

最 終 報 告 書

試験名：3, 6-ジクロロピリダジンの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：T-0466

試験期間：2010年5月19日-2011年7月5日

試験施設

株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所
〒156-0042 東京都世田谷区羽根木 1-3-11

試験委託者

厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室
〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1-2-2

株式会社ボゾリサーチセンター
〒151-0065 東京都渋谷区大山町 36-7

1. 目次

1.	目次	2
3.	要約	7
4.	緒言	8
5.	被験物質及び被験液の調製	9
5.1	被験物質及び溶媒	9
5.1.1	被験物質	9
5.1.2	溶媒	10
5.1.3	溶媒の選択理由	10
5.2	被験液の調製方法	10
5.2.1	用量設定試験用被験液の調製	10
5.2.2	本試験 1 回目用被験液の調製	10
5.2.3	本試験 2 回目用被験液の調製	10
5.2.4	被験液の保存条件	11
6.	試験材料及び方法	11
6.1	試験菌株	11
6.1.1	菌株の種類	11
6.1.2	菌株の選択理由	11
6.1.3	菌株の保存及び解凍	11
6.1.4	菌株の特性検査	12
6.2	対照物質	12
6.2.1	陰性対照物質	12
6.2.2	陽性対照物質	12

6.2.3	調製方法	13
6.3	試薬	13
6.3.1	S9Mixの調製方法	13
6.3.2	培地	14
6.3.3	ニュートリエントブロス No.2 培養液	15
6.3.4	0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4)	15
6.3.5	トップアガー	15
6.4	試験方法	16
6.4.1	前培養	16
6.4.2	プレート数	17
6.4.3	試験操作 (プレインキュベーション法)	17
6.5	判定基準	18
7.	試験結果	18
7.1	用量設定試験の観察結果及び本試験用量の設定	18
7.2	本試験 1 回目及び本試験 2 回目の観察結果	18
7.3	試験系の成立条件	19
8.	考察	19
9.	参考文献	19

Tables

別表 1	試験結果表(用量設定試験)
別表 2	試験結果表(本試験 1 回目)
別表 3	試験結果表(本試験 2 回目)

Figures

図 1	用量反応曲線(本試験 1 回目 TA100 : -S9Mix)
図 2	用量反応曲線(本試験 1 回目 TA100 : +S9Mix)
図 3	用量反応曲線(本試験 1 回目 TA1535 : -S9Mix)
図 4	用量反応曲線(本試験 1 回目 TA1535 : +S9Mix)
図 5	用量反応曲線(本試験 1 回目 WP2 <i>uvrA</i> : -S9Mix)
図 6	用量反応曲線(本試験 1 回目 WP2 <i>uvrA</i> : +S9Mix)
図 7	用量反応曲線(本試験 1 回目 TA98 : -S9Mix)
図 8	用量反応曲線(本試験 1 回目 TA98 : +S9Mix)
図 9	用量反応曲線(本試験 1 回目 TA1537 : -S9Mix)
図 10	用量反応曲線(本試験 1 回目 TA1537 : +S9Mix)

3. 要約

3, 6-ジクロロピリダジンの復帰突然変異誘発能の有無を検討するため、ネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (以下、*S. typhimurium* と略す) TA100、TA1535、TA98、TA1537 及び大腸菌 *Escherichia coli* (以下、*E. coli* と略す) WP2 *uvrA* を用いて、代謝活性化する場合及び代謝活性化しない場合の条件下で、プレインキュベーション法により実施した。なお、被験物質の溶媒にはジメチルスルホキシド (以下、DMSO と略す。) を用いた。

試験は、19.5~5000 µg/plate の範囲の被験物質処理用量で用量設定試験を実施した。その結果より本試験は、生育阻害を示した最低用量を最高用量として、代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA1537 及び代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1535 については 156~5000 µg/plate の範囲の 6 用量で実施した。代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA100、TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA1535 については、生育阻害が認められなかったため、313~5000 µg/plate の範囲の 5 用量で実施した。

1) 被験物質による沈殿及び着色

本被験物質によるプレート上の沈殿及び着色は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。

2) 生育阻害

実体顕微鏡を用いて菌に対する生育阻害を観察した結果、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1537 の 2500 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1535 及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA1537 の 5000 µg/plate の用量で認められた。

3) 復帰変異コロニー数

2 回の本試験ともに、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても陰性対照値の 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量反応性も認められなかった。

以上の試験結果より、本試験条件下において、3, 6-ジクロロピリダジンは、細菌に対する遺伝子突然変異誘発能を有さない (陰性) と判定した。

4. 結言

本試験は、厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室からの委託により、株式会社ボゾリサーチセンターで実施した。

5. 被験物質及び被験液の調製

5.1 被験物質及び溶媒

5.1.1 被験物質

官報公示整理番号 : 5-3834

入手日 : 2009年10月19日 (御殿場研究所)

Ames 試験用入手日 : 2009年11月18日 (東京研究所)

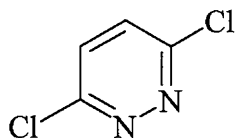
入手量 : 10.00g (Ames 試験用)

名称 : 3, 6-ジクロロピリダジン

英語名 : 3,6-Dichloropyridazine

CAS 番号 : 141-30-0

構造式 :



純度 : 99.9 %

分子量 : 148.98

融点 : 69.3°C

常温における性状 : 白色結晶性粉末

安定性 : 通常の取り扱い条件においては安定。酸化剤との接触に注意する。なお、本試験終了後に残余となった被験物質を株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所において分析し、安定性を確認した結果、赤外吸収スペクトルに大きな変化はなく、安定であることが確認された (別添 1)。

溶解性 : 水 ; 不溶

DMSO ; 50 mg/mL で溶解

溶媒中での安定性 : DMSO ; 発熱、ガスの発生等の反応性なし

保存条件 : 冷暗所 (冷蔵庫内、許容値 : 1~10°C) ・密栓

保存場所 : 東京研究所 被験物質調製保存室

保存温度 : 期間(2009.11.18~2010.6.22)中の実測温度 0.1~ 10.1°C

残量の処置 : 試験終了後の残量はすべて株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所へ送付し、分析後の残余物質は焼却処分した。

上記被験物質情報は、製造元作成の MSDS の情報による。なお、上記 DMSO の溶解性及び DMSO 中での安定性は、株式会社ボゾリサーチセンターで実施した溶解性試験の結果による。

5.1.2 溶媒

名称	:	DMSO
製造元	:	和光純薬工業株式会社
ロット番号	:	CDF0753
規格	:	JIS 規格 試薬特級 99.0%以上
保存方法	:	室温保存
保存場所	:	東京研究所 被験物質調製保存室

5.1.3 溶媒の選択理由

本被験物質は水に不溶のため、DMSO について溶解性試験を実施した。その結果、50 mg/mL で溶解し、発熱、ガスの発生等の反応性も認められなかったため、DMSO を溶媒として試験を実施した。

5.2 被験液の調製方法

5.2.1 用量設定試験用被験液の調製

滅菌した調製用試験管に被験物質を電子天秤（株式会社エー・アンド・ディ：GR-120）を用いて秤量し、その秤量値 245.3 mg に最高調製濃度の 50 mg/mL となるように溶媒量を計算し、4.906 mL の DMSO を添加して溶解し、50 mg/mL の被験液を調製した。次いで、これを公比 4 で順次 4 段階希釈し、50、12.5、3.13、0.781 及び 0.195 mg/mL の計 5 濃度の被験液を調製した。なお、被験液の調製において、発熱、ガスの発生等の反応性は認められなかった。また、被験液は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で用時調製した。

5.2.2 本試験 1 回目用被験液の調製

滅菌した調製用試験管に被験物質を電子天秤（株式会社エー・アンド・ディ：GR-120）を用いて秤量し、その秤量値 438.8 mg に最高調製濃度の 50 mg/mL となるように溶媒量を計算し、8.776 mL の DMSO を添加して溶解し、50 mg/mL の被験液を調製した。次いで、これを公比 2 で順次 5 段階希釈し、50、25、12.5、6.25、3.13 及び 1.56 mg/mL の計 6 濃度の被験液を調製した。なお、被験液の調製において、発熱、ガスの発生等の反応性は認められなかった。また、被験液は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で用時調製した。

5.2.3 本試験 2 回目用被験液の調製

滅菌した調製用試験管に被験物質を電子天秤（株式会社エー・アンド・ディ：GR-120）を用いて秤量し、その秤量値 386.1 mg に最高調製濃度の 50 mg/mL となるように溶媒量を計算し、7.722 mL の DMSO を添加して溶解し、50 mg/mL の被

験液を調製した。次いで、これを公比2で順次5段階希釈し、50、25、12.5、6.25、3.13及び1.56 mg/mLの計6濃度の被験液を調製した。なお、被験液の調製において、発熱、ガスの発生等の反応性は認められなかった。また、被験液は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で用時調製した。

5.2.4 被験液の保存条件

被験液は用時調製とし、保存はしなかった。

6. 試験材料及び方法

6.1 試験菌株

6.1.1 菌株の種類

次の5種類の菌株を用いた。

塩基対置換型

S. typhimurium TA100

S. typhimurium TA1535

E. coli WP2 *uvrA*

フレームシフト型

S. typhimurium TA98

S. typhimurium TA1537

なお、菌株は国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部より1997年10月9日に株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所で入手したのから、2005年7月21日に東京研究所へ分与された。

6.1.2 菌株の選択理由

毒性試験法ガイドラインに準じて選択した。当該菌株は変異原性物質に対する感受性が高く、細菌を用いる復帰突然変異試験に最も一般的に使用されている。

6.1.3 菌株の保存及び解凍

入手した菌株から継代して凍結保存した菌懸濁液を培養し、得られた菌懸濁液16.0 mLに、DMSO (和光純薬工業株式会社、JIS規格試薬特級、ロット番号CDM1016)を1.4 mL添加後、滅菌チューブに0.3 mLずつ分注し、-70°C以下の超低温フリーザ (三洋電機バイオメディカ株式会社:MDF-192) で保存した (保存期間中の実測温度; 2010年2月4日~2010年6月21日: -87.6~-75.6°C)。なお、使用する際は室温で解凍し、使用後の残液は廃棄した。

	使用した菌株の凍結保存日
<i>S. typhimurium</i> TA98	2010年4月8日
<i>S. typhimurium</i> TA100	2010年2月11日
<i>S. typhimurium</i> TA1535	2010年4月23日
<i>S. typhimurium</i> TA1537	2010年4月23日
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	2010年2月4日

6.1.4 菌株の特性検査

6.1.3 の凍結保存菌株を用いて、アミノ酸要求性、膜変異 *rfa* 特性、薬剤耐性因子 R-factor プラスミド、紫外線感受性、菌増殖率、陰性対照値及び陽性対照値等の特性を検査し、それぞれの菌株に特有の性質が保持されていることを確認して使用した。

	使用した菌株の特性検査実施日
<i>S. typhimurium</i> TA98	2010年4月8日~2010年4月12日
<i>S. typhimurium</i> TA100	2010年2月15日~2010年2月18日
<i>S. typhimurium</i> TA1535	2010年4月23日~2010年4月26日
<i>S. typhimurium</i> TA1537	2010年4月23日~2010年4月26日
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	2010年2月15日~2010年2月18日

6.2 対照物質

6.2.1 陰性対照物質

被験物質の調製に用いた DMSO を陰性対照物質とした。

6.2.2 陽性対照物質

毒性試験法ガイドラインに準じて、以下の変異原物質を陽性対照物質とした。

表1 陽性対照物質一覧

陽性対照物質 (略称)	ロット番号	純度(%)	保存方法	製造元
2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF-2)	WKK3086	99.6%	室温、遮光	和光純薬工業株式会社
Sodium azide (SAZ)	SDL2565	99.8%	室温、遮光	和光純薬工業株式会社
2-Methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)-aminopropylamino]acridine·2HCl (ICR-191)	534652	—	室温、遮光	Polysciences, Inc.
2-Aminoanthracene (2AA)	KLH1059	96.6%	室温、遮光	和光純薬工業株式会社
Benzo[a]pyrene (B[a]P)	17870	100%	冷蔵、遮光	AccuStandard, Inc.

保存場所 東京研究所 微生物試験室

6.2.3 調製方法

AF-2、ICR-191、2AA 及び B[a]P は DMSO（和光純薬工業株式会社、JIS 規格 試薬特級、ロット番号 CDF0753）に溶解し、SAZ は注射用水（株式会社大塚製薬工場、日本薬局方、ロット番号 K9L77）に溶解し、1.0 mL ずつ小分けして -20°C 以下で凍結保存した。なお、試験実施時に解凍して使用した。それぞれの調製濃度を表 2 に示した。

表 2 陽性対照物質調製濃度一覧

使用菌株	代謝活性化しない場合		代謝活性化する場合	
	陽性対照物質名	調製濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	陽性対照物質名	調製濃度 ($\mu\text{g/mL}$)
<i>S. typhimurium</i> TA100	AF-2	0.1 (0.01)	B[a]P	50 (5.0)
<i>S. typhimurium</i> TA1535	SAZ	5 (0.5)	2AA	20 (2.0)
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	AF-2	0.1 (0.01)	2AA	100 (10.0)
<i>S. typhimurium</i> TA98	AF-2	1 (0.1)	B[a]P	50 (5.0)
<i>S. typhimurium</i> TA1537	ICR-191	10 (1.0)	B[a]P	50 (5.0)

()内の数値は、プレートに処理したときの処理用量 ($\mu\text{g/plate}$) を示す。

6.3 試薬

6.3.1 S9Mix の調製方法

Cofactor-I の 1 バイアルに滅菌精製水を 9.0 mL 加え、完全に溶解した後ろ過 (NALGENE 0.45 μm : Lot No.1001692、1006845) 滅菌し、Cofactor-I の 1 バイアルに対して 1.0 mL の S9 を加えて S9 Mix とした。調製後、使用時まで冷蔵下で保存し、使用後の残液は廃棄した。

1) S9

名称	:	S9
製造元	:	キッコーマン株式会社
ロット番号	:	RAA-606 (用量設定試験) RAA-611 (2 回の本試験)
製造日	:	2009 年 12 月 4 日 (RAA-606) 2010 年 4 月 2 日 (RAA-611)
購入日	:	2010 年 2 月 25 日 (RAA-606) 2010 年 5 月 20 日 (RAA-611)
種・系統	:	ラット・SD 系
週齢・性	:	7 週齢・雄
体重	:	215-252 g (RAA-606) 208-254 g (RAA-611)
誘導物質	:	フェノバルビタール(PB)及び 5,6-ベンゾフラボン(BF)
投与方法	:	腹腔内投与

投与期間及び投与量 : PB 4日間連続投与 : 30+60+60+60 (mg/kg 体重)
 PB 投与 3日目 BF 投与 : 80 (mg/kg 体重)
 保存場所 : 東京研究所 被験物質調製保存室内超低温フリーザ (三洋電機バイオメディカ株式会社 : MDF-192)
 保存期間中の実測温度 : 2010年2月25日~2010年6月22日 : -87.6~-75.6°C

2) 補酵素

名称 : Cofactor-I
 製造元 : オリエンタル酵母工業株式会社
 ロット番号 : 999903 (用量設定試験)
 999001 (2回の本試験)
 製造日 : 2009年10月20日 (999903)
 2010年4月6日 (999001)
 購入日 : 2010年5月12日 (999903)
 2010年5月28日 (999001)
 保存場所 : 東京研究所 微生物試験室内冷蔵庫 (冷凍・冷蔵庫 MPR-211F : 三洋電機バイオメディカ株式会社)
 保存期間中の実測温度 : 2010年5月12日~2010年6月22日 : 2.5~8.7°C

3) S9Mix の組成 (1mL 中)

水 : 0.9 mL
 S9 : 0.1 mL
 MgCl₂ : 8.0 μmol/mL
 KCl : 33.0 μmol/mL
 グルコース-6-リン酸 : 5.0 μmol/mL
 還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(NADPH)
 : 4.0 μmol/mL
 還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH)
 : 4.0 μmol/mL
 リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)
 : 100.0 μmol/mL

6.3.2 培地

1) 最小グルコース寒天平板培地

名称 : バイタルメディア AMT-O 培地
 製造元 : 極東製薬工業株式会社
 ロット番号 : DZLB3A01
 製造日 : 2010年3月10日
 購入日 : 2010年5月12日

保存方法 : 常温保存
 保存場所 : 東京研究所 寒天培地保存室

2) 使用寒天

名称 : OXOID AGAR No.1
 製造元 : OXOID LTD.
 ロット番号 : 1073337-02

6.3.3 ニュートリエントブロス No.2 培養液

ニュートリエントブロス No.2 を 2.5 wt% となるよう精製水で溶解し、オートクレーブにより滅菌処理 (121°C、20 分) を行い、調製した。調製後は使用時まで冷蔵で保存した。

名称 : ニュートリエントブロス No.2 (Nutrient Broth No.2)
 ロット番号 : 464616
 製造元 : OXOID LTD.
 保存方法 : 室温保存
 保存場所 : 東京研究所 微生物試験室

6.3.4 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4)

0.1mol/L リン酸水素二ナトリウム水溶液に、0.1mol/L リン酸二水素ナトリウム二水和物水溶液を加えながら pH 7.4 に調整し、0.1mol/L リン酸緩衝液とした。これをオートクレーブにより滅菌処理(121°C、20 分)を行った。調製後は使用時まで冷蔵で保存した。

1) リン酸二水素ナトリウム二水和物 (NaH₂PO₄·2H₂O)

名称 : リン酸二水素ナトリウム二水和物 (NaH₂PO₄·2H₂O)
 製造元 : 和光純薬工業株式会社
 ロット番号 : PEN6717
 保存方法 : 室温保存
 保存場所 : 東京研究所 微生物試験室

2) リン酸水素二ナトリウム (Na₂HPO₄)

名称 : リン酸水素二ナトリウム (Na₂HPO₄)
 製造元 : 和光純薬工業株式会社
 ロット番号 : ALH5213
 保存方法 : 室温保存
 保存場所 : 東京研究所 微生物試験室

6.3.5 トップアガー

以下に示す寒天を用いて、調製した軟寒天液(0.6 wt% Agar, 0.6wt% NaCl)をオートクレーブにより滅菌処理(121°C、20 分)した後、*S. typhimurium* TA 株は 0.5 mmol/L D-ビオチン-0.5 mmol/L L-ヒスチジン溶液、*E. coli* 株では 0.5 mmol/L L-トリプトファン

溶液をそれぞれ 1/10 容量加えて調製した。調製後は室温で保存し、使用時は電子レンジで溶解後、固化を防ぐため 45°C の恒温槽で保温した。

1) 寒天

名称 : Bacto Agar
 製造元 : Becton, Dickinson and Company
 ロット番号 : 9023033
 保存方法 : 室温保存
 保存場所 : 東京研究所 微生物試験室

2) 塩化ナトリウム

製造元 : 和光純薬工業株式会社
 ロット番号 : EPR3006
 保存方法 : 室温保存
 保存場所 : 東京研究所 微生物試験室

3) D-ビオチン

製造元 : MP Biomedicals, Inc.
 ロット番号 : 1644J
 保存方法 : 冷蔵保存、遮光
 保存場所 : 東京研究所 微生物試験室

4) L-ヒスチジン塩酸塩一水和物

製造元 : 和光純薬工業株式会社
 ロット番号 : EWQ6361
 保存方法 : 室温保存、遮光
 保存場所 : 東京研究所 微生物試験室

5) L-トリプトファン

製造元 : 和光純薬工業株式会社
 ロット番号 : EWP0422
 保存方法 : 室温保存、遮光
 保存場所 : 東京研究所 微生物試験室

6.4 試験方法

6.4.1 前培養

- 1) ニュートリエントブロス No.2 培養液 10 mL を入れた滅菌済み L 字型試験管（内容量 48 mL）に、凍結保存菌株を解凍して得た菌懸濁液を *S. typhimurium* TA 株は各 20 μ L、*E. coli* 株は 10 μ L 植菌し、振盪恒温槽（COOL BATH SHAKER ML-10 PU-6 接続型、タイテック株式会社）にセットした。
- 2) これをプログラム制御により前培養開始まで 4°C の水浴中に放置（6 時間 30 分）した後、振盪（100 回/分）しながら 37°C に上昇後 9 時間前培養した。なお、使用後の菌懸濁液は廃棄した。

- 3) 前培養終了時に培養液の吸光度をデジタル比色計 (Mini photo 518R、タイテック株式会社) で測定し、生菌数が 1×10^9 個/mL 以上あることを確認した。なお、培養液は使用まで室温下に維持した。それぞれの菌株の換算生菌数を表 3 に示した。

表 3 菌株の換算生菌数一覧

菌株	菌数(個/mL)		
	用量設定試験	本試験 1 回目	本試験 2 回目
<i>S. typhimurium</i> TA100	4.30×10^9	4.36×10^9	4.68×10^9
<i>S. typhimurium</i> TA1535	4.70×10^9	4.81×10^9	4.88×10^9
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	7.75×10^9	7.98×10^9	7.87×10^9
<i>S. typhimurium</i> TA98	5.54×10^9	5.50×10^9	5.57×10^9
<i>S. typhimurium</i> TA1537	3.07×10^9	3.10×10^9	3.09×10^9

6.4.2 プレート数

被験物質処理群、陰性対照群及び陽性対照群のいずれについても、用量設定試験では各用量につき 2 枚、2 回の本試験では各用量につき 3 枚のプレートを用いた。

6.4.3 試験操作 (プレインキュベーション法)

- 1) 滅菌した小試験管に被験液、溶媒又は陽性対照溶液を 0.1 mL 入れ、代謝活性化しない場合は 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL を、代謝活性化する場合は S9 Mix 0.5 mL を加えた後、さらに各菌懸濁液 0.1 mL を加え、攪拌した。
- 2) 攪拌後すぐに 37°C で 20 分間振盪 (80 回/分) しながらプレインキュベーションした。
- 3) プレインキュベーション終了後、あらかじめ電子レンジを用いて溶解し、ユニット恒温槽で 45°C に保温されたトッパアガーを小試験管に 2.0 mL 加えて攪拌後、最小グルコース寒天平板培地に均一に重層した。
- 4) 無菌試験として、調製した最高用量の被験液 0.1 mL 及び調製した S9 Mix 0.5 mL をそれぞれ小試験管に取り、これにトッパアガーを 2.0 mL 加えた後に最小グルコース寒天平板培地に均一に重層した。なお、これら 1)~4) の一連の操作は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で実施した。
- 5) 最小グルコース寒天平板培地に重層したトッパアガーが固化したことを確認し、最小グルコース寒天平板培地を逆さにしてインキュベータに入れ、37°C で用量設定試験では 49 時間、本試験 1 回目では 49.5 時間、本試験 2 回目では 48 時間培養した。
- 6) 培養後、プレート上の被験物質による沈殿及び着色の有無を確認した結果、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかったため、自動コロニーカウンタ (コロニーアナライザー CA-11D systems、システムサイエンス株式会社) を用いて計数 (面積補正、補正值: 1.21) した。また、実体顕微鏡を用いて生育阻害の有無を観察した。

6.5 判定基準

被験物質処理群の復帰変異コロニー数が自然復帰変異コロニー数（陰性対照値）に対して2倍以上となる増加を示し、用量反応性及び再現性が認められた場合あるいは明確な用量反応性を示さない場合であっても自然復帰変異コロニー数の2倍以上となる増加を示し、2回の本試験で再現性が認められた場合に陽性と判定することとした。なお、測定結果については、平均値±標準偏差も併せて記載した。

7. 試験結果

用量設定試験の結果を別表1、本試験1回目の結果を別表2、本試験2回目の結果を別表3に示した。なお、図1~10は別表2より作成した。

7.1 用量設定試験の観察結果及び本試験用量の設定

本試験の試験用量を設定するため、50 mg/mLの被験液を公比4で4段階希釈した計5用量（19.5、78.1、313、1250、5000 µg/plate）を用い、用量設定試験を実施した。

その結果、本被験物質によるプレート上の沈殿及び着色は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。実体顕微鏡を用いて菌に対する生育阻害を観察した結果、代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA1537 及び代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1535 の 5000 µg/plate の用量で認められた。

本被験物質による復帰変異コロニー数は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても陰性対照値の2倍以上となる増加は認められず、用量反応性も認められなかった。

このため、本試験の試験用量は、生育阻害を示した最低用量を最高用量として、代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA1537 及び代謝活性化しない場合 *S. typhimurium* TA1535 については 5000 µg/plate を最高用量として以下公比2で5段階希釈した計6用量を設定した。また、代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA100、TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA1535 については生育阻害が認められなかったため、5000 µg/plate を最高用量として、以下公比2で4段階希釈した計5用量を設定した。なお、本試験は同一用量で2回実施した。

7.2 本試験1回目及び本試験2回目の観察結果

本被験物質によるプレート上の沈殿及び着色は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。実体顕微鏡を用いて菌に対する生育阻害を観察した結果、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1537 の 2500 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1535 及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA1537 の 5000 µg/plate の用量で認められた。

本被験物質による復帰変異コロニー数は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても陰性対照値の2倍以上となる増加は認められず、用量反応性も認められなかった。

7.3 試験系の成立条件

陽性対照値がそれぞれの菌株の陰性対照値に比較して2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加を示し、陰性対照値及び陽性対照値の復帰変異コロニー数の平均値が背景データの管理限界（別添2）内であり、無菌試験及び試験操作において雑菌の混入などの異常も認められなかったため、試験が適切に実施されたものと判断した。

8. 考察

2回の本試験ともに代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても陰性対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量反応性も認められなかった。

一方、陽性対照群では陰性対照群と比較して2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加を示したことから、使用菌株の復帰突然変異誘発物質に対する反応は適切であったことが確認され、試験は適切に実施されたものと考えられた。

以上の試験結果より、本試験条件下において、3, 6-ジクロロピリダジンは、細菌に対する復帰突然変異誘発能を有さない（陰性）と判定した。

9. 参考文献

- 1) B.N.Ames, F.D.Lee and W.E.Durston: An Improved Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens, Proc.Natl Acad.Sci.,USA, 70, No.3, pp.782-786, March 1973.
- 2) J.McCann, N.E.Spingarn, J.Kobori and B.N.Ames: Detection of Carcinogens as Mutagens: Bacterial Tester Strains with R Factor Plasmids, Proc.Natl Acad.Sci., USA, 72, No.3, pp.979-983, March 1975.
- 3) M.H.L.Green and W.J.Muriel: Mutagen Testing using Trp+ Reversion in *Escherichia coli*, Mutation Res., 38, pp.3-32, 1976.
- 4) T.Yahagi, M.Nagao, Y.Seino, T.Matsushima, T.Sugimura and M.Okada: Mutagenicities of *N*-nitrosamines on *Salmonella*, Mutation Res., 48, pp.121-130, 1977.
- 5) Dorothy M. Maron and Bruce N. Ames: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, Mutation Res., 113, pp.173-215, 1983.
- 6) 田島彌太郎, 賀田恒夫, 近藤宗平, 外村晶(編): 環境変異原実験法, 講談社, pp.56-68, 1980.
- 7) 労働省安全衛生部化学物質調査課編: 新・微生物を用いる変異原性試験ガイドブック, 中央労働災害防止協会, 1986.
- 8) 石館基(監修): 微生物を用いる変異原性試験データ集(能美健彦, 松井道子編集), 株式会社エル・アイ・シー, 東京, 1991.

(別表1)

試験結果表 (用量設定試験)

被験物質の名称:3, 6-ジクロロピリダジン

No. T-0466

試験実施期間		2010年5月24日 より 2010年5月27日				
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	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9Mix (-)	陰性対照 (DMSO)	94 83 (89)	9 11 (10)	19 26 (23)	20 19 (20)	10 16 (13)
	19.5	123 79 (101)	12 11 (12)	22 15 (19)	15 14 (15)	14 15 (15)
	78.1	90 99 (95)	11 17 (14)	16 17 (17)	11 22 (17)	18 17 (18)
	313	95 91 (93)	13 10 (12)	22 20 (21)	10 10 (10)	15 13 (14)
	1250	88 83 (86)	8 12 (10)	10 16 (13)	21 11 (16)	12 15 (14)
	5000	88 91 (90)	13 * 11 * (12)	21 29 (25)	14 24 (19)	16 * 17 * (17)
	S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	93 105 (99)	19 11 (15)	19 19 (19)	31 20 (26)
19.5		111 97 (104)	11 12 (12)	28 25 (27)	30 24 (27)	20 21 (21)
78.1		99 107 (103)	8 13 (11)	31 29 (30)	36 20 (28)	22 15 (19)
313		118 101 (110)	4 11 (8)	27 31 (29)	19 33 (26)	22 17 (20)
1250		103 128 (116)	13 6 (10)	21 21 (21)	34 21 (28)	20 16 (18)
5000		96 109 (103)	8 13 (11)	30 26 (28)	28 18 (23)	25 * 22 * (24)
陽性対照		名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2
	S9Mixを必要としな いもの 用量(μg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	コロニー数/プレート	456 470 (463)	361 342 (352)	68 73 (71)	332 348 (340)	2019 2027 (2023)
	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
	S9Mixを必要とする もの 用量(μg/プレート)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
	コロニー数/プレート	880 903 (892)	312 318 (315)	1067 1133 (1100)	275 350 (313)	103 123 (113)

(備考)

AF-2 :2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

SAZ :アジ化ナトリウム

ICR-191 :2-メキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl

2AA :2-アミノアントラセン

B[a]P :ベンゾ[a]ピレン

*: 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。

()内は、2枚のプレートの平均値を示す。

(別表2)

試験結果表(本試験1回目)

被験物質の名称:3,6-ジクロロピリダジン

No. T-0466

試験実施期間		2010年6月8日 より 2010年6月11日				
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	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9Mix (-)	陰性対照(DMSO)	104 104 99 (102 ± 2.9)	14 8 22 (15 ± 7.0)	16 17 15 (16 ± 1.0)	21 18 15 (18 ± 3.0)	4 10 8 (7 ± 3.1)
	156	NT	13 18 11 (14 ± 3.6)	NT	NT	11 6 11 (9 ± 2.9)
	313	112 91 110 (104 ± 11.6)	7 11 10 (9 ± 2.1)	8 16 16 (13 ± 4.6)	11 8 13 (11 ± 2.5)	5 4 4 (4 ± 0.6)
	625	99 85 86 (90 ± 7.8)	8 17 14 (13 ± 4.6)	22 8 14 (15 ± 7.0)	9 13 10 (11 ± 2.1)	7 7 7 (7 ± 0.0)
	1250	105 101 99 (102 ± 3.1)	13 18 14 (15 ± 2.6)	22 10 16 (16 ± 6.0)	22 18 20 (20 ± 2.0)	6 11 8 (8 ± 2.5)
	2500	104 98 83 (95 ± 10.8)	8 7 11 (9 ± 2.1)	11 19 15 (15 ± 4.0)	19 15 18 (17 ± 2.1)	6 * 10 * 8 * (8 ± 2.0)
	5000	81 94 88 (88 ± 6.5)	9 * 19 * 10 * (13 ± 5.5)	13 23 10 (15 ± 6.8)	10 11 15 (12 ± 2.6)	10 * 14 * 5 * (10 ± 4.5)
	陰性対照(DMSO)	104 107 108 (106 ± 2.1)	13 8 11 (11 ± 2.5)	15 19 16 (17 ± 2.1)	27 28 29 (28 ± 1.0)	9 10 10 (10 ± 0.6)
	156	NT	NT	NT	NT	12 11 12 (12 ± 0.6)
	313	101 121 106 (109 ± 10.4)	10 10 5 (8 ± 2.9)	15 16 15 (15 ± 0.6)	41 32 30 (34 ± 5.9)	4 10 3 (6 ± 3.8)
S9Mix (+)	625	111 103 89 (101 ± 11.1)	5 11 13 (10 ± 4.2)	10 10 15 (12 ± 2.9)	15 20 20 (18 ± 2.9)	4 12 15 (10 ± 5.7)
	1250	101 110 91 (101 ± 9.5)	9 10 8 (9 ± 1.0)	21 13 19 (18 ± 4.2)	16 26 25 (22 ± 5.5)	8 6 5 (6 ± 1.5)
	2500	119 108 91 (106 ± 14.1)	16 11 9 (12 ± 3.6)	21 24 16 (20 ± 4.0)	28 25 21 (25 ± 3.5)	2 13 10 (8 ± 5.7)
	5000	104 105 85 (98 ± 11.3)	8 6 7 (7 ± 1.0)	13 10 16 (13 ± 3.0)	23 20 15 (19 ± 4.0)	5 * 10 * 11 * (9 ± 3.2)
	名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191
	用量(μg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	コロニー数/プレート	497 486 410 (464 ± 47.4)	302 327 305 (311 ± 13.7)	59 63 53 (58 ± 5.0)	404 442 433 (426 ± 19.9)	2310 2603 2370 (2428 ± 154.8)
陽性対照	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
	用量(μg/プレート)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
	コロニー数/プレート	843 763 802 (803 ± 40.0)	265 324 274 (288 ± 31.8)	878 1045 1032 (985 ± 92.9)	276 252 244 (257 ± 16.7)	88 108 87 (94 ± 11.8)

(備考)

AF-2 :2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
SAZ :アジ化ナトリウム
ICR-191 :2-メキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノ]プロピルアミン]アクリジン・2HCl
2AA :2-アミノアントラセン
B[a]P :ベンゾ[a]ピレン

*:被験物質による生育阻害が認められたことを示す。
NT:試験せず。
()内は、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

(別表3)

試験結果表(本試験2回目)

被験物質の名称:3,6-ジクロロピリダジン

No. T-0466

試験実施期間		2010年6月21日 より 2010年6月24日				
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	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9Mix (-)	陰性対照(DMSO)	88 114 110 (104 ± 14.0)	12 8 7 (9 ± 2.6)	30 23 28 (27 ± 3.6)	12 8 13 (11 ± 2.6)	17 11 8 (12 ± 4.6)
	156	NT	5 6 7 (6 ± 1.0)	NT	NT	19 11 11 (14 ± 4.6)
	313	103 96 94 (98 ± 4.7)	10 10 10 (10 ± 0.0)	24 28 25 (26 ± 2.1)	13 14 17 (15 ± 2.1)	12 13 13 (13 ± 0.6)
	625	103 108 87 (99 ± 11.0)	4 7 2 (4 ± 2.5)	32 16 24 (24 ± 8.0)	11 13 11 (12 ± 1.2)	13 12 22 (16 ± 5.5)
	1250	105 88 103 (99 ± 9.3)	6 8 7 (7 ± 1.0)	28 28 16 (24 ± 6.9)	17 13 23 (18 ± 5.0)	18 10 13 (14 ± 4.0)
	2500	94 88 109 (97 ± 10.8)	7 8 8 (8 ± 0.6)	22 23 25 (23 ± 1.5)	13 8 11 (11 ± 2.5)	8 * 15 * 11 * (11 ± 3.5)
	5000	102 98 95 (98 ± 3.5)	8 * 7 * 10 * (8 ± 1.5)	14 30 24 (23 ± 8.1)	6 16 13 (12 ± 5.1)	14 * 9 * 17 * (13 ± 4.0)
	S9Mix (+)	陰性対照(DMSO)	132 103 104 (113 ± 16.5)	12 13 12 (12 ± 0.6)	27 21 18 (22 ± 4.6)	24 26 21 (24 ± 2.5)
156		NT	NT	NT	NT	14 12 11 (12 ± 1.5)
313		93 108 85 (95 ± 11.7)	5 13 8 (9 ± 4.0)	19 23 29 (24 ± 5.0)	25 28 25 (26 ± 1.7)	12 10 17 (13 ± 3.6)
625		93 105 111 (103 ± 9.2)	8 13 16 (12 ± 4.0)	30 27 27 (28 ± 1.7)	18 19 29 (22 ± 6.1)	10 10 10 (10 ± 0.0)
1250		111 119 108 (113 ± 5.7)	7 9 12 (9 ± 2.5)	22 20 25 (22 ± 2.5)	18 24 21 (21 ± 3.0)	7 6 8 (7 ± 1.0)
2500		97 130 101 (109 ± 18.0)	5 5 4 (5 ± 0.6)	24 22 18 (21 ± 3.1)	19 26 19 (21 ± 4.0)	11 5 14 (10 ± 4.6)
5000		84 114 95 (98 ± 15.2)	5 11 13 (10 ± 4.2)	21 44 28 (31 ± 11.8)	28 17 19 (21 ± 5.9)	7 * 8 * 15 * (10 ± 4.4)
陽性対照		名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2
	S9Mixを必要としないもの 用量(μg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	コロニー数/プレート	561 531 500 (531 ± 30.5)	255 243 246 (248 ± 6.2)	44 54 65 (54 ± 10.5)	358 343 283 (328 ± 39.7)	2458 2338 2464 (2420 ± 71.1)
	S9Mixを必要とするもの 名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
用量(μg/プレート)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0	
コロニー数/プレート	744 793 840 (792 ± 48.0)	309 371 337 (339 ± 31.0)	824 914 931 (890 ± 57.5)	290 281 235 (269 ± 29.5)	95 105 106 (102 ± 6.1)	

(備考)

AF-2 :2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
SAZ :アジ化ナトリウム
ICR-191 :2-オキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノ]プロピルアミンアクリジン・2HCl
2AA :2-アミノアントラセン
B[a]P :ベンゾ[a]ピレン

*:被験物質による生育阻害が認められたことを示す。
NT:試験せず。
()内は、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

図 1

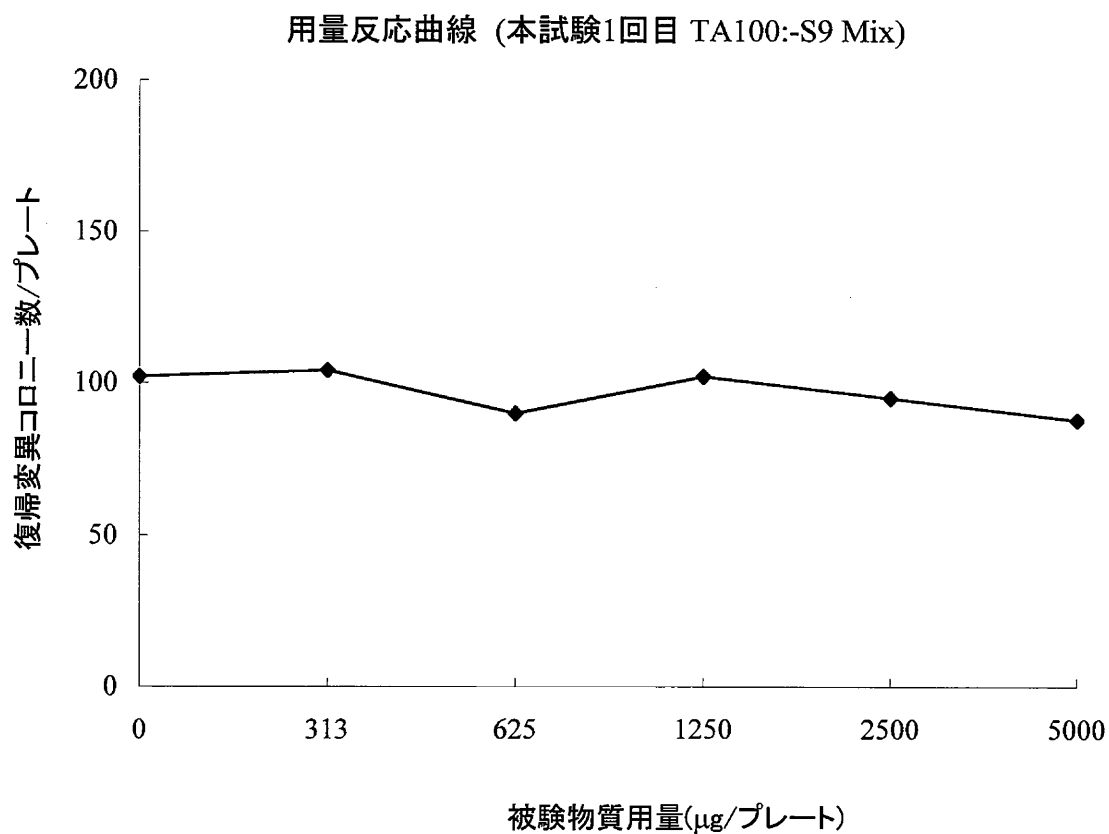


図 2

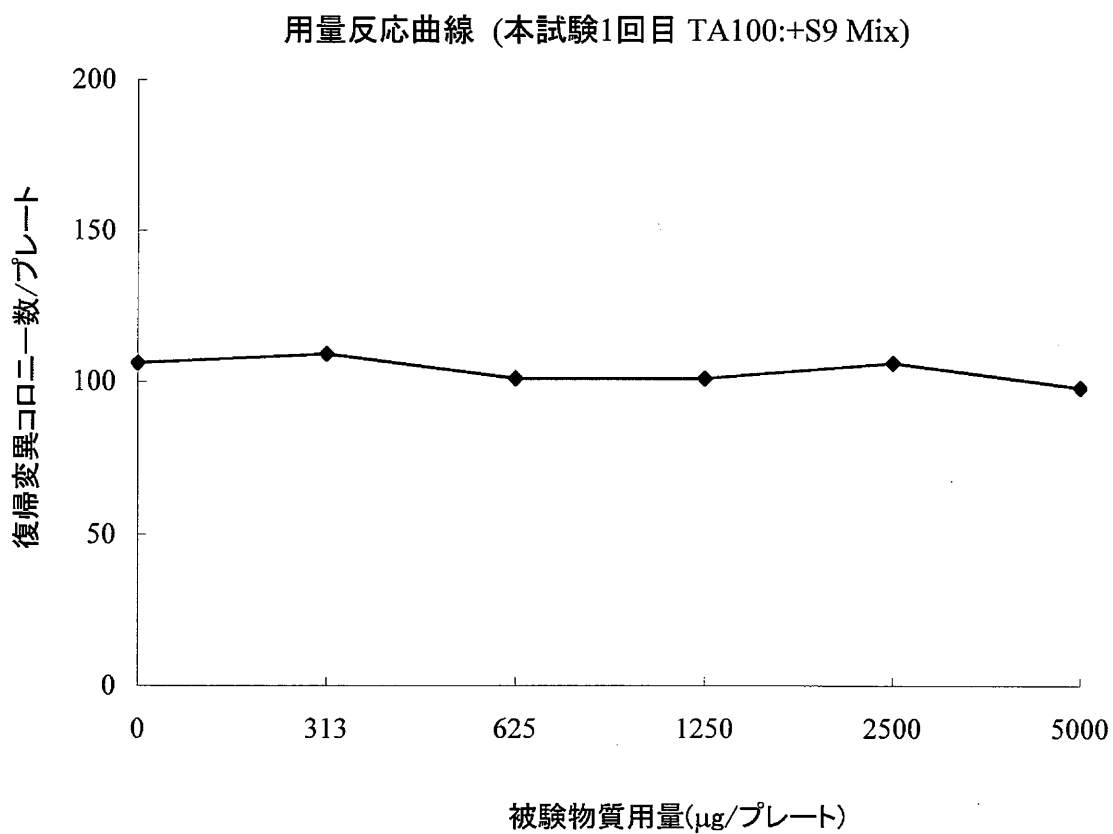


図 3

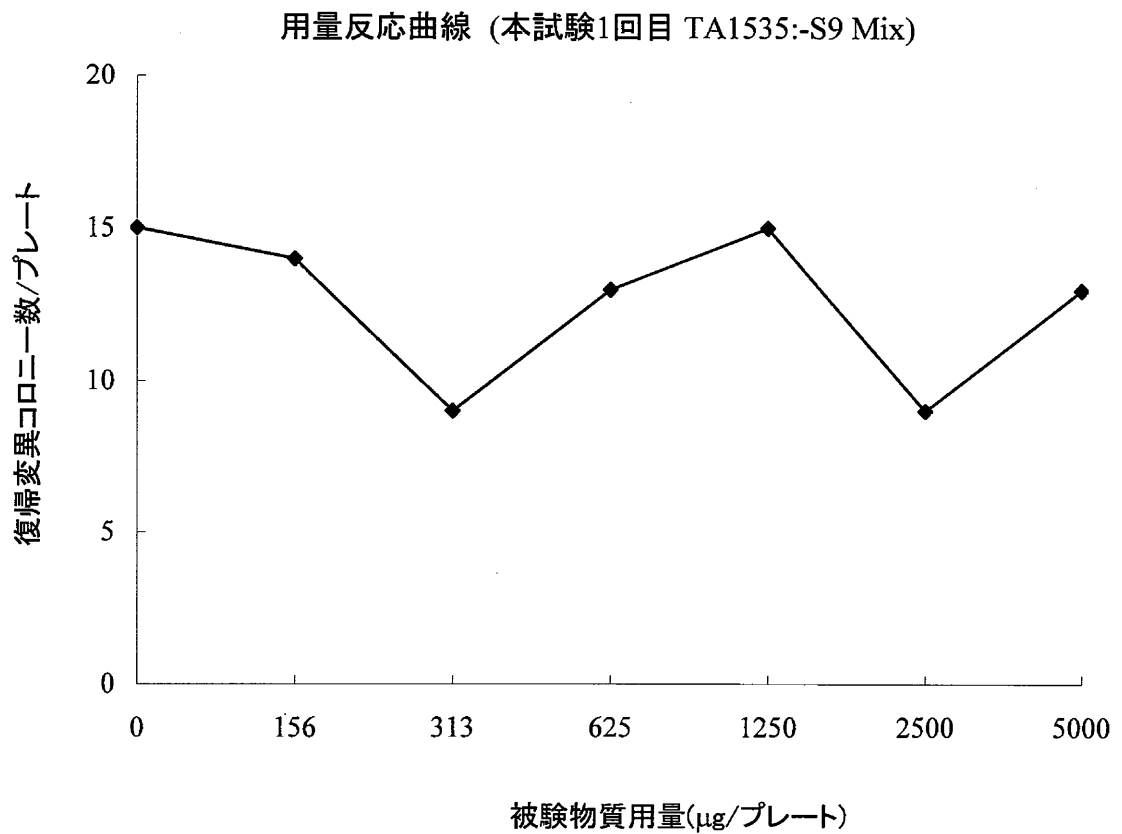


図 4

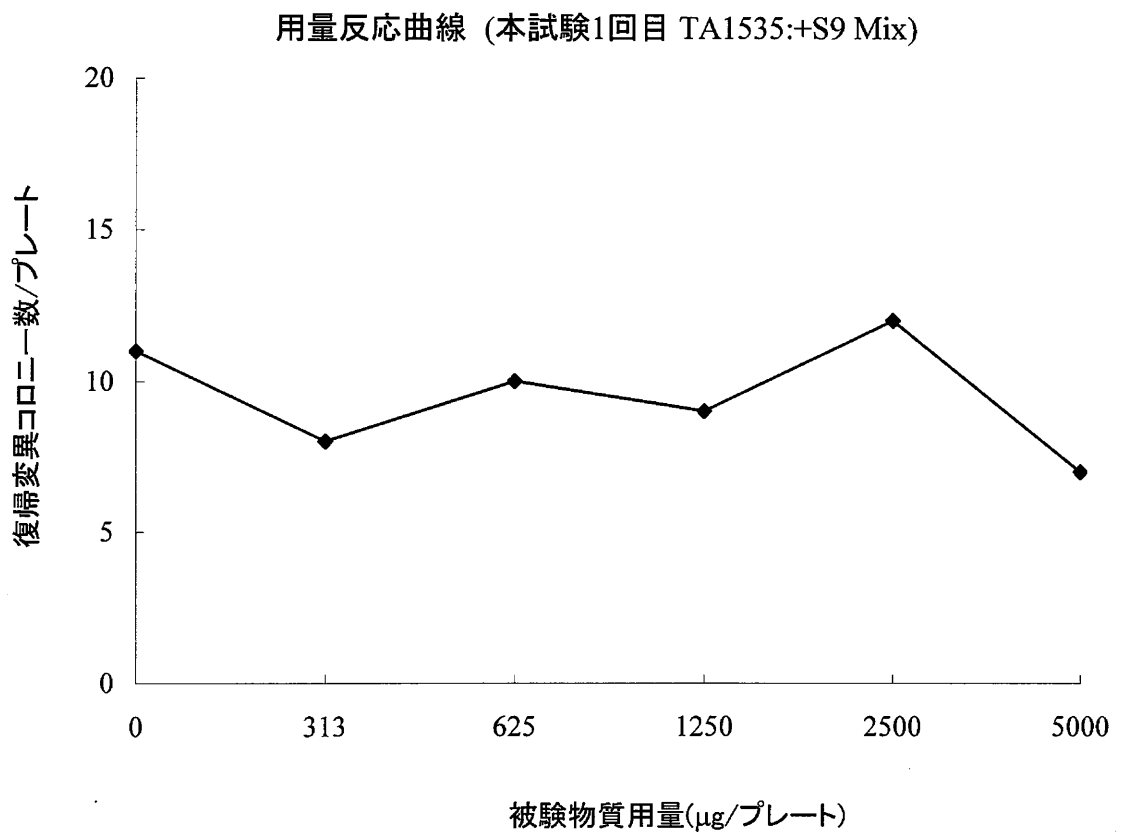


図 5

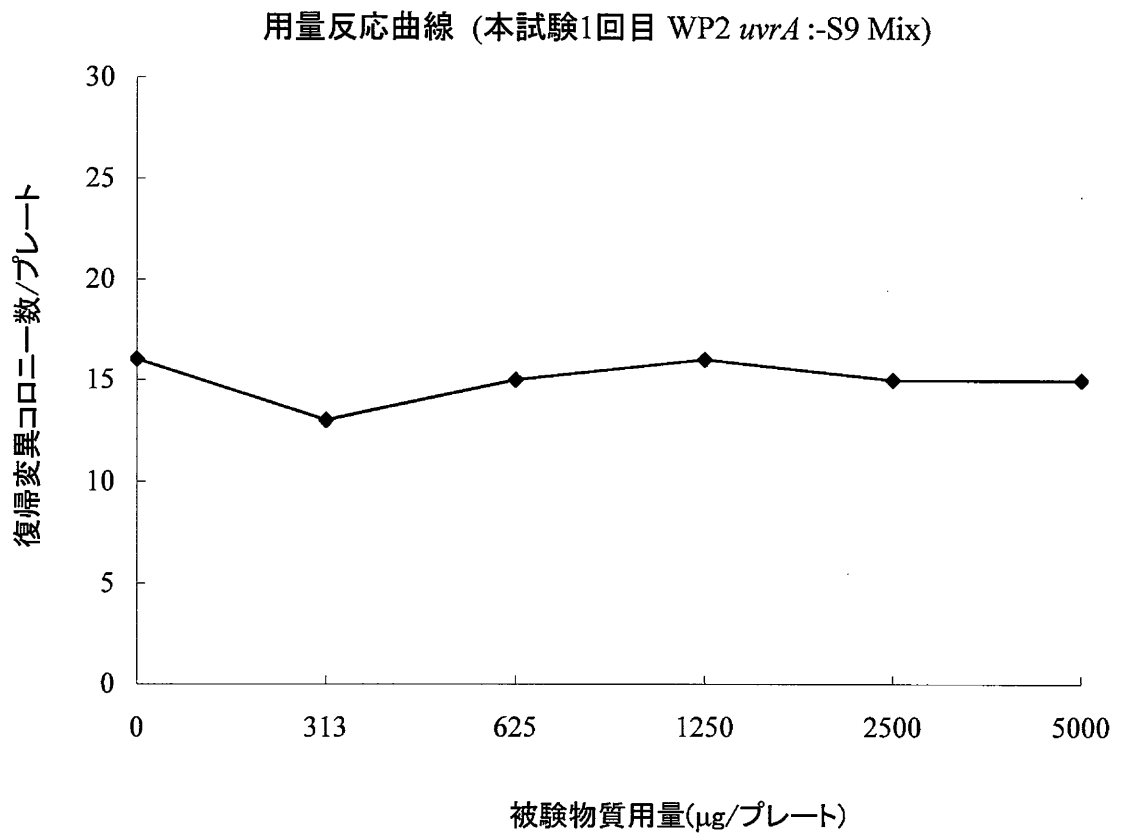


図 6

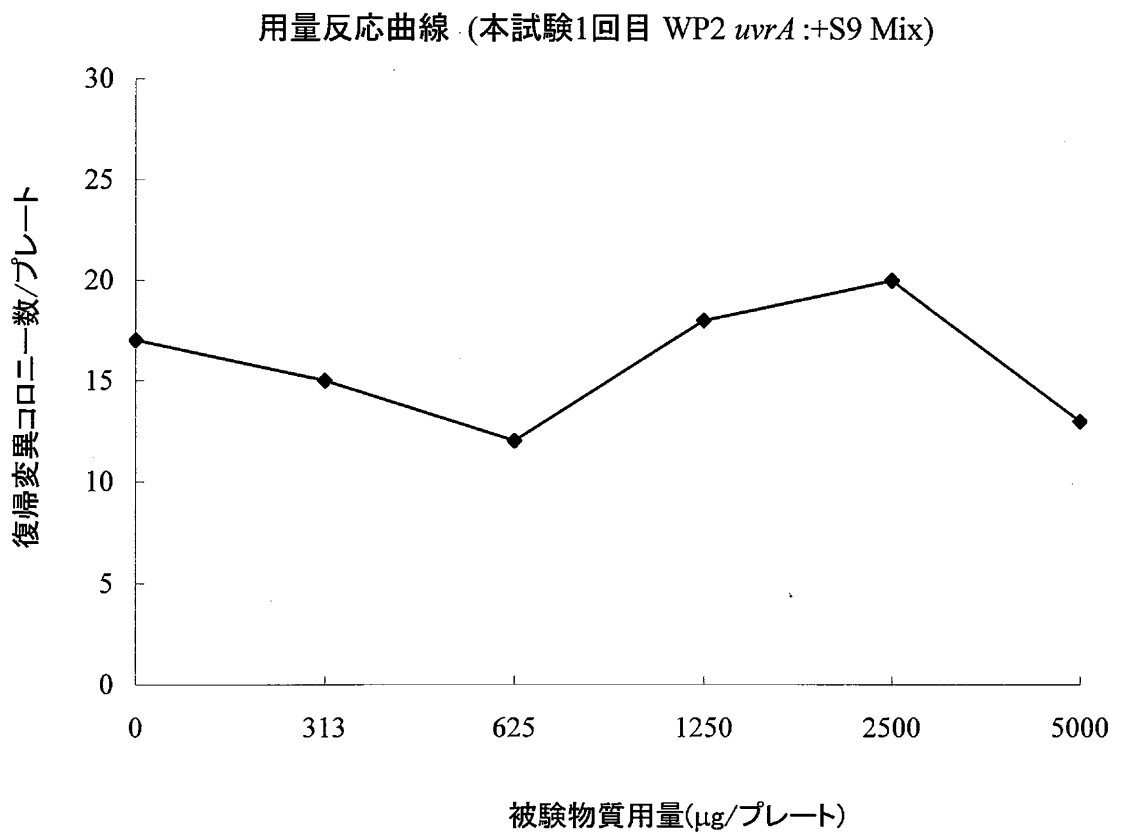


図 7

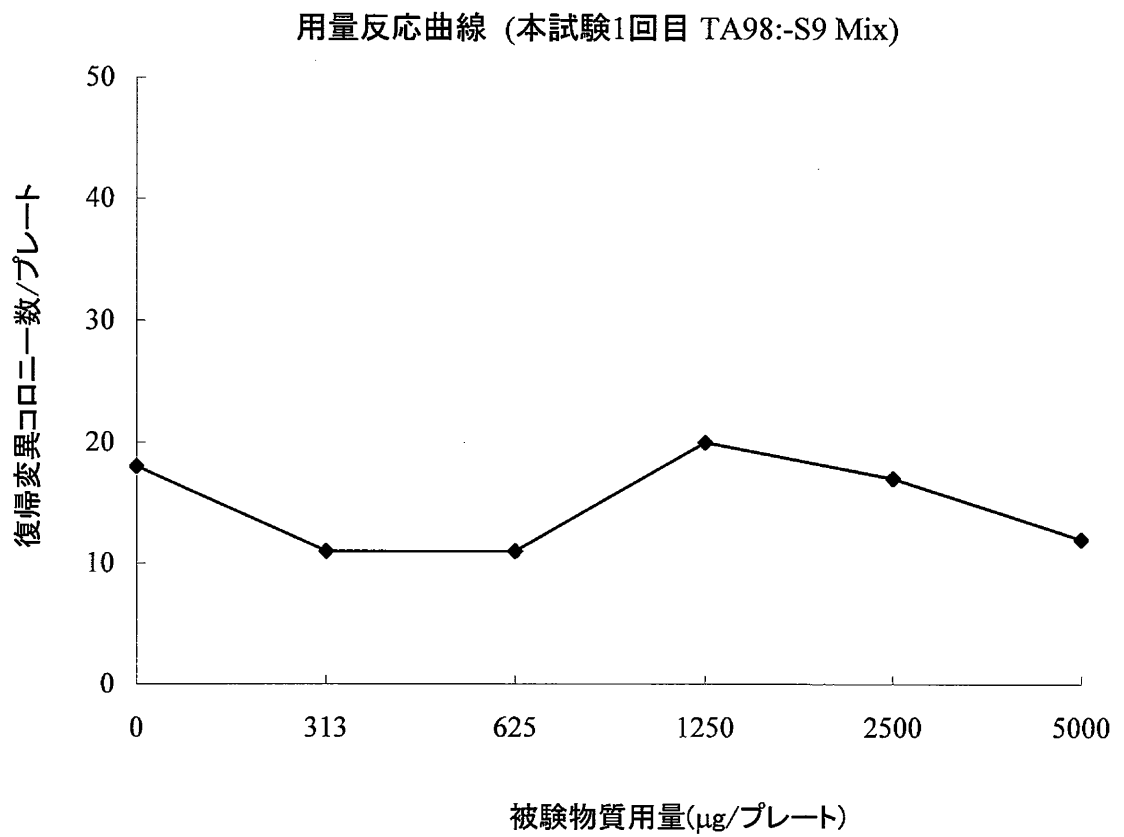


図 8

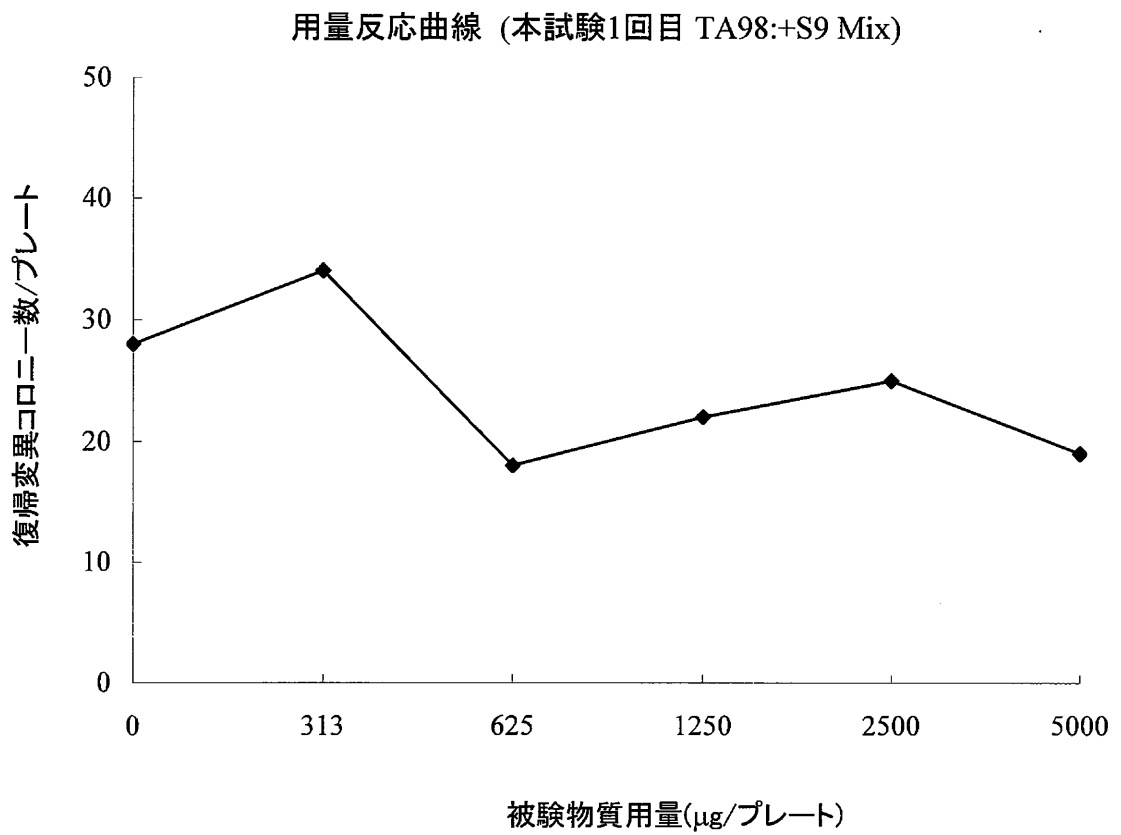


図 9

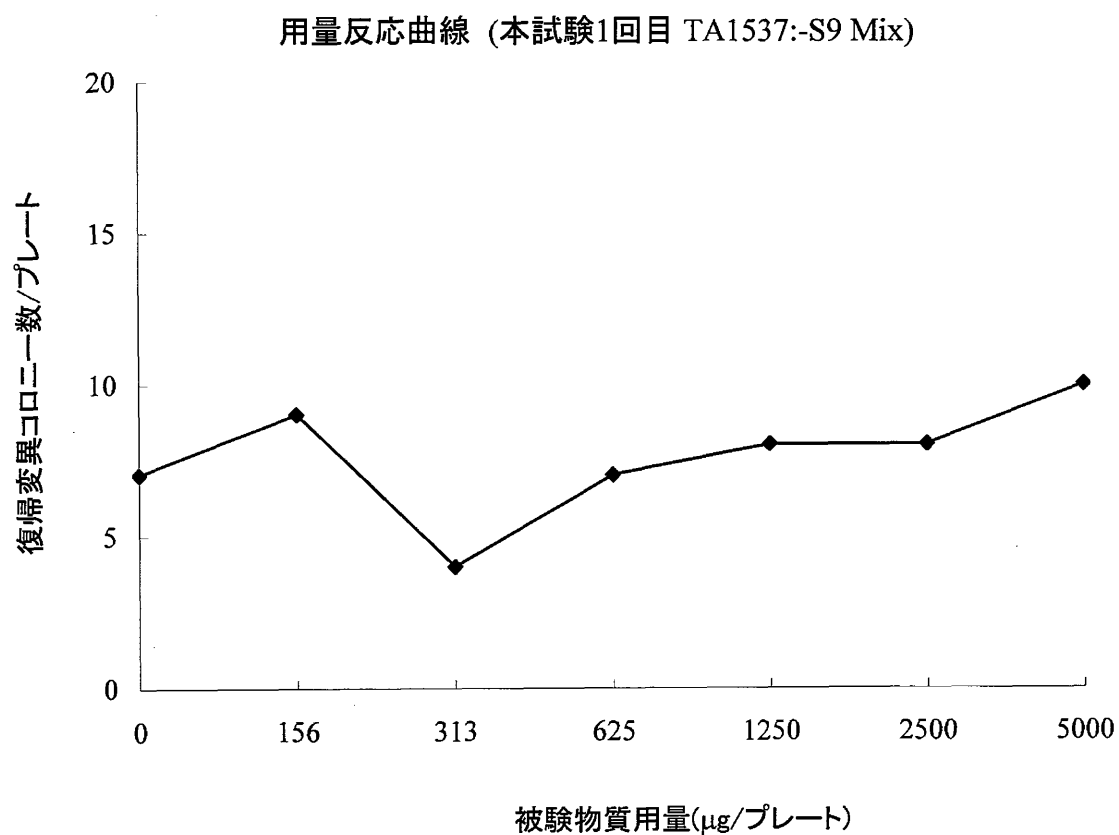


図 10

