

最終報告書

ジシクロヘキシルアミンの細菌を用いた復帰突然変異試験

(試験番号：96-068)

財団法人 畜産生物科学安全研究所

Study No. 96-068

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液の調製	6
9. 濃度設定試験（予備試験）	6
10. 本試験	6
1) 濃度設定	6
2) 実験方法	6
(1) プレインキュベーション法（直接法）	6
(2) プレインキュベーション法（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
1. 濃度設定試験	8
2. 本試験	9
3. 確認試験	9
結論および参考事項	10
参考文献	10

表：

表 1-1	S9 mix 非存在下におけるジシクロヘキシルアミン の復帰突然変異試験結果〔濃度設定試験－直接法〕	11
表 1-2	S9 mix 存在下におけるジシクロヘキシルアミン の復帰突然変異試験結果〔濃度設定試験－代謝活性化法〕	12
表 2-1	S9 mix 非存在下におけるジシクロヘキシルアミン の復帰突然変異試験結果〔本試験－直接法〕	13
表 2-2	S9 mix 存在下におけるジシクロヘキシルアミン の復帰突然変異試験結果〔本試験－代謝活性化法〕	14
表 3	S9 mix 存在下におけるジシクロヘキシルアミン の復帰突然変異試験結果〔確認試験－代謝活性化法〕	15

図：

図 1-1	ジシクロヘキシルアミン復帰突然変異試験結果－濃度設定試験	16
図 1-2	ジシクロヘキシルアミン復帰突然変異試験結果－濃度設定試験	17
図 1-3	ジシクロヘキシルアミン復帰突然変異試験結果－濃度設定試験	18
図 2-1	ジシクロヘキシルアミン復帰突然変異試験結果－本試験	19
図 2-2	ジシクロヘキシルアミン復帰突然変異試験結果－本試験	20
図 2-3	ジシクロヘキシルアミン復帰突然変異試験結果－本試験	21
図 3	ジシクロヘキシルアミン復帰突然変異試験結果－確認試験	22

要 約

ジシクロヘキシルアミンの突然変異誘発性の有無を検討するため、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。

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。156, 313, 625, 1250, 2500 および 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 濃度を設定して行った濃度設定試験では、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 2500 および 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 濃度で菌の生育阻害が認められたが、いずれの濃度においても陰性対照（溶媒対照）と比較して2倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。したがって、本試験はいずれの指標菌株とも 2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ を最高濃度とし、以下公比2で 1250, 625, 313, 156 および 78 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の計6濃度を用いて行った。その結果、濃度設定試験と同様、いずれの菌株においても 2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 濃度で菌の生育阻害が認められ、また、いずれの濃度においても復帰変異コロニー数は、陰性対照値の2倍を越えなかった。

但し、濃度設定試験および本試験ともに代謝活性化法の TA100 で若干の濃度に依存した復帰変異コロニー数の増加傾向が認められたため、1250~2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 濃度間に濃度依存性の復帰変異コロニー数の増加が認められるか否かを調べる目的で確認試験を実施した。750, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000, 2250 および 2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 濃度を設定して行った結果、いずれの濃度においても復帰変異コロニー数の明らかな増加は認められず、濃度依存性も認められなかった。また、1500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の濃度では被験物質による菌の生育阻害が認められた。

以上の成績から、本実験条件下では、ジシクロヘキシルアミンの細菌に対する突然変異誘発性は陰性と判定した。

試験目的

この試験は、ジシクロヘキシルアミンの細菌に対する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(略号) : ジシクロヘキシルアミン (DCHA)

別名 ドデカヒドロジフェニルアミン, *N*-シクロヘキシルシクロヘキサミン

CAS番号 : 101-83-7

ロット番号 :

純度 : 99.63 % (平成8年9月18日分析)
(不純物 ジシクロヘキシルイミン : 0.119%)

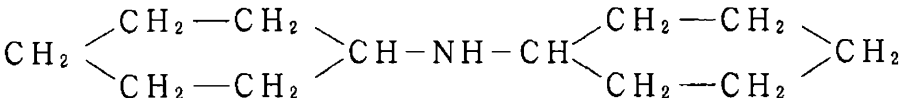
入手先(製造元) :

入手日 :

入手量 : 10 g

物性等 :

化学名 ジシクロヘキシルアミン (Dicyclohexylamine)

構造式 

分子式 $C_{12}H_{23}N$

分子量 181.31

性状(常温) 無色透明の液体

沸点 255.8 °C

融点 -0.1 °C

蒸気圧 532 Pa (100 °C)

溶解性 水 : 微溶 0.16 g/100 ml

アルコール, エーテル, ベンゼン, アセトン : 可溶

安定性：安定〔実験終了後、残余被験物質を試験委託者において分析（平成9年4月9日）した結果、純度は99.75%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℃）、密栓（窒素充填）

2. 指標菌株

以下の5種類の菌株を用いた。

（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

指標菌株は、国立公衆衛生院より入手（平成6年12月19日）したものをを用いた。

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ビオチン要求性
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, 株式会社同仁化学研究所, ロット番号 B805086, >99%）を 0.07 ml の割合で加えて-80℃以下で保存した。この保存菌株をニュートリエントブロス（Bacto-nutrient broth dehydrated, Difco laboratories,

ロット番号 44077JK) 液体培地に接種し、37°Cで 12 時間振盪培養した。培養後の菌懸濁液については、分光光度計で吸光度 (OD_{680nm}) を測定し、濁度と生菌数の換算式より 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 ($\times 10^9$ 個/ml)

指標菌株	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
濃度設定試験	1.58	1.72	1.52	1.48	1.24
本試験	1.54	1.72	1.52	1.44	1.24
確認試験	1.62	—	—	—	—

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 (濃度設定試験および本試験: ロット番号 FSM-358, 1997年2月6日製造, 1997年2月18日, 3月7日購入, 確認試験: ロット番号 FSM-356, 1996年12月13日製造, 1997年1月8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 当たりの組成は、次のとおりである。

S9 製造法

A. 使用動物

- 種・系統: Sprague-Dawley系ラット (日本エスエルシー株式会社)
- 性・週齢: 雄・7週齢
- 体重: 186~229g (FSM-358), 190~226g (FSM-356)

B. 誘導法

- 誘導物質: phenobarbital (PB), 5,6-benzoflavone (BF)
- 投与経路: 腹腔内投与
- 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 ($9,000 \times g$) 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
ナトリウムーリン酸緩衝液 (pH 7.4)	100	μmol
S9	0.1	ml

6. 被験物質の供試液の調製

被験物質は水にほとんど溶けず、予備的検討の結果、DMSOにも不溶で、アセトンには可溶であったことから、溶媒にはアセトン（和光純薬工業株式会社、ロット番号 ESE3934）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。溶媒を用いて最高濃度の供試液（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濃度の被験物質供試液を調製した。

7. 陰性対照および陽性対照

陰性対照（溶媒対照）は、被験物質の溶媒であるアセトンを用いた。陽性対照としては、以下の既知変異原性物質を用いた。

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 KCM 2259）

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 077 21MZ）

AF-2 および 2-AA は DMSO (株式会社同仁化学研究所, >99%, ロット番号 B805086) 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 K6G94) に溶解した。

8. アミノ酸添加軟寒天培地の調製

0.6%寒天粉末 (Difco laboratories, ロット番号 42101JG) および 0.5%塩化ナトリウム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-ビオチンおよび 0.5 mM L-ヒスチジン溶液, *E. coli* 用には 0.5 mM L-トリプトファン溶液を 1/10 容加え, アミノ酸添加軟寒天培地とした。

9. 濃度設定試験 (予備試験)

本試験における被験物質の適切な濃度を把握するために, 156, 313, 625, 1250, 2500 および 5000 μg /プレートの 6 濃度を用いて, 本試験と同様の実験方法で試験を行った。

10. 本試験

1) 濃度設定

濃度設定試験の結果に基づき, 最高濃度は 2500 μg /プレートとし, 以下公比 2 で計 6 段階の濃度を設定した。

2) 実験方法

(1) プレインキュベーション法 (直接法)

滅菌小試験管に前培養した菌懸濁液 0.1 ml, 被験物質の供試液 0.05 ml および 100 mM ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 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 (テスメディアAN培地, オリエンタル酵母工業株式会社, 濃度設定試験および本試験: ロット番号 AN840KL, 1996年11月12日製造, 1997年2月18日購入, 確認試験: ロット番号 AN860KL, 1996年11月27日製造, 1997年3月7日購入) は, Vogel-Bonner E 培地 (0.2%クエン酸・一水塩, 1%リン酸二カリウム, 0.192%リン酸一アンモニウム, 0.066%水酸化ナトリウム, 0.02%硫酸マグネシウム・七水塩) に 1.5%寒天粉末および 2%グルコースを加え, 30ml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。陰性対照群においては上記の被験物質の供試液 0.05 ml にかわり、被験物質用溶媒 0.05 ml を、また、陽性対照群においては、陽性対照物質溶液 0.1 ml を用いて同様に実施した。試験は各濃度 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）

滅菌小試験管に前培養した菌懸濁液 0.1 ml、被験物質の供試液 0.05 ml および S9 mix 0.5 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。陰性対照群においては、上記の被験物質の供試液 0.05 ml にかわり、被験物質用溶媒 0.05 ml を、また、陽性対照群においては、陽性対照物質溶液 0.1 mlを用いて同様に実施した。試験は各濃度 3 枚のプレートで行った。

11. 無菌試験

濃度設定試験、本試験および確認試験において、用いた溶媒、S9 mix および最高濃度の被験物質の供試液について、それぞれ 0.1 ml に 0.6%軟寒天 2 ml を加え、最少グルコース寒天平板培地に重層後、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 基準をすべて満たす場合に、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、各濃度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、以下の3基準をすべて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倍以上の数の復帰変異コロニーが出現する。
- 2) 被験物質濃度の増加とともに復帰変異コロニー数が増加する（濃度依存性）。
- 3) 濃度設定試験および本試験の結果から、復帰変異コロニー数の増加に再現性が認められる。

結 果

1. 濃度設定試験

結果は、表 1-1, 1-2 および図 1-1, 1-2, 1-3 に示した。直接法ならびに代謝活性化法とともに、全ての指標菌株において 2500 μg /プレート以上の濃度で被験物質による生育阻害が認められたが、いずれの濃度においても陰性対照と比較して2倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。ただし、代謝活性化法の TA100 においては、313~1250 μg /プレート濃度で濃度に依存した若干の復帰変異コロニー数の増加傾向が認められた。なお、2500 および 5000 μg /プレート濃度では、被験物質の供試液、菌液およびナトリウムーリン酸緩衝液または S9 mix の混合液をアミノ酸添加軟寒天培地とともに最少グルコース寒天平板培地に重層した際、油滴様の被験物質の析出が認められたが、37°Cで48時間培養後の復帰変異コロニー計数時には認められなかった。

陰性対照では背景データ（添付資料）の範囲内の復帰変異コロニー数が認められ、陽性対照として用いた AF-2, SA, 9-AA では S9 mix 非存在下で、2-AA では S9 mix 存在下でそれぞれ背景データ（添付資料）の範囲内の陽性を示す復帰変異コロニー数の増加が認められた。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。

したがって、本試験における被験物質の処理濃度は、最高濃度を抗菌性の認められる 2500 μg /プレートとし、以下公比 2 で 1250, 625, 313, 156 および 78 μg /プレートとした。

2. 本試験

結果は、表 2-1, 2-2 および図 2-1, 2-2, 2-3 に示した。濃度設定試験と同様、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ける復帰変異コロニー数は、陰性対照値の2倍を越えるものではなかった。ただし、代謝活性化法の TA100 では、156~1250 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 濃度で濃度に依存した若干の復帰変異コロニー数の増加傾向が認められた。また、いずれの菌株においても 2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 濃度で被験物質による生育阻害が認められた。なお、2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 濃度では、濃度設定試験と同様、油滴様の被験物質の析出が最少グルコース寒天平板培地への重層時に認められたが、培養終了時には認められなかった。

陰性対照では背景データ（添付資料）の範囲内の復帰変異コロニー数が認められ、陽性対照においてはそれぞれ背景データ（添付資料）の範囲内の陽性を示す復帰変異コロニー数の増加が認められた。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。

3. 確認試験

濃度設定試験および本試験において、代謝活性化法の TA100で若干の濃度に依存した復帰変異コロニー数の増加傾向が認められたため、1250 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 濃度から抗菌性が認められた 2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 濃度間でさらに濃度依存性の復帰変異コロニー数の増加が認められるか否かを調べる目的で、750, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000, 2250 および 2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 濃度を設定し、TA100 の代謝活性化法による確認試験を行った。

その結果、いずれの濃度においても復帰変異コロニー数の明らかな増加は認められず、濃度依存性も認められなかった。また、1500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の濃度では被験物質による菌の生育阻害が認められた。なお、2000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の濃度では、油滴様の被験物質が最少グルコース寒天平板培地への重層時に認められたが、培養終了時には認められなかった。

なお、陰性対照では背景データ（添付資料）の範囲内の復帰変異コロニー数が認められ、陽性対照においては、それぞれ背景データ（添付資料）の範囲内の陽性を示す復帰変異コロニー数の増加が認められた。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。

結論および参考事項

ジシクロヘキシルアミンの細菌を用いた復帰突然変異試験を実施した結果、濃度設定試験、本試験および確認試験のいずれにおいても代謝活性化の有無にかかわらず、すべての指標菌株で明らかな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、濃度設定試験、本試験および確認試験のいずれも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、ジシクロヘキシルアミンの突然変異誘発性は陰性と判定した。なお、ジシクロヘキシルアミンの変異原性については、すでに *S. typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 を用いた復帰突然変異試験³⁾ およびシリアンハムスター由来の BHK21cl13 細胞を用いたトランスフォーメーション試験⁴⁾ で陰性と報告されており、一方、ヒトリンパ球を用いた染色体異常試験では陽性⁵⁾ 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., Nichols, W. and Ramel, C., Elsevier Science Publisher, Amsterdam, New York, Oxford, pp.161-187.
- 3) Mortelmans, K., Haworth, S., Lowlor, T., Speck, W., Tainer, B. and Zeiger, E. (1986). *Salmonella* mutagenicity tests : II. Results from the testing of 270 chemicals, *Environmental Mutagenesis*, **8**(suppl.7), 1-119.
- 4) 賀田恒夫, 石館 基 監修, "環境変異原データ集," サイエントリスト社, 東京, 1980, p.141.
- 5) International Agency for Research on Cancer (IARC). (1987). "IARC Monographs on Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans," Suppl.6, World Health Organization, Lyon, pp.240-241.

表 1-1 S9 mix 非存在下におけるジシクロヘキシルアミンの復帰突然変異試験結果〔濃度設定試験-直接法〕

濃 度 〔 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 〕	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	WP2uvrA	TA98	TA1537
陰 性 対 照 〔アセトン〕	121	12	19	19	6
	139	11	12	18	6
	133	13	16	14	5
	(131 \pm 9)	(12 \pm 1)	(16 \pm 4)	(17 \pm 3)	(6 \pm 1)
156	121	12	26	26	8
	107	9	16	20	7
	133	12	10	18	7
	(120 \pm 13)	(11 \pm 2)	(17 \pm 8)	(21 \pm 4)	(7 \pm 1)
313	120	7	15	15	7
	134	10	17	19	6
	141	14	16	22	4
	(132 \pm 11)	(10 \pm 4)	(16 \pm 1)	(19 \pm 4)	(6 \pm 2)
625	110	10	18	19	8
	119	11	10	15	10
	112	12	16	21	7
	(114 \pm 5)	(11 \pm 1)	(15 \pm 4)	(18 \pm 3)	(8 \pm 2)
1250	125	10	12	12	5
	121	11	16	11	3
	118	11	15	13	4
	(121 \pm 4)	(11 \pm 1)	(14 \pm 2)	(12 \pm 1)	(4 \pm 1)
2500	0*	0*	0*	0*	0*
	0*	0*	0*	0*	0*
	0*	0*	0*	0*	0*
	(0 \pm 0)	(0 \pm 0)	(0 \pm 0)	(0 \pm 0)	(0 \pm 0)
5000	0*	0*	0*	0*	0*
	0*	0*	0*	0*	0*
	0*	0*	0*	0*	0*
	(0 \pm 0)	(0 \pm 0)	(0 \pm 0)	(0 \pm 0)	(0 \pm 0)
陽 性 対 照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
$\mu\text{g}/\text{プレート}$	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復 帰 変 異 コ ロ ニ ー 数 / プ レ ー ト	829	287	888	385	731
	964	332	934	355	819
	904	360	948	381	739
	(899 \pm 68)	(326 \pm 37)	(923 \pm 31)	(374 \pm 16)	(763 \pm 49)

(): 平均値 \pm 標準偏差

* : 菌の生育阻害が認められた

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 存在下におけるジシクロヘキシルアミン
の復帰突然変異試験結果〔濃度設定試験-代謝活性化法〕

濃 度 〔 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 〕	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	WP2uvrA	TA98	TA1537
陰 性 対 照 〔アセトン〕	108	10	19	31	12
	116	9	21	27	11
	128	13	14	33	10
	(117 \pm 10)	(11 \pm 2)	(18 \pm 4)	(30 \pm 3)	(11 \pm 1)
156	120	10	23	33	14
	121	13	23	28	11
	125	15	24	30	12
	(122 \pm 3)	(13 \pm 3)	(23 \pm 1)	(30 \pm 3)	(12 \pm 2)
313	126	8	15	33	11
	122	11	14	30	9
	115	10	14	41	14
	(121 \pm 6)	(10 \pm 2)	(14 \pm 1)	(35 \pm 6)	(11 \pm 3)
625	134	17	17	37	15
	147	10	17	42	9
	135	8	14	45	14
	(139 \pm 7)	(12 \pm 5)	(16 \pm 2)	(41 \pm 4)	(13 \pm 3)
1250	165	10	15	37	15
	143	10	21	33	17
	168	11	20	40	15
	(159 \pm 14)	(10 \pm 1)	(19 \pm 3)	(37 \pm 4)	(16 \pm 1)
2500	0*	0*	21*	0*	0*
	0*	0*	13*	0*	0*
	0*	0*	16*	0*	0*
	(0 \pm 0)	(0 \pm 0)	(17 \pm 4)	(0 \pm 0)	(0 \pm 0)
5000	0*	0*	0*	0*	0*
	0*	0*	0*	0*	0*
	0*	0*	0*	0*	0*
	(0 \pm 0)	(0 \pm 0)	(0 \pm 0)	(0 \pm 0)	(0 \pm 0)
陽 性 対 照	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
$\mu\text{g}/\text{プレート}$	1	2	10	1	2
復 帰 変 異 コ ロ ニ ー 数 / プ レ ー ト	536	196	896	210	86
	638	193	934	222	80
	543	211	1001	235	76
	(572 \pm 57)	(200 \pm 10)	(944 \pm 53)	(222 \pm 13)	(81 \pm 5)

(): 平均値 \pm 標準偏差

* : 菌の生育阻害が認められた

2-AA: 2-アミノアントラセン

表 2-1 S9 mix 非存在下におけるジシクロヘキシルアミン
の復帰突然変異試験結果〔本試験-直接法〕

濃 度 〔 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 〕	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	WP2uvrA	TA98	TA1537
陰 性 対 照 〔アセトン〕	127	11	20	27	7
	119	13	14	27	8
	110	15	22	26	6
	(119 \pm 9)	(13 \pm 2)	(19 \pm 4)	(27 \pm 1)	(7 \pm 1)
78	122	8	20	31	5
	117	12	13	32	4
	131	8	21	25	6
	(123 \pm 7)	(9 \pm 2)	(18 \pm 4)	(29 \pm 4)	(5 \pm 1)
156	107	8	16	21	7
	108	11	19	20	7
	107	15	15	15	8
	(107 \pm 1)	(11 \pm 4)	(17 \pm 2)	(19 \pm 3)	(7 \pm 0)
313	112	12	15	25	8
	124	10	13	21	7
	126	15	13	30	5
	(121 \pm 8)	(12 \pm 3)	(14 \pm 1)	(25 \pm 5)	(7 \pm 2)
625	103	8	11	25	10
	125	10	10	21	7
	115	10	14	22	7
	(114 \pm 11)	(9 \pm 1)	(12 \pm 2)	(23 \pm 2)	(8 \pm 2)
1250	106	10	15	21	5
	116	9	15	18	6
	107	11	11	19	4
	(110 \pm 6)	(10 \pm 1)	(14 \pm 2)	(19 \pm 2)	(5 \pm 1)
2500	0*	0*	1*	0*	0*
	0*	0*	9*	0*	0*
	0*	0*	12*	0*	0*
	(0 \pm 0)	(0 \pm 0)	(7 \pm 6)	(0 \pm 0)	(0 \pm 0)
陽 性 対 照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
$\mu\text{g}/\text{プレート}$	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復 帰 変 異 コ ロ ニ ー 数 / プ レ ー ト	1014	426	943	420	856
	964	421	925	391	868
	917	394	1011	392	994
	(965 \pm 49)	(414 \pm 17)	(960 \pm 45)	(401 \pm 16)	(906 \pm 76)

(): 平均値 \pm 標準偏差

* : 菌の生育阻害が認められた

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 存在下におけるジシクロヘキシルアミン
の復帰突然変異試験結果〔本試験-代謝活性化法〕

濃 度 〔 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 〕	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	WP2uvrA	TA98	TA1537
陰 性 対 照 〔アセトン〕	113	13	20	34	10
	106	12	21	38	17
	117	12	17	33	14
	(112 \pm 6)	(12 \pm 1)	(19 \pm 2)	(35 \pm 3)	(14 \pm 4)
78	117	13	18	30	10
	112	10	22	43	19
	119	13	17	38	12
	(116 \pm 4)	(12 \pm 2)	(19 \pm 3)	(37 \pm 7)	(14 \pm 5)
156	113	16	14	30	14
	114	14	12	34	15
	123	8	19	37	16
	(117 \pm 6)	(13 \pm 4)	(15 \pm 4)	(34 \pm 4)	(15 \pm 1)
313	124	11	23	39	10
	125	12	14	41	13
	141	12	16	46	17
	(130 \pm 10)	(12 \pm 1)	(18 \pm 5)	(42 \pm 4)	(13 \pm 4)
625	136	8	17	36	15
	128	15	19	36	17
	136	14	12	42	13
	(133 \pm 5)	(12 \pm 4)	(16 \pm 4)	(38 \pm 3)	(15 \pm 2)
1250	125	12	21	30	12
	144	11	19	33	9
	149	4	12	28	13
	(139 \pm 13)	(9 \pm 4)	(17 \pm 5)	(30 \pm 3)	(11 \pm 2)
2500	0*	5*	0*	0*	0*
	0*	3*	0*	0*	3*
	0*	5*	0*	0*	0*
	(0 \pm 0)	(4 \pm 1)	(0 \pm 0)	(0 \pm 0)	(1 \pm 2)
陽 性 対 照	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
$\mu\text{g}/\text{プレート}$	1	2	10	1	2
復 帰 変 異 コロニー数 /プレート	590	237	907	272	85
	514	276	965	278	83
	502	242	901	294	79
	(535 \pm 48)	(252 \pm 21)	(924 \pm 35)	(281 \pm 11)	(82 \pm 3)

(): 平均値 \pm 標準偏差

* : 菌の生育阻害が認められた

2-AA: 2-アミノアントラセン

表 3 S9 mix 存在下におけるジシクロヘキシルアミン
の復帰突然変異試験結果〔確認試験-代謝活性化法〕

濃 度 〔 μg /プレート〕	復帰変異コロニー数/プレート		
	塩基対置換型		
	TA100		
陰性対照 〔アセトン〕	134	135 (132 \pm 4)	128
750	155	166 (164 \pm 8)	170
1000	176	170 (162 \pm 20)	139
1250	129	146 (141 \pm 10)	147
1500	127*	130* (128 \pm 2)	127*
1750	137*	149* (141 \pm 7)	138*
2000	144*	189* (157 \pm 28)	137*
2250	115*	135* (129 \pm 12)	136*
2500	12*	8* (12 \pm 5)	17*
陽性対照	2-AA		
μg /プレート	1		
復帰変異コロニー数 /プレート	609	693 (632 \pm 54)	593

(): 平均値 \pm 標準偏差
* : 菌の生育阻害が認められた
2-AA: 2-アミノアントラセン

図 1-1 ジシクロヘキシルアミンの復帰突然変異試験結果—濃度設定試験

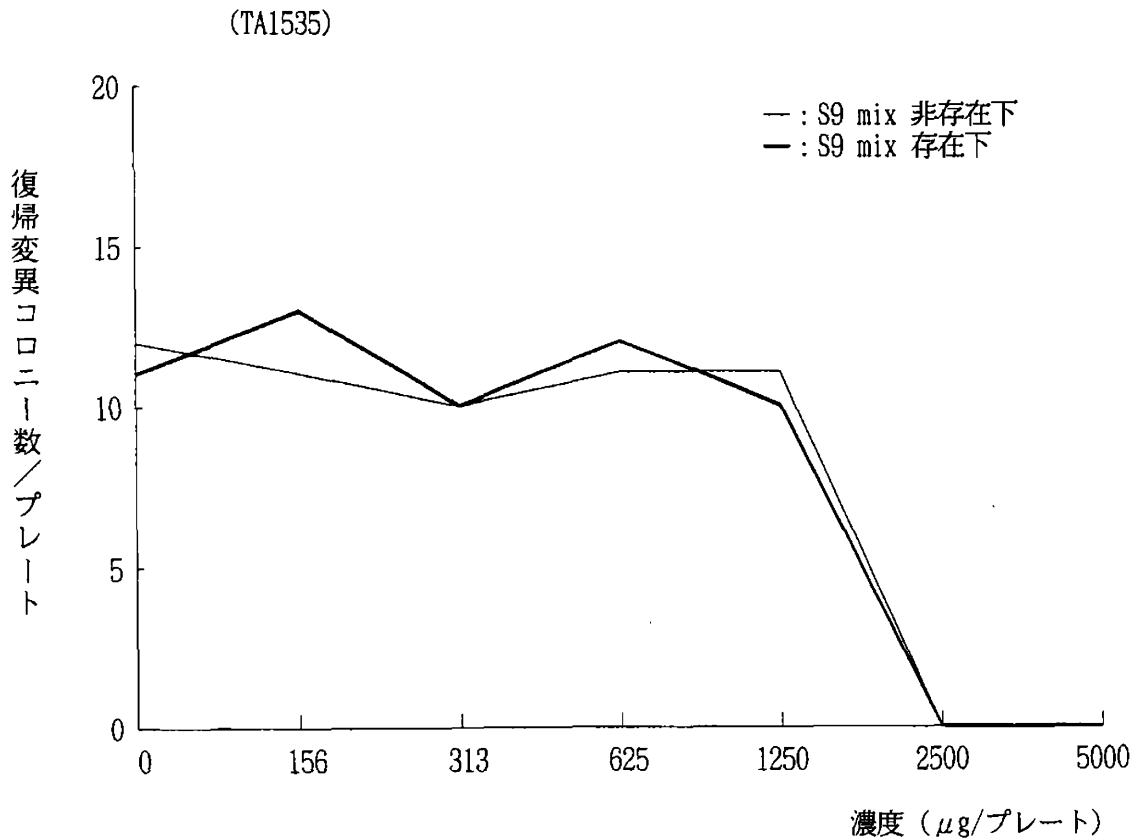
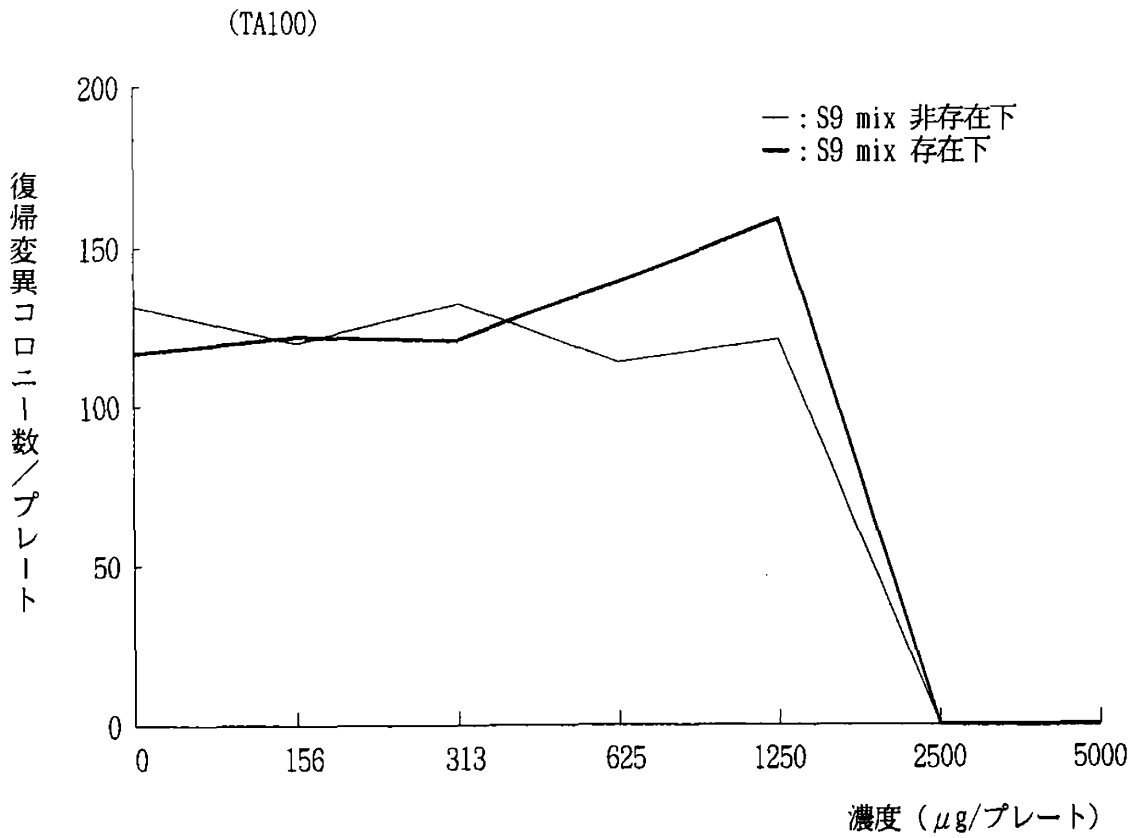


図 1-2 ジシクロヘキシルアミンの復帰突然変異試験結果—濃度設定試験

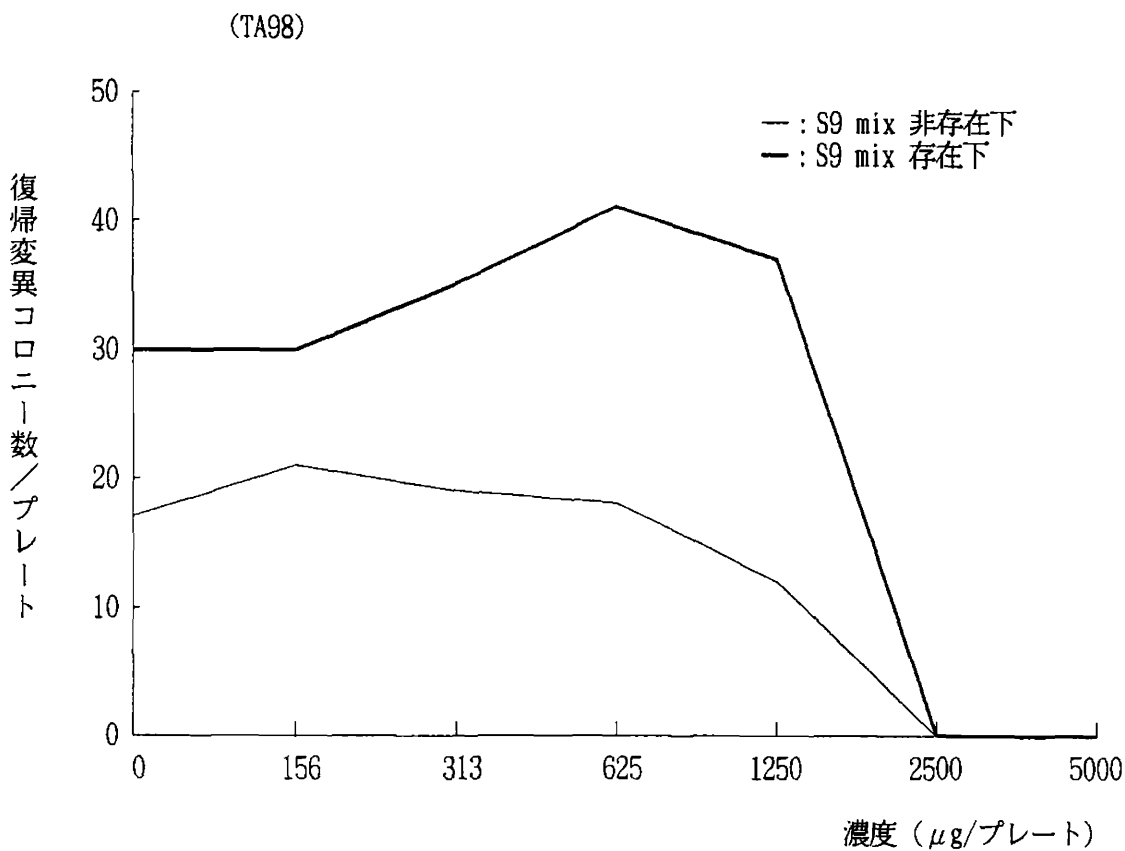
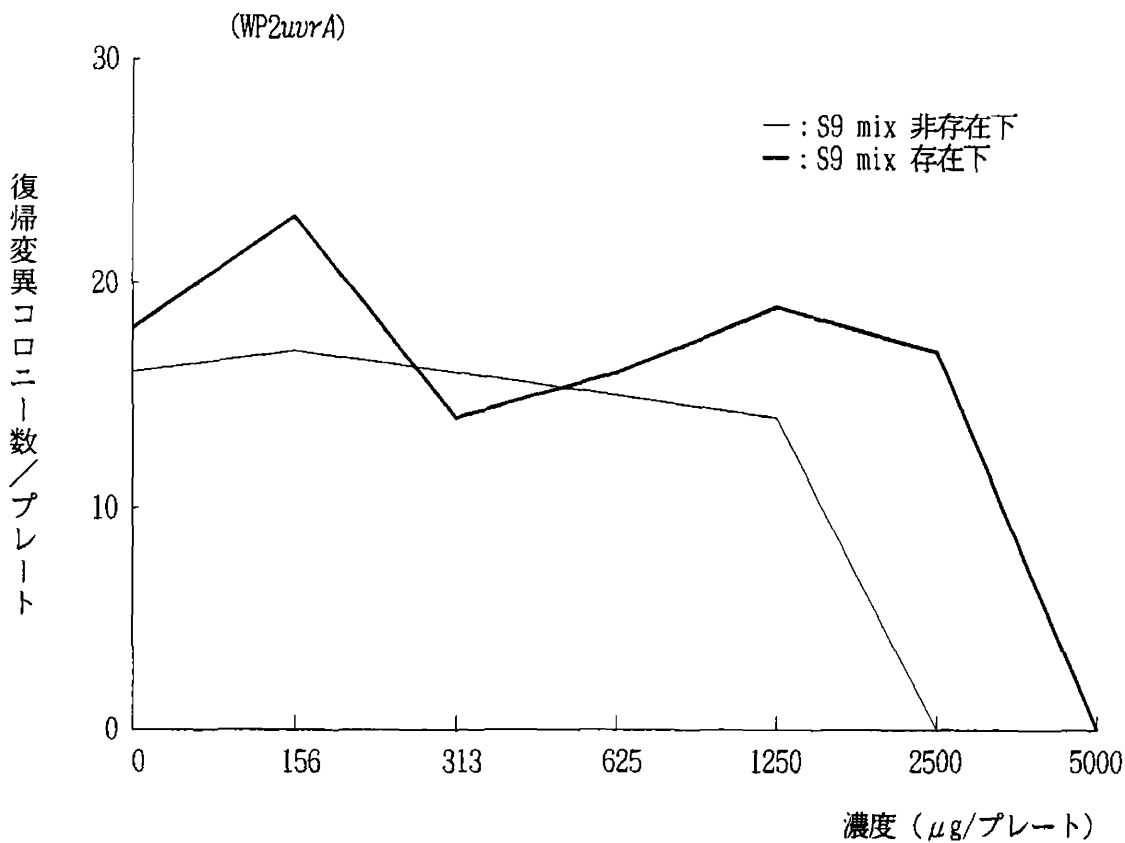


図 1-3 ジシクロヘキシルアミンの復帰突然変異試験結果—濃度設定試験

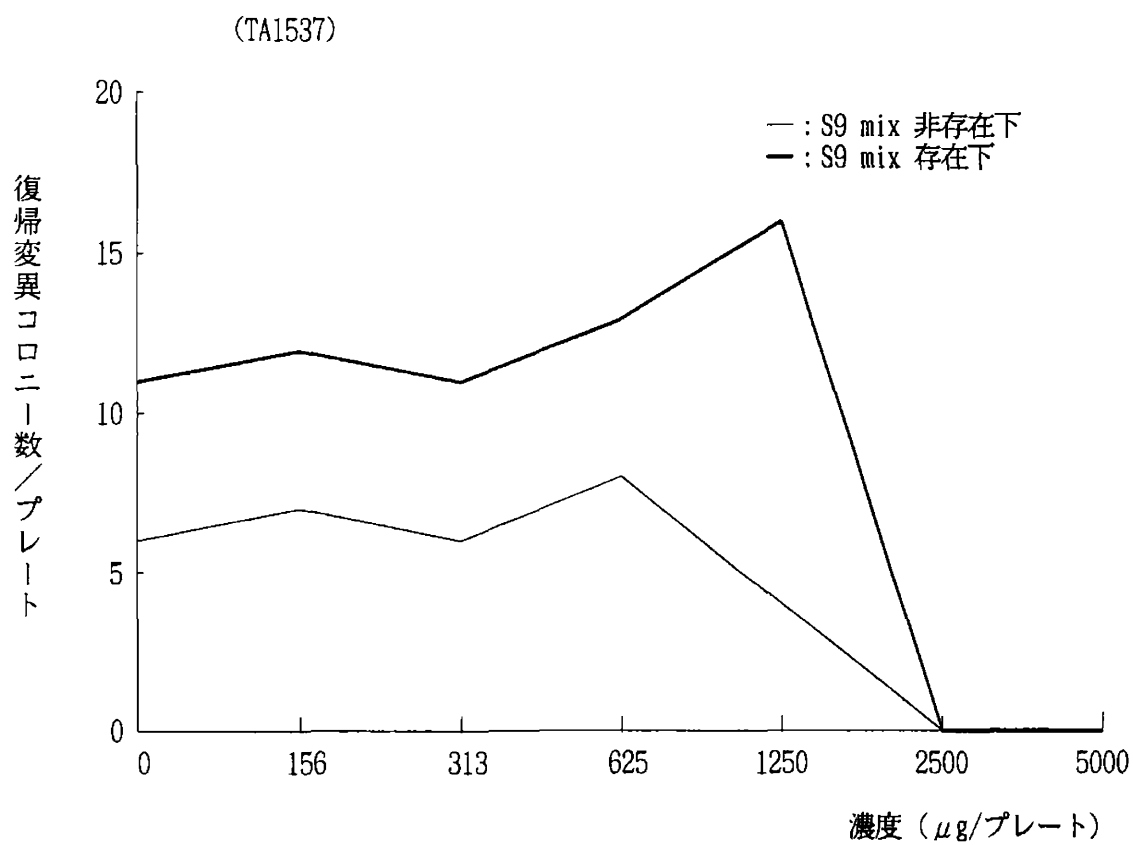


図 2-1 ジシクロヘキシルアミンの復帰突然変異試験結果—本試験

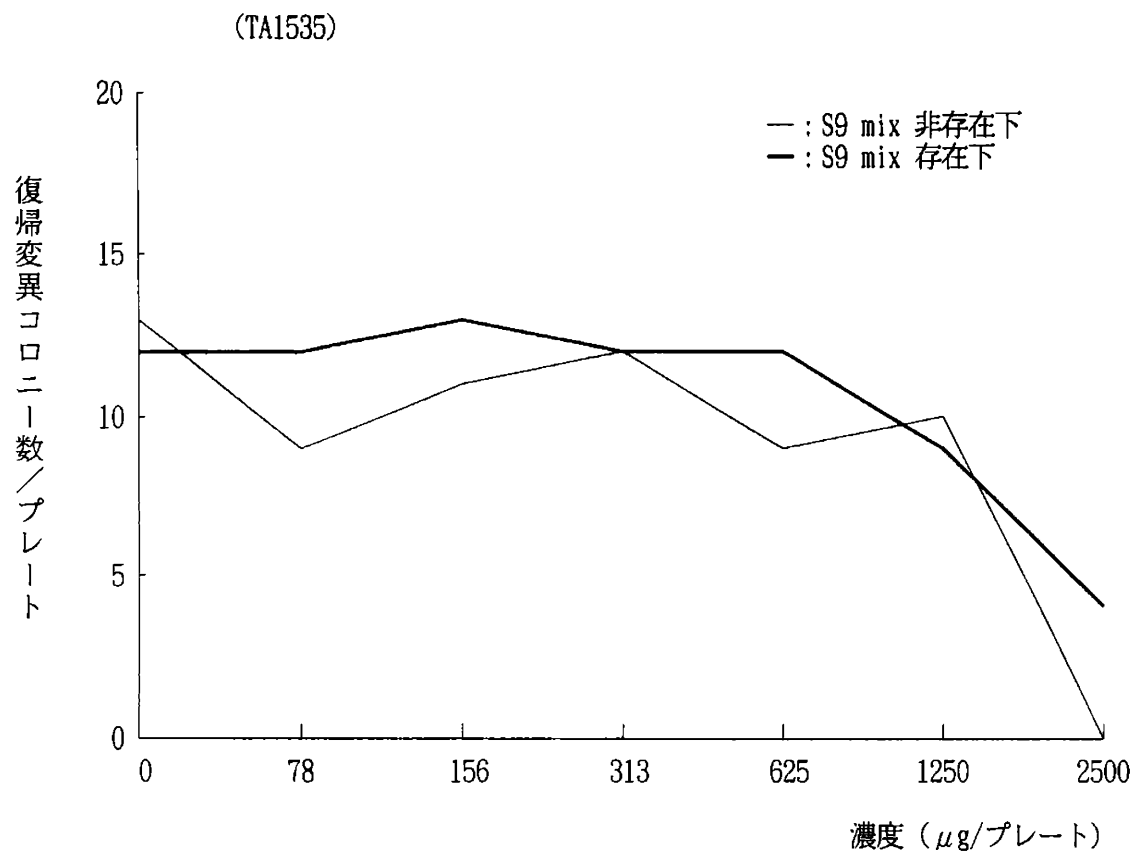
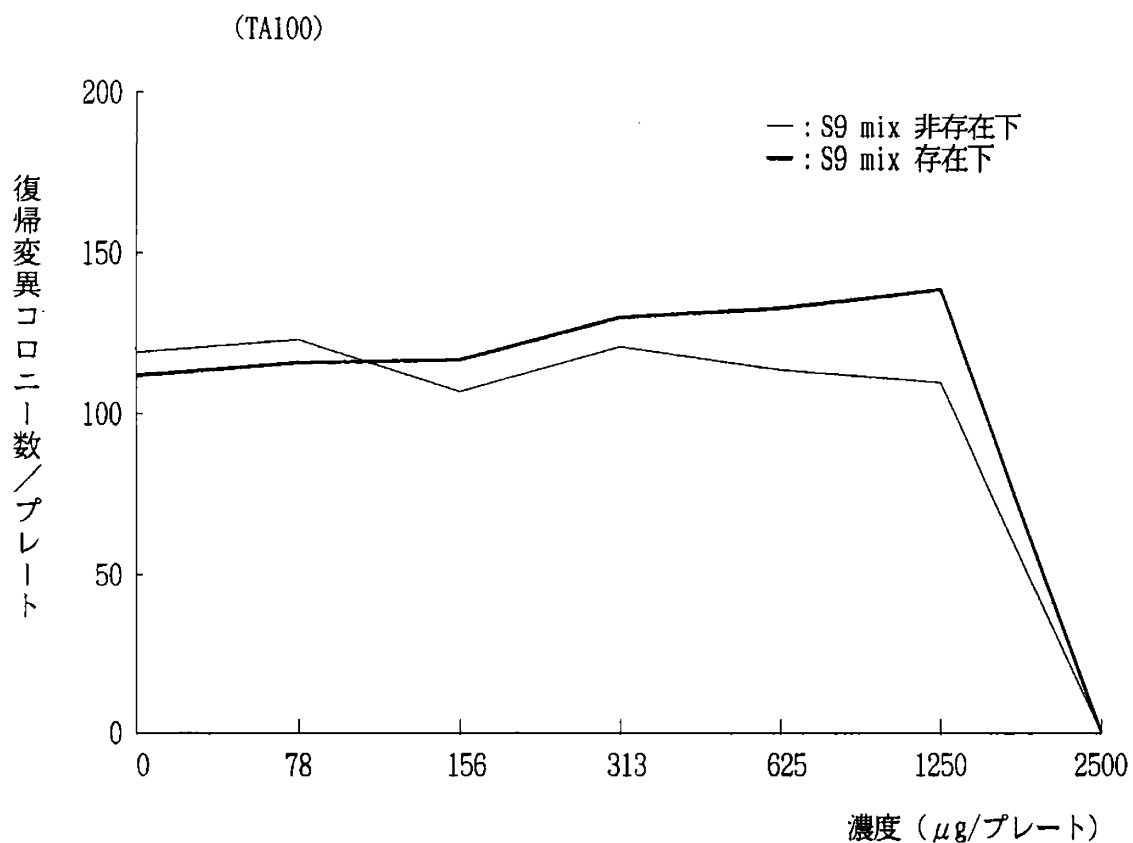


図 2-2 ジシクロヘキシルアミンの復帰突然変異試験結果—本試験

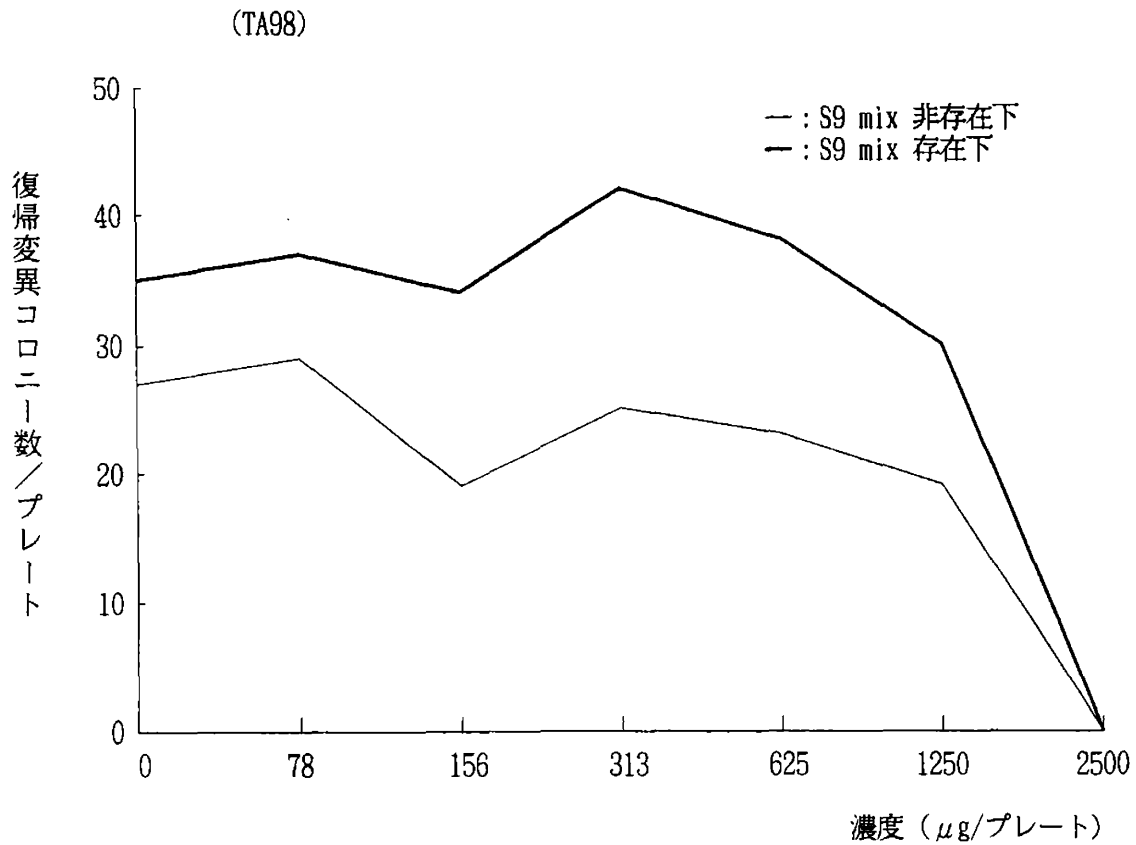
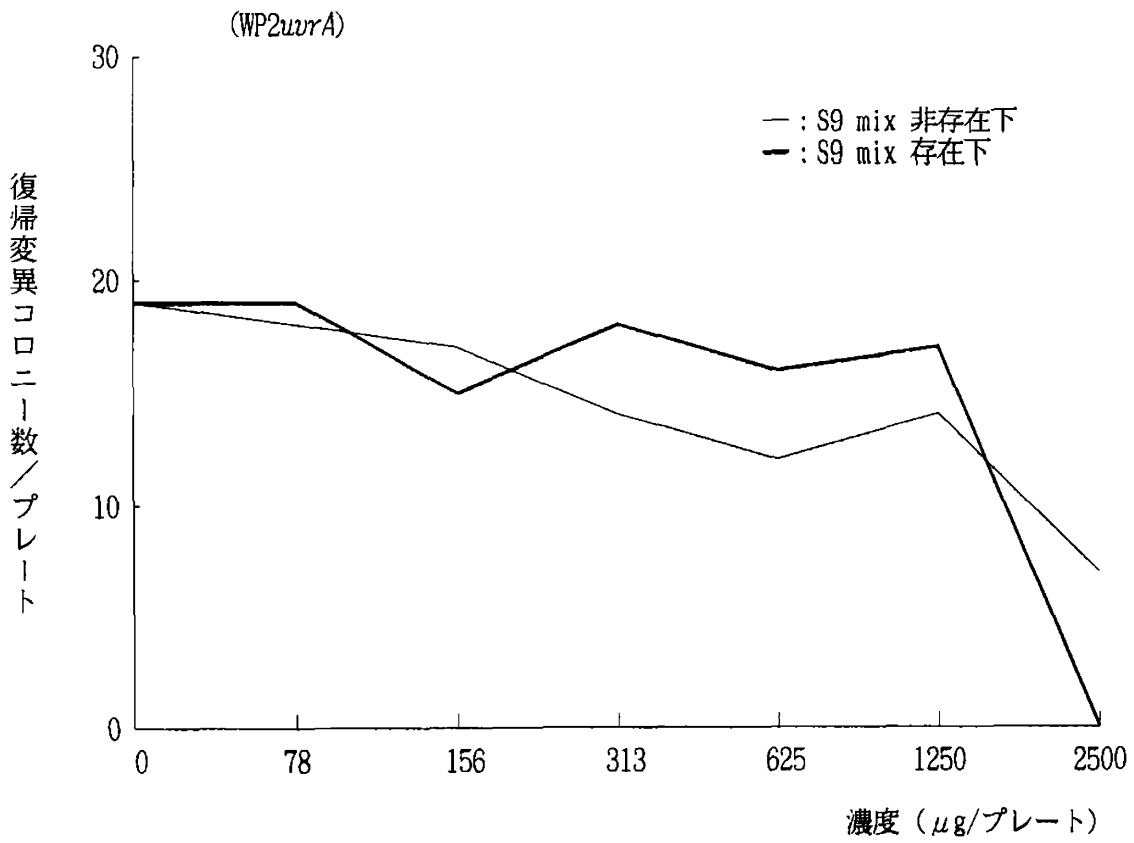


図 2-3 ジシクロヘキシルアミンの復帰突然変異試験結果一本試験

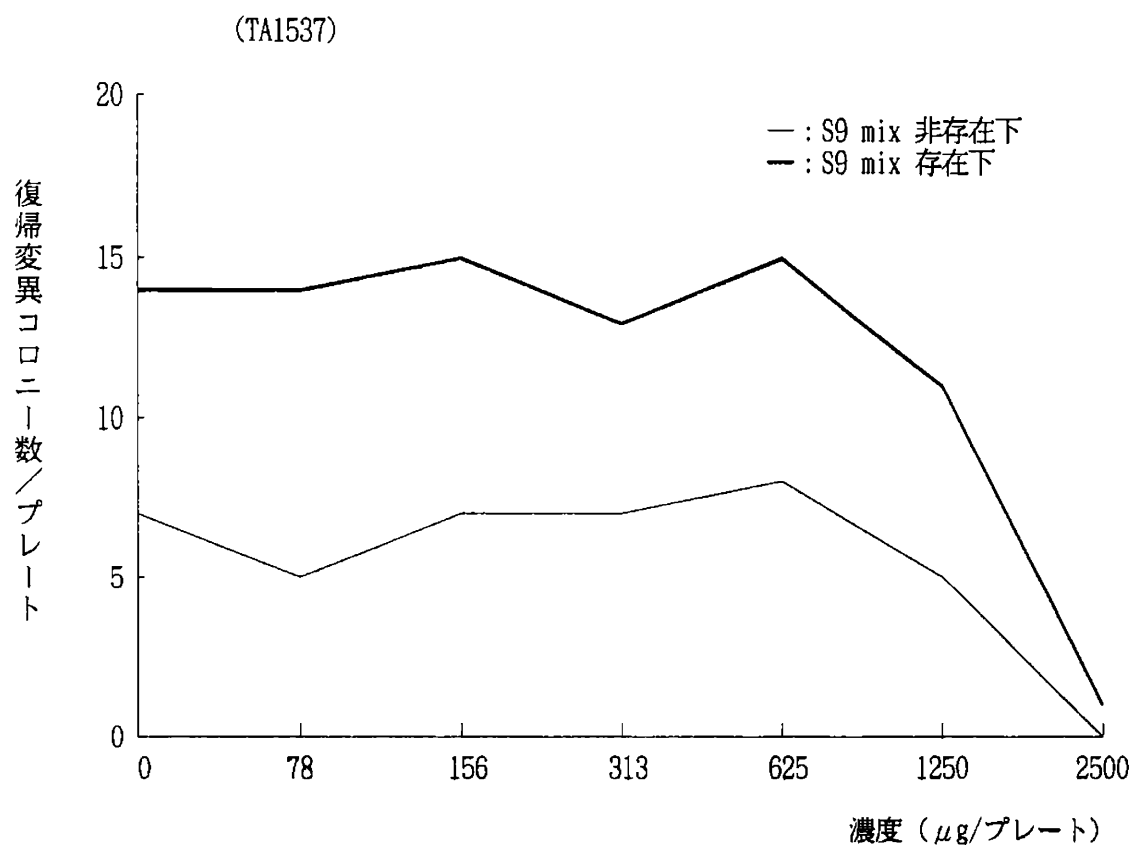


図 3 ジシクロヘキシルアミンの復帰突然変異試験結果—確認試験

