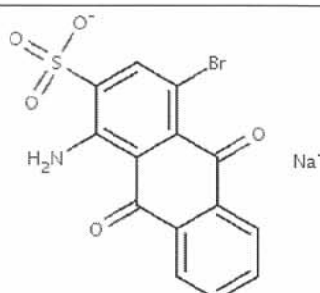


## 微生物を用いる変異原性試験結果報告書

## 1 一般的事項

化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	1-アミノ-4-ブロモアントラキノ-2-スルホン酸ナトリウム		
別名	Sodium 1-amino-4-bromoanthraquinone-2-sulfonate		
構造式又は示性式			
試験に供した 化学物質の純度	96.1%	試験に供した 化学物質の Lot No.	GJ01-PMEB
不純物の名称及び 含有率(濃度)	—		
C A S 番号	6258-06-6	蒸気圧	—
分子量	405.18	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	黄赤色～濃赤色の結晶～ 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 $\mu$ 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.	SHBF0107V	anhydrous	99.99
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 $\mu$ l にした場合に 5000 $\mu$ g 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	50分、	25°C		
	本試験	50分、	25°C		
	本試験-2	50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 $\mu$ 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	2.17	3.25	3.93	2.51	2.37
	本 試 験	2.34	3.48	4.22	2.71	2.48
	本 試 験 - 2	-	3.45	-	-	2.56
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	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、本試験-2の結果を表-3及び図-11～12に示した。変異原性の強さを比活性としてまとめ、表-4に示した。</p> <p>用量設定試験を最高用量5000 <math>\mu</math>g/プレートより公比4の7用量で実施したところ、TA98、TA100の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みられた。</p> <p>用量反応関係が得られるように用量を設定して本試験を実施したところ、TA98、TA100、TA1535、TA1537の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みられた。</p> <p>本試験において TA1535、TA1537の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みられたため、結果の再現性を確認するため本試験-2を実施したところ、TA1537の代謝活性化法による場合に本試験同様に陰性対照値の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、1-アミノ-4-ブロモアントラキノ-2-スルホン酸ナトリウム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

被験物質の沈澱が著しいプレートにマニュアルカウントを実施した。



表-1

試験結果表（用量設定試験）

被験物質の名称：1-アミノ-4-プロモアントラキノン-2-スルホン酸ナトリウム

試験実施期間		2014年 10月 21日から 2014年 10月 24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)	107	99	7	11	84	107	25	21	9	16
		119	97 ( 106 )	13	9 ( 10 )	87	99 ( 94 )	18	17 ( 20 )	10	10 ( 11 )
	1.22	123	( 128 )	6	( 8 )	108	( 100 )	15	( 18 )	9	( 10 )
	4.88	151	( 124 )	11	( 11 )	85	( 85 )	21	( 19 )	11	( 11 )
	19.5	124	( 118 )	8	( 6 )	93	( 104 )	17	( 22 )	8	( 9 )
	73.1	130	( 123 )	5	( 6 )	122	( 106 )	21	( 19 )	13	( 12 )
	313	129	( 126 )	6	( 7 )	98	( 101 )	16	( 16 )	13	( 11 )
	1250	121	( 114 )	9	( 7 )	117	( 115 )	11	( 15 )	11	( 11 )
	5000 †	146	( 138 )	8	( 10 )	109	( 105 )	25	( 24 )	15	( 12 )
		130	( 126 )	12	( 8 )	103	( 106 )	22	( 24 )	9	( 12 )
S9 mix (+)	陰性対照 (溶媒対照)	130	116	8	8	129	114	20	24	14	15
		130	127 ( 126 )	7	7 ( 8 )	130	115 ( 122 )	29	29 ( 26 )	14	13 ( 14 )
	1.22	136	( 124 )	9	( 8 )	136	( 136 )	15	( 23 )	9	( 11 )
	4.88	121	( 126 )	6	( 7 )	160	( 155 )	24	( 25 )	11	( 11 )
	19.5	148	( 128 )	8	( 13 )	123	( 124 )	31	( 33 )	15	( 17 )
	78.1	130	( 143 )	9	( 10 )	141	( 141 )	26	( 31 )	25	( 18 )
	313	266	( 292 )	8	( 13 )	149	( 182 )	286	( 221 )	25	( 23 )
	1250	579	( 635 )	14	( 12 )	144	( 141 )	63	( 73 )	18	( 17 )
	5000	133	( 125 )	9	( 10 )	117	( 115 )	22	( 22 )	13	( 18 )
		117	( 125 )	10	( 10 )	115	( 115 )	22	( 22 )	22	( 18 )
陽性対照	S9 mixを必要とするもの	名称	AF-2	NaN <sub>3</sub>	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	795	353	1203	454	839					
		784 ( 790 )	383 ( 368 )	1165 ( 1184 )	531 ( 493 )	803 ( 821 )					
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	1440	273	872	512	241					
		1377 ( 1409 )	303 ( 288 )	798 ( 835 )	533 ( 523 )	236 ( 239 )					

【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。
- 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。
- 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

表-2

試験結果表（本試験）

被験物質の名称：1-アミノ-4-プロモアントラキノ-2-スルホン酸ナトリウム

試験実施期間		2014年 10月 28日から 2014年 10月 31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)	119 127 127 101 ( 119 )	9 9 14 9 ( 10 )	100 115 97 97 ( 102 )	17 14 15 15 ( 15 )	11 14 11 10 ( 12 )	
	313	104 90 ( 97 )	9 13 ( 11 )	108 113 ( 111 )	17 11 ( 14 )	13 8 ( 11 )	
	625	121 113 ( 117 )	11 10 ( 11 )	129 82 ( 106 )	18 22 ( 20 )	11 10 ( 11 )	
	1250	102 126 ( 114 )	9 8 ( 9 )	129 94 ( 112 )	13 16 ( 15 )	10 14 ( 12 )	
	2500	116 121 ( 119 )	5 9 ( 7 )	90 109 ( 100 )	18 18 ( 18 )	13 13 ( 13 )	
	5000 †	148 109 ( 129 )	10 9 ( 10 )	99 94 ( 97 )	16 11 ( 14 )	7 16 ( 12 )	
	S9 mix (+)	陰性対照 (溶媒対照)	116 116 127 141 ( 125 )	8 10 11 11 ( 10 )	127 135 136 138 ( 134 )	30 31 24 24 ( 27 )	16 13 14 11 ( 14 )
39.1	173 159 ( 166 )	/	/	31 29 ( 30 )	/		
78.1	177 162 ( 170 )	/	/	21 53 ( 37 )	/		
156	218 440 ( 329 )	/	/	22 39 ( 31 )	/		
313	531 958 ( 745 )	22 21 ( 22 )	190 232 ( 211 )	290 128 ( 209 )	30 34 ( 32 )		
625	2284 2098 ( 2191 )	23 16 ( 20 )	170 236 ( 203 )	319 145 ( 232 )	52 61 ( 57 )		
1250	377 739 ( 558 )	13 11 ( 12 )	158 157 ( 158 )	57 62 ( 60 )	32 20 ( 26 )		
2500	227 195 ( 211 )	10 13 ( 12 )	149 149 ( 149 )	25 18 ( 22 )	17 13 ( 15 )		
5000	137 138 ( 138 )	5 13 ( 9 )	152 142 ( 147 )	14 28 ( 21 )	21 8 ( 15 )		
陽性対照	S9 mixを必要とするもの	名称 AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2	9-AA	
	用量(μg/プレート)	0.01	0.5	0.005	0.1	80	
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	1435 1438 ( 1487 )	314 313 ( 314 )	801 812 ( 807 )	531 523 ( 527 )	267 249 ( 258 )

【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. 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。
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、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-3

試験結果表（本試験-2）

被験物質の名称：1-アミノ-4-ブロモアントラキノン-2-スルホン酸ナトリウム

試験実施期間		2014年 11月 4日から 2014年 11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)	/	16 7 11 10 ( 11 )	/	/	10 8 9 11 ( 10 )		
	陰性対照(溶媒対照)	/	9 9 10 10 ( 10 )	/	/	14 21 11 10 ( 14 )		
S9 mix (+)	39.1	/	11 8 ( 10 )	/	/	14 18 ( 16 )		
	78.1	/	11 13 ( 12 )	/	/	20 21 ( 21 )		
	156	/	14 9 ( 12 )	/	/	25 22 ( 24 )		
	313	/	10 14 ( 12 )	/	/	39 24 ( 32 )		
	625	/	9 14 ( 12 )	/	/	16 34 ( 25 )		
	1250	/	17 9 ( 13 )	/	/	28 31 ( 30 )		
	2500	/	10 14 ( 12 )	/	/	13 17 ( 15 )		
	5000	/	18 7 ( 13 )	/	/	10 8 ( 9 )		
	陽性対照	S9 mixを必要とするもの	名称	AF-2	NaN <sub>3</sub>	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		/	325 317 ( 321 )	/	/	690 581 ( 636 )		
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	/	329 305 ( 317 )	/	/	271 247 ( 259 )			

【備考】

1. 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。
2. 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-4

## 試験結果表（比活性）

被験物質の名称：1-アミノ-4-ブロモアントラキノン-2-スルホン酸ナトリウム

	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	$\mu\text{g}$ /プレート	Rev./mg	$\mu\text{g}$ /プレート
用量設定試験	TA100	—	—	$5.30 \times 10^2$	313
	TA1535	—	—	—	—
	WP2 <i>uvrA</i> / pKM101	—	—	—	—
	TA98	—	—	$6.23 \times 10^2$	313
	TA1537	—	—	—	—
本試験	TA100	—	—	$3.31 \times 10^3$	625
	TA1535	—	—	$3.83 \times 10$	313
	WP2 <i>uvrA</i> / pKM101	—	—	—	—
	TA98	—	—	$5.81 \times 10^2$	313
	TA1537	—	—	$6.88 \times 10$	625
本試験 1 2	TA100	/	/	/	/
	TA1535	/	/	—	—
	WP2 <i>uvrA</i> / pKM101	/	/	/	/
	TA98	/	/	/	/
	TA1537	/	/	$5.75 \times 10$	313

(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し、斜線(/)は当該菌株について試験を実施しなかったことを示す。

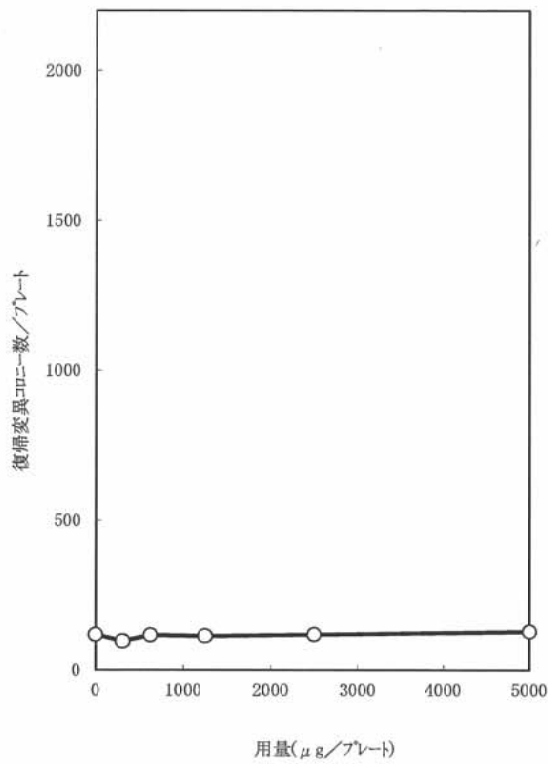


図-1 TA100における用量-反応曲線  
直接法による場合 (本試験)

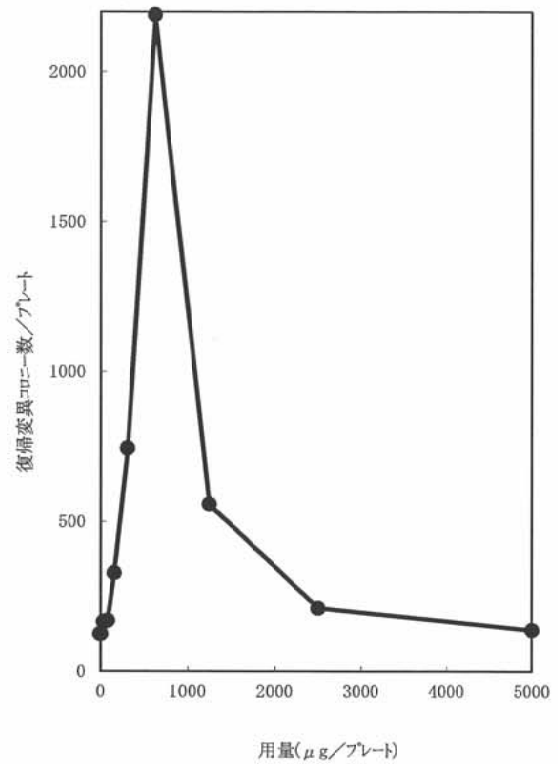


図-2 TA100における用量-反応曲線  
代謝活性化法による場合 (本試験)

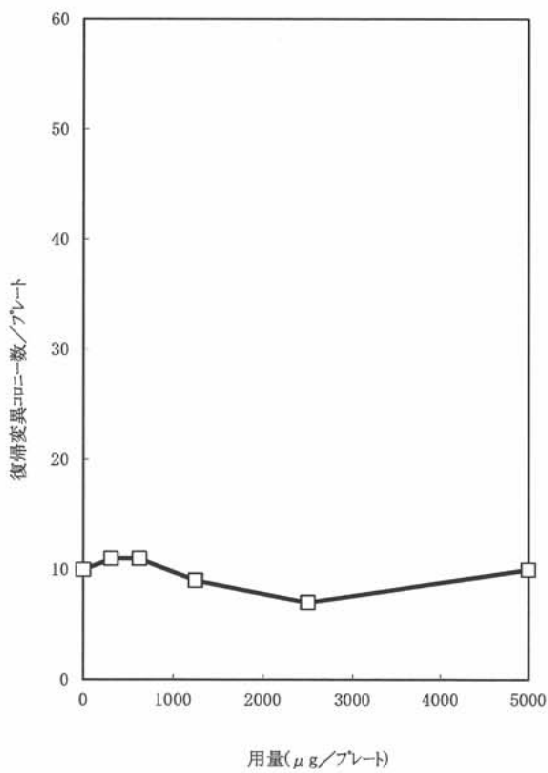


図-3 TA1535における用量-反応曲線  
直接法による場合 (本試験)

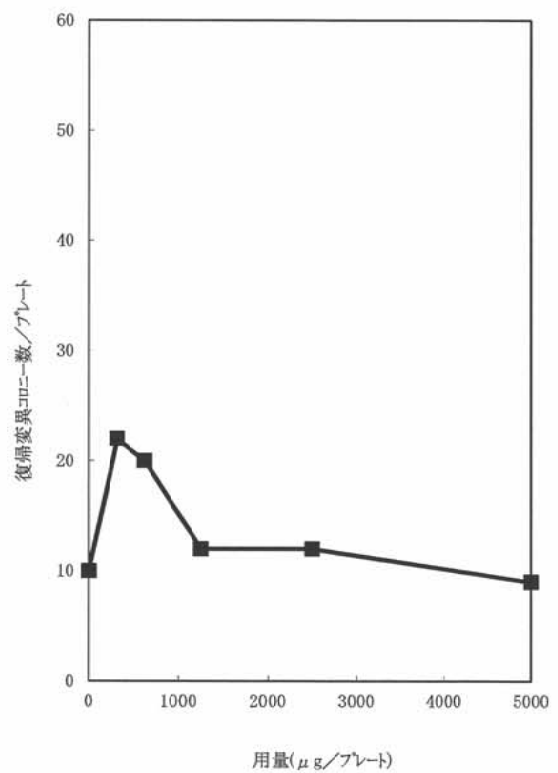


図-4 TA1535における用量-反応曲線  
代謝活性化法による場合 (本試験)

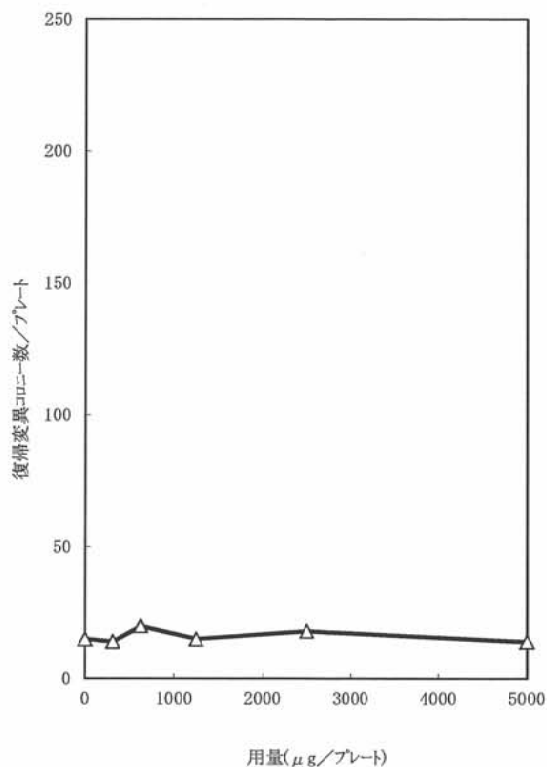


図-5 TA98における用量-反応曲線  
直接法による場合 (本試験)

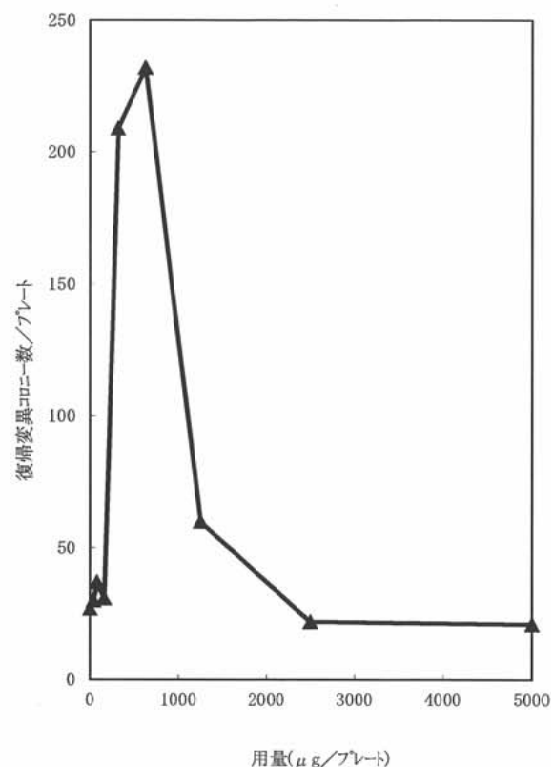


図-6 TA98における用量-反応曲線  
代謝活性化法による場合 (本試験)

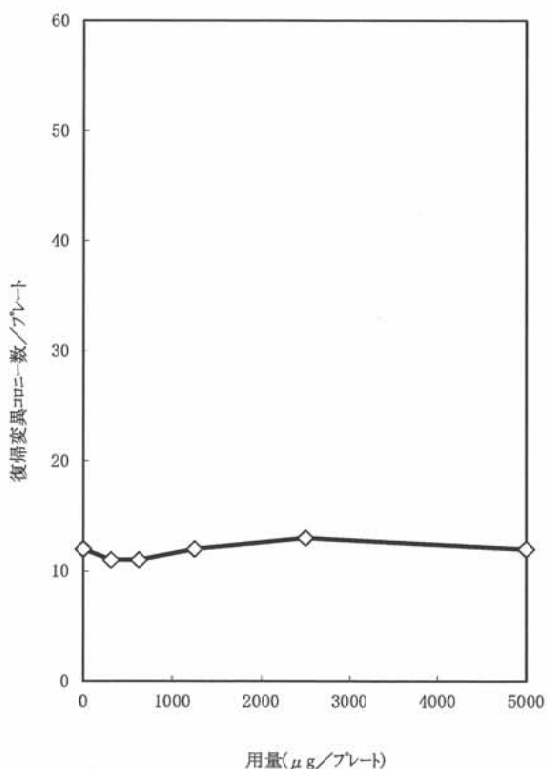


図-7 TA1537における用量-反応曲線  
直接法による場合 (本試験)

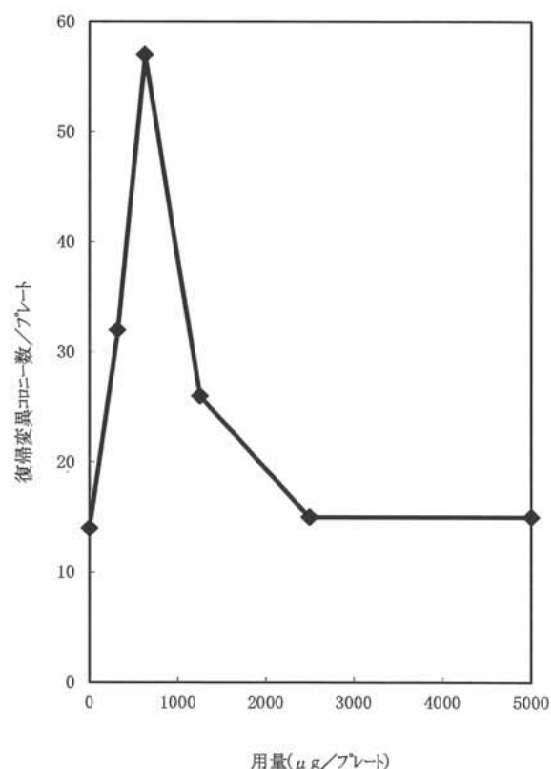


図-8 TA1537における用量-反応曲線  
代謝活性化法による場合 (本試験)

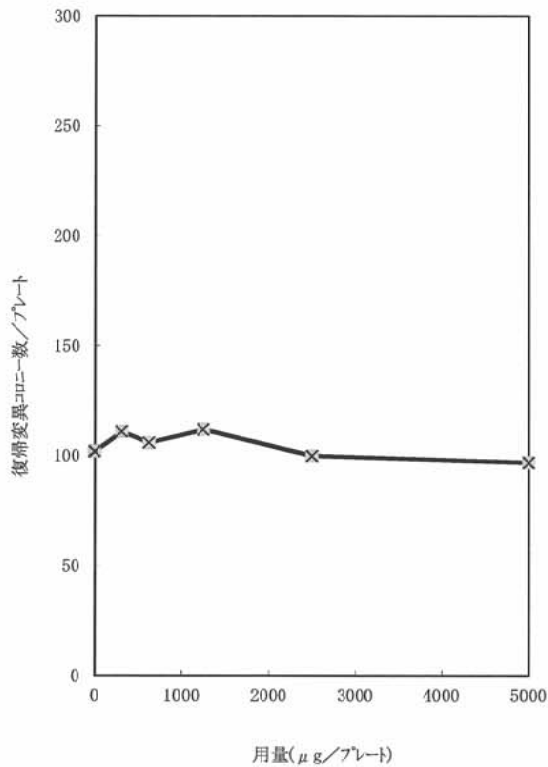


図-9 WP2uvrA/pKM101における用量-反応曲線  
直接法による場合 (本試験)

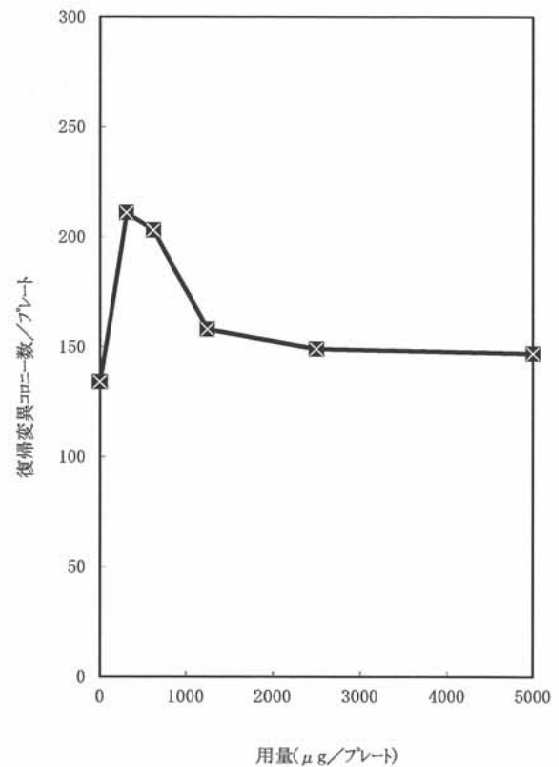


図-10 WP2uvrA/pKM101における用量-反応曲線  
代謝活性化法による場合 (本試験)

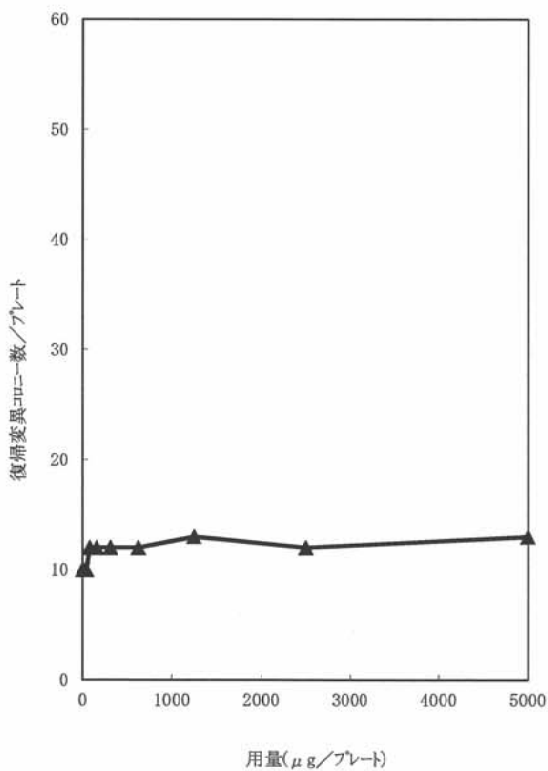


図-11 TA1535における用量-反応曲線  
代謝活性化法による場合 (本試験-2)

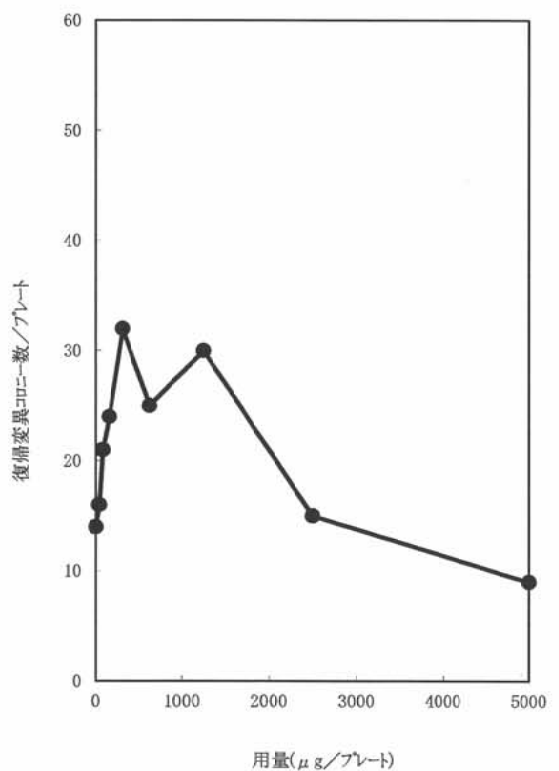


図-12 TA1537における用量-反応曲線  
代謝活性化法による場合 (本試験-2)