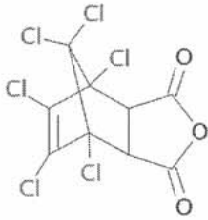


微生物を用いる変異原性試験結果報告書

1 一般的事項

化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	1, 4, 5, 6, 7, 7-ヘキサクロロビシクロ [2, 2, 1] -5-ヘブテン-2, 3-ジカルボン酸無水物		
別 名	4, 5, 6, 7, 8, 8-hexachloro-3a, 4, 7, 7a-tetrahydro-4, 7-methano-2-benzofuran-1, 3-dione、ヘット酸無水物		
構造式又は示性式			
試験に供した化学物質の純度	96.4%	試験に供した化学物質の Lot No.	HZZYE-ML
不純物の名称及び含有率(濃度)	—		
C A S 番号	115-27-5	蒸 気 圧	—
分 子 量	370.83	分 配 係 数 (1-オクタノール/水分配係数)	—
融 点	238°C		
沸 点	—	常温における性状	白色～ほとんど白色の結晶～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]*	—

*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 7月 11日 製造
購入の場合のLot No.	RAA201407A
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	198~239 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 (%)
	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	30分、	25℃		
	本試験	1時間 10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	2.12	3.13	4.15	2.54	2.37
	本 試 験	2.22	3.35	3.90	2.56	2.45
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5000 μg/7° 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>最高用量5000 μg/7° レートから公比2の7または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, 4, 5, 6, 7, 7-ヘキサクロロビシクロ [2, 2, 1] -5-ヘプテン-2, 3-ジカルボン酸無水物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	6377		
試験期間	2014年9月9日 ～ 2014年12月17日		

表-1

試験結果表（用量設定試験）

被験物質の名称：1, 4, 5, 6, 7, 7-ヘキサクロロピシクロ[2, 2, 1]-5-ヘプテン-2, 3-ジカルボン酸無水物

試験実施期間		2014年 10月 7日から 2014年 10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)	109 100 98 116 (106)	7 7 15 8 (9)	116 113 114 107 (113)	16 15 20 14 (16)	15 15 14 15 (15)		
	1.22	94 122 (108)	8 9 (9)	101 107 (104)	13 21 (17)	11 13 (12)		
	4.88	92 123 (108)	3 6 (5)	105 94 (100)	16 23 (20)	13 17 (15)		
	19.5	113 99 (106)	8 2 (5)	126 104 (115)	15 16 (16)	14 7 (11)		
	78.1	106 109 (108)	6 2 (4)	130 117 (124)	15 15 (15)	18 16 (17)		
	313	107 104 (106)	11 8 (10)	104 112 (108)	17 11 (14)	10 15 (13)		
	1250	106 90 (98)	5 8 (7)	119 113 (116)	10 14 (12)	13 10 (12)		
	5000	0* 0* (0*)	1* 7* (4*)	109 109 (109)	0* 0* (0*)	10* 13* (12*)		
	S9 mix (+)	陰性対照 (溶媒対照)	117 113 87 115 (108)	9 7 7 7 (8)	122 129 120 139 (128)	21 25 21 18 (22)	16 24 18 15 (18)	
1.22		130 109 (120)	8 2 (5)	143 162 (153)	16 13 (15)	17 20 (19)		
4.88		124 111 (118)	9 9 (9)	153 145 (149)	23 17 (20)	18 16 (17)		
19.5		114 102 (108)	6 2 (4)	143 145 (144)	16 20 (18)	20 17 (19)		
78.1		137 105 (121)	8 5 (7)	158 143 (151)	22 17 (20)	17 21 (19)		
313		115 142 (129)	7 10 (9)	152 143 (148)	26 23 (25)	15 21 (18)		
1250		100 133 (117)	8 11 (10)	141 120 (131)	22 20 (21)	16 16 (16)		
5000		86* 98* (92*)	7* 7* (7*)	123 121 (122)	18* 14* (15*)	13* 9* (11*)		
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	708 671 (690)	338 354 (346)	1140 1087 (1114)	475 508 (492)	658 636 (647)		
	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	1374 1303 (1339)	265 293 (279)	788 776 (782)	478 560 (519)	261 227 (244)			

【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：1, 4, 5, 6, 7, 7-ヘキサクロロピシクロ[2, 2, 1]-5-ヘプテン-2, 3-ジカルボン酸無水物

試験実施期間		2014年 10月 14日から 2014年 10月 17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)	94 98 100 87 (95)	17 8 13 13 (13)	90 101 105 91 (97)	22 20 15 17 (19)	9 13 11 9 (11)		
	78.1	109 119 (114)	5 11 (8)	/	21 14 (18)	9 13 (11)		
	156	100 94 (97)	10 9 (10)	/	16 22 (19)	8 11 (10)		
	313	79 96 (88)	9 14 (12)	86 72 (79)	14 13 (14)	10 15 (13)		
	625	111 106 (109)	13 13 (13)	77 86 (82)	23 24 (24)	7 13 (10)		
	1250	117 93 (105)	11 6 (9)	76 78 (77)	18 11 (15)	9 8 (9)		
	2500	126 101 (114)	14 10 (12)	75 82 (79)	21 13 (17)	8 14 (11)		
	5000	91* 113* (102*)	6* 9* (8*)	83 84 (84)	23* 23* (23*)	7* 7* (7*)		
	S9 mix (+)	陰性対照 (溶媒対照)	123 107 79 102 (103)	14 10 11 7 (11)	107 107 87 92 (98)	29 15 24 23 (23)	11 14 14 13 (13)	
		78.1	101 113 (107)	14 13 (14)	/	22 22 (22)	9 14 (12)	
156		101 133 (117)	14 8 (11)	/	28 25 (27)	16 10 (13)		
313		136 121 (129)	8 10 (9)	113 94 (104)	37 24 (31)	9 17 (13)		
625		113 106 (110)	11 10 (11)	126 94 (110)	24 16 (20)	9 8 (9)		
1250		117 105 (111)	16 13 (15)	98 89 (94)	28 32 (30)	8 11 (10)		
2500		104 134 (119)	7 9 (8)	108 117 (113)	28 17 (23)	15 11 (13)		
5000		100* 68* (84*)	6* 9* (8*)	112 112 (112)	18* 21* (20*)	7* 14* (11*)		
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
	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	

【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

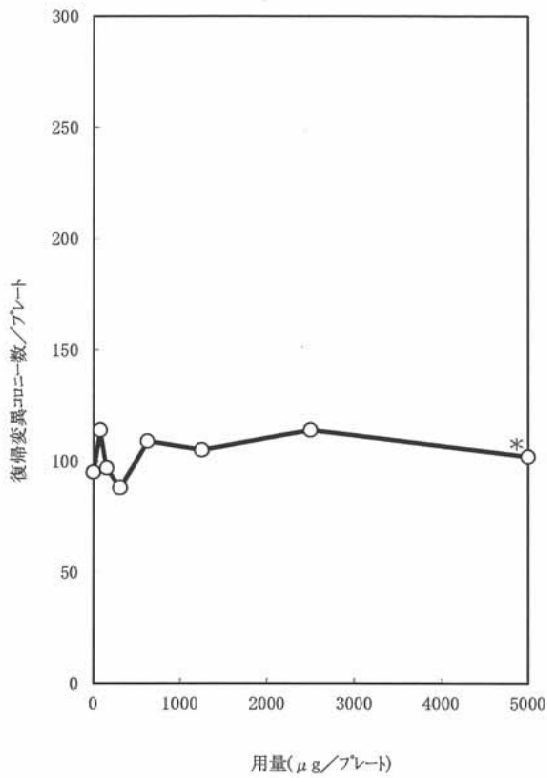


図-1 TA100における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験)

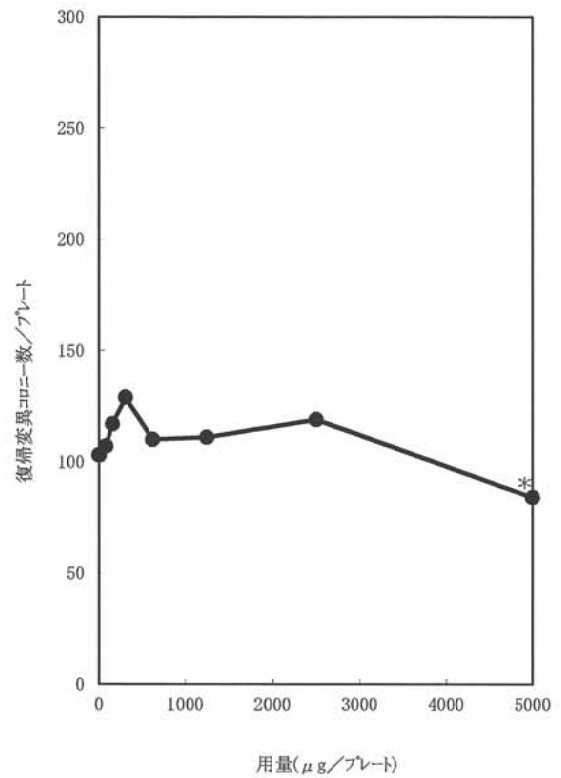


図-2 TA100における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)

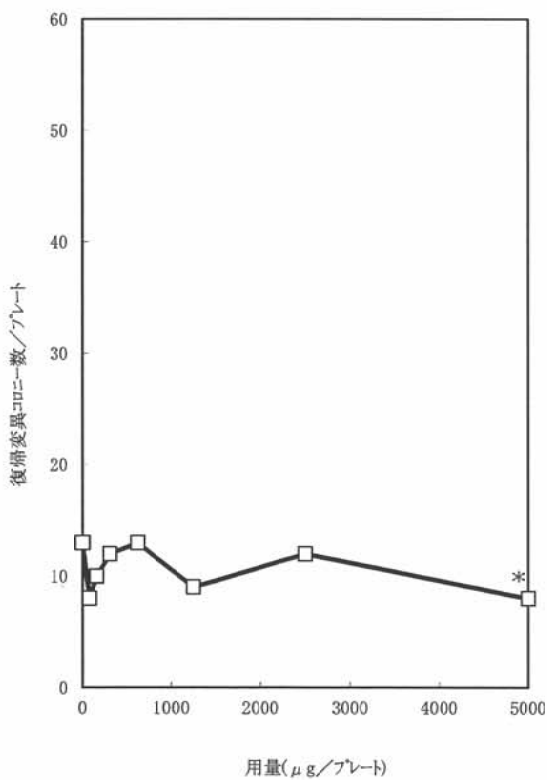


図-3 TA1535における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験)

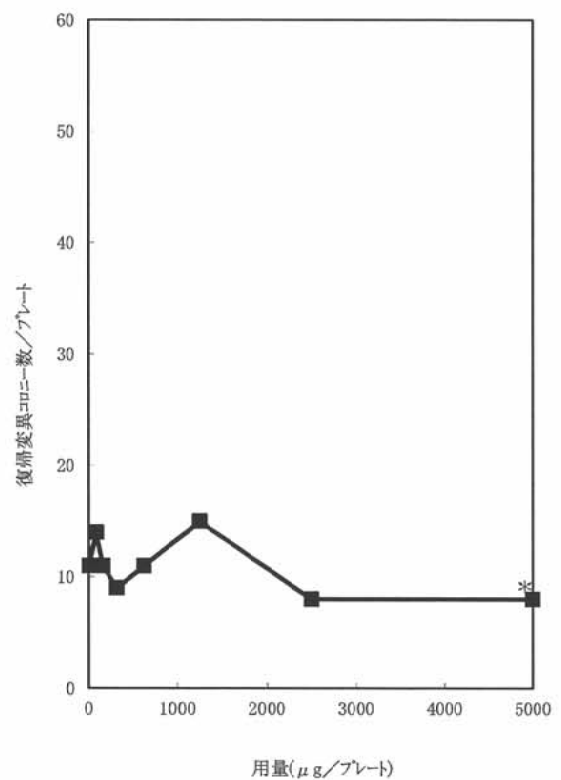


図-4 TA1535における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)

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。

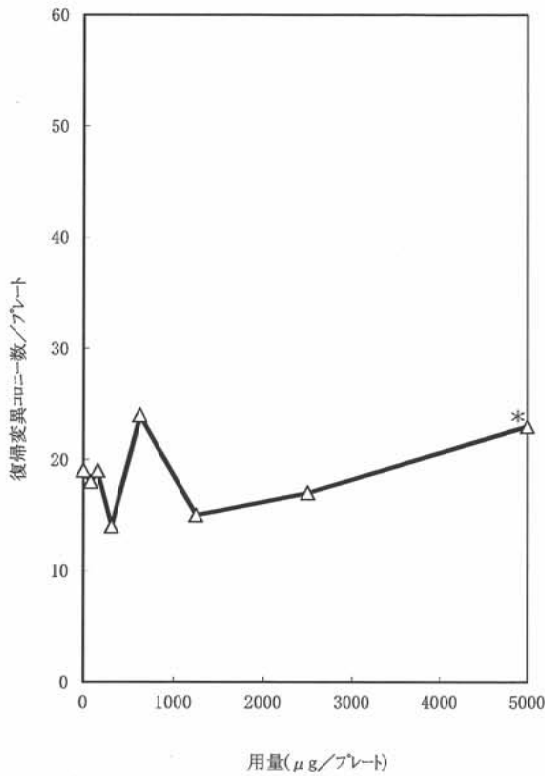


図-5 TA98における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験)

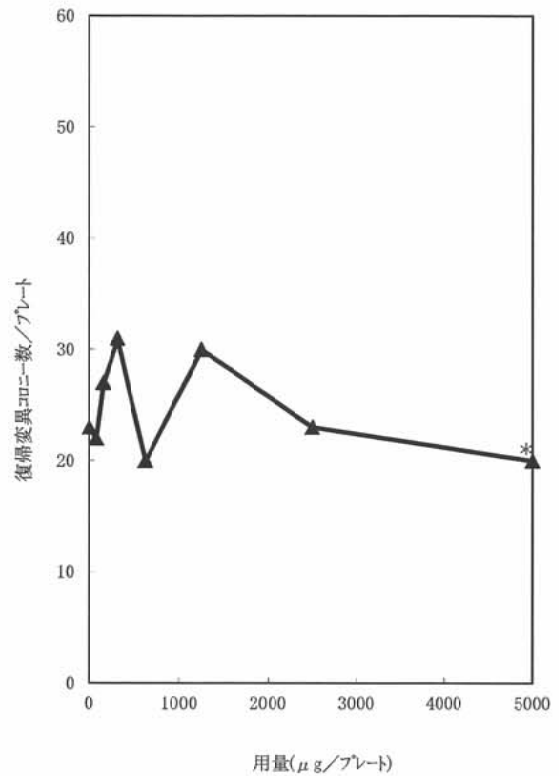


図-6 TA98における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)

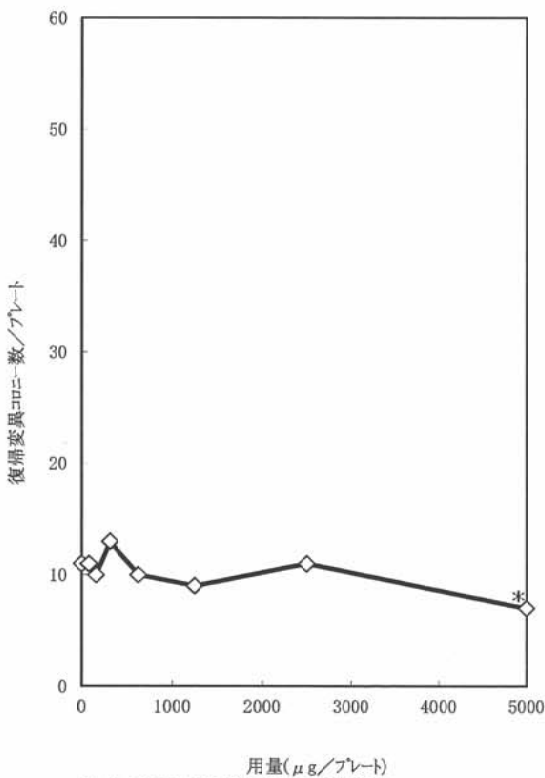


図-7 TA1537における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験)

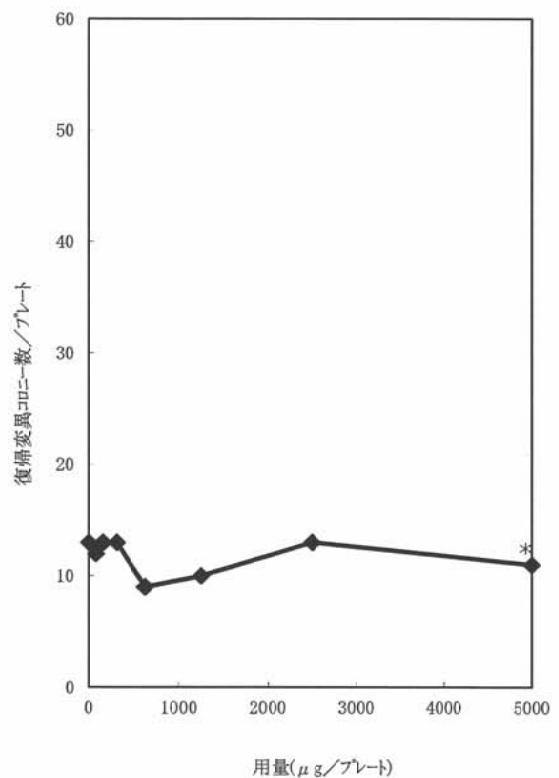


図-8 TA1537における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)

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。

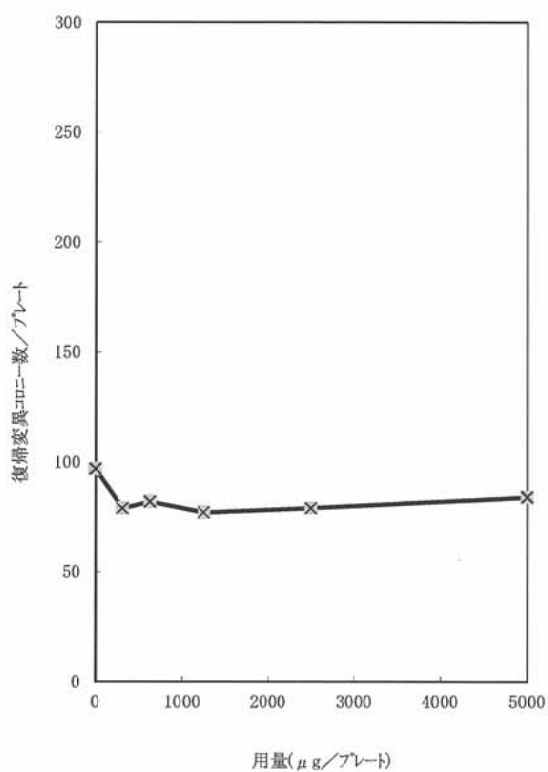


図-9 WP2uvrA/pKM101における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験)

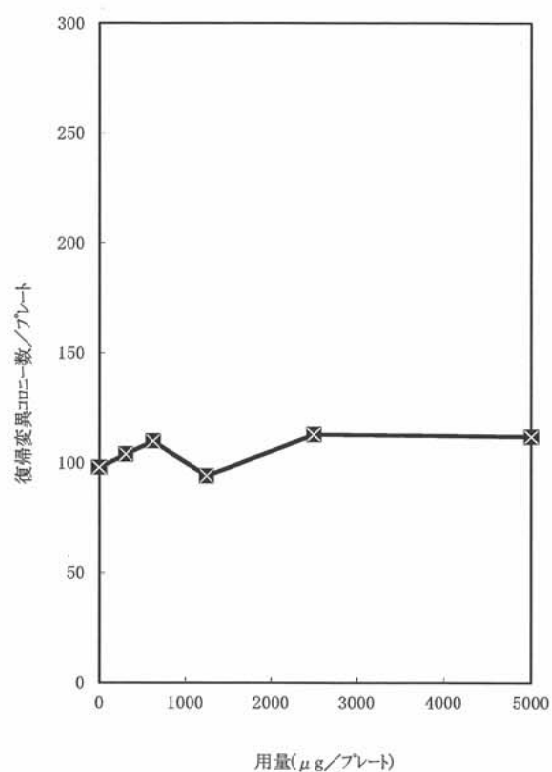


図-10 WP2uvrA/pKM101における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)