

最終報告書

表 題 : 2,6-ナフタレンジカルボン酸の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号 : SR14250

株式会社化合物安全性研究所

試験責任者の署名

表題 : 2,6-ナフタレンジカルボン酸の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号 : SR14250

株式会社化合物安全性研究所

試験責任者



2015 年 3 月 23 日

信頼性保証書

表題 : 2,6-ナフタレンジカルボン酸の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号 : SR14250

本試験は、株式会社化合物安全性研究所 QAU によって、下記のとおり査察された。

査察段階	査察日	試験責任者 への報告日	運営管理者 への報告日
試験計画書	2015 年 1 月 9 日	2015 年 1 月 9 日	2015 年 1 月 9 日
被験物質の受入・表示・保存	2015 年 1 月 9 日	2015 年 1 月 9 日	2015 年 1 月 9 日
被験物質の調製	2015 年 1 月 20 日	2015 年 1 月 20 日	2015 年 1 月 20 日
試験の実施	2015 年 1 月 20 日	2015 年 1 月 20 日	2015 年 1 月 20 日
観察・コロニー計測	2015 年 1 月 22 日	2015 年 1 月 22 日	2015 年 1 月 22 日
試験計画書変更書 (No.1)	2015 年 2 月 19 日	2015 年 2 月 19 日	2015 年 2 月 19 日
生データ	2015 年 2 月 23 日	2015 年 2 月 23 日	2015 年 2 月 23 日
最終報告書 (草案): 図表	2015 年 2 月 23 日	2015 年 2 月 23 日	2015 年 2 月 23 日
最終報告書 (草案): 本文	2015 年 2 月 23 日	2015 年 2 月 23 日	2015 年 2 月 23 日
最終報告書	2015 年 3 月 23 日	2015 年 3 月 23 日	2015 年 3 月 23 日

本試験は、「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について」(平成 23 年 3 月 31 日 薬食発 0331 第 8 号・平成 23・03・29 製局第 6 号・環保企発第 110331010 号 厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知) に従い実施された。

本試験は、試験計画書に従って実施され、また、本報告書には当該試験に使用した方法および手順が正確に記載されており、試験成績には当該試験の実施過程において得られた生データが正確に反映していることを確認した。

株式会社化合物安全性研究所

QAU 責任者



2015 年 3 月 23 日

目次

	頁
表紙	1
試験責任者の署名	2
信頼性保証書	3
目次	4
表題	6
試験番号	6
試験目的	6
試験実施基準および試験法ガイドライン	6
試験委託者	6
試験施設	6
試験責任者	6
試験従事者およびその業務分担	7
試験日程	7
1 要約	8
2 緒言	9
3 材料および方法	9
4 成績	18
5 考察	18
6 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因	20
7 参考文献	20
8 資料の保存	20

表

1	2,6-ナフタレンジカルボン酸の細菌を用いる復帰突然変異試験 (用量設定試験) (SR14250)	21
2	2,6-ナフタレンジカルボン酸の細菌を用いる復帰突然変異試験 (本試験) (SR14250)	22

図

1-1	2,6-ナフタレンジカルボン酸の細菌を用いる復帰突然変異試験(SR14250) <i>Salmonella typhimurium</i> TA100 の用量－反応曲線 (直接法)	23
-----	---	----

1-2	2,6-ナフトレンジカルボン酸の細菌を用いる復帰突然変異試験 (SR14250)	
	<i>Salmonella typhimurium</i> TA100 の用量—反応曲線 (代謝活性化法)……………	24
2-1	2,6-ナフトレンジカルボン酸の細菌を用いる復帰突然変異試験 (SR14250)	
	<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535 の用量—反応曲線 (直接法)……………	25
2-2	2,6-ナフトレンジカルボン酸の細菌を用いる復帰突然変異試験 (SR14250)	
	<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535 の用量—反応曲線 (代謝活性化法)……………	26
3-1	2,6-ナフトレンジカルボン酸の細菌を用いる復帰突然変異試験 (SR14250)	
	<i>Escherichia coli</i> WP2uvrA の用量—反応曲線 (直接法)……………	27
3-2	2,6-ナフトレンジカルボン酸の細菌を用いる復帰突然変異試験 (SR14250)	
	<i>Escherichia coli</i> WP2uvrA の用量—反応曲線 (代謝活性化法)……………	28
4-1	2,6-ナフトレンジカルボン酸の細菌を用いる復帰突然変異試験 (SR14250)	
	<i>Salmonella typhimurium</i> TA98 の用量—反応曲線 (直接法)……………	29
4-2	2,6-ナフトレンジカルボン酸の細菌を用いる復帰突然変異試験 (SR14250)	
	<i>Salmonella typhimurium</i> TA98 の用量—反応曲線 (代謝活性化法)……………	30
5-1	2,6-ナフトレンジカルボン酸の細菌を用いる復帰突然変異試験 (SR14250)	
	<i>Salmonella typhimurium</i> TA1537 の用量—反応曲線 (直接法)……………	31
5-2	2,6-ナフトレンジカルボン酸の細菌を用いる復帰突然変異試験 (SR14250)	
	<i>Salmonella typhimurium</i> TA1537 の用量—反応曲線 (代謝活性化法)……………	32

添付資料

1	Historical control data for reverse mutation test……………	33
---	--	----

表題

2,6-ナフタレンジカルボン酸の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号

SR14250

試験目的

Salmonella typhimurium および *Escherichia coli* を用いて、2,6-ナフタレンジカルボン酸の細菌における遺伝子突然変異誘発性の有無を検討した。

試験実施基準および試験法ガイドライン

試験実施基準 (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について」(平成 23 年 3 月 31 日薬食発 0331 第 8 号・平成 23・03・29 製局第 6 号・環保企発第 110331010 号 厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知)

試験法ガイドライン : 「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成 23 年 3 月 31 日薬食発 0331 第 7 号・平成 23・03・29 製局第 5 号・環保企発第 110331009 号厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知)

試験委託者

名称 : 厚生労働省 医薬食品局
所在地 : 東京都千代田区霞が関 1-2-2 (〒100-8916)
連絡先 : 審査管理課 化学物質安全対策室

試験施設

名称 : 株式会社化合物安全性研究所
所在地 : 札幌市清田区真栄 363 番 24 (〒004-0839)
運営管理者 : 

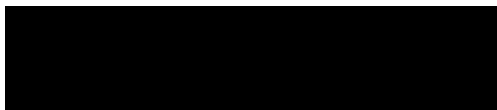
試験責任者

氏名 : 
所属 : 株式会社化合物安全性研究所 安全性研究部

試験従事者およびその業務分担

被験物質管理

試験操作



試験日程

試験開始日 : 2015 年 1 月 9 日

実験開始日 : 2015 年 1 月 20 日

用量設定試験

前培養開始 : 2015 年 1 月 19 日

被験物質処理 : 2015 年 1 月 20 日

コロニー計数 : 2015 年 1 月 22 日

本試験

前培養開始 : 2015 年 1 月 27 日

被験物質処理 : 2015 年 1 月 28 日

コロニー計数 : 2015 年 1 月 30 日

実験終了日 : 2015 年 1 月 30 日

試験終了日 : 2015 年 3 月 23 日

1 要約

2,6-ナフタレンジカルボン酸の細菌における遺伝子突然変異誘発性の有無を、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2uvrA を用いる復帰突然変異試験により検討した。試験は直接法 (S9 代謝活性化系の非存在下) および代謝活性化法 (S9 代謝活性化系の存在下) で、プレインキュベーション法により実施した。

用量設定試験では、直接法および代謝活性化法ともに被験物質の最高用量を 5000 µg/plate とし、以下公比約 3 で 6 段階の計 7 用量 (5 ~ 5000 µg/plate) を設定した。本試験では、用量設定試験の結果から、直接法および代謝活性化法ともに、被験物質の最高用量を 5000 µg/plate とし、以下公比 2 で 4 段階の計 5 用量 (156 ~ 5000 µg/plate) を設定した。

試験の結果、用量設定試験および本試験での各菌株の直接法および代謝活性化法のいずれの試験系列においても、被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の平均値の 2 倍未満であり、用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加も認められなかった。被験物質の析出および被験物質による生育阻害はいずれの菌株においても観察されなかった。このように、用量設定試験および本試験の結果には再現性が確認された。

用量設定試験および本試験のいずれにおいても、各菌株の陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、すべて試験施設の背景データに基づく管理値の範囲内であった。各菌株の陽性対照群の復帰変異コロニー数の平均値には、それぞれの陰性対照群の平均値と比較して 2 倍以上の明確な増加が認められた。これらの結果から、各菌株が変異原物質に対し適切な感度を有していたことが確認された。

以上のことから、2,6-ナフタレンジカルボン酸は、当該試験条件下において試験菌株に対する遺伝子突然変異誘発性を有しないと判断した。

2 緒言

2,6-ナフタレンジカルボン酸の細菌における遺伝子突然変異誘発性の有無を, *Salmonella typhimurium* および *Escherichia coli* を用いる復帰突然変異試験により検討した. 試験は直接法 (S9代謝活性化系の非存在下) および代謝活性化法 (S9代謝活性化系の存在下) で, プレインキュベーション法により実施した.

3 材料および方法

3.1 被験物質

名称 : 2,6-ナフタレンジカルボン酸

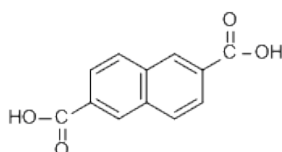
英名¹⁾ : 2,6-Naphthalenedicarboxylic Acid

別名²⁾ : 2,6-Naphthalic Acid

CAS 番号 : 1141-38-4

官報公示整理番号 (化審法)¹⁾ : (4)-402

構造式³⁾ :



化学式¹⁾ : C₁₂H₈O₄

分子量²⁾ : 216.19

物理化学的性質 : 白色 ~ わずかにうすい黄色, 結晶 ~ 粉末¹⁾

融点・凝固点 ; >300°C⁴⁾

溶解度 ; 水に不溶, アルコール類に難溶, N,N-ジメチルホルムアミドに可溶⁴⁾. 試験施設において, 水, ジメチルスルホキシドおよびアセトンを用いて調製確認を行った. 確認内容を, 3.2 被験物質の調製, 媒体の選択理由に記載した.

ロット番号 : J82SE

純度⁵⁾ : 99.7% (GC), 99.6% (中和滴定)

製造業者

入手日 : 2014 年 10 月 20 日

入手量 : 100 g (関連試験と共用)

安定性 : 関連試験を含めた試験操作終了後, 被験物質の一部を東京化成工業株式会社に送付し分析を依頼した. 分析の結果, 得られた純度は 99.9% (GC) および 100.3% (中和滴定) であり (報告書, 整理 No.

Z0062, 2015 年 2 月 21 日), 被験物質は試験期間中安定であったことが確認された.

- 保存条件 : 冷蔵 [実測範囲 5.0 ~ 9.4°C (被験物質保存室の冷蔵庫), 4.1 ~ 7.1°C (変異原性試験室の冷蔵庫)], 暗所, 気密
- 保存場所 : 被験物質保存室の冷蔵庫 [2014 年 10 月 20 日 (入手) ~ 2015 年 1 月 13 日] および変異原性試験室の冷蔵庫 [2015 年 1 月 13 日 ~ 2015 年 1 月 28 日 (本試験の被験物質処理)]
- 取扱上の注意 : マスク, 手袋および保護メガネを着用し取扱った.
- 残余被験物質の処置 : 試験操作終了後, 焼却処分するために, 産業廃棄物として回収した.

3.2 被験物質の調製

- 媒体 : ジメチルスルホキシド (ロット番号 EU020, 株式会社同仁化学研究所, 略称 ; DMSO)
- 調製方法 : 被験物質は媒体を用いて溶解および希釈し, 所定の濃度に調製した.
 用量設定試験では, 50 mg/mL の濃度を調製し, 以下公比約 3 で希釈し, 15, 5, 1.5, 0.5, 0.15 および 0.05 mg/mL 調製液を調製した.
 本試験では, 50 mg/mL の濃度を調製し, 以下公比 2 で希釈し, 25, 12.5, 6.25 および 3.13 mg/mL 調製液を調製した.
- 媒体の選択理由 : 試験施設において被験物質の調製確認を行った結果, 日本薬局方注射用水には 50 mg/mL で溶解せず, 均一に懸濁もしなかった. アセトンには 220 mg/mL および 50 mg/mL で均一に懸濁したが, すぐに沈殿が生じた. 一方, DMSO には 220 mg/mL で均一に懸濁し, 50 mg/mL で溶解した. いずれの調製液においても発熱, 発泡, 変色は認められなかった. 従って, 本被験物質の媒体および陰性対照物質には DMSO を選択した.
- 調製頻度 : 調製は用時調製とし, 用量設定試験では調製後 2 時間 15 分以内に, 本試験では調製後 2 時間 2 分以内に, 各々使用した.
- 調製上の注意 : 被験物質はクリーンベンチ内で取扱い, 調製の際にはゴム手袋, 保護メガネおよびマスクを着用し, 吸い込んだり, 眼, 皮膚および衣類に触れないようにした.

調製液の安定性確認 : 用量設定試験および本試験ともに, 被験物質調製時の目視確認において媒体との反応性 (変色, 発熱, 発泡等) はみられなかった.

残余調製液の処置 : 残余調製液は, 焼却処分するために, 産業廃棄物として回収した.

3.3 対照物質およびその調製

3.3.1 陰性対照物質

名称 : ジメチルスルホキシド
 製造者 : 株式会社同仁化学研究所
 ロット番号 : EU020
 保存条件 : 冷暗所
 調製方法 : 原液のまま使用した (モレキュラーシーブによる脱水処理済み).

3.3.2 陽性対照物質

3.3.2.1 陽性対照物質調製液

以下に示す陽性対照物質調製液を事前に調製 (調製日:2014 年 7 月 9 日) して試験に使用した.

3.3.2.1.1 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (以下, AF-2 と略す)

製造者 : 和光純薬工業株式会社
 ロット番号 : STQ3987
 含量 : 99.7%
 保存条件 : 冷暗所
 調製方法 : ジメチルスルホキシド (ロット番号 EU020, 株式会社同仁化学研究所) に 0.1 および 1 µg/mL の濃度で溶解.

3.3.2.1.2 アジ化ナトリウム (以下, NaN₃ と略す)

製造者 : 和光純薬工業株式会社
 ロット番号 : YCE7687
 純度 : 100.6%
 保存条件 : 冷暗所
 調製方法 : 注射用水 (ロット番号 K3K82, 株式会社大塚製薬工場) に 5 µg/mL の濃度で溶解.

3.3.2.1.3 9-アミノアクリジン塩酸塩水和物 (以下, 9-AA と略す)

製造者 : Fluorochem Ltd.
 ロット番号 : S16851
 含量 : 98.4%
 保存条件 : 冷暗所

調製方法 : ジメチルスルホキシド (ロット番号 EU020, 株式会社同仁化学研究所) に 800 µg/mL の濃度で溶解.

3.3.2.1.4 2-アミノアントラセン (以下, 2-AA と略す)

製造者 : 和光純薬工業株式会社

ロット番号 : KWL1226

含量 : 95.4%

保存条件 : 冷暗所

調製方法 : ジメチルスルホキシド (ロット番号 EU020, 株式会社同仁化学研究所) に 5, 10, 20 および 100 µg/mL の濃度で溶解.

3.3.2.2 陽性対照物質調製液の取扱い

保存条件 : -20°C 以下で分注凍結保存

保存場所 : 株式会社化合物安全性研究所 変異原性試験室の冷凍庫

使用方法 : 陽性対照物質調製液は, 調製日より 7 ヶ月以内 (使用期限: 調製後 1 年) に解凍し, また, 用量設定試験では解凍後 1 時間 58 分以内に, 本試験では解凍後 1 時間 42 分以内に使用した. 使用に際しては, 手袋およびマスクを着用しクリーンベンチ内で取扱った.

残余調製液の処理 : 焼却処分するために産業廃棄物として回収した.

3.4 試験菌株

試験菌株 : 以下の 5 菌株を使用した.

Salmonella typhimurium TA100

Salmonella typhimurium TA1535

Escherichia coli WP2uvrA

Salmonella typhimurium TA98

Salmonella typhimurium TA1537

菌株の入手先 : 国立衛生試験所 (現 国立医薬品食品衛生研究所)

菌株の入手年月日 : 1991 年 10 月 18 日

菌株の保存 : 培養液 8 mL に対しジメチルスルホキシドを 0.7 mL の割合で加えて 60 µL ずつ分注し, -80°C 以下で凍結保存.

試験系の選択理由 : 遺伝毒性を有する化学物質の検索に適した細菌として広く受入れられていることから選択した.

試験系の特性検査 : アミノ酸要求性, 膜変異 *rfa* 特性, 紫外線感受性, 薬剤耐性ならびに陰性対照値および陽性対照値について検査し, 規定の特性が正常に保持されていることが確認された菌株を試験に使用した.

3.5 培地

3.5.1 前培養用培地

名称および製造者 : ニュートリエントブロス培地 (Oxoid Nutrient Broth No.2, Oxoid Ltd.)
 ロット番号 : 876774
 調製方法 : 注射用水 (ロット番号 3K87, 株式会社大塚製薬工場) を用いて 25 g/L に調製した。 *Salmonella typhimurium* TA98 および TA100 の培地には、使用時にアンピシリンナトリウム (ロット番号 M3B7468, ナカライテスク株式会社) を 25 µg/mL となるように添加した。

3.5.2 試験用培地 (最少グルコース寒天培地：以下プレートと称する)

名称および製造者 : バイタルメディア AMT-O 培地 (極東製薬工業株式会社)
 ロット番号 : DZLFAV02
 製造日 : 2014 年 10 月 31 日
 使用期限 : 製造後 6 ヶ月
 調製方法 : 調製された組成を以下の表に示す。

試験用培地 1000 mL 中の組成	
硫酸マグネシウム・7 水塩	0.2 g
クエン酸・1 水塩	2.0 g
リン酸二カリウム・無水塩	10.0 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
ブドウ糖	20.0 g
寒天末 (Oxoid Agar No.1, ロット番号 1267518-02)	15.0 g

3.5.3 重層用培地

調製方法 : 次頁の表の組成の(A)ソフトアガーおよび(B)アミノ酸溶液を注射用水 (ロット番号 3K87, 株式会社大塚製薬工場) を用いて調製し、使用時に (A):(B)=10:1 の容量比で混合した。
Salmonella typhimurium には L-ヒスチジンおよび D-ビオチンのアミノ酸溶液を、*Escherichia coli* には L-トリプトファンのアミノ酸溶液を使用した。これらの重層用培地は使用時まで 47°C に保温した。

重層用培地の組成

(A) ソフトアガー

Bacto™ Agar 0.6%

(ロット番号 2046916, Becton, Dickinson and Company)

塩化ナトリウム 0.5%

(ロット番号 AWG0452, 和光純薬工業株式会社)

(B) アミノ酸溶液

L-ヒスチジンおよび D-ビオチン溶液 各々 0.5 mmol/L

(L-ヒスチジン, ロット番号 PDG2218, 和光純薬工業株式会社)

(D-ビオチン, ロット番号 PDJ0391, 和光純薬工業株式会社)

または

L-トリプトファン溶液 0.5 mmol/L

(L-トリプトファン, ロット番号 LAG1847, 和光純薬工業株式会社)

3.6 S9 mix

S9 の製造者 : キッコーマンバイオケミファ株式会社

ロット番号 : RAA201410A

製造日 : 2014 年 10 月 3 日

S9 の製造方法 : フェノバルビタールおよび 5,6-ベンゾフラボンの腹腔内投与で酵素誘導を行った Slc:SD 系ラット (雄, 7 週齢) の肝ホモジネートから調製された.

S9 の保存条件 : 購入後 -80°C 以下で凍結保存

S9 mix の調製方法 : S9, S9 mix 用 Cofactor (ロット番号 999401, Cofactor-I, オリエンタル酵母工業株式会社) および注射用水 (ロット番号 3K87, 株式会社大塚製薬工場) を用いて, 以下の表の組成に用時調製した. なお, S9 は製造日より 4 ヶ月以内 (使用期限: 製造後 6 ヶ月) に使用した.

S9 mix 1 mL 中の組成は以下の表の通りである.

S9 mix 1 mL 中の組成		
S9	0.1	mL
塩化マグネシウム	8	μmol
塩化カリウム	33	μmol
グルコース-6-リン酸	5	μmol
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	μmol
還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH)	4	μmol
リン酸ナトリウム緩衝液, pH 7.4	100	μmol

3.7 試験群

3.7.1 用量設定試験

各菌株につき，直接法 (S9 代謝活性化系の非存在下) および代謝活性化法 (S9 代謝活性化系の存在下) で試験を実施した。

直接法および代謝活性化法ともに，被験物質の最高用量を 5000 µg/plate とし，以下公比約 3 で 6 段階の計 7 用量の試験群 (5000, 1500, 500, 150, 50, 15 および 5 µg/plate, 各々プレート当たり 0.1 mL を添加) を設定した。

3.7.2 本試験

各菌株につき，直接法および代謝活性化法で試験を実施した。

用量設定試験の結果，各菌株の直接法および代謝活性化法のいずれの試験系列においても，被験物質群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の平均値の 2 倍未満であり，被験物質の用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加も認められなかった。被験物質処理による生育阻害および被験物質の析出も観察されなかった。

以上のことから，本試験の用量は，直接法および代謝活性化法ともに，被験物質の最高用量を 5000 µg/plate とし，以下公比 2 で 4 段階の計 5 用量の試験群 (5000, 2500, 1250, 625 および 313 µg/plate, 各々プレート当たり 0.1 mL を添加) を設定した。

3.7.3 陰性対照群および陽性対照群

用量設定試験および本試験のいずれにおいても，試験系列毎に陰性対照群 (ジメチルスルホキシド) および次の表の陽性対照群を設定した。

試験菌株	陽性対照物質 (用量 : µg/plate)			
	直接法		代謝活性化法	
<i>Salmonella typhimurium</i> TA100	AF-2	(0.01)	2-AA	(1)
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535	NaN ₃	(0.5)	2-AA	(2)
<i>Escherichia coli</i> WP2uvrA	AF-2	(0.01)	2-AA	(10)
<i>Salmonella typhimurium</i> TA98	AF-2	(0.1)	2-AA	(0.5)
<i>Salmonella typhimurium</i> 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

NaN₃ : アジ化ナトリウム, 9-AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩水和物

2-AA : 2-アミノアントラセン

3.7.4 プレート数およびプレートの識別

プレート数は，陰性対照群，被験物質処理群および陽性対照群ともに，各 3 枚とした。なお，無菌試験のプレート数は，最高濃度調製液および S9 mix とともに各 2 枚とした。プレートには，試験番号および試験群を特定できるようにラベルを貼付した。

3.8 試験方法

3.8.1 試験菌株の前培養

容量約 40 mL の L 字管に前培養用培地 (ニュートリエントブロス培地) 12 mL を入れ、解凍した保存菌を 12 μ L 接種し、37°C、振幅 40 mm、振とう速度 100 回/分に設定した振盪恒温槽 (Personal-11・EX, タイテック株式会社) で 10 時間の往復振とう培養を行った。なお、菌株の接種後、L 字管を振とう培養開始まで、用量設定試験では 6 時間 20 分、本試験では 6 時間 35 分、各々冷却 (氷冷) した。培養終了時に、得られた菌培養液の OD_{660nm} を濁度計 (可視光度計 CO7500 : フナコシ株式会社) で測定し、各菌株の生菌数-OD_{660nm} 相関式より生菌数を算出した。生菌数が 1×10^9 cells/mL より多いことが確認された培養液を試験に使用した。

各培養液の生菌数 (計算値) は以下の表の通りであった。

試験菌株	生菌数(計算値)($\times 10^9$ cells/mL)	
	用量設定試験	本試験
<i>Salmonella typhimurium</i> TA100	2.61	2.54
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535	2.69	2.57
<i>Escherichia coli</i> WP2uvrA	5.66	5.37
<i>Salmonella typhimurium</i> TA98	4.13	3.97
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1537	1.03	1.02

3.8.2 被験物質および対照物質調製液の処理

被験物質および対照物質調製液の処理は、プレインキュベーション法で行った。すなわち、蓋付きのポリエチレン製チューブ (5 mL 容量) を使用して、被験物質あるいは対照物質調製液 0.1 mL に、直接法の場合は 0.1 mol/L Na-リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL を、代謝活性化法の場合は S9 mix 0.5 mL を、それぞれ加えて混合し、さらに菌培養液 0.1 mL を加え、37°C、振幅 40 mm、振とう速度 100 回/分に設定した振盪恒温槽 (Personal-11・EX, タイテック株式会社) で 20 分間振とう培養 (プレインキュベーション) した。プレインキュベーション終了後、*Salmonella typhimurium* には 0.05 mmol/L L-ヒスチジンおよび 0.05 mmol/L D-ビオチンを含む重層用培地 2 mL を、*Escherichia coli* には 0.05 mmol/L L-トリプトファンを含む重層用培地 2 mL を、それぞれ加えて混和し、プレートに重層した。平坦な場所で重層用培地を固化させた後、37 $\pm$ 0.5°C に設定したインキュベーター (MIR-262, 三洋電機バイオメディカ株式会社) にプレートを入れ、49 時間 (用量設定試験) あるいは 49 時間 20 分 (本試験) の静置培養を行った。

また、試験実施の都度、試験に使用する被験物質の最高濃度調製液および S9 mix について無菌試験を実施し、雑菌の混入の有無を確認した。

3.8.3 観察および計測

各試験系の陰性対照群，被験物質処理群および陽性対照群について，プレートにおける菌株の生育阻害の有無を実体顕微鏡 (SZ6045TR, オリンパス光学工業株式会社) で確認するとともに，被験物質処理群について，プレートでの被験物質の析出の有無を目視確認した．次に，各試験系の陰性対照群，被験物質処理群および陽性対照群のプレートについて，コロニーアナライザー (CA-11D, システムサイエンス株式会社) を用いて復帰変異コロニー数の計測を行った．なお，被験物質の析出あるいは生育阻害がコロニーアナライザー計数に影響すると考えられるプレートはなかったことから，実体顕微鏡を用いた復帰変異コロニー数の目視計測は行わなかった．

生育阻害の有無の判定は以下の基準で行い，1 以上を生育阻害有とした．

0：生育阻害が認められない．

微細なバックグラウンドローン (50 倍程度の倍率で観察可能) が培地一面に観察され，陰性対照群のバックグラウンドローンとの差が認められない場合．

1：わずかな生育阻害が認められる．

陰性対照群に比べ，バックグラウンドローンが減少して個々のコロニーの大きさが大きくなっている場合．

2：中程度の生育阻害が認められる．

隆起した大きな復帰変異コロニーと，平坦で小さなバックグラウンドローンが並存している場合．

3：強い生育阻害が認められる．

バックグラウンドローンが復帰変異コロニーと同程度の大きさまで成長し，両者の判別が困難である場合．

4：生存菌が全く認められない．

3.8.4 観察結果の集計方法

各試験系の陰性対照群，被験物質処理群 (用量毎) および陽性対照群について，復帰変異コロニー数の平均値 $\pm$ 標準偏差をもとめた．

3.9 試験結果の評価

3.9.1 試験系の感度確認

各試験系の陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値が試験施設の背景データに基づく管理値の範囲内であり，かつ，各試験系の陽性対照群の復帰変異コロニー数の平均値が陰性対照群の平均値の 2 倍以上である場合に，試験系が適切な感度を有しているものと判断した．

3.9.2 試験結果の判定基準

少なくとも 1 つの試験系において、被験物質群の復帰変異コロニー数の平均値が陰性対照群の平均値の 2 倍以上となり、かつ、被験物質の用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加が再現性を持って認められた場合に陽性と判定することとした。また、試験結果に再現性が認められない場合には、確認試験等を実施して再現性を確認することとした。なお、試験結果の判定にあたって、統計学的手法は用いなかった。

3.9.3 変異原比活性の算出

当該試験において陽性結果は得られなかったことから、変異原比活性の算出は行わなかった。

4 成績

用量設定試験の結果を表 1 に、本試験の結果を表 2 に、被験物質用量と復帰変異コロニー数の用量-反応曲線を図 1-1 ~ 5-2 に示す。

用量設定試験 (5 ~ 5000 µg/plate) の結果、いずれの菌株においても、被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の平均値の 2 倍未満であり、用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加も認められなかった。被験物質の析出ならびに被験物質による生育阻害は、いずれの菌株においても観察されなかった。

本試験 (313 ~ 5000 µg/plate) の結果、いずれの菌株においても、被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の平均値の 2 倍未満であり、用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加も認められなかった。被験物質の析出ならびに被験物質による生育阻害は、いずれの菌株においても観察されなかった。

用量設定試験および本試験のいずれにおいても、各菌株の陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、すべて試験施設の背景データに基づく管理値 (添付資料 1) の範囲内であり、また、陽性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、すべて陰性対照群の平均値の 2 倍以上であった。

用量設定試験および本試験のいずれの無菌試験においても、被験物質調製液の最高濃度および S9 mix に雑菌の混入は認められなかった。

5 考察

2,6-ナフタレンジカルボン酸の細菌における遺伝子突然変異誘発性の有無を、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2uvrA を用いる復帰突然変異試験により検討した。

用量設定試験は、直接法および代謝活性化法ともに、被験物質の最高用量を 5000 µg/plate とし、以下公比約 3 で 6 段階の計 7 用量の試験群で実施した。本試験は、直接法および代謝活性化法ともに、被験物質の最高用量を 5000 µg/plate とし、以下公比 2 で 4 段階の計 5 用量の試験群で実施した。

試験の結果、用量設定試験および本試験での各菌株の直接法および代謝活性化法のいずれの試験系列においても、被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の平均値の 2 倍未満であり、用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加も認められなかった。被験物質の析出ならびに被験物質による生育阻害はいずれの菌株においても観察されなかった。このように、用量設定試験および本試験の結果には再現性が確認された。

用量設定試験および本試験のいずれにおいても、各菌株の陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、すべて試験施設の背景データに基づく管理値の範囲内であった。各菌株の陽性対照群の復帰変異コロニー数の平均値には、それぞれの陰性対照群の平均値と比較して 2 倍以上の明確な増加が認められた。これらの結果から、各菌株が変異原物質に対し適切な感度を有していたことが確認された。

以上のことから、2,6-ナフタレンジカルボン酸は、当該試験条件下において試験菌株に対する遺伝子突然変異誘発性を有しないと判断した。

なお、2,6-ナフタレンジカルボン酸は、復帰突然変異試験で陰性、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO) を用いた HGPRT 突然変異試験で陰性、CHO を用いた染色体異常試験では析出濃度で弱い構造異常を有することが示唆されている⁶⁾。

2,6-ナフタレンジカルボン酸の類縁物質では、2,6-ナフタレンジカルボン酸のジメチルエステル体である dimethyl 2,6-naphthalene dicarboxylate (CAS 番号 840-65-3) は、復帰突然変異試験で陰性、CHO を用いた HGPRT 突然変異試験で陰性、CHO あるいはチャイニーズハムスター肺由来細胞 (CHL/IU) を用いた染色体異常試験で陰性と報告されている^{7,8)}。カルボキシル基が還元された類縁物質である 1,5-naphthalenediol (CAS 番号 83-56-7) は、復帰突然変異試験で陰性、L5178Y マウスリンフォーマ試験で陰性、チャイニーズハムスター肺由来細胞 (V79) を用いた染色体異常試験では代謝活性化系の非存在下で陽性、マウスの骨髄小核試験で陰性と報告されている⁹⁾。また、2,7-naphthalenediol (CAS 番号 582-17-2) も同様に、復帰突然変異試験で陰性、L5178Y マウスリンフォーマ試験で陰性、V79 を用いた染色体異常試験では代謝活性化系の非存在下で陽性、マウスの骨髄小核試験で陰性と報告されている¹⁰⁾。一方、1,3-, 1,4-および 1,6-naphthalenediol は復帰突然変異試験で陽性と報告されている¹¹⁾。3-Hydroxy-2-naphthoic acid (CAS 番号 92-70-6) は、復帰突然変異試験は陰性、V79 を用いた染色体異常試験では代謝活性化系の非存在下で陽性と報告されている¹²⁾。母核の naphthalene (CAS 番号 91-20-3) は、復帰突然変異試験で陰性、*Drosophila melanogaster* の体性突然変異試験で陽性、CHO を用いた姉妹染

色分体交換試験および染色体異常試験で陽性、マウスへの経口投与で脳および肝臓の DNA 断片を増加させ、骨髄小核試験は陰性と報告されている¹³⁾。

6 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因はなかった。

7 参考文献

- 1) 安全データシート, 東京化成工業株式会社
- 2) Material Safety Data Sheet, TCI America
- 3) 東京化成工業株式会社ホームページ, オンラインカタログ
- 4) 安全データシート, 和光純薬工業株式会社
- 5) 試験成績書, 東京化成工業株式会社
- 6) NATIONAL INDUSTRIAL CHEMICALS NOTIFICATION AND ASSESSMENT SCHEME, File No.: NA/503, 2,6-Naphthalenedicarboxylic acid, 1997, NICNAS
- 7) NATIONAL INDUSTRIAL CHEMICALS NOTIFICATION AND ASSESSMENT SCHEME, File No.: NA/504, Dimethyl 2,6-naphthalenedicarboxylate, 1997, NICNAS
- 8) OECD SIDS, Dimethyl 2,6-naphthalenedicarboxylate, 1999
- 9) Scientific Committee on Consumer Products, OPINION ON 1,5-Naphthalenediol. 2007, COLIPIA
- 10) Scientific Committee on Consumer Products, OPINION ON 2,7-Naphthalenediol. 2010, COLIPIA
- 11) Hakura A et al, Mutagenicity of dihydroxybenzenes and dihydroxynaphthalenes for Ames Salmonella tester strains, Mutation Research, 371, 293-9 (1996)
- 12) OECD SIDS, 3-Hydroxy-2-naphthoic acid, 2004
- 13) IARC MONOGRAPHS ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS, Volume 82, Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene, 2002, WHO

8 資料の保存

8.1 資料の種類

以下を株式会社化合物安全性研究所の資料保存室に保存する。

1. 試験計画書, 試験計画書変更書
2. 生データその他の記録文書
3. 最終報告書

8.2 保存期間

試験終了後 10 年間保存し, その後の保存については試験委託者との協議により決定する。

表 1 2,6-ナフタレンジカルボン酸の細菌を用いる復帰突然変異試験 (用量設定試験) (SR14250)

S9 mix (-/+)	被験物質 (μg /プレート)	コロニー数/プレート (平均 $\pm$ S.D.)											
		塩基対置換型						フレームシフト型					
		TA100			TA1535			WP2uvr A			TA98		
S9 mix (-)	陰性対照	101	124	105 (110 $\pm$ 12)	9	9	8 (9 $\pm$ 1)	12	11	16 (13 $\pm$ 3)	21	22	10 (18 $\pm$ 7)
	5	108	108	99 (105 $\pm$ 5)	11	7	11 (10 $\pm$ 2)	17	8	8 (11 $\pm$ 5)	11	6	12 (10 $\pm$ 3)
	15	122	119	103 (115 $\pm$ 10)	11	12	13 (12 $\pm$ 1)	10	16	5 (10 $\pm$ 6)	16	17	11 (15 $\pm$ 3)
	50	104	97	111 (104 $\pm$ 7)	7	15	12 (11 $\pm$ 4)	12	12	10 (11 $\pm$ 1)	16	8	14 (13 $\pm$ 4)
	150	89	116	109 (105 $\pm$ 14)	13	6	14 (11 $\pm$ 4)	20	17	7 (15 $\pm$ 7)	15	14	15 (15 $\pm$ 1)
	500	112	119	106 (112 $\pm$ 7)	15	7	12 (11 $\pm$ 4)	11	14	15 (13 $\pm$ 2)	11	15	17 (14 $\pm$ 3)
	1500	124	98	112 (111 $\pm$ 13)	7	12	5 (8 $\pm$ 4)	11	11	2 (8 $\pm$ 5)	11	20	16 (16 $\pm$ 5)
	5000	99	109	109 (106 $\pm$ 6)	4	8	3 (5 $\pm$ 3)	15	21	13 (16 $\pm$ 4)	15	16	8 (13 $\pm$ 4)
S9 mix (+)	陰性対照	119	103	143 (122 $\pm$ 20)	13	11	12 (12 $\pm$ 1)	12	23	11 (15 $\pm$ 7)	32	27	34 (31 $\pm$ 4)
	5	128	134	128 (130 $\pm$ 3)	11	16	16 (14 $\pm$ 3)	16	11	10 (12 $\pm$ 3)	29	23	25 (26 $\pm$ 3)
	15	108	133	128 (123 $\pm$ 13)	11	8	11 (10 $\pm$ 2)	11	12	14 (12 $\pm$ 2)	37	27	33 (32 $\pm$ 5)
	50	120	128	118 (122 $\pm$ 5)	15	19	15 (16 $\pm$ 2)	18	13	15 (15 $\pm$ 3)	15	29	31 (25 $\pm$ 9)
	150	101	136	129 (122 $\pm$ 19)	13	11	6 (10 $\pm$ 4)	12	11	15 (13 $\pm$ 2)	26	20	36 (27 $\pm$ 8)
	500	124	115	122 (120 $\pm$ 5)	17	15	11 (14 $\pm$ 3)	12	17	21 (17 $\pm$ 5)	23	37	29 (30 $\pm$ 7)
	1500	119	114	103 (112 $\pm$ 8)	10	18	8 (12 $\pm$ 5)	18	12	12 (14 $\pm$ 3)	32	21	34 (29 $\pm$ 7)
	5000	95	77	100 (91 $\pm$ 12)	7	8	7 (7 $\pm$ 1)	11	19	8 (13 $\pm$ 6)	22	34	32 (29 $\pm$ 6)
陽性対照 S9 mix (-)	物質名	AF-2 ^{a)}			NaN ₃ ^{b)}			AF-2			AF-2		
	(μg /プレート)	0.01			0.5			0.01			0.1		
	コロニー数/ プレート	744	745	679 (723 $\pm$ 38)	274	254	241 (256 $\pm$ 17)	73	84	67 (75 $\pm$ 9)	381	462	388 (410 $\pm$ 45)
陽性対照 S9 mix (+)	物質名	2-AA ^{d)}			2-AA			2-AA			2-AA		
	(μg /プレート)	1			2			10			0.5		
	コロニー数/ プレート	1933	1863	1774 (1857 $\pm$ 80)	610	515	559 (561 $\pm$ 48)	1037	1107	1153 (1099 $\pm$ 58)	327	368	372 (356 $\pm$ 25)

陰性対照 : ジメチルスルホキシド

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

b) NaN₃ : アジ化ナトリウム

c) 9-AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩水和物

d) 2-AA : 2-アミノアントラセン

表 2 2,6-ナフタレンジカルボン酸の細菌を用いる復帰突然変異試験 (本試験) (SR14250)

S9 mix (-/+)	被験物質 (μg /プレート)	コロニー数/プレート (平均 $\pm$ S.D.)											
		塩基対置換型						フレームシフト型					
		TA100			TA1535			WP2uvr A			TA98		
S9 mix (-)	陰性対照	111	145	111	14	11	8	24	22	18	18	23	16
		(122 $\pm$ 20)			(11 $\pm$ 3)			(21 $\pm$ 3)			(19 $\pm$ 4)		
	313	97	97	98	12	20	17	19	17	20	21	6	8
		(97 $\pm$ 1)			(16 $\pm$ 4)			(19 $\pm$ 2)			(12 $\pm$ 8)		
	625	92	114	112	7	19	14	21	26	19	13	13	14
		(106 $\pm$ 12)			(13 $\pm$ 6)			(22 $\pm$ 4)			(13 $\pm$ 1)		
S9 mix (+)	1250	98	109	124	12	16	17	20	20	16	21	13	19
		(110 $\pm$ 13)			(15 $\pm$ 3)			(19 $\pm$ 2)			(18 $\pm$ 4)		
	2500	115	105	102	7	9	12	21	22	18	23	20	15
		(107 $\pm$ 7)			(9 $\pm$ 3)			(20 $\pm$ 2)			(19 $\pm$ 4)		
	5000	91	108	92	13	8	3	26	18	19	10	10	8
		(97 $\pm$ 10)			(8 $\pm$ 5)			(21 $\pm$ 4)			(9 $\pm$ 1)		
S9 mix (+)	陰性対照	120	146	116	12	18	13	23	22	27	35	32	24
		(127 $\pm$ 16)			(14 $\pm$ 3)			(24 $\pm$ 3)			(30 $\pm$ 6)		
	313	131	122	129	13	7	14	24	18	17	24	27	23
		(127 $\pm$ 5)			(11 $\pm$ 4)			(20 $\pm$ 4)			(25 $\pm$ 2)		
	625	123	111	135	11	10	16	26	17	21	25	22	28
		(123 $\pm$ 12)			(12 $\pm$ 3)			(21 $\pm$ 5)			(25 $\pm$ 3)		
陽性対照 S9 mix (-)	1250	132	145	140	16	12	10	21	24	27	29	31	27
		(139 $\pm$ 7)			(13 $\pm$ 3)			(24 $\pm$ 3)			(29 $\pm$ 2)		
	2500	122	135	122	14	12	7	25	26	23	46	26	28
		(126 $\pm$ 8)			(11 $\pm$ 4)			(25 $\pm$ 2)			(33 $\pm$ 11)		
	5000	93	103	120	15	6	20	27	19	13	32	22	40
		(105 $\pm$ 14)			(14 $\pm$ 7)			(20 $\pm$ 7)			(31 $\pm$ 9)		
陽性対照 S9 mix (+)	物質名	AF-2 ^{a)}			NaN ₃ ^{b)}			AF-2			AF-2		
	(μg /プレート)	0.01			0.5			0.01			0.1		
	コロニー数/ プレート	744	702	732	208	260	244	64	87	68	331	327	311
陽性対照 S9 mix (+)	物質名	2-AA ^{d)}			2-AA			2-AA			2-AA		
	(μg /プレート)	1			2			10			0.5		
	コロニー数/ プレート	1622	1786	2070	444	537	447	1103	1034	1122	336	392	355

陰性対照 : ジメチルスルホキシド

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

b) NaN₃ : アジ化ナトリウム

c) 9-AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩水和物

d) 2-AA : 2-アミノアントラセン

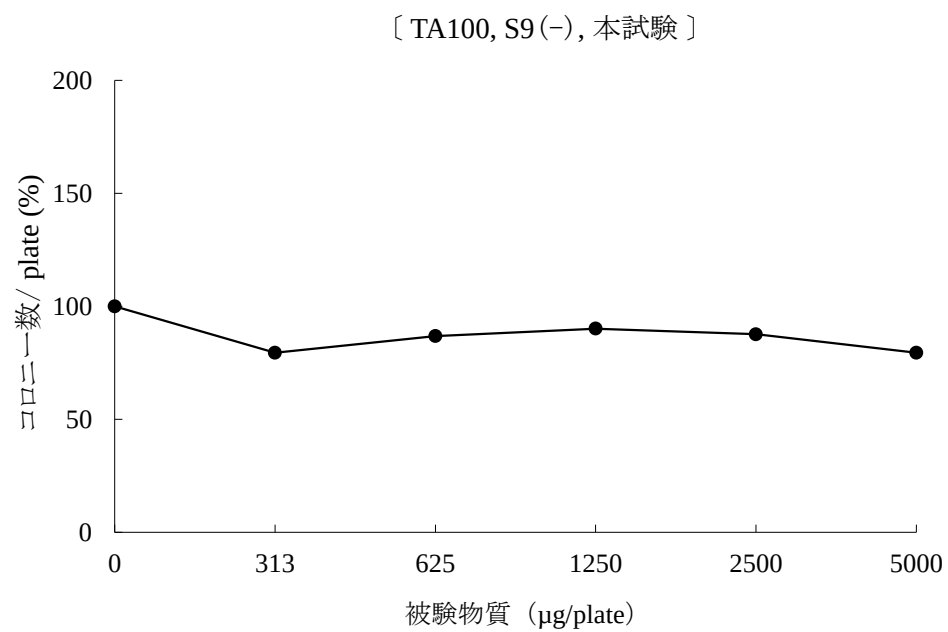
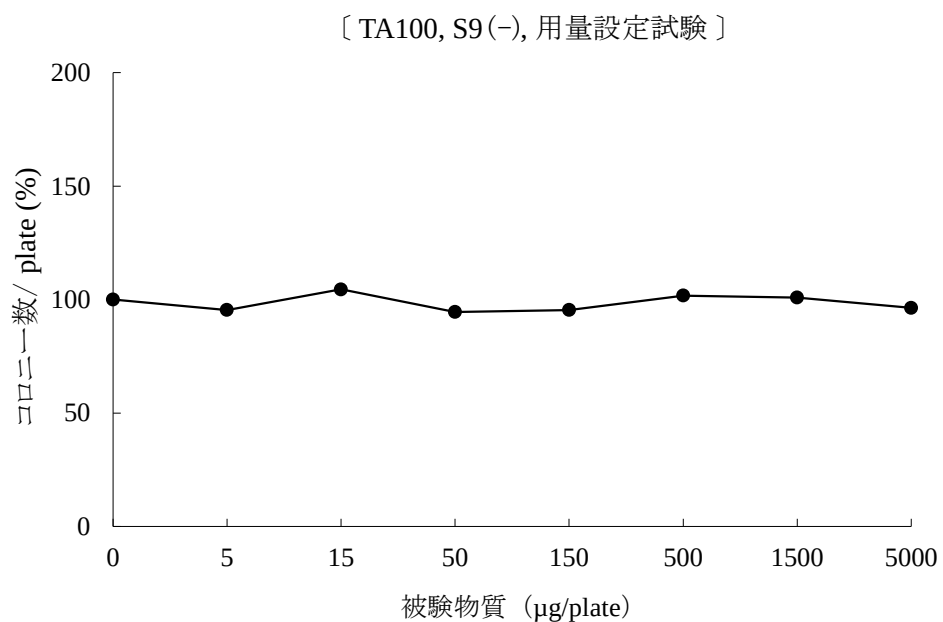


図 1-1 2,6-ナフトレンジカルボン酸の細菌を用いる復帰突然変異試験 (SR14250)
Salmonella typhimurium TA100 の用量—反応曲線 (直接法)

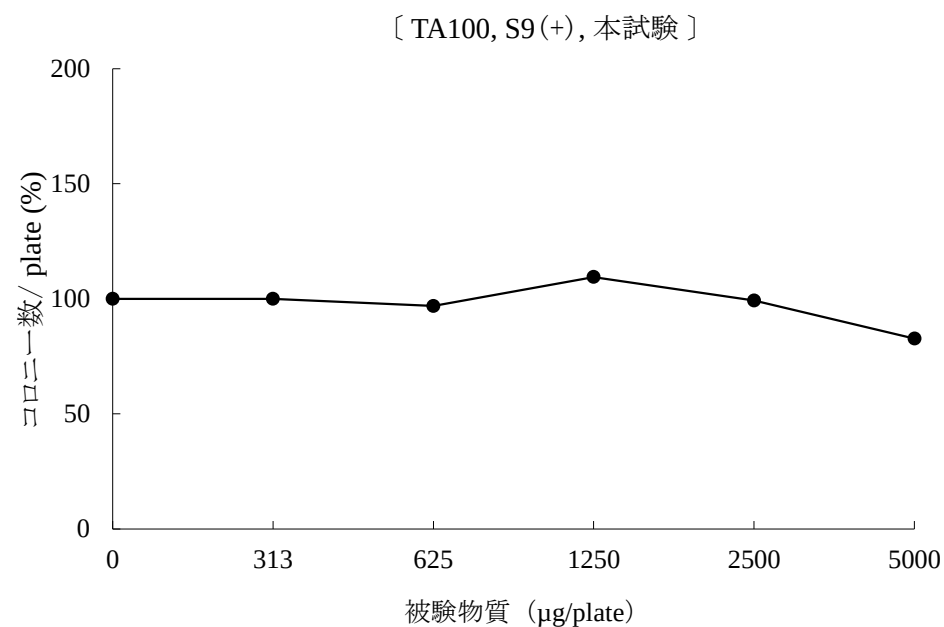
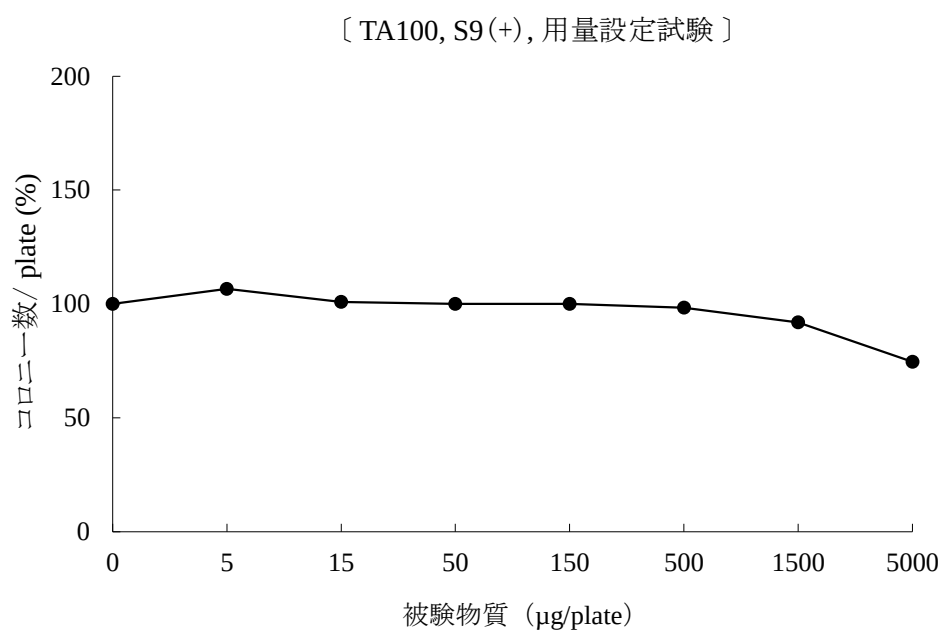


図 1-2 2,6-ナフトレンジカルボン酸の細菌を用いる復帰突然変異試験
(SR14250)
Salmonella typhimurium TA100 の用量—反応曲線 (代謝活性化法)

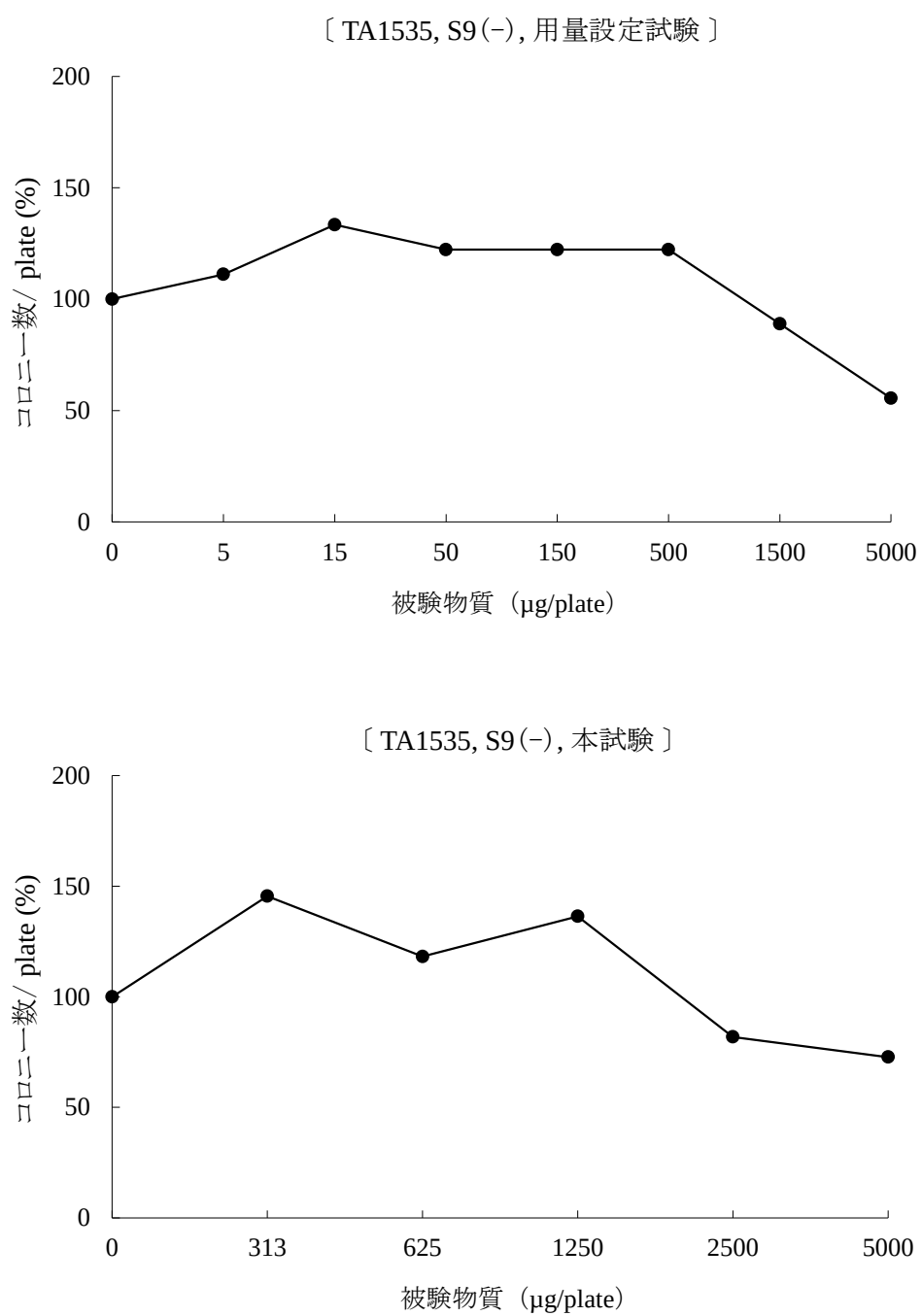


図 2-1 2,6-ナフトレンジカルボン酸の細菌を用いる復帰突然変異試験 (SR14250)
Salmonella typhimurium TA1535 の用量—反応曲線 (直接法)

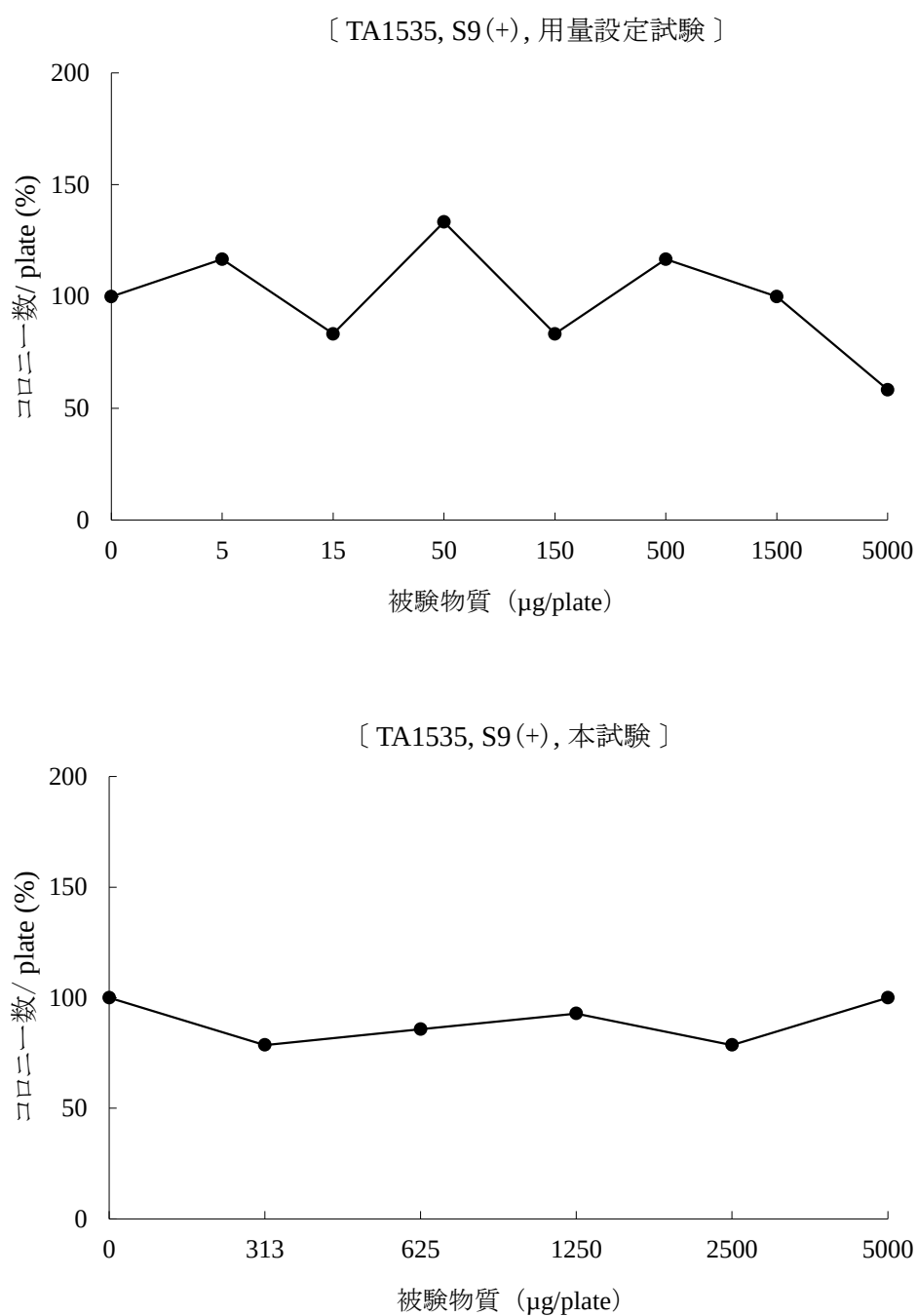


図 2-2 2,6-ナフトレンジカルボン酸の細菌を用いる復帰突然変異試験 (SR14250)
Salmonella typhimurium TA1535 の用量—反応曲線 (代謝活性化法)

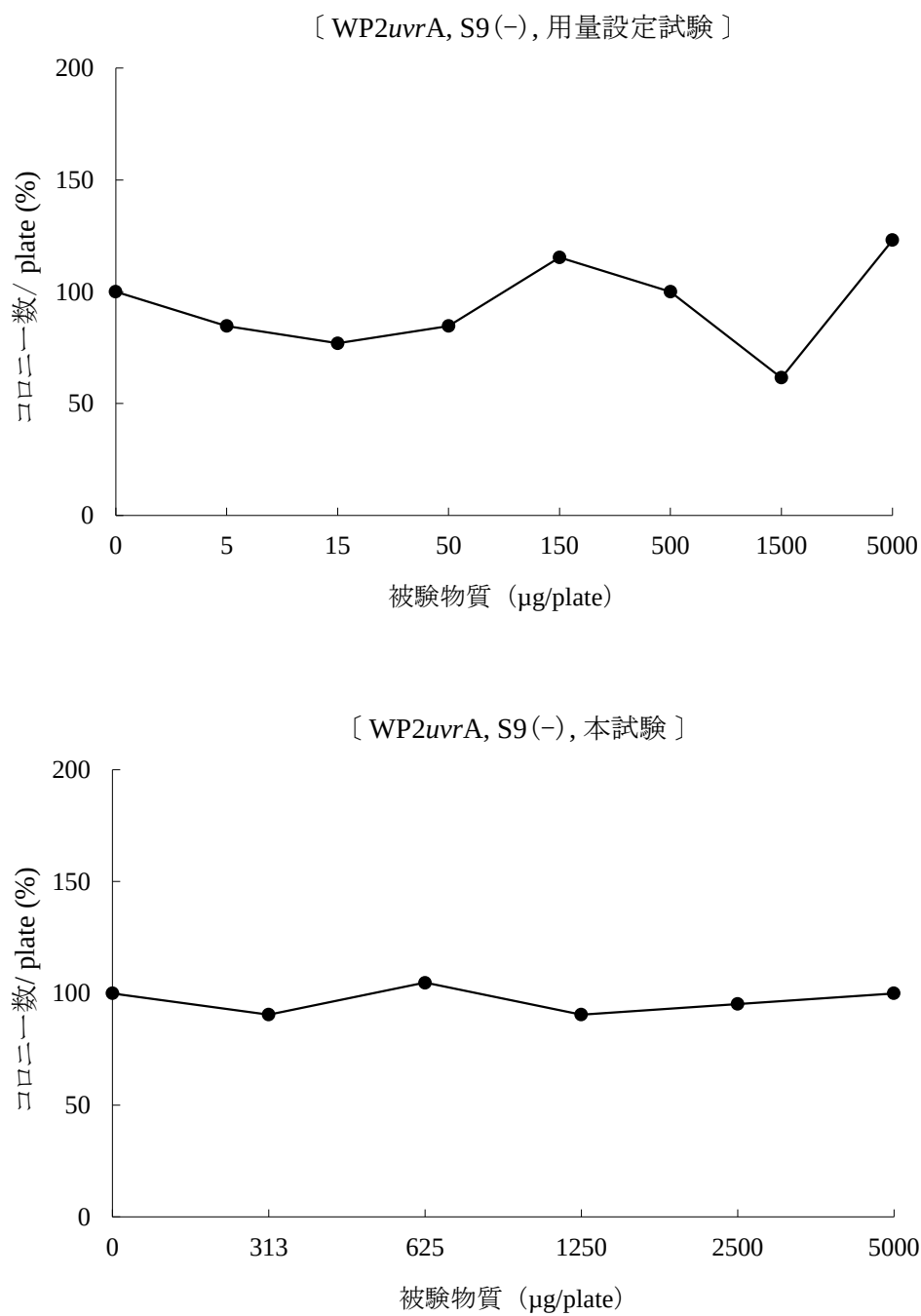


図 3-1 2,6-ナフトレンジカルボン酸の細菌を用いる復帰突然変異試験 (SR14250)
Escherichia coli WP2uvrA の用量—反応曲線 (直接法)

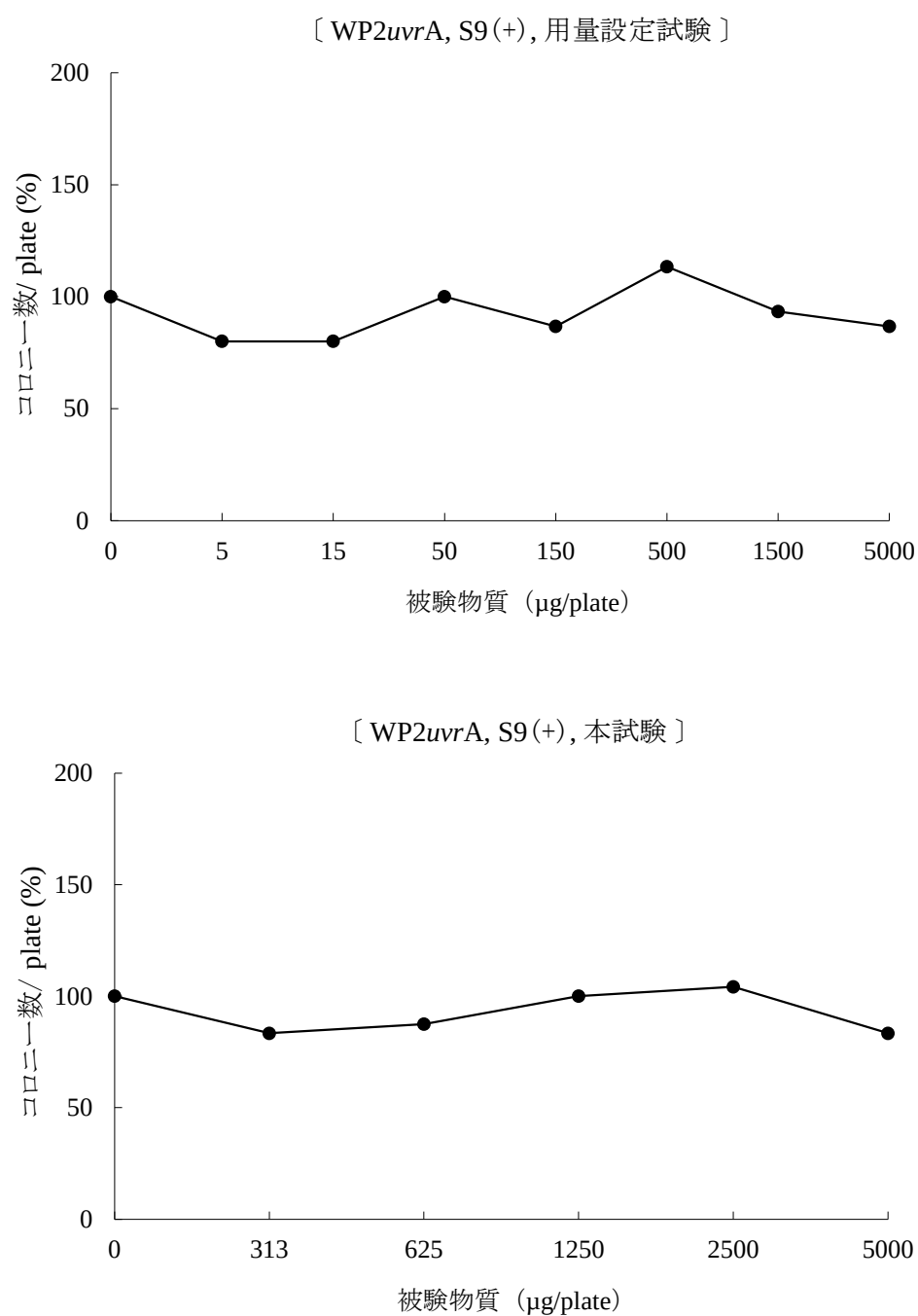


図 3-2 2,6-ナフトレンジカルボン酸の細菌を用いる復帰突然変異試験 (SR14250)
Escherichia coli WP2uvr A の用量—反応曲線 (代謝活性化法)

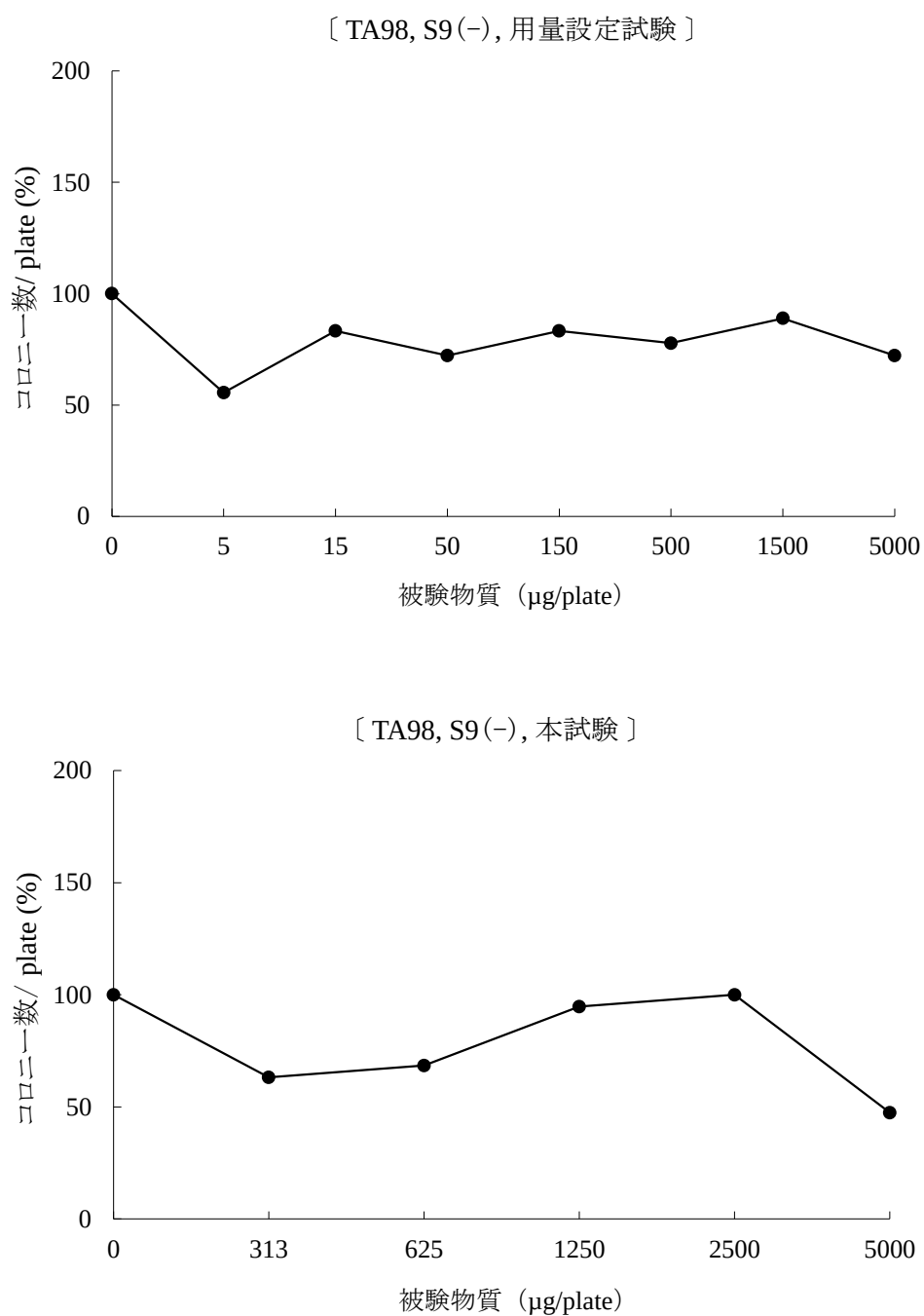


図 4-1 2,6-ナフトレンジカルボン酸の細菌を用いる復帰突然変異試験 (SR14250)
Salmonella typhimurium TA98 の用量—反応曲線 (直接法)

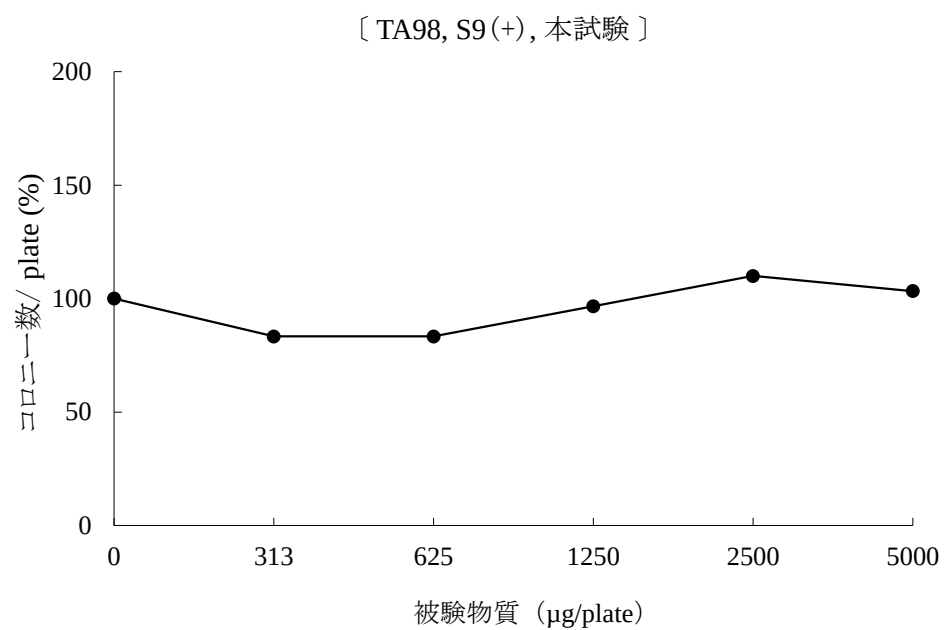
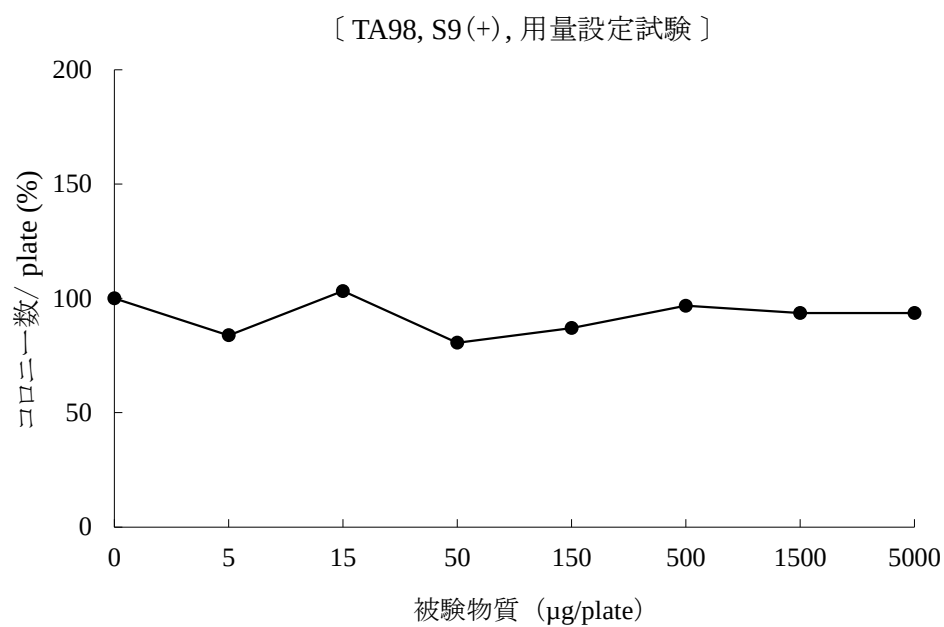


図 4-2 2,6-ナフトレンジカルボン酸の細菌を用いる復帰突然変異試験 (SR14250)
Salmonella typhimurium TA98 の用量—反応曲線 (代謝活性化法)

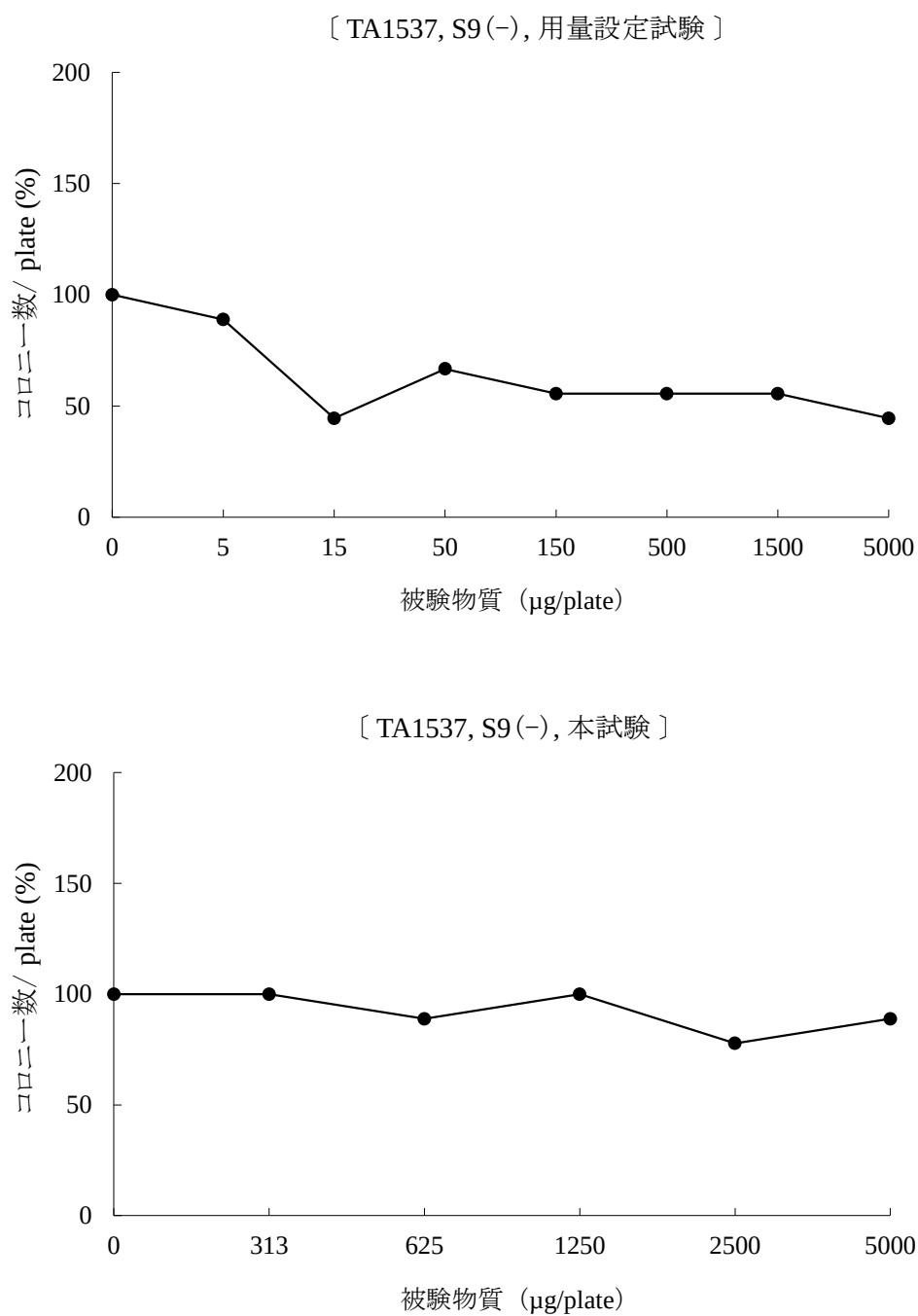


図 5-1 2,6-ナフトレンジカルボン酸の細菌を用いる復帰突然変異試験 (SR14250)
Salmonella typhimurium TA1537 の用量—反応曲線 (直接法)

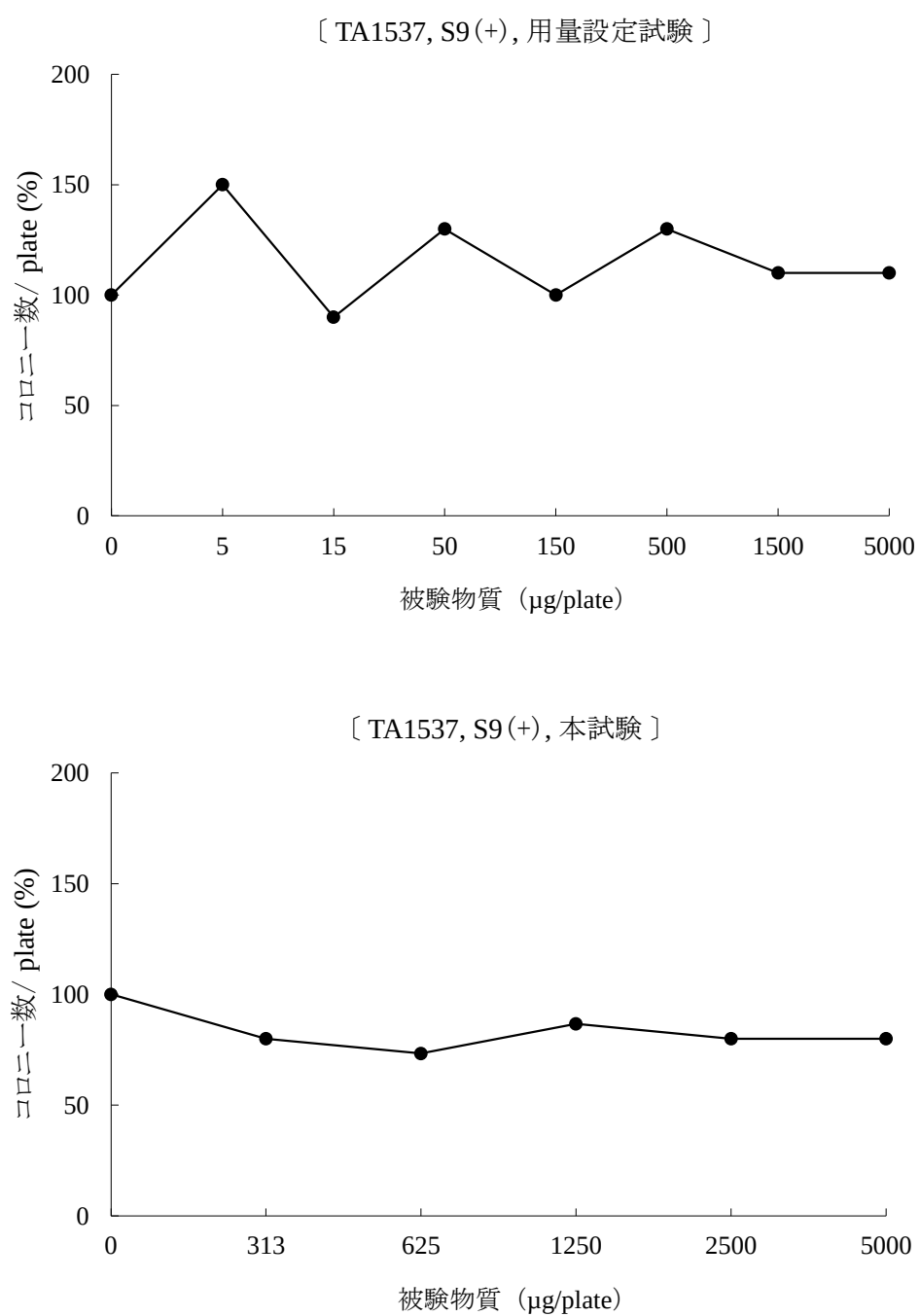


図 5-2 2,6-ナフトレンジカルボン酸の細菌を用いる復帰突然変異試験 (SR14250)
Salmonella typhimurium TA1537 の用量—反応曲線 (代謝活性化法)

Historical control data for reverse mutation test

Control data (Date : 2014.4~2014.12)										
Strain	TA100		TA1535		WP2 ^{uvr} A		TA98		TA1537	
Metabolic activation	S9(-)	S9(+)	S9(-)	S9(+)	S9(-)	S9(+)	S9(-)	S9(+)	S9(-)	S9(+)
No. of data	n = 55	n = 55	n = 55	n = 55	n = 55	n = 55	n = 56	n = 55	n = 55	n = 55
Mean ± S.D.	114 ± 12	135 ± 12	9 ± 2	10 ± 2	17 ± 3	19 ± 4	17 ± 4	34 ± 5	10 ± 3	13 ± 3
Maximum	143	163	15	14	24	29	29	47	19	25
Minimum	86	113	5	7	11	11	10	23	5	8
X-R-Rs ^a	79 ~ 149	106 ~ 164	1 ~ 17	5 ~ 15	6 ~ 28	8 ~ 30	4 ~ 30	18 ~ 50	0 ~ 21	5 ~ 21
Positive control data (Date : 2014.4~2014.12)										
Strain	TA100		TA1535		WP2 ^{uvr} A		TA98		TA1537	
Metabolic activation	S9(-)	S9(+)	S9(-)	S9(+)	S9(-)	S9(+)	S9(-)	S9(+)	S9(-)	S9(+)
Compound	AF-2	2-AA	NaN ₃	2-AA	AF-2	2-AA	AF-2	2-AA	9-AA	2-AA
Concentration (µg/plate)	0.01	1	0.5	2	0.01	10	0.1	0.5	80	2
No. of data	n = 54	n = 54	n = 54	n = 54	n = 54	n = 54	n = 55	n = 54	n = 54	n = 54
Mean ± S.D.	753 ± 64	1692 ± 299	294 ± 41	467 ± 60	75 ± 9	1175 ± 57	346 ± 47	399 ± 66	287 ± 127	375 ± 83
Maximum	898	2556	386	621	94	1329	478	608	585	612
Minimum	554	1295	226	334	57	1043	254	266	121	250
X-R-Rs ^a	612 ~ 894	1184 ~ 2200	206 ~ 382	326 ~ 608	54 ~ 96	1005 ~ 1345	256 ~ 436	274 ~ 524	74 ~ 500	189 ~ 561

^a X-R-Rs = $\bar{X} \pm 2.66R_s$; $\bar{X}$ = Mean , R_s = Mean of ($X_i - \bar{X}_i - 1$)

Culture medium : OXOID Nutrient Broth No.2

Subculture : Tester strain suspension (12 µL) was inoculated into an L-shaped tube (capacity of approximately 40 mL) containing 12 mL of the culture medium for subculture. Then, the mixture was incubated for 10 hr.

Minimum glucose agar medium : Vitalmedia AMT-O, Kyokuto Pharmaceutical Industrial Co., Ltd.