

IV 安全性

1. 毒性

(1) 急性毒性

動物名	性別	投与	LD50(mg/kg 体重)	参考文献
マウス	—	経口	1, 500	Anonymous, 1965 ¹²⁾
ラット	—	経口	1, 500	Anonymous, 1965 ¹²⁾
〃	雄	経口	2, 730	Levinskas et al., 1966 ¹³⁾
〃	雌	経口	4, 670	Levinskas, et al., 1966 ¹³⁾
モルモット	—	経口	450	Struyk et al., 1958 ¹⁾
ウサギ	雄	経口	1, 420	Levinskas et al., 1966 ¹³⁾
イヌ	—	経口	1, 000	Anonymous, 1965 ¹²⁾

(2) 短期反復投与毒性試験

ラット

1日当り50～70mg/体重kg のナタマイシンを5～10週間、反復経口投与したが、ラットの発育、血液又は組織に影響はなかった。1日当り150mg/体重kg を9週間、反復経口投与したが、多少の発育抑制が見られ、1日の投与量が500mg/kg では30%のラットが2週間以内に死亡した¹⁾。

雌雄各20匹のラットの投与群に、0、125、500、2,000又は8,000ppm のナタマイシンを含有する食餌を94～96日間、給餌した。5匹の死亡はこの処理に無関係であった。2群の最高投与量設定では発育が遅れ、食餌の摂取量が減少した。血液検査の結果と器官の重量は正常範囲にあり、肉眼的或いは顕微鏡的病変をナタマイシン摂取に起因させることは出来なかった¹³⁾。

イヌ

雌雄各3匹のビーグル犬の投与群で、7週間の（段階的給餌法）試験により経口毒性が検査された。イヌは0（対照）、312、625、1,250及び5,000ppm の濃度で当該試験物質を与えられた。

試験中に全ての動物で調査した事項：

臨床的徴候、体重、食餌の摂取量

結果：

下痢、嘔吐及びほぼ完全な食餌拒否が5,000ppm の投与群で観察され、そのため、この投与群では4日後に投与を中止した。

1,250及び625ppmでは下痢が続き、この症状は7週間の試験期間中に重度と頻度が減少した。312ppm投与群では下痢の症状は観察されなかった。1,250ppmでは給与された食餌の約半量が拒否された。より低い投与レベル群での食餌拒否は無視できるものであった。これらの投与群は成犬であったので試験期間中の体重の変動は微少であった¹³⁾。

(3) 90日反復投与毒性試験

雌雄各2匹の若いビーグル犬の投与群で亜急性経口毒性試験を実施した。当該イヌは0(対照)、375及び750ppmの食餌用量でナタマイシンを投与した。当試験の全期間中の平均1日投与量はそれぞれ約12.5及び25mg/kgであった。

試験中の検査項目は次の通りである：

臨床的徴候	眼科学的検査
体重	主要器官の重量
食餌摂取量	肉眼的観察検査
血液検査	組織病理学的検査
尿検査	
心電図	

結果

下痢は全ての投与群で1日或いはそれ以上の日数で観察された。750ppm群の1匹のイヌは36日で嘔吐した。それ以外の異常は見られなかった。試験期間中の動物の死亡はなかった。750ppm群では軽微な体重の減少が見られた。平均食餌摂取量は750ppm群で幾分減少した。血液検査及び尿検査では投与による影響は見られなかった。心電図は異常性を示さなかった。眼科学的検査では影響の徴候は見られなかった。器官の重量も影響は見られなかった。剖検及び顕微鏡的検査も何ら変化は見られなかった。

検討と結論

対照群及び375ppm群よりも750ppm群に頻繁に見られた下痢を除けば、用量相関的な投与による関連毒性の徴候は見られなかった。これらのデータから90日間の被検物質の食餌投与の毒性の発現はなく、一過性の下痢は多分、局所的な腸の炎症である。このような局所的炎症によって、より高濃度の投与が妨げられる。局所的症状と全身性の毒性との間に違いがあるので、より高濃度の投与でさらに検査を行なうことは簡単には出来ない。全身性の毒性は750ppm(約25mg/kg/日)よりかなり高濃度で発生すると結論付けられる¹⁴⁾。

(4) 長期毒性試験(2年間)

ラット

Levinskas ら^{13),15)} はラットにおける2年間の長期毒性試験を実施した。8,000 ppm を給餌されたラットは3ヶ月経過後の平均体重が対照群に比べて、雄で54%、雌で67%であり、食餌の摂取量はそれぞれ23%及び17%少なかった。特に有害反応は見られなかった。2年間、1,000 ppm を反復投与されたラットでは総食餌摂取量の減少と軽度のおだやかな成長の遅れがあった。これと同レベルのナタマイシンを含む食餌を投与されたラットの連続した2世代では繁殖性或いは泌乳能力に影響はなかった。しかし、ナタマイシン投与ラットから生まれた子供は離乳時において対照群ラットからの子供よりも平均体重が低かった。500 ppm 以下の投与量では、ラットは2年以上の反復給餌に十分耐えた。ラットでの反復投与のいずれにおいても重篤な血液学的変化及び関連する全体的或いは顕微鏡的障害は観察されなかった。

イヌ

ナタマイシンは雌雄各3匹のビーグル犬に、0、125、250又は500 ppm の食餌レベルで2年間反復投与された。250 ppm 群の1匹を除く全ての群は2年間生存し、当該死亡は投与とは無関係であった。食餌摂取量は15ヶ月の飼育室移動までは何ら影響が見られなかったが、500 ppm の食餌を与えられた雄イヌは当初は対照群ほど急速に成長しなかった。15ヶ月後に過度の肥満を防止するために食餌供給量を1/6減少させたため、全てのイヌの体重が著しく減少した。イヌの或るものは十分な体重を維持することが不可能であった。血液学的検査及び臨床化学的試験の結果では異常性は見られなかった。器官重量の測定或いは病理的变化を見るための全体的及び顕微鏡的検査では大きな影響は検出されなかった¹³⁾。

(5) 繁殖性試験

ラット

- ① 2年間の長期毒性試験中で0又は1,000 ppm のナタマイシンを給餌されているラットを取り出して20組の雄雌を用意し、当該試験として181及び223日後(224及び266日令)に交配させた。さらに若いラットで30組をつくり同様に0又は1,000 ppm のナタマイシンを給餌して48、184及び260日間の給餌後(77、213及び289日令)に交配させ、この試験の二腹目の交配群から4匹の対照群の雌と4匹の被験用の雌を用意し、これらに両親と同一の食餌を与え107日令で交配させた。ナタマイシン投与群の子供は離乳時に対照群の子供よりも平均体重が低かったが、合計54交配組の調査結果では出生率、妊娠、泌乳及び生存性指数が対照群と同一或いは上回ることを示した。この試験の子供の中で異常性の発生は低く、異常性はナタマイシン投与の影響によるとは特定出来なかった¹⁶⁾。

- ② 10匹の雄と20匹の雌のラット群が1日当り、0（2つのグループ）、5、15、50又は100mg/kgのナタマイシンを含む食餌を11週間給餌された。これらのラットは3世代繁殖試験のF0世代を形成し、各世代で生まれた2腹の同腹仔で構成された。100mg/kgの投与群では、胎児の死産数が増加して生産数が減少し、21日目での生存数が減少した。子供の体重はF0及びF1世代の2腹目の同腹仔及びF2世代の1腹目、2腹目の同腹仔で減少した。しかし、出生率、妊娠、生存性及び泌乳指数は3世代の全ての1腹目、2腹目の同腹仔で正常な範囲であった。5、15、及び50mg/kgの投与用量は発育又は繁殖に検知可能な影響はなかった¹⁷⁾。
- ③ 3世代繁殖試験のF1世代が生んだ2腹目の同腹仔から取った10匹の雄のラット群に对照食餌を与え、性的に成長しきった時点で1日当り、0、5、15、50又は100mg/kgのナタマイシンを胃挿管法で7日間の反復投与を行った。各ラットは8連続週の各週に2匹の非ナタマイシン処理のヴァージン雌ラットと交配した。各雌ラットは交配後13日で屠殺し検査した。对照群と被験群の間には、着床場所、生存及び死亡胎児の数又は変異原性に関する差は検出されなかった¹⁶⁾。
- ④ 0、5、15、50又は100mg/kgのナタマイシンを含む食餌を与えたラットによる3世代繁殖試験で生まれた5群の中から雌雄各5匹を無作為に選別した。屠殺する3～4時間前に当該動物にコルヒチンを与え、骨標本を染色体異常の調査のために作成した。被験群の中期染色体標本の異常性の数は擬似物処理した对照群で発生した数と明らかに不利なことはなかった¹⁷⁾。

(6) 催奇形性試験

ラット

ナタマイシンの3世代試験を行ったF1世代の2腹目の同腹仔から20匹の雄の群をつくり、对照食餌で成熟するまで育て、未処理の雌と交配させた。当該雌は妊娠中の6～16日間、胃挿管法により、両親と同投与用量のナタマイシン（0、5、15、50又は100mg/kg/日）を投与した。当該ラットは妊娠20日目に屠殺し、検査した。对照群と被験群との間には、妊娠数、生存同腹仔数、着床場所、吸収場所、生存及び死亡胎児の数又は柔組織及び骨組織の異常性に関して差は見られなかった¹⁷⁾。

ウサギ

- ① 10～12匹の雌のウサギ群が妊娠中の6～18日間に胃挿管法により1日当たり、0、5、15、50mg/kgのナタマイシンを投与した。それらは29日目に検査し、黄体の数、着床場所、吸収場所及び胎児の生死を記録した。着床或いは母体又は胎児の生存におけるナタマイシンの悪影響は検出されなかった。柔組織又は骨組織に見ら

れる異常性の数は対照群に自然に発生する数と差はなかった¹⁸⁾。

- ② 別の実験では妊娠している成熟したダッチ・ベルテッド種の雌は妊娠中の6～18日間に、0、5、15、及び50 mg/kg の被験物質懸濁液を胃挿管法で投与した。29日目に屠殺し（帝王切開）、解剖により子宮内容物を検査した。検査内容は次の通りである。

雌の所見

着床数

胎児：死亡、生存又は吸収されたもの

平均体重；全ての生存胎児に関して

詳細な総合検査；全ての胎児に関して

柔組織の検査；全ての生存胎児に関して

骨組織の検査；全ての胎児に関して

結果：

雌親の一般的外観、行動及び体重はナタマイシン処理による影響はなかった。妊娠、着床、生存及び死亡胎児の数、吸収の数は処理群と対照群の間に統計的な差はなかった。15 mg/kg 群の生存胎児の平均体重は対照群より低かった。胎児に見られる骨格異常性は一般的に奇形よりも変異で余分な胸骨分節が15及び50 mg/kg の投与群で見られた。これは変異と考えられ、明確な催奇形性の徴候ではなかった。

柔組織検査は対照群と試験群の間で有意な差はなかった。従ってナタマイシン投与は無関係であった。

結論：

妊娠ウサギに対してナタマイシンの50 mg/kg までの量を13日間連続投与したが、着床、又は母体に対して又は胎児生存に明白に識別できる影響はなかった。試験群の柔組織又は骨組織のどちらかに見られた異常性の数は擬似物処理の対照群で自然に発生する数と差はなかった。それゆえ、ダッチ・ベルテッド・ウサギでの催奇形性反応に対する50 mg/kg/日の無毒性量が確立された¹⁹⁾。

(7) 発癌性試験

ラットにおける2年間の経口毒性試験¹⁵⁾

試験用バッチ（バッチ No.107; 化学分析純度 97.5%）の慢性経口毒性を若い（6週令）健康なアルビノラットでの2年間の給餌試験で調査した。当該ラットには0（対照）、125、250、500及び1,000 ppm の投与レベルで試験用バッチを与え

た。試験は、5つの群：40匹の雄と40匹の雌から成る対照及び最大投与群と35匹の雄と35匹の雌の他の群、で形成した。試験期間を通しての平均1日投与量はそれぞれ約18, 37, 74及び147mg/kgであった。

試験中の調査は次のものを含めた：

- 臨床的徴候、全てのラット
- 体重、全てのラット
- 食餌消費、全てのラット
- 血液学（3、6、12、21及び24ヶ月）、各群の性別毎に5匹
- 主要な器官の重量、
 - 1年後：対照及び1,000ppm群で性別毎に5匹
 - 2年後：全ての生残ラット
- 肉眼による検査、
 - 1年後：対照及び1,000ppm群で性別毎に5匹
 - 2年後：全ての生残ラット
- 顕微鏡による検査、
 - 1年後：対照及び1,000ppm群で性別毎に5匹
 - 2年後：各群の性別毎に10匹

結果：

通常の状態、及び取り扱いが、このような長期間維持された全ての群に発生する状態を除けば、群のどれかに不利に影響することはなかった。

生残は処理によって影響されなかった。2年後の生残ラットは全ての群で50%以上であった。

1,000ppmの試験用バッチを給餌された雌雄の平均体重は対照群に比べて約10%有意に減少した。

2年間にわたる平均1日摂取量は約21g/雄ラット及び16g/雌ラットであった。

1,000ppmを投与された雄は最初の1年間は対照群より約1g/日摂取量が少なかった。1,000ppmを投与された雌は2年間を通じて平均で約1g少なかった。

ヘモグロビン、ヘマトクリット及び総白血球数、各種白血球数に処理による影響は見られなかった。6ヶ月間500ppmを給餌された雌の平均ヘモグロビン・レベルの有意な増加があった。これは対照群の値と差があった唯一の例であり、試験用バッチの給餌とは無関係と判断された。器官重量は処理により影響されなかった。

125ppmを給餌された雌に平均腎臓重量の穏やかで有意な増加が見られたが、試験用バッチ給餌とは無関係と判断された。

解剖での肉眼検査及び顕微鏡検査は、対照ラットで検出された以上の腫瘍発生の増

加或いは他の病変発生の増加を見出さなかった。

結論：

2年間、ラットに0、125、250、500及び1,000ppmを投与した試験用バッチ処理は1,000ppm群での給餌総摂取量の減少とやや穏やかな成長の遅れになったと結論付けられた。500ppm或いはそれ以下の投与レベルは2年以上、ラットが十分に耐え、それで500ppm(約25mg/kg/日)は影響が見られないレベルと考えることが出来る。

(8) 変異原性試験

① イン・ヴィトロ

Khoudokormof^{20,21)}は、ナタマイシンとその分解物(即ち、アポナタマイシン、ジナタマイシノライドジオール、及び塩酸マイコサミン)及びDelvocid®(水にナタマイシンを50%懸濁した液)の変異原誘導性を *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, 及び *Escherichia coli* で評価する試験が実施した。*B. subtilis* はカダによる標準レック・アッセイ(スポット拡散テスト)に供された(引用文献は用意されていない)。*E. coli* 株 WP2uvrA⁻及び WP2 及び *S. typhimurium* 株 TA1535、TA1538、TA98 及び TA100 はスポットテストによりリヴァース・ミューテイションの評価がなされた。全てのテストはペトリ皿に適切に希釈したナタマイシンを含む50 μ lのスポットを設定し、適切な微生物菌株を使用して実施された。本スポットテストは3時間以内及び1,3,7又は14日間及び1,2又は4ヶ月の保存後に実施された(全てのテストが全ての間隔で実施されたかどうかは明白でない)。プレート・インコーポレーション・アッセイは *E. coli* 株 WP2trp⁻ 及び *S. typhimurium* 株 TA98 及び TA100 における1%までの濃度のDelvocid®の変異原性をS-9ミックスの有無及び0.2mol/Lまでの亜硝酸塩との組み合わせで評価した。亜硝酸塩をDelvocid®と共に使用したのは、他の試験で幾つかの食品添加物と組み合わせられた亜硝酸塩がDNAに影響を与える反応物質を形成することを示しているからである。これらのテストの計画は表1に示した。各スポットテストにおいてネガティブ・コントロールは溶媒又はバッファーのみに含まれ、ポジティブ・コントロールは既知の突然変異原(n-メチル-N-ニトロ-N-ニトロソグアニジン)又はpH3.5或いは4.5でのソルビン酸と亜硝酸塩との混合物に含まれた。プレート・インコーポレーション・アッセイに対してはベンチジンがポジティブ・コントロールとして使用された。

結果の評価：統計的な分析はなされていないが、3種のテスト・システムの全てのスポットテストで陽性反応は観察されなかった。個々のプレートの結果と概要のデータはスポットテストについては報告されなかった。プレート・インコーポレシ

ン・アッセイにおける Delvocid® の単独テストでは、Salmonella 菌株及び E.coli 菌株に陽性反応は検出されなかった。亜硝酸塩を約 0.2mol/L の濃度で加えたテストでは軽微な陽性反応が見られたが、Delvocid® の存在によって増加されたものではない。

表1 Khoudokormoff によって報告された研究の実験計画

Material	Concentrations tested (%)	Bacterial system	Metabolic activation	Nitrite concentration
<i>Spot test^a</i>				
Natamycin ^b	0.1–1 ^c	<i>S. typhimurium</i> , <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> ^d	No ^e	≤ 400 mg/kg
Aponatamycin	0.5	<i>S. typhimurium</i> , <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> ^d	No ^e	≤ 400 mg/kg
Pimaricinolidediol	0.5	<i>S. typhimurium</i> , <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> ^d	No ^e	≤ 400 mg/kg
Mycosamine hydrochloride	0.5	<i>S. typhimurium</i> , <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> ^d	No ^e	≤ 400 mg/kg
Delvocid ^{b,f} hydrochloride	2	<i>S. typhimurium</i> , <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> ^d	No ^e	≤ 400 mg/kg
<i>Plate incorporation assay on top agar</i>				
Delvocid	0.04–1	<i>E. coli</i> , <i>S. typhimurium</i> ^g	No	None
	0.04–1	<i>E. coli</i> , <i>S. typhimurium</i> ^g	No	0.01–0.2 mol/L
	0.4	<i>E. coli</i> , <i>S. typhimurium</i> ^g	Yes	0.01–0.5 mol/L
	0.04–1	<i>E. coli</i> , <i>S. typhimurium</i> ^g	Yes	0.01–0.5 mol/L
		<i>E. coli</i> , <i>S. typhimurium</i> ^g		0.5 mol/L

a Carried out within 3h of exposure and after storage for 1, 3, 7, or 14 days and 1, 2, or 4 months

b Tested at pH2.5–6.5

c Only range provided

d *E. coli* strains WP2trp[–] and WP2uvrA[–] and *S. typhimurium* strains TA1535, TA1538, TA98, and TA100

- e Reported that a metabolic activation system was added 'if desired'; no further details were provided
- f Also tested in the presence of a cheese coating(WL30) at pH4.3
- g *E.coli* strains WP2 and WP2uvrA⁻ and *S.typhimurium* strains TA98 and TA100

② 3世代繁殖試験のF1世代が生んだ2腹目の同腹仔から取った10匹の雄のラット群に对照食餌を与え、性的に成長しきった時点で1日当り、0、5、15、50又は100mg/kgのナタマイシンを胃挿管法で7日間の反復投与を行った。各ラットは8連続週の各週に2匹の非ナタマイシン処理のヴァージン雌ラットと交配した。各雌ラットは交配後13日で屠殺し検査した。对照群と被験群の間には、着床場所、生存及び死亡胎児の数又は変異原性指数の関連で差は検出されなかった¹⁶⁾。

0、5、15、50又は100mg/kgのナタマイシンを含む食餌を与えたラットによる3世代調査で生まれた5群の中から雌雄各5匹を無作為に選別した。屠殺する3〜4時間前に当該動物にコルヒチンを与え、骨標本を染色体異常の調査のために作成した。被験群の中期染色体標本の異常性の数は擬似物処理した对照群で発生した数と明らかに不利なことはなかった¹⁷⁾。

(9) 微生物の耐性

ナタマイシンは広範囲の微生物、即ち皮膚糸状菌及び他の真菌、酵母及び酵母様微生物(人、動物及び植物に対して病原性のある株及び腐食性菌類を含む)に対して活性がある。標準試験ではナタマイシンは細菌又は放線菌には不活性である。マイコトキシン産生菌種が常にナタマイシンに耐性があるという証拠はない²²⁾。

酵母又は酵母様微生物はナタマイシンに対して本来の耐性を示すとは報告されていないが、皮膚糸状菌の或るものはナタマイシンの活性に耐性がある。

細菌及び抗生物質と比較して、酵母にナタマイシン耐性を誘発させることは困難であり²³⁾、獲得された耐性は基本的に本来の耐性株を選択することであって、適応によるものではないという幾つかの証拠がある。耐性培養物は病原性が減少していた²⁴⁾。その臨床上の使用において耐性が発生したという記録はない。

他の抗菌物質に対する交差耐性は調査されていない。アンホテリシンBはナイスタチン、フィリピン、エンドマイシン及びキャンディディンには交差耐性を示すが、ナタマイシンには示さなかった^{25),26)}。ナイスタチン及びアンホテリシンB耐性微生物はナタマイシンに影響を受け²⁷⁾、広く選択したナイスタチン耐性酵母もナタマイシンに対して通常の反応を示した²⁸⁾。さらに新しいin vitro試験では、ナタマイシン及びナイスタチン及びアンホテリシン間の交差耐性が発生するかも知れないことが確認されている²⁴⁾。

(10) 分解物の試験

試験結果から、ナタマイシンの分解物が擬似胃液、0.5% クエン酸及び尿中で発生することが結論付けられたが、貯蔵中のりんごに存在する物質は胃液中で作られる物質と類似している。当該分解物はナタマイシンに関連するテトラエンであり、主としてアグリコン二量体及び／又は脱炭酸化合物である^{6),7)} (関連する化学構造の概観についての別紙6 参照)。約50%のナタマイシンが擬似胃液中で1時間で分解し、胃からの減量は断食させたラット及び非断食ラットでそれぞれ33~43% 及び0~31%で発生した²⁹⁾。

エイムス・テスト

種々の物質がエイムス・テストで突然変異原性を検査された。使用したのは2種のヒスチジン要求性 *Salmonella typhimurium* 変異株: TA98、TA100 及び *Escherichia coli* WP2uvrA 及び その変異株 uvrA⁻ の2種のトリプトファン要求株である。

試験は S-9mix の有無で行なった。陽性及び陰性対照群を同時進行で試験した。

被験物質は0.04から1%濃度の Delvacid®、0.1から1.0%濃度のナタマイシン、アポナタマイシン、ジナタマイシノライドジオール及び塩酸マイコサミン(それぞれ0.5%)で試験を行った。種々の濃度の亜硝酸塩が Delvacid® 懸濁液に添加され、当該混合物は暗所にて18℃で異なる時間で保管した後に試験を行った。

Salmonella typhimurium 株 TA98、TA100、WT2trp-及び WP2trp-uvrA-を使用し、この試験で設定された条件下で S-9mix の有り、無しの両方で当該毒性試験物質を試験した結果では当該物或いはその分解物の突然変異原性は示されない²¹⁾。

カダの微生物試験

ナタマイシン 1%、アポナタマイシン、ジナタマイシノライドジオール及び塩酸マイコサミン(各 0.5%)、Delvacid®(水にナタマイシンを50%懸濁した液)及び Delvacid® 2%をオランダで通常使用されるチーズ用被覆剤、(WL30) に添加したものを、スポット・テスト(レック・アッセイ カダ)で試験した。Delvacid®及びナタマイシンは食品中で一般に遭遇する pH 範囲に当てはまるように、2.5から6.5の pH 範囲のリン酸塩-クエン酸塩バッファー中で試験した。

この試験で、野生株 (*B. subtilis* H17) と、H17に由来する変異株 M45の培養物で DNA 修復システムが欠けているものとの、発育における当該被験物質溶液の影響を比較した。2種の試験微生物は分岐線のようにV字形を形成して接種した。当該被験物質溶液 50 µl を含むペーパーディスクを線の分岐点に置いた。ペトリ皿は(6℃)に維持されて溶液の分散を可能にし、さらに37℃で24時間培養した。もし線状の培養物が阻害されないか、両方の線の培養物が同じ範囲で阻害されなければ、判定は陰性である。もし変異培養物が大きく阻害されれば当該被験物質が DNA

に働いて阻害したと考えるても良い。試験は直ちに実行され（即ち、3時間以内で）、同様に18℃で1、3、7、14日間及び1、2、4ヶ月間行われた。全ての懸濁液はペトリ皿当たり50 μ lとして試験した。被覆剤のWL30と混合した Delvocide® が切断され、ペーパーディスクの代りに試験された。

最終的に、亜硝酸塩の痕跡が食品保存料の作用に影響するかもしれないし、少なくともソルビン酸の場合ではDNAに影響する反応物質を生成するというソルビン酸での知見を考慮して、全ての試験は亜硝酸塩の添加の有無で実行した。400 ppmまでの亜硝酸塩の添加は微生物試験の結果に影響しなかった。

結果と結論：

全てのスポット・テスト（ペーパーディスクを使用した方法）は陰性であった。ナタマイシン（0.1から1%）及びその分解物であるアポナタマイシン、ジナタマイシノライドジオール及び塩酸マイコサミン（各0.5%）は、Delvocide®（ナタマイシン50%懸濁液）及びチーズ被覆剤との2%混合物（pH4.3）と同様に突然変異原性を示さなかった。各々のスポットテストには陰性及び陽性対照群が組み込まれた。陰性対照群には使用する溶媒又はバッファー（Delvocide®及びWL30の場合には被覆剤溶液単体）が常に含まれ、陽性対照群には既知の突然変異原（n-メチル-N-ニトロ-N-ニトロソグアニジン）及びソルビン酸とpH3.4又は4.5の亜硝酸塩との混合物が含まれた^{20),21)}。