



Japan
Food
Research
Laboratories

試験報告書

第 199071312-002 号

依頼者 株式会社 ニッショー

検体 aPIZAS(W・OK・DS・OJ・ON・7)

試験項目 変異原性試験

平成 11 年 07 月 13 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。

平成 11 年 08 月 23 日

財団法人

日本食品分析センター

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 大阪府吹田市豊津町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

変異原性試験

要 約

aPIZAS(W・OK・DS・OJ・ON・7)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株を用いて代謝活性化を含む復帰突然変異試験を、6.25～500 µg/平板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 ニッショー

検 体

aPIZAS(W・OK・DS・OJ・ON・7)

試験実施期間

平成11年7月14日～平成11年8月23日

試験実施場所

財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所
東京都多摩市永山6丁目11番10号

試験担当責任者

財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所
安全性試験部 安全性試験課
佐藤 秀隆

試験実施者

金氏 由樹子 , 團 由佳 , 荻田 博美 , 高橋 美津子

1 試験目的

検体の突然変異誘起性を調べるため、*Salmonella typhimurium* TA100株を用いて、代謝活性化を含む復帰突然変異試験を行う。

なお、試験は労働省告示第77号(昭和63年9月1日)に準じて行うが、試験菌株及び試験条件は依頼者の指定による。

2 検 体

aPIZAS(W・OK・DS・OJ・ON・7)

性状：無色透明液体

3 試験液の調製

用量設定試験及び本試験ともに、検体をひょう量し、高圧蒸気滅菌(121℃, 20分間)した純水(以下「滅菌水」という。)を加え、試験管ミキサーによるかくはんを行い、50 mg/mLの溶液を調製した。これを試験原液として滅菌水を用いて適宜希釈し試験に供した。分注量は50又は100 μ Lとし、分注量が50 μ Lの場合は溶媒量を一定にするため滅菌水を50 μ L加えた。

試験用量

用量設定試験

5,000, 1,000, 500, 100, 50及び10 μ g/平板

本試験

代謝活性化法によらない場合

200, 100, 50, 25, 12.5及び6.25 μ g/平板

代謝活性化法による場合

500, 250, 125, 62.5, 31.3及び15.6 μ g/平板

4 試験方法

1) 試験菌株

Salmonella typhimurium TA100株を用いた。

試験に際しては、Nutrient broth No.2(OXOID)を10 mL分注したL字型試験管に-80℃凍結保存菌株から菌株を接種した。37℃で約10時間振とう培養し、得られた菌懸濁液を試験に用いた。

2) 試験操作法

ブ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。

所定の濃度に調製した試験液0.1 mL, S9Mix^{*1}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℃の恒温槽中で20分間振とう(ブレインキュベーション)した後, これにトップアガー^{*2} 2 mLを加え混合して, 最少グルコース寒天平板培地^{*3}上に一様に広げ固化させた。37℃の恒温器中で48時間培養し, 復帰突然変異により生じたコロニー数を計数した。

試験液及びS9Mixは雑菌の混入のないことを確認した。また, 試験結果表に示す化合物について陽性対照試験を, 試験液の調製に用いた溶媒について陰性対照試験を行った。

*1 S9Mixの組成(1 mL中)

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

S9はキッコーマン株式会社製のものを購入し, -80℃に凍結保存したものを使用した。

なお, S9の添付データは次のとおりであった。

使用動物	SD系雄ラット, 7週令, 213~245 g
誘導物質	フェノバルビタール(PB) 5,6-ベンゾフラボン(5,6-BF)
投与量	PB=30+60+60+60 mg/kg, 5,6-BF=80 mg/kg
投与方法	腹腔内注射
製造年月日	平成11年5月28日
Lot No.	RAA-406

*2 トップアガーの組成

Bacto agar [DIFCO]	0.6	%
NaCl	0.5	%

高圧蒸気滅菌後，別に滅菌した0.5 mmol/L L-ヒスチジン-0.5 mmol/L D-ビオチン溶液を1/10容量加えて混合した。

*3 最少グルコース寒天平板培地

オリエンタル酵母工業株式会社製のものを購入し，使用した。

製造年月日 平成11年5月20日 (Lot No. AN290E0)

なお，組成は次のとおりである(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[OXOID AGAR No.1 ; OXOID LTD.]	15	g

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である。

3) 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。

5 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、菌の生育阻害が認められた。

陽性対照として用いた2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF-2)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 (2-AA)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 : aPIZAS(W・OK・DS・OJ・ON・7)

代謝活性化 の有無	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	
		TA100	
S9Mix (-)	陰性対照	106 82	(94)
	10	102 92	(97)
	50	41 70	(56)
	100	58 52	(55)
	500	35 * 14 *	(25)
	1000	0 * 0 *	(0)
	5000	0 * 0 *	(0)
S9Mix (+)	陰性対照	111 85	(98)
	10	95 92	(94)
	50	73 81	(77)
	100	71 81	(76)
	500	44 17 *	(31)
	1000	3 * 6 *	(5)
	5000	0 * 0 *	(0)
陽 性 対 照	S9Mix を必要 としな いもの	名 称 AF-2	
		用量($\mu\text{g}/\text{プレート}$) 0.01	
		コロニー数 729	
		/プレート 731	(730)
対 照	S9Mix を必要 とする もの	名 称 2-AA	
		用量($\mu\text{g}/\text{プレート}$) 1	
		コロニー数 2260	
		/プレート 1644	(1952)

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。

試験結果表 2 (本試験)

検体 : aPIZAS(W・OK・DS・OJ・ON・7)

代謝活性化 の有無	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	
		TA100	
S9Mix (-)	陰性対照	90 87	(89)
	6.25	80 80	(80)
	12.5	78 70	(74)
	25	81 67	(74)
	50	57 67	(62)
	100	39 51	(45)
	200	45 * 38 *	(42)
S9Mix (+)	陰性対照	88 99	(94)
	15.6	74 87	(81)
	31.3	79 68	(74)
	62.5	62 80	(71)
	125	74 67	(71)
	250	46 39	(43)
	500	23 * 16 *	(20)
陽性 対照	S9Mix 名称	AF-2	
	を必要とするもの	用量($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01
	コロニー数/プレート	867 811	(839)
	S9Mix 名称	2-AA	
	を必要とするもの	用量($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	1
	コロニー数/プレート	1198 2233	(1716)

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。

6 参考文献

- ・ 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