

細菌を用いる復帰突然変異試験報告書

試験番号 6324

2010年1月29日

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

ビス(2-モルホリノエチル) = エーテルの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験の目的

ビス(2-モルホリノエチル) = エーテル(被験物質番号: 1242)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17日
用量設定試験 (アッセイ)	2009年11月18日
用量設定試験 (コロニーカウント)	2009年11月20日
用量設定試験(再)用菌前培養	2009年12月 1日
用量設定試験(再) (アッセイ)	2009年12月 2日
用量設定試験(再) (コロニーカウント)	2009年12月 4日
本試験用菌前培養	2009年12月 7日
本試験 (アッセイ)	2009年12月 8日
本試験 (コロニーカウント)	2009年12月10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17日 ~ 2009年12月10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	
	経歴年数	12年9ヶ月	
試験担当者-1	職氏名	病理検査部 室長	
	経歴年数	29年8ヶ月	
試験担当者-2	職氏名	病理検査部	
	経歴年数	19年5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：6324

試験名：ビス（2 - モルホリノエチル）=エーテル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

細菌を用いる復帰突然変異試験
報告書

試験番号 6324

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	10
3-7 被験物質の沈殿の有無の確認方法	10
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)	10
3-9 数値の取扱い	10
4 試験成績及び考察	11
4-1 細菌を用いる復帰突然変異試験の結果	11
4-2 無菌試験	11
4-3 生育阻害(抗菌作用)の有無	11
4-4 被験物質の沈殿の有無	11
4-5 陰性対照(溶媒対照)値及び陽性対照値	12
5 結果の判定	13
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	13
7 参考文献	14
試験結果表 表-1、2	15、16
試験結果図 図-1～10	17～19

1 要約

試験は、ビス(2-モルホリノエチル) = エーテル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用量で実施したところ、複数の菌株の陽性対照値に基準値からの逸脱が見られたため、当該データは採用しないこととし、用量設定試験(再)を実施することとした。

用量設定試験(再)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、生育阻害(抗菌作用)や陰性対照(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。

本試験を最高用量5000 µg/プレートより、公比2の5用量で実施したが、全菌株ともに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。

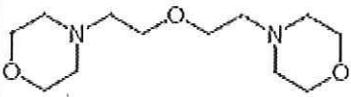
用量設定試験(再)、本試験において陽性対照物質は、それぞれの菌株において陰性対照(溶媒対照)値の2倍以上の復帰変異コロニー数を誘発し、試験が適切に実施されたことを示した。

以上の結果より、ビス(2-モルホリノエチル) = エーテル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: 1242)

化学物質の名称 (IUPAC命名法による)	ビス(2-モルホリノエチル)エーテル		
別名	-		
C A S 番号	6425-39-4		
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	244.33		
試験に供した化学物質の純度(%)	94.8		
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-オクタール/水分配係数	-		
融点	-28°C		
沸点	309°C		
常温における性状	赤みの黄色透明液体		
安定性	水: 不明 光: 不明 熱: 不明		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	水	溶解 [100mg/ml 以上] *	[水を加えた際に、発色、発泡、発熱等の変化は見られない]*
	DMSO	溶解 [100mg/ml 以上] *	[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
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-フル)-3-(5-ヒドロキシ-2-フル)アクリアミド (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 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)
TA100	AF-2	0.01
TA1535	NaN_3	0.5
TA98	AF-2	0.1
TA1537	9-AA	80
WP2uvrA/ 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 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)
TA100	2-AA	1
TA1535	2-AA	2
TA98	2-AA	0.5
TA1537	2-AA	2
WP2uvrA/ 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9月4日 製造
購入の場合の Lot No.	RAA-601
保存温度	- 80
タンパク質含有量	28.91mg/ml
購入年月日	2009年9月15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	215 ~ 252g	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(%)
	蒸留水	和光純薬工業(株)	KWP9781	高速液体 加マトグラフ用	99.9以上
溶媒選択の理由	被験物質の溶解度は、水に 100mg/ml [被験物質溶液量をプレート当たり 50 μ l にした場合に 5000 μ g の被験物質に相当する]以上溶解する。また、被験物質に水を加えた際に、発色、発泡、発熱等の変化は見られない。以上から水を溶媒に選択した。				
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					
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(再)	20分、		23	
	本試験	20分、		23	
純度換算の有無	有				無
被験物質の溶媒中の安定性	被験物質の水溶液中での安定性は不明であるが、被験物質に水を加えた際に、発色、発泡、発熱等の変化は見られなかった。				
調製の方法	被験物質に水を加え、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(再)	6時間 40分、	7
	本試験	6時間 50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(再)	30分、	23
	本試験	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	WP2uvrA/ pKM101	TA98	TA1537
生 菌 数 ($\times 10^9$ / ml)	用量設定試験(再)	3.19	3.96	4.38	2.75	2.41
	本 試 験	3.05	3.56	4.23	2.57	2.28
測 定 方 法 (いずれかを で 囲む こと)		①. 0.D. 値よりの換算 3. その他()			2. 段階希釈法	

Oxoid ニュートリエントプロス 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 μ mol
大腸菌に用いるトップアガー	L-トリプトファン	0.05 μ mol

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、各トップアガーを調製した。このトップアガーを約 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 のトッブアガーを加え、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 IN800)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
	トッブアガー	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	
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、用量設定試験(再)、本試験から構成され、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。

なお、用量設定試験において、複数の菌株の陽性対照値に基準値からの逸脱が見られたため、当該データは採用しないこととし、用量設定試験(再)を実施することとした。

用量設定試験、用量設定試験(再)、本試験

使用菌株	TA98、TA100、TA1535、TA1537、WP2uvrA/ pKM101
試験方法	プ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

3-5-2 試験におけるプレート数等

用量設定試験、用量設定試験(再)、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。

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(再)の結果、最高用量である 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量まで、生育阻害(抗菌作用)や陰性対照(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なかったため、本試験の最高用量は 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とし、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	5000、2500、1250、625、313
	有	5000、2500、1250、625、313
TA100	無	5000、2500、1250、625、313
	有	5000、2500、1250、625、313
TA1535	無	5000、2500、1250、625、313
	有	5000、2500、1250、625、313
TA1537	無	5000、2500、1250、625、313
	有	5000、2500、1250、625、313
WP2uvrA/ pKM101	無	5000、2500、1250、625、313
	有	5000、2500、1250、625、313

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事とした。⁶⁾ 上記の条件が満たされない場合は、陰性とする事とした。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(再)を表-1に、本試験の結果を表-2及び図-1～10に示した。

用量設定試験を最高用量5000 µg/プレートより公比3の8用量で実施したところ、複数の菌株の陽性対照値に基準値からの逸脱が見られたため、当該データは採用しないこととし、用量設定試験(再)を実施することとした。

用量設定試験(再)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、生育阻害(抗菌作用)や陰性対照(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。

本試験を最高用量5000 µg/プレートより、公比2の5用量で実施したが、全菌株ともに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(再)、本試験において陽性対照物質は、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、ピス(2-モルホリノエチル) = エーテル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、用量設定試験(再)、本試験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
---------------	---	---

4-4 被験物質の沈殿の有無

沈殿の有無	有	無
-------	---	---

4-5 陰性対照(溶媒対照)値及び陽性対照値

用量設定試験(再)、本試験において陽性対照物質は、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月にプ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月にプ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

ビス(2-ホルホリノエチル) = エーテル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

用量設定試験において、複数の菌株の陽性対照値に基準値からの逸脱が見られたため、当該データは採用しないこととし、用量設定試験(再)を実施した。

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(再))

被験物質の名称：ビス(2 - モルホリノエチル) = エーテル

試験実施期間		2009年12月1日 から 2009年12月4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)	111 117 97 (108)	9 9 10 (9)	67 67 52 (62)	20 25 23 (23)	16 11 10 (12)					
	2.29	104 123 114 (114)	7 16 7 (10)	67 83 68 (73)	17 17 16 (17)	6 9 9 (8)					
	6.86	129 94 107 (110)	14 9 8 (10)	63 48 49 (53)	21 25 20 (22)	9 9 5 (8)					
	20.6	120 114 127 (120)	9 5 7 (7)	62 71 51 (61)	22 14 23 (20)	8 9 6 (8)					
	61.7	109 104 124 (112)	11 8 6 (8)	63 61 76 (67)	21 20 14 (18)	10 10 10 (10)					
	185	131 120 122 (124)	16 11 14 (14)	49 61 60 (57)	20 15 24 (20)	8 9 9 (9)					
	556	107 101 122 (110)	11 13 10 (11)	66 69 76 (70)	16 18 13 (16)	7 10 8 (8)					
	1667	131 115 127 (124)	13 14 14 (14)	51 61 51 (54)	17 26 20 (21)	10 8 10 (9)					
	5000	121 130 137 (129)	10 6 10 (9)	67 75 62 (68)	14 15 20 (16)	9 9 8 (9)					
	S9 mix (+)	陰性対照 (溶媒対照)	130 120 122 (124)	10 10 13 (11)	100 87 105 (97)	25 22 18 (22)	10 10 14 (11)				
2.29		120 114 97 (110)	11 9 6 (9)	106 105 100 (104)	22 15 31 (23)	11 14 13 (13)					
6.86		114 104 94 (104)	10 10 7 (9)	92 114 104 (103)	15 18 22 (18)	11 13 13 (12)					
20.6		120 113 107 (113)	10 9 5 (8)	85 107 87 (93)	24 21 22 (22)	15 6 13 (11)					
61.7		116 113 115 (115)	10 9 8 (9)	102 106 81 (96)	24 25 24 (24)	10 10 11 (10)					
185		131 108 108 (116)	7 8 5 (7)	105 94 113 (104)	25 29 23 (26)	13 11 13 (12)					
556		120 106 115 (114)	9 6 7 (7)	99 92 94 (95)	24 29 25 (26)	7 9 9 (8)					
1667		123 108 127 (119)	10 11 13 (11)	97 98 109 (101)	28 24 21 (24)	13 11 11 (12)					
5000		144 142 142 (143)	8 8 11 (9)	101 97 101 (100)	15 20 23 (19)	11 13 11 (12)					
陽性対照		S9 mixを必要とするもの	名称 AF - 2	NaN ₃	AF - 2	AF - 2	9 - AA				
	用量 (μg/プレート)	0 . 0 1	0 . 5	0 . 0 0 5	0 . 1	8 0					
	コロニー数/プレート	557 555 575 (562)	300 328 341 (323)	1292 1162 1341 (1265)	555 579 591 (575)	471 396 391 (419)					
	S9 mixを必要とするもの	名称 2 - AA	2 - AA	2 - AA	2 - AA	2 - AA					
用量 (μg/プレート)	1	2	2	0 . 5	2						
コロニー数/プレート	1235 1278 1236 (1250)	260 276 298 (278)	904 903 907 (905)	411 416 390 (406)	238 202 235 (225)						

【備考】

1. () 内には各プレートのコロニー数の平均値を記入した。
2. 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。
3. 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：ビス(2-モルホリノエチル) = エーテル

試験実施期間		2009年12月7日 から 2009年12月10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)	117 115 119 (117)	11 9 9 (10)	75 70 71 (72)	16 24 23 (21)	8 8 13 (10)	
	313	104 121 111 (112)	9 8 10 (9)	81 90 90 (87)	17 16 18 (17)	5 9 6 (7)	
	625	111 120 107 (113)	14 8 6 (9)	72 83 94 (83)	17 24 18 (20)	9 8 13 (10)	
	1250	134 136 129 (133)	6 8 6 (7)	69 64 90 (74)	25 18 23 (22)	7 9 7 (8)	
	2500	107 111 134 (117)	10 11 6 (9)	71 78 82 (77)	21 18 28 (22)	7 6 9 (7)	
	5000	142 129 108 (126)	10 8 6 (8)	67 72 70 (70)	18 16 23 (19)	10 7 8 (8)	
	S9 mix (+)	陰性対照 (溶媒対照)	114 101 113 (109)	15 11 9 (12)	107 111 91 (103)	17 28 22 (22)	11 10 11 (11)
313		108 120 112 (113)	5 13 11 (10)	91 89 106 (95)	25 22 22 (23)	9 9 7 (8)	
625		113 116 122 (117)	10 13 8 (10)	106 115 107 (109)	17 32 18 (22)	11 13 9 (11)	
1250		155 136 142 (144)	10 13 9 (11)	123 107 100 (110)	24 26 31 (27)	10 13 13 (12)	
2500		124 131 149 (135)	15 7 14 (12)	113 109 108 (110)	23 34 29 (29)	11 11 10 (11)	
5000		133 142 129 (135)	10 13 13 (12)	121 99 102 (107)	32 24 22 (26)	10 9 10 (10)	
陽性対照		S9 mixを必要とするもの	名称 用量 (µg/プレート)	AF-2 0.01	NaN ₃ 0.5	AF-2 0.005	AF-2 0.1
	S9 mixを必要とするもの	名称 用量 (µg/プレート)	2-AA 1	2-AA 2	2-AA 2	2-AA 0.5	2-AA 2
陽性対照	S9 mixを必要とするもの	コロニー数/プレート	699 657 679 (678)	295 342 318 (318)	1168 1019 1182 (1123)	454 483 472 (470)	433 429 419 (427)
	S9 mixを必要とするもの	コロニー数/プレート	1236 1354 1278 (1289)	274 260 269 (268)	828 825 748 (800)	417 429 397 (414)	192 200 174 (189)

[備考]

1. () 内には各プレートのコロニー数の平均値を記入した。
2. 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。
3. 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

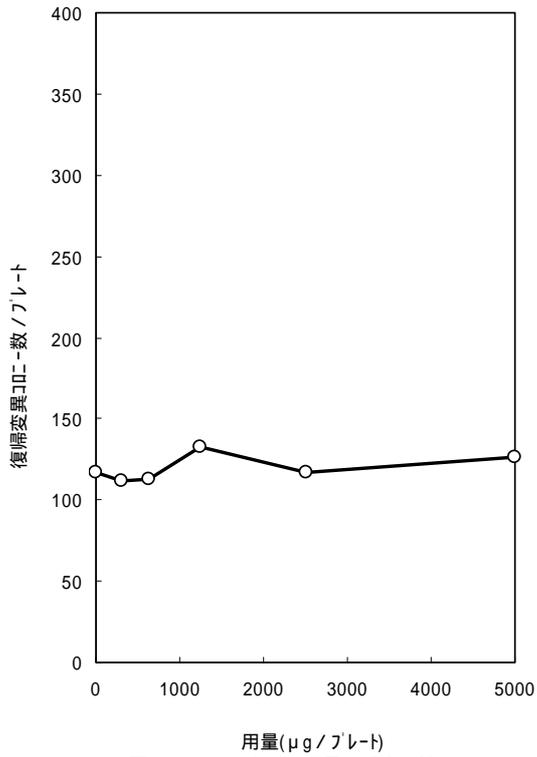


図-1 TA100における用量 - 反応曲線
直接法による場合 (本試験)

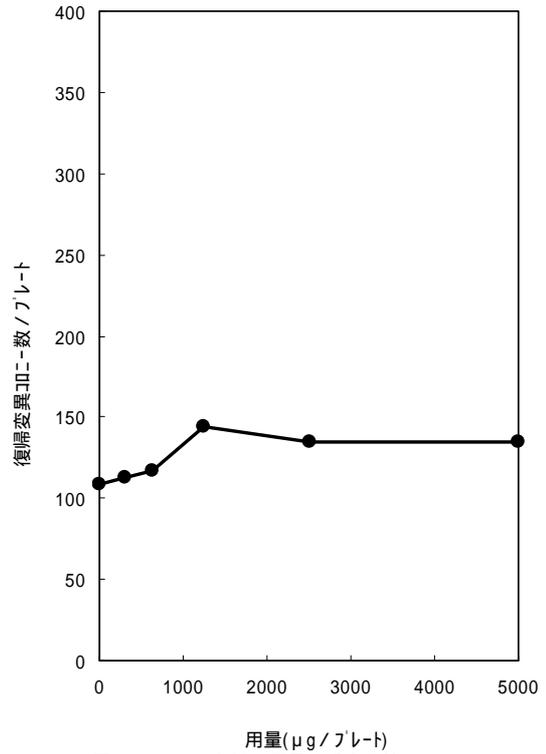


図-2 TA100における用量 - 反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)

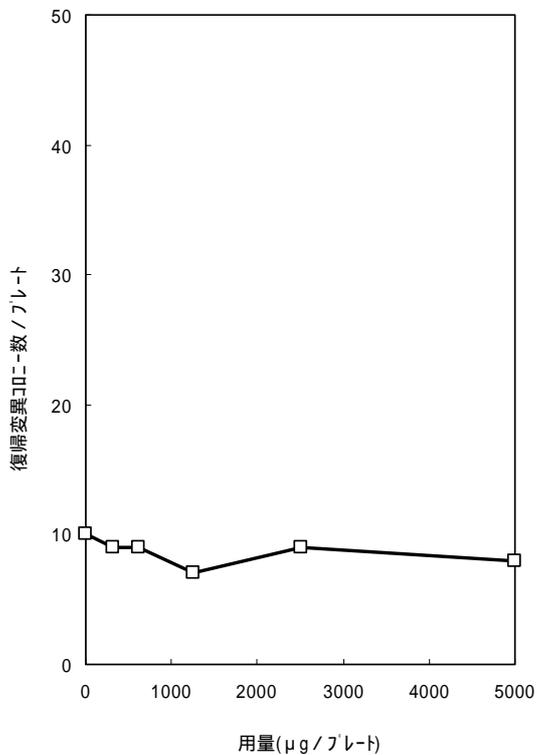


図-3 TA1535における用量 - 反応曲線
直接法による場合 (本試験)

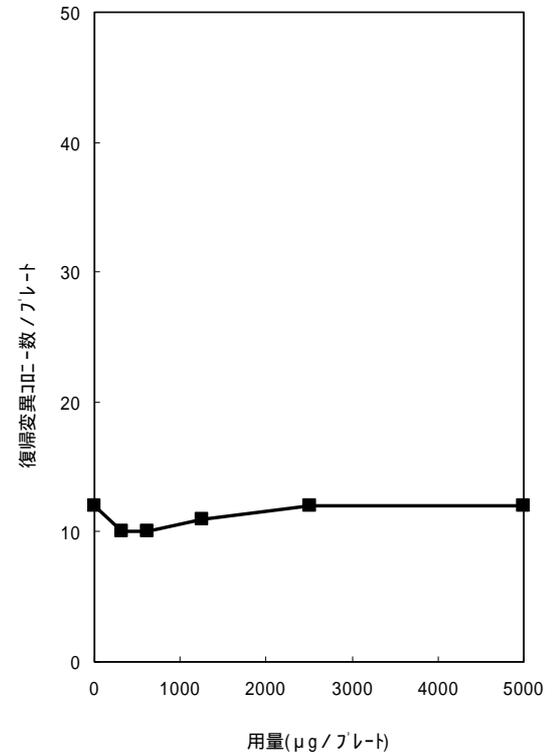


図-4 TA1535における用量 - 反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)

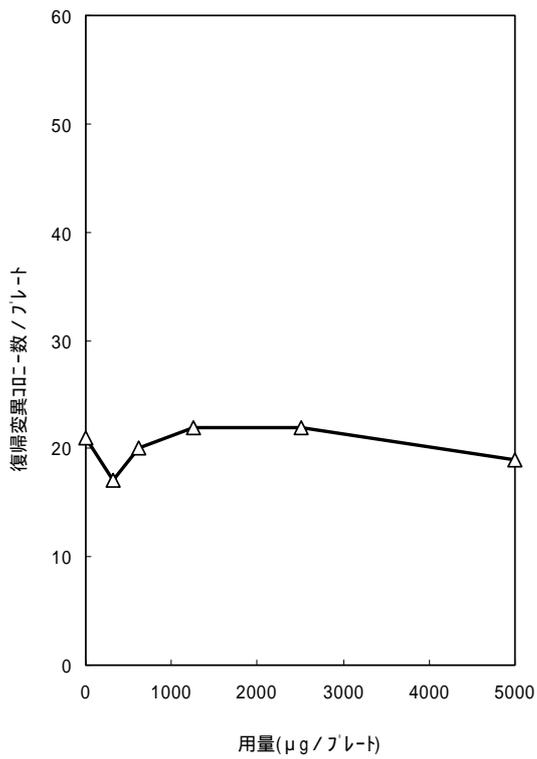


図-5 TA98における用量 - 反応曲線
直接法による場合 (本試験)

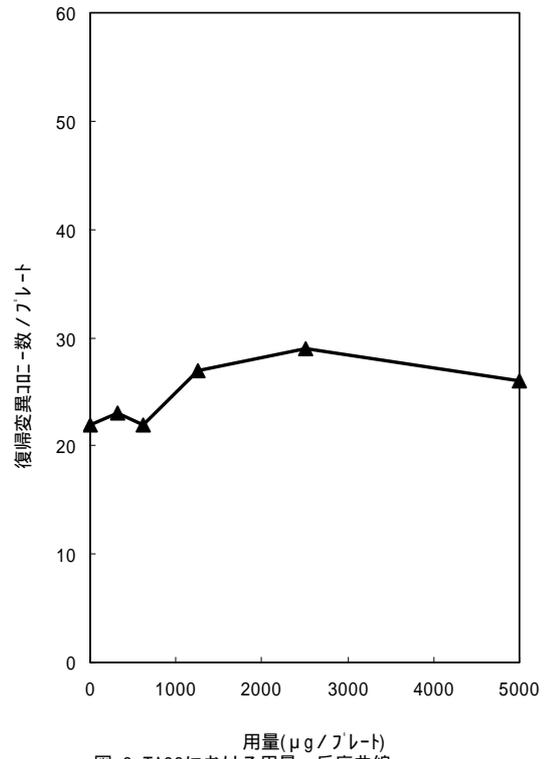


図-6 TA98における用量 - 反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)

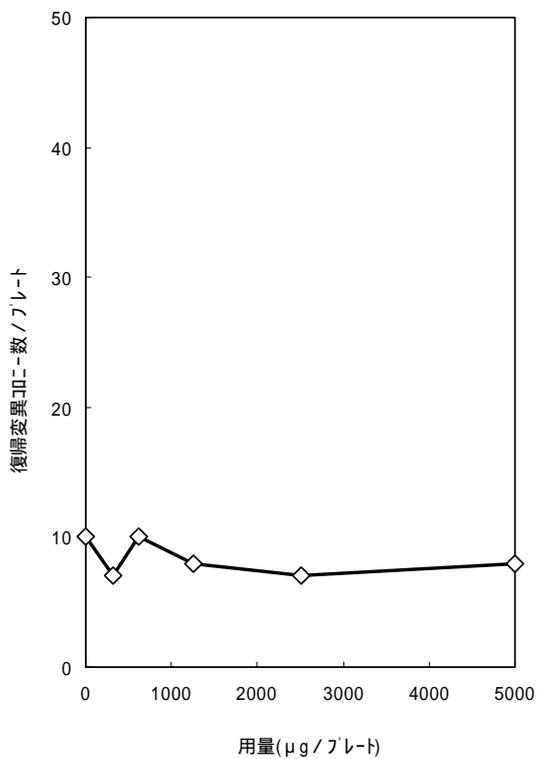


図-7 TA1537における用量 - 反応曲線
直接法による場合 (本試験)

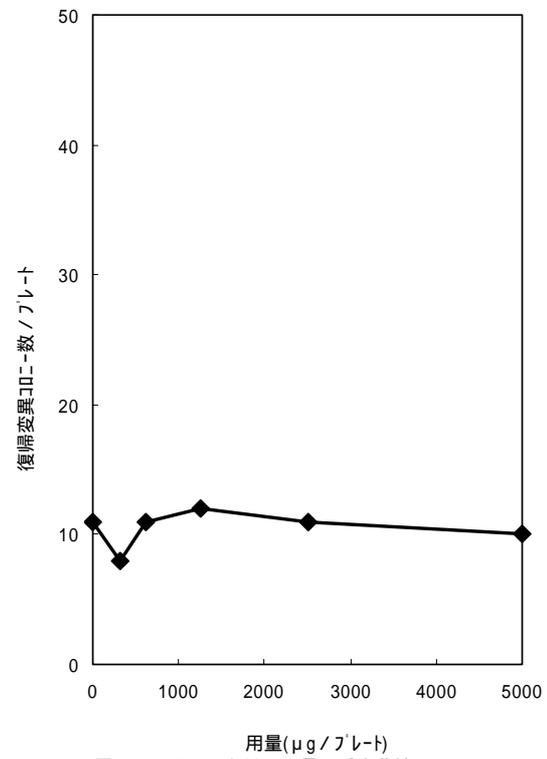


図-8 TA1537における用量 - 反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)

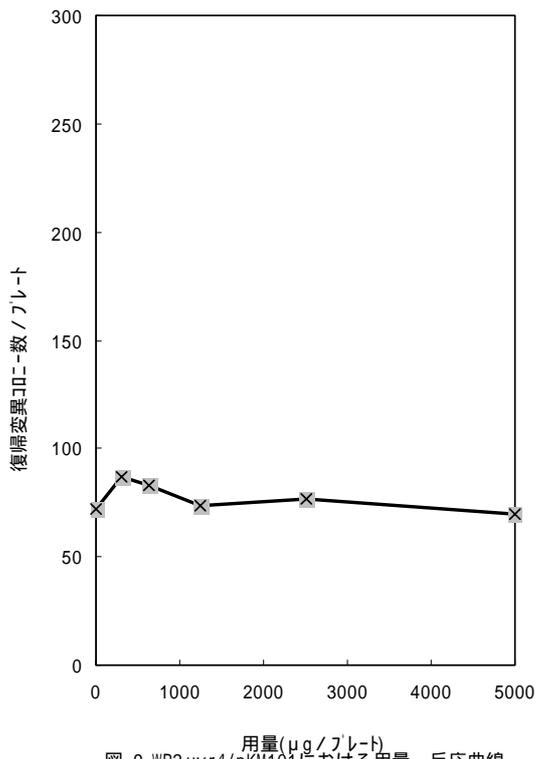


図-9 WP2uvrA/pKM101における用量 - 反応曲線
直接法による場合 (本試験)

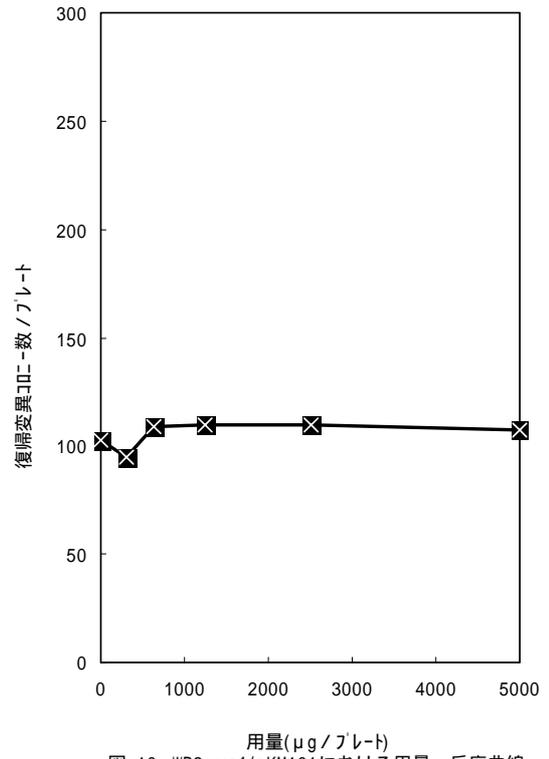


図-10 WP2uvrA/pKM101における用量 - 反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)