

表7 ナイシン含有および非含有（対照）チーズ投与群における平均体重増加量

チーズ含量	対照チーズ			ナイシン含有チーズ		
	20%	30%	40%	20%	30%	40%
ナイシン含量	0	0	0	2.00× 10 ⁴ U/g	3.01× 10 ⁴ U/g	4.01× 10 ⁴ U/g
試験前体重	76±2.4	75±2.8	83±2.4	77±2.6	67±2.8	58*±1.9
3週間後	47±5.6	78±2.5	100±2.9	47±8.7	79±4.6	95±5.1
7週間後	124±5.6	164±6.7	176±6.8	147±11.1	177±6.2	174±6.1
11週間後	180±9.7	199±8.1	207±6.8	203±13.4	216±5.6	209±9.0

平均体重、体重増加量および標準誤差はgで示す。

*対照と比較して有意な差を認める (P<0.05)

② 12週間ラット混餌投与試験（ナイシン製剤）

方法：ラット（雌雄各5匹）に12週間、飼料中濃度10,000 RU*/gのナイシン製剤（生物学的力価、10⁶ RU/g）を混餌投与した（3）。これはナイシン15×10⁴ RU/kg体重/日に相当する（平均体重は雌雄それぞれ200g、250gだったことから、摂餌量を15g/日として算出した）。対照群（雌3匹、雄2匹）には、ナイシンを添加していない食餌を与え、毎週、体重を記録した。投与群の雄を、投与群と対照群の雌と交配させ、対照群の雄も同様に交配させ、第1世代の生殖能力を検討した。全動物に剖検を実施した。

結果：対照群と投与群の体重増加に差は認められなかった。投与群には何ら異常は認められなかった。投与群と対照群の雄の生殖率は同等（100%）で、投与群と対照群の雌も同程度であった（それぞれ90%と85%）。また、すべての出生児は正常であった。

③ ラットにおける90日間試験（ナイシン製剤）

方法：各群5匹の雄性Wister系ラットに0.5～5,000 U/kg体重/日のナイシン製剤（生物学的力価、10⁶ U/g）を強制経口投与した（4）。体重と血液検査項目をモニターした。投与期間終了時、動物を剖検し、主要臓器の病理組織学的検査を実施した。

結果：ナイシン投与群において、一般状態、体重増加、血液学的検査、臓器重量、主要臓器の病理組織学的検査において投与に起因した変化は認められなかった。

④ ラットにおける10週間/25週間試験（ナイシン加水分解物）

方法：ナイシン加水分解物（ナイシン製剤を1.0N塩酸で加水分解し、脱水して活性炭処理後に再結晶したもの）を、Birmingham-Wistar系ラット雄10匹のグループに10週間、混餌投与した（1）。これらの動物は個別ケージで飼育された（実験I）。10週間後の体重および臓器重量、10週間の総摂餌量を測定した。次に、25週間、投与群にナイシン加

* RU：英国のNational Dairy Instituteは、レディング大学（University of Reading）に設置され、レディング大学が最初の研究を行っていたため、“Reading Unit”が初期の発表で使用されていた。40 RUは1μg/gに相当する。

水分解物を混餌投与した（実験Ⅱ）。これらの動物は5匹ごとケージに入れられた。同量のナイシン含有（ナイシン 3.33×10^6 U/kg 飼料）の飼料を投与した。両実験とも、毎週、体重を記録し、剖検時には臓器重量を記録した。25週間試験では、臓器も肉眼的／病理組織学的に評価された（図1）。なお、図1中の②および③で示されている（a）および（b）の（a）群は、当初対照群に対して体重増加抑制がみられた時にイーストを補給することにより体重増加抑制のない群として設定されたが、体重増加に有意差は認められずイーストは投与されなかった群であり、実質的には（b）群と条件は同一である。

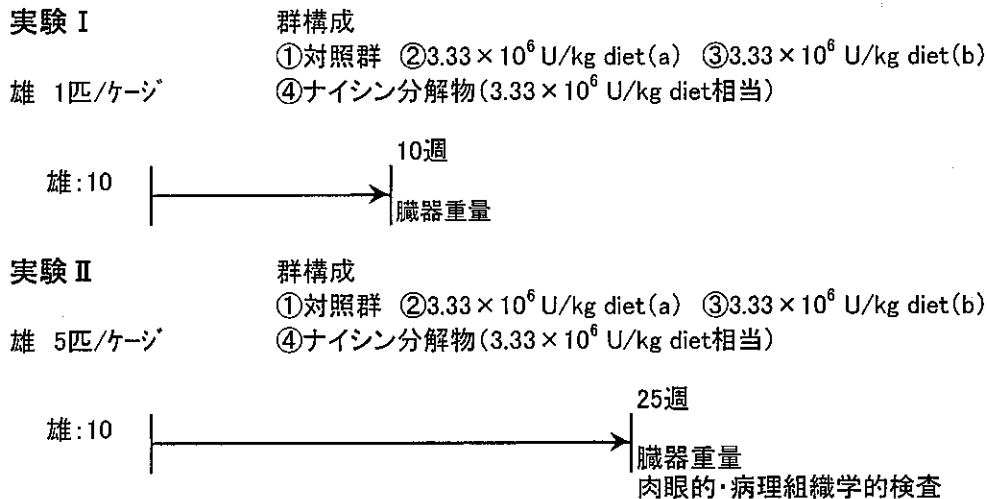


図1 試験スケジュール

投与量設定の理由：パンを除くすべての食品中の含量を 20 U/g とすれば、体重 70 kg のヒトが一日 500 g 乾燥重量の食品を摂取した場合、一日のナイシン摂取量は 10,000 U となり、約 $10,000/70 = 140$ U/kg 体重に相当する。この 140 U/kg の摂取量を、ヒトの標準一日食品摂取量と呼び、以下 D と略す (1)。

ラットにこの用量を一日に投与するために飼料中に必要とされるナイシン濃度を算出するうえで、ラットの平均体重を 250 g とし、実験全体を通じて一日 15 g の飼料を摂取すると仮定した。

140 U/kg 体重 = 35 U/体重 250 g のラット

35 U ナイシン / 15 g 飼料 = 2.33×10^3 U/kg 飼料

以上より、 2.33×10^3 U/kg のナイシン含有飼料で、ラットに一日あたり投与されるナイシン量は、140 U/kg 体重であり、D と同等の投与量となる。 3.33×10^4 U/kg 含有飼料がラットに投与される量は、ほぼ $14 \times D$ 相等であり、 3.33×10^6 U/kg 含有飼料がラットに投与される量は、ほぼ $1400 \times D$ 相等であるとみなした。

結果：両試験期間とも、ナイシン加水分解物を混餌投与した動物において体重増加に影響はなかった（表 8）。複数でケージに入れられた動物では脾臓重量に有意差はみられなかったが（表 9）、個別にケージに入れられた動物では脾臓重量の増加がみられた。評価されたその他の検査項目は全て投与による影響がみられなかったため、脾臓重量増加はおそらく個別にケージに入れられたストレスに関連があると筆者は結論付けた。

表 8 平均体重増加量および平均摂餌量 (1 匹/ケージ)

	試験前の体重 (g)	10 週後の体重 増加量 (g)	10 週間の 総摂餌量 (g)
対照の食餌	68	218	1,390
D の 1,400 倍のナイシン (a) #	71	213	1,357
D の 1,400 倍のナイシン (b) #	69	218	1,396
D の 1,400 倍のナイシン加水分解	70	213	1,355

D : ヒト標準的 1 日摂取量 (140 U/kg)

(a) 群は、当初対照群に対して体重増加抑制がみられた時にイーストを補給することにより体重増加抑制のない群として設定されたが、体重増加に有意差は認められずイーストは投与されなかった群であり、実質的には (b) 群と条件は同一である

表 9 相対臓器重量 (5 匹/ケージ)

投与群	対照	D の 1,400 倍 (a) # + (b)	D の 1,400 倍 加水分解物
心臓	257 ± 5	265 ± 4	271 ± 6
肝臓	2,998 ± 99	2,983 ± 73	2,847 ± 79
脾臓	263 ± 5	258 ± 4	225 ± 13
胃	519 ± 3	508 ± 4	505 ± 13
小腸	2,582 ± 93	2,770 ± 102	2,713 ± 102
盲腸	325 ± 9	373 ± 5	344 ± 9
副腎	11 ± 0.5	13 ± 1.6	13 ± 1.6
腎臓	571 ± 34	574 ± 17	595 ± 14
精巣	687 ± 43	728 ± 20	735 ± 38

臓器重量は、湿組織 (mg) / 生存ラット体重 100 g

D : ヒト標準的 1 日摂取量 (140 U/kg)

(a) 群は、当初対照群に対して体重増加抑制がみられた時にイーストを補給することにより体重増加抑制のない群として設定されたが、体重増加に有意差は認められずイーストは投与されなかった群であり、実質的には (b) 群と条件は同一である

⑤ マウスにおける 2 ヶ月間試験 (ナイシン製剤)

方法: クロス・ブレッド白色マウス (体重 8-10 g) の雌雄各 25 匹からなる群に、0、0.4、4.0、400 mg/kg 体重/日のナイシン製剤 (生物学的力価、 10^6 IU/g) を強制経口投与した (10)。この投与量は、ヒトの食品中濃度では約 0.002、0.02、2.0% に相当する。これとは別に、試験開始時の体重が約 2 倍のマウス (15-20 g) に、同用量のナイシンをほぼ同じ期間投与した。

一般状態、一般行動、生存率、摂餌量、体重増加を毎日観察した。2 ヶ月投与後、空腹による身体的ストレスと四塩化炭素による毒性に対する影響について検討した。

結果: 投与開始 15、30、60 日後の体重では、雌の全投与群で対照群との解離は小さかったが、雄の投与群で試験開始時の体重が軽かった 3 群 (0.4、4.0、400 mg/kg 体重/日) で、体重増加が著しく (significantly) 上昇した。生存率および摂餌量には全ての群で差はみられなかった。

2ヶ月投与後に実施した50%の食餌制限では、ナイシン高用量群で、対照群の43%に対して70%と高い死亡率を示し、体重減少においても、対照群の20%に対して25.0%と高値を示した(表10)。また、四塩化炭素の毒性に対しては用量依存的な死亡率の上昇を示し、対照群22.3%に対して、ナイシン投与群では0.4; 4.0、400 mg/kg/日群でそれぞれ、46.7、56.4、70.0%となった。

表10 ナイシン投与マウスの体重及び生存に対する食餌制限の影響

被験物質	1日摂取量 (mg/kg)	1群当たりの マウス数*	食餌制限5日後の 死亡率 (%)	体重減少 (%)	絶食動物の 生存日数 (日)
50%食餌制限 (2ヶ月投与後)					
なし (対照)	—	28	43	20	3.37
ナイシン	400	46	70	25	3.7
90%食餌制限 (3ヶ月投与後)					
なし (対照)	—	16	56.3	41.2	4.6
ナイシン	4	13	84.6	34.7	4.1

*雌雄合わせた数

食餌制限前の体重が23.5~33.3gのマウスを使用した。

⑥ マウスにおける3ヶ月間試験 (ナイシン製剤)

方法：雌雄各50匹からなるクロス・ブリード白色マウスに4.0 mg/kg 体重/日のナイシン製剤(生物学的力価、 10^6 IU/g)を強制経口投与した(10)。一般状態、一般行動、生存率、摂餌量、体重増加を毎日観察した。3ヶ月投与後、空腹による身体的ストレスに対する影響について検討した。

結果：投与後2.5ヶ月の生存率では、対照群に対し、ナイシン投与群は雌雄ともに低値を示した(表11)。投与後3ヶ月の体重増加は、雄は対照群よりも高値を示し、雌では低値を示した(表12)。摂餌量では、雄は体重増加と同様投与群で高値を示したが、雌では体重とは逆に高値を示した。摂水量は雄で高値を示し、雌では同程度であった。

3ヶ月投与後90%食餌制限の後では、死亡率では対照群56.3%に対し、ナイシン投与群では84.6%と高値を示し、体重減少では対照群41.2%に対して、34.7%と低値を示した(表10)。

表11 ナイシン投与マウスにおける2.5ヶ月時点の生存率*

被験物質	1日摂取量 (mg/kg)	生存率	
		雄	雌
なし (対照)	—	60	62
ナイシン	4	12	32

*8~10gの雄または雌マウス50匹で開始した。

表12 ナイシン3ヶ月投与マウスにおける体重増加及び1日摂取量（餌・水）の平均値

被験物質	1日摂取量 (mg/kg)	体重増加 (開始時点の体重の%)		摂餌量 (g/日)		摂水量 (ml/日)	
		雄	雌	雄	雌	雄	雌
なし (対照)	—	199	167	2.33	2.81	3.67	4.14
ナイシン	4	227	143	3.36	4.31	5.92	4.34

雌雄各50匹（開始時点の体重8～10g）を使用した。
試験期間中、摂餌量と摂水量は毎日記録した。

- ⑦ 非げっ歯類を用いた亜慢性毒性試験
実施せず。

4) 慢性毒性試験

① ラットにおける18ヶ月間試験（ナイシン製剤）

方法：雌雄各10匹からなるWistar系ラットに2.0 mg/kg 体重/日のナイシン製剤（生物学的力価、 10^6 IU/g）を通常の飼料を与える前にペースト状にして混餌投与した（10）。摂餌量、摂水量、体重増加、ストレス要因の影響を記録し、血液形態学的評価を行った。

結果：平均摂餌量では、対照群において雌雄それぞれ9.6および17.2 g/日、ナイシン投与群では9.2および16.8 g/日であり、同程度であった（表13）。摂水量では、対照群では雌雄それぞれ26.4および37.8 ml、ナイシン投与群では32.6および39.5 ml/日となり、雌の投与群で高値を示した。血液pH（blood alkalinity）、C反応性蛋白、血液形態学的評価では、対照群と同程度であった。

表13 ナイシン18ヶ月投与ラットにおける1日摂取量（餌・水）の平均値

被験物質	1日摂取量 (mg/kg)	摂餌量 (g/日)		摂水量 (ml/日)	
		雄	雌	雄	雌
なし (対照)	—	17.2	9.6	37.8	26.4
ナイシン	2	16.8	9.2	39.5	32.6

摂餌量（餌・水）は10匹のラットを用いて測定した。

② ラットにおける2年間反復投与毒性試験／繁殖試験（ナイシン製剤）

方法：Birmingham-Wistar系ラット雌30匹、雄15匹の3群に、基礎飼料またはナイシン製剤（生物学的力価、 10^6 U/g）を 3.33×10^4 、 3.33×10^6 U/kg 含有飼料を最長約2年間投与した（1）。これらの飼料中濃度は、著者らの仮定（既述、p.46）よりそれぞれ約 $14 \times D$ および $1400 \times D$ 相等であることから、 0.0196×10^5 、 $1.96 \times 10^{5*}$ units/kg 体重に相当する。F0世代の給餌開始16週間後、同一群の雌雄を交配させ、生殖能力を評価した。各投与群の出生児（F1世代）の雌30匹と雄10匹に親と同じ食餌を与えた。これらのF1世代の動物

*要請者注；FDAは、ナイシンの生物学的力価を 40×10^6 U/gとして、 1.96×10^5 U/kg 体重を4.9 mg/kg 体重相当としている（p.5）。

が 35 週齢になった時点で、雌雄各 5 匹について血液学的検査（総赤血球、リンパ球、単球、顆粒球、ヘモグロビン含有量）を実施した。37 週齢および 38 週齢では、それぞれ腎臓と消化管の機能検査を実施した。生存動物については肝機能も検査した。F1 世代各群の雌 10 匹については臓器重量（心臓、脾臓、肝臓、腎臓、胃、小腸、盲腸、副腎、卵巣、子宮）を記録し、各群の雄 10 匹については精巣の重量を測定した。約 40 週齢で、F1 世代を剖検し、各群 10 匹の臓器について病理組織学的検査を実施した。F0 世代については、死亡日を記録し、可能な限り剖検を実施した。2 年後、生存していた動物は殺処分し、剖検を行った（図 2）。

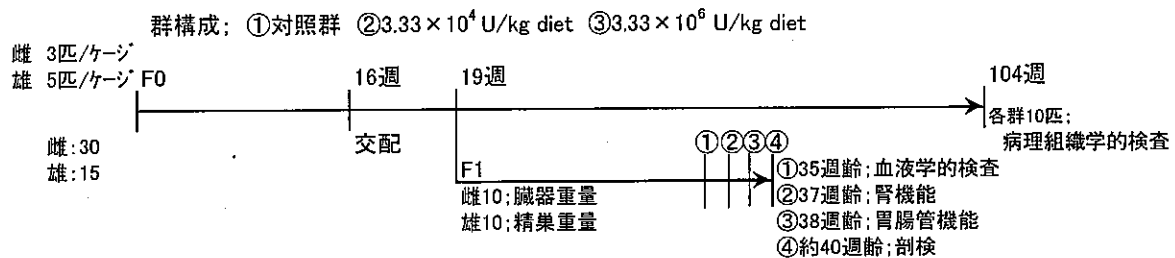


図 2 試験スケジュール

結果：F0 世代の対照群と投与群において、生存率および生殖能力に差はみられなかった（表 14、15）。F1 世代の血液学的検査、肝臓、腎臓、消化管の機能検査は正常であった。体重増加においては、F0 世代および F1 世代とも、雄の投与群において有意な減少がみられ、有意ではないが雌の F1 世代の最高用量群においても対照群に比べて低値を示した（表 16）。これらは、摂餌量のわずかな低下に起因すると考えられる。なお、雌雄両世代とも、臓器重量、肉眼的および病理組織学的所見は正常であった。

表 14 F1 世代の生存率

	対照	D の 14 倍	D の 1,400 倍
12 ヶ月後における死亡率	6	14	3
18 ヶ月後における死亡率	28	41	13
24 ヶ月後における死亡率	86	64	84

試験群と対照群の結果について統計学的有意差は認められなかった。

D：ヒト標準的 1 日摂取量（140 U/kg）

表 15 生殖行動

	対照	D の 14 倍	D の 1,400 倍
雄の受胎率	100%	100%	100%
雌の受胎率	93%	80%	80%
同腹の出生児数	11.1±0.57	11.9±0.69	11.1±0.49
生存児割合（21 日目）	95	89	99

試験群と対照群で統計学的有意差は認められなかった。

D：ヒト標準的 1 日摂取量（140 U/kg）

表 16 平均体重

週	平均体重 (g) 平均±標準誤差		
	対照	D の 14 倍	D の 1,400 倍
F0 世代 雌			
5	61±1.5	66±1.8	69±1.7
8	135±1.9	137±2.6	140±2.3
12	182±2.4	179±3.7	181±3.0
16	208±2.1	204±4.8	206±3.1
F1 世代 雌			
8	136±2.9	132±2.7	128±2.8
12	179±4.1	176±3.8	170±4.0
15	192±3.6	193±3.5	181±3.9
F0 世代 雄			
5	66±2.1	63±3.8	65±3.2
8	158±5.4	142±4.4*	156±4.6
12	226±5.4	215±5.0	216±4.5
15	274±12.6	242±6.4*	243±7.0*
F1 世代 雄			
8	168±4.6	166±7.7	154±4.5
12	268±11.2	229±14.5	214±12.0**
15	289±13.8	244±14.0*	236±15.3*

*対照と比較して有意な差を認める (P<0.05)

**対照と比較して有意な差を認める (P<0.01)

D: ヒト標準的 1 日摂取量 (140 U/kg)

F0 世代の 2 年間投与の結果から、JECFA において無毒性量 (NOAEL) を最高用量の 3.33×10^6 U/kg 飼料投与群とした。

- ③ 非げっ歯類を用いた慢性毒性試験
実施せず。

5) 繁殖試験 (ナイシン製剤)

方法: 試験方法は、米国食品医薬品局 (FDA) のガイドラインを遵守した (11)。3 世代 (F0、F1B、F2B) の CrL: CD BR 系ラットにナイシン製剤 (生物学的力価、 10^6 IU/g) を混餌投与した。26 週間、ナイシン製剤 0、0.2、1.0、5.0% を含有する基礎飼料、および比較対照群として塩化ナトリウム 3.8% (ナイシン最高用量 5.0% にナイシン中の塩化ナトリウム含量 76% をかけた値) 含有飼料を与えた。F0 世代は、雄 12 匹、雌 24 匹を用いて 60 日間以上、各飼料を投与した後に交配させ、産まれた同腹児 (F1A) を出産後 21 日まで育て、その後、殺処分し、剖検して肉眼的検査を行った。短期間の休養期間の後 (F1A 同腹児の離乳 10 日後)、F0 動物を 20 日間、再交配させた。出産後 21 日まで出生児を再度飼育した後、第 2 世代 (F2B) を出産させるために各群から雄 12 匹、雌 24 匹を選択した。すべての F0 世代と残りの F1B 児を殺処分し、肉眼的検査を行った。F1B 世代には 90 日間以上、各飼料を与えた。その後、20 日間にわたり交配させ (雄 1 匹に対して雌 2 匹、両親が同じ動物が対にならないようにした)、産まれた同腹児 (F2A) を出産後 21 日目まで飼育後、殺処分し、肉眼的検査を実施した。F1B 母動物を休養させた後 (F2A 同腹児

の離乳 10 日後)、再交配させた。これ以前の世代について概説したように、次に F2B 同腹児を育て、第 3 世代の出産を計画した。唯一の違いは、出産の 21 日後に F3B 世代の各群から雌雄各 10 匹を選択し、臓器重量を含む詳細な肉眼的検査を実施し、対照群および高用量群については病理組織学的検査を行った。すべての F2B の親と残りの F3B 児は殺処分し、肉眼的検査を実施した。

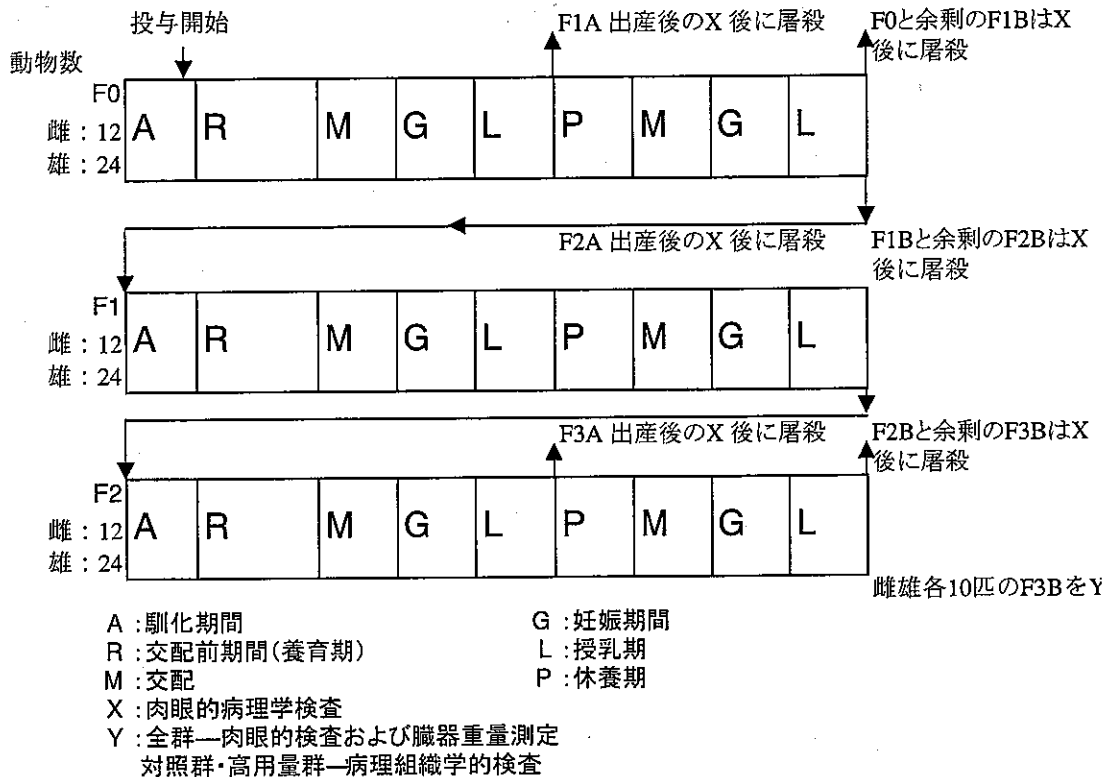


図 3 試験スケジュール

結果：親動物—最高用量の F0 および F1B において、投与に関連した変化として尿量の増加がみられたが、これは同等量の塩化ナトリウム (3.8 %) を投与した群でも同様であった。また、全ての最高用量群で、同等量の塩化ナトリウム (3.8 %) を投与した比較対照群群と同程度またはそれ以上の摂水量の増加がみられた。中用量群の F0、F1B、F2B でもわずかな上昇が観察された。摂餌量では、雄の F0 で投与開始 2 週間、F2B の投与開始 5 週間で、投与群でごくわずかに摂餌量が低下したが、一定した用量相関性はみられなかった。体重増加では、F0 で雄高用量群で体重増加抑制が観察されたが、その他の投与群では対照群と同程度であった。比較対照群で投与開始 10 週以降、中用量群で投与開始 16 週以降、わずかな体重増加抑制が観察された。しかし群間の差はごくわずかで、投与による有害作用はみられなかった。食餌効率、交配行動、妊娠率、妊娠期間、肉眼的病理検査においては、投与に起因した変化はみられなかった。

出生児—出産後損失 (litter loss post partum)、同腹児数 (litter size)、死亡率、剖検所見に投与に起因した変化はみられなかった。同腹児重量および児体重においては、F0 および F1B では統計学的に有意な差はみられなかった。F2B では投与群と比較対照群の同腹児

重量が、対照群に比べ全ての投与群でいくつかの時点において有意に増加した(表17)。
 児体重では中、高用量群の4日齢で低下がみられ、高用量群の21日齢では対照群に対し
 有意に低値を示した。これは比較対照群に対しては有意な差ではなかった。
 試験終了時の臓器重量および病理組織学的検査においては、投与に起因した変化はみられ
 なかった。

表17 F2B世代の第1回交配の出生児データ

群	動物数		0日齢		4日齢		8日齢		12日齢		21日齢		
	交配	妊娠	同腹児 体重(g)	平均児 体重(g)	同腹児 体重(g)	平均児 体重(g)	同腹児 体重(g)	平均児 体重(g)	同腹児 体重(g)	平均児 体重(g)	同腹児 体重(g)	平均児 体重(g)	
対照	—	24	A=B=23	68.2	6.1	109.1	10.3	175.2	16.9	256.1	24.9	479.7	46.8
ナイシン	0.2	23	A=B=18	73.4	6.5 ⁽⁺⁾	115.4	10.3	187.4	17.0	275.8	25.1	515.6	47.6
	1.0	24	A=B=23	83.9 ^{***}	6.4 ^a	127.2 [*]	9.8	206.1 ^(**)	16.0 [*]	303.7 ^(***)	23.9	572.7 ^{**}	45.6
	5.0	24	A=24 B=23	— 81.6 ^{**}	— 6.2	— 126.6 [*]	— 10.1	— 194.7	— 15.8	— 285.0	— 23.2	— 484.5	— 39.7 ^{**}
NaCl	3.8	24	A=B=24	78.5	6.4	124.2 [*]	10.4	193.8	16.5	278.2	23.8	488.0	43.0
Kruskal-Wallis(H検定)			B	p < 0.01	NS	p < 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	p < 0.01	p < 0.001
			A	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

対照群に対する各群の統計学的有意差:Kruskal-Wallis
 p < 0.05+
 p < 0.01++

^a 1同腹児で出産後2日のものを含む NS:有意差なし
 () = Kruskal-Wallis(H検定)を実施せず

* : 報告書中の表では6.1と記載されていたが、明らかに誤記であったため、報告書個別表から要請者で算出した値を記入

6) 発がん性試験

実施せず。なお、ラットを用いた2年間反復投与試験において、病理組織学的所見において異常は認められなかった。

7) 変異原性試験(精製ナイシン)

① 微生物を用いる突然変異試験

方法:試験方法は、OECD、欧州(EEC)、英国保健省(Department of Health)、米国環境保護局(EPA)および食品医薬品局(FDA)、日本厚生省のガイドラインを遵守した(12)。精製ナイシンの*in vitro*での変異原性を評価するため、*Salmonella typhimurium*(菌株TA 1535、TA 1537、TA 98、TA 100)のヒスチジン要求変異株と大腸菌(菌株CM 881とCM 891)のトリプトファン依存性変異株を精製ナイシン(生物学的力価、52.2×10⁶ IU/g)に曝露させた。蒸留水を陰性対照として用いた。0.15、0.5、1.5、5、15、50、150、500、1500、5000 μg/プレートという投与量を用いた予備的試験から、その後の変異原性試験の最高用量を1500 μg/プレートと決定した。Aroclor 1254誘導ラット由来の肝調製剤(S-9 mix)の存在下および非存在下において、2つの独立した変異原性試験を実施した。本試験では0、5、15、50、150、500、1500 μg/プレートで、追加試験では0、0.15、0.5、1.5、5.0、15、50 μg/プレートで試験を行った。

結果：予備的試験に基づき、変異原性試験に選択された最高用量は 1,500 μg /プレートであった。いずれの変異原性試験においても、試験した全ての用量において、変異を示さなかったが、並行して行った陽性対照化合物では、突然変異が観察された。分析法に感受性を示し、肝臓製剤の代謝活性を示した。

② マウスリンパ腫試験

方法：試験方法は、OECD、欧州（EEC）、米国環境保護局（EPA）のガイドラインを遵守した（13）。ラット肝調製剤（S-9 mix）の存在下および非存在下において、精製ナイシン（生物学的力価、 51.6×10^6 IU/g）のマウスリンパ腫 L5178Y 細胞における変異原性について検討した。試験に使用する濃度範囲を設定するために単細胞培養とナイシン濃度 3.3、10、33.3、100、333.3、1,000 mg/ml を用いて予備的試験を実施した。その後、独立した変異原性試験を以下に示した濃度で実施した。

アッセイ 1（S-9 mix なし）：25、50、100、150、200、250、300 $\mu\text{g/ml}$

アッセイ 2（S-9 mix あり）：50、100、200、400、600、800、1000 $\mu\text{g/ml}$

アッセイ 3（S-9 mix なし）：25、50、100、200、400、600、800 $\mu\text{g/ml}$

アッセイ 4（S-9 mix あり）：25、50、100、200、400、600、800 $\mu\text{g/ml}$

結果：予備試験では、精製ナイシンが 100~1,000 mg/ml の範囲でリンパ腫細胞に毒性を及ぼし、333.3 mg/ml 以上では細胞培養倍地の緩衝効果により被験物質が沈殿した。試験を行ったいずれの濃度においても精製ナイシンは変異原性を示さず、試験濃度が毒性範囲や試験系の溶解限度を超えた場合でも、マウスリンパ腫 L5178Y 細胞において精製ナイシンに変異原性はないと結論付けられた。

③ *In vitro* で培養したヒトリンパ球の分裂中期染色体解析（metaphase chromosome analysis）

方法：試験方法は、OECD、英国保健省（Department of Health）、欧州（EEC）、米国環境保護局（EPA）および食品医薬品局（FDA）のガイドラインを遵守した（14）。植物性血球凝集素（PHA）の添加により全血培養におけるヒトリンパ球の分裂を刺激し、ラット肝臓由来の代謝システム（S-9 mix）の存在下および非存在下において精製ナイシン（生物学的力価、 52.2×10^6 IU/g）に曝露させた。陽性対照および溶媒対照も調製した。適切な時間インキュベーションした後、Colcemid®を用いて細胞分裂を停止させた。染色体損傷について分裂中期の形状（metaphase figure）を検討するために、細胞を採取し、スライド標本を作製した。精製ナイシンがヒト培養リンパ球に及ぼす毒性を評価するため、ナイシン濃度 7.8、15.6、31.3、62.5、125、250、500、1000 $\mu\text{g/ml}$ で処理し、全培養と溶媒対照について分裂指数を算出した。その後の分裂中期解析のための被験物質濃度の選択はこのデータに基づいて行い、以下の通りとした。

S-9 mix なし・21 時間培養：62.5、125、250 $\mu\text{g/ml}$

S-9 mix あり・21 時間培養：125、250、500 $\mu\text{g/ml}$

S-9 mix なし・45 時間培養：125 $\mu\text{g/ml}$