

## M-1350

性の判定基準である5%未満であった。また、非代謝活性化においては、250 µg/mLでは規定数の細胞が観察されずUR (unreliable) と判定した。125 µg/mLでは0.5%、62.5 µg/mLでは0%、31.3 µg/mLでは1.0%及び15.6 µg/mLでは2.5%と陰性の判定基準である5%未満であった。

なお、陰性対照群においては染色体数的異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、又試験施設の背景値 (Attached Data 3) と同様であったことから試験は適切に実施されたと考えられた。

## 8. 考察

染色体異常試験の結果、染色体構造異常の一つの指標であるギャップを含まない染色体異常を有する細胞の出現率（TA 値）は、短時間処理法の代謝活性化では、陰性の判定基準を示したが、非代謝活性化では、陽性の判定基準である 10%以上の TA 値を示したこと及び TA 値の増加には用量依存性が認められたことから、総合的に陽性と判定した。短時間処理法の非代謝活性化において陽性結果が得られたことから、染色体構造異常誘発能の強さを、構造異常が 20%出現する推定被験物質濃度（SD<sub>20</sub> 値）を指標として検討したところ、SD<sub>20</sub> 値は 0.18 mg/mL、単位用量あたりの染色分体交換（cte）を持つ細胞の出現率の比較値である TR 値<sup>1)</sup>は 120 であった。なお、短時間処理法で明らかに陽性が確定したため、連続処理法は実施しなかった。

一方、倍数性細胞の出現率はいずれの処理法においても 5%未満であったことから、モルダントブラック-7 の染色体数的異常誘発性は陰性と判定した。

全ての処理法において、陰性対照群においては染色体構造異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、また試験施設の背景値（Attached Data 3）と同様であった。更に、陽性対照群においては著しい染色体構造異常の誘発が認められ、その出現率は陽性の判定基準内にあった。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

多くのアゾ化合物を用いた遺伝毒性試験においては、代謝活性化の条件下で陽性を示すことが報告されている<sup>6)</sup>。更に、アゾ化合物の遺伝毒性発現には、アゾ基の還元的開裂反応が重要で、それによって生じる個々の化合物が遺伝毒性に役割を果たしていることが示唆されている。本被験物質も化学構造的にアゾ化合物に属することから、その還元的開裂が重要な役割を果たすと推察され、被験物質自体やその還元的開裂産物に関する遺伝毒性試験の報告を調査したが、見当たらなかった。本被験物質と類似の化学構造を有するアゾ化合物では、Acid Alizarin Violet N の *Salmonella* 菌株を用いた復帰突然変異試験では、代謝活性化の条件下において遺伝毒性<sup>7)</sup>が認められているが、一方、Allura Red AC の染色体異常試験では、非代謝活性化では疑陽性、連続処理法では陽性と報告されており<sup>1)</sup>、遺伝毒性の発現が非代謝活性化の条件下で生じている点において、本被験物質の結果と一致している。更に、後者の物質については、*Salmonella* 菌株を用いた復帰突然変異試験及びキイロショウジョウバエ (*Drosophilla melanogaster*) を用いた伴性劣性致死試験においては、陰性と報告されている<sup>8)</sup>。また、複数のアゾ化合物を用いたマウス多臓器 DNA 単鎖切断試験 (Comet assay) では、本被験物質と同様に、水溶性のスルホン酸ナトリウム基を構造内に有する化合物は、肝臓における DNA 損傷性が低いと報告されている<sup>9)</sup>。これらの結果から、アゾ化合物の遺伝毒性の発現機構には、アゾ基の還元反応とは別の要因が存在する可能性も示唆されるが、還元によらないアゾ化合物の遺伝毒性発現機構については不明な点が多く、製造過程に生じた不純物に起因する可能性も示唆されている<sup>6)</sup>。本被験物質同様に非

代謝活性化において遺伝毒性が認められる橙色 203 号の復帰突然変異試験において、Combes らは、その遺伝毒性はアゾ基由来ではなく、ニトロ基の存在に起因すると推察している<sup>10)</sup>が、本被験物質にはアゾ基を除いて遺伝毒性に直接関与すると考えられる反応基は見当たらない。なお、肝癌を誘発することが知られている 3'-methyl-*N,N*-dimethyl-4-aminoazobenzene (3'-Me-DAB) の *Salmonella* 菌株を用いた復帰突然変異試験において、S9 の誘導剤と種差の比較検討を実施しているが、ポリ塩化ビフェニル (PCB) で誘導したラット肝 S9 によって強い遺伝毒性が得られるが<sup>11)</sup>、フェノバルビタール誘導では遺伝毒性の誘発が認められなかったと報告している<sup>12)</sup>。更に、同化合物に対する遺伝毒性は、ヒト肝 S9 を用いた場合には陰性を示し、遺伝毒性の発現に種差や性差が認められたと報告している<sup>11)</sup>ことから、S9 によるアゾ基の還元開裂には種特異性を考慮する必要が示唆される。

以上の結果から、モルダントブラック-7 は本試験条件下において染色体構造異常は誘発するが、染色体数的異常は誘発しないと結論した。

Table 1-2 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Mordant Black-7  
[Short-term treatment:-S9 mix]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (µg/mL)	Number of cells with structural chromosome aberration (%)								Cell-growth ratio (%)	Number of cells with numerical chromosome aberration (%)				Slide No.				
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g		TAG(%)	Judge-ment	Cells observed	Polyploid cells		other	Total (%)	Judge-ment	
6-18	-	NC	100	1	0	0	0	0	1	0	1	-	100	100	0	0	0	-	01-1	
			100	1	0	0	0	0	1	0	1	-	90	100	0	0	0	-	87-1	
			200	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)	-	(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-		
		15.6	100	1	1	0	0	0	2	0	2	-	100	100	3	2	5	-	67-1	
			100	1	0	0	0	0	1	0	1	-	100	100	0	0	0	-	14-1	
			200	2(1.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	3(1.5)	0(0.0)	3(1.5)	-	(105)	200	3(1.5)	2(1.0)	5(2.5)	-		
		31.3	100	1	3	0	0	0	4	0	4	-	100	100	2	0	2	-	31-1	
			100	1	3	0	0	0	4	0	4	-	90	100	0	0	0	-	03-1	
			200	2(1.0)	6(3.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	8(4.0)	0(0.0)	8(4.0)	-	(100)	200	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)	-		
		62.5	100	2	7	0	0	1	10	0	10	±	81	100	0	0	0	-	38-1	
			100	0	8	0	0	0	8	0	8	±	72	100	0	0	0	-	69-1	
			200	2(1.0)	15(7.5)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	18(9.0)	0(0.0)	18(9.0)	±	(81)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-		
		125	100	3	10	0	0	1	14	0	14	+	63	100	0	0	0	-	24-1	
			100	2	11	0	0	0	13	0	13	+	45	100	1	0	1	-	90-1	
			200	5(2.5)	21(10.5)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	27(13.5)	0(0.0)	27(13.5)	+	(57)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	-		
		250	1	0	0	0	0	0	0	0	0	UR	27	1	0	0	0	UR	41-1	
			8	0	0	0	0	0	0	0	0	UR	8	8	0	0	0	UR	41-2	
			4	0	1	0	0	0	1	0	1	UR	18	4	0	0	0	UR	08-1	
			8	1	1	0	0	0	2	0	2	UR	18	8	0	0	0	UR	08-2	
			21	1(4.8)	2(9.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	3(14.3)	0(0.0)	3(14.3)	UR	(24)	21	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	UR		
		PC	100	3	30	0	0	0	33	0	33	+	109	100	0	0	0	-	43-1	
			100	6	30	0	0	0	36	0	36	+	90	100	0	0	0	-	47-1	
				200	9(4.5)	60(30.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	69(34.5)	0(0.0)	69(34.5)	+	(105)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-	

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, other: including fragmentation

TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

NC: Negative control (water for injection)

PC: Positive control (mitomycin C, 0.075µg/mL)

Each slide number indicates the code number for chromosome observation by blind method and does not necessarily represent corresponding plate number for each cell growth ratio(%).

Each value in parenthesis on cell-growth ratio (%) data showed mean of cell-growth ratio against the negative control.

UR: These values were judged to be unreliable since no sufficient number of chromosomes could be observed due to severe cytotoxicity.

## Appendix 2-2

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Mordant Black-7

[Short-term treatment : -S9 mix]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation <sup>c)</sup>				
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean (%) <sup>b)</sup>	Condition of cells <sup>d)</sup>	Color of medium <sup>e)</sup>	Precipitates/Crystals <sup>f)</sup>		
							1)	2)	
-	6-18	0 (NC)	100 <sup>a)</sup>	100	-	-	-	-	
			93		-	-	-	-	
		32.8	66	75	-	Light-purple	-	-	-
			79		-	Light-purple	-	-	-
		65.6	79	79	+	Purple	-	-	-
			73		+	Purple	-	-	-
		131	46	45	++	Purple	-	-	-
			40		++	Purple	-	-	-
		263	13	17	++	Purple	-	-	-
			20		++	Purple	-	-	-
		525	0	3	g)	Purple	-	+	+
			6		g)	Purple	-	+	+
		1050	6	6	g)	Purple	-	+	+
			6		g)	Purple	-	+	+
		2100	6	6	g)	Purple	-	+	+
			6		g)	Purple	-	+	+
		4200	13	13	g)	Purple	+	+	+
			13		g)	Purple	+	+	+
Concentration of 50% cell-growth inhibition :					<b>121.4</b>	µg/mL			

NC: Negative Control(water for injection)

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test suspensions. Precipitates/crystals were observed <sup>1)</sup> immediately after addition of the test suspensions and <sup>2)</sup> at the end of treatment.

d) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.

+ : A small number of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.

++ : Approximately half of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.

e) - : No changes of color

f) - : Absence of precipitates/crystals

+ : Presence of precipitates

g) Condition of cells could not be observed due to severe precipitate of the test article.

Appendix 2-3

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Mordant Black-7

[Continuous treatment: 24hr]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation <sup>c)</sup>				
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean (%) <sup>b)</sup>	Condition of cells <sup>d)</sup>	Color of medium <sup>e)</sup>	Precipitates/Crystals <sup>f)</sup>		
							1)	2)	
-	24-0	0 (NC)	100 <sup>a)</sup>	100	-	-	-	-	
			91		-	-	-	-	
		32.8	91	91	-	Light-purple	-	-	-
			83		-	Light-purple	-	-	
		65.6	74	73	-	Purple	-	-	-
			66		-	Purple	-	-	
		131	33	35	++	Purple	-	-	-
			33		++	Purple	-	-	
		263	16	17	+++	Purple	-	-	-
			16		+++	Purple	-	-	
		525	16	30	g)	Purple	-	-	+
			41		g)	Purple	-	-	+
		1050	33	30	g)	Purple	-	-	+
			24		g)	Purple	-	-	+
		2100	66	69	g)	Purple	-	-	+
			66		g)	Purple	-	-	+
		4200	33	39	g)	Purple	+	-	+
			41		g)	Purple	+	-	+
Concentration of 50% cell-growth inhibition :					<b>105.2</b> µg/mL				

NC: Negative Control(water for injection)

- a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.
- b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.
- c) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test suspensions. Precipitates/crystals were observed <sup>1)</sup>immediately after addition of the test suspensions and <sup>2)</sup>at the end of treatment.
- d) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.  
 ++ : Approximately half of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.  
 +++ : Most of the cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
- e) - : No changes of color
- f) - : Absence of precipitates/crystals  
 + : Presence of precipitates
- g) Condition of cells could not be observed due to severe precipitate of the test article.

## Appendix 2-4

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Mordant Black-7

[Continuous treatment: 48hr]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation <sup>c)</sup>				
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean (%) <sup>b)</sup>	Condition of cells <sup>d)</sup>	Color of medium <sup>e)</sup>	Precipitates/Crystals <sup>f)</sup>		
							1)	2)	
-	48-0	0 (NC)	100 <sup>a)</sup>	100	-	-	-	-	
			96		-	-	-	-	
		Test article	32.8	32	33	++	Light-purple	-	-
				32		++	Light-purple	-	-
			65.6	24	24	++	Purple	-	-
				24		++	Purple	-	-
			131	17	14	++	Purple	-	-
				10		++	Purple	-	-
			263	0	4	+++	Purple	-	-
				7		+++	Purple	-	-
			525	7	4	g)	Purple	-	+
				0		g)	Purple	-	+
			1050	3	5	g)	Purple	-	+
				7		g)	Purple	-	+
			2100	46	45	g)	Purple	-	+
				42		g)	Purple	-	+
			4200	21	18	g)	Purple	+	+
				14		g)	Purple	+	+
Concentration of 50% cell-growth inhibition : below					<b>32.8</b>	µg/mL			

NC: Negative Control(water for injection)

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test suspensions. Precipitates/crystals were observed <sup>1)</sup> immediately after addition of the test suspensions and <sup>2)</sup> at the end of treatment.

d) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.

++ : Approximately half of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.

+++ : Most of the cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.

e) - : No changes of color

f) - : Absence of precipitates/crystals

+ : Presence of precipitates

g) Condition of cells could not be observed due to severe precipitate of the test article.

All calculations were carried out using Excel 2003

## Appendix 3-1

Results of observation in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Mordant Black-7

[Short-term treatment: +S9 mix]

Chromosome aberration test							
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Observation <sup>a)</sup>				
S9 mix	time (hr)		Condition of cells <sup>b)</sup>	Color of medium <sup>c)</sup>	Precipitates/Crystals <sup>d)</sup>		
					1)	2)	
+	6-18	0 (NC)	-	-	-	-	
		Test article	25.6	-	Light-purple	-	-
				-	Light-purple	-	-
			32.0	-	Light-purple	-	-
				-	Light-purple	-	-
			40.0	-	Purple	-	-
				-	Purple	-	-
		50.0	+	Purple	-	-	
			+	Purple	-	-	
		62.5	++	Purple	-	-	
			++	Purple	-	-	
PC	-	-	-	-			
		-	-	-	-		

NC: Negative Control(water for injection)

PC: Positive Control(cyclophosphamide : 14 µg/mL)

- a) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed <sup>1)</sup>immediately after addition of the test solutions and <sup>2)</sup>at the end of treatment. Upper and lower columns in each observation indicate the result of plate digit numbers 3 and 4, respectively.
- b) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.  
 + : A small number of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.  
 ++ : Approximately half of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
- c) - : No changes of color
- d) - : Absence of precipitates/crystals

Appendix 3-2

Results of observation in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Mordant Black-7

[Short-term treatment: -S9 mix]

Chromosome aberration test							
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Observation <sup>a)</sup>				
S9 mix	time (hr)		Condition of cells <sup>b)</sup>	Color of medium <sup>c)</sup>	Precipitates/Crystals <sup>d)</sup>		
					1)	2)	
-	6-18	0 (NC)	-	-	-	-	
			-	-	-	-	
		Test article	15.6	-	Light-purple	-	-
				-	Light-purple	-	-
			31.3	+	Light-purple	-	-
				+	Light-purple	-	-
			62.5	+	Purple	-	-
				+	Purple	-	-
			125	+	Purple	-	-
				+	Purple	-	-
		250	++	Purple	-	-	
			++	Purple	-	-	
		PC	-	-	-	-	-
			-	-	-	-	-

NC: Negative Control(water for injection)

PC: Positive Control(mitomycin C : 0.075 µg/mL)

- a) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed <sup>1)</sup>immediately after addition of the test solutions and <sup>2)</sup>at the end of treatment. Upper and lower columns in each observation indicate the result of plate digit numbers 3 and 4, respectively.
- b) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.  
 + : A small number of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.  
 ++ : Approximately half of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
- c) - : No changes of color
- d) - : Absence of precipitates/crystals

#### 4. 要約

モルダントブラック-7の28日間反復経口投与毒性試験を6週齢のSprague-Dawley系SPFラット〔CrI:CD(SD)、1群雌雄各6又は12匹〕を用いて実施した。投与量は0（注射用水：対照群）、40、200及び1000 mg/kgとし、対照群と1000 mg/kg投与群の一部の個体（1群雌雄各6匹）については投与期間終了後2週間の休薬期間を設けて、毒性変化の可逆性を検討した。

機能検査、握力及び血液学検査に、被験物質投与の影響は認められなかった。

一般状態では、投与期間中に軟便と着色尿が200 mg/kg以上の投与群の雌雄で認められた。

詳細な一般状態の観察では、投与期間中にオープンフィールド内観察における排糞数の高値が1000 mg/kg投与群の雄で認められた。

自発運動量では、投与4週に1000 mg/kg投与群の雌で高値がみられた。

体重及び摂餌量では、投与期間の初期に低値が1000 mg/kg投与群の雄でみられた。

尿検査（摂水量を含む）では、投与4週にビリルビンの陽性例の増加傾向が1000 mg/kg投与群の雌で、摂水量の高値が200 mg/kg以上の投与群の雄と1000 mg/kg投与群の雌で、尿量の低値と浸透圧の高値が1000 mg/kg投与群の雄と40 mg/kg以上の投与群の雌でみられた。

血液化学検査では、投与期間終了時にカリウムの高値が200 mg/kg以上の投与群の雌でみられた。

病理学検査では、腎臓において絶対あるいは相対重量の高値が1000 mg/kg投与群の雌雄で、組織学検査に尿細管上皮細胞の褐色色素が200 mg/kg以上の投与群の雌で、尿細管上皮細胞の好酸性小滴が1000 mg/kg投与群の雄で認められた。更に、盲腸及び結腸の粘膜の過形成が200 mg/kg以上の投与群の雌雄で、直腸の粘膜の過形成が1000 mg/kg投与群の雌雄で認められた。

上述した変化についてはいずれも休薬により、軽減あるいは消失し回復性を示した。

以上の結果、モルダントブラック-7の本試験条件下における無影響量は雄では病理検査における大腸（盲腸と結腸）の粘膜の過形成などから40 mg/kg/dayと推定された。一方、雌では尿検査における尿量の低値と浸透圧の高値から40 mg/kg/dayを下回ると考えられた。

B-6586

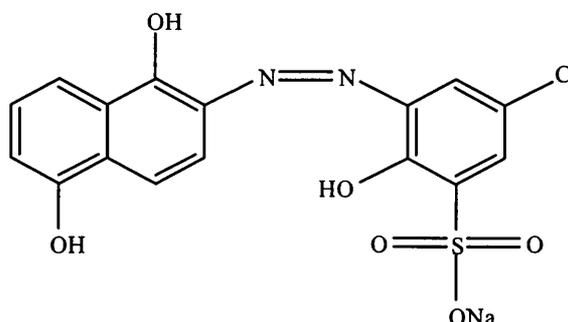
## 6. 試験材料及び方法

### 6.1 被験物質及び媒体

#### 6.1.1 被験物質

被験物質は山田化学工業株式会社より提供された。本試験に使用した被験物質のロット番号、純度等は次の通りである。また、分析チャートを添付資料1に示した。

名称	:	モルダントブラック-7
英名	:	Mordant Black -7
CAS 番号	:	3618-60-8
官報公示整理番号	:	5-2111
分子量	:	416.77
分子式	:	$C_{16}H_{10}ClN_2NaO_6S$
構造式	:	



ロット番号	:	08001
純度	:	92.7 %
不純物	:	7.3 % (うち塩分として塩素イオン 7100 mg/kg、硫酸イオン 1300 mg/kg が含有)
入手量	:	700 g (100g を 7 本)
安定性	:	投与終了後、提供先で安定性を確認した結果、安定であることが確認された (添付資料 2)。
保存方法	:	冷暗所 (実測値 3~8°C)、密閉、吸湿性あり、シリカゲルと同梱
保存場所	:	御殿場研究所 被験物質保存室及び第 1 研究棟被験物質調製室
取扱い上の注意	:	マスク、手袋及び保護眼鏡を着用した。 火気や熱源などの着火源から遠ざけ、酸化剤との接触を避けた。
返却	:	被験物質 1 g を保存試料として保存した。分析用に小分けした被験物質の残量は廃棄した。また、被験物質の残量は提供先に送付し安定性を確認後、すべて廃棄した。

の間投与を行わなかった。

## 6.9 投与方法

投与容量は 5 mL/kg 体重とし、胃ゾンデを用いて強制経口投与した（08:01~12:13の間）。対照群には媒体（注射用水）を同様に投与した。個体ごとの投与液量（表示単位：0.1 mL）は最新の体重を基準に算出した。

## 6.10 投与量及びその設定根拠並びに群構成

モルダントブラック-7の0（注射用水）、100、300及び1000 mg/kg/dayを1群雌雄各5匹のラットに14日間反復経口投与した結果<sup>1)</sup>、主な変化として、雄は1000 mg/kg投与群の1例に死亡が、雌は1000 mg/kg投与群の器官重量に変化が認められた。従って、本試験における投与量は、1000 mg/kg投与群を高用量とし、公比5で除し、200 mg/kgを中用量に、40 mg/kgを低用量とし、対照群を加え4群構成とした。1群当たりの動物を主群では雌雄各6匹、回復群では対照群及び高用量群で雌雄各6匹とした。群構成表を次の表1に示す。

表 1. 群構成表

試験群	投与量 (mg/kg)	濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	性	主 群		回 復 群	
					動物数	動物番号	動物数	動物番号
対照群	0	0	5	雄	6	1001~1006	6	1007~1012
				雌	6	1101~1106	6	1107~1112
低用量群	40	8	5	雄	6	2001~2006	-	-
				雌	6	2101~2106	-	-
中用量群	200	40	5	雄	6	3001~3006	-	-
				雌	6	3101~3106	-	-
高用量群	1000	200	5	雄	6	4001~4006	6	4007~4012
				雌	6	4101~4106	6	4107~4112

## 6.11 観察及び検査の方法

それぞれ記載された時期に観察及び検査を実施した。試験日の起算に関しては下記の通りとした。

- 投与1日（day 1 of administration）：投与開始日
- 投与1週（week 1 of administration）：投与1から投与7日
- 回復1日（day 1 of recovery）：回復開始日（投与期間終了の翌日）
- 回復1週（week 1 of recovery）：回復1から回復7日

### 6.11.1 一般状態の観察

全個体について投与期間中は毎日3回、投与前と投与直後及び約2時間後（ただし、休日と詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量測定を実施する時は投与前と投与直後の2回）、回復期間中は毎日1回、体外表、栄養状態、姿勢、行動及

## 7. 試験結果

### 7.1 一般状態

成績を Table 1-1~1-3 及び Appendix 1~10 に示した。

#### 1) 投与期間

軟便が 200 及び 1000 mg/kg 投与群の雌雄で投与 2 日以降に認められた。また、着色尿が 200 mg/kg 投与群の雄で投与 2~14 日と雌で投与 2~9 日に散見され、1000 mg/kg 投与群の雌雄全例で投与 2 日以降より投与期間を通じて認められた。

#### 2) 回復期間

1000 mg/kg 投与群の回復 1 日に軟便が雌雄で散見された。また、着色尿が雌雄全例で認められた。

### 7.2 詳細な一般状態、機能検査、握力及び自発運動量

#### 7.2.1 詳細な一般状態

成績を Table 2-1~2-18 及び Appendix 11~70 に示した。

#### 1) 投与期間

オープンフィールド内観察において排糞数の有意な高値が 1000 mg/kg 投与群の雄で投与 1 及び 2 週に認められた。

#### 2) 回復期間

いずれの検査項目においても異常はなく、雌雄とも 1000 mg/kg 投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

#### 7.2.2 機能検査

成績を Table 2-19、2-20 及び Appendix 71~76 に示した。

#### 1) 投与 4 週

いずれの検査項目においても異常はなく、雌雄とも各被験物質投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

#### 2) 回復 2 週

いずれの検査項目においても異常はなく、雌雄とも 1000 mg/kg 投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

#### 7.2.3 握力

成績を Table 2-21、2-22 及び Appendix 77~82 に示した。

#### 1) 投与 4 週

雌雄とも各被験物質投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

#### 2) 回復 2 週

雌雄とも 1000 mg/kg 投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

#### 7.2.4 自発運動量

成績を Fig. 1~4、Table 2-23、2-24 及び Appendix 83~88 に示した。

##### 1) 投与 4 週

有意な高値が 40 mg/kg 投与群の雄の測定開始後 0~10 分の測定値に、1000 mg/kg 投与群の雌に測定開始後 50~60 分の測定値にみられ、更に、測定開始後 0~60 分の合計値にも有意な高値が認められた。

##### 2) 回復 2 週

有意な高値が 1000 mg/kg 投与群の雌の測定開始後 0~10 分と 30~40 分の測定値に認められた。

#### 7.3 体重

成績を Fig.5、Table 3-1、3-2 及び Appendix 89~94 に示した。

##### 1) 投与期間

有意な低値が 1000 mg/kg 投与群の雄で投与 4、7 及び 10 日に認められた。

##### 2) 回復期間

1000 mg/kg 投与群の雌雄とも対照群とほぼ同様に推移し、有意差は認められなかった。

#### 7.4 摂餌量

成績を Fig.6、Table 4-1、4-2 及び Appendix 95~100 に示した。

##### 1) 投与期間

有意な低値が 1000 mg/kg 投与群の雄で投与 7 日に、有意な高値が 1000 mg/kg 投与群の雄で投与 14 日に認められた。

##### 2) 回復期間

雌雄とも 1000 mg/kg 投与群と対照群とほぼ同様に推移し、有意差は認められなかった。

#### 7.5 尿検査（摂水量含む）

成績を Table 5-1~5-8 及び Appendix 101~118 に示した。

##### 1) 投与 4 週

色調において淡紫色が 40 mg/kg 投与群の雌 1/6 例と 200 mg/kg 投与群の雌雄各全例で、紫色が 1000 mg/kg 投与群の雌雄各全例でみられた。また、ビリルビンの陽性例が 1000 mg/kg 投与群の雌 3/12 例でみられ、陽性例の増加傾向が認められた。また、摂水量の有意な高値が 200 mg/kg 以上の投与群の雄と 1000 mg/kg 投与群の雌で、尿量の有意な低値と浸透圧の高値が 1000 mg/kg 投与群の雄と 40 mg/kg 以上の投与群の雌で認められた。

##### 2) 回復 2 週

浸透圧の有意な高値が 1000 mg/kg 投与群の雌で認められた。

## 7.6 血液学検査

成績を Table 6-1~6-6 及び Appendix 119~136 に示した。

### 1) 投与期間終了時

いずれの検査項目においても、雌雄とも各被験物質投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

### 2) 回復期間終了時

平均赤血球色素濃度の有意な低値が 1000 mg/kg 投与群の雄で、白血球百分率の実数で好酸球数の有意な低値が 1000 mg/kg 投与群の雌雄で認められた。

## 7.7 血液化学検査

成績を Table 7-1~7-4 及び Appendix 137~148 に示した。

### 1) 投与期間終了時

カリウムの有意な高値が 200 mg/kg 以上の投与群の雌で、無機リンの有意な低値が 40 mg/kg 投与群の雄で認められた。

### 2) 回復期間終了時

いずれの検査項目においても、雌雄とも 1000 mg/kg 投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

## 7.8 器官重量

成績を Table 8-1~8-8 及び Appendix 149~172 に示した。

### 1) 投与期間終了時

腎臓 : 絶対及び相対重量の有意な高値が 1000 mg/kg 投与群の雄で、相対重量の有意な高値が 1000 mg/kg 投与群の雌で認められた。

### 2) 回復期間終了時

いずれの器官においても、雌雄とも 1000 mg/kg 投与群と対照群の間に有意差は認められなかった。

## 7.9 剖検所見

成績を Table 9-1、9-2 及び Appendix 173~244 に示した。

### 1) 投与期間終了時

下垂体	:	のう胞が 40 mg/kg 投与群の雄 1 例で認められた。
胃	:	腺胃の暗赤色巢が 200 mg/kg 投与群の雌 2 例で、前胃の隆起巢が 1000 mg/kg 投与群の雌 1 例で認められた。
腎臓	:	暗調化が 40 mg/kg 投与群の雄 1 例と雌 5 例、200 mg/kg 以上の投与群の雌雄各全例で認められた。
精巣	:	小型化が 40 及び 1000 mg/kg 投与群の各 1 例で認められた。
精巣上体	:	小型化が 40 及び 1000 mg/kg 投与群の各 1 例で認められた。

### 2) 回復期間終了時

肺	:	暗赤色巢が 1000 mg/kg 投与群の雄 1 例で認められた。
腎臓	:	暗調化が 1000 mg/kg 投与群の雄 2 例と雌 5 例で認められた。
胃	:	漿膜の隆起巢が対照群の雌 1 例で認められた。
腭リンパ節	:	結節が 1000 mg/kg 投与群の雌 1 例で認められた。

## 7.10 病理組織学検査

成績を Table 10-1~10-5 及び Appendix 173~244 に示した。

### 1) 投与期間終了時

被験物質投与によると考えられる変化が盲腸、直腸、結腸及び腎臓で認められた。

盲腸	:	軽微あるいは軽度な粘膜の過形成が対照群の雌雄各 1 例、40 mg/kg 投与群の雌雄各 2 例、200 mg/kg 投与群の雄 5 例と雌 4 例、1000 mg/kg 投与群の雌雄各全例にみられ、200 mg/kg 以上の投与群の雌雄で発現頻度の増加傾向が認められた。
結腸	:	軽微あるいは軽度な粘膜の過形成が 200 mg/kg 投与群の雄 1 例と雌 4 例、1000 mg/kg 投与群の雄全例と雌 5 例に認められた。
直腸	:	軽微あるいは軽度な粘膜の過形成が 1000 mg/kg 投与群の雄 1 例と雌 4 例に認められた。
腎臓	:	軽微あるいは軽度な尿細管上皮細胞の好酸性小滴が 1000 mg/kg 投与群の雄 3 例に、軽微な尿細管上皮細胞の褐色色素が 200 mg/kg 投与群の雌 1 例、1000 mg/kg 投与群の雌全例に認められた。

以下に示す所見については、その出現状況あるいは病理組織学的性状からいずれも偶発性の変化と判断した。

- |        |   |   |
|--------|---|---|
| 眼球     | : | 軽微な網膜異形成と結膜の石灰沈着の肉芽腫が 1000 mg/kg 投与群の雄 1 例に認められた。   |
| 下垂体    | : | 軽度な異所性頭蓋咽頭管組織が 40 mg/kg 投与群の雄 1 例に認められた。  |
| 甲状腺    | : | 軽微な鰓後体のう胞が対照群の雌雄各 1 例、1000 mg/kg 投与群の雌 2 例に認められた。   |
| 心臓     | : | 軽微な限局性の心筋炎が対照群の雄 1 例、1000 mg/kg 投与群の雄 2 例に認められた。  |
| 肺      | : | 軽微な動脈壁の鈣質沈着が 1000 mg/kg 投与群の雄 2 例に、軽微な肺泡マクロファージの集簇が 1000 mg/kg 投与群の雄 1 例に、軽微な限局性肺炎が対照群の雄 1 例に認められた。   |
| 胃      | : | 軽微あるいは軽度の腺胃のびらんが 200 mg/kg 投与群の雌 2 例で、軽度な扁平上皮の限局性過形成が 1000 mg/kg 投与群の雌 1 例で認められた。   |
| 盲腸     | : | 軽微な粘膜の細胞浸潤が対照群の雄 1 例、200 mg/kg 投与群の雌 1 例に認められた。   |
| 肝臓     | : | 軽微な微小肉芽腫が対照群の雌雄各 4 例、1000 mg/kg 投与群の雄 4 例と雌 5 例に認められた。  |
| 腎臓     | : | 軽微あるいは軽度な再生尿管が対照群の雄 2 例と雌 1 例、40 mg/kg 投与群の雄 1 例と雌 2 例、200 mg/kg 投与群の雄 2 例と雌 1 例、1000 mg/kg 投与群の雄 5 例と雌 1 例に、軽微な間質性の細胞浸潤が対照群の雌 1 例、40 mg/kg 投与群の雌 1 例、200 mg/kg 投与群の雄 1 例、1000 mg/kg 投与群の雌 1 例に認められた。 |
| 精巣     | : | 軽度あるいは高度な精細管の萎縮が 40 及び 1000 mg/kg 投与群の各 1 例で認められた。  |
| 精巣上体   | : | 軽微な間質性の細胞浸潤が対照群の 1 例、1000 mg/kg 投与群の 2 例に、高度な精子数の減少が 40 mg/kg 投与群の 1 例に、軽微あるいは軽度な管腔の細胞残屑が 40 mg/kg 投与群と 1000 mg/kg 投与群の各 1 例に認められた。   |
| 前立腺    | : | 軽微な間質性の細胞浸潤が対照群の 3 例、1000 mg/kg 投与群の 1 例に認められた。   |
| 大腿部骨格筋 | : | 軽微な筋線維の変性/壊死が 1000 mg/kg 投与群の雌雄各 1 例に認められた。   |

2) 回復期間終了時

以下に示す所見については、その出現状況あるいは病理組織学的性状からいずれも偶発性の変化と判断した。

- |       |   |  |
|-------|---|--|
| 肺     | : | 軽微な限局性肺炎と骨化生が 1000 mg/kg 投与群の雄 1 例で認められた。  |
| 胃     | : | 軽度なのう胞封入が対照群の雌 1 例で認められた。  |
| 盲腸    | : | 軽微な粘膜の細胞浸潤が対照群の雌雄各 1 例に認められた。  |
| 腎臓    | : | 軽微な再生尿細管が対照群の雄 1 例と雌 2 例、1000 mg/kg 投与群の雄 1 例と雌 2 例に、軽微な尿細管の好酸性小滴が対照群の雄 1 例に認められた。 |
| 腭リンパ節 | : | 軽度なリンパ節炎が 1000 mg/kg 投与群の雌 1 例で認められた。  |

## 8. 考察

モルダントブラック-7の28日間反復経口投与毒性試験を6週齢のSprague-Dawley系SPFラット〔CrI:CD(SD)、1群雌雄各6又は12匹〕を用いて実施した。投与量は0（注射用水：対照群）、40、200及び1000 mg/kgとし、対照群と1000 mg/kg投与群の一部の個体（1群雌雄各6匹）については投与期間終了後2週間の休薬期間を設けて毒性変化の可逆性を検討した。

一般状態では、投与期間中に軟便と着色尿が200 mg/kg以上の投与群の雌雄でみられた。なお、回復期間中については軟便と着色尿が回復1日にみられたが、その後異常は認められなかった。

詳細な一般状態の観察では、投与期間中にオープンフィールド内観察において排糞数の高値が1000 mg/kg投与群の雄でみられたが、他に異常は認められなかった。

機能検査と握力では、投与及び回復期間を通じて異常は認められなかった。

自発運動量では、投与4週に1000 mg/kg投与群の雌の測定開始後50~60分の測定値と測定開始後0~60分の合計値に高値がみられ、中枢及び末梢神経系の病理学検査に異常はみられていないものの、被験物質投与の影響が疑われた。なお、回復2週にも1000 mg/kg投与群の雌で測定開始後0~10分と30~40分の測定値に高値がみられたが、投与期間中に比べて変化の程度は減少し、休薬による回復性が認められた。その他、投与4週に40 mg/kg投与群の雄で測定開始後0~10分の測定値に高値がみられたが、投与量との関連性が認められていないことから偶発性と判断した。

体重及び摂餌量では、投与期間中に低値が1000 mg/kg投与群の雄でみられたが、投与期間初期のみの変化であった。

尿検査（摂水量を含む）では、投与4週にビリルビンの陽性例の増加傾向が1000 mg/kg投与群の雌で、摂水量の高値が200 mg/kg以上の投与群の雄と1000 mg/kg投与群の雌で、尿量の低値と浸透圧の高値が1000 mg/kg投与群の雄と40 mg/kg以上の投与群の雌でみられた。これらの変化は休薬によりいずれも消失し、回復性が認められた。また、色調において淡紫色あるいは紫色が40 mg/kg以上の投与群の雌と200 mg/kg以上の投与群の雄にみられたが、本被験物質の色調（黒~紫色）を反映したものと考えられたことから、毒性学的意義はないと判断した。

血液学検査では、回復期間終了時に平均赤血球血色素濃度の低値が1000 mg/kg投与群の雄でみられたが、ごく軽度であり、赤血球数など関連する項目には変化はないことから偶発性と判断した。また、白血球百分率の実数で好酸球数の低値が1000 mg/kg投与群の雌雄でみられたが、ごく軽度であり、白血球数及び他の白血球百分率には変化がないことから、偶発性と判断した。

血液化学検査では、投与期間終了時にカリウムの高値が200 mg/kg以上の投与群の雌でみられ、被験物質投与による腎臓への影響が疑われた。この変化は休薬により消失し、回復性が認められた。その他、投与期間終了時に無機リンの低値が40 mg/kg投

与群の雄でみられたが、ごく軽度であり、高用量群では同様な変化はみられていないことから、偶発性と判断した。

病理学検査では、投与期間終了時に腎臓の絶対及び相対重量の高値が 1000 mg/kg 投与群の雄で、相対重量の高値が 1000 mg/kg 投与群の雌で認められた。また、組織学検査で腎臓の尿細管上皮細胞の好酸性小滴が 1000 mg/kg 投与群の雄で、尿細管上皮細胞の褐色色素が 200 mg/kg 以上の投与群の雌で、また、盲腸の粘膜の過形成が 200 mg/kg 以上の投与群の雌雄で発現頻度の増加傾向が、結腸の粘膜の過形成が 200 mg/kg 以上の投与群の雌雄で、直腸の粘膜の過形成が 1000 mg/kg 投与群の雌雄でみられ、いずれも被験物質投与の影響が疑われた。これらの変化はいずれも休薬により消失し、回復性が認められた。その他、投与あるいは回復期間終了時に剖検において腎臓の暗調化が 40 mg/kg 以上の投与群の雌雄にみられたが、本被験物質の色調から、被験物質の沈着が示唆されたが、毒性学的意義はないと判断した。更に、下垂体ののう胞、腺胃と肺の暗赤色巣、胃において前胃と漿膜の隆起巣、精巣及び精巣上体の小型化及び腓リンパ節の結節がみられたが、いずれの変化もその出現状況などから偶発性と判断した。

以上の結果、モルダントブラック-7の本試験条件下における無影響量は雄では病理検査における大腸(盲腸と結腸)の粘膜の過形成などから 40 mg/kg/day と推定された。一方、雌では尿検査における尿量の低値と浸透圧の高値から 40 mg/kg/day を下回ると考えられた。なお、いずれの変化も休薬による回復性が認められた。

## 要 約

ビスフェノール A・EO 付加物（平均付加モル数 5 モル）の遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため、復帰突然変異試験を指標菌株として *Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2uvrA を用い、S9 mix 非存在（直接法）および存在（代謝活性化法）下でプレインキュベーション法により行った。

用量は、用量設定試験（予備試験）の結果、菌の生育阻害が認められる用量または 5000  $\mu$ g/プレート を最高用量とし、直接法においては、TA98、TA100、TA1535 および TA1537 では 62.5~2000  $\mu$ g/プレートの範囲（公比 2）、WP2uvrA では 156~5000  $\mu$ g/プレートの範囲（公比 2）、代謝活性化法では、いずれの菌株とも 156~5000  $\mu$ g/プレートの範囲（公比 2）で設定した。

試験は 2 回実施した。その結果、全ての菌株において代謝活性化の有無にかかわらず、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。菌の生育阻害については、直接法では、TA1535 の 1000  $\mu$ g/プレート以上、TA98、TA100 および TA1537 の 2000  $\mu$ g/プレート、代謝活性化法においては、試験 1 回目では TA1535 の 1000  $\mu$ g/プレート以上、TA100 の 5000  $\mu$ g/プレート、試験 2 回目では TA1535 の 1000  $\mu$ g/プレート以上の用量で認められた。

以上の成績から、本実験条件下では、ビスフェノール A・EO 付加物（平均付加モル数 5 モル）の細菌に対する遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

## 目的

この試験は、ビスフェノール A-EO 付加物（平均付加モル数 5 モル）の細菌に対する遺伝子突然変異誘発性の有無を明らかにするために実施した。

## 材料および方法<sup>1, 2)</sup>

### 1. 被験物質

名称：ビスフェノール A-EO 付加物（平均付加モル数 5 モル）

（英名：4,4'-isopropylidenediphenol ethoxylated）

CAS 番号：32492-61-8

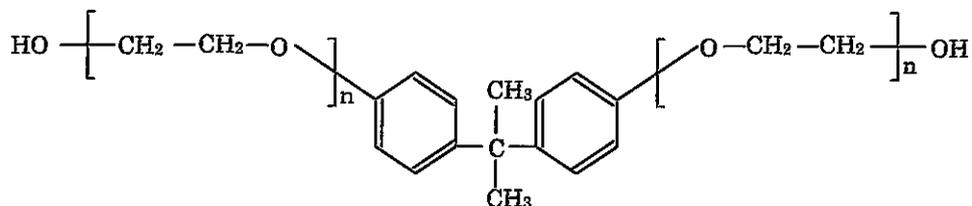
ロット番号：L3-6S004-A

純度：99%以上（水分：0.04%）

付加モル分布：1 モル：0.0%、2 モル：5.6%、3 モル：16.9%、4 モル：23.3%、  
5 モル：21.1%、6 モル：15.8%、7 モル：8.2%、8 モル：4.0%  
9 モル以上：5.1%（分析日：平成 18 年 10 月 19 日）

示性式： $(C_2H_4O)_n(C_2H_4O)_nC_{15}H_{16}O_2$

構造式：



入手先：三洋化成工業株式会社（京都府京都市東山区一橋野本町 11-1）

入手日・量：平成 19 年 3 月 14 日・25 g

物性等：

化学名　　ビスフェノール A-EO 付加物（平均付加モル数 5 モル）

分子量　　432（付加モル数 5 モルと仮定した場合）

性状(常温)　無色透明液体

酸価　　0.013 mgKOH/g

水酸基価　239 mgKOH/g

指標菌株	直接法 ( $\mu\text{g}$ /プレート)	代謝活性化法 ( $\mu\text{g}$ /プレート)
TA100	AF-2 (0.01)	2-AA (1)
TA1535	SA (0.5)	2-AA (2)
WP2uvzA	AF-2 (0.04)	2-AA (10)
TA98	AF-2 (0.1)	2-AA (1)
TA1537	9-AA (80)	2-AA (2)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (和光純薬工業株式会社、98%、ロット番号 PTQ1296)

2-AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬工業株式会社、>90%、ロット番号 KCM2259)

SA : アジ化ナトリウム (和光純薬工業株式会社、90%、ロット番号 KCG5232)

9-AA : 9-アミノアクリジン (Aldrich Chemical Company、98%、ロット番号 07721MZ)

#### 8. アミノ酸添加軟寒天培地の調製

0.6w/v%粉末寒天 (Difco Laboratories、ロット番号 5200601) および 0.5w/v% 塩化ナトリウム (和光純薬工業株式会社、ロット番号 8251) の組成の軟寒天を調製した。溶解した軟寒天に、*S. typhimurium* 用には 0.5 mM D-ビオチン (Sigma Chemical Company、ロット番号 AASXB) および 0.5 mM L-ヒスチジン (和光純薬工業株式会社、ロット番号 DLJ5479) 水溶液、*E. coli* 用には 0.5 mM L-トリプトファン (和光純薬工業株式会社、ロット番号 EWP0420) 水溶液を 1/10 容加え、アミノ酸添加軟寒天培地とした。

#### 9. 用量設定試験 (予備試験)

本試験における被験物質の適切な用量を把握するために、20~5000  $\mu\text{g}$ /プレートの範囲で用量を設定し、本試験と同様の実験方法で試験を行った。試験は各用量 1 枚のプレートで行った。

その結果 (表 1-1、1-2)、直接法の場合は、TA 98、TA100、TA1535 および TA1537 では 2000  $\mu\text{g}$ /プレート以上の用量で菌の生育阻害が認められ、WP2uvzA では菌の生育阻害は認められなかった。また、代謝活性化法の場合は、TA100、TA1535 および TA1537 では 5000  $\mu\text{g}$ /プレートで菌の生育阻害が認められ、TA 98 および WP2uvzA では菌の生育阻害は認められなかった。

## 10. 本試験

本試験は、同一菌株、同一用量で2回行った。

### 1) 用量設定

用量設定試験の結果から、被験物質の用量については、直接法の場合、TA 98、TA100、TA1535 および TA1537 では 2000  $\mu\text{g}$ /プレート を最高用量とし、以下公比 2 で 1000、500、250、125 および 62.5  $\mu\text{g}$ /プレート、WP2uvrA では 5000  $\mu\text{g}$ /プレート を最高用量とし、以下公比 2 で 2500、1250、625、313 および 156  $\mu\text{g}$ /プレート、また、代謝活性化法の場合は、いずれの菌株とも 5000  $\mu\text{g}$ /プレート を最高用量とし、以下公比 2 で 2500、1250、625、313 および 156  $\mu\text{g}$ /プレートの各計 6 用量とした。

### 2) 実験方法

#### (1) プレインキュベーション法（直接法）

滅菌小試験管に被験物質の供試液 0.1 mL、0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL (和光純薬工業株式会社、リン酸水素二ナトリウム・十二水塩：ロット番号 WAF3531、リン酸二水素ナトリウム・二水塩：ロット番号 CAJ2723) および前培養した懸濁菌液 0.1 mL を分注し、37°C で 20 分間振盪培養後、45°C に保温したアミノ酸添加軟寒天培地 2 mL を加え、最少グルコース寒天平板培地上に広げた。最少グルコース寒天平板培地 (プレート) (テスメディア AN 培地、オリエンタル酵母工業株式会社、ロット番号 ANI420FW・2007年6月5日製造・2007年8月10日購入；ロット番号 ANI730IW・2007年9月11日製造・2007年11月12日購入) は、Vogel-Bonner E 培地 (0.2 w/v% クエン酸・一水塩、1w/v% リン酸二カリウム・無水塩、0.192 w/v% リン酸一アンモニウム、0.066 w/v% 水酸化ナトリウム、0.02 w/v% 硫酸マグネシウム・七水塩) に寒天粉末を 1.5 w/v% およびグルコースを 2 w/v% となるように加え、30 mL ずつ分注したものである。37°C で 48 時間培養後、復帰変異コロニーを計数し、同時に指標菌株の生育阻害の有無を実体顕微鏡を用いて観察した。陰性対照および陽性対照群においては、上記の被験物質の供試液 0.1 mL にかわり、溶媒 (DMSO) 0.1 mL および陽性対照物質溶液 0.1 mL を用いて同様に実施した。試験は各用量 3 枚のプレートで行った。

#### (2) プレインキュベーション法（代謝活性化法）

滅菌小試験管に被験物質の供試液 0.1 mL、S9 mix 0.5 mL および前培養した懸

濁菌液 0.1 mL を分注し、37℃で 20 分間振盪培養後、45℃に保温したアミノ酸添加軟寒天培地 2 mL を加え、最少グルコース寒天平板培地上に広げた。37℃で 48 時間培養後、復帰変異コロニーを計数し、同時に指標菌株の生育阻害の有無を実体顕微鏡を用いて観察した。陰性対照および陽性対照群においては、上記の被験物質の供試液 0.1 mL にかわり、溶媒 (DMSO) 0.1 mL および陽性対照物質溶液 0.1 mL を用いて同様に実施した。試験は各用量 3 枚のプレートで行った。

#### 11. 無菌試験

用量設定試験および本試験において、用いた溶媒、S9 mix および最高用量の被験物質の供試液について、それぞれ 0.1 mL に 0.6 w/v%軟寒天培地 2 mL を加え、最少グルコース寒天平板培地 (テスメディア AN 培地、オリエンタル酵母工業株式会社、ロット番号 ANI730IW) に重層後、37℃で 48 時間培養し、菌の生育の有無を調べた。最少グルコース寒天平板培地は、それぞれ 3 枚ずつ使用した。

#### 12. 試験の有効性

以下の 3 基準を満たす場合に、試験は適切な条件下で実施され、試験は有効であると判定した。

- (1) 試験に用いた菌液、溶媒、被験物質の供試液および S9 mix に雑菌の混入がない。
- (2) 各指標菌株の陰性対照における復帰変異コロニー数が、当研究所における背景データの範囲内の値を示す (自然復帰変異体数)。
- (3) 各指標菌株の陽性対照における復帰変異コロニー数が、当研究所における陽性対照値の背景データの範囲あるいはその近くの値を示す。

#### 13. 結果の判定

結果の判定は、各用量におけるプレートでの復帰変異コロニー数の平均値を基に、原則的に以下の 3 基準を満たす場合を陽性とした。

- (1) 被験物質処理群において陰性対照値の 2 倍以上の復帰変異コロニー数が出現する。
- (2) 被験物質用量の増加とともに復帰変異コロニー数が増加する (用量依存性)。
- (3) 2回にわたる本試験の結果から復帰変異コロニー数の増加に再現性が認められる。