



受付番号 836-09-T-6346

最 終 報 告 書

財団法人化学物質評価研究機構

日田事業所



表 題 MSM パウダーの微生物を用いる変異原性試験

試験委託者 クロレラ工業株式会社
〒105-0012 東京都港区芝大門 2-4-6

要 約 MSM パウダーの突然変異誘発能の有無を代謝活性化系(S9 mix)非存在下及び存在下でネズミチフス菌 TA100、TA1535、TA98、TA1537 及び大腸菌 WP2uvrA を用いてプレインキュベーション法により検討した。

いずれの菌株においても復帰変異コロニー数は陰性対照値の2倍未満であったため、変異原性は陰性と考えられる。

最終報告書作成者の署名

試 験 責 任 者:

2009 年 10 月 21 日

小 椋 正 造

本文書は正本を正確に転写したものです。

財団法人 化学物質評価研究機構 日田事業所

2009 年 10 月 21 日

小 椋 正 造

試験コード番号: P01-4562

被験物質コード番号: HR8136

委託者コード番号: K-0500

試験施設 財団法人化学物質評価研究機構 日田事業所
〒877-0061 大分県日田市石井町3丁目822番地

試験目的 ネズミチフス菌及び大腸菌を用いて、被験物質の突然変異誘発能の有無を検索する。

試験法 「有害性の調査の基準」(労働省告示第77号、昭和63年9月1日及び労働省告示第67号、平成9年6月2日)及び「微生物を用いる変異原性試験の具体的手法及び試験結果の評価方法について」(平成11年2月8日付事務連絡)に定める試験方法に一部準拠した。

試験日程

試験開始日	2009年9月25日
実験開始日	2009年10月9日
実験終了日	2009年10月13日
試験終了日	2009年10月21日

試験責任者: 小 椋 正 造
所 属: 日田事業所 試験第三課

資料の保管場所及び保管期間

生データ、試験計画書、試験委託書、被験物質調査票、最終報告書、その他の記録文書は、試験施設の資料保管室で、試験終了日から5年間保管する。保管期限後の処置は試験委託者の承認を得る。

正本の保管

試験計画書及び最終報告書の正本は1部とし、試験施設で保管する。また、試験責任者が正本と相違ないことを証明した写しを試験委託者に送付する。

試験材料及び試験方法

1. 被験物質

名称	ロット番号	外観	純度	分子量
MSM パウダー	0903001	白色粉末	99.9% (GC 面積百分率)	94.13
室温 (被験物質保管室、デシケーター2、許容温度範囲: 10~30℃)で保管し、残余物は試験委託者に返却する。				

2. 試験に用いた菌株

ネズミチフス菌 TA100、TA1535、TA98 及び TA1537 と大腸菌 WP2*uvrA* を用いた。

3. 培 地

3.1 最少グルコース寒天平板培地(プレート)

テスメディア AN (オリエンタル酵母工業株式会社)を用いた。

3.2 軟寒天

寒天(Bacto Agar、Difco Laboratories) 0.6 w/v%及び塩化ナトリウム 0.5 w/v%を含む溶液に、ネズミチフス菌にはヒスチジン 0.5 mM 及びビオチン 0.5 mM の溶液を、大腸菌にはトリプトファン 0.5 mM 溶液を容量比 10:1 で混合した。

4. S9 mix

1 mL の S9 mix には、MgCl₂ を 8 µmol、KCl を 33 µmol、グルコース-6-リン酸を 5 µmol、NADPH を 4 µmol、NADH を 4 µmol、ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)を 100 µmol、ラット肝 S9 (オリエンタル酵母工業株式会社)を 0.1 mL 含む。

5. 試験菌株の前培養

Nutrient broth No.2 (OXOID Ltd.) 11 mL を分注した L 字管に保存菌株を接種し、シーソー式振とう機(MONOSIN-II A、タイテック株式会社)により約 50 回/分の振とう回数で 37±0.5℃にて 9 時間振とう培養した。

6. 被験物質の調製

6.1 溶 媒

蒸留水(注射用蒸留水、株式会社 大塚製薬工場)を用いた。

6.2 調製時期

用時に調製した後、室温・黄色灯下で保存し2時間以内に使用した。

7. 変異原性試験

S9 mix 非存在下及び存在下でプレインキュベーション法により試験を実施した。陰性対照には3枚のプレートを用い、陽性対照及び被験物質処理群には用量当たり2枚のプレートを用いた。

7.1 操作手順

0.1 mL の被験物質、溶媒又は陽性対照物質の調製液、0.5 mL の 0.1 M ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)又は S9 mix、0.1 mL の菌培養液を試験管に加えて $37\pm0.5^{\circ}\text{C}$ で 20 分間振とうした。軟寒天 2 mL を加え混合した後、プレートに重層した。 $37\pm0.5^{\circ}\text{C}$ で 48 時間培養した後、出現した復帰変異コロニー数を計数した。

陰性対照として使用溶媒を用い、試験菌株に応じて下記の陽性対照物質を使用する。

	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
-S9 mix	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	ICR-191
	0.01	0.5	0.01	0.1	0.5
+S9 mix	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
	1	2	10	0.5	2

7.2 用量設定

5000 μg /プレートを最高に、公比 2 で希釈した 2500、1250、625、313 及び 156 μg /プレートの6段階の用量を設定した。

8. 観察・計数

培養終了時に、被験物質の沈殿を肉眼で、生育阻害の有無を実体顕微鏡で観察し、手動カウンター及びコロニーアナライザー(CA-11D、システムサイエンス株式会社)で計数した。コロニーアナライザーでは、機器の計数値を面積補正及び数え落とし補正した値をコロニー数とした。

9. 結果の判定基準

復帰変異コロニー数が陰性対照値の2倍以上に増加した場合を陽性とし、それ以外の場合を陰性とした。

考察及び結論

試験の結果、S9 mix の有無にかかわらず、いずれの試験菌株においても復帰変異コロニー数は陰性対照値の 2 倍未満であったため、変異原性は陰性と判定した。

生育阻害及び被験物質の沈殿は認められなかった。

以上の結果から、本試験条件下では MSM パウダーには復帰突然変異誘発能はないものと判断した。

表 1

試 験 結 果 表 (本試験)

被験物質名称: MSMパウダー

試験実施期間		2009/10/9~2009/10/13				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (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
-S9 mix	陰性対照	96	8	20	22	7
		110 (109)	7 (7)	20 (22)	29 (28)	12 (8)
		122	7	25	34	6
	156	109 (113)	5 (7)	29 (26)	31 (27)	11 (11)
		116	8	23	23	10
	313	112 (115)	6 (8)	28 (29)	15 (19)	11 (11)
		117	10	29	23	10
	625	105 (107)	8 (10)	14 (21)	16 (19)	7 (9)
		109	12	27	22	10
	1250	114 (107)	6 (9)	23 (30)	29 (31)	7 (9)
		99	11	36	33	10
	2500	101 (115)	11 (10)	31 (25)	26 (25)	4 (6)
		128	9	19	23	8
	5000	110 (113)	12 (12)	26 (27)	18 (20)	8 (8)
		116	12	28	21	7
+S9 mix	陰性対照	94	7	38	31	13
		105 (104)	8 (8)	29 (33)	26 (31)	20 (17)
		112	10	33	36	19
	156	112 (119)	8 (9)	22 (21)	28 (32)	15 (16)
		126	10	20	36	16
	313	117 (114)	6 (6)	34 (32)	30 (30)	17 (14)
		110	6	30	29	11
	625	126 (127)	5 (5)	25 (26)	34 (28)	13 (12)
		128	4	27	21	11
	1250	140 (128)	14 (13)	25 (25)	23 (30)	10 (11)
		116	12	25	37	12
	2500	133 (127)	10 (9)	19 (21)	27 (25)	18 (17)
		121	7	22	23	15
	5000	129 (119)	11 (11)	35 (30)	33 (31)	15 (16)
		109	11	25	28	16
陽性対照	S9mixを必要としないもの	名 称	AF-2	NaN ₃	AF-2	ICR-191
		用量(μ g/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1
		コロニー数/プレート	580 (577)	240 (217)	266 (264)	537 (525)
	S9mixを必要とするもの	名 称	2AA	2AA	2AA	2AA
		用量(μ g/プレート)	1	2	10	0.5
		コロニー数/プレート	1179 (1184)	255 (259)	502 (485)	286 (295)

[備考]

- ・ (): プレートのコロニー数の平均値。
- ・ AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
- ・ NaN₃: アジ化ナトリウム
- ・ ICR-191: 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl
- ・ 2AA: 2-アミノアントラセン

用量反応曲線(本試験)

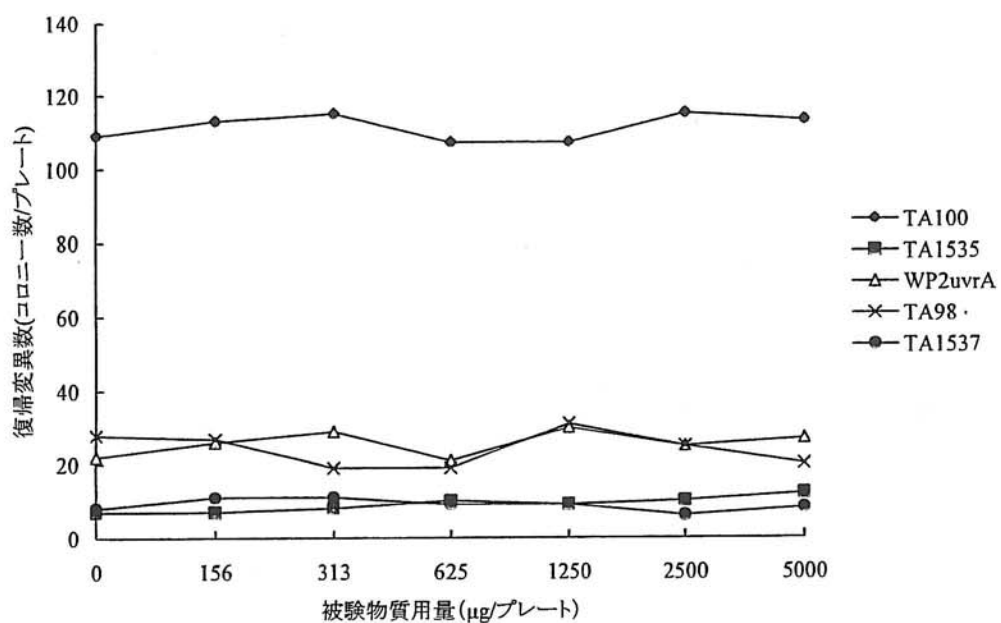


図1 -S9 mix における用量反応曲線

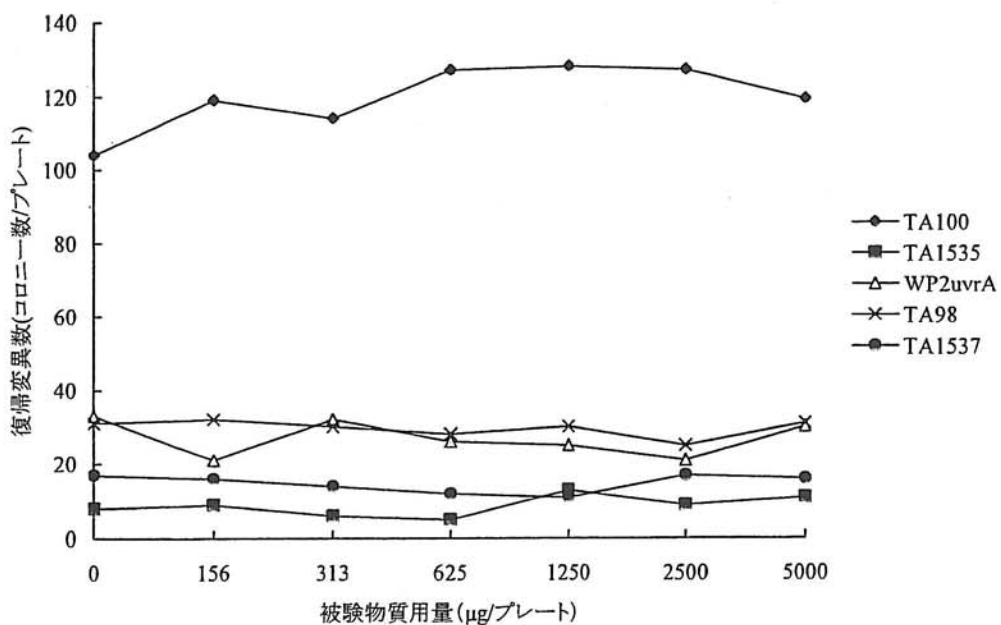


図2 +S9 mix における用量反応曲線

ヒストリカルデータ テスメディアAN培地

2009年4月～2009年9月

陰性対照(平均±3S.D.)

	-S9 mix					+S9 mix				
	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
平均値	107	11	25	21	9	113	10	29	30	18
標準偏差	16	4	7	6	3	15	4	8	7	6
上限	155	23	46	39	18	158	22	53	51	36
下限	59	1	4	3	1	68	1	5	9	1

陽性対照(平均±3S.D.)

	-S9 mix					+S9 mix				
	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	ICR-191	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
用量 (μg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	0.5	1	2	10	0.5	2
平均値	610	295	292	505	1555	1196	299	615	273	350
標準偏差	75	51	58	69	301	158	31	139	42	48
上限	835	448	466	712	2458	1670	392	1032	399	494
下限	385	142	118	298	652	722	206	198	147	206

[備考]

- ・ AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
- ・ NaN₃: アジ化ナトリウム
- ・ ICR-191: 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl
- ・ 2AA: 2-アミノアントラセン