



Japan
Food
Research
Laboratories

試 験 報 告 書

第 509050569-005 号
2009年(平成21年)07月13日

依 頼 者 株式会社 エスケイワイ

検 体 NRC触媒

表 題 変異原性試験

2009年(平成21年)06月02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



Japan
Food
Research
Laboratories

試 験 報 告 書

第 509050569-005 号
2009年(平成21年)07月13日

依 頼 者 株式会社 エスケイワイ

検 体 NRC触媒

表 題 変異原性試験

2009年(平成21年)06月02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

変異原性試験

要 約

NRC触媒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)に従い、*Escherichia coli* WP2uvrA及び*Salmonella typhimurium* TA系4菌株を用いて復帰突然変異試験を実施した。

検体について、313~5000 μ g/プレートの用量で試験を行った。その結果、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 エスケイワイ

検 体

NRC触媒

試験期間

2009年06月02日~2009年07月13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 美紀子 , 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。

2009年07月13日

中尾 亮介

1 試験目的

検体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)に従い、*Escherichia coli* WP2uvrA及び*Salmonella typhimurium* TA系4菌株を用いて復帰突然変異試験を行う。

2 検 体

NRC触媒

性状：白濁半透明液体

なお、通常使用濃度の2倍濃度に調製されたものが、検体として依頼者から提供された。

3 試験方法

1) 試験液の調製及び試験用量

検体をひょう取し、注射用水を加え試験原液を調製した。注射用水を用いて試験原液を適宜希釈し、試験液を調製した。注射用水を陰性対照とした。試験用量を以下に示した。

試験用量

用量設定試験

5000, 1250, 313, 78.1, 19.5及び4.88 μg /プレート

本試験

5000, 2500, 1250, 625及び313 μg /プレート

2) 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 (μg /プレート)	菌株	陽性対照物質	用量 (μg /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

NaN_3 : 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

3) 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
WP2 _{uvrA}	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

4) 菌の前培養

菌分注凍結保存液を解凍し、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。培養後の菌懸濁液は濁度計で吸光度を計測し、生菌数が 1×10^9 /mL以上であることを確認した。

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)	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

5) 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 ℃
-----	----------------	------	-------

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: PB 30 mg/kg, 2日目: PB 60 mg/kg 3日目: PB 60 mg/kg + 5, 6-BF 80 mg/kg 4日目: PB 60 mg/kg, 5日目: S9調製		

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		

6) 最少グルコース寒天平板培地

名称	テストメディア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		

7) トップアガー

ソフトアガーにアミノ酸溶液を1/10容量加え調製した。

① ソフトアガー

Bacto agar (DIFCO)	0.6 %
NaCl	0.5 %

② アミノ酸溶液

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	0.5 mmol/L

8) 試験操作法

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について、プレインキュベーション法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、これにトッペアガー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、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

9) 無菌試験

試験原液0.1 mL及びS9mix 0.5 mLを滅菌小試験管それぞれ2本に分注し、トッペアガー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。

10) 統計処理

実施しなかった。

11) 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及び再現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、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。

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。

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。

試験結果表1(用量設定試験)

検体の名称：NRC触媒

代謝活性化系の有無	検体の用量 (μ g/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 $uvrA$	TA98	TA1537
S9mix (-)	陰性対照	110 93 104 (102)	14 13 9 (12)	24 24 28 (25)	18 16 12 (15)	8 11 8 (9)
	4.88	114 96 (105)	12 9 (11)	23 40 (32)	16 22 (19)	16 16 (16)
	19.5	87 98 (93)	13 8 (11)	27 19 (23)	19 12 (16)	11 16 (14)
	78.1	95 103 (99)	13 13 (13)	25 28 (27)	13 23 (18)	14 15 (15)
	313	107 96 (102)	9 14 (12)	28 28 (28)	20 13 (17)	15 14 (15)
	1250	94 92 (93)	16 13 (15)	26 31 (29)	23 24 (24)	11 8 (10)
	5000	91 113 (102)	15 8 (12)	29 23 (26)	19 20 (20)	18 9 (14)
S9mix (+)	陰性対照	89 88 111 (96)	9 11 16 (12)	30 32 21 (28)	29 32 29 (30)	20 27 17 (21)
	4.88	102 110 (106)	5 5 (5)	19 16 (18)	29 39 (34)	23 29 (26)
	19.5	112 124 (118)	10 12 (11)	37 29 (33)	25 29 (27)	24 19 (22)
	78.1	98 90 (94)	10 8 (9)	33 25 (29)	24 25 (25)	21 20 (21)
	313	116 123 (120)	14 19 (17)	24 33 (29)	30 26 (28)	23 23 (23)
	1250	116 103 (110)	15 18 (17)	35 24 (30)	34 33 (34)	33 38 (36)
	5000	139 99 (119)	12 7 (10)	37 32 (35)	30 27 (29)	21 11 (16)
陽性対照	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA
	用量(μ g/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
陽性対照	コロニー数	364 374	681 735	118 130	396 403	185 220
	/プレート	369 (369)	654 (690)	113 (120)	391 (397)	229 (211)
陽性対照	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	用量(μ g/プレート)	1	2	10	0.5	2
陽性対照	コロニー数	639 747	263 298	246 252	305 334	121 153
	/プレート	876 (754)	289 (283)	296 (265)	290 (310)	142 (139)

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

試験結果表2(本試験)

検体の名称：NRC触媒

代謝活性化系の有無	検体の用量 (μ g/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 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
S9mix (-)	陰性対照	123	16	25	18	6	
		116	8	31	17	10	
		110 (116)	11 (12)	35 (30)	20 (18)	10 (9)	
	313	126	12	30	18	10	
		107 (117)	13 (13)	21 (26)	15 (17)	14 (12)	
	625	112	6	25	20	13	
		94 (103)	10 (8)	34 (30)	21 (21)	9 (11)	
	1250	133	10	35	21	3	
		131 (132)	10 (10)	29 (32)	23 (22)	7 (5)	
	2500	110	8	28	14	8	
		109 (110)	12 (10)	21 (25)	16 (15)	10 (9)	
	5000	115	8	22	23	9	
108 (112)		20 (14)	22 (22)	15 (19)	9 (9)		
S9mix (+)	陰性対照	129	11	26	30	14	
		141	8	36	27	25	
		128 (133)	7 (9)	29 (30)	43 (33)	12 (17)	
	313	126	7	28	28	16	
		121 (124)	11 (9)	32 (30)	41 (35)	19 (18)	
	625	120	6	36	29	22	
		120 (120)	9 (8)	32 (34)	26 (28)	17 (20)	
	1250	103	9	26	35	23	
		126 (115)	14 (12)	31 (29)	37 (36)	23 (23)	
	2500	103	6	23	43	18	
		106 (105)	10 (8)	42 (33)	23 (33)	15 (17)	
	5000	116	7	29	38	20	
122 (119)		9 (8)	39 (34)	35 (37)	28 (24)		
陽性対照	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA	
	用量(μ g/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
	S9mixを必要としないもの	コロニー数	335	687	129	321	187
			403	606	136	359	287
		/プレート	418 (385)	627 (640)	114 (126)	345 (342)	332 (269)
	S9mixを必要とするもの	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
用量(μ g/プレート)		1	2	10	0.5	2	
コロニー数		858	272	238	369	176	
	699	256	254	371	146		
	756 (771)	254 (261)	265 (252)	405 (382)	151 (158)		

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

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