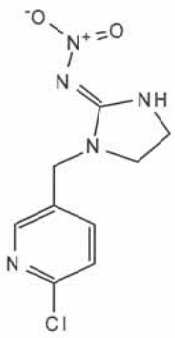


## 微生物を用いる変異原性試験結果報告書

## 1 一般的事項

化学物質の名称 (IUPAC命名法による)	1-[(6'-クロロ-3'-ピリジル)メチル]イミダゾリジン-2-(N-ニトロ)イミン		
別名	イミダクロプリド		
構造式又は示性式			
試験に供した 化学物質の純度	99.7%	試験に供した 化学物質の Lot No.	DCF1116
不純物の名称及び 含有率(濃度)	—		
C A S 番号	105827-78-9	蒸気圧	—
分子量	255.66	分配係数 (1-オクタノール/水分配係数)	—
融点	144.6°C		
沸点	—	常温における性状	白色結晶性粉末
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	難溶[50mg/ml未満]*	—
	DMSO	溶解[100mg/ml以上]*	—
供試元	和光純薬工業株式会社		

\*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 $\mu$ 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	被験物質の溶解度は、水に 50 mg/ml 未満であるが、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 本試験		30分、 40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	2.09	3.16	3.97	2.48	2.32
	本 試 験	2.18	3.08	3.83	2.56	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-リソ酸緩衝液(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 <span style="float: right; border: 1px solid black; border-radius: 50%; padding: 2px;">陰性</span>
<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5000 <math>\mu\text{g}/7^\circ\text{レ}</math>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>最高用量5000 <math>\mu\text{g}/7^\circ\text{レ}</math>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、1-[(6'-クロロ-3'-ピリジル)メチル]イミダゾリジン-2-(N-ニトロ)イミン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

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	6374		
試験期間	2014年8月28日 ~ 2014年11月13日		

表-1

試験結果表（用量設定試験）

被験物質の名称：1-[(6'-クロロ-3'-ピリジル)メチル]イミダゾリジン-2-(N-ニトロ)イミン

試験実施期間		2014年 9月 8日から 2014年 9月 11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)	117 101 106 102 ( 107 )	8 9 8 9 ( 9 )	72 91 87 92 ( 86 )	16 16 22 15 ( 17 )	10 7 7 10 ( 9 )			
	1.22	97 91 ( 94 )	3 3 ( 3 )	91 85 ( 88 )	28 11 ( 20 )	9 7 ( 8 )			
	4.88	111 85 ( 98 )	3 9 ( 6 )	93 89 ( 91 )	13 17 ( 15 )	9 10 ( 10 )			
	19.5	99 116 ( 108 )	9 8 ( 9 )	89 91 ( 90 )	24 14 ( 19 )	14 11 ( 13 )			
	78.1	109 96 ( 103 )	5 9 ( 7 )	81 104 ( 93 )	11 17 ( 14 )	7 9 ( 8 )			
	313	123 124 ( 124 )	9 7 ( 8 )	93 99 ( 96 )	11 25 ( 18 )	10 14 ( 12 )			
	1250	127 91 ( 109 )	7 7 ( 7 )	82 78 ( 80 )	17 16 ( 17 )	9 9 ( 9 )			
	5000	92 107 ( 100 )	8 7 ( 8 )	82 75 ( 79 )	13 17 ( 15 )	3 10 ( 7 )			
	S9 mix (+)	陰性対照 (溶媒対照)	114 104 104 124 ( 112 )	8 9 8 9 ( 9 )	109 116 112 82 ( 105 )	22 17 16 18 ( 18 )	14 15 13 11 ( 13 )		
		1.22	106 107 ( 107 )	6 10 ( 8 )	104 117 ( 111 )	28 26 ( 27 )	14 15 ( 15 )		
		4.88	122 116 ( 119 )	9 8 ( 9 )	109 81 ( 95 )	23 18 ( 21 )	13 9 ( 11 )		
		19.5	117 121 ( 119 )	11 9 ( 10 )	102 116 ( 109 )	18 22 ( 20 )	16 10 ( 13 )		
		78.1	91 106 ( 99 )	8 9 ( 9 )	115 119 ( 117 )	23 18 ( 21 )	18 7 ( 13 )		
		313	112 136 ( 124 )	5 7 ( 6 )	106 115 ( 111 )	21 17 ( 19 )	14 10 ( 12 )		
		1250	100 115 ( 108 )	11 7 ( 9 )	114 119 ( 117 )	16 17 ( 17 )	16 13 ( 15 )		
		5000	94 106 ( 100 )	8 9 ( 9 )	62 84 ( 73 )	15 18 ( 17 )	8 7 ( 8 )		
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 <sub>3</sub> 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		
対照	S9 mixを必要とするもの	コロニー数/プレート	670 644 ( 657 )	304 307 ( 306 )	984 690 ( 837 )	532 523 ( 528 )	487 501 ( 494 )		
		コロニー数/プレート	1437 1417 ( 1427 )	284 290 ( 287 )	784 885 ( 835 )	522 511 ( 517 )	214 192 ( 203 )		

【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. 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-〔6'-クロロ-3'-ピリジル〕メチル〕イミダゾリジン-2-(N-ニトロ)イミン

試験実施期間		2014年 9月 16日から 2014年 9月 19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)	90 96 89 113 ( 97 )	14 13 13 8 ( 12 )	67 86 67 68 ( 72 )	22 22 16 16 ( 19 )	9 11 10 7 ( 9 )					
	313	89 94 ( 92 )	3 11 ( 7 )	70 57 ( 64 )	20 17 ( 19 )	13 11 ( 12 )					
	625	87 100 ( 94 )	6 6 ( 6 )	56 68 ( 62 )	17 16 ( 17 )	13 9 ( 11 )					
	1250	105 93 ( 99 )	6 8 ( 7 )	63 63 ( 63 )	23 24 ( 24 )	8 13 ( 11 )					
	2500	90 107 ( 99 )	9 7 ( 8 )	55 79 ( 67 )	11 18 ( 15 )	11 11 ( 11 )					
	5000	102 91 ( 97 )	5 6 ( 6 )	52 54 ( 53 )	15 18 ( 17 )	6 9 ( 8 )					
	S9 mix (+)	陰性対照 (溶媒対照)	130 116 109 107 ( 116 )	11 9 9 11 ( 10 )	94 93 84 74 ( 86 )	24 25 29 17 ( 24 )	20 13 16 11 ( 15 )				
313	104 108 ( 106 )	7 10 ( 9 )	71 71 ( 71 )	17 23 ( 20 )	6 10 ( 8 )						
625	111 104 ( 108 )	3 6 ( 5 )	79 76 ( 78 )	15 22 ( 19 )	9 9 ( 9 )						
1250	117 104 ( 111 )	6 7 ( 7 )	69 75 ( 72 )	14 23 ( 19 )	9 9 ( 9 )						
2500	117 97 ( 107 )	3 10 ( 7 )	67 67 ( 67 )	26 29 ( 28 )	16 9 ( 13 )						
5000	93 98 ( 96 )	8 5 ( 7 )	61 69 ( 65 )	21 25 ( 23 )	13 6 ( 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 <sub>3</sub> 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				
陽性対照	S9 mixを必要とするもの	コロニー数/プレート	639 634 ( 637 )	319 341 ( 330 )	1069 664 ( 1017 )	538 537 ( 538 )	576 541 ( 559 )				
	S9 mixを必要とするもの	コロニー数/プレート	1390 1359 ( 1375 )	254 255 ( 255 )	786 798 ( 792 )	534 517 ( 526 )	274 226 ( 250 )				

【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。
- 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



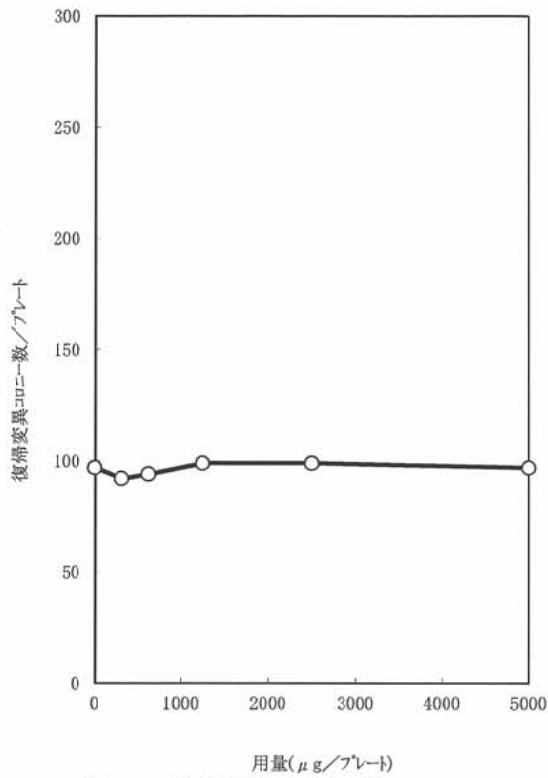


図-1 TA100における用量-反応曲線  
直接法による場合 (本試験)

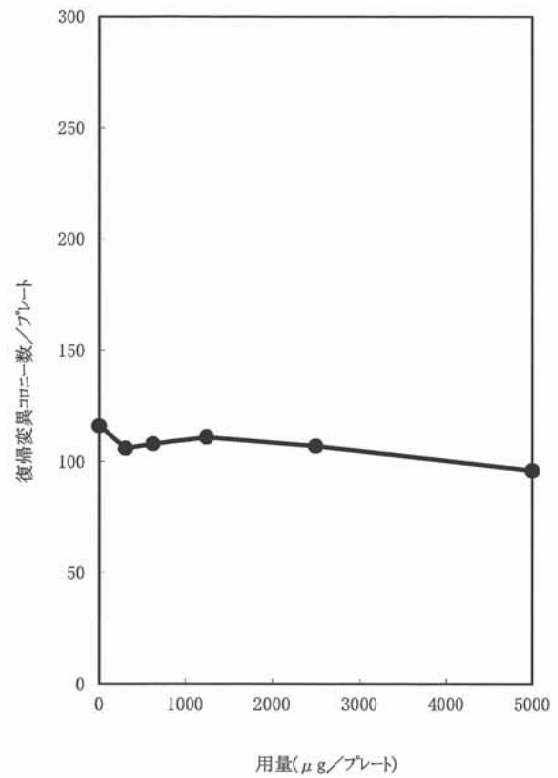


図-2 TA100における用量-反応曲線  
代謝活性化法による場合 (本試験)

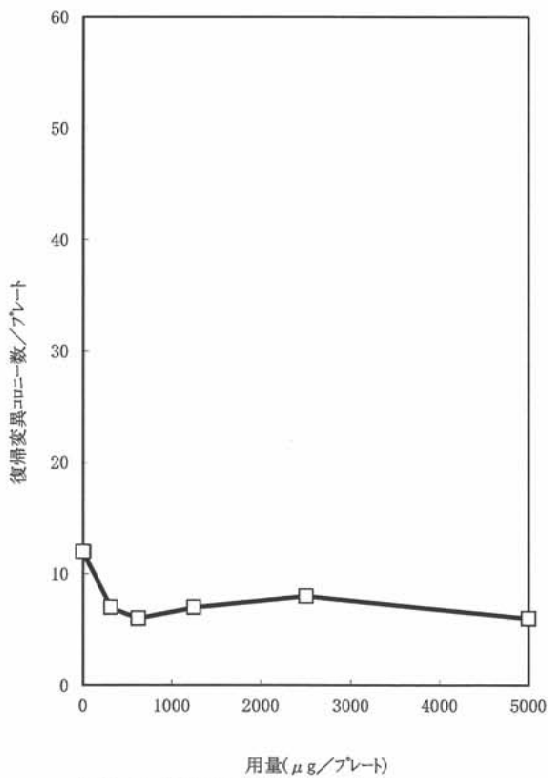


図-3 TA1535における用量-反応曲線  
直接法による場合 (本試験)

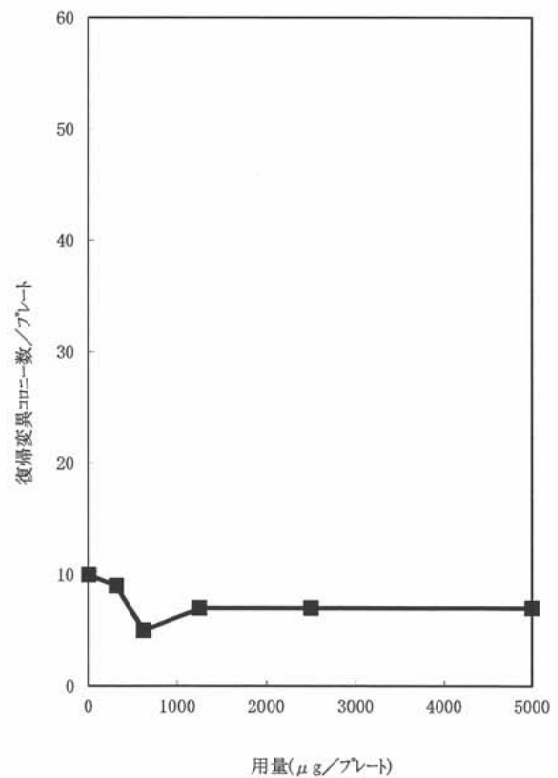


図-4 TA1535における用量-反応曲線  
代謝活性化法による場合 (本試験)

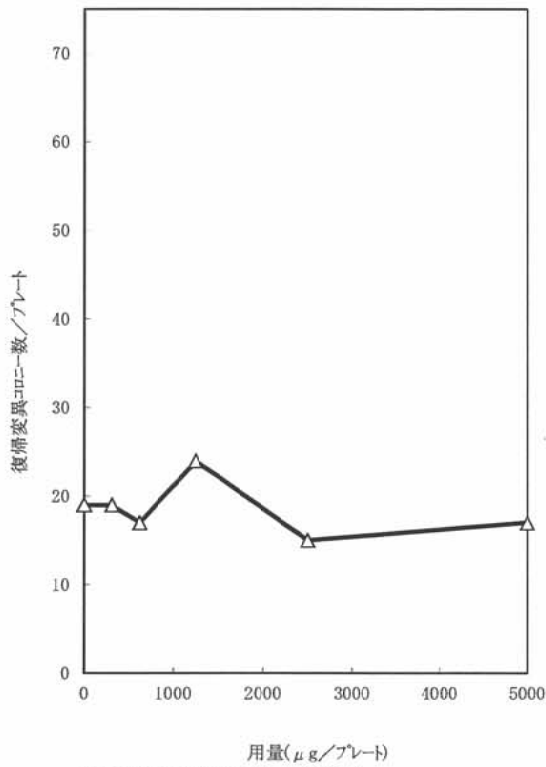


図-5 TA98における用量-反応曲線  
直接法による場合 (本試験)

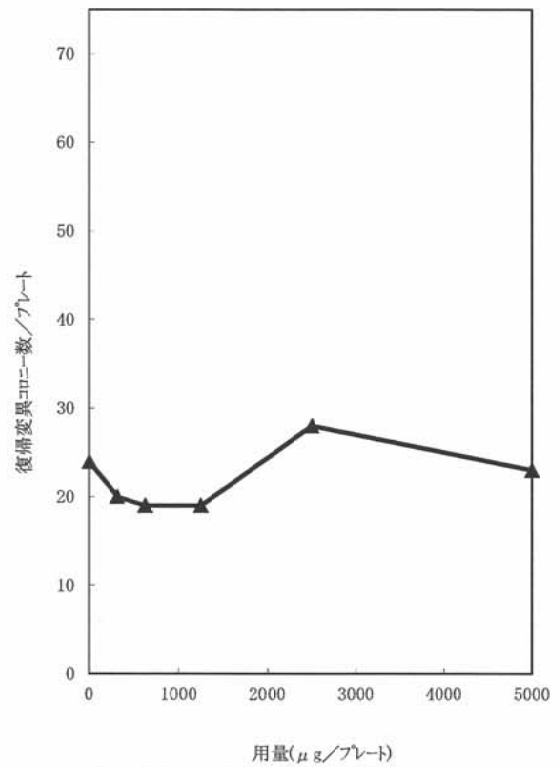


図-6 TA98における用量-反応曲線  
代謝活性化法による場合 (本試験)

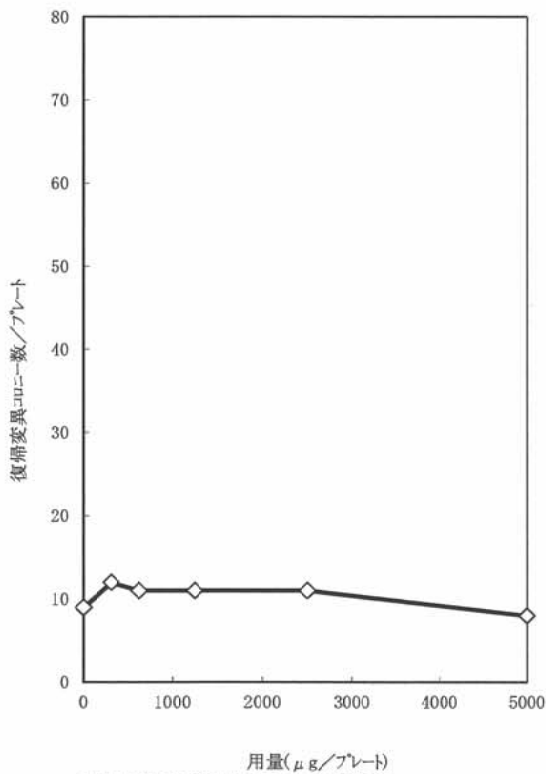


図-7 TA1537における用量-反応曲線  
直接法による場合 (本試験)

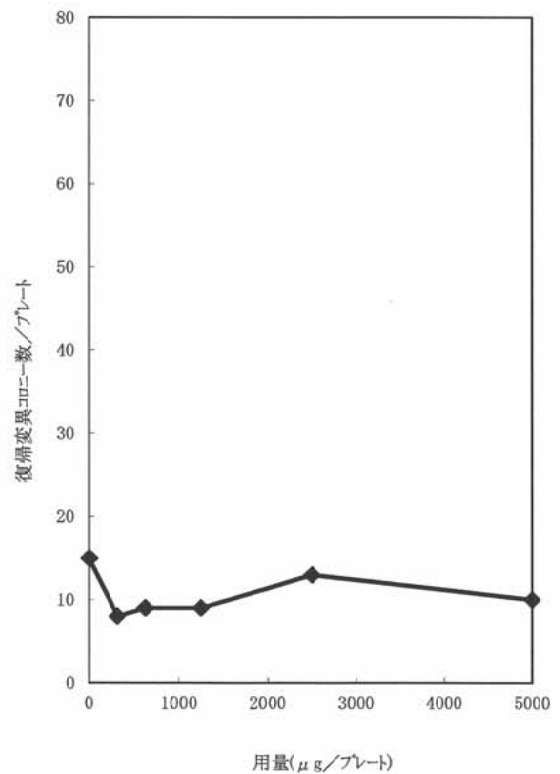


図-8 TA1537における用量-反応曲線  
代謝活性化法による場合 (本試験)

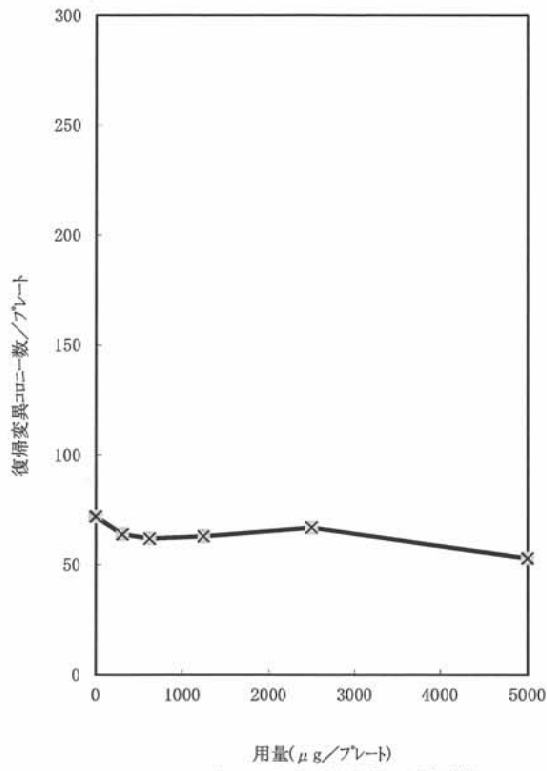


図-9 WP2 *uvrA*/pKM101における用量-反応曲線  
直接法による場合 (本試験)

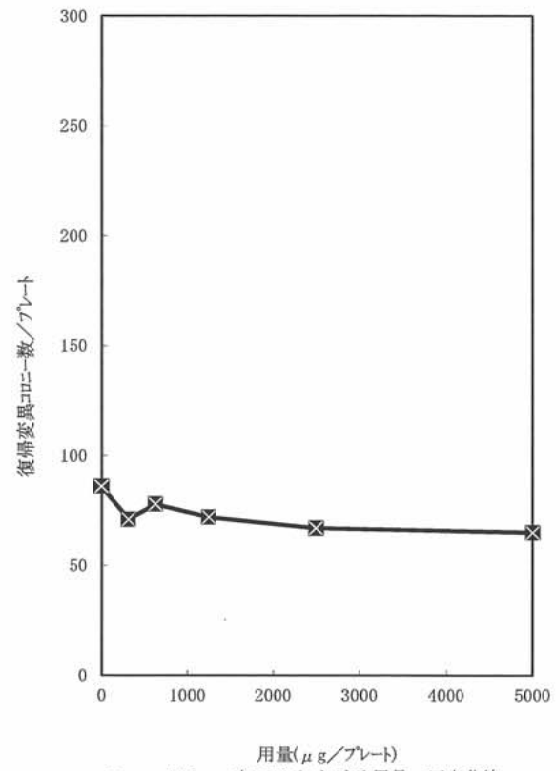


図-10 WP2 *uvrA*/pKM101における用量-反応曲線  
代謝活性化法による場合 (本試験)