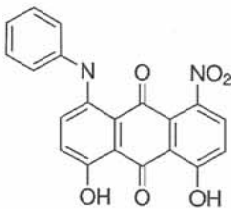


微生物を用いる変異原性試験結果報告書

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-77		
別 名	1,8-dihydroxy-4-nitro-5-(phenylamino) anthraquinone		
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.	B00197713
不純物の名称及び 含有率(濃度)	—		
C A S 番 号	20241-76-3	蒸 気 圧	—
分 子 量	376.32	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	—	—

*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		30分、	25°C	
	本試験		30分、	25°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	2.20	3.22	3.92	2.28	2.41
	本 試 験	2.21	3.21	4.08	2.64	2.42
測 定 方 法 (いずれかを○で囲むこと)		①. 0.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1日 製造
購入の場合の Lot No.	ANI330GD
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 °C
	時間	20 分
インキュベーション	温度	37 °C
	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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$より公比4の8用量で実施したところ、TA98、TA1537の直接法による場合及び代謝活性化法による場合とTA100の直接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に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、TA1537の直接法による場合及び代謝活性化法による場合と TA100の直接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、ディスパーズブルー-77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。被験物質による沈殿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	6373		
試験期間	2014年8月11日 ～ 2014年11月4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-77

試験実施期間		2014年 8月 19日から 2014年 8月 22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)	84	94	8	8	85	82	16	16	15	11
		102	121 (100)	10	14 (10)	82	83 (83)	13	24 (17)	17	17 (15)
	0.610	123	(110)	9	(9)	97	(102)	24	(19)	13	(11)
	2.44	119	(124)	15	(10)	93	(95)	29	(23)	17	(15)
	9.77	114	(107)	8	(9)	100	(93)	20	(22)	11	(13)
	39.1	128	(130)	10	(10)	89	(93)	23	(23)	16	(16)
	156	146	(144)	11	(11)	91	(91)	26	(29)	16	(15)
	625	142	(155)	7	(11)	89	(91)	32	(34)	29	(26)
	2500	164	(181)	14	(13)	92	(91)	44	(50)	23	(56)
	10000 †	183	(229)	10	(8)	100	(112)	60	(41)	59	(75)
	227	(229)	10	(8)	119	(118)	41	(41)	83	(75)	
S9 mix (+)	陰性対照 (溶媒対照)	117	128	6	8	87	98	17	15	10	9
		105	104 (114)	10	14 (10)	100	99 (96)	16	22 (18)	15	10 (11)
	0.610	130	(115)	15	(11)	99	(98)	26	(25)	15	(15)
	2.44	137	(119)	7	(9)	121	(117)	24	(26)	10	(14)
	9.77	131	(145)	11	(11)	105	(107)	23	(24)	17	(18)
	39.1	158	(140)	7	(8)	105	(106)	28	(29)	18	(18)
	156	151	(165)	15	(14)	130	(125)	36	(29)	23	(24)
	625	179	(213)	13	(13)	119	(146)	22	(49)	24	(30)
	2500	187	(186)	13	(10)	143	(173)	41	(56)	26	(50)
	10000 †	177	(196)	11	(9)	169	(179)	57	(41)	32	(56)
	194	(196)	9	(9)	176	(179)	55	(41)	68	(56)	
	179	(196)	9	(9)	180	(179)	34	(41)	57	(56)	
	212	(196)	8	(9)	178	(179)	47	(41)	54	(56)	
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	695	304	1113	428	768					
		707 (701)	314 (309)	1034 (1074)	396 (412)	878 (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	1425	261	979	418	222					
		1357 (1391)	250 (256)	997 (988)	434 (426)	234 (228)					

【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：ディスパーズブルー-77

試験実施期間		2014年 9月 2日から 2014年 9月 5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	119	16	13	104	111	18	18	14	8
		134	146 (134)	9	9 (12)	120	102 (109)	14	25 (19)	8	9 (10)
	39.1	129						32			
		141 (135)						31 (32)			
	78.1	134						28			
		133 (134)						21 (25)			
	156	141						39		17	
		129 (135)						38 (39)		18 (18)	
	313	150						32		25	
		141 (146)						38 (35)		22 (24)	
	625	143	7		115			45		31	
		152 (148)	6 (7)		117 (115)			46 (46)		23 (27)	
	1250	160	14		124			44		34	
		190 (175)	10 (12)		115 (120)			55 (50)		31 (33)	
	2500	170	15		129			47		45	
	191 (181)	14 (15)		128 (129)			54 (51)		46 (46)		
5000 †	209	10		127			42		38		
	215 (212)	9 (10)		123 (125)			62 (52)		55 (47)		
10000 †	270	18		113			50		63		
	268 (269)	13 (16)		121 (117)			42 (46)		67 (65)		
S9 mix (+)	陰性対照 (溶媒対照)	126	107	9	17	146	126	32	18	10	22
		106	105 (111)	10	10 (12)	124	114 (128)	26	20 (24)	23	13 (17)
	4.88									14	
										20 (17)	
	9.77									22	
										21 (22)	
	19.5									10	
										15 (13)	
	39.1	165						34		30	
		167 (166)						25 (30)		29 (30)	
	78.1	156						38		17	
		158 (157)						40 (39)		24 (21)	
	156	228			138			49		24	
		162 (195)			128 (133)			56 (53)		34 (29)	
	313	197			138			57		28	
	195 (196)			144 (141)			43 (50)		30 (29)		
625	191	13		167			45		36		
	229 (210)	8 (11)		134 (151)			61 (53)		25 (31)		
1250	218	15		156			67		43		
	207 (213)	16 (16)		129 (143)			74 (71)		44 (44)		
2500	202	13		160			61		47		
	202 (202)	11 (12)		195 (178)			51 (56)		37 (42)		
5000 †	196	6		159			53		39		
	212 (204)	8 (7)		181 (170)			48 (51)		47 (43)		
10000 †	197	11		158			52		73		
	211 (204)	11 (11)		195 (177)			47 (50)		71 (74)		
陽性対照	S9 mixを必要としないもの	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	753	346	993	539	610					
		691 (722)	350 (348)	920 (957)	584 (562)	555 (583)					
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	1350	259	889	521	253						
	1347 (1349)	245 (252)	807 (848)	532 (527)	255 (254)						

【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

表-3

試験結果表（比活性）

被験物質の名称：ディスパーズブルー-77

	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	1.29×10	10000	—	—
	TA1535	—	—	—	—
	WP2 <i>uvrA</i> / pKM101	—	—	—	—
	TA98	2.72×10	625	4.96×10	625
	TA1537	1.64×10	2500	8.33×10	156
本 試 験	TA100	1.35×10	10000	—	—
	TA1535	—	—	—	—
	WP2 <i>uvrA</i> / pKM101	—	—	—	—
	TA98	1.28×10^2	156	1.86×10^2	156
	TA1537	4.47×10	313	2.16×10	1250

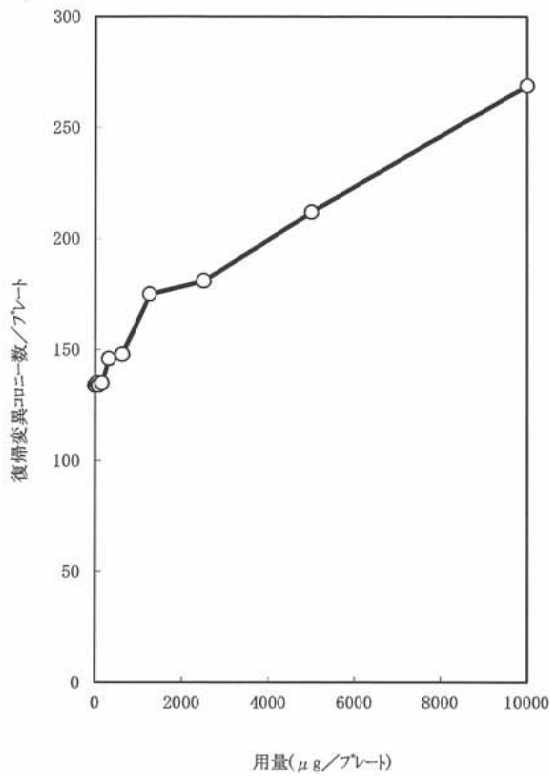


図-1 TA100における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験)

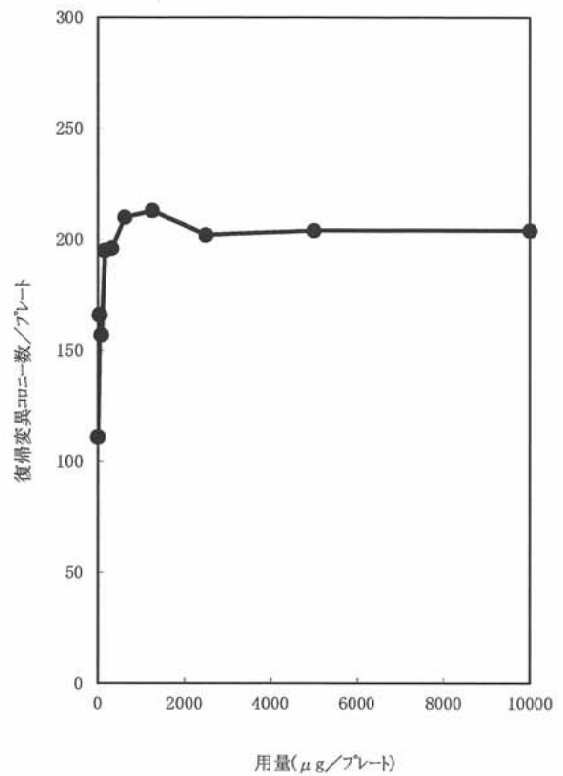


図-2 TA100における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)

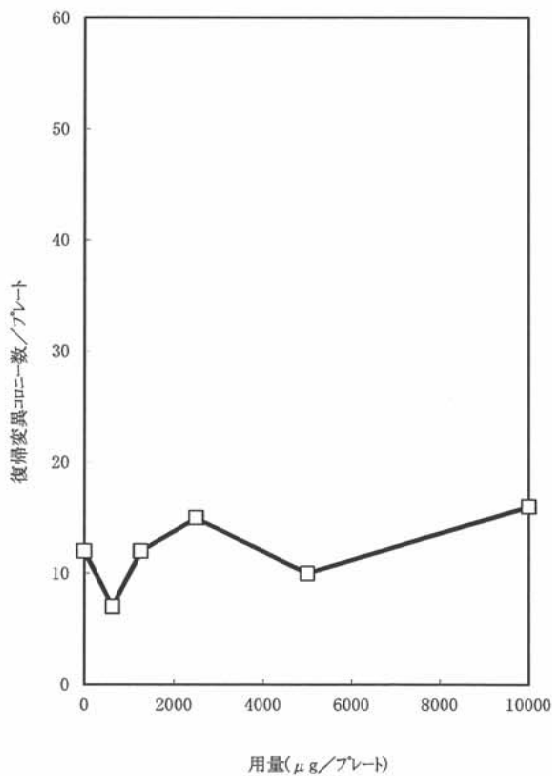


図-3 TA1535における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験)

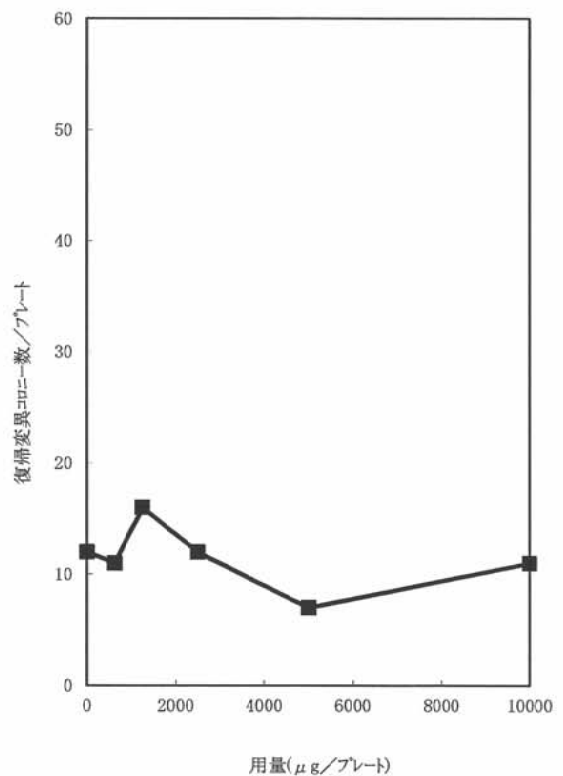


図-4 TA1535における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)

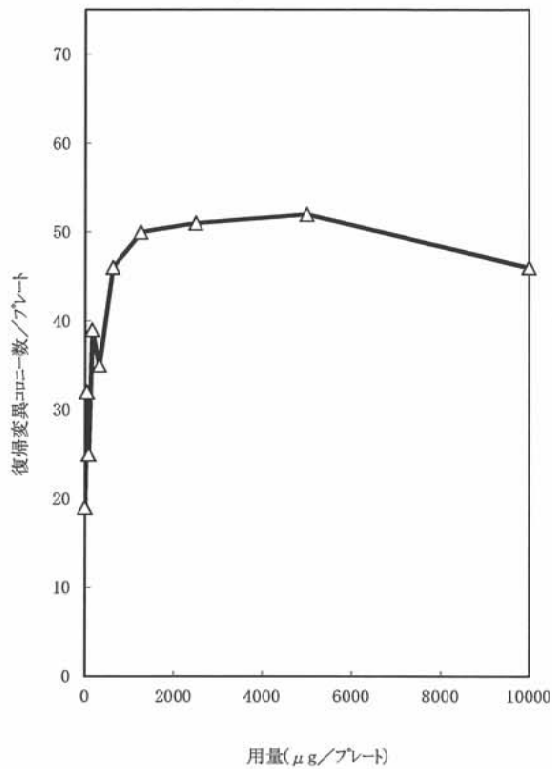


図-5 TA98における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験)

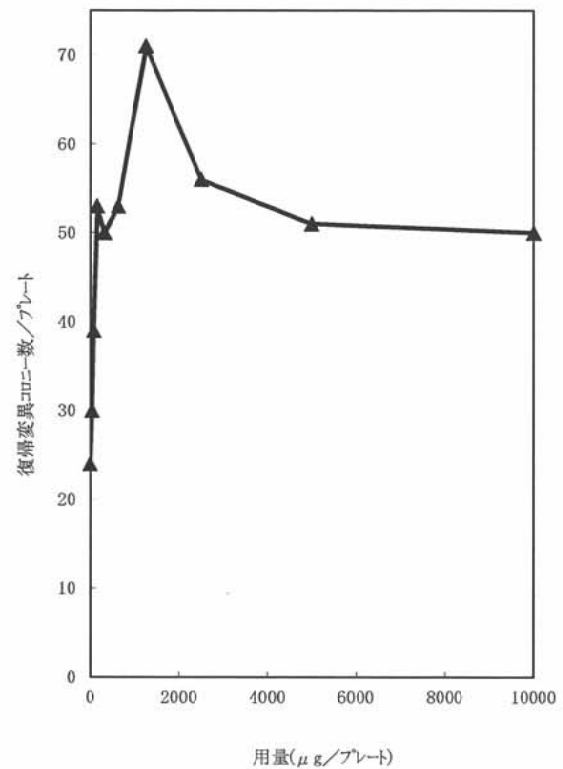


図-6 TA98における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)

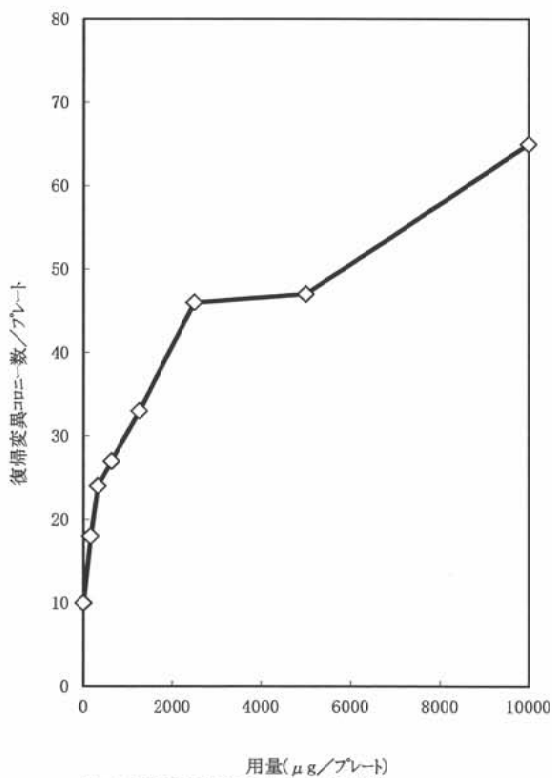


図-7 TA1537における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験)

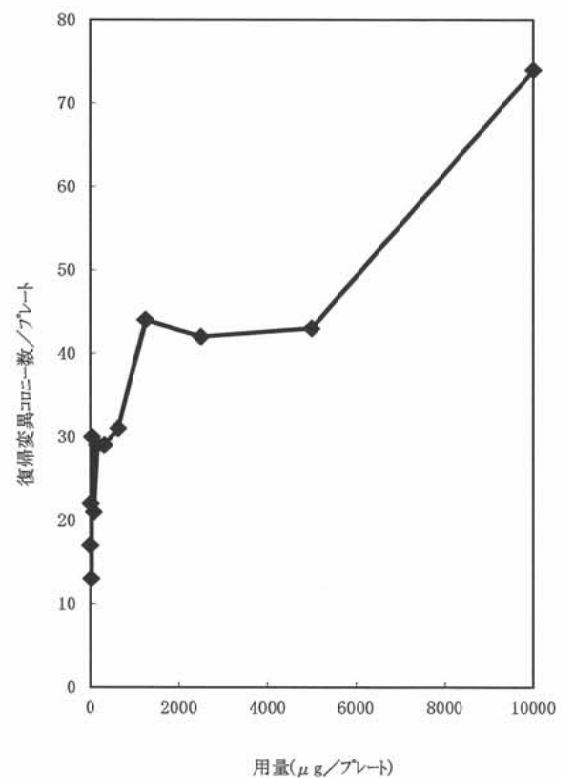


図-8 TA1537における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)

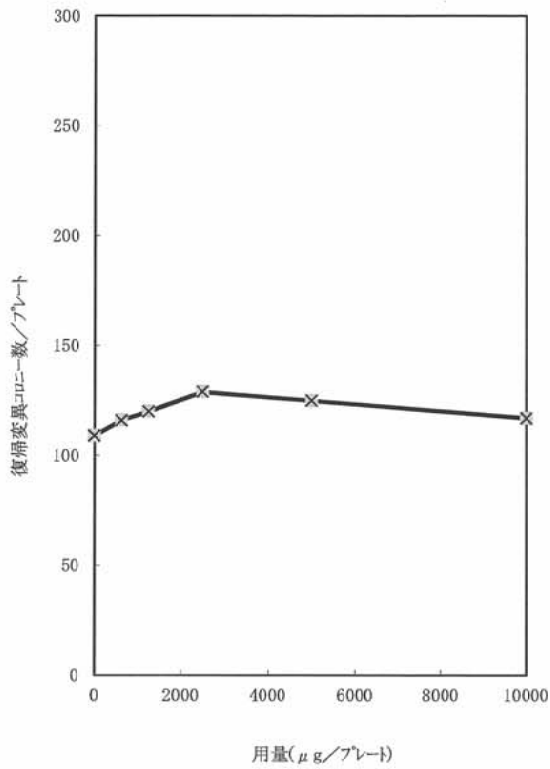


図-9 WP2uvrA/pKM101における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験)

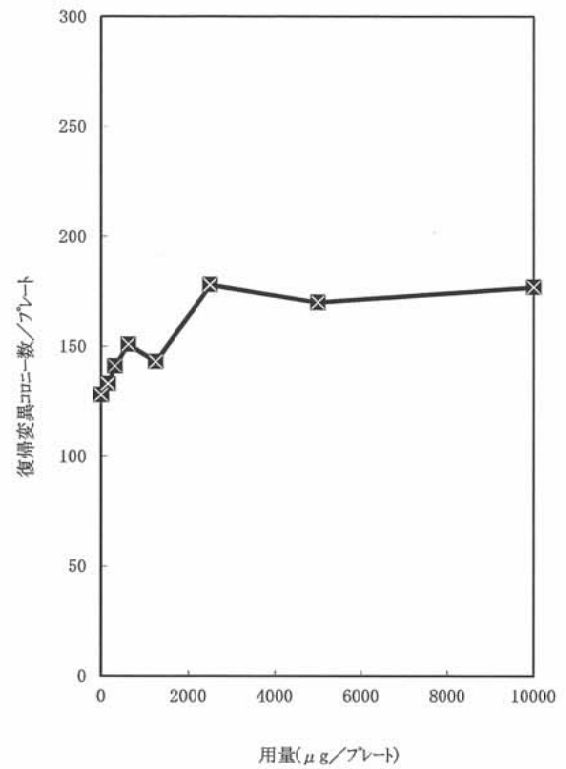


図-10 WP2uvrA/pKM101における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)