

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 中嶋 圓（財団法人食品農医薬品安全性評価センター 主席研究員）
協力研究者 益森 勝志（財団法人食品農医薬品安全性評価センター グループ長補佐）
赤星まゆみ（財団法人食品農医薬品安全性評価センター）
永井 美穂（財団法人食品農医薬品安全性評価センター）
菊池 正憲（財団法人食品農医薬品安全性評価センター）
尾崎 伸也（財団法人食品農医薬品安全性評価センター）
田中 仁（財団法人食品農医薬品安全性評価センター）

研究要旨

安全性のデータが不十分であり、現在流通している既存天然添加物 23 品目のうち、サンダラック樹脂およびメバロン酸の変異原性について、遺伝子突然変異誘発性を検討するため、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100、TA98、TA1535 および TA1537 株ならびに大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2 *uvrA* 株を用いた復帰突然変異試験を行った。コメヌカ酵素分解物およびモンタンロウでは染色体異常誘発性を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺線維芽細胞株 (CHL/IU) を用いた *in vitro* 染色体異常試験並びに BDF₁ 系雄マウスを用いた *in vivo* 小核試験を行った。Amaranth (赤色 2 号) については DNA 損傷性を検討するため、ICR 系マウスおよび SD 系ラットを用いた *in vivo* コメットアッセイを行った。

復帰突然変異試験の結果、サンダラック樹脂およびメバロン酸処理において、代謝活性化系非存在下 (-S9 処理) ならびに代謝活性化系存在下 (+S9 処理) のいずれも陰性対照に比べ復帰突然変異コロニー数の増加は認められなかった。また、用量設定試験および本試験で再現性が確認された。従って、本試験条件下において、サンダラック樹脂およびメバロン酸には遺伝子突然変異を誘起しないものと判断した。

染色体異常試験の結果、コメヌカ酵素分解物およびモンタンロウ処理群の場合、-S9 処理、+S9 処理ならびに連続処理法 24 時間処理の各用量群とも明確な染色体異常の誘発は認められなかった。従って、本試験条件下の *in vitro* 試験系において、コメヌカ酵素分解物およびモンタンロウは染色体異常を誘起しないものと判断した。

小核試験の結果、コメヌカ酵素分解物およびモンタンロウ投与群における小核多染性赤血球出現頻度は、いずれの群においても陰性対照群と同等の値を示し、統計学的に有意な差は認められなかった。また、骨髄細胞に対する影響を示すような多染性赤血球の割合の減少傾向は観察されなかった。従って、本試験条件下において、コメヌカ酵素分解物およびモンタンロウはマウス骨髄細胞に対して小核赤血球を誘起しないものと判断した。

コメットアッセイの結果、マウスの Amaranth 投与群においては、100 および 1000 mg/kg (3 回連続投与) 投与群の胃において tail length (μm) の統計学的に有意な増加が観察されたが、tail moment で再評価すると、その増加は統計学的に有意ではなかった。なお、佐々木有博士の私信によると、Amaranth のマウスへの 3 回連続投与では陰性結果となっていた。マウスおよびラットへの単回投与の胃ならびに腸管においては、陰性対照と比較して統計学的に有意な増加は観察されなかった。コメットアッセイ自体、動物個体間あるいは施設間によってデー

タに大きなバラツキが認められ、特に今回実施した胃や腸管においては、その傾向が著しいことが知られている。従って、臓器によっては安全性評価に適していない面もあると考えられ、本試験条件下において、AmaranthはDNA損傷を誘起するものと明確に判断できなかった。

キーワード：遺伝毒性試験、復帰突然変異試験、ネズミチフス菌、大腸菌、染色体異常試験、小核試験、コメットアッセイ、サンダラック樹脂、メバロン酸、コメヌカ酵素分解物、モンタンロウ、Amaranth、赤色2号

A. 研究目的

安全性のデータが不十分であり、現在流通している既存天然添加物23品目のうち、サンダラック樹脂およびメバロン酸について復帰突然変異試験【第一章】、コメヌカ酵素分解物およびモンタンロウについて染色体異常誘発試験【第二章】並びにマウス小核試験【第三章】、Tsuda等の試験【Toxicol. Sci. 61, 92-99 (2001)】の再現性を確認するためAmaranth (赤色2号) についてコメットアッセイ【第四章】を実施した。

表1 試験化合物

化合物名	用途
サンダラック樹脂	ガムベース
メバロン酸	製造用剤
コメヌカ酵素分解物	酸化防止剤
モンタンロウ	ガムベース
Amaranth (赤色2号)	着色料

サンダラック樹脂はヒノキ科サンダラック (*Tetraclinis articulata* (VAHL.) MAST.) の分泌液より、室温時エタノールで抽出し、ろ液からエタノールを留去して得られたオレオレジンから得られたものである。主構成成分はサンダラコピマール酸である。主にアルジェリア、モロッコに分布するサンダラック樹の分泌した樹脂を精製したもので、セスキテルペンおよびジテルペン類を主成分とする。用途はガムベースである。黄色～淡褐色の半透明の脆いガラス状物質で、芳香がある。水に不溶、エタノール、アセトン、エーテルおよびアミルアルコールに可溶の物質であり、株式会社岐阜セラック製造所から提供を受けた。

メバロン酸は酵母 (*Saccharomyces fibuligera*) によるコーンスチープリカー又は

カゼイン由来のペプトンを主原料とする発酵培養液より、有機溶剤で抽出して得られたものである。動物や植物中に広く含まれている生体物質であり、分子内に不斉炭素を持ち天然にはR(-)体が存在する。本品は酵母菌 *Saccharomyces fibuligera* を用いる醗酵法により得られるR(-)メバロン酸が、還元したラクトン構造をとる。食品の栄養強化や、乳酸菌等の有用腸内細菌の活性化のために使用する。淡黄色～淡褐色の透明な粘性の液で、わずかに特異なおいがある。水およびエタノールに極めて溶けやすい物質で、旭電化工業株式会社から提供を受けた。

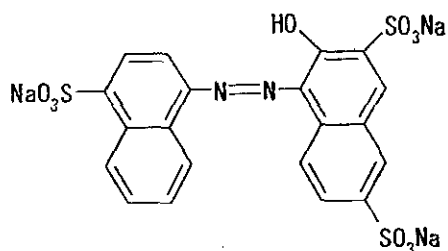
コメヌカ酵素分解物はイネ科イネ (*Oryza sativa* LINNE) の種子から得られる脱脂米ぬかを酵素分解したものより、水で抽出して得られたものである。主成分はペプチド及びフィチン酸である。本品はフィチン酸 (Phytic acid)、 $C_6H_6[OPD(OH)_2]_6$ 、分子量: 660.08 を含有する。加熱によって分解、酸性反応を示し10%水溶液のpHは0.86である。酸化防止剤として使用されている。黄褐色の水溶液または粉末で、わずかに特有のおいがある。水には溶けやすいが、エタノールには極めて溶けにくい物質で、宝酒造株式会社から提供を受けた。

モンタンロウは褐炭またはリグナイトから得られた、 $C_{20} \sim C_{32}$ の脂肪酸とテトラコシルトリアコンタニルアルコールまたは脂肪酸とヘキサコシルトリアコンタニルアルコールのエステルを主成分とする。ポーランド、ドイツ、北アメリカなどに産する褐炭から溶剤抽出により得られる化石ロウである。主成分は高級脂肪酸と高級アルコールの長鎖エステルで、遊離

後、アルコール、樹脂等も含む。用途はガムベースあるいは光沢剤である。淡黄～黄色の塊状またはフレーク状で、わずかに特有のにおいがある。水に不溶、エタノール、油脂に可溶な物質であり、株式会社加藤洋行から提供を受けた。

Amaranth の構造式および化学名を図 1 に示す。

Amaranth は食用赤色 2 号として使用されており、含量 91.7%、ロット番号 011228 のものを三栄源エフ・エフ・アイ株式会社から提供を受けた。



2, 7-Naphthalenedisulfonic acid, 3-hydroxy-4-[(4-sulfo-1-naphthalenyl)azo]-, trisodium salt

図 1 Amaranth の構造式および化学名

第一章 復帰突然変異試験 (Ames 試験)

A. 研究方法

現在流通している既存天然添加物 23 品目のうち、サンダラック樹脂およびメバロン酸を担当することとした (表 1)。陽性対照物質として、2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド、アジ化ナトリウム、9-アミノアクリジン塩酸塩および 2-アミノアントラセンを用いた。

試験菌株および培地等の準備：

試験菌株としてネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100、TA98、TA1535 および TA1537 株ならびに大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2 *uvrA* 株を使用した。

最少グルコース寒天平板培地 (プレート) と

してテスメディア AN 培地 (オリエンタル酵母工業株式会社) を試験に使用した。S9 mix については、製造後 6 ヶ月以内の S9 mix (キッコーマン株式会社) を試験に使用した。トップアガー (軟寒天) については、塩化ナトリウム 0.5 w/v% および寒天 (Bacto-agar : Difco Laboratories) 0.6 w/v% を含む水溶液をオートクレーブで滅菌して、ネズミチフス菌を用いる試験の場合、0.5 mmol/L L-ヒスチジン (関東化学株式会社) および 0.5 mmol/L D-ビオチン (関東化学株式会社) 水溶液を寒天溶液 10 容量に対し 1 容量加え、大腸菌を用いる試験の場合、0.5 mmol/L L-トリプトファン (関東化学株式会社) 水溶液を同じく 1 容量加えたものを使用した。

1) 試験菌株の前培養：

内容量 200 mL のバッフル付三角フラスコに 2.5 w/v% ニュートリエントブロス (Nutrient Broth No. 2 : Oxoid Limited) 培養液を 25 mL 分注し、これに融解した菌懸濁液を 50 μ L 接種した。培養開始までの間 4°C に保存し、その後ウォーターバスシェーカーを用い、37°C で 8 時間振盪 (100 回/分) 培養した。試験毎に菌株の培養を実施し、菌懸濁液は培養終了後速やかに使用した。

2) 被験物質等の処理：

試験管に使用溶媒、被験物質液あるいは陽性対照物質溶液を 100 μ L (サンダラック樹脂の場合、使用溶媒がエタノールのため、陽性対照物質溶液以外は 25 μ L)、次いで -S9 処理の場合、0.1 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液 (pH 7.4) を 500 μ L、+S9 処理の場合、S9 mix を 500 μ L 分注した。さらに前培養した試験菌株懸濁液 100 μ L を加えた後、ウォーターバスシェーカーを用いて 37°C で 20 分間振盪 (ブレインキューベーション) した。振盪終了後、トップアガー 2 mL を添加し、内容物を混合した後プレート上に注いだ。恒温器を用い、各プレートを 37°C で 48 時間培養した。

3) コロニー数計測

被験物質の生育阻害作用を確認するため、プ

小核の観察を実施した。その結果、小核多染性赤血球の出現頻度は各被験物質処理群とも陰性対照群と同等の値を示し、統計学的に有意な増加は認められなかった。また、全赤血球中の多染性赤血球の割合についても統計学的に有意な減少は認められなかった。

なお、陰性対照ならびに陽性対照での小核出現頻度、多染性赤血球の割合はいずれも当施設での背景データの範囲内であり、本試験が適切な条件下でなされたと判断された。

D. 結 論

本試験条件下においてコメヌカ酵素分解物およびモンタンロウのマウスに対する小核の誘発性、すなわち染色体異常ないし紡錘体形成阻害誘発性は陰性と判定した。

E. 健康危険情報

特になし

F. 参考資料

- 1) Schmid W. The micronucleus test. *Mutat Res*; 31: 9-15, 1975.
- 2) Schmid W. The micronucleus test for cytogenetic analysis. In: Hollaender A, editor. *Chemical Mutagens*. Vol. 4. New York: Plenum press; p. 31-53, 1976..
- 3) Salamone M, Heddle J, Stuart E, Katz M. Towards an improved micronucleus test: Studies on 3 model agents, mitomycin C, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene. *Mutat Res*, 74: 347-56, 1980.
- 4) Kastenbaum MA, Bowman KO. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat Res*, 9: 527-49. 1970.
- 5) Dunnett, C. W.: New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 483-91, September, 1964.

第四章 コメットアッセイ

A. 研究方法

現在流通している人工着色料のうち、Amaranth (赤色2号) を担当することとした (表 1)。陽性対照物質として、マウスではメチルアミノアゾベンゼン (DAAB) およびメタンサルホン酸エチル (EMS)、ラットでは1, 2-ジメチルヒドラジン二塩酸塩 (DMH) を用いた。

試験動物:

マウスは生後7週の雄の:CD-1 (ICR) [SPF] を購入し、8週齢で被験物質等の投与を実施した。ラットは生後7週の雄の:CD (SD) IGS [SPF] を購入し、8週齢で被験物質等の投与を実施した。各動物について疾病の有無を6日間観察すると共に、動物を飼育環境に馴化させた。

飼育管理:

換気回数1時間当たり18回、照明12時間(午前7時点灯、午後7時消灯:150~300 lux)、温度 $24.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 20\%$ に設定したマウス飼育室あるいはラット飼育室で動物を飼育した。動物には固型飼料 (MF:オリエンタル酵母工業株式会社) を自由に摂取させた。動物には水道水を自動給水ノズルより自由に摂取させた。

被験物質等の投与:

媒体および被験物質の投与経路はTsuda等の試験に準じて経口とし、マイクロシリンジとテフロン製ゾンデを用いて単回あるいは1日1回、24時間間隔で3日間連続投与した。投与容量は体重10g当たり0.1mLとし、群分け時の体重から投与液量 (mL) を求めた。陽性対照物質EMS (マウスに使用) の場合、マイクロシリンジと25G注射針を用いて腹腔内に1回投与し、DAAB (マウスに使用) あるいはDMH (ラットに使用) の場合は単回経口投与した。投与容量は体重10g当たり0.1mLとし、群分け時の体重から投与液量 (mL) を求めた。

単細胞液の調製:

腸管および胃を摘出した後切開し、表層をナイフ等で剥離させた。次いで適量のホモジナイ

ズ用緩衝液を加えダウンス型ホモジナイザーを用いてホモジナイズした。ただし、胃についてはホモジナイズせず、ホモジナイズ用緩衝液中で軽く攪拌した。5分間遠心分離(800 r/min)し、上清を捨て適量のホモジナイズ用緩衝液に懸濁して単細胞液とした。

標本の作製：

スーパーフロストガラスに0.6%アガロースゲル60 μL を滴下し均一に塗抹し、表面が乾燥した後、0.6%アガロースゲル100 μL を重層し第1層とする。単細胞液10 μL を分注したマイクロチューブに1%低融点アガロースゲル75 μL を添加し攪拌したのち、75 μL を第1層上に重層し第2層とした。第2層が固化した後、1%低融点アガロースゲル100 μL を重層し第3層とした。第3層が固化した後、各標本を核融解液の入ったバットに入れ遮光、冷蔵下で1時間以上静置した。各標本をサブマリン型電気泳動槽(BE-520あるいはBE-540)を用いて1 V/cm(25V<BE-520の場合>あるいは36V<BE-540の場合>)の定電圧で15分間電気泳動を行なった後、中和液で中和した。エタノールを用い泳動後の標本を脱水した。

細胞の観察：

全ての標本をコード化した後、マスキング法で観察した。20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のエチジウムブロマイド液(ニッポンジーン)50 μL を標本に滴下し、カバーガラスを載せた。IG励起(励起フィルター; BP520-550)および補助吸収フィルター(BA580IF)を備えた落射蛍光顕微鏡にCCDカメラを装着したコメットアッセイ解析装置(Rainbow Star システム: 東洋紡績株式会社)に画像を取り込みtail length (μm)を計測した。1器官当たり100細胞(50細胞/スライド)、すなわち1群(4匹)当たり400細胞の泳動像を解析した。

統計：

陰性対照とその他の群(陽性対照群を除く)のtail length(マウスではさらにolive's tail moment)について、最初に一元配置分散分析

(one-way ANOVA: 有意水準0.05)を実施した。同検定で有意となった場合にDunnett検定(有意水準0.05および0.01)を用いて陰性対照群と各被験物質投与群との平均値の差の検定を行った。陰性対照群と陽性対照群との比較については、tail lengthをAspin-Welchのt検定(有意水準0.05および0.01)により平均値の差の検定を行った。検定の有意水準は片側5%および1%とした。

B. 研究結果

コメットアッセイのマウスの結果を表16~19に、ラットの結果を表20および表21に示す。

本試験結果(胃: マウス)

結果を表16および表17に示した。

個体別に100細胞を解析した結果、陰性対照での平均tail lengthおよびtail momentは3時間群で9.7 μm および1.9、24時間群で11.2 μm および2.0であった。Amaranth投与によるtail lengthあるいはtail momentは単回投与の各群いずれも19.6 μm あるいは4.0以下であり、陰性対照と比較して統計学的に有意な差は認められなかった。3回連続投与群でのtail lengthは10.0 mg/kgで16.4 μm 、100 mg/kgで25.5 μm 、1000 mg/kgで23.2 μm を示し、中用量および高用量で統計学的に有意($p \leq 0.05$)な増加が観察された。しかしながら同群でのtail momentは10.0 mg/kgで3.2、100 mg/kgで6.2、1000 mg/kgで5.9と増加を示したが、統計学的に有意な増加ではなかった。

なお、標本作製時において明確な体重増加抑制傾向ならびに一般状態の変化は認められなかった。

一方、陽性対照DAABの場合、3時間群ではtail lengthは20.1 μm を示し、有意($p \leq 0.05$)な増加が見られたが、24時間群(500 mg/kg)では全例が死亡した。EMS投与の3時間でのtail lengthは31.9 μm を示し有意($p \leq 0.01$)な増加が確認された。

本試験結果（腸管：マウス）

結果を表18および表19に示した。

陰性対照での平均tail lengthおよびtail momentは3時間群で8.1 μm および1.1、24時間群で5.4 μm および0.8であった。Amaranth投与によるtail lengthあるいはtail momentは単回投与および3回連続投与の各群いずれも16.3 μm あるいは2.6以下であり、陰性対照と比較して統計学的に有意な増加は認められなかった。

なお、標本作製時において明確な体重増加抑制傾向ならびに一般状態の変化は認められなかった。

一方、陽性対照DAABの場合、3時間群でtail lengthは13.5 μm を示し、有意 ($p \leq 0.05$) な増加が見られたが、24時間群では全例が死亡した。EMS投与の3時間でのtail lengthは34.4 μm を示し有意 ($p \leq 0.01$) な増加が確認された。

本試験結果（胃：ラット）

結果を表20に示した。

個体別に100細胞を解析した結果、陰性対照での平均tail lengthは3時間群で15.4 μm 、24時間群で18.9 μm であった。Amaranth投与によるtail lengthは単回投与の各群いずれも23.1 μm 以下であり、陰性対照と比較して統計学的に有意な増加は認められなかった。

なお、標本作製時において明確な体重増加抑制傾向ならびに一般状態の変化は認められなかった。

一方、陽性対照DMHの場合、3時間群ではtail lengthは31.3 μm を示し、有意 ($p \leq 0.01$) な増加が見られたが、24時間群では26.3 μm を示し有意ではないが増加傾向が見られた。

本試験結果（腸管：ラット）

結果を表21に示した。

陰性対照での平均tail lengthは3時間群で7.9 μm 、24時間群で7.0 μm であった。Amaranth投与によるtail lengthは単回投与の各群い

れも11.9 μm 以下であり、陰性対照と比較して統計学的に有意な差は認められなかった。

なお、標本作製時において明確な体重増加抑制傾向ならびに一般状態の変化は認められなかった。

一方、陽性対照DMHのtail lengthは、3時間群で18.1 μm 、24時間群で13.3 μm を示し、有意 ($p \leq 0.05$) な増加が見られた。

C. 考 察

マウスの胃および腸管においてAmaranthは初期型DNA損傷を誘発することがTsuda等によって報告されている。本実験の再現性ならびに種差を確認するため、1.00、10.0、100、1000および2000 mg/kgの5用量を設定しマウスならびにラットへ単回投与したのち、3時間後に、さらに2000 mg/kgでは24時間後に標本作製し次いで、tail lengthを計測した。さらに、マウスについてはtail momentを計測した。また、連続投与での影響を見るため、10.0、100および1000 mg/kgの3用量についてマウスに3回連続投与した後、24時間後に標本作製し次いで、tail lengthおよびtail momentを計測した。その結果、3回連続投与、100および1000 mg/kgの胃においてのみ、陰性対照と比較して統計学的に有意な平均tail lengthの上昇が観察されたが、tail momentで再評価した場合、その上昇は有意ではなかった。コメントアッセイ自体、動物個体間あるいは施設間によってデータに大きなバラツキが認められ、特に今回実施した胃や腸管においては、その傾向が著しいことが知られている。従って、臓器によっては安全性評価に適していない面もあると考えられる。

D. 結 論

本試験条件下においてAmaranthのマウスおよびラットに対するコメント誘発性、すなわち初期DNA損傷の誘発性は明確に陽性と判断できなかった。

E. 健康危険情報

特になし

F. 参考文献

- 1) Tsuda, S., Murakami, M., Matsusaka, N., Kano, K., Taniguchi, K. and Sasaki, Yu. F. : DNA damage induced by red food dyes orally administered to pregnant and malemice, *Toxicological Sciences*, 61, 92-99, 2001.

G. 参考資料

- 1) Tice, R. R., Andrews, P. W., Hirai, O. and Singk, N. P. : The single cell gel (SCG) assay: An electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cells. Plenum Press, New York, pp. 157~164, 1990.
- 2) 平井収, Tice, R. R. : 細胞レベルでの高感度な DNA 損傷検出法, *変異原性試験*, 3, 1~11, 1994.
- 3) Anderson, D., Yu, T.-W., Phillips, B. J. and Schmezer, P. : The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay, *Mutat. Res.*, 307, 261~271, 1994.
- 4) 佐々木有 他 : マウス多臓器アルカリ SCG 法による臓器特異的遺伝子毒性の検出, *環境変異原研究*, 20, 51~621, 1998.

表16 コメット試験結果(胃:マウス)

試験用量 (mg/kg)	投与回数 ^{a)} / 処理時間 ^{b)}	動物番号	tail length [平均±S.D.] (μm)	体重[平均±S.D.](g)	標本 番号		
陰性対照 (D.W.) 0	1回/3h	1001	11.2	35.5 32.8 [34.0 ± 2.5] 36.7 31.1	49		
		1002	11.4		31		
		1003	8.6		27		
		1004	7.7		22		
Amaranth 1		1101	8.5	36.9 35.0 [34.5 ± 2.0] 32.3 33.6	23		
		1102	8.4		25		
		1103	11.6		55		
		1104	8.3		11		
10		1201	23.3	34.0 33.2 [33.9 ± 1.2] 32.8 35.5	13		
		1202	18.2		44		
		1203	14.3		58		
		1204	22.5		30		
100		1301	19.3	36.8 35.6 [35.1 ± 1.7] 35.1 32.8	3		
		1302	9.9		41		
		1303	15.9		65		
		1304	9.8		14		
1000		1401	10.8	36.1 36.2 [35.1 ± 1.5] 32.9 35.1	1		
		1402	8.5		36		
		1403	11.7		9		
		1404	21.9		34		
2000		1501	14.1	36.4 32.2 [34.4 ± 1.7] 34.7 34.2	61		
		1502	31.0		28		
		1503	10.7		48		
		1504	14.9		29		
陽性対照 DAAB ^{c)} 10		1601	22.0	32.1 35.3 [33.8 ± 1.4] 33.4 34.3	62		
		1602	12.6		54		
		1603	20.5		18		
		1604	25.3		15		
陽性対照 EMS ^{d)} 300		1701	29.5	34.0 32.2 [34.0 ± 2.1] 32.7 36.9	20		
		1702	27.0		24		
		1703	28.1		51		
		1704	42.8		2		
陰性対照 (D.W.) 0		1回/24h	2001	8.2	36.2 35.4 [35.5 ± 1.5] 36.9 33.5	35	
			2002	7.6		37	
			2003	10.5		8	
			2004	18.3		26	
Amaranth 2000			2101	12.2	35.7 33.7 [35.2 ± 1.4] 36.8 34.4	17	
			2102	19.0		47	
			2103	22.6		4	
			2104	17.2		38	
DAAB ^{c)}			全例死亡				
10			3回/24h	2201	17.5	32.3 36.5 [35.9 ± 2.6] 38.5 36.1	6
				2202	19.5		52
				2203	9.1		57
	2204			19.4	33		
100	2301			17.6	35.4 36.4 [35.2 ± 1.0] 34.0 34.9	19	
	2302			23.0		40	
	2303			35.9		64	
	2304			25.4		59	
1000	2401			32.0	36.8 36.5 [36.0 ± 0.8] 35.5 35.2	45	
	2402			16.4		12	
	2403			18.2		50	
	2404			26.1		63	

a) : 24時間間隔で投与

b) : 最終投与後、標本作製までの時間

c) : *p*-Dimethylaminoazobenzene

d) : Ethylmethanesulfonate

* : $p < 0.05$ (Aspin-Welchのt検定)** : $p < 0.01$ (Aspin-Welchのt検定)# : $p < 0.05$ (Dunnett検定)## : $p < 0.01$ (Dunnett検定)

表17 コメット試験結果(胃:マウス)

試験用量 (mg/kg)	投与回数 ^{a)} / 処理時間 ^{b)}	動物番号	tail moment [平均±S.D.]	体重 [平均±S.D.] (g)	標本 番号		
陰性対照 (D.W.) 0	1回/3h	1001	2.3	[1.9 ± 0.6]	35.5	49	
		1002	2.5		32.8	31	
		1003	1.7		36.7	27	
		1004	1.2		31.1	22	
Amaranth 1		1101	1.6	[1.7 ± 0.5]	36.9	23	
		1102	1.4		35.0	25	
		1103	2.4		32.3	55	
		1104	1.4		33.6	11	
10		1201	5.0	[3.9 ± 1.2]	34.0	13	
		1202	3.5		33.2	44	
		1203	2.4		32.8	58	
		1204	4.5		35.5	30	
100		1301	3.7	[2.3 ± 1.2]	36.8	3	
		1302	1.4		35.6	41	
		1303	3.0		35.1	65	
		1304	1.2		32.8	14	
1000	1401	1.7	[2.3 ± 1.7]	36.1	1		
	1402	1.1		36.2	36		
	1403	1.5		32.9	9		
	1404	4.7		35.1	34		
2000	1501	2.5	[4.0 ± 3.4]	36.4	61		
	1502	9.0		32.2	28		
	1503	1.6		34.7	48		
	1504	2.8		34.2	29		
陽性対照 DAAB ^{c)} 10	1601	4.5	[4.3 ± 1.3]	32.1	62		
	1602	2.6		35.3	54		
	1603	4.2		33.4	18		
	1604	5.7		34.3	15		
陽性対照 EMS ^{d)} 300	1701	7.6	[8.9 ± 3.0]	34.0	20		
	1702	7.5		32.2	24		
	1703	7.0		32.7	51		
	1704	13.3		36.9	2		
陰性対照 (D.W.) 0	1回/24h	2001	1.3	[2.0 ± 1.2]	36.2	35	
		2002	1.3		35.4	37	
		2003	1.6		36.9	8	
		2004	3.7		33.5	26	
Amaranth 2000		2101	2.0	[3.9 ± 1.6]	35.7	17	
		2102	4.3		33.7	47	
		2103	5.8		36.8	4	
		2104	3.4		34.4	38	
DAAB ^{c)}		全例死亡					
10		3回/24h	2201	3.2	[3.2 ± 1.4]	32.3	6
			2202	3.6		36.5	52
			2203	1.3		38.5	57
			2204	4.7		36.1	33
100			2301	3.6	[6.2 ± 2.8]	35.4	19
			2302	4.8		36.4	40
			2303	10.1		34.0	64
	2304		6.3	34.9		59	
1000	2401		9.7	[5.9 ± 3.2]	36.8	45	
	2402		2.7		36.5	12	
	2403		3.8		35.5	50	
	2404		7.2		35.2	63	

a) : 24時間間隔で投与

b) : 最終投与後、標本作製までの時間

c) : p-Dimethylaminoazobenzene

d) : Ethylmethanesulfonate

表18 コメット試験結果(腸管:マウス)

試験用量 (mg/kg)	投与回数 ^{a)} / 処理時間 ^{b)}	動物番号	tail length [平均±S.D.] (μ m)	体重[平均±S.D.](g)	標本 番号	
陰性対照 (D.W.) 0	1回/3h	1001	7.6	35.5	1	
		1002	6.9	32.8	38	
		1003	4.8	36.7	31	
		1004	13.1	31.1	8	
Amaranth 1		1101	13.7	36.9	54	
		1102	20.5	35.0	19	
		1103	10.6	32.3	46	
		1104	10.4	33.6	45	
10		1201	23.0	34.0	56	
		1202	9.8	33.2	16	
		1203	13.1	32.8	27	
		1204	8.3	35.5	24	
100		1301	10.3	36.8	4	
		1302	4.3	35.6	21	
		1303	12.5	35.1	9	
		1304	4.5	32.8	12	
1000	1401	17.4	36.1	28		
	1402	18.6	36.2	59		
	1403	11.4	32.9	26		
	1404	9.4	35.1	65		
2000	1501	17.5	36.4	35		
	1502	23.0	32.2	5		
	1503	12.9	34.7	42		
	1504	11.8	34.2	49		
陽性対照 DAAB ^{c)} 10	1601	13.9	32.1	11		
	1602	8.6	35.3	13		
	1603	17.8	33.4	36		
	1604	13.7	34.3	50		
陽性対照 EMS ^{d)} 300	1701	35.7	34.0	14		
	1702	36.3	32.2	34		
	1703	33.0	32.7	15		
	1704	32.6	36.9	2		
陰性対照 (D.W.) 0	1回/24h	2001	4.1	36.2	37	
		2002	5.2	35.4	44	
		2003	9.0	36.9	23	
		2004	3.3	33.5	58	
Amaranth 2000		2101	10.3	35.7	10	
		2102	9.7	33.7	6	
		2103	5.4	36.8	29	
		2104	13.3	34.4	33	
DAAB ^{c)}		全例死亡				
10		3回/24h	2201	4.1	32.3	3
			2202	21.2	36.5	17
			2203	12.9	38.5	25
			2204	6.0	36.1	51
100			2301	17.9	35.4	61
			2302	8.4	36.4	20
			2303	12.2	34.0	48
	2304		20.6	34.9	41	
1000	2401		15.0	36.8	30	
	2402		14.4	36.5	57	
	2403		5.2	35.5	47	
	2404		19.2	35.2	64	

a) : 24時間間隔で投与

b) : 最終投与後、標本作製までの時間

c) : *p*-Dimethylaminoazobenzene

d) : Ethylmethanesulfonate

* : $p < 0.05$ (Aspin-Welchのt検定)** : $p < 0.01$ (Aspin-Welchのt検定)

表19 コメット試験結果(腸管:マウス)

試験用量 (mg/kg)	投与回数 ^{a)} / 処理時間 ^{b)}	動物番号	tail moment [平均±S.D.]	体重[平均±S.D.](g)	標本 番号	
陰性対照 (D.W.) 0	1回/3h	1001	1.0	35.5 32.8 [34.0 ± 2.5] 36.7 31.1	1	
		1002	0.7		38	
		1003	0.5		31	
		1004	2.2		8	
Amaranth 1		1101	1.7	36.9 35.0 [34.5 ± 2.0] 32.3 33.6	54	
		1102	3.3		19	
		1103	1.4		46	
		1104	1.4		45	
10		1201	4.6	34.0 33.2 [33.9 ± 1.2] 32.8 35.5	56	
		1202	1.3		16	
		1203	2.3		27	
		1204	1.2		24	
100		1301	2.1	36.8 35.6 [35.1 ± 1.7] 35.1 32.8	4	
		1302	0.7		21	
		1303	2.2		9	
		1304	0.5		12	
1000	1401	2.9	36.1 36.2 [35.1 ± 1.5] 32.9 35.1	28		
	1402	3.5		59		
	1403	1.5		26		
	1404	1.5		65		
2000	1501	2.9	36.4 32.2 [34.4 ± 1.7] 34.7 34.2	35		
	1502	4.2		5		
	1503	2.1		42		
	1504	1.3		49		
陽性対照 DAAB ^{c)} 10	1601	2.7	32.1 35.3 [33.8 ± 1.4] 33.4 34.3	11		
	1602	1.0		13		
	1603	3.1		36		
	1604	2.5		50		
陽性対照 EMS ^{d)} 300	1701	10.8	34.0 32.2 [34.0 ± 2.1] 32.7 36.9	14		
	1702	11.5		34		
	1703	8.9		15		
	1704	10.0		2		
陰性対照 (D.W.) 0	1回/24h	2001	0.4	36.2 35.4 [35.5 ± 1.5] 36.9 33.5	37	
		2002	0.8		44	
		2003	1.4		23	
		2004	0.5		58	
Amaranth 2000		2101	1.9	35.7 33.7 [35.2 ± 1.4] 36.8 34.4	10	
		2102	1.5		6	
		2103	0.7		29	
		2104	2.3		33	
DAAB ^{c)}		全例死亡				
10		3回/24h	2201	0.6	32.3 36.5 [35.9 ± 2.6] 38.5 36.1	3
			2202	3.8		17
			2203	1.9		25
			2204	1.1		51
100			2301	2.9	35.4 36.4 [35.2 ± 1.0] 34.0 34.9	61
			2302	1.1		20
			2303	1.7		48
	2304		4.4	41		
1000	2401		2.3	36.8 36.5 [36.0 ± 0.8] 35.5 35.2	30	
	2402		1.9		57	
	2403		0.7		47	
	2404		3.2		64	

a) : 24時間間隔で投与

b) : 最終投与後, 標本作製までの時間

c) : *p*-Dimethylaminoazobenzene

d) : Ethylmethanesulfonate

表20 コメット試験結果(胃:ラット)

試験用量 (mg/kg)	投与回数 ^{a)} / 処理時間 ^{b)}	動物番号	tail length [平均±S.D.] (μm)	体重[平均±S.D.](g)	標本 番号	
陰性対照 (D.W.) 0	1回 /3h	1001	21.9	[15.4 ± 6.0]	286	24
		1002	12.9		295	26
		1003	8.4		284	19
		1004	18.4		290	12
Amaranth 1		1101	20.3	[19.9 ± 4.5]	290	6
		1102	15.3		281	27
		1103	18.2		278	9
		1104	25.9		284	1
10		1201	23.8	[21.3 ± 4.9]	277	3
		1202	21.7		298	32
		1203	14.3		292	47
		1204	25.4		293	17
100		1301	20.2	[22.6 ± 9.2]	286	7
		1302	24.6		290	45
		1303	11.7		282	21
		1304	33.9		285	38
1000	1401	20.3	[17.5 ± 3.9]	295	29	
	1402	21.3		288	40	
	1403	13.6		281	23	
	1404	14.8		284	49	
2000	1501	28.5	[23.1 ± 5.6]	290	30	
	1502	16.8		296	4	
	1503	19.9		287	44	
	1504	27.0		277	8	
陽性対照 DMH ^{c)} 100	1601	34.3	[31.3 ± 6.6] **	281	33	
	1602	35.3		288	5	
	1603	34.3		278	41	
	1604	21.4		281	16	
陰性対照 (D.W.) 0	1回 /24h	2001	19.7	[18.9 ± 7.5]	289	22
		2002	17.7		285	18
		2003	9.9		293	28
		2004	28.2		299	46
Amaranth 2000		2101	21.4	[21.2 ± 3.6]	289	15
		2102	23.7		292	13
		2103	16.1		300	50
		2104	23.7		289	48
陽性対照 DMH ^{c)} 50		2201	14.5	[26.3 ± 9.7]	283	42
		2202	25.5		299	11
		2203	38.1		277	31
		2204	27.2		293	35

a): 24時間間隔で投与

b): 最終投与後、標本作製までの時間

c): 1,2-Dimethylhydrazine 2HCl

** : $p < 0.01$ (Aspin-Welchのt検定)

表21 コメット試験結果(腸管:ラット)

試験用量 (mg/kg)	投与回数 ^{a)} / 処理時間 ^{b)}	動物番号	tail length [平均±S.D.] (μm)	体重[平均±S.D.](g)	標本 番号
陰性対照 (D.W.) 0	1回/3h	1001	8.5	286 295 284 290 [289 ± 4.9]	24
		1002	5.8		26
		1003	10.4		19
		1004	6.9		12
Amaranth 1		1101	8.4	290 281 278 284 [283 ± 5.1]	6
		1102	19.2		27
		1103	12.7		9
		1104	6.8		1
10		1201	5.5	277 298 292 293 [290 ± 9.1]	3
		1202	14.4		32
		1203	7.2		47
		1204	11.1		17
100		1301	6.3	286 290 282 285 [286 ± 3.3]	7
		1302	9.0		45
		1303	5.0		21
		1304	4.5		38
1000	1401	14.2	295 288 281 284 [287 ± 6.1]	29	
	1402	14.7		40	
	1403	12.1		23	
	1404	6.4		49	
2000	1501	9.5	290 296 287 277 [288 ± 7.9]	30	
	1502	8.8		4	
	1503	8.3		44	
	1504	8.8		8	
陽性対照 DMH ^{c)} 100	1601	15.0	281 288 278 281 [282 ± 4.2]	33	
	1602	19.8		5	
	1603	11.7		41	
	1604	25.8		16	
陰性対照 (D.W.) 0	1回/24h	2001	7.4	289 285 293 299 [292 ± 6.0]	22
		2002	10.3		18
		2003	5.3		28
		2004	4.9		46
Amaranth 2000		2101	8.6	289 292 300 289 [293 ± 5.2]	15
		2102	11.4		13
		2103	4.6		50
		2104	3.2		48
陽性対照 DMH ^{c)} 50		2201	12.1	283 299 277 293 [288 ± 9.9]	42
		2202	13.6		11
		2203	7.9		31
		2204	19.4		35

a) : 24時間間隔で投与

b) : 最終投与後, 標本作製までの時間

c) : 1,2-Dimethylhydrazine 2HCl

* : $p < 0.05$ (Aspin-Welchのt検定)