



Japan
Food
Research
Laboratories

試験報告書

第 509040710-002 号
2009年(平成21年)06月17日

依頼者

検 体 抗菌消臭剤(TSSC)

表 題 変異原性試験

2009年(平成21年)04月27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
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
BlueShell有限会社依頼

変異原性試験

要 約

抗菌消臭剤 (TSSC) 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。

検体の10倍希釈液 (銀濃度20 ppmの試験液) について, *Escherichia coli* WP2uvrA及び *Salmonella typhimurium* TA系4菌株を用いて代謝活性化を含む復帰突然変異試験を313~5,000 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10倍希釈液 (銀濃度20 ppmの試験液) の突然変異誘起性は陰性と結論した。

依 頼 者

検 体

抗菌消臭剤 (TSSC)

試験期間

2009年04月27日~2009年06月17日

試験実施施設

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
中尾 亮介

試験実施者

中屋敷 崇 , 後藤 愛実 , 伊藤 珠美

本資料は, 私が実施した試験に基づいて作成されたものに相違ありません。

2011年 06月21日

中尾 亮介

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、*Escherichia coli* WP2uvrA及び*Salmonella typhimurium* TA系4菌株を用いて、代謝活性化を含む復帰突然変異試験を行う。なお、試験設定及び試験液の調製方法は依頼者の指定による。

2 検 体

抗菌消臭剤(TSSC)

性状：淡黄色透明液体

なお、検体には銀が約200 ppm含まれる(依頼者からの情報による。)

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、検体を注射用水で10倍希釈し、銀濃度20 ppmの試験液を調製した。次に、20 ppm試験液の50 mgに対して1 mLの割合で注射用水を加え、20 ppm試験液の50 mg/mL溶液を調製し、これを試験原液とした。なお、20 ppm試験液の外観は無色透明液体であった。

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

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
TA98	AF-2	0.1	TA98	2-AA	0.5
TA1535	NaN ₃	0.5	TA1535	2-AA	2
TA1537	9-AA	80	TA1537	2-AA	2
WP2uvrA	AF-2	0.01	WP2uvrA	2-AA	10

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

NaN₃ : Sodium Azide

9-AA : 9-aminoacridine hydrochloride

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
	NaN ₃	和光純薬工業株式会社	注射用水
	9-AA	MP Biomedicals, LLC.	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	—
	注射用水	株式会社 大塚製薬工場	—

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
TA98	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
TA1535	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
TA1537	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
WP2uvrA	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 °C		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

ニュートリエントプロス培地[OXOID, Nutrient broth No.2]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、TA100, TA98及びTA1535は10 μ L, TA1537は3 μ L並びにWP2uvrAは10,000倍希釈した後、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 °C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(振とう方式・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 °C
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(1.0 mL)中の量	成分	S9mix(1.0 mL)中の量
S9	0.1 mL	NADH	4 μ mol
MgCl ₂	8 μ mol	NADPH	4 μ mol
KCl	33 μ mol	Na-リン酸緩衝液 (pH7.4)	100 μ mol
G-6-P	5 μ mol		

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 P0 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。

試験液0.1 mL, 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、これにトップアガー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、トップアガー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、その増加に再現性及び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。検体の10倍希釈液(銀濃度20 ppmの試験液)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10倍希釈液(銀濃度20 ppmの試験液)の突然変異誘起性は陰性であると結論した。

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, sodium azide及び9-aminoacridine hydrochloride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：抗菌消臭剤(TSSC)

代謝活性化系 の有無	試験用量 (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			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9mix (-)	陰性対照	115	11	18	24	9
		113	10	28	10	11
		94 (107)	10 (10)	32 (26)	13 (16)	5 (8)
	4.88	95	16	23	23	6
		107 (101)	14 (15)	28 (26)	17 (20)	5 (6)
	19.5	106	12	13	25	8
		129 (118)	15 (14)	23 (18)	18 (22)	8 (8)
	78.1	113	10	27	27	9
		123 (118)	12 (11)	21 (24)	27 (27)	9 (9)
	313	103	9	20	16	7
		88 (96)	7 (8)	32 (26)	17 (17)	6 (7)
	1250	103	14	14	16	11
		104 (104)	16 (15)	25 (20)	15 (16)	11 (11)
	5000	129	10	27	17	9
		100 (115)	10 (10)	24 (26)	24 (21)	8 (9)
S9mix (+)	陰性対照	99	6	30	26	15
		102	17	19	27	26
		87 (96)	10 (11)	34 (28)	26 (26)	20 (20)
	4.88	112	13	26	34	19
		112 (112)	14 (14)	36 (31)	20 (27)	27 (23)
	19.5	110	12	30	37	26
		107 (109)	9 (11)	25 (28)	30 (34)	14 (20)
	78.1	100	9	24	30	16
		90 (95)	11 (10)	29 (27)	25 (28)	29 (23)
	313	113	11	22	22	19
		113 (113)	3 (7)	27 (25)	32 (27)	16 (18)
	1250	118	8	18	38	18
		100 (109)	5 (7)	27 (23)	40 (39)	19 (19)
	5000	113	17	37	34	13
		118 (116)	12 (15)	33 (35)	21 (28)	17 (15)
陽性 対照	S9mixを 必要とし ないもの	名 称	AF-2	NaN ₃	AF-2	9-AA
		用量(μg /プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1
		コロニー数	349	660	93	407
	S9mixを 必要とす るもの	コロニー数	332	720	121	412
		/プレート	380 (354)	876 (752)	122 (112)	413 (411)
		名 称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	S9mixを 必要とす るもの	用量(μg /プレート)	1	2	10	0.5
		コロニー数	633	271	173	311
		コロニー数	693	276	191	282
		/プレート	618 (648)	262 (270)	215 (193)	335 (309)

2-AA : 2-aminoanthracene

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

NaN₃ : Sodium Azide

9-AA : 9-aminoacridine hydrochloride

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

試験用量 : 検体の10倍希釈液(銀濃度20 ppmの試験液)の用量

試験結果表2(本試験)

検体の名称：抗菌消臭剤(TSSC)

代謝活性化系 の有無	試験用量 (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			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2 $avrA$	TA98	TA1537
S9mix (-)	陰性対照	114	13	19	9	10
		112	10	23	13	9
		120 (115)	9 (11)	22 (21)	16 (13)	11 (10)
	313	101	11	28	18	12
		111 (106)	6 (9)	22 (25)	11 (15)	6 (9)
	625	115	15	28	20	8
		115 (115)	11 (13)	23 (26)	17 (19)	6 (7)
	1250	104	8	17	20	8
		118 (111)	6 (7)	22 (20)	13 (17)	11 (10)
	2500	103	11	21	24	10
		128 (116)	10 (11)	22 (22)	24 (24)	7 (9)
	5000	100	9	23	11	8
		127 (114)	14 (12)	15 (19)	18 (15)	9 (9)
S9mix (+)	陰性対照	118	9	41	28	24
		166	10	25	22	15
		160 (148)	8 (9)	36 (34)	25 (25)	14 (18)
	313	141	13	34	31	12
		145 (143)	14 (14)	29 (32)	23 (27)	19 (16)
	625	152	12	32	24	20
		159 (156)	12 (12)	37 (35)	24 (24)	12 (16)
	1250	128	13	28	26	21
		172 (150)	9 (11)	43 (36)	16 (21)	17 (19)
	2500	159	13	29	23	15
		156 (158)	9 (11)	35 (32)	31 (27)	16 (16)
	5000	152	18	32	19	12
		156 (154)	11 (15)	32 (32)	32 (26)	20 (16)
陽性対照	S9mixを必要としないもの	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	9-AA
		用量(μg /プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1
		コロニー数	413	669	138	364
	S9mixを必要とするもの	コロニー数	422	603	113	342
		コロニー数	385 (407)	651 (641)	139 (130)	340 (349)
		名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	S9mixを必要とするもの	用量(μg /プレート)	1	2	10	0.5
		コロニー数	720	275	251	328
		コロニー数	786	326	238	278
	S9mixを必要とするもの	コロニー数	774 (760)	257 (286)	280 (256)	309 (305)
		コロニー数				141 (145)
		名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA

2-AA: 2-aminoanthracene
AF-2: 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide
NaN₃: Sodium Azide
9-AA: 9-aminoacridine hydrochloride

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
試験用量: 検体の10倍希釈液(銀濃度20 ppmの試験液)の用量

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

本報告書は、BlueShell有限会社からの要請により、試験報告書第509040710-002号(平成21年06月17日発行)を平成23年06月21日に複写したものである。