

平成 26 年度

指定添加物等の安全性に関する試験
(ラズベリーケトン外 1 物質に係る
復帰突然変異試験)

イソオイゲニル メチル エーテルの細菌を用いる復帰突然変異試験

機 関 名

研究責任者名
(契 約 者)



要約

イソオイゲニル メチル エーテルの遺伝子突然変異誘発性の有無を調べるため、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施し、陰性の結果を得た。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用い、プレインキュベーション法により、S9 mix 非存在下および存在下で試験を行った。

1.50、5.00、15.0、50.0、150、500、1500 および 5000 µg/plate の 8 用量を設定して用量設定試験を行ったところ、以下の用量で生育阻害が認められた。

S9 mix 非存在下および存在下

すべての検定菌：500 µg/plate 以上

また、用いたいずれの検定菌においても、S9 mix の有無にかかわらず、陰性対照値の 2 倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。ただし、TA100 の S9 mix 存在下においては、陰性対照値の 2 倍には至らないが変異コロニー数が増加した。

用量設定試験の結果に基づき、以下の用量を設定して本試験を行った。

S9 mix 非存在下

すべての検定菌：15.6、31.3、62.5、125、250 および 500 µg/plate

S9 mix 存在下

TA100：7.81、15.6、31.3、62.5、125、250 および 500 µg/plate

TA1535、WP2 *uvrA*、TA98 および TA1537：15.6、31.3、62.5、125、250 および 500 µg/plate

その結果、用いたいずれの検定菌においても、S9 mix の有無にかかわらず、陰性対照値の 2 倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果に基づき、イソオイゲニル メチル エーテルは、用いた試験系において遺伝子突然変異誘発性を有しない(陰性)と判定した。

試験目的

イソオイゲニル メチル エーテルの遺伝子突然変異誘発性(変異原性)の有無を検討し、安全性評価の資料とするために、細菌を用いる復帰突然変異試験をプレインキュベーション法¹⁾により実施した。

試験ガイドラインと GLP

この試験は、「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」(平成 8 年 3 月 22 日付、衛化第 29 号生活衛生局長通知)に準拠し、「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」(平成 23 年 3 月 31 日付け、薬食発 0331 第 8 号厚生労働省医薬食品局長、平成 23・03・29 製局第 6 号経済産業省製造産業局長、環保企発第 110331010 号環境省総合環境政策局長通知)を遵守して実施した。

材料と方法

1. 被験物質

被験物質であるイソオイゲニル メチル エーテル[別名:メチルイソオイゲノール、化学名:1,2-dimethoxy-4-(1-propenyl)benzene、CAS 番号:93-16-3、分子式: $C_{11}H_{14}O_2$ 、分子量:178.22、ロット番号: [REDACTED]、純度:99.4%、製造年月日: [REDACTED]、使用期限: [REDACTED] 製造元: [REDACTED]]は、無色～淡黄色透明の液体である。被験物質は [REDACTED] から提供され、使用時まで冷蔵(許容範囲:1~15°C、実測値:4~6°C)、暗所で保管し、開封後は窒素置換して保管した。

被験物質原体の安定性については、被験物質提供元からの資料(製品安全データシート、非 GLP)に、通常の条件下では安定で、自己重合性はないことが記載されている。また、被験物質は、使用期限内に使用したことから本実験期間中安定であり、当該試験結果の信頼性に影響しないと判断した。

2. 陽性対照物質

用いた陽性対照物質および調製法は以下のとおりである。

名称	略称	ロット番号(購入日)	製造者	純度
2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド	AF-2	[REDACTED]	和光純薬工業	100.1%
アジ化ナトリウム	SA	[REDACTED]	和光純薬工業	100.3%
9-アミノアクリジン	9AA	[REDACTED]	Sigma-Aldrich	100.0%
ベンゾ[a]ピレン	B[a]P	[REDACTED]	Alfa Aesar	97%
2-アミノアントラセン	2AA	[REDACTED]	和光純薬工業	98.7%

AF-2、9AA、B[a]P および 2AA はジメチルスルホキシド(DMSO、ロット番号: [REDACTED]、和光純薬工業)に、SA は日局注射用水(製造番号: [REDACTED]、大塚製薬工場)に溶解して所定の濃度に調製したのち、冷凍保存(設定温度:-20°C)し、調製後 6 か月以内に用時解凍して用いた。各陽性対照物質調製液の調製濃度および添加量を以下に示す。

菌 株	S9 mix 非存在下				S9 mix 存在下			
	物質名	調製濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	添加量 ($\mu\text{L}/\text{plate}$)	用量 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	物質名	調製濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	添加量 ($\mu\text{L}/\text{plate}$)	用量 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)
<i>Salmonella typhimurium</i>								
TA100	AF-2	0.1	100	0.01	B[a]P	50	100	5
TA1535	SA	5	100	0.5	2AA	100	20	2
TA98	AF-2	1	100	0.1	B[a]P	50	100	5
TA1537	9AA	800	100	80	B[a]P	50	100	5
<i>Escherichia coli</i>								
WP2 <i>uvrA</i>	AF-2	0.1	100	0.01	2AA	100	100	10

各検定菌に用いた陽性対照物質は、当試験施設で十分な蓄積データが得られている物質および用量とした。

3. 検定菌

「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」に従い、試験には、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100、TA1535、TA98、TA1537 および大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2 *uvrA* を用いた。

S. typhimurium TA100、TA1535、TA98、TA1537 の 4 菌株は [REDACTED] に、*E. coli* WP2 *uvrA* 株は [REDACTED] に、いずれも [REDACTED] より分与された。

S. typhimurium の 4 菌株を用いる試験は、ヒスチジン要求性から非要求性への復帰突然変異²⁾、*E. coli* WP2 *uvrA* 株を用いる試験は、トリプトファン要求性から非要求性への復帰突然変異³⁾を指標とした遺伝子突然変異誘発性の検出系である。

検定菌は冷凍保存(設定温度:-80°C)したもの(凍結保存菌)を、調製後 6 か月以内に用時解凍して試験に用いた。凍結保存菌は、液体培地にて 37°C で静止期の初期まで培養した菌液 0.8 mL に対し、滅菌 DMSO を 0.07 mL の割合で加えて混合したものをプラスチックチューブに分注し、急速凍結して調製したものであり、調製時に、アミノ酸要求性、UV 感受性、膜変異 (*rfa*)、アンピシリン耐性因子 pKM101 (プラスミド) の有無および陰性対照と陽性対照の変異コロニー数について調べ、特性が適正であることが確認されている。

4. 試験材料

1) 最少グルコース寒天平板培地

最少グルコース寒天平板培地(ロット番号:[REDACTED]製造、極東製薬工業)を購入して用いた。なお、培地 1 L あたりの組成は以下のとおりで、径 90 mm のシャーレ 1 枚あたり 30 mL を流して固めたものである。

硫酸マグネシウム・七水和物	0.2	g
クエン酸・一水和物	2	g
リン酸水素二カリウム	10	g
リン酸二水素アンモニウム	1.92	g
水酸化ナトリウム	0.66	g
グルコース	20	g
大洋寒天(ロット番号 [REDACTED]、SSK セールス)	15	g

2) トップアガー

①の水溶液をオートクレーブ滅菌後、フィルター滅菌した②または③を容量比 10:1 の割合で混合して用いた。

①	バクトアガー (Difco)	0.6 w/v%
	塩化ナトリウム	0.5 w/v%
②	<i>S. typhimurium</i> 用	
	L-ヒスチジン	0.5 mmol/L
	D-ビオチン	0.5 mmol/L
③	<i>E. coli</i> 用	
	L-トリプトファン	0.5 mmol/L

3) S9 mix の組成および調製

S9 mix 1 mL あたりの組成は以下のとおりで、用時氷冷下で混合して調製した。

成分	S9 mix 1 mL 中の量	濃度
S9*1	0.1 mL	10 vol%
0.2 mol/L ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)	0.5 mL	100 μmol/mL
補酵素溶液*2	0.38 mL	—
塩化カリウム	—	33 μmol/mL
グルコース-6-リン酸	—	5 μmol/mL
NADH	—	4 μmol/mL
NADPH	—	4 μmol/mL
0.4 mol/L 塩化マグネシウム溶液	0.02 mL	8 μmol/mL

NADH: Nicotinamide-adenine dinucleotide, reduced form, disodium salt

NADPH: Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, reduced form, tetrasodium salt

*1: S9(ロット番号: [REDACTED] 製造、キッコーマンバイオケミファ)は、フェノバルビタール(PB)および5,6-ベンゾフラボン(BF)を腹腔内投与(1日目 PB 30 mg/kg、2日目 PB 60 mg/kg、3日目 PB 60 mg/kg+BF 80 mg/kg、4日目 PB 60 mg/kg)した7週齢の雄Sprague-Dawley系ラット(体重:181~239 g)の肝臓から調製したものを購入後、冷凍保存(設定温度:-80°C)して、製造後6か月以内に用時解凍して試験に用いた。

*2: 補酵素溶液は、上記の成分を混合してフィルター滅菌したのち、冷凍保存(設定温度:-80°C)し、調製後6か月以内に用時解凍して試験に用いた。

5. 被験物質調製液の調製

溶解性の予備検討の結果、被験物質は試験に必要な濃度 (50.0 mg/mL) で水に不溶であったが DMSO に溶解した。したがって、媒体には DMSO を用いた。

試験に際しては、秤量した被験物質を DMSO (ロット番号: ████████、規格: 試薬特級、純度: 99.0% 以上、和光純薬工業) に溶解して最高濃度 (50.0 mg/mL) の被験物質調製液を調製し [(調製量) 用量設定試験: 5.0 mL 以上、本試験: 1.0 mL 以上]、以下同媒体で段階希釈した。被験物質調製液は用時調製し、媒体添加後 30 分以内 (室温: 24~25°C、用量設定試験) および 21 分以内 (室温: 24~26°C、本試験) に使用した。被験物質調製液の調製濃度を以下に示す。

用量設定試験: 0.0150、0.0500、0.150、0.500、1.50、5.00、15.0 および 50.0 mg/mL

本試験: 0.0781、0.156、0.313、0.625、1.25、2.50、5.00 および 50.0* mg/mL

*: 本試験における 50.0 mg/mL 調製液は、被験物質調製液の調製にのみ使用し、試験には用いなかった。

被験物質の媒体中での安定性および含量試験については、調製後すみやかに試験に供すること、および「医薬品・化学物質 GLP 解説 (2002)、薬事日報社」に基づき実施しなかった。なお、最高濃度の被験物質調製液の調製時に、発熱、発泡などの変化がないことを目視により確認した。

6. 試験操作

1) 試験菌液の作製

ニュートリエントブロス No. 2 (ロット番号: ████████、Oxoid) を 12 mL 入れた L 字型試験管 (容積: 29 mL) に、解凍した凍結保存菌 24 μ L (TA100、TA1535、TA98、TA1537 および WP2 *uvrA*) をすみやかに接種し、4°C で保冷後、37°C で 10 時間、往復振とう培養したものを試験菌液とした。振とうには DOUBLE SHAKER NR-3 (TAITEC) を使い、振幅は 25 mm、振とう回数は毎分 100 回とした。検定菌の増殖の確認のため、レシオビーム分光光度計 (日立 U-1900 形) (HITACHI) により、試験菌液の吸光度を 660 nm で測定した。また、段階希釈法により生菌数を求めた。660 nm の吸光度の測定値および生菌数を以下に示す。

試験の種類		検定菌				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
用量設定試験	OD ₆₆₀	1.778	1.885	1.851	1.894	1.837
	生菌数 ($\times 10^9$ cells/mL)	2.59	3.52	4.34	2.58	1.50
本試験	OD ₆₆₀	1.798	1.858	1.888	1.886	1.826
	生菌数 ($\times 10^9$ cells/mL)	2.72	3.50	4.40	3.08	1.92

各試験菌液の 660 nm の吸光度の測定値は、2013 年度の背景データ(当試験施設)の平均値の 90% 以上であった。また、各試験菌液の生菌数は 1×10^9 cells/mL 以上であった。

2) 試験法

Ames らの標準法²⁾を参考にして、プレインキュベーション法¹⁾により、用量設定試験と本試験を各 1 回実施した。試験は、被験物質をそのまま検定菌に作用させる S9 mix 非存在下、および哺乳動物(ラット)のもつ薬物代謝酵素によって産生される被験物質の代謝物の遺伝子突然変異誘発性を試験する S9 mix 存在下で行った。

小試験管中に、被験物質調製液 0.1 mL、S9 mix 非存在下では 0.1 mol/L ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL、S9 mix 存在下では S9 mix 0.5 mL、試験菌液 0.1 mL を混合し、37°C で 20 分間プレインキュベーションしたのち、2 mL のトップアガーを加えて混和し、最少グルコース寒天平板培地上に流して固めた。また、被験物質調製液のかわりに使用媒体 0.1 mL または陽性対照物質溶液を加えて、それぞれ陰性対照および陽性対照とした。

培養は 37°C で 48 時間行い、出現した変異コロニー数を、コロニーアナライザー (CA-11、システムサイエンス、面積補正有り) または目視により計測した。なお、培養終了後からコロニー計測までの 1 日間、平板培地を冷蔵(設定温度: 4°C) で保管した。被験物質に由来する沈殿の有無は、目視により観察した。また、生育阻害の有無については、目視あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌叢の状態から判断した。平板は各用量、陰性対照および陽性対照につき 2 枚ずつとし、変異コロニー数についてそれぞれの平均値を求めた。陰性および陽性対照の変異コロニー数の平均値を、それぞれ陰性対照値および陽性対照値とした。

3) 試験用量

用量設定試験においては、「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」に従い、1.50、5.00、15.0、50.0、150、500、1500 および 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の 8 用量を設定した。

本試験においては、用量設定試験の結果に基づき、以下の用量を設定した。

S9 mix 非存在下

すべての検定菌: 15.6、31.3、62.5、125、250 および 500 $\mu\text{g}/\text{plate}$

S9 mix 存在下

TA100: 7.81、15.6、31.3、62.5、125、250 および 500 $\mu\text{g}/\text{plate}$

TA1535、WP2 *uvrA*、TA98 および TA1537: 15.6、31.3、62.5、125、250 および 500 $\mu\text{g}/\text{plate}$

4) 無菌試験

小試験管中に、最高用量の被験物質調製液 0.1 mL と 0.1 mol/L ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL、あるいは S9 mix 0.5 mL のみを入れ、37°C で 20 分間プレインキュベーションしたのち、2 mL のトップアガー (*S. typhimurium* 用) を加えて混合し、それぞれ最少グルコース寒天平板培地上に流して固めた。37°C で 48 時間培養後、平板培地を冷蔵(設定温度: 4°C) で 1 日間保管したのち、雑菌の混入の有無を調べた。なお、S9 mix の無菌試験については、同日に実施した他の試験と共通に用いた。

5) 識別法

平板側面に識別番号を記載した。S9 mix 非存在下は黒、S9 mix 存在下は赤の色で識別した。菌の識別は、TA100 は 0、TA1535 は 5、TA98 は 9、TA1537 は 7、WP2 *uvrA* は W とした。用量の識別は、菌の識別番号の右に用量の低いものから 1、2、3、・・・と記入した。陰性対照および陽性対照は、菌の識別番号の右に各々 0 および P と記入して識別した。試験の識別は、試験番号のかわりに菌の識別番号の左に 2 と記入した。生菌数測定における平板の識別は、菌の識別番号の左に VC と記入した。無菌試験における平板の識別は、被験物質については 2 のみを記入し、S9 mix については S9 と記入した。

6) 背景データによる管理

陰性対照値および陽性対照値が、当試験施設における背景データの変動範囲内(平均値 $\pm 3 \times$ 標準偏差)から外れた場合には、該当する検定菌について再度、同一用量を用いて試験を実施し、再試験のデータを採用することとした。なお、2013 年度に実施した各試験の陰性対照値および陽性対照値を背景データとした(資料 1)。

当該試験において、再試験は実施しなかった。

7. 結果の表示

結果の表示は、各々の平板における変異コロニー数の実測値とその平均値(小数点以下第一位を四捨五入)を示し、用量-反応曲線の図を添付した。また、被験物質に由来する沈殿および生育阻害が認められた場合は、その旨表示することとした。

8. 判定

用いた 5 種の検定菌のうち、1 種以上の検定菌の S9 mix 非存在下あるいは S9 mix 存在下において、被験物質を含有する平板上における変異コロニー数の平均値が、陰性対照値の 2 倍以上に増加し、かつ、その増加に用量依存性あるいは再現性が認められた場合に、当該試験系において遺伝子突然変異誘発性を有する(陽性)と判定することとした。なお、結果の判定に統計学的手法は用いなかった。

予見することが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

試験期間中に、「予見することが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」はなかった。

試験成績と考察

1. 用量設定試験

イソオイゲニル メチル エーテルについて、1.50、5.00、15.0、50.0、150、500、1500 および

5000 µg/plate の 8 用量を設定して用量設定試験を行った(表 1 および図 1)。その結果、以下の用量で生育阻害が認められた。

S9 mix 非存在下および存在下

すべての検定菌:500 µg/plate 以上

被験物質に由来する沈殿は、S9 mix 非存在下においては 1500 µg/plate 以上で認められ、S9 mix 存在下においては、いずれの用量においても認められなかった。また、用いたいずれの検定菌においても、S9 mix の有無にかかわらず、陰性対照値の 2 倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。ただし、TA100 の S9 mix 存在下においては、陰性対照値の 2 倍には至らないが変異コロニー数が増加した。

以上の結果から本試験における最高用量を、すべての検定菌で 500 µg/plate とした。

2. 本試験

用量設定試験の結果に基づき、以下の用量を設定して本試験を行った(表 2 および図 2)。

S9 mix 非存在下

すべての検定菌:15.6、31.3、62.5、125、250 および 500 µg/plate

S9 mix 存在下

TA100:7.81、15.6、31.3、62.5、125、250 および 500 µg/plate

TA1535、WP2 *uvrA*、TA98 および TA1537:15.6、31.3、62.5、125、250 および 500 µg/plate

その結果、以下の用量で生育阻害が認められた。

S9 mix 非存在下および存在下

すべての検定菌:500 µg/plate

被験物質に由来する沈殿は、S9 mix 非存在下および存在下ともに、いずれの用量においても認められなかった。また、用いたいずれの検定菌においても、S9 mix の有無にかかわらず、陰性対照値の 2 倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。TA100 の S9 mix 存在下においては、15.6 µg/plate の用量で変異コロニー数の増加が認められたが、陰性対照値の 2 倍には至らなかった。

すべての試験において、用いた最高用量の被験物質調製液および S9 mix への雑菌の混入は認められなかった。また、いずれの検定菌においても陽性対照物質の遺伝子突然変異誘発性が検出され、陽性対照値および陰性対照値は、ともに背景データの変動範囲内(平均値±3×標準偏差)であったことから、当該試験系の妥当性が確認された。

当該被験物質の関連物質である isoeugenol については、ヒトリンパ球を用いた *in vitro* 姉妹染色分体交換試験で陽性の結果が報告されている⁴⁾。また、関連物質である vanillin については、ヒトリンパ球を用いた *in vitro* 姉妹染色分体交換試験で陽性、チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験で陰性の結果が報告されている^{4)、5)}。

以上の結果から、イソオイゲニル メチル エーテルは、用いた試験系において遺伝子突然変異誘発性を有しない(陰性)と判定した。

参考文献

- 1) Matsushima, T., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A., Sawamura, M.: Factors modulating mutagenicity in microbial tests. in “Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens” Norpoth, K. H., Garner, R. C. eds, Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1980) pp. 273-285
- 2) Maron, D. M., Ames, B. N.: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutation Research 113: 173-215 (1983)
- 3) Green, M. H. L.: Mutagen testing using Trp⁺ reversion in *Escherichia coli*. in “Handbook of Mutagenicity Test Procedures” Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C. eds, Elsevier, Amsterdam (1984) pp. 161-187
- 4) Jansson, T., Curvall M., Hedin A., Enzell CR.: In vitro studies of biological effects of cigarette smoke condensate II. Induction of sister-chromatid exchanges in human lymphocytes by weakly acidic, semivolatile constituents. Mutation Research 169: 129-139 (1986)
- 5) 祖父尼俊雄 監修、染色体異常試験データ集、改訂 1998 年版、Life-Science Information Center、東京(1998)、p.527

表 1 イソイグニル メチル エーテルの細菌を用いる復帰突然変異試験(用量設定試験)

代謝活性化系の有無	被験物質用量 (µg/plate)	試験実施期間										
		復帰変異数 コロニー数/plate(平均)										
		塩基対置換型					フレームシフト型					
		TA100		TA1535		WP2 <i>uvrA</i>		TA98		TA1537		
S9 mix (-)	0 (陰性対照)	129	129	15	12	33	29	18	23	9	10	
		(129)		(14)		(31)		(21)		(10)		
	1.50	121	150	10	15	39	32	23	24	13	6	
		(136)		(13)		(36)		(24)		(10)		
	5.00	143	138	20	14	32	30	20	22	10	11	
		(141)		(17)		(31)		(21)		(11)		
	15.0	140	129	12	15	29	37	14	23	6	9	
		(135)		(14)		(33)		(19)		(8)		
	50.0	110	125	12	11	39	28	16	25	7	16	
	(118)		(12)		(34)		(21)		(12)			
150	147	141	13	11	29	29	21	24	8	11		
	(144)		(12)		(29)		(23)		(10)			
500	60 *	49 *	0 *	1 *	16 *	21 *	11 *	2 *	4 *	3 *		
	(55)		(1)		(19)		(7)		(4)			
1500 †	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *		
	(0)		(0)		(0)		(0)		(0)			
5000 †	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *		
	(0)		(0)		(0)		(0)		(0)			
S9 mix (+)	0 (陰性対照)	150	143	11	18	26	28	33	40	13	15	
		(147)		(15)		(27)		(37)		(14)		
	1.50	148	129	12	16	42	36	35	35	15	21	
		(139)		(14)		(39)		(35)		(18)		
	5.00	169	144	19	20	33	30	31	45	12	12	
		(157)		(20)		(32)		(38)		(12)		
	15.0	186	181	14	13	40	29	31	30	23	17	
		(184)		(14)		(35)		(31)		(20)		
	50.0	159	196	11	8	32	37	40	36	14	14	
	(178)		(10)		(35)		(38)		(14)			
150	179	187	19	13	33	30	39	33	18	24		
	(183)		(16)		(32)		(36)		(21)			
500	162 *	129 *	7 *	9 *	33 *	33 *	25 *	24 *	3 *	10 *		
	(146)		(8)		(33)		(25)		(7)			
1500	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *		
	(0)		(0)		(0)		(0)		(0)			
5000	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *		
	(0)		(0)		(0)		(0)		(0)			
陽性対照	S9 mixを必要としないもの	名称	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9AA					
		用量(µg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80					
		コロニー数/plate	512	459	502	461	125	140	514	604	524	403
			(486)		(482)		(133)		(559)		(464)	
	S9 mixを必要とするもの	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P					
		用量(µg/plate)	5	2	10	5	5					
	コロニー数/plate	1174	905	405	482	684	709	384	324	132	139	
		(1040)		(444)		(697)		(354)		(136)		

陰性対照,ジメチルスルホキシド

AF-2, 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; SA, Sodium azide; 9AA, 9-Aminoacridine; B[a]P, Benzo[a]pyrene; 2AA, 2-Aminoanthracene

†, 沈殿が認められた。

*, 生育阻害が認められた。

表 2 イソオイゲニル メチル エーテルの細菌を用いる復帰突然変異試験(本試験)

代謝活性化系の有無	被験物質用量 (µg/plate)	試験実施期間											
		復帰変異数 コロニー数/plate(平均)											
		塩基対置換型					フレームシフト型						
		TA100		TA1535		WP2 <i>uvrA</i>		TA98		TA1537			
S9 mix (-)	0 (陰性対照)	89	121	16	11	20	22	23	20	12	11		
		(105)		(14)		(21)		(22)		(12)			
	15.6	95	133	18	7	22	18	27	27	6	11		
		(114)		(13)		(20)		(27)		(9)			
	31.3	91	96	20	7	15	26	25	25	8	10		
		(94)		(14)		(21)		(25)		(9)			
	62.5	97	123	9	9	23	19	26	21	8	10		
	(110)		(9)		(21)		(24)		(9)				
125	115	122	8	13	14	18	26	26	15	7			
	(119)		(11)		(16)		(26)		(11)				
250	95	129	10	9	21	20	29	27	7	14			
	(112)		(10)		(21)		(28)		(11)				
500	67*	65*	4*	3*	14*	21*	15*	12*	7*	3*			
	(66)		(4)		(18)		(14)		(5)				
S9 mix (+)	0 (陰性対照)	119	118	10	13	31	22	29	27	20	15		
		(119)		(12)		(27)		(28)		(18)			
	7.81	148	164	NT		NT		NT		NT			
		(156)											
	15.6	189	187	15	10	30	24	33	43	13	20		
		(188)		(13)		(27)		(38)		(17)			
	31.3	133	130	12	12	22	32	41	36	13	11		
		(132)		(12)		(27)		(39)		(12)			
62.5	143	160	12	7	24	14	42	36	17	14			
	(152)		(10)		(19)		(39)		(16)				
125	148	193	13	12	28	17	27	40	20	13			
	(171)		(13)		(23)		(34)		(17)				
250	162	173	12	15	28	21	41	33	17	16			
	(168)		(14)		(25)		(37)		(17)				
500	139*	167*	8*	7*	32*	25*	27*	32*	7*	10*			
	(153)		(8)		(29)		(30)		(9)				
陽性対照	S9 mixを必要としないもの	名称	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9AA						
		用量(µg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80						
	S9 mixを必要とするもの	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P						
		用量(µg/plate)	5	2	10	5	5						
			コロニー数/plate	523	474	497	509	99	109	531	579	541	519
				(499)		(503)		(104)		(555)		(530)	
		コロニー数/plate	1078	1082	437	495	788	762	351	359	147	121	
			(1080)		(466)		(775)		(355)		(134)		

陰性対照, ジメチルスルホキシド

AF-2, 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; SA, Sodium azide; 9AA, 9-Aminoacridine; B[a]P, Benzo[a]pyrene; 2AA, 2-Aminoanthracene

*, 生育阻害が認められた。

NT, 実施せず。

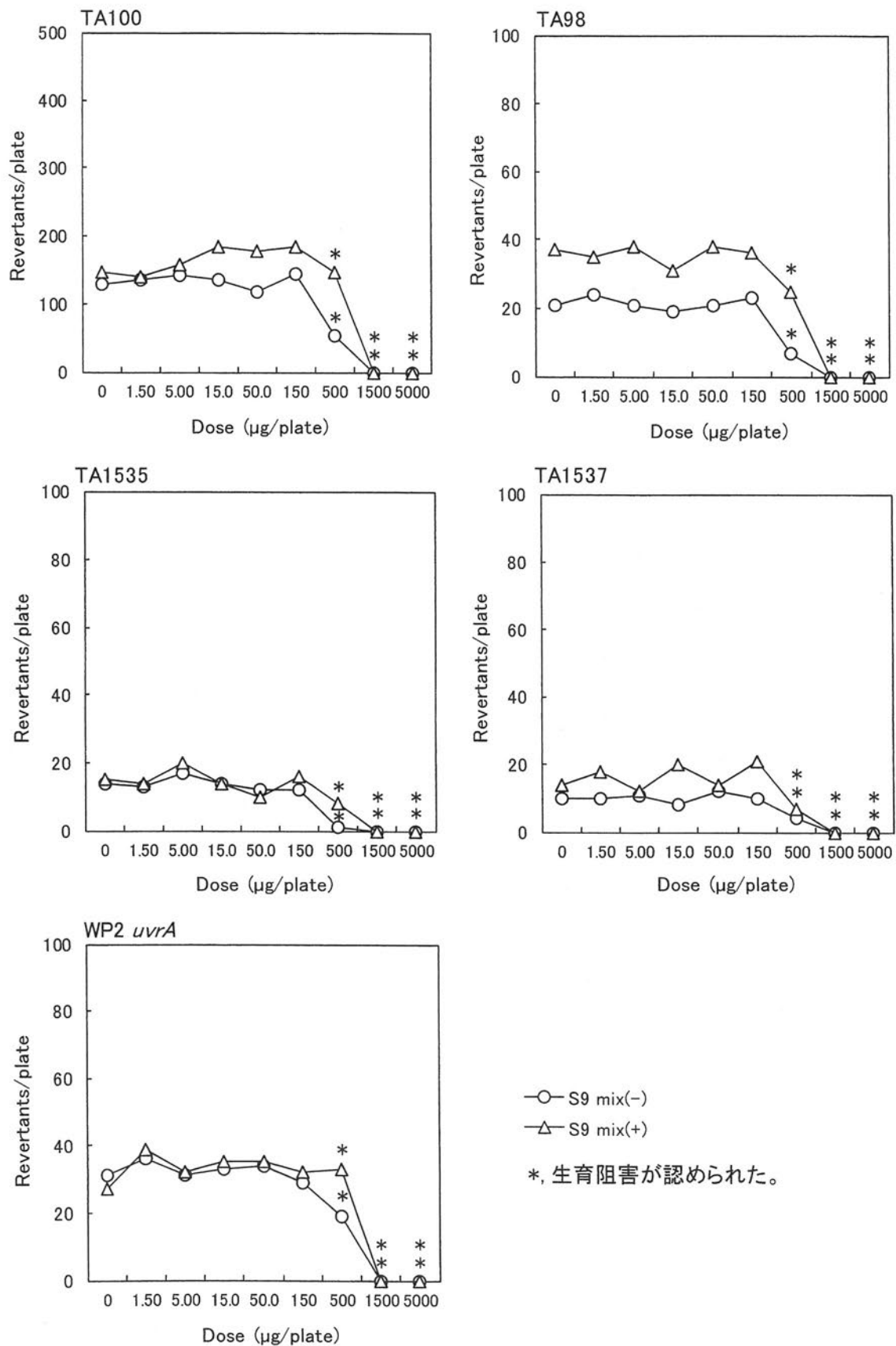


図 1 イソオイゲニル メチル エーテルの細菌を用いる復帰突然変異試験 (用量設定試験)

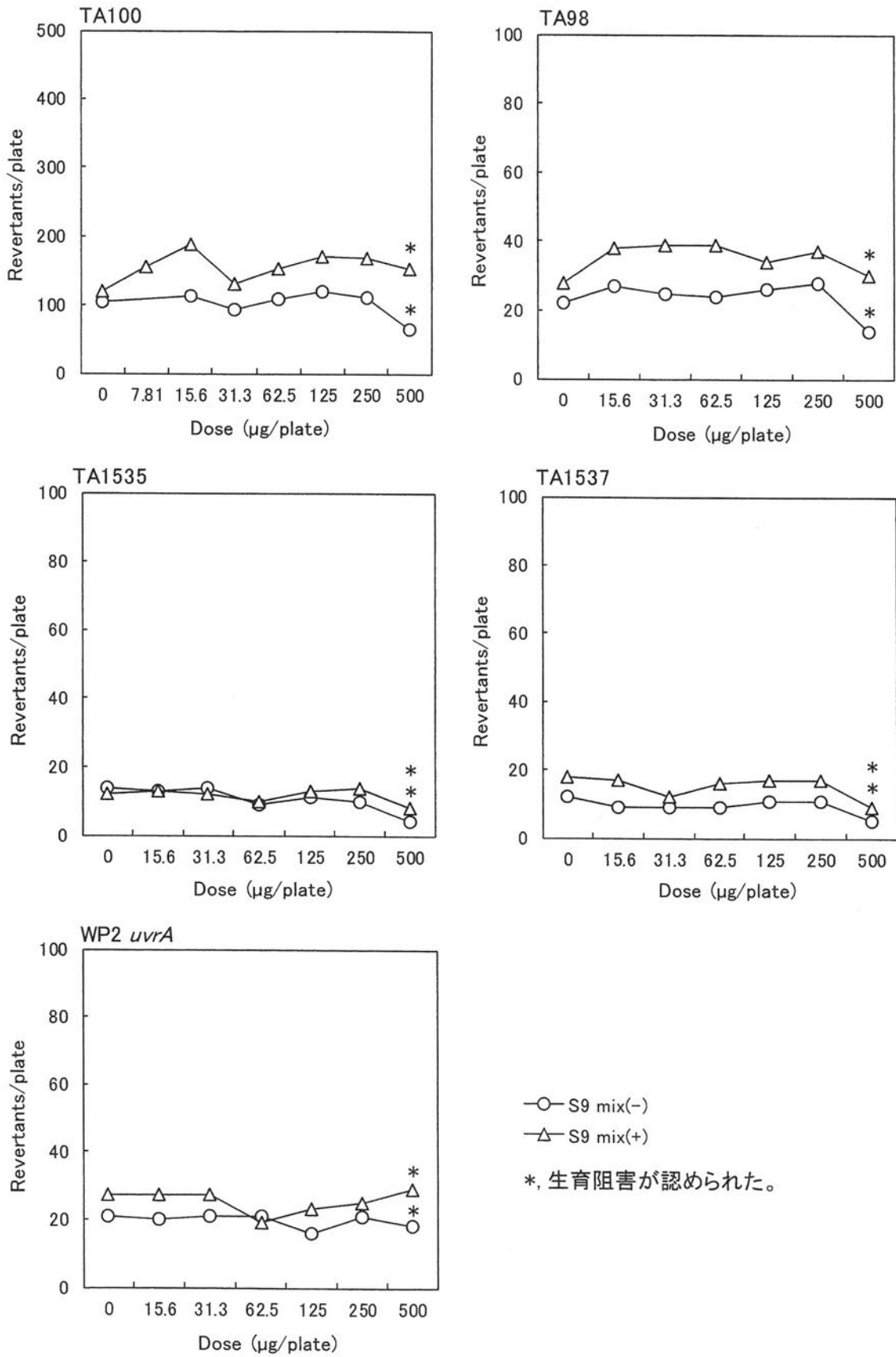


図 2 イソオイゲニル メチル エーテルの細菌を用いる復帰突然変異試験(本試験)

試験に用いた検定菌の復帰変異コロニー数の
背景データ(プレインキュベーション法)

	陰性対照値		陽性対照値	
	(- S9 mix)	(+ S9 mix)	(- S9 mix)	(+ S9 mix)
TA100	105 ± 12* (n=161)	111 ± 15 (n=166)	406 ± 66 (AF-2, 0.01 µg/plate) (n=146)	1088 ± 151 (B[a]P, 5 µg/plate) (n=110)
TA1535	11 ± 3 (n=152)	11 ± 3 (n=152)	523 ± 58 (SA, 0.5 µg/plate) (n=136)	384 ± 35 (2AA, 2 µg/plate) (n=136)
WP2 <i>uvrA</i>	30 ± 6 (n=151)	33 ± 7 (n=154)	112 ± 17 (AF-2, 0.01 µg/plate) (n=133)	506 ± 96 (2AA, 10 µg/plate) (n=138)
TA98	22 ± 4 (n=159)	30 ± 5 (n=165)	456 ± 65 (AF-2, 0.1 µg/plate) (n=144)	319 ± 37 (B[a]P, 5 µg/plate) (n=107)
TA1537	8 ± 2 (n=176)	18 ± 3 (n=180)	310 ± 79 (9AA, 80 µg/plate) (n=159)	149 ± 17 (B[a]P, 5 µg/plate) (n=109)

*: 平均値の平均 ± 標準偏差
n: 試験数

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide
SA : Sodium azide
9AA : 9-Aminoacridine
B[a]P : Benzo[a]pyrene
2AA : 2-Aminoanthracene