

微生物を用いる変異原性試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	一酸化窒素		
別 名	/		
構造式又は示性式 (い ずれも不明な場合はそ の製法の概要)	NO		
試験に供した新規 化学物質の純度	99.0%以上	試験に供した新規化 学物質の Lot No.	/
不純物の名称及び濃度	/		
CAS 番号	10102-43-9	蒸気圧	6.485 MPa (-93°C)
分子量	30.01	分配係数	/
融 点	-161°C	常温における性状	無色、無臭の気体
沸 点	-151°C		
安定性	一酸化窒素及び窒素酸化物はそれ自体不燃性であるが、それらは非常に有毒である。強酸化剤として、繊維類を含むほかの可燃性物質と接触するとき、発火及び燃焼を起こしうる。また液体燃料と接触するとき、激しい反応が起こりうる。不燃性であるが、燃焼促進性がある。		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中での安定性
	水	/	/
	DMSO	/	/
	アセトン	/	/
	その他	/	/

(備考) 上記被験物質情報は、製造元からの情報による。なお、本被験物質は、取扱い設備上、非 GLP 区域での保存、取扱いになるが、GLP に準じた記録、取扱いをすることで対応する。

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12月18日
購入の場合 Lot No.	RAA201512A
保存温度	-86.1~-70.6°C (保存期間: 2016年1月21日~2016年3月19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	190-243 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(%)
	窒素	東横化学株式会社			
溶媒選択の理由	本被験物質は、酸素と反応し二酸化窒素に変化してしまうため、安定な窒素を溶媒として試験を実施した。なお、菌への影響を考慮して暴露時間は4時間とした。				
被験物質溶液の性状	溶解 懸濁 <u>その他</u> (混合)				
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 <u>無</u>				

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 (× 10 ⁹ /mL)	用量設定試験	4.28	4.75	7.49	5.80	3.70
	本試験	3.94	4.60	8.68	5.50	3.70
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19日製造
購入の場合の Lot No.	DZLH2J01
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 (ガス暴露法)
その他の場合は その選択理由	気体のため

(2) 試験条件

組 成	菌懸濁液	0.1 mL
	被験物質溶液 (ガス)	500 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	
	時間	
インキュベーション	温度	37°C
	時間	48時間 (暴露4時間+44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、本試験の結果を別表 2 に、比活性値を別表 3 に示した。なお、図 1~10 は別表 2 より作成した。</p> <p>用量設定試験及び本試験ともに代謝活性化の有無にかかわらず <i>S. typhimurium</i> TA100、TA1535 及び <i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i> において、陰性対照値の 2 倍以上となる、復帰変異コロニー数の用量反応性を伴う増加が認められた。なお、陰性対照値の 2 倍以上のコロニー数が観察された最低用量は、本試験の代謝活性化しない場合の <i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i> 及び代謝活性化した場合の <i>S. typhimurium</i> TA1535 の 0.0977% であった。また、被験物質の暴露中、バッグ内のガスが若干褐色に変化していたため、被験物質である一酸化窒素の一部が二酸化窒素に変化したと思われた。</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。また、用量設定試験時に、窒素置換下における無酸素状態 4 時間での代謝活性化系への影響を確認し、若干の減少が考えられる菌株も見られたが、十分な増加を示しており、影響はほとんどないと判断した。</p> <p>以上の試験結果より、本試験条件下において一酸化窒素は、微生物に対する遺伝子突然変異誘発能を有する（陽性）と判定した。</p>		

(3) 参考事項

菌に対する生育阻害は、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての菌株の 1.56% 以上の被験物質濃度で認められた。

試験は下記の方法で実施した。

- 1) 滅菌した小試験管に、代謝活性化しない場合は 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL を、代謝活性化する場合は S9 Mix 0.5 mL を加えた後、さらに各菌懸濁液 0.1 mL を加え、攪拌した。
- 2) 攪拌後、あらかじめ電子レンジを用いて溶解し、ユニット恒温槽で 45°C に保温されたトップアガーを小試験管に 2.0 mL 加えて攪拌後、最小グルコース寒天平板培地に均一に重層し、固化したことを確認した。
- 3) 固化した最小グルコース寒天平板培地のふたを外し、代謝活性化の有無、用量ごとに、逆さにして固定し、ガス収集バッグ内に移した。
- 4) ガス収集バッグをシーリングした後、安全キャビネット内で希釈用ガスを注入し、漏れが無いことを確認した後、ポンプを用いてガスを抜き、再度ポンプと流量計を用いて 1 プレートあたり 500 mL の調製した被験物質ガスを注入した。陰性対照には希釈用ガスのみを同一の条件で注入した。無菌試験用として最高用量のバッグ内に最小グルコース寒天平板培地を入れた。
- 5) プレートを入れたガス収集バッグをインキュベータに入れ、37°C で 4 時間被験物質に暴露させた。
- 6) 暴露後、ガス収集バッグを安全キャビネット内に移動し、バッグ内を空気と置換した後、開封し、代謝活性化の有無、用量ごとに再度ビニール袋に入れて密封し、再度インキュベータに入れ、37°C で被験物質の暴露時間との合計が 48 時間になるように培養した。

- 7) 培養後、自動コロニーカウンタ（コロニーアナライザーCA-11D systems、システムサイエンス株式会社）を用いて計数（面積補正、補正值：1.21）した。また、実体顕微鏡を用いて菌に対する生育阻害の有無を観察した。
陽性対照物質は、プレート法により実施した。

試験は下記の文献を参考に実施した。

荒木明宏,野口忠,松島泰次郎(1988)：ガス状物質の微生物を用いる変異原性試験-テドラ-R バッグを用いる曝露試験, トキシコロジーフォーラム,11(2)184-193.

A.Araki , T.Noguchi , F.Kato , T.Matsushima(1994) : Improved method for mutagenicity testing of gaseous compounds by using a gas sampling bag. , Mutation Research, 307, 335-344.

(別表1)

試験結果表 (用量設定試験)

被験物質の名称：一酸化窒素

No. T-2007

試験実施期間		2016年3月15日 より 2016年3月18日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (%)	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 (窒素)	152 142 (147)	14 19 (17)	35 39 (37)	33 29 (31)	9 6 (8)
	0.0122	162 161 (162)	15 21 (18)	36 32 (34)	38 32 (35)	10 7 (9)
	0.0488	193 172 (183)	24 19 (22)	69 72 (71)	37 36 (37)	8 9 (9)
	0.195	203 205 (204)	95 112 (104)	204 217 (211)	42 43 (43)	11 12 (12)
	0.781	342 351 (347)	263 285 (274)	354 344 (349)	40 48 (44)	10 8 (9)
	3.13	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)
	12.5	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)
	50	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)
	S9Mix (+)	陰性対照 (窒素)	167 153 (160)	14 17 (16)	41 39 (40)	44 42 (43)
0.0122		154 147 (151)	18 25 (22)	48 62 (55)	40 47 (44)	11 12 (12)
0.0488		167 159 (163)	30 21 (26)	33 62 (48)	39 38 (39)	14 11 (13)
0.195		193 180 (187)	100 119 (110)	65 65 (65)	44 30 (37)	16 9 (13)
0.781		336 344 (340)	259 228 (244)	125 115 (120)	31 32 (32)	12 12 (12)
3.13		0* 0* (0)	0* 0* (0)	46* 23* (35)	0* 0* (0)	0* 0* (0)
12.5		0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)
50		0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)
陽性対照		名 称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2
	用量 (μg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	コロニー数/プレート (プレート法)	398 381 (390)	340 342 (341)	89 79 (84)	260 245 (253)	120 124 (122)
	コロニー数/プレート (N ₂ 4h暴露)	391 414 (403)	318 261 (290)	78 81 (80)	276 252 (264)	127 134 (131)
	名 称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
	用量 (μg/プレート)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
	コロニー数/プレート (プレート法)	1010 997 (1004)	443 436 (440)	947 954 (951)	442 456 (449)	87 86 (87)
	コロニー数/プレート (N ₂ 4h暴露)	794 825 (810)	465 478 (472)	782 765 (774)	255 273 (264)	80 76 (78)

(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)

被験物質の名称：一酸化窒素

No. T-2007

試験実施期間		2016年3月18日 より 2016年3月22日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (%)	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 (窒素)	140 163 (152)	12 15 (14)	28 35 (32)	34 30 (32)	11 14 (13)
	0.0977	139 158 (149)	25 29 (27)	68 74 (71)	47 32 (40)	10 19 (15)
	0.195	222 178 (200)	75 94 (85)	124 118 (121)	44 50 (47)	23 15 (19)
	0.391	263 258 (261)	164 142 (153)	250 268 (259)	38 45 (42)	14 16 (15)
	0.781	325 340 (333)	379 309 (344)	394 373 (384)	42 51 (47)	22 15 (19)
	1.56	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
	3.13	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
	S9Mix (+)	陰性対照 (窒素)	119 127 (123)	16 13 (15)	39 34 (37)	31 35 (33)
0.0977		142 169 (156)	35 43 (39)	36 51 (44)	28 38 (33)	12 16 (14)
0.195		149 183 (166)	126 104 (115)	48 74 (61)	38 46 (42)	19 22 (21)
0.391		343 306 (325)	232 203 (218)	138 103 (121)	36 41 (39)	21 13 (17)
0.781		383 376 (380)	374 379 (377)	186 229 (208)	27 19 (23)	12 18 (15)
1.56		0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	122 * 150 * (136)	4 * 2 * (3)	2 * 6 * (4)
3.13		0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
陽性対照		名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2
	用量 (μg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	コロニー数/プレート	294 338 (316)	513 462 (488)	76 77 (77)	366 413 (390)	212 241 (227)
	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
	用量 (μg/プレート)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
	コロニー数/プレート	886 865 (876)	582 540 (561)	986 923 (955)	405 382 (394)	153 132 (143)

(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

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3)

比 活 性

被験物質の名称：一酸化窒素

No. T-2007

	菌株名	-S9Mix	+S9Mix
		2倍以上の増加が認められた最低用量 (%)	2倍以上の増加が認められた最低用量 (%)
用量設定試験	TA100	0.781	0.781
	TA1535	0.195	0.195
	WP2 <i>uvrA</i>	0.195	0.781
	TA98		
	TA1537		
本試験	TA100	0.781	0.391
	TA1535	0.195	0.0977
	WP2 <i>uvrA</i>	0.0977	0.391
	TA98		
	TA1537		

図 1

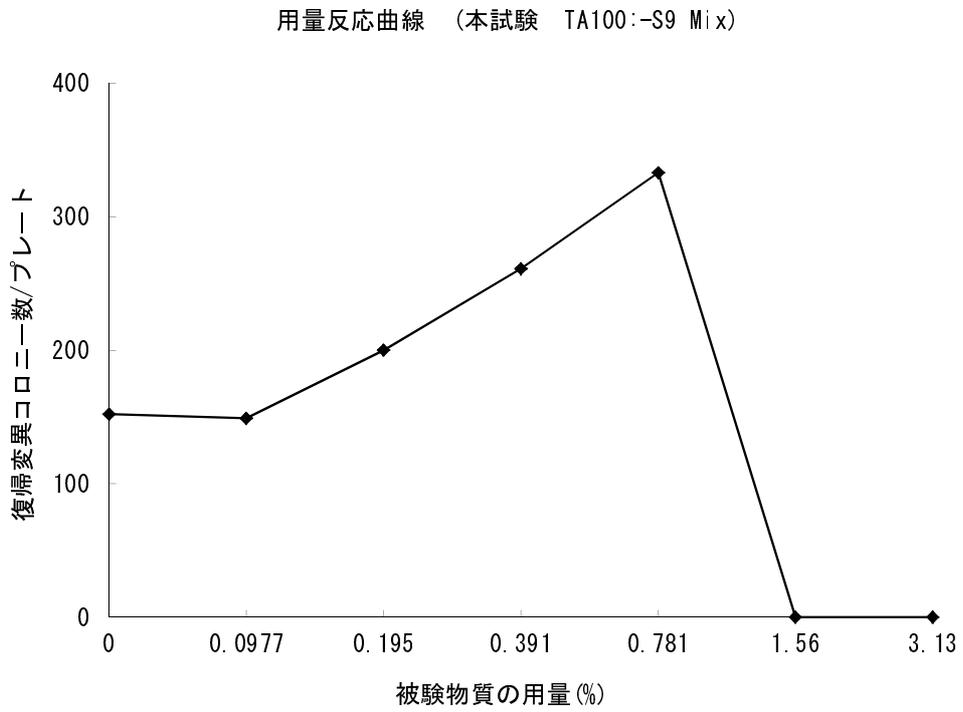


図 2

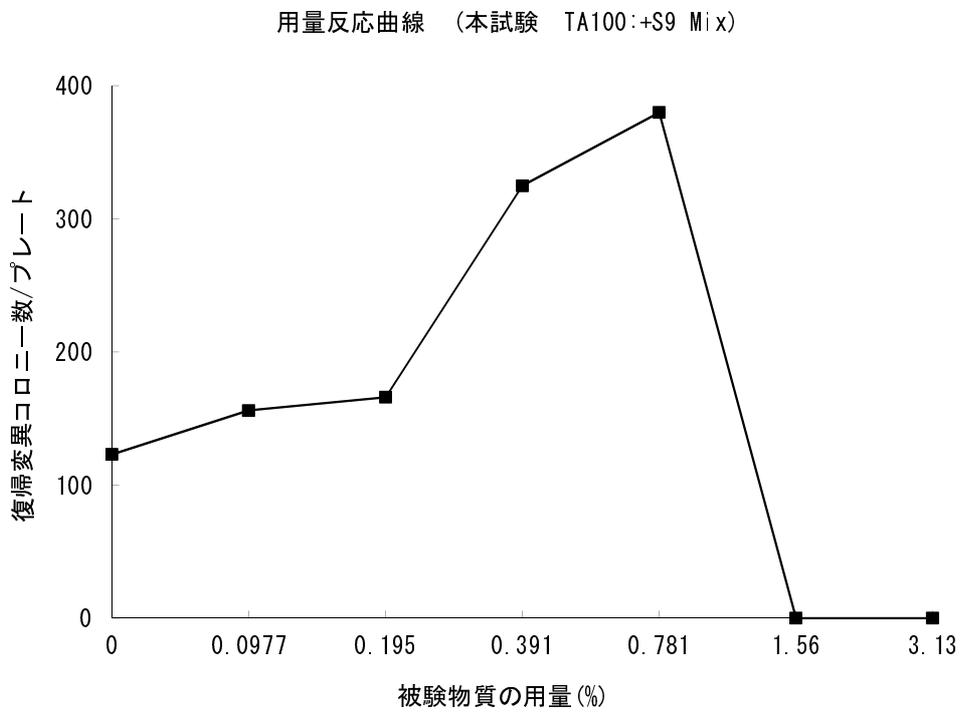


図 3

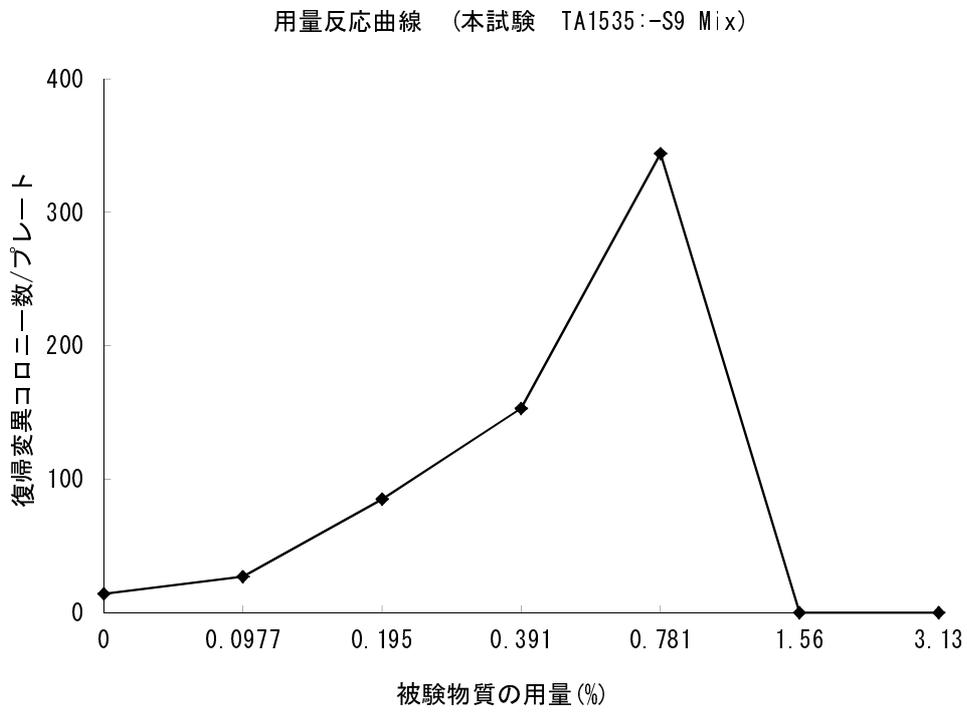


図 4

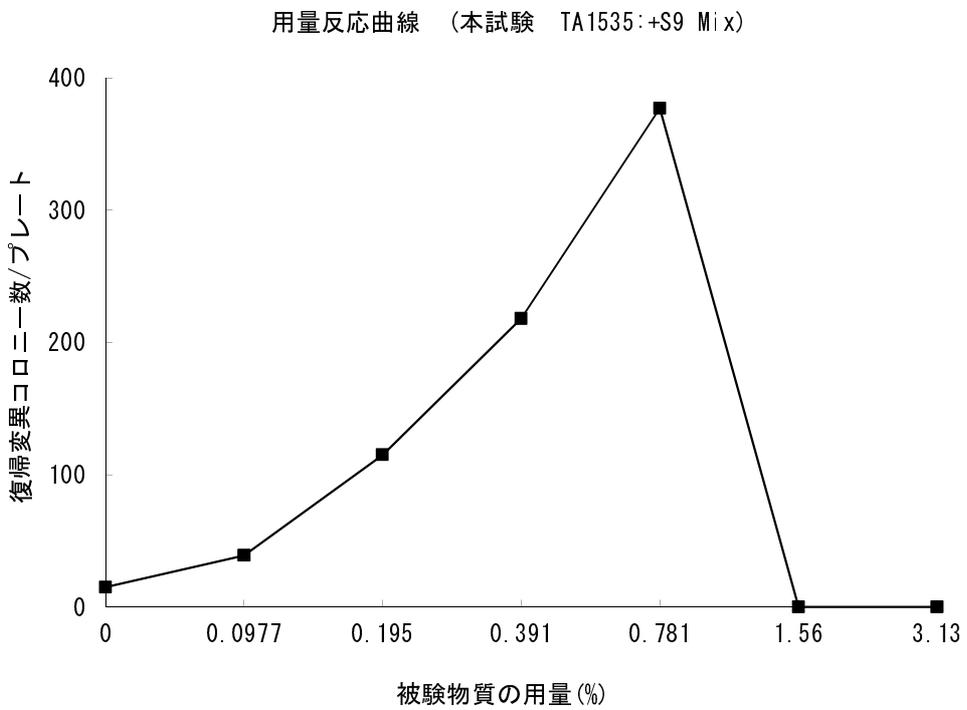


図 5

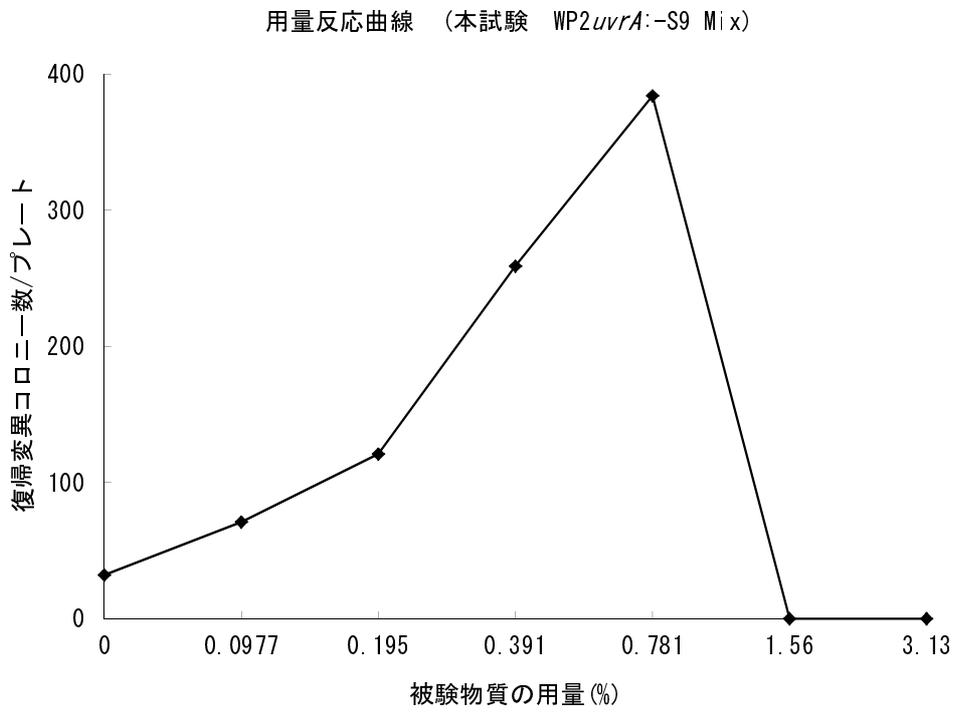


図 6

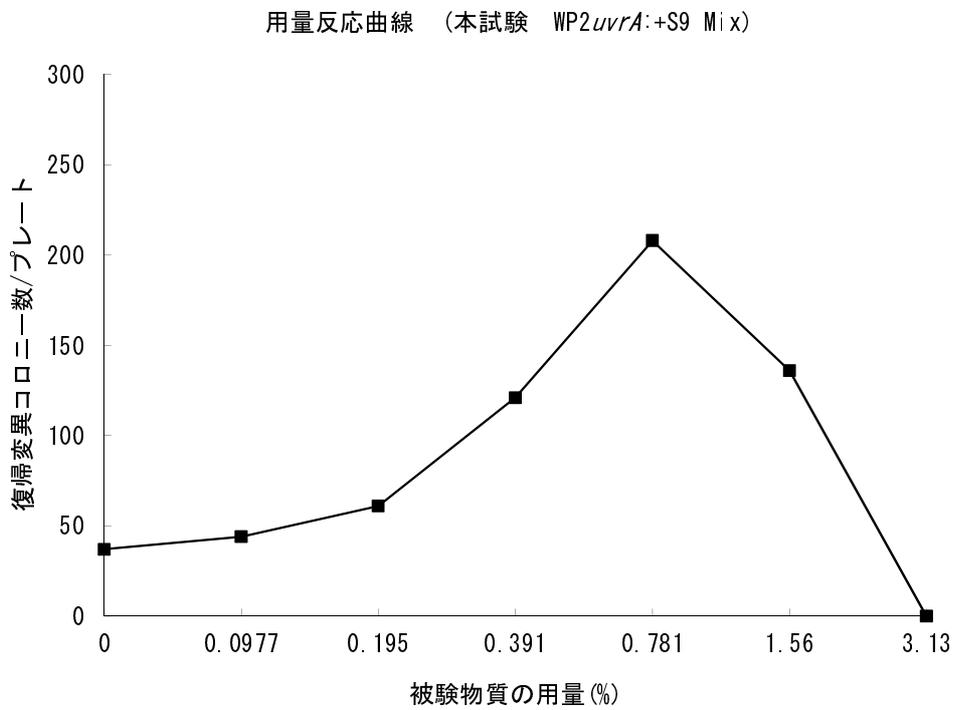


図 7

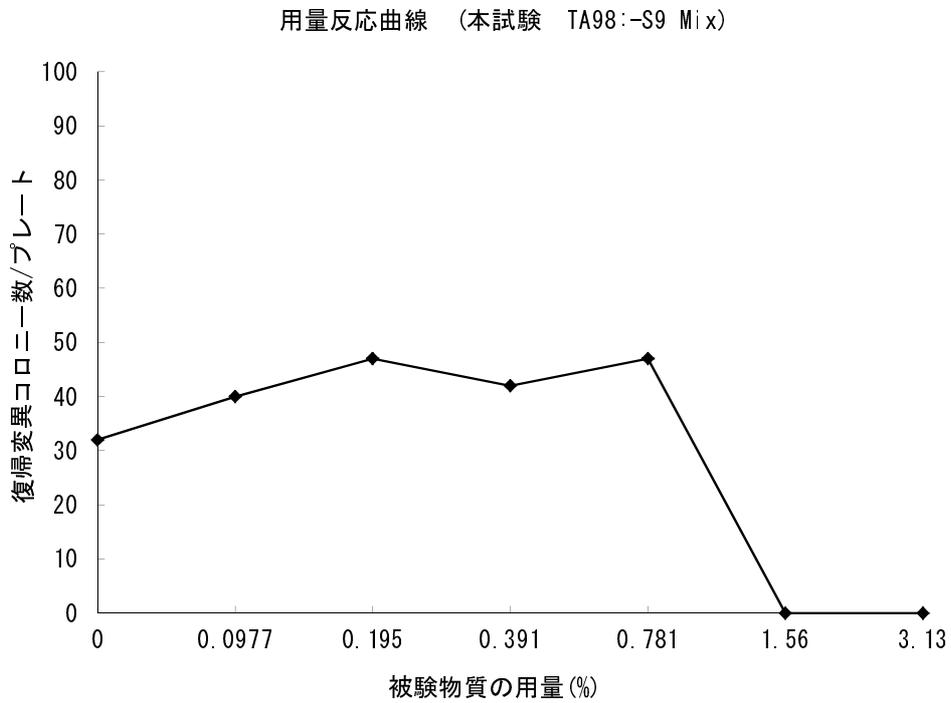


図 8

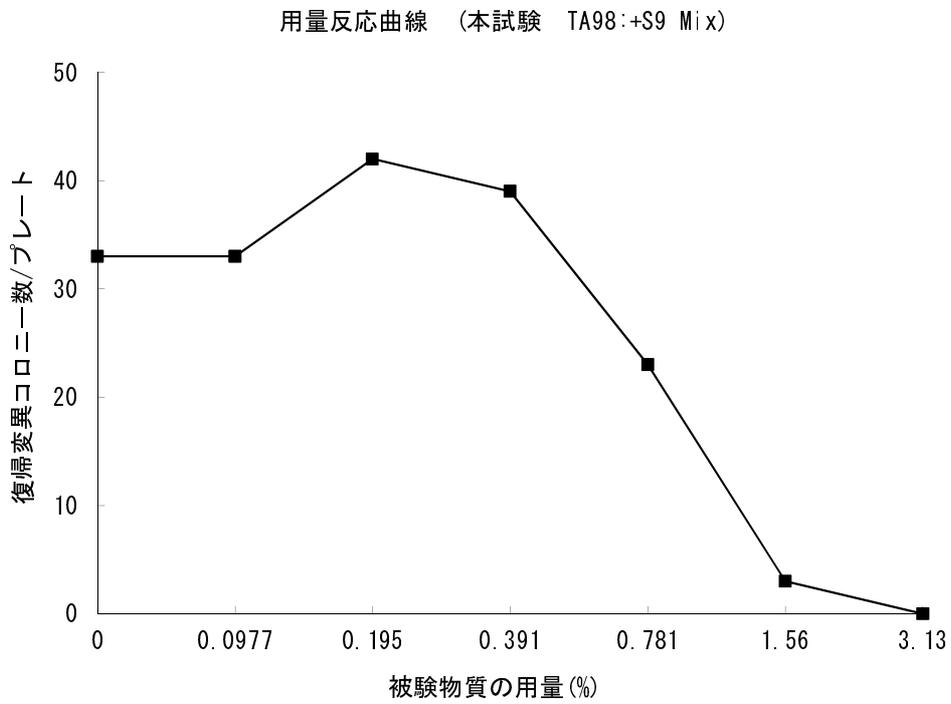


図 9

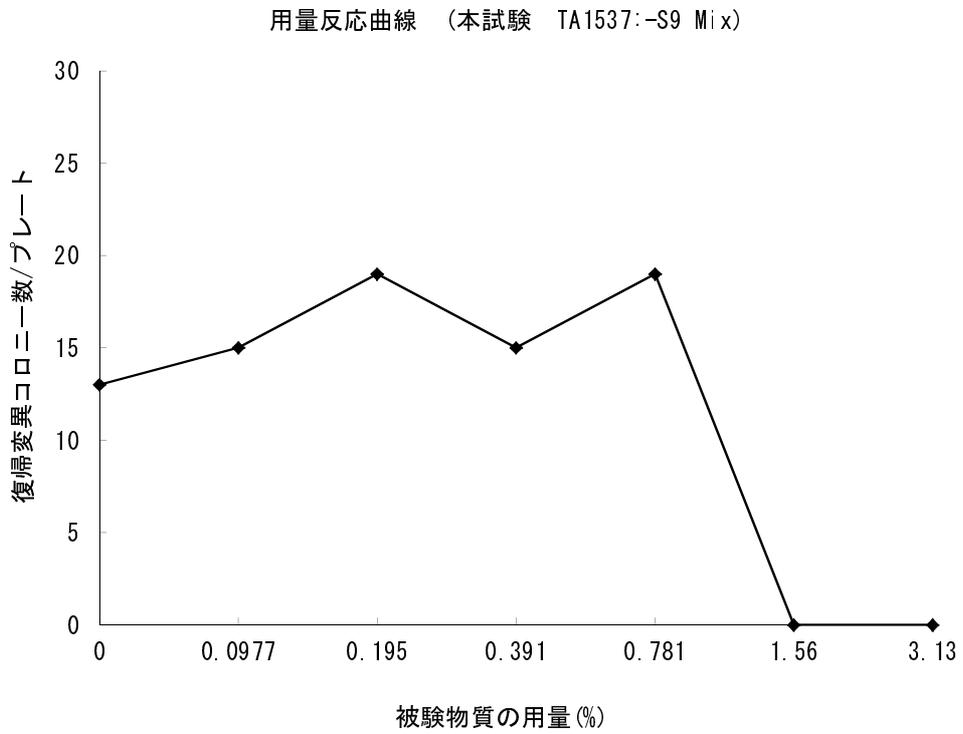


図 10

