

微生物を用いる変異原性試験結果報告書

1. 一般的な事項

新規化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	ジメチル=メチルホスホナート		
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）			
試験に供した新規化学物質の純度	97.4%	試験に供した新規化学物質の Lot No.	ZQQXC
不純物の名称及び濃度			
CAS 番号	756-79-6	蒸気圧	0.962 mmHg (25°C) *
分子量	124.08	分配係数	
融 点		常温における性状	液体（比重：1.16）
沸 点	181°C*		
安定性	適切な条件下においては安定		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中での安定性
	水	50 mg/mL で溶解	発熱有り
	DMSO	50 mg/mL で溶解	発熱、ガスの発生等の反応性なし
	アセトン		
	その他		

(備考) 上記被験物質情報は、製造元からの情報及び*：独立行政法人製品評価技術基盤 機構化学物質総合情報システム（CHRIIP）の情報による。なお、溶解度及び溶媒中の安定性については、株式会社ボゾリサーチセンターで実施した溶解度試験の結果である。

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 uvrA	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10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(%)
	DMSO	和光純薬工業 株式会社	ECH3050	JIS 規格 試薬特級	99.0%以上
溶媒選択の理由	水、DMSOについて溶解性試験を実施した。その結果水、DMSOに50 mg/mLで溶解したが、水において発熱が見られたため、発熱、ガスの発生等の反応性も認められなかったDMSOを溶媒として試験を実施した。なお、被験液の調製には、モレキュラーシーズ 4A 1/16（和光純薬工業株式会社；Lot No. HWL7297）で脱水したDMSOを使用した。				
被験物質溶液の性状	<input checked="" type="checkbox"/> 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	用時調製・室温				
純度換算の有無	<input checked="" type="checkbox"/> 有			<input type="checkbox"/> 無	

5.1.3 溶媒の選択理由

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	4.44	4.74	8.50	6.29
	本試験	4.43	4.77	8.58	6.20
測 定 方 法		(1) O.D.値より換算 2. 段階希釀法 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
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
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	0.1 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 (用量設定試験)	49時間
	時間 (本試験)	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
判定の理由		
<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 に示した。なお、図 1~10 は別表 2 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ジメチル=メチルホスホナートは、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、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても認められなかった。

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: ジメチル=メチルホスホナート

No. T-2020

試験実施期間		2016年3月4日より2016年3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	TA98	TA1537
S9Mix(-)	陰性対照(DMSO)	132 131 (132)	8 8 (8)	27 25 (26)	13 19 (16)	13 8 (11)
	1.22	132 121 (127)	8 6 (7)	33 26 (30)	12 11 (12)	10 14 (12)
	4.88	103 114 (109)	7 10 (9)	25 24 (25)	15 17 (16)	9 8 (9)
	19.5	136 116 (126)	7 8 (8)	28 25 (27)	13 13 (13)	12 7 (10)
	78.1	131 135 (133)	11 9 (10)	28 22 (25)	10 18 (14)	9 9 (9)
	313	125 134 (130)	6 4 (5)	20 22 (21)	12 10 (11)	10 6 (8)
	1250	136 124 (130)	10 8 (9)	28 22 (25)	12 15 (14)	8 7 (8)
	5000	109 149 (129)	8 12 (10)	38 28 (33)	10 15 (13)	8 10 (9)
	陰性対照(DMSO)	123 115 (119)	11 10 (11)	31 26 (29)	31 40 (36)	11 10 (11)
	S9Mix(+)	117 136 (127)	8 8 (8)	35 26 (31)	38 29 (34)	14 7 (11)
陽性対照	4.88	122 140 (131)	7 10 (9)	25 25 (25)	21 23 (22)	8 6 (7)
	19.5	151 125 (138)	7 6 (7)	25 25 (25)	22 24 (23)	12 10 (11)
	78.1	114 122 (118)	11 8 (10)	23 38 (31)	36 25 (31)	15 11 (13)
	313	91 108 (100)	10 12 (11)	27 31 (29)	34 20 (27)	12 10 (11)
	1250	113 128 (121)	7 5 (6)	40 27 (34)	25 28 (27)	11 10 (11)
	5000	134 114 (124)	7 4 (6)	29 28 (29)	21 34 (28)	10 13 (12)
	名 称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191
	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	528 499 (514)	225 238 (232)	70 62 (66)	355 385 (370)	802 912 (857)
	名 称	B[α]P	2AA	2AA	B[α]P	B[α]P
S9Mixを必要とするもの	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	701 819 (760)	247 300 (274)	551 588 (570)	396 390 (393)	123 100 (112)

(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[α]P : ベンゾ[α]ピレン

()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:ジメチル=メチルホスホナート

No. T-2020

試験実施期間		2016年3月9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(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	TA98	TA1537
S9Mix(-)	陰性対照(DMSO)	111 115 (113)	8 6 (7)	33 25 (29)	15 23 (19)	6 9 (8)
	313	100 120 (110)	10 11 (11)	27 27 (27)	14 15 (15)	8 9 (9)
	625	99 97 (98)	11 9 (10)	34 31 (33)	19 15 (17)	5 7 (6)
	1250	103 119 (111)	10 11 (11)	19 25 (22)	13 15 (14)	8 10 (9)
	2500	108 106 (107)	8 12 (10)	28 40 (34)	15 21 (18)	8 10 (9)
	5000	111 101 (106)	10 13 (12)	25 24 (25)	16 20 (18)	6 9 (8)
	陰性対照(DMSO)	127 93 (110)	7 11 (9)	33 30 (32)	34 31 (33)	14 11 (13)
	313	112 135 (124)	10 9 (10)	25 30 (28)	42 30 (36)	13 13 (13)
	625	112 105 (109)	12 7 (10)	29 29 (29)	39 29 (34)	13 12 (13)
	1250	111 129 (120)	5 8 (7)	30 30 (30)	32 40 (36)	10 7 (9)
S9Mix(+)	2500	109 129 (119)	12 6 (9)	36 30 (33)	38 35 (37)	11 10 (11)
	5000	134 117 (126)	10 8 (9)	16 19 (18)	40 29 (35)	11 13 (12)
	名 称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191
	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	447 471 (459)	225 250 (238)	70 66 (68)	318 336 (327)	1022 1211 (1117)
	名 称	B[α]P	2AA	2AA	B[α]P	B[α]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	936 900 (918)	260 255 (258)	740 810 (775)	367 402 (385)	120 101 (111)
	名 称	B[α]P	2AA	2AA	B[α]P	B[α]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	936 900 (918)	260 255 (258)	740 810 (775)	367 402 (385)	120 101 (111)

(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[α]P : ベンゾ[α]ピレン

()内は、2枚のプレートの平均値を示す。

図 1

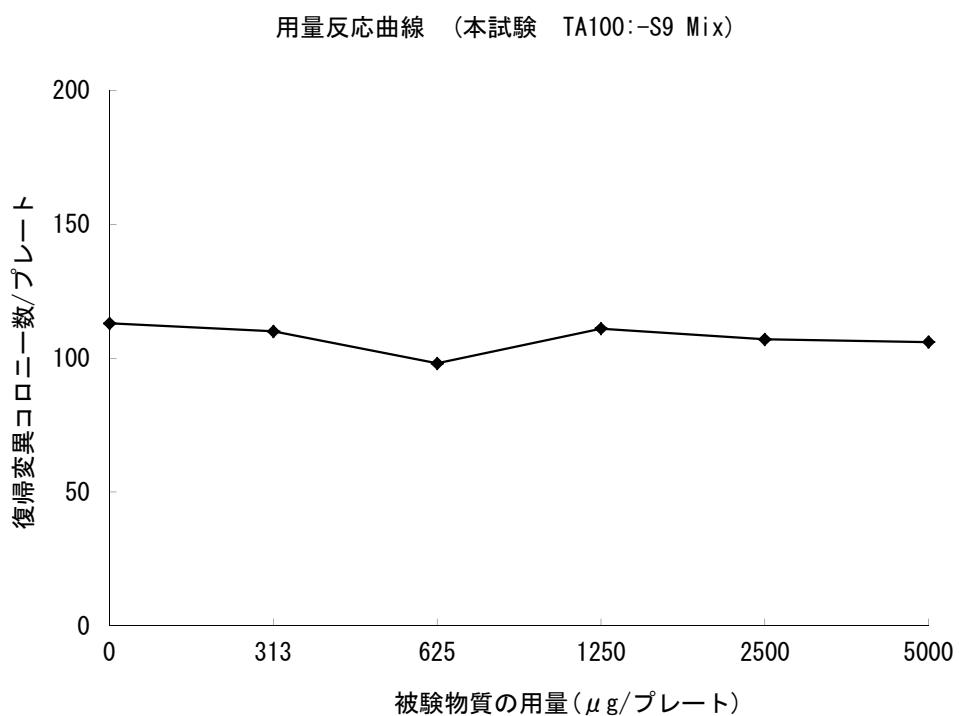


図 2

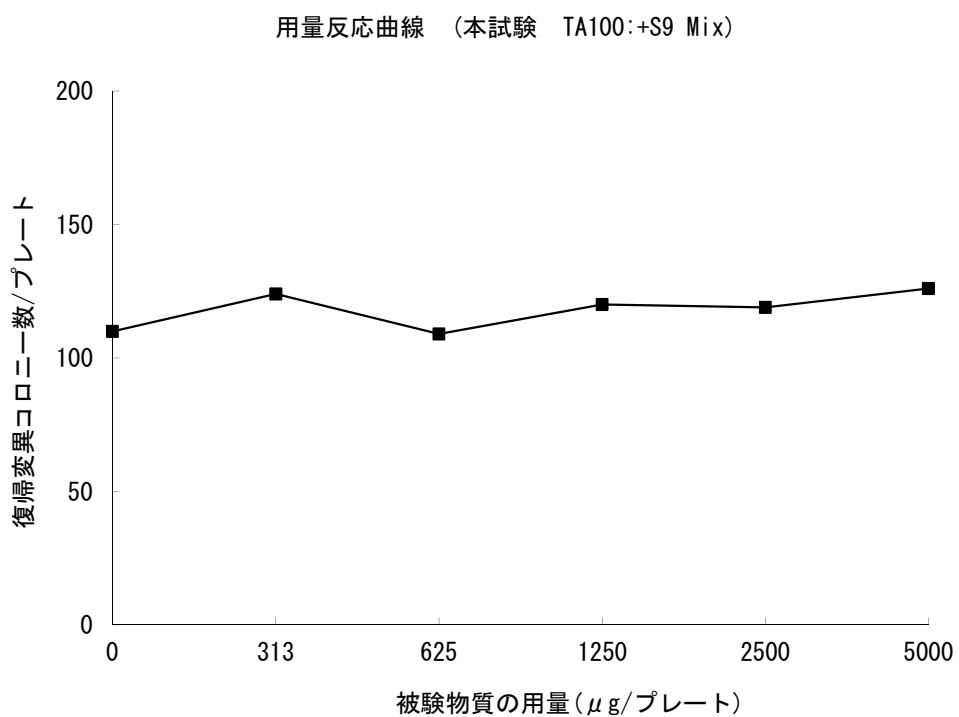


図 3

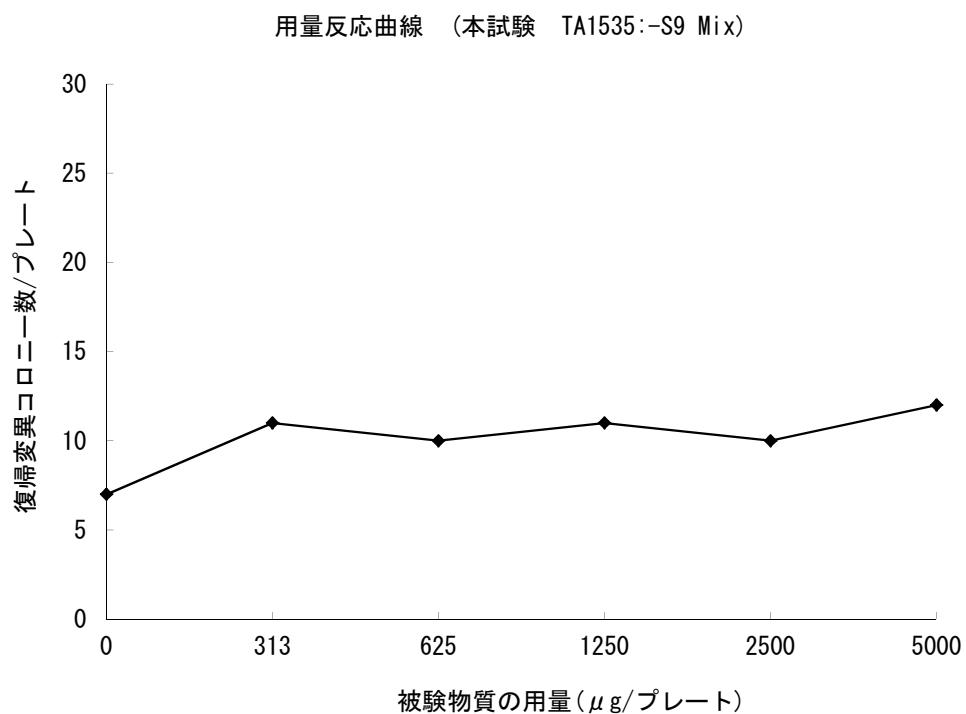


図 4

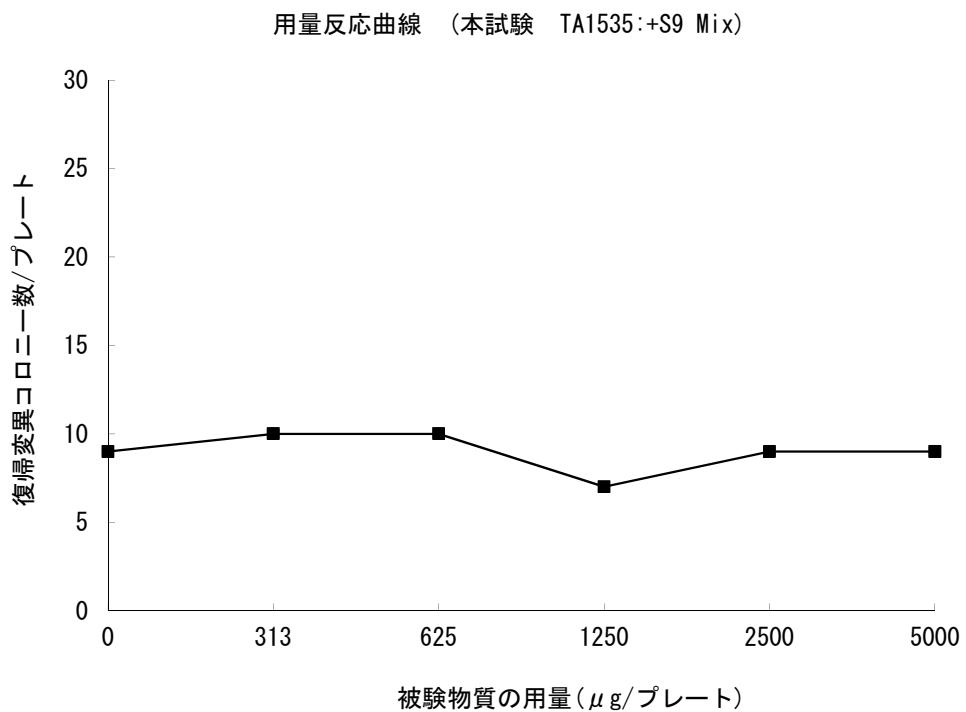


図 5

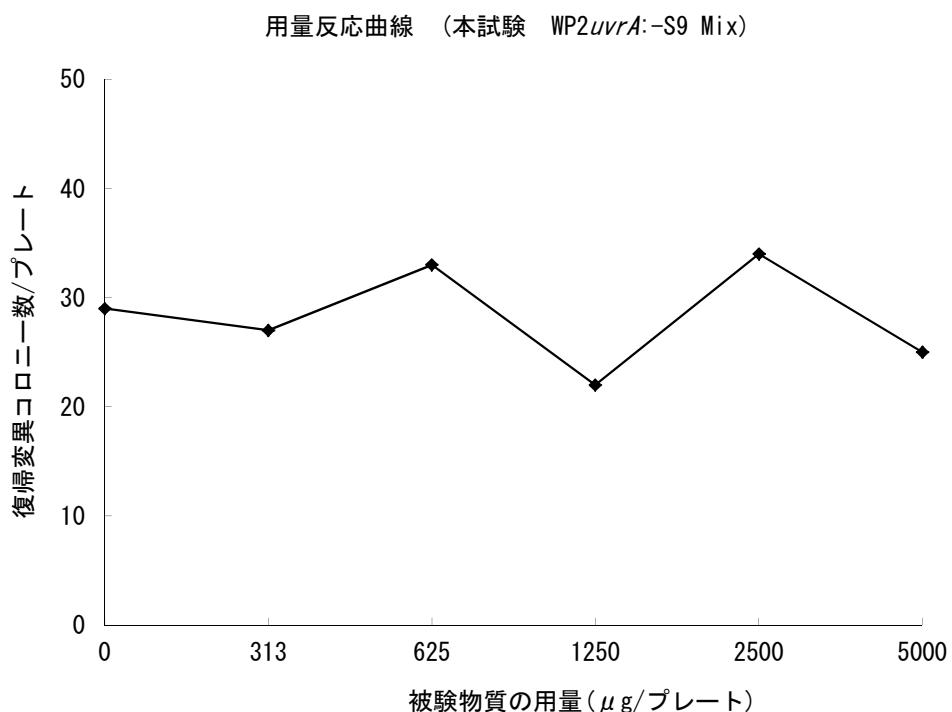


図 6

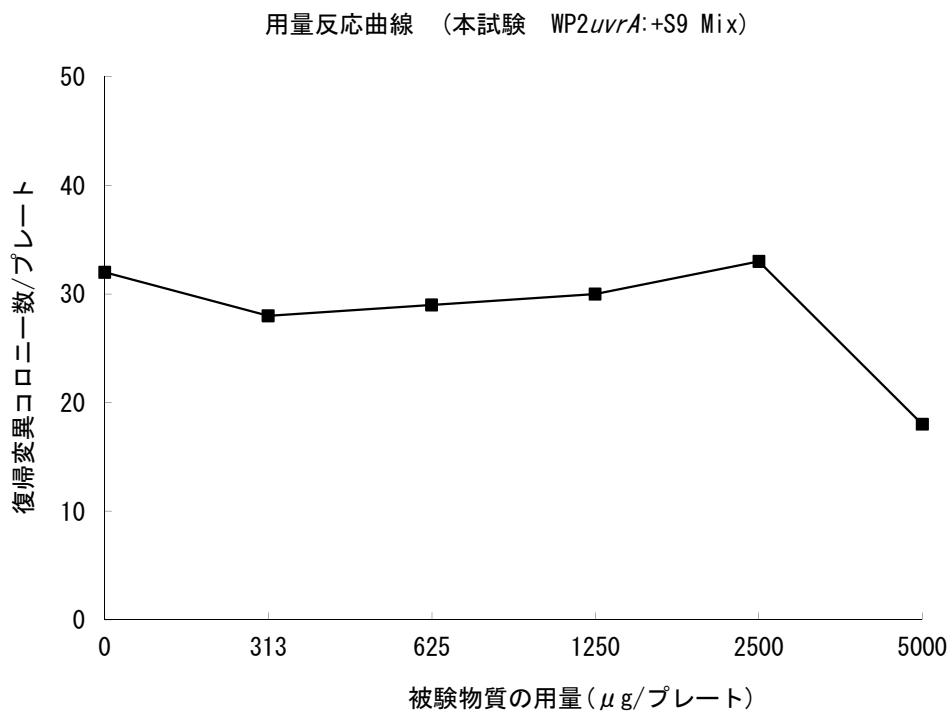


図 7

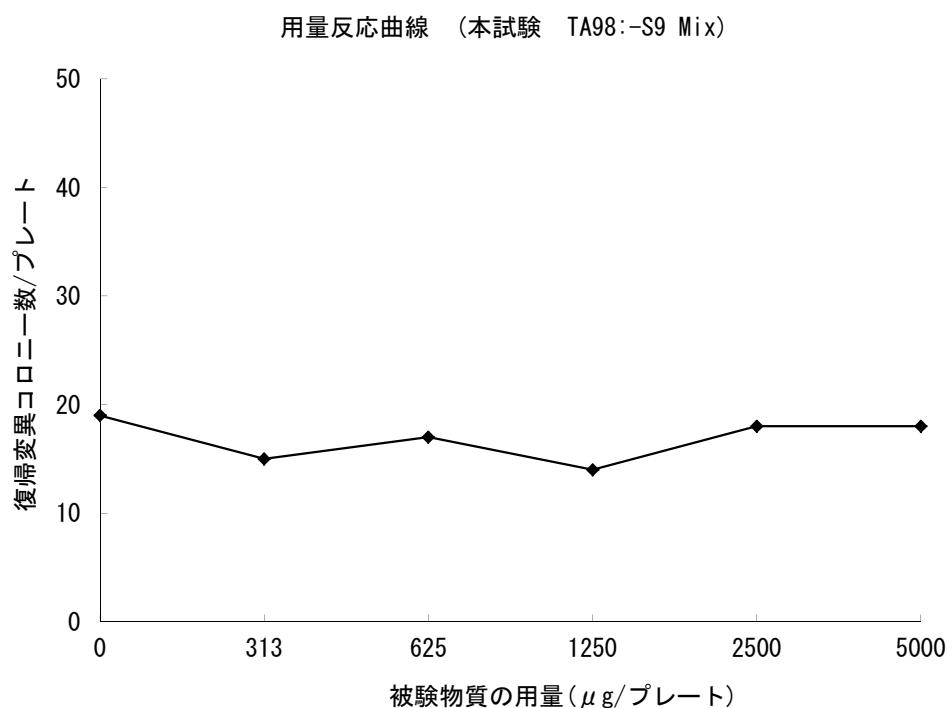


図 8

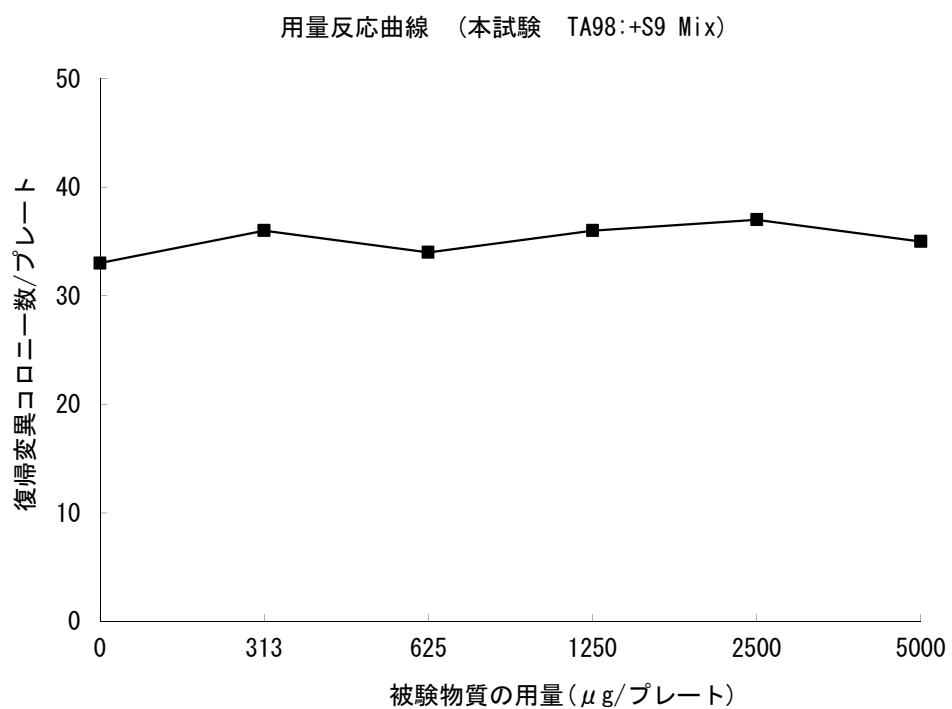


図 9

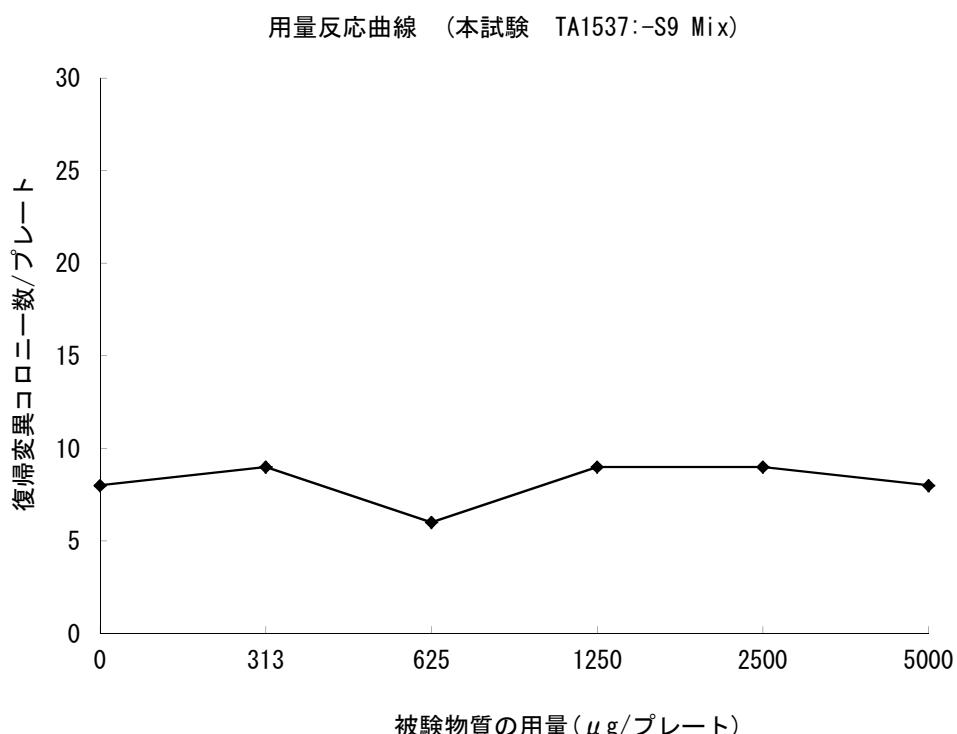


図 10

