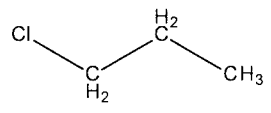


微生物を用いる変異原性試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	1-クロロプロパン		
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	99.9%	試験に供した新規化学物質の Lot No.	PC4II
不純物の名称及び濃度	/		
CAS 番号	540-54-5	蒸気圧	/
分子量	78.54	分配係数	2.04
融点	-123°C~-122°C	常温における性状	液体 (比重 : 0.89)
沸点	46°C~47°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	/	/
	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。

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	2017年4月12日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA100	国立医薬品食品衛生研究所	2017年4月12日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535	国立医薬品食品衛生研究所	2017年4月12日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1537	国立医薬品食品衛生研究所	2017年4月12日
<i>Escherichia coli</i> WP2uvrA	国立医薬品食品衛生研究所	2017年4月12日

3. S9 Mix

(1) S9の入手方法等

自製・購入の別	1.自製 <input type="checkbox"/> 購入 <input checked="" type="checkbox"/> (製造元：株式会社ボゾリサーチセンター つくば研究所)
製造年月日	2018年12月14日
購入の場合 Lot No.	S9-181214
保存温度	-70°C 以下

(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	242.1~266.1 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(%)
	空気				
溶媒選択の理由	本被験物質が空気中で安定であると考えられるため、溶媒（希釈用ガス）には空気を使用した。				
被験物質溶液の性状	溶解 懸濁 <input checked="" type="checkbox"/> その他（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 <input checked="" type="checkbox"/> 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.	1554986
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	2.54	3.92	6.76	4.20	6.35
	本試験	2.77	3.80	6.26	4.15	5.88
測定方法		<input checked="" type="checkbox"/> 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 <input type="checkbox"/> 2. <input checked="" type="checkbox"/> 購入 (購入元 極東製薬工業株式会社)
製造年月日	2018年12月14日製造
購入の場合の Lot No.	DZAJCE01
使用寒天の名称・製造・Lot No.	大洋寒天・SSK セールス株式会社・Lot No. BM-M5-273

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 <input checked="" type="checkbox"/> 3. その他 (ガス暴露法)
その他の場合は その選択理由	被験物質が低沸点物質のため

(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24時間+24時間)

8. コロニー計測の方法

計測方法	1. マニュアル計測 <input type="checkbox"/> 2. <input checked="" type="checkbox"/> 機器計測
補正の有無	1 無 <input type="checkbox"/> 2. <input checked="" type="checkbox"/> 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（2 倍以上の増加が認められた最低濃度）を別表 3 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 Attachment1、2 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>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i> 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濃度は、12.5%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 1-クロロプロパンは、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>実体顕微鏡を用いて菌に対する生育阻害を観察した結果、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての菌株の 50.0%の用量で認められた。</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> <p>試験は下記の方法で実施した。</p> <ol style="list-style-type: none">1) 滅菌した各小試験管に、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 をそれぞれ加えた後、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て固定し、用量ごとに秤取した被験物質とともに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、ポンプを使って空気を抜き、希釈用ガスをポンプと流量計を用いて注入し、被験物質が入った遠沈管を開放した。陰性対照には希釈用ガスのみを同一の条件で実施した。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) ホットプレートを使用し、被験物質を気化させた後、インキュベータに入れ、37°Cで約 24 時間被験物質に暴露させた。
- 6) 暴露後、ガス収集バッグをドラフト内に移動し、バッグ内を空気と置換した後、開封し、シャーレを用量ごとに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、使用菌株の生育阻害について実体顕微鏡を用いて観察した。また、出現した復帰変異コロニーを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。
陽性対照物質は、プレート法により実施した。

なお、試験方法については、下記の文献を参考にした。

荒木明宏，野口忠，松島泰次郎：ガス状物質の微生物を用いる変異原性試験-テドラー®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)，pp.184-193，1988.

A.Araki, T.Noguchi, F.Kato and T.Matsushima : Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by using a Gas Sampling Bag. , Mutation Res., 307, pp.335-344, 1994.

(別表1)

試験結果表 (用量設定試験)

被験物質の名称: 1-クロロプロパン

No. T-2868

試験実施期間		2019年1月9日 より 2019年1月12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)				
		塩基置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9Mix (-)	陰性対照 (空気)	129 113 (121)	12 13 (13)	19 28 (24)	24 21 (23)	11 9 (10)
	0.0122	113 96 (105)	10 12 (11)	31 19 (25)	19 26 (23)	5 6 (6)
	0.0488	137 145 (141)	13 11 (12)	31 35 (33)	22 19 (21)	10 6 (8)
	0.195	112 103 (108)	15 13 (14)	27 22 (25)	17 18 (18)	7 9 (8)
	0.781	154 128 (141)	14 12 (13)	21 21 (21)	16 20 (18)	10 7 (9)
	3.13	109 128 (119)	15 14 (15)	26 31 (29)	21 16 (19)	9 12 (11)
	12.5	136 142 (139)	12 13 (13)	64 61 (63)	22 17 (20)	12 5 (9)
	50.0	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
	S9Mix (+)	陰性対照 (空気)	127 116 (122)	12 8 (10)	25 27 (26)	34 28 (31)
0.0122		110 91 (101)	12 10 (11)	34 22 (28)	28 26 (27)	8 16 (12)
0.0488		113 114 (114)	12 8 (10)	23 35 (29)	25 38 (32)	10 11 (11)
0.195		100 112 (106)	10 13 (12)	32 30 (31)	34 33 (34)	6 10 (8)
0.781		115 93 (104)	14 14 (14)	25 33 (29)	25 25 (25)	8 11 (10)
3.13		109 141 (125)	12 19 (16)	31 33 (32)	26 25 (26)	8 10 (9)
12.5		164 137 (151)	25 24 (25)	53 55 (54)	32 28 (30)	8 7 (8)
50.0		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	416 382 (399)	322 257 (290)	79 93 (86)	325 278 (302)	255 216 (236)
	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	1452 1588 (1520)	180 197 (189)	478 460 (469)	420 430 (425)	82 80 (81)

(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
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2)

試験結果表(本試験)

被験物質の名称: 1-クロロプロパン

No. T-2868

試験実施期間		2019年1月14日 より 2019年1月17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 (空気)	118 130 (124)	11 14 (13)	25 23 (24)	25 20 (23)	11 11 (11)
	1.56	113 139 (126)	12 17 (15)	24 28 (26)	28 23 (26)	8 12 (10)
	3.13	130 128 (129)	13 11 (12)	18 28 (23)	31 19 (25)	11 7 (9)
	6.25	154 139 (147)	12 14 (13)	42 39 (41)	21 31 (26)	9 10 (10)
	12.5	146 166 (156)	15 14 (15)	56 53 (55)	30 22 (26)	7 6 (7)
	25.0	165 153 (159)	17 12 (15)	99 78 (89)	21 25 (23)	5 7 (6)
	50.0	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)
	S9Mix (+)	陰性対照 (空気)	128 130 (129)	11 12 (12)	27 23 (25)	33 39 (36)
1.56		131 113 (122)	14 11 (13)	23 21 (22)	43 40 (42)	10 14 (12)
3.13		142 155 (149)	13 18 (16)	28 21 (25)	42 36 (39)	13 10 (12)
6.25		163 146 (155)	14 17 (16)	48 42 (45)	42 31 (37)	12 9 (11)
12.5		164 155 (160)	31 25 (28)	61 68 (65)	33 41 (37)	8 15 (12)
25.0		144 169 (157)	23 22 (23)	84 72 (78)	28 35 (32)	6 7 (7)
50.0		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
	S9Mixを必要としなもの 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	526 523 (525)	239 247 (243)	79 88 (84)	312 325 (319)	288 254 (271)
	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]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	1177 1078 (1128)	189 213 (201)	574 494 (534)	424 430 (427)	78 66 (72)

(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

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。

T-2868

(別表3)

比活性

被験物質の名称：1-クロロプロパン

No. T-2868

	菌株名	-S9Mix	+S9Mix
		2倍以上の増加が認められた最小用量 (体積%)	2倍以上の増加が認められた最小用量 (体積%)
用量 設定 試験	TA100		
	TA1535		12.5
	WP2 <i>uvrA</i>	12.5	12.5
	TA98		
	TA1537		
本 試 験	TA100		
	TA1535		12.5
	WP2 <i>uvrA</i>	12.5	12.5
	TA98		
	TA1537		

図 1

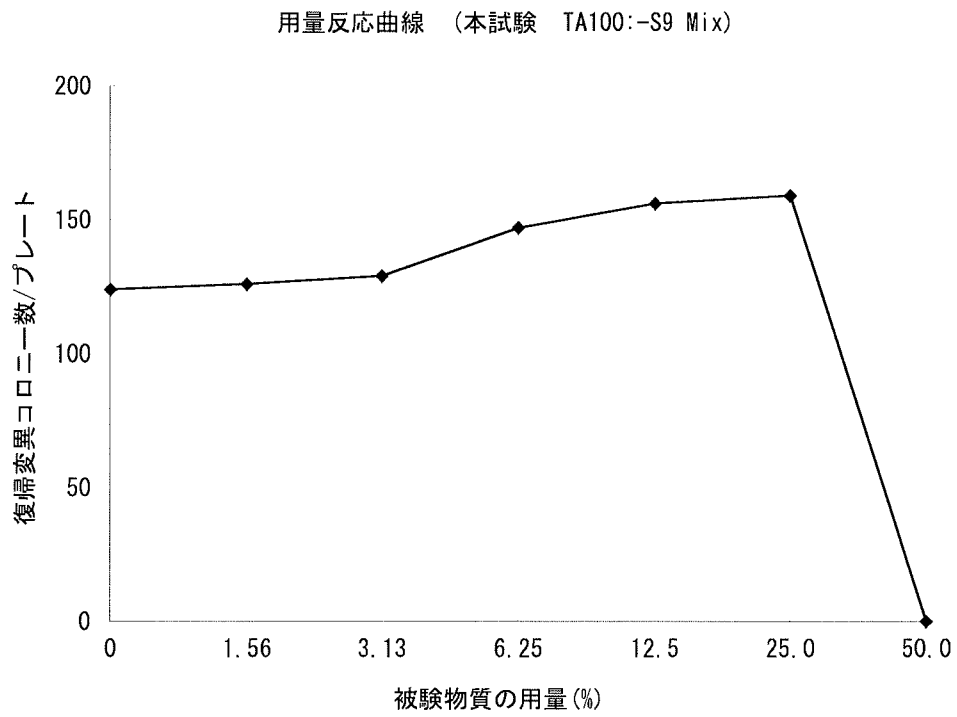


図 2

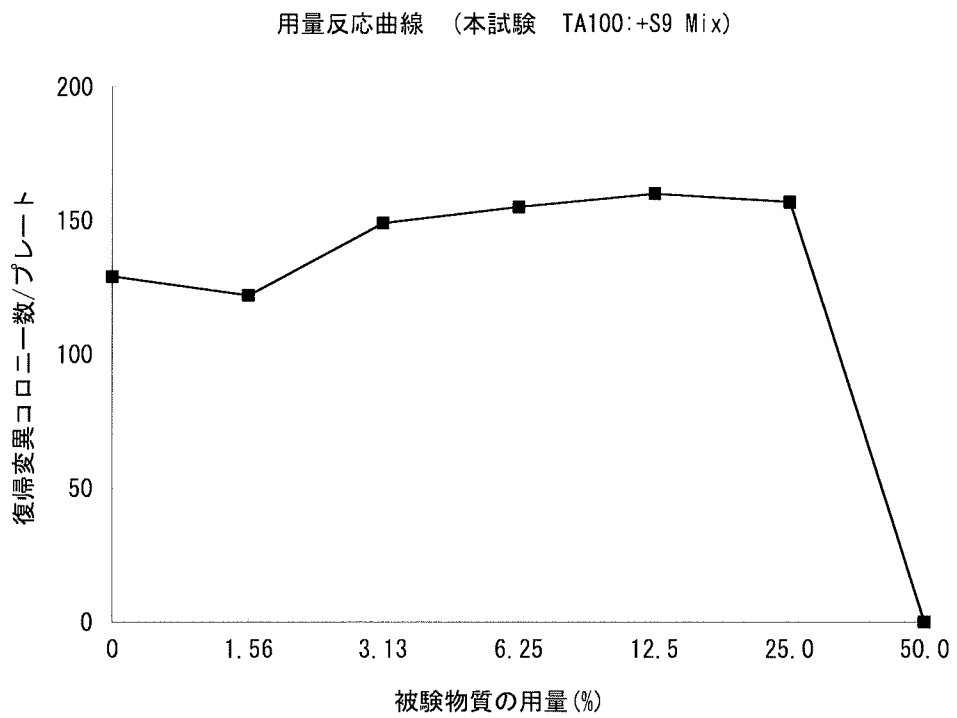


図 3

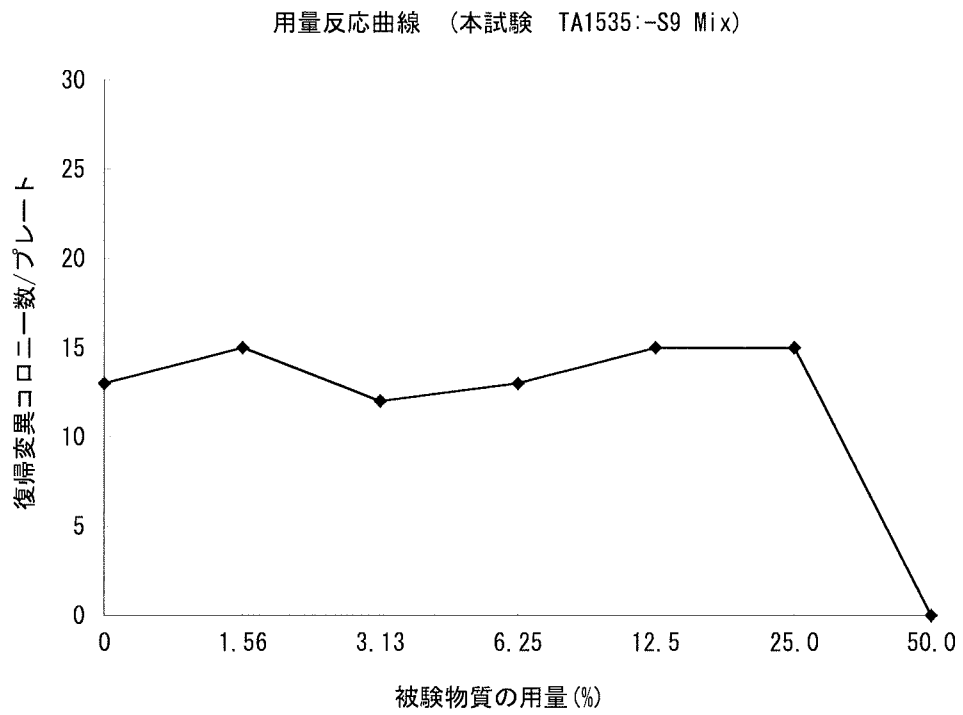


図 4

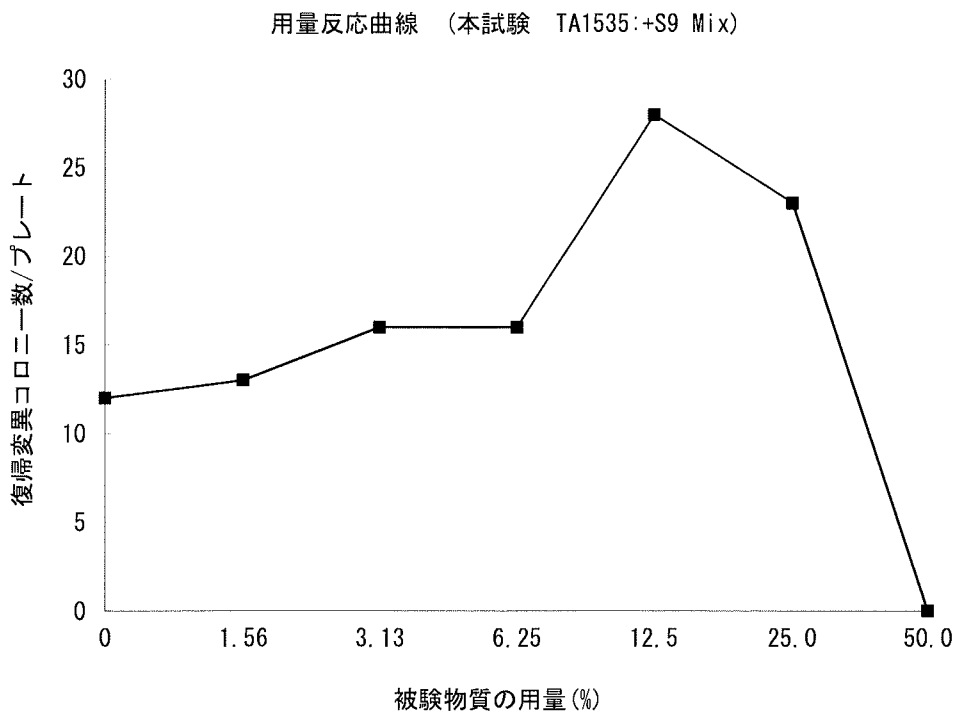


図 5

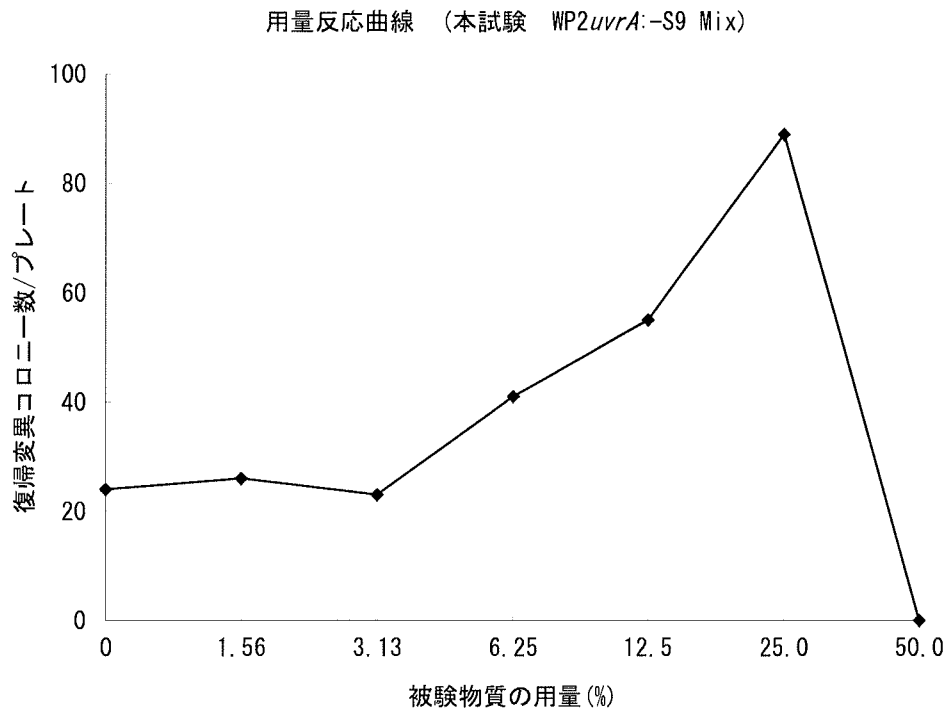


図 6

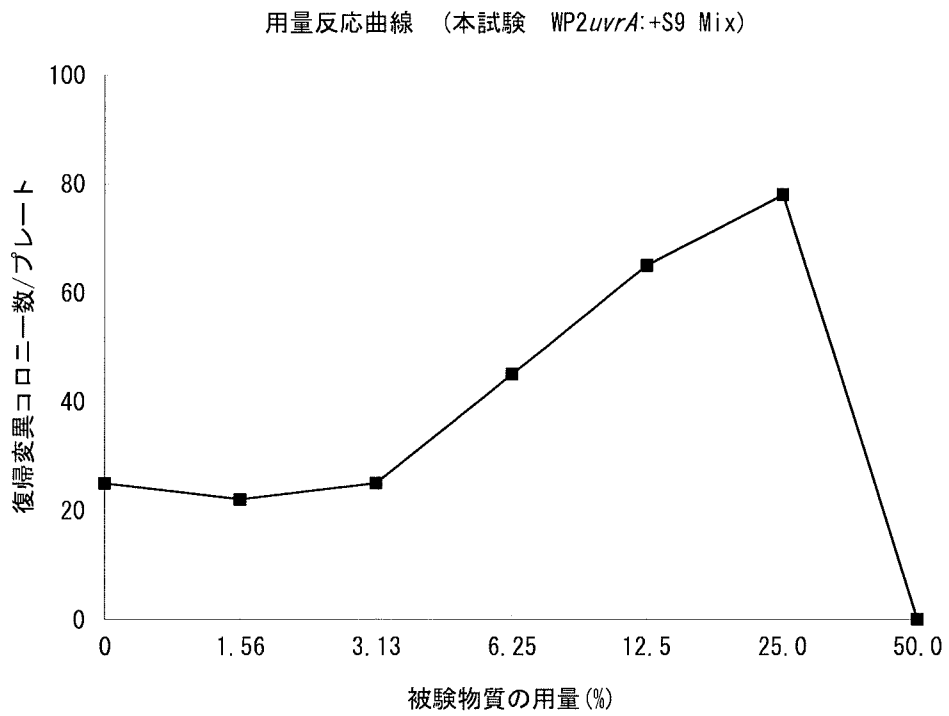


図 7

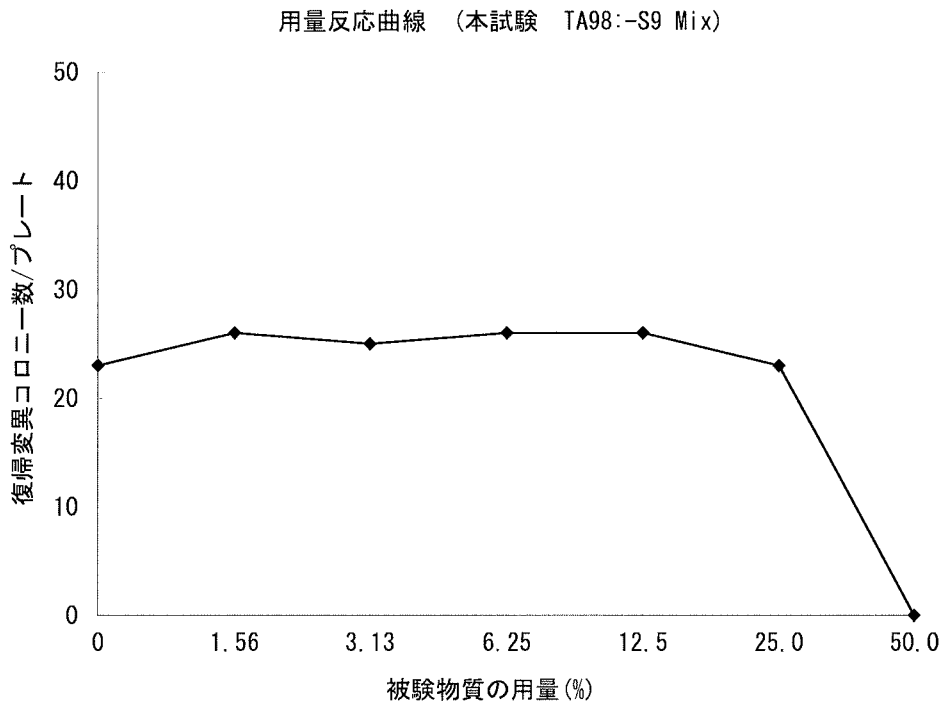


図 8

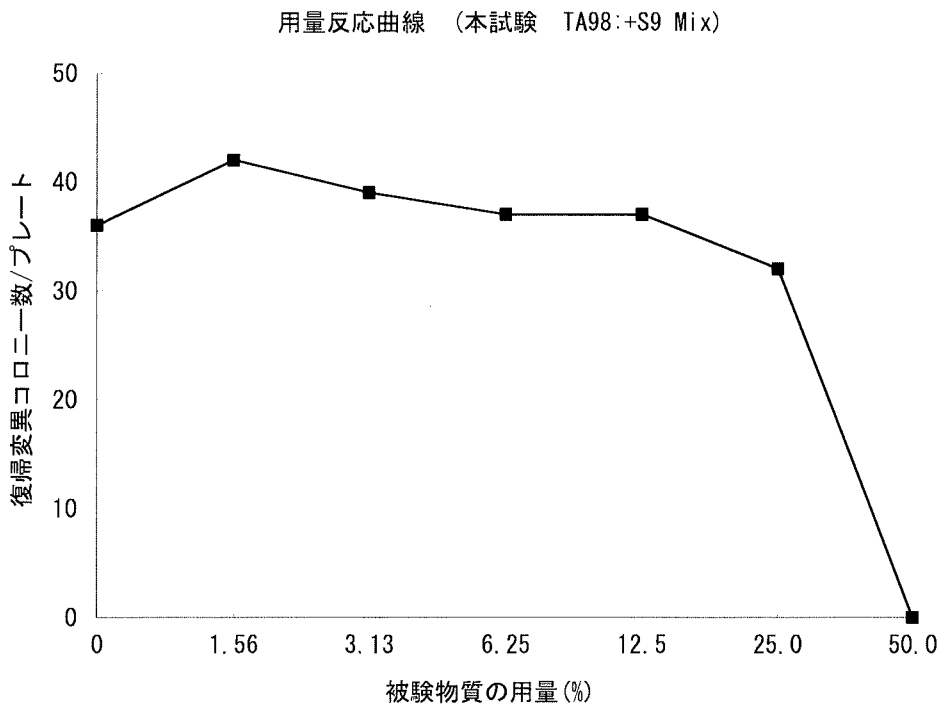


図 9

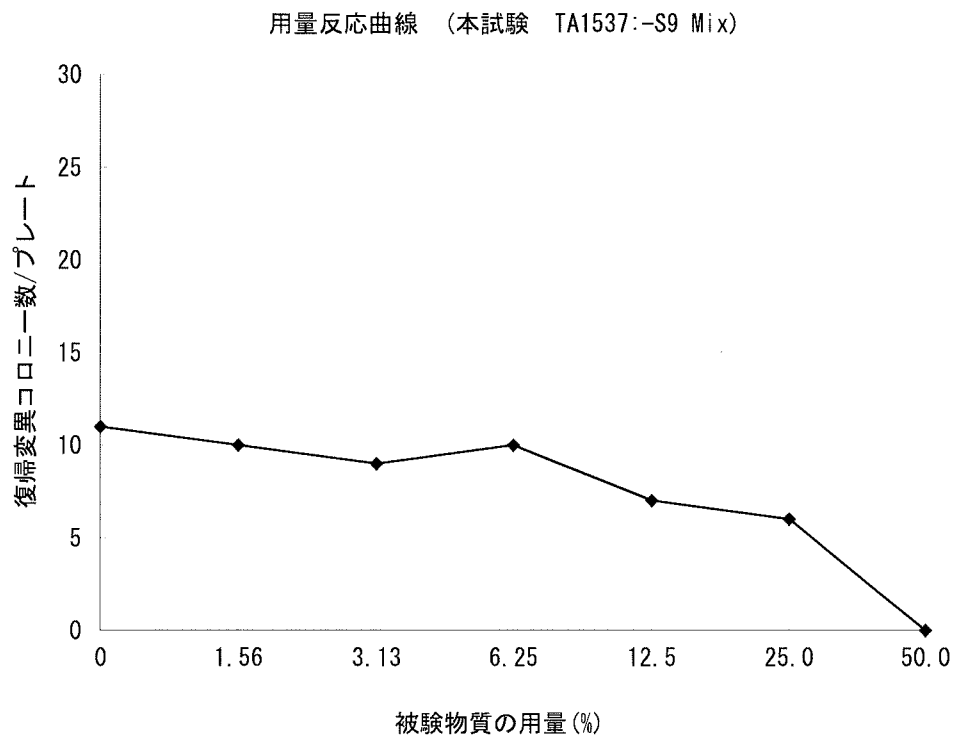
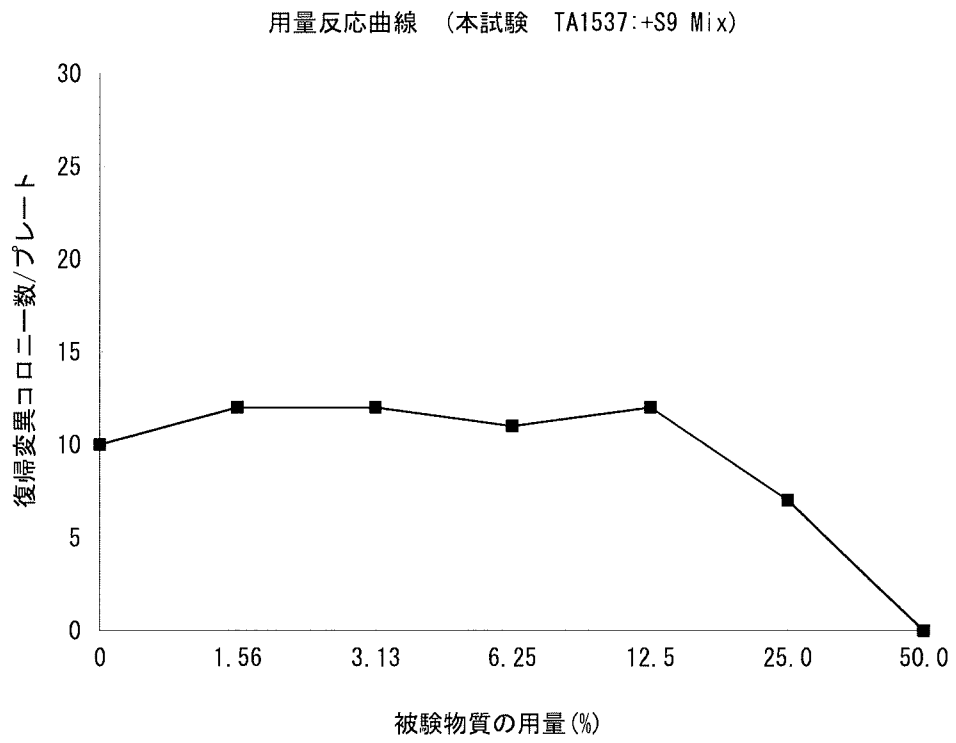


図 10



Background Data

Test Category : Bacterial reverse mutation test (Gas Exposure Method)

CODE No. : 190109

Period : From December 10, 2018 to December 27, 2018

Tester Strains	S9 Mix (-) or (+)	Classification	Mean	S.D.	Management ranges		Number of plates
					Lower limit	Upper limit	
TA100	-	Solvent control	98	15	53	142	20
	+	Solvent control	114	14	71	157	20
TA1535	-	Solvent control	11	3	1	21	20
	+	Solvent control	9	3	1	18	20
WP2uvrA	-	Solvent control	19	6	2	36	20
	+	Solvent control	22	6	4	40	20
TA98	-	Solvent control	21	7	1	41	20
	+	Solvent control	27	7	5	50	20
TA1537	-	Solvent control	10	3	1	19	20
	+	Solvent control	11	3	1	21	20

(Notice)

Solvent controls Air

S9Mix (-) : without metabolic activation

(+) : with metabolic activation

Background Data

Test Category : Bacterial reverse mutation test (Plate Method)

CODE No. :170901

Period : From July 31, 2017 to August 25, 2017

Tester Strains	S9 Mix (-) or (+)	Classification	Mean	S.D.	Management ranges		Number of plates
					Lower limit	Upper limit	
TA100	-	Positive control AF-2(0.01 µg/plate)	346	63	159	533	26
	+	Positive control B[a]P(5.0 µg/plate)	1143	158	663	1623	26
TA1535	-	Positive control SAZ(0.5 µg/plate)	350	141	192	507	26
	+	Positive control 2AA(2.0 µg/plate)	315	45	173	457	26
WP2 _{uvrA}	-	Positive control AF-2(0.01 µg/plate)	75	7	53	98	26
	+	Positive control 2AA(10.0 µg/plate)	614	75	430	798	26
TA98	-	Positive control AF-2(0.1 µg/plate)	384	113	246	522	26
	+	Positive control B[a]P(5.0 µg/plate)	455	140	250	660	26
TA1537	-	Positive control ICR-191(1.0 µg/plate)	195	61	78	312	26
	+	Positive control B[a]P(5.0 µg/plate)	98	16	45	151	26

(Notice)

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

S9Mix (-) : without metabolic activation

(+) : with metabolic activation