208-96-8

原本

T-0306

最 終 報 告 書

試験名：アセナフチレンの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：T-0306

試験期間：2009年1月8日-2009年10月16日

試験施設
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

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　　東京都千代田区霞が関1-2-2

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

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[redacted]
試験責任者：[redacted]
日付：2009年10月28日

1. 目次

1. 目次 2
2. 試験実施概要 5
2.1 試験番号 5
2.2 試験表題 5
2.3 試験目的 5
2.4 試験委託者 5
2.5 試験受託者 5
2.6 試験実施施設 5
2.7 試験日程 5
2.8 試験責任者 5
2.9 試験担当者 6
2.10 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 6
2.11 資料保存 6
2.12 試験責任者の署名又は記名・なつ印 6
3. 要約 7
4. 緒言 8
5. 被験物質及び被験液の調製 9
5.1 被験物質及び溶媒 9
5.1.1 被験物質 9
5.1.2 溶媒 10
5.1.3 溶媒の選択理由 10
5.2 被験液の調製方法 10
5.2.1 用量設定試験用被験液の調製 10
5.2.2 本試験 1 回目用被験液の調製 10
5.2.3 本試験 2 回目用被験液の調製 11
5.2.4 被験液の保存条件 11
6. 試験材料及び方法 11
6.1 試験菌株 11
6.1.1 菌株の種類 11
6.1.2 菌株の選択理由 11
6.1.3 菌株の保存及び解凍 11
6.1.4 菌株の特性検査 12
6.2 対照物質 12
6.2.1 陰性対照物質 12
6.2.2 陽性対照物質 12

6.2.3 調製方法 13
6.3 試薬 13
6.3.1 S9Mix の調製方法 13
6.3.2 最小グルコース寒天平板培地 14
6.3.3 ニュートリエントブロス No.2 培養液 15
6.3.4 0.1 mol/L リン酸緩衝液（pH 7.4） 15
6.3.5 トップアガー 16
6.4 試験方法 17
6.4.1 識別方法 17
6.4.2 前培養 17
6.4.3 本試験用量の設定 18
6.4.4 プレート数 18
6.4.5 試験操作（プレインキュベーション法） 18
6.5 判定基準 19
7. 試験結果 19
7.1 培養終了後の観察結果 19
7.2 復帰変異コロニー数 19
7.3 試験系の成立条件 19
8. 考察 20
9. 参考文献 20

Tables

別表 1 試験結果表(用量設定試験)
別表 2 試験結果表(本試験 1 回目：-S9Mix)
別表 3 試験結果表(本試験 1 回目：+S9Mix)
別表 4 試験結果表(本試験 2 回目：-S9Mix)
別表 5 試験結果表(本試験 2 回目：+S9Mix)

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)

別添 1	検査成績書
別添 2	背景データ（081020）

2. 試験実施概要

2.1 試験番号

T-0306

2.2 試験表題

アセナフチレンの細菌を用いる復帰突然変異試験

2.3 試験目的

細菌を用い、アセナフチレン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。

2.4 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　　東京都千代田区霞が関 1-2-2

2.5 試験受託者

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

2.6 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

2.7 試験日程

試験開始日	:	2009 年　1 月　8 日
用量設定試験開始日	:	2009 年　1 月 15 日
用量設定試験終了日	:	2009 年　1 月 19 日
本試験 1 回目開始日	:	2009 年　2 月　2 日
本試験 1 回目終了日	:	2009 年　2 月　5 日
本試験 2 回目開始日	:	2009 年　2 月 19 日
本試験 2 回目終了日	:	2009 年　2 月 23 日
試験終了日	:	2009 年 10 月 16 日

2.8 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
[redacted]

2.9 試験担当者

用量設定試験

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 :

[redacted]

2.10 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。なお、被験物質保存期間中に-0.6°C を示したが、極めて短時間であり、試験終了後の被験物質の分析においても純度に問題がないことから試験には影響しないと判断した。

2.11 資料保存

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。

2.12 試験責任者の署名又は記名・なつ印

[redacted] 2009 年 10 月 16 日 [redacted]

株式会社ボゾリサーチセンター　東京研究所

3. 要約

アセナフチレンの復帰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* と略す）TA100、TA1535、TA98、TA1537 及び大腸菌 *Escherichia coli*（以下、*E. coli* と略す）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ジメチルスルホキシド(以下、DMSO と略す)を用いた。

試験は、19.5~5000 μg/plate の範囲の被験物質処理用量で用量設定試験を実施した。その結果より本試験は、生育阻害を示した最低用量を最高用量として、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1537 については 0.61~19.5 μg/plate の範囲の 6 用量、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA1535、TA98、TA1537 については 2.44~78.1 μg/plate の範囲の 6 用量、代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA100、*E. coli* WP2 *uvrA* ついては 9.77~313 μg/plate の範囲の 6 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 5000 μg/plate で認められた。また、被験物質による着色は、代謝活性化した場合の 5000 μg/plate で認められた。

2) 生育阻害

実体顕微鏡を用いて菌に対する生育阻害を観察した結果、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1537 の 9.77 μg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1535 及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA1535、TA1537 の 39.1 μg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA98 の 78.1 μg/plate 以上、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、*E. coli* WP2 *uvrA* の 156 μg/plate 以上で認められた。

3) 復帰変異コロニー数

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による復帰変異コロニー数の増加は認められず、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、アセナフチレンは、細菌に対する復帰突然変異誘発能を有さない（陰性）と判定した。

4. 緒言

本試験は、厚生労働省医薬食品局審査管理課　化学物質安全対策室からの委託により、株式会社ボゾリサーチセンターで実施した。なお、試験は以下の基準を遵守し、ガイドラインに準拠して行った。

1) GLP

- 「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(OECD：1997年11月26日)
- 「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20年7月4日最終改正)

2) ガイドライン

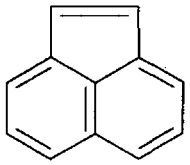
- 「OECD Guidelines for Testing of Chemicals 471」(OECD：1997年7月21日)
- 「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成15年11月21日：薬食発第1121002号厚生労働省医薬食品局長、平成15・11・13製局第2号経済産業省製造産業局長、環保企発第031121002号環境省総合環境政策局長通知、平成18年11月20日最終改正)

5. 被験物質及び被験液の調製

5.1 被験物質及び溶媒

5.1.1 被験物質

製造元	:	新日鐵化学株式会社
名称	:	アセナフチレン
ロット番号	:	7-MOM
ＣＡＳ番号	:	208-96-8
構造式	:	



純度	:	96.3%
不純物の名称及び濃度	:	ナフタレン；0.1%、1-メチルナフタレン；0.2%、アセナフテン；3.3%、その他；0.2%
分子量	:	152.20
融点	:	88-91°C
沸点	:	280°C
蒸気圧	:	2.67hPa(156°C)
分配係数	:	3.93～4.07
常温における性状	:	黄色固体
安定性	:	紫外線照射で二量体、108°C 加熱で種々のポリマーを生成する。強酸により、重合。還元するとアセナフテン、酸化するとナフタリン酸を生じる。なお、本試験終了後に残余となった被験物質を製造元において分析した結果、純度に大きな変動はなく、安定であることが確認された(別添 1)。
溶解性	:	水；不溶 DMSO；50mg/mL 以上
保存条件	:	冷蔵・遮光・密閉
保存場所	:	東京研究所　被験物質調製保存室
保存温度	:	保存期間中 2008.10.30~2009.2.20 の実測温度-0.6~8.2℃
返却	:	試験終了後の残量はすべて製造元へ返却した。

なお、上記溶解性は、株式会社ボゾリサーチセンターで実施した溶解性試験の結果であり、水については 50mg/mL で溶解しなかったため、不溶とした。

5.1.2 溶媒

名称	:	DMSO
製造元	:	和光純薬工業株式会社
ロット番号	:	PEH6808
規格	:	JIS 規格　試薬特級　99.0%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

5.1.3 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、発熱、ガスの発生等の反応性も認められなかったため、DMSO を溶媒として試験を実施した。

5.2 被験液の調製方法

5.2.1 用量設定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電子天秤（GR-120、株式会社エー・アンド・ディ）を用いて秤量し、その秤量値 272.4 mg に最高調製濃度の 50 mg/mL となるように溶媒量を計算し、5.448 mL の DMSO を添加して溶解し、50 mg/mL の被験液を調製した。次いで、これを公比 4 で順次 4 段階希釈し、50、12.5、3.13、0.781 及び 0.195 mg/mL の計 5 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。

5.2.2 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電子天秤（GR-120、株式会社エー・アンド・ディ）を用いて秤量し、その秤量値 40.2 mg に最高調製濃度の 12.5 mg/mL となるように溶媒量を計算し、3.216 mL の DMSO を添加して溶解し、12.5 mg/mL 溶液を調製した。次いで、これを 4 倍稀釈して 3.13 mg/mL の被験液を調製した。これをさらに公比 2 で順次 9 段階希釈し、3.13、1.56、0.781、0.391、0.195、0.0977、0.0488、0.0244、0.0122 及び 0.0061 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。

5.2.3 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電子天秤（GR-120、株式会社エー・アンド・ディ）を用いて秤量し、その秤量値 33.4 mg に最高調製濃度の 12.5 mg/mL となるように溶媒量を計算し、2.672 mL の DMSO を添加して溶解し、12.5 mg/mL 溶液を調製した。次いで、これを 4 倍稀釈して 3.13 mg/mL の被験液を調製した。これをさらに公比 2 で順次 9 段階希釈し、3.13、1.56、0.781、0.391、0.195、0.0977、0.0488、0.0244、0.0122 及び 0.0061 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。

5.2.4 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。

6. 試験材料及び方法

6.1 試験菌株

6.1.1 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ものから、2005 年 7 月 21 日に分与された。

6.1.2 菌株の選択理由

毒性試験法ガイドラインに準じて選択した。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ている。

6.1.3 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 PEN0496）を 0.7 mL の割合で添加して、滅菌チューブに 300 μL 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 2008 年 9 月 12 日～2009 年 2 月 19 日：-87.7～-80.9℃）。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
S. typhimurium TA98	2008 年 9 月 26 日
S. typhimurium TA100	2008 年 11 月 6 日
S. typhimurium TA1535	2008 年 9 月 12 日
S. typhimurium TA1537	2008 年 9 月 12 日
E. coli WP2 *uvrA*	2008 年 12 月 11 日

6.1.4 菌株の特性検査

6.1.3 の凍結保存菌株を用いて、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
S. typhimurium TA98	2008 年 10 月 2 日~2008 年 10 月 6 日
S. typhimurium TA100	2008 年 11 月 6 日~2008 年 11 月 10 日
S. typhimurium TA1535	2008 年 9 月 24 日~2008 年 9 月 27 日
S. typhimurium TA1537	2008 年 10 月 2 日~2008 年 10 月 6 日
E. coli WP2 *uvrA*	2008 年 12 月 11 日~2008 年 12 月 15 日

6.2 対照物質

6.2.1 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。

6.2.2 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）	17065	100%	冷蔵、遮光

保存場所　　東京研究所　微生物試験室
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.
B[*a*]P：AccuStandard, Inc.；Ames Grade

6.2.3 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 PEN0496、PEH6808）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 K8A92）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	
	陽性対照物質名	調製濃度 (μg/mL)	陽性対照物質名	調製濃度 (μg/mL)
S. typhimurium TA100	AF-2	0.1 (0.01)	B[*a*]P	50 (5.0)
S. typhimurium TA1535	SAZ	5 (0.5)	2AA	20 (2.0)
E. coli WP2 *uvrA*	AF-2	0.1 (0.01)	2AA	100 (10.0)
S. typhimurium TA98	AF-2	1 (0.1)	B[*a*]P	50 (5.0)
S. typhimurium 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。

6.3 試薬

6.3.1 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：ロット番号 642295、650855、655518）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　：　キッコーマン株式会社
ロット番号　：　RAA-586
製造日　：　2008 年 10 月 3 日
購入日　：　2008 年 10 月 30 日
種・系統　：　ラット・SD 系
週齢・性　：　7 週齢・雄
体重　：　219-257g
誘導物質　：　フェノバルビタール(PB)及び 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
：　2008 年 10 月 30 日~2009 年 2 月 20 日：-87.3～-81.5℃

2)　補酵素
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　：　999801
製造日　：　2008 年 3 月 11 日
購入日　：　2008 年 12 月 9 日(用量設定試験、本試験 1 回目)
2009 年 1 月 23 日(本試験 2 回目)
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
：　2008 年 12 月 9 日~2009 年 2 月 20 日：1.5~ 5.2°C

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

6.3.2 最小グルコース寒天平板培地

1)　バイタルメディア AMT-O 培地
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　：　DZL9C901
製造日　：　2008 年 12 月 9 日

購入日　：　2009年1月15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　：　1027367-02

6.3.3 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°C、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　：　464616
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

6.3.4 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 に調整し、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°C、20 分)を行った。調製後は使用時まで冷蔵で保存した。

1)　リン酸二水素ナトリウム二水和物 ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$)
名称　：　リン酸二水素ナトリウム二水和物 ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$)
製造元　：　和光純薬工業株式会社
ロット番号　：　SDM1133(用量設定試験、本試験 1 回目)
PEN6717(本試験 2 回目)
保存方法　：　室温保存
保存場所　：　東京研究所　微生物試験室

2)　リン酸水素二ナトリウム (Na_2HPO_4)
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

6.3.5 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 wt% Agar, 0.6wt% NaCl)をオートクレーブにより滅菌処理(121°C、20分)した後、*S. typhimurium* TA株は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容量加えて調製した。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°Cの恒温槽で保温した。

1) Bacto Agar

名称	:	Bacto Agar
製造元	:	Becton, Dickinson and Company
ロット番号	:	8120597
保存方法	:	室温保存
保存場所	:	東京研究所　微生物試験室

2) NaCl

名称	:	NaCl
製造元	:	和光純薬工業株式会社
ロット番号	:	ALJ3477
保存方法	:	室温保存
保存場所	:	東京研究所　微生物試験室

3) D-ビオチン

名称	:	D-ビオチン
製造元	:	MP Biomedicals, Inc.
ロット番号	:	3570J
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) L-ヒスチジン塩酸塩一水和物

名称	:	L-ヒスチジン塩酸塩一水和物
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) L-トリプトファン

名称	:	L-トリプトファン
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

6.4 試験方法

6.4.1 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。

S. typhimurium TA100　青
S. typhimurium TA1535　桃
E. coli WP2 *uvrA*　茶
S. typhimurium TA98　赤
S. typhimurium 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。

6.4.2 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て得た菌懸濁液を *S. typhimurium* 株では各 20 μL、*E. coli* 株では 10 μL 接種した。使用後の菌懸濁液は廃棄した。
2) 各試験菌株を接種した L 字型試験管を振盪恒温槽（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 の水浴中に放置(6 時間 30 分)した後、37°C に上昇後 9 時間前培養した。
3) 前培養終了時に培養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、培養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)		
	用量設定試験	本試験 1 回目	本試験 2 回目
S. typhimurium TA100	5.13×10^9	5.13×10^9	5.30×10^9
S. typhimurium TA1535	5.00×10^9	4.85×10^9	4.75×10^9
E. coli WP2 *uvrA*	7.78×10^9	8.11×10^9	8.18×10^9
S. typhimurium TA98	5.46×10^9	5.42×10^9	5.56×10^9
S. typhimurium TA1537	3.11×10^9	3.10×10^9	3.10×10^9

6.4.3 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 4 段階希釈した計 5 用量（19.5、78.1、313、1250、5000 μg/plate）を用い、用量設定試験を実施した。なお、用量設定試験の結果を別表 1 に示した。

用量設定試験の結果、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* TA1537 の 19.5 μg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA1535、TA98、TA1537 の 78.1 μg/plate 以上、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、*E. coli* WP2 *uvrA* の 313 μg/plate 以上で認められた。また、本被験物質によるプレート上の沈殿は、代謝活性化しない場合の 5000 μg/plate で認められた。また、被験物質による着色は、代謝活性化した場合の 5000 μg/plate で認められた。

このため、本試験の試験用量は、生育阻害を示した最低用量を最高用量として、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1537 については 19.5 μg/plate、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA1535、TA98、TA1537 については 78.1 μg/plate、代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA100、*E. coli* WP2 *uvrA* については 313 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。なお、本試験は同一用量で 2 回実施した。

6.4.4 プレート数

被験物質処理群、陰性対照群及び陽性対照群のいずれについても、用量設定試験では 2 枚、2 回の本試験では 3 枚のプレートを用いた。

6.4.5 試験操作（プレインキュベーション法）

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株の培養液 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 に保温されているトップアガーを 2.0 mL 加え攪拌後、最小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 0.1 mL 及び調製した S9Mix 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 加えた後に最小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) 最小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、最小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°C で用量設定試験、本試験 1 回目及び本試験 2 回目ともに 48 時間培養した。

5) 培養後、プレート上の被験物質による沈殿及び着色を確認した結果、代謝活性化しない場合の 5000 μg/plate で沈殿、代謝活性化した場合の 5000 μg/plate で着色が認められたものの、機器計測に影響がなかったため、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、補正値：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。

6.5 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 倍以上となる増加を示し、2 回の本試験で再現性が認められた場合に陽性と判定することとした。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。

7. 試験結果

試験の結果を別表 1～5 及び図 1～10 に示した。なお、図は別表 2、3 より作成した。

7.1 培養終了後の観察結果

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 5000 μg/plate で認められた。また、被験物質による着色は、代謝活性化した場合の 5000 μg/plate で認められた。なお、実体顕微鏡を用いて菌に対する生育阻害を観察した結果、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1537 の 9.77 μg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1535 及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA1535、TA1537 の 39.1 μg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA98 の 78.1 μg/plate 以上、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、*E. coli* WP2 *uvrA* の 156 μg/plate 以上で認められた。

7.2 復帰変異コロニー数

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による復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量反応性も認められなかった。

7.3 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の増加を示し、陰性対照値及び陽性対照値の復帰変異コロニー数の平均値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。

8. 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による復帰変異コロニー数の増加は認められず、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、アセナフチレンは、細菌に対する復帰突然変異誘発能を有さない（陰性）と判定した。

9. 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 (用量設定試験)

被験物質の名称: アセナフチレン　　No. T-0306

試験実施期間		2009年1月15日 より 2009年1月19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*uvrA*	TA98	TA1537
S9Mix (−)	陰性対照 (DMSO)	119 151 (135)	16 15 (16)	31 31 (31)	22 25 (24)	11 17 (14)
	19.5	143 126 (135)	13 19 (16)	32 32 (32)	19 17 (18)	13 * 21 * (17)
	78.1	58 * 68 * (63)	13 * 12 * (13)	17 * 22 * (20)	16 * 15 * (16)	17 * 18 * (18)
	313	45 * 43 * (44)	0 * 0 * (0)	11 * 10 * (11)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
	1250	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	7 * 6 * (7)	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)	124 130 (127)	15 15 (15)	27 37 (32)	38 39 (39)	21 19 (20)
	19.5	150 125 (138)	19 11 (15)	28 34 (31)	40 37 (39)	19 19 (19)
	78.1	146 146 (146)	10 * 11 * (11)	32 34 (33)	52 * 56 * (54)	15 * 14 * (15)
	313	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	9 * 8 * (9)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
	1250	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	7 * 8 * (8)	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	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	547 581 (564)	328 358 (343)	99 85 (92)	546 503 (525)	2120 2057 (2089)
陽性対照 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	10.0	5.0	5.0
	コロニー数/プレート	1125 1166 (1146)	319 327 (323)	1231 1163 (1197)	420 348 (384)	139 158 (149)

(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:−S9Mix)

被験物質の名称:アセナフチレン　　No. T−0306

試験実施期間		2009年2月2日 より 2009年2月5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*uvrA*	TA98	TA1537
S9Mix (−)	陰性対照 (DMSO)	153 125 107 (128 ± 23.2)	18 10 7 (12 ± 5.7)	31 26 30 (29 ± 2.6)	18 7 23 (16 ± 8.2)	10 14 7 (10 ± 3.5)
	0.61	NT	NT	NT	NT	10 8 8 (9 ± 1.2)
	1.22	NT	NT	NT	NT	7 2 5 (5 ± 2.5)
	2.44	118 118 120 (119 ± 1.2)	8 11 13 (11 ± 2.5)	35 24 34 (31 ± 6.1)	21 13 18 (17 ± 4.0)	6 7 7 (7 ± 0.6)
	4.88	128 126 130 (128 ± 2.0)	7 7 10 (8 ± 1.7)	34 32 29 (32 ± 2.5)	26 15 12 (18 ± 7.4)	21 11 8 (13 ± 6.8)
	9.77	144 126 130 (133 ± 9.5)	17 10 11 (13 ± 3.8)	31 31 35 (32 ± 2.3)	16 27 28 (24 ± 6.7)	7 * 5 * 8 * (7 ± 1.5)
	19.5	119 105 117 (114 ± 7.6)	15 13 13 (14 ± 1.2)	32 31 43 (35 ± 6.7)	21 18 18 (19 ± 1.7)	2 * 10 * 8 * (7 ± 4.2)
	39.1	118 105 126 (116 ± 10.6)	13 * 5 * 11 * (10 ± 4.2)	27 32 29 (29 ± 2.5)	21 14 10 (15 ± 5.6)	NT
	78.1	40 * 40 * 47 * (42 ± 4.0)	12 * 7 * 6 * (8 ± 3.2)	19 * 18 * 20 * (19 ± 1.0)	10 * 10 * 16 * (12 ± 3.5)	NT
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	615 618 589 (607 ± 15.9)	325 322 292 (313 ± 18.2)	122 88 102 (104 ± 17.1)	469 498 438 (468 ± 30.0)	1870 1668 1775 (1771 ± 101.1)

(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ノ]アクリジン・2HCl

*: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3)

試 験 結 果 表 (本試験1回目:+S9Mix)

被験物質の名称:アセナフチレン　　No. T-0306

試験実施期間		2009年2月2日 より 2009年2月5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*uvrA*	TA98	TA1537
S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	139 139 130 (136 ± 5.2)	15 16 7 (13 ± 4.9)	41 27 26 (31 ± 8.4)	37 34 42 (38 ± 4.0)	12 10 12 (11 ± 1.2)
	2.44	NT	19 7 15 (14 ± 6.1)	NT	36 36 37 (36 ± 0.6)	11 13 10 (11 ± 1.5)
	4.88	NT	10 10 16 (12 ± 3.5)	NT	55 49 36 (47 ± 9.7)	13 10 11 (11 ± 1.5)
	9.77	133 128 112 (124 ± 11.0)	14 10 8 (11 ± 3.1)	33 27 30 (30 ± 3.0)	38 31 48 (39 ± 8.5)	6 7 11 (8 ± 2.6)
	19.5	121 110 132 (121 ± 11.0)	10 10 13 (11 ± 1.7)	31 29 24 (28 ± 3.6)	42 38 39 (40 ± 2.1)	15 13 11 (13 ± 2.0)
	39.1	142 141 134 (139 ± 4.4)	8 * 14 * 21 * (14 ± 6.5)	27 37 33 (32 ± 5.0)	43 42 36 (40 ± 3.8)	13 * 11 * 7 * (10 ± 3.1)
	78.1	121 123 144 (129 ± 12.7)	11 * 15 * 7 * (11 ± 4.0)	23 28 28 (26 ± 2.9)	31 * 41 * 46 * (39 ± 7.6)	7 * 10 * 21 * (13 ± 7.4)
	156	74 * 40 * 72 * (62 ± 19.1)	NT	7 * 11 * 9 * (9 ± 2.0)	NT	NT
	313	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	NT	22 * 7 * 7 * (12 ± 8.7)	NT	NT
陽性対照 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	10.0	5.0	5.0
	コロニー数/プレート	1033 1084 1073 (1063 ± 26.8)	228 241 258 (242 ± 15.0)	1076 1184 1165 (1142 ± 57.7)	422 404 339 (388 ± 43.7)	134 138 142 (138 ± 4.0)

(備考)

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2回目:−S9Mix)

被験物質の名称:アセナフチレン　　No. T−0306

試験実施期間		2009年2月19日 より 2009年2月23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*uvrA*	TA98	TA1537
S9Mix (−)	陰性対照 (DMSO)	144 122 116 (127 ± 14.7)	7 8 17 (11 ± 5.5)	34 32 24 (30 ± 5.3)	18 14 18 (17 ± 2.3)	20 13 18 (17 ± 3.6)
	0.61	NT	NT	NT	NT	23 11 17 (17 ± 6.0)
	1.22	NT	NT	NT	NT	13 24 21 (19 ± 5.7)
	2.44	100 110 98 (103 ± 6.4)	2 5 7 (5 ± 2.5)	26 35 26 (29 ± 5.2)	15 18 19 (17 ± 2.1)	8 18 15 (14 ± 5.1)
	4.88	106 104 92 (101 ± 7.6)	7 9 7 (8 ± 1.2)	27 24 34 (28 ± 5.1)	9 13 8 (10 ± 2.6)	16 17 21 (18 ± 2.6)
	9.77	112 97 97 (102 ± 8.7)	11 12 7 (10 ± 2.6)	26 31 27 (28 ± 2.6)	29 13 18 (20 ± 8.2)	17 * 24 * 14 * (18 ± 5.1)
	19.5	98 118 98 (105 ± 11.5)	11 7 9 (9 ± 2.0)	32 30 36 (33 ± 3.1)	15 20 18 (18 ± 2.5)	17 * 19 * 13 * (16 ± 3.1)
	39.1	110 113 98 (107 ± 7.9)	8 * 6 * 8 * (7 ± 1.2)	39 33 22 (31 ± 8.6)	15 9 19 (14 ± 5.0)	NT
	78.1	53 * 52 * 53 * (53 ± 0.6)	7 * 8 * 7 * (7 ± 0.6)	20 * 14 * 16 * (17 ± 3.1)	5 * 10 * 10 * (8 ± 2.9)	NT
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	564 573 596 (578 ± 16.5)	221 235 257 (238 ± 18.1)	66 84 95 (82 ± 14.6)	474 560 557 (530 ± 48.8)	1548 1637 1519 (1568 ± 61.5)

(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ノ]アクリジン・2HCl

*: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5)

試 験 結 果 表 (本試験2回目:+S9Mix)

被験物質の名称:アセナフチレン　　No. T-0306

試験実施期間		2009年2月19日 より 2009年2月23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*uvrA*	TA98	TA1537
S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	156 129 106 (130 ± 25.0)	7 10 5 (7 ± 2.5)	32 29 22 (28 ± 5.1)	33 29 35 (32 ± 3.1)	14 13 15 (14 ± 1.0)
	2.44	NT	5 10 7 (7 ± 2.5)	NT	41 17 33 (30 ± 12.2)	22 24 11 (19 ± 7.0)
	4.88	NT	8 6 8 (7 ± 1.2)	NT	38 31 33 (34 ± 3.6)	25 16 25 (22 ± 5.2)
	9.77	124 104 107 (112 ± 10.8)	8 10 12 (10 ± 2.0)	31 30 30 (30 ± 0.6)	39 36 28 (34 ± 5.7)	12 28 19 (20 ± 8.0)
	19.5	106 112 101 (106 ± 5.5)	13 8 4 (8 ± 4.5)	31 33 28 (31 ± 2.5)	31 25 26 (27 ± 3.2)	12 16 14 (14 ± 2.0)
	39.1	105 113 127 (115 ± 11.1)	7 * 4 * 7 * (6 ± 1.7)	26 25 36 (29 ± 6.1)	36 45 36 (39 ± 5.2)	10 * 19 * 18 * (16 ± 4.9)
	78.1	113 122 96 (110 ± 13.2)	2 * 5 * 8 * (5 ± 3.0)	33 26 24 (28 ± 4.7)	24 * 26 * 33 * (28 ± 4.7)	13 * 11 * 9 * (11 ± 2.0)
	156	105 * 77 * 58 * (80 ± 23.6)	NT	9 * 14 * 10 * (11 ± 2.6)	NT	NT
	313	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	NT	8 * 6 * 4 * (6 ± 2.0)	NT	NT
陽性対照 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	10.0	5.0	5.0
	コロニー数/プレート	990 973 976 (980 ± 9.1)	230 232 231 (231 ± 1.0)	892 894 913 (900 ± 11.6)	412 400 318 (377 ± 51.2)	117 123 133 (124 ± 8.1)

(備考)

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。

図 1

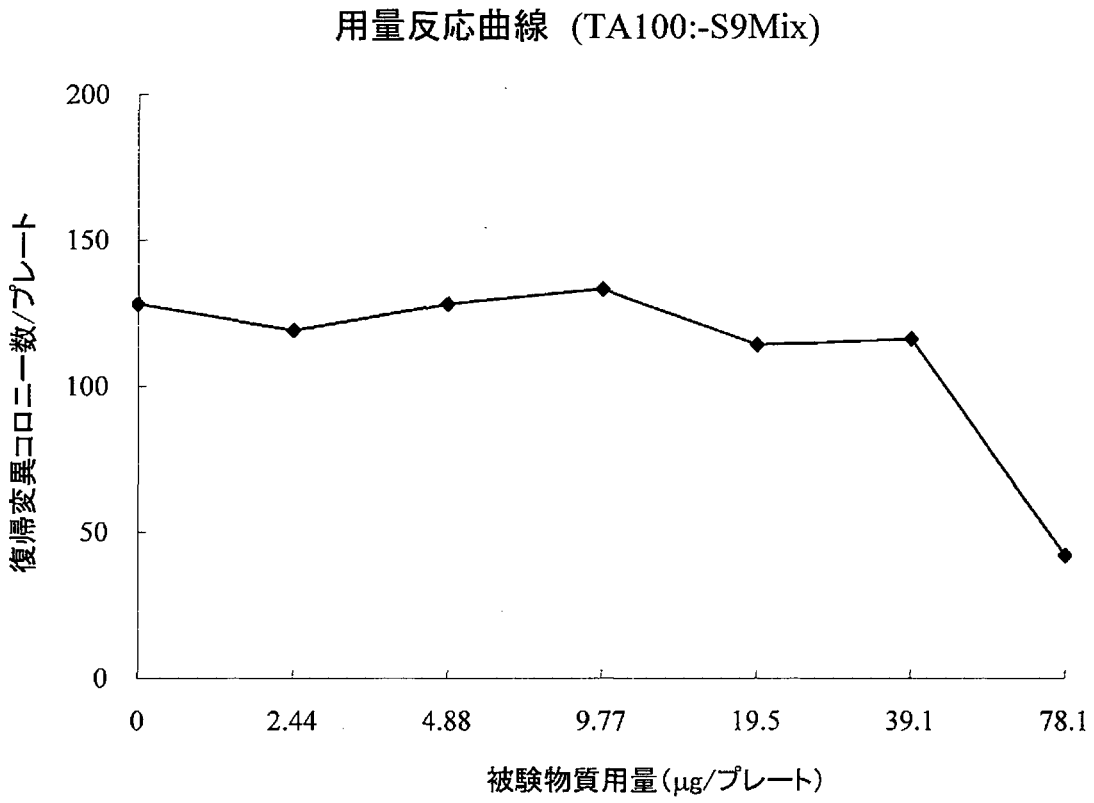

用量反応曲線 (TA100:-S9Mix)
200
150
100
50
0
復帰変異コロニー数/プレート
0
2.44
4.88
9.77
19.5
39.1
78.1
被験物質用量(μg/プレート)

図 2

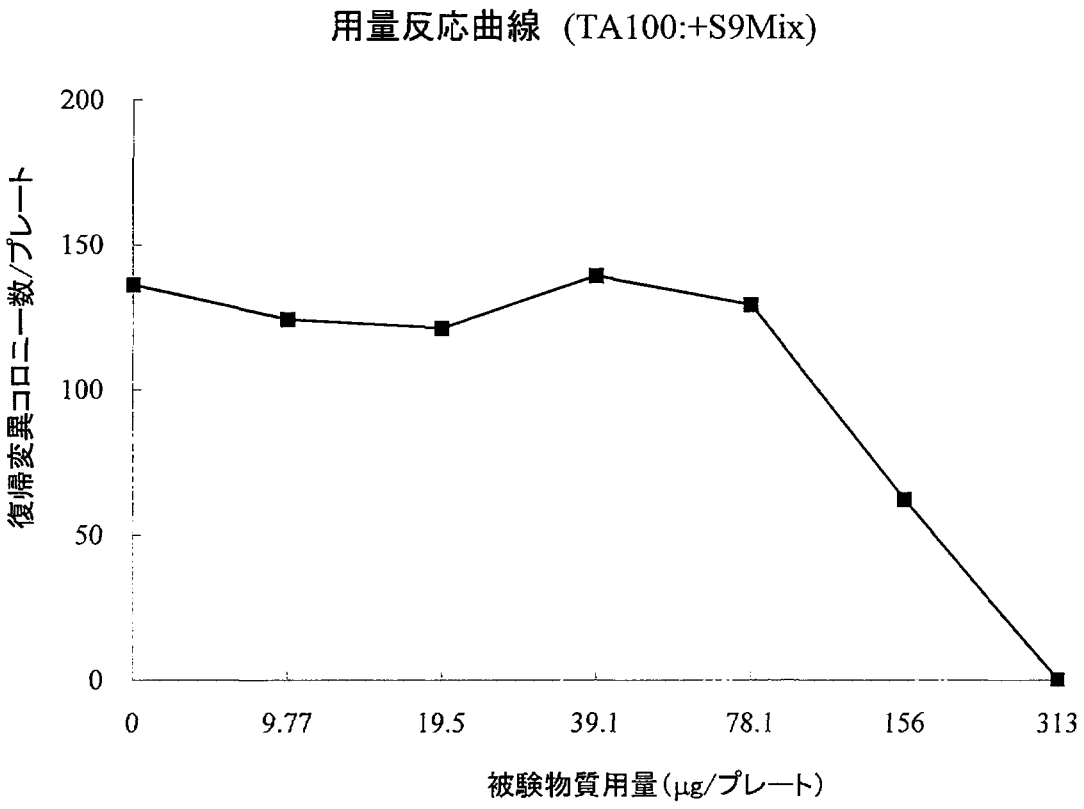

用量反応曲線 (TA100:+S9Mix)
200
150
100
50
0
復帰変異コロニー数/プレート
0
9.77
19.5
39.1
78.1
156
313
被験物質用量(μg/プレート)

図 3

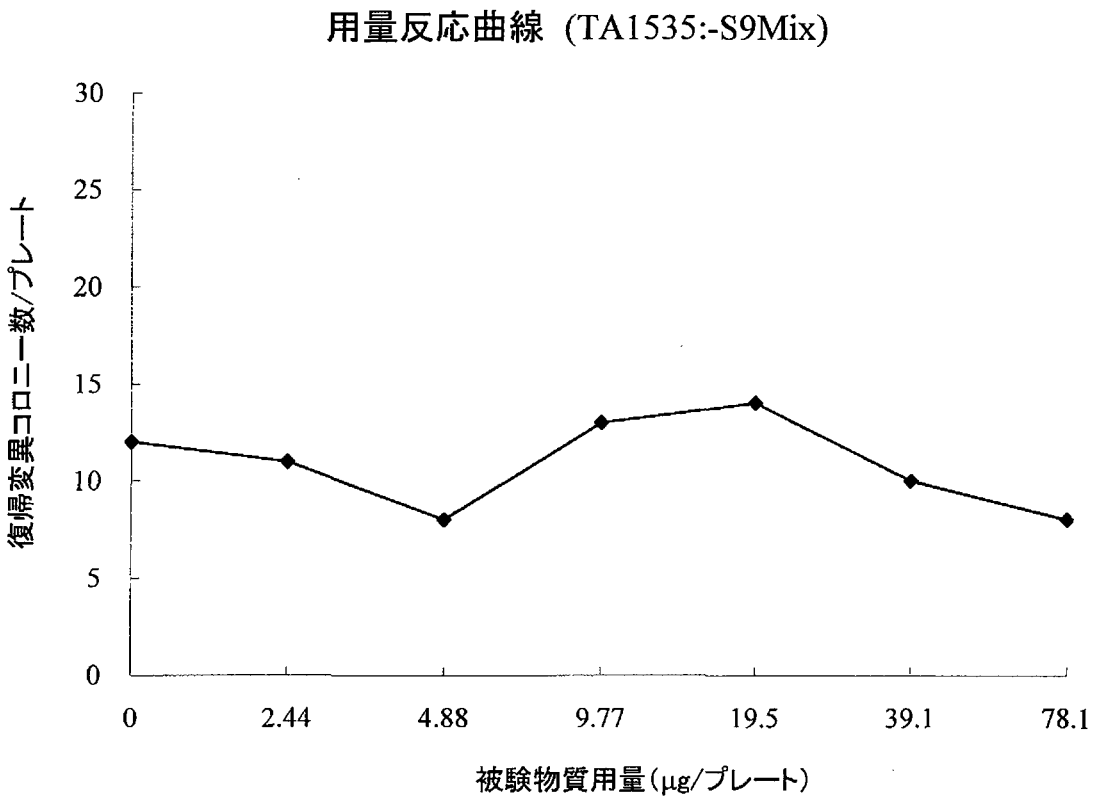

用量反応曲線 (TA1535:-S9Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
30
25
20
15
10
5
0
0
2.44
4.88
9.77
19.5
39.1
78.1
被験物質用量(μg/プレート)

図 4

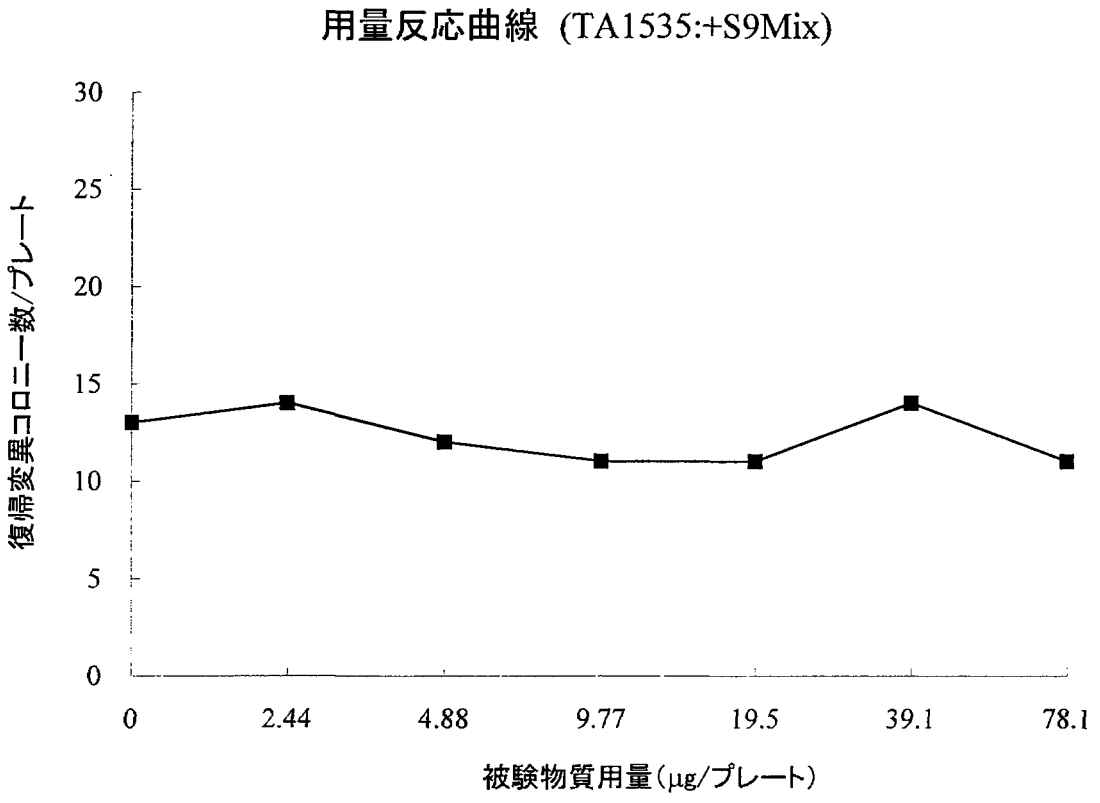

用量反応曲線 (TA1535:+S9Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
30
25
20
15
10
5
0
0
2.44
4.88
9.77
19.5
39.1
78.1
被験物質用量(μg/プレート)

図 5

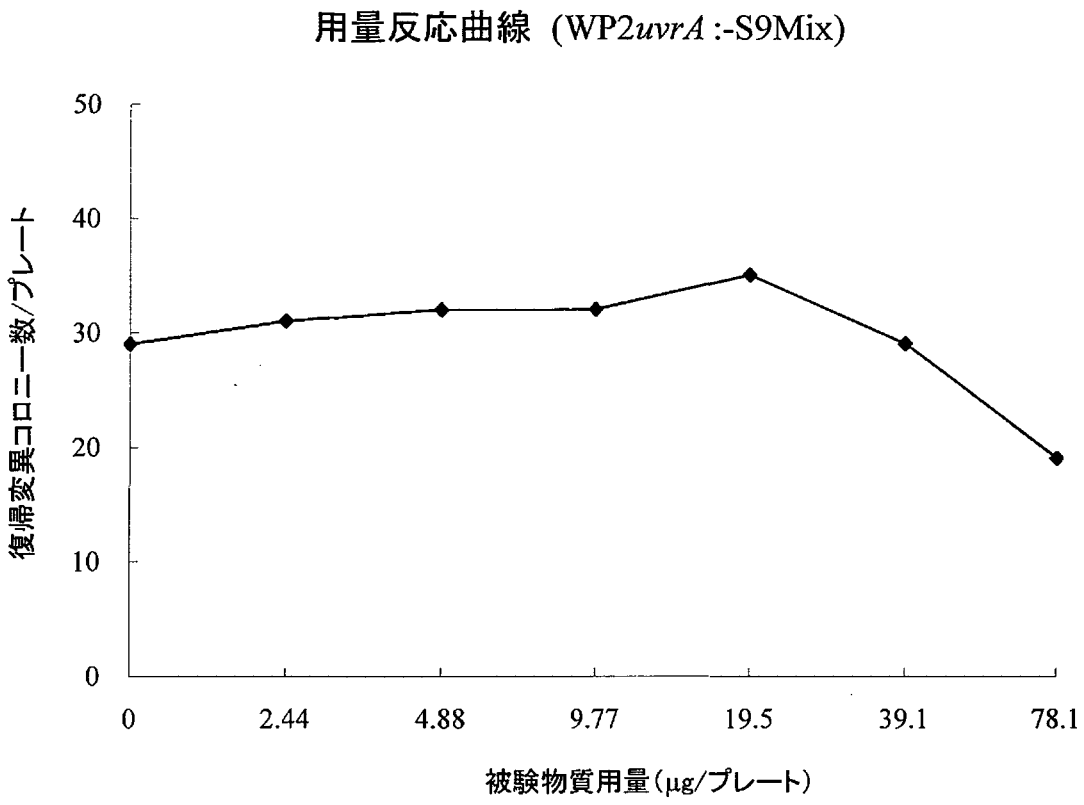

用量反応曲線 (WP2*uvrA* :-S9Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
50
40
30
20
10
0
0
2.44
4.88
9.77
19.5
39.1
78.1
被験物質用量(μg/プレート)

図 6

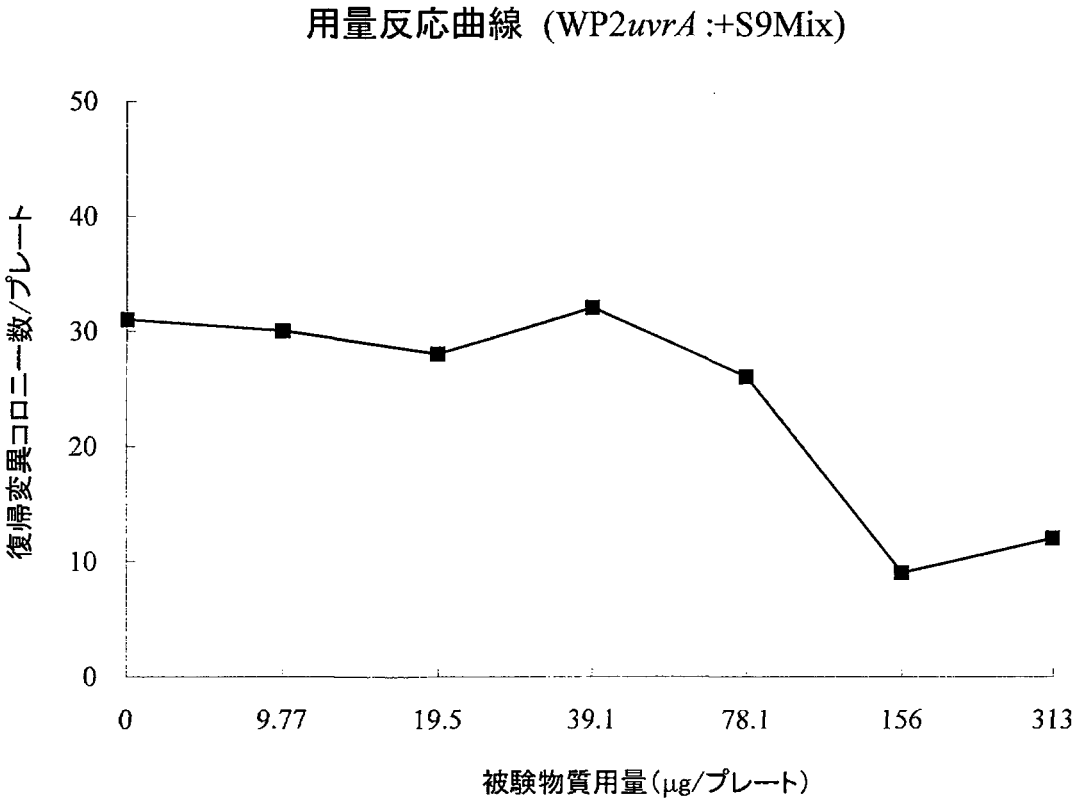

用量反応曲線 (WP2*uvrA* :+S9Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
50
40
30
20
10
0
0
9.77
19.5
39.1
78.1
156
313
被験物質用量(μg/プレート)

図 7

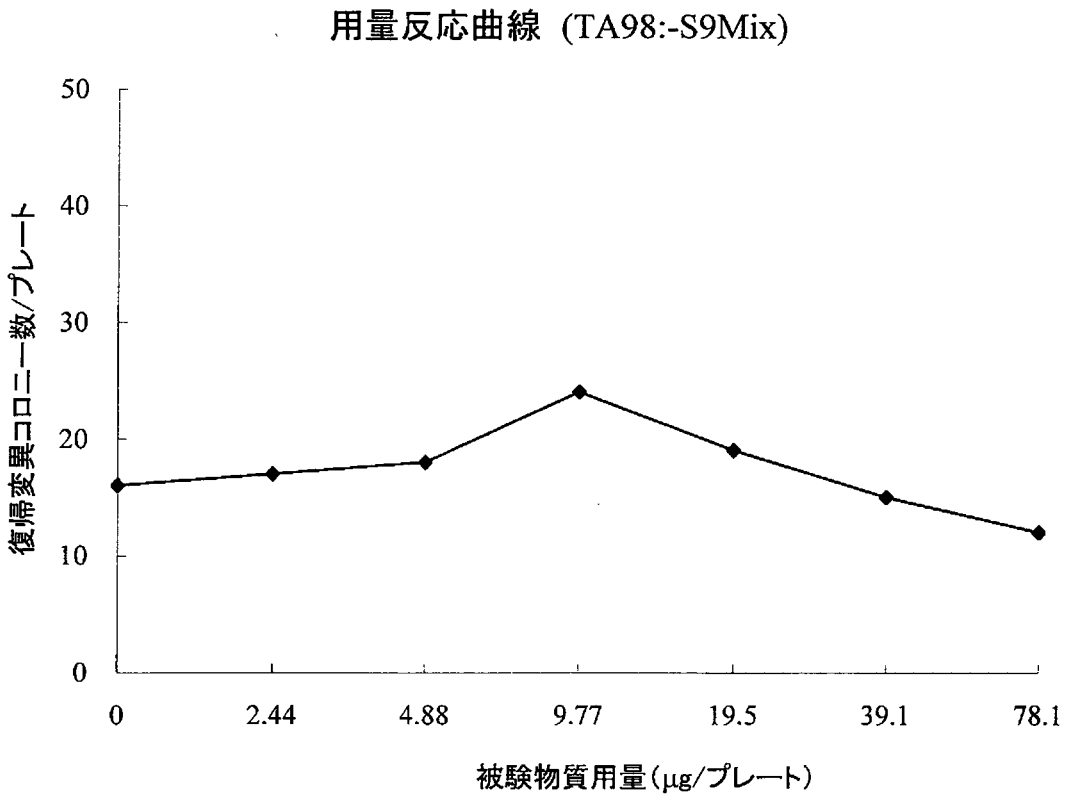

用量反応曲線 (TA98:-S9Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
50
40
30
20
10
0
0
2.44
4.88
9.77
19.5
39.1
78.1
被験物質用量(μg/プレート)

図 8

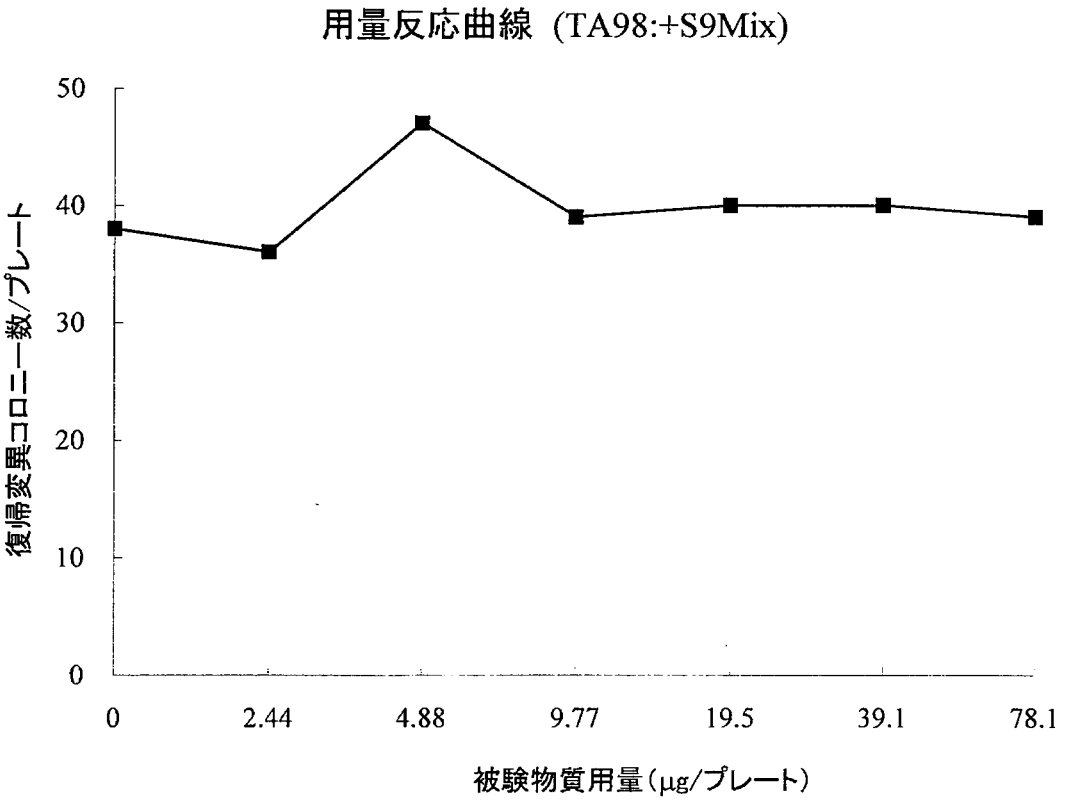

用量反応曲線 (TA98:+S9Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
50
40
30
20
10
0
0
2.44
4.88
9.77
19.5
39.1
78.1
被験物質用量(μg/プレート)

図 9

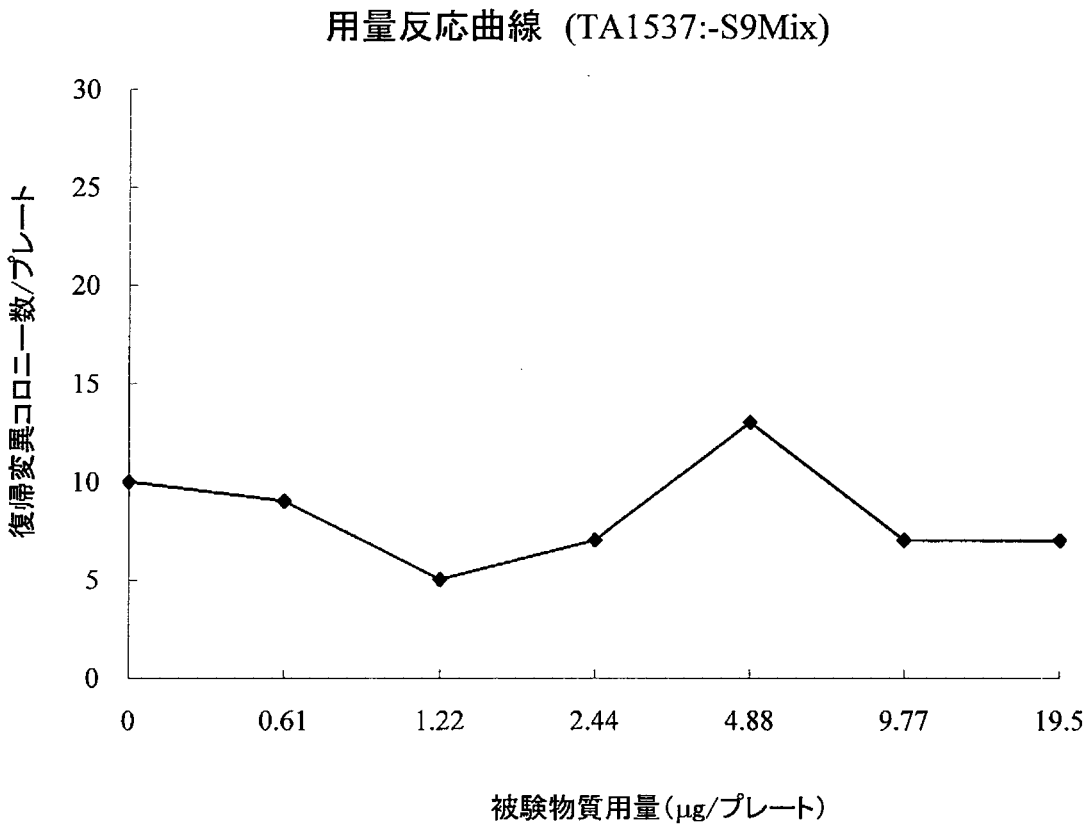
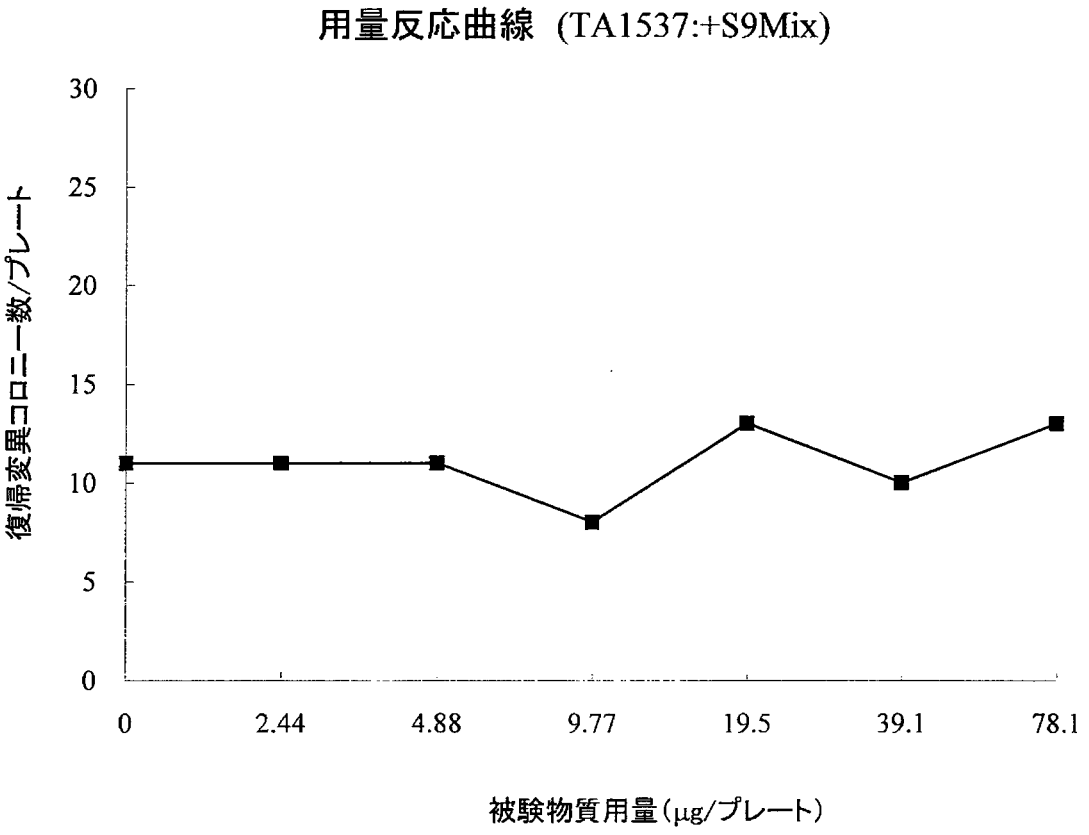

用量反応曲線 (TA1537:-S9Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
30
25
20
15
10
5
0
0
0.61
1.22
2.44
4.88
9.77
19.5
被験物質用量(μg/プレート)

図 10


用量反応曲線 (TA1537:+S9Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
30
25
20
15
10
5
0
0
2.44
4.88
9.77
19.5
39.1
78.1
被験物質用量(μg/プレート)

別添１

検　査　成　績　書

2009年4月18日

株式会社ボゾリサーチセンター

御中

新日鐵[redacted]式会社
九[redacted]
環境・安[redacted]保証室

品　　名	アセナフチレン	
試験年月日	2009年3月26日	
ロット番号	7-MOM	
検査項目	規格値	検査結果
アセナフチレン（%）	93.5以上98.5以下	96.3
ナフタレン（%）	1.0以下	0.1
1－メチルナフタレン（%）	1.5以下	0.3
1－ビニルナフタレン（%）	0.1以下	ND
アセナフテン（%）	1.5以上5.0以下	3.2
その他（%）	0.4以下	0.1

備　考	判定者	合　否
	[redacted]	合格

【問合せ】

別添 2

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

CODE No.: 081020

Period: From July 7, 2008 to October 17, 2008 (Pre-incubation Method)

Tester Strains	S9Mix (-) or (+)	Classification	Management ranges -3SD	Management ranges -2SD	Mean	Management ranges +2SD	Management ranges +3SD	number of plates
TA100	-	Solvent control	55	70	100	129	144	201
		Positive control AF-2(0.01μg/plate)	368	421	526	631	684	201
	+	Solvent control	68	87	124	162	180	201
		Positive control B[*a*]P(5.0μg/plate)	663	758	947	1137	1231	201
TA1535	-	Solvent control	1	4	9	15	17	201
		Positive control SAZ(0.5μg/plate)	176	224	321	417	465	201
	+	Solvent control	1	4	9	15	18	201
		Positive control 2AA(2.0μg/plate)	170	216	309	402	448	201
WP2*uvrA*	-	Solvent control	2	7	18	29	35	201
		Positive control AF-2(0.01μg/plate)	39	50	72	93	104	201
	+	Solvent control	5	10	20	30	34	201
		Positive control 2AA(10.0μg/plate)	703	804	1005	1206	1306	201
TA98	-	Solvent control	2	8	20	32	38	201
		Positive control AF-2(0.1μg/plate)	294	336	421	505	547	201
	+	Solvent control	9	18	35	53	62	201
		Positive control B[*a*]P(5.0μg/plate)	244	279	349	419	454	201
TA1537	-	Solvent control	1	4	10	16	19	201
		Positive control ICR-191(1.0μg/plate)	392	784	1569	2353	2745	201
	+	Solvent control	1	5	13	20	24	201
		Positive control B[*a*]P(5.0μg/plate)	61	77	110	143	160	201

(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

信頼性保証陳述書

試験番号 : T-0306

試験表題 : アセナフチレン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。

- 「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(OECD : 1997 年 11 月 26 日)
- 「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 20 年 7 月 4 日最終改正)

なお、調査は下記の通り実施致しました。

2009 年 10 月 16 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 [redacted]

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	[redacted]	2009 年 1 月 8 日	2009 年 1 月 8 日
調製・被験物質の保存・被験物質の処理		2009 年 2 月 3 日	2009 年 2 月 5 日
計数		2009 年 2 月 5 日	2009 年 2 月 6 日
生データ		2009 年 4 月 27 日	2009 年 4 月 28 日
最終報告書草案・図・表		2009 年 4 月 27 日	2009 年 4 月 28 日
最終報告書		2009 年 10 月 16 日	2009 年 10 月 16 日

プロセス調査

調査項目	調査担当者	調査日	部門責任者及び運営管理者への報告日
菌株の特性検査	[redacted]	2009 年 1 月 29 日	2009 年 2 月 2 日
		2009 年 2 月 10 日	
		2009 年 2 月 12 日	2009 年 2 月 16 日
陽性対照物質の管理		2009 年 3 月 18 日	2009 年 3 月 23 日

試験責任者陳述書

試験番号　：T-0306

試験表題　：アセナフチレン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20年7月4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。

2009年10月16日

株式会社ボゾリサーチセンター

試験責任者 [redacted]