最終報告書

水加ヒドラジンの細菌を用いる復帰突然変異試験

（試験番号：B010037）

2002 年 2 月 28 日

株式会社三菱化学安全科学研究所

目次

要約 ………………………………………………………… 4
材料および方法 ………………………………………………… 5
1. 試験物質 ………………………………………………… 5
2. テスト菌株 ………………………………………………… 6
3. 培地 ………………………………………………… 7
4. S9 mix ………………………………………………… 8
5. 試験方法 ………………………………………………… 8
結果 ………………………………………………………… 11
考察および結論 ………………………………………………… 12
参考文献 ………………………………………………………… 13

表 1　試験結果表（予備試験） ………………………………… 15
表 2－1　試験結果表（本試験 1） ………………………………… 16
表 2－2　試験結果表（本試験 1） ………………………………… 17
表 3－1　試験結果表（本試験 2） ………………………………… 18
表 3－2　試験結果表（本試験 2） ………………………………… 19
表 4　比活性 ………………………………………………… 20
図 1－1　用量―反応曲線（本試験 1；S9 mix 非存在下の TA100） ………… 21
図 1－2　用量―反応曲線（本試験 1；S9 mix 存在下の TA100） ………… 21
図 2－1　用量―反応曲線（本試験 1；S9 mix 非存在下の TA1535） ………… 22
図 2－2　用量―反応曲線（本試験 1；S9 mix 存在下の TA1535） ………… 22
図 3－1　用量―反応曲線（本試験 1；S9 mix 非存在下の WP2*uvrA*/pKM101） ………… 23
図 3－2　用量―反応曲線（本試験 1；S9 mix 存在下の WP2*uvrA*/pKM101） ………… 23
図 4－1　用量―反応曲線（本試験 1；S9 mix 非存在下の TA98） ………… 24
図 4－2　用量―反応曲線（本試験 1；S9 mix 存在下の TA98） ………… 24

図 5－1　用量―反応曲線（本試験 1；S9 mix 非存在下の TA1537）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 25
図 5－2　用量―反応曲線（本試験 1；S9 mix 存在下の TA1537）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 25
図 6－1　用量―反応曲線（本試験 2；S9 mix 非存在下の TA100）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 26
図 6－2　用量―反応曲線（本試験 2；S9 mix 存在下の TA100）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 26
図 7－1　用量―反応曲線（本試験 2；S9 mix 非存在下の TA1535）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 27
図 7－2　用量―反応曲線（本試験 2；S9 mix 存在下の TA1535）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 27
図 8－1　用量―反応曲線（本試験 2；S9 mix 非存在下の WP2*uvrA*/pKM101）・・・・・・・・・・ 28
図 8－2　用量―反応曲線（本試験 2；S9 mix 存在下の WP2*uvrA*/pKM101）・・・・・・・・・・・・ 28
図 9－1　用量―反応曲線（本試験 2；S9 mix 非存在下の TA98）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 29
図 9－2　用量―反応曲線（本試験 2；S9 mix 存在下の TA98）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 29
図 10－1 用量―反応曲線（本試験 2；S9 mix 非存在下の TA1537）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 30
図 10－2 用量―反応曲線（本試験 2；S9 mix 存在下の TA1537）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 30

要約

Salmonella typhimurium TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2*uvrA*/pKM101 の 5 菌株を用いる復帰突然変異試験で水加ヒドラジンの変異原性を調べた.

予備試験を 5000, 1250, 313, 78.1, 19.5, 4.88 および 1.22 μg/プレートで実施した結果, S9 mix 非存在下の TA100, TA1535, WP2*uvrA*/pKM101, TA98 および存在下の TA100, TA1535, WP2*uvrA*/pKM101 で, 復帰変異コロニー数の増加が認められた. また, S9 mix 非存在下では TA100, TA1535, TA98, TA1537 については 313 μg/プレート以上, WP2*uvrA*/pKM101 については 1250 μg/プレート以上で, 存在下ではすべての菌株の 5000 μg/プレートでそれぞれ菌の生育阻害が認められた. なお, S9 mix の有無にかかわらず, プレート上に沈殿物は認められなかった.

これらの結果をもとに本試験では, S9 mix 非存在下の TA100 については 625, 313, 156, 78.1, 39.1, 19.5 および 9.77 μg/プレートの 7 用量, TA1535, WP2*uvrA*/pKM101 については 156, 78.1, 39.1, 19.5, 9.77 および 4.88 μg/プレートの 6 用量, TA98, TA1537 については 313, 156, 78.1, 39.1, 19.5 および 9.77 μg/プレートの 6 用量を, 存在下の TA100 については 1250, 625, 313, 156, 78.1 および 39.1 μg/プレートの 6 用量, TA1535 については 156, 78.1, 39.1, 19.5, 9.77 および 4.88 μg/プレートの 6 用量, WP2*uvrA*/pKM101 については 78.1, 39.1, 19.5, 9.77, 4.88, 2.44 および 1.22 μg/プレートの 7 用量, TA98, TA1537 については 5000, 2500, 1250, 625, 313 および 156 μg/プレートの 6 用量をそれぞれ設定した.

2 回の本試験の結果, いずれの試験においても S9 mix 非存在下の TA100, TA1535, WP2*uvrA*/pKM101, TA1537 および存在下の TA100, TA1535, WP2*uvrA*/pKM101 で, 陰性（溶媒）対照値の 2 倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加が認められた. S9 mix 非存在下の TA98 および存在下の TA98, TA1537 では, 復帰変異コロニー数は陰性（溶媒）対照値の 2 倍以下であった. また, S9 mix 非存在下の TA100, TA1535, TA98, TA1537 および存在下の TA98, TA1537 で菌の生育阻害が認められた. なお, S9 mix の有無にかかわらず, プレート上に沈殿物は認められなかった.

以上の結果から, 水加ヒドラジンは細菌を用いる復帰突然変異試験において変異原性を有する（陽性）と判定した.

材料および方法

1. 試験物質

1.1 被験物質

から2001年2月19日に提供された水加ヒドラジンを室温，気密で保存した．被験物質の純度，組成および物理化学的性質等は以下の通りである．

新規化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	Hydrazine, monohydrate		
別　　名	水加ヒドラジン		
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合は，その製法の概要)	$H_2N\text{-}NH_2 \cdot H_2O$		
試験に供した新規化学物質の純度	100.15%	試験に供した新規化学物質の Lot No.	
不純物の名称及び濃度	不揮発分：1 ppm 塩化物(Cl)，硫酸塩(SO_4)，鉄(Fe)，重金属(as Pb)：1 ppm 以下		
CAS 番号	7803-57-8	蒸　気　圧	—
分　子　量	50.06	分配係数	—
融　　点	-51.7℃	常温における性状	無色澄明液体
沸　　点	121℃		
安　定　性	通常の取扱い条件では安定である．酸化剤と重金属およびその酸化物との接触や混合は絶対に避ける．酸化物とは急激に反応する．重金属およびその酸化物，あるいは高温において水加ヒドラジンは分解し，水素，窒素及びアンモニアを生じる．		
溶媒に対する溶解度等	溶　媒	溶　解　度	溶媒中の安定性
	水	*1　50 mg/mL で溶解	*2
	DMSO	—	—
	ｱｾﾄﾝ	—	—
	その他	—	—

DMSO：ｼﾞﾒﾁﾙｽﾙﾎｷｼﾄﾞ

*1：当研究所での溶媒検討の結果による．

*2：被験物質溶液調製時に，発熱，発泡，変色は認められなかった．

1.2 対照物質

陰性対照物質および陽性対照物質として，以下のものを用いた．

陰性対照	略称	入　手　先	ロット番号	純度（%）
注射用水	DW	㈱大塚製薬工場	K9J78	－
陽性対照	略称	入　手　先	ロット番号	純度（%）
2-(2-ﾌﾘﾙ)-3-(5-ﾆﾄﾛ-2-ﾌﾘﾙ)ｱｸﾘﾙｱﾐﾄﾞ	AF-2	和光純薬工業㈱	CAP0185	98.9
ｱｼﾞ化ﾅﾄﾘｳﾑ	NaN_3	和光純薬工業㈱	KWE6685	96.5
N-ｴﾁﾙ-*N'*-ﾆﾄﾛ-*N*-ﾆﾄﾛｿｸﾞｱﾆｼﾞﾝ	ENNG	Sigma Chemical Company	56F-3651	99.0
9-ｱﾐﾉｱｸﾘｼﾞﾝ塩酸塩	9-AA	Sigma Chemical Company	80F-0186	99
2-ｱﾐﾉｱﾝﾄﾗｾﾝ	2-AA	和光純薬工業㈱	TWH2355	98.0

2.　テスト菌株

2.1 テスト菌株

カリフォルニア大学　　より 1983 年 5 月 27 日に入手した *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および日本バイオアッセイ研究センターより 1997 年 9 月 18 日に入手した *Escherichia coli* WP2*uvrA*/pKM101 の 5 菌株を用いた．

2.2 テスト菌株の選択理由

これらの菌株は，細菌を用いる復帰突然変異試験において広く使用され，化審法ガイドラインおよび OECD ガイドラインにおいても推奨されている．

これら菌株の遺伝的特性は以下の通りである．

菌　株	変異遺伝子	付帯突然変異			検出可能な突然変異型
		DNA 修復	膜変異	R 因子	
TA100	*hisG*	*uvrB*	*rfa*	pKM101	塩基対置換
TA1535	*hisG*	*uvrB*	*rfa*	－	塩基対置換
WP2*uvrA*/pKM101	*trpE*	*uvrA*	＋	pKM101	塩基対置換
TA98	*hisD*	*uvrB*	*rfa*	pKM101	フレームシフト
TA1537	*hisC*	*uvrB*	*rfa*	－	フレームシフト

2.3 特性検査

各テスト菌株のアミノ酸要求性，紫外線感受性，膜変異，薬剤耐性などの遺伝的特徴を事前に調べ，これらの特性を備えた菌株を用いた．

2.4 保存方法

液体完全培地中に 37°C で 8 時間振盪培養した各菌懸濁液 24 mL に，2.1 mL の DMSO（関東化学㈱，ﾛｯﾄ番号 104G1307）を加え，これを 200 μL ずつ小分けしてドライアイス・アセトン中で急速凍結した．凍結した菌懸濁液は超低温冷凍庫で-80°C 以下に保存した．

2.5 菌懸濁液

各試験菌の凍結保存液（20 μL）を液体完全培地 10 mL に接種し，37°C で 8 時間振盪（振盪回数：90 回/分）培養した．培養容器には L 字管を用いた．培養終了後，濁度計を用いて菌懸濁液の濁度を測定した．濁度からの換算により菌数を算出し，適切な菌濃度であることを確認した後，試験に使用した．

試験に使用した各テスト菌株の生菌数は以下の通りである．

菌株名		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2*uvrA*/pKM101	TA98	TA1537
生菌数（$\times 10^9$/mL）	予備試験	2.62	2.70	4.01	2.13	2.41
	本試験 1	2.49	2.45	3.69	2.08	1.84
	本試験 2	2.54	2.51	3.57	2.16	2.11

3. 培地

3.1 液体完全培地

精製水 100 mL に対して，ニュートリエントブロス（Oxoid Nutrient Broth No.2 ; Unipath 社，ロット番号 028 59365）を 2.5 g の割合で加えて溶解し，オートクレーブ滅菌（121°C，15 分間）した．

3.2 最少グルコース寒天平板培地

クリメディア AM-N 培地（オリエンタル酵母工業㈱，ロット番号 ANI310EQ：2001 年 5 月 17 日製造）を使用した．

3.3 トップアガー

精製水 300 mL に Bacto-agar（Difco 社，ロット番号 136958JC）1.8 g および塩化ナトリウム 1.5 g を加え，これを 121℃で 15 分間オートクレーブ滅菌し，寒天溶液を調製した．寒天はあらかじめ調製したものを，使用時に電子レンジで溶解して使用した．サルモネラ菌用には 0.5 mmol/L D-ビオチンおよび 0.5 mmol/L L-ヒスチジンの混合水溶液，あるいは大腸菌用には 0.5 mmol/L L-トリプトファン水溶液をそれぞれ使用直前に 1/10 量添加した．使用時に約 45℃に保温した．

4. S9 mix

4.1 S9

フェノバルビタール（1 日目 30 mg/kg を 1 回腹腔内投与，2 日目以降 60 mg/kg を 1 日 1 回 3 日間腹腔内投与）と 5, 6-ベンゾフラボン（3 日目に 80 mg/kg を 1 回腹腔内投与）で酵素誘導した SD 系雄ラット（体重 195 - 239 g）肝由来 S9（キッコーマン㈱，2001 年 4 月 5 日製造；ロット番号 RAA-443）を購入し，使用した．S9 は使用時まで超低温冷凍庫（実測値-81℃～-88℃）で保存した．

4.2 S9 mix

S9 mix 1 mL あたりの組成を以下の表に示す．S9 mix は試験毎に用時調製し，使用時まで氷中に保存した．

S9	0.1 mL
塩化マグネシウム六水和物	8 μmol
塩化カリウム	33 μmol
D-グルコース 6-リン酸	5 μmol
β-NADPH	4 μmol
β-NADH	4 μmol
ナトリウム-リン酸緩衝液（pH 7.4）	100 μmol

5. 試験方法

5.1 被験物質溶液および陽性対照物質溶液の調製

溶媒検討の結果，被験物質は 50 mg/mL で注射用水（DW と略す）溶解した．また，DW を加えた際に発熱，発泡，変色は認められなかった．この結果から，溶媒には DW を用いた．

被験物質を所定濃度でDWに溶解して，最高用量の被験物質溶液とした．これを同じ溶媒で段階希釈して各用量の被験物質溶液を調製した．被験物質溶液は用時調製し，被験物質の秤量，希釈，分注および調製後の保存は，黄色灯下で行った．

陽性対照物質溶液はあらかじめ調製し，超低温冷凍庫で-80°C以下に保存した．NaN_3はDW（㈱大塚製薬工場，ロット番号K9J78）に，その他の陽性対照物質はDMSO（関東化学㈱，ロット番号207G1673）に溶解した．

5.2 被験物質用量

予備試験を5000, 1250, 313, 78.1, 19.5, 4.88および1.22 μg/プレートで実施した結果，S9 mix非存在下のTA100, TA1535, WP2*uvrA*/pKM101, TA98および存在下のTA100, TA1535, WP2*uvrA*/pKM101で，復帰変異コロニー数の増加が認められた．また，S9 mix非存在下ではTA100, TA1535, TA98, TA1537については313 μg/プレート以上，WP2*uvrA*/pKM101については1250 μg/プレート以上で，存在下ではすべての菌株の5000 μg/プレートでそれぞれ菌の生育阻害が認められた．なお，S9 mixの有無にかかわらず，プレート上に沈殿物は認められなかった．

これらの結果をもとに本試験では以下の用量を設定した．

<table>
<tr><th rowspan="2">試験菌株</th><th colspan="2">用量 （μg/プレート）</th></tr>
<tr><th>S9 mix 非存在下</th><th>S9 mix 存在下</th></tr>
<tr><td>TA100</td><td>625, 313, 156, 78.1, 39.1, 19.5, 9.77</td><td>1250, 625, 313, 156, 78.1, 39.1</td></tr>
<tr><td>TA1535</td><td rowspan="2">156, 78.1, 39.1, 19.5, 9.77, 4.88</td><td>156, 78.1, 39.1, 19.5, 9.77, 4.88</td></tr>
<tr><td>WP2uvrA/pKM101</td><td>78.1, 39.1, 19.5, 9.77, 4.88, 2.44, 1.22</td></tr>
<tr><td>TA98, TA1537</td><td>313, 156, 78.1, 39.1, 19.5, 9.77</td><td>5000, 2500, 1250, 625, 313, 156</td></tr>
</table>

5.3 復帰突然変異試験

試験はプレインキュベーション法を用いて，S9 mix非存在下および存在下で実施した．

滅菌した試験管に被験物質溶液または陰性（溶媒）対照物質0.1 mL，S9 mix非存在下の場合，次いで0.1 mol/Lナトリウムーリン酸緩衝液（pH 7.4）を0.5 mL，S9 mix存在下の場合，S9 mixを0.5 mL添加し，さらに菌懸濁液を0.1 mL加え，37°Cで20分間振盪してインキュベーションした（プレインキュベーション）．トップアガー2 mLをこの混合液に加え，最少グルコース寒天平板培地上に重層した．重層したトップアガーが凝

固した後，37°C で 48 時間以上培養した．

実体顕微鏡を用いて菌叢の生育状態を観察し，被験物質による菌の生育阻害の程度を調べた後，目視により被験物質の沈殿の有無を確認した．プレート上の復帰変異コロニー数を自動コロニーカウンターで計測した．

予備試験は各用量につき 1 枚のプレートを使用した．本試験は各用量につき 3 枚のプレートを使用し，2 回実施した．

以下の陽性対照物質についても同様に実施した．

菌　株	S9 mix 非存在下 (μg/プレート)		S9 mix 存在下 (μg/プレート)		添 加 量 (mL/プレート)
TA100	AF-2	0.01	2-AA	1	0.1
TA1535	NaN_3	0.5	2-AA	2	0.1
WP2*uvrA*/pKM101	ENNG	2	2-AA	2	0.1
TA98	AF-2	0.1	2-AA	0.5	0.1
TA1537	9-AA	80	2-AA	2	0.1

5.4 無菌試験

無菌試験にはそれぞれ 1 枚のプレートを用いた．最高用量の被験物質溶液または S9 mix をトップアガー2 mL と混和し，それぞれ最少グルコース寒天平板培地上に重層した．重層したトップアガーが凝固した後，37℃で 48 時間培養し，雑菌の混入がないことを確認した．

5.5 試験結果の判定

いずれかの試験菌株で，S9 mix の有無にかかわらず，被験物質用量の増加にともなって復帰変異コロニー数（平均値）が陰性（溶媒）対照値の 2 倍以上に増加し，さらにその増加に再現性が認められる場合に，当該被験物質は変異原性を有する（陽性）と判定した．その他の場合は陰性と判定した．以上の判定基準により，被験物質が陽性と判断された場合は，比活性（被験物質 1 mg あたりの誘発復帰変異コロニー数）を算出した．試験結果の判定に統計学的手法は用いなかった．

結果

試験の結果を表 1～4 および図 1～10 に示す.

予備試験を 5000, 1250, 313, 78.1, 19.5, 4.88 および 1.22 μg/プレートで実施した結果, S9 mix 非存在下の TA100, TA1535, WP2*uvrA*/pKM101, TA98 および存在下の TA100, TA1535, WP2*uvrA*/pKM101 で, 復帰変異コロニー数の増加が認められた. また, S9 mix 非存在下では TA100, TA1535, TA98, TA1537 については 313 μg/プレート以上, WP2*uvrA*/pKM101 については 1250 μg/プレート以上で, 存在下ではすべての菌株の 5000 μg/プレートでそれぞれ菌の生育阻害が認められた. なお, S9 mix の有無にかかわらず, プレート上に沈殿物は認められなかった.

これらの結果をもとに本試験では, S9 mix 非存在下の TA100 については 625, 313, 156, 78.1, 39.1, 19.5 および 9.77 μg/プレートの 7 用量, TA1535, WP2*uvrA*/pKM101 については 156, 78.1, 39.1, 19.5, 9.77 および 4.88 μg/プレートの 6 用量, TA98, TA1537 については 313, 156, 78.1, 39.1, 19.5 および 9.77 μg/プレートの 6 用量を, 存在下の TA100 については 1250, 625, 313, 156, 78.1 および 39.1 μg/プレートの 6 用量, TA1535 については 156, 78.1, 39.1, 19.5, 9.77 および 4.88 μg/プレートの 6 用量, WP2*uvrA*/pKM101 については 78.1, 39.1, 19.5, 9.77, 4.88, 2.44 および 1.22 μg/プレートの 7 用量, TA98, TA1537 については 5000, 2500, 1250, 625, 313 および 156 μg/プレートの 6 用量をそれぞれ設定した.

2 回の本試験の結果, いずれの試験においても S9 mix 非存在下の TA100, TA1535, WP2*uvrA*/pKM101, TA1537 および存在下の TA100, TA1535, WP2*uvrA*/pKM101 で, 陰性（溶媒）対照値の 2 倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加が認められた. S9 mix 非存在下の TA98 および存在下の TA98, TA1537 では, 復帰変異コロニー数は陰性（溶媒）対照値の 2 倍以下であった. また, S9 mix 非存在下の TA100, TA1535, TA98, TA1537 および存在下の TA98, TA1537 で菌の生育阻害が認められた. なお, S9 mix の有無にかかわらず, プレート上に沈殿物は認められなかった.

本被験物質が示した最大比活性値は, S9 mix 存在下の WP2*uvrA*/pKM101 が 4.88 μg/プレートで示した 2.32×10^4 revertants/mg であった.

最高用量の被験物質溶液および S9 mix について行った無菌試験の結果, 試験に影響を及ぼすような菌, カビ等の発育は認められなかった.

考察および結論

予備試験の結果を基に本試験を実施した結果，S9 mix 非存在下の TA100, TA1535, WP2*uvrA*/pKM101, TA1537 および S9 mix 存在下の TA100, TA1535, WP2*uvrA*/pKM101 で陰性（溶媒）対照値の 2 倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加が認められた．S9 mix 非存在下の TA98 および存在下の TA98, TA1537 では，復帰変異コロニー数は陰性（溶媒）対照値の 2 倍以下であった．

試験施設における背景データおよび背景データより算出した適正値を添付資料 1 に示した．本試験の陰性（溶媒）対照値および陽性対照値が適正値の範囲内であったこと，また S9 mix 非存在下および存在下において陽性対照が各菌株に誘発した復帰変異コロニー数が，各菌株の陰性（溶媒）対照の復帰変異コロニー数と比較して明らかに 2 倍を超えて増加し陽性の結果を示したことから，試験が適切に実施されたことが示唆された．

以上の結果から，水加ヒドラジンは細菌を用いる復帰突然変異試験において変異原性を有する（陽性）と判定した．

なお，同一物質あるいは類似化合物の変異原性に関する情報を添付資料 2 にまとめた．

参考文献

1. Maron, D.M. and Ames, B.N.（1983）: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutat. Res.*, **113**, 173-215
2. Green, M.H.L. and Muriel, W.J.(1976): Mutagen testing using Trp^{+}reversion in *Escherichia coli*, *Mutat. Res.*, **38**, 3-32
3. 労働省安全衛生部化学物質調査課編（1991）：安衛法における変異原性試験，中央労働災害防止協会，東京

表１　試験結果表（予備試験）

被験物質の名称　：　水加ヒドラジン

試験実施期間		2001年　7月　16日　より　2001年　7月　19日				
代謝活性化系の有無	被験物質用量（μg/ﾌﾟﾚｰﾄ）	復帰変異数（ｺﾛﾆｰ数/ﾌﾟﾚｰﾄ）				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2*uvrA*/pKM101	TA98	TA1537
S 9 mix（－）	陰性対照	112	8	69	21	7
	1.22	104	12	65	14	7
	4.88	139	17	95	15	7
	19.5	122	29	175	21	10
	78.1	182	64	317	42	8
	313	357*	0*	265	0*	0*
	1250	0*	0*	0*	0*	0*
	5000	0*	0*	0*	0*	0*
S 9 mix（＋）	陰性対照	105	10	73	36	14
	1.22	105	8	93	32	12
	4.88	107	16	159	30	10
	19.5	154	58	366	32	12
	78.1	190	114	1075	26	10
	313	252	186	2097	30	18
	1250	241	183	1878	42	11
	5000	0*	0*	0*	0*	0*
陽性対照 S9 mix を必要としないもの	名称	AF-2	NaN_3	ENNG	AF-2	9-AA
	用量（μg/ﾌﾟﾚｰﾄ）	0.01	0.5	2	0.1	80
	ｺﾛﾆｰ数/ﾌﾟﾚｰﾄ	624	399	2821	631	209
陽性対照 S9 mix を必要とするもの	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	用量（μg/ﾌﾟﾚｰﾄ）	1	2	2	0.5	2
	ｺﾛﾆｰ数/ﾌﾟﾚｰﾄ	1568	198	754	472	201

（備　考）＊：菌の生育阻害が認められた．

AF-2　：2-(2-ﾌﾘﾙ)-3-(5-ﾆﾄﾛ-2-ﾌﾘﾙ)ｱｸﾘﾙｱﾐﾄﾞ，　NaN_3：ｱｼﾞ化ﾅﾄﾘｳﾑ
ENNG：*N*-ｴﾁﾙ-*N'*-ﾆﾄﾛ-*N*-ﾆﾄﾛｿｸﾞｱﾆｼﾞﾝ，　9-AA：9-ｱﾐﾉｱｸﾘｼﾞﾝ塩酸塩，　2-AA：2-ｱﾐﾉｱﾝﾄﾗｾﾝ

表 2-1 試験結果表（本試験 1）

被験物質の名称 ： 水加ヒドラジン

試験実施期間		2001 年 7 月 31 日 より 2001 年 8 月 3 日				
代謝活性化系の有無	被験物質用量 (μg/ﾌﾟﾚｰﾄ)	復帰変異数（ｺﾛﾆｰ数/ﾌﾟﾚｰﾄ）				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100			TA98	TA1537
S 9 mix (−)	陰性対照	114 109 (113) 116 (± 4)			22 27 (24) 23 (± 3)	16 11 (12) 10 (± 3)
	9.77	118 132 (124) 123 (± 7)			23 17 (22) 27 (± 5)	10 12 (11) 12 (± 1)
	19.5	122 154 (139) 141 (± 16)			26 27 (26) 25 (± 1)	11 13 (12) 11 (± 1)
	39.1	177 185 (179) 176 (± 5)			18 28 (23) 23 (± 5)	11 8 (11) 13 (± 3)
	78.1	243 259 (255) 264 (± 11)			31 25 (31) 36 (± 6)	8 12 (11) 12 (± 2)
	156	218* 212* (219) 227* (± 8)			23* 23* (21) 17* (± 3)	21* 23* (24) 28* (± 4)
	313	466* 491* (482) 489* (± 14)			0* 0* (0) 0* (± 0)	0* 0* (0) 0* (± 0)
	625	0* 0* (0) 0* (± 0)				
S 9 mix (＋)	陰性対照	130 107 (116) 112 (± 12)			22 28 (29) 37 (± 8)	22 17 (19) 17 (± 3)
	39.1	198 182 (187) 182 (± 9)				
	78.1	248 218 (230) 225 (± 16)				
	156	275 244 (256) 250 (± 16)			28 21 (24) 22 (± 4)	17 18 (16) 14 (± 2)
	313	260 286 (254) 216 (± 35)			30 22 (26) 26 (± 4)	13 13 (14) 16 (± 2)
	625	250 289 (281) 305 (± 28)			22 31 (26) 24 (± 5)	12 12 (12) 13 (± 1)
	1250	268 278 (267) 256 (± 11)			32 29 (30) 29 (± 2)	15 11 (15) 18 (± 4)
	2500				30* 26* (27) 26* (± 2)	5* 2* (3) 3* (± 2)
	5000				0* 0* (0) 0* (± 0)	0* 0* (0) 0* (± 0)
陽性対照 S9 mix を必要としないもの	名称	AF-2			AF-2	9-AA
	用量 (μg/ﾌﾟﾚｰﾄ)	0.01			0.1	80
	ｺﾛﾆｰ数/ﾌﾟﾚｰﾄ	785 609 (614) 449 (±168)			665 715 (684) 672 (± 27)	192 190 (186) 177 (± 8)
陽性対照 S9 mix を必要とするもの	名称	2-AA			2-AA	2-AA
	用量 (μg/ﾌﾟﾚｰﾄ)	1			0.5	2
	ｺﾛﾆｰ数/ﾌﾟﾚｰﾄ	1783 1734 (1789) 1849 (± 58)			427 442 (434) 433 (± 8)	208 212 (219) 236 (± 15)

（備 考）＊：菌の生育阻害が認められた．

（平均値）
（±標準偏差）

AF-2 ：2-(2-ﾌﾘﾙ)-3-(5-ﾆﾄﾛ-2-ﾌﾘﾙ)ｱｸﾘﾙｱﾐﾄﾞ， 9-AA：9-ｱﾐﾉｱｸﾘｼﾞﾝ塩酸塩
2-AA：2-ｱﾐﾉｱﾝﾄﾗｾﾝ

表 2-2 試験結果表（本試験 1）

被験物質の名称 ： 水加ヒドラジン

試験実施期間		2001 年 7 月 31 日 より 2001 年 8 月 3 日			
代謝活性化系の有無	被験物質用量 (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	
		TA1535	WP2*uvrA*/pKM101		
S 9 mix (－)	陰性対照	9 11 (10) 11 (±1)	80 77 (76) 70 (±5)		
	4.88	19 13 (19) 24 (±6)	136 129 (126) 114 (±11)		
	9.77	36 45 (46) 58 (±11)	166 155 (156) 148 (±9)		
	19.5	66 78 (74) 79 (±7)	195 196 (201) 211 (±9)		
	39.1	117 116 (116) 115 (±1)	239 290 (280) 310 (±37)		
	78.1	149 124 (128) 112 (±19)	359 351 (348) 333 (±13)		
	156	110* 121* (109) 97* (±12)	341 348 (342) 336 (±6)		
S 9 mix (＋)	陰性対照	12 14 (12) 9 (±3)	99 96 (96) 93 (±3)		
	1.22		164 157 (155) 143 (±11)		
	2.44		160 157 (165) 179 (±12)		
	4.88	18 23 (22) 25 (±4)	194 219 (209) 215 (±13)		
	9.77	36 53 (40) 31 (±12)	269 250 (260) 260 (±10)		
	19.5	68 70 (66) 59 (±6)	423 455 (436) 431 (±17)		
	39.1	96 113 (102) 97 (±10)	792 814 (795) 780 (±17)		
	78.1	137 184 (161) 161 (±24)	1185 1347 (1279) 1306 (±84)		
	156	165 183 (184) 205 (±20)			
陽性対照 S9 mix を必要としないもの	名称	NaN3	ENNG		
	用量 (μg/プレート)	0.5	2		
	コロニー数/プレート	446 409 (427) 427 (±19)	3387 3114 (3161) 2982 (±207)		
陽性対照 S9 mix を必要とするもの	名称	2-AA	2-AA		
	用量 (μg/プレート)	2	2		
	コロニー数/プレート	198 208 (199) 190 (±9)	799 867 (844) 866 (±39)		

（備考）＊：菌の生育阻害が認められた．

（平均値）
（±標準偏差）

NaN3：アジ化ナトリウム， ENNG：*N*-エチル-*N*'-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン， 2-AA：2-アミノアントラセン

表 3-1 試験結果表（本試験 2）

被験物質の名称 ： 水加ヒドラジン

試験実施期間		2001 年 8 月 6 日 より 2001 年 8 月 9 日				
代謝活性化系の有無	被験物質用量 (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			TA98	TA1537
S 9 mix (−)	陰性対照	91 116 (107) 115 (± 14)			21 20 (22) 25 (± 3)	8 11 (9) 8 (± 2)
	9.77	92 116 (110) 123 (± 16)			24 27 (25) 25 (± 2)	7 6 (7) 7 (± 1)
	19.5	142 132 (139) 143 (± 6)			25 22 (24) 26 (± 2)	10 5 (9) 13 (± 4)
	39.1	150 145 (145) 140 (± 5)			28 25 (26) 24 (± 2)	11 10 (12) 15 (± 3)
	78.1	204 188 (196) 197 (± 8)			30 40 (40) 51 (± 11)	15 18 (17) 19 (± 2)
	156	189* 180* (194) 213* (± 17)			46* 36* (43) 46* (± 6)	20* 20* (25) 34* (± 8)
	313	306* 298* (295) 281* (± 13)			0* 0* (0) 0* (± 0)	0* 0* (0) 0* (± 0)
	625	0* 0* (0) 0* (± 0)				
S 9 mix (+)	陰性対照	112 110 (112) 114 (± 2)			22 32 (27) 26 (± 5)	21 18 (18) 14 (± 4)
	39.1	168 177 (173) 174 (± 5)				
	78.1	237 222 (228) 226 (± 8)				
	156	229 214 (233) 255 (± 21)			33 32 (31) 27 (± 3)	13 13 (12) 10 (± 2)
	313	257 260 (257) 253 (± 4)			30 28 (28) 25 (± 3)	12 11 (12) 13 (± 1)
	625	256 317 (302) 334 (± 41)			31 30 (29) 27 (± 2)	11 12 (12) 14 (± 2)
	1250	261 243 (248) 241 (± 11)			27 27 (26) 25 (± 1)	13 11 (13) 15 (± 2)
	2500				37* 28* (34) 37* (± 5)	2* 10* (6) 7* (± 4)
	5000				0* 0* (0) 0* (± 0)	0* 0* (0) 0* (± 0)
陽性対照 S9 mix を必要としないもの	名称	AF-2			AF-2	9-AA
	用量 (μg/プレート)	0.01			0.1	80
	コロニー数/プレート	583 623 (633) 693 (± 56)			634 613 (602) 560 (± 38)	190 184 (197) 216 (± 17)
陽性対照 S9 mix を必要とするもの	名称	2-AA			2-AA	2-AA
	用量 (μg/プレート)	1			0.5	2
	コロニー数/プレート	1863 1889 (1884) 1899 (± 19)			460 444 (464) 487 (± 22)	229 236 (233) 233 (± 4)

（備 考）＊：菌の生育阻害が認められた．

（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， 9-AA：9-アミノアクリジン塩酸塩
2-AA：2-アミノアントラセン

表 3-2 試験結果表（本試験 2）

被験物質の名称 ： 水加ヒドラジン

試験実施期間		2001 年 8 月 6 日 より 2001 年 8 月 9 日			
代謝活性化系の有無	被験物質用量 (μg/ﾌﾟﾚｰﾄ)	復帰変異数（ｺﾛﾆｰ数/ﾌﾟﾚｰﾄ）			
		塩基対置換型		フレームシフト型	
			TA1535	WP2*uvrA*/pKM101	
S 9 mix (－)	陰性対照		10 14 (13) 14 (± 2)	74 80 (77) 76 (± 3)	
	4.88		13 25 (19) 19 (± 6)	114 129 (123) 126 (± 8)	
	9.77		63 61 (62) 62 (± 1)	151 166 (157) 154 (± 8)	
	19.5		70 80 (75) 75 (± 5)	212 188 (206) 218 (± 16)	
	39.1		74 79 (81) 89 (± 8)	261 283 (278) 291 (± 16)	
	78.1		81 74 (76) 74 (± 4)	365 382 (368) 357 (± 13)	
	156		62* 58* (65) 75* (± 9)	392 356 (362) 337 (± 28)	
S 9 mix (＋)	陰性対照		10 13 (10) 8 (± 3)	91 95 (95) 99 (± 4)	
	1.22			153 135 (147) 154 (± 11)	
	2.44			153 138 (147) 150 (± 8)	
	4.88		12 24 (18) 18 (± 6)	191 200 (197) 200 (± 5)	
	9.77		33 31 (29) 24 (± 5)	215 210 (224) 246 (± 20)	
	19.5		60 61 (55) 44 (± 10)	438 413 (431) 443 (± 16)	
	39.1		100 88 (95) 98 (± 6)	733 843 (780) 764 (± 57)	
	78.1		130 145 (136) 133 (± 8)	1203 1268 (1203) 1138 (± 65)	
	156		151 178 (163) 159 (± 14)		
陽性対照 S9 mix を必要としないもの	名称		NaN_3	ENNG	
	用量 (μg/ﾌﾟﾚｰﾄ)		0.5	2	
	ｺﾛﾆｰ数/ﾌﾟﾚｰﾄ		477 455 (481) 512 (± 29)	3180 2916 (3018) 2957 (±142)	
陽性対照 S9 mix を必要とするもの	名称		2-AA	2-AA	
	用量 (μg/ﾌﾟﾚｰﾄ)		2	2	
	ｺﾛﾆｰ数/ﾌﾟﾚｰﾄ		197 212 (212) 228 (± 16)	778 768 (772) 770 (± 5)	

（備考）＊：菌の生育阻害が認められた．

（平均値）
（±標準偏差）

NaN_3：ｱｼﾞ化ﾅﾄﾘｳﾑ， ENNG：*N*-ｴﾁﾙ-*N*'-ﾆﾄﾛ-*N*-ﾆﾄﾛｿｸﾞｱﾆｼﾞﾝ， 2-AA：2-ｱﾐﾉｱﾝﾄﾗｾﾝ

表 4

比活性

	菌株名	－S9 mix		＋S9 mix	
		比活性 *1 (revertants/mg)	用量 *2 (μg/ﾌﾟﾚｰﾄ)	比活性 *1 (revertants/mg)	用量 *2 (μg/ﾌﾟﾚｰﾄ)
本試験1	TA100	1.82×10^{3}	78.1	8.97×10^{2}	156
	TA1535	3.68×10^{3}	9.77	2.87×10^{3}	9.77
	WP2*uvrA*/pKM101	8.19×10^{3}	9.77	2.32×10^{4}	4.88
	TA98	－	－	－	－
	TA1537	7.69×10	156 *3	－	－
本試験2	TA100	6.01×10^{2}	313 *3	1.49×10^{3}	78.1
	TA1535	5.02×10^{3}	9.77	2.31×10^{3}	19.5
	WP2*uvrA*/pKM101	8.19×10^{3}	9.77	2.09×10^{4}	4.88
	TA98	－	－	－	－
	TA1537	1.03×10^{2}	156 *3	－	－

*1：被験物質 1 mg あたりの誘発コロニー数

*2：本試験 1，本試験 2 のいずれも最大値の用量を採用した.

*3：菌の生育阻害の認められる用量で算出した.

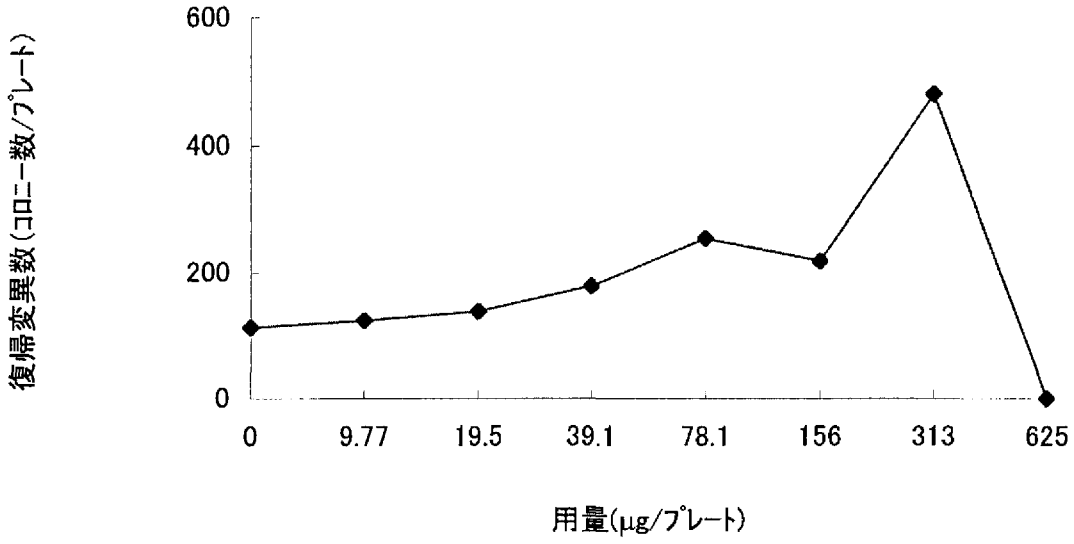

図 1－1　用量－反応曲線　（本試験1；S9 mix非存在下のTA100 ）

被験物質名：水加ヒドラジン

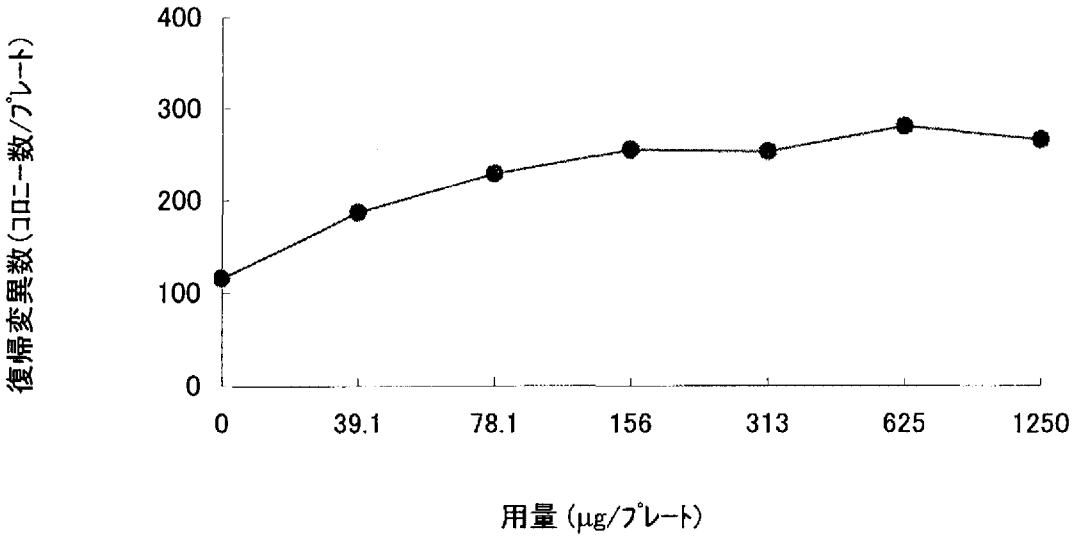

図 1－2　用量－反応曲線　（本試験1；S9 mix存在下のTA100 ）

被験物質名：水加ヒドラジン

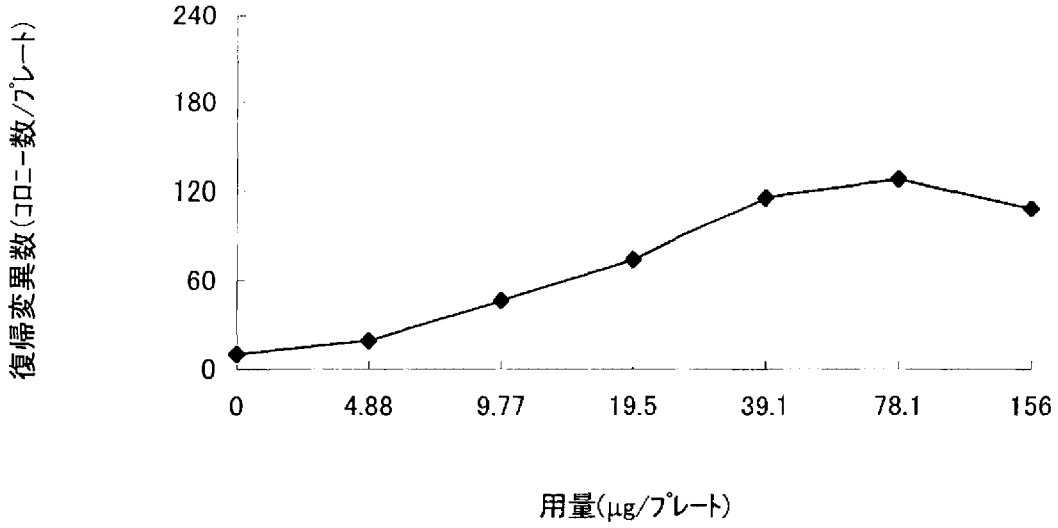

図 2－1　用量－反応曲線　（本試験1; S9 mix非存在下のTA1535 ）

被験物質名:水加ヒドラジン

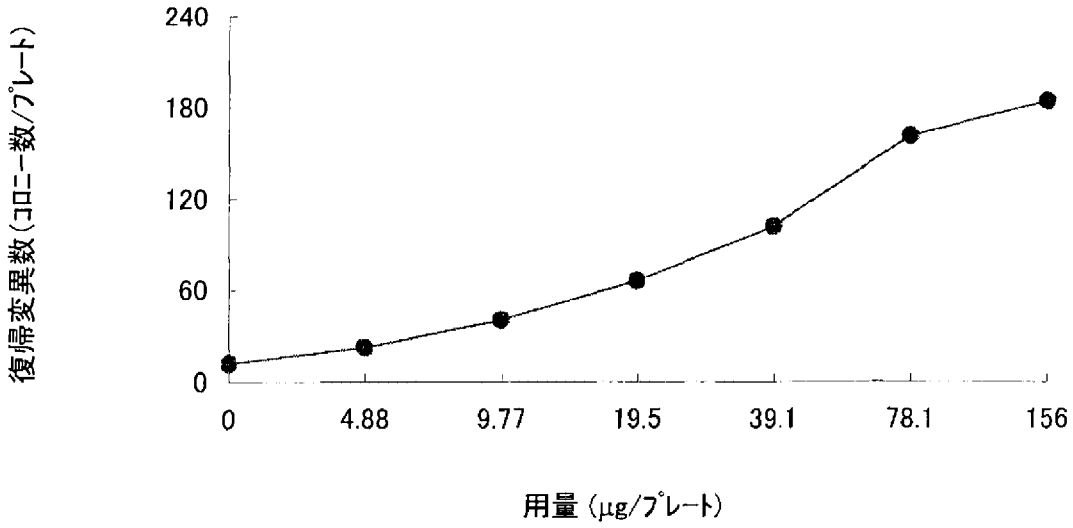

図 2－2　用量－反応曲線　（本試験1;S9 mix存在下のTA1535 ）

被験物質名:水加ヒドラジン

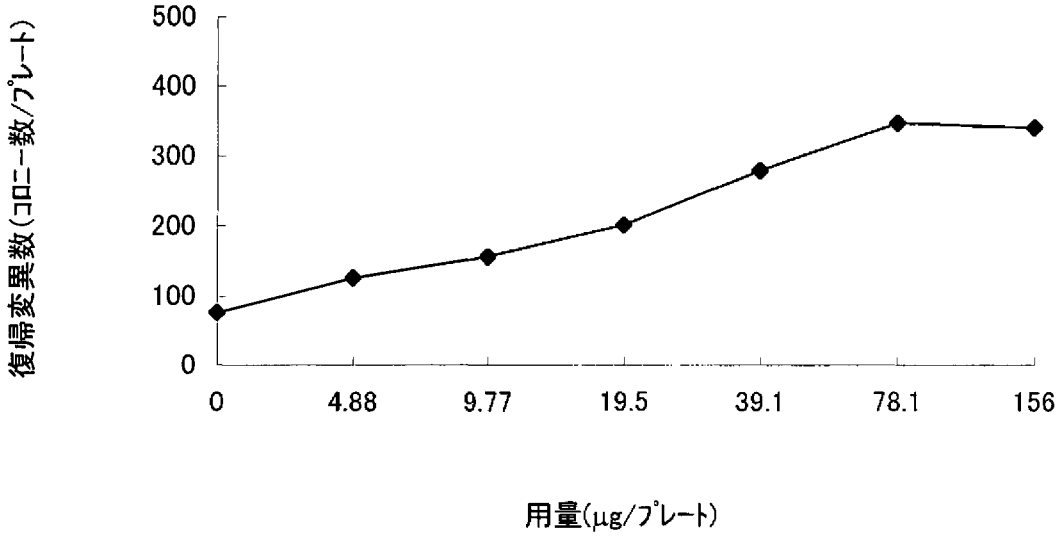

図 3－1　用量－反応曲線　（本試験1; S9 mix非存在下のWP2uvrA/pKM101 ）

被験物質名:水加ヒドラジン

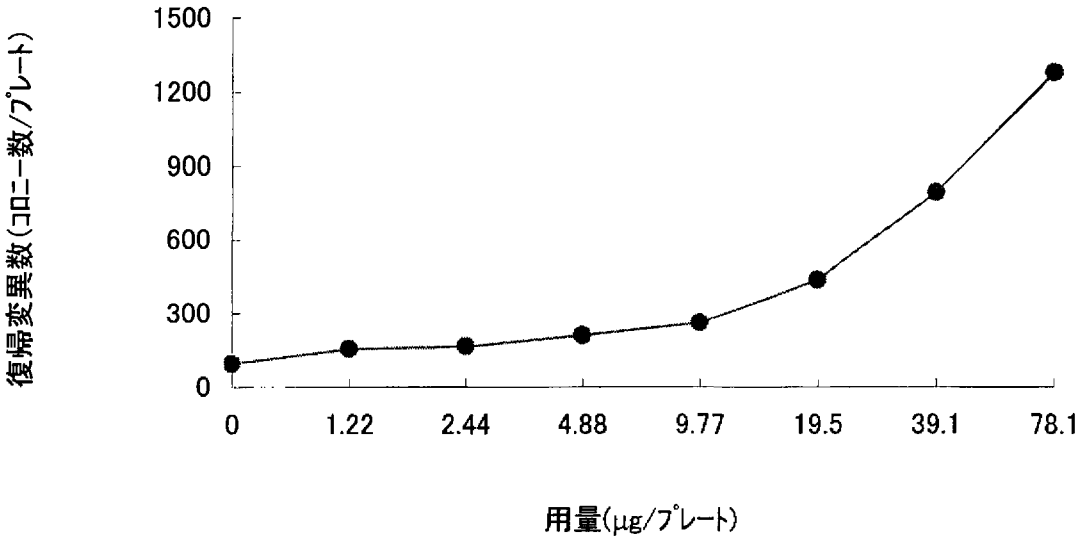

図 3－2　用量－反応曲線　（本試験1;S9 mix存在下のWP2uvrA/pKM101 ）

被験物質名:水加ヒドラジン

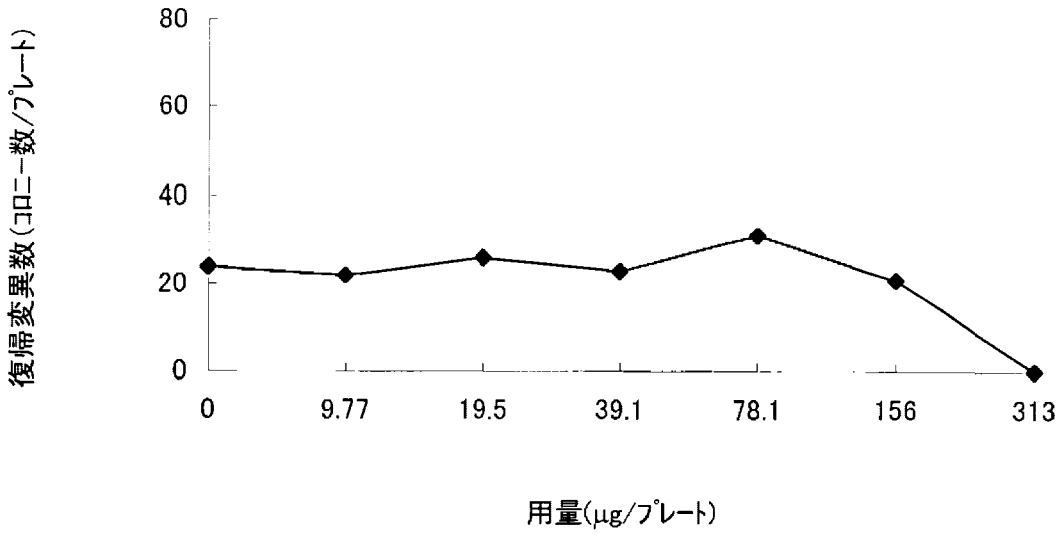

図 4－1　用量－反応曲線　（本試験1; S9 mix非存在下のTA98 ）

被験物質名:水加ヒドラジン

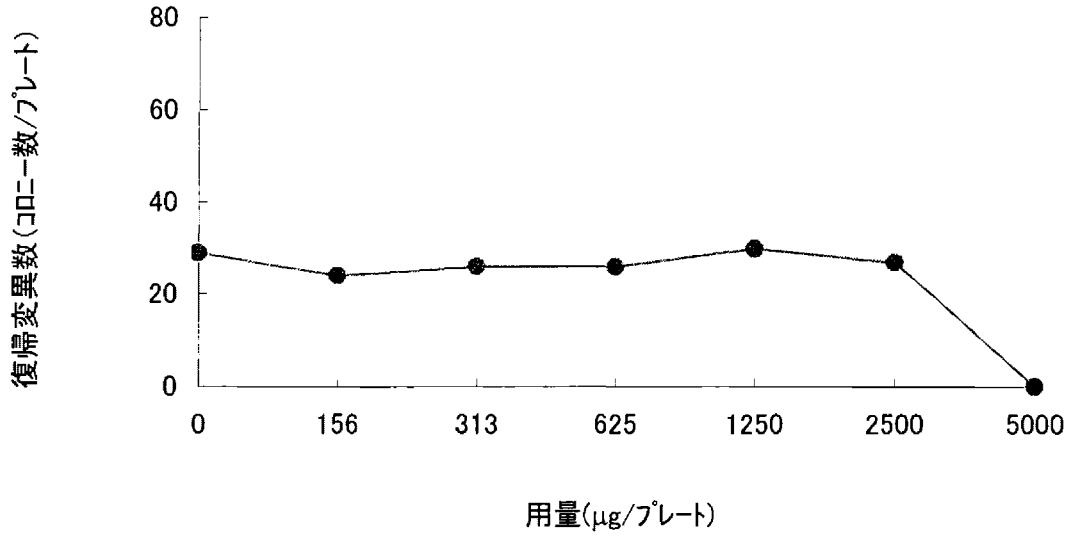

図 4－2　用量－反応曲線　（本試験1;S9 mix存在下のTA98 ）

被験物質名:水加ヒドラジン

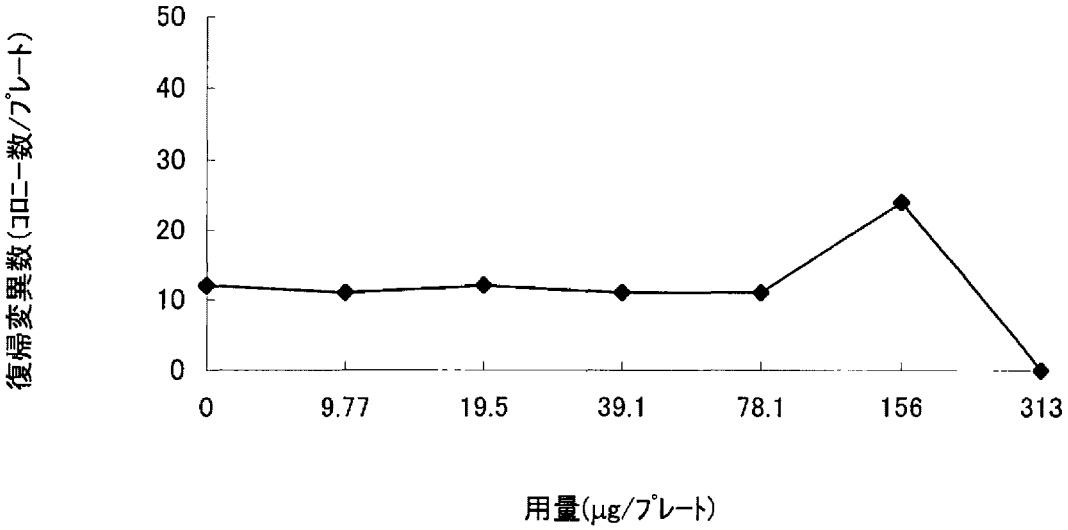

図 5－1　用量－反応曲線　（本試験1; S9 mix非存在下のTA1537 ）

被験物質名:水加ヒドラジン

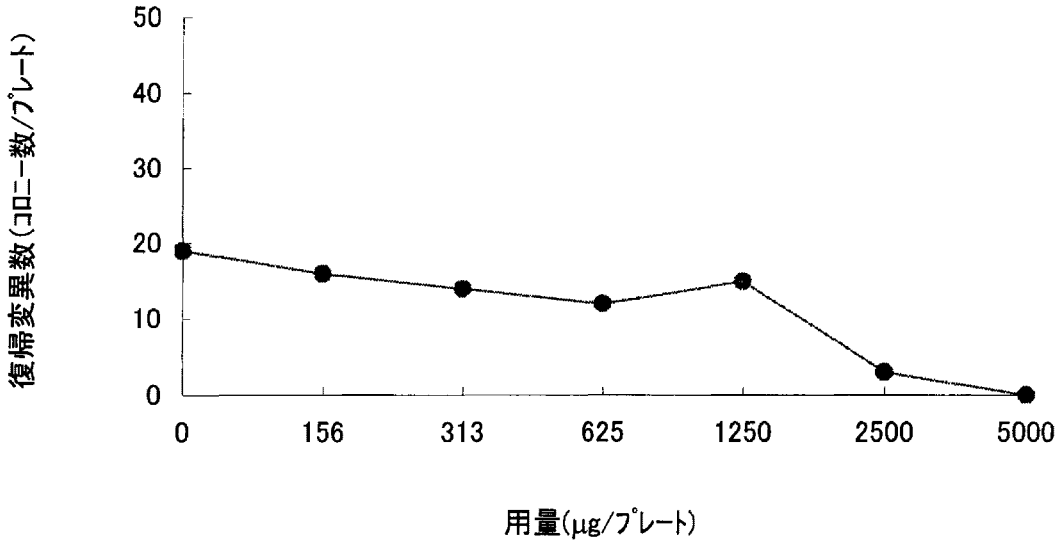

図 5－2　用量－反応曲線　（本試験1;S9 mix存在下のTA1537 ）

被験物質名:水加ヒドラジン

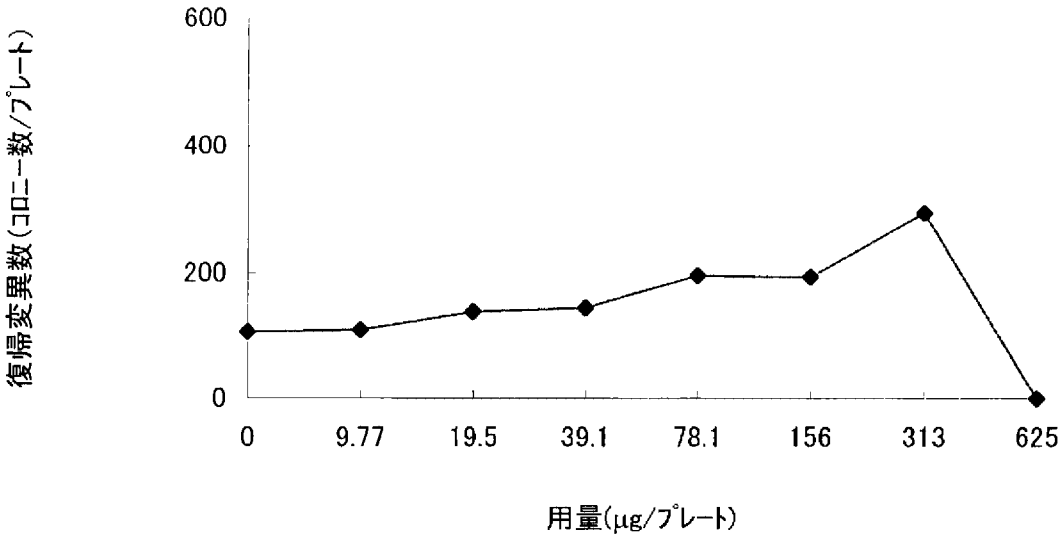

図 6－1　用量－反応曲線　（本試験2;S9 mix非存在下のTA100 ）

被験物質名:水加ヒドラジン

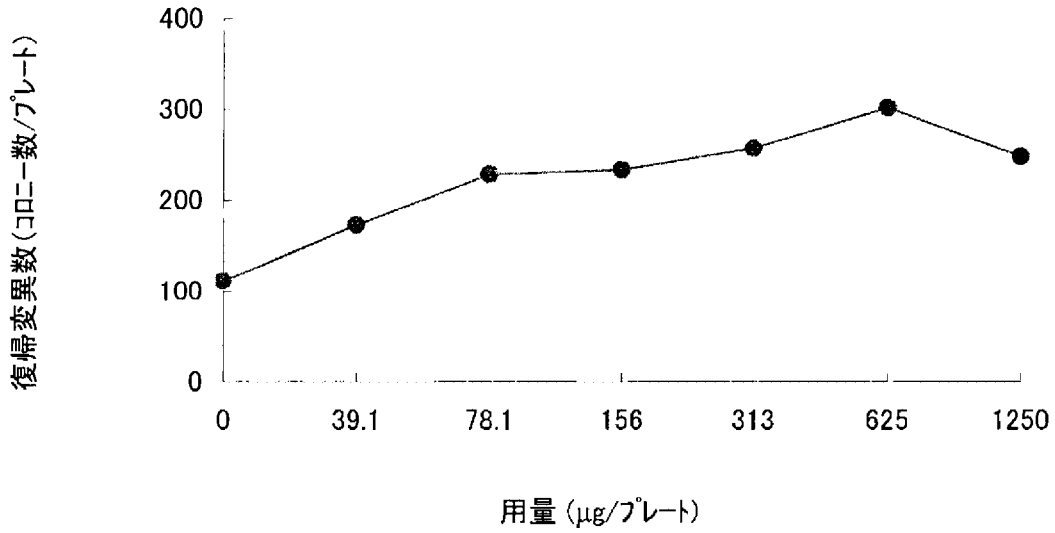

図 6－2　用量－反応曲線　（本試験2;S9 mix存在下のTA100 ）

被験物質名:水加ヒドラジン

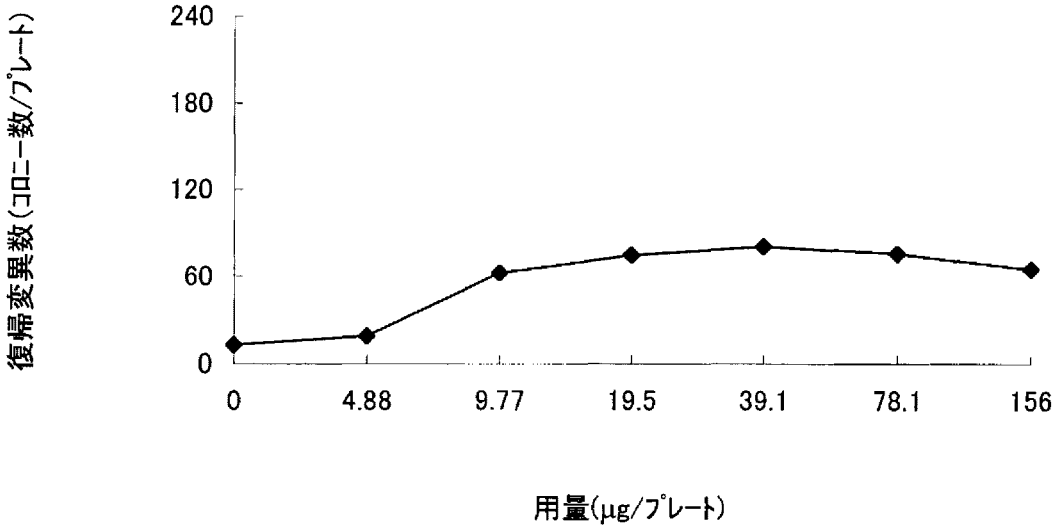

図 7−1　用量−反応曲線　（本試験2;S9 mix非存在下のTA1535）

被験物質名:水加ヒドラジン

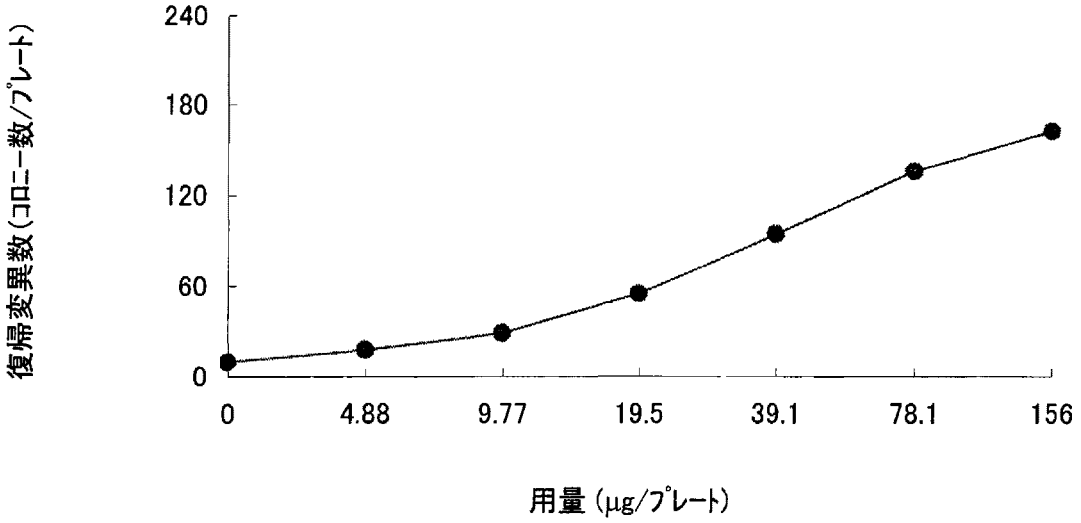

図 7−2　用量−反応曲線　（本試験2;S9 mix存在下のTA1535）

被験物質名:水加ヒドラジン

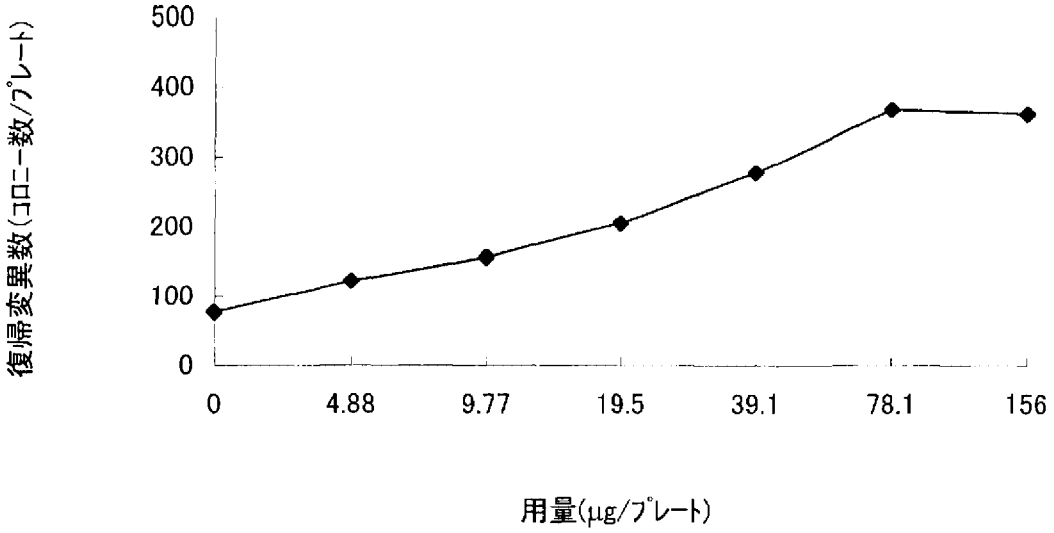

図 8－1　用量－反応曲線　（本試験2；S9 mix非存在下のWP2uvrA/pKM101 ）

被験物質名：水加ヒドラジン

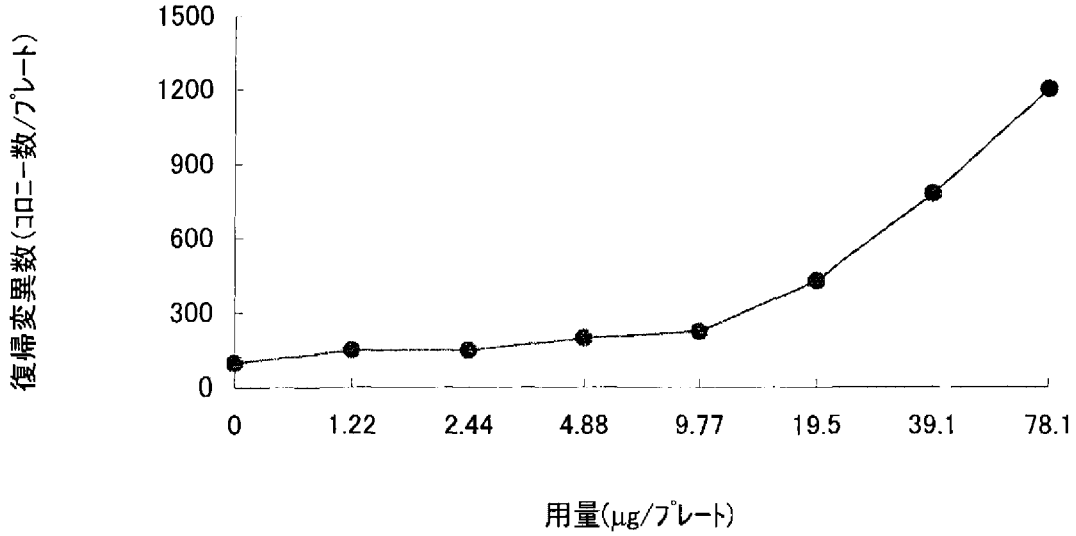

図 8－2　用量－反応曲線　（本試験2；S9 mix存在下のWP2uvrA/pKM101 ）

被験物質名：水加ヒドラジン

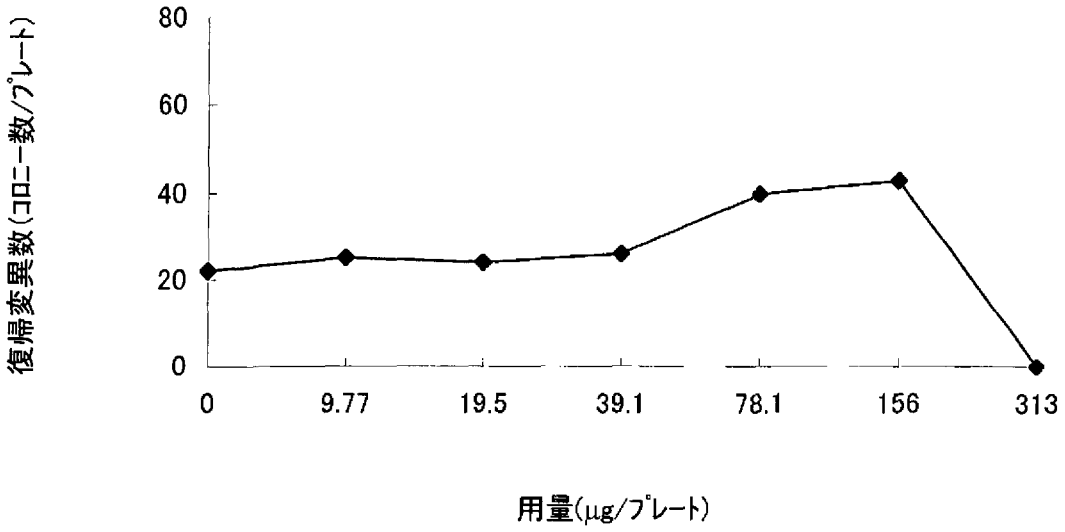

図 9－1　用量－反応曲線　（本試験2；S9 mix非存在下のTA98 ）

被験物質名：水加ヒドラジン

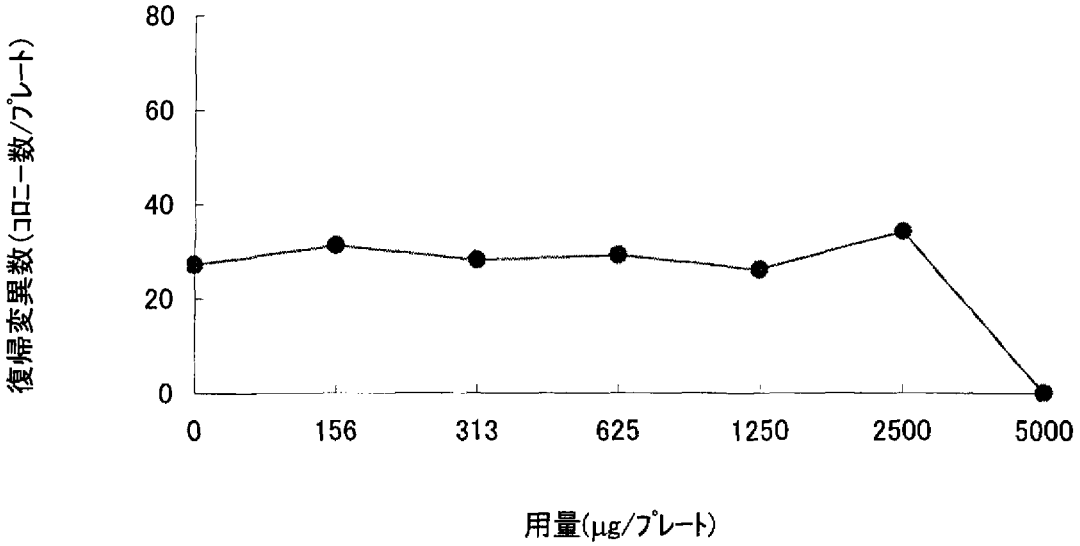

図 9－2　用量－反応曲線　（本試験2；S9 mix存在下のTA98 ）

被験物質名：水加ヒドラジン

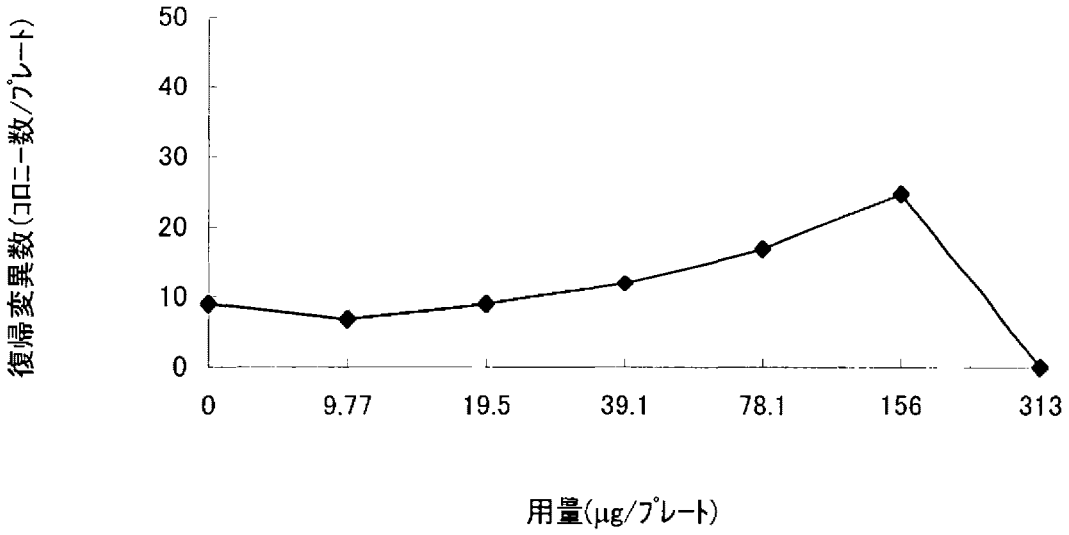

図 10－1　用量－反応曲線　（本試験2;S9 mix非存在下のTA1537）

被験物質名:水加ヒドラジン

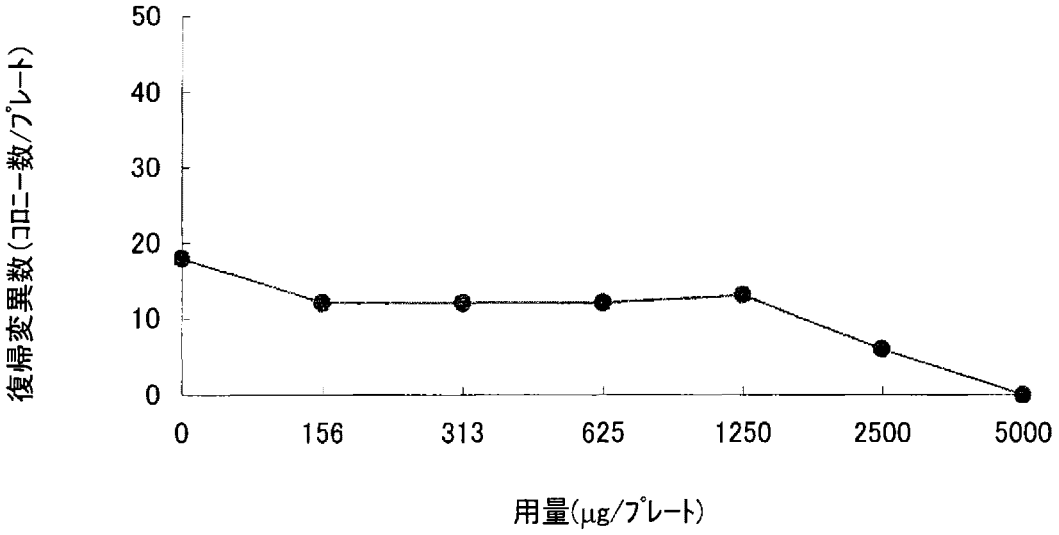

図 10－2　用量－反応曲線　（本試験2;S9 mix存在下のTA1537）

被験物質名:水加ヒドラジン