最終報告書

試験名: 4-シクロヘキセン-1, 2-ジカルボン酸 ビス(2-エチルヘキシル)の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号:T-0467

試験期間:2010年5月26日-2011年7月5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

1		Ħ	次
,		ш	~^

1	日 <i>》</i> #	1
1.	日火	4

3.	要約		8
4.	緒言		9
5.	被験织	物質及び被験液の調製	10
	5.1	被験物質及び溶媒	10
	5.1.1	被験物質	10
	5.1.2	溶媒	11
	5.1.3	溶媒の選択理由	11
	5.2	被験液の調製方法	11
	5.2.1	用量設定試験用被験液の調製	11
	5.2.2	本試験1回目用被験液の調製	12
	5.2.3	本試験2回目用被験液の調製	12
	5.2.4	被験液の保存条件	12
6.	試験	材料及び方法	12
	6.1	試験菌株	12
	6.1.1	菌株の種類	12
	6.1.2	菌株の選択理由	13
	6.1.3	菌株の保存及び解凍	13
	6.1.4	菌株の特性検査	13
	6.2	対照物質	13
	6.2.1	陰性対照物質	13
	6.2.2	陽性対照物質	14

	6.2.3	調製方法14
	6.3	試薬14
	6.3.1	S9Mix の調製方法14
	6.3.2	培地16
	6.3.3	ニュートリエントブロス No.2 培養液16
	6.3.4	0.1 mol/L リン酸緩衝液(pH 7.4)16
	6.3.5	トップアガー17
	6.4	試験方法18
	6.4.1	前培養18
	6.4.2	
	6.4.3	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	用量設定試験の観察結果及び本試験用量の設定19
	7.2	本試験1回目の観察結果20
	7.3	本試験 2 回目の観察結果20
	7.4	試験系の成立条件20
8.	考察	21
9.	参考	文献21
	ables	
	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)
	gures	
	図 1	用量反応曲線(本試験 1 回目 TA100:-S9Mix)
	図 2	用量反応曲線(本試験 1 回目 TA100: +S9Mix)
	図 3	用量反応曲線(本試験 1 回目 TA1535: -S9Mix)
	図 4	用量反応曲線(本試験 1 回目 TA1535: +S9Mix)
	図 5	用量反応曲線(本試験 1 回目 WP2 <i>uvrA</i> :-S9Mix)
	図 6	用量反応曲線(本試験 1 回目 WP2 <i>uvrA</i> : +S9Mix)
	図 7	用量反応曲線(本試験 1 回目 TA98: -S9Mix)
	図 8	用量反応曲線(本試験 1 回目 TA98: +\$9Mix)
	図 9	用量反応曲線(本試験 1 回目 TA1537: -S9Mix)
	図 10	用量反応曲線(本試験 1 回目 TA1537: +\$9Mix)

3. 要約

4-シクロへキセンー1,2-ジカルボン酸ビス(2-エチルへキシル)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アセトンを用いた。

試験は、19.5~5000 μ g/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 TA1535、TA98、TA1537 については 2.44~78.1 μ g/plate の範囲の 6 用量、代謝活性化しない場合の S. typhimurium TA100 については 9.77~313 μ g/plate の範囲の 6 用量、代謝活性化する場合の S. typhimurium TA 株については 39.1~1250 μ g/plate の範囲の 6 用量、代謝活性化の有無にかかわらず E. coli WP2 uvrA については 156~5000 μ g/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においては油状の沈殿が $156~\mu g/plate$ 以上、代謝活性化した場合の $2500~\mu g/plate$ 以上の用量において沈殿が認められた。本被験物質によるプレート上の着色は代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。

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 39.1 μg/plate 以上(本試験 1 回目においては 78.1 μg/plate 以上)、代謝活性化しない場合の S. typhimurium TA1535、TA98 の 78.1 μg/plate、代謝活性化しない場合の S. typhimurium TA100 の 313 μg/plate、代謝活性化した場合の S. typhimurium TA1537の 625 μg/plate 以上(本試験 1 回目においては 1250 μg/plate 以上)、代謝活性化した場合の S. typhimurium TA100、TA1535、TA98 の 1250 μg/plate 以上、代謝活性化した場合の 2500 μg/plate 以上(本試験 2 回目においては 5000 μg/plate)代謝活性化しない場合の E. coli WP2 uvrA の 5000 μg/plate の用量で認められた。

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陰性対照値の2倍以上とな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、4-シクロヘキセン-1, 2-ジカルボン酸ビス(2-エチルヘキシル)は、細菌に対する遺伝子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。

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

官報公示整理番号 : 3-2437

入手日 : 2009年10月23日(御殿場研究所)

Ames 試験用入手日 : 2009 年 11 月 18 日 (東京研究所)

入手量 : 25 g (Ames 試験用)

名称 : $4-\sqrt{2}$: 4-

ーエチルヘキシル)

英語名称 : Bis(2-ethylhexyl)4-Cyclohexene-1,2-dicarboxylate

CAS番号: 2915-49-3

ロット番号 : AX01

構造式:

 $\begin{array}{c|c}
O \\
\parallel \\
C - OCH_2CH & CH_2CH_3 \\
C - OCH_2CH & CH_2CH_3
\end{array}$

純度:99.0 %分子量:394.59引火点:202°C

常温における性状 : ほとんど無色透明液体(比重;0.9673)

屈折率 n 20/D : 1.4652

安定性: 通常の取扱い条件においては安定。酸化剤との接触に

注意する。なお、本試験終了後に残余となった被験物質を株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所において分析し、安定性を確認した結果、赤外吸収スペクトルに大きな変化はなく、安定であることが確認され

た (別添1)。

溶解性 : ジメチルスルホキシド(以下、DMSOと略す);不溶

アセトン; 100 mg/mL で溶解

溶媒中での安定性: DMSO、アセトン;発熱、ガスの発生等の反応性なし

保存条件 : 冷暗所(冷蔵庫内、許容値:1~10°C)

保存場所 : 東京研究所 被験物質調製保存室

保存温度 期間(2009.11.18~2010.6.22)中の実測温度 0.1~ 10.1℃

残量の処置: 試験終了後の残量はすべて株式会社ボゾリサーチセン

ター御殿場研究所へ送付し、分析後の残余物質は焼却

処分した。

なお、上記溶解性及び溶媒中での安定性は、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により、DMSO については 50 mg/mL で溶解しなかったため不溶とした。

5.1.2 溶媒

名称: アセトン

製造元 : 和光純薬工業株式会社

ロット番号 : EPR3187

規格 : JIS 規格 試薬特級 99.5%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

DMSO、アセトンについて溶解性試験を実施した結果、DMSOでは 50 mg/mLで溶解せず、アセトンでは 100 mg/mLで溶解し、いずれも発熱、ガスの発生等の反応性も認められなかったため、アセトンを溶媒として試験を実施した。なお、試験操作での小試験管への被験液の添加量は、アセトンの菌株に対する毒性を考慮して 0.05 mL とした。

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 0.200 mL 分取し、電子天秤(株式会社エー・アンド・ディ: GR-120)を用いて秤量し、その秤量値 176.7 mg に最高調製濃度の 100 mg/mL となるように溶媒量を計算し、この溶媒量から分取した際の液量 0.200 mL を差し引いた 1.567 mL のアセトンを添加して溶解し、100 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、100、25、6.25、1.56 及び 0.391 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 0.200 mL 分取し、電子天秤(株式会社エー・アンド・ディ:GR-120)を用いて秤量し、その秤量値 185.3 mg に最高調製 濃度の 100 mg/mL となるように溶媒量を計算し、この溶媒量から分取した際の液量 0.200 mL を差し引いた 1.653 mL のアセトンを添加して溶解し、100 mg/mL の被験液を調製した。次いで、これを公比 2 で順次 11 段階希釈し、100、50、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.781、0.391、0.195、0.0977 及び 0.0488 mg/mL の計 12 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 0.200 mL 分取し、電子天秤(株式会社エー・アンド・ディ: GR-120)を用いて秤量し、その秤量値 186.2 mg に最高調製 濃度の 100 mg/mL となるように溶媒量を計算し、この溶媒量から分取した際の液量 0.200 mL を差し引いた 1.662 mL のアセトンを添加して溶解し、100 mg/mL の被験液を調製した。次いで、これを公比 2 で順次 11 段階希釈し、100、50、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.781、0.391、0.195、0.0977 及び 0.0488 mg/mL の計 12 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日に東京研究所へ分与された。

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、細菌を用いる復帰突然変異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 16.0 mL に、DMSO (和光純薬工業株式会社、JIS 規格試薬特級、ロット番号 CDM1016)を 1.4 mL 添加後、滅菌チューブに 0.3 mL ずつ分注し、-70^{\circ}C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; 2010年 2月 4日~2010年 6月 21日:-87.6~-75.6 $^{\circ}$ C)。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	2010年4月 8日
S. typhimurium TA100	2010年2月11日
S. typhimurium TA1535	2010年4月23日
S. typhimurium TA1537	2010年4月23日
E. coli WP2 uvrA	2010年2月 4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	2010年4月 8日~2010年4月12日
S. typhimurium TA100	2010年2月15日~2010年2月18日
S. typhimurium TA1535	2010年4月23日~2010年4月26日
S. typhimurium TA1537	2010年4月23日~2010年4月26日
E. coli WP2 uvrA	2010年2月15日~2010年2月18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アセトン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	製造元
2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF-2)	WKK3086	99.6%	室温、遮光	和光純薬工業 株式会社
Sodium azide (SAZ)	SDL2565	99.8%	室温、遮光	和光純薬工業 株式会社
2-Methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)-aminopropylamino]acridine·2HCl (ICR-191)	534652		室温、遮光	Polysciences, Inc.
2-Aminoanthracene (2AA)	KLH1059	96.6%	室温、遮光	和光純薬工業 株式会社
Benzo[a]pyrene (B[a]P)	17870	100%	冷蔵、遮光	AccuStandard, Inc.

保存場所

東京研究所 微生物試験室

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 CDF0753)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 K9L77)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

	代謝活性化	しない場合	代謝活性化する場合		
使用菌株	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 (NALGENE $0.45\mu m$: Lot No.1006845) 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-611

製造日:2010年4月2日購入日:2010年5月20日種・系統:ラット・SD系

週齢・性 : 7週齢・雄 体重 : 208-254 g

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 (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

: 2010年5月20日~2010年6月22日:-87.3~-75.6°C

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 : 999001

製造日 : 2010年4月 6日 購入日 : 2010年5月28日

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

2010年5月28日~2010年6月22日:2.6~8.7℃

3) S9Mix の組成 (1mL中)

水 : 0.9 mL S9 : 0.1 mL

MgCl2:8.0 μmol/mLKCl: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 培地

1) 最小グルコース寒天平板培地

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 : DZLB3A01

製造日 : 2010年3月10日 購入日 : 2010年5月12日

保存方法 : 室温保存

保存場所 : 東京研究所 寒天培地保存室

2) 使用寒天

名称 : OXOID AGAR No.1

製造元 : OXOID LTD. ロット番号 : 1073337-02

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 2.5 wt%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)

0.1 mol/L リン酸水素ニナトリウム水溶液に、0.1 mol/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、0.1 mol/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($121 ^{\circ}$ 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 (NaH₂PO₄·2H₂O)

名称 : リン酸二水素ナトリウム二水和物 (NaH₂PO₄·2H₂O)

製造元 : 和光純薬工業株式会社

ロット番号:PEN6717保存方法:室温保存

保存場所 : 東京研究所 微生物試験室

2) リン酸水素ニナトリウム (Na₂HPO₄)

名称 : リン酸水素ニナトリウム (Na₂HPO₄)

製造元 : 和光純薬工業株式会社

ロット番号 : ALH5213

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) 寒天

名称

Bacto Agar

製造元

Becton, Dickinson and Company

ロット番号

9023033

保存方法

室温保存

保存場所

東京研究所 微生物試験室

2) 塩化ナトリウム

製造元

和光純薬工業株式会社

ロット番号

EPR3006

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

製造元

MP Biomedicals, Inc.

ロット番号

1644J

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

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

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 前培養

- 1) ニュートリエントブロス No.2 培養液 10 mL を入れた滅菌済み L 字型試験管 (内容量 48 mL) に、凍結保存菌株を解凍して得た菌懸濁液を S. typhimurium TA 株は各 20 μL、E. coli 株は 10 μL 植菌し、振盪恒温槽 (COOL BATH SHAKER ML-10 PU-6 接続型、タイテック株式会社) にセットした。
- 2) これを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、振盪(100回/分)しながら 37°C に上昇後 9時間前培養した。なお、使 用後の菌懸濁液は廃棄した。
- 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、生菌数が 1×10⁹個/mL 以上あることを確認した。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	牛菌	数	睯
22		ノスチ	ᅩᅋ	24	ᆓ

菌株	菌 数(個/mL)				
图 7本	用量設定試験	本試験1回目	本試験2回目		
S. typhimurium TA100	4.52×10 ⁹	4.54×10 ⁹	4.68×10 ⁹		
S. typhimurium TA1535	4.76×10 ⁹	4.65×10 ⁹	4.88×10 ⁹		
E. coli WP2 uvrA	7.69×10^{9}	8.12×10 ⁹	7.87×10^9		
S. typhimurium TA98	5.36×10 ⁹	5.13×10°	5.57×10 ⁹		
S. typhimurium TA1537	3.11×10 ⁹	3.10×10°	3.09×10^{9}		

6.4.2 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、用量設定試験では各用量につき2枚、2回の本試験では各用量につき3枚のプレートを用いた。

6.4.3 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被験液又は溶媒を 0.05 mL、陽性対照溶液を 0.1 mL入れ、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、さらに各菌懸濁液 0.1 mLを加え、攪拌した。
- 2) 攪拌後すぐに 37°C で 20 分間振盪 (80 回/分) しながらプレインキュベーションした。
- 3) プレインキュベーション終了後、あらかじめ電子レンジを用いて溶解し、ユニット恒温槽で 45℃ に保温されたトップアガーを小試験管に 2.0 mL 加えて攪拌後、最小グルコース寒天平板培地に均一に重層した。
- 4) 無菌試験として、調製した最高用量の被験液 0.05 mL 及び調製した S9 Mix 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)~4)の一連の操作は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で実施した。

- 5) 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℃で用量 設定試験及び本試験1回目では49時間、本試験2回目では48時間培養した。
- 6) 培養後、プレート上の被験物質による沈殿及び着色の有無を確認した結果、代謝活性化しない場合において油状の沈殿が 156 μg/plate 以上、代謝活性化した場合の 2500 μg/plate 以上の用量において沈殿が認められたが機器計測に支障を来たさなかったため、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。着色については、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。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

用量設定試験の結果を別表 1、本試験 1 回目の結果を別表 2、3、本試験 2 回目の結果を別表 4、5 に示した。なお、図 $1\sim10$ は別表 2、3 より作成した。

7.1 用量設定試験の観察結果及び本試験用量の設定

本試験の試験用量を設定するため、100 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、 $5000 \mu g/plate$)を用い、用量設定試験を実施した。

その結果、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において油状の沈殿が 313 μ g/plate 以上、代謝活性化した場合においては 5000 μ g/plate の用量で沈殿が認められた。本被験物質による着色は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。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 TA1535、TA98、TA1537 の 78.1 μ g/plate 以上、代謝活性化しない場合の S. typhimurium TA100 の 313 μ g/plate 以上、代謝活性化した場合の S. typhimurium TA t00 t00 t10 t10

本被験物質による復帰変異コロニー数は、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陰性対照値の2倍以上となる増加は認められず、用量反応性も認められなかった。

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 TA1535、TA98、TA1537 については 78.1 µg/plate、代謝活性化しない場合の S. typhimurium TA100 については 313 µg/plate、代謝活性化す

る場合の S. typhimurium TA 株については 1250 μ g/plate、代謝活性化の有無にかかわらず E. coli WP2 uvrA については 5000 μ g/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。

7.2 本試験1回目の観察結果

本被験物質による復帰変異コロニー数は、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陰性対照値の2倍以上となる増加は認められず、用量反応性も認められなかった。

7.3 本試験2回目の観察結果

本被験物質によるプレート上の沈殿及び着色は、代謝活性化しない場合においては油状の沈殿が 156 μ g/plate 以上、代謝活性化した場合においては 2500 μ g/plate 以上の用量で沈殿が認められた。本被験物質によるプレート上の着色は代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。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 39.1 μ g/plate 以上、代謝活性化しない場合の S. typhimurium TA1535、TA98 の 78.1 μ g/plate 以上、代謝活性化しない場合の S. typhimurium TA100 の 313 μ g/plate、代謝活性化した場合の S. typhimurium TA100 の t00 の t10 の t

本被験物質による復帰変異コロニー数は、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陰性対照値の2倍以上となる増加は認められず、用量反応性も認められなかった。

7.4 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(別添2)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陰性対照値の2倍以上とな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、4-シクロヘキセン-1, 2-ジカルボン酸ビス(2-エチルヘキシル)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.
- 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.

試 験 結 果 表 (用量設定試験)

<u>被験物質の名称:4ーシクロヘキセンー1,2ージカルボン酸ビス(2-エチルヘキシル)</u>

No. T-0467

試験実施期間		<u>7ロペキセンー 1, 2ーシカルホン酸とス(2ーエチルペキシル)</u> No. 1-0467 2010年6月1日 より 2010年6月4日						
代謝活性 被験物質		復帰変異数(コロニー数/プレート)						
化系の	の用量		塩基対置換型		フレーム	シフト型		
有無	(μg/プレート)	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537		
	陰性対照	83	12	19	18	8		
	(アセトン)	107 (95)	13 (13)	24 (22)	12 (15)	5 (7)		
		109	10	20	8	6		
	19.5	120 (115)	16 (13)	22 (21)	11 (10)	2 (4)		
		88	4 *	13	5 *	5 *		
S9Mix	78.1	87 (88)	13 * (9)	21 (17)	8 * (_ 7)	10 * (8)		
(-)		100 *	16 *	19	8 *	10 *		
	313 #	97 * (99)	10 * (13)	22 (21)	13 * (11)	3 * (7)		
		96 *	11 *	20	16 *	6 *		
	1250 #	96 * (96)	18 * (15)	22 (21)	18 * (17)	9*(8)		
		107 *	12 *	15 *	18 *	3 *		
	5000 #	106 * (107)	9 * (11)	27 * (21)	16 * (17)	9*(6)		
	陰性対照	130	13	22	30	6		
	(アセトン)	125 (128)	16 (15)	28 (25)	26 (28)	10 (8)		
		134	11	22	38	8		
	19.5	139 (137)	7 (9)	36 (29)	30 (34)	4 (6)		
		142	10	18	32	6		
S9Mix	78.1	117 (130)	10 (10)	28 (23)	28 (30)	9 (8)		
(+)		133	7	21	36	10		
	313	131 (132)	18 (13)	30 (26)	29 (33)	15 (13)		
		110 *	19 *	19	35 *	9 *		
	1250	131 * (121)	12 * (16)	17 (18)	28 * (32)	10 * (10)		
		116 *	11 *	15 *	17 *	9 *		
	5000 #	132 * (124)	7*(9)	19 * (17)	23 * (20)	4*(7)		
S9Mix	名 称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191		
を必要	用量(μg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0		
陽 いもの	コロニー数/プレート	442	260	69	454	1836		
性	32777	473 (458)	293 (277)	71 (70)	451 (453)	1914 (1875)		
対 照 S9Mix	名 称	B[#]P	2AA	2AA	B[a]P	B[<i>a</i>]P		
を必要	用量(μg/プレート)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0		
とする もの	 コロニー数/プレート	886	303	929	295	103		
		822 (854)	349 (326)	1050 (990)	306 (301)	112 (108)		

(備考)

AF-2 : 2-(2-7リル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミト・

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]アクリシン・2HCI

2AA : 2-アミノアントラセン B[a]P : ペンゾ[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。

#:被験物質による沈殿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。

試 験 結 果 表 (本試験1回目:-S9Mix)

<u>被験物質の名称:4ーシクロヘキセンー1,2ージカルボン酸ビス(2ー</u>エチルヘキシル)

No. T-0467

	実施期間	1, 2 2,3,7,1	ン酸ヒス(2-エチルヘキ) 2010 ^を	<u>₹</u> 6月15日 より 2010年6.	月18日	No. T-0467	
代謝活性	被験物質	復帰変異数(コロニー数/プレート)					
化系の	の用量	塩基対置換型		_	フレール	ムシフト型	
有無	(µg/プレート)	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
	陰性対照	119 99	10 9	12 11	21 19	4 7	
	(アセトン)	104 (107 ± 10.4)	9 (9±0.6)	10 (11 ± 1.0)	10 (17 ± 5.9)		
		104 (107 = 10.4)	12	10 (11 = 1:0)	19	6	
			19		27	5	
	2.44	NI	9 (13 ± 5.1)	NT	I8 (21 ± 4.9)	10 (7 ± 2.6)	
			15		8	4	
			7		13	8	
	4.88	NT NT	12 (11 ± 4.0)	NT	13 (11 ± 2.9)	2 (5 ± 3.1)	
		83	10		12	2	
		79	11		22	5	
	9.77	96 (86 ± 8.9)	11 (11 ± 0.6)	NT_	8 (14 ± 7.2)	6 (4 ± 2.1)	
		97	4		12	6	
		90	4		16	4	
	19.5	110 (99 ± 10.1)	11 (6 ± 4.0)	NT	19 (16 ± 3.5)	· /	
		79	7 9		13	3 5	
	39.1	86 97 (87 ± 9.1)	10 (9 ± 1.5)	NT	16 14 (14 ± 1.5)	l	
	39.1	100	7 *	NI	10 *	4 (4 ± 1.0) 2 *	
S9Mix		102	6 *		11 *	3 *	
(-)	78.1	103 (102 ± 1.5)	7 * (7 ± 0.6)	NT	21 * (14 ± 6.1)	5 * (3 ± 1.5)	
		85		7		·····	
		98		16			
	156 #	104 (96 ± 9.7)	NT	18 (14 ± 5.9)	NT	NT	
		88 *		11			
	[90 *		27			
	313 #	96 * (91 ± 4.2)	NT	21 (20 ± 8.1)	NT	NT	
				10			
	005.4) TT	19	\		
	625 #	NT	TM	11 (13 ± 4.9)	NT _.	NT	
				13			
	1250 #	NT	NT	10 (12 ± 1.5)	NT	NT	
	1200 #	111		21	*1*	***	
			·	9			
	2500 #	TM	NТ	11 (l4 ± 6.4)	NT	NT	
				10 *			
				15 *			
	5000 #	NT	NT	17 * ([4 ± 3.6)	NT	NT	
78	名 称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191	
陽 S9Mix 性 を必要	用量(µg/プレート) コロニー数/プレート	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0	
対としな		540	245	70	473	1961	
照しいもの	コロニー数/フレート 	545	257	54	394	2196	
		545 (543 ± 2.9)	300 (267 ± 28.9)	56 (60 ± 8.7)	474 (447 ± 45.9)	2001 (2053 ± 125.7)	

(備考)

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

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]アクリシ・ン・2HCI

*:被験物質による生育阻害が認められたことを示す。

#:被験物質による沈殿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。

試 験 結 果 表 (本試験1回目:+S9Mix)

<u>被験物質の名称:4ーシクロヘキセンー1,2ージカルボン酸ビス(2ーエチルヘキシル)</u>

No. T-0467

試験実施期間		2010年6月15日 より 2010年6月18日					
代謝活性	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)					
化系の		塩基対置換型			フレームシフト型		
有無		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
	陰性対照 (アセトン)	113	15	12	27	6	
		105	8	12	31	4	
	(, 2, 5,	113 (110 ± 4.6)	5 (9 ± 5.1)	19 (14 ± 4.0)	16 (25 ± 7.8)	5 (5 ± 1.0	
		122	8		27	4	
		129	10		30	5	
	39.1	114 (122 ± 7.5)	9 (9 ± 1.0)	NT	33 (30 ± 3.0)	5 (5 ± 0.6	
		113	11		41	11	
		107	5		20	2	
	78.1	120 (113 ± 6.5)	4 (7 ± 3.8)	NT	25 (29 ± 11.0)	7 (7 ± 4.5	
		132	7	18	20	9	
	-	120	4	17	17	10	
	156	126 (126 ± 6.0)	13 (8 ± 4.6)	22 (19 ± 2.6)	38 (25 ± 11.4)	6 (8 ± 2.1	
001#		107	8	13	23	8	
S9Mix (+)		101	8	13	31	5	
	313	114 (107 ± 6.5)	5 (7 ± 1.7)	16 (14 ± 1.7)	23 (26 ± 4.6)	7 (7 ± 1.5	
		108	13	13	25	17	
		108	13	17	33	5	
	625	104 (107 ± 2.3)	10 (12 ± 1.7)	20 (17 ± 3.5)	24 (27 ± 4.9)	6 (9 ± 6.7	
		111 *	13 *	17	26 *	8 *	
		121 *	10 *	21	25 *	7 *	
	1250	99 * (110 ± 11.0)	8 * (10 ± 2.5)	22 (20 ± 2.6)	23 * (25 ± 1.5)	5 * (7 ± 1.5	
		_		21 *			
				22 *			
	2500 #	NT	NT	13 * (19 ± 4.9)	NT	NT	
				13 *			
				9 *			
	5000 #	NT	· NT	19 * (14 ± 5.0)	NI	NΓ	
	名 称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P	
陽 S9Mix 性 を必要 対 とする	用量(μg/プレート)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0	
注 を必要		840	226	759	255	73	
照しもの	コロニー数/プレート	788	259	838	314	94	
		774 (801 ± 34.8)	292 (259 ± 33.0)	718 (772 ± 61.0)	271 (280 ± 30.5)	81 (83 ± 10.6	

(備考)

2AA :2-アミノアントラセン B[a]P :ヘンソ「[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。

#:被験物質による沈殿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。

試 験 結 果 表 (本試験2回目:-S9Mix)

被験物質の名称:4-シクロヘキセン-1,2-ジカルボン酸ビス(2-エチルヘキシル)

No. T-0467

試験実施期間		<u>キャンー1, 2ーンカルホン酸ヒス(2ーエナルヘキシル)</u> No. T-0467 2010年6月21日 より 2010年6月24日					
代謝活性	被験物質	復帰変異数(コロニー数/プレート)					
化系の	の用量	塩基対置換型		フレームシフト型		シント型	
有無	(μg/プレ ー ト)	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
	陰性対照	97	9	19	19	16	
	(アセトン)	102	4	38	19	8	
		113 (104 ± 8.2)	11 (8 ± 3.6)	20 (26 ± 10.7)	19 (19 ± 0.0)	10 (11 ± 4.2	
			18		17	11	
			6		18	5	
	2.44	NT	13 (12 ± 6.0)	NT	27 (21 ± 5.5)	8 (8 ± 3.0	
			7		15	8	
	4.88	NT	4 4 (5 ± 1.7)	NT	18 27 (20 ± 6.2)	13 11 (11 ± 2.5	
	4.00	85	10	141	21 (20 ± 0.2)	12	
		95	8		14	15	
	9.77	107 (96 ± 11.0)	13 (10 ± 2.5)	NT	18 (18 ± 3.5)	6 (11 ± 4.6	
		111	15		18	11	
		112	8		21	11	
	19.5	105 (109 ± 3.8)	5 (9 ± 5.1)	NT	27 (22 ± 4.6)	11 (11 ± 0.0	
		86	14		21	15 *	
		104	11		28	10 *	
	39 .1	91 (94 ± 9.3)	9 (11 ± 2.5)	NT	11 (20 ± 8.5)	16 * (14 ± 3.2	
S9Mix		82	10 *		16 *	16 *	
(-)		116	18 *		21 *	15 *	
	78.1	106 (101 ± 17.5)	14 * (14 ± 4.0)	NT	17 * (18 ± 2.6)	14 * (15 ± 1.0	
		75		25			
	156 #	127	TN	24 36 (28 ± 6.7)	NT	NTT	
	100 #	94 (99 ± 26.3) 106 *	N1	36 (28 ± 6.7)	IN 1	NT	
		99 *		27			
l	313 #	96 * (100 ± 5.1)	NT	18 (27 ± 9.5)	NT	NT	
		,		24			
				22			
	625 #	NT	NT	25 (24 ± 1.5)	NT	NT	
				21			
				34			
	1250 #	NT	NT	30 (28 ± 6.7)	NT	NT	
	. [25			
				20			
	2500 #	NT	NT	29 (25 ± 4.5)	NT	NT	
				24 * 28 *			
	5000 #	NT	NT	28 * 18 * (23 ± 5.0)	NT	NT	
	名 称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191	
陽 S9Mix	ーロ 1/3・ 用量(μg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0	
性 を必要		533	338	61	427	2244	
対 としな 照 いもの	コロニー数/プレート	509	330	61	397	1946	
		439 (494 ± 48.8)	320 (329 ± 9.0)	57 (60 ± 2.3)	358 (394 ± 34.6)	1869 (2020 ± 198.1	

(備考)

AF-2

: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロー2-フリル)アクリルアミト*

SAZ :73

: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]アクリシ`ン・2HCl

*:被験物質による生育阻害が認められたことを示す。

#:被験物質による沈殿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。

試 験 結 果 表 (本試験2回目:+S9Mix)

被験物質の名称:4-シクロヘキセン-1,2-ジカルボン酸ビス(2-エチルヘキシル)

No. T-0467

試験実施期間			2010年6月21日 より 2010年6月24日					
代謝活性		被験物質	復帰変異数(コロニー数/プレート)					
化系 <i>0</i> 有無	:系の		塩基対置換型			フレームシフト型		
	有無		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
		BOAL	126	8	35	33	11	
		陰性対照 (アセトン)	125	8	24	39	11	
		() ()	115 (122 ± 6.1)	7 (8 ± 0.6)	27 (29 ± 5.7)	33 (35 ± 3.5)	14 (12 ± 1.7)	
			123	14		36	11	
			103	9		25	12	
		39.1	140 (122 ± 18.5)	8 (10 ± 3.2)	NT	39 (33 ± 7.4)	7 (10 ± 2.6)	
			134	12		32	13	
			92	11		27	12	
		78.1	103 (110 ± 21.8)	9 (11 ± 1.5)	NT	28 (29 ± 2.6)	21 (15 ± 4.9)	
			109	14	27	25	10	
			125	5	27	29	10	
		156	106 (113 ± 10.2)	8 (9 ± 4.6)	26 (27 ± 0.6)	53 (36 ± 15.1)	16 (12 ± 3.5)	
_			120	9	31	41	15	
	9Mix (十)		122	12	21	27	20	
'	,	313	110 (117 ± 6.4)	10 (10 ± 1.5)	31 (28 ± 5.8)	31 (33 ± 7.2)	19 (18 ± 2.6)	
			123	5	25	36	11 *	
			106	11	22	33	16 *	
		625	120 (116 ± 9.1)	11 (9 ± 3.5)	24 (24 ± 1.5)	43 (37 ± 5.1)	18 * (15 ± 3.6)	
			130 *	11 *	36	33 *	17 *	
			115 *	13 *	35	28 *	16 *	
		1250	131 * (125 ± 9.0)	13 * (12 ± 1.2)	24 (32 ± 6.7)	48 * (36 ± 10.4)	10 * (14 ± 3.8)	
					25			
					24			
		2500 #	NT	NT	27 (25 ± 1.5)	NT	NT	
					28 *			
					30 *			
L		5000 #	. NT	NT	27 * (28 ± 1.5)	NT	NT	
陽	S9Mix を必要	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	
対	とする	コロニー数/プレ~ト	781	335	921	290	102	
照	ŧσ		812	292	995	311	94	
			837 (810 ± 28.1)	310 (312 ± 21.6)	916 (944 ± 44.2)	337 (313 ± 23.5)	103 (100 ± 4.9)	

(備考)

2AA : 2-アミノアントラセン B[a]P : ^`ンゾ [a]ピレン

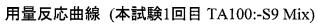
NT:試験せず。

^{*:}被験物質による生育阻害が認められたことを示す。

^{#:}被験物質による沈殿が認められたことを示す。

⁽⁾内は、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

図 1



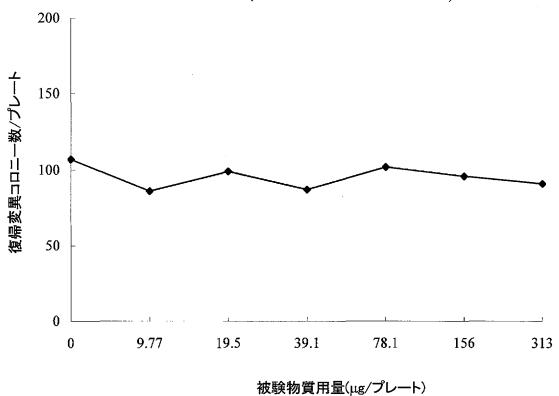


図 2

用量反応曲線 (本試験1回目 TA100:+S9 Mix)

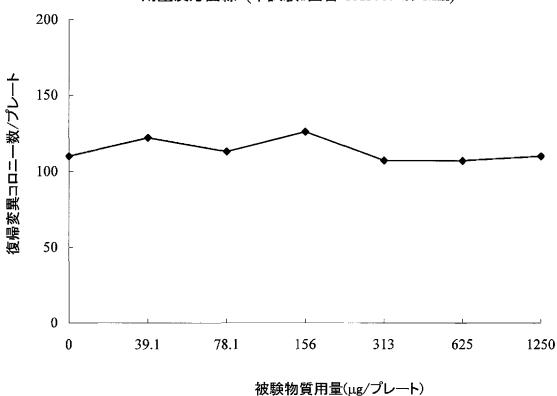
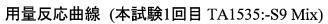


図 3



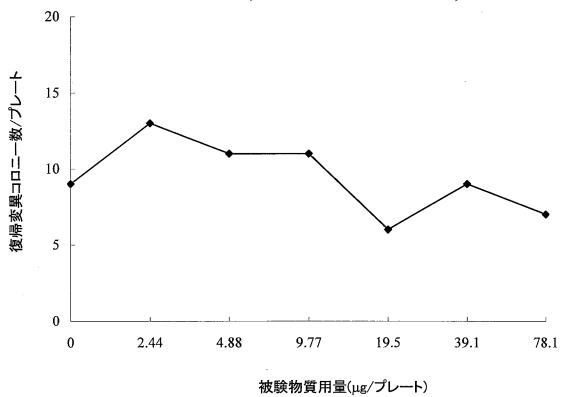


図 4

用量反応曲線 (本試験1回目 TA1535:+S9 Mix)

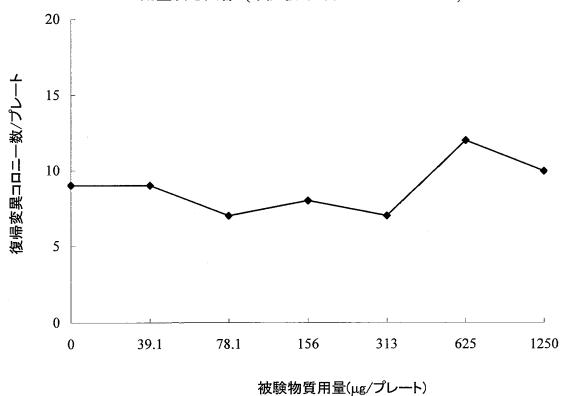


図 5



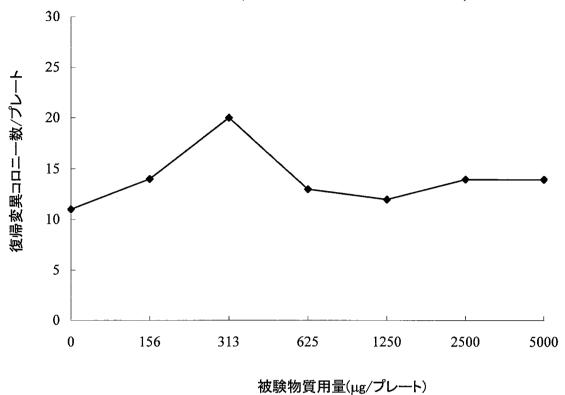


図 6

用量反応曲線 (本試験1回目 WP2 uvrA:+S9 Mix)

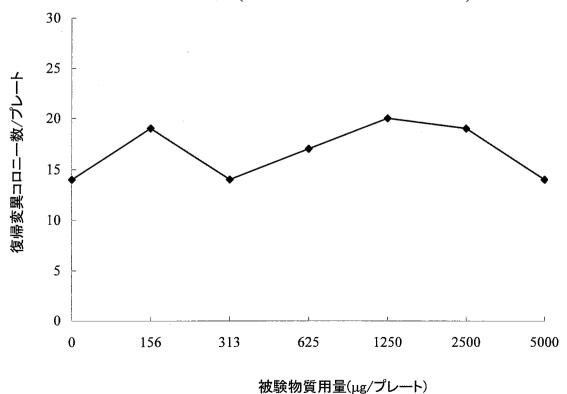
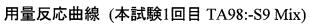


図 7



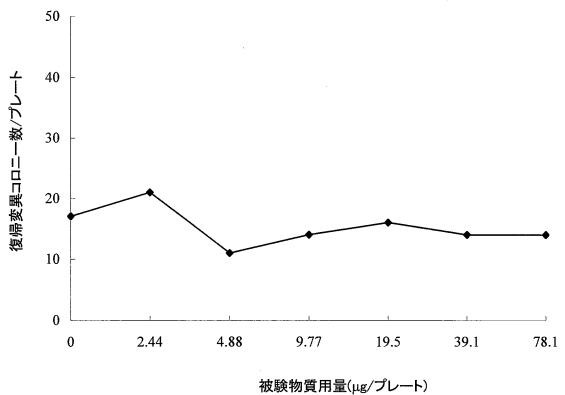


図 8

用量反応曲線 (本試験1回目 TA98:+S9 Mix)

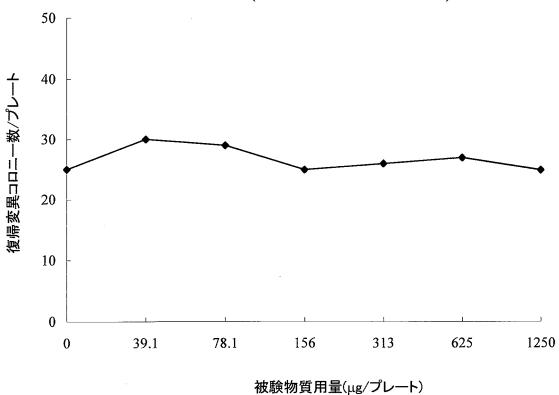
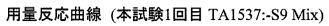


図 9



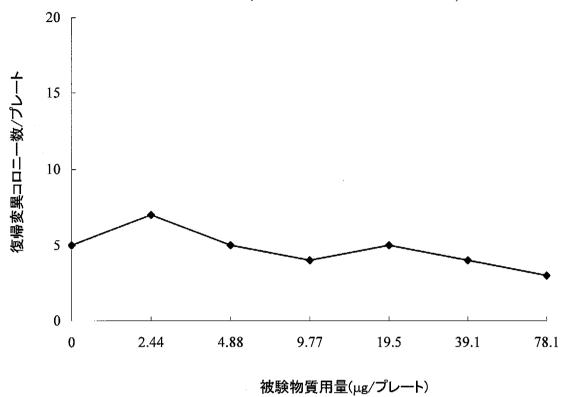


図 10

用量反応曲線 (本試験1回目 TA1537:+S9 Mix)

