Japan
Food
Research
Laboratories

試 験 報 告 書

第 299080377-004 号

依 頼 者　アサヒプリテック株式会社

検　　体　アクアプロ21Rによる生成水

試 験 項 目　細菌を用いる復帰突然変異試験

平成 11 年 08 月 19 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 10 月 25 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 〒564-005 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

本報告書を他に掲載するときは当センターの承認を受けて下さい。

細菌を用いる復帰突然変異試験

要　　約

アクアプロ21Rによる生成水の突然変異誘起性を調べる目的で厚生省薬務局薬審1第24号(平成元年9月11日)の変異原性試験法に従い，試験を実施した。

被験物質について，*Escherichia coli* WP2 *uvrA*株及び*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100～500 μL/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被験物質の突然変異誘起性は陰性と結論した。

依 頼 者

アサヒプリテック株式会社

被験物質

アクアプロ21Rによる生成水

試験実施期間

平成11年8月26日～平成11年10月25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

1　試験目的

被験物質の突然変異誘起性を調べるため，厚生省薬務局薬審1第24号(平成元年9月11日)の変異原性試験法に従い，*Escherichia coli* WP2 *uvrA*株及び*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。

2　被験物質

アクアプロ21Rによる生成水

備考：被験物質は，依頼者により設置されたアクアプロ21Rを用いて試験実施場所において調製した(設置日：平成11年8月20日)。

3　試験方法

1)　試験液の調製

被験物質は試験当日に採取し，よう素滴定法により有効塩素濃度を測定した。用量設定試験及び本試験ともに，被験物質を口径0.45 μmのメンブランフィルターを用いてろ過滅菌したものを試験液とした。また，注射用水(日本薬局方)[大塚製薬株式会社，製造番号9B83P]0.1 mLを陰性対照とした。

2)　試験用量

用量設定試験

500，400，300，200及び100 μL/平板

本試験

用量設定試験と同じ用量に設定した。

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(+)

strain	陽性対照物質	用量 (μg/plate)	strain	陽性対照物質	用量 (μg/plate)
TA100	AF-2	0.01	TA100	2-AA	1
TA98	AF-2	0.1	TA98	2-AA	0.5
TA1535	ENNG	5	TA1535	2-AA	2
TA1537	9-AA	80	TA1537	2-AA	2
WP2 *uvrA*	AF-2	0.01	WP2 *uvrA*	2-AA	10

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

ENNG : *N*-ethyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine

9-AA : 9-aminoacridine

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	Lot No.	グレード	純度(%)	溶媒名
陽性対照	AF-2	NIHSから分与されたもの	—	—	—	DMSO
	ENNG	ナカライテスク株式会社	V8G4785	—	97	エタノール
	9-AA	Aldrich	TT00220MJ	—	98	DMSO
	2-AA	和光純薬工業株式会社	AWL2898	—	90	DMSO
溶媒	DMSO	和光純薬工業株式会社	KSR1987	生化学用	99.5以上	—
	エタノール	関東化学株式会社	101G1708	残留農薬試験用	99.5以上	—

陽性対照物質溶液の調製保存等；分注保存(保存温度 -20℃)

NIHS：国立医薬品食品衛生研究所

Aldrich : Aldrich Chemical Company, Inc.

DMSO：ジメチルスルホキシド

4) 使用菌株

① 入手方法等

菌株名	入手先	入手年月日	試験に使用した保存ロットの特性検査日
TA100	Bruce N. Ames	昭和55年12月11日	平成11年7月9日
TA98	Bruce N. Ames	昭和55年12月11日	平成11年7月28日
TA1535	Bruce N. Ames	昭和55年12月11日	平成11年7月9日
TA1537	Bruce N. Ames	昭和55年12月11日	平成11年7月28日
WP2 *uvrA*	東京大学医科学研究所	昭和56年1月12日	平成11年4月26日

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	超低温フリーザー　サンヨー　MDF-291AT			

5) 菌の前培養

Nutrient broth No.2(OXOID, Lot No.60435)を10 mL分注したL字型試験管に，菌分注凍結保存液を解凍して20 μL接種した。菌を接種したL字型試験管は振とうを始めるまで氷冷し，試験開始までに37℃で約10時間振とう培養した。菌懸濁液は分光光度計で吸光度を計測し，所定の範囲に到達したところで培養を止めた。

振とう培養装置の型式及び製造元	ユニットシェーカーモノシンⅡ^{A} タイテック株式会社
振とう方法(振とう型式・振とう数等)	モノー型式・36回/分
培養容器(形状・容量・栓)	L字管・30 mL・モルトン栓

6) S9及びS9Mix

① S9の入手先，保存方法等

製造元	キッコーマン株式会社	保存温度	-80℃
製造年月日	平成11年7月16日	保存機器名及び型式名	超低温フリーザー サンヨー MDF-291AT
購入年月日	平成11年8月24日		
Lot No.	RAA-409		

② S9の調製方法

使用動物		誘導物質	
種・系統性	ラット・SD系雄	名称	フェノバルビタール(PB) 5,6-ベンゾフラボン(5,6-BF)
週齢	7週	投与方法	腹腔内投与
体重	209～243 g	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	クリメディアAM-N培地		
製造元	オリエンタル酵母工業株式会社	使用寒天	
製造年月日	平成11年5月20日	名称	OXOID AGAR No.1
購入年月日	平成11年7月9日	製造元	OXOID LTD.
Lot No.	AN290E0	Lot No.	802436
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)			
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 g	クエン酸・H_2O	2 g
K_2HPO_4	10 g	$NH_4H_2PO_4$	1.92 g
NaOH	0.66 g	グルコース	20 g
寒天	15 g		

8) トップアガーの組成

Bacto agar[DIFCO, Lot No.121826JA]	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，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℃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(*S. typhimurium* TA系4菌株については，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，また，*E.coli* WP2 *uvrA*株については，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℃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。

① 自動コロニーカウンターの計数方法(陽性対照の平板のみ計測した。)

機種：コロニーカウンター OL-502A[吉川工業株式会社]

測定面積5,027.5の条件で，平板当たりのコロニー数が約1,500までは面積補正として係数1.1を用いた。1,500以上では，数え落としが認められたので係数1.2を用いた。

② 菌の生育阻害のチェック方法

a) 復帰変異コロニー数の減少の有無

b) 目視によるバックグラウンドの観察

c) 実体顕微鏡によるバックグラウンドの観察

10) 無菌試験

試験液は0.1 mL，S9Mixは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℃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

1)　有効塩素濃度

用量設定試験の測定値は36 mg/L，本試験の測定値は35 mg/Lであった。

2)　細菌を用いる復帰突然変異試験

試験結果を試験結果表1及び2に示した。被験物質は，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被験物質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S9Mix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，*N*-ethyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine及び9-aminoacridine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）

被験物質：アクアプロ21Rによる生成水

代謝活性化の有無	用量 (μL/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	TA1535	WP2 *uvrA*	フレームシフト型 TA98	TA1537
S9Mix (−)	陰性対照	122 95 (109)	6 8 (7)	35 29 (32)	25 29 (27)	2 4 (3)
	100	106 102 (104)	9 7 (8)	30 16 (23)	37 19 (28)	3 8 (6)
	200	102 99 (101)	6 11 (9)	36 20 (28)	15 16 (16)	13 8 (11)
	300	109 101 (105)	8 9 (9)	26 21 (24)	20 18 (19)	9 6 (8)
	400	111 104 (108)	11 10 (11)	21 16 (19)	11 22 (17)	9 9 (9)
	500	102 117 (110)	6 9 (8)	29 12 (21)	18 16 (17)	5 6 (6)
S9Mix (+)	陰性対照	95 109 (102)	6 7 (7)	15 25 (20)	33 32 (33)	17 26 (22)
	100	96 77 (87)	11 10 (11)	11 23 (17)	37 24 (31)	32 23 (28)
	200	80 78 (79)	6 6 (6)	24 29 (27)	19 25 (22)	21 22 (22)
	300	88 93 (91)	9 6 (8)	22 19 (21)	32 27 (30)	30 24 (27)
	400	82 88 (85)	9 6 (8)	27 24 (26)	20 28 (24)	23 25 (24)
	500	90 87 (89)	7 8 (8)	24 19 (22)	24 31 (28)	20 33 (27)
陽性対照 S9Mixを必要としないもの	名称	AF-2	ENNG	AF-2	AF-2	9-AA
	用量(μg/プレート)	0.01	5	0.01	0.1	80
	コロニー数／プレート	855 809 (832)	7861 6868 (7365)	100 110 (105)	690 655 (673)	896 825 (861)
陽性対照 S9Mixを必要とするもの	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	用量(μg/プレート)	1	2	10	0.5	2
	コロニー数／プレート	1497 1470 (1484)	238 290 (264)	1069 1199 (1134)	609 404 (507)	143 130 (137)

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：注射用水

試験結果表2（本試験）

被験物質：アクアプロ21Rによる生成水

代謝活性化の有無	用量 (μL/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	TA1535	WP2 *uvrA*	フレームシフト型 TA98	TA1537
S9Mix (−)	陰性対照	95 101 (98)	4 8 (6)	11 25 (18)	16 14 (15)	13 11 (12)
	100	79 86 (83)	3 6 (5)	18 18 (18)	12 13 (13)	7 4 (6)
	200	103 96 (100)	12 10 (11)	24 10 (17)	13 18 (16)	12 10 (11)
	300	110 93 (102)	5 6 (6)	24 17 (21)	19 18 (19)	3 12 (8)
	400	120 100 (110)	12 8 (10)	17 18 (18)	15 21 (18)	8 13 (11)
	500	82 105 (94)	5 6 (6)	14 18 (16)	25 27 (26)	4 9 (7)
S9Mix (+)	陰性対照	85 89 (87)	9 11 (10)	26 31 (29)	29 26 (28)	15 17 (16)
	100	97 83 (90)	10 8 (9)	27 24 (26)	28 28 (28)	19 14 (17)
	200	98 98 (98)	5 8 (7)	21 26 (24)	25 24 (25)	16 19 (18)
	300	93 88 (91)	10 4 (7)	26 20 (23)	21 20 (21)	14 12 (13)
	400	103 105 (104)	6 4 (5)	17 22 (20)	27 35 (31)	15 21 (18)
	500	92 96 (94)	11 9 (10)	13 24 (19)	19 22 (21)	12 12 (12)
陽性対照 S9Mixを必要としないもの	名称	AF-2	ENNG	AF-2	AF-2	9-AA
	用量(μg/プレート)	0.01	5	0.01	0.1	80
	コロニー数／プレート	745 748 (747)	7939 9319 (8629)	151 163 (157)	669 573 (621)	1424 1106 (1265)
陽性対照 S9Mixを必要とするもの	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	用量(μg/プレート)	1	2	10	0.5	2
	コロニー数／プレート	1405 1421 (1413)	280 273 (277)	1379 1290 (1335)	397 408 (403)	196 189 (193)

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：注射用水

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："化学物質の有害性調査制度関係法令の解説"(1986) 中央労働災害防止協会.
・ 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.
・ 厚生省薬務局医療機器開発課監修："医療用具及び医用材料の基礎的な生物学的試験のガイドライン1995解説"(1996)薬事日報社.

以　上