

最 終 報 告 書

モノオレイン酸グリセリルの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号 : 7819 (115-184)

平成 17 年 5 月 11 日

試験委託者

厚生労働省 医薬食品局

財団法人 食品農医薬品安全性評価センター

目 次

1. 要約.....	4
2. 表題.....	5
3. 試験目的.....	5
12. 被験物質.....	8
13. 試験材料および方法.....	10
14. 試験結果.....	19
15. 考察および結論.....	22
16. 参考文献.....	23

Figures

Figure 1	Dose-finding study of glycerol monooleate in strain TA100	25
Figure 2	Dose-finding study of glycerol monooleate in strain TA1535	26
Figure 3	Dose-finding study of glycerol monooleate in strain WP2 <i>uvrA</i>	27
Figure 4	Dose-finding study of glycerol monooleate in strain TA98	28
Figure 5	Dose-finding study of glycerol monooleate in strain TA1537	29
Figure 6	Dose-finding study of glycerol monooleate in strain TA100 (restudy)	30
Figure 7	Dose-finding study of glycerol monooleate in strain TA1535 (restudy)	31
Figure 8	Dose-finding study of glycerol monooleate in strain WP2 <i>uvrA</i> (restudy)	32
Figure 9	Dose-finding study of glycerol monooleate in strain TA98 (restudy).....	33
Figure 10	Dose-finding study of glycerol monooleate in strain TA1537 (restudy)	34

Figure 11	Dose-finding study of glycerol monooleate in strain TA100 (additional study)	35
Figure 12	Dose-finding study of glycerol monooleate in strain TA98 (additional study)	36
Figure 13	Dose-finding study of glycerol monooleate in strain TA1537 (additional study)	37
Figure 14	Bacterial reversion assay of glycerol monooleate in strain TA100	38
Figure 15	Bacterial reversion assay of glycerol monooleate in strain TA1535	39
Figure 16	Bacterial reversion assay of glycerol monooleate in strain WP2 <i>uvrA</i>	40
Figure 17	Bacterial reversion assay of glycerol monooleate in strain TA98	41
Figure 18	Bacterial reversion assay of glycerol monooleate in strain TA1537	42

Tables

Table 1	Summary data on dose-finding study of glycerol monooleate [Non-activation method: -S9]	43
Table 2	Summary data on dose-finding study of glycerol monooleate [Activation method: +S9]	44
Table 3	Summary data on dose-finding study of glycerol monooleate (restudy) [Non-activation method: -S9]	45
Table 4	Summary data on dose-finding study of glycerol monooleate (restudy) [Activation method: +S9]	46
Table 5	Summary data on dose-finding study of glycerol monooleate (additional study) [Non-activation method: -S9]	47
Table 6	Summary data on dose-finding study of glycerol monooleate (additional study) [Activation method: +S9]	49
Table 7	Results of the bacterial reverse mutation test of glycerol monooleate [Non-activation method: -S9]	50
Table 8	Results of the bacterial reverse mutation test of glycerol monooleate [Activation method: +S9]	52

1. 要約

当該試験条件下において、モノオレイン酸グリセリルには遺伝子突然変異を誘起する作用がないものと判断した。

モノオレイン酸グリセリルの変異原性について、遺伝子突然変異誘発性を検討するため、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100, TA98, TA1535 および TA1537 株ならびに大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2*uvrA* 株を用いた復帰突然変異試験を行った。

用量設定試験において代謝活性化系非存在下 (-S9 処理) ならびに代謝活性化系存在下 (+S9 処理) の TA100 および TA1537 株で、低用量においても生育阻害作用が観察されたことから再試験を実施した。他の菌株では復帰変異コロニーの増加傾向は認められなかった。再試験においても同様な傾向がみられ、-S9 処理の TA100, TA98 および TA1537 ならびに+S9 処理の TA1537 株では評価群数が4用量に満たないことから追加試験を実施した。

用量設定試験(再試験および追加試験を含む)および本試験において、モノオレイン酸グリセリル処理群ではラット肝ミクロソーム (S9) 添加の有無にかかわらず、陰性対照に比べ各試験菌株の復帰突然変異コロニー数の明確な増加は認められなかった。

一方、代謝活性化系非存在下および代謝活性化系存在下での陽性対照物質は、それぞれの試験菌株に対し明確な突然変異誘発作用を示した。

12. 被験物質

12.1. 被験物質名

モノオレイン酸グリセリル (英名 : Glycerol monooleate)

12.2. ロット番号

12.3. 純度

99.93%

12.4. 成分情報

抽出トコフェロール : 0.05%

リン酸 : 0.02%

12.5. 製造元

12.6. 保存条件

密栓した容器に保管する.

直射日光を避け, 室温に保管する.

12.7. 保存場所

安評センター被験物質保管庫 (C-3)

12.8. CAS No.

111-03-5 (主成分)

12.9. 化学名

9-Octadecenoic acid, (9Z)-, 2,3-dihydroxypropyl ester

12.10. 化学構造



12.11. 分子式

C₂₁H₄₀O₄

12.12. 分子量

356.54

12.13. 物質の状態

形状：ロウ状

色：淡黄色

臭い：僅かな特異臭

12.14. 融点（流動点）

42°C

12.15. 溶解性

水溶解性：不溶

溶媒溶解性：クロロホルムに可溶，DMSO に可溶（50 mg/mL 以上）

12.16. 安定性／反応性

通常の使用では安定

12.17. 取り扱い上の注意

火気注意

作業場の換気を十分に行う。

保護眼鏡，保護手袋等の適切な保護具を使用する。

取り扱い後は，手，顔等を良く洗い，うがいをする。

12.18. 残余被験物質の処理

被験物質の一部を保存した後，残りは品質試験等の実施のため被験物質提供元へ返却した。品質分析の結果（平成 16 年 11 月 26 日付報告），安定性に関して問題はなかった。

13. 試験材料および方法

13.1. 試験菌株

細菌を用いる復帰突然変異試験において広く使用されていることから、試験菌株として次の5種類の菌株を使用した。

ネズミチフス菌	TA100	(ヒスチジン要求性の塩基対置換型)
ネズミチフス菌	TA98	(ヒスチジン要求性のフレームシフト型)
ネズミチフス菌	TA1535	(ヒスチジン要求性の塩基対置換型)
ネズミチフス菌	TA1537	(ヒスチジン要求性のフレームシフト型)
大腸菌	WP2 <i>uvrA</i>	(トリプトファン要求性の塩基対置換型)

ネズミチフス菌は昭和58年9月9日にカリフォルニア大学 から、
また、大腸菌については昭和58年3月16日に国立衛生試験所（現 国立医薬品食品衛生研究所）から分与を受けた。

平成15年9月16日～同年9月19日に菌株の特性検査を実施し、規定の特性を保持している菌株を試験に使用した。各菌株の菌懸濁液にジメチルスルホキシド（DMSO；GC用；純度99.9%，Lot No. K30049278；Merck）を容量比80：7の割合で添加した後、凍結保存用チューブに0.2 mLずつ分注した。これを液体窒素を用いて凍結した後、超低温フリーザー（MDF-U71V；三洋電機バイオメディカ；設定温度-80℃）に保存した。

13.2. 培地の調製

13.2.1. 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（平成16年3月23日製造，Lot No. ANI260CT；オリエンタル酵母工業）を試験に使用した。本プレートは、Vogel-Bonner 最少培地 E を含む組成の溶液 30 mL を無菌的にシャーレに分注したものである。

最少グルコース寒天平板培地の組成を以下に示した.

硫酸マグネシウム・7水塩	0.2	g
クエン酸・1水塩	2	g
リン酸二カリウム・無水塩	10	g
リン酸一アンモニウム	1.92	g
水酸化ナトリウム	0.66	g
グルコース	20	g
寒天 (BA-30A : Lot No. 40127 ; 伊那食品工業)	12.0	g
精製水	1000	mL

13.2.2. トップアガー (軟寒天)

塩化ナトリウム 0.5 w/v%および寒天 (Bacto-agar : Lot No. 1124004 ; Difco Laboratories) 0.6 w/v%を含む水溶液をオートクレーブで滅菌した後, ネズミチフス菌を用いる試験の場合, 0.5 mmol/L L-ヒスチジン (Lot No. 308C2055 ; 関東化学) および 0.5 mmol/L D-ビオチン (Lot No. 301C2275 ; 関東化学) 水溶液を寒天溶液 10 容量に対し 1 容量加え, 大腸菌を用いる試験の場合, 0.5 mmol/L L-トリプトファン (Lot No. 008D2026 ; 関東化学) 水溶液を同じく 1 容量加えた.

13.3. 試験菌株の前培養

内容量 200 mL のバッフル付三角フラスコに 2.5 w/v%ニュートリエントブロス (Nutrient Broth No. 2 : Lot No. 298714 ; Oxoid) 培養液を 25 mL 分注し, これに融解した菌懸濁液を 50 μ L 接種した. 培養開始までの間冷却ユニット (COOLPIPE 200D あるいは ML-10F : タイテック【復帰突然変異試験において使用】) を用いて 4°C に保存し, その後ウォーターバスシェーカー (MM-10 : タイテック) を用い, 37°C で 8 時間振盪 (100 回/分) 培養した. 試験毎に菌株の培養を実施し, 菌懸濁液は培養終了後速やかに使用した.

ATP フォトメーター (ルミテスターK-100 : キッコーマン) を用いて計測した生菌数を次頁に示した.

試験	生菌数 ($\times 10^9$ /mL)				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
用量設定試験	2.93	2.27	2.96	2.06	1.90
再試験	2.63	2.45	3.07	2.15	1.43
再試験-追加試験	3.40	-	-	4.48	1.21
復帰突然変異試験	3.60	3.37	3.96	3.31	1.56

13.4. S9 mix

製造後 6 カ月以内の S9 mix (Lot No. FSM-503 ; キッコーマン) を試験に使用した。
使用時まで超低温フリーザー (設定温度 -80°C) に保存した。

13.4.1. S9 の調製方法

S9 調製の際の動物種, 性, 臓器, 誘導物質ならびに誘導方法を以下に示した。

ロット番号	RAA-503
製造年月日	平成 16 年 5 月 21 日 (誘導物質投与開始後 5 日目)
使用動物	ラット : Sprague-Dawley 系
性/週齢	雄/7 週齢
体重	209~236 g
臓器	肝臓
誘導物質	Phenobarbital (PB) および 5,6-Benzoflavone (BF)
投与量および 投与回数	PB : 30 mg/kg 1 回 (1 日目) 60 mg/kg 3 回 (2~4 日目) BF : 80 mg/kg 1 回 (3 日目)
投与方法	腹腔内投与
蛋白含量	28.85 mg/mL

13.4.2. S9 mix の組成

S9 mix 1 mL 中の量を次に示した.

S9	0.1	mL
MgCl ₂	8	μmol
KCl	33	μmol
G-6-P	5	μmol
NADPH	4	μmol
NADH	4	μmol
Na-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100	μmol

13.5. 被験物質液の調製

本被験物質はDMSOに易溶であることからモレキュラーシーブを用いて脱水処理を行ったDMSO (GC 用 ; 純度 99.9%, Lot No. K30049278 ; Merck) に溶解させた.

用量設定試験および同 (再試験) では使用直前に調製原液 (50.0 mg/mL 液) を準備した. この 50.0 mg/mL 調製原液を使用溶媒で順次希釈し, 20.0, 8.00, 3.20, 1.28, 0.512, 0.205 および 0.0819 mg/mL 液を調製した.

用量設定試験 (再試験-追加試験) では, 使用直前に調製原液 (2.00 mg/mL 溶液) を準備した. この 2.00 mg/mL 調製原液を使用溶媒で順次希釈し, 1.00, 0.500, 0.250, 0.125, 0.0625, 0.0313, 0.0156, 0.00781, 0.00391, 0.00195 および 0.000977 mg/mL 溶液を調製した.

復帰突然変異試験では, 使用直前に調製原液 (50.0 mg/mL 溶液) を準備した. この 50.0 mg/mL 調製原液を使用溶媒で順次希釈し, 25.0, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.781, 0.391, 0.195, 0.0977, 0.0488, 0.0244, 0.0122, 0.00610, 0.00305 および 0.00153 mg/mL 溶液を調製した.

いずれの場合も調製後, 速やかに処理を行った.

13.6. 対照群

13.6.1. 陰性 (溶媒) 対照

使用溶媒 (DMSO) で試験した.

13.6.2. 陽性対照

調製済み陽性対照物質溶液 (Lot No. M0003 ; オリエンタル酵母工業) を試験に使用した. 陽性対照物質名および用量を以下に示した.

AF-2 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド
NaN₃ アジ化ナトリウム
9-AA 9-アミノアクリジン塩酸塩
2-AA 2-アミノアントラセン

《代謝活性化系非存在下：-S9 mix》

菌株	化合物名	調製日	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	陽性対照 溶液濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	ロット番号
ネズミチフス菌 TA100	AF-2	2003.4.11	0.01	0.1	030411AF01
ネズミチフス菌 TA98	AF-2	2003.4.11	0.1	1.0	030411AF10
ネズミチフス菌 TA1535	NaN ₃	2003.4.10	0.5	5.0	030410N
ネズミチフス菌 TA1537	9-AA	2003.4.11	80	800	030411A9
大腸菌 WP2 <i>uvrA</i>	AF-2	2003.4.11	0.01	0.1	030411AF01

《代謝活性化系存在下：+S9 mix》

ネズミチフス菌 TA100	2-AA	2003.4.10	1.0	10	030410A210
ネズミチフス菌 TA98	2-AA	2003.4.10	0.5	5.0	030410A205
ネズミチフス菌 TA1535	2-AA	2003.4.10	2.0	20	030410A220
ネズミチフス菌 TA1537	2-AA	2003.4.10	2.0	20	030410A220
大腸菌 WP2 <i>uvrA</i>	2-AA	2003.4.10	10	100	030410A2100

なお、これらの用量は「安衛法における変異原性試験－テストガイドラインと GLP」
(労働省安全衛生部化学物質調査課編，平成3年) に準じて設定した。

13.6.3. 無菌試験

被験物質液(調製原液)ならびに S9 mix については無菌試験を実施した。すなわち、
調製原液 100 μL あるいは S9 mix 500 μL にトップアガーを 2 mL 添加し、プレート上に
注いだ。37°C の条件で 48 時間培養した後、雑菌汚染の有無を確認した。

調製原液および S9 mix のいずれについても 2 枚のプレートを用いて無菌試験を実施
した。

用量設定試験，同(再試験)，同(再試験－追加試験)および復帰突然変異試験での

モノオレイン酸グリセリル調製原液ならびに S9 mix の無菌試験において、菌の増殖は認められなかった。

13.7. 用量設定試験（予備試験）

13.7.1. 用量

ガイドライン上定められた最高用量である 5000 µg/プレート を最高用量とし、以下 2000, 800, 320, 128, 51.2, 20.5 および 8.19 µg/プレートの計 8 段階を用量設定試験の用量とした。

13.7.2. 使用プレート数および識別

用量当たり 3 枚のプレートを用いた。

試験菌株の別、S9 mix の有無および用量を明記することにより各プレートを識別した。

13.7.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

試験管に使用溶媒、被験物質液あるいは陽性対照物質溶液を 100 µL、次いで代謝活性化系非存在下（-S9 処理）の場合、0.1 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液（pH 7.4）を 500 µL、代謝活性化系存在下（+S9 処理）の場合、S9 mix を 500 µL 分注した。さらに前培養した試験菌株の懸濁液 100 µL を加えた後、ウォーターバスシェーカー（MM-10：タイテック）を用いて設定温度 37°C で 20 分間振盪（120 回/分；ブレインキューベーション）した。振盪終了後、トップアガーを 2 mL 添加し、内容物を混合した。その後、混合液をプレート上に注ぎ一様に広げた。恒温器（SSV-R11DA：池田理化）を用いて 37°C の条件で 48 時間各プレートを培養した。

13.7.4. 析出等の観察

各処理法において、処理開始およびコロニー数計測時に析出等の有無を肉眼で観察した。

13.7.5. コロニー数計測

被験物質の生育阻害作用を確認するため、プレート上の試験菌株（背景菌）の生育状態について実体顕微鏡（×40）を用いて観察した。次いで、復帰突然変異により生じたコロニーを計測した。計測に際しては、コロニーアナライザー（CA-11：システムサイエンス）を用い、面積補正ならびに数え落とし補正を実施してコロニー数を算出した。

強度の被験物質析出により、コロニーアナライザーの使用が不適切と考えられた用量については目視でコロニー数を計数した。

13.8. 用量設定試験（再試験）

用量設定試験では-S9 および+S9 処理の両処理とも TA100, TA1537 株で生育阻害が

低用量群においても観察された。他の3菌株では同作用がみられていないことから、確認のため再試験を実施した。

13.8.1. 用量

13.7.1.に記載の用量で実施した。

13.8.2. 使用プレート数および識別

13.7.2.に記載の方法に準じた。

13.8.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

13.7.3.に記載の方法に準じた。ただし、プレインキュベーションには M-100^N：タイテック株式会社を用いた。

13.8.4. 析出等の観察

13.7.4.に記載の方法に準じた。

13.8.5. コロニー数計測

13.7.5.に記載の方法に準じた。

13.9. 用量設定試験（再試験－追加試験）

用量設定試験および同再試験において再現性はほぼ確認されたが、TA100（-S9 処理）、TA98（-S9 処理）および TA1537（-S9 および+S9 処理）株では評価群群数が4用量を満たしていないことから、同株について追加試験を実施した。

13.9.1. 用量

用量設定試験（再試験）の結果を基に、生育阻害が認められると考えられる用量を最高用量に下記の6～8用量実施した。

《代謝活性化系非存在下：-S9 処理》

菌株	用量 (μg/プレート)											
TA100	-	-	-	-	-	-	6.25	12.5	25.0	50.0	100	200
TA98	-	-	-	-	-	3.13	6.25	12.5	25.0	50.0	100	-
TA1537	0.0977	0.195	0.391	0.781	1.56	3.13	6.25	12.5	-	-	-	-

《代謝活性化系存在下：+S9 処理》

菌株	用量 (μg/プレート)					
TA1537	6.25	12.5	25.0	50.0	100	200

13.9.2. 使用プレート数および識別

13.7.2.に記載の方法に準じた。

13.9.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

13.7.3.に記載の方法に準じた。

13.9.4. 析出等の観察

13.7.4.に記載の方法に準じた。

13.9.5. コロニー数計測

13.7.5.に記載の方法に準じた。

13.10. 復帰突然変異試験

13.10.1. 用量

復帰突然変異試験では、用量設定試験（再試験、同追加試験を含む）等の結果から TA1535 および WP2*avrA* 株の両処理法（±S9）および TA98 の+S9 処理において、復帰変異コロニーの増加および試験菌株に対する生育阻害が認められなかった。したがって、5000 µg/プレート を最高用量とし、以下に示した用量（6 用量）を設定した。また、生育阻害が認められた TA100 および TA1537 の両処理（±S9）および TA98 の-S9 処理においては、生育阻害が認められると考えられる用量を最高用量として、次の表に示した用量（6～7 用量）を設定した。

《代謝活性化系非存在下：-S9 処理》

菌株	用量 (µg/プレート)										
TA100	4.88	9.77	19.5	39.1	78.1	156	—	—	—	—	—
TA1535	—	—	—	—	—	156	313	625	1250	2500	5000
WP2 <i>avrA</i>	—	—	—	—	—	156	313	625	1250	2500	5000
TA98	4.88	9.77	19.5	39.1	78.1	156	—	—	—	—	—
TA1537	0.153	0.305	0.610	1.22	2.44	4.88	9.77	—	—	—	—

《代謝活性化系存在下：+S9 処理》

菌株	用量 (µg/プレート)										
TA100	9.77	19.5	39.1	78.1	156	313	625	—	—	—	—
TA1535	—	—	—	—	156	313	625	1250	2500	5000	—
WP2 <i>avrA</i>	—	—	—	—	156	313	625	1250	2500	5000	—
TA98	—	—	—	—	156	313	625	1250	2500	5000	—
TA1537	9.77	19.5	39.1	78.1	156	313	—	—	—	—	—

13.10.2. 使用プレート数および識別

13.7.2.に記載の方法に準じた。

13.10.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

13.7.3.に記載の方法に準じた.

13.10.4. 析出等の観察

13.7.4.に記載の方法に準じた.

13.10.5. コロニー数計測

13.7.5.に記載の方法に準じた.

13.11. 結果の解析

復帰突然変異コロニー数が陰性対照の2倍以上に増加し, かつその増加に用量依存性あるいは再現性が認められた場合に陽性と判定した.

14. 試験結果

14.1. 用量設定試験

14.1.1. 試験結果

結果を Figure 1~5 および Table 1, 2 に示した.

モノオレイン酸グリセリル処理の場合, 代謝活性化系非存在下 (-S9 処理) ならびに代謝活性化系存在下 (+S9 処理) のいずれの試験菌株においても, 復帰突然変異コロニー数の増加は認められなかった. 試験菌株に対する生育阻害作用は-S9 処理の場合, TA100 株の 128 μg /プレート以上の用量および TA1537 株の全ての用量で観察された. また, +S9 処理の場合は, TA100 株の 320 μg /プレート以上の用量ならびに TA1537 株の 128 μg /プレート以上の用量で観察された. 他の 3 菌株では生育阻害作用は観察されなかった. 一方, 陽性対照物質は, 各試験菌株に対して復帰突然変異を顕著に誘発した.

14.1.2. 被験物質の析出等

被験物質処理時, -S9 処理の 128 μg /プレート以上の用量, +S9 処理の 320 μg /プレート以上の用量で白色粉末状 (-S9 処理では一部塊状) の析出物が認められた. コロニー計数時, 両処理とも 800 μg /プレート以上の用量で白色粉末状 (-S9 処理では一部塊状) の析出物が認められた. 析出物の影響により, 両処理とも 800 μg /プレート以上の用量ではコロニーアナライザーの使用が不適切と判断し, 目視でコロニーを計数した.

14.2. 用量設定試験 (再試験)

用量設定試験では, -S9 および+S9 処理の両処理とも TA100, TA1537 株において生育阻害が低用量群においても観察された. 他の 3 菌株では同作用がみられていないことから, 確認のため再試験を実施した.

14.2.1. 試験結果

結果を Figure 6~10 および Table 3, 4 に示した.

モノオレイン酸グリセリル処理群では, -S9 ならびに+S9 処理のいずれにおいても, 復帰突然変異コロニー数の増加は認められなかった. 試験菌株に対する生育阻害作用は-S9 処理の場合, TA100 株の 128 μg /プレート以上の用量, TA98 株の 51.2 μg /プレート以上の用量および TA1537 株の全ての用量で観察された. また, +S9 処理の場合は, TA100 株の 320 μg /プレート以上の用量ならびに TA1537 株の 128 μg /プレート以上の用量で観察された. 他の 3 菌株では生育阻害作用は観察されなかった.

一方, 陽性対照物質は, 各試験菌株に対して復帰突然変異を顕著に誘発した.

14.2.2. 被験物質の析出等

被験物質処理時, -S9 処理の 128 μg /プレート以上の用量, +S9 処理の 320 μg /プレ-

ト以上の用量で白色粉末状（-S9 処理では一部塊状）の析出物が認められた。コロニー計数時、両処理とも 800 µg/プレート以上の用量で白色粉末状（-S9 処理では一部塊状）の析出物が認められた。析出物の影響により、両処理とも 800 µg/プレート以上の用量ではコロニーアナライザーの使用が不適切と判断し、目視でコロニーを計数した。

14.3. 用量設定試験（再試験－追加試験）

用量設定試験および同再試験において再現性はほぼ確認されたが、TA100（-S9 処理）、TA98（-S9 処理）および TA1537（-S9 および+S9 処理）株では評価群群数が 4 用量を満たしていないことから同株について追加試験を実施した。

14.3.1. 試験結果

結果を Figure 11～13 および Table 5, 6 に示した。

モノオレイン酸グリセリル処理群では-S9 ならびに+S9 処理のいずれにおいても、復帰突然変異コロニー数の増加は認められなかった。試験菌株に対する生育阻害作用は-S9 処理の場合、TA100 株の 100 µg/プレート以上の用量、TA98 株の 100 µg/プレートおよび TA1537 株の 3.13 µg/プレート以上の用量で観察された。また、+S9 処理の場合は TA1537 株の 200 µg/プレートで観察された。

一方、陽性対照物質は、各試験菌株に対して復帰突然変異を顕著に誘発した。

14.3.2. 被験物質の析出等

なお、処理開始およびコロニー数計測時において被験物質析出等の変化は観察されなかった。

14.4. 復帰突然変異試験

14.4.1. 試験結果

試験結果を Figure 14～18 および Table 7, 8 に示した。

被験物質処理群の場合、-S9 ならびに+S9 処理のいずれにおいても、復帰突然変異コロニー数の増加は認められなかった。試験菌株に対する生育阻害作用は-S9 処理の場合、TA100 株の 156 µg/プレート、TA98 株の 78.1 µg/プレート以上の用量および TA1537 株の 4.88 µg/プレート以上の用量で観察された。また、+S9 処理の場合は、TA100 株の 156 µg/プレート以上の用量、TA1537 株の 313 µg/プレートで観察された。

一方、陽性対照物質は、各試験菌株に対して復帰突然変異を顕著に誘発した。

14.4.2. 被験物質の析出等

被験物質処理時、両処理とも 313 µg/プレート以上の用量で白色粉末状（-S9 処理では一部塊状）の析出物が認められた。コロニー計数時、-S9 処理の 1250 µg/プレート以上の用量および+S9 処理の 625 µg/プレート以上の用量で白色粉末状（-S9 処理では

一部塊状)の析出物が認められた。析出物の影響により、いずれの処理とも 1250 $\mu\text{g}/$
プレート以上の用量ではコロニーアナライザーの使用が不適切と判断し、目視でコロ
ニーを計数した。

15. 考察および結論

モノオレイン酸グリセリルの変異原性, すなわち遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため, 微生物 (ネズミチフス菌・大腸菌) を用いたプレインキュベーション法による復帰突然変異試験を実施した。

用量設定試験においてはガイドライン上の限界用量である 5000 µg/プレートまで検討した。その結果, -S9 および+S9 処理の両処理とも TA100, TA1537 株では試験菌株に対する生育阻害作用が低用量群においても観察され, 残りの3菌株では同作用がみられていないことから, 確認のため再試験を実施した。再現性は概ね確認されたが, TA100, TA98 および TA1537 株では評価群群数が4用量を満たしていないことから追加試験を実施した。

復帰突然変異試験を含めたいずれの試験においても, モノオレイン酸グリセリル処理群では陰性対照と比較し, 復帰突然変異コロニー数の明確な増加は認められなかった。

これら両処理法での試験結果は, 用量設定試験, 同再試験, 同追加試験ならびに復帰突然変異試験において再現性が確認された。

また, 現在まで本被験物質モノオレイン酸グリセリル (Glycerol monooleate) に関する遺伝毒性ならびに発がん性の報告はない。

類縁体であるグリセロール (Glycerol) については, 細菌を用いる復帰突然変異試験, CHO 細胞を用いた染色体異常試験, CHO 細胞を用いた姉妹染色分体交換試験, CHO 細胞を用いた遺伝子突然変異試験, ラット肝細胞を用いた UDS 試験で陰性¹⁾と報告されている。Glyceryl trinitrate (nitroglycerin) は, 復帰突然変異試験 (TA1535 のみ) で陽性²⁾との報告があった。また, Glycerol formal は, マウス骨髄小核試験で陰性³⁾との報告があった。

なお, 陰性対照群あるいは陽性対照群でのコロニー数は, いずれも当施設での背景データ (Appendix 1) と同等であり, 本試験は適切な条件でなされたと判断された。

以上の試験結果から, 当該試験条件下において, モノオレイン酸グリセリルの微生物に対する遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

16. 参考文献

- 1) Doolittle D.J., Lee D.A. and Lee C.K.: The genotoxic activity of glycerol in an in vitro test battery. Food Chem. Toxicol. 1988, 26(7):631-635.
- 2) Maragos C.M., Andrews A.W., Keefer L.K. and Elespuru R.K.: Mutagenicity of glyceryl trinitrate (nitroglycerin) in *Salmonella typhimurium*. Mutat. Res. 1993, 298(3):187-195.
- 3) Ashby J. and Ratpan F.: Inactivity of glycerol formal in a mouse micronucleus assay: relationship to its teratogenicity. Environ. Mutagen. 1986, 8(6):873-877

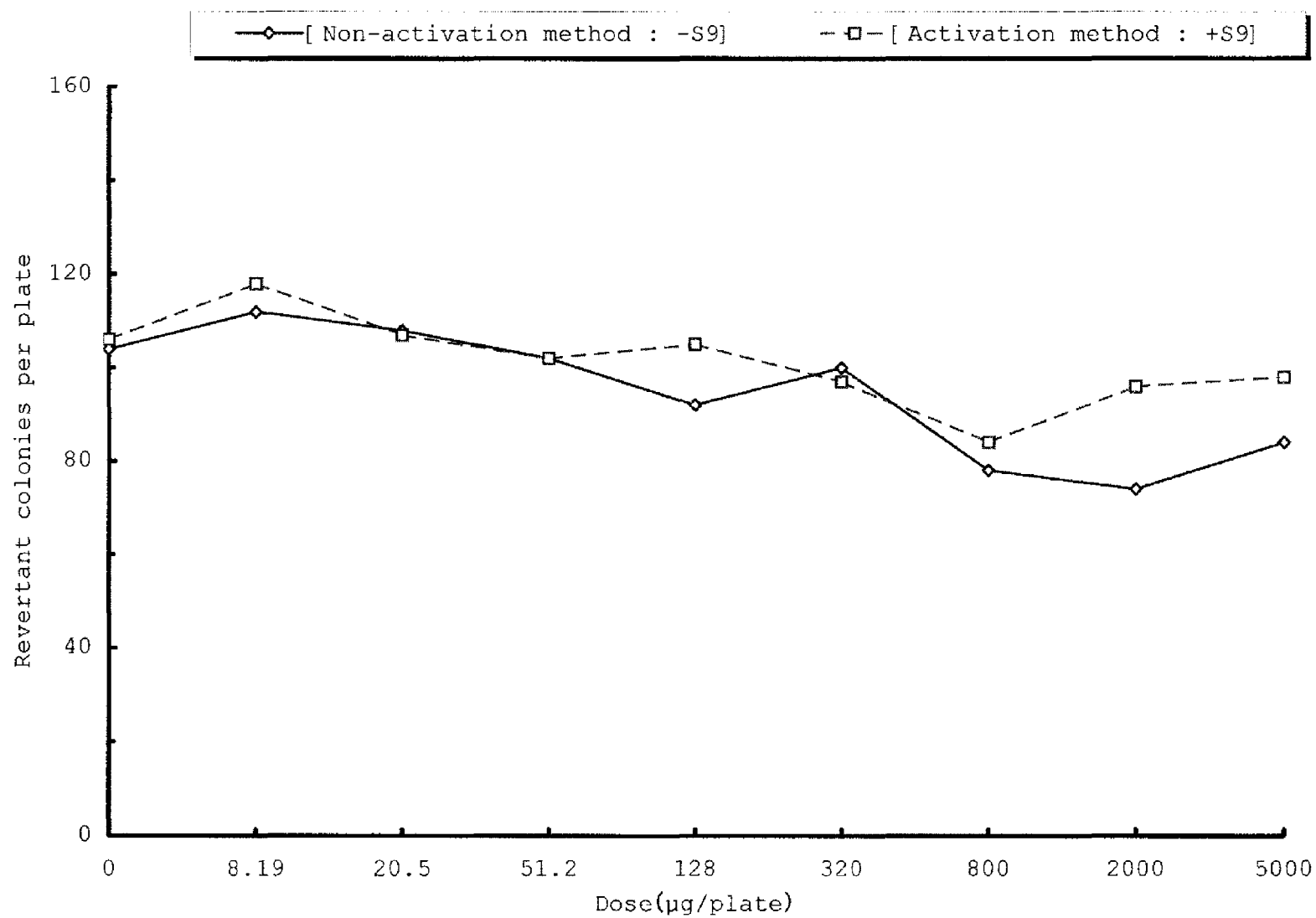


Figure 1. Dose-finding study of glycerol monooleate in strain TA100

- 26 -

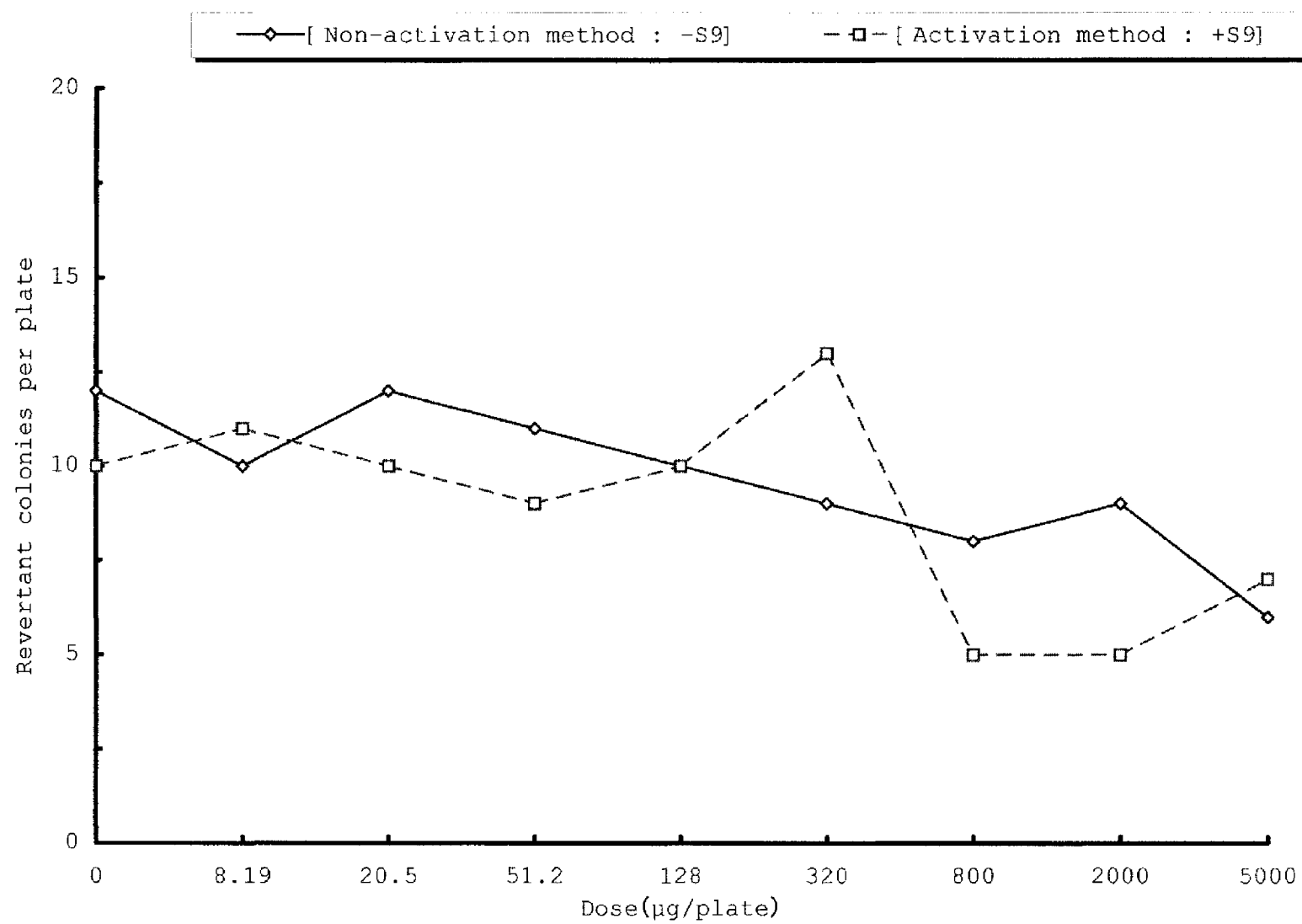


Figure 2. Dose-finding study of glycerol monooleate in strain TA1535

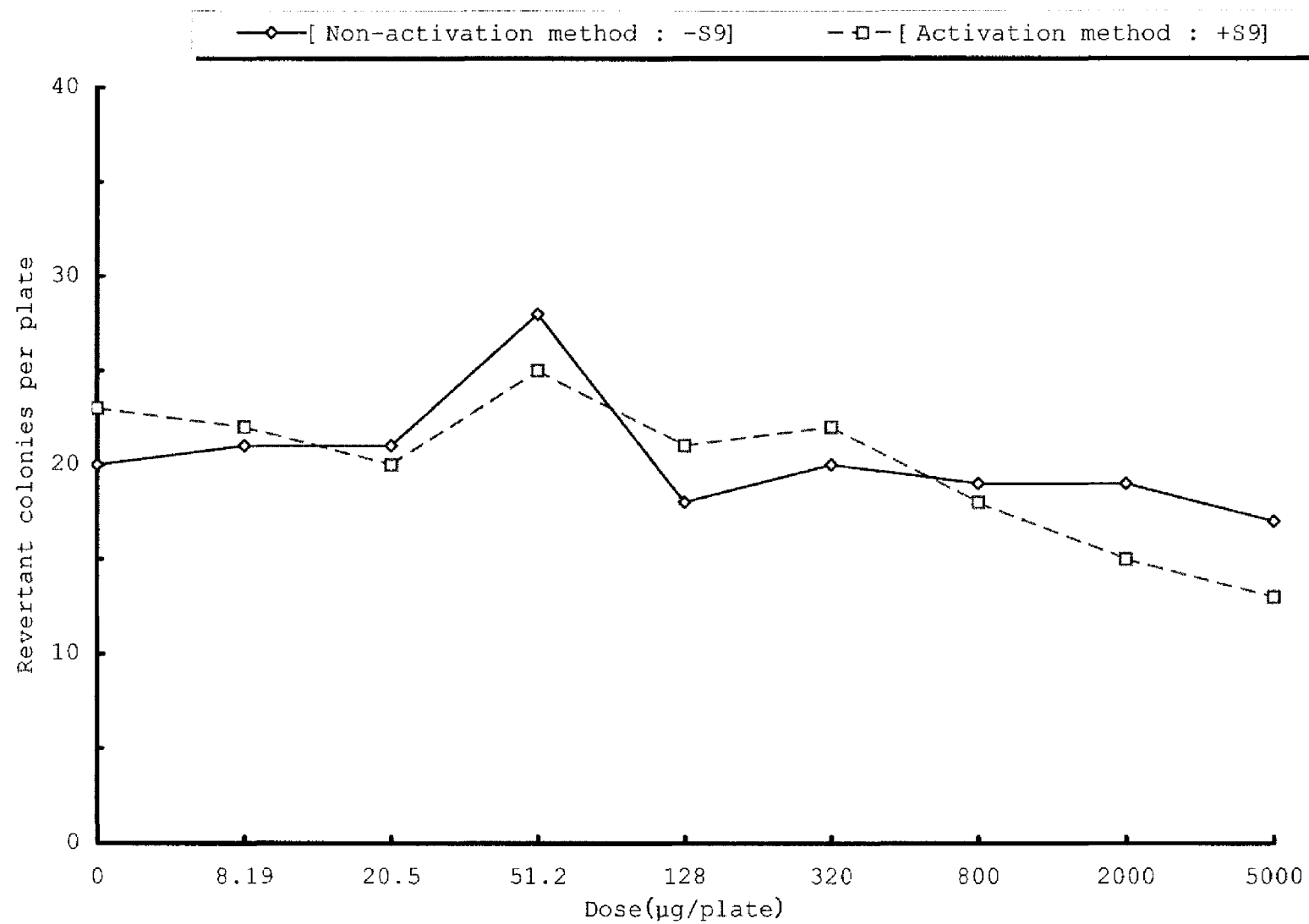


Figure 3. Dose-finding study of glycerol monooleate in strain WP2uvrA

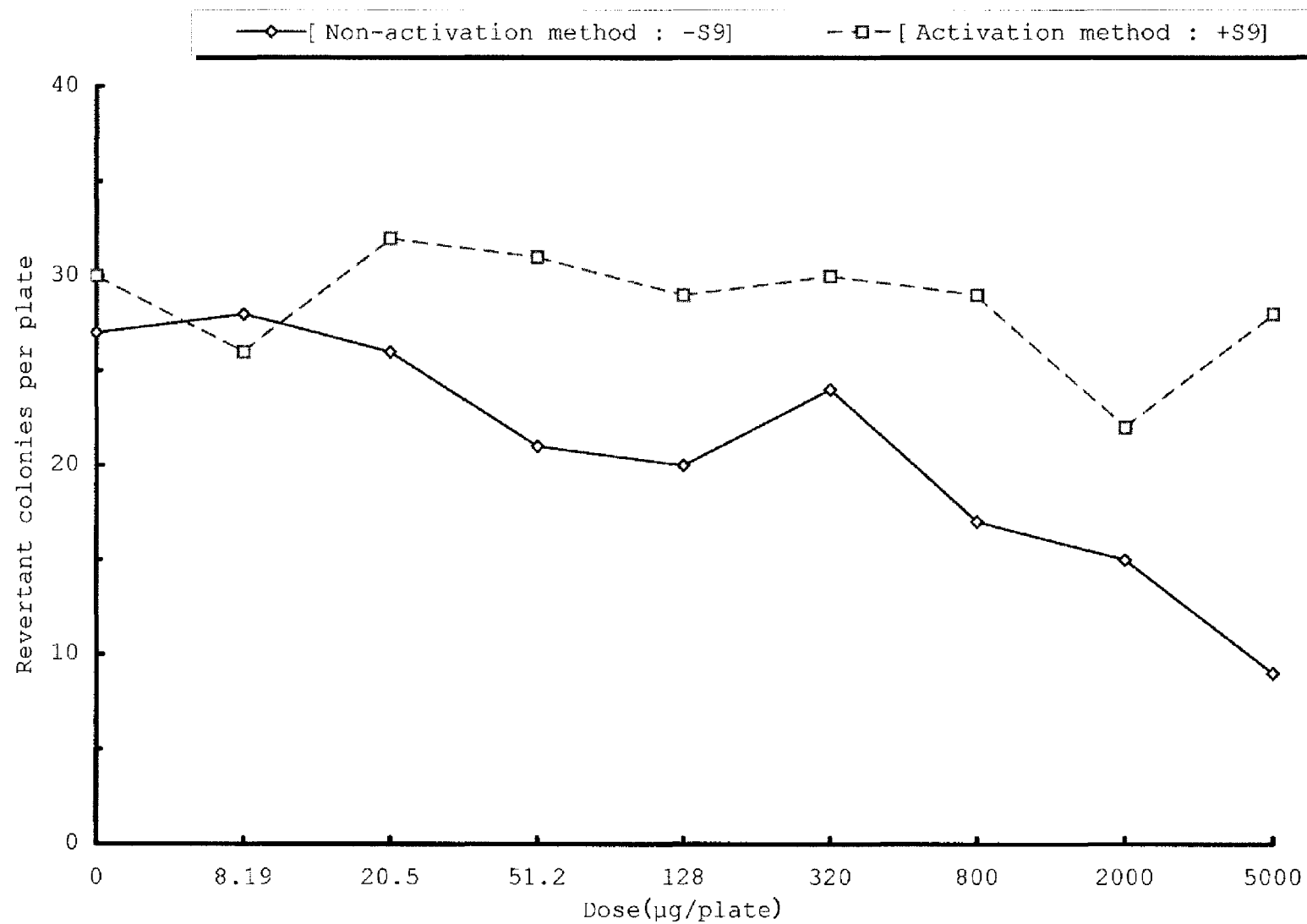


Figure 4. Dose-finding study of glycerol monooleate in strain TA98

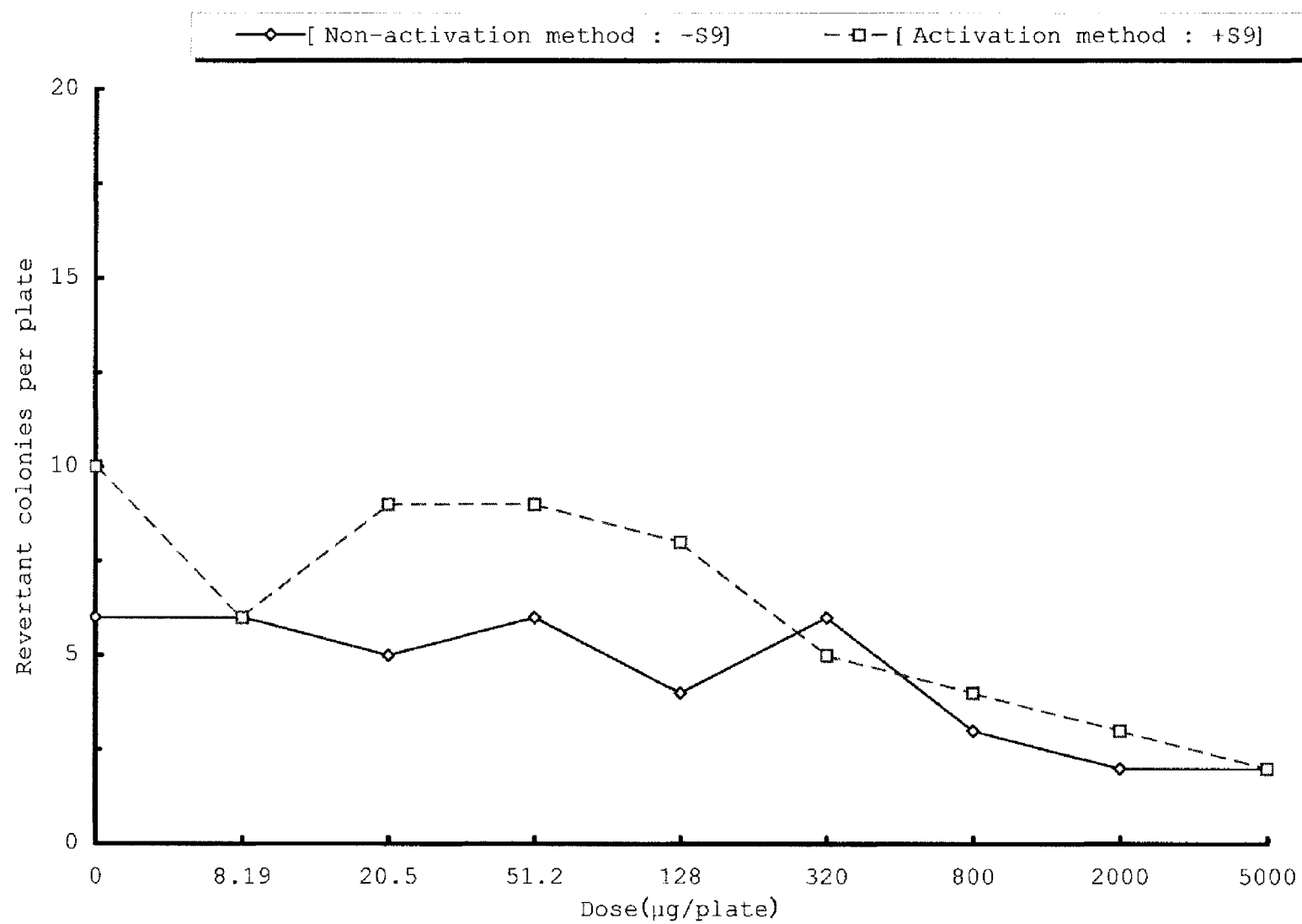


Figure 5. Dose-finding study of glycerol monooleate in strain TA1537

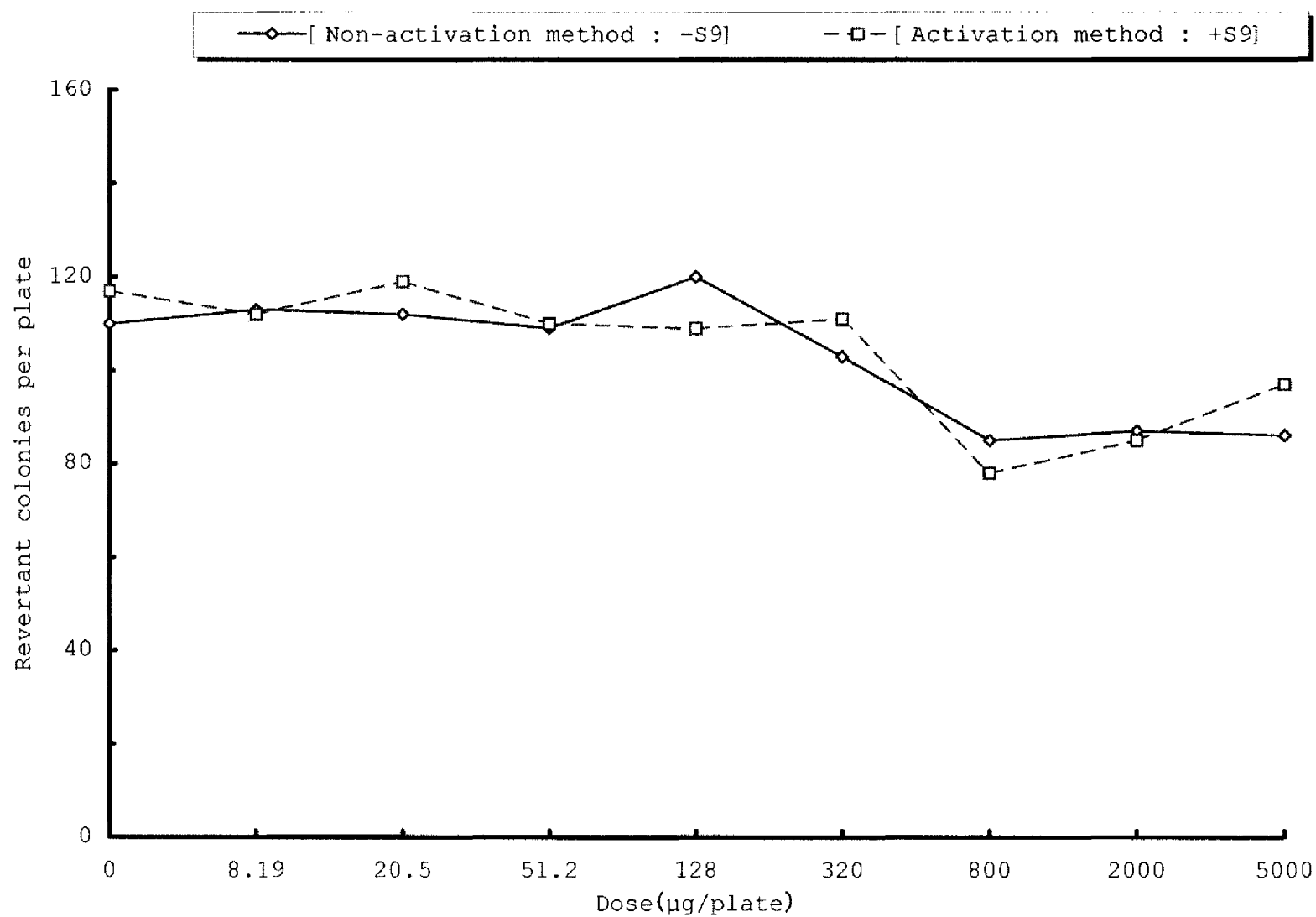


Figure 6. Dose-finding study of glycerol monooleate in strain TA100 (restudy)

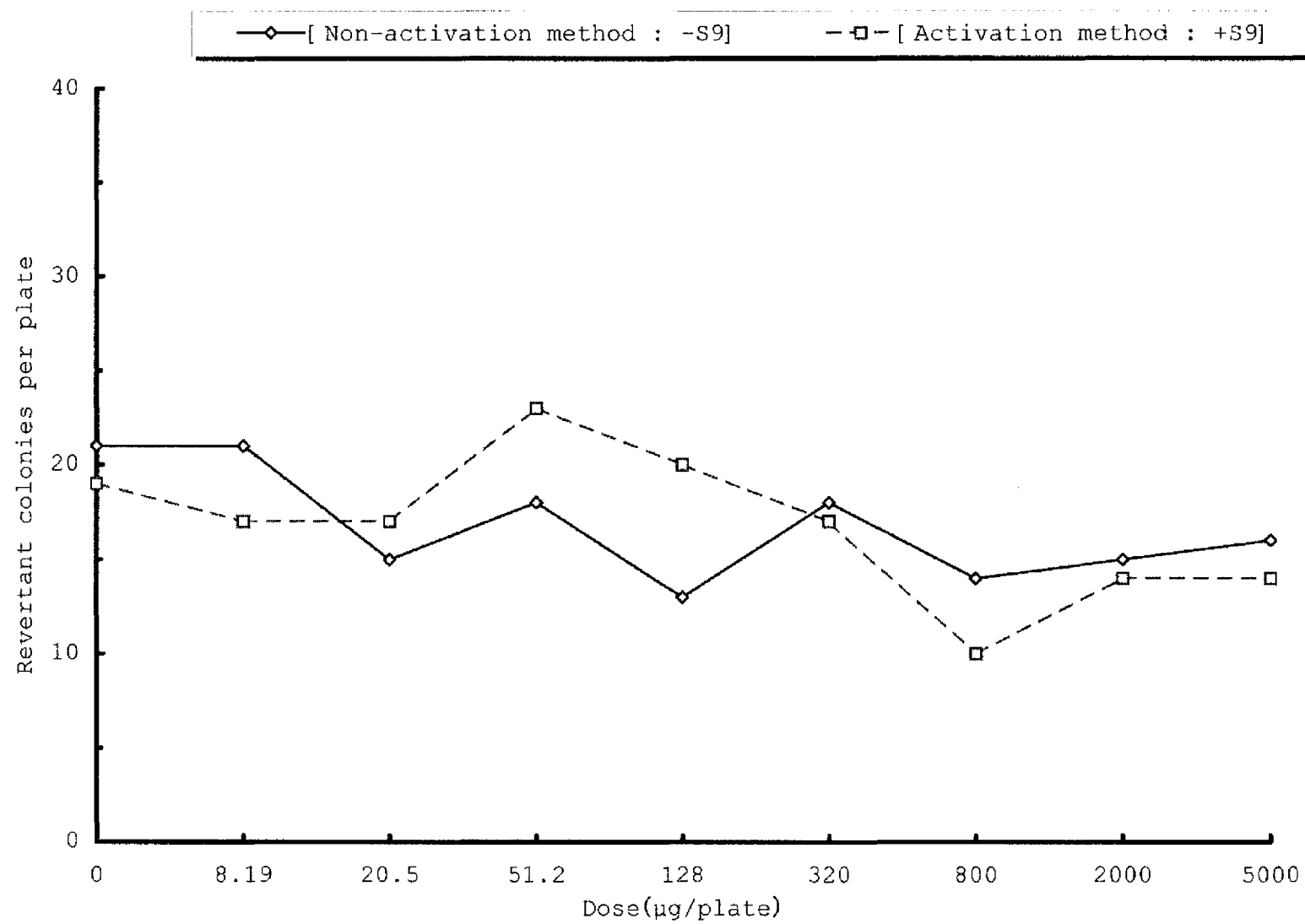


Figure 7. Dose-finding study of glycerol monooleate in strain TA1535 (restudy)

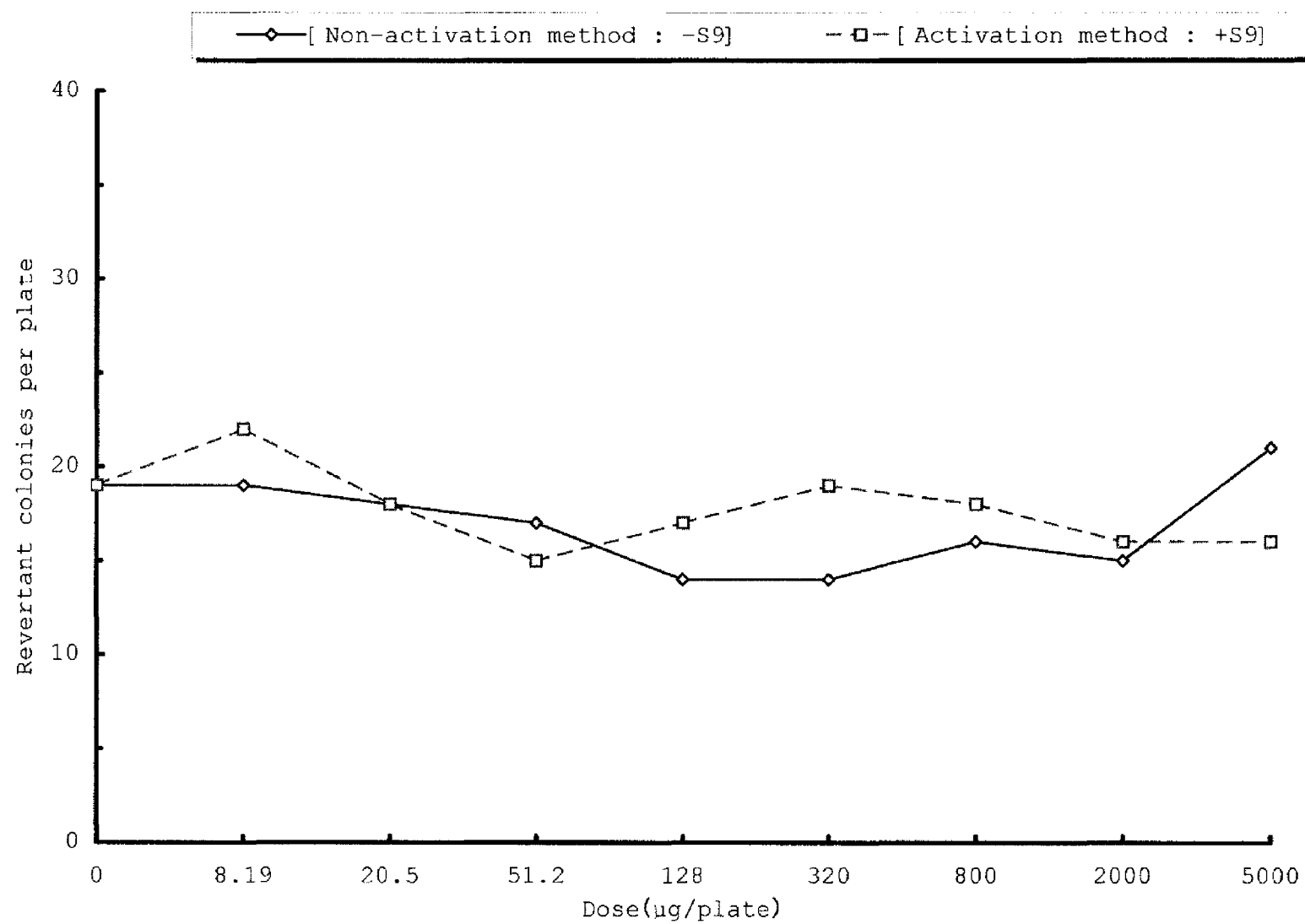


Figure 8. Dose-finding study of glycerol monooleate in strain WP2uvrA (restudy)

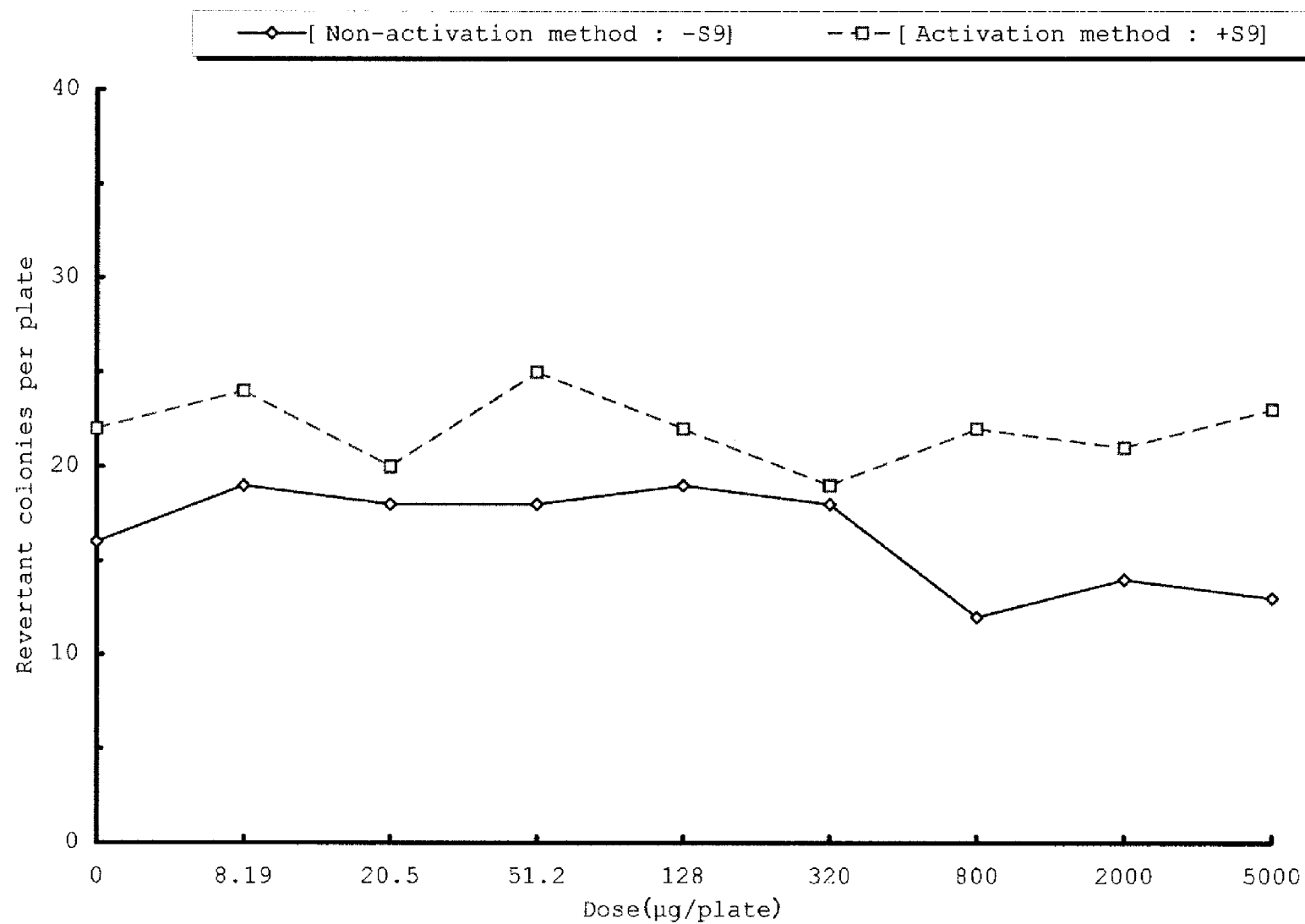


Figure 9. Dose-finding study of glycerol monooleate in strain TA98 (restudy)

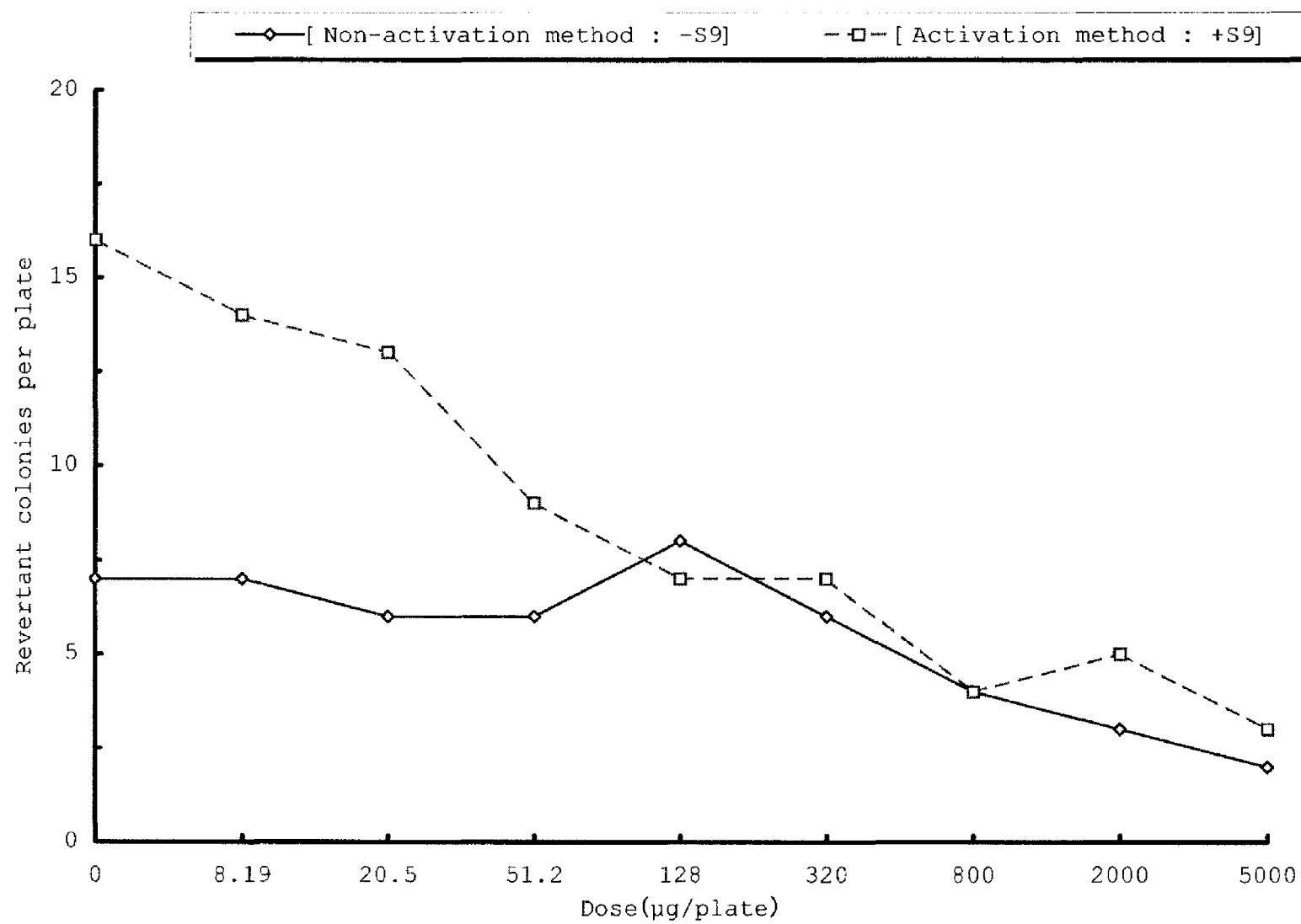


Figure 10. Dose-finding study of glycerol monooleate in strain TA1537 (restudy)

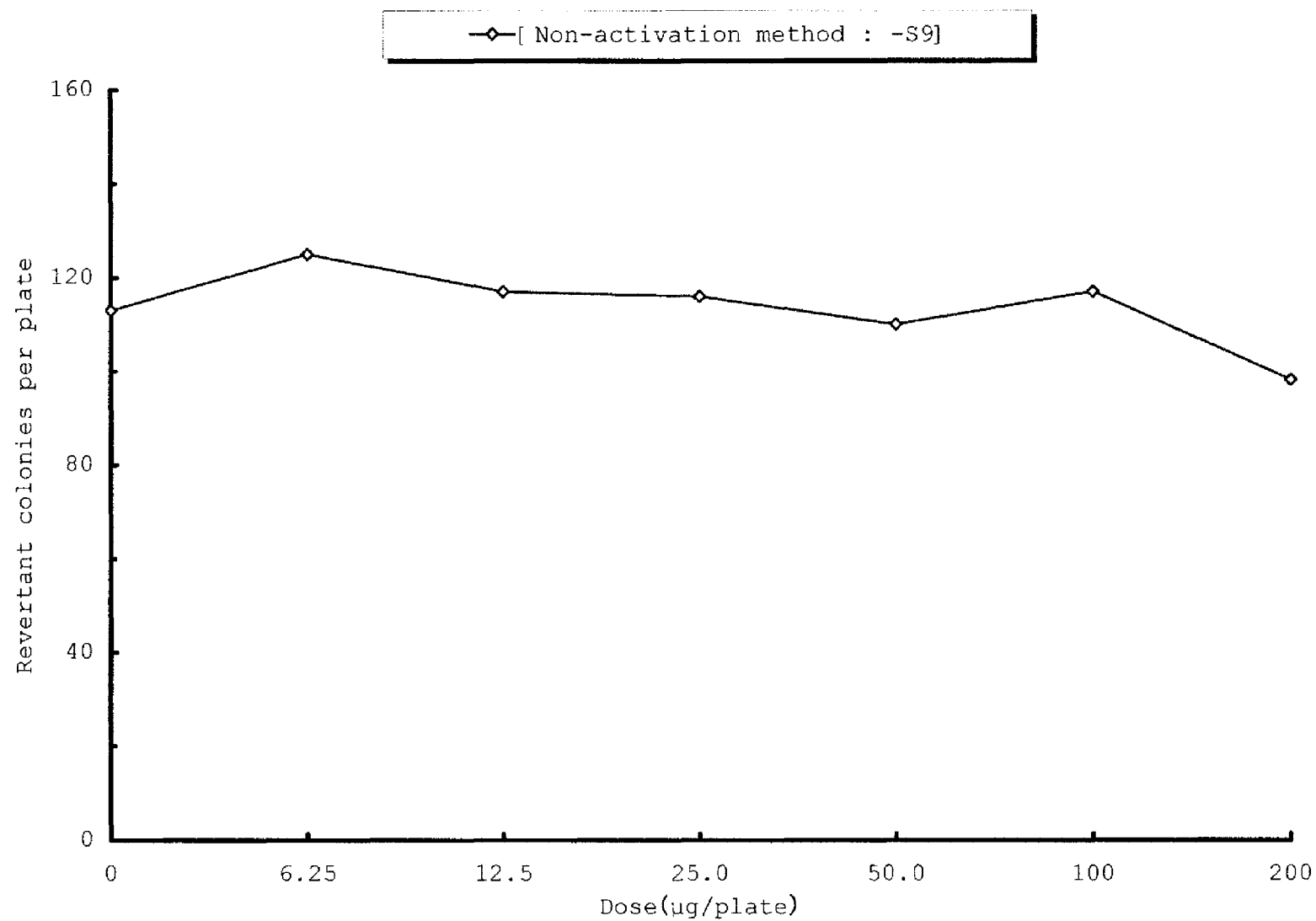


Figure 11. Dose-finding study of glycerol monooleate in strain TA100 (additional study)

- 36 -

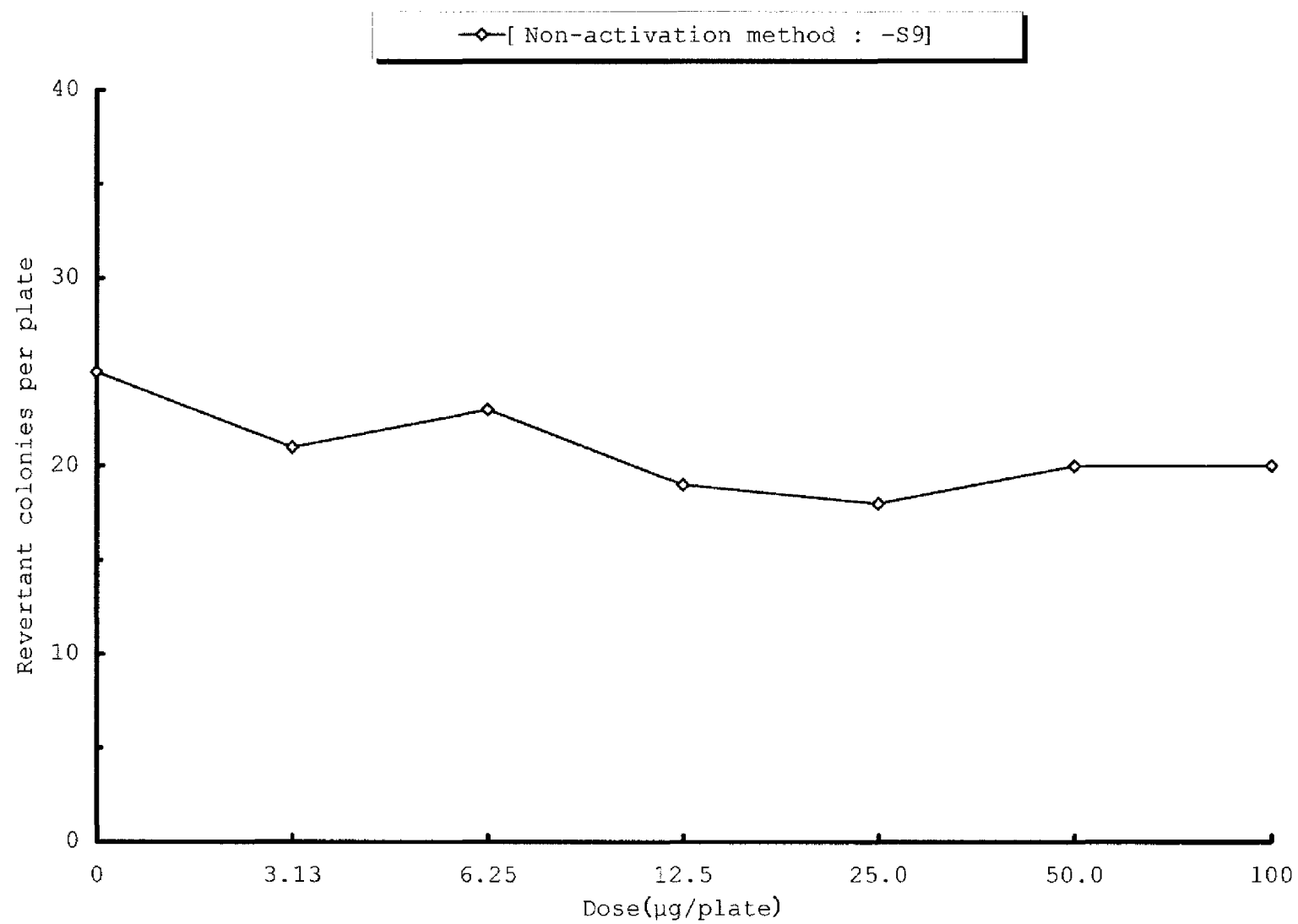


Figure 12. Dose-finding study of glycerol monooleate in strain TA98 (additional study)

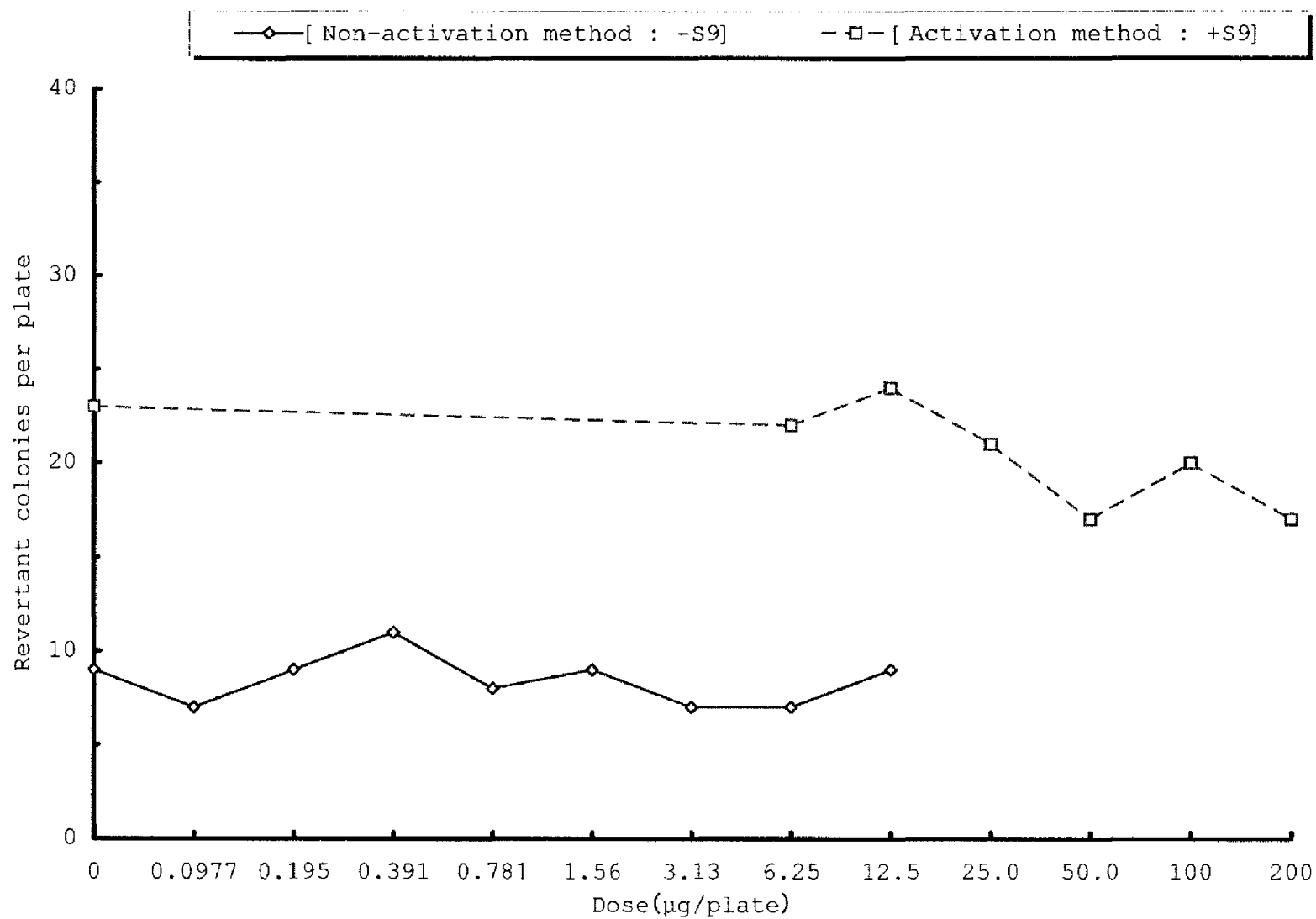


Figure 13. Dose-finding study of glycerol monooleate in strain TA1537 (additional study)

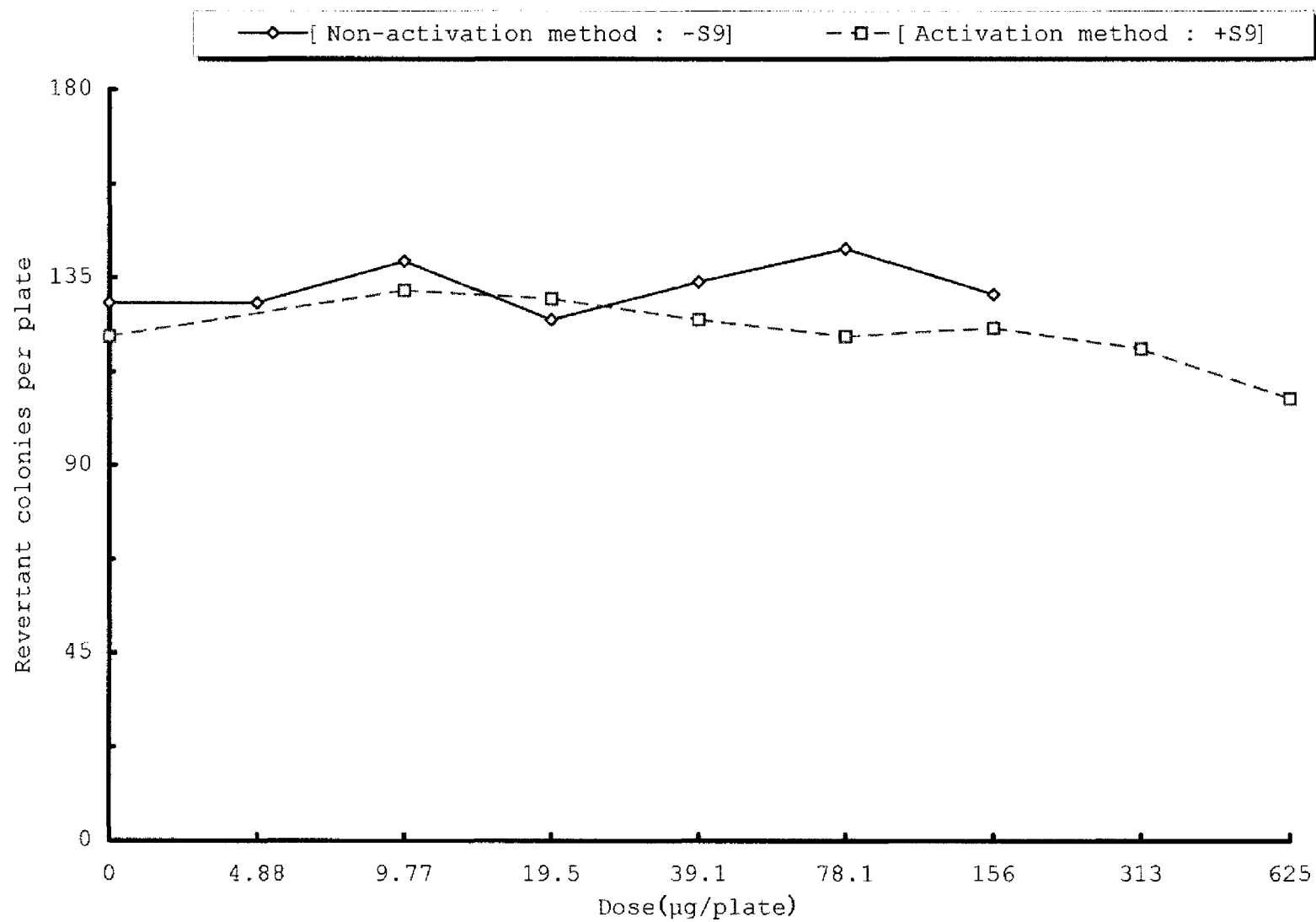


Figure 14. Bacterial reversion assay of glycerol monooleate in strain TA100

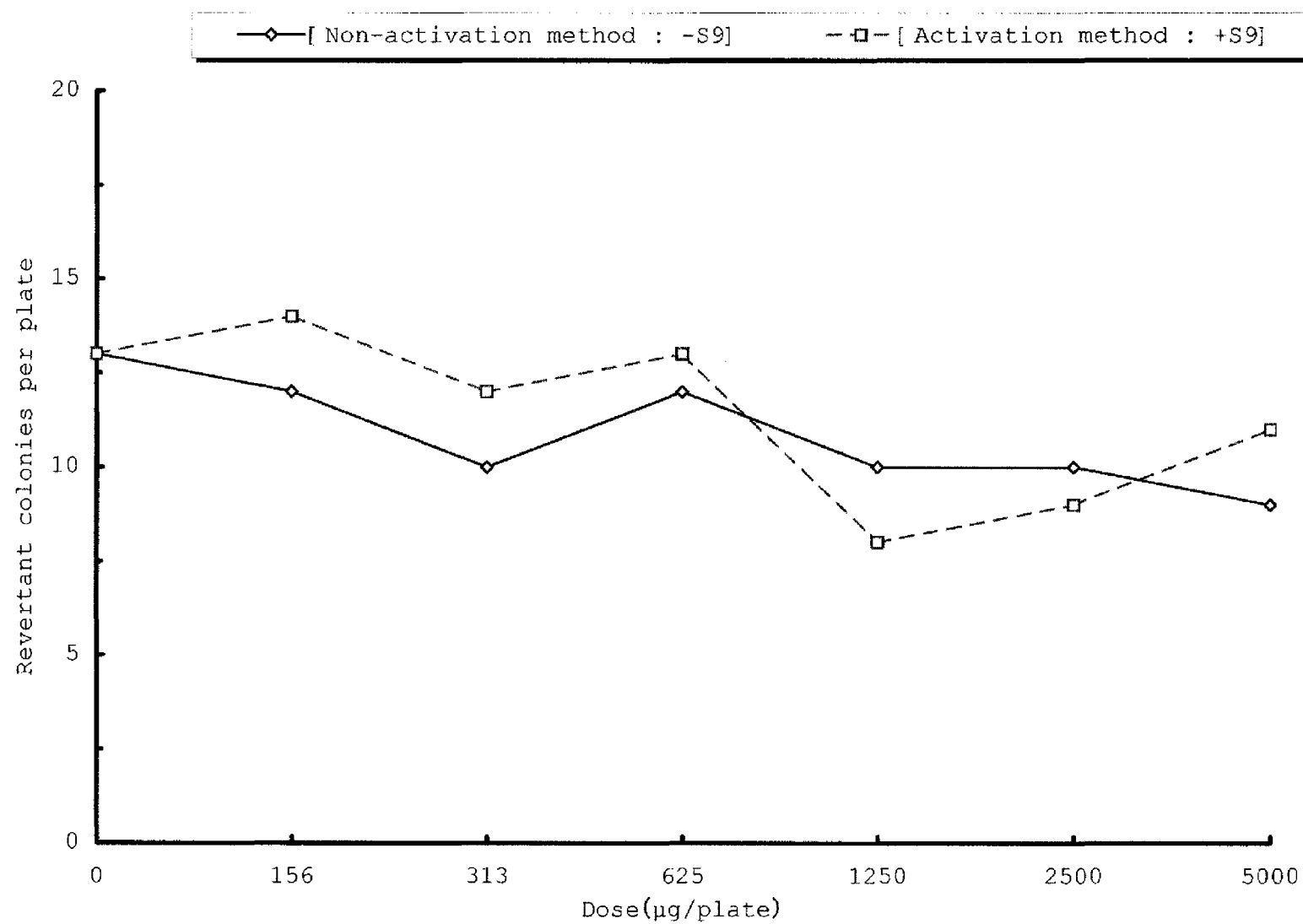


Figure 15. Bacterial reversion assay of glycerol monooleate in strain TA1535

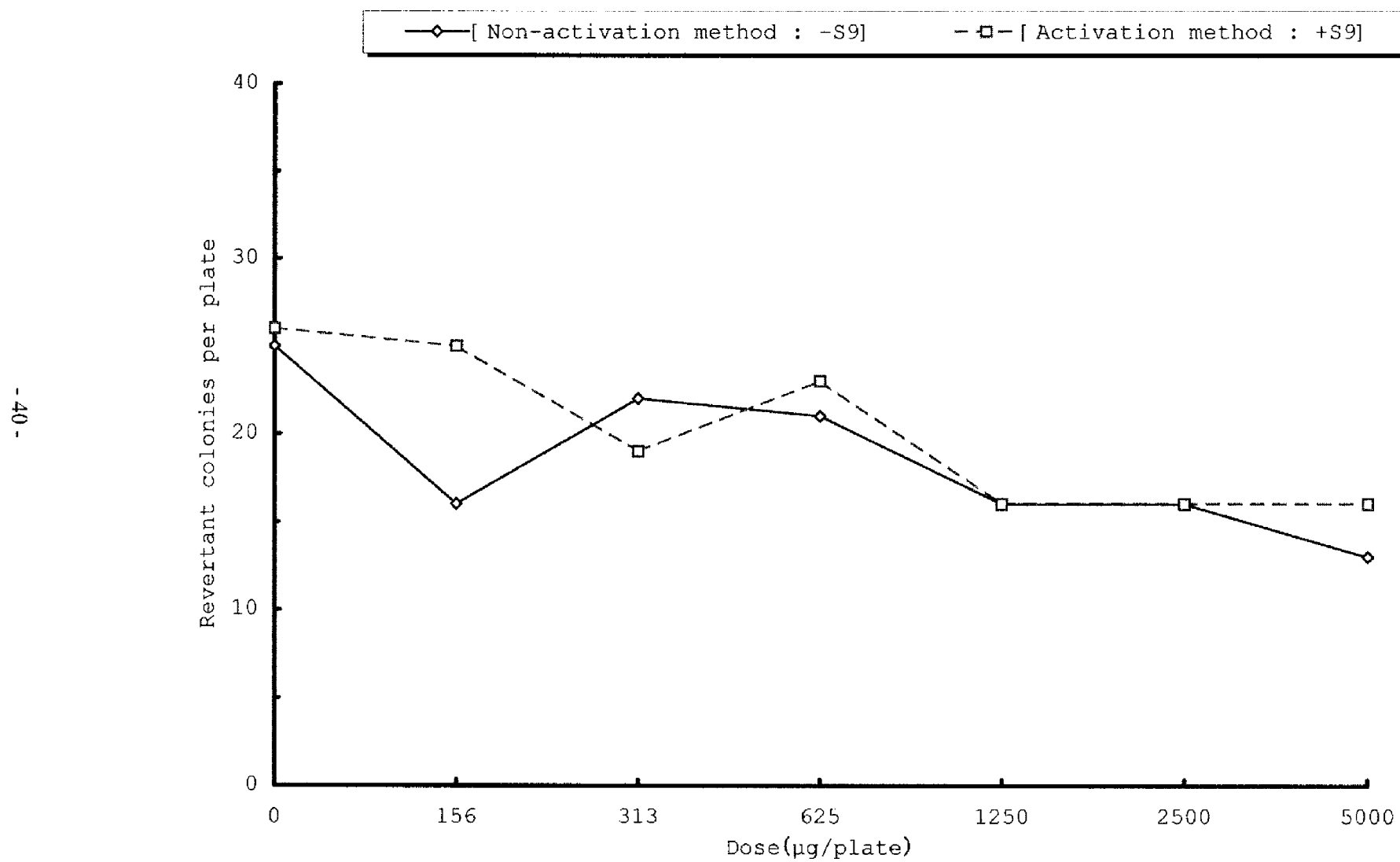


Figure 16. Bacterial reversion assay of glycerol monooleate in strain WP2uvrA

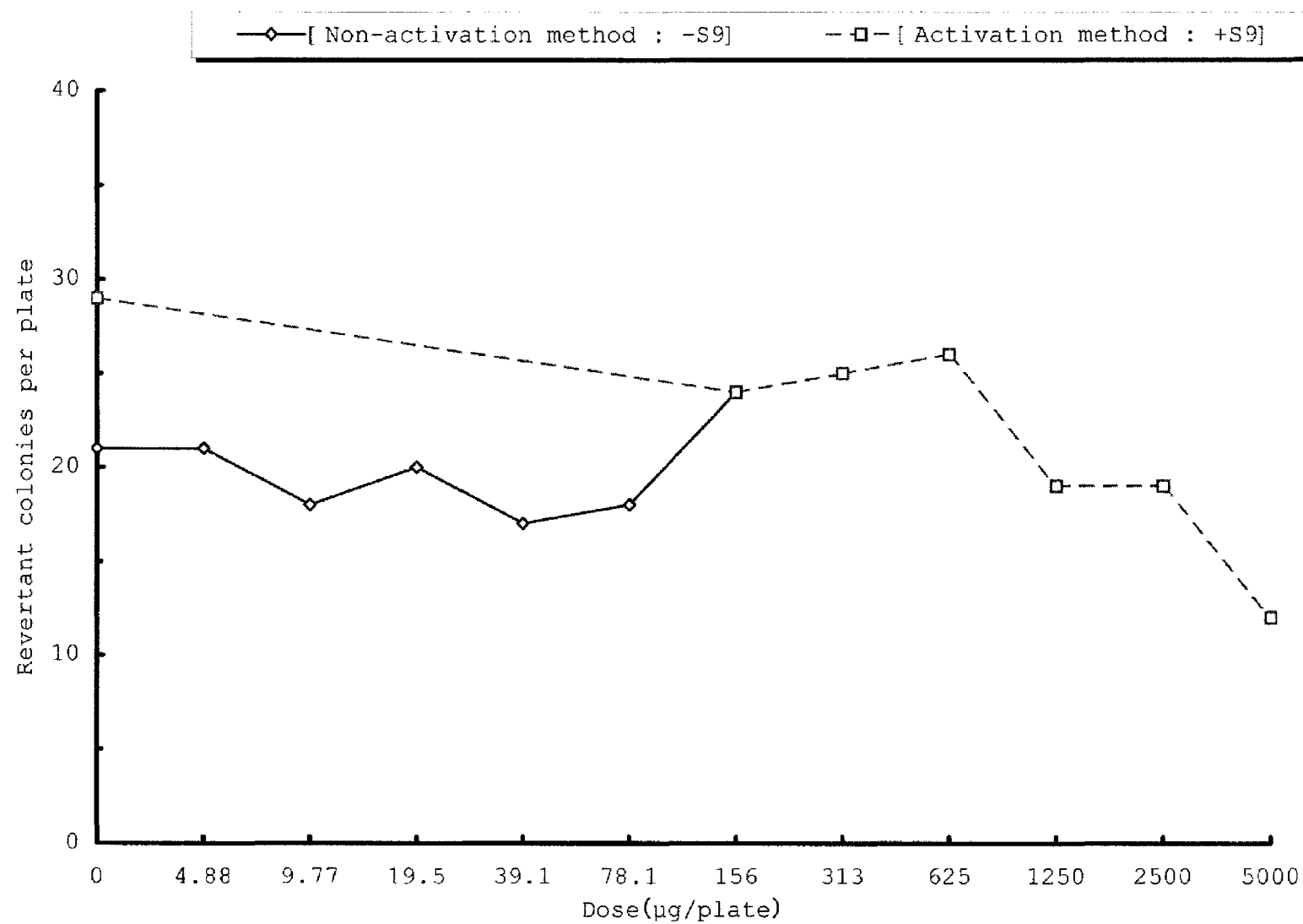


Figure 17. Bacterial reversion assay of glycerol monooleate in strain TA98

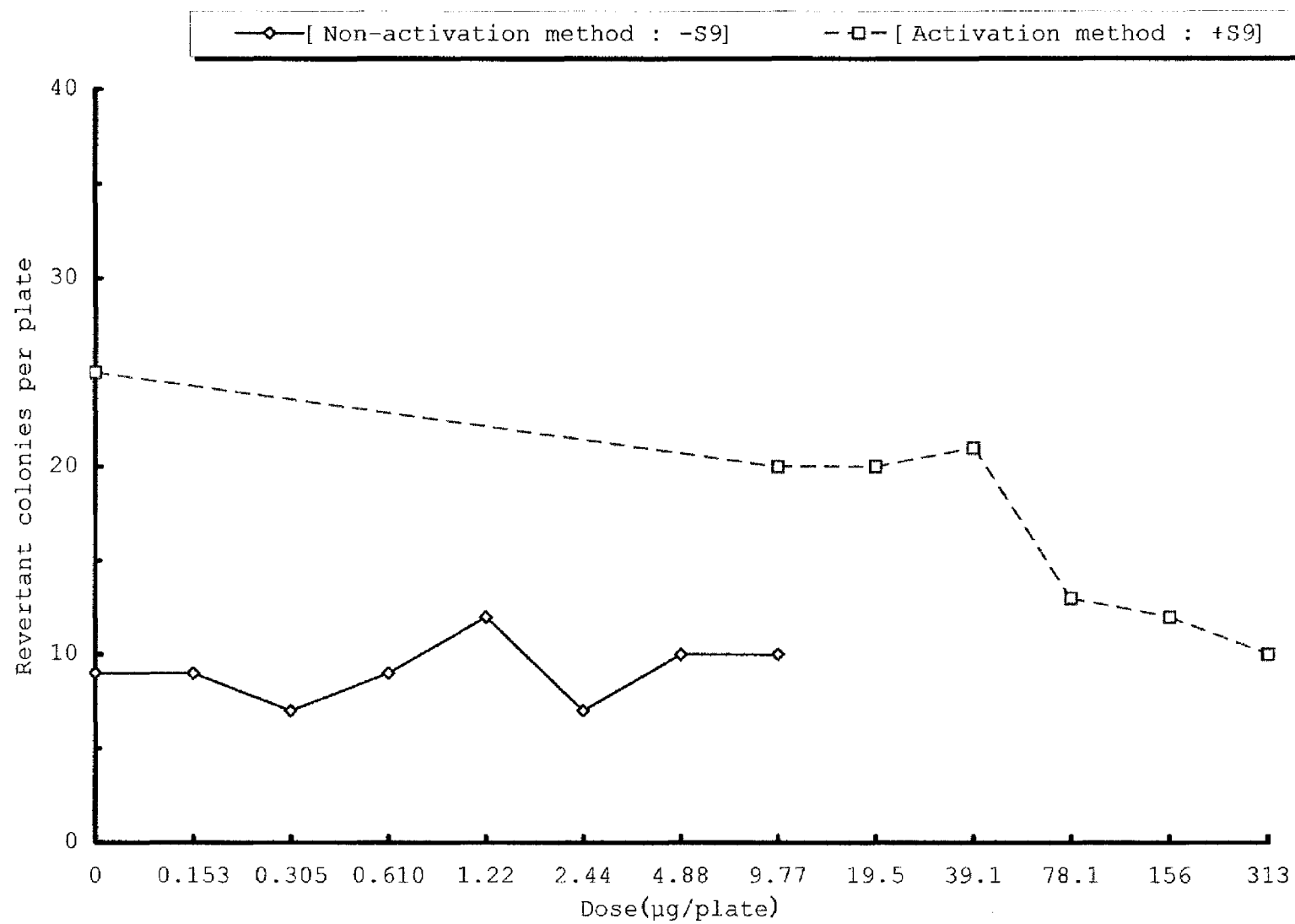


Figure 18. Bacterial reversion assay of glycerol monooleate in strain TA1537

Table 1. Summary data on dose-finding study of glycerol monooleate
[Non-activation method : -S9]

Compound	Dose (µg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
Glycerol -monooleate	0	107	105	99	12	11	13	19	19	21	29	27	24	8	5	6
		[104	±	4]	[12	±	1]	[20	±	1]	[27	±	3]	[6	±	2]
	8.19	113	120	104	8	10	11	23	20	20	31	31	23	6*	7*	6*
		[112	±	8]	[10	±	2]	[21	±	2]	[28	±	5]	[6	±	1]
	20.5	114	105	105	12	11	12	22	22	19	27	27	23	5*	5*	6*
		[108	±	5]	[12	±	1]	[21	±	2]	[26	±	2]	[5	±	1]
	51.2	98	103	104	12	11	9	28	27	28	24	21	17	5*	7*	5*
		[102	±	3]	[11	±	2]	[28	±	1]	[21	±	4]	[6	±	1]
	128	91*	94*	92*	7	12	10	16	17	22	18	17	24	4*	3*	6*
		[92	±	2]	[10	±	3]	[18	±	3]	[20	±	4]	[4	±	2]
	320	108*	91*	101*	7	11	10	16	23	21	31	21	21	7*	5*	6*
		[100	±	9]	[9	±	2]	[20	±	4]	[24	±	6]	[6	±	1]
	800 +	82*	76*	75*	7	9	8	18	23	17	14	20	16	3*	4*	3*
		[78	±	4]	[8	±	1]	[19	±	3]	[17	±	3]	[3	±	1]
	2000 +	76*	74*	72*	9	8	9	19	20	18	14	17	15	1*	2*	2*
		[74	±	2]	[9	±	1]	[19	±	1]	[15	±	2]	[2	±	1]
	5000 +	82*	86*	85*	4	7	7	20	16	16	8	9	9	2*	1*	2*
		[84	±	2]	[6	±	2]	[17	±	2]	[9	±	1]	[2	±	1]
Positive control		568	593	556 a)	527	548	520 b)	141	128	109 a)	708	689	716 c)	219	250	174 d)
		[572	±	19]	[532	±	15]	[126	±	16]	[704	±	14]	[214	±	38]

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01µg/plate b): NaN₃; Sodium azide, 0.5µg/plate

c): AF-2, 0.1µg/plate d): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80µg/plate

* : Growth inhibition was observed.

+ : Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 2. Summary data on dose-finding study of glycerol monooleate
[Activation method : +S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
Glycerol -monooleate	0	100	110	107	11	9	10	22	25	22	28	29	32	10	10	9
		[106	$\pm$	5]	[10	$\pm$	1]	[23	$\pm$	2]	[30	$\pm$	2]	[10	$\pm$	1]
	8.19	109	123	121	11	14	8	24	22	21	30	25	23	5	5	8
		[118	$\pm$	8]	[11	$\pm$	3]	[22	$\pm$	2]	[26	$\pm$	4]	[6	$\pm$	2]
	20.5	103	107	110	12	9	10	20	18	21	30	35	30	7	11	8
		[107	$\pm$	4]	[10	$\pm$	2]	[20	$\pm$	2]	[32	$\pm$	3]	[9	$\pm$	2]
	51.2	96	106	105	10	9	7	29	25	22	32	30	32	8	11	8
		[102	$\pm$	6]	[9	$\pm$	2]	[25	$\pm$	4]	[31	$\pm$	1]	[9	$\pm$	2]
	128	105	112	98	8	11	10	21	24	17	34	26	27	10*	9*	6*
		[105	$\pm$	7]	[10	$\pm$	2]	[21	$\pm$	4]	[29	$\pm$	4]	[8	$\pm$	2]
	320	94*	95*	101*	13	14	11	20	21	25	29	28	34	5*	5*	4*
		[97	$\pm$	4]	[13	$\pm$	2]	[22	$\pm$	3]	[30	$\pm$	3]	[5	$\pm$	1]
	800 +	84*	82*	86*	5	6	5	17	21	16	29	30	27	3*	5*	4*
		[84	$\pm$	2]	[5	$\pm$	1]	[18	$\pm$	3]	[29	$\pm$	2]	[4	$\pm$	1]
	2000 +	90*	97*	100*	5	4	7	16	13	16	19	22	25	4*	3*	3*
		[96	$\pm$	5]	[5	$\pm$	2]	[15	$\pm$	2]	[22	$\pm$	3]	[3	$\pm$	1]
	5000 +	100*	99*	95*	8	9	5	12	13	14	28	29	26	2*	3*	2*
		[98	$\pm$	3]	[7	$\pm$	2]	[13	$\pm$	1]	[28	$\pm$	2]	[2	$\pm$	1]
Positive control		1036	928	1039 a)	203	227	255 b)	758	662	693 c)	363	394	359 d)	122	133	112 b)
		[1001	$\pm$	63]	[228	$\pm$	26]	[704	$\pm$	49]	[372	$\pm$	19]	[122	$\pm$	11]

a) : 2-AA; 2-Aminoanthracene, $1\mu\text{g}/\text{plate}$ b) : 2-AA, $2\mu\text{g}/\text{plate}$ c) : 2-AA, $10\mu\text{g}/\text{plate}$ d) : 2-AA, $0.5\mu\text{g}/\text{plate}$

* : Growth inhibition was observed.

+ : Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 3. Summary data on dose-finding study of glycerol monooleate (restudy)
[Non-activation method : -S9]

Compound	Dose (µg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
Glycerol -monooleate	0	108 [110	118 ±	105 7]	22 [21	23 ±	19 2]	19 [19	20 ±	18 1]	15 [16	16 ±	18 2]	7 [7	7 ±	6 1]
	8.19	110 [113	112 ±	117 4]	20 [21	22 ±	20 1]	22 [19	18 ±	17 3]	19 [19	20 ±	18 1]	7* [7	7* ±	8* 1]
	20.5	114 [112	104 ±	118 7]	14 [15	13 ±	18 3]	18 [18	16 ±	20 2]	21 [18	15 ±	18 3]	8* [6	5* ±	6* 2]
	51.2	115 [109	104 ±	107 6]	18 [18	22 ±	15 4]	15 [17	20 ±	15 3]	22* [18	19* ±	14* 4]	7* [6	6* ±	6* 1]
	128	120* [120	120* ±	121* 1]	13 [13	11 ±	16 3]	13 [14	14 ±	15 1]	21* [19	19* ±	18* 2]	8* [8	7* ±	8* 1]
	320	104* [103	95* ±	111* 8]	15 [18	15 ±	23 5]	15 [14	12 ±	15 2]	16* [18	21* ±	18* 3]	6* [6	6* ±	5* 1]
	800 +	88* [85	84* ±	83* 3]	14 [14	15 ±	13 1]	19 [16	15 ±	14 3]	14* [12	12* ±	10* 2]	3* [4	5* ±	4* 1]
	2000 +	90* [87	86* ±	84* 3]	11 [15	17 ±	16 3]	15 [15	13 ±	16 2]	13* [14	14* ±	16* 2]	2* [3	4* ±	2* 1]
	5000 +	85* [86	90* ±	84* 3]	18 [16	13 ±	17 3]	21 [21	22 ±	19 2]	14* [13	10* ±	15* 3]	1* [2	3* ±	1* 1]
Positive control		592 [576	582 ±	553 a) 20]	471 [494	471 ±	539 b) 39]	98 [111	132 ±	103 a) 18]	700 [663	682 ±	607 c) 49]	276 [323	359 ±	335 d) 43]

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01µg/plate b): NaN₃; Sodium azide, 0.5µg/plate

c): AF-2, 0.1µg/plate d): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80µg/plate

* : Growth inhibition was observed.

+ : Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 4. Summary data on dose-finding study of glycerol monooleate (restudy)
[Activation method : +S9]

Compound	Dose (µg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
Glycerol -monooleate	0	120	114	118	20	18	20	20	19	19	20	22	25	17	16	16
		[117	±	3]	[19	±	1]	[19	±	1]	[22	±	3]	[16	±	1]
	8.19	102	118	115	16	18	16	25	21	20	27	25	21	14	14	13
		[112	±	9]	[17	±	1]	[22	±	3]	[24	±	3]	[14	±	1]
	20.5	112	120	124	20	12	20	18	20	15	19	21	21	13	11	14
		[119	±	6]	[17	±	5]	[18	±	3]	[20	±	1]	[13	±	2]
	51.2	111	112	106	26	22	21	16	15	15	25	22	28	10	9	9
		[110	±	3]	[23	±	3]	[15	±	1]	[25	±	3]	[9	±	1]
	128	113	103	111	23	15	23	18	16	16	21	25	21	7*	8*	6*
		[109	±	5]	[20	±	5]	[17	±	1]	[22	±	2]	[7	±	1]
	320	102*	115*	116*	16	17	18	21	19	17	21	20	17	7*	7*	6*
		[111	±	8]	[17	±	1]	[19	±	2]	[19	±	2]	[7	±	1]
	800 +	79*	74*	82*	9	11	9	18	19	18	23	20	22	4*	4*	4*
		[78	±	4]	[10	±	1]	[18	±	1]	[22	±	2]	[4	±	0]
	2000 +	83*	87*	85*	14	13	16	17	14	18	18	25	19	4*	6*	5*
		[85	±	2]	[14	±	2]	[16	±	2]	[21	±	4]	[5	±	1]
	5000 +	93*	98*	100*	14	13	14	18	14	15	24	23	21	2*	4*	2*
		[97	±	4]	[14	±	1]	[16	±	2]	[23	±	2]	[3	±	1]
Positive control		666	769	665 a)	244	211	229 b)	623	701	639 c)	381	364	430 d)	129	122	124 b)
		[706	±	60]	[228	±	17]	[654	±	41]	[392	±	34]	[125	±	4]

a) : 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1µg/plate b) : 2-AA, 2µg/plate c) : 2-AA, 10µg/plate d) : 2-AA, 0.5µg/plate

* : Growth inhibition was observed.

+ : Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 5. Summary data on dose-finding study of glycerol monooleate (additional study)
[Non-activation method : -S9]

Compound	Dose (µg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]										
		TA100			TA1535	WP2uvrA	TA98			TA1537		
Glycerol -monooleate	0	111	110	118			24	23	28	9	9	9
		[113	±	4]			[25	±	3]	[9	±	6]
	0.0977									9	6	7
										[7	±	2]
	0.195									9	9	9
										[9	±	0]
	0.391									13	13	8
										[11	±	3]
	0.781									10	8	7
										[8	±	2]
1.56										10	8	9
										[9	±	1]
3.13							19	21	23	5*	9*	6*
							[21	±	2]	[7	±	2]
6.25		126	126	123			19	28	23	8*	7*	7*
		[125	±	2]			[23	±	5]	[7	±	1]
12.5		126	104	120			16	20	20	7*	10*	11*
		[117	±	11]			[19	±	2]	[9	±	2]
25.0		114	122	113			20	16	18			
		[116	±	5]			[18	±	2]			
50.0		107	107	117			21	21	18			
		[110	±	6]			[20	±	2]			

Table 5. -Continued

Compound	Dose (µg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]										
		TA100			TA1535	WP2uvrA	TA98			TA1537		
Glycerol -monooleate	100	115*	123*	114*			21*	18*	22*			
		[117	±	5]			[20	±	2]			
	200	91*	100*	104*								
		[98	±	7]								
Positive control		524	491	502 a)			610	599	646 c)	161	196	
		[506	±	17]			[618	±	25]	[176	±	18]

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01µg/plate

c): AF-2, 0.1µg/plate d): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80µg/plate

* : Growth inhibition was observed.

Table 6. Summary data on dose-finding study of glycerol monooleate (additional study)
[Activation method : +S9]

Compound	Dose (µg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]				
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
Glycerol -monooleate	3					27 21 22 [23 ± 3]
	6.25					21 22 23 [22 ± 1]
	12.5					29 20 23 [24 ± 5]
	25.0					25 22 17 [21 ± 4]
	50.0					18 15 18 [17 ± 2]
	100					21 19 19 [20 ± 1]
	200					18* 16* 18* [17 ± 1]
Positive control						141 137 132 b) [137 ± 5]

b) : 2-AA; 2-Aminoanthracene, 2µg/plate

* : Growth inhibition was observed.

Table 7. Results of the bacterial reverse mutation test of glycerol monoleate
[Non-activation method : -S9]

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
Glycerol -monoleate	0	127	137	123	12	16	12	28	20	28	23	20	21	10	9	9
		[129	$\pm$	7]	[13	$\pm$	2]	[25	$\pm$	5]	[21	$\pm$	2]	[9	$\pm$	1]
	0.153													7	9	10
														[9	$\pm$	2]
	0.305													6	6	8
														[7	$\pm$	1]
	0.610													10	8	8
														[9	$\pm$	1]
	1.22													12	13	11
														[12	$\pm$	1]
	2.44													7	5	9
														[7	$\pm$	2]
	4.88	123	130	133							20	22	22	11*	10*	8*
		[129	$\pm$	5]							[21	$\pm$	1]	[10	$\pm$	2]
	9.77	140	142	135							22	17	16	7*	13*	9*
		[139	$\pm$	4]							[18	$\pm$	3]	[10	$\pm$	3]
	19.5	128	120	128							17	19	24			
		[125	$\pm$	5]							[20	$\pm$	4]			

* : Growth inhibition was observed.

Table 7. -Continued

Compound	Dose (µg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
Glycerol -monooleate	39.1	135	131	137							16	16	20			
		[134	±	3]							[17	±	2]			
	78.1	148	137	142							17*	22*	16*			
		[142	±	6]							[18	±	3]			
	156	138*	127*	128*	12	11	14	13	17	18	19*	30*	22*			
		[131	±	6]	[12	±	2]	[16	±	3]	[24	±	6]			
	313				8	8	13	20	22	25						
					[10	±	3]	[22	±	3]						
	625				14	13	10	24	23	16						
					[12	±	2]	[21	±	4]						
	1250 +				10	9	12	15	18	16						
					[10	±	2]	[16	±	2]						
	2500 -				9	9	13	17	13	17						
					[10	±	2]	[16	±	2]						
	5000 +				10	8	8	15	10	15						
					[9	±	1]	[13	±	3]						
Positive control		885	891	882 a)	549	557	542 b)	167	147	130 a)	664	652	750 c)	196	197	208 d)
		[886	±	5]	[549	±	8]	[148	±	19]	[689	±	53]	[200	±	7]

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b): NaN_3 ; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$

* : Growth inhibition was observed.

+ : Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 8. Results of the bacterial reverse mutation test of glycerol monooleate
[Activation method : +S9]

Compound	Dose (µg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
Glycerol monooleate	0	124	117	122	14	12	13	23	24	32	30	28	28	27	25	22
		[121	±	4]	[13	±	1]	[26	±	5]	[29	±	1]	[25	±	3]
	9.77	139	126	132										21	21	17
		[132	±	7]										[20	±	2]
	19.5	127	137	125										21	20	18
		[130	±	6]										[20	±	2]
	39.1	128	116	130										22	22	18
		[125	±	8]										[21	±	2]
	78.1	124	117	121										9	12	17
		[121	±	4]										[13	±	4]
	156	123*	126*	119*	14	14	14	29	25	22	27	24	22	10	13	14
		[123	±	4]	[14	±	0]	[25	±	4]	[24	±	3]	[12	±	2]
	313	112*	120*	122*	10	11	14	21	14	23	23	29	24	8*	10*	11*
		[118	±	5]	[12	±	2]	[19	±	5]	[25	±	3]	[10	±	2]
	625 +	115*	101*	103*	12	13	15	27	20	21	29	19	29			
		[106	±	8]	[13	±	2]	[23	±	4]	[26	±	6]			
	1250 +				8	6	9	14	16	17	19	22	16			
					[8	±	2]	[16	±	2]	[19	±	3]			
	2500 +				9	10	8	15	18	15	18	18	20			
					[9	±	1]	[16	±	2]	[19	±	1]			
	5000 +				10	11	11	18	17	14	13	12	10			
					[11	±	1]	[16	±	2]	[12	±	2]			
Positive control		1027	1048	980 a)	357	320	331 b)	695	807	693 c)	366	381	363 d)	144	136	146 b)
		[1018	±	35]	[336	±	19]	[732	±	65]	[370	±	10]	[142	±	5]

a) : 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1µg/plate b) : 2-AA, 2µg/plate c) : 2-AA, 10µg/plate d) : 2-AA, 0.5µg/plate

* : Growth inhibition was observed.

+ : Visible precipitation was observed at the end of exposure period.