

最終報告書

2,4-ジニトロフェノールの細菌を用いる復帰突然変異試験

(試験番号: 98-098)

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	5
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）	6
10. 本試験	6
1) 用量設定	6
2) 実験方法	7
(1) プレインキューベーション法（直接法）	7
(2) プレインキューベーション法（代謝活性化法）	7
11. 無菌試験	7
12. 試験の有効性	8
13. 結果の判定	8
結果	8
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2,4-ジニトロフェノールの 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2,4-ジニトロフェノールの 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2,4-ジニトロフェノールの 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2,4-ジニトロフェノールの 復帰突然変異試験結果〔本試験2回目-代謝活性化法〕	15
表 3	S9 mix 非存在下における2,4-ジニトロフェノールの 復帰突然変異試験結果〔確認試験1回目-直接法〕	16
表 4	S9 mix 非存在下における2,4-ジニトロフェノールの 復帰突然変異試験結果〔確認試験2回目-直接法〕	17

図：

図 1-1	2,4-ジニトロフェノールの 復帰突然変異試験結果-本試験1回目	18
図 1-2	2,4-ジニトロフェノールの 復帰突然変異試験結果-本試験1回目	19
図 1-3	2,4-ジニトロフェノールの 復帰突然変異試験結果-本試験1回目	20
図 1-4	2,4-ジニトロフェノールの 復帰突然変異試験結果-本試験1回目	21
図 1-5	2,4-ジニトロフェノールの 復帰突然変異試験結果-本試験1回目	22
図 2-1	2,4-ジニトロフェノールの 復帰突然変異試験結果-本試験2回目	23
図 2-2	2,4-ジニトロフェノールの 復帰突然変異試験結果-本試験2回目	24

図 2-3	2,4-ジニトロフェノールの 復帰突然変異試験結果-本試験 2 回目	25
図 2-4	2,4-ジニトロフェノールの 復帰突然変異試験結果-本試験 2 回目	26
図 2-5	2,4-ジニトロフェノールの 復帰突然変異試験結果-本試験 2 回目	27
図 3	2,4-ジニトロフェノールの 復帰突然変異試験結果-確認試験 1 回目	28
図 4	2,4-ジニトロフェノールの 復帰突然変異試験結果-確認試験 2 回目	28

要 約

2,4-ジニトロフェノール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* WP2uvrA 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）の結果から菌の生育阻害が認められる用量を最高用量とし、直接法の場合は、TA100, TA1535 および WP2uvrA では 156~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、TA98 および TA1537 では 78.1~2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲（公比2）で、また、代謝活性化法の場合は、TA100, TA1535 および TA1537 では 78.1~2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、TA98 および WP2uvrA では 156~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲（公比2）で設定した。

試験は2回実施した。その結果、1回目の試験においては、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なかったが、2回目の試験においては、直接法での TA98 で陰性対照値の2倍を越える復帰変異コロニー数の増加が認められた。菌の生育阻害については、直接法の場合、TA1537 では 1250 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上、TA100 および TA1535 では 2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上、TA98 では 2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、WP2uvrA では 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で認められた。代謝活性化法の場合は、TA100, TA1535 および TA1537 では 2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、TA98 では 2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上、WP2uvrA では 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で認められた。

そこで、TA98 について 78.1~2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で用量を設定し、直接法における確認試験を2回行った。その結果、2回の試験とも用量依存的な復帰変異コロニー数の増加傾向が認められ、陰性対照値の2倍近くの増加が認められた。菌の生育阻害は、2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で認められた。

以上の成績から、本実験条件下では、2,4-ジニトロフェノールは細菌に対し遺伝子突然変異を誘発する疑いがあるもの（疑陽性）と判定した。

試験目的

この試験は、2,4-ジニトロフェノール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) : 2,4-ジニトロフェノール(2,4DNP)

別名 1-Hydroxy-2,4-dinitrobenzene

CAS番号 : 51-28-5

ロット番号 :

純度 : 85.2% (平成10年11月12日分析) [不純物 : 2,6-Dinitrophenol 0.6%,
水 13.9%, 不明 0.3%]

入手先(製造元) :

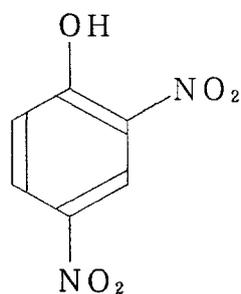
入手日 : 平成10年11月20日

入手量 : 250 g

物性等 :

化学名 2,4-Dinitrophenol

構造式



分子式 $(\text{OH})\text{C}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)_2$

分子量 184.11

性状(常温) 淡黄色固体

融点 112.5°C

蒸気圧 2.67×10^{-6} kPa

溶解性 水：0.56 g/100 mL (18℃), 酢酸エチル, アセトン, ピリジン：易溶,
クロロホルム, ベンゼン, トルエン, アルカリ性水溶液, ジメチルスル
ホキシド (DMSO)：可溶, 熱湯, エタノール：微溶

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12日) した結果, 純度は85.6%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 WP2uvrA

(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°C 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°C 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 ($\text{OD}_{660\text{nm}}$) を測定し, 懸濁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 ($\times 10^9/\text{mL}$)

指標菌株	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
用量設定試験	1.54	1.67	1.56	1.44	1.28
本試験 (1回目)	1.58	1.76	1.38	1.44	1.21
本試験 (2回目)	1.58	1.62	1.43	1.41	1.17
確認試験 (1回目)	—	—	—	1.41	—
確認試験 (2回目)	—	—	—	1.33	—

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°C 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

- 種・系統: Sprague-Dawley系ラット (日本エスエルシー株式会社)
- 性・週齢: 雄・7週齢
- 体重: 198~231g

B. 誘導法

- 誘導物質: phenobarbital (PB), 5,6-benzoflavone (BF)
- 投与経路: 腹腔内投与
- 投与方法 (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 ($9,000 \times g$) 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

被験物質は水に難溶であり、DMSO に可溶であるため、溶媒には DMSO (和光純薬工業株式会社, ロット番号 ACH7185, 99.9%) 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 DMSO 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)
WP2uvrA	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 5000 μg /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, 直接法の場合は, TA98 および TA1537 では 2000 μg /プレート以上, TA100, TA1535 および WP2uvrA では 5000 μg /プレートで菌の生育阻害が認められた。代謝活性化法の場合は, TA100, TA1535 および TA1537 では 2000 μg /プレート以上, TA98 および WP2uvrA では 5000 μg /プレートで菌の生育阻害が認められた。

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, 直接法の場合, TA98 および TA1537 では 78.1, 156, 313, 625, 1250 および 2500 μg /プレート (公比2), TA100, TA1535 および WP2uvrA では 156, 313, 625, 1250, 2500 および 5000 μg /プレート (公比2), また, 代謝活性化法の場合は, TA100, TA1535 および TA1537 で 78.1, 156, 313, 625, 1250 および 2500 μg /プレート (公比2), TA98 およ

び WP2uvrA では 156, 313, 625, 1250, 2500 および 5000 μ g/プレート (公比 2) のそれぞれ 6 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°C で 20 分間振盪培養後, 45°C 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°C 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 (DMSO) 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°C で 20 分間振盪培養後, 45°C 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°C 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 (DMSO) 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, 本試験および確認試験において, 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°C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, 1-4, 1-5, 2-1, 2-2, 2-3, 2-4, 2-5）、1回目の試験においては、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かった。しかし、2回目の試験においては、直接法で

の TA98 の 625 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で陰性対照値の 2 倍を越える復帰変異コロニー数の増加 (2.3 倍) が認められた。その他の指標菌株では、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なかった。菌の生育阻害については、直接法の場合、TA1537 では 1250 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上、TA100 および TA1535 では 2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上、TA98 では 2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、WP2uvrA では 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で認められた。代謝活性化法の場合は TA100、TA1535 および TA1537 では 2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、TA98 では 2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上、WP2uvrA では 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で認められた。

そこで、TA98 について本試験と同様の用量に 469 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (313 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ と 625 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の中間量) と 938 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (625 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ と 1250 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の中間量) を加えた計 8 用量を設定し、直接法における確認試験を 2 回行った。

その結果 (表 3, 4 および図 3, 4), 2 回の試験とも、用量依存的な復帰変異コロニー数の増加傾向が認められ、陰性対照値の 2 倍近くの増加 (1 回目: 1.75 倍, 2 回目: 1.78 倍) が認められた。菌の生育阻害は、2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で認められた。

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は、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

2,4-ジニトロフェノールの細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した結果、直接法の TA98 において 2 回の本試験のうち 1 回のみで陽性値を示す復帰変異コロニー数の増加が認められた。TA98 の直接法における確認試験を 2 回行った結果、いずれも用量依存的な復帰変異コロニー数の増加傾向が認められ、陰性対照値の 2 倍近くの増加が認められた。

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

以上の結果、2,4-ジニトロフェノールの遺伝子突然変異誘発性は陽性とは判定できないものの、TA98 においては用量依存的な復帰変異コロニー数の増加傾向に再現性が認められ、復帰変異コロニー数の最大値が陰性対照値の 1.3~2.3倍に達したことから、本被験物質は遺伝子突然変異を誘発する可能性が高いものと考えられる。

したがって、本実験条件下では、2,4-ジニトロフェノールは遺伝子突然変異を誘発する疑いがあるもの（疑陽性）と判定した。

2,4-ジニトロフェノールの変異原性については、*Salmonella typhimurium* を用いた復帰突然変異試験およびシリアンハムスター由来の BHK21cl13 細胞を用いたトランスフォーメーション試験とともに陰性³⁾との報告がある。

2,4-ジニトロフェノールの類縁化合物の変異原性について、2,4,6-トリニトロフェノール (Picric acid) は、*S. typhimurium* を用いた復帰突然変異試験で代謝活性化による TA98 および TA1537 において陽性⁴⁾、マウス骨髄細胞を用いた小核試験で陰性⁵⁾、4-ニトロフェノールは、*S. typhimurium* を用いた復帰突然変異試験⁴⁾ および初代ラット肝細胞を用いた不定期 DNA 合成試験⁶⁾ で陰性、*Proteus mirabilis* を用いた DNA 修復試験で陽性⁷⁾、2-ニトロフェノールは、*S. typhimurium* を用いた復帰突然変異試験で陰性⁴⁾と報告されている。また、3-メチル-4-ニトロフェノールは、*S. typhimurium* および *Escherichia coli* を用いた復帰突然変異試験で陰性⁸⁾、CHL 細胞を用いた染色体異常試験で陽性⁹⁾と報告されている。

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) Purchase, I.F.H., Longstaff, E., Ashby, J., Styles, J.A., Anderson, D., Lefevre, P.A. and Westwood, F.R. (1978). An evaluation of 6 short-term tests

- for detecting organic chemical carcinogens. : *Br. J. Cancer*, **37**, 924-936.
- 4) Haworth, S., Lawlor, T., Mortelmans, K., Speck, W. and Zeiger, E. (1983). *Salmonella* mutagenicity test results for 250 chemicals. *Environmental Mutagenesis*, **5**, 3-142.
- 5) Gocke, E., King, M.T., Eckhart, K. and Wild, D. (1981). Mutagenicity of cosmetic ingredients licensed by the European Communities. *Mutation Research*, **90**, 91-109.
- 6) Probst, G.S., McMahon, R.E., Holl, L.E., Thompson, C.Z., Epp, J.K. and Neal, S.B. (1981). Chemically-induced DNA synthesis in primary rat hepatocyte cultures : A comparison with bacterial mutagenicity using 218 compounds. *Environmental Mutagenesis*, **3**, 11-32.
- 7) Adler, B., Braun, R., Schöneich, J. and Böhme, H. (1976). Repair-defective mutants of *Proteus mirabilis* as a prescreening system for the detection of potential carcinogens. *Biologisches Zentralblatt*, **95**, 463-469.
- 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.2” 化学物質点検推進委員会, 東京, 1995, pp.163-166.
- 9) 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.2” 化学物質点検推進委員会, 東京, 1995, pp.167-170.

表 1-1 S9 mix 非存在下における 2,4-ジニトロフェノール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	WP2uvrA	TA98	TA1537
陰 性 対 照 〔ジメチルスルホキシド〕	131	10	15	22	12
	116	15	16	23	9
	102	13	12	38	7
	(116 \pm 15)	(13 \pm 3)	(14 \pm 2)	(28 \pm 9)	(9 \pm 3)
78.1	--	--	--	40	5
	--	--	--	27	11
	--	--	--	33	11
	--	--	--	(33 \pm 7)	(9 \pm 3)
156	95	8	12	40	8
	112	13	19	32	11
	119	12	21	33	11
	(109 \pm 12)	(11 \pm 3)	(17 \pm 5)	(35 \pm 4)	(10 \pm 2)
313	135	11	7	44	10
	128	8	14	37	9
	99	14	15	30	12
	(121 \pm 19)	(11 \pm 3)	(12 \pm 4)	(37 \pm 7)	(10 \pm 2)
625	122	6	17	37	12
	149	3	13	35	10
	166	4	11	43	9
	(146 \pm 22)	(4 \pm 2)	(14 \pm 3)	(38 \pm 4)	(10 \pm 2)
1250	119	8	12	23	3*
	81	2	9	24	2*
	113	2	5	19	1*
	(104 \pm 20)	(4 \pm 3)	(9 \pm 4)	(22 \pm 3)	(2 \pm 1)
2500	0*	0*	4	0*	0*
	0*	0*	2	0*	0*
	0*	0*	4	0*	0*
	(0 \pm 0)	(0 \pm 0)	(3 \pm 1)	(0 \pm 0)	(0 \pm 0)
5000	0*	0*	0*	--	--
	0*	0*	0*	--	--
	0*	0*	0*	--	--
	(0 \pm 0)	(0 \pm 0)	(0 \pm 0)	--	--
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	963 925 923 (937 \pm 23)	476 367 446 (430 \pm 56)	703 708 657 (689 \pm 28)	444 421 473 (446 \pm 26)	537 496 739 (591 \pm 130)

() : 平均値 \pm 標準偏差

* : 菌の生育阻害が認められた。

-- : 試験せず

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 2,4-ジニトロフェノール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	WP2uvrA	TA98	TA1537
陰 性 対 照 〔ジメチルスルホキシド〕	114	10	20	23	14
	88	12	27	38	15
	100	14	24	25	13
	(101 \pm 13)	(12 \pm 2)	(24 \pm 4)	(29 \pm 8)	(14 \pm 1)
78.1	116	10	--	--	13
	98	16	--	--	14
	106	9	--	--	12
	(107 \pm 9)	(12 \pm 4)	--	--	(13 \pm 1)
156	89	8	17	29	11
	102	9	14	29	9
	106	10	18	35	11
	(99 \pm 9)	(9 \pm 1)	(16 \pm 2)	(31 \pm 3)	(10 \pm 1)
313	97	7	12	31	9
	95	10	11	26	9
	80	8	15	25	12
	(91 \pm 9)	(8 \pm 2)	(13 \pm 2)	(27 \pm 3)	(10 \pm 2)
625	81	7	14	27	3
	84	10	12	18	2
	90	6	11	28	2
	(85 \pm 5)	(8 \pm 2)	(12 \pm 2)	(24 \pm 6)	(2 \pm 1)
1250	12	3	11	3	0
	22	1	5	7	0
	5	1	10	13	0
	(13 \pm 9)	(2 \pm 1)	(9 \pm 3)	(8 \pm 5)	(0 \pm 0)
2500	0*	0*	0	0*	0*
	0*	0*	0	0*	0*
	0*	0*	0	0*	1*
	(0 \pm 0)	(0 \pm 0)	(0 \pm 0)	(0 \pm 0)	(0 \pm 1)
5000	--	--	0*	0*	--
	--	--	0*	0*	--
	--	--	0*	0*	--
	--	--	(0 \pm 0)	(0 \pm 0)	--
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	511 486 529 (509 \pm 22)	142 139 166 (149 \pm 15)	732 743 820 (765 \pm 48)	324 309 331 (321 \pm 11)	91 78 82 (84 \pm 7)

(): 平均値 \pm 標準偏差

* : 菌の生育阻害が認められた。

-- : 試験せず

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 2,4-ジニトロフェノールの復帰突然変異試験結果 [本試験 2 回目-直接法]

用 量 [$\mu\text{g}/\text{プレート}$]	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	WP2uvrA	TA98	TA1537
陰性対照 [ジメチルスルホキシド]	106	17	18	21	10
	104	8	16	19	13
	114	15	17	28	9
	(108 \pm 5)	(13 \pm 5)	(17 \pm 1)	(23 \pm 5)	(11 \pm 2)
78.1	--	--	--	33	12
	--	--	--	31	7
	--	--	--	37	11
	--	--	--	(34 \pm 3)	(10 \pm 3)
156	108	13	14	38	14
	106	8	22	36	14
	115	9	25	44	10
	(110 \pm 5)	(10 \pm 3)	(20 \pm 6)	(39 \pm 4)	(13 \pm 2)
313	110	10	19	44	13
	115	10	26	32	13
	110	11	27	38	17
	(112 \pm 3)	(10 \pm 1)	(24 \pm 4)	(38 \pm 6)	(14 \pm 2)
625	159	10	10	65	13
	139	9	11	42	18
	129	13	16	50	14
	(142 \pm 15)	(11 \pm 2)	(12 \pm 3)	(52 \pm 12)	(15 \pm 3)
1250	132	7	13	17	1*
	131	7	9	15	1*
	95	4	19	24	2*
	(119 \pm 21)	(6 \pm 2)	(14 \pm 5)	(19 \pm 5)	(1 \pm 1)
2500	0*	0*	4	0*	0*
	17*	0*	2	0*	0*
	4*	0*	1	0*	0*
	(7 \pm 9)	(0 \pm 0)	(2 \pm 2)	(0 \pm 0)	(0 \pm 0)
5000	0*	0*	0*	--	--
	0*	0*	0*	--	--
	0*	0*	0*	--	--
	(0 \pm 0)	(0 \pm 0)	(0 \pm 0)	--	--
陽性対照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
$\mu\text{g}/\text{プレート}$	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復 帰 変 異 コロニー数 /プレート	1102	415	882	415	607
	1100	431	893	395	858
	1056	386	888	371	696
	(1086 \pm 26)	(411 \pm 23)	(888 \pm 6)	(394 \pm 22)	(720 \pm 127)

(): 平均値 \pm 標準偏差

* : 菌の生育阻害が認められた。

-- : 試験せず

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 2,4-ジニトロフェノール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	WP2uvrA	TA98	TA1537
陰 性 対 照 〔ジメチルスルホキシド〕	100	8	18	43	16
	97	10	19	40	13
	107	9	28	38	13
	(101 \pm 5)	(9 \pm 1)	(22 \pm 6)	(40 \pm 3)	(14 \pm 2)
78.1	102	10	--	--	11
	97	6	--	--	17
	108	9	--	--	9
	(102 \pm 6)	(8 \pm 2)	--	--	(12 \pm 4)
156	97	11	17	30	13
	88	6	25	24	13
	98	9	17	29	12
	(94 \pm 6)	(9 \pm 3)	(20 \pm 5)	(28 \pm 3)	(13 \pm 1)
313	108	13	18	31	15
	88	10	19	29	8
	98	7	19	31	11
	(98 \pm 10)	(10 \pm 3)	(19 \pm 1)	(30 \pm 10)	(11 \pm 4)
625	77	9	17	45	9
	54	4	16	34	3
	51	4	17	26	4
	(61 \pm 14)	(6 \pm 3)	(17 \pm 1)	(35 \pm 10)	(5 \pm 3)
1250	17	1	16	8	0
	23	1	9	5	0
	25	2	16	3	0
	(22 \pm 4)	(1 \pm 1)	(14 \pm 4)	(5 \pm 3)	(0 \pm 0)
2500	0*	2*	5	0*	0*
	0*	3*	4	0*	0*
	0*	5*	11	1*	0*
	(0 \pm 0)	(3 \pm 2)	(7 \pm 4)	(0 \pm 1)	(0 \pm 0)
5000	--	--	0*	0*	--
	--	--	0*	0*	--
	--	--	0*	0*	--
	--	--	(0 \pm 0)	(0 \pm 0)	--
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	615 577 593 (595 \pm 19)	168 162 160 (163 \pm 4)	848 748 920 (839 \pm 86)	321 313 330 (321 \pm 9)	94 92 75 (87 \pm 10)

(): 平均値 \pm 標準偏差

* : 菌の生育阻害が認められた。

-- : 試験せず

2-AA : 2-アミノアントラセン

表 3 S9 mix 非存在下における 2,4-ジニトロフェノールの復帰突然変異試験結果 [確認試験 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	WP2uvrA	TA98	TA1537
陰性対照 〔ジメチルスルホキシド〕	--	--	--	28	--
	--	--	--	31	--
	--	--	--	25	--
	--	--	--	(28 \pm 3)	--
78.1	--	--	--	32	--
	--	--	--	34	--
	--	--	--	38	--
	--	--	--	(35 \pm 3)	--
156	--	--	--	39	--
	--	--	--	30	--
	--	--	--	33	--
	--	--	--	(34 \pm 5)	--
313	--	--	--	44	--
	--	--	--	46	--
	--	--	--	34	--
	--	--	--	(41 \pm 6)	--
469	--	--	--	46	--
	--	--	--	40	--
	--	--	--	46	--
	--	--	--	(44 \pm 3)	--
625	--	--	--	49	--
	--	--	--	50	--
	--	--	--	49	--
	--	--	--	(49 \pm 1)	--
938	--	--	--	60	--
	--	--	--	36	--
	--	--	--	47	--
	--	--	--	(48 \pm 12)	--
1250	--	--	--	19	--
	--	--	--	20	--
	--	--	--	15	--
	--	--	--	(18 \pm 3)	--
2500	--	--	--	0*	--
	--	--	--	0*	--
	--	--	--	0*	--
	--	--	--	(0 \pm 0)	--
陽性対照	--	--	--	AF-2	--
μg /プレート	--	--	--	0.1	--
復 帰 変 異 コロニー数 /プレート	--	--	--	300	--
	--	--	--	313	--
	--	--	--	314	--
	--	--	--	(309 \pm 8)	--

(): 平均値 \pm 標準偏差 * : 菌の生育阻害が認められた。 -- : 試験せず
AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

表 4 S9 mix 非存在下における 2,4-ジニトロフェノールの復帰突然変異試験結果〔確認試験 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	WP2uvrA	TA98	TA1537
陰 性 対 照 〔ジメチルスルホキシド〕	--	--	--	29	--
	--	--	--	24	--
	--	--	--	29	--
	--	--	--	(27 \pm 3)	--
78.1	--	--	--	39	--
	--	--	--	30	--
	--	--	--	28	--
	--	--	--	(32 \pm 6)	--
156	--	--	--	32	--
	--	--	--	50	--
	--	--	--	48	--
	--	--	--	(43 \pm 10)	--
313	--	--	--	48	--
	--	--	--	49	--
	--	--	--	45	--
	--	--	--	(47 \pm 2)	--
469	--	--	--	49	--
	--	--	--	45	--
	--	--	--	46	--
	--	--	--	(47 \pm 2)	--
625	--	--	--	53	--
	--	--	--	48	--
	--	--	--	42	--
	--	--	--	(48 \pm 6)	--
938	--	--	--	37	--
	--	--	--	52	--
	--	--	--	46	--
	--	--	--	(45 \pm 8)	--
1250	--	--	--	21	--
	--	--	--	14	--
	--	--	--	11	--
	--	--	--	(15 \pm 5)	--
2500	--	--	--	0*	--
	--	--	--	0*	--
	--	--	--	0*	--
	--	--	--	(0 \pm 0)	--
陽 性 対 照	--	--	--	AF-2	--
μg /プレート	--	--	--	0.1	--
復 帰 変 異 コ ロ ニ ー 数 / プ レ ー ト	--	--	--	364	--
	--	--	--	382	--
	--	--	--	384	--
	--	--	--	(377 \pm 11)	--

() : 平均値 \pm 標準偏差 * : 菌の生育阻害が認められた。 -- : 試験せず
AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

図 1-1 2,4-ジニトロフェノールの復帰突然変異試験結果—本試験1回目

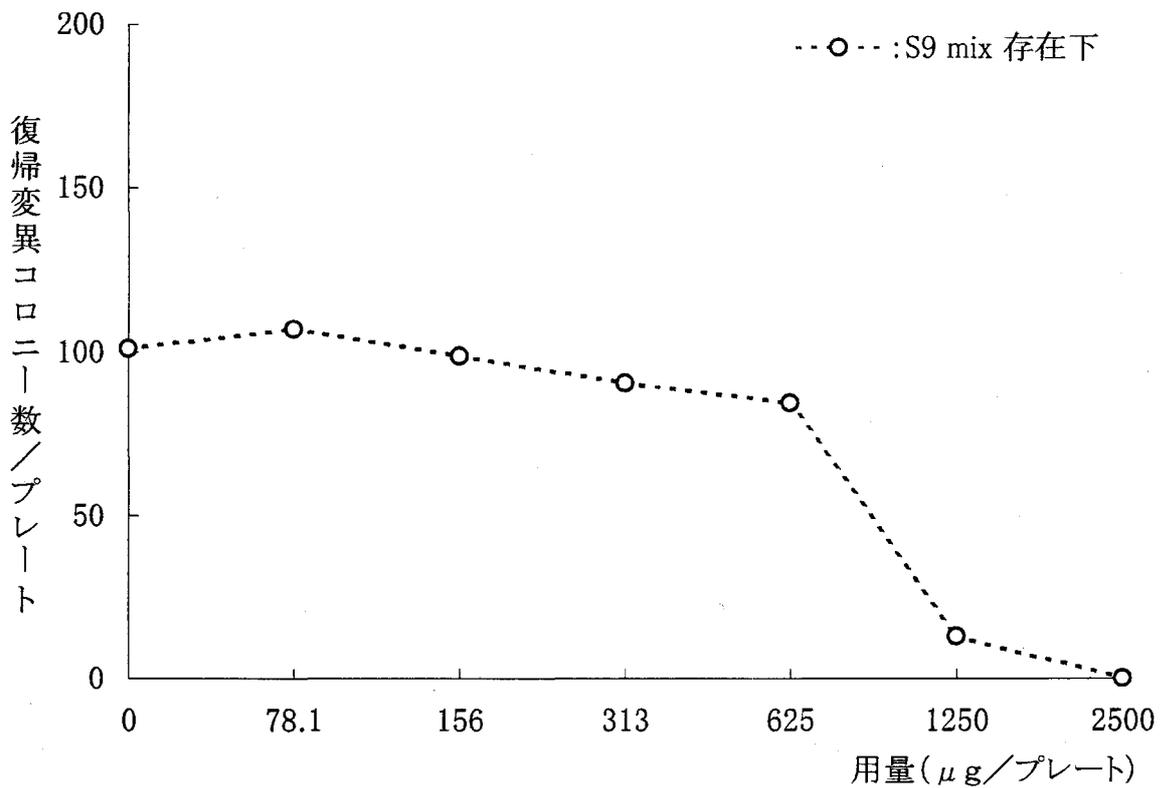
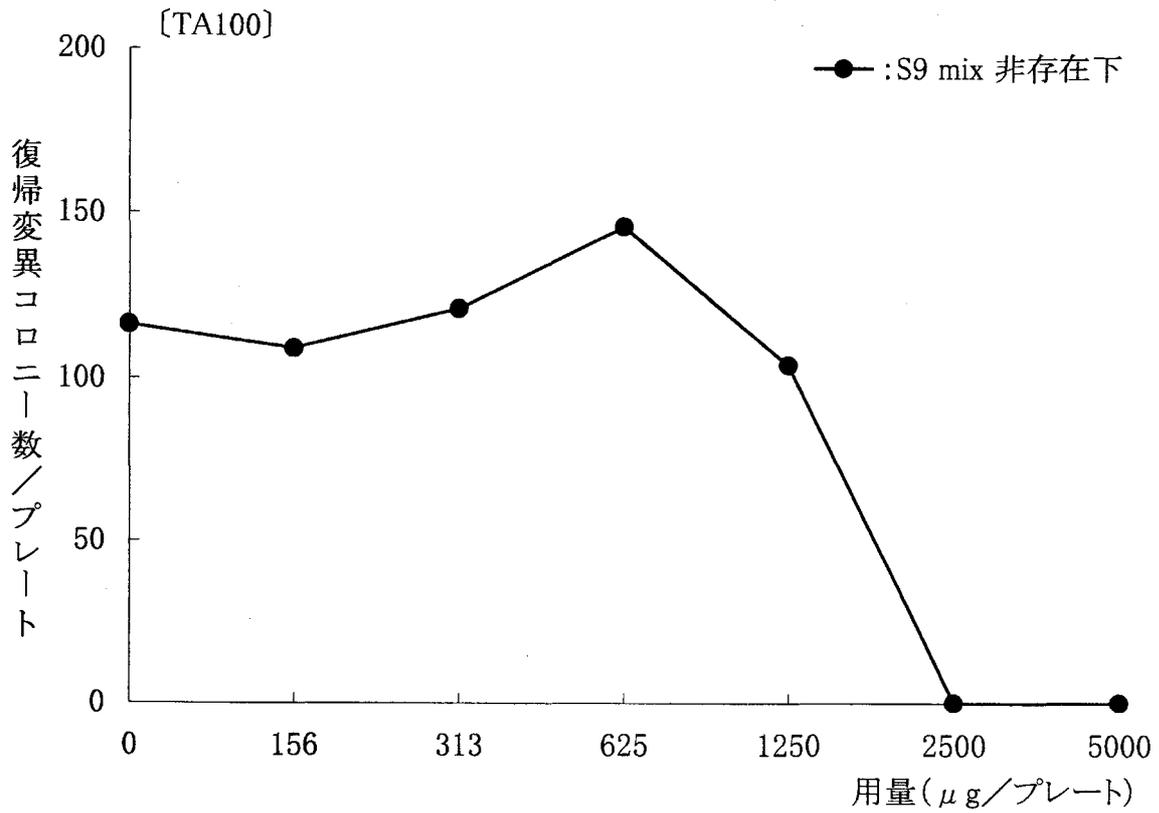


図 1-2 2,4-ジニトロフェノールの復帰突然変異試験結果—本試験1回目

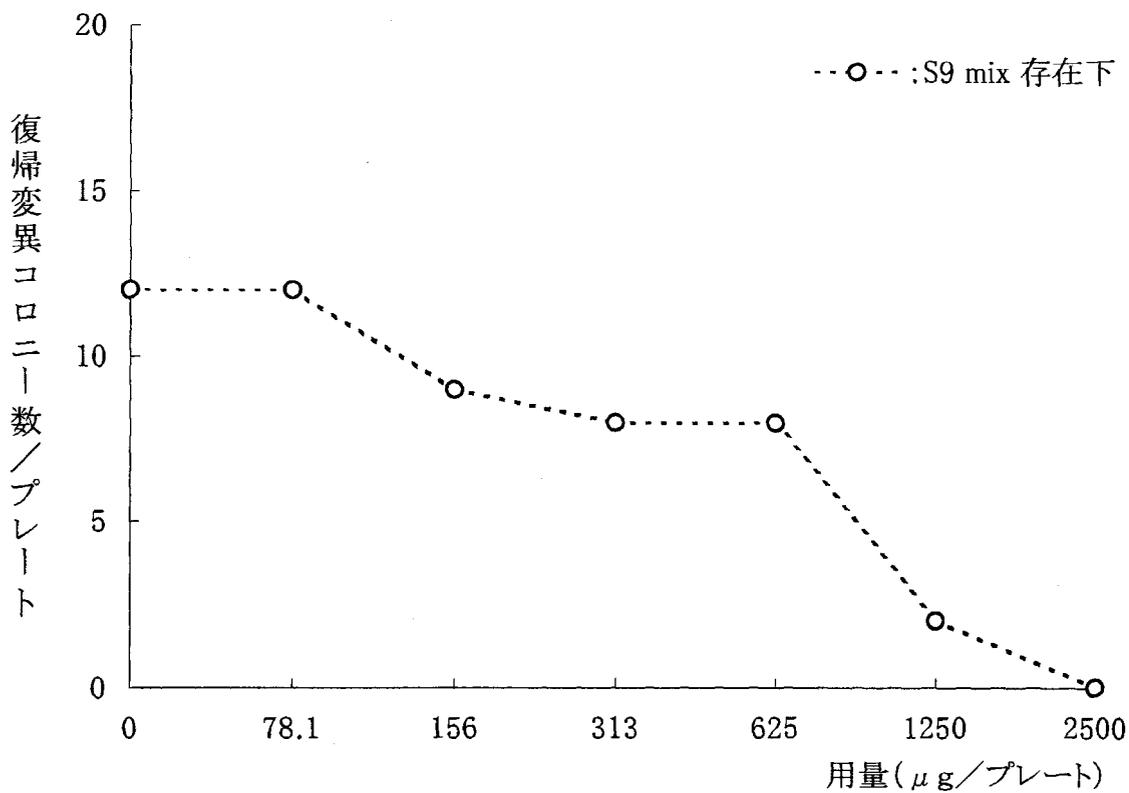
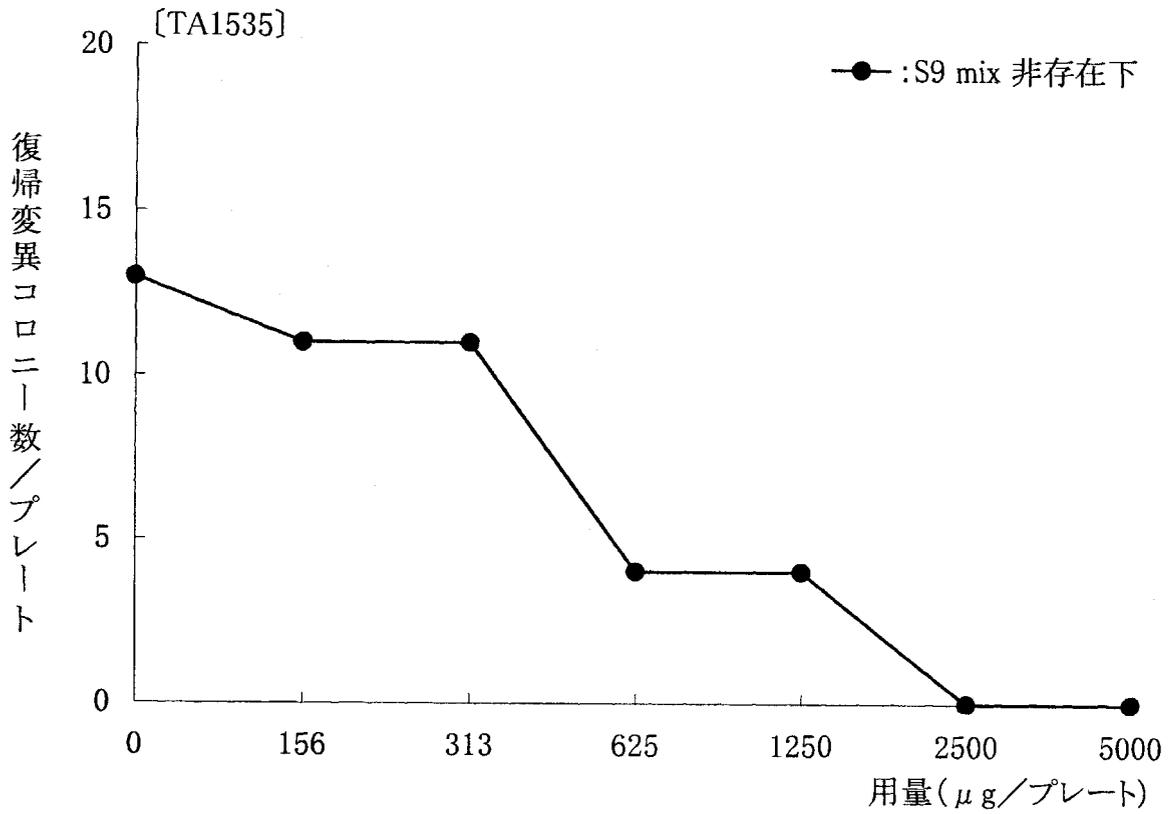


図 1-3 2,4-ジニトロフェノールの復帰突然変異試験結果—本試験1回目

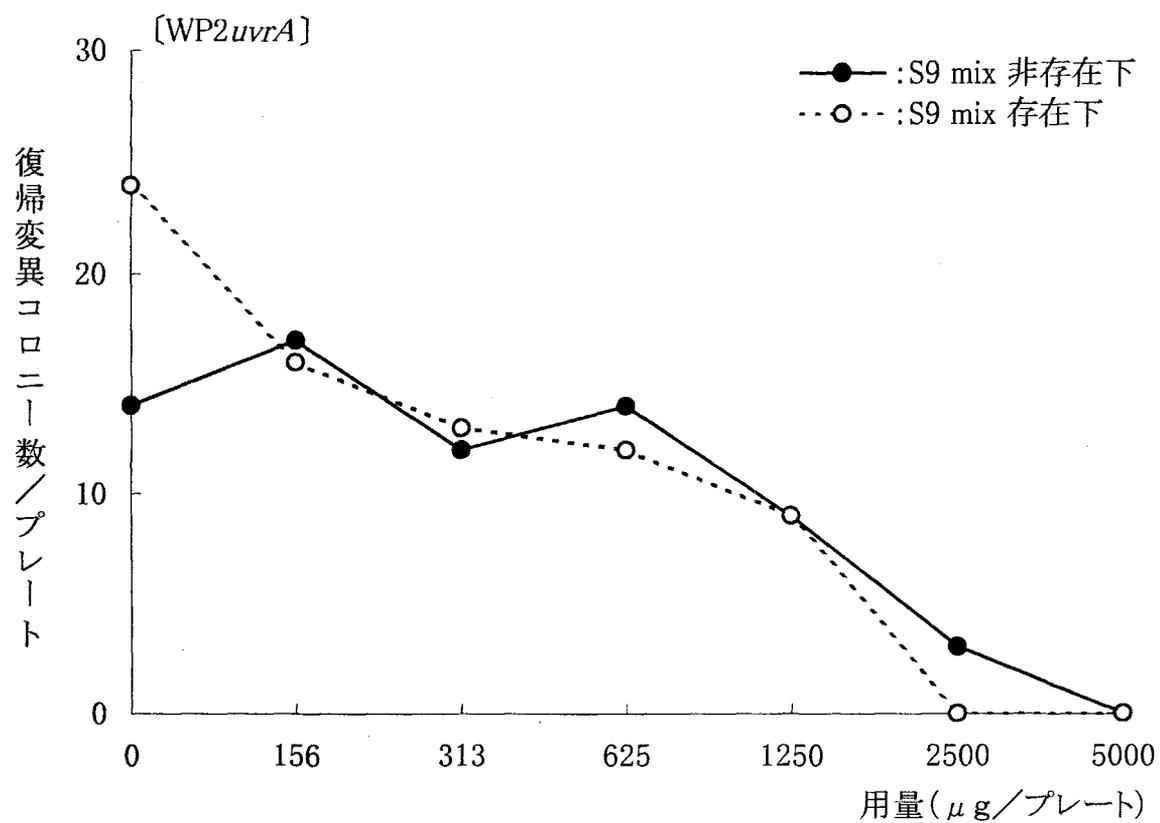


図 1-4 2,4-ジニトロフェノールの復帰突然変異試験結果—本試験1回目

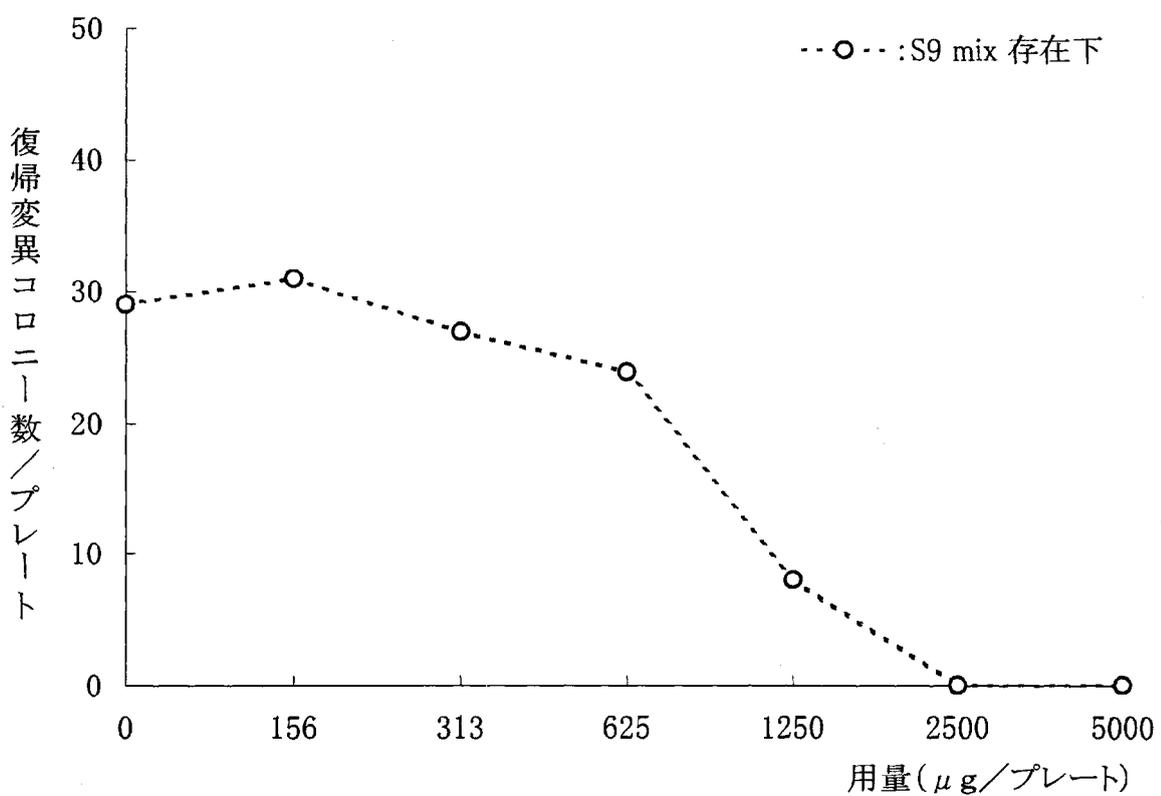
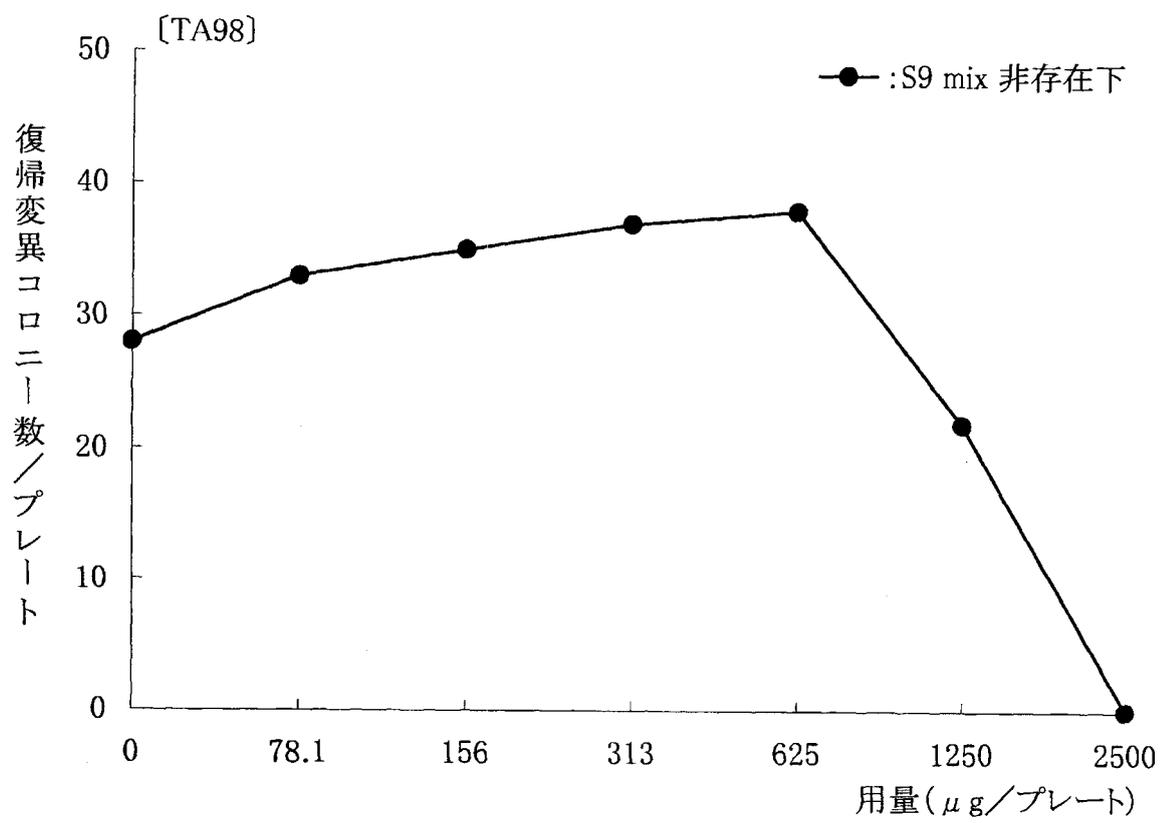


図 1-5 2,4-ジニトロフェノールの復帰突然変異試験結果—本試験1回目

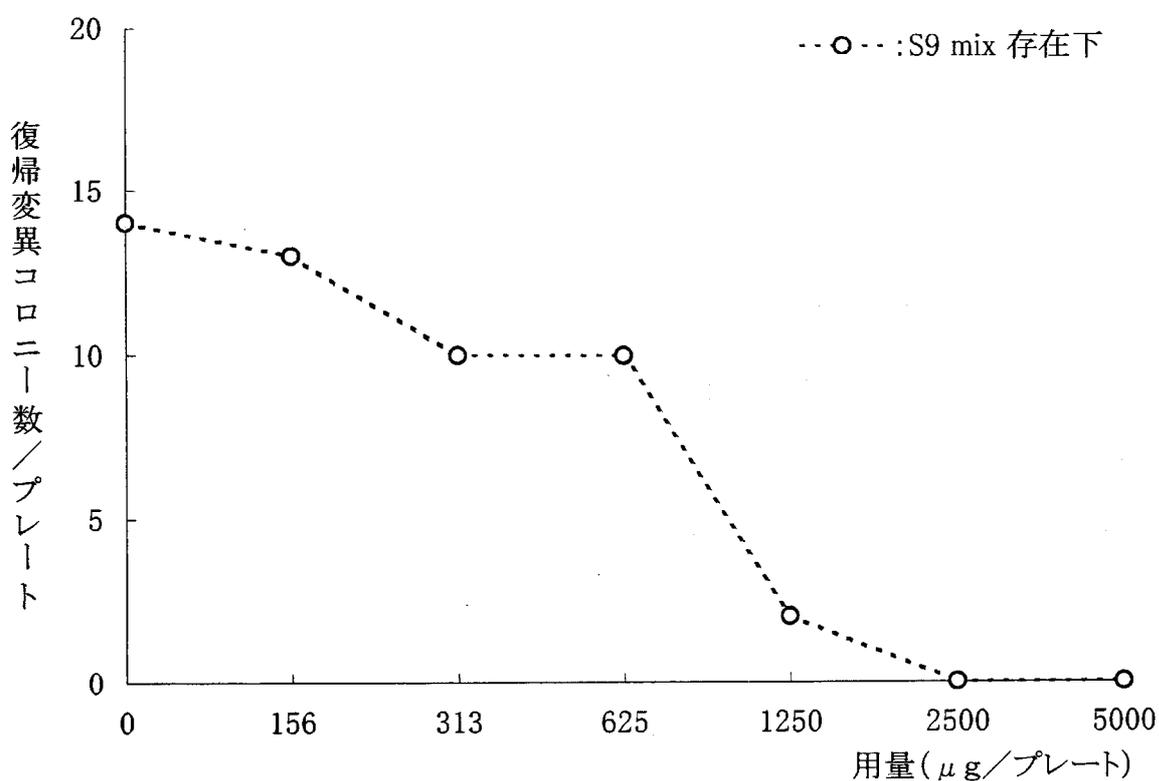
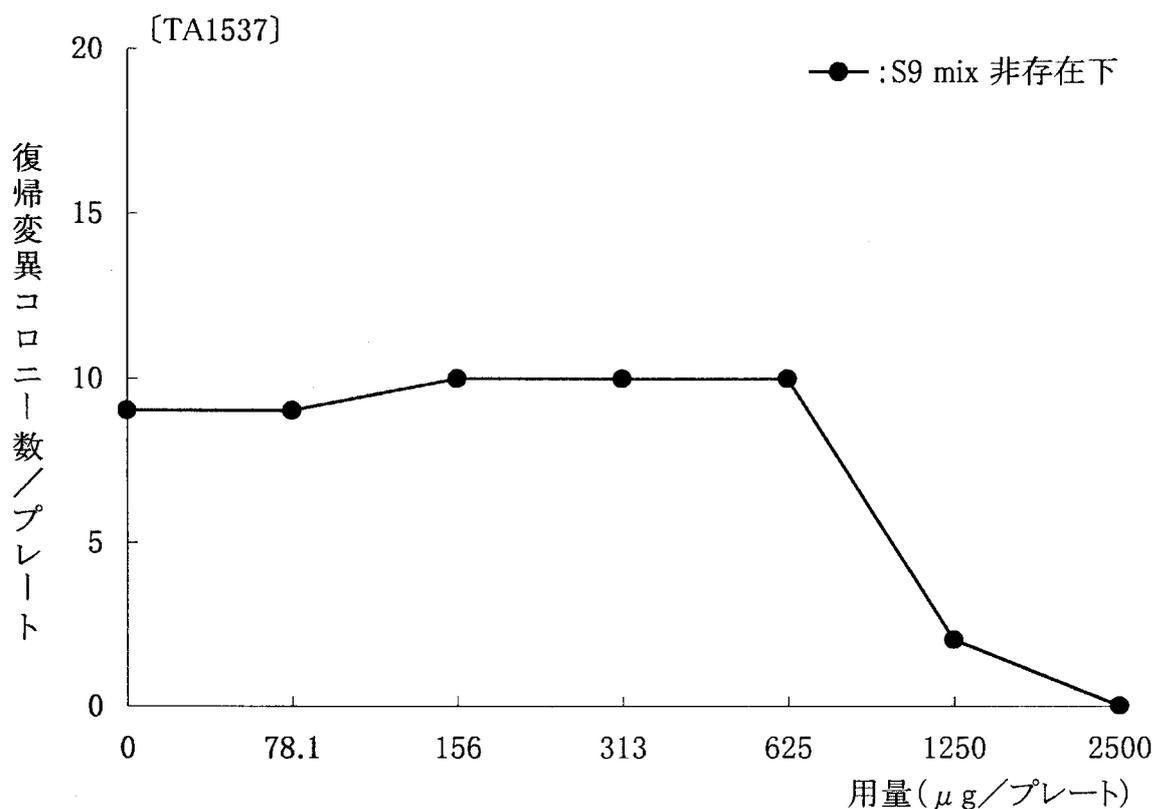


図 2-1 2,4-ジニトロフェノールの復帰突然変異試験結果—本試験2回目

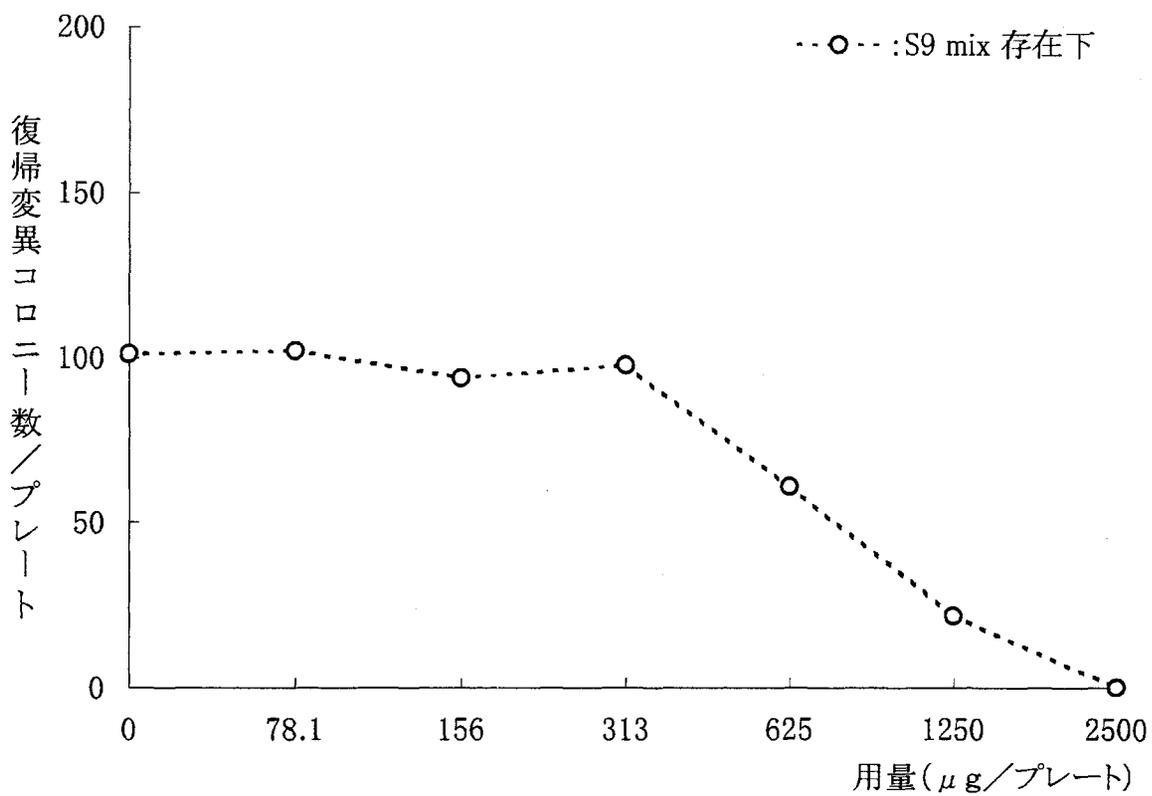
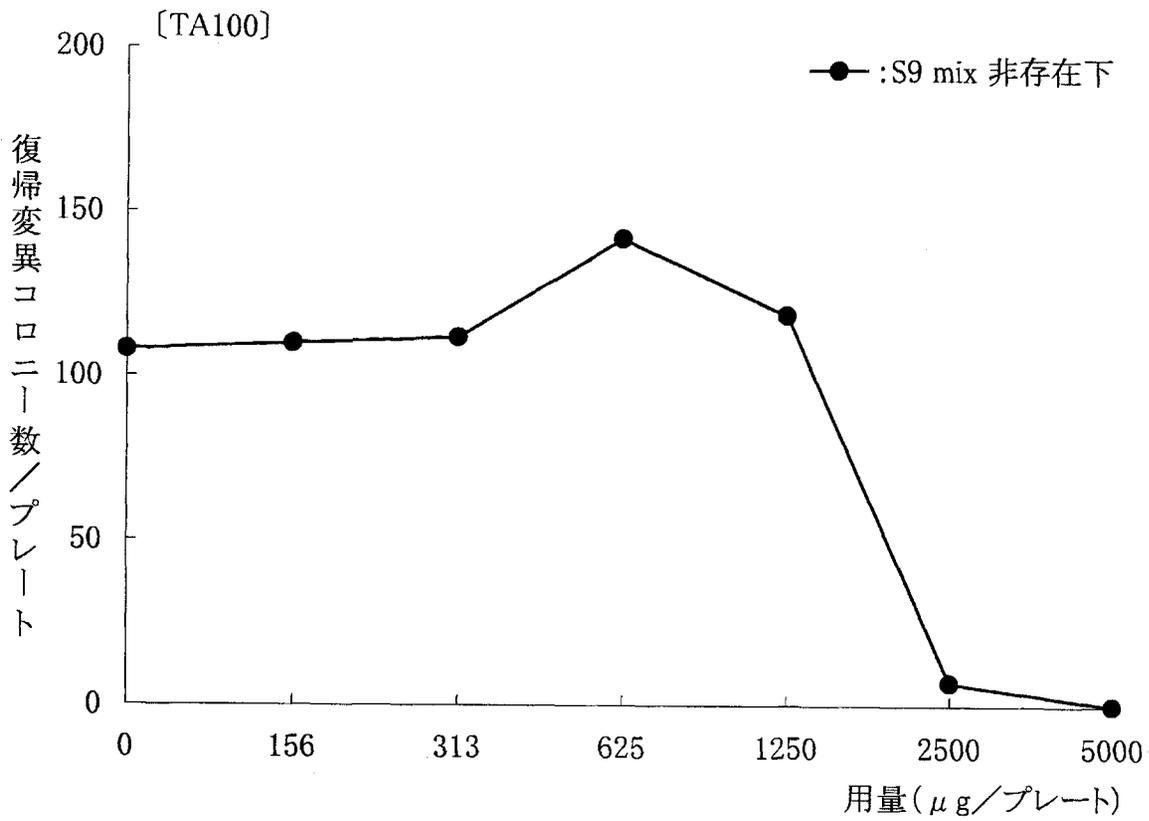


図 2-2 2,4-ジニトロフェノールの復帰突然変異試験結果—本試験2回目

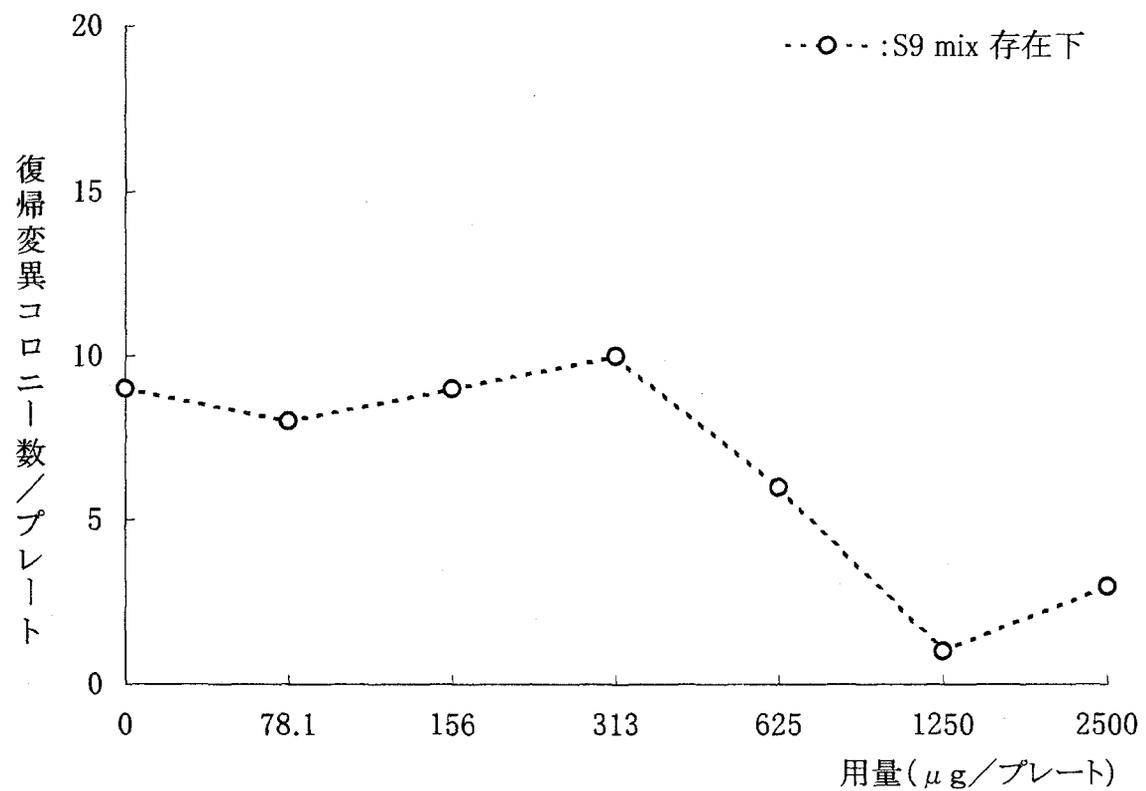
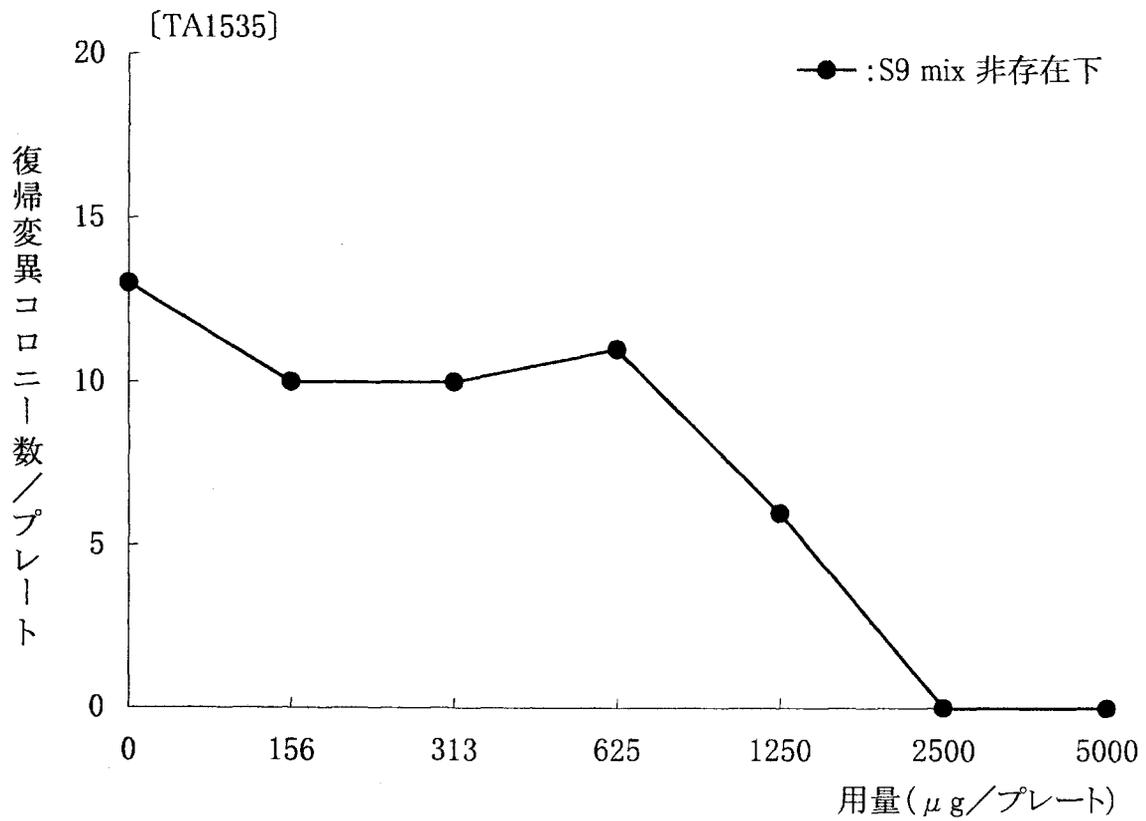


図 2-3 2,4-ジニトロフェノールの復帰突然変異試験結果—本試験2回目

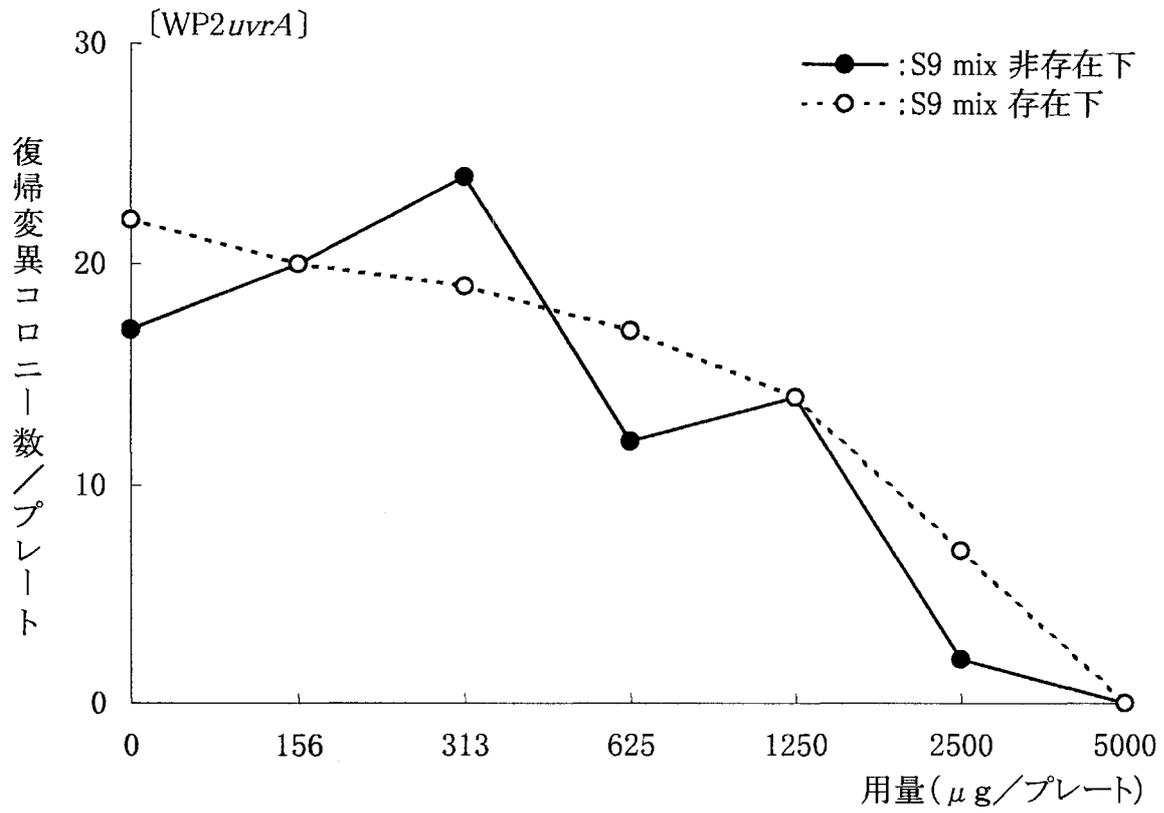


図 2-4 2,4-ジニトロフェノールの復帰突然変異試験結果—本試験2回目

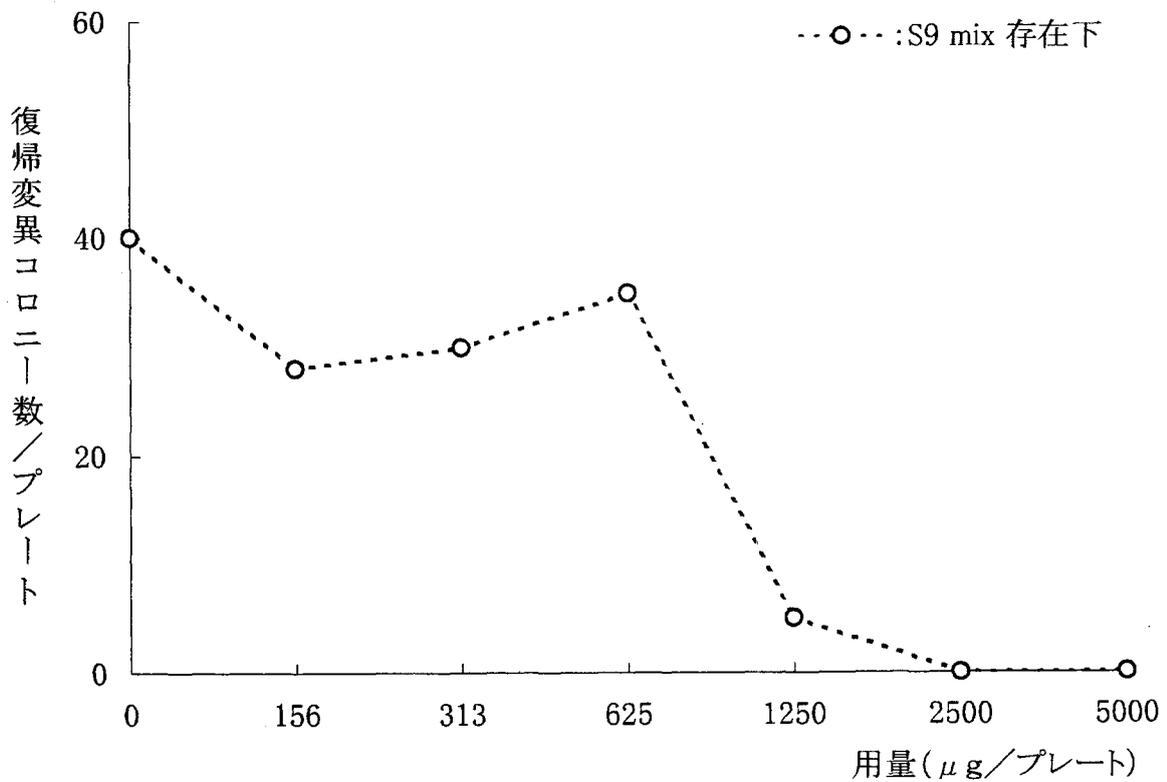
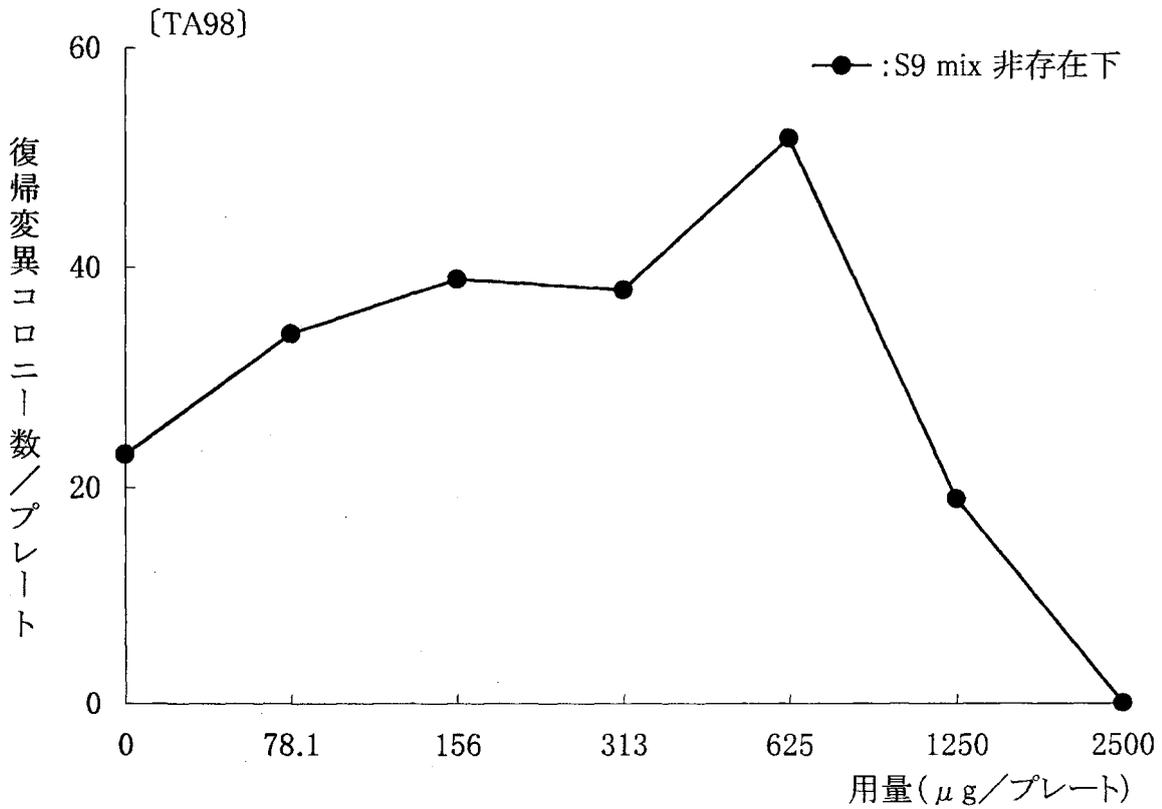


図 2-5 2,4-ジニトロフェノールの復帰突然変異試験結果—本試験2回目

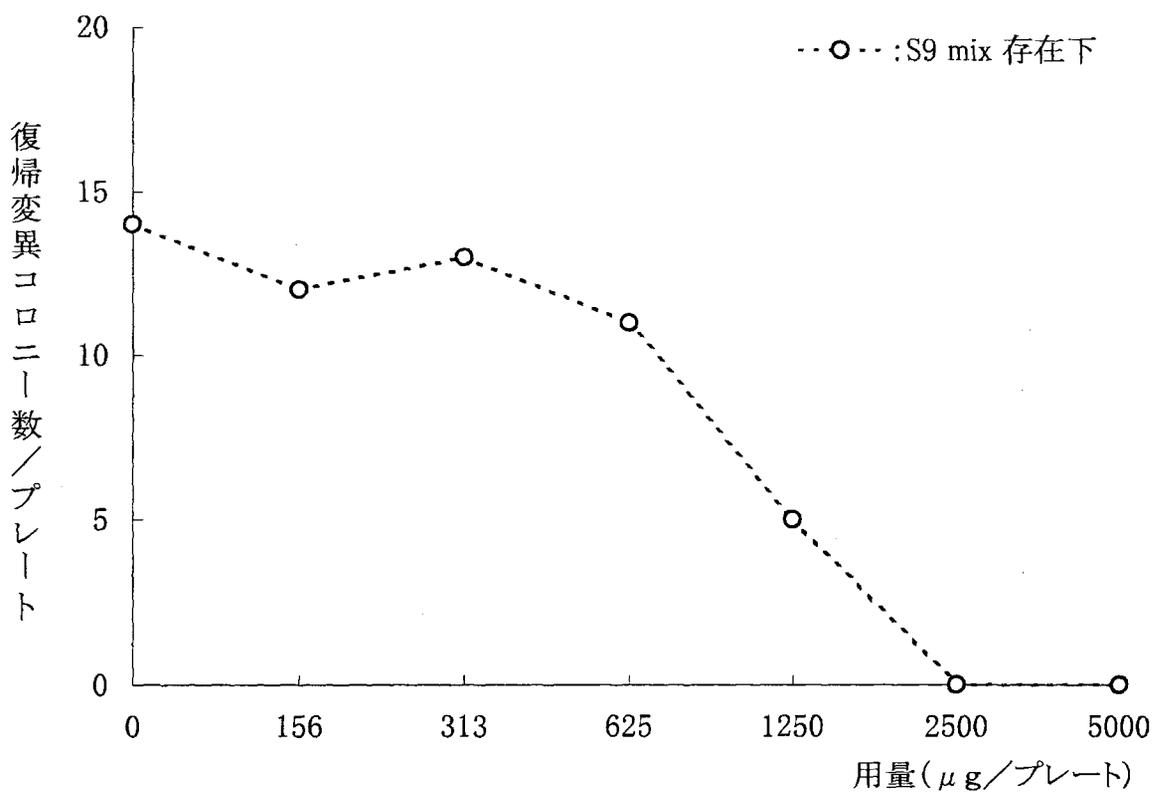
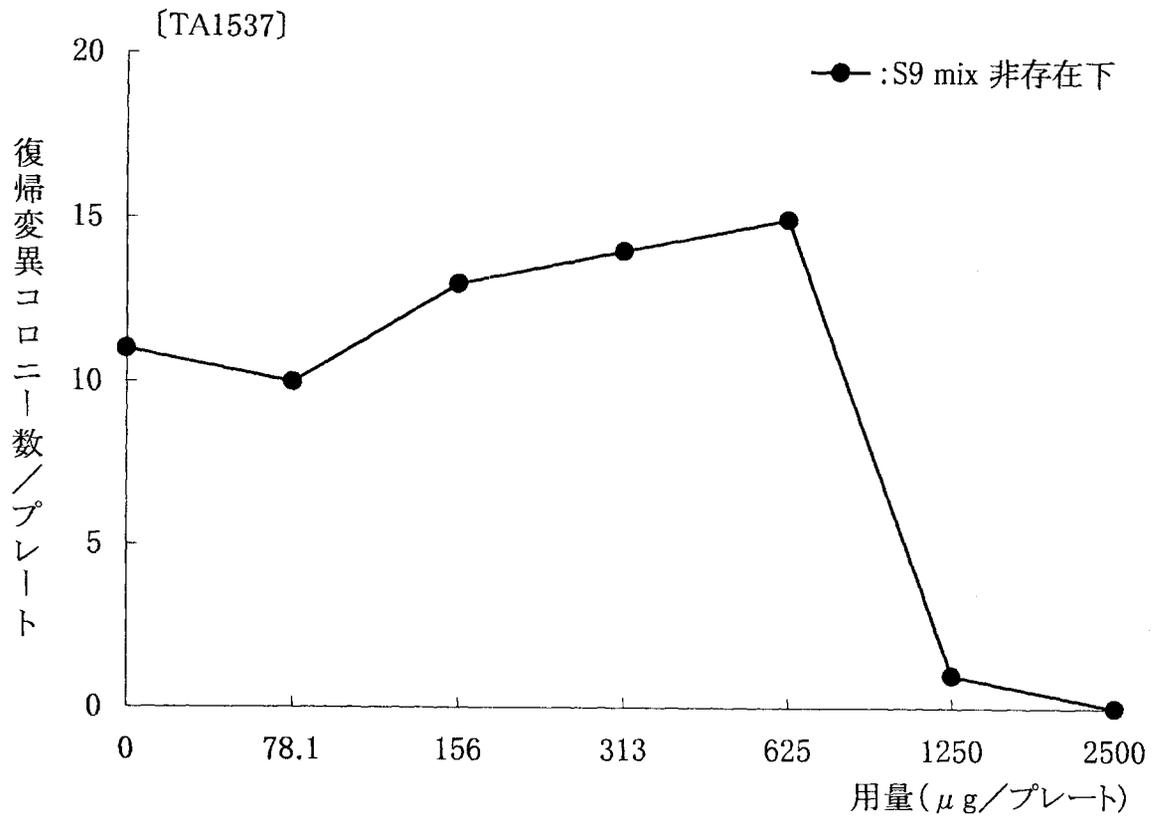


図3 2,4-ジニトロフェノールの復帰突然変異試験結果—確認試験1回目

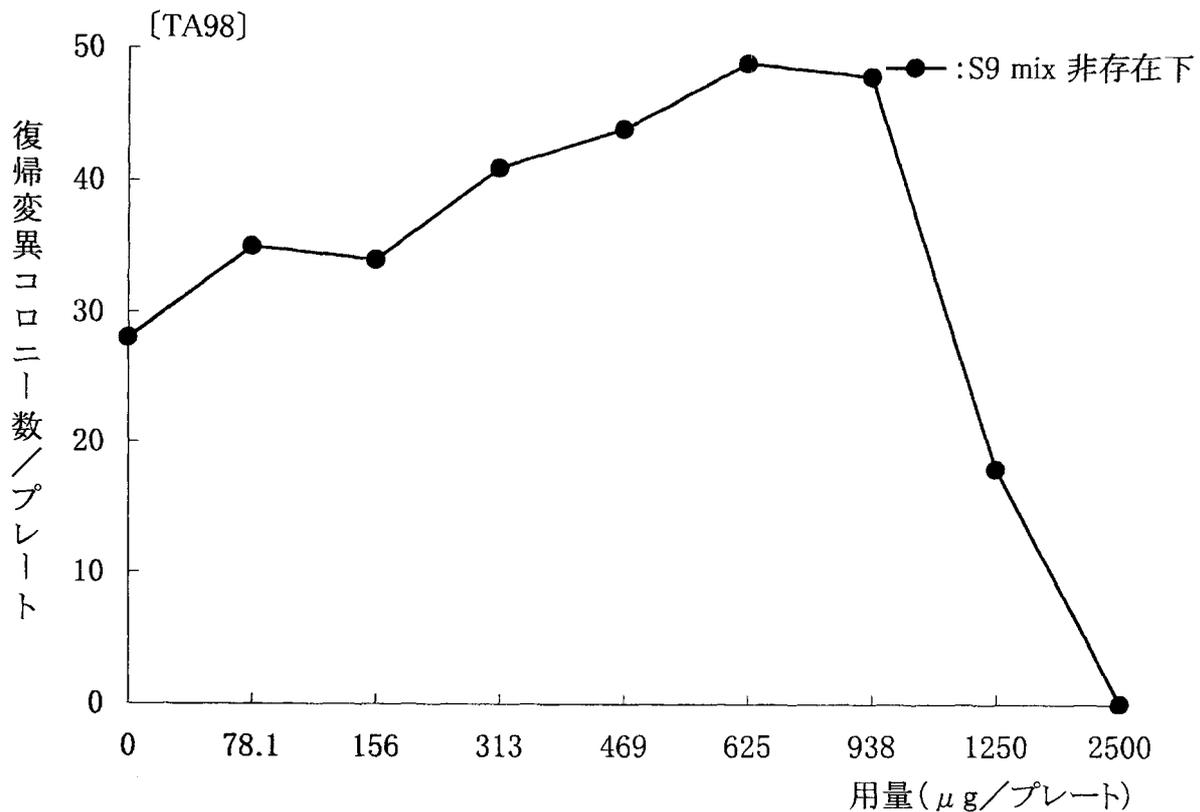


図4 2,4-ジニトロフェノールの復帰突然変異試験結果—確認試験2回目

