

ログウッド色素の細菌を用いる復帰突然変異試験

分担研究者 中嶋 圓 財団法人 食品農医薬品安全性評価センター
遺伝毒性グループ グループリーダー
試験責任者 菊池 正憲 財団法人 食品農医薬品安全性評価センター
遺伝毒性グループ
試験担当者 赤星 まゆみ 財団法人 食品農医薬品安全性評価センター
遺伝毒性グループ

要旨

本研究の目的は、既存添加物であるログウッド色素の微生物に対する遺伝子突然変異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「安全性に関する試験の標準的実施方法（微生物を用いる復帰突然変異試験）」の基準に従い実施した。その結果、ログウッド色素の微生物に対する遺伝子突然変異誘発性は認められなかった。

A.目的

既存天然添加物であるログウッド色素は、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たものである。わが国では使用実績はないようであるが、苦味酒に含有されて輸入される場合がある。

本試験は、ログウッド色素の微生物に対する遺伝子突然変異誘発性の有無を検索することを目的とした。

B.方法

1. 既存天然添加物

日本食品添加物協会より提供されたログウッド色素（Logwood colour）を試験に用いた。提供されたログウッド色素は室温下で

保管した。

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の5菌株を用いた。入手した菌株はAmesら¹⁾及びMaronら²⁾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8.0%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8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。

3. S9 及び S9 mix

S9 mix 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 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 の組成は、4 mM NADPH、4 mM NADH、5 mM G-6-P、8 mM MgCl₂、33 mM KCl、100 mM ナトリウム・リン酸緩衝液 (pH7.4)、10%S9 である。

4. 溶媒および被験物質溶液の調製

ログウッド色素は、ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解あるいは良好に懸濁するため、溶媒として DMSO を用い、連続希釈により被験物質液を調製した。プレートあたり被験物質液を 100 µL 添加した。

5. 復帰突然変異試験

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「安全性に関する試験の標準的実施方法(微生物を用いる復帰突然変異試験)」³⁾の基準に従い、Ames ら¹⁾及び Maron ら²⁾の方法に準拠し、以下の示したプレインキュベーション法⁴⁾で実施した。

被験物質溶液、溶媒または陽性対照物質溶液 0.1ml と S9 mix あるいは 0.1M Na-リン酸緩衝液 0.5 ml と試験菌株の前培養液 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、ただちに最少

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。

6. 判定基準

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、用量依存性あるいは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。

(倫理面の配慮):本研究は細菌を用い *in vitro* 条件下にて試験を行っていることから、動物愛護上の配慮ならびにヒト組織利用の倫理上問題となることはない。

C. 結果

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 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(表1、2)。

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 のそれぞれの試験での溶媒対照値と陽性対照値は、当センターの背景

値の範囲内であった。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、ログウッド色素の微生物に対する復帰突然変異原性は陰性と判定した。

E. 引用文献

- 1) 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.
- 2) Maron, D.M. and B.N. Ames (1983): Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutation Res.*, 113, 173-215.
- 3) 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
- 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.

表1 用量設定試験結果表

被験物質の名称： ログウッド色素

試験番号： 7611 (079-163)

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	TA98	TA1537	
- S 9 m i x	陰性対照	116 112 (114)	17 5 (11)	37 24 (31)	24 20 (22)	6 6 (6)	
	8.19	101 133 (117)	4 8 (6)	18 29 (24)	24 30 (27)	8 3 (6)	
	20.5	93 93 (93)	16 11 (14)	21 20 (21)	18 23 (21)	3 5 (4)	
	51.2	102 105 (104)	7 11 (9)	25 27 (26)	27 16 (22)	7 5 (6)	
	128	114 105 (110)	6 10 (8)	23 29 (26)	24 20 (22)	4 4 (4)	
	320	115* 107* (111)	7 9 (8)	22 27 (25)	26 35 (31)	7 7 (7)	
	800	95* 106* (101)	12 13 (13)	20 19 (20)	25* 36* (31)	6* 4* (5)	
	2000	59* 46* (53)	7* 14* (11)	18* 17* (18)	24* 29* (27)	3* 2* (3)	
	5000	0* 0* (0)	0* 0* (0)	19* 16* (18)	31* 30* (31)	0* 0* (0)	
	+ S 9 m i x	陰性対照	117 132 (125)	14 11 (13)	27 23 (25)	37 32 (35)	15 27 (21)
8.19		143 167 (155)	14 7 (11)	24 25 (25)	38 42 (40)	28 21 (25)	
20.5		130 129 (130)	10 12 (11)	18 23 (21)	41 33 (37)	19 25 (22)	
51.2		115 117 (116)	7 4 (6)	17 20 (19)	33 33 (33)	25 18 (22)	
128		110 136 (123)	10 12 (11)	21 18 (20)	27 35 (31)	24 25 (25)	
320 +		133 121 (127)	11 11 (11)	25 21 (23)	37 25 (31)	17 18 (18)	
800 +		118 122 (120)	9 7 (8)	13 19 (16)	23 21 (22)	17 10 (14)	
2000 +		87 85 (86)	11 14 (13)	23 15 (19)	26 33 (30)	4 5 (5)	
5000 +		99* 111* (105)	7 12 (10)	11 7 (9)	24 25 (25)	6* 5* (6)	
陽性対照		S 9 m i x を必要としないもの	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2
	用量($\mu\text{g}/\text{プレート}$)		0.01	0.5	0.01	0.1	80
	S 9 m i x を必要とするもの	コロニー数/プレート	489 503 (496)	640 666 (653)	152 125 (139)	681 628 (655)	243 322 (283)
		名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
S 9 m i x を必要とするもの	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	1250 1274 (1262)	392 409 (401)	722 782 (752)	208 204 (206)	181 148 (165)	

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

9-AA : 9-Aminoacridine hydrochloride

* : 菌の生育阻害が認められた

+ : 暴露終了時, 被験物質の析出が認められた

NaN₃ : Sodium azide

2-AA : 2-Aminoanthracene

表2 試験結果表

被験物質の名称： ログウッド色素

試験番号： 7611 (079-163)

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	TA98	TA1537
-S9mix	陰性対照	96 88 (92)	7 11 (9)	23 21 (22)	25 16 (21)	5 6 (6)
	19.5	95 115 (105)	/	/	/	/
	39.1	100 116 (108)	/	/	23 26 (25)	7 4 (6)
	78.1	101 100 (101)	7 13 (10)	20 25 (23)	29 17 (23)	3 3 (3)
	156	103 105 (104)	9 9 (9)	21 20 (21)	23 29 (26)	6 6 (6)
	313	98 112 (105)	16 11 (14)	22 29 (26)	35 32 (34)	7 7 (7)
	625	102* 117* (110)	9 12 (11)	26 25 (26)	31 33 (32)	4 3 (4)
	1250	/	12* 6* (9)	15 27 (21)	34* 34* (34)	3* 4* (4)
	2500	/	13* 10* (12)	19* 14* (17)	/	/
	+S9mix	陰性対照	112 111 (112)	11 12 (12)	24 31 (28)	32 36 (34)
156		119 112 (116)	12 11 (12)	34 24 (29)	27 22 (25)	30 26 (28)
313 +		118 106 (112)	14 17 (16)	24 19 (22)	33 39 (36)	15 27 (21)
625 +		116 123 (120)	10 16 (13)	26 29 (28)	26 32 (29)	16 14 (15)
1250 +		121 99 (110)	9 6 (8)	21 26 (24)	29 20 (25)	7 17 (12)
2500 +		90 89 (90)	12 13 (13)	22 21 (22)	28 23 (26)	5 6 (6)
5000 +		82* 90* (86)	13 7 (10)	11 11 (11)	16 14 (15)	4* 3* (4)
陽性対照		名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2
	用量($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	コロニー数/プレート	446 441 (444)	581 628 (605)	135 154 (145)	657 750 (704)	194 155 (175)
	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	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	755 691 (723)	312 330 (321)	673 779 (726)	195 174 (185)	160 146 (153)

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

NaN₃ : Sodium azide

9-AA : 9-Aminoacridine hydrochloride

2-AA : 2-Aminoanthracene

* : 菌の生育阻害が認められた

+ : 暴露終了時,被験物質の析出が認められた

ログウッド色素のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

分担研究者 中嶋 圓 財団法人 食品農医薬品安全性評価センター
遺伝毒性グループ グループリーダー
試験責任者 菊池 正憲 財団法人 食品農医薬品安全性評価センター
遺伝毒性グループ
試験担当者 田 中 仁 財団法人 食品農医薬品安全性評価センター
遺伝毒性グループ

要旨

本研究の目的は、既存添加物であるログウッド色素のほ乳類培養細胞に対する染色体異常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「安全性に関する試験の標準的実施方法（哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験）」の基準に従い実施した。その結果、ログウッド色素のほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性が認められた。

A.目的

既存天然添加物であるログウッド色素は、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たものである。わが国では使用実績はないようであるが、苦味酒に含有されて輸入される場合がある。

本試験は、ログウッド色素のほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性の有無を検索することを目的とした。

B.方法

1. 既存添加物

日本食品添加物協会より提供されたログウッド色素（Logwood colour）を試験に用いた。提供されたログウッド色素は室温下で

保管した。

2. 細胞

試験には、チャイニーズ・ハムスター肺由来のCHL/IU細胞を用いた。CHL/IU細胞を、国立医薬品食品衛生研究所より入手（1984年11月入手）し、継代後、液体窒素（-196℃）中に凍結保存した。その細胞（倍加時間約18時間、マイコプラズマの汚染なし）を、解凍後、継代16および20代で試験に用いた。

培養には、仔牛血清（CS、Invitrogen Corp.）を10%添加したイーグルMEM培養液を用い、CO₂インキュベーター（5% CO₂、37℃）内で培養した。

3. S9 及び S9 mix

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 Sprague-Dawley ラットの肝臓より調製された S9 に、補酵素を添加した市販品 (S9 mix : キッコーマン株式会社製造) を購入して用いた。

S9 mix 1 mL 中の組成は、G-6-P が 5 $\mu\text{mol}/0.1\text{ mL}$ 、NADP が 4 $\mu\text{mol}/0.1\text{ mL}$ 、 MgCl_2 が 5 $\mu\text{mol}/0.1\text{ mL}$ 、KCl が 33 $\mu\text{mol}/0.1\text{ mL}$ 、HEPES (pH7.2) が 4 $\mu\text{mol}/0.2\text{ mL}$ 、蒸留水が 1 mL、S9 が 0.3 mL である。

4. 溶媒および被験物質溶液の調製

ログウッド色素は、ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解あるいは良好に懸濁するため、溶媒として DMSO を用い、連続希釈により被験物質液を調製した。プレートあたり被験物質液を 1 vol% 添加した。

5. 処理方法

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「安全性に関する試験の標準的実施方法 (哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験)」¹⁾ の基準に従い、石館ら²⁾ の方法に準拠して以下に示した手順で実施した。

細胞増殖抑制試験では CHL/IU 細胞を細胞培養用マルチプレート 12 ウェルに播種 (8×10^3 個/well) し、染色体異常試験では組織培養用シャーレに播種 (4×10^4 個/6 cm dish) した。それぞれ 3 日間培養した後、短時間処理法および連続処理法による処理を行った。短時間処理法では、培地交換したのち、S9 mix 非添加および添加条件下で既存天然添加物を加えて 6 時間処理した。処理終了

後、細胞をダルベッコリン酸緩衝液で洗浄し、培養液でさらに 18 時間培養した。また、連続処理法では、被験物質を加えて 24 時間連続処理した。

6. 細胞増殖抑制作用の測定

細胞増殖抑制作用測定の各ウェルについては、10 vol%ホルマリン溶液で固定し、0.1%クリスタルバイオレット液で染色した。色素溶出液 (30%エタノール+1%酢酸) を各ウェルに加えて 5 分間放置した後、分光光度計を用いて 580 nm の吸光度を測定した。陰性 (溶媒) 対照群と比較した各処理群の相対増殖率を計算し出し、増殖率の指標とした。染色体異常試験においては ATP フォトメーターを用いて細胞増殖に関するデータを採取した。

7. 染色体標本の作製

培養終了の 2 時間前にコルセミドを最終濃度が 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加した。培養終了後、0.25%トリプシン液をプレートあたり 2 mL 加えて細胞をはがし、遠心分離 (1000 rpm、5 分) 後、37°C に暖めておいた 5 mL の 0.075 mol/L KCl 水溶液を加え、約 16 分間低張処理を行った。低張処理後、固定液 (メタノール : 酢酸 = 3 : 1 (v/v)) を加えて細胞を固定した。細胞浮遊液をスライドガラス上に滴下し、乾燥させた。スライド標本を 1.2 %ギムザ液 (pH 6.8 の 1/100 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液で希釈調製) で染色し、水洗後、乾燥させた。

8. 染色体分析

染色体異常の分析は、標本をコード化して、処理条件が分からない状態で行った。

プレートあたり 100 個の分裂中期像を顕微鏡下で観察し、染色体の構造異常の有無を分析し、異常の種類別に記録した。ギャップについては、染色分体幅よりも狭い非染色性部位と定義し、構造異常誘発性の判定には含めないこととした。

また、プレートあたり 100 個の分裂中期像を観察し、倍数性細胞の出現数についても計数した。

9. 判定基準

染色体異常をもつ細胞の出現頻度が陰性対照群に比較して明らかに増加し、濃度依存性又は再現性が得られる場合に、陽性と判定した。

(倫理面の配慮)：本研究では株化されたげっ歯類の細胞のみを用い *in vitro* 条件下で試験を行っていることから、動物愛護上の配慮ならびにヒト組織利用の倫理上問題になることはない。

C. 結果

染色体異常試験に用いる濃度を決定するため、ログウッド色素の細胞増殖抑制作用を調べた結果、ログウッド色素は CHL/IU 細胞の増殖を阻害し、50%細胞増殖抑制濃度は短時間処理法-S9 処理、同+S9 処理および連続処理法 24 時間処理でそれぞれ 146, 420, および 168 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった(表 1、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、ログウッド色素は、短時間処理法+S9 処理で用量依存性を伴ない、10%を超える染色体構造異常誘発頻度の増加が認められ、同-S9 処理においても

10%は超えないものの、増加傾向が認められた(表 3)。なお、短時間処理法において陽性反応が確認されたことから、連続処理法 24 時間処理については顕微鏡観察を実施しなかった。

D. 考察

ログウッド色素について、細胞の増殖が抑制される用量まで試験した結果、短時間処理法+S9 処理で 10%を超える染色体異常の誘発が認められ、同-S9 処理においても僅かながら増加傾向が認められた。一方、陽性対照物質については、明らかに染色体異常が誘発され、その出現頻度は当センターの背景値の範囲内であった。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、ログウッド色素のほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と判定した。

E. 引用文献

- 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) 石館 基 監修 (1987): <改定> 染色体異常試験データ集、エル・アイ・シー

表 1 細胞増殖抑制試験の結果（短時間処理法）

被験物質の名称：ログウッド色素

測定方法：分光光度計による吸光度測定

試験番号： 7612 (079-164)

代謝活性化法によらない場合 (6-18 h)		代謝活性化法による場合 (6-18 h)	
用量 (mg/mL)	細胞増殖率 (%)	用量 (mg/mL)	細胞増殖率 (%)
0	100	0	100
0.00488	93.4	0.00488	103.5
0.00977	87.8	0.00977	108.3
0.0195	91.3	0.0195	111.4
0.0391	79.8	0.0391	111.2
0.0781	76.3	0.0781	103.5
0.156	59.5	0.156	98.0
0.313	7.4	0.313	95.1
0.625	3.5	0.625	3.1
1.25	9.8	1.25	10.4
2.5 +	24.8	2.5 +	31.5

[備考] 括弧内には処理時間及び回復時間を記入すること。

細胞増殖率は溶媒処理群を 100 %とし、濃度の低い順に記録すること。

+ : 暴露終了時、被験物質の析出が認められた

表 2 細胞増殖抑制試験の結果（連続処理法）

被験物質の名称：ログウッド色素

測定方法：分光光度計による吸光度測定

試験番号： 7612 (079-164)

代謝活性化法によらない場合 (24-0 h)			
用量 (mg/mL)	細胞増殖率 (%)		
0	100		
0.00488	105.8		
0.00977	98.4		
0.0195	102.6		
0.0391	104.0		
0.0781	100.1		
0.156	53.6		
0.313	5.7		
0.625	4.8		
1.25	25.8		
2.5 +	69.1		

[備考] 括弧内には処理時間及び回復時間を記入すること。

細胞増殖率は溶媒処理群を 100 %とし、濃度の低い順に記録すること。

+ : 暴露終了時、被験物質の析出が認められた

表3 染色体異常試験の結果(短時間処理法)

試験番号: 7612 (079-164)

被験物質の名称: ログウツド色素

処理時間 (h)	S9 mix	被験物質の用量 (ng/ml)	染色体構造異常の細胞数(出現頻度%)				細胞増殖率 (%)	ギャップ の出現数		染色体の数的異常の細胞数(出現頻度%)	観察細胞数	倍數体	その他	総異常細胞数 (%)		
			観察細胞数	染色体切断	染色体交換	染色体切断染色体交換		その他	総異常細胞数 (%)							
6-18	-	陰性対照 (DMSO) 0	100	1	0	0	0	0	2	100.0	100	1	0	0	1	
			100	0	0	0	0	0	0	0	100.0	100	1	0	0	1
			200	1	1	0	0	0	0	2 (1.0)	100.0	200	2	0	0	2 (1.0)
6-18	-	0.0872	100	1	3	0	0	0	3	64.9	100	0	0	0	0	
			100	1	2	0	0	0	0	2	93.2	100	0	0	0	0
			200	2	5	0	0	0	0	5 (2.5)	79.1	200	0	0	0	0 (0.0)
6-18	-	0.109	100	1	4	0	0	0	5	67.8	100	2	0	0	2	
			100	1	0	0	0	0	0	1	72.8	100	0	0	0	0
			200	2	4	0	0	0	0	6 (3.0)	70.3	200	2	0	0	2 (1.0)
6-18	-	0.136	100	1	4	0	0	0	5	51.8	100	0	0	0	0	
			100	0	5	0	0	0	0	5	59.0	100	1	0	0	1
			200	1	9	0	0	0	0	10 (5.0)	55.4	200	1	0	0	1 (0.5)
6-18	-	0.170	100	5	3	0	0	0	6	30.4	100	0	0	0	0	
			100	3	6	0	0	0	0	8	38.7	100	0	0	0	0
			200	8	9	0	0	0	0	14 (7.0)	34.6	200	0	0	0	0 (0.0)
6-18	-	0.213	TOX	-	-	-	-	-	-	26.9	-	-	-	-	-	
			TOX	-	-	-	-	-	-	-	24.6	-	-	-	-	-
			-	-	-	-	-	-	-	-	25.8	-	-	-	-	-
6-18	-	陽性対照 (MMC) 0.0001	100	21	27	0	0	0	42	70.1	100	1	0	0	1	
			100	18	34	0	2	0	0	48	65.7	100	0	0	0	0
			200	39	61	0	2	0	0	90 (45.0)	67.9	200	1	0	0	1 (0.5)
6-18	+	陰性対照 (DMSO) 0	100	0	0	0	0	0	0	100.0	100	0	0	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	100.0	100	2	0	0	2
			200	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	100.0	200	2	0	0	2 (1.0)
6-18	+	0.266	100	0	2	0	0	0	2	82.2	100	0	0	0	0	
			100	0	3	0	0	0	0	3	71.0	100	0	0	0	0
			200	0	5	0	0	0	0	5 (2.5)	76.6	200	0	0	0	0 (0.0)
6-18	+	0.333	100	4	8	0	0	0	11	55.5	100	1	0	0	1	
			100	0	5	0	0	0	0	5	55.5	100	1	0	0	1
			200	4	13	0	0	0	0	16 (8.0)	55.5	200	0	0	0	2 (1.0)
6-18	+	0.416	100	11	15	0	0	0	20	37.0	100	0	0	0	0	
			100	14	16	0	0	0	1	24	41.8	100	1	0	0	1
			200	25	31	0	0	0	1	44 (22.0)	39.4	200	0	0	0	1 (0.5)
6-18	+	0.520	TOX	-	-	-	-	-	-	30.6	-	-	-	-	-	
			TOX	-	-	-	-	-	-	-	44.7	-	-	-	-	-
			-	-	-	-	-	-	-	-	37.7	-	-	-	-	-
6-18	+	陽性対照 (CP) 0.0125	100	6	29	0	0	0	32	98.6	100	0	0	0	0	
			100	7	29	0	0	0	0	33	82.8	100	1	0	0	1
			200	13	58	0	0	0	0	65 (32.5)	90.7	200	1	0	0	1 (0.5)

MMC : Mitomycin C

CP : Cyclophosphamide

ログウッド色素のげっ歯類を用いる小核試験

分担研究者 中嶋 圓 財団法人 食品農医薬品安全性評価センター
遺伝毒性グループ グループリーダー
試験責任者 嶋田 佐和子 財団法人 食品農医薬品安全性評価センター
遺伝毒性グループ
試験担当者 古屋 有佳子 財団法人 食品農医薬品安全性評価センター
遺伝毒性グループ

要旨

本研究は、既存天然添加物であるログウッド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「安全性に関する試験の標準的実施方法（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、ログウッド色素のマウス骨髄の多染性赤血球に対する小核誘発性が認められた。

A. 目的

既存天然添加物であるログウッド色素は、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たものである。わが国では使用実績はないようであるが、苦味酒に含有されて輸入される場合がある。

本試験は、ログウッド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. 方法

1. 既存天然添加物

日本食品添加物協会より提供されたログウッド色素（Logwood colour）を試験に用いた。提供されたログウッド色素は室温下で

保管した。

2. 使用動物

8週齢の雄のBDF₁（C57BL/6×DBA/2）マウス（SPF）を日本エスエルシー株式会社より購入し、1週間の検疫・馴化ののち、9週齢のマウスを試験に用いた。

3. 飼育条件

動物は全飼育期間を通して、温度 24.5±2.5℃、湿度 55±20%、照明 12 時間（7:00 点灯、19:00 消灯）、換気回数 1 時間あたり 18 回に設定した環境下で飼育した。

動物を 2～3 匹ずつケージに収容し、MF 固型飼料（オリエンタル酵母工業株式会社）を自由摂取させた。また、水道水を自動給

水ノズルより自由摂取させた。

4. 溶媒および被験物質溶液の調製

ログウッド色素は、水に不溶であることから、媒体としてトウモロコシ油を用い、連続希釈により被験物質懸濁液を調製した。10 mL/kgの投与用量で被験物質懸濁液を強制経口投与した。

5. 投与方法

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「安全性に関する試験の標準的実施方法（げっ歯類を用いる小核試験）」¹⁾の基準に従い、以下に示した手順で実施した。

マウス用胃ゾンデを用いて被験物質溶液を1日1回、24時間間隔で2日間の強制経口投与を行った。

用量設定試験では1群3匹、小核試験では1群6匹（評価数は5匹）のマウスを用いた。

6. 小核標本の作製

炭酸ガス吸入法で動物を安楽死させて、大腿骨を摘出し、少量の非働化済みウシ胎児血清を用いて洗い出し、遠心（1000 rpm、5分）し余剰血清を除き、塗抹標本作製した。室温で乾燥させた標本をメタノールで固定した。作製したスライド標本を3%ギムザ液（pH 6.8の1/100 mol/Lナトリウム・リン酸緩衝液で希釈調製）で染色し、ナトリウム・リン酸緩衝液（pH 6.8）および精製水で洗浄し、乾燥させた。さらに0.001%クエン酸水溶液および精製水で洗浄した後、再び乾燥させた。

7. 小核標本の観察

標本の観察は、コード化し処理条件等が分からない状態で行った。光学顕微鏡下で多染性赤血球を1匹あたり2000個観察し、小核を有する細胞を計数した。また、全赤血球（多染性赤血球および正染性赤血球）500個を観察し、多染性赤血球の数を計数した。

8. 統計方法

各試験群の小核多染性赤血球の出現頻度は条件付き二項検定（Kastenbaum and Bowmanの推計学的方法²⁾；有意水準上側0.05）を用い、また、観察赤血球中の多染性赤血球の割合についてはDunnettのt-検定法³⁾を用いて有意差（有意水準0.05）を判定した。

9. 判定基準

被験物質処理群において統計学的な有意差が認められた場合、陽性と判定した。ただし、最終的な判定は試験条件下での生物学的な妥当性も考慮して行った。

（倫理面の配慮）：本研究では実験動物としてマウスを用いているが、（財）食品農医薬品安全性評価センターの実験動物保護管理規定を遵守しており、動物愛護上の配慮が十分になされている。また、ヒト組織利用の倫理上問題となることはない。

C. 結果

用量設定試験の結果、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1）。これらの結果に

基づき 500、1000 および 2000 mg/kg/day の 3 用量で小核試験を実施した。

標本観察の結果、小核を有する多染性赤血球頻度は、陰性対照値 (0.22%) と比較して、500、1000 および 2000 mg/kg/day でそれぞれ 0.19、0.15 および 0.36% となり、2000 mg/kg/day でのみ有意な増加が認められた (表 2、付表 1)。また、全赤血球に対する多染性赤血球の割合については、2000 mg/kg でのみ有意な減少が認められた。一方、マイトマイシン C (MMC) 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

ログウッド色素について、ガイドラインで定められた 2000 mg/kg を高用量とした用量設定試験を実施した結果、いずれの投与群においても死亡例が認められなかった。このことから小核試験では 2000 mg/kg まで検討した。その結果、用量依存性は見られないものの、2000 mg/kg において陰性対照に比較して小核誘発率の統計学的に有意な増加が認められた。また、2000 mg/kg においては多染性赤血球の割合が有意に減少し、骨髄細胞の分裂抑制作用が確認された。一方、陽性対照群については、小核誘発率が明らかに増加し、その出現頻度は当センターの背景値の範囲内であった。また、陰性対照群の小核誘発率も当センターの背景値の範囲内であった。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、ログウッド色素のマウス骨髄多染性赤血球に対する小核誘発性は陽性と判定した。

本被験物質のログウッド色素については細菌を用いる復帰突然変異試験で陰性、ほ乳

類培養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において陽性の結果が得られている。したがって、*in vitro* あるいは *in vivo* においてログウッド色素が遺伝毒性を示す可能性があるかと推察された。

E. 引用文献

- 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) Kastenbaum, M.A., and K. O. Bowman (1970): Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutation Res.*, 9, 527-549.
- 3) Dunnett CW. (1964): New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, 482-491.

基づき 500、1000 および 2000 mg/kg/day の 3 用量で小核試験を実施した。

標本観察の結果、小核を有する多染性赤血球頻度は、陰性対照値 (0.22%) と比較して、500、1000 および 2000 mg/kg/day でそれぞれ 0.19、0.15 および 0.36% となり、2000 mg/kg/day でのみ有意な増加が認められた (表 2、付表 1)。また、全赤血球に対する多染性赤血球の割合については、2000 mg/kg でのみ有意な減少が認められた。一方、マイトマイシン C (MMC) 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

ログウッド色素について、ガイドラインで定められた 2000 mg/kg を高用量とした用量設定試験を実施した結果、いずれの投与群においても死亡例が認められなかった。このことから小核試験では 2000 mg/kg まで検討した。その結果、用量依存性は見られないものの、2000 mg/kg において陰性対照に比較して小核誘発率の統計学的に有意な増加が認められた。また、2000 mg/kg においては多染性赤血球の割合が有意に減少し、骨髓細胞の分裂抑制作用が確認された。一方、陽性対照群については、小核誘発率が明らかに増加し、

その出現頻度は当センターの背景値の範囲内であった。また、陰性対照群の小核誘発率も当センターの背景値の範囲内であった。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、ログウッド色素の Maus 骨髓多染性赤血球に対する小核誘発性は陽性と判定した。

本被験物質のログウッド色素については細菌を用いる復帰突然変異試験で陰性、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験および Maus を用いる小核試験において陽性の結果が得られている。したがって、*in vitro* あるいは *in vivo* においてログウッド色素が遺伝毒性を示す可能性があるかと推察された。

E. 引用文献

- 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) Kastenbaum, M.A., and K. O. Bowman (1970): Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutation Res.*, 9, 527-549.
- 3) Dunnett CW. (1964): New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, 482-491.

表1 ログウッド色素の2回投与による50%致死量 (LD₅₀²)

Exp. No. 7613 (079-165)				
品目	1回あたりの投与量 (mg/kg)	投与回数	生存数/投与数 (3日間)	推定LD ₅₀ ²
ログウッド色素	1024	×2	3/3	
	1280	×2	3/3	
	1600	×2	3/3	
	2000	×2	3/3	>2000mg/kg

投与方法: 経口投与

表2 小核試験成績

Exp No. 7613 (079-165)

被験物質	投与量 mg/kg/day	投与方法	投与回数	投与間隔	サンプル リング 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)}	%	± SD	(Min / Max)
ロダウド色素 (Corn oil)	0	p.o	×2	24h	24	5	53.6 ± 9.0	(42.0 / 64.0)	—	10000	22	—	0.22 ± 0.06	(0.15 / 0.30)
	500	p.o	×2	24h	24	5	44.0 ± 8.2	(37.8 / 56.2)	N.S.	10000	19	N.S.	0.19 ± 0.09	(0.10 / 0.30)
	1000	p.o	×2	24h	24	5	51.3 ± 5.0	(42.8 / 55.4)	N.S.	10000	15	N.S.	0.15 ± 0.04	(0.10 / 0.20)
	2000	p.o	×2	24h	24	5	42.9 ± 2.0	(40.8 / 45.2)	*	10000	36	*	0.36 ± 0.13	(0.20 / 0.50)
MMC	2	i.p.	×1	—	24	5	46.9 ± 4.5	(43.4 / 53.2)	N.S.	10000	557	*	5.57 ± 0.95	(4.75 / 7.00)

a) : 最終投与後のサンプルリング時間

b) : Dunnettのt-検定による検定 (*: P≤0.05)

c) : Kastenbaum and Bowmanの推計学的方法による検定 (*: P≤0.05)

MMC : Mitocycin C

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

附表 1.

Exp No. : 7613 (079-165)
 検体名 : ログウッド色素
 機関名 : (財)食品農医薬品安全性評価センター
 動物 : マウス/BDF₁ /雄/9週齢/経口投与
 備考 :

mg/kg/day	SCHEDULE	MOUSE	MNPCE : %	PCE/(PCE+NCE) : %	BW : g	判定
0 Vehicle (Corn oil)	×2, 24hr	2001	0.30	56.0	25.5	
		2002	0.25	47.0	22.7	
		2003	0.20	42.0	27.2	
		2004	0.15	59.2	25.6	
		2005	0.20	64.0	23.3	
	Mean	0.22	53.6	24.9		
	Std	0.06	9.0	1.8		
	Min	0.15	42.0	22.7		
	Max	0.30	64.0	27.2		
	Total No.	22				
500	×2, 24hr	2101	0.10	38.0	23.5	
		2102	0.25	56.2	24.2	
		2103	0.10	39.2	23.1	
		2104	0.20	49.0	23.9	
		2105	0.30	37.8	23.6	
	Mean	0.19	44.0	23.7		
	Std	0.09	8.2	0.4		
	Min	0.1	37.8	23.1		
	Max	0.30	56.2	24.2		
	Total No.	19				
1000	×2, 24hr	2201	0.15	52.0	23.7	
		2202	0.20	54.4	25.7	
		2203	0.10	51.8	23.5	
		2204	0.15	55.4	25.4	
		2205	0.15	42.8	27.7	
	Mean	0.15	51.3	25.2		
	Std	0.04	5.0	1.7		
	Min	0.1	42.8	23.5		
	Max	0.20	55.4	27.7		
	Total No.	15				
2000	×2, 24hr	2301	0.20	43.6	24.2	
		2302	0.45	44.0	23.9	
		2303	0.25	40.8	25.0	
		2304	0.50	45.2	23.9	
		2305	0.40	40.8	27.0	
	Mean	0.36	42.9	24.8		
	Std	0.13	2.0	1.3		
	Min	0.2	40.8	23.9		
	Max	0.50	45.2	27.0		
	Total No.	36				
MMC 2	×1, 24hr	1501	7.00	50.0	26.4	
		1502	5.15	43.6	26.7	
		1503	6.05	53.2	28.8	
		1504	4.75	44.2	27.9	
		1505	4.90	43.4	24.6	
	Mean	5.57	46.9	26.9		
	Std	0.95	4.5	1.6		
	Min	4.75	43.4	24.6		
	Max	7.00	53.2	28.8		
	Total No.	557				

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

MNPCE : Frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes.

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

MMC : Mitomycin C

S^K : Kastenbaum and Bowman の推計学的方法による検定

グレープフルーツ種子抽出物の細菌を用いる復帰突然変異試験

分担研究者 中嶋 圓 財団法人 食品農医薬品安全性評価センター
遺伝毒性グループ グループリーダー
試験責任者 菊池 正憲 財団法人 食品農医薬品安全性評価センター
遺伝毒性グループ
試験担当者 上田 摩弥 財団法人 食品農医薬品安全性評価センター
遺伝毒性グループ

要旨

本研究の目的は、既存添加物であるグレープフルーツ種子抽出物の微生物に対する遺伝子突然変異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「安全性に関する試験の標準的実施方法（微生物を用いる復帰突然変異試験）」の基準に従い実施した。その結果、グレープフルーツ種子抽出物の微生物に対する遺伝子突然変異誘発性について判定するには、本試験結果のみでは不十分であった。

A. 目的

既存添加物であるグレープフルーツ種子抽出物は、ミカン科グレープフルーツ (*Citrus paradisi* MCAF.) の種子より、水またはエタノールで抽出して得られたものである。主成分は脂肪酸およびフラボノイドなどで構成されており、抗菌作用があるので日持向上剤として用いられる。

本試験は、グレープフルーツ種子抽出物の微生物に対する遺伝子突然変異誘発性の有無を検索することを目的とした。

B. 方法

1. 既存天然添加物

日本食品添加物協会より提供されたグ

レープフルーツ種子抽出物 (Grapefruit seed extract) を試験に用いた。提供されたグレープフルーツ種子抽出物は室温下で保管した。

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 の 5 菌株を用いた。入手した菌株は Ames ら¹⁾ 及び Maron ら²⁾ 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 8.0% 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°Cで 8 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。

3. S9 及び S9 mix

S9 mix 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 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 の組成は、4 mM NADPH、4 mM NADH、5 mM G-6-P、8 mM MgCl₂、33 mM KCl、100 mM ナトリウム・リン酸緩衝液 (pH7.4)、10% S9 である。

4. 溶媒および被験物質溶液の調製

グレープフルーツ種子抽出物は、水に溶解するため、溶媒として注射用水を用いた。0.2 μm のフィルターでろ過除菌したものを調製原液とし、連続希釈により被験物質液を調製した。プレートあたり被験物質液を 100 μL 添加した。

5. 復帰突然変異試験

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「安全性に関する試験の標準的実施方法 (微生物を用いる復帰突然変異試験)」³⁾ の基準に従い、Ames 法¹⁾ 及び Maron 法²⁾ の方法に準拠し、以下の示したプレインキュベーション法⁴⁾ で実施した。

被験物質溶液、溶媒または陽性対照物質溶液 0.1ml と S9 mix あるいは 0.1M Na-リン酸緩衝液 0.5 ml と試験菌株の前培養液 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、ただ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。

6. 判定基準

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、用量依存性あるいは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。

(倫理面の配慮) : 本研究は細菌を用い *in vitro* 条件下にて試験を行っていることから、動物愛護上の配慮ならびにヒト組織利用の倫理上問題となることはない。

C. 結果

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。その結果、用量設定試験の代謝活性化によらない場合の TA1535、及び TA1537 株において、1 用量のみ溶媒対照値の 2 倍の復帰変異コロニー数の増加が認められた。他のネズミチフス菌 TA98、TA100、及び大腸菌 WP2*uvrA* については、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復帰コロニー数の増加は認められなかった (表 1、2)。

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 WP2_{uvrA} のそれぞれの試験での溶媒対照値と陽性対照値は、当センターの背景値の範囲内であった。このことより試験は適切に実施されたものと判断した。しかしながら代謝活性化によらない場合における TA1535、及び TA1537 株の復帰コロニー数の増加について、用量設定試験及び本試験で再現性が認められず、また、用量設定試験の代謝活性化によらない場合の全菌株では、生育阻害作用が低用量まで認められ、同作用が認められない用量が 1~2 用量のみしか採れなかった。以上のことより、グレープフルーツ種子抽出物の微生物に対する復帰突然変異原性を判定するには、さらに確認試験等の実施が必要である。

E. 引用文献

- 1) 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.
- 2) Maron, D.M. and B.N. Ames (1983): Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutation Res.*, 113, 173-215.
- 3) 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

- 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.

表1 用量設定試験結果表

被験物質の名称： グレープフルーツ種子抽出物

試験番号： 7588 (079-154)

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	TA98	TA1537
-S9mix	陰性対照	114 111 (113)	10 9 (10)	32 29 (31)	22 19 (21)	7 5 (6)
	8.19	119 127 (123)	8 8 (8)	30 24 (27)	23 22 (23)	11 13 (12)
	20.5	93* 100* (97)	10* 8* (9)	25 27 (26)	25* 20* (23)	5* 6* (6)
	51.2	84* 92* (88)	24* 18* (21)	26* 23* (25)	17* 16* (17)	6* 7* (7)
	128	50* 60* (55)	7* 8* (8)	21* 20* (21)	13* 12* (13)	4* 6* (5)
	320	0* 0* (0)	0* 0* (0)	9* 7* (8)	0* 0* (0)	0* 0* (0)
	800	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)
	2000	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)
	5000	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)
	+S9mix	陰性対照	129 127 (128)	10 9 (10)	26 30 (28)	36 33 (35)
8.19		129 133 (131)	9 10 (10)	24 27 (26)	37 33 (35)	22 19 (21)
20.5		119 123 (121)	11 9 (10)	19 21 (20)	27 25 (26)	24 21 (23)
51.2		145 134 (140)	9 7 (8)	26 24 (25)	26 26 (26)	24 26 (25)
128		138 146 (142)	8 6 (7)	21 24 (23)	34 32 (33)	13 16 (15)
320		96* 110* (103)	6* 9* (8)	25 21 (23)	29* 33* (31)	7* 7* (7)
800		31* 31* (31)	3* 4* (4)	11* 12* (12)	18* 24* (21)	4* 7* (6)
2000		0* 0* (0)	0* 0* (0)	2* 3* (3)	0* 0* (0)	0* 0* (0)
5000 +		0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)
陽性対照		名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2
	用量($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	コロニー数 /プレート	443 476 (460)	446 464 (455)	96 98 (97)	613 692 (653)	306 527 (417)
	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	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	790 722 (756)	323 298 (311)	741 723 (732)	366 318 (342)	143 131 (137)

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

NaN₃ : Sodium azide

9-AA : 9-Aminoacridine hydrochloride

2-AA : 2-Aminoanthracene

* : 菌の生育阻害が認められた

+ : 暴露終了時、被験物質の析出が認められた