

付表 2.

IET No. :
 検体名 : ログウッド色素
 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	LN-1	0.30	58.4	39.9	13226
		LN-2	0.15	56.4	38.3	13205
		LN-3	0.10	52.8	41.2	13284
		LN-4	0.05	64.8	38.0	13285
		LN-5	0.05	54.4	36.8	13214
		Mean	0.13	57.4	38.8	
		Std	0.10	4.7	1.7	
		Min	0.05	52.8	36.8	
		Max	0.30	64.8	41.2	
		Total No.	13			
500	×2, 24hr	LL-1	0.00	56.4	38.3	13255
		LL-2	0.10	61.0	37.2	13263
		LL-3	0.15	55.2	38.6	13230
		LL-4	0.20	51.0	39.8	13294
		LL-5	0.05	54.8	40.6	13256
		Mean	0.10	55.7	38.9	
		Std	0.08	3.6	1.3	S ^K
		Min	0	51.0	37.2	
		Max	0.20	61.0	40.6	判定
		Total No.	10			—
1000	×2, 24hr	LM-1	0.20	57.6	38.5	13237
		LM-2	0.20	58.6	40.5	13293
		LM-3	0.00	50.2	39.4	13225
		LM-4	0.15	51.2	39.7	13259
		LM-5	0.05	62.0	38.5	13283
		Mean	0.12	55.9	39.3	
		Std	0.09	5.0	0.8	S ^K
		Min	0	50.2	38.5	
		Max	0.20	62.0	40.5	判定
		Total No.	12			—
2000	×2, 24hr	LH-1	0.20	61.8	39.9	13267
		LH-2	0.05	58.6	36.4	13219
		LH-3	0.10	55.6	38.0	13271
		LH-4	0.10	55.8	39.0	13228
		LH-5	0.00	52.2	40.8	13281
		Mean	0.09	56.8	38.8	
		Std	0.07	3.6	1.7	S ^K
		Min	0	52.2	36.4	
		Max	0.20	61.8	40.8	判定
		Total No.	9			—
MMC 2 (i.p.)	×1, 24hr	LP-1	3.75	60.0	41.0	13201
		LP-2	2.95	54.4	42.5	13248
		LP-3	2.50	51.0	41.0	13265
		LP-4	2.85	47.2	40.3	13254
		LP-5	3.50	57.0	41.2	13204
		Mean	3.11	53.9	41.2	
		Std	0.51	5.0	0.8	χ ²
		Min	2.5	47.2	40.3	
		Max	3.75	60.0	42.5	判定
		Total No.	311			++

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 : カイニ乗検定による検定 (p<0.01)

MMC : Mitomycin C

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 宮川 誠（株）三菱化学安全科学研究所

研究要旨

既存天然添加物等の変異原性を中心とした安全性研究の一環として、マウス骨髄細胞を用いる小核誘試験でホホバロウ、サンダラック樹脂およびエラグ酸、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537および*Escherichia coli* WP2uvrA/pKM101の5菌株を用いる復帰突然変異試験でモンタンロウの変異原性をそれぞれ調べた。

ホホバロウ、サンダラック樹脂およびエラグ酸は、予備試験として7週齢のICR系（Crj：CD-1）雌雄マウスに500、1000、2000 mg/kgの3用量で強制経口投与（2回、24時間間隔）した。その結果、いずれの被験物質においても、雌雄ともに被験物質投与による死亡および一般状態の変化は見られなかった。

この結果に基づき、それぞれの被験物質で7週齢のICR系雄マウスに500、1000、2000 mg/kgの3用量で強制経口投与（2回、24時間間隔）し、骨髄細胞における小核誘発性の有無を検討した。いずれの被験物質も投与による死亡および一般状態の変化は見られなかった。小核をもつ多染性赤血球（MNPCE）の出現数および多染性赤血球（PCE）の割合は、いずれの被験物質も陰性対照群と比較して有意な差はなかった。

モンタンロウは、予備試験として5000、1250、313、78.1、19.5、4.88および1.22 µg/プレートで実施した結果、S9 mixの有無にかかわらず、いずれの菌株においても被験物質処理群における復帰変異コロニー数は陰性（溶媒）対照値の2倍以下であった。また、S9 mixの有無にかかわらず、いずれの菌株においても菌の生育阻害は認められなかった。なお、S9 mix非存在下および存在下の1250 µg/プレート以上でプレート上に沈殿物が認められた。

これらの結果に基づき、S9 mix非共存下および共存下のすべての菌株について5000、2500、1250、625、313 µg/プレートの5用量を設定して本試験を実施した。その結果、S9 mixの有無にかかわらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数は陰性（溶媒）対照値の2倍以下であった。また、S9 mixの有無にかかわらず、いずれの菌株についても菌の生育阻害は認められなかった。なお、S9 mix非存在下および存在下の625 µg/プレート以上でプレート上に沈殿物が認められた。

したがって、本試験条件下におけるホホバロウ、サンダラック樹脂およびエラグ酸はマウス骨髄細胞を用いる小核試験において変異原性を有しないと結論した。また、モンタンロウは細菌を用いる復帰突然変異試験において変異原性を有しないと結論した。

A. 研究目的

既存天然添加物等の変異原性を中心とした安全性研究の一環として、マウス骨髄細胞を用いる小核試験でホホバロウ、サンダラック樹脂およびエラグ酸の変異原性を検討した。また、ネズミチフス菌株および大腸菌株を用いる復帰突然変異試験でモンタンロウの変異原性を検討した。

B. 研究方法

ミツバ貿易㈱から提供されたホホバロウ（品名JOJOBAL〔精製ホホバオイル〕、製造番号014270）、㈱岐阜セラミック製造所から提供されたサンダラック樹脂および長岡香料㈱から提供されたエラグ酸（製造番号11222）をマウス骨髄細胞を用いる小核試験に使用した。また、㈱ロッテから提供されたモンタンロウをネズミチフス菌株および大腸菌株を用いる復帰突然変異試験に使用した。

[マウス小核試験]

日本チャールス・リバー㈱からICR系（Crj：CD-1）マウス（7週齢）を購入し、温湿度、換気および照明が自動制御されている飼育室で飼育した。

食品添加物ガイドラインに従い投与経路は経口（強制経口投与）、投与回数2回は（24時間間隔）とした。ただし、陽性対照群については、単回腹腔内投与とした。

予備検討は、雌雄マウスに500、1000、2000 mg/kgで強制経口投与（2回、24時間間隔）を実施した。その結果、雌雄ともに被験物質投与による死亡および一般状態の変化は見られなかった。

したがって、本試験の用量は2000 mg/kgを最高用量として以下1000、500 mg/kgの3用量（公比2）とした。その他に溶媒（オリーブ油）のみを投与する陰性対照群およびCP 40 mg/kgを投与する陽性対照群を設定した。投与液量は、いずれも体重1 kgあたり10 mLとし、各投与直前に測定した体重をもとに算出した。

被験物質をオリーブ油（ヨシダ製薬㈱）で溶解し、同じ溶媒で段階希釈したものを投与した。群構成は、被験物質投与群、陰性対照群および陽性対照群をそれぞれ5匹ずつとした。一般状態を1日1回観察した。

投与日（投与直前）および標本作製日に全例の体重を測定した。

最終投与24時間後にマウスを頸椎脱臼により安楽死させた後、大腿骨を摘出した。リン酸緩衝生理食塩液〔PBS(-)、日水製薬㈱〕で骨髄細胞を洗出し、細胞浮遊液を得た。この細胞浮遊液を200 rpmで5分間遠心分離した後、上清を分取した。上清に10%中性緩衝ホルマリンを加え、1000 rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てた。同様の操作を2回繰り返し、残った少量の10%中性緩衝ホルマリンで均一な骨髄細胞浮遊液を作り、保存した。骨髄細胞浮遊液をアクリジン・オレンジ染色し、骨髄細胞をスライドガラスに伸展した。

標本はB励起の蛍光顕微鏡を用いてブラインド法により観察した。1個体毎に全赤血球（多染性赤血球および正染性赤血球）1000個における多染性赤血球の割合を調べると共に、多染性赤血球2000個中の小核をもつ細胞数を数えた（2領域、合計2000個）。細胞の識別はHayashiらの方法に従い、赤血球の細胞質中に黄緑色の蛍光を放つ顆粒を小核とした。なお、多染性赤血球とは赤血球の細胞質が赤色蛍光色のもの、正染性赤血球とは赤血球の細胞質が蛍光を発しないものとしてそれぞれを区別した。小核をもつ多染性赤血球の出現頻度についてはKastenbaumとBowmanの統計学的方法、多染性赤血球出現頻度（%）についてはStudentのt検定を用いて有意水準5%および1%の有意差検定を実施した。用量の増加とともに小核をもつ多染性赤血球の有意な増加が認められる場合を陽性と判定した。

（倫理面への配慮）

本研究は㈱三菱化学安全科学研究所鹿島研究所動物実験倫理委員会の承認を受けて実施したものである。

[復帰突然変異試験]

陰性（溶媒）対照物質にはジメチルスルホキシド（DMSOと略す；関東化学株）を用いた。また、陽性対照物質にはAF-2、 NaN_3 、ENNG、9-AA、2-AAを用いた。

テスト菌株はカリフォルニア大学B. N. Ames教授より入手した*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537および日本バイオアッセイ研究センターより入手した*Escherichia coli* WP2uvrA/pKM101の5菌株を用いた。

各テスト菌株のアミノ酸要求性、紫外線感受性、膜変異、薬剤耐性などの遺伝的特徴を事前に調べ、これらの特性を備えた菌株を用いた。

溶媒検討の結果、被験物質は50 mg/mLで注射用水（DWと略す）およびDMSOに不溶であったが、被験物質およびDMSOを約70～80℃に加温することでDMSOに均一に懸濁した。また、均一に懸濁した後は、常温においても均一な懸濁を保っていた。さらに、DMSOを加えた際に変色、発泡等の変化は認められなかった。この結果から、溶媒にはDMSOを用いた。被験物質を加温融解した後、加温したDMSOを加え、振盪攪拌および超音波処理により均一に懸濁させて50 mg/mLの被験物質懸濁液とした。これを同じ溶媒で段階希釈して各用量の被験物質懸濁液を調製した。被験物質溶液は用時調製し、被験物質の秤量、希釈、分注、調製および調製後の保存は黄色灯下で行った。

陽性対照物質溶液はあらかじめ調製し、使用時まで超低温冷凍庫で-80℃以下に保存した。 NaN_3 はDW（株大塚製薬工場）に、その他の陽性対照物質はDMSOに溶解した。

予備試験を5000、1250、313、78.1、19.5、4.88および1.22 μg /プレートで実施した。その結果、S9 mixの有無にかかわらず、いずれの菌株においても被験物質処理群における復帰変異コロニー数は陰性（溶媒）対照値の2倍以下であった。また、S9 mixの有無にかかわらず、い

ずれの菌株においても菌の生育阻害は認められなかった。なお、S9 mix非存在下および存在下の1250 μg /プレート以上でプレート上に沈殿物が認められた。これらの結果をもとに、S9 mix非共存下および共存下のすべての菌株について5000、2500、1250、625、313 μg /プレートの5用量を設定して本試験を実施した。

試験はプレインキュベーション法を用いて、S9 mix非存在下および存在下で実施した。滅菌した試験管に被験物質溶液または陰性（溶媒）対照物質あるいは陽性対照物質溶液を0.1 mL、S9 mix非存在下の場合、次いで0.1 mol/Lナトリウムリン酸緩衝液（pH 7.4）を0.5 mL、S9 mix存在下の場合、S9 mixを0.5 mL添加し、さらに菌懸濁液を0.1 mL加え、37℃で20分間振盪してインキュベーションした（プレインキュベーション）。

トップアガー2 mLをこの混合液に加え、最少グルコース寒天平板培地上に重層した。重層したトップアガーが凝固した後、37℃で48時間以上培養した。

実体顕微鏡を用いて菌叢の生育状態を観察し、被験物質による菌の生育阻害の程度を調べた後、目視により被験物質の沈殿の有無を確認した。

プレート上の復帰変異コロニー数を自動コロニーカウンターまたは目視で計測した。予備試験は各用量につき1枚のプレートを使用した。本試験は各用量につき3枚のプレートを使用し、2回実施した。

また、陽性対照物質についても同様に実施した。

無菌試験にはそれぞれ1枚のプレートを用いた。最高用量の被験物質懸濁液またはS9 mixをトップアガー2 mLと混和し、それぞれ最少グルコース寒天平板培地上に重層した。重層したトップアガーが凝固した後、37℃で48時間培養し、雑菌の混入について確認した。

試験結果の判定に際しては、いずれかの試験菌株で、S9 mixの有無にかかわらず、被験物質用量の増加にともなって復帰変異コロニー数

(平均値)が陰性(溶媒)対照値の2倍以上に増加し、さらにその増加に再現性が認められる場合に、当該被験物質は変異原性を有する(陽性)と判定した。その他の場合は陰性と判定した。試験結果の判定に統計学的手法は用いなかった。

C. 研究結果

試験の結果を別表1～6に示す。

[マウス小核試験]

予備試験は、いずれの被験物質についても7週齢のICR系(Crj:CD-1)雌雄マウスに500、1000、2000 mg/kgの3用量で強制経口投与(2回、24時間間隔)した結果、いずれの被験物質においても、雌雄ともに被験物質投与による死亡および一般状態の変化は見られなかった。

この結果に基づき、それぞれの被験物質で7週齢のICR系雄マウスに500、1000、2000 mg/kgの3用量で強制経口投与(2回、24時間間隔)し、骨髄細胞における小核誘発性の有無を検討した。いずれの被験物質も被験物質投与による死亡および一般状態の変化は見られなかった。小核をもつ多染性赤血球(MNPCE)の出現数および多染性赤血球(PCE)の出現頻度は、いずれの被験物質投与群でも、陰性対照群と比較して有意な差はなかった。

[復帰突然変異試験]

予備試験を5000、1250、313、78.1、19.5、4.88および1.22 μ g/プレートで実施した。その結果、S9 mixの有無にかかわらず、いずれの菌株においても被験物質処理群における復帰変異コロニー数は陰性(溶媒)対照値の2倍以下であった。また、S9 mixの有無にかかわらず、いずれの菌株においても菌の生育阻害は認められなかった。なお、S9 mix非存在下および存在下の1250 μ g/プレート以上でプレート上に沈殿物が認められた。

これらの結果を基に、S9 mix非共存下および共存下のすべての菌株について5000、2500、1250、625、313 μ g/プレートの5用量を設定して本試験を実施した結果、S9 mixの有無

にかかわらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数は陰性(溶媒)対照値の2倍以下であった。また、S9 mixの有無にかかわらず、いずれの菌株についても菌の生育阻害は認められなかった。なお、S9 mix非存在下および存在下の625 μ g/プレート以上でプレート上に沈殿物が認められた。

最高用量の被験物質溶液およびS9 mixについて行った無菌試験の結果、試験に影響を及ぼすような菌、カビ等の混入は認められなかった。

なお、溶媒に加温したDMSOを用いたことによる試験系への影響を確認するため、加温していないDMSOによる陰性対照試験を同時に実施したが、加温したDMSOの結果と比較して明らかな差は認められなかった。

D. 考察および結論

マウス小核試験、復帰突然変異試験ともに陰性(溶媒)対照値および陽性対照値が適正範囲内であったことから、試験が適切に実施されたことが確認できた。

E. 結論

ホホバロウ、サンダラック樹脂およびエラグ酸のマウス小核試験では、いずれも小核を持つ多染性赤血球の出現頻度の増加は見られなかったため、陰性と結論した。モンタンロウの復帰突然変異試験でも2倍以上のコロニー数の増加は見られなかったため陰性と結論した。

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

特になし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

I. 参考資料

- 1) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983) : Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutat. Res.*, **113**, 173-215
- 2) Green, M.H.L. and Muriel, W.J. (1976) : Mutagen testing using *Trp*⁺ reversion in *Escherichia coli*, *Mutat. Res.*, **38**, 3-32
- 3) 労働省安全衛生部化学物質調査課編 (1991) : 安衛法における変異原性試験, 中央労働災害防止協会, 東京

別表1 小核試験結果

被験物質	濃度 (mg/kg) ×投与回数	動物番号	PCE 観察数	MNPCE		PCE/(PCE+NCE) (%) (Mean±SD)
				観察数 (合計)	出現頻度 (Mean±SD)	
陰性対照 (オリーブ油)	0×2 ¹	10101	2000	2	0.10	50.0
		10102	2000	2	0.10	46.6
		10103	2000	1	0.05	50.3
		10104	2000	3	0.15	51.8
		10105	2000	2	0.10	50.9
				(10)	0.10 ± 0.04	49.9 ± 1.98
被験物質 (ホホバロウ)	500×2 ¹	10201	2000	2	0.10	54.4
		10202	2000	5	0.25	55.4
		10203	2000	1	0.05	50.4
		10204	2000	1	0.05	41.8
		10205	2000	2	0.10	54.3
				(11)	0.11 ± 0.08	51.3 ± 5.62
	1000×2 ¹	10301	2000	1	0.05	45.8
10302		2000	3	0.15	46.1	
10303		2000	1	0.05	55.1	
10304		2000	1	0.05	52.7	
10305		2000	3	0.15	53.7	
				(9)	0.09 ± 0.05	50.7 ± 4.40
	2000×2 ¹	10401	2000	1	0.05	55.8
10402		2000	5	0.25	49.8	
10403		2000	3	0.15	55.0	
10404		2000	2	0.10	56.8	
10405		2000	1	0.05	52.2	
				(12)	0.12 ± 0.08	53.9 ± 2.87 ^{4#}
陽性対照 (CP)	40×1 ²	10501	2000	34	1.70	51.9
		10502	2000	32	1.60	56.0
		10503	2000	43	2.15	56.0
		10504	2000	60	3.00	56.9
		10505	2000	45	2.25	56.1
				(214) ^{3**}	2.14 ± 0.56	55.4 ± 1.98 ^{4##}

PCE：多染性赤血球，MNPCE：小核を持つ多染性赤血球，

NCE：正染性赤血球，CP：シロホソアミド

1. 経口投与（24時間間隔，2回）

2. 腹腔内投与（1回）

3. Kastenbaum と Bowman の統計学的方法による有意差検定 (** p<0.01)

4. Student の *t*-検定による有意差検定 (# p<0.05, ## p<0.01)

別表2 小核試験結果

被験物質	濃度 (mg/kg) ×投与回数	動物番号	PCE 観察数	MNPCE		PCE/(PCE+NCE) (%) (Mean±SD)
				観察数 (合計)	出現頻度 (Mean±SD)	
陰性対照 (オリーブ油)	0×2 ¹	10101	2000	2	0.10	50.0
		10102	2000	2	0.10	46.6
		10103	2000	1	0.05	50.3
		10104	2000	3	0.15	51.8
		10105	2000	2	0.10	50.9
				(10)	0.10 ±0.04	49.9 ±1.98
被験物質 (サンダラック樹脂)	500×2 ¹	30101	2000	1	0.05	47.7
		30102	2000	3	0.15	50.1
		30103	2000	2	0.10	45.5
		30104	2000	3	0.15	47.8
		30105	2000	1	0.05	51.3
				(10)	0.10 ±0.05	48.5 ±2.27
	1000×2 ¹	30201	2000	3	0.15	51.7
30202		2000	2	0.10	51.4	
30203		2000	2	0.10	50.7	
30204		2000	2	0.10	50.5	
30205		2000	1	0.05	48.4	
				(10)	0.10 ±0.04	50.5 ±1.29
	2000×2 ¹	30301	2000	2	0.10	48.6
30302		2000	4	0.20	47.0	
30303		2000	1	0.05	57.9	
30304		2000	1	0.05	51.6	
30305		2000	3	0.15	55.1	
				(11)	0.11 ±0.07	52.0 ±4.50
陽性対照 (CP)	40×1 ²	10501	2000	34	1.70	51.9
		10502	2000	32	1.60	56.0
		10503	2000	43	2.15	56.0
		10504	2000	60	3.00	56.9
		10505	2000	45	2.25	56.1
				(214) ^{3**}	2.14 ±0.56	55.4 ±1.98 ^{4##}

PCE：多染性赤血球，MNPCE：小核を持つ多染性赤血球，
NCE：正染性赤血球，CP：シロキファミド

1. 経口投与（24時間間隔，2回）

2. 腹腔内投与（1回）

3. Kastenbaum と Bowmanの統計学的方法による有意差検定 (** p<0.01)

4. Studentのt-検定による有意差検定 (# p<0.05, ## p<0.01)

別表3 小核試験結果

被験物質	濃度 (mg/kg) ×投与回数	動物番号	PCE 観察数	MNPCE		PCE/(PCE+NCE) (%) (Mean±SD)
				観察数 (合計)	出現頻度 (Mean±SD)	
陰性対照 (オリーブ油)	0×2 ¹	10101	2000	1	0.05	59.8
		10102	2000	5	0.25	51.0
		10103	2000	6	0.30	59.1
		10104	2000	2	0.10	57.6
		10105	2000	3	0.15	55.6
				(17)	0.17 ± 0.10	56.6 ± 3.53
被験物質 (エラゲ酸)	500×2 ¹	10201	2000	1	0.05	56.0
		10202	2000	5	0.25	58.2
		10203	2000	3	0.15	56.3
		10204	2000	2	0.10	57.0
		10205	2000	2	0.10	60.7
				(13)	0.13 ± 0.08	57.6 ± 1.91
	1000×2 ¹	10301	2000	3	0.15	55.1
		10302	2000	3	0.15	59.4
		10303	2000	3	0.15	57.4
		10304	2000	2	0.10	56.8
		10305	2000	4	0.20	57.6
				(15)	0.15 ± 0.04	57.3 ± 1.55
	2000×2 ¹	10401	2000	1	0.05	47.6
		10402	2000	3	0.15	51.8
		10403	2000	2	0.10	50.9
		10404	2000	3	0.15	60.4
		10405	2000	1	0.05	55.9
				(10)	0.10 ± 0.05	53.3 ± 4.94
陽性対照 (CP)	40×1 ²	10501	2000	29	1.45	49.5
		10502	2000	63	3.15	47.2
		10503	2000	45	2.25	44.3
		10504	2000	41	2.05	45.0
		10505	2000	54	2.70	44.9
				(232) ^{3**}	2.32 ± 0.65	46.2 ± 2.16 ^{4##}

PCE：多染性赤血球，MNPCE：小核を持つ多染性赤血球，
NCE：正染性赤血球，CP：シロホスファミド

1. 経口投与（24時間間隔，2回）

2. 腹腔内投与（1回）

3. Kastenbaum と Bowmanの統計学的方法による有意差検定 (** p<0.01)

4. Studentのt-検定による有意差検定 (# p<0.05, ## p<0.01)

別表4

試験結果表（予備試験）

被験物質の名称：モンタンロウ

試験実施期間		2002年 2月 4日 より 2002年 2月 7日				
代謝活性化系の有無	被験物質用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	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 ¹⁾	94	7	71	13	11
	陰性対照 ²⁾	85	10	65	11	16
	1.22	85	11	60	19	11
	4.88	88	10	56	12	6
	19.5	84	7	69	16	13
	78.1	81	12	61	7	3
	313	81	11	63	18	16
	1250 †	91	3	46	13	12
	5000 †	80	5	48	7	8
S9 mix (+)	陰性対照 ¹⁾	102	10	83	20	17
	陰性対照 ²⁾	93	8	77	21	11
	1.22	93	6	83	19	16
	4.88	88	17	76	24	8
	19.5	81	7	78	13	12
	78.1	113	10	90	13	15
	313	106	14	77	22	13
	1250 †	82	9	83	21	9
	5000 †	91	4	96	22	14
陽性対照	名称	AF-2	NaN ₃	ENNG	AF-2	9-AA
	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.5	2	0.1	80
	コロニー数 / プレート	601	380	3174	662	163
	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	1	2	2	0.5	2
	コロニー数 / プレート	1011	148	1094	383	148

(備考) †：沈殿物が認められた。

1) 加温したDMSOによる陰性対照試験

2) 加温していないDMSOによる陰性対照試験

AF-2：2-(2-フル)-3-(5-ニトロ-2-フル)アクリアミド^{*}，NaN₃：アジ化ナトリウム

ENNG：N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロゲンアジジン，9-AA：9-アミナクリジン塩酸塩，2-AA：2-アミナトレン

別表5

試験結果表（本試験1）

被験物質の名称：モンタンロウ

試験実施期間		2002年 2月 12日 より 2002年 2月 15日				
代謝活性化の有無	被験物質用量 (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	WP2uvrA/pKM101	TA98	TA1537
S9 mix (-)	陰性対照 ¹⁾	92	7	77	17	9
		93 (93)	11 (8)	67 (70)	15 (15)	15 (12)
		94 (± 1)	6 (± 3)	66 (± 6)	14 (± 2)	12 (± 3)
	陰性対照 ²⁾	85	5	75	13	15
		103 (94)	11 (8)	68 (75)	16 (15)	24 (17)
		95 (± 9)	7 (± 3)	81 (± 7)	16 (± 2)	12 (± 6)
	313	94	9	76	15	12
		85 (93)	11 (9)	78 (74)	19 (17)	10 (10)
	625 †	96	6	71	18	10
		92 (88)	4 (5)	60 (63)	14 (15)	12 (12)
	1250 †	76 (± 11)	4 (± 1)	57 (± 7)	13 (± 3)	15 (± 3)
		81	7	57	18	10
	2500 †	76 (81)	10 (7)	59 (59)	14 (16)	9 (9)
		86 (± 5)	5 (± 3)	62 (± 3)	17 (± 2)	7 (± 2)
5000 †	81	5	71	16	10	
	75 (80)	4 (6)	60 (64)	16 (16)	7 (9)	
5000 †	85 (± 5)	9 (± 3)	62 (± 6)	16 (± 0)	11 (± 2)	
	88	9	68	15	5	
S9 mix (+)	陰性対照 ¹⁾	101	8	82	21	19
		90 (98)	12 (9)	82 (86)	23 (23)	10 (14)
		103 (± 7)	7 (± 3)	93 (± 6)	24 (± 2)	14 (± 5)
	陰性対照 ²⁾	99	6	82	27	17
		93 (97)	8 (7)	86 (92)	21 (24)	22 (18)
		100 (± 4)	6 (± 1)	108 (± 14)	24 (± 3)	14 (± 4)
	313	97	10	79	26	11
		86 (95)	6 (9)	90 (84)	23 (25)	15 (16)
	625 †	101 (± 8)	11 (± 3)	84 (± 6)	25 (± 2)	22 (± 6)
		87	10	76	21	13
	1250 †	94 (91)	10 (9)	70 (77)	26 (23)	11 (14)
		91 (± 4)	6 (± 2)	84 (± 7)	21 (± 3)	17 (± 3)
	2500 †	98	15	67	20	12
		94 (93)	8 (11)	74 (72)	23 (21)	13 (12)
5000 †	87 (± 6)	10 (± 4)	75 (± 4)	20 (± 2)	11 (± 1)	
	108	12	84	20	9	
5000 †	99 (99)	8 (10)	77 (81)	19 (20)	10 (9)	
	89 (± 10)	9 (± 2)	82 (± 4)	22 (± 2)	8 (± 1)	
5000 †	95	6	73	22	11	
	92 (101)	8 (7)	85 (78)	23 (22)	7 (9)	
5000 †	116 (± 13)	7 (± 1)	75 (± 6)	21 (± 1)	9 (± 2)	
	名称	AF-2	NaN ₃	ENNG	AF-2	9-AA
S9 mixを必要としないもの	用量 (µg/プレート)	0.01	0.5	2	0.1	80
	コロニー数/プレート	557	406	2939	639	185
		548 (556)	438 (414)	2873 (2939)	724 (686)	184 (191)
S9 mixを必要とするもの	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	1381	219	1165	373	182
	1548 (1406)	177 (196)	1261 (1214)	424 (419)	176 (175)	
	1290 (± 131)	191 (± 21)	1216 (± 48)	460 (± 44)	167 (± 8)	

(備考) †: 沈殿物が認められた。

(平均値)

1) 加温したDMSOによる陰性対照試験

(±標準偏差)

2) 加温していないDMSOによる陰性対照試験

AF-2: 2-(2-フル)-3-(5-ニトロ-2-フル)アクリルアミド, NaN₃: アジ化ナトリウム

ENNG: N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン, 9-AA: 9-アミノアクリン塩酸塩, 2-AA: 2-アミノアントラセン

別表6

試験結果表 (本試験2)

被験物質の名称 : モンタンロウ

試験実施期間		2002年 2月 18日 より 2002年 2月 21日				
代謝活性化系の有無	被験物質用量 (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	WP2uvrA/pKM101	TA98	TA1537
S9 mix (-)	陰性対照 ¹⁾	82 99 (85) 74 (± 13)	6 6 (7) 9 (± 2)	57 56 (61) 71 (± 8)	21 10 (17) 19 (± 6)	11 12 (10) 6 (± 3)
	陰性対照 ²⁾	80 87 (83) 82 (± 4)	6 10 (7) 4 (± 3)	73 55 (66) 69 (± 9)	12 22 (16) 15 (± 5)	6 9 (7) 7 (± 2)
	313	87 101 (93) 90 (± 7)	8 10 (8) 7 (± 2)	67 69 (68) 68 (± 1)	19 13 (17) 18 (± 3)	14 7 (11) 11 (± 4)
	625 †	99 93 (89) 74 (± 13)	11 10 (10) 9 (± 1)	65 62 (67) 73 (± 6)	16 13 (14) 13 (± 2)	8 10 (10) 11 (± 2)
	1250 †	73 86 (81) 85 (± 7)	7 8 (8) 8 (± 1)	75 62 (70) 72 (± 7)	14 12 (13) 13 (± 1)	7 11 (11) 14 (± 4)
	2500 †	75 82 (77) 73 (± 5)	8 8 (7) 6 (± 1)	58 53 (58) 62 (± 5)	15 14 (15) 15 (± 1)	6 12 (8) 6 (± 3)
	5000 †	83 76 (79) 77 (± 4)	7 10 (8) 6 (± 2)	60 58 (61) 66 (± 4)	13 9 (13) 18 (± 5)	10 12 (10) 8 (± 2)
	S9 mix (+)	陰性対照 ¹⁾	107 88 (104) 118 (± 15)	5 7 (7) 9 (± 2)	93 83 (89) 90 (± 5)	28 28 (25) 19 (± 5)
陰性対照 ²⁾		95 103 (103) 112 (± 9)	6 9 (9) 11 (± 3)	84 80 (83) 84 (± 2)	20 13 (16) 16 (± 4)	13 18 (13) 8 (± 5)
313		97 90 (94) 96 (± 4)	7 15 (12) 13 (± 4)	72 82 (77) 76 (± 5)	13 16 (15) 15 (± 2)	19 11 (15) 14 (± 4)
625 †		130 112 (115) 102 (± 14)	9 12 (11) 11 (± 2)	109 88 (94) 86 (± 13)	19 18 (20) 24 (± 3)	9 17 (13) 14 (± 4)
1250 †		103 97 (104) 111 (± 7)	9 10 (10) 10 (± 1)	100 84 (87) 78 (± 11)	20 26 (24) 25 (± 3)	12 8 (9) 8 (± 2)
2500 †		90 91 (92) 95 (± 3)	10 12 (10) 9 (± 2)	79 85 (81) 78 (± 4)	15 16 (18) 22 (± 4)	18 10 (15) 18 (± 5)
5000 †		89 97 (93) 93 (± 4)	9 10 (10) 10 (± 1)	73 80 (75) 72 (± 4)	29 24 (26) 24 (± 3)	9 8 (10) 14 (± 3)
陽性対照		名称	AF-2	NaN ₃	ENNG	AF-2
	用量 (µg/プレート)	0.01	0.5	2	0.1	80
	コロニー数 /プレート	539 495 (486) 425 (± 57)	371 357 (370) 383 (± 13)	3080 2747 (2859) 2751 (± 191)	655 622 (653) 681 (± 30)	186 103 (138) 125 (± 43)
	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	1245 1153 (1182) 1147 (± 55)	123 140 (142) 164 (± 21)	1279 1042 (1080) 918 (± 183)	404 397 (417) 450 (± 29)	150 141 (152) 166 (± 13)

(備考) †: 沈殿物が認められた。

(平均値)

1) 加温したDMSOによる陰性対照試験

(±標準偏差)

2) 加温していないDMSOによる陰性対照試験

AF-2: 2-(2-フル)3-(5-ニトロ-2-フル)アクリルアミド, NaN₃: ナトリウム

ENNG: N-1-フル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン, 9-AA: 9-アミノアクリジン塩酸塩, 2-AA: 2-アミノアントレン

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 田中 憲穂 ((財)食品薬品安全センター 秦野研究所 研究部 副部長)

協力研究者 太田 亮 ((財)食品薬品安全センター 秦野研究所)

山影 康次 ((財)食品薬品安全センター 秦野研究所)

研究要旨

我が国で使用されている既存天然添加物の安全性評価の一環として、変異原性試験データのないマスチックおよびアグロバクテリウムスクシノグルカンについて、食品添加物ガイドラインに示された「哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験」および「げっ歯類を用いる小核試験」を実施し、*in vitro* および *in vivo* における染色体異常誘発作用の有無を検討した。また、キダチアロエ抽出物について、「げっ歯類を用いる小核試験」を実施し、*in vivo* における染色体異常誘発作用の有無を検討した。

A. 研究目的

食品の製造過程または食品の加工や保存の目的で食品に添加、混和などの方法によって使用される食品添加物のうち、天然添加物として使用実績が認められ、品目が確定しているものの中に既存天然添加物がある。現在流通が認められている 489 の既存天然添加物に関しては様々な観点からそれらの安全性確認が行われているが、およそ 23 品目については安全性に関する知見が得られていない。

本研究は、安全性に関する知見が得られていない既存天然添加物 3 品目(キダチアロエ抽出物、マスチック、アグロバクテリウムスクシノグルカン)について、チャイニーズ・ハムスター肺由来の CHL/IU 細胞を

用いる染色体異常試験およびマウスを用いる小核試験を実施し、食事を通じての長期暴露に伴う発癌性リスクを類推するための基礎データを得ることを目的とする。

B. 研究方法

1. 既存天然添加物¹⁾

キダチアロエ抽出物(ロット番号 990301G、日本粉末薬品(株))は、キダチアロエの葉から得られた多糖類を主成分とするもので、増粘安定剤として飲料物やアイスクリーム等に使用される。マスチック (small No5, 00 クロップ、(株)ロッテ)は、ウルシ科のヨウニユウコウの分泌物から得られたマスチカジエノン酸を主成分とするもので、ガムベースとしてチューインガムに

使用される。アグロバクテリウムスクシノグルカン(ロット番号 9818252、ローディア日華(株))は、アグロバクテリウムの培養液から得られたスクシノグリカンを主成分とするもので、増粘安定剤として調味料類、タレ・ソース類、ドレッシング類、アイスクリーム類、ゼリー類等広範囲にわたり使用される。

2. 哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

マスチックおよびアグロバクテリウムスクシノグルカンの2品目について、チャイニーズ・ハムスター肺由来のCHL/IU細胞を用いて染色体異常試験を行った。マスチックについてはアセトンに溶解し、アグロバクテリウムスクシノグルカンについてはジメチルスルホキシドに懸濁して試験に用いた。

細胞播種(2×10^4 個/6 cm dish)後3日目に培地交換し、S9 mix²⁾非添加および添加条件下で既存天然添加物を加えた。6時間処理後、細胞をリン酸緩衝塩類溶液で洗浄し、培養液でさらに18時間培養した。また、培養3日目に培地交換し、既存天然添加物を加えて24時間連続処理した。

培養終了後、単層培養細胞密度計を用いて細胞密度を測定し、増殖率の指標とした。また、常法に従い染色体標本を作製し、染色体分析を行った。

3. げっ歯類を用いる小核試験

キダチアロエ抽出物、マスチックおよびアグロバクテリウムスクシノグルカンの3品目について、雄のICR系(Crj:CD-1)マウスを用いて小核試験を実施した。キダチアロエ抽出物については日局注射用水に懸濁し、マスチックおよびアグロバクテリウムスクシノグルカンについてはオリブ油に懸

濁して試験に用いた。

1群5匹の雄マウスに1日1回、24時間間隔で2日間の強制経口投与を行い、最終投与の24時間後に骨髄塗抹標本を作製し、アクリジンオレンジ染色して小核の観察を行った。

C. 研究結果

1. 哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

染色体異常試験に用いる濃度を決定するため、マスチックおよびアグロバクテリウムスクシノグルカンの増殖抑制作用を調べた結果、マスチックは濃度依存的にCHL/IU細胞の増殖を阻害した(図1)。一方、アグロバクテリウムスクシノグルカンは5.0 mg/mL(生理的限界濃度)の濃度においてもCHL/IU細胞の増殖を抑制しなかった(図2)。これらの結果を基に処理濃度を設定し、染色体異常試験を実施した。

染色体分析の結果、マスチックについては、S9 mix存在下で6時間処理した0.13 mg/mLの濃度で統計学的な有意差が認められ、それより高い濃度では細胞毒性のため染色体分析ができなかった(表2)。それ以外の処理群では染色体異常の誘発は認められなかった(表1~3)。アグロバクテリウムスクシノグルカンについては、いずれの処理条件においても染色体異常の誘発は認められなかった(表4~6)。

2. げっ歯類を用いる小核試験

毒性試験の結果、3品目ともにガイドラインで定められている2000 mg/kgにおいても死亡例が認められなかった(表7)。これらの結果に基づき3品目ともに500、1000および2000 mg/kg/dayの3用量で試験を実施した。

標本観察の結果、3品目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有意な変化は認められなかった(表8)。一方、シクロフォスファミド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。

D. 考察

我々は、食事を通して食品添加物を日常的に摂取していることから、これらの安全性を確認することは我々の生活を守る意味で重要である。今回、安全性に関する知見が得られていない既存天然添加物3品目(キダチアロエ抽出物、マスチック、アグロバクテリウムスクシノグルカン)について、*in vitro*および*in vivo*における染色体異常誘発作用について調査を行った。その結果、3品目すべてにおいて、明らかな染色体異常誘発作用を示す結果は得られなかった。マスチックについては統計学的な有意差が認められたものの、その出現頻度は低く、それより高い濃度では細胞は生存できなかった。これは、今回の*in vitro*での試験条件が過酷であることを示唆しており、今回得られた統計学的有意差は生物学的な観点からは問題としないと考えられる。このことは、マウスを用いた小核試験の結果が陰性であることから支持される。

今回試験した既存天然添加物は、流通ルートから排除されることなく現在まで利用されてきていることから、疫学的には安全であると推察されるが、科学的な観点からも遺伝的には安全であることが示唆された。今回の試験結果に加えて、細菌を用いる復帰突然変

異試験結果やその他の生物学的な安全性データを加味することで、発ガン性を含むヒトに対する安全性をより正確に評価できると期待される。

E. 結論

キダチアロエ抽出物には、*in vivo*において染色体異常誘発作用のないことが明らかとなった。また、マスチックおよびアグロバクテリウムスクシノグルカンについては、*in vitro*および*in vivo*において染色体異常誘発作用のないことが明らかとなった。

F. 引用文献

- 1) 日本食品添加物協会編, 既存添加物名簿 収載品目リスト注解書, 1999
- 2) 石館 基 監修, 「<改定> 染色体異常試験データ集」, エル・アイ・シー, 東京, 1987

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

表1 マスチックでチャイニーズ・ハムスター培養細胞 (CHL/IU 細胞) を6時間処理 (S9 mix 非存在下) したときの染色体分析結果

群	濃度 (mg/mL)	S9 mix	処理 時間 (h)	細胞 増殖率 (%)	分裂 ³⁾ 指数 (%)	分析				倍 数 性 細胞の数 (%)	傾向性検定 ⁷⁾ 構 造 的 異 常											
						細胞数		種類と数				その他 ⁵⁾ の異常	構造異常を有する細胞の数 ギヤップを除去(%)	ギヤップ を含む(%)								
						分析 細胞数	細胞数	gap	ctb						cse	mul	合計					
無処理対照																						
						100	1	2	1	0	0	4	0	4	4	(4.0)	3	(3.0)	2	(0.5)		
						100	2	1	0	0	0	3	0	3	(3.0)	1	(1.0)	0	(0.0)			
						200	3	3	1	0	0	7	0	7	(3.5)	4	(2.0)	2	(0.3)			
陰性対照 ¹⁾	0		6 - (18)	100		100	0	2	0	0	0	2	0	2	(2.0)	2	(2.0)	1	(0.3)			
						100	1	6	0	0	0	7	0	7	(7.0)	6	(6.0)	0	(0.0)			
						200	1	8	0	0	0	9	0	9	(4.5)	8	(4.0)	1	(0.1)			
マスチック																						
	0.0020		6 - (18)	97		not observed																
	0.0039		6 - (18)	96		100	2	1	0	0	0	3	0	3	(3.0)	1	(1.0)	4	(1.0)			
						100	1	1	0	0	0	2	0	2	(2.0)	1	(1.0)	1	(0.3)			
						200	3	2	0	0	0	5	0	5	(2.5)	2	(1.0)	5	(0.6)			
	0.0078		6 - (18)	90		100	1	0	0	0	0	1	0	1	(1.0)	0	(0.0)	3	(0.8)			
						100	2	1	1	3	0	7	0	5	(5.0)	3	(3.0)	1	(0.3)			
						200	3	1	1	3	0	8	0	6	(3.0)	3	(1.5)	4	(0.5)			
	0.016		6 - (18)	70	3.2, 2.6	100	2	1	0	0	0	3	0	3	(3.0)	1	(1.0)	2	(0.5)			
						100	0	2	1	1	0	4	0	4	(4.0)	4	(4.0)	0	(0.0)			
						200	2	3	1	1	0	7	0	7	(3.5)	5	(2.5)	2	(0.3)			
マスチック																						
	0.031		6 - (18)	40	Tox, Tox	not observed due to extreme cytotoxicity																
	0.1 µg/mL		6 - (18)			100	4	43	56	2	0	105	0	57	(57.0)	57	(57.0)	0	(0.0)			
						100	9	48	63	2	0	132	0	57	(57.0)	55	(55.0)	0	(0.0)			
						200	13	91	119	4	0	237	0	114	(57.0)	112	(56.0)	0	(0.0)			

gap: 染色体型および染色体型のギヤップ, ctb: 染色体切断, cse: 染色体交換, csb: 染色体切断, cse: 染色体交換 (二動原体性染色体および環状染色体), mul: 多染色体異常, MMC: マイトマイシンC, Tox: 細胞毒性.

1) アセトンを溶媒として使用し、1 vol% 添加した。 2) 単層培養細胞密度計により各ディッシュにおける細胞密度を測定し、増殖抑制の指標とした。 3) ディッシュあたり500細胞分析した。 4) 1細胞中に10個以上の異常がある場合は異常の数を10個とスコアした。 5) アテニエーションおよび未成熟染色体凝縮などであるが、構造異常からは除外した。 6) 各濃度につき800細胞分析した。 7) コクラン・アーマリッジの傾向性検定 ($p < 0.01$) を行った。

*: フィッシャーの直接確率法で有意差あり ($p < 0.01$)。

表2 マスチックでチャイニーズ・ハムスター培養細胞 (CHL/1U 細胞) を6時間処理 (S9 mix 存在下) したときの染色体分析結果

群	濃度 (mg/mL)	S9 mix	処理時間 (h)	細胞増殖率 (%) ²⁾	分裂指数 (%) ³⁾	分析細胞数				構造異常の種類と数 ⁴⁾		その他 ⁵⁾ の異常	構造異常を有する細胞の数		倍率細胞の数 (%) ⁶⁾	傾向性検定 ⁷⁾			
						gap	ctb	cte	csb	cse	mul		合計	ギャップを含む (%)			ギャップを除く (%)	構造異常	数値的異常
陰性対照1)	0	+	6 - (18)	100	—	100	1	1	0	0	0	0	2	2	2	0	0	(0.0)	
						100	1	0	1	0	0	0	2	2	2	0	5	(1.3)	
						200	2	1	1	0	0	0	4	4	2	2	5	(0.6)	
マスチック	0.031	+	6 - (18)	99	—	100	0	0	2	0	0	0	2	2	2	1	0	(0.3)	
						100	0	0	1	1	0	0	2	2	2	0	0	(0.0)	
						200	0	0	3	1	0	0	4	4	4	1	1	(0.1)	
マスチック	0.063	+	6 - (18)	88	—	100	0	4	0	0	10	14	5	5	5	4	(1.0)		
						100	0	0	0	1	0	0	1	1	1	8	(2.0)		
						200	0	4	0	1	0	15	6	6	6	12	(1.5)		
マスチック	0.13	+	6 - (18)	85	9.8, 7.2	100	2	5	4	0	0	11	6	6	4	1	(0.3)		
						100	2	8	9	0	0	19	10	10	8	4	(1.0)		
						200	4	13	13	0	0	30	16	16	12*	5	(0.6)	+	
マスチック	0.25	+	6 - (18)	50	Tox, Tox	not observed due to extreme cytotoxicity													
マスチック	0.50	+	6 - (18)	64	Tox, Tox	not observed due to extreme cytotoxicity													
CPA	5 µg/mL	+	6 - (18)	—	—	100	4	25	42	0	0	71	51	49	49	0	(0.0)		
						100	6	25	49	0	1	81	52	49	49	0	(0.0)		
						200	10	50	91	0	1	152	103	98*	98*	0	(0.0)		

gap: 染色分体型および染色分型のギャップ, ctb: 染色分体切断, cte: 染色分体交換, csb: 染色分体交換 (二動原体性染色体および環状染色体), mul: 多染色体異常, CPA: シクロホスファミド, Tox: 細胞毒性.

1) アセトンを溶媒として使用し、1 vol% 添加した。 2) 単層培養細胞密度計により各デインジエにおける細胞密度を測定し、増殖抑制の指標とした。 3) デインジエあたり500細胞分析した。 4) 1細胞中に10個以上の異常がある場合は異常の数を10個とスコアした。 5) アテニエーションおよび未成熟染色体凝縮などであるが、構造異常からは除外した。

6) 各濃度につき800細胞分析した。 7) コクラン・アーミデジの傾向性検定 ($p < 0.01$) を行った。

*: ファインジャーの直接確率法で有意差あり ($p < 0.01$)。

表3 マスチックでチャイニーニーズ・ハムスター培養細胞 (CHL/IU 細胞) を24時間連続処理 (S9 mix 非存在下) したときの染色体分析結果

群	濃度 (mg/mL)	処理 時間 (h)	細胞 増殖率 (%)	分裂 ³⁾ 指数 (%)	分析				構造異常の種類と数		その他 ⁵⁾ の異常	構造異常を有する細胞の数		倍 ⁶⁾ 性の 細胞の数 (%)	傾向性検定 ⁷⁾ 構造的 異常		
					細胞数	gap	ctb	cte	csb	cse		mul	合計			ギャップ を含む (%)	ギャップ を除く (%)
陰性対照 ¹⁾	0	24	100	—	100	1	1	0	0	0	10	12	0	3 (3.0)	2 (2.0)	2 (0.5)	
					100	1	1	0	0	1	0	3	2	3 (3.0)	2 (2.0)	2 (0.5)	
					200	2	2	0	0	1	10	15	2	6 (3.0)	4 (2.0)	4 (0.5)	
マスチック	0.016	24	93	—	not observed												
マスチック	0.031	24	83	—	100	0	2	1	0	0	0	3	0	3 (3.0)	3 (3.0)	0 (0.0)	
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.5)	
					200	0	2	1	0	0	0	3	0	3 (1.5)	3 (1.5)	2 (0.3)	
マスチック	0.063	24	66	—	100	1	1	1	0	0	0	3	0	3 (3.0)	2 (2.0)	3 (0.8)	
					100	1	1	0	0	0	2	0	2	2 (2.0)	1 (1.0)	1 (0.3)	
					200	2	2	1	0	0	0	5	0	5 (2.5)	3 (1.5)	4 (0.5)	
マスチック	0.13	24	54	2.2, 2.2	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	
					100	1	1	0	0	0	2	0	2	2 (2.0)	1 (1.0)	1 (0.3)	
					200	1	1	0	0	0	2	0	2	2 (1.0)	1 (0.5)	2 (0.3)	
マスチック	0.25	24	28	0.0, 0.4	not observed due to the small number of metaphases												
MMC	0.05 µg/mL	24	—	—	100	3	41	71	0	0	0	115	0	61 (61.0)	60 (60.0)	0 (0.0)	
					100	6	32	63	0	0	0	101	0	58 (58.0)	56 (56.0)	0 (0.0)	
					200	9	73	134	0	0	0	216	0	119 (59.5)	116* (58.0)	0 (0.0)	

gap: 染色体型および染色体型のギャップ, ctb: 染色体切断, cte: 染色体交換, csb: 染色体切断, cse: 染色体交換 (二動原体染色体および環状染色体), mul: 多染色体異常, MMC: マイトマイシンC.

- 1) アセトンを溶媒として使用し、1 vol% 添加した。 2) 単層培養細胞密度計により各デインシユにおける細胞密度を測定し、増殖抑制の指標とした。 3) デインシユあたり500細胞分析した。 4) 1細胞中に10個以上の異常がある場合は異常の数を10個とスコアした。 5) アテニエーションおよび未成熟染色体凝縮などであるが、構造異常からは除外した。 6) 各濃度につき800細胞分析した。 7) コ克蘭・アームテッジの傾向性検定 ($p < 0.01$) を行った。
*: フインジャーの直接確率法で有意差あり ($p < 0.01$)。

表4 アグロバクテリウムスクシノグルカン (ABSG) でチャイニーズ・ハムスター培養細胞 (CHL/IU 細胞) を6時間処理 (S9 mix 非存在下) したときの染色体分析結果

群	濃度 (mg/mL)	S9 mix	処理 時間 (h)	細胞 増殖率 (%)	分裂 ³⁾ 指数 (%)	分析 細胞数	構造異常の種類と数 ⁴⁾				合計	構造異常を有する細胞の数 を含ま (%)		倍 数 性 細胞の数 (%)	傾向性検定 ⁷⁾ 構造 異常		
							gap	ctb	cte	csb		cse	mul			ギヤップ を含ま (%)	ギヤップ を除く (%)
無処理対照				—	—	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2 (0.5)	
				—	—	100	0	1	0	0	2	0	3	3	3	1 (0.3)	
				—	—	200	0	1	0	0	2	0	3	3	3	3 (0.4)	
陰性対照 ¹⁾	0	—	6-(18)	100	—	100	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0 (0.0)	
				—	—	100	0	0	0	2	0	0	2	2	2	0 (0.0)	
				—	—	200	1	0	0	2	0	0	3	3	3	0 (0.0)	
ABSC	0.63	—	6-(18)	109	—	not observed											
ABSC	1.3	—	6-(18)	148	—	100	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0 (0.0)	
				—	—	100	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0 (0.0)	
				—	—	200	0	2	0	0	0	2	2	2	2	0 (0.0)	
ABSC	2.5	—	6-(18)	102	—	100	0	2	1	1	0	4	4	4	4	0 (0.0)	
				—	—	100	0	1	0	0	1	0	2	2	2	0 (0.0)	
				—	—	200	0	3	1	1	1	0	6	6	6	0 (0.0)	
ABSC	5.0	—	6-(18)	97	8.0, 5.4	100	0	1	0	1	0	2	2	2	2	0 (0.0)	
				—	—	100	0	0	0	5	0	0	5	2	2	0 (0.0)	
				—	—	200	0	1	0	6	0	0	7	4	4	0 (0.0)	
MMC	0.1 µg/mL	—	6-(18)	—	—	100	2	40	81	0	0	123	0	61	61	0 (0.0)	
				—	—	100	1	40	96	4	0	141	1	67	67	0 (0.0)	
				—	—	200	3	80	177	4	0	264	1	128	127*	0 (0.0)	

gap: 染色体型および染色体型のギヤップ, ctb: 染色体切断, cte: 染色体交換, csb: 染色体交換 (二動原体性染色体および環状染色体), mul: 多染色体異常, MMC: マイトマイシンC.

1) ジメチルスルホキシドを媒体として使用し、1 vol% 添加した。 2) 単層培養細胞密度計により各デイスコにおける細胞密度を測定し、増殖抑制の指標とした。 3) デイスコあたり500細胞分析した。 4) 1細胞中に10個以上の異常がある場合は異常の数を10個とスコアした。 5) アテニエーションおよび未成熟染色体凝縮などであるが、構造異常からは除外した。 6) 各濃度につき800細胞分析した。 7) コクラン・アームテッジの傾向性検定 ($p < 0.01$) を行った。

*: フライッジャーの直接確率法で有意差あり ($p < 0.01$)。

表5 アグロバクテリウムスクシノグルガン (ABSG) でチャイニーズ・ハムスター培養細胞 (CHL/IU 細胞) を6時間処理 (S9 mix 存在下) したときの染色体分析結果

群	濃度 (mg/mL)	S9 mix	処理 時間 (h)	細胞 増殖率 (%)	分裂 指数 (%)	構造異常の種類と数				分析 細胞数	その他 ⁵⁾ の異常		倍 数 性 細胞の数 (%)	傾向性検定 ⁷⁾ 構 造 異 常
						gap	ctb	cte	csb		cse	mul ⁴⁾		
陰性対照 ¹⁾	0	+	6 - (18)	100	—	0	1	1	0	0	2	0	2 (2.0)	0 (0.0)
ABSC	0.63	+	6 - (18)	98	—	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)
ABSC	1.3	+	6 - (18)	103	—	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)
ABSC	2.5	+	6 - (18)	106	—	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)
ABSC	5.0	+	6 - (18)	102	7.8, 6.6	0	1	0	0	1	0	0	1 (1.0)	1 (0.3)
CPA	5 µg/mL	+	6 - (18)	—	—	0	2	0	0	0	2	0	2 (2.0)	0 (0.0)
						0	3	0	0	1	0	7	4 (3.5)	4 (2.0)
						0	1	18	28	0	0	47	33 (33.0)	33 (33.0)
						0	2	13	20	1	0	36	27 (27.0)	27 (27.0)
						0	3	31	48	1	0	83	60 (30.0)	60* (30.0)

gap: 染色体型および染色体型のギャップ, ctb: 染色体切断, cte: 染色体切断, csb: 染色体交換, cse: 染色体交換 (二動原体性染色体および環状染色体), mul: 多染色体異常, CPA: シクロホスファミド.

1) ジメチルスルホキシドを媒体として使用し、1 vol% 添加した。 2) 単層培養細胞密度計により各デイスケにおける細胞密度を測定し、増殖抑制の指標とした。 3) デイシユあたりの500細胞分析した。 4) 1細胞中に10個以上の異常がある場合は異常の数を10個とスコアした。 5) アテニエーションおよび未成熟染色体凝縮などであるが、構造異常からは除外した。 6) 各濃度につき800細胞分析した。 7) コ克蘭・アーミテッジの傾向性検定 ($p < 0.01$) を行った。
*: フィンジャーの直接確率法で有意差あり ($p < 0.01$).