糸体及び子実体、またその培養液から水で抽出して得られたもので、濃褐色の粉末である。本製品は、エキス分30%(w/w)及び食物繊維70%(w/w)の組成であった。

2) ログウッド色素(供給元

Angostura(Trinidad)、輸入元(株)明治屋)

マメ科ログウッド(*Haematoxylon campechianum*)の心材より熱時水で抽出して得られる黒褐色の粉末で、主色素は、ヘマトキシリンである。

2. 試験溶液の調製

1) ヒメマツタケ抽出物

検体を蒸留水で溶解し、試験溶液とした。

2) ログウッド色素

検体を蒸留水で加熱溶解し、試験溶液とした。

3) 陰性対照

陰性対照は、蒸留水を用いた。

4) 陽性対照

陽性対照は、マイトマイシンC 2mg (マイトマイシン協和S、協和発酵工業株式会社)に生理食塩水を10mL加えて溶解した溶液を試験液とした。

3. 動物

8週齢のddY系雄マウス(日本SLC)を、温度22±3°C、明暗12時間のconventional環境下で固形飼料(日本クレア CE-2)及び水(水道水)を自

由摂取させ、1週間の観察期間を経た後、試験に使用した。

4. 急性毒性試験

検体の投与量を決定するために急性毒性試験を行った。ヒメマツタケ抽出物は、エキス分が30%(w/w)なので、エキス分として25、50及び100mg/mLになるよう試験溶液を調製した(ヒメマツタケ抽出物 83.3、166.7、及び333.3mg/mL)。ログウッド色素は25、50及び100mg/mLになるよう試験溶液を調製した。各試験液あたり1群3匹のマウスに20mL/kg/dayの容量で経口ゾンデを用いて経口投与を行った。24時間間隔で2回投与を行った後、2週間にわたり症状及び体重変化を観察した。

陰性対照には蒸留水を用い、24時間間隔で、2回経口投与を行った。

5. 小核試験

1) 群

マウスは1群5匹とし、各検体投与群3群、陰性対照群および陽性対照群を設けた。試験開始直前に体重を測定し、各実験群の平均体重に偏りが生じないように、群分けを行った。

2) 投与量および投与濃度

ヒメマツタケ抽出物は、1667mg、3333mg及び6667mg/20mL/kgを、ログウッド色素は、500mg、1000mg及び2000mg/20mL/kgを、24時間間隔で2回経口投与した。陰性対照として、蒸留水を20mL/kgを24時間間隔で2回経口投与した。

陽性対照としてマイトマイシンC 2mg/10mL/kgを、検体投与群及び陰性対照群の採材前日に、1回腹腔内投与を行った。

3) 採取時間

実験群、陰性対照群及び陽性対照群は、最終投与の24時間後に頸椎脱臼により屠殺し、大腿骨を採取した。

4) 標本作製

片側の大腿骨を取り出し、0.4mlの牛胎仔血清を用い、骨髓細胞を遠沈管に洗い出した。1000rpmで10分間遠沈し、上澄をすて少量の上澄み液で細胞懸濁液を作り、塗抹標本作製した。風

乾後、メタノールで5分間固定した。Sorensenリン酸緩衝液(pH 6.8)で希釈した3%ギムザ液で30分間染色し、水洗後、0.4%クエン酸溶液に数秒間浸し、水洗後送風下で乾燥させた。

5) 観察方法

標本はコード化し、多染性赤血球(PCE)および正染赤血球(NCE)を盲検法により観察した。1匹あたりPCEを2000個観察し、多染性赤血球中の小核出現頻度(MNPCE)および多染性赤血球比(PCE)を求めた。

PCEについては χ^2 検定を、MNPCEは条件付2項検定(Kastenbaum and Bouman)を行った。

C. 研究結果

1. 急性毒性試験

急性毒性試験の結果を表1に示した。ヒメマツタケ抽出物及びログウッド色素のいずれの濃度群においても、検体の投与による死亡や体重の減少は認められなかった。この結果に基づき、各検体における1回あたりの最高投与量は、ヒメマツタケ抽出物6667mg/kgおよびログウッド色素2000mg/kgとした。

2. 小核試験

ヒメマツタケ抽出物及びログウッド色素の小核試験の結果を表2に、各検体における結果詳細を付表に示した。

1) ヒメマツタケ抽出物

多染性赤血球中の小核保有細胞の出現頻度は、陽性対照群では2.30%、陰性対照群では0.12%、試験溶液投与群の6667mg/kg群、3333mg/kg群、1667mg/kg群でそれぞれ0.15%、0.16%、0.16%であった。いずれの試験溶液投与群でも、陰性対照群と比較して小核保有細胞の出現頻度に有意差は認められず、また多染性赤血球比(PCE)の減少も認められなかった。以上によりヒメマツタケ抽出物の小核試験は、陰性の結果であった。

2) ログウッド色素

多染性赤血球中の小核保有細胞の出現頻度は、陽性対照群では3.11%、陰性対照群では0.13%、試験溶液投与群の2000mg/kg群、1000mg/kg群、

500mg/kg群でそれぞれ0.09%、0.12%、0.10%であった。いずれの試験溶液投与群でも、陰性対照群と比較して小核保有細胞の出現頻度に有意差は認められず、また多染性赤血球比(PCE)の減少も認められなかった。以上によりログウッド色素の小核試験は、陰性の結果であった。

D. 考 察

ヒメマツタケ (*Agaricus blazei* Murrill) は、ブラジル原産の担子菌で、その子実体から単離された複数のpolysaccharideや、linoreic acid及びergosterolでの抗腫瘍作用が実験的に証明され、健康食品として広く市販されている。食品添加物としては、水溶性の画分が苦味料として使用されているが、使用基準は定められておらず、安全性についてのデータもない。そこで、今回ヒメマツタケ抽出物の急性毒性試験及びマウス骨髄細胞での小核試験を行った。試験に用いたヒメマツタケ抽出物は、エキス分が30%(w/w)であったため、苦味料の本体であるエキス分としての最高投与量が2000mg/kg/dayになるように投与を行った。ヒメマツタケ抽出物としては大量の投与量(6667mg/kg/day)にもかかわらず、死亡や異常な症状及び体重の減少も認められず、極めて毒性の低い物質であることが示された。小核試験の結果も、MNPCE及びPCEで全く有意差を認めなかった。Delmontらは、マウスにおいてcyclophosphamideによる染色体異常を、ヒメマツタケの抽出溶液が抑制したことを報告している。また、Menoliらは、チャイニーズハムスターのV76細胞における染色体異常試験で、ヒメマツタケ抽出溶液が、methylethanesulfonateの変異原性を抑制し、それ自体にも変異原性がなかったことを報告している。これらの試験に用いた抽出物より本試験で用いた検体の方が高濃度であり、抽出方法も異なっているが、これらの試験と同様に本試験の結果からも、ヒメマツタケ抽出物には、変異原性はないものと考えられる。

ログウッド色素は、メキシコ原産のマメ科の

常緑小高木であるログウッド(*Haematoxylon campechianum*)の心材より熱水抽出して得られる色素で、着色料として海外で用いられている。主成分としてヘマトキシリンを約10%含有しており、他にtanninやresinを含有している。主色素であるヘマトキシリンは、顕微鏡観察用の染色色素として古くから使用されているが、安全性に関するデータはほとんどない。そこで、ログウッド色素の急性毒性試験及びマウス骨髄細胞の小核試験を行った。急性毒性試験では、死亡や異常な症状及び体重の減少も認められず、極めて毒性の低い物質であることが示された。小核試験の結果も、MNPCE及びPCEで全く有意差を認めなかった。ヘマトキシリンについては、AuらがCHO細胞を用いた染色体異常試験を行っているが、染色体異常はなかったことが報告されている。ログウッド色素はヘマトキシリンを主色素とするものの、より粗な状態であり、他の抽出成分も多く含有している。しかし、今回の小核試験の結果から、変異原性はないものと考えられる。

E. 結 論

今回の研究で用いた既存天然添加物であるヒメマツタケ抽出物及びログウッド色素では変異原性は認められなかった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT) (CSGMT/JEMS, MMS, The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan) : Protocol recommended by the CSGMT/JEMS.MMS for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test, *Mutagenesis*, 10, 153-159 (1995)

- 2) The collaborative Study Group for the Micronucleus Test : Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining;the summary report of the 5th collaborative study by CSGMT/JEMS · MMS, Mutat. Res., 278, 83-98 (1992)
- 3) Kishi, M., Horiuchi, Y., watanabe, S. and Hayashi, M. : Varidation of the mouse peripheral blood micronucleus assay using acridine supravital staining with urethane, Mutat.Res., 278, 205-208 (1992)
- 4) by cyclophosphamide, Mutat. Res., 496, 15-21 (2001)
- 5) Menoli, RC., Mantovani, MS., Riberio, LR., Speit, G. and Jordao, BQ. : Antimutagenic effects of the mushroom *Agaricus blazei* Murill extracts on V79 cells, Mutat. Res., 496, 5-13 (2001)
- 6) The Merc Index. 9th ed. Rahway, New Jersey: Merc & Co.,Inc.,606 (1979)
- 7) Au, W. and Hsu, TC. : Studies on the clastogenic effects of biologic stains and dyes, Environ. Mutagen., 1, 27-35 (1979)

H. 参考資料

- 1) Kastenbaum, M.A. and Bowman, K.O. : Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies, Mutat. Res., 9, 529-549 (1970)
- 2) 厚生省生活衛生局食品化学課監修, 食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針 (1996)
- 3) Itoh, H., Ito, H., Amano, H., and Noda, H. : ~~Inhibitory~~ action of a (1 → 3) glucan-protein complex isolated from *Agaricus blazei* Murill(Himematsutake) on Meth A fibrosarcoma-bearing mice and its antitumor mechanism, Jpn. J. Pharmacol., 66, 265-271 (1994)
- 4) Osaki, Y., Kato, T., Yamamoto, K., Okubo, J. and Miyazaki, T. : Antimutagenic and bactericidal substances in the fruit body of a Bacidiomycete *Agaricus blazei*, Yakugaku Zasshi, 114, 342-350 (1994)
- 5) Takaku, T., Kimura, Y. and Okuda, H. : Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murill and its mechanism of action, J. Nutr., 131, 14009-1413 (2001)
- 6) Delmonto, RD., de Lima,PL., Sugui, MM., da Eira, AF., Salvadori, DM., Speit, G. and Ribeiro, LR. : Antimutagenic effect of *Agaricus blazei* Murill mushroom on the genotoxicity induced

表1. 被験物質についての2回投与による50%致死量 (LD₅₀²)

| 品目 | 1回あたりの投 与量 (mg/kg) | 投与回数 | 生存数/投与数 (二週間) | 推定LD ₅₀ ² |
|-----------|-----------------------|------|------------------|---------------------------------|
| ヒメマツタケ抽出物 | 1667 | ×2 | 3/3 | |
| | 3333 | ×2 | 3/3 | |
| | 6667 | ×2 | 3/3 | >6667mg/kg |
| ログウッド色素 | 500 | ×2 | 3/3 | |
| | 1000 | ×2 | 3/3 | |
| | 2000 | ×2 | 3/3 | >2000mg/kg |

表2. 小核試験成績

| 被験物質 | 動物 サンプル リング 時間 ^{a)} | 投与回数 | 投与間隔 | 動物 数 | 多染性赤血球頻度 | | | 多染性赤血球 | | |
|----------------------|---------------------------------------|------|------|---------|--------------------------|--------------------|------------------|--------|------------------|---------------------------|
| | | | | | mg/kg/day | % ± SD (Min / Max) | 検定 ^{b)} | 観察数 | 検定 ^{c)} | % ± SD (Min / Max) |
| ヒメマツダゲ抽出物 (Water) | 24 | ×2 | 24h | 5 | 56.5 ± 4.8 (51.2 / 62.4) | — | 10000 | 12 | — | 0.12 ± 0.08 (0.05 / 0.20) |
| | 24 | ×2 | 24h | 5 | 56.0 ± 4.0 (50.4 / 59.8) | N.S. | 10000 | 16 | N.S. | 0.16 ± 0.10 (0.05 / 0.30) |
| | 24 | ×2 | 24h | 5 | 54.0 ± 5.2 (49.0 / 62.0) | N.S. | 10000 | 16 | N.S. | 0.16 ± 0.09 (0.05 / 0.30) |
| | 24 | ×2 | 24h | 5 | 54.6 ± 4.1 (50.8 / 60.8) | N.S. | 10000 | 15 | N.S. | 0.15 ± 0.04 (0.10 / 0.20) |
| MMC (i.p.) | 24 | ×1 | 24h | 5 | 56.9 ± 6.4 (50.2 / 64.8) | N.S. | 10000 | 230 | *** | 2.30 ± 0.76 (1.50 / 3.40) |
| ログウッド色素 (Water) | 24 | ×2 | 24h | 5 | 57.4 ± 4.7 (52.8 / 64.8) | — | 10000 | 13 | — | 0.13 ± 0.10 (0.05 / 0.30) |
| | 24 | ×2 | 24h | 5 | 55.7 ± 3.6 (51.0 / 61.0) | N.S. | 10000 | 10 | N.S. | 0.10 ± 0.08 (0.00 / 0.20) |
| | 24 | ×2 | 24h | 5 | 55.9 ± 5.0 (50.2 / 62.0) | N.S. | 10000 | 12 | N.S. | 0.12 ± 0.09 (0.00 / 0.20) |
| | 24 | ×2 | 24h | 5 | 56.8 ± 3.6 (52.2 / 61.8) | N.S. | 10000 | 9 | N.S. | 0.09 ± 0.07 (0.00 / 0.20) |
| MMC (i.p.) | 24 | ×1 | 24h | 5 | 53.9 ± 5.0 (47.2 / 60.0) | N.S. | 10000 | 311 | ** | 3.11 ± 0.51 (2.50 / 3.75) |

^{a)} : 最終投与後のサンプリング時間

^{b)} : Wilcoxonの順位和検定による検定

^{c)} : MMCはカイ二乗検定による検定 (***) p < 0.001, ** p < 0.01, * p < 0.05, それ以外はKastenbaum-Bowmanの数表による検定

CMC : Carboxymethylcellulose sodium salt

MMC : Mitomycin C

N.S. : Not significantly different from the vehicle control. (p > 0.05)

付表 1.
 IET No. :
 検体名 : ヒメマツタケ抽出物
 機関名 : 神奈川県衛生研究所
 動物 : マウス/ddY /雄/9週齢/経口投与

| mg/kg/day | SCHEDULE | MOUSE | MNPCE : % | PCE/(PCE+NCE): % | BW:g | CODE |
|-------------------------|----------|-----------|-----------|------------------|------|----------------|
| 0 Vehicle (Water) | ×2, 24hr | AN-1 | 0.20 | 51.2 | 38.6 | 13180 |
| | | AN-2 | 0.05 | 52.2 | 36.9 | 13189 |
| | | AN-3 | 0.05 | 57.2 | 36.6 | 13132 |
| | | AN-4 | 0.10 | 62.4 | 36.9 | 13192 |
| | | AN-5 | 0.20 | 59.4 | 35.9 | 13147 |
| | | Mean | 0.12 | 56.5 | 37.0 | |
| | | Std | 0.08 | 4.8 | 1.0 | |
| | | Min | 0.05 | 51.2 | 35.9 | |
| | | Max | 0.20 | 62.4 | 38.6 | |
| | | Total No. | 12 | | | |
| 1667 | ×2, 24hr | AL-1 | 0.15 | 57.4 | 37.1 | 13133 |
| | | AL-2 | 0.05 | 59.0 | 35.9 | 13160 |
| | | AL-3 | 0.30 | 53.2 | 38.6 | 13143 |
| | | AL-4 | 0.10 | 50.4 | 37.1 | 13134 |
| | | AL-5 | 0.20 | 59.8 | 37.5 | 13124 |
| | | Mean | 0.16 | 56.0 | 37.2 | |
| | | Std | 0.10 | 4.0 | 1.0 | S ^K |
| | | Min | 0.05 | 50.4 | 35.9 | |
| | | Max | 0.30 | 59.8 | 38.6 | 判定 |
| | | Total No. | 16 | | | - |
| 3333 | ×2, 24hr | AM-1 | 0.15 | 49.0 | 38.7 | 13118 |
| | | AM-2 | 0.05 | 54.0 | 36.9 | 13187 |
| | | AM-3 | 0.15 | 49.8 | 36.5 | 13172 |
| | | AM-4 | 0.30 | 62.0 | 36.1 | 13131 |
| | | AM-5 | 0.15 | 55.2 | 37.6 | 13142 |
| | | Mean | 0.16 | 54.0 | 37.2 | |
| | | Std | 0.09 | 5.2 | 1.0 | S ^K |
| | | Min | 0.05 | 49.0 | 36.1 | |
| | | Max | 0.30 | 62.0 | 38.7 | 判定 |
| | | Total No. | 16 | | | - |
| 6667 | ×2, 24hr | AH-1 | 0.15 | 60.8 | 38.2 | 13178 |
| | | AH-2 | 0.10 | 53.6 | 38.0 | 13144 |
| | | AH-3 | 0.20 | 56.4 | 35.9 | 13103 |
| | | AH-4 | 0.15 | 51.6 | 36.2 | 13153 |
| | | AH-5 | 0.15 | 50.8 | 37.3 | 13117 |
| | | Mean | 0.15 | 54.6 | 37.1 | |
| | | Std | 0.04 | 4.1 | 1.0 | S ^K |
| | | Min | 0.10 | 50.8 | 35.9 | |
| | | Max | 0.20 | 60.8 | 38.2 | 判定 |
| | | Total No. | 15 | | | - |
| MMC 2 (i.p.) | ×1, 24hr | AP-1 | 1.50 | 55.4 | 38.4 | 13158 |
| | | AP-2 | 2.10 | 51.8 | 38.3 | 13168 |
| | | AP-3 | 1.80 | 64.8 | 37.3 | 13102 |
| | | AP-4 | 2.70 | 50.2 | 40.4 | 13149 |
| | | AP-5 | 3.40 | 62.2 | 39.1 | 13175 |
| | | Mean | 2.30 | 56.9 | 38.7 | |
| | | Std | 0.76 | 6.4 | 1.2 | χ ² |
| | | Min | 1.50 | 50.2 | 37.3 | |
| | | Max | 3.40 | 64.8 | 40.4 | 判定 |
| | | Total No. | 230 | | | +++ |

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の数表による検定

χ² : カイ二乗検定による検定 (p<0.001)

MMC : Mitomycin C