

Japan
Food
Research
Laboratories

試験報告書

第 107024587-002号

2007年(平成19年)04月03日

依頼者 株式会社 アメニティーズフォーユー

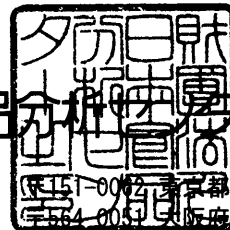
検体 MRA500-01-02

表題 変異原性試験

2007年(平成19年)02月26日当センターに提出された
上記検体について試験した結果は次のとおりです。

財団法人

日本食品



東京本部 〒151-0062 東京都渋谷区元代々木町52番1号
大阪支所 〒564-0051 大阪府茨田市豊津町3番1号
名古屋支所 〒460-0011 名古屋市中区大須4丁目5番13号
九州支所 〒812-0034 福岡市博多区下呉服町1番12号
多摩研究所 〒206-0025 東京都多摩市永山6丁目11番10号
千歳研究所 〒066-0052 北海道千歳市文京2丁目3番
彩都研究所 〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ7丁目4番41号

変異原性試験

要 約

MRA500-01・02の突然変異誘起性を調べる目的で労働省告示第77号(昭和63年9月1日)に準じ試験を実施した。

検体について、*Salmonella typhimurium* TA100を用いて代謝活性化を含む復帰突然変異試験を156~5,000 μ g/プレートの用量で行ったところ、いずれの場合においても復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。以上のことから、本試験条件下における検体の突然変異誘起性は陰性と結論した。

依 頼 者

株式会社 アメニティーズフォーユー

検 体

MRA500-01・02

試験実施期間

平成19年3月1日~平成19年4月3日

試験実施場所

財団法人 日本食品分析センター 千歳研究所
北海道千歳市文京2丁目3番

試験責任者

財団法人 日本食品分析センター 千歳研究所
安全性試験部 生物科学課
前田 貴宣

試験実施者

宮北 春香 , 後藤 愛実

1 試験目的

検体の突然変異誘起性を調べるため、労働省告示第77号(昭和63年9月1日)に準じ、*Salmonella typhimurium* TA100を用いて、代謝活性化を含む復帰突然変異試験を行う。なお、試験菌株は依頼者の指定による。

2 検 体

MRA500-01・02

性状：オフホワイト粉末

3 試験方法

1) 試験液の調製

用量設定試験及び本試験ともに、注射用水で検体の50 mg/mLを調製し、試験原液とした。注射用水の100 μ Lを陰性対照とした。

2) 試験用量

用量設定試験

5,000, 1,250, 313, 78.1, 19.5及び4.88 μ g/プレート

本試験

代謝活性化法によらない場合

5,000, 2,500, 1,250, 625, 313及び156 μ g/プレート

代謝活性化法による場合

5,000, 2,500, 1,250, 625及び313 μ g/プレート

3) 陽性対照物質及び陽性対照物質を溶解する溶媒

① 陽性対照物質と用量

| S9(-) | | | S9(+) | | |
|-------|--------|-----------------------|-------|--------|-----------------------|
| 菌株 | 陽性対照物質 | 用量 (μ g/プレート) | 菌株 | 陽性対照物質 | 用量 (μ g/プレート) |
| TA100 | AF-2 | 0.01 | TA100 | 2-AA | 1 |

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

2-AA : 2-aminoanthracene

② 陽性対照物質及び陽性対照物質を溶解する溶媒

| 物質名 | | 製造元 | 溶媒名 |
|------|------|--------------|------|
| 陽性対照 | AF-2 | 和光純薬工業株式会社 | DMSO |
| | 2-AA | 和光純薬工業株式会社 | DMSO |
| 溶媒 | DMSO | 株式会社 同仁化学研究所 | — |

陽性対照物質溶液の調製保存等：分注保存(保存温度-80℃)

DMSO：ジメチルスルホキシド

4) 使用菌株

① 入手先

| 菌株 | 入手先 |
|-------|----------------------------|
| TA100 | 中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター |

② 保存方法

| | | | | |
|------------|------|----------|------|-----------|
| 保存方法 | 分注凍結 | 保存液組成 | 菌懸濁液 | 0.8 mL |
| 保存温度 | -80℃ | | DMSO | 0.07 mL |
| 保存機器名及び型式名 | | 超低温フリーザー | サンヨー | MDF-293AT |

5) 菌の前培養

Nutrient broth No.2[OXOID]を15 mL分注したバツフル付三角フラスコに、菌分注凍結保存液を解凍し、10 μ L接種した。菌を接種したバツフル付三角フラスコは旋回を始めるまで冷蔵し、試験開始までに37℃で10時間旋回培養した。菌懸濁液は濁度計で吸光度を計測した。

| | |
|--------------------|-------------------------------|
| 振とう培養装置の型式及び製造元 | バイオシェーカー BR-40LF タイテック株式会社 |
| 振とう方法(振とう型式・振とう数等) | 旋回式・100回/分 |
| 培養容器(形状・容量・栓) | バツフル付三角フラスコ・100 mL・シリコン栓 |

6) S9及びS9Mix

① S9の製造元, 保存方法

| | | | |
|------------|-------------------------|------|-------|
| 製造元 | オリエンタル酵母工業株式会社 | 保存温度 | -80 ℃ |
| 保存機器名及び型式名 | 超低温フリーザー サンヨー MDF-293AT | | |

② S9の調製方法

| | | | |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|------|-------|
| 使用動物の種・系統及び性 | ラット・SD系 雄 | 投与方法 | 腹腔内投与 |
| 誘導物質の名称 | フェノバルビタール (PB) 5,6-ベンゾフラボン (5,6-BF) | | |
| 投与期間及び投与量 (mg/kg体重) | 1日目: PB30 mg/kg, 2日目: PB60 mg/kg 3日目: PB60 mg/kg+5,6-BF80 mg/kg 4日目: PB60 mg/kg | | |

③ S9Mixの組成

| 成分 | S9Mix (1 mL) 中の量 | 成分 | S9Mix (1 mL) 中の量 |
|-------------------|------------------|----------------------|------------------|
| S9 | 0.1 mL | NADH | 4 μmol |
| MgCl ₂ | 8 μmol | NADPH | 4 μmol |
| KCl | 33 μmol | Na-リン酸緩衝液 (pH7.4) | 100 μmol |
| G-6-P | 5 μmol | | |

7) 最少グルコース寒天平板培地

| | | | |
|-----------------------------------------|------------|------------------------------------------------|----------------|
| 名称 | テスメディアAN培地 | 製造元 | オリエンタル酵母工業株式会社 |
| 備考: 直径100 mmの滅菌平板1枚当たり30 mLを分注して固化させたもの | | | |
| 組成(培地1 L当たり) | | | |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.2 g | クエン酸·H ₂ O | 2 g |
| K ₂ HPO ₄ | 10 g | NH ₄ H ₂ PO ₄ | 1.92 g |
| NaOH | 0.66 g | グルコース | 20 g |
| 寒天 | 15 g | | |

8) ソフトアガーの組成

| | |
|--------------------|-------|
| Bacto agar (DIFCO) | 0.6 % |
| NaCl | 0.5 % |

9) 試験操作法

プレインキュベーション法(代謝活性化法によらない場合及び代謝活性化法による場合の両条件)により試験を行った。

所定量の試験液, S9Mix又は0.1 mol/L Na-リン酸緩衝液(pH7.4)0.5 mL及び菌懸濁液0.1 mLを順次滅菌小試験管に加えた。37 °Cの恒温槽中で20分間振とう(プレインキュベーション)した後, これにトッパアガー2 mL(ソフトアガーに別に滅菌した0.5 mmol/L L-ヒスチジン-0.5 mmol/L D-ビオチン-0.5 mmol/L L-トリプトファン溶液を1/10容量加えたもの。)を加え混合して, 最少グルコース寒天平板培地上に一様に広げ固化させた。37 °Cの恒温器中で48時間培養し, 復帰突然変異により出現したコロニーを計数した。

菌の生育阻害のチェック方法

- ① 復帰変異コロニー数の減少の有無
- ② 目視によるバックグラウンドの観察
- ③ 実体顕微鏡によるバックグラウンドの観察

10) 無菌試験

試験原液の0.1 mL及びS9Mixの0.5 mLを滅菌小試験管にそれぞれ2本分注し, トッパアガー2 mLを加え混合して, 最少グルコース寒天平板培地上に一様に広げ固化させた。37 °Cの恒温器中で48時間培養し, 菌の発育の有無を観察した。

11) 統計処理

実施しなかった。

12) 判定基準

コロニー数の平均値が, 陰性対照と比較して試験区で2倍以上に増加し, かつ, その増加に用量依存性が認められた場合に陽性と判定する。

4 試験結果

試験結果を試験結果表1及び2に示した。検体は, 用量設定試験及び本試験のいずれの場合においても, 陰性対照に比べ復帰変異コロニー数を増加させなかった。以上のことから, 本試験条件下における検体の突然変異誘起性は陰性であると結論した。

なお, 試験結果表に示す試験用量で, 菌の生育阻害及び検体の沈殿が認められた。

無菌試験では, 試験原液及びS9Mixともに菌の発育は観察されなかった。

陽性対照として用いた2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamideでは, 陰性対照と比較して著明な復帰変異コロニー数の増加を認めた。また, 2-aminoanthraceneはS9Mix存在下で, 著明な復帰変異を誘起した。

試験結果表1(用量設定試験)

検体の名称 : MRA500-01-02

| 代謝活性化系 の有無 | 検体の 用量 (μg /プレート) | 復帰変異数(コロニー数/プレート) | |
|---------------|-------------------------------------|----------------------|-------------------|
| | | 塩基置換型 | |
| | | TA100 | |
| S9Mix (-) | 陰性対照 | 102 88 110 | (100) |
| | 4.88 | 125 105 | (115) |
| | 19.5 | 131 124 | (128) |
| | 78.1 | 118 110 | (114) |
| | 313 | 105 129 | (117) |
| | 1250 # | 107 114 | (111) |
| | 5000 # | 0 * 0 * | (0) |
| | S9Mix (+) | 陰性対照 | 123 146 118 |
| 4.88 | | 142 113 | (128) |
| 19.5 | | 133 126 | (130) |
| 78.1 | | 104 128 | (116) |
| 313 | | 119 132 | (126) |
| 1250 # | | 130 136 | (133) |
| 5000 # | | 124 130 | (127) |
| 陽 性 | | 名 称 | AF-2 |
| | 用量(μg /プレート) | 0.01 | |
| | コロニー数 /プレート | 261 258 262 | (260) |
| 対 照 | 名 称 | 2-AA | |
| | 用量(μg /プレート) | 1 | |
| | コロニー数 /プレート | 1416 1395 1461 | (1424) |

2-AA : 2-aminoanthracene

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

括弧内は各プレートのコロニー数の平均値を示す。

陰性対照 : 試験液の調製に用いた溶媒

* : 菌の生育阻害が認められたことを示す。

: 検体の沈殿が認められたことを示す。

試験結果表 2 (本試験)

検体の名称 : MRA500-01・02

| 代謝活性化系 の有無 | 検体の 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 | |
| | | TA100 | |
| S9Mix (-) | 陰性対照 | 124 124 107 | (118) |
| | 156 | 122 107 | (115) |
| | 313 | 116 137 | (127) |
| | 625 | 105 102 | (104) |
| | 1250 # | 116 98 | (107) |
| | 2500 # | 108 99 | (104) |
| | 5000 # | 0 * 0 * | (0) |
| | S9Mix (+) | 陰性対照 | 121 139 121 |
| 313 | | 138 144 | (141) |
| 625 | | 99 136 | (118) |
| 1250 # | | 148 124 | (136) |
| 2500 # | | 138 106 | (122) |
| 5000 # | | 101 111 | (106) |
| 陽 性 | | 名 称 | AF-2 |
| | S9Mixを 必要とし ないもの 用量(μg /プレート) | 0.01 | |
| | コロニー数 /プレート | 269 264 290 | (274) |
| | 対 照 | 名 称 | 2-AA |
| S9Mixを 必要とす るもの 用量(μg /プレート) | | 1 | |
| コロニー数 /プレート | | 1389 1140 1371 | (1300) |

2-AA : 2-aminoanthracene

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

括弧内は各プレートのコロニー数の平均値を示す。

陰性対照 : 試験液の調製に用いた溶媒

* : 菌の生育阻害が認められたことを示す。

: 検体の沈殿が認められたことを示す。

5 参考文献

- Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. : *Cancer Lett.*, 1, 91-96 (1975).
- Maron, D. M. and Ames, B. N. : *Mutat. Res.*, 113, 173-215 (1983).
- 労働省化学物質調査課編：“安衛法における変異原性試験” (1991) 中央労働災害防止協会.

以 上