最 終 報 告 書

N,N,N－トリメチル－2－[(2－メチル－1－オキソ－2－プロペニル)
オキシ]－エタンアミニウムクロライドの細菌を用いる復帰突然変異試験

(試験番号: 98-104)

財団法人　畜産生物科学安全研究所

目　次

要約 …… 1頁

試験目的 …… 2

材料および方法 …… 2

1．被験物質 …… 2

2．指標菌株 …… 3

3．指標菌株の検査 …… 3

4．指標菌株の保存と前培養 …… 4

5．S9 mix …… 4

6．被験物質の供試液の調製 …… 5

7．陰性対照および陽性対照 …… 6

8．アミノ酸添加軟寒天培地の調製 …… 6

9．用量設定試験（予備試験） …… 7

10．本試験 …… 7

1）用量設定 …… 7

2）実験方法 …… 7

(1) プレインキュベーション法（直接法） …… 7

(2) プレインキュベーション法（代謝活性化法） …… 8

11．無菌試験 …… 8

12．試験の有効性 …… 8

13．結果の判定 …… 8

結果 …… 9

結論および参考事項 …… 9

参考文献 …… 10

表：

表 1-1　S9 mix 非存在下における *N,N,N*－トリメチル－2－[(2－メチル－1－オキソ－2－プロペニル) オキシ]－エタンアミニウムクロライドの復帰突然変異試験結果〔本試験 1 回目－直接法〕 …… 12

表 1-2　S9 mix 存在下における *N,N,N*－トリメチル－2－[(2－メチル－1－オキソ－2－プロペニル) オキシ]－エタンアミニウムクロライドの復帰突然変異試験結果〔本試験 1 回目－代謝活性化法〕 …… 13

表 2-1　S9 mix 非存在下における *N,N,N*－トリメチル－2－[(2－メチル－1－オキソ－2－プロペニル) オキシ]－エタンアミニウムクロライドの復帰突然変異試験結果〔本試験 2 回目－直接法〕 …… 14

表 2-2　S9 mix 存在下における *N,N,N*－トリメチル－2－[(2－メチル－1－オキソ－2－プロペニル) オキシ]－エタンアミニウムクロライドの復帰突然変異試験結果〔本試験 2 回目－代謝活性化法〕 …… 15

図：

図 1-1　*N,N,N*－トリメチル－2－[(2－メチル－1－オキソ－2－プロペニル) オキシ]－エタンアミニウムクロライドの復帰突然変異試験結果－本試験 1 回目 …… 16

図 1-2　*N,N,N*－トリメチル－2－[(2－メチル－1－オキソ－2－プロペニル) オキシ]－エタンアミニウムクロライドの復帰突然変異試験結果－本試験 1 回目 …… 17

図 1-3　*N,N,N*－トリメチル－2－[(2－メチル－1－オキソ－2－プロペニル) オキシ]－エタンアミニウムクロライドの復帰突然変異試験結果－本試験 1 回目 …… 18

図 2-1　*N,N,N*－トリメチル－2－[(2－メチル－1－オキソ－2－プロペニル）オキシ]－エタンアミニウムクロライドの復帰突然変異試験結果－本試験 2 回目 …… 19
図 2-2　*N,N,N*－トリメチル－2－[(2－メチル－1－オキソ－2－プロペニル）オキシ]－エタンアミニウムクロライドの復帰突然変異試験結果－本試験 2 回目 …… 20
図 2-3　*N,N,N*－トリメチル－2－[(2－メチル－1－オキソ－2－プロペニル）オキシ]－エタンアミニウムクロライドの復帰突然変異試験結果－本試験 2 回目 …… 21

要　約

N,N,N－トリメチル－2－[(2－メチル－1－オキソ－2－プロペニル) オキシ]－エタンアミニウムクロライドの遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため，復帰突然変異試験を指標菌株として *Salmonella typhimurium* TA100，TA1535，TA98，TA1537 および *Escherichia coli* WP2*uvrA* を用い，S9 mix 非存在（直接法）および存在（代謝活性化法）下でプレインキュベーション法により行った。

用量は，用量設定試験（予備試験）の結果，5000μg/プレートまでの用量で代謝活性化の有無にかかわらず，全ての菌株において生育阻害が認められなかったため，313～5000μg/プレートの範囲（公比２）で設定した。

試験は，２回実施した。その結果，全ての菌株において代謝活性化の有無にかかわらず，復帰変異コロニー数の増加は認められず，また，菌の生育阻害についても認められなかった。

以上の成績から，本実験条件下では，*N,N,N*－トリメチル－2－[(2－メチル－1オキソ－2－プロペニル) オキシ]－エタンアミニウムクロライド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。

試験目的

この試験は，*N,N,N*－トリメチル－2－[(2－メチル－1－オキソ－2－プロペニル）オキシ]－エタンアミニウムクロライドの細菌に対する遺伝子突然変異誘発性の有無を明らかにするために実施した。

材料および方法[1, 2]

1．被験物質

名称(略号)：　*N,N,N*－トリメチル－2－[(2－メチル－1－オキソ－2－プロペニル）オキシ]－エタンアミニウムクロライド（ETMPC）

別名　メタクリル酸ジメチルアミノエチルメチルクロライド塩；ジメチルアミノエチルメタクリレート四級化物；2-(メタクリロイルオキシ）エチルトリメチルアンモニウムクロライド；QDM；2-(トリメチルアンモニオ）エチルメタクリレート塩化物；Methacrylatoethyl trimethyl ammonium chloride; Methacryloxyethyltrimethyl ammonium chloride

ＣＡＳ番号：　5039-78-1

ロット番号：

純　　度：　78.1 %（平成10年10月14日分析）

不純物　水：21.7 %，安定剤（4-メトキシフェノール）：1962 ppm (0.2 %)

入手先(製造元)：

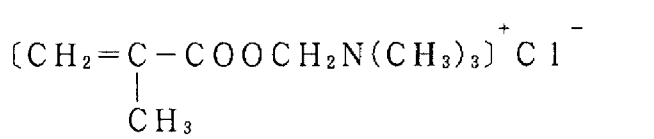
入 手 日：　平成10年10月16日

入 手 量：　250 g

物 性 等：

化 学 名　Ethanaminium, *N,N,N*-trimethyl-2-[(2-methyl-1-oxo-2-propenyl) oxy]-, chloride

構 造 式



$$[CH_2{=}\underset{\underset{CH_3}{|}}{C}{-}COOCH_2N(CH_3)_3]^{+}\,Cl^{-}$$

分 子 式　$C_9H_{18}ClNO_2$

分 子 量　207.75

性状(常温)　無色透明液体

融　　点　−10℃

溶 解 性　水：易溶

安　定　性：　安定〔実験終了後，残余被験物質を　　において分析（平成11年7月16日）した結果，純度は78.0%で，実験期間中被験物質は安定であったことを確認した。〕

保 管 条 件：　冷暗所（4℃），密栓

2．指標菌株

指標菌株は，国立公衆衛生院より入手（平成6年12月19日）した以下の5種類を用いた。

（塩基対置換型）

Salmonella typhimurium TA100, TA1535

Escherichia coli WP2*uvrA*

（フレームシフト型）

Salmonella typhimurium TA98, TA1537

3．指標菌株の検査

次に示す指標菌株の遺伝的特性およびその他の諸性質に関する項目について検査し，本来の特性を有することを確認した。

1）*S. typhimurium* におけるヒスチジンおよびビオチン要求性

E. coli におけるトリプトファン要求性

2）紫外線感受性（ *uvrA*, *uvrB* ）

3）*S. typhimurium* におけるクリスタルバイオレット感受性（ *rfa* ）

4）*S. typhimurium* TA100 および TA98 におけるアンピシリン耐性（ pKM101 ）

5）自然突然変異体数

6）陽性対照物質に対する反応性

4．指標菌株の保存と前培養

菌液 0.8 mL にジメチルスルホキシド（DMSO，和光純薬工業株式会社，ロット番号 TPK7807，99.9%）を 0.07 mL の割合で加えて－80℃以下で保存した。この保存菌株の 25 μL をニュートリエントブロス（Bacto nutrient broth dehydrated，Difco Laboratories，ロット番号 44077JK）液体培地 15 mL に接種し，37℃で 12 時間振盪培養した。培養後の懸濁菌液については，分光光度計で吸光度（OD_{660nm}）を測定し，濁度と生菌数の換算式より 1 mL あたり 1×10^9 以上の生菌数が得られていることを確認した。

生菌数（$\times10^9$/mL）

指標菌株	TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
用量設定試験	1.50	1.67	1.52	1.41	1.24
本試験（1回目）	1.54	1.72	1.43	1.44	1.24
本試験（2回目）	1.54	1.76	1.47	1.41	1.14

5．S9 mix

代謝活性化法に用いた S9 mix は，ラット肝臓のホモジネートの薬物代謝酵素分画（S9）にコファクターを加えて凍結された市販品をキッコーマン株式会社から購入し，使用した（ロット番号：FSM-399，1999年3月19日製造，1999年4月2日購入）。凍結 S9 mix は－80℃以下で保存し，使用時に冷水中で解凍して用いた。使用した S9 の製造法および S9 mix の 1 mL 当たりの組成は，次のとおりである。

S9 製造法

A．使用動物

a） 種・系統： Sprague-Dawley系ラット（日本エスエルシー株式会社）

b） 性・週齢： 雄・7週齢

c） 体　　重： 198～231g

B．誘導法

a） 誘導物質： phenobarbital （PB），5,6-benzoflavone（BF）

b） 投与経路： 腹腔内投与

c） 投与法（投与開始日起算）：

1日目－PB 30 mg/kg， 2， 3， 4日目－PB 60 mg/kg

3日目－BF 80 mg/kg

C．調製法

最終投与の翌日に肝臓ホモジネートを遠心分離（9,000×g）し，その上清を採取

S9 mix 1 mL 当たりの組成

$MgCl_2$	8 μmol
KCl	33 μmol
G-6-P	5 μmol
NADH	4 μmol
NADPH	4 μmol
リン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.4）	100 μmol
S9	0.1 mL

6．被験物質の供試液の調製

被験物質は水に可溶であるため，溶媒には蒸留水（株式会社大塚製薬工場，ロット番号 K7B87）を用いた。被験物質の供試液の調製は，実験の直前に行った。溶媒を用いて最高用量の供試液（原液）を調製し，ついで，この原液を溶媒で順次希釈して所定の用量の被験物質供試液を調製した。なお，被験物質供試液を調製する際は，純度換算を行った。

7．陰性対照および陽性対照

陰性対照（溶媒対照）には，被験物質の溶媒である蒸留水を用いた。陽性対照としては，以下の既知変異原性物質を用いた。

指標菌株	直接法 （μg/プレート）	代謝活性化法 （μg/プレート）
TA100	AF-2 (0.01)	2-AA (1)
TA1535	SA (0.5)	2-AA (2)
WP2*uvrA*	AF-2 (0.04)	2-AA (10)
TA98	AF-2 (0.1)	2-AA (1)
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（和光純薬工業株式会社，98%，ロット番号 PTQ1296）

2-AA： 2-アミノアントラセン（和光純薬工業株式会社，>90%，ロット番号 KCM 2259）

SA ： アジ化ナトリウム（和光純薬工業株式会社，90%，ロット番号 KCG5232）

9-AA： 9-アミノアクリジン（Aldrich Chemical Company，98%，ロット番号 07721MZ）

AF-2 および 2-AA は DMSO（和光純薬工業株式会社，ロット番号 ACH7185，99.9%）に，SA および 9-AA は蒸留水（株式会社大塚製薬工場，ロット番号 K7B87）に溶解した。

8．アミノ酸添加軟寒天培地の調製

0.6 %寒天粉末（Difco laboratories，ロット番号 42101JG）および0.5 %塩化ナトリウム（和光純薬工業株式会社，ロット番号 6314，7001）の組成の軟寒天を調製した。溶解した軟寒天に，*S. typhimurium* 用には 0.5 mM D-ビオチン（Sigma Chemical Company，ロット番号 126H0568）および 0.5 mM L-ヒスチジン（和光純薬工業株式会社，ロット番号 DLJ5479）水溶液，*E. coli* 用には 0.5 mM L-トリプトファン（和光純薬工業株式会社，ロット番号 KCK3898）水溶液を 1/10 容加え，アミノ酸添加軟寒天培地とした。

9．用量設定試験（予備試験）

本試験における被験物質の適切な用量を把握するために，全指標菌株について，100，200，500，1000，2000 および 5000μg/プレートの６用量を用いて，本試験と同様の実験方法で試験を行った。試験は各用量１枚のプレートで行った。

その結果，代謝活性化の有無にかかわらず，いずれの菌株においても全ての用量において，菌の生育阻害は認められなかった。

10．本試験

1）用量設定

用量設定試験の結果から，被験物質の用量は，直接法および代謝活性化法ともに最高用量を試験法ガイドラインで規定されている上限量の 5000μg/プレートとし，以下公比２で 2500，1250，625 および 313 μg/プレートの計５用量とした。

2）実験方法

(1) プレインキュベーション法（直接法）

滅菌小試験管に前培養した懸濁菌液 0.1 mL，被験物質の供試液 0.1 mL および 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.4）0.5 mL（和光純薬工業株式会社，リン酸水素二ナトリウム・十二水塩：ロット番号 CAH3075，リン酸二水素ナトリウム・二水塩：ロット番号 CAJ2723）を分注し，37℃で20分間振盪培養後，45℃に保温したアミノ酸添加軟寒天培地 2 mL を加え，最少グルコース寒天平板培地上に広げた。最少グルコース寒天平板培地（テスメディアAN培地，オリエンタル酵母工業株式会社，ロット番号 AN080B0，1999年２月４日製造，1999年３月19日購入）は，Vogel-Bonner E 培地（0.2％クエン酸・一水塩，１％リン酸二カリウム，0.192％リン酸一アンモニウム，0.066％水酸化ナトリウム，0.02％硫酸マグネシウム・七水塩）に 1.5％寒天粉末および２％グルコースを加え，30 mL ずつ分注したものである。37℃で48時間培養後，復帰変異コロニーを計数し，同時に指標菌株の生育阻害の有無を実体顕微鏡を用いて観察した。陰性対照および陽性対照群においては，上記の被験物質の供試液 0.1 mL にかわり，溶媒（蒸留水）および陽性対照物質溶液 0.1 mL を用いて同様に実施した。試験は各用量３枚のプレートで行った。

(2) プレインキュベーション法（代謝活性化法）

滅菌小試験管に前培養した懸濁菌液 0.1 mL，被験物質の供試液 0.1 mL および S9 mix 0.5 mL を分注し，37℃で20分間振盪培養後，45℃に保温したアミノ酸添加軟寒天培地 2 mL を加え，最少グルコース寒天平板培地上に広げた。37℃で48時間培養後，復帰変異コロニーを計数し，同時に指標菌株の生育阻害の有無を実体顕微鏡を用いて観察した。陰性対照および陽性対照群においては，上記の被験物質の供試液 0.1 mL にかわり，溶媒（蒸留水）および陽性対照物質溶液 0.1 mL を用いて同様に実施した。試験は各用量３枚のプレートで行った。

11. 無菌試験

用量設定試験および本試験において，用いた溶媒，S9 mix および最高用量の被験物質の供試液について，それぞれ 0.1 mL に 0.6%軟寒天 2 mL を加え，最少グルコース寒天平板培地に重層後，37℃で48時間培養し，菌の生育の有無を調べた。最少グルコース寒天平板培地は，それぞれ３枚ずつ使用した。

12. 試験の有効性

以下の３基準を満たす場合に，試験は適切な条件下で実施され，試験は有効と判定した。

１）試験に用いた菌液，溶媒，被験物質の供試液および S9 mix に雑菌の混入がない。

２）各指標菌株の陰性対照における復帰変異コロニー数が，当研究所における背景データの範囲内の値を示す（自然復帰変異体数）。

３）各指標菌株の陽性対照における復帰変異コロニー数が，当研究所の背景データの範囲あるいはその近くの値を示す。

13. 結果の判定

結果の判定は，各用量におけるプレートでの復帰変異コロニー数の平均値を基に，原則的に以下の３基準を満たす場合を陽性とした。

１）被験物質処理群において陰性対照値の２倍以上の復帰変異コロニー数が出現する。

２）被験物質用量の増加とともに復帰変異コロニー数が増加する（用量依存性）。

3）2回にわたる本試験の結果から，復帰変異コロニー数の増加に再現性が認められる。

但し，明確な用量依存性が認められない場合においても，陽性値を示す試験結果に再現性が認められれば陽性と判定した。

結　果

試験を2回実施した結果（表 1-1，1-2，2-1，2-2 および図 1-1，1-2，1-3，2-1，2-2，2-3），直接法および代謝活性化法のいずれの場合も，供試したすべての菌株において復帰変異コロニー数は，陰性対照値の2倍を越えることはなく，また，菌の生育阻害も認められなかった。

なお，陰性対照群では，背景データ（添付資料）の範囲内の復帰変異コロニー数が認められ，陽性対照群においても，それぞれ背景データ（添付資料）の範囲内の陽性を示す復帰変異コロニー数の増加が認められた。また，試験に用いた菌液，溶媒，被験物質の供試液および S9 mix などには，雑菌の混入は認められなかった。その他，実験中，被験物質の析出等，特記すべき変化は認められなかった。

結論および参考事項

N,N,N－トリメチル－2－[(2－メチル－1－オキソ－2－プロペニル）オキシ]－エタンアミニウムクロライドの変異原性に関する報告は見当たらないが，その類縁化合物について，2－(ジメチルアミノ）エチルメタクリラートは，*Salmonella typhimurium* および *Escherichia coli* を用いた復帰突然変異試験[3]並びに CHL 細胞を用いた染色体異常試験[4]でともに陽性，2－(ジエチルアミノ）エチルメタクリラートは，*S. typhimurium* および *E. coli* を用いた復帰突然変異試験で陰性[5]，CHL 細胞を用いた染色体異常試験では陽性[6]と報告されている。(ジメチルアミノ）エチルアクリラートは，*S. typhimurium* および *E. coli* を用いた復帰突然変異試験[7]並びに CHL 細胞を用いた染色体異常試験[8]でいずれも陽性，2－(ジメチルアミノ）エチル塩化物は，酵母菌を用いた復帰突然変

異試験で陽性[9]と報告されている。また，エチルメタクリラートは，L5178Y マウスリンホーマ細胞を用いた染色体異常試験[10] および姉妹染色分体交換試験[11] で陽性，*S. typhimurium* を用いた復帰突然変異試験[12]および CHO 細胞を用いた染色体異常試験[11]では陰性と報告されている。

そこで，今回 *N,N,N*－トリメチル－2－[(2－メチル－1－オキソ－2－プロペニル) オキシ]－エタンアミニウムクロライドの遺伝子突然変異誘発性の有無を調べるため，細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。その結果，代謝活性化の有無にかかわらず，すべての指標菌株で復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

試験の有効性については，２回にわたる本試験ともに有効であることが確認された。

したがって，本実験条件下では，*N,N,N*－トリメチル－2－[(2－メチル－1－オキソ－２－プロペニル) オキシ]－エタンミニウムクロライドの遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

参考文献

1）Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*, **113**, 173-215.

2）Green, M.H. (1984). " Handbook of Mutagenicity Test Procedures " 1, Vol.3, eds. by Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C., Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, pp.161-187.

3） 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室　監修，“化学物質毒性試験報告 Vol.6” 化学物質点検推進連絡協議会，東京，1998，pp.559-564.

4） 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室　監修，“化学物質毒性試験報告 Vol.6” 化学物質点検推進連絡協議会，東京，1998，pp.565-568.

5） 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室　監修，“化学物質毒性試験報告 Vol.6” 化学物質点検推進連絡協議会，東京，1998，pp.168-171.

6） 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室　監修，“化学物質毒性試験報告 Vol.6” 化学物質点検推進連絡協議会，東京，1998，pp.172-175.

7） 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修, “化学物質毒性試験報告, Vol.5” 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 1997, pp.595-600.

8） 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修, “化学物質毒性試験報告, Vol.5” 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 1997, pp.601-604.

9） Zimmermann, F.K., Borstel, R.C., Halle, E.S., Parry, J.M., Siebert, D., Zetterberg, G., Barale, R. and Loprieno, N. (1984). Testing of chemicals for genetic activity with *Saccharomyces cerevisiae* : a report of U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research*, **133**, 199-244.

10) Moore, M.M., Amtower, A., Doerr, C.L., Brock, K.H. and Dearfield, K.L. (1988). Genotoxicity of acrylic acid, methyl acrylate, ethyl acrylate, methyl methacrylate and ethyl methacrylate in L5178Y mouse lymphoma cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **11**, 49-63.

11) “The Dictionary of Substances and their Effects” Vol.4, eds. by M.L. Richardson, S. Gangolli, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1994, pp.430-432.

12) Zeiger, E., Anderson, B., Haworth, S., Lawlor, T., Mortelmans, K., and Speck, W. (1987). *Salmonella* mutagenicity test : Ⅲ. Results from the testing of 255 chemicals. *Environmental Mutagenesis*, **9**(supplment 9), 1-109.

表 1-1　S9 mix 非存在下における *N,N,N*－トリメチル－2－[(2－メチル－1－オキソ－2－プロペニル)オキシ]－エタンアミニウムクロライドの復帰突然変異試験結果〔本試験１回目－直接法〕

用　量〔μg/プレート〕	復帰変異コロニー数／プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
陰性対照〔蒸留水〕	121 115 109 (115±6)	14 12 8 (11±3)	19 15 14 (16±3)	20 17 22 (20±3)	6 10 12 (9±3)
313	125 132 114 (124±9)	7 14 13 (11±4)	16 15 13 (15±2)	15 21 16 (17±3)	10 8 8 (9±1)
625	111 113 118 (114±4)	9 12 13 (11±2)	22 18 16 (19±3)	28 22 27 (26±3)	10 4 9 (8±3)
1250	120 92 130 (114±20)	13 11 10 (11±2)	23 14 16 (18±5)	29 16 18 (21±7)	7 9 14 (10±4)
2500	115 120 114 (116±3)	14 17 12 (14±3)	23 20 21 (21±2)	23 21 22 (22±1)	10 5 6 (7±3)
5000	108 124 112 (115±8)	8 14 16 (13±4)	18 23 14 (18±5)	21 25 33 (26±6)	8 16 6 (10±5)
陽性対照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
μg/プレート	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復帰変異コロニー数／プレート	967 982 930 (960±27)	411 363 407 (394±27)	807 833 824 (821±13)	433 454 413 (433±21)	413 450 577 (480±86)

(　)：平均値±標準偏差
AF-2：2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
SA　：アジ化ナトリウム
9-AA：9-アミノアクリジン

表 1-2　S9 mix 存在下における *N,N,N*－トリメチル－2－[(2－メチル－1－オキソ－2－プロペニル)オキシ]－エタンアミニウムクロライドの復帰突然変異試験結果〔本試験 1 回目－代謝活性化法〕

用　量〔μg/プレート〕	復帰変異コロニー数／プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
陰性対照〔蒸留水〕	99 96 104 (100±4)	12 12 10 (11±1)	22 25 28 (25±3)	30 36 22 (29±7)	15 10 18 (14±4)
313	118 108 117 (114±6)	20 11 14 (15±5)	13 18 17 (16±3)	24 33 30 (29±5)	9 11 14 (11±3)
625	111 95 114 (107±10)	8 11 7 (9±2)	17 23 15 (18±4)	28 27 33 (29±3)	6 9 8 (8±2)
1250	99 104 93 (99±6)	12 8 11 (10±2)	25 20 22 (22±3)	28 25 28 (27±2)	11 10 10 (10±1)
2500	98 110 99 (102±7)	9 13 17 (13±4)	20 17 17 (18±2)	31 28 24 (28±4)	11 10 16 (12±3)
5000	120 115 119 (118±3)	7 12 9 (9±3)	18 21 17 (19±2)	20 27 25 (24±4)	16 10 6 (11±5)
陽性対照	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
μg/プレート	1	2	10	1	2
復帰変異コロニー数／プレート	574 657 575 (602±48)	138 165 161 (155±15)	712 731 739 (727±14)	348 358 338 (348±10)	104 82 91 (92±11)

(　)：平均値±標準偏差
2-AA：2-アミノアントラセン

表 2-1　S9 mix 非存在下における *N,N,N*－トリメチル－2－[(2－メチル－1－オキソ－2－プロペニル)オキシ]－エタンアミニウムクロライドの復帰突然変異試験結果〔本試験 2 回目－直接法〕

用　量〔μg/プレート〕	復帰変異コロニー数／プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
陰性対照〔蒸留水〕	110 144 132 (129±17)	8 10 11 (10±2)	16 18 17 (17±1)	29 36 27 (31±5)	8 11 7 (9±2)
313	135 127 147 (136±10)	7 13 10 (10±3)	11 18 21 (17±5)	30 38 25 (31±7)	5 7 7 (6±1)
625	131 121 141 (131±10)	11 7 9 (9±2)	23 19 12 (18±6)	30 33 35 (33±3)	10 8 5 (8±3)
1250	115 125 117 (119±5)	9 8 9 (9±1)	19 20 15 (18±3)	35 29 26 (30±5)	16 10 12 (13±3)
2500	134 113 112 (120±12)	8 14 10 (11±3)	21 16 19 (19±3)	28 19 20 (22±5)	13 9 3 (8±5)
5000	121 139 118 (126±11)	8 9 12 (10±2)	19 24 13 (19±6)	34 27 29 (30±4)	10 6 9 (8±2)
陽性対照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
μg/プレート	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復帰変異コロニー数／プレート	1000 996 1073 (1023±43)	457 546 465 (489±49)	836 863 828 (842±18)	603 567 494 (555±56)	601 455 550 (535±74)

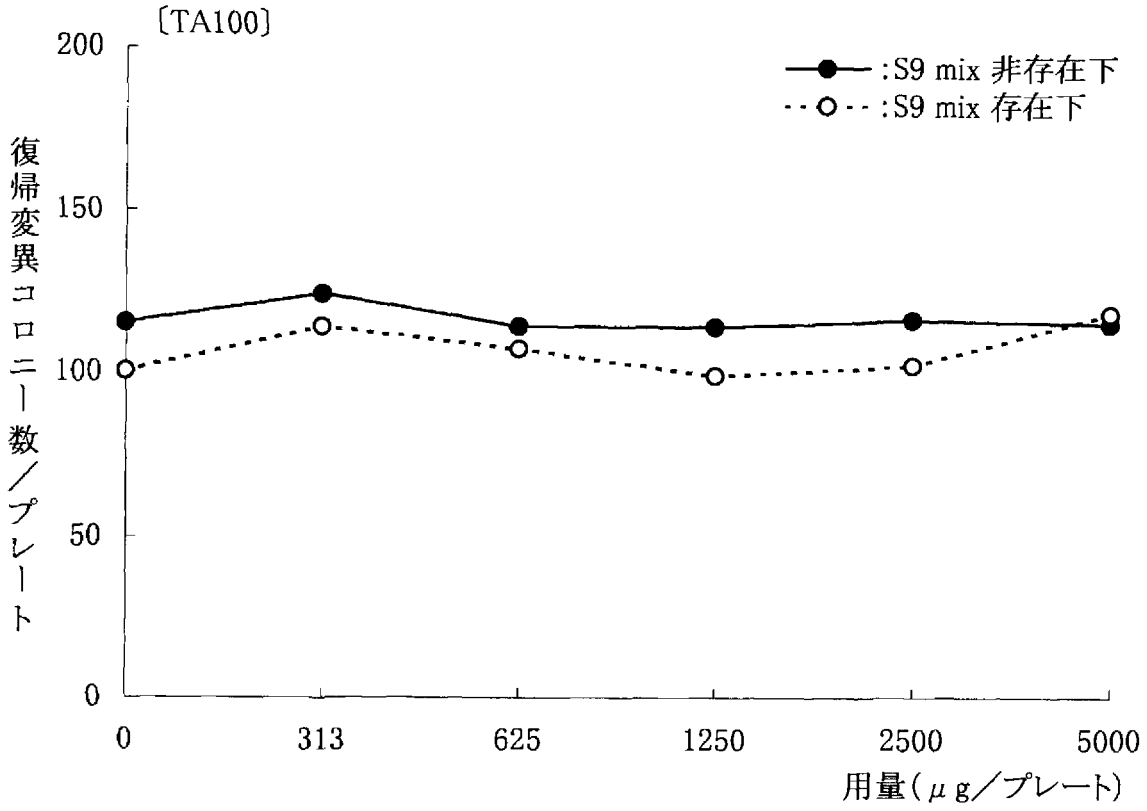
( ): 平均値±標準偏差
AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
SA : アジ化ナトリウム
9-AA: 9-アミノアクリジン

表 2-2　S9 mix 存在下における *N,N,N*－トリメチル－2－[(2－メチル－1－オキソ－2－プロペニル)オキシ]－エタンアミニウムクロライドの復帰突然変異試験結果〔本試験 2 回目－代謝活性化法〕

用　量〔μg/プレート〕	復帰変異コロニー数／プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
陰性対照〔蒸留水〕	125 101 111 (112±12)	11 9 9 (10±1)	12 23 20 (18±6)	37 52 31 (40±11)	9 14 10 (11±3)
313	118 131 114 (121±9)	10 7 10 (9±2)	17 15 22 (18±4)	46 46 37 (43±5)	12 9 13 (11±2)
625	125 116 114 (118±6)	8 10 11 (10±2)	21 26 25 (24±3)	39 35 41 (38±3)	8 13 14 (12±3)
1250	128 150 128 (135±13)	13 10 11 (11±2)	21 16 21 (19±3)	43 33 31 (36±6)	11 9 10 (10±1)
2500	129 118 137 (128±10)	9 10 10 (10±1)	22 28 23 (24±3)	24 22 29 (25±4)	10 15 9 (11±3)
5000	155 139 142 (145±9)	11 16 10 (12±3)	18 20 19 (19±1)	38 44 42 (41±3)	14 11 16 (14±3)
陽性対照	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
μg/プレート	1	2	10	1	2
復帰変異コロニー数／プレート	622 635 644 (634±11)	188 161 156 (168±17)	936 887 890 (904±27)	373 322 324 (340±29)	105 77 75 (86±17)

(　)：平均値±標準偏差
2-AA：2-アミノアントラセン

図 1－1　*N*,*N*,*N*-トリメチル-2-[(2-メチル-1-オキソ-プロペニル)オキシ]-エタンアミニウムクロライドの復帰突然変異試験結果－本試験1回目



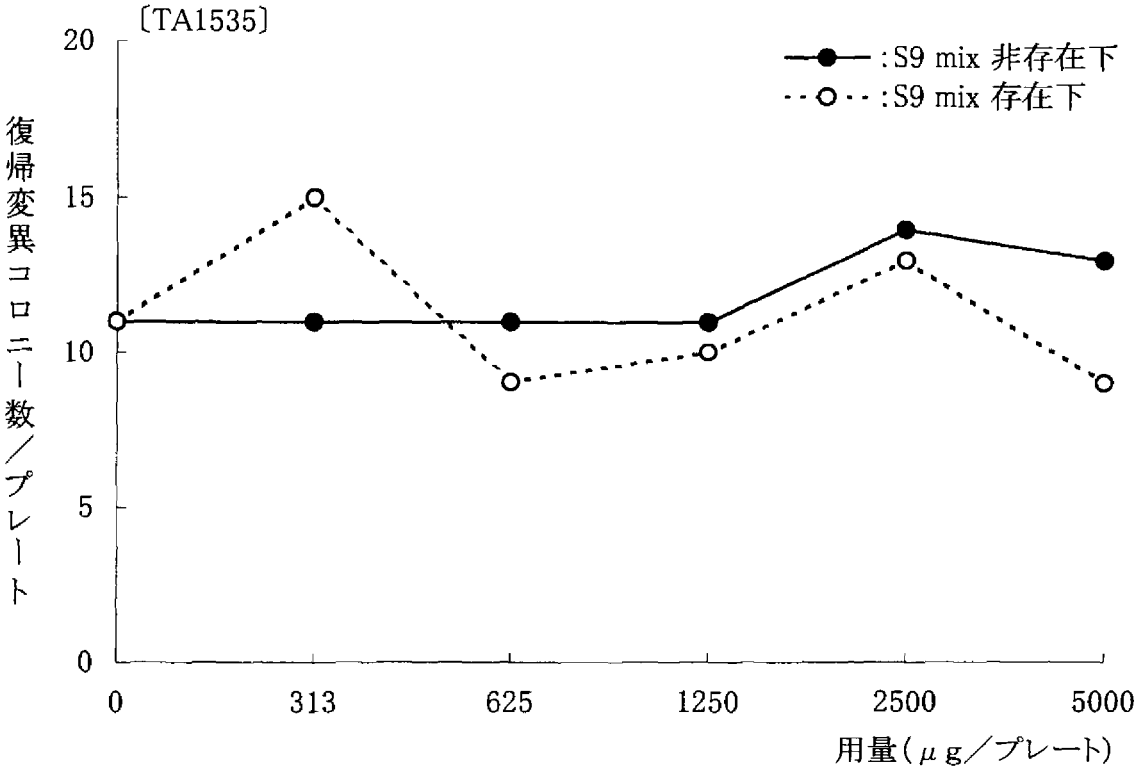
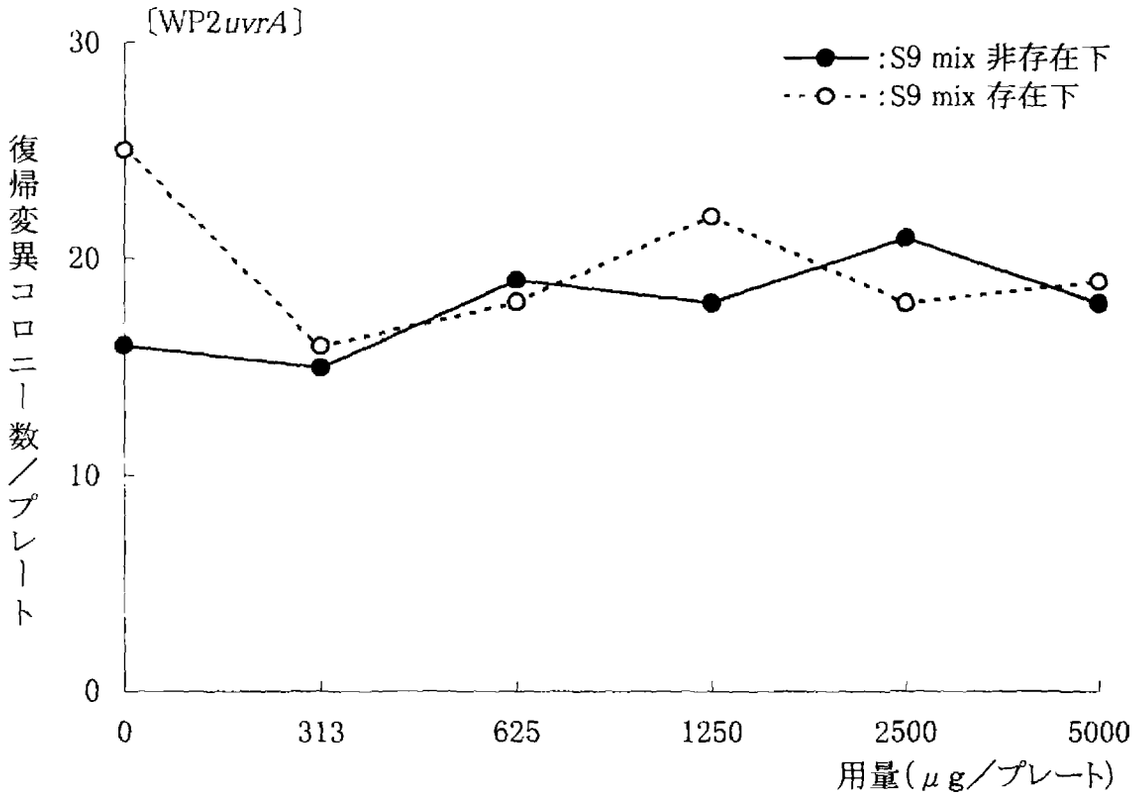


図 1－2　*N,N,N*-トリメチル-2-[(2-メチル-1-オキソ-プロペニル)オキシ]-エタンアミニウムクロライドの復帰突然変異試験結果－本試験1回目



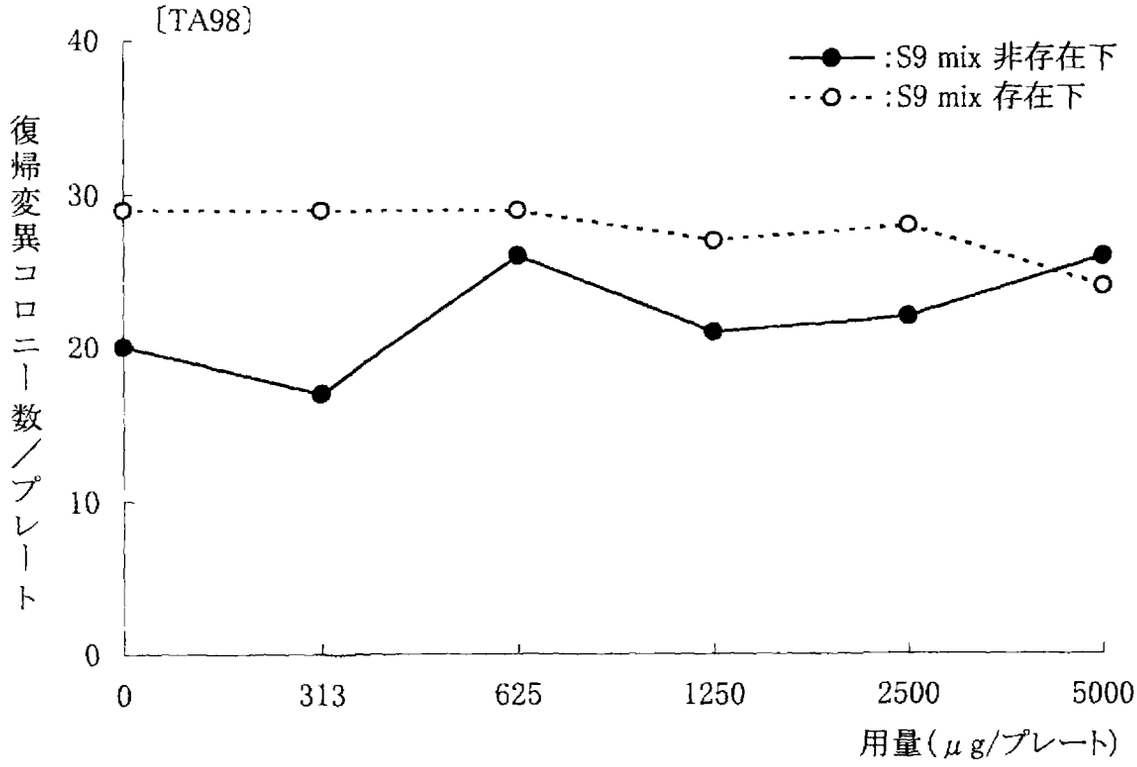


図 1－3　*N*,*N*,*N*-トリメチル-2-[(2-メチル-1-オキソ-プロペニル)オキシ]-エタンアミニウムクロライドの復帰突然変異試験結果－本試験1回目

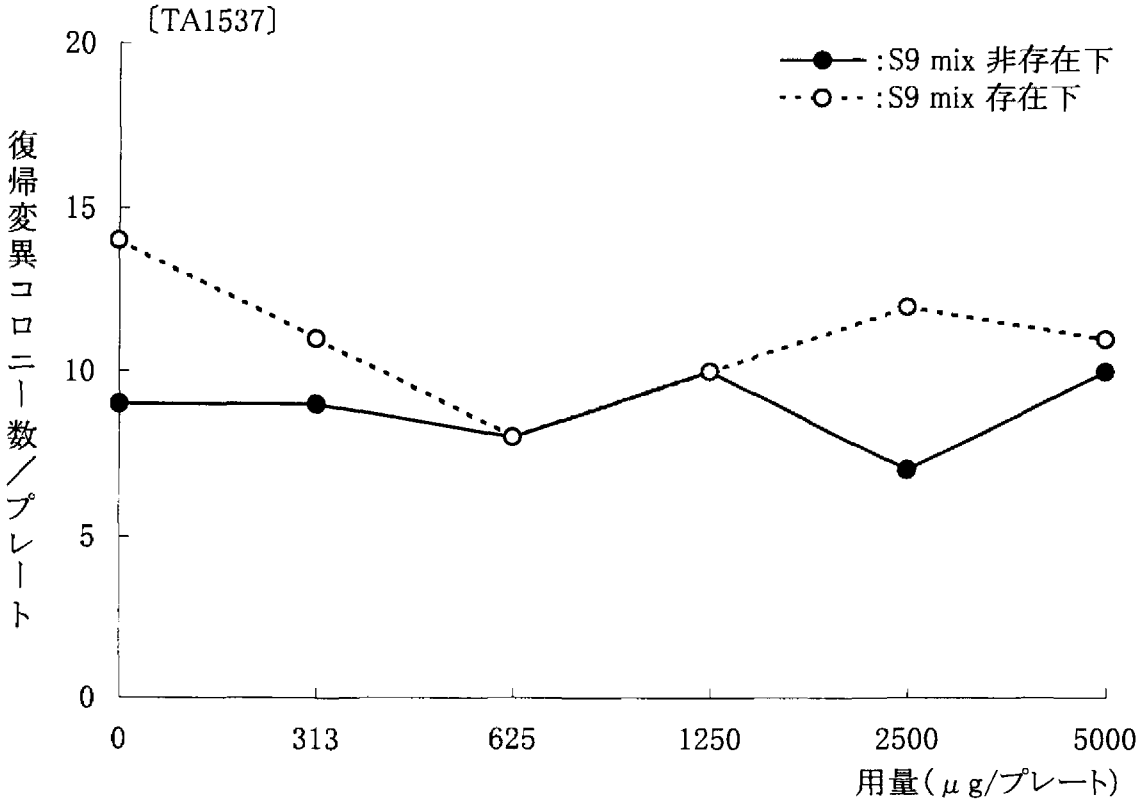
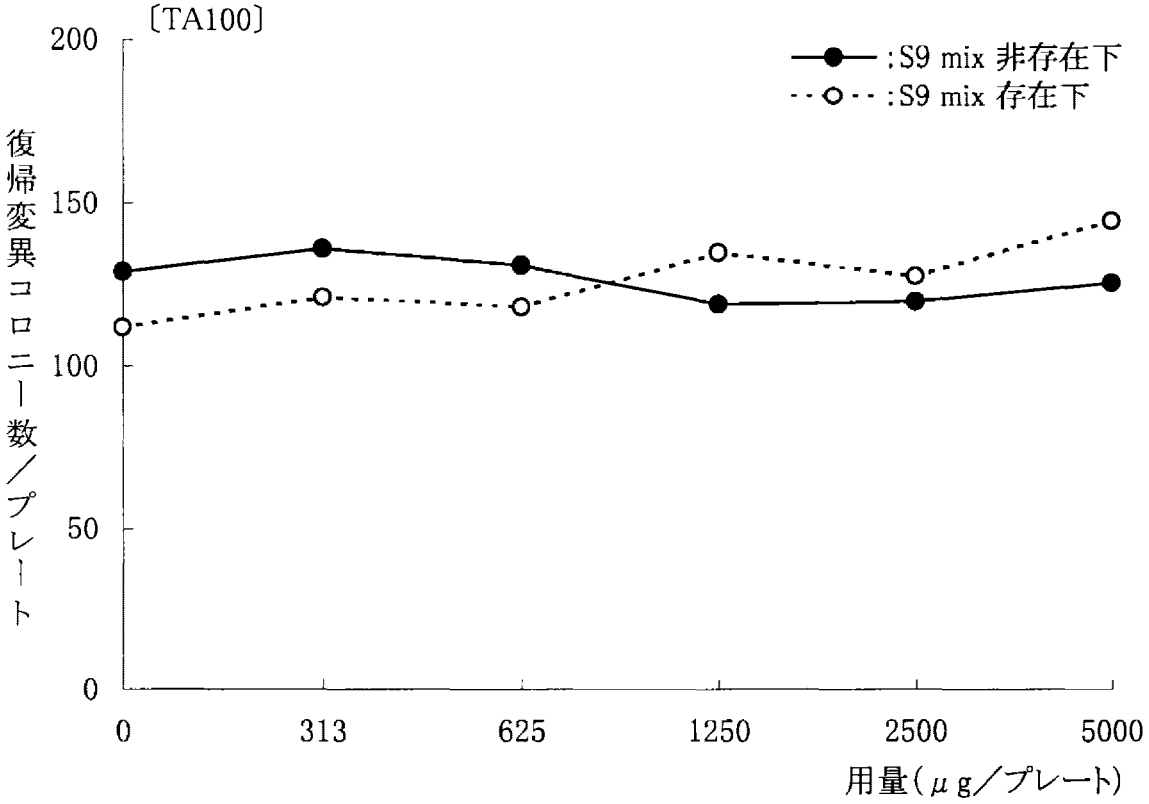


図 2－1　*N*,*N*,*N*-トリメチル-2-[(2-メチル-1-オキソ-プロペニル)オキシ]-エタンアミニウムクロライドの復帰突然変異試験結果－本試験2回目



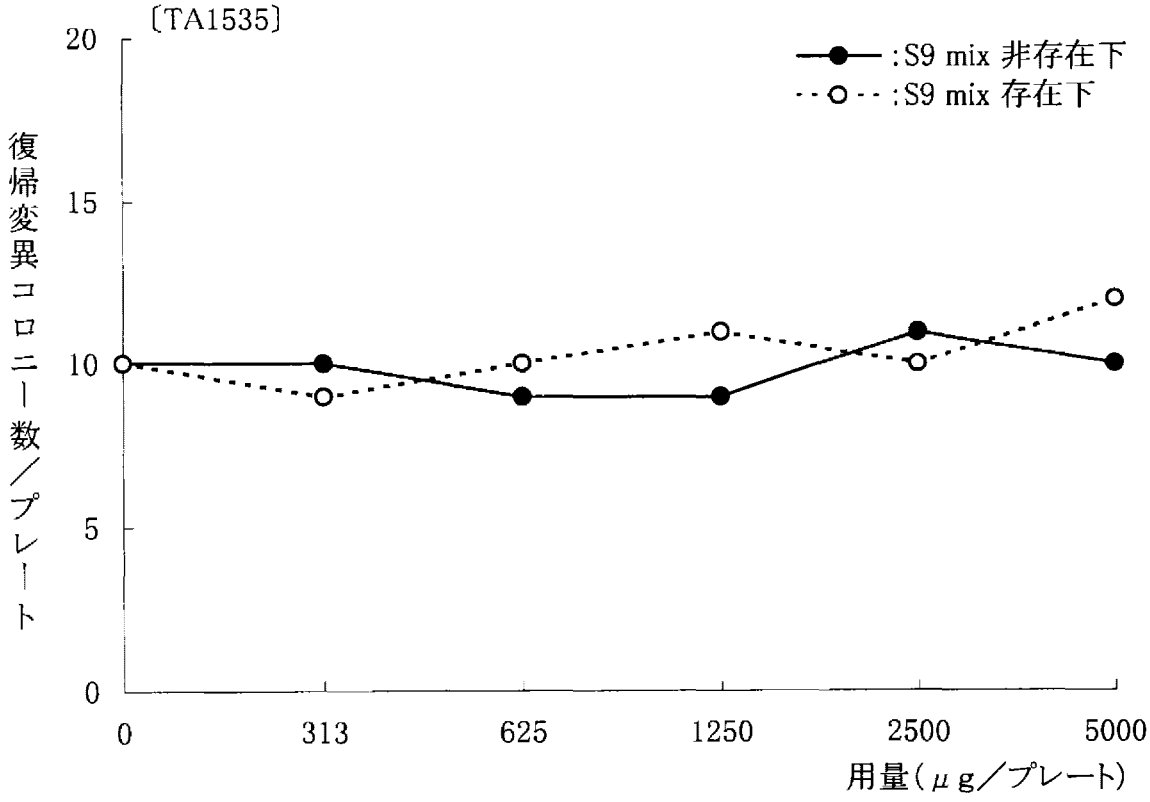
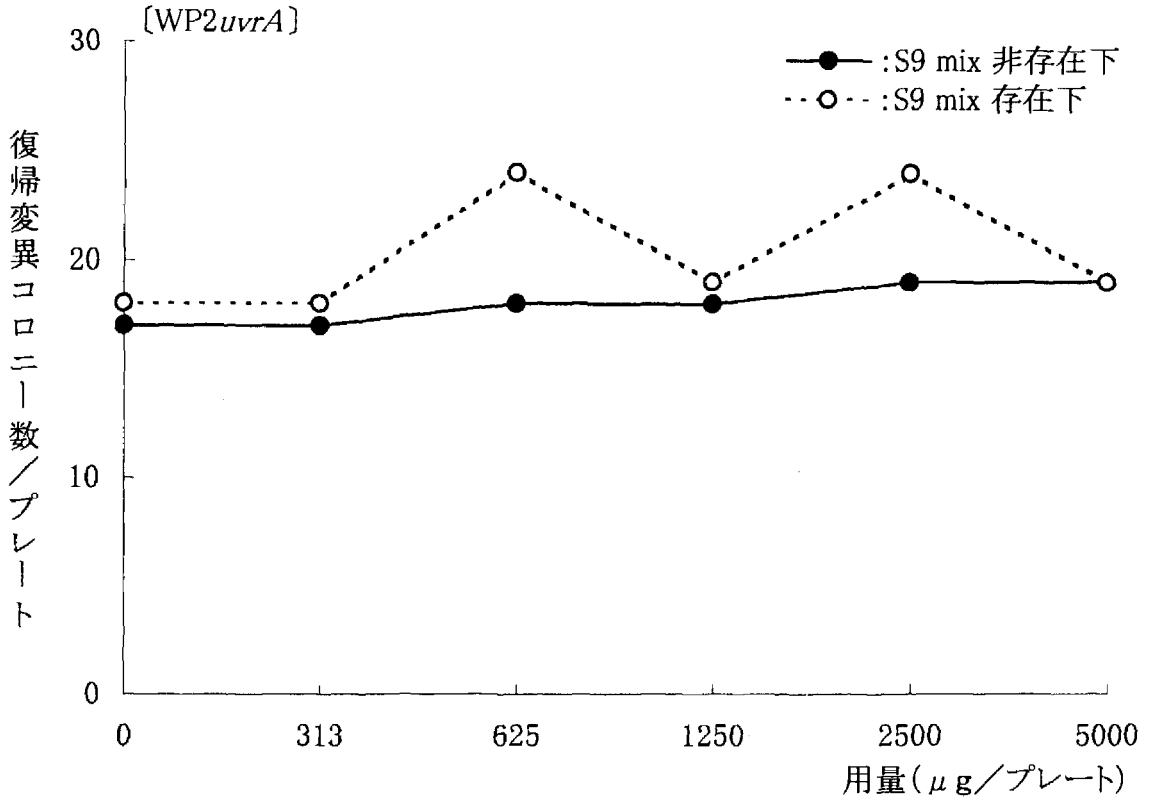


図 2－2　*N,N,N*-トリメチル-2-[(2-メチル-1-オキソ-プロペニル)オキシ]-エタンアミニウムクロライドの復帰突然変異試験結果－本試験2回目



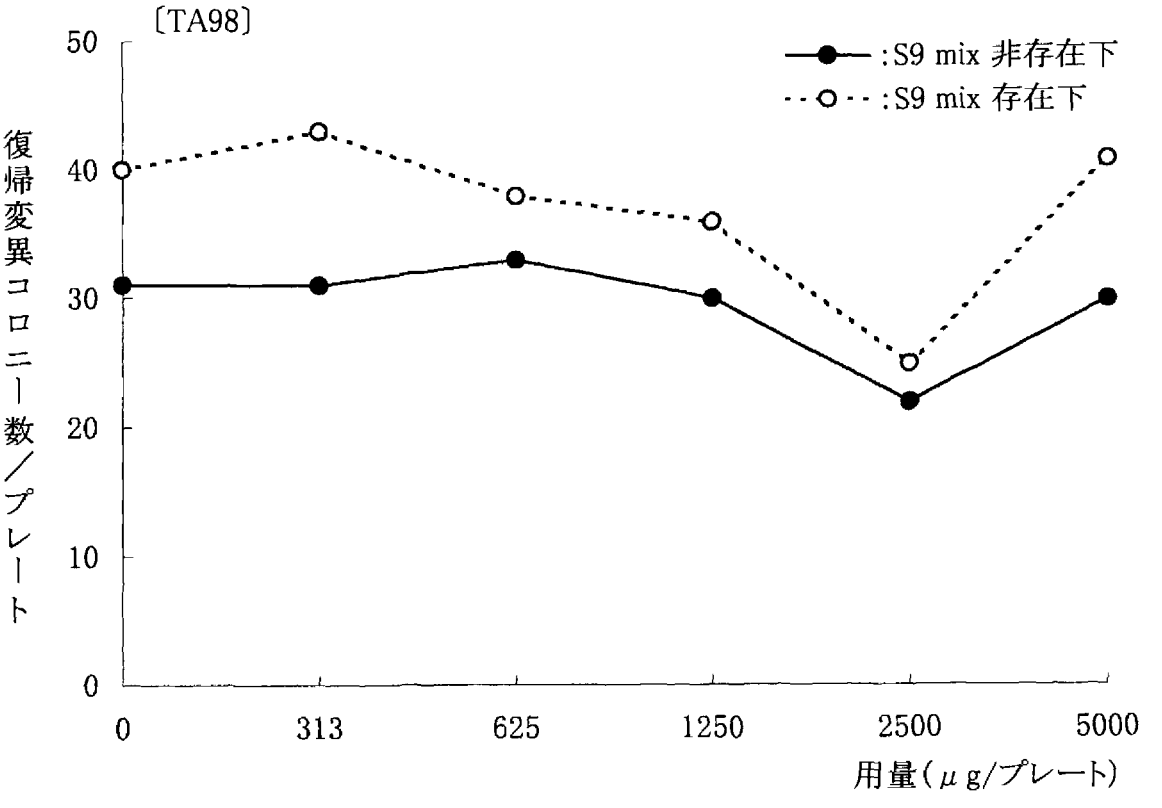
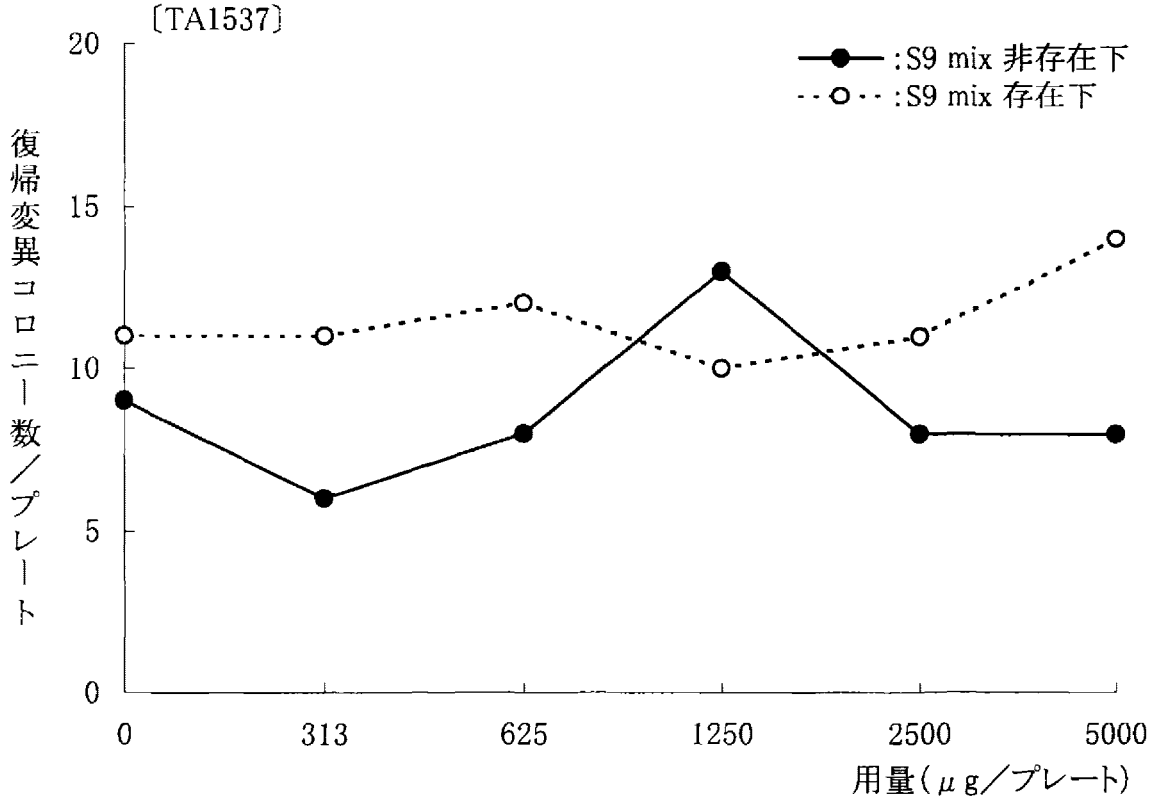



図 2－3　*N*,*N*,*N*-トリメチル-2-[(2-メチル-1-オキソ-プロペニル)オキシ]-エタンアミニウムクロライドの復帰突然変異試験結果－本試験2回目