



最終報告書

試験表題:2,3-ペンタンジオンの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号: 



試験責任者署名:



本報告書は表紙を含む 25 枚



目次

	(頁)
1. 要約.....	4
2. 試験表題.....	5
3. 試験番号.....	5
4. 試験目的.....	5
5. 試験委託者.....	5
6. 試験施設.....	5
7. 試験責任者.....	5
8. 試験実施.....	5
9. GLP 及びガイドライン.....	6
10. 試験関係資料の保存.....	6
11. 被験物質及び対照物質.....	7
11.1. 被験物質.....	7
11.2. 陰性対照物質.....	7
11.3. 陽性対照物質.....	7
12. 使用菌株.....	8
13. S9 mix.....	8
13.1. S9.....	8
13.2. コファクター.....	9
13.3. S9 mix の調製.....	9
14. 培地.....	9
15. 試験方法.....	9
15.1. 識別方法.....	9
15.2. 試験構成.....	10
15.3. 菌懸濁液の調製.....	10
15.4. 被験物質液の調製.....	10
15.5. 陽性対照物質液の調製.....	11
15.6. 用量段階.....	11
15.7. 試験操作.....	12
15.8. 無菌試験.....	12
15.9. 観察及び復帰変異コロニー数の計測.....	12
16. 試験の成立条件.....	12
17. 結果の表示.....	13
18. 統計学的処理.....	13
19. 判定基準.....	13
20. 結果及び考察.....	13
21. 試験の信頼性に影響をおよぼした要素.....	14

別表 1	試験結果表（用量設定試験）
別表 2, 3	試験結果表（本試験）
別表 4~6	試験結果表（確認試験）
別表 7	比活性値表
図 1	用量反応曲線（用量設定試験）
図 2	用量反応曲線（本試験）
図 3	用量反応曲線（確認試験）
添付資料	陰性対照値及び陽性対照値の背景データから算出した基準値

1. 要約

2,3-ペンタンジオンの遺伝子突然変異誘発性を、塩基対置換型変異株の *S. typhimurium* TA100, TA1535, *E. coli* WP2 *uvrA* 及びフレームシフト型変異株の *S. typhimurium* TA98, TA1537 を用い、37°C, 20 分間のプレインキュベーション法により検討した。試験は、代謝活性化非存在下及び代謝活性化存在下の用量設定試験及び本試験により実施し、用量設定試験及び本試験での試験結果の再現性を確認した。また、代謝活性化非存在下の *S. typhimurium* TA98, TA100, *E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化存在下のすべての菌株については、確認試験を実施し試験結果の再現性を確認した。その結果、本被験物質は代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA98, TA100, *E. coli* WP2 *uvrA* に対して復帰変異コロニー数を用量反応的に増加させ、代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA100 及び代謝活性化非存在下の *S. typhimurium* TA98 については陰性対照の 2 倍以上の増加を示した。また、*S. typhimurium* TA100 では本試験及び確認試験において、*S. typhimurium* TA98 では用量設定試験、本試験及び確認試験において試験結果に再現性も得られた。復帰変異コロニー数の増加は、*S. typhimurium* TA98 の代謝活性化非存在下ではすべての試験、代謝活性化存在下では用量設定試験において、代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA100 ではすべての試験において、代謝活性化の有無にかかわらず *E. coli* WP2 *uvrA* では本試験及び確認試験において、背景データから算出した陰性対照の変動範囲の上限を超えた。一方、陽性対照は、代謝活性化の有無にかかわらずすべての菌株に対して、復帰変異コロニー数を陰性対照の 2 倍以上に増加させた。陰性対照及び陽性対照の平均値は、用量設定試験、本試験及び確認試験のいずれにおいても背景データから算出した変動範囲の範囲内であった。また、無菌試験の結果、雑菌の混入がないことが確認された。これらの結果は、試験が適切に実施されたことを示す。

以上の結果より、本被験物質は遺伝子突然変異誘発性を有すると判定する。



2. 試験表題

2,3-ペンタンジオンの細菌を用いる復帰突然変異試験

3. 試験番号



4. 試験目的

被験物質の遺伝子突然変異誘発性を、塩基対置換型変異株の *S. typhimurium* TA100, TA1535, *E. coli* WP2 *uvrA* 及びフレームシフト型変異株の *S. typhimurium* TA98, TA1537 を使用し検討する。

5. 試験委託者

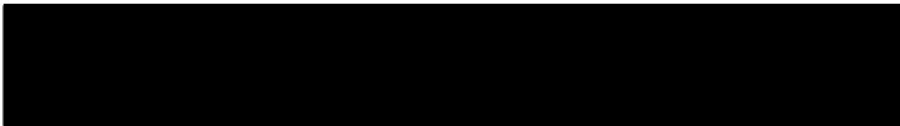
国立医薬品食品衛生研究所



試験委託担当者



6. 試験施設



7. 試験責任者



8. 試験実施

試験開始日

溶解性試験

用量設定試験

前培養開始日

処理日

観察及びコロニー数計測

本試験

前培養開始日

処理日

観察及びコロニー数計測

確認試験

前培養開始日

処理日

観察及びコロニー数計測

試験終了日



9. GLP 及びガイドライン

遵守した GLP :

非適用

適用したガイドライン :

「新規化学物質等に係る試験の方法について」(薬食発 0331 第 7 号, 平成 23・03・29 製局第 5 号, 環企発第 110331009 号, 平成 23 年 3 月 31 日, 薬生発 1221 第 1 号, 20151209 製局第 1 号, 環企発第 1512211 号, 平成 27 年 12 月 21 日による一部改正)

「労働安全衛生法第 57 条の 3 第 1 項の規定に基づき労働大臣の定める基準を定める告示」
(労働省告示第 77 号, 昭和 63 年 9 月 1 日及び労働省告示第 67 号, 平成 9 年 6 月 2 日)

「微生物を用いる変異原性試験の具体的手法及び試験結果の評価方法について」(事務連絡, 平成 11 年 2 月 8 日)

10. 試験関係資料の保存

保存場所 : 当試験施設, 資料保存施設

保存資料 : 試験計画書 (原本) 及びその変更の記録

被験物質の受領, 返却または廃棄, 管理に関する記録

被験物質の使用に関する記録

菌株の管理に関する記録

試験の実施に関する記録

最終報告書 (原本)

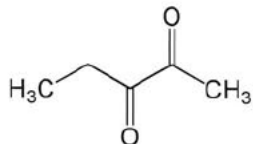
その他記録文書

保存期間 : 本試験終了後 5 年間保存

11. 被験物質及び対照物質

11.1. 被験物質

名称： 2,3-ペンタンジオン
別名： アセチルプロピオニル
CAS 番号： 600-14-6
構造式：



ロット番号： [REDACTED]
製造元： [REDACTED]
純度： 99.7%
分子量： 100.12
融点： -52°C
沸点： 108°C
常温における性状：淡黄色～黄色の透明液体
溶解性： 水に不溶，ジメチルスルホキシドに 5 wt%以上，アセトンに 10 wt%以上溶解¹⁾
安定性： 冷蔵で安定
溶媒中での安定性：水，ジメチルスルホキシド及びアセトンに安定¹⁾
保存条件： 遮光，冷蔵
保存場所： [REDACTED] (許容範囲：2～8°C)
取り扱い上の注意：引火性の高い液体及び蒸気 (引火点 18°C)
残余被験物質の管理：試験操作終了後，被験物質管理責任者に移管
1) 溶解性試験の結果による

11.2. 陰性対照物質

陰性対照物質は，被験物質液の調製に使用した下記のジメチルスルホキシドとした。

名称：ジメチルスルホキシド (以下 DMSO と略す)
ロット番号： [REDACTED]
純度：100.0%
規格等級：試薬特級
供給元：和光純薬工業株式会社

11.3. 陽性対照物質

陽性対照物質は，細菌を用いる復帰突然変異試験に汎用されている下記のものを使用した。

名称：2-(2-furyl-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (以下 AF-2 と略す)
ロット番号： [REDACTED]
含量：99.7%
供給元：和光純薬工業株式会社

名称：Sodium azide（以下 AZI と略す）

ロット番号：[REDACTED]

純度：99.9%

供給元：和光純薬工業株式会社

名称：9-aminoacridine（以下 9AA と略す）

ロット番号：[REDACTED]

純度：99.5%

供給元：SIGMA-ALDRICH

名称：2-aminoanthracene（以下 2AA と略す）

ロット番号：[REDACTED]

含量：96.7%

供給元：和光純薬工業株式会社

12. 使用菌株

菌株は、既知変異誘発物質に対して高い感受性を有しており、細菌を用いる復帰突然変異試験に汎用されている下記の菌株を使用した。菌株の入手先及び入手年月日を以下に示す。入手した菌株は、-80°Cで保存した。

菌株名	入手先	入手年月日
塩基対置換型変異株； <i>S. typhimurium</i> TA100, TA1535	日本バイオアッセイ研究センター	[REDACTED]
フレームシフト型変異株 <i>S. typhimurium</i> TA98, TA1537		
塩基対置換型変異株； <i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	国立遺伝学研究所	[REDACTED]

13. S9 mix

13.1. S9

S9は、オリエンタル酵母工業株式会社製造の以下のラット肝 S9 を使用した。S9 は、使用するまで-80°Cで保存した。

使用動物	ラット：Sprague-Dawley 系
性，週齢／体重範囲	雄，7週齢／208.4±9.6 g
Lot No.	[REDACTED]
製造年月日	[REDACTED]
誘導物質	Phenobarbital (PB) 及び 5,6-Benzoflavone (BF)
投与量及び投与回数	PB: 30 mg/kg 1回 (1日目) 60 mg/kg 3回 (2~4日目) BF: 80 mg/kg 1回 (3日目)
投与方法	腹腔内投与

13.2. コファクター

コファクターは、グルコース-6-リン酸、NADH 及び NADPH (オリエンタル酵母工業株式会社) を 0.22 mol/L ナトリウム-リン酸緩衝液に溶解し、濾過滅菌した後 MgCl₂-KCl 溶液を加えたものを使用した。

13.3. S9 mix の調製

-80°C に凍結保存した S9 を用時に解凍し、コファクターと 1 : 9 の割合で混合した。以下に S9 mix 1 mL 中の成分濃度を示す。調製した S9 mix は、氷冷下で保存した。

S9	0.1 mL
塩化マグネシウム	8 µmol
塩化カリウム	33 µmol
グルコース-6-リン酸	5 µmol
NADPH	4 µmol
NADH	4 µmol
リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4)	100 µmol

14. 培地

ニュートリエントブロス液は、25 g/L の Nutrient broth No. 2 (Lot No. [REDACTED] Oxoid Ltd.) を使用した。最少グルコース寒天平板培地は、極東製薬工業株式会社製造の以下の組成のバイタルメディア AMT-S 培地 (Lot No. [REDACTED] 使用寒天；大洋寒天, Lot No. [REDACTED] SSK セールス) を使用した。トップアガーは、軟寒天溶液 (Bacto Agar, Becton, Dickinson) : 0.6%, 塩化ナトリウム (和光純薬工業株式会社) : 0.5% に、アミノ酸溶液 (0.5 mmol/L ヒスチジン；関東化学株式会社, 0.5 mmol/L ビオチン；和光純薬工業株式会社, 0.5 mmol/L トリプトファン；関東化学株式会社) の混合溶液を 1/10 容量で加えたものを使用した。

15. 試験方法

15.1. 識別方法

各菌株の前培養時には、油性マーカーペンで菌株名を培養容器に表記した。試験時の最少グルコース寒天平板培地には、試験番号、菌株名、用量、被験物質名 (別名を含む)、陰性対照物質名又は陽性対照物質名及び代謝活性化の有無を明記した。

15.2. 試験構成

菌株ごとに代謝活性化非存在下及び代謝活性化存在下について実施し、さらに陰性対照及び陽性対照を設けた。なお、陽性対照は、同日に実施した試験と共有した。用量当たりの最少グルコース寒天平板培地は、陰性対照、被験物質及び陽性対照のいずれも2枚とした。陽性対照物質の用量は、細菌を用いる復帰突然変異試験に広く使用されている下記の用量とした。

菌 株	代謝活性化非存在下		代謝活性化存在下	
	化学物質名	用 量 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	化学物質名	用 量 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)
TA100	AF-2	0.01	2AA	1.0
TA1535	AZI	0.5	2AA	2.0
WP2 <i>uvrA</i>	AF-2	0.01	2AA	10.0
TA98	AF-2	0.1	2AA	0.5
TA1537	9AA	80.0	2AA	2.0

15.3. 菌懸濁液の調製

三角フラスコ（容量 200 mL）にニュートリエントブロス培養液を 25 mL 分注し、これに菌懸濁液 50 μL を接種して 37°C で 10 時間、100 回/min で振盪培養した。接種したニュートリエントブロス培養液は、培養開始まで 4°C に保存した。培養終了後菌懸濁液の濁度（O.D.）を波長 660 nm で測定し、菌数が 1.0×10^9 個/mL 以上であることを確認した。以下に試験ごとの生菌数を示す。

試 験	生菌数 ($\times 10^9$ 個/mL)				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
用量設定試験	4.27	5.46	5.92	4.50	2.80
本 試 験	4.23	5.39	5.72	4.53	2.74
確 認 試 験	4.29	5.28	5.97	4.45	2.73

15.4. 被験物質液の調製

15.4.1. 溶媒

本被験物質の溶媒は、溶解性試験の結果より設定した。溶解性試験は、日本薬局方注射用水、DMSO 及びアセトンを経験に実施した。溶解性試験の調製濃度は、日本薬局方注射用水及び DMSO の場合は 50 mg/mL、アセトンの場合は 100 mg/mL とした。

所定量の被験物質を用時秤量した。これに 50 または 100 mg/mL の濃度になるよう各溶媒を加え、目視により発熱、発煙等の反応性の有無及び溶解性を確認した。その結果、本被験物質は DMSO 及びアセトンに対して溶解した。また、日本薬局方注射用水に対しては、超音波による分散によっても一様に懸濁しなかった。一方、本被験物質と溶媒との反応性については、いずれの溶媒においてもなんら認められなかった。従って、本被験物質はこれらの溶媒に対して安定であると判断した。

以上の結果より、本被験物質の溶媒は溶液が得られ、また反応性が認められず溶媒中で本被験物質が安定であると判断された DMSO とした。

15.4.2. 調製方法

所定量の被験物質を用時秤量した。これに溶解性試験の結果より設定した溶媒を加え、最高濃度の被験物質溶液 50 mg/mL を調製した。調製の際は、秤量した被験物質の液量を添加する DMSO の液量から除いた。また、調製に使用した DMSO は、Molecular Sieves (3A)により脱水した。低濃度の被験物質溶液は、同様の DMSO を使用して最高濃度の被験物質溶液を段階希釈し調製した。使用後の残余被験物質液は、感染性廃棄物として廃棄した。試験ごとの被験物質の秤量値及び液量、DMSO の添加量を下記に示す。

試験区分	秤量値(mg)	液量(μL)	添加量(mL)
用量設定試験	207.43	220	3.929
本試験	262.00	270	4.970
確認試験	211.61	220	4.012

15.5. 陽性対照物質液の調製

陽性対照物質は、DMSO (LotNo. [REDACTED], 純度 100.0%, 和光純薬工業株式会社) に溶解し-80°C に凍結保存したものを、用時に解凍して使用した。調製濃度を下記に示す。使用後の残余陽性対照物質液は、感染性廃棄物として廃棄した。

化学物質名	濃度 (μg/mL)
AF-2	0.1, 1.0
AZI	5
9AA	800
2AA	5, 10, 20, 100

15.6. 用量段階

本試験の用量段階を設定するため、用量設定試験を実施し復帰変異コロニー数の計測及び生育阻害、析出の有無の観察を行った。用量設定試験の用量段階は、5000 μg/plate を最高用量とした以下公比 4 の計 6 用量とした。用量設定試験の結果を別表 1 に示す。

本被験物質は、代謝活性化非存在下のすべての菌株に対して 1250 μg/plate の用量で生育阻害を示した。代謝活性化存在下においても、*S. typhimurium* TA100, TA1535, TA1537 に対して 313 μg/plate 以上、*S. typhimurium* TA98, *E. coli* WP2 *uvrA* に対して 1250 μg/plate 以上の用量で生育阻害を示した。また、復帰変異コロニー数の用量反応的な増加が代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA98, TA100, *E. coli* WP2 *uvrA* に対して観察され、*S. typhimurium* TA98 では陰性対照の 2 倍以上の増加を示した。一方、被験物質の析出については、代謝活性化の有無にかかわらずいずれの用量段階においても観察されなかった。

以上の結果より、本試験の用量段階は、代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA98, TA100, *E. coli* WP2 *uvrA* については、直線的な用量反応性が得られるよう、復帰変異コロニー数の増加が観察された用量を参考に代謝活性化非存在下及び代謝活性化存在下の *S. typhimurium* TA98, *E. coli* WP2 *uvrA* では 2500 μg/plate を最高用量とした以下公比 2 の計 7 用量、代謝活性化存在下の *S. typhimurium* TA100 では 2500 μg/plate を最高用量とした以下公比 2 の計 9 用量とした (別表 2, 3)。一方、代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA1535, TA1537 については、用量設定試験において復帰変異コロニー数の増加が認められなかったことから、本試験の用量段階は、生育阻害の観察された用量を参考に 313 または 1250 μg/plate を最高用量とした以下公比 2 の計 6 用量とした

(別表 2, 3) . また, 代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA98, TA100, *E. coli* WP2 *uvrA* については, 本試験の結果を参考に 1600 または 2400 $\mu\text{g}/\text{plate}$ を最高用量とした以下公比 2 の計 7 または 10 用量による確認試験を実施し, 試験結果の再現性を確認した (別表 4, 5) . また, 代謝活性化存在下の *S. typhimurium* TA1535, TA1537 については, 用量設定試験において試験結果の評価及び再現性の確認に必要な用量数が満たないと判断し, 313 $\mu\text{g}/\text{plate}$ を最高用量とした以下公比 2 の計 6 用量による確認試験 (別表 6) を実施した.

15.7. 試験操作

菌株と被験物質液の処理方法は, 細菌を用いる復帰突然変異試験の定法として用いられる 37°C, 20 分間のプレインキュベーション法とした.

試験管に陰性対照物質, 被験物質液または陽性対照物質液 0.1 mL を分注した. これに代謝活性化非存在下の場合は 1/15 mol/L ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4) を, 代謝活性化存在下の場合は S9 mix を 0.5 mL 加え, さらに菌懸濁液 0.1 mL を加えて攪拌した後 37°C, 振盪回数 105~116 回/分 (変動範囲) で 20 分間プレインキュベーションした. プレインキュベーション終了後これにトッパガーを 2.0 mL 加えて攪拌し, 最少グルコース寒天平板培地に重層した. 最少グルコース寒天平板培地の上下を反転し, 37°C で 48 時間培養した.

15.8. 無菌試験

被験物質への雑菌の混入, 試験操作時の雑菌の混入がないことを確認するため, 被験物質液と S9 mix について無菌試験を実施した. 無菌試験における被験物質液及び S9 mix の添加量は, 被験物質液と菌株との処理時の液量とした. 最高濃度の被験物質液または S9 mix にトッパガーを 2.0 mL 加え, 最少グルコース寒天平板培地に重層した. 最少グルコース寒天平板培地の上下を反転し, 37°C で 48 時間培養した.

15.9. 観察及び復帰変異コロニー数の計測

復帰変異コロニー数の計測時に目視で析出の有無を確認し, 実体顕微鏡を用いて background lawn の生育を観察し生育障害の有無を確認した. 析出または生育障害が認められた場合は, その旨を記録した. 復帰変異コロニー数の計測は, *S. typhimurium* TA100 及び陽性対照は計数値を面積補正 (補正值 1.20) したコロニーアナライザー (CA-11D, システムサイエンス株式会社) を用いて計測し, 他は用手法で計測した.

16. 試験の成立条件

下記の条件を満たしている場合に, 試験は成立とした.

1. 陰性対照及び陽性対照の復帰変異コロニー数の平均値が背景データ (添付資料) の変動範囲内であること. 変動範囲を外れる場合にあっては, 背景データとの比較から偶発的な要因によるものと考えられること.
2. 陽性対照の復帰変異コロニー数の平均値が陰性対照の復帰変異コロニー数の平均値の 2 倍以上を示す.
3. 無菌試験の結果, 雑菌による汚染が無い.
4. 計測値に欠落がない.

17. 結果の表示

菌株ごとの被験物質の各用量、陰性及び陽性対照において計測した最少グルコース寒天平板培地ごとの実数値を表示し、用量あたりの復帰変異コロニー数の平均値も併せて表示した。さらに、菌株ごとの被験物質の用量と復帰変異コロニー数の用量反応曲線を図示した。また、陰性対照と比較して復帰変異コロニー数の2倍以上の増加が観察され陽性と判定した場合は、2倍以上の増加を示す用量における最大比活性値を算出し表示した。

18. 統計学的処理

統計学的処理は行わなかった。


19. 判定基準

被験物質液処理の復帰変異コロニー数を陰性対照の復帰変異コロニー数と比較し、用量あたりの復帰変異コロニー数の平均値が背景データの陰性対照の変動範囲の上限を超え、かつ、陰性対照の平均値の2倍以上に増加しその増加に用量反応性及び再現性が認められた場合に陽性と判定した。

20. 結果及び考察

被験物質の遺伝子突然変異誘発性を、塩基対置換型変異株の *S. typhimurium* TA100, TA1535, *E. coli* WP2 *uvrA* 及びフレームシフト型変異株の *S. typhimurium* TA98, TA1537 を用い、37°C, 20 分間のプレインキュベーション法により検討した。試験は、代謝活性化非存在下及び代謝活性化存在下の用量設定試験及び本試験により実施し、用量設定試験及び本試験での試験結果の再現性を確認した。また、代謝活性化非存在下の *S. typhimurium* TA98, TA100, *E. coli* WP2 *uvrA* については、確認試験を実施し試験結果の再現性を確認した。代謝活性化存在下の *S. typhimurium* TA1535, TA1537 についても、確認試験を実施し試験結果の再現性を確認した。試験の結果を別表 1 及び図 1 に、本試験の結果を別表 2, 3 及び図 2 に、確認試験の結果を別表 4~6 及び図 3 に示す。また、陰性対照と比較して復帰変異コロニー数の2倍以上の増加を示す用量における最大比活性値を、別表 7 に示す。

本被験物質は、代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA98, TA100, *E. coli* WP2 *uvrA* に対して復帰変異コロニー数を用量反応的に増加させ、代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA100 及び代謝活性化非存在下の *S. typhimurium* TA98 については陰性対照の2倍以上の増加を示した。また、*S. typhimurium* TA100 では試験及び確認試験において、*S. typhimurium* TA98 では用量設定試験、本試験及び確認試験において、試験結果に再現性も得られた。代謝活性化非存在下の *S. typhimurium* TA98 においても、用量設定試験で陰性対照と比較して2倍以上の復帰変異コロニー数の増加が観察された。しかし、本試験及び確認試験では2倍以上の増加は観察されず、再現性は得られなかった。復帰変異コロニー数の増加は、*S. typhimurium* TA98 の代謝活性化非存在下ではすべての試験、代謝活性化存在下では用量設定試験において、代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA100 ではすべての試験において、代謝活性化の有無にかかわらず *E. coli* WP2 *uvrA* では本試験及び確認試験において、背景データから算出した陰性対照の変動範囲の上限を超えた。一方、陽性対照は、代謝活性化の有無にかかわらずすべての菌株に対して、復帰変異コロニー数を陰性対照の2倍以上に増加させた。陰性対照及び陽性対照の平均値は、用量設定試験及び本試験のいずれについても背景データから算出した変動範囲の範囲内であった。また、無菌試験の結果、雑菌の混入がないことが確認された。これらの結果は、試験が適切に実施されたことを示す。



以上の結果より、本被験物質の遺伝子突然変異誘発性は陽性と判定する。

なお、本被験物質は、代謝活性化非存在下の *S. typhimurium* TA100 に対して 1067 µg/plate 以上、その他の菌株に対して 1250 µg/plate 以上の用量で生育阻害を示した。代謝活性化存在下においても、*S. typhimurium* TA100, TA1535, TA1537 に対して 313 µg/plate 以上、*S. typhimurium* TA98 に対して 625 µg/plate 以上、*E. coli* WP2 *uvrA* に対して 1067 µg/plate 以上の用量で生育阻害を示した。また、本被験物質は、代謝活性化の有無にかかわらずいずれの用量段階においても析出を生じなかった。

21. 試験の信頼性に影響をおよぼした要素

該当する事項はなかった。

別表1 試験結果表 (用量設定試験)

試験実施期間		[redacted]より [redacted]				
代謝活性化系の有無	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	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
-S9 mix	陰性対照	138 (134) 129	10 (13) 16	15 (20) 24	31 (34) 37	7 (8) 8
	4.88	130 (132) 133	11 (14) 17	14 (19) 24	33 (40) 46	8 (8) 7
	19.5	125 (124) 123	9 (12) 15	16 (20) 23	48 (39) 30	10 (9) 8
	78.1	148 (148) 147	15 (14) 12	28 (22) 16	45 (45) 45	9 (8) 6
	313	200 (204) 207	14 (14) 13	16 (17) 18	40 (53) 65	6 (9) 11
	1250	214 * (220) 225 *	16 * (14) 11 *	40 * (37) 33 *	86 * (82) 78 *	13 * (11) 9 *
	5000	0 * (0) 0 *	0 * (0) 0 *	0 * (0) 0 *	46 * (45) 43 *	0 * (0) 0 *
+ S9 mix	陰性対照	127 (129) 131	13 (13) 13	32 (30) 27	42 (38) 34	10 (13) 15
	4.88	143 (142) 140	13 (13) 13	31 (32) 33	34 (34) 34	12 (13) 13
	19.5	134 (129) 124	15 (13) 11	37 (37) 37	39 (35) 30	12 (11) 10
	78.1	173 (163) 153	14 (14) 14	27 (30) 32	44 (44) 44	8 (9) 10
	313	201 * (197) 193 *	6 * (10) 14 *	35 (34) 33	56 (57) 57	12 * (13) 13 *
	1250	234 * (257) 279 *	13 * (12) 10 *	46 * (42) 38 *	72 * (85) 98 *	8 * (12) 15 *
	5000	106 * (120) 133 *	12 * (8) 4 *	12 * (10) 7 *	50 * (54) 57 *	0 * (0) 0 *
陽性対照	名称	AF-2	AZI	AF-2	AF-2	9AA
	用量 (µg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	80.0
S9 mixを必要としないもの	コロニー数/プレート	515 (614) 713	580 (568) 555	160 (160) 159	464 (425) 385	372 (347) 322
	名称	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
S9 mixを必要とするもの	用量 (µg/プレート)	1.0	2.0	10.0	0.5	2.0
	コロニー数/プレート	1087 (1132) 1176	394 (423) 451	1038 (1080) 1121	492 (442) 391	207 (207) 207

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, AZI: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene
 陰性対照: ジメチルスルホキシド
 (): 平均値

別表2 試験結果表 (本試験)

試験実施期間		[Redacted]より [Redacted]					
代謝活性化系の有無	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	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
-S9 mix	陰性対照	115 (114) 113	14 (17) 19	34 (33) 31	21 (22) 23	7 (9) 11	
	39.1	112 (109) 106	10 (14) 18	34 (33) 31	33 (33) 32	7 (7) 7	
	78.1	120 (131) 141	17 (17) 16	32 (35) 38	30 (29) 27	11 (9) 7	
	156	168 (172) 176	13 (12) 11	38 (43) 47	32 (31) 30	7 (9) 10	
	313	194 (216) 237	13 (16) 18	38 (40) 42	29 (36) 42	7 (8) 9	
	625	273 (277) 280	16 (17) 17	41 (49) 57	48 (41) 33	12 (8) 4	
	1250	258 * (245) 231 *	15 * (15) 15 *	67 * (63) 59 *	45 * (48) 51 *	8 * (11) 13 *	
	2500	98 * (103) 108 *		61 * (54) 46 *	51 * (47) 42 *		
陽性対照	S9 mixを必要としないもの	名称	AF-2	AZI	AF-2	AF-2	9AA
		用量 (µg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	80.0
		コロニー数/プレート	492 (485)	491 (498)	145 (138)	357 (387)	271 (267)
			477	504	130	417	262

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, AZI: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine

陰性対照: ジメチルスルホキシド

(): 平均値

*: 生育阻害

別表3 試験結果表 (本試験)

試験実施期間		[Redacted] より [Redacted]					
代謝活性化系の有無	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	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
+ S9 mix	陰性対照	128 (130) 132	11 (15) 18	32 (34) 35	29 (30) 31	9 (12) 15	
	9.77	128 (123) 118	16 (15) 13			9 (8) 7	
	19.5	133 (127) 121	14 (14) 14			13 (14) 14	
	39.1	123 (126) 128	13 (13) 13	46 (44) 42	31 (26) 21	9 (9) 9	
	78.1	139 (132) 124	14 (15) 15	36 (38) 39	28 (26) 24	11 (11) 11	
	156	137 (129) 121	16 (16) 15	46 (44) 42	25 (26) 27	9 (9) 9	
	313	196* (189) 182*	12* (14) 16*	36 (38) 39	33 (33) 33	12* (10) 8*	
	625	262* (256) 249*		38 (42) 45	49* (41) 33*		
	1250	322* (327) 332*		50* (49) 47*	45* (48) 51*		
	2500	145* (140) 134*		53* (52) 50*	24* (18) 12*		
陽性対照	S9 mixを必要とするもの	名称	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
		用量 (µg/プレート)	1.0	2.0	10.0	0.5	2.0
		コロニー数/プレート	904 (933) 962	369 (404) 439	1169 (1117) 1065	415 (414) 413	142 (160) 177

2AA: 2-Aminoanthracene

陰性対照: ジメチルスルホキシド

(): 平均値

*: 生育阻害

別表 4

試験結果表 (確認試験)

試験実施期間		[redacted]より [redacted]			
代謝活性化系の有無	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	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	
-S9 mix	陰性対照	124 (123) 122	36 (36) 36	22 (20) 18	
	140	153 (162) 170			
	211	188 (193) 198	46 (49) 51	21 (21) 20	
	316	202 (199) 196	45 (51) 57	22 (20) 18	
	474	246 (276) 305	57 (54) 50	34 (24) 14	
	711	316 (295) 273	52 (56) 60	29 (30) 30	
	1067	296 * (281) 266 *	55 (56) 56	45 (42) 39	
	1600	195 * (198) 201 *	68 * (69) 69 *	38 * (41) 44 *	
	2400		69 * (68) 66 *	19 * (24) 29 *	
	陽性対照	S9 mixを必要としないもの	名称	AF-2	AF-2
用量 (μg/プレート)			0.01	0.01	0.1
コロニー数/プレート			467 (492) 516	101 (104) 107	384 (388) 391

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

陰性対照: ジメチルスルオキシド

(): 平均値

*: 生育阻害

別表 5

試験結果表 (確認試験)

試験実施期間		[redacted]より[redacted]			
代謝活性化系の有無	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	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	
+ S9 mix	陰性対照	139 (133) 127	43 (42) 41	23 (31) 38	
	62.4	125 (127) 128			
	93.6	130 (133) 135			
	140	149 (154) 159		26 (23) 20	
	211	168 (167) 166	43 (40) 36	31 (28) 25	
	316	179 (177) 175	44 (45) 45	36 (37) 37	
	474	220 * (208) 196 *	49 (53) 56	37 (39) 41	
	711	254 * (276) 297 *	78 (79) 80	41 (40) 38	
	1067	296 * (277) 257 *	69 * (71) 73 *	41 * (42) 42 *	
	1600	231 * (238) 244 *	61 * (59) 56 *	25 * (28) 30 *	
	2400	96 * (110) 124 *	26 * (30) 33 *		
陽性対照	S9 mixを必要とするもの	名称	2AA	2AA	2AA
		用量 (µg/プレート)	1.0	10.0	0.5
		コロニー数/プレート	1046 (1084) 1121	1011 (1046) 1081	428 (428) 428

2AA: 2-Aminoanthracene

陰性対照: ジメチルスルホキシド

(): 平均値

*: 生育阻害

別表 6

試験結果表 (確認試験)

試験実施期間		[REDACTED]より [REDACTED]		
代謝活性化系の有無	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 TA1535	フレームシフト型 TA1537	
-S9 mix	陰性対照	8 (9) 9	8 (7) 6	
+ S9 mix	陰性対照	11 (10) 9	13 (14) 14	
	9.77	11 (12) 13	15 (15) 14	
	19.5	13 (14) 15	13 (12) 11	
	39.1	8 (10) 11	15 (14) 12	
	78.1	9 (11) 12	17 (13) 8	
	156	8 (8) 7	15 (13) 11	
	313	8* (10) 11*	12* (14) 15*	
陽性対照	S9 mixを必要としないもの	名称	AZI	9AA
		用量 (μg/プレート)	0.5	80.0
		コロニー数/プレート	482 (482) 482	275 (286) 296
	S9 mixを必要とするもの	名称	2AA	2AA
		用量 (μg/プレート)	2.0	2.0
		コロニー数/プレート	343 (354) 365	151 (173) 195

AZI: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

陰性対照: ジメチルスルホキシド

(): 平均値

*: 生育阻害

別表 7 比活性値表

	菌株名	-S9 mix		+S9 mix	
		比活性値	計算に用いた用量	比活性値	計算に用いた用量
用量設定試験	TA100				
	TA1535				
	WP2 <i>uvrA</i>				
	TA98	38.4	1250 µg/plate	37.6	1250 µg/plate
	TA1537				
本試験	TA100	261	625 µg/plate	158	1250 µg/plate
	TA1535				
	WP2 <i>uvrA</i>				
	TA98	20.8	1250 µg/plate		
	TA1537				
確認試験	TA100	323	474 µg/plate	201	711 µg/plate
	TA1535	—	—		
	WP2 <i>uvrA</i>				
	TA98	20.6	1067 µg/plate		
	TA1537	—	—		

比活性値: (用量あたりの復帰変異コロニー数－陰性対照の復帰変異コロニー数) / 用量(mg)

図1 用量反応曲線 (用量設定試験)

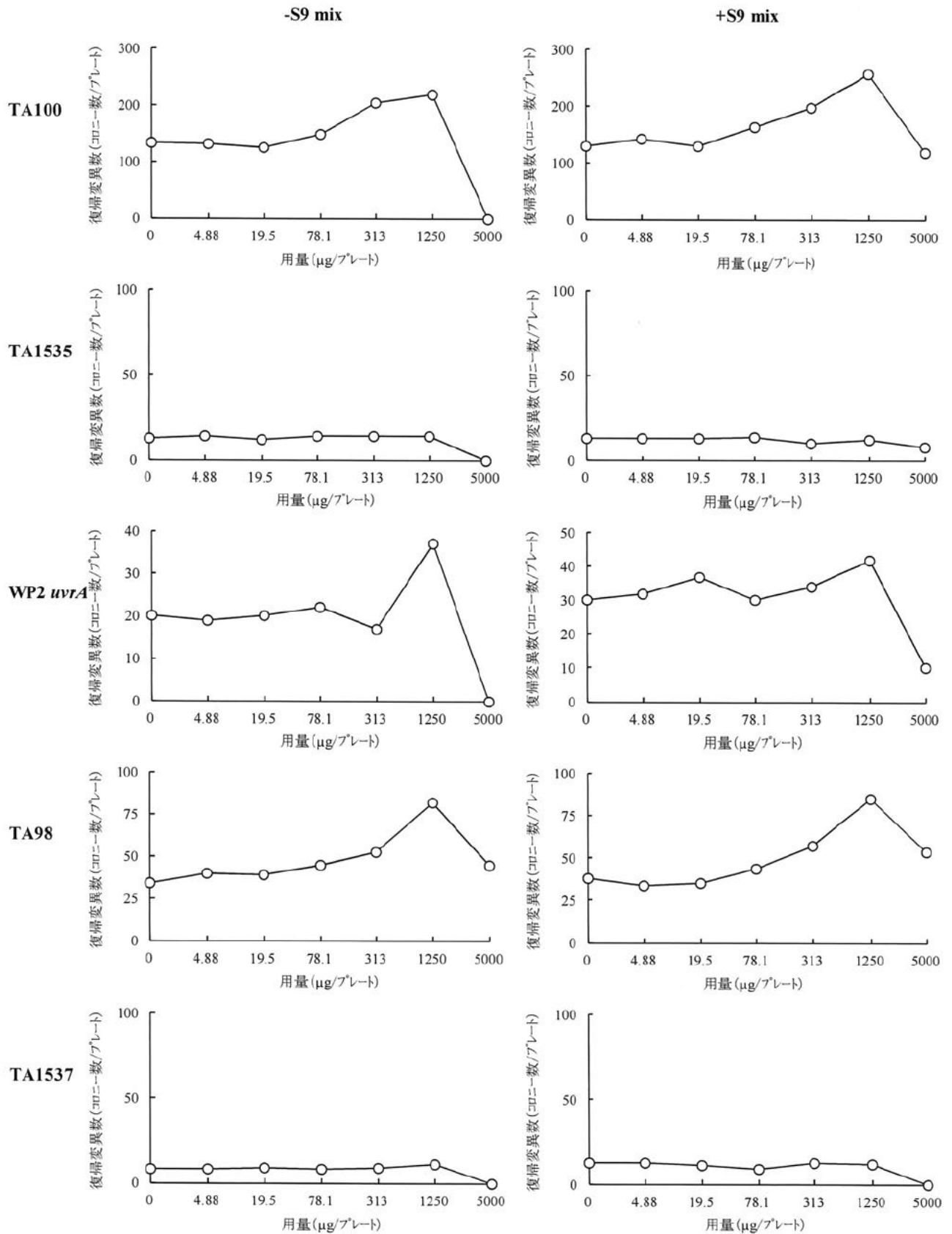


図2 用量反応曲線 (本試験)

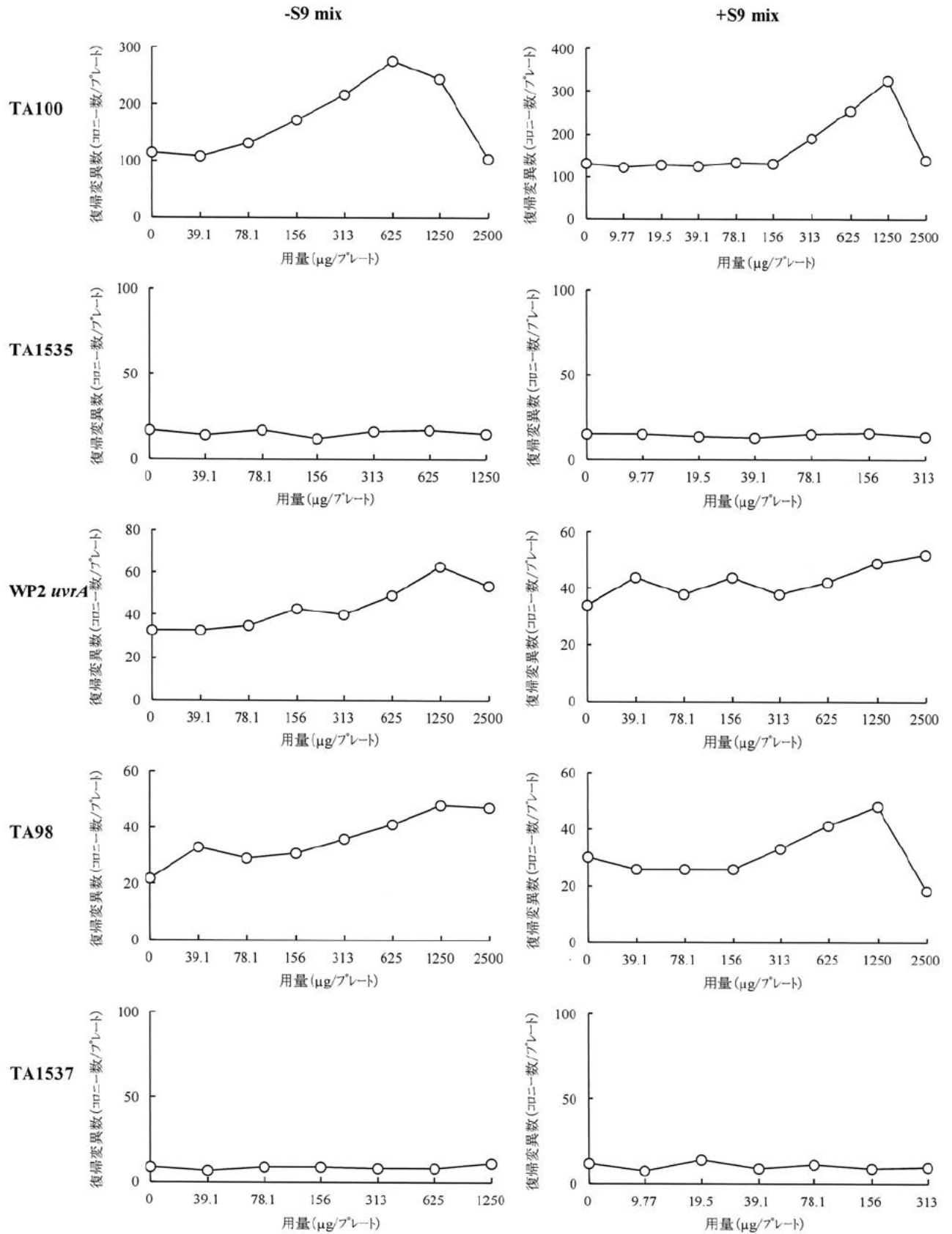
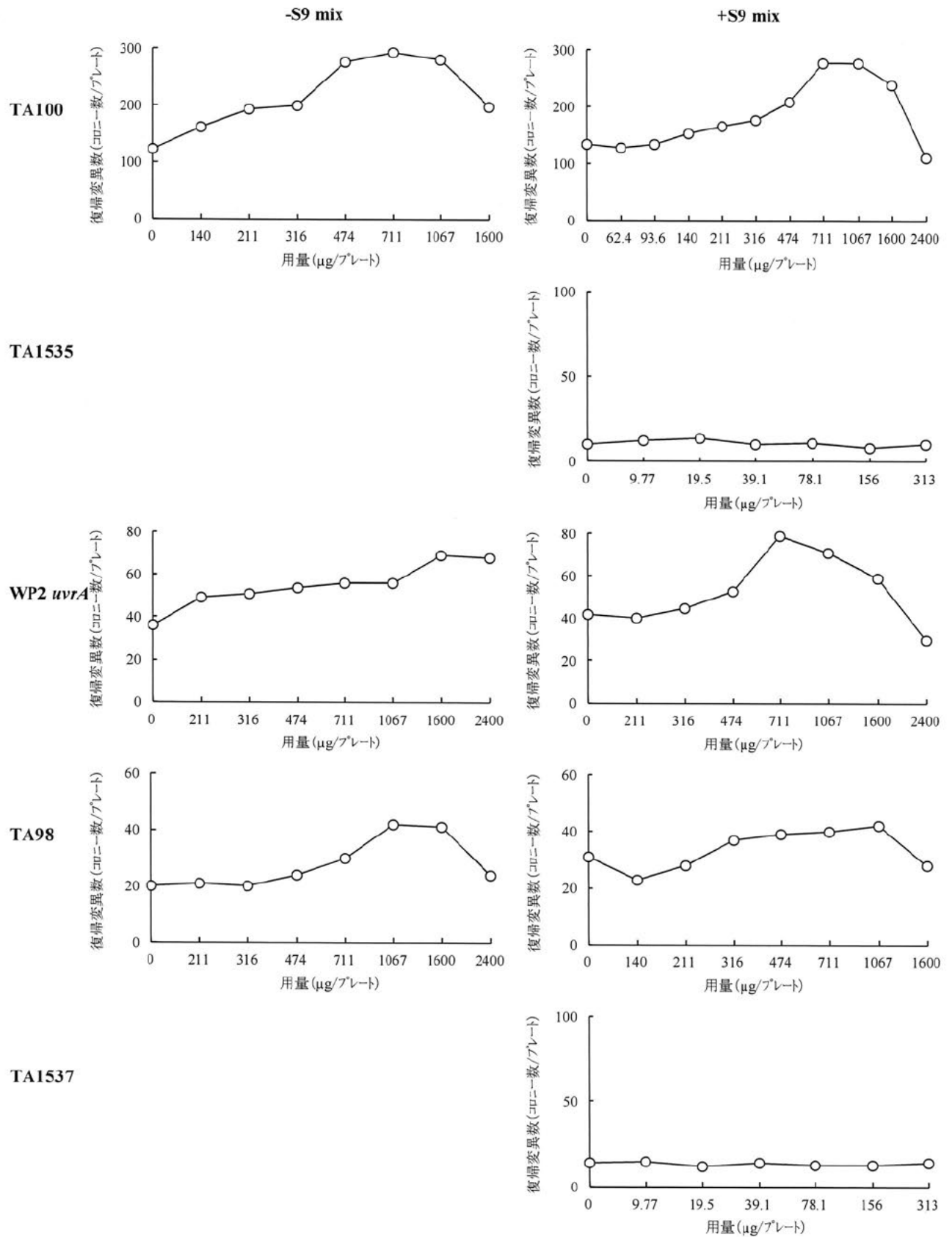


図3 用量反応曲線 (確認試験)



添付資料

陰性対照値及び陽性対照値の背景データから算出した基準値

データ集計期間: (WP2 *uvrA*, TA98 については)
(TA100 については)

菌株の保存ロット番号: *S. typhimurium* TA100
S. typhimurium TA1535
E. coli WP2 *uvrA*
S. typhimurium TA98
S. typhimurium TA1537

陰性対照値

菌株名	S9 mix	背景データ					変動範囲
		データ数	最小値	最大値	平均値	標準偏差	
TA100	—	55	93	162	126	13.9	84 - 168
	+	55	103	181	143	17.8	90 - 196
TA1535	—	967	5	21	11	2.8	3 - 19
	+	951	4	24	11	2.8	3 - 19
WP2 <i>uvrA</i>	—	499	12	43	25	5.3	9 - 41
	+	493	15	49	29	5.8	12 - 46
TA98	—	571	10	49	23	5.5	7 - 40
	+	572	17	51	33	6.5	14 - 53
TA1537	—	944	2	18	9	2.4	2 - 16
	+	943	3	22	13	2.6	5 - 21

陽性対照値

菌株名	陽性対照物質 及び用量 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S9 mix	背景データ					変動範囲
			データ数	最小値	最大値	平均値	標準偏差	
TA100	AF-2:0.01	—	50	465	782	634	62.1	448 - 820
	2AA : 1.0	+	50	1053	1657	1345	141.9	919 - 1771
TA1535	AZI : 0.5	—	305	380	672	541	54.0	379 - 703
	2AA : 2.0	+	305	218	576	432	48.2	287 - 577
WP2 <i>uvrA</i>	AF-2:0.01	—	188	71	184	111	18.5	56 - 167
	2AA :10.0	+	185	684	1333	1028	145.7	591 - 1465
TA98	AF-2: 0.1	—	186	174	534	330	62.0	144 - 516
	2AA : 0.5	+	188	305	667	501	67.5	299 - 704
TA1537	9AA :80.0	—	296	116	553	268	71.3	54 - 482
	2AA : 2.0	+	291	127	365	217	40.6	95 - 339

試験ごとの陰性対照及び陽性対照の実測値を蓄積し、菌株ごとに平均 (M)、標準偏差 (S.D.)、最小値及び最大値を算出した。算出された値をもとに、変動範囲 ($M \pm 3S.D.$) を設定した。変動範囲の算出値が 0 以下になる場合は、最小値を下限値とした。陽性対照の変動範囲の下限値が陰性対照の変動範囲の上限値以下になる場合は、陽性対照の最小値を変動範囲の下限値とした。