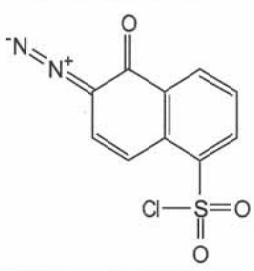


## 微生物を用いる変異原性試験結果報告書

## 1 一般的事項

化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	1, 2-ナフトキノン-2-ジアジド-5-スルホニルクロライド		
別名			
構造式又は示性式			
試験に供した 化学物質の純度	98.3%	試験に供した 化学物質の Lot No.	IF4AB-EB
不純物の名称及び 含有率(濃度)	—		
C A S 番号	3770-97-6	蒸気圧	—
分子量	268.68	分配係数 (1-オクタノール/水分配係数)	—
融点	132℃ (分解)		
沸点	—	常温における性状	赤みの黄色または濃い黄 赤色の結晶または粉末
安定性	水：水との接触により分解し、有毒なガスを発生する。 光：— 熱：爆発的に分解することがある。		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	水	—	水との接触により分 解する。
	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
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°C (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 $\mu$ mol
MgCl <sub>2</sub>	8 $\mu$ mol	NADH	4 $\mu$ mol
KCl	33 $\mu$ mol	Na-リン酸緩衝液	100 $\mu$ mol
グルコース-6-リン酸	5 $\mu$ 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	被験物質は水と反応することが分かっている。 被験物質の溶解度は、無水 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、被験物質に無水 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無水 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	30分、	25℃		
	本試験	30分、	25℃		
	確認試験	1時間 50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.	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 <sup>9</sup> /ml)	用 量 設 定 試 験	2.30	3.62	4.52	2.70	2.61
	本 試 験	2.23	3.23	4.12	2.47	2.36
	確 認 試 験	—	3.45	—	—	—
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、確認試験の結果を表-3及び図-11～12に示した。変異原性の強さを比活性としてまとめ、表-4に示した。</p> <p>用量設定試験を最高用量5000 <math>\mu</math>g/プレートより公比4の7用量で実施したところ、TA98、TA100及び大腸菌 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。</p> <p>用量反応関係が得られるよう用量を設定し本試験を実施したところ、TA98、TA100、TA1535及び大腸菌 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>TA1535の直接法による場合及び代謝活性化法による場合について、結果の再現性を確認するため確認試験を実施したところ、本試験同様、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、1, 2-ナフトキノン-2-ジアジド-5-スルホニルクロライ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	6366		
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：1，2-ナフトキノン-2-ジアジド-5-スルホニルクロライド

試験実施期間		2014年 7月 1日から 2014年 7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)	102 112 94 94 ( 101 )	15 13 15 15 ( 15 )	71 98 69 86 ( 81 )	17 13 16 13 ( 15 )	7 11 10 7 ( 9 )					
	1.22	86 101 ( 94 )	14 9 ( 12 )	85 74 ( 80 )	13 16 ( 15 )	8 7 ( 8 )					
	4.88	90 105 ( 98 )	9 8 ( 9 )	76 89 ( 83 )	16 18 ( 17 )	5 14 ( 10 )					
	19.5	148 122 ( 135 )	14 20 ( 17 )	124 112 ( 118 )	14 14 ( 14 )	5 11 ( 8 )					
	78.1	223 233 ( 228 )	10 17 ( 14 )	170 219 ( 195 )	28 38 ( 33 )	6 8 ( 7 )					
	313	473 493 ( 483 )	20 21 ( 21 )	402 414 ( 408 )	85 107 ( 96 )	7 13 ( 10 )					
	1250	361* 364* ( 363* )	24* 30* ( 27* )	391* 384* ( 388* )	0* 0* ( 0* )	0* 0* ( 0* )					
	5000	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)	93 124 94 96 ( 102 )	11 11 10 10 ( 11 )	77 90 106 91 ( 91 )	29 24 22 24 ( 25 )	10 10 11 9 ( 10 )				
		1.22	87 121 ( 104 )	16 9 ( 13 )	123 101 ( 112 )	26 20 ( 23 )	14 11 ( 13 )				
		4.88	109 128 ( 119 )	9 13 ( 11 )	119 97 ( 108 )	16 22 ( 19 )	14 10 ( 12 )				
		19.5	126 123 ( 125 )	7 5 ( 6 )	113 123 ( 118 )	21 15 ( 18 )	9 8 ( 9 )				
		78.1	187 163 ( 175 )	3 11 ( 7 )	187 179 ( 183 )	26 39 ( 33 )	7 8 ( 8 )				
		313	558 461 ( 510 )	17 14 ( 16 )	436 414 ( 425 )	157 137 ( 147 )	9 13 ( 11 )				
		1250	715* 719* ( 717* )	16* 10* ( 13* )	729* 740* ( 735* )	0* 0* ( 0* )	0* 0* ( 0* )				
		5000	0* 0* ( 0* )	0* 0* ( 0* )	0* 0* ( 0* )	0* 0* ( 0* )	0* 0* ( 0* )				
陽性対照		S9 mixを必要とするもの	名称 AF-2 用量(μg/プレート) 0.01	名称 NaN <sub>3</sub> 用量(μg/プレート) 0.5	名称 AF-2 用量(μg/プレート) 0.005	名称 AF-2 用量(μg/プレート) 0.1	名称 9-AA 用量(μg/プレート) 80				
		コロニー数/プレート	654 694 ( 674 )	317 306 ( 312 )	928 794 ( 861 )	527 548 ( 538 )	618 648 ( 633 )				
	S9 mixを必要とするもの	名称 2-AA 用量(μg/プレート) 1	名称 2-AA 用量(μg/プレート) 2	名称 2-AA 用量(μg/プレート) 2	名称 2-AA 用量(μg/プレート) 0.5	名称 2-AA 用量(μg/プレート) 2					
	コロニー数/プレート	1400 1388 ( 1394 )	260 275 ( 268 )	1060 977 ( 1019 )	361 492 ( 427 )	232 215 ( 224 )					

【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、NaN<sub>3</sub>: 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：1，2-ナフトキノン-2-ジアジド-5-スルホニルクロライド

試験実施期間		2014年 7月 7日から 2014年 7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)	133	120	11	9	91	92	18	23	11	14
		122	143 (130)	10	9 (10)	79	81 (86)	16	17 (19)	8	8 (10)
	9.77	142				70		9			
		144 (143)				89 (80)		16 (13)			
	19.5	128				96		15		15	
		115 (122)	11			97 (97)		13 (14)		9 (12)	
	39.1	136				123		16		14	
		145 (141)	8			128 (126)		17 (17)		14 (14)	
	78.1	194				170		30		11	
		212 (203)	11			158 (164)		28 (29)		11 (11)	
156	313				245		53		10		
	336 (325)	18			258 (252)		41 (47)		15 (13)		
313	516				388		82		16		
	447 (482)	22			372 (380)		76 (79)		11 (14)		
625	542				447		91*		16		
	480 (511)	46			402 (425)		92* (92*)		14 (15)		
1250	460*				393*		0*		0*		
	451* (456*)	41*			484* (439*)		0* (0*)		0* (0*)		
S9 mix (+)	陰性対照 (溶媒対照)	126	142	11	13	102	106	22	24	11	11
		107	119 (124)	16	15 (14)	112	91 (103)	16	25 (22)	15	9 (12)
	9.77			11		100					
				15 (13)		117 (109)					
	19.5	142				126		8		13	
		121 (132)	13			127 (127)		14 (11)		13 (13)	
	39.1	134				122		18		14	
		149 (142)	11			124 (123)		17 (18)		7 (11)	
	78.1	180				173		34		14	
		191 (186)	11			197 (185)		38 (36)		15 (15)	
156	273				260		55		14		
	314 (294)	11			243 (252)		44 (50)		16 (15)		
313	494				382		75		14		
	452 (473)	20			393 (388)		76 (76)		13 (14)		
625	927				504		0*		0*		
	838 (883)	31			549 (527)		0* (0*)		0* (0*)		
1250	795*				674*		0*		0*		
	648* (722*)	21*			622* (648*)		0* (0*)		0* (0*)		
隔対照	S9 mixを必要とするもの	名称	AF-2	NaN <sub>3</sub>	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	599	326	1098	522	454				
			610 (605)	323 (325)	961 (1030)	514 (518)	572 (513)				
対照	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	1355	250	904	491	222				
			1246 (1301)	286 (268)	868 (886)	457 (474)	275 (249)				

【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、NaN<sub>3</sub>: 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（確認試験）

被験物質の名称：1，2-ナフトキノン-2-ジアジド-5-スルホニルクロライド

試験実施期間		2014年 7月 22日から 2014年 7月 25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)		13 10 13 10 ( 12 )				
	19.5		10 10 ( 10 )				
	39.1		6 9 ( 8 )				
	78.1		11 6 ( 9 )				
	156		13 23 ( 18 )				
	313		15 17 ( 16 )				
	625		22 24 ( 23 )				
	1250		32* 22* ( 27* )				
	S9 mix (+)	陰性対照(溶媒対照)		8 8 8 9 ( 8 )			
19.5			5 7 ( 6 )				
39.1			8 10 ( 9 )				
78.1			15 11 ( 13 )				
156			10 9 ( 10 )				
313			14 17 ( 16 )				
625			22 24 ( 23 )				
1250			22* 21* ( 22* )				
陽性対照		S9 mixを必要とするもの	名称	AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2
	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		323 310 ( 317 )				
	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		285 293 ( 289 )					

【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、NaN<sub>3</sub>: 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-4

## 試験結果表（比活性）

被験物質の名称：1，2-ナフトキノン-2-ジアジド-5-スルホニルクロライド

	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	$\mu\text{g}$ /プレート	Rev./mg	$\mu\text{g}$ /プレート
用量 設定 試験	TA100	$1.63 \times 10^3$	78.1	$1.30 \times 10^3$	313
	TA1535	—	—	—	—
	WP2 <i>uvrA</i> / pKM101	$1.46 \times 10^3$	78.1	$1.18 \times 10^3$	78.1
	TA98	$2.59 \times 10^2$	313	$3.90 \times 10^2$	313
	TA1537	—	—	—	—
本 試 験	TA100	$1.25 \times 10^3$	156	$1.21 \times 10^3$	625
	TA1535	$4.47 \times 10$	313	$2.56 \times 10$	625
	WP2 <i>uvrA</i> / pKM101	$1.06 \times 10^3$	156	$9.55 \times 10^2$	156
	TA98	$1.92 \times 10^2$	313	$1.79 \times 10^2$	156
	TA1537	—	—	—	—
確 認 試 験	TA100	/	/	/	/
	TA1535	$1.20 \times 10$	1250	$2.56 \times 10$	313
	WP2 <i>uvrA</i> / pKM101	/	/	/	/
	TA98	/	/	/	/
	TA1537	/	/	/	/

(注) 横線(—)は当該菌株について陰性対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数を誘発しなかったことを示し、斜線(/)は当該菌株について試験を実施しなかったことを示す。

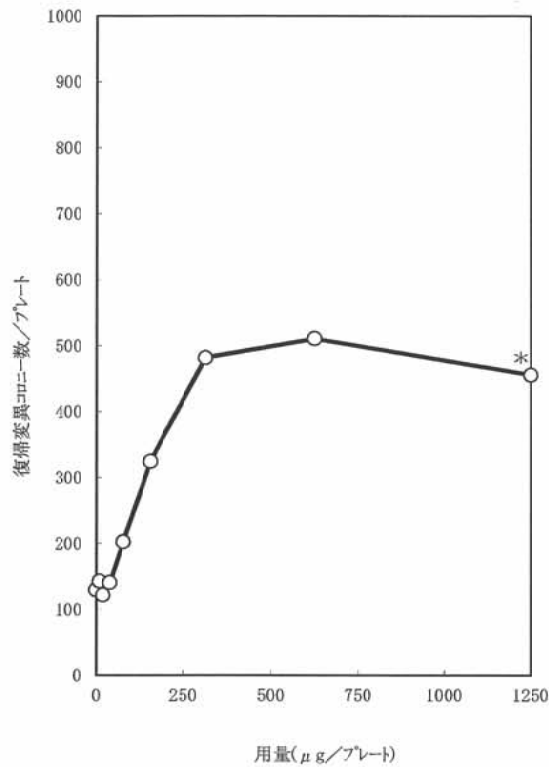


図-1 TA100における用量-反応曲線  
直接法による場合 (本試験)

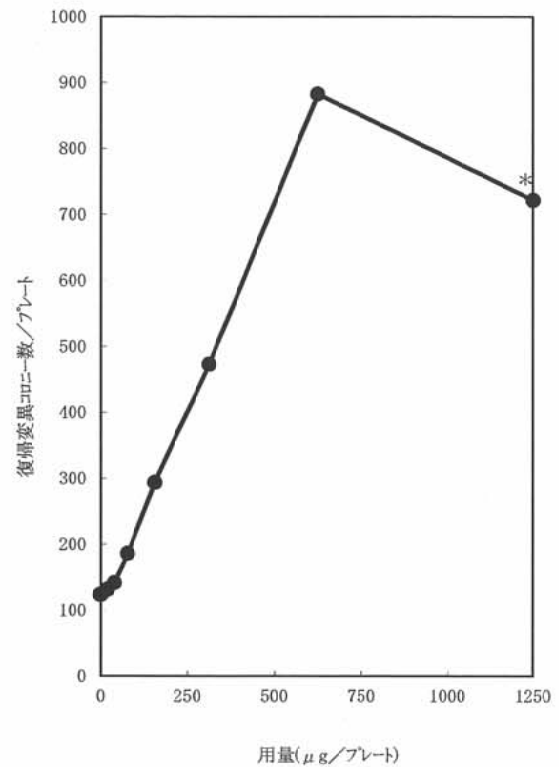


図-2 TA100における用量-反応曲線  
代謝活性化法による場合 (本試験)

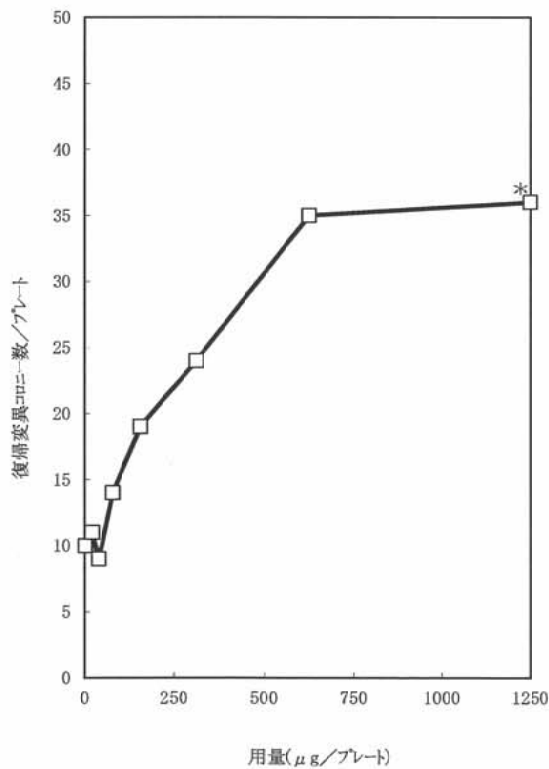


図-3 TA1535における用量-反応曲線  
直接法による場合 (本試験)

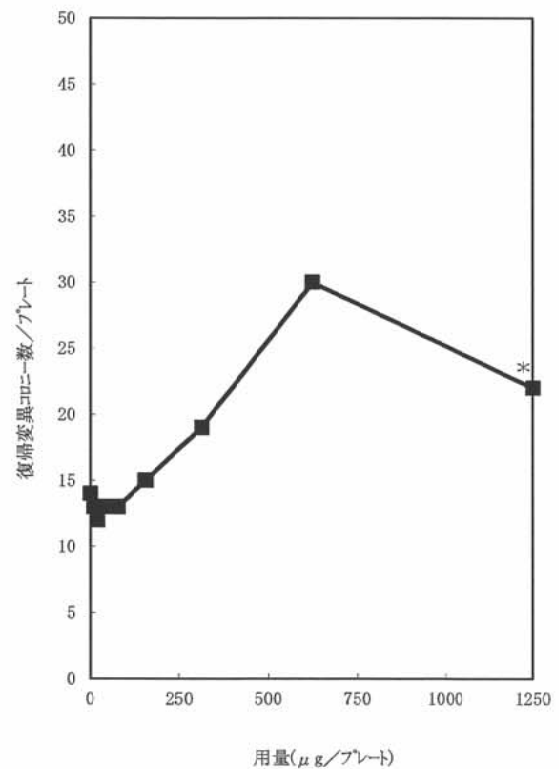


図-4 TA1535における用量-反応曲線  
代謝活性化法による場合 (本試験)

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。

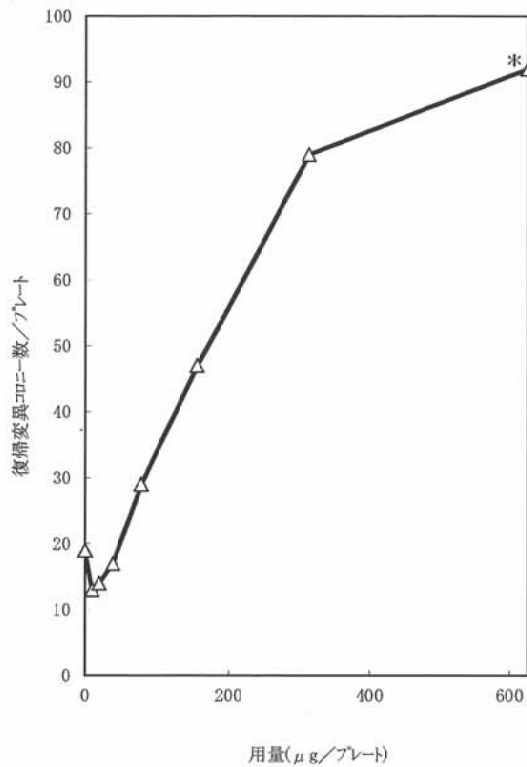


図-5 TA98における用量-反応曲線  
直接法による場合 (本試験)  
(625 μg/プレートまでをプロットした。)

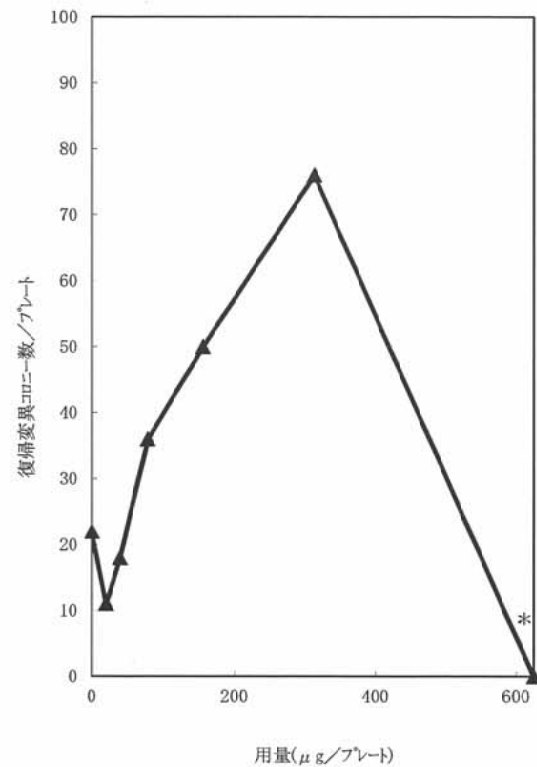


図-6 TA98における用量-反応曲線  
代謝活性化法による場合 (本試験)  
(625 μg/プレートまでをプロットした。)

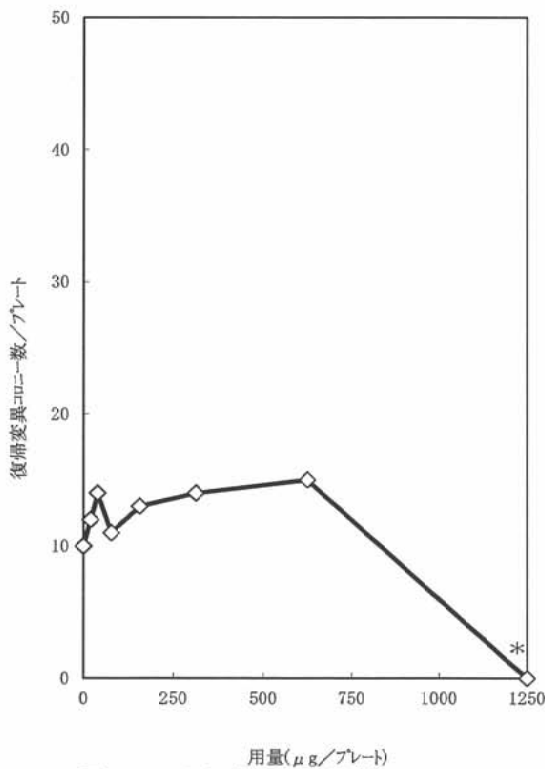


図-7 TA1537における用量-反応曲線  
直接法による場合 (本試験)

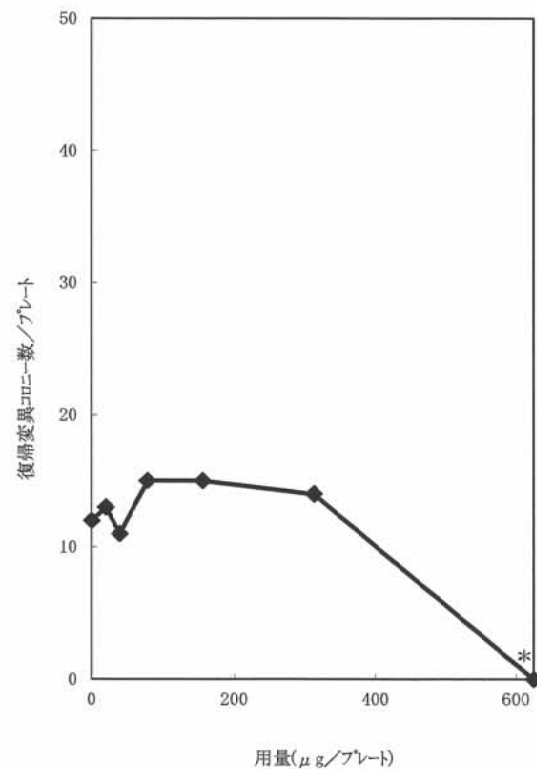


図-8 TA1537における用量-反応曲線  
代謝活性化法による場合 (本試験)  
(625 μg/プレートまでをプロットした。)

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。

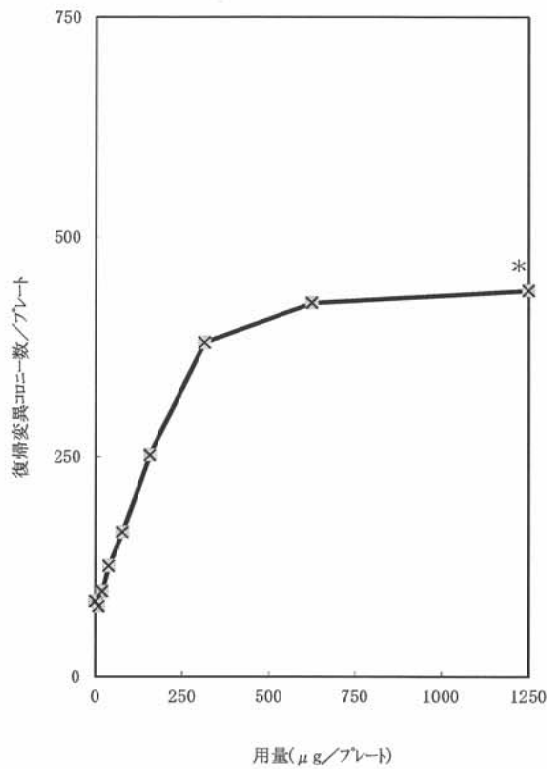


図-9 WP2uvrA/pKM101における用量-反応曲線  
直接法による場合 (本試験)

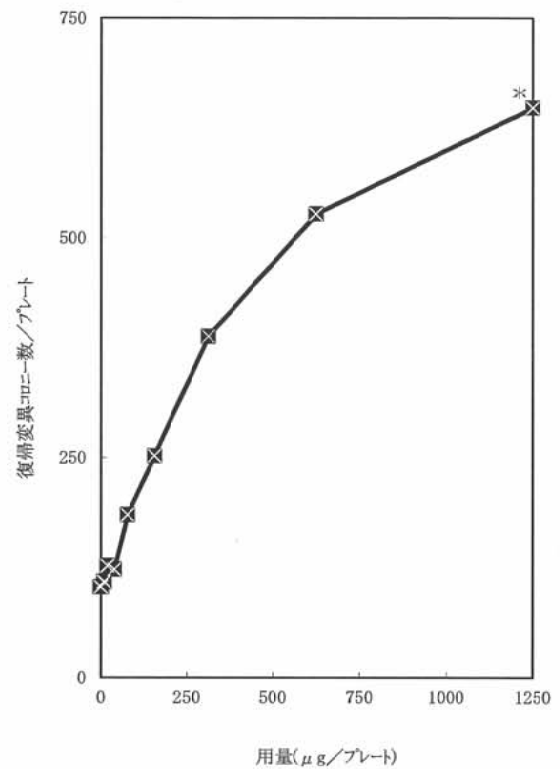


図-10 WP2uvrA/pKM101における用量-反応曲線  
代謝活性化法による場合 (本試験)

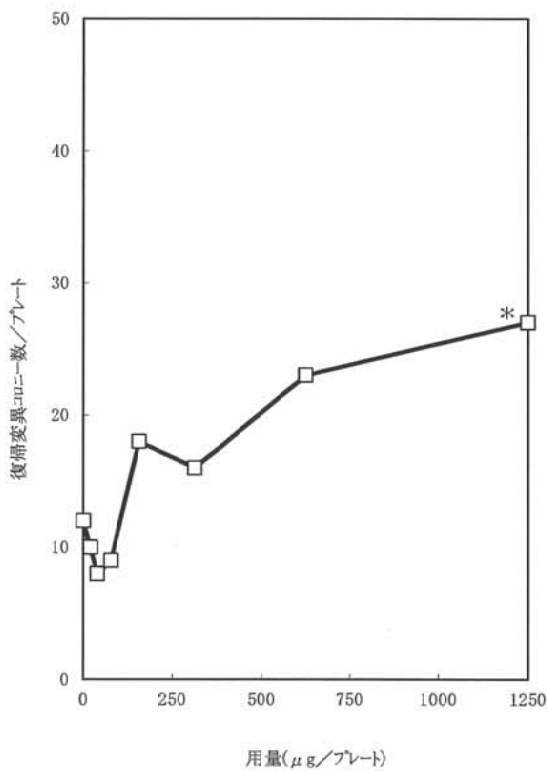


図-11 TA1535における用量-反応曲線  
直接法による場合 (本試験)

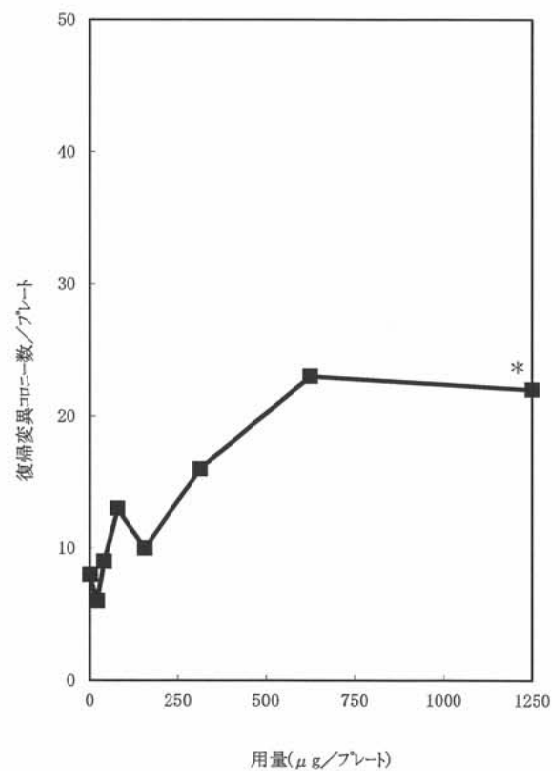


図-12 TA1535における用量-反応曲線  
代謝活性化法による場合 (本試験-2)

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。