



**生物学的安全性試験
復帰突然変異（Ames）試験
報告書**

合同会社STH殿

株式会社メイプルバイオラボラトリーズ

化粧品製造業許可12C Z 200259、製造販売業許可12C0X 10014
〒270-1402 千葉県白井市平塚2802-1

電話 04-7100-0001

e-mail; inquiry@maple-biolab.com

2021年6月21日

目的

合同会社STH殿が製造する試薬（CLEANEST NFE2（室内用））の生物学的安全性（復帰突然変異）を、Ames法を用いて確認する。

試験期間

2021年5月10日から6月18日

試験方法

試験方法は OECD TG471 に準拠した。

試験結果

OECD TG471 に記載の5菌株（TA100、TA98、TA1535、TA1537、WP2uvrA）を用いて復帰突然変異試験を実施した。本試験において S9Mix（-）、S9Mix（+）いずれの系の場合も製品濃度を用い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。

以上の試験結果より、本被験物質の変異原性は陰性であると判定される。



**生物学的安全性試験
復帰突然変異試験
報告書**

合同会社STH殿

株式会社メイプルバイオラボラトリーズ

化粧品製造業許可12C Z 200259、製造販売業許可12C O X 10014

〒270-1402 千葉県白井市平塚2802-1

電話 04-7100-0001

e-mail; inquiry@maple-biolab.com

2021年6月21日

目的

合同会社STH殿が製造する試薬（CLEANEST NFE2（室内用））の生物学的安全性（復帰突然変異）を、Ames法を用いて確認する。

試験期間

2021年5月10日から6月18日

試験方法

試験方法は OECD TG471 に準拠した。

被験物質

CLEANEST NFE2 (室内用) ; 合同会社 STH 殿提供品

代謝活性系非存在下で測定する場合の陽性対照物質としては、それぞれの微生物に対して以下の試薬を使用した。

1. ネズミチフス菌 TA98 ; 2-ニトロフルオレン (2-NF)
2. ネズミチフス菌 TA100 ; アジ化ナトリウム (NaN₃)
3. ネズミチフス菌 TA1535 ; アジ化ナトリウム (NaN₃)
4. ネズミチフス菌 TA1537 ; 9-アミノアクリジン (9-AA)
5. 大腸菌 WP2uvrA ; マイトマイシンC (1 mg/mL)

代謝活性存在下で測定する場合の陽性対照物質としては、すべての微生物に対して以下の試薬を使用した。

1. シクロホスアミド

試験手順

対象物質

各陽性対象物質は PBS にて 1mg/mL の原液を調整した後、2-ニトロフルオレンは 10μg/mL に、アジ化ナトリウムは精製水を用いて 5μg/mL に、9-アミノアクリジンは 800μg/mL に、マイトマイシンCは 1 mg/mL に希釈調整した。

試験系

使用菌株 (NBRC より購入)

Salmonella typhimurium	(TA100)
Salmonella typhimurium	(TA98)
Salmonella typhimurium	(TA1535)
Salmonella typhimurium	(TA1537)
Escherichia coli	(WP2uvrA)

試験材料の調整

1. S9Mix

次表の通り S9Mix を無菌的に調整した。

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

2. ニュートリエントプロス培養液

ニュートリエントプロス	0.8 g
塩化ナトリウム	0.5 g
精製水	100mL

3. 最少グルコース寒天平板培地

Vogel-Bonner の最少培地 E (10 倍濃度の原液)

硫酸マグネシウム	2 g
クエン酸・1 水塩	20 g
リン酸二カリウム・無水塩	100 g
リン酸水素アンモニウムナトリウム・4 水塩	35 g
精製水	全量を 1000mL にする。

最少グルコース寒天平板培地

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

Vogel-Bonner の最少培地 E (10 倍濃度の原液)、グルコース溶液、寒天溶液を高圧蒸気滅菌後 60℃に冷まし、寒天溶液に混合する。この 20mL を 9cm のシャーレに分注する。37℃のインキュベーター中に転倒して 2 日間放置して表面を乾燥させる。

4. トップアガー

寒天 0.6%
塩化ナトリウム 0.5%
高圧滅菌後 45℃で保温

サルモネラ用；寒天液 100mL、0.5mM L-ヒスチジン+0.5mM D-ビオチン 10mL 添加
大腸菌用； 寒天液 100mL、0.5mM L-トリプトファン 10mL 添加

信頼性の予見；予見することのできなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったことに関する情報

予見することのできなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったことはない。

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を分注・凍結保存したものを解凍し、そのうちの 20 μ L を 10mL のニュートリエントブロス培養液に接種し、12 時間 37℃のインキュベーター内に置いて振とう培養を行った。試験管にこの培養液 0.1mL、S9Mix0.5mL 及び被験物質溶液 0.1mL をとり、37℃で 20 分間プレインキュベートを行った。

アミノ酸（ヒスチジン又はトリプトファン）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板培地の上にまき、37℃で 48 時間培養した。培養後実体顕微鏡及び肉眼により各菌株の生育疎外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。

2. 本試験

2 枚ずつのシャーレを用いた。

本試験は用量設定試験と同様の操作で実施した。

用量設定試験で菌株に生育阻害が認められなかったので最高濃度を 50 μ g/mL（5 μ g/プレート）とした。

3. 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及び溶媒対照群のデータと比較して、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、用量依存性が見られ、かつ再現性が認められる場合を陽性と判断した。

4. 試験結果

表 1. 陰性対照、検体、陽性対照に生育した微生物数 (cfu)

	陰性対照				検体				陽性対照			
	S9+	平均値	S9-	平均値	S9+	平均値	S9-	平均値	S9+	平均値	S9-	平均値
(TA98)	77	78.5	126	130.5	81	75.5	53	49.5	75	73.0	210	191.0
フレームシフト型	80		135		70		46		71		172	
(TA100)	125	130.0	113	113.0	111	106.0	85	82.0	114	106.5	404	377.5
塩基対置換型	135		113		101		79		99		351	
(TA1535)	19	17.5	34	22.5	25	24.0	23	23.0	126	116.0	399	289.5
塩基対置換型	16		11		23		23		106		180	
(TA1537)	11	8.0	3	16.5	11	22.5	3	27.5	64	59.5	77	84.0
フレームシフト型	5		30		34		52		55		91	
(WP2uvrA)	72	72.5	64	63.5	73	68.0	65	60.0	83	77.5	114	132.5
塩基対置換型	73		63		63		55		72		151	

5. 考察

OECD TG471 に記載の 5 菌株 (TA100、TA98、TA1535、TA1537、WP2uvrA) を用いて復帰突然変異試験を実施した。本試験において S9Mix (-)、S9Mix (+) いずれの系の場合も製品濃度を用い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、また測定誤差範囲内で溶媒対照の 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。

以上の試験結果より、本被験物質の変異原性は陰性であると判定される。

試験担当者

小林 初江 (資格 ; 臨床検査技師) 、大西 守 (資格 ; Ph.D. (B'ham))
株式会社メイプルバイオラボラトリーズ