

微生物を用いる変異原性試験結果報告書

1 一般的事項

化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	(2-クロロエチル) アンモニウム=クロリド		
別 名	—		
構造式又は示性式			
試験に供した 化学物質の純度	99.4%	試験に供した 化学物質の Lot No.	WPR7E-AS
不純物の名称及び 含有率(濃度)	—		
C A S 番 号	870-24-6	蒸 気 圧	—
分 子 量	115.99	分 配 係 数 (1-オクタノール/水分配係数)	—
融 点	147°C		
沸 点	—	常温における性状	白色結晶または粉末
安 定 性	水：— 光：— 熱：—		
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]*	—
	DMSO	—	—

*日本バイオアッセイ研究センターの試験による。

2 試験に用いた菌株

菌 株 名	入 手 先	入 手 年 月 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
TA1535	同 上	1988年 5月 16日
TA98	同 上	1988年 5月 16日
TA1537	同 上	1988年 5月 16日
WP2 <i>uvrA</i> / pKM101	同 上	1983年 6月 29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	2014年 3月 20日 製造
購入の場合のLot No.	RAA-20140320
保存温度	-80℃ (保存機器名 三洋電機株式会社 MDF-392AT)

(2) S9の調製方法

使用動物		誘導物質	
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	179~229 g	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

(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 (-)	-

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(高圧蒸気滅菌したもの)	和光純薬工業株式会社	KWP9781	高速液体クロマトグラフ用	99以上
溶媒選択の理由	被験物質の溶解度は、蒸留水に 100 mg/ml [被験物質溶液量をプレート当り 50 μ l にした場合に 5000 μ g の被験物質に相当する] 以上であり、被験物質に蒸留水を加えた際に、発色、発泡、発熱等の変化は見られなかったことから溶媒に蒸留水を選択した。				
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	1時間 20分、	25 $^{\circ}$ C		
	本試験	1時間 30分、	25 $^{\circ}$ C		
純度換算の有無	有			無	

5 前培養の条件等

(1) 条件

ニュートリエントプロス	名称	製造元	Lot No.
	Oxoid ニュートリエントプロス No.2	OXOID LTD.	941971
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

(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	2.17	3.35	4.08	2.61	2.50
	本試験	2.14	3.27	3.95	2.63	2.35
測定方法 (いずれかを○で囲むこと)		1. O.D. 値よりの換算 2. 段階希釈法 3. 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	2014年4月15日 製造
購入の場合の Lot No.	ANI200DD
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. : 31122

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 (プレート当たり)

プレインキュベーション法		
組 成	菌懸濁液	0.1 ml
	被験物質溶液	0.05 ml
	Na-リソ酸緩衝液(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
プレインキュベーション	温 度	37 ℃
	時 間	20 分
インキュベーション	温 度	37 ℃
	時 間	48 時間

8 コロニー計測の方法

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

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
<p>[判定の理由]</p> <p>用量設定試験の結果を表-1に、本試験の結果を表-2-1、表-2-2及び図-1～10に示した。変異原性の強さを比活性としてまとめ、表-3に示した。</p> <p>用量設定試験を最高用量5000 μg/プレートより公比4の7用量で実施したところ、TA100、TA1535及び WP2 <i>uvrA</i>/pKM101の直接法による場合及び代謝活性化法による場合に、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増加が認められた。生育阻害はすべての菌株の直接法による場合にみられた。</p> <p>最高用量を生育阻害を示す用量、あるいは5000 μg/プレートとし、公比2または4で本試験を実施したところ、TA100、TA1535及び WP2 <i>uvrA</i>/pKM101の直接法による場合及び代謝活性化法による場合に、用量設定試験と同様、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増加が認められた。</p> <p>陽性対照物質は、それぞれの試験菌株において陰性対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数を誘発した。また、陰性対照値及び陽性対照値は、当センターのヒストリカルデータより作成した基準の範囲内であった。これらの結果は試験が適切に実施されたことを示している。</p> <p>以上の結果より、(2-クロロエチル)アンモニウム=クロリドの微生物に対する変異原性は、陽性と判定した。</p>		

(3) 参考事項

特記事項なし。

10 その他

試験実施施設	名 称	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	
	所 在 地	〒257-0015 神奈川県秦野市平沢 2445	電話 0463 (82) 3911 FAX 0463 (82) 3860
試験責任者	職 氏 名	[REDACTED]	
	経 験 年 数	[REDACTED]	
試験番号	6362		
試験期間	2014年6月3日 ~ 2014年9月10日		

表-1

試験結果表（用量設定試験）

被験物質の名称：（2-クロロエチル）アンモニウム＝クロリド

試験実施期間		2014年 6月 9日から 2014年 6月 12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)	135 123 112 119 (122)	7 8 8 6 (7)	130 113 121 111 (119)	22 20 18 25 (21)	11 15 8 11 (11)					
	1.22	88 129 (109)	13 (13)	102 149 (126)	21 27 (24)	15 18 (17)					
	4.88	121 128 (125)	26 (27)	112 108 (110)	19 20 (20)	24 18 (21)					
	19.5	136 172 (154)	95 (72)	139 128 (134)	26 29 (28)	15 17 (16)					
	78.1	260 257 (259)	212 (215)	127 137 (132)	21 24 (23)	17 17 (17)					
	313	618 729 (674)	779 (772)	158 144 (151)	18 17 (18)	18 18 (18)					
	1250	0* 0* (0*)	2095* 2059* (2077*)	252 286 (274)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)					
	5000	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	622* 788* (705*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)					
	S9 mix (+)	陰性対照 (溶媒対照)	123 121 128 118 (123)	12 10 11 9 (11)	139 151 147 131 (142)	35 18 27 25 (26)	9 16 22 21 (17)				
		1.22	127 126 (127)	15 (16)	137 144 (141)	18 20 (19)	19 20 (20)				
4.88		167 153 (160)	37 (37)	130 154 (142)	27 21 (24)	21 12 (17)					
19.5		161 157 (159)	89 (101)	139 138 (139)	33 24 (29)	10 19 (15)					
78.1		320 341 (331)	295 (332)	150 166 (158)	21 29 (25)	15 15 (15)					
313		790 825 (808)	1057 (1058)	194 190 (192)	27 29 (28)	21 20 (21)					
1250		2060 2083 (2072)	2128 (2140)	321 353 (337)	28 30 (29)	25 10 (18)					
5000		3276 3423 (3350)	3481 (3511)	845 999 (922)	29 25 (27)	24 22 (23)					
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)	0.01	0.5	0.005	0.1	80				
	コロニー数/プレート	726 670 (698)	405 419 (412)	1338 1212 (1275)	568 530 (549)	937 739 (838)					
	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	1447 1483 (1465)	327 335 (331)	1085 908 (997)	490 455 (473)	286 256 (271)						

【備考】

1. 菌の生育阻害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. 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-2-1

試験結果表（本試験）

被験物質の名称：（2-クロロエチル）アンモニウム=クロリド

試験実施期間		2014年 6月16日から 2014年 6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)	90 108 96 118 (103)	11 13 11 15 (13)	124 123 122 122 (123)	15 20 16 16 (17)	25 21 20 22 (22)
	0.305	/	19 17 (18)	/	/	18 12 (15)
	0.610	/	/	/	/	/
	1.22	/	25 21 (23)	/	/	20 15 (18)
	2.44	/	/	/	/	/
	4.88	/	98 90 (94)	/	/	24 13 (19)
	9.77	/	/	/	/	/
	19.5	143 157 (150)	288 303 (296)	/	/	17 19 (18)
	39.1	201 215 (208)	/	/	12 9 (11)	/
	78.1	298 259 (279)	363 375 (369)	146 136 (141)	13 9 (11)	10 17 (14)
	156	398 422 (410)	/	157 175 (166)	13 10 (12)	/
	313	646 713 (680)	951 930 (941)	198 180 (189)	19 13 (16)	18 19 (19)
	625	1211 1240 (1226)	/	214 228 (221)	16* 13* (15*)	/
	1250	0* 0* (0*)	2151* 2215* (2183*)	263 272 (268)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)
	2500	/	/	404 422 (413)	/	/
	5000	/	/	697* 748* (723*)	/	/
陽性対照	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA
	用量(μg/プレート)	0.01	0.5	0.005	0.1	80
対しないもの	コロニー数/プレート	669 667 (683)	347 381 (364)	1386 1242 (1314)	483 501 (492)	945 786 (866)

【備考】

1. 菌の生育阻害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. 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

表-2-2

試験結果表（本試験）

被験物質の名称：（2-クロロエチル）アンモニウム=クロリド

試験実施期間		2014年 6月16日から 2014年 6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)	124 103	12 9	168 165	34 25	18 26	105 137 (117)	10 6 (9)	162 150 (161)	21 29 (27)	20 19 (21)
	1.22	105 137 (121)	15 18 (17)	/	/	/	/	/	/	/	
	2.44	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
	4.88	150 158 (154)	22 26 (24)	/	/	/	/	/	/	/	
	9.77	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
	19.5	153 160 (157)	107 133 (120)	/	/	/	/	/	/	/	
	39.1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
	78.1	276 297 (287)	365 366 (366)	172 162 (167)	/	/	/	/	/	/	
	156	/	/	204 180 (192)	/	/	/	/	/	/	
	313	681 747 (714)	1091 1072 (1082)	214 214 (214)	24 18 (21)	18 20 (19)	/	/	/	/	
	625	/	/	273 266 (270)	16 13 (15)	22 19 (21)	/	/	/	/	
	1250	1908 1934 (1921)	2402 2340 (2371)	334 369 (352)	18 19 (19)	24 16 (20)	/	/	/	/	
	2500	/	/	505 506 (506)	24 26 (25)	19 25 (22)	/	/	/	/	
	5000	3254 3304 (3279)	3721 3644 (3683)	797 806 (802)	21 27 (24)	26 21 (24)	/	/	/	/	
	陽性対照	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	
対する	コロニー数/プレート	1097 1161 (1129)		263 260 (262)		1010 1122 (1066)		521 515 (518)		232 237 (235)	

【備考】

1. 菌の生育阻害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. 陽性対照物質の名称 2-AA: 2-アミノアントラセン

表-3

試験結果表（比活性）

被験物質の名称：（2-クロロエチル）アンモニウム=クロリド

	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
		Rev./mg	μg /プレート	Rev./mg	μg /プレート
用量 設定 試験	TA100	1.76×10^3	313	2.66×10^3	78.1
	TA1535	4.10×10^3	4.88	5.33×10^3	4.88
	WP2 <i>uvrA</i> / pKM101	1.24×10^2	1250	1.56×10^2	5000、1250
	TA98	—	—	—	—
	TA1537	—	—	—	—
本 試 験	TA100	2.69×10^3	39.1	2.18×10^3	78.1
	TA1535	1.66×10^4	4.88	5.69×10^3	19.5
	WP2 <i>uvrA</i> / pKM101	1.20×10^2	5000	1.53×10^2	1250
	TA98	—	—	—	—
	TA1537	—	—	—	—

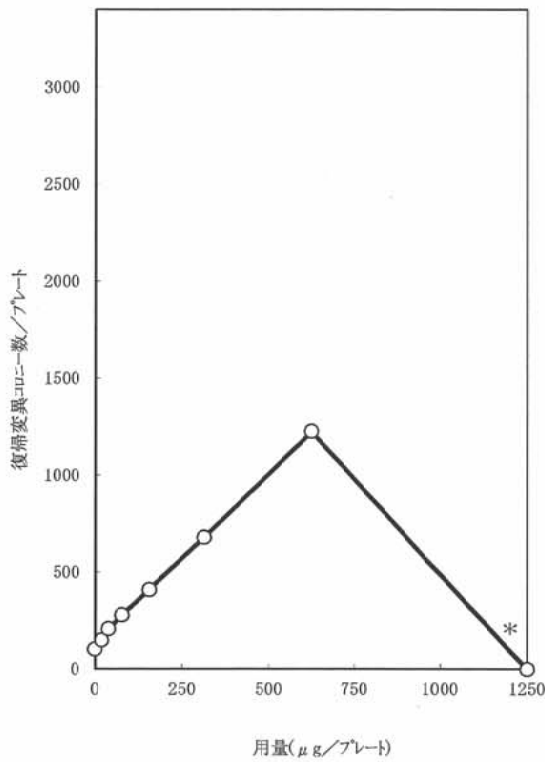


図-1 TA100における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験)

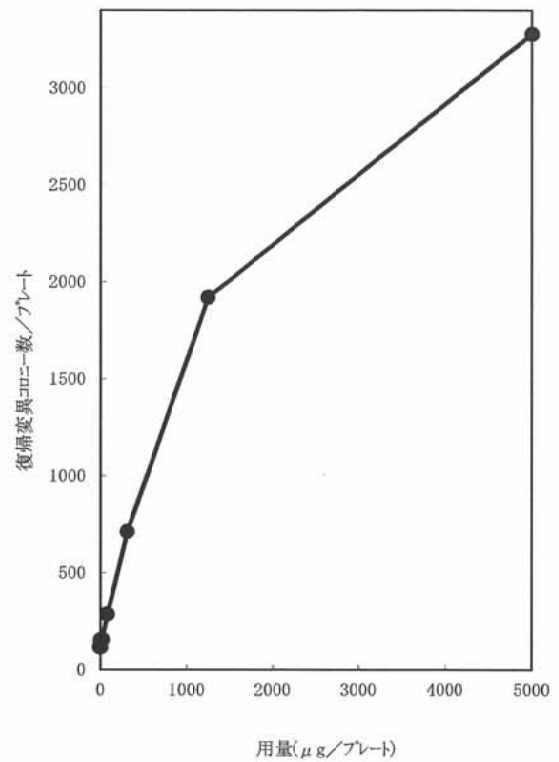


図-2 TA100における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)

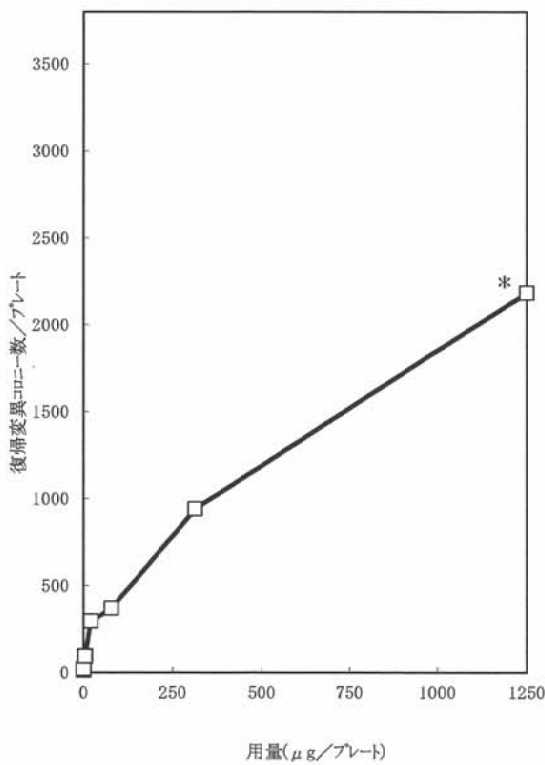


図-3 TA1535における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験)

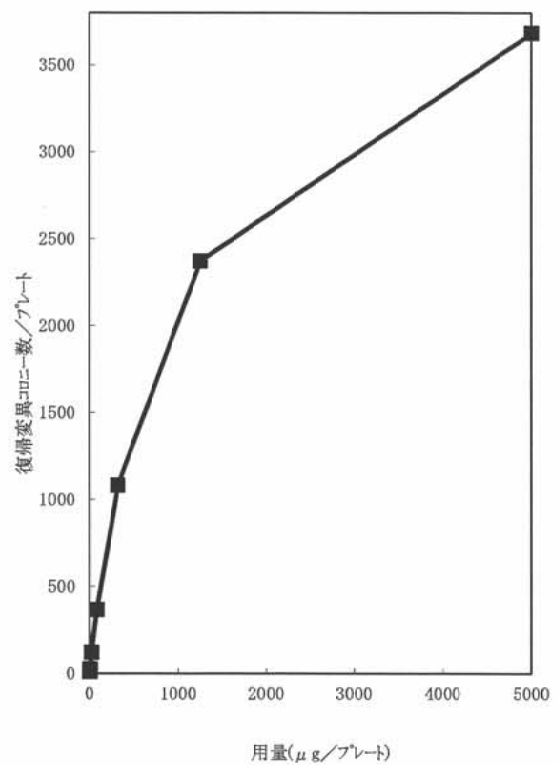


図-4 TA1535における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)

注：生育阻害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。

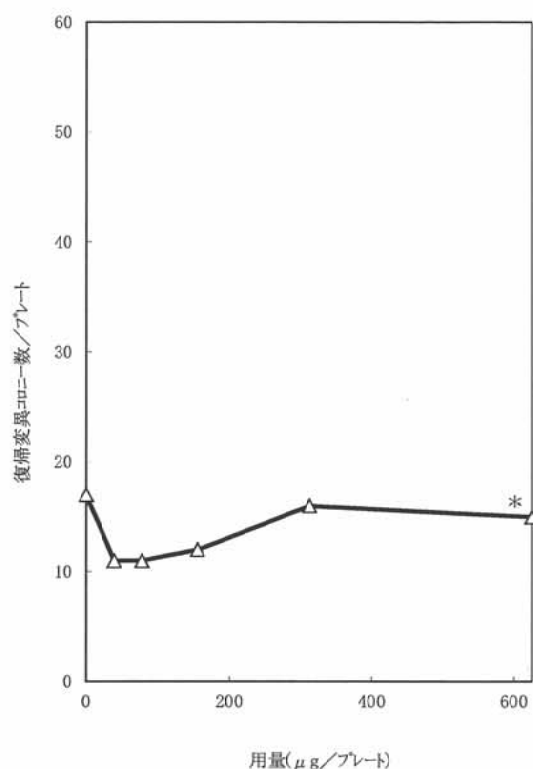


図-5 TA98における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験)
(625 μg/プレートまでをプロットした。)

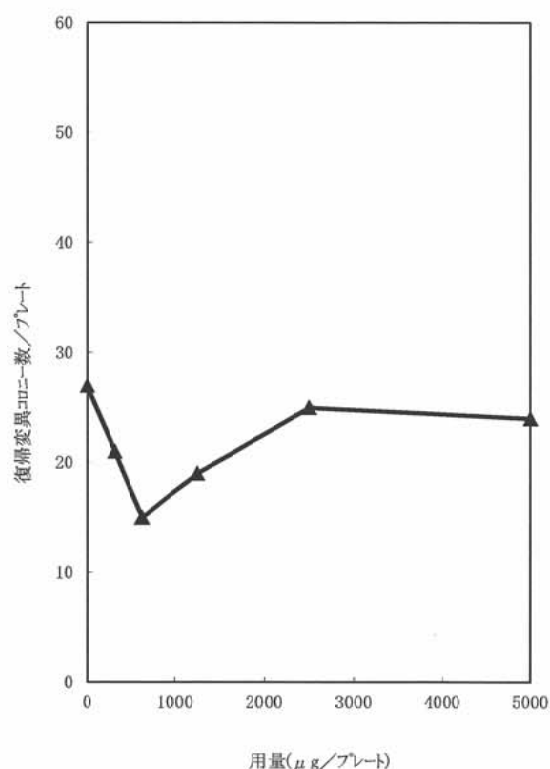


図-6 TA98における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)

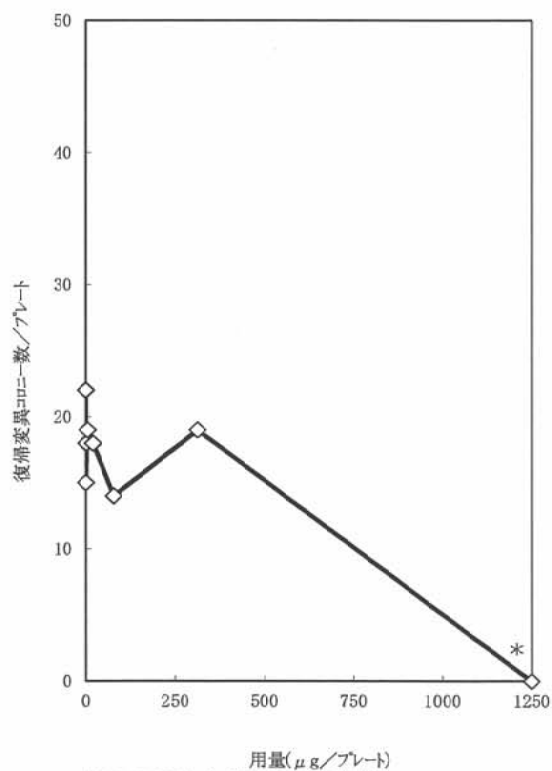


図-7 TA1537における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験)

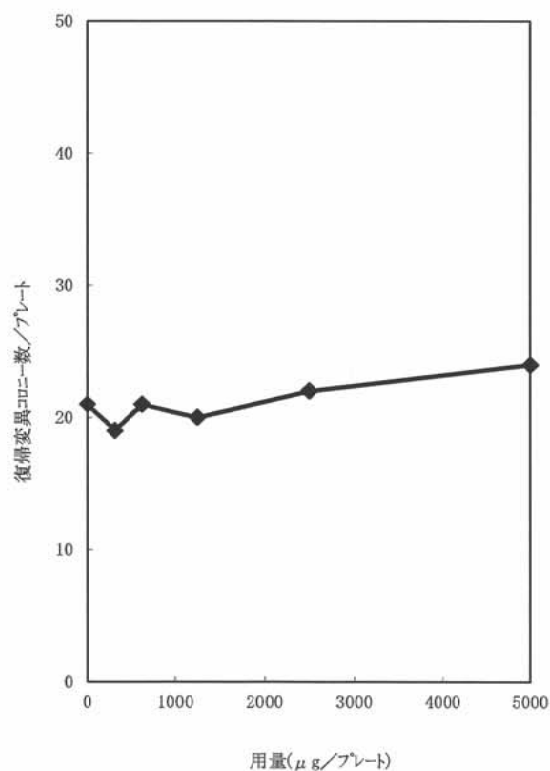


図-8 TA1537における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)

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。

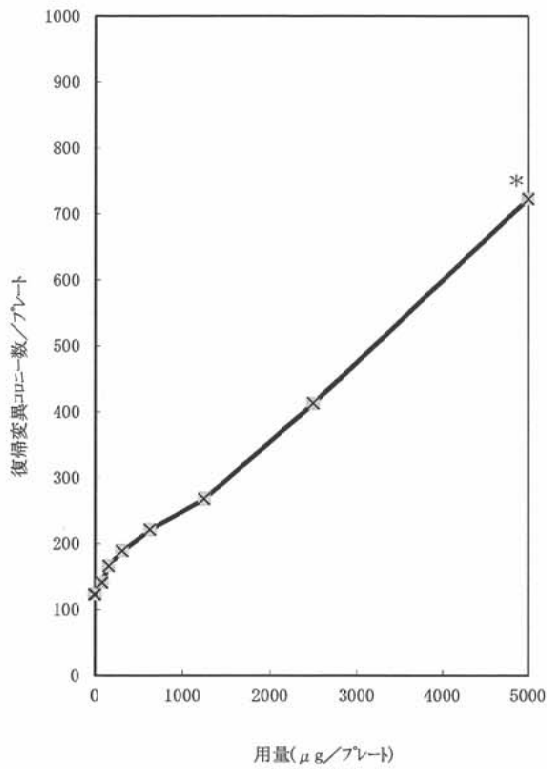


図-9 WP2uvrA/pKM101における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験)

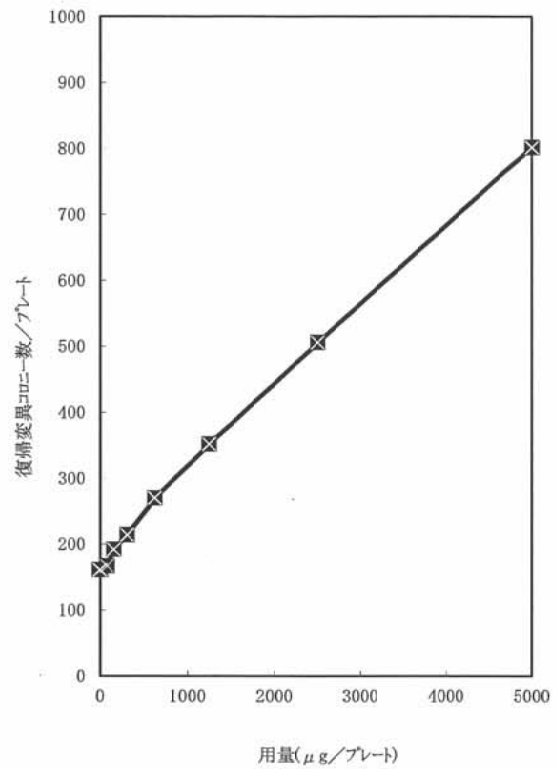


図-10 WP2uvrA/pKM101における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)

注：生育阻害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。