

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)	3, 4-エポキシシクロヘキシルメチル (3, 4-エポキシ) シクロヘキサンカルボキシレート		
別名	7-オキサビシクロ (4.1.0) ヘプタン-3-カルボン酸, 7-オキサビシクロ (4.1.0) ヘプト-3-イルメチルエステル, 7-オキサビシクロ (4.1.0) ヘプト-3-イルメチル 7-オキサビシクロ (4.1.0) ヘプタン-3-カルボン酸		
構造式又は示性式			
試験に供した 化学物質の純度	95.9%	試験に供した 化学物質の Lot No.	AWK0701
不純物の名称及び 含有率 (濃度)	—		
C A S 番号	2386-87-0	蒸気圧	—
分子量	252.31	分配係数 (1-オクタノール/水分配係数)	—
融点	-20°C		
沸点	204°C (133.3Pa)	常温における性状	僅微黄色の液体
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	難溶	—
	DMSO	溶解 [100mg/ml 以上]*	—

*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
WP2uvrA/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 (%)
	ジメチルスルホキシド (DMSO)	SIGMA-ALDRICH Co.	SHBB3671V	anhydrous	≥99.9
溶媒選択の理由	被験物質の溶解度は、水に難溶であるが、DMSOに100 mg/ml[被験物質溶液量をプレート当り50 μlにした場合に5000 μgの被験物質質量に相当する]以上であり、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ことから溶媒にDMSO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℃		
	本試験	1時間 10分、	25℃		
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 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	WP2uvrA/ pKM101	TA98	TA1537
生 菌 数 (×10 ⁹ /ml)	用 量 設 定 試 験	2.33	3.48	4.20	2.68	2.47
	本 試 験	2.35	3.44	4.33	2.70	2.58
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
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及び TA1535の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 TA98、TA100、TA1535、TA1537の直接法による場合と代謝活性化法による場合及び WP2 <i>uvrA</i>/pKM101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/プレートとし本試験を実施したところ、用量設定試験と同様、TA100及び TA1535の代謝活性化法による場合に陰性対照値の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、3, 4-エポキシシクロヘキシルメチル(3, 4-エポキシ)シクロヘキサンカルボキシレート(3, 4-エポキシ)シクロヘキサンカルボキシレート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	6365		
試験期間	2014年6月17日 ～ 2014年9月26日		

表-1

試験結果表（用量設定試験）

被験物質の名称：3, 4-エポキシシクロヘキシルメチル（3, 4-エポキシ）シクロヘキサンカルボキシレート

試験実施期間		2014年 6月 24日から 2014年 6月 27日						
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	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)	126 115 105 126 (118)	7 18 10 16 (13)	120 124 122 108 (119)	16 20 15 18 (17)	20 24 17 18 (20)		
	1.22	110 96 (103)	12 10 (11)	131 135 (133)	16 19 (18)	22 22 (22)		
	4.88	116 96 (106)	10 11 (11)	110 129 (120)	24 19 (22)	16 13 (15)		
	19.5	135 110 (123)	11 20 (16)	131 135 (133)	22 20 (21)	22 18 (20)		
	78.1	112 113 (113)	12 15 (14)	142 144 (143)	19 17 (18)	13 25 (19)		
	313	128 134 (131)	10 15 (13)	112 137 (125)	22* 17* (20*)	19 26 (23)		
	1250	203 176 (190)	24 19 (22)	134 126 (130)	25* 16* (21*)	18 24 (21)		
	5000	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	
	S9 mix (+)	陰性対照 (溶媒対照)	129 133 115 128 (126)	11 12 10 11 (11)	144 160 143 147 (149)	18 16 19 29 (21)	25 21 19 17 (21)	
1.22		122 131 (127)	10 12 (11)	158 176 (167)	26 35 (31)	17 20 (19)		
4.88		141 124 (133)	19 4 (12)	156 169 (163)	26 24 (25)	26 20 (23)		
19.5		122 107 (115)	7 11 (9)	161 151 (156)	34 27 (31)	24 21 (23)		
78.1		156 151 (154)	10 13 (12)	152 147 (150)	33 27 (30)	24 20 (22)		
313		147 159 (153)	43 40 (42)	162 153 (158)	39 30 (35)	29 19 (24)		
1250		268 285 (277)	143 151 (147)	176 195 (186)	33 30 (32)	22 27 (25)		
5000		638* 582* (610*)	465* 508* (487*)	179 175 (177)	25* 25* (25*)	18* 12* (15*)		
陽性対照		S9 mixを必要とするもの	名称 AF-2 用量($\mu\text{g}/\text{プレート}$) 0.01	名称 NaN ₃ 0.5	名称 AF-2 0.005	名称 AF-2 0.1	名称 9-AA 80	
		コロニー数/プレート 635 612 (624)	462 478 (470)	1269 1133 (1201)	542 551 (547)	781 665 (723)		
		名称 2-AA 用量($\mu\text{g}/\text{プレート}$) 1	名称 2-AA 2	名称 2-AA 2	名称 2-AA 0.5	名称 2-AA 2		
		コロニー数/プレート 1430 1400 (1415)	339 313 (326)	998 1111 (1055)	479 435 (457)	238 239 (239)		

【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. 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：3, 4-エポキシシクロヘキシルメチル（3, 4-エポキシ）シクロヘキサカルボキシレート

試験実施期間		2014年 6月 30日から 2014年 7月 3日									
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	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		WP2JvrA/pKM101	TA98		TA1537		
S9 mix (-)	陰性対照 (溶媒対照)	114 101 91 100 (102)	8 9 10 10 (9)	116 128 120 102 (117)	16 22 13 29 (20)	14 11 14 15 (14)					
	4.88	/	/	/	16 14 (15)	/					
	9.77	/	/	/	15 11 (13)	/					
	19.5	/	/	/	15 13 (14)	/					
	39.1	/	/	/	21 14 (18)	/					
	78.1	91 106 (99)	13 10 (12)	115 121 (118)	15 18 (17)	9 10 (10)					
	156	123 106 (115)	13 10 (12)	122 122 (122)	15 18 (17)	9 14 (12)					
	313	119 113 (116)	10 7 (9)	102 122 (112)	14* 17* (16*)	6 14 (10)					
	625	128 133 (131)	8 15 (12)	112 120 (116)	/	18 7 (13)					
	1250	149 173 (161)	15 15 (15)	113 117 (115)	/	13 13 (13)					
	2500	178 208 (193)	15 14 (15)	127 127 (127)	/	15 7 (11)					
	5000	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	/	0* 0* (0*)					
	S9 mix (+)	陰性対照 (溶媒対照)	111 109 123 102 (111)	8 8 8 5 (7)	141 137 130 131 (135)	21 26 26 31 (26)	11 15 14 14 (14)				
		39.1	/	9 11 (10)	/	/	/				
78.1		114 109 (112)	18 13 (16)	/	29 9 (19)	10 10 (10)					
156		114 114 (114)	22 34 (28)	/	28 28 (28)	14 16 (15)					
313		139 135 (137)	44 44 (44)	136 150 (143)	22 21 (22)	11 14 (13)					
625		173 181 (177)	81 72 (77)	144 156 (150)	23 29 (26)	7 13 (10)					
1250		235 194 (215)	144 142 (143)	164 155 (160)	25 30 (28)	10 16 (13)					
2500		356 372 (364)	269 274 (272)	171 158 (165)	14 23 (19)	11 11 (11)					
5000		438* 312* (375*)	368* 364* (366*)	158 165 (162)	22* 28* (25*)	11* 10* (11*)					
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($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.5	0.005	0.1	80					
	コロニー数/プレート	733 721 (727)	331 316 (324)	977 926 (952)	524 558 (541)	521 496 (509)					
	S9 mixを必要とするもの	名称 2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA					
用量($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	1	2	2	0.5	2						
コロニー数/プレート	1430 1342 (1386)	328 286 (307)	761 794 (778)	531 523 (527)	285 248 (267)						

【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. 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（比活性）

被験物質の名称：3, 4-エポキシシクロヘキシルメチル（3, 4-エポキシ）シクロヘキサンカルボキシレート

	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	—	—	1.21×10^2	1250
	TA1535	—	—	1.09×10^2	1250
	WP2 <i>uvrA</i> / pKM101	—	—	—	—
	TA98	—	—	—	—
	TA1537	—	—	—	—
本試験	TA100	—	—	1.01×10^2	2500
	TA1535	—	—	1.35×10^2	156
	WP2 <i>uvrA</i> / pKM101	—	—	—	—
	TA98	—	—	—	—
	TA1537	—	—	—	—

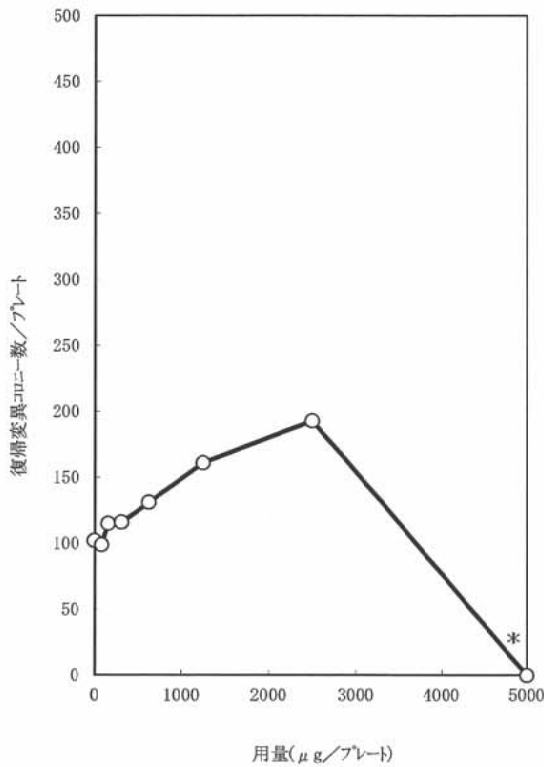


図-1 TA100における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験)

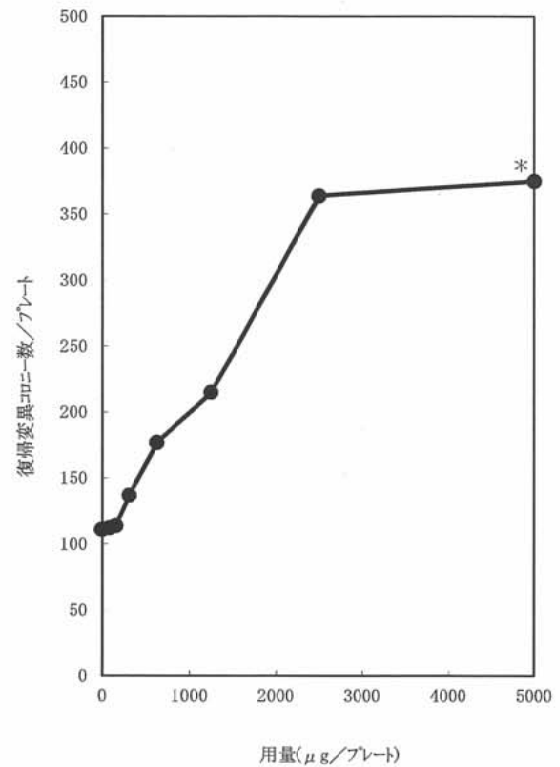


図-2 TA100における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)

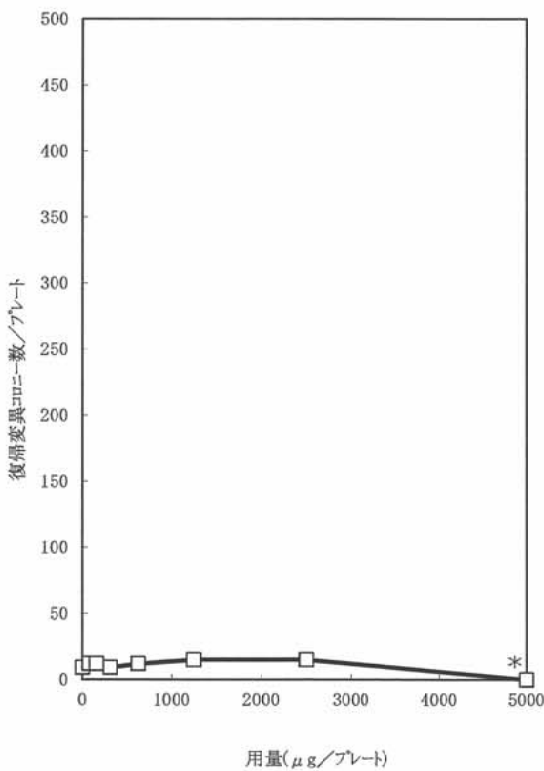


図-3 TA1535における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験)

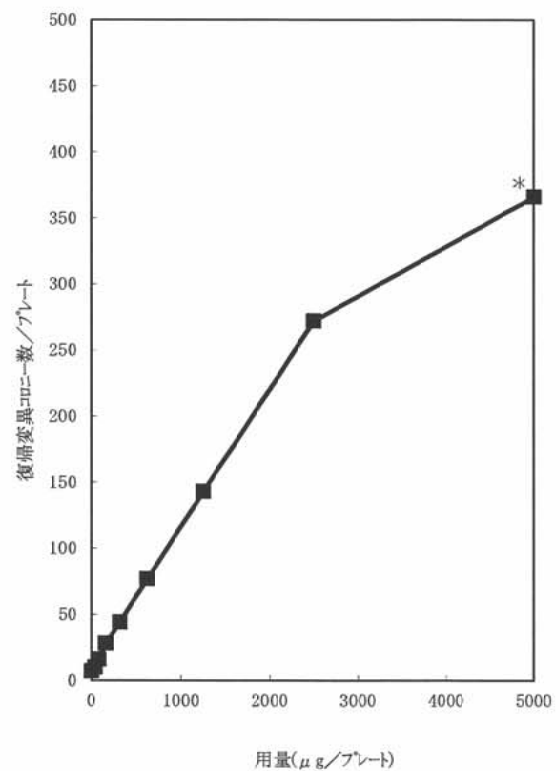


図-4 TA1535における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)

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。

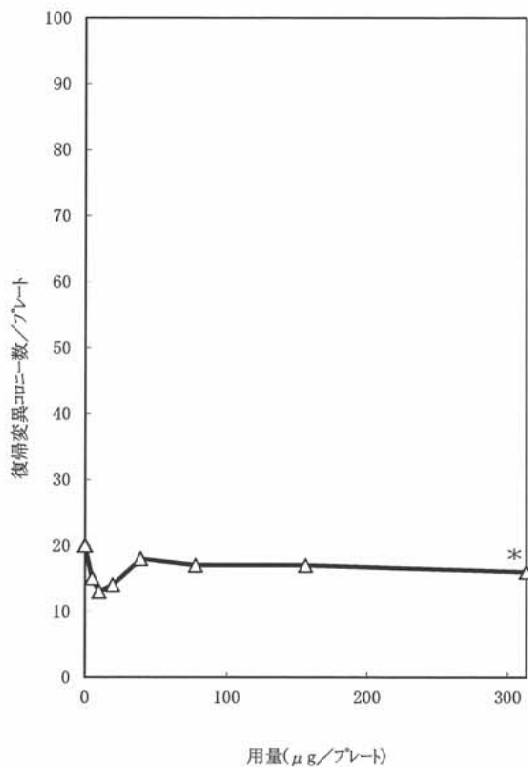


図-5 TA98における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験)

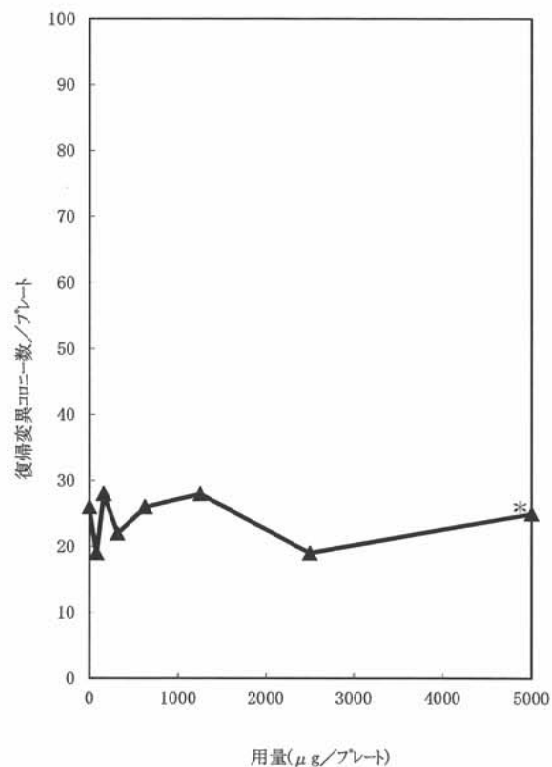


図-6 TA98における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)

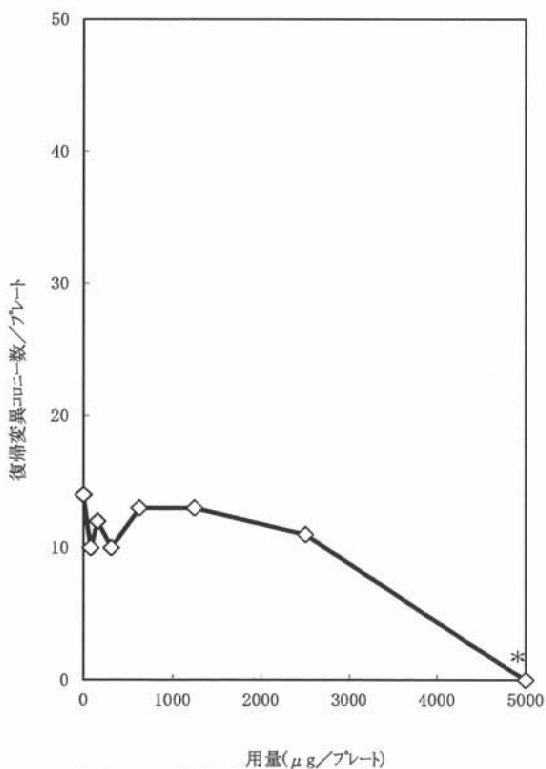


図-7 TA1537における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験)

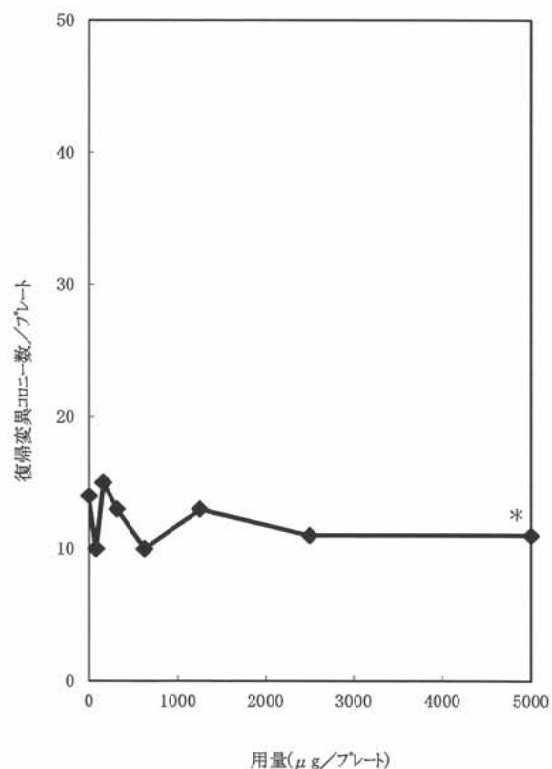


図-8 TA1537における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)

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。

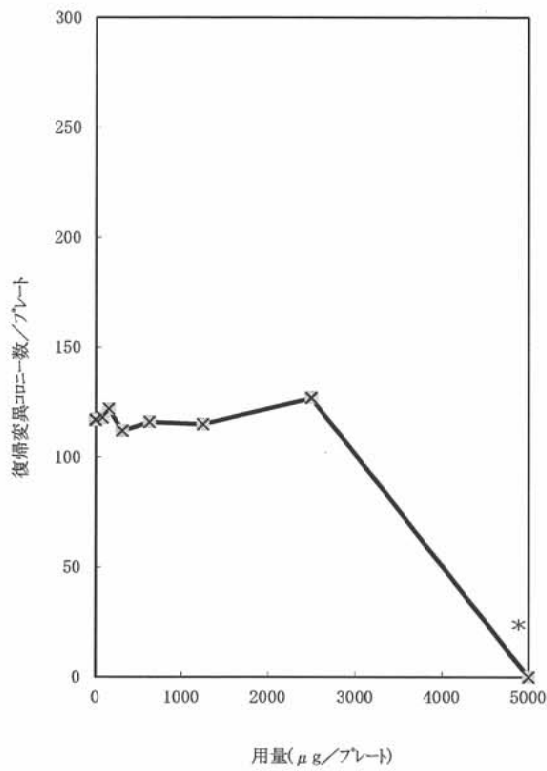


図-9 WP2uvrA/pKM101における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験)

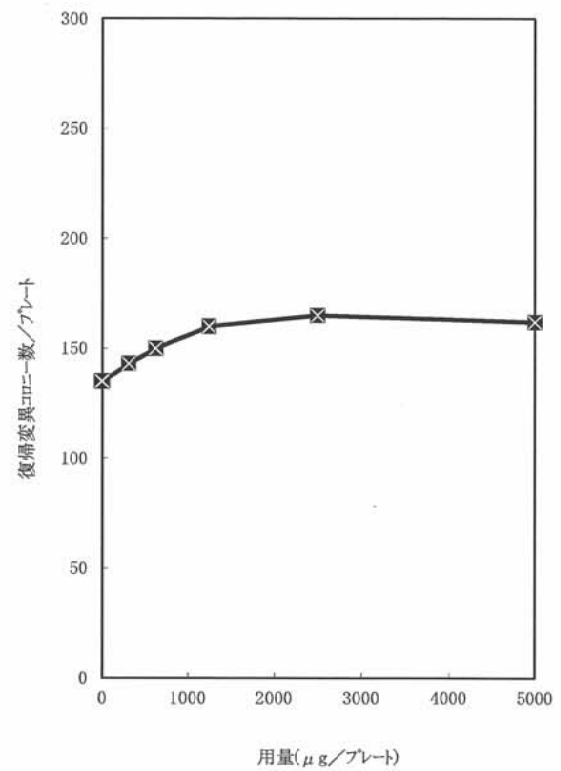


図-10 WP2uvrA/pKM101における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)

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。