

細菌を用いる復帰突然変異試験報告書

試験番号 6323

2010 年 1 月 29 日

中央労働災害防止協会
日本バイオアッセイ研究センター

目 次

項 目	ページ
表題	i
試験の目的	i
試験ガイドラインの対応	i
GLP の対応	i
試験委託者	
試験施設の名称及び所在地	
試験日程	
業務分担	
試資料の保管	
試験責任者の署名、捺印及び日付	
運営管理者及び試験責任者陳述書	
信頼性保証証明書	
本文	

表題

2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ[イソベンゾフラン-1(3H),9'-[9H]キサンテン]-3-オンの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験の目的

2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ[イソベンゾフラン-1(3H),9'-[9H]キサンテン]-3-オン(被験物質番号:1241)の細菌に対する復帰突然変異原性の有無をプレインキュベーション法を用いて検索した。

試験ガイドラインの対応

本試験は、平成 15 年 11 月 21 日付け、薬食発第 1121002 号、平成 15・11・13 製局第 2 号、環境省発第 031121002 号、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通知「新規化学物質等に係る試験の方法について」の「細菌を用いる復帰突然変異試験」及び OECD 化学品テストガイドライン 471(微生物突然変異試験 1997 年 7 月 21 日採択)に基づき、代謝活性化の有無でプレインキュベーション法を用いて実施した。

GLP の対応

本試験は、平成 15 年 11 月 21 日付け、薬食発第 1121003 号、平成 15・11・17 製局第 3 号、環境省発第 031121004 号、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通知「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」及び「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(November 26, 1997)に準拠し実施した。

試験委託者

経済産業省製造産業局化学物質管理課
東京都千代田区霞ヶ関 1-3-1

試験施設の名称及び所在地

中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター
神奈川県秦野市平沢 2445 番地

試験日程

被験物質入手	2009年 9月 9日
試験開始	2009年11月12日
用量設定試験用菌前培養	2009年11月16日
用量設定試験（アッセイ）	2009年11月17日
用量設定試験（コロニーカウント）	2009年11月19日
本試験用菌前培養	2009年11月24日
本試験（アッセイ）	2009年11月25日
本試験（コロニーカウント）	2009年11月27日
本試験-2用菌前培養	2009年11月30日
本試験-2（アッセイ）	2009年12月 1日
本試験-2（コロニーカウント）	2009年12月 3日
試験終了	2010年 1月29日

試験期間 2009年11月12日～2010年1月29日

復帰突然変異試験 実施期間

2009年11月16日～2009年12月3日

業務分担

運 営 管 理 者	職 氏 名	副所長	
試 験 責 任 者	職 氏 名	病理検査部 室長補佐	
	経 験 年 数	12 年 8 ヶ月	
試 験 担 当 者 - 1	職 氏 名	病理検査部 室長	
	経 験 年 数	29 年 7 ヶ月	
試 験 担 当 者 - 2	職 氏 名	病理検査部	
	経 験 年 数	19 年 4 ヶ月	


試資料の保管

試験計画書、生データ、記録文書、報告書、信頼性保証証明書、被験物質、その他試験に係る試資料は、日本バイオアッセイ研究センターの標準操作手順書に従って、試資料保管施設に保管する。ただし、被験物質は約 1g を保管し、残量は廃棄する。

保管期間は、試験終了後 10 年間とする。なお、この期間にあっても被験物質については品質が評価に耐え得る期間とする。

試験責任者の署名、捺印及び日付

試験責任者


 2010 年 1 月 29 日

陳 述 書

試験番号：6323

試験名：2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ [イソベンゾフラン-1(3H), 9'-[9H]キサンテン] -3-オンの細菌を用いる復帰突然変異試験

記

上記試験は、平成15年11月21日付け、薬食発第1121003号、平成15・11・17製局第3号、環企発第031121004号、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通知「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」及び「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(November 26, 1997)のGLP基準に準拠し実施され、この報告資料はその試験結果に基づいてまとめられたものに相違ありません。

中央労働災害防止協会
日本バイオアッセイ研究センター

運営管理者

2010年1月29日

試験責任者

2010年1月29日

信頼性保証証明書

標題 (表題) 2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ[イソベンゾフラン-1(3H), 9'-[9H]キサンテン]-3-オンの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号 6323

被験物質の名称 2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ[イソベンゾフラン-1(3H), 9'-[9H]キサンテン]-3-オン

本試験は、平成 15 年 11 月 21 日付け薬食発第 1121002 号、平成 15・11・13 製局第 2 号、環保企発第 031121002 号、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通知「新規化学物質等に係る試験の方法について」の「細菌を用いる復帰突然変異試験」及び OECD 化学品テストガイドライン 471 (微生物突然変異試験 1997 年 7 月 21 日採択) に基づき、代謝活性化の有無でプレインキュベーション法を用いて実施された。

最終報告書には、試験で使用した方法及び手順が正確に記載されており、報告結果は、試験の生データを正確に反映していることを認める。

なお、監査・査察の実施日及び報告日は以下のとおりである。

対 象	監査・査察実施日	運営管理者及び試験責任者への報告日
試験計画書	2009 年 11 月 12 日	2009 年 11 月 12 日
試験の実施	2009 年 11 月 30 日, 12 月 1, 3 日	2009 年 12 月 3 日
被験物質の管理	2010 年 1 月 8 日	2010 年 1 月 8 日
データの取り扱い管理	2010 年 1 月 7～8 日	
最終報告書	2010 年 1 月 7～8 日	
	2010 年 1 月 29 日	2010 年 1 月 29 日

2010 年 1 月 29 日

信頼性保証責任者

所 属 中央労働災害防止協会
日本バイオアッセイ研究センター
職 名 信頼性保証主管

氏 名

細菌を用いる復帰突然変異試験
報告書

試験番号 6323

本 文

本文目次

項 目	ページ
1 要約	1
2 材料	2
2-1 被験物質	2
2-2 試験系	3
2-3 陽性対照物質	4
2-4 S9 及び S9 mix	5
2-5 被験物質溶液の調製及び陰性対照に使用した溶媒(溶媒対照)	6
2-6 培地及び前培養の条件	6
3 試験方法	8
3-1 採用した試験方法とその理由	8
3-2 プレインキュベーション法の手順	8
3-3 コロニー数の算定方法	9
3-4 生育阻害(抗菌作用)の有無の確認方法	9
3-5 試験の構成及び内容	9
3-6 無菌試験	11
3-7 被験物質の沈殿の有無の確認方法	11
3-8 細菌を用いる復帰突然変異試験結果の解析方法(判定方法)	11
3-9 数値の取扱い	11
4 試験成績及び考察	12
4-1 細菌を用いる復帰突然変異試験の結果	12
4-2 無菌試験	12
4-3 生育阻害(抗菌作用)の有無	12
4-4 被験物質の沈殿の有無	12
4-5 陰性対照(溶媒対照)値及び陽性対照値	13
5 結果の判定	14
6 試験の信頼性に影響を及ぼした事態及び試験計画書に従わなかったこと	14
7 参考文献	14
試験結果表 表-1～3	15～17
試験結果図 図-1～14	18～21

1 要約

試験は、2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ[イソベンゾフラン-1(3H),9'-[9H]キサンテン]-3-オンの細菌に対する復帰突然変異原性の有無を検索することを目的とした。

試験菌株は、ネズミチフス菌¹⁾ TA98、TA100、TA1535、TA1537 及び大腸菌²⁾ WP2uvrA/ pKM101 の5菌株とし、試験方法としてプレインキュベーション法³⁾を用い、代謝活性化法による場合(+S9 mix)及び直接法による場合(-S9 mix)で試験を実施した。

用量設定試験を最高用量5000 µg/プレートより公比3の8用量で実施したが、ネズミチフス菌 TA98、TA100、TA1535、TA1537 及び大腸菌 WP2uvrA/pKM101の代謝活性化法による場合(+S9 mix)及び直接法による場合(-S9 mix)のいずれにおいても、陰性対照(溶媒対照)値の2倍以上の復帰変異コロニー数の上昇は認められなかった。生育阻害(抗菌作用)はネズミチフス菌 TA98、TA100、TA1535、TA1537の直接法による場合(-S9 mix)にみられた。

最高用量5000 µg/プレートないし生育阻害(抗菌作用)を示す用量が最高用量となるように用量を設定して本試験を実施したが、全菌株ともに陰性対照(溶媒対照)値の2倍以上の復帰変異コロニー数の上昇は認められなかった。

用量設定試験において生育阻害(抗菌作用)を示さない用量が4用量段階以上得られなかったネズミチフス菌 TA98、TA100、TA1535、TA1537の直接法による場合(-S9 mix)について本試験-2を実施したが、陰性対照(溶媒対照)値の2倍以上の復帰変異コロニー数の上昇は認められなかった。

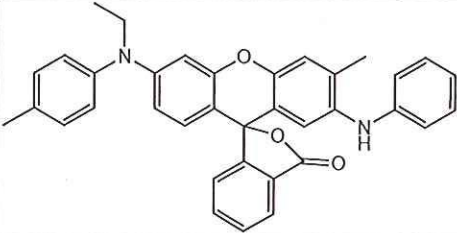
陽性対照物質は、それぞれの菌株において陰性対照(溶媒対照)値の2倍以上の復帰変異コロニー数を誘発し、試験が適切に実施されたことを示した。

以上の結果より、2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ[イソベンゾフラン-1(3H),9'-[9H]キサンテン]-3-オンの細菌に対する復帰突然変異原性は、陰性と判定した。

2 材料

2-1 被験物質

2-1-1 被験物質の性質(被験物質番号: 1241)

化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルス ピロ [イソベンゾフラン-1(3H), 9'-[9H]キサンテン]-3-オン		
別 名	E T A C 6'-[エチル(4-メチルフェニル)アミノ]-3'-メチル-2'-(フェニルアミノ)-スピロ[イソベンゾフラン -1(3H), 9'-(9H)キサンテン]-3-オン		
C A S 番 号	59129-79-2		
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)			
分 子 量	539		
試験に供した 化学物質の純度(%)	99.0		
試験に供した化学 物質のロット番号	[REDACTED]		
不 純 物 の 名 称 及 び 含 有 率	—		
蒸 気 圧	—		
対 水 溶 解 度	—		
1-オクタノール/水分分配係数	—		
融 点	205 °C以上		
沸 点	—		
常温における性状	微着色粉末、臭気無し		
安 定 性	水：酸により発色の可能性あり 光：光に対し著しい分解性は認められないが、遮光保存が望ましい 熱：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	不溶	—
	DMSO	難溶[50mg/ml 以下] 100mg/ml 懸濁可能*	[DMSO を加えた際に、発 色、発泡、発熱等の変化 は見られない]*
供 試 元	[REDACTED]		

*当センターの試験による。

2-1-2 保管及び取扱い

被験物質は、被験物質保管区域の保管庫に室温・遮光条件下で保管した。

2-1-3 被験物質の特性・同一性、安定性

1) 特性・同一性

被験物質の同一性は、赤外吸収スペクトルを測定し、文献値と比較することにより確認した。

2) 安定性

被験物質の安定性は、実験(用量設定試験)開始前及び実験(本試験等)終了後に赤外吸収スペクトルを測定し、それぞれのデータを比較することにより確認した。

2-2 試験系

2-2-1 試験に用いた菌株

試験にはネズミチフス菌¹⁾ TA100、TA1535、TA98、TA1537 及び大腸菌²⁾ WP2uvrA/ pKM101 の5菌株を用いた。

2-2-2 選定理由

従来から、細菌を用いる復帰突然変異試験(微生物を用いる変異原性試験)に広く使用されているほか、平成15年11月21日付け薬食発第1121002号、平成15・11・13製局第2号、環境企発第031121002号、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通知「新規化学物質等に係る試験の方法について」の「細菌を用いる復帰突然変異試験」及びOECD化学物品テストガイドライン471(微生物突然変異試験1997年7月21日採択)に規定されている。

2-2-3 入手方法

菌 株 名	入 手 先	入 手 年 月 日	試験に使用する保存ロットの特性検査日
TA100	東京大学医科学研究所 癌 生 物 学 研 究 部	1985 年 6 月 21 日	2008 年 4 月 23 日
TA1535	同 上	1988 年 5 月 16 日	2008 年 4 月 23 日
TA98	同 上	1988 年 5 月 16 日	2008 年 4 月 23 日
TA1537	同 上	1988 年 5 月 16 日	2008 年 4 月 23 日
WP2uvrA/ pKM101	同 上	1983 年 6 月 29 日	2008 年 4 月 23 日

2-2-4 保存方法

保 存 温 度	組	成
-80	菌懸濁液	0.8 ml
	DMSO	0.07 ml

保存した菌株は、あらかじめ遺伝的性質(特性)を調べて菌の性質が適切であることを確認した。保存は、菌懸濁液0.8 ml に DMSO 0.07 ml の割合で混合した菌液を200 µl ずつ凍結用チューブに分注し、アセトン - ドライアイス冷媒で凍結した後、-80 (三洋電機株式会社 MDF-392AT)で保存した。前培養のために一度解凍した保存菌液は再使用せず廃棄した。

2-3 陽性対照物質

2-3-1 陽性対照物質と陽性対照物質を溶解した溶媒

物 質 名		製 造 元	Lot No.	グ レード	純 度 (%)	溶 媒 名
陽 性 対 照 物 質	ナトリウム・アジド (NaN ₃)	和 光 純 薬 工 業 株 式 会 社	TSK 3329	試薬特級	98	DMSO
	9-アミノアクリジン (9-AA)	Aldrich Chemical Co., Inc.	S30507- 0336	-	98	DMSO
	2-(2-フリル)-3-(5-ヒドロキシ-2- フリル)アクリルアミド (AF-2)	和 光 純 薬 工 業 株 式 会 社	WKK 3086	和光特級	> 98.0	DMSO
	2-アミノアントラセン (2-AA)	和 光 純 薬 工 業 株 式 会 社	ASM 1101	-	97.4	DMSO
溶 媒	ジメチルスルホキシド (DMSO)	関 東 化 学 株 式 会 社	008X1802	分光分析用	99.7	

2-3-2 使用する陽性対照物質の保存及び取扱い

陽性対照物質は、暗所に冷蔵保存した。DMSO で調製した陽性対照物質溶液は 500 μl ずつ凍結用チューブに分注し、-80 で保存した。試験のために解凍した陽性対照物質溶液の残りは再使用せず廃棄した。

2-3-3 使用した陽性対照物質の名称及び用量

直接法による場合		
菌株名	陽性対照物質	用量 (μg / プレート)
TA100	AF-2	0.01
TA1535	NaN_3	0.5
TA98	AF-2	0.1
TA1537	9-AA	80
WP2 <u>uvrA</u> / pKM101	AF-2	0.005

代謝活性化法による場合		
菌株名	陽性対照物質	用量 (μg / プレート)
TA100	2-AA	1
TA1535	2-AA	2
TA98	2-AA	0.5
TA1537	2-AA	2
WP2 <u>uvrA</u> / pKM101	2-AA	2

2-4 S9 及び S9 mix

2-4-1 S9 の入手方法等

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	2009 年 7 月 17 日 製造
購入の場合の Lot No.	RAA-599
保 存 温 度	- 80
タンパク質含有量	25.55mg/ml
購 入 年 月 日	2009 年 7 月 28 日 購入
保 存 機 器 名	三洋電機株式会社 MDF-392AT

S9 は製造後 6 ヶ月以内のものを試験に使用した。

2-4-2 S9 の調製方法

使 用 動 物		誘 導 物 質 ⁴⁾	
種・系統	ラット・ Sprague-Dawley (Slc:SD)	名 称	フェノバルビタール(PB) 及び 5,6-ベンゾフラボン (BF)
性	雄		
週 齢	7 週	投 与 方 法	腹 腔 内 投 与
体 重	211 ~ 248g	投与期間及び投与量 (g/ kg 体重)	1 日目(投与開始日) :PB 0.03 2 日目 ~ 4 日目 :PB 0.06 3 日目 :BF 0.08

フェノバルビタール投与開始後 5 日目の動物の肝臓を、3 倍量の 0.15M KCl でホモジナイズして、9000G で 10 分間遠心分離した上清を S9 として調製したものを購入して使用した。

2-4-3 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 μ mol
MgCl ₂	8 μ mol	NADH	4 μ mol
KCl	33 μ mol	Na-リン酸緩衝液	100 μ mol
グルコース-6-リン酸	5 μ mol	その他 (-)	-

上記の組成で S9 mix を試験ごとに当センターで調製した。

2-5 被験物質溶液の調製及び陰性対照に使用した溶媒(溶媒対照)

使 用 溶 媒	名 称	製 造 元	Lot No.	グレード	純 度 (%)
	DMSO	関東化学(株)	906X2040	分光分析用	99.7
溶 媒 選 択 の 理 由	被験物質の溶解度は、水や DMSO に 50mg/ml [被験物質溶液量をプレート当たり 100 μ l にした場合に 5000 μ g の被験物質質量に相当する]以下であるが、DMSO に 100mg/ml の濃度で懸濁可能である。また、被験物質に DMSO を加えた際に、発色、発泡、発熱等の変化は見られない。以上から DMSO を溶媒に選択した。				
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 DMSO を加え、超音波分散装置を用いて懸濁させた。				
溶液の調製から使用までの保存時間と温度	用量設定試験	50分、		23	
	本試験	10分、		22	
	本試験-2	20分、		23	
純 度 換 算 の 有 無	有		無		
被 験 物 質 の 溶 媒 中 で の 安 定 性	被験物質の DMSO 溶液中での安定性は不明であるが、被験物質に DMSO を加えた際に、発色、発泡、発熱等の変化は見られなかった。				
調 製 の 方 法	被験物質に DMSO を加え、攪拌して溶解させた。被験物質の光への安定性は不明であるので、調製は黄色灯下で実施した。				

2-6 培地及び前培養の条件

2-6-1 前培養の条件

ニュートリエントブロス	名 称	製 造 元	Lot No.
	Oxoid ニュートリエントブロス No.2	OXOID LTD.	612715
前 培 養 時 間	10 時間 00 分		
培養容器(形状・容量)	形 状：三角フラスコ	容 量：62.5 ml	
培 養 液 量	15 ml	接 種 菌 量	30 μ l
保存菌株の接種から振とう培養までの保存時間と温度	用量設定試験	6時間 40分、	7
	本試験	6時間 50分、	7
	本試験-2	6時間 30分、	7
振とう培養終了から使用までの保存時間と温度	用量設定試験	1時間 00分、	23
	本試験	40分、	22
	本試験-2	30分、	23
振とう培養装置の型式及び製造元	型 式：RX-30 製造元：タイテック株式会社		
振とう方法(振とう形式・振とう数等)	振とう形式：旋回 旋回数：120 回/分 旋回直径：3 cm		

2-6-2 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	WP2 <i>uvrA</i> / pKM101	TA98	TA1537
生 菌 数 ($\times 10^9$ / ml)	用量設定試験	3.15	3.99	4.31	2.62	2.37
	本 試 験	3.21	3.90	4.53	2.57	2.40
	本 試 験 - 2	3.30	3.84		2.68	2.56
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. その他 ()				

0xoid ニュートリエントブロス No.2 を用い、10 時間培養し静止期の初期で培養を止めた。分光光度計(株式会社 島津製作所 MPS-2000)を用い、660nm で 1cm セルの吸光度を測定し、生菌数に換算した。生菌数が 1×10^9 / ml 以上の場合に前培養液を試験に用いた。

2-6-3 最小グルコース寒天平板培地等

(1) トップアガー

	成 分	トップアガー 1 ml 中の量
ネズミチフス菌に用いるトップアガー	L-ヒスチジン、D-ビオチン	0.05 μmol
大腸菌に用いるトップアガー	L-トリプトファン	0.05 μmol

寒 天	名 称	Bacto™ Agar
	製 造 元	Becton, Dickinson and Company
	Lot No.	6080253

寒天 0.6wt%、NaCl 0.5wt%の割合の水溶液を高圧蒸気滅菌し、室温で保存した。それを加温溶解し、上記の組成となるように滅菌したアミノ酸溶液を加え、各トッパアガーを調製した。このトッパアガーを約 45℃ に保温して試験に使用した。

(2) 最小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	2009年7月14日 製造
購入の場合の Lot No.	ANI490GY
使用寒天の名称・ 製造元・Lot No.等	使用寒天の名称：伊那寒天 BA-30A 製造元：伊那食品工業株式会社 Lot No.：80828
寒天培地の液量	30 ml
購入年月日	2009年9月1日 購入

3 試験方法

3-1 採用した試験方法とその理由

本試験は、平成 15 年 11 月 21 日付け薬食発第 1121002 号、平成 15・11・13 製局第 2 号、環企発第 031121002 号、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通知「新規化学物質等に係る試験の方法について」の「細菌を用いる復帰突然変異試験」及び OECD 化学品テストガイドライン 471(微生物突然変異試験 1997 年 7 月 21 日採択)に基づいて実施した。

なお、ガイドラインに指定されたプレート法とプレインキュベーション法では、一般的にプレインキュベーション法の方が感度良く被験物質の変異原性を検出できる^{3.5)}と考えられるため、プレインキュベーション法を用いることとした。

3-2 プレインキュベーション法の手順

被験物質溶液又は溶媒 0.05ml 若しくは陽性対照物質溶液 0.05 ml と S9 mix あるいは 0.1M Na-リン酸緩衝液 0.5 ml と試験菌の前培養液 0.1 ml を試験管に入れ、よく混合し 37 で 20 分間、恒温振とう水槽(ヤマト科学株式会社 BW200+BF500)中で振とうした(プレインキュベーション)。プレインキュベーションした後、2 ml のトップアガーを加え、直ちに最小グルコース寒天平板培地(プレート)上に広げて固めた。本被験物質の光への安定性は不明であったので、以上の操作は黄色灯下で実施した。固化したプレートを 37 で 48 時間、恒温培養器(ヤマト科学株式会社 IN-81)で上下を転倒し、遮光して培養した後、試験菌株の生育阻害(抗菌作用)状況を調べ復帰突然変異コロニー数を測定した。

プレインキュベーション法

組 成	試験に用いる前培養液	0.1 ml
	被 験 物 質 溶 液	0.05 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
	トップアガー	2 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

3-3 コロニー数の算定方法

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 面積及び数え落とし補正)
計測方法の1と2を併用した理由	被験物質の沈澱が著しいプレートにマニュアルカウントを実施した。
測定機器・型式・製造元	測定機器名：テレビ線コロニーカウンター 型式：CA-90S 製造元：東洋測器株式会社

機器計測を用いた場合は、面積補正と数え落とし補正をパーソナルコンピュータ(株式会社日立製作所 FLORA330W DK5)を用いて実施した。

3-4 生育阻害(抗菌作用)の有無の確認方法

実体顕微鏡(日本光学工業株式会社 SMZ-10)を用い、40倍ですべてのプレートについて観察した。被験物質処理したプレートを陰性対照(溶媒対照)のプレートと比較し、アミノ酸要求性の微細なコロニー(バックグラウンドローン)の数が減少するか、減少して大きくなる場合に生育阻害(抗菌作用)があると判定した。

3-5 試験の構成及び内容

3-5-1 試験の構成

試験は用量設定試験、本試験及び本試験-2 から構成され、各々の使用菌株、方法及び代謝活性化の有無は以下の通りである。

用量設定試験、本試験

使用菌株	TA98、TA100、TA1535、TA1537、WP2uvrA/ pKM101
試験方法	ブレインキュベーション法
代謝活性化の有無	代謝活性化法による場合及び直接法による場合

ネズミチフス菌の直接法については用量設定試験において生育阻害を示さない用量が4段階以上得られなかったため、本試験-2を実施した。

本試験-2

使用菌株	TA98、TA100、TA1535、TA1537
試験方法	ブレインキュベーション法
代謝活性化の有無	直接法による場合

3-5-2 試験におけるプレート数等 用量設定試験、本試験

区 分	被験物質処理群	陽 性 対 照 群	溶 媒 対 照 群
直 接 法 に よ る 場 合	3 枚	3 枚	3 枚
代謝活性化法による場合	3 枚	3 枚	3 枚

なお、試験は S9 mix を加えた場合(代謝活性化法による場合)と加えない場合(直接法による場合)とを菌株ごとに連続して行った。

本試験-2

区 分	被験物質処理群	陽 性 対 照 群	溶 媒 対 照 群
直 接 法 に よ る 場 合	3 枚	3 枚	3 枚

3-5-3 用量設定及びその理由

あらかじめ用量設定試験を最高用量 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ から公比 3 の 8 用量段階で行い、生育阻害(抗菌作用)を示す用量を調べた後に本試験を行った。

用量設定試験の結果、陰性対照(溶媒対照)値の 2 倍以上の復帰変異コロニー数の上昇が認められず、生育阻害(抗菌作用)がネズミチフス菌の直接法による場合(-S9 mix)にみられた。

以上より、本試験の最高用量は、ネズミチフス菌の直接法による場合(-S9 mix)については最高用量が生育阻害(抗菌作用)を示す用量となるように、それ以外の菌株については最高用量 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ として、下記の用量段階に設定した。

菌 株 名	S9 の有無	本試験の用量設定 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)
TA98	無	39.1、19.5、9.77、4.88、2.44、1.22、0.610、0.305
	有	5000、2500、1250、625、313
TA100	無	39.1、19.5、9.77、4.88、2.44、1.22、0.610、0.305
	有	5000、2500、1250、625、313
TA1535	無	39.1、19.5、9.77、4.88、2.44、1.22、0.610、0.305
	有	5000、2500、1250、625、313
TA1537	無	39.1、19.5、9.77、4.88、2.44、1.22、0.610、0.305
	有	5000、2500、1250、625、313
WP2uvrA/ pKM101	無	5000、2500、1250、625、313
	有	5000、2500、1250、625、313

ネズミチフス菌の直接法については、用量設定試験において生育阻害を示さない用量が4段階以上得られなかったため、下記の用量に設定して本試験-2を実施した。

菌 株 名	S9の有無	本試験-2の用量設定 (μg / プレート)
TA98	無	9.77、4.88、2.44、1.22、0.610、0.305
TA100	無	19.5、9.77、4.88、2.44、1.22、0.610
TA1535	無	19.5、9.77、4.88、2.44、1.22、0.610
TA1537	無	9.77、4.88、2.44、1.22、0.610、0.305

3-6 無菌試験

試験に使用したものと同量の調製した S9 mix 溶液及び被験物質溶液(試験に用いた最高用量について実施)を最小グルコース寒天平板培地に軟寒天溶液で重層し、37 で 48 時間培養して菌の生育の有無を目視で確認した。

3-7 被験物質の沈殿の有無の確認方法

復帰変異コロニーの計数時に、肉眼による観察を被験物質処理したすべてのプレートに対して行った。

3-8 細菌を用いる復帰突然変異試験結果の解析方法(判定方法)

被験物質の用量の増加とともに復帰突然変異コロニー数が増加し、かつ陰性対照(溶媒対照)の2倍以上に増加し、再現性の得られた場合に陽性とすることとした。⁶⁾ 上記の条件が満たされない場合は、陰性とすることとした。データ解析のための統計学的手法は用いなかった。

3-9 数値の取扱い

報告書中のコロニー数は実数で表示し、平均値は小数点以下を四捨五入して表示した。

4 試験成績及び考察

4-1 細菌を用いる復帰突然変異試験の結果

用量設定試験を表-1、本試験の結果を表-2及び図-1～10、本試験-2の結果を表-3及び図-11～14示した。

試験菌株は、ネズミチフス菌¹⁾ TA98、TA100、TA1535、TA1537 及び大腸菌²⁾ WP2uvrA/ pKM101 の5菌株とし、試験方法としてブレインキュベーション法³⁾を用い、代謝活性化法による場合(+ S9 mix)及び直接法による場合(-S9 mix)で試験を実施した。

用量設定試験を最高用量5000 µg/プレートより公比3の8用量で実施したが、ネズミチフス菌 TA98、TA100、TA1535、TA1537及び大腸菌 WP2uvrA/pKM101の代謝活性化法による場合(+S9 mix)及び直接法による場合(-S9 mix)のいずれにおいても、陰性対照(溶媒対照)値の2倍以上の復帰変異コロニー数の上昇は認められなかった。生育阻害(抗菌作用)はネズミチフス菌 TA98、TA100、TA1535、TA1537の直接法による場合(-S9 mix)にみられた。

最高用量5000 µg/プレートないし生育阻害(抗菌作用)を示す用量が最高用量となるように用量を設定して本試験を実施したが、全菌株ともに陰性対照(溶媒対照)値の2倍以上の復帰変異コロニー数の上昇は認められなかった。

用量設定試験において生育阻害(抗菌作用)を示さない用量が4用量段階以上得られなかったネズミチフス菌 TA98、TA100、TA1535、TA1537の直接法による場合(-S9 mix)について本試験-2を実施したが、陰性対照(溶媒対照)値の2倍以上の復帰変異コロニー数の上昇は認められなかった。

陽性対照物質は、それぞれの菌株において陰性対照(溶媒対照)値の2倍以上の復帰変異コロニー数を誘発し、試験が適切に実施されたことを示した。

以上の結果より、2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ[イソベンゾフラン-1(3H),9'-[9H]キサンテン]-3-オンの細菌に対する復帰突然変異原性は、陰性と判定した。

4-2 無菌試験

区 分	菌の増殖の有無	
被験物質溶液	有	無
S9 mix	有	無

用量設定試験、本試験、本試験-2のいずれの試験においても被験物質溶液及び調製した S9 mix に菌の混入は認められず、被験物質溶液及び S9 mix の調製は無菌的に実施された。

4-3 生育阻害(抗菌作用)の有無

生育阻害(抗菌作用)の有無	有	無
---------------	---	---

生育阻害(抗菌作用)の認められた用量は、試験結果表に示した。

4-4 被験物質の沈殿の有無

沈 殿 の 有 無	有	無
-----------	---	---

被験物質の沈殿の認められた用量は、試験結果表に示した。

4-5 陰性対照(溶媒対照)値及び陽性対照値

陽性対照物質は、それぞれの菌株において陰性対照(溶媒対照)値の 2 倍以上の復帰変異コロニー数を誘発した。また、陰性対照(溶媒対照)値及び陽性対照値の平均値は当センターのヒストリカルデータより作成した基準値⁷⁾の範囲内(下記参照)であり、試験が適切に実施されたことを示した。

陰性対照値(溶媒対照値)

[2007 年 11 月～2008 年 6 月にブレインキュベーション法で実施した試験]

菌 株 名	S9 の有無	ヒストリカルデータ			基準値
		試験数	平均値	標準偏差	
TA98	無	n=20	17	4	5 ~ 30
	有	n=20	22	2	16 ~ 28
TA100	無	n=20	102	8	78 ~ 126
	有	n=20	107	11	81 ~ 132
TA1535	無	n=20	12	3	4 ~ 19
	有	n=20	12	3	2 ~ 22
TA1537	無	n=20	9	3	2 ~ 15
	有	n=20	12	4	0 ~ 24
WP2uvrA/ pKM101	無	n=20	69	10	44 ~ 93
	有	n=20	97	13	61 ~ 134

陽性対照値

[2007 年 11 月～2008 年 6 月にブレインキュベーション法で実施した試験]

菌 株 名	陽性対照物質(濃度)			S9 の有無	ヒストリカルデータ			基準値
					試験数	平均値	標準偏差	
TA98	AF-2	0.1	μg/p	無	n=20	479	39	364 ~ 593
	2-AA	0.5	μg/p	有	n=20	508	48	395 ~ 620
TA100	AF-2	0.01	μg/p	無	n=20	640	42	552 ~ 728
	2-AA	1.0	μg/p	有	n=20	1523	115	1224 ~ 1823
TA1535	NaN ₃	0.5	μg/p	無	n=20	360	39	268 ~ 451
	2-AA	2.0	μg/p	有	n=20	289	21	225 ~ 354
TA1537	9-AA	80	μg/p	無	n=20	558	106	338 ~ 778
	2-AA	2.0	μg/p	有	n=20	240	31	163 ~ 317
WP2uvrA/ pKM101	AF-2	0.005	μg/p	無	n=20	1064	167	646 ~ 1482
	2-AA	2.0	μg/p	有	n=20	901	65	760 ~ 1042

5 結果の判定

2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ[イソベンゾフラン-1(3H),9'-[9H]キサンテン]-3-オンの細菌に対する復帰突然変異原性は、陰性と判定した。

6 試験の信頼性に影響を及ぼした事態及び試験計画書に従わなかったこと

試験の信頼性に影響を及ぼした事態及び試験計画書に従わなかった事態はなかった。

7 参考文献

- 1) Maron, D.M. and Ames, B.N.
Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test.
Mutat. Res., 113, 173-215 (1983)
- 2) Green, M.H.L. and Muriel, W.J.
Mutagen testing using TRP⁺ reversion in *Escherichia coli*.
Mutat. Res., 38, 3-32 (1976)
- 3) Matsushima, T., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M.
Factors modulating mutagenicity in microbial tests.
In "Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens",
eds. K.H. Norpoth and R.C. Garner, pp.273-285 (1980),
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- 4) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T.
A safe substitute for polychlorinated biphenyls as an inducer of metabolic activation system.
In "In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing",
eds. F.J. de Serres, J.R. Fouts, J.R. Bend and R.M. Philpot,
pp.85-88 (1976), Elsevier / North-Holland, Amsterdam.
- 5) Yahagi, T., Nagao, M., Seino, Y., Matsushima, T., Sugimura, T. and Okada, M.
Mutagenicities of N-nitrosamines on *Salmonella*.
Mutat. Res., 48, 121-130 (1977)
- 6) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E.
Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* /mammalian microsome mutagenicity test.
Mutat. Res., 31, 347-364 (1975)
- 7) 丹後俊郎著、臨床検査への統計学、pp.74-80、朝倉書店 (1986)

表- 1

試験結果表（用量設定試験）

被験物質の名称：2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-
メチルスピロ[イソベンゾフラン-1(3H),9'-[9H]キサンテン]-3-オン

試験実施期間		2009年11月16日 から 2009年11月19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/pKM101	TA98	TA1537	
S9 mix (-)	陰性対照 (溶媒対照)	106 120 120 (115)	7 8 7 (7)	68 79 64 (70)	15 14 15 (15)	7 10 6 (8)	
	2.29	113 130 121 (121)	11 7 7 (8)	92 71 68 (77)	14 17 16 (16)	6 8 10 (8)	
	6.86	114 128 105 (116)	6 7 9 (7)	67 76 59 (67)	18 11 14 (14)	5 9 3 (6)	
	20.6	139 * 109 * 133 * (127 *)	6 * 10 * 5 * (7 *)	78 83 81 (81)	13 * 16 * 11 * (13 *)	7 * 10 * 8 * (8 *)	
	61.7	119 * 112 * 121 * (117 *)	11 * 7 * 6 * (8 *)	68 68 69 (68)	18 * 21 * 18 * (19 *)	6 * 2 * 10 * (6 *)	
	185 †	112 * 112 * 117 * (114 *)	4 * 4 * 7 * (5 *)	70 73 92 (78)	18 * 14 * 20 * (17 *)	4 * 4 * 7 * (5 *)	
	556 †	107 * 102 * 94 * (101 *)	4 * 8 * 4 * (5 *)	60 75 56 (64)	11 * 9 * 15 * (12 *)	7 * 11 * 6 * (8 *)	
	1667 †	81 * 82 * 87 * (83 *)	2 * 9 * 9 * (7 *)	62 61 49 (57)	12 * 15 * 11 * (13 *)	4 * 4 * 6 * (5 *)	
	5000 †	73 * 80 * 65 * (73 *)	4 * 7 * 6 * (6 *)	36 66 52 (51)	18 * 20 * 22 * (20 *)	5 * 2 * 4 * (4 *)	
	S9 mix (+)	陰性対照 (溶媒対照)	126 114 130 (123)	7 7 10 (8)	108 94 104 (102)	31 25 21 (26)	9 16 11 (12)
		2.29	150 129 170 (150)	6 8 7 (7)	82 81 91 (85)	24 23 25 (24)	17 6 9 (11)
		6.86	136 151 134 (140)	10 7 6 (8)	96 97 105 (99)	18 22 30 (23)	14 9 9 (11)
20.6		166 126 134 (142)	9 11 9 (10)	99 96 92 (96)	29 26 34 (30)	10 15 9 (11)	
61.7		157 136 134 (142)	9 8 7 (8)	98 98 92 (96)	33 25 26 (28)	10 7 13 (10)	
185		143 136 184 (154)	9 5 11 (8)	109 96 112 (106)	37 30 39 (35)	14 9 8 (10)	
556 †		129 138 142 (136)	9 10 7 (9)	87 94 91 (91)	17 23 18 (19)	10 7 8 (8)	
1667 †		150 139 147 (145)	8 7 3 (6)	77 75 79 (77)	18 11 13 (14)	9 6 12 (9)	
5000 †		142 143 116 (134)	6 5 5 (5)	68 64 64 (65)	17 19 20 (19)	10 7 9 (9)	
陽性対照		S9 mixを必要としないもの	名 称 用量(μg/プレート)	A F - 2 0 . 0 1	NaN ₃ 0 . 5	A F - 2 0 . 0 0 5	A F - 2 0 . 1
	S9 mixを必要とするもの	コロニー数/プレート	648 643 660 (650)	340 362 330 (344)	1449 1307 1456 (1404)	556 567 579 (567)	427 463 445 (445)
		名 称 用量(μg/プレート)	2 - A A 1	2 - A A 2	2 - A A 2	2 - A A 0 . 5	2 - A A 2
		コロニー数/プレート	1354 1300 1319 (1324)	254 287 275 (272)	920 853 980 (918)	472 498 482 (484)	183 214 188 (195)

〔備考〕

- 菌の生育阻害(抗菌作用)が認められる場合は、該当する数値の右に*印を付した。
- ()内には各プレートのコロニー数の平均値を記入した。
- 復帰変異数は、被験物質用量の低い順に実測値及び平均値を記入した。
- プレート上に沈澱が析出した場合は、その用量に†印を付した。
- 陽性対照物質の名称 AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、NaN₃ : ナトリウム・アジド、9-AA : 9-アミノアクリジン、2-AA : 2-アミノアントラセン

表-2

試験結果表（本試験）

被験物質の名称：2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-
メチルスピロ[イソベンゾフラン-1(3H),9'-[9H]キサンテン]-3-オン

試験実施期間		2009年11月24日 から 2009年11月27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/pKM101		TA98		TA1537
S9 mix (-)	陰性対照 (溶媒対照)	91 92 101 (95)	7 10 9 (9)	76 60 61 (66)	15 10 13 (13)	9 11 11 (10)					
	0.305	76 84 76 (79)	6 9 6 (7)		10 9 17 (12)	3 11 13 (9)					
		85 92 81 (86)	7 8 8 (8)		14 7 15 (12)	9 10 7 (9)					
	0.610	82 92 82 (85)	6 10 7 (8)		9 11 13 (11)	11 11 13 (12)					
		91 92 99 (94)	13 10 11 (11)		13 14 16 (14)	7 13 9 (10)					
	2.44	108 89 97 (98)	11 11 7 (10)		11 17 11 (13)	5 10 15 (10)					
		75 86 64 (75)	7 6 10 (8)		11 * 16 * 18 * (15 *)	6 * 13 * 11 * (10 *)					
	4.88	71 * 91 * 78 * (80 *)	10 * 3 * 8 * (7 *)		14 * 10 * 15 * (13 *)	13 * 10 * 7 * (10 *)					
		74 * 83 * 76 * (78 *)	9 * 6 * 7 * (7 *)		18 * 13 * 10 * (14 *)	8 * 7 * 7 * (7 *)					
	9.77			51 50 45 (49)							
		625 †			36 46 37 (40)						
	1250 †			41 51 54 (49)							
		2500 †			48 39 63 (50)						
	5000 †			41 39 47 (42)							
S9 mix (+)		陰性対照 (溶媒対照)	111 104 84 (100)	11 15 10 (12)	71 98 75 (81)	26 17 20 (21)	13 15 21 (16)				
	313 †	126 118 94 (113)	11 7 9 (9)	55 84 78 (72)	17 25 18 (20)	7 13 8 (9)					
		117 112 110 (113)	4 8 9 (7)	66 75 61 (67)	13 17 18 (16)	10 10 4 (8)					
	625 †	114 113 96 (108)	8 13 8 (10)	68 76 67 (70)	21 18 17 (19)	4 8 15 (9)					
		112 115 98 (108)	6 15 9 (10)	70 60 77 (69)	16 12 15 (14)	12 10 11 (11)					
	5000 †	115 102 96 (104)	10 14 12 (12)	47 65 63 (58)	22 19 21 (21)	10 8 11 (10)					
陽性 対照	S9 mixを 必要と しない もの	名 称	A F - 2	NaN ₃	A F - 2	A F - 2	9 - A A				
		用量(μg/プレート)	0 . 0 1	0 . 5	0 . 0 0 5	0 . 1	8 0				
	S9 mixを 必要と する もの	コロニー数/ プレート	657 694 652 (668)	326 328 299 (318)	1415 1179 1318 (1304)	374 382 367 (374)	379 391 405 (392)				
		名 称	2 - A A	2 - A A	2 - A A	2 - A A	2 - A A				
		用量(μg/プレート)	1	2	2	0 . 5	2				
		コロニー数/ プレート	1318 1374 1355 (1349)	248 239 240 (242)	1019 865 954 (946)	488 475 489 (484)	219 245 242 (235)				

【備考】

1. 菌の生育阻害(抗菌作用)が認められる場合は、該当する数値の右に*印を付した。
2. ()内には各プレートのコロニー数の平均値を記入した。
3. 復帰変異数は、被験物質用量の低い順に実測値及び平均値を記入した。
4. プレート上に沈澱が析出した場合は、その用量に†印を付した。
5. 陽性対照物質の名称 AF-2：2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、NaN₃：ナトリウム・アジド、9-AA：9-アミノアクリジン、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：2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-
メチルスピロ[イソベンゾフラン-1(3H),9'-[9H]キサンテン]-3-オン

試験実施期間		2009年11月30日 から 2009年12月3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		TA98		TA1537	
S9 mix (-)	陰性対照 (溶媒対照)	83	106	13	11	13	15	11	14	
		87	(92)	11	(12)	18	(15)	7	(11)	
	0.305					9	17	6	15	
						17	(14)	10	(10)	
	0.610	77	83	7	9	14	15	10	14	
		94	(85)	7	(8)	15	(15)	15	(13)	
	1.22	83	84	6	13	18	14	14	9	
		68	(78)	14	(11)	16	(16)	11	(11)	
	2.44	89	99	8	9	16	10	11	13	
	77	(88)	9	(9)	11	(12)	13	(12)		
4.88	109	93	8	6	14	16	11	9		
	91	(98)	13	(9)	14	(15)	15	(12)		
9.77	90	101	10	6	15 *	15 *	8 *	11 *		
	82	(91)	11	(9)	16 *	(15 *)	9 *	(9 *)		
19.5	77 *	98 *	6 *	11 *						
	77 *	(84 *)	11 *	(9 *)						
陽性対照	S9 mixを必要としないもの	名 称	A F - 2		NaN ₃		A F - 2		9 - A A	
		用量(μg /プレート)	0 . 0 1		0 . 5		0 . 1		8 0	
		コロニー数/プレート	674	671	305	316	514	522	350	416
		696	(680)	338	(320)	516	(517)	440	(402)	

【備考】

- 菌の生育阻害(抗菌作用)が認められる場合は、該当する数値の右に*印を付した。
- () 内には各プレートのコロニー数の平均値を記入した。
- 復帰変異数は、被験物質用量の低い順に実測値及び平均値を記入した。
- 陽性対照物質の名称 AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、NaN₃ : ナトリウム・アジド、
9-AA : 9-アミノアクリジン

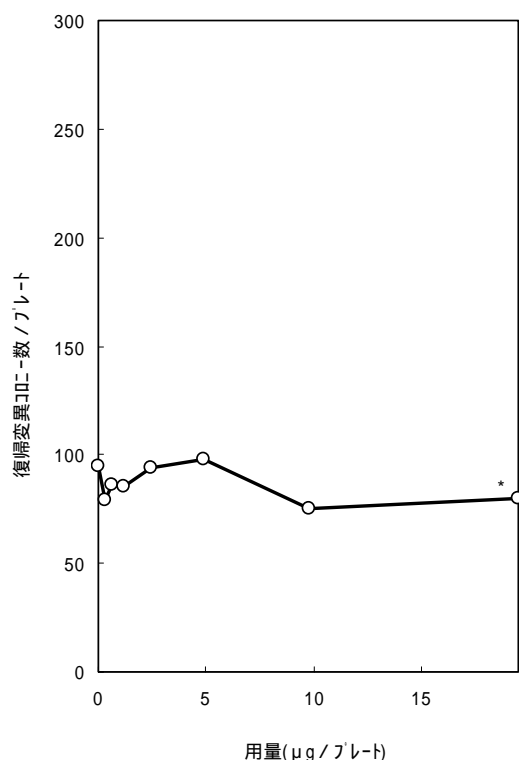


図-1 TA100における用量 - 反応曲線
直接法による場合（本試験）
（19.5 μg / プレートまでプロットした。）

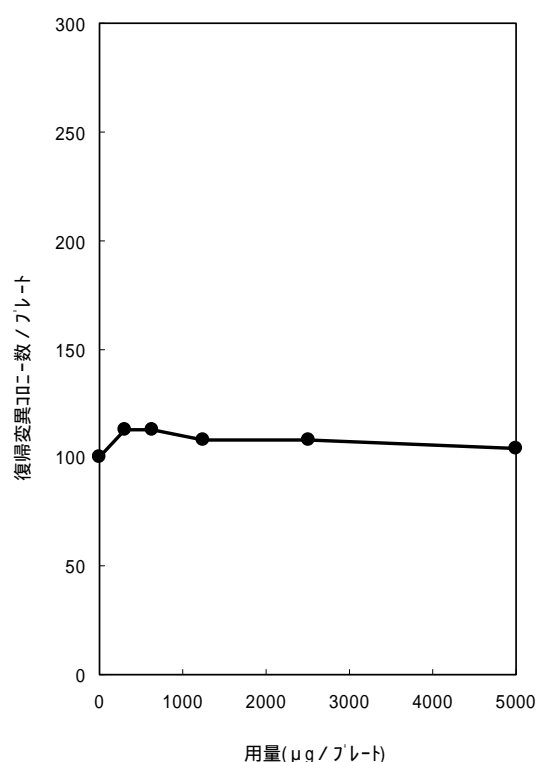


図-2 TA100における用量 - 反応曲線
代謝活性化法による場合（本試験）

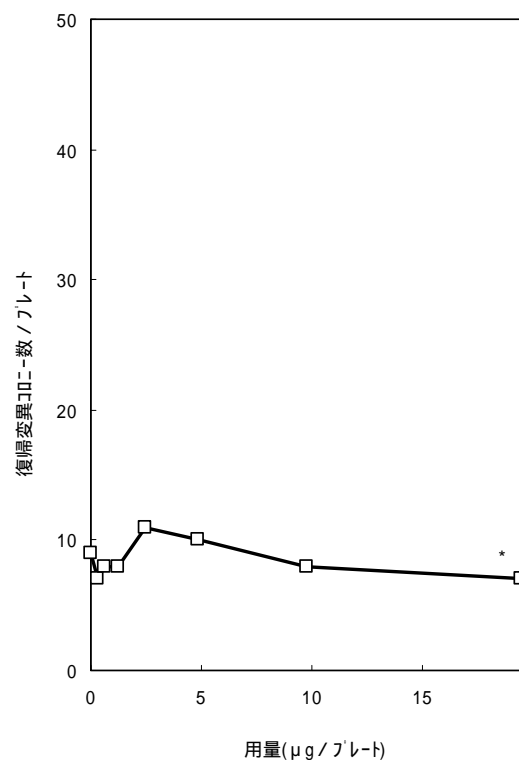


図-3 TA1535における用量 - 反応曲線
直接法による場合（本試験）
（19.5 μg / プレートまでプロットした。）

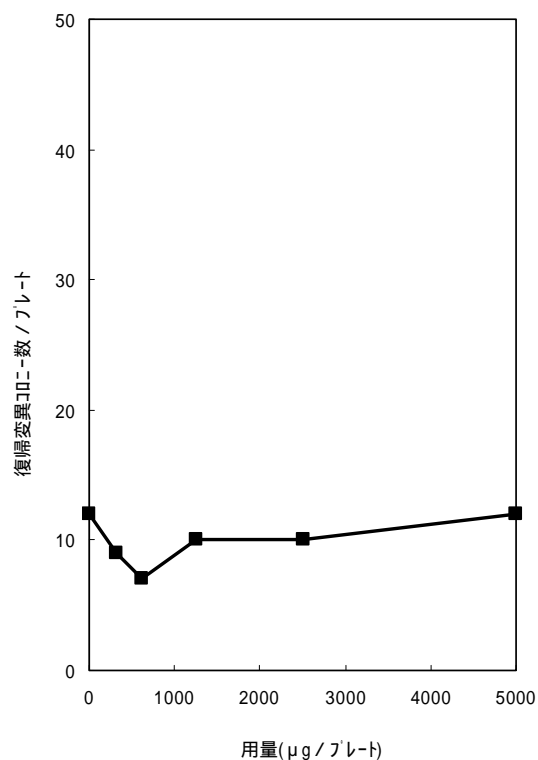


図-4 TA1535における用量 - 反応曲線
代謝活性化法による場合（本試験）

注：生育阻害(抗菌作用)が認められる場合は、該当するポイントの左上に*を付した。

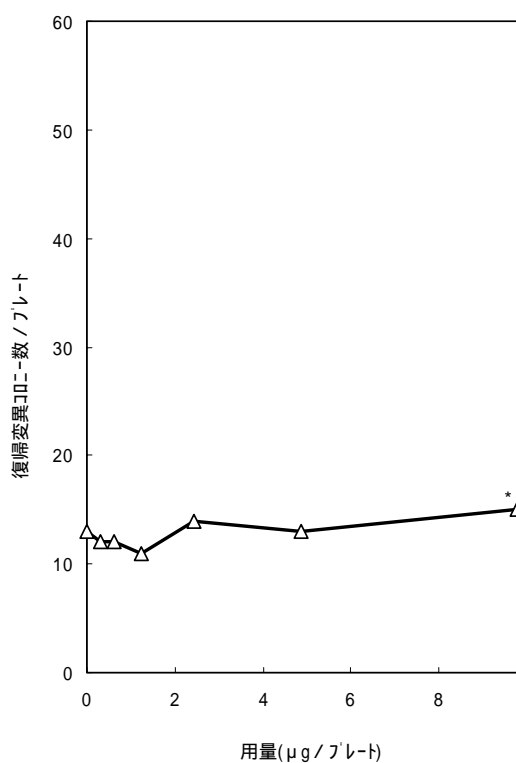


図-5 TA98における用量 - 反応曲線
直接法による場合（本試験）
（9.77 μg/プレートまでプロットした。）

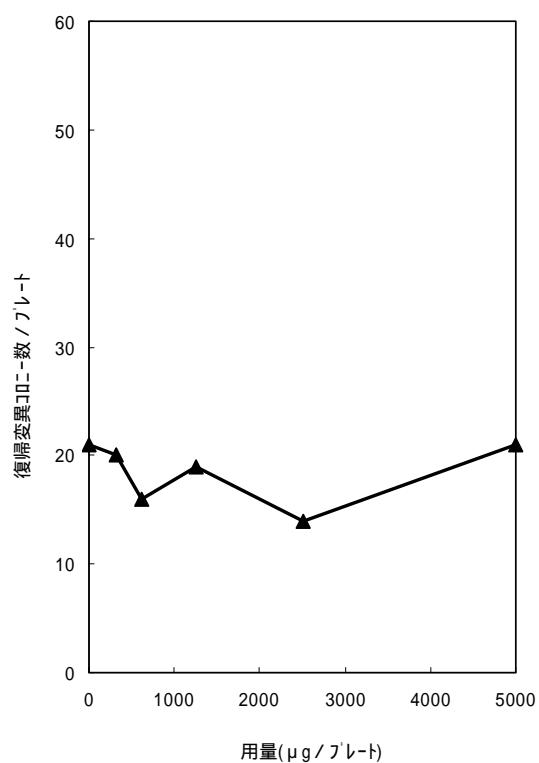


図-6 TA98における用量 - 反応曲線
代謝活性化法による場合（本試験）

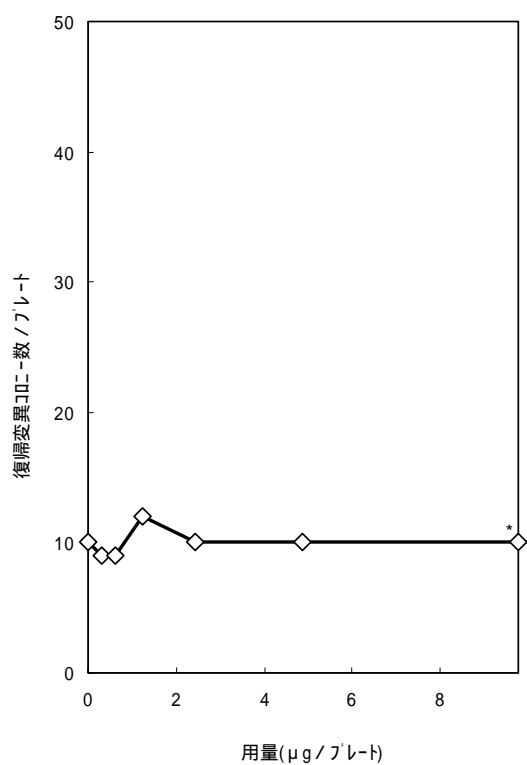


図-7 TA1537における用量 - 反応曲線
直接法による場合（本試験）
（9.77 μg/プレートまでプロットした。）

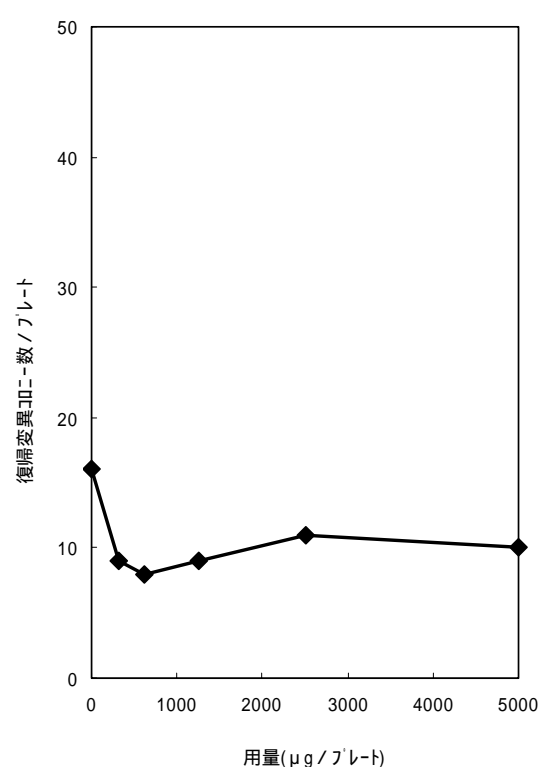


図-8 TA1537における用量 - 反応曲線
代謝活性化法による場合（本試験）

注：生育阻害（抗菌作用）が認められる場合は、該当するポイントの左上に*を付した。

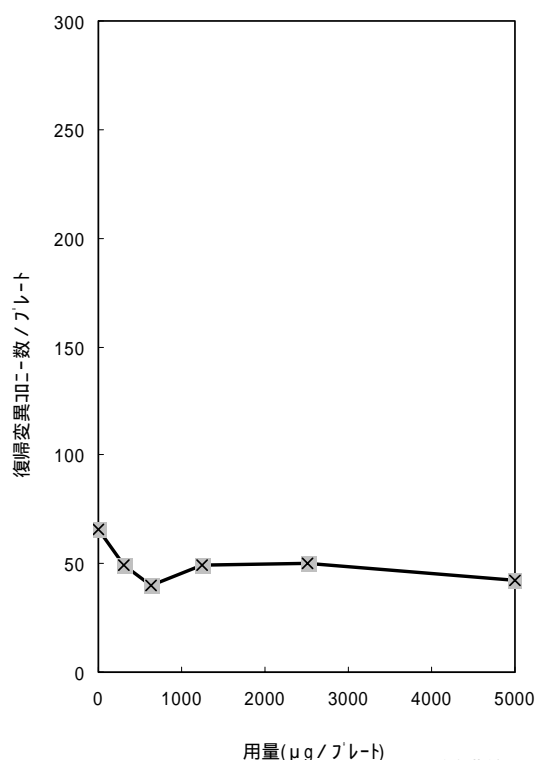


図-9 WP2uvrA/pKM101における用量 - 反応曲線
直接法による場合（本試験）

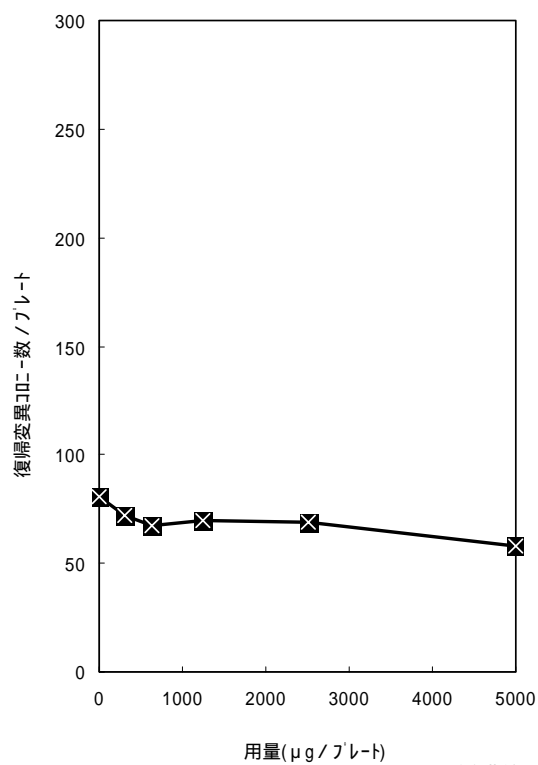


図-10 WP2uvrA/pKM101における用量 - 反応曲線
代謝活性化法による場合（本試験）

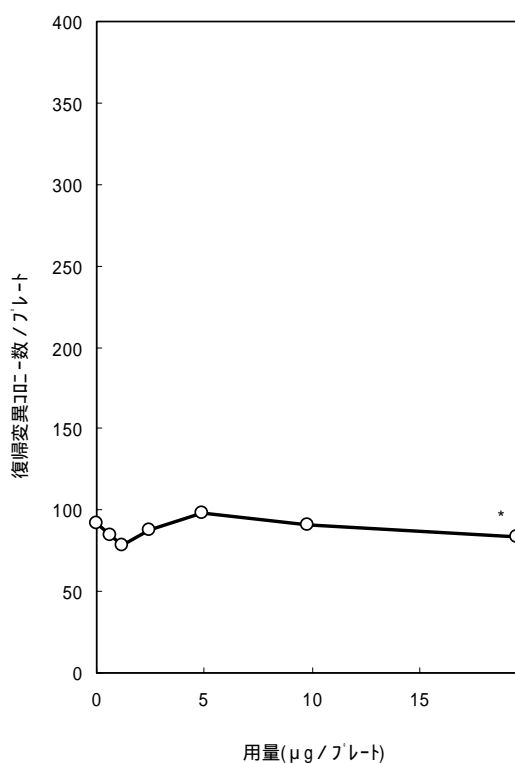


図-11 TA100における用量 - 反応曲線
直接法による場合（本試験-2）

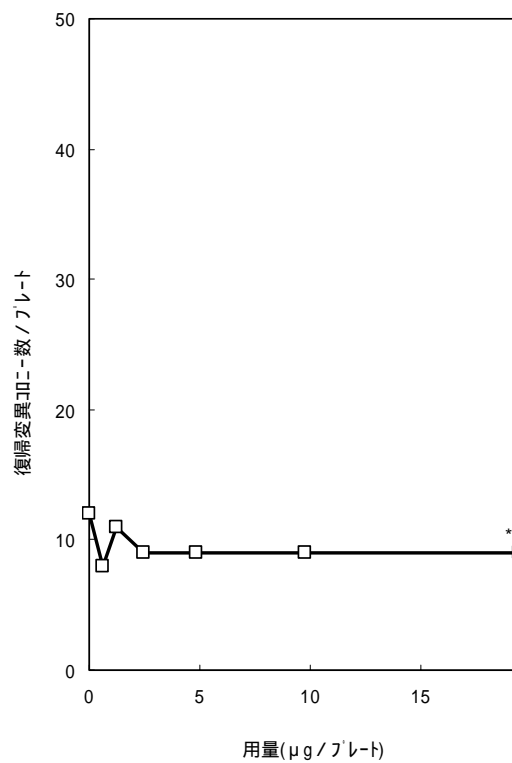


図-12 TA1535における用量 - 反応曲線
直接法による場合（本試験-2）

注：生育阻害(抗菌作用)が認められる場合は、該当するポイントの左上に*を付した。

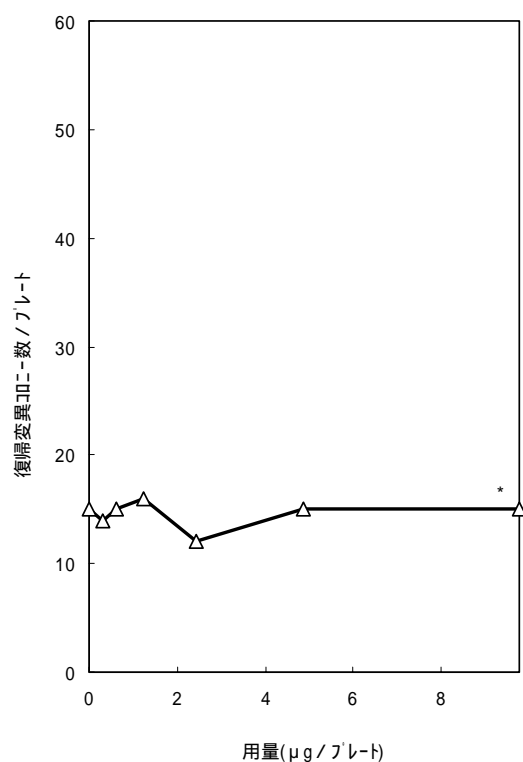


図-13 TA98における用量 - 反応曲線
直接法による場合 (本試験-2)

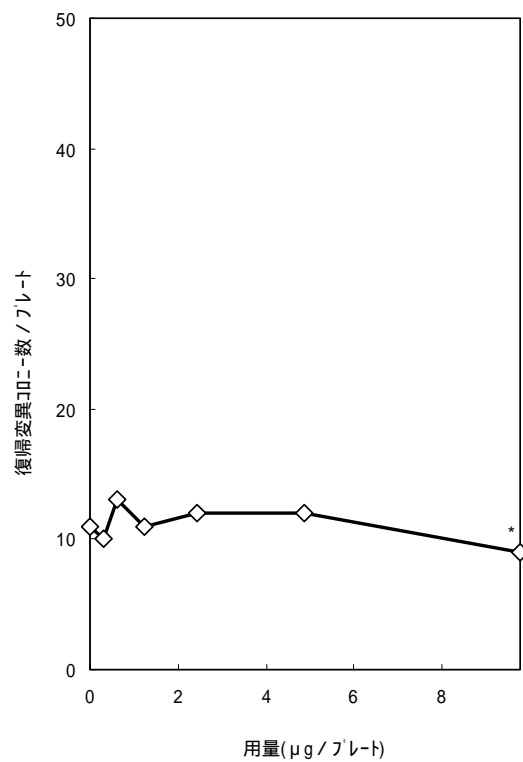


図-14 TA1537における用量 - 反応曲線
直接法による場合 (本試験-2)

注：生育阻害(抗菌作用)が認められる場合は、該当するポイントの左上に*を付した。