

本写しは原本と相違ありません

最終報告書

硫化亜鉛の細菌を用いる復帰突然変異試験

(試験番号：B000873)

2001 年 3 月 23 日

株式会社三菱化学安全科学研究所

陳述書

試験委託者： 経済産業省(旧通商産業省) 製品評価技術センター

表 題： 硫化亜鉛の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号： B000873

本試験は、下記の基準に従い実施したものである。

OECD Principles of Good Laboratory Practice, Decision of the council concerning mutual acceptance of data in the assessment of chemicals (1997)

試験責任者：

株式会社三菱化学安全科学研究所
鹿島研究所 応用生物研究部

信 頼 性 保 証 証 明 書

株式会社 三菱化学安全科学研究所
鹿島研究所

試験委託者：経済産業省(旧通商産業省) 製品評価技術センター

表 題：硫化亜鉛の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：B000873

本試験は試験計画書および標準操作手順書に従って実施され、本報告書には試験に使用した方法、手順が正確に記載されており、試験結果は生データを正確に反映していることを下記の通り確認した。



調査内容	実施者	実施日	試験責任者 への報告日	運営管理者 への報告日
試験計画書		2000年12月4日	2000年12月4日	2000年12月4日
試験実施状況		2001年2月6日	2001年2月6日	2001年2月7日
		2001年2月8日	2001年2月8日	2001年2月8日
生データ・報告書草案		2001年3月6日 ～2001年3月7日	2001年3月7日	2001年3月7日
最終報告書		2001年3月23日	2001年3月23日	2001年3月23日

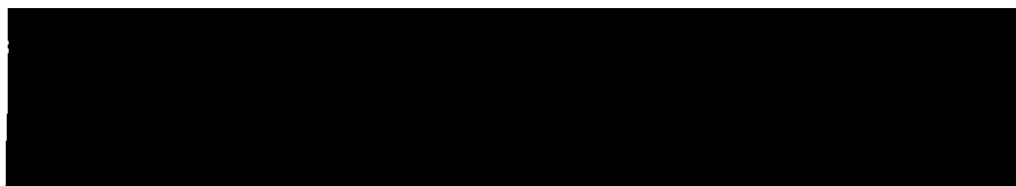
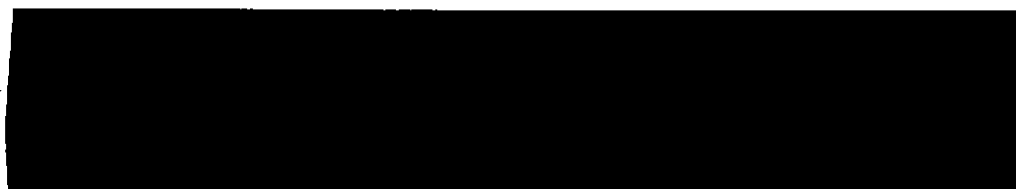
目次

試験実施概要	1
試験責任者署名欄	3
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	7
5. 試験方法	8
結果	10
考察および結論	11
参考文献	12
試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因	13
表 1 試験結果表 (予備試験)	14
表 2 試験結果表 (本試験 1)	15
表 3 試験結果表 (本試験 2)	16
図 1, 図 2 用量-反応曲線 (本試験 1, TA100, 本試験 1, TA1535)	17
図 3, 図 4 用量-反応曲線 (本試験 1, WP2uvrA/pKM101, 本試験 1, TA98)	18
図 5 用量-反応曲線 (本試験 1, TA1537)	19
図 6, 図 7 用量-反応曲線 (本試験 2, TA100, 本試験 2, TA1535)	20
図 8, 図 9 用量-反応曲線 (本試験 2, WP2uvrA/pKM101, 本試験 2, TA98)	21
図 10 用量-反応曲線 (本試験 2, TA1537)	22
添付資料 1	23
添付資料 2	24

試験実施概要

1. 表 題： 硫化亜鉛の細菌を用いる復帰突然変異試験 (試験番号：B000873) .
2. 試験目的： サルモネラ菌株および大腸菌株を用いる復帰変異試験を実施し、被験物質の変異原性を検討する.
3. 適用ガイドライン：
OECD Guideline for Testing of Chemicals (No. 471, 1997)
4. 適用 G L P： OECD Principles of Good Laboratory Practice, Decision of the council concerning mutual acceptance of data in the assessment of chemicals (1997)
5. 試験委託者： 経済産業省(旧通商産業省) 製品評価技術センター
東京都渋谷区西原二丁目 49 番 10 号
6. 試験受託者： 株式会社三菱化学安全科学研究所
東京都港区芝二丁目 1 番 30 号
7. 試験施設： 株式会社三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所
茨城県鹿島郡波崎町砂山 14 番地
8. 株式会社三菱化学安全科学研究所
鹿島研究所 応用生物研究部
千葉県佐原市玉造一丁目 9 番 11 号

9. 試験従事者：



10. 試験日程：	試験開始	2000 年 12 月 4 日
	予備試験	2000 年 12 月 5 日 ~ 12 月 8 日
	本試験 1	2001 年 2 月 5 日 ~ 2 月 8 日
	本試験 2	2001 年 2 月 13 日 ~ 2 月 16 日
	試験終了	2001 年 3 月 23 日

11. 保 存： 試験計画書，生データ，記録文書および最終報告書は，鹿島研究所の資料保存室に保存する。保存期間は最終報告書作成後 10 年間とし，以後の保存は試験委託者と協議の上，決定する。

試験責任者署名欄

試験委託者： 経済産業省(旧通商産業省) 製品評価技術センター

表 題： 硫化亜鉛の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号： B000873

試験責任者： 2001 年 3 月 23

株式会社三菱化学安全科学研究所

鹿島研究所 応用生物研究部

要約

硫化亜鉛について、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2uvrA/pKM101 の 5 菌株を指標とする復帰変異試験を実施した。

予備試験を 5000, 1250, 313, 78.1, 19.5, 4.88, 1.22 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の 7 用量で実施した結果、S9 mix の有無によらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数の増加および菌の生育阻害は認められなかった。これらの結果をもとに本試験 1, 2 では、すべての菌株について 5000 ~ 313 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (公比 2) の 5 用量を設定した。

2 回の本試験の結果、S9 mix の有無によらず、いずれの菌株においても陰性(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は認められなかった。

以上の結果から、硫化亜鉛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さない(陰性)と結論した。

材料および方法

1. 試験物質

1.1 被験物質

経済産業省(旧通商産業省) 製品評価技術センターから提供された硫化亜鉛(製造元：
 [REDACTED] CAS番号：1314-98-3, ロット番号：[REDACTED] 純度：98.1%)を冷蔵、
 暗所に気密で保存し、使用した。被験物質の組成および物理化学的性質は以下の通りであ
 る。

被験物質の安定性は、通常の使用においては安定である([REDACTED] MSDS[平成10年]に
 よる)ため、確認しなかった。

示性式：ZnS

常温における性状：微緑～白色の粉末

融 点：1180℃で昇華する

沸 点：昇華

溶解性：0.688 mg/100 mL (18℃)で水に溶解，50 mg/mLでジメチルスルホキシドに不溶，
 希塩酸，希硫酸に溶解。

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 (%)
ジメチルスルホキシド	DMSO	関東化学(株)	204G1360	99.7
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)アクリルアミド	AF-2	和光純薬工業(株)	CAP0185	98.9
アジ化ナトリウム	NaN ₃	和光純薬工業(株)	KWE6685	96.5
N-エチル-N'-ニトロ- N-ニトロソグアニジン	ENNG	Sigma Chemical Company	56F-3651	99.0
9-アミノアクリジン塩酸塩	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(株)	TWH2355	98.0

2. テスト菌株^{1, 2}

2.1 テスト菌株

カリフォルニア大学 B.N. Ames 教授より 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 17 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、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	<i>hisG</i>	<i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	pKM101	塩基対置換
TA1535	<i>hisG</i>	<i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	—	塩基対置換
WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	<i>trpE</i>	<i>uvrA</i>	+	pKM101	塩基対置換
TA98	<i>hisD</i>	<i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	pKM101	フレームシフト
TA1537	<i>hisC</i>	<i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	—	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℃で 8 時間振盪培養した各菌懸濁液 24 mL に対し、2.1 mL のジメチルスルホキシド(DMSO と略す；関東化学㈱，ロット番号 104G1307)を加えた。これを 200 μ L ずつ小分けしてドライアイス・アセトン中で急速凍結し、-80℃以下に凍結保存したものを使用した。

2.5 菌懸濁液

凍結保存した菌懸濁液を解凍後、20 μ L を液体完全培地 10 mL に接種し、37℃で 8 時間振盪培養した。培養容器には L 字管を用いた。菌懸濁液の菌濃度は濁度計を用いて測定し、濁度から換算して生菌数を算出した。

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 <i>uvrA</i> /pKM101	TA98	TA1537
生菌数 ($\times 10^9$ /mL)	予備試験	2.54	2.62	4.21	2.22	2.42
	本試験 1	2.52	2.62	4.01	2.43	2.27
	本試験 2	2.62	2.70	4.41	2.27	2.35

3. 培地

3.1 液体完全培地

精製水 1 L に対し、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)25 g の割合で溶解し、オートクレーブ滅菌(121℃, 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(株), ロット番号 ANI530IP : 2000 年 9 月 7 日製造)を購入し、使用した。

3.3 トップアガー

精製水 300 mL に粉末寒天 (Bacto-Agar, Difco 社, ロット番号 136958JC) 1.8 g, 塩化ナトリウム 1.5 g を加え、オートクレーブ滅菌(121℃, 15 分間)し完全に溶解した。その後、あらかじめ調製しておいた 0.5 mmol/L D-ビオチン, 0.5 mmol/L L-ヒスチジン混合水溶液(サルモネラ用)または 0.5 mmol/L L-トリプトファン水溶液(大腸菌用)をそれぞれ 1/10 量添加した。使用時まで約 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, 2 日目以降 60 mg/kg を 3 回腹腔内投与)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 7 週令 SD 系雄ラット(体重 195 - 240 g)肝由来 S9(キッコーマン(株), ロット番号 RAA-434 : 2000 年 10 月 27 日製造)を購入し、使用した。使用時まで約-90℃~-80℃以下で保存した。

4.2 S9 mix

S9 mix 1 mL あたり以下の組成で調製し、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塩	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
滅菌精製水	残 量

5. 試験方法³

5.1 被験物質懸濁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)、DMSO に不溶であったが、DMSO に均一に懸濁した。また、DMSO 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 DMSO を用いた。被験物質を所定濃度で DMSO に懸濁し、これを同じ溶媒で希釈して各用量の被験物質懸濁液を調製した。使用時まで室温、イエローランプ下で保存した。

陽性対照物質溶液はあらかじめ所定の濃度に調製し、 -80°C 以下に凍結保存したものを使用した。NaN₃はDW(㈱大塚製薬工場、ロット番号 K9J78)に、その他はDMSO(関東化学㈱、ロット番号 104G1307)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, 1.22 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の 7 用量で実施した結果、S9 mix の有無によらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数の増加および菌の生育阻害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。

菌 株 名	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	
	S9 mix 非共存下	S9 mix 共存下
TA100, TA1535 TA98, TA1537 WP2uvrA /pKM101	5000, 2500, 1250, 625, 313	5000, 2500, 1250, 625, 313

5.3 復帰変異試験

試験はプレインキュベーション法で実施した。

滅菌した試験管に被験物質懸濁液または陰性(溶媒)対照物質を 0.1 mL, 0.1 mol/L ナトリウムーリン酸緩衝液(pH 7.4)を 0.5 mL および菌懸濁液を 0.1 mL 加え, 37°C で 20 分間振盪培養した。S9 mix を共存させる場合には, 0.1 mol/L ナトリウムーリン酸緩衝液の代わりに S9 mix を 0.5 mL 添加した。プレインキュベーション後, トップアガー 2 mL を上記の混合液に加え混和し, 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有無を調べた後, 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または目視で計測した。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, 再現性を確認するため 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 非共存下 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9 mix 共存下 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	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 <i>uvrA</i> /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

最高用量の被験物質懸濁液または S9 mix をトップアガーと混和し, 最少グルコース寒天平板培地上に重層した。37°C で 48 時間培養後, 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 の有無によらず, 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。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 ~ 3 および図 1 ~ 10 に示す。

予備試験を 5000, 1250, 313, 78.1, 19.5, 4.88, 1.22 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の 7 用量で実施した結果, S9 mix の有無によらず, いずれの菌株においても復帰変異コロニー数の増加および菌の生育阻害は認められなかった。これらの結果をもとに本試験 1, 2 では 5000 ~ 313 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (公比 2) の 5 用量を設定した。

2 回の本試験の結果, S9 mix の有無によらず, いずれの菌株においても陰性(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および菌の生育阻害は認められなかった。

S9 mix 非共存下の 313 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上および共存下の 78.1 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上で沈殿物が認められた。

また, 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, 試験の成立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

本試験 1, 2 を 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ を最高用量に実施したが, S9 mix の有無によらず, いずれの菌株においても陰性(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は認められなかった。

試験施設における 1999 年度および 2000 年度の陰性(溶媒)対照値および陽性対照値の背景データを添付資料 1, 2 に示した。本試験の陰性(溶媒)対照値および陽性対照値が背景データより算出した適正值の範囲内であったこと, また S9 mix 非共存下および共存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, 硫化亜鉛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さない(陰性)と結論した。

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

試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

なし

表 1

試験結果表 (予備試験)

被験物質の名称 : 硫化亜鉛

試験実施期間		2000年12月5日より2000年12月8日					
代謝活性化系の有無		被験物質 用量 ($\mu\text{g}/7^{\circ}\text{プレート}$)	復帰変異数 (コロニー数/ 7°プレート)				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2uvrA/pKM101	TA98	TA1537
S 9 mix (-)	陰性対照	121	9	50	13	9	
	1.22	107	13	68	12	10	
	4.88	114	11	52	16	8	
	19.5	100	13	55	15	11	
	78.1	125	13	52	17	9	
	313+	118	9	59	12	7	
	1250+	116	11	57	17	7	
	5000+	109	10	52	14	5	
S 9 mix (+)	陰性対照	110	16	74	22	11	
	1.22	111	11	73	17	14	
	4.88	110	16	74	20	12	
	19.5	114	12	70	20	14	
	78.1+	119	11	71	21	12	
	313+	114	15	83	25	18	
	1250+	100	13	92	20	21	
	5000+	108	12	78	17	14	
陽性対照	S9 mixを必要とするもの	名称	AF-2	NaN ₃	ENNG	AF-2	9-AA
		用量 ($\mu\text{g}/7^{\circ}\text{プレート}$)	0.01	0.5	2	0.1	80
		コロニー数/ 7°プレート	625	403	2357	544	206
	S9 mixを必要とするもの	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		用量 ($\mu\text{g}/7^{\circ}\text{プレート}$)	1	2	2	0.5	2
		コロニー数/ 7°プレート	1777	282	1053	565	227

(備考) + : 沈殿物が認められた。

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド, 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, 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 2

試験結果表(本試験1)

被験物質の名称 : 硫化亜鉛

試験実施期間		2001年 2月 5日 より 2001年 2月 8日						
代謝活性化系の有無	被験物質用量 ($\mu\text{g}/7^\circ\text{プレート}$)	復帰変異数(コロニー数/ 7°プレート)						
		塩基対置換型			フレームシフト型			
		TA100	TA1535	WP2uvrA/pKM101	TA98	TA1537		
S 9 mix (-)	陰性対照	107 105 (109) 115 (\pm 5)	11 12 (10) 8 (\pm 2)	64 69 (68) 71 (\pm 4)	14 16 (16) 17 (\pm 2)	9 11 (10) 9 (\pm 1)		
		84 111 (101) 107 (\pm 15)	8 12 (11) 12 (\pm 2)	60 70 (71) 83 (\pm 12)	18 17 (16) 14 (\pm 2)	12 9 (10) 10 (\pm 2)		
		98 100 (93) 81 (\pm 10)	6 10 (8) 7 (\pm 2)	87 74 (80) 80 (\pm 7)	11 10 (12) 15 (\pm 3)	21 12 (15) 11 (\pm 6)		
	3 1 3 +	83 92 (87) 86 (\pm 5)	8 5 (7) 7 (\pm 2)	72 73 (73) 74 (\pm 1)	15 13 (15) 18 (\pm 3)	6 8 (7) 8 (\pm 1)		
		90 86 (87) 85 (\pm 3)	10 5 (7) 6 (\pm 3)	66 88 (74) 68 (\pm 12)	15 15 (15) 14 (\pm 1)	14 11 (12) 11 (\pm 2)		
		81 92 (85) 81 (\pm 6)	6 10 (7) 5 (\pm 3)	74 79 (78) 80 (\pm 3)	10 12 (12) 14 (\pm 2)	11 17 (13) 11 (\pm 3)		
	S 9 mix (+)	陰性対照	113 109 (106) 97 (\pm 8)	13 8 (12) 15 (\pm 4)	84 91 (93) 105 (\pm 11)	28 21 (23) 19 (\pm 5)	20 16 (19) 20 (\pm 2)	
			93 107 (102) 106 (\pm 8)	13 8 (12) 14 (\pm 3)	92 82 (88) 90 (\pm 5)	23 19 (23) 28 (\pm 5)	16 15 (16) 17 (\pm 1)	
			100 86 (98) 108 (\pm 11)	9 10 (9) 8 (\pm 1)	84 90 (86) 83 (\pm 4)	15 25 (21) 22 (\pm 5)	19 15 (17) 18 (\pm 2)	
		3 1 3 +	86 102 (96) 100 (\pm 9)	4 12 (7) 5 (\pm 4)	86 88 (89) 92 (\pm 3)	30 17 (23) 23 (\pm 7)	13 16 (15) 16 (\pm 2)	
			93 97 (92) 87 (\pm 5)	10 12 (10) 8 (\pm 2)	91 85 (91) 97 (\pm 6)	20 21 (21) 22 (\pm 1)	12 15 (15) 19 (\pm 4)	
			87 98 (95) 101 (\pm 7)	8 11 (10) 10 (\pm 2)	89 83 (83) 78 (\pm 6)	22 15 (21) 26 (\pm 6)	15 19 (16) 13 (\pm 3)	
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 ($\mu\text{g}/7^\circ\text{プレート}$)	0.01	0.5	2	0.1	80
			コロニー数 / 7°プレート	534 469 (552) 654 (\pm 94)	433 427 (431) 434 (\pm 4)	2177 2102 (2103) 2031 (\pm 73)	549 555 (539) 514 (\pm 22)	273 223 (231) 196 (\pm 39)
		S9 mix を必要 とする もの	名 称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
			用 量 ($\mu\text{g}/7^\circ\text{プレート}$)	1	2	2	0.5	2
			コロニー数 / 7°プレート	1306 1210 (1281) 1328 (\pm 63)	249 211 (229) 226 (\pm 19)	850 935 (883) 865 (\pm 45)	483 457 (484) 511 (\pm 27)	277 206 (234) 218 (\pm 38)

(備考) + : 沈殿物が認められた。

(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, 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, 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)

被験物質の名称 : 硫化亜鉛

試験実施期間		2001年 2月 13日 より 2001年 2月 16日					
代謝活性化系の有無	被験物質 用量 ($\mu\text{g}/7^\circ\text{プレート}$)	復帰変異数(コロニー数/ 7°プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	TA98	TA1537	
S 9 mix (-)	陰性対照	99 91 (100) 110 (± 10)	12 12 (12) 12 (± 0)	74 72 (73) 72 (± 1)	17 16 (17) 17 (± 1)	14 13 (12) 10 (± 2)	
	3 1 3 +	109 95 (105) 112 (± 9)	6 11 (9) 10 (± 3)	61 71 (65) 63 (± 5)	13 14 (13) 13 (± 1)	9 9 (11) 14 (± 3)	
	6 2 5 +	100 96 (95) 90 (± 5)	7 7 (7) 6 (± 1)	67 69 (67) 65 (± 2)	16 20 (16) 12 (± 4)	15 13 (14) 13 (± 1)	
	1 2 5 0 +	86 93 (92) 97 (± 6)	7 8 (7) 5 (± 2)	64 72 (70) 73 (± 5)	13 10 (14) 18 (± 4)	11 9 (11) 14 (± 3)	
	2 5 0 0 +	102 90 (95) 94 (± 6)	11 8 (8) 5 (± 3)	68 69 (70) 72 (± 2)	15 11 (13) 14 (± 2)	9 12 (12) 14 (± 3)	
	5 0 0 0 +	91 93 (93) 96 (± 3)	4 5 (4) 4 (± 1)	59 65 (63) 64 (± 3)	14 19 (16) 15 (± 3)	10 14 (12) 13 (± 2)	
S 9 mix (+)	陰性対照	91 121 (104) 100 (± 15)	11 9 (11) 12 (± 2)	94 95 (94) 94 (± 1)	24 27 (25) 23 (± 2)	12 19 (15) 15 (± 4)	
	3 1 3 +	90 97 (101) 116 (± 13)	10 10 (9) 8 (± 1)	84 95 (91) 93 (± 6)	34 19 (27) 29 (± 8)	18 20 (20) 21 (± 2)	
	6 2 5 +	94 95 (102) 117 (± 13)	10 9 (9) 9 (± 1)	87 92 (88) 85 (± 4)	25 26 (23) 19 (± 4)	14 19 (16) 15 (± 3)	
	1 2 5 0 +	100 122 (109) 104 (± 12)	7 10 (8) 6 (± 2)	85 81 (86) 93 (± 6)	28 23 (24) 20 (± 4)	14 18 (16) 16 (± 2)	
	2 5 0 0 +	92 91 (95) 101 (± 6)	7 9 (7) 6 (± 2)	82 81 (83) 87 (± 3)	18 24 (22) 23 (± 3)	11 17 (13) 10 (± 4)	
	5 0 0 0 +	93 84 (91) 97 (± 7)	10 6 (8) 9 (± 2)	82 84 (84) 86 (± 2)	21 15 (20) 23 (± 4)	16 14 (15) 16 (± 1)	
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 ($\mu\text{g}/7^\circ\text{プレート}$)	0.01	0.5	2	0.1	80
		コロニー数 / 7°プレート	556 536 (544) 541 (± 10)	399 392 (418) 464 (± 40)	2445 1969 (2144) 2018 (± 262)	568 584 (580) 589 (± 11)	196 159 (188) 210 (± 26)
	S9 mix を必要 とする もの	名 称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		用 量 ($\mu\text{g}/7^\circ\text{プレート}$)	1	2	2	0.5	2
		コロニー数 / 7°プレート	1242 1323 (1271) 1249 (± 45)	187 174 (182) 184 (± 7)	714 778 (761) 792 (± 42)	366 358 (365) 370 (± 6)	197 197 (190) 176 (± 12)

(備考) + : 沈殿物が認められた。

(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, NaN₃ : アジ化ナトリウム

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソクアニジン, 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

図 1 (本試験 1)

被験物質名： 硫化亜鉛

用量-反応曲線 (TA100)

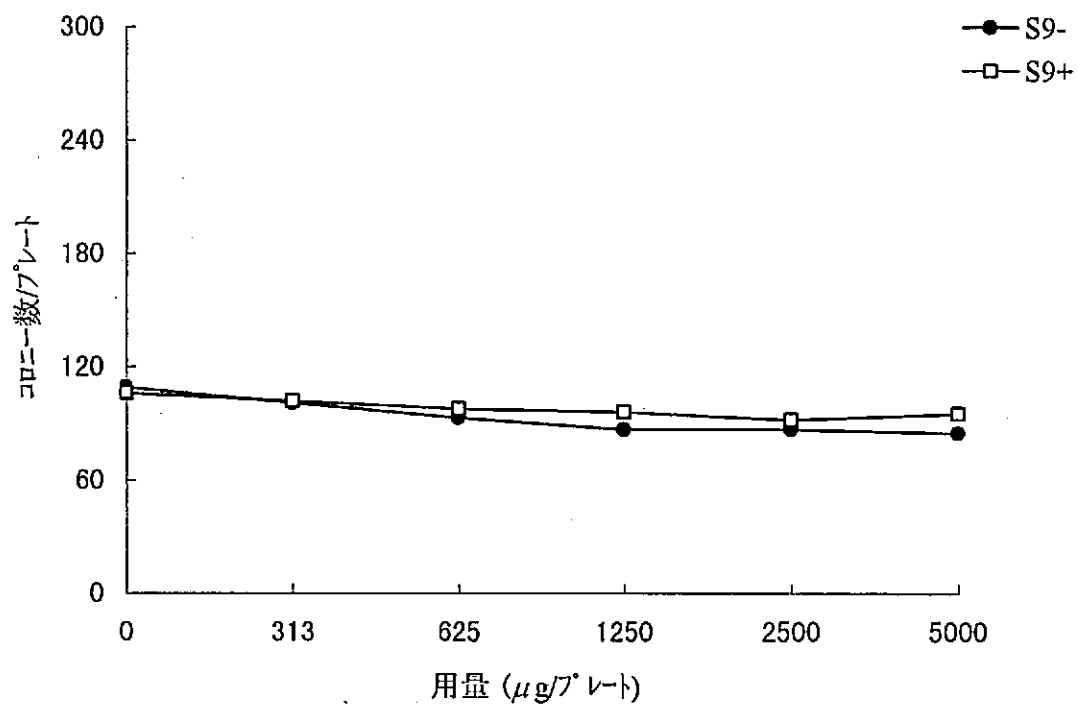


図 2 (本試験 1)

被験物質名： 硫化亜鉛

用量-反応曲線 (TA1535)

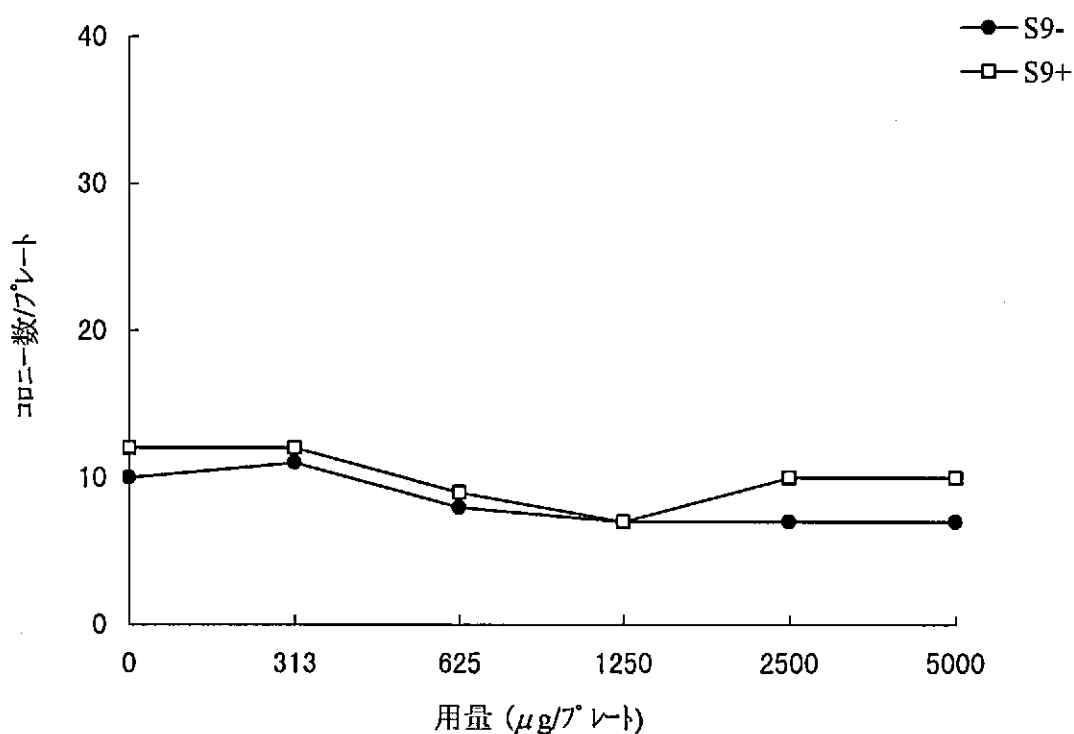


図 3 (本試験 1)

被験物質名: 硫化亜鉛

用量-反応曲線 (WP2uvrA /pKM101)

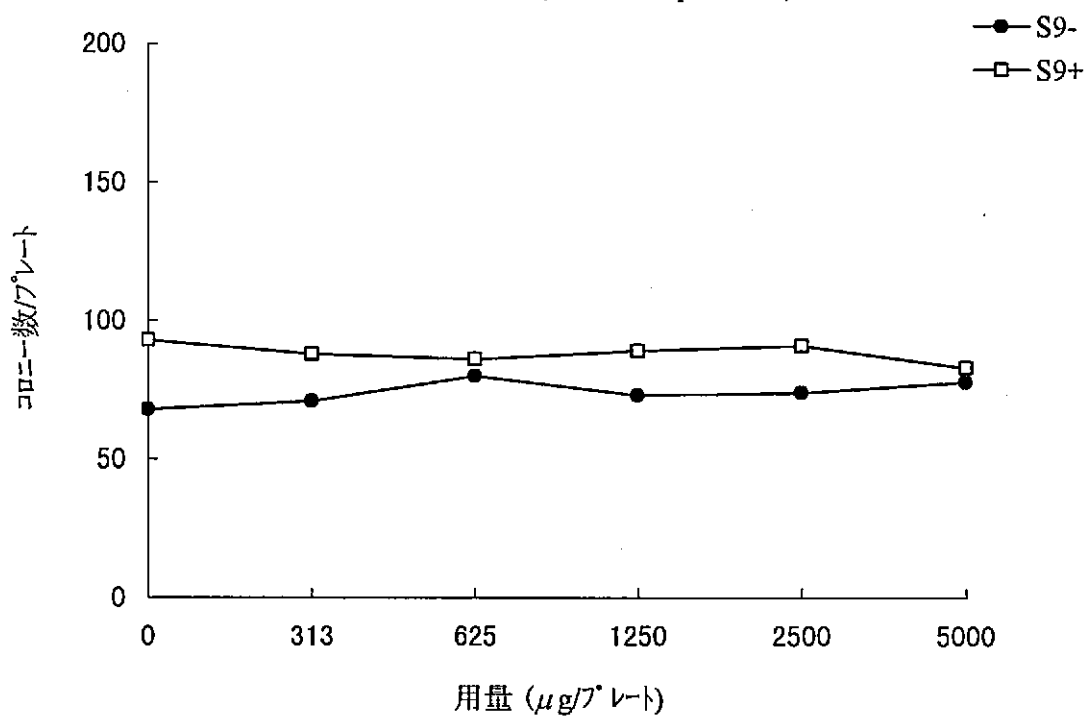


図 4 (本試験 1)

被験物質名: 硫化亜鉛

用量-反応曲線 (TA98)

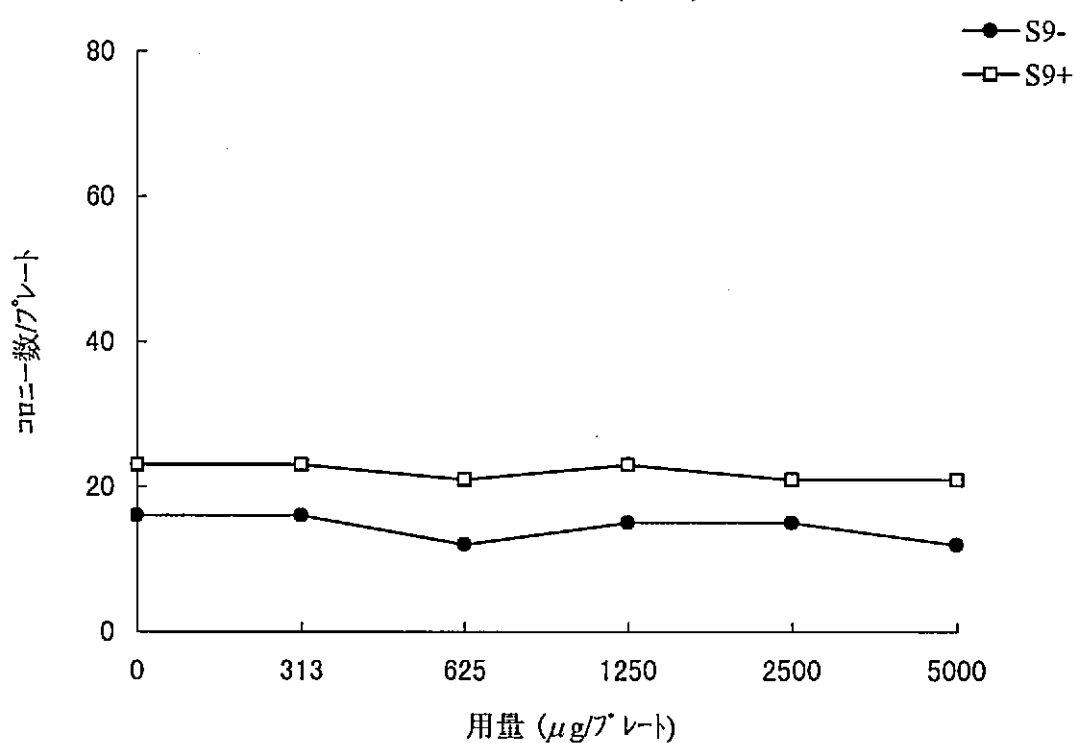


図 5 (本試験 1)

被験物質名： 硫化亜鉛

用量-反応曲線 (TA1537)

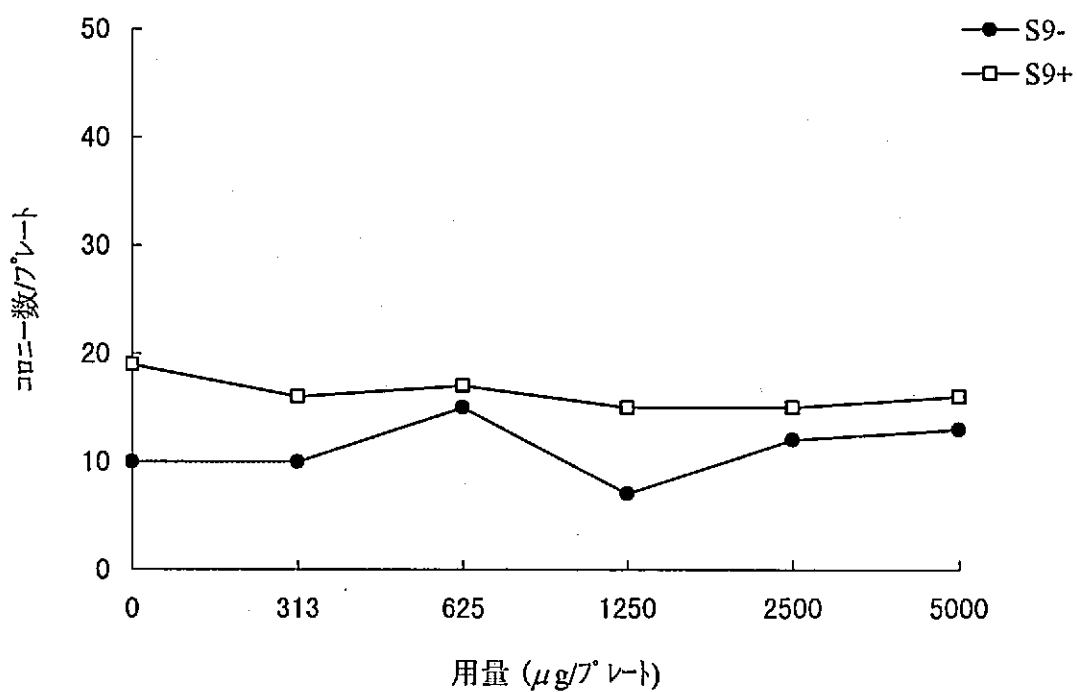


図 6 (本試験 2)

被験物質名： 硫化亜鉛

用量－反応曲線 (TA100)

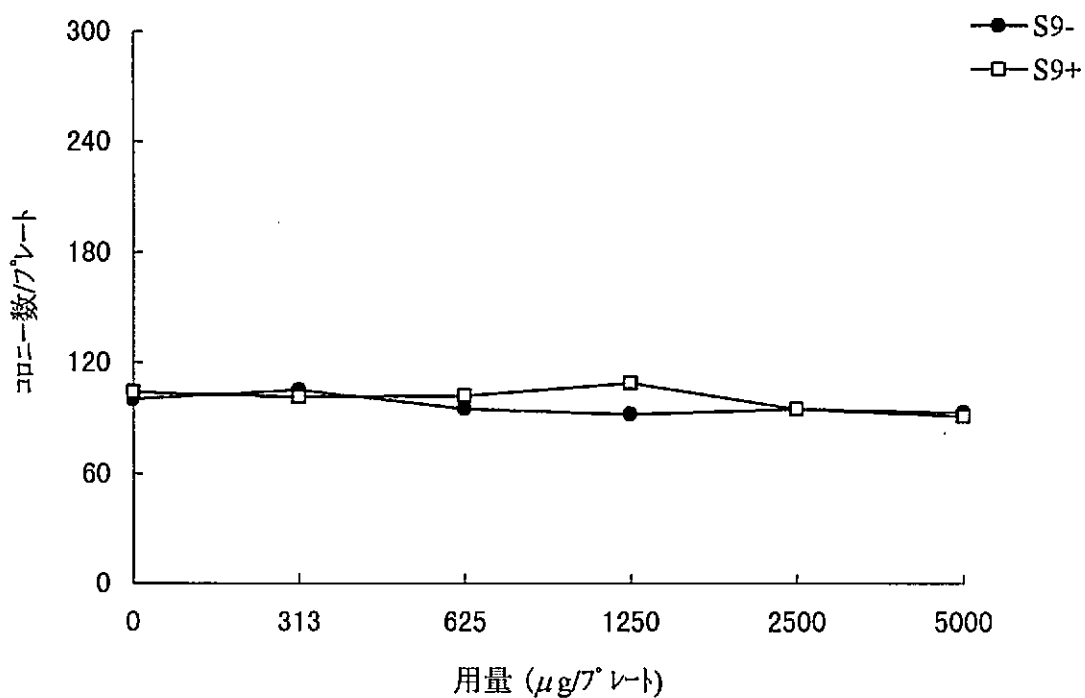


図 7 (本試験 2)

被験物質名： 硫化亜鉛

用量－反応曲線 (TA1535)

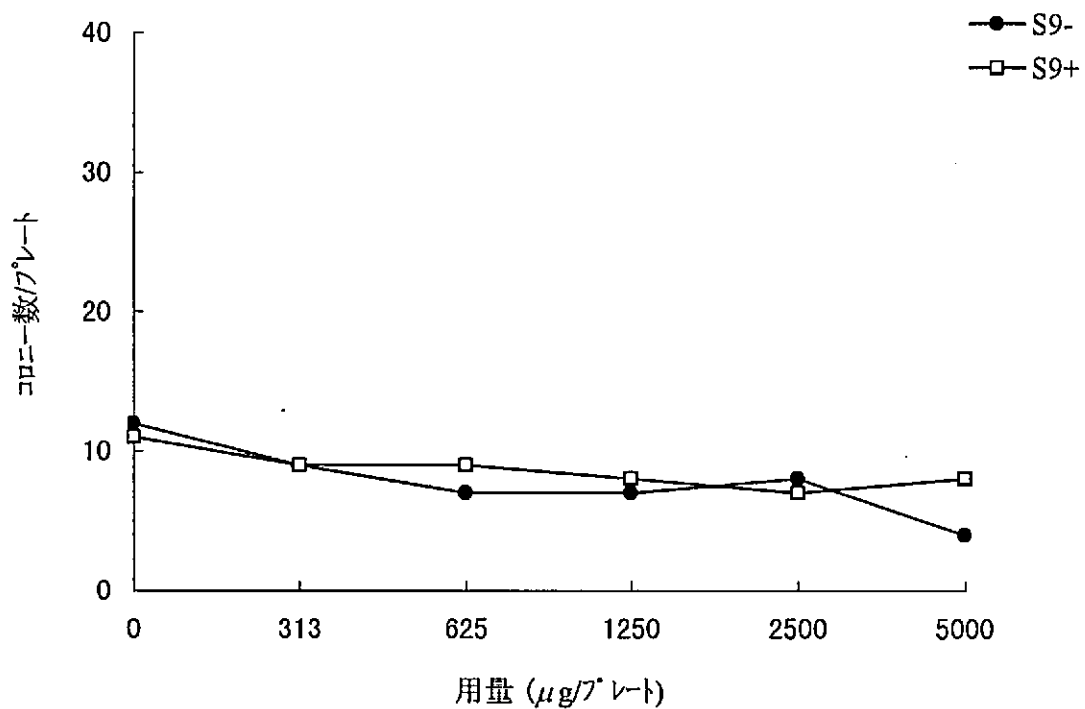


図 8 (本試験 2)

被験物質名： 硫化亜鉛

用量-反応曲線 (WP2uvrA /pKM101)

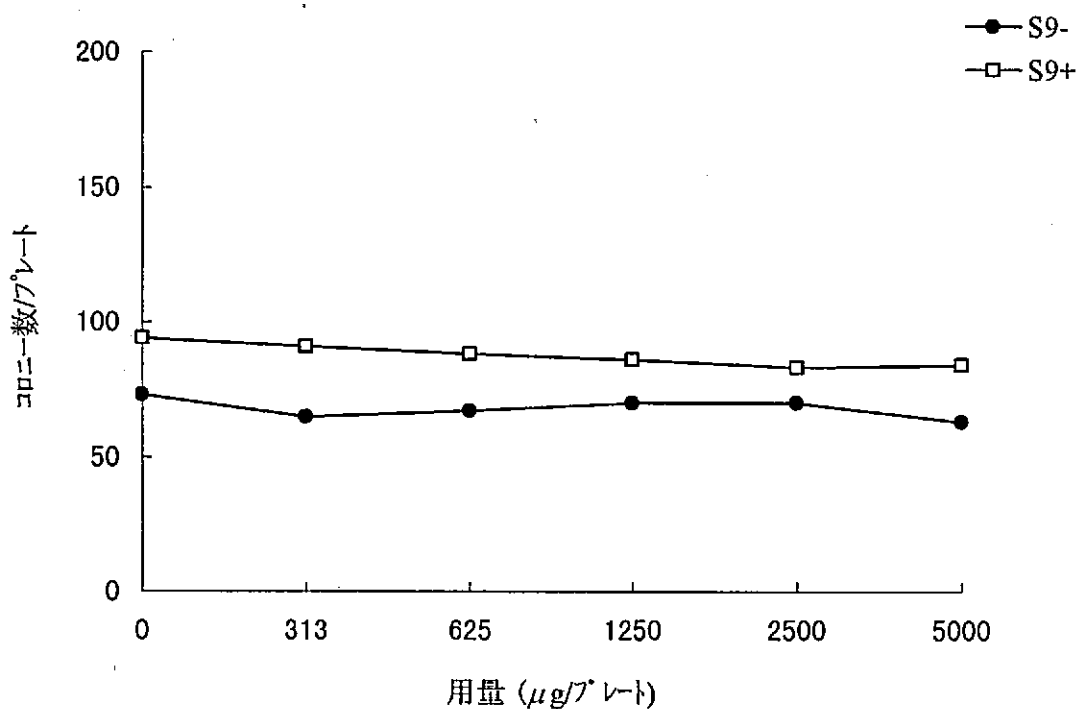


図 9 (本試験 2)

被験物質名： 硫化亜鉛

用量-反応曲線 (TA98)

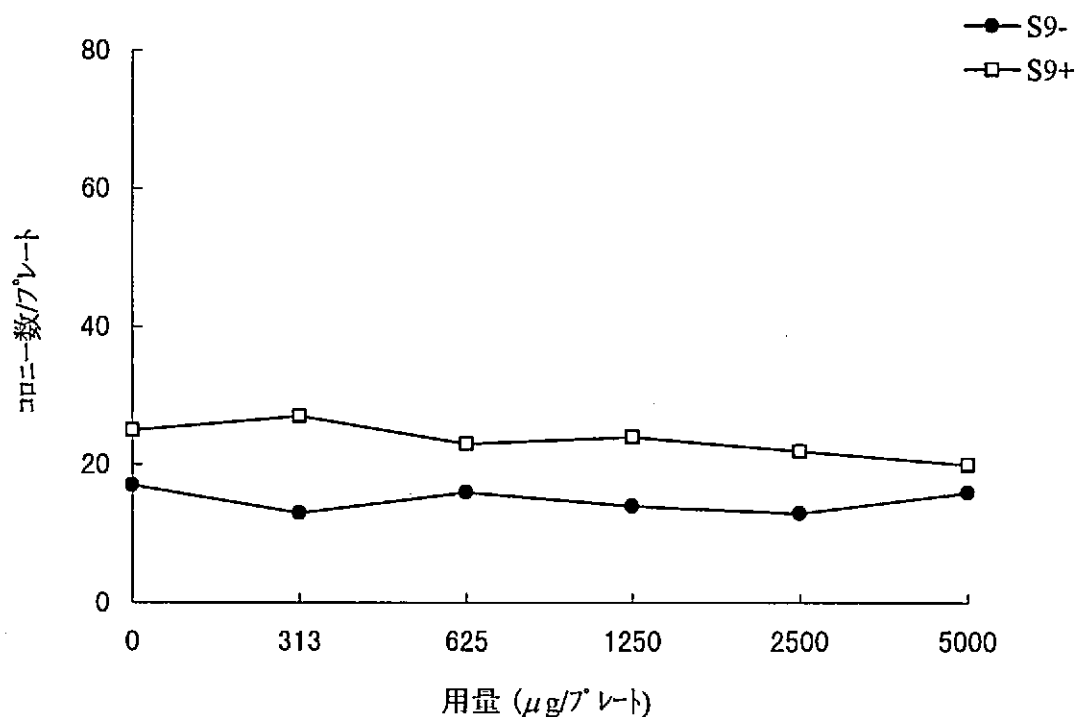
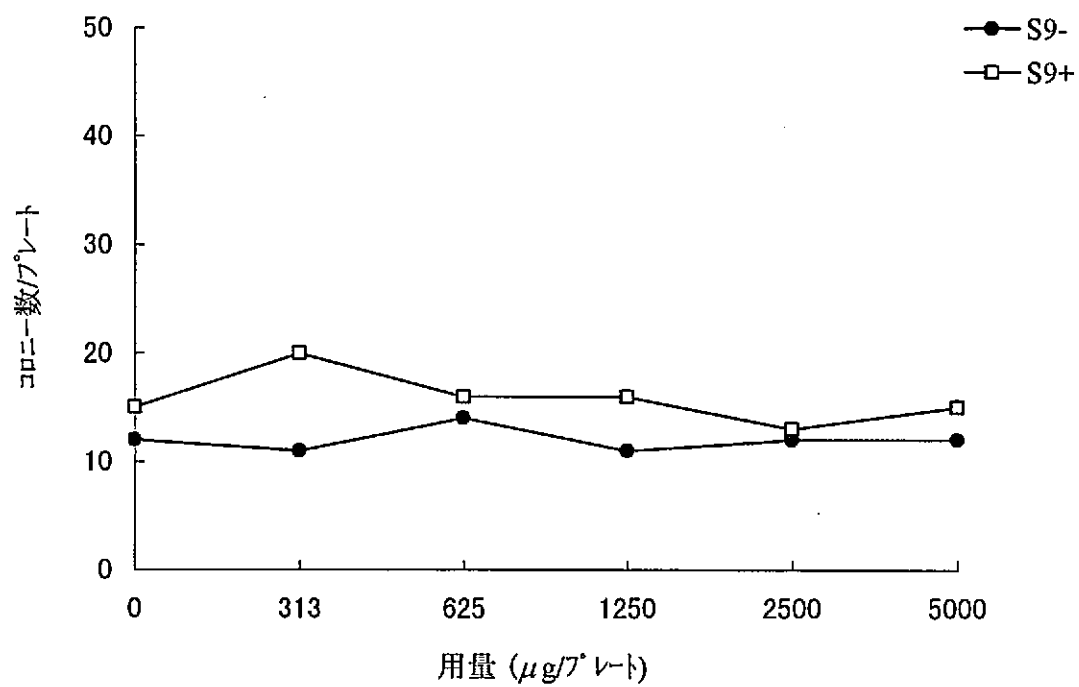


図 10 (本試験 2)

被験物質名： 硫化亜鉛

用量－反応曲線 (TA1537)



添付資料 1

1999 年度の陰性(溶媒)対照値および陽性対照値の背景データ

1. 陰性(溶媒)対照値

菌 株	S9 の有無	実験数	平均	平均±SD	平均±2SD	平均±3SD
TA100	S9－	129	116	97 - 135	78 - 154	59 - 173
	S9＋	129	118	99 - 137	80 - 156	60 - 175
TA1535	S9－	129	10	8 - 13	5 - 16	2 - 19
	S9＋	129	11	8 - 13	5 - 16	3 - 19
WP2 ^{uvrA} /pKM101	S9－	11	52	46 - 59	39 - 65	33 - 72
	S9＋	11	61	46 - 76	32 - 90	17 - 105
TA98	S9－	129	22	16 - 27	11 - 32	6 - 38
	S9＋	129	30	24 - 35	18 - 41	12 - 47
TA1537	S9－	130	8	6 - 11	3 - 14	0 - 17
	S9＋	130	13	9 - 17	5 - 20	1 - 24

2. 陽性対照値

菌 株	S9 の有無	名称および濃度(μg/plate)	実験数	平均	平均±SD	平均±2SD	平均±3SD
TA100	S9－	AF-2 0.01	129	516	413 - 619	311 - 722	208 - 825
	S9＋	2-AA 1.0	129	1068	793 - 1343	519 - 1618	244 - 1892
TA1535	S9－	NaN3 0.5	129	398	348 - 448	298 - 499	248 - 549
	S9＋	2-AA 2.0	129	209	179 - 238	149 - 268	119 - 298
WP2 ^{uvrA} /pKM101	S9－	ENNG 2.0	10	1640	1407 - 1873	1173 - 2107	940 - 2340
	S9＋	2-AA 2.0	11	689	602 - 776	515 - 863	428 - 950
TA98	S9－	AF-2 0.1	129	499	419 - 580	338 - 660	258 - 741
	S9＋	2-AA 0.5	129	449	362 - 535	276 - 622	190 - 708
TA1537	S9－	9-AA 80	130	420	309 - 530	199 - 640	89 - 751
	S9＋	2-AA 2.0	130	178	139 - 217	99 - 256	60 - 295

1999 年 1 月 8 日から 1999 年 12 月 23 日までのデータを集計した。

添付資料 2

2000 年度の陰性(溶媒)対照値および陽性対照値の背景データ

1. 陰性(溶媒)対照値

菌 株	S9 の有無	実験数	平均	平均±SD	平均±2SD	平均±3SD
TA100	S9－	118	111	98 - 124	85 - 137	72 - 150
	S9＋	116	115	102 - 128	89 - 141	76 - 154
TA1535	S9－	111	11	8 - 14	5 - 17	1 - 20
	S9＋	109	11	8 - 14	6 - 17	3 - 20
WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	S9－	58	63	56 - 70	49 - 78	42 - 85
	S9＋	58	85	78 - 92	71 - 99	64 - 106
TA98	S9－	115	20	15 - 25	10 - 30	5 - 35
	S9＋	113	28	23 - 34	17 - 40	11 - 46
TA1537	S9－	110	10	8 - 13	5 - 15	3 - 18
	S9＋	108	15	12 - 19	8 - 23	5 - 26

2. 陽性対照値

菌 株	S9 の有無	名称および 濃度(μg/plate)	実験数	平均	平均 ±SD	平均 ±2SD	平均 ±3SD
TA100	S9－	AF-2 0.01	118	578	509 - 647	440 - 716	372 - 785
	S9＋	2-AA 1.0	116	1361	1223 - 1500	1085 - 1638	946 - 1776
TA1535	S9－	NaN3 0.5	111	429	377 - 480	326 - 531	274 - 583
	S9＋	2-AA 2.0	109	231	203 - 259	174 - 287	146 - 315
WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	S9－	ENNG 2.0	58	2480	2216 - 2744	1952 - 3008	1688 - 3272
	S9＋	2-AA 2.0	58	759	586 - 931	414 - 1103	242 - 1275
TA98	S9－	AF-2 0.1	115	548	474 - 622	401 - 695	327 - 769
	S9＋	2-AA 0.5	113	452	395 - 509	338 - 566	281 - 622
TA1537	S9－	9-AA 80	110	275	201 - 349	128 - 422	54 - 496
	S9＋	2-AA 2.0	108	191	163 - 219	135 - 247	107 - 275

2000 年 1 月 14 日から 2000 年 12 月 14 日までのデータを集計した。

細菌を用いる復帰突然変異試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	硫化亜鉛		
別 名	—		
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)	ZnS		
試験に供した新規 化学物質の純度	98.1%	試験に供した新規 化学物質の Lot No.	<div></div>
不純物の名称及び濃度	—		
C A S 番 号	1314-98-3	蒸 気 圧	—
分 子 量	—	分配係数	—
融 点	1180℃で昇華する	常温における性状	微緑～白色粉末
沸 点	昇華		
安 定 性	通常の使用においては安定である		
溶媒に対する溶解度等	溶 媒	溶 解 度	溶媒中の安定性
	水	0.688 mg/100 mL (18℃)	—
	DMSO	*1 50 mg/mL で不溶	*2
	アセトン	—	—
	希塩酸・希硫酸	可溶	—

DMSO : ジメチルスルホキシド

*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。

2. 試験に用いた菌株

菌株名	入手先	入手年月日
TA100	カリフォルニア大学 B.N.Ames 教授	1983年 5月27日
TA1535		
TA98		
TA1537		
WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	日本バイオアッセイ研究センター	1997年 9月17日

3. S9 mix

(1) S9 の入手方法等 (該当する番号を○で囲み, 必要事項を記入すること.)

自製・購入の別	1. 自製 ② 購入 (製造元 : キッコーマン株式会社)
製造年月日	2000年 10月 27日 製造
購入の場合の Lot No.	RAA-434
保存温度	-80℃以下

(2) S9 の調製方法

使用動物		誘導物質	
種・系統	SD系ラット	名称	フェノバルビタール (PB), 5,6-ベンゾフラボン (BF)
性	雄	投与方法	腹腔内投与
週齢	7週齢	投与期間及び投与量 (g/kg 体重)	PB; 1日目 : 0.03 2~4日目 : 0.06 BF; PB投与3日目 : 0.08
体重	195 - 240 g		

(3) S9 mix の組成

成分	S9 mix 1 mL 中の量	成分	S9 mix 1 mL 中の量
S9	0.1 mL	β-NADPH	4 μmol
MgCl ₂ · 6H ₂ O	8 μmol	β-NADH	4 μmol
KCl	33 μmol	Na-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μmol
D-グルコース 6-リン酸	5 μmol	滅菌精製水	残量

4. 被験物質溶液の調製（被験物質溶液の性状及び純度換算の有無は該当するものを○で囲むこと。）

使用溶媒	名 称	製 造 元	Lot No.	グレード	純度 (%)
	DMSO	関東化学株式会社	204G1360	—	99.7
溶媒選択の理由	溶媒検討の結果、50 mg/mL で注射用水および DMSO に不溶であったが、DMSO に均一に懸濁した。また、DMSO 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 DMSO を用いた。				
被験物質溶液の性状	溶解	懸濁	その他（ ）		
被験物質が難溶性の場合における懸濁等の方法	被験物質に溶媒を加え、超音波で 1 分間処理した後、タッチミキサーで攪拌して均一に懸濁した。				
溶液の調製から使用までの保存時間と温度	10 分 ～ 40 分		室温		
純度換算の有無	有		無		

5. 前培養の条件等

(1) 条件

ニュートリエントブロス	名 称	製 造 元	Lot No.
	Oxoid Nutrient Broth	Unipath 社	028 59365
前培養時間	8 時間		
培養容器 (形状・容量)	L 型試験管 22.0 mL		
培養液量	10 mL	接種菌量	20 μ L

(2) 前培養終了時の生菌数等

菌 株 名		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2uvrA/pKM101	TA98	TA1537
生菌数 ($\times 10^9$ /mL)	予 備 試 験	2.54	2.62	4.21	2.22	2.42
	本 試 験 1	2.52	2.62	4.01	2.43	2.27
	本 試 験 2	2.62	2.70	4.41	2.27	2.35
測 定 方 法 (いずれかを○で囲むこと)		1. O.D.値よりの換算 2. 段階希釈法 3. 濁度よりの換算				

6. 最少グルコース寒天平板培養地（該当する番号を○で囲み、必要事項を記入すること。）

自製・購入の別	1. 自製 2. 購入（製造元：オリエンタル酵母工業株式会社）
製造年月日	2000 年 9 月 7 日
購入の場合の Lot No.	クリメディア AM-N 培地 ANI530IP
使用寒天の名称・ 製造元・Lot No.	名 称：伊那寒天 (BA-30A) 製造元：伊那食品工業㈱ Lot No. : 90705

7. 試験の方法（該当する番号を○で囲み、必要事項を記入すること。）

(1) 試験方法とその選定理由

採用した試験方法	1. プレインキュベーション法 2. プレート法 3. その他（ ）
その他の場合は その選定理由	

(2) 試験条件

組 成	菌 懸 濁 液	0.1 mL
	被験物質溶液	0.1 mL
	Na-リン酸緩衝液（直接法による場合）	0.5 mL
	S9 mix（代謝活性化法による場合）	0.5 mL
	トッパアガー	2.0 mL
	その他（ ）	—
プレインキュベーション	温 度	37℃
	時 間	20 分
インキュベーション	温 度	37℃
	時 間	48 時間

8. コロニー計測の方法

計測方法	1. マニュアル計測 2. 機器計測
補正の有無	1. 無 2. 有（補正の方法：面積および数え落とし補正）

9. 試験の結果

(1) 試験結果は別表 1～3 による。


(2) 結果の判定

判 定 (いずれかを○で囲むこと.)	陽 性 陰 性
<p>判定の理由</p> <p>予備試験の結果をもとに、本試験 1, 2 を 5000 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量にして実施した結果, S9 mix の有無によらず, いずれの菌株においても陰性(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は認められなかった。</p> <p>以上の結果から、被験物質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。</p>	

(3) 参考事項

- ・ 予備試験を 5000, 1250, 313, 78.1, 19.5, 4.88, 1.22 $\mu\text{g/プレート}$ の 7 用量で実施した結果, S9 mix の有無によらず, いずれの菌株においても復帰変異コロニー数の増加および菌の生育阻害は認められなかった。この結果をもとに本試験 1, 2 では, S9 mix 非共存下および共存下のすべての菌株について 5000～313 $\mu\text{g/プレート}$ (公比 2)の 5 用量を設定した。
- ・ S9 mix の有無によらず, いずれの菌株においても菌の生育阻害は認められなかった。
- ・ S9 mix 非共存下の 313 $\mu\text{g/プレート}$ 以上および共存下の 78.1 $\mu\text{g/プレート}$ 以上で沈殿物が認められた。
- ・ 試験結果の判定には, 統計学的手法は用いなかった。

10. その他

試験実施施設	名 称	株式会社三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所
	所在地	茨城県鹿島郡波崎町砂山 14 番地 電話 0479(46)2871 FAX 0479(46)2874
試験責任者	職氏名	
	経験年数	
試験番号	B000873	
試験期間	2000 年 12 月 4 日 より 2001 年 3 月 23 日	

試 験 結 果 表 (予備試験)

被験物質の名称 : 硫化亜鉛

試験実施期間		2000年 12月 5日 より 2000年 12月 8日					
代謝活性化系の有無	被験物質用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	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/pKM101	TA98	TA1537	
S 9 mix (-)	陰性対照	121	9	50	13	9	
	1.22	107	13	68	12	10	
	4.88	114	11	52	16	8	
	19.5	100	13	55	15	11	
	78.1	125	13	52	17	9	
	313+	118	9	59	12	7	
	1250+	116	11	57	17	7	
	5000+	109	10	52	14	5	
S 9 mix (+)	陰性対照	110	16	74	22	11	
	1.22	111	11	73	17	14	
	4.88	110	16	74	20	12	
	19.5	114	12	70	20	14	
	78.1+	119	11	71	21	12	
	313+	114	15	83	25	18	
	1250+	100	13	92	20	21	
	5000+	108	12	78	17	14	
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($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.5	2	0.1	80
		コロニー数/ プレート	625	403	2357	544	206
	S9 mixを必要とするもの	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		用量($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	1	2	2	0.5	2
		コロニー数/ プレート	1777	282	1053	565	227

(備考) + : 沈殿物が認められた。

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド, NaN₃ : アジ化ナトリウム

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニシン, 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

試 験 結 果 表 (本 試 験 1)

被験物質の名称 : 硫化亜鉛

試験実施期間		2001年 2月 5日 より 2001年 2月 8日						
代謝活性化系の有無	被験物質 用 量 ($\mu\text{g}/7^\circ\text{プレート}$)	復帰変異数 (コロニー数/ 7°プレート)						
		塩 基 対 置 換 型			フ レームシフト型			
		TA100	TA1535	WP2uvrA/pKM101	TA98	TA1537		
S 9 mix (-)	陰性対照	107 105 (109) 115 (\pm 5)	11 12 (10) 8 (\pm 2)	64 69 (68) 71 (\pm 4)	14 16 (16) 17 (\pm 2)	9 11 (10) 9 (\pm 1)		
		84 111 (101) 107 (\pm 15)	8 12 (11) 12 (\pm 2)	60 70 (71) 83 (\pm 12)	18 17 (16) 14 (\pm 2)	12 9 (10) 10 (\pm 2)		
		98 100 (93) 81 (\pm 10)	6 10 (8) 7 (\pm 2)	87 74 (80) 80 (\pm 7)	11 10 (12) 15 (\pm 3)	21 12 (15) 11 (\pm 6)		
	3 1 3 +	83 92 (87) 86 (\pm 5)	8 5 (7) 7 (\pm 2)	72 73 (73) 74 (\pm 1)	15 13 (15) 18 (\pm 3)	6 8 (7) 8 (\pm 1)		
		90 86 (87) 85 (\pm 3)	10 5 (7) 6 (\pm 3)	66 88 (74) 68 (\pm 12)	15 15 (15) 14 (\pm 1)	14 11 (12) 11 (\pm 2)		
		81 92 (85) 81 (\pm 6)	6 10 (7) 5 (\pm 3)	74 79 (78) 80 (\pm 3)	10 12 (12) 14 (\pm 2)	11 17 (13) 11 (\pm 3)		
	S 9 mix (+)	陰性対照	113 109 (106) 97 (\pm 8)	13 8 (12) 15 (\pm 4)	84 91 (93) 105 (\pm 11)	28 21 (23) 19 (\pm 5)	20 16 (19) 20 (\pm 2)	
			93 107 (102) 106 (\pm 8)	13 8 (12) 14 (\pm 3)	92 82 (88) 90 (\pm 5)	23 19 (23) 28 (\pm 5)	16 15 (16) 17 (\pm 1)	
			100 86 (98) 108 (\pm 11)	9 10 (9) 8 (\pm 1)	84 90 (86) 83 (\pm 4)	15 25 (21) 22 (\pm 5)	19 15 (17) 18 (\pm 2)	
		3 1 3 +	86 102 (96) 100 (\pm 9)	4 12 (7) 5 (\pm 4)	86 88 (89) 92 (\pm 3)	30 17 (23) 23 (\pm 7)	13 16 (15) 16 (\pm 2)	
			93 97 (92) 87 (\pm 5)	10 12 (10) 8 (\pm 2)	91 85 (91) 97 (\pm 6)	20 21 (21) 22 (\pm 1)	12 15 (15) 19 (\pm 4)	
			87 98 (95) 101 (\pm 7)	8 11 (10) 10 (\pm 2)	89 83 (83) 78 (\pm 6)	22 15 (21) 26 (\pm 6)	15 19 (16) 13 (\pm 3)	
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 ($\mu\text{g}/7^\circ\text{プレート}$)	0.01	0.5	2	0.1	80
			コロニー数 / 7°プレート	534 469 (552) 654 (\pm 94)	433 427 (431) 434 (\pm 4)	2177 2102 (2103) 2031 (\pm 73)	549 555 (539) 514 (\pm 22)	273 223 (231) 196 (\pm 39)
		S9 mix を必要 とする も の	名 称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
			用 量 ($\mu\text{g}/7^\circ\text{プレート}$)	1	2	2	0.5	2
			コロニー数 / 7°プレート	1306 1210 (1281) 1328 (\pm 63)	249 211 (229) 226 (\pm 19)	850 935 (883) 865 (\pm 45)	483 457 (484) 511 (\pm 27)	277 206 (234) 218 (\pm 38)

(備考) + : 沈殿物が認められた。

(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, 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, 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

試 験 結 果 表 (本 試 験 2)

被験物質の名称 : 硫化亜鉛

試験実施期間		2001年 2月 13日 より 2001年 2月 16日					
代謝活性化系の有無	被験物質 用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	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/pKM101	TA98	TA1537	
S 9 mix (-)	陰性対照	99 91 (100) 110 (± 10)	12 12 (12) 12 (± 0)	74 72 (73) 72 (± 1)	17 16 (17) 17 (± 1)	14 13 (12) 10 (± 2)	
		109 95 (105) 112 (± 9)	6 11 (9) 10 (± 3)	61 71 (65) 63 (± 5)	13 14 (13) 13 (± 1)	9 9 (11) 14 (± 3)	
		100 96 (95) 90 (± 5)	7 7 (7) 6 (± 1)	67 69 (67) 65 (± 2)	16 20 (16) 12 (± 4)	15 13 (14) 13 (± 1)	
	3 1 3 +	86 93 (92) 97 (± 6)	7 8 (7) 5 (± 2)	64 72 (70) 73 (± 5)	13 10 (14) 18 (± 4)	11 9 (11) 14 (± 3)	
		102 90 (95) 94 (± 6)	11 8 (8) 5 (± 3)	68 69 (70) 72 (± 2)	15 11 (13) 14 (± 2)	9 12 (12) 14 (± 3)	
		91 93 (93) 96 (± 3)	4 5 (4) 4 (± 1)	59 65 (63) 64 (± 3)	14 19 (16) 15 (± 3)	10 14 (12) 13 (± 2)	
	6 2 5 +	91 121 (104) 100 (± 15)	11 9 (11) 12 (± 2)	94 95 (94) 94 (± 1)	24 27 (25) 23 (± 2)	12 19 (15) 15 (± 4)	
		90 97 (101) 116 (± 13)	10 10 (9) 8 (± 1)	84 95 (91) 93 (± 6)	34 19 (27) 29 (± 8)	18 20 (20) 21 (± 2)	
		94 95 (102) 117 (± 13)	10 9 (9) 9 (± 1)	87 92 (88) 85 (± 4)	25 26 (23) 19 (± 4)	14 19 (16) 15 (± 3)	
	1 2 5 0 +	100 122 (109) 104 (± 12)	7 10 (8) 6 (± 2)	85 81 (86) 93 (± 6)	28 23 (24) 20 (± 4)	14 18 (16) 16 (± 2)	
		92 91 (95) 101 (± 6)	7 9 (7) 6 (± 2)	82 81 (83) 87 (± 3)	18 24 (22) 23 (± 3)	11 17 (13) 10 (± 4)	
		93 84 (91) 97 (± 7)	10 6 (8) 9 (± 2)	82 84 (84) 86 (± 2)	21 15 (20) 23 (± 4)	16 14 (15) 16 (± 1)	
S 9 mix (+)	陰性対照	91 121 (104) 100 (± 15)	11 9 (11) 12 (± 2)	94 95 (94) 94 (± 1)	24 27 (25) 23 (± 2)	12 19 (15) 15 (± 4)	
		90 97 (101) 116 (± 13)	10 10 (9) 8 (± 1)	84 95 (91) 93 (± 6)	34 19 (27) 29 (± 8)	18 20 (20) 21 (± 2)	
		94 95 (102) 117 (± 13)	10 9 (9) 9 (± 1)	87 92 (88) 85 (± 4)	25 26 (23) 19 (± 4)	14 19 (16) 15 (± 3)	
	3 1 3 +	100 122 (109) 104 (± 12)	7 10 (8) 6 (± 2)	85 81 (86) 93 (± 6)	28 23 (24) 20 (± 4)	14 18 (16) 16 (± 2)	
		92 91 (95) 101 (± 6)	7 9 (7) 6 (± 2)	82 81 (83) 87 (± 3)	18 24 (22) 23 (± 3)	11 17 (13) 10 (± 4)	
		93 84 (91) 97 (± 7)	10 6 (8) 9 (± 2)	82 84 (84) 86 (± 2)	21 15 (20) 23 (± 4)	16 14 (15) 16 (± 1)	
	6 2 5 +	91 121 (104) 100 (± 15)	11 9 (11) 12 (± 2)	94 95 (94) 94 (± 1)	24 27 (25) 23 (± 2)	12 19 (15) 15 (± 4)	
		90 97 (101) 116 (± 13)	10 10 (9) 8 (± 1)	84 95 (91) 93 (± 6)	34 19 (27) 29 (± 8)	18 20 (20) 21 (± 2)	
		94 95 (102) 117 (± 13)	10 9 (9) 9 (± 1)	87 92 (88) 85 (± 4)	25 26 (23) 19 (± 4)	14 19 (16) 15 (± 3)	
	1 2 5 0 +	100 122 (109) 104 (± 12)	7 10 (8) 6 (± 2)	85 81 (86) 93 (± 6)	28 23 (24) 20 (± 4)	14 18 (16) 16 (± 2)	
		92 91 (95) 101 (± 6)	7 9 (7) 6 (± 2)	82 81 (83) 87 (± 3)	18 24 (22) 23 (± 3)	11 17 (13) 10 (± 4)	
		93 84 (91) 97 (± 7)	10 6 (8) 9 (± 2)	82 84 (84) 86 (± 2)	21 15 (20) 23 (± 4)	16 14 (15) 16 (± 1)	
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($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.5	2	0.1	80
		コロニー数/プレート	556 536 (544) 541 (± 10)	399 392 (418) 464 (± 40)	2445 1969 (2144) 2018 (± 262)	568 584 (580) 589 (± 11)	196 159 (188) 210 (± 26)
	S9 mixを必要とするもの	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		用量($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	1	2	2	0.5	2
		コロニー数/プレート	1242 1323 (1271) 1249 (± 45)	187 174 (182) 184 (± 7)	714 778 (761) 792 (± 42)	366 358 (365) 370 (± 6)	197 197 (190) 176 (± 12)

(備考) + : 沈殿物が認められた。

(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, 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, 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

GENETIC TOXICITY IN VITRO (BACTERIAL TEST)

TEST SUBSTANCE

- Zinc sulfide (CAS No. 1314-98-3)

Remarks: Source: [REDACTED] Lot No. [REDACTED] Purity: 98.1 %, Kept in an airtight container and in a refrigerator and dark until use

METHOD

- Method/guideline: OECD Guideline for Bacterial Reverse Mutation Test (No. 471, 1997)
- Test type: Reverse mutation assay
- GLP: Yes
- Year: 2000-2001
- Species/Strain: *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537
Escherichia coli WP2uvrA/pKM101
- Metabolic activation: With and without S9 from rat liver, induced with phenobarbital and 5,6-benzoflavone
- Statistical methods: none

REMARKS FIELD FOR TEST CONDITIONS

- Study Design:
 - Concentration: -S9: 0, 313, 625, 1250, 2500, 5000 µg/plate (all strains)
+S9: 0, 313, 625, 1250, 2500, 5000 µg/plate (all strains)
 - Number of replicates: 2
 - Plates/test: 3
 - Procedure: According to the preliminary test results, the main test was performed twice.
 - Solvent: Dimethyl sulfoxide
 - Positive controls: -S9: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide (TA100 and TA98)
Sodium azide (TA1535), 9-Aminoacridine (TA1537) and
N-Ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (WP2uvrA/pKM101)
+S9: 2-Aminoanthracene (all strains)

RESULTS

- Cytotoxic concentration:

Toxicity was not observed up to 5000 µg/plate (five strains) with and without metabolic activation.

• **Genotoxic effects:**

	+	?	-
With metabolic activation:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Without metabolic activation:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

REMARKS FIELD FOR RESULTS.

This Chemical did not induce gene mutation up to 5000 µg/plate in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* strains with or without metabolic activation.

CONCLUSIONS

This Chemical is not mutagenic under the conditions of the study.

DATA QUALITY

- **Reliabilities:** Valid without restriction

Remarks field for Data Reliability

Well conducted study, carried out by the Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd. (Japan).

REFERENCES (Free Text)

- 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 Mutagenicity Tests in Industrial Safety and Health Law (1991) : Edited by the Chemical Substance Investigation Division of the Industrial Safety and Health Department of the Ministry of Labor of Japan, Japan Industrial Safety and Health Association, Tokyo.

GENERAL REMARKS