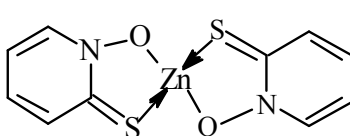


微生物を用いる変異原性試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	2-メルカプトピリジンN-オキシド亜鉛		
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	98%以上	試験に供した新規化学物質の Lot No.	USR3K
不純物の名称及び濃度	/		
CAS 番号	13463-41-7	蒸気圧	/
分子量	317.70	分配係数	/
融点	/	常温における性状	固体
沸点	/		
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 で不溶	発熱、ガスの発生等の反応性なし
	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	100 mg/mL で不溶	発熱、ガスの発生等の反応性なし
	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。なお、溶解度及び溶媒中で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。また DMSO の溶解度は、株式会社ボゾリサーチセンターで実施した被験液の調製時に得られた結果である。

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 <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	2013年10月25日製造
購入の場合 Lot No.	RAA20131025
保存温度	-87.6~-78.8°C (保存期間：2013年12月3日~2014年2月22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	195-247 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	PDM3591	JIS規格 試薬特級	99.0%以上
溶媒選択の理由	水、DMSO、アセトンについて溶解性試験を実施した。その結果、水、DMSOに50 mg/mL、アセトンに100 mg/mLで溶解しなかった。しかし、DMSOにおいては懸濁可能で、いずれの溶媒においても発熱、ガスの発生等の反応性も認められなかったためDMSOを溶媒とした。なお、用量設定試験の被験液の調製において、50 mg/mLでDMSOに溶解したため、試験は溶液で実施した。				
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.	876774
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	5.42	6.30	8.84	6.75	4.76
	本試験1回目	5.40	6.68	8.75	6.13	5.44
	本試験2回目	5.43	6.30	8.78	6.32	5.39
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	2013年10月16日製造
購入の場合の Lot No.	DZLEAG01
使用寒天の名称・製造・Lot No.	OXOID AGAR No.1・OXOID LTD.・Lot No. 1213483-02

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 (用量設定試験)	48 時間
	時間 (本試験 1 回目)	48 時間
	時間 (本試験 2 回目)	49 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、本試験 1 回目の結果を別表 2、本試験 2 回目の結果を別表 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 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 2-メルカプトピリジン N-オキシド亜鉛は、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は、代謝活性化しない場合の 1250 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の 5000 µg/plate 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。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 78.1 µg/plate 以上の用量で認められた。

用量設定試験の結果、代謝活性化の有無にかかわらずすべての菌株において、生育阻害を示さない用量が 4 用量以上得られなかったことから、同一用量で本試験を 2 回実施した。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-メルカプトピリジンN-オキシド亜鉛

No. T-1465

試験実施期間		2014年1月23日 より 2014年1月27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)	82 109 (96)	8 13 (11)	19 17 (18)	30 23 (27)	14 11 (13)	
	1.22	97 84 (91)	8 10 (9)	11 13 (12)	35 20 (28)	11 6 (9)	
	4.88	93 90 (92)	5 8 (7)	11 11 (11)	18 21 (20)	6 5 (6)	
	19.5	105 105 (105)	8 8 (8)	24 15 (20)	21 23 (22)	6 9 (8)	
	78.1	38 * 31 * (35)	3 * 4 * (4)	0 * 0 * (0)	5 * 8 * (7)	0 * 0 * (0)	
	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(DMSO)	118 116 (117)	8 11 (10)	22 16 (19)	44 46 (45)	9 11 (10)
		1.22	102 98 (100)	9 10 (10)	16 10 (13)	62 70 (66)	10 13 (12)
4.88		117 98 (108)	15 17 (16)	11 17 (14)	61 49 (55)	18 12 (15)	
19.5		126 132 (129)	10 14 (12)	21 19 (20)	48 67 (58)	20 14 (17)	
78.1		23 * 18 * (21)	2 * 2 * (2)	5 * 4 * (5)	11 * 11 * (11)	3 * 4 * (4)	
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)	
陽性対照		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	583 586 (585)	350 476 (413)	74 62 (68)	494 450 (472)	1326 1194 (1260)	
	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	971 1120 (1046)	362 454 (408)	1011 939 (975)	454 374 (414)	116 97 (107)	

(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1回目)

被験物質の名称： 2-メルカプトピリジンN-オキシド亜鉛

No. T-1465

試験実施期間		2014年2月13日 より 2014年2月17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)	100 105 (103)	11 7 (9)	18 21 (20)	18 13 (16)	5 5 (5)
	2.44	89 85 (87)	7 6 (7)	21 14 (18)	12 13 (13)	4 4 (4)
	4.88	83 97 (90)	8 7 (8)	19 25 (22)	10 13 (12)	4 2 (3)
	9.77	101 91 (96)	5 7 (6)	21 21 (21)	18 13 (16)	4 3 (4)
	19.5	108 117 (113)	8 9 (9)	14 12 (13)	10 13 (12)	4 5 (5)
	39.1	107 113 (110)	5 6 (6)	16 18 (17)	10 16 (13)	4 9 (7)
	78.1	10 * 20 * (15)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
	S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	107 108 (108)	10 13 (12)	22 22 (22)	31 31 (31)
2.44		128 111 (120)	9 4 (7)	21 19 (20)	35 31 (33)	8 7 (8)
4.88		128 131 (130)	10 6 (8)	19 15 (17)	39 32 (36)	7 7 (7)
9.77		155 127 (141)	6 4 (5)	18 27 (23)	34 30 (32)	4 5 (5)
19.5		168 148 (158)	6 4 (5)	29 24 (27)	42 32 (37)	7 13 (10)
39.1		128 120 (124)	4 4 (4)	22 18 (20)	18 22 (20)	3 3 (3)
78.1		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 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	コロニー数/プレート	515 509 (512)	306 289 (298)	57 65 (61)	294 336 (315)	1150 1106 (1128)
	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	1015 983 (999)	293 267 (280)	952 1022 (987)	389 378 (384)	110 137 (124)

(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。

()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2回目)

被験物質の名称 : 2-メルカプトピリジンN-オキシド亜鉛

No. T-1465

試験実施期間		2014年2月21日 より 2014年2月24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 96 (93)	4 4 (4)	23 20 (22)	14 18 (16)	6 8 (7)
	2.44	81 79 (80)	5 4 (5)	27 14 (21)	17 18 (18)	9 4 (7)
	4.88	79 73 (76)	5 4 (5)	18 19 (19)	16 10 (13)	4 3 (4)
	9.77	92 100 (96)	6 4 (5)	13 15 (14)	17 19 (18)	5 4 (5)
	19.5	96 76 (86)	4 4 (4)	20 15 (18)	10 18 (14)	4 5 (5)
	39.1	87 75 (81)	5 4 (5)	15 19 (17)	17 14 (16)	6 4 (5)
	78.1	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
	S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	100 95 (98)	10 6 (8)	13 18 (16)	27 25 (26)
2.44		97 119 (108)	8 5 (7)	17 21 (19)	16 15 (16)	7 4 (6)
4.88		97 105 (101)	6 4 (5)	15 17 (16)	19 14 (17)	10 5 (8)
9.77		108 140 (124)	11 8 (10)	22 14 (18)	17 15 (16)	11 8 (10)
19.5		117 132 (125)	8 13 (11)	16 16 (16)	13 16 (15)	9 5 (7)
39.1		103 95 (99)	4 6 (5)	13 15 (14)	17 15 (16)	3 7 (5)
78.1		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 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	コロニー数/プレート	545 534 (540)	237 241 (239)	65 55 (60)	472 396 (434)	1612 1634 (1623)
	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	881 927 (904)	309 276 (293)	932 812 (872)	414 435 (425)	85 105 (95)

(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

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。

()内は、2枚のプレートの平均値を示す。

図 1

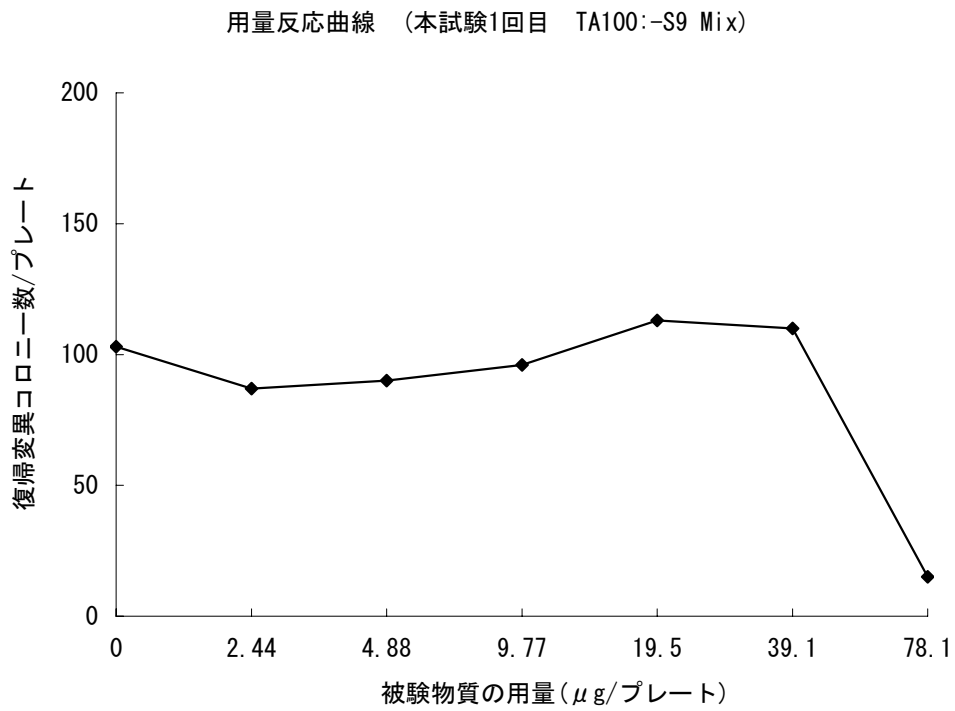


図 2

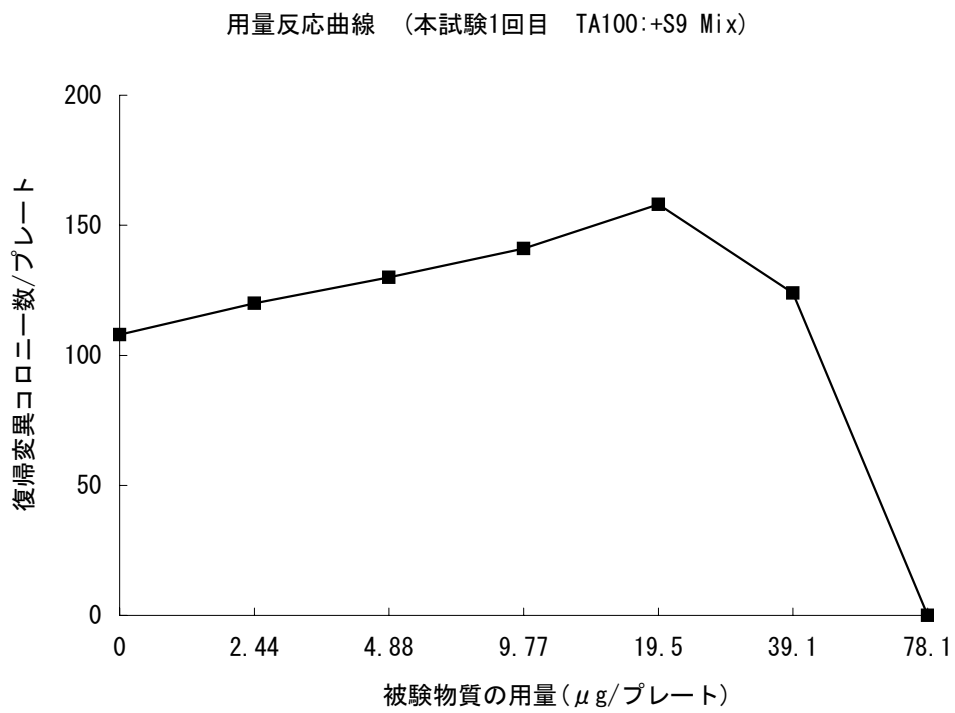


図 3

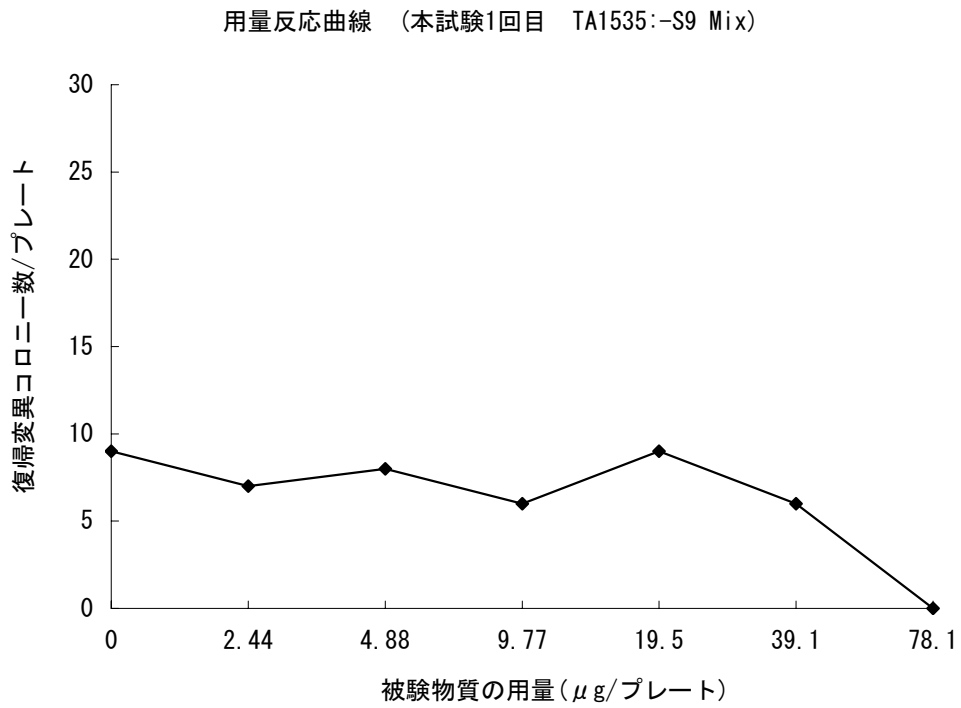


図 4

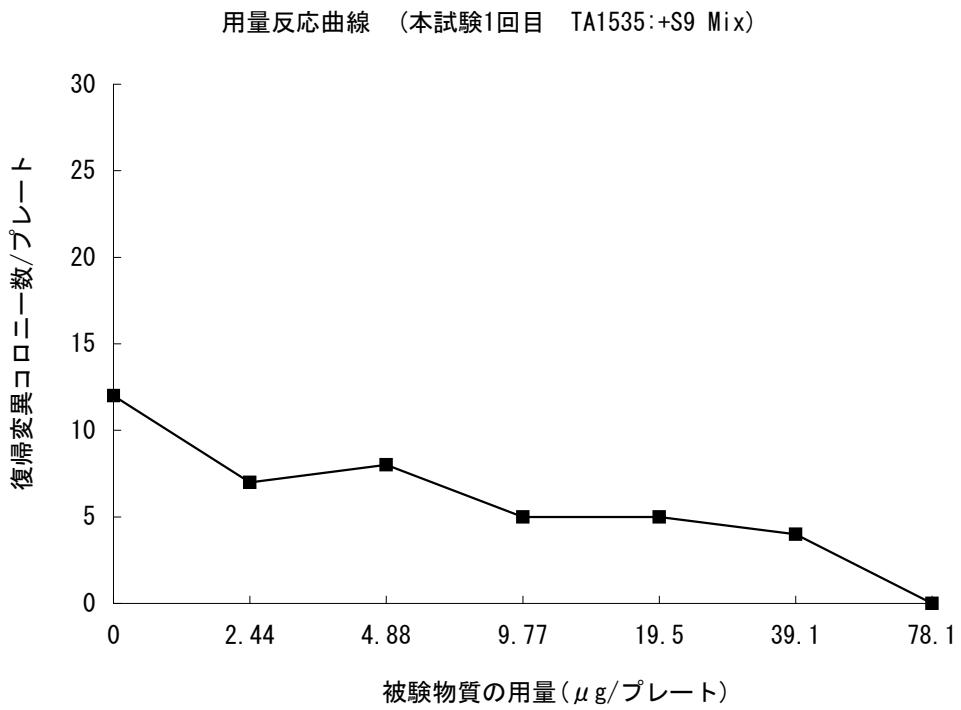


図 5

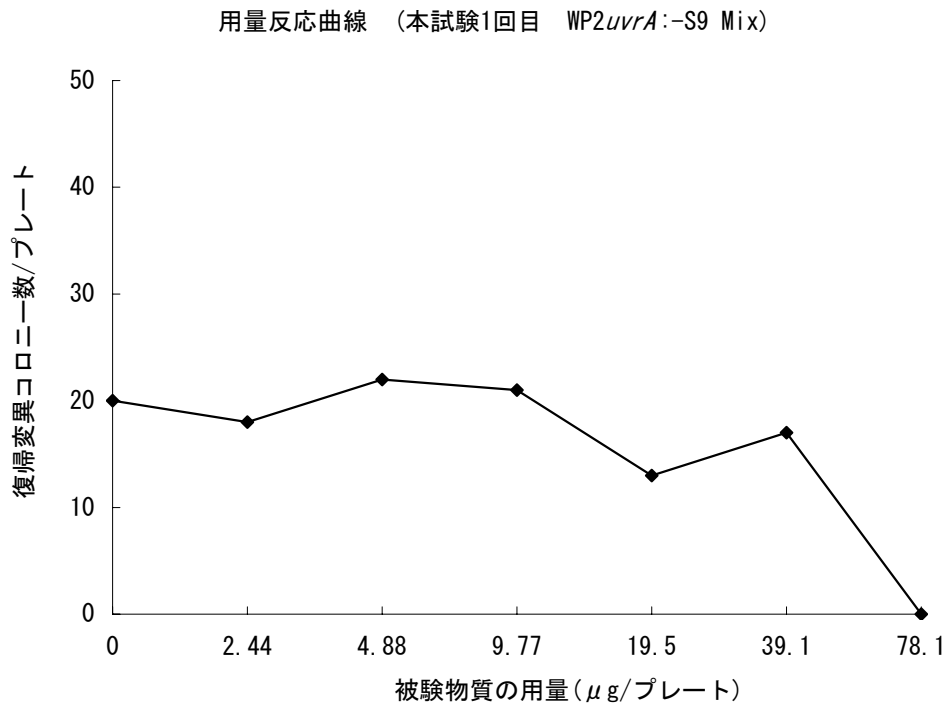


図 6

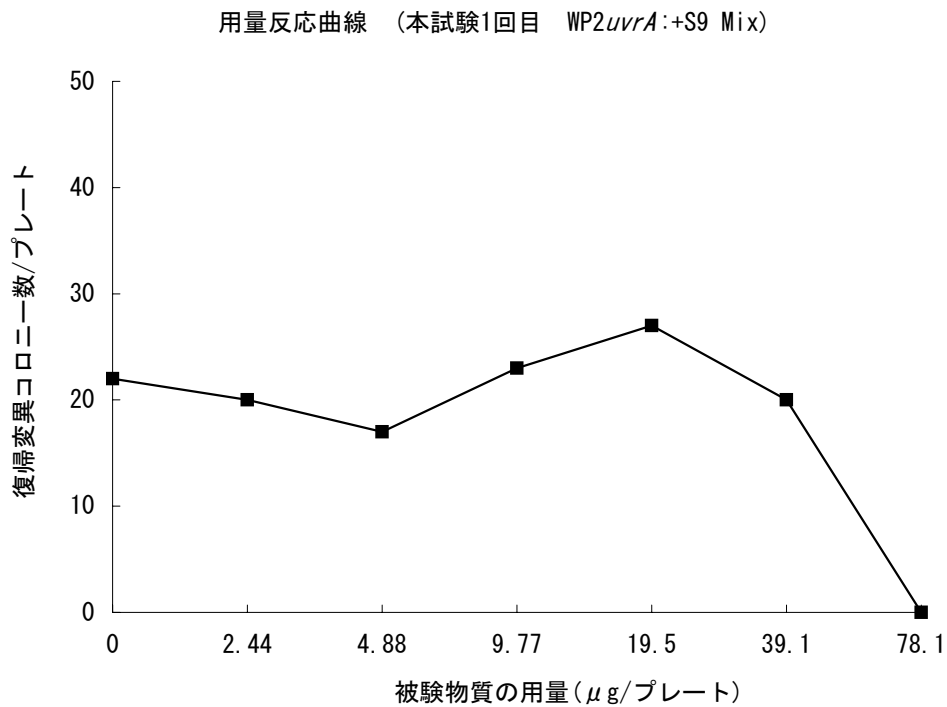


図 7

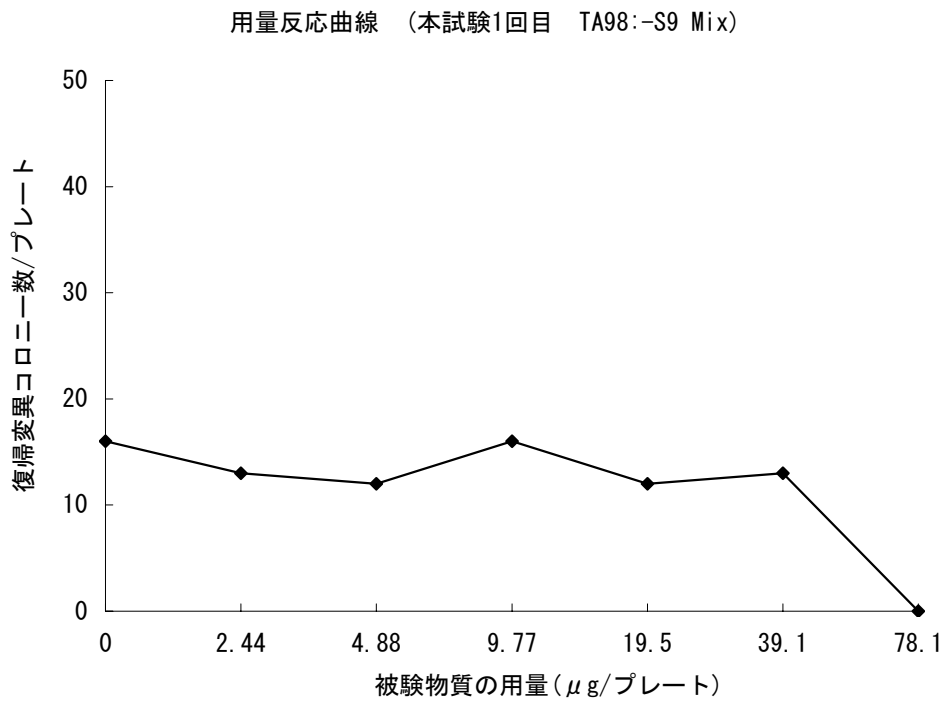


図 8

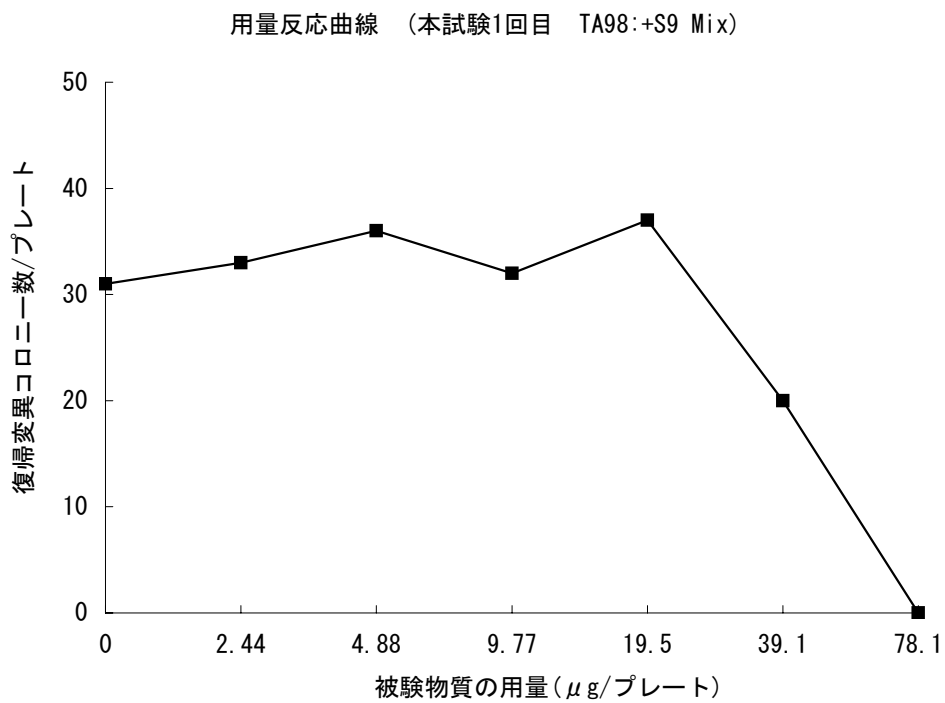


図 9

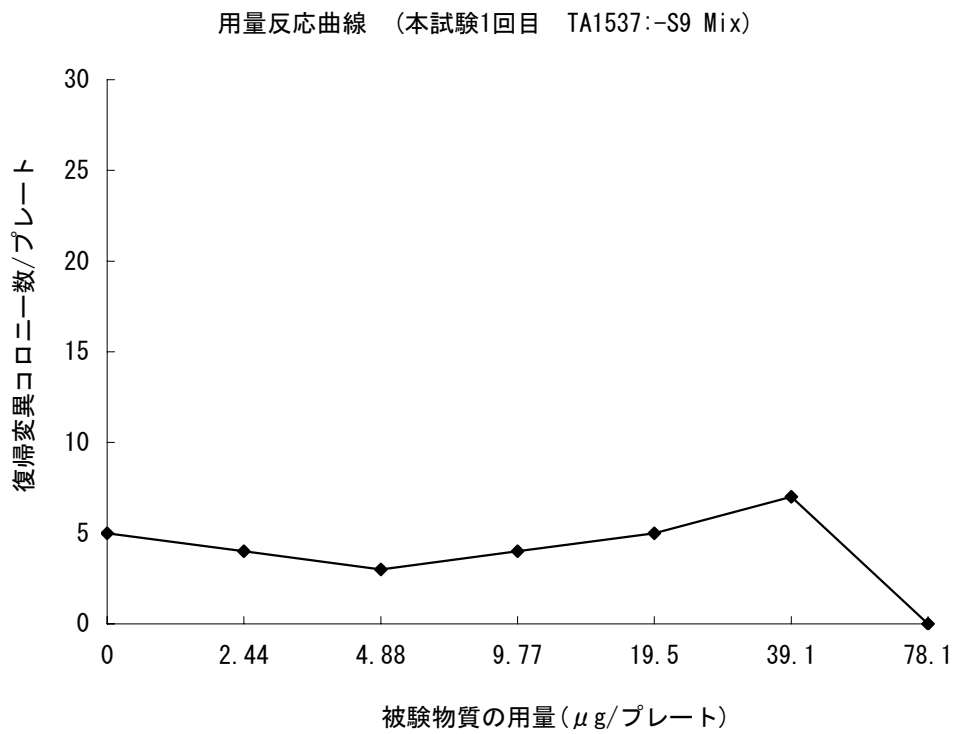


図 10

