

最終報告書

表 題：3,4,5,6-テトラクロロフタルイミドの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：SR08204

株式会社 化合物安全性研究所

目次

	頁
表紙	1
目次	4
要約	8
緒言	9
材料および方法	9
成績	17
考察	18

表

表 1	試験結果表(用量設定試験)	20
表 2	試験結果表(本試験)	21

図

図 1-1	<i>Salmonella typhimurium</i> TA100 の用量—反応曲線(直接法)	22
図 1-2	<i>Salmonella typhimurium</i> TA100 の用量—反応曲線(代謝活性化法)	23
図 2-1	<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535 の用量—反応曲線(直接法)	24
図 2-2	<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535 の用量—反応曲線(代謝活性化法)	25
図 3-1	<i>Escherichia coli</i> WP2uvrA の用量—反応曲線(直接法)	26
図 3-2	<i>Escherichia coli</i> WP2uvrA の用量—反応曲線(代謝活性化法)	27
図 4-1	<i>Salmonella typhimurium</i> TA98 の用量—反応曲線(直接法)	28
図 4-2	<i>Salmonella typhimurium</i> TA98 の用量—反応曲線(代謝活性化法)	29
図 5-1	<i>Salmonella typhimurium</i> TA1537 の用量—反応曲線(直接法)	30
図 5-2	<i>Salmonella typhimurium</i> TA1537 の用量—反応曲線(代謝活性化法)	31

要 約

3, 4, 5, 6-テトラクロロフタルイミドの細菌における遺伝子突然変異誘発性の有無を、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2uvrA を用いる復帰突然変異試験により検討した。試験は、代謝活性化系(S9 mix)の非存在下(直接法)ならびに存在下(代謝活性化法)において、プレインキュベーション法により実施した。

用量設定試験は、直接法および代謝活性化法ともに被験物質の最高用量を 5000 µg/plate とし、以下公比約 3 で 6 段階の計 7 用量(5~5000 µg/plate)で実施した。本試験は、用量設定試験の結果に基づき、直接法および代謝活性化法ともに被験物質の最高用量を 5000 µg/plate とし、以下公比 2 で 5 段階の計 6 用量(156~5000 µg/plate)で実施した。

用量設定試験の結果、各菌株のいずれの試験系列においても、被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の平均値の 2 倍未満であり、用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加も認められず、結果は陰性であった。被験物質の析出が、各菌株の各試験系列において、1500 µg/plate 以上の用量で観察された。生育阻害は、各菌株のいずれの試験系列においても観察されなかった。

本試験の結果、各菌株のいずれの試験系列においても、被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の平均値の 2 倍未満であり、用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加も認められず、結果は陰性であった。被験物質の析出が、各菌株の各試験系列において、1250 µg/plate 以上の用量で観察された。生育阻害は、各菌株のいずれの試験系列においても観察されなかった。

用量設定試験および本試験のいずれにおいても、各菌株の陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、すべて試験施設の背景データに基づく管理値の範囲内であった。また、各菌株の陽性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、陰性対照群の平均値の 2 倍以上の明確な増加を示した。これらの結果から、各菌株が変異原物質に対し適切な感度を有していたことが確認された。

以上のことから、3, 4, 5, 6-テトラクロロフタルイミドは、当該試験条件下において細菌における遺伝子突然変異誘発性を有しないと判断した。

緒 言

3,4,5,6-テトラクロロフタルイミドの細菌における遺伝子突然変異誘発性の有無を、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2uvrA を用いる復帰突然変異試験により検討した。試験は、代謝活性化系(S9 mix)の非存在下(直接法)ならびに存在下(代謝活性化法)において、プレインキュベーション法により実施した。

材料および方法

1. 被験物質

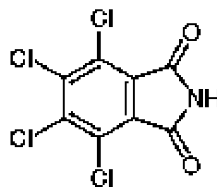
名称 : 3,4,5,6-テトラクロロフタルイミド

英名 : 3,4,5,6-Tetrachlorophthalimide

CAS No. : 1571-13-7

官報公示整理番号 : 化審法 ; (5)-3355

構造式 :



分子式 : $C_8HCl_4NO_2$

分子量 : 284.913

物理化学的性質 : 外観等 ; 白色粉末

融点 ; $>300^{\circ}C$

溶解度 ; 蒸留水、ジメチルスルホキシド、アセトンに溶解しない

(試験施設における確認)。

純度(中和滴定) : 99.8% (資料 1)

入手量 : 25 g (関連試験と共通)

保存条件 : 密栓した後、冷暗所に保存した(2~8°C、実測範囲 2~8°C)。

- 保存場所 : 株式会社 化合物安全性研究所 検体保存室(受入日 2009 年 6 月 4 日～2009 年 6 月 8 日)および変異原性試験室(2009 年 6 月 8 日～本試験 被験物質処理日 2009 年 7 月 15 日)
- 安定性および反応性 : 通常の取扱い条件においては安定。酸化剤との接触に注意した。実験終了後に、使用した被験物質の純度に関する分析成績を入手し、被験物質の安定性について確認した(資料 2)。
- 取扱上の注意 : 換気のよい場所で取扱った。適切な保護具を着用し、粉じんが飛散しないように取扱った。取扱い後は手や顔等を良く洗った。
- 残余被験物質の処置: 試験操作終了後、安定性分析のため分析者へ送付した。

2. 被験物質の調製

被験物質は蒸留水、ジメチルスルホキシドまたはアセトンに溶解しなかった。蒸留水には均一に懸濁し、反応性は認められなかった。ジメチルスルホキシドまたはアセトンでは、安定して均一な懸濁状態を得ることができなかった。以上のことから、溶媒として蒸留水(日本薬局方注射用水)を選択した。

用量設定試験では、50 mg/mL 調製液から蒸留水を用いて公比約 3 で段階希釈し、15、5、1.5、0.5、0.15 および 0.05 mg/mL 調製液を調製した。

本試験では、50 mg/mL 調製液から蒸留水を用いて公比 2 で段階希釈し、25、12.5、6.25、3.13 および 1.56 mg/mL 調製液を調製した。

調製液の安定性では、用量設定試験および本試験ともに、被験物質調製時の目視確認において媒体との反応性(変色、発熱、発泡等)はみられなかった。

被験物質調製液は用時調製とし、用量設定試験および本試験ともに調製後 2.3 時間以内に試験に使用した。

残余調製液は、焼却処分するために、産業廃棄物として回収した。

3. 陰性対照物質

陰性対照物質として、被験物質の調製媒体である蒸留水(日本薬局方注射用水、ロット番号 7K81、株式会社大塚製薬工場)を、原液のまま使用した。

4. 陽性対照物質およびその調製

陽性対照物質として、次頁の表の既知変異原物質を使用した。これらの陽性対照物質は冷暗所(2～8℃設定)で保存した。

陽性対照物質は、含量補正をせずにそれぞれ次表の濃度に調製し、-20℃以下で分注凍結保存したものを解凍後 2.1 時間以内に使用した。調製液は、調製日より 9 ヶ月以

内(使用期限：調製後 1 年)に使用した。残余調製液は焼却処分するために産業廃棄物として回収した。

陽性対照物質	調製濃度	調製媒体
2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド(含量 98.3%) ロット番号 SDJ4376 和光純薬工業株式会社	0.1 および 1 µg/mL	ジメチルスルホキシド ロット番号 VV035 株式会社同仁化学研究所
アジ化ナトリウム(純度 99.8%) ロット番号 SDH6348 和光純薬工業株式会社	5 µg/mL	日本薬局方注射用水 ロット番号 7K81 株式会社大塚製薬工場
9-アミノアクリジン塩酸塩水和物 (純度 99.9%) ロット番号 S32398-347 Sigma-Aldrich Corporation	800 µg/mL	ジメチルスルホキシド ロット番号 VV035 株式会社同仁化学研究所
2-アミノアントラセン(含量 97.2%) ロット番号 TSP5974 和光純薬工業株式会社	5、10、20 および 100 µg/mL	ジメチルスルホキシド ロット番号 VV035 株式会社同仁化学研究所

5. 試験菌株

試験には、*Salmonella typhimurium* (以下 *S. typhimurium* と称する)TA100、TA1535、TA98 および TA1537 ならびに *Escherichia coli* (以下 *E. coli* と称する)WP2uvrA を使用した。これらの菌株は、1991 年 10 月 18 日に国立衛生試験所(現 国立医薬品食品衛生研究所)より分与された。また、これらの菌株は遺伝毒性を有する化学物質の検索に適した細菌として広く受入れられていることから選択した。

各菌株は、培養液 8 mL に対しジメチルスルホキシド(ロット番号 VV035、株式会社同仁化学研究所)0.7 mL を加え、-80℃以下で分注凍結保存した。各菌株の培養液の一部を用いて、菌株の特性(アミノ酸要求性、膜変異 *rfa* 特性、紫外線感受性および薬剤耐性ならびに陰性対照物質および陽性対照物質に対する感度)の検査を行い、これらの特性が正常に保持されていることが確認された菌株を試験に使用した。

6. 培地

(1) 前培養用培地

前培養用のニュートリエントブロス培地として、ニュートリエントブロス(OXOID NUTRIENT BROTH No. 2、ロット番号 464616、OXOID LTD.)を日本薬局方注射用水(ロット番号 7K81、株式会社大塚製薬工場)を用いて 25 g/L に調製した。*S. typhimurium* TA98

および TA100 の培地には、使用時にアンピシリンナトリウム(ロット番号 M8B0619、ナカライテスク株式会社)を 25 µg/mL となるように添加した。

(2) 試験用培地(最少グルコース寒天培地：以下プレートと称する)

試験用培地として使用した最少グルコース寒天培地(バイタルメディア AMT-0 培地、ロット番号 DZLA1R01、2009 年 1 月 27 日製造、極東製薬工業株式会社)1000 mL 中の組成は次表の通りである。

試験用培地 1000 mL 中の組成	
硫酸マグネシウム・7 水塩	0.2 g
クエン酸・1 水塩	2.0 g
リン酸二カリウム・無水塩	10.0 g
リン酸一アンモニウム	1.92 g
水酸化ナトリウム	0.66 g
ブドウ糖	20.0 g
寒天末[OXOID AGAR No. 1、ロット番号 1050942-02]	15.0 g

(3) 重層用培地

次表の組成のソフトアガーおよびアミノ酸溶液を蒸留水(日本薬局方注射用水)を用いて調製し、使用時に(A) : (B) = 10:1 の容量比で混合した。*S. typhimurium* には L-ヒスチジンおよび D-ビオチンのアミノ酸溶液を、*E. coli* には L-トリプトファンのアミノ酸溶液を使用した。これらの重層用培地は使用時まで 47°C に保温した。

重層用培地の組成	
(A) ソフトアガー	
Bacto™ Agar (ロット番号 8284757、Becton, Dickinson and Company)	0.6 %
塩化ナトリウム (ロット番号 611F1714、関東化学株式会社)	0.5 %
(B) アミノ酸溶液	
L-ヒスチジンおよび D-ビオチン溶液 (L-ヒスチジン、ロット番号 WKK2889、和光純薬工業株式会社) (D-ビオチン、ロット番号 PEN6828、和光純薬工業株式会社)	各々 0.5 mmol/L
または	
L-トリプトファン溶液 (L-トリプトファン、ロット番号 PEP6208、和光純薬工業株式会社)	0.5 mmol/L

7. S9 mix

S9 mix は、S9(ロット番号 RAA-593、2009年3月6日製造、キッコーマン株式会社)、S9 mix 用 Cofactor (Cofactor-I、ロット番号 999901、オリエンタル酵母工業株式会社) および日本薬局方注射用水(ロット番号 7K81、株式会社大塚製薬工場)を用いて用時調製した。

S9 は、購入後 -80°C 以下で保存し、製造日より5ヵ月以内(使用期限:製造後6ヵ月)に使用した。このS9は、フェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンの腹腔内投与で酵素誘導したSlc:SD系ラット(雄、7週齢)の肝ホモジネートより調製された。

S9 mix 1 mL 中の組成は次表の通りである。

S9 mix 1 mL 中の組成	
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
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 μmol
還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH)	4 μmol
リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.4	100 μmol

8. 試験群

(1) 用量設定試験

各菌株につき、直接法(代謝活性化系 S9 mix の非存在下)および代謝活性化法(代謝活性化系 S9 mix の存在下)で試験を実施した。

直接法および代謝活性化法ともに、被験物質の最高用量を 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ とし以下公比約 3 で 6 段階の計 7 用量の試験群(5000、1500、500、150、50、15 および 5 $\mu\text{g}/\text{plate}$)を設定した。

(2) 本試験

各菌株につき、直接法および代謝活性化法で試験を実施した。

直接法および代謝活性化法ともに、用量設定試験の結果、いずれの用量においても生育阻害が観察されず、1500 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の用量で被験物質の析出が観察されたことから、本試験では、被験物質の最高用量を 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ とし以下公比 2 で 5 段階の計 6 用量(5000、2500、1250、625、313 および 156 $\mu\text{g}/\text{plate}$)を設定した。

(3) 陰性対照群および陽性対照群

用量設定試験および本試験いずれにおいても、試験系列毎に陰性対照群(日本薬局方注射用水)および次頁の表の陽性対照群を設定した。

供試菌株	陽性対照物質 (用量: $\mu\text{g}/\text{plate}$)	
	直接法	代謝活性化法
<i>S. typhimurium</i> TA100	AF-2 (0.01)	2-AA (1)
<i>S. typhimurium</i> TA1535	NaN_3 (0.5)	2-AA (2)
<i>E. coli</i> WP2uvrA	AF-2 (0.01)	2-AA (10)
<i>S. typhimurium</i> TA98	AF-2 (0.1)	2-AA (0.5)
<i>S. typhimurium</i> TA1537	9-AA (80)	2-AA (2)

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

NaN_3 : アジ化ナトリウム、 9-AA: 9-アミノアクリジン塩酸塩水和物

2-AA: 2-アミノアントラセン

(4) プレート数およびプレートの識別

プレート数は、各試験群ともに3枚とした。

プレートには、試験番号および試験群を特定できるようにラベルを貼付した。

9. 試験方法

(1) 試験菌株の前培養

容量約40 mLのL字管に前培養用培地(ニュートリエントブロス培地)12 mLを入れ、これに解凍した保存菌を12 μL 接種し、L字管を氷冷(用量設定試験: 7.3時間、本試験: 7.5時間)後、37°C、振幅40 mm、振盪速度100回/分に設定した振盪恒温槽(Personal-11・EX、タイテック株式会社)で10時間の往復振盪培養を行った。培養終了時に、得られた菌培養液のOD_{660nm}を比色計(mini photo 518、タイテック株式会社)で測定し、各菌株の生菌数-OD_{660nm} 相関式より生菌数を算出した。生菌数が 1×10^9 cells/mLより多く、十分に菌が生育していることが確認された菌培養液を試験に使用した。

各培養液の生菌数(計算値)は次表の通りであった。

供試菌株	生菌数(計算値)($\times 10^9$ cells/mL)	
	用量設定試験	本試験
<i>S. typhimurium</i> TA100	1.94	2.30
<i>S. typhimurium</i> TA1535	3.06	3.52
<i>E. coli</i> WP2uvrA	3.82	4.15
<i>S. typhimurium</i> TA98	2.24	2.66
<i>S. typhimurium</i> TA1537	2.28	2.47

(2) 被験物質調製液および対照物質調製液の処理

被験物質調製液および対照物質調製液の処理を、プレインキュベーション法で行った。

蓋付きのポリエチレン製チューブ(5 mL 容量)を使用して、被験物質調製液あるいは対照物質調製液 0.1 mL を、直接法の場合は 0.1 mol/L Na-リン酸緩衝液(pH 7.4) 0.5 mL と、代謝活性化法の場合は S9 mix 0.5 mL と、それぞれ混合した。その混合液に菌培養液 0.1 mL を加え、37°C、振幅 40 mm、振盪速度 100 回/分に設定した振盪恒温槽(Personal-11・EX、タイテック株式会社)で 20 分間振盪培養(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、*S. typhimurium* には 0.05 mmol/L L-ヒスチジンおよび 0.05 mmol/L D-ビオチンを含む重層用培地 2 mL を、*E. coli* には 0.05 mmol/L L-トリプトファンを含む重層用培地 2 mL を、それぞれ加えて混和し、プレートに重層した。平坦な場所で重層用培地を固化させた後、プレートを 37°C に設定したインキュベータ(MIR-262、三洋電機株式会社および三洋電機バイオメディカ株式会社)で 49 時間静置培養した。

用量設定試験および本試験それぞれにおいて、試験に使用した被験物質調製液の最高濃度および S9 mix 調製液について無菌試験を行い、雑菌の混入の有無を確認した。

(3) プレートの観察

各試験系の陰性対照群、被験物質処理群および陽性対照群について、プレートでの生育阻害の有無を実体顕微鏡(SZ6045TR、オリンパス光学工業株式会社)で確認するとともに、被験物質処理群について、プレートでの被験物質の析出の有無を目視確認した。次に、試験系の陰性対照群、被験物質処理群および陽性対照群の各プレートについて、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)を用いて復帰変異コロニー数の計測を行った。なお、被験物質の析出がコロニーアナライザー計数に影響すると考えられるプレートについては、実体顕微鏡を用いて復帰変異コロニー数の目視計測を行った。

菌株の生育阻害の有無の判定は標準操作手順書に基づき以下の基準(0~4)で行い、1 以上を生育阻害有とした。

0：生育阻害が認められない。

微細なバックグラウンドコロニー(50 倍程度の倍率で観察可能)が培地一面に観察され、対照群のバックグラウンドコロニーとの差が認められない場合。

1：わずかな生育阻害が認められる。

陰性対照群に比べ、バックグラウンドコロニーが減少して個々のコロニーの大きさが大きくなっている場合。

2：中程度の生育阻害が認められる。

隆起した大きな復帰変異コロニーと、平坦で小さなバックグラウンドコロニーが並存している場合。

3：強い生育阻害が認められる。

バックグラウンドコロニーが復帰変異コロニーと同程度の大きさまで成長し、両者の判別が困難である場合。

4：生存菌が全く認められない。

(4) 観察結果の集計方法

各試験系の陰性対照群、被験物質処理群(用量毎)および陽性対照群について、復帰変異コロニー数の平均値±標準偏差を求めた。

10. 試験結果の評価

(1) 試験系の感度確認

陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値が、それぞれ試験施設の背景データに基づく管理値の範囲内であり、かつ、陽性対照群の復帰変異コロニー数の平均値が陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値の2倍以上である場合に、試験系が適切な感度を有しているものと判断した。

(2) 試験結果の判定基準

少なくとも1つの試験系において、被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値が陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値の2倍以上となり、かつ被験物質用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加が、用量設定試験と本試験で再現性を持って認められた場合に、当該被験物質の遺伝子突然変異誘発性は陽性であるとした。試験結果の判定にあたって、統計学的手法は用いなかった。

(3) 変異原比活性の算出

本実験において陽性結果は得られなかったため、変異原比活性の算出は実施しなかった。

成 績

用量設定試験の結果を表 1 に、本試験の結果を表 2 に示す。また、用量設定試験および本試験における被験物質用量と復帰変異コロニー数の用量-反応曲線を図 1-1～5-2 に示す。

用量設定試験(5～5000 µg/plate)の結果、各菌株のいずれの試験系列においても、被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の平均値の 2 倍未満であり、用量の増加にともなう復帰変異コロニーの増加も認められなかった。被験物質の析出が、直接法および代謝活性化法いずれにおいても、1500 µg/plate 以上の用量で観察された。生育阻害は、各菌株の直接法および代謝活性化法、いずれの試験系列においても観察されなかった。

本試験(156～5000 µg/plate)の結果、各菌株のいずれの試験系列においても、被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の平均値の 2 倍未満であり、用量の増加にともなう復帰変異コロニーの増加も認められなかった。被験物質の析出が、直接法および代謝活性化法いずれにおいても、1250 µg/plate 以上の用量で観察された。生育阻害は、各菌株の直接法および代謝活性化法、いずれの試験系列においても観察されなかった。

用量設定試験および本試験のいずれにおいても、各菌株の陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、すべて試験施設の背景データに基づく管理値(資料 3)の範囲内であった。また、各菌株の陽性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、陰性対照群の平均値の 2 倍以上の明確な増加を示した。

用量設定試験および本試験のいずれの無菌試験においても、被験物質調製液の最高濃度および S9 mix 調製液に雑菌の混入は認められなかった。

考 察

3, 4, 5, 6-テトラクロロフタルイミドの細菌における遺伝子突然変異誘発性の有無を、*S. typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *E. coli* WP2uvrA を用いる復帰突然変異試験により検討した。

用量設定試験は、被験物質の最高用量を 5000 µg/plate とし、以下公比約 3 で 6 段階の計 7 用量の試験群で実施した。本試験は、用量設定試験の結果に基づき、被験物質の最高用量を 5000 µg/plate とし、以下公比 2 で 5 段階の計 6 用量の試験群で実施した。

試験の結果、用量設定試験および本試験ともに、各菌株のいずれの試験系列においても、被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の平均値の 2 倍未満であり、用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加も認められず、結果は陰性であった。被験物質の析出が、各菌株の各試験系列において、1250 µg/plate 以上の用量で観察された。生育阻害は、各菌株のいずれの試験系列においても観察されなかった。このように、用量設定試験および本試験の結果には再現性が確認された。

用量設定試験および本試験のいずれにおいても、各菌株の陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、すべて試験施設の背景データに基づく管理値の範囲内であった。また、各菌株の陽性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、陰性対照群の平均値の 2 倍以上の明確な増加を示した。これらの結果から、各菌株が変異原物質に対し適切な感度を有していたことが確認された。

以上のことから、3, 4, 5, 6-テトラクロロフタルイミドは、当該試験条件下において細菌における遺伝子突然変異誘発性を有しないと判断した。

表 1

試験結果表 (用量設定試験)

被験物質の名称 : 3,4,5,6-テトラクロロフタルイミド

試験実施期間		2009年6月23日～2009年6月25日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	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	WP2uvr A	TA98	TA1537	
-S9 mix	陰性対照	100 , 91 112 (101 \pm 11)	6 , 16 8 (10 \pm 5)	17 , 21 23 (20 \pm 3)	28 , 22 23 (24 \pm 3)	8 , 12 7 (9 \pm 3)	
	5	97 , 113 105 (105 \pm 8)	8 , 9 8 (8 \pm 1)	22 , 21 11 (18 \pm 6)	25 , 31 38 (31 \pm 7)	12 , 5 8 (8 \pm 4)	
	15	96 , 80 87 (88 \pm 8)	7 , 15 12 (11 \pm 4)	16 , 15 13 (15 \pm 2)	26 , 19 26 (24 \pm 4)	14 , 7 8 (10 \pm 4)	
	50	95 , 99 90 (95 \pm 5)	9 , 8 12 (10 \pm 2)	15 , 6 11 (11 \pm 5)	26 , 23 23 (24 \pm 2)	11 , 18 16 (15 \pm 4)	
	150	93 , 90 100 (94 \pm 5)	10 , 13 11 (11 \pm 2)	21 , 9 12 (14 \pm 6)	23 , 32 35 (30 \pm 6)	8 , 10 9 (9 \pm 1)	
	500	118 , 104 95 (106 \pm 12)	14 , 10 12 (12 \pm 2)	18 , 27 19 (21 \pm 5)	34 , 30 22 (29 \pm 6)	9 , 14 14 (12 \pm 3)	
	1500 †	78 , 108 80 (89 \pm 17)	12 , 3 6 (7 \pm 5)	18 , 11 14 (14 \pm 4)	29 , 24 25 (26 \pm 3)	16 , 15 7 (13 \pm 5)	
	5000 †	94 , 87 97 (93 \pm 5)	8 , 6 9 (8 \pm 2)	8 , 13 14 (12 \pm 3)	28 , 26 29 (28 \pm 2)	13 , 12 15 (13 \pm 2)	
+S9 mix	陰性対照	105 , 146 133 (128 \pm 21)	10 , 21 12 (14 \pm 6)	17 , 14 19 (17 \pm 3)	48 , 34 37 (40 \pm 7)	16 , 16 9 (14 \pm 4)	
	5	138 , 154 158 (150 \pm 11)	8 , 12 12 (11 \pm 2)	10 , 23 22 (18 \pm 7)	36 , 43 33 (37 \pm 5)	8 , 17 17 (14 \pm 5)	
	15	135 , 117 109 (120 \pm 13)	8 , 7 9 (8 \pm 1)	20 , 17 13 (17 \pm 4)	54 , 49 50 (51 \pm 3)	15 , 18 14 (16 \pm 2)	
	50	133 , 128 118 (126 \pm 8)	7 , 6 14 (9 \pm 4)	21 , 16 24 (20 \pm 4)	35 , 44 48 (42 \pm 7)	12 , 10 11 (11 \pm 1)	
	150	110 , 153 123 (129 \pm 22)	16 , 12 13 (14 \pm 2)	19 , 17 22 (19 \pm 3)	35 , 40 51 (42 \pm 8)	13 , 16 16 (15 \pm 2)	
	500	125 , 122 134 (127 \pm 6)	2 , 13 13 (9 \pm 6)	11 , 14 31 (19 \pm 11)	34 , 38 41 (38 \pm 4)	18 , 13 20 (17 \pm 4)	
	1500 †	128 , 114 135 (126 \pm 11)	4 , 13 9 (9 \pm 5)	27 , 20 17 (21 \pm 5)	36 , 38 41 (38 \pm 3)	23 , 15 11 (16 \pm 6)	
	5000 †	136 , 108 125 (123 \pm 14)	9 , 6 8 (8 \pm 2)	21 , 15 17 (18 \pm 3)	37 , 36 46 (40 \pm 6)	23 , 19 20 (21 \pm 2)	
陽性	S9 mixを必要としないもの	名 称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA
		用量($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
対照	S9 mixを必要とするもの	名 称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		用量($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	1	2	10	0.5	2
		コロニー数 /プレート	787 , 778 835 (800 \pm 31)	263 , 308 315 (295 \pm 28)	95 , 120 129 (115 \pm 18)	451 , 493 465 (470 \pm 21)	413 , 190 197 (267 \pm 127)
		コロニー数 /プレート	1521 , 1541 1481 (1514 \pm 31)	447 , 503 486 (479 \pm 29)	1156 , 1150 1321 (1209 \pm 97)	299 , 254 282 (278 \pm 23)	544 , 553 611 (569 \pm 36)

() : 各プレートのコロニー数の平均値および標準偏差

† : 被験物質の析出

陰性対照 : 日本薬局方注射用水

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

9-AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩水和物

NaN₃ : アジ化ナトリウム

2-AA : 2-アミノアントラセン

表 2

試験結果表 (本試験)

被験物質の名称 : 3,4,5,6-テトラクロロフタルイミド

試験実施期間		2009年7月15日～2009年7月17日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	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 uvr A	TA98	TA1537	
-S9 mix	陰性対照	120 , 94 123 (112 \pm 16)	7 , 8 6 (7 \pm 1)	16 , 17 21 (18 \pm 3)	16 , 12 9 (12 \pm 4)	23 , 22 15 (20 \pm 4)	
	156	115 , 124 117 (119 \pm 5)	5 , 9 3 (6 \pm 3)	11 , 23 14 (16 \pm 6)	11 , 11 12 (11 \pm 1)	20 , 19 17 (19 \pm 2)	
	313	113 , 109 116 (113 \pm 4)	9 , 8 11 (9 \pm 2)	17 , 19 19 (18 \pm 1)	8 , 12 12 (11 \pm 2)	14 , 24 16 (18 \pm 5)	
	625	110 , 121 97 (109 \pm 12)	6 , 6 10 (7 \pm 2)	11 , 19 16 (15 \pm 4)	17 , 16 18 (17 \pm 1)	18 , 11 13 (14 \pm 4)	
	1250 †	110 , 142 111 (121 \pm 18)	11 , 11 8 (10 \pm 2)	20 , 17 23 (20 \pm 3)	20 , 19 15 (18 \pm 3)	24 , 20 29 (24 \pm 5)	
	2500 †	111 , 138 121 (123 \pm 14)	12 , 9 6 (9 \pm 3)	12 , 22 12 (15 \pm 6)	12 , 12 16 (13 \pm 2)	31 , 16 22 (23 \pm 8)	
	5000 †	105 , 123 137 (122 \pm 16)	11 , 3 8 (7 \pm 4)	17 , 18 22 (19 \pm 3)	11 , 13 17 (14 \pm 3)	27 , 26 20 (24 \pm 4)	
+S9 mix	陰性対照	166 , 173 167 (169 \pm 4)	10 , 12 8 (10 \pm 2)	11 , 17 16 (15 \pm 3)	26 , 32 34 (31 \pm 4)	25 , 26 28 (26 \pm 2)	
	156	180 , 133 143 (152 \pm 25)	8 , 7 8 (8 \pm 1)	12 , 26 13 (17 \pm 8)	38 , 42 38 (39 \pm 2)	33 , 27 23 (28 \pm 5)	
	313	152 , 158 160 (157 \pm 4)	11 , 5 6 (7 \pm 3)	22 , 12 18 (17 \pm 5)	24 , 32 31 (29 \pm 4)	29 , 17 16 (21 \pm 7)	
	625	151 , 148 152 (150 \pm 2)	15 , 15 6 (12 \pm 5)	10 , 30 12 (17 \pm 11)	28 , 43 23 (31 \pm 10)	18 , 14 9 (14 \pm 5)	
	1250 †	156 , 160 132 (149 \pm 15)	13 , 11 7 (10 \pm 3)	15 , 22 16 (18 \pm 4)	34 , 24 29 (29 \pm 5)	27 , 30 25 (27 \pm 3)	
	2500 †	127 , 145 134 (135 \pm 9)	6 , 12 2 (7 \pm 5)	20 , 15 16 (17 \pm 3)	31 , 32 26 (30 \pm 3)	32 , 15 21 (23 \pm 9)	
	5000 †	130 , 138 153 (140 \pm 12)	7 , 15 5 (9 \pm 5)	20 , 27 17 (21 \pm 5)	32 , 17 31 (27 \pm 8)	37 , 28 26 (30 \pm 6)	
陽性	S9 mixを必要としないもの	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA
		用量($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
対照	S9 mixを必要とするもの	コロニー数/プレート	814 , 829 734 (792 \pm 51)	262 , 306 319 (296 \pm 30)	88 , 86 104 (93 \pm 10)	416 , 454 425 (432 \pm 20)	169 , 121 262 (184 \pm 72)
		名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		用量($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	1	2	10	0.5	2
		コロニー数/プレート	1441 , 1297 1358 (1365 \pm 72)	432 , 489 491 (471 \pm 34)	1207 , 1331 1301 (1280 \pm 65)	313 , 249 248 (270 \pm 37)	353 , 415 331 (366 \pm 44)

() : 各プレートのコロニー数の平均値および標準偏差

† : 被験物質の析出

陰性対照 : 日本薬局方注射用水

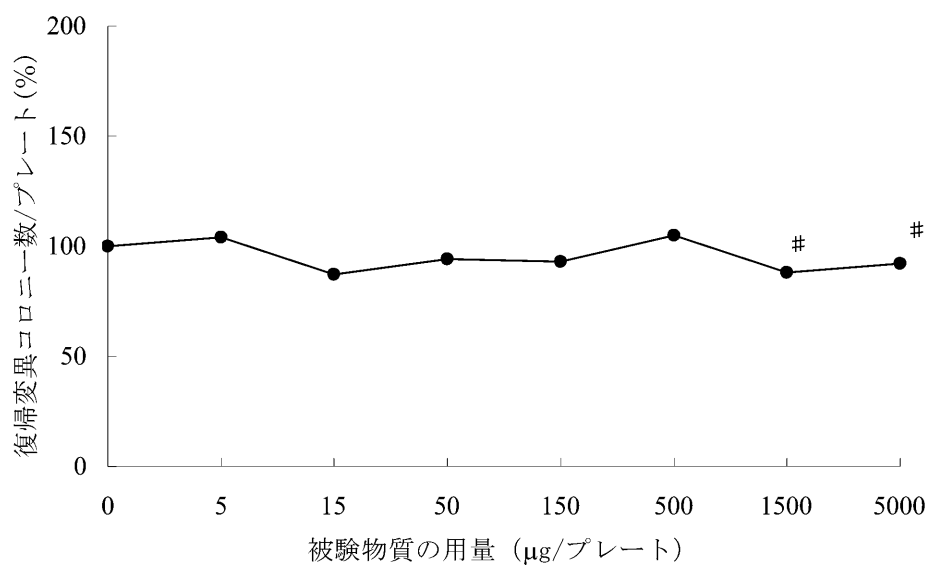
AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

9-AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩水和物

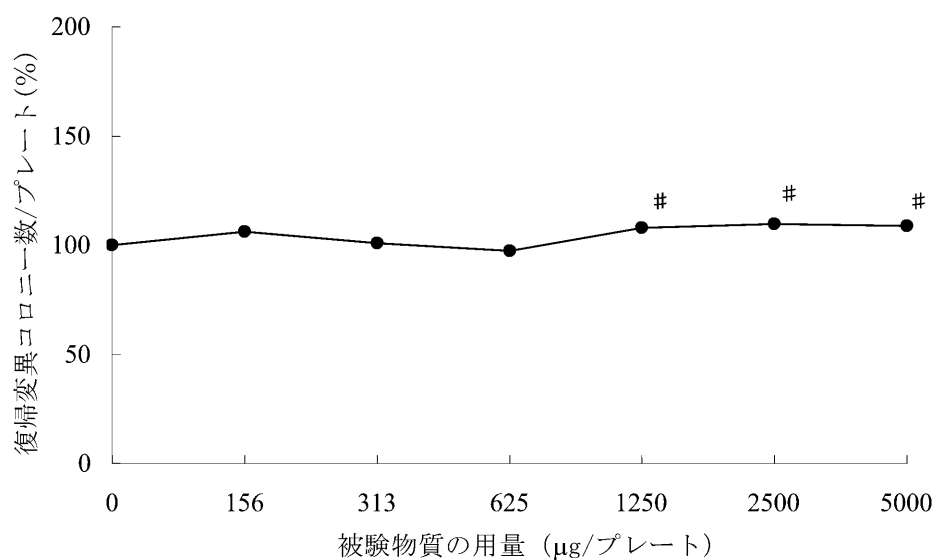
NaN₃ : アジ化ナトリウム

2-AA : 2-アミノアントラセン

〔TA100, S9(-), 用量設定試験〕



〔TA100, S9(-), 本試験〕

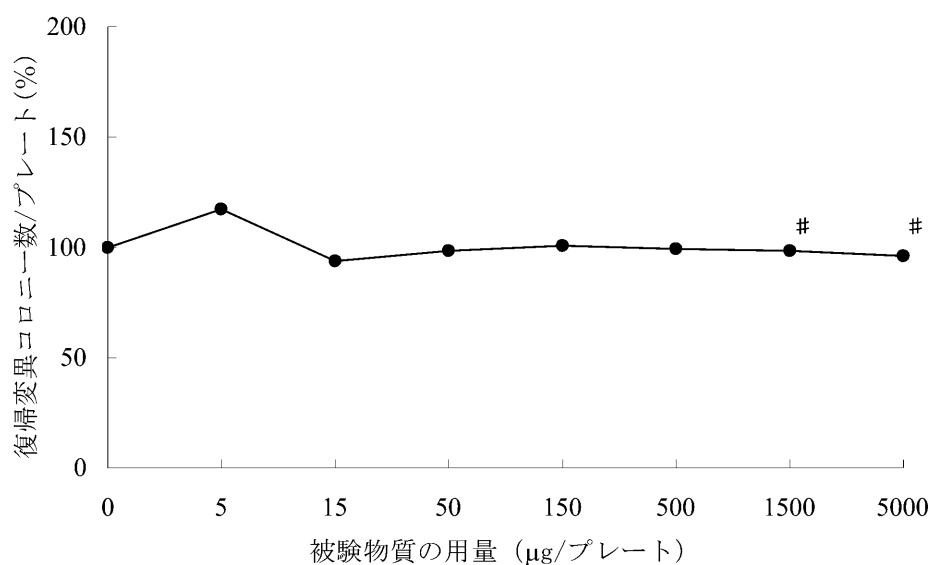


被験物質の名称 : 3,4,5,6-テトラクロロフタルイミド

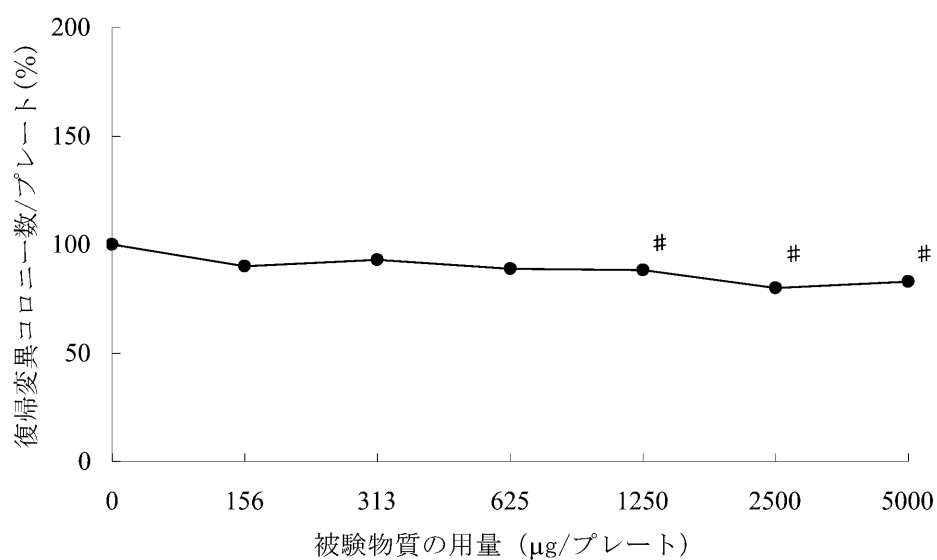
図 1-1 *Salmonella typhimurium* TA100 の用量—反応曲線(直接法)

: 被験物質の析出

〔TA100, S9(+), 用量設定試験〕



〔TA100, S9(+), 本試験〕

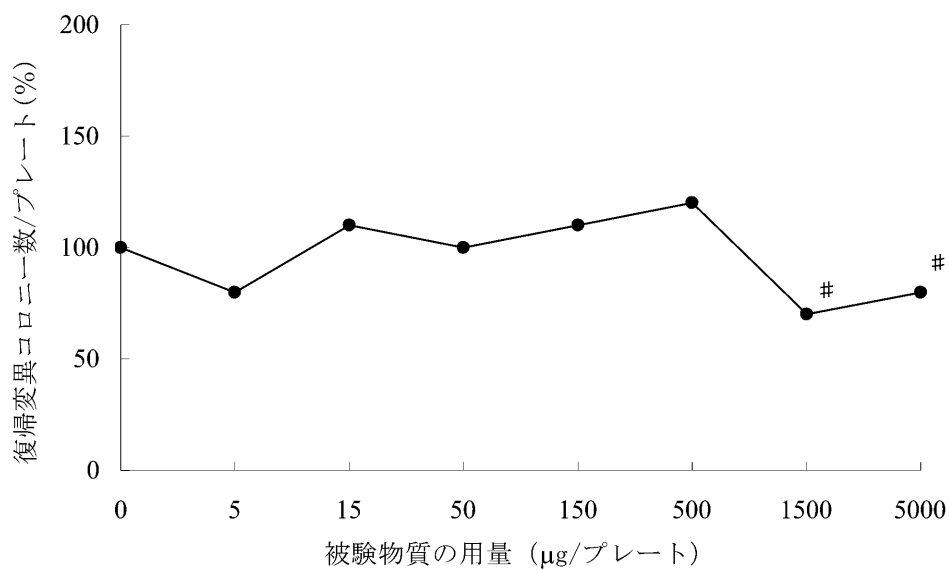


被験物質の名称 : 3,4,5,6-テトラクロロフタルイミド

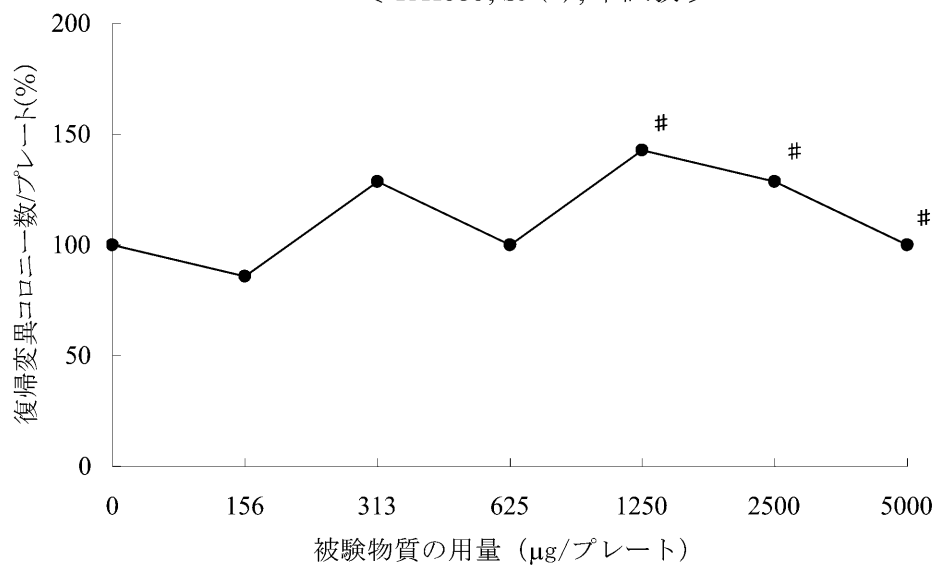
図 1-2 *Salmonella typhimurium* TA100 の用量—反応曲線
(代謝活性化法)

: 被験物質の析出

〔TA1535, S9(-), 用量設定試験〕



〔TA1535, S9(-), 本試験〕

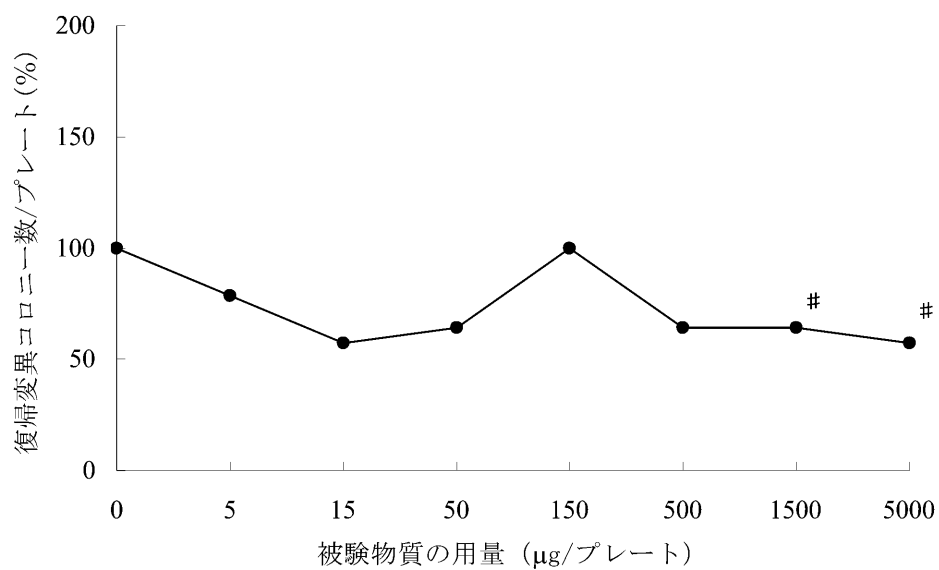


被験物質の名称 : 3,4,5,6-テトラクロロフタルイミド

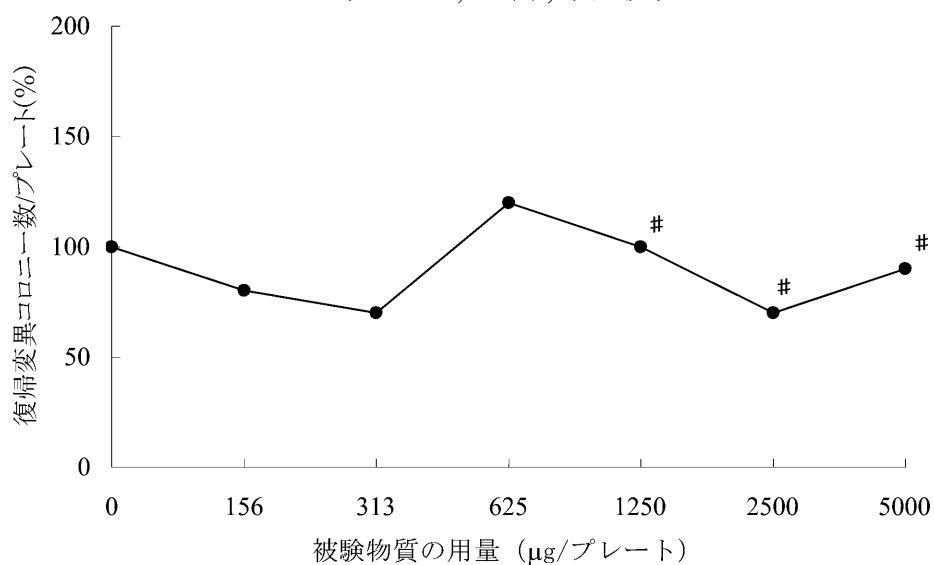
図 2-1 *Salmonella typhimurium* TA1535 の用量—反応曲線(直接法)

: 被験物質の析出

〔TA1535, S9(+), 用量設定試験〕



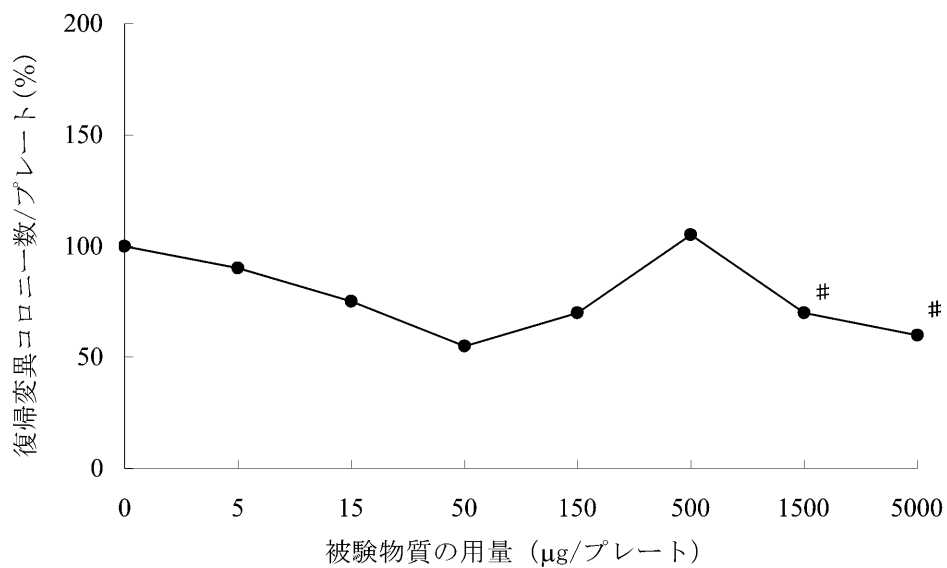
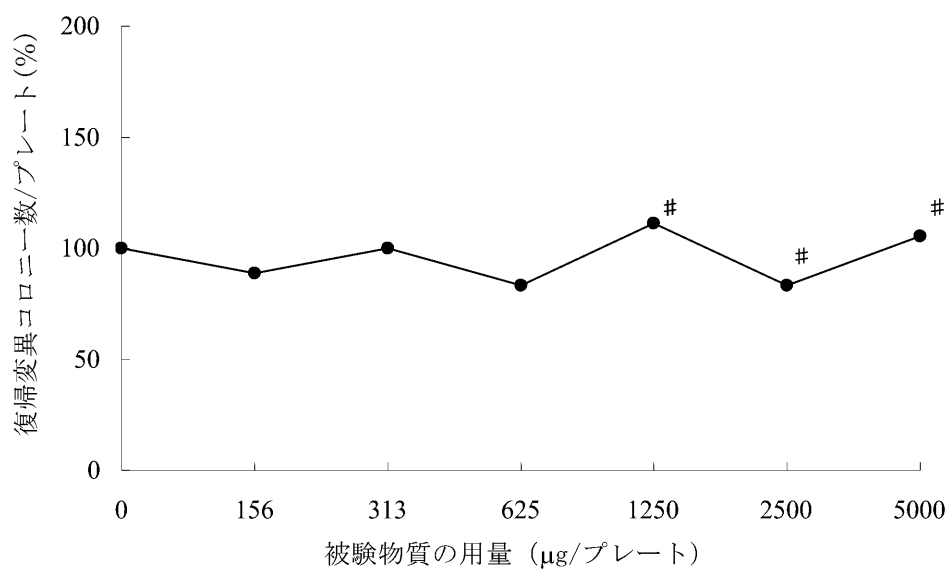
〔TA1535, S9(+), 本試験〕



被験物質の名称 : 3,4,5,6-テトラクロロフタルイミド

図 2-2 *Salmonella typhimurium* TA1535 の用量—反応曲線
(代謝活性化法)

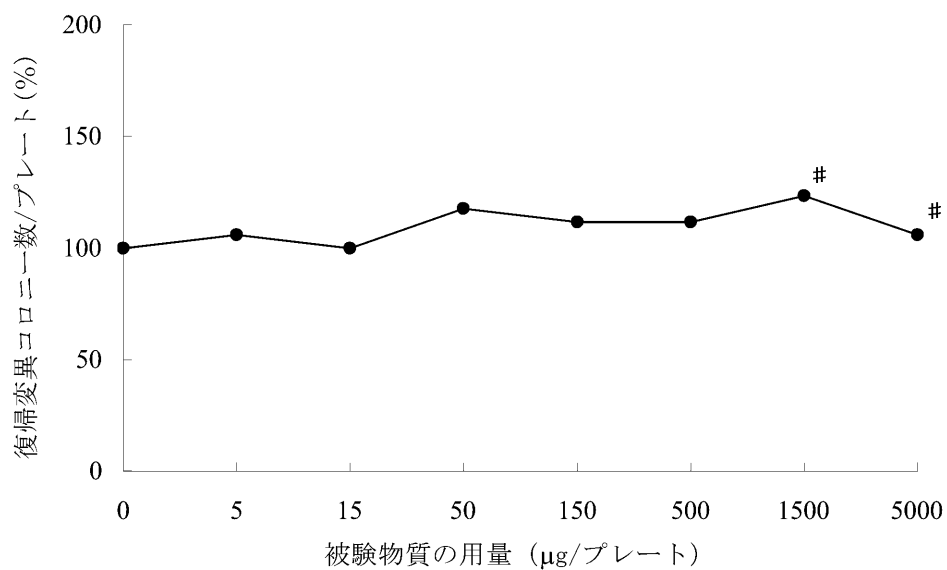
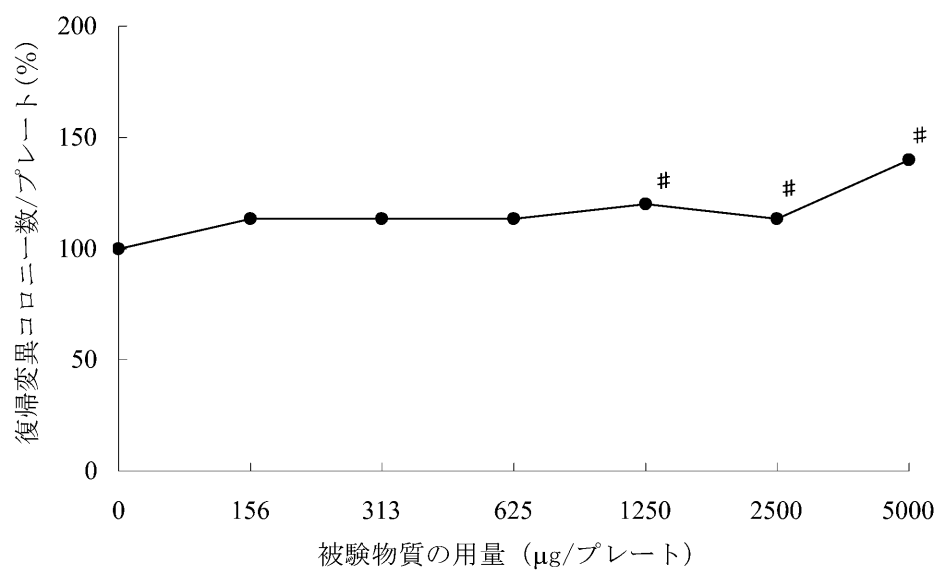
: 被験物質の析出

〔 WP2_{uvr} A, S9(-), 用量設定試験 〕〔 WP2_{uvr} A, S9(-), 本試験 〕

被験物質の名称 : 3,4,5,6-テトラクロロフタルイミド

図 3-1 *Escherichia coli* WP2_{uvr} A の用量—反応曲線(直接法)

: 被験物質の析出

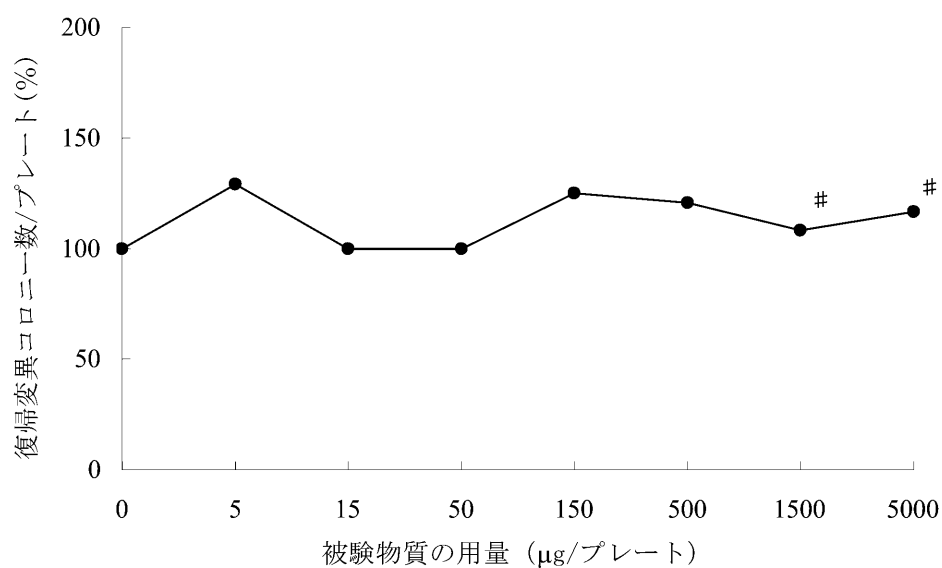
〔 WP2_{uvr} A, S9(+), 用量設定試験 〕〔 WP2_{uvr} A, S9(+), 本試験 〕

被験物質の名称 : 3,4,5,6-テトラクロロフタルイミド

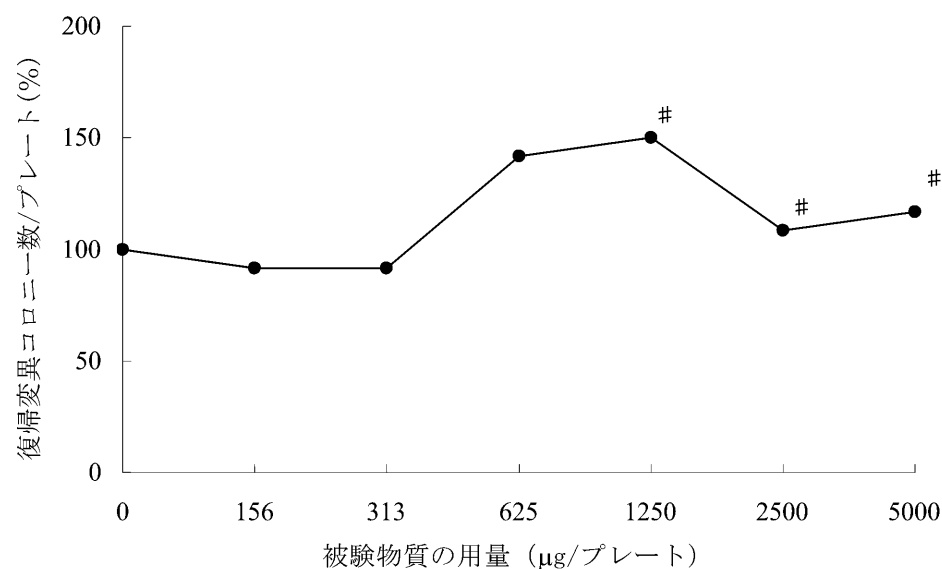
図 3-2 *Escherichia coli* WP2_{uvr} A の用量—反応曲線
(代謝活性化法)

: 被験物質の析出

〔TA98, S9(-), 用量設定試験〕



〔TA98, S9(-), 本試験〕

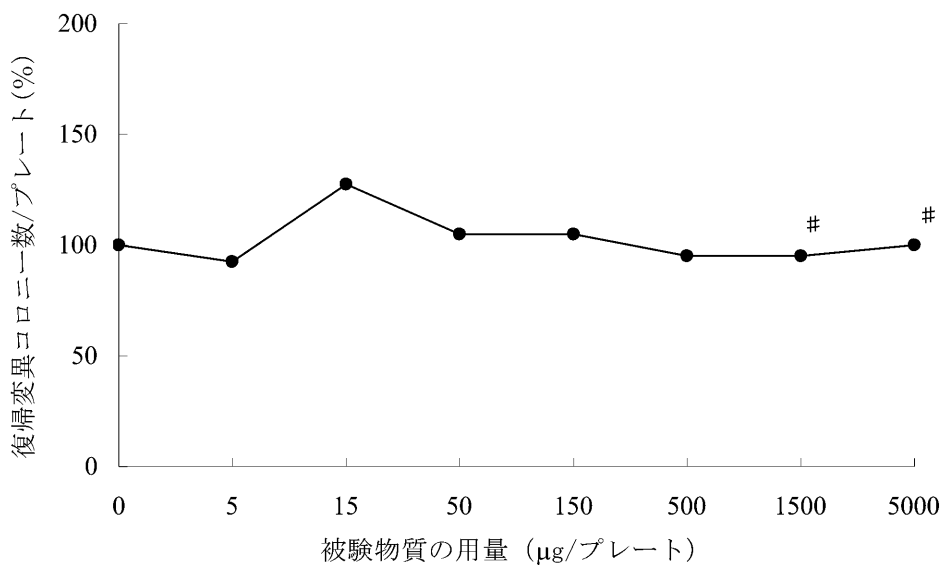


被験物質の名称 : 3,4,5,6-テトラクロロフタルイミド

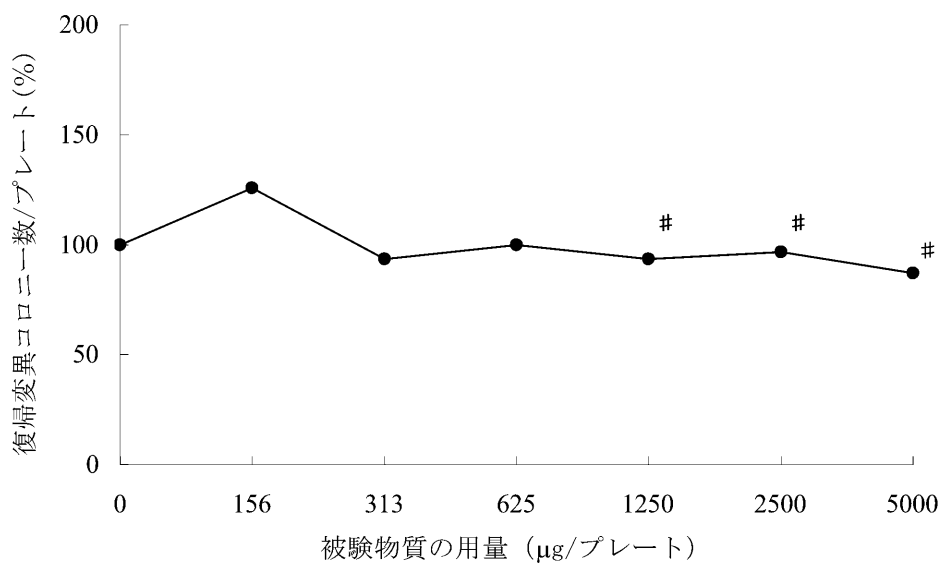
図 4-1 *Salmonella typhimurium* TA98 の用量—反応曲線(直接法)

: 被験物質の析出

〔TA98, S9(+), 用量設定試験〕



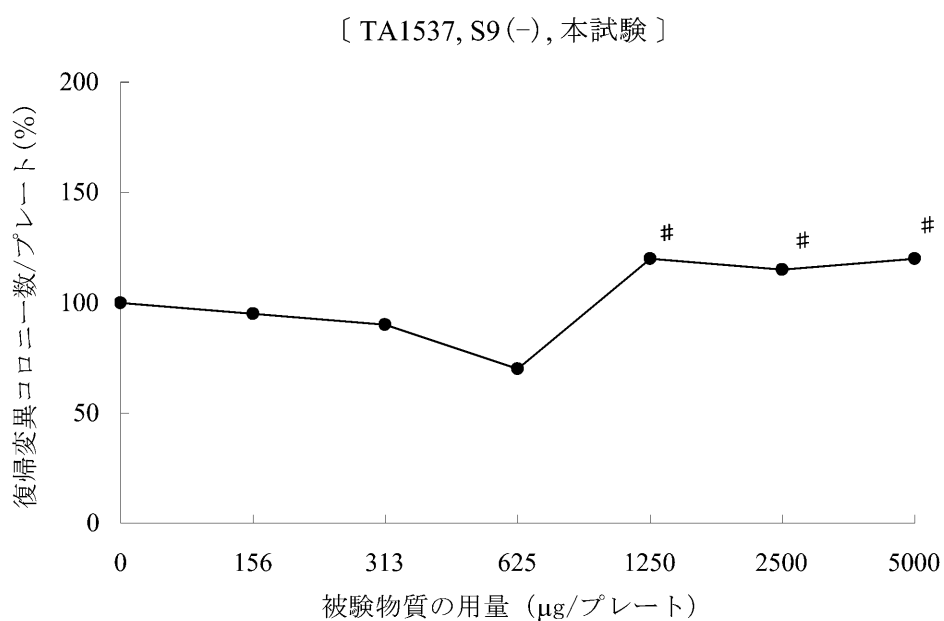
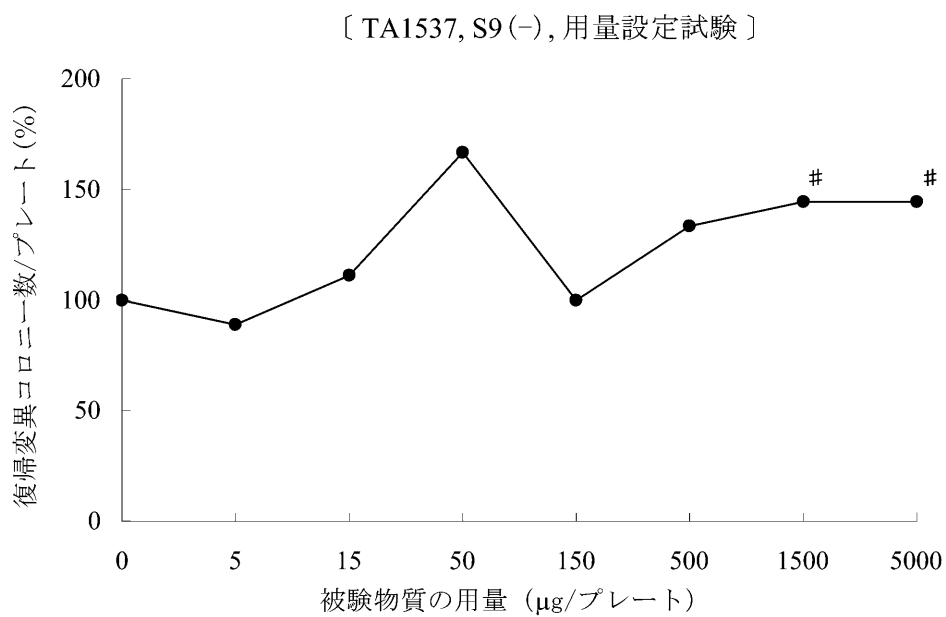
〔TA98, S9(+), 本試験〕



被験物質の名称 : 3,4,5,6-テトラクロロフタルイミド

図 4-2 *Salmonella typhimurium* TA98 の用量—反応曲線
(代謝活性化法)

: 被験物質の析出

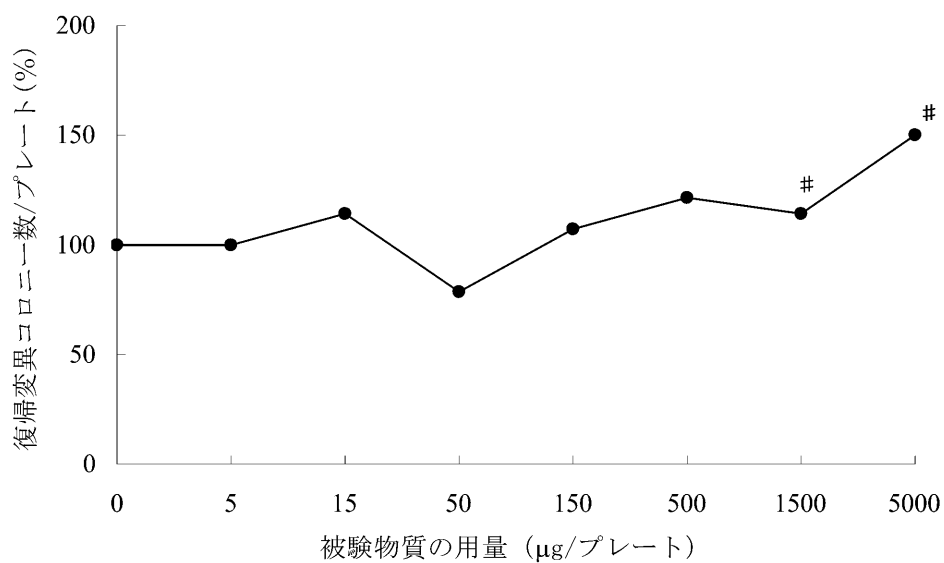


被験物質の名称 : 3,4,5,6-テトラクロロフタルイミド

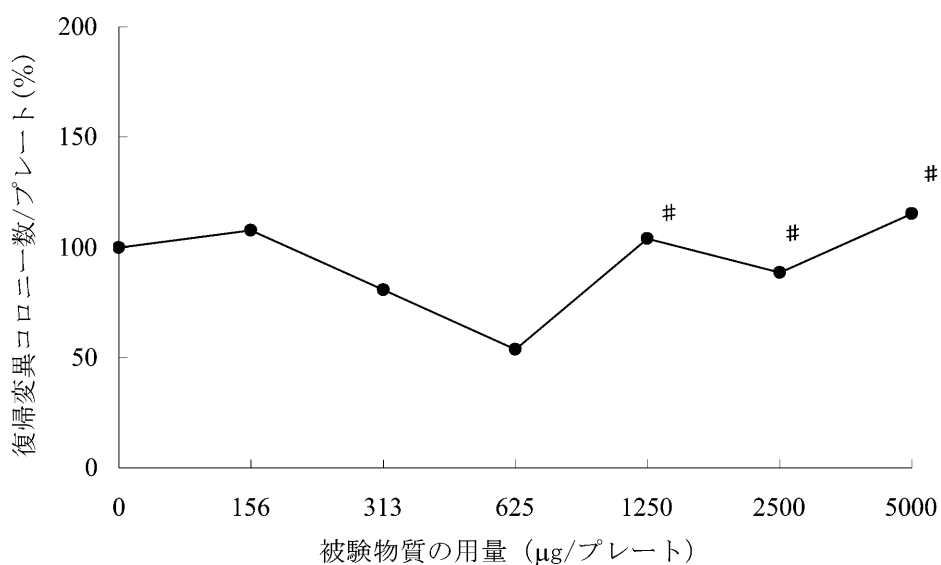
図 5-1 *Salmonella typhimurium* TA1537 の用量—反応曲線(直接法)

: 被験物質の析出

〔TA1537, S9(+), 用量設定試験〕



〔TA1537, S9(+), 本試験〕



被験物質の名称 : 3,4,5,6-テトラクロロフタルイミド

図 5-2 *Salmonella typhimurium* TA1537 の用量—反応曲線
(代謝活性化法)

: 被験物質の析出