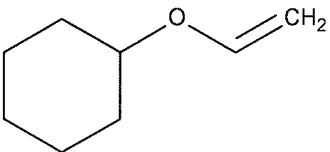


微生物を用いる変異原性試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	シクロヘキシル=ビニル=エーテル		
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	99.7% (GC)	試験に供した新規化学物質の Lot No.	MKBZ0628V
不純物の名称及び濃度	/		
CAS 番号	2182-55-0	蒸気圧	
分子量	126.20	分配係数	
融 点	/		常温における性状
沸 点			
安定性	データなし		
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 で不溶	発熱、ガスの発生等の反応性なし
	DMSO	50 mg/mL で不溶	発熱、ガスの発生等の反応性なし
	アセトン	100 mg/mL で不溶	発熱、ガスの発生等の反応性なし
	DMF	100 mg/mL で不溶	発熱、ガスの発生等の反応性なし
	1,4-ジオキサン	100 mg/mL で溶解	発熱、ガスの発生等の反応性なし

(備考) 上記被験物質情報は、製造元からの情報による。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性試験の結果である。

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	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 2. 購入（製造元：株式会社ポゾリサーチセンター）
製造年月日	2019年8月2日製造
購入の場合 Lot No.	S9-190802
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	221.4~250.8 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-ジオキサソ	富士フイルム和光純薬株式会社	APJ5976	試薬特級	100.0%
溶媒選択の理由	本試験で使用する溶媒を選定するため、水、DMSO の 50 mg/mL 及びアセトン、DMF、1,4-ジオキサソの 100 mg/mL での溶解性試験を実施した。その結果、水、DMSO、アセトン及び DMF に不溶であったが、1,4-ジオキサソに溶解し、溶媒添加直後、発熱、ガスの発生等の反応性は認められなかった。溶媒添加 1 時間後、色調変化等の反応性も認められなかったため 1,4-ジオキサソを溶媒として選択した。なお、被験液の調製には、モレキュラシーブス 4A 1/16（富士フイルム和光純薬株式会社；Lot No. YLP7563）で脱水した 1,4-ジオキサソを使用した。				
被験物質溶液の性状	<input checked="" type="checkbox"/> 溶解 <input type="checkbox"/> 懸濁 <input type="checkbox"/> 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="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.	2202237
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	5.10	4.77	7.76	5.48	4.00
	本試験	5.10	4.52	7.77	5.45	3.95
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	2019年10月25日製造
購入の場合の Lot No.	DZAKAP02
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-M5-277

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（用量設定試験）	48.5 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 <input type="checkbox"/> 2. 機器計測 <input checked="" type="checkbox"/>
補正の有無	1 無 <input type="checkbox"/> 2 有（補正の方法 面積補正） <input checked="" type="checkbox"/>

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 Attachment 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シクロヘキシル=ビニル=エーテルは、微生物に対する遺伝子突然変異誘発能を有しない（陰性）と判定した。</p>		

(3) 参考事項

本被験物質による沈殿は、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。本被験物質による菌に対する生育阻害は、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての菌株において 156 µg/plate 以上の用量で認められた。

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。

溶媒の選定にあたり下記論文を参考とした。

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

(別表1)

試験結果表 (用量設定試験)

被験物質の名称: シクロヘキシルニビニルエーテル

No. T-3085

試験実施期間		2019年11月26日 より 2019年11月29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)	96 112 (104)	7 9 (8)	30 29 (30)	27 27 (27)	8 4 (6)	
	1.22	109 100 (105)	8 10 (9)	25 30 (28)	21 20 (21)	8 5 (7)	
	4.88	105 109 (107)	8 16 (12)	25 25 (25)	28 23 (26)	4 4 (4)	
	19.5	103 107 (105)	13 15 (14)	36 28 (32)	21 24 (23)	7 4 (6)	
	78.1	87 75 (81)	5 10 (8)	30 21 (26)	27 19 (23)	5 10 (8)	
	313	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	
	1250	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	
	5000	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	
	S9Mix (+)	陰性対照 (1.4-ジオキサン)	134 121 (128)	11 17 (14)	31 42 (37)	30 41 (36)	7 8 (8)
		1.22	134 134 (134)	9 10 (10)	39 41 (40)	34 32 (33)	10 13 (12)
4.88		123 100 (112)	15 8 (12)	26 32 (29)	28 24 (26)	10 7 (9)	
19.5		116 122 (119)	12 11 (12)	27 33 (30)	37 33 (35)	11 4 (8)	
78.1		103 113 (108)	11 13 (12)	25 26 (26)	28 27 (28)	7 4 (6)	
313		70* 83* (77)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	
1250		0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	0* 0* (0)	
5000		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	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	760 759 (760)	236 231 (234)	163 149 (156)	437 447 (442)	1439 1372 (1406)	
	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	1061 1114 (1088)	235 268 (252)	644 601 (623)	318 315 (317)	87 76 (82)	

(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: シクロヘキシル=ビニル=エーテル

No. T-3085

試験実施期間		2019年12月12日 より 2019年12月16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)	103 126 (115)	9 12 (11)	27 37 (32)	27 24 (26)	8 8 (8)
	9.77	122 128 (125)	7 10 (9)	22 33 (28)	22 28 (25)	9 11 (10)
	19.5	125 108 (117)	10 12 (11)	35 28 (32)	24 27 (26)	8 10 (9)
	39.1	104 110 (107)	9 9 (9)	35 29 (32)	20 20 (20)	7 11 (9)
	78.1	96 90 (93)	10 11 (11)	33 27 (30)	19 23 (21)	7 6 (7)
	156	70 * 50 * (60)	7 * 7 * (7)	13 * 17 * (15)	11 * 15 * (13)	4 * 6 * (5)
	313	71 * 56 * (64)	0 * 0 * (0)	15 * 15 * (15)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
	S9Mix (+)	陰性対照 (1,4-ジ'オキサン)	123 143 (133)	14 10 (12)	33 44 (39)	34 39 (37)
9.77		155 107 (131)	10 13 (12)	40 30 (35)	27 40 (34)	8 7 (8)
19.5		152 138 (145)	5 10 (8)	25 33 (29)	32 44 (38)	9 9 (9)
39.1		111 155 (133)	9 7 (8)	33 26 (30)	45 46 (46)	9 5 (7)
78.1		126 117 (122)	12 12 (12)	32 26 (29)	33 39 (36)	7 10 (9)
156		89 * 87 * (88)	8 * 10 * (9)	25 * 29 * (27)	25 * 30 * (28)	7 * 6 * (7)
313		77 * 94 * (86)	5 * 4 * (5)	19 * 17 * (18)	16 * 19 * (18)	4 * 4 * (4)
陽性対照		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	770 673 (722)	310 371 (341)	147 163 (155)	373 568 (471)	1162 1146 (1154)
	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	1201 1288 (1245)	231 223 (227)	645 643 (644)	268 261 (265)	102 120 (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・2HC1

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。

図 1

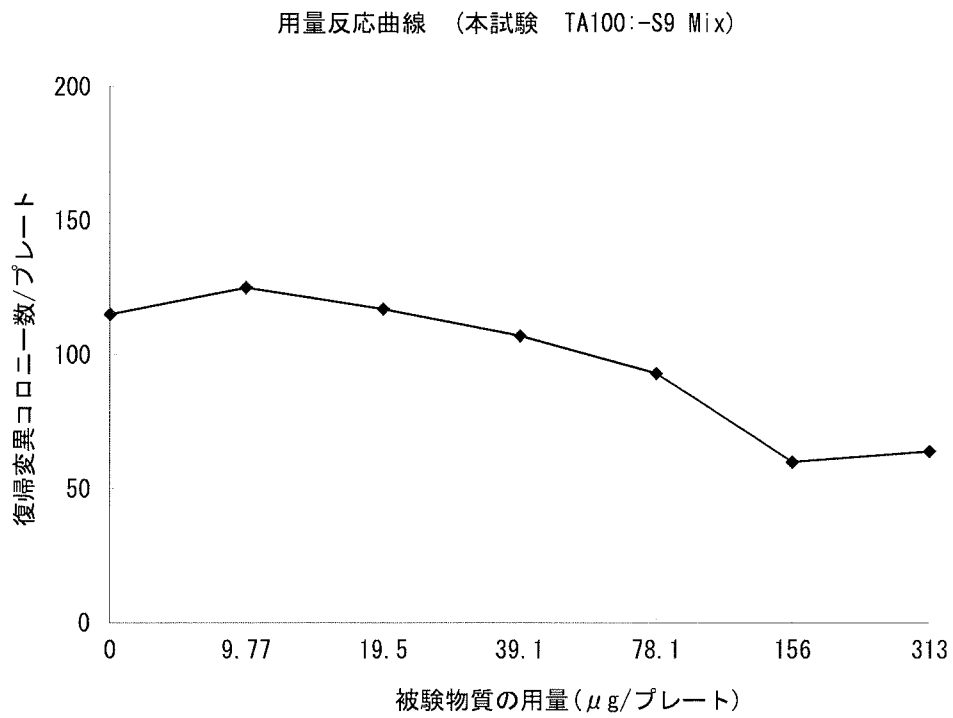


図 2

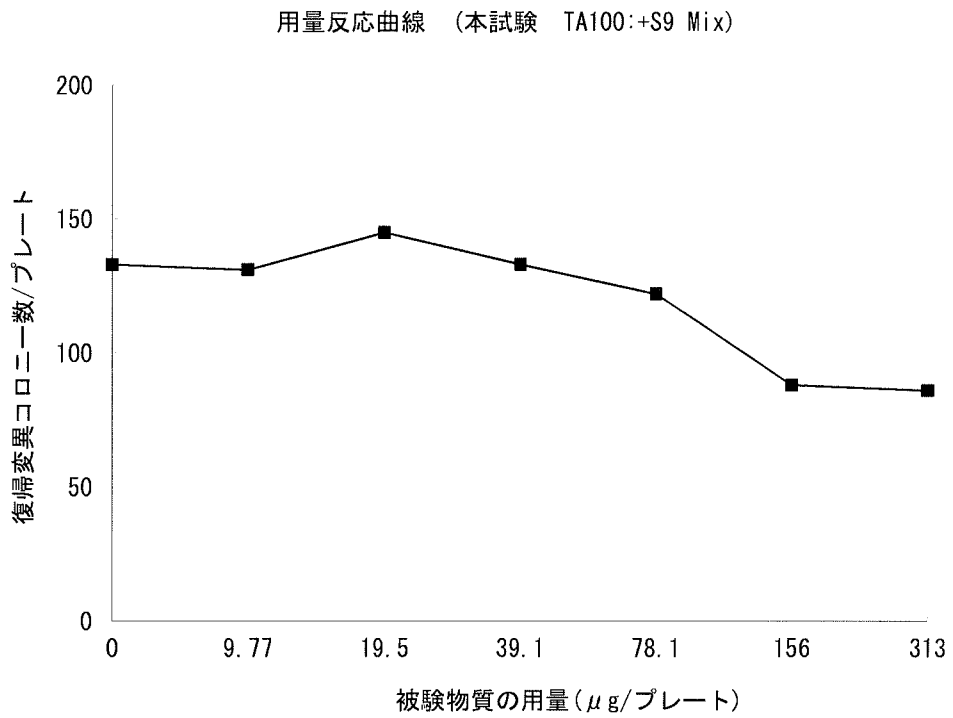


図 3

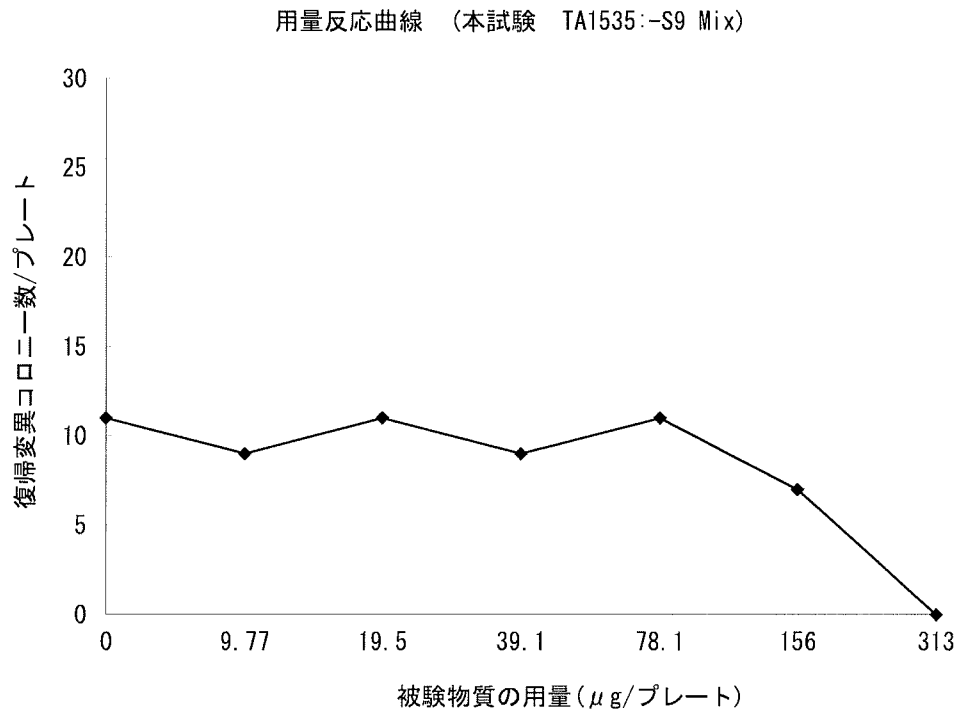


図 4

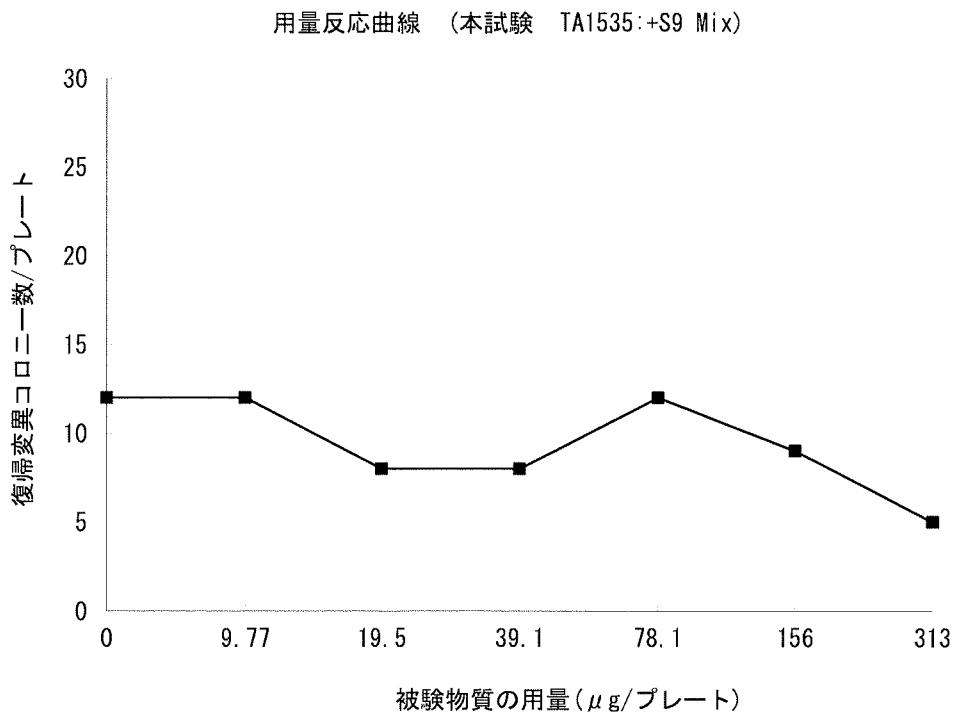


図 5

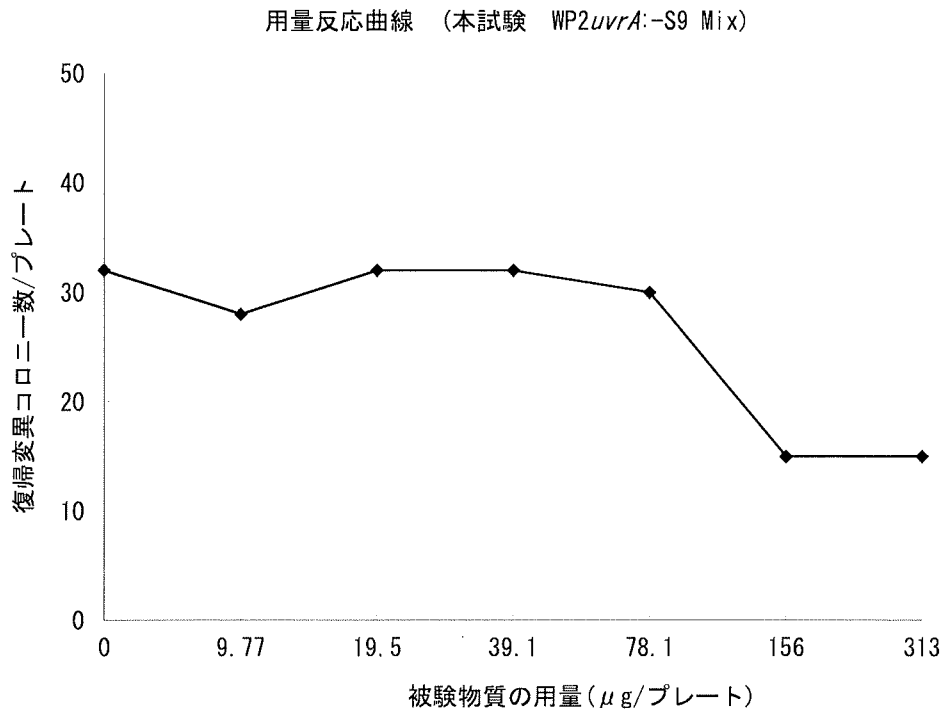


図 6

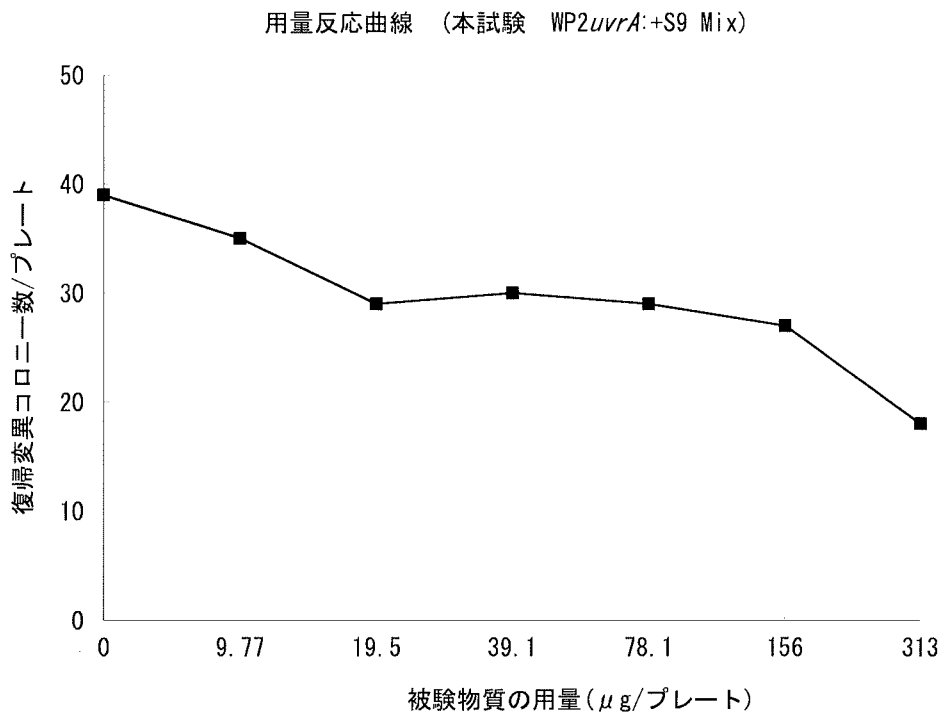


図 7

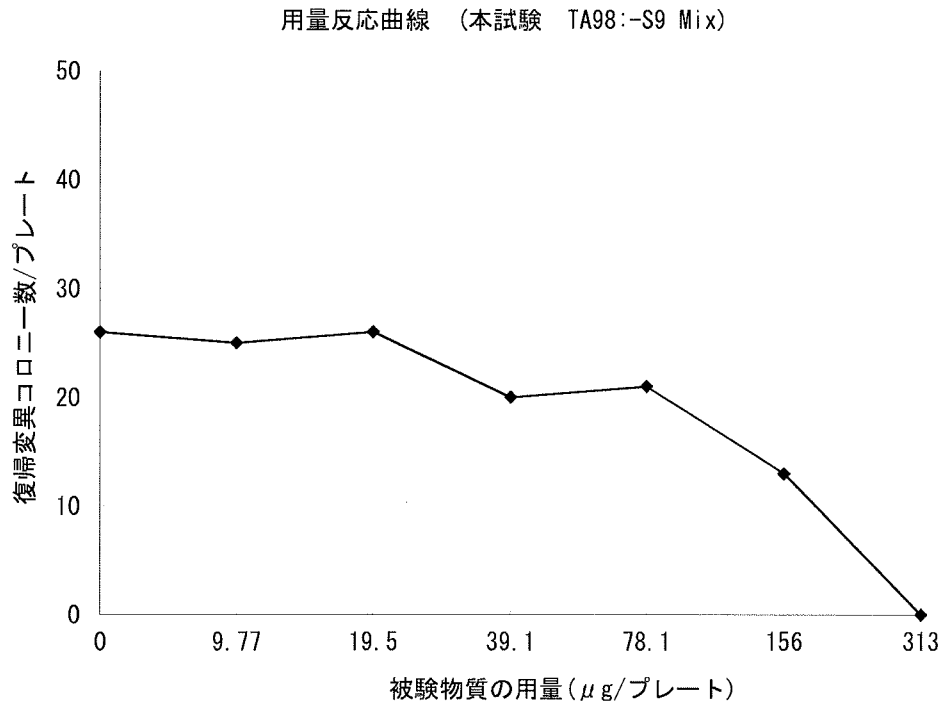


図 8

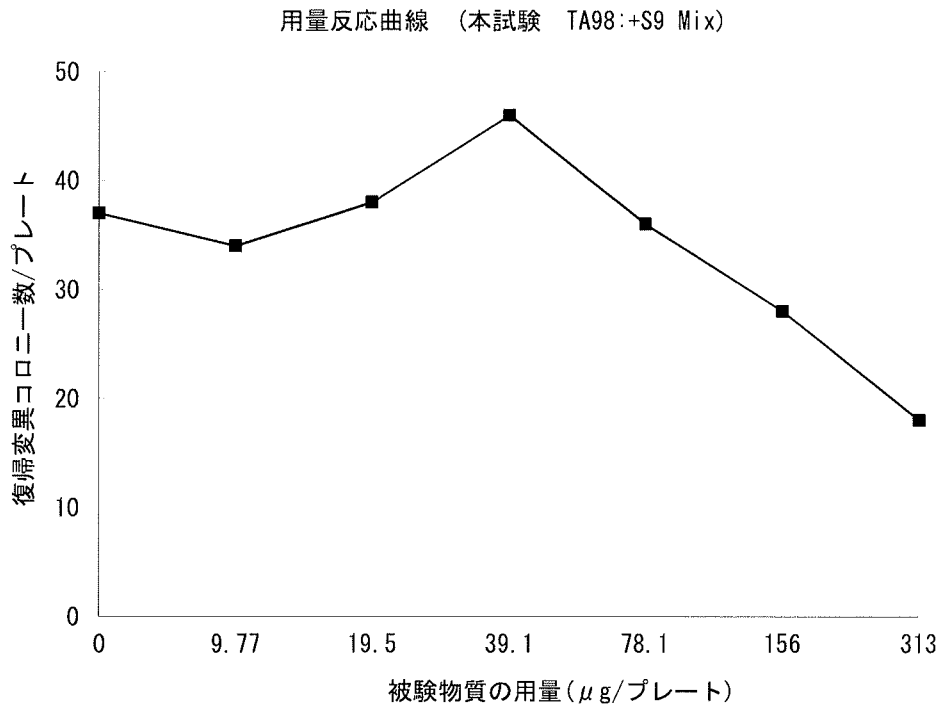


図 9

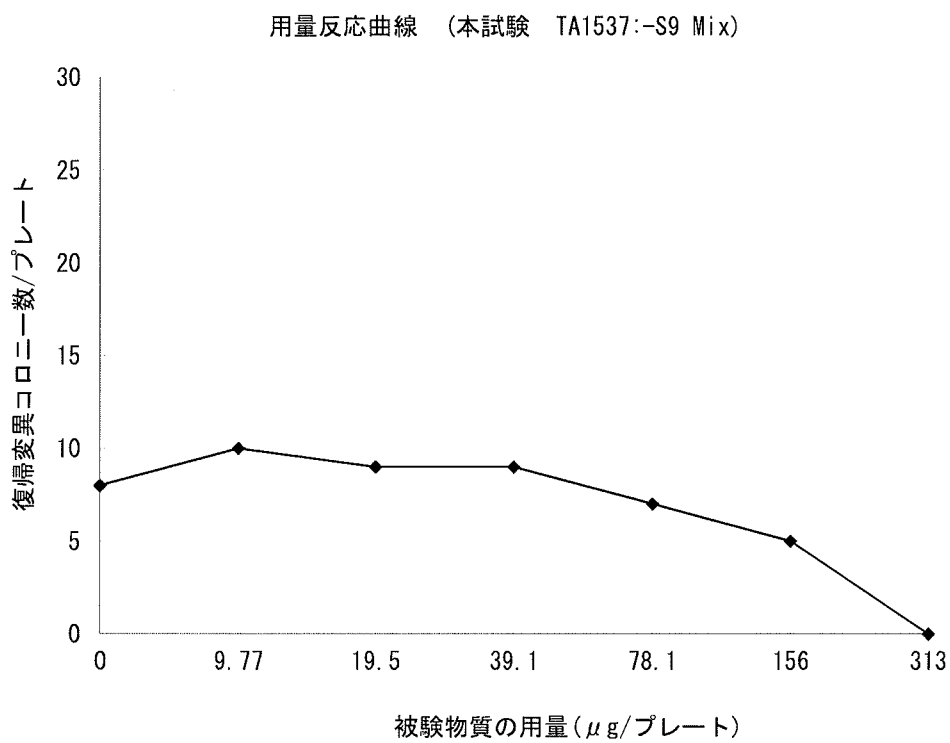
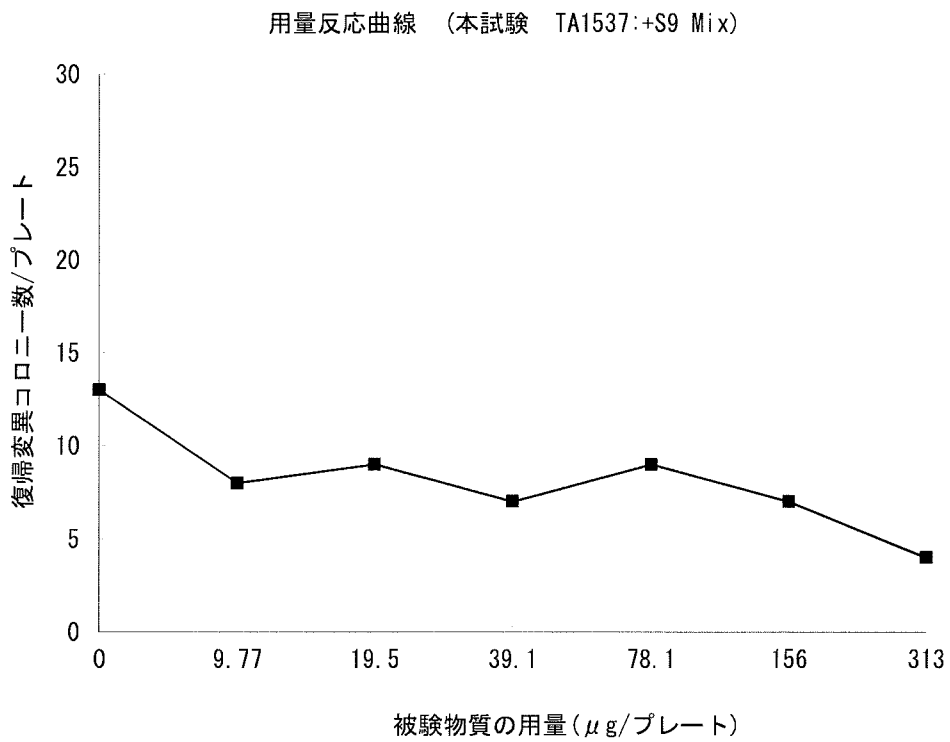


図 10



Background Data

Test Category : Bacterial reverse mutation test (Preincubation Method)

CODE No. : 190924

Period : From September 20, 2019 to September 24, 2019

Tester Strains	S9 Mix (-) or (+)	Classification	Mean	S.D.	Management ranges		Number of plates
					Lower limit	Upper limit	
TA100	-	Solvent control	107	13	69	146	20
		Positive control AF-2 (0.01 µg/plate)	565	87	302	827	20
	+	Solvent control	121	11	87	154	20
		Positive control B[a]P (5.0 µg/plate)	977	90	708	1247	20
TA1535	-	Solvent control	10	4	1	20	20
		Positive control SAZ (0.5 µg/plate)	305	44	174	437	20
	+	Solvent control	10	3	1	20	20
		Positive control 2AA (2.0 µg/plate)	231	28	146	316	20
WP2uvrA	-	Solvent control	29	7	9	49	20
		Positive control AF-2 (0.01 µg/plate)	101	21	38	164	20
	+	Solvent control	30	7	9	52	20
		Positive control 2AA (10.0 µg/plate)	611	84	358	864	20
TA98	-	Solvent control	26	5	11	42	20
		Positive control AF-2 (0.1 µg/plate)	399	32	304	495	20
	+	Solvent control	37	7	16	57	20
		Positive control B[a]P (5.0 µg/plate)	282	22	218	347	20
TA1537	-	Solvent control	7	4	1	18	20
		Positive control ICR-191 (1.0 µg/plate)	1406	267	605	2208	20
	+	Solvent control	10	3	2	18	20
		Positive control B[a]P (5.0 µg/plate)	83	12	47	119	20

(Notice)

Solvent controls Water, Dimethyl sulfoxide(DMSO)

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