最終報告書

ベンゼンスルホンアミドの細菌を用いる復帰突然変異試験

（試験番号：B060316）

株式会社三菱化学安全科学研究所

2. 目次

1. 陳述書 2
2. 目次 3
3. 試験実施概要 5
3.1 表題 5
3.2 試験番号 5
3.3 試験目的 5
3.4 適用ガイドライン 5
3.5 適用 GLP 5
3.6 試験委託者 5
3.7 試験受託者 5
3.8 試験施設 5
3.9 試験責任者 6
3.10 試験従事者 6
3.11 試験日程 6
3.12 保存 6
3.13 保存する資料 6
4. 試験責任者署名 7
5. 要約 8
6. 材料および方法 9
6.1 被験物質 9
6.2 対照物質 10
6.3 試験菌株 11
6.4 培地 13
6.5 S9 mix 14
6.6 被験物質溶液および陽性対照物質溶液の調製 15
6.7 被験物質および陽性対照物質用量 16
6.8 復帰突然変異試験 17
7. 結果 19
7.1 予備試験 19
7.2 本試験 19
7.3 無菌試験 19
8. 考察および結論 19
9. 参考文献 20

試験結果表

表 1　試験結果表（予備試験）..... 21
表 2　試験結果表（本試験 1）..... 22
表 3　試験結果表（本試験 2）..... 23

図

図 1-1　用量-反応曲線（本試験 1；−S9 mix）..... 24
図 1-2　用量-反応曲線（本試験 1；+S9 mix）..... 24
図 2-1　用量-反応曲線（本試験 2；−S9 mix）..... 25
図 2-2　用量-反応曲線（本試験 2；+S9 mix）..... 25

3. 試験実施概要

3.1 表題
ベンゼンスルホンアミドの細菌を用いる復帰突然変異試験

3.2 試験番号
B060316

3.3 試験目的
ネズミチフス菌株および大腸菌株を用いる復帰突然変異試験を実施し，ベンゼンスルホンアミドの変異原性を検討する.

3.4 適用ガイドライン
(1) 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連名通知）
(2) OECD Guideline for the Testing of Chemicals (No.471, 1997)

3.5 適用 GLP
(1) 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
（厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名基準，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 15 年 11 月 21 日）
(2) OECD Principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997)

3.6 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
東京都千代田区霞ヶ関一丁目 2 番 2 号

3.7 試験受託者
株式会社三菱化学安全科学研究所
東京都港区芝浦四丁目 2 番 8 号
（平成 19 年 3 月 31 日以前は，東京都港区芝二丁目 1 番 30 号）

3.8 試験施設
株式会社三菱化学安全科学研究所　鹿島研究所
茨城県神栖市砂山 14 番地

5. 要約

ネズミチフス菌株 TA100, TA1535, TA98 および TA1537 ならびに大腸菌株 WP2*uvrA*/pKM101 の 5 菌株を用いる復帰突然変異試験でベンゼンスルホンアミドの変異原性を調べた. 試験は S9 mix 非存在下および存在下でプレインキュベーション法により実施した.

予備試験を 1.22, 4.88, 19.5, 78.1, 313, 1250 および 5000 μg/プレートの 7 用量で実施した結果，S9 mix の有無にかかわらず，いずれの試験菌株においても生育阻害は認められず，被験物質処理群における復帰変異コロニー数は陰性（溶媒）対照値の 2 倍未満であった．なお，S9 mix の有無にかかわらず，いずれの被験物質処理群においてもプレート上に沈殿は認められなかった.

予備試験の結果から本試験は，S9 mix 非存在下および存在下のすべての菌株について 313, 625, 1250, 2500, 5000 μg/プレートの 5 用量で実施した.

2 回の本試験の結果，S9 mix の有無にかかわらず，いずれの試験菌株においても生育阻害は認められず，被験物質処理群における復帰変異コロニー数は陰性（溶媒）対照値の 2 倍未満であった．なお，S9 mix の有無にかかわらず，いずれの被験物質処理群においてもプレート上に沈殿は認められなかった.

本試験の陰性（溶媒）対照値および陽性対照値は，当研究所の適正範囲内であった．また，陽性対照により誘発された復帰変異コロニー数は，S9 mix 非存在下および存在下のいずれの試験菌株においても陰性（溶媒）対照値の 2 倍を超えて増加し，明らかな陽性結果を示した．従って，本試験の妥当性が確認された.

以上の結果から，ベンゼンスルホンアミドは本試験条件下において変異原性を有さない（陰性）と結論した.

6. 材料および方法

6.1 被験物質

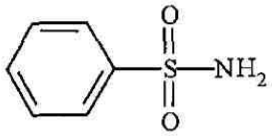
6.1.1 名称

ベンゼンスルホンアミド

6.1.2 CAS 番号

98-10-2

6.1.3 構造式



6.1.4 分子量

157.18

6.1.5 ロット番号

6.1.6 純度（含量）

99.2%

6.1.7 性状

白色結晶

6.1.8 その他の物理化学的性状

蒸気圧：0.000894 mmHg（25°C）
対水溶解度：4300 mg/L（16°C）
1-オクタノール/水分配係数：0.31
融点：153.3°C

6.1.9 製造元

6.1.10 入手量

25 g

6.1.11　保存条件
室温（許容範囲：10～30°C；実測値：21.1～25.3°C），遮光

6.1.12　保管場所
被験物質保管場所（52）

6.1.13　安定性の確認
当研究所で実施する「ベンゼンスルホンアミドのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験（試験番号：B060317）」において，実験開始前と実験終了後に赤外吸収スペクトル（IR）法で赤外吸収スペクトルを測定し，被験物質の特性に変化がないことを確認した．
測定機器：島津フーリエ変換赤外分光光度計（FTIR-8300，株式会社島津製作所）
方法：KBr 打錠法

6.1.14　残余被験物質の処理
被験物質の残余は実験終了後に廃棄した．

6.2　対照物質
6.2.1　陰性対照物質
6.2.1.1　名称
ジメチルスルホキシド（DMSO と略す）

6.2.1.2　製造元
関東化学株式会社

6.2.1.3　規格
分光分析用

6.2.1.4　ロット番号
510F1666

6.2.1.5　含量（純度）
100.0%

6.2.1.6　陰性対照物質の選択理由
溶媒検討の結果，被験物質は 50 mg/mL で注射用水に不溶であったが，DMSO には溶解した．また，被験物質を DMSO と混合した際に発熱，発泡，変色は認められなかった．これらの結果から，本被験物質の溶媒（陰性対照物質）には DMSO を選択した．

6.2.2 陽性対照物質

6.2.2.1 名称，製造元等

名称（略称）	製造元	ロット番号	含量（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）	和光純薬工業株式会社	SEL1402	99.0%
ｱｼﾞ化ﾅﾄﾘｳﾑ（NaN_3）	和光純薬工業株式会社	TCK7533	99.2%
9-ｱﾐﾉｱｸﾘｼﾞﾝ塩酸塩（9-AA）	Sigma-Aldrich Co.	092K3441	99%
2-ｱﾐﾉｱﾝﾄﾗｾﾝ（2-AA）	和光純薬工業株式会社	TCM6741	93.3%

6.2.2.2 陽性対照物質の選択理由

細菌を用いる復帰突然変異試験において広く使用され，適用ガイドラインにおいて推奨されている．

6.3 試験菌株

6.3.1 試験菌株

試験菌株 [1], [2]	入手先（入手日）
Salmonella typhimurium TA100, TA1535 TA98, TA1537	カリフォルニア大学（1983 年 5 月 27 日）
Escherichia coli WP2*uvrA*/pKM101	日本バイオアッセイ研究センター（1997 年 9 月 18 日）

6.3.2 試験菌株の選択理由

細菌を用いる復帰突然変異試験において広く使用され，適用ガイドラインにおいて推奨されている．

6.3.3 試験菌株の保存

6.3.3.1 組成

液体完全培地中にて 37°C で 8 時間前培養を行った菌懸濁液 24 mL に 2.1 mL の DMSO（関東化学株式会社，ロット番号 508F1409）を混合した．

6.3.3.2 保存方法

分注凍結（分注量：0.2 mL）

6.3.3.3 保存条件

超低温冷凍庫（日本フリーザー株式会社，CL-322，実測値：−85°C ～ −79°C）

6.3.3.4 保存日および使用期限

試験菌株	保存日（ロット番号）	使用期限
TA100, TA1535, TA98 TA1537, WP2*uvrA*/pKM101	2005 年 11 月 30 日（051130）	2006 年 11 月 29 日

6.3.4 試験菌株の遺伝的特性

6.3.4.1 遺伝的特性

試験菌株	アミノ酸要求性 (1)	紫外線感受性 (2)	膜変異 (3)	薬剤耐性 (4)
TA100	*his*⁻（塩基対置換）	Δ *uvrB*	*rfa*	+（pKM101）
TA1535	*his*⁻（塩基対置換）	Δ *uvrB*	*rfa*	–
TA98	*his*⁻（フレームシフト）	Δ *uvrB*	*rfa*	+（pKM101）
TA1537	*his*⁻（フレームシフト）	Δ *uvrB*	*rfa*	–
WP2*uvrA* /pKM101	*trp*⁻（塩基対置換）	Δ *uvrA*	Wild type	+（pKM101）

(1) *his*⁻はヒスチジン要求性，*trp*⁻はトリプトファン要求性を示す．
(2) Δ *uvrA* および Δ *uvrB* は DNA 修復遺伝子の欠失を示し，紫外線感受性を示す．
(3) *rfa* は細胞壁のリポ多糖類の欠失を示し，クリスタルバイオレット感受性を示す．
(4) +（pKM101）は薬剤耐性因子を保持していることを示し，アンピシリン耐性を示す．

6.3.4.2 遺伝的特性の確認

試験菌株の遺伝的特性を 2005 年 12 月 2 日に確認した．試験には上記の特性を備えた菌株を用いた．

6.3.5 菌懸濁液

6.3.5.1 培養

培養温度：37°C（培養開始まで 10°C に保冷）
培養時間：8 時間
培養方法：往復振とう（振とう回数：90 回／分）
培養容器：L 字管（容量 22 mL）
培養液：液体完全培地（10 mL）
菌株および接種量：保存菌株を融解し，0.02 mL 接種

6.3.5.2 菌懸濁液の菌濃度

培養終了後，濁度計（コロナ電気株式会社，UT-11）を用いて濁度を測定し，濁度からの換算により生菌数を算出した．菌懸濁液は菌濃度が 1×10^{9}/mL 以上であることを確認した後，試験に使用した．菌懸濁液は用時調製し，調製後は室温で保存した．

各菌懸濁液の生菌数を以下に示す.

試験菌株		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2*uvrA* /pKM101	TA98	TA1537
生菌数 (×10 ^{9}/mL)	予備試験	2.39	1.89	5.86	3.32	2.03
	本試験 1	2.51	1.98	6.42	3.48	1.90
	本試験 2	2.39	1.91	5.99	3.26	2.01

6.4 培地

6.4.1 液体完全培地の調製

Oxoid Nutrient Broth No.2（Oxoid 社，ロット番号 261002）7.5 g に精製水 300 mL を加えて溶解した．これを 121°C で 15 分間オートクレーブ滅菌し，冷蔵保存した.

6.4.2 トップアガーの調製

6.4.2.1 軟寒天の調製

Bacto-agar（Becton, Dickinson and Company，ロット番号 3345853）1.8 g および塩化ナトリウム（関東化学株式会社，ロット番号 705X1484）1.5 g に精製水 300 mL を加え，これを 121℃で 15 分間オートクレーブ滅菌して，室温で保存した.

6.4.2.2 トップアガーの調製

軟寒天を電子レンジで液化し，以下に示すアミノ酸水溶液をそれぞれ使用直前に 1/10 量添加した．トップアガーは用時調製し，約 45°C に保温した.

ネズミチフス菌： 0.5 mmol/L D-ビオチン†・L-ヒスチジン†混合水溶液

大腸菌： 0.5 mmol/L L-トリプトファン†水溶液

†： D-ビオチン（和光純薬工業株式会社，ロット番号 EWL2869）
L-ヒスチジン塩酸塩一水和物（和光純薬工業株式会社，ロット番号 TCN4471）
L-トリプトファン（和光純薬工業株式会社，ロット番号 TCJ2266）

6.4.3 最少グルコース寒天平板培地

6.4.3.1 名称

クリメディア AM-N 培地（寒天：伊那寒天 [BA-30A]，伊那食品工業株式会社，ロット番号 51115）

6.4.3.2 製造元

オリエンタル酵母工業株式会社

6.4.3.3 ロット番号
ANI580FV

6.4.3.4 製造日および入手日
2006 年 6 月 10 日製造
2006 年 7 月 13 日入手

6.5 S9 mix
6.5.1 S9
6.5.1.1 製造元
キッコーマン株式会社

6.5.1.2 ロット番号
RAA-542

6.5.1.3 製造日および入手日
2006 年 4 月 21 日製造
2006 年 5 月 19 日入手

6.5.1.4 製造方法
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（フェノバルビタール投与 3 日目に 80 mg/kg を 1 回腹腔内投与）で酵素誘導した 7 週齢 SD 系雄ラット（体重 210 – 245 g）の肝臓より調製された.

6.5.1.5 蛋白含量
25.48 mg/mL

6.5.1.6 保存条件
超低温冷凍庫（日本フリーザー株式会社，CL-322，実測値：–85°C ～ –80°C）

6.5.1.7 使用期限
2006 年 10 月 20 日（製造日から 6 ヵ月間）

6.5.2 Cofactor mix
6.5.2.1 名称
Cofactor-I

6.5.2.2 製造元
オリエンタル酵母工業株式会社

6.5.2.3 ロット番号
999603

6.5.2.4 調製
Cofactor-I に滅菌精製水 9 mL を加えて溶解し，メンブレンフィルター（孔径：0.45 μm）でろ過して Cofactor mix とした．Cofactor mix は用時調製した．

6.5.3 S9 mix
Cofactor mix 9 mL に対して，S9 を 1 mL の割合で加え S9 mix とした．S9 mix は用時調製し，使用時まで氷槽中に保存した．
S9 mix 1 mL あたりの組成を以下の表に示す．

S9	0.1 mL
塩化マグネシウム	8 μmol
塩化カリウム	33 μmol
グルコース-6 -リン酸	5 μmol
NADPH	4 μmol
NADH	4 μmol
リン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.4）	100 μmol
滅菌精製水	残量

6.6 被験物質溶液および陽性対照物質溶液の調製
6.6.1 被験物質溶液の調製
(1) 被験物質を秤量（予備試験：250 mg，本試験：500 mg）して DMSO を加え，振とう撹拌により溶解させて 50 mg/mL 溶液とした．
(2) 予備試験では，50 mg/mL 溶液の一部を DMSO で段階希釈して 12.5, 3.13, 0.781, 0.195, 0.0488 および 0.0122 mg/mL 溶液を調製した．
(3) 本試験では，50 mg/mL 溶液の一部を DMSO で段階希釈して 25, 12.5, 6.25 および 3.13 mg/mL 溶液を調製した．
(4) 被験物質溶液は用時調製し，調製後は使用までの間室温，黄色灯下で保存した（予備試験：35 分，本試験 1：20 分，本試験 2：35 分）．
(5) 被験物質の秤量，溶液の希釈，分注および被験物質処理を含む全ての操作は室温，黄色灯下で行った．

6.6.2 陽性対照物質溶液
6.6.2.1 陽性対照物質溶液の調製
陽性対照物質溶液は，2006 年 3 月 24 日に調製した保存液を用時融解して試験に使用した．
(1) NaN_3 は注射用水（株式会社大塚製薬工場，ロット番号 K5D74）に，AF-2, 9-AA および 2-AA は DMSO（関東化学株式会社，ロット番号 510F1666）に溶解した．

(2) これを同じ溶媒で希釈して所定濃度の陽性対照物質溶液とした.

6.6.2.2 保存方法
分注凍結（分注量：0.5 mL）

6.6.2.3 保存条件
超低温冷凍庫（日本フリーザー株式会社，CL-322，実測値：−85°C ～ −79°C）

6.6.2.4 調製濃度および使用期限

名称および濃度（μg/mL）		調製日	使用期限
AF-2	0.05, 0.1, 1	2006 年 3 月 24 日	2007 年 3 月 23 日
NaN_3	5		
9-AA	800		
2-AA	5, 10, 20		

6.6.2.5 陽性対照値の確認
凍結保存した陽性対照物質溶液について，プレインキュベーション法で試験を実施し，陽性対照値が当該年度の適正範囲内であることを確認している.

6.7 被験物質および陽性対照物質用量
6.7.1 被験物質用量
6.7.1.1 予備試験
ガイドラインに従い 5000 μg/プレートを最高用量とし，以下の用量を設定した.

試験菌株	用量（μg/プレート）
	S9 mix 非存在下および存在下
TA100, TA1535, TA98 TA1537, WP2*uvrA*/pKM101	1.22, 4.88, 19.5, 78.1, 313, 1250, 5000

6.7.1.2 本試験
予備試験の結果，S9 mix の有無にかかわらず，いずれの試験菌株においても生育阻害は認められず，被験物質処理群における復帰変異コロニー数は陰性（溶媒）対照値の 2 倍未満であった．なお，S9 mix の有無にかかわらず，いずれの被験物質処理群においてもプレート上に沈殿は認められなかった.
以上の結果をもとに，本試験では 5000 μg/プレートを最高用量として以下の用量を設定した.

試験菌株	用量（μg/プレート）
	S9 mix 非存在下および存在下
TA100, TA1535, TA98 TA1537, WP2*uvrA*/pKM101	313, 625, 1250, 2500, 5000

6.7.2 陽性対照物質用量

6.7.2.1 名称および用量

試験菌株	名称および用量（μg/プレート）			
	S9 mix 非存在下		S9 mix 存在下	
TA100	AF-2	0.01	2-AA	1
TA1535	NaN_3	0.5	2-AA	2
TA98	AF-2	0.1	2-AA	0.5
TA1537	9-AA	80	2-AA	2
WP2*uvrA*/pKM101	AF-2	0.005	2-AA	2

6.7.2.2 陽性対照物質用量の選択理由

これらの用量は，各試験菌株に対して陽性を示すことが知られている．

6.8 復帰突然変異試験

6.8.1 試験法の選択

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[3].

6.8.2 プレインキュベーション法

(1) 各用量につき，滅菌した試験管に被験物質溶液，陰性（溶媒）対照物質または陽性対照物質溶液を 0.1 mL 添加した．
(2) S9 mix 非存在下の場合，0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液 †（pH 7.4）を 0.5 mL 加えて混和し，さらに菌懸濁液を 0.1 mL 加えた．
(3) S9 mix 存在下の場合，S9 mix を 0.5 mL 加えて混和し，さらに菌懸濁液を 0.1 mL 加えた．
(4) この混合液を 37°C で 20 分間緩やかに振とう（振とう回数：90 回／分）してインキュベーションした（プレインキュベーション）．
(5) プレインキュベーション後，この混合液に融解したトップアガーを 2 mL 加え，最少グルコース寒天平板培地上に重層した．
(6) 重層したトップアガーが凝固した後，37°C で 48 時間培養した．

†: リン酸水素二ナトリウム無水塩（和光純薬工業株式会社，ロット番号 KLL4270）
リン酸二水素ナトリウム二水和物（和光純薬工業株式会社，ロット番号 CER2739）

6.8.3 観察

沈殿物：48 時間培養後に目視で観察した
菌の生育阻害：48 時間培養後に実体顕微鏡（Nikon, SMZ-10）で観察した

6.8.4 コロニー計測

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（システムサイエンス株式会社，CA-11）で計測した．機器計測に際しては面積補正および数え落とし補正を行った．

6.8.5 プレート数

予備試験：　1プレート／用量
本試験：　3プレート／用量

6.8.6 結果の集計

陰性（溶媒）対照，陽性対照および被験物質の各処理について，計測したコロニー数の平均値および標準偏差を算出した．平均値および標準偏差は小数点以下を四捨五入して表示した．

6.8.7 無菌試験

被験物質溶液およびS9 mixそれぞれ1枚のプレートを使用し，試験毎に実施した．

(1) 最高用量の被験物質溶液 0.1 mL または S9 mix 0.5 mL にトップアガー2 mL を加えて混和した．
(2) それぞれ最少グルコース寒天平板培地上に重層した．
(3) 重層したトップアガーが凝固した後，37°C で 48 時間培養し，雑菌の混入について目視で確認した．

6.8.8 実験の成立基準

本試験については，下記の条件をすべて満たしている場合に成立とした．

(1) 陰性（溶媒）対照値（平均値）および陽性対照値（平均値）が試験施設における背景データの適正範囲内にあること．
(2) 陽性対照値（平均値）が，対応する試験菌株の陰性（溶媒）対照値と比較して明らかに2倍を越えて増加していること．
(3) 生育阻害の認められない用量が4用量以上あり，かつ評価可能な用量が5用量以上あること．
(4) 無菌試験の結果，雑菌による汚染が無いこと．
(5) 試験プレートが汚染あるいは他の不測の事態によって計測不能になり，失われていないこと．

6.8.9　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（平均値）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．試験結果の評価には統計学的検定を実施しなかった．

6.8.10　再現性の確認

試験結果の再現性は 2 回の本試験で確認した．

7. 結果

7.1　予備試験（表 1）

予備試験の結果，S9 mix の有無にかかわらず，いずれの試験菌株においても生育阻害は認められず，被験物質処理群における復帰変異コロニー数は陰性（溶媒）対照値の 2 倍未満であった．なお，S9 mix の有無にかかわらず，いずれの被験物質処理群においてもプレート上に沈殿は認められなかった．

7.2　本試験（表 2～3 および図 1-1～2-2）

2 回の本試験ともに，S9 mix の有無にかかわらず，いずれの試験菌株においても生育阻害は認められず，被験物質処理群における復帰変異コロニー数は陰性（溶媒）対照値の 2 倍未満であった．なお，S9 mix の有無にかかわらず，いずれの被験物質処理群においてもプレート上に沈殿は認められなかった．

7.3　無菌試験

予備試験および本試験のいずれにおいても，最高用量の被験物質溶液および S9 mix には菌，カビの混入は認められなかった．

8. 考察および結論

予備試験の結果に基づいて，5000 μg/プレートを最高用量として本試験を実施した結果，S9 mix の有無にかかわらず，いずれの試験菌株においても被験物質処理群における復帰変異コロニー数は陰性（溶媒）対照値の 2 倍未満であり，2 回の本試験で再現性が確認された．
本試験の陰性（溶媒）対照値および陽性対照値は，当研究所の適正範囲内であった（添付資料 1）．また，陽性対照物質により誘発された復帰変異コロニー数は，S9 mix 非存在下および存在下のいずれの試験菌株においても陰性（溶媒）対照値の 2 倍を超えて増加し，明らかな陽性結果を示した．さらに，いずれの試験においても生育阻害の認められない用量が 4 用量以上あり，かつ評価可能な用量が 5

用量以上得られた．従って，本試験の妥当性が確認された．

以上の結果から，ベンゼンスルホンアミドは本試験条件下において変異原性を有さない（陰性）と結論した．

なお，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．

9. 参考文献

[1] Maron DM and Ames BN. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. Mutat Res 1983; 113: 173-215.
[2] Green MHL and Muriel WJ. Mutagen testing using Trp^+ reversion in *Escherichia coli*. Mutat Res 1976; 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）

試験期間		2006年 8月 8日 ～ 2006年 8月11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
S9 mix (−)	陰性対照	97	10	59	15	11
	1.22	102	11	64	17	9
	4.88	107	13	63	15	10
	19.5	93	8	64	19	11
	78.1	101	12	68	16	11
	313	109	10	76	18	14
	1250	103	8	73	16	12
	5000	95	9	66	16	10
S9 mix (+)	陰性対照	101	11	87	21	18
	1.22	101	14	83	22	15
	4.88	111	11	94	27	19
	19.5	104	12	96	21	20
	78.1	109	12	86	25	18
	313	104	12	88	28	17
	1250	100	9	93	24	17
	5000	103	11	93	23	21
陽性対照 S9 mix (−)	名称	AF-2	NaN_3	AF-2	AF-2	9-AA
	用量 (μg/ﾌﾟﾚｰﾄ)	0.01	0.5	0.005	0.1	80
	(ｺﾛﾆｰ数/ﾌﾟﾚｰﾄ)	626	541	811	719	339
陽性対照 S9 mix (+)	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)	1264	226	854	486	171

(備考)　陰性対照：ジメチルスルホキシド (DMSO)

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, 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　試験結果表 （本試験 1）

試験期間		2006年 9月 4日 ～ 2006年 9月 7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	TA1535	WP2*uvrA* /pKM101	TA98	TA1537
S9 mix (–)	陰性対照	103 96 (100) 102 (4)	9 12 (11) 12 (2)	63 71 (68) 69 (4)	17 22 (19) 18 (3)	15 14 (15) 16 (1)
	313	103 105 (103) 100 (3)	10 10 (11) 12 (1)	60 68 (65) 68 (5)	17 19 (19) 21 (2)	14 17 (15) 14 (2)
	625	95 99 (101) 109 (7)	10 11 (10) 10 (1)	64 65 (64) 63 (1)	16 18 (18) 20 (2)	16 18 (16) 14 (2)
	1250	98 100 (100) 102 (2)	12 10 (12) 13 (2)	61 65 (65) 70 (5)	17 17 (17) 17 (0)	12 14 (15) 18 (3)
	2500	104 120 (106) 95 (13)	11 11 (11) 10 (1)	61 61 (63) 66 (3)	19 18 (18) 17 (1)	15 13 (14) 14 (1)
	5000	94 102 (98) 99 (4)	9 14 (12) 14 (3)	67 68 (69) 72 (3)	18 19 (19) 19 (1)	11 15 (13) 14 (2)
S9 mix (+)	陰性対照	117 127 (115) 102 (13)	11 12 (12) 14 (2)	81 87 (84) 84 (3)	31 23 (26) 24 (4)	18 19 (19) 20 (1)
	313	107 109 (112) 121 (8)	10 9 (10) 12 (2)	84 87 (85) 83 (2)	23 22 (22) 22 (1)	18 16 (19) 24 (4)
	625	103 114 (109) 111 (6)	11 12 (12) 14 (2)	81 85 (82) 79 (3)	26 21 (26) 30 (5)	19 20 (19) 17 (2)
	1250	107 105 (110) 117 (6)	10 12 (10) 9 (2)	84 85 (85) 85 (1)	24 19 (22) 23 (3)	22 21 (20) 17 (3)
	2500	107 108 (111) 119 (7)	12 11 (12) 12 (1)	80 91 (86) 88 (6)	25 22 (23) 22 (2)	18 20 (21) 24 (3)
	5000	104 120 (113) 115 (8)	11 10 (11) 13 (2)	94 87 (87) 80 (7)	22 23 (22) 21 (1)	18 19 (18) 18 (1)
陽性対照 S9 mix (–)	名称	AF-2	NaN_3	AF-2	AF-2	9-AA
	用量 (μg/プレート)	0.01	0.5	0.005	0.1	80
	(コロニー数/プレート)	664 679 (683) 706 (21)	570 569 (552) 516 (31)	985 953 (955) 927 (29)	729 761 (744) 742 (16)	467 455 (474) 499 (23)
陽性対照 S9 mix (+)	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	用量 (μg/プレート)	1	2	2	0.5	2
	(コロニー数/プレート)	1334 1370 (1357) 1366 (20)	222 252 (238) 241 (15)	761 770 (760) 748 (11)	411 433 (421) 420 (11)	212 210 (209) 205 (4)

(備考)　陰性対照：ジメチルスルホキシド(DMSO)　　(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, NaN_3: アジ化ナトリウム, 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　試験結果表 （本試験 2）

試験期間		2006年 9月19日 ～ 2006年 9月22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
S9 mix (−)	陰性対照	96 101 (100) 104 (4)	9 12 (10) 9 (2)	75 70 (72) 71 (3)	21 18 (19) 18 (2)	10 9 (11) 13 (2)
	313	101 96 (100) 102 (3)	8 12 (11) 14 (3)	70 74 (72) 71 (2)	17 20 (18) 16 (2)	11 14 (11) 8 (3)
	625	99 102 (104) 110 (6)	10 8 (9) 9 (1)	72 81 (77) 77 (5)	19 20 (20) 21 (1)	10 9 (10) 10 (1)
	1250	108 109 (108) 106 (2)	10 9 (10) 12 (2)	76 76 (76) 76 (0)	23 21 (20) 17 (3)	12 9 (11) 11 (2)
	2500	108 98 (101) 97 (6)	13 9 (10) 9 (2)	67 73 (70) 70 (3)	17 18 (19) 22 (3)	13 11 (12) 11 (1)
	5000	109 104 (105) 102 (4)	10 9 (11) 14 (3)	75 68 (72) 74 (4)	22 19 (20) 20 (2)	11 15 (12) 9 (3)
S9 mix (+)	陰性対照	102 112 (105) 101 (6)	11 11 (11) 10 (1)	96 86 (91) 90 (5)	22 28 (25) 25 (3)	16 16 (17) 19 (2)
	313	108 119 (109) 100 (10)	11 14 (12) 10 (2)	83 95 (88) 86 (6)	21 22 (21) 21 (1)	18 17 (17) 17 (1)
	625	113 100 (106) 104 (7)	10 11 (11) 12 (1)	87 85 (87) 90 (3)	23 24 (25) 27 (2)	21 16 (18) 18 (3)
	1250	106 123 (111) 104 (10)	9 10 (11) 14 (3)	88 84 (88) 91 (4)	22 28 (25) 24 (3)	17 19 (18) 18 (1)
	2500	106 121 (110) 102 (10)	12 11 (11) 9 (2)	88 87 (88) 90 (2)	20 21 (21) 23 (2)	18 17 (18) 18 (1)
	5000	102 106 (103) 100 (3)	11 9 (10) 10 (1)	92 102 (94) 88 (7)	31 21 (26) 25 (5)	18 19 (19) 20 (1)
陽性対照 S9 mix (−)	名称	AF-2	NaN_3	AF-2	AF-2	9-AA
	用量 (μg/ﾌﾟﾚｰﾄ)	0.01	0.5	0.005	0.1	80
	(ｺﾛﾆｰ数/ﾌﾟﾚｰﾄ)	606 647 (623) 617 (21)	566 521 (532) 510 (30)	618 780 (727) 784 (95)	887 760 (833) 851 (65)	308 308 (311) 316 (5)
陽性対照 S9 mix (+)	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)	1462 1527 (1451) 1364 (82)	234 238 (237) 239 (3)	663 680 (673) 675 (9)	380 389 (387) 393 (7)	215 201 (213) 222 (11)

(備考)　陰性対照：ジメチルスルホキシド (DMSO)　　(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, NaN_3: ｱｼﾞ化ﾅﾄﾘｳﾑ, 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

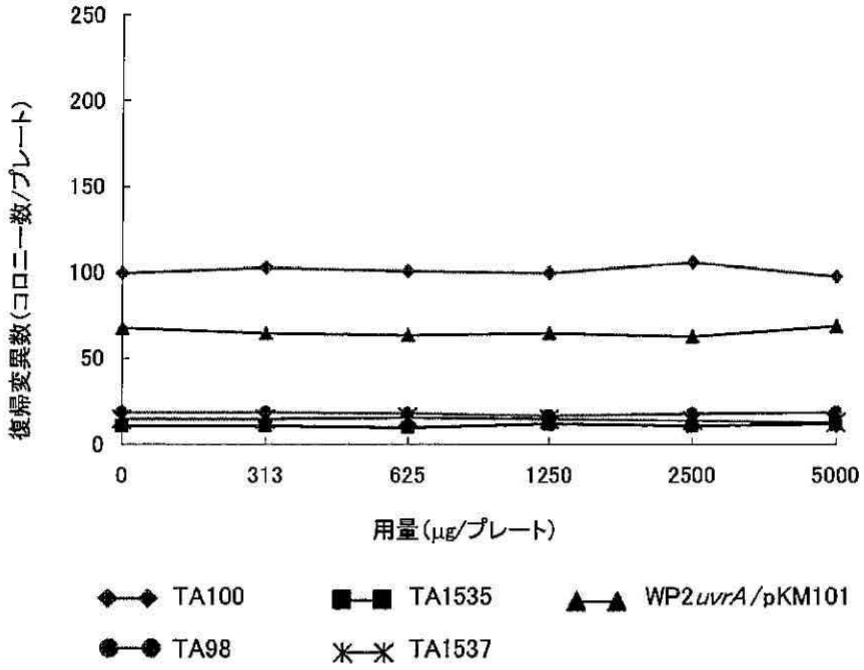


図 1-1　　用量ー反応曲線　（本試験 1;-S9 mix）

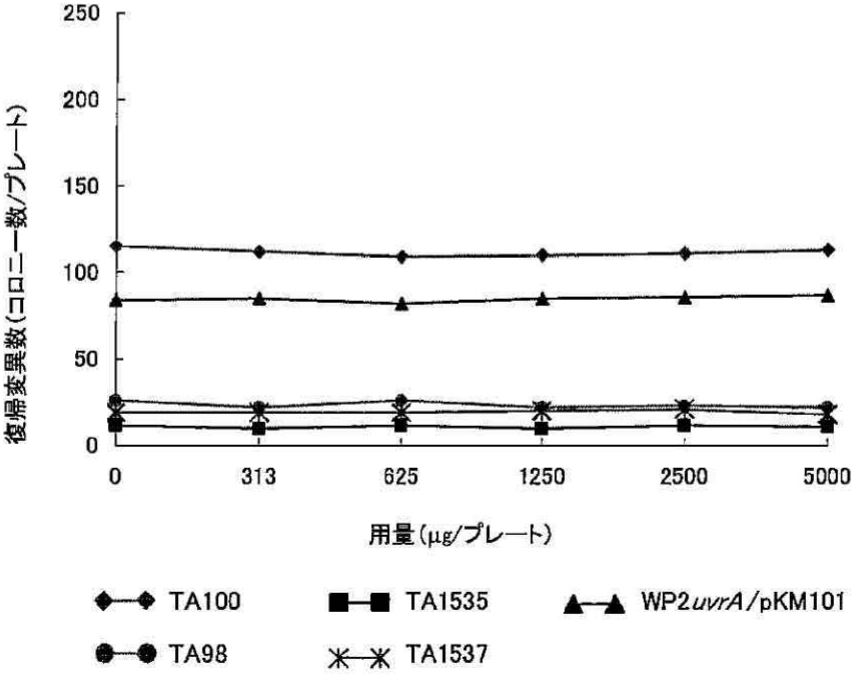


図 1-2　　用量ー反応曲線　（本試験 1;+S9 mix）

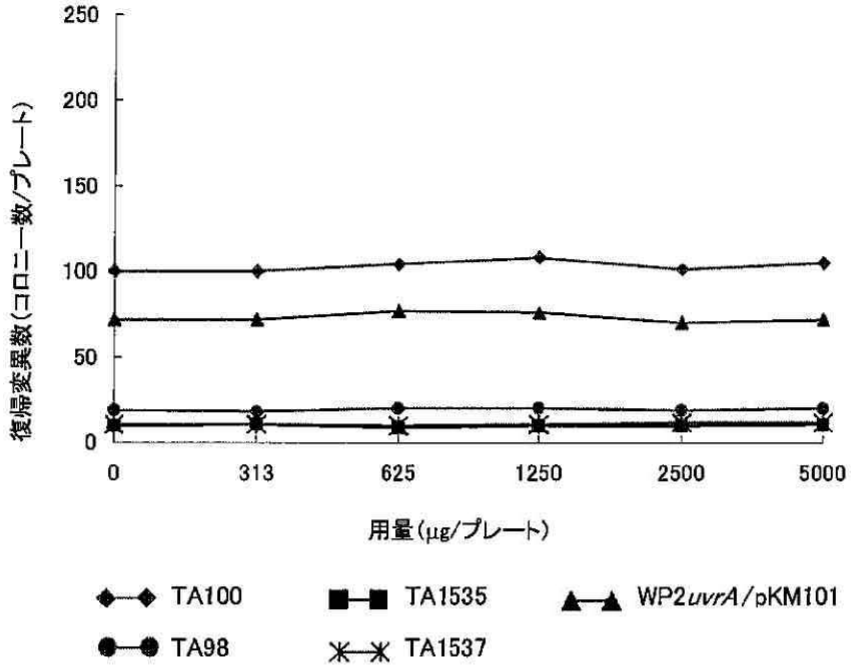


図 2-1　　用量ー反応曲線　（本試験 2; −S9 mix）

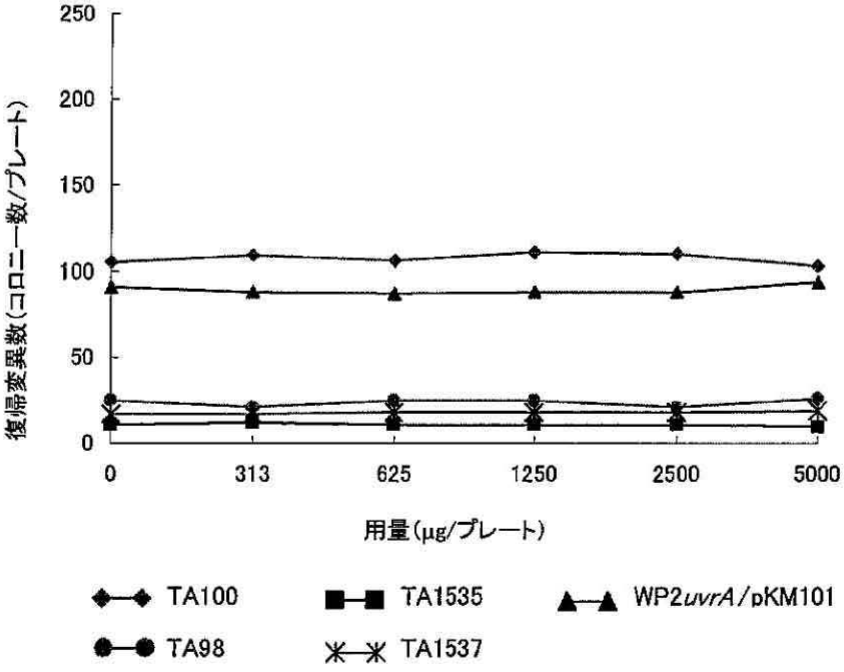


図 2-2　　用量ー反応曲線　（本試験 2; +S9 mix）