

最 終 報 告 書

β -プロモスチレンの細菌を用いる復帰突然変異試験

T-0142

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	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) 追加確認試験用被験液の調製	8
(5) 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	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) ニュートリエントプロス 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 (プレイ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	16
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 : -S9Mix)
- ・別表 3 試験結果表(本試験 1 回目 : +S9Mix)
- ・別表 4 試験結果表(本試験 2 回目 : -S9Mix)
- ・別表 5 試験結果表(本試験 2 回目 : +S9Mix)
- ・別表 6 試験結果表 (追加確認試験)

Figures

- ・図 1 用量反応曲線(TA100 : -S9Mix)
- ・図 2 用量反応曲線(TA100 : +S9Mix)
- ・図 3 用量反応曲線(TA1535 : -S9Mix)
- ・図 4 用量反応曲線(TA1535 : +S9Mix)
- ・図 5 用量反応曲線(WP2 $uvrA$: -S9Mix)
- ・図 6 用量反応曲線(WP2 $uvrA$: +S9Mix)
- ・図 7 用量反応曲線(TA98 : -S9Mix)
- ・図 8 用量反応曲線(TA98 : +S9Mix)
- ・図 9 用量反応曲線(TA1537 : -S9Mix)
- ・図 10 用量反応曲線(TA1537 : +S9Mix)

試験実施概要

1. 試験計画書

試験番号 : T-0142

試験表題 : β -プロモスチレ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、 β -プロモスチレ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 17 年 4 月 1 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 18 年 11 月 20 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 1-2-2

5. 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 1-3-11

6. 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

要 約

β -プロモスチレ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 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 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、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1537 及び代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA1535、TA1537 については 2.44～78.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の範囲の 6 用量、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA100、TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* については、9.77～313 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 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* TA1535、TA1537 の 39.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100 及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA1535、TA1537 の 78.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* の 156 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上で認められた。

3. 復帰変異コロニー数

本試験 1 回目の代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA1535 において、陰性対照値の 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加が認められたが、本試験 2 回目では 2 倍以上には増加しなかった。このため、同一用量で追加確認試験を実施した。その結果、陰性対照値の 2 倍以上には増加せず、用量反応性も認められなかった。これらの結果は、陰性対照値が低値のために数個の変動により発生したものと考えられ、被験物質による増加ではないと判断した。なお、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100 において、陰性対照値の 2 倍には達しないものの、用量依存的な復帰変異コロニー数の増加が認められた。その他の菌株においては、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。

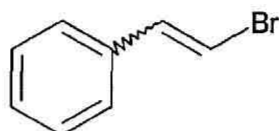
以上の試験結果より、本試験条件下において、 β -プロモスチレンは、細菌に対する遺伝子突然変異誘発能をさない（陰性）と判定した。

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	β -プロモスチレン
CAS 番号	103-64-0
ロット番号	
構造式	



純 度	99.6%
分 子 量	183.05
常温における性状	黄色透明液体（比重：1.4246）
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。
保存方法	冷暗所・密栓
保存温度	保存期間(2008.1.28～2008.4.1)中の実測温度：-1.6～9.8℃
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（予備試験、本試験 1 回目、2 回目） PEQ4800（追加確認試験）
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、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 0.150 mL を分取して電子天秤（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 214.8 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、この溶媒量から分取した際の液量 0.150 mL を差し引いた 4.146 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 0.020 mL を分取して電子天秤 (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 32.2 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、この溶媒量から分取した際の液量 0.020 mL を差し引いた 2.556 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 7 段階希釈し、3.13、1.56、0.781、0.391、0.195、0.0977、0.0488 及び 0.0244 mg/mL の計 8 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 0.020 mL を分取して電子天秤 (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 29.7 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、この溶媒量から分取した際の液量 0.020 mL を差し引いた 2.356 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 7 段階希釈し、3.13、1.56、0.781、0.391、0.195、0.0977、0.0488 及び 0.0244 mg/mL の計 8 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) 追加確認試験用被験液の調製

滅菌した調製用試験管に被験物質 0.020 mL を分取して電子天秤 (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 31.0 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、この溶媒量から分取した際の液量 0.020 mL を差し引いた 2.460 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 溶液を公比 4 で 2 段階希釈して 0.781 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、0.781、0.391、0.195、0.0977、0.0488 及び 0.0244 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。

(5) 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℃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 31 日：-81～-71℃）。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		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

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 パ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 パイアルに対して 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) |
| 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 4 月 1 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、2008 年 3 月 3 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 4 月 1 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、追加確認試験)
- 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 (NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ 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 ₂ HPO 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、追加確認試験)
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	追加確認 試験
<i>S. typhimurium</i> TA100	5.51×10^9	5.23×10^9	4.46×10^9	
<i>S. typhimurium</i> TA1535	5.04×10^9	5.02×10^9	4.89×10^9	4.97×10^9
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	8.18×10^9	8.09×10^9	7.94×10^9	
<i>S. typhimurium</i> TA98	6.21×10^9	5.91×10^9	5.09×10^9	
<i>S. typhimurium</i> TA1537	3.07×10^9	3.09×10^9	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 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、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1537 株及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA1535、TA1537 の 78.1 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* の 313 µg/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、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1537 及び代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA1535、TA1537 については 78.1 µg/plate、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA100、TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* については 313 µg/plate をそれぞれ最高用量として、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 回の本試験及び追加確認試験ではそれぞれ 3 枚のプレートを用いた。

(5) 試験操作（プ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 0.1 mL 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 分間振盪しながらプ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 49.5 時間、本試験 2 回目では 48.5 時間、追加確認試験では 48.5 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 1～6 及び図 1～10 に示した。なお、図は別表 2、3 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* TA1535、TA1537 の 39.1 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100 及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA1535、TA1537 の 78.1 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* の 156 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

本試験 1 回目の代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA1535 において、陰性対照値の 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加が認められたが、本試験 2 回目及び追加確認試験では 2 倍以上には増加しなかった。その他の菌株においては、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、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。

2. 考察

本試験 1 回目の代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA1535 において、陰性対照値の 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加が認められたが、本試験 2 回目では 2 倍以上には増加しなかった。このため、同一用量で追加確認試験を実施した。その結果、陰性対照値の 2 倍以上には増加せず、用量反応性も認められなかった。これらの結果は、陰性対照値が低値のために数個の変動により発生したものと考えられ、被験物質による増加ではないと判断した。なお、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100 において、陰性対照値の 2 倍には達しないものの、用量依存的な復帰変異コロニー数の増加が認められた。その他の菌株においては、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、 β -プロモスチレンは、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.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 *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: β -プロモステレン

No. T-0142

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(μ g/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)	105 91 (98)	12 10 (11)	16 19 (18)	31 22 (27)	4 16 (10)
	1.22	122 103 (113)	10 12 (11)	18 15 (17)	36 27 (32)	9 5 (7)
	4.88	129 108 (119)	11 11 (11)	15 14 (15)	27 24 (26)	5 8 (7)
	19.5	108 116 (112)	5 5 (5)	15 15 (15)	20 30 (25)	7 5 (6)
	78.1	114 * 103 * (109)	6 * 7 * (7)	15 14 (15)	22 23 (23)	11 * 5 * (8)
	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)
	陰性対照(DMSO)	165 166 (166)	10 22 (16)	25 16 (21)	54 51 (53)	9 14 (12)
	1.22	186 204 (195)	15 13 (14)	15 24 (20)	45 60 (53)	7 7 (7)
S9Mix (+)	4.88	200 188 (194)	13 20 (17)	23 16 (20)	51 47 (49)	8 7 (8)
	19.5	220 237 (229)	12 8 (10)	17 25 (21)	43 55 (49)	7 3 (5)
	78.1	297 307 (302)	13 * 14 * (14)	32 22 (27)	61 61 (61)	5 * 13 * (9)
	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)
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(μ g/プレート) 0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
		コロニー数/プレート 558 511 (535)	324 338 (331)	78 83 (81)	437 434 (436)	1686 1413 (1550)
	S9Mixを必要とするもの	名称 B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
		用量(μ g/プレート) 5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
		コロニー数/プレート 855 814 (835)	305 293 (299)	1131 1175 (1153)	292 292 (292)	113 123 (118)

(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]ピコリン・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:-S9Mix)

被験物質の名称: β -プロモスチレン

No. T-0142

試験実施期間		2008年3月10日 より 2008年3月13日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	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)	145 117 114 (125 $\pm$ 17.1)	17 10 14 (14 $\pm$ 3.5)	29 27 28 (28 $\pm$ 1.0)	12 19 17 (16 $\pm$ 3.6)	8 10 5 (8 $\pm$ 2.5)
	2.44	114 136 106 (119 $\pm$ 15.5)	12 5 5 (7 $\pm$ 4.0)	NT	NT	7 6 8 (7 $\pm$ 1.0)
	4.88	116 125 119 (120 $\pm$ 4.6)	13 8 11 (11 $\pm$ 2.5)	NT	NT	10 8 5 (8 $\pm$ 2.5)
	9.77	124 128 124 (125 $\pm$ 2.3)	11 4 14 (10 $\pm$ 5.1)	28 18 31 (26 $\pm$ 6.8)	16 21 16 (18 $\pm$ 2.9)	5 7 4 (5 $\pm$ 1.5)
	19.5	125 110 117 (117 $\pm$ 7.5)	10 11 4 (8 $\pm$ 3.8)	31 24 24 (26 $\pm$ 4.0)	10 16 33 (20 $\pm$ 11.9)	7 7 3 (6 $\pm$ 2.3)
	39.1	123 122 119 (121 $\pm$ 2.1)	11 * 18 * 8 * (12 $\pm$ 5.1)	31 19 24 (25 $\pm$ 6.0)	13 16 21 (17 $\pm$ 4.0)	5 * 5 * 6 * (5 $\pm$ 0.6)
	78.1	118 * 118 * 100 * (112 $\pm$ 10.4)	7 * 7 * 6 * (7 $\pm$ 0.6)	19 29 13 (20 $\pm$ 8.1)	15 12 17 (15 $\pm$ 2.5)	6 * 4 * 8 * (6 $\pm$ 2.0)
	156	NT	NT	0 * 0 * 0 * (0 $\pm$ 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 $\pm$ 0.0)	NT
	313	NT	NT	0 * 0 * 0 * (0 $\pm$ 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 $\pm$ 0.0)	NT
陽性対照	名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191
	用量($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	コロニー数/プレート	540 609 563 (571 $\pm$ 35.1)	209 208 225 (214 $\pm$ 9.5)	71 64 79 (71 $\pm$ 7.5)	479 454 422 (452 $\pm$ 28.6)	1996 2010 1880 (1962 $\pm$ 71.4)

(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

*: 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 1回目: +S9Mix)

被験物質の名称: β -プロモステレン

No. T-0142

試験実施期間		2008年3月10日 より 2008年3月13日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	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)	152 144 134 (143 ± 9.0)	8 11 6 (8 ± 2.5)	33 19 24 (25 ± 7.1)	38 58 57 (51 ± 11.3)	13 8 13 (11 ± 2.9)
	2.44	NT	15 12 11 (13 ± 2.1)	NT	NT	17 14 11 (14 ± 3.0)
	4.88	NT	5 11 7 (8 ± 3.1)	NT	NT	7 13 7 (9 ± 3.5)
	9.77	149 157 147 (151 ± 5.3)	16 17 12 (15 ± 2.6)	30 14 40 (28 ± 13.1)	59 48 64 (57 ± 8.2)	7 13 8 (9 ± 3.2)
	19.5	162 162 175 (166 ± 7.5)	8 10 9 (9 ± 1.0)	28 31 25 (28 ± 3.0)	39 52 41 (44 ± 7.0)	10 11 8 (10 ± 1.5)
	39.1	193 197 173 (188 ± 12.9)	19 21 13 (18 ± 4.2)	25 30 34 (30 ± 4.5)	53 45 42 (47 ± 5.7)	21 16 13 (17 ± 4.0)
	78.1	269 211 231 (237 ± 29.5)	10 * 16 * 11 * (12 ± 3.2)	18 29 27 (25 ± 5.9)	59 60 41 (53 ± 10.7)	7 * 12 * 13 * (11 ± 3.2)
	156	137 * 116 * 128 * (127 ± 10.5)	NT	34 * 31 * 22 * (29 ± 6.2)	33 * 33 * 28 * (31 ± 2.9)	NT
	313	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	NT	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	NT
	名 称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
陽性対照	S9Mixを必要とするもの	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	5.0	2.0	10.0	5.0
	コロニー数/プレート	824 817 837 (826 ± 10.1)	307 262 316 (295 ± 28.9)	1205 1225 1249 (1226 ± 22.0)	322 322 333 (326 ± 6.4)	111 113 109 (111 ± 2.0)

(備考)

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。
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4)

試験結果表(本試験 2回目:-S9Mix)

被験物質の名称: β -プロモスチレン

No. T-0142

試験実施期間		2008年3月24日 より 2008年3月27日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	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)	90 126 106 (107 $\pm$ 18.0)	11 18 12 (14 $\pm$ 3.8)	13 10 13 (12 $\pm$ 1.7)	30 16 12 (19 $\pm$ 9.5)	9 10 9 (9 $\pm$ 0.6)
	2.44	127 120 117 (121 $\pm$ 5.1)	15 13 16 (15 $\pm$ 1.5)	NT	NT	7 4 6 (6 $\pm$ 1.5)
	4.88	113 115 126 (118 $\pm$ 7.0)	5 12 10 (9 $\pm$ 3.6)	NT	NT	4 4 4 (4 $\pm$ 0.0)
	9.77	114 116 132 (121 $\pm$ 9.9)	11 7 11 (10 $\pm$ 2.3)	17 17 8 (14 $\pm$ 5.2)	18 21 18 (19 $\pm$ 1.7)	5 7 2 (5 $\pm$ 2.5)
	19.5	118 137 114 (123 $\pm$ 12.3)	8 6 8 (7 $\pm$ 1.2)	16 16 13 (15 $\pm$ 1.7)	23 17 18 (19 $\pm$ 3.2)	6 10 10 (9 $\pm$ 2.3)
	39.1	125 98 113 (112 $\pm$ 13.5)	12 * 7 * 5 * (8 $\pm$ 3.6)	18 27 17 (21 $\pm$ 5.5)	19 23 16 (19 $\pm$ 3.5)	5 * 6 * 4 * (5 $\pm$ 1.0)
	78.1	97 * 90 * 94 * (94 $\pm$ 3.5)	7 * 6 * 8 * (7 $\pm$ 1.0)	12 21 16 (16 $\pm$ 4.5)	23 23 14 (20 $\pm$ 5.2)	8 * 4 * 10 * (7 $\pm$ 3.1)
	156	NT	NT	15 * 15 * 7 * (12 $\pm$ 4.6)	0 * 0 * 0 * (0 $\pm$ 0.0)	NT
	313	NT	NT	0 * 0 * 0 * (0 $\pm$ 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 $\pm$ 0.0)	NT
陽性対照	名 称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191
	用量($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	コロニー数/プレート	506 510 469 (495 $\pm$ 22.6)	286 252 247 (262 $\pm$ 21.2)	66 82 69 (72 $\pm$ 8.5)	477 460 419 (452 $\pm$ 29.8)	2203 2306 2223 (2244 $\pm$ 54.6)

(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-メキシノ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノ]ピロリジン・2HCl

*: 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5)

試験結果表 (本試験 2回目: +S9Mix)

被験物質の名称: β -プロモステレン

No. T-0142

試験実施期間		2008年3月24日 より 2008年3月27日				
代謝活性化系の有無		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)	122 140 110 (124 $\pm$ 15.1)	13 7 8 (9 $\pm$ 3.2)	18 13 25 (19 $\pm$ 6.0)	53 47 38 (46 $\pm$ 7.5)	13 8 12 (11 $\pm$ 2.6)
	2.44	NT	9 7 11 (9 $\pm$ 2.0)	NT	NT	12 5 9 (9 $\pm$ 3.5)
	4.88	NT	7 8 10 (8 $\pm$ 1.5)	NT	NT	8 6 6 (7 $\pm$ 1.2)
	9.77	129 151 145 (142 $\pm$ 11.4)	8 10 8 (9 $\pm$ 1.2)	14 15 16 (15 $\pm$ 1.0)	38 42 36 (39 $\pm$ 3.1)	5 10 10 (8 $\pm$ 2.9)
	19.5	159 159 136 (151 $\pm$ 13.3)	10 4 11 (8 $\pm$ 3.8)	19 16 13 (16 $\pm$ 3.0)	47 45 33 (42 $\pm$ 7.6)	12 10 7 (10 $\pm$ 2.5)
	39.1	188 197 172 (186 $\pm$ 12.7)	21 15 11 (16 $\pm$ 5.0)	21 12 14 (16 $\pm$ 4.7)	32 53 56 (47 $\pm$ 13.1)	12 8 9 (10 $\pm$ 2.1)
	78.1	219 221 197 (212 $\pm$ 13.3)	7 * 11 * 15 * (11 $\pm$ 4.0)	14 19 15 (16 $\pm$ 2.6)	45 41 47 (44 $\pm$ 3.1)	13 * 8 * 12 * (11 $\pm$ 2.6)
	156	90 * 123 * 132 * (115 $\pm$ 22.1)	NT	16 * 15 * 21 * (17 $\pm$ 3.2)	22 * 31 * 28 * (27 $\pm$ 4.6)	NT
	313	0 * 0 * 0 * (0 $\pm$ 0.0)	NT	0 * 0 * 0 * (0 $\pm$ 0.0)	4 * 8 * 6 * (6 $\pm$ 2.0)	NT
	名 称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
陽性対照	S9Mixを必要とするもの	用量(μ g/プレート)	5.0	2.0	10.0	5.0
	コロニー数/プレート	808 720 721 (750 $\pm$ 50.5)	338 282 339 (320 $\pm$ 32.6)	1039 962 1044 (1015 $\pm$ 46.0)	288 295 306 (296 $\pm$ 9.1)	93 94 113 (100 $\pm$ 11.3)

(備考)

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。
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6)

試験結果表 (追加確認試験)

被験物質の名称: β -プロモステレン

No.T-0142

試験実施期間		2008年3月31日 より 2008年4月3日	
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)	
		塩基対置換型	
		TA1535	
S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	8	
		11	
		13 (11 $\pm$ 2.5)	
	2.44	13	
		4	
		7 (8 $\pm$ 4.6)	
	4.88	5	
		8	
		10 (8 $\pm$ 2.5)	
	9.77	8	
		9	
		14 (10 $\pm$ 3.2)	
	19.5	6	
		16	
		11 (11 $\pm$ 5.0)	
陽性対照	39.1	8	
		5	
		11 (8 $\pm$ 3.0)	
	78.1	10 *	
		11 *	
		12 * (11 $\pm$ 1.0)	
S9Mixを必要とするもの	名 称	2AA	
	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	2.0	
	コロニー数/プレート	353	
		333	
		310 (332 $\pm$ 21.5)	

(備考)

2AA : 2-アミノアントラセン

*: 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

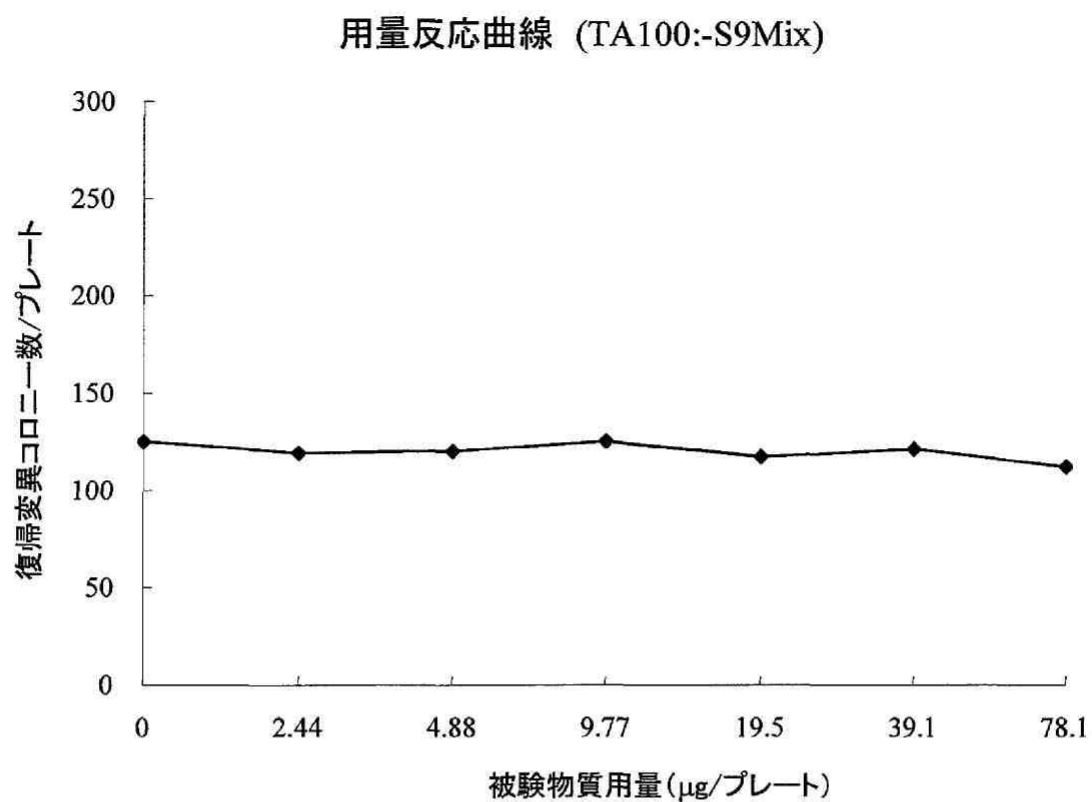


図 2

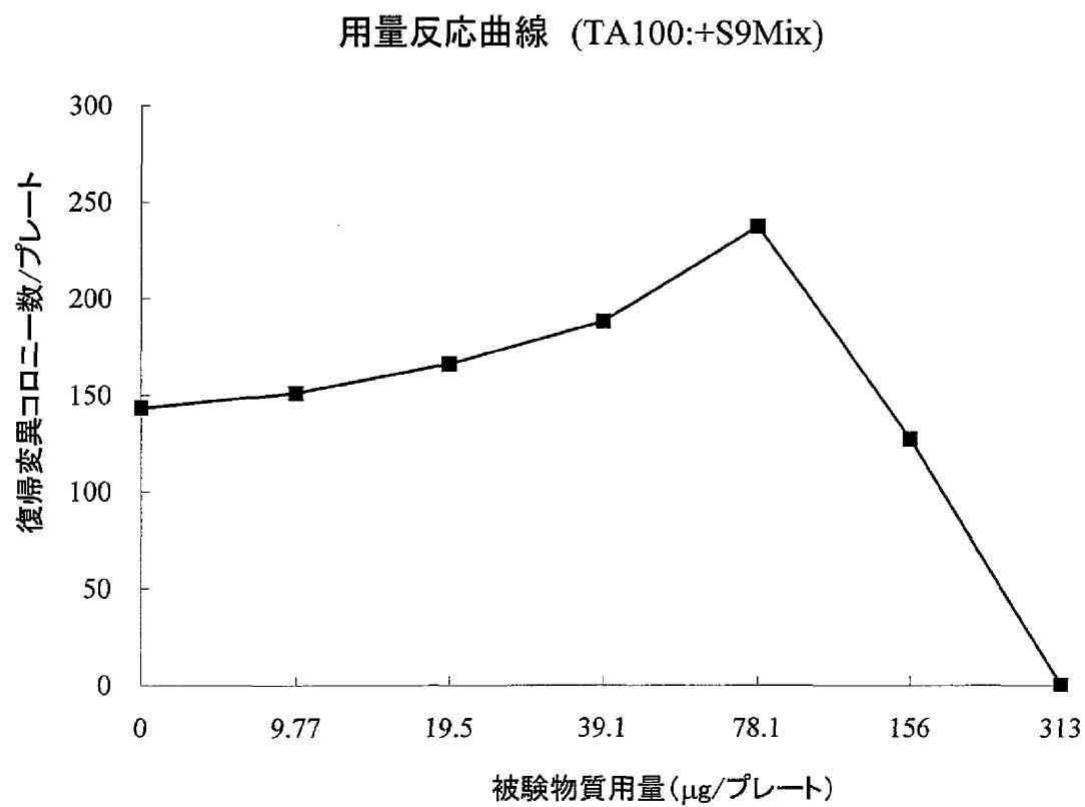


図 3

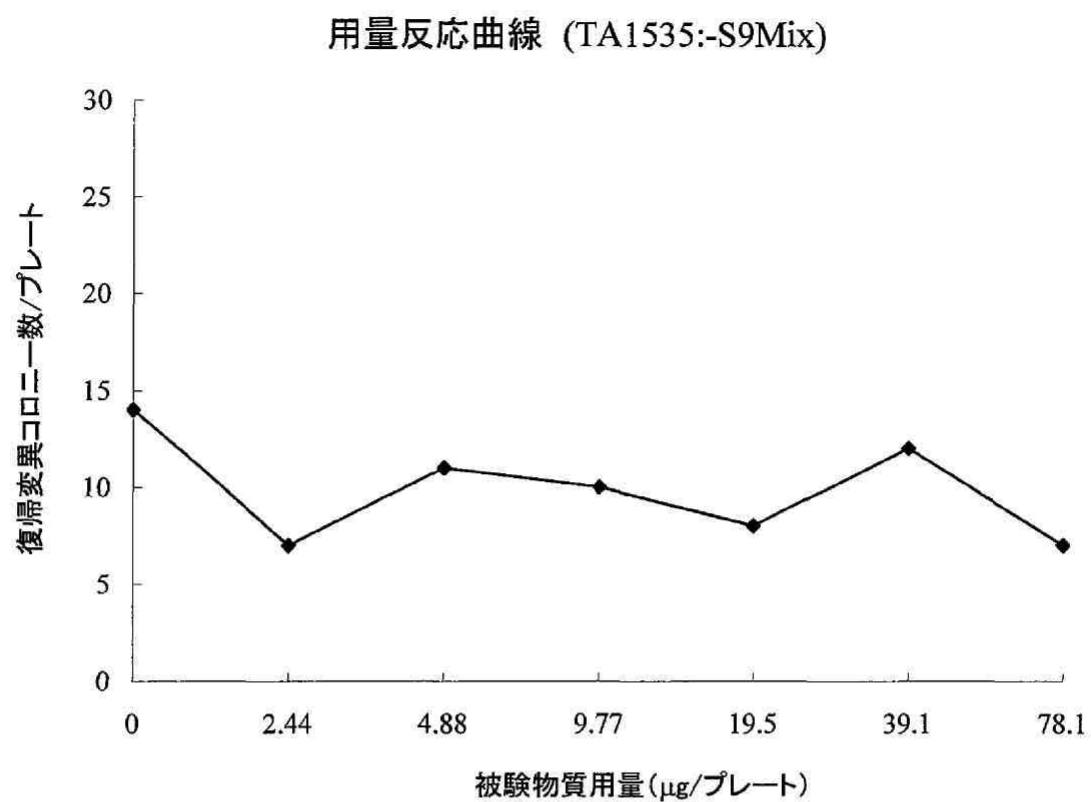


図 4

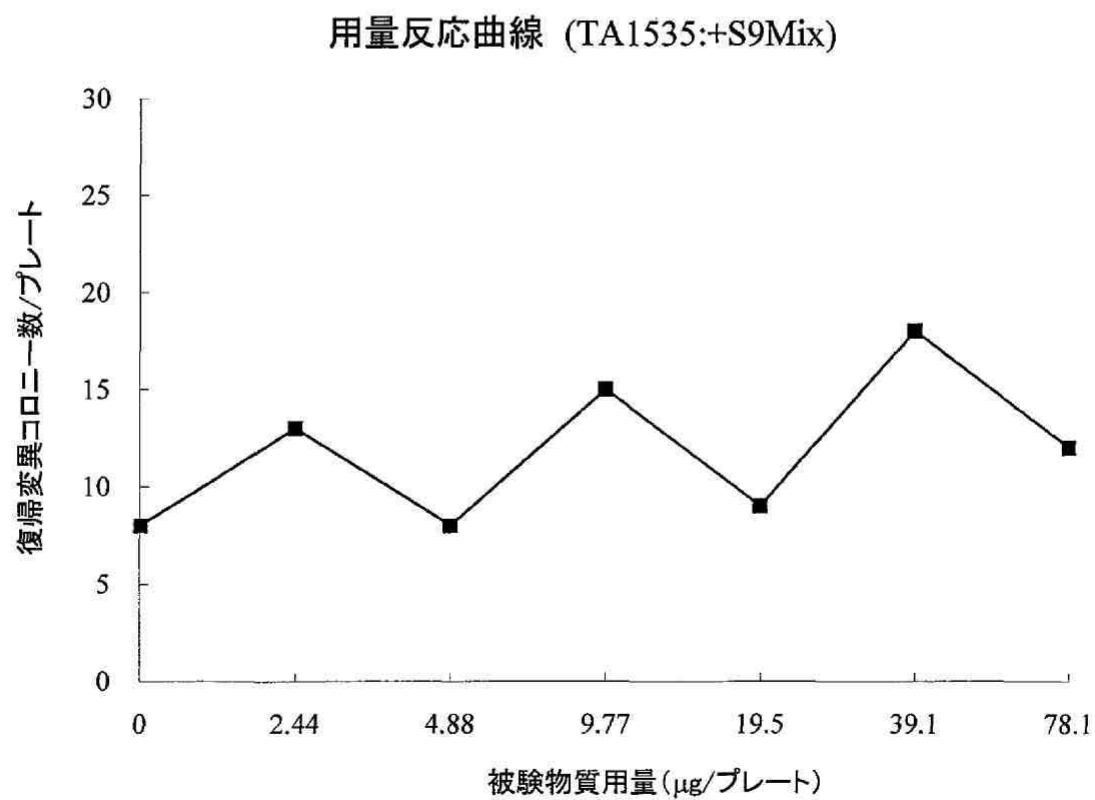


図 5

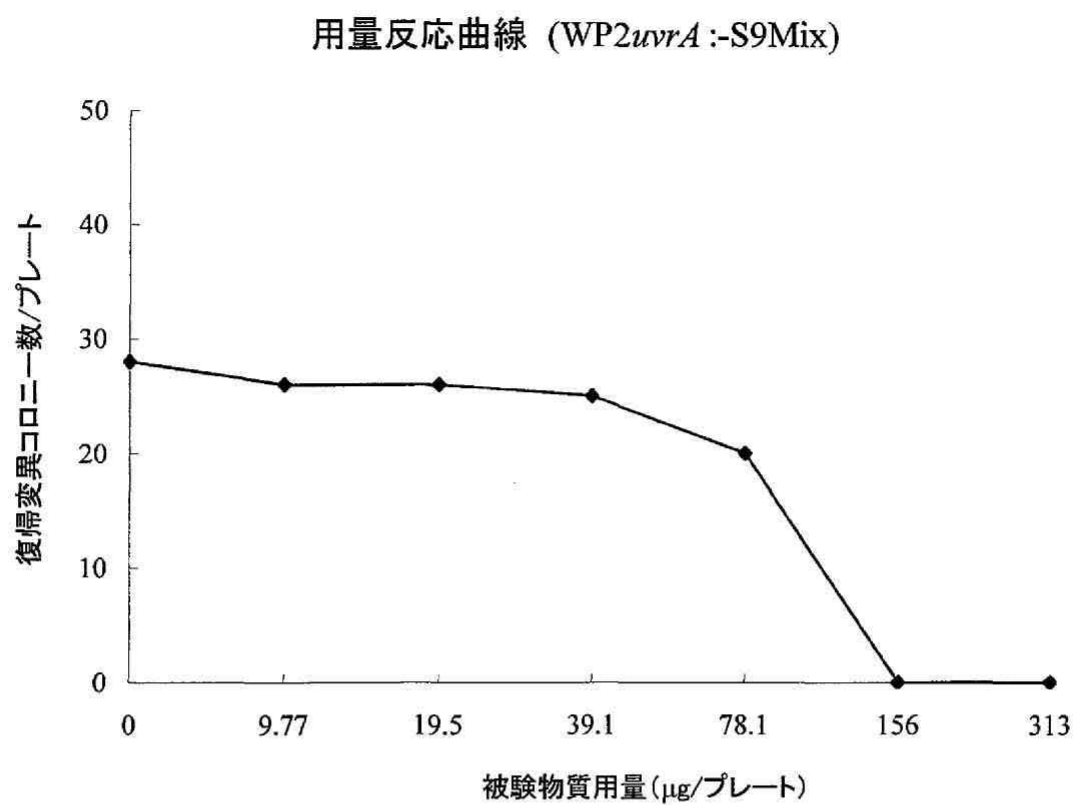


図 6

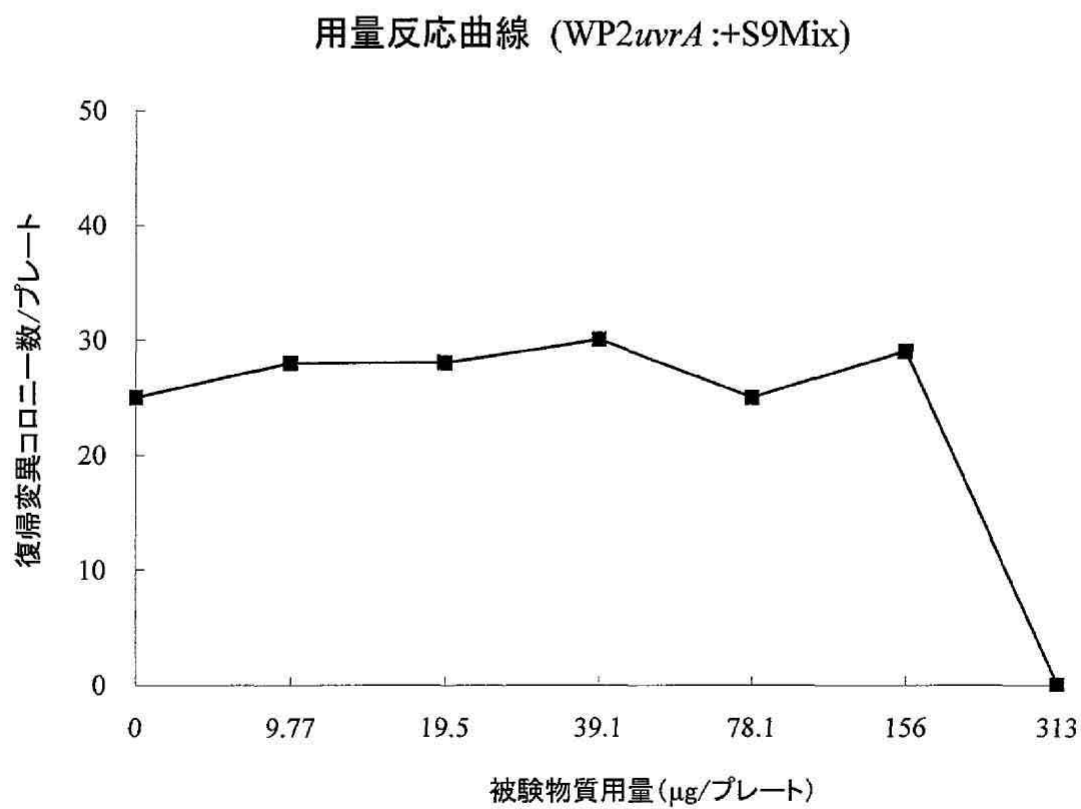


図 7

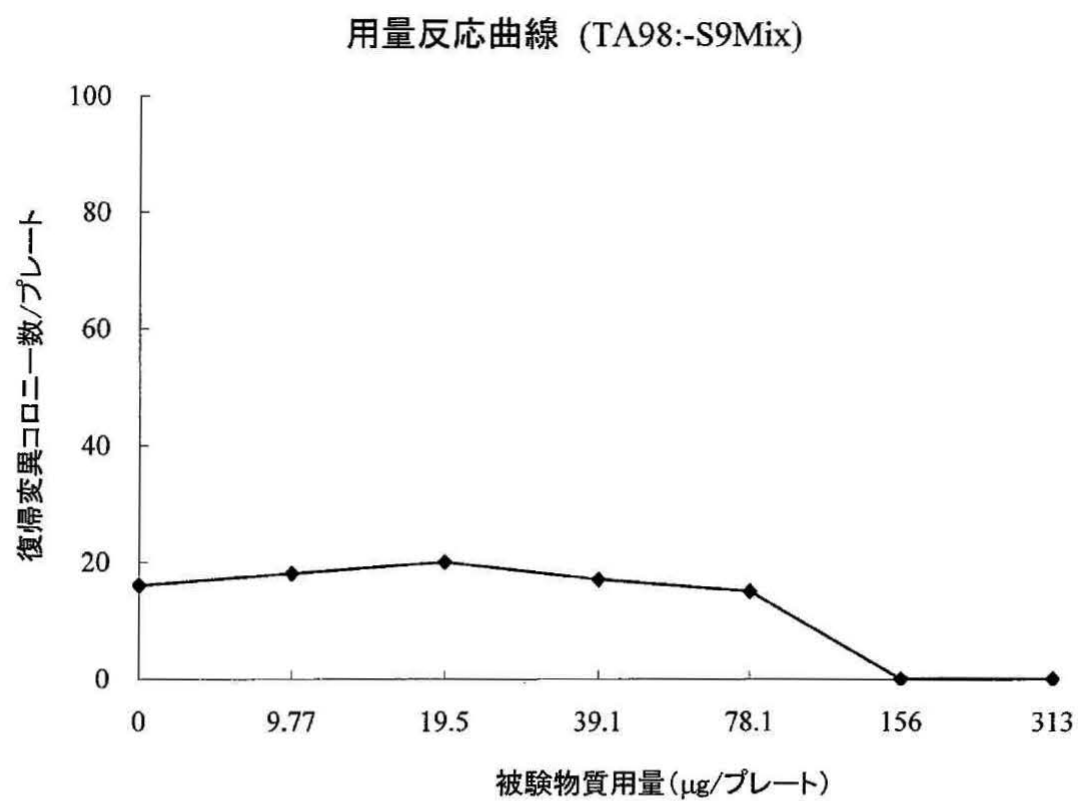


図 8

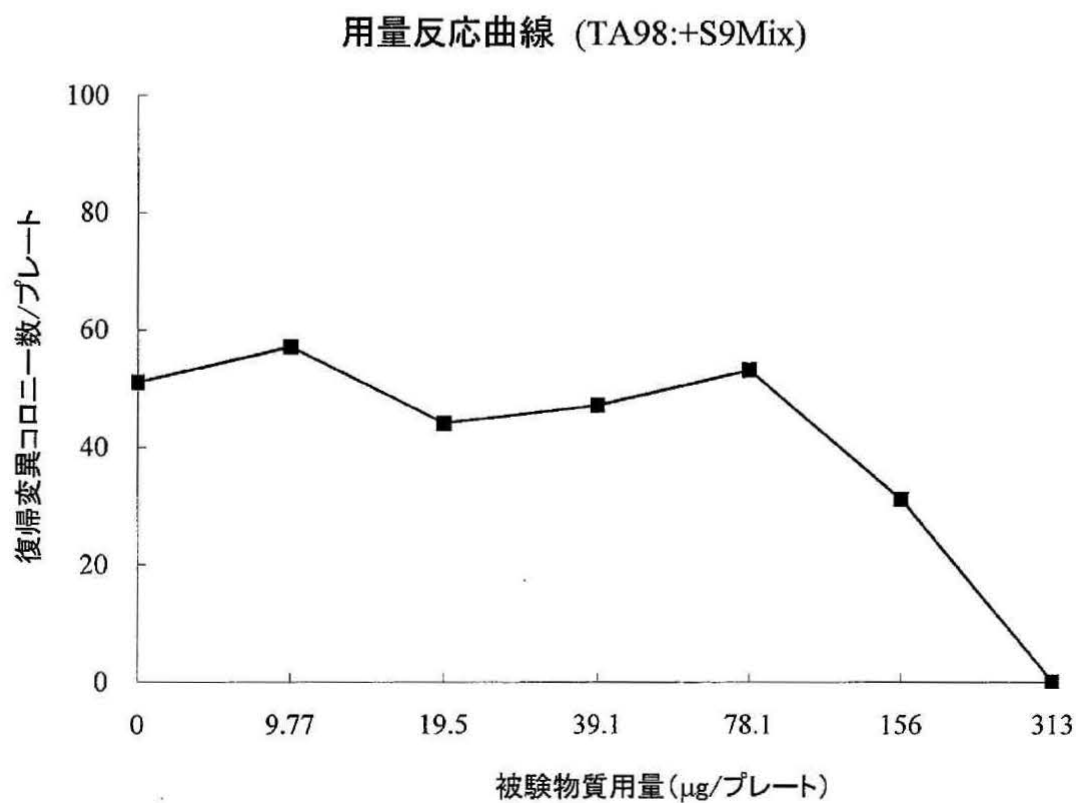


図 9

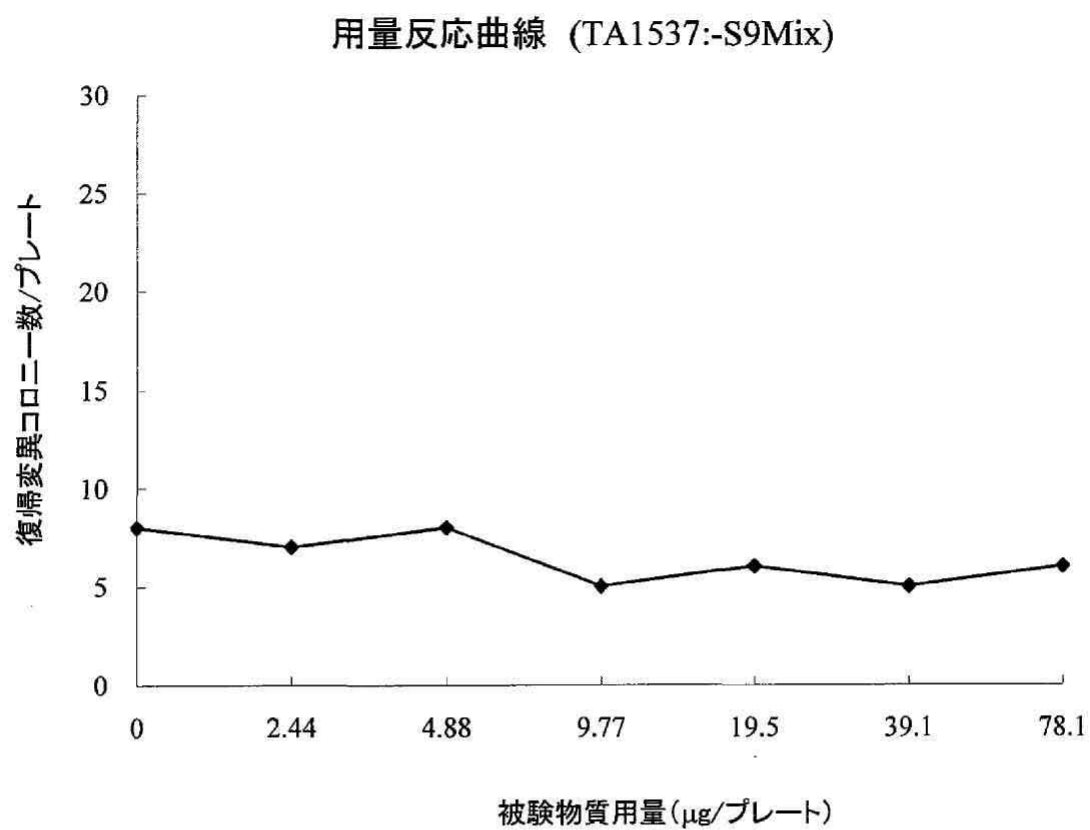


図 10

