

2010年9月3日

## 分析結果報告書

株式会社日新化学研究所  
坂井 恵梨子 様

(株) UBE 科学分析センター  
安全性評価研究室  
〒755-8633 宇部市大字小串 1978-5  
TEL 0836-31-5809  
FAX 0836-31-6509

2010年8月19日にご依頼のありました件（受付 No.120113）につきまして下記の通りご報告申し上げます。

### 記

1.表題	
Ames 試験（簡易試験）	
2. 試験結果	
被験物質	判定
Accucide 100	陰性

本分析に関するお問い合わせは 藤井 <28383u@ube-ind.co.jp> までお願いします。

室長	担当者
	

## 微生物を用いる変異原性試験 (Ames 試験)

### 試験材料および方法

#### 1.被験物質

Accucide 100

#### 2.対照物質

陽性対照物質としては 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF-2, 和光純薬工業)および 2-aminoanthracene (2AA, 和光純薬工業)を用いた。陰性対照としては被験物質の溶媒 dimethylsulfoxide (DMSO, 関東化学)をそのまま用いた。

#### 3.Ames 試験

##### 1)被験物質溶液の調製

被験物質は用時 DMSO に溶解して調製した。最高用量が 5000 $\mu$ g/plate になるように調製し、これ以下の用量は希釈法により調製した。一方、陽性対照物質は安衛法ガイドライン (労働省安全衛生部化学物質調査課, 1991) に準じた用量で DMSO に溶解した。

##### 2)使用菌株

*Salmonella typhimurium* (ネズミチフス菌) の TA100 株を用いた。これは日本バイオアッセイ研究センターより分与されたものを特性確認後、DMSO を加えた培地で凍結保存(-80 $^{\circ}$ C)したものを試験に用いた。

##### 3)前培養

凍結菌株を解凍後、2.5% nutrient broth(OXOID No.2)水溶液に接種し、37 $^{\circ}$ C で 7 時間振盪培養した菌懸濁液を試験に用いた。

##### 4)培地

検定用培地には、最小グルコース寒天平板培地 (バイタルメディア AMT-S, 極東製薬工業株式会社)を用いた。トップアガーは Bacto Agar(Difco)0.6%と NaCl 0.5%の割合で調製した水溶液に、0.5mM L-histidine および 0.5mM D(+)-biotin の水溶液を用時に混合した。

##### 5) S9mix

S9 (誘導剤: phenobarbital と 5,6-benzoflavone の併用) はキッコーマン株式会社より購入し、S9mix を調製した。S9mix 1.0mL の組成は、S9 0.1mL, KCl 33 $\mu$ mol, MgCl<sub>2</sub> 8 $\mu$ mol, glucose-6-phosphate 5 $\mu$ mol, NADH 4 $\mu$ mol, NADPH 4 $\mu$ mol, Na-phosphate buffer (pH7.4) 100 $\mu$ mol および精製水 0.9mL とした。

##### 6)試験方法

試験は、S9mix を添加しない試験系 (-S9) と添加する試験系 (+S9) について安衛法ガイドラインに従い、preincubation 法で実施した。用量設定は 5000 $\mu$ g/plate を最高用量として、公比 2 で計 8 段階を設定した。各菌株についてプレート 2 枚を設けた。

滅菌試験管に、被験液 0.1mL と 0.1M Na-phosphate buffer または S9mix 0.5mL および菌懸濁液 0.1mL を順次分注し、37 $^{\circ}$ C で 20 分振盪させながら preincubation を行った。終了後、45 $^{\circ}$ C に保温したトップアガー 2mL を加えて混合し、最小グルコース寒天平板培地に重層した。固化後、プレートを上下転倒し、37 $^{\circ}$ C で 48 時間培養した。

培養終了後、実体顕微鏡にて菌の生育状態を調べた。さらに、プレート上の沈殿物を観察した後、復帰変異コロニー数を肉眼あるいはコロニーカウンターを用い計測した。

##### 7)判定基準

安衛法ガイドラインに準じて、復帰変異コロニー数が陰性対照の 2 倍以上の値を示し、さらに用量依存性が確認された場合を陽性と判定した。

### 試験結果

被験物質 Accucide 100は、本試験条件下においては陰性であった。

## 試験結果表 (簡易試験)

被験物質の名称 : Accucide 100

試験実施期間		2010年8月31日 より 2010年9月2日	
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	復帰変異コロニー数/プレート	
		塩基対置換型	
		TA100	
- S9mix	陰性対照	77	83 ( 80)
	39.1	92	70 ( 81)
	78.1	85	92 ( 89)
	156	80	72 ( 76)
	313	88	65 ( 77)
	625	76	99 ( 88)
	1250	104	90 ( 97)
	2500	101	101 ( 101)
	5000	0	0 ( 0)*
+ S9mix	陰性対照	84	77 ( 81)
	39.1	84	112 ( 98)
	78.1	83	111 ( 97)
	156	71	93 ( 82)
	313	100	79 ( 90)
	625	114	96 ( 105)
	1250	108	80 ( 94)
	2500	81	120 ( 101)*
	5000	1	12 ( 7)*
陽性対照	S9mixを必要としないもの	名称	AF-2
		用量( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	0.01
		コロニー数/プレート	613 572 ( 593)
	S9mixを必要とするもの	名称	2AA
		用量( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	1
		コロニー数/プレート	951 940 ( 946)

注) 陽性対照化合物 :

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド\*

2AA : 2-アミノアントラセン

\* : 被験物質による生育阻害作用が認められた。

( ) 内の数字はプレートの平均を示す。

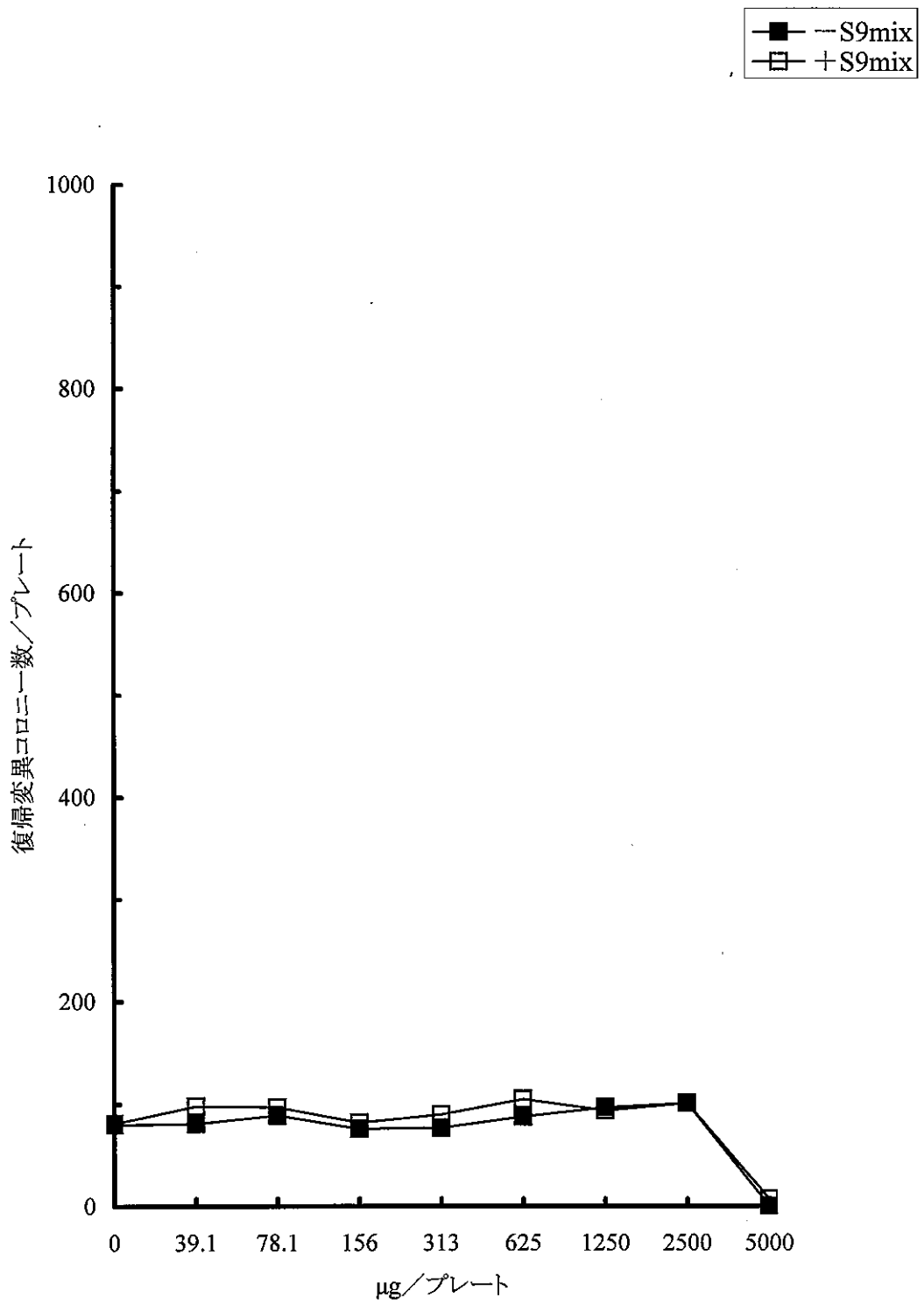


図 1 用量-反応曲線 (簡易試験)  
 被験物質 : Accucide 100  
 菌株 : TA100