

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	2016年10月7日製造
購入の場合 Lot No.	RAA201610A
保存温度	-85.6~-78.7°C (保存期間: 2016年11月22日~2017年1月11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	194-246 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	DSH0997	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、水の 50 mg/mL で溶解せず、DMSO に 50 mg/mL で溶解し、発熱、ガスの発生等の反応性も認められなかったため、DMSO を溶媒として試験を実施した。なお、被験液の調製には、モレキュラシーブス 4A 1/16 (和光純薬工業株式会社 ; Lot No. HWG7622) で脱水した DMSO 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 (× 10 ⁹ /mL)	用量設定試験	4.19	4.80	8.69	6.02	3.67
	本試験	4.14	4.80	7.01	5.63	3.65
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10月21日製造 ¹⁾ 、2016年11月15日製造 ²⁾
購入の場合の Lot No.	DZLHLAL01 ¹⁾ 、DZLHBF01 ²⁾
使用寒天の名称・製造・Lot No.	OXOID AGAR No.1・OXOID LTD.・Lot No. 1365423 ¹⁾ 1372870 ²⁾

1) 用量設定試験に使用 2) 本試験に使用

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	0.1 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	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、本試験の結果を別表 2、3 に、比活性を別表 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、TA98 及び代謝活性化した場合の <i>S. typhimurium</i> TA1535 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依存性を伴う増加が認められ再現性を示した。なお、最大比活性値は、用量設定試験の代謝活性化しない場合の <i>S. typhimurium</i> TA100 における 1.45×10^4 (Rev/mg) であった。</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 4,4'-ジニトロジフェニルエーテルは、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

<p>本被験物質によるプレート上の沈殿は、代謝活性化の有無にかかわらず 313 µg/plate 以上の用量で認められた。本被験物質によるプレート上の着色は、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。</p> <p>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。</p> <p>本試験の試験用量は、最大比活性値を参考として、代謝活性化の有無にかかわらず <i>S. typhimurium</i> TA100 においては 78.1 µg/plate、代謝活性化する場合の <i>S. typhimurium</i> TA98 及び TA1535 においては 313 µg/plate、代謝活性化しない場合の <i>S. typhimurium</i> TA98 においては 1250 µg/plate を最高用量として以下公比 2 で 5 段階希釈した計 6 用量を設定した。</p> <p>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。</p>
--

(別表1)

試験結果表 (用量設定試験)

被験物質の名称: 4,4'-ジニトロジフェニルエーテル

No. T-2279

試験実施期間		2016年12月20日 より 2016年12月23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 (DMSO)	89 102 (96)	6 10 (8)	29 22 (26)	15 16 (16)	8 7 (8)	
	1.22	112 108 (110)	7 8 (8)	22 26 (24)	17 14 (16)	7 8 (8)	
	4.88	205 152 (179)	10 7 (9)	35 35 (35)	18 18 (18)	5 5 (5)	
	19.5	404 351 (378)	12 8 (10)	21 32 (27)	18 22 (20)	6 7 (7)	
	78.1	571 569 (570)	12 9 (11)	31 16 (24)	23 32 (28)	8 6 (7)	
	313 #	604 564 (584)	10 8 (9)	25 25 (25)	31 33 (32)	7 5 (6)	
	1250 #	629 518 (574)	11 7 (9)	35 34 (35)	42 37 (40)	8 4 (6)	
	5000 #	496 554 (525)	9 8 (9)	30 18 (24)	39 42 (41)	4 5 (5)	
	S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	116 102 (109)	12 12 (12)	32 32 (32)	40 32 (36)	9 9 (9)
		1.22	137 138 (138)	5 6 (6)	24 31 (28)	40 49 (45)	10 10 (10)
4.88		195 156 (176)	12 7 (10)	33 28 (31)	46 44 (45)	7 11 (9)	
19.5		400 356 (378)	14 13 (14)	32 28 (30)	55 63 (59)	10 13 (12)	
78.1		838 674 (756)	26 22 (24)	32 35 (34)	96 100 (98)	6 10 (8)	
313 #		696 734 (715)	37 26 (32)	31 29 (30)	92 95 (94)	10 7 (9)	
1250 #		680 590 (635)	31 24 (28)	29 36 (33)	84 97 (91)	6 7 (7)	
5000 #		510 476 (493)	17 16 (17)	35 27 (31)	67 78 (73)	10 11 (11)	
陽性対照		名 称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191
		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	571 519 (545)	231 257 (244)	73 78 (76)	258 299 (279)	1239 1441 (1340)	
	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	792 841 (817)	298 304 (301)	885 874 (880)	304 311 (308)	108 102 (105)	

(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

: 被験物質による沈殿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:-S9Mix)

被験物質の名称: 4,4'-ジニトロジフェニルエーテル

No. T-2279

試験実施期間		2017年1月10日 より 2017年1月13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 (一)	陰性対照 (DMSO)	98 109 (104)	9 8 (9)	26 24 (25)	14 20 (17)	7 5 (6)	
	2.44	106 117 (112)	NT	NT	NT	NT	
	4.88	132 146 (139)	NT	NT	NT	NT	
	9.77	185 168 (177)	NT	NT	NT	NT	
	19.5	213 235 (224)	NT	NT	NT	NT	
	39.1	320 273 (297)	NT	NT	22 21 (22)	NT	
	78.1	382 500 (441)	NT	NT	30 36 (33)	NT	
	156	NT	NT	NT	44 46 (45)	NT	
	313 #	NT	9 6 (8)	24 29 (27)	55 35 (45)	6 5 (6)	
	625 #	NT	7 6 (7)	33 30 (32)	50 61 (56)	6 8 (7)	
	1250 #	NT	7 6 (7)	25 21 (23)	53 59 (56)	7 6 (7)	
	2500 #	NT	6 8 (7)	25 24 (25)	NT	7 7 (7)	
	5000 #	NT	8 6 (7)	28 23 (26)	NT	7 6 (7)	
	陽性対照	名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191
		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		605 600 (603)	267 288 (278)	77 75 (76)	307 272 (290)	1225 1260 (1243)	

(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

: 被験物質による沈殿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:+S9Mix)

被験物質の名称 : 4,4'-ジニトロジフェニルエーテル

No. T-2279

試験実施期間		2017年1月10日 より 2017年1月13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	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537	
S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	145 131 (138)	9 8 (9)	32 32 (32)	28 28 (28)	9 11 (10)	
	2.44	167 152 (160)	NT	NT	NT	NT	
	4.88	221 220 (221)	NT	NT	NT	NT	
	9.77	268 282 (275)	11 8 (10)	NT	56 45 (51)	NT	
	19.5	372 336 (354)	8 7 (8)	NT	68 64 (66)	NT	
	39.1	438 435 (437)	10 12 (11)	NT	61 62 (62)	NT	
	78.1	582 569 (576)	16 22 (19)	NT	78 71 (75)	NT	
	156	NT	19 21 (20)	NT	58 83 (71)	NT	
	313 #	NT	28 24 (26)	27 27 (27)	79 76 (78)	8 7 (8)	
	625 #	NT	NT	28 25 (27)	NT	8 9 (9)	
	1250 #	NT	NT	31 35 (33)	NT	6 8 (7)	
	2500 #	NT	NT	30 33 (32)	NT	9 9 (9)	
	5000 #	NT	NT	30 29 (30)	NT	8 9 (9)	
	陽性対照	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		922 914 (918)	255 305 (280)	966 978 (972)	359 405 (382)	87 92 (90)	

(備考)

B[a]P : ベンゾ[a]ピレン
2AA : 2-アミノアントラセン

: 被験物質による沈殿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。

図 1

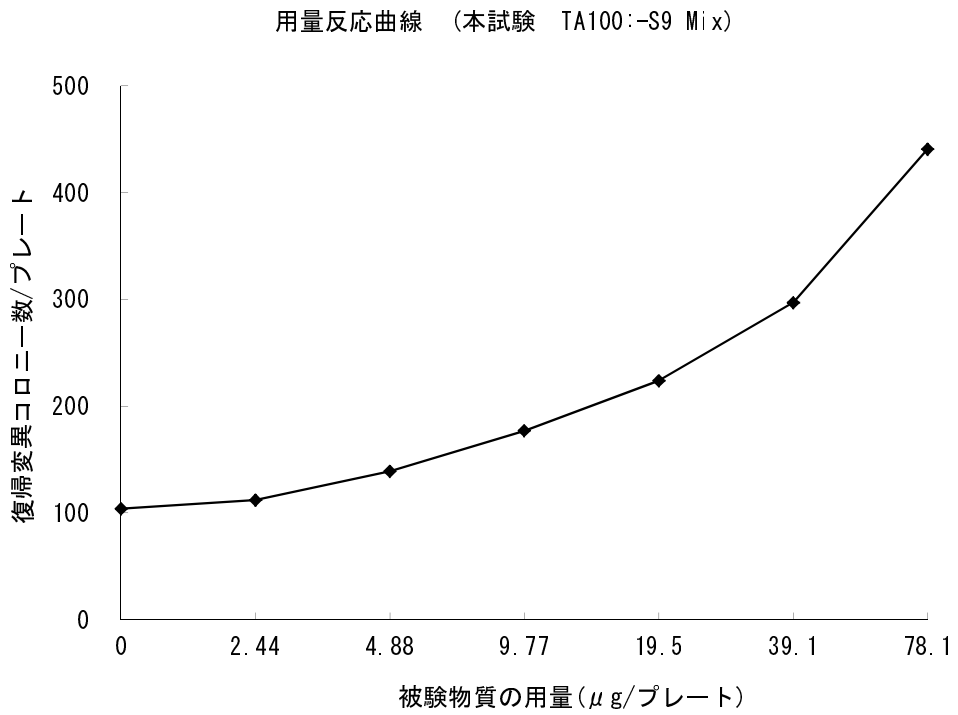


図 2

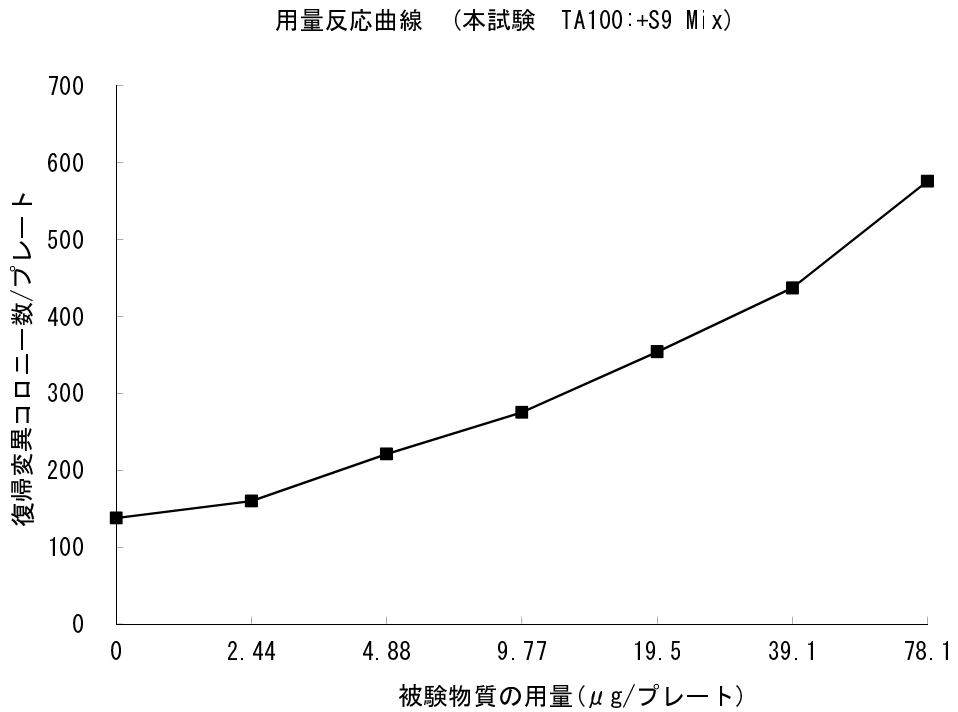


図 3

用量反応曲線 (本試験 TA1535:-S9 Mix)

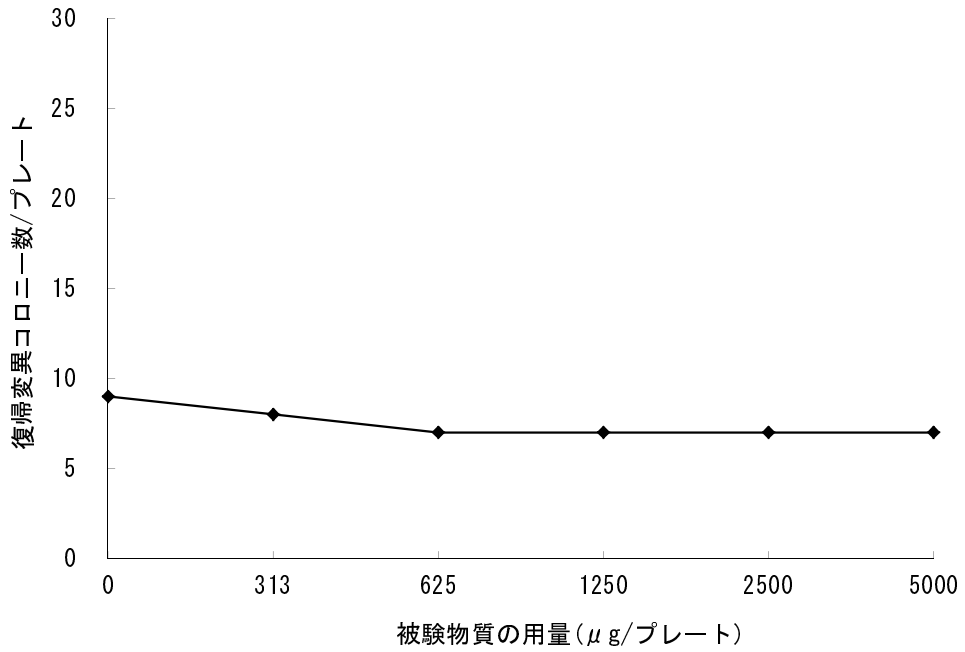


図 4

用量反応曲線 (本試験 TA1535:+S9 Mix)

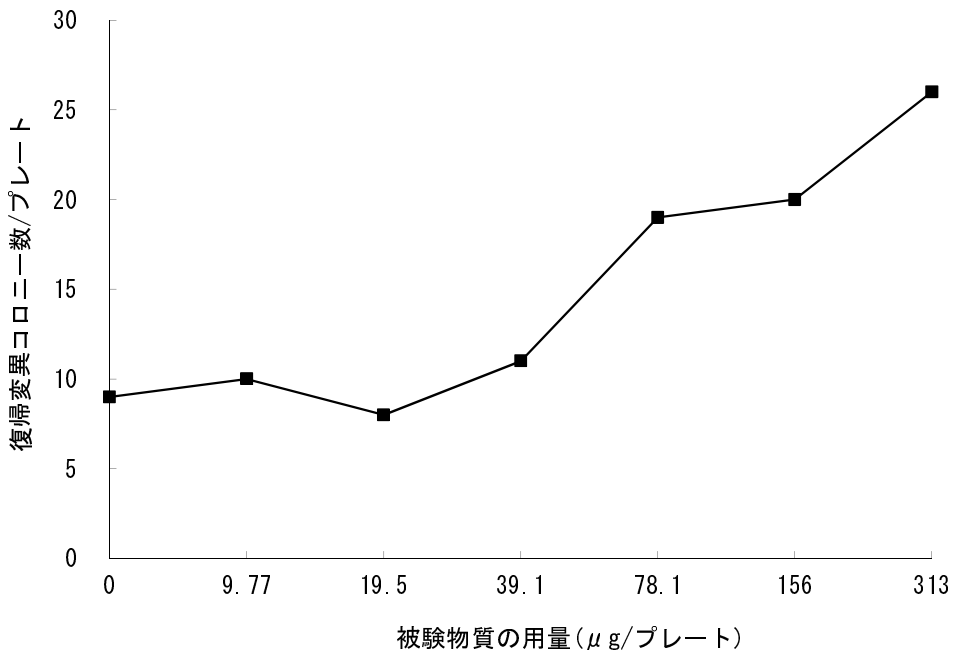


図 5

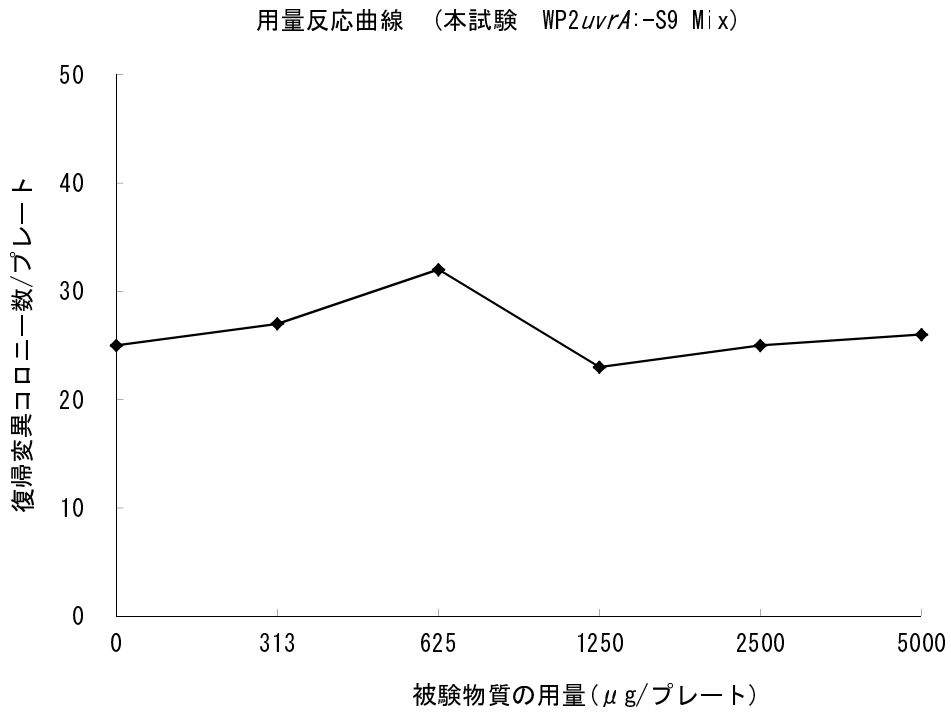


図 6

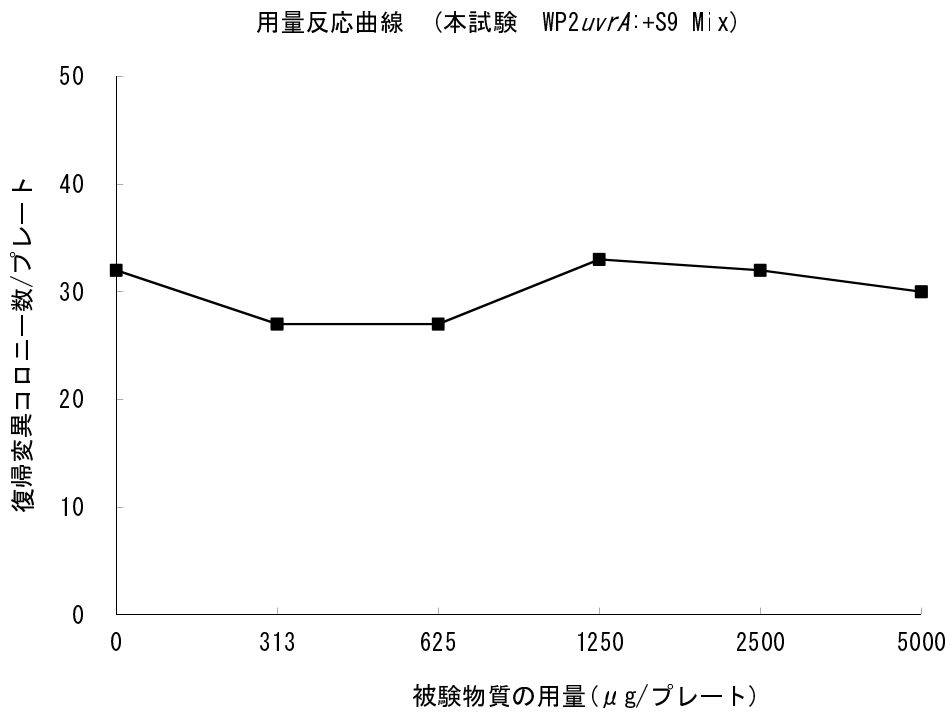


図 7

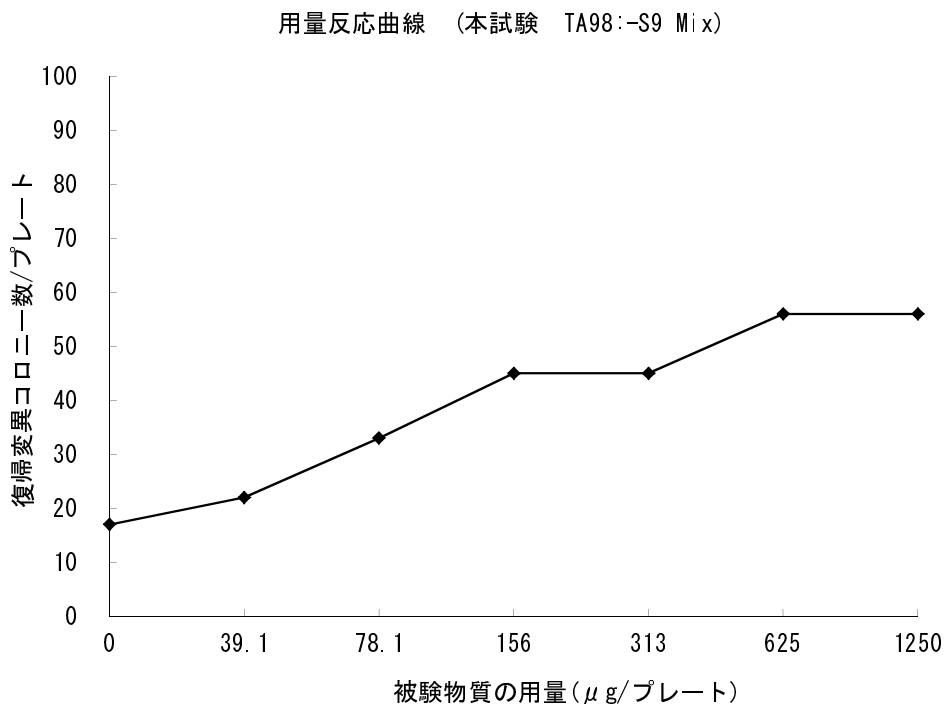


図 8

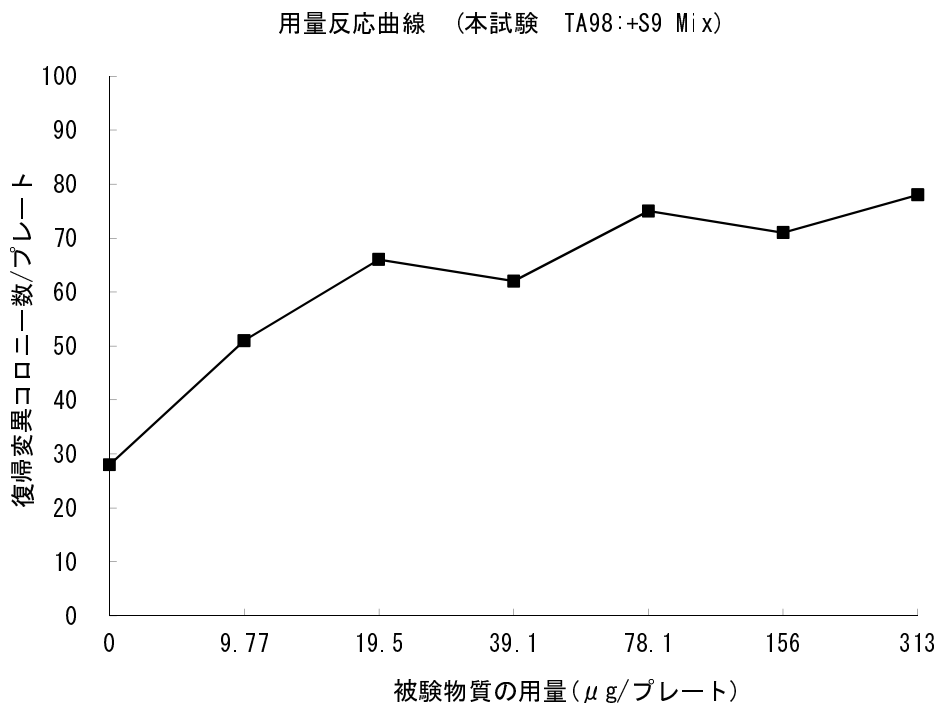


図 9

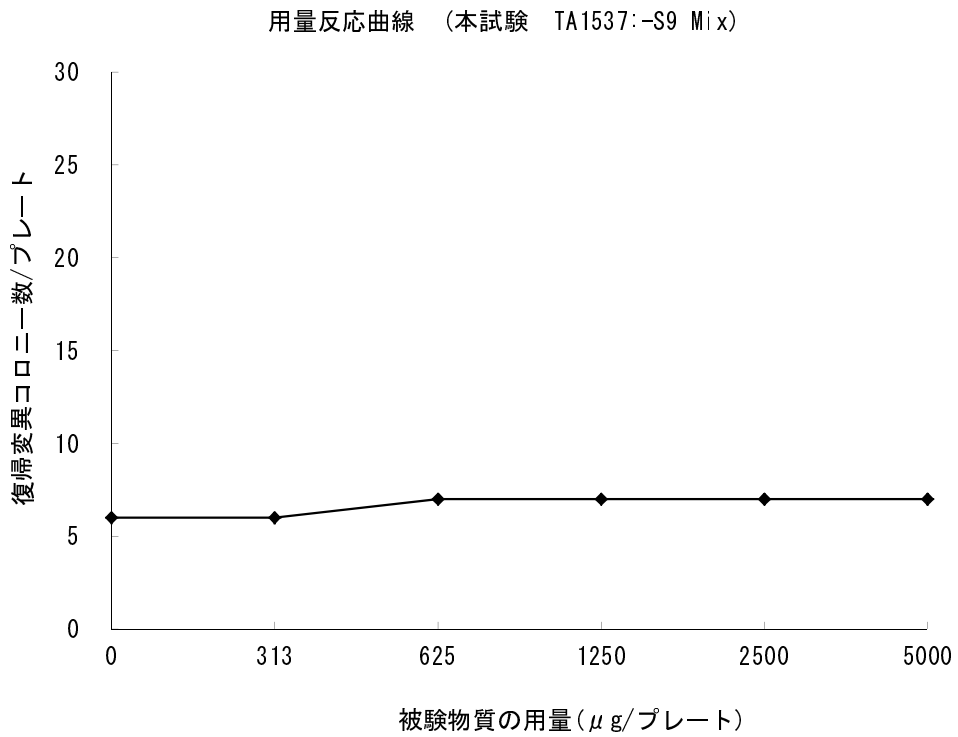
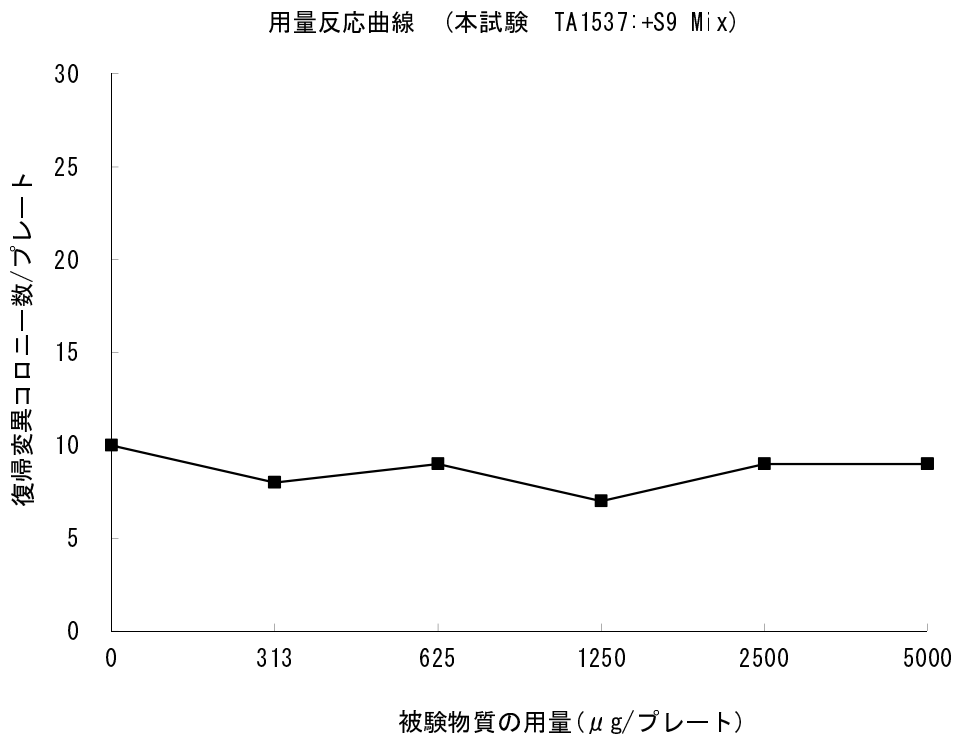


図 10



**Background Data of the reverse mutation tests in bacteria
at the Tokyo Laboratory of the BoZo Research Center Inc.**

CODE No. :160908

(Pre-incubation Method)

Tester Strains	S9 Mix (-) or (+)	Classification	Mean	S.D.	Management ranges		Number of plates
					Lower limit	Upper limit	
TA100	-	Solvent control	117	13.7	76	158	102
		Positive control AF-2(0.01 µg/plate)	547	71.8	331	762	102
	+	Solvent control	132	17.2	80	183	102
		Positive control B[a]P(5.0 µg/plate)	891	126	512	1269	102
TA1535	-	Solvent control	9	2.60	1	17	102
		Positive control SAZ(0.5 µg/plate)	233	26.4	154	312	102
	+	Solvent control	10	2.75	2	18	102
		Positive control 2AA(2.0 µg/plate)	258	34.1	156	360	102
WP2uvrA	-	Solvent control	27	3.98	15	39	102
		Positive control AF-2(0.01 µg/plate)	71	6.4	52	91	102
	+	Solvent control	30	4.41	17	44	102
		Positive control 2AA(10.0 µg/plate)	718	114	375	1062	102
TA98	-	Solvent control	18	3.50	7	28	102
		Positive control AF-2(0.1 µg/plate)	346	57.1	174	517	102
	+	Solvent control	32	5.45	15	48	102
		Positive control B[a]P(5.0 µg/plate)	384	46.4	245	523	102
TA1537	-	Solvent control	8	2.36	1	15	102
		Positive control ICR-191(1.0 µg/plate)	1011	193	431	1590	102
	+	Solvent control	10	2.55	2	17	102
		Positive control B[a]P(5.0 µg/plate)	110	12.1	73	146	102

(Notice)

Solvent controls Water, Dimethylsulfoxide(DMSO) and Acetone

Positive controls AF-2 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

SAZ : Sodium azide

ICR-191 : 2-methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)aminopropylamino]acridine·2HCl

B[a]P : Benzo[a]pyrene

2AA : 2-aminoanthracene

S9 Mix (-) : without metabolic activation

(+) : with metabolic activation