

最終報告書

表 題：2-ブロモ-2-ニトロプロパン-1,3-ジオールの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：S R 0 5 3 7 9

株式会社 化合物安全性研究所

目 次

表紙	1
目次	4
要約	9
緒言	11
材料および方法	11
成績	21
考察	23
参考資料	24

Tables

Table 1	Reverse mutation test of 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537 and <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA without metabolic activation (dose-finding test) (SR05379).....	26
Table 2	Reverse mutation test of 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537 and <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA with metabolic activation (dose-finding test) (SR05379)	27
Table 3	Reverse mutation test of 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537 and <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA without metabolic activation (I) (SR05379)	28
Table 4	Reverse mutation test of 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537 and <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA with metabolic activation (I) (SR05379).....	29
Table 5	Reverse mutation test of 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol in <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 without metabolic activation (confirmatory test) (SR05379).....	30

Table 6-1	Reverse mutation test of 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA1537 and <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA without metabolic activation (II) (SR05379) ······	31
Table 6-2	Reverse mutation test of 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol in <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 without metabolic activation (II) (SR05379) ······	32
Table 7	Reverse mutation test of 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537 and <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA with metabolic activation (II) (SR05379) ······	33

Figures

Figure 1-1	Reverse mutation test of 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100 without metabolic activation (dose-response curves) (SR05379) ······	34
Figure 1-2	Reverse mutation test of 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100 with metabolic activation (dose-response curves) (SR05379) ······	35
Figure 2-1	Reverse mutation test of 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol in <i>Salmonella typhimurium</i> TA1535 without metabolic activation (dose-response curves) (SR05379) ······	36
Figure 2-2	Reverse mutation test of 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol in <i>Salmonella typhimurium</i> TA1535 with metabolic activation (dose-response curves) (SR05379) ······	37
Figure 3-1	Reverse mutation test of 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol in <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA without metabolic activation (dose-response curves) (SR05379) ······	38
Figure 3-2	Reverse mutation test of 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol in <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA with metabolic activation (dose-response curves) (SR05379) ······	39
Figure 4-1-1	Reverse mutation test of 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol in <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 without metabolic activation (dose-response curves) (SR05379) ······	40
Figure 4-1-2	Reverse mutation test of 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol in <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 without metabolic activation (dose-response curves) (SR05379) ······	41

Figure 4-2	Reverse mutation test of 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol in <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 with metabolic activation (dose-response curves) (SR05379) · · · · ·	42
Figure 5-1	Reverse mutation test of 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol in <i>Salmonella typhimurium</i> TA1537 without metabolic activation (dose-response curves) (SR05379) · · · · ·	43
Figure 5-2	Reverse mutation test of 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol in <i>Salmonella typhimurium</i> TA1537 with metabolic activation (dose-response curves) (SR05379) · · · · ·	44

要 約

2-ブロモ-2-ニトロプロパン-1,3-ジオールの細菌における遺伝子突然変異誘発性を検討する目的で、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2uvrA を用いる復帰突然変異試験を実施した。試験は代謝活性化系 (S9 mix) の非存在下(直接法)ならびに存在下(代謝活性化法)において、プレインキュベーション法により実施した。

用量設定試験の結果に基づき、本試験を2回実施した。

本試験1回目(1.17~75あるいは4.69~150 µg/plate)

S. typhimurium TA98 の直接法において、18.8 µg/plate の用量の復帰変異コロニー数の平均値は、陰性対照群の値の2倍以上となった。*S. typhimurium* TA98 の直接法を除く試験群では、被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の値の2倍未満で、用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加もみられなかった。生育阻害が、各菌株の37.5 µg/plate 以上、75 µg/plate 以上あるいは150 µg/plate の用量で観察された。被験物質の析出は観察されなかった。

S. typhimurium TA98 の直接法についての確認試験(9.83~37.5 µg/plate)の結果、15.4および19.2 µg/plate の用量の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の値の2倍以上となり、また、用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加が認められた。変異原比活性は、1510 revertants/mg であった。生育阻害が24.0 µg/plate 以上の用量で観察された。被験物質の析出は観察されなかった。

本試験2回目

本試験1回目あるいは確認試験と同様の用量で実施した。

S. typhimurium TA98 の直接法では、15.4、19.2および24.0 µg/plate の用量の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の値の2倍以上となり、また、用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加が認められた。変異原比活性は、1333 revertants/mg であった。*S. typhimurium* TA98 の直接法を除く試験群では、被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の値の2倍未満で、用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加もみられなかった。生育阻害が、各菌株とも本試験1回目と同様の用量で観察された。被験物質の析出は観察されなかった。

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

以上のことから、2-ブロモ-2-ニトロプロパン-1,3-ジオールは、当該試験条件において、代謝活性化系の非存在下で *S. typhimurium* TA98 に対する遺伝子突然変異誘発性を有すると判断した。

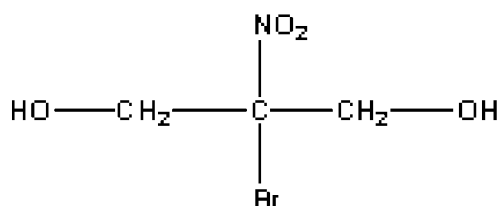
緒 言

2-ブロモ-2-ニトロプロパン-1,3-ジオールの細菌における遺伝子突然変異誘発性を、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2uvrA を用いる復帰突然変異試験により検討した。試験は、代謝活性化系(S9 mix)の非存在下(直接法)ならびに存在下(代謝活性化法)において、プレインキュベーション法により実施した。

材料および方法

1. 被験物質

名称	: 2-ブロモ-2-ニトロプロパン-1,3-ジオール
英名	: 2-Bromo-2-nitro-1,3-propanediol
CAS No.	: 52-51-7
化審法官報公示整理番号	: (2)-325
構造式	:



分子式	: C ₃ H ₆ BrNO ₄
分子量	: 199.99
物理化学的性質	: 外観 ; 白色結晶
	臭い ; 無臭
	pH ; 5~6(1%水溶液)
	沸点 ; データなし
	融点 ; 130~133℃
	引火点 ; データなし
	発火点 ; データなし

爆発限界；データなし

蒸気圧；データなし

比重；データなし

溶解性；水、エタノール及びアセトンに溶けやすい。

水溶状；澄明

ロット番号

含量(HPLC) : 99.7% (Appendix 1)

水分 : 0.04% (Appendix 1)

不純物の名称およびその濃度：不明(データなし)

製造者

入手量 : 25 g (関連試験と共通)

安定性 : 実験終了後に、残余被験物質について純度に関する分析成績を製造者より入手した。その結果、被験物質は実験期間中安定であったことが確認された (Appendix 2)。

保存条件 : 密閉、遮光、冷所 (実測範囲：1～10℃)

取扱上の注意 : 吸い込んだり、眼、皮膚及び衣類に触れないように、適切な保護具を着用して取扱った。

残余被験物質の処置 : 試験操作終了後、残余被験物質全てを純度分析のため製造者へ送付した。

2. 被験物質の調製

被験物質を精秤し、日本薬局方注射用水 (ロット番号 5L88、株式会社大塚製薬工場) を用いて溶解および希釈し調製した。なお、被験物質は水に溶けやすいことから、日本薬局方注射用水を調製媒体として選択した。

用量設定試験では、50 mg/mL 調製液を公比約 3 で段階希釈し 15、5、1.5、0.5、0.15 および 0.05 mg/mL 調製液を調製した。

本試験 1 回目では、15 mg/mL 調製液から 1.5 mg/mL 調製液を調製後、1.5 mg/mL 調製液から公比 2 で段階希釈し 0.750、0.375、0.188、0.0938、0.0459、0.0234 および 0.0117 mg/mL 調製液を調製した。確認試験では、7.5 mg/mL 調製液から 0.750 および 0.375 mg/mL 調製液を調製後、0.375 mg/mL 調製液から公比 1.25 で段階希釈し 0.300、0.240、0.192、0.154、0.123 および 0.0983 mg/mL 調製液を調製した。

本試験 2 回目では、15 mg/mL 調製液から 1.5 および 0.750 mg/mL 調製液を調製後、0.750 mg/mL 調製液から公比 2 で段階希釈し 0.375、0.188、0.0938、0.0469、0.0234 および 0.0117 mg/mL 調製液を、0.375 mg/mL 調製液から公比 1.25 で段階希釈し 0.300、0.240、0.192、0.154、0.123 および 0.0983 mg/mL 調製液を調製した。

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

これらの調製液はクリーンベンチ内で用時調製し、調製に際してはマスクおよび手袋を着用し、吸引したり皮膚に触れないようにして取扱った。

被験物質調製液は、用量設定試験および本試験 2 回目では調製後 2.4 時間以内に、本試験 1 回目では調製後 2.3 時間以内に、確認試験では調製後 0.6 時間以内に使用した。

残余調製液は、焼却処分するために、産業廃棄物として回収した。

3. 陰性対照物質

陰性対照物質として、被験物質の調製媒体である日本薬局方注射用水(ロット番号 5L88、株式会社大塚製薬工場)を原液のまま使用した。

4. 陽性対照物質およびその調製

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

陽性対照物質は、含量補正をせずにそれぞれ次表の濃度に調製し、分注後-20℃以下で凍結保存したものを解凍後 2.1 時間以内に使用した。調製液は、調製日より 5 ヶ月以内(使用期限：調製後 1 年)に使用した。

陽性対照物質	調製濃度	調製媒体
2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド(含量 98.3%) ロット番号 SDJ4376 和光純薬工業株式会社	0.1 および 1 µg/mL	ジメチルスルホキシド ロット番号 TA026 株式会社同仁化学研究所
アジ化ナトリウム(純度 99.8%) ロット番号 SDH6348 和光純薬工業株式会社	5 µg/mL	日本薬局方注射用水 ロット番号 5D73 株式会社大塚製薬工場

陽性対照物質	調製濃度	調製媒体
9-アミノアクリジン塩酸塩水和物 (含量 98.8%) ロット番号 03024JR Sigma-Aldrich Corporation	800 µg/mL	ジメチルスルホキシド ロット番号 TA026 株式会社同仁化学研究所
2-アミノアントラセン (含量 97.4%) ロット番号 TCG4316 和光純薬工業株式会社	5、10、20 およ び 100 µg/mL	ジメチルスルホキシド ロット番号 TA026 株式会社同仁化学研究所

5. 試験菌株

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

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

6. 培地

(1) 前培養用培地

前培養用のニュートリエントブロス培地として、ニュートリエントブロス(OXOID NUTRIENT BROTH No. 2、ロット番号 298714、OXOID LTD.)を日本薬局方注射用水(ロット番号 6J92、株式会社大塚製薬工場)を用いて 25 g/L に調製した。*S. typhimurium* TA98 および TA100 の培地には、使用時にアンピシリンナトリウム(ロット番号 M3F9025、ナカライテスク株式会社)を 25 µg/mL となるように添加した。

(2) 試験用培地(最少グルコース寒天培地)

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

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

(3) 重層用培地

次表の組成のソフトアガーおよびアミノ酸溶液を蒸留水を用いて調製し、使用時に (A) : (B) = 10:1 の容量比で混合した。*S. typhimurium* には L-ヒスチジンおよび D-ビオチンのアミノ酸溶液を、*E. coli* には L-トリプトファンのアミノ酸溶液を使用した。

重層用培地の組成	
(A) ソフトアガー	
Bacto™ Agar	0.6 %
(ロット番号 5123150、Becton, Dickinson and Company)	
塩化ナトリウム	0.5 %
(ロット番号 611F1714、関東化学株式会社)	
(B) アミノ酸溶液	
L-ヒスチジンおよび D-ビオチン溶液	各々 0.5 mmol/L
(L-ヒスチジン、ロット番号 ASP6644、和光純薬工業株式会社)	
(D-ビオチン、ロット番号 LTM1077、和光純薬工業株式会社)	
または	
L-トリプトファン溶液	0.5 mmol/L
(L-トリプトファン、ロット番号 ASG2385、和光純薬工業株式会社)	

7. S9 mix

S9 mix は、S9(ロット番号 RAA-554、2007 年 2 月 2 日製造、キッコーマン株式会社)、S9 mix 用 Cofactor(Cofactor-I、ロット番号 999604、オリエンタル酵母工業株式会社)および日本薬局方注射用水(ロット番号 5L88、株式会社大塚製薬工場)を用いて用時調製した。

S9 は、購入後-80℃以下で保存し、製造日より 3 ヶ月以内(使用期限：製造後 6 ヶ月)に使用した。この S9 は、フェノバルビタールおよび 5,6-ベンゾフラボンの腹腔内投与で酵素誘導した Slc:SD 系ラット(雄、7 週齢)の肝ホモジネートより調製された。

S9 mix 1 mL 中の組成は次表の通りである。

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

8. 試験群

(1) 用量設定試験

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

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

(2) 本試験

1) 本試験 1 回目

各菌株につき、直接法および代謝活性化法で試験を実施した。

直接法では、用量設定試験の結果 50 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の用量で生育阻害が観察されたことから、被験物質の最高用量を 75 あるいは 150 $\mu\text{g}/\text{plate}$ とし、以下公比 2 で低下させた計 6 用量 (4.69～150 $\mu\text{g}/\text{plate}$)あるいは 7 用量(1.17～75 $\mu\text{g}/\text{plate}$)を設定した。

代謝活性化法では、用量設定試験の結果 150 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の用量で生育阻害が観察されたことから、被験物質の最高用量を 150 $\mu\text{g}/\text{plate}$ とし、以下公比 2 で低下させた計 6 用量 (4.69～150 $\mu\text{g}/\text{plate}$)を設定した。

2) 本試験 1 回目の確認試験

本試験 1 回目の結果、*S. typhimurium* TA98 の直接法では、18.8 µg/plate の用量の復帰変異コロニー数の平均値が、陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値の 2 倍以上となったことから、同菌株の直接法について確認試験を行った。

被験物質の最高用量を 37.5 µg/plate とし、以下公比 1.25 で低下させた計 7 用量 (9.83～37.5 µg/plate) を設定した。

3) 本試験 2 回目

各菌株につき、直接法および代謝活性化法で試験を実施した。

直接法では、*S. typhimurium* TA98 を除く各菌株は、本試験 1 回目と同様に被験物質の最高用量を 75 あるいは 150 µg/plate とし、以下公比 2 で低下させた計 6 用量 (4.69～150 µg/plate) あるいは 7 用量 (1.17～75 µg/plate) を設定した。*S. typhimurium* TA98 では、本試験 1 回目の確認試験と同様に被験物質の最高用量を 37.5 µg/plate とし、以下公比 1.25 で低下させた計 7 用量 (9.83～37.5 µg/plate) を設定した。

代謝活性化法では、各菌株とも本試験 1 回目と同様に被験物質の最高用量を 150 µg/plate とし、以下公比 2 で低下させた計 6 用量 (4.69～150 µg/plate) を設定した。

(3) 陰性対照群および陽性対照群

試験系列毎に、陰性対照群 (日本薬局方注射用水) および次表の陽性対照群を設定した。

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

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

NaN₃ : アジ化ナトリウム、 9-AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩水和物

2-AA : 2-アミノアントラセン

(4) プレート数およびプレートの識別

プレート数は、各試験群ともに 3 枚とした。

プレートには、識別のための試験番号および試験群を記載したラベルを貼付した。

9. 試験方法

(1) 試験菌株の前培養

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

各培養液の生菌数(計算値)は次表の通りであった。

供試菌株	生菌数(計算値)($\times 10^9$ cells/mL)			
	用量設定試験	本試験(1 回目)	確認試験	本試験(2 回目)
<i>S. typhimurium</i> TA100	3.35	3.21	—	3.21
<i>S. typhimurium</i> TA1535	4.03	3.87	—	3.87
<i>E. coli</i> WP2uvrA	4.68	4.68	—	4.68
<i>S. typhimurium</i> TA98	3.33	3.21	2.96	3.09
<i>S. typhimurium</i> TA1537	2.14	2.07	—	2.07

(2) 被験物質調製液および対照物質調製液の処理

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

蓋付きのポリエチレン製チューブ(5 mL 容量)を使用して、被験物質調製液あるいは対照物質調製液 0.1 mL を、直接法の場合は 0.1 mol/L Na-リン酸緩衝液(pH7.4) 0.5 mL と、代謝活性化法の場合は S9 mix 0.5 mL と、それぞれ混合した。その混合液に菌培養液 0.1 mL を加え、37℃、振幅 40 mm、振盪速度 100 回/分に設定した振盪恒温槽(Personal-11・EX、タイテック株式会社)で 20 分間振盪培養(ブレインキュベーション)した。ブレインキュベーション終了後、*S. typhimurium* には 0.05 mmol/L L-ヒスチジンおよび 0.05 mmol/L D-ビオチンを含む重層用培地 2 mL を、*E. coli* には 0.05 mmol/L L-トリプトファンを含む重層用培地 2 mL を、それぞれ加えて混和し、最少グルコース寒天培地に重層した。平坦な場所で重層用培地を固化させた後、プレートを 37℃で 48～49 時間静置培養した(MIR-262：三洋電機バイオメディカ株式会社)。

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

(3) プレートの観察

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

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

0 : 生育阻害が認められない。

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

1 : わずかな生育阻害が認められる。

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

2 : 中程度の生育阻害が認められる。

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

3 : 強い生育阻害が認められる。

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

4 : 生存菌が全く認められない。

(4) 観察結果の集計方法

各試験群の復帰変異コロニー数の平均値±標準偏差を求めた。

10. 試験結果の評価

(1) 試験系の感度確認

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

(2) 試験結果の判定基準

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

(3) 変異原比活性の算出

陽性結果となった *S. typhimurium* TA98 の直接法について、以下の式により変異原比活性を算出した。本試験 1 回目および本試験 2 回目ともに、算出値が最高となる用量の比活性を採用した。

$$\text{比活性 (Revertants/mg)} = (A - B) / C$$

A : 当該用量における復帰変異コロニー数の平均値

B : 陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値

C : 当該用量 (mg/plate)

成 績

1. 用量設定試験 (5～5000 µg/plate)

復帰変異コロニー数を Table 1 および 2 に示す。

各菌株の直接法および代謝活性化法ともに、被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の値の 2 倍未満であった。生育阻害が、各菌株の 50 あるいは 150 µg/plate 以上の用量で観察された。被験物質の析出は観察されなかった。

2. 本試験 1 回目 (1.17～75 あるいは 4.69～150 µg/plate)

復帰変異コロニー数を Table 3～5 に、被験物質と復帰変異コロニー数の用量-反応曲線を Figure 1-1～5-2 に示す。

S. typhimurium TA98 の直接法では、18.8 µg/plate の用量の復帰変異コロニー数の平均値が陰性対照群の値の 2 倍以上となった。*S. typhimurium* TA98 の直接法を除く他の試験群では、被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の値の 2 倍未満で、用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加もみられなかった。生育阻害が、各菌株の 37.5 µg/plate 以上、75 µg/plate 以上あるいは 150 µg/plate の用量で観察された。いずれの試験群にも被験物質の析出は観察されなかった。

S. typhimurium TA98 の直接法の確認試験 (9.83～37.5 µg/plate) では、15.4 および 19.2 µg/plate の用量で復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の値の 2 倍以上となり、また、用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加が認められた。変異原比活性は、1510 revertants/mg であった。生育阻害が、24.0 µg/plate 以上の用量で観察された。被験物質の析出は観察されなかった。

3. 本試験 2 回目 (9.83～37.5、1.17～75 あるいは 4.69～150 µg/plate)

復帰変異コロニー数を Table 6-1～7 に、被験物質と復帰変異コロニー数の用量-反応曲線を Figure 1-1～5-2 に示す。

S. typhimurium TA98 の直接法では、15.4、19.2 および 24.0 µg/plate の用量で復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の値の 2 倍以上となり、また、用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加が認められた。変異原比活性は、1333 revertants/mg であった。生育阻害が、24.0 µg/plate 以上の用量で観察された。

S. typhimurium TA98 の直接法を除く他の試験群では、被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の値の 2 倍未満で、用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加もみられなかった。生育阻害が、各菌株の 37.5 µg/plate 以上、75 µg/plate 以上あるいは 150 µg/plate の用量で観察された。いずれの試験群にも、被験物質の析出は観察されなかった。

4. 陰性対照群および陽性対照群の復帰変異コロニー数

用量設定試験、本試験およびその確認試験のいずれにおいても、各菌株の陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、全て試験施設の背景データから求めた管理値 (Appendix 3) の範囲内であり、また、陽性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、全て陰性対照群の値の 2 倍以上であった。

5. 無菌試験

用量設定試験、本試験およびその確認試験のいずれにおいても、被験物質調製液の最高濃度および S9 mix に雑菌の混入はみられなかった。

考 察

2-ブロモ-2-ニトロプロパン-1,3-ジオールの細菌における遺伝子突然変異誘発性を、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2uvrA を用いる復帰突然変異試験により検討した。

試験の結果、*S. typhimurium* TA98 の直接法では、被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の値の2倍以上となり、また、用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加が認められた。この結果は、2回の本試験で再現性が確認された。従って、当該被験物質は、*S. typhimurium* TA98 の代謝活性化系の非存在下において遺伝子突然変異誘発性を有すると判断した。変異原比活性は、1510(本試験1回目)および1333(本試験2回目) revertants/mg であった。なお、*S. typhimurium* TA98 の直接法を除く他の試験群では、被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の値の2倍未満で、用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加も認められず、遺伝子突然変異誘発性は陰性であった。

被験物質は、当該試験条件において、フレームシフト変異への感受性を有する *S. typhimurium* TA98 において代謝活性化系の非存在下で陽性となった。被験物質の遺伝子突然変異誘発性については *S. typhimurium* TA98 を含む復帰突然変異試験で陰性との報告があり¹⁾、当該試験結果とは異なるものであった。当該被験物質は生育阻害が低用量まで観察されるとともに、*S. typhimurium* TA98 における陽性反応は生育阻害濃度に続く非常に狭い用量範囲で認められ、その復帰変異コロニー数は公比1.25で設定した用量の2あるいは3用量でのみ陰性対照群の値の2倍を超えるものであった。従って、試験条件により、被験物質の陽性反応は生育阻害濃度とそれに隣接した用量の間に隠されてしまう可能性があるものと考えられた。

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

以上のことから、2-ブロモ-2-ニトロプロパン-1,3-ジオールは、当該試験条件において、代謝活性化系の非存在下で *S. typhimurium* TA98 に対する遺伝子突然変異誘発性を有すると判断した。

2-ブロモ-2-ニトロプロパン-1,3-ジオールの遺伝毒性に関する情報については、NTP の概要資料¹⁾において、マウスの小核試験で陰性、V79 細胞による突然変異試験で代謝活性化系の非存在下および存在下ともに陰性、*S. typhimurium*による復帰突然変異試験で代謝活性化系の非存在下および存在下ともに陰性、ヒトリンパ細胞による染色体異常試験では代謝活性化系の存在下で陰性および非存在下で陽性と報告されている。また、類縁物質の3-クロロ-1,2-プロパンジオールでは、同じく NTP の資料²⁾において *S. typhimurium*による復帰突然変異試験で陽性と報告されている。

参考資料

- 1) ChemIDPlus/HSDB 52-51-7 Toxicity - National Toxicology Program
- 2) Testing Status: 3-Chloro-1,2-propanediol 11513-R - National Toxicology Program

Table 1 Reverse mutation test of 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2uvr A without metabolic activation (dose-finding test) (SR05379)

Compound	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertants per plate (Mean $\pm$ S.D.)				
		S9 (-)				
		TA100	TA1535	WP2uvr A	TA98	TA1537
Control ^a		130 , 146	16 , 11	16 , 23	12 , 13	4 , 9
		148 (141 $\pm$ 10)	11 (13 $\pm$ 3)	20 (20 $\pm$ 4)	18 (14 $\pm$ 3)	9 (7 $\pm$ 3)
2-Bromo-2-nitro-1,3-propanediol	5	143 , 151 129 (141 $\pm$ 11)	12 , 8 7 (9 $\pm$ 3)	17 , 11 27 (18 $\pm$ 8)	17 , 16 18 (17 $\pm$ 1)	4 , 6 3 (4 $\pm$ 2)
	15	145 , 155 125 (142 $\pm$ 15)	15 , 13 9 (12 $\pm$ 3)	18 , 21 22 (20 $\pm$ 2)	24 , 12 18 (18 $\pm$ 6)	6 , 5 12 (8 $\pm$ 4)
	50	131 * , 116 * 93 * (113 $\pm$ 19)	0 * , 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)	16 * , 21 * 21 * (19 $\pm$ 3)	0 * , 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)	0 * , 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)
	150	0 * , 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)	0 * , 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)	0 * , 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)	0 * , 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)	0 * , 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)
	500	0 * , 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)	0 * , 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)	0 * , 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)	0 * , 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)	0 * , 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)
	1500	0 * , 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)	0 * , 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)	0 * , 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)	0 * , 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)	0 * , 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)
	5000	0 * , 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)	0 * , 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)	0 * , 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)	0 * , 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)	0 * , 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)
Positive control		AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Rev./plate	628 , 707 653	243 , 256 292	98 , 120 101	340 , 380 383	269 , 245 211
	(Mean $\pm$ S.D.)	(663 $\pm$ 40)	(264 $\pm$ 25)	(106 $\pm$ 12)	(368 $\pm$ 24)	(242 $\pm$ 29)

a : Water for injection (Japanese pharmacopoeia)

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

NaN₃ : Sodium azide

9-AA : 9-Aminoacridine hydrochloride hydrate

Rev. : Revertants

* : Growth inhibition

Table 2 Reverse mutation test of 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2uvr A with metabolic activation (dose-finding test) (SR05379)

Compound	Concentration (µg/plate)	Revertants per plate (Mean±S.D.)				
		S9 (+)				
		TA100	TA1535	WP2uvr A	TA98	TA1537
Control ^a		150 , 137 152 (146±8)	10 , 9 8 (9±1)	17 , 21 18 (19±2)	35 , 36 35 (35±1)	6 , 7 15 (9±5)
2-Bromo-2-nitro-1, 3-propanediol	5	157 , 157 150 (155±4)	8 , 6 11 (8±3)	21 , 17 18 (19±2)	39 , 29 30 (33±6)	11 , 12 8 (10±2)
	15	144 , 149 153 (149±5)	10 , 11 10 (10±1)	19 , 17 22 (19±3)	36 , 27 25 (29±6)	11 , 13 9 (11±2)
	50	179 , 151 164 (165±14)	11 , 14 14 (13±2)	33 , 22 22 (26±6)	32 , 25 37 (31±6)	9 , 8 11 (9±2)
	150	0 * , 0 * 0 * (0±0)	0 * , 0 * 0 * (0±0)	0 * , 0 * 0 * (0±0)	0 * , 0 * 0 * (0±0)	0 * , 0 * 0 * (0±0)
	500	0 * , 0 * 0 * (0±0)	0 * , 0 * 0 * (0±0)	0 * , 0 * 0 * (0±0)	0 * , 0 * 0 * (0±0)	0 * , 0 * 0 * (0±0)
	1500	0 * , 0 * 0 * (0±0)	0 * , 0 * 0 * (0±0)	0 * , 0 * 0 * (0±0)	0 * , 0 * 0 * (0±0)	0 * , 0 * 0 * (0±0)
	5000	0 * , 0 * 0 * (0±0)	0 * , 0 * 0 * (0±0)	0 * , 0 * 0 * (0±0)	0 * , 0 * 0 * (0±0)	0 * , 0 * 0 * (0±0)
Positive control		2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration (µg/plate)	1	2	10	0.5	2
	Rev./plate	1251 , 1222 1344	235 , 212 259	877 , 910 962	309 , 347 329	174 , 194 196
	(Mean±S.D.)	(1272±64)	(235±24)	(916±43)	(328±19)	(188±12)

a : Water for injection (Japanese pharmacopoeia)

2-AA : 2-Aminoanthracene

Rev. : Revertants

* : Growth inhibition

Table 3 Reverse mutation test of 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2uvr A without metabolic activation (I) (SR05379)

Compound	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertants per plate (Mean $\pm$ S.D.)				
		S9 (-)				
		TA100	TA1535	WP2uvr A	TA98	TA1537
Control ^a		137 , 140 137 (138 $\pm$ 2)	6 , 6 11 (8 $\pm$ 3)	20 , 19 10 (16 $\pm$ 6)	11 , 12 10 (11 $\pm$ 1)	7 , 9 7 (8 $\pm$ 1)
2-Bromo-2-nitro-1,3-propanediol	1.17	-	10 , 9 5 (8 $\pm$ 3)	-	14 , 12 12 (13 $\pm$ 1)	3 , 7 6 (5 $\pm$ 2)
	2.34	-	11 , 12 11 (11 $\pm$ 1)	-	16 , 20 12 (16 $\pm$ 4)	5 , 5 7 (6 $\pm$ 1)
	4.69	130 , 140 141 (137 $\pm$ 6)	6 , 3 7 (5 $\pm$ 2)	17 , 20 17 (18 $\pm$ 2)	7 , 11 16 (11 $\pm$ 5)	5 , 6 4 (5 $\pm$ 1)
	9.38	124 , 126 137 (129 $\pm$ 7)	10 , 9 11 (10 $\pm$ 1)	25 , 19 19 (21 $\pm$ 3)	11 , 13 8 (11 $\pm$ 3)	5 , 6 6 (6 $\pm$ 1)
	18.8	120 , 152 137 (136 $\pm$ 16)	10 , 13 5 (9 $\pm$ 4)	13 , 25 12 (17 $\pm$ 7)	24 , 27 46 (32 $\pm$ 12)	7 , 8 7 (7 $\pm$ 1)
	37.5	133 , 117 125 (125 $\pm$ 8)	0 * , 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)	19 , 14 17 (17 $\pm$ 3)	7 * , 7 * 7 * (7 $\pm$ 0)	0 * , 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)
	75	0 * , 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)	0 * , 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)	11 * , 6 * 20 * (12 $\pm$ 7)	0 * , 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)	0 * , 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)
	150	0 * , 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)	-	0 * , 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)	-	-
Positive control		AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Rev./plate	717 , 729 784	242 , 271 294	99 , 92 96	236 , 283 324	207 , 205 186
	(Mean $\pm$ S.D.)	(743 $\pm$ 36)	(269 $\pm$ 26)	(96 $\pm$ 4)	(281 $\pm$ 44)	(199 $\pm$ 12)

a : Water for injection (Japanese pharmacopoeia)

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

NaN₃ : Sodium azide

9-AA : 9-Aminoacridine hydrochloride hydrate

Rev. : Revertants

* : Growth inhibition

- : Blank

Table 4 Reverse mutation test of 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2uvr A with metabolic activation (I) (SR05379)

Compound	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertants per plate (Mean $\pm$ S.D.)				
		S9 (+)				
		TA100	TA1535	WP2uvr A	TA98	TA1537
Control ^a		142 , 154 148 (148 $\pm$ 6)	6 , 9 10 (8 $\pm$ 2)	19 , 28 23 (23 $\pm$ 5)	22 , 24 23 (23 $\pm$ 1)	16 , 10 7 (11 $\pm$ 5)
2-Bromo-2-nitro-1, 3-propanediol	4.69	156 , 157 163 (159 $\pm$ 4)	6 , 7 8 (7 $\pm$ 1)	28 , 26 25 (26 $\pm$ 2)	18 , 31 33 (27 $\pm$ 8)	10 , 5 7 (7 $\pm$ 3)
	9.38	163 , 149 146 (153 $\pm$ 9)	7 , 7 16 (10 $\pm$ 5)	30 , 17 26 (24 $\pm$ 7)	32 , 23 17 (24 $\pm$ 8)	12 , 6 8 (9 $\pm$ 3)
	18.8	133 , 156 165 (151 $\pm$ 17)	12 , 12 13 (12 $\pm$ 1)	19 , 25 23 (22 $\pm$ 3)	20 , 31 27 (26 $\pm$ 6)	8 , 4 11 (8 $\pm$ 4)
	37.5	156 , 142 148 (149 $\pm$ 7)	13 , 8 10 (10 $\pm$ 3)	18 , 15 31 (21 $\pm$ 9)	24 , 29 29 (27 $\pm$ 3)	6 , 6 14 (9 $\pm$ 5)
	75	191 , 167 175 (178 $\pm$ 12)	8 , 7 16 (10 $\pm$ 5)	26 , 21 20 (22 $\pm$ 3)	21 , 28 17 (22 $\pm$ 6)	8 , 11 5 (8 $\pm$ 3)
	150	0 * , 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)	0 * , 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)	0 * , 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)	0 * , 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)	0 * , 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)
Positive control		2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2
	Rev./plate	1387 , 1265 1327	322 , 316 304	768 , 858 745	294 , 294 330	177 , 190 144
	(Mean $\pm$ S.D.)	(1326 $\pm$ 61)	(314 $\pm$ 9)	(790 $\pm$ 60)	(306 $\pm$ 21)	(170 $\pm$ 24)

a : Water for injection (Japanese pharmacopoeia)

2-AA : 2-Aminoanthracene

Rev. : Revertants

* : Growth inhibition

Table 5 Reverse mutation test of 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol in *Salmonella typhimurium* TA98 without metabolic activation (confirmatory test) (SR05379)

Compound	Concentration (µg/plate)	Revertants per plate (Mean±S.D.)
		S9 (-)
		TA98
Control ^a		18 , 13 14 (15±3)
2-Bromo-2-nitro-1, 3-propanediol	9.83	23 , 26 22 , (24±2)
	12.3	17 , 13 13 (14±2)
	15.4	42 , 32 18 (31±12)
	19.2	51 , 41 41 (44±6)
	24.0	25 [*] , 18 [*] 17 [*] (20±4)
	30.0	5 [*] , 8 [*] 4 [*] (6±2)
	37.5	0 [*] , 0 [*] 0 [*] (0±0)
		AF-2
Positive control	Concentration (µg/plate)	0.1
	Rev./plate	337 , 379 373
	(Mean±S.D.)	(363±23)

a : Water for injection (Japanese pharmacopoeia)

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

Rev. : Revertants

* : Growth inhibition

Table 6-1 Reverse mutation test of 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA1537 and *Escherichia coli* WP2uvr A without metabolic activation (II) (SR05379)

Compound	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertants per plate (Mean $\pm$ S.D.)			
		S9 (-)			
		TA100	TA1535	WP2uvr A	TA1537
Control ^a		103 , 115 105 (108 $\pm$ 6)	11 , 10 11 (11 $\pm$ 1)	13 , 17 16 (15 $\pm$ 2)	8 , 7 5 (7 $\pm$ 2)
2-Bromo-2-nitro-1,3-propanediol	1.17	-	13 , 10 8 (10 $\pm$ 3)	-	5 , 10 4 (6 $\pm$ 3)
	2.34	-	7 , 12 7 (9 $\pm$ 3)	-	5 , 6 8 (6 $\pm$ 2)
	4.69	118 , 117 89 (108 $\pm$ 16)	12 , 15 8 (12 $\pm$ 4)	18 , 12 6 (12 $\pm$ 6)	5 , 5 4 (5 $\pm$ 1)
	9.38	85 , 135 105 (108 $\pm$ 25)	8 , 8 11 (9 $\pm$ 2)	14 , 14 12 (13 $\pm$ 1)	5 , 5 7 (6 $\pm$ 1)
	18.8	120 , 98 99 (106 $\pm$ 12)	11 , 12 8 (10 $\pm$ 2)	15 , 7 14 (12 $\pm$ 4)	7 , 5 8 (7 $\pm$ 2)
	37.5	146 , 94 123 (121 $\pm$ 26)	0 *, 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)	13 , 19 8 (13 $\pm$ 6)	0 *, 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)
	75	0 *, 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)	0 *, 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)	4 *, 9 * 8 * (7 $\pm$ 3)	0 *, 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)
	150	0 *, 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)	-	0 *, 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)	-
Positive control		AF-2	NaN ₃	AF-2	9-AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	80
	Rev./plate	741 , 718 678	273 , 292 274	92 , 99 94	266 , 331 338
	(Mean $\pm$ S.D.)	(712 $\pm$ 32)	(280 $\pm$ 11)	(95 $\pm$ 4)	(312 $\pm$ 40)

a : Water for injection (Japanese pharmacopocia)

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

NaN₃ : Sodium azide

9-AA : 9-Aminoacridine hydrochloride hydrate

Rev. : Revertants

* : Growth inhibition

- : Blank

Table 6-2 Reverse mutation test of 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol in *Salmonella typhimurium* TA98 without metabolic activation (II) (SR05379)

Compound	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertants per plate (Mean $\pm$ S.D.)
		S9 (-)
		TA98
Control ^a		11 , 15 9 (12 $\pm$ 3)
2-Bromo-2-nitro-1, 3-propanediol	9.83	16 , 12 10 , (13 $\pm$ 3)
	12.3	18 , 9 16 (14 $\pm$ 5)
	15.4	23 , 31 23 (26 $\pm$ 5)
	19.2	37 , 32 26 (32 $\pm$ 6)
	24.0	42 * , 39 * 52 * (44 $\pm$ 7)
	30.0	13 * , 14 * 17 * (15 $\pm$ 2)
	37.5	3 * , 8 * 2 * (4 $\pm$ 3)
		AF-2
Positive control	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.1
	Rev./plate	276 , 323 302
	(Mean $\pm$ S.D.)	(300 $\pm$ 24)

a : Water for injection (Japanese pharmacopoeia)

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

Rev. : Revertants

* : Growth inhibition

Table 7 Reverse mutation test of 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2uvr A with metabolic activation (II) (SR05379)

Compound	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertants per plate (Mean $\pm$ S.D.)				
		S9 (+)				
		TA100	TA1535	WP2uvr A	TA98	TA1537
Control ^a		133 , 140 134 (136 $\pm$ 4)	7 , 9 8 (8 $\pm$ 1)	18 , 15 25 (19 $\pm$ 5)	38 , 29 35 (34 $\pm$ 5)	11 , 13 13 (12 $\pm$ 1)
2-Bromo-2-nitro-1, 3-propanediol	4.69	132 , 124 123 (126 $\pm$ 5)	11 , 8 11 (10 $\pm$ 2)	17 , 21 16 (18 $\pm$ 3)	20 , 29 27 (25 $\pm$ 5)	11 , 12 7 (10 $\pm$ 3)
	9.38	108 , 157 133 (133 $\pm$ 25)	9 , 14 12 (12 $\pm$ 3)	16 , 21 17 (18 $\pm$ 3)	23 , 30 24 (26 $\pm$ 4)	9 , 11 8 (9 $\pm$ 2)
	18.8	151 , 124 141 (139 $\pm$ 14)	10 , 7 11 (9 $\pm$ 2)	27 , 17 14 (19 $\pm$ 7)	19 , 24 20 (21 $\pm$ 3)	13 , 14 18 (15 $\pm$ 3)
	37.5	153 , 113 132 (133 $\pm$ 20)	6 , 6 12 (8 $\pm$ 3)	20 , 26 21 (22 $\pm$ 3)	26 , 27 28 (27 $\pm$ 1)	10 , 12 8 (10 $\pm$ 2)
	75	166 , 168 155 (163 $\pm$ 7)	7 , 12 5 (8 $\pm$ 4)	16 , 25 23 (21 $\pm$ 5)	25 , 40 31 (32 $\pm$ 8)	12 , 11 12 (12 $\pm$ 1)
	150	0 * , 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)	0 * , 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)	0 * , 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)	0 * , 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)	0 * , 0 * 0 * (0 $\pm$ 0)
Positive control		2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2
	Rev./plate	1316 , 1351 1419	293 , 252 255	1012 , 911 897	294 , 277 319	167 , 152 172
	(Mean $\pm$ S.D.)	(1362 $\pm$ 52)	(267 $\pm$ 23)	(940 $\pm$ 63)	(297 $\pm$ 21)	(164 $\pm$ 10)

a : Water for injection (Japanese pharmacopoeia)

2-AA : 2-Aminoanthracene

Rev. : Revertants

* : Growth inhibition

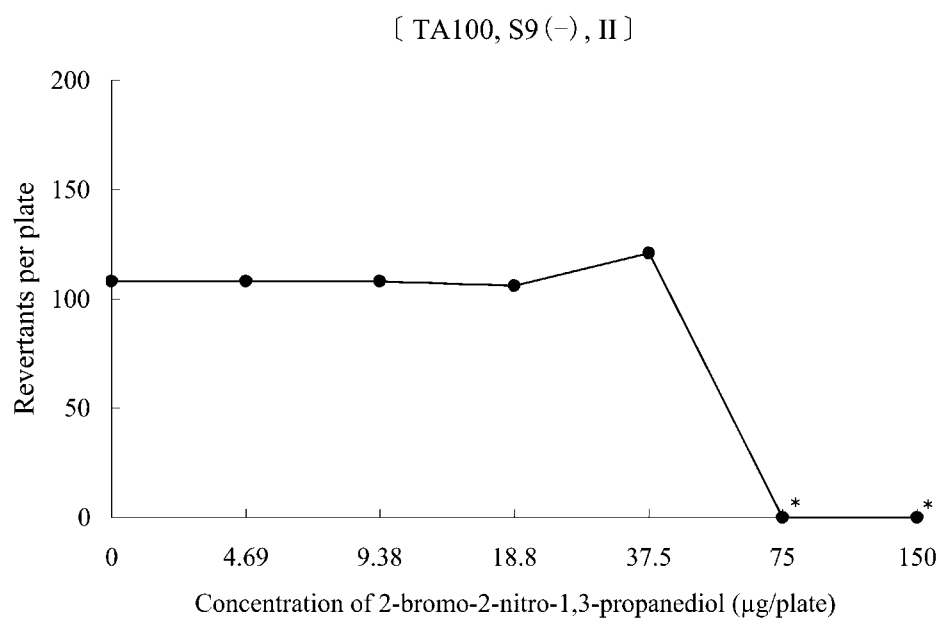
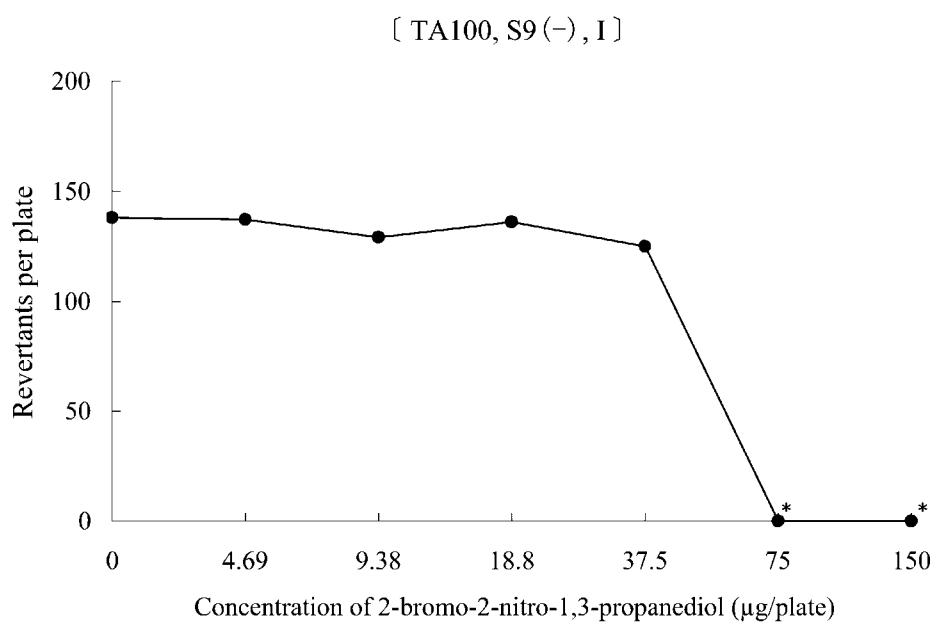


Figure 1-1 Reverse mutation test of 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol in *Salmonella typhimurium* TA100 without metabolic activation (dose-response curves) (SR05379)

* : Growth inhibition

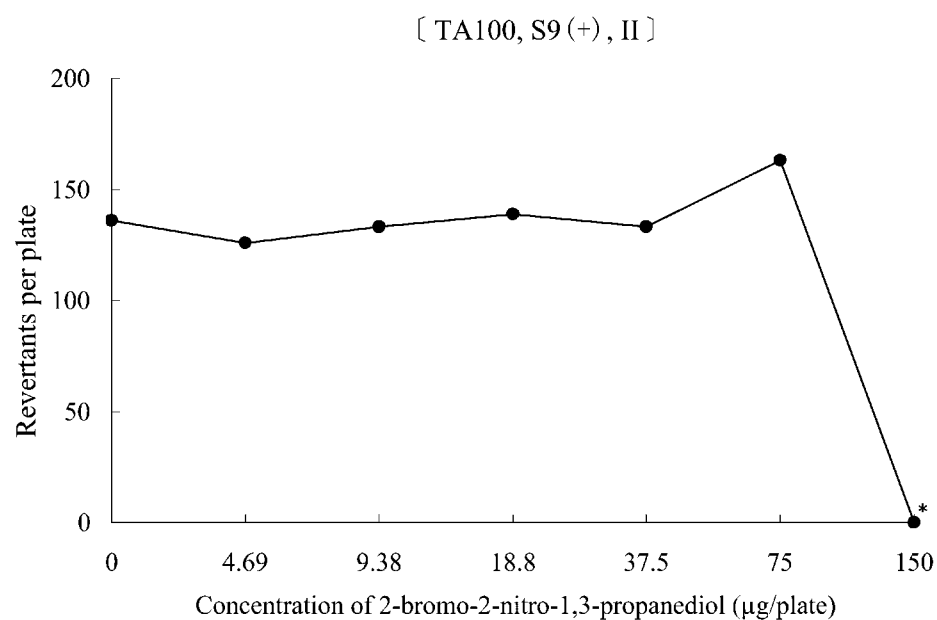
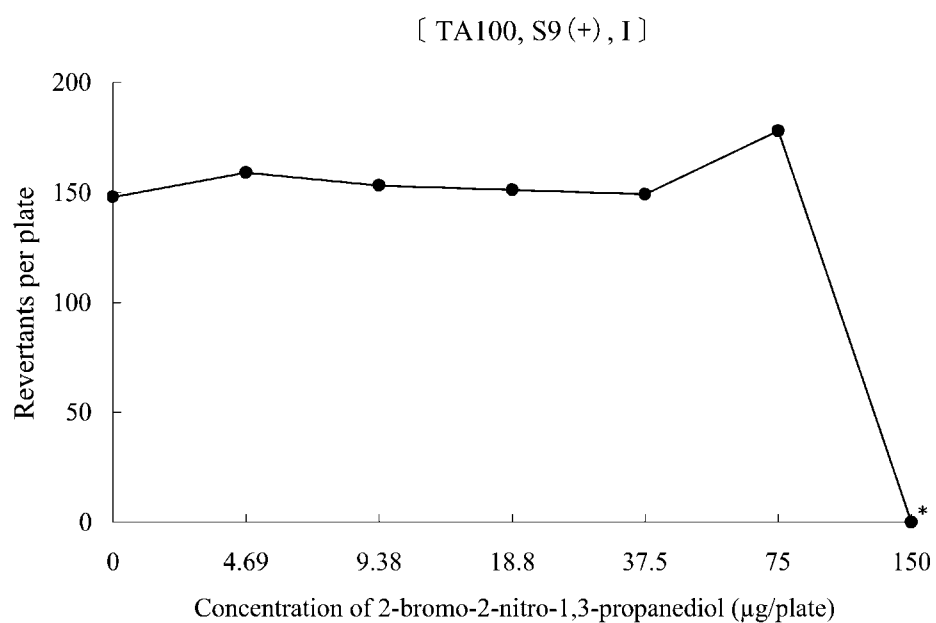


Figure 1-2 Reverse mutation test of 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol in *Salmonella typhimurium* TA100 with metabolic activation (dose-response curves) (SR05379)

* : Growth inhibition

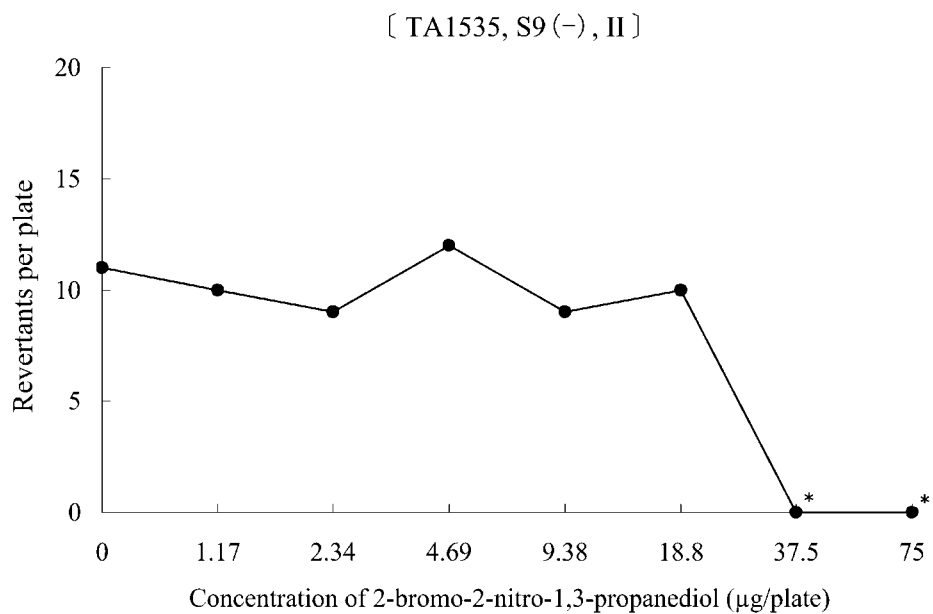
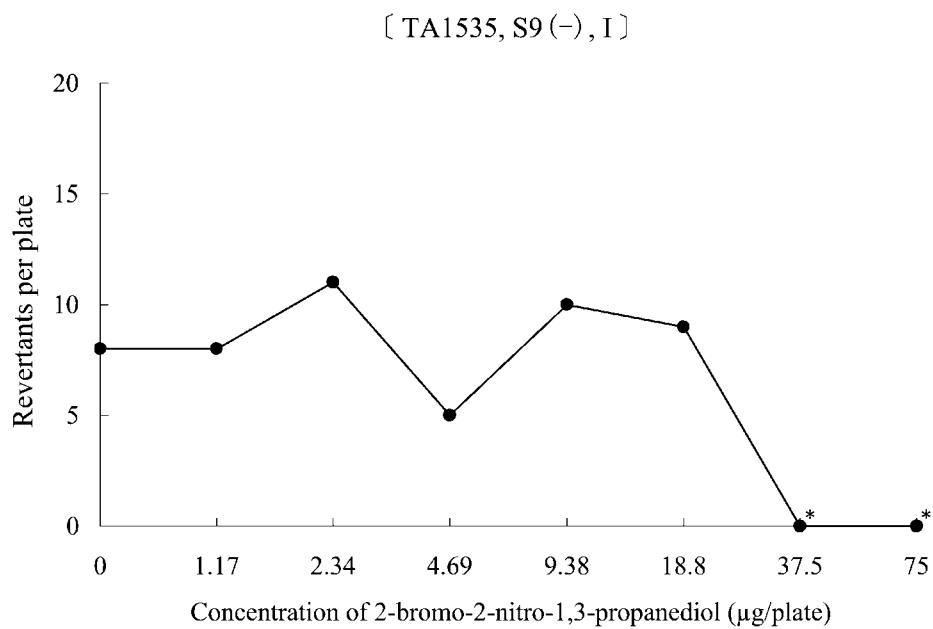


Figure 2-1 Reverse mutation test of 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol in *Salmonella typhimurium* TA1535 without metabolic activation (dose-response curves) (SR05379)

* : Growth inhibition

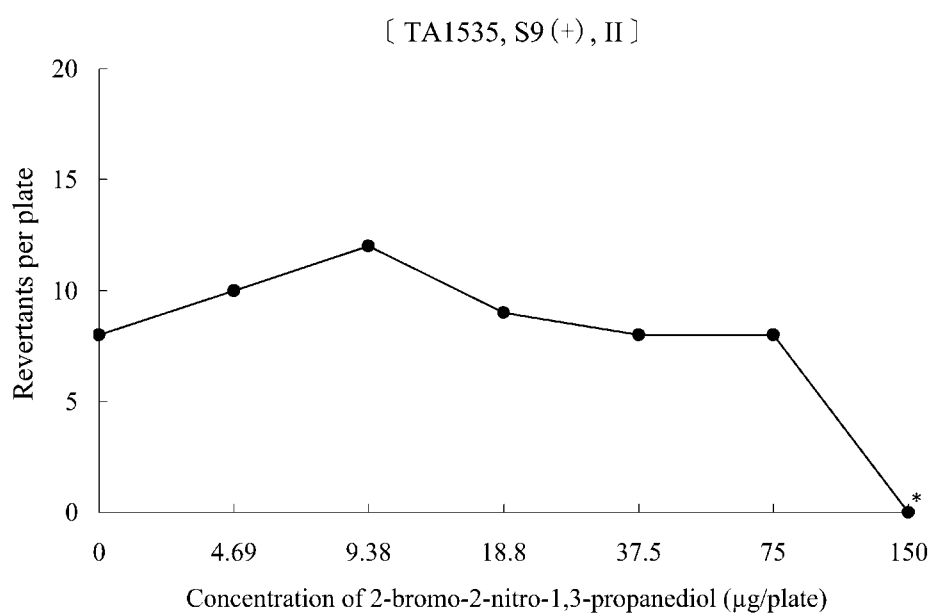
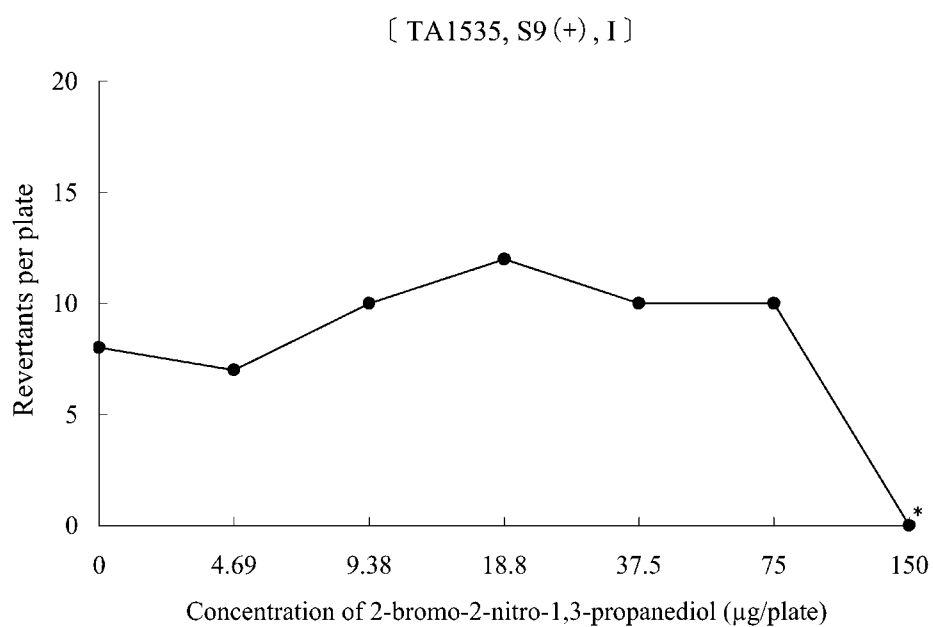


Figure 2-2 Reverse mutation test of 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol in *Salmonella typhimurium* TA1535 with metabolic activation (dose-response curves) (SR05379)

* : Growth inhibition

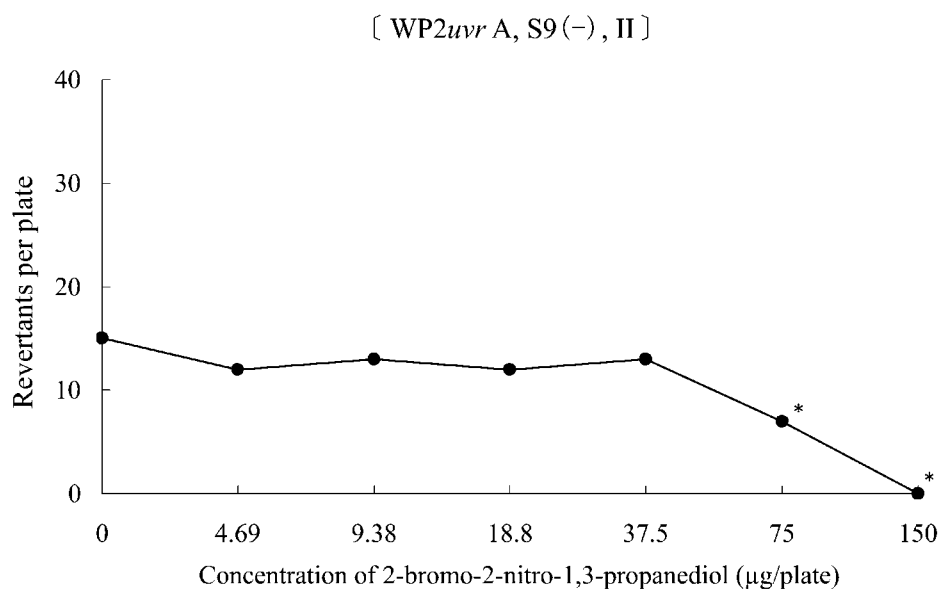
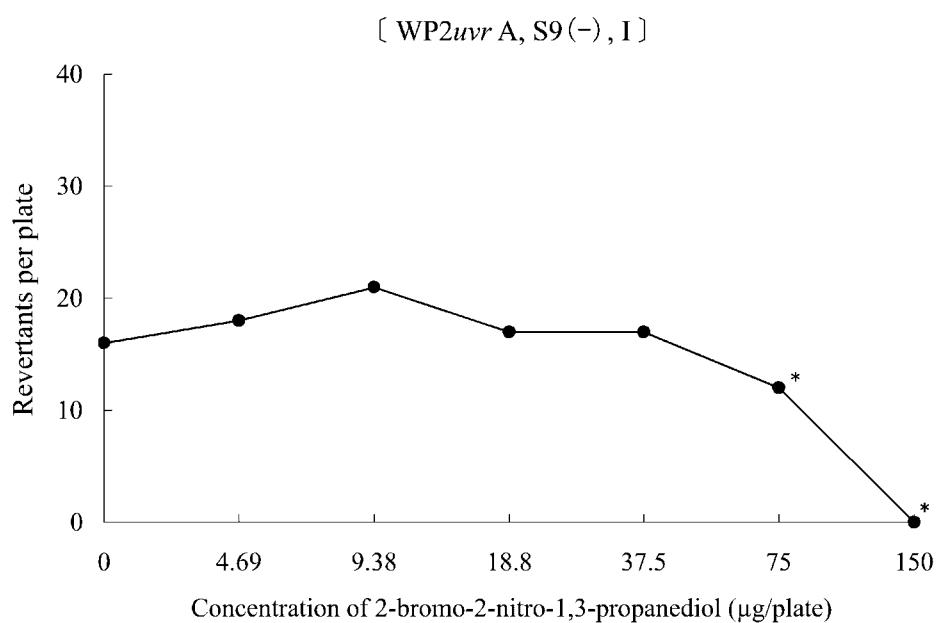


Figure 3-1 Reverse mutation test of 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol in *Escherichia coli* WP2*uvr* A without metabolic activation (dose-response curves) (SR05379)

* : Growth inhibition

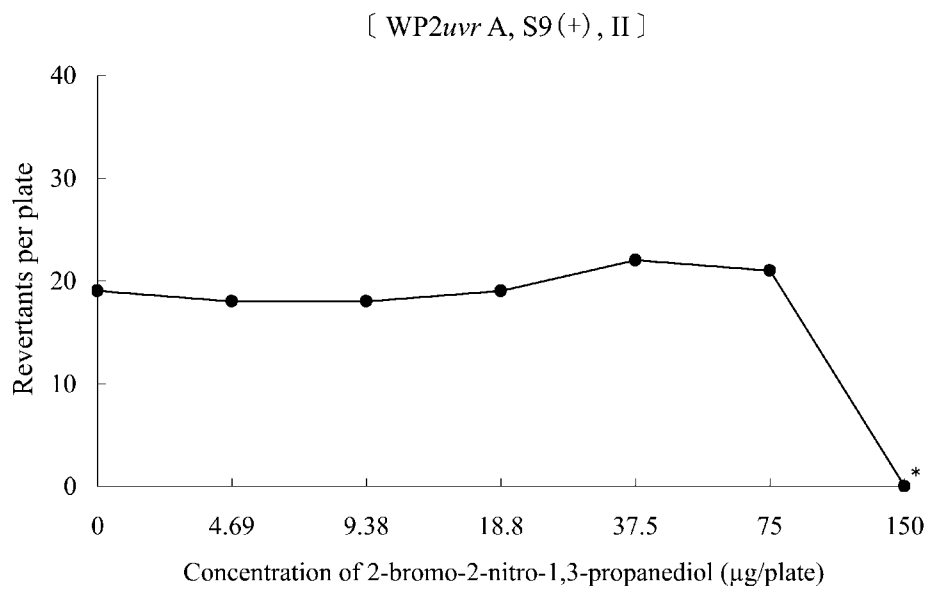
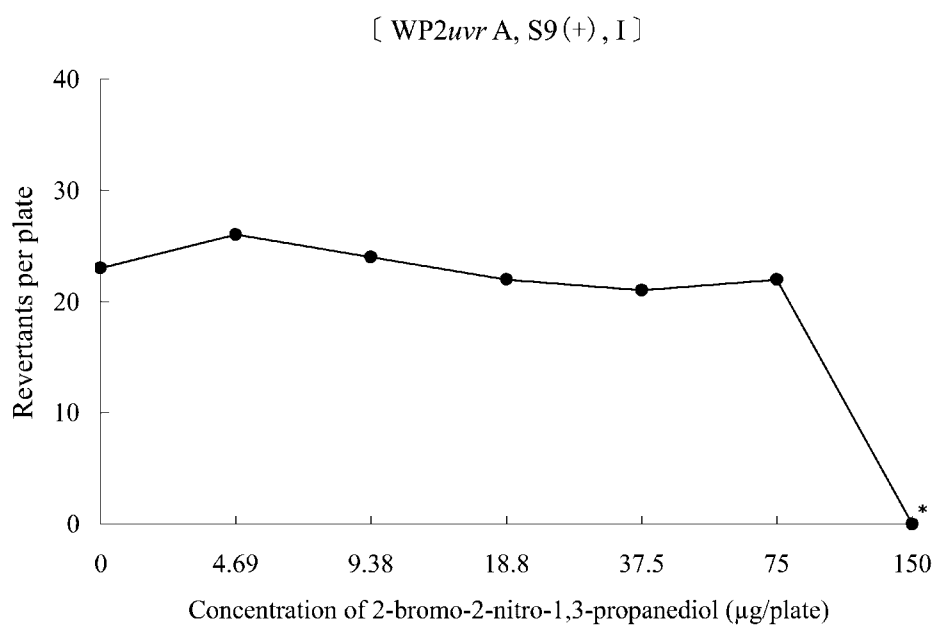


Figure 3-2 Reverse mutation test of 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol in *Escherichia coli* WP2*uvr* A with metabolic activation (dose-response curves) (SR05379)

* : Growth inhibition

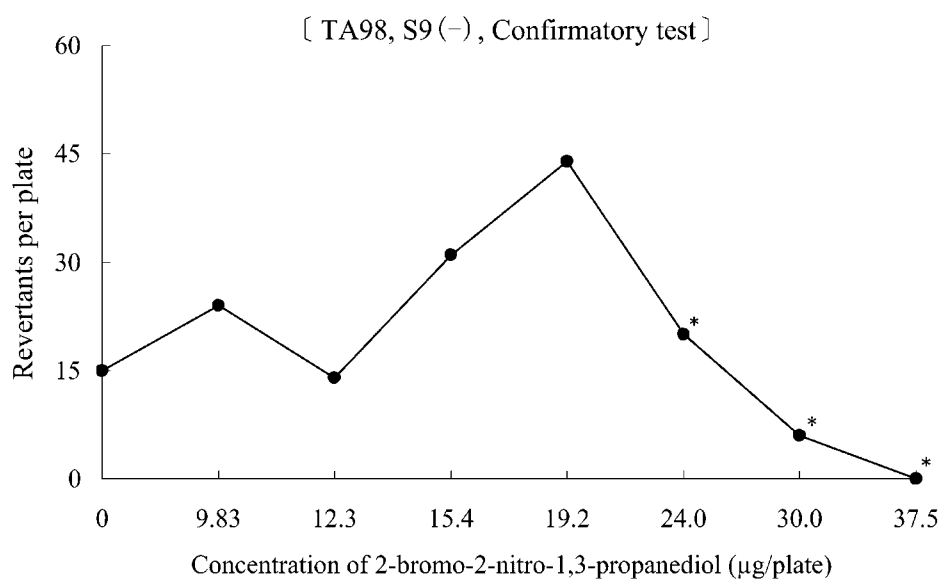
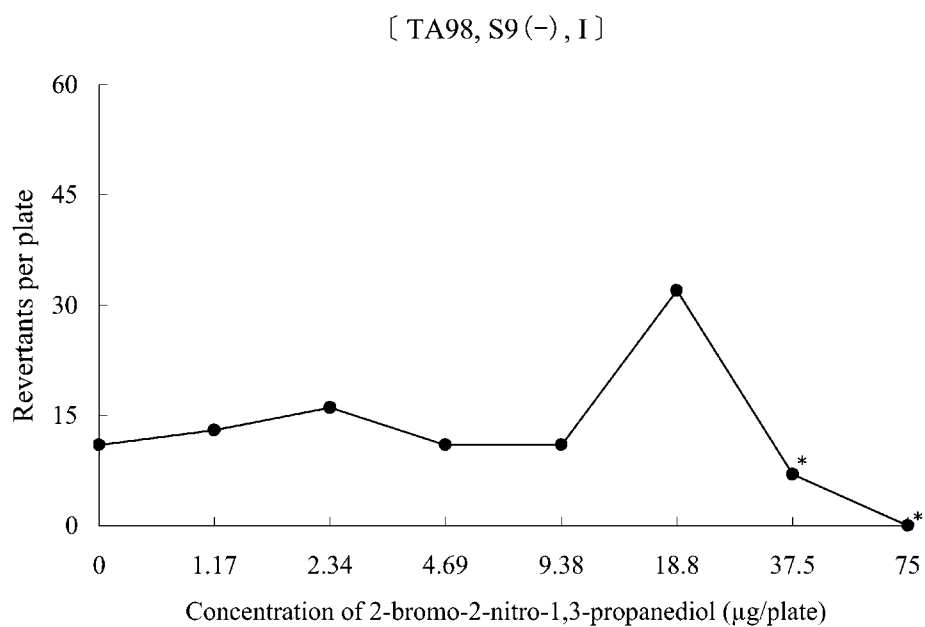


Figure 4-1-1 Reverse mutation test of 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol in *Salmonella typhimurium* TA98 without metabolic activation (dose-response curves) (SR05379)

* : Growth inhibition

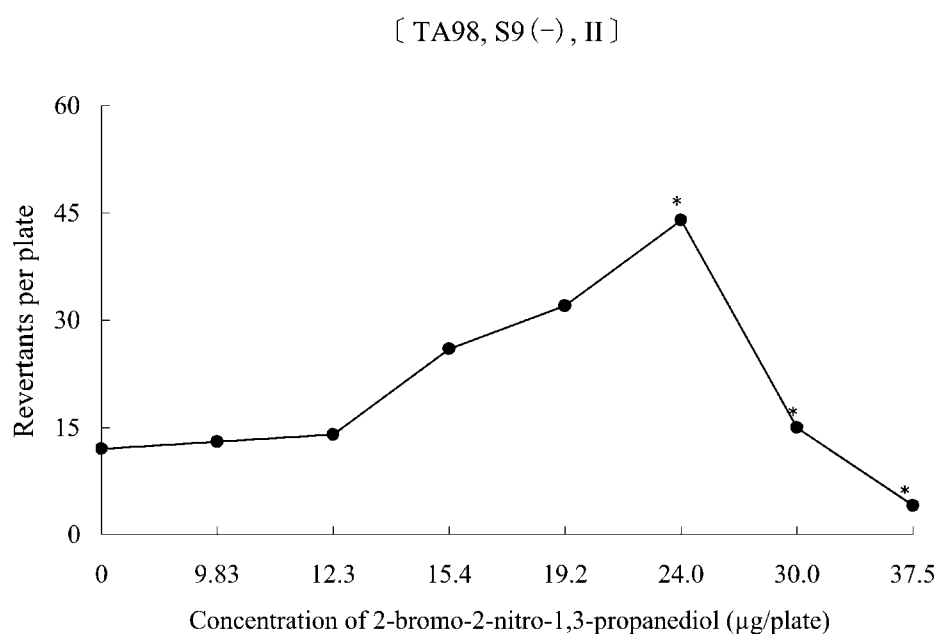


Figure 4-1-2 Reverse mutation test of 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol in *Salmonella typhimurium* TA98 without metabolic activation (dose-response curves) (SR05379)

* : Growth inhibition

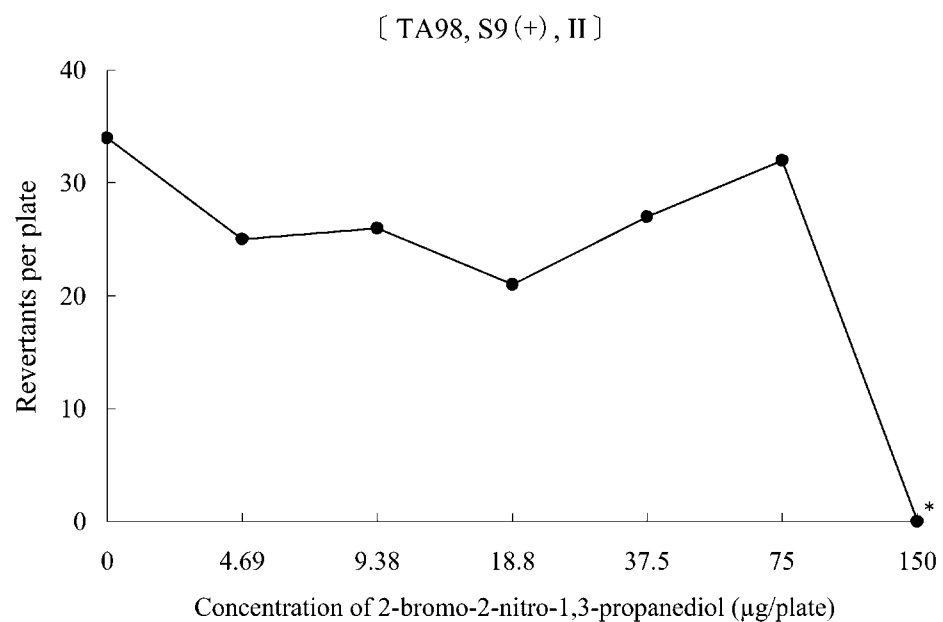
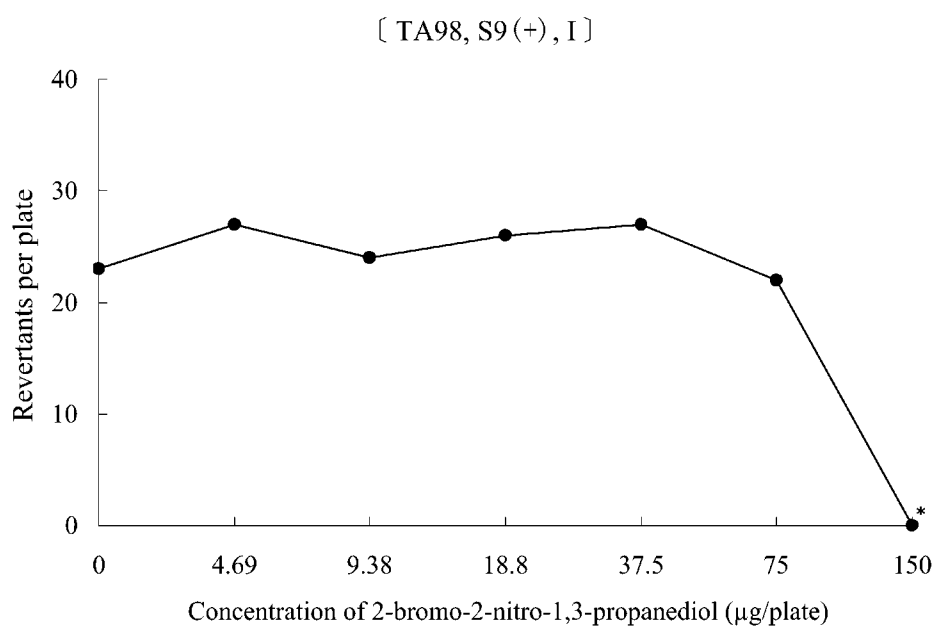
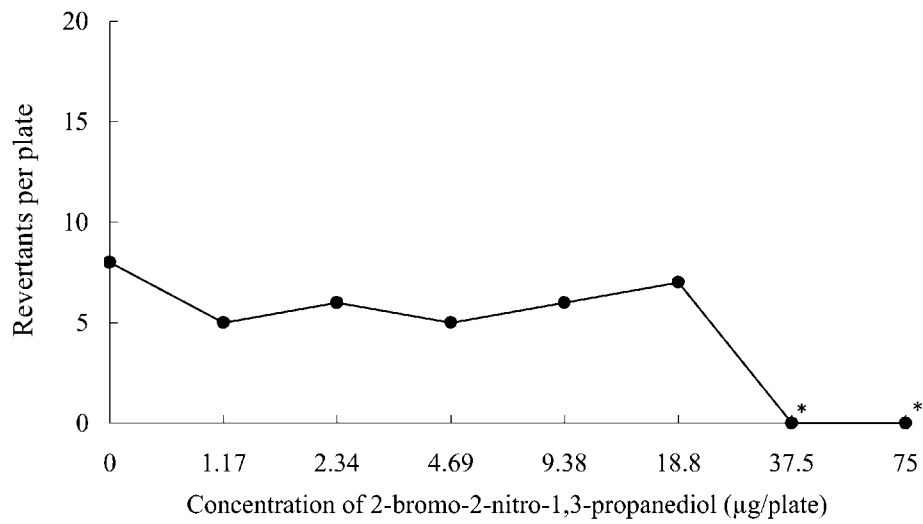


Figure 4-2 Reverse mutation test of 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol in *Salmonella typhimurium* TA98 with metabolic activation (dose-response curves) (SR05379)

* : Growth inhibition

[TA1537, S9 (-), I]



[TA1537, S9 (-), II]

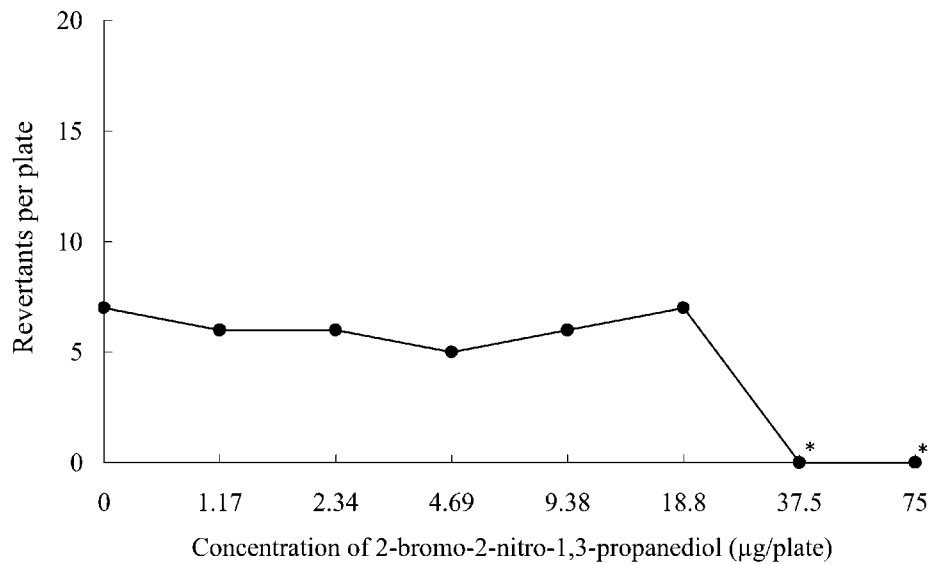


Figure 5-1 Reverse mutation test of 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol in *Salmonella typhimurium* TA1537 without metabolic activation (dose-response curves) (SR05379)

* : Growth inhibition

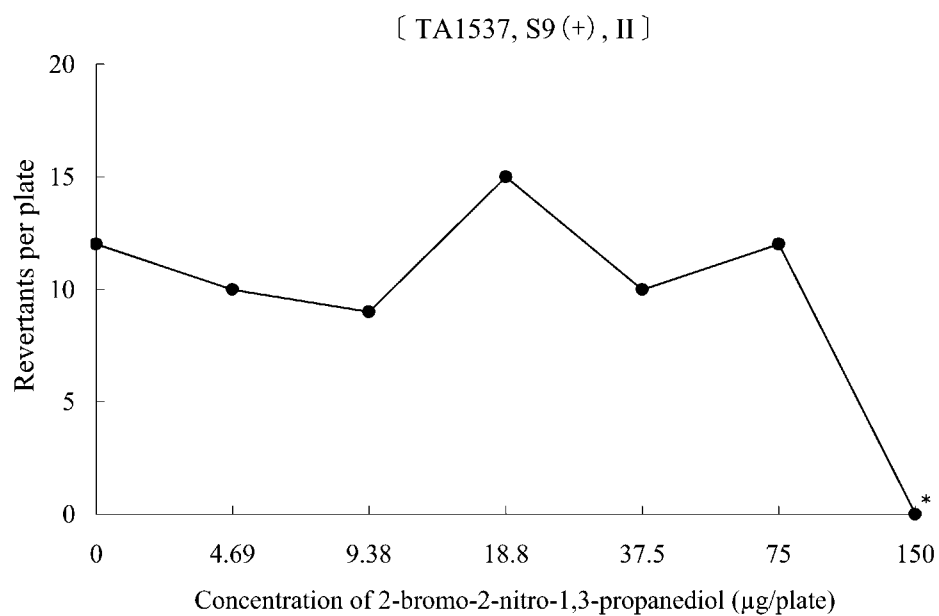
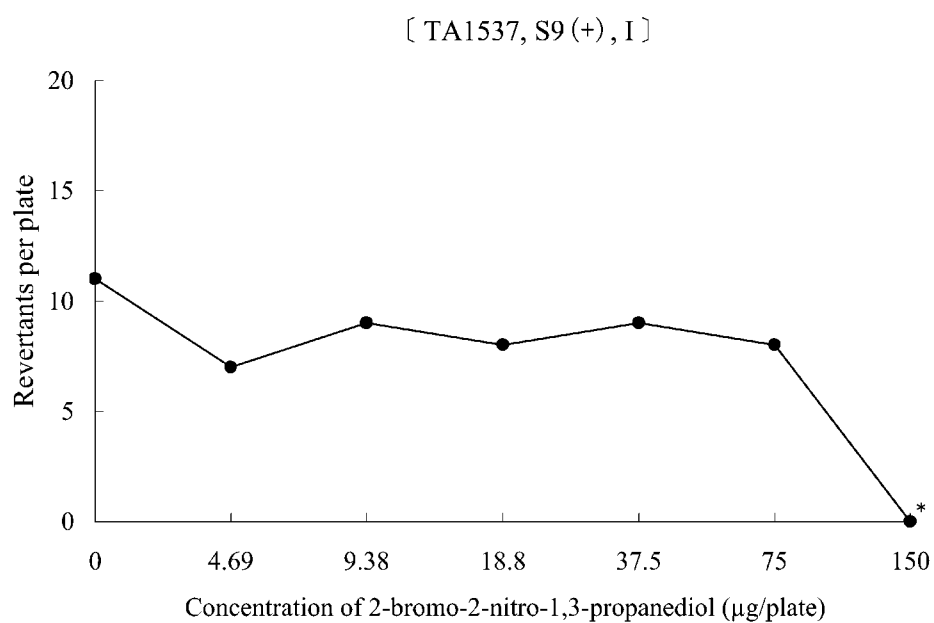


Figure 5-2 Reverse mutation test of 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol in *Salmonella typhimurium* TA1537 with metabolic activation (dose-response curves) (SR05379)

* : Growth inhibition