

# 最終報告書

2-ニトロ-p-アニシジンの細菌を用いる復帰突然変異試験

T-0130

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

	頁
目 次 .....	1
試験実施概要 .....	3
試験従事者一覧 .....	5
要 約 .....	6
被験物質及び被験液の調製 .....	7
1. 被験物質及び溶媒 .....	7
(1) 被験物質 .....	7
(2) 溶媒 .....	7
(3) 溶媒の選択理由 .....	7
2. 被験液の調製方法 .....	8
(1) 予備試験用被験液の調製 .....	8
(2) 本試験 1 回目用被験液の調製 .....	8
(3) 本試験 2 回目用被験液の調製 .....	8
(4) 被験液の保存条件 .....	8
試験材料及び試験方法 .....	8
1. 試験菌株 .....	8
(1) 菌株の種類 .....	8
(2) 菌株の選択理由 .....	9
(3) 菌株の保存及び解凍 .....	9
(4) 菌株の特性検査 .....	9
2. 対照物質 .....	9
(1) 陰性対照物質 .....	9
(2) 陽性対照物質 .....	9
(3) 調製方法 .....	10
3. 試薬 .....	10
(1) S9Mix の調製方法 .....	10
(2) 最少グルコース寒天平板培地 .....	11
(3) ニュートリエントプロス No.2 培養液 .....	11
(4) 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) .....	11
(5) トップアガー .....	12
4. 試験方法 .....	13
(1) 識別方法 .....	13
(2) 前培養 .....	13
(3) 本試験用量の設定 .....	13
(4) プレート数 .....	14
(5) 試験操作 (プレインキュベーション法) .....	14
5. 判定基準 .....	14

試験結果及び考察 .....	15
1. 試験結果 .....	15
(1) 培養終了後の観察結果 .....	15
(2) 復帰変異コロニー数 .....	15
(3) 試験系の成立条件 .....	15
2. 考察 .....	15
参考文献 .....	15

#### Tables

- ・別表 1 試験結果表(予備試験)
- ・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)
- ・別表 6 予備試験における比活性値
- ・別表 7 本試験 1 回目における比活性値
- ・別表 8 本試験 2 回目における比活性値

#### 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(WP2 *uvrA* : -S9Mix)
- ・図 6 用量反応曲線(WP2 *uvrA* : +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)
- ・図 10 用量反応曲線(TA1537 : +S9Mix)

## 試験実施概要

### 1. 試験計画書

試験番号 : T-0130

試験表題 : 2-ニトロ-p-アニシジンの細菌を用いる復帰突然変異試験

### 2. 試験目的 : 細菌を用いて、2-ニトロ-p-アニシジンの復帰突然変異誘発能の有無を明らかにすることを目的とした。

### 3. 遵守した基準及び準拠したガイドライン

#### 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」  
(平成 15 年 11 月 21 日 : 薬食発第 1121003 号、平成 15・11・17 製局第 3 号、環  
保企発第 031121004 号、平成 17 年 4 月 1 日最終改正)
- ・「OECD Principles of Good Laboratory Practice」  
(OECD : 1997 年 11 月 26 日)

#### 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」  
(平成 15 年 11 月 21 日 : 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、環保企発第 031121002 号環境省総  
合環境政策局長通知、平成 17 年 4 月 1 日最終改正)
- ・「OECD Guidelines for Testing of Chemicals 471」  
(OECD : 1997 年 7 月 21 日)

### 4. 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

### 5. 試験受託者 : 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

### 6. 試験実施施設 : 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

## 要 約

2-ニトロ-p-アニシジンの遺伝子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* と略した) TA100、TA1535、TA98、TA1537 及び大腸菌 *Escherichia coli* (以下、*E. coli* と略した) 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、1.22~5000 µg/plate の範囲の被験物質処理用量で予備試験を実施した。その結果より本試験は、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1537、*E. coli* WP2 *uvrA* については 313~5000 µg/plate の範囲の 5 用量、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98 については 156~5000 µg/plate の範囲の 6 用量、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1535 及び代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA1537、*E. coli* WP2 *uvrA* については 39.1~1250 µg/plate の範囲の 6 用量、代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA98 については 0.61~78.1 µg/plate の範囲の 8 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。また、本被験物質による着色は、代謝活性化の有無にかかわらず 39.1 µg/plate 以上で認められた。

### 2. 生育阻害

代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA1535 の 1250 µg/plate 以上で認められた。

### 3. 復帰変異コロニー数

代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98、TA1537 及び代謝活性化した場合のすべての菌株において、陰性対照の 2 倍以上となる用量依存的な復帰変異コロニー数が認められた。また、陰性対照の 2 倍以上となる増加を示した菌株の各用量について比活性値を計算した結果、最大で約 97500 Rev/mg となり、非常に強い変異原性を示した。

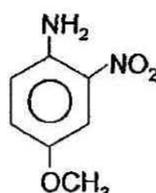
以上の試験結果より、本試験条件下において、2-ニトロ-p-アニシジンは、細菌に対する遺伝子突然変異誘発能を有する (陽性) と判定した。

## 被験物質及び被験液の調製

## 1. 被験物質及び溶媒

## (1) 被験物質

名 称	2-ニトロ・p-アニシジン
CAS 番号	96-96-8
ロット番号	
構造式	



純 度	99.91%
不純物の名称及び濃度	情報提供なし
分 子 量	168.15
融 点	123.8～125.0℃
沸 点	情報提供なし
蒸 気 圧	情報提供なし
分配係数	情報提供なし
常温における性状	橙色粉末
安 定 性	試験終了後の被験物質を東京化成工業株式会社分析センターで確認した結果、純度 99.9%が確認され、成分に変化がないことが確認された。
溶 解 性	情報提供なし
溶媒中での安定性	情報提供なし
保 存 方 法	室温
保 存 温 度	保存期間(2007.11.14～2007.12.22)中の実測温度：14～28℃
保 存 場 所	東京研究所 被験物質調製保存室
廃 棄 方 法	試験終了後の残量は焼却後、廃棄した。

## (2) 溶媒

名 称	DMSO
製 造 元	和光純薬工業株式会社
ロット番号	WKK3098
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

## (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 の 50mg/mL では溶解し、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。

## 2. 被験液の調製方法

### (1) 予備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 207.0 mg 秤取し、これに 4.140 mL の DMSO を添加して溶解し、最高調製濃度の 50 mg/mL の被験液を調製した。次いで、50 mg/mL の被験液を公比 4 で順次 6 段階希釈し、12.5、3.13、0.781、0.195、0.0488 及び 0.0122 mg/mL の計 7 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。

### (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 293.6 mg 秤取し、これに 5.872 mL の DMSO を添加して溶解し、最高調製濃度の 50 mg/mL の被験液を調製した。次いで、50 mg/mL の被験液を公比 2 で順次 13 段階希釈し、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.781、0.391、0.195、0.0977、0.0488、0.0244、0.0122 及び 0.0061 mg/mL の計 14 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。

### (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 272.7 mg 秤取し、これに 5.454 mL の DMSO を添加して溶解し、最高調製濃度の 50 mg/mL の被験液を調製した。次いで、50 mg/mL の被験液を公比 2 で順次 13 段階希釈し、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.781、0.391、0.195、0.0977、0.0488、0.0244、0.0122 及び 0.0061 mg/mL の計 14 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。

### (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。

## 試験材料及び試験方法

### 1. 試験菌株

#### (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。

## (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。

## (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 WKP5050) 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 2007 年 8 月 31 日~2007 年 12 月 21 日:  $-81\sim-71^{\circ}\text{C}$ )。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	2007 年 8 月 31 日
<i>S. typhimurium</i> TA100	2007 年 9 月 4 日
<i>S. typhimurium</i> TA1535	2007 年 10 月 11 日
<i>S. typhimurium</i> TA1537	2007 年 10 月 11 日
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	2007 年 10 月 11 日

## (4) 菌株の特性検査

(3) の凍結保存菌株を調製した際に、培養した菌培養液の残液を用いて、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	2007 年 8 月 31 日~2007 年 9 月 3 日
<i>S. typhimurium</i> TA100	2007 年 9 月 4 日~2007 年 9 月 6 日
<i>S. typhimurium</i> TA1535	2007 年 10 月 18 日~2007 年 10 月 22 日
<i>S. typhimurium</i> TA1537	2007 年 10 月 18 日~2007 年 10 月 22 日
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	2007 年 10 月 18 日~2007 年 10 月 22 日

## 2. 対照物質

## (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。

## (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)-aminopropylaminolacridine-2HCl (ICR-191)	534652	/	室温、遮光
2-Aminoanthracene (2AA)	KLH1059	96.6%	室温、遮光
Benzo[a]pyrene (B[a]P)	KLG2702	101.0%	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.

### (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 WKP5050) 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 K7C76) に溶解し、1.0 mL ずつ小分けして -20℃ 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。

## 3. 試薬

### (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 : Lot No. 616213) 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	オリエンタル酵母工業株式会社
ロット番号	07100507
製造日	2007年10月5日
購入日	2007年11月28日
種・系統	ラット・SD系
週齢・性	7週齢・雄
体重	205.4±9.1g
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	2007年11月28日~2007年12月22日 : -81~-71℃

- 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      | 999702  |
| 製 造 日      | 2007年7月17日  |
| 購 入 日      | 2007年11月27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 | 2007年11月27日~2007年12月22日: 1~8℃                       |

## 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

## (2) 最少グルコース寒天平板培地

- 1) 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   | DZL8AU01      |
| 製 造 日   | 2007年10月30日   |
| 購 入 日   | 2007年12月4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	994025-02

## (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℃、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

## (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℃、20 分)を行った。調製後は使用時まで冷蔵で保存した。

- |        |   |
|--------|---|
| 1) 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   |
| 保存方法   | 室温保存  |
| 保存場所   | 東京研究所 微生物試験室  |
| 2) 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  |

## (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, 0.6 wt% 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 株では 0.5 mmol/L の *D*-ビオチン及び 0.5 mmol/L の *L*-ヒスチジン溶液を、*E. coli* 株では 0.5 mmol/L の *L*-トリプトファン溶液をそれぞれ 1/10 容量となるように加え、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) 名 称 | Bacto Agar                    |
| 製造元    | Becton, Dickinson and Company |
| ロット番号  | 7060972                       |
| 保存方法   | 室温保存                          |
| 保存場所   | 東京研究所 微生物試験室                  |
| 2) 名 称 | NaCl                          |
| 製造元    | 和光純薬工業株式会社                    |
| ロット番号  | TSK1093                       |
| 保存方法   | 室温保存                          |
| 保存場所   | 東京研究所 微生物試験室                  |
| 3) 名 称 | <i>D</i> -ビオチン                |
| 製造元    | MP Biomedicals, Inc.          |
| ロット番号  | 3558H                         |
| 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) 名 称 | <i>L</i> -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) 名 称 | <i>L</i> -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                  |

## 4. 試験方法

## (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
<i>S. typhimurium</i> TA98	赤
<i>S. typhimurium</i> 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。

## (2) 前培養

- 1) ニュートリエントブロス 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℃ の水浴中に放置 (6 時間 30 分) した後、37℃ 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)		
	予備試験	本試験 1 回目	本試験 2 回目
<i>S. typhimurium</i> TA100	$5.54 \times 10^9$	$5.03 \times 10^9$	$5.67 \times 10^9$
<i>S. typhimurium</i> TA1535	$5.16 \times 10^9$	$4.96 \times 10^9$	$5.25 \times 10^9$
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	$8.17 \times 10^9$	$8.17 \times 10^9$	$8.16 \times 10^9$
<i>S. typhimurium</i> TA98	$6.08 \times 10^9$	$5.51 \times 10^9$	$6.17 \times 10^9$
<i>S. typhimurium</i> TA1537	$3.30 \times 10^9$	$3.18 \times 10^9$	$3.36 \times 10^9$

## (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 6 段階希釈した計 7 用量 (1.22, 4.88, 19.5, 78.1, 313, 1250, 5000  $\mu$ g/plate) を用い、予備試験を実施した。なお、予備試験の結果を別表 1 に示した。

予備試験の結果、本被験物質処理による生育阻害は、代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA1535 の 1250  $\mu$ g/plate 以上で認められた。なお、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98、TA1537 及び代謝活性化した場合のすべての菌株において、陰性対照の 2 倍以上となる用量依存的な復帰変異コロニー数が認められた。また、本被験物質によるプレート上の沈殿は、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。また、本被験物質による着色は、代謝活性化の有無にかかわらず 78.1

µg/plate 以上で認められた。

このため本試験の試験用量は、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1537、*E. coli* WP2 *uvrA* については 5000 µg/plate を最高用量として、以下公比 2 で 4 段階希釈した計 5 用量を設定した。また、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98 については 5000 µg/plate、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1535 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、代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA1537、*E. coli* WP2 *uvrA* については 1250 µg/plate を最高用量として以下公比 2 で 5 段階希釈した計 6 用量、代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA98 については 78.1 µg/plate を最高用量として以下公比 2 で 7 段階希釈した計 8 用量を設定し、変異原性の確認できる用量とした。

#### (4) プレート数

被験物質処理群、陰性対照及び陽性対照処理群について、予備試験ではそれぞれ 2 枚、2 回の本試験ではそれぞれ 3 枚のプレートを用いた。

#### (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プアガーを 2.0 mL 加え攪拌後、最少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、これにトップアガーを 2.0 mL 加えた後に最少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) 最少グルコース寒天平板培地に重層したトップアガーが固化したことを確認し、最少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 で予備試験では 49.5 時間、本試験 1 回目では 48 時間、本試験 2 回目では 48 時間培養した。
- 5) 培養後、寒天培地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 39.1 µg/plate 以上で着色が認められたが、機器計測に影響がなかったため、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。

### 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、用量設定試験との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、判定に際して統計学的手法は用いなかった。

## 試験結果及び考察

### 1. 試験結果

試験の結果を別表 1～8 及び図 1～10 に示した。なお、図は別表 2、3 より作成した。

#### (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。また、本被験物質による着色は、代謝活性化の有無にかかわらず 39.1 µg/plate 以上で認められた。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、代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA1535 の 1250 µg/plate 以上で菌の生育阻害が認められた。

#### (2) 復帰変異コロニー数

代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98、TA1537 及び代謝活性化した場合のすべての菌株において、陰性対照の 2 倍以上となる用量依存的な復帰変異コロニー数が認められた。

#### (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を示し、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）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。

### 2. 考察

2 回の本試験ともに、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98、TA1537 及び代謝活性化した場合のすべての菌株において、陰性対照の 2 倍以上となる用量依存的な復帰変異コロニー数が認められた。また、陰性対照の 2 倍以上となる増加を示した菌株の各用量について比活性値を計算した結果、最大で約 97500 Rev/mg となり、非常に強い変異原性を示した。なお、類似化合物である p-アニシジンについては、変異原性が陽性となる結果(神奈川県環境科学センター、ACGHI 7th, 2001、NTP DB, 2006)、変異原性が陰性となる結果(NTP DB, 2006、IARC 27, 1982、産衛学会勧告, 1996)を示していることから、強い変異原性とは考えられないため、側鎖として結合したニトロ基によって変異原性が強められたと考えられる。

以上の試験結果より、本試験条件下において、2-ニトロ-p-アニシジンは、細菌に対する遺伝子突然変異誘発能を有する（陽性）と判定した。

## 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<sup>+</sup> 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(予備試験)

被験物質の名称:2-ニトロ-p-アニシジン

No. T-0130

試験実施期間		2007年12月10日 より 2007年12月13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)	105 103 ( 104 )	5 11 ( 8 )	15 16 ( 16 )	14 15 ( 15 )	7 10 ( 9 )
	1.22	94 100 ( 97 )	11 13 ( 12 )	19 30 ( 25 )	12 16 ( 14 )	5 5 ( 5 )
	4.88	98 98 ( 98 )	14 14 ( 14 )	14 32 ( 23 )	7 20 ( 14 )	5 10 ( 8 )
	19.5	103 114 ( 109 )	4 11 ( 8 )	23 16 ( 20 )	11 7 ( 9 )	7 7 ( 7 )
	78.1	106 94 ( 100 )	5 10 ( 8 )	28 22 ( 25 )	19 10 ( 15 )	12 7 ( 10 )
	313	107 100 ( 104 )	10 11 ( 11 )	15 14 ( 15 )	50 47 ( 49 )	8 21 ( 15 )
	1250	108 103 ( 106 )	6 * 6 * ( 6 )	18 19 ( 19 )	120 128 ( 124 )	14 8 ( 11 )
	5000	74 77 ( 76 )	4 * 4 * ( 4 )	15 15 ( 15 )	204 195 ( 200 )	25 24 ( 25 )
S9Mix (+)	陰性対照(DMSO)	102 99 ( 101 )	11 16 ( 14 )	15 19 ( 17 )	33 39 ( 36 )	13 15 ( 14 )
	1.22	241 182 ( 212 )	35 22 ( 29 )	19 16 ( 18 )	59 48 ( 54 )	17 10 ( 14 )
	4.88	431 473 ( 452 )	76 70 ( 73 )	16 16 ( 16 )	76 76 ( 76 )	10 13 ( 12 )
	19.5	957 992 ( 975 )	218 150 ( 184 )	18 18 ( 18 )	151 178 ( 165 )	18 11 ( 15 )
	78.1	1762 1669 ( 1716 )	517 404 ( 461 )	36 74 ( 55 )	433 467 ( 450 )	22 20 ( 21 )
	313	2563 2619 ( 2591 )	478 476 ( 477 )	80 77 ( 79 )	833 843 ( 838 )	30 33 ( 32 )
	1250	2961 2798 ( 2880 )	290 * 254 * ( 272 )	79 89 ( 84 )	1767 1794 ( 1781 )	93 88 ( 91 )
	5000	2298 1744 ( 2021 )	56 * 49 * ( 53 )	31 24 ( 28 )	1644 1687 ( 1666 )	112 115 ( 114 )
陽性対照	S9Mixを必要とするもの	名称 AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191
	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	555 499 ( 527 )	240 253 ( 247 )	67 64 ( 66 )	403 446 ( 425 )	2197 2039 ( 2118 )
	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	1029 1002 ( 1016 )	285 306 ( 296 )	1132 1108 ( 1120 )	339 339 ( 339 )	109 92 ( 101 )	

(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-ニトロロ-アニシジン

No. T-0130

試験実施期間		2007年12月17日 より 2007年12月20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 (一)	陰性対照 (DMSO)	109 99 108 ( 105 ± 5.5 )	10 13 15 ( 13 ± 2.5 )	22 19 15 ( 19 ± 3.5 )	20 17 11 ( 16 ± 4.6 )	5 5 6 ( 5 ± 0.6 )
	39.1	NT	10 16 12 ( 13 ± 3.1 )	NT	NT	NT
	78.1	NT	12 13 10 ( 12 ± 1.5 )	NT	NT	NT
	156	NT	6 13 11 ( 10 ± 3.6 )	NT	37 31 19 ( 29 ± 9.2 )	NT
	313	97 105 105 ( 102 ± 4.6 )	10 7 15 ( 11 ± 4.0 )	10 18 7 ( 12 ± 5.7 )	54 33 53 ( 47 ± 11.8 )	10 5 6 ( 7 ± 2.6 )
	625	110 105 87 ( 101 ± 12.1 )	7 9 11 ( 9 ± 2.0 )	22 13 21 ( 19 ± 4.9 )	117 100 95 ( 104 ± 11.5 )	13 10 6 ( 10 ± 3.5 )
	1250	81 94 74 ( 83 ± 10.1 )	5 * 11 * 6 * ( 7 ± 3.2 )	11 19 11 ( 14 ± 4.6 )	146 154 139 ( 146 ± 7.5 )	7 14 8 ( 10 ± 3.8 )
	2500	77 93 90 ( 87 ± 8.5 )	NT	10 8 13 ( 10 ± 2.5 )	197 198 171 ( 189 ± 15.3 )	19 23 22 ( 21 ± 2.1 )
	5000	66 74 69 ( 70 ± 4.0 )	NT	5 8 5 ( 6 ± 1.7 )	209 163 247 ( 206 ± 42.1 )	18 31 24 ( 24 ± 6.5 )
	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 0.01 528 559 546 ( 544 ± 15.6 )	SAZ 0.5 327 333 341 ( 334 ± 7.0 )	AF-2 0.01 78 64 72 ( 71 ± 7.0 )	AF-2 0.1 387 420 354 ( 387 ± 33.0 )

(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-メキシー-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-ニトロ-p-アニシジン

No. T-0130

試験実施期間		2007年12月17日 より 2007年12月20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)	96 106 89 ( 97 ± 8.5 )	7 10 8 ( 8 ± 1.5 )	15 16 16 ( 16 ± 0.6 )	21 24 33 ( 26 ± 6.2 )	7 10 5 ( 7 ± 2.5 )		
	0.61	132 142 131 ( 135 ± 6.1 )	15 19 16 ( 17 ± 2.1 )	NT	34 38 39 ( 37 ± 2.6 )	NT		
	1.22	205 209 202 ( 205 ± 3.5 )	24 24 29 ( 26 ± 2.9 )	NT	28 32 35 ( 32 ± 3.5 )	NT		
	2.44	280 299 295 ( 291 ± 10.0 )	59 48 34 ( 47 ± 12.5 )	NT	57 50 60 ( 56 ± 5.1 )	NT		
	4.88	427 430 535 ( 464 ± 61.5 )	94 64 82 ( 80 ± 15.1 )	NT	83 64 70 ( 72 ± 9.7 )	NT		
	9.77	706 791 690 ( 729 ± 54.3 )	169 160 131 ( 153 ± 19.9 )	NT	109 137 111 ( 119 ± 15.6 )	NT		
	19.5	1032 1018 1160 ( 1070 ± 78.3 )	235 245 244 ( 241 ± 5.5 )	NT	174 188 228 ( 197 ± 28.0 )	NT		
	39.1	1399 1453 1526 ( 1459 ± 63.7 )	386 438 348 ( 391 ± 45.2 )	38 44 30 ( 37 ± 7.0 )	376 324 329 ( 343 ± 28.7 )	12 17 12 ( 14 ± 2.9 )		
	78.1	2004 1868 1921 ( 1931 ± 68.5 )	501 541 568 ( 537 ± 33.7 )	35 50 59 ( 48 ± 12.1 )	469 378 402 ( 416 ± 47.2 )	15 13 16 ( 15 ± 1.5 )		
	156	NT	NT	70 74 68 ( 71 ± 3.1 )	NT	30 12 18 ( 20 ± 9.2 )		
	313	NT	NT	97 72 102 ( 90 ± 16.1 )	NT	31 28 23 ( 27 ± 4.0 )		
	625	NT	NT	106 114 114 ( 111 ± 4.6 )	NT	57 54 47 ( 53 ± 5.1 )		
	1250	NT	NT	99 97 99 ( 98 ± 1.2 )	NT	102 107 84 ( 98 ± 12.1 )		
	陽性対照	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	802 852 833 ( 829 ± 25.2 )	354 300 324 ( 326 ± 27.1 )	1255 1311 1334 ( 1300 ± 40.6 )	293 265 277 ( 278 ± 14.0 )	126 124 116 ( 122 ± 5.3 )

(備考)

2AA : 2-アミノアントラセン

B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

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-ニトロ-p-アニシジン

No. T-0130

試験実施期間		2007年12月21日 より 2007年12月25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 (一)	陰性対照 (DMSO)	93 91 91 ( 92 ± 1.2 )	11 13 10 ( 11 ± 1.5 )	16 19 15 ( 17 ± 2.1 )	21 25 18 ( 21 ± 3.5 )	7 19 16 ( 14 ± 6.2 )
	39.1	NT	4 11 9 ( 8 ± 3.6 )	NT	NT	NT
	78.1	NT	12 13 8 ( 11 ± 2.6 )	NT	NT	NT
	156	NT	7 5 8 ( 7 ± 1.5 )	NT	39 25 24 ( 29 ± 8.4 )	NT
	313	119 94 99 ( 104 ± 13.2 )	11 9 10 ( 10 ± 1.0 )	21 12 23 ( 19 ± 5.9 )	54 59 45 ( 53 ± 7.1 )	18 10 11 ( 13 ± 4.4 )
	625	99 110 123 ( 111 ± 12.0 )	7 12 6 ( 8 ± 3.2 )	12 13 10 ( 12 ± 1.5 )	117 122 100 ( 113 ± 11.5 )	20 20 24 ( 21 ± 2.3 )
	1250	102 97 93 ( 97 ± 4.5 )	7* 6* 12* ( 8 ± 3.2 )	16 10 14 ( 13 ± 3.1 )	175 148 150 ( 158 ± 15.0 )	7 22 14 ( 14 ± 7.5 )
	2500	99 94 121 ( 105 ± 14.4 )	NT	9 7 7 ( 8 ± 1.2 )	246 203 235 ( 228 ± 22.3 )	38 38 34 ( 37 ± 2.3 )
	5000	67 50 59 ( 59 ± 8.5 )	NT	9 7 8 ( 8 ± 1.0 )	248 199 227 ( 225 ± 24.6 )	28 25 46 ( 33 ± 11.4 )
	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 555 520 459 ( 511 ± 48.6 )	348 328 309 ( 328 ± 19.5 )	62 84 84 ( 77 ± 12.7 )	497 406 425 ( 443 ± 48.0 )	2098 2083 2073 ( 2085 ± 12.6 )

(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-オキシ-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-ニトロ-p-アニジン

No. T-0130

試験実施期間		2007年12月21日 より 2007年12月25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)	109 101 93 ( 101 ± 8.0 )	18 6 11 ( 12 ± 6.0 )	11 10 19 ( 13 ± 4.9 )	27 32 42 ( 34 ± 7.6 )	19 15 21 ( 18 ± 3.1 )		
	0.61	164 161 163 ( 163 ± 1.5 )	17 10 10 ( 12 ± 4.0 )	NT	45 38 30 ( 38 ± 7.5 )	NT		
	1.22	210 245 206 ( 220 ± 21.5 )	22 30 30 ( 27 ± 4.6 )	NT	51 41 34 ( 42 ± 8.5 )	NT		
	2.44	290 290 295 ( 292 ± 2.9 )	54 47 40 ( 47 ± 7.0 )	NT	63 77 50 ( 63 ± 13.5 )	NT		
	4.88	478 456 463 ( 466 ± 11.2 )	94 87 61 ( 81 ± 17.4 )	NT	72 76 71 ( 73 ± 2.6 )	NT		
	9.77	639 732 732 ( 701 ± 53.7 )	101 117 151 ( 123 ± 25.5 )	NT	139 108 93 ( 113 ± 23.5 )	NT		
	19.5	1139 1027 1063 ( 1076 ± 57.2 )	197 232 254 ( 228 ± 28.7 )	NT	214 192 185 ( 197 ± 15.1 )	NT		
	39.1	1384 1392 1307 ( 1361 ± 46.9 )	368 347 428 ( 381 ± 42.0 )	31 36 41 ( 36 ± 5.0 )	269 315 280 ( 288 ± 24.0 )	22 22 30 ( 25 ± 4.6 )		
	78.1	1776 1586 1419 ( 1594 ± 178.6 )	511 405 511 ( 476 ± 61.2 )	71 69 44 ( 61 ± 15.0 )	487 476 422 ( 462 ± 34.8 )	34 32 33 ( 33 ± 1.0 )		
	156	NT	NT	85 113 87 ( 95 ± 15.6 )	NT	30 28 25 ( 28 ± 2.5 )		
	313	NT	NT	123 107 136 ( 122 ± 14.5 )	NT	36 35 46 ( 39 ± 6.1 )		
	625	NT	NT	107 154 128 ( 130 ± 23.5 )	NT	54 53 45 ( 51 ± 4.9 )		
	1250	NT	NT	110 115 103 ( 109 ± 6.0 )	NT	116 134 101 ( 117 ± 16.5 )		
	陽性対照	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	1042 1001 1055 ( 1033 ± 28.2 )	331 337 281 ( 316 ± 30.7 )	1003 1191 1137 ( 1110 ± 96.8 )	332 302 341 ( 325 ± 20.4 )	126 117 137 ( 127 ± 10.0 )	

(備考)

2AA :2-アミノアントラセン

B[a]P :ベンゾ[a]ピレン

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6)

予備試験における比活性値

被験物質の名称:2-ニトロ-p-アニシジン

No. T-0130

試験実施期間		2007年12月10日 より 2007年12月13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)					
	1.22					
	4.88					
	19.5					
	78.1					
	313				109	
	1250				87	
	5000				37	3
S9Mix (+)	陰性対照(DMSO)					
	1.22	90984	12295			
	4.88	71926	12090		8197	
	19.5	44821	8718		6615	
	78.1	20679	5723	487	5301	
	313	7955	1479	198	2562	58
	1250	2223	206	54	1396	62
	5000	384	8		326	20

(備考)

上記の比活性値は、陰性対照の2倍以上の復帰変異コロニー数を示したもののみ記載した。

(別表7)

## 本試験1回目における比活性値

被験物質の名称: 2-ニトロ-p-アニシジン

No. T-0130

試験実施期間		2007年12月17日 より 2007年12月20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)					
	39.1					
	78.1					
	156					
	313				99	
	625				141	8
	1250				104	4
	2500				69	6
	5000				38	2
S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)					
	0.61		14754			
	1.22	88525	14754			
	2.44	79508	15984		12295	
	4.88	75205	14754		9426	
	9.77	64688	14841		9519	
	19.5	49897	11949		8769	
	39.1	34834	9795	537	8107	179
	78.1	23483	6773	410	4994	102
	156			353		83
	313			236		64
	625			152		74
	1250			66		73

(備考)

上記の比活性値は、陰性対照の2倍以上の復帰変異コロニー数を示したもののみ記載した。

(別表8)

## 本試験2回目における比活性値

被験物質の名称:2-ニトロ-p-アニシジン

No. T-0130

試験実施期間		2007年12月21日 より 2007年12月25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)					
	39.1					
	78.1					
	156					
	313				102	
	625				147	
	1250				110	
	2500				83	9
	5000				41	4
	S9Mix (+)	陰性対照(DMSO)				
0.61						
1.22		97541	12295			
2.44		78279	14344			
4.88		74795	14139		7992	
9.77		61412	11361		8086	
19.5		50000	11077		8359	
39.1		32225	9437	588	6496	
78.1		19117	5941	615	5480	
156				526		
313				348		67
625				187		53
1250				77		79

(備考)

上記の比活性値は、陰性対照の2倍以上の復帰変異コロニー数を示したものののみ記載した。

図 1

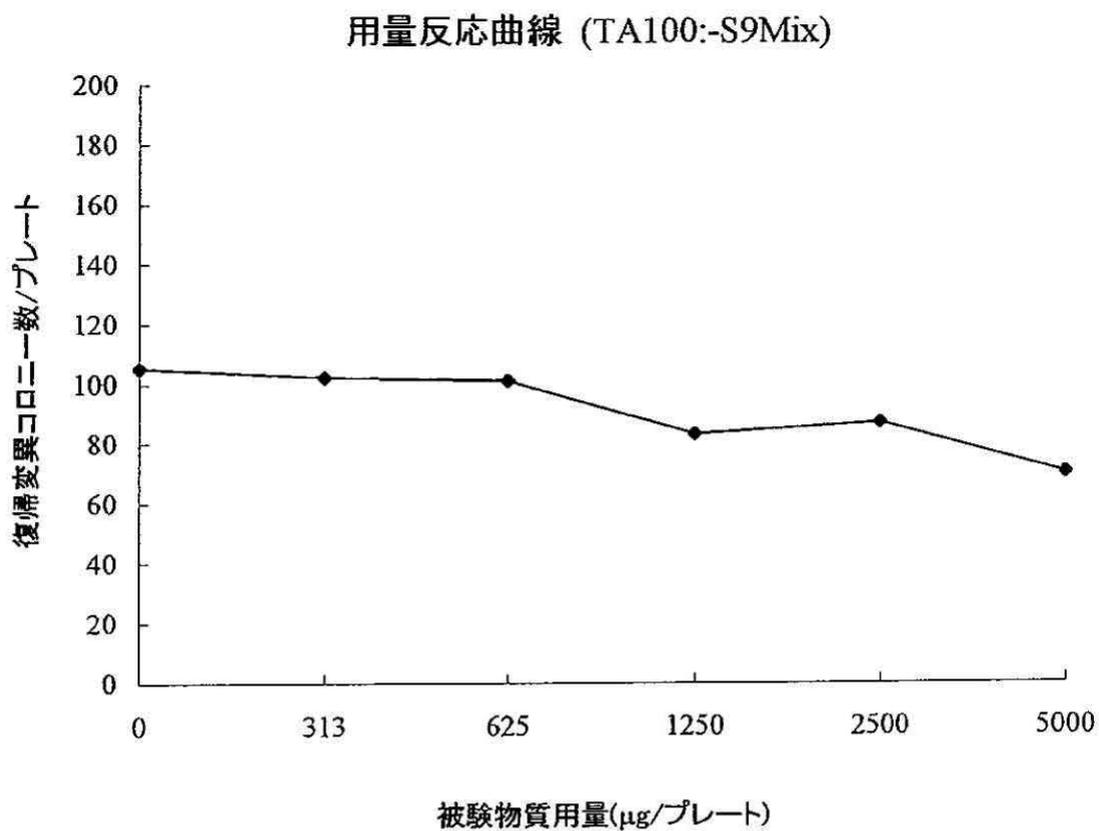


図 2

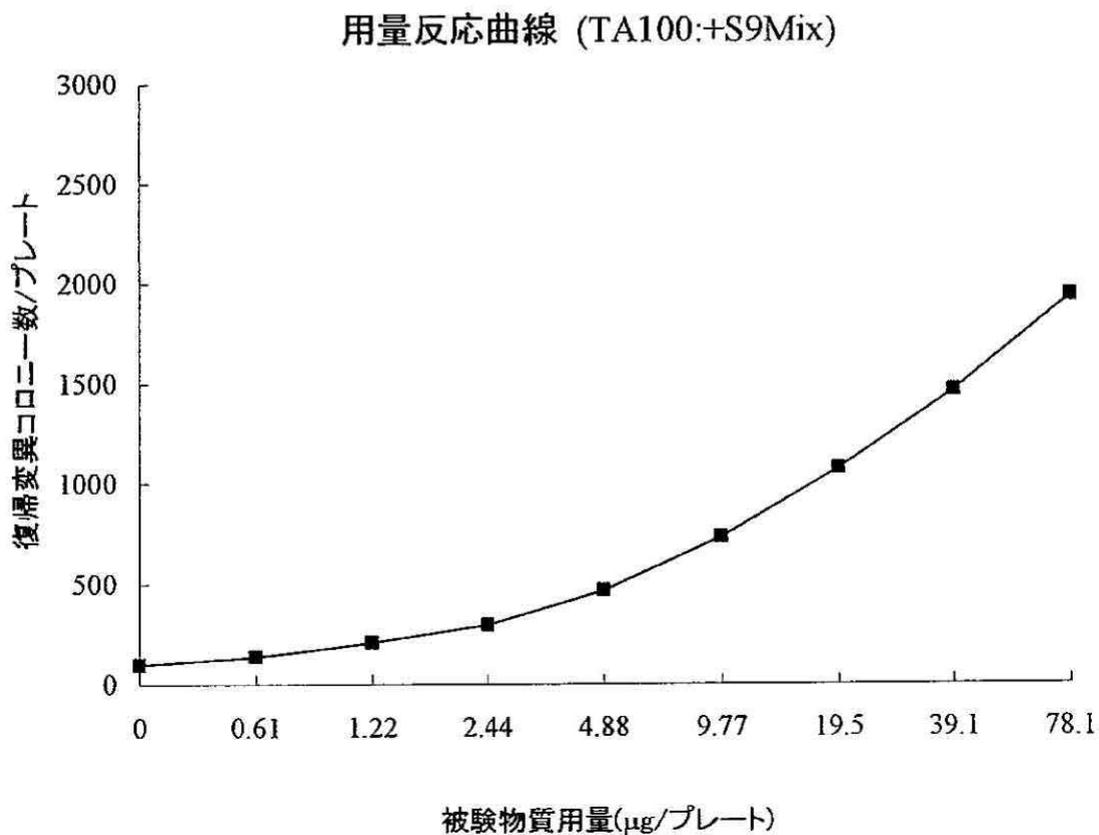


図 3

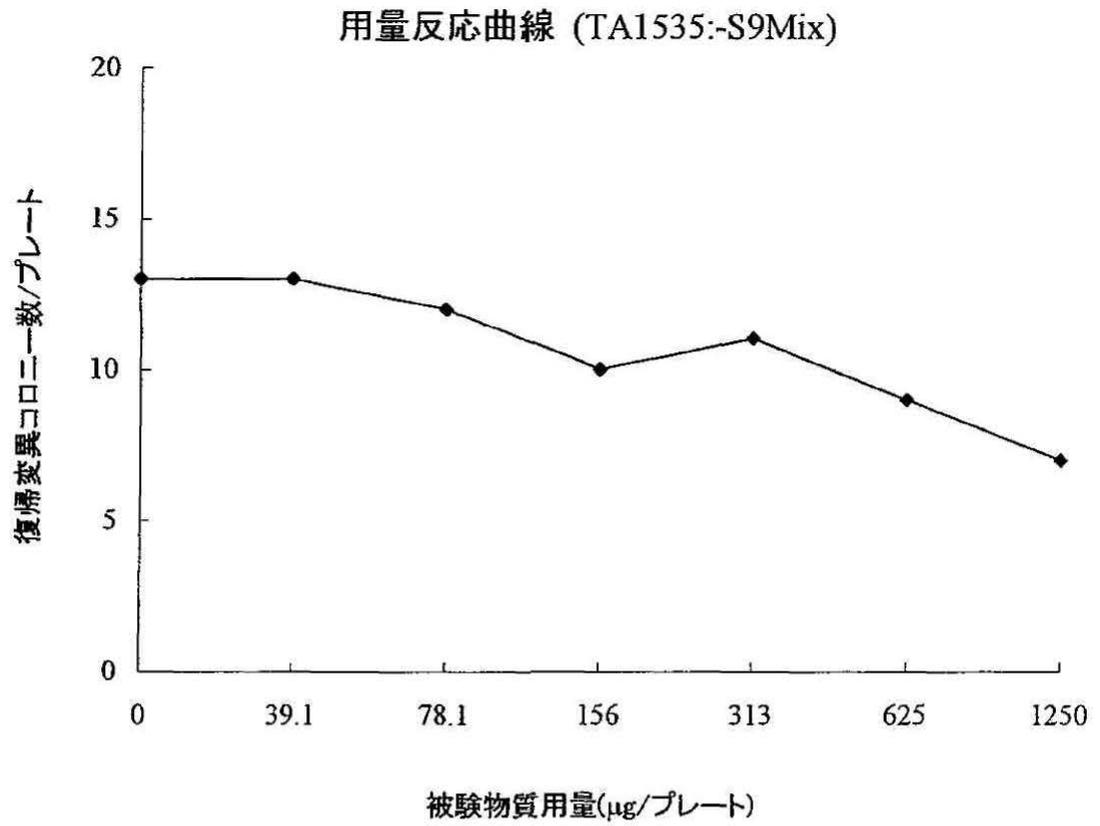


図 4

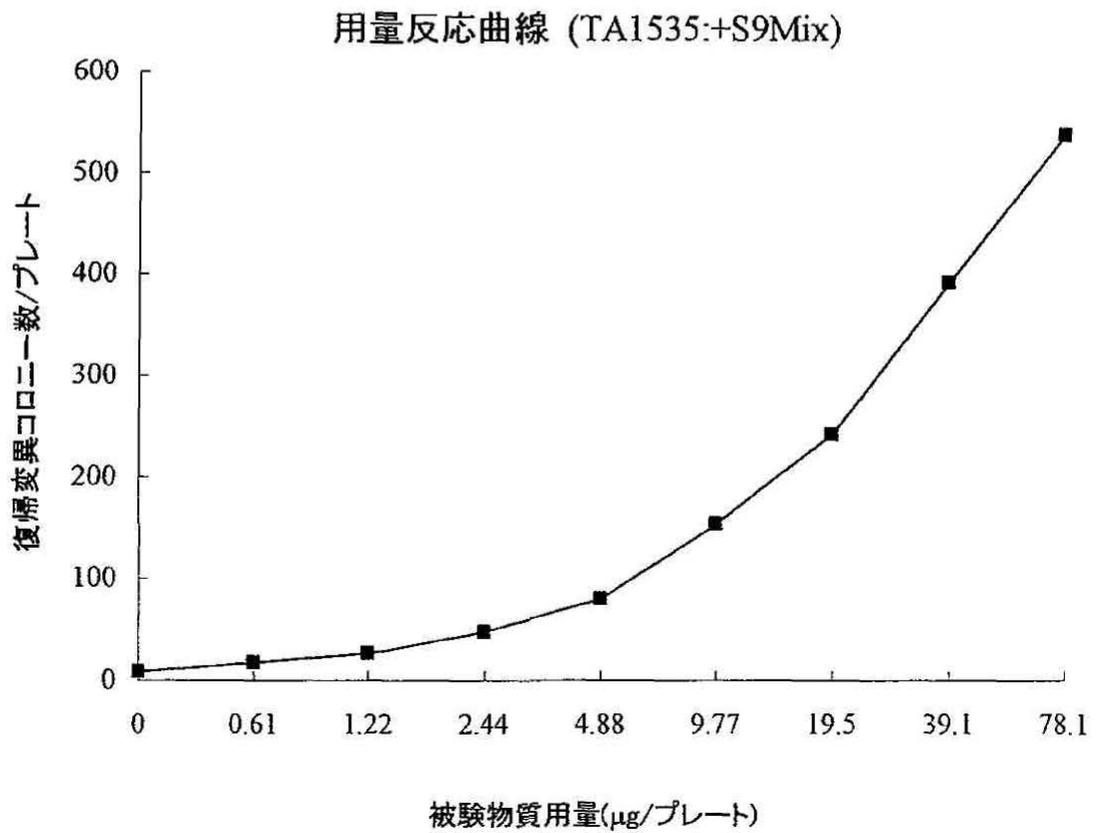


図 5

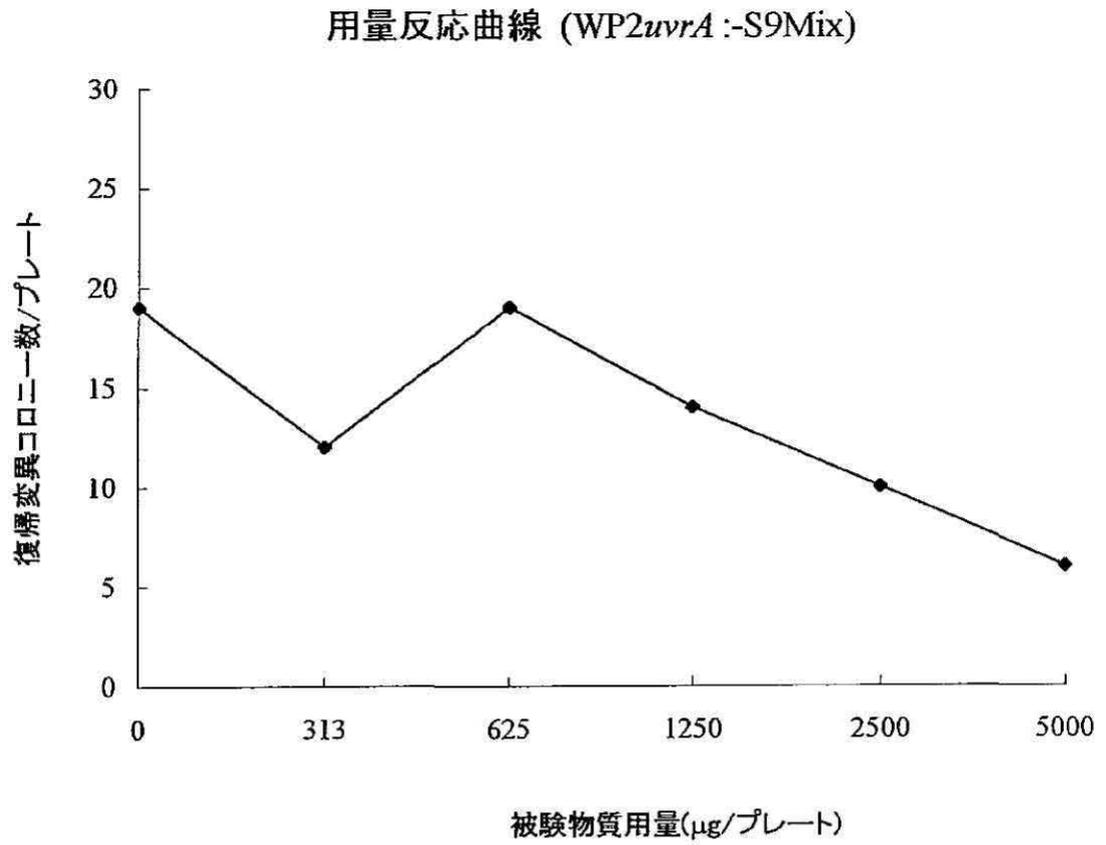


図 6

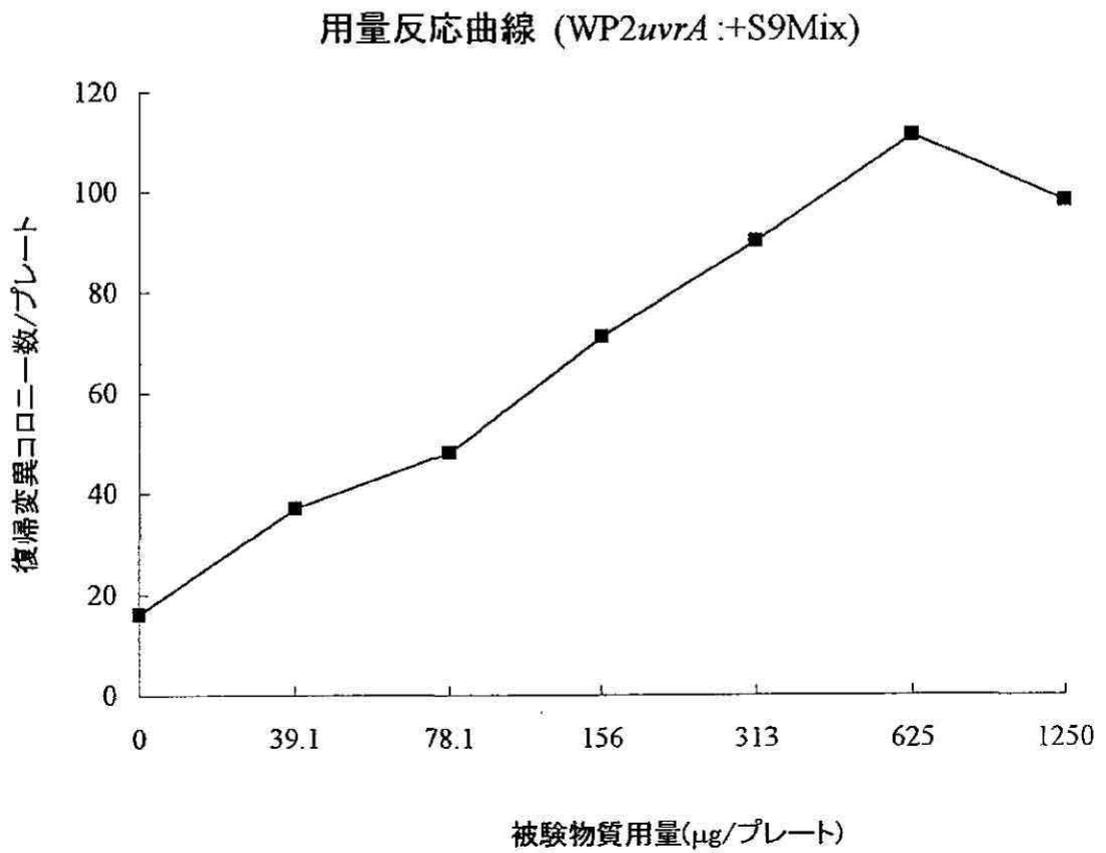


図 7

用量反応曲線 (TA98:-S9Mix)

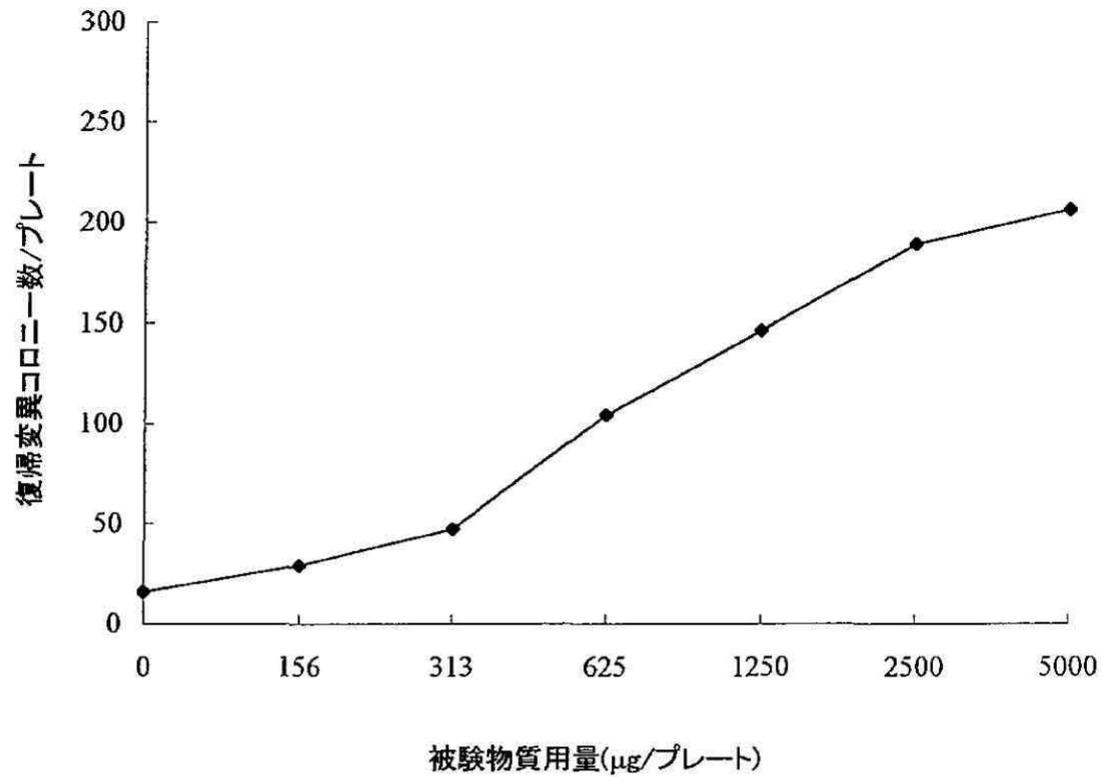


図 8

用量反応曲線 (TA98:+S9Mix)

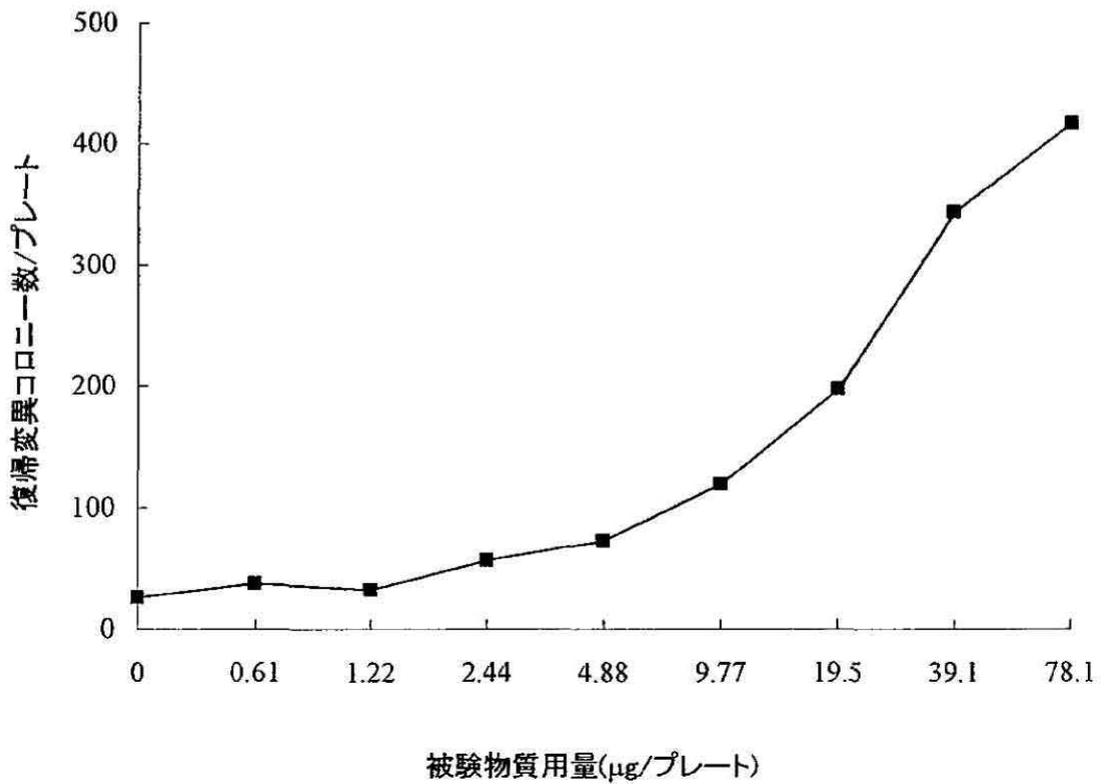


図 9

用量反応曲線 (TA1537:-S9Mix)

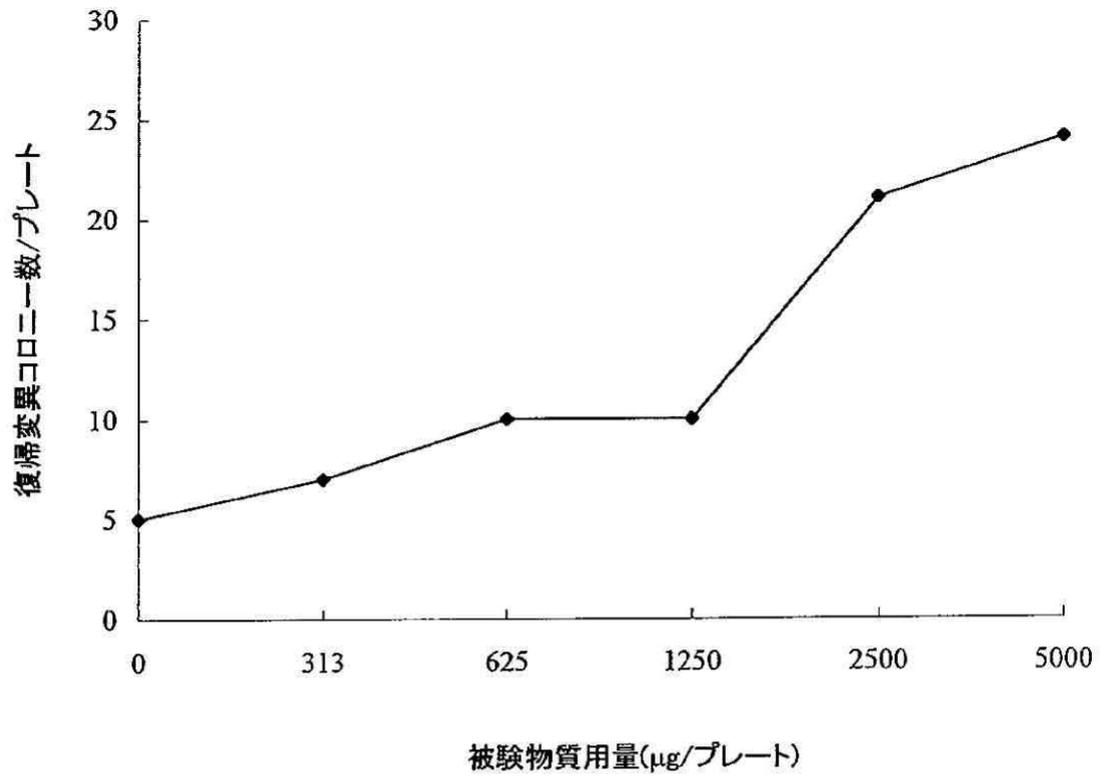


図 10

用量反応曲線 (TA1537:+S9Mix)

