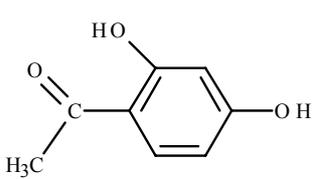


微生物を用いる変異原性試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	2', 4'-ジヒドロキシアセトフェノン		
別名	/		
構造式又は示性式 (いずれも不明な場合はその製法の概要)			
試験に供した新規化学物質の純度	99%	試験に供した新規化学物質の Lot No.	STBC7459V
不純物の名称及び濃度	/		
CAS 番号	89-84-9	蒸気圧	/
分子量	152.15	分配係数	/
融点	143~145°C	常温における性状	固体
沸点	336°C		
安定性	適切な条件下においては安定		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中での安定性
	水	50 mg/mL で不溶	発熱、ガスの発生等の反応性なし
	DMSO	50 mg/mL で溶解	発熱、ガスの発生等の反応性なし
	アセトン	/	/
	その他	/	/

(備考) 上記被験物質情報は、製造元からの情報及び*：独立行政法人製品評価技術基盤機構化学物質総合情報システム (CHRIP) の情報による。なお、水及び DMSO の溶解度及び溶媒中での安定性については、株式会社ボゾリサーチセンターで実施した溶解性試験の結果である。

2. 試験に用いた菌株

菌株名	入手先	入手年月日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA98	国立医薬品食品衛生研究所	1997年10月9日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA100	国立医薬品食品衛生研究所	1997年10月9日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535	国立医薬品食品衛生研究所	1997年10月9日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1537	国立医薬品食品衛生研究所	1997年10月9日
<i>Escherichia coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	独立行政法人 製品評価技術基盤機構	2011年10月20日

3. S9 Mix

(1) S9の入手方法等

自製・購入の別	1.自製 ② 購入 (製造元: キッコーマンバイオケミファ株式会社)
製造年月日	2013年9月26日製造
購入の場合 Lot No.	RAA20130926
保存温度	-88.1~-78.8°C (保存期間: 2013年10月23日~2014年1月25日)

(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& 5,6-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 (mg/kg 体重)	PB4日間連続投与: 30+60+60+60(mg/kg 体重) PB投与3日目 BF投与: 80(mg/kg 体重)
体重	187-230 g		

(3) S9Mixの組成

成分	S9Mix 1mL 中の量	成分	S9Mix 1mL 中の量
S9	0.1 mL	NADPH	4 μmol
MgCl ₂	8 μmol	NADH	4 μmol
KCl	33 μmol	Na-リン酸緩衝液	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(%)
	DMSO	和光純薬工業株式会社	PDM3591	JIS規格 試薬特級	99.0%以上
溶媒選択の理由	水、DMSOについて溶解性試験を実施した。その結果、水に50 mg/mLで溶解せず、DMSOに50 mg/mLで溶解し、発熱、ガスの発生等の反応性も認められなかったためDMSOを溶媒として試験を実施した。				
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	用時調製・室温				
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.
	Nutrient Broth No.2	OXOID LTD.	876774
前培養時間	9時間		
培養容器(形状・容器)	L字管・48mL		
培養液量	10 mL	接種菌量	<i>S. typhimurium</i> 株 20 μL <i>E. coli</i> 株 10 μL

(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>	TA98	TA1537
生菌数 (× 10 ⁹ /mL)	用量設定試験	5.40	6.43	8.76	6.62	4.45
	本試験	5.39	5.66	8.82	6.84	4.50
	追加確認試験	5.41	/	/	/	/
測定方法		① O.D.値より換算 2. 段階希釈法 3. その他				

6. 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 (購入元 極東製薬工業株式会社)
製造年月日	2013年10月11日製造
購入の場合の Lot No.	DZLEAB01
使用寒天の名称・製造・Lot No.	OXOID AGAR No.1・OXOID LTD.・Lot No. 1213483-02

7. 試験の方法

(1) 試験方法とその選択理由

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 その選択理由	

(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
	S9Mix (代謝活性化法による場合)	0.5 mL
	トップアガー	2.0 mL
プレインキュベーション	温度	37°C
	時間	20分間
インキュベーション	温度	37°C
	時間 (用量設定試験)	48.5時間
	時間 (本試験)	48時間
	時間 (追加確認試験)	49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 面積補正:補正值 1.21)

9. 試験の結果

- (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 用量設定試験の結果を別表 1、本試験の結果を別表 2、追加確認試験の結果を別表 3、比活性値表を別表 4 に示した。なお、図 1~10 は別表 2 より、図 11 は別表 3 より作成した。また、当該試験の参考データとして参照した背景データを Attached Data として添付した。 用量設定試験、本試験及び追加確認試験のいずれも、代謝活性化した場合の <i>S. typhimurium</i> TA100 において復帰変異コロニーの用量反応性を伴う増加が認められ、本試験及び追加確認試験においては陰性対照値の 2 倍以上の増加を示した。代謝活性化しない場合の <i>S. typhimurium</i> TA100 及びその他の菌株については、陰性対照値の 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量反応性も認められなかった。なお、最大比活性値は本試験の代謝活性化した場合の <i>S. typhimurium</i> TA100 における 1.76×10^2 (Rev/mg) であった。 一方、陽性対照群では陰性対照群と比較して 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加を示したことから、使用菌株の復帰突然変異誘発物質に対する反応は適切であったことが確認され、試験は適切に実施されたものと考えられた。 以上の試験結果より、本試験条件下において 2', 4' -ジヒドロキシアセトフェノンは、微生物に対する遺伝子突然変異誘発能を有する (陽性) と判定した。		

(3) 参考事項

本被験物質によるプレート上の沈殿及び着色は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。実体顕微鏡を用いて菌に対する生育阻害を観察した結果、代謝活性化の有無にかかわらずすべての菌株の 5000 µg/plate の用量で認められた。

代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100 については、陰性対照値の 2 倍以上となる増加に再現性が得られなかったため、追加確認試験を実施した。追加確認試験の試験用量は 500~2000 µg/plate の範囲を公差 250 で計 7 用量 (500、750、1000、1250、1500、1750、2000 µg/plate) を設定した。

被験液の調製及び試験操作は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で実施した。

(別表1)

試験結果表 (用量設定試験)

被験物質の名称： 2', 4' - ジヒドロキシアセトフェノン

No. T-1439

試験実施期間		2014年1月7日 より 2014年1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	TA98	TA1537
S9Mix (-)	陰性対照 (DMSO)	81 94 (88)	10 8 (9)	13 12 (13)	18 28 (23)	8 4 (6)
	1.22	83 95 (89)	6 5 (6)	14 19 (17)	16 24 (20)	9 6 (8)
	4.88	83 82 (83)	8 4 (6)	12 12 (12)	18 22 (20)	4 4 (4)
	19.5	87 93 (90)	10 6 (8)	13 13 (13)	13 23 (18)	4 5 (5)
	78.1	88 89 (89)	8 6 (7)	10 14 (12)	20 21 (21)	5 3 (4)
	313	90 87 (89)	14 5 (10)	13 11 (12)	22 10 (16)	3 4 (4)
	1250	64 76 (70)	8 5 (7)	11 10 (11)	23 17 (20)	7 4 (6)
	5000	14 * 21 * (18)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	8 * 8 * (8)	0 * 0 * (0)
	S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	113 110 (112)	12 13 (13)	12 17 (15)	30 23 (27)
1.22		97 85 (91)	5 7 (6)	18 17 (18)	33 22 (28)	7 4 (6)
4.88		103 108 (106)	5 11 (8)	14 13 (14)	29 25 (27)	5 7 (6)
19.5		96 96 (96)	5 7 (6)	14 15 (15)	25 28 (27)	4 6 (5)
78.1		132 141 (137)	8 7 (8)	17 19 (18)	20 27 (24)	4 6 (5)
313		228 157 (193)	8 6 (7)	25 13 (19)	28 33 (31)	9 5 (7)
1250		227 209 (218)	5 6 (6)	18 16 (17)	22 28 (25)	6 10 (8)
5000		81 * 73 * (77)	2 * 3 * (3)	5 * 3 * (4)	11 * 18 * (15)	2 * 2 * (2)
陽性対照		名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2
	用量 (μg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	コロニー数/プレート	508 574 (541)	287 322 (305)	50 57 (54)	317 324 (321)	1486 1586 (1536)
	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
	用量 (μg/プレート)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
	コロニー数/プレート	970 1002 (986)	329 319 (324)	1030 1048 (1039)	344 392 (368)	83 97 (90)

(備考)

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

SAZ : アジ化ナトリウム

ICR-191 : 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl

2AA : 2-アミノアントラセン

B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

* : 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。

()内は、2枚のプレートの平均値を示す。

(別表2)

試験結果表 (本試験)

被験物質の名称： 2', 4' -ジヒドロキシアセトフェノン

No. T-1439

試験実施期間		2014年1月14日 より 2014年1月17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	TA98	TA1537
S9Mix (-)	陰性対照 (DMSO)	117 105 (111)	5 7 (6)	22 10 (16)	18 13 (16)	12 8 (10)
	156	82 97 (90)	5 11 (8)	16 14 (15)	15 21 (18)	7 5 (6)
	313	83 88 (86)	8 10 (9)	17 19 (18)	12 18 (15)	11 16 (14)
	625	101 84 (93)	7 6 (7)	18 16 (17)	16 13 (15)	14 12 (13)
	1250	93 79 (86)	7 4 (6)	14 15 (15)	22 18 (20)	8 4 (6)
	2500	84 88 (86)	6 3 (5)	7 7 (7)	13 13 (13)	13 7 (10)
	5000	42 * 54 * (48)	4 * 4 * (4)	2 * 4 * (3)	6 * 8 * (7)	9 * 6 * (8)
	S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	111 98 (105)	8 10 (9)	24 17 (21)	19 28 (24)
156		144 156 (150)	10 8 (9)	26 14 (20)	30 21 (26)	8 11 (10)
313		194 182 (188)	18 7 (13)	25 24 (25)	21 25 (23)	11 11 (11)
625		209 221 (215)	11 15 (13)	21 16 (19)	25 34 (30)	12 13 (13)
1250		207 256 (232)	7 6 (7)	20 25 (23)	30 36 (33)	7 13 (10)
2500		226 188 (207)	7 9 (8)	21 16 (19)	15 14 (15)	9 10 (10)
5000		143 * 123 * (133)	5 * 4 * (5)	3 * 10 * (7)	16 * 18 * (17)	10 * 6 * (8)
陽性対照		名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2
	用量 (μg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	コロニー数/プレート	555 589 (572)	271 254 (263)	52 57 (55)	459 517 (488)	1123 944 (1034)
	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
	用量 (μg/プレート)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
	コロニー数/プレート	932 861 (897)	489 404 (447)	848 811 (830)	358 296 (327)	92 103 (98)

(備考)

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

SAZ : アジ化ナトリウム

ICR-191 : 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HC1

2AA : 2-アミノアントラセン

B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

* : 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。

()内は、2枚のプレートの平均値を示す。

(別表3)

試験結果表 (追加確認試験)

被験物質の名称： 2',4'-ジヒドロキシアセトフェノン No.T-1439

試験実施期間		2014年1月24日 より 2014年1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	
		TA100	
S9Mix (-)	陰性対照 (DMSO)	101	
		102	(102)
S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	109	
		100	(105)
	500	147	
		170	(159)
	750	183	
		141	(162)
	1000	183	
		174	(179)
	1250	195	
		189	(192)
1500	203		
	217	(210)	
1750	181		
	188	(185)	
2000	209		
	186	(198)	
陽性対照	S9Mixを必要としないもの	名 称	AF-2
		用量 (µg/プレート)	0.01
		コロニー数/プレート	551 545 (548)
陽性対照	S9Mixを必要とするもの	名 称	B[a]P
		用量 (µg/プレート)	5.0
		コロニー数/プレート	1148 1047 (1098)

(備考)

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

B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

()内は、2枚のプレートの平均値を示す。

(別表 4)

比 活 性

被験物質名：2', 4'-ジヒドロキシアセトフェノン

No.T-1439

	菌株名	-S9Mix		+S9Mix	
		比活性	計算に使用した用量 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	比活性	計算に使用した用量 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)
用量 設定 試験	TA100				
	TA1535				
	WP2 <i>uvrA</i>				
	TA98				
	TA1537				
本 試 験	TA100			1.76×10^2	625
	TA1535				
	WP2 <i>uvrA</i>				
	TA98				
	TA1537				
認 追 試 加 試 確 験	TA100			7.00×10^1	1500

図 1

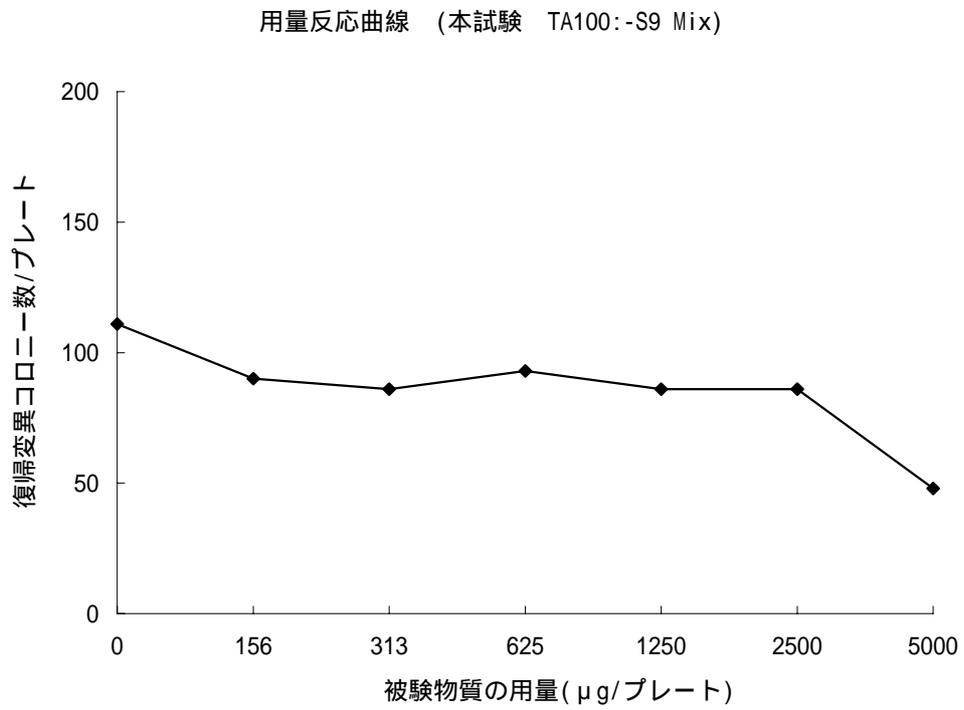


図 2

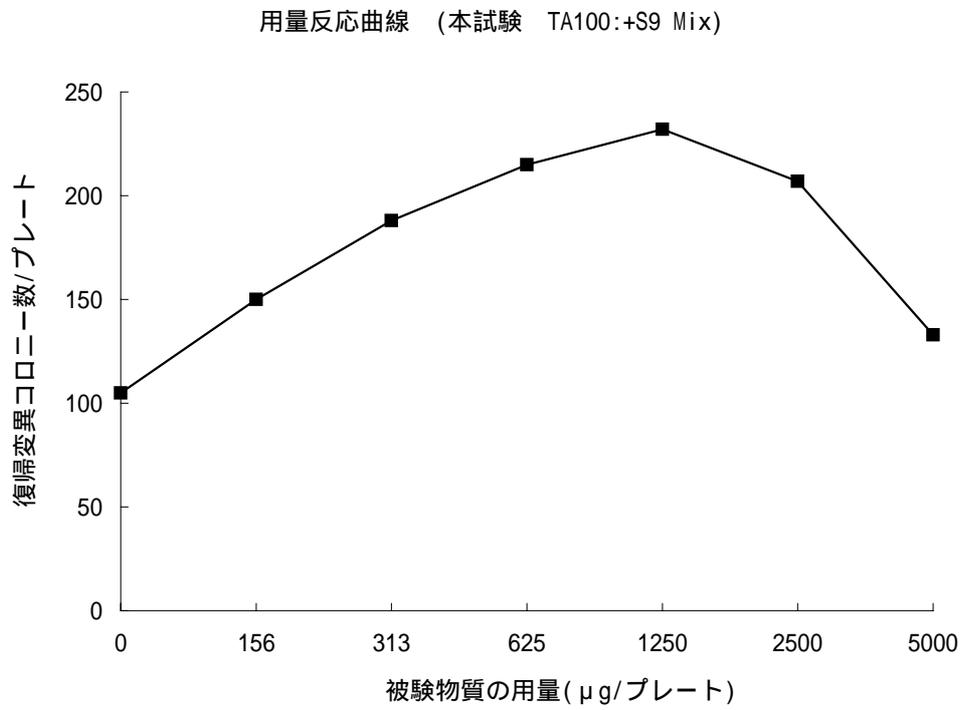


図 3

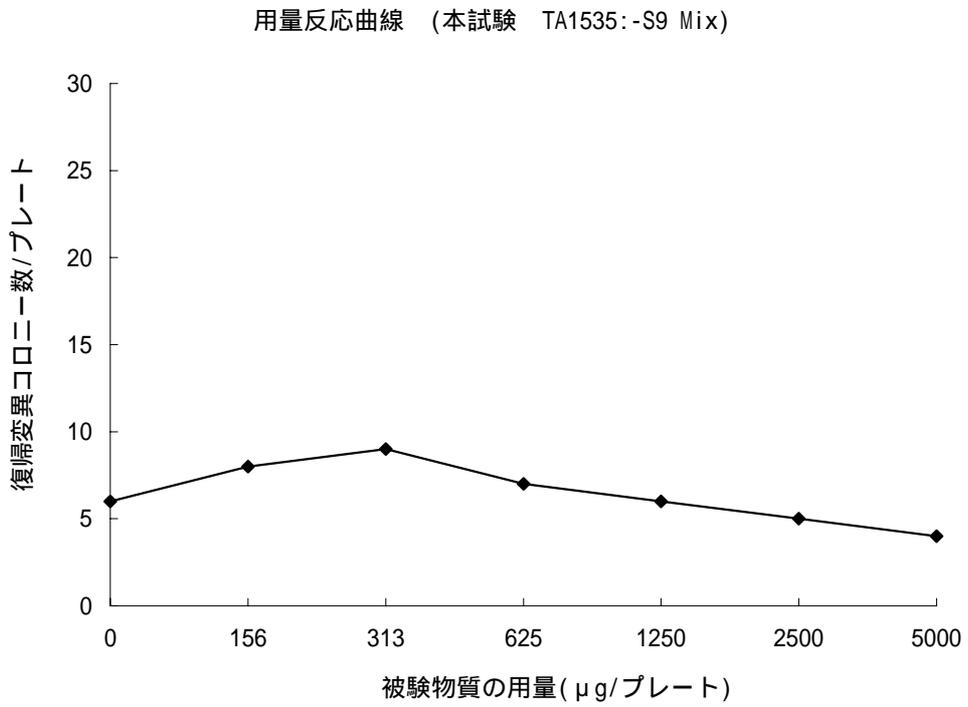


図 4

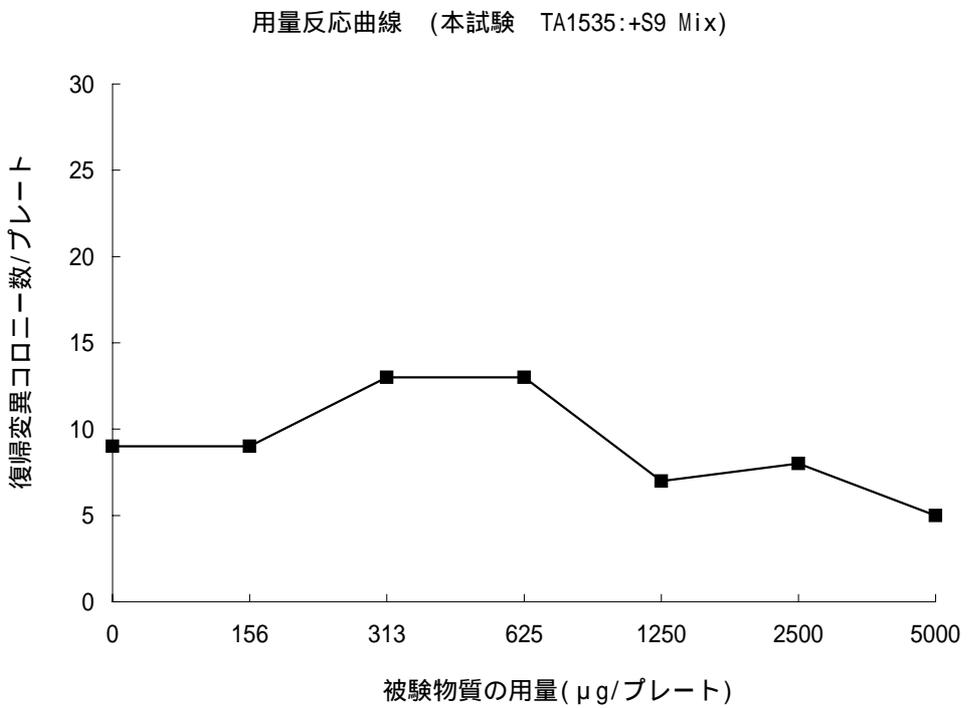


図 5

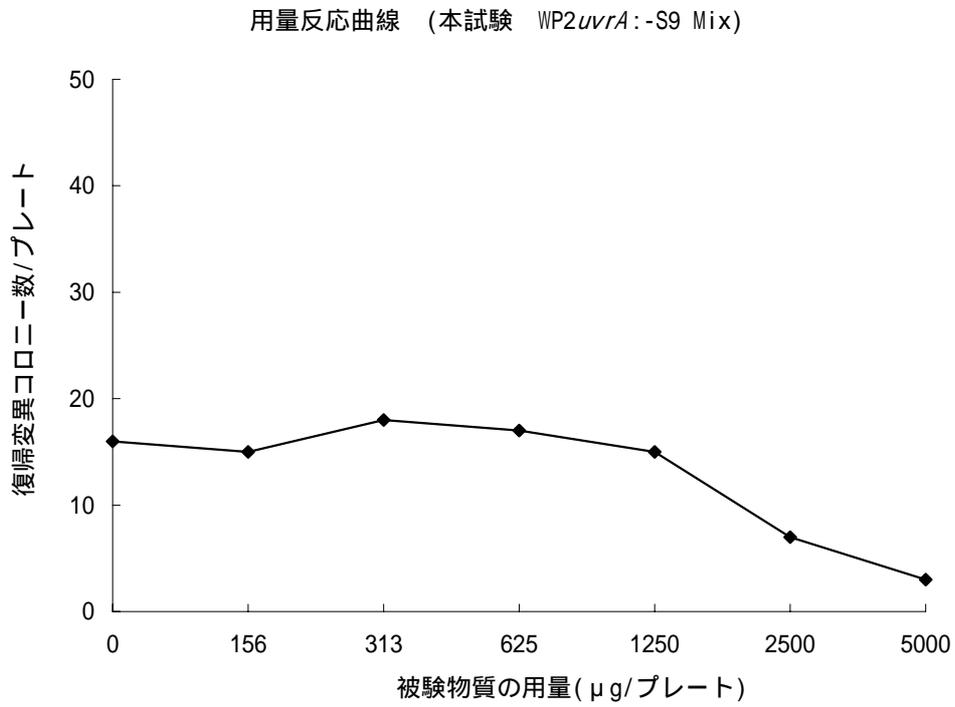


図 6

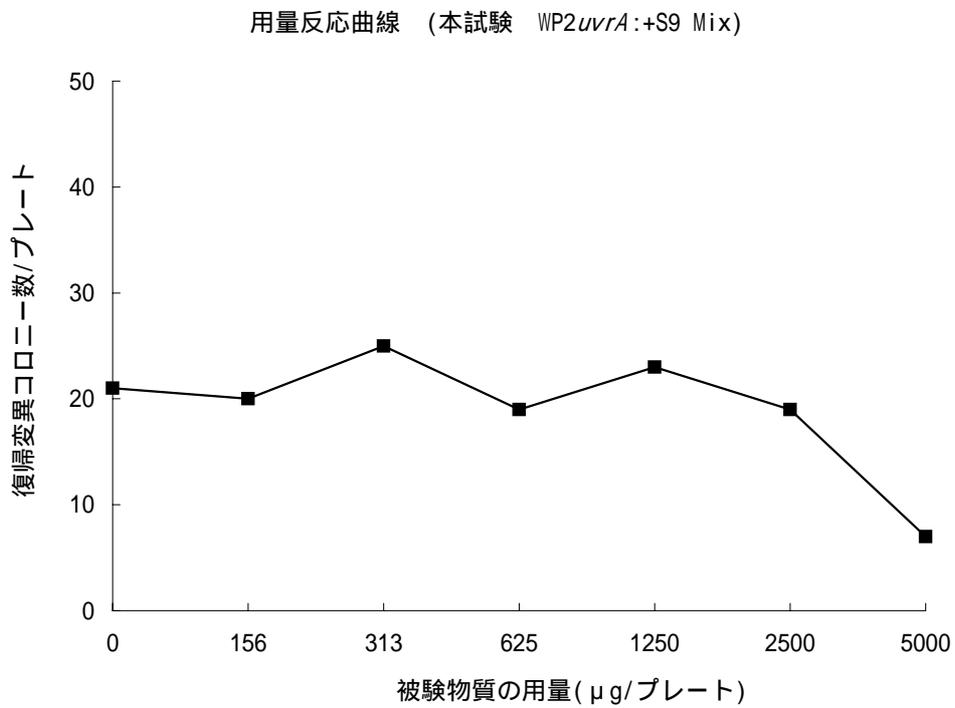


図 7

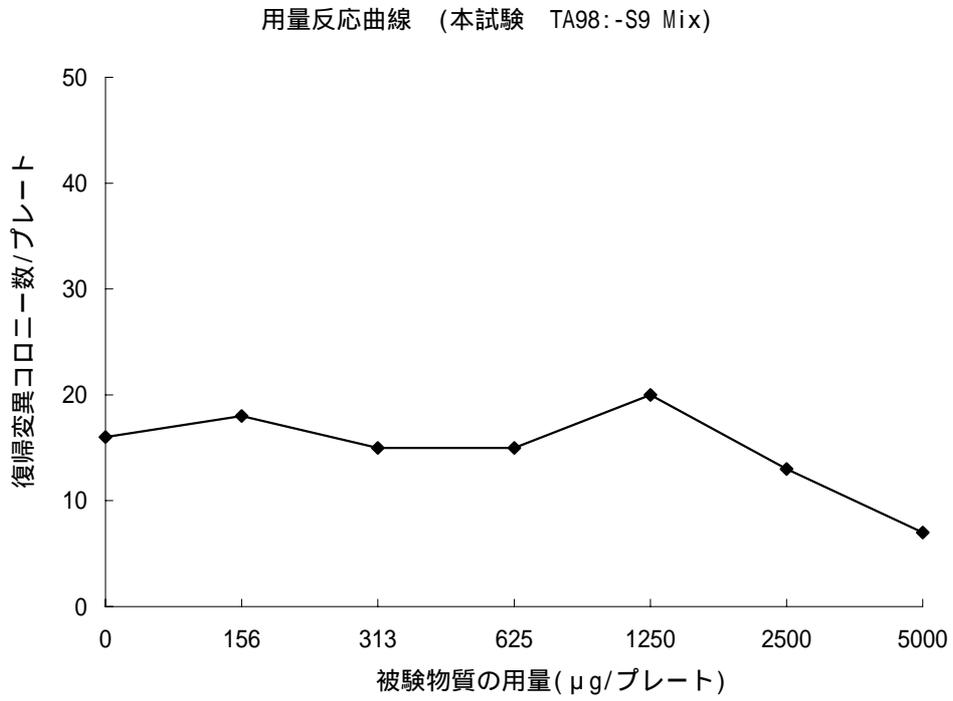


図 8

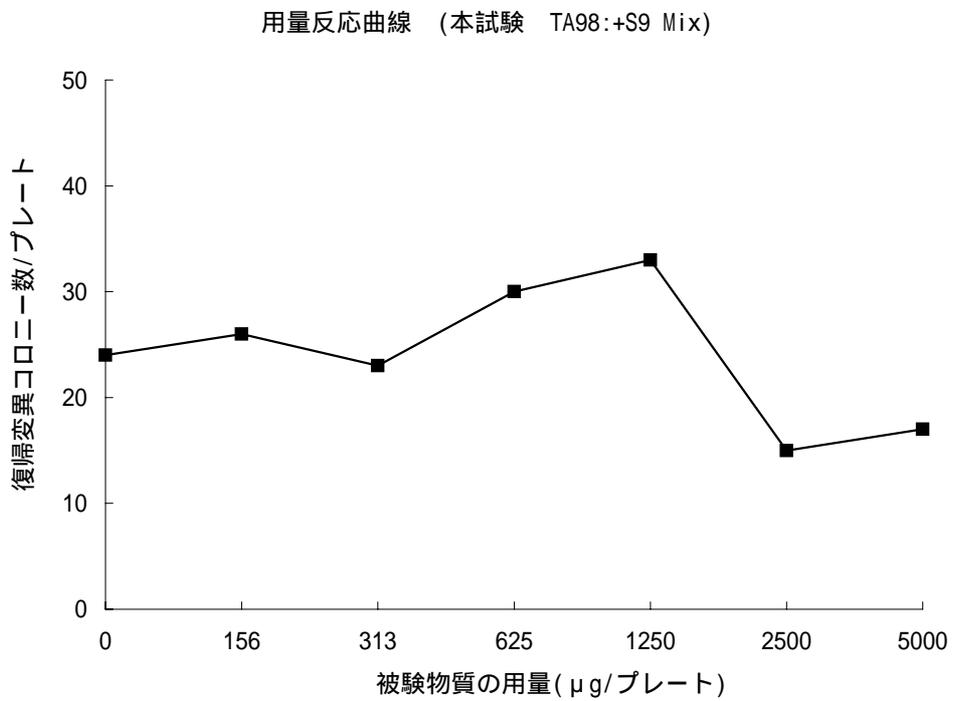


図 9

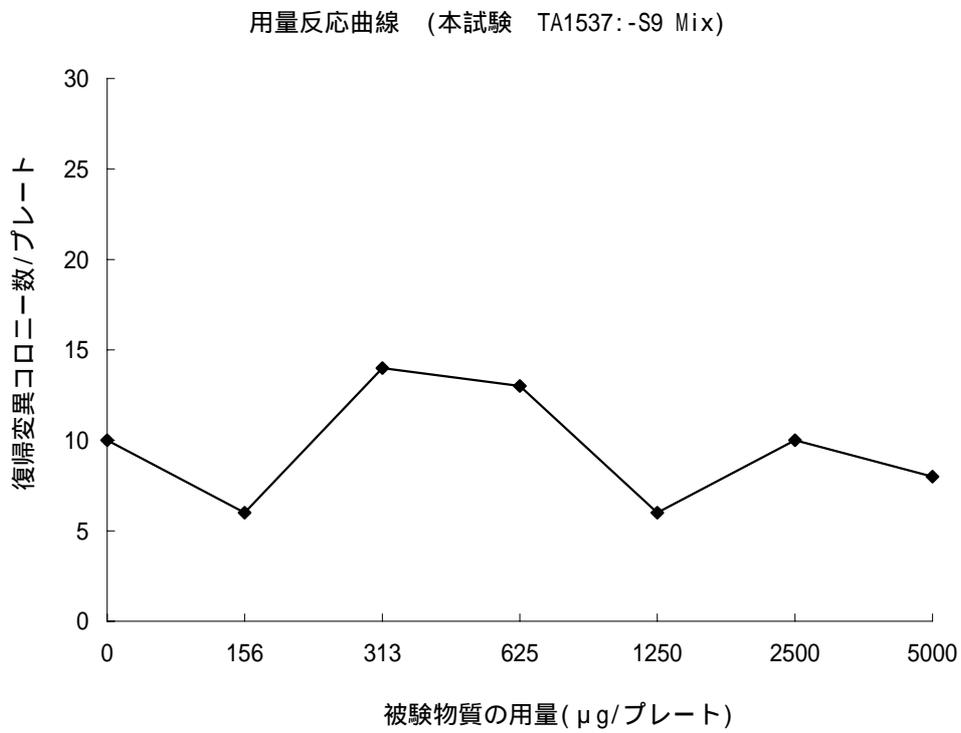


図 10

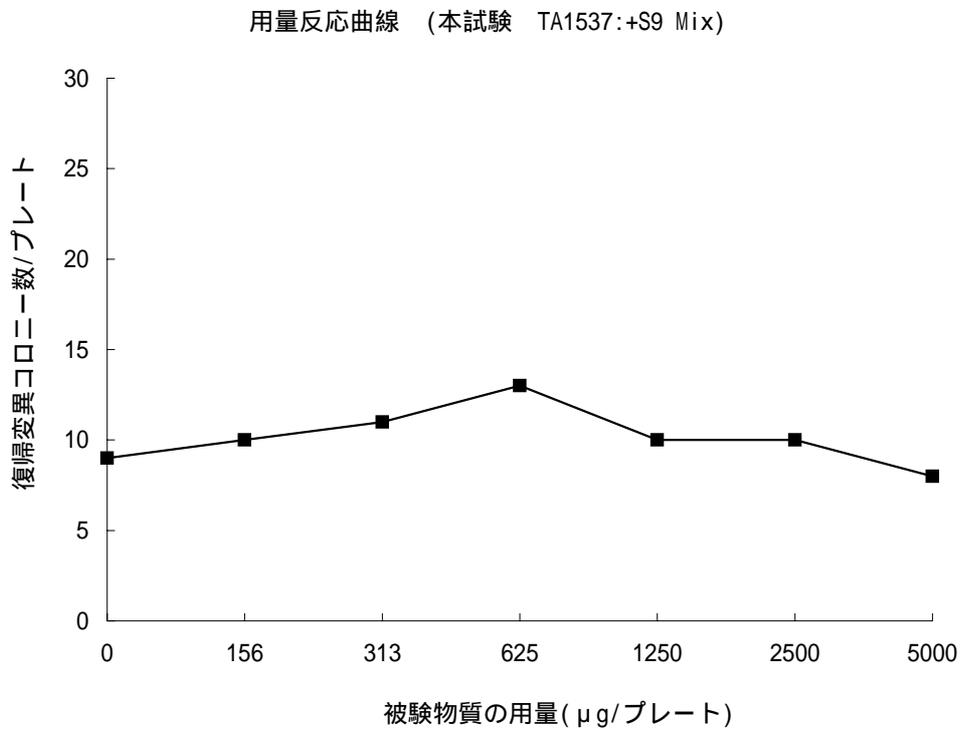


図 11

用量反応曲線 (追加確認試験 TA100:+S9 Mix)

