



LIFE SCIENCE LABORATORY
5-19, 2-chome, Nishihonmachi,
Nishi-ku, OSAKA, JAPAN.
Tel.06-6531-1881

生活科学研究所®
大阪市西区西本町2丁目5番19号
Tel.06-6531-1881 (代)

試験コード番号:06-VII-0301

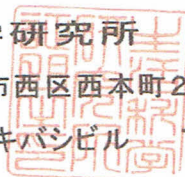
最 終 報 告 書

白金ナノ粒子の固定化の細菌を用いる復帰突然変異試験

平成18年 4月26日



生活科学研究所
大阪府大阪市西区西本町2丁目5番19号
ニューオカザギバシビル TEL (06)6531-1881(代)





LIFE SCIENCE LABORATORY
5-19, 2-chome, Nishihonmachi,
Nishi-ku, OSAKA, JAPAN.
Tel.06-6531-1881

生活科学研究所®
大阪市西区西本町2丁目5番19号
Tel.06-6531-1881 (代)

06-VII-0301

2) 名 称	株式会社 バイオフェイス
所在地	京都府宇治市開町 39 番地 2
試験担当者	鍛本 功

5. 試験期間

試験開始日	平成18年 3月30日
試験終了日	平成18年 4月26日

6. 被験物質および対照物質

1) 被験物質

(1) 名 称	白金ナノ粒子の固定化
(2) 化学名	白金ナノコロイド溶液



LIFE SCIENCE LABORATORY
5-19, 2-chome, Nishihonmachi,
Nishi-ku, OSAKA, JAPAN.
Tel.06-6531-1881

生活科学研究所®
大阪市西区西本町2丁目5番19号
Tel.06-6531-1881 (代)

06-VII-0301

2) 対照物質(陽性対照物質)

- | 名 称 | |
|-----|--|
| | 1) N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (ENNG)
[ナカライテスク株式会社, Lot. VOR8925] |
| | 2) 2-nitrofluorene (2-NF)
[ALDRICH CHEMICAL COMPANY, Lot. 18016CO] |
| | 3) 9-aminoacridine hydrochloride (9-AA)
[ALDRICH CHEMICAL COMPANY, Lot.16323JR] |
| | 4) 2-aminoanthracene (2-AA)
[和光純薬株式会社 Lot. DWK5667] |
| | 5) Sodium azide (NaN ₃)
[和光純薬株式会社 Lot. TPR1596] |

7. 溶媒対照物質

1) 被験物質に用いた溶媒

注射用水(蒸留水)[大塚製薬株式会社 Lot. 3H90N]

2) 陽性対照物質に用いた溶媒

ENNG、2-NF、9-AA および 2-AA は Dimethyl sulfoxide(DMSO)
[和光純薬工業株式会社 Lot. PEK5523]

NaN₃ は注射用水(蒸留水)

8. 被験物質および対照物質の調製

1) 被験物質

用量設定試験では被験物質 300mg を秤量し、蒸留水を加えて 6.00mL とし、50000 μg/mL の希釈液を調製した後、12500、3125、781 および 195 μg/mL に希釈調製した。

本試験では被験物質 300mg を秤量し、蒸留水を加えて 6.00mL とし、50000 μg/mL(有効成分)の希釈液を調製した後、25000、12500、6250 および 3125 μg/mL に希釈調製した。



LIFE SCIENCE LABORATORY
5-19, 2-chome, Nishihonmachi,
Nishi-ku, OSAKA, JAPAN.
Tel. 06-6531-1881

生活科学研究所®
大阪市西区西本町2丁目5番19号
Tel. 06-6531-1881 (代)

06-VII-0301

2) 対照物質

各陽性対照物質はDMSOまたは蒸留水(NaN_3 のみ)にて1mg/mLの原液を調製した後、ENNGは20 $\mu\text{g/mL}$ に、2-NFは10 $\mu\text{g/mL}$ に、9-AAは800 $\mu\text{g/mL}$ に、2-AAは200、20、10および5 $\mu\text{g/mL}$ にDMSOで希釈調製した。 NaN_3 は蒸留水を用いて5 $\mu\text{g/mL}$ に希釈調製した。

9. 投与条件下における安定性、均一性および分析方法

被験物質は溶媒に対して安定、且つ水に易溶であり、また用時調製したことから安定かつ均一性が保たれているものと考えられた。

対照物質は広く復帰突然変異試験に用いられていることより、投与条件下では安定であると考えられた。

10. 試験系

使用菌株		入手先	入手日
<i>Salmonella typhimurium</i>	TA100	(財)発酵研究所	平成10年6月13日
	TA98	(財)発酵研究所	平成10年6月13日
	TA1535	(財)発酵研究所	平成10年6月13日
	TA1537	(財)発酵研究所	平成10年6月13日
<i>Escherichia coli</i>	WP2uvrA	(財)発酵研究所	平成10年6月13日

前培養終了時の生菌数($\times 10^9/\text{mL}$ [濁度(660nmにおける吸光)より換算])

	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
用量設定試験	1.09	1.38	1.87	1.42	1.47
本試験	1.20	1.40	1.54	1.30	1.52

11. 試験材料の調製

1) S9Mix

S9は入手後、使用時まで -80°C で保存した。

用時、次表の成分をもつS9Mixを無菌的に調製した。



LIFE SCIENCE LABORATORY
5-19, 2-chome, Nishihonmachi,
Nishi-ku, OSAKA, JAPAN.
Tel. 06-6531-1881

生活科学研究所®
大阪市西区西本町2丁目5番19号
Tel. 06-6531-1881 (代)

06-VII-0301

成 分	S9Mix 1mL 中の量	
S9	0.1mL	
0.4M塩化マグネシウム水溶液	0.02mL	8 μ mol
1.65M塩化カリウム水溶液	0.02mL	33 μ mol
1Mグルコース-6-リン酸水溶液	0.005mL	5 μ mol
0.1M・NADPH水溶液	0.04mL	4 μ mol
0.1M・NADH水溶液	0.04mL	4 μ mol
0.2Mナトリウム-リン酸緩衝液	0.5mL	100 μ mol
精製水	残量(全量で 1mL とする)	

2) ニュートリエントブロス培養液

- ・ニュートリエントブロス (Difco Laboratories) 0.8g
- ・塩化ナトリウム 0.5g
- ・精製水 100mL

この培養液をL字管に 10mL ずつ分注し、高圧滅菌した。

3) 最少グルコース寒天平板培地

まず、次の組成をもつ Vogel-Bonner の最少培地 E (10 倍濃度の原液) を調製した。

- ・硫酸マグネシウム・7水塩 2g
- ・クエン酸・1水塩 20g
- ・リン酸二カリウム・無水塩 100g
- ・リン酸水素アンモニウムナトリウム・4水塩 35g

これらをこの順に精製水に溶解して全量 1000mL とした (pH 7)。

次にこれを用いて次の組成をもつ最少グルコース寒天平板培地を調製した。

- ・Vogel-Bonner の最少培地 E (10 倍の濃度の原液) 80mL
- ・グルコース 16g/100mL 精製水
- ・寒天 (Difco Laboratories) 12g/620mL 精製水

これらをそれぞれ高圧滅菌し、約 60°C に放冷した後混合して、 γ 線滅菌済のシャーレ (直径 90mm、株式会社イナ・オプティカ) に 30mL ずつ分注して固化した。



LIFE SCIENCE LABORATORY
5-19, 2-chome, Nishihonmachi,
Nishi-ku, OSAKA, JAPAN.
Tel. 06-6531-1881

生活科学研究所®
大阪市西区西本町2丁目5番19号
Tel. 06-6531-1881 (代)

06-VII-0301

4) トップアガー

寒天 0.6% および塩化ナトリウム 0.5% を含む水溶液を調製し、高圧滅菌した後、約 45°C に保温した。

サルモネラ菌用として、これら寒天液 10 容量にろ過滅菌した 0.5mM L-ヒスチジンおよび 0.5mM D-ビオチンを含む水溶液 1 容量を加えて混合した。また、大腸菌用として、寒天液 10 容量にろ過滅菌した 0.5mM L-トリプトファンの水溶液 1 容量を加えて混合した。

これらは使用するまで約 45°C に保温し、寒天が固まらないようにした。なお、使用するアミノ酸水溶液は、吸引濾過滅菌装置 (孔径 0.22 μm、岩城硝子工業株式会社) を用いてろ過滅菌した。

12. 予見することのできなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態および試験計画書に従わなかつたこと

本試験において、前培養で TA98 の菌数が指定の範囲以下であったため、本試験実施を翌日に延期した。試薬や培地などは、使用期限を厳守し、必要なものは再調製したため、試験の信頼性に影響を及ぼさないものと判断した。これ以外について予見することのできなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態および試験計画書に従わなかつたことはなかつた。

13. 試験実施の方法

試験はプレインキュベーション法により実施した。

1) 用量設定試験

用量設定試験には各用量段階ごとに 2 枚ずつのシャーレを用いた。

用量設定試験では、それぞれの菌株について菌懸濁液の分注凍結保存したものを解凍し、そのうちの 20 μL を 10mL のニュートリエントブロス培養液に接種し、37°C で 12 時間暗室に置いて振とう培養 (65 往復/分) を行った。無菌試験管にこの培養液 0.1mL、S9Mix 0.5mL (S9Mix を用いない場合には同量の pH7.4 の 0.1M ナトリウムーリン酸緩衝液) および被験物質溶液 0.1mL [被験物質の最高濃度を 50000 μg/mL (= 5000 μg/プレート) とし、公比 4 で減少する 5 段階の濃度を設定した] をとり、37°C で 20 分間プレインキュベーションを行った。そこへアミノ酸を添加したトップアガー 2mL を加えて混合し、最少グルコース寒天平



LIFE SCIENCE LABORATORY
5-19, 2-chome, Nishihonmachi,
Nishi-ku, OSAKA, JAPAN.
Tel. 06-6531-1881

生活科学研究所®
大阪市西区西本町2丁目5番19号
Tel. 06-6531-1881 (代)

06-VII-0301

板培地の上にまきひろげ、37°Cで48時間培養した。培養後、実体顕微鏡および肉眼により各菌株の生育阻害の有無を観察するとともに、復帰突然変異コロニー数を数えた。

また、それぞれの菌株について溶媒対照および陽性対照群を設定した。

各菌株に対して使用する陽性対照物質の最終用量は、当研究所SOPに従い、下記のとおりとした。

菌株名	S9Mix(-)系		S9Mix(+)系	
	名称	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	名称	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)
TA100	NaN_3	0.5	2-AA	1
TA98	2-NF	1	2-AA	0.5
TA1535	NaN_3	0.5	2-AA	2
TA1537	9-AA	80	2-AA	2
WP2uvrA	ENNG	2	2-AA	20

2) 本試験

本試験についても各用量段階ごとに2枚ずつのシャーレを用いた。

本試験も用量設定試験と同様の操作で実施した。本試験での用量は、用量設定試験の結果より決定した。すなわち、菌株に生育阻害が認められなかったため、最高濃度を50000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (=5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$)とし、公比2で減少する5段階の濃度を設定した。

3) S9Mix および被験物質溶液の無菌試験

普通寒天培地(栄研化学株式会社、pH7.2)を用いて調製した普通寒天平板培地(20mL)のプレート上にS9Mix、0.1M ナトリウム-リン酸緩衝液、2種類のトップアガーおよび各濃度の被験物質溶液(各0.1mL)を塗抹して、37°Cで48時間培養し、雑菌の混入の有無を調べた。



LIFE SCIENCE LABORATORY
5-19, 2-chome, Nishihonmachi,
Nishi-ku, OSAKA, JAPAN.
Tel.06-6531-1881

生活科学研究所®
大阪市西区西本町2丁目5番19号
Tel.06-6531-1881 (代)

06-VII-0301

14. 試験結果の判定基準

5 菌株について各用量ともそれぞれ 2 枚のシャーレを使用し、5 段階の用量で実施した被験物質群と陽性対照および溶媒対照群のデータを比較して、復帰突然変異コロニー数の平均値が溶媒対照の 2 倍以上で、用量依存性がみられ、かつ再現性が認められる場合を陽性と判定した。

15. 試験成績

用量設定試験の結果は表 1 に、本試験の結果は表 2 および図 1~5 に示した。

陽性対照物質について、用量設定試験(表 1)および本試験(表 2)において、S9Mix(-)、S9Mix(+)いずれの系の場合もすべての菌株で溶媒対照の 2 倍以上の復帰突然変異コロニー数が認められ、明らかに変異原性陽性を示した。

また、無菌試験において、いずれの試験液も雑菌の混入は認められなかった。

用量設定試験(表 1)において、S9Mix(-)、S9Mix(+)いずれの系の場合も最高用量を 5000 μ g/プレートとし、公比 4 で減少する 5 段階の用量を設定して試験を行った。S9Mix(-)、S9Mix(+)いずれの系の場合もすべての菌株で生育阻害は認められず、また溶媒対照と同様のコロニー数であり、従って 2 倍以上の復帰突然変異コロニー数は認められなかった。

本試験(表 2 および図 1~5)においては、用量設定試験の結果にもとづいて、S9Mix(-)、S9Mix(+)いずれの系の場合も、最高用量を 5000 μ g/プレートとし、公比 2 で減少する 5 段階の用量を設定して試験を行った。S9Mix(-)、S9Mix(+)いずれの系の場合もすべての菌株で生育阻害は認められず、また溶媒対照と同様のコロニー数であり、従って 2 倍以上の復帰突然変異コロニー数は認められなかった。また、用量設定試験と本試験の再現性も良好であった。

16. 考察および結論

白金ナノ粒子の固定化について 5 菌株 (TA100、TA1535、WP2uvrA、TA98 および TA1537) を用いて復帰突然変異原性試験を実施した。用量設定ならびに本試験において、S9Mix(-)、S9Mix(+)いずれの系の場合も、最高用量を 5000 μ g/プレート(有効成分)として試験を行った結果、すべての菌株で生育阻害は認められず、また溶媒対照の 2 倍以上の復帰突然変異コロニー数は認められなかった。また、用量設定試験と本試験の再現性も良好であった。



LIFE SCIENCE LABORATORY
5-19, 2-chome, Nishihonmachi,
Nishi-ku, OSAKA, JAPAN.
Tel.06-6531-1881

生活科学研究所®
大阪市西区西本町2丁目5番19号
Tel.06-6531-1881 (代)

06-VII-0301

以上のことから、当研究所における試験結果の判定基準に従って、本被験物質の変異原性は陰性であると判定した。

以上

表 1

白金ナノ粒子の固定化の細菌を用いる復帰突然変異試験
(用量設定試験)

試験実施期間		平成 18年 4月11日 ~ 4月14日				
代謝活性化の有無	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	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(-)	溶媒対照	111	9	20	25	5
		102 (107)	22 (16)	19 (20)	23 (24)	3 (4)
	19.5	110	10	19	18	6
		122 (116)	22 (16)	11 (15)	22 (20)	4 (5)
	78.1	99	17	19	23	4
		101 (100)	19 (18)	13 (16)	22 (23)	5 (5)
	312.5	130	11	21	15	3
		117 (124)	21 (16)	16 (19)	15 (15)	6 (5)
	1250	111	19	17	23	3
		136 (124)	20 (20)	21 (19)	20 (22)	2 (3)
	5000	100	23	21	21	3
		105 (103)	11 (17)	17 (19)	22 (22)	6 (5)
S9Mix(+)	溶媒対照	103	9	18	25	11
		105 (104)	10 (10)	15 (17)	27 (26)	7 (9)
	19.5	121	12	13	34	15
		119 (120)	7 (10)	13 (13)	27 (31)	7 (11)
	78.1	129	13	12	27	14
		108 (119)	9 (11)	22 (17)	24 (26)	13 (14)
	312.5	144	10	12	36	12
		130 (137)	11 (11)	9 (11)	25 (31)	16 (14)
	1250	98	14	8	24	6
		78 (88)	9 (12)	17 (13)	26 (25)	6 (6)
	5000	114	7	13	34	6
		124 (119)	16 (12)	10 (12)	32 (33)	6 (6)
陽性	名称	NaN_3	NaN_3	ENNG	2-NF	9-AA
	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.5	0.5	2	1	80
対照	コロニー数 /プレート	584 624 (604)	267 276 (272)	866 785 (826)	171 183 (177)	353 334 (344)
	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
対照	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	1	2	20	0.5	2
	コロニー数 /プレート	334 329 (332)	92 60 (76)	378 320 (349)	111 120 (116)	75 61 (68)

[備考]

1. 菌の生育阻害が認められる場合は、該当する数値の右に*印を付すること。
2. ()内に各プレートのコロニー数の平均値を記入すること。
3. 復帰変異数は、被験物質用量の低い順に実測値及び平均値を記入すること。
4. プレート上に沈殿が析出した場合は、その用量に+印を付すこと。
5. ENNG: N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, 2-NF: 2-nitrofluorene
9-AA: 9-aminoacridine hydrochloride, 2-AA: 2-aminoanthracene, NaN_3 : sodium azide

表 2

白金ナノ粒子の固定化の細菌を用いる復帰突然変異試験
(本試験)

試験実施期間		平成 18年 4月 19日 ~ 4月 22日					
代謝活性化の有無	被験物質の用量 (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(-)	溶媒対照	138	27	16	20	5	
		149 (144)	16 (22)	15 (16)	14 (17)	3 (4)	
	312.5	123	20	15	14	1	
		156 (140)	14 (17)	12 (14)	12 (13)	4 (3)	
	625	141	17	18	24	7	
		158 (150)	25 (21)	11 (15)	20 (22)	3 (5)	
	1250	133	28	12	12	4	
		147 (140)	26 (27)	19 (16)	15 (14)	4 (4)	
	2500	122	21	14	16	4	
		115 (119)	17 (19)	14 (14)	10 (13)	4 (4)	
	5000	140	23	16	10	3	
		118 (129)	26 (25)	13 (15)	12 (11)	5 (4)	
S9Mix(+)	溶媒対照	96	11	21	26	5	
		158 (127)	10 (11)	16 (19)	24 (25)	8 (7)	
	312.5	116	9	22	26	6	
		109 (113)	16 (13)	17 (20)	32 (29)	8 (7)	
	625	120	13	20	32	3	
		123 (122)	9 (11)	16 (18)	26 (29)	4 (4)	
	1250	121	13	13	34	10	
		125 (123)	13 (13)	14 (14)	23 (29)	7 (9)	
	2500	123	10	17	31	6	
		108 (116)	13 (12)	20 (19)	29 (30)	5 (6)	
	5000	115	7	11	28	3	
		102 (109)	15 (11)	13 (12)	30 (29)	7 (5)	
陽性対照	S9Mixを必要としないもの	名称	NaN ₃	NaN ₃	ENNG	2-NF	9-AA
		用量 (μg /プレート)	0.5	0.5	2	1	80
		コロニー数 /プレート	462 529 (496)	392 366 (379)	650 744 (697)	166 167 (167)	568 317 (443)
	S9Mixを必要とするもの	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		用量 (μg /プレート)	1	2	20	0.5	2
		コロニー数 /プレート	348 294 (321)	96 67 (82)	450 496 (473)	92 89 (91)	69 57 (63)

[備考]

1. 菌の生育阻害が認められる場合は、該当する数値の右に*印を付すること。
2. ()内に各プレートのコロニー数の平均値を記入すること。
3. 復帰変異数は、被験物質用量の低い順に実測値及び平均値を記入すること。
4. プレート上に沈殿が析出した場合は、その用量に+印を付すこと。
5. ENNG: N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, 2-NF: 2-nitrofluorene
9-AA: 9-aminoacridine hydrochloride, 2-AA: 2-aminoanthracene, NaN₃: sodium azide

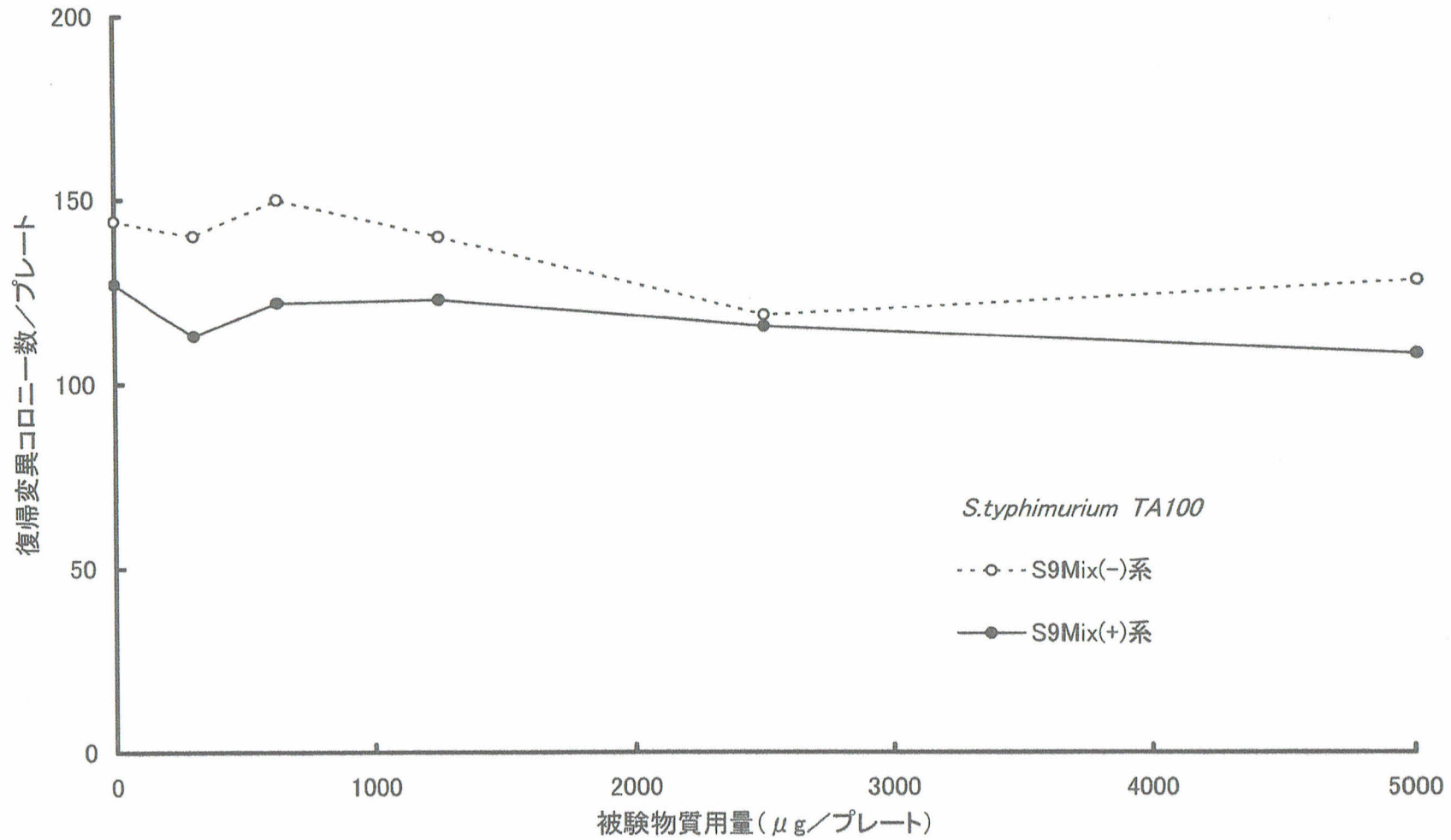


図 1 白金ナノ粒子の固定化の塩基対置換型変異株 *S. typhimurium* TA100 を用いた復帰突然変異試験 (本試験) 用量-反応曲線

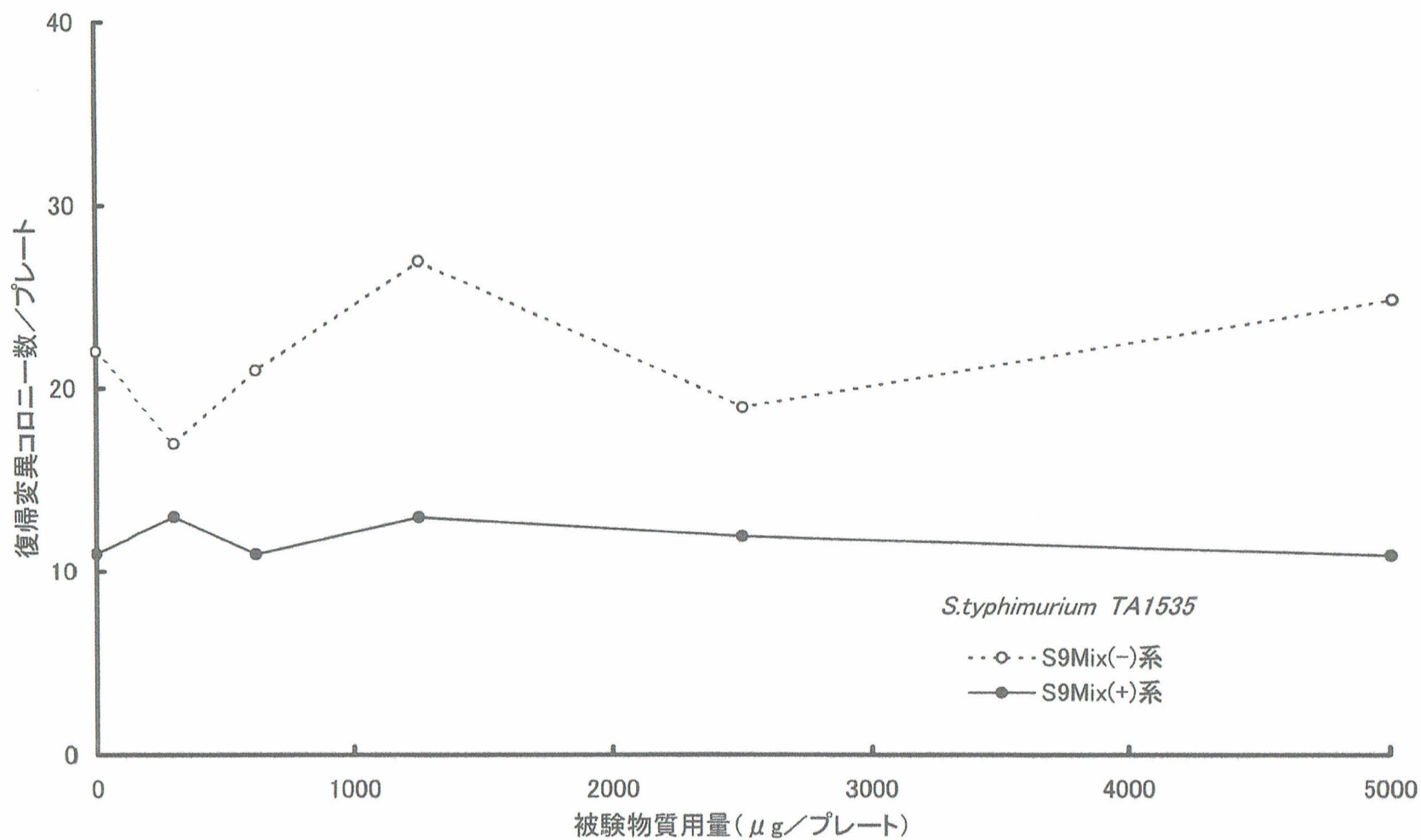


図 2 白金ナノ粒子の固定化の塩基対置換型変異株 *S. typhimurium* TA1535 を用いた復帰突然変異試験 (本試験) 用量-反応曲線

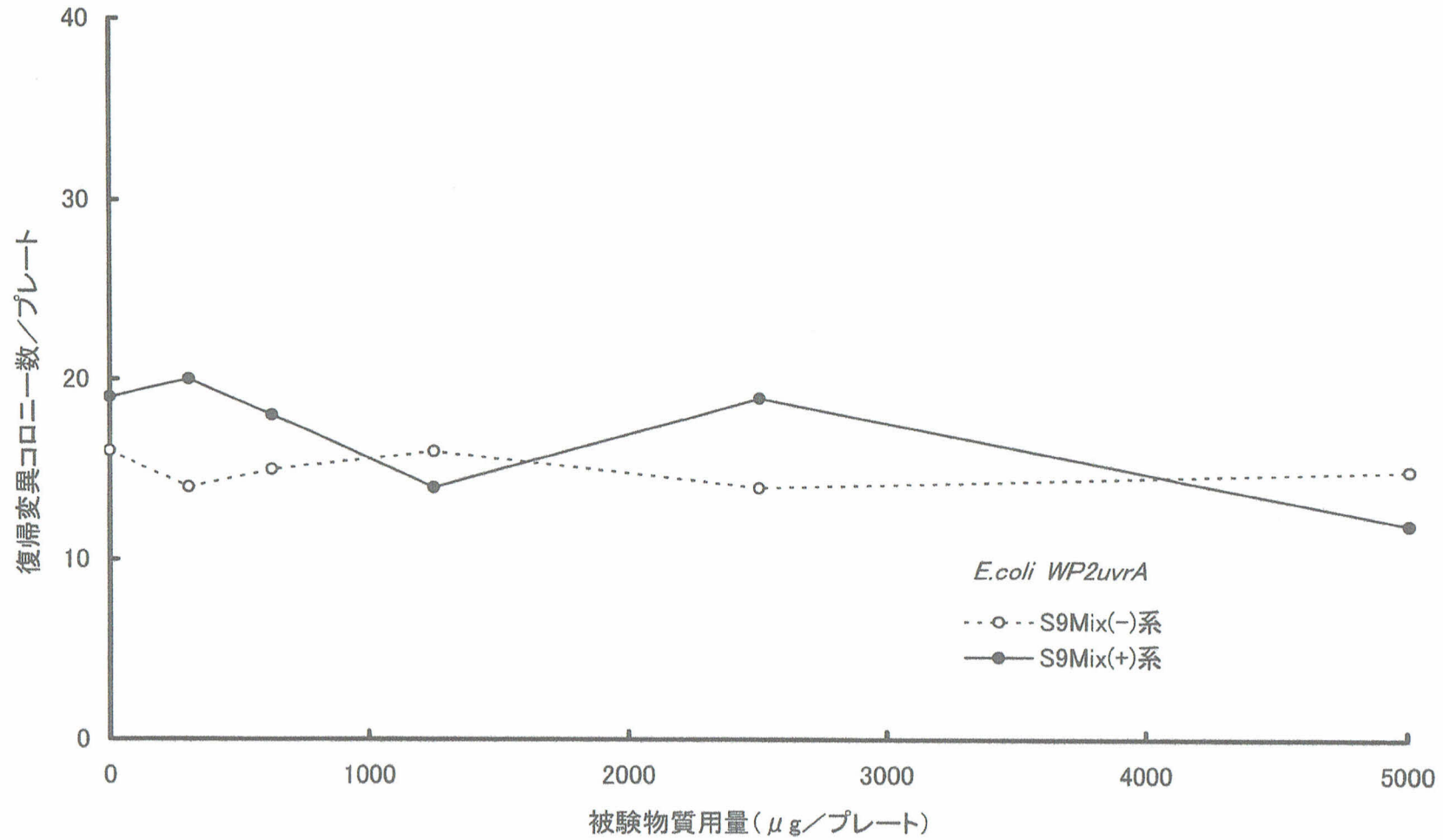


図 3 白金ナノ粒子の固定化の塩基対置換型変異株 *E. coli* WP2uvrA を用いた復帰突然変異試験 (本試験) 用量-反応曲線

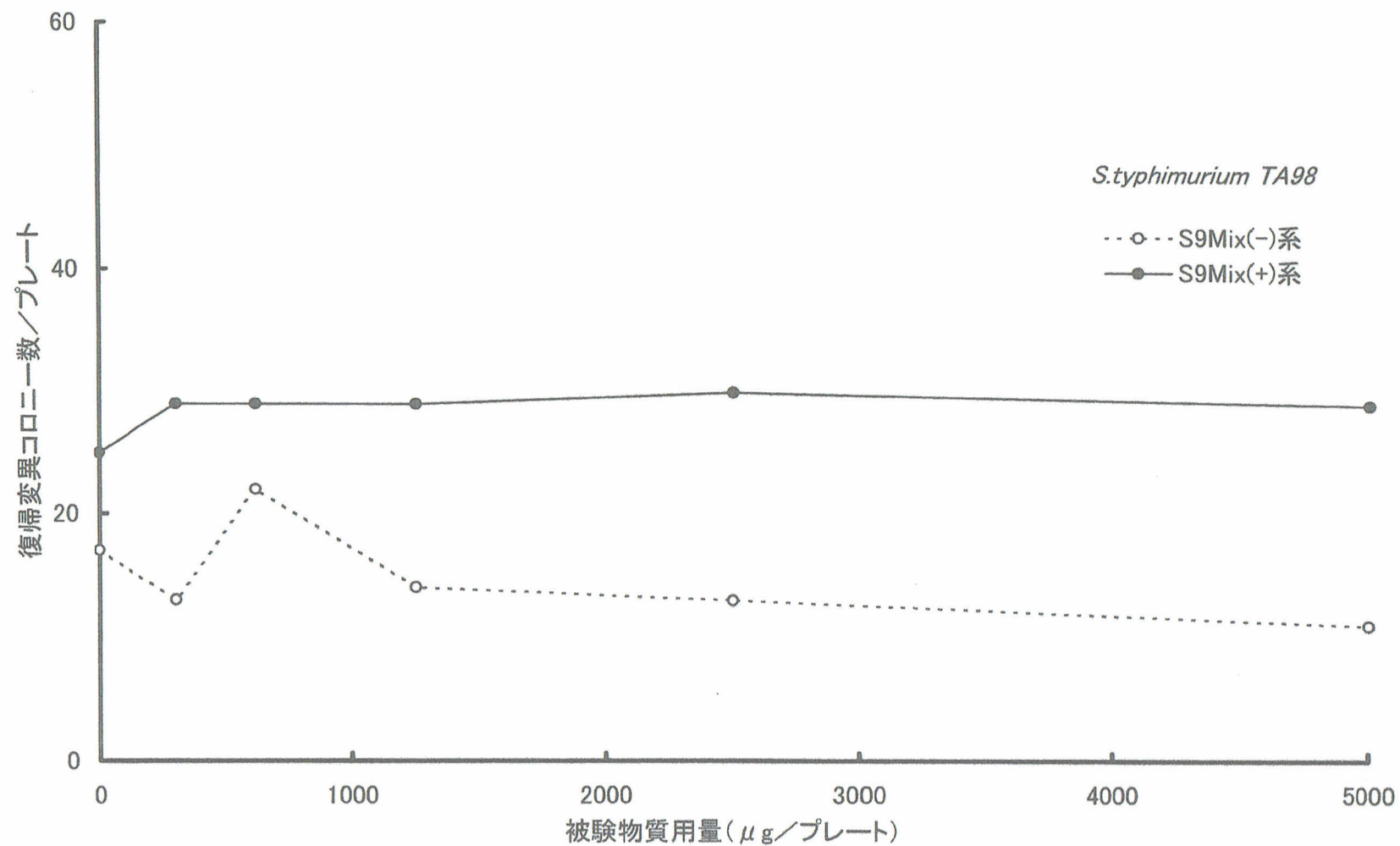


図 4 白金ナノ粒子の固定化のフレームシフト型変異株 *S.typhimurium* TA98 を用いた復帰突然変異試験 (本試験) 用量-反応曲線

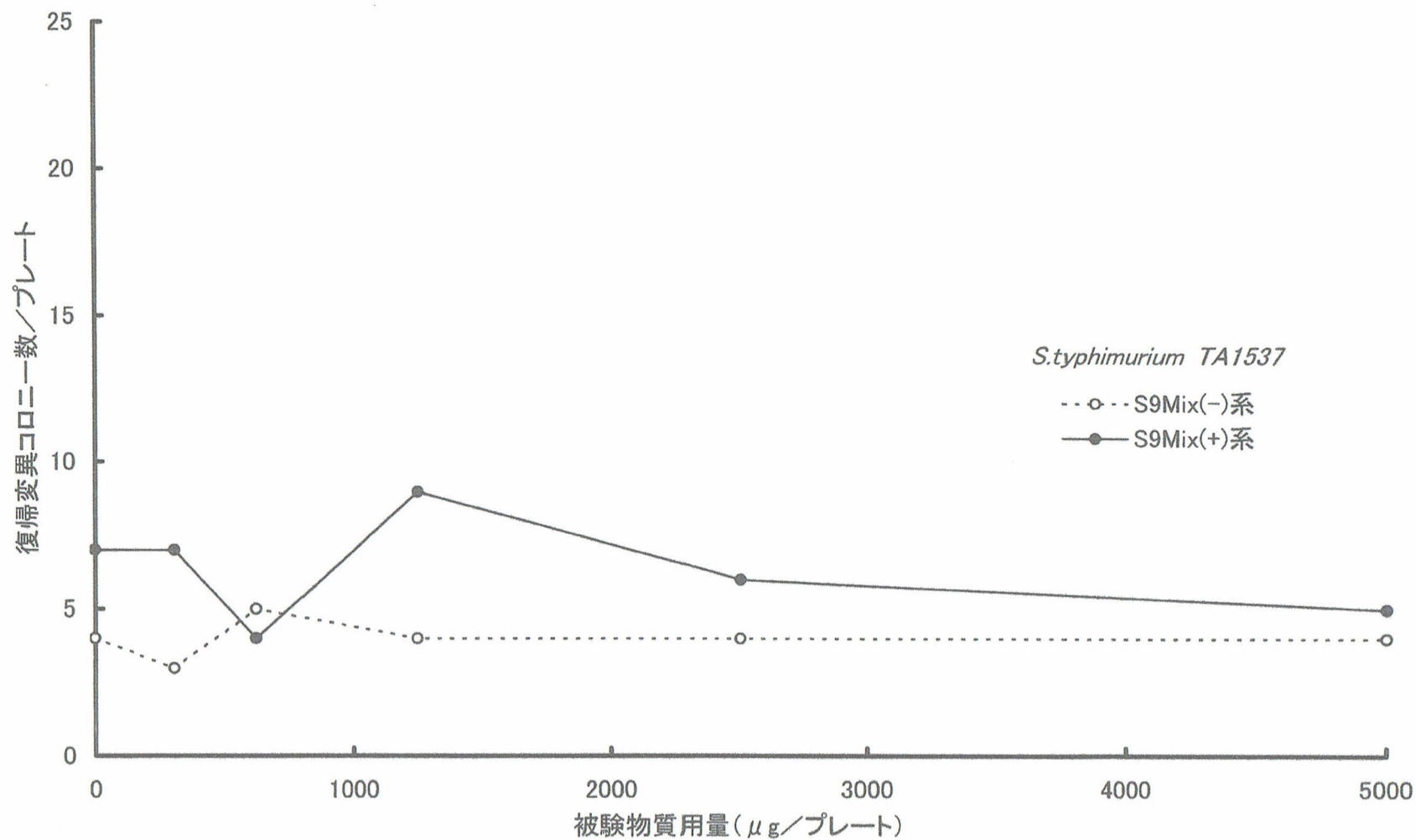


図 5 白金ナノ粒子の固定化のフレームシフト型変異株 *S.typhimurium* TA1537 を用いた復帰突然変異試験 (本試験) 用量-反応曲線