

最終報告書

表 題：リン酸トリアリルの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：SR08207

株式会社 化合物安全性研究所

陳 述 書

表題：リン酸トリアリルの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：SR08207

1. 本試験は GLP 基準「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 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、最終改正 平成 20 年 7 月 4 日 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、試験方法は「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・平成 15・11・13 製局第 2 号・環保企発第 031121002 号、最終改正 平成 18 年 11 月 20 日 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)および OECD 試験法ガイドライン (OECD Guideline for Testing of Chemicals; Bacterial Reverse Mutation Test (471), 21st July 1997)に基づいて実施したものであります。
2. 本試験は、試験計画書に従って実施し、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認められませんでした。

株式会社 化合物安全性研究所

試験責任者

2012 年 4 月 6 日

信 頼 性 保 証 書

表題：リン酸トリアリルの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：SR08207

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	2010 年 7 月 9 日	2010 年 7 月 9 日	2010 年 7 月 9 日
試験計画書変更書(No. 1)	2010 年 7 月 16 日	2010 年 7 月 20 日	2010 年 7 月 20 日
試験計画書変更書(No. 2)	2010 年 8 月 6 日	2010 年 8 月 6 日	2010 年 8 月 6 日
試験計画書変更書(No. 3)	2010 年 10 月 29 日	2010 年 10 月 29 日	2010 年 10 月 29 日
試験計画書変更書(No. 4)	2011 年 10 月 3 日	2011 年 10 月 3 日	2011 年 10 月 3 日
被験物質の受入・表示・保存	2010 年 7 月 9 日	2010 年 7 月 9 日	2010 年 7 月 9 日
被験物質の調製	2010 年 7 月 14 日	2010 年 7 月 14 日	2010 年 7 月 14 日
試験の実施	2010 年 7 月 14 日	2010 年 7 月 14 日	2010 年 7 月 14 日
観察・コロニー計測	2010 年 7 月 16 日	2010 年 7 月 20 日	2010 年 7 月 20 日
生データ	2010 年 10 月 22 日	2010 年 10 月 22 日	2010 年 10 月 22 日
最終報告書(草案)：図表	2010 年 10 月 22 日	2010 年 10 月 22 日	2010 年 10 月 22 日
最終報告書(草案)：本文	2010 年 10 月 22 日	2010 年 10 月 22 日	2010 年 10 月 22 日
最終報告書	2012 年 4 月 6 日	2012 年 4 月 6 日	2012 年 4 月 6 日

1. 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、最終改正 平成20年7月4日 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)、「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・平成15・11・13製局第2号・環保企発第031121002号、最終改正 平成18年11月20日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)および OECD 試験法ガイドライン (OECD Guideline for Testing of Chemicals ; Bacterial Reverse Mutation Test (471), 21st July 1997) に従い実施された。
2. 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

2012 年 4 月 6 日

目 次

	頁
表紙	1
陳述書	2
信頼性保証書	3
目次	4
表題・試験番号・試験目的・試験実施基準および試験法ガイドライン	
試験委託者・試験施設・試験責任者	6
試験従事者およびその業務分担・試験期間	7
要約	8
緒言	9
材料および方法	9
成績	18
考察	20
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	21
資料の保存	21
試験責任者の記名なつ印	21
表	
表 1 試験結果表(用量設定試験)	22
表 2 試験結果表(本試験)	23
表 3 試験結果表(本試験(追加試験))	24
図	
図 1-1 <i>Salmonella typhimurium</i> TA100 の用量—反応曲線(直接法)	25
図 1-2 <i>Salmonella typhimurium</i> TA100 の用量—反応曲線(代謝活性化法)	26
図 2-1 <i>Salmonella typhimurium</i> TA1535 の用量—反応曲線(直接法)	27
図 2-2 <i>Salmonella typhimurium</i> TA1535 の用量—反応曲線(代謝活性化法)	28
図 3-1 <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA の用量—反応曲線(直接法)	29
図 3-2 <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA の用量—反応曲線(代謝活性化法)	30
図 4-1 <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 の用量—反応曲線(直接法)	31
図 4-2 <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 の用量—反応曲線(代謝活性化法)	32
図 5-1 <i>Salmonella typhimurium</i> TA1537 の用量—反応曲線(直接法)	33
図 5-2 <i>Salmonella typhimurium</i> TA1537 の用量—反応曲線(代謝活性化法)	34

資料

資料 1	試験成績書(2010 年 05 月 11 日)	35
資料 2	安定性に関する情報(報告書番号 NCAS10-159・抜粋、報告書番号 NCAS10-158・抜粋)	36
資料 3	Historical control data for reverse mutation test.....	43

表題 : リン酸トリアリルの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号 : S R 0 8 2 0 7

試験目的 : *Salmonella typhimurium* および *Escherichia coli* を用いて、リン酸トリアリルの細菌における遺伝子突然変異誘発性の有無を検討することを目的とした。

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 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、最終改正 平成 20 年 7 月 4 日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 15 年 11 月 21 日薬食発第 1121002 号・平成 15・11・13 製局第 2 号・環保企発第 031121002 号、最終改正 平成 18 年 11 月 20 日 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)

OECD 試験法ガイドライン (OECD Guideline for Testing of Chemicals; Bacterial Reverse Mutation Test (471), 21st July 1997)

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 : XXXXXXXXXX

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

:

試験期間

試験開始日 : 2010 年 7 月 9 日

被験物質受入 : 2010 年 5 月 6 日

実験開始日 : 2010 年 7 月 14 日

用量設定試験

前培養開始 : 2010 年 7 月 13 日

被験物質処理 : 2010 年 7 月 14 日

コロニー計数 : 2010 年 7 月 16 日

用量設定試験(再試験)

前培養開始 : 2010 年 7 月 27 日

被験物質処理 : 2010 年 7 月 28 日

コロニー計数 : 2010 年 7 月 30 日

本試験

前培養開始 : 2010 年 8 月 3 日

被験物質処理 : 2010 年 8 月 4 日

コロニー計数 : 2010 年 8 月 6 日

本試験(追加試験)

前培養開始 : 2010 年 8 月 9 日

被験物質処理 : 2010 年 8 月 10 日

コロニー計数 : 2010 年 8 月 12 日

実験終了日 : 2010 年 8 月 12 日

試験終了日 : 2012 年 4 月 6 日

要 約

リン酸トリアリル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、代謝活性化系(S9 mix)の非存在下(直接法)ならびに存在下(代謝活性化法)において、プレインキュベーション法により実施した。

用量設定試験および用量設定試験(再試験)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(5~5000 µg/plate)の試験群で実施した。本試験は、用量設定試験および用量設定試験(再試験)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 5 段階の計 6 用量(156~5000 µg/plate)の試験群で実施した。さらに、本試験(追加試験)として、*Salmonella typhimurium* TA100 の直接法につき、最高用量を 5000 µg/plate とし以下公比 1.25 で 9 段階の計 10 用量(671~5000 µg/plate)の試験群で実施した。

用量設定試験および本試験ならびに本試験(追加試験)の結果、*Salmonella typhimurium* TA100 の直接法において、被験物質処理群における復帰変異コロニー数の増加傾向が再現性をもって観察されたが、いずれも陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値の 2 倍未満であった。

一方、*Salmonella typhimurium* TA100 の代謝活性化法、および他の 4 菌株(*Salmonella typhimurium* TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2uvrA)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ず、これらの結果は、用量設定試験および用量設定試験(再試験)ならびに本試験において再現性が確認された。

生育阻害が、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98 および TA1537 の直接法において 5000 µg/plate の用量で各々観察された。被験物質の析出は各菌株のいずれの試験系列においても観察されなかった。これらの結果は、用量設定試験および用量設定試験(再試験)、ならびに本試験および本試験(追加試験)において再現性が確認された。

各菌株の陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、用量設定試験の *Salmonella typhimurium* TA98 の直接法を除き、用量設定試験、用量設定試験(再試験)、本試験および本試験(追加試験)のいずれにおいても、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。また、各菌株の陽性対照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 倍以上の明確な増加を示した。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、リン酸トリアリルは、当該試験条件下において細菌における遺伝子突然変異誘発性を有しないと判断した。

緒 言

リン酸トリアリル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、代謝活性化系(S9 mix)の非存在下(直接法)ならびに存在下(代謝活性化法)において、プレインキュベーション法により実施した。

材料および方法

1. 被験物質

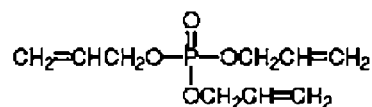
名称 : リン酸トリアリル ; Triallyl Phosphate

別名 : Phosphoric Acid Triallyl Ester

CAS No. : 1623-19-4

化審法官報公示整理番号 : (2)-1960

示性式(構造式) :



分子式 : C₉H₁₅O₄P

分子量 : 218.19

物理化学的性質 : 外観 ; 無色～うすい黄色の透明液体

沸点/沸騰範囲 ; 113°C/0.5kPa

密度 ; 1.08

比重(20/20) ; 1.0822 (資料 1)

屈折率(n_{20/D}) ; 1.4493 (資料 1)

溶解度 ; 水 : 難溶 [蒸留水(日本薬局方注射用水、50 mg/mL の濃度まで検討)に混合せず、ジメチルスルホキシドに 200 mg/mL の濃度まで溶解する(試験施設における確認)。]

オクタノール/水分配係数 ; 1.76

ロット番号 : 3MAPA

純度 : 99.4%(GC) (資料 1)

実験終了後に、使用した被験物質の安定性に関する分析情報を入手し、被験物質の安定性について確認した(資料 2)。

不純物の名称およびその濃度 : 記載なし

製造者 : 名称 ; 東京化成工業株式会社
 所在地 ; 東京都北区豊島 6 丁目 15 番 9 号 (〒114-0003)

入手量 : 500 mL×2 本(関連試験と共用)

安定性 : 空気中の水分により分解する。重合する恐れがある。

保存条件 : 火気注意とした。窒素充填した後、密栓して冷暗所に保管した(実測範囲 2～9℃)。火気や熱源などの着火源から遠ざけた。防湿に留意した。酸化剤から離して保管した。

保存場所 : 株式会社 化合物安全性研究所 被験物質保存室(受入日 2010 年 5 月 6 日～7 月 12 日)および変異原性試験室[2010 年 7 月 12 日～本試験(追加試験)被験物質処理 2010 年 8 月 10 日]

取扱上の注意 : 取扱いは換気のよい場所で行った。適切な保護具を着用した。漏れ、あふれ、飛散しないよう注意し、みだりに蒸気を発生させないようにした。火気や着火源から遠ざけた。取扱い後は手や顔などをよく洗った。取扱う場合は、局所排気内で取扱った。エアゾールが発生しないように取扱った。保護具着用の上、十分な注意のもと開封した。吸湿分解するため、湿気に充分注意した。皮膚、眼および衣類との接触を避けた。

残余被験物質の処置 : 試験操作終了後、安定性分析のため分析者へ送付した。

有害性情報、他 : 急性毒性データ マウス腹腔内 LDLo 500 mg/kg
 マウス静脈内 LD50 70800 µg/kg

2. 被験物質の調製

被験物質は水に難溶で混合せず、ジメチルスルホキシドに溶解することから、当該試験の媒体としてジメチルスルホキシド(ロット番号 BT159、株式会社同仁化学研究所)を選択した。

用量設定試験および用量設定試験(再試験)では、50 mg/mL 調製液からジメチルスルホキシドを用いて公比約 3 で段階希釈し、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 調製液から公比 2 で段階希釈し、25、12.5、6.25、3.13 および 1.56 mg/mL 調製液を調製した。本試験(追加試験)では、50 mg/mL 調製液から公比 1.25 で段階希釈し、40、32、25.6、20.48、16.38、13.11、10.49、8.39 および 6.71 mg/mL 調製液を調製した。

被験物質の調製は用時調製とし、用量設定試験は調製後 2.6 時間以内に、用量設定試験(再試験)は調製後 0.6 時間以内に、本試験は調製後 2.4 時間以内に、本試験(追加試験)は調製後 0.8 時間以内に、各々試験に使用した。

調製はクリーンベンチ内で行った。調製に際しては、保護眼鏡・保護面等、マスク、手袋および白衣等を着用し、吸引または眼、皮膚および衣類に触れないようにして取扱った。

調製時に、媒体の反応性(変色、発熱、発泡等)の有無を目視確認した。用量設定試験、用量設定試験(再試験)、本試験および本試験(追加試験)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。

残余調製液は、焼却処分するために、産業廃棄物として回収した。

3. 陰性対照物質

陰性対照物質として、被験物質の調製媒体であるジメチルスルホキシド(ロット番号 BT159、株式会社同仁化学研究所)を、モレキュラーシーブを用いて脱水処理を行い、原液のまま使用した。

4. 陽性対照物質およびその調製

陽性対照物質として、次表の既知変異原物質を使用した。これらの陽性対照物質は冷暗所(2～8℃設定)で保存した。

陽性対照物質は、含量補正をせずにそれぞれ次表の濃度に調製し、-20℃以下で分注凍結保存したものを解凍後 2.2 時間以内に使用した。調製液は、調製日より 11 ヶ月以内(使用期限：調製後 1 年)に使用した。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。

陽性対照物質	調製濃度	調製媒体
2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド(含量 98.3%) ロット番号 SDJ4376 和光純薬工業株式会社	0.1 および 1 µg/mL	ジメチルスルホキシド ロット番号 WF032 株式会社同仁化学研究所
アジ化ナトリウム(純度 99.8%) ロット番号 SDH6348 和光純薬工業株式会社	5 µg/mL	日本薬局方注射用水 ロット番号 8L88 株式会社大塚製薬工場
9-アミノアクリジン塩酸塩水和物 (純度 99.9%) ロット番号 S32398-347 Sigma-Aldrich Corporation	800 µg/mL	ジメチルスルホキシド ロット番号 WF032 株式会社同仁化学研究所
2-アミノアントラセン(含量 97.2%) ロット番号 TSP5974 和光純薬工業株式会社	5、10、20 および 100 µg/mL	ジメチルスルホキシド ロット番号 WF032 株式会社同仁化学研究所

5. 試験系

試験には、*Salmonella typhimurium* (以下 *S. typhimurium* と称する)TA100、TA1535、TA98 および TA1537 ならびに *Escherichia coli*(以下 *E. coli* と称する)WP2uvrA を使用した。これらの菌株は、1991 年 10 月 18 日に国立衛生試験所(現 国立医薬品食品衛生研究所)より分与された。また、これらの菌株は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。

各菌株は、培養液 8 mL に対しジメチルスルホキシド(ロット番号 BT159、株式会社同仁化学研究所)0.7 mL を加え、-80℃以下で分注凍結保存した。各菌株の培養液の一部を用いて、

菌株の特性(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、これら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。

6. 培地

(1) 前培養用培地

前培養用のニュートリエントブロス培地として、ニュートリエントブロス (OXOID NUTRIENT BROTH No. 2、ロット番号 464616、OXOID LTD.) を日本薬局方注射用水(ロット番号 8L88、株式会社大塚製薬工場)を用いて 25 g/L に調製した。*S. 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 M8B0619、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。

(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)

試験用培地として使用した最少グルコース寒天培地(バイタルメディア AMT-0 培地、ロット番号 DZLB2Q01、2010 年 2 月 26 日製造、極東製薬工業株式会社)1000 mL 中の組成は次表の通りである。

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 1073337-02]	15.0 g

(3) 重層用培地

次表の組成のソフトアガーおよびアミノ酸溶液を蒸留水(日本薬局方注射用水)を用いて調製し、使用時に(A) : (B) = 10:1 の容量比で混合した。*S. 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、*E. 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℃ 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 9131109、Becton, Dickinson and Company)	
塩化ナトリウム	0.5%
(ロット番号 106P5602、関東化学株式会社)	
(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 WKK2889、和光純薬工業株式会社)	
(D-ビオチン、ロット番号 CDJ4769、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 PEP6208、和光純薬工業株式会社)	

7. S9 mix

S9 mix は、S9(ロット番号 RAA-609、2010 年 2 月 5 日製造、キッコーマン株式会社)、S9 mix 用 Cofactor (Cofactor-I、ロット番号 999903、オリエンタル酵母工業株式会社)および日本薬局方注射用水(ロット番号 9K88、株式会社大塚製薬工場)を用いて用時調製した。

S9 は、購入後 -80°C 以下で保存し、製造日より 6 ヶ月以内(使用期限：製造後 6 ヶ月)に使用した。この S9 は、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した Slc:SD 系ラット(雄、7 週齢)の肝ホモジネートより調製された。

S9 mix 1 mL 中の組成は次表の通りである。

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

8. 試験群

(1) 用量設定試験

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

各菌株の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 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 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 $\mu\text{g}/\text{plate}$)を設定した。これらの試験群を次表に示す。

試験系列	試験群	用量($\mu\text{g}/\text{plate}$)	プレート数
直接法	被験物質処理群	5	3
		15	3
		50	3
		150	3
		500	3
		1500	3
		5000	3
代謝活性化法	被験物質処理群	5	3
		15	3
		50	3
		150	3
		500	3
		1500	3
		5000	3

(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、被験物質による陽性反応は認められなかった。生育阻害が、*S. typhimurium* TA100、TA1535、TA98 および TA1537 の直接法において 5000 µg/plate の用量で観察された。被験物質の析出は、いずれの菌株においても観察されなかった。

以上の結果から、本試験の用量は、各菌株の直接法および代謝活性化法につき、被験物質の最高用量を 5000 µg/plate とし、以下公比 2 で 5 段階の計 6 用量(5000、2500、1250、625、313 および 156 µg/plate)を設定した。これらの試験群を次表に示す。

試験系列	試験群	用量(µg/plate)	プレート数
直接法	被験物質処理群	156	3
		313	3
		625	3
		1250	3
		2500	3
		5000	3
代謝活性化法	被験物質処理群	156	3
		313	3
		625	3
		1250	3
		2500	3
		5000	3

(3) 本試験(追加試験)

本試験の結果、*S. typhimurium* TA100 の直接法において 1250 および 2500 µg/plate の用量で復帰変異コロニー数の増加傾向が観察された。

このことから、本試験(追加試験)では、*S. typhimurium* TA100 の直接法につき、被験物質の最高用量を 5000 µg/plate とし、以下公比 1.25 で 9 段階の計 10 用量(5000、4000、3200、2560、2048、1638、1311、1049、839 および 671 µg/plate)を設定した。試験群を次表に示す。

試験系列	試験群	用量(µg/plate)	プレート数
直接法	被験物質処理群	671	3
		839	3
		1049	3
		1311	3
		1638	3
		2048	3
		2560	3
		3200	3
		4000	3
		5000	3

(4) 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)および次頁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)

(5) プレート数およびプレートの識別

プレート数は、各試験群ともに3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。

9. 試験方法

(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 μL 接種し、37℃、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 字管は振とう培養開始まで冷却(氷冷)を行った[用量設定試験：7.4 時間、用量設定試験(再試験)：6.8 時間、本試験：7.4 時間、本試験(追加試験)：7.5 時間]。培養終了時に、得られた菌培養液の OD_{660nm} を比色計(mini photo 518、タイテック株式会社)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 1×10⁹ 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)は次表の通りであった。

供試菌株	生菌数(計算値)(×10 ⁹ cells/mL)			
	用量設定試験	用量設定試験 (再試験)	本試験	本試験 (追加試験)
<i>S. typhimurium</i> TA100	2.52	—	2.52	2.60
<i>S. typhimurium</i> TA1535	3.02	—	3.20	—
<i>E. coli</i> WP2uvrA	4.17	—	4.17	—
<i>S. typhimurium</i> TA98	2.73	3.00	2.73	—
<i>S. typhimurium</i> TA1537	1.30	—	1.30	—

(2) 被験物質調製液および対照物質調製液の処理

被験物質調製液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、被験物質調製液あるいは対照物質調製液 0.1 mL を、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℃、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℃に設定したインキュベーター (MIR-262、三洋電機株式会社) にプレートを入れ、49 時間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) 観察

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肉眼確認した。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。

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コロニー (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コロニー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、バックグラウンドコロニー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コロニーが並存している場合。

3：強い生育阻害が認められる。

バックグラウンドコロニー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。

(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±標準偏差をもとめた。

10. 試験結果の評価

(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。

(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、被験物質処理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した。試験結果に再現性が認められない場合には、確認試験、追加試験等を実施して再現性を確認した。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) 変異原比活性の算出

本実験において陽性結果は得られなかったため、変異原比活性の算出は実施しなかった。

成 績

用量設定試験および用量設定試験(再試験)の結果を表 1 に、本試験の結果を表 2 に、本試験(追加試験)の結果を表 3 に示す。また、用量設定試験、用量設定試験(再試験)、本試験および本試験(追加試験)における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。

用量設定試験は 5~5000 µg/plate の用量で実施した。なお、*S. typhimurium* TA98 の直接法については、陰性対照群の平均値が当施設における背景データに基づく管理値(資料 3)から逸脱したため、試験系としての適切な感度を有しないと判断して、用量設定試験(再試験)を実施した。これらの結果、*S. typhimurium* TA100 の直接法において 1500 µg/plate の用量で復帰変異コロニー数の増加傾向が観察されたものの、陰性対照群の平均値の 2 倍以上の増加ではなかった。一方、*S. typhimurium* TA100 の代謝活性化法、および他の 4 菌株(*S. typhimurium* TA98、TA1537 および *E. coli* WP2uvrA)では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。生育阻害が、*S. typhimurium* TA100、TA1535、TA98 および TA1537 の直接法において 5000 µg/plate の用量で観察された。被験物質の析出は、各菌株のいずれの試験系列においても観察されなかった。

本試験は、用量設定試験の結果を勘案して 156~5000 µg/plate の用量で実施した。その結果、*S. typhimurium* TA100 の直接法において 1250 および 2500 µg/plate の用量で復帰変異コロニー数の増加傾向が観察された。一方、*S. typhimurium* TA100 の代謝活性化法、および他の 4 菌株(*S. typhimurium* TA98、TA1537 および *E. coli* WP2uvrA)では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。生育阻害が、*S. typhimurium* TA100、TA1535、TA98 および TA1537 の直接法において 5000 µg/plate の用量で観察された。被験物質の析出は、各菌株のいずれの試験系列においても観察されなかった。

S. typhimurium TA100 の直接法につき実施した本試験(追加試験)(671~5000 µg/plate)の結果、1311~2048 µg/plate の用量で復帰変異コロニー数の増加傾向が観察されたものの、陰性対照群の平均値の 2 倍以上の増加ではなかった。生育阻害が 5000 µg/plate の用量で観察された。被験物質の析出は観察されなかった。

各菌株の陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、用量設定試験の *S. typhimurium* TA98 の直接法を除き、用量設定試験、用量設定試験(再試験)、本試験および本試験(追加試験)のいずれにおいても、試験施設の背景データに基づく管理値(資料 3)の範囲内であった。また、各菌株の陽性対照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 倍以上の明確な増加を示した。

用量設定試験、用量設定試験(再試験)、本試験および本試験(追加試験)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。

考 察

リン酸トリアリルの細菌における遺伝子突然変異誘発性の有無を、*S. typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *E. coli* WP2uvrA を用いる復帰突然変異試験により検討した。

用量設定試験および用量設定試験(再試験)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 5 段階の計 6 用量の試験群で実施した。さらに、本試験(追加試験)として、*S. typhimurium* TA100 の直接法につき、最高用量を 5000 µg/plate とし以下公比 1.25 で 9 段階の計 10 用量の試験群で実施した。

S. typhimurium TA100 の直接法において、被験物質処理群における復帰変異コロニー数の増加傾向が、用量設定試験および本試験ならびに本試験(追加試験)で再現性をもって観察されたが、いずれも陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値の 2 倍未満であったことから、陰性結果と判断した。

一方、*S. typhimurium* TA100 の代謝活性化法、および他の 4 菌株(*S. typhimurium* TA1535、TA98、TA1537 および *E. coli* WP2uvrA) 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ず、これらの結果は、用量設定試験および用量設定試験(再試験)ならびに本試験において再現性が確認された。

生育阻害が、*S. typhimurium* TA100、TA1535、TA98 および TA1537 の直接法において 5000 µg/plate の用量で各々観察された。被験物質の析出は各菌株のいずれの試験系列においても観察されなかった。これらの結果は、用量設定試験および用量設定試験(再試験)、ならびに本試験および本試験(追加試験)において再現性が確認された。

各菌株の陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、用量設定試験の *S. typhimurium* TA98 の直接法を除き、用量設定試験、用量設定試験(再試験)、本試験および本試験(追加試験)のいずれにおいても、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。また、各菌株の陽性対照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 倍以上の明確な増加を示した。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、リン酸トリアリルは、当該試験条件下において細菌における遺伝子突然変異誘発性を有しないと判断した。

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。

資料の保存

1. 資料保存施設および保存資料

以下の資料を株式会社 化合物安全性研究所の資料保存室に保存する。

(1) 試験計画書および試験計画書変更書

(2) 生データその他の記録文書

(3) 最終報告書

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。

試験責任者の記名なつ印

  2012 年 4 月 6 日

表 1

SR08207

試 験 結 果 表 (用量設定試験)

被験物質の名称 : リン酸トリアリル

試験実施期間		2010 年 7 月 14 日 ～ 2010 年 7 月 16 日、2010 年 7 月 28 日 ～ 2010 年 7 月 30 日						
代謝活性化系の有無		被験物質 の用量 (μ g/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>uvr</i> A	TA98	TA98(再試験)	TA1537
-S9 mix	陰性対照	158 , 144 109 (137±25)	11 , 14 19 (15±4)	29 , 28 17 (25±7)	46 , 30 32 (36±9)	28 , 35 19 (27±8)	22 , 17 18 (19±3)	
	5	110 , 142 138 (130±17)	12 , 16 15 (14±2)	17 , 17 27 (20±6)	38 , 46 22 (35±12)	21 , 23 29 (24±4)	13 , 14 6 (11±4)	
	15	123 , 144 137 (135±11)	21 , 16 14 (17±4)	21 , 31 25 (26±5)	24 , 24 27 (25±2)	34 , 21 25 (27±7)	8 , 16 12 (12±4)	
	50	154 , 143 118 (138±18)	22 , 11 19 (17±6)	27 , 26 27 (27±1)	26 , 30 29 (28±2)	17 , 28 18 (21±6)	13 , 16 18 (16±3)	
	150	130 , 119 151 (133±16)	10 , 15 27 (17±9)	23 , 27 22 (24±3)	32 , 33 30 (32±2)	20 , 18 21 (20±2)	8 , 12 8 (9±2)	
	500	156 , 126 162 (148±19)	17 , 20 11 (16±5)	21 , 21 24 (22±2)	32 , 36 24 (31±6)	16 , 22 23 (20±4)	12 , 7 11 (10±3)	
	1500	197 , 204 178 (193±13)	16 , 17 15 (16±1)	27 , 23 32 (27±5)	24 , 15 21 (20±5)	23 , 25 18 (22±4)	12 , 12 11 (12±1)	
	5000	35 *, 55 * 26 * (39±15)	2 *, 0 * 2 * (1±1)	18 , 23 18 (20±3)	0 *, 0 * 0 * (0±0)	0 *, 0 * 0 * (0±0)	3 *, 0 * 0 * (1±2)	
-S9 mix	陰性対照	128 , 166 141 (145±19)	12 , 15 17 (15±3)	41 , 12 30 (28±15)	28 , 35 31 (31±4)		13 , 13 6 (11±4)	
	5	141 , 144 188 (158±26)	24 , 25 18 (22±4)	35 , 22 29 (29±7)	23 , 31 19 (24±6)		6 , 7 4 (6±2)	
	15	158 , 166 157 (160±5)	23 , 21 20 (21±2)	19 , 23 37 (26±9)	38 , 28 23 (30±8)		13 , 8 7 (9±3)	
	50	155 , 155 158 (156±2)	17 , 22 18 (19±3)	27 , 22 39 (29±9)	40 , 23 14 (26±13)		10 , 3 8 (7±4)	
	150	132 , 135 151 (139±10)	11 , 12 26 (16±8)	21 , 26 32 (26±6)	23 , 35 30 (29±6)		13 , 9 11 (11±2)	
	500	138 , 192 179 (170±28)	19 , 20 10 (16±6)	34 , 24 33 (30±6)	25 , 17 30 (24±7)		6 , 6 15 (9±5)	
	1500	143 , 144 145 (144±1)	11 , 10 11 (11±1)	37 , 26 30 (31±6)	14 , 17 17 (16±2)		7 , 11 6 (8±3)	
	5000	99 , 106 97 (101±5)	4 , 1 2 (2±2)	22 , 19 20 (20±2)	0 , 0 0 (0±0)		2 , 7 6 (5±3)	
陽性	S9 mixを必要としないもの	名 称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	AF-2	9-AA
		用量(μ g/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	0.1	80
対照	S9 mixを必要とするもの	コロニー数/プレート	636 , 620 648 (635±14)	249 , 279 303 (277±27)	83 , 73 63 (73±10)	297 , 355 362 (338±36)	324 , 291 289 (301±20)	420 , 302 400 (374±63)
		名 称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		用量(μ g/プレート)	1	2	10	0.5	0.5	2
		コロニー数/プレート	1445 , 1311 1545 (1434±117)	581 , 583 569 (578±8)	1120 , 979 1124 (1074±83)	145 , 159 137 (147±11)		477 , 454 558 (496±55)

() : 各プレートのコロニー数の平均値および標準偏差

* : 菌株の生育阻害

陰性対照 : ジメチルスルホキシド

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニコロ-2-フリル)アクリルアミド

9-AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩水和物

NaN₃ : アジ化ナトリウム

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 : リン酸トリアリル

試験実施期間		2010 年 8 月 4 日 ~ 2010 年 8 月 6 日					
代謝活性化系 の有無	被験物質 の用量 (μ g/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	
S9 mix	陰性対照	118 , 111 135 (121 $\pm$ 12)	7 , 8 9 (8 $\pm$ 1)	11 , 18 15 (15 $\pm$ 4)	12 , 21 22 (18 $\pm$ 6)	8 , 13 13 (11 $\pm$ 3)	
	156	174 , 121 149 (148 $\pm$ 27)	10 , 5 6 (7 $\pm$ 3)	16 , 5 17 (13 $\pm$ 7)	9 , 13 12 (11 $\pm$ 2)	14 , 8 8 (10 $\pm$ 3)	
	313	147 , 147 126 (140 $\pm$ 12)	6 , 9 8 (8 $\pm$ 2)	17 , 15 18 (17 $\pm$ 2)	17 , 23 14 (18 $\pm$ 5)	10 , 8 2 (7 $\pm$ 4)	
	625	113 , 147 132 (131 $\pm$ 17)	11 , 8 12 (10 $\pm$ 2)	13 , 21 12 (15 $\pm$ 5)	16 , 7 8 (10 $\pm$ 5)	6 , 5 6 (6 $\pm$ 1)	
	1250	169 , 181 159 (170 $\pm$ 11)	7 , 11 5 (8 $\pm$ 3)	11 , 17 12 (13 $\pm$ 3)	9 , 12 16 (12 $\pm$ 4)	2 , 8 1 (4 $\pm$ 4)	
	2500	156 , 159 193 (169 $\pm$ 21)	12 , 8 7 (9 $\pm$ 3)	17 , 12 12 (14 $\pm$ 3)	11 , 3 7 (7 $\pm$ 4)	4 , 8 1 (4 $\pm$ 4)	
	5000	35 * , 22 * 45 * (34 $\pm$ 12)	3 * , 1 * 2 * (2 $\pm$ 1)	12 , 8 8 (9 $\pm$ 2)	0 * , 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)	1 * , 3 * 3 * (2 $\pm$ 1)	
-S9 mix	陰性対照	151 , 150 160 (154 $\pm$ 6)	7 , 9 9 (8 $\pm$ 1)	13 , 8 18 (13 $\pm$ 5)	38 , 18 20 (25 $\pm$ 11)	11 , 12 7 (10 $\pm$ 3)	
	156	142 , 155 138 (145 $\pm$ 9)	11 , 20 11 (14 $\pm$ 5)	19 , 12 18 (16 $\pm$ 4)	32 , 29 22 (28 $\pm$ 5)	11 , 6 8 (8 $\pm$ 3)	
	313	125 , 141 121 (129 $\pm$ 11)	11 , 7 7 (8 $\pm$ 2)	16 , 16 14 (15 $\pm$ 1)	22 , 31 33 (29 $\pm$ 6)	12 , 14 4 (10 $\pm$ 5)	
	625	134 , 126 142 (134 $\pm$ 8)	8 , 10 7 (8 $\pm$ 2)	14 , 21 23 (19 $\pm$ 5)	21 , 24 18 (21 $\pm$ 3)	11 , 11 8 (10 $\pm$ 2)	
	1250	112 , 140 119 (124 $\pm$ 15)	15 , 7 7 (10 $\pm$ 5)	12 , 17 22 (17 $\pm$ 5)	14 , 14 13 (14 $\pm$ 1)	3 , 6 5 (5 $\pm$ 2)	
	2500	132 , 114 133 (126 $\pm$ 11)	3 , 3 9 (5 $\pm$ 3)	12 , 25 22 (20 $\pm$ 7)	23 , 9 6 (13 $\pm$ 9)	7 , 3 10 (7 $\pm$ 4)	
	5000	98 , 96 118 (104 $\pm$ 12)	2 , 0 3 (2 $\pm$ 2)	24 , 24 11 (20 $\pm$ 8)	7 , 3 1 (4 $\pm$ 3)	1 , 8 3 (4 $\pm$ 4)	
陽性	S9 mixを 必要とし ないもの	名 称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA
		用量(μ g/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
対照	S9 mixを 必要とす るもの	コロニー数 /プレート	647 , 624 669 (647 $\pm$ 23)	244 , 265 301 (270 $\pm$ 29)	69 , 70 56 (65 $\pm$ 8)	345 , 363 316 (341 $\pm$ 24)	335 , 281 293 (303 $\pm$ 28)
		名 称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		用量(μ g/プレート)	1	2	10	0.5	2
		コロニー数 /プレート	1361 , 1307 1223 (1297 $\pm$ 70)	509 , 516 580 (535 $\pm$ 39)	1167 , 1128 1135 (1143 $\pm$ 21)	172 , 185 151 (169 $\pm$ 17)	278 , 364 408 (350 $\pm$ 66)

() : 各プレートのコロニー数の平均値および標準偏差

* : 菌株の生育阻害

陰性対照 : ジメチルスルホキシド

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

9-AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩水和物

NaN₃ : アジ化ナトリウム

2-AA : 2-アミノアントラセン

表 3

試 験 結 果 表 (本試験(追加試験))

被験物質の名称 : リン酸トリアリル

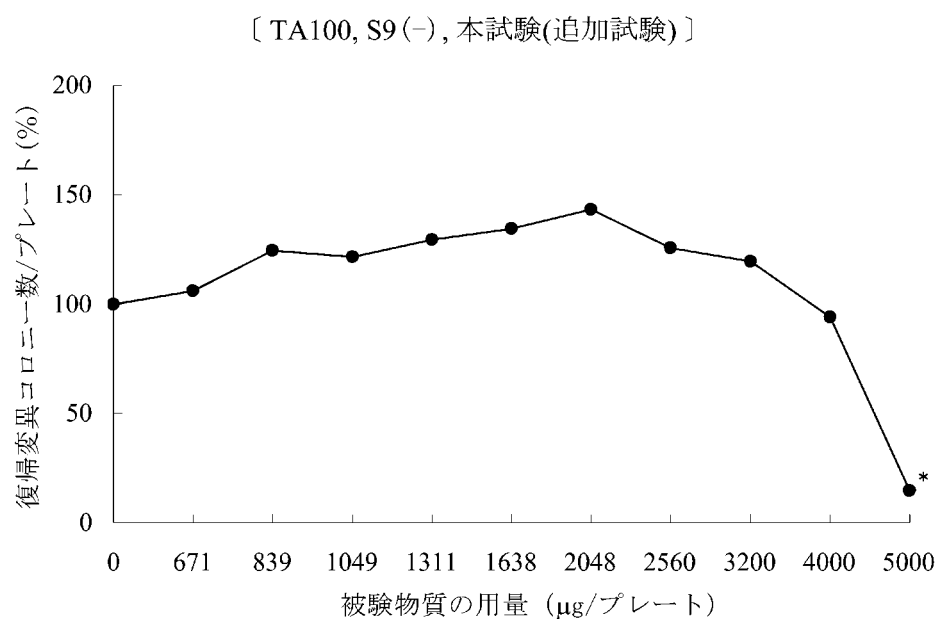
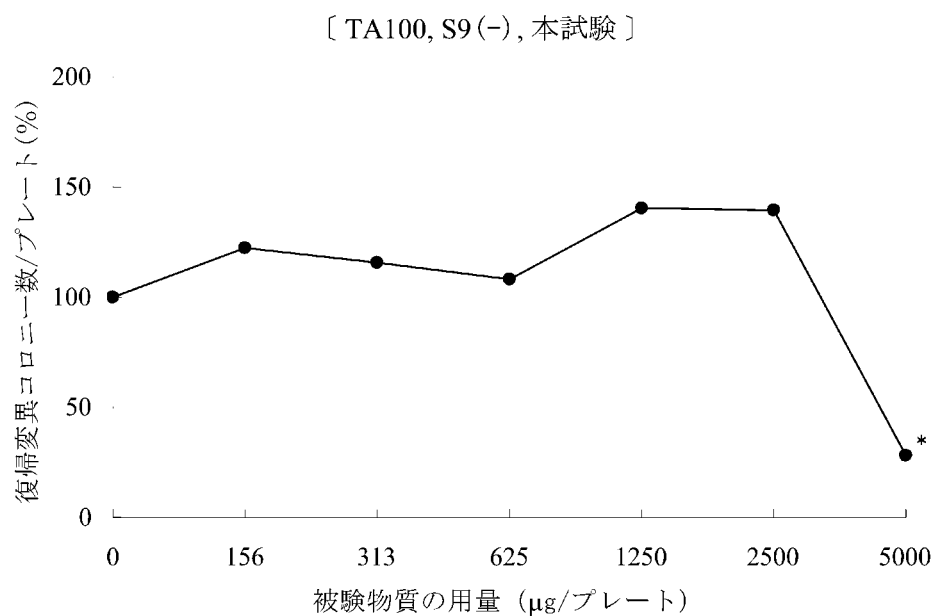
試験実施期間		2010 年 8 月 10 日 ~ 2010 年 8 月 12 日	
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μ g/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)	
		塩基置換型	
		TA100	
-S9 mix	陰性対照	102 , 99 104 (102 $\pm$ 3)	
	671	116 , 103 105 (108 $\pm$ 7)	
	839	107 , 119 155 (127 $\pm$ 25)	
	1049	123 , 140 108 (124 $\pm$ 16)	
	1311	141 , 130 124 (132 $\pm$ 9)	
	1638	158 , 128 124 (137 $\pm$ 19)	
	2048	142 , 149 147 (146 $\pm$ 4)	
	2560	139 , 126 120 (128 $\pm$ 10)	
	3200	116 , 119 132 (122 $\pm$ 9)	
	4000	101 , 107 80 (96 $\pm$ 14)	
	5000	0 * , 28 * 17 * (15 $\pm$ 14)	
陽性対照	S9 mixを必要とし	名 称	AF-2
	ないもの	用量(μ g/プレート)	0.01
		コロニー数/プレート	529 , 513 505 (516 $\pm$ 12)

() : 各プレートのコロニー数の平均値および標準偏差

* : 菌株の生育阻害

陰性対照 : ジメチルスルホキシド

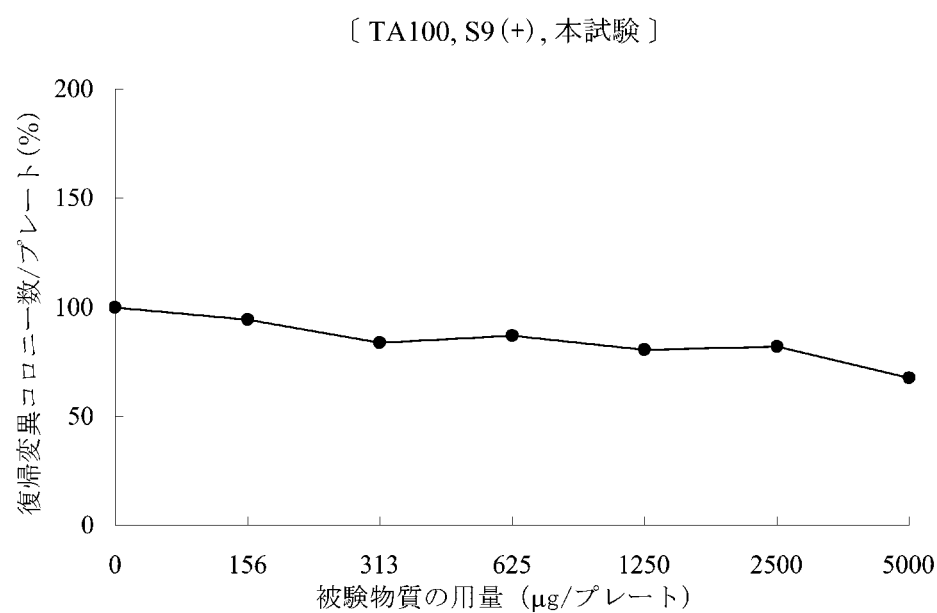
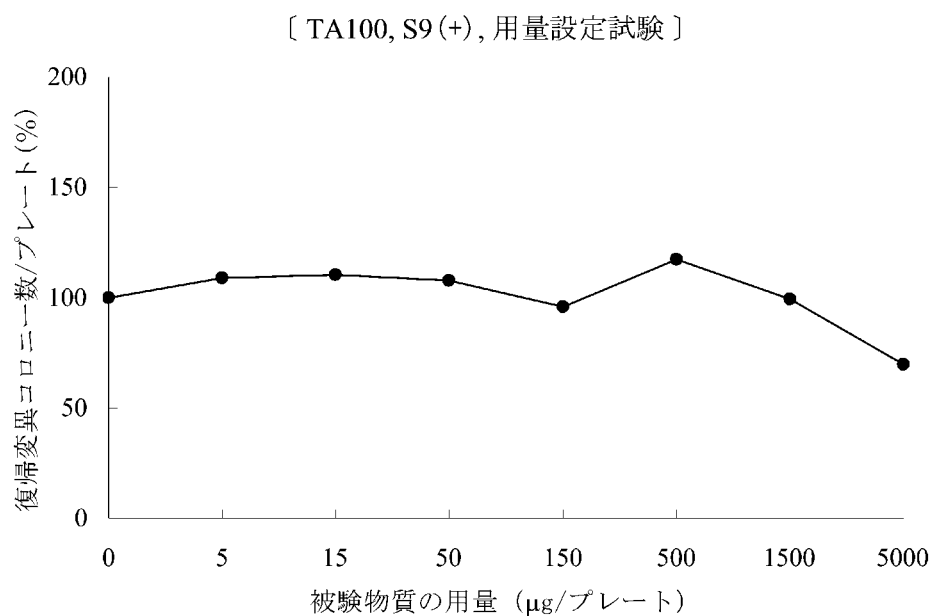
AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド



被験物質の名称 : リン酸トリアリル

図 1-1 *Salmonella typhimurium* TA100 の用量—反応曲線(直接法)

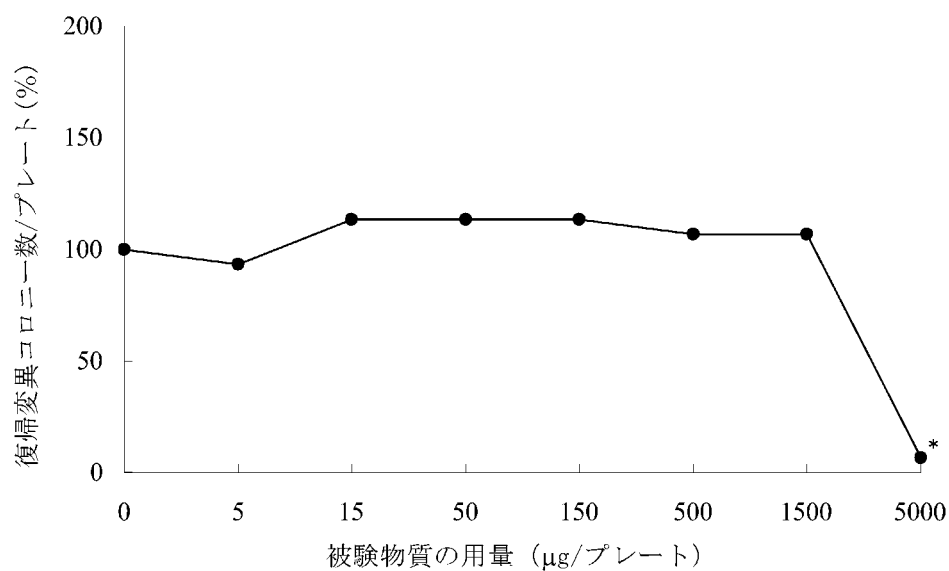
* : 菌株の生育阻害



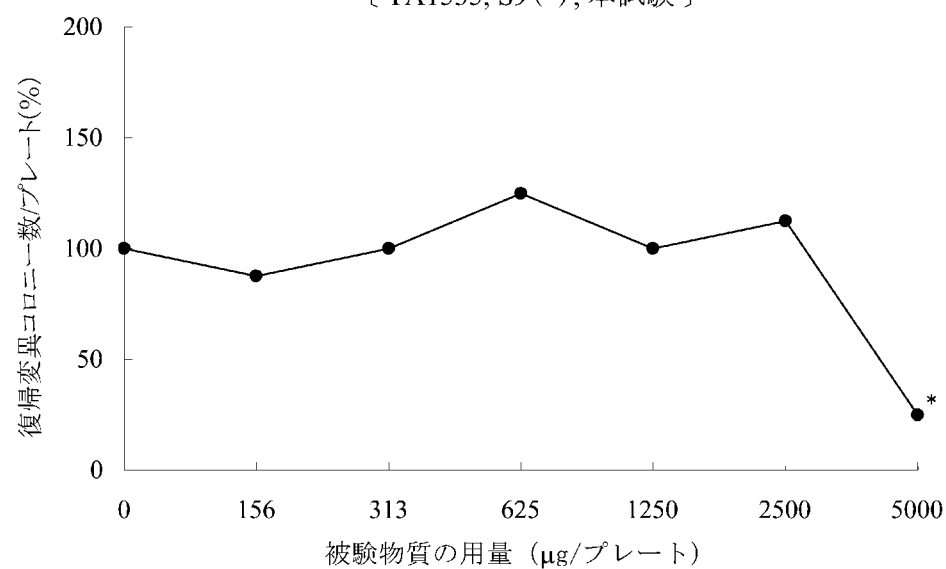
被験物質の名称 : リン酸トリアリル

図 1-2 *Salmonella typhimurium* TA100 の用量—反応曲線
(代謝活性化法)

〔TA1535, S9(-), 用量設定試験〕



〔TA1535, S9(-), 本試験〕

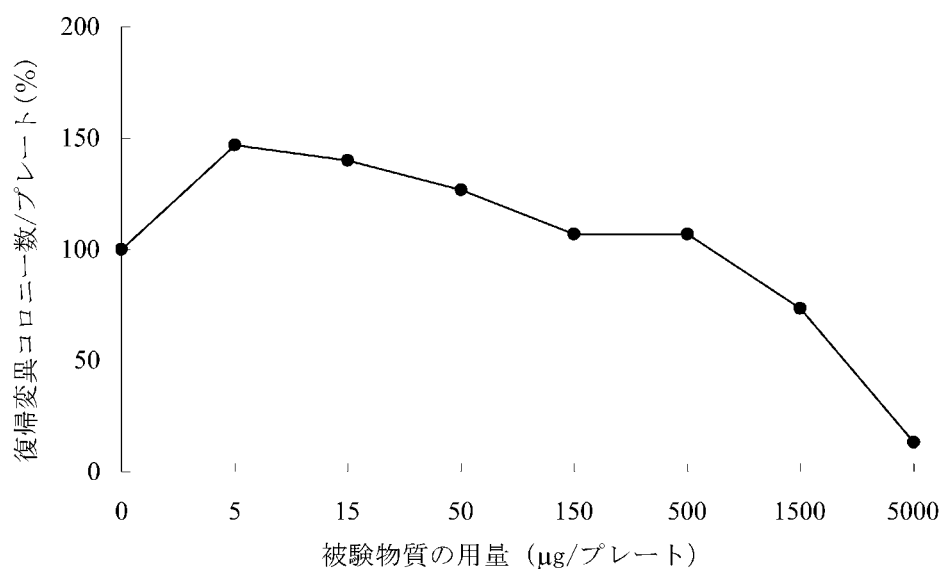


被験物質の名称 : リン酸トリアリル

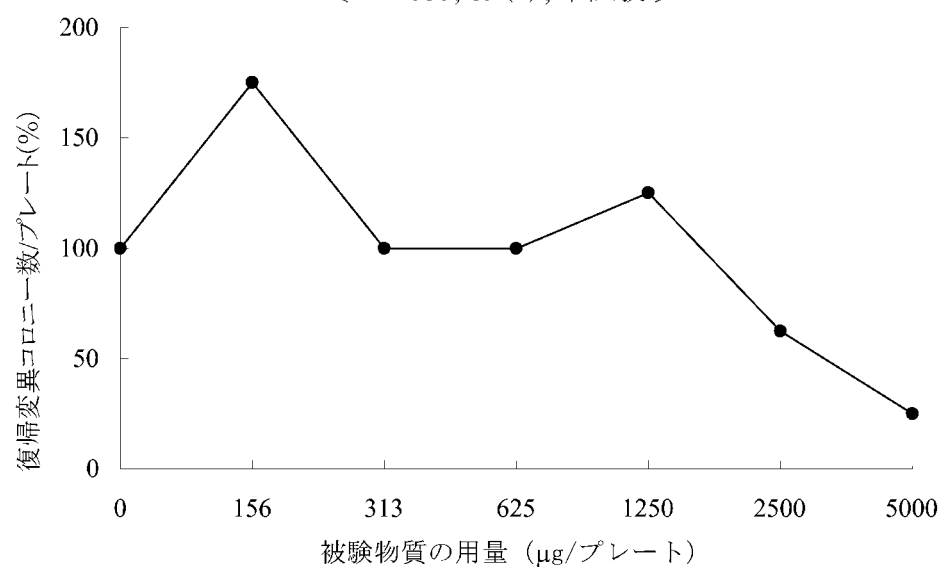
図 2-1 *Salmonella typhimurium* TA1535 の用量—反応曲線(直接法)

* : 菌株の生育阻害

〔TA1535, S9(+), 用量設定試験〕

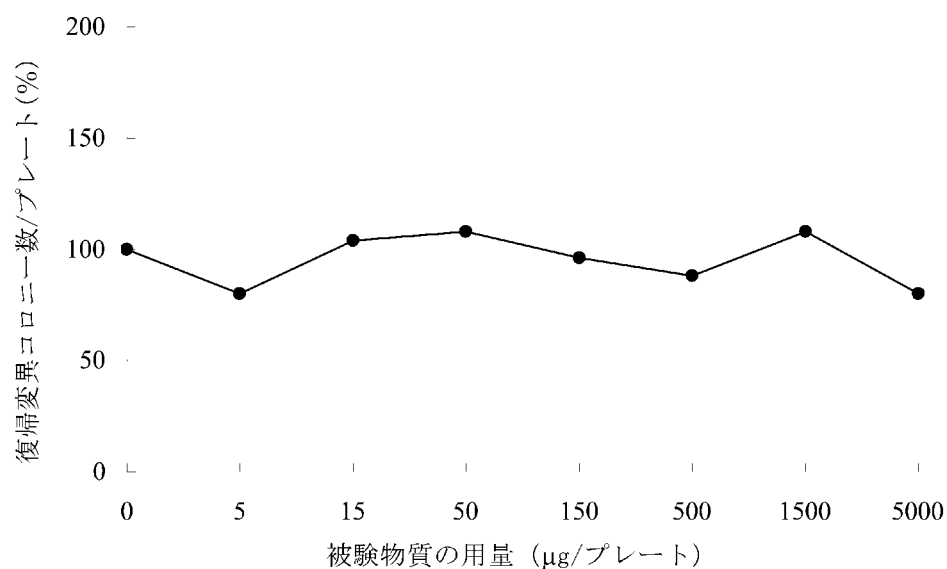
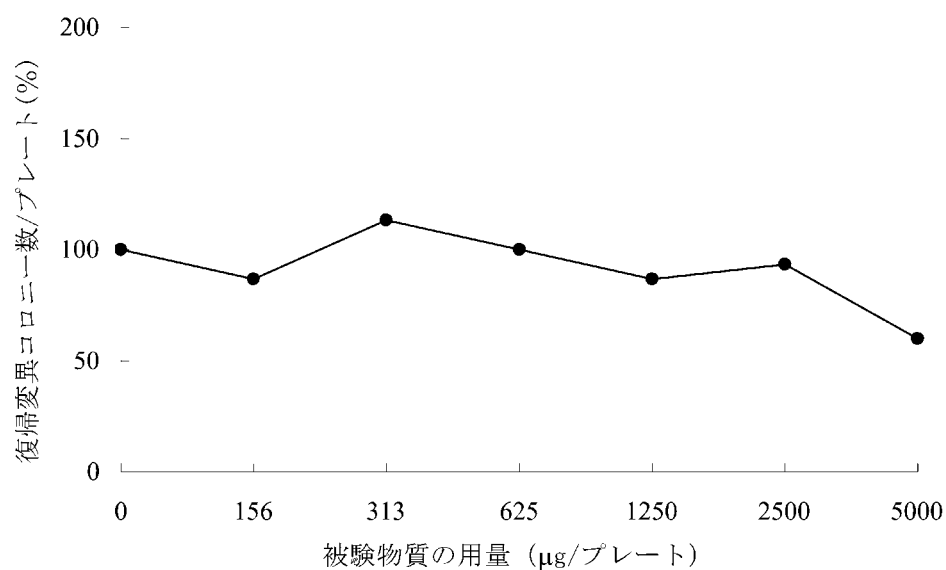


〔TA1535, S9(+), 本試験〕



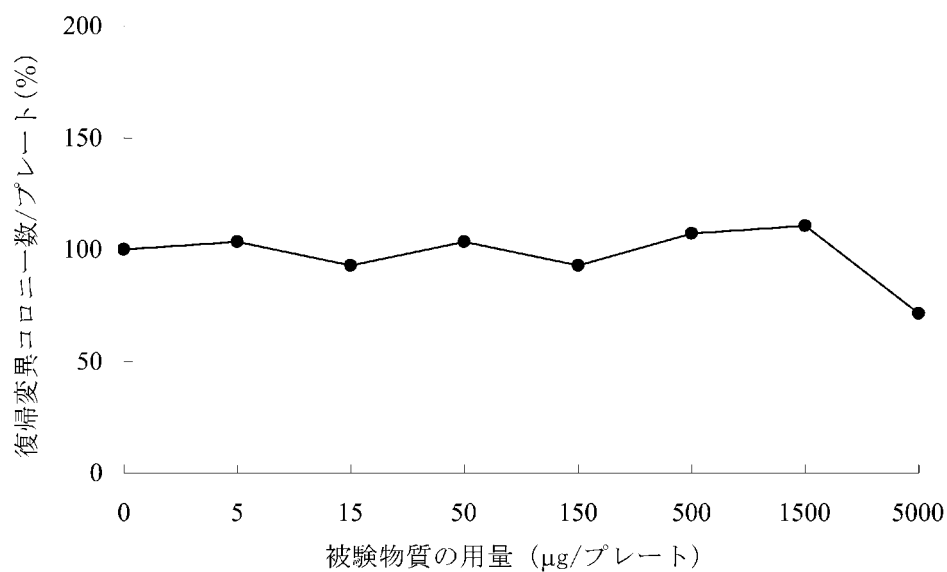
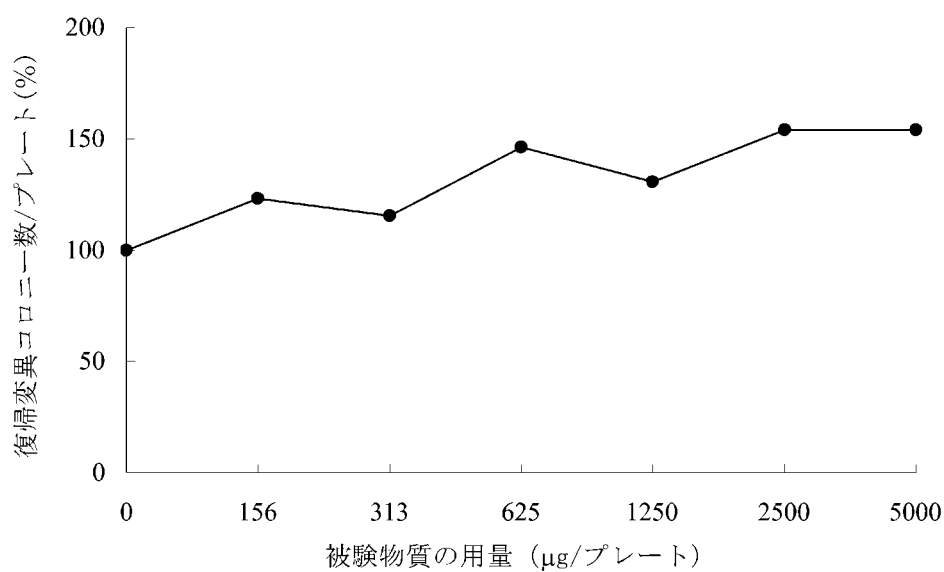
被験物質の名称 : リン酸トリアリル

図 2-2 *Salmonella typhimurium* TA1535 の用量—反応曲線
(代謝活性化法)

〔 WP2_{uvr} A, S9(-), 用量設定試験 〕〔 WP2_{uvr} A, S9(-), 本試験 〕

被験物質の名称 : リン酸トリアリル

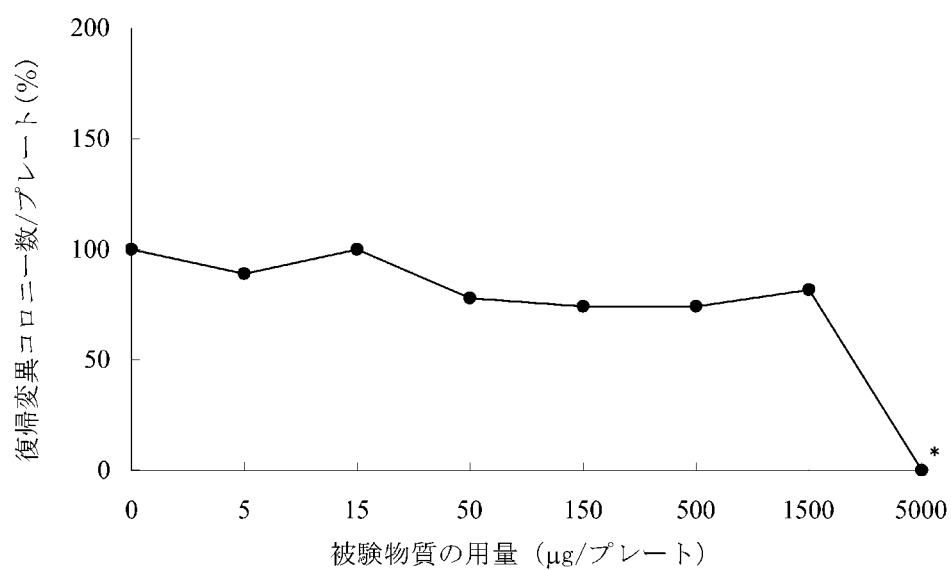
図 3-1 *Escherichia coli* WP2_{uvr} A の用量—反応曲線(直接法)

〔 WP2_{uvr} A, S9(+), 用量設定試験 〕〔 WP2_{uvr} A, S9(+), 本試験 〕

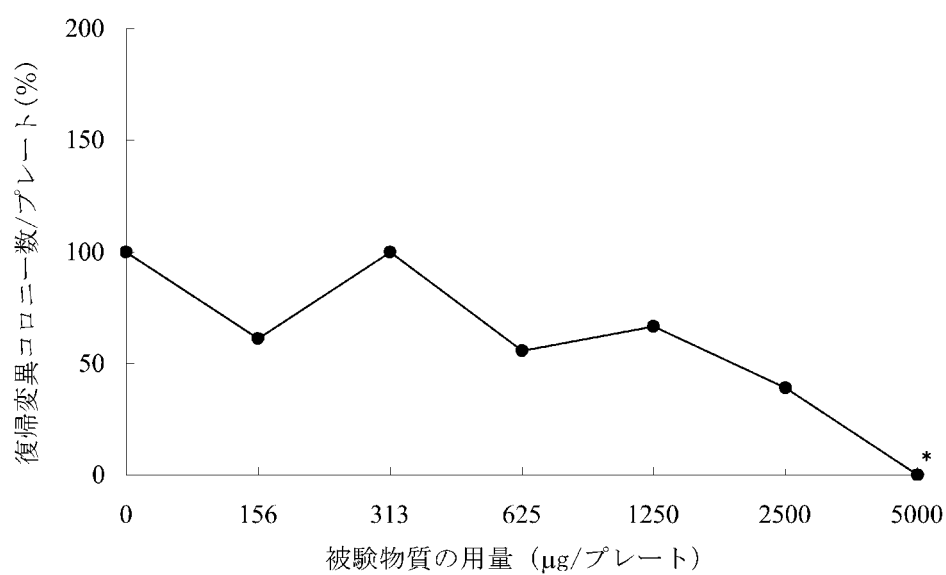
被験物質の名称 : リン酸トリアリル

図 3-2 *Escherichia coli* WP2_{uvr} A の用量—反応曲線
(代謝活性化法)

〔TA98, S9(-), 用量設定試験(再試験)〕



〔TA98, S9(-), 本試験〕

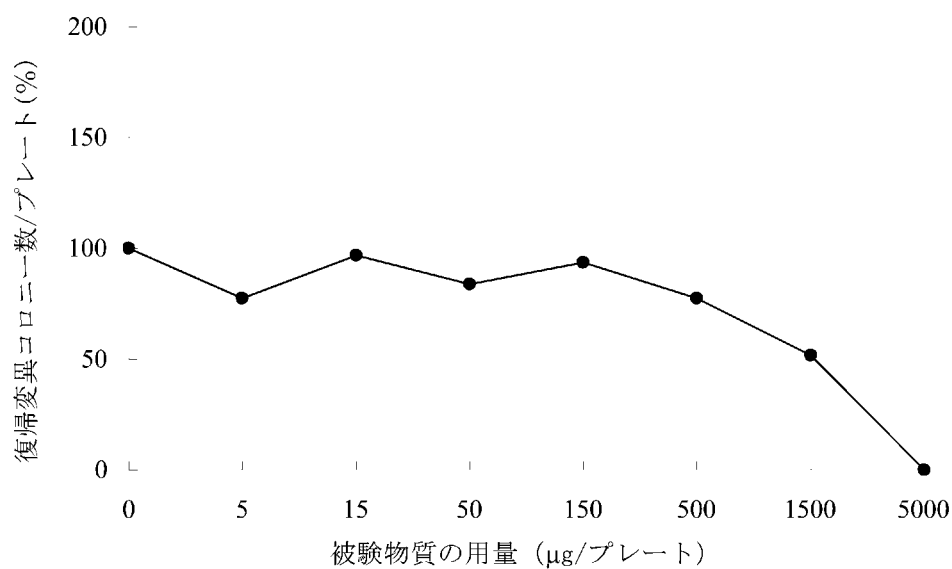


被験物質の名称 : リン酸トリアリル

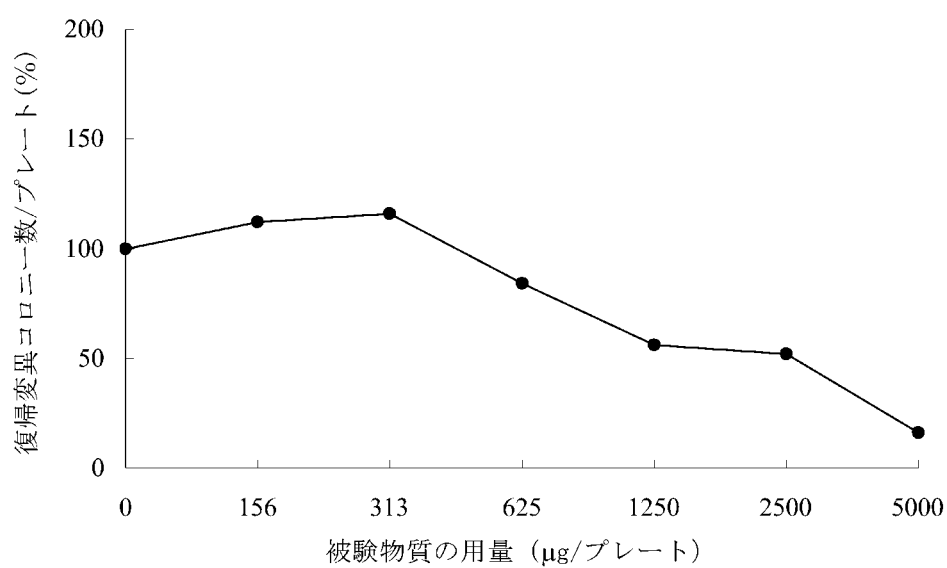
図 4-1 *Salmonella typhimurium* TA98 の用量—反応曲線(直接法)

* : 菌株の生育阻害

〔 TA98, S9(+), 用量設定試験 〕



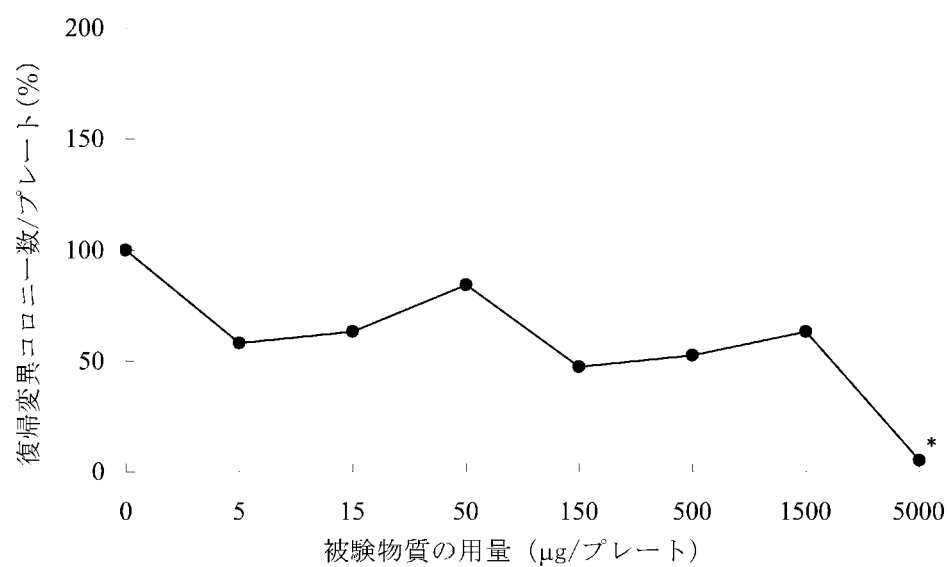
〔 TA98, S9(+), 本試験 〕



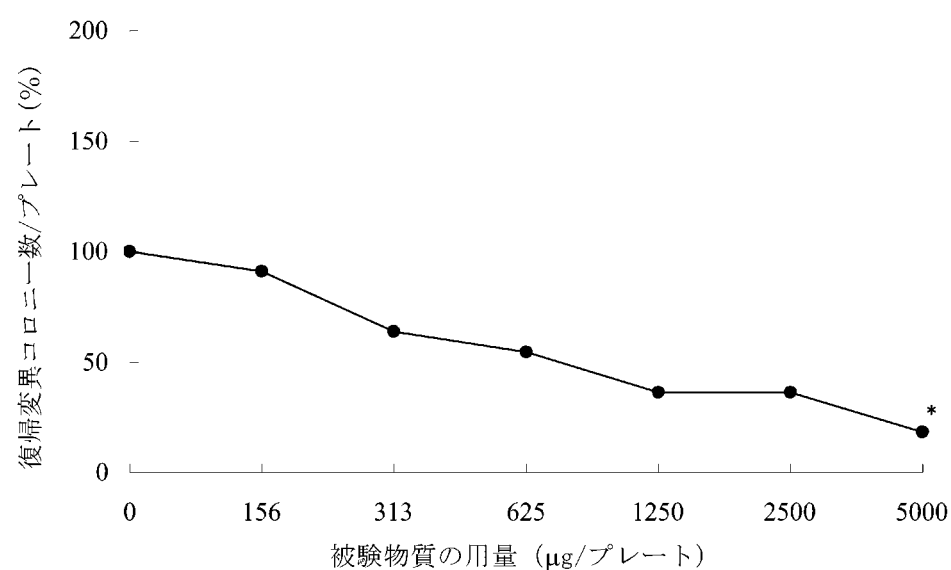
被験物質の名称 : リン酸トリアリル

図 4-2 *Salmonella typhimurium* TA98 の用量—反応曲線
(代謝活性化法)

〔TA1537, S9(-), 用量設定試験〕



〔TA1537, S9(-), 本試験〕

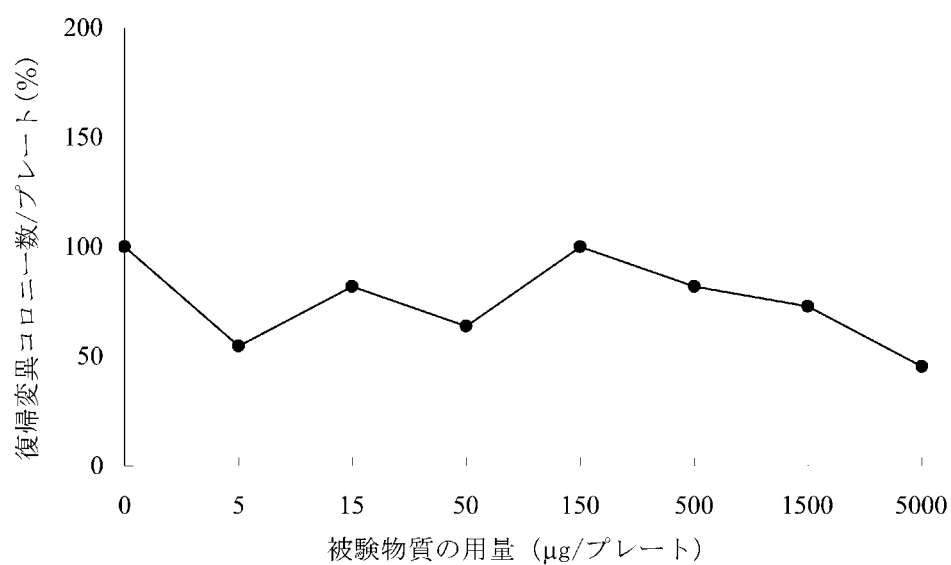


被験物質の名称 : リン酸トリアリル

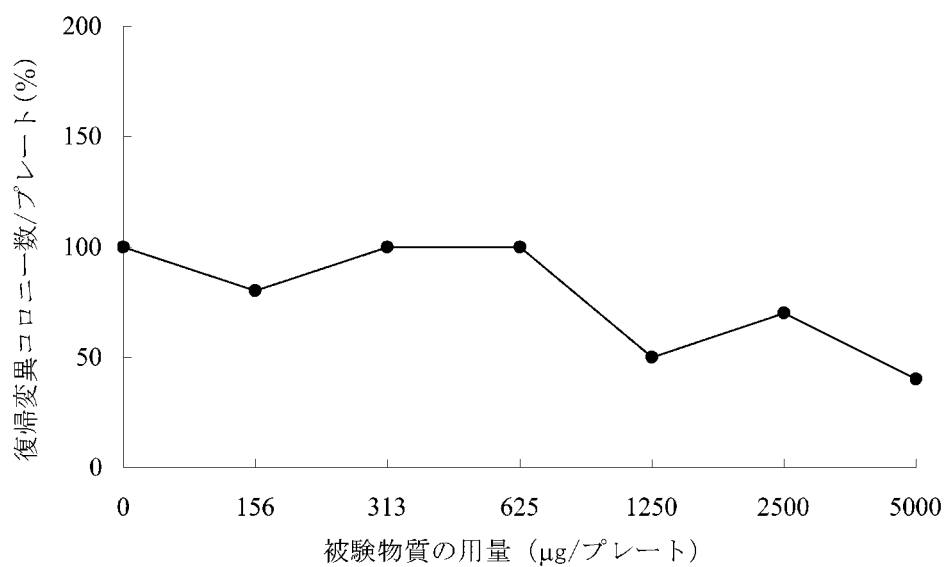
図 5-1 *Salmonella typhimurium* TA1537 の用量—反応曲線(直接法)

* : 菌株の生育阻害

〔TA1537, S9(+), 用量設定試験〕



〔TA1537, S9(+), 本試験〕



被験物質の名称 : リン酸トリアリル

図 5-2 *Salmonella typhimurium* TA1537 の用量—反応曲線
(代謝活性化法)



試験成績書

2010年05月11日

東京化成工業株式会社 品質保証課
〒103-0023
東京都中央区日本橋本町4丁目10
TEL: 03(5640)8860 FAX: 03(5640)8861

製品名: Triallyl Phosphate					
製品コード: P0264	等級: EP	製品ロット: 3MAPA	判定: 合格		

項目	結果	規格値
純度(GC)	99.4 %	94.0 %以上
比重 (20/20)	1.0822	1.0800 ~ 1.0840
屈折率 n _{20/D}	1.4493	1.4470 ~ 1.4500

最終報告書

試験名

投与液中のリン酸トリアリルの安定性・均一性試験

著 者



試験終了日

2010年7月29日

試験施設

株式会社日曹分析センター（略称 NCAS）小田原事業所
〒250-0216 神奈川県小田原市高田 345

試験委託者

株式会社化合物安全性研究所
〒004-0839 北海道札幌市清田区真栄 363 番 24

試験番号

NCAS 10-159

5.2.6 投与液中リン酸トリアリルの安定性試験

1.2項の模擬投与液を冷蔵保存し、10 日後に冷蔵庫より取り出し、室温で 4 時間放置した。その後、新たに調製した模擬投与液と共に 5.2.5 項と同様に分析し、濃度を確認した。なお、模擬投与液量は 10 mL のため、全量を分析に使用した。

分析は各分析試料について 2 連で実施し、得られた各投与液濃度をリン酸トリアリルの秤取量で補正した。その後平均濃度を求め、残存率を下式により算出した。残存率が $100.0 \pm 10.0\%$ の場合安定とした。

$$\text{残存率 (\%)} = \frac{\text{保存後 (冷蔵 10 日 + 室温 4 時間) の模擬投与液平均濃度}}{\text{保存前の模擬投与液平均濃度}} \times 100$$

6. 計算および数値の取り扱い

すべての計算は、Microsoft Excel 2003 (SP3) で行った。

個々の定量値は有効数字 4 桁とした。定量値の平均値は有効数字 3 桁とし、標準偏差は平均値の最小桁数と同様とした。変動係数および残存率は小数第 1 位まで求め、真度は小数第 2 位まで求めた。

結果、考察および結論

1. リン酸トリアリルの同一性試験

実験開始時の標準物質の赤外線吸収スペクトル(図 2 参照)は、試験委託者より提供されたリン酸トリアリルの赤外線吸収スペクトル(図 1 参照)と一致し、同一性が確認された。

2. 投与液中リン酸トリアリルの均一性試験

機器使用前点検結果を表 1 に示す。検量線最高濃度の標準溶液(SS-1)を 3 回測定して求めたピーク面積の変動係数は 1.3% であったので、異常なしと判断し濃度測定を実施した。

検量線試料の測定結果を表 2 に、検量線および検量線試料の代表的な GC クロマトグラムを図 3～図 5 示す。相関係数は 0.9999 となり、真度はすべての検量線試料で $-1.39 \sim 1.32\%$ の範囲内であった。従って、判定基準を満たした。

均一性用投与液の濃度測定結果を表 3 に、代表的な GC クロマトグラムを図 7～図 12 に示す。0.1 mg/mL 均一性用投与液において、2 連で測定した各層(上層、中層、下層)のリン酸トリアリル濃度の平均濃度およびその変動係数は、順に上層で 0.0883 mg/mL および 2.0%、中層で 0.0904 mg/mL および 2.4%、下層で 0.0826 mg/mL および 3.9% であった。各層の平均濃度の全平均値は 0.0871 mg/mL となり、その変動係数は 4.6% であった。各層の平均濃度の全平均値から求めた変動係数が均一性の判定基準(変動係数が 10% 以内)を満たしたので、0.1 mg/mL 投与液中でリン酸トリアリルは均一である事が確認された。同様に、100 mg/mL 均一性用投与液において、2 連で測定した各層(上層、中層、下層)のリン酸トリアリル濃度の平均濃度およびその変動係数は、順に上層で 101 mg/mL および 0.9%、中層で 105 mg/mL および 1.6%、下層で 103 mg/mL および 3.9% であった。各層の平均濃度の全平均値は 103 mg/mL となり、その変動係数は 1.9% であった。各層の平均濃度の全平均値から求めた変動係数が均一性の判定基準(変動係数が 10% 以内)を満たしたので、100 mg/mL 投与液中でリン酸トリアリルは均一である事が確認された。

1% MC 水溶液を分析した結果(図 6 参照)、リン酸トリアリルの検出時間付近に定量を妨害するようなピークがないことを確認した。

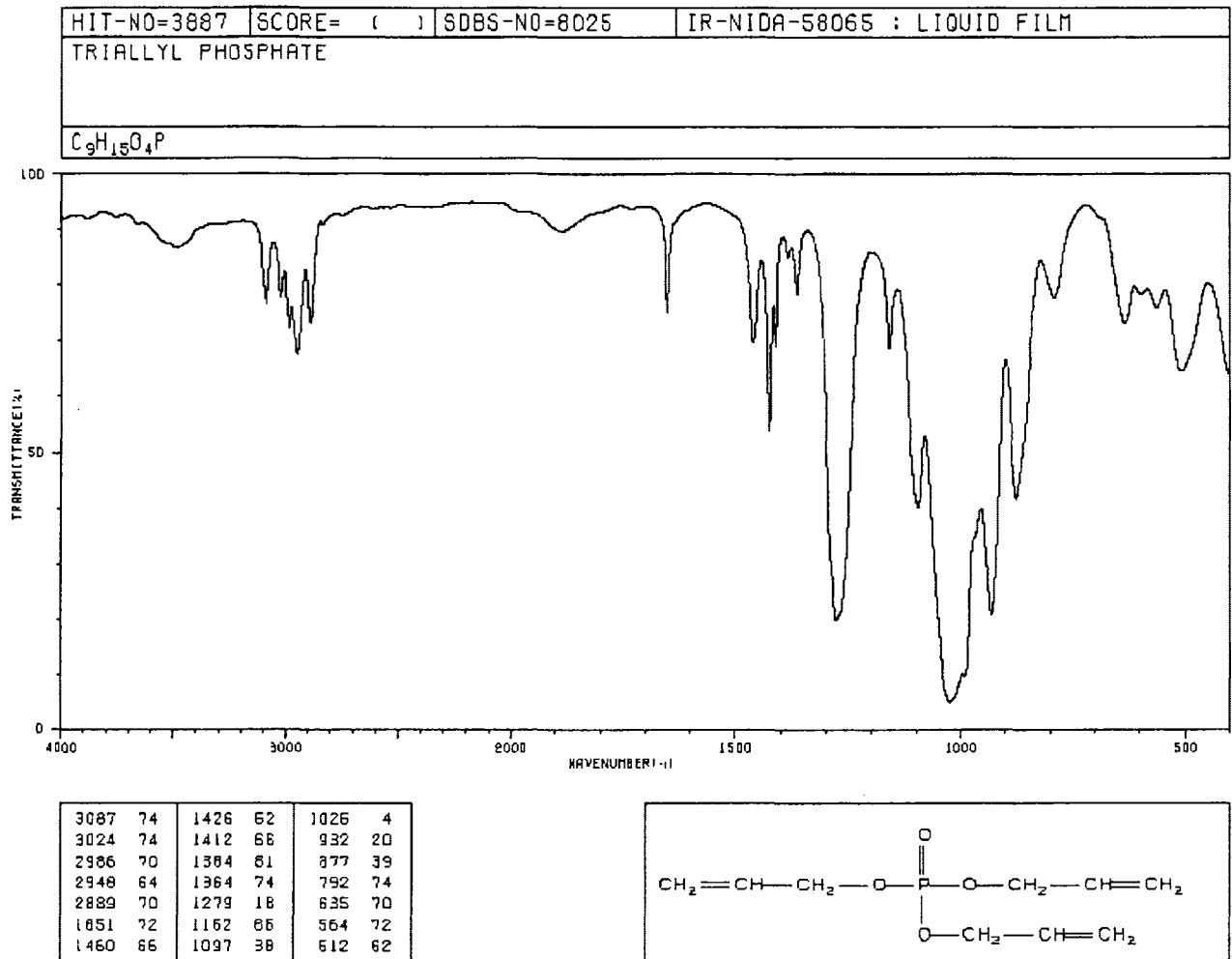


図 1 試験委託者より提供されたリン酸トリアリルの赤外線吸収スペクトル

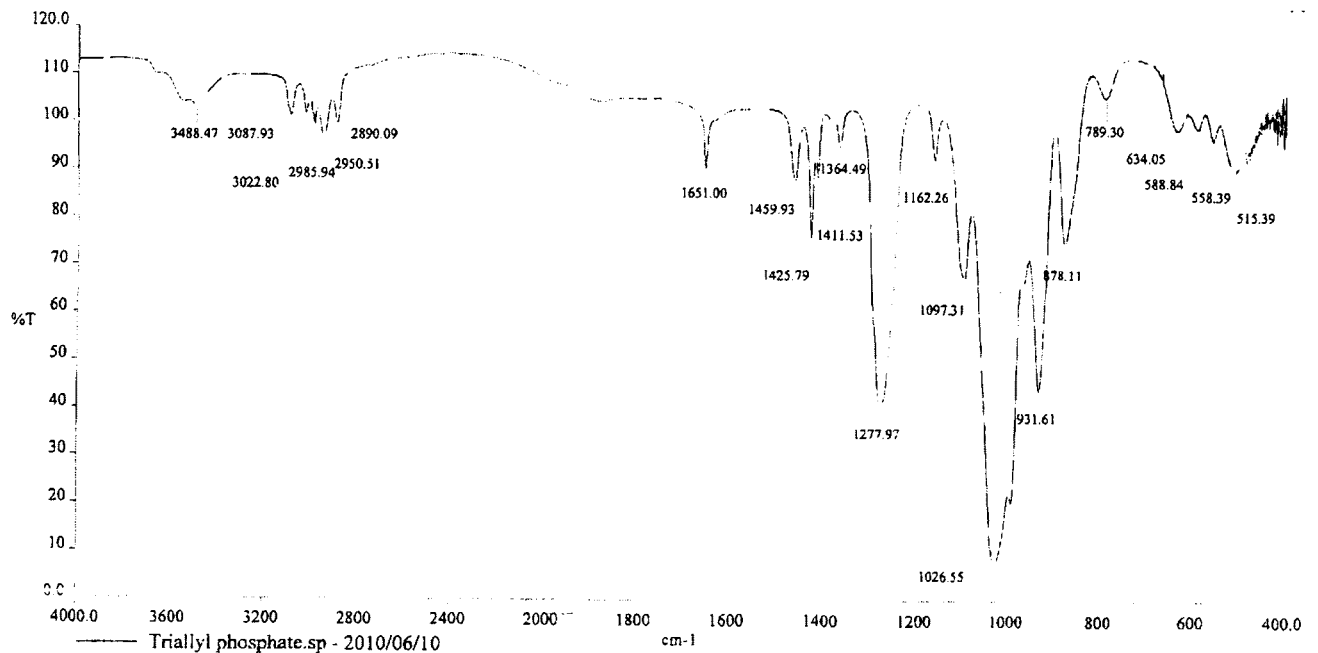


図 2 実験開始時の標準物質の赤外線吸収スペクトル

最終報告書

試験名

投与液中のリン酸トリアリル濃度確認試験

著 者



試験終了日

2010 年 11 月 4 日

試験施設

株式会社日曹分析センター (略称 NCAS) 小田原事業所
〒250-0216 神奈川県小田原市高田 345

試験委託者

株式会社化合物安全性研究所
〒004-0839 北海道札幌市清田区真栄 363 番 24

試験番号

NCAS 10-158

1.2. 2回目受領投与液の測定結果

機器使用前点検結果（測定日：2010年10月4日）を表4に示す。最高濃度の検量線試料(SS-5)を3回測定して求めたピーク面積の変動係数は0.4%であったので、異常なしと判断し濃度測定を実施した。

検量線試料の測定結果（測定日：2010年10月4日）を表5に示す。検量線の相関係数は0.9449、真度は最低濃度の検量線試料で12.77%、その他の検量線試料で-18.56～17.28%の範囲内であり、最低濃度以外の検量線試料で真度の判定基準を満たさなかった。同時に測定した投与液においても一部の試料で変動係数が判定基準を超えたため（表6参照）、機器の動作不良が原因であると判断し、注入口のライナーやセプタムを交換して再分析を行った。

再分析時（測定日：2010年10月5日）の機器使用前点検結果を表4に示す。最高濃度の検量線試料(SS-5)を3回測定して求めたピーク面積の変動係数は1.1%であったので、異常なしと判断し濃度測定を実施した。

検量線試料の測定結果（測定日：2010年10月5日）を表5に示す。検量線の相関係数は0.9994、真度は-6.05～4.53%の範囲内であり、判定基準を満たした。

2回目受領投与液を測定した結果（測定日：2010年10月5日）を表6に、各濃度投与液の代表的な測定溶液のクロマトグラムを図11～図13に示す。各投与液の2連で測定した測定溶液濃度の変動係数は0.2～2.9%の範囲内であり、測定結果は有効であった。最終的な投与液濃度は以下の通りとなり、1および10 mg/mLの投与液は設定濃度に対して±15%以内であることから、設定濃度に調整されたと判断した。0.1 mg/mL 投与液は設定濃度に対して+27%となった。再々分析を実施するには試料量が不足していたため、再々分析は実施しなかった。試験委託者に連絡し、これらを報告書に記載する事とした。

試料名	設定濃度 (mg/mL)	測定結果 (mg/mL)
リン酸トリアル 0.1 mg/mL 調製液	0.1	0.127
リン酸トリアル 1 mg/mL 調製液	1	0.974
リン酸トリアル 10 mg/mL 調製液	10	9.21

2. リン酸トリアルルの安定性

実験終了時の標準物質のIRスペクトル(図15)と試験番号 NCAS 10-159「投与液中のリン酸トリアルルの安定性・均一性試験」で測定したIRスペクトル(図14)を比較したところ、主な吸収波数が一致したため、実験期間中の測定対象物質は安定であると判断した。

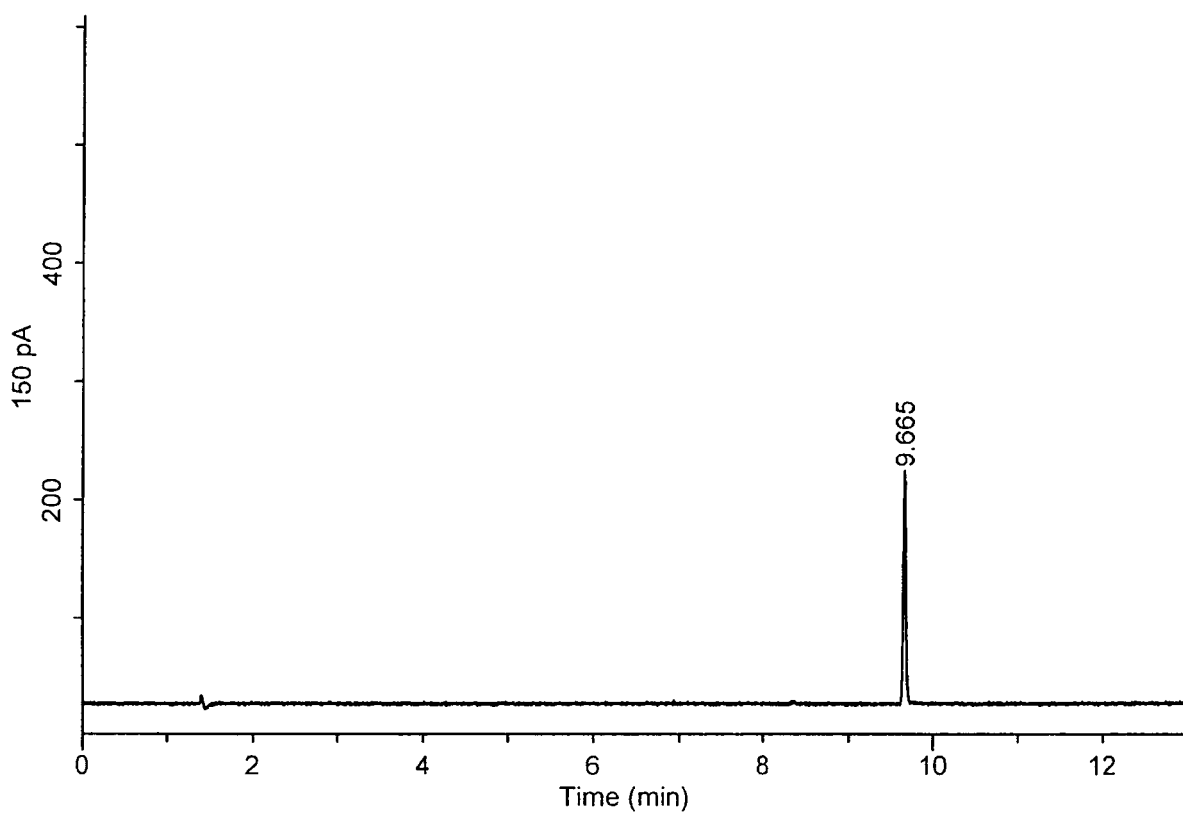


図 13 10 mg/mL 調製液の代表的な測定溶液のクロマトグラム (2010 年 10 月 5 日測定)

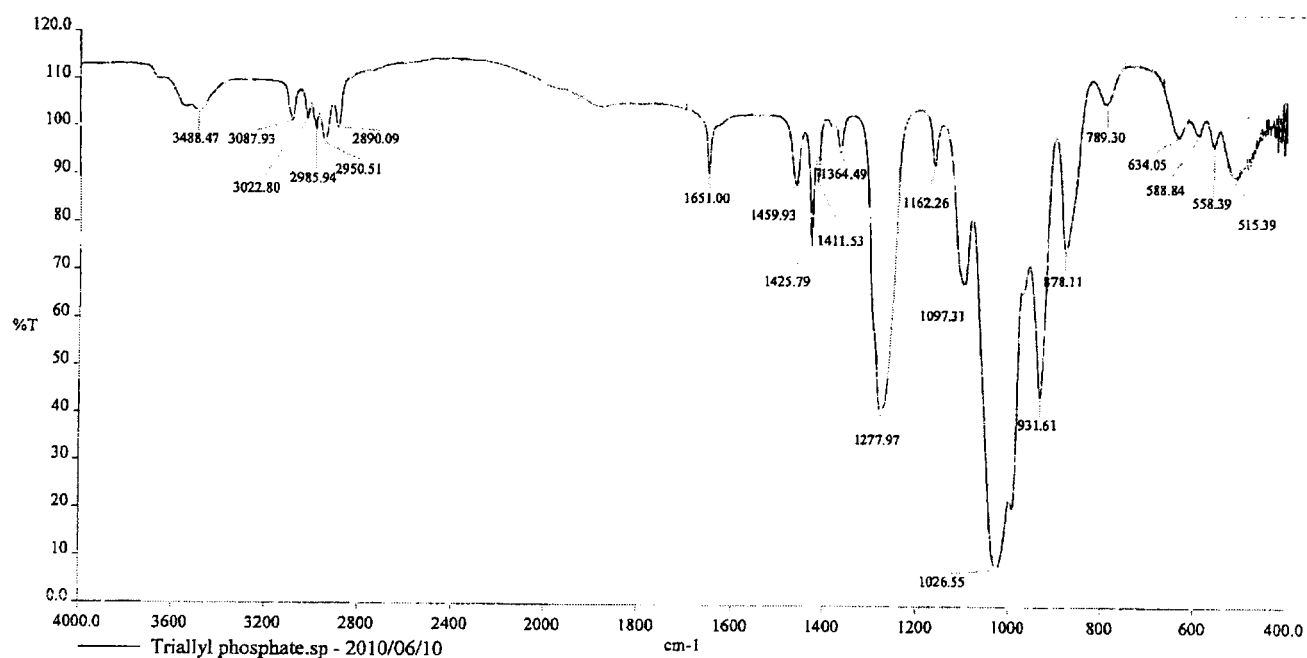


図 14 実験開始時の標準物質の IR スペクトル (試験番号 NCAS 10-159 より)

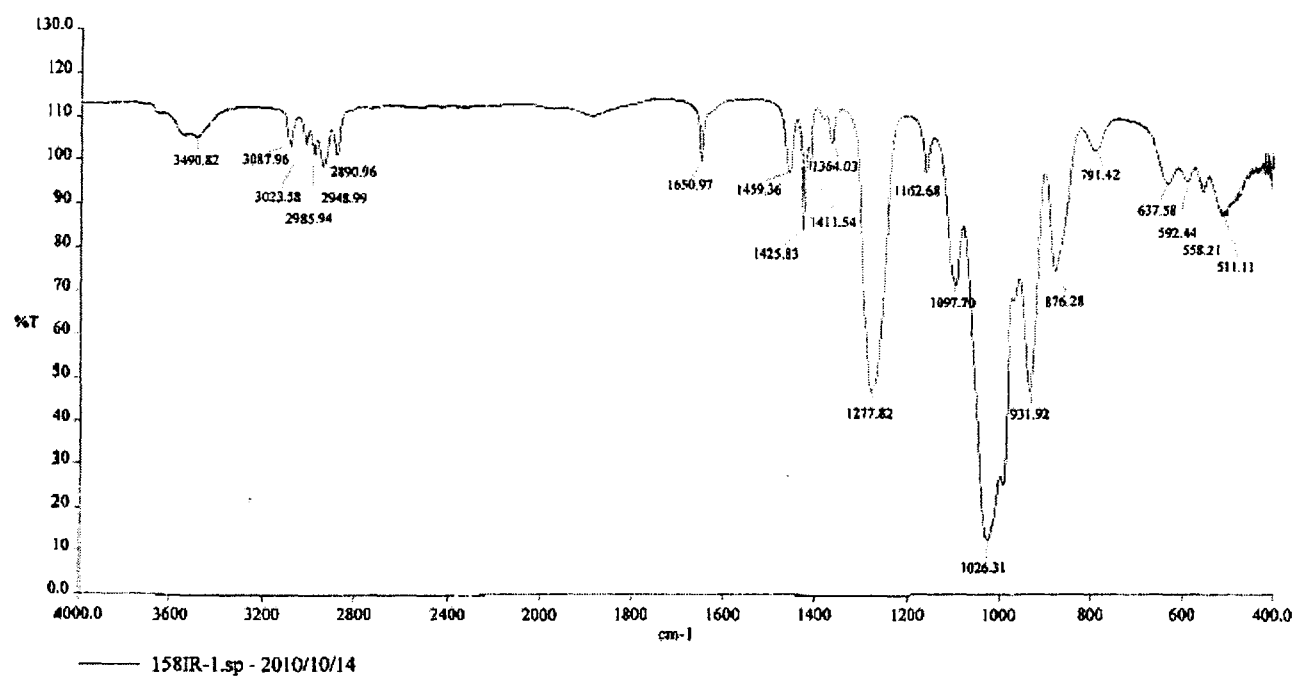


図 15 全実験終了時の標準物質の IR スペクトル

Historical control data for reverse mutation test

(2010. 7)

Control data (Date : 2010.4~2010.6)										
Strain	TA100		TA1535		WP2 _{uvr} A		TA98		TA1537	
Metabolic activation	S9()	S9(1)	S9()	S9(1)	S9()	S9(1)	S9()	S9(1)	S9()	S9(1)
No. of data	n = 13	n = 13	n = 13	n = 13	n = 13	n = 14	n = 14	n = 13	n = 13	n = 13
Mean ± S.D.	121 ± 14	141 ± 12	10 ± 2	12 ± 2	15 ± 2	18 ± 3	17 ± 3	32 ± 4	14 ± 5	14 ± 3
Maximum	147	156	12	18	19	24	22	38	25	21
Minimum	101	120	7	10	12	14	11	25	9	10
X-R-Rs ^a	89 ~ 153	109 ~ 173	5 ~ 15	4 ~ 20	4 ~ 26	7 ~ 29	6 ~ 28	19 ~ 45	1 ~ 27	3 ~ 25
Reference : Control data (Date : 2004.1~2010.6)										
No. of data	n = 386	n = 434	n = 361	n = 362	n = 356	n = 359	n = 389	n = 384	n = 363	n = 364
Mean ± S.D.	117 ± 14	135 ± 13	10 ± 2	10 ± 2	18 ± 4	20 ± 4	16 ± 3	29 ± 4	13 ± 4	16 ± 5
Maximum	147	169	24	22	30	32	27	42	29	33
Minimum	75	100	5	6	9	12	10	18	4	2
X-R-Rs ^a	85 ~ 149	100 ~ 170	5 ~ 15	5 ~ 15	7 ~ 29	9 ~ 31	8 ~ 24	18 ~ 40	2 ~ 24	5 ~ 27
Positive control data (Date : 2010.4~2010.6)										
Strain	TA100		TA1535		WP2 _{uvr} A		TA98		TA1537	
Metabolic activation	S9()	S9(1)	S9()	S9(1)	S9()	S9(1)	S9()	S9(1)	S9()	S9(1)
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 = 12	n = 12	n = 12	n = 12	n = 12	n = 13	n = 13	n = 12	n = 12	n = 12
Mean ± S.D.	614 ± 51	1323 ± 121	278 ± 48	567 ± 54	64 ± 6	1231 ± 77	287 ± 26	146 ± 13	226 ± 65	368 ± 59
Maximum	702	1464	392	646	79	1348	335	172	378	443
Minimum	528	1156	217	437	55	1086	241	127	144	275
X-R-Rs ^a	470 ~ 758	868 ~ 1778	166 ~ 390	410 ~ 724	48 ~ 80	1034 ~ 1428	199 ~ 375	117 ~ 175	48 ~ 404	187 ~ 549
Reference : Positive control data (Date : 2004.1~2010.6)										
No. of data	n = 385	n = 433	n = 360	n = 361	n = 355	n = 358	n = 388	n = 383	n = 362	n = 363
Mean ± S.D.	735 ± 118	1377 ± 294	270 ± 50	333 ± 117	102 ± 17	955 ± 195	340 ± 76	267 ± 59	256 ± 66	273 ± 119
Maximum	1158	2291	482	686	158	1456	594	433	640	791
Minimum	505	851	156	167	53	474	184	122	89	124
X-R-Rs ^a	541 ~ 929	914 ~ 1840	177 ~ 363	224 ~ 442	78 ~ 126	713 ~ 1197	207 ~ 473	179 ~ 355	99 ~ 413	140 ~ 406

^a X-R-Rs = $X \pm 2.66Rs$; X = Mean, Rs = Mean of (Xi - Xi-1)

Culture medium : OXOID Nutrient Broth No.2

Subculture : Tester strain suspension (12μ L) 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.