

陳 述 書

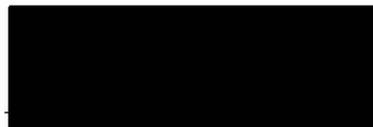
本報告書は、「2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)ヘキサンの細菌を用いる復帰突然変異試験（試験番号：05-236）」の最終報告書原本の正確な写しであることに相違ありません。

平成 20 年 11 月 11 日

財団法人 畜産生物科学安全研究所

試験責任者

安全性研究部 首席研究員



信頼性保証責任者

信頼性保証室 首席研究員



最終報告書

2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)ヘキサンの細菌を用いる復帰突然変異試験
(試験番号：05-236)

財団法人 畜産生物科学安全研究所

陳述書

試験表題：2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)ヘキサンの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：05-236

本試験は、本試験は、化審法ガイドライン「新規化学物質等に係る試験の方法について、最終改正：平成17年4月1日」（平成15年11月21日付け薬食発第1121002号厚生労働省医薬食品局長、平成15・11・13製局第2号経済産業省製造産業局長、環境企発第031121002号環境省総合環境政策局長、連名通知）および化審法GLP「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」（平成15年11月21日付け薬食発第1121003号厚生労働省医薬食品局長、平成15・11・17製局第3号経済産業省製造産業局長、環境企発第031121004号環境省総合環境政策局長、連名通知）に定める基準に準拠して実施した。

試験責任者

(財) 畜産生物科学安全研究所

安全性研究部 首席研究員



平成20年 11月 11日

試験表題：2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)ヘキサンの細菌を用いる復帰突
然変異試験

試験番号：05-236

試験委託者：

名 称 厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室
所在地 東京都千代田区霞が関1-2-2
委託担当者 [REDACTED]

試験実施施設：

名 称 財団法人 畜産生物科学安全研究所
所在地 神奈川県相模原市橋本台3-7-11
運営管理者 専務理事 [REDACTED]
試験責任者 安全性研究部 首席研究員 [REDACTED]
信頼性保証 信頼性保証室 首席研究員 [REDACTED]
責任者

試験期間：

試験開始日 平成18年11月17日
実験開始日 平成19年1月15日
実験終了日 平成19年1月26日
試験終了日 平成20年11月11日

試験成績の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態および試験計画書からの逸脱

本試験に関し、予見することが出来なかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある
事態および試験計画書からの逸脱はなかった。

資料の保管：

本試験における下記の資料は、最終報告書作成後10年間、財団法人 畜産生物科学安

全研究所において保管する。その後の保管については、試験委託者と協議して決める。

1. 試験計画書
2. 被験物質に関する記録
3. 試験結果に関する記録
4. 信頼性保証に関する記録
5. 最終報告書

試験責任者、担当者および業務分担

試験責任者

氏名



平成20年 11月 11日

試験担当者およびその業務分担

実験操作 :



データ整理 :

信頼性保証証明書

試験表題 : 2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)ヘキサンの細菌を用いる
復帰突然変異試験

試験番号 : 05-236

<u>審査・査察実施日</u>	<u>試験責任者への報告日</u>	<u>運営管理者への報告日</u>
1. 試験計画書審査 平成18年11月17日	平成18年11月17日	平成18年11月17日
2. 試験計画書記載事項変更審査 (変-1) 平成20年04月28日	平成20年04月28日	平成20年04月28日
3. 試験実施状況査察 本試験(1回目): 指標菌株の前培養 平成19年01月22日	平成19年01月22日	平成19年01月22日
本試験(1回目): 被験物質の量・菌数チェック・被験物質調製・菌液の取扱い・ S9mixの使用・被験物質, 対照物質及び菌液の添加・トップアガ 一の作製・指標菌株の検査・無菌試験 平成19年01月23日	平成19年01月23日	平成19年01月23日
本試験(1回目): 指標菌株検査結果の判定手順 平成19年01月24日	平成19年01月24日	平成19年01月24日
本試験(1回目): コロニー数の計測・無菌試験及びアミノ酸要求性検査の結果 判定手順 平成19年01月25日	平成19年01月25日	平成19年01月25日
4. 生データ査察 平成20年04月24日	平成20年04月24日	平成20年04月24日
5. 報告書(草案)審査 平成20年04月24日	平成20年04月24日	平成20年04月24日
6. 最終報告書審査 平成20年11月11日	平成20年11月11日	平成20年11月11日

上記の審査・査察により、本試験が「化審法GLP」に従って実施され、本報告書には、当該試験で使用した方法・手順が忠実に記載され、試験成績には、当該試験の実施過程において得られた生データが正確に反映されていることを確認した。

平成 20 年 11 月 11 日
財団法人 畜産生物科学安全研究所

信頼性保証責任者



目次

要約	1頁
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	3
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	6
(1) プレインキュベーション法(直接法)	6
(2) プレインキュベーション法(代謝活性化法)	7
11. 無菌試験	7
12. 試験の有効性	7
13. 結果の判定	8
結果	8
結論	9
文献	9

表：

表 1-1 S9 mix 非存在下における 2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ) ヘキサンの用量設定試験結果 [直接法]	10
表 1-2 S9 mix 存在下における 2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ) ヘキサンの用量設定試験結果 [代謝活性化法]	11

表 2-1	S9 mix 非存在下における 2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ) ヘキサンの復帰突然変異試験結果 [本試験 1 回目-直接法]	12
表 2-2	S9 mix 非存在下における 2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ) ヘキサン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 3-1	S9 mix 非存在下における 2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ) ヘキサンの復帰突然変異試験結果 [本試験 2 回目-直接法]	14
表 3-2	S9 mix 非存在下における 2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ) ヘキサン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	2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)ヘキサンの 復帰突然変異試験結果-本試験 1 回目	16
図 2	2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)ヘキサンの 復帰突然変異試験結果-本試験 2 回目	19
添付資料	復帰変異コロニー数 : 背景データ	22

要 約

2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)ヘキサン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、いずれの菌株とも生育阻害が認められなかったため、直接法および代謝活性化法ともに 156～5000 μ g/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なかった。菌の生育阻害についても、いずれの菌株とも認められなかった。

以上の成績から、本実験条件下では、2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)ヘキサン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。

目 的

この試験は、2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)ヘキサン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 : 2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)ヘキサン
別 名 : パーヘキサ 25B
CAS 番号 : 78-63-7
ロット番号 : 060516
純 度 : 99.2% [平成 18 年 5 月 15 日、日本油脂株式会社において分析 (GC 法)]

入 手 先 : XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

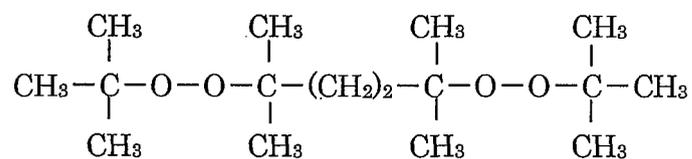
入 手 日 : 平成 18 年 5 月 18 日

入 手 量 : 50 g

物 性 等 :

化学名 2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)ヘキサン
(2,5-Dimethyl-2,5-di(t-butylperoxy)hexane)

構造式



分子式 C₁₆H₃₄O₄

分子量 290.45

性状 特異臭のある無色透明な液体

凝固点 3.9°C (純度 91.5%品)

比重 0.873 (25°C)

引火点 65°C (セタ密閉式)

発火点 443°C (ASTM E659)

蒸気圧(mmHg) 0.1(28°C), 0.4(50°C), 0.7(65°C), 760(250°C)

溶解性 水に不溶、ジオール類に不溶、アルコール、エーテル、エステル、
ケトン等に可溶

安定性 : 安定 [実験終了後、(財)畜産生物科学安全研究所において保管した
残余被験物質を日本油脂株式会社に委託して分析 (平成 19 年 3 月
15 日、GC 法) した結果、純度は 98.7%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 (2~6°C)、密栓

2. 指標菌株

指標菌株は、国立保健医療科学院 生活環境部 (元 : 国立公衆衛生院 地域環境衛
生学部) 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 TCQ7669、100%) 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 μ L をニュートリエントブロス (Bacto nutrient broth dehydrated、Difco Laboratories、ロット番号 149018) 液体培地 15mL 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 (OD_{660nm}) を測定し、濁度と生菌数の換算式により 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 ($\times 10^9$ /mL)

指標菌株	TA100	TA1535	WP2 _{uvrA}	TA98	TA1537
用量設定試験	1.46	1.62	1.17	1.33	1.14
本試験(1回目)	1.50	1.62	1.30	1.41	1.21
本試験(2回目)	1.38	1.53	1.25	1.33	1.21

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-550・2006 年 9 月 29 日製造・2007 年 1 月 10 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 あたりの組成は、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: 209~255 g

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) 投与方法 (投与開始日起算)
 - 1 日目: PB 30 mg/kg、2 日目: PB 60 mg/kg
 - 3 日目: PB 60 mg/kg + BF 80 mg/kg、4 日目: PB 60 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 (9000 \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

被験物質は水に不溶であり、予備的検討の結果、DMSO に不溶、アセトンに可溶であったため、溶媒にはアセトン（和光純薬工業株式会社、ロット番号 EWM6387、100%）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作製した。

7. 陰性対照および陽性対照

陰性対照（溶媒対照）には、被験物質用の溶媒であるアセトンを用いた。陽性対照としては、以下の既知変異原物質を用いた。

AF-2 および 2-AA は DMSO（和光純薬工業株式会社、ロット番号 EWP7032、100%）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 K6B76、局方）に溶解した。

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 KCM2259）

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）

8. アミノ酸添加軟寒天培地の調製

0.6w/v%粉末寒天 (Difco Laboratories、ロット番号 5200601) および 0.5w/v% 塩化ナトリウム (和光純薬工業株式会社、ロット番号 8251) 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 TCK7637) 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 EWP0420) 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、20~5000 μg /プレート の範囲で用量を設定し、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 (表 1-1、1-2)、直接法および代謝活性化法のいずれの場合も、全ての菌株で菌の生育阻害は認められなかった。なお、2000 および 5000 μg /プレートで、培養終了時のプレート上に被験物質と思われる油滴様物が認められた。

10. 本試験

本試験は、同一菌株、同一用量で 2 回行った。

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のいずれの場合も、5000 μg /プレートを最高用量とし、以下公比 2 で 2500、1250、625、313 および 156 μg /プレートの計 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)

滅菌小試験管に被験物質の供試液 0.05 mL、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 WAF3531、リン酸二水素ナトリウム・二水塩：ロット番号 CAJ2723) および前培養した懸濁菌液 0.1 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。最少グルコース寒天平板培地（プレート）（テスメディア AN 培地、オリエンタル酵母工業株式会社、ロット番号 ANIX40JV・2006年10月5日製造・2007年1月5日購入）は、Vogel-Bonner E 培地（0.2 w/v%クエン酸・一水塩、1w/v%リン酸二カリウム・無水塩、0.192 w/v%リン酸一アンモニウム、0.066 w/v%水酸化ナトリウム、0.02 w/v%硫酸マグネシウム・七水塩）に寒天粉末を 1.5 w/v%およびグルコースを 2 w/v%となるように加え、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 0.05 mLにかわり、溶媒（アセトン）0.05 mL 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）

滅菌小試験管に被験物質の供試液 0.05 mL、S9 mix 0.5 mL および前培養した懸濁菌液 0.1 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 0.05 mLにかわり、溶媒（アセトン）0.05 mL 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 0.6w/v%軟寒天培地 2 mL を加え、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 ANIX40JV）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、試験は有効であると判定した。

- (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、当研究所における陽性対照値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する。

結 果

試験を 2 回実施した結果（表 2-1、2-2、3-1、3-2 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 倍を超えることはなかった。菌の生育阻害については、直接法および代謝活性化法のいずれの場合にも認められなかった。なお、2500 および 5000 μg /プレートでは、培養終了時のプレート上に被験物質と思われる油滴様物が認められた。

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た。陽性対照群においては明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められ、その程度は、それぞれ背景データ（添付資料）の範囲内またはその近くの陽性値を示すものであった。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。

結 論

2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)ヘキサンについて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、全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2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)ヘキサンの遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)ヘキサンの変異原性については、*S. typhimurium* TA97, TA98, TA100 および TA1535 を用いた復帰突然変異試験で陰性と報告されている³⁾。

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. , Nicols, W. and Ramel, C. , Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, pp. 161-187.
- 3) Errol Zeiger, et. al. (1988). *Salmonella* mutation tests: IV. Results from the testing of 300 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 11, Supplement 12: 1-158.

表 1-1 S9 mix 非存在下における2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)ヘキサンの
 用量設定試験結果〔直接法〕

用 量 〔 μ g/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〔アセトン〕	110	13	16	31	13
20	97	13	13	26	19
50	115	22	17	33	11
100	109	14	18	23	17
200	125	10	17	29	16
500	109	16	20	30	13
1000	80	14	25	29	9
2000 #	103	16	15	15	16
5000 #	108	10	15	31	11
陽性対照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
μ g/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	901	416	528	426	674

: 培養終了時のプレート上に被験物質と思われる油滴様物が認められた。

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2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)ヘキサンの
用量設定試験結果〔代謝活性化法〕

用 量 〔 μ g/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〔アセトン〕	98	13	16	33	16
20	104	10	21	28	15
50	107	6	18	33	20
100	119	18	20	42	12
200	130	11	16	37	19
500	120	17	31	35	14
1000	89	19	17	28	20
2000 [#]	116	12	23	27	15
5000 [#]	111	18	23	24	11
陽性対照	2- AA	2- AA	2- AA	2- AA	2- AA
μ g/プレート	1	2	10	1	2
復帰変異コロニー数 /プレート	437	205	444	336	80

: 培養終了時のプレート上に被験物質と思われる油滴様物が認められた。
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2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)ヘキサンの復帰突然変異試験結果[本試験1回目-直接法]

用 量 [μ g/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 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
陰性対照	115	10	23	32	10
[アセトン]	106	12	26	27	11
	105	6	15	31	8
	(109 ± 6)	(9 ± 3)	(21 ± 6)	(30 ± 3)	(10 ± 2)
156	104	9	26	46	18
	93	10	22	27	8
	98	9	32	25	9
	(98 ± 6)	(9 ± 1)	(27 ± 5)	(33 ± 12)	(12 ± 6)
313	103	6	17	22	15
	106	14	26	24	13
	94	9	25	24	4
	(101 ± 6)	(10 ± 4)	(23 ± 5)	(23 ± 1)	(11 ± 6)
625	101	4	22	41	16
	103	8	28	35	11
	99	10	18	37	9
	(101 ± 2)	(7 ± 3)	(23 ± 5)	(38 ± 3)	(12 ± 4)
1250	83	4	19	31	9
	100	15	22	37	11
	109	4	27	37	6
	(97 ± 13)	(8 ± 6)	(23 ± 4)	(35 ± 3)	(9 ± 3)
2500 #	88	10	29	26	10
	96	10	25	31	10
	93	10	19	36	10
	(92 ± 4)	(10 ± 0)	(24 ± 5)	(31 ± 5)	(10 ± 0)
5000 #	92	6	32	25	8
	111	6	33	37	10
	124	7	23	30	12
	(109 ± 16)	(6 ± 1)	(29 ± 6)	(31 ± 6)	(10 ± 2)
陽性対照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
μ g/プレート	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復帰変異	558	603	780	356	573
コロニー数	558	547	867	296	443
/プレート	631	509	862	317	529
	(582 ± 42)	(553 ± 47)	(836 ± 49)	(323 ± 30)	(515 ± 66)

: 培養終了時のプレート上に被験物質と思われる油滴様物が認められた。

(): 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2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)ヘキサンの
 復帰突然変異試験結果〔本試験1回目-代謝活性化法〕

用 量 〔 μ g/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 〔アセトン〕	110 92 98 (100 ± 9)	5 9 7 (7 ± 2)	19 22 28 (23 ± 5)	53 40 39 (44 ± 8)	16 17 10 (14 ± 4)
156	114 98 125 (112 ± 14)	6 10 3 (6 ± 4)	21 24 27 (24 ± 3)	40 44 49 (44 ± 5)	12 9 13 (11 ± 2)
313	106 113 93 (104 ± 10)	9 9 7 (8 ± 1)	28 37 21 (29 ± 8)	38 29 40 (36 ± 6)	13 15 12 (13 ± 2)
625	110 104 87 (100 ± 12)	6 9 8 (8 ± 2)	26 24 34 (28 ± 5)	27 33 26 (29 ± 4)	12 11 12 (12 ± 1)
1250	86 102 88 (92 ± 9)	8 8 5 (7 ± 2)	23 28 37 (29 ± 7)	30 33 31 (31 ± 2)	14 10 10 (11 ± 2)
2500 #	98 76 104 (93 ± 15)	5 5 8 (6 ± 2)	24 24 37 (28 ± 8)	33 32 32 (32 ± 1)	14 8 7 (10 ± 4)
5000 #	99 88 102 (96 ± 7)	8 7 6 (7 ± 1)	20 26 15 (20 ± 6)	38 40 41 (40 ± 2)	7 8 15 (10 ± 4)
陽性対照 μ g/プレート	2-AA 1	2-AA 2	2-AA 10	2-AA 1	2-AA 2
復帰変異 コロニー数 /プレート	382 348 320 (350 ± 31)	179 178 192 (183 ± 8)	391 428 496 (438 ± 53)	215 196 204 (205 ± 10)	95 78 72 (82 ± 12)

: 培養終了時のプレート上に被験物質と思われる油滴様物が認められた。

(): 平均値±標準偏差

2-AA: 2-アミノアントラセン

表 3-1 S9 mix 非存在下における2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)ヘキサンの復帰突然変異試験結果[本試験2回目-直接法]

用 量 [μ g/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	122	9	18	18	13
[アセトン]	121	6	12	30	9
	137	12	26	29	14
	(127 \pm 9)	(9 \pm 3)	(19 \pm 7)	(26 \pm 7)	(12 \pm 3)
156	120	8	24	27	18
	132	7	27	17	19
	121	11	26	36	10
	(124 \pm 7)	(9 \pm 2)	(26 \pm 2)	(27 \pm 10)	(16 \pm 5)
313	126	10	16	33	20
	118	11	18	34	13
	123	10	27	17	20
	(122 \pm 4)	(10 \pm 1)	(20 \pm 6)	(28 \pm 10)	(18 \pm 4)
625	107	9	32	18	16
	125	4	22	21	18
	136	4	25	22	15
	(123 \pm 15)	(6 \pm 3)	(26 \pm 5)	(20 \pm 2)	(16 \pm 2)
1250	118	8	16	17	18
	130	10	16	17	7
	107	6	23	14	21
	(118 \pm 12)	(8 \pm 2)	(18 \pm 4)	(16 \pm 2)	(15 \pm 7)
2500 #	109	6	15	17	17
	121	7	28	18	23
	122	10	14	20	14
	(117 \pm 7)	(8 \pm 2)	(19 \pm 8)	(18 \pm 2)	(18 \pm 5)
5000 #	111	6	26	22	10
	132	7	14	21	18
	133	10	21	13	9
	(125 \pm 12)	(8 \pm 2)	(20 \pm 6)	(19 \pm 5)	(12 \pm 5)
陽性対照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
μ g/プレート	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復帰変異	570	533	781	353	465
コロニー数	553	491	822	366	592
/プレート	539	467	712	368	629
	(554 \pm 16)	(497 \pm 33)	(772 \pm 56)	(362 \pm 8)	(562 \pm 86)

: 培養終了時のプレート上に被験物質と思われる油滴様物が認められた。

(): 平均値 \pm 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 3-2 S9 mix 存在下における2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)ヘキサン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 〔 μ g/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	117	8	24	31	20
[アセトン]	126	6	33	32	13
	113	8	25	36	20
	(119 \pm 7)	(7 \pm 1)	(27 \pm 5)	(33 \pm 3)	(18 \pm 4)
156	123	13	13	32	21
	123	7	26	22	19
	125	8	20	21	17
	(124 \pm 1)	(9 \pm 3)	(20 \pm 7)	(25 \pm 6)	(19 \pm 2)
313	132	7	24	28	25
	112	3	26	19	22
	112	9	22	24	21
	(119 \pm 12)	(6 \pm 3)	(24 \pm 2)	(24 \pm 5)	(23 \pm 2)
625	128	9	27	33	18
	125	7	19	35	23
	111	4	25	20	17
	(121 \pm 9)	(7 \pm 3)	(24 \pm 4)	(29 \pm 8)	(19 \pm 3)
1250	101	7	21	23	23
	114	14	22	32	17
	126	2	19	25	18
	(114 \pm 13)	(8 \pm 6)	(21 \pm 2)	(27 \pm 5)	(19 \pm 3)
2500 #	132	5	20	27	26
	134	3	17	23	20
	115	10	19	31	19
	(127 \pm 10)	(6 \pm 4)	(19 \pm 2)	(27 \pm 4)	(22 \pm 4)
5000 #	116	9	33	29	20
	117	7	23	24	16
	127	3	24	20	25
	(120 \pm 6)	(6 \pm 3)	(27 \pm 6)	(24 \pm 5)	(20 \pm 5)
陽性対照	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
μ g/プレート	1	2	10	1	2
復帰変異	393	172	447	215	88
コロニー数	387	176	421	244	96
/プレート	370	162	415	255	95
	(383 \pm 12)	(170 \pm 7)	(428 \pm 17)	(238 \pm 21)	(93 \pm 4)

: 培養終了時のプレート上に被験物質と思われる油滴様物が認められた。

(): 平均値 \pm 標準偏差

2-AA: 2-アミノアントラセン

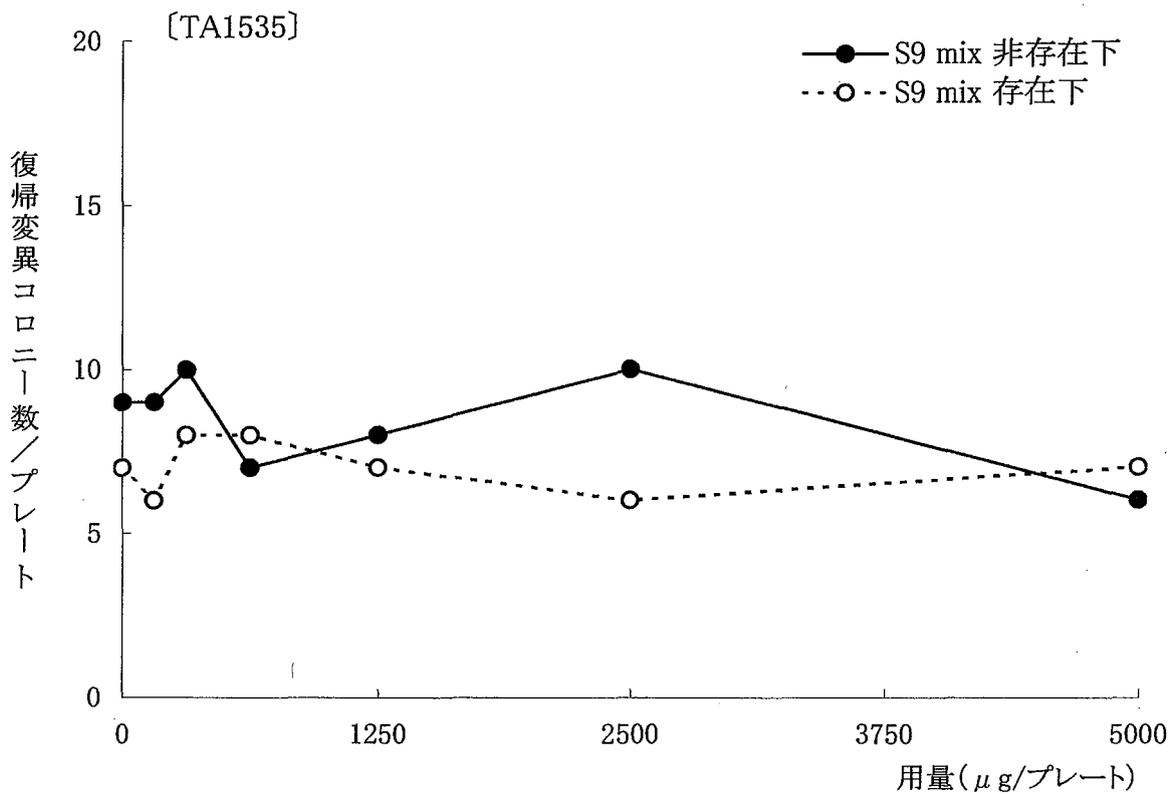
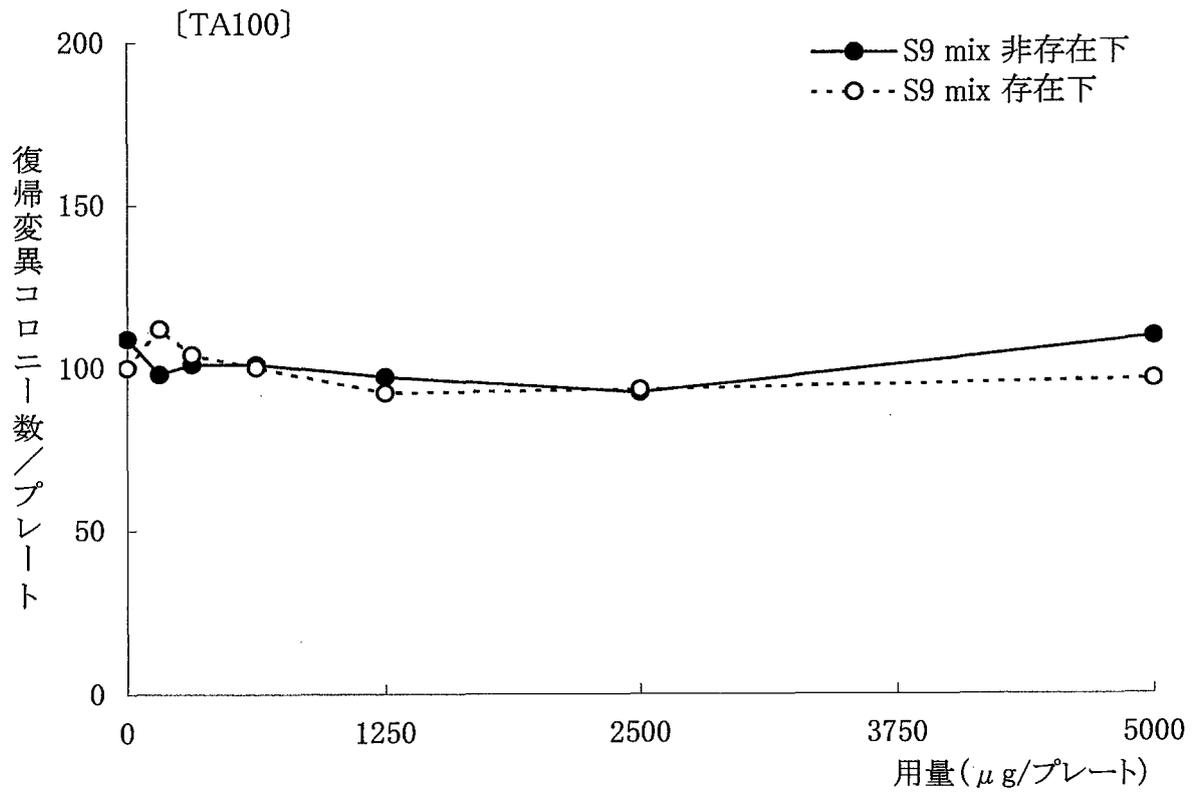


図 1-1 2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)ヘキサンの復帰突然変異試験結果一本試験1回目

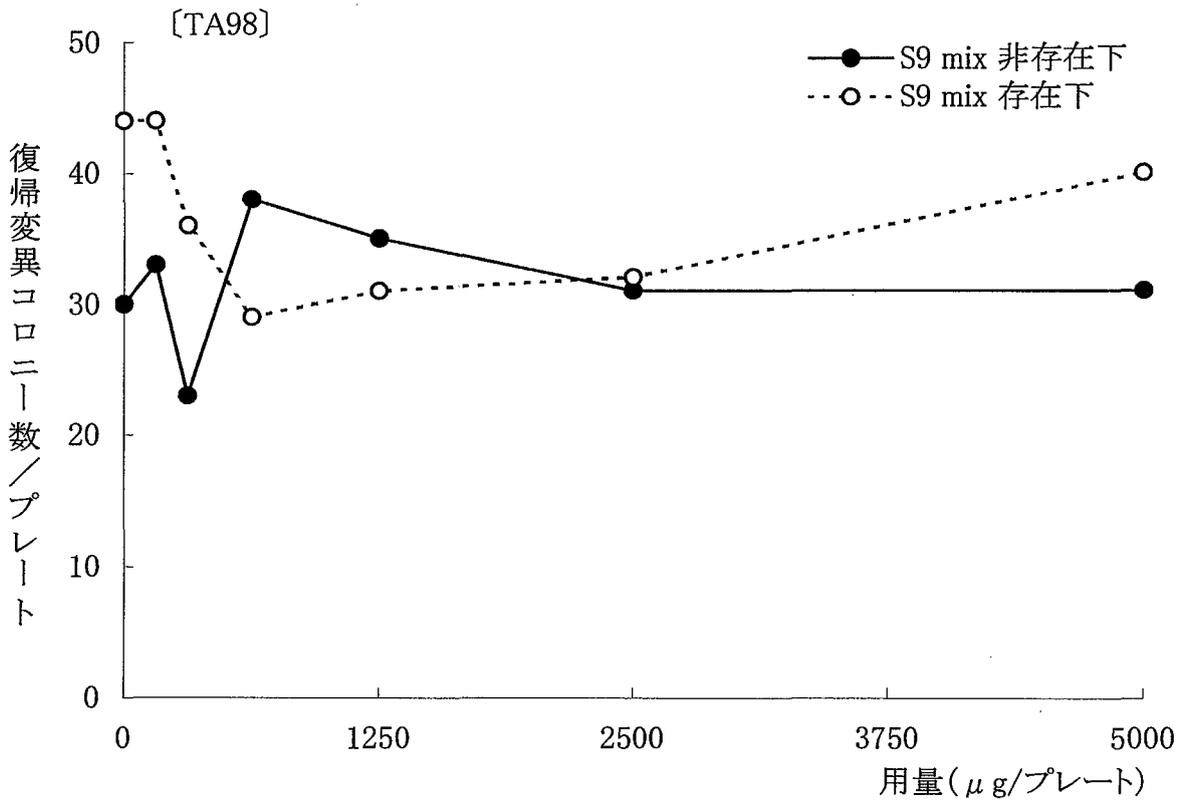
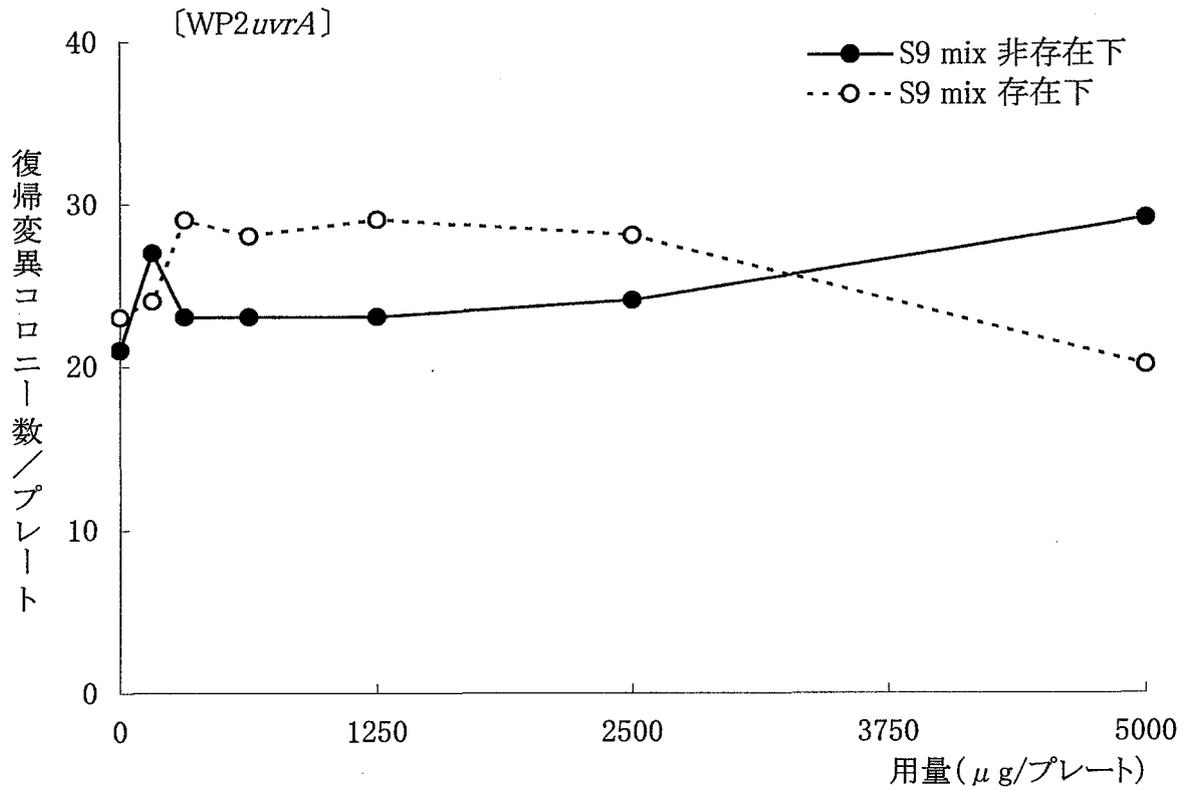


図 1-2 2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)ヘキサンの復帰突然変異試験結果一本試験1回目

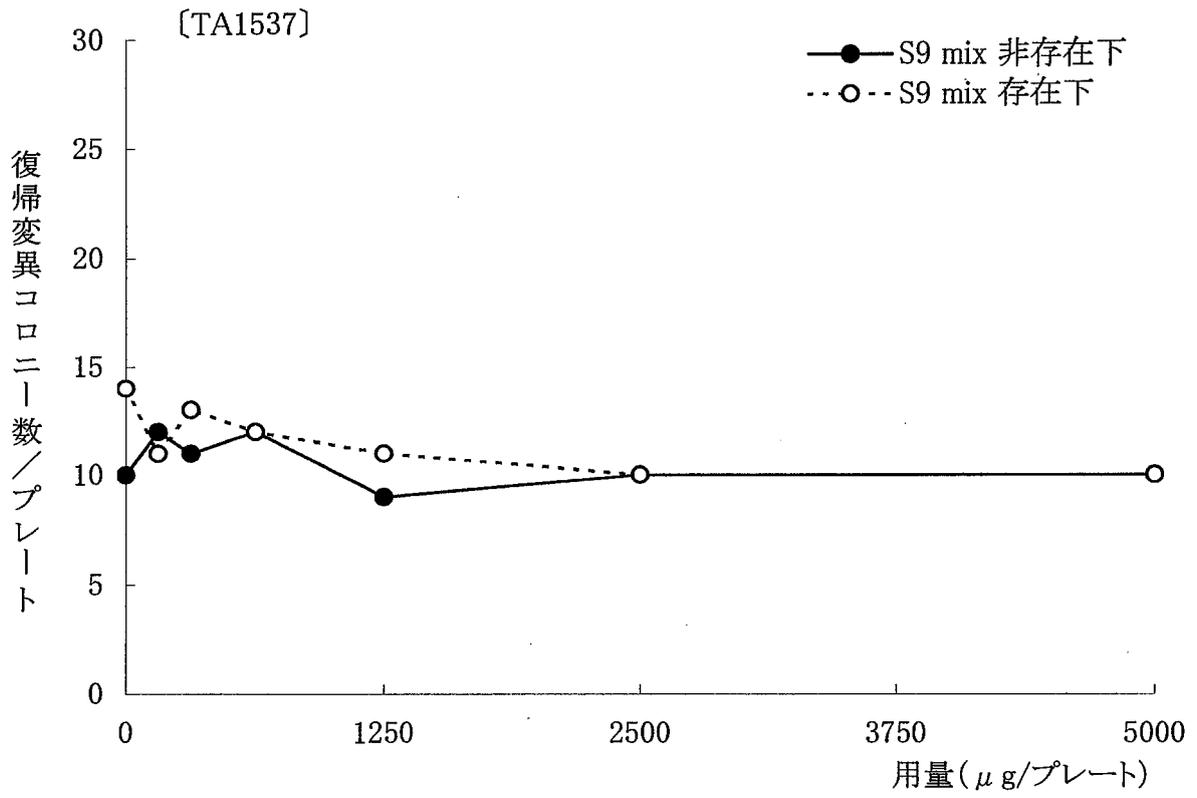


図 1-3 2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)ヘキサンの復帰突然変異試験結果一本試験1回目

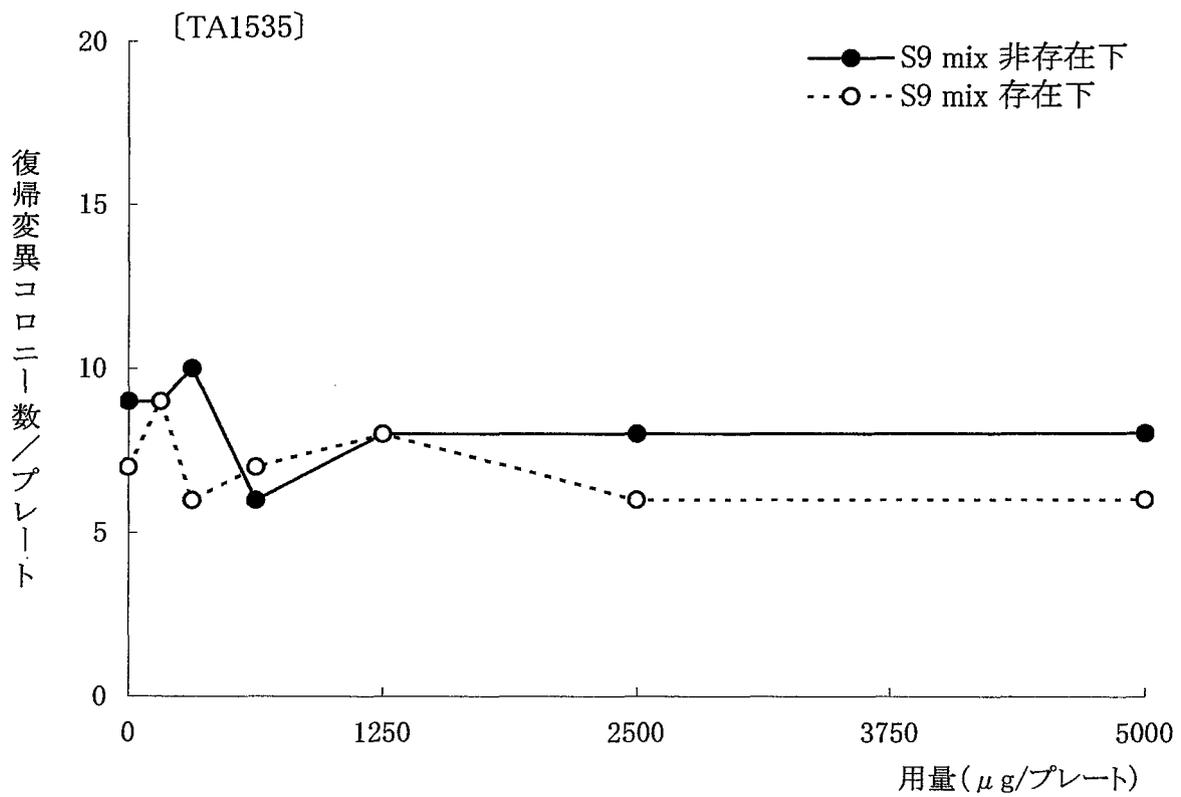
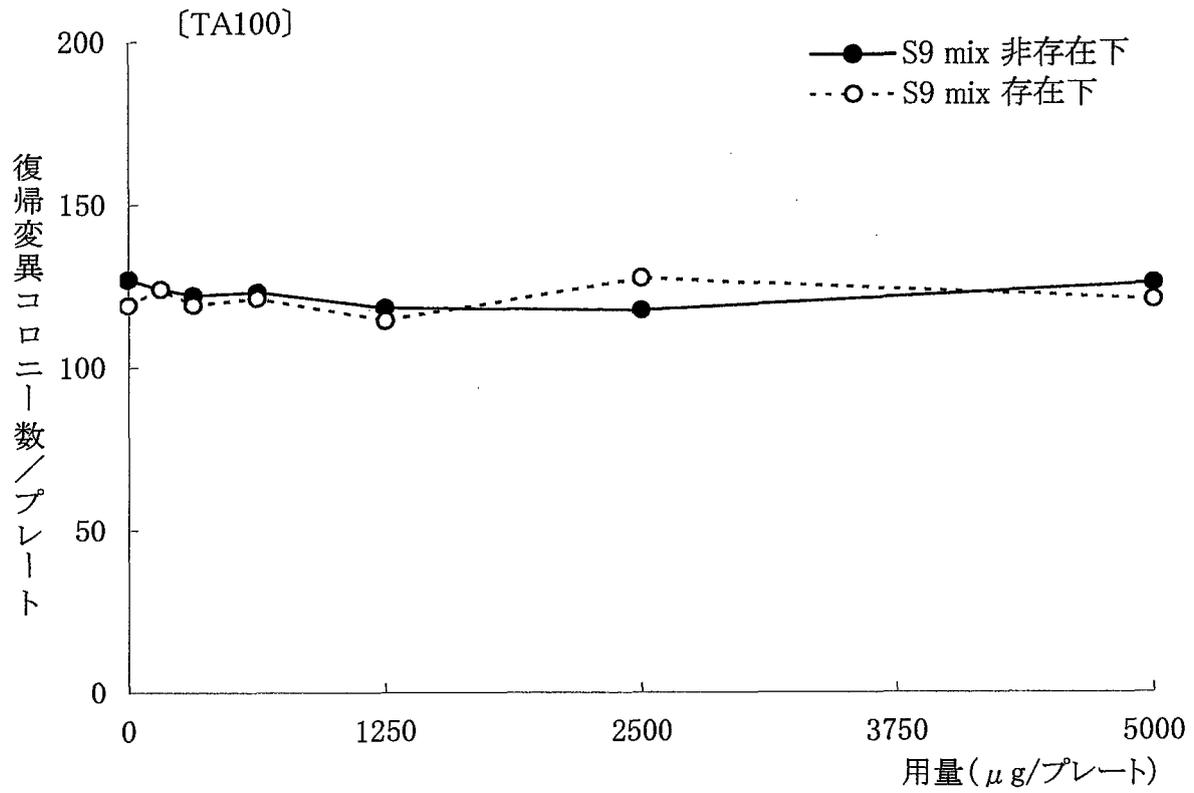


図 2-1 2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)ヘキサンの復帰突然変異試験結果一本試験2回目

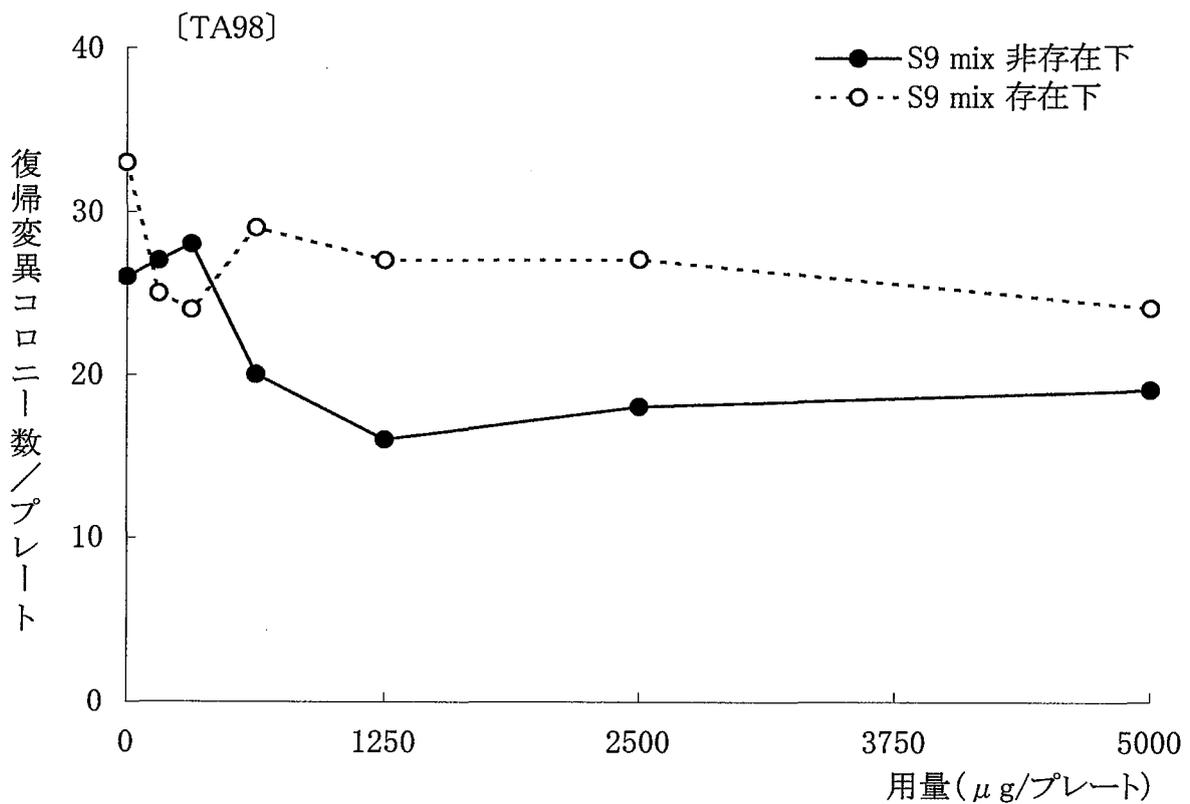
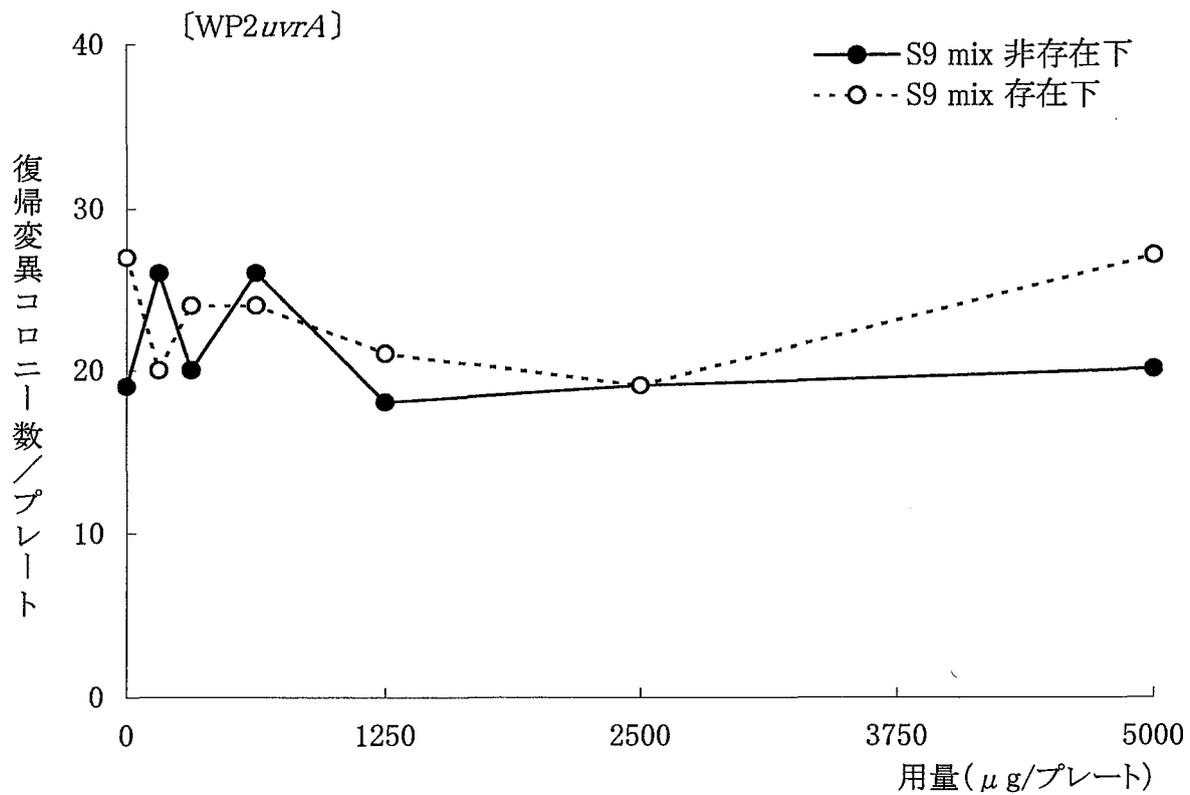


図 2-2 2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)ヘキサンの復帰突然変異試験結果一本試験2回目

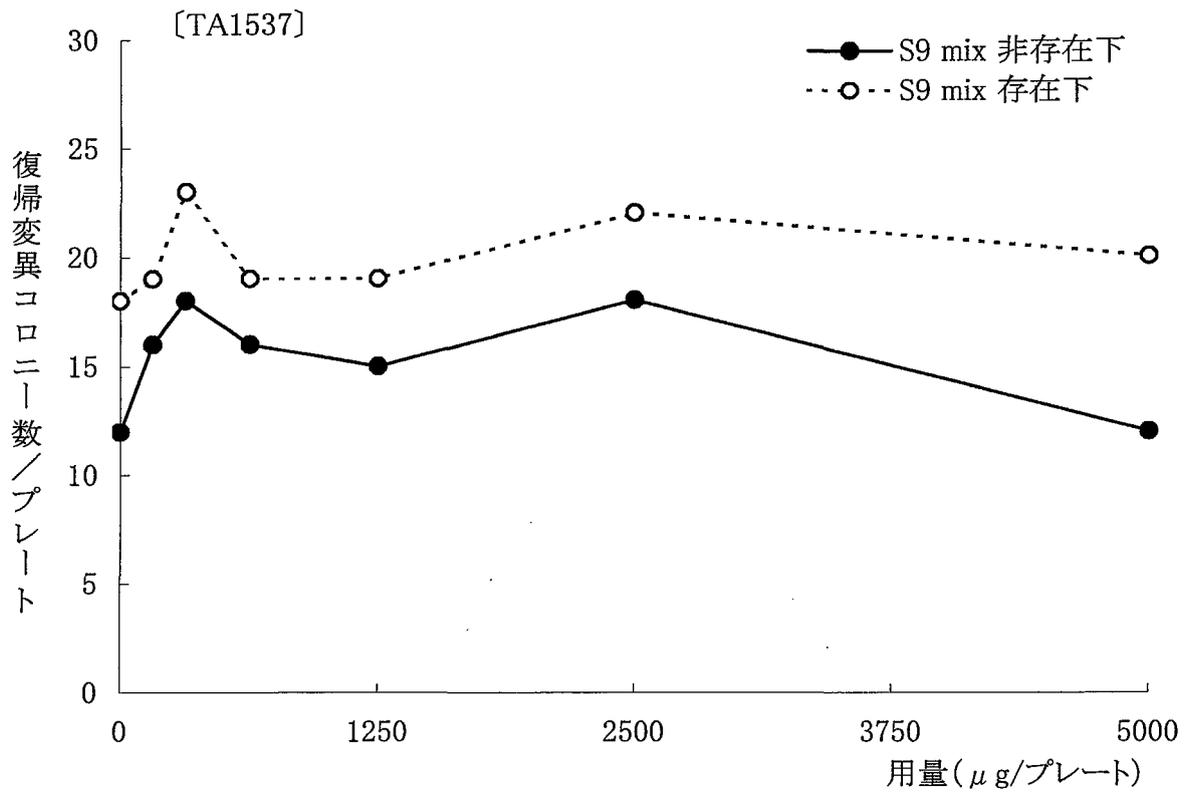


図 2-3 2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)ヘキサンの復帰突然変異試験結果—本試験2回目

添付資料

復帰変異コロニー数：背景データ

自然復帰変異値（復帰変異コロニー数／プレート）						
指標菌株		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
直接法	n	316	289	311	320	298
	平均	120	11	17	24	8
	標準偏差	18	4	4	7	3
	最大値(+2S. D.)	156	19	25	38	14
	最小値(-2S. D.)	84	3	9	10	2
代謝活性化法	n	326	294	306	302	294
	平均	117	10	21	34	13
	標準偏差	17	3	5	7	4
	最大値(+2S. D.)	151	16	31	48	21
	最小値(-2S. D.)	83	4	11	20	5
陽性対照値（復帰変異コロニー数／プレート）						
指標菌株		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
陽性対照物質		AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
用量（ μ g/プレート）		0.01	0.5	0.04	0.1	80
直接法	n	236	234	238	238	234
	平均	766	362	792	396	563
	標準偏差	180	75	175	70	223
	最大値(+2S. D.)	1126	512	1142	536	1009
	最小値(-2S. D.)	406	212	442	256	117
陽性対照物質		2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
用量（ μ g/プレート）		1	2	10	1	2
代謝活性化法	n	248	234	240	229	233
	平均	496	159	844	312	101
	標準偏差	125	47	223	87	37
	最大値(+2S. D.)	746	253	1290	486	175
	最小値(-2S. D.)	246	65	398	138	27

AF-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

2-AA : 2-アミノアントラセン

S. D. : 標準偏差