

## 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)	塩化マンガン		
別 名	Manganese(II) chloride		
構造式又は示性式	$\begin{array}{c} \text{Cl} \\   \\ \text{Mn} \\ \diagdown \\ \text{Cl} \end{array}$		
試験に供した 化学物質の純度	99.99%	試験に供した 化学物質の Lot No.	F12Z004
不純物の名称及び 含有率(濃度)	—		
C A S 番 号	7773-01-5	蒸 気 圧	—
分 子 量	125.84	分 配 係 数 (1-オクタノール/水分配係数)	—
融 点	650℃		
沸 点	1190℃	常温における性状	白色～薄い赤色の結晶～ 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	溶解[100mg/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 9月 5日 製造
購入の場合のLot No.	RAA201409A
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	188~236 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 (%)
	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 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℃		
	本試験	40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 $\mu$ 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	2.34	3.44	4.10	2.80	2.48
	本 試 験	2.29	3.38	4.07	2.59	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9月2日 製造
購入の場合の Lot No.	ANI440ID
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</math>g/7°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認められなかった。生育阻害はすべての菌株の直接法による場合と代謝活性化法による場合にみられた。</p> <p>最高用量を生育阻害を示す用量とし本試験を実施したところ、用量設定試験と同様、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認められなかった。</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、塩化マンガ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

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。

## 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	6383		
試験期間	2015年1月23日 ～ 2015年3月3日		

表-1

試験結果表（用量設定試験）

被験物質の名称：塩化マンガン

試験実施期間		2015年 1月 26日から 2015年 1月 29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)	113	113	15	8	81	92	20	23	11	9
		94	112 ( 108 )	7	8 ( 10 )	90	82 ( 86 )	26	20 ( 22 )	10	7 ( 9 )
	1.22	106	( 104 )	8	( 8 )	81	( 94 )	11	( 17 )	10	( 9 )
		101	( 105 )	14	( 10 )	98	( 92 )	25	( 20 )	14	( 13 )
	4.88	101	( 105 )	6	( 10 )	85	( 92 )	15	( 20 )	11	( 13 )
	19.5	115	( 113 )	11	( 12 )	101	( 100 )	11	( 15 )	7	( 8 )
		111	( 113 )	13	( 12 )	98	( 100 )	18	( 15 )	8	( 8 )
	78.1	112	( 113 )	7	( 11 )	101	( 94 )	34	( 25 )	8	( 9 )
		114	( 113 )	15	( 11 )	86	( 94 )	16	( 25 )	9	( 9 )
	313	121*	( 139* )	2*	( 6* )	93	( 101 )	23	( 26 )	11	( 13 )
	157*	( 139* )	9*	( 6* )	108	( 101 )	29	( 26 )	15	( 13 )	
1250	113*	( 122* )	9*	( 10* )	93	( 97 )	14*	( 15* )	8*	( 9* )	
	131*	( 122* )	10*	( 10* )	101	( 97 )	15*	( 15* )	9*	( 9* )	
5000 †	111*	( 97* )	6*	( 7* )	102*	( 101* )	19*	( 20* )	6*	( 8* )	
	83*	( 97* )	7*	( 7* )	99*	( 101* )	21*	( 20* )	9*	( 8* )	
S9 mix (+)	陰性対照 (溶媒対照)	114	111	9	13	102	109	26	23	9	9
		136	120 ( 120 )	8	7 ( 9 )	94	105 ( 103 )	23	30 ( 26 )	14	9 ( 10 )
	1.22	133	( 123 )	3	( 4 )	112	( 110 )	36	( 30 )	3	( 6 )
		112	( 123 )	5	( 4 )	108	( 110 )	23	( 30 )	9	( 6 )
	4.88	109	( 118 )	2	( 5 )	108	( 110 )	26	( 24 )	9	( 8 )
		126	( 118 )	8	( 5 )	111	( 110 )	21	( 24 )	7	( 8 )
	19.5	113	( 107 )	8	( 9 )	92	( 104 )	26	( 26 )	15	( 12 )
		100	( 107 )	9	( 9 )	115	( 104 )	25	( 26 )	9	( 12 )
	78.1	133	( 148 )	8	( 8 )	102	( 102 )	28	( 28 )	7	( 12 )
		163	( 148 )	8	( 8 )	101	( 102 )	28	( 28 )	16	( 12 )
313	145	( 148 )	8	( 8 )	123	( 121 )	26	( 29 )	16	( 14 )	
	150	( 148 )	7	( 8 )	119	( 121 )	31	( 29 )	11	( 14 )	
1250	116*	( 138* )	7*	( 8* )	90	( 115 )	24*	( 25* )	11*	( 11* )	
	159*	( 138* )	8*	( 8* )	139	( 115 )	25*	( 25* )	10*	( 11* )	
5000 †	82*	( 89* )	6*	( 10* )	93*	( 95* )	19*	( 23* )	8*	( 9* )	
	96*	( 89* )	13*	( 10* )	97*	( 95* )	26*	( 23* )	10*	( 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	652	355	1053	586	673				
			666 ( 669 )	354 ( 355 )	900 ( 977 )	568 ( 577 )	636 ( 655 )				
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	1398	311	814	531	243				
			1392 ( 1395 )	317 ( 314 )	792 ( 803 )	534 ( 533 )	293 ( 268 )				

【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. 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。
5. 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：塩化マンガン

試験実施期間		2015年 2月 2日から 2015年 2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)	100 113 122 116 ( 113 )	13 14 8 16 ( 13 )	101 123 99 101 ( 106 )	16 21 18 14 ( 17 )	9 16 8 8 ( 10 )						
	4.88	127 128 ( 128 )	11 14 ( 13 )	/	/	/						
	9.77	127 101 ( 114 )	20 13 ( 17 )	/	/	/						
	19.5	113 133 ( 123 )	16 13 ( 15 )	/	15 14 ( 15 )	11 10 ( 11 )						
	39.1	128 135 ( 132 )	18 14 ( 16 )	/	20 17 ( 19 )	16 14 ( 15 )						
	78.1	131 128 ( 130 )	17 18 ( 18 )	124 116 ( 120 )	13 18 ( 16 )	13 14 ( 14 )						
	156	117 113 ( 115 )	16 18 ( 17 )	116 113 ( 115 )	13 15 ( 14 )	14 14 ( 14 )						
	313	124* 113* ( 119* )	18* 17* ( 18* )	120 116 ( 118 )	14 20 ( 17 )	15 14 ( 15 )						
	625	/	/	104 104 ( 104 )	18* 18* ( 18* )	13 11 ( 12 )						
	1250	/	/	126 115 ( 121 )	14* 16* ( 15* )	8* 13* ( 11* )						
	2500 †	/	/	106* 126* ( 116* )	/	/						
	5000 †	/	/	73* 103* ( 88* )	/	/						
	S9 mix (+)	陰性対照 (溶媒対照)	119 141 120 117 ( 124 )	16 11 15 14 ( 14 )	121 134 139 111 ( 126 )	20 29 21 34 ( 26 )	9 17 16 15 ( 14 )					
		19.5	137 111 ( 124 )	15 18 ( 17 )	/	15 21 ( 18 )	10 10 ( 10 )					
39.1		123 127 ( 125 )	13 15 ( 14 )	/	24 31 ( 28 )	15 10 ( 13 )						
78.1		133 146 ( 140 )	15 17 ( 16 )	144 142 ( 143 )	25 22 ( 24 )	9 20 ( 15 )						
156		134 136 ( 135 )	15 18 ( 17 )	139 138 ( 139 )	25 32 ( 29 )	11 11 ( 11 )						
313		142 144 ( 143 )	9 22 ( 16 )	138 145 ( 142 )	30 22 ( 26 )	10 5 ( 8 )						
625		119* 109* ( 114* )	17* 14* ( 16* )	129 126 ( 128 )	31 24 ( 28 )	14 15 ( 15 )						
1250		133* 122* ( 128* )	16* 8* ( 12* )	157 136 ( 147 )	22* 22* ( 22* )	16* 14* ( 15* )						
2500 †		/	/	156* 165* ( 161* )	/	/						
5000 †		/	/	120* 117* ( 119* )	/	/						
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				
			コロニー数/プレート	670 743 ( 707 )	366 370 ( 368 )	920 860 ( 890 )	465 487 ( 476 )	604 617 ( 611 )				
		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	1383 1388 ( 1386 )	317 322 ( 320 )	835 792 ( 814 )	509 517 ( 513 )	272 274 ( 273 )				

【備考】

- 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。
- ( ) 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)-9-(6-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



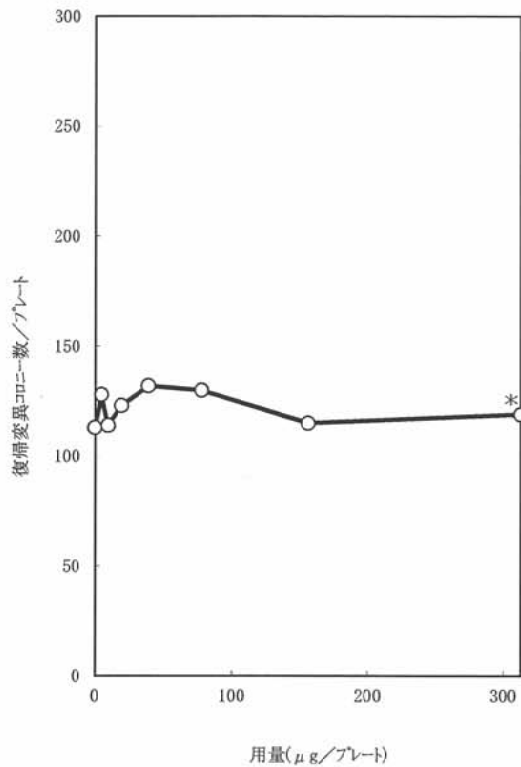


図-1 TA100における用量-反応曲線  
直接法による場合 (本試験)

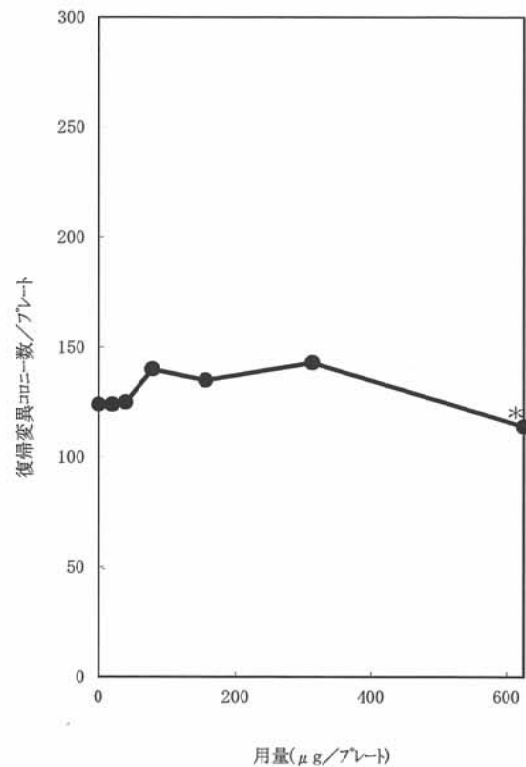


図-2 TA100における用量-反応曲線  
代謝活性化法による場合 (本試験)  
(625 μg/プレートまでプロットした。)

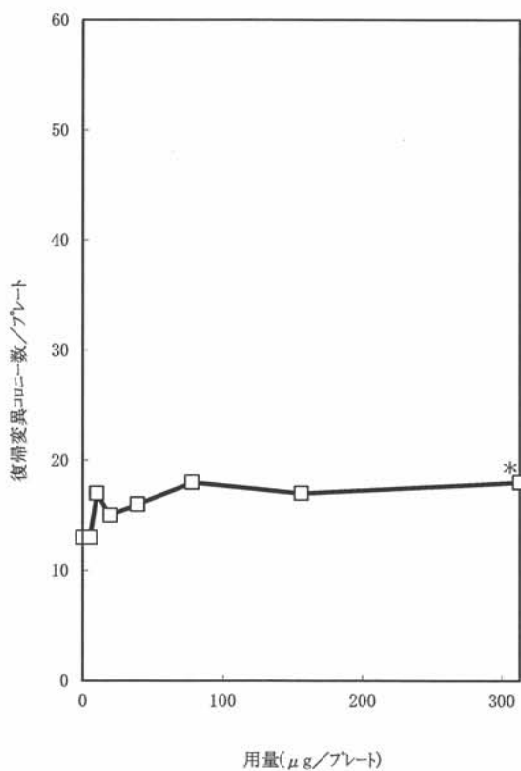


図-3 TA1535における用量-反応曲線  
直接法による場合 (本試験)

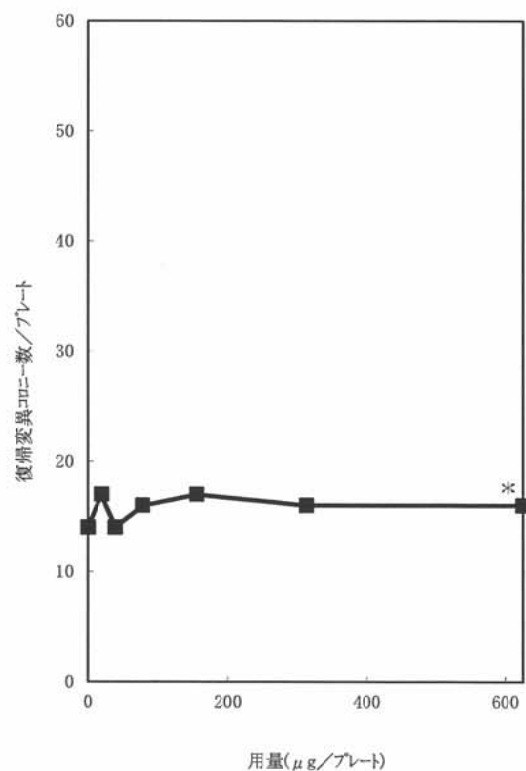


図-4 TA1535における用量-反応曲線  
代謝活性化法による場合 (本試験)  
(625 μg/プレートまでプロットした。)

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。

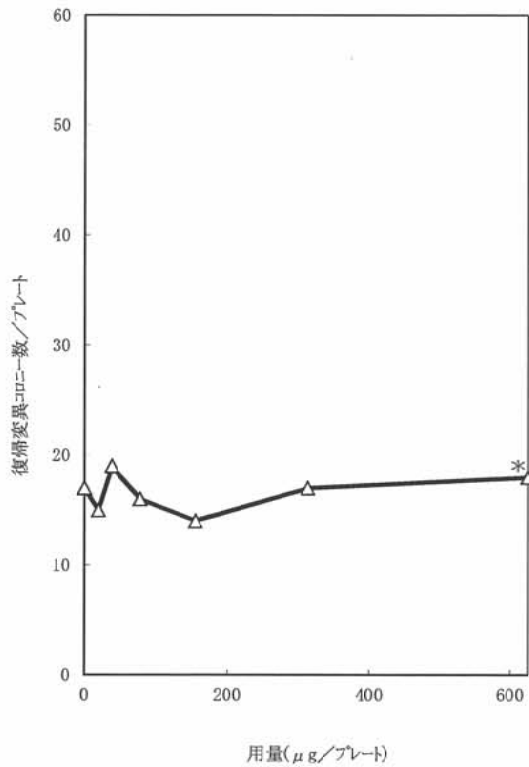


図-5 TA98における用量-反応曲線  
直接法による場合 (本試験)  
(625 μg/プレートまでプロットした。)

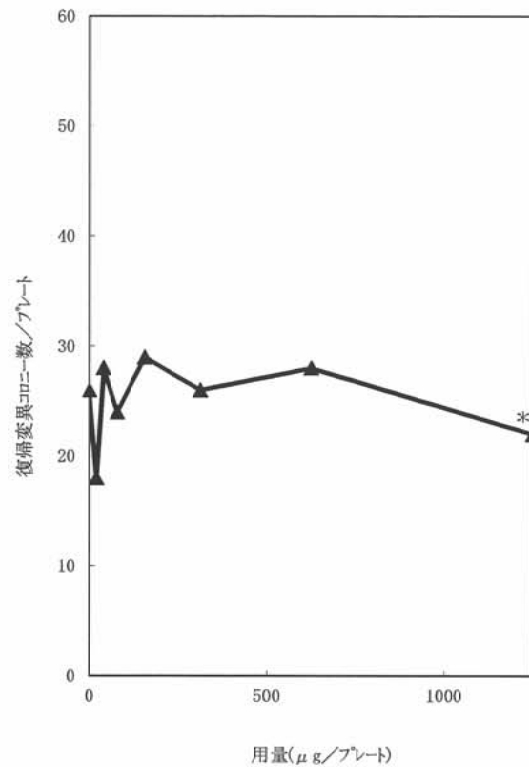


図-6 TA98における用量-反応曲線  
代謝活性化法による場合 (本試験)

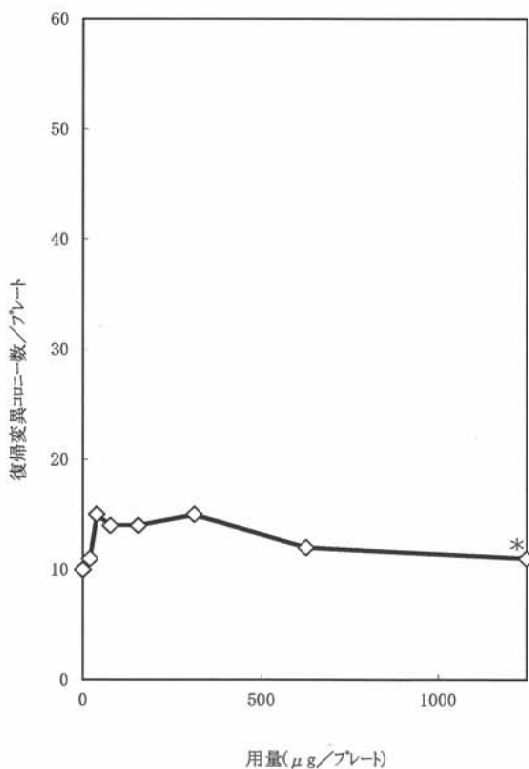


図-7 TA1537における用量-反応曲線  
直接法による場合 (本試験)

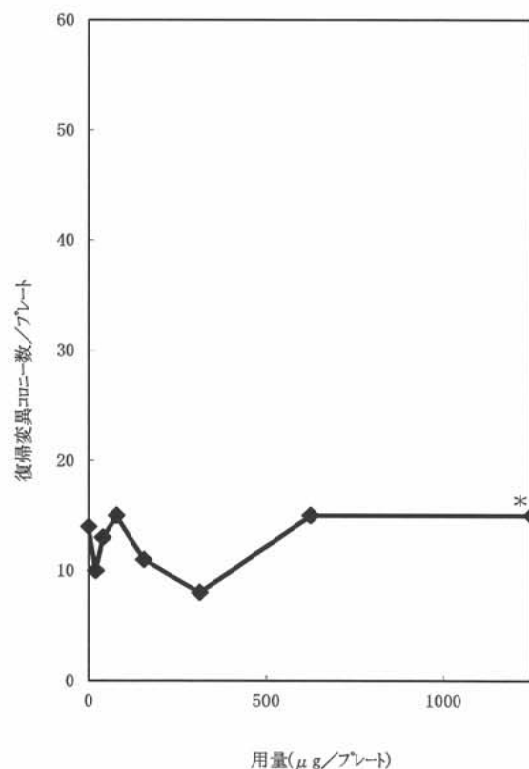


図-8 TA1537における用量-反応曲線  
代謝活性化法による場合 (本試験)

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。

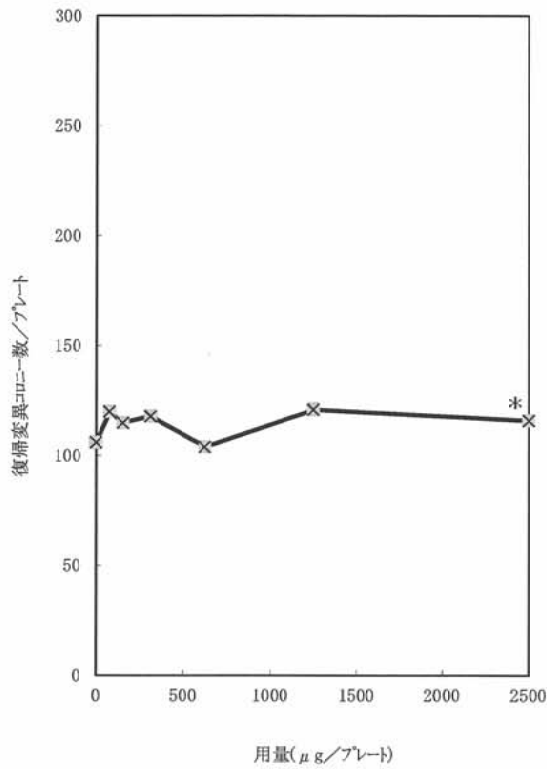


図-9 WP2uvrA/pKM101における用量-反応曲線  
直接法による場合 (本試験)  
(2500 μg/プレートまでプロットした。)

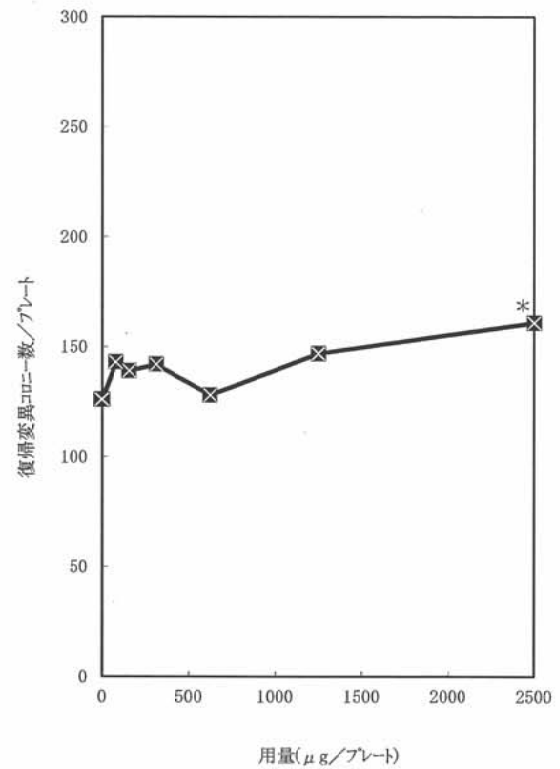


図-10 WP2uvrA/pKM101における用量-反応曲線  
代謝活性化法による場合 (本試験)  
(2500 μg/プレートまでプロットした。)

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。