



最終報告書

2-ニトロ・p-クレゾールの細菌を用いる復帰突然変異試験

T-0021

2007年8月30日

本資料は原本から複写したものに相違ありません。

株式会社 ボゾリサーチセンター

試験責任者:

日付: 2007年 9月 21日

株式会社 **ボゾリサーチセンター**

東京本部	〒151-0065	東京都渋谷区大山町36-7
本社・東京研究所	〒156-0042	東京都世田谷区羽根木1-3-11
御殿場研究所	〒412-0039	静岡県御殿場市かまど1284
函南研究所	〒419-0101	静岡県田方郡函南町桑原三本松1308-125

試験責任者陳述書

試験番号 : T-0021

試験表題 : 2-ニトロ-p-クレゾールの細菌を用いる復帰突然変異試験

当該試験は、「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」（平成15年11月21日：薬食発第1121003号、平成15・11・17製局第3号、環保企発第031121004号、平成17年4月1日最終改正）及び「OECD Principles of Good Laboratory Practice」（OECD：1997年11月26日）を満たす試験施設等において実施されたものに相違ありません。

2007年 8 月 30 日

株式会社ボゾリサーチセンター

試験責任者

信頼性保証陳述書

試験番号 : T-0021

試験表題 : 2-ニトロ-p-クレゾールの細菌を用いる復帰突然変異試験

本試験は以下に示す基準を遵守して実施されたことを保証致します。

- ・「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)

なお、調査は下記の通り実施致しました。

2007 年 9 月 13 日

株式会社ボゾリサーチセンター

信頼性保証部門責任者

試験における調査

調 査 項 目	調査担当者	調 査 日	試験責任者及び運営管理 者への報告日
試験計画書		2006 年 11 月 7 日	2006 年 11 月 7 日
調製・被験物質の保存、被験物質の 処理		2006 年 12 月 1 日	2006 年 12 月 4 日
計数		2006 年 12 月 4 日	2006 年 12 月 7 日
生データ		2007 年 3 月 28 日	2007 年 3 月 30 日
最終報告書草案、図・表		2007 年 3 月 28 日	2007 年 3 月 30 日
改善確認		2007 年 4 月 6 日	2007 年 4 月 9 日
最終報告書		2007 年 9 月 13 日	2007 年 9 月 13 日

目 次

	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) 本試験 3 回目用被験液の調製	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	8
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) ニュートリエントブロス No.2 培養液	11
4) 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4)	11
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	13
4) プレート数	14

5) 試験操作	14
5. 判定基準	14
試験結果及び考察	14
1. 試験結果	14
1) 培養終了後の観察結果	15
2) 復帰突然変異コロニー数	15
3) 試験系の成立条件	15
2. 考察	15
参考文献	15

Tables

- ・別表 1 試験結果表(予備試験)
- ・別表 2 試験結果表(本試験 1 回目)
- ・別表 3 試験結果表(本試験 2 回目)
- ・別表 4 試験結果表(本試験 3 回目)

Figures

- ・図 1 用量反応曲線(本試験 1 回目 : -S9Mix *S. typhimurium* TA 株)
- ・図 2 用量反応曲線(本試験 1 回目 : +S9Mix *S. typhimurium* TA 株)
- ・図 3 用量反応曲線(本試験 1 回目 : WP2 *uvrA*)
- ・図 4 用量反応曲線(本試験 3 回目 : TA98)

試験実施概要

1. 試験計画書

試験番号 : T-0021

試験表題 : 2-ニトロ-p-クレゾール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、2-ニトロ-p-クレゾール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 17 年 4 月 1 日最終改正)
- ・「OECD Guidelines for Testing of Chemicals 471」
(OECD : 1997 年 7 月 21 日)

4. 試験委託者 : 厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室
〒100-8916 東京都千代田区霞ヶ関 1-2-25. 試験受託者 : 株式会社ボゾリサーチセンター
〒156-0042 東京都世田谷区羽根木 1-3-116. 試験実施施設 : 株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所
〒156-0042 東京都世田谷区羽根木 1-3-11

7. 被験物質

供給者 : 厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室

被験物質名 : 2-ニトロ-p-クレゾール

ロット番号 : FBR01

受領日 : 2006 年 6 月 13 日

保存場所 : 東京研究所 被験物質調製保存室

8. 試験日程

試験開始日	2006年11月6日
予備試験開始日	2006年11月14日
本試験1回目開始日	2006年11月30日
本試験1回目終了日	2006年12月4日
本試験2回目開始日	2006年12月11日
本試験2回目終了日	2006年12月14日
本試験3回目開始日	2006年12月15日
本試験3回目終了日	2006年12月18日
試験終了日	2007年8月30日

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

10. 試験担当者 :

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

本試験において予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったことはなかった。

12. 資料の保存

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

13. 試験責任者の記名・捺印

: 2007年8月30日

試験従事者一覧

予備試験

使用菌株の前培養	:
被験物質の調製	:
被験物質の処理	:

コロニーの計数	:
---------	---

本試験 1 回目

使用菌株の前培養	:
被験物質の調製	:
被験物質の処理	:

コロニーの計数	:
---------	---

本試験 2 回目

使用菌株の前培養	:
被験物質の調製	:
被験物質の処理	:

コロニーの計数	:
---------	---

本試験 3 回目

使用菌株の前培養	:
被験物質の調製	:
被験物質の処理	:
コロニーの計数	:

要 約

2-ニトロ-p-クレゾール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* を用いて復帰突然変異誘発試験を実施した。

試験は、1.22～5000 µg/plate の範囲の被験物質処理用量で予備試験を実施し、その結果より本試験用量を設定し、実施した。なお、試験は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。また、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。

1. 被験物質による沈殿及び着色

本被験物質による沈殿は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれも認められなかった。また、本被験物質による着色は、代謝活性化の有無にかかわらず 625 µg/plate 以上で認められた。

2. 生育阻害

代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA98 の 313 µg/plate 以上、代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA100、TA1535 及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA1537 の 625 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1537 の 1250 µg/plate 以上、代謝活性化の有無にかかわらず *E. coli* WP2 *uvrA* の 2500 µg/plate 以上において菌の生育阻害が認められた。

3. 復帰突然変異コロニー数

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、復帰突然変異コロニー数は陰性対照の2倍以上には増加せず、用量反応性も認められなかった。

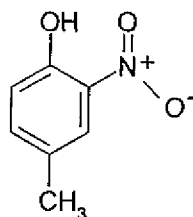
以上の試験結果より、本試験条件下において、2-ニトロ-p-クレゾールは、細菌に対する遺伝子突然変異誘発能を有さない (陰性) と判定した。

被験物質及び被験液の調製

1. 被験物質及び溶媒

1) 被験物質

名 称	2-ニトロ-p-クレゾール(4-Methyl-2-nitrophenol)
CAS 番号	119-33-5
ロット番号	FBR01
構 造 式	



純 度	99.8%
分 子 量	153.14
安 定 性	通常の取り扱い条件においては安定。酸化剤との接触に注意。
性 状	黄色固体
保 存 方 法	密栓して冷暗所に保存する。
取扱上の注意	吸い込んだり、眼、皮膚及び衣類に触れないよう保護具を着用した。
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	LTH4791
規 格	JIS 規格 試薬特級 99%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 で溶解したため、DMSO を溶媒として試験を実施した。

2. 被験液の調製方法

1) 予備試験用被験液の調製

滅菌した調製用試験管に被験物質を 223.8 mg 秤取し、これに 4.476 mL の DMSO を添加して溶解し、最高濃度の 50 mg/mL の被験液を調製した。次いで、50 mg/mL 被験液を公比 4 で順次 6 段階希釈し、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、被験液は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で用時調製した。

2) 本試験 1 回目用被験液の調製

滅菌した調製用試験管に被験物質を 252.7 mg 秤取し、これに 5.054 mL の DMSO を添加して溶解し、最高濃度の 50 mg/mL の被験液を調製した。次いで、50 mg/mL 被験液を公比 2 で順次 7 段階希釈し、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.781 及び 0.391 mg/mL の計 8 濃度の被験液を調製した。なお、被験液は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で用時調製した。

3) 本試験 2 回目用被験液の調製

滅菌した調製用試験管に被験物質を 299.5 mg 秤取し、これに 5.990 mL の DMSO を添加して溶解し、最高濃度の 50 mg/mL の被験液を調製した。次いで、50 mg/mL 被験液を公比 2 で順次 8 段階希釈し、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.781、0.391 及び 0.195 mg/mL の計 9 濃度の被験液を調製した。なお、被験液は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で用時調製した。

4) 本試験 3 回目用被験液の調製

滅菌した調製用試験管に被験物質を 29.0 mg 秤取し、これに 2.320 mL の DMSO を添加して溶解し、最高濃度の 12.5 mg/mL の被験液を調製した。次いで、12.5 mg/mL 被験液を公比 2 で順次 6 段階希釈し、6.25、3.13、1.56、0.781、0.391 及び 0.195 mg/mL の計 7 濃度の被験液を調製した。なお、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 1997 年 10 月 9 日に国立衛生試験所（現国立医薬品食品衛生研究所）変異遺伝部から株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所に分与され、2005 年 7 月 21 日に株式会社ボゾリサーチセンター東京研究所に移管されたものである。

2) 菌株の選択理由

試験委託者からの依頼により選択した。また、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、毒性試験法ガイドラインで指定されている。

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 SDK3621、SDG7463）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：-72～-81℃）。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	2006 年 9 月 26 日
<i>S. typhimurium</i> TA100	2006 年 5 月 25 日
<i>S. typhimurium</i> TA1535	2006 年 5 月 25 日
<i>S. typhimurium</i> TA1537	2006 年 5 月 25 日
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	2006 年 9 月 26 日

4) 菌株の特性検査

凍結保存した菌株について、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	2006 年 9 月 26 日～2006 年 9 月 28 日
<i>S. typhimurium</i> TA100	2006 年 5 月 25 日～2006 年 5 月 27 日
<i>S. typhimurium</i> TA1535	2006 年 5 月 25 日～2006 年 5 月 27 日
<i>S. typhimurium</i> TA1537	2006 年 5 月 25 日～2006 年 5 月 27 日
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	2006 年 9 月 26 日～2006 年 9 月 28 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 微生物試験室の室温保存庫

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 LTP5665 及び LTH4791) 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 K5D75) に溶解し、1.0 mL ずつ小分け分注して-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	調製濃度 (μg/mL)	陽性対照物質	調製濃度 (μg/mL)
<i>S. typhimurium</i> TA100	AF-2	0.1 (0.01)	B[a]P	50 (5.0)
<i>S. typhimurium</i> TA1535	SAZ	5 (0.5)	2AA	20 (2.0)
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	AF-2	0.1 (0.01)	2AA	100(10.0)
<i>S. typhimurium</i> TA98	AF-2	1 (0.1)	B[a]P	50 (5.0)
<i>S. typhimurium</i> TA1537	ICR-191	10 (1.0)	B[a]P	50 (5.0)

() 内の数値は、プレートに処理したときの処理用量 (μg/plate) を示す。

3. 試薬

1) S9Mix の調製方法

Cofactor-I の 1 バイアルに滅菌精製水を 9.0 mL 加え、完全に溶解した後フィルター (Nalge Nunc Int. 0.45μM : Lot No.579748 及び Whatman 0.45μM : Lot No.L559) 滅菌し、Cofactor-I の 1 バイアルに対して 1.0 mL の S9 を加えて S9 Mix とした。調製後、使用時まで冷蔵下で保存し、使用後の残液は廃棄した。

(1) S9

名 称	S9
製 造 元	オリエンタル酵母工業株式会社
ロット番号	06080405
製 造 日	2006 年 8 月 4 日
購 入 日	2006 年 9 月 20 日
種 ・ 系 統	ラット・SD 系
週 齢 ・ 性	7 週齢・雄
体 重	214.8±11.3g
誘 導 物 質	フェノバルビタール(PB)& 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 温 度	保存期間中の実測温度：-75~-81℃

(2) コファクター

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	999603
製 造 日	2006 年 6 月 7 日
購 入 日	2006 年 11 月 8 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 温 度	保存期間中の実測温度: 1~9℃

(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	DZL79F01
製 造 日	2006 年 9 月 15 日
購 入 日	2006 年 9 月 27 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	911885-02

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	349915
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 に調製し、0.1mol/L リン酸緩衝液とした。これをオートクレーブにより滅菌処理(121℃、20 分)を行った。調製後は使用時まで冷蔵で保存した。

- | | |
|---------|---|
| (1) 名 称 | リン酸二水素ナトリウム二水和物 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) |
| 製 造 元 | 和光純薬工業株式会社 |
| ロット番号 | SDM1133 |
| 保 存 方 法 | 室温保存 |
| 保 存 場 所 | 東京研究所 微生物試験室 |
| (2) 名 称 | リン酸水素二ナトリウム (Na_2HPO_4) |
| 製 造 元 | 和光純薬工業株式会社 |
| ロット番号 | EWM2400 |
| 保 存 方 法 | 室温保存 |
| 保 存 場 所 | 東京研究所 微生物試験室 |

5) トップアガー

以下に示す寒天を用いて、調製した軟寒天液 (0.6 % Agar, 0.6 % NaCl) をオートクレーブにより滅菌 (121℃、20 分処理) した後、*S. typhimurium* TA 株では 0.5 mmol/L *D*-ビオチン-0.5 mmol/L *L*-ヒスチジン溶液、*E. coli* 株では 0.5 mmol/L *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 | 5118380 |
| 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 | 8423 |
| 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 | <i>D</i> -ビオチン ((+)-Biotin, Vitamin H) |
| 製 造 元 | ICN Biomedicals, Inc. |
| ロット番号 | 3559H |
| 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 | <i>L</i> -ヒスチジン塩酸塩一水和物
(<i>L</i> -Histidine Hydrochloride Monohydrate) |
| 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 | <i>L</i> -トリプトファン (<i>L</i> -Tryptophan) |
| 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た菌懸濁液を *S. typhimurium* TA 株は各 20 μ L、*E. coli* 株は 10 μ L 植菌した。なお、使用後の菌懸濁液は廃棄した。
- (2) これを振盪恒温槽 (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℃水浴中で放置(6 時間 30 分)した後、37℃に上昇後 9 時間前培養した。
- (3) 前培養終了時に菌懸濁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、菌懸濁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	本試験 3 回目
<i>S. typhimurium</i> TA100	5.33×10^9	5.67×10^9	6.19×10^9	
<i>S. typhimurium</i> TA1535	4.75×10^9	4.80×10^9	4.88×10^9	
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	7.03×10^9	6.92×10^9	6.78×10^9	
<i>S. typhimurium</i> TA98	4.98×10^9	5.09×10^9	5.32×10^9	5.07×10^9
<i>S. typhimurium</i> TA1537	4.16×10^9	4.23×10^9	4.24×10^9	

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 7 用量 (1.22, 4.88, 19.5, 78.1, 313, 1250, 5000 μ g/plate) を用い、予備試験を実施した。なお、予備試験の結果を別表 1 に示した。

予備試験の結果、本被験物質処理による生育阻害は、代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA 株の 1250 μ g/plate 以上、代謝活性化の有無にかかわらず *E. coli* WP2 *uvrA* の 5000 μ g/plate において認められた。また、本被験物質による沈殿は認められず、着色は代謝活性化の有無にかかわらず 1250 μ g/plate 以上で認められた。

このため本試験の試験用量は、代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA 株については 1250 µg/plate、*E. coli* WP2 *uvrA* については 5000 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、本試験ではそれぞれ 3 枚のプレートを用いた。

5) 試験操作

- (1) 滅菌した小試験管に調製した被験液、溶媒又は陽性対照溶液を 0.1mL 入れ、これに代謝活性化しない場合は 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL を、代謝活性化する場合は S9 Mix 0.5 mL を加えた後、それぞれの小試験管に各菌懸濁液 0.1 mL を加えた。
- (2) 小試験管を攪拌後すぐに 37℃で 20 分間振盪しながらブレインキュベーションし、これに 45℃に維持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。
無菌試験として、調製した最高用量の被験液 0.1mL 及び調製した S9 Mix 0.5mL をそれぞれ小試験管に取り、これにトップアガーを 2.0mL 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、これらの一連の操作は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で実施した。
- (3) 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℃で約 50 時間（予備試験：49.9 時間、本試験 1 回目：48 時間、本試験 2 回目：49.4 時間、本試験 3 回目：50.7 時間）培養した。
- (4) 培養後、寒天培地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沈殿は認められず、着色による影響もなかったため、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 倍以上に増加し、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 1～4 及び図 1～4 に示した。なお、図 1～3 は別表 2、図 4 は別表 4 より作成した。

1) 培養終了後の観察結果

本被験物質による沈殿は、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。また、被験物質による着色は代謝活性化の有無にかかわらず 625 µg/plate 以上で認められた。なお、生育阻害の有無について実体顕微鏡を用いて観察した結果、代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA98 の 313 µg/plate 以上、代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA100、TA1535 及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA1537 の 625 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1537 の 1250 µg/plate 以上、代謝活性化の有無にかかわらず *E. coli* WP2 *uvrA* の 2500 µg/plate 以上において菌の生育阻害が認められた。なお、本試験 1 回目の *S. typhimurium* TA98 において、代謝活性化の有無にかかわらず 313 µg/plate 以上で生育阻害を示し、生育阻害を示さない用量数が 3 用量以下となったため、本試験 2 回目では用量数を増やして試験を実施した。また、代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA98 については、生育阻害の再現性を確認するため、本試験 3 回目を実施した。

2) 復帰突然変異コロニー数

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、陰性対照群と比較して 2 倍以上には増加せず、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を示し、本試験 1 回目の代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1537 の陽性対照値を除いて、陰性対照値及び陽性対照値の復帰変異コロニー数が背景データの管理限界（平均値±3SD）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。なお、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1537 の陽性対照値についても、使用している調製 Lot No. の背景データでは管理用背景データよりも若干高値傾向にあるため、試験結果に影響しないと判断した。

2. 考察

3 回の本試験ともに、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、本被験物質処理による復帰変異コロニー数は、いずれの試験用量においても陰性対照と比較して 2 倍以上となる再現性のある増加は認められず、用量反応性も認められなかった。

一方、陽性対照群では陰性対照群と比較して 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加を示したことから、使用菌株の復帰突然変異誘発物質に対する反応は適切であったことが確認され、試験は適切に実施されたものと考えられた。

以上の試験結果より、本試験条件下において代謝活性化の有無にかかわらず、2-ニトロ-p-クレゾールは、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:2-ニトロ-p-クレゾール

No. T-0021

試験実施期間		平成18年11月14日 より 平成18年11月17日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量(μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9Mix (-)	陰性対照(DMSO)	73 87 (80)	11 8 (10)	29 28 (29)	24 22 (23)	5 5 (5)
	1.22	83 82 (83)	12 10 (11)	21 26 (24)	13 13 (13)	4 5 (5)
	4.88	96 71 (84)	10 7 (9)	24 27 (26)	15 28 (22)	5 7 (6)
	19.5	89 90 (90)	13 12 (13)	16 19 (18)	18 24 (21)	10 2 (6)
	78.1	83 88 (86)	9 6 (8)	30 24 (27)	13 19 (16)	5 4 (5)
	313	94 116 (105)	13 13 (13)	24 25 (25)	8 1 (5)	5 7 (6)
	1250	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	14 19 (17)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
	5000	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
S9Mix (+)	陰性対照(DMSO)	121 111 (116)	9 4 (7)	23 25 (24)	24 38 (31)	9 6 (8)
	1.22	110 94 (102)	7 10 (9)	40 30 (35)	37 37 (37)	12 12 (12)
	4.88	96 106 (101)	8 8 (8)	24 27 (26)	28 19 (24)	11 8 (10)
	19.5	119 91 (105)	9 8 (9)	31 25 (28)	38 38 (38)	4 8 (6)
	78.1	105 111 (108)	6 5 (6)	34 24 (29)	30 25 (28)	11 7 (9)
	313	125 122 (124)	9 4 (7)	21 30 (26)	9 15 (12)	4 7 (6)
	1250	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	15 36 (26)	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
		用量(μg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1
		コロニー数/プレート	656 654 (655)	283 276 (280)	97 83 (90)	492 497 (495)
	S9Mixを必要とするもの	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P
		用量(μg/プレート)	5.0	2.0	10	5.0
		コロニー数/プレート	1094 1093 (1094)	381 355 (368)	912 951 (932)	319 314 (317)

(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-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノ]プロピルアミン・2HCl

2AA : 2-アミノアントラセン

B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

* : 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。

() 内は、2枚のプレートの平均値を示す。

(別表2)

試験結果表(本試験 1回目)

被験物質の名称:2-ニトロ-p-クレゾール

No. T-0021

試験実施期間		平成18年11月30日 より 平成18年12月4日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量(μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9Mix (一)	陰性対照(DMSO)	93 100 110 (101 ± 8.5)	11 11 10 (11 ± 0.6)	13 17 14 (15 ± 2.1)	27 26 45 (33 ± 10.7)	15 14 10 (13 ± 2.6)
	39.1	95 117 142 (118 ± 23.5)	16 5 9 (10 ± 5.6)	NT	23 30 22 (25 ± 4.4)	14 15 16 (15 ± 1.0)
	78.1	117 112 107 (112 ± 5.0)	14 11 8 (11 ± 3.0)	NT	24 31 16 (24 ± 7.5)	13 16 18 (16 ± 2.5)
	156	90 108 107 (102 ± 10.1)	15 10 12 (12 ± 2.5)	15 18 15 (16 ± 1.7)	19 26 27 (24 ± 4.4)	5 10 11 (9 ± 3.2)
	313	99 102 115 (105 ± 8.5)	16 8 25 (16 ± 8.5)	19 21 18 (19 ± 1.5)	0 * 3 * 7 * (3 ± 3.5)	13 7 11 (10 ± 3.1)
	625	51 * 71 * 78 * (67 ± 14.0)	15 * 5 * 11 * (10 ± 5.0)	10 22 33 (22 ± 11.5)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	7 7 11 (8 ± 2.3)
	1250	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	18 18 14 (17 ± 2.3)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)
	2500	NT	NT	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	NT	NT
	5000	NT	NT	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	NT	NT
S9Mix (+)	陰性対照(DMSO)	129 96 118 (114 ± 16.8)	8 13 14 (12 ± 3.2)	19 27 20 (22 ± 4.4)	42 33 40 (38 ± 4.7)	24 13 22 (20 ± 5.9)
	39.1	137 120 142 (133 ± 11.5)	12 13 10 (12 ± 1.5)	NT	37 34 43 (38 ± 4.6)	19 16 16 (17 ± 1.7)
	78.1	146 141 156 (148 ± 7.6)	16 8 8 (11 ± 4.6)	NT	42 24 48 (38 ± 12.5)	19 15 16 (17 ± 2.1)
	156	149 171 162 (161 ± 11.1)	18 15 18 (17 ± 1.7)	18 22 22 (21 ± 2.3)	39 39 27 (35 ± 6.9)	14 19 13 (15 ± 3.2)
	313	150 153 151 (151 ± 1.5)	14 21 13 (16 ± 4.4)	18 22 18 (19 ± 2.3)	12 * 6 * 4 * (7 ± 4.2)	15 14 16 (15 ± 1.0)
	625	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	13 * 11 * 3 * (9 ± 5.3)	21 25 24 (23 ± 2.1)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	13 * 14 * 10 * (12 ± 2.1)
	1250	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	16 20 18 (18 ± 2.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)
	2500	NT	NT	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	NT	NT
	5000	NT	NT	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	NT	NT
陽性対照	名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191
	用量(μg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	コロニー数/プレート	682 658 666 (669 ± 12.2)	420 400 426 (415 ± 13.6)	97 122 93 (104 ± 15.7)	565 552 579 (565 ± 13.5)	2253 2272 2258 (2261 ± 9.8)
	名称	B[α]P	2AA	2AA	B[α]P	B[α]P
	用量(μg/プレート)	5.0	2.0	10	5.0	5.0
	コロニー数/プレート	1012 970 950 (977 ± 31.6)	400 432 356 (396 ± 38.2)	823 764 817 (801 ± 32.5)	361 362 391 (371 ± 17.0)	93 102 107 (101 ± 7.1)

(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-メチル-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノ]ピリミジン・2HCl
 2AA : 2-アミノアントラセン
 B[α]P : ベンゾ[α]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。

試験結果表(本試験 2回目)

被験物質の名称:2-ニトロ-p-クレゾール

No. T-0021

試験実施期間		平成18年12月11日 より 平成18年12月14日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量(μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9Mix (-)	陰性対照(DMSO)	120 136 132 (129 ± 8.3)	13 8 8 (10 ± 2.9)	16 11 18 (15 ± 3.6)	25 25 15 (22 ± 5.8)	8 5 9 (7 ± 2.1)
	19.5	NT	NT	NT	21 18 24 (21 ± 3.0)	NT
	39.1	120 149 121 (130 ± 16.5)	17 16 10 (14 ± 3.8)	NT	21 20 21 (21 ± 0.6)	5 9 8 (7 ± 2.1)
	78.1	128 121 140 (130 ± 9.6)	8 11 7 (9 ± 2.1)	NT	21 16 16 (18 ± 2.9)	3 12 5 (7 ± 4.7)
	156	127 132 142 (134 ± 7.6)	14 13 10 (12 ± 2.1)	25 11 20 (19 ± 7.1)	12 13 18 (14 ± 3.2)	7 6 5 (6 ± 1.0)
	313	143 153 130 (142 ± 11.5)	8 8 13 (10 ± 2.9)	10 15 11 (12 ± 2.6)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	5 4 7 (5 ± 1.5)
	625	62 * 68 * 47 * (59 ± 10.8)	10 * 8 * 8 * (9 ± 1.2)	17 25 19 (20 ± 4.2)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	5 5 2 (4 ± 1.7)
	1250	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	11 11 9 (10 ± 1.2)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)
	2500	NT	NT	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	NT	NT
	5000	NT	NT	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	NT	NT
S9Mix (+)	陰性対照(DMSO)	162 132 144 (146 ± 15.1)	11 18 10 (13 ± 4.4)	25 15 20 (20 ± 5.0)	28 37 37 (34 ± 5.2)	11 13 13 (12 ± 1.2)
	19.5	NT	NT	NT	26 28 39 (31 ± 7.0)	NT
	39.1	142 139 140 (140 ± 1.5)	19 16 8 (14 ± 5.7)	NT	25 39 30 (31 ± 7.1)	10 9 17 (12 ± 4.4)
	78.1	151 138 174 (154 ± 18.2)	16 10 9 (12 ± 3.8)	NT	26 34 33 (31 ± 4.4)	13 5 8 (9 ± 4.0)
	156	166 172 168 (169 ± 3.1)	16 12 21 (16 ± 4.5)	22 29 18 (23 ± 5.6)	33 23 16 (24 ± 8.5)	7 10 14 (10 ± 3.5)
	313	175 163 160 (166 ± 7.9)	11 23 7 (14 ± 8.3)	21 18 23 (21 ± 2.5)	11 * 5 * 7 * (8 ± 3.1)	13 8 16 (12 ± 4.0)
	625	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	7 * 17 * 16 * (13 ± 5.5)	22 12 14 (16 ± 5.3)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	6 * 2 * 5 * (4 ± 2.1)
	1250	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	9 9 18 (12 ± 5.2)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)
	2500	NT	NT	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	NT	NT
	5000	NT	NT	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	NT	NT
陽性対照	名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191
	用量(μg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	コロニー数/プレート	667 664 684 (672 ± 10.8)	347 324 296 (322 ± 25.5)	83 79 91 (84 ± 6.1)	545 550 526 (540 ± 12.7)	1484 1465 1376 (1442 ± 57.7)
	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
陽性対照	用量(μg/プレート)	5.0	2.0	10	5.0	5.0
	コロニー数/プレート	1053 975 1114 (1047 ± 69.7)	372 432 430 (411 ± 34.1)	799 834 755 (796 ± 39.6)	377 416 385 (393 ± 20.6)	117 113 104 (111 ± 6.7)

(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-メチル-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノ]プロピルアクリジン-2HCl
 2AA : 2-アミノアントラセン
 B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

* : 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。
 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 3回目)

被験物質の名称:2-ニトロ-p-クレゾール

No.T-0021

試験実施期間		平成18年12月15日より平成18年12月18日	
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)	
		フレームシフト型	
		TA98	
S9Mix (-)	陰性対照 (DMSO)	32 23 23	(26 ± 5.2)
	19.5	21 31 20	(24 ± 6.1)
	39.1	28 23 22	(24 ± 3.2)
	78.1	16 24 19	(20 ± 4.0)
	156	21 17 16	(18 ± 2.6)
	313	10 * 8 * 4 *	(7 ± 3.1)
	625	0 * 0 * 0 *	(0 ± 0.0)
	1250	0 * 0 * 0 *	(0 ± 0.0)
S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	36 44 30	(37 ± 7.0)
	19.5	46 44 42	(44 ± 2.0)
	39.1	23 36 28	(29 ± 6.6)
	78.1	39 36 33	(36 ± 3.0)
	156	36 42 33	(37 ± 4.6)
	313	8 * 14 * 13 *	(12 ± 3.2)
	625	0 * 0 * 0 *	(0 ± 0.0)
	1250	0 * 0 * 0 *	(0 ± 0.0)
陽性対照	名 称	AF-2	
	S9Mixを必要としないもの 用量(μg/プレート)	0.1	
	コロニー数/プレート	499 403 452	(451 ± 48.0)
	名 称	B[a]P	
	S9Mixを必要とするもの 用量(μg/プレート)	5.0	
	コロニー数/プレート	450 446 505	(467 ± 33.0)

(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

B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

* : 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。
 () 内は、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

図 1

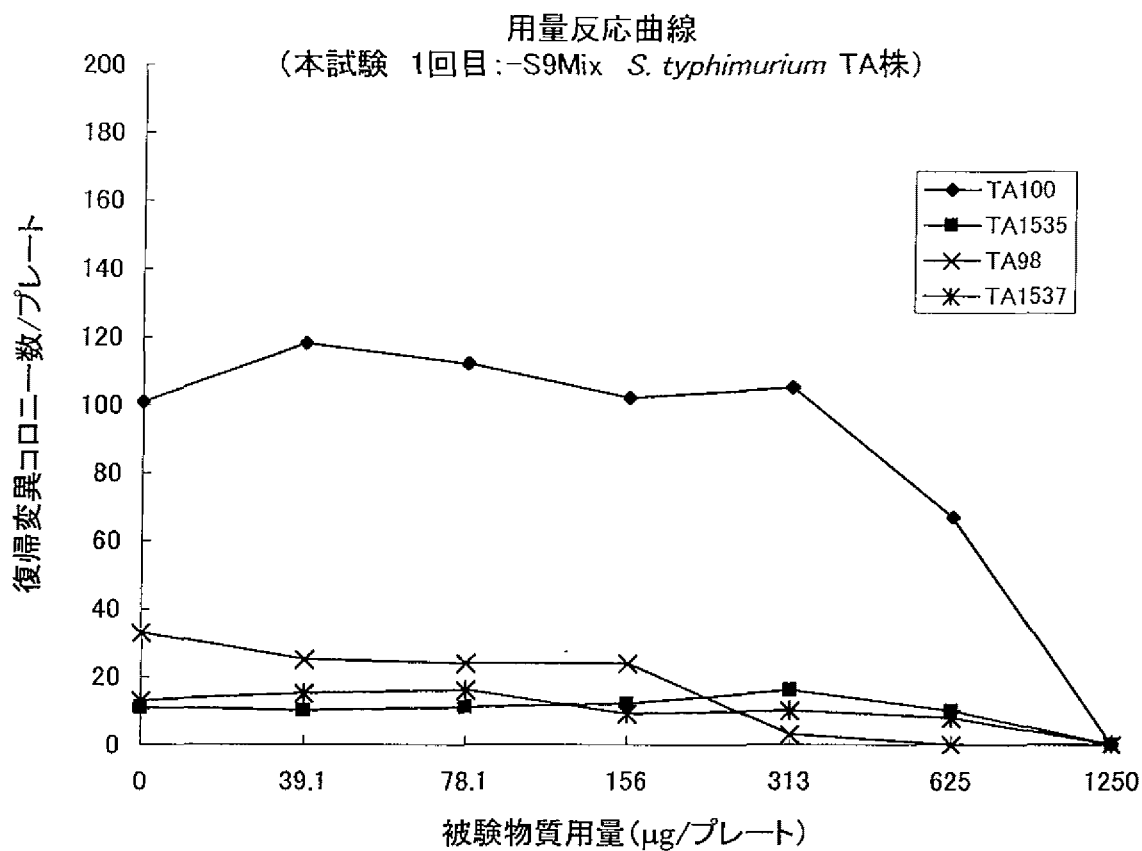


図 2

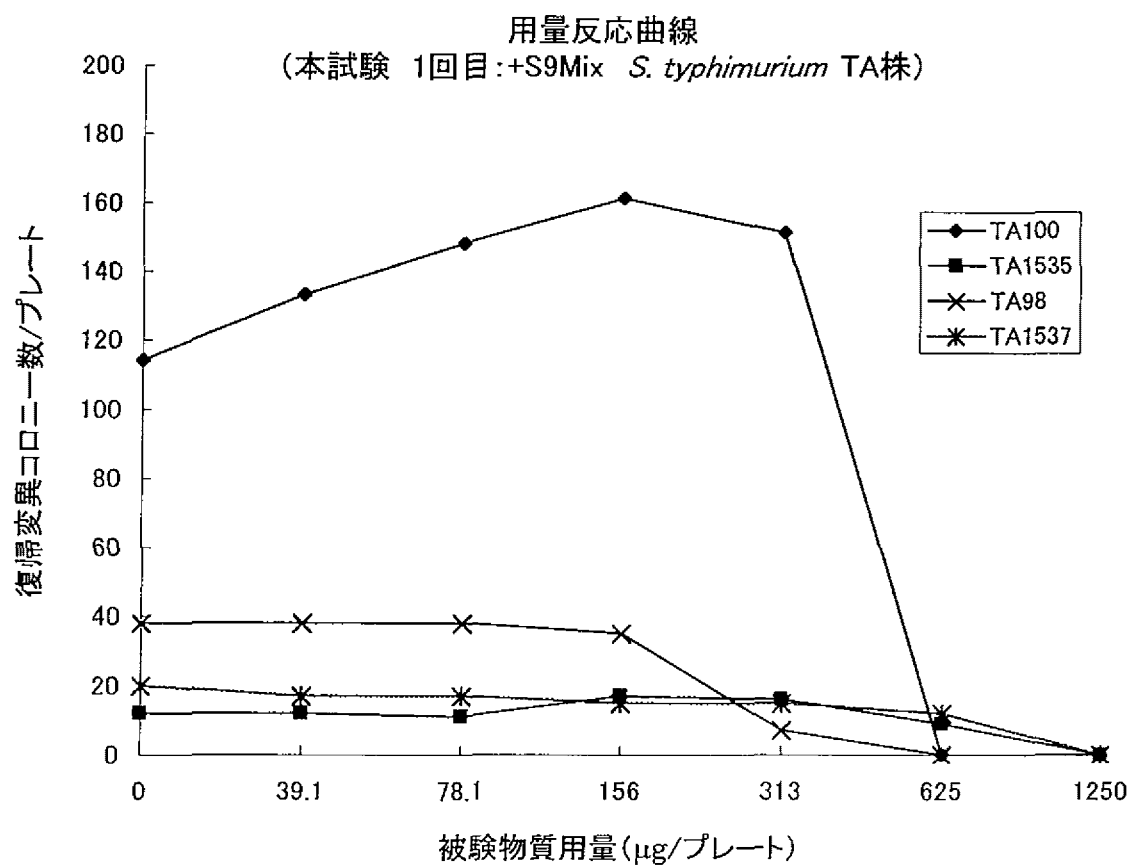


図 3

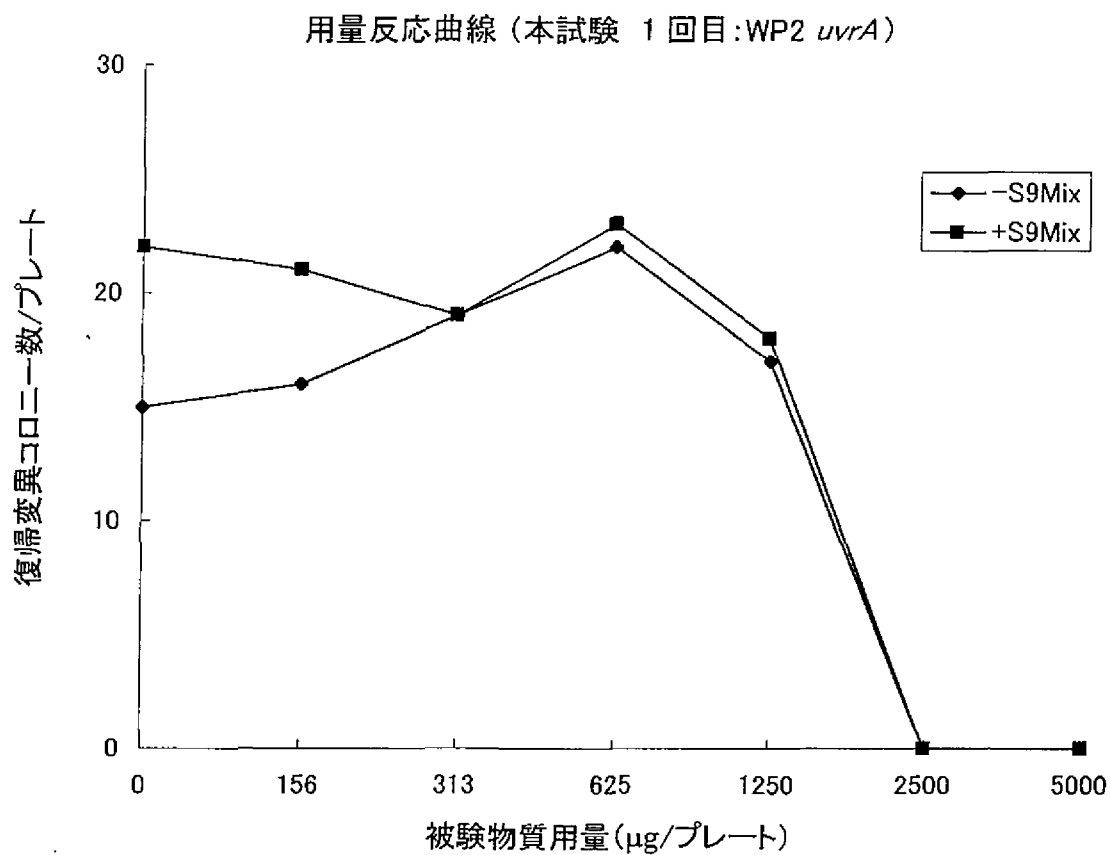
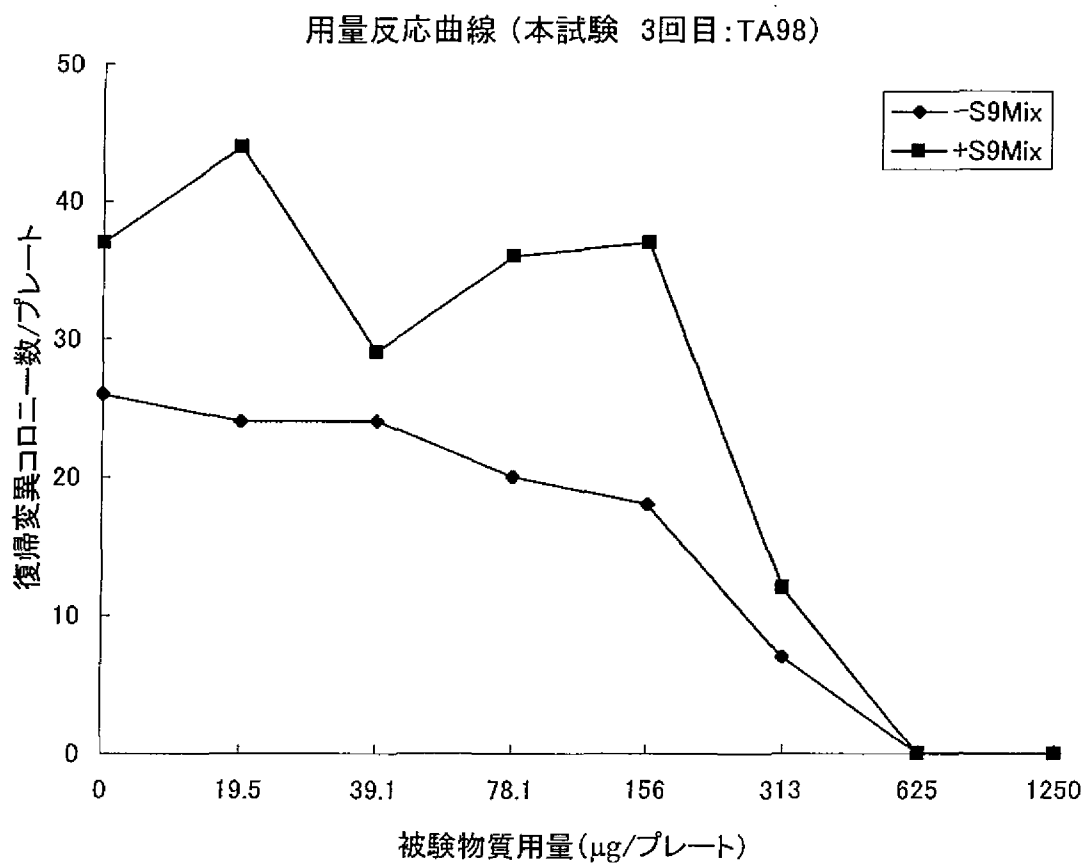


図 4



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

CODE No.: 060616

Period: From February 17, 2006 to June 16, 2006

Tester Strains	S9Mix (-) or (+)	Classification	Management ranges		Mean	Management ranges		number of plates
			-3SD	-2SD		+2SD	+3SD	
TA100	-	Solvent control	66	84	119	155	173	77
		Positive control AF-2(0.01 μ g/plate)	381	435	544	652	707	77
	+	Solvent control	70	89	127	165	184	77
		Positive control B[a]P(5.0 μ g/plate)	775	885	1107	1328	1439	77
TA1535	-	Solvent control	2	5	10	15	17	77
		Positive control SAZ(0.5 μ g/plate)	162	206	294	383	427	77
	+	Solvent control	2	5	10	15	17	77
		Positive control 2AA(2.0 μ g/plate)	174	222	316	411	459	77
WP2uvrA	-	Solvent control	5	10	21	31	36	77
		Positive control AF-2(0.01 μ g/plate)	45	57	81	105	117	77
	+	Solvent control	6	11	23	34	40	77
		Positive control 2AA(10.0 μ g/plate)	501	638	911	1184	1321	77
TA98	-	Solvent control	5	10	20	30	35	77
		Positive control AF-2(0.01 μ g/plate)	219	279	399	518	578	77
	+	Solvent control	8	17	34	51	59	77
		Positive control B[a]P(5.0 μ g/plate)	232	296	423	549	613	77
TA1537	-	Solvent control	1	3	8	13	16	77
		Positive control ICR-191(1.0 μ g/plate)	678	863	1233	1603	1788	77
	+	Solvent control	1	5	12	19	23	77
		Positive control B[a]P(5.0 μ g/plate)	47	60	86	112	125	77

(Notice)

Solvent controls Water, Dimethylsulfoxide(DMSO) or Acetone

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

SAZ : Sodium azide

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

B[a]P : Benzo[a]pyrene

2AA : 2-aminoanthracene

S9Mix (-) : without metabolic activation

(+) : with metabolic activation