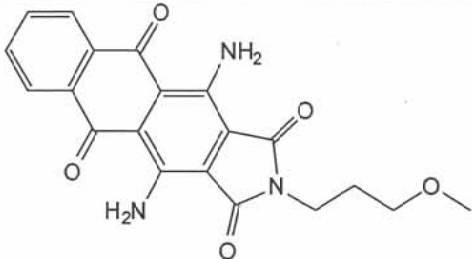


微生物を用いる変異原性試験結果報告書

1 一般的事項

化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	ディスパーズブルー-60		
別名	4, 11-diamino-2-(3-methoxypropyl)-1H-naphth[2, 3-f]isoindol-1, 3, 5, 10 (2H)-tetrone		
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.	G3014
不純物の名称及び 含有率 (濃度)	—		
C A S 番号	12217-80-0	蒸気圧	—
分子量	379.37	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	青～黒い粉末
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[200mg/ml 以上]*	—
	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 5月 23日 製造
購入の場合のLot No.	RAA201405A
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	182~247 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 200 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 10000 μ g の被験物質質量に相当する]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 本試験		15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 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	2.27	3.21	4.05	2.76	2.42
	本 試 験	2.19	3.29	4.23	2.76	2.49
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7月24日 製造
購入の場合の Lot No.	ANI360GD
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-リッ酸緩衝液(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。</p> <p>用量設定試験を最高用量10000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$より公比4の7用量で実施したが、TA98、TA100、TA1535、TA1537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はみられなかった。</p> <p>本試験を最高用量10000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$から公比2の5用量で本試験を実施したが、TA98、TA100、TA1535、TA1537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値の2倍以上の復帰変異コロニー数の増加はみられなかった。</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、ディスパーズブルー-60の微生物に対する変異原性は、陰性と判定した。</p>	

(3) 参考事項

被験物質の純度が不明であったため、最高用量を10000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とした。被験物質の沈澱が著しいプレートにマニュアル計測を実施した。

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	6372		
試験期間	2014年8月28日 ～ 2014年11月7日		

表-1

試験結果表（用量設定試験）

被験物質の名称：ディスパーズブルー-60

試験実施期間		2014年 9月 9日から 2014年 9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)	96 124 107 115 (111)	8 8 13 9 (10)	105 90 90 85 (93)	21 17 22 23 (21)	10 15 16 9 (13)					
	2.44	123 123 (123)	10 9 (10)	91 92 (92)	10 13 (12)	10 15 (13)					
	9.77	112 102 (107)	9 11 (10)	99 104 (102)	15 17 (16)	6 10 (8)					
	39.1	122 116 (119)	9 9 (9)	97 90 (94)	17 18 (18)	3 6 (5)					
	156	105 116 (111)	7 3 (5)	86 83 (85)	10 13 (12)	8 7 (8)					
	625	116 106 (111)	7 7 (7)	81 99 (90)	18 16 (17)	7 8 (8)					
	2500	70 102 (86)	10 9 (10)	78 84 (81)	14 8 (11)	9 7 (8)					
	10000 †	81 77 (79)	5 8 (7)	74 89 (82)	15 14 (15)	15 9 (12)					
	S9 mix (+)	陰性対照 (溶媒対照)	134 114 119 120 (122)	13 8 11 8 (10)	138 117 117 113 (121)	24 24 25 24 (24)	9 16 20 16 (15)				
		2.44	124 124 (124)	9 7 (8)	127 115 (121)	20 24 (22)	16 18 (17)				
9.77		126 120 (123)	13 8 (11)	102 107 (105)	25 20 (23)	17 16 (17)					
39.1		117 136 (128)	10 6 (8)	115 136 (126)	22 21 (22)	16 16 (16)					
156		153 146 (150)	10 9 (10)	139 126 (133)	20 28 (24)	16 11 (14)					
625		122 150 (136)	11 10 (11)	139 127 (133)	29 24 (27)	15 14 (15)					
2500		149 121 (135)	6 7 (7)	134 137 (136)	24 25 (25)	6 9 (8)					
10000 †		80 57 (69)	6 7 (7)	92 86 (89)	14 14 (14)	7 12 (10)					
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			
		コロニー数/プレート	737 732 (735)	316 307 (312)	1166 1133 (1150)	571 518 (545)	580 657 (619)				
陰性対照	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	1423 1444 (1434)	252 255 (254)	839 780 (810)	522 527 (525)	225 232 (229)					

【備考】

- () 内には各プレートのコロニー数の平均値を記入した。
- 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。
- プレート上に沈澱が析出した場合は、その用量に†印を付した。
- 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：ディスパースブルー-60

試験実施期間		2014年 9月 30日から 2014年10月 3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)	129 113 112 106 (115)	7 8 8 9 (8)	92 93 99 86 (93)	25 16 20 16 (19)	13 18 13 22 (17)		
	625	111 91 (101)	13 8 (11)	61 79 (70)	15 26 (21)	15 14 (15)		
	1250	97 97 (97)	13 6 (10)	82 85 (84)	14 20 (17)	11 11 (11)		
	2500	98 114 (106)	13 6 (10)	96 76 (86)	17 25 (21)	18 11 (15)		
	5000 †	102 105 (104)	6 8 (7)	87 70 (79)	16 9 (13)	12 15 (14)		
	10000 †	81 86 (84)	12 5 (9)	75 64 (70)	15 11 (13)	11 10 (11)		
	陰性対照 (溶媒対照)	136 129 144 128 (134)	7 8 11 11 (9)	109 113 122 98 (111)	25 28 31 28 (28)	16 23 18 23 (20)		
	625	153 156 (155)	11 11 (11)	116 146 (131)	39 38 (39)	21 17 (19)		
	1250	120 148 (134)	6 11 (9)	129 130 (130)	44 33 (39)	16 16 (16)		
	2500	149 130 (140)	8 8 (8)	142 136 (139)	38 18 (28)	16 13 (15)		
	5000 †	105 113 (109)	6 4 (5)	94 99 (97)	16 15 (16)	12 13 (13)		
	10000 †	77 82 (80)	2 9 (6)	94 120 (107)	11 12 (12)	12 12 (12)		
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	
	コロニー数/プレート	749 723 (736)	353 358 (356)	1123 1044 (1084)	524 503 (514)	772 761 (767)		
	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	1420 1365 (1393)	314 281 (298)	851 810 (831)	524 509 (517)	294 274 (284)		

【備考】

1. () 内には各プレートのコロニー数の平均値を記入した。
2. 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。
3. プレート上に沈澱が析出した場合は、その用量に†印を付した。
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

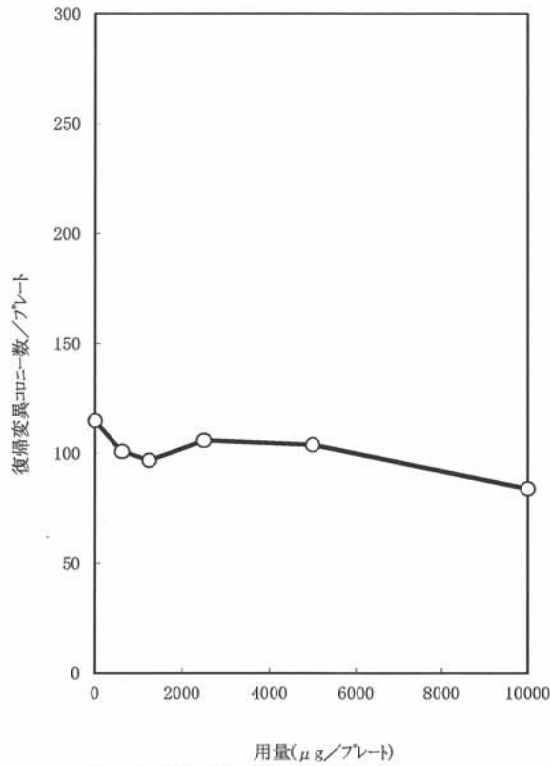


図-1 TA100における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験)

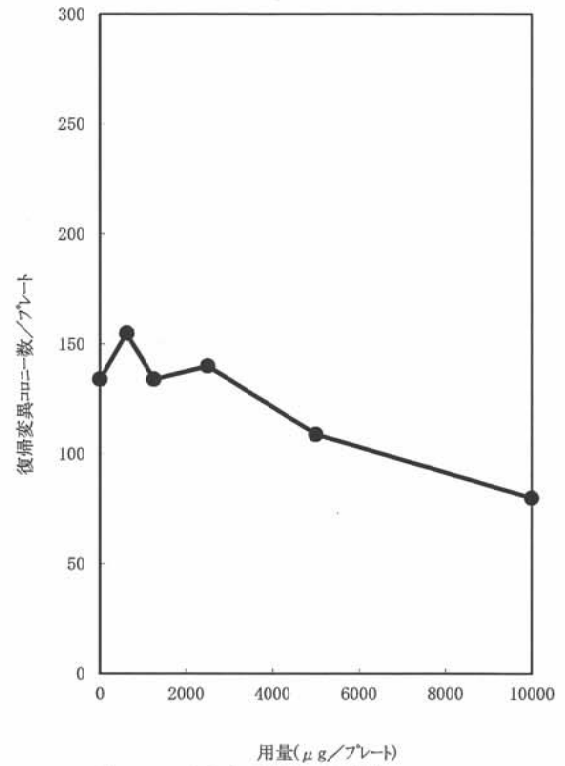


図-2 TA100における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)

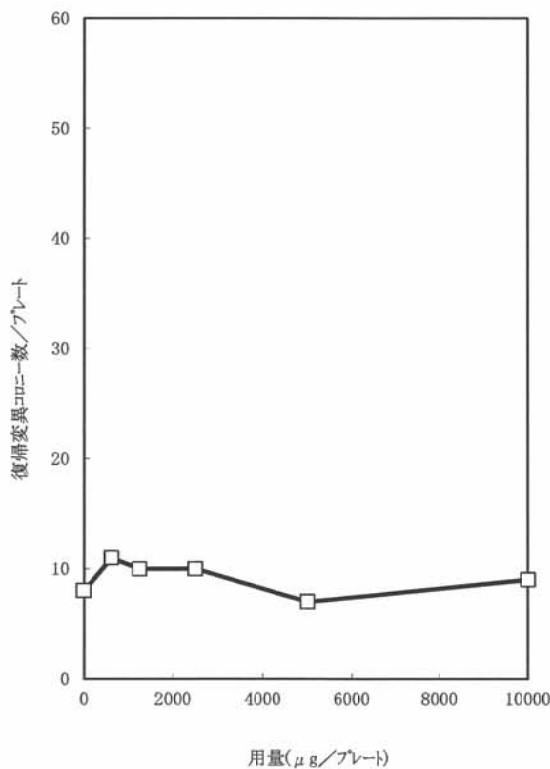


図-3 TA1535における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験)

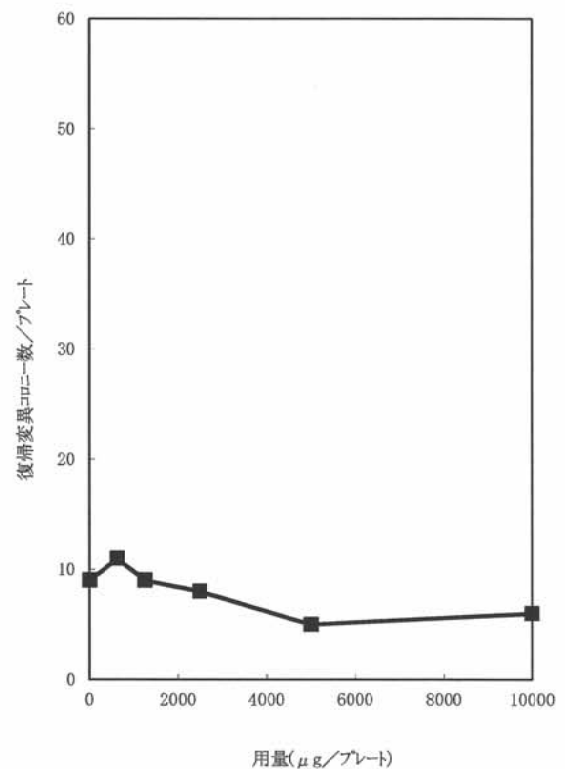


図-4 TA1535における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)

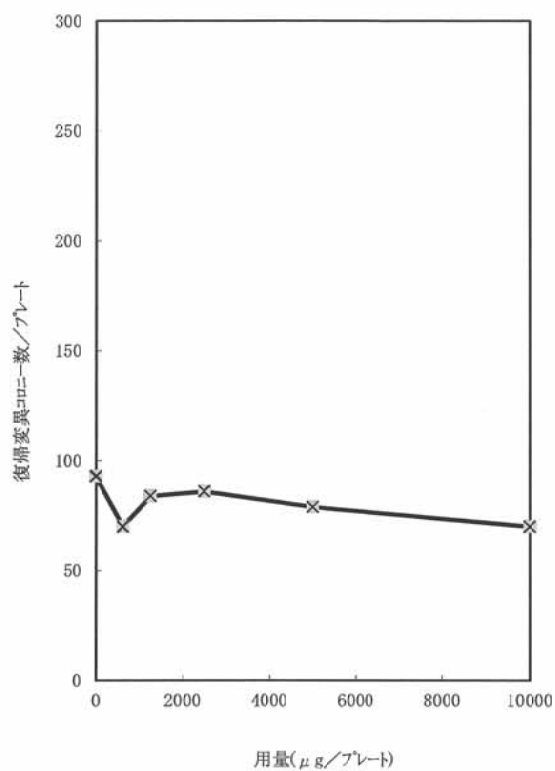


図-9 WP2 *uvrA*/pKM101における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験)

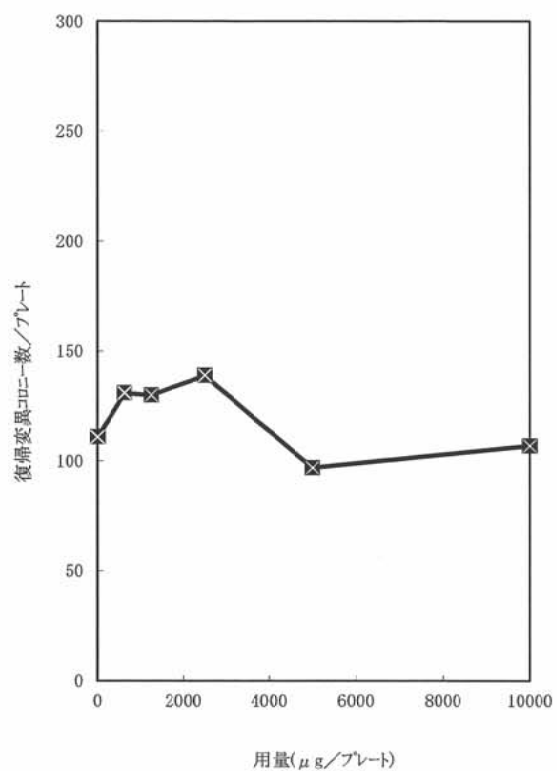


図-10 WP2 *uvrA*/pKM101における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)