

信 頼 性 保 証 書

試験番号：901523

表 題：ビニルトリメトキシシランの細菌を用いる復帰突然変異試験

当試験に関して、2004年8月25日から2005年11月1日にかけて調査を実施し、その結果は運営管理者及び試験責任者に報告した。

当試験は「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）並びにOECD PRINCIPLES OF GOOD LABORATORY PRACTICE（OECD 化学物質の安全性試験の実施に関する基準）に従って実施され、この最終報告書には試験の方法が正確に記載され、かつ生データが正確に反映されていることを保証する。

（調査の状況は、別紙1のとおりである。）

2005 年 11 月 1 日

株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所

信頼性保証部門責任者



別紙 1

調 査 項 目	調査実施日			調査結果報告日		
1. 試験計画書及び主計画表	2004年	8月	25日	2004年	8月	25日
2. 実施（用量設定試験）	2004年	9月	7日	2004年	9月	17日
3. 菌株の前培養〔本試験（Ⅰ）〕	2004年	9月	14日	2004年	9月	17日
4. 試験計画書変更書（No. 1）	2004年	9月	14日	2004年	9月	17日
5. 被験物質の管理	2004年	9月	15日	2004年	9月	17日
6. 検体の調製	2004年	9月	15日	2004年	9月	17日
7. 実施〔本試験（Ⅰ）〕	2004年	9月	15日	2004年	9月	17日
8. 判定〔本試験（Ⅰ）〕	2004年	9月	17日	2004年	9月	17日
9. 実施〔本試験（Ⅱ）〕	2004年	9月	28日	2004年	9月	28日
10. 試験計画書変更書（No. 2）	2004年	10月	18日	2004年	10月	18日
11. 生データ	2004年	11月	1日	2004年	11月	2日
		～ 11月	2日			
12. 最終報告書（一次案）	2004年	11月	2日	2004年	11月	2日
13. 生データ（再調査）	2004年	11月	8日	2004年	11月	8日
14. 最終報告書（一次案）（再調査）	2004年	11月	8日	2004年	11月	8日
15. 最終報告書	2005年	11月	1日	2005年	11月	1日

ビニルトリメトキシシランの細菌を用いる復帰突然変異試験

最 終 報 告 書

作成日 2005年 11月 1日

株式会社日本バイオリサーチセンター
羽島研究所

最終報告書作成者署名

試験番号：901523

表 題：ビニルトリメトキシシランの細菌を用いる復帰突然変異試験

2005 年 11 月 / 日

株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所

試験責任者



被験物質名：ビニルトリメトキシシラン（CAS No.2768-02-7）

試験系：*Salmonella typhimurium*：TA100, TA98, TA1535, TA1537
Escherichia coli：WP2uvrA

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
 東京都千代田区霞が関1丁目2番2号

試験施設：株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所
 岐阜県羽島市福寿町間島6丁目104番地

試験目的：ビニルトリメトキシシランの細菌を用いる復帰突然変異試験を行い、その遺伝子突然変異誘発性の有無について検討した。

準拠したガイドライン：

「OECD化学品テストガイドライン、471細菌を用いる復帰突然変異試験」（1997年7月21日採択）平成15年11月21日付（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，環企発第031121002号：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」の別添「化学物質の慢性毒性試験，生殖能及び後世代に及ぼす影響に関する試験，催奇形性試験，変異原性試験，がん原性試験，生体内運命に関する試験及び薬理学的試験」

遵守した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（平成15年11月21日，薬食発第1121003号，平成15・11・17製局第3号，環企発第031121004号）並びにOECD PRINCIPLES OF GOOD LABORATORY PRACTICE（OECD化学物質の安全性試験の実施に関する基準）

試験開始日：2004年 8月 24日

試験終了日：2005年 11月 1日

試験実施日：用量設定試験

菌株の前培養実施日（実験開始日）	2004年 9月 6日
試験の実施日	2004年 9月 7日
判定日	2004年 9月 9日

本試験(I)

菌株の前培養実施日	2004年 9月 14日
試験の実施日	2004年 9月 15日
判定日	2004年 9月 17日

本試験(II)

菌株の前培養実施日	2004年 9月 27日
試験の実施日	2004年 9月 28日
判定日（実験終了日）	2004年 9月 30日

資料保存場所：この試験において当試験施設で発生したすべての資料は、株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所の資料保管室に保存する。保存期間は、最終報告書提出後10年間とする。

試験計画書に従わなかったこと：

1. 被験物質冷蔵保管庫の温度の許容範囲はSOPで2～8℃としていたが、試験開始前の逸脱が2004年3月3日の午後1時16分頃～午後7時13分頃(最低1.4℃)、2004年4月25日の午前9時00分頃(最高8.2℃)、2004年6月14日の正午頃～午後6時00分頃(最高12.0℃)及び2004年7月4日の午後2時20分頃～午後8時40分頃(最高12.0℃)に認められた。しかし、温度の逸脱幅はいずれもわずかであること、その他の期間の温度は2～8℃であり、許容範囲内であることから、試験に使用しても問題ないと判断した。
2. 被験物質冷蔵保管庫の温度の試験開始後の逸脱は、2004年9月15日の午前11時00分頃～午前11時45分頃(最高12.0℃)及び、2004年9月23日の午後11時20分頃(最低1.8℃)に認められた。しかし、温度の逸脱幅はいずれもわずかであること、その他の期間の温度は2～8℃であり、許容範囲内であることから、試験成績への影響はないと判断した。

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：

当該事態は認められなかった。

試験従事者及び業務分担

試験責任者: [REDACTED]

(試験計画書の作成, 試験の実施の指示, データのチェック, 最終報告書の作成)

試験従事者: [REDACTED]

(検体の調製, 試験の実施, データのまとめ及びチェック)

[REDACTED]

(試験の実施)

[REDACTED]

(試験の実施, データのまとめ及びチェック)

[REDACTED]

(被験物質, 陽性対照物質及び陰性対照物質の管理)

目 次

要 約		8
緒 言		9
方 法		9
1. 被験物質, 媒体, 陽性対照物質及び陰性対照物質		9
2. 検体液		10
3. 試験菌株		11
4. S9 mix		12
5. 培地		12
6. 無菌試験		12
7. 試験方法		13
8. 試験の成立条件		14
9. 統計学的方法		14
10. 判定基準		14
試験成績		15
1. 用量設定試験		15
2. 本試験 (I) 及び本試験 (II)		15
考 察		16
文 献		16

Attachment, Table及びFigureの目次

Attachment 1.	Specificity of test strains	17
Attachment 2.	Number of surviving cells in bacterial suspension	17
Attachment 3.	Preparation of S9	18
Attachment 4.	Composition of S9 mix	18
Attachment 5.	Composition of minimum glucose agar plate medium	18
Attachment 6.	Test conditions	19
Attachment 7.	Background data of reverse mutation test in bacteria	20
Table 1.	Reverse mutation test of Silane, ethenyltrimethoxy- in bacteria (dose-finding test)	21
Table 2-1.	Reverse mutation test of Silane, ethenyltrimethoxy- in bacteria (mutagenicity test I)	22
Table 2-2.	Reverse mutation test of Silane, ethenyltrimethoxy- in bacteria (mutagenicity test I)	23
Table 3-1.	Reverse mutation test of Silane, ethenyltrimethoxy- in bacteria (mutagenicity test II)	24
Table 3-2.	Reverse mutation test of Silane, ethenyltrimethoxy- in bacteria (mutagenicity test II)	25
Figure 1-1.	Reverse mutation test of Silane, ethenyltrimethoxy- in bacteria (dose-finding test :without S9 mix)	26
Figure 1-2.	Reverse mutation test of Silane, ethenyltrimethoxy- in bacteria (dose-finding test :with S9 mix)	27
Figure 2-1.	Reverse mutation test of Silane, ethenyltrimethoxy- in bacteria (mutagenicity test I:without S9 mix)	28
Figure 2-2.	Reverse mutation test of Silane, ethenyltrimethoxy- in bacteria (mutagenicity test I:with S9 mix)	29
Figure 3-1.	Reverse mutation test of Silane, ethenyltrimethoxy- in bacteria (mutagenicity test II:without S9 mix)	30
Figure 3-2.	Reverse mutation test of Silane, ethenyltrimethoxy- in bacteria (mutagenicity test II:with S9 mix)	31

要 約

ビニルトリメトキシシランの遺伝子突然変異誘発性の有無を、*Salmonella typhimurium*のTA100, TA98, TA1535及びTA1537並びに*Escherichia coli*のWP2uvrAを用い、プレインキュベーション法による復帰突然変異試験により検討した。試験は、S9 mix無添加とS9 mix添加の場合について実施した。

ビニルトリメトキシシランの156.3～5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 濃度における復帰変異コロニー数は、本試験(I)及び本試験(II)において、いずれの菌株ともS9 mix無添加及びS9 mix添加の場合にかかわらず、陰性対照の2倍未満であった。陽性対照物質は、S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合のいずれにおいても、明らかな陽性結果を示した。本試験(I)及び本試験(II)の結果には再現性が認められた。

以上の結果、当試験の条件下において、ビニルトリメトキシシランに遺伝子突然変異誘発性はないと判定する。

緒 言

ビニルトリメトキシシランの細菌を用いる復帰突然変異試験を行い、その遺伝子突然変異誘発性の有無について検討した。

方 法

1. 被験物質、媒体、陽性対照物質及び陰性対照物質

1.1. 被験物質

被験物質のビニルトリメトキシシラン [CAS No.2768-02-7, 分子量: 148.2, 沸点: 123°C, 蒸気圧: 2.7 kPa 以下/25°C, 揮発性: なし, 融点: 0°C以下, 比重又は高比重: 0.97(25°C)] は, 無色透明の液体で微臭があり, 水に難溶である。又, 水及び酸, アルカリ化合物と穏やかに反応 (加水分解) し, 引火性のメタノールを生成する。当試験には, [REDACTED] から入手したものをを用いた [製造元: [REDACTED], ロット番号: 308595, 含量: 100 %]。入手後は, 試験施設の被験物質保管室の保管庫 (冷蔵庫: RC-M501, 株式会社日立製作所) 内に冷蔵 (設定: 4°C, 実測値: 1.4~12.0°C)・遮光の条件下で保管した。

1.2. 媒体

媒体には, ジメチルスルホキシド [以下DMSO, 紫外部吸収スペクトル用, ロット番号: PU140, 使用期限: 2009年2月26日 (自社規定), 株式会社同仁化学研究所] を用いた。DMSOは, 使用時まで試験施設の被験物質保管室の保管庫内に, 室温 (設定: 23°C, 実測値: 21.8~26.0°C)・遮光の条件下で保管した。

1.3. 陽性対照物質

1.3.1. 2-アミノアントラセン (2-aminoanthracene, 略名: 2AA)

緑色から金色の粉末, 純度: 97.4%, ロット番号: 90K3670, Sigma-Aldrich CO., 使用期限: 2007年1月7日 (自社規定), 保管条件: 冷蔵 (設定: 4°C, 冷蔵庫: MPR-311D, 三洋電機株式会社)・防湿

1.3.2. アジ化ナトリウム (sodium azide, 略名: NaN₃)

白色〜ほとんど白色の結晶 (特級, 単品), 純度: 99.8 %, ロット番号: M3H9553, ナカライテスク株式会社, 使用期限: 2008年9月1日 (自社規定), 保管条件: 冷蔵 (設定: 4°C, 冷蔵庫: MPR-311D, 三洋電機株式会社)・防湿・遮光

1.3.3. 9-アミノアクリジン (9-aminoacridine hydrochloride, 略名 : 9AA)

黄色の粉末(特級, 単品), 純度 : 97.6 %, ロット番号 : M3N4147, ナカライテスク株式会社, 使用期限 : 2008年10月13日(自社規定), 保管条件 : 冷蔵(設定 : 4℃, 冷蔵庫 : MPR-311D, 三洋電機株式会社).

1.3.4. 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド [2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, 略名 : AF-2]

黄みの赤色結晶性粉末(特級, 単品), 含量 : 99.0 %, ロット番号 : SEL1402, 和光純薬工業株式会社, 使用期限 : 2007年2月4日(自社規定), 保管条件 : 冷蔵(設定 : 4℃, 冷蔵庫 : MPR-311D, 三洋電機株式会社)・遮光.

1.4. 陰性対照物質

陰性対照物質は, 被験物質の媒体として用いたDMSOとした.

2. 検体液

2.1. 被験物質

用量設定試験, 本試験(I)及び本試験(II)のいずれの場合も, 被験物質の必要量を秤量(電子天秤:AT261, メトラー・トレド株式会社)し, DMSOに溶解して最高濃度液 (50 mg/mL)を調製した. 最高濃度液より低い濃度液は, 最高濃度液からDMSOで順次希釈して調製した. 調製は用時に行い, 使用後の残液は廃棄処分した.

2.2. 陽性対照物質

2AA, 9AA及びAF-2はDMSO (紫外部吸収スペクトル用, ロット番号 : 2AA及びAF-2 ; NJ151, 9AA ; PU140, 株式会社同仁化学研究所)に, NaN_3 は注射用水 (局方品, ロット番号 : K2K75, 株式会社大塚製薬工場)に溶解して, 以下に示す濃度液を調製した (2AAの調製日 : 2004年4月9日, 9AA及び NaN_3 の調製日 : 2004年7月2日, AF-2の調製日 : 2004年8月6日, 各調製液の使用期限は調製後1年以内とした) .

各調製液は, チューブ (2 mL容セラムチューブ, 住友ベークライト株式会社)に0.5 mLずつ分注し, 冷蔵庫 [型式 : MDF-291AT (検体保管庫 No.8), 三洋電機株式会社]内に冷凍 (設定 : -85℃, 実測値 : -89~-78℃) 保管した. 試験の際には各調製液を融解して使用し, 使用後の残液は廃棄処分した.

	菌株名	物質名	調製濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	試験濃度 ($\mu\text{g/plate}$)
S9 mix (+)	TA100	2AA	10	1
	TA1535	2AA	20	2
	WP2 <i>uvrA</i>	2AA	100	10
	TA98	2AA	5	0.5
	TA1537	2AA	20	2
S9 mix (-)	TA100	AF-2	0.1	0.01
	TA1535	NaN ₃	5	0.5
	WP2 <i>uvrA</i>	AF-2	0.1	0.01
	TA98	AF-2	1	0.1
	TA1537	9AA	800	80

陽性対照物質は、その反応性が試験施設のバックグラウンドデータの範囲内にあったことから、生物学的に十分な活性を有していたと判断した。

3. 試験菌株

試験菌株には、国内各GLP準拠毒性試験ガイドラインにおいて規定されており、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*S.typhimurium*のTA100, TA98, TA1535及びTA1537並びに*E.coli*のWP2*uvrA*を使用した。TA100及びTA98は1996年10月18日に、TA1535, TA1537及びWP2*uvrA*は1995年2月25日に、いずれも中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センターから入手した。

菌株の特性として「安衛法における変異原性試験-テストガイドラインとGLP-」¹⁾に従い、アミノ酸要求性、紫外線感受性、膜変異性特性及び薬剤耐性因子R-factorプラスミドの有無を検査し(TA100及びTA98の検査日：2004年2月25日～2月27日、TA1535, TA1537及びWP2*uvrA*の検査日：2003年10月29日～10月31日)、試験施設の基準に適合しているコロニーを選択した(Attachment 1)。

菌株は、特性検査の結果から選択したコロニーを培養し、その菌懸濁液0.8 mLに対してDMSOを0.07 mLの割合で加えたものを、チューブ(2 mL容セラムチューブ、住友ベークライト株式会社)に200 μL ずつ分注し、-80 $^{\circ}\text{C}$ 設定の冷凍庫[型式：BFV-130(LR)、エスベック株式会社]内に凍結保管した(TA100及びTA98の分注日：2004年3月23日、TA1535, TA1537及びWP2*uvrA*の分注日：2003年12月26日、使用期限：分注後2年以内)。

菌株の前培養には、OXOID NUTRIENT BROTH No.2(ロット番号：298714, OXOID LTD.)2.0 gに注射用水80 mLの割合で加えて高圧蒸気滅菌(121 $^{\circ}\text{C}$, 15分)した培養液を使用した。乾熱滅菌(180 $^{\circ}\text{C}$, 1時間、以下同様)したモルトン栓付のL字管(容量：約40 mL)に先の培養液を10 mL分注し、ここへ融解した菌液を20 μL 接種した。これを往復振盪型式(振盪数：90回/分、振幅：4 cm)の振盪器(型式：M-100^N、タイテック株式会社)を用いて、37 $^{\circ}\text{C}$ で9時間振盪培養した。

培養終了後、菌懸濁液の濁度を分光光度計(型式：NovaspecII, アマシャム バイオサイエンス株式会社)を用いて測定し、そのO.D.値から生菌数を求めた(Attachment 2)。また、菌懸濁液は使用時まで室温で保管した。なお、実験操作は空調管理されたAmes試験室(A棟)にて行った。

4. S9 mix

S9は、Attachment 3の条件により2004年6月11日にオリエンタル酵母工業株式会社で製造されたもの(ロット番号：04061103)を使用した。S9は、2004年7月2日に購入し、使用時まで-80℃設定の冷凍庫[型式：BFV-130(LR), エスベック株式会社]内に凍結保管した。

S9 mixは、S9 mix用のCofactor(商品名：Cofactor- I, ロット番号：999401, オリエンタル酵母工業株式会社)を注射用水で溶解し、メンブランフィルター($\phi 0.2 \mu\text{m}$, Nalge)で濾過した後、使用直前にS9を加えて調製した。S9 mixの組成をAttachment 4に示した。

5. 培地

最少グルコース寒天平板培地は、テスメディアAN培地(ロット番号：ANI520FT, 製造日：2004年6月8日, オリエンタル酵母工業株式会社)を使用した。テスメディアAN培地の組成をAttachment 5に示した。

トップアガーは、注射用水にBacto Agar(ロット番号：2120028, DIFCO)が0.6%, 塩化ナトリウムが0.5%の割合になるように加えて高圧蒸気滅菌(121℃, 20分, 以下同様)した。この水溶液に*S. typhimurium*の場合には0.5 mmol/L L-ヒスチジンと0.5 mmol/L D-ビオチンを混合した水溶液を、*E. coli*の場合には0.5 mmol/L L-トリプトファン水溶液を、それぞれ容量比10:1の割合で加えて調製した。なお、各アミノ酸溶液はフィルターシステム($\phi 0.22 \mu\text{m}$, CORNING)で濾過したものを使用した。

6. 無菌試験

被験物質の最高濃度液及びS9 mixの無菌試験は、用量設定試験、本試験(I)及び本試験(II)実施の際に、それぞれ2枚のプレートを用いて実施した。

試験は、被験物質の最高濃度液0.1 mL又はS9 mix 0.5 mLに、45℃に保温したトップアガー2 mLを加えて最少グルコース寒天平板培地上に播き広げ、プレートを転倒して37℃設定の恒温器(型式：IA-81, ヤマト科学株式会社)内で約48時間培養した後、コロニーの出現を調べた。被験物質の最高濃度液の無菌試験には、用量設定試験、本試験(I)及び本試験(II)とも50 mg/mL濃度液を用いた。

7. 試験方法

7.1. 試験操作

試験条件をAttachment 6に示した。

試験は、プレインキュベーション法により、代謝活性化によらない場合(S9 mix無添加)と代謝活性化による場合(S9 mix添加)で行った。すなわち、乾熱滅菌した試験管(15.5×100 mm, 清浄試験管ラルボ, テルモ株式会社)に, ①検体液0.1 mL, ②高圧蒸気滅菌した0.1 mol/L Na-リン酸緩衝液(pH 7.4) 0.5 mL(代謝活性化によらない場合)又はS9 mix 0.5 mL(代謝活性化による場合), ③菌懸濁液0.1 mLの順に加え, 往復振盪型式の振盪器を用いて37℃で20分間インキュベーションした。その後, 45℃に保温したトップアガーを2 mL加えて混合した後, 最少グルコース寒天平板培地上に播き広げ, プレート転倒して37℃設定の恒温器内で約48時間培養した。

培養終了後, プレート上での析出物の有無を肉眼で観察した後, 復帰変異コロニー数を, コロニーアナライザー(CA-11D, エームステストシステム)により計測し, その後, 菌の生育阻害の有無を100倍の顕微鏡下で観察した。プレート上での析出物の有無は, 培養開始時にも肉眼で観察した。

プレートは, 菌株, 代謝活性化の有無及び濃度の組み合わせごとに用量設定試験では1枚, 本試験(I)及び本試験(II)では各3枚使用した。また, 試験管及びプレートは, 菌株ごとに油性インクで色分けすることで識別した。

7.2. 用量設定試験

用量設定試験の試験濃度は, 「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)に従い, S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合とも, いずれの菌株も5000 µg/plateを最高濃度として, 以下公比4で1250, 312.5, 78.1, 19.5, 4.88, 1.22及び0.305 µg/plateの計8濃度を設定した。対照として, 全菌株に対し陰性対照及び陽性対照を設けた。

7.3. 本試験(I)及び本試験(II)

用量設定試験の結果から本試験(I)及び本試験(II)の濃度は, S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合とも, 復帰変異コロニー数の増加は認められなかったことから, 菌の生育阻害が認められた菌株については, 菌の生育阻害を示さないと考えられる濃度が4濃度以上含まれるように5000 µg/plateを最高濃度として, 以下公比2で6濃度, 菌の生育阻害が認められなかった菌株については, 用量設定試験と同様に5000 µg/plateを最高濃度として, 以下公比2で5濃度を設定した。すなわち, S9 mix無添加のTA100, TA1535, TA98及びTA1537, S9 mix添加のTA1537では, 156.3, 312.5, 625, 1250, 2500及び5000 µg/plate, その他については, 312.5, 625, 1250, 2500及び5000 µg/plateとした。対照として, 全菌株に対し陰性対照及び陽性対照を設けた。

8. 試験の成立条件

無菌試験で被験物質の最高濃度液及びS9 mixに雑菌の混入がなく、陰性対照及び陽性対照の復帰変異コロニー数が試験施設のバックグラウンドデータ (Attachment 7) の範囲内にあり、さらに試験系に影響した他の要因がない場合に試験が成立するものとした。

9. 統計学的方法

復帰変異コロニー数は、濃度ごとに平均値と標準偏差を算出した。なお、下記の判定基準に従ったため、有意差検定は実施しなかった。

10. 判定基準

試験の結果は、被験物質を処理したプレートにおける復帰変異コロニー数が陰性対照の2倍以上の値を示し、更に濃度に依存して増加した場合を陽性とした。

試験成績

1. 用量設定試験 (Table 1及びFigure 1-1～1-2)

1.1. プレート上の析出物

プレート上の析出物は、培養開始時及び培養終了時とも、S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合のいずれの濃度においても認められなかった。

1.2. 菌の生育阻害

菌の生育阻害は、S9 mix無添加の場合、TA100, TA1535, TA98及びTA1537の5000 µg/plateにおいて認められた。S9 mix添加の場合、TA1537の5000 µg/plateにおいて認められた。

1.3. 復帰変異コロニー数

復帰変異コロニー数は、S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合とも、いずれの菌株においても陰性対照の2倍未満であった。

1.4. 無菌試験

無菌試験では、被験物質の最高濃度液(50 mg/mL)及びS9 mixに雑菌の混入は認められなかった。

1.5. 陰性対照及び陽性対照

陽性対照物質は、明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。又、陰性対照及び陽性対照における復帰変異コロニー数は、試験施設のバックグラウンドデータの範囲内にあった。

2. 本試験(I) (Table 2-1～2-2及びFigure 2-1～2-2) 及び本試験(II) (Table 3-1～3-2及びFigure 3-1～3-2)

2.1. プレート上の析出物

プレート上の析出物は、培養開始時及び培養終了時とも、S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合のいずれの濃度においても認められなかった。

2.2. 菌の生育阻害

菌の生育阻害は、S9 mix無添加の場合、TA100, TA1535, TA98及びTA1537の5000 µg/plateにおいて認められた。S9 mix添加の場合、TA1537の5000 µg/plateにおいて認められた。

2.3. 復帰変異コロニー数

復帰変異コロニー数は、S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合とも、いずれの菌株においても陰性対照の2倍未満であった。

2.4. 無菌試験

無菌試験では、被験物質の最高濃度液(50 mg/mL)及びS9 mixに雑菌の混入は認められなかった。

2.5. 陰性対照及び陽性対照

陽性対照物質は、明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。又、陰性対照及び陽性対照における復帰変異コロニー数は、試験施設のバックグラウンドデータの範囲内にあった。

考 察

ビニルトリメトキシシランの遺伝子突然変異誘発性の有無を、細菌を用いる復帰突然変異試験により検討した。

ビニルトリメトキシシランは、S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合とも、いずれの菌株のすべての濃度において、復帰変異コロニー数は陰性対照の2倍以上に増加しなかった。

各試験における無菌試験では、被験物質の最高濃度液及びS9 mixに雑菌の混入は認められなかった。

各試験における陽性対照物質は、明らかな復帰変異コロニー数の増加を示し、陰性対照及び陽性対照における復帰変異コロニー数は、試験施設のバックグラウンドデータの範囲内にあった。

本試験(I) 及び本試験(II)には再現性が認められた。

以上の結果、当試験の条件下において、ビニルトリメトキシシランに遺伝子突然変異誘発性はないと判定する。

なお、ビニルトリメトキシシラン及び類縁物質の変異原性に関する文献報告はなかった。

文 献

- 1) 労働省安全衛生部化学物質調査課(編): 安衛法における変異原性試験ーテストガイドラインとGLPー, 中央労働災害防止協会, 平成3年3月

Attachment 1. Specificity of test strains

		TA100	TA1535	WP2 _{uvrA}	TA98	TA1537
Amino acid requirement	His ^{-a)}	32 ^{b)} 44	0 0		3 6	0 2
	Trp ⁻					
Sensitivity to UV radiation		+ ^{c)}	+	+	+	+
rfa specificity		11.3 mm ^{d)}	13.0 mm	0.0 mm	10.2 mm	15.8 mm
R-factor presence		0.0 mm ^{e)}	11.8mm	17.8 mm	0.0 mm	19.7 mm

a) : D-biotin was contained in plates.

b) : Number of revertant colonies/plate.

c) : +: Presence of sensitivity.

d) : Diameter of inhibition zone induced by paper disk (diameter: 6 mm) containing crystal violet (10 μ g/10 μ L).

e) : Diameter of inhibition zone induced by paper disk (diameter: 6 mm) containing ampicillin sodium (10 μ g/10 μ L).

Attachment 2. Number of surviving cells in bacterial suspension

	Number of surviving cells ($\times 10^9$ cells/mL)				
	TA100	TA1535	WP2 _{uvrA}	TA98	TA1537
Dose-finding test	3.1	4.2	5.2	3.5	2.5
Mutagenicity test (I)	3.3	4.4	5.1	3.6	2.7
Mutagenicity test (II)	3.2	4.5	5.0	3.7	2.7

Attachment 3. Preparation of S9

Animal used		Inducing substance	
Species, Strain	Rat, Sprague-Dawley rat (CRJ)	Name	Phenobarbital (PB)
Sex	Male		5,6-Benzoflavone (BF)
Age	7 weeks	Administration method	i.p.
Body weight	214.6 ± 8.3g* (n=45)	Day of administration and dose	Day 1 PB 30 mg/kg Days 2,3 and 4 PB 60 mg/kg Day 3 BF 80 mg/kg

*: Mean ± S.D.

Attachment 4. Composition of S9 mix

Constituents	Quantity in 1 mL S9 mix	Constituents	Quantity in 1 mL S9 mix
S9	0.1 mL	NADPH	4 μ mol
MgCl ₂	8 μ mol	NADH	4 μ mol
KCl	33 μ mol	Na-phosphate buffer (pH 7.4)	100 μ mol
Glucose-6-phosphate	5 μ mol	Distilled water	0.9 mL

Attachment 5. Composition of minimum glucose agar plate medium

Amount in 1000 mL minimum glucose agar plate		
A	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2 g
	Citric acid · H ₂ O	2 g
	K ₂ HPO ₄	10 g
	NaNH ₄ HPO ₄ · 4H ₂ O	1.92 g
	NaOH	0.66 g
	Distilled water	200 mL
B	Glucose	20 g
	Distilled water	100 mL
C	Agar	15 g
	Distilled water	700 mL

Each medium A, B, C was autoclaved, refrigerated at 60°C and mixed with each other. The mixed medium in a volume of 30 mL was dispensed into a petri plate sterilized by gamma rays and then solidified.

Attachment 6. Test conditions

Test condition \ Method		Pre-incubation method
Test substance solution		0.1 mL
0.1mol/L Na-phosphate buffer (pH 7.4) (in case of non-metabolic activation method)		0.5 mL
S9 mix (in case of metabolic activation method)		0.5 mL
Bacteria suspension		0.1 mL
Pre-incubation	Temperature	37°C
	Time	20 minutes
Top agar solution		2 mL
Incubation	Temperature	37°C
	Time	48 hours

Attachment 7. Background data of reverse mutation test in bacteria

Supplier of bacteria: Japan Bioassay Laboratory, Japan Industrial Safety and Health Association.

Date of procurement of bacteria: 1995. 2. 25 (TA1535, TA1537, WP2*uvrA*) and 1996. 10. 18 (TA98, TA100).

Period of accumulation of data: 2002.1~2003. 12.

Culture media: Minimum glucose agar plate medium.

		Revertant colonies/plate				
Bacteria strains		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9 mix (-)	Negative control	80 ~ 176 (n=139)	3 ~ 21 (n=137)	16 ~ 53 (n=139)	8 ~ 32 (n=141)	2 ~ 20 (n=137)
		119 ± 39.5 (79 ~ 159)	9 ± 6.4 (2 ~ 15)	33 ± 15.6 (17 ~ 48)	18 ± 9.7 (8 ~ 28)	9 ± 7.5 (2 ~ 17)
	Positive control	AF-2 0.01µg/plate	NaN ₃ 0.5µg/plate	AF-2 0.01µg/plate	AF-2 0.1µg/plate	9AA 80µg/plate
		321 ~ 673 (n=139)	421 ~ 658 (n=137)	103 ~ 219 (n=139)	364 ~ 586 (n=141)	163~ 700 (n=137)
		538 ± 123.5 (414 ~ 661)	543 ± 94.2 (449 ~ 637)	148 ± 45.5 (102 ~ 193)	456 ± 109.5 (346 ~ 565)	439 ± 232.1 (207 ~ 672)
	S9 mix (+)	Negative control	88 ~ 193 (n=137)	3 ~ 24 (n=139)	17 ~ 60 (n=137)	12 ~ 45 (n=137)
123 ± 38.7 (84 ~ 161)			9 ± 7.1 (2 ~ 16)	34 ± 16.8 (17 ~ 51)	28 ± 12.9 (15 ~ 41)	15 ± 10.4 (5 ~ 26)
Positive control		2AA 1µg/plate	2AA 2µg/plate	2AA 10µg/plate	2AA 0.5µg/plate	2AA 2µg/plate
		579 ~ 2372 (n=137)	235 ~ 473 (n=139)	753 ~ 1266 (n=137)	283 ~ 859 (n=137)	104 ~ 372 (n=137)
		1054 ± 547.8 (506 ~ 1601)	342 ± 104.3 (238 ~ 446)	977 ± 242.9 (734 ~ 1220)	432 ± 190.5 (241 ~ 622)	178 ± 101.6 (77 ~ 280)

Upper row: minimum~maximum (n=number of plates).

Lower row: Mean ± 2 × S.D. [calculated by Microsoft (R) Excel 97].

Hashima Laboratory, Nihon Bioresearch Inc.

Table 1. Reverse mutation test of Silane, ethenyltrimethoxy- in bacteria (dose-finding test)

With (+) or Without (-) S9 mix	Compound concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9 mix (-)	Negative control	95	10	24	17	7
	0.305	102	11	33	13	10
	1.22	106	4	30	10	6
	4.88	79	9	33	18	9
	19.5	97	3	18	23	7
	78.1	115	9	40	17	11
	312.5	105	7	24	13	9
	1250	109	6	24	8	10
	5000	79*	14*	21	21*	7*
S9 mix (+)	Negative control	120	12	29	24	19
	0.305	135	16	31	19	9
	1.22	122	4	32	25	18
	4.88	105	5	31	33	15
	19.5	127	13	41	32	14
	78.1	109	6	33	27	15
	312.5	122	7	26	30	5
	1250	113	6	25	24	7
	5000	121	16	37	38	12*
Positive control not requiring S9 mix	Name	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Number of colonies/plate	539	575	155	564	475
Positive control requiring S9 mix	Name	2AA				
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2
	Number of colonies/plate	859	342	880	365	122

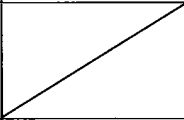
Negative control : Dimethyl sulfoxide.

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide; NaN₃ : Sodium azide; 9AA : 9-Aminoacridine hydrochloride.

2AA : 2-Aminoanthracene.

* : Bacterial growth inhibition was observed.

Table 2-1. Reverse mutation test of Silane, ethenyltrimethoxy- in bacteria (mutagenicity test I)

With (+) or without (-) S9 mix	Compound concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (Number of colonies/plate)				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9 mix (-)	Negative Control	103 106 106 (105 $\pm$ 1.7)	6 11 11 (9 $\pm$ 2.9)	26 32 45 (34 $\pm$ 9.7)	14 14 24 (17 $\pm$ 5.8)	7 7 16 (10 $\pm$ 5.2)
	156.3	107 115 116 (113 $\pm$ 4.9)	7 7 10 (8 $\pm$ 1.7)		12 17 20 (16 $\pm$ 4.0)	6 9 9 (8 $\pm$ 1.7)
	312.5	109 120 147 (125 $\pm$ 19.6)	7 7 10 (8 $\pm$ 1.7)	34 38 47 (40 $\pm$ 6.7)	14 18 18 (17 $\pm$ 2.3)	9 10 12 (10 $\pm$ 1.5)
	625	100 113 123 (112 $\pm$ 11.5)	3 8 10 (7 $\pm$ 3.6)	29 30 37 (32 $\pm$ 4.4)	8 12 15 (12 $\pm$ 3.5)	3 6 8 (6 $\pm$ 2.5)
	1250	115 123 130 (123 $\pm$ 7.5)	13 14 14 (14 $\pm$ 0.6)	30 33 38 (34 $\pm$ 4.0)	7 16 20 (14 $\pm$ 6.7)	5 7 10 (7 $\pm$ 2.5)
	2500	101 117 127 (115 $\pm$ 13.1)	7 13 18 (13 $\pm$ 5.5)	32 37 46 (38 $\pm$ 7.1)	14 17 22 (18 $\pm$ 4.0)	5 9 10 (8 $\pm$ 2.6)
	5000	82* 85* 92* (86 $\pm$ 5.1)	5* 5* 12* (7 $\pm$ 4.0)	24 33 36 (31 $\pm$ 6.2)	21* 23* 25* (23 $\pm$ 2.0)	6* 10* 12* (9 $\pm$ 3.1)
Positive control not requiring S9 mix	Name	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Number of colonies/plate	505 522 537 (521 $\pm$ 16.0)	546 548 579 (558 $\pm$ 18.5)	139 141 149 (143 $\pm$ 5.3)	419 423 432 (425 $\pm$ 6.7)	220 281 288 (263 $\pm$ 37.4)

Negative control : Dimethyl sulfoxide.

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide; NaN₃ : Sodium azide; 9AA : 9-Aminoacridine hydrochloride.

() : Mean $\pm$ S.D.

* : Bacterial growth inhibition was observed.

Table 2-2. Reverse mutation test of Silane, ethenyltrimethoxy- in bacteria (mutagenicity test I)

With (+) or without (-) S9 mix	Compound concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (Number of colonies/plate)					
		Base-pair substitution type			Frameshift type		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9 mix (+)	Negative Control	121 122 130 (124 $\pm$ 4.9)	9 12 12 (11 $\pm$ 1.7)	32 43 51 (42 $\pm$ 9.5)	20 22 29 (24 $\pm$ 4.7)	9 10 13 (11 $\pm$ 2.1)	
	156.3					9 13 17 (13 $\pm$ 4.0)	
	312.5	118 119 138 (125 $\pm$ 11.3)	8 13 14 (12 $\pm$ 3.2)	39 39 44 (41 $\pm$ 2.9)	19 24 24 (22 $\pm$ 2.9)	11 14 21 (15 $\pm$ 5.1)	
	625	140 141 146 (142 $\pm$ 3.2)	7 7 14 (9 $\pm$ 4.0)	37 45 56 (46 $\pm$ 9.5)	21 24 31 (25 $\pm$ 5.1)	13 13 20 (15 $\pm$ 4.0)	
	1250	142 149 155 (149 $\pm$ 6.5)	3 10 12 (8 $\pm$ 4.7)	34 38 53 (42 $\pm$ 10.0)	21 29 31 (27 $\pm$ 5.3)	5 11 12 (9 $\pm$ 3.8)	
	2500	128 151 164 (148 $\pm$ 18.2)	6 7 12 (8 $\pm$ 3.2)	47 50 50 (49 $\pm$ 1.7)	32 32 40 (35 $\pm$ 4.6)	14 18 19 (17 $\pm$ 2.6)	
	5000	142 151 167 (153 $\pm$ 12.7)	11 12 14 (12 $\pm$ 1.5)	30 45 47 (41 $\pm$ 9.3)	32 39 43 (38 $\pm$ 5.6)	11* 14* 16* (14 $\pm$ 2.5)	
Positive control requiring S9 mix	Name	2AA					
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies/plate	867 919 935 (907 $\pm$ 35.6)	307 331 355 (331 $\pm$ 24.0)	789 834 980 (868 $\pm$ 99.9)	368 400 448 (405 $\pm$ 40.3)	131 135 138 (135 $\pm$ 3.5)	

Negative control : Dimethyl sulfoxide.

2AA : 2-Aminoanthracene.

() : Mean $\pm$ S.D.

* : Bacterial growth inhibition was observed.

Table 3-1. Reverse mutation test of Silane, ethenyltrimethoxy- in bacteria (mutagenicity test II)

With (+) or without (-) S9 mix	Compound concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (Number of colonies/plate)					
		Base-pair substitution type			Frameshift type		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9 mix (-)	Negative Control	118 128 134 (127 $\pm$ 8.1)	10 14 14 (13 $\pm$ 2.3)	29 40 43 (37 $\pm$ 7.4)	26 27 31 (28 $\pm$ 2.6)	7 7 11 (8 $\pm$ 2.3)	
	156.3	133 158 158 (150 $\pm$ 14.4)	9 12 13 (11 $\pm$ 2.1)		18 26 30 (25 $\pm$ 6.1)	12 13 16 (14 $\pm$ 2.1)	
	312.5	138 142 147 (142 $\pm$ 4.5)	13 13 17 (14 $\pm$ 2.3)		19 21 28 (23 $\pm$ 4.7)	10 11 12 (11 $\pm$ 1.0)	
	625	123 144 148 (138 $\pm$ 13.4)	10 17 17 (15 $\pm$ 4.0)	21 22 33 (25 $\pm$ 6.7)	21 25 28 (25 $\pm$ 3.5)	10 12 14 (12 $\pm$ 2.0)	
	1250	124 153 154 (144 $\pm$ 17.0)	13 14 19 (15 $\pm$ 3.2)	30 31 31 (31 $\pm$ 0.6)	26 26 26 (26 $\pm$ 0.0)	6 11 17 (11 $\pm$ 5.5)	
	2500	122 141 150 (138 $\pm$ 14.3)	11 11 21 (14 $\pm$ 5.8)	28 35 44 (36 $\pm$ 8.0)	15 24 39 (26 $\pm$ 12.1)	6 7 12 (8 $\pm$ 3.2)	
	5000	84* 101* 106* (97 $\pm$ 11.5)	6* 15* 17* (13 $\pm$ 5.9)	24 26 32 (27 $\pm$ 4.2)	19* 26* 27* (24 $\pm$ 4.4)	5* 6* 10* (7 $\pm$ 2.6)	
Positive control not requiring S9 mix	Name	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9AA	
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
	Number of colonies/plate	496 515 528 (513 $\pm$ 16.1)	542 570 572 (561 $\pm$ 16.8)	113 152 155 (140 $\pm$ 23.4)	453 454 461 (456 $\pm$ 4.4)	183 261 338 (261 $\pm$ 77.5)	

Negative control : Dimethyl sulfoxide.

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide; NaN₃ : Sodium azide; 9AA : 9-Aminoacridine hydrochloride.

() : Mean $\pm$ S.D.

* : Bacterial growth inhibition was observed.

Table 3-2. Reverse mutation test of Silane, ethenyltrimethoxy- in bacteria (mutagenicity test II)

With (+) or without (-) S9 mix	Compound concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (Number of colonies/plate)				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9 mix (+)	Negative Control	110 150 159 (140 $\pm$ 26.1)	12 14 16 (14 $\pm$ 2.0)	34 36 47 (39 $\pm$ 7.0)	30 32 40 (34 $\pm$ 5.3)	14 16 19 (16 $\pm$ 2.5)
	156.3					16 22 23 (20 $\pm$ 3.8)
	312.5	118 137 142 (132 $\pm$ 12.7)	12 14 18 (15 $\pm$ 3.1)	24 33 37 (31 $\pm$ 6.7)	26 28 33 (29 $\pm$ 3.6)	12 19 22 (18 $\pm$ 5.1)
	625	141 144 157 (147 $\pm$ 8.5)	7 11 18 (12 $\pm$ 5.6)	33 38 46 (39 $\pm$ 6.6)	26 29 32 (29 $\pm$ 3.0)	8 21 23 (17 $\pm$ 8.1)
	1250	133 140 145 (139 $\pm$ 6.0)	18 19 26 (21 $\pm$ 4.4)	29 39 40 (36 $\pm$ 6.1)	27 37 46 (37 $\pm$ 9.5)	12 18 19 (16 $\pm$ 3.8)
	2500	137 167 176 (160 $\pm$ 20.4)	18 21 24 (21 $\pm$ 3.0)	25 42 43 (37 $\pm$ 10.1)	29 38 43 (37 $\pm$ 7.1)	10 17 19 (15 $\pm$ 4.7)
	5000	159 164 183 (169 $\pm$ 12.7)	13 20 21 (18 $\pm$ 4.4)	39 53 56 (49 $\pm$ 9.1)	28 30 35 (31 $\pm$ 3.6)	14* 18* 20* (17 $\pm$ 3.1)
Positive control requiring S9 mix	Name	2AA				
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2
	Number of colonies/plate	935 941 977 (951 $\pm$ 22.7)	289 341 363 (331 $\pm$ 38.0)	776 836 879 (830 $\pm$ 51.7)	460 464 482 (469 $\pm$ 11.7)	126 136 161 (141 $\pm$ 18.0)

Negative control : Dimethyl sulfoxide.

2AA : 2-Aminoanthracene.

() : Mean $\pm$ S.D.

* : Bacterial growth inhibition was observed.

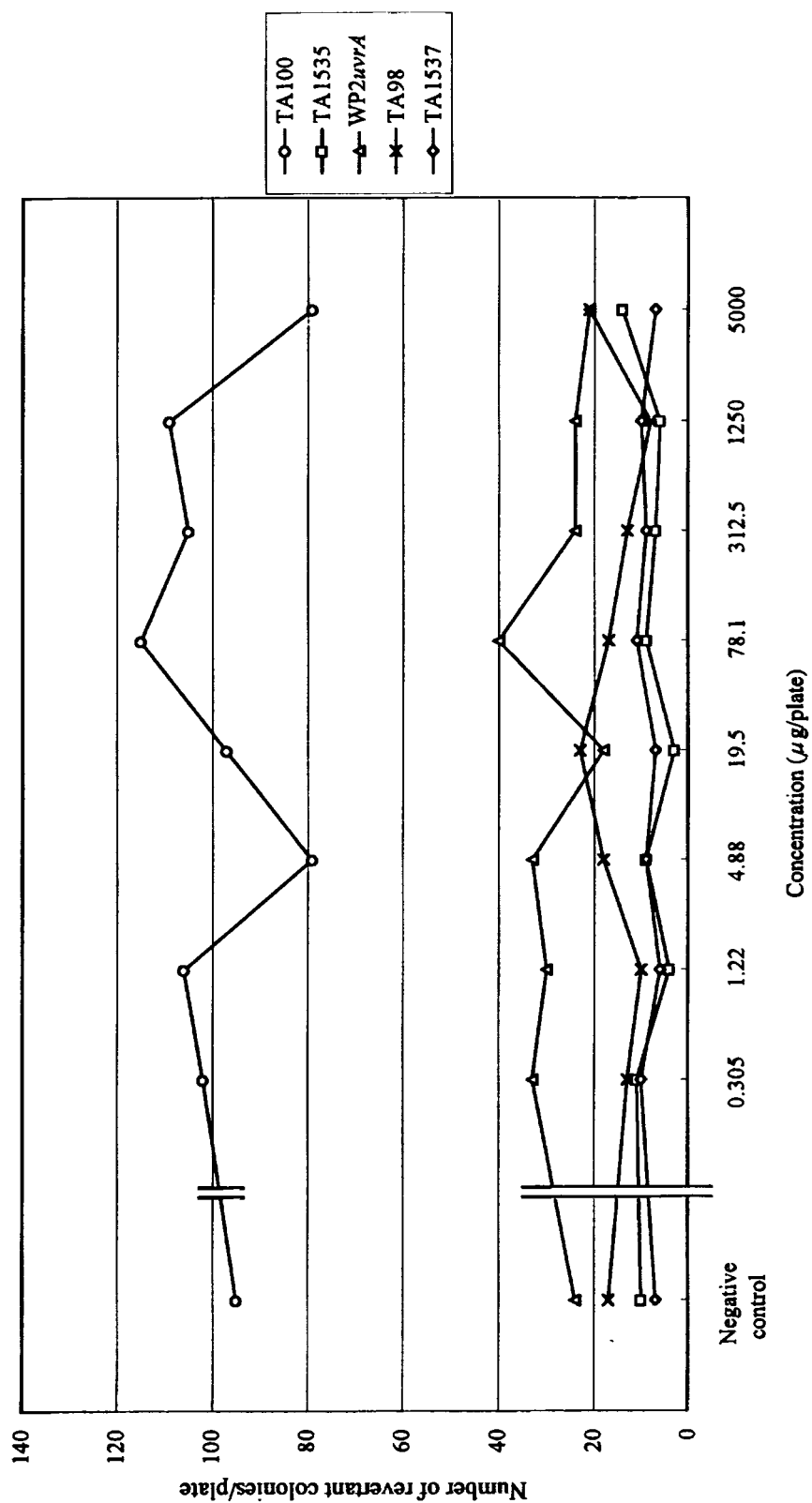


Figure 1-1. Reverse mutation test of Silane, ethenyltrimethoxy- in bacteria (dose-finding test: without S9 mix).

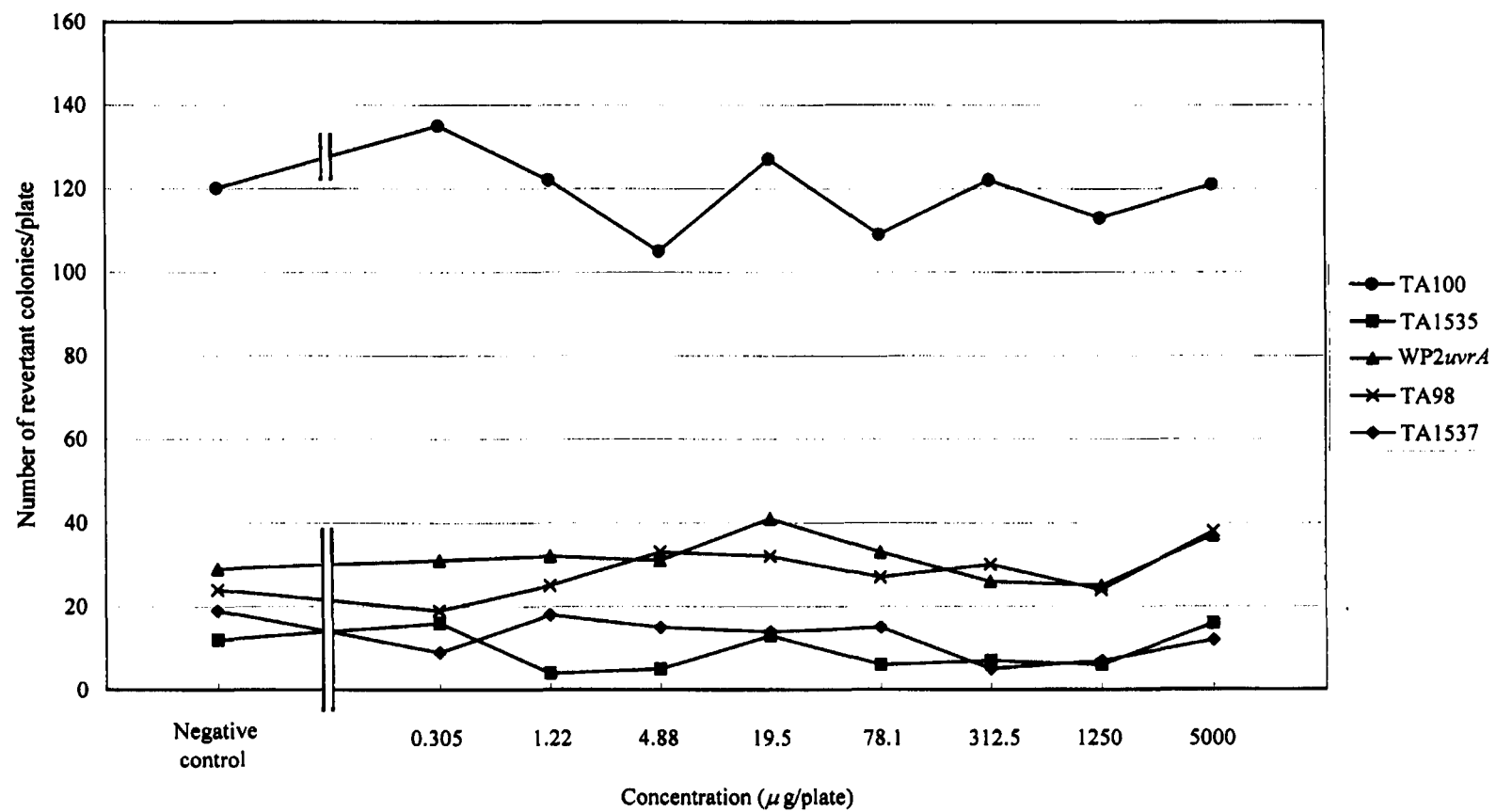


Figure 1-2. Reverse mutation test of Silane, ethenyltrimethoxy- in bacteria (dose-finding test: with S9 mix).

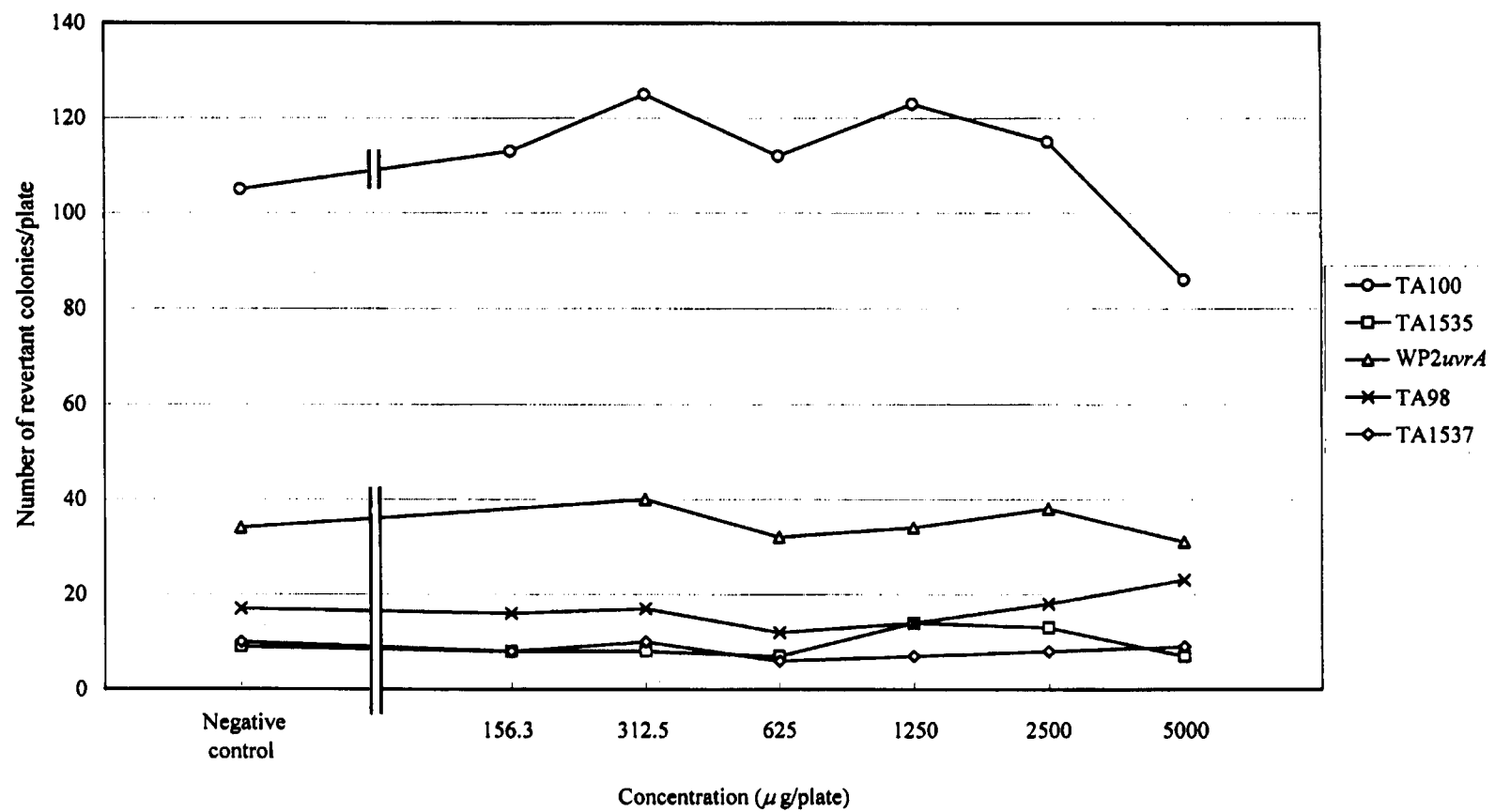


Figure 2-1. Reverse mutation test of Silane, ethenyltrimethoxy- in bacteria (mutagenicity test I: without S9 mix).

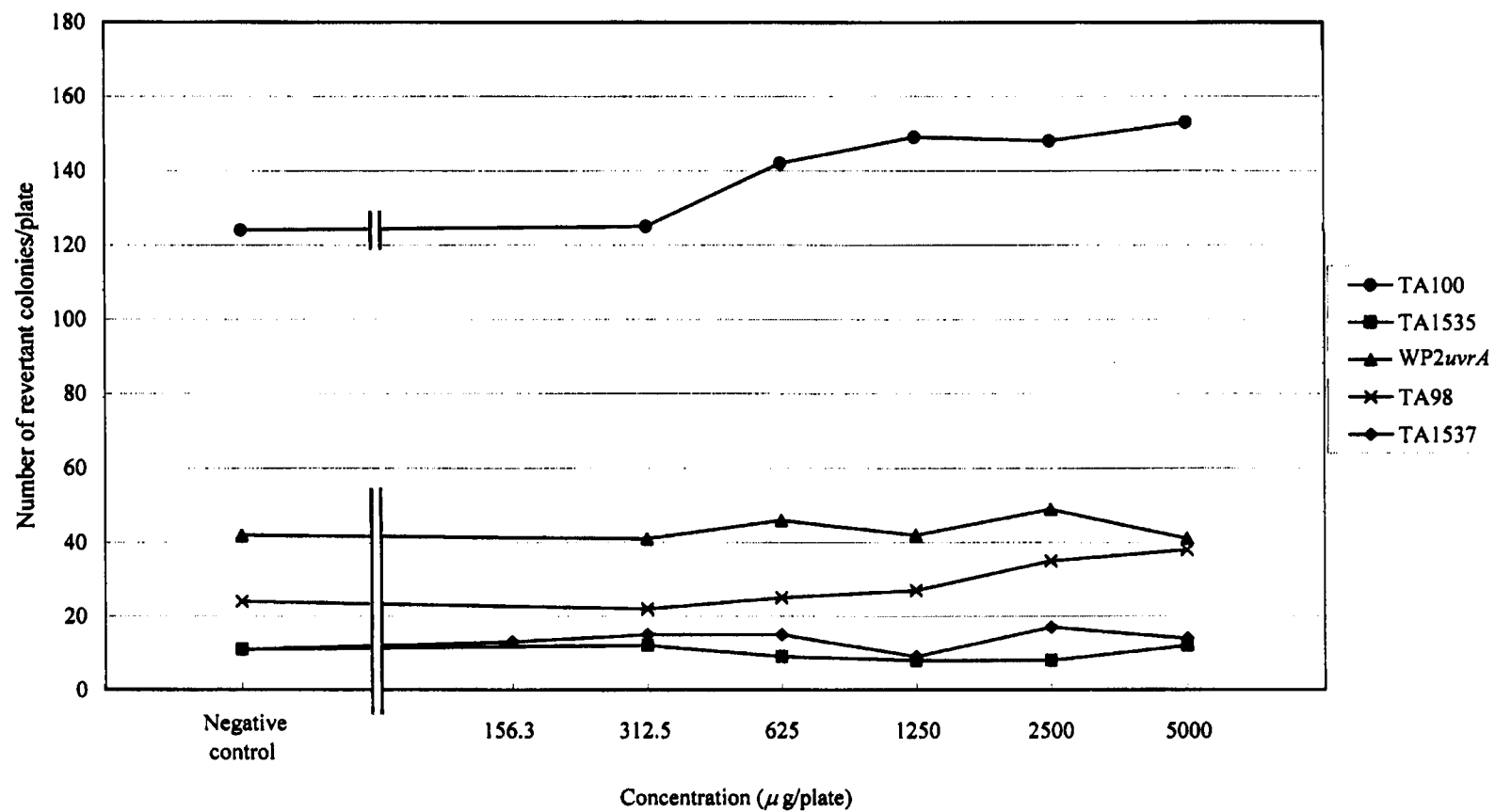


Figure 2-2. Reverse mutation test of Silane, ethenyltrimethoxy- in bacteria (mutagenicity test I: with S9 mix).

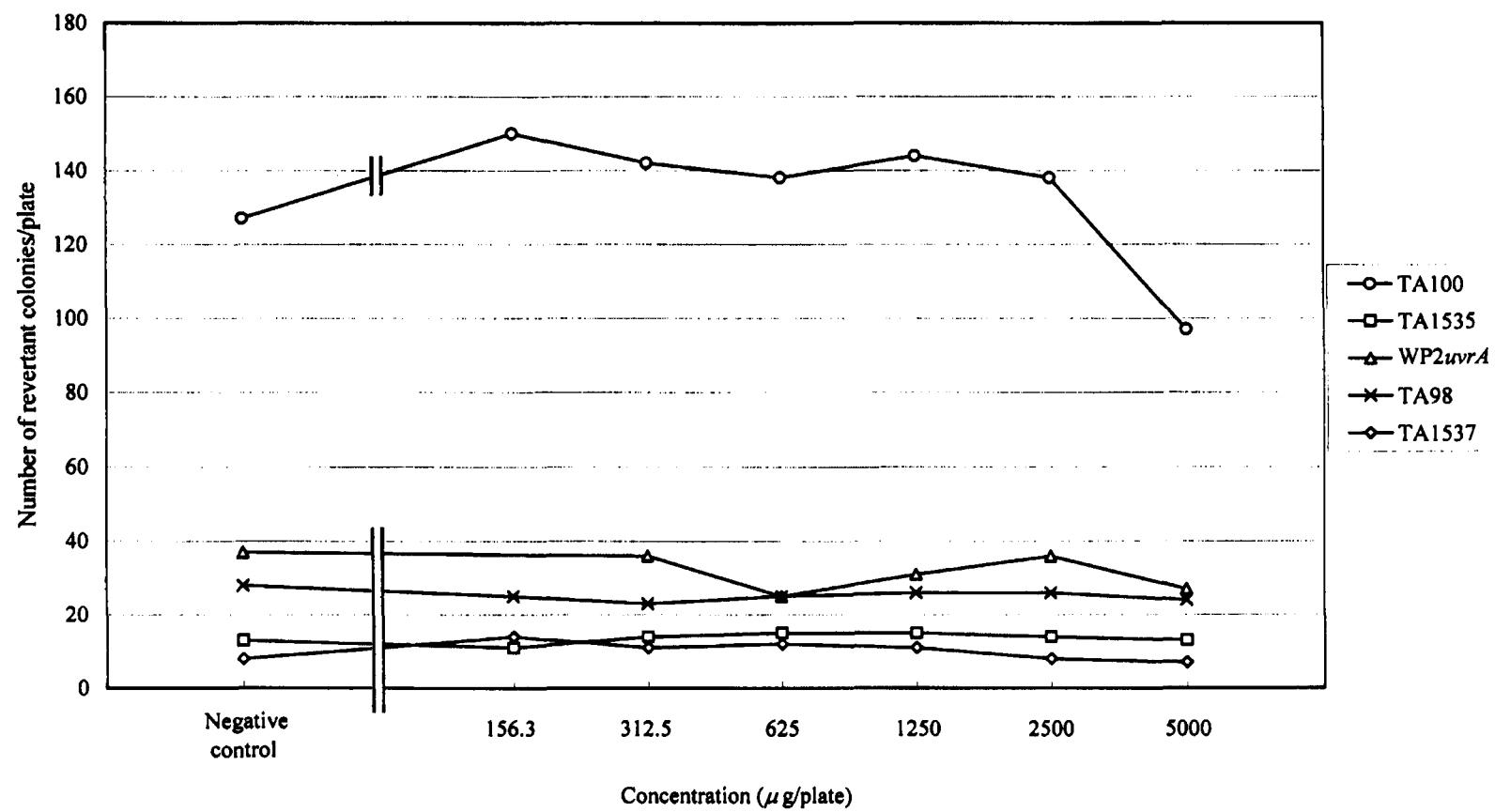


Figure 3-1. Reverse mutation test of Silane, ethenyltrimethoxy- in bacteria (mutagenicity test II: without S9 mix).

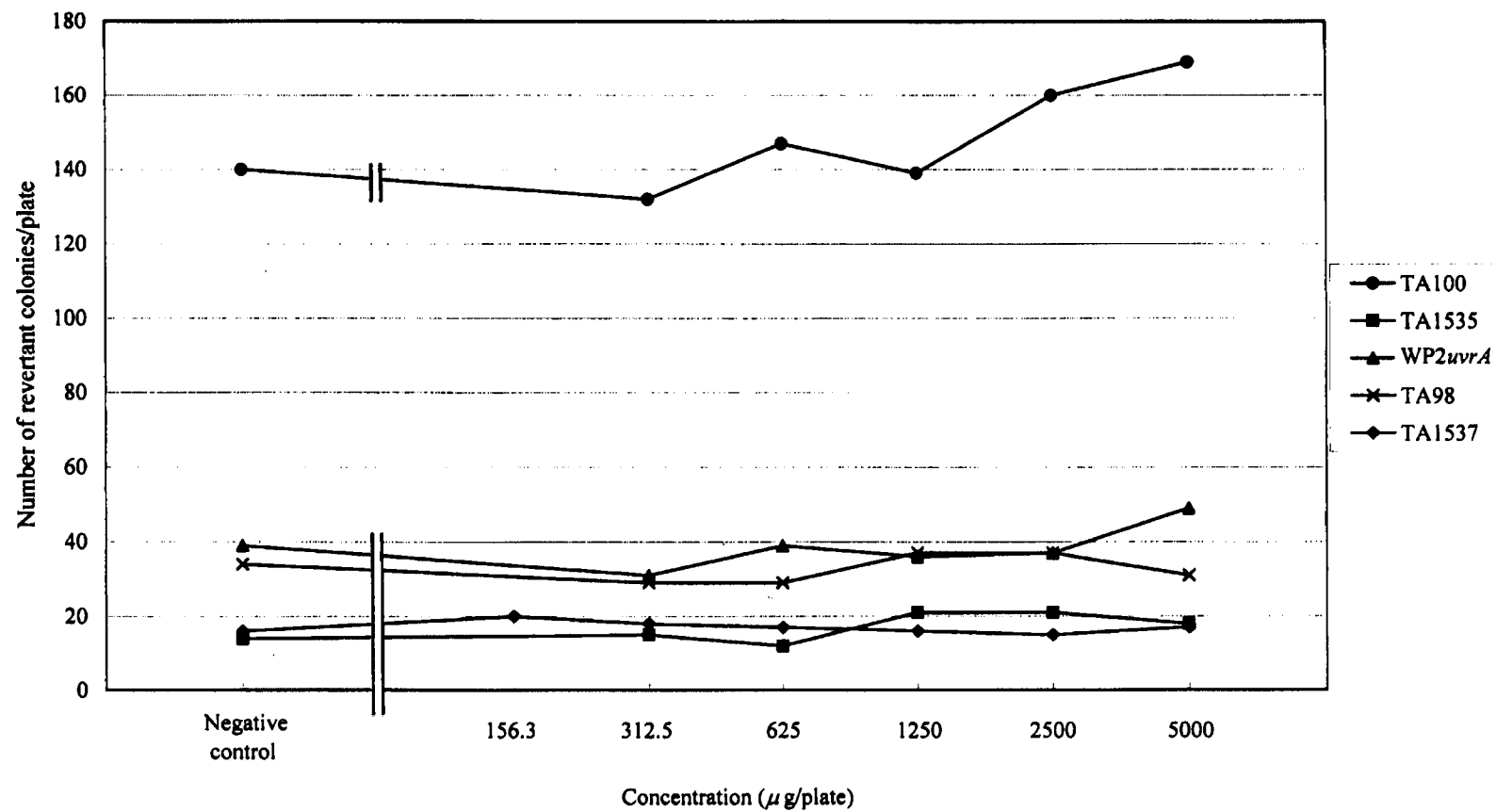


Figure 3-2. Reverse mutation test of Silane, ethenyltrimethoxy- in bacteria (mutagenicity test II: with S9 mix).

Bacterial test ¹⁾

Purity	: 100%
Type species/strains	: <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98 , TA1537 <i>Escherichia coli</i> WP2 <i>uvrA</i>
Test method	: Guidelines for Screening Mutagenicity Testing of Chemicals (Chemical Substances Control Law of Japan) and OECD Test Guideline 471
Procedures	: Pre-incubation method
Solvent	: Dimethyl sulfoxide
Positive controls	: -S9 mix ; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide (TA100,TA98, WP2 <i>uvrA</i>), Sodium azide (TA1535) and 9-Aminoacridine (TA1537) +S9 mix ; 2-Aminoanthracene (all strains)
Dosage	: -S9 mix ; 0, 156.3, 312.5, 625, 1250, 2500, 5000 µg/plate (TA100, TA1535, TA98 , TA1537) ; 0, 312.5, 625, 1250, 2500, 5000 µg/plate (WP2 <i>uvrA</i>) +S9 mix ; 0, 312.5, 625, 1250, 2500, 5000 µg/plate (TA100, TA1535, TA98 , WP2 <i>uvrA</i>) ; 0, 156.3, 312.5, 625, 1250, 2500, 5000 µg/plate (TA1537)
S9	: Rat liver, induced with phenobarbital and 5,6-benzoflavone
Plates / test	: 3
Number of replicats	: 2
GLP	: Yes

Test results :

This chemical did not induce gene mutations in *S. typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *E. coli* WP2*uvrA* strains with or without S9 mix. Toxicity was observed at 5000 µg/plate (TA100, TA1535, TA98 and TA1537) without S9 mix, and at 5000 µg/plate (TA1537) with S9 mix.

Genotoxic effects :

Salmonella typhimurium TA100, TA1535, TA98, TA1537

	+	?	-
Without metabolic activation :	[]	[]	[*]
With metabolic activation :	[]	[]	[*]

Escherichia coli WP2*uvrA*

	+	?	-
Without metabolic activation :	[]	[]	[*]
With metabolic activation :	[]	[]	[*]

1) The test was performed by Nihon Bioresearch Inc., 6-104 Majima, Fukuju-cho, Hashima, Gifu, 501-6251, Japan. Tel +81-58-392-6222 Fax +81-58-392-1284.

細菌を用いる復帰突然変異試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質の名称 (IUPAC命名法による)	ビニルトリメトキシシラン		
別 名	オルガノシラン		
C A S 番 号	2768-02-7		
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合 は、その製法の概要)	$(\text{CH}_3\text{O})_3\text{SiCH}=\text{CH}_2$		
分 子 量	148.2		
試験に供した新規 化学物質の純度	100%		
試験に供した新規 化学物質のLot No.	308595		
不純物の名称及び含有率	—		
蒸 気 圧	2.7 kPa以下/25℃		
対 水 溶 解 度	難溶		
1-オクタノール/水分配係数	—		
融 点	0℃以下		
沸 点	123℃		
常温における性状	無色透明の液体で微臭		
安 定 性	水及び酸、アルカリ化合物と穏やかに反応(加水分解)して、引火性のメタノールを生成する。		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	DMSO	301.5 mg/mL以上	*
その他 * : 301.5 mg/mL DMSO溶液に発熱、発泡は認められず。			

[備考] 物理化学的性状は、可能な限り記入すること。

1. 「蒸気圧」の欄には、被験物質の蒸気圧を記入すること。
2. 「安定性」の欄には、温度、光等に対する安定性を記入すること。
3. 「溶媒に対する溶解度等」の欄には、被験物質の溶媒に対する溶解度及びその溶媒中での安定性を記入すること。

2. 試験に用いた菌株

菌 株 名	入 手 先	入 手 年 月 日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA 98	中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター	1996年 10月 18日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA 100	中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター	1996年 10月 18日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA 1535	中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター	1995年 2月 25日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA 1537	中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター	1995年 2月 25日
<i>Escherichia coli</i> WP2uvrA	中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター	1995年 2月 25日

3. S9 mix

(1) S9の入手法等（該当する番号を○で囲み、必要事項を記入すること。）

自製・購入の別	1.自製 (2.)購入（製造元：オリエンタル酵母工業株式会社）
製造年月日	2004年 6月 11日製造
購入の場合のLot No.	04061103
保存温度	-80 °C

(2) S9の調製方法

使用動物		誘導物質	
種・系統	ラット、Crj:CD (SD)	名 称	Phenobarbital (PB) 5,6-Benzoflavone (BF)
性	雄	投与方 法	i.p.
週 令	7 週	投与期間及び投与量 (g / kg 体 重)	1 日 目 PB 0.03 g/kg
体 重	214.6 ± 8.3 g		2,3,4 日 目 PB 0.06 g/kg 3 日 目 BF 0.08 g/kg

(3) S9 mixの組成

成 分	S9 mix 1mL中の量	成 分	S9 mix 1mL中の量
S9	0.1 mL	NADPH	4 μ mol
MgCl ₂	8 μ mol	NADH	4 μ mol
KCl	33 μ mol	Na-リン酸緩衝液	100 μ mol
グルコース-6-リン酸	5 μ mol	その他（注射用水）	0.9 mL

4. 被験物質溶液の調製（被験物質溶液の性状及び純度換算の有無は該当するものを○で囲むこと。）

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	株式会社同仁化学研究所	PU140	紫外吸収スペクトル用	100.0
溶媒選択の理由	ジメチルスルホキシド(DMSO)は、細菌を用いる復帰突然変異試験で一般的に用いられており、被験物質が容易に溶解するため。				
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	— 時間 — 分 — °C 用量設定試験、本試験 (I)、本試験 (II) とも用時調製				
純度換算の有無	有 (換算計数:) ☒ 無				

5. 前培養の条件等

(1) 条件

ニュートリエントブロス	名称	製造元	Lot No.
	OXOID NUTRIENT BROTH No.2	OXOID Ltd.	298714
前 培 養 時 間	9 時間		
培養容器 (形状・容量)	形状: L字管 容量: 約 40 mL		
培 養 液 量	10 mL	接 種 菌 量	20 μ L

(2) 前培養終了時の生菌数等

菌 株 名		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
生菌数 ($\times 10^9$ /mL)	用量設定試験	3.1	4.2	5.2	3.5	2.5
	本 試 験 (I)	3.2	4.4	5.1	3.6	2.7
	本 試 験 (II)	3.3	4.5	5.0	3.7	2.7
測 定 方 法 (いずれかを○で囲むこと。)		☒ 1. O. D. 値よりの換算 2. 段階希釈 3. その他 ()				

6. 最少グルコース寒天平板培地（該当する番号を○で囲み、必要事項を記入すること。）

自 製 ・ 購 入 の 別	1. 自 製 ② 購 入 (製造元: オリエンタル酵母工業株式会社)
製 造 年 月 日	2004年 6月 8日製造
購 入 の 場 合 の L o t N o .	ANI520FT
使用寒天の名称・製造元・Lot No.	伊那寒天 BA-30A 伊那食品工業 (株) Lot No.40127

7. 試験の方法（該当する番号を○で囲み、必要事項を記入すること。）

(1) 試験方法とその選定理由

採用した試験方法	① プレインキュベーション法 2. プレート法 3. その他 ()
その他の場合は その選定理由	_____

(2) 試験条件

組 成	菌 懸 濁 液	0.1 mL
	被験物質溶液	0.1 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 °C
	時 間	20 分
インキュベーション	温 度	37 °C
	時 間	約48 時間

8. コロニー計測の方法

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 面積補正+数え落とし補正)

9. 試験結果

(1) 試験の結果は別表1-1～1-3による。

(2) 結果の判定

判 定 (いずれかを○で囲むこと。)	陽性	陰性
判定の理由 本被験物質は、S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合とも、いずれの菌株においても、復帰変異コロニー数は陰性対照の2倍以上に増加しなかった。 2回実施した本試験には再現性が認められた。 本試験で用いた陽性対照物質は明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。また、陰性対照及び陽性対照における復帰変異コロニー数は背景データのほぼ範囲内にあり、試験条件を満たすものであったことから、試験系に影響した他の要因がなく、試験は適切に実施されたことが確認された。 以上の結果より、本被験物質は陰性と判定した。		

(陽性と判定した場合には、別表2比活性の表を添付すること。)

(3) 参考事項

[用量設定理由] 本試験の実施に先駆けて、試験濃度設定のために用量設定試験を実施した。用量設定試験の試験濃度は、「新規化学物質等に係る試験方法について」(平成15年11月21日)に従い、いずれの菌株も5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$を最高濃度として、以下公比4で1250、312.5、78.1、19.5、4.88、1.22及び0.305 $\mu\text{g}/\text{plate}$の計8濃度を設定した。対照として、全菌株に対し陰性対照及び陽性対照を設けた。 用量設定試験の結果から本試験(I)及び本試験(II)の濃度は、S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合とも、復帰変異コロニー数の増加は認められなかったことから、菌の生育阻害が認められた菌株については、菌の生育阻害を示さないと考えられる濃度が4濃度以上含まれるように5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$を最高濃度として、以下公比2で6濃度、菌の生育阻害が認められなかった菌株については、用量設定試験と同様に5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$を最高濃度として、以下公比2で5濃度を設定した。すなわち、S9 mix無添加のTA100、TA1535、TA98及びTA1537、S9 mix添加のTA1537では、156.3、312.5、625、1250、2500及び5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$、その他の菌株については、312.5、625、1250、2500及び5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$とした。対照として、全菌株に対し陰性対照及び陽性対照を設けた。 [被験物質の析出] 用量設定試験、本試験(I)及び本試験(II)とも、いずれの濃度においても被験物質の析出は認められなかった。

[無菌試験]

各試験の無菌試験では、被験物質の最高濃度液およびS9 mixに雑菌の混入は認められなかった。

[判定基準]

被験物質における復帰変異コロニー数が、陰性対照の2倍以上の値を示し、さらに高濃度になるに従って増加した場合を陽性とした。

[備考]「参考事項」の欄には、試験結果に対する試験責任者の見解等を記入すること。

10. その他

試験実施施設	名称	株式会社 日本バイオリサーチセンター 羽島研究所			
	所在地	〒501-6251 岐阜県羽島市福寿町間島6丁目104番地	電話	058 (392) 6222	
			FAX	058 (392) 1284	
試験責任者	職氏名	試験管理部			
	経験年数	15 年			
試験番号	901523				
試験期間	2004年 8月 24日より 2005年 11月 1日				

[備考]

1. 本様式への記載は、最終報告書より転記して作成すること。
2. 最終報告書と同じ試験番号を記載すること。
3. 本様式の作成責任者は、本様式の欄外に、所属及び氏名を記載すること。

(別表 1-1)

試 験 結 果 表

被験物質の名称： ビニルトリメトキシシラン（用量設定試験）

試験実施期間		2004年 9月 6日 より 2004年 9月 9日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/プレート)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
-S9 mix	陰性対照	95 (95)	10 (10)	24 (24)	17 (17)	7 (7)	
	0.305	102 (102)	11 (11)	33 (33)	13 (13)	10 (10)	
	1.22	106 (106)	4 (4)	30 (30)	10 (10)	6 (6)	
	4.88	79 (79)	9 (9)	33 (33)	18 (18)	9 (9)	
	19.5	97 (97)	3 (3)	18 (18)	23 (23)	7 (7)	
	78.1	115 (115)	9 (9)	40 (40)	17 (17)	11 (11)	
	312.5	105 (105)	7 (7)	24 (24)	13 (13)	9 (9)	
	1250	109 (109)	6 (6)	24 (24)	8 (8)	10 (10)	
	5000	79* (79)	14* (14)	21 (21)	21* (21)	7* (7)	
+S9 mix	陰性対照	120 (120)	12 (12)	29 (29)	24 (24)	19 (19)	
	0.305	135 (135)	16 (16)	31 (31)	19 (19)	9 (9)	
	1.22	122 (122)	4 (4)	32 (32)	25 (25)	18 (18)	
	4.88	105 (105)	5 (5)	31 (31)	33 (33)	15 (15)	
	19.5	127 (127)	13 (13)	41 (41)	32 (32)	14 (14)	
	78.1	109 (109)	6 (6)	33 (33)	27 (27)	15 (15)	
	312.5	122 (122)	7 (7)	26 (26)	30 (30)	5 (5)	
	1250	113 (113)	6 (6)	25 (25)	24 (24)	7 (7)	
	5000	121 (121)	16 (16)	37 (37)	38 (38)	12* (12)	
陽性対照	S9 mixを必要としないもの	名 称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9AA
		用量 (μg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
		コロニー数/プレート	539 (539)	575 (575)	155 (155)	564 (564)	475 (475)
	S9 mixを必要とするもの	名 称	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
		用量 (μg/プレート)	1	2	10	0.5	2
		コロニー数/プレート	859 (859)	342 (342)	880 (880)	365 (365)	122 (122)

【備考】

1. 菌の生育阻害が認められる場合は、該当する数値の右上に*印を付すること。
2. 括弧内には各プレートのコロニー数の平均値を記入すること。
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すること。
4. プレート上で沈殿が析出した場合は、その用量に#印を付すること。
5. 略称で示された陽性物質の名称を欄外に記入すること。

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; NaN₃: Sodium azide; 9AA: 9-Aminoacridine hydrochloride;
2AA: 2-Aminoanthracene.

(別表1-2)

試験結果表

被験物質の名称： ビニルトリメトキシシラン（本試験Ⅰ）

試験実施期間		2004年 9月 14日 より 2004年 9月 17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		TA98		TA1537	
-S9 mix	陰性対照	103 106 106 (105 $\pm$ 1.7)	6 11 11 (9 $\pm$ 2.9)	26 32 45 (34 $\pm$ 9.7)	14 14 24 (17 $\pm$ 5.8)	7 7 16 (10 $\pm$ 5.2)						
	156.3	107 115 116 (113 $\pm$ 4.9)	7 7 10 (8 $\pm$ 1.7)			12 17 20 (16 $\pm$ 4.0)	6 9 9 (8 $\pm$ 1.7)					
	312.5	109 120 147 (125 $\pm$ 19.6)	7 7 10 (8 $\pm$ 1.7)	34 38 47 (40 $\pm$ 6.7)	14 18 18 (17 $\pm$ 2.3)	9 10 12 (10 $\pm$ 1.5)						
	625	100 113 123 (112 $\pm$ 11.5)	3 8 10 (7 $\pm$ 3.6)	29 30 37 (32 $\pm$ 4.4)	8 12 15 (12 $\pm$ 3.5)	3 6 8 (6 $\pm$ 2.5)						
	1250	115 123 130 (123 $\pm$ 7.5)	13 14 14 (14 $\pm$ 0.6)	30 33 38 (34 $\pm$ 4.0)	7 16 20 (14 $\pm$ 6.7)	5 7 10 (7 $\pm$ 2.5)						
	2500	101 117 127 (115 $\pm$ 13.1)	7 13 18 (13 $\pm$ 5.5)	32 37 46 (38 $\pm$ 7.1)	14 17 22 (18 $\pm$ 4.0)	5 9 10 (8 $\pm$ 2.6)						
	5000	82* 85* 92* (86 $\pm$ 5.1)	5* 5* 12* (7 $\pm$ 4.0)	24 33 36 (31 $\pm$ 6.2)	21* 23* 25* (23 $\pm$ 2.0)	6* 10* 12* (9 $\pm$ 3.1)						
+S9 mix	陰性対照	121 122 130 (124 $\pm$ 4.9)	9 12 12 (11 $\pm$ 1.7)	32 43 51 (42 $\pm$ 9.5)	20 22 29 (24 $\pm$ 4.7)	9 10 13 (11 $\pm$ 2.1)						
	156.3							9 13 17 (13 $\pm$ 4.0)				
	312.5	118 119 138 (125 $\pm$ 11.3)	8 13 14 (12 $\pm$ 3.2)	39 39 44 (41 $\pm$ 2.9)	19 24 24 (22 $\pm$ 2.9)	11 14 21 (15 $\pm$ 5.1)						
	625	140 141 146 (142 $\pm$ 3.2)	7 7 14 (9 $\pm$ 4.0)	37 45 56 (46 $\pm$ 9.5)	21 24 31 (25 $\pm$ 5.1)	13 13 20 (15 $\pm$ 4.0)						
	1250	142 149 155 (149 $\pm$ 6.5)	3 10 12 (8 $\pm$ 4.7)	34 38 53 (42 $\pm$ 10.0)	21 29 31 (27 $\pm$ 5.3)	5 11 12 (9 $\pm$ 3.8)						
	2500	128 151 164 (148 $\pm$ 18.2)	6 7 12 (8 $\pm$ 3.2)	47 50 50 (49 $\pm$ 1.7)	32 32 40 (35 $\pm$ 4.6)	14 18 19 (17 $\pm$ 2.6)						
	5000	142 151 167 (153 $\pm$ 12.7)	11 12 14 (12 $\pm$ 1.5)	30 45 47 (41 $\pm$ 9.3)	32 39 43 (38 $\pm$ 5.6)	11* 14* 16* (14 $\pm$ 2.5)						
陽性対照	S9 mixを必要としないもの	名 称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9AA					
		用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80					
		コロニー数/プレート	505 522 537 (521 $\pm$ 16.0)	546 548 579 (558 $\pm$ 18.5)	139 141 149 (143 $\pm$ 5.3)	419 423 432 (425 $\pm$ 6.7)	220 281 288 (263 $\pm$ 37.4)					
	S9 mixを必要とするもの	名 称	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA					
		用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	1	2	10	0.5	2					
		コロニー数/プレート	867 919 935 (907 $\pm$ 35.6)	307 331 355 (331 $\pm$ 24.0)	789 834 980 (868 $\pm$ 99.9)	368 400 448 (405 $\pm$ 40.3)	131 135 138 (135 $\pm$ 3.5)					

[備考]

1. 菌の生育阻害が認められる場合は、該当する数値の右上に*印を付すること。
2. 括弧内には各プレートのコロニー数の平均値を記入すること。
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すること。
4. プレート上で沈殿が析出した場合は、その用量に#印を付すること。
5. 略称で示された陽性物質の名称を欄外に記入すること。

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; NaN₃: Sodium azide; 9AA: 9-Aminoacridine hydrochloride.
2AA: 2-Aminoanthracene.

(別表1-3)

試験結果表

被験物質の名称： ビニルトリメトキシシラン（本試験Ⅱ）

試験実施期間		2004年 9月 27日 より 2004年 9月 30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	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537	
-S9 mix	陰性対照	118 128 134 (127 $\pm$ 8.1)	10 14 14 (13 $\pm$ 2.3)	29 40 43 (37 $\pm$ 7.4)	26 27 31 (28 $\pm$ 2.6)	7 7 11 (8 $\pm$ 2.3)		
	156.3	133 158 158 (150 $\pm$ 14.4)	9 12 13 (11 $\pm$ 2.1)		18 26 30 (25 $\pm$ 6.1)	12 13 16 (14 $\pm$ 2.1)		
	312.5	138 142 147 (142 $\pm$ 4.5)	13 13 17 (14 $\pm$ 2.3)	31 38 38 (36 $\pm$ 4.0)	19 21 28 (23 $\pm$ 4.7)	10 11 12 (11 $\pm$ 1.0)		
	625	123 144 148 (138 $\pm$ 13.4)	10 17 17 (15 $\pm$ 4.0)	21 22 33 (25 $\pm$ 6.7)	21 25 28 (25 $\pm$ 3.5)	10 12 14 (12 $\pm$ 2.0)		
	1250	124 153 154 (144 $\pm$ 17.0)	13 14 19 (15 $\pm$ 3.2)	30 31 31 (31 $\pm$ 0.6)	26 26 26 (26 $\pm$ 0.0)	6 11 17 (11 $\pm$ 5.5)		
	2500	122 141 150 (138 $\pm$ 14.3)	11 11 21 (14 $\pm$ 5.8)	28 35 44 (36 $\pm$ 8.0)	15 24 39 (26 $\pm$ 12.1)	6 7 12 (8 $\pm$ 3.2)		
	5000	84* 101* 106* (97 $\pm$ 11.5)	6* 15* 17* (13 $\pm$ 5.9)	24 26 32 (27 $\pm$ 4.2)	19* 26* 27* (24 $\pm$ 4.4)	5* 6* 10* (7 $\pm$ 2.6)		
+S9 mix	陰性対照	110 150 159 (140 $\pm$ 26.1)	12 14 16 (14 $\pm$ 2.0)	34 36 47 (39 $\pm$ 7.0)	30 32 40 (34 $\pm$ 5.3)	14 16 19 (16 $\pm$ 2.5)		
	156.3					16 22 23 (20 $\pm$ 3.8)		
	312.5	118 137 142 (132 $\pm$ 12.7)	12 14 18 (15 $\pm$ 3.1)	24 33 37 (31 $\pm$ 6.7)	26 28 33 (29 $\pm$ 3.6)	12 19 22 (18 $\pm$ 5.1)		
	625	141 144 157 (147 $\pm$ 8.5)	7 11 18 (12 $\pm$ 5.6)	33 38 46 (39 $\pm$ 6.6)	26 29 32 (29 $\pm$ 3.0)	8 21 23 (17 $\pm$ 8.1)		
	1250	133 140 145 (139 $\pm$ 6.0)	18 19 26 (21 $\pm$ 4.4)	29 39 40 (36 $\pm$ 6.1)	27 37 46 (37 $\pm$ 9.5)	12 18 19 (16 $\pm$ 3.8)		
	2500	137 167 176 (160 $\pm$ 20.4)	18 21 24 (21 $\pm$ 3.0)	25 42 43 (37 $\pm$ 10.1)	29 38 43 (37 $\pm$ 7.1)	10 17 19 (15 $\pm$ 4.7)		
	5000	159 164 183 (169 $\pm$ 12.7)	13 20 21 (18 $\pm$ 4.4)	39 53 56 (49 $\pm$ 9.1)	28 30 35 (31 $\pm$ 3.6)	14* 18* 20* (17 $\pm$ 3.1)		
陽性対照	S9 mixを必要としないもの	名 称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9AA	
		用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
		コロニー数/プレート	496 515 528 (513 $\pm$ 16.1)	542 570 572 (561 $\pm$ 16.8)	113 152 155 (140 $\pm$ 23.4)	453 454 461 (456 $\pm$ 4.4)	183 261 338 (261 $\pm$ 77.5)	
	S9 mixを必要とするもの	名 称	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
		用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	1	2	10	0.5	2	
		コロニー数/プレート	935 941 977 (951 $\pm$ 22.7)	289 341 363 (331 $\pm$ 38.0)	776 836 879 (830 $\pm$ 51.7)	460 464 482 (469 $\pm$ 11.7)	126 136 161 (141 $\pm$ 18.0)	

[備考]

1. 菌の生育阻害が認められる場合は、該当する数値の右上に*印を付すること。
2. 括弧内には各プレートのコロニー数の平均値を記入すること。
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すること。
4. プレート上で沈殿が析出した場合は、その用量に#印を付すること。
5. 略称で示された陽性物質の名称を欄外に記入すること。

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; NaN₃: Sodium azide; 9AA: 9-Aminoacridine hydrochloride.
2AA: 2-Aminoanthracene.