

添付資料2

平成 20 年 10 月 31 日

アーテック工房株式会社様

麻布大学
生命・環境科学部環境科学科

後藤純雄



ヘルスコ・キュアーの変異原性試験結果報告

1. 報告内容

ヘルスコ・キュアーを DMSO に懸濁して、ネズミチフス菌 TA100 及び TA98 株で変異原性を試験（公定法に準拠）し陰性である結果を得ました。次いで、ヘルスコ・キュアー中に変異原性成分が存在すると想定して酢酸エチルで有機成分を抽出し、その抽出物をアセトンに溶解して変異原性を試験し、その結果も陰性であったことを報告します。

2. ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100 及び TA98 株を用いた Ames(pre-incubation)法による DMSO 懸濁物の変異原性

○試料名 ヘルスコ・キュアー

○試料 十分攪拌した原液（灰白色粘性液体）を DMSO（ジメチルスルホキシド：蛍光分析用、同仁化学製）に懸濁（74.3mg/mL：脱水ヘルスコ・キュアー5000 μ g/100 μ L に相当）し、これを変異原性試験用最高濃度とし変異原性試験に供した。

（ヘルスコ・キュアーの原液 1.07g をシリカゲル NeoBLUE 入りデシケーター内で脱水し、秤量したところ 0.72g に減少したことから上記換算を行った）

○試験方法 新規化学物質のバクテリアを用いる変異原性試験法（Ames 法：厚生労働省の変異原性ガイドライン^{文献1}）に準じて試験を実施した。

○試験条件 溶媒 ヘルスコ・キュアーが水、DMSO に溶解しないため DMSO に懸濁状態で試験した。なお、この懸濁時に発熱、ガス発生等の溶媒との反応は認められなかった。

 濃度 最高濃度を換算重量 5000 μ g/100 μ L とした。この原液を公比 4 (1/4 ずつ) で DMSO で段階的に希釈して用いた。(100 μ L/plate)

菌株	塩基対置換型突然変異の検出に高感度な TA100 及びフレームシフト型突然変異の検出に高感度な TA98 の代表的な 2 菌株を用いた。(100 μ L/plate)
代謝活性化	フェノバルビタールと 5,6-ベンゾフラボンの腹腔内投与で酵素誘導した SD 系雄ラット肝より得た S9 (キッコーマン製) と補酵素 (グルコース-6-リン酸、NADPH、NADH ほか:オリエンタル酵母工業製) の混合溶液 (S9mix) を調製した。これを添加した場合 (+S9) と添加しなかった場合 (-S9) について試験した。なお、緩衝液はリン酸水素二ナトリウムとリン酸ナトリウムで pH7.4 とした。(+S9 : S9mix 500 μ L/plate) 又は (-S9 : 緩衝液 500 μ L/plate)
前培養	試験前日にニュートリエントブロス (関東化学製) が 10mL 入った L 字ガラス管に凍結保存 (-80 $^{\circ}$ C) しておいた試験菌株の解凍液 20 μ L を接種し、16 時間 (TA100 株) 及び 12 時間 (TA98 株) 振とうして前培養した。変異原性試験は、滅菌試験管に試料の DMSO 溶液 100 μ L とこの前培養菌液 100 μ L (約 10^9 個/mL) を順に入れ、37 $^{\circ}$ C で 20 分間ブレインキューベーション (振とう) した。
培養	上記試験管にソフトアガー 2mL (0.5mM のビオチン、0.5mM ヒスチジンを含む) を加えて混合 (vortex) しシャーレ (最小グルコース平板培地) 重層した。試験後のシャーレを 37 $^{\circ}$ C、48 時間インキュベーターで培養した。
コロニー 計数	シャーレ表面に出現した復帰変異コロニー (His ⁺) を、自動コロニーカウンター (東洋測器製) を用いて計数し記録した。

2-1) 試験結果 (別表 1,2)

2 度行った変異原性試験結果をそれぞれ別表 1 及び 2 に示してある。別表 1 から、TA98-S9、313 μ g/plate の条件では溶媒対照のコントロール値 (自然復帰コロニー数 : 15 個) の 2 倍のコロニー数 (30 個) を示したが良好な dose-response は認められなかった。また、それ以外の試験条件 (TA98+S9、TA100-S9、TA100+S9) では対応するコントロールの 2 倍以上の復帰変異コロニーは認められなかった。更に、二回目の試験結果 (別表 2) では TA98 及び TA100 の両菌株で S9mix 添加の有無にかかわらずコントロールの 2 倍以上を与えることはなかった。

2-2) 試験結果の判定

上記の試験結果から「陰性」と判断されました。

3. ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100 及び TA98 株を用いた Ames(pre-incubation)法による酢酸エチル抽出物の変異原性

- 試料名 ヘルスコ・キュアーの酢酸エチル抽出物
- 試料 十分攪拌した原液 134.64 g を秤取した。この適当量を 1L の分液ロートに入れ酢酸エチル (和光純薬製 残留農薬試験用 3000) を加えた。分液ロートを充分振とうして静置し、上澄液 (酢酸エチル部分) 濾過 (アドバンテック No5C) し、この操作を繰り返し濾液を集めた。抽出操作を秤取した原液について繰り返す、計 3L の酢酸エチルを用いて有機成分を抽出した。全ての濾液を集めてロータリーエバポレーター (約 35°C) で濃縮し、濃縮液を試料バイアルに移した。弱い窒素気流下で濃縮液中の酢酸エチルを留去しタール状物質を得た。これをシリカゲル NeoBLUE 入りデシケータ内に入れ、約 24 時間乾燥し秤量した。変異原性試験まで冷凍保存 (-30°C) した。
- 測定方法 新規化学物質のバクテリアを用いる変異原性試験法 (Ames 法: 厚生労働省の変異原性ガイドライン^{文獻1}) に準じて試験を実施した。
- 測定条件
- | | |
|-------|---|
| 溶媒 | タール状の酢酸エチル抽出物が、エタノールに不溶、DMSO に難溶、アセトンに易溶であったため、試料をアセトンで溶解 (50 μ L/plate) して試験した。(DMSO の場合には 100 μ L/plate で試験を行いますが、アセトンは比較的毒性が高いため通常 50 μ L/plate で試験が行われます) |
| 濃度 | 最高濃度を重量 5000 μ g/50 μ L : plate とした。この原液を公比 2 (1/2 ずつ) でアセトンで段階的に希釈して用いた。 |
| 菌株 | 塩基対置換型突然変異の検出に高感度な TA100 及びフレームシフト型突然変異の検出に高感度な TA98 の代表的な 2 菌株を用いた。 |
| 代謝活性化 | フェノバルビタールと 5,6-ベンゾフラボンの腹腔内投与で酵素誘導した SD 系雄ラット肝より得た S9 (キッコーマン製) と補酵素 (グルコース-6-リン酸、NADPH、NADH ほか: オリエンタル酵母工業製) 系の混合溶液 (S9mix) を調製した。これを添加した場合 (+S9) と添加しなかった場合 (-S9) について試験した。なお、緩衝液はリン酸水素二ナトリウムとリン酸ナトリウムで pH7.4 とした。(+S9 : S9mix 500 μ L/plate) 又は (-S9 : 緩衝液 500 μ L/plate) |

前培養	試験前日にニュートリエントブロス（関東化学製）が 10mL 入った L 字ガラス管に凍結保存 (-80℃) しておいた試験菌株の解凍液 20 μL を接種し、16 時間 (TA100 株) 及び 12 時間 (TA98 株) 振とうして前培養した。変異原性試験は、滅菌試験管に試料のアセトン溶液 50 μL と前培養菌液 100 μL (約 10 ⁹ 個/mL) を順に入れ、37℃で 20 分間プレインキュベーション (振とう) した。
培養	上記試験管にソフトアガー2mL (それぞれ 0.5mM のビオチン、ヒスチジンを含む) を加えて混合 (vortex) しシャーレ (最小グルコース平板培地) 重層した。試験後のシャーレを 37℃、48 時間インキュベーターで培養した。
コロニー 計数	シャーレ表面に出現した復帰変異コロニー (His ⁺) を、自動コロニーカウンター (東洋測器製) を用いて計数した。

3-1) 試験結果 (別表 3)

酢酸エチル抽出物の変異原性試験結果を別表 3 に示してある。別表 3 から、代謝活性化系 S9mix の無添加条件 (-S9) 下の試料の高濃度領域 (1250~5000 μg/plate) で菌に対する生育阻害作用 (Killing) が認められたが、すべての試験条件 (TA98-S9、TA98+S9、TA100-S9、TA100+S9) で溶媒対照のコントロール値 (自然復帰コロニー数: 15 個) の 2 倍以上のコロニー数は認められなかった。

3-2) 試験結果の判定

上記の試験結果から「陰性」と判断された。

4. 参考事項

一般にコントロールの 2 倍以上のコロニー数と良好な dose-response を与え、かつ再現性がある場合に変異原性が陽性と判断しています。今回の試料 (ヘルスコ・キュアー) は、TA98 株及び TA100 株を用いた変異原性試験 (DMSO 懸濁での試験及び酢酸エチル抽出成分の試験) では両試験とも変異原性が陰性となります。このことから試料のヘルスコ・キュアーには変異原性物質が殆ど含まれていないものと思われませんが、製造手法やロットが異なる場合などには変異原性が認められる可能性もありますので、その様な場合にはこの様な試験を追試されることを勧めます。

5. 参考文献: (厚生) 労働省安全衛生部化学物質調査課編: 安衛法における変異原性試験—テストガイドラインと GLP—; 中央労働災害防止協会発行 (1991)

別表1 ヘルスコ・キューアーのDMSO懸濁物の変異原性試験結果

レーザーカウンター/目視コロニーカウント記録用紙 (1)

カウント日 2008/8/27

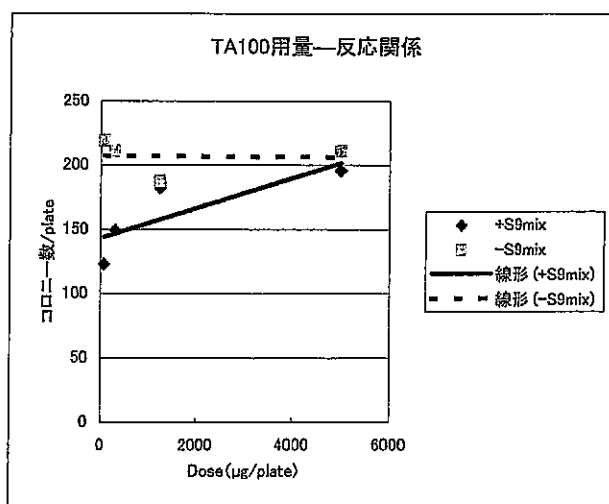
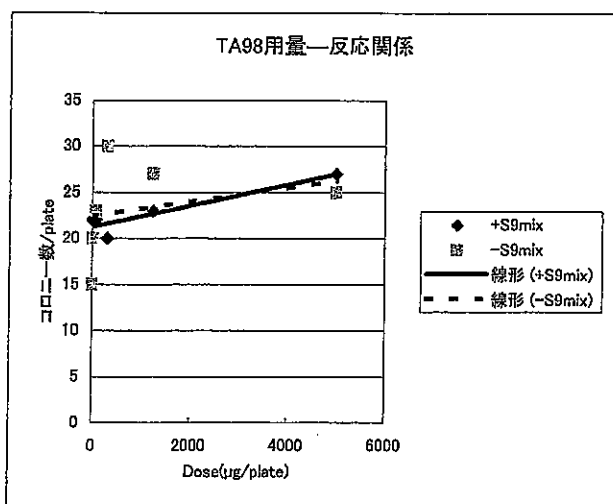
担当者名 Goto

サンプル名: ヘルスコ・キューアー

菌株名 TA98,TA100

S9mix	Dose (μg/p)	TA98 (コロニー数/p)	Dose (μg/p)	TA100 (コロニー数/p)	Dose (μg/p)	(コロニー数/p)	Dose (μg/p)	(コロニー数/p)	Dose (μg/p)	(コロニー数/p)
-	0	10 19 16 (15)	0	186 202 206 (198)						
	溶媒対照		溶媒対照							
	6		6		6		6		6	
	19.5	5 16 24 (20)	19.5	5 — —	5		5		5	
	78.1	4 30 16 (23)	78.1	4 230 208 (219)	4		4		4	
	313	3 31 29 (30)	313	3 211 — (211)	3		3		3	
	1250	2 29 24 (27)	1250	2 179 196 (188)	2		2		2	
5000	1 18 31 (25)	5000	1 208 214 (211)	1		1		1		
+	0	16 24 25 (22)	0	106 124 160 (130)						
	溶媒対照		溶媒対照							
	6		6		6		6		6	
	5		5		5		5		5	
	78.1	4 20 24 (22)	78.1	4 114 132 (123)	4		4		4	
	313	3 20 20 (20)	313	3 127 172 (150)	3		3		3	
	1250	2 20 25 (23)	1250	2 175 190 (183)	2		2		2	
5000	1 28 25 (27)	5000	1 202 190 (196)	1		1		1		

Killing(菌の生育阻害)



別表2 ヘルスコ・キュアーのDMSO懸濁物の変異原性試験結果

レーザーカウンター/目視コロニーカウント記録用紙 (2)

カウント日 2008/8/28

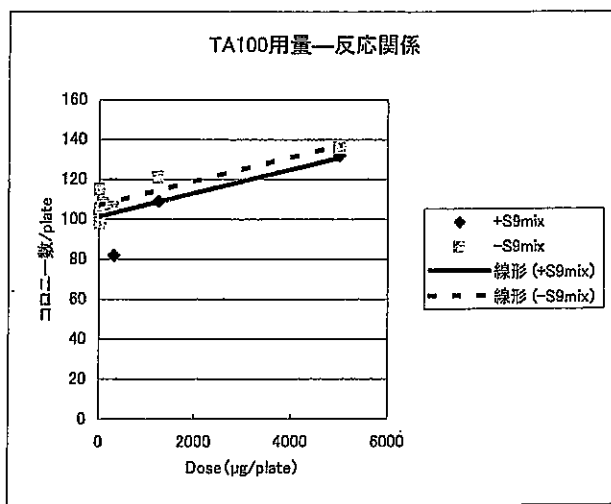
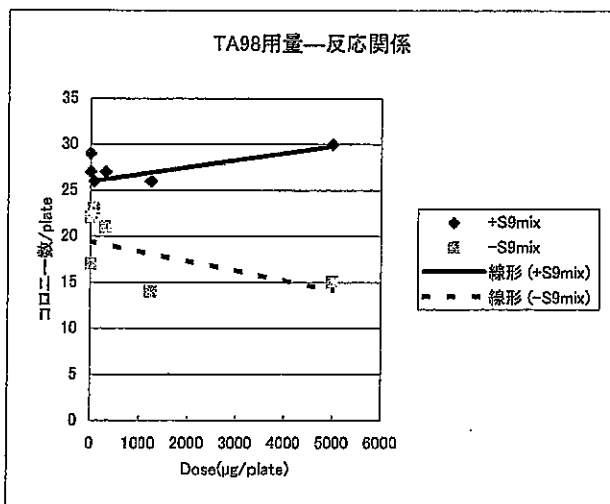
担当者名 Nakano (Goto)

サンプル名: ヘルスコ・キュアー

菌株名 Ta98、TA100

S9mix	Dose (μg/p)	TA98 (コロニー数/p)	Dose (μg/p)	TA100 (コロニー数/p)	Dose (μg/p)	(コロニー数/p)	Dose (μg/p)	(コロニー数/p)	Dose (μg/p)	(コロニー数/p)
-	0	18 24 31 14 (22)	0	91 125 128 116 (115)						
	溶媒対照		溶媒対照							
	4.9	6 18 15 (17)	4.9	6 91 104 (98)						
	19.5	5 14 20 (17)	19.5	5 108 101 (105)						
	78.1	4 29 17 (23)	78.1	4 104 112 (108)						
	313	3 26 16 (21)	313	3 100 112 (106)						
	1250	2 13 14 (14)	1250	2 133 108 (121)						
+	0	36 27 24 (29)	0	87 132 129 112 (115)						
	溶媒対照		溶媒対照							
	4.9	6 25 28 (27)	4.9	6 108 106 (107)						
	19.5	5 21 22 (22)	19.5	5 109 87 (98)						
	78.1	4 25 26 (26)	78.1	4 108 103 (106)						
	313	3 26 28 (27)	313	3 59 104 (82)						
	1250	2 27 25 (26)	1250	2 109 — (109)						
5000	1 30 29 (30)	5000	1 119 144 (132)							

Killing(菌の生育阻害)



別表3 ヘルスコ・キュアーの溶媒抽出物の変異原性試験結果

レーザーカウンター/目視コロニーカウント記録用紙 (3)

カウント日 2008/9/14

担当者名 Goto

サンプル名: ヘルスコ・キュアー

菌株名 TA98,TA100

S9mix	Dose (μg/p)		TA98 (コロニー数/p)		Dose (μg/p)		TA100 (コロニー数/p)		Dose (μg/p)		Dose (μg/p)		Dose (μg/p)		Dose (μg/p)	
-	0		31		87											
	溶媒対照		33	(28)	99	(99)										
			21		112											
	156	6	12	(15)	137	(131)	6		6							
			17		125											
	313	5	13	(16)	38	(46)	5		5							
			19		54											
625	4	19	(11)	49	(29)	4		4								
		3(Killing)		9(Killing)												
1250	3	0(Killing)	(0)	69	(41)	3		3								
		0(Killing)		13(Killing)												
2500	2	0(Killing)	(0)	15(Killing)	(43)	2		2								
		0(Killing)		70												
5000	1	0(Killing)	(0)	50	(26)	1		1								
		0(Killing)		1(Killing)												
+	0		33		197											
	溶媒対照		33	(36)	176	(188)										
			42		192											
	156	6	42	(45)	211	(207)	6		6							
			48		203											
	313	5	46	(55)	262	(251)	5		5							
			63		240											
625	4	56	(59)	272	(225)	4		4								
		61		178												
1250	3	67	(66)	259	(262)	3		3								
		64		264												
2500	2	73	(59)	255	(248)	2		2								
		44		240												
5000	1	62	(64)	290	(252)	1		1								
		65		213												

Killing(菌の生育阻害)

