

2-メチル-1-フェニルプロパン-2-イル=アセタートの  
細菌を用いる復帰突然変異試験  
報告書

試験番号 6414

2017年1月24日

## 目 次

項 目	ページ
表題	i
試験の目的	i
GLP の対応	i
試験ガイドラインの対応	i
試験委託者	i
試験施設の名称及び所在地	i
試験日程	ii
業務分担	ii
試資料の保管	iii
試験責任者の署名、捺印及び日付	iii
運営管理者及び試験責任者陳述書	iv
信頼性保証証明書	v
本文	vi

## 表題

2-メチル-1-フェニルプロパン-2-イル=アセタートの細菌を用いる復帰突然変異試験

## 試験の目的

2-メチル-1-フェニルプロパン-2-イル=アセアート(被験物質番号:4363)の細菌に対する復帰突然変異原性の有無をプレインキュベーション法を用いて検索した。

## GLP の対応

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日付け、薬食発第0331008号厚生労働省医薬食品局長、平成23・03・29製局第6号経済産業省製造産業局長、環境企発第110331010号環境省総合環境政策局長通知)に準拠し実施した。

## 試験ガイドラインの対応

試験は、「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日付け薬食発第0331007号厚生労働省医薬食品局長、平成23・03・29製局第5号経済産業省製造産業局長、環境企発第110331009号環境省総合環境政策局長通知 最終改正平成27年12月21日)の「細菌を用いる復帰突然変異試験」により代謝活性化の有無でプレインキュベーション法を用いて実施した。

## 試験委託者

厚生労働省 医薬・生活衛生局 医薬品審査管理課 化学物質安全対策室  
東京都千代田区霞が関1-2-2

## 試験施設の名称及び所在地

独立行政法人労働者健康安全機構 日本バイオアッセイ研究センター  
神奈川県秦野市平沢 2445 番地

試験日程

被験物質入手	2016年 8月25日
試験開始	2016年11月14日
用量設定試験用菌前培養	2016年11月21日
用量設定試験（アッセイ）	2016年11月22日
用量設定試験（コロニーカウント）	2016年11月24日
本試験用菌前培養	2016年11月28日
本試験（アッセイ）	2016年11月29日
本試験（コロニーカウント）	2016年12月 1日
試験終了	2017年 1月24日

試験期間	2016年11月14日 ～ 2017年 1月24日
復帰突然変異試験実施期間	2016年11月21日 ～ 2016年12月 1日

業務分担

運 営 管 理 者	職 氏 名	所長	
運 営 管 理 者 代 行 (2016年11月12日から 2016年11月18日まで)	職 氏 名	管理課長	
試 験 責 任 者	職 氏 名	病理検査部 遺伝毒性試験室	
	経 験 年 数	19年 5ヶ月	
試 験 担 当 者	職 氏 名	病理検査部 遺伝毒性試験室	
	経 験 年 数	25年 11ヶ月	

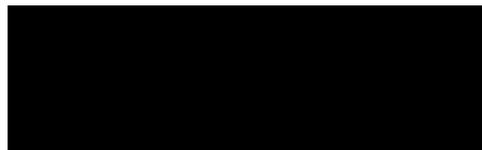
### 試資料の保管

試験計画書、生データ、記録文書、報告書、信頼性保証証明書、被験物質その他試験に係る試資料は、日本バイオアッセイ研究センターの標準操作手順書に従って、試資料保管施設に保管する。なお、被験物質は約1gを保管し、残りは廃棄する。

保管期間は、試験終了後10年間とする。なお、この期間にあっても被験物質については品質が評価に耐え得る期間とする。

### 試験責任者の署名、捺印及び日付

試験責任者



陳 述 書

試験番号：6414

試験名：2-メチル-1-フェニルプロパン-2-イル=アセタートの細菌を用いる復帰突然変異試験

記

上記試験は、「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日付け、薬食発第0331008号厚生労働省医薬食品局長、平成23・03・29製局第6号経済産業省製造産業局長、環企発第110331010号環境省総合環境政策局長通知）に準拠し実施され、この報告資料はその試験結果に基づいてまとめられたものに相違ありません。

独立行政法人労働者健康安全機構  
日本バイオアッセイ研究センター

運営管理者

試験責任者

## 信頼性保証証明書

標 題 (表 題) 2-メチル-1-フェニルプロパン-2-イル=アセタートの  
細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号 6 4 1 4

被験物質の名称 2-メチル-1-フェニルプロパン-2-イル=アセタート

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 日付け、薬食発第 0331008 号厚生労働省医薬食品局長、平成 23・03・29 製局第 6 号経済産業省製造産業局長、環保企発第 110331010 号環境省総合環境政策局長通知に準拠し実施された。

最終報告書には、試験で使用した方法及び手順が正確に記載されており、報告結果は、試験の生データを正確に反映していることを認めます。

なお、監査・査察の実施日及び報告日は以下のとおりであります。

対 象	監査・査察実施日	運営管理者及び試験責任者への報告日
試験計画書	2016 年 11 月 14 日	2016 年 11 月 14 日
試験計画書(変更等)	2016 年 11 月 17 日	2016 年 11 月 17 日
試験の実施	2016 年 11 月 28, 29, 12 月 1 日	2016 年 12 月 1 日
被験物質の管理	2016 年 12 月 26 日	
データの取り扱い管理	2016 年 12 月 22～ 26 日	2016 年 12 月 26 日
最終報告書	2016 年 12 月 22～ 26 日	
	2017 年 1 月 24 日	2017 年 1 月 24 日

2017 年 1 月 24 日

信頼性保証責任者

所 属 独立行政法人 労働者健康安全機構

日本バイオアッセイ研究センター

職 名 信頼性保証主管

氏 名



細菌を用いる復帰突然変異試験  
報告書

試験番号 6414

本 文

## 本文目次

項目	ページ
1 要約	1
2 材料	
2-1 被験物質	2
2-2 試験系	3
2-3 陽性対照物質	4
2-4 S9及びS9 mix	5
2-5 被験物質溶液の調製及び陰性対照に使用した溶媒(溶媒対照)	6
2-6 培地及び前培養の条件	6
3 試験方法	
3-1 採用した試験方法とその理由	8
3-2 プレインキュベーション法の手順	8
3-3 コロニー数の算定方法	9
3-4 生育阻害の有無の確認方法	9
3-5 試験の構成及び内容	9
3-6 無菌試験	10
3-7 被験物質の沈殿の有無の確認方法	10
3-8 細菌を用いる復帰突然変異試験結果の解析方法(判定方法)	10
3-9 数値の取扱い	11
4 試験成績及び考察	
4-1 細菌を用いる復帰突然変異試験の結果	11
4-2 無菌試験	11
4-3 生育阻害の有無	11
4-4 被験物質の沈殿の有無	11
4-5 陰性対照(溶媒対照)値及び陽性対照値	12
5 結果の判定	13
6 試験の信頼性に影響を及ぼした事態及び試験計画書に従わなかったこと	13
7 参考文献	13
試験結果表 表-1、2	14、15
試験結果図 図-1～10	16～18

## 1 要約

試験は、2-メチル-1-フェニルプロパン-2-イル=アセタートの細菌に対する復帰突然変異原性の有無を検索することを目的とした。

試験菌株はネズミチフス菌TA98、TA100、TA1535、TA1537及び大腸菌WP2*uvrA*/pKM101の5菌株とし、試験方法としてプレインキュベーション法を用い、直接法による場合(-S9 mix)及び代謝活性化法による場合(+S9 mix)で試験を実施した。

用量設定試験を最高用量5000  $\mu$ g/プレートより公比4の7用量で実施したところ、TA98、TA100、TA1535、TA1537及びWP2*uvrA*/pKM101の直接法による場合及び代謝活性化法による場合のいずれにおいても、陰性対照(溶媒対照)値の2倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。生育障害はすべての菌株の直接法による場合及び代謝活性化法による場合の313  $\mu$ g/プレート以上の用量でみられた。

最高用量313  $\mu$ g/プレートより公比2の7用量で本試験を実施したが、TA98、TA100、TA1535、TA1537及びWP2*uvrA*/pKM101の直接法による場合及び代謝活性化法による場合のいずれにおいても、陰性対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

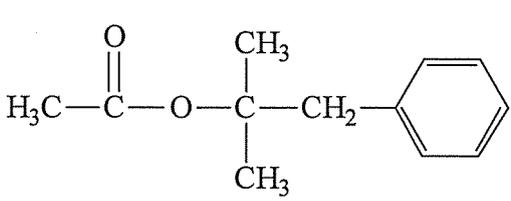
陽性対照物質は、それぞれの試験菌株において陰性対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数を誘発した。また、陰性対照値及び陽性対照値は、当センターのヒストリカルデータより作成した基準の範囲内であった。これらの結果は試験が適切に実施されたことを示している。

以上の結果より、2-メチル-1-フェニルプロパン-2-イル=アセタートの細菌に対する復帰突然変異原性は、陰性と判定した。

## 2 材料

## 2-1 被験物質

## 2-1-1 被験物質の性質(被験物質番号: 4363)

化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	2-メチル-1-フェニルプロパン-2-イル=アセタート		
別 名	1,1-Dimethyl-2-phenylethyl Acetate		
構造式又は示性式 (構造が単一で示せない場合はその組成)			
試験に供した 化学物質の純度	99.9%(GC)	試験に供した 化学物質の Lot No.	AF01
不純物の名称及び 含有率(濃度)	-		
C A S 番 号	151-05-3	蒸 気 圧	-
分 子 量	192.26	分 配 係 数 (1-オクタノール/水分配係数)	-
融 点	33.0°C		
沸 点	-	常温における性状	白色~透明の固体
安 定 性	水:- 光:- 熱:-		
溶媒に対する溶解度等	溶 媒	溶 解 度	溶 媒 中 の 安 定 性
	水	難溶[50mg/ml 未満]*	-
	DMSO	溶解[100mg/ml 以上]*	-
供 試 元	東京化成工業株式会社		

\*当センターの試験による。

## 2-1-2 保管及び取扱い

被験物質は、被験物質保管区域の冷蔵庫に遮光して保管した。被験物質の取り扱いは黄色灯下で行った。

## 2-2 試験系

## 2-2-1 試験に用いた菌株

試験には、ネズミチフス菌<sup>1)</sup>TA100、TA1535、TA98、TA1537及び大腸菌<sup>2)</sup>WP2uvrA/pKM101の5菌株を用いた。

## 2-2-2 選定理由

従来から、細菌を用いる復帰突然変異試験（微生物を用いる変異原性試験）に広く使用されているほか、「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日付け薬食発第0331007号厚生労働省医薬食品局長、平成23・03・29製局第5号経済産業省製造産業局長、環境企発第110331009号環境省総合環境政策局長通知 最終改正平成27年12月21日）の「細菌を用いる復帰突然変異試験」に規定されている。

## 2-2-3 入手方法

菌株名	入手先	入手年月日	試験に使用する保存ロットの特性検査日
TA100	東京大学医科学研究所 癌生物学研究部	1985年 6月21日	2014年 6月 4日
TA1535	同 上	1988年 5月16日	2014年 6月 4日
TA98	同 上	1988年 5月16日	2014年 6月 4日
TA1537	同 上	1988年 5月16日	2014年 6月11日
WP2uvrA/ pKM101	同 上	1983年 6月29日	2014年 6月11日

## 2-2-4 保存方法

保存温度	組 成	
-80℃	菌懸濁液	0.8 ml
	DMSO	0.07 ml

保存する菌株は、あらかじめ遺伝的性質(特性)を調べて菌の性質が適切であることを確認した。保存は、菌懸濁液0.8 ml に DMSO 0.07 mlの割合で混合した菌液を200  $\mu$ lずつ凍結用チューブに分注し、アセトンドライアイス冷媒で凍結した後、-80℃(三洋電機株式会社 MDF-392AT)で保存した。前培養のために一度解凍した保存菌液は再使用せず廃棄した。

## 2-3 陽性対照物質

## 2-3-1 陽性対照物質と陽性対照物質を溶解した溶媒

物質名	製造元	Lot No.	グレード	純度 (%)	溶媒名	
陽性対照物質	ナトリウム・アジド (NaN <sub>3</sub> )	和光純薬工業株式会社	TSK 3329	試薬特級	98	DMSO
	9-アミノアクリジン (9-AA)	Aldrich Chemical Co., Inc.	S30507-336	—	98	DMSO
	2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリアミド (AF-2)	和光純薬工業株式会社	WKK 3086	和光特級	> 98.0	DMSO
	2-アミノアントラセン (2-AA)	和光純薬工業株式会社	TLH 6618	—	98.7	DMSO
溶媒	ジメチルスルホキシド (DMSO)	SIGMA-ALDRICH Co.	SHBF0107V	—	≥99.9	

## 2-3-2 使用した陽性対照物質の保存及び取扱い

陽性対照物質は、暗所に冷蔵保存した。DMSOで調製した陽性対照物質溶液は500 μlずつ凍結用チューブに分注し、-40℃で保存した。試験のために解凍した陽性対照物質溶液の残りは再使用せず廃棄した。

## 2-3-3 使用した陽性対照物質の名称及び用量

直接法による場合		
菌株名	陽性対照物質	用量 (μg/プレート)
TA100	AF-2	0.01
TA1535	NaN <sub>3</sub>	0.5
TA98	AF-2	0.1
TA1537	9-AA	80
WP2uvrA/ pKM101	AF-2	0.005

代謝活性化法による場合		
菌株名	陽性対照物質	用量 (μg/プレート)
TA100	2-AA	1
TA1535	2-AA	2
TA98	2-AA	0.5
TA1537	2-AA	2
WP2uvrA/ pKM101	2-AA	2

## 2-4 S9及びS9 mix

## 2-4-1 S9の入手方法等

自製・購入の別	1. 自製 ②. 購入 (製造元: キッコーマンバイオケミファ株式会社)
製造年月日	2016年9月9日製造
購入の場合のLot No.	RAA201609A
保存温度	-80°C (保存機器名 三洋電機株式会社 MDF-392AT)
タンパク質含有量	21.28mg/ml
購入年月日	2016年10月5日購入

S9は製造後6ヶ月以内のものを試験に使用した。

## 2-4-2 S9の調製方法

使用動物		誘導物質 <sup>3)</sup>	
種・系統	ラット・ Sprague-Dawley (Slc:SD)	名 称	フェノバルビタール (PB) 及び 5,6-ベンゾフラボン (BF)
性	雄		
週 齢	7 週	投 与 方 法	腹 腔 内 投 与
体 重	184~227 g	投与期間及び投与量 (g/kg体重)	1日目(投与開始日) : PB 0.03 2日目~4日目 : PB 0.06 3日目 : BF 0.08

フェノバルビタール投与開始後5日目の動物の肝臓を、3倍量の0.15 M KClでホモジナイズして、9000Gで10分間遠心分離した上清をS9として調製したものを購入して使用した。

## 2-4-3 S9 mixの組成

成 分	S9 mix 1 ml中の量	成 分	S9 mix 1 ml中の量
S9	0.1 ml	NADPH	4 $\mu$ mol
MgCl <sub>2</sub>	8 $\mu$ mol	NADH	4 $\mu$ mol
KCl	33 $\mu$ mol	Na-リン酸緩衝液	100 $\mu$ mol
グルコース-6-リン酸	5 $\mu$ mol	その他 ( - )	-

上記の組成でS9 mixを試験ごとに当センターで調製した。

## 2-5 被験物質溶液の調製及び陰性対照に使用した溶媒(溶媒対照)

使用溶媒	名 称	製 造 元	Lot No.	グレード	純度(%)
	ジメチルスルホキシド (DMSO)	SIGMA-ALDRICH Co.	SHBF0107V	anhydrous	99.99
溶媒選択の理由	被験物質の溶解度は、水に 50 mg/ml 未満であるが、DMSO に 100 mg/ml [被験物質溶液量をプレート当たり 50 $\mu$ l にした場合に 5000 $\mu$ g の被験物質に相当する] 以上であり、被験物質に DMSO を加えた際に、発色、発泡、発熱等の変化は見られなかったことから溶媒に DMSO を選択した。				
被験物質溶液の性状	溶解 懸濁 その他 ( )				
被験物質が難溶性の場合における懸濁等の方法	—				
溶液の調製から使用までの保存時間と温度	用量設定試験	15分、	25℃		
	本試験	15分、	25℃		
純度換算の有無	有			無	
被験物質の溶媒中での安定性	被験物質の DMSO 中での安定性は不明であるが、被験物質に DMSO を加えた際に、発色、発泡、発熱等の変化は見られなかった。				
調製の方法	被験物質に DMSO を加え溶解させた。調製は黄色灯下で実施した。				

## 2-6 培地及び前培養の条件

## 2-6-1 前培養の条件

ニュートリエントブロス	名 称	製 造 元	Lot No.
	Oxoidニュートリエントブロス No.2	OXOID LTD.	941971
前 培 養 時 間	10時間00分		
培養容器(形状・容量)	形 状：三角フラスコ 容 量：62.5 ml		
培 養 液 量	15 ml	接 種 菌 量	30 $\mu$ l
保存菌株の接種から振とう培養までの保存時間と温度	用量設定試験	10時間 30分、	7℃
	本試験	10時間 30分、	7℃
振とう培養終了から使用までの保存時間と温度	用量設定試験	30分、	25℃
	本試験	1時間 00分、	25℃
振とう培養装置の型式及び製造元	型式：XY-80 製造元：タイテック株式会社		
振とう方法(振とう形式・振とう数等)	振とう形式：旋回 旋回数：120 回/分 旋回直径：3 cm		



## 3 試験方法

## 3-1 採用した試験方法とその理由

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日付け、薬食発第0331008号厚生労働省医薬食品局長、平成23・03・29製局第6号経済産業省製造産業局長、環境企発第110331010号環境省総合環境政策局長通知）に従い、代謝活性化の有無でプレインキュベーション法<sup>4)</sup>を用いて実施した。

なお、ガイドラインに指定されたプレート法とプレインキュベーション法では、一般的にプレインキュベーション法の方が感度良く被験物質の変異原性を検出できる<sup>4,5)</sup>と考えられるため、プレインキュベーション法を用いた。

## 3-2 プレインキュベーション法の手順

被験物質溶液又は溶媒 0.05ml 若しくは陽性対照物質溶液 0.05ml と S9 mix あるいは 0.1M Na-リン酸緩衝液 0.5ml と菌懸濁液 0.1ml を試験管に入れ、よく混合し、37℃で20分間、恒温振とう水槽(ヤマト科学株式会社 BW200+BF500)中で振とうした(プレインキュベーション)。プレインキュベーションした後、2ml のトップアガーを加え、直ちに最少グルコース寒天平板培地(プレート)上に広げて固めた。以上の操作は黄色灯下で実施した。固化したプレートの上下を転倒し、37℃で48時間、恒温培養器(ヤマト科学株式会社 IN-81)で、遮光して培養した後、試験菌株の生育阻害状況を調べ復帰突然変異コロニー数を測定した。

## プレインキュベーション法

組 成 (プレート当たり)	菌懸濁液	0.1 ml
	被 験 物 質 溶 液	0.05 ml
	Na-リン酸緩衝液(直接法による場合)	0.5 ml
	S9 mix(代謝活性化法による場合)	0.5 ml
	トップアガー	2 ml
	そ の 他	—
プレインキュベーション	温 度	37 ℃
	時 間	20 分
インキュベーション	温 度	37 ℃
	時 間	48 時間

## 3-3 コロニー数の算定方法

計測方法	1. マニュアル計測      ② 機器計測
補正の有無	1. 無      ② 有      (補正の方法 面積及び数え落とし補正)
計測方法の1と2を併用した理由	—
測定機器・型式・製造元	測定機器名：自動コロニーカウンター 型式：CA-90S      製造元：東洋測器株式会社

機器計測を用いた場合は、面積補正と数え落とし補正をパーソナルコンピュータ(HP社 PY-H-AT492AV-BYJG)を用いて実施した。

## 3-4 生育阻害の有無の確認方法

実体顕微鏡(日本光学工業株式会社 SMZ-10)を用い、40倍ですべてのプレートについて観察した。被験物質処理したプレートを陰性対照(溶媒対照)のプレートと比較し、アミノ酸要求性の微細なコロニー(バックグラウンドローン)の数が減少するか、減少して大きくなる場合に生育阻害があると判定した。

## 3-5 試験の構成及び内容

## 3-5-1 試験の構成

試験は用量設定試験及び本試験から構成され、各々の使用菌株、方法及び代謝活性化の有無は以下の通りである。

## 用量設定試験、本試験

使用菌株	TA98、TA100、TA1535、TA1537、WP2 $uvrA$ /pKM101
試験方法	プレーンキュベーション法
代謝活性化の有無	直接法による場合及び代謝活性化法による場合

## 3-5-2 試験におけるプレート数等

## 用量設定試験、本試験

区分	被験物質処理群	陽性対照群	溶媒対照群
直接法による場合	2枚	2枚	4枚
代謝活性化法による場合	2枚	2枚	4枚

なお、試験はS9 mixを加えた場合(代謝活性化法による場合)と加えない場合(直接法による場合)とを連続して行った。

## 3-5-3 用量設定及びその理由

用量設定試験を最高用量5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ より公比4の7用量で実施し、その結果を表-1に示した。

用量設定試験の結果、ネズミチフス菌TA98、TA100、TA1535、TA1537及び大腸菌WP2*uvrA*/pKM101の直接法による場合(-S9 mix)及び代謝活性化法による場合(+S9 mix)のいずれにおいても陰性対照(溶媒対照)値の2倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。生育阻害はすべての菌株の直接法による場合及び代謝活性化法による場合の313  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量でみられた。

以上より、本試験の用量は、最高用量313  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とし、公比2の7用量とした。

菌株名	S9の有無	本試験の用量設定 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )
TA98	無	313、156、78.1、39.1、19.5、9.77、4.88
	有	313、156、78.1、39.1、19.5、9.77、4.88
TA100	無	313、156、78.1、39.1、19.5、9.77、4.88
	有	313、156、78.1、39.1、19.5、9.77、4.88
TA1535	無	313、156、78.1、39.1、19.5、9.77、4.88
	有	313、156、78.1、39.1、19.5、9.77、4.88
TA1537	無	313、156、78.1、39.1、19.5、9.77、4.88
	有	313、156、78.1、39.1、19.5、9.77、4.88
WP2 <i>uvrA</i> / pKM101	無	313、156、78.1、39.1、19.5、9.77、4.88
	有	313、156、78.1、39.1、19.5、9.77、4.88

## 3-6 無菌試験

調製したS9 mix溶液及び被験物質溶液(試験に用いた最高用量について実施)を試験に使用したものと同量を最少グルコース寒天平板培地に軟寒天溶液で重層し、37°Cで48時間培養して菌の生育の有無を目視で確認した。

## 3-7 被験物質の沈殿の有無の確認方法

復帰変異コロニーの計数時に肉眼による観察を被験物質処理したすべてのプレートに対して行った。

## 3-8 細菌を用いる復帰突然変異試験結果の解析方法(判定方法)

被験物質の用量の増加とともに復帰突然変異コロニー数が増加し、かつ陰性対照(溶媒対照)の2倍以上に増加し、再現性の得られた場合に陽性とすることとした<sup>6)</sup>。上記の条件が満たされない場合は、陰性とすることとした。データ解析のための統計学的手法は用いなかった。

## 3-9 数値の取扱い

報告書中のコロニー数は実数で表示し、平均値は小数点以下を四捨五入して表示した。

## 4 試験成績及び考察

## 4-1 細菌を用いる復帰突然変異試験の結果

用量設定試験の結果を表-1に、本試験の結果を表-2及び図-1～10に示した。

用量設定試験を最高用量5000  $\mu$ g/プレートより公比4の7用量で実施したところ、TA98、TA100、TA1535、TA1537及び WP2uvrA/pKM101の直接法による場合及び代謝活性化法による場合のいずれにおいても、陰性対照(溶媒対照)値の2倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。生育阻害はすべての菌株の直接法による場合及び代謝活性化法による場合の313  $\mu$ g/プレート以上の用量でみられた。

最高用量313  $\mu$ g/プレートより公比2の7用量で本試験を実施したが、TA98、TA100、TA1535、TA1537及び WP2uvrA/pKM101の直接法による場合及び代謝活性化法による場合のいずれにおいても、陰性対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

陽性対照物質は、それぞれの試験菌株において陰性対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数を誘発した。また、陰性対照値及び陽性対照値は、当センターのヒストリカルデータより作成した基準の範囲内であった。これらの結果は試験が適切に実施されたことを示している。

以上の結果より、2-メチル-1-フェニルプロパン-2-イル=アセタートの細菌に対する復帰突然変異原性は、陰性と判定した。

## 4-2 無菌試験

区 分	菌の増殖の有無	
被験物質溶液	有	無
S9 mix	有	無

用量設定試験、本試験のいずれの試験においても被験物質溶液及び調製したS9 mix、並びに、全ての試験プレートに雑菌の混入は認められず、被験物質溶液及びS9 mixの調製は無菌的に実施された。

## 4-3 生育阻害の有無

生育阻害の有無	有	無
---------	---	---

生育阻害の認められた用量は、試験結果表に示した。

## 4-4 被験物質の沈殿の有無

沈殿の有無	有	無
-------	---	---

## 4-5 陰性対照(溶媒対照)値及び陽性対照値

陽性対照物質は、それぞれの菌株において陰性対照(溶媒対照)値の2倍以上の復帰変異コロニー数を誘発した。また、陰性対照(溶媒対照)値及び陽性対照値の平均値は当センターのヒストリカルデータより作成した基準値<sup>7)</sup>の範囲内(下記参照)であり、試験が適切に実施されたことを示した。

## 陰性対照値(溶媒対照値)

[2014年8月～2014年12月にプレインキュベーション法で実施した試験]

菌株名	S9の有無	ヒストリカルデータ			基準値
		試験数	平均値	標準偏差	
TA98	無	n=32	23	9	1～48
	有	n=33	25	7	6～44
TA100	無	n=32	111	13	75～146
	有	n=33	116	13	76～156
TA1535	無	n=33	10	2	4～16
	有	n=34	10	2	5～15
TA1537	無	n=33	12	3	5～20
	有	n=34	14	3	3～25
WP2uvrA/ pKM101	無	n=30	89	12	53～124
	有	n=31	106	14	70～142

## 陽性対照値 [2014年8月～2014年12月にプレインキュベーション法で実施した試験]

菌株名	陽性対照物質(用量)			S9の有無	ヒストリカルデータ			基準値
					試験数	平均値	標準偏差	
TA98	AF-2	0.1	$\mu\text{g}/\text{プレート}$	無	n=32	495	57	330～661
	2-AA	0.5	$\mu\text{g}/\text{プレート}$	有	n=33	514	45	401～628
TA100	AF-2	0.01	$\mu\text{g}/\text{プレート}$	無	n=32	684	64	505～862
	2-AA	1.0	$\mu\text{g}/\text{プレート}$	有	n=33	1453	115	1103～1803
TA1535	NaN <sub>3</sub>	0.5	$\mu\text{g}/\text{プレート}$	無	n=33	331	27	260～402
	2-AA	2.0	$\mu\text{g}/\text{プレート}$	有	n=34	286	18	248～324
TA1537	9-AA	80	$\mu\text{g}/\text{プレート}$	無	n=33	610	96	333～886
	2-AA	2.0	$\mu\text{g}/\text{プレート}$	有	n=34	244	31	160～328
WP2uvrA/ pKM101	AF-2	0.005	$\mu\text{g}/\text{プレート}$	無	n=30	1030	183	387～1673
	2-AA	2.0	$\mu\text{g}/\text{プレート}$	有	n=31	813	71	630～996

## 5 結果の判定

2-メチル-1-フェニルプロパン-2-イル=アセタートの細菌に対する復帰突然変異原性は、陰性と判定した。

## 6 試験の信頼性に影響を及ぼした事態及び試験計画書に従わなかったこと

試験の信頼性に影響を及ぼした事態はなかった。試験計画書 7ページ 13 陽性対照物質 (1) 陽性対照物質と陽性対照物質を溶解する溶媒の表中 溶媒の Lot No. 「SHBB3671V」は誤記載で、正しくは「SHBF0107V」であった。

## 7 参考文献

- 1) Maron, D.M. and Ames, B.N.  
Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 113, 173-215 (1983)
- 2) Green, M.H.L. and Muriel, W.J.  
Mutagen testing using TRP<sup>+</sup> reversion in *Escherichia coli*. *Mutat. Res.*, 38, 3-32 (1976)
- 3) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T.  
A safe substitute for polychlorinated biphenyls as an inducer of metabolic activation system. In “In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing”, eds. F.J. de Serres, J.R. Fouts, J.R. Bend and R.M. Philpot, pp.85-88 (1976), Elsevier / North-Holland, Amsterdam.
- 4) Matsushima, T., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M.  
Factors modulating mutagenicity in microbial tests. In “Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens”, eds. K.H. Norpoth and R.C. Garner, pp.273-285 (1980), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- 5) Yahagi, T., Nagao, M., Seino, Y., Matsushima, T., Sugimura, T. and Okada, M.  
Mutagenicities of N-nitrosamines on *Salmonella*. *Mutat. Res.*, 48, 121-130 (1977)
- 6) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E.  
Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* /mammalian microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 31, 347-364 (1975)
- 7) 丹後俊郎著、臨床検査への統計学、pp.74-80、朝倉書店 (1986)

表-1

試験結果表（用量設定試験）

被験物質の名称：2-メチル-1-フェニルプロパン-2-イルニアセタート

試験実施期間		2016年11月21日から 2016年11月24日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	復帰変異数（コロニー数/プレート）					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2uvrA/pKM101	TA98	TA1537	
S9 mix (-)	陰性対照 (溶媒対照)	114 113 120 115 ( 116 )	13 10 8 7 ( 10 )	67 55 64 63 ( 62 )	23 20 21 24 ( 22 )	9 8 8 6 ( 8 )	
	1.22	123 116 ( 120 )	8 9 ( 9 )	76 64 ( 70 )	25 18 ( 22 )	2 8 ( 5 )	
	4.88	120 104 ( 112 )	7 8 ( 8 )	66 64 ( 65 )	28 16 ( 22 )	6 6 ( 6 )	
	19.5	115 115 ( 115 )	7 3 ( 5 )	84 67 ( 76 )	18 16 ( 17 )	10 8 ( 9 )	
	78.1	123 106 ( 115 )	6 13 ( 10 )	64 72 ( 68 )	17 15 ( 16 )	6 5 ( 6 )	
	313	0* 0* ( 0* )	0* 0* ( 0* )	0* 0* ( 0* )	0* 0* ( 0* )	0* 0* ( 0* )	
	1250	0* 0* ( 0* )	0* 0* ( 0* )	0* 0* ( 0* )	0* 0* ( 0* )	0* 0* ( 0* )	
	5000	0* 0* ( 0* )	0* 0* ( 0* )	0* 0* ( 0* )	0* 0* ( 0* )	0* 0* ( 0* )	
	S9 mix (+)	陰性対照 (溶媒対照)	135 120 108 116 ( 120 )	9 7 8 10 ( 9 )	90 78 70 93 ( 83 )	38 23 20 25 ( 27 )	8 6 6 8 ( 7 )
		1.22	111 128 ( 120 )	5 10 ( 8 )	71 68 ( 70 )	28 28 ( 28 )	6 6 ( 6 )
		4.88	112 113 ( 113 )	10 9 ( 10 )	78 74 ( 76 )	33 25 ( 29 )	10 5 ( 8 )
		19.5	120 105 ( 113 )	8 6 ( 7 )	84 78 ( 81 )	31 21 ( 26 )	9 3 ( 6 )
		78.1	131 134 ( 133 )	8 5 ( 7 )	71 79 ( 75 )	24 31 ( 28 )	5 7 ( 6 )
		313	0* 0* ( 0* )	0* 0* ( 0* )	0* 0* ( 0* )	0* 0* ( 0* )	0* 0* ( 0* )
1250		0* 0* ( 0* )	0* 0* ( 0* )	0* 0* ( 0* )	0* 0* ( 0* )	0* 0* ( 0* )	
5000		0* 0* ( 0* )	0* 0* ( 0* )	0* 0* ( 0* )	0* 0* ( 0* )	0* 0* ( 0* )	
陽性対照	S9 mixを必要としないもの	名称 AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2	9-AA	
	用量( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	0.01	0.5	0.005	0.1	80	
対照	S9 mixを必要とするもの	名称 2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	
	用量( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	1	2	2	0.5	2	
		コロニー数/プレート	650 639 ( 645 )	346 316 ( 331 )	831 816 ( 824 )	577 547 ( 562 )	364 440 ( 402 )
		コロニー数/プレート	1495 1605 ( 1550 )	262 249 ( 256 )	860 783 ( 822 )	626 602 ( 614 )	241 243 ( 242 )

〔備考〕

1. 菌の生育阻害が認められる場合は、該当する数値の右に\*印を付した。
2. ( ) 内には各プレートのコロニー数の平均値を記入した。
3. 復帰変異数は、被験物質用量の低い順に実測値及び平均値を記入した。
4. 陽性対照物質の名称 AF-2：2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、NaN<sub>3</sub>：ナトリウム・アジド、9-AA：9-アミノアクリジン、2-AA：2-アミノアントラセン

表-2

試験結果表 (本試験)

被験物質の名称：2-メチル-1-フェニルプロパン-2-イルニアセタート

試験実施期間		2016年11月28日から 2016年12月1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/pKM101	TA98	TA1537
S9 mix (-)	陰性対照 (溶媒対照)	102 109 91 120 ( 106 )	7 8 7 6 ( 7 )	59 49 55 54 ( 54 )	16 10 17 17 ( 15 )	7 8 7 7 ( 7 )
	4.88	96 106 ( 101 )	9 9 ( 9 )	51 48 ( 50 )	22 14 ( 18 )	2 9 ( 6 )
	9.77	89 108 ( 99 )	5 6 ( 6 )	57 54 ( 56 )	21 10 ( 16 )	9 5 ( 7 )
	19.5	89 107 ( 98 )	9 6 ( 8 )	61 57 ( 59 )	9 21 ( 15 )	5 3 ( 4 )
	39.1	105 112 ( 109 )	9 3 ( 6 )	62 69 ( 66 )	10 13 ( 12 )	5 3 ( 4 )
	78.1	93 89 ( 91 )	7 5 ( 6 )	46 59 ( 53 )	15 17 ( 16 )	3 9 ( 6 )
	156	0* 0* ( 0* )	0* 0* ( 0* )	0* 0* ( 0* )	0* 0* ( 0* )	0* 0* ( 0* )
	313	0* 0* ( 0* )	0* 0* ( 0* )	0* 0* ( 0* )	0* 0* ( 0* )	0* 0* ( 0* )
S9 mix (+)	陰性対照 (溶媒対照)	119 114 108 107 ( 112 )	11 7 7 10 ( 9 )	71 70 67 75 ( 71 )	16 17 16 26 ( 19 )	8 9 9 9 ( 9 )
	4.88	128 99 ( 114 )	6 7 ( 7 )	70 64 ( 67 )	21 22 ( 22 )	11 7 ( 9 )
	9.77	107 119 ( 113 )	8 7 ( 8 )	55 66 ( 61 )	16 17 ( 17 )	3 5 ( 4 )
	19.5	113 119 ( 116 )	7 13 ( 10 )	71 71 ( 71 )	20 22 ( 21 )	5 7 ( 6 )
	39.1	134 139 ( 137 )	6 7 ( 7 )	52 53 ( 53 )	17 25 ( 21 )	7 9 ( 8 )
	78.1	106 114 ( 110 )	9 13 ( 11 )	62 68 ( 65 )	17 23 ( 20 )	5 9 ( 7 )
	156	0* 0* ( 0* )	0* 0* ( 0* )	0* 0* ( 0* )	0* 0* ( 0* )	0* 0* ( 0* )
	313	0* 0* ( 0* )	0* 0* ( 0* )	0* 0* ( 0* )	0* 0* ( 0* )	0* 0* ( 0* )
陽性対照	S9 mixを必要としないもの	名称 AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2	9-AA
	用量(μg/プレート)	0.01	0.5	0.005	0.1	80
対照	S9 mixを必要とするもの	名称 2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	用量(μg/プレート)	1	2	2	0.5	2
		コロニー数/プレート	623 605 ( 614 )	317 326 ( 322 )	927 827 ( 877 )	468 449 ( 459 )
		コロニー数/プレート	1122 1235 ( 1179 )	266 255 ( 261 )	765 704 ( 735 )	619 552 ( 586 )
		コロニー数/プレート	377 335 ( 356 )			191 216 ( 204 )

[備考]

1. 菌の生育阻害が認められる場合は、該当する数値の右に\*印を付した。
2. ( ) 内には各プレートのコロニー数の平均値を記入した。
3. 復帰変異数は、被験物質用量の低い順に実測値及び平均値を記入した。
4. 陽性対照物質の名称 AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、NaN<sub>3</sub>: ナトリウム・アジド、9-AA: 9-アミノアクリジン、2-AA: 2-アミノアントラセン

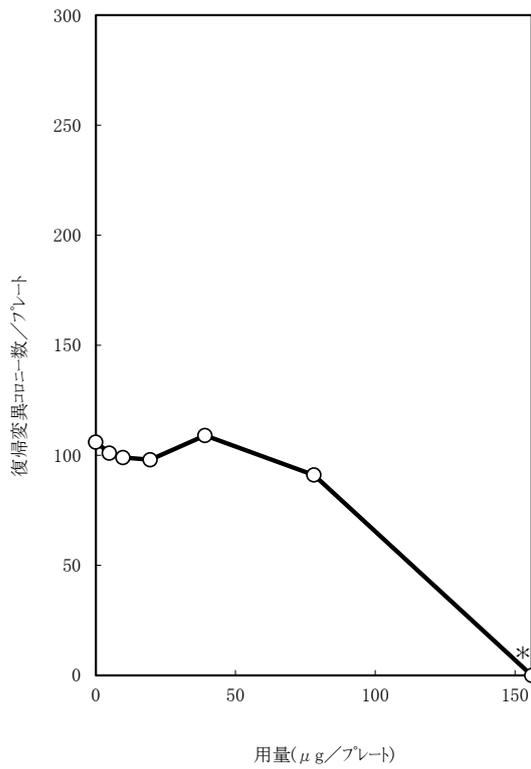


図-1 TA100における用量-反応曲線  
直接法による場合 (本試験)  
(156 μg/プレートまでプロットした。)

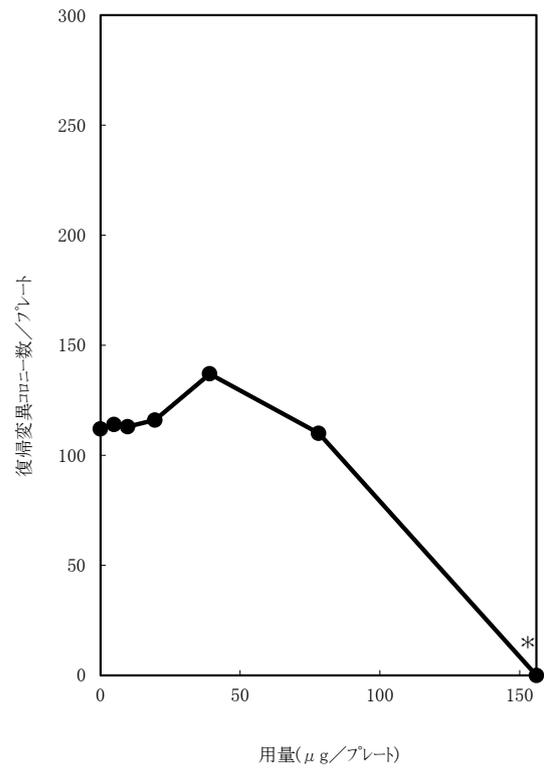


図-2 TA100における用量-反応曲線  
代謝活性化法による場合 (本試験)  
(156 μg/プレートまでプロットした。)

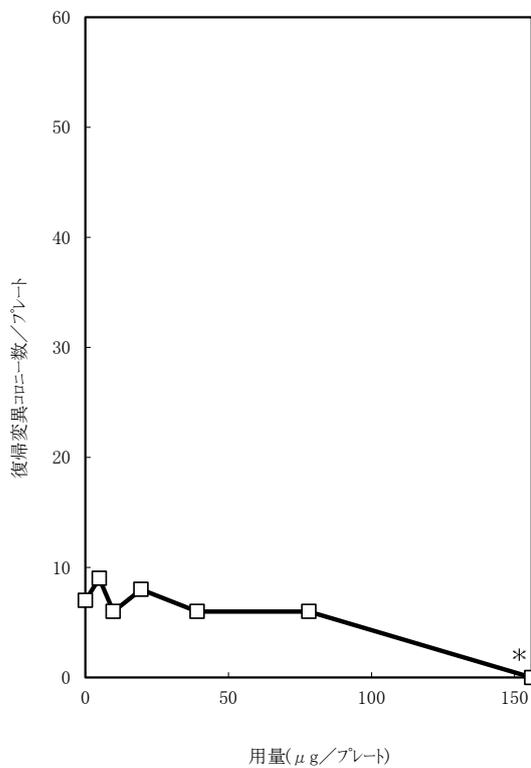


図-3 TA1535における用量-反応曲線  
直接法による場合 (本試験)  
(156 μg/プレートまでプロットした。)

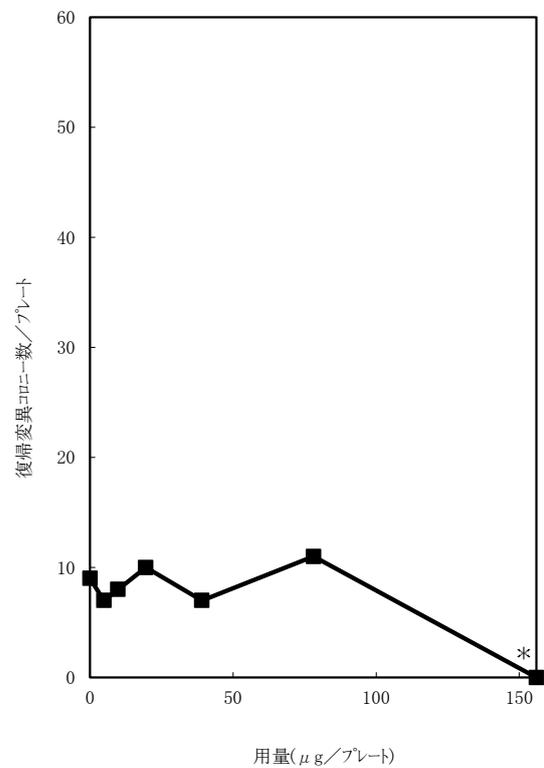


図-4 TA1535における用量-反応曲線  
代謝活性化法による場合 (本試験)  
(156 μg/プレートまでプロットした。)

注：生育阻害が認められる場合は、該当するポイントの左上に\*を付した。

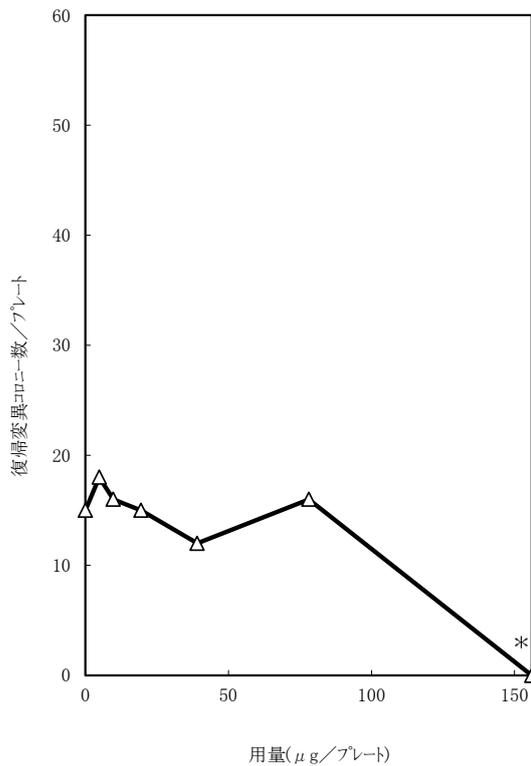


図-5 TA98における用量-反応曲線  
直接法による場合 (本試験)  
(156 μg/プレートまでプロットした。)

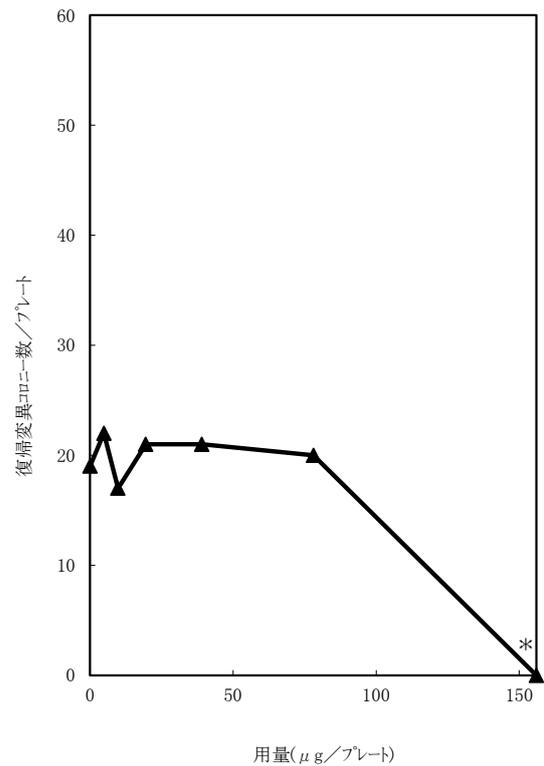


図-6 TA98における用量-反応曲線  
代謝活性化法による場合 (本試験)  
(156 μg/プレートまでプロットした。)

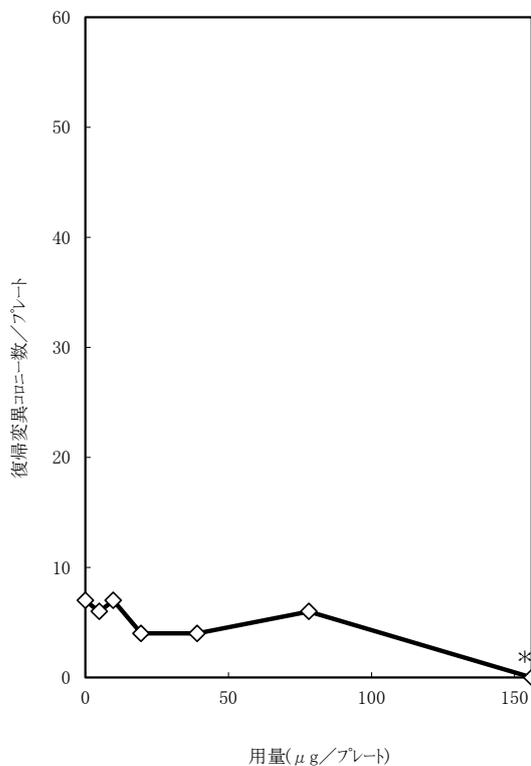


図-7 TA1537における用量-反応曲線  
直接法による場合 (本試験)  
(156 μg/プレートまでプロットした。)

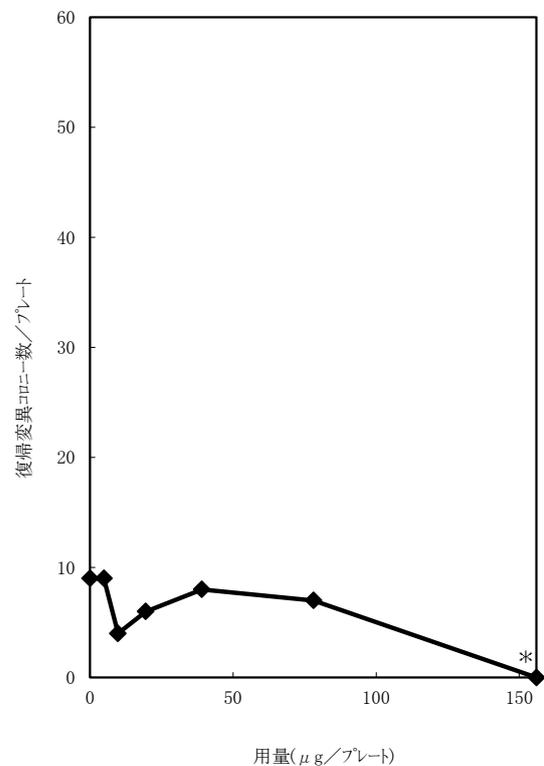
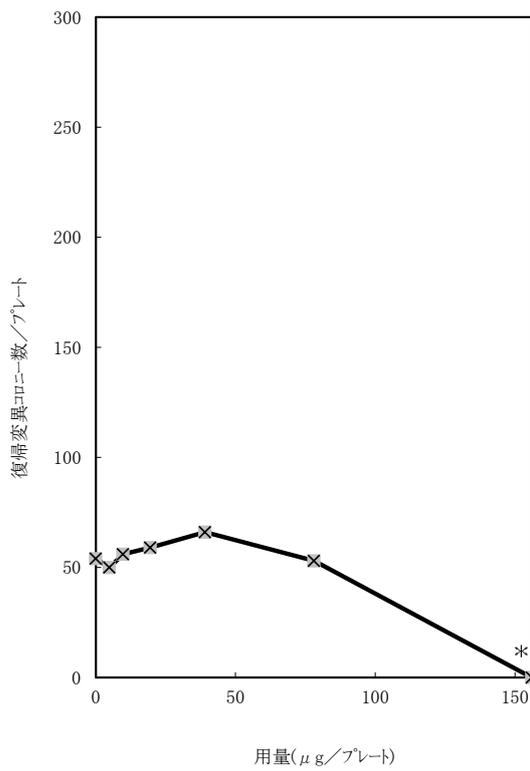
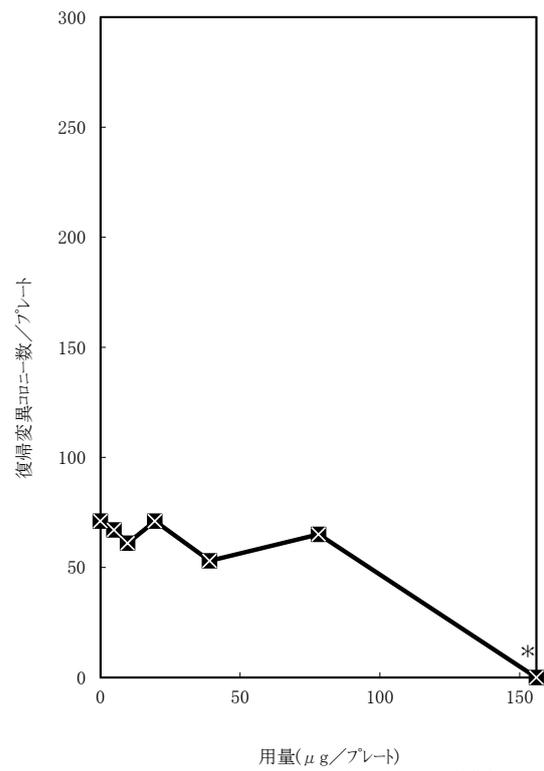


図-8 TA1537における用量-反応曲線  
代謝活性化法による場合 (本試験)  
(156 μg/プレートまでプロットした。)

注：生育阻害が認められる場合は、該当するポイントの左上に\*を付した。



用量(μg/プレート)  
 図-9 WP2uvrA/pKM101における用量-反応曲線  
 直接法による場合 (本試験)  
 (156 μg/プレートまでプロットした。)



用量(μg/プレート)  
 図-10 WP2uvrA/pKM101における用量-反応曲線  
 代謝活性化法による場合 (本試験)  
 (156 μg/プレートまでプロットした。)

注：生育阻害が認められる場合は、該当するポイントの左上に\*を付した。