

## 変異原性試験

### 要 約

700ppm HC10 次亜塩素酸水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、*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3.13~100  $\mu$ L/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

野口歯科医学研究所株式会社

### 検 体

700ppm HC10 次亜塩素酸水

### 試験実施期間

平成19年6月1日~平成19年7月5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、*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

700ppm HClO 次亜塩素酸水

性状：無色透明液体

## 3 試験方法

### 1) 試験液の調製

用量設定試験，本試験1及び本試験2ともに，検体を試験原液とした。注射用水の100  $\mu$ Lを陰性対照とした。

### 2) 試験用量

#### 用量設定試験

100, 50, 25, 12.5及び6.25  $\mu$ L/プレート

#### 本試験1

代謝活性化法によらない場合

*S. typhimurium* TA100及びTA1537

100, 50, 25, 12.5, 6.25及び3.13  $\mu$ L/プレート

*S. typhimurium* TA98, TA1535及び*E. coli* WP2uvrA

100, 50, 25, 12.5及び6.25  $\mu$ L/プレート

代謝活性化法による場合

100, 50, 25, 12.5及び6.25  $\mu$ L/プレート

#### 本試験2

代謝活性化法によらない場合

*S. typhimurium* TA1537

100, 50, 25, 12.5, 6.25及び3.13  $\mu$ L/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 ( $\mu$ g/プレート)	菌株	陽性対照物質	用量 ( $\mu$ 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 <sub>3</sub>	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<sub>3</sub> : 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 <sub>3</sub>	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 °C)

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

ニュートリエントブロス培地 [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  $\mu$ L, TA1537は3  $\mu$ L並びにWP2*uvrA*は10,000倍希釈した後、10  $\mu$ 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 °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 $\mu$ mol
MgCl <sub>2</sub>	8 $\mu$ mol	NADPH	4 $\mu$ mol
KCl	33 $\mu$ mol	Na-リン酸緩衝液 (pH7.4)	100 $\mu$ mol
G-6-P	5 $\mu$ 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 <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2 g	クエン酸·H <sub>2</sub> O	2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 g	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	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-ピオチン-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1～3に示した。検体は、用量設定試験、本試験1及び本試験2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, 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: 700ppm HC10 次亜塩素酸水

代謝活性化系 の有無	検体の 用量 ( $\mu$ L/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	115	12	17	22	6
		98	8	20	18	14
		129 (114)	15 (12)	20 (19)	14 (18)	10 (10)
	6.25	104	10	25	20	12
		95 (100)	8 (9)	30 (28)	16 (18)	3 (8)
		106 (103)	12 (9)	23 (23)	23 (24)	6 (5)
	12.5	99	6	23	24	3
		106 (103)	12 (9)	23 (23)	23 (24)	6 (5)
	25	112	7	24	16	9
		114 (113)	11 (9)	33 (29)	15 (16)	7 (8)
	50	70	6	30	16	1 *
		83 (77)	5 (6)	24 (27)	14 (15)	4 * (3)
81 *		10 *	21 *	15 *	0 *	
100	72 * (77)	3 * (7)	17 * (19)	9 * (12)	0 * (0)	
S9Mix (+)	陰性対照	171	7	24	30	13
		150	8	26	36	20
		142 (154)	13 (9)	25 (25)	32 (33)	20 (18)
	6.25	147	8	28	25	11
		144 (146)	8 (8)	34 (31)	27 (26)	22 (17)
	12.5	150	11	19	22	26
		166 (158)	14 (13)	30 (25)	22 (22)	10 (18)
	25	147	10	30	28	17
		161 (154)	10 (10)	24 (27)	26 (27)	20 (19)
	50	153	10	25	26	23
		193 (173)	11 (11)	21 (23)	34 (30)	16 (20)
		138	11	26	20	13
100	142 (140)	6 (9)	27 (27)	32 (26)	15 (14)	
陽性	名称	AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2	9-AA
	用量( $\mu$ g/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	コロニー数 /プレート	249 259 259 (256)	518 491 578 (529)	57 55 87 (66)	170 167 171 (169)	156 159 156 (157)
対照	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	用量( $\mu$ g/プレート)	1	2	10	0.5	2
	コロニー数 /プレート	1311 1389 1062 (1254)	339 332 320 (330)	209 202 229 (213)	526 578 496 (533)	241 244 189 (225)

2-AA: 2-aminoanthracene  
 AF-2: 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide  
 NaN<sub>3</sub>: 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  
 \*: 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1)

検体の名称: 700ppm HC10 次亜塩素酸水

代謝活性化系の有無	検体の用量 ( $\mu$ L/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	119 89 92 (100)	6 10 9 (8)	23 19 21 (21)	18 20 13 (17)	10 8 11 (10)
	3.13	93 109 (101)				10 18 (14)
	6.25	116 110 (113)	16 13 (15)	18 16 (17)	15 17 (16)	12 14 (13)
	12.5	121 105 (113)	9 13 (11)	21 20 (21)	28 14 (21)	13 14 (14)
	25	119 102 (111)	9 12 (11)	26 21 (24)	20 28 (24)	10 10 (10)
	50	70 75 (73)	4 14 (9)	15 21 (18)	8 11 (10)	5 * 7 * (6)
	100	74 * 0 * (37)	12 * 13 * (13)	15 * 28 * (22)	7 * 3 * (5)	3 * 2 * (3)
	陰性対照	111 123 102 (112)	10 8 11 (10)	23 29 28 (27)	28 21 22 (24)	28 20 23 (24)
	6.25	96 137 (117)	4 15 (10)	27 27 (27)	28 33 (31)	22 35 (29)
	12.5	121 125 (123)	6 18 (12)	25 26 (26)	23 27 (25)	16 24 (20)
25	121 114 (118)	9 7 (8)	33 19 (26)	26 26 (26)	27 22 (25)	
50	145 107 (126)	12 10 (11)	31 34 (33)	30 35 (33)	24 16 (20)	
100	138 134 (136)	10 11 (11)	18 32 (25)	23 28 (26)	18 15 (17)	
陽性	名称	AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2	9-AA
	用量( $\mu$ g/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	コロニー数 /プレート	214 227 210 (217)	471 537 484 (497)	80 69 77 (75)	143 186 188 (172)	196 195 239 (210)
対照	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	用量( $\mu$ g/プレート)	1	2	10	0.5	2
	コロニー数 /プレート	1287 1113 1224 (1208)	320 331 311 (321)	236 239 293 (256)	485 436 483 (468)	233 258 249 (247)

2-AA: 2-aminoanthracene  
 AF-2: 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide  
 NaN<sub>3</sub>: 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  
 \*: 菌の生育阻害が認められたことを示す。

試験結果表3(本試験2)

検体の名称: 700ppm HC10 次亜塩素酸水

代謝活性化系 の有無	検体の 用量 ( $\mu$ L/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)	
		フレームシフト型	
		TA1537	
S9Mix (-)	陰性対照	9 6 8	( 8)
	3.13	3 3	( 3)
	6.25	10 7	( 9)
	12.5	9 8	( 9)
	25	7 5	( 6)
	50	9 4	* ( 7)
	100	1 2	* ( 2)
	陽性 対照	名称	9-AA
S9Mixを 必要とし ないもの 用量( $\mu$ g/プレート)		80	
コロニー数 /プレート		167 149 151	( 156)

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  
\*: 菌の生育阻害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