

## 最 終 報 告 書

試験名：2,4-ジブロモフェノールの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：T-0308

試験期間：2009年1月8日-2009年12月10日

### 試験施設

株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所  
〒156-0042 東京都世田谷区羽根木 1-3-11

### 試験委託者

厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室  
〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1-2-2

株式会社ボゾリサーチセンター  
〒151-0065 東京都渋谷区大山町 36-7

## 1. 目次

1.	目次 .....	2
3.	要約 .....	8
4.	緒言 .....	9
5.	被験物質及び被験液の調製.....	10
5.1	被験物質及び溶媒 .....	10
5.1.1	被験物質 .....	10
5.1.2	溶媒.....	11
5.1.3	溶媒の選択理由 .....	11
5.2	被験液の調製方法 .....	11
5.2.1	用量設定試験用被験液の調製 .....	11
5.2.2	本試験 1 回日用被験液の調製.....	11
5.2.3	本試験 2 回日用被験液の調製.....	11
5.2.4	被験液の保存条件 .....	12
6.	試験材料及び方法.....	12
6.1	試験菌株 .....	12
6.1.1	菌株の種類 .....	12
6.1.2	菌株の選択理由 .....	12
6.1.3	菌株の保存及び解凍 .....	12
6.1.4	菌株の特性検査.....	13
6.2	対照物質 .....	13
6.2.1	陰性対照物質.....	13
6.2.2	陽性対照物質.....	13

6.2.3	調製方法	14
6.3	試薬	14
6.3.1	S9Mixの調製方法	14
6.3.2	最小グルコース寒天平板培地	15
6.3.3	ニュートリエントブロス No.2 培養液	16
6.3.4	0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4)	16
6.3.5	トップアガー	16
6.4	試験方法	17
6.4.1	識別方法	17
6.4.2	前培養	18
6.4.3	本試験用量の設定	18
6.4.4	プレート数	19
6.4.5	試験操作 (プレインキュベーション法)	19
6.5	判定基準	19
7.	試験結果	20
7.1	培養終了後の観察結果	20
7.2	復帰変異コロニー数	20
7.3	試験系の成立条件	20
8.	考察	20
9.	参考文献	21

## Tables

別表 1	試験結果表(用量設定試験)
別表 2	試験結果表(本試験 1 回目: -S9Mix)
別表 3	試験結果表(本試験 1 回目: +S9Mix)
別表 4	試験結果表(本試験 2 回目: -S9Mix)
別表 5	試験結果表(本試験 2 回目: +S9Mix)

## Figures

図 1	用量反応曲線(TA100: -S9Mix)
図 2	用量反応曲線(TA100: +S9Mix)
図 3	用量反応曲線(TA1535: -S9Mix)
図 4	用量反応曲線(TA1535: +S9Mix)
図 5	用量反応曲線(WP2uvrA: -S9Mix)
図 6	用量反応曲線(WP2uvrA: +S9Mix)
図 7	用量反応曲線(TA98: -S9Mix)
図 8	用量反応曲線(TA98: +S9Mix)
図 9	用量反応曲線(TA1537: -S9Mix)

圖 10

用量反應曲線(TA1537 : +S9Mix)

### 3. 要約

2,4-ジブロモフェノールの復帰突然変異誘発能の有無を検討するため、ネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (以下、*S. typhimurium* と略す) TA100、TA1535、TA98、TA1537 及び大腸菌 *Escherichia coli* (以下、*E. coli* と略す) WP2 *uvrA* を用いて、代謝活性化する場合及び代謝活性化しない場合の条件下で、プレインキュベーション法により実施した。なお、被験物質の溶媒にはジメチルスルホキシド(以下、DMSO と略す)を用いた。

試験は、19.5~5000 µg/plate の範囲の被験物質処理用量で用量設定試験を実施した。その結果より本試験は、生育阻害を示した最低用量を最高用量として、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1535 については 2.44~78.1 µg/plate の範囲の 6 用量、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1537 及び代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA 株については 9.77~313 µg/plate の範囲の 6 用量、代謝活性化の有無にかかわらず *E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98 については 39.1~1250 µg/plate の範囲の 6 用量で実施した。

#### 1) 被験物質による沈殿及び着色

本被験物質によるプレート上の沈殿及び着色は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。

#### 2) 生育阻害

実体顕微鏡を用いて菌に対する生育阻害を観察した結果、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1535 の 78.1 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1537 及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA1535、TA1537 の 156 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、TA98 の 313 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* の 625 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の *E. coli* WP2 *uvrA* の 1250 µg/plate 以上で認められた。

#### 3) 復帰変異コロニー数

2 回の本試験ともに、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本被験物質による復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量反応性も認められなかった。

以上の試験結果より、本試験条件下において、2,4-ジブロモフェノールは、細菌に対する復帰突然変異誘発能を有さない(陰性)と判定した。

#### 4. 緒言

本試験は、厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室からの委託により、株式会社ボゾリサーチセンターで実施した。

## 5. 被験物質及び被験液の調製

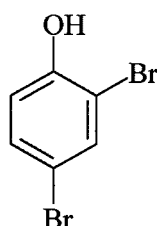
### 5.1 被験物質及び溶媒

#### 5.1.1 被験物質

名称 : 2,4-ジブロモフェノール

CAS番号 : 615-58-7

構造式 :



純度 : 98.4%

分子量 : 251.90

融点 : 38.0°C

沸点 : 239°C

分配係数 : 3.22

常温における性状 : 白色~うすい黄色の結晶~粉末

安定性 : 通常の取り扱い条件においては安定。なお、本試験終了後に残余となった被験物質を株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所において分析し、安定性を確認した結果、赤外吸収スペクトルに大きな変化はなく、安定であることが確認された(別添 1)。

溶解性 : 水 ; 不溶  
DMSO ; 50mg/mL 以上

保存条件 : 冷暗所・密栓

保存温度 : 保存期間(御殿場研究所 2008.11.7~2008.12.24 ; 3~5°C、  
東京研究所 2008.12.25~2009.2.24 ; 0.4~8.2°C)

返却 : 試験終了後の残量はすべて株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所へ送付し、分析後の残余物質は焼却処分した。

なお、上記溶解性は、株式会社ボゾリサーチセンターで実施した溶解性試験の結果であり、水については 50mg/mL で溶解しなかったため、不溶とした。

### 5.1.2 溶媒

名称	:	DMSO
製造元	:	和光純薬工業株式会社
ロット番号	:	PEH6808
規格	:	JIS 規格 試薬特級 99.0%以上
保存方法	:	室温保存
保存場所	:	東京研究所 被験物質調製保存室

### 5.1.3 溶媒の選択理由

溶解性試験を実施した結果、本被験物質は水に 50mg/mL で溶解せず、DMSO に 50mg/mL で溶解し、いずれも発熱、ガスの発生等の反応性も認められなかったため、DMSO を溶媒として試験を実施した。

## 5.2 被験液の調製方法

### 5.2.1 用量設定試験用被験液の調製

滅菌した調製用試験管に被験物質を電子天秤 (GR-120、株式会社エー・アンド・ディ) を用いて秤量し、その秤量値 173.0 mg に最高調製濃度の 50 mg/mL となるように溶媒量を計算し、3.460 mL の DMSO を添加して溶解し、50 mg/mL の被験液を調製した。次いで、これを公比 4 で順次 4 段階希釈し、50、12.5、3.13、0.781 及び 0.195 mg/mL の計 5 濃度の被験液を調製した。なお、被験液の調製において、発熱、ガスの発生等の反応性は認められなかった。また、被験液は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で用時調製した。

### 5.2.2 本試験 1 回目用被験液の調製

滅菌した調製用試験管に被験物質を電子天秤 (GR-120、株式会社エー・アンド・ディ) を用いて秤量し、その秤量値 93.8 mg に最高調製濃度の 12.5 mg/mL となるように溶媒量を計算し、7.504 mL の DMSO を添加して溶解し、12.5 mg/mL の被験液を調製した。次いで、これを公比 2 で順次 9 段階希釈し、12.5、6.25、3.13、1.56、0.781、0.391、0.195、0.0977、0.0488 及び 0.0244 mg/mL の計 10 濃度の被験液を調製した。なお、被験液の調製において、発熱、ガスの発生等の反応性は認められなかった。また、被験液は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で用時調製した。

### 5.2.3 本試験 2 回目用被験液の調製

滅菌した調製用試験管に被験物質を電子天秤 (GR-120、株式会社エー・アンド・ディ) を用いて秤量し、その秤量値 89.0 mg に最高調製濃度の 12.5 mg/mL となるように溶媒量を計算し、7.120 mL の DMSO を添加して溶解し、12.5 mg/mL の被験液を調製した。次いで、これを公比 2 で順次 9 段階希釈し、12.5、6.25、3.13、1.56、0.781、0.391、0.195、0.0977、0.0488 及び 0.0244 mg/mL の計 10 濃度の被



験液を調製した。なお、被験液の調製において、発熱、ガスの発生等の反応性は認められなかった。また、被験液は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で用時調製した。

#### 5.2.4 被験液の保存条件

被験液は用時調製とし、保存はしなかった。

### 6. 試験材料及び方法

#### 6.1 試験菌株

##### 6.1.1 菌株の種類

次の5種類の菌株を用いた。

塩基対置換型

*S. typhimurium* TA100

*S. typhimurium* TA1535

*E. coli* WP2 *uvrA*

フレームシフト型

*S. typhimurium* TA98

*S. typhimurium* TA1537

なお、菌株は国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部より 1997年10月9日に株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所で入手したのから、2005年7月21日に分与された。

##### 6.1.2 菌株の選択理由

毒性試験法ガイドラインに準じて選択した。当該菌株は変異原性物質に対する感受性が高く、細菌を用いる変異原性試験に最も一般的に使用されている。

##### 6.1.3 菌株の保存及び解凍

入手した菌株から継代して凍結保存した菌懸濁液を培養し、得られた菌懸濁液 8.0 mL に対して、DMSO (和光純薬工業株式会社、JIS 規格試薬特級、ロット番号 PEN0496) を 0.7 mL の割合で添加して、滅菌チューブに 300  $\mu$ L ずつ分注し、 $-70^{\circ}\text{C}$  以下の超低温フリーザ (三洋電機バイオメディカ株式会社: MDF-192) で保存した (保存期間中の実測温度 2008年9月12日~2009年2月23日:  $-87.7\sim-80.9^{\circ}\text{C}$ )。なお、使用する際は室温で解凍し、使用後の残液は廃棄した。

	使用した菌株の凍結保存日
<i>S. typhimurium</i> TA98	2008年9月26日
<i>S. typhimurium</i> TA100	2008年11月6日

<i>S. typhimurium</i> TA1535	2008年9月12日
<i>S. typhimurium</i> TA1537	2008年9月12日
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	2008年12月11日

#### 6.1.4 菌株の特性検査

6.1.3 の凍結保存菌株を用いて、アミノ酸要求性、膜変異 *rfa* 特性、薬剤耐性因子 R-factor プラスミド、紫外線感受性、菌増殖率、陰性対照値及び陽性対照値等の特性を検査し、それぞれの菌株に特有の性質が保持されていることを確認して使用した。

	使用した菌株の特性検査実施日
<i>S. typhimurium</i> TA98	2008年10月2日~2008年10月6日
<i>S. typhimurium</i> TA100	2008年11月6日~2008年11月10日
<i>S. typhimurium</i> TA1535	2008年9月24日~2008年9月27日
<i>S. typhimurium</i> TA1537	2008年10月2日~2008年10月6日
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	2008年12月11日~2008年12月15日

## 6.2 対照物質

### 6.2.1 陰性対照物質

被験物質の調製に用いた DMSO を陰性対照物質とした。

### 6.2.2 陽性対照物質

毒性試験法ガイドラインに準じて、以下の変異原物質を陽性対照物質とした。

表 1 陽性対照物質一覧

陽性対照物質 (略称)	ロット番号	純度(%)	保存方法
2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF-2)	PKE1831	99.5%	室温、遮光
Sodium azide (SAZ)	SDL2565	99.8%	室温、遮光
2-Methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)-aminopropylamino]acridine·2HCl (ICR-191)	534652	/	室温、遮光
2-Aminoanthracene (2AA)	KLH1059	96.6%	室温、遮光
Benzo[a]pyrene (B[a]P)	17065	100%	冷蔵、遮光

保存場所 東京研究所 微生物試験室  
 製造元 AF-2、SAZ、B[a]P 及び 2AA : 和光純薬工業株式会社  
 ICR-191 : Polysciences, Inc.  
 B[a]P : AccuStandard, Inc. ; Ames Grade

### 6.2.3 調製方法

AF-2、ICR-191、2AA 及び B[a]P は DMSO（和光純薬工業株式会社、JIS 規格 試薬特級、ロット番号 PEN0496、PEH6808）に溶解し、SAZ は注射用水（株式会社大塚製薬工場、日本薬局方、ロット番号 K8A92）に溶解し、1.0 mL ずつ小分けして -20°C 以下で凍結保存した。なお、試験実施時に解凍して使用した。それぞれの調製濃度を表 2 に示した。

表 2 陽性対照物質調製濃度一覧

使用菌株	代謝活性化しない場合		代謝活性化する場合	
	陽性対照物質名	調製濃度 (µg/mL)	陽性対照物質名	調製濃度 (µg/mL)
<i>S. typhimurium</i> TA100	AF-2	0.1 (0.01)	B[a]P	50 (5.0)
<i>S. typhimurium</i> TA1535	SAZ	5 (0.5)	2AA	20 (2.0)
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	AF-2	0.1 (0.01)	2AA	100 (10.0)
<i>S. typhimurium</i> TA98	AF-2	1 (0.1)	B[a]P	50 (5.0)
<i>S. typhimurium</i> TA1537	ICR-191	10 (1.0)	B[a]P	50 (5.0)

( )内の数値は、プレートに処理したときの処理用量 (µg/plate) を示す。

## 6.3 試薬

### 6.3.1 S9Mix の調製方法

Cofactor-I の 1 バイアルに滅菌精製水を 9.0 mL 加え、完全に溶解した後ろ過 (Nalge Nunc Int. 0.45µM : ロット番号 642295、655518、650855) 滅菌し、Cofactor-I の 1 バイアルに対して 1.0 mL の S9 を加えて S9 Mix とした。調製後、使用時まで冷蔵下で保存し、使用後の残液は廃棄した。

#### 1) S9

名称	:	S9
製造元	:	キッコーマン株式会社
ロット番号	:	RAA-586
製造日	:	2008年10月3日
購入日	:	2008年10月30日
種・系統	:	ラット・SD系
週齢・性	:	7週齢・雄
体重	:	219-257g
誘導物質	:	フェノバルビタール(PB)及び5,6-ベンゾフラボン(BF)
投与方法	:	腹腔内投与
投与期間及び投与量	:	PB 4日間連続投与 : 30+60+60+60 (mg/kg 体重) PB 投与 3日目 BF 投与 : 80 (mg/kg 体重)

- 保存場所 : 東京研究所 被験物質調製保存室内超低温フリーザ (三洋電機バイオメディカ株式会社 : MDF-192)
- 保存期間中の実測温度 : 2008年10月30日~2009年2月24日 : -87.3~-81.5°C
- 2) 補酵素
- 名称 : Cofactor-I
- 製造元 : オリエンタル酵母工業株式会社
- ロット番号 : 999801
- 製造日 : 2008年3月11日
- 購入日 : 2008年12月9日、2009年1月23日
- 保存場所 : 東京研究所 微生物試験室内冷蔵庫 (冷凍・冷蔵庫 MPR-211F : 三洋電機バイオメディカ株式会社)
- 保存期間中の実測温度 : 2008年12月9日~2009年2月24日 : 1.5~6.5°C
- 3) S9Mixの組成 (1mL中)
- 水 : 0.9 mL
- S9 : 0.1 mL
- MgCl<sub>2</sub> : 8.0 μmol/mL
- KCl : 33.0 μmol/mL
- グルコース-6-リン酸 : 5.0 μmol/mL
- 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) : 4.0 μmol/mL
- 還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH) : 4.0 μmol/mL
- リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4) : 100.0 μmol/mL

### 6.3.2 最小グルコース寒天平板培地

- 1) バイタルメディア AMT-O 培地
- 名称 : バイタルメディア AMT-O 培地
- 製造元 : 極東製薬工業株式会社
- ロット番号 : DZL9C901
- 製造日 : 2008年12月9日
- 購入日 : 2009年1月15日
- 保存方法 : 常温保存
- 保存場所 : 東京研究所 変異原性試験室
- 2) 使用寒天
- 名称 : OXOID AGAR No.1

製造元 : Oxoid Ltd.  
ロット番号 : 1027367-02

### 6.3.3 ニュートリエントブロス No.2 培養液

ニュートリエントブロス No.2 を 2.5wt% となるよう精製水で溶解し、オートクレーブにより滅菌処理 (121°C、20 分) を行い、調製した。調製後は使用時まで冷蔵で保存した。

名称 : ニュートリエントブロス No.2 (Nutrient Broth No.2)  
ロット番号 : 464616  
製造元 : Oxoid Ltd.  
保存方法 : 室温保存  
保存場所 : 東京研究所 微生物試験室

### 6.3.4 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4)

0.1mol/L リン酸水素二ナトリウム水溶液に、0.1mol/L リン酸二水素ナトリウム二水和物水溶液を加えながら pH 7.4 に調整し、0.1mol/L リン酸緩衝液とした。これをオートクレーブにより滅菌処理(121°C、20 分)を行った。調製後は使用時まで冷蔵で保存した。

#### 1) リン酸二水素ナトリウム二水和物 (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O)

名称 : リン酸二水素ナトリウム二水和物 (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O)  
製造元 : 和光純薬工業株式会社  
ロット番号 : SDM1133(用量設定試験、本試験 1 回目)  
PEN6717(本試験 2 回目)  
保存方法 : 室温保存  
保存場所 : 東京研究所 微生物試験室

#### 2) リン酸水素二ナトリウム (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)

名称 : リン酸水素二ナトリウム (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)  
製造元 : 和光純薬工業株式会社  
ロット番号 : EWM2400  
保存方法 : 室温保存  
保存場所 : 東京研究所 微生物試験室

### 6.3.5 トップアガー

以下に示す寒天を用いて、調製した軟寒天液(0.6 wt% Agar, 0.6wt% NaCl)をオートクレーブにより滅菌処理(121°C、20 分)した後、*S. typhimurium* TA 株は 0.5 mmol/L D-ビオチン-0.5 mmol/L L-ヒスチジン溶液、*E. coli* 株では 0.5 mmol/L L-トリプトファン溶液をそれぞれ 1/10 容量加えて調製した。調製後は室温で保存し、使用時は電子レンジで溶解後、固化を防ぐため 45°C の恒温槽で保温した。

- 1) Bacto Agar  
 名称 : Bacto Agar  
 製造元 : Becton, Dickinson and Company  
 ロット番号 : 8120597  
 保存方法 : 室温保存  
 保存場所 : 東京研究所 微生物試験室
- 2) NaCl  
 名称 : NaCl  
 製造元 : 和光純薬工業株式会社  
 ロット番号 : ALJ3477  
 保存方法 : 室温保存  
 保存場所 : 東京研究所 微生物試験室
- 3) D-ビオチン  
 名称 : D-ビオチン  
 製造元 : MP Biomedicals, Inc.  
 ロット番号 : 3570J  
 保存方法 : 冷蔵保存、遮光  
 保存場所 : 東京研究所 微生物試験室
- 4) L-ヒスチジン塩酸塩一水和物  
 名称 : L-ヒスチジン塩酸塩一水和物  
 製造元 : 和光純薬工業株式会社  
 ロット番号 : EWQ6361  
 保存方法 : 室温保存、遮光  
 保存場所 : 東京研究所 微生物試験室
- 5) L-トリプトファン  
 名称 : L-トリプトファン  
 製造元 : 和光純薬工業株式会社  
 ロット番号 : EWP0422  
 保存方法 : 室温保存、遮光  
 保存場所 : 東京研究所 微生物試験室

## 6.4 試験方法

### 6.4.1 識別方法

#### 1) 菌株の識別

以下に示す色のマーカーで識別した。

<i>S. typhimurium</i> TA100	青
<i>S. typhimurium</i> TA1535	桃
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	茶

*S. typhimurium* TA98 赤

*S. typhimurium* TA1537 緑

## 2) 濃度の識別

代謝活性化しない場合は「-」、代謝活性化する場合は「+」とし、これに続けて陰性対照(Solvent Control)を「SC」、陽性対照(Positive Control)を「PC」、被験物質処理群を濃度の低い方から「1」、「2」、「3」…の番号を各菌の色のマーカーで記載し、識別した。

### 6.4.2 前培養

- 1) ニュートリエントプロス No.2 培養液 10mL を入れた滅菌済み L字型試験管に凍結保存菌株を解凍して得た菌懸濁液を *S. typhimurium* 株では各 20  $\mu$ L、*E. coli* 株では 10  $\mu$ L 接種した。使用後の菌懸濁液は廃棄した。
- 2) 各試験菌株を接種した L字型試験管を振盪恒温槽 (COOL BATH SHAKER ML-10 PU-6 接続型、タイテック株式会社) にセットし、プログラム制御により前培養開始まで 4°C の水浴中に放置(6 時間 30 分)した後、37°C に上昇後 9 時間前培養した。
- 3) 前培養終了時に培養液の吸光度をデジタル比色計 (Mini photo 518R、タイテック株式会社) で測定した。なお、培養液は使用まで室温下に維持した。それぞれの菌株の換算生菌数を表 3 に示した。

表 3 菌株の換算生菌数一覧

菌株	菌数(cells/mL)		
	用量設定試験	本試験 1 回目	本試験 2 回目
<i>S. typhimurium</i> TA100	$4.91 \times 10^9$	$5.13 \times 10^9$	$5.26 \times 10^9$
<i>S. typhimurium</i> TA1535	$4.94 \times 10^9$	$4.97 \times 10^9$	$4.65 \times 10^9$
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	$8.03 \times 10^9$	$8.10 \times 10^9$	$8.15 \times 10^9$
<i>S. typhimurium</i> TA98	$6.27 \times 10^9$	$6.00 \times 10^9$	$5.60 \times 10^9$
<i>S. typhimurium</i> TA1537	$2.99 \times 10^9$	$2.99 \times 10^9$	$3.09 \times 10^9$

### 6.4.3 本試験用量の設定

本試験の試験用量を設定するため、50 mg/mL の被験液を公比 4 で 4 段階希釈した計 5 用量 (19.5、78.1、313、1250、5000  $\mu$ g/plate) を用い、用量設定試験を実施した。なお、用量設定試験の結果を別表 1 に示した。

用量設定試験の結果、本被験物質処理による生育阻害は、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1535 の 78.1  $\mu$ g/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1537 及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA 株の 313  $\mu$ g/plate 以上、代謝活性化の有無にかかわらず *E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化しない *S. typhimurium* TA98 の 1250  $\mu$ g/plate 以上で認められた。また、本被験物質によるプレート上の沈殿及び着色は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められな

った。

このため、本試験の試験用量は、生育阻害を示した最低用量を最高用量として、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1535 については 78.1 µg/plate、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1537 及び代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA 株については 313 µg/plate、代謝活性化の有無にかかわらず *E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98 については 1250 µg/plate をそれぞれ最高用量として、以下公比 2 で 5 段階希釈した計 6 用量を設定した。なお、本試験は同一用量で 2 回実施した。

#### 6.4.4 プレート数

被験物質処理群、陰性対照群及び陽性対照群のいずれについても、用量設定試験では 2 枚、2 回の本試験では 3 枚のプレートを用いた。

#### 6.4.5 試験操作（プレインキュベーション法）

- 1) 滅菌した小試験管に調製した被験液、溶媒又は陽性対照溶液を 0.1mL 入れ、これに代謝活性化しない場合は 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL を、代謝活性化する場合は S9 Mix 0.5 mL を加えた後、それぞれの小試験管に各菌株の培養液 0.1 mL を加えた。
- 2) 小試験管を攪拌後すぐに 37°C で 20 分間振盪しながらプレインキュベーションし、これに 45°C に保温されているトッパアガーを 2.0 mL 加え攪拌後、最小グルコース寒天平板培地に均一に重層した。
- 3) 無菌試験として、調製した最高用量の被験液 0.1 mL 及び調製した S9 Mix 0.5 mL をそれぞれ小試験管に取り、これにトッパアガーを 2.0 mL 加えた後に最小グルコース寒天平板培地に均一に重層した。なお、これら 1)~3) の一連の操作は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で実施した。
- 4) 最小グルコース寒天平板培地に重層したトッパアガーが固化したことを確認し、最小グルコース寒天平板培地を逆さにしてインキュベータに入れ、37°C で用量設定試験、本試験 1 回目では 49 時間、本試験 2 回目では 49.5 時間培養した。
- 5) 培養後、プレート上の被験物質による沈殿及び着色を確認した結果、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかったため、自動コロニーカウンタ（コロニーアナライザー CA-11D systems、システムサイエンス株式会社）を用いて計数（面積補正、補正值：1.21）した。また、実体顕微鏡を用いて生育阻害の有無を観察した。

#### 6.5 判定基準

被験物質処理群の復帰変異コロニー数が自然復帰変異コロニー数（陰性対照値）に対して 2 倍以上となる増加を示し、用量反応性及び再現性が認められた場合あるいは明確な用量反応性を示さない場合であっても自然復帰変異コロニー数の 2 倍以上とな



る増加を示し、2回の本試験で再現性が認められた場合に陽性と判定することとした。なお、測定結果については、平均値±標準偏差も併せて記載した。

## 7. 試験結果

試験の結果を別表1~5及び図1~10に示した。なお、図は別表2、3より作成した。

### 7.1 培養終了後の観察結果

本被験物質によるプレート上の沈殿及び着色は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。なお、実体顕微鏡を用いて菌に対する生育阻害を観察した結果、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1535 の 78.1 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1537 及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA1535、TA1537 の 156 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、TA98 の 313 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* の 625 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の *E. coli* WP2 *uvrA* の 1250 µg/plate 以上で認められた。

### 7.2 復帰変異コロニー数

2回の本試験ともに、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本被験物質による復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量反応性も認められなかった。

### 7.3 試験系の成立条件

陽性対照値がそれぞれの菌株の陰性対照値に比較して2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加を示し、本試験2回目の代謝活性化した場合の *E. coli* WP2 *uvrA* の陰性対照値を除き、陰性対照値及び陽性対照値の復帰変異コロニー数の平均値が背景データの管理限界(平均値±3SD：別添2)内であり、無菌試験及び試験操作において雑菌の混入などの異常も認められなかったため、試験が適切に実施されたものと判断した。なお、本試験2回目の代謝活性化した場合の *E. coli* WP2 *uvrA* の陰性対照値についても、管理限界をわずかに超える程度(38：5~34)であり、使用した試薬及び試験操作に問題はなく、被験物質処理群の復帰変異コロニー数に用量依存性がないことから、判定には影響しないと判断した。

## 8. 考察

2回の本試験ともに、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本被験物質による復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量反応性も認められなかった。

一方、陽性対照群では陰性対照群と比較して2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加を示したことから、使用菌株の復帰突然変異誘発物質に対する反応は適切であつ

たことが確認され、試験は適切に実施されたものと考えられた。

以上の試験結果より、本試験条件下において、2,4-ジブロモフェノールは、細菌に対する復帰突然変異誘発能を有さない（陰性）と判定した。

## 9. 参考文献

- 1) B.N.Ames, F.D.Lee and W.E.Durston: An Improved Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens, Proc.Natl Acad.Sci.,USA, 70, No.3, pp.782-786, March 1973.
- 2) J.McCann, N.E.Spingarn, J.Kobori and B.N.Ames: Detection of Carcinogens as Mutagens: Bacterial Tester Strains with R Factor Plasmids, Proc.Natl Acad.Sci., USA, 72, No.3, pp.979-983, March 1975.
- 3) M.H.L.Green and W.J.Muriel: Mutagen Testing using Trp+ Reversion in *Escherichia coli*, Mutation Res., 38, pp.3-32, 1976.
- 4) T.Yahagi, M.Nagao, Y.Seino, T.Matsushima, T.Sugimura and M.Okada: Mutagenicities of *N*-nitrosamines on *Salmonella*, Mutation Res., 48, pp.121-130, 1977.
- 5) Dorothy M. Maron and Bruce N. Ames: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, Mutation Res., 113, pp.173-215, 1983.
- 6) 田島彌太郎, 賀田恒夫, 近藤宗平, 外村晶 (編) : 環境変異原実験法, 講談社, pp.56-68, 1980.
- 7) 労働省安全衛生部化学物質調査課編: 新・微生物を用いる変異原性試験ガイドブック, 中央労働災害防止協会, 1986.
- 8) 石館基 (監修) : 微生物を用いる変異原性試験データ集 (能美健彦, 松井道子編集), 株式会社エル・アイ・シー, 東京, 1991.

(別表1)

## 試験結果表 (用量設定試験)

被験物質の名称: 2,4-ジブロモフェノール

No. T-0308

試験実施期間		2009年1月20日 より 2009年1月23日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2 <sup>uvrA</sup>	TA98	TA1537	
S9Mix (-)	陰性対照 (DMSO)	138 138 ( 138 )	8 13 ( 11 )	24 25 ( 25 )	11 18 ( 15 )	8 14 ( 11 )	
	19.5	147 131 ( 139 )	11 19 ( 15 )	21 13 ( 17 )	13 15 ( 14 )	11 10 ( 11 )	
	78.1	142 129 ( 136 )	16 * 16 * ( 16 )	16 16 ( 16 )	19 19 ( 19 )	13 15 ( 14 )	
	313	108 * 97 * ( 103 )	9 * 19 * ( 14 )	12 16 ( 14 )	8 15 ( 12 )	11 * 8 * ( 10 )	
	1250	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 )	
	S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	130 140 ( 135 )	11 13 ( 12 )	20 21 ( 21 )	45 37 ( 41 )	22 13 ( 18 )
19.5		149 126 ( 138 )	15 12 ( 14 )	11 25 ( 18 )	37 30 ( 34 )	22 24 ( 23 )	
78.1		151 142 ( 147 )	9 14 ( 12 )	10 25 ( 18 )	34 33 ( 34 )	24 13 ( 19 )	
313		111 * 92 * ( 102 )	7 * 7 * ( 7 )	11 11 ( 11 )	29 * 19 * ( 24 )	10 * 8 * ( 9 )	
1250		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 )	
陽性対照		S9Mixを必要としないもの	名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2
	用量(μg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0	
	コロニー数/プレート	655 664 ( 660 )	238 301 ( 270 )	85 68 ( 77 )	439 479 ( 459 )	1744 1468 ( 1606 )	
	S9Mixを必要とするもの	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
	用量(μg/プレート)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0	
	コロニー数/プレート	1120 1041 ( 1081 )	263 267 ( 265 )	1293 1221 ( 1257 )	412 371 ( 392 )	168 123 ( 146 )	

(備考)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド  
SAZ : アジ化ナトリウム  
ICR-191 : 2-メキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl  
2AA : 2-アミノアントラセン  
B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

\* : 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。  
( )内は、2枚のプレートの平均値を示す。

(別表2)

## 試験結果表 (本試験1回目:-S9Mix)

被験物質の名称:2,4-ジブロモフェノール

No. T-0308

試験実施期間		2009年2月3日 より 2009年2月6日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (µg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9Mix (-)	陰性対照 (DMSO)	134 117 116 ( 122 ± 10.1 )	13 19 12 ( 15 ± 3.8 )	16 25 30 ( 24 ± 7.1 )	20 16 24 ( 20 ± 4.0 )	11 17 7 ( 12 ± 5.0 )
	2.44	NT	13 17 13 ( 14 ± 2.3 )	NT	NT	NT
	4.88	NT	13 17 15 ( 15 ± 2.0 )	NT	NT	NT
	9.77	154 141 153 ( 149 ± 7.2 )	15 13 13 ( 14 ± 1.2 )	NT	NT	19 16 16 ( 17 ± 1.7 )
	19.5	139 108 149 ( 132 ± 21.4 )	20 15 15 ( 17 ± 2.9 )	NT	NT	19 8 21 ( 16 ± 7.0 )
	39.1	146 123 126 ( 132 ± 12.5 )	13 18 14 ( 15 ± 2.6 )	17 21 25 ( 21 ± 4.0 )	26 24 23 ( 24 ± 1.5 )	13 17 20 ( 17 ± 3.5 )
	78.1	156 123 137 ( 139 ± 16.6 )	15 * 15 * 8 * ( 13 ± 4.0 )	25 25 22 ( 24 ± 1.7 )	18 17 13 ( 16 ± 2.6 )	15 19 16 ( 17 ± 2.1 )
	156	144 * 128 * 124 * ( 132 ± 10.6 )	NT	22 15 16 ( 18 ± 3.8 )	17 12 24 ( 18 ± 6.0 )	21 * 10 * 10 * ( 14 ± 6.4 )
	313	112 * 113 * 90 * ( 105 ± 13.0 )	NT	22 16 31 ( 23 ± 7.5 )	17 10 11 ( 13 ± 3.8 )	19 * 7 * 8 * ( 11 ± 6.7 )
	625	NT	NT	0 * 0 * 0 * ( 0 ± 0.0 )	0 * 0 * 0 * ( 0 ± 0.0 )	NT
	1250	NT	NT	0 * 0 * 0 * ( 0 ± 0.0 )	0 * 0 * 0 * ( 0 ± 0.0 )	NT
	陽性対照	S9Mixを必要としなもの 名称 用量 (µg/プレート) コロニー数/プレート	AF-2 0.01 659 600 668 ( 642 ± 36.9 )	SAZ 0.5 335 268 360 ( 321 ± 47.6 )	AF-2 0.01 87 87 87 ( 87 ± 0.0 )	AF-2 0.1 559 480 519 ( 519 ± 39.5 )

(備考)

AF-2 : 2-(2-フルル)-3-(5-ニトロ-2-フルル)アクリルアミド  
SAZ : アジ化ナトリウム  
ICR-191 : 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl

\*: 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。  
NT: 試験せず。  
( )内は、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

(別表3)

## 試験結果表 (本試験1回目+S9Mix)

被験物質の名称:2,4-ジブロモフェノール

No. T-0308

試験実施期間		2009年2月3日 より 2009年2月6日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	140 142 134 ( 139 ± 4.2 )	13 8 16 ( 12 ± 4.0 )	21 24 31 ( 25 ± 5.1 )	29 36 47 ( 37 ± 9.1 )	23 19 13 ( 18 ± 5.0 )	
	9.77	150 136 142 ( 143 ± 7.0 )	15 8 13 ( 12 ± 3.6 )	NT	41 28 32 ( 34 ± 6.7 )	21 16 15 ( 17 ± 3.2 )	
	19.5	134 123 146 ( 134 ± 11.5 )	11 17 9 ( 12 ± 4.2 )	NT	48 42 43 ( 44 ± 3.2 )	16 21 12 ( 16 ± 4.5 )	
	39.1	107 154 147 ( 136 ± 25.4 )	10 15 15 ( 13 ± 2.9 )	30 19 32 ( 27 ± 7.0 )	37 40 28 ( 35 ± 6.2 )	27 9 20 ( 19 ± 9.1 )	
	78.1	134 123 156 ( 138 ± 16.8 )	13 10 9 ( 11 ± 2.1 )	21 25 24 ( 23 ± 2.1 )	31 34 36 ( 34 ± 2.5 )	13 21 15 ( 16 ± 4.2 )	
	156	132 140 126 ( 133 ± 7.0 )	13 * 11 * 6 * ( 10 ± 3.6 )	28 29 29 ( 29 ± 0.6 )	32 19 22 ( 24 ± 6.8 )	14 * 11 * 20 * ( 15 ± 4.6 )	
	313	68 * 88 * 57 * ( 71 ± 15.7 )	6 * 4 * 5 * ( 5 ± 1.0 )	16 18 18 ( 17 ± 1.2 )	0 * 0 * 0 * ( 0 ± 0.0 )	8 * 5 * 6 * ( 6 ± 1.5 )	
	625	NT	NT	4 4 4 ( 4 ± 0.0 )	NT	NT	
	1250	NT	NT	0 * 0 * 0 * ( 0 ± 0.0 )	NT	NT	
	陽性対照	S9Mixを必要とするもの	名称 用量(μg/プレート)	B[a]P 5.0	2AA 2.0	2AA 10.0	B[a]P 5.0
		コロニー数/プレート	953 1042 1035 ( 1010 ± 49.5 )	264 293 292 ( 283 ± 16.5 )	997 1113 1159 ( 1090 ± 83.5 )	393 378 373 ( 381 ± 10.4 )	150 116 146 ( 137 ± 18.6 )

(備考)

2AA :2-アミノアントラセン  
B[a]P :ベンゾ[a]ピレン

\*:被験物質による生育阻害が認められたことを示す。  
NT:試験せず。  
( )内は、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

(別表4)

## 試験結果表 (本試験2回目:-S9Mix)

被験物質の名称:2,4-ジプロモフェノール

No. T-0308

試験実施期間		2009年2月23日 より 2009年2月26日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix (-)	陰性対照 (DMSO)	118 132 133 ( 128 ± 8.4 )	11 12 7 ( 10 ± 2.6 )	42 30 29 ( 34 ± 7.2 )	13 15 16 ( 15 ± 1.5 )	13 16 19 ( 16 ± 3.0 )	
	2.44	NT	8 8 8 ( 8 ± 0.0 )	NT	NT	NT	
	4.88	NT	9 4 10 ( 8 ± 3.2 )	NT	NT	NT	
	9.77	137 140 116 ( 131 ± 13.1 )	4 9 6 ( 6 ± 2.5 )	NT	NT	11 20 24 ( 18 ± 6.7 )	
	19.5	150 134 145 ( 143 ± 8.2 )	5 10 5 ( 7 ± 2.9 )	NT	NT	14 19 13 ( 15 ± 3.2 )	
	39.1	140 128 147 ( 138 ± 9.6 )	12 6 5 ( 8 ± 3.8 )	20 30 30 ( 27 ± 5.8 )	13 10 10 ( 11 ± 1.7 )	21 15 20 ( 19 ± 3.2 )	
	78.1	142 153 150 ( 148 ± 5.7 )	8 * 7 * 10 * ( 8 ± 1.5 )	29 33 41 ( 34 ± 6.1 )	16 13 15 ( 15 ± 1.5 )	18 16 17 ( 17 ± 1.0 )	
	156	112 * 141 * 135 * ( 129 ± 15.3 )	NT	24 34 29 ( 29 ± 5.0 )	14 20 11 ( 15 ± 4.6 )	21 * 15 * 17 * ( 18 ± 3.1 )	
	313	73 * 87 * 82 * ( 81 ± 7.1 )	NT	26 23 23 ( 24 ± 1.7 )	7 7 10 ( 8 ± 1.7 )	11 * 16 * 9 * ( 12 ± 3.6 )	
	625	NT	NT	0 * 0 * 0 * ( 0 ± 0.0 )	0 * 0 * 0 * ( 0 ± 0.0 )	NT	
	1250	NT	NT	0 * 0 * 0 * ( 0 ± 0.0 )	0 * 0 * 0 * ( 0 ± 0.0 )	NT	
	陽性対照	S9Mixを必要としな いもの	名称 用量(μg/プレート)	AF-2 0.01	SAZ 0.5	AF-2 0.01	AF-2 0.1
		コロニー数/プレート	612 632 647 ( 630 ± 17.6 )	269 212 240 ( 240 ± 28.5 )	79 83 77 ( 80 ± 3.1 )	518 506 548 ( 524 ± 21.6 )	1695 1660 1864 ( 1740 ± 109.1 )

(備考)

AF-2 :2-(2-フルル)-3-(5-ニトロ-2-フルル)アクリルアミド  
SAZ :アジ化ナトリウム  
ICR-191 :2-メキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl

\*:被験物質による生育阻害が認められたことを示す。  
NT:試験せず。  
( )内は、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

(別表5)

## 試験結果表 (本試験2回目+S9Mix)

被験物質の名称:2,4-ジブロモフェノール

No. T-0308

試験実施期間		2009年2月23日 より 2009年2月26日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	100 134 139 ( 124 ± 21.2 )	8 11 8 ( 9 ± 1.7 )	35 44 34 ( 38 ± 5.5 )	37 38 38 ( 38 ± 0.6 )	24 19 18 ( 20 ± 3.2 )	
	9.77	151 138 131 ( 140 ± 10.1 )	7 10 4 ( 7 ± 3.0 )	NT	27 34 28 ( 30 ± 3.8 )	18 18 18 ( 18 ± 0.0 )	
	19.5	156 158 116 ( 143 ± 23.7 )	8 12 7 ( 9 ± 2.6 )	NT	36 23 31 ( 30 ± 6.6 )	25 18 15 ( 19 ± 5.1 )	
	39.1	156 176 161 ( 164 ± 10.4 )	11 6 8 ( 8 ± 2.5 )	36 32 31 ( 33 ± 2.6 )	30 26 35 ( 30 ± 4.5 )	15 16 16 ( 16 ± 0.6 )	
	78.1	150 154 162 ( 155 ± 6.1 )	12 11 9 ( 11 ± 1.5 )	32 21 33 ( 29 ± 6.7 )	24 28 28 ( 27 ± 2.3 )	8 13 12 ( 11 ± 2.6 )	
	156	123 142 117 ( 127 ± 13.1 )	5 * 8 * 3 * ( 5 ± 2.5 )	17 25 27 ( 23 ± 5.3 )	20 16 13 ( 16 ± 3.5 )	18 * 10 * 12 * ( 13 ± 4.2 )	
	313	59 * 77 * 54 * ( 63 ± 12.1 )	4 * 2 * 2 * ( 3 ± 1.2 )	22 25 22 ( 23 ± 1.7 )	14 * 13 * 15 * ( 14 ± 1.0 )	7 * 6 * 6 * ( 6 ± 0.6 )	
	625	NT	NT	8 7 4 ( 6 ± 2.1 )	NT	NT	
	1250	NT	NT	0 * 0 * 0 * ( 0 ± 0.0 )	NT	NT	
	陽性対照	S9Mixを必要とするもの	名称 用量(μg/プレート)	B[a]P 5.0	2AA 2.0	2AA 10.0	B[a]P 5.0
		コロニー数/プレート	1027 1085 964 ( 1025 ± 60.5 )	293 299 272 ( 288 ± 14.2 )	949 899 868 ( 905 ± 40.9 )	357 362 301 ( 340 ± 33.9 )	115 132 119 ( 122 ± 8.9 )

(備考)

2AA :2-アミノアントラセン  
B[a]P :ベンゾ[a]ピレン

\*: 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。  
NT: 試験せず。  
( )内は、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

図 1

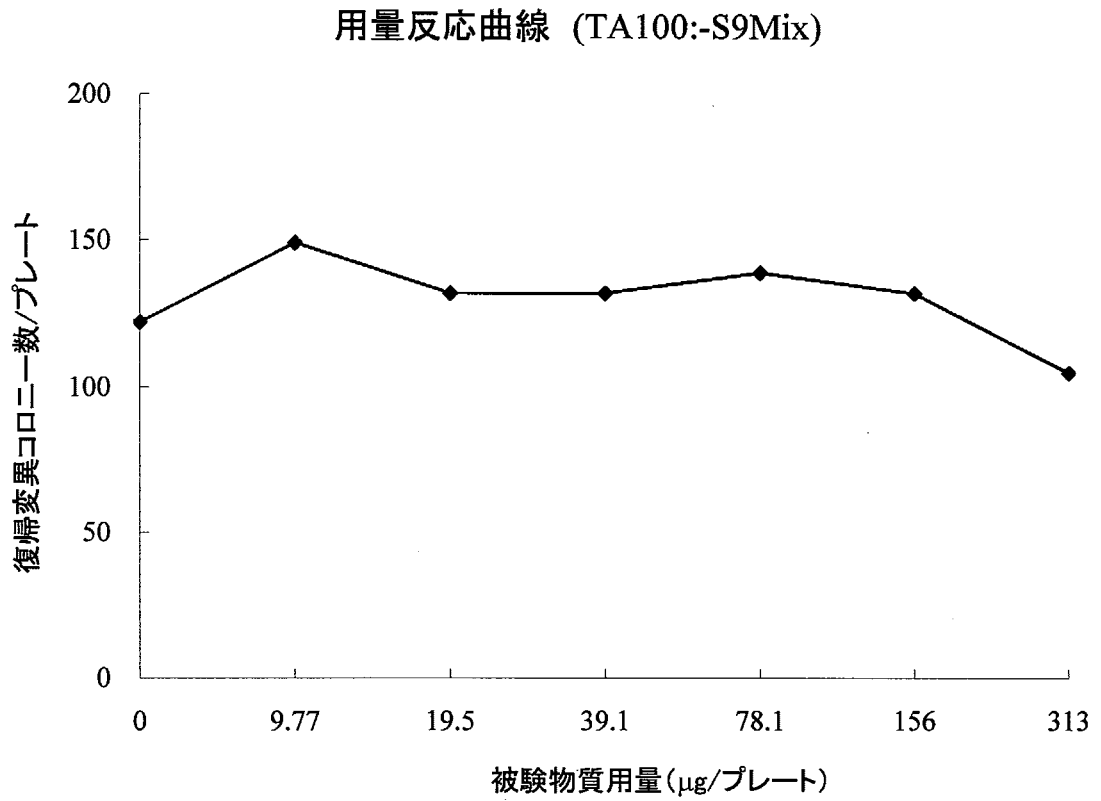


図 2

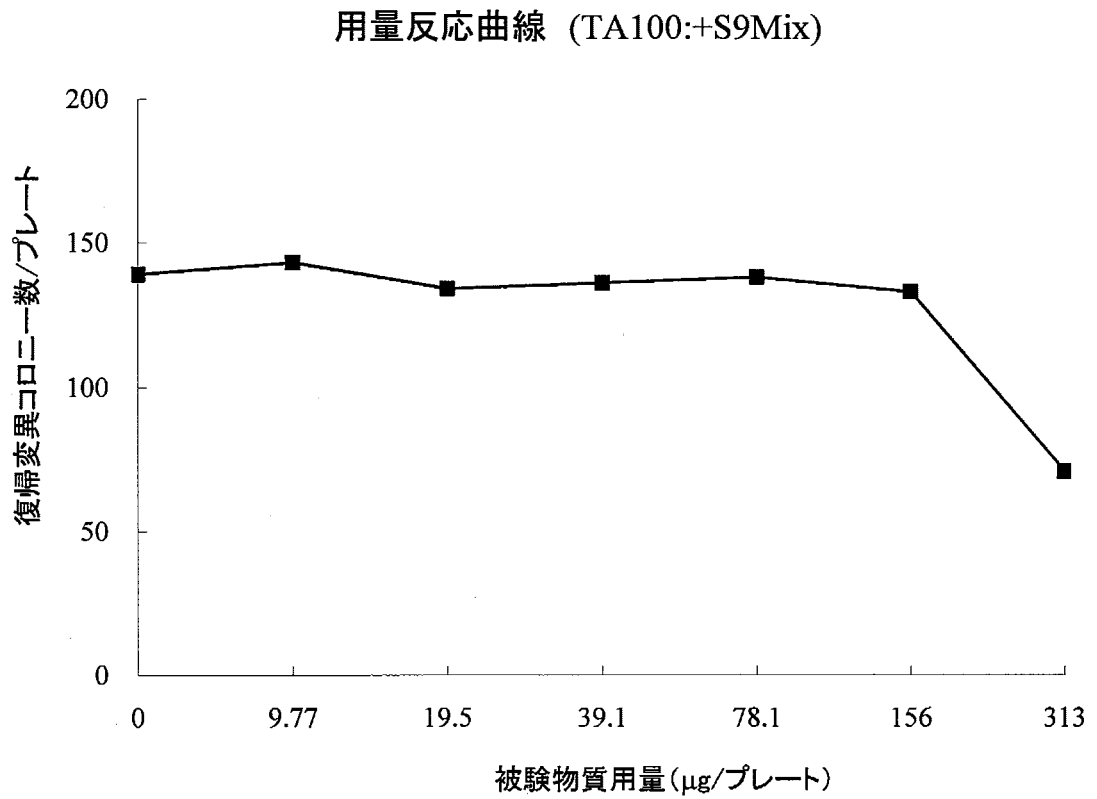




図 3

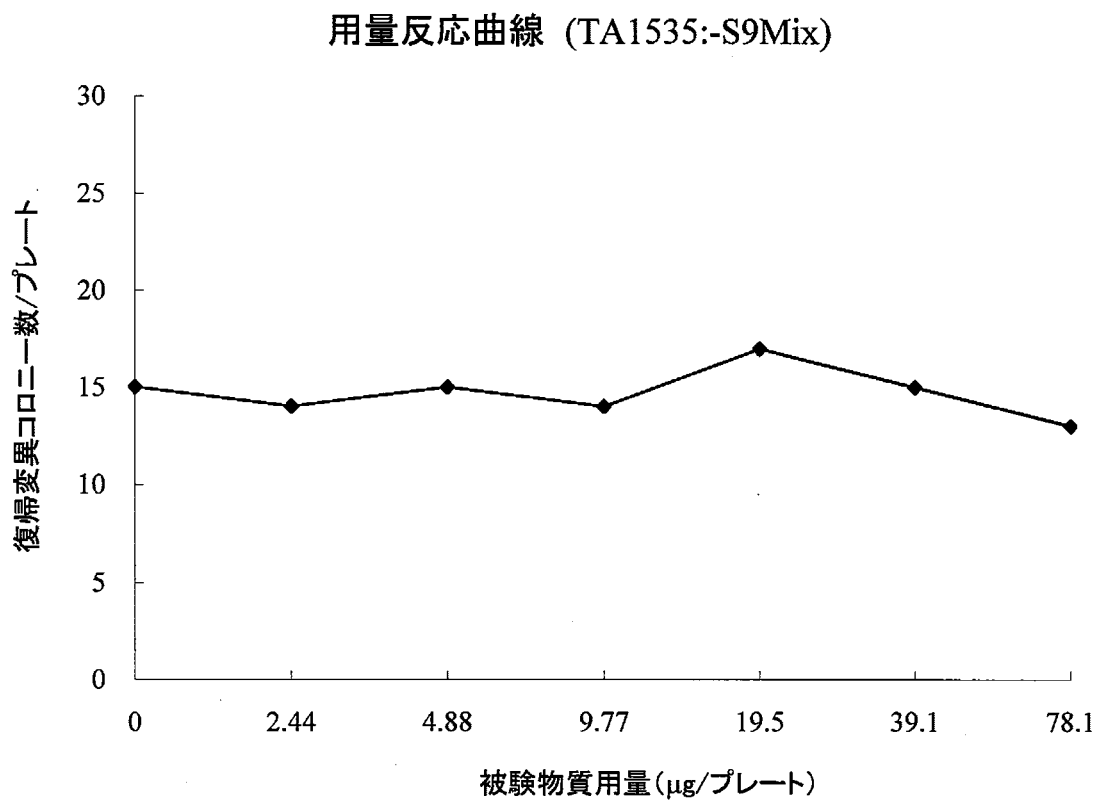


図 4

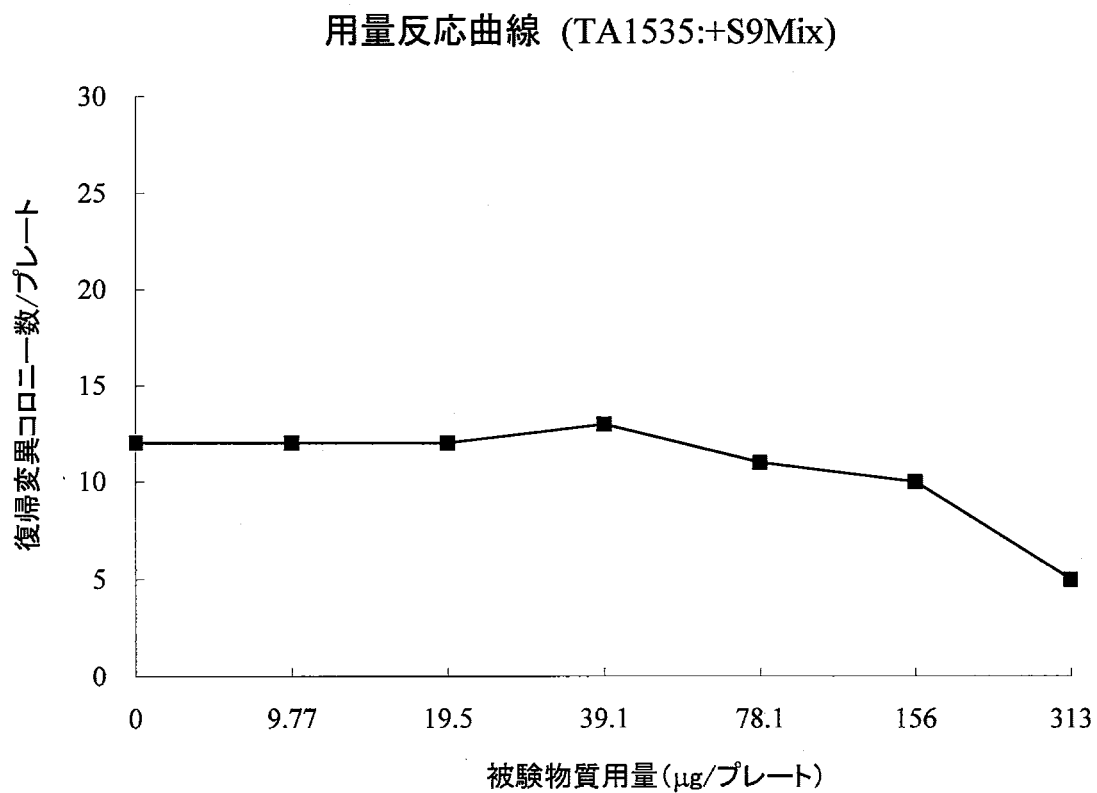


図 5

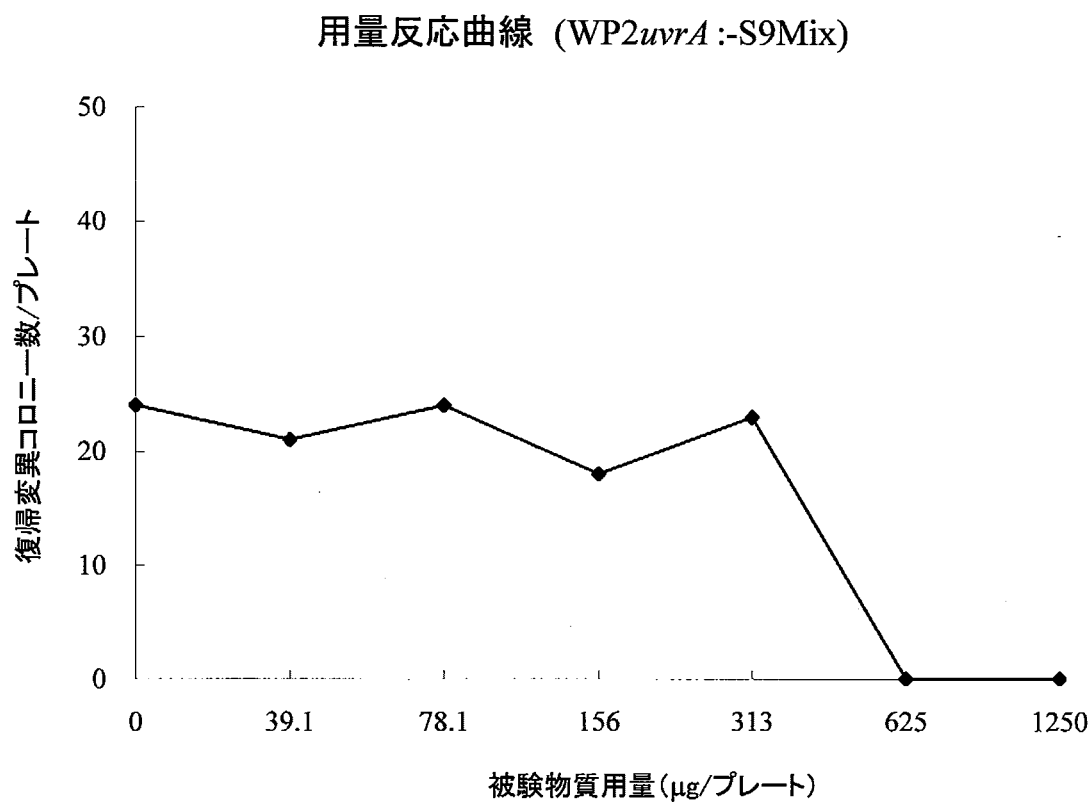


図 6

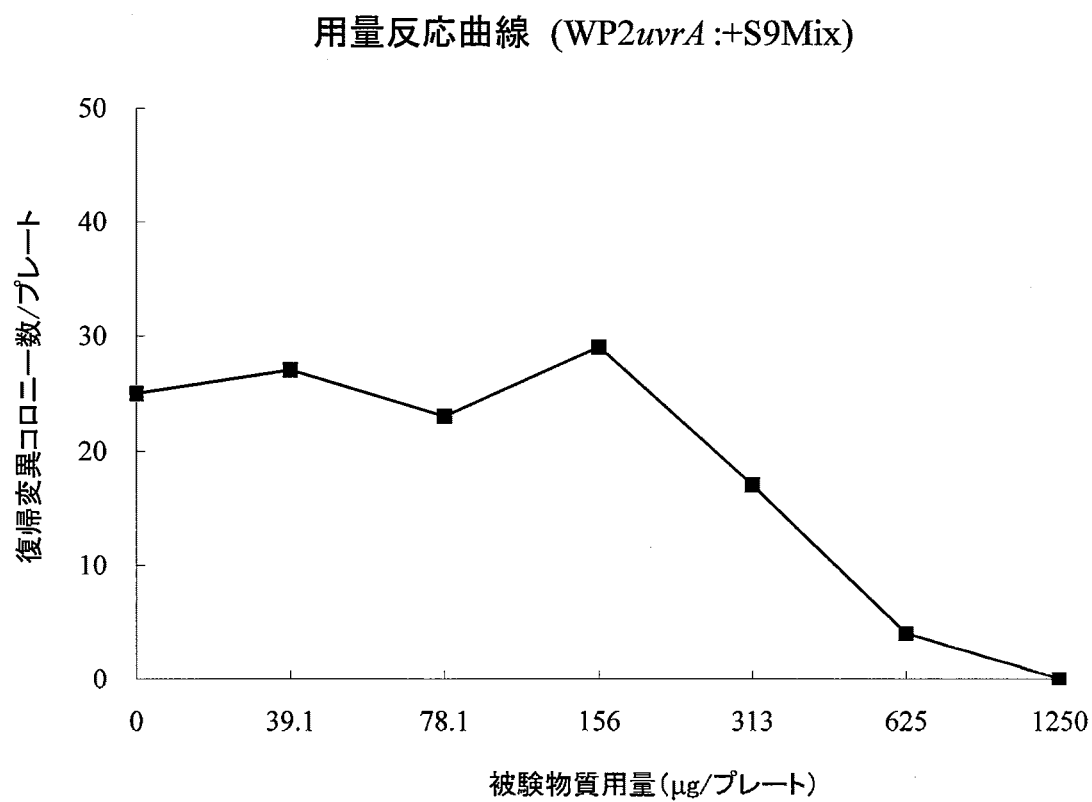


図 7

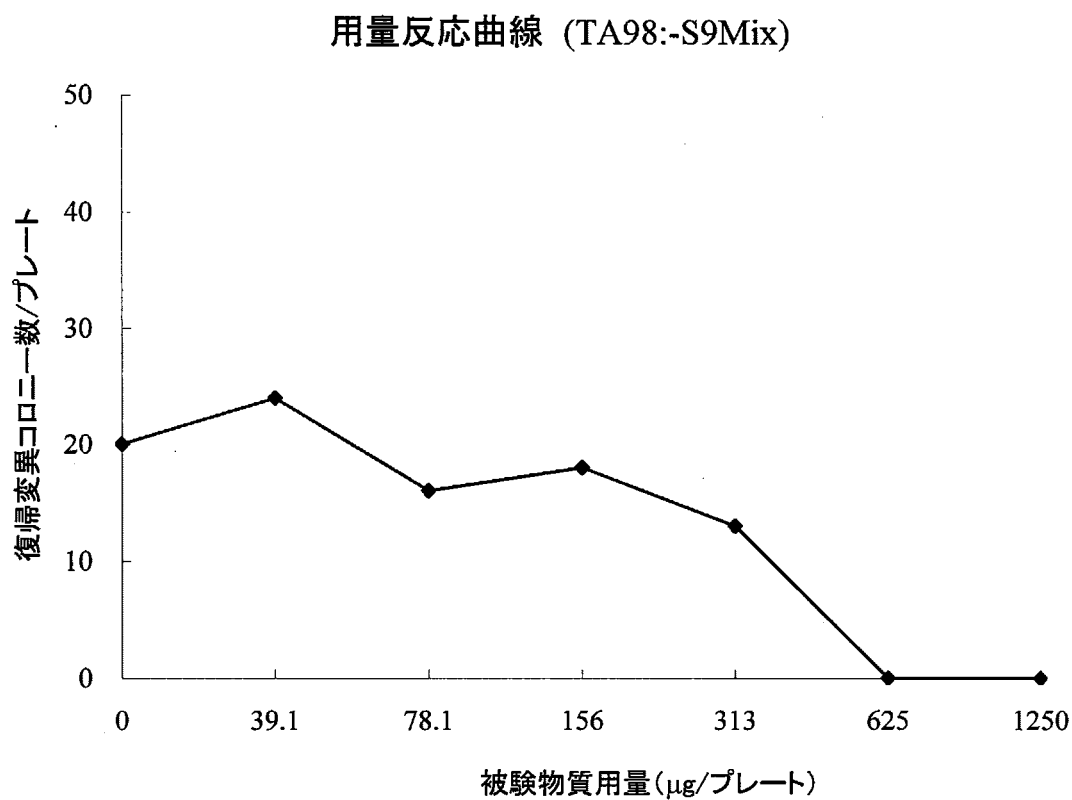


図 8

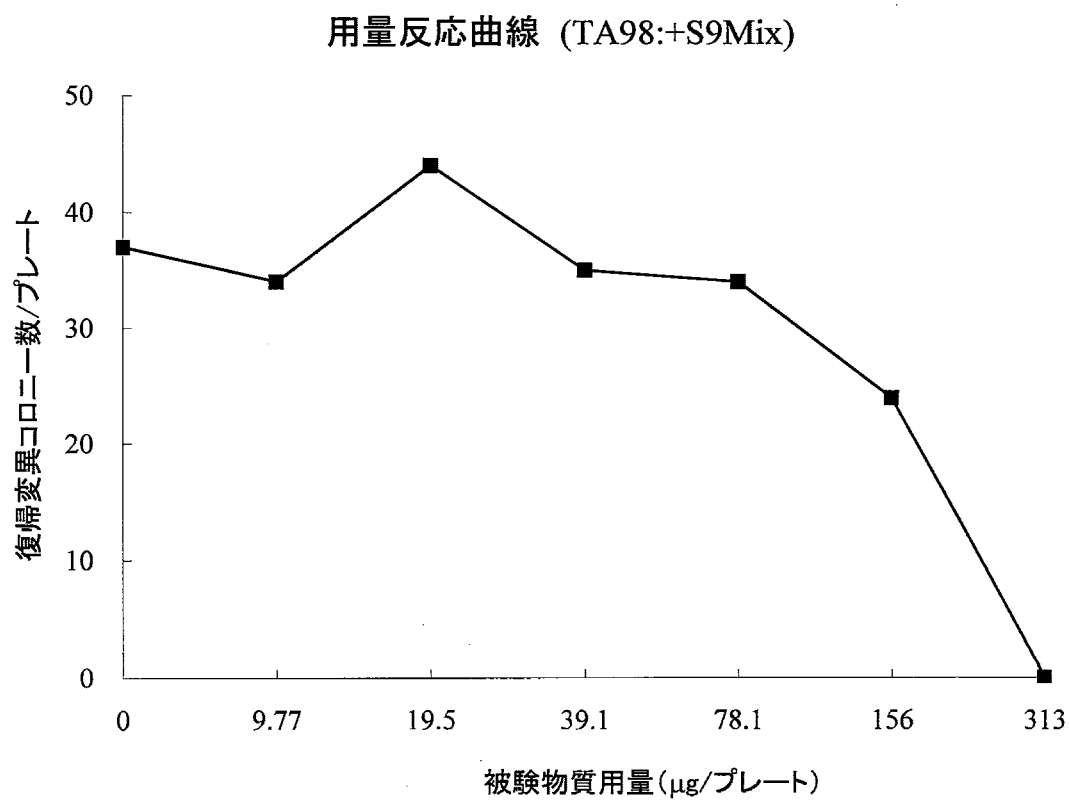


図 9

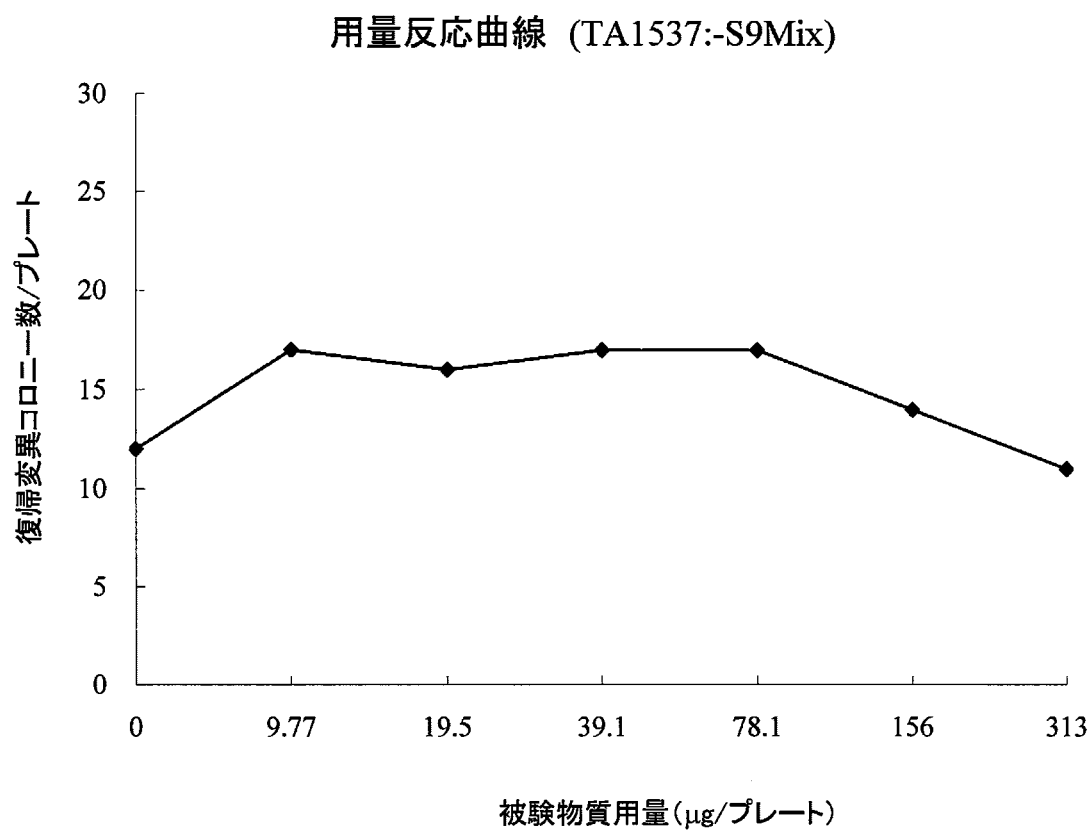


図 10

