最 終 報 告 書

四臭化エタンの細菌を用いる復帰突然変異試験

（試験番号：00-258）

財団法人 畜産生物科学安全研究所

目　次

要約 …… 1頁
試験目的 …… 2
材料および方法 …… 2
1．被験物質 …… 2
2．指標菌株 …… 3
3．指標菌株の検査 …… 3
4．指標菌株の保存と前培養 …… 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 …… 8
13．結果の判定 …… 8
結果 …… 8
結論および参考事項 …… 9
参考文献 …… 9

表：
表1－1　S9 mix 非存在下における四臭化エタンの
　　用量設定試験結果［直接法］ …… 11
表1－2　S9 mix 非存在下における四臭化エタンの
　　用量設定試験結果［代謝活性化法］ …… 12

表２－１　S9 mix 非存在下における四臭化エタンの復帰突然変異
試験結果［本試験１回目－直接法］…… 13
表２－２　S9 mix 存在下における四臭化エタンの復帰突然変異
試験結果［本試験１回目－代謝活性化法］…… 14
表３－１　S9 mix 非存在下における四臭化エタンの復帰突然変異
試験結果［本試験２回目－直接法］…… 15
表３－２　S9 mix 存在下における四臭化エタンの復帰突然変異
試験結果［本試験２回目－代謝活性化法］…… 16

図：

図１　四臭化エタンの復帰突然変異試験結果－本試験１回目 …… 17
図２　四臭化エタンの復帰突然変異試験結果－本試験２回目 …… 20

要 約

四臭化エタ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* WP2*uvr*A 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，菌の生育阻害が認められた用量を最高用量とし，直接法ではいずれの菌株とも 15.6～500μg/プレートの範囲（公比 2），また，代謝活性化法では *S. typhimurium* については 15.6～500μg/プレート，*E. coli* においては 31.3～1000μg/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は，直接法および代謝活性化法ともにいずれの菌株とも最高用量において認められた。

以上の成績から，本実験条件下では，四臭化エタ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。

試験目的

この試験は，四臭化エタ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　：　四臭化エタン，英名　tetrabromoethane（TBE）

別　　名　：　acetylene tetrabromide，*sym*-tetrabromoethane，Muthmann's liquid，TBE，tetrabromoacetylene，S-tetrabromoethane

ＣＡＳ番号　：　79-27-6

ロット番号　：

純　　度　：　99.2%（分析日：平成 13 年 3 月 8 日）
不純物：安定剤として，1,2-ブチレンオキサイドを 0.2%添加

入 手 先　：

入 手 日　：　平成 13 年 3 月 26 日

入 手 量　：　250 g

物 性 等　：

化学名	1, 1, 2, 2 - テトラブロモエタン (1, 1, 2, 2 - tetrabromoethane)
示性式	$Br_2(CH)_2Br_2$
分子式	$C_2H_2Br_4$
分子量	345.65
性状(常温)	無色または淡黄色の透明液体で，樟脳に似た臭気を有する。
融点	0℃
沸点	151℃
比重	2.962（20/4℃）
蒸気圧	133 Pa（65℃）
溶解性	油溶性〔水に不溶，ジメチルスルホキシド（DMSO）に 100 mg/mL 以上，エタノール，エーテル，クロロホルム，四塩化炭素，アニリンに可溶〕

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　　において分析（平成14年1月18日，GC法）した結果，純度は99.2%で，実験期間中被験物質は安定であったことを確認した。］

保管条件　：冷暗所（4℃），密栓

2．指標菌株

指標菌株は，国立公衆衛生院より入手（平成6年12月19日）した以下の5種類を用いた。

（塩基対置換型）
Salmonella typhimurium TA100，TA1535
Escherichia coli WP2*uvrA*
（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 ACH7185，TPK7807，99.9%）を0.07 mLの割合で加えて−80℃以下で保存した。この保存菌株の25 μL をニュートリエントブロス（Bacto nutrient broth dehydrated, Difco Laboratories, ロット番号 44077JK)液体培地15mLに接種し，

37℃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（$\times10^9$/mL）

指標菌株	TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
用量設定試験	1.46	1.62	1.47	1.41	1.21
本試験(1 回目)	1.54	1.72	1.38	1.33	1.21
本試験(2 回目)	1.50	1.67	1.25	1.33	1.14

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（用量設定試験：ロット番号 FSM-445・2001 年 5 月 25 日製造・2001 年 6 月 14 日購入，本試験：ロット番号 FSM-449・2001 年 8 月 10 日製造・2001 年 8 月 28 日購入）。凍結 S9 mix は−80℃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：　213～242 g（FSM-445），203～246 g（FSM-449）

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）投与法（投与開始日起算）
  - 1 日目−PB 30 mg/kg，　2，3，4 日目−PB 60 mg/kg
  - 3 日目−BF 80 mg/kg

C．調製法

最終投与の翌日に肝臓ホモジネートを遠心分離(9000×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，DMSO に 100mg/mL 以上可溶であることから，溶媒には DMSO（和光純薬工業株式会社，ロット番号 DWP7008，100%）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 DMSO 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 ELE7866，99.9%）に，SA および 9-AA は蒸留水（株式会社大塚製薬工場，ロット番号 K0G81，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)
WP2*uvrA*	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 132695XA）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 7001）の組成の軟寒天を調製した。溶解した軟寒天に，*S. typhimurium* 用には 0.5 mM D-ビオチン（Sigma Chemical Company，ロット番号 39H0679）および0.5 mM L-ヒスチジン（和光純薬工業株式会社，ロット番号 DLJ5479）水溶液，*E. coli* 用には0.5 mM L-トリプトファン（和光純薬工業株式会社，ロット番号 KCK3898）水溶液を 1/10 容加え，アミノ酸添加軟寒天培地とした。

9．用量設定試験（予備試験）

本試験における被験物質の適切な用量を把握するために，20～5000μg/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），直接法の場合は，いずれの菌株とも 500μg/プレート以上の用量で，また，代謝活性化法の場合は，*S. typhimurium* では 500μg/プレート以上，*E. coli* では 1000μg/プレート以上の用量で菌の生育阻害が認められた。

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，直接法の場合は 500μg/プレートを最高用量とし，以下公比 2 で 250，125，62.5，31.3 および 15.6μg/プレートの計 6 用量，また，代謝活性法の場合は，*S. typhimurium* では 500μg/プレートを最高用量とし，以下公比 2 で 250，125，62.5，31.3 および 15.6μg/プレート，*E. coli* では 1000μg/プレートを最高用量とし，以下公比 2 で 500，250，125，62.5 および 31.3μg/プレートのそれぞれ計 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）

滅菌小試験管に前培養した懸濁菌液 0.1 mL，被験物質の供試液 0.1 mL および 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.4）0.5 mL（和光純薬工業株式会社，リン

酸水素二ナトリウム・十二水塩：ロット番号 CAH3075，リン酸二水素ナトリウム・二水塩：ロット番号 CAJ2723）を分注し，37℃で 20 分間振盪培養後，45℃に保温したアミノ酸添加軟寒天培地 2 mL を加え，最少グルコース寒天平板培地上に広げた。最少グルコース寒天平板培地（テスメディア AN 培地，オリエンタル酵母工業株式会社，用量設定試験：ロット番号 ANI220ＤＱ・2001 年 4 月 5 日製造・2001 年 6 月 13 日購入，本試験：ロット番号 ANI460ＧＱ・2001 年 7 月 17 日製造・2001 年 8 月 27 日購入）は，Vogel-Bonner E 培地（0.2w/v%クエン酸・一水塩，1w/v%リン酸二カリウム，0.192w/v%リン酸一アンモニウム，0.066w/v%水酸化ナトリウム，0.02w/v%硫酸マグネシウム・七水塩）に寒天粉末を 1.5w/v%およびグルコースを 2w/v%となるように加え，30 mL ずつ分注したものである。37℃で 48 時間培養後，復帰変異コロニーを計数し，同時に指標菌株の生育阻害の有無を実体顕微鏡を用いて観察した。陰性対照および陽性対照群においては，上記の被験物質の供試液 0.1 mL にかわり，溶媒（DMSO）および陽性対照物質溶液 0.1 mL を用いて同様に実施した。試験は各用量 3 枚のプレートで行った。

(2) プレインキュベーション法（代謝活性化法）

滅菌小試験管に前培養した懸濁菌液 0.1 mL，被験物質の供試液 0.1 mL および S9 mix 0.5 mL を分注し，37℃で 20 分間振盪培養後，45℃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℃で 48 時間培養後，復帰変異コロニーを計数し，同時に指標菌株の生育阻害の有無を実体顕微鏡を用いて観察した。陰性対照および陽性対照群においては，上記の被験物質の供試液 0.1 mL にかわり，溶媒（DMSO）および陽性対照物質溶液 0.1 mL を用いて同様に実施した。試験は各用量 3 枚のプレートで行った。

11．無菌試験

用量設定試験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，用量設定試験：ロット番号 ANI220ＤＱ，本試験：ロット番号 ANI460ＧＱ）に重層後，37℃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した。

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，直接法では 500 μg/プレートで，また，代謝活性化法においては *S. typhimurium* では 500 μg/プレート，*E. coli* では 1000 μg/プレートで認められた。

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。その他，実験中被験物質の析出等，特記すべき変化は認められなかった。

結論および参考事項

四臭化エタ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，本実験条件下では四臭化エタンの遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

四臭化エタンの変異原性については，*S. typhimurium* を用いた復帰突然変異試験において，S9 mix存在下のTA98，TA100，TA97およびTA104並びにS9 mix非存在下のTA97で陽性と報告されている[3]が,今回の試験においてはTA98およびTA100ともに陽性値は確認できなかった。この結果の相違の一因として，陽性と報告されている試験では，Arocolor1254によって酵素誘導されたS9 mixを用いており，今回試験に用いた薬物代謝酵素との分子種の違いが考えられる。その他の報告では，大腸菌を用いたDNA修復試験で陽性[4, 5]と報告されている。

参考文献

1) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation. Research*, **113**, 173-215.

2) Green, M. H. (1984). "Handbook of Mutagenicity Test Procedures" 1, Vol. 3, eds. by Kilbey, B. J., Legator, M., Nicols, W. and Ramel, C., Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, pp. 161-187.

3) Strobel, K. and Grummt, T. (1987). Aliphatic and aromatic halocarbons as

potential mutagens in drinking water. III. Halogenated ethanes and ethenes., *Toxicoligical and Environmental Chemistry*, 15, 101-128.

4) Rosenkranz, H. S., Gutter, B. and Speck W. T. (1976). Mutagenicity and DNA-modifying activity : A comparison of two microbial assays, *Mutation Research*, 41, 61-70.

5) Brem, H. Stein, A. B. and Rosenkranz, H. S. (1974). The mutagenicity and DNA-modifying effect of haloalkanes, *Cancer Research*, 34, 2576-2579.

表 1-1　　S9 mix 非存在下における四臭化エタンの用量設定試験結果〔直接法〕

用　量 〔μg/プレート〕	復帰変異コロニー数／プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
陰性対照 〔ジメチルスルホキシド〕	115	8	22	27	11
20	111	5	17	29	13
50	93	6	11	28	18
100	114	9	16	30	17
200	112	8	16	26	17
500	69 *	2 *	15 *	11 *	7 *
1000	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *
2000	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *
5000	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *
陽性対照	AF－2	SA	AF－2	AF－2	9－AA
μg/プレート	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復帰変異コロニー数／プレート	637	377	695	253	244

(　): 平均値±標準偏差
＊　: 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 存在下における四臭化エタンの用量設定試験結果〔代謝活性化法〕

用　量 〔μg/プレート〕	復帰変異コロニー数／プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
陰性対照 〔ジメチルスルホキシド〕	109	8	22	32	14
20	88	9	25	38	21
50	109	11	22	37	12
100	83	9	28	37	16
200	104	9	16	26	17
500	77 *	5 *	28	29 *	20 *
1000	0 *	0 *	5 *	10 *	0 *
2000	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *
5000	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *
陽性対照	2- AA	2- AA	2- AA	2- AA	2- AA
μg/プレート	1	2	10	1	2
復帰変異コロニー数 ／プレート	395	148	788	261	86

(　): 平均値±標準偏差
＊　: 菌の生育阻害が認められた。
2-AA: 2-アミノアントラセン

表 2-1　S9 mix 非存在下における四臭化エタンの復帰突然変異試験結果
〔本試験1回目－直接法〕

用　量	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	
〔μg/プレート〕	TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
陰性対照	98	10	26	33	14
〔ジメチル	92	6	27	28	10
スルホキシド〕	112	9	24	38	15
	(101 ± 10)	(8 ± 2)	(26 ± 2)	(33 ± 5)	(13 ± 3)
	104	12	26	28	8
15 .6	113	10	35	31	12
	97	9	26	21	15
	(105 ± 8)	(10 ± 2)	(29 ± 5)	(27 ± 5)	(12 ± 4)
	95	8	25	40	11
31 .3	91	8	30	37	11
	83	6	20	22	14
	(90 ± 6)	(7 ± 1)	(25 ± 5)	(33 ± 10)	(12 ± 2)
	107	8	27	27	13
62 .5	136	9	28	23	12
	101	10	26	34	11
	(115 ± 19)	(9 ± 1)	(27 ± 1)	(28 ± 6)	(12 ± 1)
	83	10	32	15	11
125	103	11	33	16	14
	102	6	37	30	12
	(96 ± 11)	(9 ± 3)	(34 ± 3)	(20 ± 8)	(12 ± 2)
	105	8	29	25	16
250	104	9	28	34	8
	105	4	26	33	10
	(105 ± 1)	(7 ± 3)	(28 ± 2)	(31 ± 5)	(11 ± 4)
	75 *	3 *	13 *	17 *	6 *
500	94 *	10 *	13 *	20 *	7 *
	88 *	4 *	25 *	18 *	9 *
	(86 ± 10)	(6 ± 4)	(17 ± 7)	(18 ± 2)	(7 ± 2)
陽性対照	AF－2	SA	AF－2	AF－2	9－AA
μg/プレート	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復帰変異	599	340	1171	597	423
コロニー数	602	346	1167	561	284
／プレート	658	348	1190	534	252
	(620 ± 33)	(345 ± 4)	(1176 ± 12)	(564 ± 32)	(320 ± 91)

( ): 平均値±標準偏差
* : 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 存在下における四臭化エタ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	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	
〔μg/プレート〕	TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
陰性対照	97	6	29	31	18
〔ジメチル	100	12	33	33	16
スルホキシド〕	115	8	24	20	10
	(104 ± 10)	(9 ± 3)	(29 ± 5)	(28 ± 7)	(15 ± 4)
	101	13	--	29	14
15 .6	100	5	--	25	16
	102	4	--	35	17
	(101 ± 1)	(7 ± 5)	--	(30 ± 5)	(16 ± 2)
	98	8	28	27	10
31 .3	102	10	34	20	9
	104	9	27	28	22
	(101 ± 3)	(9 ± 1)	(30 ± 4)	(25 ± 4)	(14 ± 7)
	106	10	39	30	14
62 .5	108	7	33	26	18
	116	16	23	26	15
	(110 ± 5)	(11 ± 5)	(32 ± 8)	(27 ± 2)	(16 ± 2)
	112	11	38	34	13
125	87	9	33	26	15
	90	7	42	26	13
	(96 ± 14)	(9 ± 2)	(38 ± 5)	(29 ± 5)	(14 ± 1)
	90	9	23	26	9
250	101	8	26	26	16
	93	12	34	25	12
	(95 ± 6)	(10 ± 2)	(28 ± 6)	(26 ± 1)	(12 ± 4)
	76 *	5 *	26	24 *	5 *
500	111 *	4 *	24	27 *	14 *
	111 *	5 *	29	31 *	12 *
	(99 ± 20)	(5 ± 1)	(26 ± 3)	(27 ± 4)	(10 ± 5)
	--	--	5 *	--	--
1000	--	--	16 *	--	--
	--	--	16 *	--	--
	--	--	(12 ± 6)	--	--
陽性対照	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
μg/プレート	1	2	10	1	2
復帰変異	322	140	672	224	64
コロニー数	330	119	599	209	83
／プレート	319	127	561	252	63
	(324 ± 6)	(129 ± 11)	(611 ± 56)	(228 ± 22)	(70 ± 11)

( ): 平均値±標準偏差
* : 菌の生育阻害が認められた。
-- : 試験せず
2-AA: 2-アミノアントラセン

表 3-1　S9 mix 非存在下における四臭化エタンの復帰突然変異試験結果
〔本試験2回目－直接法〕

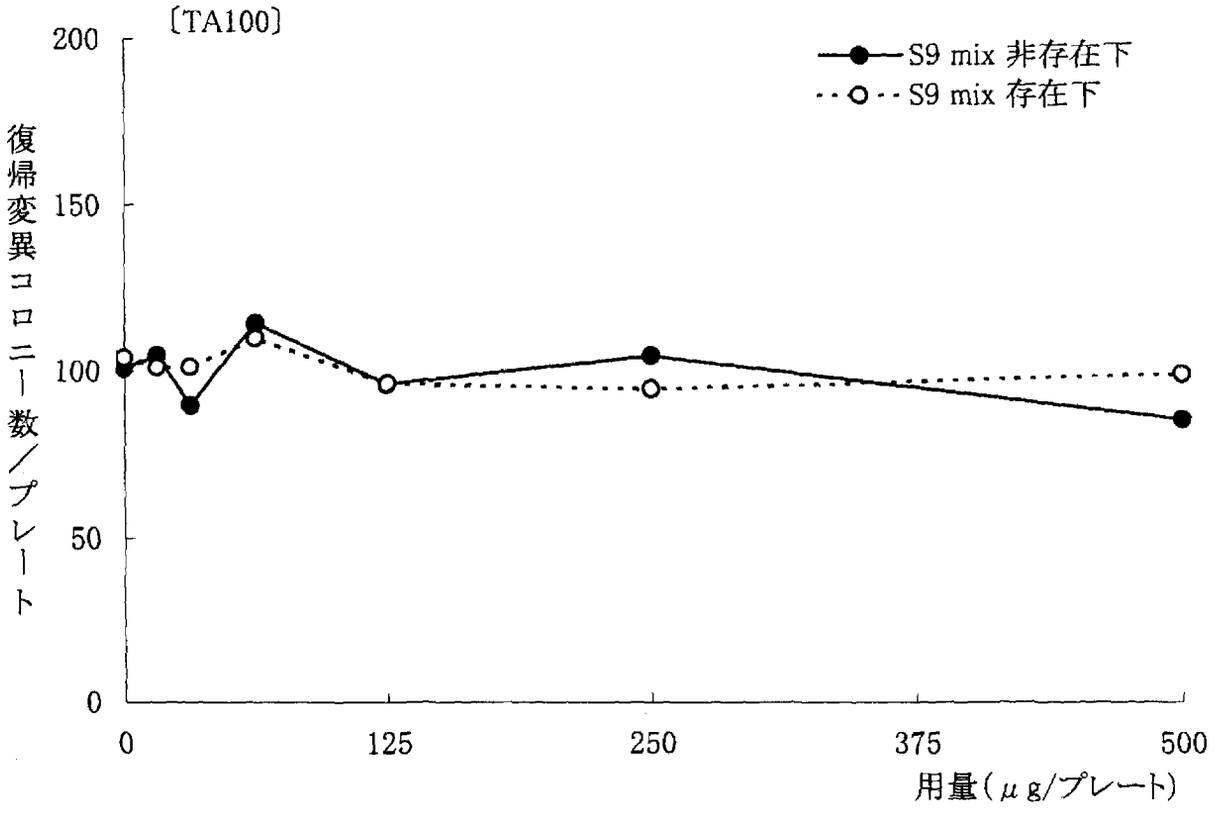
用量 〔μg/プレート〕	復帰変異コロニー数／プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
陰性対照 〔ジメチルスルホキシド〕	98	11	28	32	9
	92	9	19	31	10
	95	14	23	19	14
	(95 ± 3)	(11 ± 3)	(23 ± 5)	(27 ± 7)	(11 ± 3)
15.6	87	6	24	29	16
	91	14	20	23	12
	95	16	25	19	17
	(91 ± 4)	(12 ± 5)	(23 ± 3)	(24 ± 5)	(15 ± 3)
31.3	100	14	21	16	16
	79	12	22	24	8
	94	6	14	23	11
	(91 ± 11)	(11 ± 4)	(19 ± 4)	(21 ± 4)	(12 ± 4)
62.5	107	12	19	16	15
	86	10	16	35	12
	128	15	24	40	13
	(107 ± 21)	(12 ± 3)	(20 ± 4)	(30 ± 13)	(13 ± 2)
125	119	10	12	37	15
	103	18	12	34	12
	104	14	26	27	12
	(109 ± 9)	(14 ± 4)	(17 ± 8)	(33 ± 5)	(13 ± 2)
250	98	17	34	32	13
	96	11	18	39	15
	106	10	21	30	16
	(100 ± 5)	(13 ± 4)	(24 ± 9)	(34 ± 5)	(15 ± 2)
500	71 *	13 *	16 *	14 *	8 *
	95 *	9 *	15 *	24 *	13 *
	100 *	1 *	10 *	26 *	6 *
	(89 ± 16)	(8 ± 6)	(14 ± 3)	(21 ± 6)	(9 ± 4)
陽性対照	AF－2	SA	AF－2	AF－2	9－AA
μg/プレート	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復帰変異コロニー数／プレート	739	330	938	441	424
	762	341	905	416	450
	780	327	812	404	327
	(760 ± 21)	(333 ± 7)	(885 ± 65)	(420 ± 19)	(400 ± 65)

( ): 平均値±標準偏差
* : 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 存在下における四臭化エタ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 〔μg/プレート〕	復帰変異コロニー数／プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
陰性対照 〔ジメチルスルホキシド〕	105 116 100 (107 ± 8)	16 15 15 (15 ± 1)	21 33 22 (25 ± 7)	34 36 34 (35 ± 1)	19 10 12 (14 ± 5)
15.6	95 89 105 (96 ± 8)	17 11 16 (15 ± 3)	-- -- -- --	32 26 36 (31 ± 5)	20 7 10 (12 ± 7)
31.3	115 86 101 (101 ± 15)	13 7 18 (13 ± 6)	26 22 20 (23 ± 3)	24 28 25 (26 ± 2)	13 13 13 (13 ± 0)
62.5	102 104 103 (103 ± 1)	10 10 11 (10 ± 1)	24 33 27 (28 ± 5)	22 33 24 (26 ± 6)	12 18 12 (14 ± 3)
125	105 106 95 (102 ± 6)	14 13 14 (14 ± 1)	20 19 31 (23 ± 7)	34 15 27 (25 ± 10)	11 10 14 (12 ± 2)
250	101 96 82 (93 ± 10)	7 9 7 (8 ± 1)	30 24 32 (29 ± 4)	22 30 23 (25 ± 4)	14 12 8 (11 ± 3)
500	84 * 96 * 102 * (94 ± 9)	16 * 9 * 7 * (11 ± 5)	20 27 28 (25 ± 4)	26 * 23 * 24 * (24 ± 2)	13 * 13 * 18 * (15 ± 3)
1000	-- -- -- --	-- -- -- --	14 * 19 * 8 * (14 ± 6)	-- -- -- --	-- -- -- --
陽性対照	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
μg/プレート	1	2	10	1	2
復帰変異コロニー数／プレート	339 332 334 (335 ± 4)	127 131 138 (132 ± 6)	446 428 431 (435 ± 10)	210 175 205 (197 ± 19)	66 87 64 (72 ± 13)

( ): 平均値±標準偏差
* : 菌の生育阻害が認められた。
-- : 試験せず
2-AA: 2-アミノアントラセン



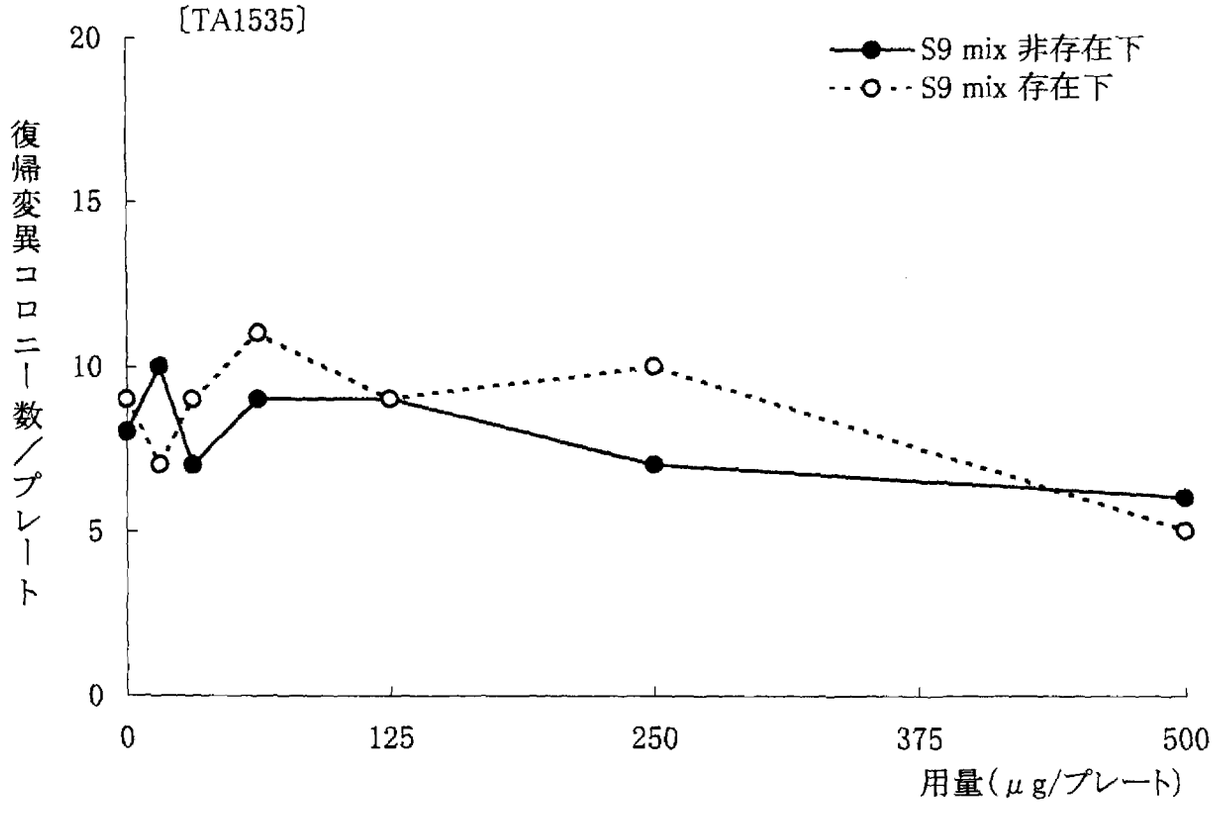
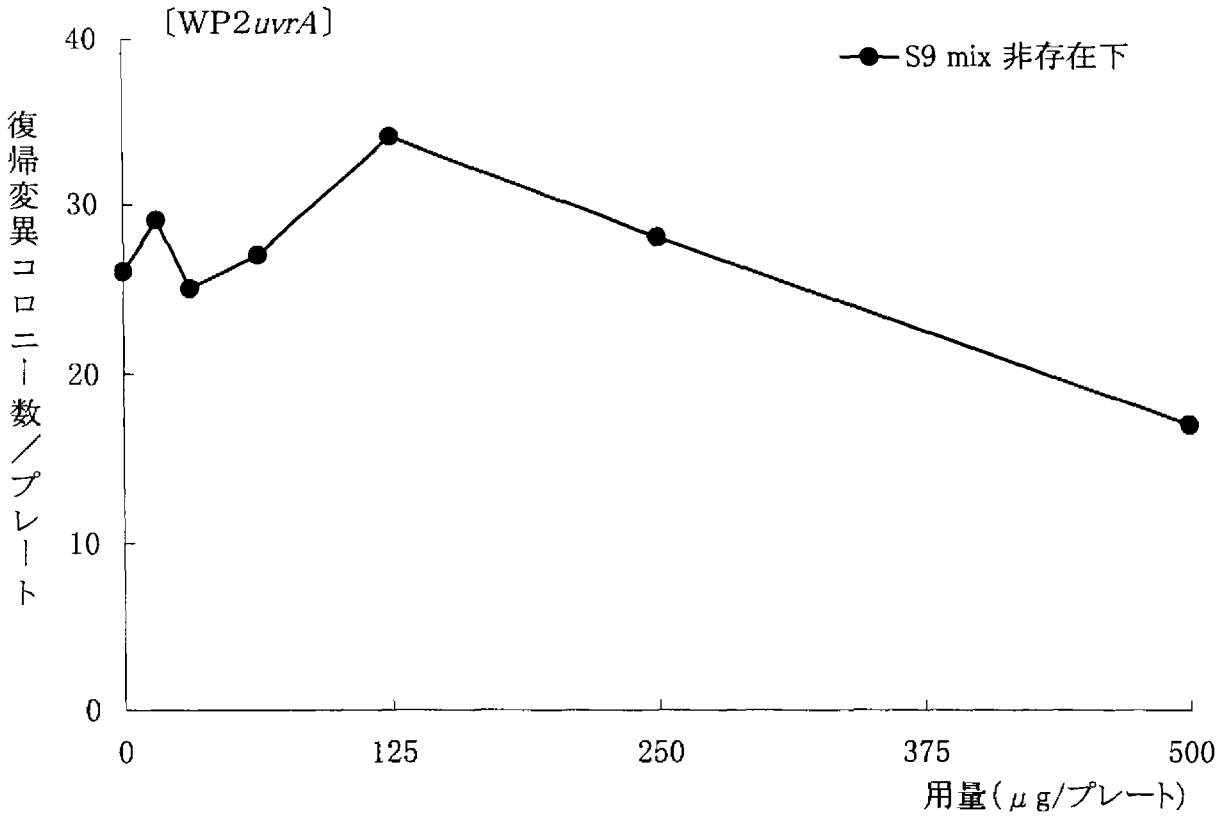


図 1-1　　四臭化エタンの復帰突然変異試験結果－本試験1回目



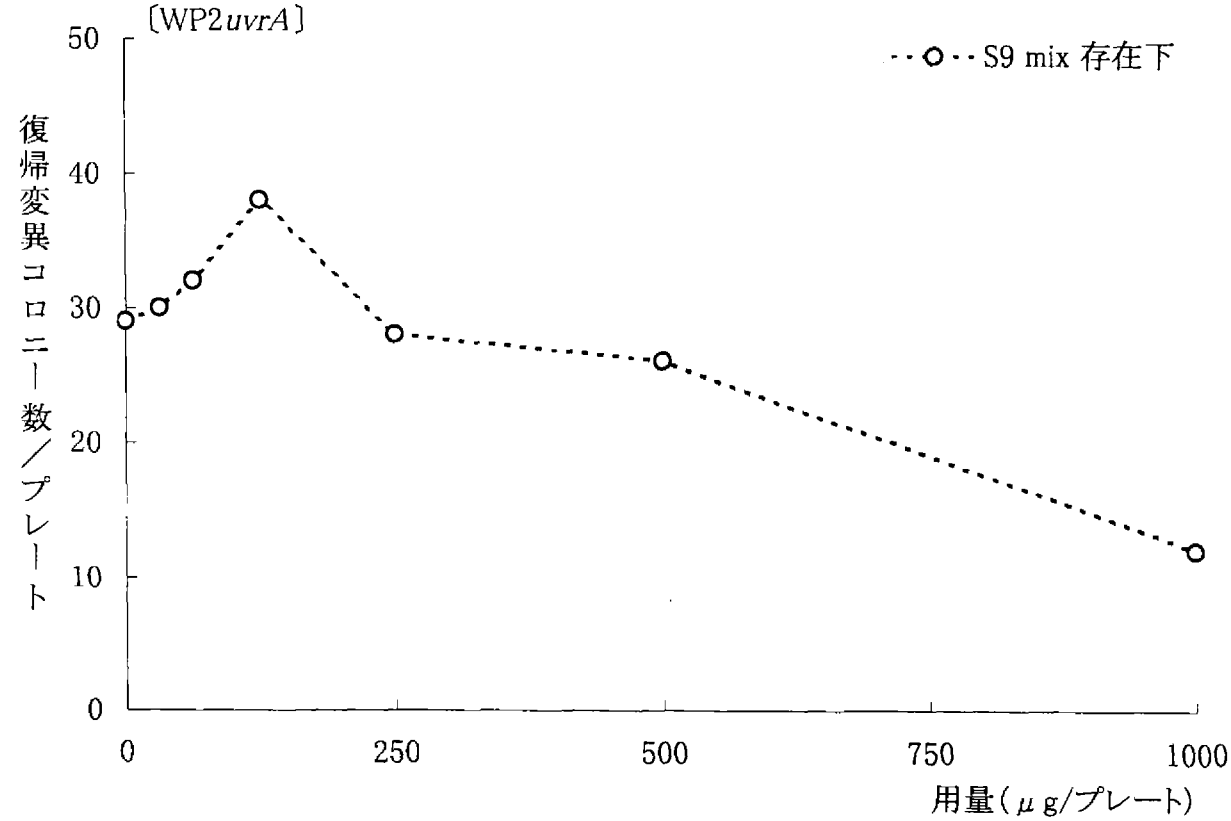
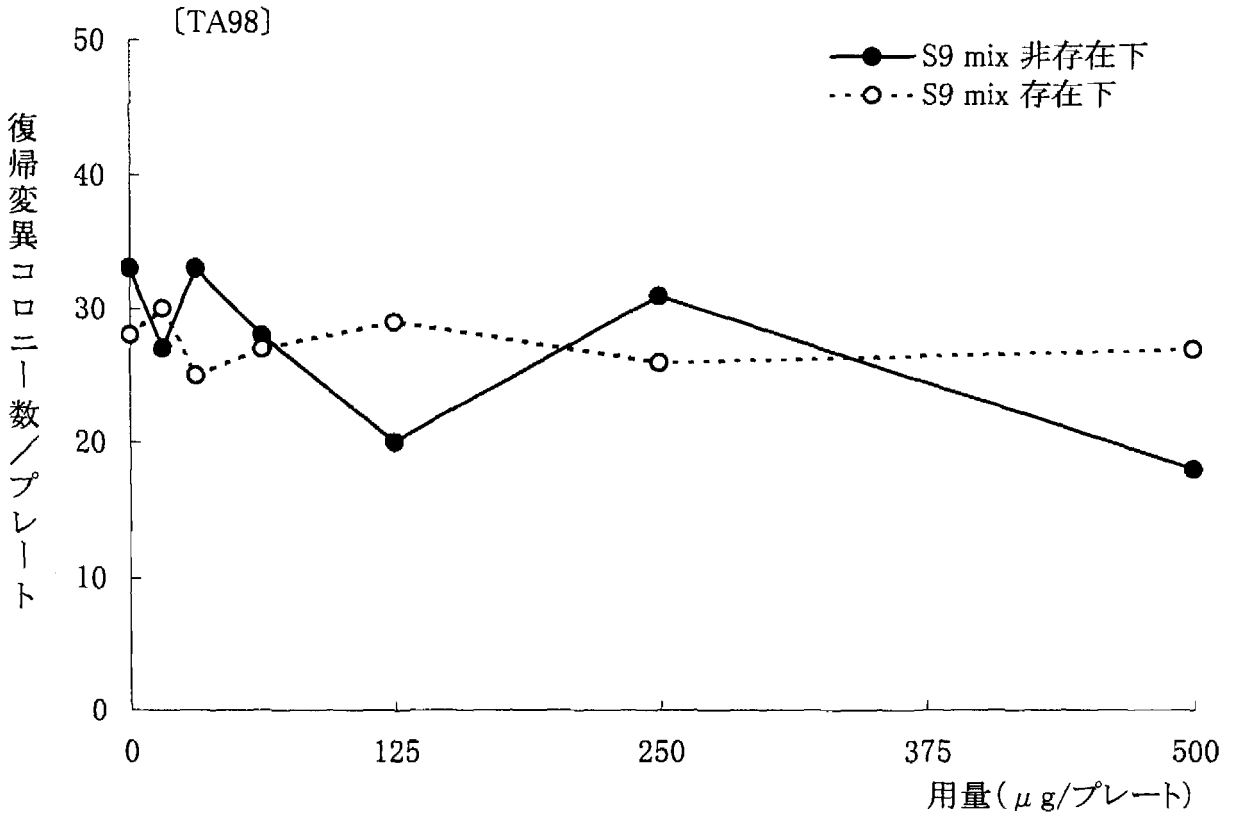


図 1-2　　四臭化エタンの復帰突然変異試験結果－本試験1回目



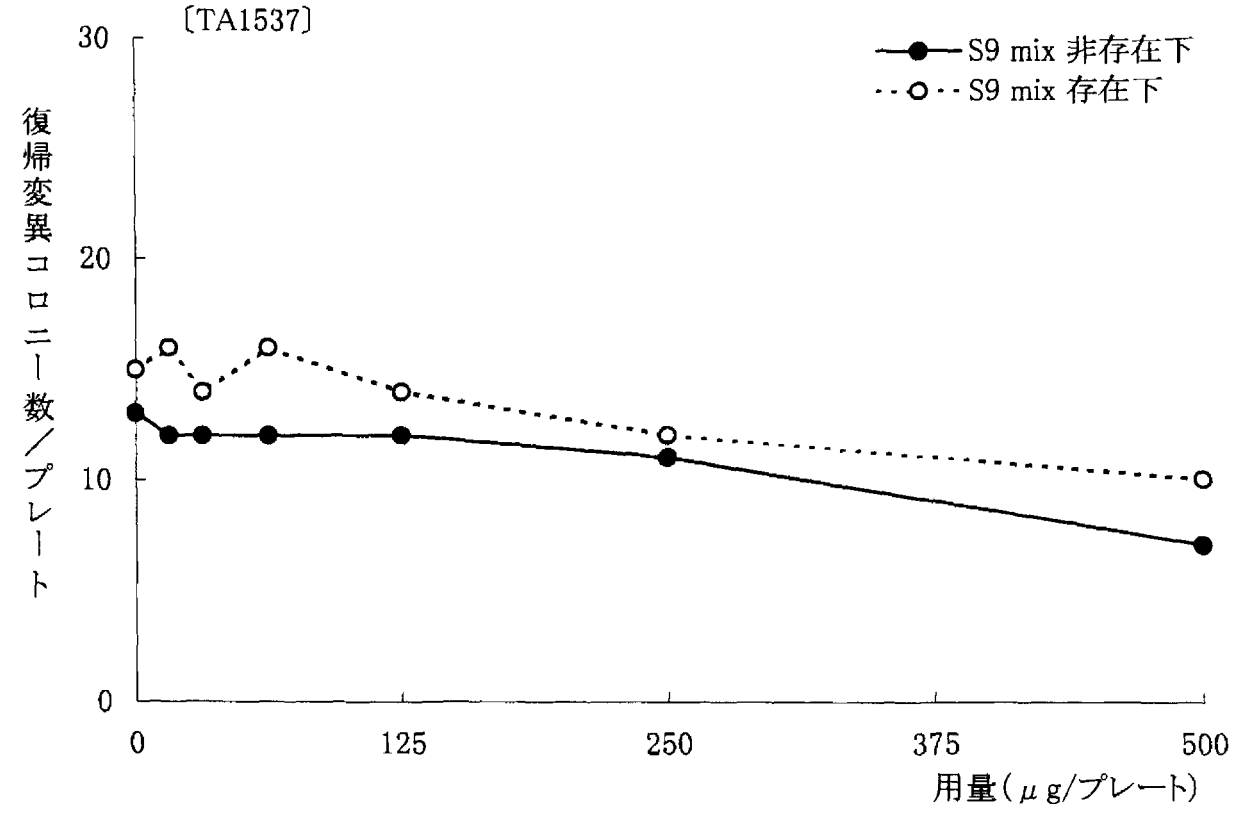
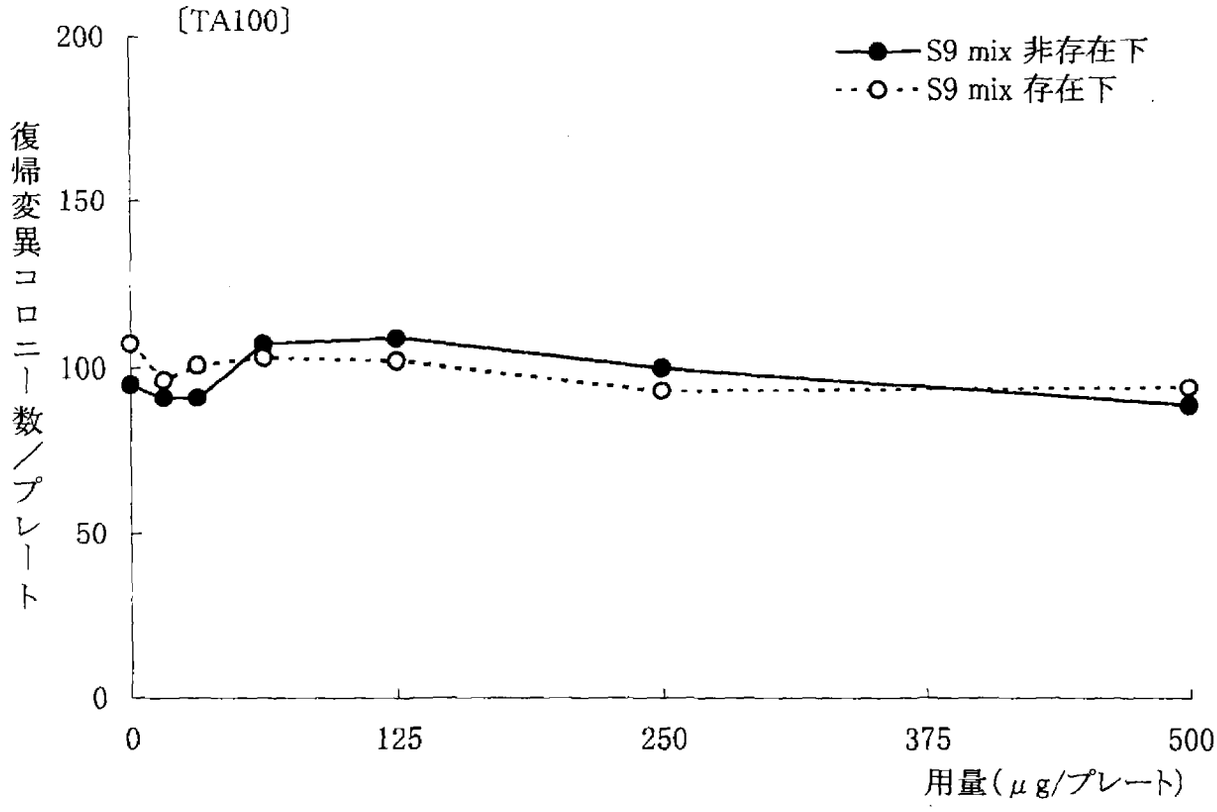


図 1-3　　四臭化エタンの復帰突然変異試験結果－本試験1回目



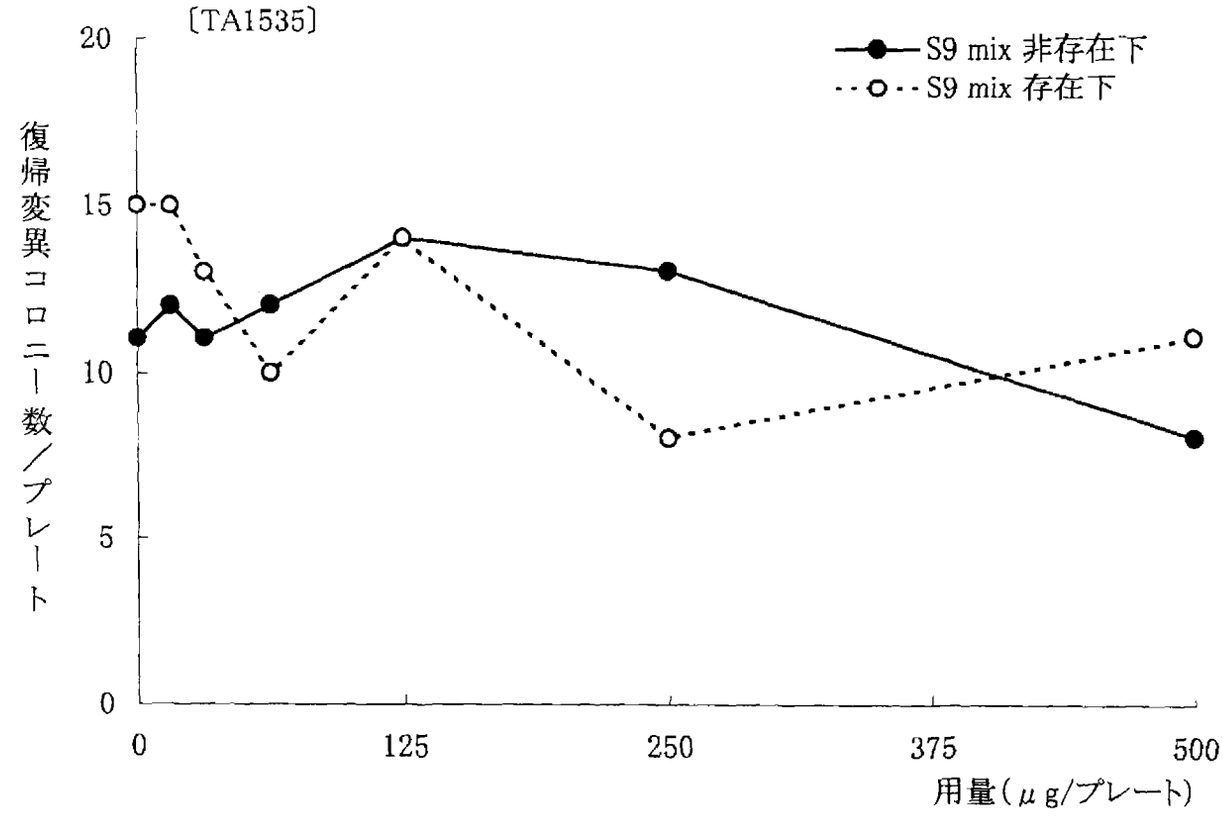
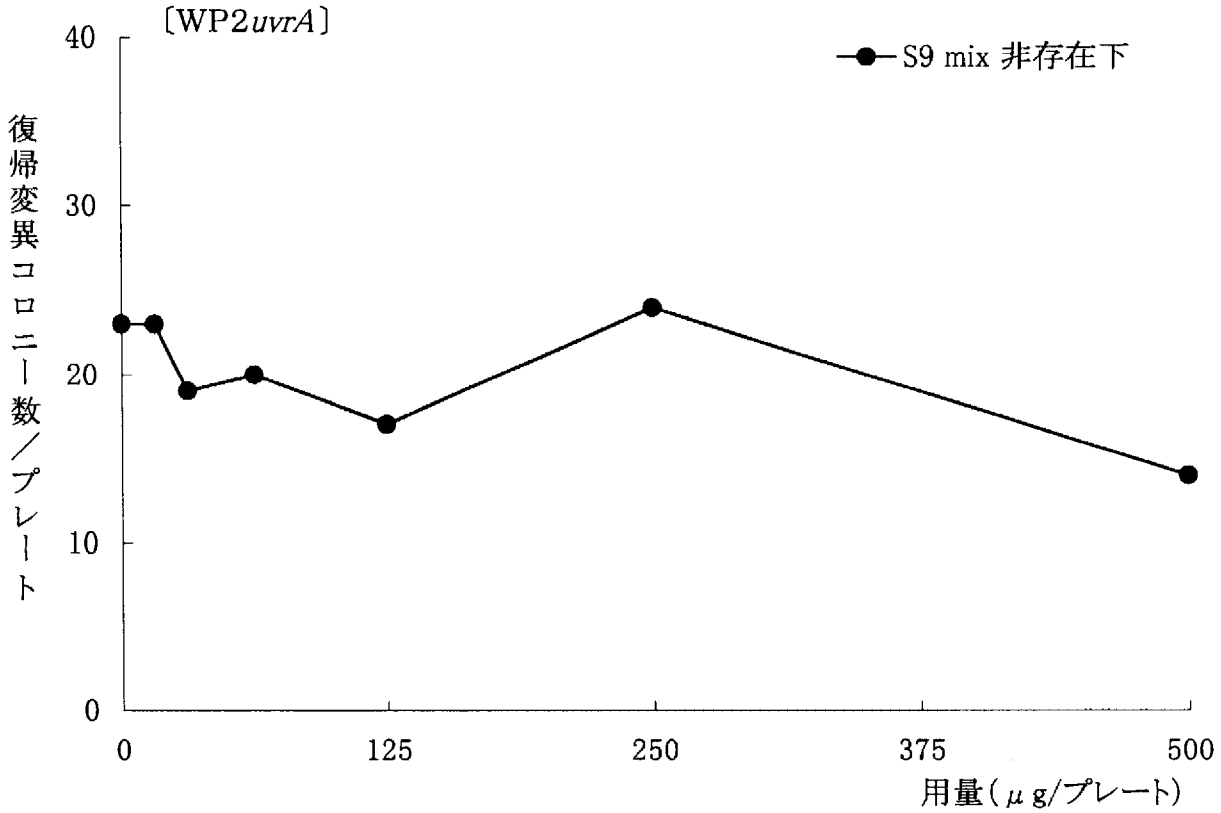


図 2-1　　四臭化エタンの復帰突然変異試験結果－本試験2回目



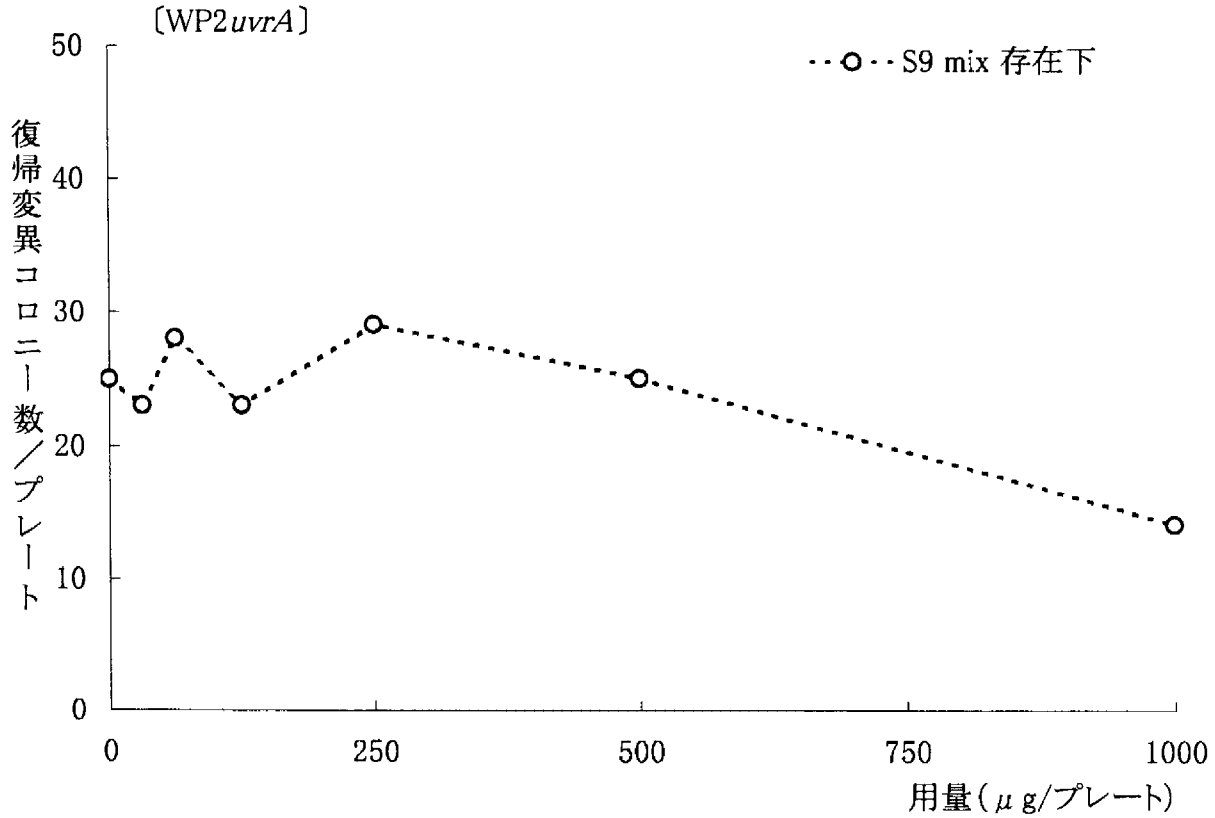
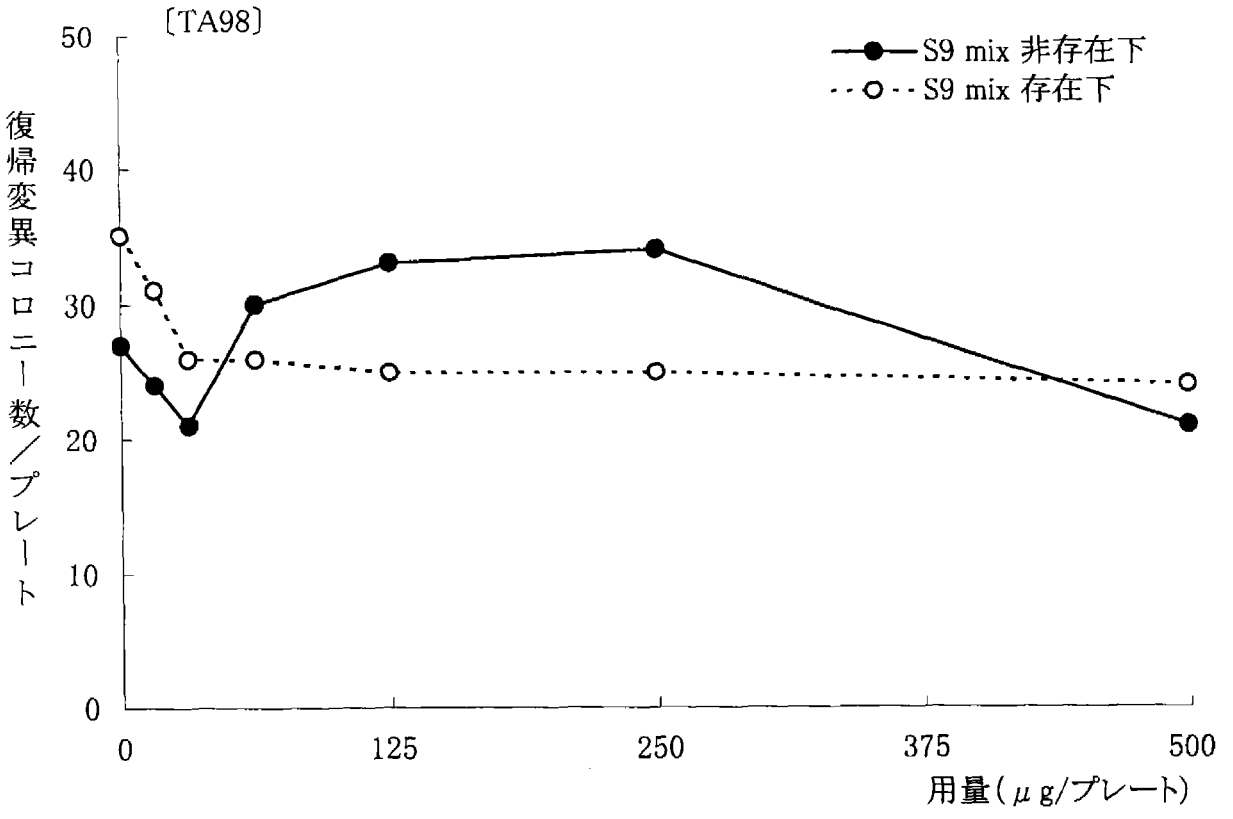


図 2-2　　四臭化エタンの復帰突然変異試験結果－本試験2回目



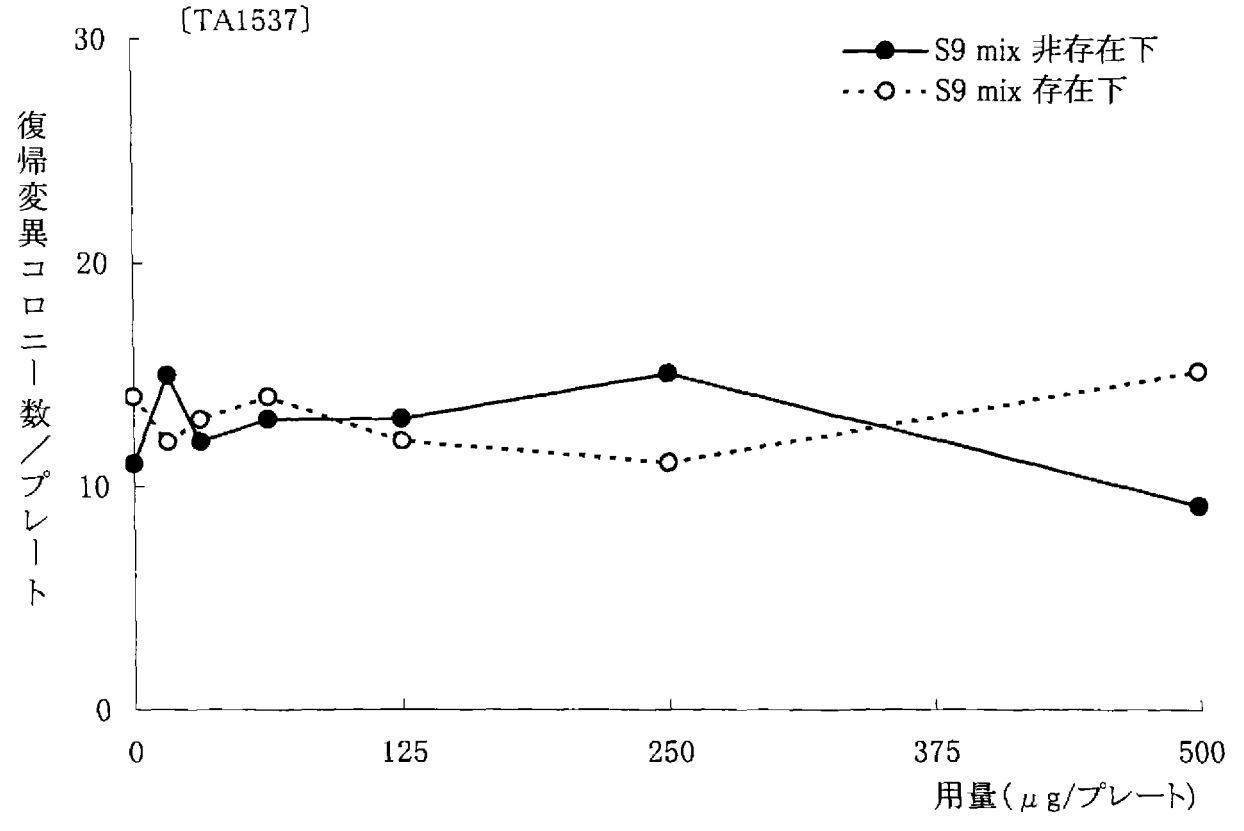


図 2-3　　四臭化エタンの復帰突然変異試験結果-本試験2回目