

# 最終報告書

1,3,5-トリ-tert-ブチルベンゼンの細菌を用いる復帰突然変異試験

T-0061

2008年12月17日

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
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	8
2. 被験液の調製方法	8
(1) 予備試験用被験液の調製	8
(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) 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) ニュートリエントブロス 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	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) 復帰突然変異コロニー数	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)
- ・別表 3 試験結果表(本試験 2 回目)

#### 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)

## 要 約

1,3,5-トリ-tert-ブチルベンゼ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アセトンを用いた。

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、TA98、TA1537 については 9.77～313 µg/plate、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1535 については 39.1～1250 µg/plate の範囲の各 6 用量で実施した。また、代謝活性化しない場合の *E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化する場合のすべての菌株については 313～5000 µg/plate の範囲の各 5 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は、代謝活性化しない場合の 625 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の 1250 µg/plate 以上で認められた。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、いずれの用量においても認められなかった。

### 2. 生育阻害

代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98、TA1537 の 156 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100 の 313 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1535 の 1250 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、1,3,5-トリ-tert-ブチルベンゼンは、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。

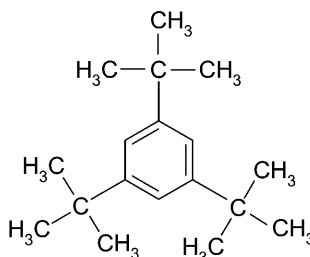
## 被験物質及び被験液の調製

## 1. 被験物質及び溶媒

## (1) 被験物質

名 称 1,3,5-トリ-tert-ブチルベンゼン  
CAS 番号 1460-02-2

構 造 式



純 度 99.2%  
不純物の名称及び濃度 情報なし  
分 子 量 246.43

融 点 69～71℃  
沸 点 121～122℃  
蒸 気 圧 データなし  
分配係数 データなし  
常温における性状 白色の粉末  
安 定 性 試験終了後の被験物質の含量分析を実施した結果、含量に変化がないことが確認された。

保 存 方 法 室温  
保 存 温 度 保存期間(2007.4.3～2007.7.11)中の実測温度：16～27℃  
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。  
そ の 他 試験終了後の被験物質について、  
分析した結果、純度は 98.9%であった。

## (2) 溶媒

名 称 アセトン  
製 造 元 和光純薬工業株式会社  
ロット番号 TSN0063  
規 格 JIS 規格 試薬特級 99.5%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

水、ジメチルスルホキシド(以下、DMSO と略す)、アセトンについて溶解性試験を実施した結果、本被験物質は水、DMSO に 50mg/mL で溶解せず、アセトンに 100mg/mL で溶解し、発熱、ガスの発生等の反応性も認められなかったため、アセトンを溶媒として試験を実施した。なお、アセトンを溶媒としたため、通常の 2 倍の濃度に調製し、試験操作での小試験管への被験液の添加量は、溶媒の菌株に対する毒性を考慮して 0.05mL とした。

## 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 206.7 mg 秤取し、これに 2.067 mL のアセトンを添加して溶解し、最高調製濃度の 100 mg/mL の被験液を調製した。次いで、100 mg/mL 被験液を公比 4 で順次 6 段階希釈し、100、25、6.25、1.56、0.391、0.0977 及び 0.0244 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を 284.4 mg 秤取し、これに 2.844 mL のアセトンを添加して溶解し、最高調製濃度の 100 mg/mL の被験液を調製した。次いで、100 mg/mL 溶液を公比 2 で順次 9 段階希釈し、100、50、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.781、0.391 及び 0.195 mg/mL の計 10 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を 302.3 mg 秤取し、これに 3.023 mL のアセトンを添加して溶解し、最高調製濃度の 100 mg/mL の被験液を調製した。次いで、100 mg/mL 溶液を公比 2 で順次 9 段階希釈し、100、50、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.781、0.391 及び 0.195 mg/mL の計 10 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) 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のから、2005 年 7 月 21 日に分与された。

## (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 LTH4791、WKP5050）を 0.7 mL の割合で添加して、滅菌チューブに 300  $\mu$ L ずつ分注し、-70°C 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 2 月 23 日～2007 年 7 月 9 日：-81～-73°C）。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 2 月 23 日
<i>S. typhimurium</i> TA100	2007 年 5 月 11 日
<i>S. typhimurium</i> TA1535	2007 年 6 月 1 日
<i>S. typhimurium</i> TA1537	2007 年 6 月 1 日
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	2007 年 3 月 2 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	2007 年 2 月 23 日～2007 年 2 月 26 日
<i>S. typhimurium</i> TA100	2007 年 5 月 11 日～2007 年 5 月 14 日
<i>S. typhimurium</i> TA1535	2007 年 6 月 1 日～2007 年 6 月 4 日
<i>S. typhimurium</i> TA1537	2007 年 6 月 1 日～2007 年 6 月 4 日
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	2007 年 3 月 2 日～2007 年 3 月 5 日

## 2. 対照物質

## (1) 陰性対照物質

被験物質の調製に用いたアセトン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 LTH4791、WKP5050) 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 K6F75) 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	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、完全に溶解した後ろ過 (Nalge Nunc Int. 0.45µM : Lot No.600845) 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	07042001
製 造 日	2007 年 4 月 20 日



購入日 2007年6月19日  
 種・系統 ラット・SD系  
 週齢・性 7週齢・雄  
 体重 204.7±9.2g  
 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)  
 保存期間中の実測温度 2007年6月19日～2007年7月11日：-80～-74℃

## 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 999701  
 製造日 2007年2月19日  
 購入日 2007年6月19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 2007年6月19日～2007年7月11日：4～10℃

## 3) S9Mix の組成 (1mL 中)

水	0.9 mL
S9	0.1 mL
MgCl <sub>2</sub>	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 DZL84601(予備試験)、DZL86F01(本試験 1回目、2回目)  
 製造日 DZL84601：2007年4月6日  
 DZL86F01：2007年6月15日  
 購入日 DZL84601：2007年5月15日  
 DZL86F01：2007年6月29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 946458-02

## (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 (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )
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	6275177
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	DPK1032
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(予備試験)、3558H(本試験 1 回目、2 回目)
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<br>( <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  $\mu$ L、*E. coli* 株は 10  $\mu$ 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°C 水浴中で放置(6 時間 30 分)した後、37°C 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
<i>S. typhimurium</i> TA100	$5.85 \times 10^9$	$5.65 \times 10^9$	$5.55 \times 10^9$
<i>S. typhimurium</i> TA1535	$4.83 \times 10^9$	$4.84 \times 10^9$	$4.74 \times 10^9$
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	$7.02 \times 10^9$	$7.08 \times 10^9$	$7.08 \times 10^9$
<i>S. typhimurium</i> TA98	$4.95 \times 10^9$	$5.04 \times 10^9$	$5.02 \times 10^9$
<i>S. typhimurium</i> TA1537	$4.22 \times 10^9$	$4.24 \times 10^9$	$4.22 \times 10^9$

## (3) 本試験用量の設定

本試験の試験用量を設定するため、100 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 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、TA98、TA1537 の 313 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1535 の 1250 µg/plate 以上において菌の生育阻害が認められた。また、本被験物質によるプレート上の沈殿は、代謝活性化の有無にかかわらず 1250 µg/plate 以上で認められた。なお、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、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、TA98、TA1537 については 313 µg/plate、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1535 については 1250 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。また、代謝活性化しない場合の *E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化する場合のすべての菌株については 5000 µg/plate を最高用量として、以下公比 2 で 4 段階希釈した計 5 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及び溶媒を 0.05mL、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°C 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°C 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。
- 3) 無菌試験として、調製した最高用量の被験液 0.05 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48時間以上（予備試験：49時間、本試験1回目：50時間、本試験2回目：49時間）培養した。
- 5) 培養後、寒天培地上の被験物質による沈殿を確認した結果、代謝活性化しない場合の625 µg/plate以上、代謝活性化した場合の1250 µg/plate以上で沈殿が認められたため、目視による計数を行った。なお、陽性対照のみ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、本試験の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1～3及び図1～10に示した。なお、図は別表2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、代謝活性化しない場合の625 µg/plate以上、代謝活性化した場合の1250 µg/plate以上で認められた。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、いずれの用量においても認められなかった。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、代謝活性化しない場合の*S. typhimurium* TA98、TA1537の156 µg/plate以上、代謝活性化しない場合の*S. typhimurium* TA100の313 µg/plate以上、代謝活性化しない場合の*S. typhimurium* TA1535の1250 µg/plate以上において菌の生育阻害が認められた。

#### (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、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：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

2 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、1,3,5-トリ-tert-ブチルベンゼンは、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<sup>+</sup> 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:1,3,5-トリ-tert-ブチルベンゼン

No. T-0061

試験実施期間		2007年6月25日 より 2007年6月28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(アセトン)	120 113 ( 117 )	7 10 ( 9 )	16 18 ( 17 )	21 24 ( 23 )	9 5 ( 7 )	
	1.22	102 107 ( 105 )	8 12 ( 10 )	24 25 ( 25 )	22 19 ( 21 )	4 3 ( 4 )	
	4.88	127 126 ( 127 )	8 6 ( 7 )	14 13 ( 14 )	26 12 ( 19 )	4 3 ( 4 )	
	19.5	113 104 ( 109 )	10 6 ( 8 )	21 16 ( 19 )	14 24 ( 19 )	2 7 ( 5 )	
	78.1	110 94 ( 102 )	6 3 ( 5 )	15 20 ( 18 )	20 23 ( 22 )	7 8 ( 8 )	
	313	99 * 110 * ( 105 )	11 6 ( 9 )	22 20 ( 21 )	21 * 23 * ( 22 )	5 * 7 * ( 6 )	
	1250 #	102 * 114 * ( 108 )	7 * 9 * ( 8 )	23 23 ( 23 )	14 * 12 * ( 13 )	4 * 3 * ( 4 )	
	5000 #	110 * 116 * ( 113 )	9 * 2 * ( 6 )	13 19 ( 16 )	14 * 12 * ( 13 )	5 * 3 * ( 4 )	
	S9Mix (+)	陰性対照(アセトン)	154 142 ( 148 )	16 9 ( 13 )	23 18 ( 21 )	40 34 ( 37 )	10 17 ( 14 )
		1.22	144 162 ( 153 )	11 11 ( 11 )	29 21 ( 25 )	34 49 ( 42 )	10 11 ( 11 )
4.88		141 154 ( 148 )	13 11 ( 12 )	23 26 ( 25 )	40 28 ( 34 )	6 10 ( 8 )	
19.5		152 175 ( 164 )	10 10 ( 10 )	19 18 ( 19 )	51 48 ( 50 )	4 6 ( 5 )	
78.1		171 170 ( 171 )	8 12 ( 10 )	21 25 ( 23 )	37 40 ( 39 )	5 13 ( 9 )	
313		139 141 ( 140 )	12 4 ( 8 )	18 19 ( 19 )	43 48 ( 46 )	14 7 ( 11 )	
1250 #		122 125 ( 124 )	9 10 ( 10 )	29 20 ( 25 )	33 37 ( 35 )	12 8 ( 10 )	
5000 #		132 144 ( 138 )	5 6 ( 6 )	21 14 ( 18 )	27 24 ( 26 )	9 4 ( 7 )	
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(μg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	コロニー数/プレート	571 541 ( 556 )	264 269 ( 267 )	67 62 ( 65 )	417 445 ( 431 )	1607 1692 ( 1650 )	
	S9Mixを必要とするもの	名称 B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]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	878 999 ( 939 )	348 332 ( 340 )	819 869 ( 844 )	306 298 ( 302 )	91 90 ( 91 )		

(備考)

AF-2 :2-(2-フリル)-3-(5-ニコロ-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]ピロピルアミノ]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。  
 #:被験物質の沈澱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: 1,3,5-トリ-tert-ブチルベンゼン

No. T-0061

試験実施期間		2007年7月3日 より 2007年7月6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 (アセトン)	123 112 105 ( 113 ± 9.1 )	14 9 12 ( 12 ± 2.5 )	23 31 32 ( 29 ± 4.9 )	16 17 19 ( 17 ± 1.5 )	7 14 15 ( 12 ± 4.4 )
	9.77	113 117 123 ( 118 ± 5.0 )	NT	NT	21 16 23 ( 20 ± 3.6 )	17 10 6 ( 11 ± 5.6 )
	19.5	118 118 96 ( 111 ± 12.7 )	NT	NT	19 20 15 ( 18 ± 2.6 )	14 16 15 ( 15 ± 1.0 )
	39.1	95 117 112 ( 108 ± 11.5 )	11 11 13 ( 12 ± 1.2 )	NT	16 17 31 ( 21 ± 8.4 )	10 15 10 ( 12 ± 2.9 )
	78.1	102 103 77 ( 94 ± 14.7 )	17 11 10 ( 13 ± 3.8 )	NT	19 19 12 ( 17 ± 4.0 )	17 21 20 ( 19 ± 2.1 )
	156	91 90 94 ( 92 ± 2.1 )	9 13 12 ( 11 ± 2.1 )	NT	22 * 24 * 18 * ( 21 ± 3.1 )	11 * 12 * 13 * ( 12 ± 1.0 )
	313	107 * 114 * 111 * ( 111 ± 3.5 )	15 12 8 ( 12 ± 3.5 )	33 28 23 ( 28 ± 5.0 )	17 * 23 * 11 * ( 17 ± 6.0 )	13 * 9 * 12 * ( 11 ± 2.1 )
	625 #	NT	13 10 12 ( 12 ± 1.5 )	24 27 25 ( 25 ± 1.5 )	NT	NT
	1250 #	NT	12 * 8 * 10 * ( 10 ± 2.0 )	34 29 24 ( 29 ± 5.0 )	NT	NT
	2500 #	NT	NT	30 26 25 ( 27 ± 2.6 )	NT	NT
	5000 #	NT	NT	42 30 25 ( 32 ± 8.7 )	NT	NT
	S9Mix (+)	陰性対照 (アセトン)	122 125 143 ( 130 ± 11.4 )	15 15 11 ( 14 ± 2.3 )	23 35 35 ( 31 ± 6.9 )	29 44 32 ( 35 ± 7.9 )
313		129 116 129 ( 125 ± 7.5 )	5 6 15 ( 9 ± 5.5 )	39 25 23 ( 29 ± 8.7 )	41 46 47 ( 45 ± 3.2 )	17 18 8 ( 14 ± 5.5 )
625		113 125 120 ( 119 ± 6.0 )	8 9 6 ( 8 ± 1.5 )	31 31 30 ( 31 ± 0.6 )	46 38 31 ( 38 ± 7.5 )	14 10 16 ( 13 ± 3.1 )
1250 #		117 117 125 ( 120 ± 4.6 )	9 9 9 ( 9 ± 0.0 )	34 30 33 ( 32 ± 2.1 )	44 28 34 ( 35 ± 8.1 )	16 14 13 ( 14 ± 1.5 )
2500 #		124 110 121 ( 118 ± 7.4 )	13 8 9 ( 10 ± 2.6 )	35 26 31 ( 31 ± 4.5 )	39 34 41 ( 38 ± 3.6 )	14 8 10 ( 11 ± 3.1 )
5000 #		113 109 97 ( 106 ± 8.3 )	11 12 9 ( 11 ± 1.5 )	29 28 30 ( 29 ± 1.0 )	29 29 30 ( 29 ± 0.6 )	10 15 9 ( 11 ± 3.2 )
陽性対照		名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2
	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	505 526 522 ( 518 ± 11.2 )	408 382 386 ( 392 ± 14.0 )	83 94 74 ( 84 ± 10.0 )	464 449 422 ( 445 ± 21.3 )	1638 1702 1520 ( 1620 ± 92.3 )
	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]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	898 866 904 ( 889 ± 20.4 )	422 368 377 ( 389 ± 28.9 )	1168 1151 1228 ( 1182 ± 40.5 )	300 304 336 ( 313 ± 19.7 )	106 90 105 ( 100 ± 9.0 )

(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  
SAZ : アジ化ナトリウム  
ICR-191 : 2-ネキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]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

# : 被験物質の沈殿が認められたことを示す。  
\* : 被験物質の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 2回目)

被験物質の名称: 1,3,5-トリtert-ブチルベンゼン

No. T-0061

試験実施期間		2007年7月10日 より 2007年7月13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)					
		塩基置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix (-)	陰性対照 (アセトン)	85 100 105 ( 97 ± 10.4 )	5 9 10 ( 8 ± 2.6 )	46 36 31 ( 38 ± 7.6 )	35 31 27 ( 31 ± 4.0 )	12 18 20 ( 17 ± 4.2 )	
	9.77	103 96 108 ( 102 ± 6.0 )	NT	NT	28 31 44 ( 34 ± 8.5 )	22 24 28 ( 25 ± 3.1 )	
	19.5	104 101 103 ( 103 ± 1.5 )	NT	NT	28 42 51 ( 40 ± 11.6 )	15 13 13 ( 14 ± 1.2 )	
	39.1	113 95 126 ( 111 ± 15.6 )	12 8 6 ( 9 ± 3.1 )	NT	41 43 33 ( 39 ± 5.3 )	22 12 18 ( 17 ± 5.0 )	
	78.1	117 100 103 ( 107 ± 9.1 )	10 10 15 ( 12 ± 2.9 )	NT	39 49 44 ( 44 ± 5.0 )	18 22 14 ( 18 ± 4.0 )	
	156	99 92 97 ( 96 ± 3.6 )	5 6 8 ( 6 ± 1.5 )	NT	39* 35* 35* ( 36 ± 2.3 )	10* 13* 15* ( 13 ± 2.5 )	
	313	81* 109* 90* ( 93 ± 14.3 )	12 7 13 ( 11 ± 3.2 )	42 32 35 ( 36 ± 5.1 )	34* 30* 35* ( 33 ± 2.6 )	13* 22* 17* ( 17 ± 4.5 )	
	625 #	NT	17 8 12 ( 12 ± 4.5 )	19 33 28 ( 27 ± 7.1 )	NT	NT	
	1250 #	NT	12* 6* 10* ( 9 ± 3.1 )	36 36 19 ( 30 ± 9.8 )	NT	NT	
	2500 #	NT	NT	30 34 21 ( 28 ± 6.7 )	NT	NT	
	5000 #	NT	NT	32 24 30 ( 29 ± 4.2 )	NT	NT	
	S9Mix (+)	陰性対照 (アセトン)	129 103 139 ( 124 ± 18.6 )	10 8 12 ( 10 ± 2.0 )	38 35 35 ( 36 ± 1.7 )	40 55 53 ( 49 ± 8.1 )	18 14 19 ( 17 ± 2.6 )
		313	139 118 123 ( 127 ± 11.0 )	6 10 8 ( 8 ± 2.0 )	43 36 31 ( 37 ± 6.0 )	42 47 47 ( 45 ± 2.9 )	17 21 22 ( 20 ± 2.6 )
		625	111 98 109 ( 106 ± 7.0 )	6 8 14 ( 9 ± 4.2 )	35 43 46 ( 41 ± 5.7 )	47 48 62 ( 52 ± 8.4 )	13 11 21 ( 15 ± 5.3 )
1250 #		104 108 116 ( 109 ± 6.1 )	12 9 13 ( 11 ± 2.1 )	31 43 42 ( 39 ± 6.7 )	40 49 60 ( 50 ± 10.0 )	24 18 21 ( 21 ± 3.0 )	
2500 #		132 124 132 ( 129 ± 4.6 )	15 7 6 ( 9 ± 4.9 )	32 44 44 ( 40 ± 6.9 )	48 36 54 ( 46 ± 9.2 )	11 15 32 ( 19 ± 11.2 )	
5000 #		136 117 125 ( 126 ± 9.5 )	11 12 8 ( 10 ± 2.1 )	30 24 38 ( 31 ± 7.0 )	23 32 47 ( 34 ± 12.1 )	17 17 17 ( 17 ± 0.0 )	
陽性対照	名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191	
	S9Mixを必要としな いもの 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	520 459 497 ( 492 ± 30.8 )	275 232 335 ( 281 ± 51.7 )	88 91 79 ( 86 ± 6.2 )	408 418 416 ( 414 ± 5.3 )	1897 1914 1568 ( 1793 ± 195.0 )	
	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P	
S9Mixを必要とする もの 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	788 848 703 ( 780 ± 72.9 )	329 328 354 ( 337 ± 14.7 )	947 961 1035 ( 981 ± 47.3 )	265 303 293 ( 287 ± 19.7 )	92 88 89 ( 90 ± 2.1 )		

(備考)

AF-2 : 2-(2-フルル)-3-(5-ニトロ-2-フルル)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)アミノプロピルアミノ]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

# : 被験物質の沈澱が認められたことを示す。

\* : 被験物質の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。

図 1

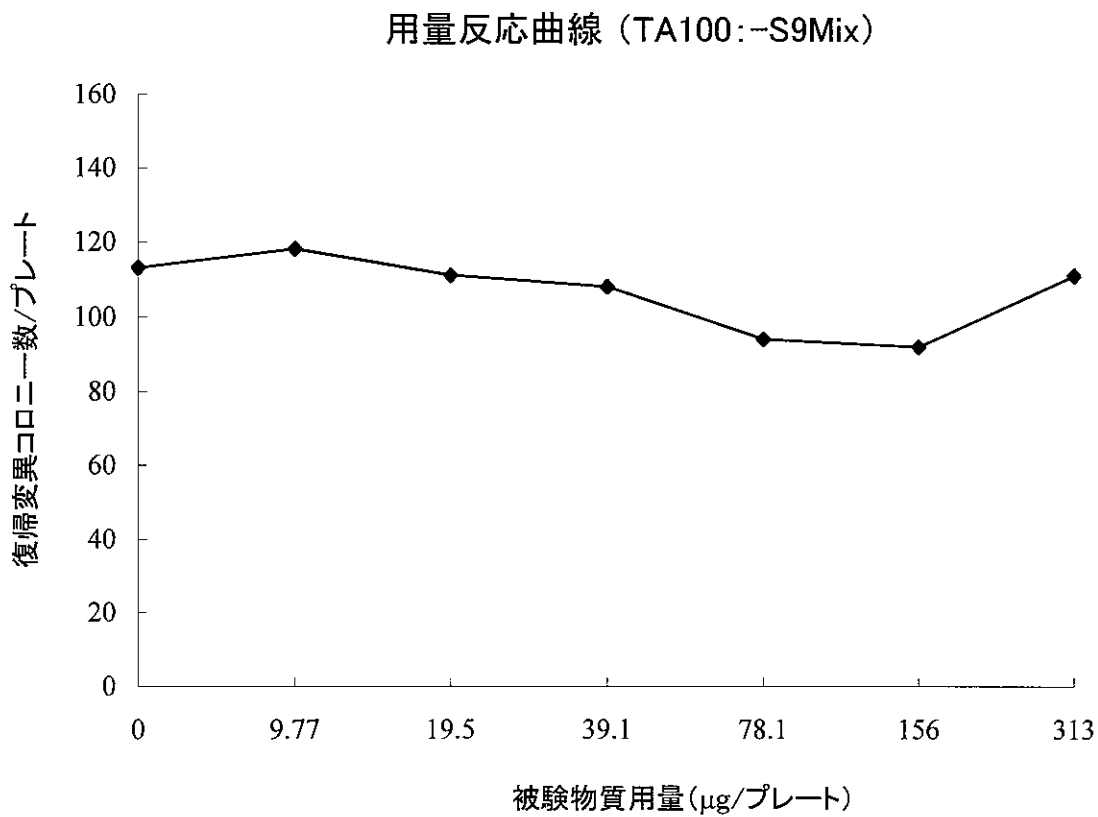


図 2

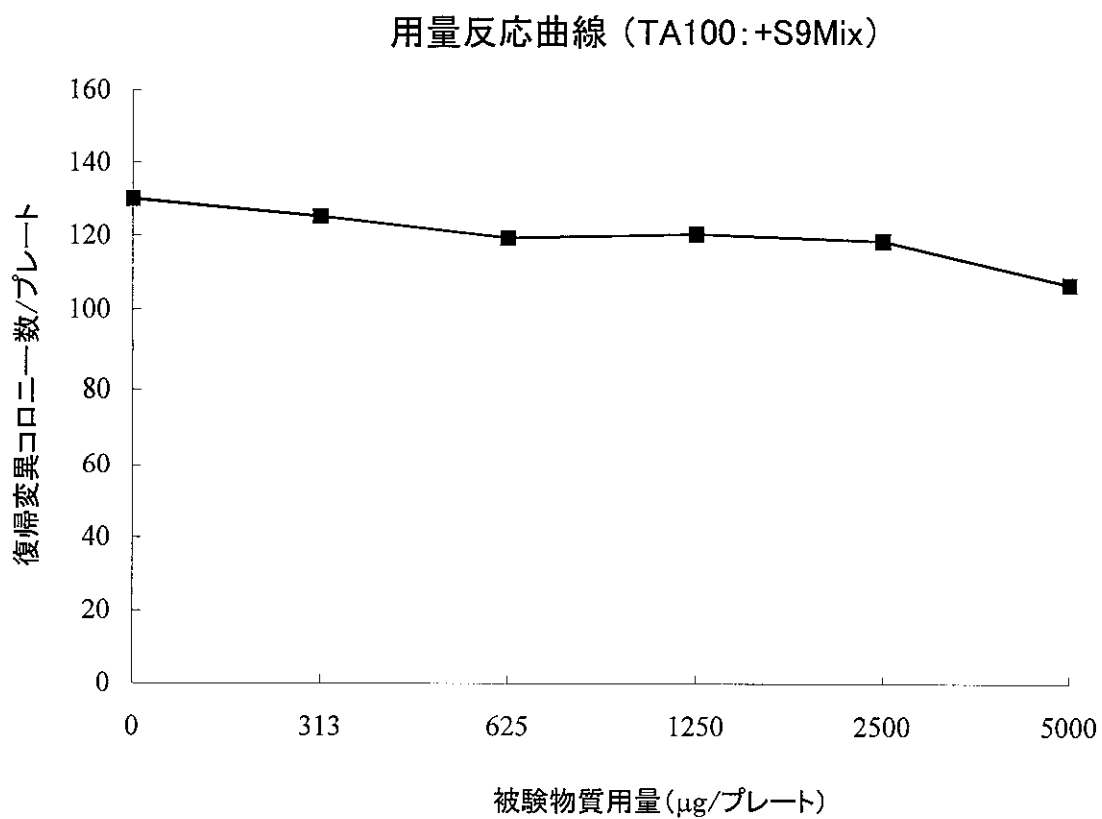


図 3

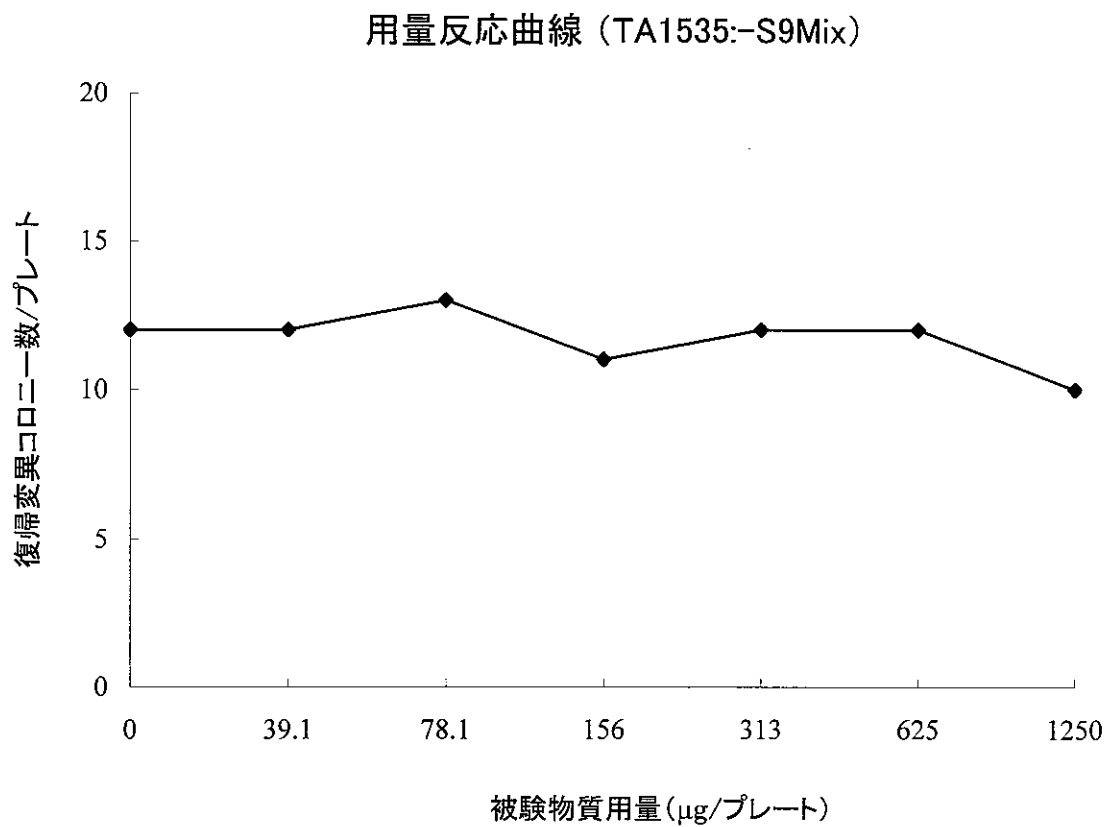


図 4

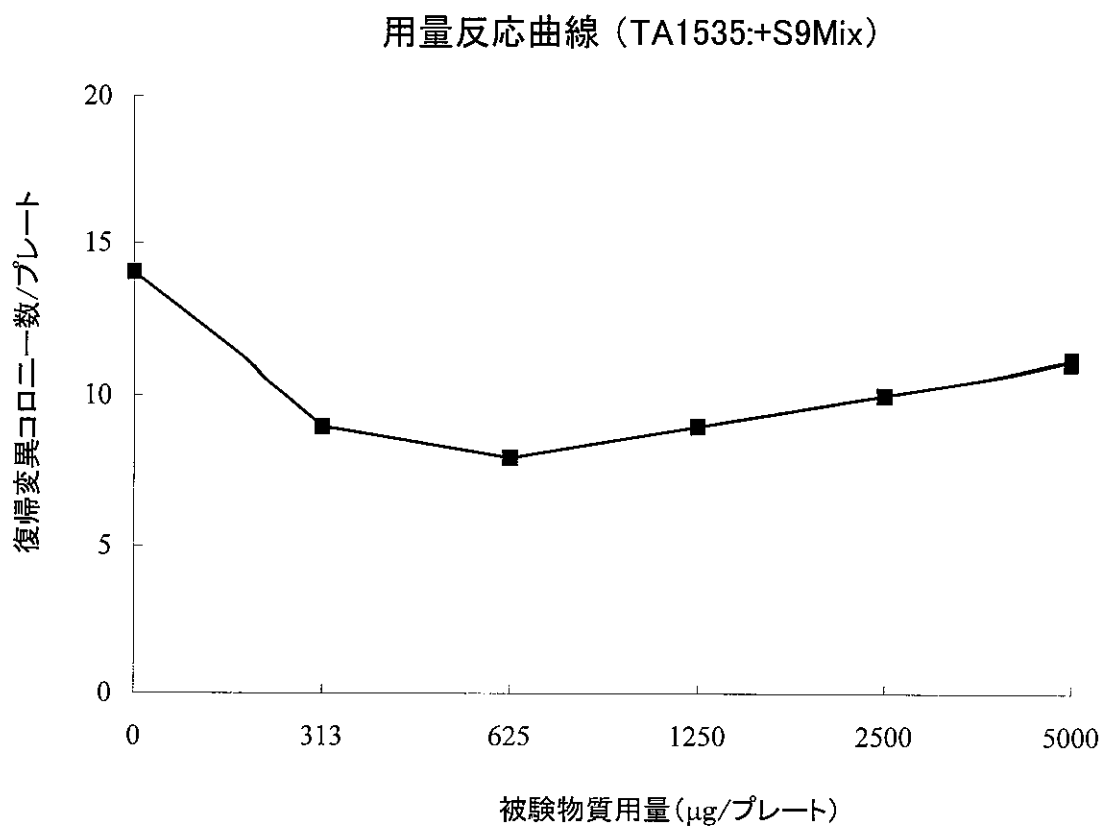


図 5

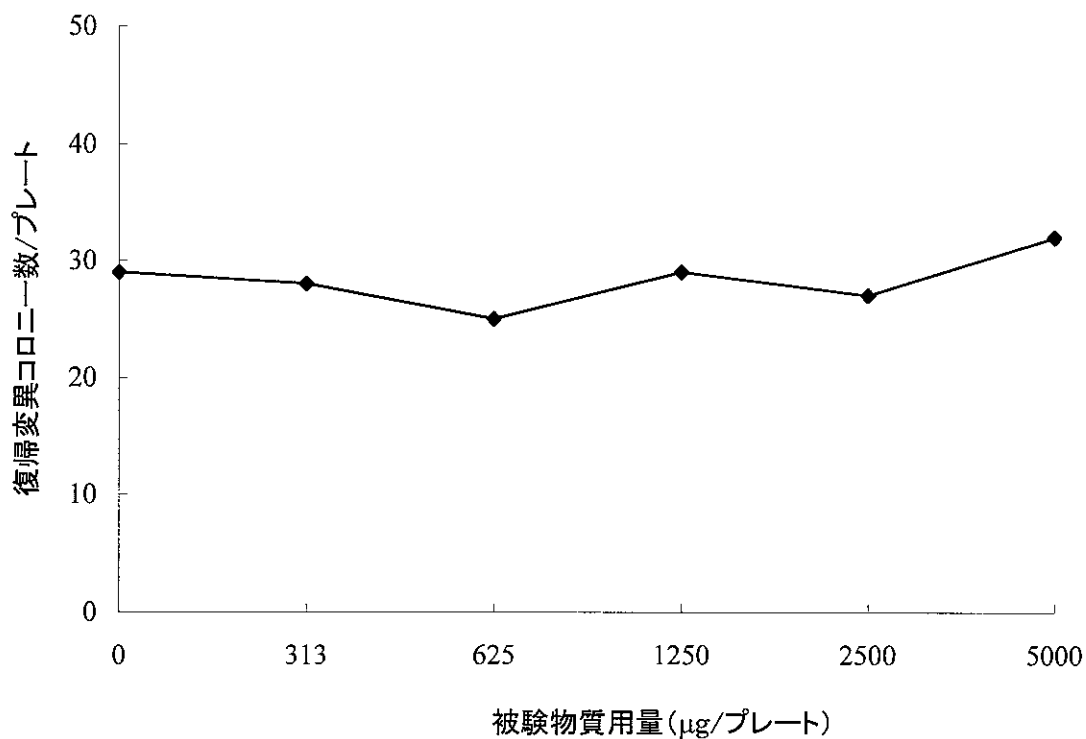
用量反応曲線 (WP2 $uvrA$ :-S9Mix)

図 6

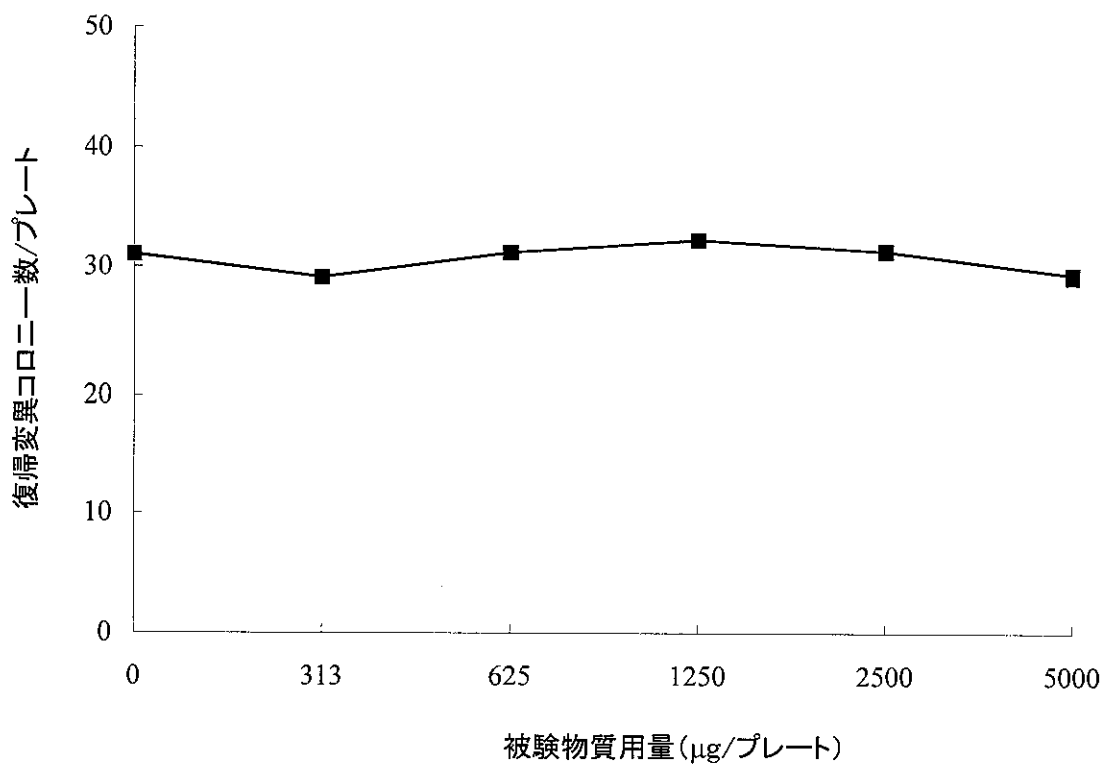
用量反応曲線 (WP2 $uvrA$ :+S9Mix)

図 7

用量反応曲線 (TA98:-S9Mix)

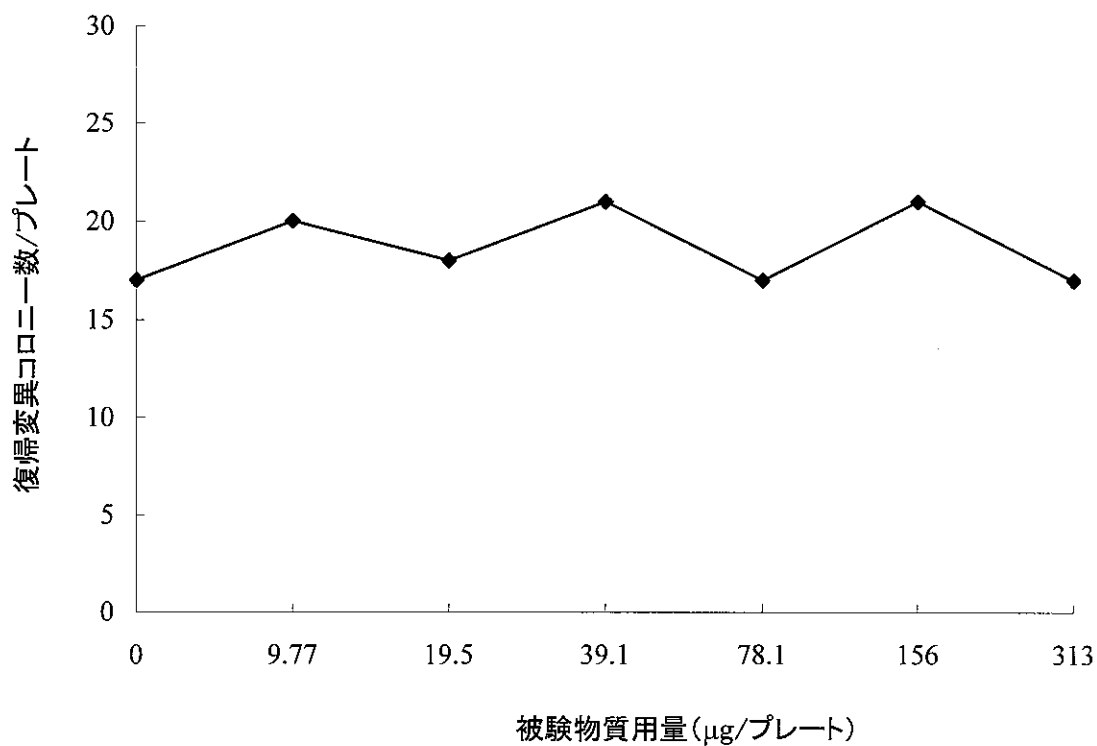


図 8

用量反応曲線 (TA98:+S9Mix)

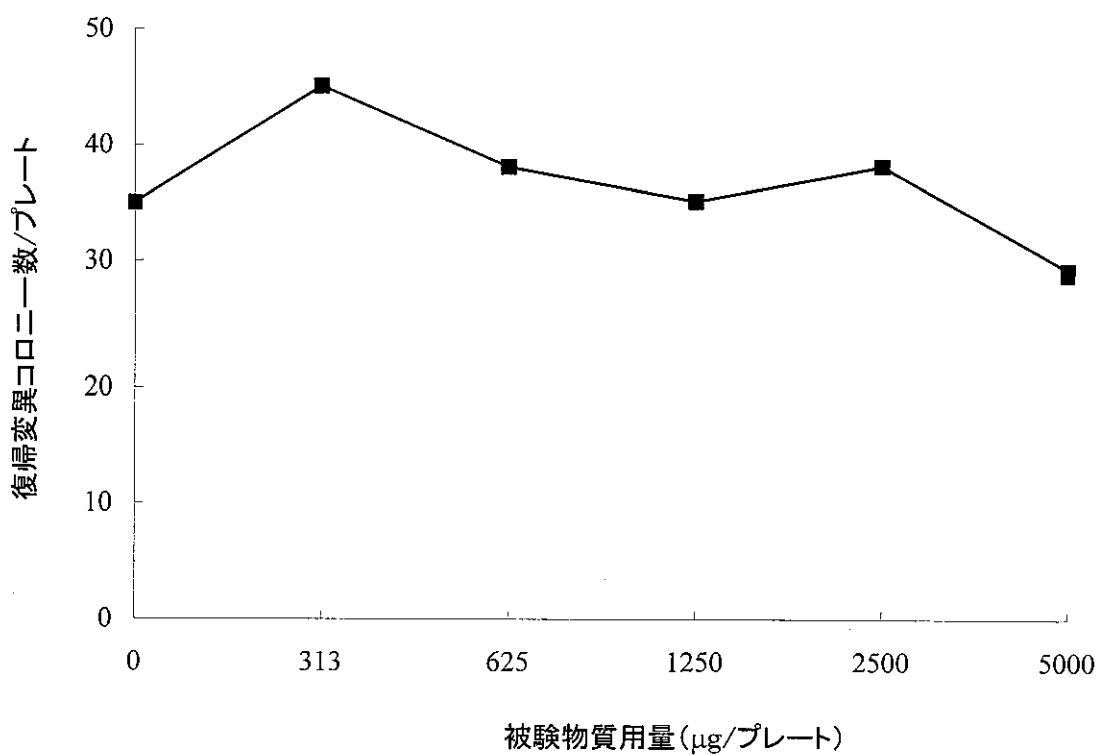


図 9

用量反応曲線 (TA1537:-S9Mix)

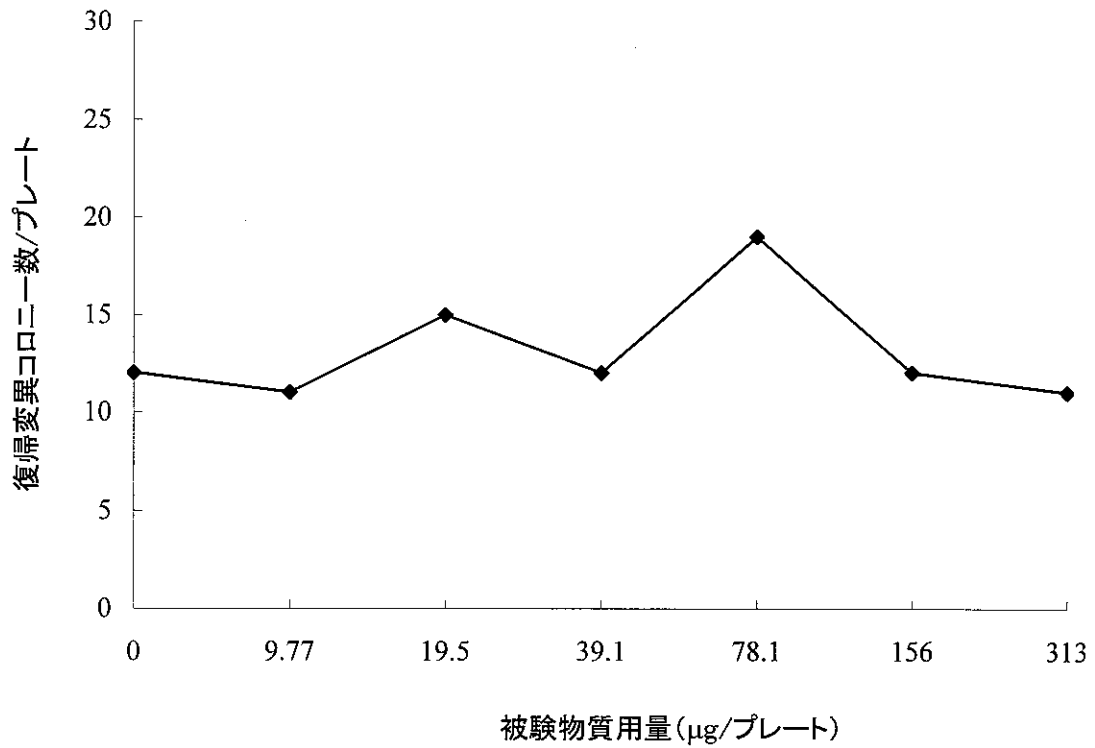


図 10

用量反応曲線 (TA1537:+S9Mix)

