BOZO RESEARCH CENTER INC.

最 終 報 告 書

1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸の細菌を用いる復帰突然変異試験

T-0027

2007年8月30日

株式会社ボゾリサーチセンター

東 京 本 部 〒151-0065 東京都渋谷区大山町36－7
本社・東京研究所 〒156-0042 東京都世田谷区羽根木1－3－11
御殿場研究所 〒412-0039 静岡県御殿場市かまど1284
函南研究所 〒419-0101 静岡県田方郡函南町桑原三本松1308-125

目　次

頁

目　次 …… 1

要　約 …… 6

被験物質及び被験液の調製 …… 7
1. 被験物質及び溶媒 …… 7
1) 被験物質 …… 7
2) 溶媒 …… 7
3) 溶媒の選択理由 …… 7
2. 被験液の調製方法 …… 7
1) 予備試験用被験液の調製 …… 7
2) 本試験 1 回目用被験液の調製 …… 8
3) 本試験 2 回目用被験液の調製 …… 8
4) 被験液の保存条件 …… 8

試験材料及び試験方法 …… 8
1. 試験菌株 …… 8
1) 菌株の種類 …… 8
2) 菌株の選択理由 …… 8
3) 菌株の保存及び解凍 …… 8
4) 菌株の特性検査 …… 9
2. 対照物質 …… 9
1) 陰性対照物質 …… 9
2) 陽性対照物質 …… 9
3) 調製方法 …… 10
3. 試薬 …… 10
1) S9Mix の調製方法 …… 10
2) 最少グルコース寒天平板培地 …… 11
3) ニュートリエントブロス No.2 培養液 …… 11
4) 0.1 mol/L リン酸緩衝液（pH 7.4） …… 11
5) トップアガー …… 12
4. 試験方法 …… 13
1) 識別方法 …… 13
2) 前培養 …… 13
3) 本試験用量の設定 …… 13
4) プレート数 …… 14
5) 試験操作 …… 14

5. 判定基準 …… 14

試験結果及び考察 …… 15
1. 試験結果 …… 15
1) 培養終了後の観察結果 …… 15
2) 復帰突然変異コロニー数 …… 15
3) 試験系の成立条件 …… 15
2. 考察 …… 15

参考文献 …… 15

Tables

・別表 1　試験結果表(予備試験)
・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：-S9Mix *S. typhimurium* TA 株)
・図 2　用量反応曲線(本試験 1 回目：+S9Mix *S. typhimurium* TA 株)
・図 3　用量反応曲線(本試験 1 回目：-S9Mix WP2 *uvrA*)
・図 4　用量反応曲線(本試験 1 回目：+S9Mix WP2 *uvrA*)

要　約

1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸の遺伝子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* と略した)TA100、TA1535、TA98、TA1537 及び大腸菌 *Escherichia coli*（以下、*E. coli* と略した）WP2 *uvrA* を用いて復帰突然変異誘発試験を実施した。

試験は、1.22～5000 μg/plate の範囲の被験物質処理用量で予備試験を実施し、その結果より本試験用量を設定し、実施した。なお、試験は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。また、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。

1. 被験物質による沈殿及び着色

本被験物質による沈殿及び着色は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれも認められなかった。

2. 生育阻害

代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA98 及び TA1537 の 5000 μg/plate で菌の生育阻害が認められた。

3. 復帰突然変異コロニー数

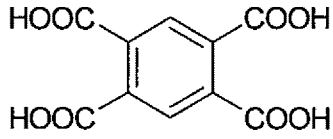
代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても、復帰突然変異コロニー数は陰性対照の 2 倍以上には増加せず、用量反応性も認められなかった。

以上の試験結果より、本試験条件下において、1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸は、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。

被験物質及び被験液の調製

1. 被験物質及び溶媒

1) 被験物質

名　　称	1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸 (1,2,4,5-Benzenetetracarboxylic Acid)
CAS 番号	89-05-4
構造式	
純　　度	99.9%
分子量	254.15
安定性	試験終了後の被験物質の純度を分析した結果、99.9%の純度を示し、試験期間中の安定性に問題がないことが確認された。
性　　状	白色粉末
融　　点	281～284.5℃
保存方法	室温・暗所に保存した。
取扱上の注意	吸い込んだり、眼、皮膚及び衣類に触れないよう保護具を着用した。
保存場所	東京研究所　被験物質調製保存室
廃棄方法	試験終了後の残量は焼却後、廃棄した。

2) 溶媒

名　　称	DMSO
製造元	和光純薬工業株式会社
ロット番号	LTH4791
規　　格	JIS 規格 試薬特級　99%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

3) 溶媒の選択理由

溶解性試験を実施した結果、本被験物質は水に 50mg/mL で溶解せず、DMSO に 50mg/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。

2. 被験液の調製方法

1) 予備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 217.5 mg 秤取し、これに 4.350 mL の DMSO を添加して溶解し、最高濃度の 50 mg/mL の被験液を調製した。次いで、50 mg/mL 被験液を公比 4 で順次 6 段階希釈し、12.5、3.13、0.781、0.195、0.0488 及び 0.0122 mg/mL の計 7 濃度の被験液を調製した。なお、被験液は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で用時調製した。

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366.4 mg秤取し、これに7.328 mLのDMSOを添加して溶解し、50 mg/mLの被験液を調製した。これを公比2で順次5段階希釈し、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、被験液は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で用時調製した。

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383.4 mg秤取し、これに7.668 mLのDMSOを添加して溶解し、50 mg/mLの被験液を調製した。これを公比2で順次5段階希釈し、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、被験液は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で用時調製した。

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。

試験材料及び試験方法

1. 試験菌株

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1997年10月9日に国立衛生試験所（現国立医薬品食品衛生研究所）変異遺伝部から株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所に分与され、2005年7月21日に株式会社ボゾリサーチセンター東京研究所に移管されたものである。

2) 菌株の選択理由

試験委託者からの依頼により選択した。また、当該菌株は変異原性物質に対する感受性が高く、細菌を用いる変異原性試験に最も一般的に使用され、毒性試験法ガイドラインで指定されている。

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 8.0 mLに対して、DMSO（和光純薬工業株式会社、JIS 規格試薬特級、ロット番号 SDK3621、SDG7463）を0.7 mLの割合で添加して、滅菌チューブに300 μLずつ分注し、-70℃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：-72～-81℃）。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
S. typhimurium TA98	2006 年 9 月 26 日
S. typhimurium TA100	2006 年 5 月 25 日
S. typhimurium TA1535	2006 年 5 月 25 日
S. typhimurium TA1537	2006 年 5 月 25 日
E. coli WP2 *uvrA*	2006 年 9 月 26 日

4) 菌株の特性検査

凍結保存した菌株について、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
S. typhimurium TA98	2006 年 9 月 26 日～2006 年 9 月 28 日
S. typhimurium TA100	2006 年 5 月 25 日～2006 年 5 月 27 日
S. typhimurium TA1535	2006 年 5 月 25 日～2006 年 5 月 27 日
S. typhimurium TA1537	2006 年 5 月 25 日～2006 年 5 月 27 日
E. coli WP2 *uvrA*	2006 年 9 月 26 日～2006 年 9 月 28 日

2. 対照物質

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。

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
2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF-2)	PKE1831	99.5%	室温、遮光
Sodium azide (SAZ)	SDL2565	99.8%	室温、遮光
2-Methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)-aminopropylamino]acridine・2HCl (ICR-191)	534652		室温、遮光
2-Aminoanthracene (2AA)	KLH1059	96.6%	室温、遮光
Benzo[*a*]pyrene (B[*a*]P)	KLG2702	101.0%	冷蔵、遮光

保存場所： 東京研究所 微生物試験室の室温保存庫

製 造 元： AF-2、SAZ、B[*a*]P 及び 2AA：和光純薬工業株式会社

ICR-191：Polysciences, Inc.

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 LTP5665）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 K5D75）に溶解し、1.0 mL ずつ小分け分注して-20℃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	調製濃度 (μg/mL)	陽性対照物質	調製濃度 (μg/mL)
S. typhimurium TA100	AF-2	0.1 (0.01)	B[*a*]P	50 (5.0)
S. typhimurium TA1535	SAZ	5 (0.5)	2AA	20 (2.0)
E. coli WP2 *uvrA*	AF-2	0.1 (0.01)	2AA	100(10.0)
S. typhimurium TA98	AF-2	1 (0.1)	B[*a*]P	50 (5.0)
S. typhimurium 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（μg/plate）を示す。

3. 試薬

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、完全に溶解した後フィルター（Nalge Nunc Int. 0.45μM : Lot No.579748）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	オリエンタル酵母工業株式会社
ロット番号	06080405
製 造 日	2006 年 8 月 4 日
購 入 日	2006 年 9 月 20 日
種・系統	ラット・SD 系
週齢・性	7 週齢・雄
体　　重	214.8±11.3g
誘導物質	フェノバルビタール(PB)& 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）
保存温度	保存期間中の実測温度：-75～-81℃

(2) コファクター

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	999603
製 造 日	2006年6月7日
購 入 日	2006年11月8日
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）
保存温度	保存期間中の実測温度：1～8℃

(3) S9Mixの組成（1mL中）

水	0.9	mL
S9	0.1	mL
$MgCl_2$	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

2) 最少グルコース寒天平板培地

(1)

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	DZL79F01
製 造 日	2006年9月15日
購 入 日	2006年9月27日
保存方法	常温保存
保存場所	東京研究所　変異原性試験室

(2) 使用寒天

名　　称	OXOID　AGAR No.1
製 造 元	OXOID LTD.
ロット番号	911885-02

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2.5wt%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℃、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	349915
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

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に調製し、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℃、20分)を行った。調製後は使用時まで冷蔵で保存した。

(1) 名　　称　　リン酸二水素ナトリウム二水和物 ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$)
製 造 元　　和光純薬工業株式会社
ロット番号　　SDM1133
保 存 方 法　　室温保存
保 存 場 所　　東京研究所　微生物試験室

(2) 名　　称　　リン酸水素二ナトリウム (Na_2HPO_4)
製 造 元　　和光純薬工業株式会社
ロット番号　　EWM2400
保 存 方 法　　室温保存
保 存 場 所　　東京研究所　微生物試験室

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 % Agar, 0.6 % NaCl）をオートクレーブにより滅菌（121℃、20 分処理）した後、*S. typhimurium* TA 株では 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 容量となるように加え、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℃の恒温槽で保温した。

(1) 名　　称　　Bacto Agar
製 造 元　　Becton, Dickinson and Company
ロット番号　　5118380
保 存 方 法　　室温保存
保 存 場 所　　東京研究所　微生物試験室

(2) 名　　称　　NaCl
製 造 元　　和光純薬工業株式会社
ロット番号　　8423
保 存 方 法　　室温保存
保 存 場 所　　東京研究所　微生物試験室

(3) 名　　称　　*D*-ビオチン ((+)-Biotin、Vitamin H)
製 造 元　　ICN Biomedicals, Inc.
ロット番号　　3559H
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) 名　　称　　*L*-ヒスチジン塩酸塩一水和物
(*L*-Histidine Hydrochloride Monohydrate)
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) 名　　称　　*L*-トリプトファン(*L*-Tryptophan)
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

4. 試験方法

1) 識別方法

(1) 菌株の識別

以下に示す色のマーカーで識別した。

S. typhimurium TA100	青
S. typhimurium TA1535	桃
E. coli WP2 *uvrA*	茶
S. typhimurium TA98	赤
S. typhimurium TA1537	緑

(2) 濃度の識別

代謝活性化しない場合は「－」、代謝活性化する場合は「＋」とし、これに続けて陰性対照(Solvent Control)を「SC」、陽性対照(Positive Control)を「PC」、被験物質処理群を濃度の低い方から「1」、「2」、「3」･･･の番号を各菌の色のマーカーで記載し、識別した。

2) 前培養

(1) ニュートリエントブロス No.2 培養液 10mL を入れた滅菌済み L 字型試験管に凍結保存菌株を解凍した菌懸濁液を *S. typhimurium* TA 株は各 20 μL、*E. coli* 株は 10 μL 植菌した。なお、使用後の菌懸濁液は廃棄した。

(2) これを振盪恒温槽（COOL BATH SHAKER ML-10 PU-6 接続型、タイテック株式会社）にセットし、プログラム制御により前培養開始まで 4℃水浴中で放置(6 時間 30 分)した後、37℃に上昇後 9 時間前培養した。

(3) 前培養終了時に菌懸濁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）で測定した。なお、菌懸濁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(cells/mL)		
	予備試験	本試験 1 回目	本試験 2 回目
S. typhimurium TA100	5.31×10^9	5.85×10^9	6.02×10^9
S. typhimurium TA1535	4.78×10^9	4.86×10^9	4.86×10^9
E. coli WP2 *uvrA*	7.04×10^9	6.95×10^9	6.95×10^9
S. typhimurium TA98	4.93×10^9	5.16×10^9	5.25×10^9
S. typhimurium TA1537	4.18×10^9	4.26×10^9	4.22×10^9

3) 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 6 段階希釈した 7 用量（1.22, 4.88, 19.5, 78.1, 313, 1250, 5000 μg/plate）を用い、予備試験を実施した。なお、予備試験の結果を別表 1 に示した。

予備試験の結果、本被験物質処理による生育阻害は、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA98 及び TA1537 の 5000 μg/plate で認められた。また、本被験物質による沈殿及び着色は代謝活性化の有無にかかわらず認められなかった。

このため本試験の試験用量は、代謝活性化しない場合のすべての菌株及び代謝活性化する場合の *E. coli* WP2 *uvrA* については、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 用量とした。また、代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA 株については、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。

4) プレート数

被験物質処理群、陰性対照及び陽性対照処理群について予備試験ではそれぞれ 2 枚、本試験ではそれぞれ 3 枚のプレートを用いた。

5) 試験操作

(1) 滅菌した小試験管に調製した被験液、溶媒又は陽性対照溶液を 0.1mL 入れ、これに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、それぞれの小試験管に各菌懸濁液 0.1 mL を加えた。

(2) 小試験管を攪拌後すぐに 37℃で 20 分間振盪しながらプレインキュベーションし、これに 45℃に維持されているトップアガーを 2.0 mL 加え攪拌後、最少グルコース寒天平板培地に均一に重層した。
無菌試験として、調製した最高用量の被験液 0.1mL 及び調製した S9Mix 0.5mL をそれぞれ小試験管に取り、これにトップアガーを 2.0mL 加えた後に最少グルコース寒天平板培地に均一に重層した。なお、これらの一連の操作は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で実施した。

(3) 最少グルコース寒天平板培地に重層したトップアガーが固化したことを確認し、最少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℃で約 50 時間（予備試験：50.6 時間、本試験 1 回目：49.7 時間、本試験 2 回目：50.5 時間）培養した。

(4) 培養後、寒天培地上の被験物質による沈殿及び着色を確認した結果、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沈殿は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-11DSystems、システムサイエンス株式会社）を用いて計数（面積補正、補正値：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。

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 倍以上に増加し、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。

試験結果及び考察

1. 試験結果

試験の結果を別表 1～3 及び図 1～4 に示した。なお、図は別表 2 より作成した。

1) 培養終了後の観察結果

本被験物質による沈殿は、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。また、被験物質による着色も認められなかった。なお、生育阻害の有無について実体顕微鏡を用いて観察した結果、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA98 及び TA1537 の 5000 μg/plate で菌の生育阻害が認められた。

2) 復帰突然変異コロニー数

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、陰性対照群と比較して 2 倍以上には増加せず、用量反応性も認められなかった。

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が背景データの管理限界（平均値±3SD）内であり、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。

2. 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、塩基対置換型，フレームシフト型のいずれの菌株においても、本被験物質処理による復帰変異コロニー数は、いずれの試験用量においても陰性対照と比較して 2 倍以上には増加せず、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代謝活性化の有無にかかわらず、1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸は、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。

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 *Eschericha 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（予備試験）

被験物質の名称：1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸　　No. T-0027

試験実施期間		平成18年11月27日 より 平成18年11月30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	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
S9Mix（−）	陰性対照（DMSO）	87 109 (98)	9 12 (11)	13 22 (18)	31 30 (31)	8 16 (12)
	1.22	88 94 (91)	17 19 (18)	20 17 (19)	25 14 (20)	10 6 (8)
	4.88	110 105 (108)	11 8 (10)	16 18 (17)	16 21 (19)	5 9 (7)
	19.5	126 102 (114)	10 10 (10)	22 13 (18)	21 36 (29)	7 13 (10)
	78.1	101 114 (108)	16 10 (13)	11 11 (11)	21 30 (26)	5 11 (8)
	313	114 106 (110)	8 8 (8)	14 13 (14)	19 22 (21)	13 6 (10)
	1250	117 103 (110)	14 13 (14)	13 21 (17)	25 38 (32)	5 8 (7)
	5000	108 111 (110)	13 7 (10)	13 16 (15)	34 28 (31)	7 9 (8)
S9Mix（＋）	陰性対照（DMSO）	117 111 (114)	10 14 (12)	15 17 (16)	48 30 (39)	10 16 (13)
	1.22	123 121 (122)	12 7 (10)	16 17 (17)	57 36 (47)	12 19 (16)
	4.88	125 132 (129)	14 12 (13)	22 18 (20)	49 34 (42)	15 13 (14)
	19.5	90 114 (102)	18 18 (18)	16 20 (18)	29 42 (36)	11 16 (14)
	78.1	118 119 (119)	8 8 (8)	25 15 (20)	39 54 (47)	10 17 (14)
	313	122 135 (129)	12 8 (10)	11 18 (15)	59 30 (45)	22 8 (15)
	1250	110 122 (116)	12 9 (11)	16 20 (18)	42 41 (42)	13 12 (13)
	5000	123 * 116 * (120)	13 * 10 * (12)	20 22 (21)	53 * 48 * (51)	13 * 12 * (13)
陽性対照 S9Mixを必要としないもの	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	583 557 (570)	348 368 (358)	73 87 (80)	555 477 (516)	1863 1661 (1762)
陽性対照 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	5.0	5.0
	コロニー数/プレート	1271 1344 (1308)	311 380 (346)	895 847 (871)	413 416 (415)	119 111 (115)

(備考)

AF-2　：2-(2-ﾌﾘﾙ)-3-(5-ﾆﾄﾛ-2-ﾌﾘﾙ)ｱｸﾘﾙｱﾐﾄﾞ
SAZ　：ｱｼﾞ化ﾅﾄﾘｳﾑ
ICR-191　：2-ﾒﾄｷｼ-6-ｸﾛﾛ-9-[3-(2-ｸﾛﾛｴﾁﾙ)ｱﾐﾉﾌﾟﾛﾋﾟﾙｱﾐﾉ]ｱｸﾘｼﾞﾝ･2HCl
2AA　：2-ｱﾐﾉｱﾝﾄﾗｾﾝ
B[*a*]P　：ﾍﾞﾝｿﾞ[*a*]ﾋﾟﾚﾝ

＊：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：1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸　　No. T-0027

試験実施期間		平成18年12月4日 より 平成18年12月7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	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
S9Mix（−）	陰性対照（DMSO）	136 116 106 (119 ± 15.3)	8 16 11 (12 ± 4.0)	16 22 16 (18 ± 3.5)	21 22 18 (20 ± 2.1)	7 6 7 (7 ± 0.6)
	313	117 129 123 (123 ± 6.0)	12 16 9 (12 ± 3.5)	13 18 10 (14 ± 4.0)	22 17 22 (20 ± 2.9)	9 16 5 (10 ± 5.6)
	625	114 96 113 (108 ± 10.1)	14 16 11 (14 ± 2.5)	22 18 18 (19 ± 2.3)	22 17 26 (22 ± 4.5)	5 10 6 (7 ± 2.6)
	1250	129 105 118 (117 ± 12.0)	12 7 8 (9 ± 2.6)	13 15 17 (15 ± 2.0)	18 21 24 (21 ± 3.0)	4 10 9 (8 ± 3.2)
	2500	118 137 173 (143 ± 27.9)	14 18 16 (16 ± 2.0)	13 15 22 (17 ± 4.7)	24 23 31 (26 ± 4.4)	4 3 7 (5 ± 2.1)
	5000	125 131 120 (125 ± 5.5)	15 17 13 (15 ± 2.0)	13 26 21 (20 ± 6.6)	24 28 28 (27 ± 2.3)	8 10 12 (10 ± 2.0)
S9Mix（＋）	陰性対照（DMSO）	148 124 133 (135 ± 12.1)	11 7 15 (11 ± 4.0)	21 11 20 (17 ± 5.5)	38 30 38 (35 ± 4.6)	16 23 15 (18 ± 4.4)
	156	110 123 122 (118 ± 7.2)	13 9 8 (10 ± 2.6)	NT	34 39 38 (37 ± 2.6)	15 15 16 (15 ± 0.6)
	313	145 142 159 (149 ± 9.1)	18 14 9 (14 ± 4.5)	19 23 18 (20 ± 2.6)	36 44 32 (37 ± 6.1)	11 11 12 (11 ± 0.6)
	625	149 145 140 (145 ± 4.5)	11 7 8 (9 ± 2.1)	24 27 16 (22 ± 5.7)	31 31 32 (31 ± 0.6)	14 12 11 (12 ± 1.5)
	1250	123 141 138 (134 ± 9.6)	17 16 5 (13 ± 6.7)	22 18 13 (18 ± 4.5)	42 36 33 (37 ± 4.6)	19 16 8 (14 ± 5.7)
	2500	159 126 140 (142 ± 16.6)	5 20 10 (12 ± 7.6)	25 21 18 (21 ± 3.5)	36 41 36 (38 ± 2.9)	13 10 8 (10 ± 2.5)
	5000	159 * 136 * 129 * (141 ± 15.7)	11 * 18 * 13 * (14 ± 3.6)	16 27 22 (22 ± 5.5)	38 * 36 * 45 * (40 ± 4.7)	10 * 8 * 16 * (11 ± 4.2)
陽性対照 S9Mixを必要としないもの	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	638 690 649 (659 ± 27.4)	371 362 328 (354 ± 22.7)	103 90 84 (92 ± 9.7)	560 567 592 (573 ± 16.8)	1676 1723 1675 (1691 ± 27.4)
陽性対照 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	5.0	5.0
	コロニー数/プレート	1139 1198 1221 (1186 ± 42.3)	360 381 370 (370 ± 10.5)	862 975 919 (919 ± 56.5)	354 398 350 (367 ± 26.6)	117 103 80 (100 ± 18.7)

（備考）

AF-2　：2-(2-ﾌﾘﾙ)-3-(5-ﾆﾄﾛ-2-ﾌﾘﾙ)ｱｸﾘﾙｱﾐﾄﾞ
SAZ　：ｱｼﾞ化ﾅﾄﾘｳﾑ
ICR-191　：2-ﾒﾄｷｼ-6-ｸﾛﾛ-9-[3-(2-ｸﾛﾛｴﾁﾙ)ｱﾐﾉﾌﾟﾛﾋﾟﾙｱﾐﾉ]ｱｸﾘｼﾞﾝ･2HCl
2AA　：2-ｱﾐﾉｱﾝﾄﾗｾﾝ
B[*a*]P　：ﾍﾞﾝｿﾞ[*a*]ﾋﾟﾚﾝ

＊：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:1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸　　No. T-0027

試験実施期間			平成18年12月12日 より 平成18年12月15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	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
S9Mix（−）	陰性対照（DMSO）		71	15	34	21	8
			76	13	33	20	9
			92 (80 ± 11.0)	15 (14 ± 1.2)	33 (33 ± 0.6)	13 (18 ± 4.4)	10 (9 ± 1.0)
	313		114	8	28	25	4
			88	19	28	11	7
			94 (99 ± 13.6)	7 (11 ± 6.7)	24 (27 ± 2.3)	20 (19 ± 7.1)	8 (6 ± 2.1)
	625		99	11	36	21	9
			104	19	36	15	7
			112 (105 ± 6.6)	5 (12 ± 7.0)	34 (35 ± 1.2)	22 (19 ± 3.8)	8 (8 ± 1.0)
	1250		106	11	34	11	10
			94	8	22	15	8
			104 (101 ± 6.4)	21 (13 ± 6.8)	22 (26 ± 6.9)	19 (15 ± 4.0)	6 (8 ± 2.0)
	2500		89	12	27	15	11
			90	12	27	15	16
			97 (92 ± 4.4)	11 (12 ± 0.6)	28 (27 ± 0.6)	14 (15 ± 0.6)	7 (11 ± 4.5)
	5000		77	10	38	30	9
			73	13	36	26	8
			100 (83 ± 14.6)	16 (13 ± 3.0)	42 (39 ± 3.1)	20 (25 ± 5.0)	8 (8 ± 0.6)
S9Mix（＋）	陰性対照（DMSO）		111	13	32	25	5
			119	8	36	36	7
			130 (120 ± 9.5)	11 (11 ± 2.5)	24 (31 ± 6.1)	34 (32 ± 5.9)	12 (8 ± 3.6)
	156		118	13		28	7
			139	18		39	9
			93 (117 ± 23.0)	10 (14 ± 4.0)	NT	36 (34 ± 5.7)	5 (7 ± 2.0)
	313		109	9	22	36	11
			111	18	39	22	7
			122 (114 ± 7.0)	16 (14 ± 4.7)	33 (31 ± 8.6)	39 (32 ± 9.1)	10 (9 ± 2.1)
	625		123	8	25	30	10
			123	14	25	34	8
			124 (123 ± 0.6)	13 (12 ± 3.2)	47 (32 ± 12.7)	42 (35 ± 6.1)	10 (9 ± 1.2)
	1250		129	13	32	24	13
			120	7	28	33	7
			109 (119 ± 10.0)	18 (13 ± 5.5)	24 (28 ± 4.0)	30 (29 ± 4.6)	11 (10 ± 3.1)
	2500		146	19	26	37	9
			139	10	35	30	8
			115 (133 ± 16.3)	10 (13 ± 5.2)	33 (31 ± 4.7)	36 (34 ± 3.8)	14 (10 ± 3.2)
	5000		100 *	10 *	25	31 *	6 *
			117 *	11 *	33	33 *	8 *
			111 * (109 ± 8.6)	15 * (12 ± 2.6)	18 (25 ± 7.5)	36 * (33 ± 2.5)	7 * (7 ± 1.0)
陽性対照	S9Mixを必要としないもの	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	546	364	98	472	1575
			576	370	106	423	1520
			511 (544 ± 32.5)	379 (371 ± 7.5)	89 (98 ± 8.5)	436 (444 ± 25.4)	1355 (1483 ± 114.5)
	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	5.0	5.0
		コロニー数/プレート	1130	418	889	347	115
			1304	329	838	327	113
			1114 (1183 ± 105.4)	369 (372 ± 44.6)	843 (857 ± 28.1)	406 (360 ± 41.1)	128 (119 ± 8.1)

（備考）

AF-2　：2-(2-ﾌﾘﾙ)-3-(5-ﾆﾄﾛ-2-ﾌﾘﾙ)ｱｸﾘﾙｱﾐﾄﾞ
SAZ　：ｱｼﾞ化ﾅﾄﾘｳﾑ
ICR-191　：2-ﾒﾄｷｼ-6-ｸﾛﾛ-9-[3-(2-ｸﾛﾛｴﾁﾙ)ｱﾐﾉﾌﾟﾛﾋﾟﾙｱﾐﾉ]ｱｸﾘｼﾞﾝ･2HCl
2AA　：2-ｱﾐﾉｱﾝﾄﾗｾﾝ
B[*a*]P　：ﾍﾞﾝｿﾞ[*a*]ﾋﾟﾚﾝ

＊：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

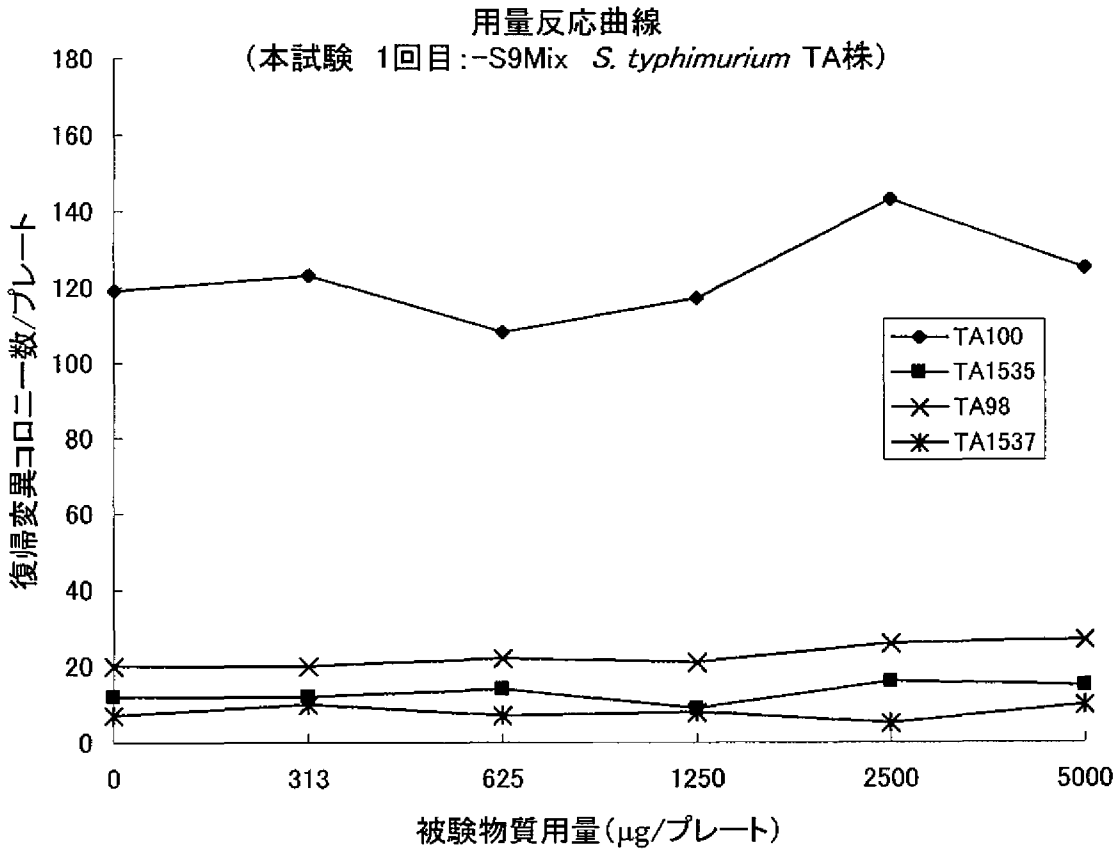

用量反応曲線
（本試験　1回目：−S9Mix　S. typhimurium TA株）
復帰変異コロニー数/プレート
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
313
625
1250
2500
5000
被験物質用量（μg/プレート）
TA100
TA1535
TA98
TA1537

図 2

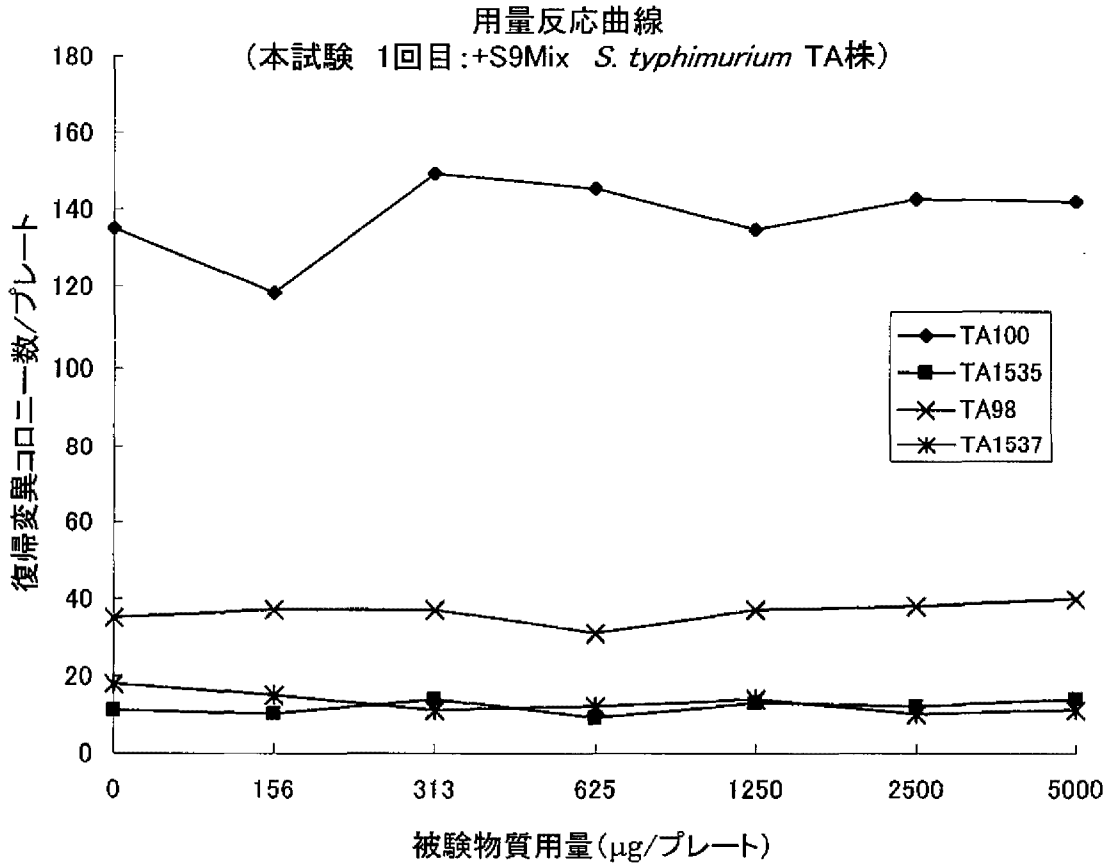

用量反応曲線
（本試験　1回目：+S9Mix　S. typhimurium TA株）
復帰変異コロニー数/プレート
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
156
313
625
1250
2500
5000
被験物質用量（μg/プレート）
TA100
TA1535
TA98
TA1537

図 3

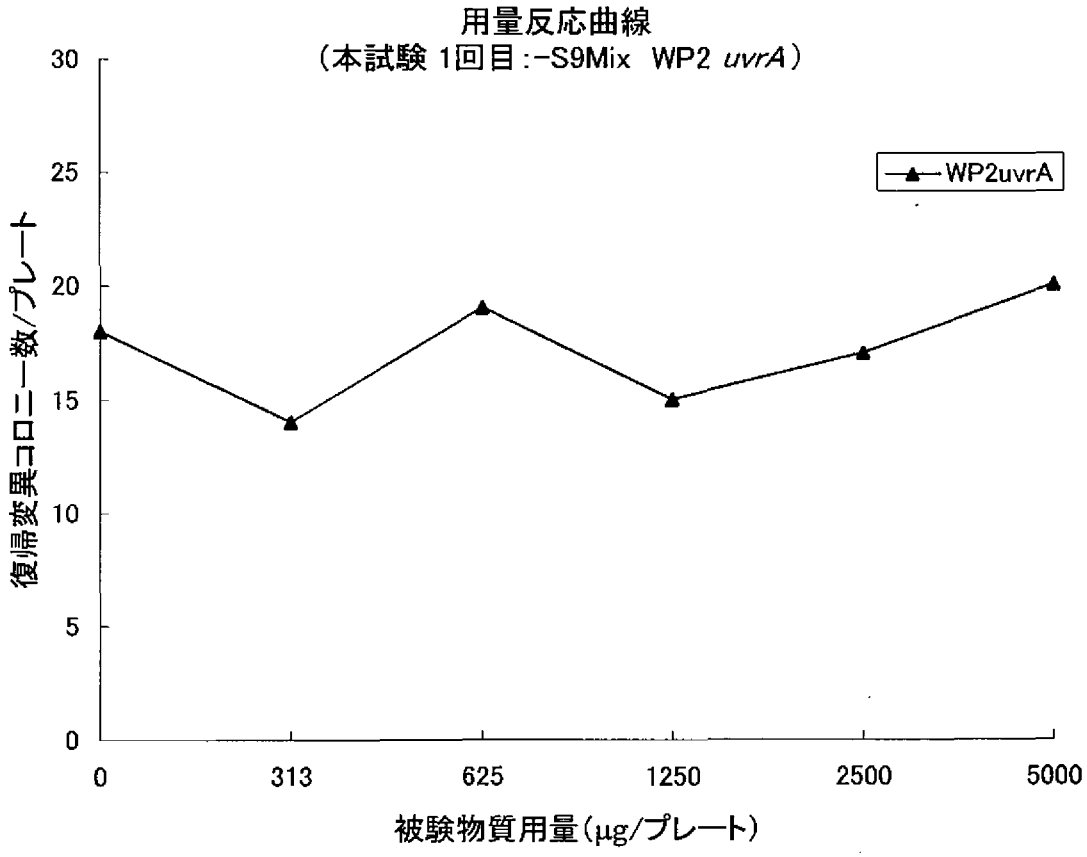
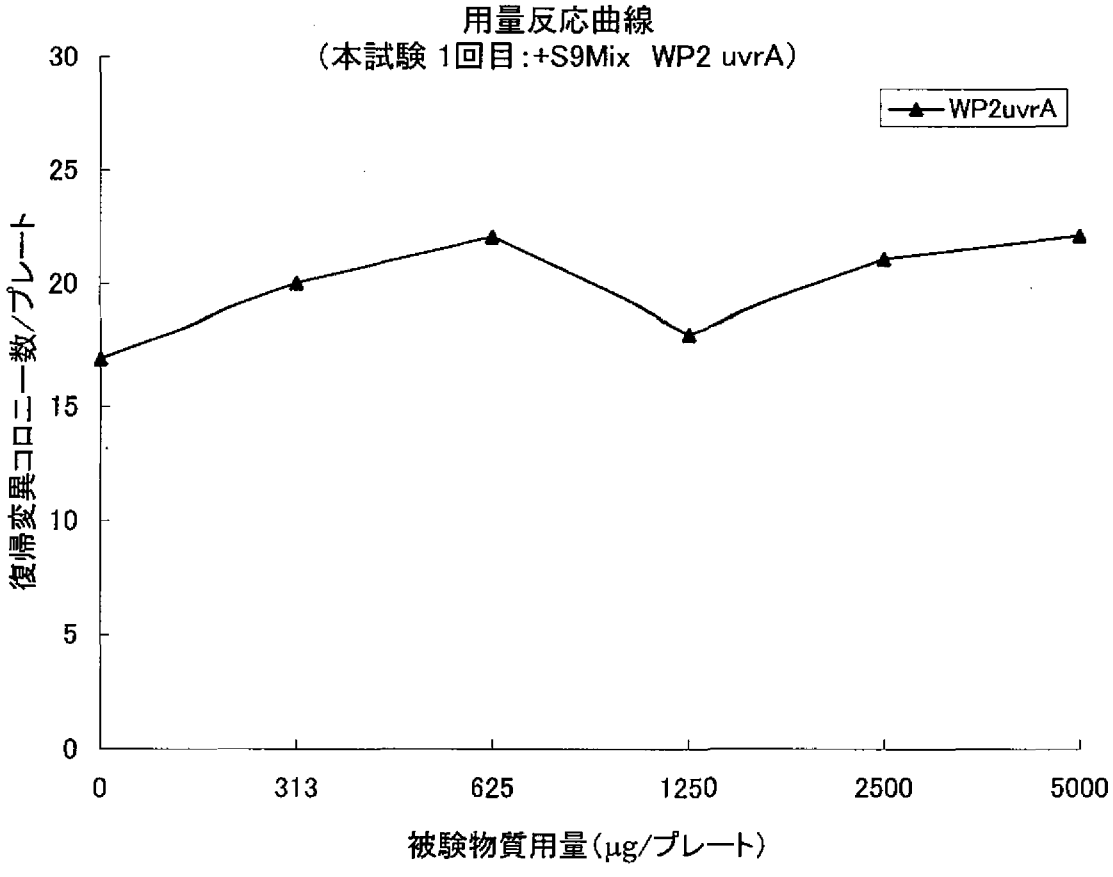

用量反応曲線
（本試験 1回目:−S9Mix WP2 uvrA）
WP2uvrA
復帰変異コロニー数/プレート
30
25
20
15
10
5
0
0
313
625
1250
2500
5000
被験物質用量（μg/プレート）

図 4


用量反応曲線
（本試験 1回目:+S9Mix WP2 uvrA）
WP2uvrA
復帰変異コロニー数/プレート
30
25
20
15
10
5
0
0
313
625
1250
2500
5000
被験物質用量（μg/プレート）