

株式会社 JA アグリひみ 御中

2008年11月25日

微生物を用いる変異原性試験報告書 (AMES 試験)

株式会社ベルブリッジ
研究ラボ



石川県金沢市角間町
金沢大学 ベンチャービジネスラボラトリー

微生物を用いる変異原性試験報告書

株式会社ベルブリッジ
研究ラボ

石川県金沢市角間町
金沢大学 ベンチャービジネスラボラトリー

微生物を用いる変異原性試験報告書

1. 被験物質

被験物質の名称	滅菌ハトムギ分解エキス
---------	-------------

2. 試験に用いた菌株

菌株名	入手先	入手年月日
TA100	日本バイオアッセイ研究センター	1995年 6月 29日
TA1535	日本バイオアッセイ研究センター	1995年 6月 29日
TA98	日本バイオアッセイ研究センター	1995年 6月 29日
TA1537	日本バイオアッセイ研究センター	1995年 6月 29日
WP2uvrA	日本バイオアッセイ研究センター	1995年 6月 29日

3. S9 mix

(1) S9の入手方法等

自製・購入の別	1.自製 2.購入(製造元：キッコーマン株式会社)
製造年月日	2008年8月1日 製造
購入の場合の Lot No.	RAA-580
保存温度	-80℃

(2) S9の調製方法

使用動物		誘導物質	
種・系統	ラット Sprague-Dawley	名称	フェノバルビタール(PB)及び 5,6-ベンゾフラボン(BF)
性	雄	投与方法	腹腔内投与
週令	7週	投与期間及び 投与量 (g/kg 体重)	1日目投与開始：PB 0.03
体重	213-248g		2日目～4日目：PB 0.06 3日目：BF 0.08

(3) S9 mixの組成

成分	S9 mix 1ml 中の量	成分	S9 mix 1ml 中の量
S9	0.1 ml	NADPH	4μmol
MgCl ₂	8μmol	NADH	4μmol
KCl	33μmol	Na-リン酸緩衝液	100μmol
グルコース-6-リン酸	5μmol	その他()	

4. 被験物質溶液の調製

使用溶媒	名称	製造元	Lot No.	グレード	純度(%)
	ジメチルスルホキシド (DMSO)	関東化学株式会社	906X2040	分光分析用	99.7%
溶液の調製から使用までの保存時間と温度	用量設定試験	0時間 15分	27℃		
	本試験	0時間 12分	27℃		
純度換算の有無	有			無	

5. 前培養の条件等

(1)条件

ニュートリエントブロス	名称	製造元	Lot No.
	Nutrient Broth No.2	Oxoid	464616
前培養時間	7時間 00分		
培養容器(形状・容量)	形状:L型試験管 容量:30ml		
培養液量	10ml	接種菌量	20 μ l (大腸菌のみ 5 μ l)

(2)前培養終了時の生菌数等

菌株名		塩基対置換型			7 μ m37型	
		TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
生菌数 ($\times 10^9$ cells/ml)	用量設定試験	3.89	3.28	5.85	3.08	1.69
	本試験	3.56	3.31	5.77	3.03	1.66
測定方法 (いずれかを○で囲むこと。)		<input checked="" type="radio"/> 1. O.D.値よりの換算 <input type="radio"/> 2. 段階希釈法 <input type="radio"/> 3. その他()				

6. 最小グルコース寒天平板培地

自製・購入の別	1.自製 <input checked="" type="radio"/> 2.購入(製造元: 極東製薬工業株式会社)
製造年月日	2008年6月13日 製造
購入の場合の Lot No.	DZA96D01
使用寒天の名称・製造元・Lot No.	大洋寒天・清水食品・BM-M5-228

7. 試験の方法

(1)試験方法とその選定理由

採用した試験方法	①.プレインキュベーション法 2.プレート法 3.その他(改良プレインキュベーション法)
----------	---

(2)試験条件

組成	菌懸濁液	0.1ml
	被験物質溶液	0.1ml
	Na-リン酸緩衝液(直接法による場合)	0.5ml
	S9 mix(代謝活性化法による場合)	0.5ml
	トッペアガー	2.0ml
	その他()	
プレインキュベーション	温度	37℃
	時間	20分
インキュベーション	温度	37℃
	時間	48時間

8.コロニー計測の方法

計測方法	1.マニュアル計測 ②.機器計測
補正の有無	1.無* ¹ ②.有* ² (補正の方法:面積補正及び数え落とし補正)

*1 マニュアル計測の場合 *2 機器計測の場合

9. 試験の結果

(1)試験の結果は別表1～別表2による。


(2)結果の判定

判定 (いずれかを○で囲むこと。)	陽性	②.陰性
<p>判定の理由</p> <p>被験物質、滅菌ハトムギ分解エキスについて、ネズミチフス菌 <i>S.typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537 および大腸菌 <i>E.coli</i> WP2uvrA を使用して、変異原性試験を実施した。</p> <p>その結果、陽性判定の基準となる復帰変異コロニー数の最高値が陰性対照値の2倍以上に増加しなかったことから陰性と判定した。</p>		

(3)参考事項

すべての試験において、生育阻害及び被験物質の沈殿は認められなかった。
無菌試験については、用量設定試験および本試験のいずれにおいても菌の生育はみられなかった。

10. その他

試験実施施設	名称	株式会社ユービーイー科学分析センター	
	所在地	〒755-8633 山口県宇部市大字小串字沖の山 1978-6	電話 0836(31)5809 FAX 0836(31)6509
試験責任者	職氏名	主席研究員	藤井 伸芳 
試験番号 (受付番号)	USA-R-08648 (109702)		
試験期間	2008年10月20日～2008年11月4日		

別表 1

用量設定試験結果表

被験物質の名称： 滅菌ハトムギ分解エキス

試験実施期間		2008年10月20日より 2008年10月23日									
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	84	(80)	6	(11)	19	(25)	13	(16)	5	(5)
		75		15		30		18		4	
	4.88	85	(88)	11	(8)	29	(25)	13	(16)	3	(4)
		90		5		20		18		5	
	19.5	69	(74)	10	(10)	25	(28)	11	(13)	3	(4)
		79		10		30		14		5	
	78.1	72	(76)	7	(8)	23	(28)	17	(19)	6	(6)
		79		9		32		21		6	
	313	76	(73)	8	(9)	20	(25)	23	(21)	1	(3)
		70		10		29		18		4	
	1250	95	(92)	6	(6)	28	(26)	16	(16)	9	(6)
		88		6		24		16		3	
	5000	78	(77)	6	(6)	39	(34)	13	(14)	9	(8)
		75		6		29		15		6	
+S9 mix	陰性対照	80	(74)	6	(8)	43	(37)	26	(26)	8	(9)
		68		9		30		25		10	
	4.88	77	(78)	5	(10)	29	(30)	19	(23)	9	(8)
		78		15		30		26		6	
	19.5	71	(80)	10	(8)	27	(33)	30	(31)	11	(9)
		89		5		39		32		6	
	78.1	96	(98)	9	(11)	29	(32)	22	(23)	20	(15)
		100		13		34		23		10	
	313	81	(79)	8	(7)	49	(39)	20	(22)	16	(12)
		76		5		29		23		8	
	1250	93	(85)	10	(9)	22	(29)	27	(30)	11	(10)
		77		8		36		33		8	
	5000	97	(101)	8	(6)	25	(37)	33	(36)	6	(6)
		104		4		48		38		6	
陽性対照	S9 mixを必要とするもの	名称	AF-2 ¹⁾	NaN ₃ ²⁾	AF-2	AF-2	9-AA ³⁾				
		用量 (μ g/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	80				
	コロニー数/プレート	703	(658)	344	(353)	194	(199)	719	(640)	219	(215)
		613		361		203		561		210	
	S9 mixを必要とするもの	名称	2-AA ⁴⁾	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA				
		用量 (μ g/プレート)	1.0	2.0	10	0.5	2.0				
コロニー数/プレート	1527	(1512)	305	(300)	935	(881)	382	(426)	125	(133)	
	1497		294		827		470		141		

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

2)NaN₃ :Sodiumazide

3)9-AA :9-Aminoacridine

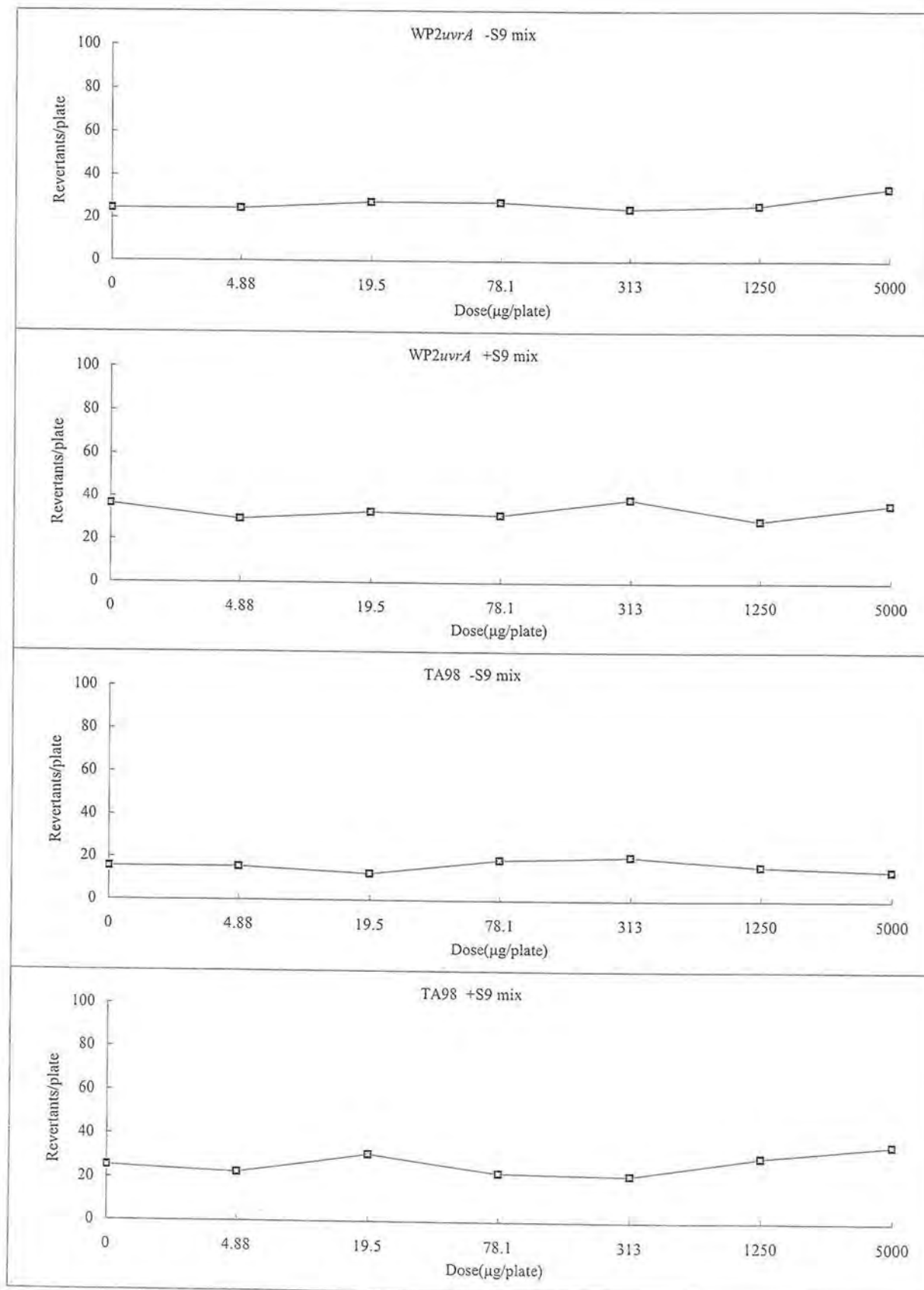
4)2-AA :2-Aminoanthracene

[備考]

- 1 数値右の*印は、菌の生育阻害が認められるもの。
- 2 用量右の†印は、被験物質の沈殿が認められるもの。
- 3 () 内は、各プレートのコロニー数の平均値。

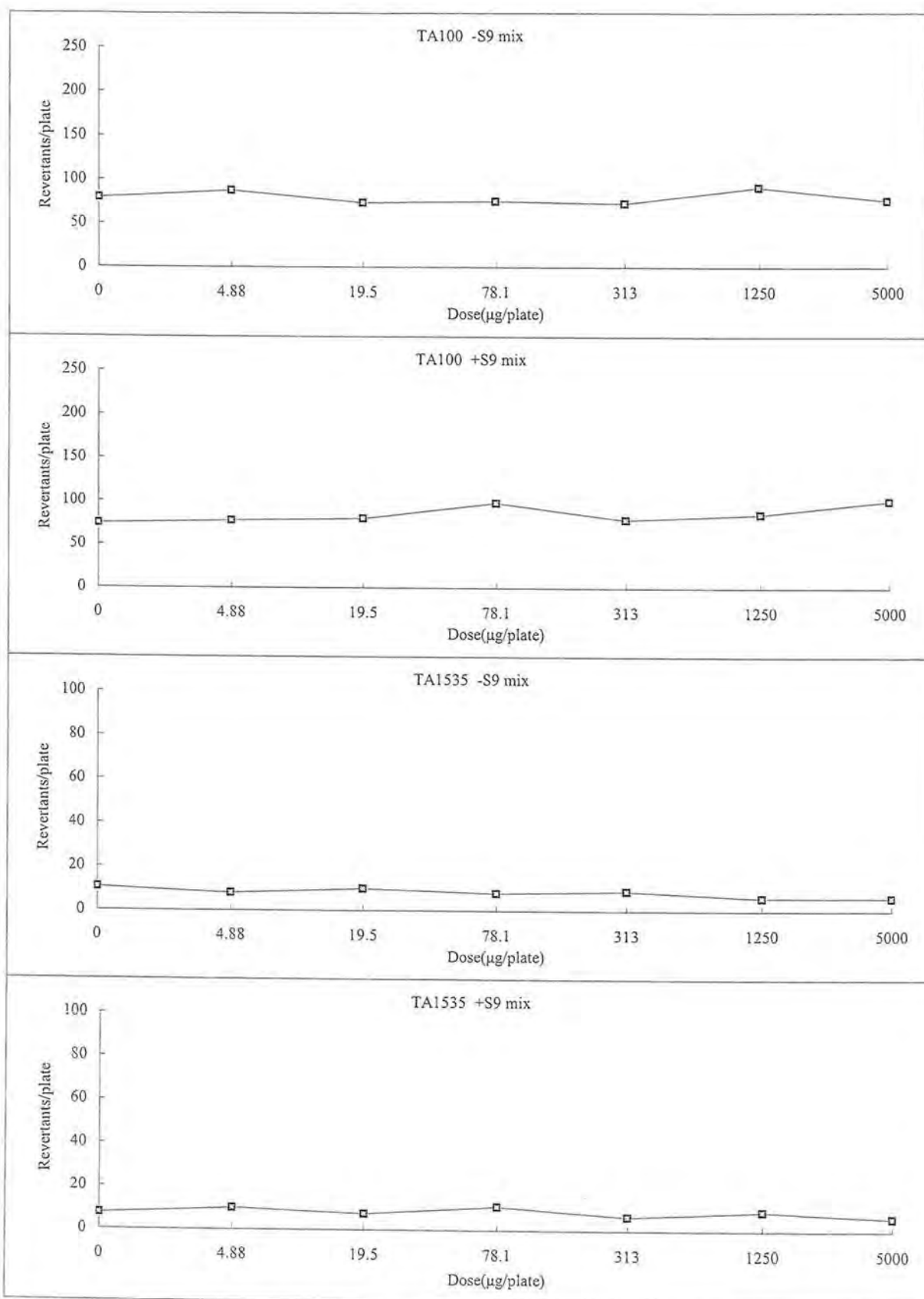
別添 2

用量反応曲線(用量設定試験)



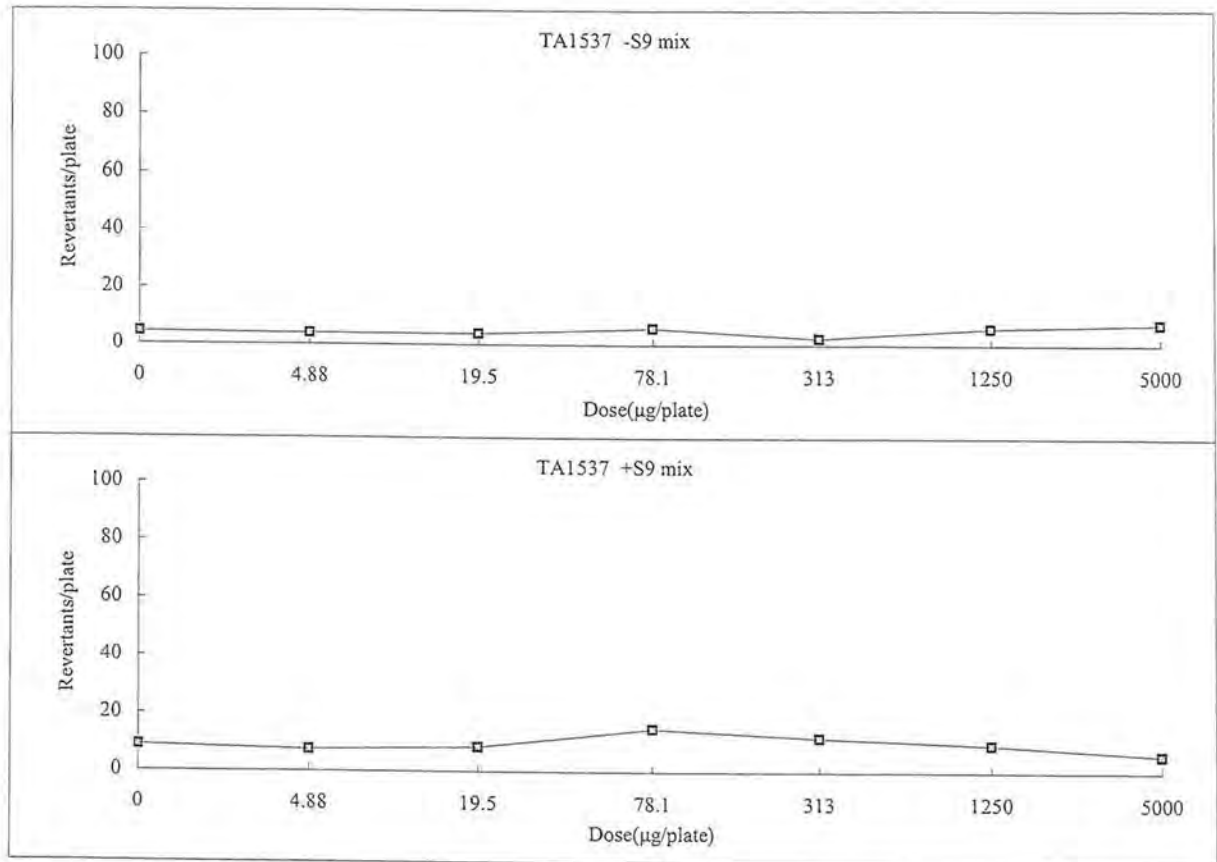
別添 1

用量反応曲線(用量設定試験)



別添 3

用量反応曲線(用量設定試験)



別表 2

本試験結果表

被験物質の名称： 滅菌ハトムギ分解エキス

試験実施期間		2008年10月27日より 2008年10月29日									
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	63	(68)	9	(10)	25	(22)	10	(13)	5	(6)
		72		11		18		15		6	
	156	83	(84)	8	(6)	18	(21)	9	(7)	6	(5)
		84		4		23		5		3	
	313	67	(71)	6	(7)	23	(28)	6	(13)	3	(6)
		75		8		32		19		9	
	625	93	(93)	6	(4)	36	(25)	19	(16)	5	(7)
		92		2		13		13		8	
	1250	83	(88)	5	(4)	25	(20)	11	(11)	4	(3)
		92		3		15		11		1	
	2500	96	(95)	4	(7)	14	(17)	16	(14)	9	(8)
		94		10		19		11		6	
	5000	100	(89)	7	(8)	23	(26)	20	(15)	13	(9)
		78		9		28		9		4	
+S9 mix	陰性対照	93	(92)	6	(8)	29	(28)	13	(17)	14	(13)
		91		9		27		20		11	
	156	98	(87)	4	(5)	34	(29)	22	(23)	6	(8)
		75		6		23		23		9	
	313	88	(91)	3	(6)	25	(27)	18	(24)	5	(5)
		93		8		28		29		5	
	625	124	(117)	14	(10)	29	(36)	25	(22)	10	(10)
		109		5		42		19		9	
	1250	77	(90)	5	(7)	25	(28)	16	(21)	6	(9)
		102		8		30		25		11	
	2500	98	(94)	1	(4)	32	(33)	27	(23)	5	(10)
		90		6		33		19		14	
	5000	81	(91)	3	(7)	33	(35)	22	(19)	9	(8)
		100		10		37		15		6	
陽 性 対 照	S9 mix を必要 としな いもの	名称	AF-2 ¹⁾	NaN ₃ ²⁾	AF-2	AF-2	9-AA ³⁾				
		用量 (μ g/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	80				
対 照	S9 mix を必要 とする もの	コロニー数 /プレート	594 (610)	322 (335)	146 (160)	521 (549)	197 (201)				
		626	347	173	576	205					
		名称	2-AA ⁴⁾	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA				
		用量 (μ g/プレート)	1.0	2.0	10	0.5	2.0				
		コロニー数 /プレート	1183 (1207)	363 (359)	1059 (1087)	483 (484)	142 (149)				
		1230	354	1114	484	156					

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

2)NaN₃ :Sodiumazide

3)9-AA :9-Aminoacridine

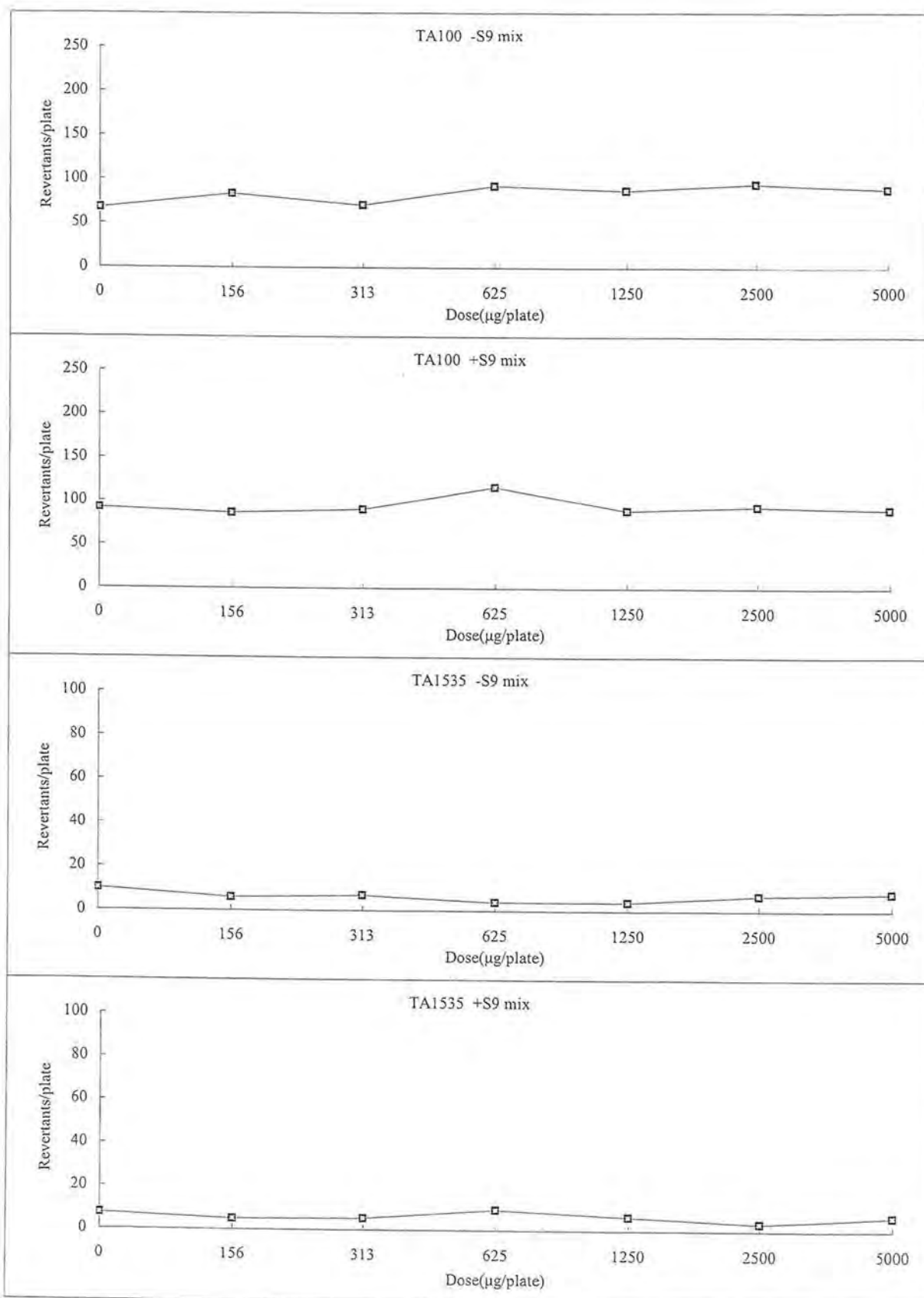
4)2-AA :2-Aminoanthracene

[備考]

- 1 数値右の*印は、菌の生育阻害が認められるもの。
- 2 用量右の†印は、被験物質の沈殿が認められるもの。
- 3 () 内は、各プレートのコロニー数の平均値。

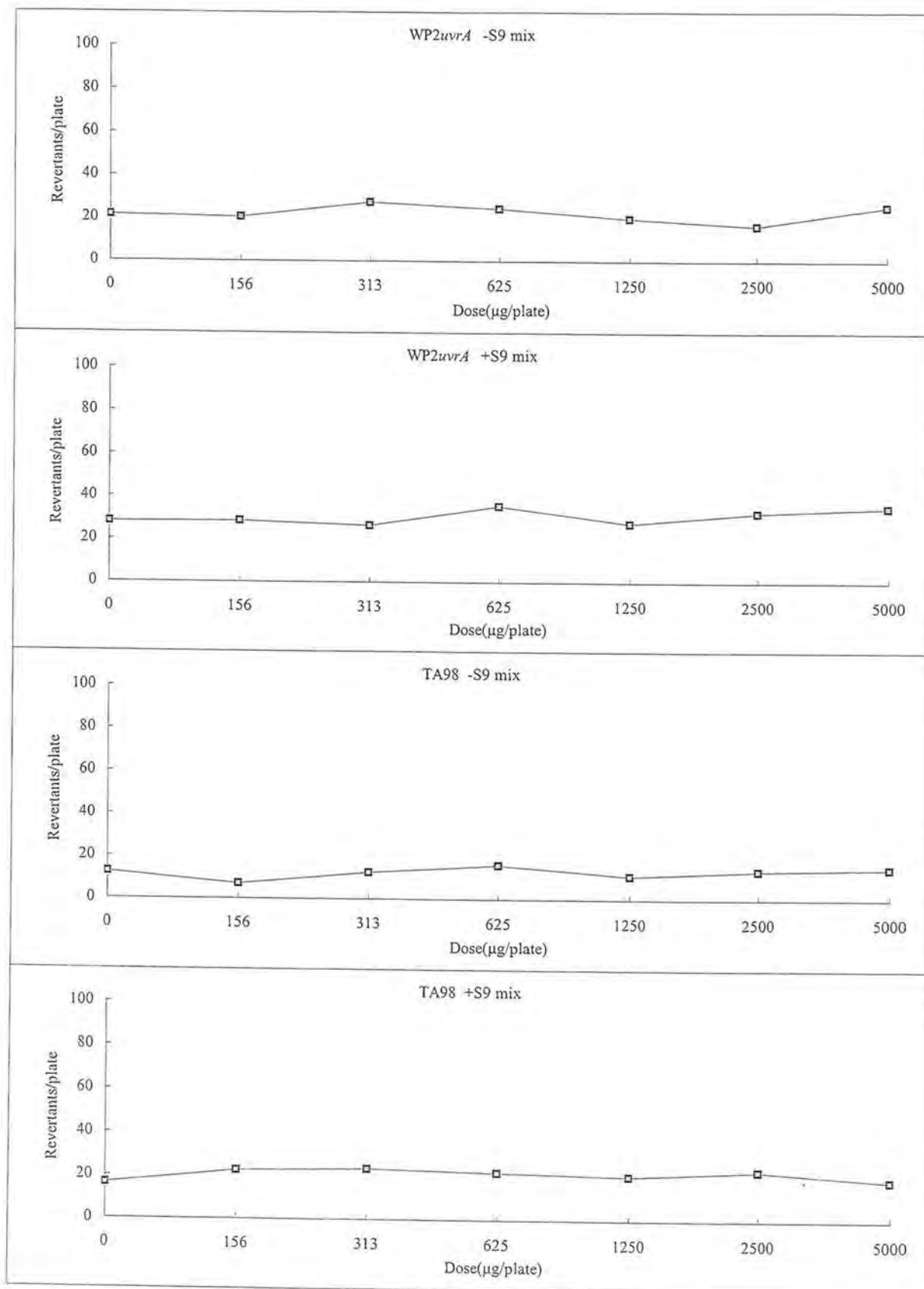
別添 4

用量反応曲線(本試験)



別添 5

用量反応曲線(本試験)



別添 6

用量反応曲線(本試験)

