

# 最終報告書

塩基性炭酸ニッケル（Ⅱ）の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：7822（115-187）

平成17年5月11日

試験委託者

厚生労働省 医薬食品局

財団法人 食品農医薬品安全性評価センター

目 次

1. 要約.....	4
2. 表題.....	5
3. 試験目的.....	5
12. 被験物質.....	7
13. 試験材料および方法.....	9
14. 試験結果.....	17
15. 考察および結論.....	19
16. 参考文献.....	20

Figures

Figure 1	Dose-finding study of nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate in strain TA100 .....	23
Figure 2	Dose-finding study of nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate in strain TA1535 .....	24
Figure 3	Dose-finding study of nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate in strain WP2 <i>uvrA</i> .....	25
Figure 4	Dose-finding study of nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate in strain TA98 .....	26
Figure 5	Dose-finding study of nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate in strain TA1537 .....	27

Figure 6	Bacterial reverse mutation test of nickel ( II ) carbonate hydroxide tetrahydrate in strain TA100 .....	28
Figure 7	Bacterial reverse mutation test of nickel ( II ) carbonate hydroxide tetrahydrate in strain TA1535 .....	29
Figure 8	Bacterial reverse mutation test of nickel ( II ) carbonate hydroxide tetrahydrate in strain WP2 <i>uvrA</i> .....	30
Figure 9	Bacterial reverse mutation test of nickel ( II ) carbonate hydroxide tetrahydrate in strain TA98 .....	31
Figure 10	Bacterial reverse mutation test of nickel ( II ) carbonate hydroxide tetrahydrate in strain TA1537 .....	32
Figure 11	Confirmative examination of nickel ( II ) carbonate hydroxide tetrahydrate in strain TA1535 .....	33
Tables		
Table 1	Summary data on dose-finding study of nickel ( II ) carbonate hydroxide tetrahydrate [Non-activation method: -S9].....	34
Table 2	Summary data on dose-finding study of nickel ( II ) carbonate hydroxide tetrahydrate [Activation method: +S9].....	35
Table 3	Results on bacterial reverse mutation test of nickel ( II ) carbonate hydroxide tetrahydrate [Non-activation method: -S9].....	36
Table 4	Results on bacterial reverse mutation test of nickel ( II ) carbonate hydroxide tetrahydrate [Activation method: +S9].....	37
Table 5	Results on bacterial reverse mutation test of nickel ( II ) carbonate hydroxide tetrahydrate (confirmative examination) [Activation method: +S9].....	38

## 1. 要約

当該試験条件下において、塩基性炭酸ニッケル(Ⅱ)には遺伝子突然変異を誘起する作用がないものと判断した。

塩基性炭酸ニッケル(Ⅱ)の変異原性について、遺伝子突然変異誘発性を検討するため、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100, TA98, TA1535 および TA1537 株ならびに大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2uvrA 株を用いた復帰突然変異試験を行った。

その結果、塩基性炭酸ニッケル(Ⅱ)処理では、TA1535 の代謝活性化系存在下を除き、8.19~5000 µg/プレート of いずれの用量においても、ラット肝ミクロソーム (S9) 添加の有無にかかわらず、陰性対照の2倍以上の増加は認められなかった。なお、TA1535 株の代謝活性化系存在下では、用量設定試験では復帰変異コロニー数の増加は認められなかったが、復帰突然変異試験において復帰変異コロニー数が陰性対照の2倍以上に増加した。したがって、復帰突然変異試験(確認試験)を実施したが、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

一方、陽性対照物質は、各試験菌株に対し明確な突然変異誘発作用を示した。

また、用量設定試験ならびに復帰突然変異試験あるいは確認試験により、試験結果の再現性が確認された。

12. 被験物質

12.1. 被験物質名

塩基性炭酸ニッケル (II) (英名 : Nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate)

12.2. ロット番号

12.3. 含量

94.7%

本被験物質 (分子量 376.18) 中の Ni (原子量 58.69) の含量は理論値では 46.8% (58.69 × 3 / 376.18) であるが, 本ロットの Ni 含量測定結果は 44.3%であったため, 94.7% (44.3 / 46.8) とした.

12.4. 製造元

12.5. 保存条件

室温・密閉

12.6. 保存場所

安評センター被験物質保管庫 (C-3)

12.7. CAS No.

39430-27-8

12.8. 化学名

Nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate

12.9. 分子式

$\text{NiCO}_3 \cdot 2\text{Ni}(\text{OH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

12.10. 分子量

376.18

304.11 (無水物)

12.11. 物質の状態

うすい緑の粉末

12.12. 溶解性

二酸化炭素を含む水に不溶, 酸に可溶

**12.13. 取り扱い上の注意**

吸い込んだり、目、皮膚および衣類に触れないように適切な保護具を着用した。屋内作業における取り扱い場所では、局所排気装置を使用した。

**12.14. 残余被験物質の処理**

被験物質の一部（2g）を保存した後、残りは廃棄処分した。

**12.15. 安定性**

他の試験機関（食品薬品安全センター秦野研究所）にて保管されていた同一ロットの被験物質について実施した品質分析の結果（平成17年1月15日付報告）、安定性に関して問題はなかった。

### 13. 試験材料および方法

#### 13.1. 試験菌株

細菌を用いる復帰突然変異試験において広く使用されていることから、試験菌株として次の5種類の菌株を使用した。

ネズミチフス菌	TA100	(ヒスチジン要求性の塩基対置換型)
ネズミチフス菌	TA98	(ヒスチジン要求性のフレームシフト型)
ネズミチフス菌	TA1535	(ヒスチジン要求性の塩基対置換型)
ネズミチフス菌	TA1537	(ヒスチジン要求性のフレームシフト型)
大腸菌	WP2 <i>uvrA</i>	(トリプトファン要求性の塩基対置換型)

ネズミチフス菌は昭和58年9月9日にカリフォルニア大学 から、  
また、大腸菌については昭和58年3月16日に国立衛生試験所(現 国立医薬品食品衛生研究所) から分与を受けた。

平成15年9月16日～同年9月19日【用量設定試験および復帰突然変異試験】ならびに平成16年9月6日～同年9月9日【確認試験】に菌株の特性検査を実施し、規定の特性を保持している菌株を試験に使用した。各菌株の菌懸濁液にジメチルスルホキシド(DMSO:GC用;純度99.9%;Lot No. K30049278;Merck)を容量比80:7の割合で添加した後、凍結保存用チューブに0.2 mLずつ分注した。これを液体窒素を用いて凍結した後、超低温フリーザー(MDF-U71V:三洋電機バイオメディカ;設定温度-80°C)に保存した。

#### 13.2. 培地の調製

##### 13.2.1. 最少グルコース寒天平板培地(プレート)

テスメディア AN 培地(平成16年6月15日製造, Lot No. AN1540FT;オリエンタル酵母工業)を試験に使用した。本プレートは, Vogel-Bonner 最少培地 E を含む溶液 30 mL を無菌的にシャーレに分注したものである。

最少グルコース寒天平板培地の組成を以下に示した.

硫酸マグネシウム・7水塩	0.2	g
クエン酸・1水塩	2	g
リン酸二カリウム・無水塩	10	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
グルコース	20	g
寒天 (BA-30A : Lot No. 40127 ; 伊那食品工業)	11.0	g
精製水	1000	mL

### 13.2.2. トップアガー

塩化ナトリウム 0.5 w/v%および寒天 (Bacto-agar : Lot No. 3069265 ; BD Diagnostic Systems) 0.6 w/v%を含む水溶液をオートクレーブで滅菌した. ネズミチフス菌を用いる試験の場合, 0.5 mmol/L L-ヒスチジン (Lot No. 308C2055 ; 関東化学) および 0.5 mmol/L D-ビオチン (Lot No. 301C2275 ; 関東化学) 水溶液を寒天溶液 10 容量に対し 1 容量加え, 大腸菌を用いる試験の場合, 0.5 mmol/L L-トリプトファン (Lot No. 008D2026 ; 関東化学) 水溶液を同じく 1 容量加えた.

### 13.3. 試験菌株の前培養

内容量 200 mL のバツフル付三角フラスコに 2.5 w/v%ニュートリエントブロス (Nutrient Broth No. 2 : Lot No. 298714 ; Oxoid) 培養液を 25 mL 分注し, これに融解した菌懸濁液を 50  $\mu$ L 接種した. フラスコをクールバスシェーカー (ML-10F : タイテック) に設置し, 約 4°C に保存した. その後, 設定温度 37°C で 8 時間振盪 (100 回/分) 培養した. 試験毎に菌株の培養を実施し, 菌懸濁液は培養終了後速やかに使用した.

ATP フォトメーター (ルミテスター-K-100 ; キッコーマン) を用いて計測した生菌数を次の表に示した.

試験	生菌数 ( $\times 10^9$ /mL)				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
用量設定試験	2.06	3.14	3.32	2.51	1.07
復帰突然変異試験	2.51	3.12	3.21	3.38	1.09
確認試験	—	3.26	—	—	—



13.4. S9 mix

製造後6ヵ月以内のS9 mix (Lot No. FSM-505【用量設定試験および復帰突然変異試験】)ならびにFSM-503【確認試験】;キッコーマン)を試験に使用した。使用時まで超低温フリーザー(設定温度-80°C)に保存した。

13.4.1. S9の調製方法

S9調製の際の動物種、性、臓器、誘導物質ならびに誘導方法を以下に示した。

試験	用量設定試験および 復帰突然変異試験	確認試験
ロット番号	RAA-505	RAA-503
製造年月日	平成16年7月2日	平成16年5月21日
	(誘導物質投与開始後5日目)	
使用動物	ラット: Sprague-Dawley系	
性/週齢	雄/7週齢	
体重	204~239 g	209~236 g
臓器	肝臓	
誘導物質	Phenobarbital (PB) および 5,6-Benzoflavone (BF)	
投与量および 投与回数	PB: 30 mg/kg 1回(1日目) 60 mg/kg 3回(2~4日目) BF: 80 mg/kg 1回(3日目)	
投与方法	腹腔内投与	
蛋白含量	27.04 mg/mL	28.85 mg/mL

13.4.2. S9 mixの組成

S9 mix 1 mL中の量を以下に示した。

S9	0.1	mL
MgCl <sub>2</sub>	8	μmol
KCl	33	μmol
G-6-P	5	μmol
NADPH	4	μmol
NADH	4	μmol
Na-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100	μmol

### 13.5. 被験物質液の調製

本被験物質は水、DMSO ともに不溶ではあるが、水に良好に懸濁することから、被験物質を注射用水（日本薬局方注射用水：Lot No. K4D88；大塚製薬工場）に懸濁し、調製原液とした。本被験物質は秤量の際、純度換算および無水物換算を実施し、その換算係数は 1.306 とした。なお、換算係数は以下の式で求めた。

$$\frac{\text{塩基性炭酸ニッケル (II) の分子量}}{\text{塩基性炭酸ニッケル (II) 無水物の分子量} \times 0.947} = \frac{376.18}{304.11 \times 0.947} = 1.306$$

用量設定試験では、使用直前に調製原液 (50.0 mg/mL 液) を準備した。この 50.0 mg/mL 調製原液を使用溶媒で順次希釈し、20.0, 8.00, 3.20, 1.28, 0.512, 0.205 および 0.0819 mg/mL 液を調製した。調製後、速やかに処理を行った。

復帰突然変異試験では、使用直前に調製原液 (50.0 mg/mL 液) を準備した。この 50.0 mg/mL 調製原液を使用溶媒で順次希釈し、25.0, 12.5, 6.25, 3.13 および 1.56 mg/mL 液を調製した。調製後、速やかに処理を行った。

復帰突然変異試験（確認試験）では、使用直前に調製原液 (50.0 mg/mL 液) を準備した。この 50.0 mg/mL 調製原液を使用溶媒で順次希釈し、25.0, 12.5, 6.25, 3.13 および 1.56 mg/mL 液を調製した。調製後、速やかに処理を行った。

### 13.6. 対照群

#### 13.6.1. 陰性（溶媒）対照

使用溶媒の注射用水で試験した。

#### 13.6.2. 陽性対照

調製済み陽性対照物質溶液（オリエンタル酵母工業）を試験に使用した。陽性対照物質名および用量を以下に示した。

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

《代謝活性化系非存在下：-S9 処理》

菌株	化合物名	調製日	用量 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	陽性対照 溶液濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	ロット番号
ネズミチフス菌 TA100	AF-2	2003.4.11	0.01	0.1	030411AF01
ネズミチフス菌 TA98	AF-2	2003.4.11	0.1	1.0	030411AF10
ネズミチフス菌 TA1535	$\text{NaN}_3$	2003.4.10	0.5	5.0	030410N
ネズミチフス菌 TA1537	9-AA	2003.4.11	80	800	030411A9
大腸菌 WP2 <i>invA</i>	AF-2	2003.4.11	0.01	0.1	030411AF01

《代謝活性化系存在下：+S9 処理》

ネズミチフス菌 TA100	2-AA	2003.4.10	1.0	10	030410A210
ネズミチフス菌 TA98	2-AA	2003.4.10	0.5	5.0	030410A205
ネズミチフス菌 TA1535	2-AA	2003.4.10	2.0	20	030410A220
ネズミチフス菌 TA1537	2-AA	2003.4.10	2.0	20	030410A220
大腸菌 WP2 <i>invA</i>	2-AA	2003.4.10	10	100	030410A2100

なお、これらの用量は「安衛法における変異原性試験—テストガイドラインと GLP」(旧労働省安全衛生部化学物質調査課編, 平成3年) に準じて設定した。

13.6.3. 無菌試験

被験物質液(調製原液)ならびに S9 mix については無菌試験を実施した。すなわち、調製原液 100  $\mu\text{L}$  あるいは S9 mix 500  $\mu\text{L}$  にトップアガーを 2 mL 添加し、プレート上に注いだ。37°C の条件で 48 時間培養した後、雑菌汚染の有無を確認した。

調製原液および S9 mix のいずれについても 2 枚のプレートを用いて無菌試験を実施した。

塩基性炭酸ニッケル(II) 調製原液ならびに S9 mix の無菌試験において、菌の増殖は認められなかった。

13.7. 用量設定試験(予備試験)

13.7.1. 用量

ガイドライン上定められた最高用量である 5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  を最高用量とし、以下 2000, 800, 320, 128, 51.2, 20.5 および 8.19  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の計 8 用量を設定した。

13.7.2. 使用プレート数および識別方法

用量当たり 3 枚のプレートを用いた。

試験菌株, S9 mix の有無および用量を明記することにより各プレートを識別した。

13.7.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

試験管に使用溶媒, 被験物質液あるいは陽性対照物質溶液を 100  $\mu$ L, 次いで代謝活性化系非存在下 (-S9 処理) の場合, 0.1 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液 (pH 7.4) を 500  $\mu$ L, 代謝活性化系存在下 (+S9 処理) の場合, S9 mix を 500  $\mu$ L 分注した。さらに前培養した試験菌株懸濁液 100  $\mu$ L を加えた後, ウォーターバスシェーカー (M-100<sup>N</sup>: タイテック) を用いて設定温度 37°C で 20 分間振盪 (120 回/分; プレインキュベーション) した。振盪終了後, トップアガー 2 mL を添加し, 内容物を混合した。その後, 混合液をプレート上に注ぎ一様に広げた。恒温器 (SSV-R11DA: 池田理化) を用い, 各プレートを 37°C の条件で 48 時間培養した。

13.7.4. 析出等の観察

各処理法において, 処理開始およびコロニー数計測時に析出等の有無を肉眼で観察した。

13.7.5. コロニー数計測

被験物質の生育阻害作用を確認するため, プレート上の試験菌株 (背景菌) の生育状態について実体顕微鏡 ( $\times 40$ ) を用いて観察した。次いで, 復帰突然変異により生じたコロニー数を計数した。計測に際しては, コロニーアナライザー (CA-11: システムサイエンス) を用い, 面積補正ならびに数え落とし補正を実施してコロニー数を算出した。

13.8. 復帰突然変異試験 (本試験)

13.8.1. 用量

用量設定試験の結果, 代謝活性化系非存在下 (-S9 処理) の WP2<sub>uvrA</sub> 株において, 5000  $\mu$ g/プレートで生育阻害作用が認められた。その他においては試験菌株に対する生育阻害作用は認められなかった。また, 全ての菌株において変異原性は認められなかった。したがって, 復帰突然変異試験においては, 5000  $\mu$ g/プレートを最高用量として, 次の表に示した用量 (6 用量) を設定した。

《代謝活性化系非存在下：-S9 処理》

菌株	用量 (μg/プレート)					
TA100	156	313	625	1250	2500	5000
TA1535	156	313	625	1250	2500	5000
WP2 <i>uvrA</i>	156	313	625	1250	2500	5000
TA98	156	313	625	1250	2500	5000
TA1537	156	313	625	1250	2500	5000

《代謝活性化系存在下：+S9 処理》

菌株	用量 (μg/プレート)					
TA100	156	313	625	1250	2500	5000
TA1535	156	313	625	1250	2500	5000
WP2 <i>uvrA</i>	156	313	625	1250	2500	5000
TA98	156	313	625	1250	2500	5000
TA1537	156	313	625	1250	2500	5000

13.8.2. 使用プレート数および識別方法

13.7.2.に記載した方法に準じた。

13.8.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

13.7.3.に記載した方法に準じた。

13.8.4. 析出等の観察

13.7.4.に記載した方法に準じた。

13.8.5. コロニー数計測

13.7.5.に記載した方法に準じた。

13.9. 復帰突然変異試験（確認試験）

本試験の結果、+S9 処理 TA1535 株の 1250 μg/プレートでのみ復帰変異コロニー数が陰性対照の 2 倍以上に増加した。しかし、用量設定試験では増加傾向が認められなかったことから、再現性を確認するために確認試験を実施した。

13.9.1. 用量

確認試験においては、5000 μg/プレートを最高用量として、次の表に示した用量（6 用量）を設定した。なお、陰性対照および陽性対照については-S9 処理も実施した。

《代謝活性化系存在下 : +S9 処理》

菌株	用量 (µg/プレート)					
	156	313	625	1250	2500	5000
TA1535						

13.9.2. 使用プレート数および識別方法

13.7.2.に記載した方法に準じた。

13.9.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

13.7.3.に記載した方法に準じた。ただし、プレインキュベーションはウォーターバスシェーカー (MM-10 : タイテック) を用い、プレートの培養には恒温器 (MT-62 : 池田理化) を用いた。

13.9.4. 析出等の観察

13.7.4.に記載した方法に準じた。

13.9.5. コロニー数計測

13.7.5.に記載した方法に準じた。

13.10. 結果の解析

復帰変異コロニー数が陰性対照の2倍以上に増加し、かつその増加に用量依存性あるいは再現性が認められた場合に陽性と判定した。

統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

## 14. 試験結果

### 14.1. 用量設定試験

試験結果を Figure 1~5 および Table 1, 2 に示した.

塩基性炭酸ニッケル (II) 処理での復帰変異コロニー数は, -S9 処理および+S9 処理のいずれの試験菌株においても増加は認められなかった. また, -S9 処理 WP2*uvrA* 株の 5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ において試験菌株に対する生育阻害作用が認められた. その他においては生育阻害作用は認められなかった.

一方, 陽性対照物質は, 各試験菌株に対して陰性対照の 2 倍以上の復帰変異コロニーを誘発した.

### 14.2. 被験物質の析出等 (用量設定試験)

処理開始時, 両処理法の 128~5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で, うすい緑色の被験物質の残存物が認められた. コロニー数計測時においては, いずれの用量でも析出等の変化は観察されなかった.

### 14.3. 復帰突然変異試験

試験結果を Figure 6~10 および Table 3, 4 に示した.

塩基性炭酸ニッケル (II) 処理での復帰変異コロニー数は, +S9 処理の TA1535 株の 1250  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ においてのみ陰性対照の 2 倍を超える僅かな増加が認められたが, その他においては増加が認められなかった. また, -S9 処理 TA100 および WP2*uvrA* 株の 5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ において試験菌株に対する生育阻害作用が認められた.

一方, 陽性対照物質は, 各試験菌株に対して復帰突然変異を顕著に誘発した.

### 14.4. 被験物質の析出等 (復帰突然変異試験)

処理開始時, 両処理法の 156~5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で, うすい緑色の被験物質の残存物が認められた. コロニー数計測時においては, いずれの用量でも析出等の変化は観察されなかった.

### 14.5. 復帰突然変異試験 (確認試験)

試験結果を Figure 11 および Table 5 に示した.

塩基性炭酸ニッケル (II) 処理での復帰変異コロニー数については, 増加は認められなかった. また, 試験菌株に対する生育阻害作用は認められなかった.

一方, 陽性対照物質は, 各試験菌株に対して復帰突然変異を顕著に誘発した.

14.6. 被験物質の析出等（復帰突然変異試験（確認試験））

処理開始時, 156~5000 µg/プレートで, うすい緑色の被験物質の残存物が認められた。コロニー数計測時においては, いずれの用量でも析出等の変化は観察されなかった。

以上, 用量設定試験ならびに復帰突然変異試験あるいは確認試験において, 代謝活性化系非存在下および代謝活性化系存在下の両処理法において再現性が確認された。



## 15. 考察および結論

塩基性炭酸ニッケル(Ⅱ)の変異原性、すなわち遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため、細菌(ネズミチフス菌・大腸菌)を用いたブレインキュベーション法による復帰突然変異試験を実施した。

ガイドライン上定められた最高用量である5000 µg/プレートまで検討した結果、塩基性炭酸ニッケル(Ⅱ)処理群では、TA1535株の代謝活性化系存在下を除き、代謝活性化系非存在下および代謝活性化系存在下のいずれにおいても、陰性対照の2倍以上の増加は認められなかった。なお、TA1535株の代謝活性化系存在下では、用量設定試験では復帰変異コロニー数の増加は認められなかったが、復帰突然変異試験において復帰変異コロニー数が陰性対照の2倍以上に増加した。したがって、復帰突然変異試験(確認試験)を実施したが、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

これら両処理法での試験結果は、用量設定試験ならびに復帰突然変異試験あるいは確認試験により再現性が確認された。

また、本被験物質塩基性炭酸ニッケル(Ⅱ)の遺伝毒性についてRTECSでは、ハムスター卵巣に姉妹染色分体交換を誘発すると報告している<sup>1)</sup>が、発がん性の報告は現在までない。

また、IARCではニッケル化合物の発がん性をグループ1(ヒトに対して発がん性がある)としている<sup>1)</sup>。類縁体であるスルファミン酸ニッケル、硫酸ニッケルおよび塩化ニッケルについては、細菌を用いた復帰突然変異試験で陰性<sup>2)</sup>と報告されている。

なお、陰性対照群あるいは陽性対照群でのコロニー数の群平均値は、復帰突然変異試験の両処理法におけるTA100株の陽性対照を除き、いずれも当施設の背景データ(Appendix 1)の範囲内であった。また、復帰突然変異試験の両処理法におけるTA100株の陽性対照についても、陽性対照として十分な反応を示していることから、本試験は適切な条件で実施されたものと判断された。

以上の試験結果から、当該試験条件下において、塩基性炭酸ニッケル(Ⅱ)の細菌に対する遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

16. 参考文献

- 1) “製品安全データシート (MSDS No. JW140103)”, 和光純薬工業株式会社, 大阪, 2002.
- 2) 労働省 労働基準局 安全衛生部 化学物質調査課 監修 “労働安全衛生法 有害性調査制度に基づく 既存化学物質 変異原性試験データ集”, JETOC, 東京, 1996, p.142-147.

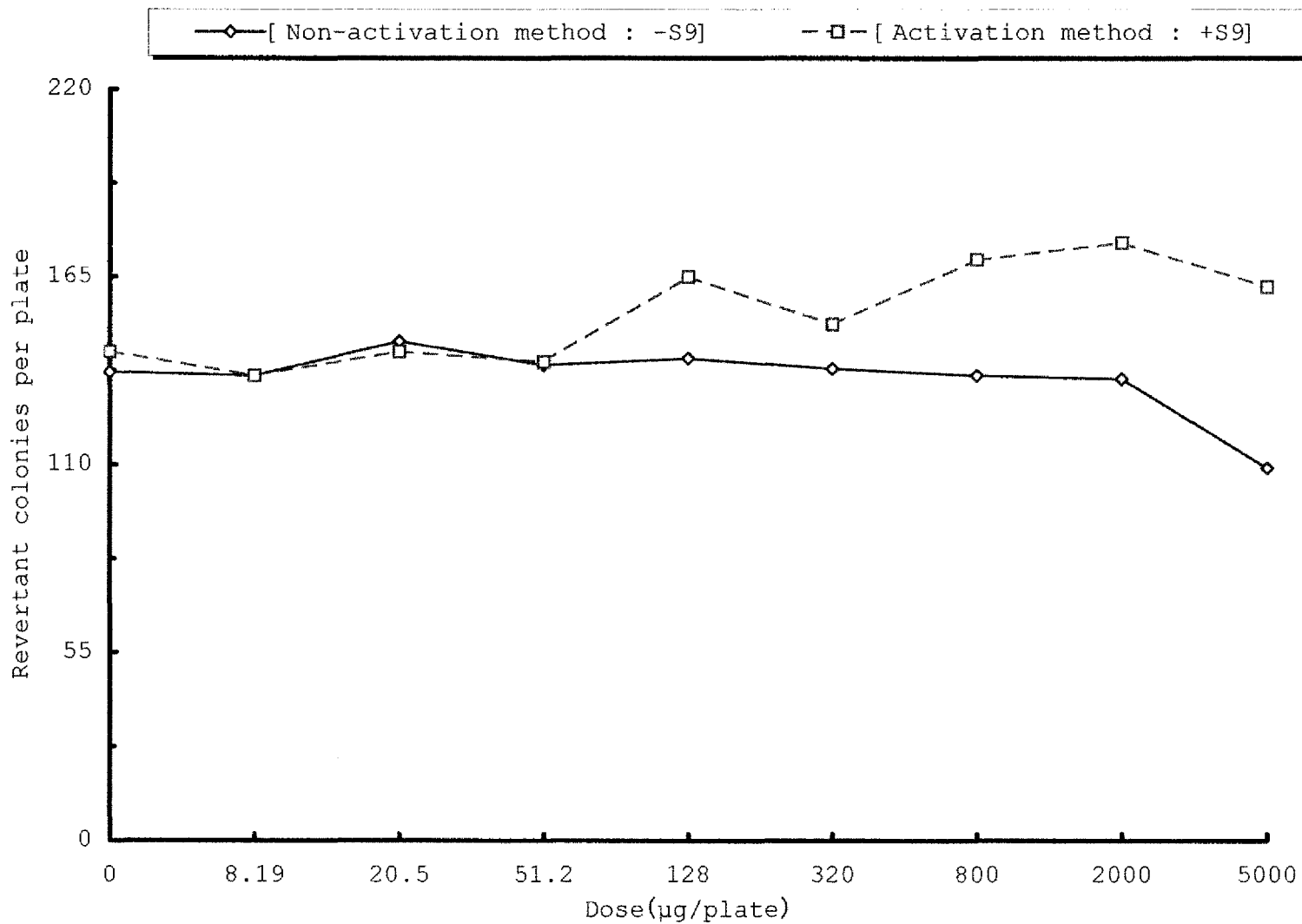
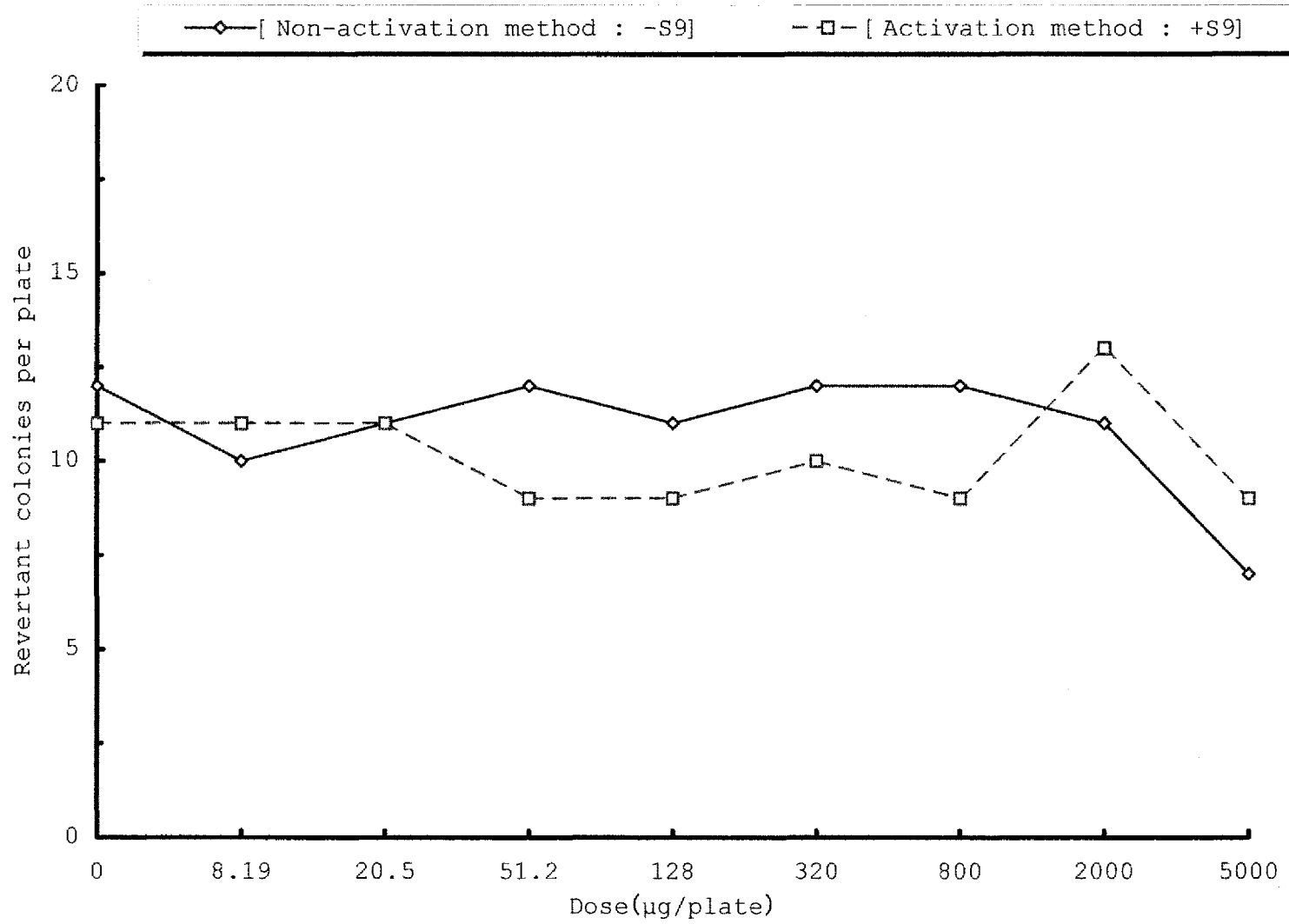
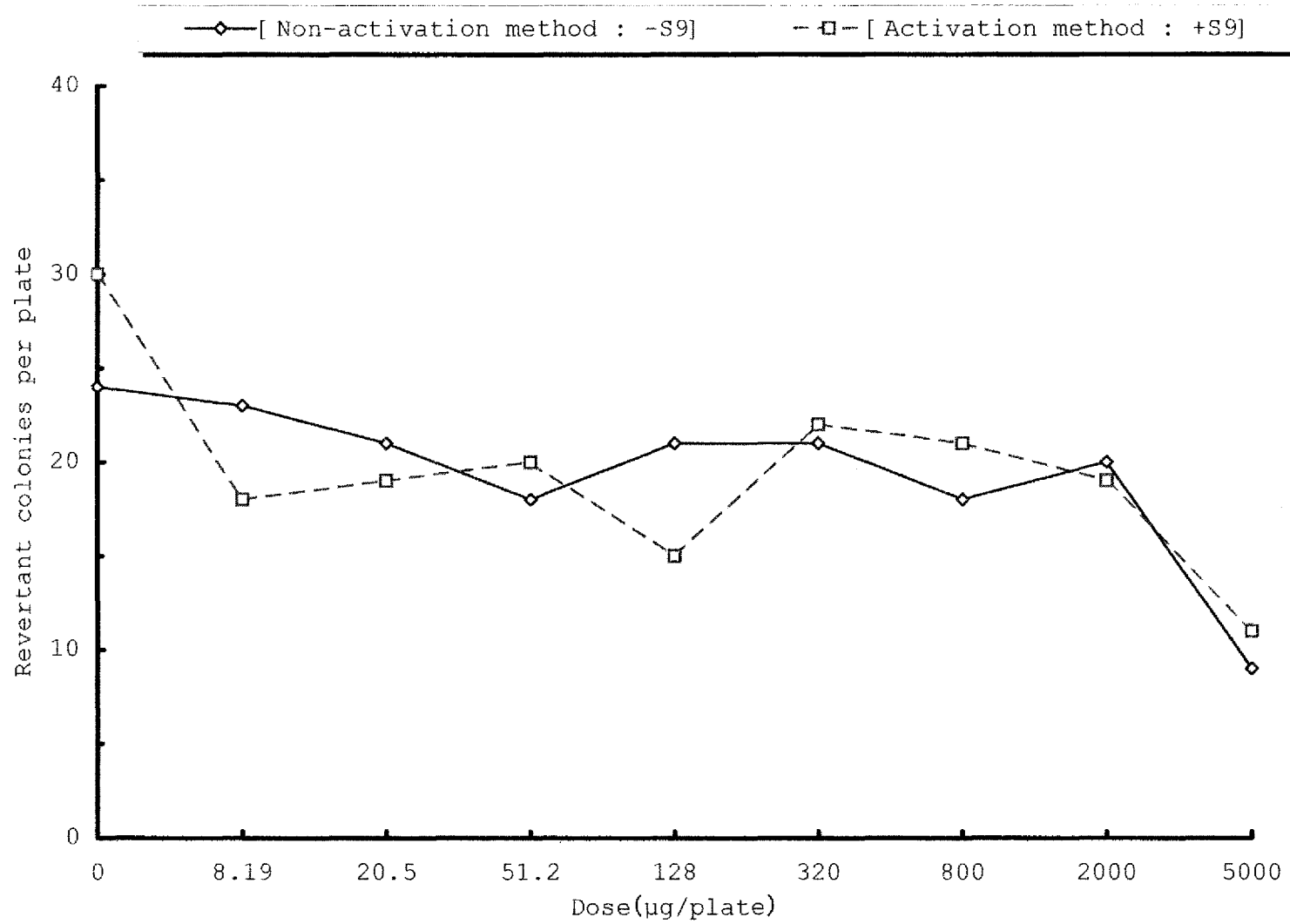


Figure 1. Dose-finding study of nickel(II) carbonate hydroxide tetrahydrate in strain TA100



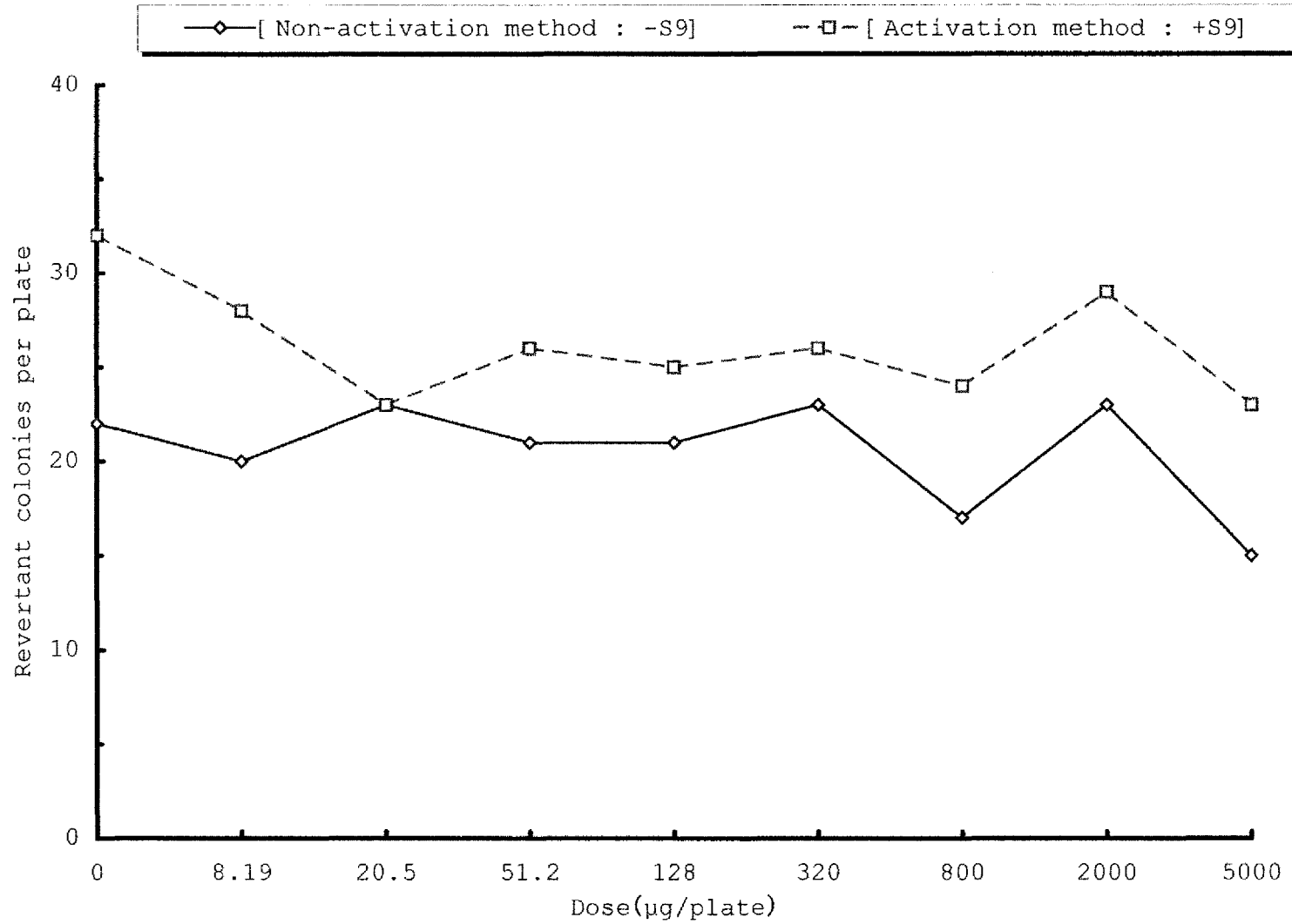
-24-

Figure 2. Dose-finding study of nickel(II) carbonate hydroxide tetrahydrate in strain TA1535



- 25 -

Figure 3. Dose-finding study of nickel(II) carbonate hydroxide tetrahydrate in strain WP2uvrA



- 26 -

Figure 4. Dose-finding study of nickel(II) carbonate hydroxide tetrahydrate in strain TA98

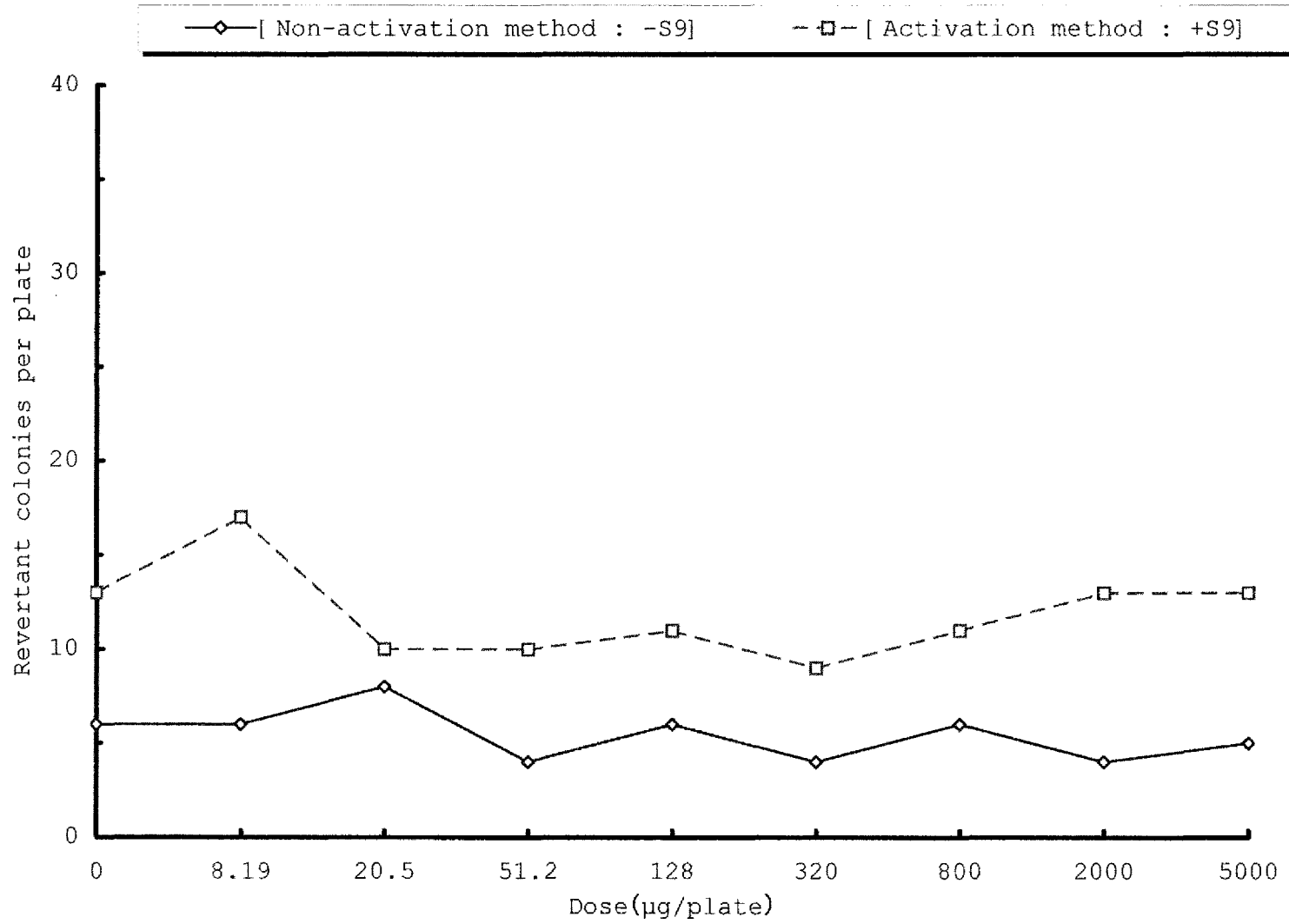


Figure 5. Dose-finding study of nickel(II) carbonate hydroxide tetrahydrate in strain TA1537

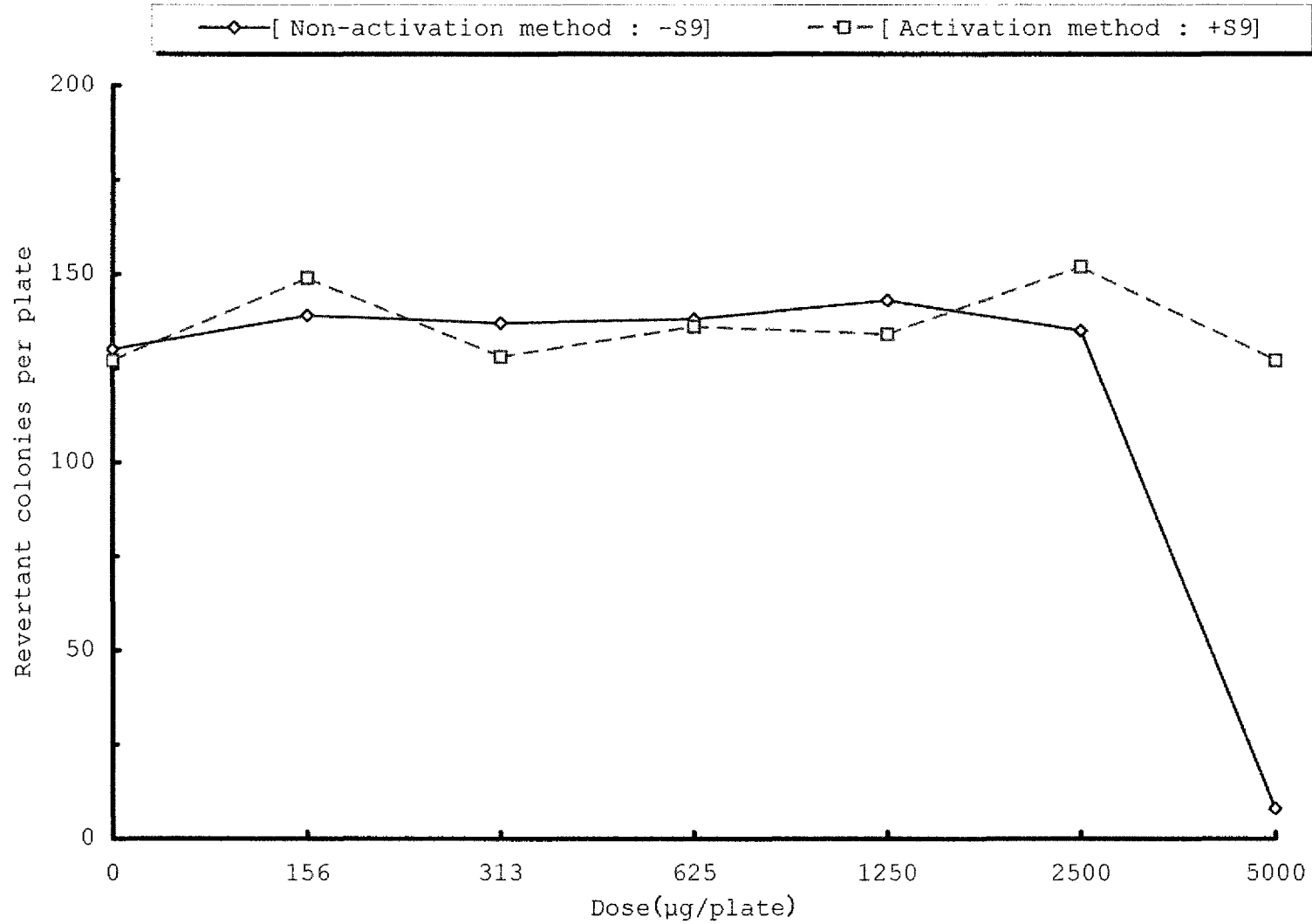


Figure 6. Bacterial reverse mutation test of nickel(II) carbonate hydroxide tetrahydrate in strain TA100



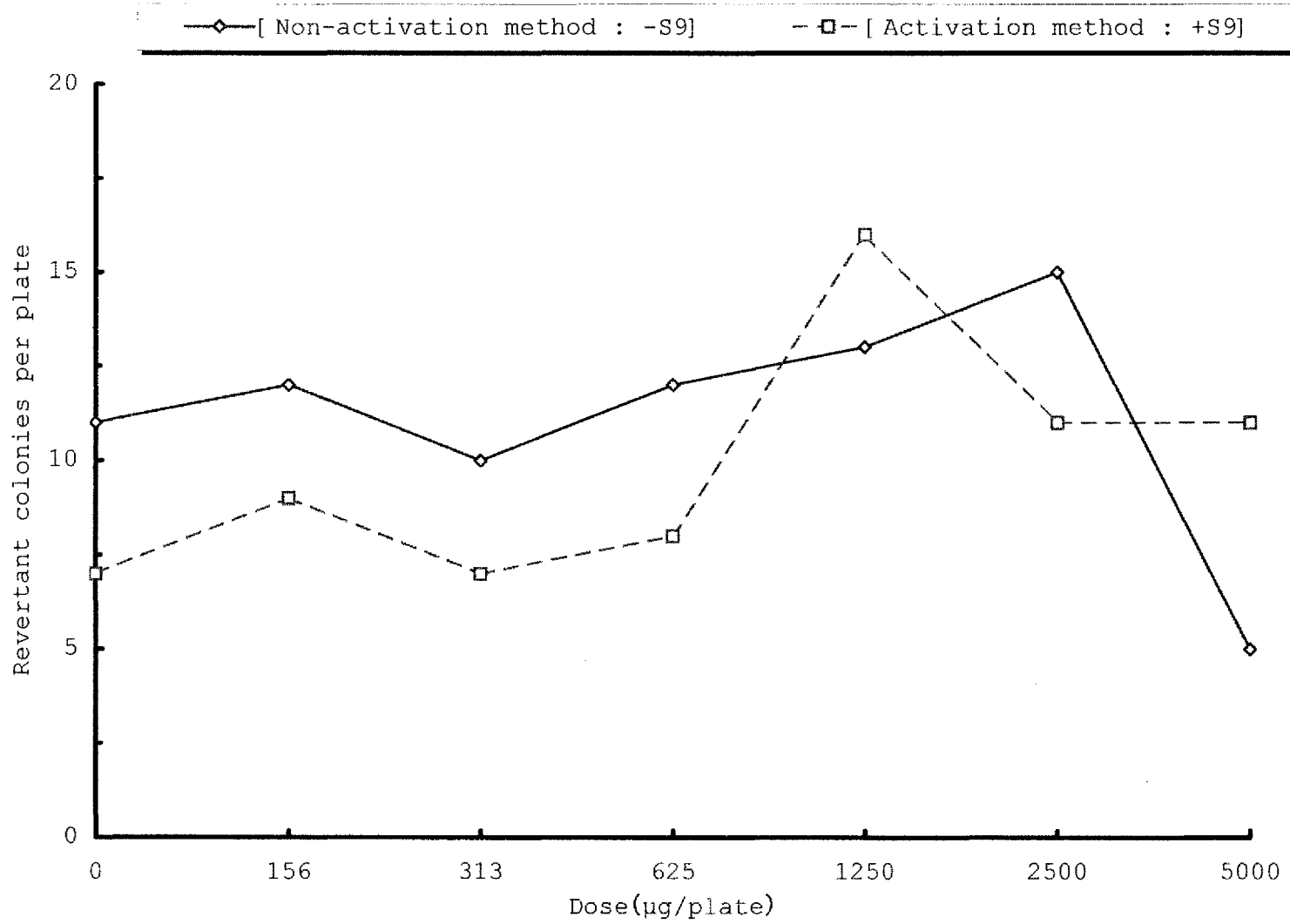


Figure 7. Bacterial reverse mutation test of nickel(II) carbonate hydroxide tetrahydrate in strain TA1535

- 30 -

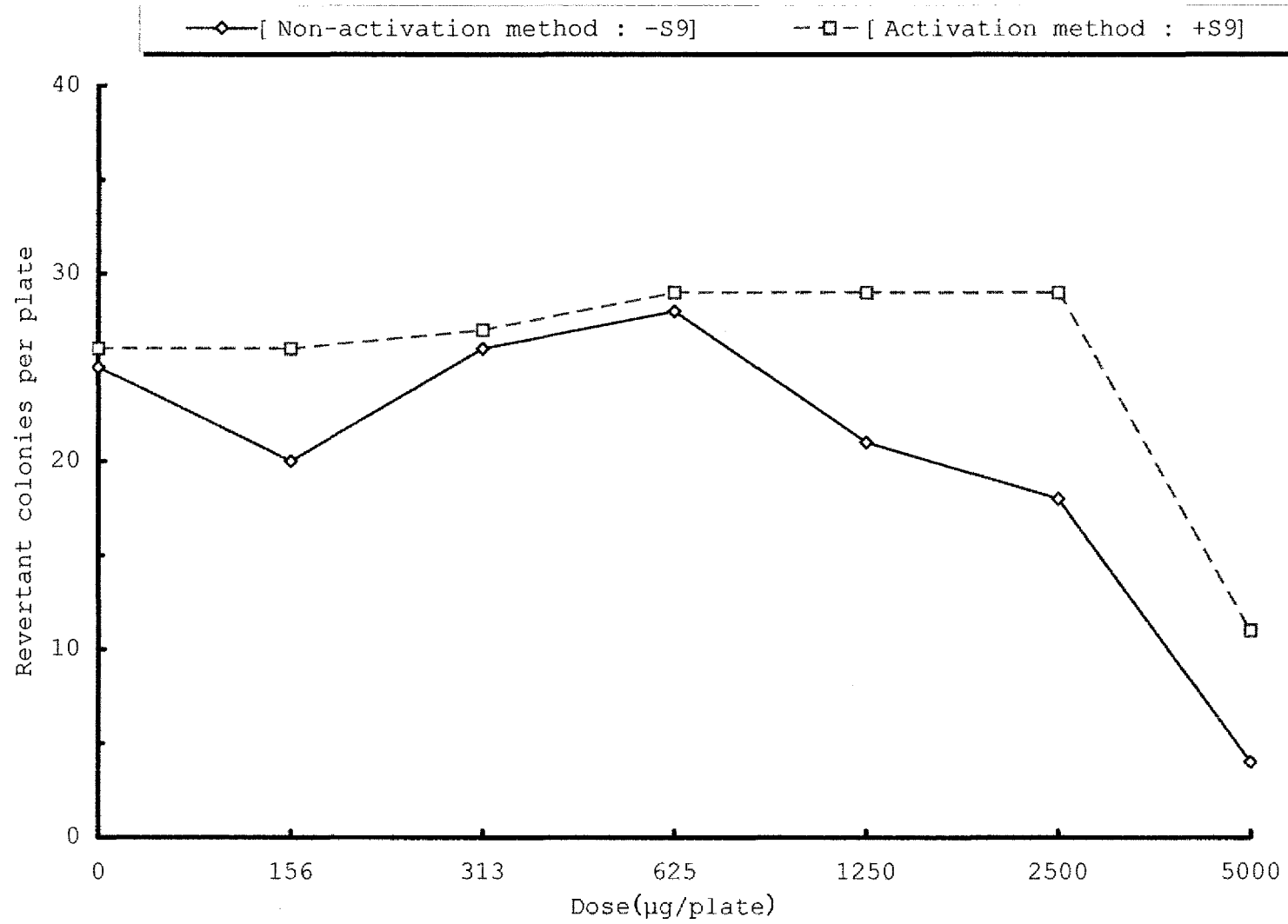


Figure 8. Bacterial reverse mutation test of nickel(II) carbonate hydroxide tetrahydrate in strain WP2uvrA

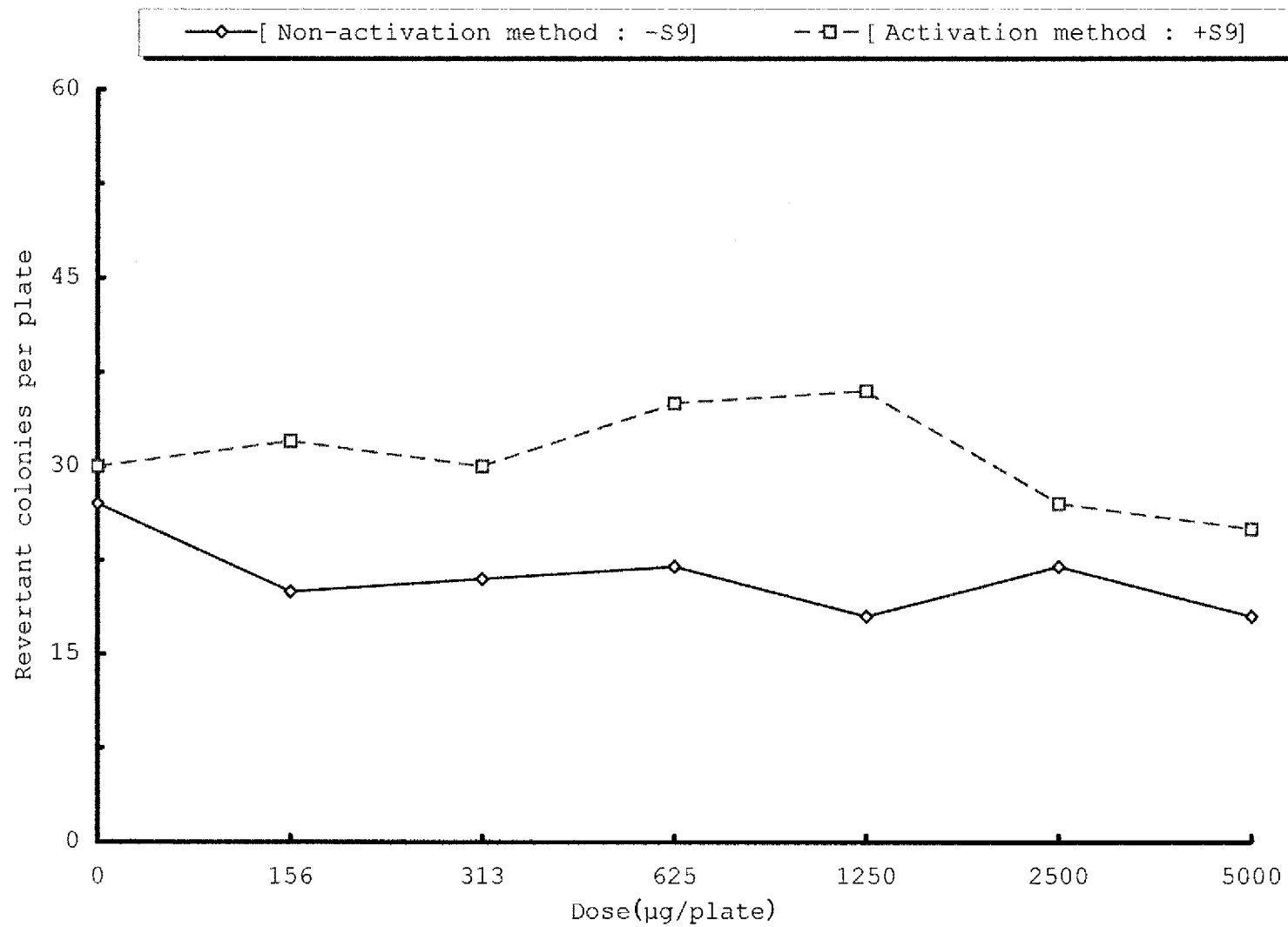


Figure 9. Bacterial reverse mutation test of nickel(II) carbonate hydroxide tetrahydrate in strain TA98

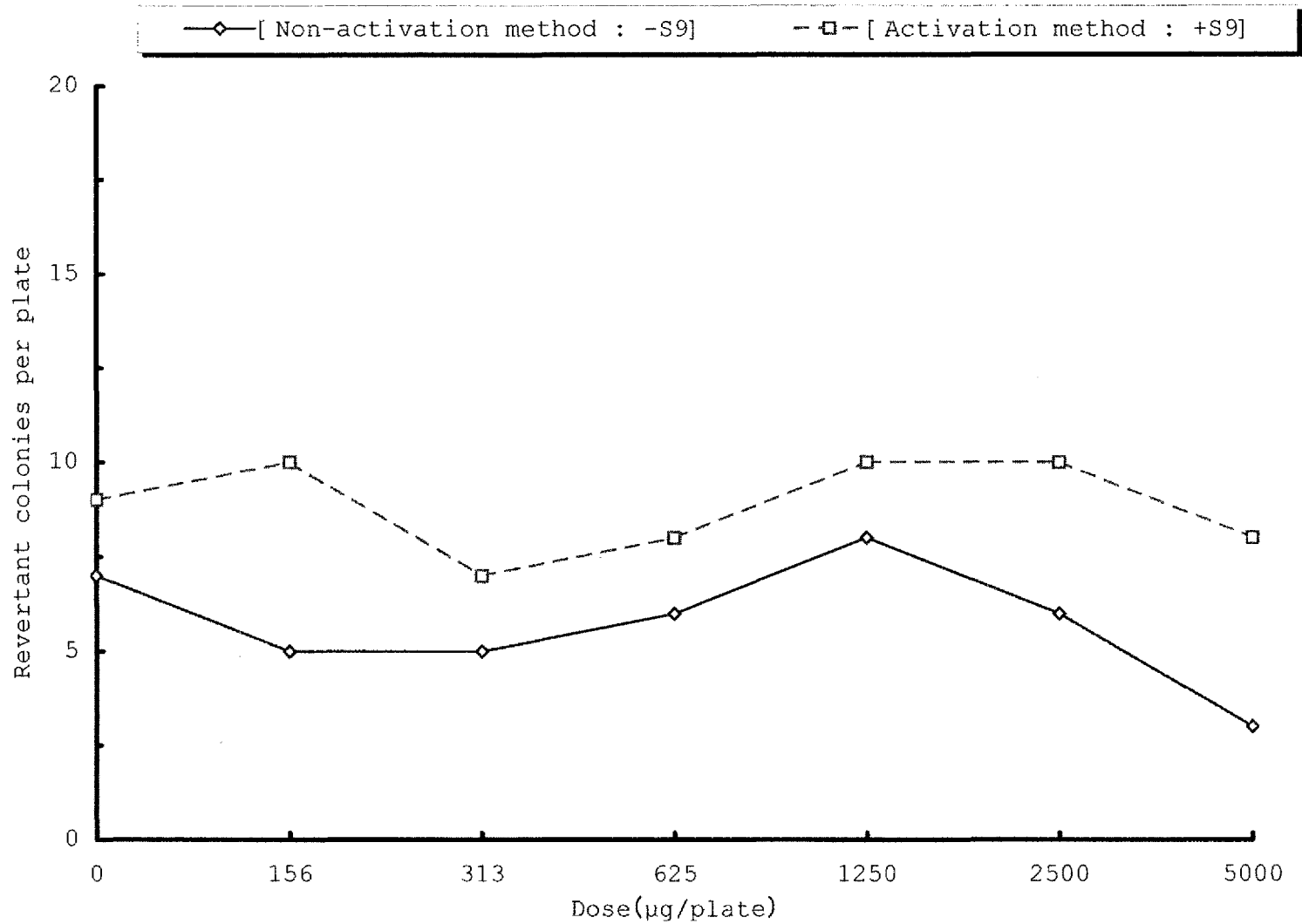


Figure 10. Bacterial reverse mutation test of nickel(II) carbonate hydroxide tetrahydrate in strain TA1537

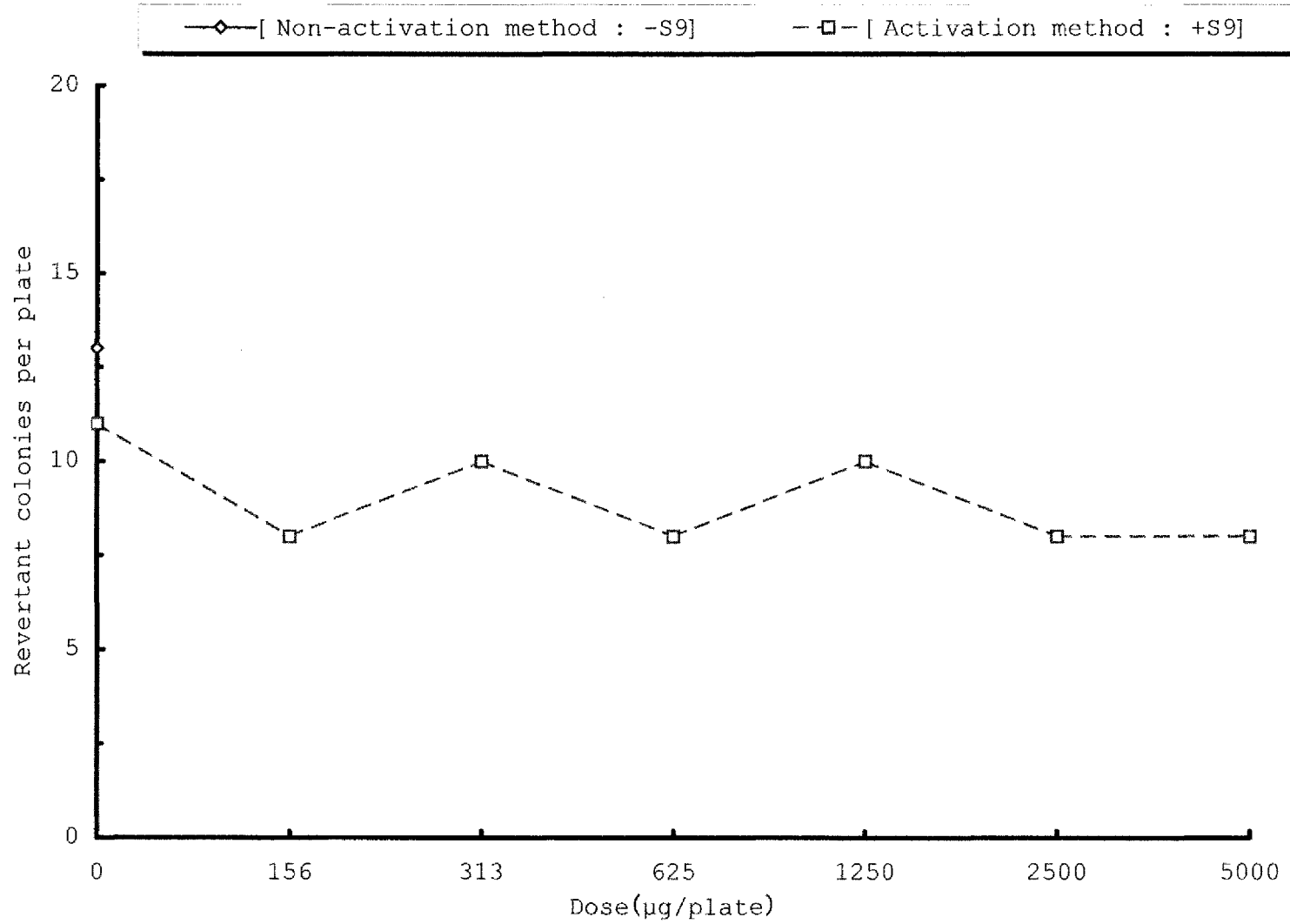


Figure 11. Confirmative examination of nickel(II) carbonate hydroxide tetrahydrate in strain TA1535

Table 1. Summary data on dose-finding study of nickel(II) carbonate hydroxide tetrahydrate  
[Non-activation method : -S9]

Compound	Dose (µg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
nickel(II) carbonate hydroxide tetrahydrate	0	141	136	134	7	18	11	15	30	28	22	23	20	7	6	5
		[ 137	±	4 ]	[ 12	±	6 ]	[ 24	±	8 ]	[ 22	±	2 ]	[ 6	±	1 ]
	8.19	128	137	144	7	12	11	37	16	15	22	22	17	10	5	3
		[ 136	±	8 ]	[ 10	±	3 ]	[ 23	±	12 ]	[ 20	±	3 ]	[ 6	±	4 ]
	20.5	129	148	162	7	11	15	24	19	21	20	24	26	7	7	10
		[ 146	±	17 ]	[ 11	±	4 ]	[ 21	±	3 ]	[ 23	±	3 ]	[ 8	±	2 ]
	51.2	126	147	145	8	12	16	21	20	12	20	22	20	4	3	5
		[ 139	±	12 ]	[ 12	±	4 ]	[ 18	±	5 ]	[ 21	±	1 ]	[ 4	±	1 ]
128	140	132	151	11	8	15	18	18	26	16	24	22	6	6	6	
	[ 141	±	10 ]	[ 11	±	4 ]	[ 21	±	5 ]	[ 21	±	4 ]	[ 6	±	0 ]	
320	133	137	143	16	6	14	25	18	19	19	28	23	4	3	6	
	[ 138	±	5 ]	[ 12	±	5 ]	[ 21	±	4 ]	[ 23	±	5 ]	[ 4	±	2 ]	
800	145	125	137	16	7	14	15	19	19	20	19	13	7	5	6	
	[ 136	±	10 ]	[ 12	±	5 ]	[ 18	±	2 ]	[ 17	±	4 ]	[ 6	±	1 ]	
2000	148	107	149	13	6	14	21	18	21	24	24	21	5	5	1	
	[ 135	±	24 ]	[ 11	±	4 ]	[ 20	±	2 ]	[ 23	±	2 ]	[ 4	±	2 ]	
5000	97	135	96	7	5	9	12*	7*	8*	12	13	20	4	3	8	
	[ 109	±	22 ]	[ 7	±	2 ]	[ 9	±	3 ]	[ 15	±	4 ]	[ 5	±	3 ]	
Positive control		894	972	951 a)	601	591	524 b)	127	130	136 a)	655	661	649 c)	337	348	327 d)
		[ 939	±	40 ]	[ 572	±	42 ]	[ 131	±	5 ]	[ 655	±	6 ]	[ 337	±	11 ]

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 µg/plate    b): NaN<sub>3</sub>; Sodium azide, 0.5 µg/plate  
c): AF-2, 0.1 µg/plate    d): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 µg/plate  
\* : Growth inhibition was observed.

Table 2. Summary data on dose-finding study of nickel(II) carbonate hydroxide tetrahydrate  
[Activation method : +S9]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
nickel(II) carbonate hydroxide tetrahydrate	0	143	131	156	10	15	9	28	33	29	29	38	30	11	20	8
		[ 143	$\pm$ 13]	[ 11	$\pm$ 3]	[ 30	$\pm$ 3]	[ 32	$\pm$ 5]	[ 13	$\pm$ 6]					
	8.19	125	158	124	7	15	12	20	16	18	29	27	27	12	21	18
		[ 136	$\pm$ 19]	[ 11	$\pm$ 4]	[ 18	$\pm$ 2]	[ 28	$\pm$ 1]	[ 17	$\pm$ 5]					
	20.5	152	139	139	8	13	11	16	22	19	31	24	13	10	9	12
		[ 143	$\pm$ 8]	[ 11	$\pm$ 3]	[ 19	$\pm$ 3]	[ 23	$\pm$ 9]	[ 10	$\pm$ 2]					
	51.2	153	133	134	3	15	9	18	23	18	24	25	28	12	10	8
		[ 140	$\pm$ 11]	[ 9	$\pm$ 6]	[ 20	$\pm$ 3]	[ 26	$\pm$ 2]	[ 10	$\pm$ 2]					
128	167	173	155	7	11	10	17	19	9	28	28	20	8	16	8	
	[ 165	$\pm$ 9]	[ 9	$\pm$ 2]	[ 15	$\pm$ 5]	[ 25	$\pm$ 5]	[ 11	$\pm$ 5]						
320	167	143	142	3	12	16	19	26	21	26	26	26	12	8	8	
	[ 151	$\pm$ 14]	[ 10	$\pm$ 7]	[ 22	$\pm$ 4]	[ 26	$\pm$ 0]	[ 9	$\pm$ 2]						
800	165	179	167	8	9	11	14	29	21	31	23	17	7	12	14	
	[ 170	$\pm$ 8]	[ 9	$\pm$ 2]	[ 21	$\pm$ 8]	[ 24	$\pm$ 7]	[ 11	$\pm$ 4]						
2000	187	174	163	8	18	13	11	22	23	32	26	30	15	14	11	
	[ 175	$\pm$ 12]	[ 13	$\pm$ 5]	[ 19	$\pm$ 7]	[ 29	$\pm$ 3]	[ 13	$\pm$ 2]						
5000	176	156	155	8	9	9	9	11	13	29	20	21	14	8	16	
	[ 162	$\pm$ 12]	[ 9	$\pm$ 1]	[ 11	$\pm$ 2]	[ 23	$\pm$ 5]	[ 13	$\pm$ 4]						
Positive control		870	838	845 a)	366	355	342 b)	650	725	630 c)	315	399	361 d)	164	157	184 b)
		[ 851	$\pm$ 17]	[ 354	$\pm$ 12]	[ 668	$\pm$ 50]	[ 358	$\pm$ 42]	[ 168	$\pm$ 14]					

a) : 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1  $\mu\text{g}/\text{plate}$     b) : 2-AA, 2  $\mu\text{g}/\text{plate}$     c) : 2-AA, 10  $\mu\text{g}/\text{plate}$     d) : 2-AA, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 3. Results on bacterial reverse mutation test of nickel(II) carbonate hydroxide tetrahydrate  
[ Non-activation method : -S9]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
nickel(II) carbonate hydroxide tetrahydrate	0	126	134	131	11	13	9	27	19	29	15	30	35	5	7	9
		[ 130	$\pm$	4]	[ 11	$\pm$	2]	[ 25	$\pm$	5]	[ 27	$\pm$	10]	[ 7	$\pm$	2]
	156	122	142	154	10	15	11	17	19	23	18	19	23	0	2	12
		[ 139	$\pm$	16]	[ 12	$\pm$	3]	[ 20	$\pm$	3]	[ 20	$\pm$	3]	[ 5	$\pm$	6]
	313	136	140	136	10	10	11	21	24	32	22	18	23	3	7	5
		[ 137	$\pm$	2]	[ 10	$\pm$	1]	[ 26	$\pm$	6]	[ 21	$\pm$	3]	[ 5	$\pm$	2]
	625	153	134	128	13	10	13	34	25	25	26	24	17	6	3	10
	[ 138	$\pm$	13]	[ 12	$\pm$	2]	[ 28	$\pm$	5]	[ 22	$\pm$	5]	[ 6	$\pm$	4]	
1250	152	138	140	9	14	16	25	16	23	14	24	17	3	5	16	
	[ 143	$\pm$	8]	[ 13	$\pm$	4]	[ 21	$\pm$	5]	[ 18	$\pm$	5]	[ 8	$\pm$	7]	
2500	124	138	144	19	15	11	21	12	22	21	20	24	4	5	8	
	[ 135	$\pm$	10]	[ 15	$\pm$	4]	[ 18	$\pm$	6]	[ 22	$\pm$	2]	[ 6	$\pm$	2]	
5000	5*	16*	2*	4	7	5	4*	6*	3*	30	18	6	0	3	5	
	[ 8	$\pm$	7]	[ 5	$\pm$	2]	[ 4	$\pm$	2]	[ 18	$\pm$	12]	[ 3	$\pm$	3]	
Positive control		1105	1115	1091 a)	564	568	614 b)	124	121	147 a)	695	745	722 c)	307	295	354 d)
		[ 1104	$\pm$	12]	[ 582	$\pm$	28]	[ 131	$\pm$	14]	[ 721	$\pm$	25]	[ 319	$\pm$	31]

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01  $\mu\text{g}/\text{plate}$       b):  $\text{NaN}_3$ ; Sodium azide, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$

c): AF-2, 0.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$       d): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80  $\mu\text{g}/\text{plate}$

\* : Growth inhibition was observed.



Table 4. Results on bacterial reverse mutation test of nickel(II) carbonate hydroxide tetrahydrate  
[Activation method : +S9]

Compound	Dose (µg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
nickel(II) carbonate hydroxide tetrahydrate	0	124	130	127	6	7	8	26	21	31	22	40	29	7	9	11
		[ 127	±	3]	[ 7	±	1]	[ 26	±	5]	[ 30	±	9]	[ 9	±	2]
	156	155	132	159	10	7	11	36	23	19	34	27	36	13	6	12
		[ 149	±	15]	[ 9	±	2]	[ 26	±	9]	[ 32	±	5]	[ 10	±	4]
	313	126	142	117	8	6	7	31	16	33	29	32	28	12	3	5
		[ 128	±	13]	[ 7	±	1]	[ 27	±	9]	[ 30	±	2]	[ 7	±	5]
	625	135	124	148	11	6	7	39	19	30	34	31	39	7	8	10
	[ 136	±	12]	[ 8	±	3]	[ 29	±	10]	[ 35	±	4]	[ 8	±	2]	
1250	124	135	144	17	19	11	20	35	33	43	37	29	11	11	9	
	[ 134	±	10]	[ 16	±	4]	[ 29	±	8]	[ 36	±	7]	[ 10	±	1]	
2500	172	144	140	12	10	11	31	28	29	22	33	27	7	9	13	
	[ 152	±	17]	[ 11	±	1]	[ 29	±	2]	[ 27	±	6]	[ 10	±	3]	
5000	111	136	133	10	10	14	11	9	14	24	22	30	6	12	7	
	[ 127	±	14]	[ 11	±	2]	[ 11	±	3]	[ 25	±	4]	[ 8	±	3]	
Positive control		1599	1639	1707 a)	533	485	450 b)	581	617	579 c)	331	330	288 d)	168	141	163 b)
		[ 1648	±	55]	[ 489	±	42]	[ 592	±	21]	[ 316	±	25]	[ 157	±	14]

a) : 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 µg/plate    b) : 2-AA, 2 µg/plate    c) : 2-AA, 10 µg/plate    d) : 2-AA, 0.5 µg/plate

Table 5. Results on bacterial reverse mutation test of nickel(II) carbonate hydroxide tetrahydrate (confirmative examination) [Activation method : +S9]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [ Mean $\pm$ S.D. ]		
		TA1535		
nickel(II) carbonate hydroxide tetrahydrate	0	11	13	10
		[ 11	$\pm$	2 ]
	156	6	12	6
		[ 8	$\pm$	3 ]
	313	8	13	10
		[ 10	$\pm$	3 ]
	625	13	6	6
	[ 8	$\pm$	4 ]	
1250	10	11	10	
	[ 10	$\pm$	1 ]	
2500	11	6	8	
	[ 8	$\pm$	3 ]	
5000	7	13	4	
	[ 8	$\pm$	5 ]	
Positive control		364	386	399 a)
		[ 383	$\pm$	18 ]
(Without S9mix)				
	0	9	12	17
		[ 13	$\pm$	4 ]
Positive control		567	580	528 b)
		[ 558	$\pm$	27 ]

a): 2-AA; 2-Aminoanthracene, 2  $\mu\text{g}/\text{plate}$     b):  $\text{NaN}_3$ ; Sodium azide, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$