B041791

最終報告書

ジベンジルトルエンの細菌を用いる復帰突然変異試験

（試験番号：B041791）

2006 年 9 月 14 日

株式会社三菱化学安全科学研究所

2. 目次

2. 目次 3

5. 要約 10
6. 材料および方法 11
6.1 被験物質 11
6.1.1 名称 11
6.1.2 構造式 11
6.1.3 分子量 11
6.1.4 CAS 番号 11
6.1.5 ロット番号 11
6.1.6 純度 11
6.1.7 提供者 11
6.1.8 性状 11
6.1.9 蒸気圧 11
6.1.10 沸点 11
6.1.11 融点 11
6.1.12 保存条件 12
6.1.13 保管場所 12
6.1.14 安定性の確認 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 13
6.3 試験菌株 13
6.3.1 試験菌株 13
6.3.2 試験菌株の選択理由 13
6.3.3 試験菌株の保存 13
6.3.4 試験菌株の遺伝的特性 14
6.3.5 菌懸濁液 14
6.4 培地 15
6.4.1 液体完全培地の調製 15
6.4.2 トップアガーの調製 15
6.4.3 最少グルコース寒天平板培地 15
6.5 S9 mix 16
6.5.1 S9 16
6.5.2 Cofactor mix 16
6.5.3 S9 mix 17
6.6 被験物質溶液および陽性対照物質溶液の調製 17
6.6.1 被験物質溶液の調製 17
6.6.2 陽性対照物質溶液の調製 17
6.7 被験物質および陽性対照物質用量 18
6.7.1 被験物質用量 18
6.7.2 陽性対照物質用量 19
6.8 復帰突然変異試験 19
6.8.1 試験法の選択 19
6.8.2 プレインキュベーション法 19
6.8.3 観察 20
6.8.4 コロニー計測 20
6.8.5 プレート数 20
6.8.6 結果の集計 20
6.8.7 無菌試験 20
6.8.8 実験の成立基準 20
6.8.9 試験結果の判定 21
6.8.10 再現性の確認 21
7. 結果 21
7.1 予備試験 21
7.2 本試験 21
7.3 無菌試験 21
8. 考察および結論 22
9. 参考文献 22

試験結果表

表 1　試験結果表（予備試験）..... 23
表 2　試験結果表（本試験 1）..... 24
表 3　試験結果表（本試験 2）..... 25

図

図 1-1　用量–反応曲線（本試験 1；–S9 mix）..... 26
図 1-2　用量–反応曲線（本試験 1；–S9 mix）..... 26
図 1-3　用量–反応曲線（本試験 1；+S9 mix）..... 27
図 2-1　用量–反応曲線（本試験 2；–S9 mix）..... 28
図 2-2　用量–反応曲線（本試験 2；–S9 mix）..... 28
図 2-3　用量–反応曲線（本試験 2；+S9 mix）..... 29

5. 要約

ネズミチフス菌株 TA100, TA1535, TA98 および TA1537 ならびに大腸菌株 WP2*uvrA*/pKM101 の 5 菌株を用いる復帰突然変異試験でジベンジルトルエンの変異原性を調べた. 試験は S9 mix 非存在下および存在下でプレインキュベーション法により実施した.

予備試験を 1.22, 4.88, 19.5, 78.1, 313, 1250, 5000 μg/プレートの7用量で実施した結果, S9 mix 非存在下の TA98, TA1537 において 78.1 μg/プレート以上の用量で菌の生育阻害が認められた. また, S9 mix 非存在下および存在下の 1250 μg/プレート以上の用量でプレート上に沈殿物が認められた. なお, S9 mix の有無にかかわらず, いずれの試験菌株においても被験物質処理群における復帰変異コロニー数は陰性（溶媒）対照値の 2 倍未満であった.

予備試験の結果から本試験は, S9 mix 非存在下の TA100, TA1535, WP2*uvrA*/pKM101 は 313, 625, 1250, 2500, 5000 μg/プレートの 5 用量, TA98, TA1537 は 2.44, 4.88, 9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156 μg/プレートの 7 用量で, S9 mix 存在下は 313, 625, 1250, 2500, 5000 μg/プレートの 5 用量で実施した.

2 回の本試験の結果, S9 mix の有無にかかわらず, いずれの試験菌株においても被験物質処理群における復帰変異コロニー数は陰性（溶媒）対照値の 2 倍未満であった. また, S9 mix 非存在下の TA98, TA1537 では 39.1 μg/プレート以上の用量で菌の生育阻害が認められた. S9 mix 非存在下の TA100, TA1535, WP2*uvrA*/pKM101 および存在下のすべての菌株では菌の生育阻害は認められなかった. なお, S9 mix 非存在下では 625 μg/プレート以上の用量で, S9 mix 存在下では 1250 μg/プレート以上の用量でプレート上に沈殿物が認められた.

当該試験の陰性（溶媒）対照値および陽性対照値は, 当研究所の適正範囲内であった. また, 陽性対照により誘発された復帰変異コロニー数は, S9 mix 非存在下および存在下のいずれの試験菌株においても陰性（溶媒）対照値の 2 倍を超えて増加し, 明らかな陽性結果を示した. 従って, 本試験の妥当性が確認された.

以上の結果から, ジベンジルトルエンは本試験条件下において変異原性を有さないと結論した.

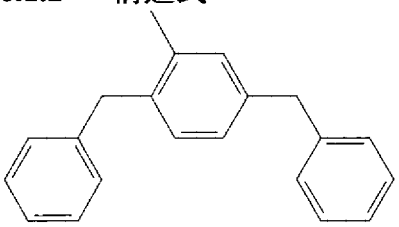
6. 材料および方法

6.1 被験物質

6.1.1 名称

ジベンジルトルエン（英語名称：Dibenzyltoluene）

6.1.2 構造式



6.1.3 分子量

272.41

6.1.4 CAS 番号

26898-17-9

6.1.5 ロット番号

6.1.6 純度

99.3%

6.1.7 提供者

6.1.8 性状

微黄色透明液体

6.1.9 蒸気圧

377 Pa（200°C）

6.1.10 沸点

391°C

6.1.11 融点

–30°C 以下

6.1.12　保存条件
冷蔵（許容範囲：1～10°C；実測値：2.4～8.8°C），気密，対光条件無し

6.1.13　保管場所
試験施設，被験物質保管場所（54）
（被験物質を受領してから 2005 年 3 月 2 日に試験責任者に移管されるまでは，被験物質保管場所（59）において保管されていた．）

6.1.14　安定性の確認
当研究所において，実験開始前と実験終了後に赤外吸収スペクトル（IR）法で赤外吸収スペクトルを測定し，被験物質の特性に変化がないことを確認した．
測定機器：島津フーリエ変換赤外分光光度計（FTIR-8300，株式会社島津製作所）
方法：
(1) セル板（KBr）の上に被験物質を一滴落とした．
(2) (1) の上にもう一枚のセル板（KBr）を密着させた．
(3) 分光光度計にセットし，IR スペクトルを測定した．

6.2　対照物質
6.2.1　陰性対照物質
6.2.1.1　名称
ジメチルスルホキシド（DMSO と略す）

6.2.1.2　製造元
関東化学株式会社

6.2.1.3　ロット番号
508F1409

6.2.1.4　含量（純度）
100.0%

6.2.1.5　陰性対照物質の選択理由
溶媒検討の結果，被験物質は 50 mg/mL で注射用水に不溶であったが，DMSO には溶解した．また，被験物質を DMSO と混合した際に発熱，発泡，変色は認められなかった．これらの結果から，本被験物質の溶媒（陰性対照物質）には DMSO を選択した．

6.2.2 陽性対照物質

6.2.2.1 名称，製造元等

名称（略称）	製造元	ロット番号	含量（純度）
2-(2-ﾌﾘﾙ)-3-(5-ﾆﾄﾛ-2-ﾌﾘﾙ)ｱｸﾘﾙｱﾐﾄﾞ（AF-2）	和光純薬工業株式会社	SEL1402	99.0%
ｱｼﾞ化ﾅﾄﾘｳﾑ（NaN_3）	和光純薬工業株式会社	TCK7533	99.2%
9-ｱﾐﾉｱｸﾘｼﾞﾝ塩酸塩（9-AA）	Sigma Chemical Co.	080K1684	98%
2-ｱﾐﾉｱﾝﾄﾗｾﾝ（2-AA）	和光純薬工業株式会社	TCM6741	93.3%

6.2.2.2 陽性対照物質の選択理由

細菌を用いる復帰突然変異試験において広く使用され，適用ガイドラインにおいて推奨されている．

6.3 試験菌株

6.3.1 試験菌株

試験菌株 [1], [2]	入手先（入手日）
Salmonella typhimurium	
TA100, TA1535	カリフォルニア大学
TA98, TA1537	(1983 年 5 月 27 日)
Escherichia coli	
WP2*uvrA*/pKM101	日本バイオアッセイ研究センター
	(1997 年 9 月 18 日)

6.3.2 試験菌株の選択理由

細菌を用いる復帰突然変異試験において広く使用され，適用ガイドラインにおいて推奨されている．

6.3.3 試験菌株の保存

6.3.3.1 組成

液体完全培地中にて 37°C で 8 時間前培養を行った菌懸濁液 24 mL に 2.1 mL の DMSO（関東化学株式会社，ロット番号 508F1409）を混合した．

6.3.3.2 保存方法

分注凍結（分注量：0.2 mL）

6.3.3.3 保存条件

超低温冷凍庫（日本フリーザー株式会社，CL-322，実測値：–85 ～ –79°C [許容温度：–60°C 以下]）

6.3.3.4 保存日および使用期限

試験菌株	保存日（ロット番号）	使用期限
TA100, TA1535, TA98 TA1537, WP2*uvrA*/pKM101	2005 年 1 月 26 日（050126）	2006 年 1 月 25 日

6.3.4 試験菌株の遺伝的特性

6.3.4.1 遺伝的特性

試験菌株	アミノ酸要求性 (1)	紫外線感受性 (2)	膜変異 (3)	薬剤耐性 (4)
TA100	*his*⁻（塩基対置換）	Δ *uvrB*	*rfa*	+（pKM101）
TA1535	*his*⁻（塩基対置換）	Δ *uvrB*	*rfa*	–
TA98	*his*⁻（フレームシフト）	Δ *uvrB*	*rfa*	+（pKM101）
TA1537	*his*⁻（フレームシフト）	Δ *uvrB*	*rfa*	–
WP2*uvrA* /pKM101	*trp*⁻（塩基対置換）	Δ *uvrA*	Wild type	+（pKM101）

(1) *his*⁻はヒスチジン要求性，*trp*⁻はトリプトファン要求性を示す．
(2) Δ *uvrA* およびΔ *uvrB* はDNA修復遺伝子の欠失を示し，紫外線感受性を示す．
(3) *rfa* は細胞壁のリポ多糖類の欠失を示し，クリスタルバイオレット感受性を示す．
(4) +（pKM101）は薬剤耐性因子を保持していることを示し，アンピシリン耐性を示す．

6.3.4.2 遺伝的特性の確認

試験菌株の遺伝的特性を 2005 年 1 月 28 日に確認した．試験には上記（6.3.4.1 項）の特性を備えた菌株を用いた．

6.3.5 菌懸濁液

6.3.5.1 培養

培養温度：37°C（培養開始まで 10°C に保冷）
培養時間：8 時間
培養方法：往復振とう（振とう回数：90 回/分）
培養容器：L 字管（容量 22 mL）
培養液：液体完全培地（10 mL）
菌株および接種量：保存菌株（6.3.3 項参照）を融解し，0.02 mL 接種

6.3.5.2 菌懸濁液の菌濃度

培養終了後，濁度計（コロナ電気株式会社，UT-11）を用いて濁度を測定し，濁度からの換算により生菌数を算出した．菌懸濁液は菌濃度が 1×10^{9}/mL 以上であることを確認した後，試験に使用した．菌懸濁液は用時調製し，調製後は室温で保存した．

各菌懸濁液の生菌数を以下に示す.

試験菌株		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2*uvrA*/pKM101	TA98	TA1537
生菌数 ($\times 10^9$/mL)	予備試験	2.39	1.89	5.99	3.74	2.07
	本試験 1	2.39	1.89	6.05	3.46	2.03
	本試験 2	2.60	2.08	6.48	3.46	2.17

6.4 培地

6.4.1 液体完全培地の調製

Oxoid Nutrient Broth No.2（Oxoid 社，ロット番号 261002）7.5 g に精製水 300 mL を加えて溶解した. これを 121°C で 15 分間オートクレーブ滅菌し冷蔵保存した.

6.4.2 トップアガーの調製

6.4.2.1 軟寒天の調製

Bacto-agar（Becton Dickinson and company，ロット番号 3345853）1.8 g および塩化ナトリウム（関東化学株式会社，ロット番号 602F1244）1.5 g に精製水 300 mL を加え，これを 121°C で 15 分間オートクレーブ滅菌して，室温で保存した.

6.4.2.2 トップアガーの調製

軟寒天を電子レンジで液化し，以下に示すアミノ酸水溶液をそれぞれ使用直前に 1/10 量添加した．トップアガーは用時調製し，約 45°C に保温した.

ネズミチフス菌： 0.5 mmol/L D-ビオチン†・L-ヒスチジン†混合水溶液

大腸菌： 0.5 mmol/L L-トリプトファン†水溶液

†： D-ビオチン（和光純薬工業株式会社，ロット番号 ASH1929）
L-ヒスチジン塩酸塩一水和物（和光純薬工業株式会社，ロット番号 TCN4471）
L-トリプトファン（和光純薬工業株式会社，ロット番号 TCJ2266）

6.4.3 最少グルコース寒天平板培地

6.4.3.1 名称

クリメディア AM-N 培地（寒天：伊那寒天 [BA-30A]，伊那食品工業株式会社，ロット番号 40721）

6.4.3.2 製造元

オリエンタル酵母工業株式会社

6.4.3.3 ロット番号

ANI190CU

6.4.3.4 製造日および入手日
2005 年 3 月 5 日製造
2005 年 4 月 11 日入手

6.5 S9 mix
6.5.1 S9
6.5.1.1 製造元
キッコーマン株式会社

6.5.1.2 ロット番号
RAA-517

6.5.1.3 製造日および入手日
2005 年 2 月 25 日製造
2005 年 3 月 29 日入手

6.5.1.4 製造方法
フェノバルビタール（1 日目 30 mg/kg を 1 回腹腔内投与，2 日目以降 60 mg/kg を 1 日 1 回 3 日間腹腔内投与）と 5, 6-ベンゾフラボン（フェノバルビタール投与 3 日目に 80 mg/kg を 1 回腹腔内投与）で酵素誘導した 7 週齢 SD 系雄ラット（体重 210 – 249 g）の肝臓より調製された.

6.5.1.5 蛋白含量
26.02 mg/mL

6.5.1.6 保存条件
超低温冷凍庫（日本フリーザー株式会社，CL-322，実測値：–85 ～ –80°C [許容温度：–60°C 以下]）

6.5.1.7 使用期限
2005 年 8 月 24 日（製造日から 6 ヵ月間）

6.5.2 Cofactor mix
6.5.2.1 名称
Cofactor-I

6.5.2.2 製造元
オリエンタル酵母工業株式会社

6.5.2.3 ロット番号
999501

6.5.2.4 調製

Cofactor-I 1 本に滅菌精製水 9 mL の割合で加えて溶解し，メンブレンフィルター（孔径：0.45 μm）でろ過して Cofactor mix とした．Cofactor mix は用時調製した．

6.5.3 S9 mix

Cofactor mix 9 mL に対して，S9 を 1 mL の割合で加え S9 mix とした．S9 mix は用時調製し，使用時まで氷槽中に保存した．

S9 mix 1 mL あたりの組成を以下の表に示す．

S9	0.1 mL
塩化マグネシウム	8 μmol
塩化カリウム	33 μmol
D -グルコース 6 -リン酸	5 μmol
β-NADPH	4 μmol
β-NADH	4 μmol
ナトリウム-リン酸緩衝液（pH 7.4）	100 μmol
滅菌精製水	残量

6.6 被験物質溶液および陽性対照物質溶液の調製

6.6.1 被験物質溶液の調製

(1) 被験物質を秤量（予備試験：250 mg，本試験 1, 2：500 mg）して DMSO を加え，振とう撹拌により溶解させて 50 mg/mL 溶液とした．
(2) 予備試験では，この溶液の一部を DMSO で段階希釈して 12.5, 3.13, 0.781, 0.195, 0.0488 および 0.0122 mg/mL 溶液を調製した．
(3) 本試験では，この溶液の一部を DMSO で段階希釈して 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.781, 0.391, 0.195, 0.0977, 0.0488 および 0.0244 mg/mL 溶液を調製した．
(4) 被験物質溶液は用時調製し，調製後は使用までの間室温，黄色灯下で保存した（予備試験：35 分，本試験 1：30 分，本試験 2：15 分）．
(5) 被験物質の秤量，溶液の希釈，分注および被験物質処理を含む全ての操作は室温，黄色灯下で行った．

6.6.2 陽性対照物質溶液の調製

6.6.2.1 調製方法

陽性対照物質溶液は，2005 年 2 月 9 日に調製した保存液を用時融解して試験に使用した．

(1) NaN_3 は注射用水（株式会社大塚製薬工場，ロット番号 K4C79）に，AF-2, 9-AA および 2-AA は DMSO（関東化学株式会社，ロット番号 508F1409）に溶解した．
(2) これを同じ溶媒で希釈して所定濃度の陽性対照物質溶液とした．

6.6.2.2 保存方法
分注凍結（分注量：0.5 mL）

6.6.2.3 保存条件
超低温冷凍庫（日本フリーザー株式会社，CL-322，実測値：−85 ～ −80°C [許容温度：−60°C 以下]）

6.6.2.4 調製濃度および使用期限

名称および濃度（μg/mL）		調製日	使用期限
AF-2	0.05, 0.1, 1	2005 年 2 月 9 日	2006 年 2 月 8 日
NaN_3	5		
9-AA	800		
2-AA	5, 10, 20		

6.6.2.5 陽性対照値の確認
凍結保存した陽性対照物質溶液について，プレインキュベーション法で試験を実施し，陽性対照値が当該年度の適正範囲内であることを確認している．

6.7 被験物質および陽性対照物質用量
6.7.1 被験物質用量
6.7.1.1 予備試験
ガイドラインに従い 5000 μg/プレートを最高用量とし，以下の用量を設定した．

試験菌株	用量（μg/プレート）
	S9 mix 非存在下および存在下
TA100, TA1535, TA98 TA1537, WP2*uvrA*/pKM101	1.22, 4.88, 19.5, 78.1, 313, 1250, 5000

6.7.1.2 本試験
予備試験の結果を基に本試験は以下の用量で実施した．S9 mix 非存在下の TA98, TA1537 は生育阻害が認められたことから，明らかな菌の生育阻害を示す用量を最高用量とした．その他の試験菌株は生育阻害が認められなかったことから 5000 μg/プレートを最高用量とした．

試験菌株	用量（μg/プレート）	
	S9 mix 非存在下	S9 mix 存在下
TA100, TA1535, WP2*uvrA*/pKM101	313, 625, 1250, 2500, 5000	313, 625, 1250, 2500, 5000
TA98, TA1537	2.44, 4.88, 9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156	

6.7.2 陽性対照物質用量

6.7.2.1 名称および用量

試験菌株	名称および用量（μg/プレート）	
	S9 mix 非存在下	S9 mix 存在下
TA100	AF-2 0.01	2-AA 1
TA1535	NaN_3 0.5	2-AA 2
TA98	AF-2 0.1	2-AA 0.5
TA1537	9-AA 80	2-AA 2
WP2*uvrA*/pKM101	AF-2 0.005	2-AA 2

6.7.2.2 陽性対照物質用量の選択理由

これらの用量は，各試験菌株に対して陽性を示すことが知られている．

6.8 復帰突然変異試験

6.8.1 試験法の選択

試験はプレインキュベーション法を用いて，S9 mix 非存在下および存在下で実施した[3].

6.8.2 プレインキュベーション法

(1) 各用量につき，滅菌した試験管に被験物質溶液，陰性（溶媒）対照物質または陽性対照物質を 0.1 mL 添加した．
(2) S9 mix 非存在下の場合，0.1 mol/L ナトリウム–リン酸緩衝液†（pH 7.4）を 0.5 mL 加えて混和し，さらに菌懸濁液を 0.1 mL 加えた．
(3) S9 mix 存在下の場合，S9 mix を 0.5 mL 加えて混和し，さらに菌懸濁液を 0.1 mL 加えた．
(4) この混合液を 37°C で 20 分間緩やかに振とう（振とう回数：90 回／分）してインキュベーションした（プレインキュベーション）．
(5) プレインキュベーション後，この混合液に融解したトップアガーを 2 mL 加え，最少グルコース寒天平板培地上に重層した．
(6) 重層したトップアガーが凝固した後，37°C で 48 時間培養した．

†: リン酸水素二ナトリウム無水塩（和光純薬工業株式会社，ロット番号 TCP3820）
リン酸二水素ナトリウム二水和物（和光純薬工業株式会社，ロット番号 CER2739）

6.8.3　観察
48 時間培養後；
沈殿物：　　目視
菌の生育阻害：実体顕微鏡（Nikon，SMZ-10）

6.8.4　コロニー計測
プレート上の復帰変異コロニー数を自動コロニーカウンター（システムサイエンス株式会社，CA-11）および目視で計測した．機器計測に際しては面積補正および数え落とし補正を行った．
以下に示す用量ではプレート上に著しい沈殿物が認められたため，これらのプレートは目視で計測した．
予備試験：　S9 mix 非存在下および存在下の 5000 μg/プレート
本試験 1, 2：　S9 mix 非存在下および存在下の 2500 μg/プレート以上

6.8.5　プレート数
予備試験：1 プレート/用量
本試験：　3 プレート/用量

6.8.6　結果の集計
陰性（溶媒）対照，陽性対照および被験物質の各処理について，計測したコロニー数の平均値および標準偏差を算出した．平均値および標準偏差は小数点以下を四捨五入して表示した．

6.8.7　無菌試験
被験物質溶液および S9 mix それぞれにつき 1 枚のプレートを使用し，試験毎に実施した．
(1) 最高用量の被験物質溶液 0.1 mL または S9 mix 0.5 mL にトップアガー2 mL を加えて混和した．
(2) それぞれ最少グルコース寒天平板培地上に重層した．
(3) 重層したトップアガーが凝固した後，37°C で 48 時間培養し，雑菌の混入について目視で確認した．

6.8.8　実験の成立基準
下記の条件をすべて満たしている場合に成立とした．
(1) 陰性（溶媒）対照値（平均値）および陽性対照値（平均値）が試験施設における背景データの適正範囲内にあること．
(2) 陽性対照値（平均値）が，対応する試験菌株の陰性（溶媒）対照値と比較して明らかに 2 倍を越えて増加していること．
(3) 生育阻害の認められない用量が 4 用量以上あり，かつ評価可能な用量が 5 用

量以上あること.

(4) 無菌試験の結果，雑菌による汚染が無いこと.

(5) 試験プレートが汚染あるいは他の不測の事態によって計測不能になり，失われていないこと.

6.8.9 試験結果の判定

いずれかの試験菌株で，S9 mix の有無にかかわらず，被験物質用量の増加にともなって復帰変異コロニー数（平均値）が陰性（溶媒）対照値の 2 倍以上に増加し，さらにその増加に再現性が認められる場合に，当該被験物質は変異原性を有する（陽性）と判定した．その他の場合は陰性と判定した．試験結果には統計学的検定を実施しなかった.

6.8.10 再現性の確認

試験結果の再現性は 2 回の本試験で確認した.

7. 結果

7.1 予備試験（表 1）

S9 mix 非存在下の TA98, TA1537 において 78.1 μg/プレート以上の用量で菌の生育阻害が認められた．また，S9 mix 非存在下および存在下の 1250 μg/プレート以上の用量でプレート上に沈殿物が認められた．なお，S9 mix の有無にかかわらず，いずれの試験菌株においても被験物質処理群における復帰変異コロニー数は陰性（溶媒）対照値の 2 倍未満であった.

7.2 本試験（表 2 および 3）

2 回の本試験ともに，S9 mix の有無にかかわらず，いずれの試験菌株においても被験物質処理群における復帰変異コロニー数は陰性（溶媒）対照値の 2 倍未満であった．また，S9 mix 非存在下の TA98, TA1537 では 39.1 μg/プレート以上の用量で菌の生育阻害が認められた．S9 mix 非存在下の TA100, TA1535, WP2*uvrA*/pKM101 および存在下のすべての菌株では菌の生育阻害は認められなかった．なお，S9 mix 非存在下では 625 μg/プレート以上の用量で，S9 mix 存在下では 1250 μg/プレート以上の用量でプレート上に沈殿物が認められた.

7.3 無菌試験

予備試験および本試験のいずれにおいても，最高用量の被験物質溶液および S9 mix には菌，カビの混入は認められなかった.

8. 考察および結論

予備試験の結果に基づいて，5000 μg/プレートあるいは菌の生育阻害の認められる用量を最高用量として本試験を実施した結果，S9 mix の有無にかかわらず，いずれの試験菌株においても被験物質処理群における復帰変異コロニー数は陰性（溶媒）対照値の 2 倍未満であり，2 回の本試験で再現性が確認された．

本試験の陰性（溶媒）対照値および陽性対照値は，当研究所の適正範囲内であった（添付資料 1）．また，陽性対照により誘発された復帰変異コロニー数は，S9 mix 非存在下および存在下のいずれの試験菌株においても陰性（溶媒）対照値の 2 倍を超えて増加し，明らかな陽性結果を示した．さらに，いずれの試験においても生育阻害の認められない用量が 4 用量以上あり，かつ評価可能な用量が 5 用量以上得られた．従って，本試験の妥当性が確認された．

以上の結果から，ジベンジルトルエンは本試験条件下において変異原性を有さないと結論した．

なお，類似化合物の変異原性に関する情報を添付資料 2 にまとめた．

9. 参考文献

[1] Maron DM and Ames BN. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. Mutat Res 1983; 113: 173-215.
[2] Green MHL and Muriel WJ. Mutagen testing using Trp^+ reversion in *Escherichia coli*. Mutat Res 1976; 38: 3-32.
[3] Chemical Substance Investigation Division of the Industrial Safety and Health Department of the Ministry of Labor of Japan, Japan Industrial Safety and Health Association, editors. Mutagenicity Tests in Industrial Safety and Health Law. 1991.

表1　試験結果表（予備試験）

試験期間		2005年 5月23日 ～ 2005年 5月26日				
代謝活性化系の有無	被験物質用量 (μg / ﾌﾟﾚｰﾄ)	復帰変異数 (ｺﾛﾆｰ数 / ﾌﾟﾚｰﾄ)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2*uvrA* /pKM101	TA98	TA1537
S9 mix (–)	陰性対照	100	11	73	21	10
	1.22	100	7	73	15	13
	4.88	114	10	71	17	8
	19.5	115	8	88	19	9
	78.1	90	11	70	11 *	10 *
	313	113	10	83	14 *	6 *
	1250 †	95	7	75	11 *	8 *
	5000 †	93	7	72	10 *	5 *
S9 mix (+)	陰性対照	116	11	101	25	17
	1.22	123	8	89	24	19
	4.88	114	10	85	30	17
	19.5	133	9	104	34	16
	78.1	118	8	99	30	13
	313	117	8	89	28	15
	1250 †	115	11	92	24	16
	5000 †	113	7	84	23	12
陽性対照 S9 mix (–)	名称	AF-2	NaN_3	AF-2	AF-2	9-AA
	用量 (μg/ﾌﾟﾚｰﾄ)	0.01	0.5	0.005	0.1	80
	(ｺﾛﾆｰ数/ﾌﾟﾚｰﾄ)	637	588	707	731	277
陽性対照 S9 mix (+)	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	用量 (μg/ﾌﾟﾚｰﾄ)	1	2	2	0.5	2
	(ｺﾛﾆｰ数/ﾌﾟﾚｰﾄ)	1108	182	625	395	197

(備考)　*: 菌の生育阻害が認められた.
†: 沈殿物が認められた.
陰性対照：ジメチルスルホキシド（DMSO）

AF-2: 2-(2-ﾌﾘﾙ)-3-(5-ﾆﾄﾛ-2-ﾌﾘﾙ)ｱｸﾘﾙｱﾐﾄﾞ, NaN_3: ｱｼﾞ化ﾅﾄﾘｳﾑ, 9-AA: 9-ｱﾐﾉｱｸﾘｼﾞﾝ塩酸塩, 2-AA: 2-ｱﾐﾉｱﾝﾄﾗｾﾝ

表2　試験結果表（本試験1）

試験期間		2005年 5月31日 ～ 2005年 6月 3日				
代謝活性化系の有無	被験物質用量 (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* /pKM101	TA98	TA1537
S9 mix (−)	陰性対照	103 105 (101) 94 (6)	14 16 (14) 13 (2)	69 70 (71) 75 (3)	24 22 (24) 25 (2)	11 11 (10) 9 (1)
	2.44				28 18 (23) 22 (5)	10 8 (10) 12 (2)
	4.88				24 24 (24) 23 (1)	10 12 (10) 8 (2)
	9.77				26 27 (24) 19 (4)	9 8 (9) 9 (1)
	19.5				22 25 (23) 21 (2)	11 11 (11) 10 (1)
	39.1				27 * 20 * (23) 21 * (4)	9 * 7 * (8) 9 * (1)
	78.1				18 * 17 * (17) 15 * (2)	9 * 10 * (9) 7 * (2)
	156				14 * 17 * (16) 18 * (2)	6 * 8 * (7) 6 * (1)
	313	94 99 (100) 108 (7)	8 10 (9) 8 (1)	75 67 (72) 75 (5)		
	625 †	101 94 (103) 115 (11)	10 9 (10) 10 (1)	67 77 (71) 69 (5)		
	1250 †	101 106 (99) 90 (8)	14 12 (14) 15 (2)	69 70 (69) 69 (1)		
	2500 †	94 98 (98) 102 (4)	6 8 (7) 6 (1)	66 83 (74) 73 (9)		
	5000 †	108 93 (102) 104 (8)	9 7 (7) 5 (2)	72 66 (67) 62 (5)		
S9 mix (+)	陰性対照	127 129 (127) 125 (2)	13 10 (13) 15 (3)	101 102 (97) 88 (8)	29 27 (30) 34 (4)	15 14 (14) 13 (1)
	313	104 118 (109) 104 (8)	12 10 (11) 10 (1)	102 97 (102) 107 (5)	34 24 (29) 28 (5)	14 15 (15) 17 (2)
	625	113 114 (112) 110 (2)	14 16 (14) 12 (2)	100 101 (98) 92 (5)	35 31 (31) 27 (4)	14 17 (17) 21 (4)
	1250 †	110 139 (120) 110 (17)	19 11 (16) 17 (4)	95 90 (95) 99 (5)	25 25 (26) 28 (2)	18 19 (18) 17 (1)
	2500 †	105 107 (106) 105 (1)	8 10 (9) 9 (1)	82 81 (82) 82 (1)	33 30 (31) 29 (2)	20 18 (17) 13 (4)
	5000 †	127 114 (116) 108 (10)	10 9 (11) 14 (3)	80 81 (78) 72 (5)	32 29 (34) 40 (6)	15 17 (16) 16 (1)
陽性対照 S9 mix (−)	名称	AF-2	NaN_3	AF-2	AF-2	9-AA
	用量 (μg/プレート)	0.01	0.5	0.005	0.1	80
	(コロニー数/プレート)	739 773 (771) 802 (32)	607 633 (623) 628 (14)	1063 942 (941) 817 (123)	741 689 (709) 698 (28)	287 302 (285) 267 (18)
陽性対照 S9 mix (+)	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)	1108 1190 (1110) 1032 (79)	201 204 (218) 248 (26)	782 749 (762) 756 (17)	482 418 (455) 466 (33)	184 178 (186) 197 (10)

(備考)　*: 菌の生育阻害が認められた.　(平均値)
†: 沈殿物が認められた.　(±標準偏差)
陰性対照 : ジメチルスルホキシド(DMSO)

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド, NaN_3: アジ化ナトリウム, 9-AA: 9-アミノアクリジン塩酸塩, 2-AA: 2-アミノアントラセン

表3　試験結果表（本試験2）

試験期間		2005年 6月20日 ～ 2005年 6月23日				
代謝活性化系の有無	被験物質用量 (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* /pKM101	TA98	TA1537
S9 mix (−)	陰性対照	104 95 (98) 95 (5)	13 12 (11) 8 (3)	86 73 (77) 71 (8)	24 18 (20) 17 (4)	17 16 (15) 12 (3)
	2.44				18 24 (20) 18 (3)	13 14 (14) 15 (1)
	4.88				25 22 (21) 16 (5)	13 18 (15) 14 (3)
	9.77				22 26 (24) 23 (2)	15 12 (15) 17 (3)
	19.5				26 19 (20) 16 (5)	15 14 (15) 15 (1)
	39.1				18 * 16 * (17) 17 * (1)	9 * 11 * (9) 8 * (2)
	78.1				17 * 17 * (17) 16 * (1)	9 * 10 * (9) 8 * (1)
	156				17 * 13 * (14) 13 * (2)	8 * 9 * (8) 8 * (1)
	313	95 97 (99) 106 (6)	8 10 (10) 11 (2)	73 87 (76) 69 (9)		
	625 †	103 94 (102) 109 (8)	7 9 (8) 9 (1)	68 77 (74) 78 (6)		
	1250 †	99 97 (96) 92 (4)	11 11 (11) 11 (0)	88 81 (81) 74 (7)		
	2500 †	91 106 (97) 93 (8)	8 7 (8) 10 (2)	73 82 (78) 79 (5)		
	5000 †	94 103 (100) 103 (5)	8 9 (9) 9 (1)	65 71 (70) 73 (4)		
S9 mix (+)	陰性対照	129 116 (118) 109 (10)	9 12 (10) 10 (2)	94 103 (102) 109 (8)	24 29 (25) 22 (4)	19 16 (18) 18 (2)
	313	100 96 (99) 100 (2)	9 12 (11) 11 (2)	104 93 (96) 90 (7)	28 24 (26) 25 (2)	17 20 (19) 19 (2)
	625	107 96 (101) 99 (6)	9 13 (11) 12 (2)	88 107 (102) 110 (12)	28 31 (28) 24 (4)	16 16 (16) 16 (0)
	1250 †	97 98 (101) 107 (6)	11 11 (10) 9 (1)	91 92 (92) 93 (1)	23 24 (25) 29 (3)	15 18 (17) 18 (2)
	2500 †	115 106 (105) 95 (10)	10 9 (9) 9 (1)	93 90 (96) 105 (8)	24 20 (22) 21 (2)	18 15 (17) 17 (2)
	5000 †	96 102 (97) 94 (4)	8 7 (8) 9 (1)	90 101 (92) 84 (9)	20 27 (25) 29 (5)	16 15 (18) 22 (4)
陽性対照 S9 mix (−)	名称	AF-2	NaN_3	AF-2	AF-2	9-AA
	用量 (μg/プレート)	0.01	0.5	0.005	0.1	80
	(コロニー数/プレート)	651 614 (645) 669 (28)	581 570 (570) 560 (11)	1017 941 (976) 971 (38)	852 896 (870) 863 (23)	315 353 (338) 347 (20)
陽性対照 S9 mix (+)	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)	1182 1183 (1192) 1210 (16)	173 189 (186) 196 (12)	783 709 (723) 676 (55)	349 388 (370) 372 (20)	188 163 (177) 179 (13)

(備考)　*: 菌の生育阻害が認められた.　　(平均値)
†: 沈殿物が認められた.　　(±標準偏差)
陰性対照：ジメチルスルホキシド(DMSO)

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド, NaN_3: アジ化ナトリウム, 9-AA: 9-アミノアクリジン塩酸塩, 2-AA: 2-アミノアントラセン

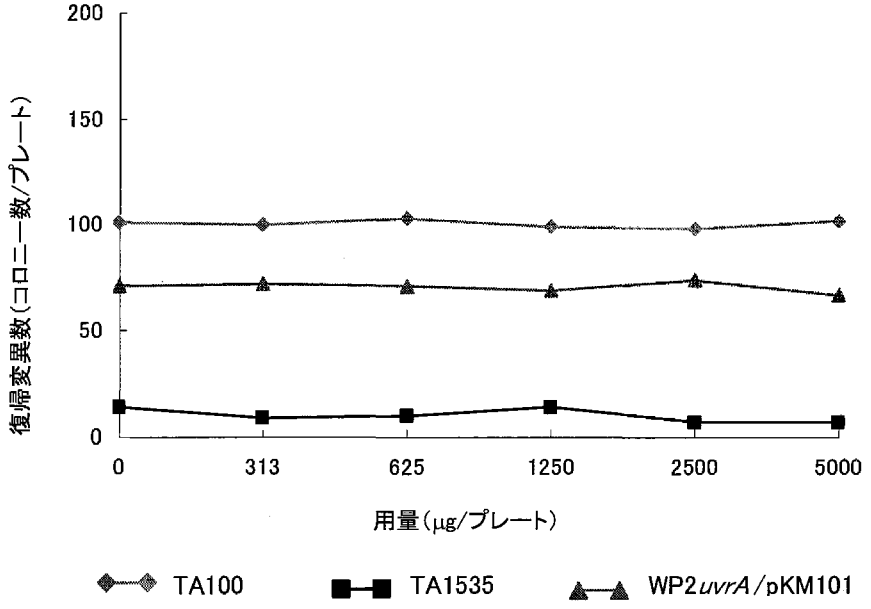


図 1-1　　用量ー反応曲線　（本試験 1;-S9 mix）

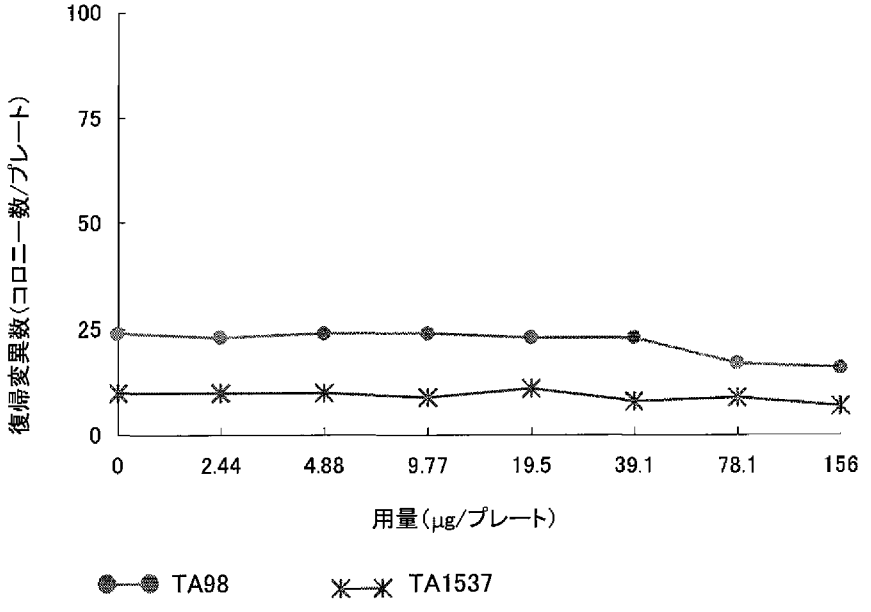


図 1-2　　用量ー反応曲線　（本試験 1;-S9 mix）

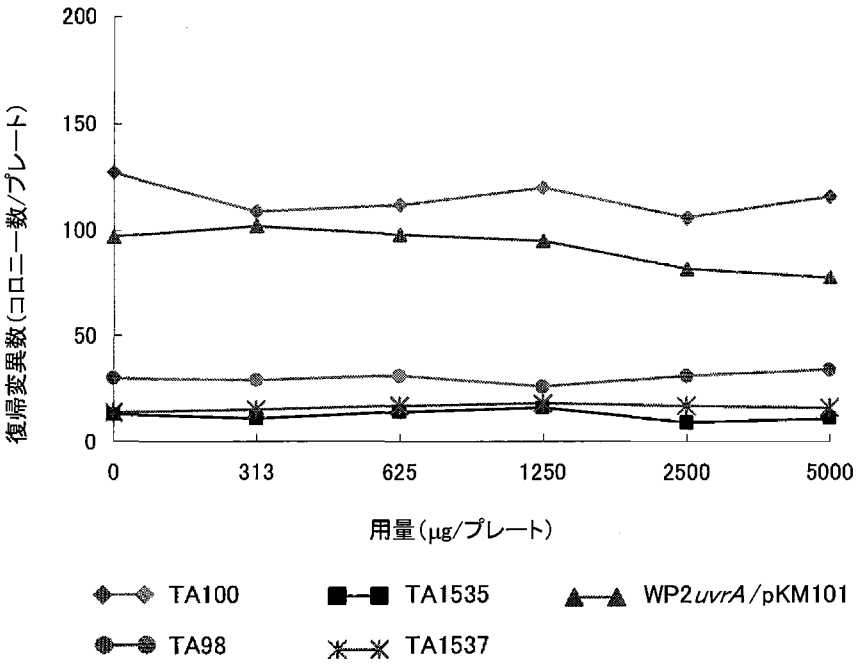


図 1-3　　用量－反応曲線　（本試験 1;+S9 mix）

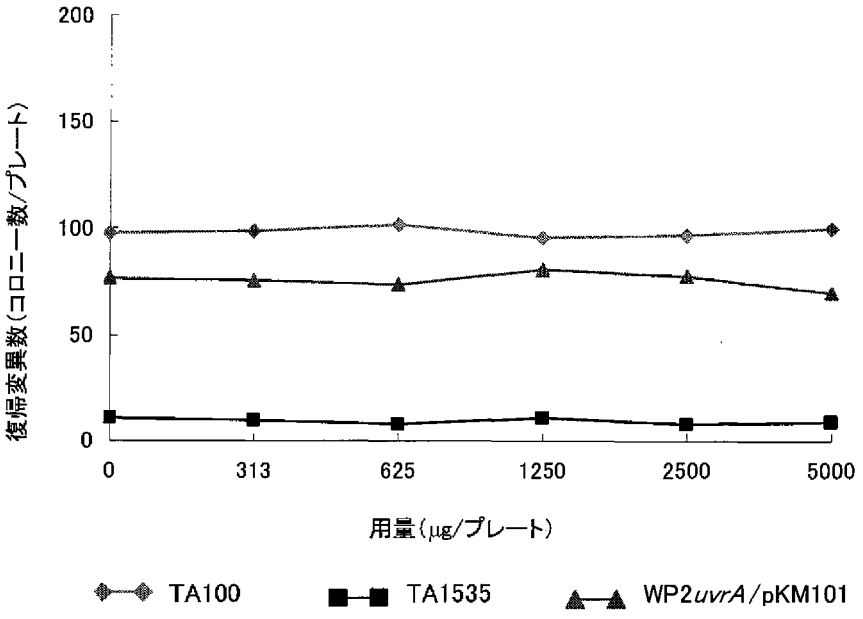


図 2-1　　用量ー反応曲線　（本試験 2; -S9 mix）

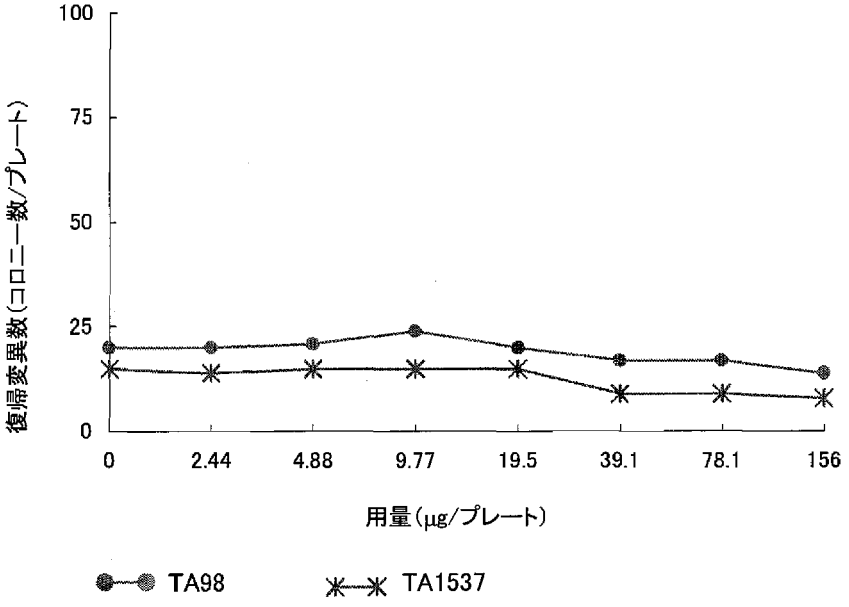


図 2-2　　用量ー反応曲線　（本試験 2; -S9 mix）

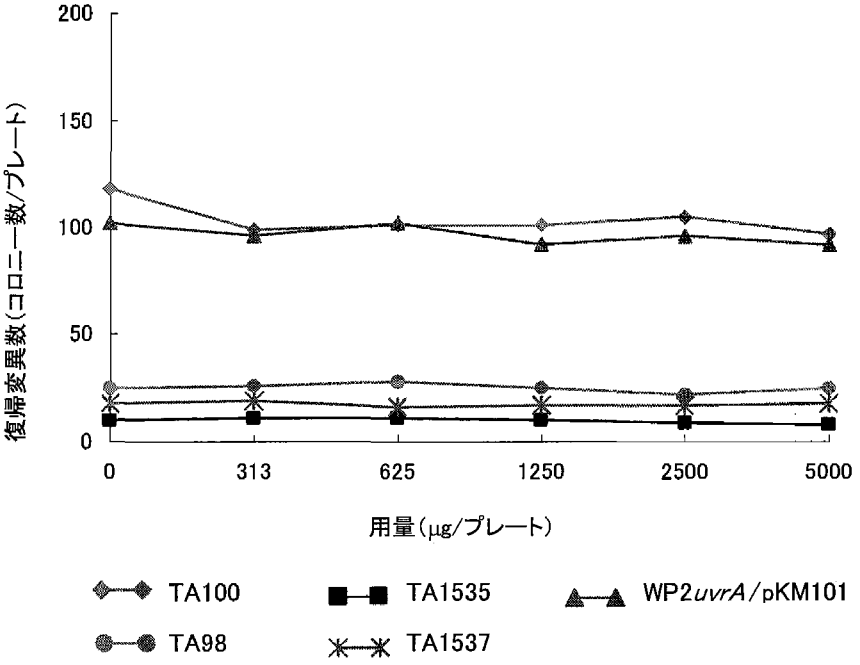


図 2-3　　用量－反応曲線　（本試験 2; +S9 mix）