

②変異原性試験

細菌を用いる復帰突然変異試験（資料24）

試験機関：財団法人 化学品検査協会 化学品安全センター日田研究所

報告書作成年：1994年

公表：有

論文著者；稲井恒彦ら

文献名；超酸化水の安全性試験(第3報)細菌を用いる復帰突然変異試験

発行年月日；応用薬理48(3) p179~181 (1994) Received April 22, 1994

検体：pH 2.24、有効塩素濃度30-50 ppmの電解次亜塩素酸水

試験方法

ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA100、TA1535、TA98、TA1537) 及びトリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* WP2 uvrA 株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 Mix) で直接法および代謝活性化法についてプレインキュベーション法で試験した。検体は希釈せずに 62.5~1000 μ l/plate の範囲の5用量で実施した。

用量設定根拠

使用するすべての試験菌株を用いて、被験物質の用量設定試験を実施したところ、直接法の 1000 μ l/plate においてすべての試験菌株で生育阻害作用が認められた。代謝活性化法では生育阻害は認められなかった。したがって、被験物質の用量は、代謝活性化系の有無にかかわらず、1000 μ l/plate を最高に、公比 2 で希釈した 500、250、125 および 62.5 μ l/plate の 5 用量を設定した。

試験結果

結果を次表に示した。代謝活性化系の有無に関わらず、62.5~1000 μ l/plate の濃度範囲ですべての試験菌株において復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。一方陽性対照物質では、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数の著しい増加が認められた。

以上の結果より、電解次亜塩素酸水は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性は有しないものと判断される。

薬物		濃度 (μ l/ plate)	S-9 Mix の 有無	復帰変異コロニー数/plate				
				塩基置換型			フレームシフト型	
				TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
対照	水道水	1000	—	114	13	47	22	10
	KCl-HCl*	500	—	115	11	45	27	12
検体		62.5	—	126	11	45	20	9
		125	—	125	13	41	19	11
		250	—	121	16	50	18	13
		500	—	137	12	63	21	11
		1000	—	84▲	9▲	27▲	15▲	7▲
対照	水道水	1000	+	122	15	50	30	15
	KCl-HCl*	500	+	127	14	51	27	16
検体		62.5	+	123	12	54	31	14
		125	+	134	12	53	33	13
		250	+	124	16	51	31	11
		500	+	125	15	49	38	15
		1000	+	134	17	42	39	16
陽性 対照	AF-2**	0.01	—	633	—	610	—	—
		0.1	—	—	—	—	576	—
	NaN ₃ **	0.5	—	—	291	—	—	—
	ICR-191**	1	—	—	—	—	—	2090
	2AA**	0.5	+	—	—	—	184	—
		1	+	703	—	—	—	—
		2	+	—	184	—	—	173
		10	+	—	—	629	—	—

*KCl-hydrochloric acid buffer (pH 2.0)

** μ g/plate

AF-2, 2-(2-furyl)-3-nitro-2-furyl acrylamide, NaN₃, sodium azide, ICR-191, 2-methoxy-6-chloro-9-(3-(2-chloroethyl)-aminopropylamino) acridine · 2HCl, 2AA, 2-Aminoanthracene, ▲, growth inhibition.

i. 旭ガラスエンジニアリング株式会社

細菌を用いる復帰突然変異試験 (資料 25)

試験機関：財団法人 食品薬品安全センター 秦野研究所

報告書作成年：1994年

公表：無

検体：pH 2.55、有効塩素濃度49.35 ppmの電解次亜塩素酸水

試験方法

ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA100、TA1535、TA98、TA1537) 及びトリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* WP2 uvrA 株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 Mix) で直接法および代謝活性化法についてプレインキュベーション法で試験した。検体は希釈せずに 6.3~100 μ l/plate の範囲の5用量で実施した。

用量設定根拠

1~100 μ l/plate の範囲で公比を約3とし、5段階の用量を設定して試験を行った結果、用いた5種類の検定菌の直接法、代謝活性化法のいずれにおいても、抗菌性は認められず、また陰性および比較対照の2倍以上となる変異コロニー数の増加も認められなかった。したがって、本試験では最高用量を100 μ l/plate とし、公比2で5用量を設定することとした。

試験結果

結果を次表に示した。2回の試験において、代謝活性化系の有無に関わらず、63~100 μ l/plate の濃度範囲ですべての試験菌株において復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。一方陽性対照物質では、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数の著しい増加が認められた。

以上の結果より、電解次亜塩素酸水は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性は有しないものと判断される。

薬物	濃度 (μ l/ plate)	S-9 Mix の 有無	復帰変異コロニー数/plate					
			塩基置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2 uvrA	TA98	TA1537	
対 照	水道水	100	—	117	16	21	25	12
	NaCl-HCl*	100	—	98	14	30	27	9
検 体	6.3	—	—	119	16	37	17	7
	12.5	—	—	99	15	27	23	10
	25	—	—	123	14	29	21	7
	50	—	—	103	14	32	23	8
	100	—	—	115	12	25	24	11
対 照	水道水	1000	+	112	18	34	28	18
	NaCl-HCl*	500	+	117	15	38	38	18
検 体	6.3	+	—	120	15	31	31	15
	12.5	+	—	128	12	24	34	15
	25	+	—	125	13	33	24	17
	50	+	—	110	17	27	35	15
	100	+	—	138	10	23	25	13
陽 性 対 照	AF-2**	0.01	—	526	—	154	—	—
		0.1	—	—	—	—	514	—
	NaN ₃ **	0.5	—	—	324	—	—	—
	9AA**	80	—	—	—	—	—	1103
	2AA**	0.5	+	—	—	—	271	—
		1	+	587	—	—	—	—
		2	+	—	266	—	—	257
		10	+	—	—	975	—	—

*NaCl-hydrochloric acid buffer (pH 2.6)

** μ g/plate

AF-2, 2-(2-furyl)-3-nitro-2-furyl acrylamide, NaN₃, sodium azide, 9AA, 9-aminoacridine,
2AA, 2-Aminoanthracene

ii. アマノ株式会社

細菌を用いる復帰突然変異試験（資料 26）

試験機関：社団法人 北里研究所

報告書作成年：1995年

公表：無

検体：pH 2.52、有効塩素濃度60 ppmの電解次亜塩素酸水

試験方法

ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA100、TA1535、TA98、TA1537) 及びトリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* WP2 uvrA 株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 Mix) で直接法および代謝活性化法についてプレインキュベーション法で試験した。検体は希釈せずに 1~200 μ l/plate の範囲の 6 用量で実施した。

用量設定根拠

200、500 μ l/plate の用量を設定して試験を行った結果、500 μ l/plate の用量でのみ抗菌性が認められた。したがって、本試験では最高用量を 200 μ l/plate とした。

試験結果

結果を次表に示した。2回の試験において、代謝活性化系の有無に関わらず、1~200 μ l/plate の濃度範囲ですべての試験菌株において復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。一方陽性対照物質では、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数の著しい増加が認められた。

以上の結果より、電解次亜塩素酸水は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性は有しないものと判断される。

薬物	濃度 (μ l/ plate)	S-9 Mix の 有無	復帰変異コロニー数/plate					
			塩基置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
対照	0	-	164	20	33	48	26	
検体	1	-	205	15	30	60	17	
	5	-	188	23	21	56	27	
	10	-	194	17	33	40	22	
	50	-	166	21	28	38	22	
	100	-	161	19	24	22	22	
	200	-	93	14	24	10	21	
対照	0	+	190	28	27	54	53	
検体	1	+	203	13	27	48	58	
	5	+	200	20	27	45	65	
	10	+	206	18	28	56	67	
	50	+	191	21	24	43	62	
	100	+	152	14	36	33	65	
	200	+	97	17	20	19	56	
陽性 対照	AF-2*	0.01	-	—	—	67	—	—
		0.1	-	—	—	—	123	—
		2.0	-	406	—	—	—	—
	NaN ₃ *	0.5	-	—	379	—	—	—
		ICR-191*	1	-	—	—	—	—
	2AA*	0.5	-	—	—	—	73	—
		1	-	197	—	—	—	—
		2	-	—	34	—	—	30
		20	-	—	—	25	—	—
		0.5	+	—	—	—	722	—
		1	+	2216	—	—	—	—
	2	+	—	1186	—	—	—	223
20	+	—	—	956	—	—		

* μ g/plate

AF-2, 2-(2-furyl)-3-nitro-2-furyl acrylamide, NaN₃, sodium azide, ICR-191, 2-methoxy-6-chloro-9-(3-(2-chloroethyl)-aminopropylamino) acridine · 2HCl, 2AA, 2-Aminoanthracene

iii. 大洋エンジニアリング株式会社

細菌を用いる復帰突然変異試験（資料 27）

試験機関：社団法人 北里研究所

報告書作成年：1993年

公表：無

検体：pH 2.46、有効塩素濃度48 ppmの電解次亜塩素酸水

試験方法

ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA100、TA1535、TA98、TA1537) 及びトリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* WP2 uvrA 株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 Mix) の存在下および非存在下で、Ames 法を用いて変異原性を検定した。検体は希釈せずに 1~1000 μ l/plate の範囲の 7 用量で実施した。

用量設定根拠

500、1000 μ l/plate の用量を設定して試験を行った結果、WP2 uvrA の 1000 μ l/plate の用量でのみ抗菌性が認められた。したがって、500 μ l/plate 以下では、被験物質の使用菌株に対する毒性はないと考えられる。

試験結果

結果を次表に示した。代謝活性化系の有無に関わらず、1~1000 μ l/plate の濃度範囲ですべての試験菌株において復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。一方陽性対照物質では、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数の著しい増加が認められた。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性は有しないものと判断される。

薬物	濃度 (μ l/plate)	S-9 Mixの 有無	復帰変異コロニー数/plate					
			塩基置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
対照	0	-	163	16	57	81	21	
検体	1	-	168	18	55	93	12	
	5	-	137	14	52	102	19	
	10	-	170	15	45	78	15	
	50	-	162	18	47	84	13	
	100	-	169	14	73	76	17	
	500	-	153	14	41	79	13	
	1000	-	152	12	22	65	11	
対照	0	+	173	20	71	50	29	
検体	1	+	147	17	54	59	23	
	5	+	143	12	48	57	30	
	10	+	145	10	44	76	26	
	50	+	130	9	52	69	31	
	100	+	131	16	47	76	32	
	500	+	134	14	50	66	25	
	1000	+	127	11	26	61	30	
陽性 対照	AF-2*	0.01	-	—	—	97	—	—
		0.1	-	—	—	—	146	—
		2.0	-	318	—	—	—	—
	NaN ₃ *	0.5	-	—	1544	—	—	—
		ICR-191*	1	-	—	—	—	—
	2AA*	0.5	-	—	—	—	52	—
		1	-	186	—	—	—	—
		2	-	—	23	—	—	35
		20	-	—	—	40	—	—
		0.5	+	—	—	—	863	—
1		+	780	—	—	—	—	
2		+	—	463	—	—	166	
20	+	—	—	1288	—	—		

* μ g/plate

AF-2, 2-(2-furyl)-3-nitro-2-furyl acrylamide, NaN₃, sodium azide, ICR-191, 2-methoxy-6-chloro-9-(3-(2-chloroethyl)-aminopropylamino) acridine · 2HCl, 2AA, 2-Aminoanthracene

iv. 三浦電子株式会社

細菌を用いる復帰突然変異試験 (資料 28)

試験機関：社団法人 北里研究所

報告書作成年：1990年

公表：無

検体：pH 2.52、有効塩素濃度35 ppmの電解次亜塩素酸水

試験方法

ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* (TA100、TA102、TA1535、TA98、TA1537) 及びトリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* WP2 uvrA 株を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 Mix) の存在下および非存在下で、Ames 法を用いて変異原性を検定した。検体は希釈せずに 1~1000 μ l/plate の範囲の 7 用量で実施した。

用量設定根拠

500、1000 μ l/plate の用量を設定して試験を行った結果、TA98 および TA102 の 1000 μ l/plate の用量で抗菌性が認められた。したがって、500 μ l/plate 以下では、被験物質の使用菌株に対する毒性はないと考えられる。

試験結果

結果を次表に示した。代謝活性化系の有無に関わらず、1~1000 μ l/plate の濃度範囲ですべての試験菌株において復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。一方陽性対照物質では、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数の著しい増加が認められた。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性は有しないものと判断される。

薬物	濃度 (μ l/ plate)	S-9 Mixの 有無	復帰変異コロニー数/plate						
			塩基置換型				フレームシフト型		
			TA100	TA102	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
対照	0	-	108	302	17	21	26	28	
検体	1	-	80	344	19	25	21	40	
	5	-	113	270	15	24	23	41	
	10	-	126	310	20	33	26	36	
	50	-	103	250	18	30	24	28	
	100	-	115	348	18	28	24	43	
	500	-	105	242	16	24	19	30	
	1000	-	87	70	12	20	10	21	
対照	0	+	116	277	20	29	30	37	
検体	1	+	111	406	18	28	24	40	
	5	+	103	426	20	26	35	31	
	10	+	108	392	19	27	37	34	
	50	+	132	330	21	30	38	30	
	100	+	108	376	19	26	25	43	
	500	+	123	262	15	23	27	27	
	1000	+	92	272	9	22	13	28	
陽性 対照	AF-2*	0.01	-	-	-	-	78	-	-
		0.1	-	-	-	-	-	174	-
		2.0	-	378	-	-	-	-	-
	NaN ₃ *	0.5	-	-	-	288	-	-	-
		ICR-191*	1	-	-	-	-	-	680
	MMC*	1	-	-	1768	-	-	-	-
	2AA*	0.5	-	-	-	-	-	26	-
		1	-	132	-	-	-	-	-
		2	-	-	-	17	-	-	28
		20	-	-	396	-	23	-	-
		0.5	+	-	-	-	-	198	-
		1	+	476	-	-	-	-	-
		2	+	-	-	80	-	-	234
	20	+	-	1480	-	152	-	-	

* μ g/plate

AF-2, 2-(2-furyl)-3-nitro-2-furyl acrylamide, NaN₃, sodium azide, ICR-191, 2-methoxy-6-chloro-9-(3-(2-chloroethyl)-aminopropylamino) acridine · 2HCl, MMC, mitomycin C, 2AA, 2-Aminoanthracene

v. アマノ株式会社

チャイニーズハムスターの細胞を用いる染色体異常試験 (資料 29)

試験機関：社団法人 北里研究所

報告書作成年：1995年

公表：無

検体：pH 2.6、有効塩素濃度45-50 ppmの電解次亜塩素酸水

試験方法

チャイニーズハムスターDON-D6細胞を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系(S-9 Mix)で、直接法および代謝活性化法を用いて染色体異常試験を行った。検体は5、10、20%の濃度で実施した。

用量設定根拠

被験物質溶出液100%を最高用量として、公比2で5用量を設定して試験を行った結果、直接法、代謝活性化法ともに25%以上で高い細胞抑制が認められた。したがって、被験物質濃度5、10、20%を設定し、染色体異常試験を実施した。

試験結果

結果を次表に示した。直接法、代謝活性化法のいずれの処理群でも構造異常および倍数性異常細胞の出現頻度は低く、無処理対照との間に有意差は認められなかった。一方陽性対照群では構造異常を有する細胞が高頻度に出現し、無処理対照との間に有意差が認められた。

以上の結果より、電解次亜塩素酸水はDON-D6細胞を用いた本試験条件下において、代謝活性化の有無にかかわらず染色体異常誘発能はない。

薬物	処理 濃度 (%)	処理 時間 (hr)	判定	
			直接法	
			倍数体数**	構造異常細胞**
対照(培養液)	20	24	- (1)	- (1)
		48	- (0)	- (3)
検体	5 10 20	24	(1)	(0)
			- (3)	- (2)
			(0)	(2)
	5 10 20	48	(0)	(2)
			- (0)	- (1)
			(0)	(0)
陽性対照 MMS	11*	24	- (3)	+ (43)
	11*	48	- (0)	+ (39)
薬物	処理 濃度 (%)	S-9 Mix の 有無	代謝活性化法	
			倍数体数**	構造異常細胞**
対照(培養液)	20	+	- (2)	- (0)
		-	- (3)	- (1)
検体	5 10 20	+	(3)	(1)
			- (1)	- (2)
			(5)	(7)
	5 10 20	-	(1)	(1)
			- (0)	- (1)
			(3)	(0)
陽性対照 CP	10*	+	- (3)	+ (41)
	10*	-	- (0)	- (0)

* μ g/plate

**異常をもつ細胞の出現頻度(%)を () に示す。

MMS, Methyl Methanesulfonate, CP, cyclophosphamide

vi. 大洋エンジニアリング株式会社

ハムスターの細胞を用いる染色体異常試験（資料 30、21、22）

試験機関：社団法人 北里研究所

報告書作成年：1993年

公表：無

検体：pH 2.42、有効塩素濃度50 ppmの電解次亜塩素酸水

試験方法

チャイニーズハムスターDON-D6細胞を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系（S-9 Mix）で、直接法および代謝活性化法を用いて染色体異常試験を行った。検体は直接法では20、40、80%、代謝活性化法では22.5、45、90%の濃度で実施した。

用量設定根拠

培養液中の被験物質濃度90%を最高用量として、7用量を設定して試験を行った結果、直接法の24時間および48時間では90%濃度で細胞増殖の抑制が認められた。代謝活性化法ではすべての用量において細胞抑制が認められなかった。したがって、直接法では20、40、80%、代謝活性化法では22.5、45、90%を設定し、染色体異常試験を実施した。

試験結果

結果を次表に示した。直接法、代謝活性化法のいずれの処理群でも構造異常および倍数性異常細胞の出現頻度は低く、無処理対照との間に有意差は認められなかった。一方陽性対照群では構造異常を有する細胞が高頻度に出現し、無処理対照との間に有意差が認められた。

以上の結果より、電解次亜塩素酸水はDON-D6細胞を用いた本試験条件下において、代謝活性化の有無にかかわらず染色体異常誘発能はない。

薬物	処理濃度 (%)	処理時間 (hr)	判定	
			直接法	
			倍数体数**	構造異常細胞**
対照(蒸留水)	100	24	- (0)	- (6)
		48	- (1)	- (9)
検体	20	24	(1)	(5)
	40		- (0)	- (4)
	80		(0)	(3)
	20	48	(2)	(4)
	40		- (1)	- (5)
	80		(1)	(3)
陽性対照 MMS	11*	24	- (1)	+ (40)
	11*	48	- (0)	+ (34)
薬物	処理濃度 (%)	S-9 Mixの有無	代謝活性化法	
			倍数体数**	構造異常細胞**
対照(蒸留水)	100	+	- (0)	- (2)
		-	- (0)	- (1)
検体	22.5	+	(1)	(10)
	45		- (0)	- (3)
	90		(1)	(2)
	22.5	-	(0)	(2)
	45		- (1)	- (5)
	90		(2)	(3)
陽性対照 CP	10*	+	- (1)	+ (31)
	10*	-	- (1)	- (8)

* μ g/plate

**異常をもつ細胞の出現頻度(%)を () に示す。

MMS, Methyl Methanesulfonate, CP, cyclophosphamide