

最終報告書

2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号 6337

2011年3月3日

本文目次

項目	ページ
1 要約	1
2 材料	2
2-1 被験物質	2
2-2 試験系	3
2-3 陽性対照物質	4
2-4 S9 及び S9 mix	5
2-5 被験物質溶液の調製及び陰性対照に使用した溶媒(溶媒対照)	6
2-6 培地及び前培養の条件	7
3 試験方法	8
3-1 採用した試験方法とその理由	8
3-2 プレインキュベーション法の手順	9
3-3 コロニー数の算定方法	9
3-4 生育阻害(抗菌作用)の有無の確認方法	10
3-5 試験の構成及び内容	10
3-6 無菌試験	11
3-7 被験物質の沈殿の有無の確認方法	11
3-8 試験結果の解析方法(判定方法)	11
3-9 数値の取扱い	11
4 試験成績及び考察	12
4-1 細菌を用いる復帰突然変異試験の結果	12
4-2 無菌試験	12
4-3 生育阻害(抗菌作用)の有無	12
4-4 被験物質の沈殿の有無	12
4-5 陰性対照(溶媒対照)値及び陽性対照値	13
5 結果の判定	14
7 参考文献	14
試験結果表 表-1、2	15~17
試験結果図 図-1~15	18~22

1 要約

試験は、2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸の細菌に対する復帰突然変異原性の有無を検索することを目的とした。

試験菌株は、ネズミチフス菌 TA98、TA100、TA1535、TA1537 及び大腸 WP2*uvrA*/pKM101 の 5 菌株とし、試験方法としてプレインキュベーション法を用い、S9 濃度 10% 及び 30% の代謝活性化法による場合 (+S9 mix) 並びに直接法による場合 (-S9 mix) で試験を実施した。

用量設定試験は、S9濃度10%の代謝活性化法による場合 (+S9 mix) 及び直接法による場合 (-S9 mix) で、最高用量 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ より公比3の8用量で実施した。ネズミチフス菌 TA98、TA100、TA1535、TA1537 及び大腸菌 WP2*uvrA*/pKM101 の代謝活性化法による場合 (+S9 mix) 及び直接法による場合 (-S9 mix) のいずれにおいても、陰性対照(溶媒対照)値の2倍以上の復帰変異コロニー数の増加及び生育阻害(抗菌作用)は認められなかった。

本試験は、S9濃度10%及び30%の代謝活性化法による場合 (+S9 mix) 並びに直接法による場合 (-S9 mix) で、最高用量 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ より公比2の5用量で実施した。全菌株ともに代謝活性化法による場合 (+S9 mix) 及び直接法による場合 (-S9 mix) のいずれにおいても、陰性対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数の増加及び生育阻害(抗菌作用)は認められなかった。

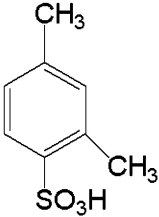
陽性対照物質は、それぞれの菌株において陰性対照(溶媒対照)値の2倍以上の復帰変異コロニー数の増加を示した。また、陰性対照値及び陽性対照値は、当センターのヒストリカルデータより作成した基準の範囲内であった。これらの結果は試験が適切に実施されたことを示している。

以上の結果より、2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸の細菌に対する復帰突然変異原性は、陰性と判定した。

2 材料

2-1 被験物質

2-1-1 被験物質の性質(被験物質番号：1248)

化学物質の名称 (IUPAC命名法による)	2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸		
別名	m-キシレン-4-スルホン酸		
C A S 番号	88-61-9		
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合は、その製法の概要)			
分子量	186.23		
試験に供した化学物質の純度(%)	99.7% (無水物換算)		
試験に供した化学物質のロット番号			
不純物の名称及び含有率	水：16.1%、強熱残分：0.05%以下		
蒸気圧	-		
対水溶解度	-		
1-オクタノール/水分配係数	-		
融点	-		
沸点	-		
常温における性状	結晶又は結晶性粉末		
安定性	水：- 光：- 熱：-		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	水	易溶 [100mg/ml 以上]*	- [水を加えた際に、発色、発泡、発熱等の変化は見られなかった]*
備考	(品名：m-キシレン-4-スルホン酸 n 水和物)		

*：当センターの試験による。

2-1-2 保管及び取扱い

被験物質は、被験物質保管区域の保管庫内デシケータ中に密栓して室温かつ遮光条件下で保管した。被験物質の取扱いは、黄色灯下で行った。

2-1-3 被験物質の特性・同一性、安定性

1) 特性・同一性

被験物質の特性・同一性は、被験物質の赤外吸収スペクトルを赤外分光光度計 (Shimadzu FTIR-8200PC) を用いて測定し、文献値と比較することにより行った。その結果、赤外吸収スペクトルは文献と同じ波長にピークが認められ、試験に使用した被験物質は 2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸であることを確認した。

2) 安定性

被験物質の安定性は、使用開始前及び使用終了後に被験物質のクロマトグラムを高速液体クロマトグラフ (Agilent Technologies 1090) を用いて測定し、それぞれのデータを比較することにより行った。その結果、それぞれの測定結果に差は認められず、被験物質は試験実施期間中安定であった。

2-2 試験系

2-2-1 試験に用いた菌株

試験にはネズミチフス菌¹⁾ TA100、TA1535、TA98、TA1537 及び大腸菌²⁾ WP2uvrA/ pKM101 の 5 菌株を用いた。

2-2-2 選定理由

従来から、細菌を用いる復帰突然変異試験に広く使用されているほか、「新規化学物質等に係る試験の方法について」の別添「細菌を用いる復帰突然変異試験」平成 15 年 11 月 21 日付け薬食発第 1121002 号厚生労働省医薬食品局長、平成 15・11・13 製局第 2 号経済産業省製造産業局長、環境企発第 031121002 号環境省総合環境政策局長通知及び OECD 試験法ガイドライン 471 (微生物突然変異試験 1997 年 7 月 21 日採択) に規定されている。

2-2-3 入手方法

菌株名	入手先	入手年月日	試験に使用する保存ロットの特性検査日
TA100	東京大学医科学研究所 癌生物学研究部	1985 年 6 月 21 日	2010 年 4 月 21 日
TA1535	同 上	1988 年 5 月 16 日	2010 年 4 月 21 日
TA98	同 上	1988 年 5 月 16 日	2010 年 4 月 21 日
TA1537	同 上	1988 年 5 月 16 日	2010 年 4 月 21 日
WP2uvrA/ pKM101	同 上	1983 年 6 月 29 日	2010 年 6 月 1 日

2-2-4 保存方法

保存温度	組 成
-80℃	菌懸濁液 0.8 ml
	DMSO 0.07 ml

保存した菌株は、あらかじめ遺伝的性質(特性)を調べて菌の性質が適切であることを確認した。保存は、菌懸濁液 0.8 ml に DMSO 0.07 ml の割合で混合した菌液を 200 μ l ずつ凍結用チューブに分注し、アセトンドライアイス冷媒で凍結した後、-80℃ (三洋電機株式会社 MDF-392AT) で保存した。前培養のために一度解凍した保存菌液は再使用せず廃棄した。

2-3 陽性対照物質

2-3-1 陽性対照物質と陽性対照物質を溶解した溶媒

物質名	製造元	Lot No.	グレード	純度(%)	溶媒名	
陽性対照物質	ナトリウム・アジド (NaN ₃)	和光純薬工業株式会社	TSK 3329	試薬特級	98	DMSO
	9-アミノアクリジン (9-AA)	Aldrich Chemical Co., Inc.	S30507-336	—	98	DMSO
	2-(2-フリル)-3-(5-ニコロ-2-フリル)アクリルアミド* (AF-2)	和光純薬工業株式会社	WKK 3086	和光特級	> 98.0	DMSO
	2-アミノアントラセン (2-AA)	和光純薬工業株式会社	ASM 1101	—	97.4	DMSO
溶媒	ジメチルスルホキシド (DMSO)	関東化学株式会社	008X1802	分光分析用	99.7	

2-3-2 使用する陽性対照物質の保存及び取扱い

陽性対照物質は、暗所に冷蔵保存した。DMSO で調製した陽性対照物質溶液は 500 μ l ずつ凍結用チューブに分注し、-40℃で保存した。試験のために解凍した陽性対照物質溶液の残りは再使用せず廃棄した。

2-3-3 使用した陽性対照物質の名称及び用量

直接法による場合		
菌株名	陽性対照物質	用量 (μ g/プレート)
TA100	AF-2	0.01
TA1535	NaN ₃	0.5
TA98	AF-2	0.1
TA1537	9-AA	80
WP2uvrA/ pKM101	AF-2	0.005

代謝活性化法による場合		
菌株名	陽性対照物質	用量 (μ g/プレート)
TA100	2-AA	1
TA1535	2-AA	2
TA98	2-AA	0.5
TA1537	2-AA	2
WP2uvrA/ pKM101	2-AA	2

2-4 S9 及び S9 mix

2-4-1 S9 の入手方法等

自製・購入の別	1. 自製 (2.) 購入 (製造元: キッコーマン株式会社)
製造年月日	2010年7月16日 製造
購入の場合の Lot No.	RAA-617
保存温度	-80℃
タンパク質含有量	26.98 mg/ml
購入年月日	2010年7月30日 購入
保存機器名	三洋電機株式会社 MDF-392AT

S9 は製造後 6 ヶ月以内のものを試験に使用した。

2-4-2 S9 の調製方法

使用動物		誘導物質 ⁴⁾	
種・系統	ラット・ Sprague-Dawley (Slc:SD)	名 称	フェノバルビタール (PB) 及び 5,6-ベンゾフラボン (BF)
性	雄		
週 齢	7 週	投与 方法	腹腔内投与
体 重	211~248 g	投与期間及び投与量 (g/kg 体重)	1 日目 (投与開始日) : PB 0.03 2 日目~4 日目 : PB 0.06 3 日目 : BF 0.08

フェノバルビタール投与開始後 5 日目の動物の肝臓を、3 倍量の 0.15M KCl でホモジナイズして、9000G で 10 分間遠心分離した上清を S9 として調製したものを購入して使用した。

2-4-3 S9 mix の組成

成 分	S9 mix 1 ml 中の量	成 分	S9 mix 1 ml 中の量
S9	0.1ml (10%の場合) 0.3ml (30%の場合)	NADPH	4 μ mol
MgCl ₂	8 μ mol	NADH	4 μ mol
KCl	33 μ mol	Na-リン酸緩衝液	100 μ mol
グルコース-6-リン酸	5 μ mol	その他 (-)	-

上記の組成で S9 mix を試験ごとに当センターで調製した。

2-5 被験物質溶液の調製及び陰性対照に使用した溶媒(溶媒対照)

2-5-1 被験物質溶液の調製

使用溶媒	名称	製造元	Lot No.	グレード	純度(%)
	蒸留水	和光純薬工業(株)	KWP9781	液体クロマトグラム用	99.9%以上
溶媒選択の理由	被験物質は、水に 100 mg/ml 以上[被験物質溶液をプレート当り 50 μ l 添加した場合に 5000 μ g の被験物質量以上に相当する]溶解する。また、被験物質に水を加えた際に、発色、発泡、発熱等の変化は見られなかった。以上から水を溶媒に選択した。				
被験物質溶液の性状	<input checked="" type="radio"/> 溶解 <input type="radio"/> 懸濁 <input type="radio"/> その他 ()				
被験物質が難溶性の場合における懸濁等の方法	—				
溶液の調製から使用までの保存時間と温度	用量設定試験	45分、			25 $^{\circ}$ C
	本試験	30分、			25 $^{\circ}$ C
純度換算の有無	<input checked="" type="radio"/> 有 <input type="radio"/> 無 (被験物質の純度は、無水物換算で 99.7%であるが、水分を 16.1%含んでいることから純度 83.6%として換算を行った。)				
被験物質の溶媒中の安定性	被験物質に水中での安定性は不明であるが、水を加えた際に発色、発泡、発熱等の変化は見られなかった。				
調製の方法	被験物質に水を加え溶解し、段階希釈により各濃度を調製した。被験物質の光への安定性は不明であるので、調製は黄色灯下で実施した。				

2-5-2 被験物質調製溶液中の被験物質の濃度及び均一性

被験物質調製溶液中の被験物質の濃度及び均一性は、試験実施前に、用量設定試験と同じ操作により調製した最高濃度と最低濃度調製溶液について各 3 点サンプリングし、高速液体クロマトグラフ (Agilent Technologies 1090) を用いて濃度を測定して確認した。その結果、被験物質調製溶液中の被験物質濃度は設定濃度に対し 101 から 103%の範囲であり、また各濃度について 3 点サンプリングした濃度測定においても差は認められなかった。従って、実施した調製方法により被験物質は正確に調製されていることが確認された。

2-5-3 被験物質調製溶液中の被験物質の安定性

被験物質調製溶液中の被験物質の安定性は、試験実施前に用量設定試験と同じ操作により調製した最高濃度と最低濃度調製溶液について、被験物質調製直後と3時間後の被験物質調製容器内の調製溶液をそれぞれ3点サンプリングし、高速液体クロマトグラフ (Agilent Technologies 1090) を用いて濃度を測定して確認した。その結果、それぞれの時点における被験物質濃度に差は認められず、被験物質調製溶液中の被験物質は3時間以上安定であることが確認された。試験に使用した被験物質調製溶液は、調製後3時間以内に使用した。

2-6 培地及び前培養の条件

2-6-1 前培養の条件

ニュートリエントブロス	名 称		製 造 元		Lot No.	
		Oxoidニュートリエントブロス No.2		OXOID LTD.		612715
前 培 養 時 間	10時間00分					
培養容器(形状・容量)	形 状：三角フラスコ		容 量：62.5 ml			
培 養 液 量	15 ml		接 種 菌 量		30 μ l	
保存菌株の接種から振とう培養までの保存時間と温度	用量設定試験		6時間 00分、		7°C	
	本試験		6時間 15分、		7°C	
振とう培養終了から使用までの保存時間と温度	用量設定試験		45分、		25°C	
	本試験		1時間 10分、		25°C	
振とう培養装置の型式及び製造元	型 式：RX-30 製造元：タイテック株式会社					
振とう方法(振とう形式・振とう数等)	振とう形式：旋回		回転数：120 回/分 回転直径：3 cm			

2-6-2 前培養終了時の生菌数等

菌 株 名		塩 基 対 置 換 型			フ レ ー ム シ フ ト 型	
		TA100	TA1535	WP2uvrA/ pKM101	TA98	TA1537
生 菌 数 ($\times 10^9$ / ml)	用 量 設 定 試 験	3.03	3.63	4.04	2.69	2.25
	本 試 験	3.10	3.79	4.14	2.77	2.28
測 定 方 法 (いずれかを○で囲むこと)		①. O.D. 値よりの換算 2. 段階希釈法 3. その他 ()				

Oxoid ニュートリエントブロス No.2 を用い、10 時間培養し静止期の初期で培養を止めた。分光光度計(株式会社 島津製作所 MPS-2000)を用い、660nm で1cm セルの吸光度を測定し、生菌数に換算した。生菌数が 1×10^9 / ml 以上の場合に菌懸濁液を試験に用いた。

2-6-3 最少グルコース寒天平板培地等

(1) トップアガー

	成 分	トップアガー 1 ml 中の量
ネズミチフス菌に用いるトップアガー	L-ヒスチジン、D-ビオチン	0.05 μ mol
大腸菌に用いるトップアガー	L-トリプトファン	0.05 μ mol

寒 天	名 称	Bacto™ Agar
	製 造 元	Becton, Dickinson and Company
	Lot No.	9023033

寒天 0.6wt%、NaCl 0.5wt%の割合の水溶液を高圧蒸気滅菌し、室温で保存した。それを加温溶解し、上記の組成となるように滅菌したアミノ酸溶液を加え、各トップアガーを調製した。このトップアガーを約 45℃に保温して試験に使用した。

(2) 最少グルコース寒天平板培地

自製・購入の別	1. 自製 2. 購入(製造元：オリエンタル酵母工業株式会社)
製造年月日	2010年3月2日 製造
購入の場合の Lot No.	ANI150CZ
使用寒天の名称・製造元・Lot No.等	使用寒天の名称：伊那寒天 BA-30A 製造元：伊那食品工業株式会社 Lot No. : 90216
寒天培地の液量	30 ml
購入年月日	2010年4月28日 購入

3 試験方法

3-1 採用した試験方法とその理由

本試験は、「新規化学物質等に係る試験の方法について」の別添「細菌を用いる復帰突然変異試験」（平成 15 年 11 月 21 日付け、薬食発第 1121002 号厚生労働省医薬食品局長、平成 15・11・13 製局第 2 号経済産業省製造産業局長、環境企発第 031121002 号環境省総合環境政策局長通知、最終改正 平成 18 年 11 月 20 日）及び OECD 試験法ガイドライン 471（微生物突然変異試験 1997 年 7 月 21 日採択）に従い、代謝活性化の有無でプレインキュベーション法を用いて実施した。

なお、ガイドラインに指定されたプレート法とプレインキュベーション法では、一般的にプレインキュベーション法の方が感度良く被験物質の変異原性を検出できる^{3,5)}と考えられるため、プレインキュベーション法を用いた。

S9 濃度 10%を用いた代謝活性化法による試験結果が陰性であったので、S9 濃度 30%を用いた代謝活性化法による試験を追加実施して最終判定を行った。

3-2 プレインキュベーション法の手順

被験物質溶液又は溶媒 0.05ml 若しくは陽性対照物質溶液 0.05 ml と S9 mix あるいは 0.1M Na-リン酸緩衝液 0.5 ml と菌懸濁液 0.1 ml を試験管に入れ、よく混合し 37°C で 20 分間、恒温振とう水槽(ヤマト科学株式会社 BW200+BF500)中で振とうした(プレインキュベーション)。プレインキュベーションした後、2 ml のトップアガーを加え、直ちに最少グルコース寒天平板培地(プレート)上に広げて固めた。本被験物質の光に対する安定性は不明であったので、以上の操作は黄色灯下で実施した。固化したプレートを 37°C で 48 時間、恒温培養器(ヤマト科学株式会社 IN-81)で上下を転倒し、遮光して培養した後、試験菌株の生育阻害(抗菌作用)状況を調べ復帰突然変異コロニー数を測定した。

プレインキュベーション法

組 成	菌 懸 濁 液	0.1 ml
	被 験 物 質 溶 液	0.05 ml
	Na-リン酸緩衝液(直接法による場合)	0.5 ml
	S9 mix(代謝活性化法による場合)	0.5 ml
	ト ッ プ ア ガ ー	2 ml
	そ の 他	—
プレインキュベーション	温 度	37 °C
	時 間	20 分
インキュベーション	温 度	37 °C
	時 間	48 時間

3-3 コロニー数の算定方法

計 測 方 法	1. マニュアル計測 (2.) 機器計測
補 正 の 有 無	1. 無 (2.) 有 (補正の方法 面積及び数え落とし補正)
計 測 方 法 の 1 と 2 を 併 用 し た 理 由	—
測 定 機 器 ・ 型 式 ・ 製 造 元	測定機器名：テレビ線コロニーカウンター 型式：CA-90S 製造元：東洋測器株式会社

機器計測を用いた場合は、面積補正と数え落とし補正をパーソナルコンピュータ(株式会社日立製作所 FLORA330W DK5)を用いて実施した。

3-4 生育阻害(抗菌作用)の有無の確認方法

実体顕微鏡(日本光学工業株式会社 SMZ-10)を用い、40倍ですべてのプレートについて観察した。被験物質処理したプレートを陰性対照(溶媒対照)のプレートと比較し、アミノ酸要求性の微細なコロニー(バックグラウンドローン)の数が減少するか、減少して大きくなる場合に生育阻害(抗菌作用)があると判定した。

3-5 試験の構成及び内容

3-5-1 試験の構成

試験は用量設定試験、本試験から構成され、各々の使用菌株、方法及び代謝活性化の有無は以下の通りである。

用量設定試験

使用菌株	TA100、TA1535、TA98、TA1537、WP2 <i>uvrA</i> /pKM101
試験方法	プレインキュベーション法
代謝活性化の有無	S9濃度10%の代謝活性化法による場合及び直接法による場合

本試験

使用菌株	TA100、TA1535、TA98、TA1537、WP2 <i>uvrA</i> /pKM101
試験方法	プレインキュベーション法
代謝活性化の有無	S9濃度10%及び30%の代謝活性化法による場合並びに直接法による場合

3-5-2 試験におけるプレート数等

用量設定試験、本試験

区分	被験物質処理群	陽性対照群	溶媒対照群
直接法による場合	3枚	3枚	3枚
代謝活性化法による場合	3枚	3枚	3枚

なお、試験は直接法による場合と代謝活性化法による場合を菌株ごとに連続して行った。

3-5-3 用量設定及びその理由

あらかじめ用量設定試験を最高用量 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ から公比 3 の 8 用量段階で行い、生育阻害(抗菌作用)を示す用量を調べた後に本試験を行った。用量設定試験の結果、陰性対照(溶媒対照)値の 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加及び生育阻害(抗菌作用)は認められなかったため、本試験の最高用量は 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ から公比 2 の 5 用量段階に設定した。

菌株名	S9の有無	本試験の用量設定 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)
TA100	無	5000、2500、1250、625、313
	有	5000、2500、1250、625、313
TA1535	無	5000、2500、1250、625、313
	有	5000、2500、1250、625、313
TA98	無	5000、2500、1250、625、313
	有	5000、2500、1250、625、313
TA1537	無	5000、2500、1250、625、313
	有	5000、2500、1250、625、313
WP2 $uvrA$ / pKM101	無	5000、2500、1250、625、313
	有	5000、2500、1250、625、313

3-6 無菌試験

試験に使用したものと同量の調製した S9 mix 溶液及び被験物質溶液(試験に用いた最高用量について実施)を最少グルコース寒天平板培地に軟寒天溶液で重層し、37°C で 48 時間培養して菌の生育の有無を目視で確認した。

3-7 被験物質の沈殿の有無の確認方法

復帰変異コロニーの計数時に、肉眼による観察を被験物質処理したすべてのプレートに対して行った。

3-8 試験結果の解析方法(判定方法)

被験物質の用量の増加とともに復帰突然変異コロニー数が増加し、かつ陰性対照(溶媒対照)の 2 倍以上に増加し、再現性の得られた場合に陽性とする事とした⁶⁾。上記の条件が満たされない場合は、陰性とする事とした。データ解析のための統計学的手法は用いなかった。

3-9 数値の取扱い

報告書中のコロニー数は実数で表示し、平均値は小数点以下を四捨五入して表示した。

4 試験成績及び考察

4-1 細菌を用いる復帰突然変異試験の結果

用量設定試験を表-1に、本試験の結果を表-2及び図-1から15に示した。

用量設定試験は、S9濃度10%の代謝活性化法による場合(+S9 mix)及び直接法による場合(-S9 mix)について、最高用量5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ より公比3の8用量段階で実施した。ネズミチフス菌 TA98、TA100、TA1535、TA1537及び大腸菌 WP2uvrA/pKM101のS9濃度10%の代謝活性化法による場合(+S9 mix)及び直接法による場合(-S9 mix)のいずれにおいても、陰性対照(溶媒対照)値の2倍以上の復帰変異コロニー数の増加及び生育阻害(抗菌作用)は認められなかった。

本試験は、S9濃度10%及び30%の代謝活性化法による場合(+S9 mix)並びに直接法による場合(-S9 mix)について、最高用量5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ から公比2の5用量段階で実施した。全菌株ともに S9濃度10%及び30%の代謝活性化法による場合(+S9 mix)、並びに直接法による場合(-S9 mix)のいずれにおいても、陰性対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数の増加及び生育阻害(抗菌作用)は認められなかった。

陽性対照物質は、それぞれの菌株において陰性対照(溶媒対照)値の2倍以上の復帰変異コロニー数の増加を示した。また、S9濃度10%の代謝活性化法による場合(+S9 mix)及び直接法による場合(-S9 mix)における陰性対照値及び陽性対照値は、当センターのヒストリカルデータより作成した基準の範囲内であり、試験は適切に実施されたことを示している。

以上の結果より、2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸の細菌に対する復帰突然変異原性は、陰性と判定した。

4-2 無菌試験

区 分	菌の増殖の有無	
被験物質溶液	有	無
S9 mix	有	無

用量設定試験、本試験のいずれの試験においても被験物質溶液及び調製した S9 mix に菌の混入は認められず、被験物質溶液及び S9 mix の調製は無菌的に実施された。

4-3 生育阻害(抗菌作用)の有無

生育阻害(抗菌作用)の有無	有	無
---------------	---	---

4-4 被験物質の沈殿の有無

沈殿の有無	有	無
-------	---	---

4-5 陰性対照(溶媒対照)値及び陽性対照値

用量設定試験、本試験において陽性対照物質は、それぞれの菌株において陰性対照(溶媒対照)値の2倍以上の復帰変異コロニー数を誘発した。また、S9濃度10%の代謝活性化法による場合(+S9 mix)及び直接法による場合(-S9 mix)の陰性対照(溶媒対照)値及び陽性対照値の平均値は当センターのヒストリカルデータより作成した基準値⁷⁾の範囲内(下記参照)であり、試験が適切に実施されたことを示した。

陰性対照値(溶媒対照値)

[2009年5月～2010年6月にプレインキュベーション法で実施した試験]

菌株名	S9*の有無	ヒストリカルデータ			基準値
		試験数	平均値	標準偏差	
TA100	無	n=53	106	11	77～135
	有	n=49	112	12	80～145
TA1535	無	n=53	9	2	5～14
	有	n=48	10	2	4～16
TA98	無	n=52	18	4	6～29
	有	n=48	23	3	14～31
TA1537	無	n=52	10	3	1～18
	有	n=48	12	3	2～22
WP2uvrA/ pKM101	無	n=51	70	10	46～94
	有	n=50	104	12	68～139

* : S9濃度10%の代謝活性化法による場合

陽性対照値 [2009年5月～2010年6月にプレインキュベーション法で実施した試験]

菌株名	陽性対照物質(用量)			S9*の有無	ヒストリカルデータ			基準値
					試験数	平均値	標準偏差	
TA100	AF-2	0.01	μg/プレート	無	n=53	679	50	564～794
	2-AA	1.0	μg/プレート	有	n=49	1305	81	1074～1537
TA1535	NaN ₃	0.5	μg/プレート	無	n=53	344	35	256～432
	2-AA	2.0	μg/プレート	有	n=48	265	21	215～315
TA98	AF-2	0.1	μg/プレート	無	n=52	492	53	305～678
	2-AA	0.5	μg/プレート	有	n=48	445	46	323～566
TA1537	9-AA	80	μg/プレート	無	n=52	474	61	303～644
	2-AA	2.0	μg/プレート	有	n=48	216	29	132～299
WP2uvrA/ pKM101	AF-2	0.005	μg/プレート	無	n=51	1215	161	783～1647
	2-AA	2.0	μg/プレート	有	n=50	867	73	683～1051

* : S9濃度10%の代謝活性化法による場合

5 結果の判定

2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸の細菌に対する復帰突然変異原性は、陰性と判定した。

7 参考文献

- 1) Maron, D.M. and Ames, B.N.
Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test.
Mutat. Res., 113, 173-215 (1983)
- 2) Green, M.H.L. and Muriel, W.J.
Mutagen testing using TRP⁺ reversion in *Escherichia coli*.
Mutat. Res., 38, 3-32 (1976)
- 3) Matsushima, T., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M.
Factors modulating mutagenicity in microbial tests.
In "Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens",
eds. K.H. Norpoth and R.C. Garner, pp.273-285 (1980),
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- 4) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T.
A safe substitute for polychlorinated biphenyls as an inducer of metabolic activation system.
In "In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing",
eds. F.J. de Serres, J.R. Fouts, J.R. Bend and R.M. Philpot,
pp.85-88 (1976), Elsevier / North-Holland, Amsterdam.
- 5) Yahagi, T., Nagao, M., Seino, Y., Matsushima, T., Sugimura, T. and Okada, M.
Mutagenicities of N-nitrosamines on *Salmonella*.
Mutat. Res., 48, 121-130 (1977)
- 6) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E.
Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* / mammalian microsomes mutagenicity test.
Mutat. Res., 31, 347-364 (1975)
- 7) 丹後俊郎著、臨床検査への統計学、pp.74-80、朝倉書店 (1986)

表-1

試験結果表（用量設定試験）

被験物質の名称：2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸

試験実施期間		2010年 8月17日 から 2010年 8月20日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量(μg/プレート)	複俾変異数(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/pKM101	TA98	TA1537	
S9 mix (-)	陰性対照 (溶媒対照)	134 115 117 (122)	10 9 7 (9)	68 54 66 (63)	15 14 11 (13)	8 7 7 (7)	
	2.29	136 120 160 (139)	8 9 10 (9)	56 60 70 (62)	20 18 25 (21)	5 9 3 (6)	
	6.86	122 151 127 (133)	3 8 11 (7)	70 52 55 (59)	23 17 24 (21)	10 8 8 (9)	
	20.6	120 150 149 (140)	8 6 9 (8)	67 63 60 (63)	17 14 22 (18)	3 5 8 (5)	
	61.7	111 119 136 (122)	8 9 5 (7)	69 43 54 (55)	15 22 11 (16)	10 11 6 (9)	
	185	108 127 145 (127)	11 6 7 (8)	61 53 47 (54)	23 15 18 (19)	13 5 10 (9)	
	566	126 112 108 (115)	13 9 10 (11)	48 54 64 (55)	17 11 11 (13)	5 8 3 (5)	
	1667	109 158 137 (135)	11 7 8 (9)	47 66 54 (56)	24 17 16 (19)	6 7 7 (7)	
	5000	123 142 139 (135)	7 5 8 (7)	47 48 62 (52)	23 16 15 (18)	7 5 9 (7)	
	S9 mix (10% S9量) (+)	陰性対照 (溶媒対照)	134 131 135 (133)	18 9 10 (12)	81 83 98 (87)	16 21 17 (18)	9 10 10 (10)
2.29		128 142 142 (137)	5 8 7 (7)	83 94 112 (96)	15 31 21 (22)	11 10 5 (9)	
6.86		148 134 151 (144)	8 6 8 (7)	106 75 78 (86)	32 26 18 (25)	8 6 8 (7)	
20.6		137 141 119 (132)	9 7 8 (8)	78 76 86 (80)	20 9 17 (15)	10 6 7 (8)	
61.7		134 124 109 (122)	8 11 13 (11)	92 82 86 (87)	21 21 24 (22)	13 9 7 (10)	
185		150 117 108 (125)	9 14 7 (10)	91 99 94 (95)	16 17 18 (17)	7 9 11 (9)	
566		113 105 120 (113)	10 11 13 (11)	72 91 81 (81)	16 24 17 (19)	13 11 10 (11)	
1667		130 141 134 (135)	5 13 9 (9)	70 102 85 (86)	22 15 24 (20)	8 9 6 (8)	
5000		151 134 149 (145)	10 16 5 (10)	91 83 82 (85)	17 23 25 (22)	10 13 9 (11)	
陽性対照		S9 mixを必要としないもの	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2
	用量(μg/プレート)		0.01	0.5	0.005	0.1	80
	S9 mix(10% S9量)を必要とするもの	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		用量(μg/プレート)	1	2	2	0.5	2
		コロニー数/プレート	725 647 680 (684)	319 319 297 (312)	1235 1081 1098 (1138)	524 546 571 (547)	401 372 407 (393)
		コロニー数/プレート	1338 1139 1216 (1229)	282 279 309 (290)	938 875 881 (898)	459 542 516 (506)	267 215 211 (231)

【備考】

- () 内には各プレートのコロニー数の平均値を記入した。
- 複俐変異数は、被験物質用量の低い順に裏側値及び平均値を記入した。
- 陽性対照物質の名称 AF-2: 2-(2-フリル)-5-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、NaN₃: ナトリウム・アジド、9-AA: 9-アミノアクリジン、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：2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸

試験実施期間		2010年 8月23日 から 2010年 8月26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/pKM101	TA98	TA1537	
S9 mix (-)	陰性対照 (溶媒対照)	106 123 39 (109)	14 10 11 (12)	61 51 70 (61)	31 23 17 (24)	6 8 8 (7)	
	313	101 89 98 (96)	14 6 7 (9)	70 56 57 (61)	23 20 31 (25)	6 11 8 (8)	
	625	108 120 101 (110)	9 10 11 (10)	63 61 64 (63)	31 28 31 (30)	9 5 6 (7)	
	1250	136 98 108 (114)	11 6 9 (9)	75 54 56 (62)	28 17 22 (22)	8 5 7 (7)	
	2500	97 124 114 (112)	7 14 6 (9)	69 63 78 (70)	20 26 26 (24)	3 6 6 (5)	
	5000	135 108 104 (116)	7 10 15 (11)	63 59 56 (59)	30 26 28 (28)	6 7 7 (7)	
	S9 mix (10% S9量) (+)	陰性対照 (溶媒対照)	136 106 106 (116)	15 11 17 (14)	106 83 83 (91)	31 29 18 (26)	7 15 8 (10)
313		143 121 138 (134)	13 8 5 (9)	90 69 71 (77)	22 28 28 (26)	9 10 9 (9)	
625		128 128 109 (122)	9 5 11 (8)	81 85 90 (85)	22 23 21 (22)	13 10 11 (11)	
1250		107 93 121 (107)	5 8 10 (8)	84 83 105 (91)	16 24 31 (24)	7 9 14 (10)	
2500		104 102 117 (108)	8 9 10 (9)	77 67 85 (76)	24 20 14 (19)	11 7 9 (9)	
5000		109 136 117 (121)	9 7 11 (9)	79 77 86 (81)	32 29 30 (30)	7 13 8 (9)	
陽性でないもの		名称	A F - 2	NaN ₃	A F - 2	A F - 2	9 - A A
	用量 (μg/プレート)	0 . 0 1	0 . 5	0 . 0 0 5	0 . 1	8 0	
対照	名称	2 - A A	2 - A A	2 - A A	2 - A A	2 - A A	
	用量 (μg/プレート)	1	2	2	0 . 5	2	
S9 mix (10% S9量)を必要とするもの	コロニー数/プレート	752 759 751 (754)	348 319 312 (326)	1402 1531 1466 (1466)	497 557 567 (540)	440 468 489 (466)	
	コロニー数/プレート	1270 1359 1227 (1285)	263 259 259 (260)	934 872 887 (901)	523 504 529 (519)	260 266 256 (261)	

【備考】

- () 内には各プレートのコロニー数の平均値を記入した。
- 復帰変異数は、被験物質用量の低い順に真値及び平均値を記入した。
- 陰性対照物質の名称 AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド, NaN₃: ナトリウム・アジド, 9-AA: 9-アミノアクリジン, 2-AA: 2-アミノアントラセン

表-2 続き

試験結果表 (本試験) 続き

被験物質の名称: 2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸

試験実施期間		2010年 8月23日 から 2010年 8月26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/pKM101	TA98	TA1537	
S9 mix (30% S9量) (+)	陰性対照 (溶媒対照)	124 134 144 (134)	13 11 15 (13)	106 63 94 (88)	25 33 32 (30)	9 9 9 (9)	
	313	119 142 133 (131)	15 3 15 (11)	97 97 98 (96)	31 28 31 (30)	13 14 11 (13)	
	625	144 143 121 (136)	17 7 10 (11)	83 102 75 (87)	36 20 32 (29)	8 8 16 (11)	
	1250	145 127 145 (139)	10 14 14 (13)	94 114 96 (101)	34 32 23 (30)	10 11 10 (10)	
	2500	135 121 163 (140)	11 9 8 (9)	83 102 107 (97)	20 24 31 (25)	13 9 13 (12)	
	5000	156 129 126 (137)	9 13 18 (13)	97 94 84 (92)	28 22 17 (22)	10 15 9 (11)	
	陽性対照	名称 2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
用量 (μg/プレート)	1	2	2	0.5	2		
コロニー数/プレート	402 405 434 (414)	160 133 128 (140)	358 347 416 (374)	166 165 178 (170)	79 67 83 (76)		

【備考】

1. () 内には各プレートのコロニー数の平均値を記入した。
2. 復帰変異数は、被験物質用量の低い値に実測値及び平均値を記入した。
3. 陽性対照物質の名称 2-AA: 2-アミノアントラセン

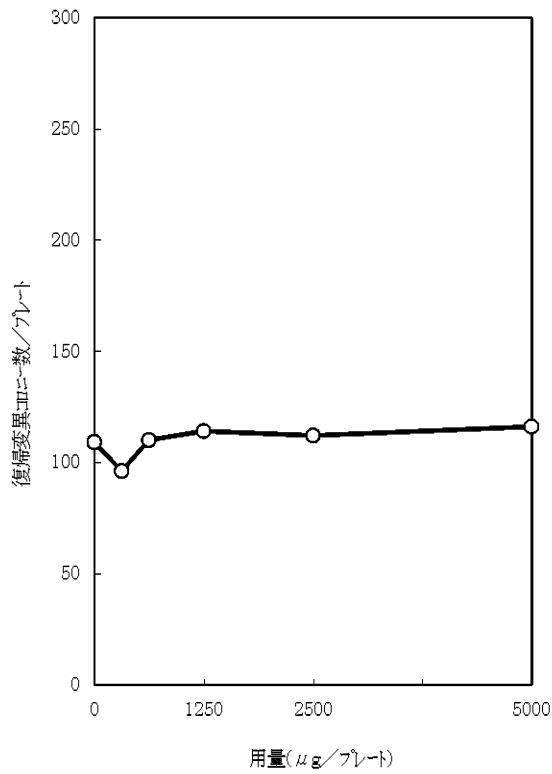


図-1 TA100における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験)

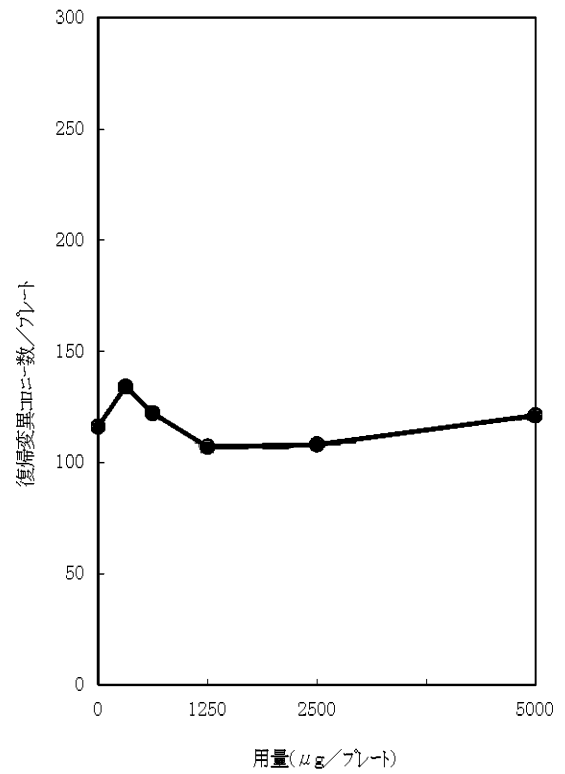


図-2 TA100における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (10%S9量:本試験)

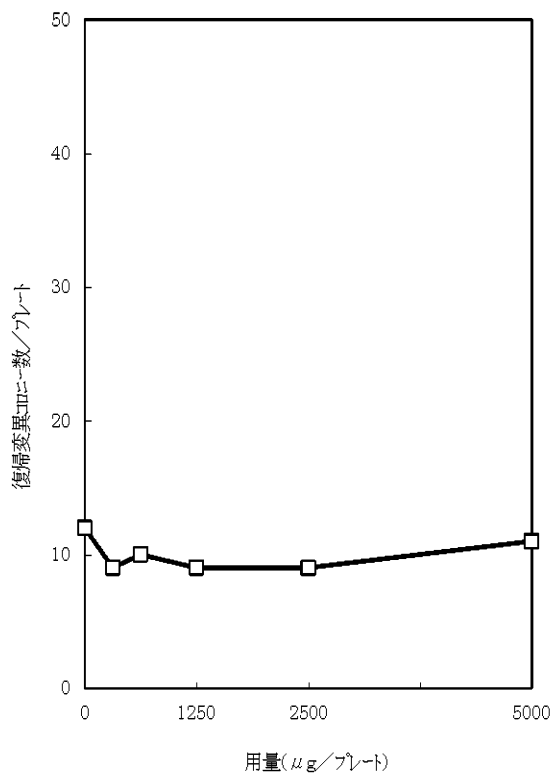


図-3 TA1535における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験)

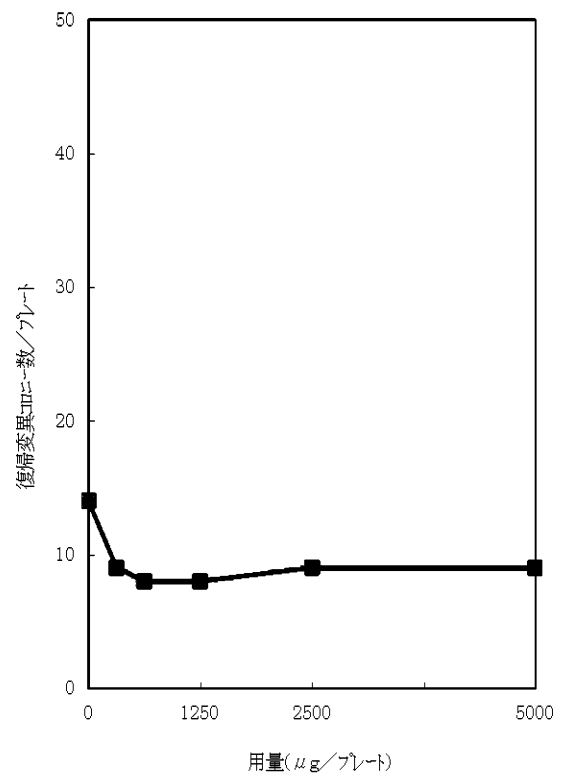


図-4 TA1535における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (10%S9量:本試験)

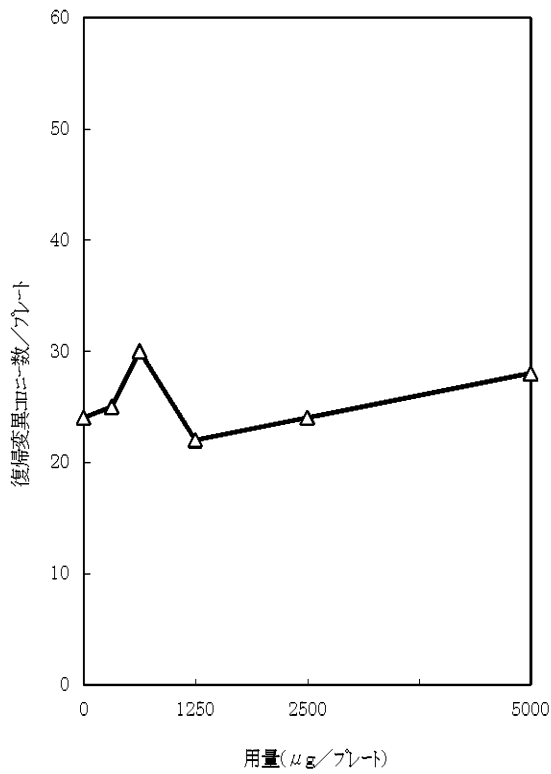


図-5 TA98における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験)

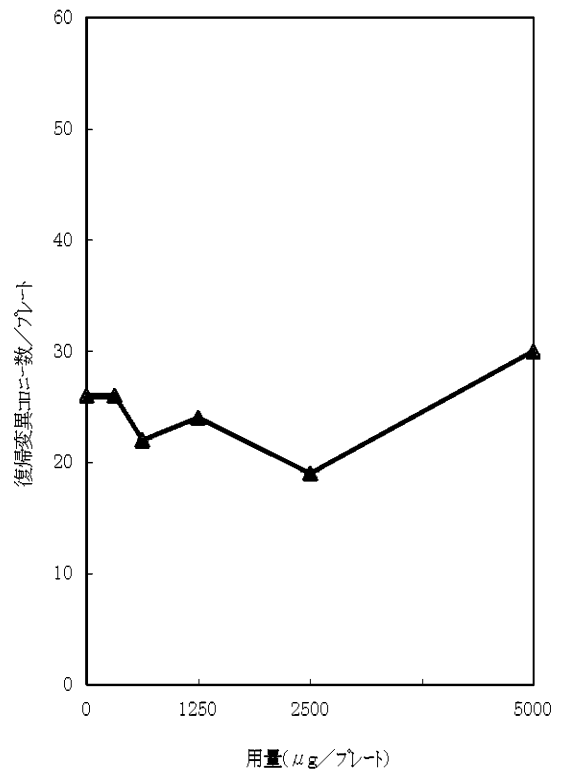


図-6 TA98における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (10%S9量: 本試験)

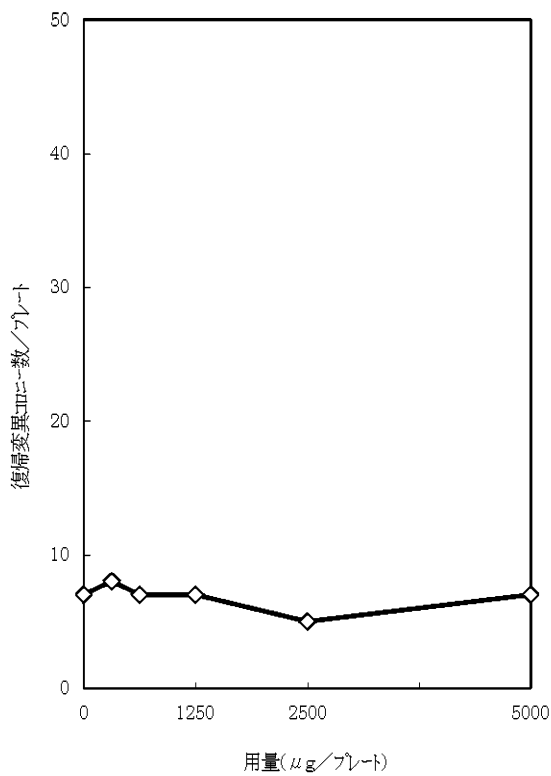


図-7 TA1537における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験)

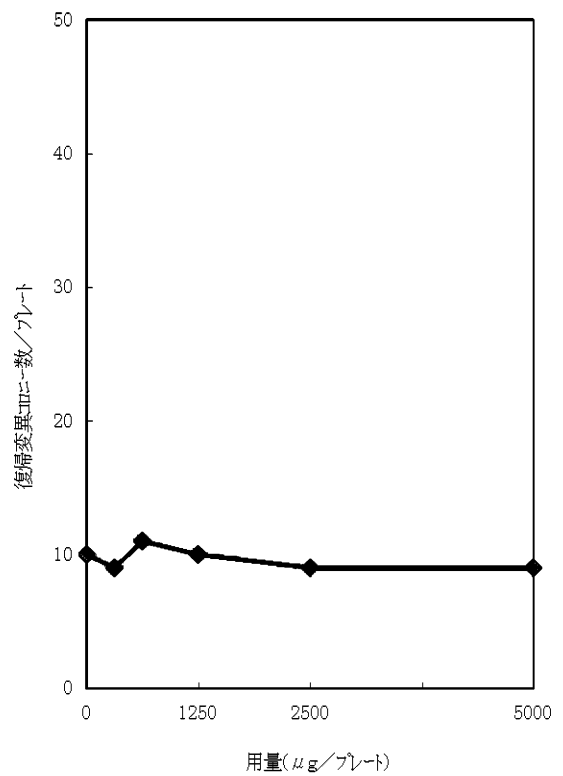


図-8 TA1537における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (10%S9量: 本試験)

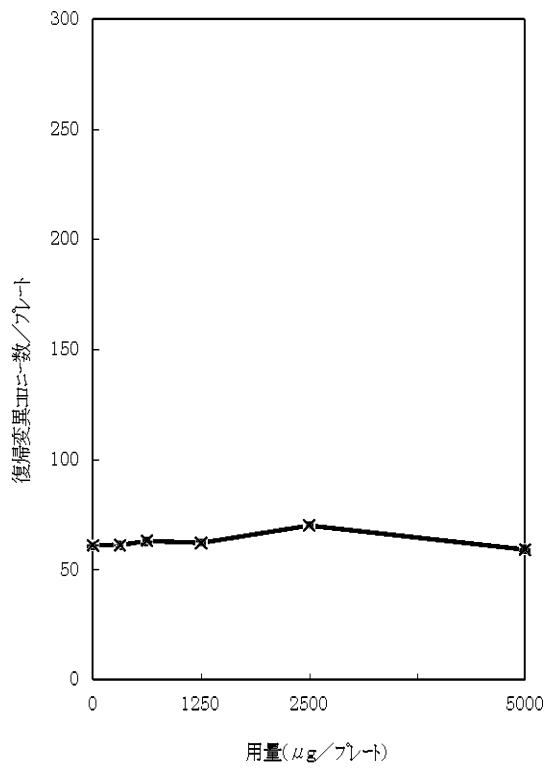


図-9 WP2 *uvrA*/pKM101における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験)

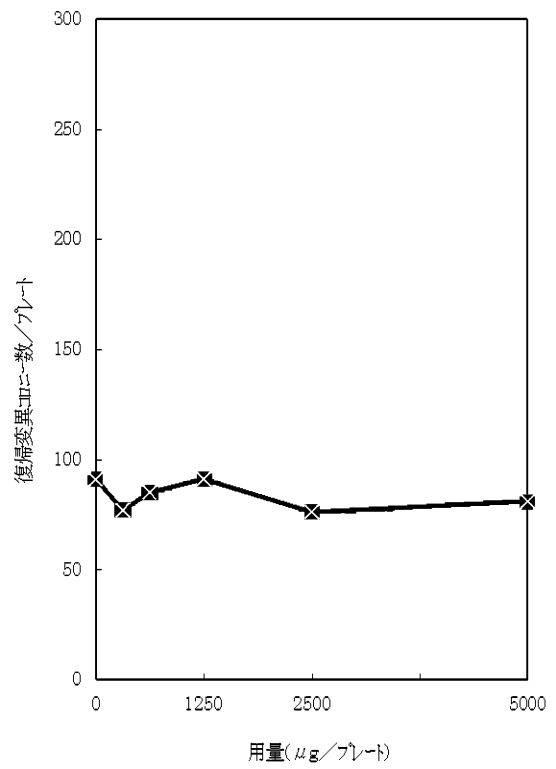


図-10 WP2 *uvrA*/pKM101における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (10%SS量: 本試験)

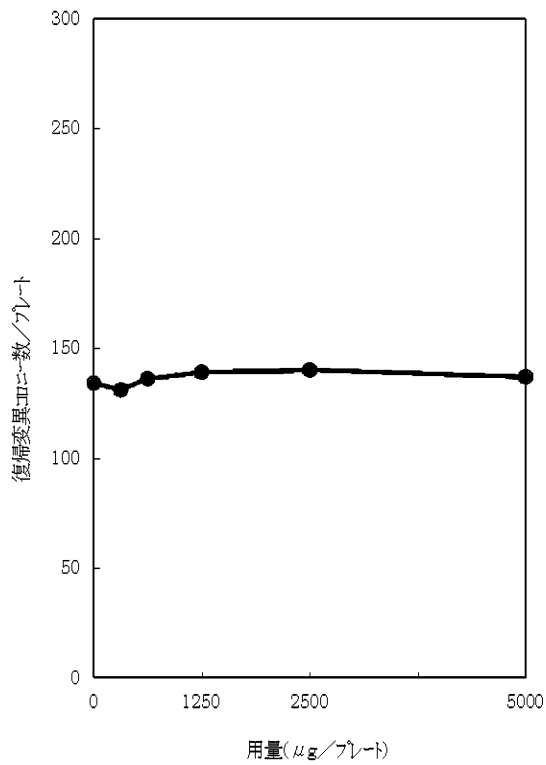


図-11 TA100における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (30%S9量: 本試験)

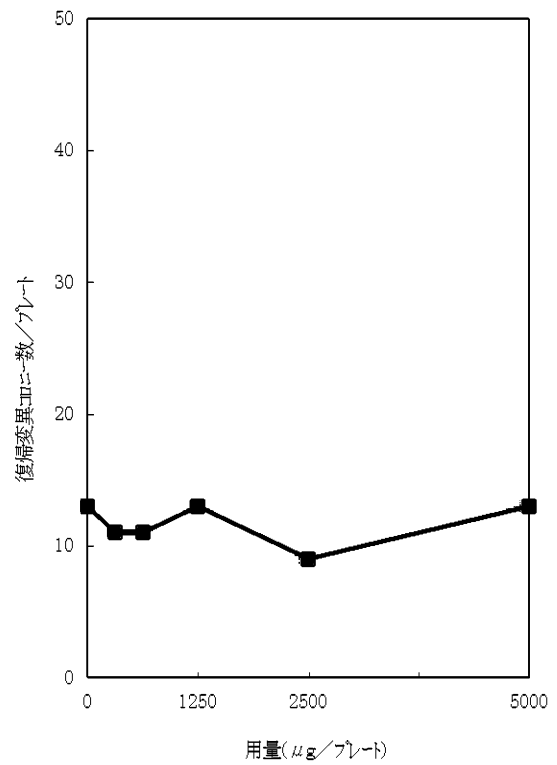


図-12 TA1535における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (30%S9量: 本試験)

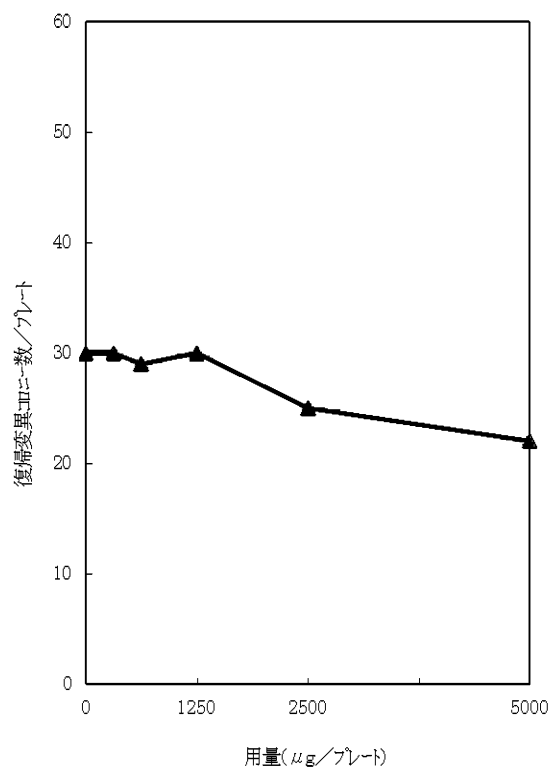


図-13 TA98における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (30%S9量: 本試験)

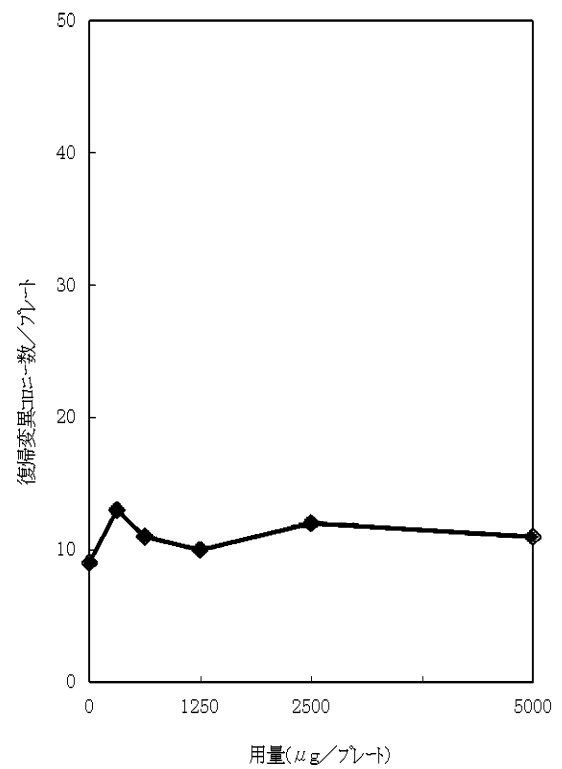


図-14 TA1537における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (30%S9量: 本試験)

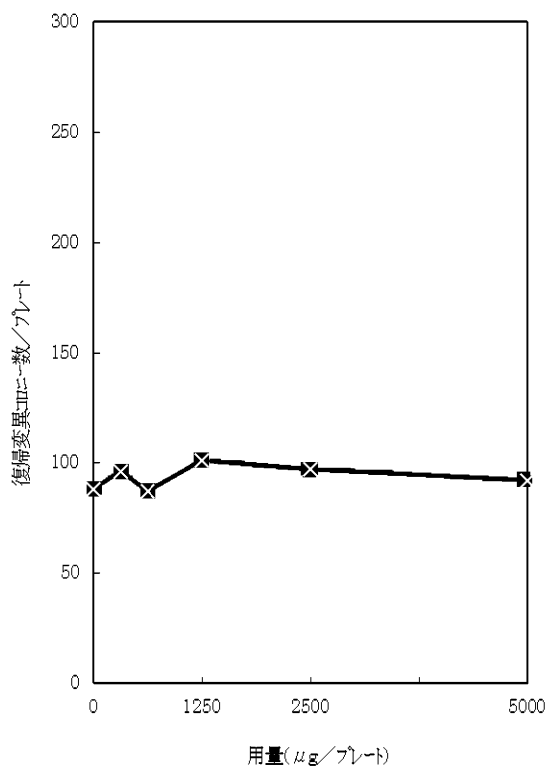


図-15 WP2 *uvrA*/pKM101における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (30%38量: 本試験)