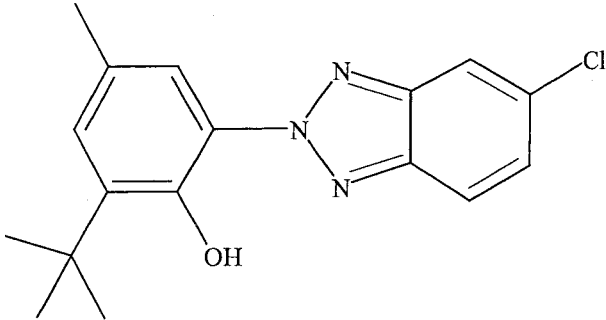


細菌を用いる復帰突然変異試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質の名称 (IUPAC命名法による)	ブメトリゾール		
別 名	2-(2'-ヒドロキシ-3-tert-ブチル-5'-メチルフェニル)-5-クロロベンゾトリアゾール		
C A S 番 号	3896-11-5		
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)			
分 子 量	315.80		
試験に供した新規 化学物質の純度	99.9%		
試験に供した新規 化学物質のLot No.	01721IW4		
不純物の名称 及び含有率	—		
蒸 気 圧	7.5×10E-7 Pa (20℃)		
対 水 溶 解 度	<1mg/L (20℃) EEC A6		
1-オクタノール/水分配係数	LogPow > 6 (20 – 25℃)		
融 点	138 – 141℃		
沸 点	—		
常温における性状	淡黄色粉末、臭いなし		
安 定 性	常温・常圧で安定		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	DMSO	5 mg/mL以下*	**
その他 * : 試験施設において確認 ** : 50 mg/mL DMSO懸濁液に発熱、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	2005年 1月 21日製造
購入の場合のLot No.	05012111
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	216.4 ± 8.9 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	紫外外部吸収 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、良好な懸濁状態となるため。				
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	タッチミキサーで攪拌することにより均一な懸濁状態とした。				
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	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
生菌数 ($\times 10^9$ /mL)	用量設定試験	3.1	4.4	5.1	3.6	2.6
	本 試 験 (I)	3.2	4.5	5.2	3.7	2.7
	本 試 験 (II)	3.1	4.3	5.1	3.6	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	2005年 2月 5日製造
購 入 の 場 合 の L o t N o .	ANI090BU
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.40721

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1-1～1-5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の方法について」（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、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、以下公比2で6濃度を設定した。すなわち、S9 mix無添加の場合、TA100では9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156.3及び312.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 、TA1535及びWP2uvrAでは39.1, 78.1, 156.3, 312.5, 625及び1250 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 、TA98及びTA1537では0.61, 1.22, 2.44, 4.88, 9.77及び19.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ とした。S9 mix添加の場合、TA100, TA1535, TA98及びTA1537では9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156.3及び312.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 、WP2uvrAでは39.1, 78.1, 156.3, 312.5, 625及び1250 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 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]

プレート上の析出物は、S9 mix無添加の場合、培養開始時には39.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上（用量設定試験では78.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上）の濃度において、培養終了時には19.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度において白色の油膜状析出物及び白色の微細な析出物が認められた。S9 mix添加の場合、培養開始時には156.3 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上（用量設定試験では312.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上）の濃度において、培養終了時には78.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度において白色の微細な析出物が認められた。

[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 主任研究員		[REDACTED]		
	経験年数	17 年		[REDACTED]		
試験番号	901924					
試験期間	2005年 4月 1日より 2006年 11月 13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： ブメトリゾール (用量設定試験)

試験実施期間		2005年 5月 10日 より 2005年 5月 13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	153 (153)	10 (10)	43 (43)	10 (10)	10 (10)		
	0.305	121 (121)	5 (5)	54 (54)	14 (14)	12 (12)		
	1.22	126 (126)	5 (5)	41 (41)	19 (19)	9 (9)		
	4.88	130 (130)	12 (12)	38 (38)	14 (14)	12 (12)		
	19.5#	137 (137)	8 (8)	37 (37)	17* (17)	6* (6)		
	78.1#	118 (118)	10 (10)	51 (51)	19* (19)	11* (11)		
	312.5#	147* (147)	13 (13)	47 (47)	13* (13)	8* (8)		
	1250#	116* (116)	8* (8)	39* (39)	12* (12)	9* (9)		
	5000#	144* (144)	9* (9)	43* (43)	12* (12)	7* (7)		
+S9 mix	陰性対照	142 (142)	11 (11)	45 (45)	19 (19)	13 (13)		
	0.305	137 (137)	9 (9)	37 (37)	23 (23)	20 (20)		
	1.22	130 (130)	7 (7)	29 (29)	20 (20)	14 (14)		
	4.88	131 (131)	7 (7)	39 (39)	18 (18)	14 (14)		
	19.5	114 (114)	9 (9)	50 (50)	13 (13)	17 (17)		
	78.1#	123 (123)	5 (5)	45 (45)	19 (19)	14 (14)		
	312.5#	136* (136)	9* (9)	35 (35)	21* (21)	17* (17)		
	1250#	113* (113)	5* (5)	46* (46)	24* (24)	12* (12)		
	5000#	139* (139)	6* (6)	39* (39)	20* (20)	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 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
		コロニー数/プレート	556 (556)	573 (573)	159 (159)	517 (517)	516 (516)	
	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	903 (903)	363 (363)	990 (990)	400 (400)	155 (155)	

[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: ブメトリゾール (本試験 I)

試験実施期間		2005年 5月 23日 より			2005年 5月 26日			
代謝活性化系の有無		被験物質の用量 ($\mu\text{g}/7^\circ\text{プレート}$)	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	86 107 123 (105 $\pm$ 18.6)	11 13 15 (13 $\pm$ 2.0)	17 27 28 (24 $\pm$ 6.1)	13 15 15 (14 $\pm$ 1.2)	7 9 16 (11 $\pm$ 4.7)		
	0.61				17 17 19 (18 $\pm$ 1.2)	2 7 9 (6 $\pm$ 3.6)		
	1.22				13 22 25 (20 $\pm$ 6.2)	9 10 11 (10 $\pm$ 1.0)		
	2.44				19 19 26 (21 $\pm$ 4.0)	10 10 11 (10 $\pm$ 0.6)		
	4.88				18 20 28 (22 $\pm$ 5.3)	8 11 13 (11 $\pm$ 2.5)		
	9.77	90 96 112 (99 $\pm$ 11.4)			19* 22* 23* (21 $\pm$ 2.1)	7* 11* 13* (10 $\pm$ 3.1)		
	19.5#	90 115 115 (107 $\pm$ 14.4)			17* 22* 23* (21 $\pm$ 3.2)	7* 7* 15* (10 $\pm$ 4.6)		
	39.1#	91 96 97 (95 $\pm$ 3.2)	9 9 12 (10 $\pm$ 1.7)	19 27 37 (28 $\pm$ 9.0)				
	78.1#	98 103 108 (103 $\pm$ 5.0)	13 13 13 (13 $\pm$ 0.0)	23 27 30 (27 $\pm$ 3.5)				
	156.3#	97* 98* 116* (104 $\pm$ 10.7)	10 17 20 (16 $\pm$ 5.1)	25 34 34 (31 $\pm$ 5.2)				
	312.5#	80* 95* 96* (90 $\pm$ 9.0)	10 10 22 (14 $\pm$ 6.9)	24 30 37 (30 $\pm$ 6.5)				
	625#		13* 16* 17* (15 $\pm$ 2.1)	26 29 37 (31 $\pm$ 5.7)				
	1250#		6* 7* 13* (9 $\pm$ 3.8)	20* 28* 32* (27 $\pm$ 6.1)				
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 ($\mu\text{g}/7^\circ\text{プレート}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
		コロニー数/プレート	414 459 474 (449 $\pm$ 31.2)	573 635 646 (618 $\pm$ 39.4)	103 132 137 (124 $\pm$ 18.4)	365 374 375 (371 $\pm$ 5.5)	391 413 427 (410 $\pm$ 18.1)	
	S9 mixを必要とするもの	名 称						
		用量 ($\mu\text{g}/7^\circ\text{プレート}$)						
		コロニー数/プレート						

[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.

(別表1-3)

試験結果表

被験物質の名称： ブメトリゾール (本試験 I)

試験実施期間		2005年 5月 23日 より 2005年 5月 26日						
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/プレート)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)						
		塩基対置換型			フレームシフト型			
		TA100	TA1535	WP2 ^{uvrA}	TA98	TA1537		
+S9 mix	陰性対照	99 121 129 (116±15.5)	11 12 15 (13±2.1)	33 34 34 (34±0.6)	26 28 34 (29±4.2)	17 18 20 (18±1.5)		
	9.77	107 108 121 (112±7.8)	9 14 26 (16±8.7)		23 28 32 (28±4.5)	22 22 24 (23±1.2)		
	19.5	108 116 130 (118±11.1)	5 12 17 (11±6.0)		20 24 32 (25±6.1)	16 17 20 (18±2.1)		
	39.1	94 95 123 (104±16.5)	7 11 11 (10±2.3)	29 35 35 (33±3.5)	22 27 29 (26±3.6)	12 14 20 (15±4.2)		
	78.1#	77 96 104 (92±13.9)	13 14 18 (15±2.6)	20 29 30 (26±5.5)	24 28 29 (27±2.6)	12 13 16 (14±2.1)		
	156.3#	91 114 120 (108±15.3)	12 16 17 (15±2.6)	27 29 30 (29±1.5)	20 22 29 (24±4.7)	13 20 21 (18±4.4)		
	312.5#	82* 110* 112* (101±16.8)	12* 15* 23* (17±5.7)	27 29 31 (29±2.0)	23* 26* 26* (25±1.7)	17* 17* 21* (18±2.3)		
	625#			17 29 30 (25±7.2)				
	1250#			20* 26* 35* (27±7.5)				
陽性対照	S9 mixを必要としないもの	名 称						
		用量 (μg/プレート)						
		コロニー数/プレート						
	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	861 881 920 (887±30.0)	315 332 346 (331±15.5)	737 765 778 (760±21.0)	389 415 436 (413±23.5)	128 139 140 (136±6.7)	

[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。

2AA: 2-Aminoanthracene.

(別表 1 - 4)

試 験 結 果 表

被験物質の名称： ブメトリゾール (本試験Ⅱ)

試験実施期間		2005年 5月 30日 より 2005年 6月 2日								
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/7°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		
-S9 mix	陰性対照	99 101 111 (104±6.4)	5 6 7 (6±1.0)	28 30 34 (31±3.1)	17 18 22 (19±2.6)	5 7 9 (7±2.0)				
	0.61				21 22 26 (23±2.6)	6 10 10 (9±2.3)				
	1.22				13 21 27 (20±7.0)	10 10 12 (11±1.2)				
	2.44				19 19 23 (20±2.3)	7 8 11 (9±2.1)				
	4.88				13 25 25 (21±6.9)	7 8 10 (8±1.5)				
	9.77	110 112 121 (114±5.9)			17* 24* 27* (23±5.1)	6* 7* 7* (7±0.6)				
	19.5#	98 110 117 (108±9.6)			14* 18* 29* (20±7.8)	4* 6* 10* (7±3.1)				
	39.1#	102 105 118 (108±8.5)	5 6 12 (8±3.8)	20 24 27 (24±3.5)						
	78.1#	95 96 104 (98±4.9)	9 10 11 (10±1.0)	21 21 30 (24±5.2)						
	156.3#	109* 116* 125* (117±8.0)	4 12 14 (10±5.3)	24 28 29 (27±2.6)						
	312.5#	89* 104* 108* (100±10.0)	5 10 11 (9±3.2)	18 18 29 (22±6.4)						
	625#		7* 12* 13* (11±3.2)	17 20 36 (24±10.2)						
	1250#		10* 10* 11* (10±0.6)	19* 25* 26* (23±3.8)						
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/7°プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	80			
		コロニー数/プレート	451 457 581 (496±73.4)	515 536 601 (551±44.8)	123 127 131 (127±4.0)	454 464 472 (463±9.0)	294 411 597 (434±152.8)			
	S9 mixを必要とするもの	名 称								
		用量 (μg/7°プレート)								
		コロニー数/プレート								

[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.

(別表1-5)

試験結果表

被験物質の名称: ブメトリゾール (本試験Ⅱ)

試験実施期間		2005年 5月 30日 より 2005年 6月 2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 $uvrA$		
+S9 mix	陰性対照	117 118 128 (121 $\pm$ 6.1)	7 11 13 (10 $\pm$ 3.1)	24 26 31 (27 $\pm$ 3.6)	20 30 33 (28 $\pm$ 6.8)	14 14 22 (17 $\pm$ 4.6)				
	9.77	104 106 109 (106 $\pm$ 2.5)	7 10 12 (10 $\pm$ 2.5)		19 22 24 (22 $\pm$ 2.5)	11 13 15 (13 $\pm$ 2.0)				
	19.5	101 106 132 (113 $\pm$ 16.6)	5 7 11 (8 $\pm$ 3.1)		21 21 25 (22 $\pm$ 2.3)	12 16 20 (16 $\pm$ 4.0)				
	39.1	104 111 121 (112 $\pm$ 8.5)	10 10 11 (10 $\pm$ 0.6)	21 23 34 (26 $\pm$ 7.0)	21 26 34 (27 $\pm$ 6.6)	11 19 20 (17 $\pm$ 4.9)				
	78.1#	104 113 120 (112 $\pm$ 8.0)	3 6 8 (6 $\pm$ 2.5)	26 33 38 (32 $\pm$ 6.0)	25 27 32 (28 $\pm$ 3.6)	16 18 25 (20 $\pm$ 4.7)				
	156.3#	114 115 118 (116 $\pm$ 2.1)	6 8 9 (8 $\pm$ 1.5)	22 30 30 (27 $\pm$ 4.6)	20 26 28 (25 $\pm$ 4.2)	3 17 18 (13 $\pm$ 8.4)				
	312.5#	97* 112* 112* (107 $\pm$ 8.7)	6* 6* 7* (6 $\pm$ 0.6)	21 31 35 (29 $\pm$ 7.2)	20* 22* 37* (26 $\pm$ 9.3)	7* 13* 13* (11 $\pm$ 3.5)				
	625#			28 29 34 (30 $\pm$ 3.2)						
	1250#			31* 33* 38* (34 $\pm$ 3.6)						
陽性対照	S9 mixを必要としないもの	名 称								
		用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)								
		コロニー数/プレート								
	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	898 944 958 (933 $\pm$ 31.4)	347 350 419 (372 $\pm$ 40.7)	769 790 795 (785 $\pm$ 13.8)	431 450 475 (452 $\pm$ 22.1)	115 141 141 (132 $\pm$ 15.0)			

[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。

2AA: 2-Aminoanthracene.

ブメトリゾールの細菌を用いる復帰突然変異試験

最 終 報 告 書

作成日 2006年 11月 13日

本報告書は最終報告書を複写したものに
相違ありません。

2006 年 12 月 12 日

試験責任者

株式会社日本バイオリサーチセンター
羽島研究所

信頼性保証書

試験番号：901924

表 題：ブメトリゾールの細菌を用いる復帰突然変異試験

当試験に関して、2005年4月4日から2006年11月13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。）

2006 年 11 月 13 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	2005年	4月	4日	2005年	4月	4日
2. 実施（用量設定試験）	2005年	5月	11日	2005年	5月	11日
3. 試験計画書変更書（No. 1）	2005年	5月	17日	2005年	5月	17日
4. 試験計画書変更書（No. 2）	2005年	5月	19日	2005年	5月	19日
5. 菌株の前培養〔本試験（Ⅰ）〕	2005年	5月	23日	2005年	5月	31日
6. 試験計画書変更書（No. 3）	2005年	5月	24日	2005年	5月	31日
7. 被験物質の管理	2005年	5月	24日	2005年	5月	31日
8. 検体の調製	2005年	5月	24日	2005年	5月	31日
9. 実施〔本試験（Ⅰ）〕	2005年	5月	24日	2005年	5月	31日
10. 判定〔本試験（Ⅰ）〕	2005年	5月	26日	2005年	5月	31日
11. 実施〔本試験（Ⅱ）〕	2005年	5月	31日	2005年	5月	31日
12. 生データ	2005年	6月	27日	2005年	6月	28日
	～	6月	28日			
13. 最終報告書（一次案）	2005年	6月	28日	2005年	6月	28日
14. 試験計画書変更書（No. 4）	2005年	7月	8日	2005年	7月	8日
15. 生データ（再調査）	2005年	7月	8日	2005年	7月	8日
16. 最終報告書（一次案）（再調査）	2005年	7月	8日	2005年	7月	8日
17. 試験計画書変更書（No. 5）	2006年	9月	11日	2006年	9月	11日
18. 最終報告書	2006年	11月	13日	2006年	11月	13日

最終報告書作成者署名

試験番号：901924

表 題：ブメトリゾールの細菌を用いる復帰突然変異試験

2006 年 11 月 13 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：ブメトリゾール (CAS No. 3896-11-5)

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：ブメトリゾール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）並びに平成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、環保企発第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)

試験開始日：2005年 4月 1日

試験終了日：2006年 11月 13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）	2005年 5月 10日
試験の実施日	2005年 5月 11日
判定日	2005年 5月 13日

本試験(I)

菌株の前培養実施日	2005年 5月 23日
試験の実施日	2005年 5月 24日
判定日	2005年 5月 26日

本試験(II)

菌株の前培養実施日	2005年 5月 30日
試験の実施日	2005年 5月 31日
判定日(実験終了日)	2005年 6月 2日

資料の保存場所：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：

該当事項はなかった。

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：

該当事項はなかった。

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, 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		11
3. 試験菌株		11
4. S9 mix		12
5. 培地		12
6. 無菌試験		13
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		17

Attachment, Table及びFigureの目次

Attachment 1.	Specificity of test strains		18
Attachment 2.	Number of surviving cells in bacterial suspension		18
Attachment 3.	Preparation of S9		19
Attachment 4.	Composition of S9 mix		19
Attachment 5.	Composition of minimum glucose agar plate medium		19
Attachment 6.	Test conditions		20
Attachment 7.	Background data of reverse mutation test with bacteria		21
Table 1.	Reverse mutation test of bumetizole in bacteria (dose-finding test)		22
Table 2-1.	Reverse mutation test of bumetizole in bacteria (mutagenicity test I: -S9 mix)		23
Table 2-2.	Reverse mutation test of bumetizole in bacteria (mutagenicity test I: +S9 mix)		24
Table 3-1.	Reverse mutation test of bumetizole in bacteria (mutagenicity test II: -S9 mix)		25
Table 3-2.	Reverse mutation test of bumetizole in bacteria (mutagenicity test II: +S9 mix)		26
Figure 1-1.	Reverse mutation test of bumetizole in bacteria (dose-finding test : -S9 mix)		27
Figure 1-2.	Reverse mutation test of bumetizole in bacteria (dose-finding test : +S9 mix)		28
Figure 2-1.	Reverse mutation test of bumetizole in bacteria (mutagenicity test I: -S9 mix)		29
Figure 2-2.	Reverse mutation test of bumetizole in bacteria (mutagenicity test I: +S9 mix)		30
Figure 3-1.	Reverse mutation test of bumetizole in bacteria (mutagenicity test II: -S9 mix)		31
Figure 3-2.	Reverse mutation test of bumetizole in bacteria (mutagenicity test II: +S9 mix)		32

要 約

ブメトリゾール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無添加及びS9 mix添加の場合について実施した。

ブメトリゾールの0.61～1250 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 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、ブメトリゾールに遺伝子突然変異誘発性はないと判定する。

緒 言

ブメトリゾール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

被験物質のブメトリゾール [日本語別名: 2-(2'-ヒドロキシ-3-tert-ブチル-5'-メチルフェニル)-5- クロロベンゾトリアゾール, 英語名: bumetizole, 英語別名: 2-(2'-Hydroxy-3-tert-butyl-5'-methylphenyl)-5-chlorobenzotriazole, CAS No.3896-11-5, 分子量:315.80, 蒸気圧: 7.5×10^{-7} Pa (20°C), 融点: 138-141°C, 相対密度: 1.32 g/cm³ (25°C)] は、淡黄色の粉末で臭いはない。当試験には、XXXXXXXXXX から入手したもの [ロット番号: 01721IW4, 含量: 99.9%] を用いた。入手後は、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: 20.4~24.9°C) ・密閉の条件下で保管した。

入手後に試験施設で被験物質を分析した結果、含量は99.5%であった。ブメトリゾールのラットを用いる経口投与による反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験 (試験番号: 100624) の投与期間終了後に試験施設で被験物質を再分析した結果、含量は100.6%であり、使用期間中の安定性が確認された。

1.2. 媒体

媒体には、ジメチルスルホキシド [以下DMSO, 紫外吸収スペクトル用, 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: 20.4~24.9°C) ・遮光の条件下で保管した。

1.3. 陽性対照物質

陽性対照物質は、ポジコンAMマルチセット (セット番号: M0005, 使用期限: 2006年9月1日, オリエンタル酵母工業株式会社) を用いた。ポジコンAMマルチセットは、使用時まで試験施設の被験物質保管室の保管庫 (設定: -85°C, 実測値: -88~-77°C, 冷凍庫: MDF-291AT, 三洋電機株式会社) 内に、冷凍の条件下で保管した。

なお、冷凍 (-80°C) 保存条件下で NaN_3 の 5 $\mu\text{g/mL}$ は製造後1年7ヵ月間、その他は製造後2年間安定であることが製造元により確認されている。

下記にポジコンAMマルチセットの内容を記載した。

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

1.3.1.1. 調製液

5 $\mu\text{g/mL}$ (ロット番号: 050202A205), 10 $\mu\text{g/mL}$ (ロット番号: 050202A210),
20 $\mu\text{g/mL}$ (ロット番号: 050202A220), 100 $\mu\text{g/mL}$ (ロット番号: 050202A2100)

製 造 日 : 2005年 2月 2日

媒 体 : DMSO (紫外外部吸収スペクトル用, ロット番号 : SL045, 株式会社同仁化学研究所)

1.3.1.2. 原体

ロット番号 : DWH6744

製 造 元 : 和光純薬工業株式会社

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

1.3.2.1. 調製液

5 µg/mL (ロット番号 : 050202N)

製 造 日 : 2005年 2月 2日

媒 体 : 注射用水 (ロット番号 : 2D85, 株式会社大塚製薬工場)

1.3.2.2. 原体

ロット番号 : MIT9709

製 造 元 : ナカライテスク株式会社

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

1.3.3.1. 調製液

800 µg/mL (ロット番号 : 050203A9)

製 造 日 : 2005年 2月 3日

媒 体 : DMSO (紫外外部吸収スペクトル用, ロット番号 : NB123, 株式会社同仁化学研究所)

1.3.3.2. 原体

ロット番号 : MOE9006

製 造 元 : ナカライテスク株式会社

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]

1.3.4.1. 調製液

0.1 µg/mL (ロット番号 : 050203AF01), 1.0 µg/mL (ロット番号 : 050203AF10)

製 造 日 : 2005年 2月 3日

媒 体 : DMSO (紫外外部吸収スペクトル用, ロット番号 : SL045, 株式会社同仁化学研究所)

1.3.4.2. 原体

ロット番号 : WAP0369

製 造 元 : 和光純薬工業株式会社

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に懸濁して最高濃度液[用量設定試験：50 mg/mL, 本試験(I)及び本試験(II)：12.5 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

試験の際に、ポジコンAM マルチセットを融解して使用し、使用後の残液は廃棄処分した。

以下に各菌株に対する陽性対照物質名、濃度及び試験濃度を示した。

	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

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(*S.typhimurium*の場合は、2 mLの0.5 mmol/L D-ビオチンを含むトップアガーで、*E.coli*の場合には2 mLのプレーンのトップアガーで最少グルコース寒天平板培地に、通常行っている試験方法で前培養した菌懸濁液0.1 mLと共に重層し、48時間培養して0.1 mL中に含まれる復帰変異コロニー数を調べた)、紫外線

感受性、膜変異 *rfa* 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 μ L ずつ分注し、-80 °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：2005 年 4 月 13 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 °C，15 分)した培養液を使用した。乾熱滅菌(180 °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 μ L 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 °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：Novaspec II，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 2005 年 1 月 21 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：05012111)を使用した。S9 は、2005 年 2 月 10 日に購入し、使用時まで -80 °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。

S9 mix は、S9 mix 用の Cofactor(商品名：Cofactor- I，ロット番号：999402，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(ϕ 0.2 μ 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：ANI090BU，製造日：2005 年 2 月 5 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 °C，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(ϕ 0.22 μ 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 °Cに保温したトッパアガー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 °C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、用量設定試験では50 mg/mL濃度液を、本試験(I)及び本試験(II)では12.5 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 °Cで20分間インキュベーションした。その後、45 °Cに保温したトッパアガーを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、プレートを転倒して37 °C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ところ、用量設定試験では、被験物質で処理したプレート上に析出物が認められ、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)による復帰変異コロニー数の測定ができないと判断されたため、陰性対照及び被験物質で処理したプレートはハンディコロニーカウンター(CC-1, アズワン株式会社)を用いた目算法により、陽性対照ではコロニーアナライザーにより復帰変異コロニー数を計測した。本試験(I)及び本試験(II)では、プレート上の析出物がコロニーアナライザーによる復帰変異コロニー数の測定を妨げないと判断されたため、コロニーアナライザーにより測定した。また、復帰変異コロニー数を計測後、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、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、以下公比2で6濃度を設定した。すなわち、S9 mix無添加の場合、TA100では9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156.3及び312.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$, TA1535及びWP2*uvrA*では39.1, 78.1, 156.3, 312.5, 625及び1250 $\mu\text{g}/\text{plate}$, TA98及びTA1537では0.61, 1.22, 2.44, 4.88, 9.77及び19.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ とした。S9 mix添加の場合、TA100, TA1535, TA98及びTA1537では9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156.3及び312.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$, WP2*uvrA*では39.1, 78.1, 156.3, 312.5, 625及び1250 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 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。

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、S9 mix無添加の場合、培養開始時には78.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度において、培養終了時には19.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度において白色の油膜状析出物及び白色の微細な析出物が認められた。S9 mix添加の場合、培養開始時には312.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度において、培養終了時には78.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度において白色の微細な析出物が認められた。

1.2. 菌の生育阻害

S9 mix無添加の場合、TA100では312.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度において、TA1535及びWP2*uvrA*では1250 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度において、TA98及びTA1537では19.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度において菌の生育阻害が認められた。S9 mix添加の場合、TA100、TA1535、TA98及びTA1537では312.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度において、WP2*uvrA*では1250 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度において菌の生育阻害が認められた。

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、S9 mix無添加の場合、培養開始時には39.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度において、培養終了時には19.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度において白色の油膜状析出物及び白色の微細な析出物が認められた。S9 mix添加の場合、培養開始時には156.3 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度において、培養終了時には78.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度において白色の微細な析出物が認められた。

2.2. 菌の生育阻害

S9 mix無添加の場合、TA100では156.3 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度において、TA1535では625 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度において、WP2*uvrA*では1250 $\mu\text{g}/\text{plate}$ において、TA98及びTA1537では9.77 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度において菌の生育阻害が認められた。S9 mix添加の場合、TA100、TA1535、TA98及びTA1537では312.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ において、WP2*uvrA*では1250 $\mu\text{g}/\text{plate}$ において菌の生育阻害が認められた。

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(12.5 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

ブメトリゾール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。

ブメトリゾールは、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、ブメトリゾールに遺伝子突然変異誘発性はないと判定する。なお、ブメトリゾールは当試験施設で同時期に実施した哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験で陰性の結果が得られている²⁾。また、関連物質の2-(2'-ヒドロキシ-3',5'-ジ-tert-ブチルフェニル)ベンゾトリアゾールでは復帰変異試験³⁾、染色体異常試験⁴⁾で陰性との報告がある。

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
- 2) []：ブメトリゾールの哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験（試験番号：971124），株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所（2006）。
- 3) []：化学物質毒性試験報告，10，237（2003）。
- 4) []：化学物質毒性試験報告，10，243（2003）。

Attachment 1. Specificity of test strains

		TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
Amino acid requirement	His ^{-a)}	32 ^{b)} 44	2 7	/	3 6	2 2
	Trp ⁻	/	/		/	/
Sensitivity to UV radiation		+ ^{c)}	+	+	+	+
rfa specificity		11.3 mm ^{d)}	12.9 mm	0.0 mm	10.2 mm	13.7 mm
R-factor presence		0.0 mm ^{e)}	11.8 mm	16.3 mm	0.0 mm	19.0 mm

a): D-biotin was contained in plates.

b): Number of revertant colonies/plate.

c): +; Present of sensitivity.

d): Diameter of inhibition zone induced by crystal violet (10 µg/10 µL) on paper disk (diameter: 6 mm) .

e): Diameter of inhibition zone induced by ampicillin sodium (10 µg/10 µL) on paper disk (diameter: 6 mm).

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	4.4	5.1	3.6	2.6
Mutagenicity test (I)	3.2	4.5	5.2	3.7	2.7
Mutagenicity test (II)	3.1	4.3	5.1	3.6	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	216.4 ± 8.9 g* (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 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

Method		Pre-incubation method
Test condition		
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 with 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: 2003.1 ~ 2004. 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	73 ~ 176 (n=167)	3 ~ 23 (n=159)	16 ~ 58 (n=157)	10 ~ 32 (n=167)	3 ~ 20 (n=157)
		114 ± 40.9 (73 ~ 155)	10 ± 7.6 (2 ~ 17)	33 ± 17.7 (15 ~ 51)	18 ± 9.8 (8 ~ 28)	9 ± 7.2 (2 ~ 16)
	Positive control	AF-2 0.01 µg/plate	NaN ₃ 0.5 µg/plate	AF-2 0.01 µg/plate	AF-2 0.1 µg/plate	9AA 80 µg/plate
		320 ~ 618 (n=165)	421 ~ 660 (n=159)	103 ~ 200 (n=155)	357 ~ 586 (n=167)	167 ~ 665 (n=157)
		514 ± 106.6 (407 ~ 620)	539 ± 96.1 (443 ~ 636)	148 ± 42.1 (106 ~ 190)	441 ± 95.4 (346 ~ 537)	409 ± 227.9 (181 ~ 637)
	S9 mix (+)	Negative control	68 ~ 193 (n=161)	3 ~ 24 (n=155)	17 ~ 61 (n=151)	12 ~ 46 (n=159)
121 ± 44.5 (76 ~ 165)			10 ± 8.0 (2 ~ 18)	36 ± 18.4 (18 ~ 55)	27 ± 12.1 (15 ~ 39)	15 ± 9.8 (5 ~ 25)
Positive control		2AA 1 µg/plate	2AA 2 µg/plate	2AA 10 µg/plate	2AA 0.5 µg/plate	2AA 2 µg/plate
		583 ~ 2372 (n=161)	231 ~ 473 (n=155)	720 ~ 1200 (n=151)	265 ~ 859 (n=159)	93 ~ 372 (n=153)
		987 ± 485.7 (501 ~ 1473)	338 ± 106.5 (232 ~ 444)	920 ± 210.5 (710 ~ 1131)	420 ± 171.6 (249 ~ 592)	172 ± 105.3 (66 ~ 277)

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 bumetrizole 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	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
S9 mix (-)	Negative control	153	10	43	10	10
	0.305	121	5	54	14	12
	1.22	126	5	41	19	9
	4.88	130	12	38	14	12
	19.5#	137	8	37	17*	6*
	78.1#	118	10	51	19*	11*
	312.5#	147*	13	47	13*	8*
	1250#	116*	8*	39*	12*	9*
	5000#	144*	9*	43*	12*	7*
S9 mix (+)	Negative control	142	11	45	19	13
	0.305	137	9	37	23	20
	1.22	130	7	29	20	14
	4.88	131	7	39	18	14
	19.5	114	9	50	13	17
	78.1##	123	5	45	19	14
	312.5##	136*	9*	35	21*	17*
	1250##	113*	5*	46*	24*	12*
	5000##	139*	6*	39*	20*	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	556	573	159	517	516
Positive control requiring S9 mix	Name	2AA				
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2
	Number of colonies/plate	903	363	990	400	155

Negative control : Dimethylsulfoxide.

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.

: White oily membrane-like precipitations and white fine precipitations were observed on the surface of agar plate.

: White fine precipitations were observed on the surface of agar plate.

Table 2-1. Reverse mutation test of bumetrizole in bacteria (mutagenicity test I : -S9 mix)

Compound concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
	Base-pair substitution type			Frameshift type	
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
Negative control	86 , 107 , 123 (105 $\pm$ 18.6)	11 , 13 , 15 (13 $\pm$ 2.0)	17 , 27 , 28 (24 $\pm$ 6.1)	13 , 15 , 15 (14 $\pm$ 1.2)	7 , 9 , 16 (11 $\pm$ 4.7)
0.61				17 , 17 , 19 (18 $\pm$ 1.2)	2 , 7 , 9 (6 $\pm$ 3.6)
1.22				13 , 22 , 25 (20 $\pm$ 6.2)	9 , 10 , 11 (10 $\pm$ 1.0)
2.44				19 , 19 , 26 (21 $\pm$ 4.0)	10 , 10 , 11 (10 $\pm$ 0.6)
4.88				18 , 20 , 28 (22 $\pm$ 5.3)	8 , 11 , 13 (11 $\pm$ 2.5)
9.77	90 , 96 , 112 (99 $\pm$ 11.4)			19* , 22* , 23* (21 $\pm$ 2.1)	7* , 11* , 13* (10 $\pm$ 3.1)
19.5#	90 , 115 , 115 (107 $\pm$ 14.4)			17* , 22* , 23* (21 $\pm$ 3.2)	7* , 7* , 15* (10 $\pm$ 4.6)
39.1#	91 , 96 , 97 (95 $\pm$ 3.2)	9 , 9 , 12 (10 $\pm$ 1.7)	19 , 27 , 37 (28 $\pm$ 9.0)		
78.1#	98 , 103 , 108 (103 $\pm$ 5.0)	13 , 13 , 13 (13 $\pm$ 0.0)	23 , 27 , 30 (27 $\pm$ 3.5)		
156.3#	97* , 98* , 116* (104 $\pm$ 10.7)	10 , 17 , 20 (16 $\pm$ 5.1)	25 , 34 , 34 (31 $\pm$ 5.2)		
312.5#	80* , 95* , 96* (90 $\pm$ 9.0)	10 , 10 , 22 (14 $\pm$ 6.9)	24 , 30 , 37 (30 $\pm$ 6.5)		
625#		13* , 16* , 17* (15 $\pm$ 2.1)	26 , 29 , 37 (31 $\pm$ 5.7)		
1250#		6* , 7* , 13* (9 $\pm$ 3.8)	20* , 28* , 32* (27 $\pm$ 6.1)		
Positive control					
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	414 , 459 , 474 (449 $\pm$ 31.2)	573 , 635 , 646 (618 $\pm$ 39.4)	103 , 132 , 137 (124 $\pm$ 18.4)	365 , 374 , 375 (371 $\pm$ 5.5)	391 , 413 , 427 (410 $\pm$ 18.1)

Negative control : Dimethylsulfoxide.

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.

: White oily membrane-like precipitations and white fine precipitations were observed on the surface of agar plate.

Table 2-2. Reverse mutation test of bumetrizole in bacteria (mutagenicity test I : +S9 mix)

Compound concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
	Base-pair substitution type			Frameshift type	
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
Negative control	99 , 121 , 129 (116 $\pm$ 15.5)	11 , 12 , 15 (13 $\pm$ 2.1)	33 , 34 , 34 (34 $\pm$ 0.6)	26 , 28 , 34 (29 $\pm$ 4.2)	17 , 18 , 20 (18 $\pm$ 1.5)
9.77	107 , 108 , 121 (112 $\pm$ 7.8)	9 , 14 , 26 (16 $\pm$ 8.7)		23 , 28 , 32 (28 $\pm$ 4.5)	22 , 22 , 24 (23 $\pm$ 1.2)
19.5	108 , 116 , 130 (118 $\pm$ 11.1)	5 , 12 , 17 (11 $\pm$ 6.0)		20 , 24 , 32 (25 $\pm$ 6.1)	16 , 17 , 20 (18 $\pm$ 2.1)
39.1	94 , 95 , 123 (104 $\pm$ 16.5)	7 , 11 , 11 (10 $\pm$ 2.3)	29 , 35 , 35 (33 $\pm$ 3.5)	22 , 27 , 29 (26 $\pm$ 3.6)	12 , 14 , 20 (15 $\pm$ 4.2)
78.1##	77 , 96 , 104 (92 $\pm$ 13.9)	13 , 14 , 18 (15 $\pm$ 2.6)	20 , 29 , 30 (26 $\pm$ 5.5)	24 , 28 , 29 (27 $\pm$ 2.6)	12 , 13 , 16 (14 $\pm$ 2.1)
156.3##	91 , 114 , 120 (108 $\pm$ 15.3)	12 , 16 , 17 (15 $\pm$ 2.6)	27 , 29 , 30 (29 $\pm$ 1.5)	20 , 22 , 29 (24 $\pm$ 4.7)	13 , 20 , 21 (18 $\pm$ 4.4)
312.5##	82* , 110* , 112* (101 $\pm$ 16.8)	12* , 15* , 23* (17 $\pm$ 5.7)	27 , 29 , 31 (29 $\pm$ 2.0)	23* , 26* , 26* (25 $\pm$ 1.7)	17* , 17* , 21* (18 $\pm$ 2.3)
625##			17 , 29 , 30 (25 $\pm$ 7.2)		
1250##			20* , 26* , 35* (27 $\pm$ 7.5)		
Positive control					
Name	2AA				
Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2
Number of colonies/plate	861 , 881 , 920 (887 $\pm$ 30.0)	315 , 332 , 346 (331 $\pm$ 15.5)	737 , 765 , 778 (760 $\pm$ 21.0)	389 , 415 , 436 (413 $\pm$ 23.5)	128 , 139 , 140 (136 $\pm$ 6.7)

Negative control : Dimethylsulfoxide.

2AA : 2-Aminoanthracene.

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

* : Bacterial growth inhibition was observed.

: White fine precipitations were observed on the surface of agar plate.

Table 3-1. Reverse mutation test of bumetrizole in bacteria (mutagenicity test II : -S9 mix)

Compound concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
	Base-pair substitution type			Frameshift type	
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
Negative control	99 , 101 , 111 (104 $\pm$ 6.4)	5 , 6 , 7 (6 $\pm$ 1.0)	28 , 30 , 34 (31 $\pm$ 3.1)	17 , 18 , 22 (19 $\pm$ 2.6)	5 , 7 , 9 (7 $\pm$ 2.0)
0.61				21 , 22 , 26 (23 $\pm$ 2.6)	6 , 10 , 10 (9 $\pm$ 2.3)
1.22				13 , 21 , 27 (20 $\pm$ 7.0)	10 , 10 , 12 (11 $\pm$ 1.2)
2.44				19 , 19 , 23 (20 $\pm$ 2.3)	7 , 8 , 11 (9 $\pm$ 2.1)
4.88				13 , 25 , 25 (21 $\pm$ 6.9)	7 , 8 , 10 (8 $\pm$ 1.5)
9.77	110 , 112 , 121 (114 $\pm$ 5.9)			17*, 24*, 27* (23 $\pm$ 5.1)	6*, 7*, 7* (7 $\pm$ 0.6)
19.5#	98 , 110 , 117 (108 $\pm$ 9.6)			14*, 18*, 29* (20 $\pm$ 7.8)	4*, 6*, 10* (7 $\pm$ 3.1)
39.1#	102 , 105 , 118 (108 $\pm$ 8.5)	5 , 6 , 12 (8 $\pm$ 3.8)	20 , 24 , 27 (24 $\pm$ 3.5)		
78.1#	95 , 96 , 104 (98 $\pm$ 4.9)	9 , 10 , 11 (10 $\pm$ 1.0)	21 , 21 , 30 (24 $\pm$ 5.2)		
156.3#	109*, 116*, 125* (117 $\pm$ 8.0)	4 , 12 , 14 (10 $\pm$ 5.3)	24 , 28 , 29 (27 $\pm$ 2.6)		
312.5#	89*, 104*, 108* (100 $\pm$ 10.0)	5 , 10 , 11 (9 $\pm$ 3.2)	18 , 18 , 29 (22 $\pm$ 6.4)		
625#		7*, 12*, 13* (11 $\pm$ 3.2)	17 , 20 , 36 (24 $\pm$ 10.2)		
1250#		10*, 10*, 11* (10 $\pm$ 0.6)	19*, 25*, 26* (23 $\pm$ 3.8)		
Positive control					
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	451 , 457 , 581 (496 $\pm$ 73.4)	515 , 536 , 601 (551 $\pm$ 44.8)	123 , 127 , 131 (127 $\pm$ 4.0)	454 , 464 , 472 (463 $\pm$ 9.0)	294 , 411 , 597 (434 $\pm$ 152.8)

Negative control : Dimethylsulfoxide.

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.

: White oily membrane-like precipitations and white fine precipitations were observed on the surface of agar plate.

Table 3-2. Reverse mutation test of bumetrizole in bacteria (mutagenicity test II: +S9 mix)

Compound concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
	Base-pair substitution type			Frameshift type	
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
Negative control	117 , 118 , 128 (121 $\pm$ 6.1)	7 , 11 , 13 (10 $\pm$ 3.1)	24 , 26 , 31 (27 $\pm$ 3.6)	20 , 30 , 33 (28 $\pm$ 6.8)	14 , 14 , 22 (17 $\pm$ 4.6)
9.77	104 , 106 , 109 (106 $\pm$ 2.5)	7 , 10 , 12 (10 $\pm$ 2.5)		19 , 22 , 24 (22 $\pm$ 2.5)	11 , 13 , 15 (13 $\pm$ 2.0)
19.5	101 , 106 , 132 (113 $\pm$ 16.6)	5 , 7 , 11 (8 $\pm$ 3.1)		21 , 21 , 25 (22 $\pm$ 2.3)	12 , 16 , 20 (16 $\pm$ 4.0)
39.1	104 , 111 , 121 (112 $\pm$ 8.5)	10 , 10 , 11 (10 $\pm$ 0.6)	21 , 23 , 34 (26 $\pm$ 7.0)	21 , 26 , 34 (27 $\pm$ 6.6)	11 , 19 , 20 (17 $\pm$ 4.9)
78.1##	104 , 113 , 120 (112 $\pm$ 8.0)	3 , 6 , 8 (6 $\pm$ 2.5)	26 , 33 , 38 (32 $\pm$ 6.0)	25 , 27 , 32 (28 $\pm$ 3.6)	16 , 18 , 25 (20 $\pm$ 4.7)
156.3##	114 , 115 , 118 (116 $\pm$ 2.1)	6 , 8 , 9 (8 $\pm$ 1.5)	22 , 30 , 30 (27 $\pm$ 4.6)	20 , 26 , 28 (25 $\pm$ 4.2)	3 , 17 , 18 (13 $\pm$ 8.4)
312.5##	97* , 112* , 112* (107 $\pm$ 8.7)	6* , 6* , 7* (6 $\pm$ 0.6)	21 , 31 , 35 (29 $\pm$ 7.2)	20* , 22* , 37* (26 $\pm$ 9.3)	7* , 13* , 13* (11 $\pm$ 3.5)
625##			28 , 29 , 34 (30 $\pm$ 3.2)		
1250##			31* , 33* , 38* (34 $\pm$ 3.6)		
Positive control					
Name	2AA				
Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2
Number of colonies/plate	898 , 944 , 958 (933 $\pm$ 31.4)	347 , 350 , 419 (372 $\pm$ 40.7)	769 , 790 , 795 (785 $\pm$ 13.8)	431 , 450 , 475 (452 $\pm$ 22.1)	115 , 141 , 141 (132 $\pm$ 15.0)

Negative control : Dimethylsulfoxide.

2AA : 2-Aminoanthracene.

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

* : Bacterial growth inhibition was observed.

: White fine precipitations were observed on the surface of agar plate.

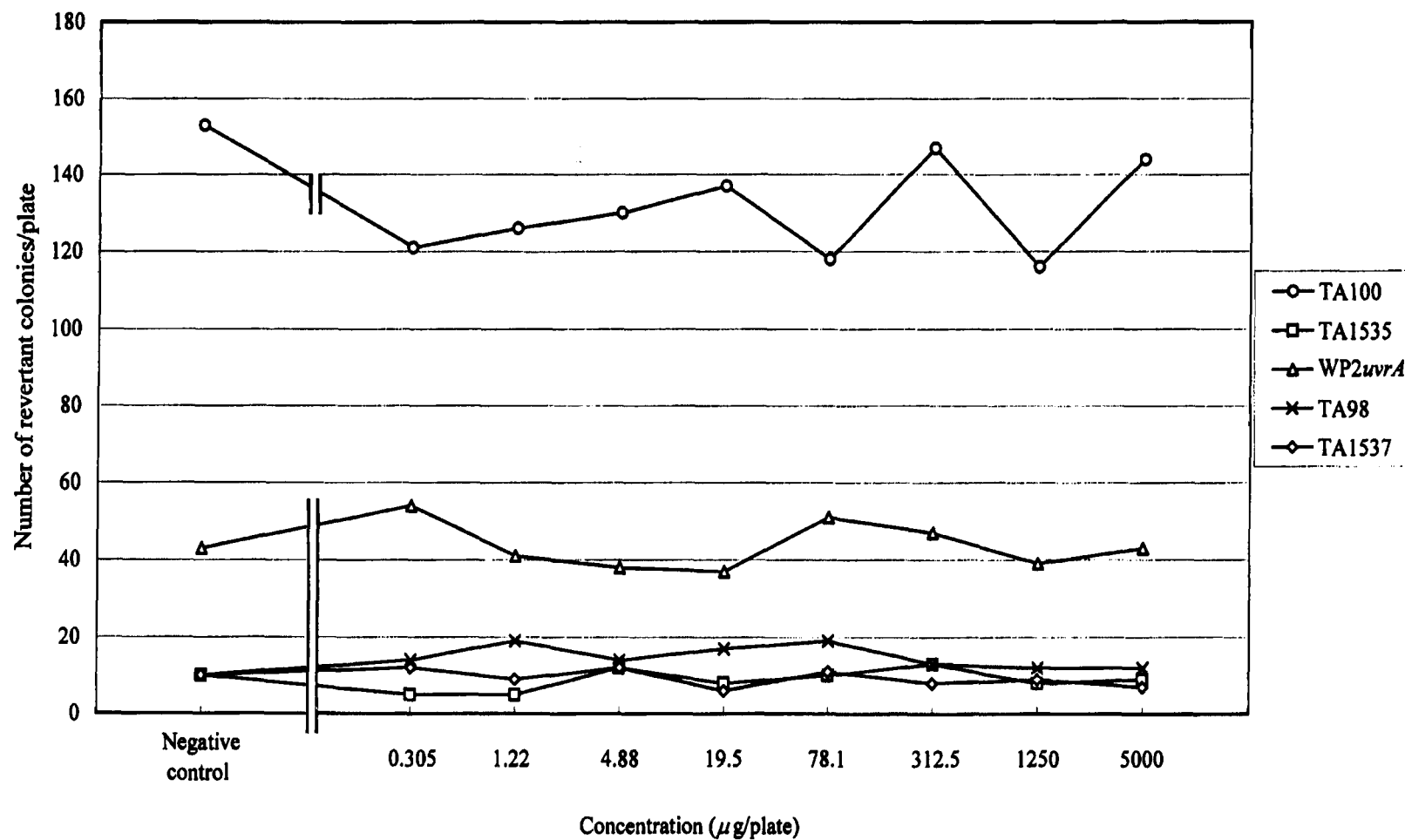


Figure 1-1. Reverse mutation test of bumetrizole in bacteria (dose-finding test: -S9 mix).

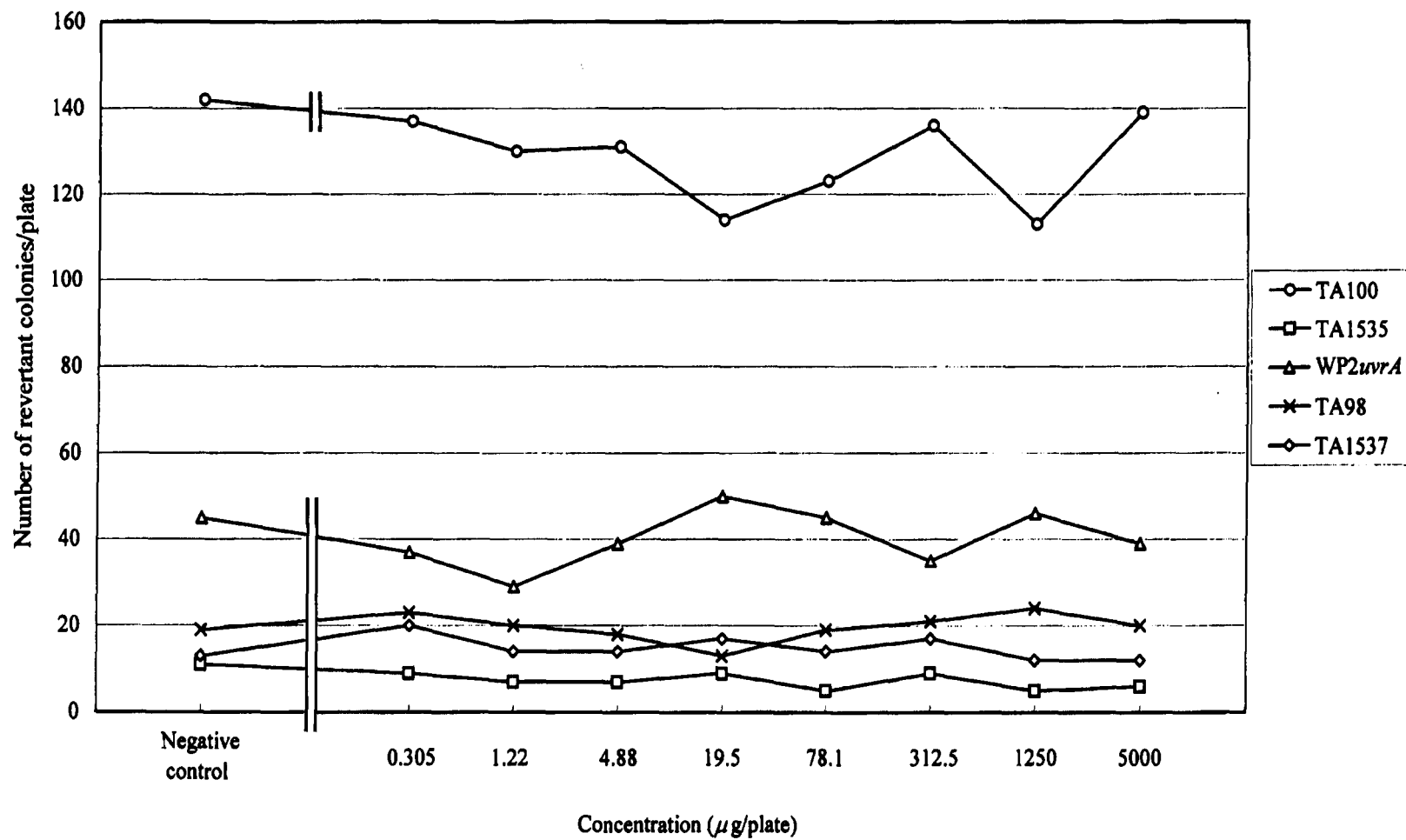


Figure 1-2. Reverse mutation test of bumetrizole in bacteria (dose-finding test: +S9 mix).

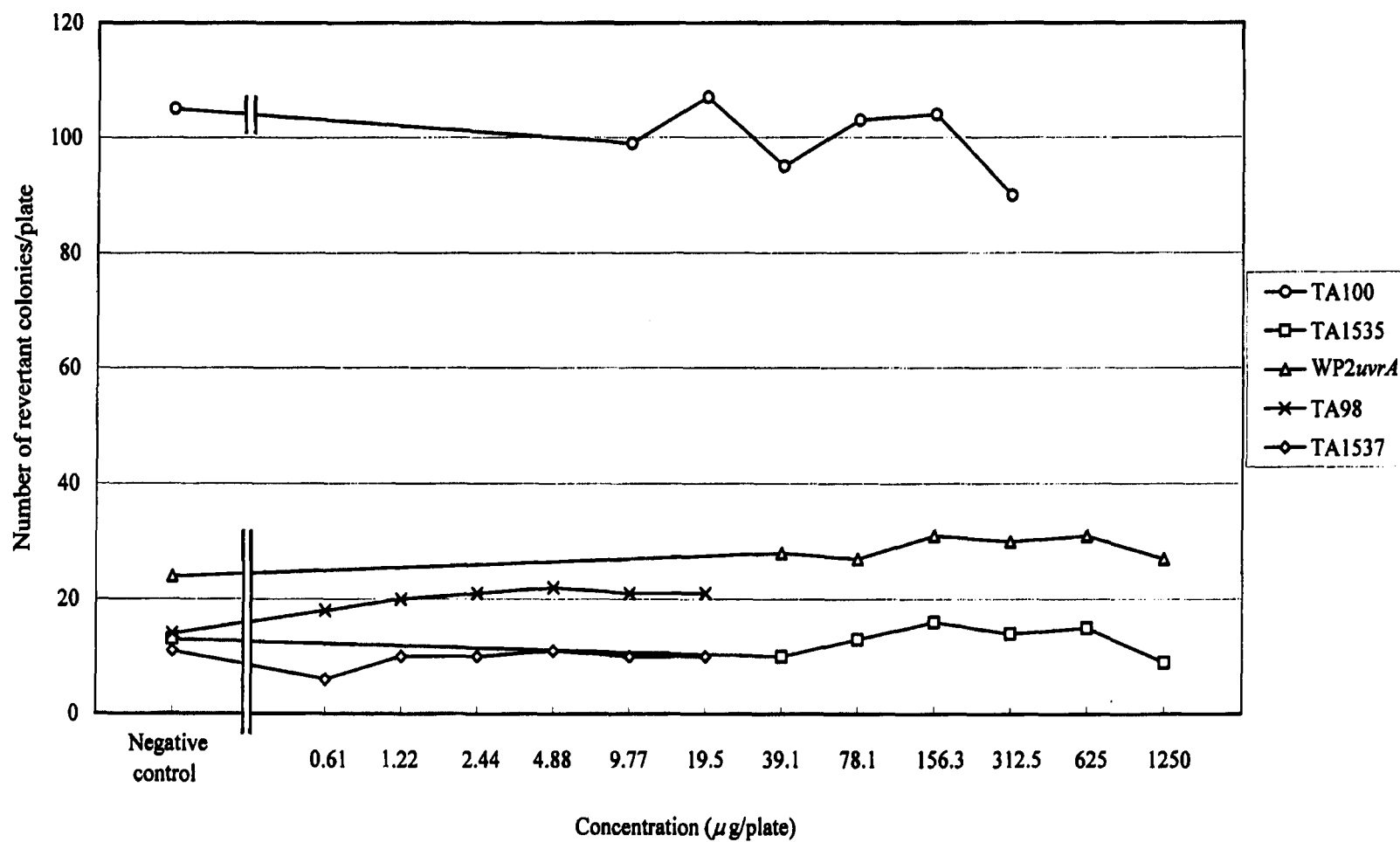


Figure 2-1. Reverse mutation test of bumetrizole in bacteria (mutagenicity test I: -S9 mix).

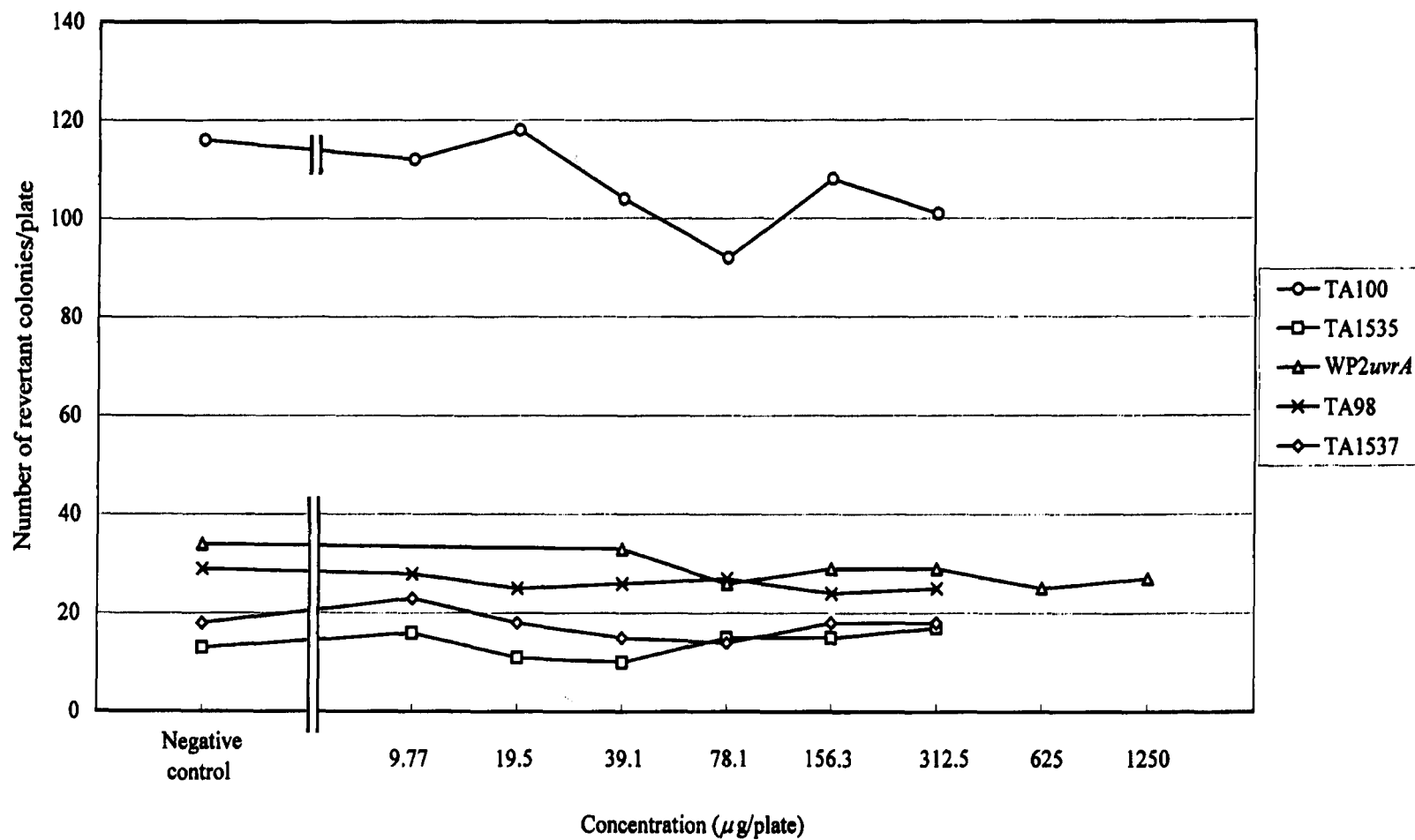


Figure 2-2. Reverse mutation test of bumetizole in bacteria (mutagenicity test I: +S9 mix).

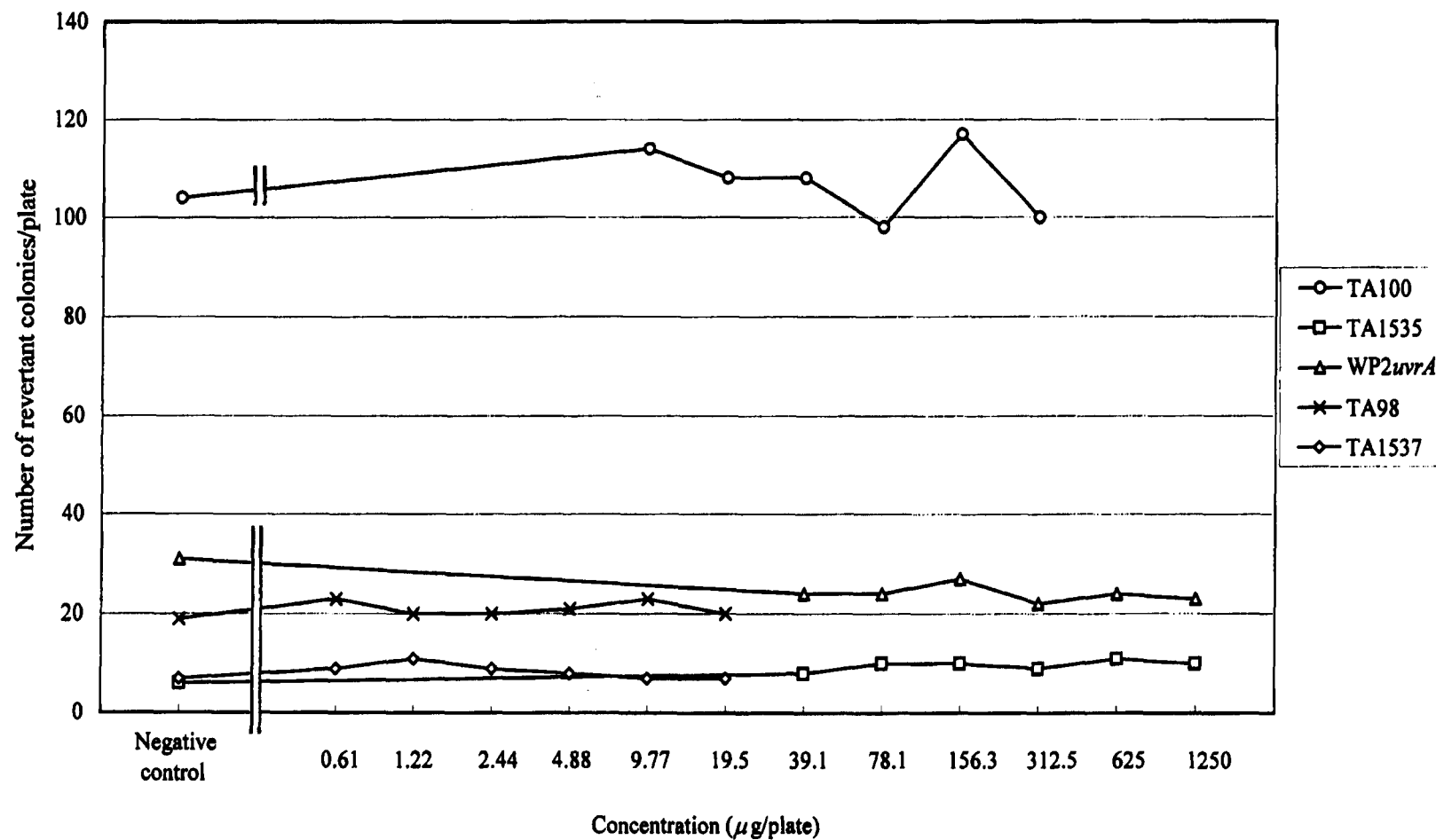


Figure 3-1. Reverse mutation test of bumetizole in bacteria (mutagenicity test II: -S9 mix).

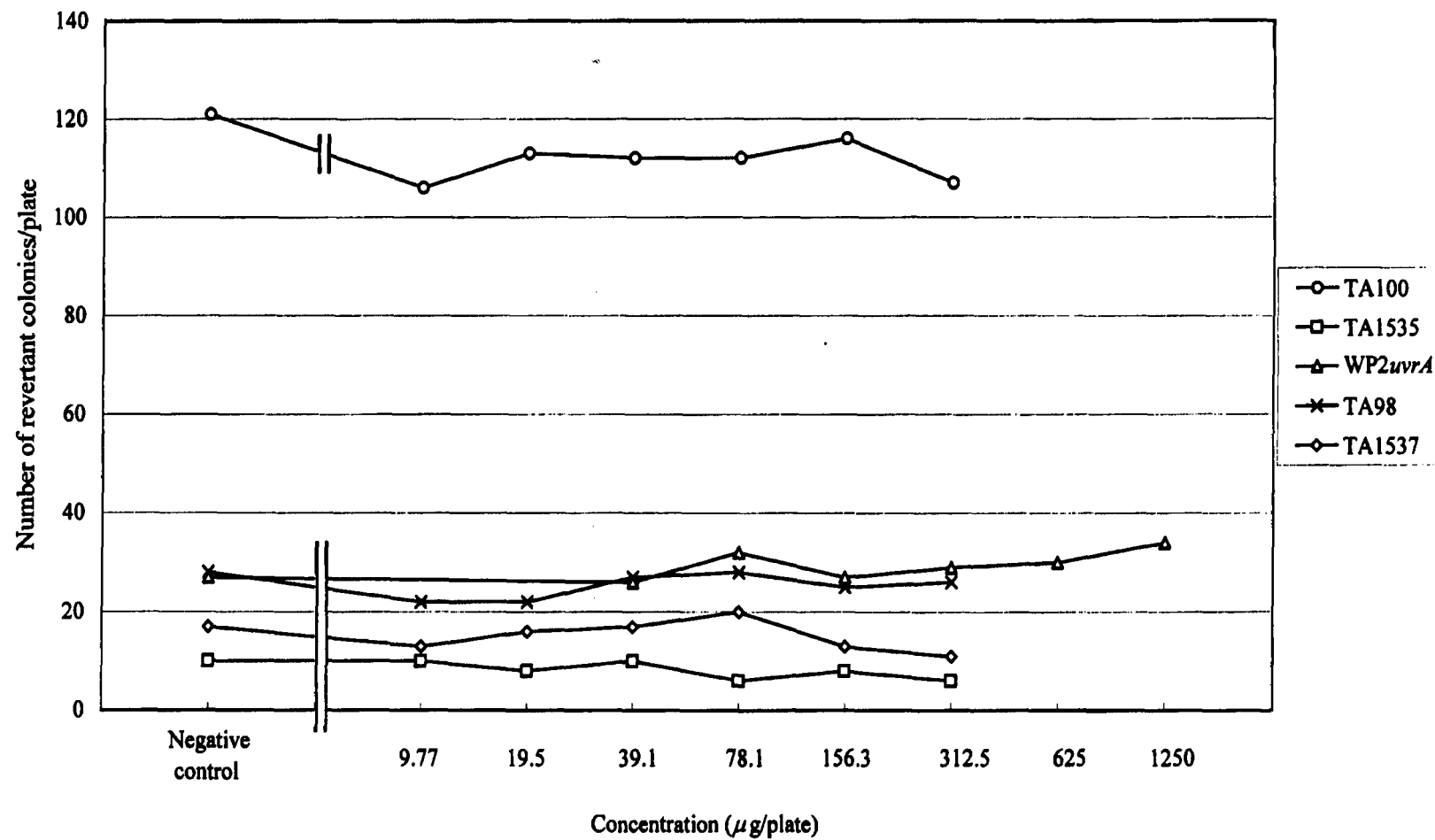


Figure 3-2. Reverse mutation test of bumetrizole in bacteria (mutagenicity test II: +S9 mix).

アミノ酸要求性検査

ー ニュートリエントブロス培養液の有無による復帰コロニー数の変化 ー

アミノ酸要求性検査を以下の方法により実施し、復帰コロニー数の変化を検討した。

1. 前培養液（ニュートリエントブロス培養液）を洗浄し、菌を生理食塩液に懸濁して、その菌懸濁液をプレートに播き広げ 48 時間培養した。

ニュートリエントブロス培養液：無し

2. 前培養液の洗浄をせず、菌懸濁液をプレートに播き広げ 48 時間培養した。

ニュートリエントブロス培養液：有り

項目 \ 菌株名		<i>S.typhimurium</i>				<i>E.coli</i>
		TA100	TA98	TA1535	TA1537	WP2uvrA
アミノ酸要求性	His ⁻	0 1	0 1	0 2	0 1	0 3
	Trp ⁻					

表 1. 「ニュートリエントブロス培養液：無し」における復帰コロニー数

項目 \ 菌株名		<i>S.typhimurium</i>				<i>E.coli</i>
		TA100	TA98	TA1535	TA1537	WP2uvrA
アミノ酸要求性	His ⁻	37 45	5 5	2 2	0 3	5 6
	Trp ⁻					

表 2. 「ニュートリエントブロス培養液：有り」における復帰コロニー数

結果

検査結果を表 1.および表 2.に示した。ニュートリエントブロス培養液を洗浄して培養を行った結果、復帰コロニーはほとんど認められなかった。ニュートリエントブロス培養液を洗浄しないで培養を行った場合では、復帰コロニー数の増加がみられ、ニュートリエントブロス培養液中のアミノ酸により形成されたものと考えられた。