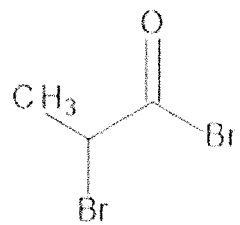


微生物を用いる変異原性試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	2-ブロモプロパノイル=ブロミド		
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	97.3% (GC)	試験に供した新規化学物質の Lot No.	Y4N8K
不純物の名称及び濃度			
CAS 番号	563-76-8	蒸気圧	0.2 kPa/20°C
分子量	215.87	分配係数	0.38
融点		常温における性状	液体
沸点	155°C		
安定性	適切な条件下で安定		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中での安定性
	水		分解し、有毒なガスを発生する
	DMSO	50 mg/mL で溶解	発熱・色調変化あり (橙色→黄色)
	アセトン	100 mg/mL で溶解	色調変化あり (黄色→橙色)
	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、溶解性及び溶媒中の安定性については、株式会社ポ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：株式会社ボ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-ジオキサン	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	<p>本被験物質は、水に分解し、有毒なガスを発生するとの製造元の情報より、DMSO の 50 mg/mL 及びアセトン、1,4-ジオキサンの 100 mg/mL での溶解性試験を実施した。その結果、すべての溶媒に溶解したが、DMSO 及びアセトンでは溶媒添加直後の溶液と溶媒添加 1 時間後の溶液で色調変化があったため溶媒と反応していると判断した。1,4-ジオキサンにおいては、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 時間後においても色調変化等の反応性も認められなかったため 1,4-ジオキサン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-ジオキサンを使用した</p>				
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 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	4.28	7.77	5.29	4.20
	本試験	5.08	4.81	7.77	5.55	4.34
	確認試験		4.70			
測 定 方 法		<input checked="" type="checkbox"/> O.D.値より換算 <input type="checkbox"/> 段階希釈法 <input type="checkbox"/> 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 checked="" type="checkbox"/> 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	<input checked="" type="checkbox"/> プレインキュベーション法 <input type="checkbox"/> プレート法 <input type="checkbox"/> 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・確認試験）	48 時間
	時間（本試験）	49 時間

8. コロニー計測の方法

計測方法	<input type="checkbox"/> 1. マニュアル計測 <input checked="" type="checkbox"/> 2. 機器計測
補正の有無	1 無 <input checked="" type="checkbox"/> 2 有（補正の方法 面積補正）

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、確認試験の結果を別表 3 に、比活性値表を別表 4 に示した。なお、図 1~10 は別表 2、図 11 は別表 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 Attachment として添付した。</p> <p>代謝活性化の有無にかかわらず <i>S. typhimurium</i> TA100 及び代謝活性化しない場合の <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的な増加が認められ、代謝活性化の有無にかかわらず <i>S. typhimurium</i> TA100 は用量設定試験及び本試験にて、代謝活性化しない場合の <i>S. typhimurium</i> TA1535 は本試験及び確認試験にて、再現性が確認された。代謝活性化した場合の <i>S. typhimurium</i> TA1535 及び代謝活性化の有無にかかわらず、その他菌株においては陰性対照値の 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。なお、最大比活性値は、本試験の代謝活性化しない場合の <i>S. typhimurium</i> TA100 の 1250 µg/plate における 1.01×10^2 (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 2-ブロモプロパノイル=ブロミドは、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

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 5000 µg/plate の用量で認められた。本被験物質による菌に対する生育阻害は、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1535 の 3536 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1535 以外菌株の及び代謝活性化した場合のすべての菌株の 5000 µg/plate 用量で認められた。

代謝活性化の有無にかかわらず、すべての菌株において生育阻害の認められた最低用量の 5000 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 用量で本試験を設定した。(代謝活性の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA100 においては最大比活性が得られる用量も兼ねた)。

代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1535 においては、用量設定試験及び本試験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再現性が得られなかったため、復帰変異コロニー数の増加が認められた用量域をより狭い用量段階 625、884、1250、1768、2500、3536、5000 µg/plate (公比 $\sqrt{2}$) で確認試験を実施した。

なお、溶媒の選定にあたり、下記の文献を参照した。

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

本被験物質は湿気を避けるべきとの製造元からの情報より、容器の開封、被験物質の秤量は窒素を充填したパック内で行った。

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： 2-ブロモプロパノイル=プロミド

No. T-3090

試験実施期間		2019年11月27日 より 2019年12月2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'キチン)	110 83 (97)	9 8 (9)	25 14 (20)	17 12 (15)	6 4 (5)	
	1.22	119 112 (116)	7 4 (6)	18 14 (16)	19 14 (17)	5 5 (5)	
	4.88	117 126 (122)	9 7 (8)	14 14 (14)	19 15 (17)	3 3 (3)	
	19.5	145 141 (143)	9 15 (12)	18 14 (16)	15 15 (15)	3 3 (3)	
	78.1	130 143 (137)	9 17 (13)	18 17 (18)	14 12 (13)	9 6 (8)	
	313	128 145 (137)	11 12 (12)	17 12 (15)	11 20 (16)	8 4 (6)	
	1250	196 193 (195)	15 16 (16)	18 14 (16)	13 13 (13)	10 7 (9)	
	5000 #	96 * 0 * (48)	0 * 0 * (0)	0 * 15 * (8)	6 * 0 * (3)	0 * 0 * (0)	
	S9Mix (+)	陰性対照 (1,4-ジ'キチン)	138 109 (124)	7 9 (8)	28 25 (27)	25 20 (23)	5 6 (6)
		1.22	125 123 (124)	9 6 (8)	20 28 (24)	16 23 (20)	4 2 (3)
4.88		121 122 (122)	8 7 (8)	25 20 (23)	27 22 (25)	5 4 (5)	
19.5		136 147 (142)	7 9 (8)	26 24 (25)	21 27 (24)	2 4 (3)	
78.1		117 132 (125)	4 5 (5)	27 16 (22)	25 25 (25)	3 10 (7)	
313		120 104 (112)	8 8 (8)	19 19 (19)	23 28 (26)	3 6 (5)	
1250		152 155 (154)	8 7 (8)	18 15 (17)	19 20 (20)	5 5 (5)	
5000 #		301 * 351 * (326)	1 * 1 * (1)	33 * 42 * (38)	11 * 19 * (15)	1 * 4 * (3)	
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	632 601 (617)	254 235 (245)	130 131 (131)	342 330 (336)	1039 1530 (1285)	
	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	843 985 (914)	202 205 (204)	589 512 (551)	225 256 (241)	74 76 (75)	

(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。

: 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)

被験物質の名称： 2-ブロモプロパノイル=プロミド

No. T-3090

試験実施期間		2019年12月16日 より 2019年12月19日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μ g/プレート)	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 (1,4-ジメチル)	100 111 (106)	10 11 (11)	27 27 (27)	26 25 (26)	6 8 (7)
	156	135 181 (158)	10 8 (9)	16 18 (17)	25 23 (24)	10 6 (8)
	313	162 182 (172)	9 6 (8)	19 15 (17)	26 27 (27)	5 4 (5)
	625	205 193 (199)	7 8 (8)	24 24 (24)	18 27 (23)	4 3 (4)
	1250	207 256 (232)	16 22 (19)	22 16 (19)	26 33 (30)	11 8 (10)
	2500	305 311 (308)	22 28 (25)	21 29 (25)	20 21 (21)	15 8 (12)
	5000 #	33 * 9 * (21)	0 * 0 * (0)	11 * 18 * (15)	10 * 11 * (11)	0 * 0 * (0)
	S9Mix (+)	陰性対照 (1,4-ジメチル)	122 121 (122)	8 10 (9)	29 30 (30)	33 33 (33)
156		120 132 (126)	10 10 (10)	24 28 (26)	25 33 (29)	8 4 (6)
313		123 155 (139)	11 8 (10)	26 31 (29)	25 35 (30)	5 6 (6)
625		136 140 (138)	8 9 (9)	20 21 (21)	36 30 (33)	11 4 (8)
1250		156 190 (173)	9 11 (10)	20 22 (21)	28 38 (33)	7 7 (7)
2500		254 330 (292)	16 13 (15)	26 31 (29)	46 38 (42)	6 5 (6)
5000 #		348 * 377 * (363)	16 * 17 * (17)	36 * 33 * (35)	45 * 30 * (38)	6 * 4 * (5)
陽性対照		名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2
	S9Mixを必要としな いもの 用量 (μ g/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	コロニー数/プレート	653 626 (640)	305 325 (315)	131 148 (140)	315 316 (316)	1682 1469 (1576)
	S9Mixを必要とする もの 名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
用量 (μ g/プレート)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0	
コロニー数/プレート	1248 1137 (1193)	285 234 (260)	748 848 (798)	286 266 (276)	97 89 (93)	

(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。

: 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3)

試験結果表 (確認試験)

被験物質の名称： 2-ブロモプロパノイル=プロミド

No. T-3090

試験実施期間		2019年12月23日より 2019年12月26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	
		TA1535	
S9Mix (-)	陰性対照 (1,4-ジオキサン)	12 8	(10)
	625	11 10	(11)
	884	16 22	(19)
	1250	40 51	(46)
	1768	45 31	(38)
	2500	31 27	(29)
	3536	35 * 16 *	(26)
	5000 #	3 * 1 *	(2)
	陽性対照	名 称	SAZ
用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)		0.5	
コロニー数/プレート		287 273	(280)

(備考)

SAZ : アジ化ナトリウム

* : 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。

: 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4)

比 活 性

被験物質の名称：2-ブロモプロパノイル≒ブロミド

No. T-3090

	菌株名	-S9Mix		+S9Mix	
		比活性	計算に使用した用量 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	比活性	計算に使用した用量 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)
用量 設定 試験	TA100	7.84×10^1	1250	4.04×10^1	5000
	TA1535				
	WP2 <i>uvrA</i>				
	TA98				
	TA1537				
本 試 験	TA100	1.01×10^2	1250	6.80×10^1	2500
	TA1535	5.60×10^0	2500		
	WP2 <i>uvrA</i>				
	TA98				
	TA1537				
確 認 試 験	TA1535	2.88×10^1	1250		

図 1

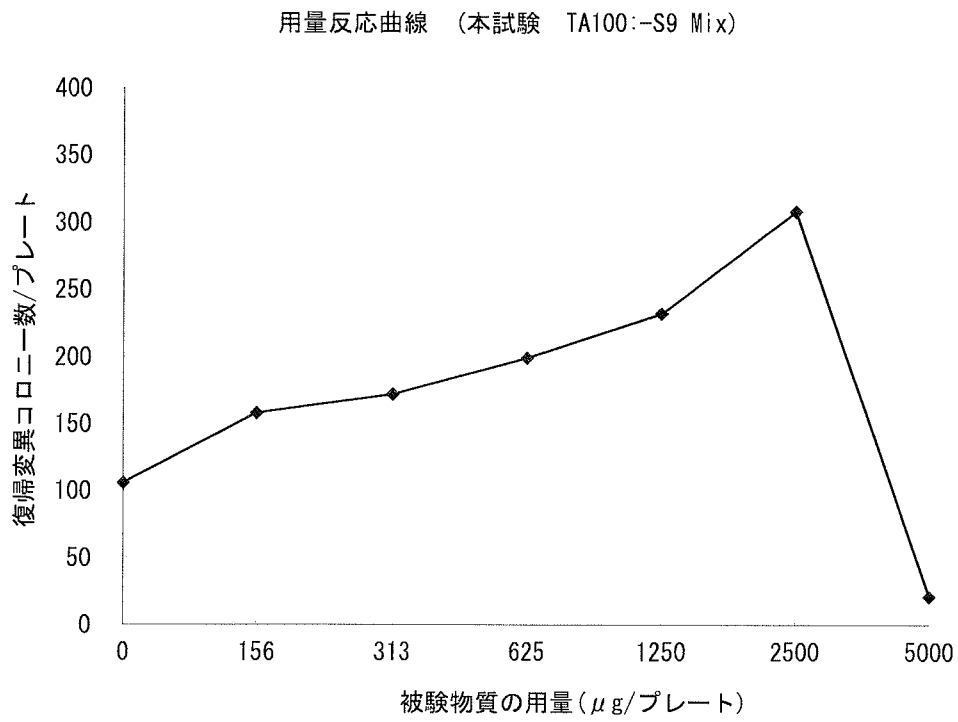


図 2

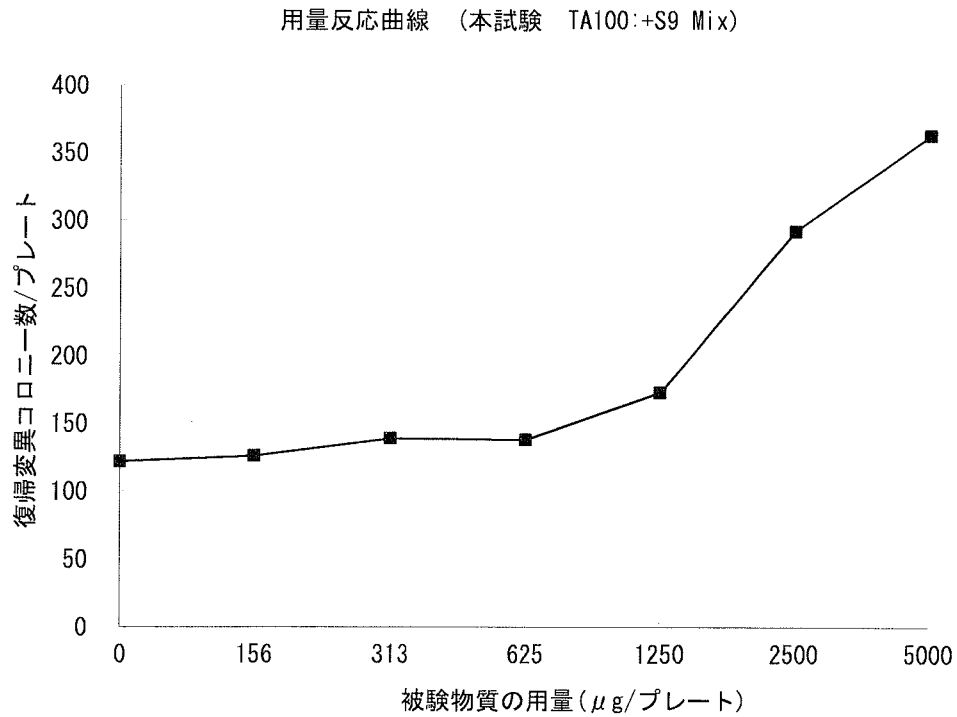


図 3

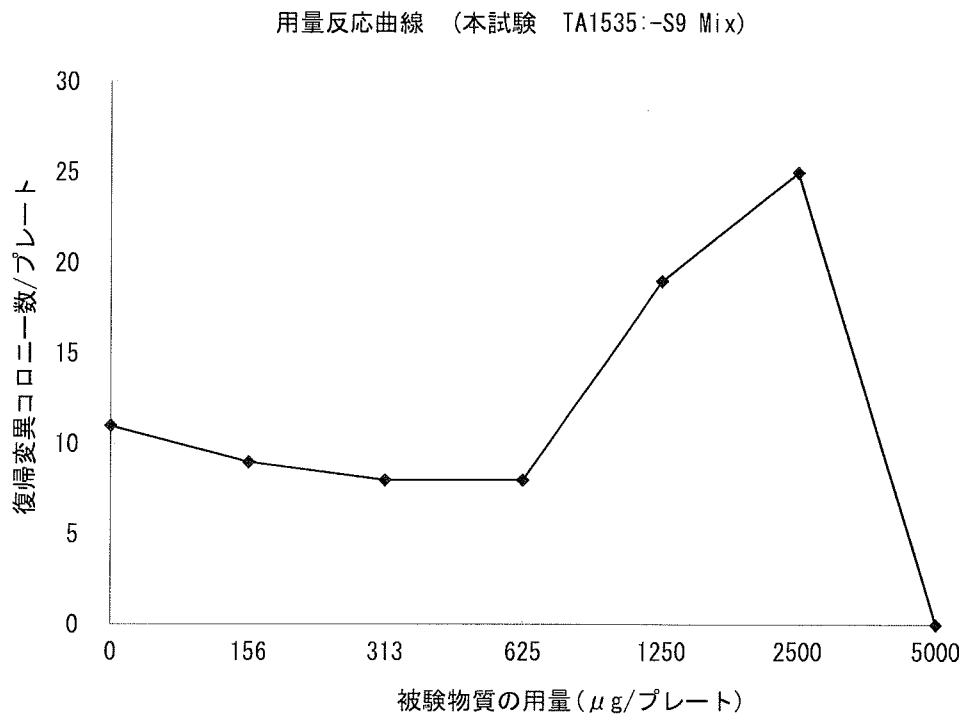


図 4

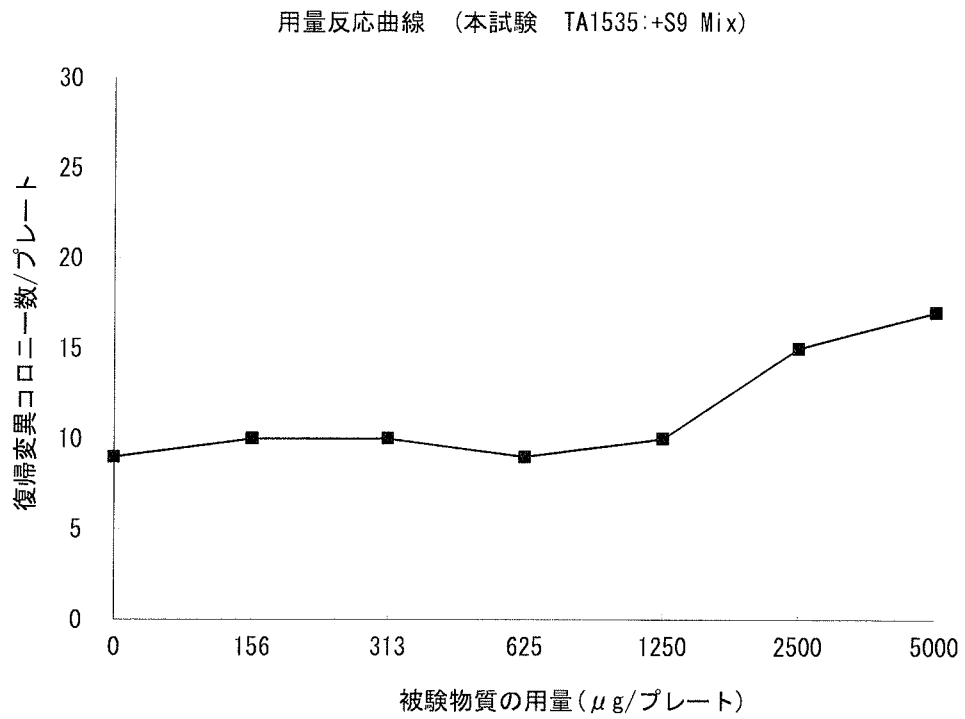


図 5

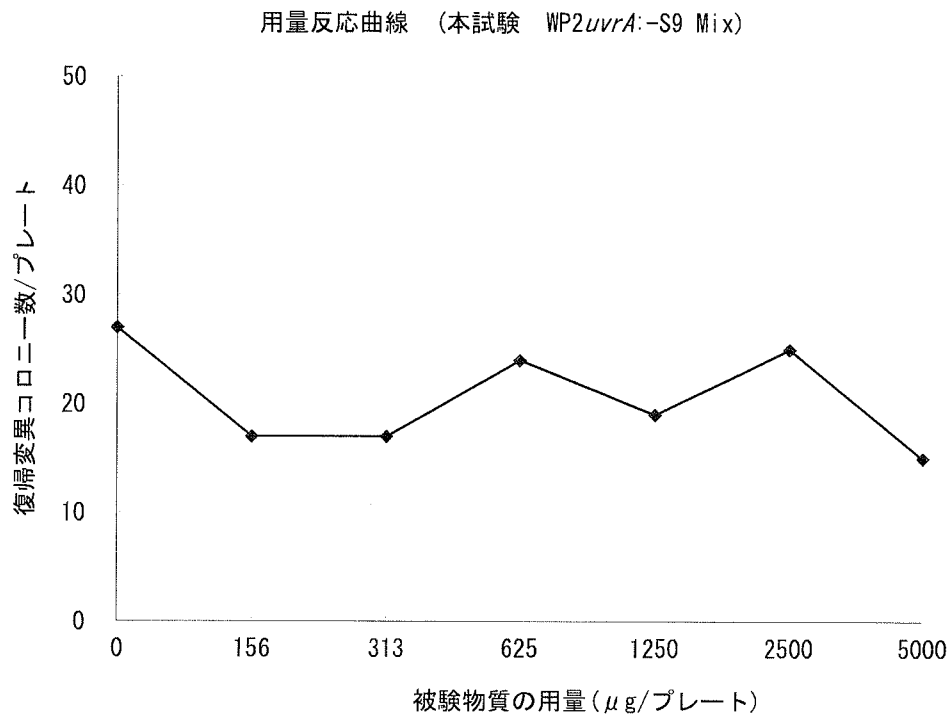


図 6

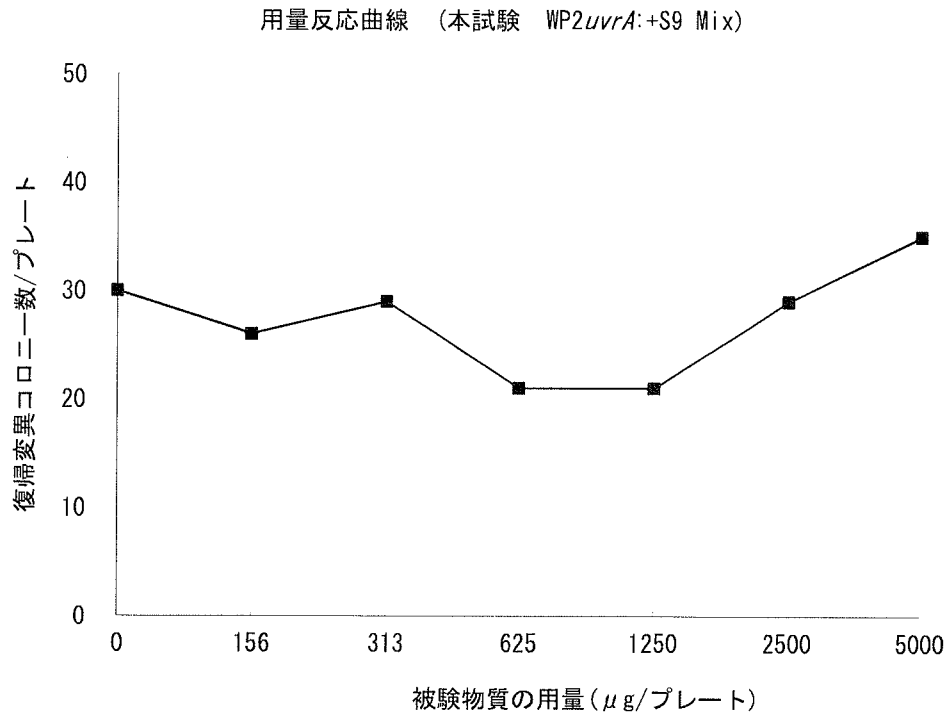


図 7

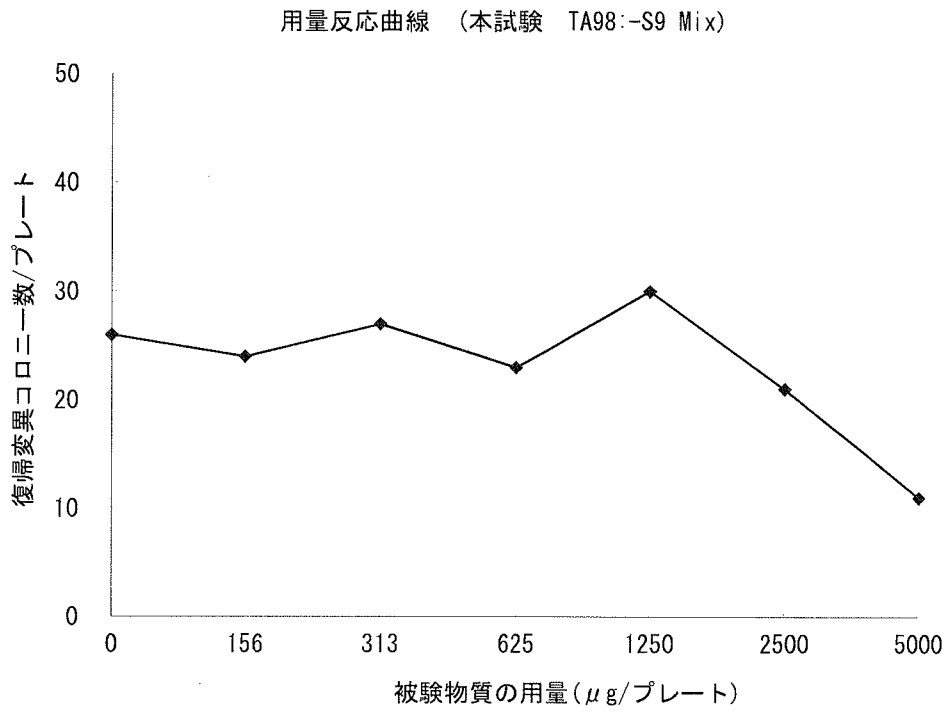


図 8

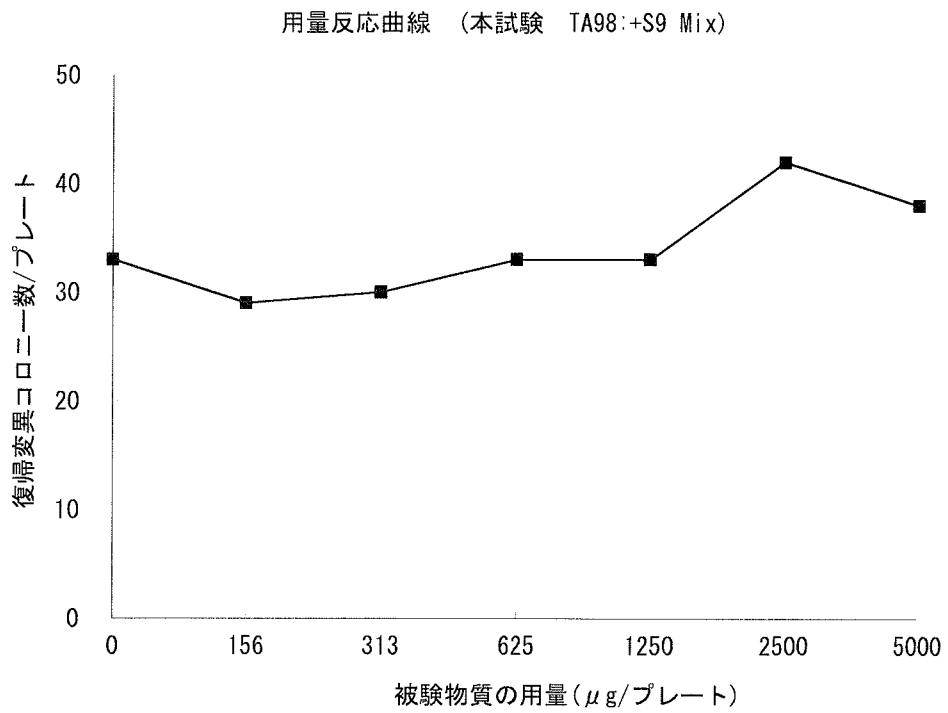


図 9

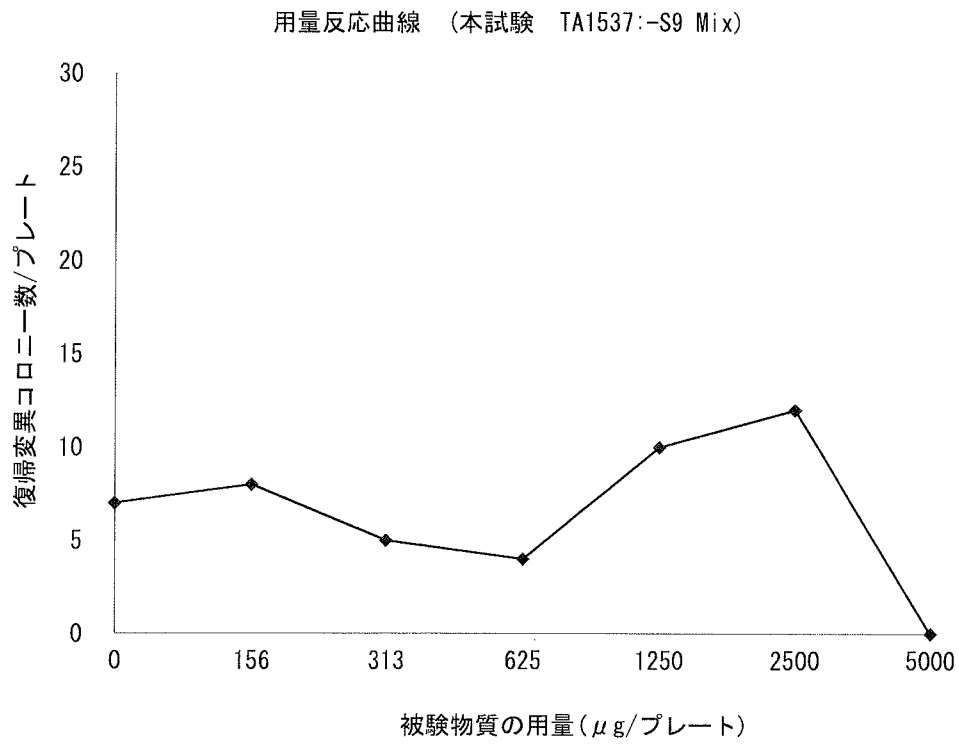


図 10

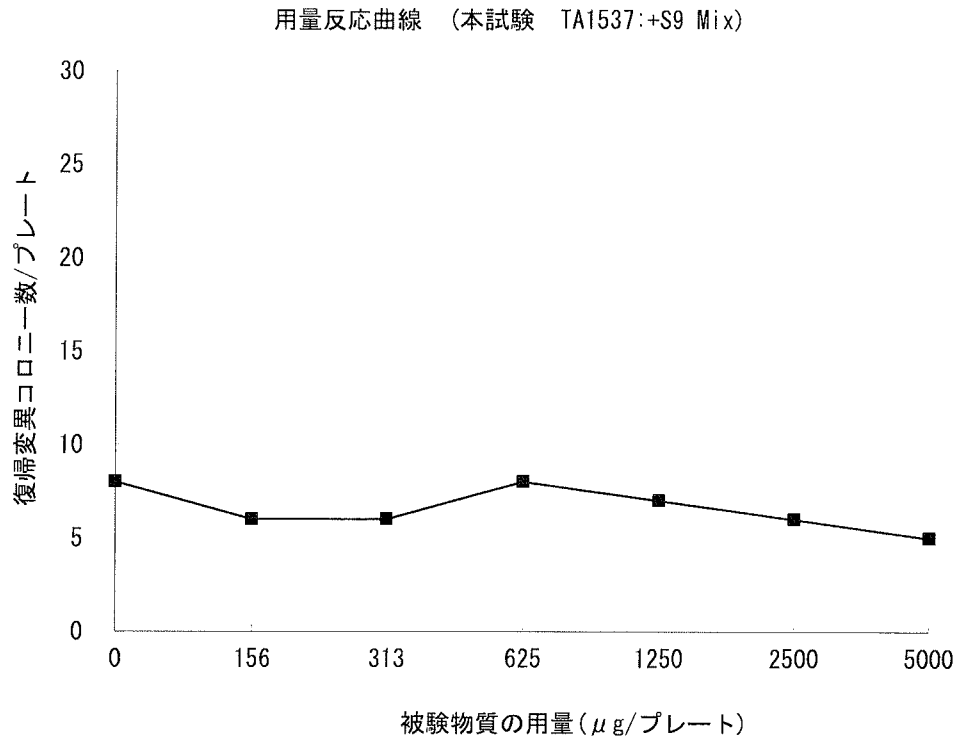
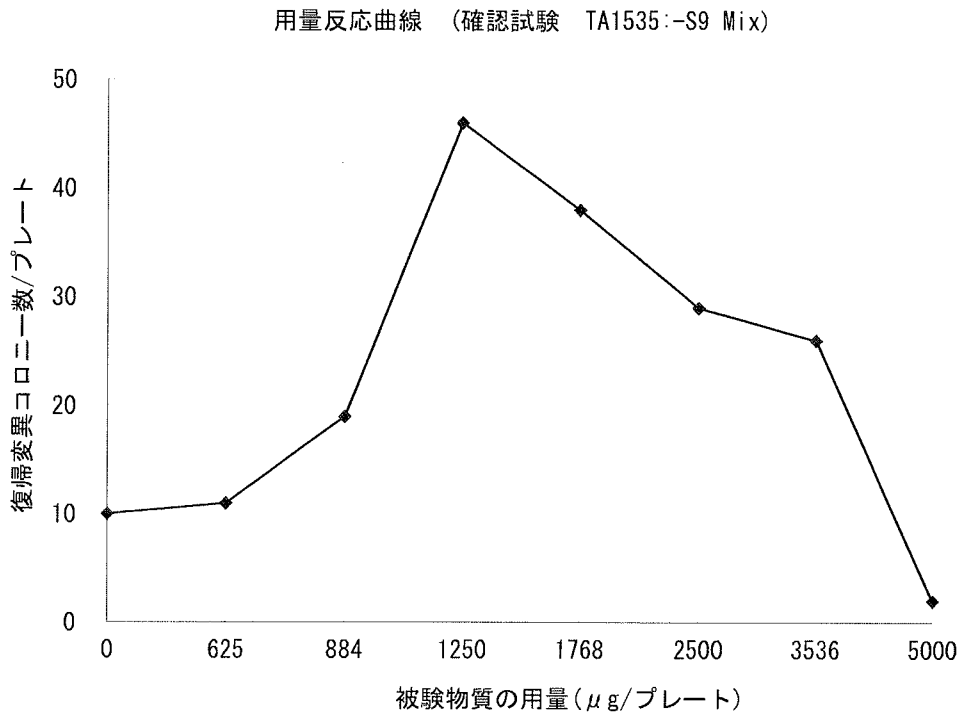


図 11



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