

2. 試験に用いた菌株

菌株名	入手先	入手年月日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA98	国立医薬品食品衛生研究所	1997年10月9日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA100	国立医薬品食品衛生研究所	1997年10月9日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535	国立医薬品食品衛生研究所	1997年10月9日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1537	国立医薬品食品衛生研究所	1997年10月9日
<i>Escherichia coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	独立行政法人 製品評価技術基盤機構	2011年10月20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	2015年11月27日製造
購入の場合 Lot No.	RAA201511B
保存温度	-86.5~-70.6°C (保存期間：2015年12月17日~2016年3月8日)

(2) S9の調製方法

使用動物		誘導物質	
種・系統	ラット・SD系	名称	PB& 5,6-BF
性	雄	投与方法	腹腔内投与
週齢	7週齢	投与期間及び 投与量 (mg/kg 体重)	PB4日間連続投与: 30+60+60+60(mg/kg 体重) PB投与3日目 BF投与: 80(mg/kg 体重)
体重	197-252 g		

(3) S9Mixの組成

成分	S9Mix 1mL 中の量	成分	S9Mix 1mL 中の量
S9	0.1 mL	NADPH	4 μmol
MgCl ₂	8 μmol	NADH	4 μmol
KCl	33 μmol	Na-リン酸緩衝液	100 μmol
グルコース-6-リン酸	5 μmol	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(%)
	1,4-ジオキサン	和光純薬工業株式会社	ECJ2496	JIS規格 試薬特級	99.5%以上
溶媒選択の理由	水に溶けないとの情報より、DMSO、アセトン、1,4-ジオキサンについて溶解性試験を実施した。その結果、DMSOに50 mg/mLで溶解せず、アセトンと1,4-ジオキサンに100 mg/mLで溶解したが、アセトンにおいては色調変化が認められたため、発熱、ガスの発生等の反応性も認められなかった1,4-ジオキサンを溶媒として試験を実施した。なお、被験液の調製には、モレキュラシーブス 4A 1/16（和光純薬工業株式会社；Lot No. HWL7297）で脱水した1,4-ジオキサンを使用した。				
被験物質溶液の性状	<input checked="" type="radio"/> 溶解 <input type="radio"/> 懸濁 <input type="radio"/> 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	用時調製・室温				
純度換算の有無	有 <input checked="" type="radio"/> 無				

5. 前培養の条件

(1) 条件

ニュートリエントブロス	名 称	製 造 元	Lot No.
	Nutrient Broth No.2	OXOID LTD.	1239615
前培養時間	9時間		
培養容器(形状・容器)	L字管・48mL		
培養液量	10 mL	接種菌量	<i>S. typhimurium</i> 株 20 µL <i>E. coli</i> 株 10 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	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
生菌数 ($\times 10^9$ /mL)	用量設定試験	3.94	4.47	8.95	4.94	3.60
	本試験1回目	4.15	4.74	8.40	6.34	3.69
	本試験2回目	4.35	4.79	/	/	3.53
測定方法		① O.D.値より換算 2. 段階希釈法 3. その他				

6. 最小グルコース寒天平板培地

自製・購入の別	1. 自製 ② 購入 (購入元 極東製薬工業株式会社)
製造年月日	2016年2月5日 (DZLH2501) 2016年2月9日 (DZLH2901)
購入の場合の Lot No.	DZLH2501 (用量設定試験に使用) DZLH2901 (本試験に使用)
使用寒天の名称・製造・Lot No.	OXOID AGAR No.1・OXOID LTD.・Lot No. 1309432

7. 試験の方法

(1) 試験方法とその選択理由

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 その選択理由	

(2) 試験条件

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
	S9Mix (代謝活性化法による場合)	0.5 mL
	トップアガー	2.0 mL
プレインキュベーション	温度	37°C
	時間	20 分間
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 面積補正:補正值 1.21)

9. 試験の結果

- (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別表 1 に、本試験 1 回目の結果を別表 2、3 に、本試験 2 回目の結果を別表 4 に示した。なお、図 1~10 は別表 2、3 より作成した。また、当該試験の参考データとして参照した背景データを Attached Data として添付した。</p> <p>用量設定試験及び 2 回の本試験ともに代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても陰性対照値の 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量反応性も認められなかった。</p> <p>一方、陽性対照群では陰性対照群と比較して 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加を示したことから、使用菌株の復帰突然変異誘発物質に対する反応は適切であったことが確認され、試験は適切に実施されたものと考えられた。</p> <p>以上の試験結果より、本試験条件下において 2 - { 2 - [2 - (アクリロイルオキシ) (メチル) エトキシ] (メチル) エトキシ} (メチル) エチル=アクリラートは、微生物に対する遺伝子突然変異誘発能を有さない (陰性) と判定した。</p>		

(3) 参考事項

本被験物質によるプレート上の沈殿及び着色は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。

菌に対する生育阻害は、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535 及び TA1537 の 78.1 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98 の 313 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化した場合のすべての菌株の 1250 µg/plate 以上の用量で認められた。

陽性対照値については、本試験の代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA1535 において、管理値を超える増加を示したが、代謝活性化しない場合の陰性対照値及び陽性対照値は適切な値を示していることから菌の遺伝的特性及び陽性対照物質に対する感受性に問題は無いと判断した。代謝活性化系についても、管理値をわずかに外れているが、十分な増加を示していることから、試験操作に問題はなく試験結果の評価に影響は無いと判断した。

溶媒の選定にあたり、下記の文献を参照した。

Dorothy M. Maron, John Katzenellenbogen and Bruce N. Ames: COMPATIBILITY OF ORGANIC SOLVENTS WITH THE SALMONELLA/MICROSOME TEST, Mutation Res., 88, pp.343-350, 1981

代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535 及び TA1537 においては、用量設定試験の結果、生育阻害を示さない用量数が 4 用量以上得られなかったため、同一用量で本試験を 2 回実施し、再現性の確認をした。

被験液の調製及び試験操作は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で実施した。

(別表1)

試験結果表 (用量設定試験)

被験物質の名称: 2-[2-[2-(アクリロイルオキシ) (メチル) エトキシ] (メチル) エトキシ]
(メチル) エチル=アクリラート

No. T-1992

試験実施期間		2016年2月19日 より 2016年2月22日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μ g/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	TA98	TA1537	
S9Mix (-)	陰性対照 (1.4-ジチザン)	143 127 (135)	8 7 (8)	27 21 (24)	20 22 (21)	10 10 (10)	
	1.22	129 155 (142)	5 11 (8)	18 21 (20)	13 15 (14)	9 13 (11)	
	4.88	117 134 (126)	8 8 (8)	21 22 (22)	20 24 (22)	10 5 (8)	
	19.5	98 128 (113)	6 7 (7)	16 25 (21)	20 17 (19)	11 7 (9)	
	78.1	68* 48* (58)	8* 6* (7)	21 16 (19)	17 21 (19)	10* 9* (10)	
	313	60* 68* (64)	7* 9* (8)	19 16 (18)	22* 20* (21)	4* 4* (4)	
	1250	32* 34* (33)	1* 2* (2)	12* 10* (11)	5* 2* (4)	0* 0* (0)	
	5000	0* 0* (0)	1* 1* (1)	10* 10* (10)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	
	S9Mix (+)	陰性対照 (1.4-ジチザン)	148 148 (148)	8 11 (10)	23 31 (27)	31 39 (35)	10 13 (12)
		1.22	133 138 (136)	7 8 (8)	30 33 (32)	38 38 (38)	12 10 (11)
4.88		157 180 (169)	9 11 (10)	21 30 (26)	30 29 (30)	6 6 (6)	
19.5		164 177 (171)	8 10 (9)	29 21 (25)	32 30 (31)	5 5 (5)	
78.1		140 157 (149)	9 15 (12)	28 39 (34)	26 46 (36)	7 10 (9)	
313		119 149 (134)	13 10 (12)	20 34 (27)	31 22 (27)	13 10 (12)	
1250		82* 100* (91)	7* 7* (7)	35* 32* (34)	27* 27* (27)	5* 8* (7)	
5000		33* 28* (31)	0* 0* (0)	9* 7* (8)	2* 5* (4)	0* 0* (0)	
陽性対照		名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191
		用量 (μ g/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	コロニ-数/プレート	594 571 (583)	255 256 (256)	59 65 (62)	342 368 (355)	999 905 (952)	
	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P	
	用量 (μ g/プレート)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0	
	コロニ-数/プレート	685 873 (779)	257 226 (242)	529 632 (581)	446 435 (441)	106 105 (106)	

(備考)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
 SAZ : アジ化ナトリウム
 ICR-191 : 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HC1
 2AA : 2-アミノアントラセン
 B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

* : 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。
 ()内は、2枚のプレートの平均値を示す。

(別表2)

試験結果表 (本試験1回目:-S9Mix)

被験物質の名称: 2-[2-[2-(アクリロイルオキシ) (メチル) エトキシ] (メチル) エトキシ]
(メチル) エチル=アクリラート

No. T-1992

試験実施期間		2016年3月7日 より 2016年3月10日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	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	TA98	TA1537	
S9Mix (-)	陰性対照 (1.4-ジオキサン)	109 94 (102)	9 11 (10)	23 21 (22)	19 18 (19)	9 11 (10)	
	2.44	97 110 (104)	8 9 (9)	NT	NT	8 9 (9)	
	4.88	105 123 (114)	12 6 (9)	NT	NT	7 9 (8)	
	9.77	115 93 (104)	7 9 (8)	NT	16 19 (18)	12 7 (10)	
	19.5	108 104 (106)	10 9 (10)	NT	14 15 (15)	6 8 (7)	
	39.1	89 108 (99)	10 13 (12)	26 21 (24)	19 20 (20)	8 8 (8)	
	78.1	96 * 91 * (94)	8 * 5 * (7)	25 28 (27)	15 18 (17)	6 * 5 * (6)	
	156	NT	NT	21 34 (28)	14 17 (16)	NT	
	313	NT	NT	27 25 (26)	12 * 16 * (14)	NT	
	625	NT	NT	29 27 (28)	NT	NT	
	1250	NT	NT	12 * 22 * (17)	NT	NT	
	陽性対照	S9Mixを必要としないもの	名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2
		用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
		コロニー数/プレート	476 497 (487)	214 228 (221)	82 71 (77)	312 368 (340)	1024 964 (994)

(備考)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

SAZ : アジ化ナトリウム

ICR-191 : 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl

* : 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。

NT : 試験せず。

()内は、2枚のプレートの平均値を示す。

(別表3)

試験結果表 (本試験1回目: +S9Mix)

被験物質の名称: 2-[2-[2-(アクリロイルオキシ) (メチル) エトキシ] (メチル) エトキシ]
(メチル) エチル=アクリラート

No. T-1992

試験実施期間		2016年3月7日 より 2016年3月10日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	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	TA98	TA1537
S9Mix (+)	陰性対照 (1.4-ジオキサン)	142 147 (145)	12 11 (12)	30 33 (32)	31 26 (29)	10 7 (9)
	39.1	147 157 (152)	10 11 (11)	23 34 (29)	33 31 (32)	5 7 (6)
	78.1	120 105 (113)	6 5 (6)	30 34 (32)	28 30 (29)	9 10 (10)
	156	149 128 (139)	10 13 (12)	28 48 (38)	26 31 (29)	4 9 (7)
	313	123 135 (129)	15 7 (11)	22 26 (24)	23 19 (21)	7 6 (7)
	625	130 118 (124)	11 8 (10)	19 19 (19)	36 19 (28)	7 4 (6)
	1250	143 * 134 * (139)	8 * 7 * (8)	18 * 23 * (21)	22 * 13 * (18)	5 * 5 * (5)
	名 称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
コロニー数/プレート	981 979 (980)	315 323 (319)	823 800 (812)	346 423 (385)	101 102 (102)	

(備考)

B[a]P : ベンゾ[a]ピレン
2AA : 2-アミノアントラセン

* : 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。
()内は、2枚のプレートの平均値を示す。

(別表4)

試験結果表 (本試験2回目)

被験物質の名称 : 2-[2-(2-(アクリロイルオキシ) (メチル) エトキシ) (メチル) エトキシ] (メチル) エチル=アクリラート

No. T-1992

試験実施期間		2016年3月10日 より 2016年3月14日		
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	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	TA1537
S9Mix (-)	陰性対照 (1.4-ジオキサ)	119 134 (127)	5 6 (6)	5 5 (5)
	2.44	131 103 (117)	7 2 (5)	4 4 (4)
	4.88	114 100 (107)	4 3 (4)	5 2 (4)
	9.77	124 117 (121)	4 4 (4)	5 4 (5)
	19.5	114 112 (113)	4 5 (5)	2 2 (2)
	39.1	112 100 (106)	6 5 (6)	2 5 (4)
	78.1	97 * 120 * (109)	0 * 0 * (0)	1 * 2 * (2)
	陽性対照	名称	AF-2	SAZ
用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)		0.01	0.5	1.0
コロニー数/プレート		505 511 (508)	222 212 (217)	1002 1025 (1014)

(備考)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

SAZ : アジ化ナトリウム

ICR-191 : 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピル; ミノ]アクリジン・2HCl

* : 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。

()内は、2枚のプレートの平均値を示す。

図 1

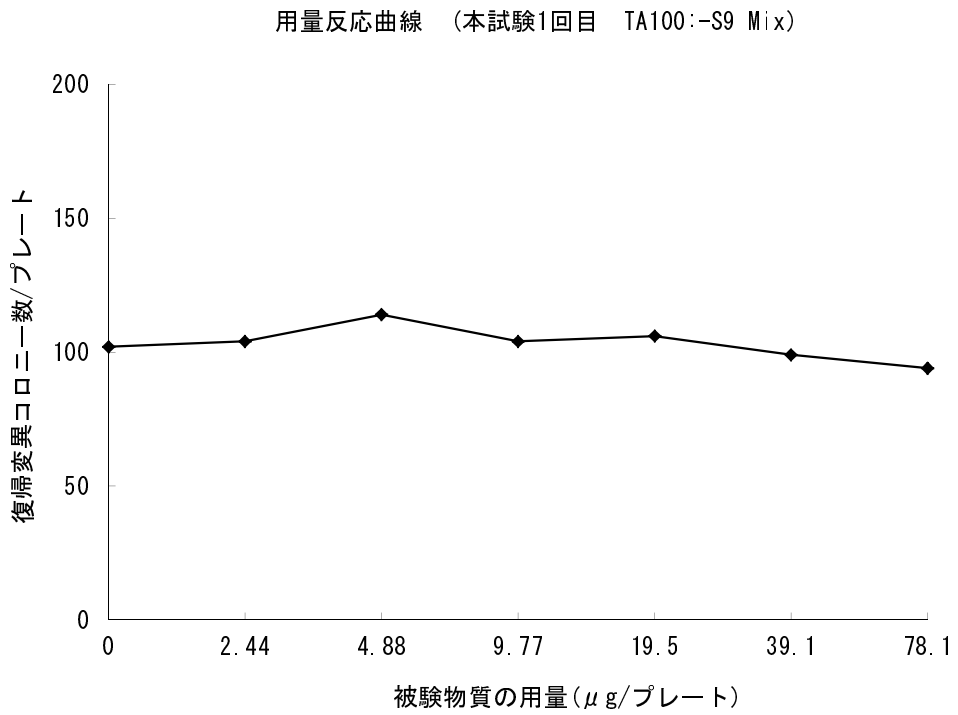


図 2

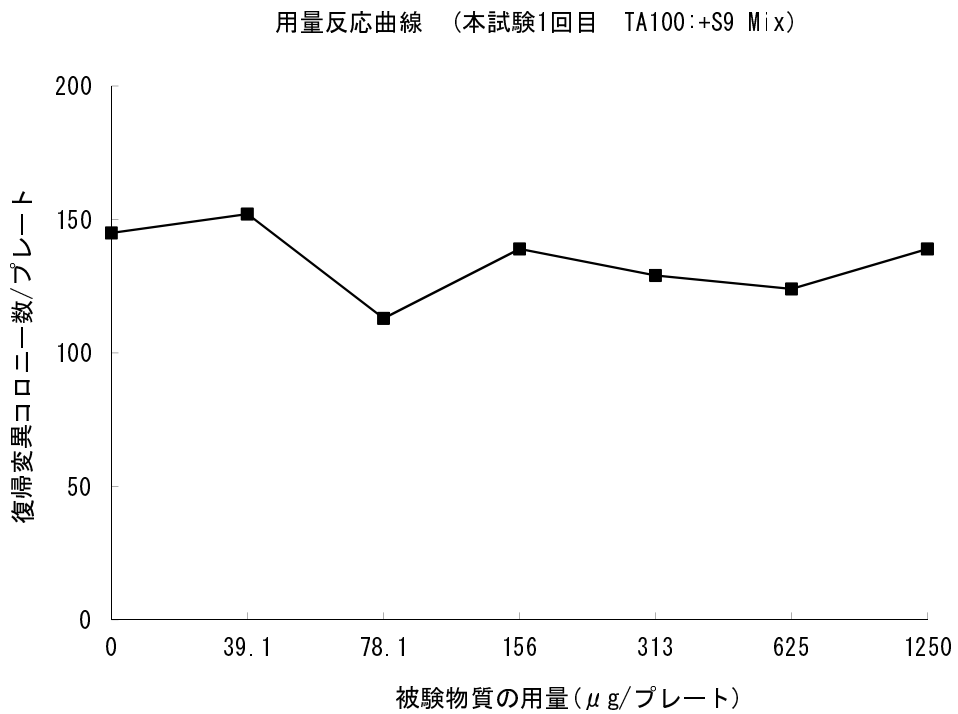


図 3

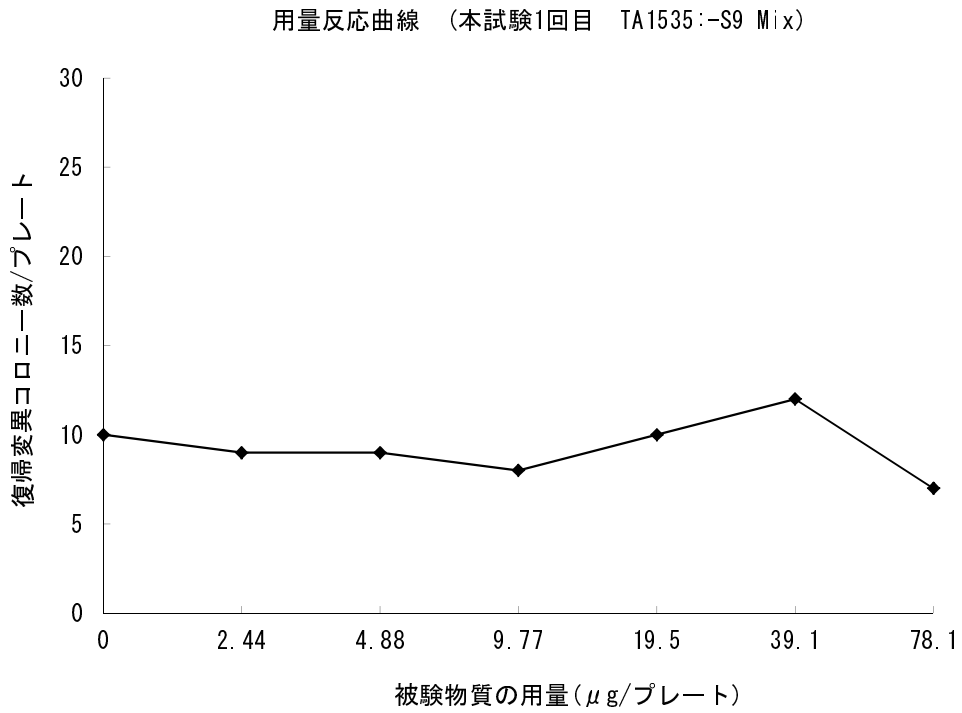


図 4

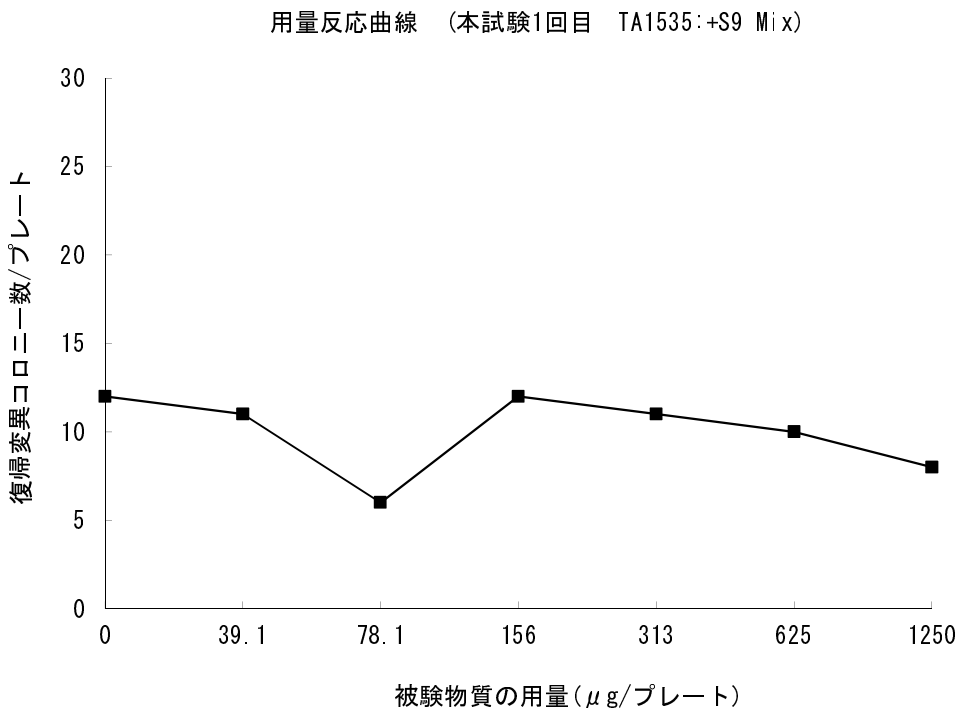


図 5

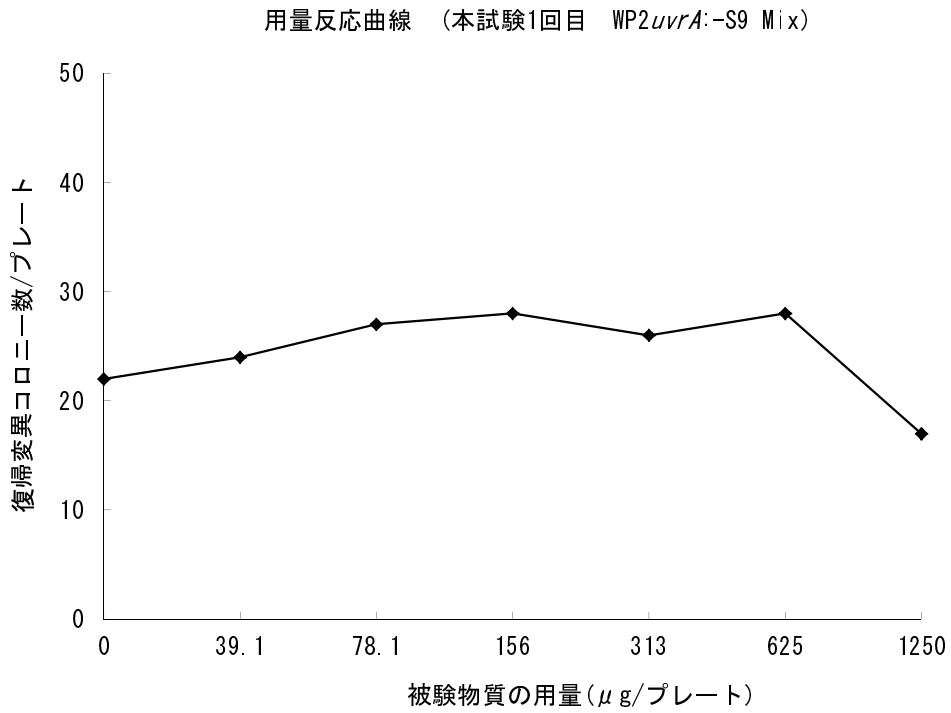


図 6

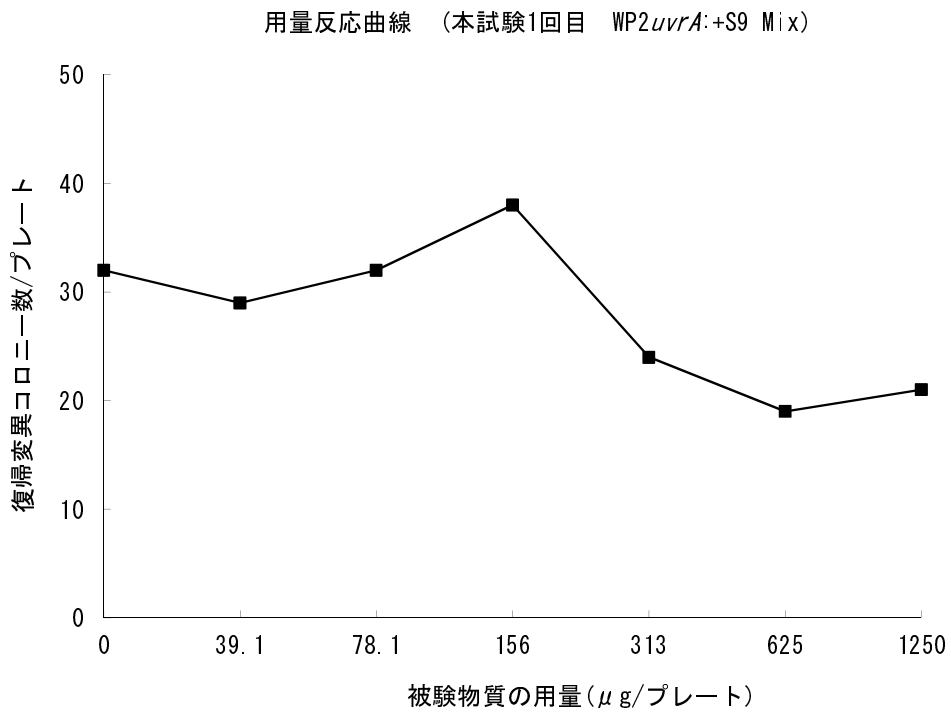


図 7

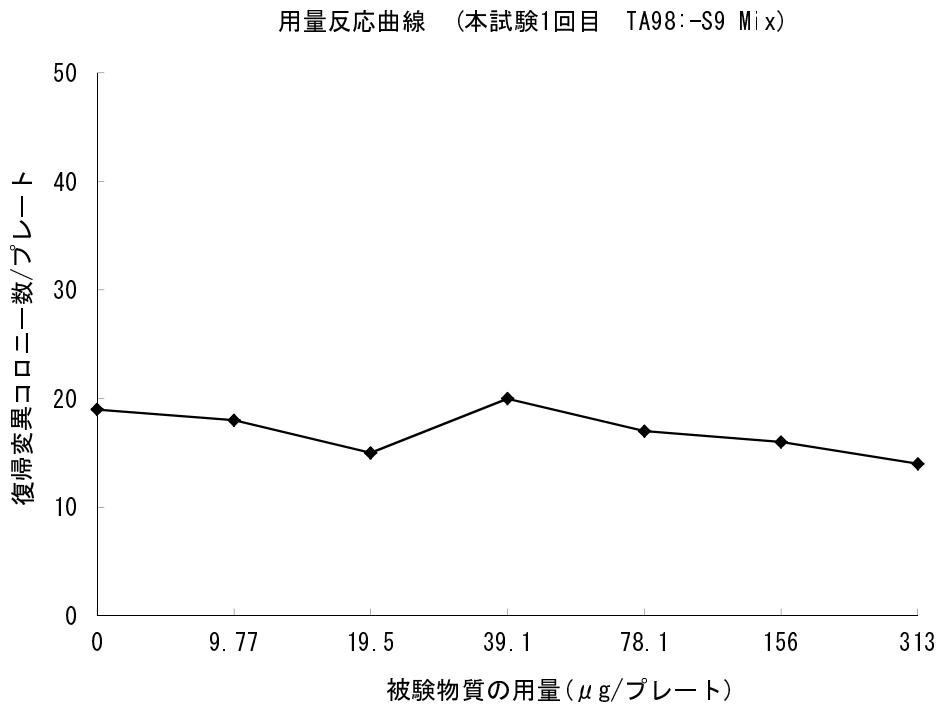


図 8

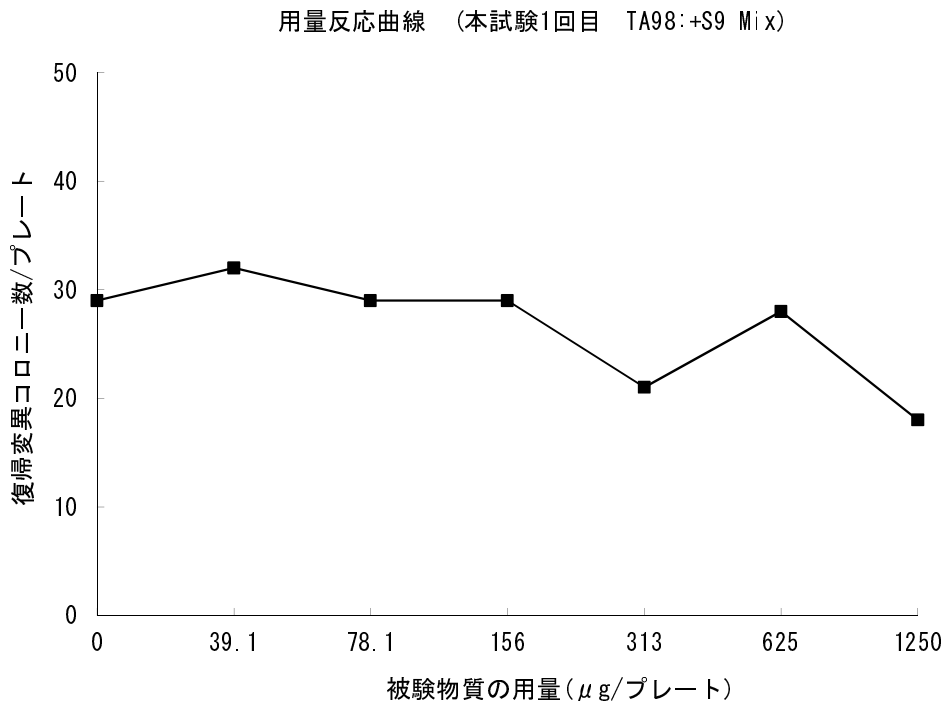


図 9

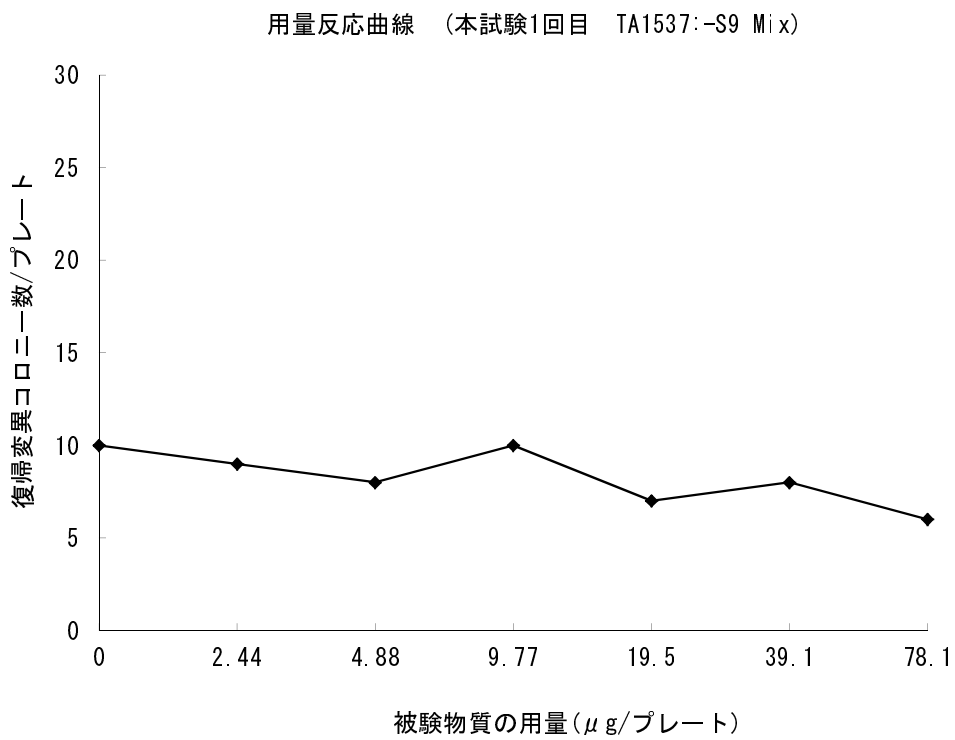


図 10

