

最終報告書

リアクティブブルー19の細菌を用いる復帰突然変異試験
(試験番号：00-141)

財団法人 畜産生物科学安全研究所

陳述書

試験表題：リアクティブブルー19の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号： 00-141

本試験は、OECDの試験法ガイドライン“OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS, 471, Bacterial Reverse Mutation Test(1997)”およびOECDのGLP “OECD PRINCIPLES OF GOOD LABORATORY PRACTICE(1997)”に定める基準に準拠して実施した。

試験責任者



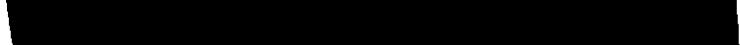
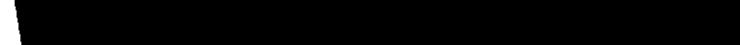
試験表題：リアクティブブルー19の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：00-141

試験委託者：

名 称 製品評価技術センター
所在地 東京都渋谷区西原二丁目49番10号
委託責任者 

試験実施施設：

名 称 財団法人 畜産生物科学安全研究所
所在地 神奈川県相模原市橋本台三丁目7番11号
運営管理者 
試験責任者 
信頼性保証責任者 

試験期間：

試験開始日 平成12年12月14日
実験期間 開始日：平成13年1月10日
終了日：平成13年2月3日
試験終了日 平成13年3月29日

試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる要因：

本試験に関し、試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる要因はなかった。

資料の保管：

本試験における下記の資料は、最終報告書作成後 10 年間、財団法人 畜産生物科学安全研究所において保管する。その後の保管については、試験委託者と協議して決める。

1. 試験計画書
2. 被験物質に関する記録
3. 試験結果に関する記録
4. 信頼性保証に関する記録
5. 最終報告書

試験責任者，担当者および業務分担

試験責任者

試験担当者およびその業務分担

実験操作

データ整理

信頼性保証証明書

試験表題 : リアクティブブルー 19 の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号 : 00-141

<u>審査・査察実施日</u>	<u>試験責任者への報告日</u>	<u>運営管理者への報告日</u>
1. 試験実施状況査察		
本試験(1回目): 指標菌株の前培養 平成13年01月15日	平成13年01月15日	平成13年01月15日
本試験(1回目): 被験物質の秤量・菌数チェック・被験物質調製・菌液の取扱い・S9mixの使用・被験物質, 対照物質及び菌液の添加・トップアガールの作製・指標菌株の検査・無菌試験 平成13年01月16日	平成13年01月16日	平成13年01月16日
本試験(1回目): 指標菌株検査結果の判定手順 平成13年01月17日	平成13年01月17日	平成13年01月17日
本試験(1回目): コロニー数の計測・無菌試験及びアミノ酸要求性検査の結果判定手順 平成13年01月18日	平成13年01月18日	平成13年01月18日
2. 生データ査察 平成13年03月06日	平成13年03月06日	平成13年03月06日
3. 報告書(草案) 審査 平成13年03月06日	平成13年03月06日	平成13年03月06日
4. 報告書審査 平成13年03月29日	平成13年03月29日	平成13年03月29日

上記の審査・査察により、本試験が「OECDのGLP」に従って実施され、本報告書には、当該試験で使用した方法・手順が忠実に記載され、試験成績には、当該試験の実施過程において得られた生データが正確に反映されていることを確認した。

平成 13 年 3 月 29 日
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	4
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	7
1) 用量設定	7
2) 実験方法	7
(1) プレインキュベーション法 (直接法)	7
(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	8
12. 試験の有効性	8
13. 結果の判定	8
結果	9
結論	10
参考文献	11

表：

表 1-1 S9 mix 非存在下におけるリアクティブブルー19 の復帰突然変異試験結果 [本試験 1 回目-直接法]	12
表 1-2 S9 mix 存在下におけるリアクティブブルー19 の復帰突然変異試験結果 [本試験 1 回目-代謝活性化法]	13

表 2-1	S9 mix 非存在下におけるリアクティブブルー19 の復帰突然変異試験結果 [本試験 2 回目-直接法]	14
表 2-2	S9 mix 存在下におけるリアクティブブルー19 の復帰突然変異試験結果 [本試験 2 回目-代謝活性化法]	15
図 :		
図 1	リアクティブブルー19 の復帰突然変異試験結果-本試験 1 回目	16
図 2	リアクティブブルー19 の復帰突然変異試験結果-本試験 2 回目	19
添付資料	復帰変異コロニー数-背景データ	22

要約

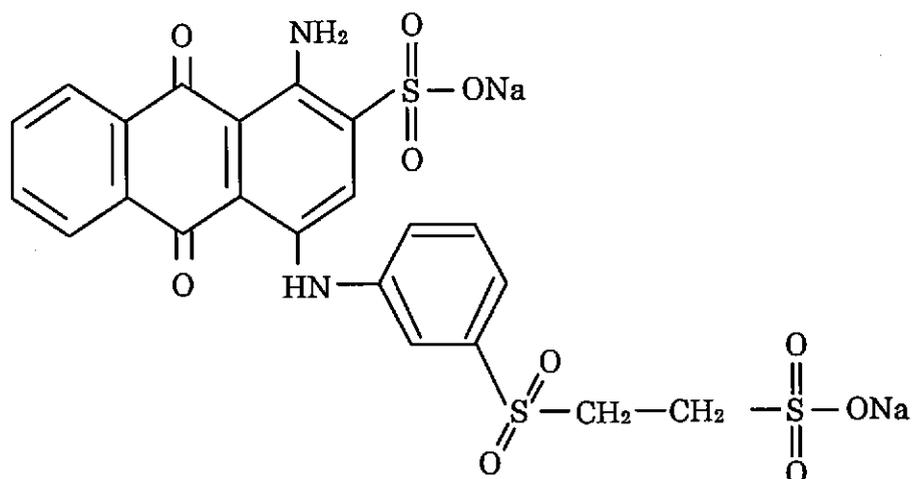
リアクティブブルー19の遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため、復帰突然変異試験を指標菌株として *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2uvrA を用い、S9 mix 非存在（直接法）および存在（代謝活性化法）下でプレインキュベーション法により行った。

用量は、用量設定試験（予備試験）の結果、5000 μ g/プレートまでの用量で代謝活性化の有無にかかわらず、全ての菌株において生育阻害が認められなかったため、156～5000 μ g/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、直接法の場合は、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。一方、代謝活性化法の場合は、試験1回目ではTA100, TA98 および TA1537 で用量依存的な復帰変異コロニー数の増加が認められ、それぞれ313～2500 μ g/プレート、313～2500 μ g/プレートおよび625 μ g/プレートで陰性対照値の2倍を超える増加が認められた。また、試験2回目においてもTA100, TA98 および TA1537 で用量依存的な復帰変異コロニー数の増加が認められ、それぞれ156～2500 μ g/プレート、156～2500 μ g/プレートおよび625～2500 μ g/プレートで陰性対照値の2倍を超える増加が認められた。菌の生育阻害については、代謝活性化の有無にかかわらず、全ての菌株において認められなかった。

以上の成績から、本実験条件下では、リアクティブブルー19の細菌に対する遺伝子突然変異誘発性は陽性と判定した。また、本被験物質の比変異活性値は、1833.3/mgであった。

構造式



分子式 $C_{22}H_{16}N_2O_{11}S_3Na_2$

分子量 626.56

性状(常温) 青色粉末

溶解性 水溶性 (50 mg/mL 以上)

安定性 : 安定 [実験終了後, 残余被験物質を(財)畜産生物科学安全研究所において分析 (平成 13 年 3 月 7 日) した結果, 純度は 77.0% 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°C), 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 WP2uvrA

(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する。

(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, 99.9%) を 0.07 mL の割合で加えて -80°C 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) 液体培地に接種し, 37°C 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 ($\text{OD}_{660\text{nm}}$) 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 ($\times 10^9/\text{mL}$)

指標菌株	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
用量設定試験	1.46	1.53	1.43	1.33	1.17
本試験(1回目)	1.38	1.53	1.47	1.41	1.17
本試験(2回目)	1.46	1.62	1.38	1.33	1.21

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-435・2000年11月10日製造・2000年11月21日購入, 本試験: ロット番号 FSM-438・2001年1月19日製造・2001年1月30日購入, ロット番号 FSM-435)。凍結 S9 mix は -80°C 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： 213～252 g (FSM-435), 206～243 g (FSM-438)

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) 投与方法（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

被験物質は水に可溶であるため、溶媒には蒸留水（株式会社大塚製薬工場，ロット番号 K0G81）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調製した。なお、供試液の調製に際しては、純度換算を行った。

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蒸留水を用いた。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 KSH7608，TPE7144，99.9%）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 K9G84，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 <i>uvrA</i>	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 126H0568, 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, 全指標菌株について, 39.1, 78.1, 156, 313, 625, 1250, 2500 および 5000 μg /プレートの 8 用量を用いて, 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, 代謝活性化の有無にかかわらず, いずれの菌株においても全ての用量において菌の生育阻害は認められなかった。

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、直接法および代謝活性化法ともに最高用量を試験法ガイドラインで規定されている上限量の5000 μ g/プレートとし、以下公比2で2500, 1250, 625, 313および156 μ g/プレートの計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°Cで20分間振盪培養後, 45°C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, ロット番号 ANI560IP・2000年9月21日製造・2000年11月8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°C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 (蒸留水) 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°Cで20分間振盪培養後, 45°C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°C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 (蒸留水) 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、ロット番号 ANI520IP・2000 年 9 月 5 日製造・2000 年 11 月 21 日購入、ロット番号 ANI560IP）に重層後、37°C 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1-1, 1-2, 2-1, 2-2 および図1-1, 1-2, 1-3, 2-1, 2-2, 2-3), 直接法の場合は, 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。代謝活性化法の場合は, 試験1回目ではTA100, TA98 および TA1537 で用量依存的な復帰変異コロニー数の増加が認められ, それぞれ 313~2500 μ g/プレート, 313~2500 μ g/プレートおよび 625 μ g/プレートで陰性対照値の2倍を超える増加が認められた。また, 試験2回目においても TA100, TA98 および TA1537 で用量依存的な復帰変異コロニー数の増加が認められ, それぞれ 156~2500 μ g/プレート, 156~2500 μ g/プレートおよび 625~2500 μ g/プレートで陰性対照値の2倍を超える増加が認められた。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においても認められなかった。

陰性対照値の2倍を超える復帰変異コロニー数の増加が認められる菌株について, それぞれの比変異活性値(比活性)を算出した(陰性対照値の2倍を超える復帰変異コロニー数の増加が認められた用量について, その復帰変異コロニー数の平均値から陰性対照のコロニー数の平均値を差し引いた値を用量で除して求めた。)³⁾。結果は下表のとおりであった。

(本試験1回目)

菌株名	比変異活性値 (誘発復帰変異コロニー数/mg)	計算に用いた用量 (μ g/プレート)
TA100	495.2	313
	216.0	625
	128.8	1250
	99.2	2500
TA98	236.4	313
	272.0	625
	188.0	1250
	36.0	2500
TA1537	27.2	625

(本試験 2 回目)

菌株名	比変異活性値 (誘発復帰変異コロニー数/mg)	計算に用いた用量 (μg /プレート)
TA100	1833.3	156
	1131.0	313
	755.2	625
	460.0	1250
	106.4	2500
TA98	326.9	156
	316.3	313
	316.8	625
	218.4	1250
	22.8	2500
TA1537	30.4	625
	30.4	1250
	6.8	2500

なお、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、陽性対照群においても、それぞれ背景データ（添付資料）の範囲内の陽性を示す復帰変異コロニー数の増加が認められた。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

リアクティブブルー19 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、2 回の本試験とも代謝活性化法における TA100、TA98 および TA1537 で明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。

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、本実験条件下ではリアクティブブルー19 の遺伝子突然変異誘発性は陽性と判定した。また、本被験物質の比変異活性値は最も高い値を示した 1833.3/mg を採用した。

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) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修, "化審法毒性試験法の解説 改訂版", 化学工業日報社, 東京, 1992, p. 47.

表 1-1 S9 mix 非存在下におけるリアクティブブルー19の復帰突然変異試験結果
〔本試験1回目—直接法〕

用 量 〔 μ g/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 〔蒸留水〕	129	10	22	28	8
	108	11	24	30	10
	113	5	24	29	13
	(117 \pm 11)	(9 \pm 3)	(23 \pm 1)	(29 \pm 1)	(10 \pm 3)
156	107	7	19	22	8
	114	10	30	35	17
	107	7	18	35	8
	(109 \pm 4)	(8 \pm 2)	(22 \pm 7)	(31 \pm 8)	(11 \pm 5)
313	106	6	24	33	9
	158	3	25	29	12
	123	3	25	29	11
	(129 \pm 27)	(4 \pm 2)	(25 \pm 1)	(30 \pm 2)	(11 \pm 2)
625	108	11	21	30	14
	115	11	20	17	9
	99	10	23	31	14
	(107 \pm 8)	(11 \pm 1)	(21 \pm 2)	(26 \pm 8)	(12 \pm 3)
1250	91	14	25	33	12
	111	7	21	21	8
	114	9	25	29	10
	(105 \pm 13)	(10 \pm 4)	(24 \pm 2)	(28 \pm 6)	(10 \pm 2)
2500	108	10	24	26	12
	131	8	22	25	9
	144	11	27	15	14
	(128 \pm 18)	(10 \pm 2)	(24 \pm 3)	(22 \pm 6)	(12 \pm 3)
5000	142	12	26	31	7
	119	8	35	26	12
	108	11	21	29	13
	(123 \pm 17)	(10 \pm 2)	(27 \pm 7)	(29 \pm 3)	(11 \pm 3)
陽性対照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
μ g/プレート	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復帰変異	465	376	959	427	276
コロニー数	464	468	969	382	243
/プレート	468	467	1028	391	279
	(466 \pm 2)	(437 \pm 53)	(985 \pm 37)	(400 \pm 24)	(266 \pm 20)

(): 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

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 存在下におけるリアクティブブルー19の復帰突然変異試験結果
〔本試験1回目ー代謝活性化法〕

用 量 〔 μ g/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 〔蒸留水〕	96	9	30	34	14
	109	10	28	29	15
	115	8	24	41	17
	(107 \pm 10)	(9 \pm 1)	(27 \pm 3)	(35 \pm 6)	(15 \pm 2)
156	140	11	18	75	19
	231	9	18	52	22
	225	8	24	65	23
	(199 \pm 51)	(9 \pm 2)	(20 \pm 3)	(64 \pm 12)	(21 \pm 2)
313	306	13	20	108	23
	264	9	32	112	30
	216	9	31	107	24
	(262 \pm 45)	(10 \pm 2)	(28 \pm 7)	(109 \pm 3)	(26 \pm 4)
625	216	7	23	212	29
	280	11	25	186	35
	230	10	18	216	31
	(242 \pm 34)	(9 \pm 2)	(22 \pm 4)	(205 \pm 16)	(32 \pm 3)
1250	325	10	24	266	33
	287	9	20	275	22
	193	8	33	268	21
	(268 \pm 68)	(9 \pm 1)	(26 \pm 7)	(270 \pm 5)	(25 \pm 7)
2500	288	8	33	131	23
	306	8	31	133	25
	472	8	34	111	24
	(355 \pm 101)	(8 \pm 0)	(33 \pm 2)	(125 \pm 12)	(24 \pm 1)
5000	185	8	32	38	14
	193	7	41	32	24
	167	9	24	33	23
	(182 \pm 13)	(8 \pm 1)	(32 \pm 9)	(34 \pm 3)	(20 \pm 6)
陽性対照	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
μ g/プレート	1	2	10	1	2
復帰変異	511	137	723	330	100
コロニー数	489	140	670	314	90
/プレート	436	127	715	367	79
	(479 \pm 39)	(135 \pm 7)	(703 \pm 29)	(337 \pm 27)	(90 \pm 11)

(): 平均値 \pm 標準偏差

2-AA: 2-アミノアントラセン

表 2-1 S9 mix 非存在下におけるリアクティブブルー19の復帰突然変異試験結果
〔本試験2回目—直接法〕

用 量 〔 μ g/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 〔蒸留水〕	138	9	16	27	10
	111	12	17	30	8
	125	12	26	30	13
	(125 \pm 14)	(11 \pm 2)	(20 \pm 6)	(29 \pm 2)	(10 \pm 3)
156	132	8	30	30	15
	110	11	26	27	12
	126	13	26	32	12
	(123 \pm 11)	(11 \pm 3)	(27 \pm 2)	(30 \pm 3)	(13 \pm 2)
313	114	5	19	25	9
	120	7	22	30	16
	123	10	21	34	12
	(119 \pm 5)	(7 \pm 3)	(21 \pm 2)	(30 \pm 5)	(12 \pm 4)
625	117	7	22	22	9
	122	9	24	28	8
	114	6	25	23	10
	(118 \pm 4)	(7 \pm 2)	(24 \pm 2)	(24 \pm 3)	(9 \pm 1)
1250	124	7	25	24	5
	120	8	24	21	15
	116	8	26	29	12
	(120 \pm 4)	(8 \pm 1)	(25 \pm 1)	(25 \pm 4)	(11 \pm 5)
2500	100	9	28	26	12
	115	8	25	29	14
	119	6	25	19	12
	(111 \pm 10)	(8 \pm 2)	(26 \pm 2)	(25 \pm 5)	(13 \pm 1)
5000	140	6	27	34	12
	118	11	35	29	9
	136	7	32	27	21
	(131 \pm 12)	(8 \pm 3)	(31 \pm 4)	(30 \pm 4)	(14 \pm 6)
陽性対照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
μ g/プレート	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復帰変異	548	378	610	370	317
コロニー数	502	346	647	374	242
/プレート	505	391	705	362	230
	(518 \pm 26)	(372 \pm 23)	(654 \pm 48)	(369 \pm 6)	(263 \pm 47)

(): 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

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 存在下におけるリアクティブブルー19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 [μ g/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 [蒸留水]	120	9	28	27	12
	109	10	25	25	16
	100	8	20	31	16
	(110 \pm 10)	(9 \pm 1)	(24 \pm 4)	(28 \pm 3)	(15 \pm 2)
156	449	8	23	79	22
	383	6	31	73	14
	356	13	21	86	23
	(396 \pm 48)	(9 \pm 4)	(25 \pm 5)	(79 \pm 7)	(20 \pm 5)
313	434	12	21	144	30
	438	9	30	121	15
	519	10	16	115	20
	(464 \pm 48)	(10 \pm 2)	(22 \pm 7)	(127 \pm 15)	(22 \pm 8)
625	551	10	18	251	31
	590	14	21	220	38
	604	10	20	206	33
	(582 \pm 27)	(11 \pm 2)	(20 \pm 2)	(226 \pm 23)	(34 \pm 4)
1250	687	11	32	318	43
	656	11	25	289	69
	712	5	19	295	48
	(685 \pm 28)	(9 \pm 3)	(25 \pm 7)	(301 \pm 15)	(53 \pm 14)
2500	369	8	27	89	34
	379	6	21	83	26
	381	5	20	84	36
	(376 \pm 6)	(6 \pm 2)	(23 \pm 4)	(85 \pm 3)	(32 \pm 5)
5000	157	9	21	21	14
	156	4	36	22	10
	149	12	35	28	10
	(154 \pm 4)	(8 \pm 4)	(31 \pm 8)	(24 \pm 4)	(11 \pm 2)
陽性対照	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
μ g/プレート	1	2	10	1	2
復帰変異	464	152	579	240	123
コロニー数	448	143	567	213	90
/プレート	426	139	591	235	86
	(446 \pm 19)	(145 \pm 7)	(579 \pm 12)	(229 \pm 14)	(100 \pm 20)

(): 平均値 \pm 標準偏差
 2-AA: 2-アミノアントラセン

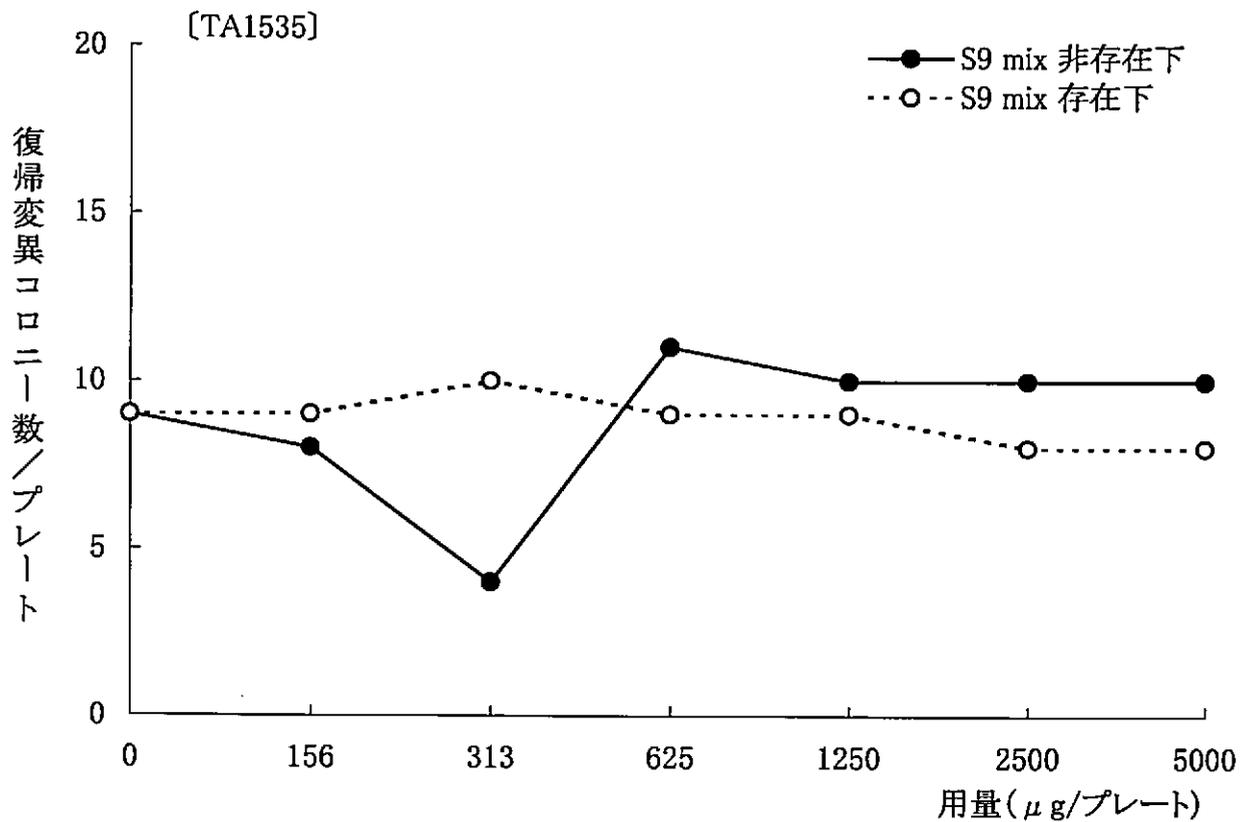
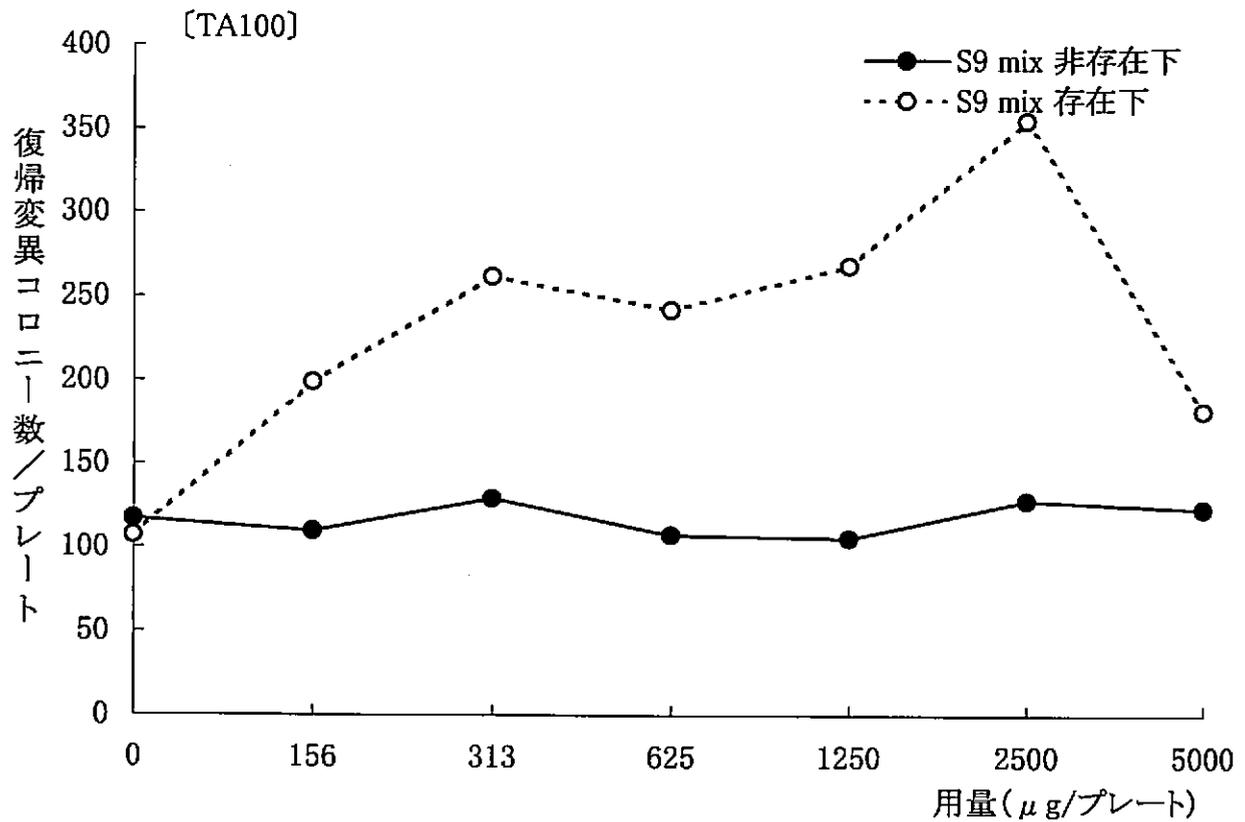


図 1-1 リアクティブブルー19の復帰突然変異試験結果一本試験1回目

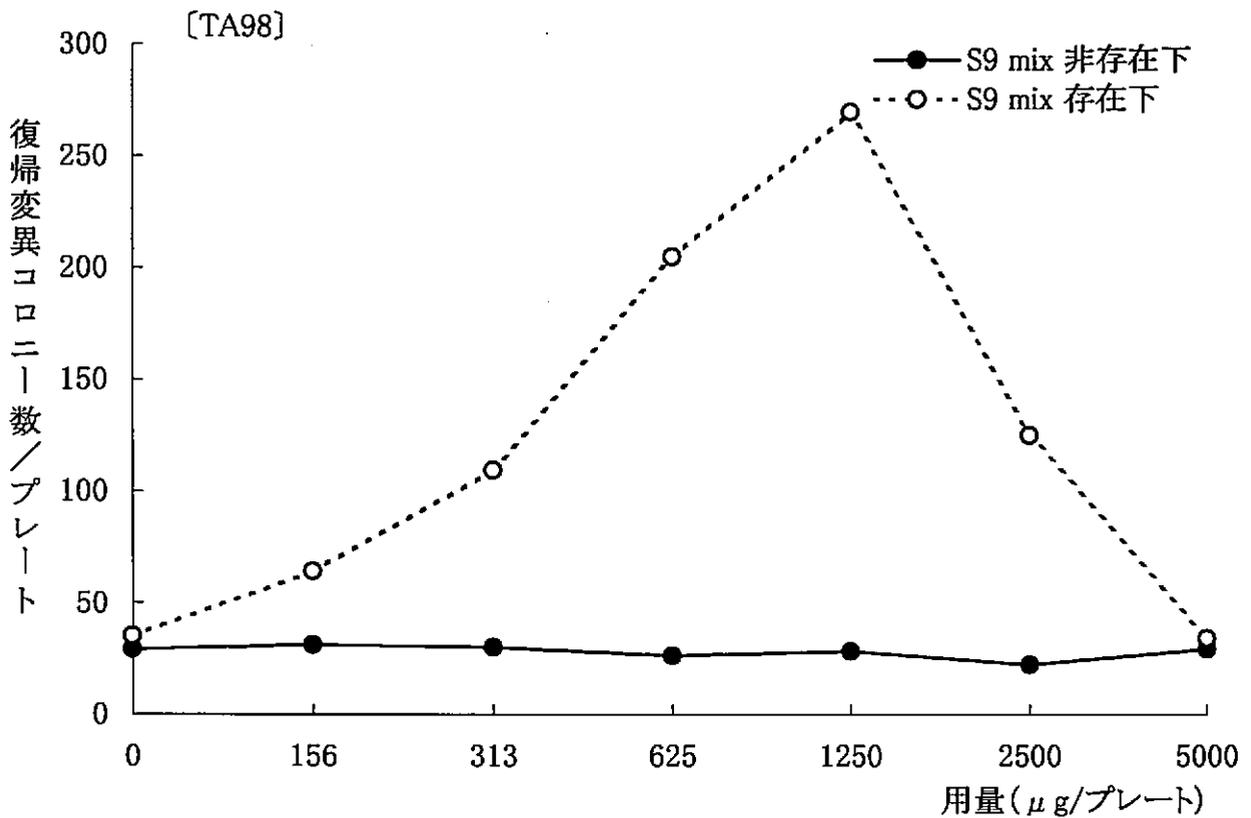
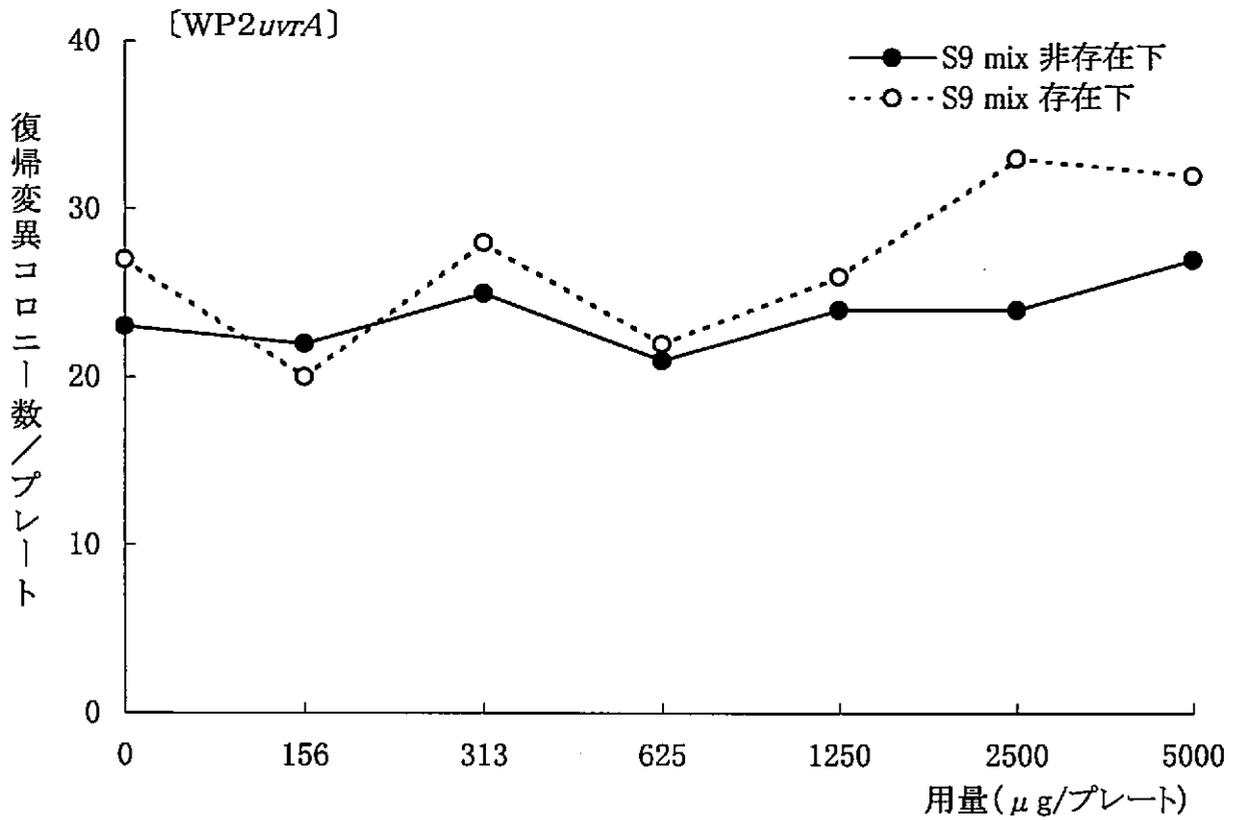


図 1-2 リアクティブブルー19の復帰突然変異試験結果—本試験1回目

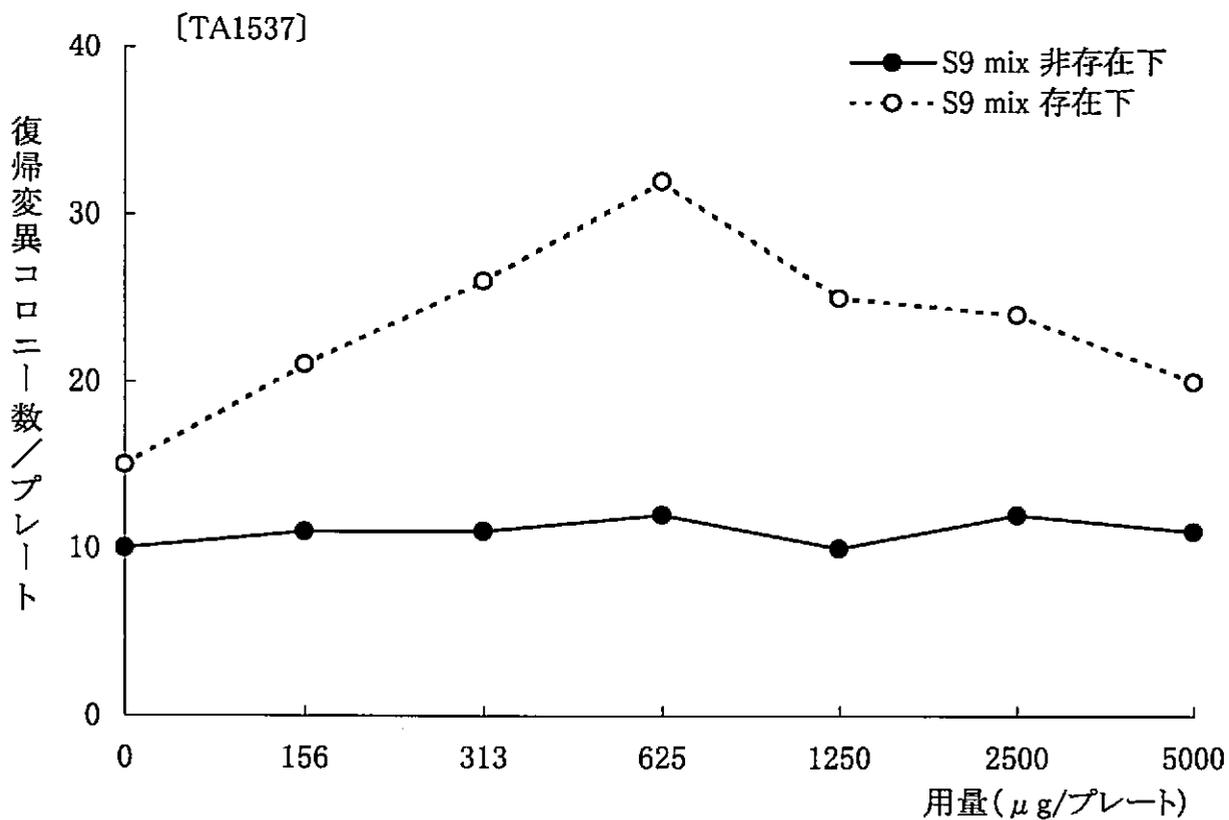


図 1-3 リアクティブブルー19の復帰突然変異試験結果—本試験1回目

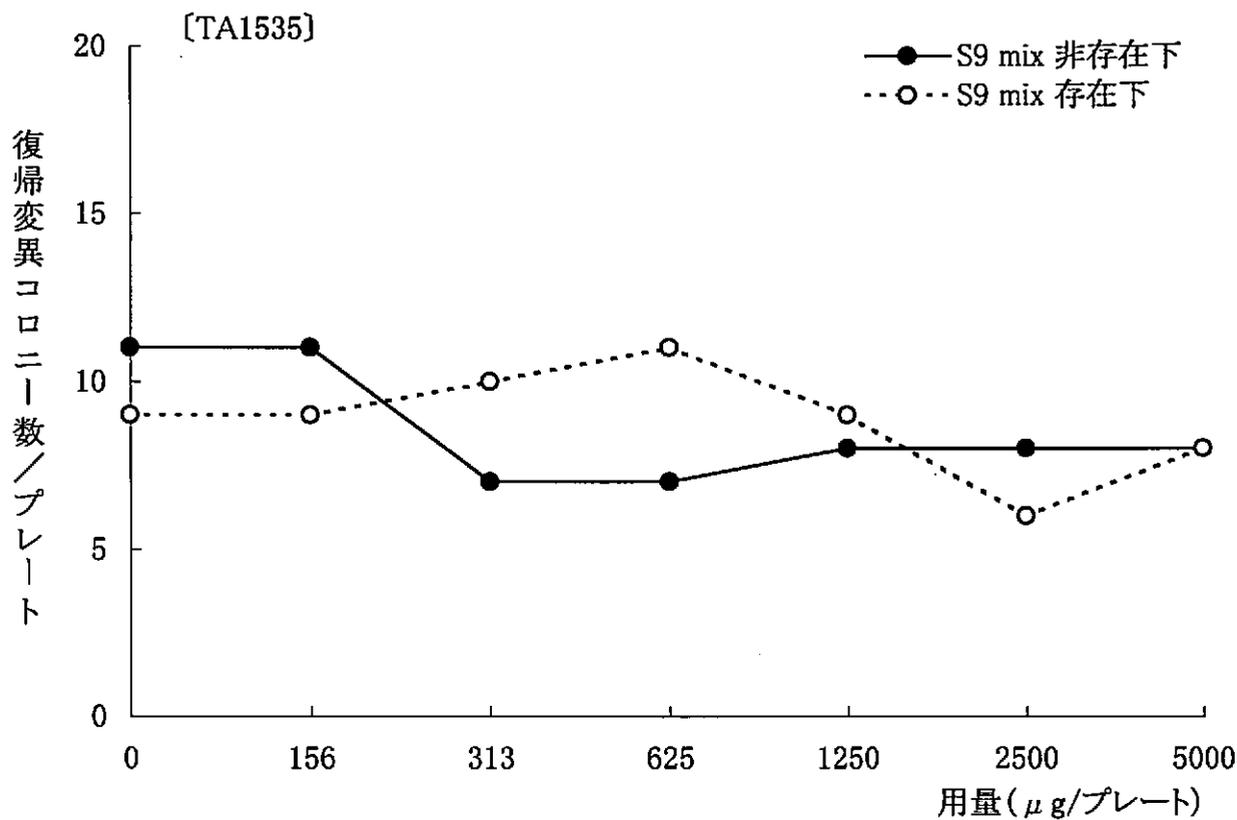
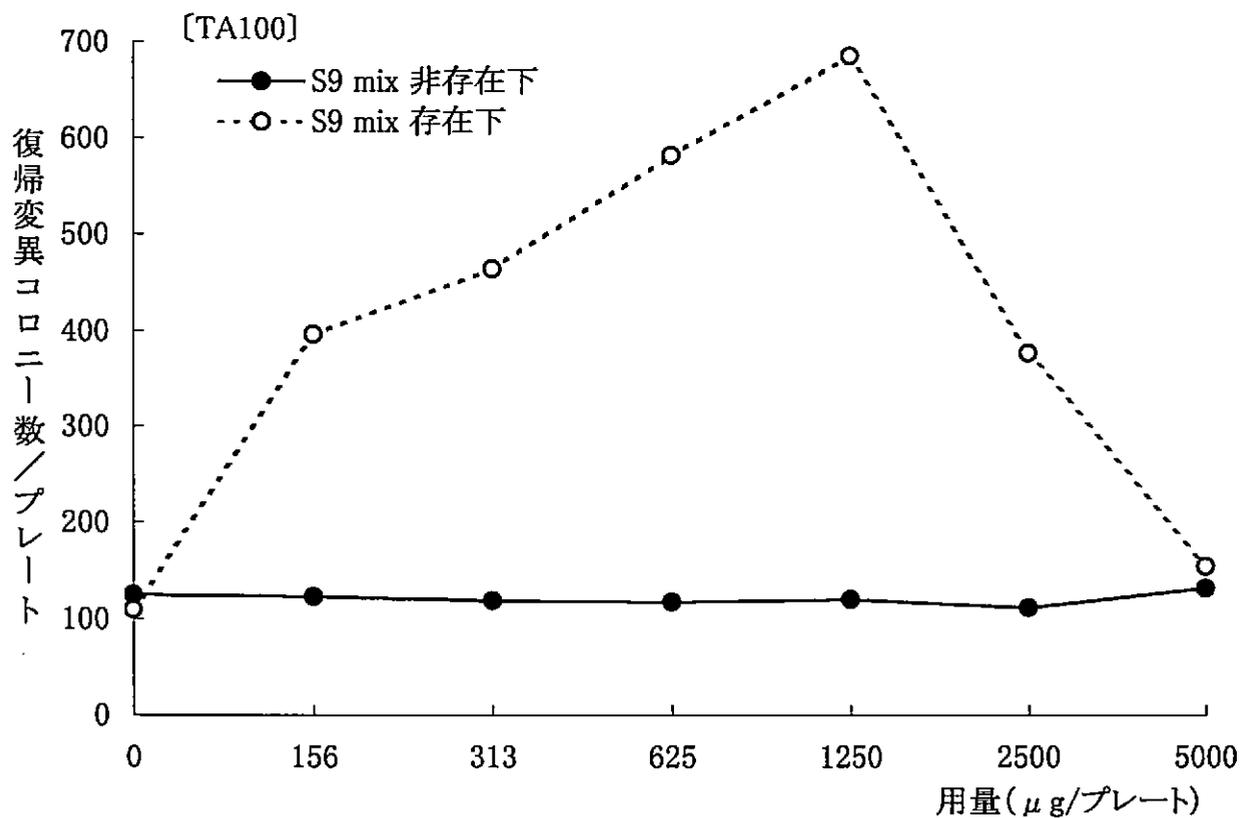


図 2-1 リアクティブブルー19の復帰突然変異試験結果—本試験2回目

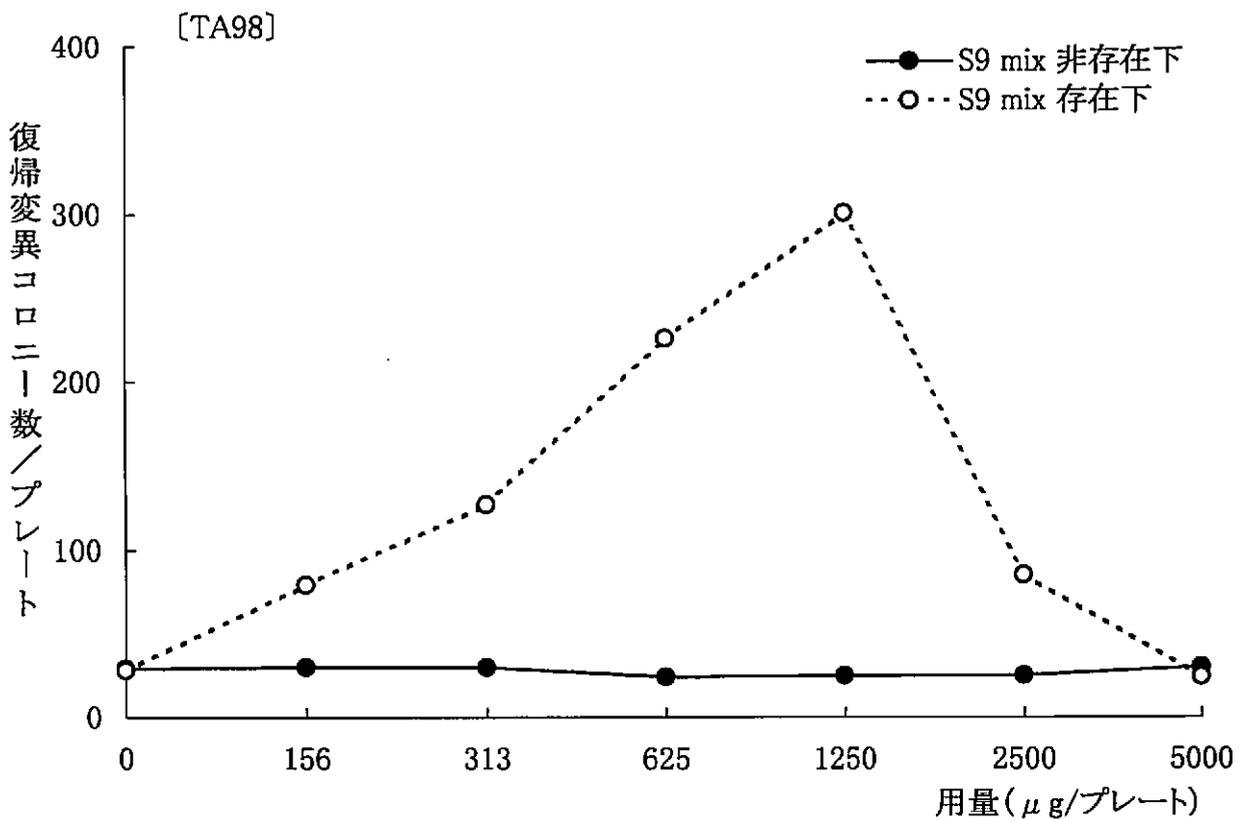
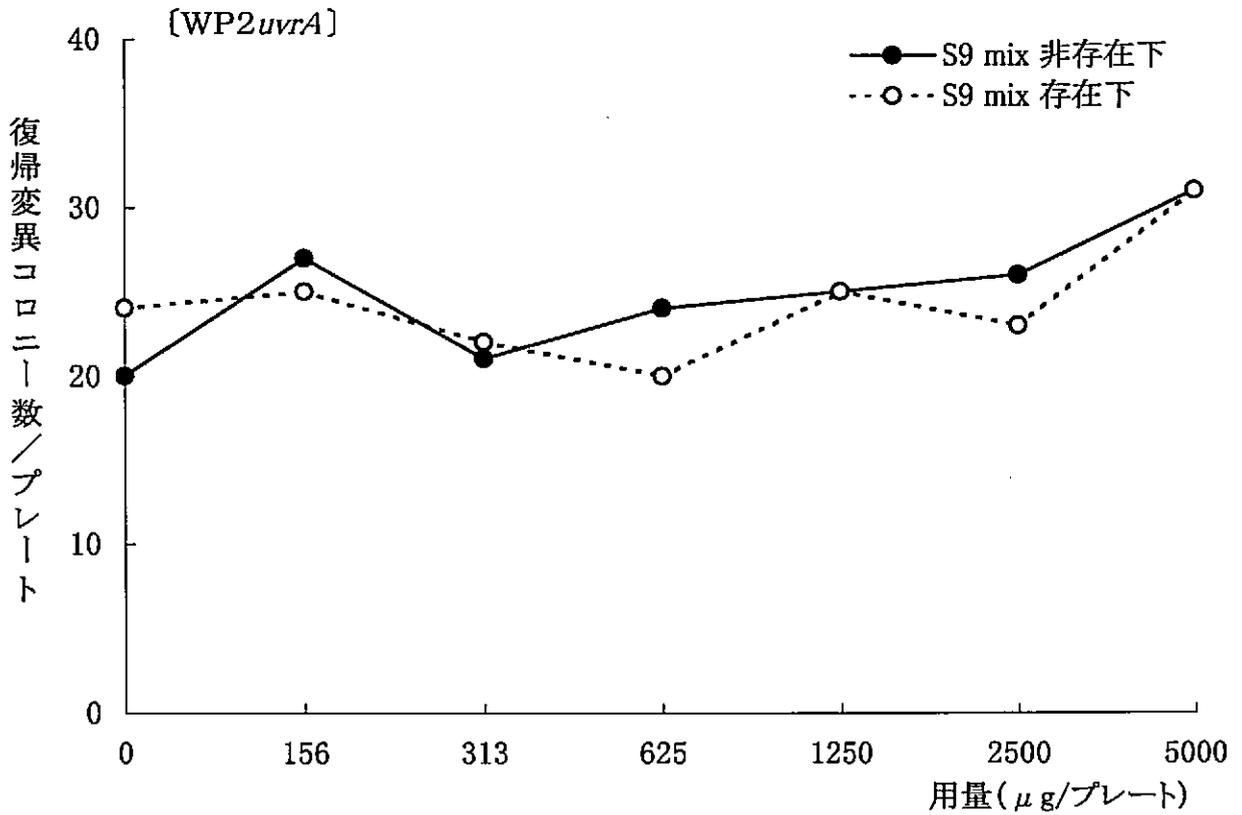


図 2-2 リアクティブブルー19の復帰突然変異試験結果—本試験2回目

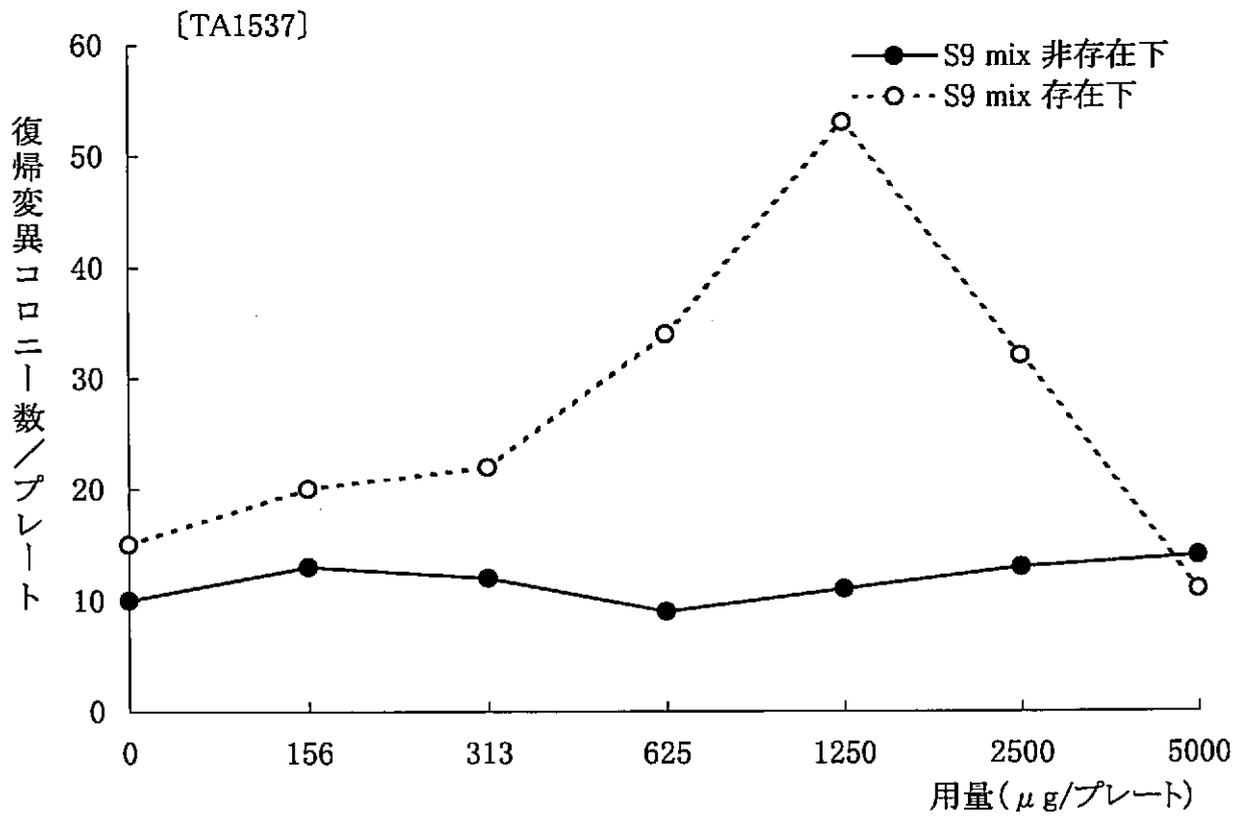


図 2-3 リアクティブブルー19の復帰突然変異試験結果-本試験2回目

添付資料

復帰変異コロニー数—背景データ

自然復帰変異値 (復帰変異コロニー数/プレート)						
指標菌株		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
直接法	n	224	204	219	234	205
	平均	125	11	15	23	8
	標準偏差	17	4	4	7	3
	最大値	182	31	27	41	18
	最小値	94	6	6	10	1
代謝活性化法	n	235	196	215	211	203
	平均	120	10	20	35	12
	標準偏差	17	3	5	7	4
	最大値	164	20	33	56	28
	最小値	88	4	9	18	5
陽性対照値 (復帰変異コロニー数/プレート)						
指標菌株		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
陽性対照物質		AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
用量 (μg/プレート)		0.01	0.5	0.04	0.1	80
直接法	n	164	162	167	166	161
	平均	818	358	798	386	650
	標準偏差	174	86	185	71	201
	最大値	1139	842	1429	717	1510
	最小値	402	223	306	251	236
陽性対照物質		2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
用量 (μg/プレート)		1	2	10	1	2
代謝活性化法	n	177	163	169	158	162
	平均	523	166	941	325	107
	標準偏差	133	53	185	97	42
	最大値	876	371	1540	759	245
	最小値	280	85	654	173	51

AF-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

2-AA : 2-アミノアントラセン

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

既存化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	リアクティブブルー19		
別 名	1-アミノ-4-(3-(2-(スルファート)エチル)スルホニルアニリノ)アントラキノ-2-スルホン酸 2ナトリウム塩		
構造式または示性式 (いずれも不明の場合は、その製法の概要)			
試験に供した既存 化学物質の純度	77.1%	試験に供した既存 化学物質の Lot.No.	■
不純物の名称及び濃度	1-アミノアントラキノ-2-スルホン酸 ナトリウム塩 : 5.3% 1-アミノ-4-プロモアントラキノ-2-スルホン酸 ナトリウム塩 : 5.3% 1-アミノ-4-ヒドロキシアントラキノ-2-スルホン酸 ナトリウム塩 : 4.3% 1-アミノ-4-(3-ビニルスルホニルアニリノ)アントラキノ-2-スルホン酸 ナトリウム塩 : 3.7% Na ₂ SO ₄ : 1.1% 水分 : 1.8%		
CAS番号	2580-78-1		
分子 量	626.56	蒸 気 圧	—
融 点	—	分配係数	—
沸 点	—	常温における性状	青色粉末
安 定 性	常温で安定		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	水	50mg/mL以上	安定
	DMSO	—	—
	エタノール	—	—
	その他(アセトン)	—	—

DMSO : ジメチルスルホキシド

2. 試験に用いた菌株

菌株名	入手先	入手先
TA98	国立公衆衛生院	平成6年12月19日
TA100	国立公衆衛生院	平成6年12月19日
TA1535	国立公衆衛生院	平成6年12月19日
TA1537	国立公衆衛生院	平成6年12月19日
WP2uvrA	国立公衆衛生院	平成6年12月19日

3. S9 mix

(1) S9 mix の入手方法

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	平成12年11月10日 製造 (FSM-435) 平成13年 1月19日 製造 (FSM-438)
購入の場合の Lot No.	FSM-435, FSM-438
保存温度	-80°C以下 (超低温槽 ウルトラディープ CF-41SD)

(2) S9 の調製方法

使用動物		誘導物質	
種・系統	ラット・SD系	名称	PB および 5, 6-BF
性	雄	投与方法	腹腔内投与
週齢	7週	投与期間及び投与量	PB 30 mg/kg 1回
体重	213~252 g (FSM-435) 206~243 g (FSM-438)	(mg/kg 体重)	PB 60 mg/kg 3回 5, 6-BF 80 mg/kg 1回

(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	NADPH	4 μmol
MgCl ₂	8 μmol	NADH	4 μmol
KCl	33 μmol	Na-リッ酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μmol
グルコース-6-リン酸	5 μmol	その他()	—

4.被験物質溶液の調製

使用溶媒	名称	製造元	Lot No.	グレード	純度 (%)
	蒸留水	(株)大塚製薬工場	K0G81	局方	—
溶媒選択の理由	被験物質は水に可溶であることから、溶媒には蒸留水を用いた。				
被験物質溶媒の性状	(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	—				
溶媒の調製から使用までの保存時間と温度	1時間以内, 20℃				
純度換算の有無	(有)		無		

5.前培養の条件

(1) 条件

ニュートリエントブロス	名称	製造元	Lot No.
	Bacto nutrient broth dehydrated	Difco Laboratories	44077JK
前培養時間	12時間		
培養容器(形状・容量)	モルトン栓付三角コルベン, 300 mL		
培養液量	15 mL	接種菌量	25 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	TA98	TA1537	
生菌数 ($\times 10^9$ /mL)	用量設定試験	1.46	1.53	1.43	1.33	1.17
	本試験(1回目)	1.38	1.53	1.47	1.41	1.17
	本試験(2回目)	1.46	1.62	1.38	1.33	1.21
測定方法	(1) 0.D.値よりの換算 2.段階希釈法 3.その他 ()					

6. 最少グルコース寒天平板培地

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	平成12年9月21日 製造 (ANI560IP) 平成12年9月5日 製造 (ANI520IP)
購入の場合のLot No.	ANI560IP, ANI520IP
使用寒天の名称・製造元・Lot No.	伊那寒天 BA-30A, 伊那食品工業株式会社, 00222(ANI560IP), 90705(ANI520IP)

7. 試験の方法

(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	懸濁菌液	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
	トッアガー	2.0 mL
	その他 ()	
プレインキュベーション	温 度	37 °C
	時 間	20 分
インキュベーション	温 度	37 °C
	時 間	48 時間

8. コロニーの計測法

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)

9. 試験結果

(1) 試験の結果は別表による

(2) 結果の判定

判 定	陽性	陰性
判定の理由	試験を2回行った結果、代謝活性化法における TA100, TA98, TA1537 で陰性対照値の2倍を超える用量依存的な復帰変異コロニー数の増加が認められた。陽性対照群では、それぞれの菌株に対して陰性対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数の増加が認められ、試験が適切に行われたことを示した。 以上の結果より、本実験条件下において本被験物質の遺伝子突然変異誘発性は陽性と判定した。	

(3) 参考事項

用量設定試験（予備試験）は、39.1~5000 μ g/プレートの範囲で行った。その結果、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても生育阻害は認められなかった。
したがって、本試験は、156~5000 μ g/プレートの範囲の用量（公比2）を用いて行った。菌の生育阻害については予備試験と同様、認められなかった。

10. その他

試験実施施設	名 称	財団法人 畜産生物科学安全研究所	
	所 在 地	神奈川県相模原市橋本台三丁目7番11号	電話 042 (762) 2775 FAX 042 (762) 7979
試験責任者	職 氏 名	[REDACTED]	
	経 験 年 数	[REDACTED]	
試験期間	平成12年12月14日 より 平成13年3月29日		
試験番号	00-141		

表 1-1 S9 mix 非存在下におけるリアクティブブルー19の復帰突然変異試験結果
〔本試験1回目—直接法〕

用 量 〔 μ g/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	129	10	22	28	8
〔蒸留水〕	108	11	24	30	10
	113	5	24	29	13
	(117 \pm 11)	(9 \pm 3)	(23 \pm 1)	(29 \pm 1)	(10 \pm 3)
156	107	7	19	22	8
	114	10	30	35	17
	107	7	18	35	8
	(109 \pm 4)	(8 \pm 2)	(22 \pm 7)	(31 \pm 8)	(11 \pm 5)
313	106	6	24	33	9
	158	3	25	29	12
	123	3	25	29	11
	(129 \pm 27)	(4 \pm 2)	(25 \pm 1)	(30 \pm 2)	(11 \pm 2)
625	108	11	21	30	14
	115	11	20	17	9
	99	10	23	31	14
	(107 \pm 8)	(11 \pm 1)	(21 \pm 2)	(26 \pm 8)	(12 \pm 3)
1250	91	14	25	33	12
	111	7	21	21	8
	114	9	25	29	10
	(105 \pm 13)	(10 \pm 4)	(24 \pm 2)	(28 \pm 6)	(10 \pm 2)
2500	108	10	24	26	12
	131	8	22	25	9
	144	11	27	15	14
	(128 \pm 18)	(10 \pm 2)	(24 \pm 3)	(22 \pm 6)	(12 \pm 3)
5000	142	12	26	31	7
	119	8	35	26	12
	108	11	21	29	13
	(123 \pm 17)	(10 \pm 2)	(27 \pm 7)	(29 \pm 3)	(11 \pm 3)
陽性対照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
μ g/プレート	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復帰変異	465	376	959	427	276
コロニー数	464	468	969	382	243
/プレート	468	467	1028	391	279
	(466 \pm 2)	(437 \pm 53)	(985 \pm 37)	(400 \pm 24)	(266 \pm 20)

(): 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

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 存在下におけるリアクティブブルー19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 〔 μ g/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 〔蒸留水〕	96	9	30	34	14
	109	10	28	29	15
	115	8	24	41	17
	(107 \pm 10)	(9 \pm 1)	(27 \pm 3)	(35 \pm 6)	(15 \pm 2)
156	140	11	18	75	19
	231	9	18	52	22
	225	8	24	65	23
	(199 \pm 51)	(9 \pm 2)	(20 \pm 3)	(64 \pm 12)	(21 \pm 2)
313	306	13	20	108	23
	264	9	32	112	30
	216	9	31	107	24
	(262 \pm 45)	(10 \pm 2)	(28 \pm 7)	(109 \pm 3)	(26 \pm 4)
625	216	7	23	212	29
	280	11	25	186	35
	230	10	18	216	31
	(242 \pm 34)	(9 \pm 2)	(22 \pm 4)	(205 \pm 16)	(32 \pm 3)
1250	325	10	24	266	33
	287	9	20	275	22
	193	8	33	268	21
	(268 \pm 68)	(9 \pm 1)	(26 \pm 7)	(270 \pm 5)	(25 \pm 7)
2500	288	8	33	131	23
	306	8	31	133	25
	472	8	34	111	24
	(355 \pm 101)	(8 \pm 0)	(33 \pm 2)	(125 \pm 12)	(24 \pm 1)
5000	185	8	32	38	14
	193	7	41	32	24
	167	9	24	33	23
	(182 \pm 13)	(8 \pm 1)	(32 \pm 9)	(34 \pm 3)	(20 \pm 6)
陽性対照	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
μ g/プレート	1	2	10	1	2
復帰変異	511	137	723	330	100
コロニー数	489	140	670	314	90
/プレート	436	127	715	367	79
	(479 \pm 39)	(135 \pm 7)	(703 \pm 29)	(337 \pm 27)	(90 \pm 11)

(): 平均値 \pm 標準偏差

2-AA: 2-アミノアントラセン

表 2-1 S9 mix 非存在下におけるリアクティブブルー-19の復帰突然変異試験結果
〔本試験2回目-直接法〕

用 量 [μ g/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 〔蒸留水〕	138	9	16	27	10
	111	12	17	30	8
	125	12	26	30	13
	(125 ± 14)	(11 ± 2)	(20 ± 6)	(29 ± 2)	(10 ± 3)
156	132	8	30	30	15
	110	11	26	27	12
	126	13	26	32	12
	(123 ± 11)	(11 ± 3)	(27 ± 2)	(30 ± 3)	(13 ± 2)
313	114	5	19	25	9
	120	7	22	30	16
	123	10	21	34	12
	(119 ± 5)	(7 ± 3)	(21 ± 2)	(30 ± 5)	(12 ± 4)
625	117	7	22	22	9
	122	9	24	28	8
	114	6	25	23	10
	(118 ± 4)	(7 ± 2)	(24 ± 2)	(24 ± 3)	(9 ± 1)
1250	124	7	25	24	5
	120	8	24	21	15
	116	8	26	29	12
	(120 ± 4)	(8 ± 1)	(25 ± 1)	(25 ± 4)	(11 ± 5)
2500	100	9	28	26	12
	115	8	25	29	14
	119	6	25	19	12
	(111 ± 10)	(8 ± 2)	(26 ± 2)	(25 ± 5)	(13 ± 1)
5000	140	6	27	34	12
	118	11	35	29	9
	136	7	32	27	21
	(131 ± 12)	(8 ± 3)	(31 ± 4)	(30 ± 4)	(14 ± 6)
陽性対照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
μ g/プレート	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復帰変異	548	378	610	370	317
コロニー数	502	346	647	374	242
/プレート	505	391	705	362	230
	(518 ± 26)	(372 ± 23)	(654 ± 48)	(369 ± 6)	(263 ± 47)

(): 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

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 存在下におけるリアクティブブルー19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 〔蒸留水〕	120	9	28	27	12
	109	10	25	25	16
	100	8	20	31	16
	(110 ± 10)	(9 ± 1)	(24 ± 4)	(28 ± 3)	(15 ± 2)
156	449	8	23	79	22
	383	6	31	73	14
	356	13	21	86	23
	(396 ± 48)	(9 ± 4)	(25 ± 5)	(79 ± 7)	(20 ± 5)
313	434	12	21	144	30
	438	9	30	121	15
	519	10	16	115	20
	(464 ± 48)	(10 ± 2)	(22 ± 7)	(127 ± 15)	(22 ± 8)
625	551	10	18	251	31
	590	14	21	220	38
	604	10	20	206	33
	(582 ± 27)	(11 ± 2)	(20 ± 2)	(226 ± 23)	(34 ± 4)
1250	687	11	32	318	43
	656	11	25	289	69
	712	5	19	295	48
	(685 ± 28)	(9 ± 3)	(25 ± 7)	(301 ± 15)	(53 ± 14)
2500	369	8	27	89	34
	379	6	21	83	26
	381	5	20	84	36
	(376 ± 6)	(6 ± 2)	(23 ± 4)	(85 ± 3)	(32 ± 5)
5000	157	9	21	21	14
	156	4	36	22	10
	149	12	35	28	10
	(154 ± 4)	(8 ± 4)	(31 ± 8)	(24 ± 4)	(11 ± 2)
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	464	152	579	240	123
コロニー数	448	143	567	213	90
/プレート	426	139	591	235	86
	(446 ± 19)	(145 ± 7)	(579 ± 12)	(229 ± 14)	(100 ± 20)

(): 平均値±標準偏差

2-AA: 2-アミノアントラセン

表 3 リアクティブブルー19の比活性

	菌株名	-S9 mix		+S9 mix	
		比活性	計算に用いた用量	比活性	計算に用いた用量
本試験	TA100	—	—	495.2 /mg	313 μ g/プレート
1回目	TA98	—	—	272.0 /mg	625 μ g/プレート
	TA1537	—	—	27.2 /mg	625 μ g/プレート
本試験	TA100	—	—	1833.3 /mg	156 μ g/プレート
2回目	TA98	—	—	326.9 /mg	156 μ g/プレート
	TA1537	—	—	30.4 /mg	625 μ g/プレート

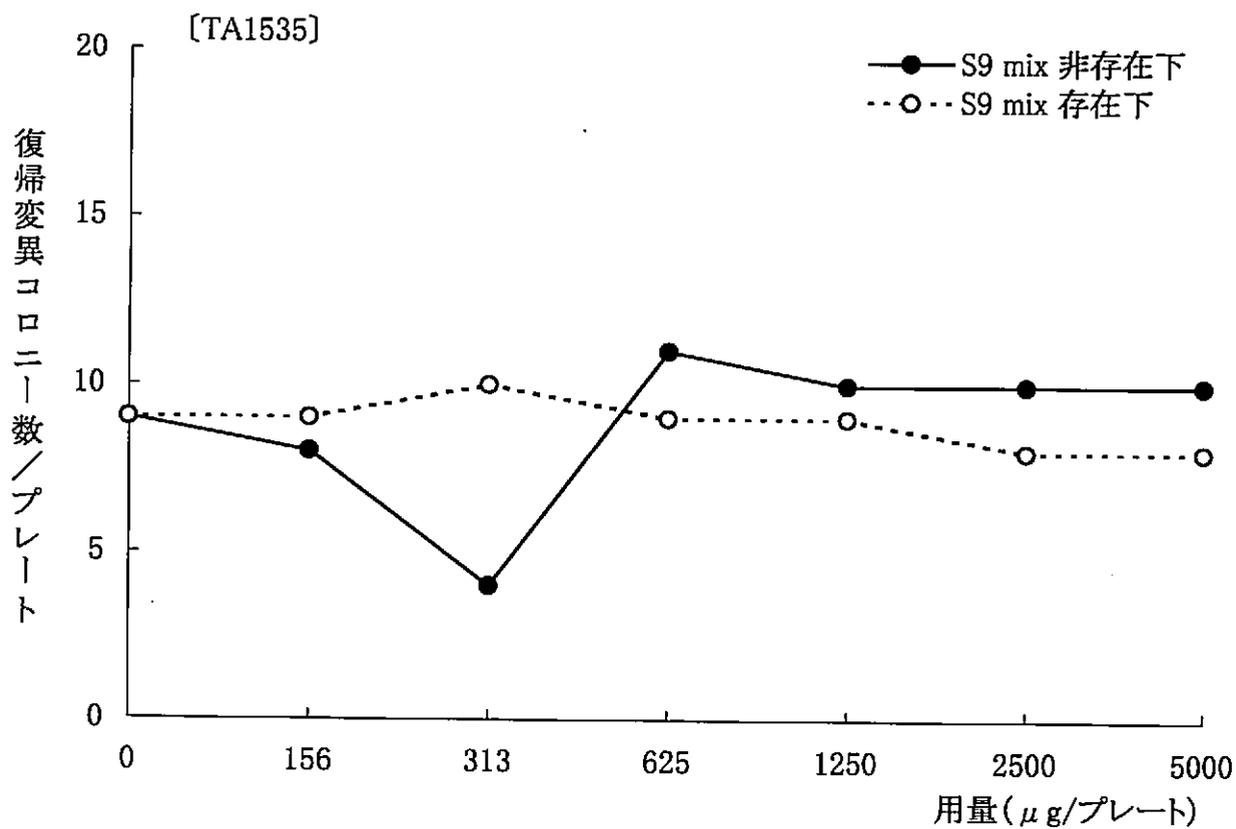
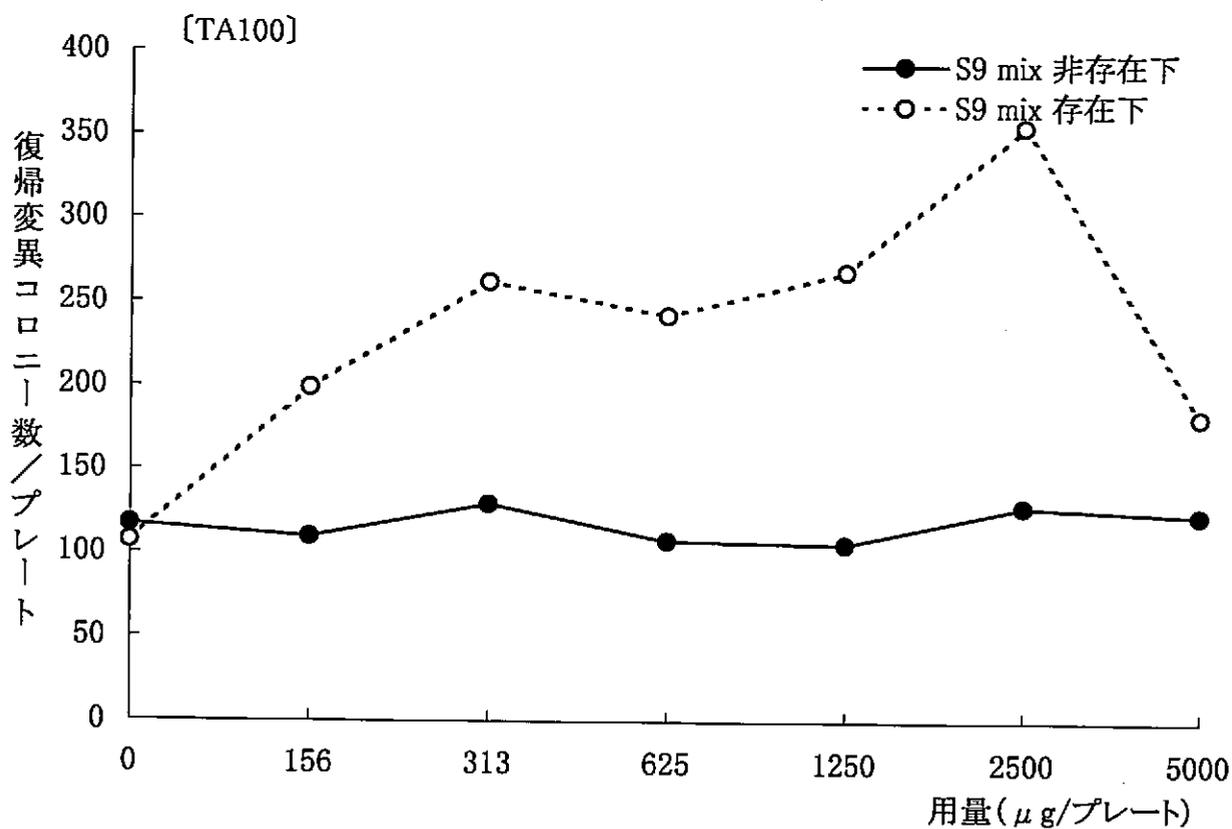


図 1-1 リアクティブブルー19の復帰突然変異試験結果—本試験1回目

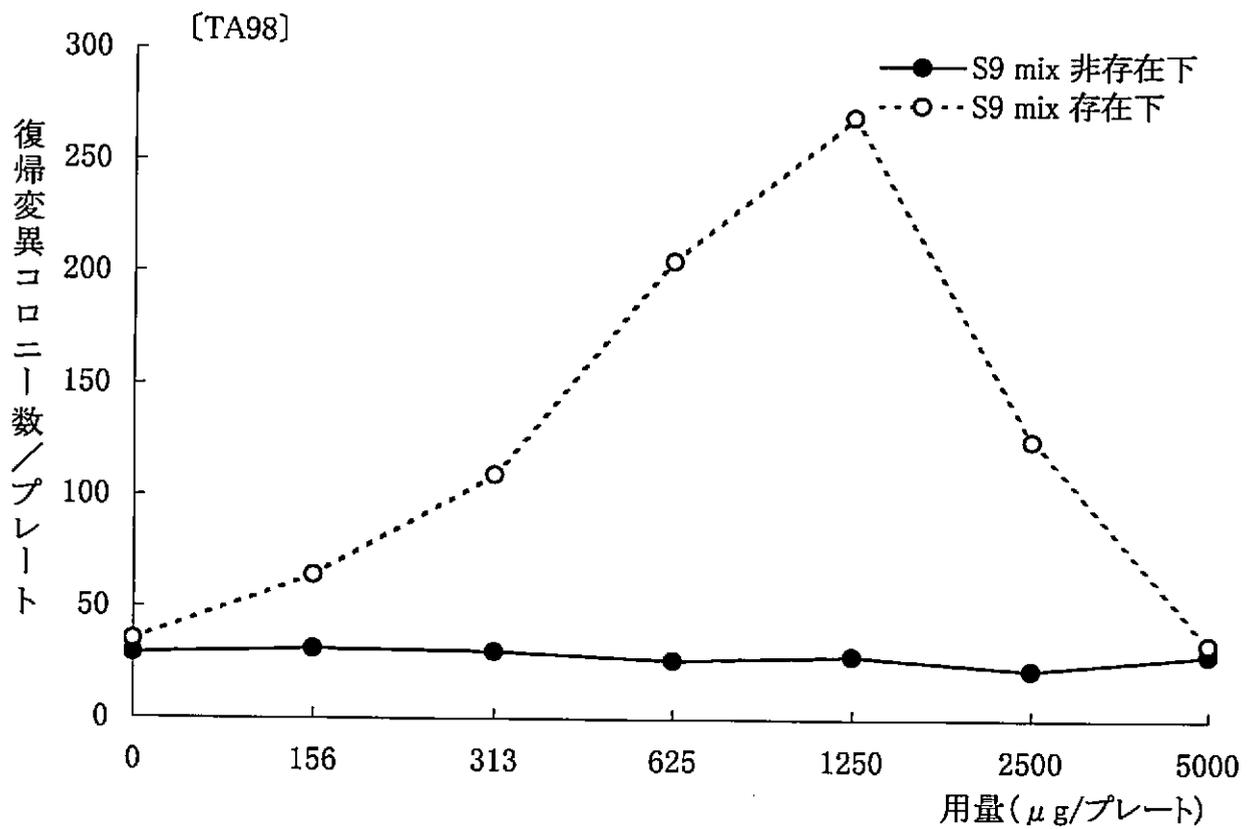
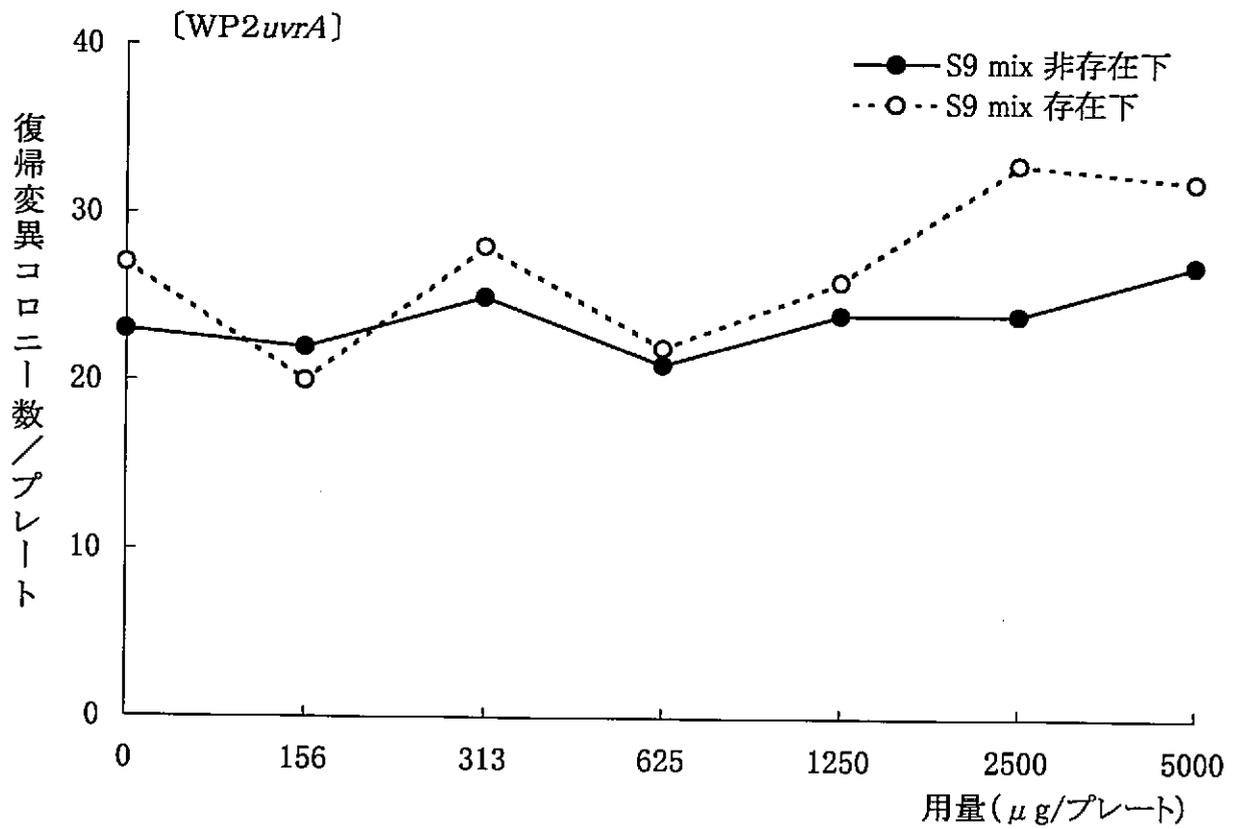


図 1-2 リアクティブブルー19の復帰突然変異試験結果—本試験1回目

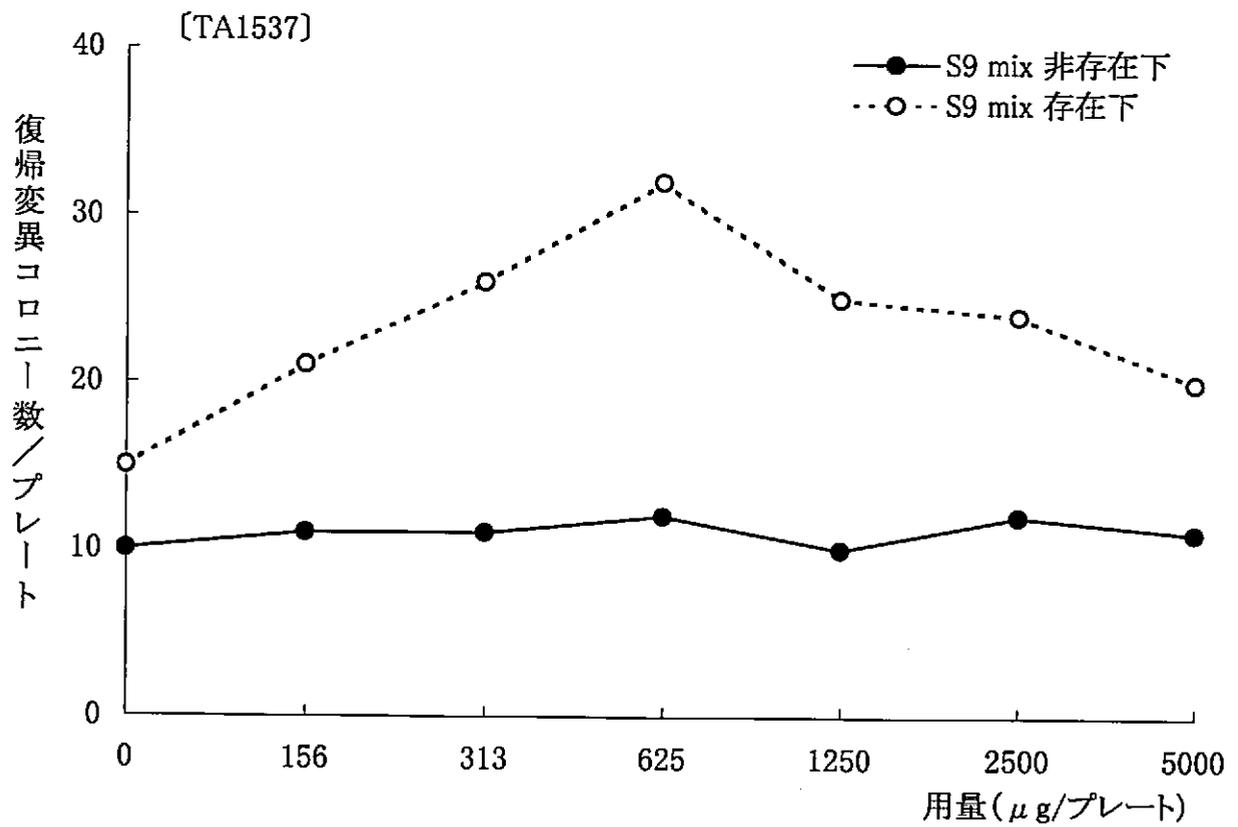


図 1-3 リアクティブブルー19の復帰突然変異試験結果—本試験1回目

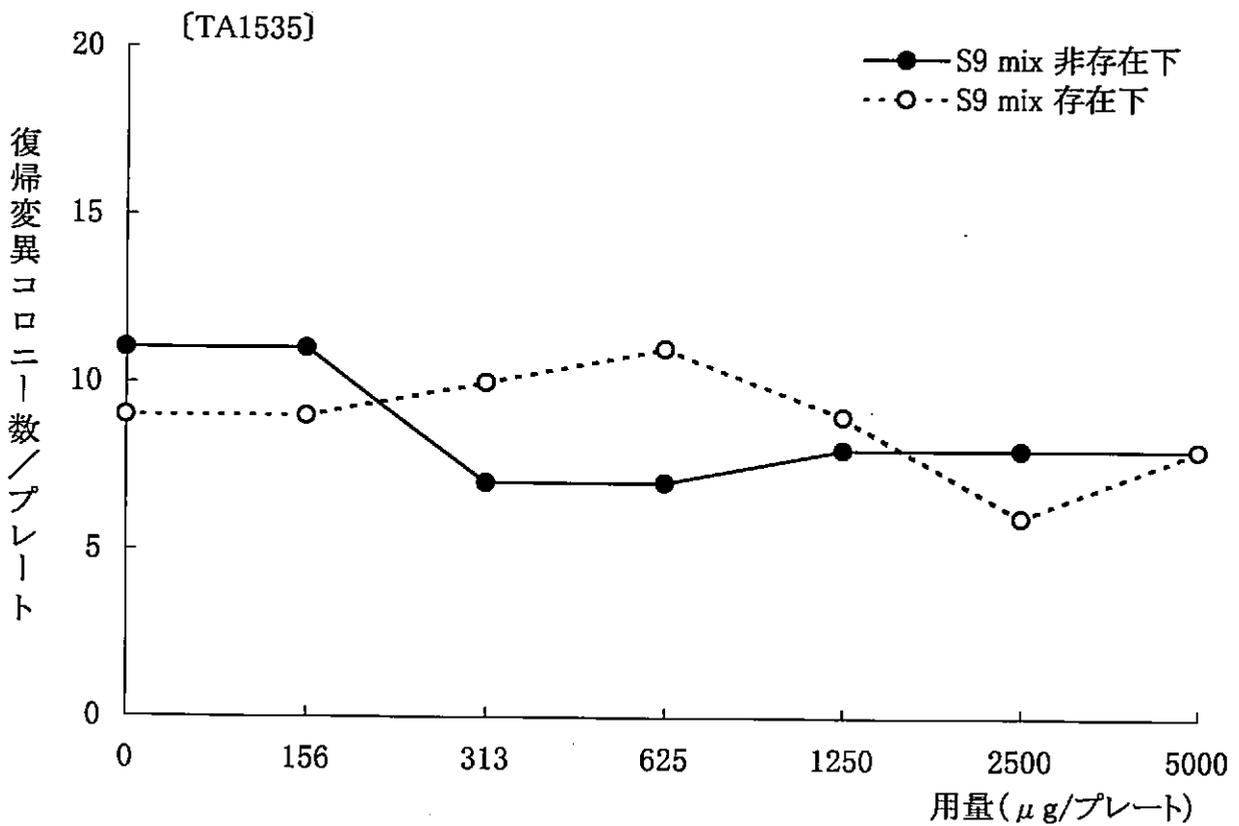
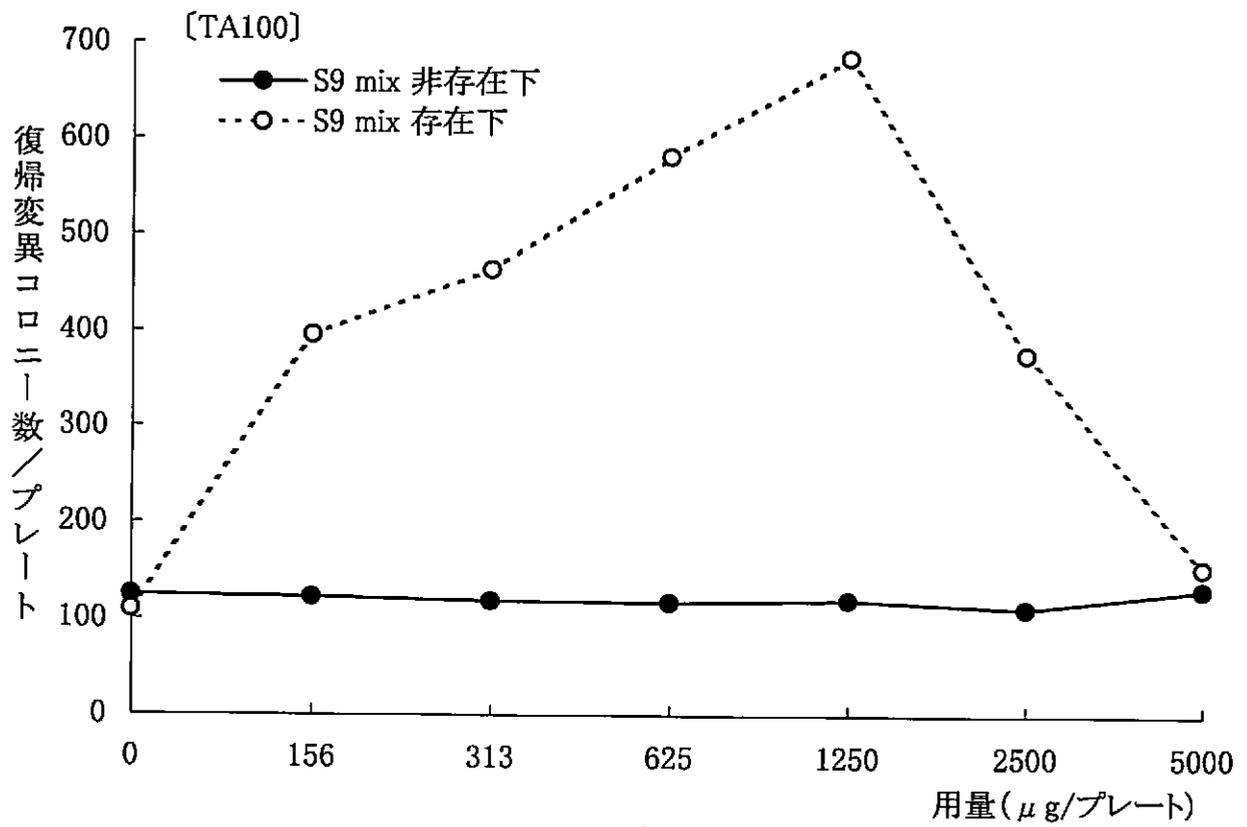


図 2-1 リアクティブブルー19の復帰突然変異試験結果—本試験2回目

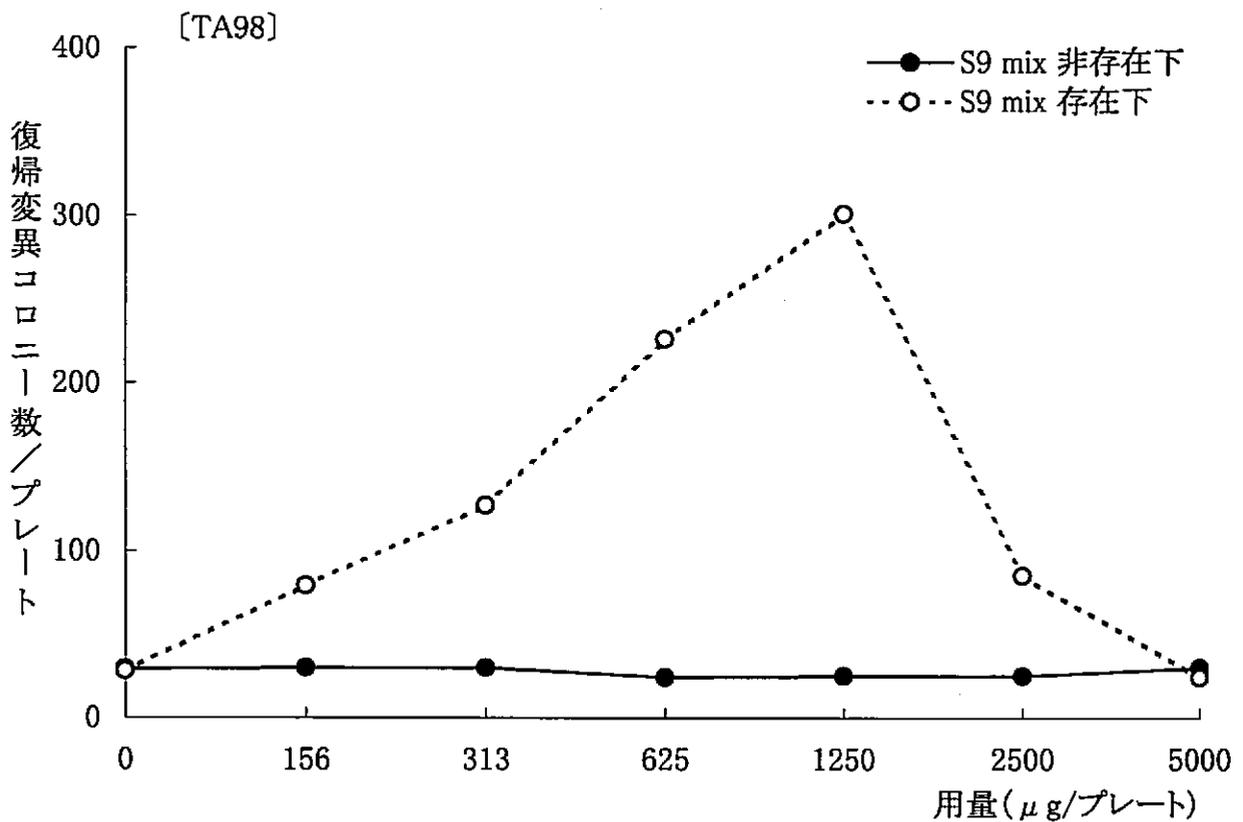
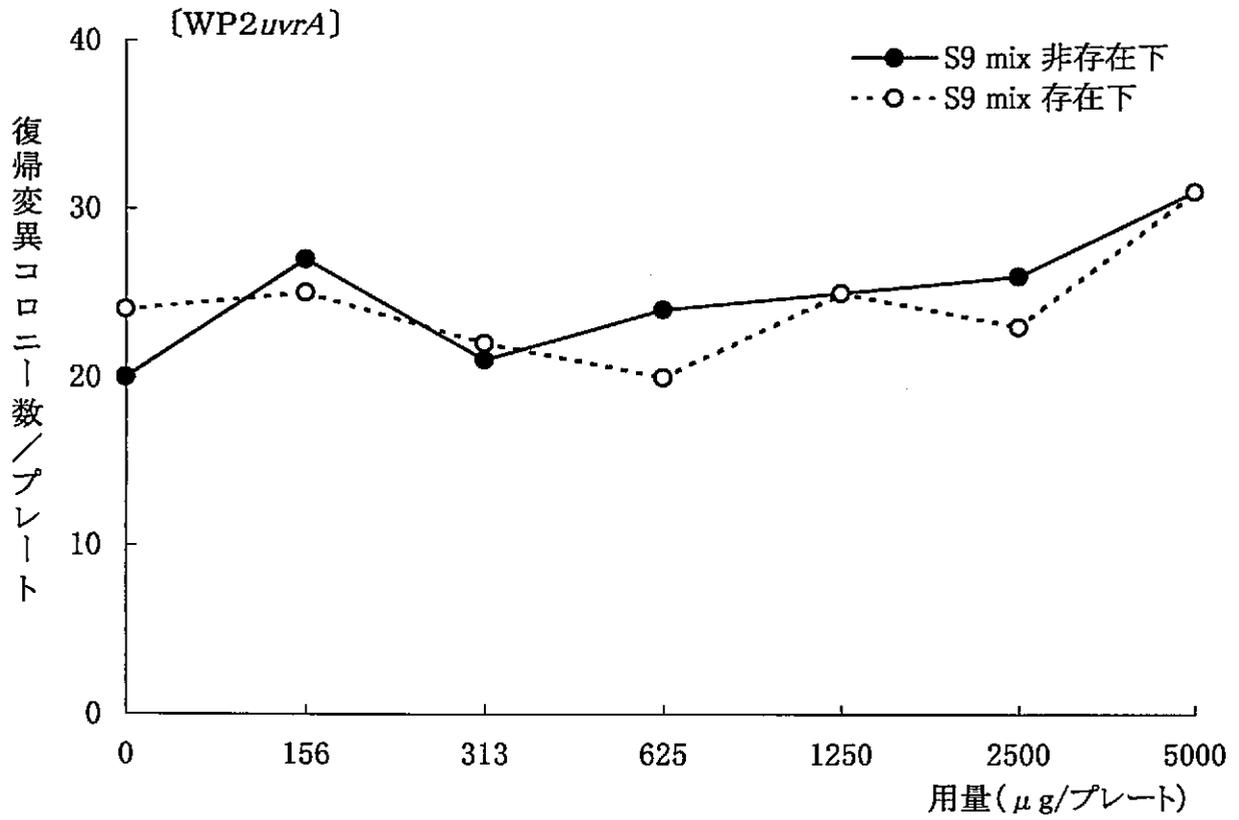


図 2-2 リアクティブブルー19の復帰突然変異試験結果—本試験2回目

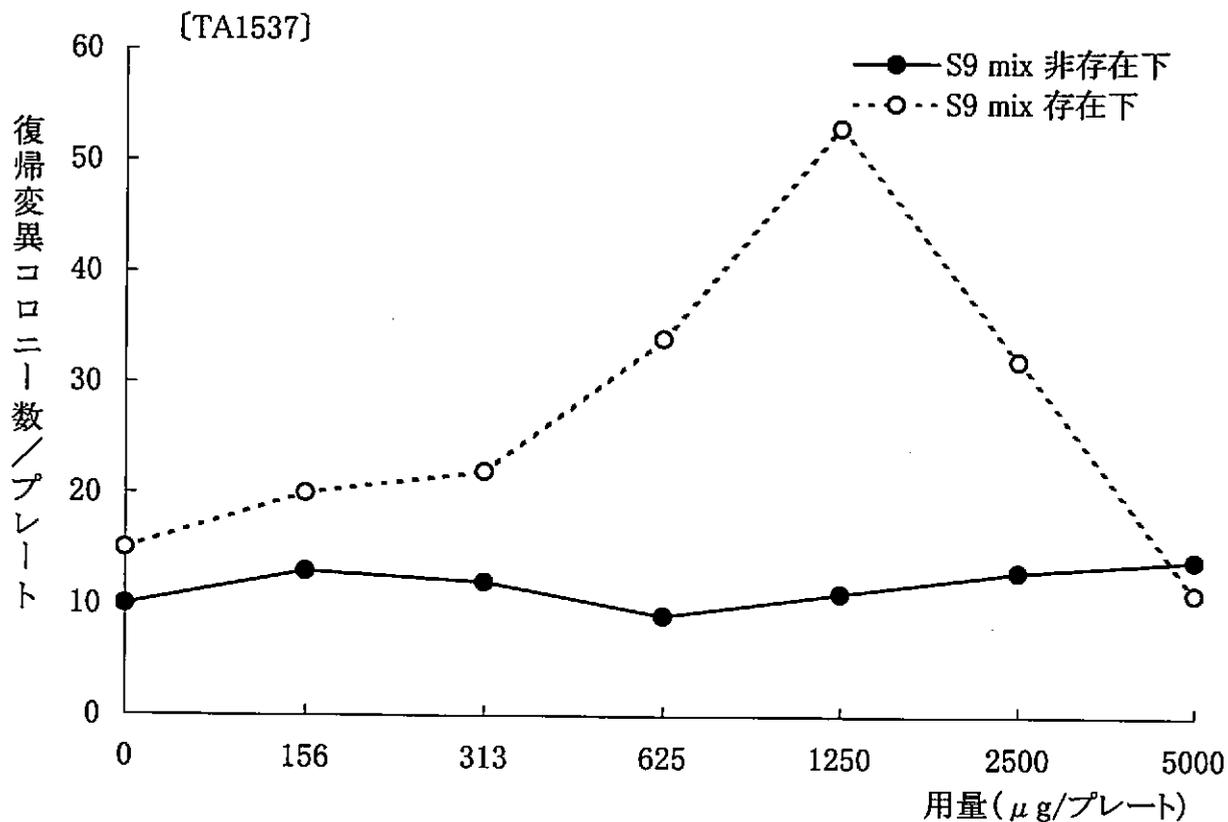


図 2-3 リアクティブブルー19の復帰突然変異試験結果-本試験2回目

陳述書

試験表題：リアクティブブルー19の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号： 00-141

本試験は、OECDの試験法ガイドライン“OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS, 471, Bacterial Reverse Mutation Test(1997)”およびOECDのGLP “OECD PRINCIPLES OF GOOD LABORATORY PRACTICE(1997)”に定める基準に準拠して実施した。

試験責任者



試験表題：リアクティブブルー19の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：00-141

試験委託者：

名 称 製品評価技術センター
所在地 東京都渋谷区西原二丁目49番10号
委託責任者

試験実施施設：

名 称 財団法人 畜産生物科学安全研究所
所在地 神奈川県相模原市橋本台三丁目7番11号
運営管理者
試験責任者
信頼性保証
責任者

試験期間：

試験開始日 平成12年12月14日
実験期間 開始日：平成13年1月10日
終了日：平成13年2月3日
試験終了日 平成13年3月29日

試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる要因：

本試験に関し、試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる要因はなかった。

資料の保管：

本試験における下記の資料は、最終報告書作成後 10 年間、財団法人 畜産生物科学安全研究所において保管する。その後の保管については、試験委託者と協議して決める。

1. 試験計画書
2. 被験物質に関する記録
3. 試験結果に関する記録
4. 信頼性保証に関する記録
5. 最終報告書

試験責任者，担当者および業務分担

試験責任者

試験担当者

実験操作

データ整理

信頼性保証証明書

試験表題 : リアクティブブルー 19 の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号 : 00-141

審査・査察実施日 試験責任者への報告日 運営管理者への報告日

1. 試験実施状況査察

本試験(1回目): 指標菌株の前培養
平成13年01月15日 平成13年01月15日 平成13年01月15日

本試験(1回目): 被験物質の秤量・菌数チェック・被験物質調製・菌液の取扱い・
S9mixの使用・被験物質, 対照物質及び菌液の添加・トップアガ
ーの作製・指標菌株の検査・無菌試験
平成13年01月16日 平成13年01月16日 平成13年01月16日

本試験(1回目): 指標菌株検査結果の判定手順
平成13年01月17日 平成13年01月17日 平成13年01月17日

本試験(1回目): コロニー数の計測・無菌試験及びアミノ酸要求性検査の結果
判定手順
平成13年01月18日 平成13年01月18日 平成13年01月18日

2. 生データ査察
平成13年03月06日 平成13年03月06日 平成13年03月06日

3. 報告書(草案) 審査
平成13年03月06日 平成13年03月06日 平成13年03月06日

4. 報告書審査
平成13年03月29日 平成13年03月29日 平成13年03月29日

上記の審査・査察により、本試験が「OECDのGLP」に従って実施され、本報告書には、当該試験で使用した方法・手順が忠実に記載され、試験成績には、当該試験の実施過程において得られた生データが正確に反映されていることを確認した。

平成 13 年 3 月 29 日
財団法人 畜産生物科学安全研究所

ROBUST SUMMARY TEMPLATE

GENETIC TOXICITY IN VITRO (BACTERIAL TEST)

TEST SUBSTANCE

Reactive blue 19 (CAS No. 2580-78-1)

Source : [REDACTED] — purity : 77.1% ; 1-amino-anthraquinone-2-sulfonate : 5.3%, 1-amino-4-bromoanthraquinone-2-sulfonate : 5.3%, 1-amino-4-hydroxyanthraquinone-2-sulfonate : 4.3%, 1-amino-4-(3-vinylsulfonylanilino)anthraquinone-2-sulfonate : 3.7%, Na₂SO₄ : 1.1%, water : 1.8%. Stability during use confirmed by HPLC.

METHOD

- Method/guideline : OECD Test Guidelines 471
- Test type : Reverse mutation assay
- GLP : Yes (OECD)
- Year : 2001
- Species/Strain : *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537
Escherichia coli WP2uvrA
- Metabolic activation : with and without S9 mix
- Statistical methods : No

REMARKS FIELD FOR TEST CONDITIONS

- Study Design :
 - Concentration : without S9 mix : 0, 156, 313, 625, 1250, 2500, 5000 µg/plate (all strains)
with S9 mix : 0, 156, 313, 625, 1250, 2500, 5000 µg/plate (all strains)
 - Number of replicates : 2
 - Plates/test : 3
 - Procedure : pre-incubation method
 - Solvent : distilled water
 - Positive controls : without S9 mix : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (TA100, TA98, WP2uvrA), Sodium azide (TA1535) and 9-Aminoacridine (TA1537)
with S9 mix : 2-Aminoanthracene (all strains)

RESULTS

- Cytotoxic concentration : Non
- Genotoxic effects : positive in TA100 (156~2500 µg/plate), TA98 (156~2500 µg/plate) and TA1537 (625~2500 µg/plate) with metabolic activation

CONCLUSIONS

This chemical was mutagenic in the *S.typhimurium* TA100, TA98 and TA1537 with metabolic activation.

DATA QUALITY

- Reliabilities : valid without restriction

REFERENCES (Free Text)

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

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.

試験結果報告書の内容に関するお問い合わせには応じかねますので御了承下さい。