

試験報告書

依頼者 株式会社 エムエージャパン

一般財団法人

日本食品分析センター

東京都渋谷区元代々木町52番1号



検 体 ティオスカイコートV(品番:TAK-V)

表 題 微生物を用いる変異原性試験

2021 年 10 月 11 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をご報告いたします。

微生物を用いる変異原性試験

要 約

ティオスカイコートV(品番:TAK-V)の遺伝子突然変異誘発性を調べる目的で、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菌株を用いてプレインキュベーション法による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遺伝子突然変異誘発性は、陰性と結論した。

1 依頼者

株式会社 エムエージャパン

2 検体

ティオスカイコートV(品番:TAK-V)

3 試験実施施設

一般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

4 試験責任者

一般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
中村 鉄平

5 試験期間

2021年10月11日～2021年11月30日

6 試験目的

検体の遺伝子突然変異誘発性を調べる目的で、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。

7 試験方法

1) 試験液の調製及び試験用量

検体を秤取し注射用水を加えた後、超音波処理を行い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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

本試験

5000, 2500, 1250, 625及び313 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

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 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	菌株	陽性対照物質	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)
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 monohydrate

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	富士フィルム和光純薬株式会社	DMSO
	NaN_3	富士フィルム和光純薬株式会社	注射用水
	9-AA	東京化成工業株式会社	DMSO
	2-AA	富士フィルム和光純薬株式会社	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保存：分注保存(保存温度 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$)

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	独立行政法人製品評価技術基盤機構	バイオテクノロジーセンター
TA98	独立行政法人製品評価技術基盤機構	バイオテクノロジーセンター
TA1535	独立行政法人製品評価技術基盤機構	バイオテクノロジーセンター
TA1537	独立行政法人製品評価技術基盤機構	バイオテクノロジーセンター
WP2 $uvrA$	独立行政法人製品評価技術基盤機構	バイオテクノロジーセンター

② 保存方法

保存方法	分注凍結	保存液組成	菌培養液	0.8 mL
保存温度	-80 °C		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、その後、37 °C で 10 時間旋回培養した。菌培養液は吸光度を測定し、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	家田貿易株式会社	保存温度	-80 °C
-----	----------	------	--------

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	バイタルメディアAMT-S培地	製造元	極東製薬工業株式会社
備考：直径90 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, 注射用水(陰性対照)0.1 mL又は陽性対照物質溶液0.1 mLを試験管に入れた。これに、代謝活性化法によらない場合は0.1 mol/L Na-リン酸緩衝液(pH7.4) 0.5 mLを、代謝活性化法による場合はS9mix 0.5 mLを混合し、更に菌培養液0.1 mLを加えて、37 °Cの振とう恒温水槽中で約20分間振とう(プレインキュベーション)した。次いでトップアガー2 mLを加えて混合し、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。

9) 統計処理

実施しなかった。

10) 判定基準

復帰変異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 (TA98, TA100及びWP2uvrA) 又は3倍以上 (TA1535及びTA1537) 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。

なお、試験区のコロニー数の平均値が、陰性対照と比較して2倍未満 (TA98, TA100及びWP2uvrA) 又は3倍未満 (TA1535及びTA1537) の場合には、復帰変異コロニー数の増加は認められないものとする。

8 試験結果

試験結果を表-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。菌の生育阻害及び検体の析出、沈殿は、いずれの試験用量においても認められなかった。

陽性対照では、著明な復帰変異コロニー数の増加が認められた。

9 結論

検体について、*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。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遺伝子突然変異誘発性は、陰性と結論した。

10 参考文献

- Yahagi, T.; Degawa, M.; Seino, Y.; Matsushima, T.; Nagao, M.; Sugimura, T.; Hashimoto, Y. Mutagenicity of carcinogenic azo dyes and their derivatives. *Cancer Lett.* 1975, 1(2), p. 91-96.
- Maron, D. M.; Ames, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 1983, 113(3-4), p. 173-215.
- 三宅幸雄, 森田健, 若田明裕, 朝波省吾, 島田弘康. 医薬品のための遺伝毒性試験Q&A. 第1版, サイエンティスト社, 2000.
- 第3回Ames試験講習会—プログラム及び講習テキスト—(2010年7月21日～7月23日, 慶應義塾大学薬学部).
- 第61回Ames定例会 Ames試験: 評価方法を中心に(2019年7月5日, JT東京研修センター).

表-1 試験結果表(用量設定試験)

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	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9mix (-)	陰性対照	79	9	15	23	3	
		86	6	13	23	3	
		110 (92)	9 (8)	21 (16)	21 (22)	1 (2)	
	4.88	92	9	22	15	4	
		86 (89)	2 (6)	18 (20)	21 (18)	1 (3)	
		19.5	91	7	17	21	2
	78.1	83 (87)	10 (9)	21 (19)	18 (20)	1 (2)	
		96	6	18	19	2	
		87 (92)	5 (6)	28 (23)	28 (24)	7 (5)	
	313	82	12	21	23	4	
		79 (81)	11 (12)	20 (21)	11 (17)	3 (4)	
		1250	82	5	17	26	2
	5000	76 (79)	9 (7)	22 (20)	15 (21)	2 (2)	
		98	2	25	14	6	
93 (96)		11 (7)	15 (20)	19 (17)	1 (4)		
S9mix (+)	陰性対照	70	7	17	22	7	
		99	5	14	31	9	
		90 (86)	12 (8)	22 (18)	30 (28)	11 (9)	
	4.88	92	10	14	26	7	
		104 (98)	9 (10)	17 (16)	25 (26)	5 (6)	
		19.5	100	11	20	25	12
	78.1	93 (97)	7 (9)	17 (19)	25 (25)	12 (12)	
		87	9	17	33	6	
		100 (94)	11 (10)	11 (14)	37 (35)	6 (6)	
	313	76	13	18	21	11	
		89 (83)	11 (12)	17 (18)	26 (24)	10 (11)	
		1250	102	11	25	37	4
	5000	82 (92)	9 (10)	22 (24)	36 (37)	7 (6)	
		108	14	22	22	9	
87 (98)		15 (15)	20 (21)	30 (26)	6 (8)		
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	368	572	99	424	435
			393	532	76	417	344
		/プレート	367 (376)	544 (549)	71 (82)	397 (413)	304 (361)
	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		529	270	229	250	76	
		535	237	230	254	87	
	/プレート	459 (508)	256 (254)	247 (235)	227 (244)	103 (89)	

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide
 NaN₃ : Sodium azide
 9-AA : 9-Aminoacridine hydrochloride monohydrate
 2-AA : 2-Aminoanthracene

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

表-2 試験結果表(本試験)

代謝活性化系の有無	検体の用量 (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	86	4	10	14	1	
		82	6	19	23	1	
		78 (82)	7 (6)	15 (15)	21 (19)	4 (2)	
	313	77	6	25	12	0	
		80 (79)	11 (9)	20 (23)	21 (17)	2 (1)	
		625	100	4	21	10	4
	1250	82 (91)	6 (5)	17 (19)	13 (12)	4 (4)	
		95	12	16	14	4	
		82 (89)	5 (9)	15 (16)	17 (16)	2 (3)	
	2500	86	5	17	14	3	
		74 (80)	5 (5)	18 (18)	18 (16)	2 (3)	
		5000	82	14	10	15	0
79 (81)	9 (12)	19 (15)	12 (14)	2 (1)			
	陰性対照	106	13	11	22	5	
		74	12	20	15	9	
102 (94)		5 (10)	23 (18)	19 (19)	7 (7)		
313	87	5	17	34	6		
	88 (88)	9 (7)	11 (14)	28 (31)	10 (8)		
	625	83	7	23	25	4	
1250	92 (88)	7 (7)	15 (19)	19 (22)	7 (6)		
	80	6	22	21	7		
	96 (88)	7 (7)	18 (20)	26 (24)	10 (9)		
2500	114	5	13	29	10		
	112 (113)	8 (7)	18 (16)	27 (28)	13 (12)		
	5000	94	13	22	33	11	
110 (102)	15 (14)	16 (19)	25 (29)	10 (11)			
	陽性	名 称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA
		用量(μg /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	337	445	98	344	364	
		332	385	87	355	335	
	/プレート	340 (336)	438 (423)	111 (99)	342 (347)	449 (383)	
対照	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	
S9mixを必要とするもの	コロニー数	442	201	229	243	75	
		460	218	285	280	79	
	/プレート	437 (446)	182 (200)	245 (253)	282 (268)	87 (80)	

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide
 NaN₃ : Sodium azide
 9-AA : 9-Aminoacridine hydrochloride monohydrate
 2-AA : 2-Aminoanthracene

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

以 上

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。

2021年11月30日

中村 鉄平