

最終報告書

表 題：モノイソプロピルナフタレンの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：SR05350

株式会社 化合物安全性研究所

目 次

	頁
表紙	1
目次	4
要約	8
緒言	9
材料および方法	9
成績	18
考察	19

Tables

Table 1	Reverse mutation test of isopropylnaphthalene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537 and <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA without metabolic activation (dose-finding test)(SR05350).....	21
Table 2	Reverse mutation test of isopropylnaphthalene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537 and <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA with metabolic activation (dose-finding test) (SR05350).....	22
Table 3	Reverse mutation test of isopropylnaphthalene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537 and <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA without metabolic activation (I) (SR05350).....	23
Table 4	Reverse mutation test of isopropylnaphthalene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537 and <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA with metabolic activation (I) (SR05350).....	24
Table 5	Reverse mutation test of isopropylnaphthalene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537 and <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA without metabolic activation (II) (SR05350).....	25

Table 6	Reverse mutation test of isopropylnaphthalene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537 and <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA with metabolic activation (II) (SR05350).....	26
---------	--	----

Figures

Figure 1-1	Reverse mutation test of isopropylnaphthalene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100 without metabolic activation (dose-response curves) (SR05350).....	27
Figure 1-2	Reverse mutation test of isopropylnaphthalene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100 with metabolic activation (dose-response curves) (SR05350).....	28
Figure 2-1	Reverse mutation test of isopropylnaphthalene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA1535 without metabolic activation (dose-response curves) (SR05350).....	29
Figure 2-2	Reverse mutation test of isopropylnaphthalene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA1535 with metabolic activation (dose-response curves) (SR05350).....	30
Figure 3-1	Reverse mutation test of isopropylnaphthalene in <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA without metabolic activation (dose-response curves) (SR05350).....	31
Figure 3-2	Reverse mutation test of isopropylnaphthalene in <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA with metabolic activation (dose-response curves) (SR05350).....	32
Figure 4-1	Reverse mutation test of isopropylnaphthalene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 without metabolic activation (dose-response curves) (SR05350).....	33
Figure 4-2	Reverse mutation test of isopropylnaphthalene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 with metabolic activation (dose-response curves) (SR05350).....	34
Figure 5-1	Reverse mutation test of isopropylnaphthalene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA1537 without metabolic activation (dose-response curves) (SR05350).....	35
Figure 5-2	Reverse mutation test of isopropylnaphthalene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA1537 with metabolic activation (dose-response curves) (SR05350).....	36

要 約

モノイソプロピルナフタレンの細菌における遺伝子突然変異誘発性を検討する目的で、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2uvrA を用いる復帰突然変異試験を実施した。試験は代謝活性化系(S9 mix)の非存在下(直接法)ならびに存在下(代謝活性化法)において、プレインキュベーション法により実施した。

用量設定試験では、被験物質の最高用量を 5000 µg/plate とし、以下公比約 3 で低下させた計 7 用量(5~5000 µg/plate)を設定した。本試験を 2 回実施し、被験物質の最高用量は、用量設定試験の結果に基づき各菌株の各試験系列において生育阻害がみられる用量として 62.5、250、1000 あるいは 2000 µg/plate を選択し、以下公比 2 で低下させた計 6 あるいは 7 用量を設定した。

本試験の結果、直接法および代謝活性化法のいずれの系列においても、各菌株の被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の値の 2 倍未満であり、また用量の増加に伴う復帰変異コロニーの増加もみられず、当該被験物質の遺伝子突然変異誘発性は陰性であった。生育阻害が、各菌株の各試験系列において設定用量の高用量で観察された。被験物質の析出が、*Escherichia coli* WP2uvrA の代謝活性化法の 250 µg/plate 以上の用量で観察された。

用量設定試験および本試験のいずれにおいても、各菌株の陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は全て試験施設の背景データに基づく管理値の範囲内であった。また、各菌株の陽性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、それぞれにおける陰性対照群の値の 2 倍以上の明確な増加を示した。これらの結果から、各菌株が変異原物質に対し適切な感受性を有していたことが確認された。

以上のことから、モノイソプロピルナフタレンは、当該試験条件下において試験菌株に対する遺伝子突然変異誘発性を有しないと判断した。

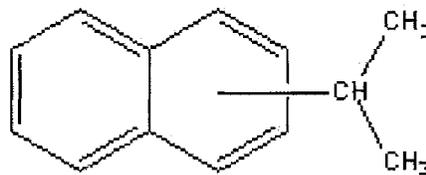
緒 言

モノイソプロピルナフタレンの細菌における遺伝子突然変異誘発性を、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2uvrA を用いる復帰突然変異試験により検討した。試験は、代謝活性化系(S9 mix)の非存在下(直接法)ならびに存在下(代謝活性化法)において、プレインキュベーション法により実施した。

材料および方法

1. 被験物質

名称	: モノイソプロピルナフタレン
英名	: Isopropylnaphthalene
CAS No.	: 29253-36-9
化学物質番号	: 化審法 ; 4-961
構造式	:



分子式	: C ₁₃ H ₁₄
分子量	: 170.25 (分子式より算出)
物理化学的性質	: 外観 ; 微黄色透明の液体 色数 (APHA) ; 20 比重 (15/4) ; 0.987 水分 ; 73 ppm 酸価 ; 0.000 KOHmg/g 沸点 ; 不明 溶解性 ; 水に不溶。ジメチルスルホキシドに 500 mg/mL まで溶解する(試験施設における確認)。

純度(GC%) : 96.3% (Appendix 1)

不純物の名称およびその濃度 : 不純物の名称は不明。ガスクロ分析チャートで被験物質以外に 16 個のピークが認められ、その面積比(GC%)は最大のもので 0.712%であり、全て 1%未満であった(Appendix 1)。

入手量 : 500 mL(関連試験と共通)

安定性 : 実験終了後に、使用した被験物質の純度に関する分析成績を入手し(Appendix 2)、被験物質の安定性について確認した。

保存条件 : 冷暗所(実測範囲 : 1~10°C)

取扱上の注意 : 使用に際しては、手袋、マスク等を着用し、吸入または眼、皮膚および衣類に触れないようにして取扱った。

残余被験物質の処置 : 試験操作終了後、提供者に返却した。

2. 被験物質の調製

被験物質は水に不溶で、ジメチルスルホキシドに溶解するため、その調製媒体として、ジメチルスルホキシド(ロット番号 SL045、株式会社同仁化学研究所)を使用した。

用量設定試験では、50 mg/mL 調製液からジメチルスルホキシドを用いて公比約 3 で段階希釈し、15、5、1.5、0.5、0.15 および 0.05 mg/mL 調製液を調製した。

本試験では、20 mg/mL 調製液からジメチルスルホキシドを用いて公比 2 で段階希釈し、10、5、2.5、1.25、0.625、0.313、0.156、0.0781、0.0391 および 0.0195 mg/mL 調製液を調製した。

調製液の安定性では、用量設定試験および本試験ともに、被験物質調製時の目視確認において媒体との反応性(変色、発熱、発泡等)はみられなかった。

被験物質調製液は、用量設定試験および本試験ともに調製後 2.5 時間以内に試験に使用した。

残余調製液は、焼却処分するために、産業廃棄物として回収した。

3. 陰性対照物質

陰性対照物質として、被験物質の調製媒体であるジメチルスルホキシド(ロット番号SL045、株式会社同仁化学研究所)を、モレキュラーシーブを用いて脱水処理を行い、原液のまま使用した。

4. 陽性対照物質およびその調製

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

陽性対照物質は、含量補正をせずにそれぞれ次表の濃度に調製し、分注後-20℃以下で凍結保存したものを解凍後2.1時間以内に使用した。調製液は、調製日より3ヵ月以内(使用期限：調製後1年)に使用した。

陽性対照物質	調製濃度	調製媒体
2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド(含量98.3%) ロット番号SDJ4376 和光純薬工業株式会社	0.1 および 1 µg/mL	ジメチルスルホキシド ロット番号TA026 株式会社同仁化学研究所
アジ化ナトリウム(純度99.8%) ロット番号SDH6348 和光純薬工業株式会社	5 µg/mL	日本薬局方注射用水 ロット番号5D73 株式会社大塚製薬工場
9-アミノアクリジン塩酸塩水和物(含量98.8%) ロット番号03024JR Sigma-Aldrich Corporation	800 µg/mL	ジメチルスルホキシド ロット番号TA026 株式会社同仁化学研究所
2-アミノアントラセン(含量97.4%) ロット番号TCG4316 和光純薬工業株式会社	5、10、20 および 100 µg/mL	ジメチルスルホキシド ロット番号TA026 株式会社同仁化学研究所

5. 試験菌株

試験には、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 ならびに *Escherichia coli* WP2uvrA を使用した。これらの菌株は、1991年10月18日に国立衛生試験所(現国立医薬品食品衛生研究所)より分与された。また、これらの菌株は遺伝毒性を有する化学物質の検索に適した細菌として広く受け入れられていることから選択した。

各菌株は、培養液 8 mL に対しジメチルスルホキシド(ロット番号 SL045、株式会社同仁化学研究所)0.7 mL を加え、試験チューブに分注後-80℃以下で凍結保存した。各菌株の培養液の一部を用いて、菌株の特性(アミノ酸要求性、膜変異 *rfa* 特性、紫外線感受性および薬剤耐性)ならびに陰性対照物質および陽性対照物質に対する感受性の検査を行い、これらの特性および感受性が正常に保持されていることが確認された菌株を試験に使用した。

6. 培地

(1) 前培養用培地

前培養用のニュートリエントブロス培地として、ニュートリエントブロス(OXOID NUTRIENT BROTH No. 2、ロット番号 298714、OXOID LTD.)を日本薬局方注射用水(ロット番号 6C97、株式会社大塚製薬工場)を用いて 25 g/L に調製した。*S. typhimurium* TA98 および TA100 の培地には、使用時にアンピシリンナトリウム(ロット番号 M3F9025、ナカライテスク株式会社)を 25 µg/mL となるように添加した。

(2) 試験用培地(最少グルコース寒天培地)

試験用培地として使用した最少グルコース寒天培地(バイタルメディア AMT-0 培地、ロット番号 DZL7A501(2006 年 10 月 5 日製造、用量設定試験)または、ロット番号 DZL7C501(2006 年 12 月 5 日製造、本試験)極東製薬工業株式会社)1000 mL 中の組成は次表の通りである。

試験用培地 1000 mL 中の組成	
硫酸マグネシウム・7 水塩	0.2 g
クエン酸・1 水塩	2.0 g
リン酸二カリウム・無水塩	10.0 g
リン酸一アンモニウム	1.92 g
水酸化ナトリウム	0.66 g
ブドウ糖	20.0 g
寒天末[OXOID AGAR No. 1、ロット番号 911885-02 (用量設定試験)または 946458-02(本試験)]	15.0 g

(3) 重層用培地

次頁の表の組成のソフトアガーおよびアミノ酸溶液を蒸留水を用いて調製し、使用時に(A) : (B) = 10:1 の容量比で混合した。*S. typhimurium* には L-ヒスチジンおよび D-ビオチンのアミノ酸溶液を、*E. coli* には L-トリプトファンのアミノ酸溶液を使用した。これらの重層用培地は、使用時まで 47℃に保温した。

重層用培地の組成

(A) ソフトアガー

Bacto™ Agar	0.6 %
-------------	-------

(ロット番号 5123150、Becton, Dickinson and Company)

塩化ナトリウム	0.5 %
---------	-------

(ロット番号 611F1714、関東化学株式会社)

(B) アミノ酸溶液

L-ヒスチジンおよびD-ビオチン溶液	各々 0.5 mmol/L
--------------------	---------------

(L-ヒスチジン、ロット番号 ASP6644、和光純薬工業株式会社)

(D-ビオチン、ロット番号 LTM1077、和光純薬工業株式会社)

または

L-トリプトファン溶液	0.5 mmol/L
-------------	------------

(L-トリプトファン、ロット番号 ASG2385、和光純薬工業株式会社)

7. S9 mix

S9 mix は、S9(ロット番号 RAA-550、2006年9月29日製造、キッコーマン株式会社)、S9 mix 用 Cofactor [Cofactor-1、ロット番号 999601(用量設定試験)または 999604(本試験)、オリエンタル酵母工業株式会社]および日本薬局方注射用水(ロット番号 5L88、株式会社大塚製薬工場)を用いて用時調製した。

S9 は、購入後-80℃以下で保存し、製造日より5ヵ月以内(使用期限：製造後6ヵ月)に使用した。この S9 は、フェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンの腹腔内投与で酵素誘導した Slc:SD 系ラット(雄、7週齢)の肝ホモジネートより調製された。

S9 mix 1 mL 中の組成は次表の通りである。

S9 mix 1 mL 中の組成	
S9	0.1 mL
塩化マグネシウム	8 μmol
塩化カリウム	33 μmol
グルコース-6-リン酸	5 μmol
還元型ニコチンアミドアデニンヌクレオチドリン酸(NADPH)	4 μmol
還元型ニコチンアミドアデニンヌクレオチド(NADH)	4 μmol
リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.4	100 μmol

8. 試験群

(1) 用量設定試験

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

直接法および代謝活性化法ともに被験物質の最高用量を 5000 µg/plate とし、以下公比約 3 で用量を低下させた計 7 試験群(5000、1500、500、150、50、15 および 5 µg/plate)を設定した。

(2) 本試験

各菌株につき、直接法および代謝活性化法で試験を実施した。

直接法では、用量設定試験の結果、50 あるいは 500 µg/plate 以上の用量で生育阻害が観察されたことから、本試験では、被験物質の最高用量を 62.5 あるいは 1000 µg/plate とし、以下公比 2 で低下させた計 6 用量 (1.95~62.5 µg/plate) あるいは 7 用量(15.6~1000 µg/plate)を設定した。

代謝活性化法では、用量設定試験の結果、50、150 あるいは 1500 µg/plate 以上の用量で生育阻害が観察されたことから、本試験では、被験物質の最高用量を 62.5 あるいは 250 あるいは 2000 µg/plate とし、以下公比 2 で低下させた計 6 用量 (1.95~62.5 あるいは 62.5~2000 µg/plate) あるいは 7 用量(3.91~250 µg/plate)を設定した。

(3) 陰性対照群および陽性対照群

用量設定試験および本試験いずれにおいても、試験系列毎に陰性対照群(ジメチルスルホキシド)および次表の陽性対照群を設定した。

供試菌株	陽性対照物質 (用量: µg/plate)	
	直接法	代謝活性化法
<i>S. typhimurium</i> TA100	AF-2 (0.01)	2-AA (1)
<i>S. typhimurium</i> TA1535	NaN ₃ (0.5)	2-AA (2)
<i>E. coli</i> WP2uvrA	AF-2 (0.01)	2-AA (10)
<i>S. typhimurium</i> TA98	AF-2 (0.1)	2-AA (0.5)
<i>S. typhimurium</i> TA1537	9-AA (80)	2-AA (2)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
NaN₃ : アジ化ナトリウム、 9-AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩水和物
2-AA : 2-アミノアントラセン

(4) プレート数およびプレートの識別

プレート数は、各試験群ともに 3 枚とした。

プレートには、識別のための試験番号および試験群を記載したラベルを貼付した。

9. 試験方法

(1) 試験菌株の前培養

容量約 40 mL の L 字管に前培養用培地(ニュートリエントブロス培地)12 mL を入れ、これに解凍した保存菌を 12 μ L 接種し、L 字管を氷冷後、37°C、振幅 40 mm、振盪速度 100 回/分に設定した振盪恒温槽(Personal-11・EX、タイテック株式会社)で 10 時間の往復振盪培養を行った。培養終了時に、得られた菌培養液の OD_{660nm} を比色計(mini photo 518、タイテック株式会社)で測定し、各菌株の生菌数-OD_{660nm} 相関式より生菌数を算出した。生菌数が 1×10^9 cells/mL より多く、十分に菌が生育していることが確認された菌培養液を試験に使用した。

各培養液の生菌数(計算値)は次表の通りであった。

供試菌株	生菌数(計算値)($\times 10^9$ cells/mL)		
	用量設定試験	本試験(1回目)	本試験(2回目)
<i>S. typhimurium</i> TA100	3.07	3.07	3.07
<i>S. typhimurium</i> TA1535	3.72	3.72	3.72
<i>E. coli</i> WP2uvrA	4.50	4.50	4.50
<i>S. typhimurium</i> TA98	2.96	3.09	3.21
<i>S. typhimurium</i> TA1537	2.00	2.07	2.00

(2) 被験物質調製液および対照物質調製液の処理

被験物質調製液および対照物質調製液の処理を、プレインキュベーション法で行った。

蓋付きのポリエチレン製チューブ(5 mL 容量)を使用して、被験物質調製液あるいは対照物質調製液 0.1 mL を、直接法の場合は 0.1 mol/L Na-リン酸緩衝液(pH 7.4) 0.5 mL と、代謝活性化法の場合は S9 mix 0.5 mL と、それぞれ混合した。その混合液に菌培養液 0.1 mL を加え、37°C、振幅 40 mm、振盪速度 100 回/分に設定した振盪恒温槽(Personal-11・EX、タイテック株式会社)で 20 分間振盪培養(プレインキュベーション)した。プレインキュベーション終了後、*S. typhimurium* には 0.05 mmol/L L-ヒスチジンおよび 0.05 mmol/L D-ビオチンを含む重層用培地 2 mL を、*E. coli* には 0.05 mmol/L レトリプトファンを含む重層用培地 2 mL を、それぞれ加えて混和し、最少グルコース寒天培地に重層した。平坦な場所で重層用培地を固化させた後、プレートを 37°C に設定したインキュベータ(MIR-262: 三洋電機バイオメディカ株式会社)で 48~49 時間静置培養した。

用量設定試験および本試験それぞれにおいて、試験に使用した被験物質調製液の最高濃度および S9 mix 調製液について雑菌の混入の有無を確認した。

(3) プレーートの観察

各菌株の陰性対照群、被験物質処理群および陽性対照群について、プレートでの生育阻害の有無を実体顕微鏡(SZ6045TR、オリンパス光学工業株式会社)で確認するとともに、被験物質処理群について、プレートでの被験物質の析出の有無を目視確認した。次に、各菌株の陰性対照群、被験物質処理群および陽性対照群の各プレートについて、コロニーアナライザー(CA-11D、システムサイエンス株式会社)を用いて復帰変異コロニー数の計測を行った。なお、被験物質の析出がコロニーアナライザー計数に影響すると考えられるプレートについては、実体顕微鏡を用いて復帰変異コロニー数の目視計数を行った。

菌株の生育阻害の有無の判定は標準操作手順書に基づき以下の基準(0~4)で行い、基準1以上を生育阻害有りとした。

0：生育阻害が認められない。

微細なバックグラウンドコロニー(50倍程度の倍率で観察可能)が培地一面に観察され、対照群のバックグラウンドコロニーとの差が認められない。

1：わずかな生育阻害が認められる。

対照群に比べ、バックグラウンドコロニーが減少して個々のコロニーの大きさが大きくなっている。

2：中程度の生育阻害が認められる。

隆起した大きな復帰変異コロニーと、平坦で小さなバックグラウンドコロニーが並存している。

3：強い生育阻害が認められる。

バックグラウンドコロニーが復帰変異コロニーと同程度の大きさまで成長し、両者の判別が困難である。

4：生存菌が全く認められない。

(4) 観察結果の集計方法

各試験群の復帰変異コロニー数の平均値±標準偏差を求めた。

10. 試験結果の評価

(1) 試験系の感度確認

各菌株の陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値が、それぞれ試験施設の背景データに基づく管理値の範囲内であり、かつ、各菌株の陽性対照群の復帰変異コロニー数の平均値が陰性対照群の値の2倍以上である場合に、試験系が適切な感度を有しているものと判断した。

(2) 試験結果の判定基準

被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値が陰性対照群の値の 2 倍以上となり、かつ用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加が、用量設定試験と本試験で再現性を持って認められた場合に、被験物質の遺伝子突然変異誘発性は陽性であるとした。試験結果の判定にあたって、統計学的手法は用いなかった。

成 績

用量設定試験の復帰変異コロニー数の計測結果を Table 1 および 2 に、本試験の復帰変異コロニー数の計測結果を Table 3～6 に示す。また、本試験における被験物質用量と復帰変異コロニー数の用量-反応曲線を Figure 1-1～5-2 に示す。

用量設定試験(5～5000 µg/plate)の結果、いずれの菌株においても、被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の 2 倍未満であり、用量の増加に伴う復帰変異コロニーの増加もみられなかった。生育阻害が、直接法の 50 あるいは 500 µg/plate 以上の用量および代謝活性化法の 50、150 あるいは 1500 µg/plate 以上の用量で観察された。被験物質の析出が、直接法の 5000 µg/plate の用量および代謝活性化法の 500 µg/plate 以上の用量で観察された。

本試験[1.95～62.5 µg/plate : *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA98 および TA1537 の直接法ならびに *S. typhimurium* TA1537 の代謝活性化法、3.91～250 µg/plate : *S. typhimurium* TA100、TA1535 および TA98 の代謝活性化法、15.6～1000 µg/plate : *E. coli* WP2uvrA の直接法、62.5～2000 µg/plate : *E. coli* WP2uvrA の代謝活性化法)を 2 回実施した結果、いずれの菌株においても、被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の 2 倍未満であり、用量の増加に伴う復帰変異コロニーの増加もみられなかった。生育阻害が、直接法の 31.3 あるいは 250 µg/plate 以上の用量あるいは 62.5µg/plate の用量および代謝活性化法の 31.3、62.5 あるいは 1000 µg/plate 以上の用量で観察された。被験物質の析出が、代謝活性化法の *E. coli* WP2uvrA の 250 µg/plate 以上の用量で観察された。

用量設定試験および本試験いずれにおいても、各菌株の陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、全て試験施設の背景データに基づく管理値(Appendix 3)の範囲内であり、また、陽性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、全て陰性対照群の値の 2 倍以上であった。

用量設定試験および本試験いずれの無菌試験においても、被験物質調製液の最高濃度および S9 mix に雑菌の混入はみられなかった。

考 察

モノイソプロピルナフタレンの細菌における遺伝子突然変異誘発性を、*S. typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *E. coli* WP2uvrA を用いる復帰突然変異試験により検討した。

用量設定試験は、被験物質の最高用量を 5000 µg/plate とし、以下公比約 3 で用量を低下させた計 7 用量の試験群で実施した。その結果、各菌株の各試験系列で生育阻害ならびに被験物質の析出が観察された。

本試験は、用量設定試験の結果に基づき、被験物質の最高用量を 62.5、250、1000 あるいは 2000 µg/plate とし、以下公比 2 で用量を低下させた計 6 あるいは 7 用量の試験群を設定し、2 回実施した。その結果、各菌株の直接法および代謝活性化法のいずれの試験系列においても、被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の値の 2 倍未満であり、用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加も認められず、結果は陰性であった。生育阻害が、各菌株の設定用量の高用量で観察され、また、被験物質の析出が、代謝活性化法における *E. coli* WP2uvrA の高用量で観察された。これらの結果には、再現性が確認された。

用量設定試験および本試験のいずれにおいても、各菌株の陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、全て試験施設の背景データに基づく管理値の範囲内であった。各菌株の陽性対照群の復帰変異コロニー数の平均値には、それぞれの陰性対照群の値と比較して 2 倍以上の明確な増加が認められた。これらの結果から、各菌株が変異原物質に対し適切な感受性を有していたことが確認された。

以上のことから、モノイソプロピルナフタレンは、当該試験条件下において試験菌株に対する遺伝子突然変異誘発性を有しないと判断した。

Table 1 Reverse mutation test of isopropyl-naphthalene in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2*uvr* A without metabolic activation (dose-finding test) (SR05350)

Compound	Concentration (µg/plate)	Revertants per plate (Mean±S.D.)				
		S9(-)				
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvr</i> A	TA98	TA1537
Control ^a		105 , 79	9 , 9	18 , 14	12 , 10	18 , 11
		105 (96±15)	6 (8±2)	18 (17±2)	23 (15±7)	9 (13±5)
Isopropyl-naphthalene	5	116 , 96 113 (108±11)	7 , 8 12 (9±3)	19 , 18 15 (17±2)	16 , 12 23 (17±6)	9 , 11 9 (10±1)
	15	116 , 91 83 (97±17)	6 , 11 7 (8±3)	12 , 16 19 (16±4)	23 , 15 23 (20±5)	8 , 7 7 (7±1)
	50	61 [*] , 77 [*] 43 [*] (60±17)	2 [*] , 3 [*] 6 [*] (4±2)	8 , 16 9 (11±4)	9 [*] , 10 [*] 6 [*] (8±2)	4 [*] , 4 [*] 3 [*] (4±1)
	150	60 [*] , 58 [*] 37 [*] (52±13)	3 [*] , 7 [*] 7 [*] (6±2)	12 , 12 8 (11±2)	13 [*] , 18 [*] 7 [*] (13±6)	5 [*] , 4 [*] 5 [*] (5±1)
	500	42 [*] , 44 [*] 35 [*] (40±5)	4 [*] , 3 [*] 2 [*] (3±1)	9 [*] , 10 [*] 10 [*] (10±1)	16 [*] , 8 [*] 11 [*] (12±4)	2 [*] , 2 [*] 5 [*] (3±2)
	1500	43 [*] , 41 [*] 44 [*] (43±2)	0 [*] , 0 [*] 0 [*] (0±0)	10 [*] , 7 [*] 18 [*] (12±6)	12 [*] , 13 [*] 10 [*] (12±2)	0 [*] , 1 [*] 0 [*] (0±1)
	5000	49 ^{**} , 37 ^{**} 52 ^{**} (46±8)	0 ^{**} , 0 ^{**} 0 ^{**} (0±0)	11 ^{**} , 10 ^{**} 8 ^{**} (10±2)	12 ^{**} , 6 ^{**} 6 ^{**} (8±3)	2 ^{**} , 2 ^{**} 3 ^{**} (2±1)
Positive control		AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA
	Concentration (µg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Rev./plate (Mean±S.D.)	723 , 733 717 (724±8)	360 , 388 370 (373±14)	97 , 86 98 (94±7)	257 , 343 290 (297±43)	183 , 233 161 (192±37)

a : Dimethyl sulfoxide
 AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide
 NaN₃ : Sodium azide
 9-AA : 9-Aminoacridine hydrochloride hydrate
 Rev. : Revertants
 # : Precipitation at the end of treatment
 * : Growth inhibition

Table 2 Reverse mutation test of isopropyl naphthalene in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2uvr A with metabolic activation (dose-finding test) (SR05350)

Compound	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertants per plate (Mean \pm S.D.)				
		S9(+)				
		TA100	TA1535	WP2uvr A	TA98	TA1537
Control ^a		127 , 103 123 (118 \pm 13)	13 , 14 13 (13 \pm 1)	20 , 23 18 (20 \pm 3)	29 , 39 36 (35 \pm 5)	18 , 7 12 (12 \pm 6)
Isopropyl naphthalene	5	132 , 139 116 (129 \pm 12)	7 , 6 7 (7 \pm 1)	20 , 18 14 (17 \pm 3)	44 , 36 26 (35 \pm 9)	13 , 7 12 (11 \pm 3)
	15	142 , 113 135 (130 \pm 15)	11 , 8 11 (10 \pm 2)	21 , 19 21 (20 \pm 1)	39 , 31 40 (37 \pm 5)	9 , 11 12 (11 \pm 2)
	50	115 , 119 108 (114 \pm 6)	9 , 11 7 (9 \pm 2)	18 , 16 23 (19 \pm 4)	41 , 39 35 (38 \pm 3)	8 [*] , 13 [*] 7 [*] (9 \pm 3)
	150	79 [*] , 92 [*] 70 [*] (80 \pm 11)	12 [*] , 15 [*] 4 [*] (10 \pm 6)	22 , 17 15 (18 \pm 4)	25 [*] , 32 [*] 37 [*] (31 \pm 6)	12 [*] , 12 [*] 12 [*] (12 \pm 0)
	500	70 ^{#*} , 79 ^{#*} 75 ^{#*} (75 \pm 5)	12 ^{#*} , 6 ^{#*} 12 ^{#*} (10 \pm 3)	14 [#] , 11 [#] 21 [#] (15 \pm 5)	36 ^{#*} , 29 ^{#*} 30 ^{#*} (32 \pm 4)	12 ^{#*} , 9 ^{#*} 6 ^{#*} (9 \pm 3)
	1500	91 ^{#*} , 66 ^{#*} 65 ^{#*} (74 \pm 15)	6 ^{#*} , 5 ^{#*} 2 ^{#*} (4 \pm 2)	16 ^{#*} , 20 ^{#*} 9 ^{#*} (15 \pm 6)	28 ^{#*} , 22 ^{#*} 32 ^{#*} (27 \pm 5)	5 ^{#*} , 1 ^{#*} 9 ^{#*} (5 \pm 4)
	5000	0 ^{#*} , 0 ^{#*} 0 ^{#*} (0 \pm 0)	0 ^{#*} , 0 ^{#*} 0 ^{#*} (0 \pm 0)	8 ^{#*} , 20 ^{#*} 20 ^{#*} (16 \pm 7)	16 ^{#*} , 16 ^{#*} 17 ^{#*} (16 \pm 1)	0 ^{#*} , 0 ^{#*} 0 ^{#*} (0 \pm 0)
Positive control		2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2
	Rev./plate (Mean \pm S.D.)	1096 , 1250 1214 (1187 \pm 81)	306 , 324 365 (332 \pm 30)	1035 , 1014 986 (1012 \pm 25)	229 , 263 312 (268 \pm 42)	165 , 152 170 (162 \pm 9)

a : Dimethyl sulfoxide

2-AA : 2-Aminoanthracene

Rev. : Revertants

: Precipitation at the end of treatment

* : Growth inhibition

Table 3 Reverse mutation test of isopropyl naphthalene in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2uvr A without metabolic activation (I) (SR05350)

Compound	Concentration (µg/plate)	Revertants per plate (Mean±S.D.)				
		S9(-)				
		TA100	TA1535	WP2uvr A	TA98	TA1537
Control ^a		135 , 140 131 (135±5)	11 , 13 15 (13±2)	19 , 13 18 (17±3)	22 , 20 14 (19±4)	12 , 14 11 (12±2)
Isopropyl naphthalene	1.95	152 , 146 128 (142±12)	14 , 10 11 (12±2)	-	29 , 19 24 (24±5)	12 , 11 9 (11±2)
	3.91	141 , 133 137 (137±4)	8 , 10 11 (10±2)	-	20 , 30 15 (22±8)	7 , 7 7 (7±0)
	7.81	113 , 150 137 (133±19)	11 , 5 8 (8±3)	-	28 , 24 16 (23±6)	15 , 10 10 (12±3)
	15.6	138 , 117 101 (119±19)	15 , 6 4 (8±6)	18 , 11 17 (15±4)	10 , 11 20 (14±6)	7 , 6 9 (7±2)
	31.3	89 [*] , 85 [*] 83 [*] (86±3)	8 [*] , 5 [*] 11 [*] (8±3)	24 , 11 17 (17±7)	24 , 21 18 (21±3)	2 [*] , 3 [*] 2 [*] (2±1)
	62.5	69 [*] , 68 [*] 59 [*] (65±6)	8 [*] , 7 [*] 6 [*] (7±1)	12 , 19 9 (13±5)	9 [*] , 11 [*] 13 [*] (11±2)	4 [*] , 5 [*] 3 [*] (4±1)
	125	-	-	6 , 20 13 (13±7)	-	-
	250	-	-	8 [*] , 8 [*] 7 [*] (8±1)	-	-
	500	-	-	6 [*] , 12 [*] 12 [*] (10±3)	-	-
	1000	-	-	12 [*] , 16 [*] 15 [*] (14±2)	-	-
		AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA
Positive control	Concentration (µg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Rev./plate	770 , 733 760	357 , 294 340	99 , 86 100	316 , 269 338	432 , 263 333
	(Mean±S.D.)	(754±19)	(330±33)	(95±8)	(308±35)	(343±85)

a : Dimethyl sulfoxide
 AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide
 NaN₃ : Sodium azide
 9-AA : 9-Aminoacridine hydrochloride hydrate
 Rev. : Revertants
 * : Growth inhibition
 - : Blank

Table 4 Reverse mutation test of isopropyl naphthalene in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2uvr A with metabolic activation (I) (SR05350)

Compound	Concentration (µg/plate)	Revertants per plate (Mean±S.D.)				
		S9(+)				
		TA100	TA1535	WP2uvr A	TA98	TA1537
Control ^a		152 , 136 139 (142±9)	13 , 9 12 (11±2)	20 , 18 19 (19±1)	32 , 40 36 (36±4)	21 , 14 22 (19±4)
Isopropyl naphthalene	1.95	-	-	-	-	7 , 15 17 (13±5)
	3.91	135 , 149 152 (145±9)	6 , 12 7 (8±3)	-	40 , 37 34 (37±3)	18 , 17 19 (18±1)
	7.81	158 , 134 149 (147±12)	17 , 12 8 (12±5)	-	41 , 31 33 (35±5)	17 , 26 23 (22±5)
	15.6	143 , 139 125 (136±9)	8 , 10 5 (8±3)	-	25 , 34 38 (32±7)	21 , 21 14 (19±4)
	31.3	147 , 143 137 (142±5)	9 , 10 12 (10±2)	-	42 , 41 39 (41±2)	25 [*] , 16 [*] 13 [*] (18±6)
	62.5	93 [*] , 116 [*] 108 [*] (106±12)	7 [*] , 14 [*] 3 [*] (8±6)	15 , 23 14 (17±5)	37 [*] , 31 [*] 33 [*] (34±3)	10 [*] , 19 [*] 14 [*] (14±5)
	125	71 [*] , 69 [*] 72 [*] (71±2)	12 [*] , 4 [*] 11 [*] (9±4)	23 , 11 19 (18±6)	35 [*] , 35 [*] 32 [*] (34±2)	-
	250	58 [*] , 69 [*] 53 [*] (60±8)	3 [*] , 8 [*] 7 [*] (6±3)	18 [#] , 16 [#] 12 [#] (15±3)	22 [*] , 22 [*] 19 [*] (21±2)	-
	500	-	-	20 [#] , 21 [#] 19 [#] (20±1)	-	-
	1000	-	-	16 ^{#*} , 12 ^{#*} 13 ^{#*} (14±2)	-	-
	2000	-	-	16 ^{#*} , 11 ^{#*} 21 ^{#*} (16±5)	-	-
Positive control	Concentration (µg/plate)	2-AA 1	2-AA 2	2-AA 10	2-AA 0.5	2-AA 2
	Rev./plate	1184 , 1198 1187	224 , 267 242	1048 , 952 1028	274 , 274 280	168 , 176 175
	(Mean±S.D.)	(1190±7)	(244±22)	(1009±51)	(276±3)	(173±4)

a : Dimethyl sulfoxide

2-AA : 2-Aminoanthracene

Rev. : Revertants

: Precipitation at the end of treatment

* : Growth inhibition

- : Blank

Table 5 Reverse mutation test of isopropyl naphthalene in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2uvr A without metabolic activation (II) (SR05350)

Compound	Concentration (µg/plate)	Revertants per plate (Mean±S.D.)				
		S9(-)				
		TA100	TA1535	WP2uvr A	TA98	TA1537
Control ^a		132 , 128 124 (128±4)	7 , 11 10 (9±2)	18 , 11 11 (13±4)	20 , 10 26 (19±8)	16 , 17 17 (17±1)
Isopropyl naphthalene	1.95	149 , 124 109 (127±20)	6 , 12 9 (9±3)	-	14 , 16 16 (15±1)	22 , 22 16 (20±3)
	3.91	114 , 114 115 (114±1)	8 , 5 10 (8±3)	-	23 , 18 19 (20±3)	12 , 13 17 (14±3)
	7.81	128 , 124 128 (127±2)	10 , 7 11 (9±2)	-	19 , 13 21 (18±4)	24 , 21 28 (24±4)
	15.6	120 , 129 129 (126±5)	6 , 7 8 (7±1)	15 , 20 17 (17±3)	20 , 16 16 (17±2)	13 , 12 22 (16±6)
	31.3	103 , 81 72 (85±16)	7 [*] , 8 [*] 7 [*] (7±1)	18 , 14 9 (14±5)	19 , 12 16 (16±4)	7 [*] , 3 [*] 6 [*] (5±2)
	62.5	71 [*] , 57 [*] 70 [*] (66±8)	11 [*] , 9 [*] 9 [*] (10±1)	13 , 8 20 (14±6)	16 [*] , 9 [*] 13 [*] (13±4)	7 [*] , 3 [*] 4 [*] (5±2)
	125	-	-	8 , 8 14 (10±3)	-	-
	250	-	-	20 [*] , 15 [*] 23 [*] (19±4)	-	-
	500	-	-	11 [*] , 11 [*] 11 [*] (11±0)	-	-
1000	-	-	16 [*] , 11 [*] 18 [*] (15±4)	-	-	
		AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA
Positive control	Concentration (µg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Rev./plate	759 , 765 757	320 , 340 328	93 , 104 103	382 , 343 334	275 , 371 259
	(Mean±S.D.)	(760±4)	(329±10)	(100±6)	(353±26)	(302±61)

a : Dimethyl sulfoxide
 AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide
 NaN₃ : Sodium azide
 9-AA : 9-Aminoacridine hydrochloride hydrate
 Rev. : Revertants
 * : Growth inhibition
 - : Blank

Table 6 Reverse mutation test of isopropyl-naphthalene in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2uvr A with metabolic activation (II) (SR05350)

Compound	Concentration (µg/plate)	Revertants per plate (Mean±S.D.)				
		S9(+)				
		TA100	TA1535	WP2uvr A	TA98	TA1537
Control ^a		126 , 140 153 (140±14)	11 , 13 8 (11±3)	11 , 20 19 (17±5)	38 , 49 31 (39±9)	27 , 16 21 (21±6)
Isopropyl-naphthalene	1.95	-	-	-	-	28 , 30 22 (27±4)
	3.91	157 , 182 163 (167±13)	12 , 11 11 (11±1)	-	45 , 44 43 (44±1)	15 , 22 31 (23±8)
	7.81	172 , 150 161 (161±11)	12 , 7 10 (10±3)	-	39 , 39 40 (39±1)	21 , 29 20 (23±5)
	15.6	141 , 156 170 (156±15)	4 , 9 11 (8±4)	-	38 , 35 42 (38±4)	32 , 25 38 (32±7)
	31.3	147 , 129 147 (141±10)	8 , 7 5 (7±2)	-	34 , 40 47 (40±7)	26 [*] , 28 [*] 27 [*] (27±1)
	62.5	151 [*] , 133 [*] 153 [*] (146±11)	8 [*] , 18 [*] 9 [*] (12±6)	15 , 26 18 (20±6)	38 [*] , 39 [*] 42 [*] (40±2)	23 [*] , 24 [*] 16 [*] (21±4)
	125	107 [*] , 117 [*] 110 [*] (111±5)	5 [*] , 11 [*] 7 [*] (8±3)	22 , 19 17 (19±3)	31 [*] , 35 [*] 38 [*] (35±4)	-
	250	97 [*] , 96 [*] 90 [*] (94±4)	6 [*] , 6 [*] 10 [*] (7±2)	16 [#] , 22 [#] 14 [#] (17±4)	35 [*] , 31 [*] 27 [*] (31±4)	-
	500	-	-	21 [#] , 17 [#] 12 [#] (17±5)	-	-
	1000	-	-	11 ^{#*} , 16 ^{#*} 21 ^{#*} (16±5)	-	-
2000	-	-	13 ^{#*} , 27 ^{#*} 16 ^{#*} (19±7)	-	-	
Positive control		2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration (µg/plate)	1	2	10	0.5	2
	Rev./plate (Mean±S.D.)	1437 , 1403 1404 (1415±19)	295 , 273 294 (287±12)	894 , 933 996 (941±51)	307 , 274 319 (300±23)	174 , 193 204 (190±15)

a : Dimethyl sulfoxide

2-AA : 2-Aminoanthracene

Rev. : Revertants

: Precipitation at the end of treatment

* : Growth inhibition

- : Blank

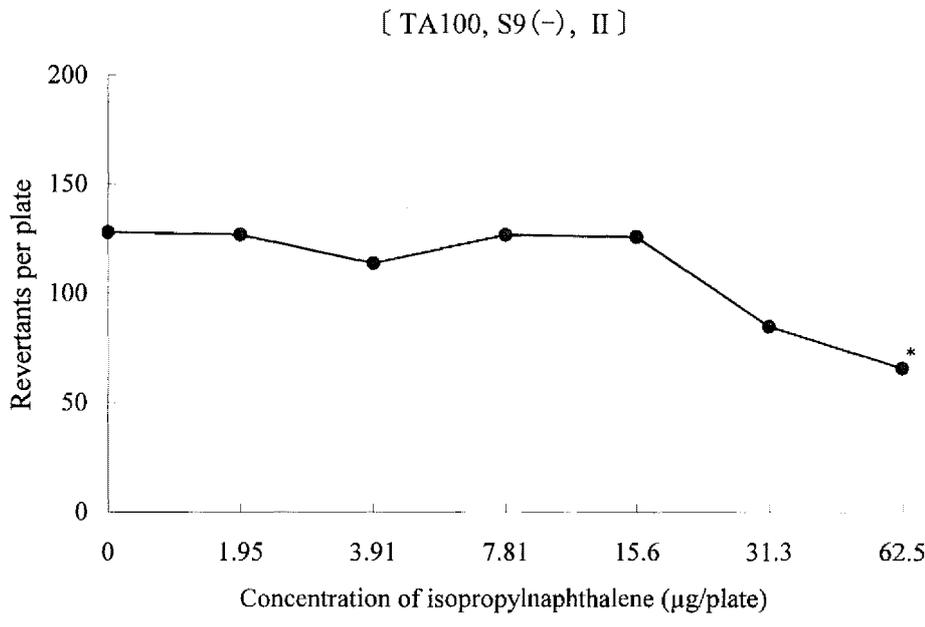
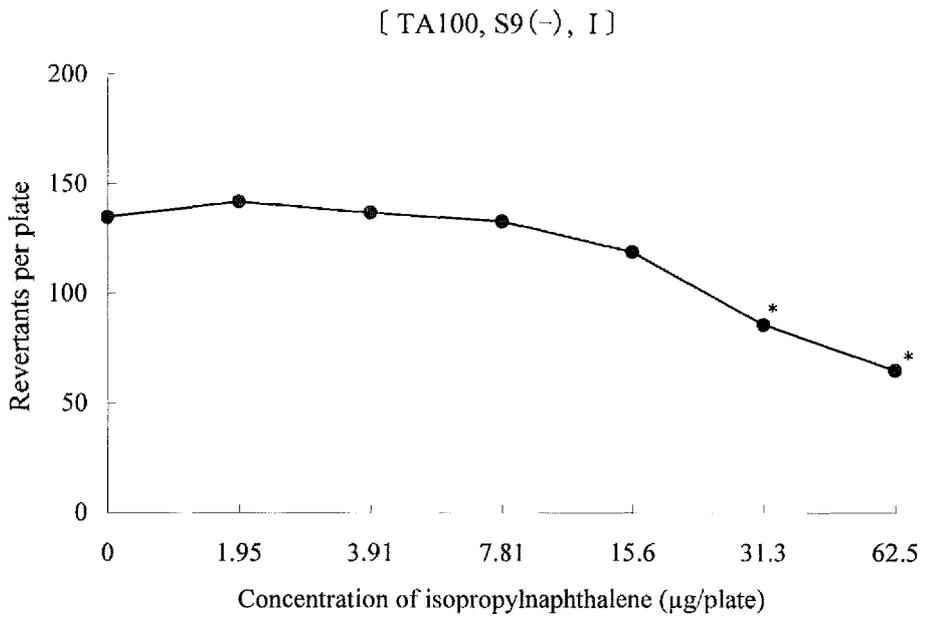


Figure 1-1 Reverse mutation test of isopropyl naphthalene in *Salmonella typhimurium* TA100 without metabolic activation (dose-response curves) (SR05350)

* : Growth inhibition

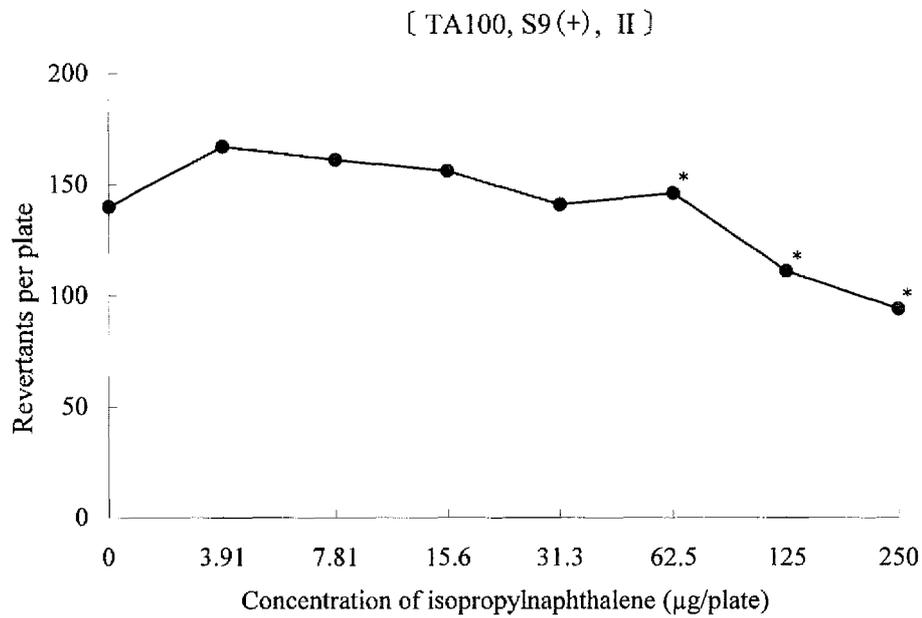
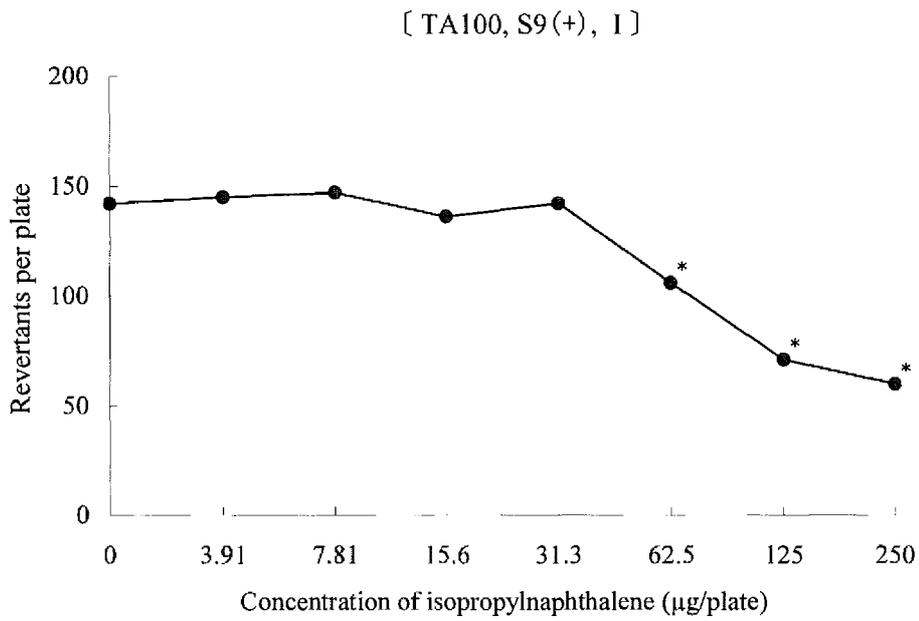


Figure 1-2 Reverse mutation test of isopropyl naphthalene in *Salmonella typhimurium* TA100 with metabolic activation (dose-response curves) (SR05350)

* : Growth inhibition

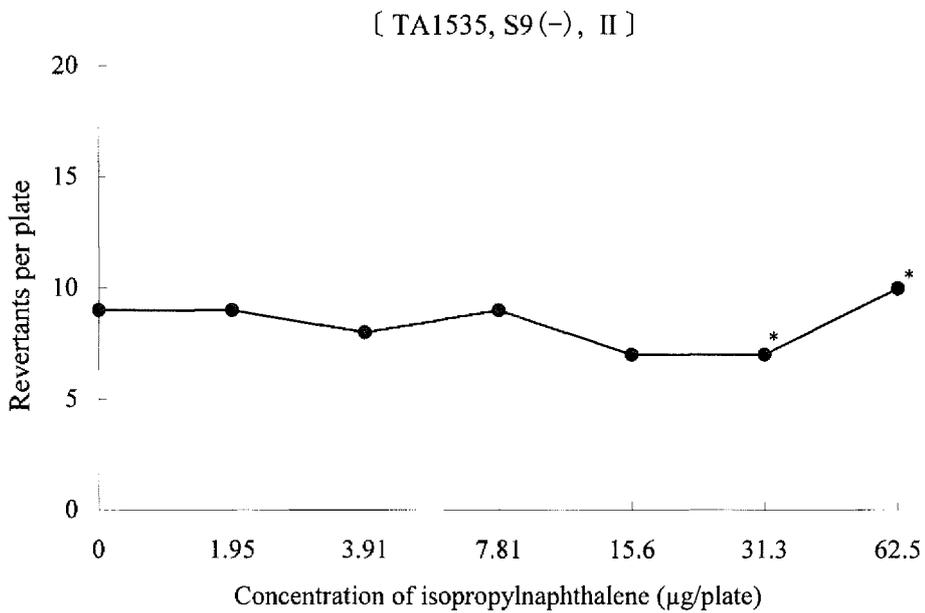
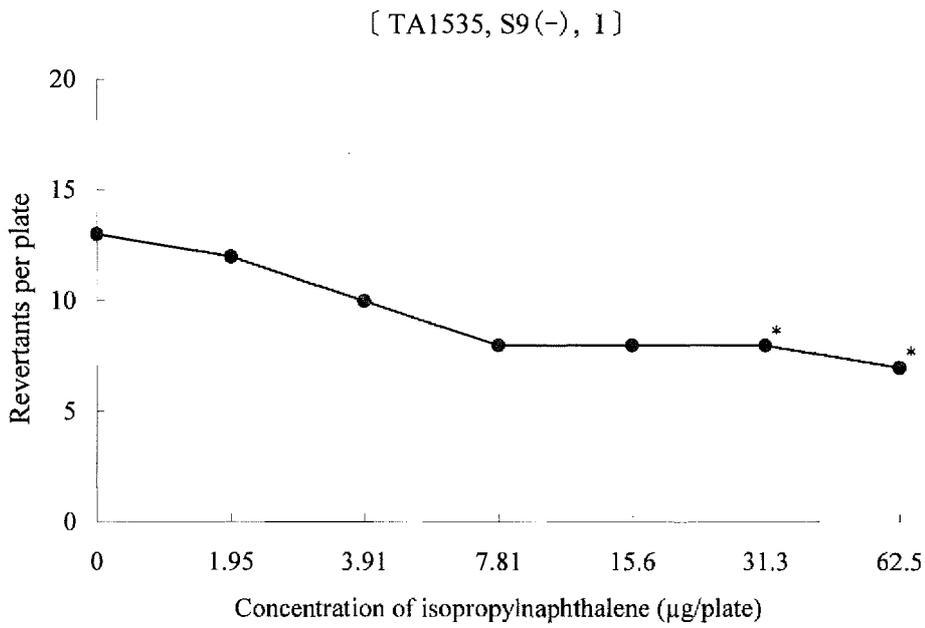


Figure 2-1 Reverse mutation test of isopropyl naphthalene in *Salmonella typhimurium* TA1535 without metabolic activation (dose-response curves) (SR05350)

* : Growth inhibition

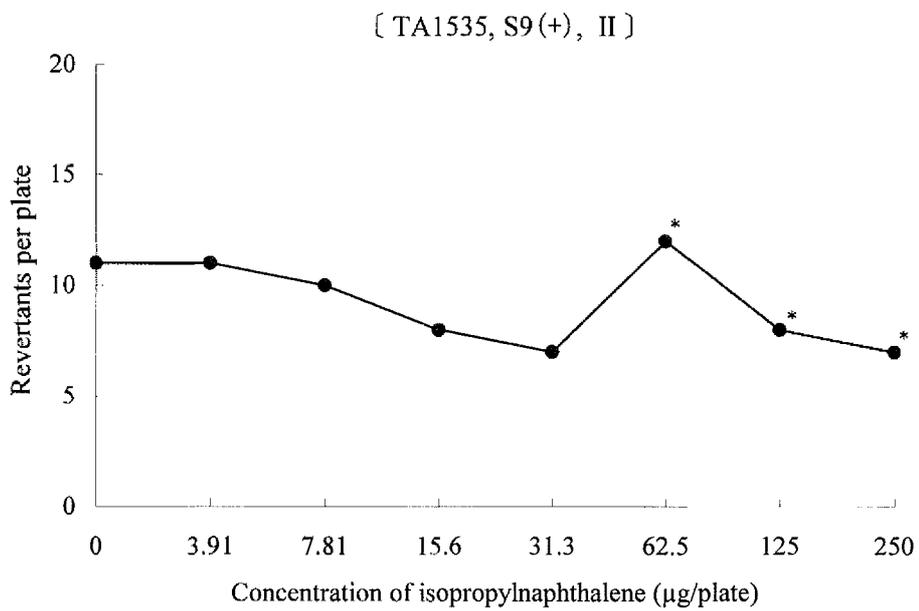
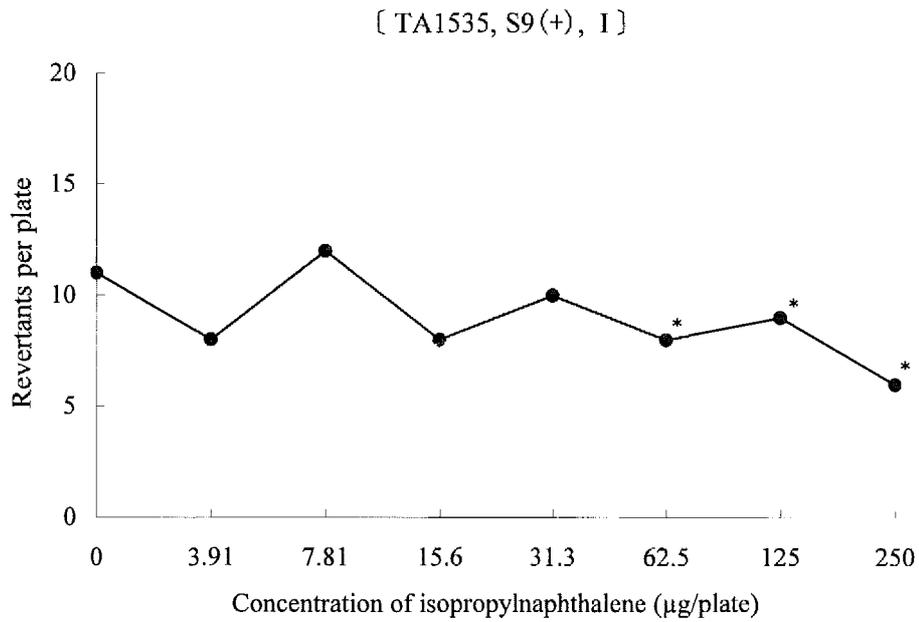


Figure 2-2 Reverse mutation test of isopropyl naphthalene in *Salmonella typhimurium* TA1535 with metabolic activation (dose-response curves) (SR05350)

* : Growth inhibition

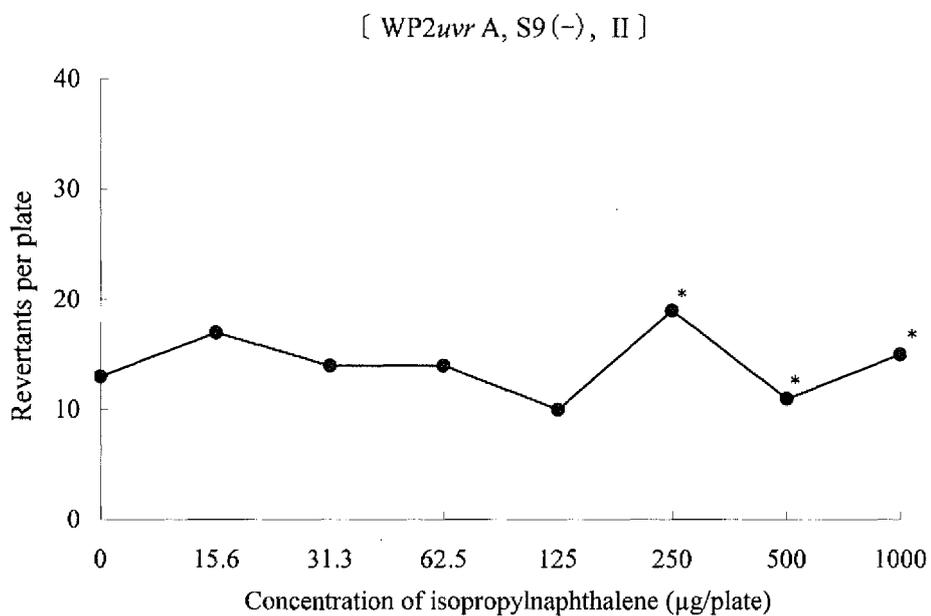
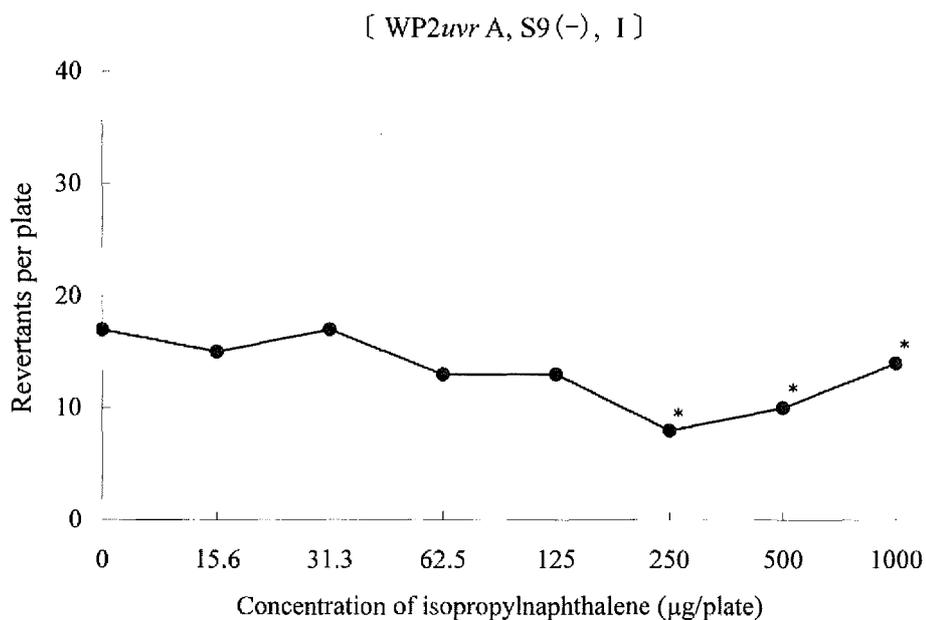


Figure 3-1 Reverse mutation test of isopropyl naphthalene in *Escherichia coli* WP2*uvr* A without metabolic activation (dose-response curves) (SR05350)

* : Growth inhibition

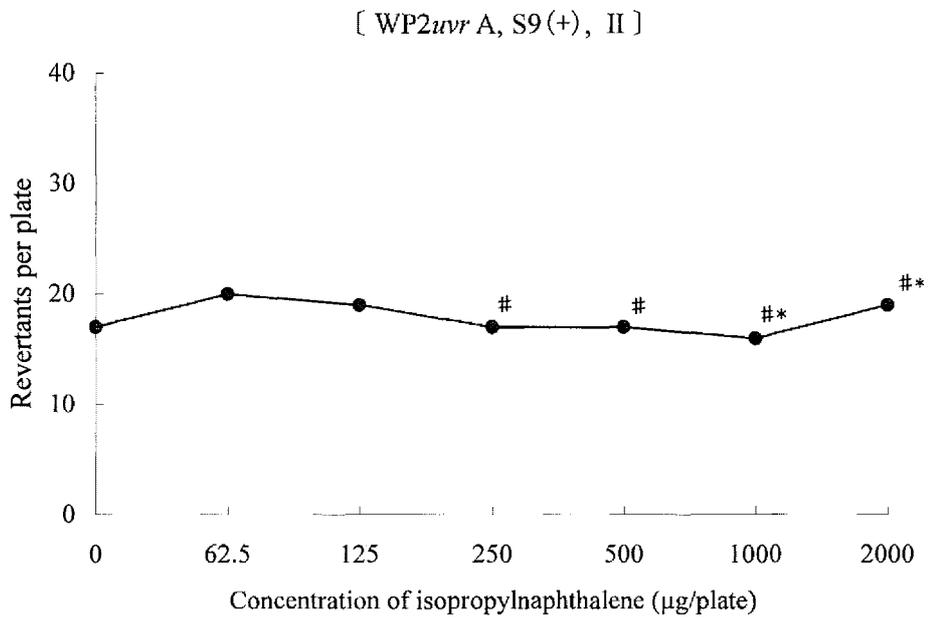
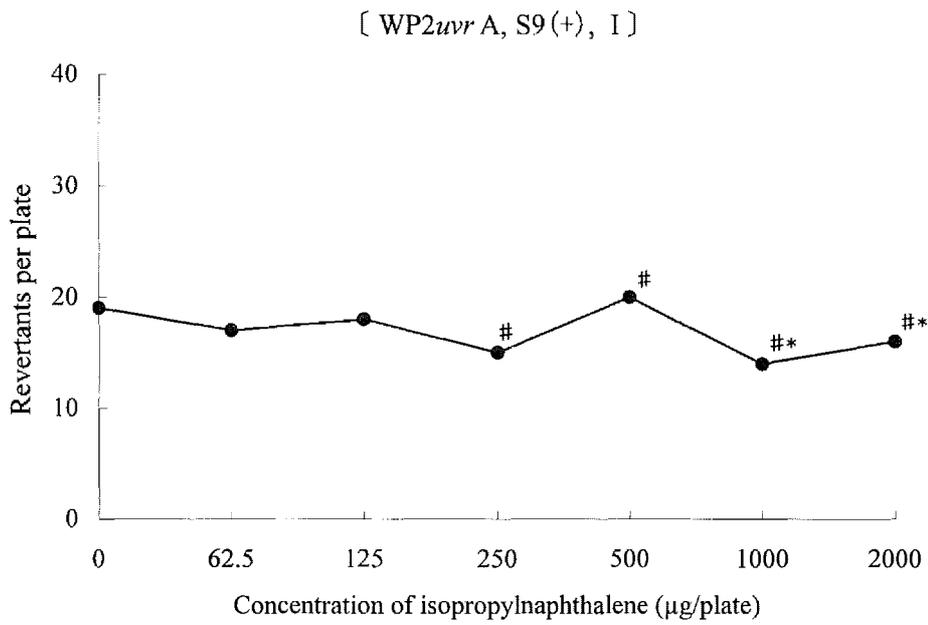


Figure 3-2 Reverse mutation test of isopropyl naphthalene in *Escherichia coli* WP2*uvr* A with metabolic activation (dose-response curves) (SR05350)

: Precipitation at the of treatment

* : Growth inhibition

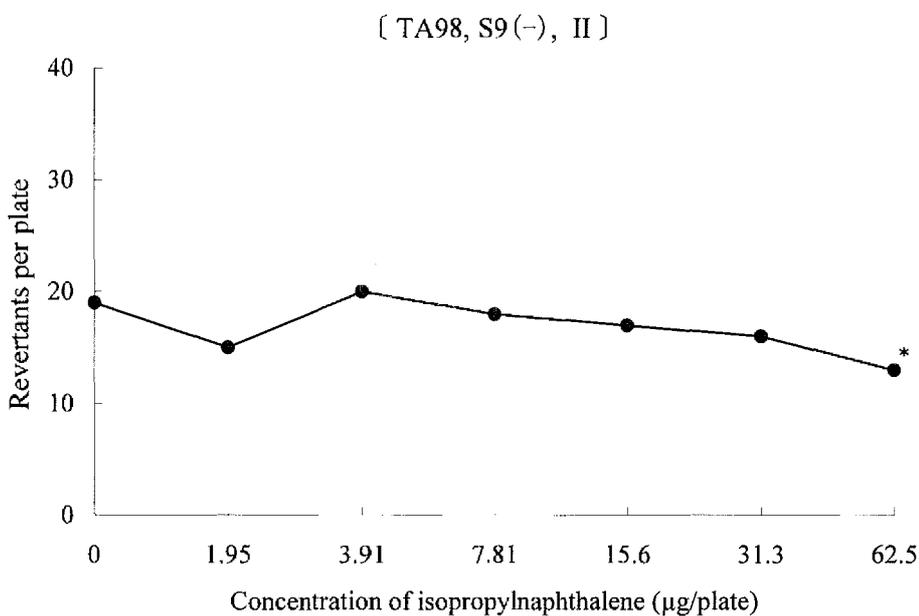
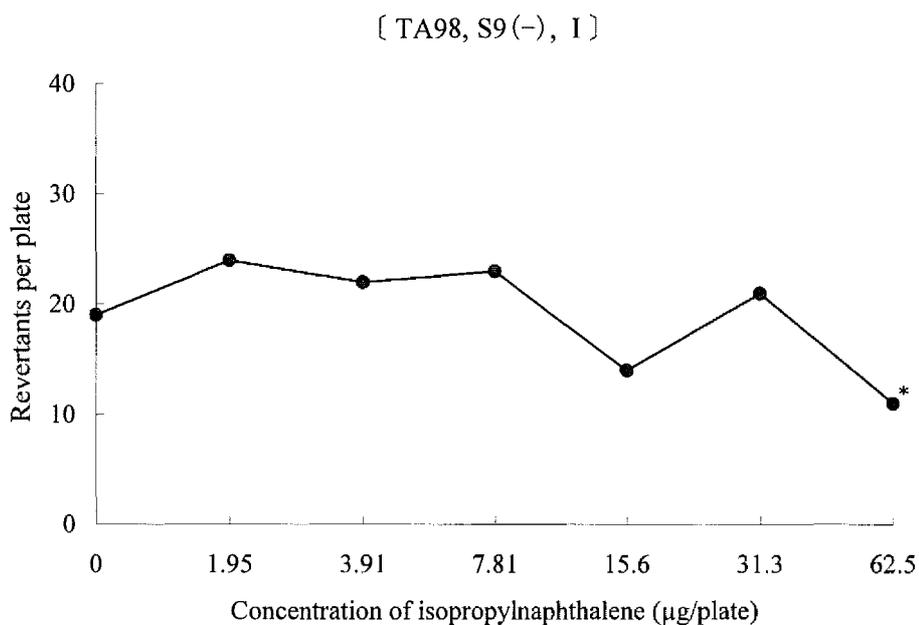


Figure 4-1 Reverse mutation test of isopropylnaphthalene in *Salmonella typhimurium* TA98 without metabolic activation (dose-response curves) (SR05350)

* : Growth inhibition

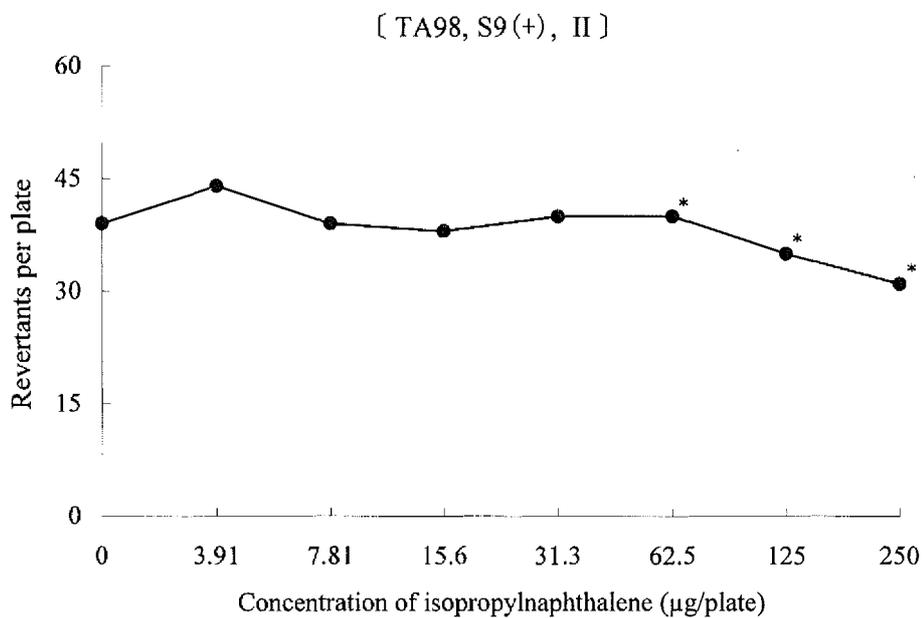
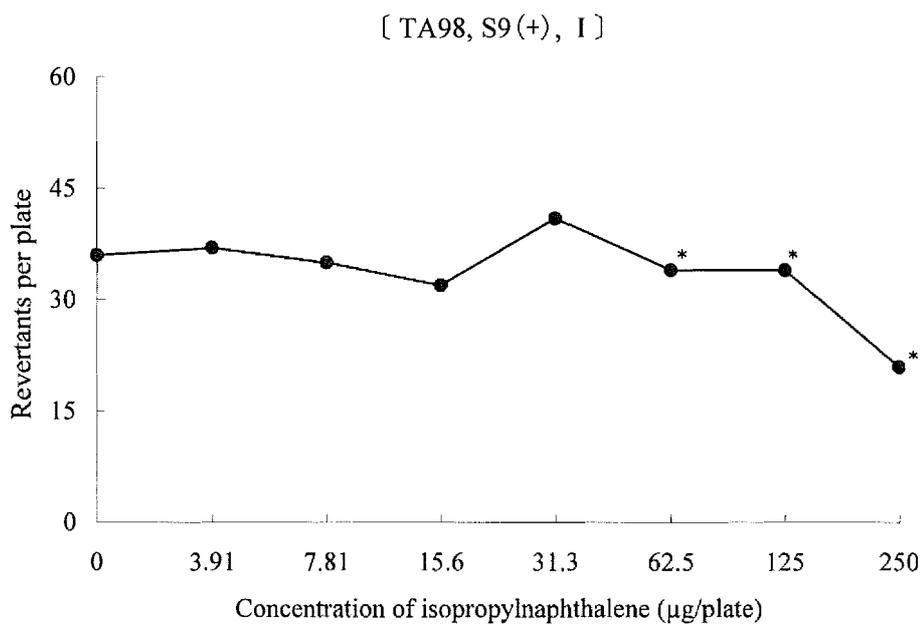


Figure 4-2 Reverse mutation test of isopropylnaphthalene in *Salmonella typhimurium* TA98 with metabolic activation (dose-response curves) (SR05350)

* : Growth inhibition

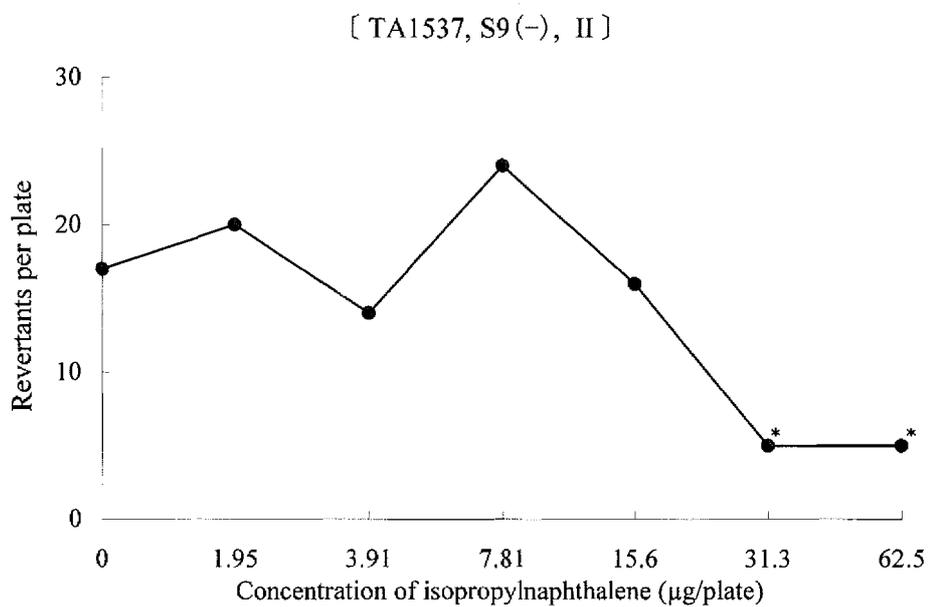
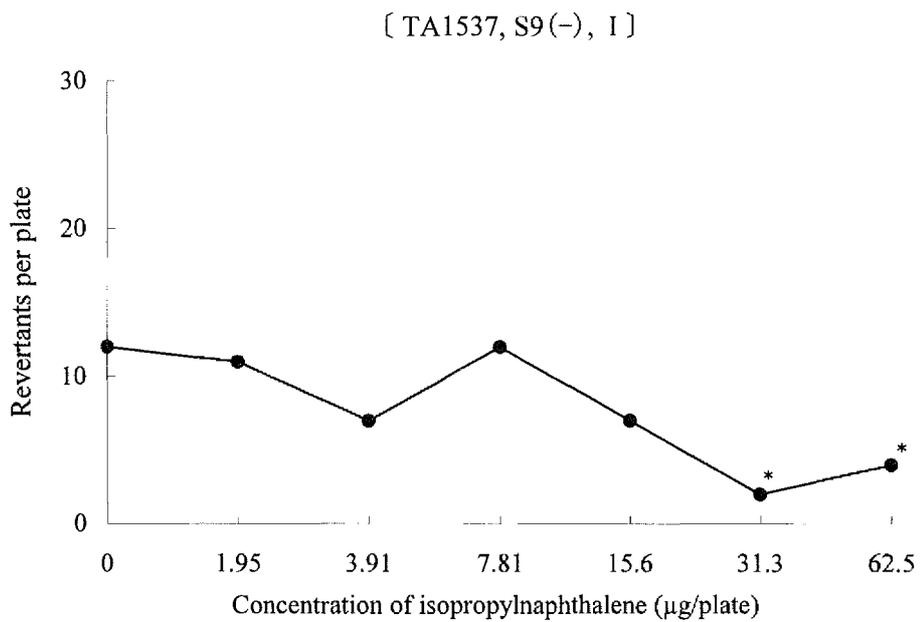


Figure 5-1 Reverse mutation test of isopropyl naphthalene in *Salmonella typhimurium* TA1537 without metabolic activation (dose-response curves) (SR05350)

* : Growth inhibition

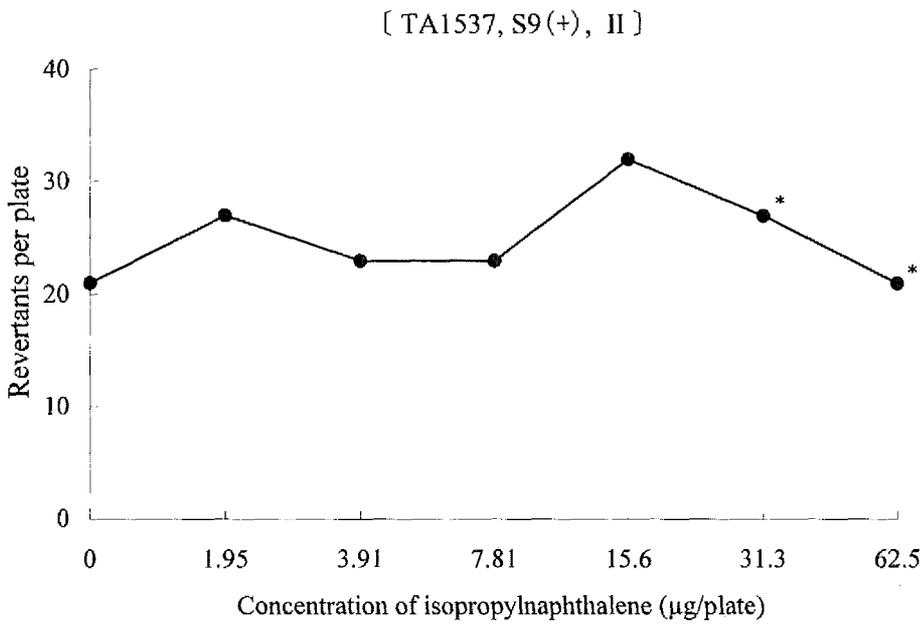
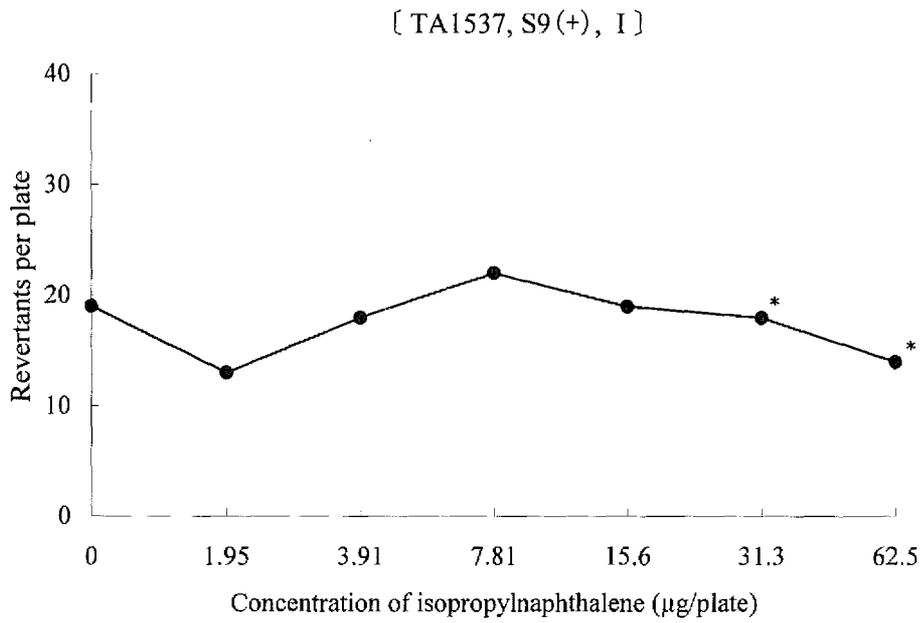


Figure 5-2 Reverse mutation test of isopropyl naphthalene in *Salmonella typhimurium* TA1537 with metabolic activation (dose-response curves) (SR05350)

* : Growth inhibition