

最 終 報 告 書

4-ヒドロキシジフェニルメタンの細菌を用いる復帰突然変異試験

T-0143

2009 年 10 月 16 日

本資料は原本から複写したものに相違ありません。

株式会社 ボゾリサーチセンター

試験責任者:

日付: 2009 年 10 月 28 日

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

	頁
目 次	1
試験実施概要	3
試験従事者一覧	5
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	8
(1) 予備試験用被験液の調製	8
(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	9
(3) 菌株の保存及び解凍	9
(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	10
(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	12
(4) 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4)	12
(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	14
(4) プレート数	14
(5) 試験操作 (プレーンキュベーション法)	14
5. 判定基準	15

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	16

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：-S9Mix)
- ・図 2 用量反応曲線(本試験：+S9Mix)

別添 背景データ(071109)

試験実施概要

1. 試験計画書

試験番号 : T-0143

試験表題 : 4-ヒドロキシジフェニルメタンの細菌を用いる復帰突然変異試験

2. 試験目的 : 細菌を用いて、4-ヒドロキシジフェニルメタンの復帰突然変異誘発能の有無を明らかにすることを目的とした。

3. 遵守した基準及び準拠したガイドライン

GLP

- ・「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」（平成 15 年 11 月 21 日：薬食発第 1121003 号、平成 15・11・17 製局第 3 号、環保企発第 031121004 号、平成 20 年 7 月 4 日最終改正）
- ・「OECD Principles of Good Laboratory Practice」（OECD：1997 年 11 月 26 日）

ガイドライン

- ・「新規化学物質等に係る試験の方法について」（平成 15 年 11 月 21 日：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、環保企発第 031121002 号環境省総合環境政策局長通知、平成 17 年 4 月 1 日最終改正）
- ・「OECD Guidelines for Testing of Chemicals 471」（OECD：1997 年 7 月 21 日）

4. 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 1-2-25. 試験受託者 : 株式会社ボゾリサーチセンター
〒156-0042 東京都世田谷区羽根木 1-3-116. 試験実施施設 : 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

7. 被験物質

製造元 : 東京化成工業株式会社

被験物質名 : 4-ヒドロキシジフェニルメタン

ロット番号 : C770A

受領日 : 2008 年 1 月 28 日

保存場所 : 東京研究所 被験物質調製保存室

8. 試験日程

試験開始日	2008年2月20日
予備試験開始日	2008年2月25日
予備試験終了日	2008年2月28日
本試験1回目開始日	2008年3月13日
本試験1回目終了日	2008年3月17日
本試験2回目開始日	2008年3月25日
本試験2回目終了日	2008年3月28日
試験終了日	2009年10月16日

9. 試験責任者 : 株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所 研究部 第1研究室

10. 試験担当者 :

11. 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと

本試験において予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態はなかった。なお、試験計画書には補酵素 (Cofactor-I) の保存方法を冷蔵保存 (10°C 以下) と記載した。しかし、補酵素 (Cofactor-I) の保存期間中の実測温度において、最高で 10.9°C を示したが、試験実施時の冷蔵庫の扉の開閉による短時間の上昇であり、この試薬が凍結乾燥品であることから、試験への影響はないと判断した。

12. 資料の保存

試験計画書、記録文書、生データ及び報告書類 (最終報告書の原本を含む) は、株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所の資料保存施設に保存する。なお、その期間は最終報告書提出後 10 年間とする。期間終了後の保存については、厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室と株式会社ボゾリサーチセンター間で協議し、その処置を決定する。

13. 試験責任者の記名・捺印

: 2009年10月16日

試験従事者一覧

予備試験

使用菌株の前培養 :
被験物質の調製 :
被験物質の処理 :

コロニーの計数 :

本試験 1 回目

使用菌株の前培養 :
被験物質の調製 :
被験物質の処理 :

コロニーの計数 :

本試験 2 回目

使用菌株の前培養 :
被験物質の調製 :
被験物質の処理 :

コロニーの計数 :

要 約

4-ヒドロキシジフェニルメタン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、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、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た。その結果より本試験は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株についても 9.77～313 µg/plate の範囲の 6 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* TA 株及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1537 の 156 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* の 313 µg/plate 以上で認められた。

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、本被験物質によ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。

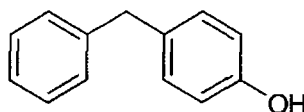
以上の試験結果より、本試験条件下において、4-ヒドロキシジフェニルメタンは、細菌に対する遺伝子突然変異誘発能を有さない (陰性) と判定した。

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	4-ヒドロキシジフェニルメタン
CAS 番 号	101-53-1
ロット番号	C770A
構 造 式	



純 度	99.8%
不純物の名称及び濃度	情報提供なし
分 子 量	184.23
融 点	84.9℃
沸 点	情報提供なし
蒸 気 圧	情報提供なし
分配係数	情報提供なし
常温における性状	白色小針状晶
安 定 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する。
溶 解 性	情報提供なし
溶媒中での安定性	情報提供なし
保 存 方 法	冷暗所・密栓
保 存 温 度	保存期間(2008.1.28~2008.3.26)中の実測温度：0.0~9.8℃
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株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所で焼却後、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	WKF6984
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

(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、アセトンに 100mg/mL で溶解し、いずれも発熱、ガスの発生等の反応性も認められなかったため、溶媒の菌株への毒性を考慮して 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電子天秤（GR-120、株式会社エー・アンド・ディ）を用いて秤量し、その秤量値 244.4 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、4.888 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、50 mg/mL の被験液を公比 4 で順次 6 段階希釈し、50、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。

(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（GR-120、株式会社エー・アンド・ディ）を用いて秤量し、その秤量値 40.9 mg に最高調製濃度の 12.5 mg/mL となるように溶媒量を計算し、3.272 mL の DMSO を添加して溶解し、12.5 mg/mL 溶液を調製した。次いで、12.5 mg/mL 溶液を 4 倍希釈して 3.13 mg/mL の被験液を調製した。これをさらに公比 2 で順次 5 段階希釈し、3.13、1.56、0.781、0.391、0.195 及び 0.0977 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。

(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（GR-120、株式会社エー・アンド・ディ）を用いて秤量し、その秤量値 28.9 mg に最高調製濃度の 12.5 mg/mL となるように溶媒量を計算し、2.312 mL の DMSO を添加して溶解し、12.5 mg/mL 溶液を調製した。次いで、12.5 mg/mL 溶液を 4 倍希釈して 3.13 mg/mL の被験液を調製した。これをさらに公比 2 で順次 5 段階希釈し、3.13、1.56、0.781、0.391、0.195 及び 0.0977 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。

(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ものから、2005 年 7 月 21 日に分与された。

(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、細菌を用いる変異原性試験に最も一般的に使用されている。

(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 WKP5050、WKF6984）を 0.7 mL の割合で添加して、滅菌チューブに 300 μ L 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 2007 年 10 月 11 日～2008 年 3 月 25 日： $-81\sim-71^{\circ}\text{C}$ ）。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	2007 年 12 月 19 日
<i>S. typhimurium</i> TA100	2008 年 1 月 25 日
<i>S. typhimurium</i> TA1535	2008 年 2 月 14 日
<i>S. typhimurium</i> TA1537	2008 年 2 月 14 日
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	2007 年 10 月 11 日

(4) 菌株の特性検査

(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	2007 年 12 月 19 日～2007 年 12 月 22 日
<i>S. typhimurium</i> TA100	2008 年 1 月 25 日～2008 年 1 月 28 日
<i>S. typhimurium</i> TA1535	2008 年 2 月 20 日～2008 年 2 月 23 日
<i>S. typhimurium</i> TA1537	2008 年 2 月 20 日～2008 年 2 月 23 日
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	2007 年 10 月 18 日～2007 年 10 月 22 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	96.6%	室温、遮光
2-Aminoanthracene (2AA)	KLH1059		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

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 WKK3098、WKF6984) 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 K7C76) に溶解し、1.0 mL ずつ小分けして-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	
	陽性対照物質名	調製濃度 (µg/mL)	陽性対照物質名	調製濃度 (µg/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 (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、完全に溶解した後ろ過 (Nalge Nunc Int. 0.45µM : Lot No. 625844) 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	07113009
製造日	2007 年 11 月 30 日

- | | |
|------------|---|
| 購入日 | 2008年1月10日 |
| 種・系統 | ラット・SD系 |
| 週齢・性 | 7週齢・雄 |
| 体重 | 222.0±16.9g |
| 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) |
| 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 | 2008年1月10日～2008年3月26日：-81～-71℃ |
- 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 | 999703 |
| 製 造 日 | 2007年10月9日 |
| 購 入 日 | 2008年2月15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) |
| 保存期間中の実測温度 | 2008年2月15日～2008年3月26日：2.0～10.9℃ |
- 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 DZL8CQ01 (予備試験)
DZL92M01 (本試験 1 回目、2 回目)
- 製 造 日 DZL8CQ01：2007年12月26日
DZL92M01：2008年2月22日
- 購 入 日 DZL8CQ01：2008年1月31日
DZL92M01：2008年3月7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 994025-02

(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	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

(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℃、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 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
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 wt% Agar, 0.6 wt% NaCl) をオートクレーブにより滅菌処理 (121℃、20 分) した後、*S. typhimurium* TA 株では 0.5 mmol/L の *D*-ビオチン及び 0.5 mmol/L の *L*-ヒスチジン溶液を、*E. coli* 株では 0.5 mmol/L の *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	7060972
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	TSK1093 (予備試験) TSF6861 (本試験 1 回目、2 回目)
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 |
| 製 造 元 | MP Biomedicals, Inc. |
| ロット番号 | 3558H |
| 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 |
| 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 |
| 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。

<i>S. typhimurium</i> TA100	青
<i>S. typhimurium</i> TA1535	桃
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	茶
<i>S. typhimurium</i> TA98	赤
<i>S. typhimurium</i> 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て得た菌懸濁液を *S. typhimurium* TA 株では各 20 μ L、*E. coli* 株では 10 μ L 接種した。使用後の菌懸濁液は廃棄した。
- 2) 各試験菌株を接種した L 字型試験管を振盪恒温槽 (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℃ の水浴中に放置 (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(cells/mL)		
	予備試験	本試験 1 回目	本試験 2 回目
<i>S. typhimurium</i> TA100	5.39×10^9	$5.45 \times 10^9(-S9)$ $5.02 \times 10^9(+S9)$	4.56×10^9
<i>S. typhimurium</i> TA1535	5.04×10^9	5.05×10^9	4.74×10^9
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	8.18×10^9	8.14×10^9	8.04×10^9
<i>S. typhimurium</i> TA98	6.07×10^9	6.06×10^9	5.39×10^9
<i>S. typhimurium</i> TA1537	3.08×10^9	3.03×10^9	3.11×10^9

(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 段階希釈した計 7 用量 (1.22, 4.88, 19.5, 78.1, 313, 1250, 5000 μ g/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、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても 313 μ g/plate 以上で認められた。また、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。

このため本試験の試験用量は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株についても 313 μ g/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、2 回の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 (ブレインキュベーション法)

- 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株の培養液 0.1 mL を加えた。
- 2) 小試験管を攪拌後すぐに 37℃ で 20 分間振盪しながらブレインキュベーションし、これに 45℃ に保温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。
- 3) 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、これにトップアガーを 2.0 mL 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 1)～3) の一連の操作は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で実施した。
- 4) 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℃ で予備試験では 49.5 時間、本試験 1 回目では 48 時間、本試験 2 回目では 49 時間培養した。

- 5) 培養後、プレート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。

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。

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、2 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。なお、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* TA 株及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1537 の 156 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* の 313 µg/plate 以上で菌の生育阻害が認められた。

(2) 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、本被験物質によ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。

(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、代謝活性化しない場合の *E. coli* WP2 *uvrA* の陰性対照値を除き、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（平均値±3SD：別添）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。また、代謝活性化しない場合の *E. coli* WP2 *uvrA* の陰性対照値についても管理限界をわずかに超えたものであり、被験物質処理群も同様な数値を示していることから、判定には影響しないと判断した。

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、本被験物質によ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、4-ヒドロキシジフェニルメタンは、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。

参考文献

- (1) B.N.Ames, F.D.Lee and W.E.Durstun: 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(予備試験)

被験物質の名称:4-ヒドロキシジフェニルメタン

No. T-0143

試験実施期間		2008年2月25日 より 2008年2月28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)	74 83 (79)	10 7 (9)	18 21 (20)	13 19 (16)	22 16 (19)
	1.22	88 67 (78)	23 7 (15)	31 8 (20)	18 16 (17)	21 25 (23)
	4.88	100 81 (91)	14 7 (11)	28 25 (27)	13 19 (16)	9 16 (13)
	19.5	91 82 (87)	11 11 (11)	31 24 (28)	16 18 (17)	18 18 (18)
	78.1	81 88 (85)	9 16 (13)	17 30 (24)	18 13 (16)	13 16 (15)
	313	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
	1250	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
	5000	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
S9Mix (+)	陰性対照(DMSO)	159 159 (159)	22 10 (16)	30 17 (24)	59 59 (59)	16 17 (17)
	1.22	148 161 (155)	14 12 (13)	29 19 (24)	59 57 (58)	15 13 (14)
	4.88	160 159 (160)	19 11 (15)	21 22 (22)	53 48 (51)	15 15 (15)
	19.5	171 140 (156)	15 8 (12)	15 35 (25)	42 45 (44)	24 21 (23)
	78.1	121 133 (127)	12 4 (8)	23 21 (22)	39 34 (37)	10 20 (15)
	313	41 * 60 * (51)	0 * 0 * (0)	8 * 8 * (8)	19 * 22 * (21)	0 * 0 * (0)
	1250	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
	5000	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (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 459 490 (475)	351 350 (351)	98 90 (94)	359 354 (357)	1764 1435 (1600)
	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 770 831 (801)	282 338 (310)	1124 1203 (1164)	333 299 (316)	119 119 (119)

(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]ピロリジン・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:4-ヒドロキシジフェニルメタン

No. T-0143

試験実施期間		2008年3月13日 より 2008年3月17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)	131	16	45	21	18
		127	14	44	20	17
		126 (128 ± 2.6)	17 (16 ± 1.5)	39 (43 ± 3.2)	38 (26 ± 10.1)	26 (20 ± 4.9)
	9.77	133	25	44	26	10
		126	32	43	25	18
		138 (132 ± 6.0)	13 (23 ± 9.6)	49 (45 ± 3.2)	29 (27 ± 2.1)	8 (12 ± 5.3)
	19.5	131	18	34	22	15
		132	16	24	28	14
		155 (139 ± 13.6)	12 (15 ± 3.1)	39 (32 ± 7.6)	26 (25 ± 3.1)	10 (13 ± 2.6)
	39.1	123	11	43	19	11
		126	16	46	30	11
		125 (125 ± 1.5)	16 (14 ± 2.9)	38 (42 ± 4.0)	28 (26 ± 5.9)	7 (10 ± 2.3)
	78.1	141	18	41	27	14
		120	6	30	33	13
		126 (129 ± 10.8)	12 (12 ± 6.0)	50 (40 ± 10.0)	18 (26 ± 7.5)	8 (12 ± 3.2)
S9Mix (+)	陰性対照(DMSO)	88 *	8 *	30	16 *	10 *
		103 *	13 *	34	25 *	6 *
		93 * (95 ± 7.6)	8 * (10 ± 2.9)	28 (31 ± 3.1)	19 * (20 ± 4.6)	4 * (7 ± 3.1)
	156	0 *	4 *	0 *	7 *	0 *
		0 *	2 *	0 *	4 *	0 *
		0 * (0 ± 0.0)	2 * (3 ± 1.2)	0 * (0 ± 0.0)	0 * (4 ± 3.5)	0 * (0 ± 0.0)
	313	132	18	27	52	16
		134	15	39	61	8
		117 (128 ± 9.3)	16 (16 ± 1.5)	39 (35 ± 6.9)	42 (52 ± 9.5)	13 (12 ± 4.0)
	9.77	113	15	38	75	16
		122	19	39	62	6
		125 (120 ± 6.2)	24 (19 ± 4.5)	45 (41 ± 3.8)	57 (65 ± 9.3)	13 (12 ± 5.1)
	19.5	120	16	43	53	11
		135	22	38	53	15
		136 (130 ± 9.0)	19 (19 ± 3.0)	35 (39 ± 4.0)	51 (52 ± 1.2)	14 (13 ± 2.1)
	39.1	129	11	38	56	15
		120	8	45	74	15
		111 (120 ± 9.0)	16 (12 ± 4.0)	40 (41 ± 3.6)	77 (69 ± 11.4)	16 (15 ± 0.6)
	78.1	88	20	43	44	7
		101	16	34	57	11
		121 (103 ± 16.6)	19 (18 ± 2.1)	36 (38 ± 4.7)	48 (50 ± 6.7)	11 (10 ± 2.3)
陽性対照	S9Mixを必要としないもの	97 *	18 *	48	66	15 *
		105 *	18 *	54	59	17 *
		101 * (101 ± 4.0)	17 * (18 ± 0.6)	42 (48 ± 6.0)	41 (55 ± 12.9)	16 * (16 ± 1.0)
	156	81 *	0 *	18 *	24 *	0 *
		68 *	0 *	16 *	35 *	0 *
		80 * (76 ± 7.2)	0 * (0 ± 0.0)	15 * (16 ± 1.5)	25 * (28 ± 6.1)	0 * (0 ± 0.0)
	313	132	18	27	52	16
		134	15	39	61	8
		117 (128 ± 9.3)	16 (16 ± 1.5)	39 (35 ± 6.9)	42 (52 ± 9.5)	13 (12 ± 4.0)
	9.77	113	15	38	75	16
		122	19	39	62	6
		125 (120 ± 6.2)	24 (19 ± 4.5)	45 (41 ± 3.8)	57 (65 ± 9.3)	13 (12 ± 5.1)
	19.5	120	16	43	53	11
		135	22	38	53	15
		136 (130 ± 9.0)	19 (19 ± 3.0)	35 (39 ± 4.0)	51 (52 ± 1.2)	14 (13 ± 2.1)
	39.1	129	11	38	56	15
		120	8	45	74	15
		111 (120 ± 9.0)	16 (12 ± 4.0)	40 (41 ± 3.6)	77 (69 ± 11.4)	16 (15 ± 0.6)
	78.1	88	20	43	44	7
		101	16	34	57	11
		121 (103 ± 16.6)	19 (18 ± 2.1)	36 (38 ± 4.7)	48 (50 ± 6.7)	11 (10 ± 2.3)
陽性対照	S9Mixを必要とするもの	97 *	18 *	48	66	15 *
		105 *	18 *	54	59	17 *
		101 * (101 ± 4.0)	17 * (18 ± 0.6)	42 (48 ± 6.0)	41 (55 ± 12.9)	16 * (16 ± 1.0)
	156	81 *	0 *	18 *	24 *	0 *
		68 *	0 *	16 *	35 *	0 *
		80 * (76 ± 7.2)	0 * (0 ± 0.0)	15 * (16 ± 1.5)	25 * (28 ± 6.1)	0 * (0 ± 0.0)
	313	132	18	27	52	16
		134	15	39	61	8
		117 (128 ± 9.3)	16 (16 ± 1.5)	39 (35 ± 6.9)	42 (52 ± 9.5)	13 (12 ± 4.0)
	9.77	113	15	38	75	16
		122	19	39	62	6
		125 (120 ± 6.2)	24 (19 ± 4.5)	45 (41 ± 3.8)	57 (65 ± 9.3)	13 (12 ± 5.1)
	19.5	120	16	43	53	11
		135	22	38	53	15
		136 (130 ± 9.0)	19 (19 ± 3.0)	35 (39 ± 4.0)	51 (52 ± 1.2)	14 (13 ± 2.1)
	39.1	129	11	38	56	15
		120	8	45	74	15
		111 (120 ± 9.0)	16 (12 ± 4.0)	40 (41 ± 3.6)	77 (69 ± 11.4)	16 (15 ± 0.6)
	78.1	88	20	43	44	7
		101	16	34	57	11
		121 (103 ± 16.6)	19 (18 ± 2.1)	36 (38 ± 4.7)	48 (50 ± 6.7)	11 (10 ± 2.3)
陽性対照	S9Mixを必要とするもの	97 *	18 *	48	66	15 *
		105 *	18 *	54	59	17 *
		101 * (101 ± 4.0)	17 * (18 ± 0.6)	42 (48 ± 6.0)	41 (55 ± 12.9)	16 * (16 ± 1.0)
	156	81 *	0 *	18 *	24 *	0 *
		68 *	0 *	16 *	35 *	0 *
		80 * (76 ± 7.2)	0 * (0 ± 0.0)	15 * (16 ± 1.5)	25 * (28 ± 6.1)	0 * (0 ± 0.0)
	313	132	18	27	52	16
		134	15	39	61	8
		117 (128 ± 9.3)	16 (16 ± 1.5)	39 (35 ± 6.9)	42 (52 ± 9.5)	13 (12 ± 4.0)
	9.77	113	15	38	75	16
		122	19	39	62	6
		125 (120 ± 6.2)	24 (19 ± 4.5)	45 (41 ± 3.8)	57 (65 ± 9.3)	13 (12 ± 5.1)
	19.5	120	16	43	53	11
		135	22	38	53	15
		136 (130 ± 9.0)	19 (19 ± 3.0)	35 (39 ± 4.0)	51 (52 ± 1.2)	14 (13 ± 2.1)
	39.1	129	11	38	56	15
		120	8	45	74	15
		111 (120 ± 9.0)	16 (12 ± 4.0)	40 (41 ± 3.6)	77 (69 ± 11.4)	16 (15 ± 0.6)
	78.1	88	20	43	44	7
		101	16	34	57	11
		121 (103 ± 16.6)	19 (18 ± 2.1)	36 (38 ± 4.7)	48 (50 ± 6.7)	11 (10 ± 2.3)

(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、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:4-ヒドロキシジフェニルメタン

No. T-0143

試験実施期間		2008年3月25日 より 2008年3月28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 (一)	陰性対照(DMSO)	102	8	18	16	5
		121	11	19	15	11
		110 (111 ± 9.5)	11 (10 ± 1.7)	11 (16 ± 4.4)	21 (17 ± 3.2)	7 (8 ± 3.1)
	9.77	103	11	10	11	7
		119	11	23	16	8
		123 (115 ± 10.6)	10 (11 ± 0.6)	21 (18 ± 7.0)	21 (16 ± 5.0)	13 (9 ± 3.2)
	19.5	120	11	19	23	10
		106	8	11	16	4
		111 (112 ± 7.1)	8 (9 ± 1.7)	11 (14 ± 4.6)	12 (17 ± 5.6)	12 (9 ± 4.2)
	39.1	122	8	25	19	4
		112	9	15	12	7
		131 (122 ± 9.5)	5 (7 ± 2.1)	21 (20 ± 5.0)	14 (15 ± 3.6)	8 (6 ± 2.1)
S9Mix (十)	陰性対照(DMSO)	124	10	15	20	11
		116	7	16	16	7
		103 (114 ± 10.6)	8 (8 ± 1.5)	7 (13 ± 4.9)	19 (18 ± 2.1)	11 (10 ± 2.3)
	156	87 *	10 *	17	10 *	4 *
		83 *	15 *	18	11 *	3 *
		87 * (86 ± 2.3)	5 * (10 ± 5.0)	23 (19 ± 3.2)	8 * (10 ± 1.5)	2 * (3 ± 1.0)
	313	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *
		0 *	0 *	0 *	0 *	0 *
		0 * (0 ± 0.0)	0 * (0 ± 0.0)	0 * (0 ± 0.0)	0 * (0 ± 0.0)	0 * (0 ± 0.0)
	9.77	142	6	10	38	11
		112	9	17	34	12
		119 (124 ± 15.7)	8 (8 ± 1.5)	7 (11 ± 5.1)	39 (37 ± 2.6)	10 (11 ± 1.0)
	19.5	114	11	13	34	18
		103	10	15	32	12
		128 (115 ± 12.5)	7 (9 ± 2.1)	19 (16 ± 3.1)	31 (32 ± 1.5)	8 (13 ± 5.0)
	39.1	120	11	11	36	7
		104	11	21	25	11
		125 (116 ± 11.0)	7 (10 ± 2.3)	18 (17 ± 5.1)	41 (34 ± 8.2)	13 (10 ± 3.1)
	78.1	121	8	12	44	12
		117	5	21	16	8
		125 (121 ± 4.0)	11 (8 ± 3.0)	18 (17 ± 4.6)	47 (36 ± 17.1)	14 (11 ± 3.1)
陽性対照	S9Mixを必要としないもの	114	15	17	37	9
		112	13	16	48	21
		115 (114 ± 1.5)	8 (12 ± 3.6)	15 (16 ± 1.0)	34 (40 ± 7.4)	15 (15 ± 6.0)
	S9Mixを必要とするもの	97 *	6 *	22	38	6 *
		122 *	11 *	19	30	8 *
		138 * (119 ± 20.7)	4 * (7 ± 3.6)	18 (20 ± 2.1)	33 (34 ± 4.0)	15 * (10 ± 4.7)
	313	65 *	0 *	10 *	18 *	0 *
		105 *	0 *	12 *	27 *	0 *
		77 * (82 ± 20.5)	0 * (0 ± 0.0)	10 * (11 ± 1.2)	15 * (20 ± 6.2)	0 * (0 ± 0.0)
	S9Mixを必要とするもの	名称	AF-2	SAZ	AF-2	ICR-191
		用量(μg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1
		コロニー数/プレート	609	278	70	488
陽性対照	S9Mixを必要とするもの	541	249	74	480	2015
		551 (567 ± 36.7)	301 (276 ± 26.1)	84 (76 ± 7.2)	447 (472 ± 21.7)	2386
						2095 (2165 ± 195.2)
	S9Mixを必要とするもの	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P
		用量(μg/プレート)	5.0	2.0	10.0	5.0
		コロニー数/プレート	754	325	1055	254
	S9Mixを必要とするもの	745	365	1044	269	77
		753 (751 ± 4.9)	348 (346 ± 20.1)	868 (989 ± 104.9)	264 (262 ± 7.6)	89
						89 (85 ± 6.9)

(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、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

図 1

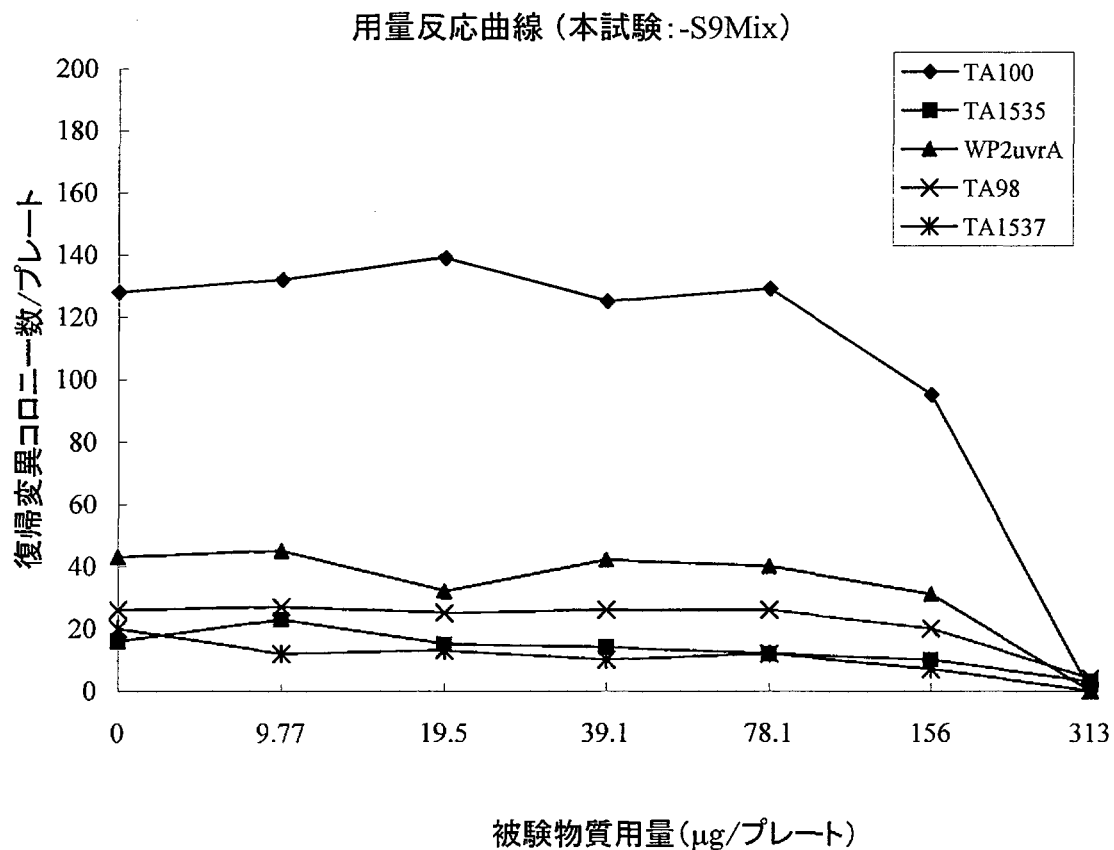
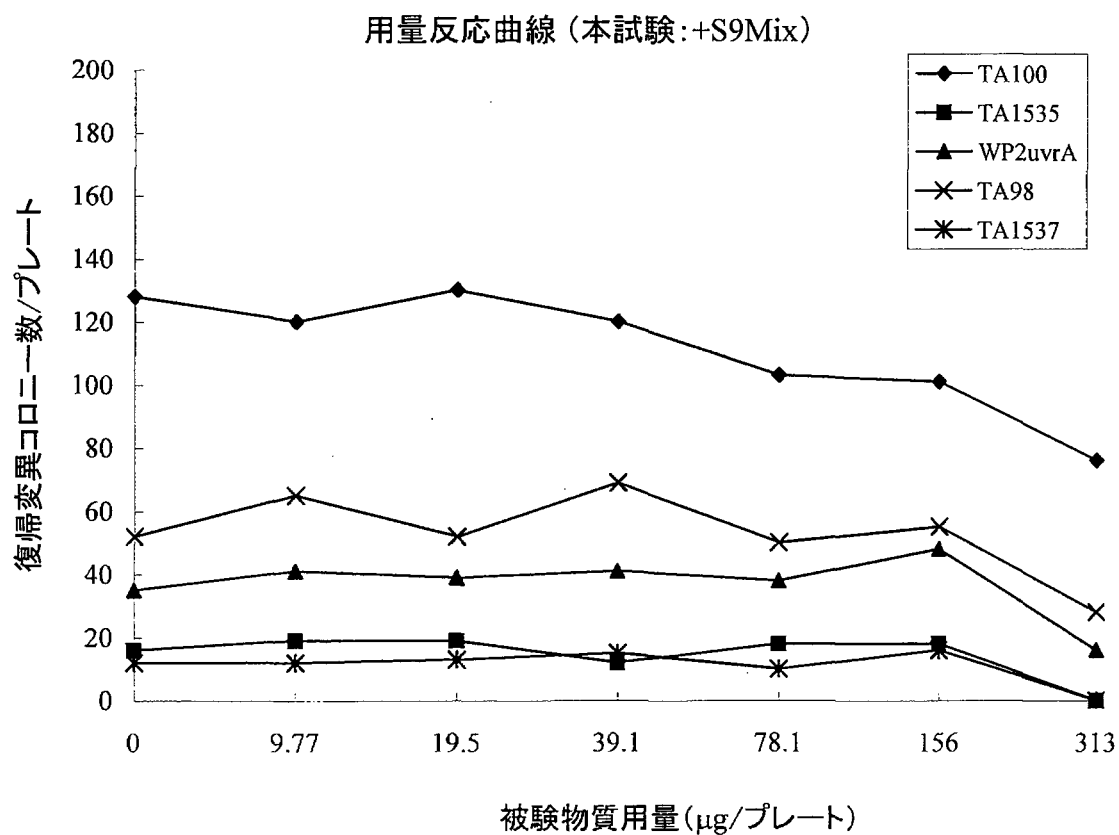


図 2



Background Data of the reverse mutation tests in bacteria at the Tokyo Laboratory of the Bozo Research Center Inc.

CODE No.: 071109

Period: From July 20, 2007 to November 1, 2007

(Pre-incubation Method)

Tester Strains	S9Mix (-) or (+)	Classification	Management ranges		Mean	Management ranges		number of plates
			-3SD	-2SD		+2SD	+3SD	
TA100	-	Solvent control	52	66	95	123	138	200
		Positive control AF-2(0.01 μ g/plate)	401	458	572	687	744	200
	+	Solvent control	69	86	119	153	169	200
		Positive control B[a]P(5.0 μ g/plate)	631	722	902	1082	1173	200
TA1535	-	Solvent control	3	6	12	18	21	200
		Positive control SAZ(0.5 μ g/plate)	188	239	342	444	495	200
	+	Solvent control	1	5	12	19	23	200
		Positive control 2AA(2.0 μ g/plate)	290	331	414	497	538	200
WP2uvrA	-	Solvent control	6	11	23	34	40	200
		Positive control AF-2(0.01 μ g/plate)	46	58	83	109	121	200
	+	Solvent control	6	13	25	38	44	200
		Positive control 2AA(10.0 μ g/plate)	754	862	1077	1292	1400	200
TA98	-	Solvent control	5	10	21	31	36	200
		Positive control AF-2(0.1 μ g/plate)	326	372	465	558	605	200
	+	Solvent control	16	24	40	56	64	200
		Positive control B[a]P(5.0 μ g/plate)	233	266	333	399	433	200
TA1537	-	Solvent control	1	4	10	17	20	200
		Positive control ICR-191(1.0 μ g/plate)	1529	1748	2185	2621	2840	200
	+	Solvent control	1	6	14	23	28	200
		Positive control B[a]P(5.0 μ g/plate)	58	74	105	137	153	200

(Notice)

Solvent controls Water, Dimethylsulfoxide(DMSO), Acetone, *N,N*-Dimethylformamid or 1,4-Dioxane

Positive controls AF-2 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

SAZ : Sodium azide

ICR-191 : 2-methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)aminopropylamino]acridine·2HCl

B[a]P : Benzo[a]pyrene

2AA : 2-aminoanthracene

S9Mix (-) : without metabolic activation

(+) : with metabolic activation

信頼性保証陳述書

試験番号 : T-0143

試験表題 : 4-ヒドロキシジフェニルメタンの細菌を用いる復帰突然変異試験

本試験は以下に示す基準を遵守して実施されたことを保証致します。

- ・「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(OECD:1997年11月26日)
- ・「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」(平成15年11月21日:薬食発第1121003号、平成15・11・17製局第3号、環境企発第031121004号、平成20年7月4日最終改正)

なお、調査は下記の通り実施致しました。

2009年10月16日
株式会社ボゾリサーチセンター
信頼性保証部門責任者

試験における調査

調査項目	調査担当者	調査日	試験責任者及び運営管理者への報告日
試験計画書		2008年2月21日	2008年2月21日
調製・被験物質の保存・被験物質の処理		2008年3月14日	2008年3月17日
計数		2008年3月17日	2008年3月19日
生データ		2008年6月4日	2008年6月5日
最終報告書草案・図・表		2008年6月4日	2008年6月5日
最終報告書		2009年10月16日	2009年10月16日

プロセス調査

調査項目	調査担当者	調査日	部門責任者及び運営管理者への報告日
菌株の特性検査		2008年1月25日	
		2008年1月28日	2008年1月28日
		2008年3月13日	2008年3月14日
陽性対照物質の管理		2008年3月13日	2008年3月14日

試験責任者陳述書

試験番号 : T-0143

試験表題 : 4-ヒドロキシジフェニルメタンの細菌を用いる復帰突然変異試験

当該試験は、「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」（平成 15 年 11 月 21 日：薬食発第 1121003 号、平成 15・11・17 製局第 3 号、環保企発第 031121004 号、平成 20 年 7 月 4 日最終改正）及び「OECD Principles of Good Laboratory Practice」（OECD：1997 年 11 月 26 日）を満たす試験施設等において実施されたものに相違ありません。

2009 年 10 月 16 日

株式会社ボゾリサーチセンター

試験責任者

