

最終報告書

4-エチルモルホリンの細菌を用いる復帰突然変異試験
(試験番号：01-289)

財団法人 畜産生物科学安全研究所

目 次

要約	1 頁
試験目的	2
材料および方法	2
1. 被験物質	2
2. 指標菌株	3
3. 指標菌株の検査	3
4. 指標菌株の保存と前培養	3
5. S9 mix	4
6. 被験物質の供試液の調製	5
7. 陰性対照および陽性対照	5
8. アミノ酸添加軟寒天培地の調製	5
9. 用量設定試験(予備試験)	6
10. 本試験	6
1) 用量設定	6
2) 実験方法	6
(1) プレインキューベーション法 (直接法)	6
(2) プレインキューベーション法 (代謝活性化法)	7
11. 無菌試験	7
12. 試験の有効性	7
13. 結果の判定	8
結果	8
結論および参考事項	8
参考文献	9

表：

表 1-1 S9 mix 非存在下における 4-エチルモルホリン の用量設定試験結果 [直接法]	11
表 1-2 S9 mix 存在下における 4-エチルモルホリン の用量設定試験結果 [代謝活性化法]	12

表 2-1	S9 mix 非存在下における 4-エチルモルホリン の復帰突然変異試験結果 [本試験 1 回目-直接法]	13
表 2-2	S9 mix 存在下における 4-エチルモルホリン の復帰突然変異試験結果 [本試験 1 回目-代謝活性化法]	14
表 3-1	S9 mix 非存在下における 4-エチルモルホリン の復帰突然変異試験結果 [本試験 2 回目-直接法]	15
表 3-2	S9 mix 存在下における 4-エチルモルホリン の復帰突然変異試験結果 [本試験 2 回目-代謝活性化法]	16
図 :		
図 1	4-エチルモルホリン復帰突然変異試験結果-本試験 1 回目	17
図 2	4-エチルモルホリン復帰突然変異試験結果-本試験 2 回目	20

要約

4-エチルモルホリンの遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため、復帰突然変異試験を指標菌株として *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2uvrA を用い、S9 mix 非存在 (直接法) および存在 (代謝活性化法) 下でプレインキュベーション法により行った。

用量は、用量設定試験 (予備試験) の結果、5000 μ g/プレートまでの用量で代謝活性化の有無にかかわらず、すべての菌株において生育阻害が認められなかったため、313~5000 μ g/プレートの範囲 (公比2) で5用量を設定した。

試験は2回実施した。その結果、全ての菌株において代謝活性化の有無にかかわらず、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。菌の生育阻害については、代謝活性化の有無にかかわらず、全ての菌株において認められなかった。

以上の成績から、本実験条件下では、4-エチルモルホリンの細菌に対する遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

試験目的

この試験は、4-エチルモルホリンの細菌に対する遺伝子突然変異誘発性の有無を明らかにするために実施した。

材料および方法^{1, 2)}

1. 被験物質

名 称 : 4-エチルモルホリン
別 名 : N-エチルモルホリン, エチルモルホリン, NEM
CAS番号 : 100-74-3
ロット番号 :
純 度 : 99.84%〔平成14年2月22日, において分
析(3級アミン価:指示薬法)〕

入 手 先 :

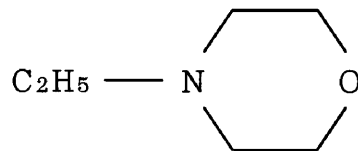
入 手 日 : 平成14年4月23日

入 手 量 : 250 g

物 性 等 :

化学名 4-エチルモルホリン (4-Ethyl Morpholine)

構造式



分子式 $C_6H_{13}NO$

分子量 115.18

性状(常温) アンモニア臭を有する無色の液体

沸点 $138.3^{\circ}C$ (760 mmHg)

蒸気圧 6 mmHg ($20^{\circ}C$)

揮発性 無

凝固点 $-70^{\circ}C >$

比重 0.914 ($20/20^{\circ}C$)

初留点 133°C
引火点 33°C
溶解性 水に易溶
安定性 : 安定 [実験終了後, (財)畜産生物科学安全研究所において保管した
残余被験物質を において分析(平成 15 年 3 月
7 日, 3 級アミン価: 指示薬法) した結果, 純度は 98.54% で, 実
験期間中被験物質は安定であったことを確認した。]
保管条件 : 冷暗所 (4°C), 密栓

2. 指標菌株

指標菌株は, 国立公衆衛生院より入手 (平成 6 年 12 月 19 日) した以下の 5 種類を用いた。

(塩基対置換型)

Salmonella typhimurium TA100, TA1535

Escherichia coli WP2uvrA

(フレームシフト型)

Salmonella typhimurium TA98, TA1537

3. 指標菌株の検査

次に示す指標菌株の遺伝的特性およびその他の諸性質に関する項目について検査し, 本来の特性を有することを確認した。

- (1) *S. typhimurium* におけるヒスチジンおよびピオチン要求性
E. coli におけるトリプトファン要求性
- (2) 紫外線感受性 (*uvrA*, *uvrB*)
- (3) *S. typhimurium* におけるクリスタルバイオレット感受性 (*rfa*)
- (4) *S. typhimurium* TA100 および TA98 におけるアンピシリン耐性(pKM101)
- (5) 自然突然変異体数
- (6) 陽性対照物質に対する反応性

4. 指標菌株の保存と前培養

菌液 0.8 mL にジメチルスルホキシド (DMSO, 和光純薬工業株式会社, ロット番

号 TPK7807, 99.9%) を 0.07 mL の割合で加えて -80°C 以下で保存した。この保存菌株の 25 μ L をニュートリエントブロス (Bacto nutrient broth dehydrated, Difco Laboratories, ロット番号 44077JK) 液体培地 15mL に接種し, 37°C で 12 時間振盪培養した。培養後の懸濁菌液については, 分光光度計で吸光度 (OD_{660nm}) を測定し, 濁度と生菌数の換算式により 1 mL あたり 1×10^9 以上の生菌数が得られていることを確認した。

生菌数 ($\times 10^9$ /mL)

指標菌株	TA100	TA1535	WP2 _{uvrA}	TA98	TA1537
用量設定試験	1.58	1.81	1.38	1.48	1.17
本試験(1回目)	1.54	1.72	1.38	1.33	1.14
本試験(2回目)	1.46	1.67	1.34	1.33	1.14

5. S9 mix

代謝活性化法に用いた S9 mix は, ラット肝臓のホモジネートの薬物代謝酵素分画 (S9) にコファクターを加えて凍結された市販品をキッコーマン株式会社から購入し, 使用した (ロット番号 FSM-474・2002 年 11 月 21 日製造・2002 年 12 月 12 日購入)。凍結 S9 mix は -80°C 以下で保存し, 使用時に冷水中で解凍して用いた。使用した S9 の製造法および S9 mix の 1 mL あたりの組成は, 次のとおりである。

S9 製造法

A. 使用動物

- a) 種・系統: Sprague-Dawley 系ラット (日本エスエルシー株式会社)
- b) 性・週齢: 雄・7 週齢
- c) 体重: 201~239 g

B. 誘導法

- a) 誘導物質: phenobarbital (PB), 5, 6-benzoflavone (BF)
- b) 投与経路: 腹腔内投与
- c) 投与方法 (投与開始日起算)
 - 1 日目 - PB 30 mg/kg, 2, 3, 4 日目 - PB 60 mg/kg
 - 3 日目 - BF 80 mg/kg

C. 調製法

最終投与の翌日に肝臓ホモジネートを遠心分離(9000 \times g)し, その上清を採取

S9 mix 1 mL 当たりの組成

MgCl ₂	8	μmol
KCl	33	μmol
G·6·P	5	μmol
NADH	4	μmol
NADPH	4	μmol
リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4)	100	μmol
S9	0.1	mL

6. 被験物質の供試液の調製

被験物質は水に易溶であるため、溶媒には蒸留水（株式会社大塚製薬工場，ロット番号 K0G81，局方）を用いた。被験物質の供試液の調製は、実験の直前に行った。溶媒を用いて最高用量の供試液（原液）を調製し、ついで、この原液を溶媒で順次希釈して所定の用量の被験物質供試液を作製した。

7. 陰性対照および陽性対照

陰性対照（溶媒対照）には、被験物質用の溶媒である DMSO を用いた。陽性対照としては、以下の既知変異原物質を用いた。

AF-2 および 2-AA は DMSO（和光純薬工業株式会社，ロット番号 DWH7397，TCQ7669，100%）に，SA および 9-AA は蒸留水（株式会社大塚製薬工場，ロット番号 K0G81，局方）に溶解した。

指標菌株	直接法 (μg/プレート)	代謝活性化法 (μg/プレート)
TA100	AF-2 (0.01)	2-AA (1)
TA1535	SA (0.5)	2-AA (2)
WP2uvrA	AF-2 (0.04)	2-AA (10)
TA98	AF-2 (0.1)	2-AA (1)
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 (和光純薬工業株式会社，98%，ロット番号 PTQ1296)

2-AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬工業株式会社，>90%，ロット番号 KCM2259)

SA : アジ化ナトリウム (和光純薬工業株式会社，90%，ロット番号 KCG5232)

9-AA : 9-アミノアクリジン (Aldrich Chemical Company，98%，ロット番号 07721MZ)

8. アミノ酸添加軟寒天培地の調製

0.6w/v% 粉末寒天 (Difco Laboratories，ロット番号 132695XA) および 0.5w/v%

塩化ナトリウム（和光純薬工業株式会社，ロット番号 7001）の組成の軟寒天を調製した。溶解した軟寒天に，*S. typhimurium* 用には 0.5 mM D-ビオチン（Sigma Chemical Company，ロット番号 39H0679）および 0.5 mM L-ヒスチジン（和光純薬工業株式会社，ロット番号 DLJ5479）水溶液，*E. coli* 用には 0.5 mM L-トリプトファン（和光純薬工業株式会社，ロット番号 KCK3898）水溶液を 1/10 容加え，アミノ酸添加軟寒天培地とした。

9. 用量設定試験（予備試験）

本試験における被験物質の適切な用量を把握するために，20～5000 μg /プレート の範囲で用量を設定し，本試験と同様の実験方法で試験を行った。試験は各用量 1 枚のプレートで行った。

その結果（表 1-1，1-2），いずれの菌株とも代謝活性化の有無にかかわらず，菌の生育阻害は認められなかった。

10. 本試験

本試験は，同一菌株，同一用量で 2 回行った。

1) 用量設定

用量設定試験の結果から，被験物質の用量は 5000 μg /プレートを最高用量とし，以下公比 2 で 2500，1250，625 および 313 μg /プレートの計 5 用量とした。

2) 実験方法

(1) プレインキュベーション法（直接法）

滅菌小試験管に被験物質の供試液 0.1 mL，0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.4）0.5 mL（和光純薬工業株式会社，リン酸水素二ナトリウム・十二水塩：ロット番号 CAH3075，リン酸二水素ナトリウム・二水塩：ロット番号 CAJ2723）および前培養した懸濁菌液 0.1 mL を分注し，37°C で 20 分間振盪培養後，45°C に保温したアミノ酸添加軟寒天培地 2 mL を加え，最少グルコース寒天平板培地上に広げた。最少グルコース寒天平板培地（プレート）（テスメディア AN 培地，オリエンタル酵母工業株式会社，ロット番号 ANI800KR・2002 年 11 月 26 日製造・2002 年 12 月 12 日購入）は，Vogel-Bonner E 培地（0.2w/v%クエン酸・一水塩，1w/v%リン酸二カリウム，0.192w/v%リン酸一アンモニウム，0.066w/v%水酸化

ナトリウム、0.02w/v%硫酸マグネシウム・七水塩)に寒天粉末を1.5w/v%およびグルコースを2w/v%となるように加え、30 mLずつ分注したものである。37°Cで48時間培養後、復帰変異コロニーを計数し、同時に指標菌株の生育阻害の有無を実体顕微鏡を用いて観察した。陰性対照および陽性対照群においては、上記の被験物質の供試液0.1 mLにかわり、溶媒(蒸留水)および陽性対照物質溶液0.1 mLを用いて同様に実施した。試験は各用量3枚のプレートで行った。

(2) プレインキュベーション法(代謝活性化法)

滅菌小試験管に被験物質の供試液0.1 mL, S9 mix 0.5 mLおよび前培養した懸濁菌液0.1 mLを分注し、37°Cで20分間振盪培養後、45°Cに保温したアミノ酸添加軟寒天培地2 mLを加え、最少グルコース寒天平板培地上に広げた。37°Cで48時間培養後、復帰変異コロニーを計数し、同時に指標菌株の生育阻害の有無を実体顕微鏡を用いて観察した。陰性対照および陽性対照群においては、上記の被験物質の供試液0.1 mLにかわり、溶媒(蒸留水)および陽性対照物質溶液0.1 mLを用いて同様に実施した。試験は各用量3枚のプレートで行った。

11. 無菌試験

用量設定試験および本試験において、用いた溶媒, S9 mix および最高用量の被験物質の供試液について、それぞれ0.1 mLに0.6w/v%軟寒天培地2 mLを加え、最少グルコース寒天平板培地(テスメディア AN 培地, オリエンタル酵母工業株式会社, ロット番号 ANI800KR)に重層後、37°Cで48時間培養し、菌の生育の有無を調べた。最少グルコース寒天平板培地は、それぞれ3枚ずつ使用した。

12. 試験の有効性

以下の3基準を満たす場合に、試験は適切な条件下で実施され、試験は有効であると判定した。

- (1) 試験に用いた菌液, 溶媒, 被験物質の供試液および S9 mix に雑菌の混入がない。
- (2) 各指標菌株の陰性対照における復帰変異コロニー数が、当研究所における背景データの範囲内の値を示す(自然復帰変異体数)。
- (3) 各指標菌株の陽性対照における復帰変異コロニー数が、当研究所における陽性対照値の背景データの範囲あるいはその近くの値を示す。

13. 結果の判定

結果の判定は、各用量におけるプレートでの復帰変異コロニー数の平均値を基に、原則的に以下の3基準を満たす場合を陽性とした。

- (1) 被験物質処理群において陰性対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数が出現する。
 - (2) 被験物質用量の増加とともに復帰変異コロニー数が増加する（用量依存性）。
 - (3) 2回にわたる本試験の結果から復帰変異コロニー数の増加に再現性が認められる。
- 但し、明確な用量依存性が認められない場合においても、陽性値を示す試験結果に再現性が認められれば陽性と判定した。

結 果

試験を2回実施した結果（表2-1, 2-2, 3-1, 3-2 および図1-1, 1-2, 1-3, 2-1, 2-2, 2-3）、直接法および代謝活性化法のいずれの場合も、供試したすべての菌株において復帰変異コロニー数は、陰性対照値の2倍を超えることはなかった。また、菌の生育阻害も認められなかった。

陰性対照群では背景データ（添付資料）の範囲内の復帰変異コロニー数が認められた。陽性対照群においては明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められ、その程度は、それぞれ背景データ（添付資料）の範囲内の陽性値を示すものであった。また、試験に用いた菌液、溶媒、被験物質の供試液およびS9 mixなどには、雑菌の混入は認められなかった。その他、実験中被験物質の析出等、特記すべき変化は認められなかった。

結論および参考事項

4-エチルモルホリンについて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た。その結果、代謝活性化の有無にかかわらず、全ての指標菌株で復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

試験の有効性については、2回にわたる本試験ともに有効であることが確認された。

したがって、本実験条件下では4-エチルモルホリンの遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

4-エチルモルホリンの変異原性については、*Salmonella typhimurium* を用いた復帰突然変異試験で、ラットおよびハムスターの肝臓から調製された3濃度のS9を用いた代謝活性化法によるTA1535で弱い陽性または疑陽性との結果³⁾が報告されている。それらは、いずれも6667または10000 μ g/プレートの高用量で認められた結果であり、3333 μ g/プレート以下の用量では復帰変異コロニー数の増加は認められていない。今回の試験で設定した5000 μ g/プレート以下の用量では、陽性または疑陽性の結果は得られなかった。また、L5178Y細胞を用いたマウスリンフォーマアッセイおよびBALB/3T3細胞を用いたトランスフォーメーションアッセイでいずれも陰性⁴⁾と報告されている。

4-エチルモルホリンの類縁化合物の変異原性について、モルホリンは、L5178Y細胞を用いたマウスリンフォーマアッセイおよびBALB/3T3細胞を用いたトランスフォーメーションアッセイでいずれも陽性⁴⁾、また、N-メチルモルホリンオキシドは、同様の試験でいずれも陰性⁴⁾と報告されている。N-ニトロソモルホリンは、*E. coli* PQ₃₇ strainを用いたSOS chromotestで陽性⁵⁾、*S. typhimurium*を用いた宿主経路試験および体細胞突然変異試験でいずれも陽性⁶⁾、シヨウジョウバエを用いた伴性劣性致死試験で陽性⁶⁾、V79細胞およびシリアンハムスター由来の培養細胞を用いた体細胞突然変異試験でいずれも陽性⁶⁾、ラット肝細胞を用いた不定期DNA試験で陽性⁶⁾、シリアンハムスター由来の培養細胞を用いた細胞形質転換試験で陽性⁶⁾、ラットリンパ球を用いた染色体異常試験で陽性⁶⁾、マウスを用いた優性致死試験で陰性⁶⁾と報告されている。

参考文献

- 1) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation. Research*, 113, 173-215.

- 2) Green, M. H. (1984). "Handbook of Mutagenicity Test Procedures" 1, Vol. 3, eds. by Kilbey, B. J., Legator, M., Nicols, W. and Ramel, C., Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, pp. 161-187.
- 3) Zeiger, E., Anderson, B., Howorth, S., Lawlor, T., Mortelmans, K. and Speck, W. (1987). *Salmonella* Mutagenicity Tests : III. Results from the testing of 255 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 19 (Supplement 9), 1-110.
- 4) Conaway, C. C., Myhr, B. C., Rundell, J. O. and Brusick, D. J. (1982). Evaluation of morpholine, piperazine and analogues in the L5178Y mouse lymphoma assay and BALB/3T3 transformation assay, *Environmental Mutagenesis*, 4, 390.
- 5) Quillardet, P., Bellecombe, C. and Hofnung, M. (1985). The SOS chromotest, a colorimetic bacterial assay for genotoxins : validation study with 83 compounds, *Mutation Research*, 147, 79-95.
- 6) 賀田恒夫, 石館 基 監修, "環境変異原データ集 1", サイエンティスト社, 東京, 1980, p. 317.

表 1-1 S9 mix 非存在下における 4-エチルモルホリンの用量設定試験結果〔直接法〕

用 量 〔 μ g/プレート〕	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
陰性対照〔蒸留水〕	123	9	18	22	5
20	112	11	26	24	4
50	106	8	30	26	7
100	108	10	18	32	3
200	99	6	18	34	8
500	102	13	14	29	5
1000	110	9	18	20	5
2000	117	14	19	32	7
5000	104	10	21	25	9
陽性対照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
μ g/プレート	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復帰変異コロニー数 /プレート	759	310	821	444	390

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

SA : アジ化ナトリウム

9-AA: 9-アミノアクリジン

表 1-2 S9 mix 存在下における 4-エチルモルホリンの用量設定試験結果〔代謝活性化法〕

用 量 〔 μ g/プレート〕	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
陰性対照〔蒸留水〕	110	7	27	28	14
20	118	5	19	30	16
50	104	6	15	41	11
100	116	6	19	37	11
200	118	7	20	29	10
500	112	5	17	40	14
1000	122	7	25	31	15
2000	106	5	25	34	10
5000	100	4	30	37	12
陽性対照	2- AA	2- AA	2- AA	2- AA	2- AA
μ g/プレート	1	2	10	1	2
復帰変異コロニー数 /プレート	310	113	497	216	63

2-AA: 2-アミノアントラセン

表 2-1 S9 mix 非存在下における 4-エチルモルホリンの復帰突然変異試験結果
〔本試験1回目－直接法〕

用 量 〔 μ g/プレート〕	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
陰性対照	145	9	22	19	4
[蒸留水]	120	12	20	17	7
	123	9	28	21	8
	(129 \pm 14)	(10 \pm 2)	(23 \pm 4)	(19 \pm 2)	(6 \pm 2)
313	105	11	22	14	11
	124	11	23	17	11
	110	6	20	16	7
	(113 \pm 10)	(9 \pm 3)	(22 \pm 2)	(16 \pm 2)	(10 \pm 2)
625	129	9	28	25	6
	114	10	19	14	8
	113	11	24	20	6
	(119 \pm 9)	(10 \pm 1)	(24 \pm 5)	(20 \pm 6)	(7 \pm 1)
1250	117	13	23	16	11
	111	18	23	24	5
	131	9	18	23	4
	(120 \pm 10)	(13 \pm 5)	(21 \pm 3)	(21 \pm 4)	(7 \pm 4)
2500	135	9	21	24	9
	128	16	15	16	5
	150	11	25	20	7
	(138 \pm 11)	(12 \pm 4)	(20 \pm 5)	(20 \pm 4)	(7 \pm 2)
5000	139	9	21	18	8
	132	7	26	15	11
	133	10	33	20	11
	(135 \pm 4)	(9 \pm 2)	(27 \pm 6)	(18 \pm 3)	(10 \pm 2)
陽性対照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
μ g/プレート	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復帰変異	741	339	1375	518	401
コロニー数	816	329	1116	512	404
/プレート	824	478	1097	502	445
	(794 \pm 46)	(382 \pm 83)	(1196 \pm 155)	(511 \pm 8)	(417 \pm 25)

(): 平均値 \pm 標準偏差

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

SA : アジ化ナトリウム

9-AA: 9-アミノアクリジン

表 2-2 S9 mix 存在下における 4-エチルモルホリンの復帰突然変異試験結果
 [本試験1回目-代謝活性化法]

用 量 [μ g/プレート]	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
陰性対照	141	6	30	20	18
[蒸留水]	130	11	23	20	10
	150	13	30	35	14
	(140 \pm 10)	(10 \pm 4)	(28 \pm 4)	(25 \pm 9)	(14 \pm 4)
313	112	12	24	26	16
	141	5	27	36	14
	114	5	30	25	11
	(122 \pm 16)	(7 \pm 4)	(27 \pm 3)	(29 \pm 6)	(14 \pm 3)
625	125	8	29	25	14
	129	10	30	26	21
	133	8	21	32	14
	(129 \pm 4)	(9 \pm 1)	(27 \pm 5)	(28 \pm 4)	(16 \pm 4)
1250	141	8	33	18	7
	132	11	40	20	18
	140	14	20	30	9
	(138 \pm 5)	(11 \pm 3)	(31 \pm 10)	(23 \pm 6)	(11 \pm 6)
2500	142	14	33	32	13
	137	14	19	24	10
	130	14	28	29	9
	(136 \pm 6)	(14 \pm 0)	(27 \pm 7)	(28 \pm 4)	(11 \pm 2)
5000	132	8	39	32	9
	132	15	32	29	14
	119	10	25	23	17
	(128 \pm 8)	(11 \pm 4)	(32 \pm 7)	(28 \pm 5)	(13 \pm 4)
陽性対照	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
μ g/プレート	1	2	10	1	2
復帰変異	470	181	448	262	123
コロニー数	551	142	414	221	89
/プレート	485	158	445	255	94
	(502 \pm 43)	(160 \pm 20)	(436 \pm 19)	(246 \pm 22)	(102 \pm 18)

(): 平均値 \pm 標準偏差

2-AA: 2-アミノアントラセン

表 3-1 S9 mix 非存在下における 4-エチルモルホリンの復帰突然変異試験結果
〔本試験2回目-直接法〕

用 量 〔 μ g/プレート〕	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
陰性対照	139	4	23	20	14
[蒸留水]	156	6	18	22	12
	149	10	24	26	5
	(148 \pm 9)	(7 \pm 3)	(22 \pm 3)	(23 \pm 3)	(10 \pm 5)
313	137	10	20	22	6
	165	12	18	29	12
	130	5	17	29	7
	(144 \pm 19)	(9 \pm 4)	(18 \pm 2)	(27 \pm 4)	(8 \pm 3)
625	160	11	25	23	7
	141	4	21	32	3
	155	5	16	27	8
	(152 \pm 10)	(7 \pm 4)	(21 \pm 5)	(27 \pm 5)	(6 \pm 3)
1250	145	11	23	30	7
	138	10	22	23	8
	179	5	18	26	10
	(154 \pm 22)	(9 \pm 3)	(21 \pm 3)	(26 \pm 4)	(8 \pm 2)
2500	150	10	21	29	11
	147	9	25	27	9
	133	16	18	24	8
	(143 \pm 9)	(12 \pm 4)	(21 \pm 4)	(27 \pm 3)	(9 \pm 2)
5000	144	6	24	27	8
	167	13	24	28	8
	176	7	21	23	6
	(162 \pm 17)	(9 \pm 4)	(23 \pm 2)	(26 \pm 3)	(7 \pm 1)
陽性対照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
μ g/プレート	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復帰変異	813	340	964	434	425
コロニー数	833	294	1005	398	592
/プレート	844	299	988	377	424
	(830 \pm 16)	(311 \pm 25)	(986 \pm 21)	(403 \pm 29)	(480 \pm 97)

(): 平均値 \pm 標準偏差

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

SA : アジ化ナトリウム

9-AA: 9-アミノアクリジン

表 3-2 S9 mix 存在下における 4-エチルモルホリンの復帰突然変異試験結果
〔本試験2回目－代謝活性化法〕

用 量 〔 μ g/プレート〕	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
陰性対照	145	8	29	33	11
[蒸留水]	147	4	29	31	16
	115	6	31	33	14
	(136 \pm 18)	(6 \pm 2)	(30 \pm 1)	(32 \pm 1)	(14 \pm 3)
313	138	4	30	29	11
	178	12	28	37	12
	137	3	32	41	7
	(151 \pm 23)	(6 \pm 5)	(30 \pm 2)	(36 \pm 6)	(10 \pm 3)
625	140	9	29	31	9
	159	5	27	36	14
	144	4	31	28	12
	(148 \pm 10)	(6 \pm 3)	(29 \pm 2)	(32 \pm 4)	(12 \pm 3)
1250	143	5	32	37	15
	142	7	22	40	21
	180	7	27	34	18
	(155 \pm 22)	(6 \pm 1)	(27 \pm 5)	(37 \pm 3)	(18 \pm 3)
2500	145	11	33	34	10
	169	4	19	26	14
	175	7	22	43	24
	(163 \pm 16)	(7 \pm 4)	(25 \pm 7)	(34 \pm 9)	(16 \pm 7)
5000	153	5	30	35	19
	138	11	25	35	21
	168	13	25	43	13
	(153 \pm 15)	(10 \pm 4)	(27 \pm 3)	(38 \pm 5)	(18 \pm 4)
陽性対照	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
μ g/プレート	1	2	10	1	2
復帰変異	392	132	476	247	79
コロニー数	418	122	418	212	80
/プレート	353	136	423	206	86
	(388 \pm 33)	(130 \pm 7)	(439 \pm 32)	(222 \pm 22)	(82 \pm 4)

(): 平均値 \pm 標準偏差

2-AA: 2-アミノアントラセン

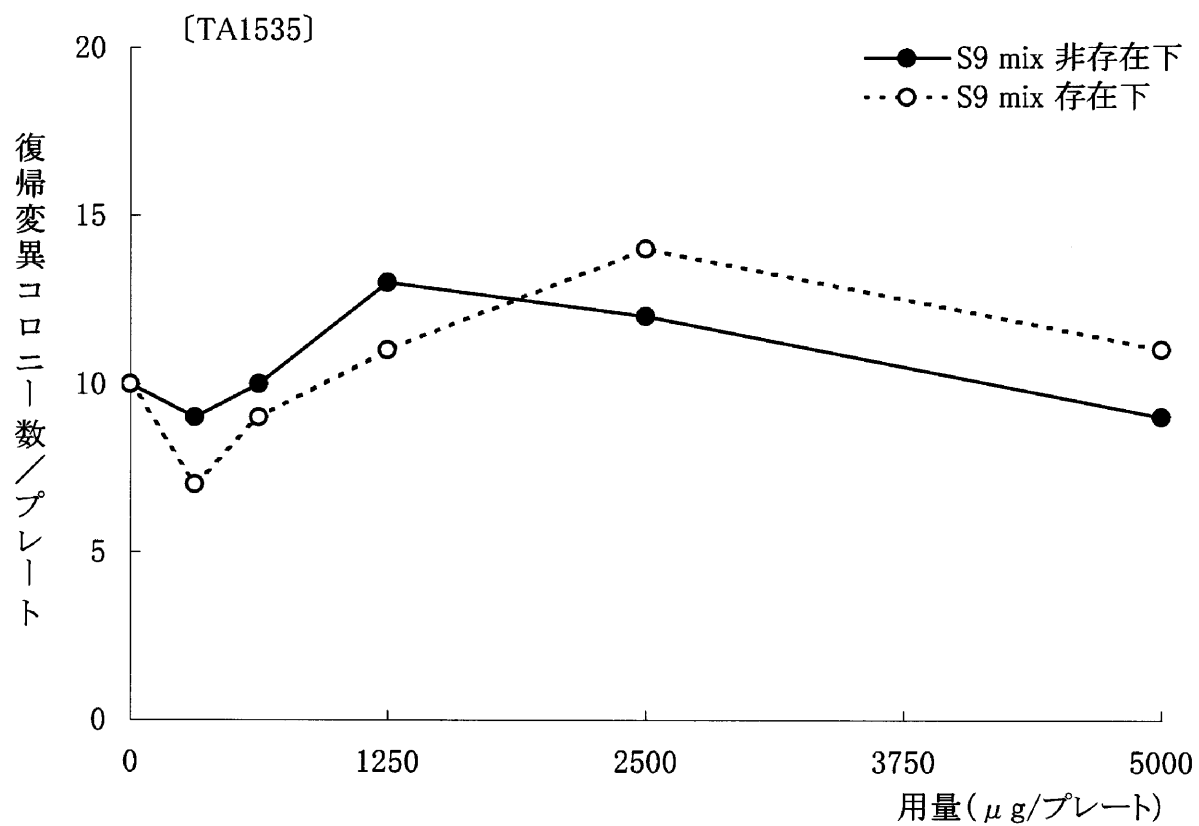
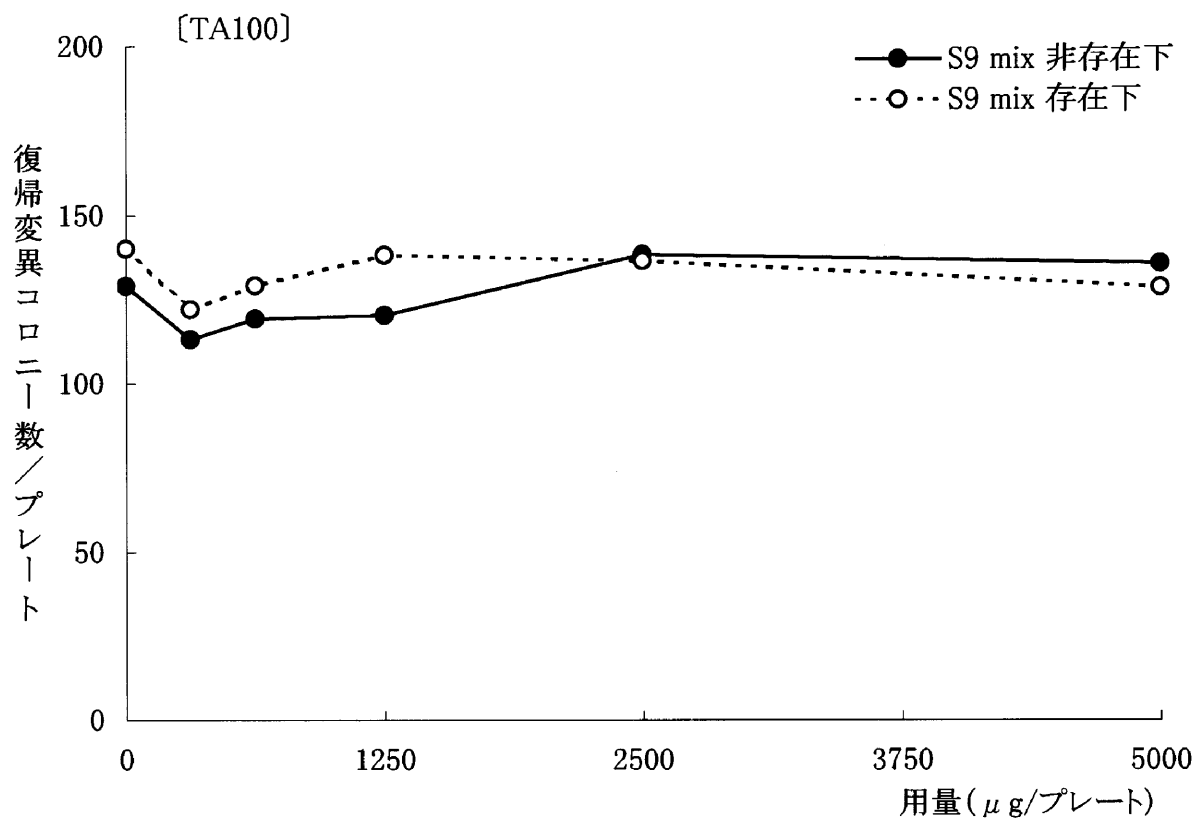


図 1-1 4-エチルモルホリンの復帰突然変異試験結果一本試験1回目

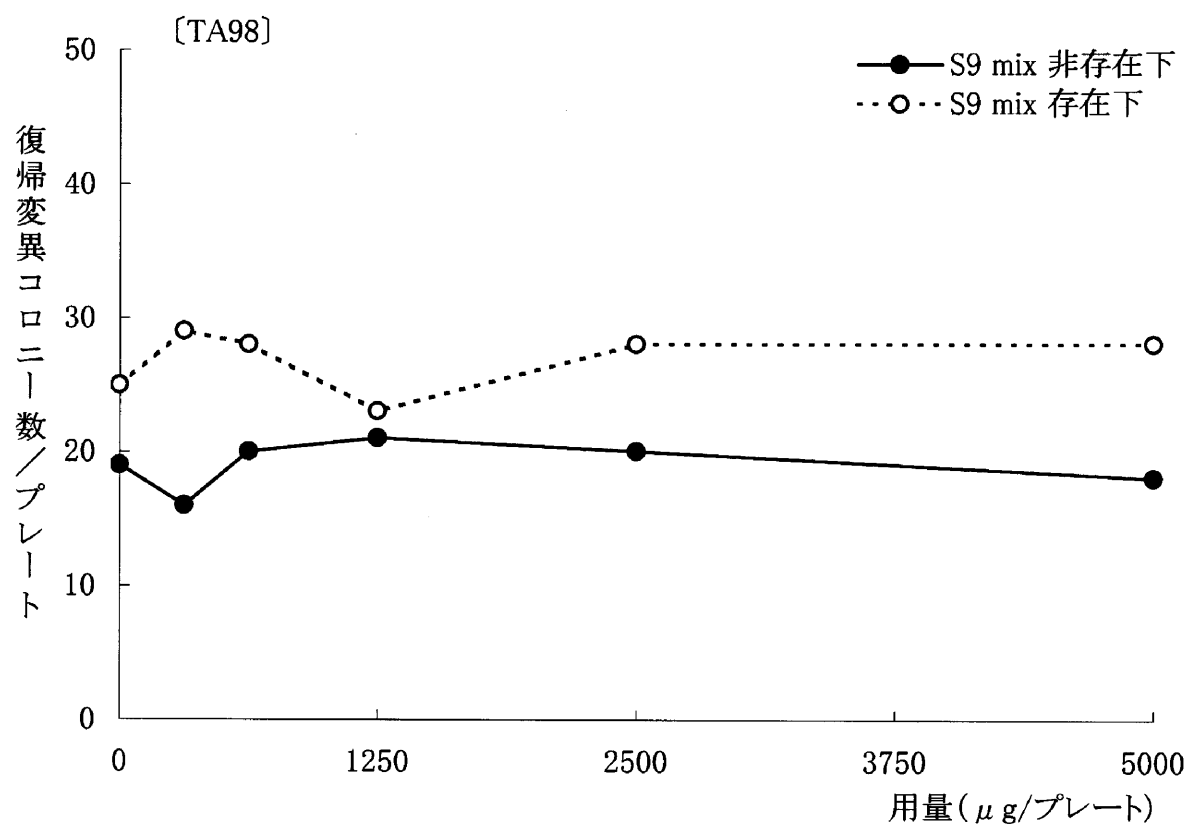
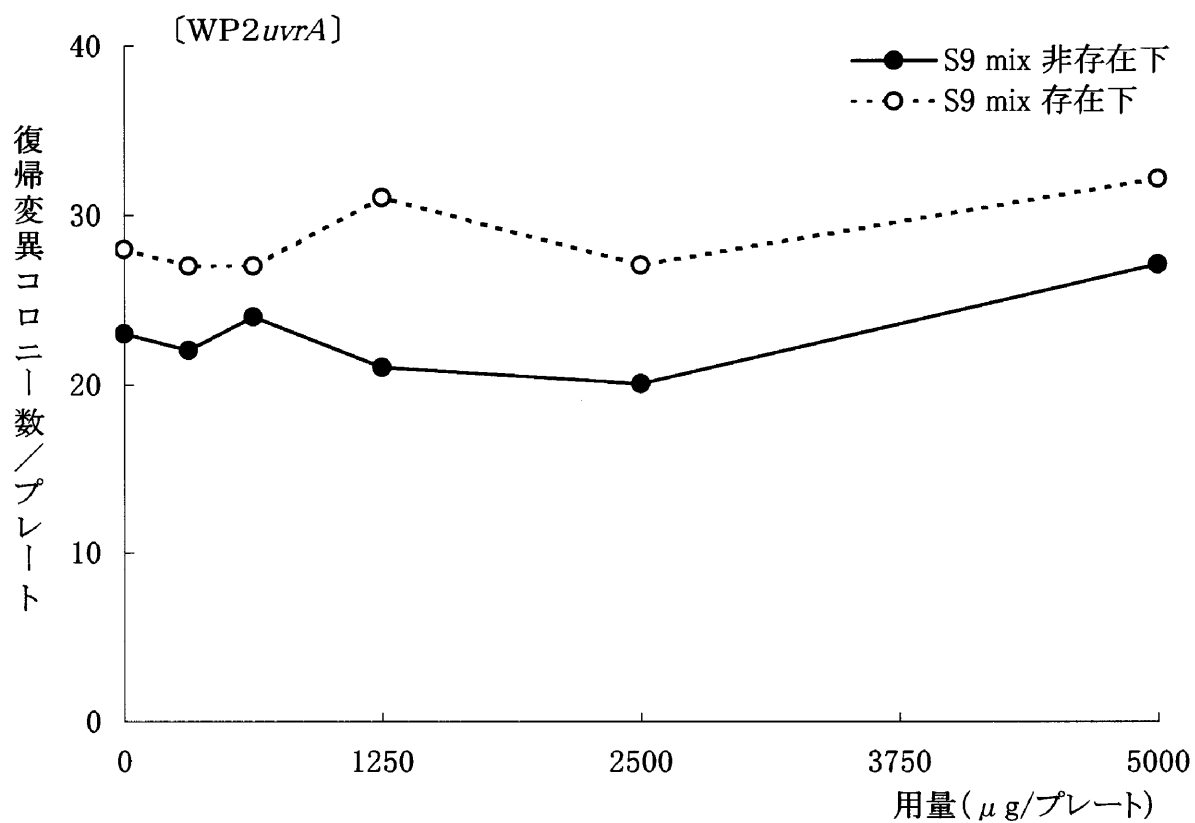


図 1-2 4-エチルモルホリンの復帰突然変異試験結果—本試験1回目

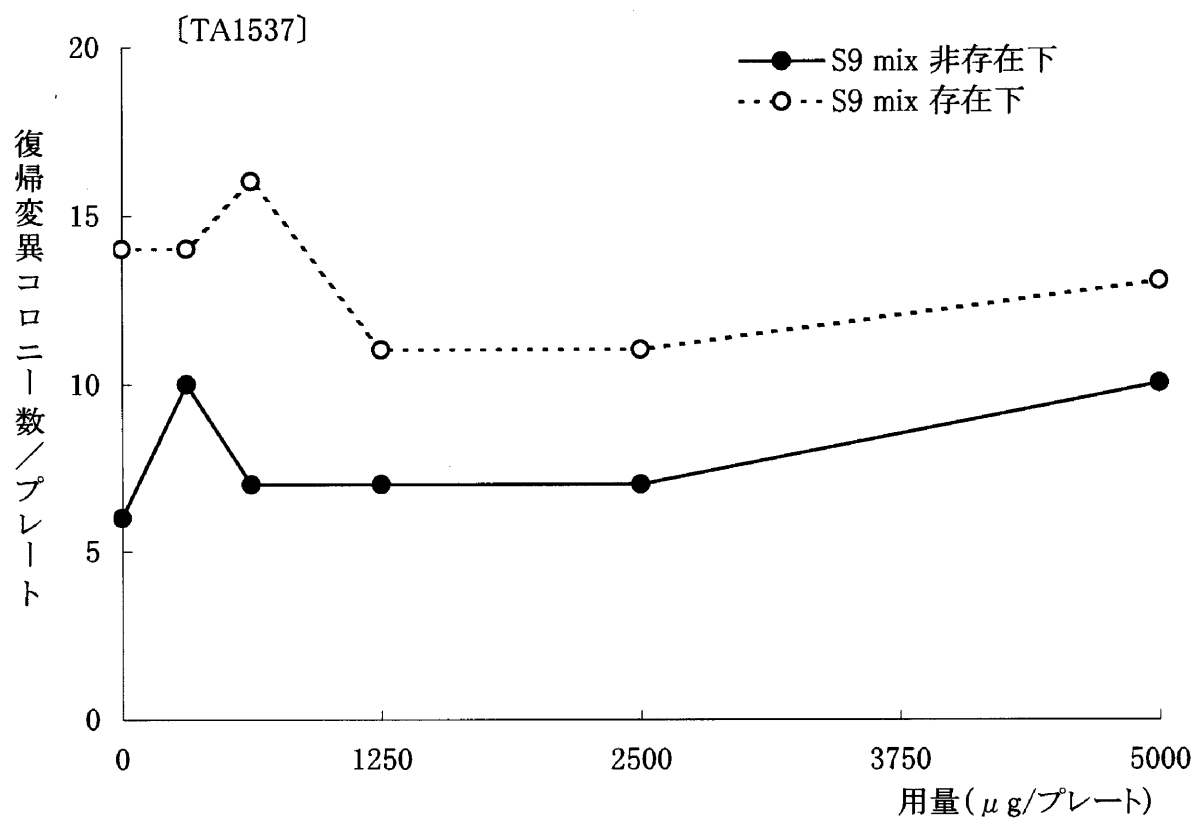


図 1-3 4-エチルモルホリンの復帰突然変異試験結果—本試験1回目

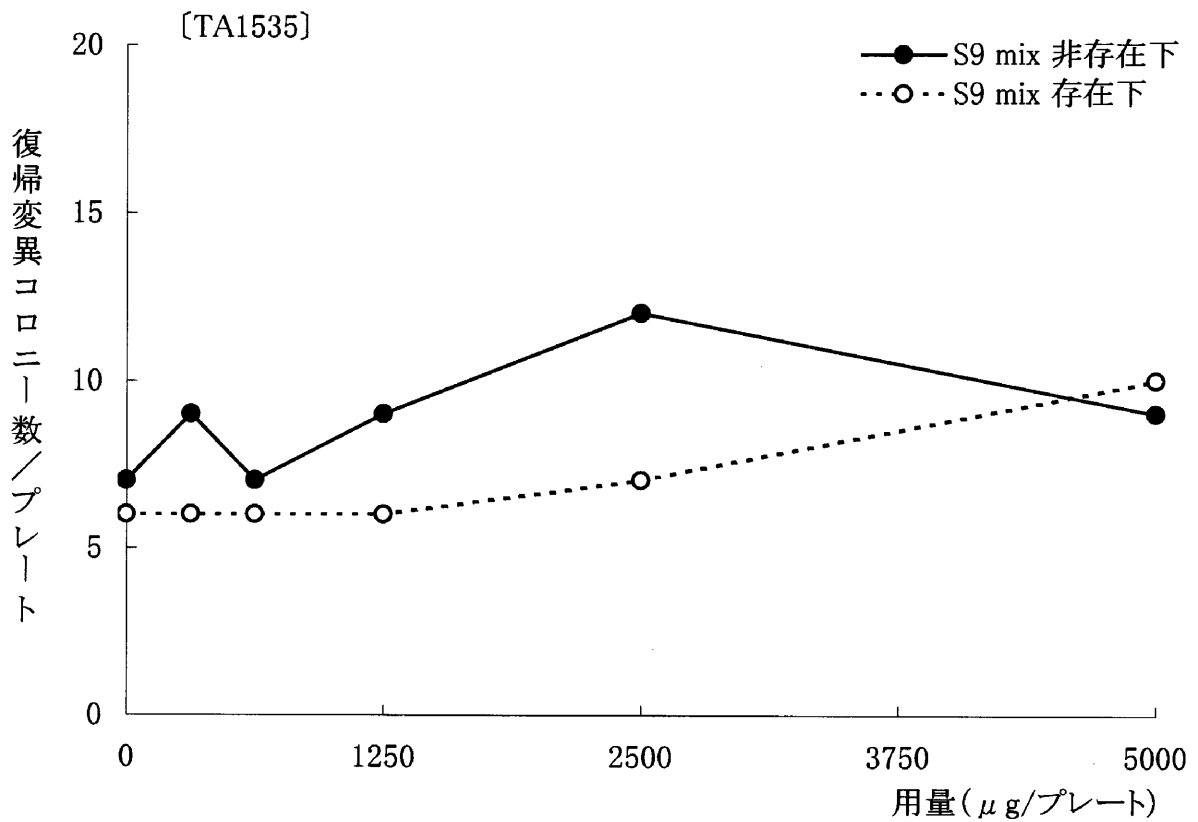
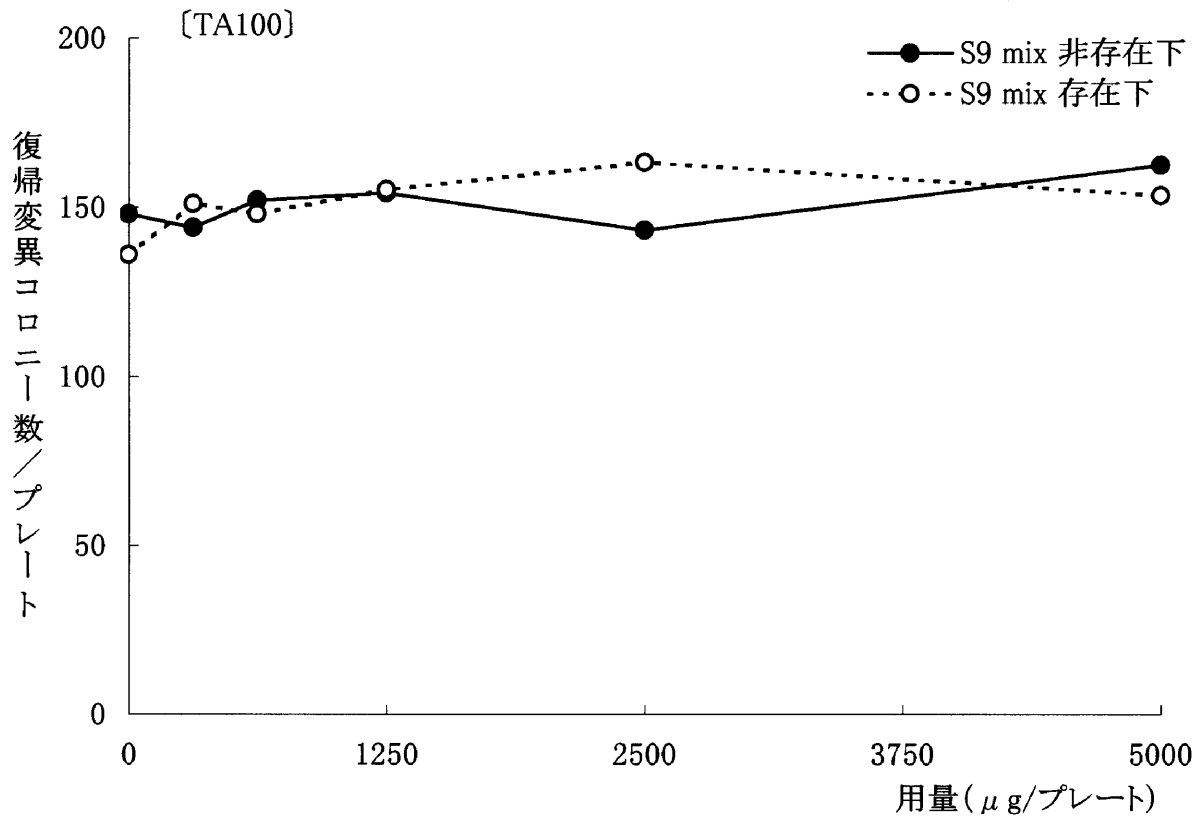


図 2-1 4-エチルモルホリンの復帰突然変異試験結果—本試験2回目

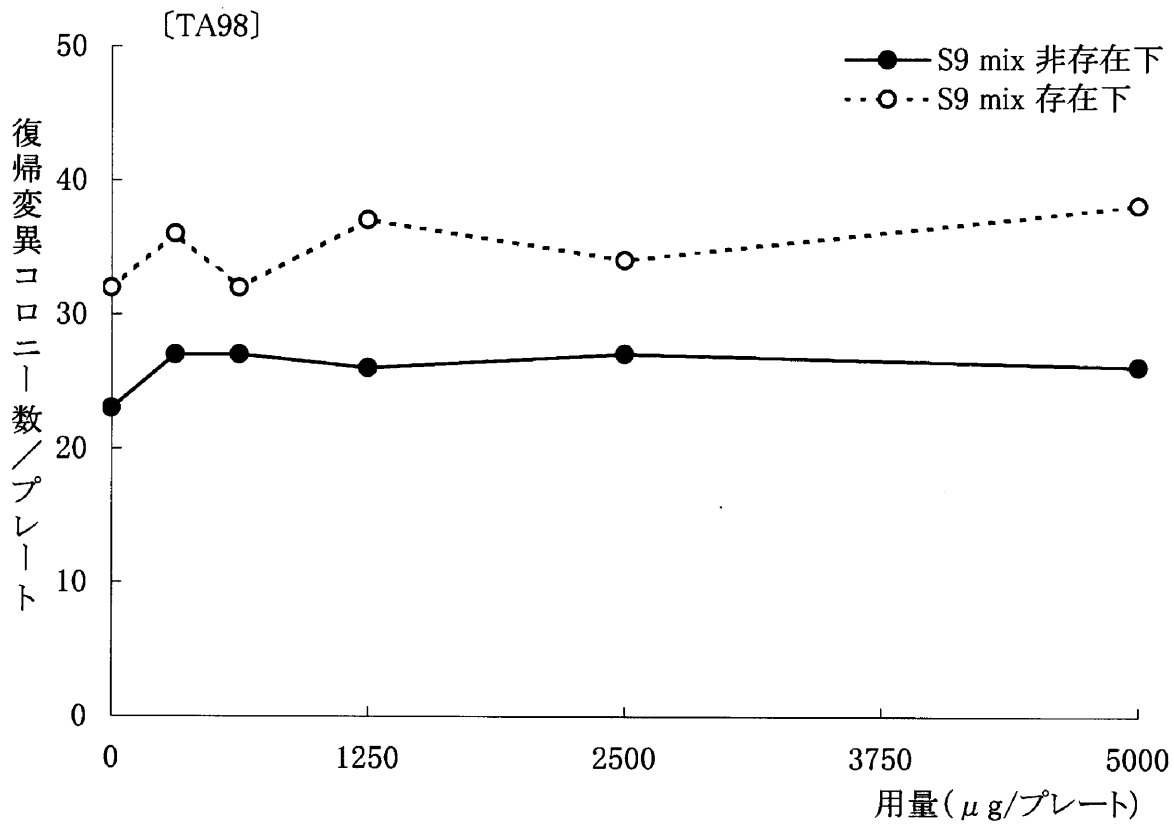
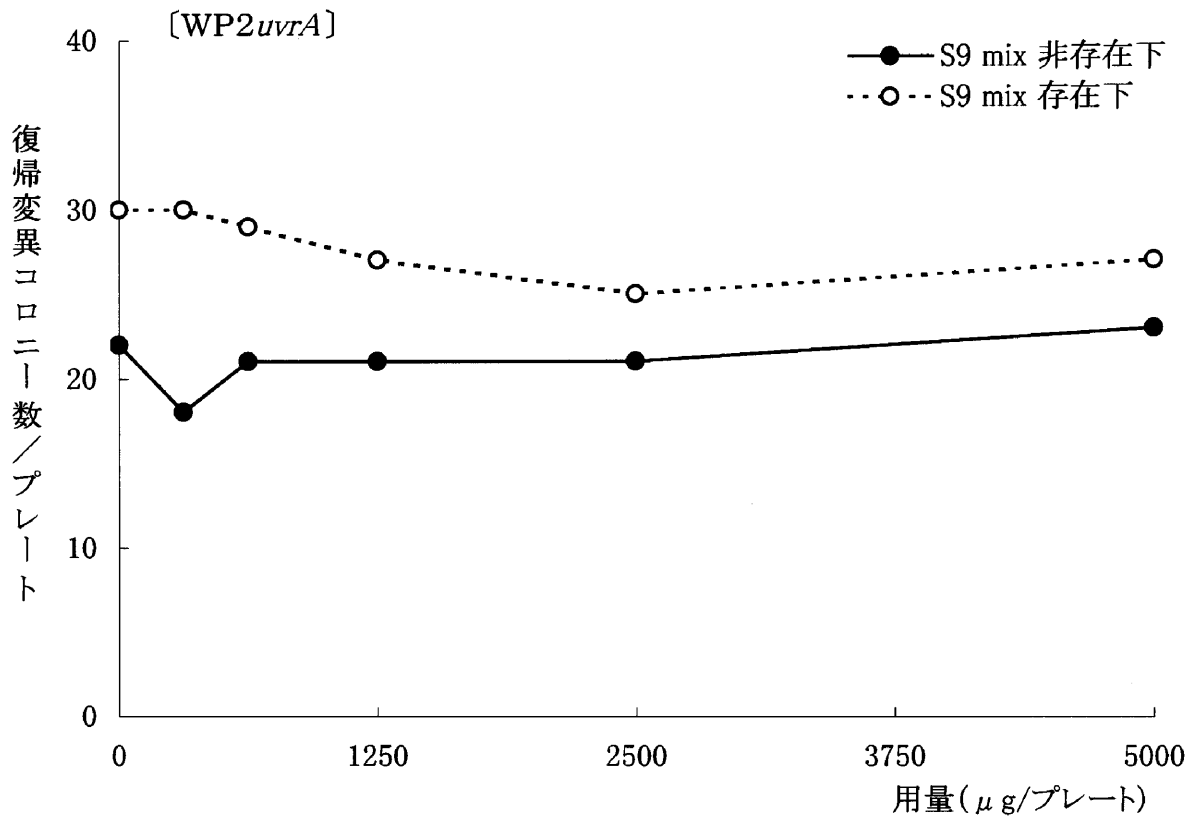


図 2-2 4-エチルモルホリンの復帰突然変異試験結果—本試験2回目

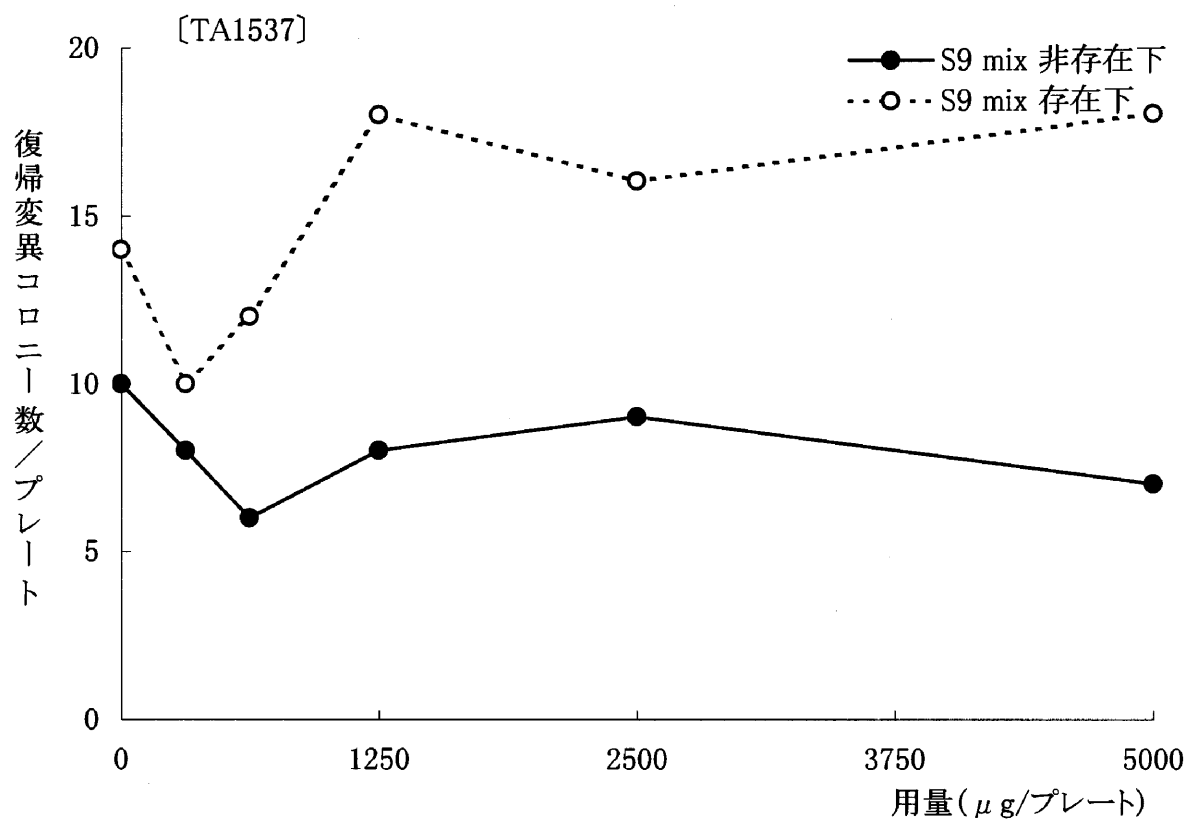


図 2-3 4-エチルモルホリンの復帰突然変異試験結果-本試験2回目