

フルジオキサニルの復帰突然変異試験

フルジオキシソニルの復帰突然変異試験 概要

検 体

フルジオキシソニル

試験実施施設

財団法人 日本食品分析センター 千歳研究所

北海道千歳市文京2丁目3番

試験目的

検体の突然変異誘起性を調べる目的で、「医薬品の遺伝毒性試験に関するガイドラインについて」(平成11年11月1日 医薬審第1604号)の別添「遺伝毒性試験ガイドライン」に従い、復帰突然変異試験を行う。

試験用量及び使用菌株を以下に示す。

試験用量

5000, 1580, 500, 158, 50, 15.8, 5, 1.58, 0.5, 0.158, 0.05及び0.0158 μg /プレート

使用菌株

Salmonella typhimurium TA98, *Salmonella typhimurium* TA100及び*Salmonella typhimurium* TA1535

試験方法

検体について、0.0158～5000 μg /プレートの用量で復帰突然変異試験を行った。試験は、*Salmonella typhimurium* TA98, TA100及びTA1535を用いて、代謝活性化法によらない場合及び代謝活性化法による場合について、プレート法により実施した。

ジメチルスルホキシドを用いて試験液を調製した。試験液0.1 mL, S9mix又は0.1 mol/L Na-リン酸緩衝液(pH7.4) 0.5 mL及び菌懸濁液0.1 mLを順次滅菌小試験管に加え、トップアガー2 mLを加えて混合し、最少グルコース寒天平板培地上に一様に広げ固化させた。37 °Cの恒温器中で48時間培養し、復帰突然変異により出現したコロニーを計数した。

試験結果

検体は、陰性対照に比べ復帰変異コロニー数を増加させなかった。

以上のことから、本試験条件下における検体の突然変異誘起性は、陰性と結論した。

以 上

試験報告書

依頼者 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課



検体 フルジオキソニル

表題 フルジオキソニルの復帰突然変異試験

2011年(平成23年)10月12日に受託いたしました試験の結果は次のとおりです。

フルジオキシニルの復帰突然変異試験

要 約

フルジオキシニルの突然変異誘起性を調べる目的で、「医薬品の遺伝毒性試験に関するガイドラインについて」(平成11年11月1日 医薬審第1604号)の別添「遺伝毒性試験ガイドライン」に従い、*Salmonella typhimurium* TA98, TA100及びTA1535を用いて復帰突然変異試験を実施した。

検体について、0.0158～5000 μ g/プレートの用量で試験を行った。その結果、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上のことから、本試験条件下における検体の突然変異誘起性は、陰性と結論した。

依 頼 者

厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課

検 体

フルジオキシニル

試験期間

2011年10月12日～2012年02月03日

試験実施施設

財団法人 日本食品分析センター 千歳研究所
北海道千歳市文京2丁目3番

試験責任者

財団法人 日本食品分析センター 千歳研究所
安全性試験部 生物科学課
中尾 亮介

1 試験目的

検体の突然変異誘起性を調べる目的で、「医薬品の遺伝毒性試験に関するガイドラインについて」(平成11年11月1日 医薬審第1604号)の別添「遺伝毒性試験ガイドライン」に従い、*Salmonella typhimurium* TA98, TA100及びTA1535を用いて復帰突然変異試験を行う。

なお、試験用量及び使用菌株は「フルジオキシニルの復帰突然変異試験」仕様書に従う。

2 検 体

フルジオキシニル

なお、財団法人 日本食品分析センターが購入した以下のものを検体とした。

Product name: Fludioxonil
Product number: 46102
Lot number: SZB9314XV
Brand: Fluka
Company: Sigma-Aldrich Corporation

3 試験方法

1) 試験液の調製及び試験用量

検体をひょう取し、ジメチルスルホキシドを加え試験原液を調製した。

ジメチルスルホキシドを用いて試験原液を適宜希釈し、試験液を調製した。ジメチルスルホキシドを陰性対照とした。

試験用量を以下に示した。

試験用量

5000, 1580, 500, 158, 50, 15.8, 5, 1.58, 0.5, 0.158, 0.05及び
0.0158 $\mu\text{g}/\text{プレート}$

2) 陽性対照物質及び陽性対照物質を溶解する溶媒

① 陽性対照物質と用量

S9(-)			S9(+)		
菌株	陽性対照物質	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	菌株	陽性対照物質	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)
TA100	AF-2	0.01	TA100	2-AA	1
TA98	AF-2	0.1	TA98	2-AA	0.5
TA1535	NaN_3	0.5	TA1535	2-AA	2

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

NaN_3 : Sodium azide

2-AA : 2-Aminoanthracene

② 陽性対照物質及び陽性対照物質を溶解する溶媒

物質名		製造元	溶媒名
陽性 対 照	AF-2	和光純薬工業株式会社	DMSO
	NaN ₃	和光純薬工業株式会社	注射用水
	2-AA	和光純薬工業株式会社	DMSO
溶 媒	DMSO	株式会社 同仁化学研究所	—
	注射用水	株式会社 大塚製薬工場	—

陽性対照物質溶液の保存：分注保存(保存温度-80℃)

DMSO：ジメチルスルホキシド

3) 使用菌株

① 入手先

菌株	入手先
TA100	中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター
TA98	中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター
TA1535	中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター

② 保存方法

保存方法	分注凍結	保存液組成	菌懸濁液	0.8 mL
保存温度	-80℃		DMSO	0.07 mL

4) 菌の前培養

菌分注凍結保存液を解凍し、ニュートリエントブロス培地[OXOID, Nutrient broth No. 2]を15 mL分注したバツフル付三角フラスコに接種した。菌を接種したバツフル付三角フラスコは旋回を始めるまで冷蔵し、その後、37℃で10時間旋回培養した。培養後の菌懸濁液は吸光度を測定し、生菌数が 1×10^9 /mL以上であることを確認した。

振とう培養装置の型式及び製造元	バイオシェーカー BR-40LF タイテック株式会社
振とう方法 (振とう方式・振とう数)	旋回式・100回/分
培養容器(形状・容量・栓)	バツフル付三角フラスコ・100 mL・シリコン栓

5) S9及びS9mix

① S9の製造元, 保存方法

製造元	オリエンタル酵母工業株式会社	保存温度	-80 °C
-----	----------------	------	--------

② S9の調製方法

使用動物の種・系統及び性	ラット・SD系 雄	投与方法	腹腔内投与
誘導物質の名称	フェノバルビタール (PB) 5,6-ベンゾフラボン (5,6-BF)		
投与期間及び投与量 (mg/kg体重)	1日目: PB 30 mg/kg, 2日目: PB 60 mg/kg 3日目: PB 60 mg/kg + 5,6-BF 80 mg/kg 4日目: PB 60 mg/kg, 5日目: S9調製		

③ S9mixの組成

成分	S9mix(1.0 mL)中の量	成分	S9mix(1.0 mL)中の量
S9	0.1 mL	NADH	4 μmol
MgCl ₂	8 μmol	NADPH	4 μmol
KCl	33 μmol	Na-リン酸緩衝液 (pH7.4)	100 μmol
G-6-P	5 μmol		

6) 最少グルコース寒天平板培地

名称	テスメディアAN培地	製造元	オリエンタル酵母工業株式会社
備考: 直径100 mmの滅菌平板1枚当たり30 mLを分注して固化させたもの			
組成(培地1 L当たり)			
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g	クエン酸·H ₂ O	2 g
K ₂ HPO ₄	10 g	NH ₄ H ₂ PO ₄	1.92 g
NaOH	0.66 g	グルコース	20 g
寒天	15 g		

7) トップアガー

ソフトアガーにアミノ酸溶液を1/10容量加え調製した。

① ソフトアガー

Bacto agar (DIFCO)	0.6 %
NaCl	0.5 %

② アミノ酸溶液

L-ヒスチジン	0.5 mmol/L
D-ビオチン	0.5 mmol/L
L-トリプトファン	0.5 mmol/L

8) 試験操作法

代謝活性化法によらない場合及び代謝活性化法による場合について、プレート法により試験を行った。

試験液0.1 mL, S9mix又は0.1 mol/L Na-リン酸緩衝液 (pH7.4) 0.5 mL及び菌懸濁液0.1 mLを順次滅菌小試験管に加え、トップアガー2 mLを加えて混合し、最少グルコース寒天平板培地上に一様に広げ固化させた。37 °Cの恒温器中で48時間培養し、復帰突然変異により出現したコロニーを計数した。

9) 統計処理

実施しなかった。

10) 判定基準

コロニー数の平均値が、陰性対照と比較して試験区で2倍以上に増加し、かつ、その増加に用量依存性及び再現性が認められた場合に陽性と判定する。

なお、試験区のコロニー数の平均値が、陰性対照と比較して2倍未満の場合には、復帰変異コロニー数の増加は認められないものとする。

4 試験結果

試験結果を表-1~4に示した。検体は、陰性対照に比べ復帰変異コロニー数を増加させなかった。

なお、表-1~4に示す試験用量で、検体の析出、沈殿が認められた。菌の生育阻害は、いずれの試験用量においても認められなかった。

陽性対照では、著明な復帰変異コロニー数の増加が認められた。

5 結 論

検体について、*Salmonella typhimurium* TA98, TA100及びTA1535を用いて復帰突然変異試験を実施した。その結果、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上のことから、本試験条件下における検体の突然変異誘起性は、陰性と結論した。

6 参考文献

- Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. : Cancer Lett., 1, 91-96(1975).
- Maron, D. M. and Ames, B. N. : Mutat. Res., 113, 173-215(1983).
- 労働省告示第77号(昭和63年9月1日).

表-1 試験結果表(用量設定試験 代謝活性化法によらない場合)

検体の名称： フルジオキソニル

代謝活性化系 の有無	検体の 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	TA98
S9mix (-)	陰性対照	192	10	15
		220 (203)	9 (9)	21 (16)
		198	8	13
	0.0158	193	10	27
		225 (209)	10 (12)	21 (25)
		209	16	27
	0.05	194	12	17
		190 (204)	11 (12)	19 (21)
		227	12	27
	0.158	190	10	20
		183 (194)	8 (9)	18 (19)
		209	9	20
	0.5	190	8	16
		211 (198)	4 (7)	31 (24)
		193	9	26
1.58	196	9	21	
	205 (205)	12 (11)	19 (23)	
	214	12	30	
5	189	19	24	
	227 (206)	6 (10)	20 (22)	
	202	6	22	
15.8	216	11	21	
	197 (199)	13 (10)	27 (23)	
	185	6	20	
50	187	8	20	
	195 (192)	10 (9)	21 (19)	
	195	10	15	
158	193	15	17	
	192 (202)	11 (13)	18 (17)	
	221	12	16	
500	183	12	21	
	206 (205)	7 (9)	27 (23)	
	226	7	21	
1580 †	184	10	15	
	189 (190)	13 (10)	30 (22)	
	197	7	21	
5000 †	192	9	19	
	196 (195)	6 (9)	11 (17)	
	196	11	20	
陽性対照	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2
	用量(μ g/プレート)	0.01	0.5	0.1
	コロニー数	417	690	352
	/プレート	407 (413)	699 (717)	359 (343)
		414	762	319

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

NaN₃ : Sodium azide

括弧内は各プレートのコロニー数の平均値を示す。

陰性対照 : 試験液の調製に用いた溶媒

† : 検体の析出, 沈殿が認められたことを示す。

表-2 試験結果表(用量設定試験 代謝活性化法による場合)

検体の名称： フルジオキソニル

代謝活性化系 の有無	検体の 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	TA98
S9mix (+)	陰性対照	174	6	30
		193 (189)	12 (10)	36 (32)
		200	12	30
	0.0158	193	16	25
		207 (196)	10 (12)	27 (28)
		187	10	31
	0.05	199	11	35
		193 (199)	12 (10)	31 (32)
		206	7	30
	0.158	188	10	28
		204 (202)	10 (9)	21 (26)
		214	8	30
	0.5	183	7	37
		208 (201)	8 (9)	32 (32)
		211	12	26
	1.58	224	7	31
223 (223)		9 (9)	39 (33)	
222		11	30	
5	225	13	36	
	217 (219)	6 (10)	28 (32)	
	215	12	32	
15.8	183	14	27	
	193 (200)	13 (12)	33 (32)	
	224	9	35	
50	205	9	29	
	191 (199)	8 (10)	30 (25)	
	201	12	16	
158	194	8	34	
	176 (184)	8 (6)	27 (33)	
	183	3	38	
500	186	11	28	
	199 (191)	5 (8)	26 (26)	
	189	9	25	
1580 †	195	11	29	
	201 (196)	7 (10)	11 (21)	
	191	11	24	
5000 †	204	11	32	
	174 (184)	12 (10)	29 (30)	
	175	7	29	
陽性対照	名 称	2-AA	2-AA	2-AA
	用量(μg /プレート)	1	2	0.5
	コロニー数 /プレート	1278 1224 (1226) 1176	392 359 (376) 376	422 389 (421) 452

2-AA : 2-Aminoanthracene

括弧内は各プレートのコロニー数の平均値を示す。

陰性対照：試験液の調製に用いた溶媒

†：検体の析出，沈殿が認められたことを示す。

表-3 試験結果表(本試験 代謝活性化法によらない場合)

検体の名称: フルジオキシニル

代謝活性化系の有無	検体の用量 (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	TA98	
S9mix (-)	陰性対照	103	9	26	
		112 (109)	10 (10)	14 (21)	
		113	12	24	
	0.0158	114	13	26	
		123 (119)	8 (11)	14 (19)	
		119	12	17	
	0.05	129	11	23	
		109 (115)	10 (10)	23 (21)	
		107	10	17	
	0.158	133	15	18	
		117 (115)	15 (14)	27 (24)	
		96	11	27	
	0.5	122	17	20	
		137 (130)	7 (11)	28 (22)	
		132	9	19	
	1.58	116	13	20	
		105 (119)	12 (12)	15 (19)	
		135	10	21	
	5	123	5	28	
		101 (111)	14 (12)	25 (25)	
109		17	21		
15.8	107	12	32		
	118 (112)	6 (8)	22 (27)		
	111	5	28		
50	117	8	21		
	133 (121)	11 (10)	19 (21)		
	114	11	24		
158	105	6	19		
	108 (104)	12 (9)	16 (20)		
	100	8	25		
500	96	8	23		
	113 (107)	7 (7)	29 (24)		
	112	6	19		
1580 †	112	9	20		
	99 (104)	7 (8)	20 (20)		
	101	7	20		
5000 †	97	16	20		
	96 (96)	7 (10)	13 (18)		
	94	8	20		
陽性対照	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	
	用量(μg/プレート)	0.01	0.5	0.1	
	コロニー数	368	737	384	
	/プレート	350 (366)	684 (704)	347 (357)	
		379	692	339	

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide
NaN₃: Sodium azide

括弧内は各プレートのコロニー数の平均値を示す。
陰性対照: 試験液の調製に用いた溶媒
†: 検体の析出, 沈殿が認められたことを示す。

表-4 試験結果表(本試験 代謝活性化法による場合)

検体の名称： フルジオキシニル

代謝活性化系 の有無	検体の 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	TA98
S9mix (+)	陰性対照	135	7	17
		127 (134)	3 (7)	30 (23)
		141	10	22
	0.0158	116	11	30
		127 (131)	13 (10)	35 (30)
		150	6	26
	0.05	127	12	26
		125 (125)	10 (9)	24 (24)
		122	5	21
	0.158	135	7	32
		134 (141)	11 (8)	29 (30)
		153	7	28
	0.5	135	17	31
		130 (134)	8 (11)	26 (32)
		138	7	39
	1.58	157	12	35
150 (161)		14 (12)	19 (30)	
175		9	37	
5	133	11	36	
	139 (131)	10 (10)	25 (31)	
	120	8	32	
15.8	128	12	27	
	114 (122)	12 (11)	42 (33)	
	124	10	31	
50	138	10	30	
	147 (142)	11 (8)	34 (33)	
	141	4	36	
158	130	6	17	
	114 (124)	8 (8)	28 (24)	
	129	9	27	
500	115	13	18	
	121 (123)	11 (11)	36 (27)	
	133	9	26	
1580 †	121	11	32	
	112 (112)	11 (10)	23 (27)	
	102	9	27	
5000 †	113	7	24	
	106 (107)	10 (9)	36 (28)	
	102	9	24	
陽性対照	名称	2-AA	2-AA	2-AA
	用量(μg /プレート)	1	2	0.5
	コロニー数 /プレート	1487 1378 (1407) 1356	381 416 (390) 374	458 445 (453) 457

2-AA : 2-Aminoanthracene

括弧内は各プレートのコロニー数の平均値を示す。

陰性対照：試験液の調製に用いた溶媒

†：検体の析出、沈殿が認められたことを示す。

以上