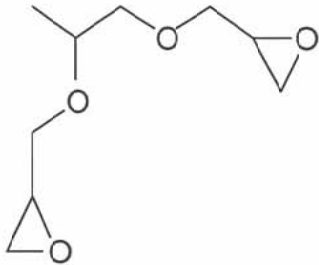


微生物を用いる変異原性試験結果報告書

1 一般的事項

化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	2,2'-[(1-メチルエチレン)ビス(オキシメチレン)]ビスオキシラン		
別 名	—		
構造式又は示性式			
試験に供した 化学物質の純度	—	試験に供した 化学物質の Lot No.	652525
不純物の名称及び 含有率(濃度)	—		
C A S 番 号	16096-30-3	蒸 気 圧	—
分 子 量	188.22	分 配 係 数 (1-オクタノール/水分配係数)	—
融 点	—		
沸 点	—	常温における性状	粘性無色透明液体
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[100mg/ml 未満]*	—
	DMSO	溶解[200mg/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℃ (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 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 (%)
	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 100 mg/ml 未満であるが、DMSO に 200 mg/ml [被験物質溶液量をプレート当り 50 μl にした場合に 10000 μg の被験物質量に相当する] 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 本試験		10分、 30分、	25℃ 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	2.48	3.64	4.25	2.68	2.59
	本 試 験	2.47	3.62	4.17	2.64	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5月27日 製造
購入の場合の Lot No.	ANI270ED
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10000 $\mu\text{g}/7^\circ\text{プレート}$より公比4の8用量で実施したところ、TA98、TA100、TA1535及び大腸菌 WP2 <i>uvrA</i>/pKM101の直接法による場合と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、用量設定試験と同様、TA98、TA100、TA1535及び大腸菌 WP2 <i>uvrA</i>/pKM101の直接法による場合と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、2,2'-[(1-メチルエチレン)ビス(オキシメチレン)]ビスオキシラン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

被験物質は重合反応する物質であり、純度の記載がない。純度換算できないため最高用量を10000 $\mu\text{g}/7^\circ\text{プレート}$ として試験を行った。

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	6370		
試験期間	2014年7月4日 ～ 2014年10月9日		

表-1

試験結果表（用量設定試験）

被験物質の名称：2,2'-(1-メチルエチレン)ビス(オキシメチレン)]ビスオキシラン

試験実施期間		2014年 7月 29日から 2014年 8月 1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)	101 104	7 10	97 100	20 15	7 10	106 86 (99)	9 9 (9)	91 85 (93)	17 18 (18)	8 9 (9)		
	0.610	83	11	97	13	11	102 (93)	6 (9)	79 (88)	14 (14)	13 (12)		
	2.44	111	9	78	10	7	98 (105)	9 (9)	76 (77)	13 (12)	9 (8)		
	9.77	105	16	112	15	8	128 (117)	7 (12)	111 (112)	18 (17)	10 (9)		
	39.1	135	15	124	13	10	123 (129)	15 (15)	117 (121)	14 (14)	8 (9)		
	156	242	37	126	16	8	246 (244)	30 (34)	120 (123)	18 (17)	15 (12)		
	625	600	87	207	26	7	576 (588)	78 (83)	215 (211)	24 (25)	10 (9)		
	2500	1295	278	417	29*	10*	1346 (1321)	276 (277)	421 (419)	47* (38*)	13* (12*)		
	10000	2301*	176*	0*	52*	17*	2314* (2308*)	179* (178*)	0* (0*)	45* (49*)	16* (17*)		
	S9 mix (+)	陰性対照 (溶媒対照)	121 112	9 9	93 93	17 18	14 8	107 104 (111)	11 10 (10)	85 84 (89)	18 20 (18)	11 10 (11)	
0.610		102	11	94	24	14	108 (105)	9 (10)	106 (100)	18 (21)	10 (12)		
2.44		115	9	114	21	13	109 (112)	10 (10)	100 (107)	20 (21)	13 (13)		
9.77		114	9	113	20	14	102 (108)	5 (7)	102 (108)	25 (23)	7 (11)		
39.1		100	20	109	14	8	124 (112)	15 (18)	121 (115)	18 (16)	8 (8)		
156		197	52	173	17	8	164 (181)	37 (45)	171 (172)	16 (17)	10 (9)		
625		557	207	439	30	11	580 (569)	181 (194)	397 (418)	28 (29)	8 (10)		
2500		1346	603	612	48*	10	1334 (1340)	570 (587)	661 (637)	39* (44*)	11 (11)		
10000		2656*	292*	0*	53*	14*	2649* (2653*)	299* (296*)	0* (0*)	52* (53*)	18* (16*)		
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
	コロニー数/プレート	717	307	1117	424	807	741 (729)	352 (330)	1160 (1139)	466 (445)	839 (823)		
陽性対照	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	1417	233	871	461	282	1397 (1407)	272 (253)	899 (885)	455 (458)	269 (276)		

【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

試験結果表（本試験）

被験物質の名称：2,2'-(1-メチルエチレン)ビス(オキシメチレン)ビスオキシラン

試験実施期間		2014年 8月 4日から 2014年 8月 7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)	120 127 116 131 (124)	8 13 9 9 (10)	113 93 114 96 (104)	14 25 24 13 (19)	13 18 10 10 (13)						
	19.5	136 137 (137)	10 10 (10)									
	39.1	173 143 (158)	8 17 (13)									
	78.1	202 232 (217)	23 16 (20)							6 18 (12)		
	156	285 309 (297)	34 24 (29)	136 139 (138)	13 9 (11)	24 17 (21)						
	313	389 428 (409)	60 64 (62)	176 156 (166)	20 23 (22)	10 14 (12)						
	625	594 613 (604)	111 86 (99)	225 214 (220)	22 28 (25)	16 16 (16)						
	1250	897 937 (917)	180 144 (162)	303 314 (309)	18 32 (25)	15 13 (14)						
	2500	1281 1268 (1275)	259 255 (257)	402 371 (387)	49* 36* (43*)	17* 14* (16*)						
	5000	3024 2754 (2889)	322 324 (323)	355 350 (353)	70* 52* (66*)	20* 16* (18*)						
	10000	2345* 2249* (2297*)	185* 199* (192*)	0* 0* (0*)	57* 59* (58*)	21* 17* (19*)						
	S9 mix (+)	陰性対照 (溶媒対照)	141 130 119 126 (129)	15 8 8 13 (11)	141 148 129 135 (138)	20 15 26 16 (19)	18 11 17 16 (16)					
		19.5		16 11 (14)								
		39.1	136 145 (141)	18 11 (15)								
78.1		177 166 (172)	16 25 (21)	133 150 (142)								
156		198 209 (204)	38 39 (39)	179 198 (189)	26 30 (28)	14 16 (15)						
313		341 342 (342)	78 74 (76)	290 247 (269)	25 26 (26)	18 8 (13)						
625		599 582 (591)	191 190 (191)	461 438 (450)	29 32 (31)	13 23 (18)						
1250		989 973 (981)	353 356 (355)	667 650 (659)	39 39 (39)	15 15 (15)						
2500		1341 1375 (1358)	589 573 (581)	767 712 (740)	46* 57* (52*)	23 18 (21)						
5000		2463 2410 (2437)	558 516 (537)	607 595 (601)	67* 92* (80*)	20 16 (18)						
10000		2474* 2401* (2438*)	278* 268* (273*)	0* 0* (0*)	53* 51* (52*)	22* 13* (18*)						
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	9-AA 80				
		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				
			コロニー数/プレート	782 763 (773)	322 316 (319)	1038 933 (986)	552 517 (535)	607 509 (558)				
		コロニー数/プレート	1415 1398 (1407)	278 262 (270)	954 986 (970)	493 483 (488)	265 245 (255)					

【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：2, 2' -[(1-メチルエチレン)ビス(オキシメチレン)]ビスオキシラン

	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	μ g/プレート	Rev./mg	μ g/プレート
用量 設定 試験	TA100	9.29×10^2	156	7.33×10^2	625
	TA1535	1.60×10^2	156	2.94×10^2	625
	WP2 <i>uvrA</i> / pKM101	1.89×10^2	625	5.26×10^2	625
	TA98	8.00	2500	1.04×10	2500
	TA1537	—	—	—	—
本 試 験	TA100	1.11×10^3	156	7.39×10^2	625
	TA1535	1.66×10^2	313	2.88×10^2	625
	WP2 <i>uvrA</i> / pKM101	1.86×10^2	625	4.99×10^2	625
	TA98	9.60	2500	1.60×10	1250
	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。

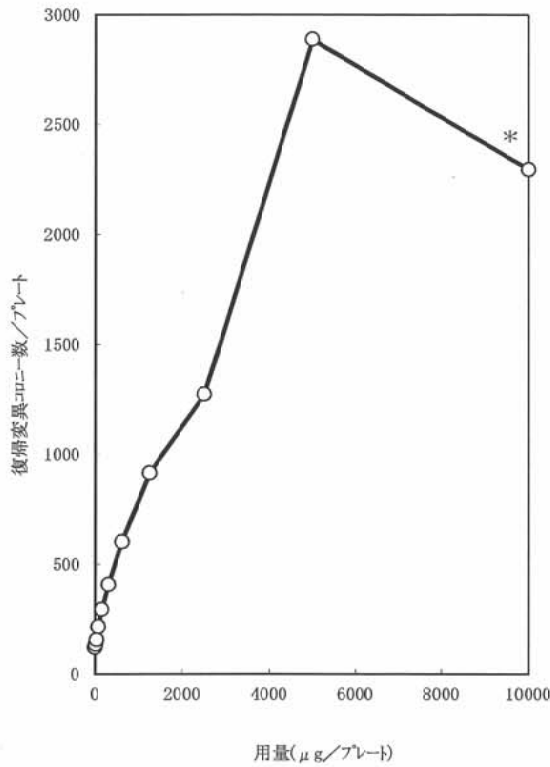


図-1 TA100における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験)

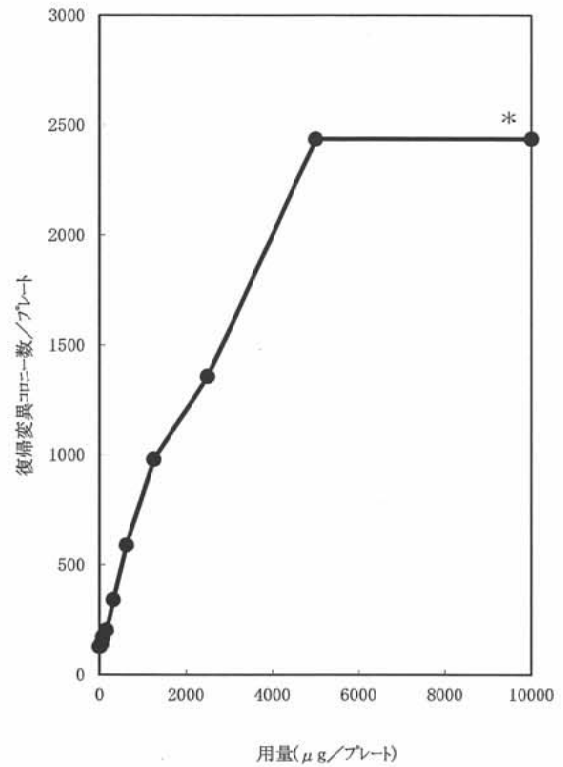


図-2 TA100における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)

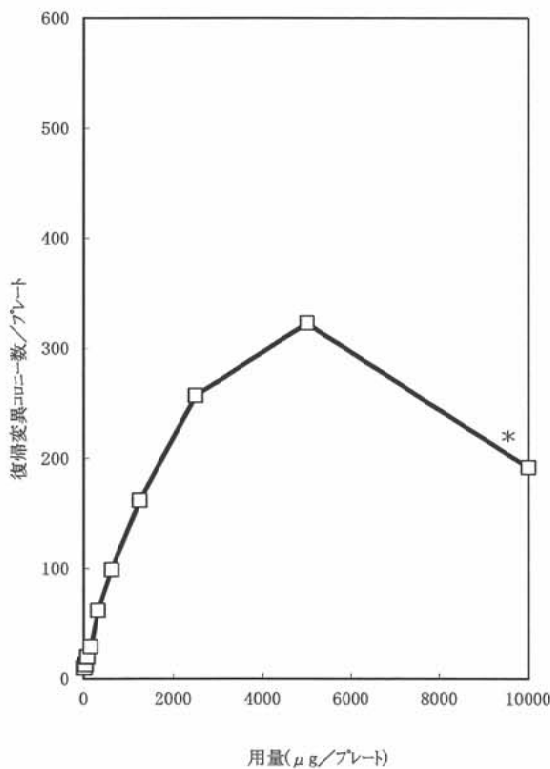


図-3 TA1535における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験)

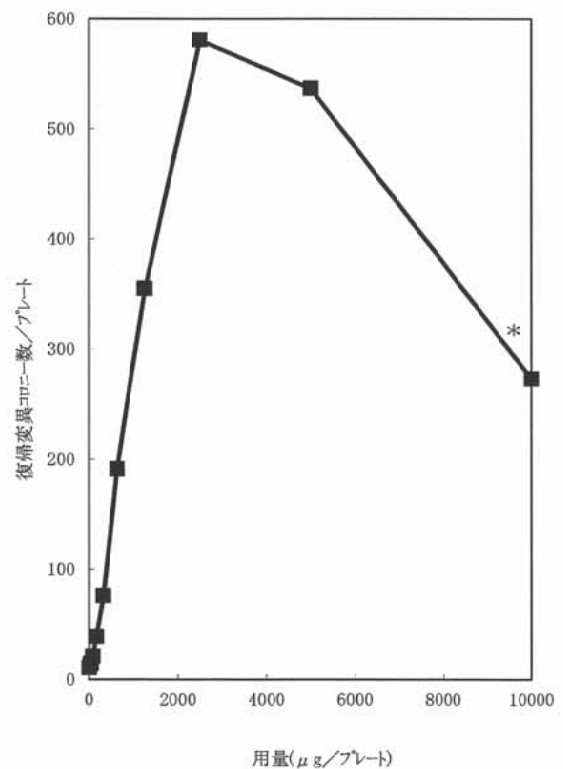


図-4 TA1535における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)

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。

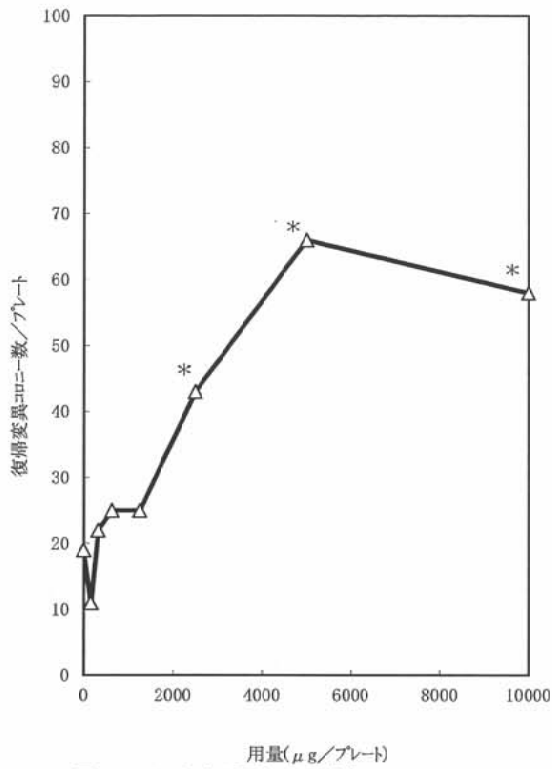


図-5 TA98における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験)

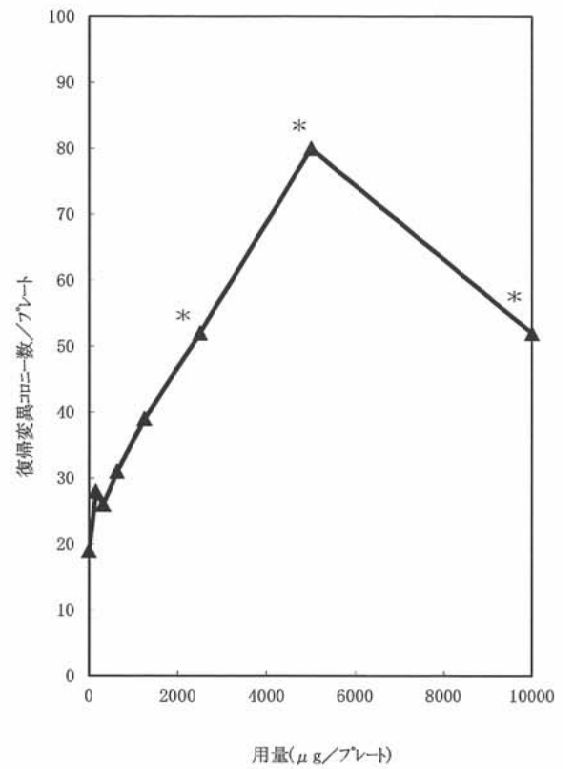


図-6 TA98における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)

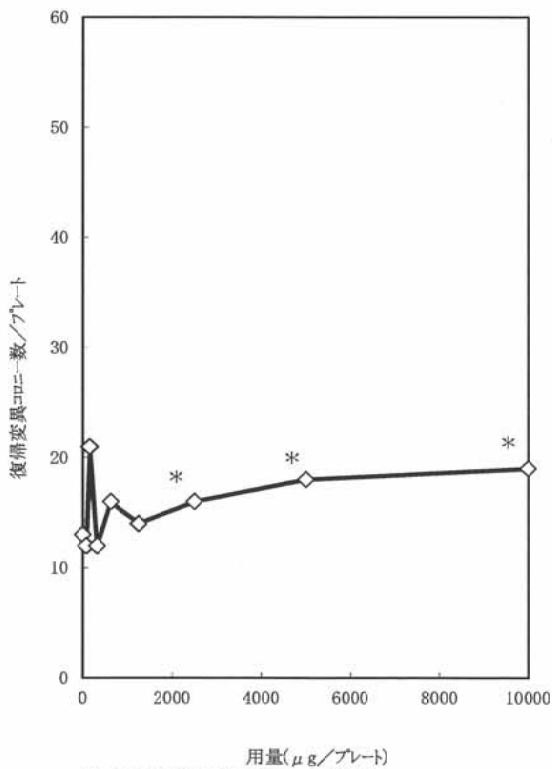


図-7 TA1537における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験)

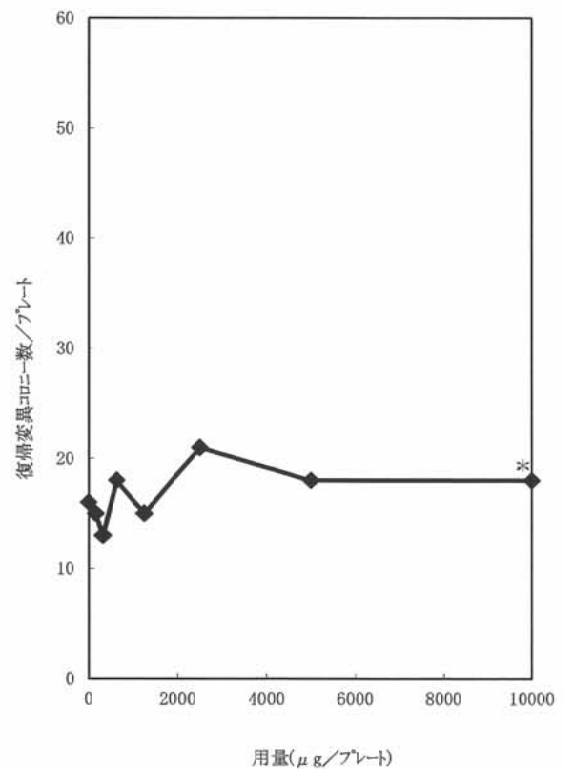


図-8 TA1537における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)

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。

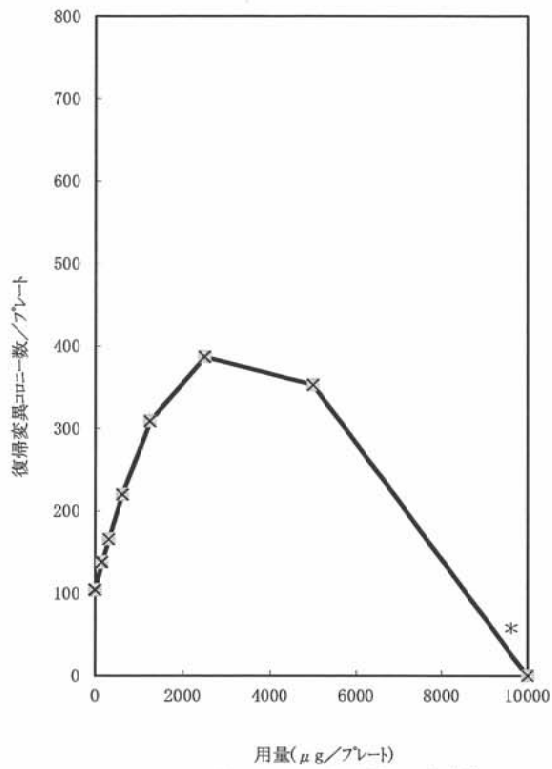


図-9 WP2uvrA/pKM101における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験)

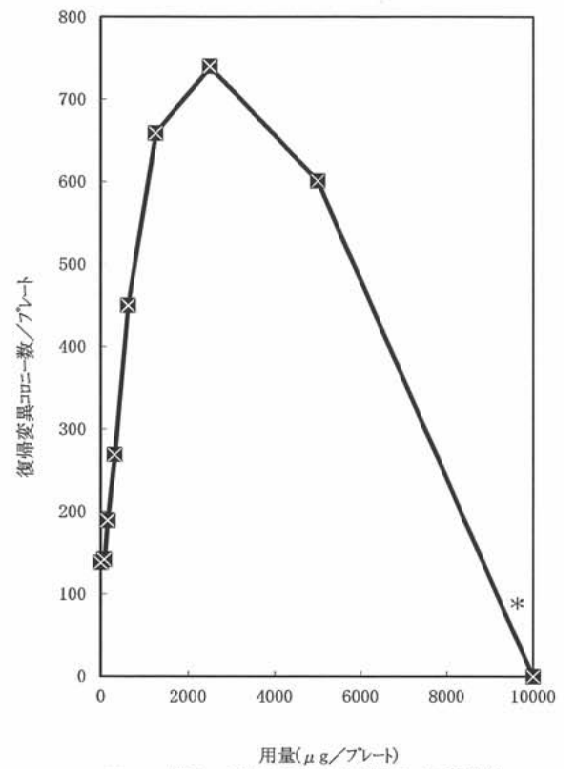


図-10 WP2uvrA/pKM101における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)

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。