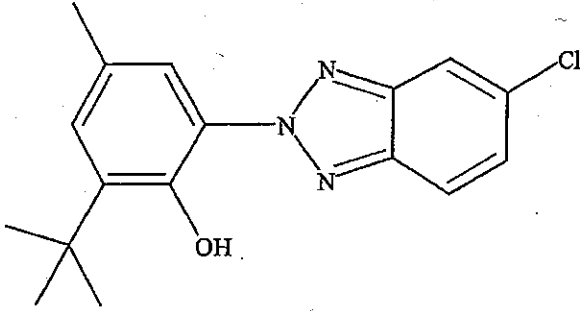


細菌を用いる復帰突然変異試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質の名称 (IUPAC命名法による)	ブメトリゾール		
別名	2-(2'-ヒドロキシ-3-tert-ブチル-5'-メチルフェニル)-5-クロロベンゾトリアゾール		
C A S 番号	3896-11-5		
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合は、その製法の概要)			
分子量	315.80		
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.	01721IW4		
不純物の名称及び含有率	—		
蒸気圧	7.5×10^{-7} Pa (20°C)		
対水溶解度	<1mg/L (20°C) EEC A6		
1-オクタノール/水分配係数	LogPow > 6 (20-25°C)		
融点	138-141°C		
沸点	—		
常温における性状	淡黄色粉末、臭いなし		
安定性	常温・常圧で安定		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	DMSO	5 mg/mL以下*	**
その他	<p>* : 試験施設において確認</p> <p>** : 50 mg/mL DMSO懸濁液に発熱，発泡は認められず。</p>		

[備考] 物理化学的性状は、可能な限り記入すること。

- 「蒸気圧」の欄には、被験物質の蒸気圧を記入すること。
- 「安定性」の欄には、温度、光等に対する安定性を記入すること。
- 「溶媒に対する溶解度等」の欄には、被験物質の溶媒に対する溶解度及びその溶媒中での安定性を記入すること。

2. 試験に用いた菌株

菌株名	入手先	入手年月日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA 98	中央労働災害防止協会 日本ハチアッセイ研究センター	1996年 10月 18日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA 100	中央労働災害防止協会 日本ハチアッセイ研究センター	1996年 10月 18日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA 1535	中央労働災害防止協会 日本ハチアッセイ研究センター	1995年 2月 25日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA 1537	中央労働災害防止協会 日本ハチアッセイ研究センター	1995年 2月 25日
<i>Escherichia coli</i> WP2uvrA	中央労働災害防止協会 日本ハチアッセイ研究センター	1995年 2月 25日

3. S9 mix

(1) S9の入手法等 (該当する番号を○で囲み, 必要事項を記入すること.)

自製・購入の別	1.自製 (2)購入 (製造元: オリエンタル酵母工業株式会社)
製造年月日	2005年 1月 21日製造
購入の場合のLot No.	05012111
保存温度	-80 °C

(2) S9の調製方法

使用動物		誘導物質	
種・系統	ラット, Crj:CD (SD)	名 称	Phenobarbital (PB) 5,6-Benzoflavone (BF)
性	雄	投与方法	i.p.
週令	7週	投与期間及び投与量	1日目 PB 0.03 g/kg 2,3,4日目 PB 0.06 g/kg
体重	216.4 ± 8.9 g	(g/kg体重)	3日目 BF 0.08 g/kg

(3) S9 mixの組成

成分	S9 mix 1mL中の量	成分	S9 mix 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 (注射用水)	0.9 mL

4. 被験物質溶液の調製 (被験物質溶液の性状及び純度換算の有無は該当するものを○で囲むこと。)

使用溶媒	名称	製造元	Lot No.	グレード	純度 (%)
	ジメチルスルホキシド	株式会社同仁化学研究所	PU140	紫外部吸収スペクトル用	100.0
溶媒選択の理由	ジメチルスルホキシド(DMSO)は、細菌を用いる復帰突然変異試験で一般的に用いられており、良好な懸濁状態となるため。				
被験物質溶液の性状	溶解	<input checked="" type="radio"/> 懸濁	その他 ()		
被験物質が難溶性の場合における懸濁等の方法	タッチミキサーで攪拌することにより均一な懸濁状態とした。				
溶液の調製から使用までの保存時間と温度	— 時間	— 分	— °C		
純度換算の有無	用量設定試験, 本試験 (I), 本試験 (II) とも用時調製				
	有 (換算計数:)				<input checked="" type="radio"/> 無

5. 前培養の条件等

(1) 条件

ニュートリエントブロス	名称	製造元	Lot No.
	OXOID NUTRIENT BROTH No.2	OXOID Ltd.	298714
前培養時間	9 時間		
培養容器 (形状・容量)	形状: L字管 容量: 約 40 mL		
培養液量	10 mL	接種菌量	20 μ L

(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	WP2uvrA	TA98	TA1537	
生菌数 ($\times 10^9$ /mL)	用量設定試験	3.1	4.4	5.1	3.6	2.6
	本試験(I)	3.2	4.5	5.2	3.7	2.7
	本試験(II)	3.1	4.3	5.1	3.6	2.7
測定方法 (いずれかを○で囲むこと。)	<input checked="" type="radio"/> 1. O. D. 値よりの換算 2. 段階希釈 <input type="radio"/> 3. その他 ()					

6. 最少グルコース寒天平板培地 (該当する番号を○で囲み、必要事項を記入すること。)

自製・購入の別	1. 自製 ②. 購入 (製造元: オリエンタル酵母工業株式会社)
製造年月日	2005年 2月 5日製造
購入の場合の Lot No.	ANI090BU
使用寒天の名称・製造元・Lot No.	伊那寒天 BA-30A 伊那食品工業 (株) Lot No.40721

7. 試験の方法 (該当する番号を○で囲み、必要事項を記入すること。)

(1) 試験方法とその選定理由

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定理由	_____

(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
	S9 mix (代謝活性化法による場合)	0.5 mL
	トッ・プ・ア・ガー	2 mL
	その他 ()	_____
プレインキュベーション	温 度	37 °C
	時 間	20 分
インキュベーション	温 度	37 °C
	時 間	約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 ② 機器計測
補正の有無	1. 無 ② 有 (補正の方法 面積補正+数え落とし補正)

9. 試験結果

(1) 試験の結果は別表1-1～1-5による。

(2) 結果の判定

判 定 (いずれかを○で囲むこと.)	陽性	陰性
<p>判定の理由</p> <p>本被験物質は、S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合とも、いずれの菌株においても、復帰変異コロニー数は陰性対照の2倍以上に増加しなかった。</p> <p>2回実施した本試験には再現性が認められた。</p> <p>本試験で用いた陽性対照物質は明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。また、陰性対照及び陽性対照における復帰変異コロニー数は背景データの範囲内にあり、試験条件を満たすものであったことから、試験系に影響した他の要因がなく、試験は適切に実施されたことが確認された。</p> <p>以上の結果より、本被験物質は陰性と判定した。</p>		

(陽性と判定した場合には、別表2比活性の表を添付すること。)

(3) 参考事項

<p>[用量設定理由]</p> <p>本試験の実施に先駆けて、試験濃度設定のために用量設定試験を実施した。用量設定試験の試験濃度は、「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成15年11月21日)に従い、いずれの菌株も5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$を最高濃度として、以下公比4で1250, 312.5, 78.1, 19.5, 4.88, 1.22及び0.305 $\mu\text{g}/\text{plate}$の計8濃度を設定した。対照として、全菌株に対し陰性対照及び陽性対照を設けた。</p> <p>用量設定試験の結果から本試験(I)及び本試験(II)の濃度は、S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合とも、菌の生育阻害を示さないと考えられる濃度が4濃度以上含まれるように、以下公比2で6濃度を設定した。すなわち、S9 mix無添加の場合、TA100では39.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156.3及び312.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$、TA1535及びWP2uvrAでは39.1, 78.1, 156.3, 312.5, 625及び1250 $\mu\text{g}/\text{plate}$、TA98及びTA1537では0.61, 1.22, 2.44, 4.88, 9.77及び19.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$とした。S9 mix添加の場合、TA100, TA1535, TA98及びTA1537では39.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156.3及び312.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$、WP2uvrAでは39.1, 78.1, 156.3, 312.5, 625及び1250 $\mu\text{g}/\text{plate}$とした。対照として、全菌株に対し陰性対照及び陽性対照を設けた。</p>
<p>[被験物質の析出]</p> <p>プレート上の析出物は、S9 mix無添加の場合、培養開始時には39.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$以上(用量設定試験では78.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$以上)の濃度において、培養終了時には19.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$以上の濃度において白色の油膜状析出物及び白色の微細な析出物が認められた。S9 mix添加の場合、培養開始時には156.3 $\mu\text{g}/\text{plate}$以上(用量設定試験では312.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$以上)の濃度において、培養終了時には78.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$以上の濃度において白色の微細な析出物が認められた。</p>

(別表1-1)

試験結果表

被験物質の名称: ブメトリゾール (用量設定試験)

試験実施期間		2005年 5月 10日 より					2005年 5月 13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		
-S9 mix	陰性対照	153 (153)	10 (10)	43 (43)	10 (10)	10 (10)		
	0.305	121 (121)	5 (5)	54 (54)	14 (14)	12 (12)		
	1.22	126 (126)	5 (5)	41 (41)	19 (19)	9 (9)		
	4.88	130 (130)	12 (12)	38 (38)	14 (14)	12 (12)		
	19.5#	137 (137)	8 (8)	37 (37)	17* (17)	6* (6)		
	78.1#	118 (118)	10 (10)	51 (51)	19* (19)	11* (11)		
	312.5#	147* (147)	13 (13)	47 (47)	13* (13)	8* (8)		
	1250#	116* (116)	8* (8)	39* (39)	12* (12)	9* (9)		
	5000#	144* (144)	9* (9)	43* (43)	12* (12)	7* (7)		
+S9 mix	陰性対照	142 (142)	11 (11)	45 (45)	19 (19)	13 (13)		
	0.305	137 (137)	9 (9)	37 (37)	23 (23)	20 (20)		
	1.22	130 (130)	7 (7)	29 (29)	20 (20)	14 (14)		
	4.88	131 (131)	7 (7)	39 (39)	18 (18)	14 (14)		
	19.5	114 (114)	9 (9)	50 (50)	13 (13)	17 (17)		
	78.1#	123 (123)	5 (5)	45 (45)	19 (19)	14 (14)		
	312.5#	136* (136)	9* (9)	35 (35)	21* (21)	17* (17)		
	1250#	113* (113)	5* (5)	46* (46)	24* (24)	12* (12)		
	5000#	139* (139)	6* (6)	39* (39)	20* (20)	12* (12)		
陽性対照	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9AA		
	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80		
	コロニー数/プレート	556 (556)	573 (573)	159 (159)	517 (517)	516 (516)		
	名称	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA		
	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	1	2	10	0.5	2		
	コロニー数/プレート	903 (903)	363 (363)	990 (990)	400 (400)	155 (155)		

【備考】

1. 菌の生育阻害が認められる場合は、該当する数値の右上に*印を付すること。
2. 括弧内には各プレートのコロニー数の平均値を記入すること。
3. 復帰変異数は、被験物質用量の低い順に実測値及び平均値を記入すること。
4. プレート上で沈殿が析出した場合は、その用量に#印を付すること。
5. 略称で示された陽性物質の名称を欄外に記入すること。

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; NaN₃: sodium azide; 9AA: 9-aminoacridine hydrochloride; 2AA: 2-aminoanthracene.

(別表1-2)

試験結果表

被験物質の名称: プメトリゾール (本試験 I)

試験実施期間		2005年 5月 23日 より 2005年 5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			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
-S9 mix	陰性対照	86 107 123 (105 \pm 18.6)	11 13 15 (13 \pm 2.0)	17 27 28 (24 \pm 6.1)	13 15 15 (14 \pm 1.2)	7 9 16 (11 \pm 4.7)	
	0.61	/	/	/	17 17 19 (18 \pm 1.2)	2 7 9 (6 \pm 3.6)	
	1.22	/	/	/	13 22 25 (20 \pm 6.2)	9 10 11 (10 \pm 1.0)	
	2.44	/	/	/	19 19 26 (21 \pm 4.0)	10 10 11 (10 \pm 0.6)	
	4.88	/	/	/	18 20 28 (22 \pm 5.3)	8 11 13 (11 \pm 2.5)	
	9.77	90 96 112 (99 \pm 11.4)	/	/	19* 22* 23* (21 \pm 2.1)	7* 11* 13* (10 \pm 3.1)	
	19.5#	90 115 115 (107 \pm 14.4)	/	/	17* 22* 23* (21 \pm 3.2)	7* 7* 15* (10 \pm 4.6)	
	39.1#	91 96 97 (95 \pm 3.2)	9 9 12 (10 \pm 1.7)	19 27 37 (28 \pm 9.0)	/	/	
	78.1#	98 103 108 (103 \pm 5.0)	13 13 13 (13 \pm 0.0)	23 27 30 (27 \pm 3.5)	/	/	
	156.3#	97* 98* 116* (104 \pm 10.7)	10 17 20 (16 \pm 5.1)	25 34 34 (31 \pm 5.2)	/	/	
	312.5#	80* 95* 96* (90 \pm 9.0)	10 10 22 (14 \pm 6.9)	24 30 37 (30 \pm 6.5)	/	/	
	625#	/	13* 16* 17* (15 \pm 2.1)	26 29 37 (31 \pm 5.7)	/	/	
	1250#	/	6* 7* 13* (9 \pm 3.8)	20* 28* 32* (27 \pm 6.1)	/	/	
陽性対照	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9AA	
	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
	コロニー数/プレート	414 459 474 (449 \pm 31.2)	573 635 646 (618 \pm 39.4)	103 132 137 (124 \pm 18.4)	365 374 375 (371 \pm 5.5)	391 413 427 (410 \pm 18.1)	
	名称	/	/	/	/	/	
S9 mixを必要とするもの	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	/	/	/	/	/	
	コロニー数/プレート	/	/	/	/	/	

【備考】

1. 菌の生育阻害が認められる場合は、該当する数値の右上に*印を付すること。
2. 括弧内には各プレートのコロニー数の平均値を記入すること。
3. 復帰変異数は、被験物質用量の低い順に実測値及び平均値を記入すること。
4. プレート上で沈殿が析出した場合は、その用量に#印を付すること。
5. 略称で示された陽性物質の名称を欄外に記入すること。

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; NaN₃: sodium azide; 9AA: 9-aminoacridine hydrochloride.

(別表1-3)

試験結果表

被験物質の名称: プメトリゾール (本試験 I)

試験実施期間		2005年 5月 23日 より			2005年 5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			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
+S9 mix	陰性対照	99 121 129 (116 \pm 15.5)	11 12 15 (13 \pm 2.1)	33 34 34 (34 \pm 0.6)	26 28 34 (29 \pm 4.2)	17 18 20 (18 \pm 1.5)	
	9.77	107 108 121 (112 \pm 7.8)	9 14 26 (16 \pm 8.7)	/	23 28 32 (28 \pm 4.5)	22 22 24 (23 \pm 1.2)	
	19.5	108 116 130 (118 \pm 11.1)	5 12 17 (11 \pm 6.0)	/	20 24 32 (25 \pm 6.1)	16 17 20 (18 \pm 2.1)	
	39.1	94 95 123 (104 \pm 16.5)	7 11 11 (10 \pm 2.3)	29 35 35 (33 \pm 3.5)	22 27 29 (26 \pm 3.6)	12 14 20 (15 \pm 4.2)	
	78.1#	77 96 104 (92 \pm 13.9)	13 14 18 (15 \pm 2.6)	20 29 30 (26 \pm 5.5)	24 28 29 (27 \pm 2.6)	12 13 16 (14 \pm 2.1)	
	156.3#	91 114 120 (108 \pm 15.3)	12 16 17 (15 \pm 2.6)	27 29 30 (29 \pm 1.5)	20 22 29 (24 \pm 4.7)	13 20 21 (18 \pm 4.4)	
	312.5#	82* 110* 112* (101 \pm 16.8)	12* 15* 23* (17 \pm 5.7)	27 29 31 (29 \pm 2.0)	23* 26* 26* (25 \pm 1.7)	17* 17* 21* (18 \pm 2.3)	
	625#	/	/	17 29 30 (25 \pm 7.2)	/	/	
	1250#	/	/	20* 26* 35* (27 \pm 7.5)	/	/	
陽性対照	S9 mixを必要としないもの	名称	/	/	/	/	
	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	/	/	/	/	/	
	コロニー数/プレート	/	/	/	/	/	
S9 mixを必要とするもの	名称	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	1	2	10	0.5	2	
	コロニー数/プレート	861 881 920 (887 \pm 30.0)	315 332 346 (331 \pm 15.5)	737 765 778 (760 \pm 21.0)	389 415 436 (413 \pm 23.5)	128 139 140 (136 \pm 6.7)	

[備考]

1. 菌の生育阻害が認められる場合は、該当する数値の右上に*印を付すること。
2. 括弧内には各プレートのコロニー数の平均値を記入すること。
3. 復帰変異数は、被験物質用量の低い順に実測値及び平均値を記入すること。
4. プレート上で沈殿が析出した場合は、その用量に#印を付すること。
5. 略称で示された陽性物質の名称を欄外に記入すること。

2AA: 2-Aminoanthracene.

(別表1-4)

試験結果表

被験物質の名称: プメトリゾール (本試験Ⅱ)

試験実施期間		2005年 5月 30日 より			2005年 6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	
-S9 mix	陰性対照	99 101 111 (104 \pm 6.4)	5 6 7 (6 \pm 1.0)	28 30 34 (31 \pm 3.1)	17 18 22 (19 \pm 2.6)	5 7 9 (7 \pm 2.0)	
	0.61	/	/	/	21 22 26 (23 \pm 2.6)	6 10 10 (9 \pm 2.3)	
	1.22	/	/	/	13 21 27 (20 \pm 7.0)	10 10 12 (11 \pm 1.2)	
	2.44	/	/	/	19 19 23 (20 \pm 2.3)	7 8 11 (9 \pm 2.1)	
	4.88	/	/	/	13 25 25 (21 \pm 6.9)	7 8 10 (8 \pm 1.5)	
	9.77	110 112 121 (114 \pm 5.9)	/	/	17* 24* 27* (23 \pm 5.1)	6* 7* 7* (7 \pm 0.6)	
	19.5#	98 110 117 (108 \pm 9.6)	/	/	14* 18* 29* (20 \pm 7.8)	4* 6* 10* (7 \pm 3.1)	
	39.1#	102 105 118 (108 \pm 8.5)	5 6 12 (8 \pm 3.8)	20 24 27 (24 \pm 3.5)	/	/	
	78.1#	95 96 104 (98 \pm 4.9)	9 10 11 (10 \pm 1.0)	21 21 30 (24 \pm 5.2)	/	/	
	156.3#	109* 116* 125* (117 \pm 8.0)	4 12 14 (10 \pm 5.3)	24 28 29 (27 \pm 2.6)	/	/	
	312.5#	89* 104* 108* (100 \pm 10.0)	5 10 11 (9 \pm 3.2)	18 18 29 (22 \pm 6.4)	/	/	
	625#	/	7* 12* 13* (11 \pm 3.2)	17 20 36 (24 \pm 10.2)	/	/	
	1250#	/	10* 10* 11* (10 \pm 0.6)	19* 25* 26* (23 \pm 3.8)	/	/	
	陽性対照	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9AA
用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)		0.01	0.5	0.01	0.1	80	
コロニー数/プレート		451 457 581 (496 \pm 73.4)	515 536 601 (551 \pm 44.8)	123 127 131 (127 \pm 4.0)	454 464 472 (463 \pm 9.0)	294 411 597 (434 \pm 152.8)	
名称		/	/	/	/	/	
S9 mixを必要とするもの	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	/	/	/	/	/	
	コロニー数/プレート	/	/	/	/	/	

[備考]

1. 菌の生育阻害が認められる場合は、該当する数値の右上に*印を付すること。
2. 括弧内には各プレートのコロニー数の平均値を記入すること。
3. 復帰変異数は、被験物質用量の低い順に実測値及び平均値を記入すること。
4. プレート上で沈殿が析出した場合は、その用量に#印を付すること。
5. 略称で示された陽性物質の名称を欄外に記入すること。

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; NaN₃: sodium azide; 9AA: 9-aminoacridine hydrochloride.

(別表1-5)

試験結果表

被験物質の名称: プメトリゾール (本試験Ⅱ)

試験実施期間		2005年 5月 30日 より			2005年 6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	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
+S9 mix	陰性対照	117 118 128 (121 \pm 6.1)	7 11 13 (10 \pm 3.1)	24 26 31 (27 \pm 3.6)	20 30 33 (28 \pm 6.8)	14 14 22 (17 \pm 4.6)	
	9.77	104 106 109 (106 \pm 2.5)	7 10 12 (10 \pm 2.5)	/	19 22 24 (22 \pm 2.5)	11 13 15 (13 \pm 2.0)	
	19.5	101 106 132 (113 \pm 16.6)	5 7 11 (8 \pm 3.1)	/	21 21 25 (22 \pm 2.3)	12 16 20 (16 \pm 4.0)	
	39.1	104 111 121 (112 \pm 8.5)	10 10 11 (10 \pm 0.6)	21 23 34 (26 \pm 7.0)	21 26 34 (27 \pm 6.6)	11 19 20 (17 \pm 4.9)	
	78.1#	104 113 120 (112 \pm 8.0)	3 6 8 (6 \pm 2.5)	26 33 38 (32 \pm 6.0)	25 27 32 (28 \pm 3.6)	16 18 25 (20 \pm 4.7)	
	156.3#	114 115 118 (116 \pm 2.1)	6 8 9 (8 \pm 1.5)	22 30 30 (27 \pm 4.6)	20 26 28 (25 \pm 4.2)	3 17 18 (13 \pm 8.4)	
	312.5#	97* 112* 112* (107 \pm 8.7)	6* 6* 7* (6 \pm 0.6)	21 31 35 (29 \pm 7.2)	20* 22* 37* (26 \pm 9.3)	7* 13* 13* (11 \pm 3.5)	
	625#	/	/	28 29 34 (30 \pm 3.2)	/	/	
	1250#	/	/	31* 33* 38* (34 \pm 3.6)	/	/	
陽性対照	名称	/	/	/	/	/	
	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	/	/	/	/	/	
	コロニー数/プレート	/	/	/	/	/	
S9 mixを必要とするもの	名称	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	1	2	10	0.5	2	
	コロニー数/プレート	898 944 958 (933 \pm 31.4)	347 350 419 (372 \pm 40.7)	769 790 795 (785 \pm 13.8)	431 450 475 (452 \pm 22.1)	115 141 141 (132 \pm 15.0)	

【備考】

1. 菌の生育阻害が認められる場合は、該当する数値の右上に*印を付すること。
2. 括弧内には各プレートのコロニー数の平均値を記入すること。
3. 復帰変異数は、被験物質用量の低い順に実測値及び平均値を記入すること。
4. プレート上で沈殿が析出した場合は、その用量に#印を付すること。
5. 略称で示された陽性物質の名称を欄外に記入すること。

2AA: 2-Aminoanthracene.

被験物質名：ブメトリゾール (CAS No. 3896-11-5)

試験系：*Salmonella typhimurium* : TA100, TA98, TA1535, TA1537

Escherichia coli : WP2uvrA

試験委託者：厚生労働省 医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室
東京都千代田区霞が関1丁目2番2号

試験施設：株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所
岐阜県羽島市福寿町間島6丁目104番地

試験目的：ブメトリゾールの細菌を用いる復帰突然変異試験を行い、その遺伝子突然変異誘発性の有無について検討した。

準拠したガイドライン：

「OECD化学品テストガイドライン、471細菌を用いる復帰突然変異試験」(1997年7月21日採択)並びに平成15年11月21日付(薬食発第1121002号：厚生労働省医薬食品局長、平成15・11・13製局第2号：経済産業省製造産業局長、環保企発第031121002号：環境省総合環境政策局長連名通知)「新規化学物質等に係る試験の方法について」の別添「化学物質の慢性毒性試験、生殖能及び後世代に及ぼす影響に関する試験、催奇形性試験、変異原性試験、がん原性試験、生体内運命に関する試験及び薬理学的試験」

遵守したGLP：新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準(平成15年11月21日、薬食発第1121003号、平成15・11・17製局第3号、環保企発第031121004号)並びにOECD PRINCIPLES OF GOOD LABORATORY PRACTICE (OECD化学物質の安全性試験の実施に関する基準)

試験開始日：2005年 4月 1日

試験終了日：2006年 11月 13日

試験実施日：用量設定試験

菌株の前培養実施日 (実験開始日)	2005年 5月 10日
試験の実施日	2005年 5月 11日
判定日	2005年 5月 13日

本試験(I)

菌株の前培養実施日	2005年 5月 23日
試験の実施日	2005年 5月 24日
判定日	2005年 5月 26日

要 約

ブメトリゾールの遺伝子突然変異誘発性の有無を、*Salmonella typhimurium*のTA100, TA98, TA1535及びTA1537並びに*Escherichia coli*のWP2uvrAを用い、プレインキュベーション法による復帰突然変異試験により検討した。試験は、S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合について実施した。

ブメトリゾールの0.61～1250 µg/plate濃度における復帰変異コロニー数は、本試験(I)及び本試験(II)において、いずれの菌株ともS9 mix無添加及びS9 mix添加の場合にかかわらず、陰性対照の2倍未満であった。陽性対照物質は、S9 mix無添加及びS9 mix添加の場合のいずれにおいても、明らかな陽性結果を示した。本試験(I)及び本試験(II)の結果には再現性が認められた。

以上の結果、当試験の条件下において、ブメトリゾールに遺伝子突然変異誘発性はないと判定する。

Table 1. Reverse mutation test of bumetrizole in bacteria(dose-finding test)

With(+) or without(-) S9 mix	Compound concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2 uvrA	TA98	TA1537
S9 mix (-)	Negative control	153	10	43	10	10
	0.305	121	5	54	14	12
	1.22	126	5	41	19	9
	4.88	130	12	38	14	12
	19.5#	137	8	37	17*	6*
	78.1#	118	10	51	19*	11*
	312.5#	147*	13	47	13*	8*
	1250#	116*	8*	39*	12*	9*
	5000#	144*	9*	43*	12*	7*
S9 mix (+)	Negative control	142	11	45	19	13
	0.305	137	9	37	23	20
	1.22	130	7	29	20	14
	4.88	131	7	39	18	14
	19.5	114	9	50	13	17
	78.1###	123	5	45	19	14
	312.5##	136*	9*	35	21*	17*
	1250##	113*	5*	46*	24*	12*
	5000##	139*	6*	39*	20*	12*
Positive control not requiring S9 mix	Name	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Number of colonies/plate	556	573	159	517	516
Positive control requiring S9 mix	Name	2AA				
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2
	Number of colonies/plate	903	363	990	400	155

Negative control : Dimethylsulfoxide.

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide; NaN₃ : sodium azide; 9AA : 9-aminoacridine hydrochloride;

2AA : 2-aminoanthracene.

* : Bacterial growth inhibition was observed.

: White oily membrane-like precipitations and white fine precipitations were observed on the surface of agar plate.

: White fine precipitations were observed on the surface of agar plate.

Table 2-1. Reverse mutation test of bumetrizole in bacteria (mutagenicity test I : -S9 mix)

Compound concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
	Base-pair substitution type			Frameshift type	
	TA100	TA1535	WP2 _{uvrA}	TA98	TA1537
Negative control	86, 107, 123 (105 \pm 18.6)	11, 13, 15 (13 \pm 2.0)	17, 27, 28 (24 \pm 6.1)	13, 15, 15 (14 \pm 1.2)	7, 9, 16 (11 \pm 4.7)
0.61	/	/	/	17, 17, 19 (18 \pm 1.2)	2, 7, 9 (6 \pm 3.6)
1.22	/	/	/	13, 22, 25 (20 \pm 6.2)	9, 10, 11 (10 \pm 1.0)
2.44	/	/	/	19, 19, 26 (21 \pm 4.0)	10, 10, 11 (10 \pm 0.6)
4.88	/	/	/	18, 20, 28 (22 \pm 5.3)	8, 11, 13 (11 \pm 2.5)
9.77	90, 96, 112 (99 \pm 11.4)	/	/	19*, 22*, 23* (21 \pm 2.1)	7*, 11*, 13* (10 \pm 3.1)
19.5#	90, 115, 115 (107 \pm 14.4)	/	/	17*, 22*, 23* (21 \pm 3.2)	7*, 7*, 15* (10 \pm 4.6)
39.1#	91, 96, 97 (95 \pm 3.2)	9, 9, 12 (10 \pm 1.7)	19, 27, 37 (28 \pm 9.0)	/	/
78.1#	98, 103, 108 (103 \pm 5.0)	13, 13, 13 (13 \pm 0.0)	23, 27, 30 (27 \pm 3.5)	/	/
156.3#	97*, 98*, 116* (104 \pm 10.7)	10, 17, 20 (16 \pm 5.1)	25, 34, 34 (31 \pm 5.2)	/	/
312.5#	80*, 95*, 96* (90 \pm 9.0)	10, 10, 22 (14 \pm 6.9)	24, 30, 37 (30 \pm 6.5)	/	/
625#	/	13*, 16*, 17* (15 \pm 2.1)	26, 29, 37 (31 \pm 5.7)	/	/
1250#	/	6*, 7*, 13* (9 \pm 3.8)	20*, 28*, 32* (27 \pm 6.1)	/	/
Positive control					
Name	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9AA
Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
Number of colonies/plate	414, 459, 474 (449 \pm 31.2)	573, 635, 646 (618 \pm 39.4)	103, 132, 137 (124 \pm 18.4)	365, 374, 375 (371 \pm 5.5)	391, 413, 427 (410 \pm 18.1)

Negative control : Dimethylsulfoxide.

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; NaN₃ : sodium azide; 9AA : 9-aminoacridine hydrochloride.

() : Mean \pm S.D.

* : Bacterial growth inhibition was observed.

: White oily membrane-like precipitations and white fine precipitations were observed on the surface of agar plate.

Table 2-2. Reverse mutation test of bumetrizole in bacteria (mutagenicity test I : +S9 mix)

Compound concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
	Base-pair substitution type			Frameshift type	
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
Negative control	99, 121, 129 (116 \pm 15.5)	11, 12, 15 (13 \pm 2.1)	33, 34, 34 (34 \pm 0.6)	26, 28, 34 (29 \pm 4.2)	17, 18, 20 (18 \pm 1.5)
9.77	107, 108, 121 (112 \pm 7.8)	9, 14, 26 (16 \pm 8.7)	/	23, 28, 32 (28 \pm 4.5)	22, 22, 24 (23 \pm 1.2)
19.5	108, 116, 130 (118 \pm 11.1)	5, 12, 17 (11 \pm 6.0)	/	20, 24, 32 (25 \pm 6.1)	16, 17, 20 (18 \pm 2.1)
39.1	94, 95, 123 (104 \pm 16.5)	7, 11, 11 (10 \pm 2.3)	29, 35, 35 (33 \pm 3.5)	22, 27, 29 (26 \pm 3.6)	12, 14, 20 (15 \pm 4.2)
78.1##	77, 96, 104 (92 \pm 13.9)	13, 14, 18 (15 \pm 2.6)	20, 29, 30 (26 \pm 5.5)	24, 28, 29 (27 \pm 2.6)	12, 13, 16 (14 \pm 2.1)
156.3##	91, 114, 120 (108 \pm 15.3)	12, 16, 17 (15 \pm 2.6)	27, 29, 30 (29 \pm 1.5)	20, 22, 29 (24 \pm 4.7)	13, 20, 21 (18 \pm 4.4)
312.5##	82*, 110*, 112* (101 \pm 16.8)	12*, 15*, 23* (17 \pm 5.7)	27, 29, 31 (29 \pm 2.0)	23*, 26*, 26* (25 \pm 1.7)	17*, 17*, 21* (18 \pm 2.3)
625##	/	/	17, 29, 30 (25 \pm 7.2)	/	/
1250##	/	/	20*, 26*, 35* (27 \pm 7.5)	/	/
Positive control					
Name	2AA				
Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2
Number of colonies/plate	861, 881, 920 (887 \pm 30.0)	315, 332, 346 (331 \pm 15.5)	737, 765, 778 (760 \pm 21.0)	389, 415, 436 (413 \pm 23.5)	128, 139, 140 (136 \pm 6.7)

Negative control : Dimethylsulfoxide.

2AA : 2-Aminoanthracene.

() : Mean \pm S.D.

* : Bacterial growth inhibition was observed.

: White fine precipitations were observed on the surface of agar plate.

Table 3-1. Reverse mutation test of bumetizole in bacteria (mutagenicity test II : -S9 mix)

Compound concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
	Base-pair substitution type			Frameshift type	
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
Negative control	99, 101, 111 (104 \pm 6.4)	5, 6, 7 (6 \pm 1.0)	28, 30, 34 (31 \pm 3.1)	17, 18, 22 (19 \pm 2.6)	5, 7, 9 (7 \pm 2.0)
0.61	/	/	/	21, 22, 26 (23 \pm 2.6)	6, 10, 10 (9 \pm 2.3)
1.22	/	/	/	13, 21, 27 (20 \pm 7.0)	10, 10, 12 (11 \pm 1.2)
2.44	/	/	/	19, 19, 23 (20 \pm 2.3)	7, 8, 11 (9 \pm 2.1)
4.88	/	/	/	13, 25, 25 (21 \pm 6.9)	7, 8, 10 (8 \pm 1.5)
9.77	110, 112, 121 (114 \pm 5.9)	/	/	17*, 24*, 27* (23 \pm 5.1)	6*, 7*, 7* (7 \pm 0.6)
19.5#	98, 110, 117 (108 \pm 9.6)	/	/	14*, 18*, 29* (20 \pm 7.8)	4*, 6*, 10* (7 \pm 3.1)
39.1#	102, 105, 118 (108 \pm 8.5)	5, 6, 12 (8 \pm 3.8)	20, 24, 27 (24 \pm 3.5)	/	/
78.1#	95, 96, 104 (98 \pm 4.9)	9, 10, 11 (10 \pm 1.0)	21, 21, 30 (24 \pm 5.2)	/	/
156.3#	109*, 116*, 125* (117 \pm 8.0)	4, 12, 14 (10 \pm 5.3)	24, 28, 29 (27 \pm 2.6)	/	/
312.5#	89*, 104*, 108* (100 \pm 10.0)	5, 10, 11 (9 \pm 3.2)	18, 18, 29 (22 \pm 6.4)	/	/
625#	/	7*, 12*, 13* (11 \pm 3.2)	17, 20, 36 (24 \pm 10.2)	/	/
1250#	/	10*, 10*, 11* (10 \pm 0.6)	19*, 25*, 26* (23 \pm 3.8)	/	/
Positive control					
Name	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9AA
Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
Number of colonies/plate	451, 457, 581 (496 \pm 73.4)	515, 536, 601 (551 \pm 44.8)	123, 127, 131 (127 \pm 4.0)	454, 464, 472 (463 \pm 9.0)	294, 411, 597 (434 \pm 152.8)

Negative control : Dimethylsulfoxide.

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; NaN₃ : sodium azide; 9AA : 9-aminoacridine hydrochloride.

() : Mean \pm S.D.

* : Bacterial growth inhibition was observed.

: White oily membrane-like precipitations and white fine precipitations were observed on the surface of agar plate.

Table 3-2. Reverse mutation test of bumetrizole in bacteria (mutagenicity test II: +S9 mix)

Compound concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
	Base-pair substitution type			Frameshift type	
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
Negative control	117, 118, 128 (121 \pm 6.1)	7, 11, 13 (10 \pm 3.1)	24, 26, 31 (27 \pm 3.6)	20, 30, 33 (28 \pm 6.8)	14, 14, 22 (17 \pm 4.6)
9.77	104, 106, 109 (106 \pm 2.5)	7, 10, 12 (10 \pm 2.5)	/	19, 22, 24 (22 \pm 2.5)	11, 13, 15 (13 \pm 2.0)
19.5	101, 106, 132 (113 \pm 16.6)	5, 7, 11 (8 \pm 3.1)	/	21, 21, 25 (22 \pm 2.3)	12, 16, 20 (16 \pm 4.0)
39.1	104, 111, 121 (112 \pm 8.5)	10, 10, 11 (10 \pm 0.6)	21, 23, 34 (26 \pm 7.0)	21, 26, 34 (27 \pm 6.6)	11, 19, 20 (17 \pm 4.9)
78.1##	104, 113, 120 (112 \pm 8.0)	3, 6, 8 (6 \pm 2.5)	26, 33, 38 (32 \pm 6.0)	25, 27, 32 (28 \pm 3.6)	16, 18, 25 (20 \pm 4.7)
156.3##	114, 115, 118 (116 \pm 2.1)	6, 8, 9 (8 \pm 1.5)	22, 30, 30 (27 \pm 4.6)	20, 26, 28 (25 \pm 4.2)	3, 17, 18 (13 \pm 8.4)
312.5##	97*, 112*, 112* (107 \pm 8.7)	6*, 6*, 7* (6 \pm 0.6)	21, 31, 35 (29 \pm 7.2)	20*, 22*, 37* (26 \pm 9.3)	7*, 13*, 13* (11 \pm 3.5)
625##	/	/	28, 29, 34 (30 \pm 3.2)	/	/
1250##	/	/	31*, 33*, 38* (34 \pm 3.6)	/	/
Positive control					
Name	2AA				
Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2
Number of colonies/plate	898, 944, 958 (933 \pm 31.4)	347, 350, 419 (372 \pm 40.7)	769, 790, 795 (785 \pm 13.8)	431, 450, 475 (452 \pm 22.1)	115, 141, 141 (132 \pm 15.0)

Negative control : Dimethylsulfoxide.

2AA : 2-Aminoanthracene.

() : Mean \pm S.D.

* : Bacterial growth inhibition was observed.

: White fine precipitations were observed on the surface of agar plate.

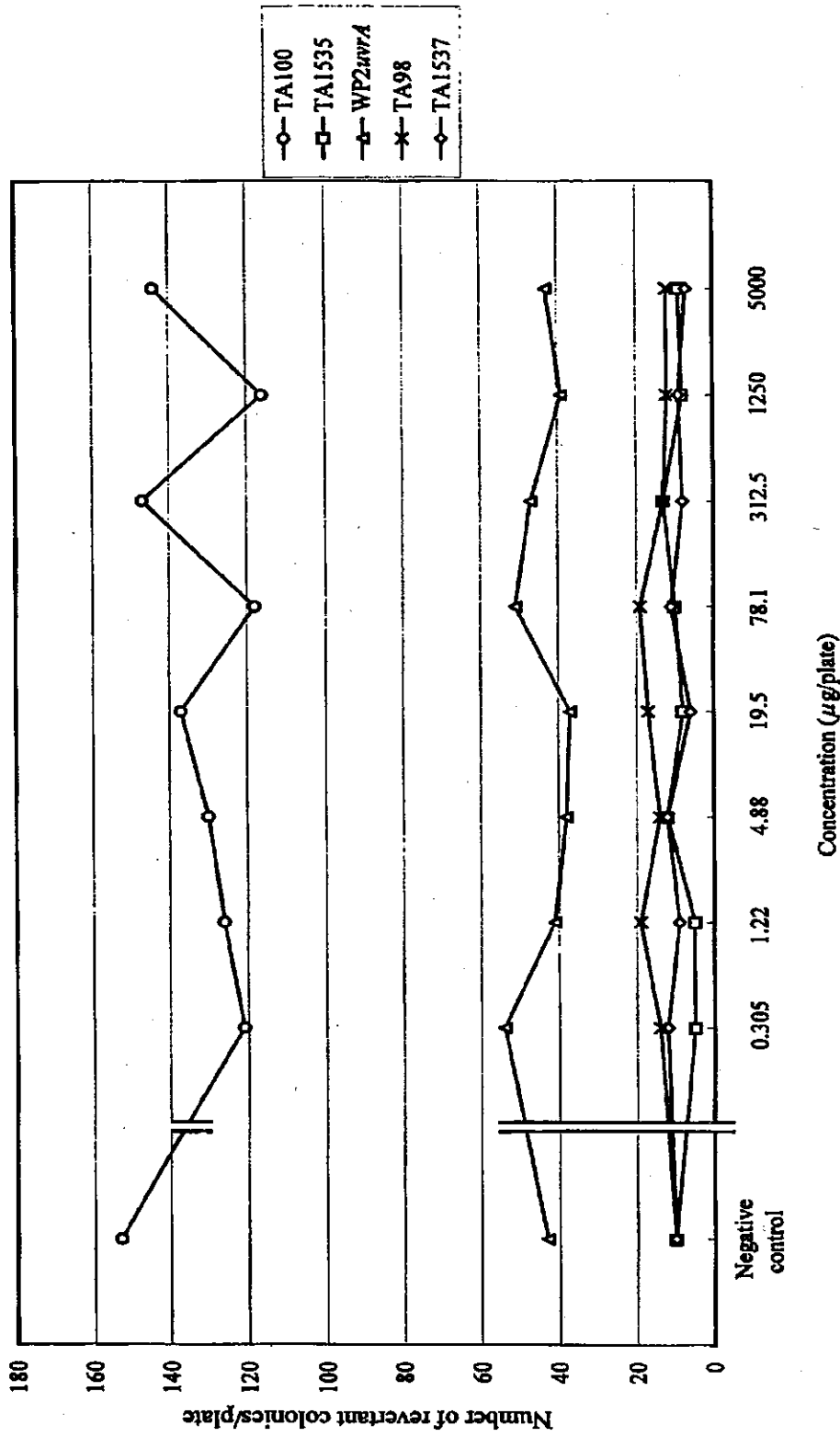


Figure 1-1. Reverse mutation test of bumetrizole in bacteria (dose-finding test: -S9 mix).

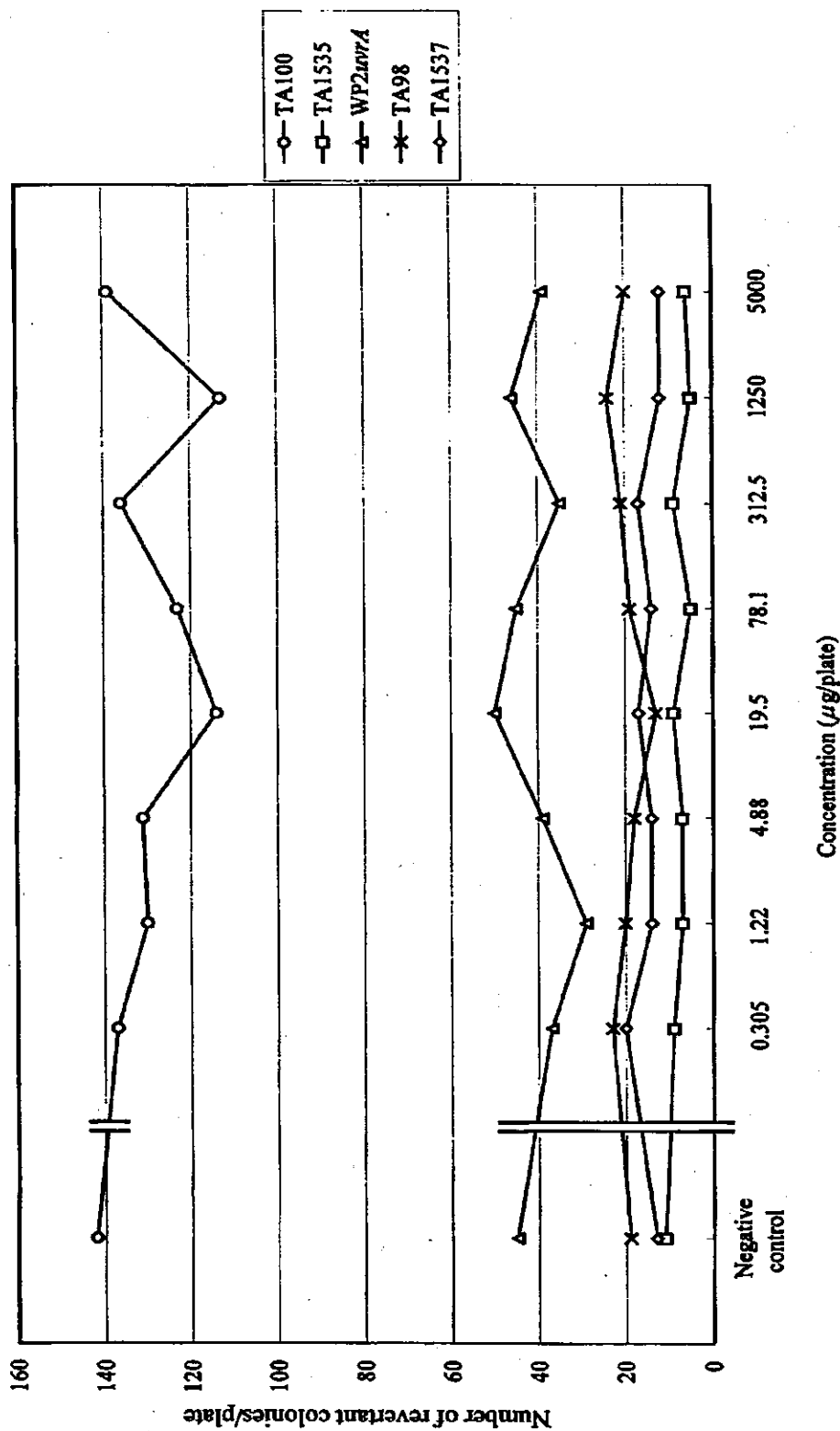


Figure 1-2. Reverse mutation test of bumetrizole in bacteria (dose-finding test: +S9 mix).

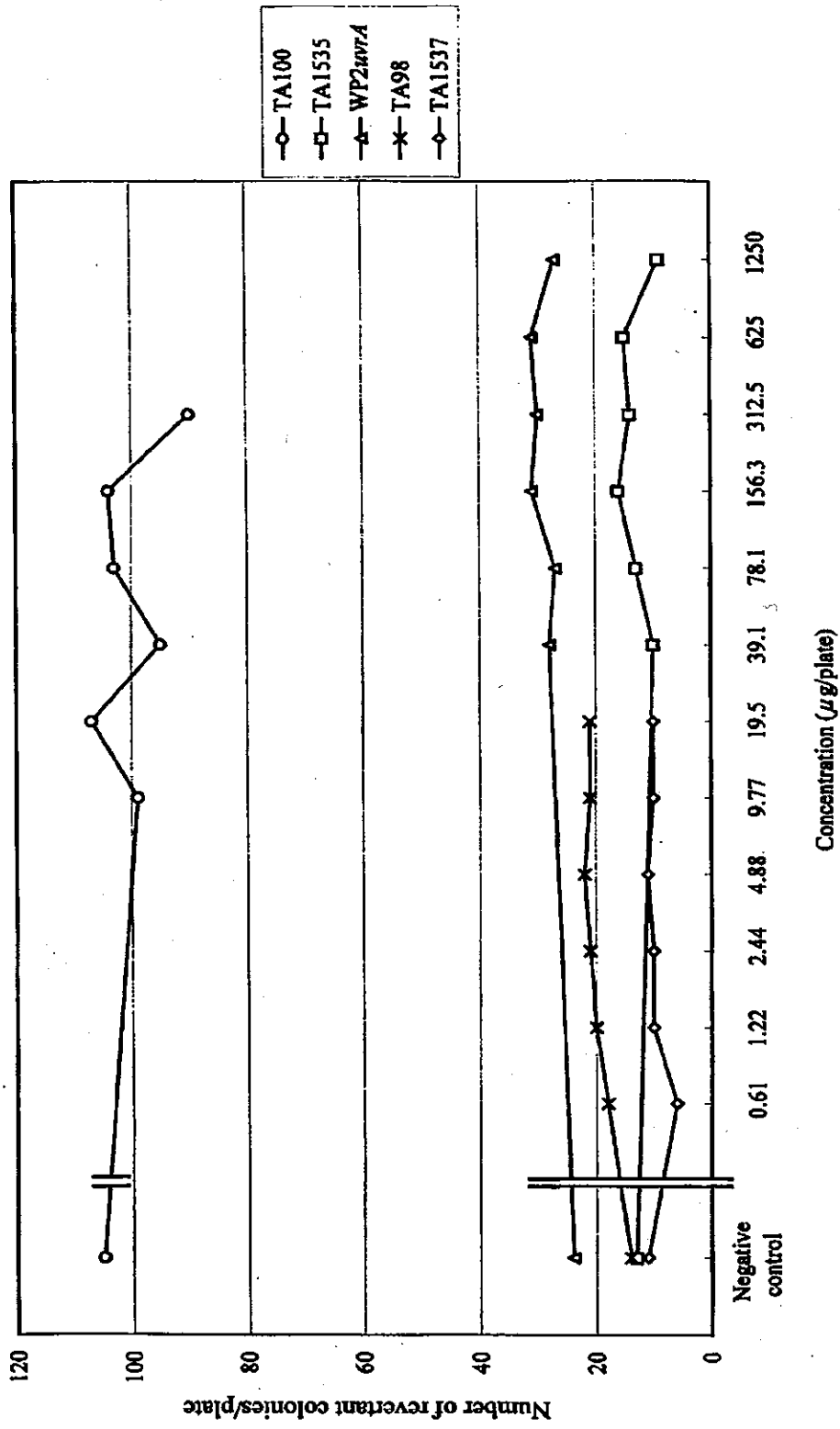


Figure 2-1. Reverse mutation test of bumetrizole in bacteria (mutagenicity test I: -S9 mix).

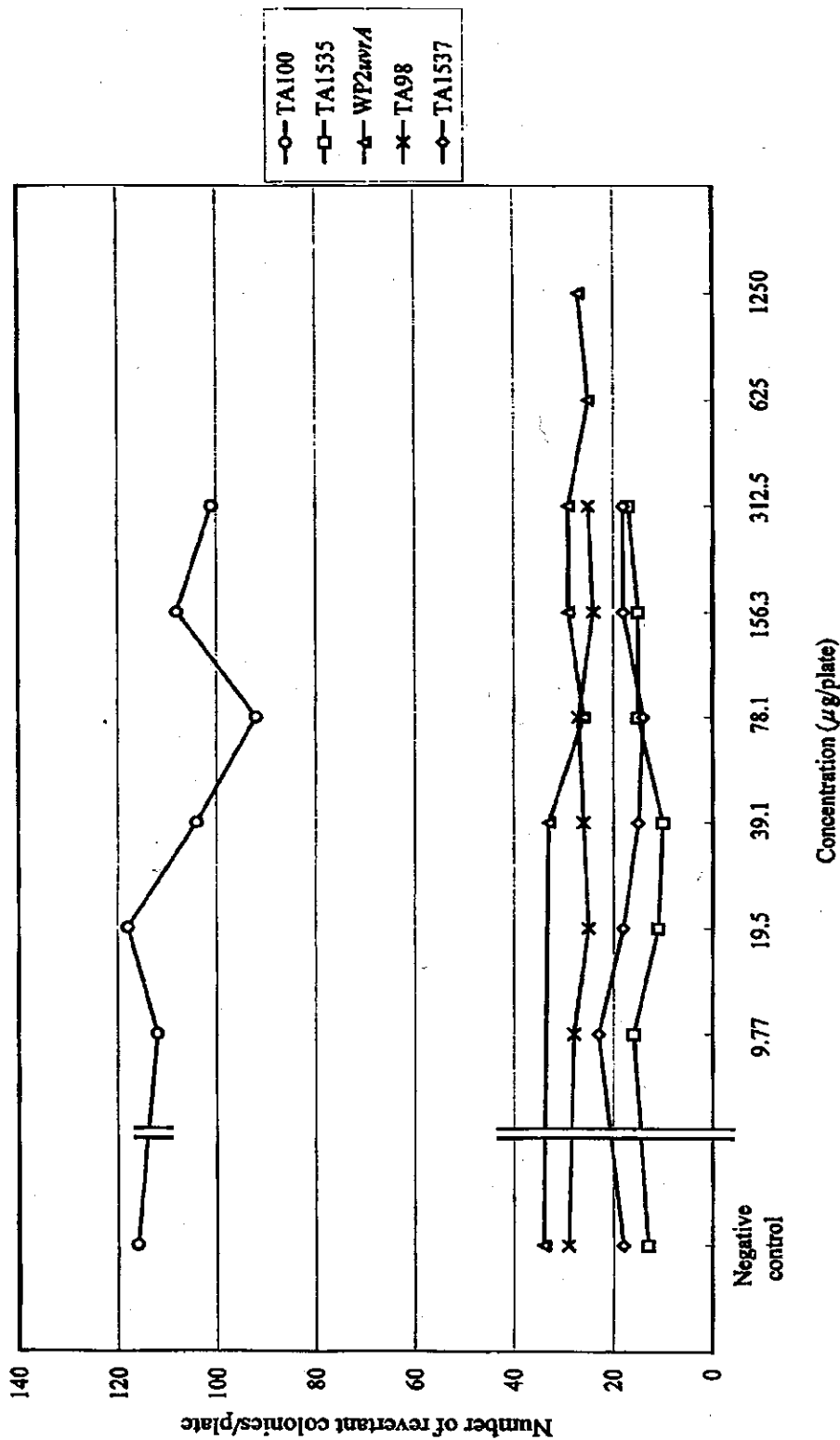


Figure 2-2. Reverse mutation test of bumetrizole in bacteria (mutagenicity test I: +S9 mix).

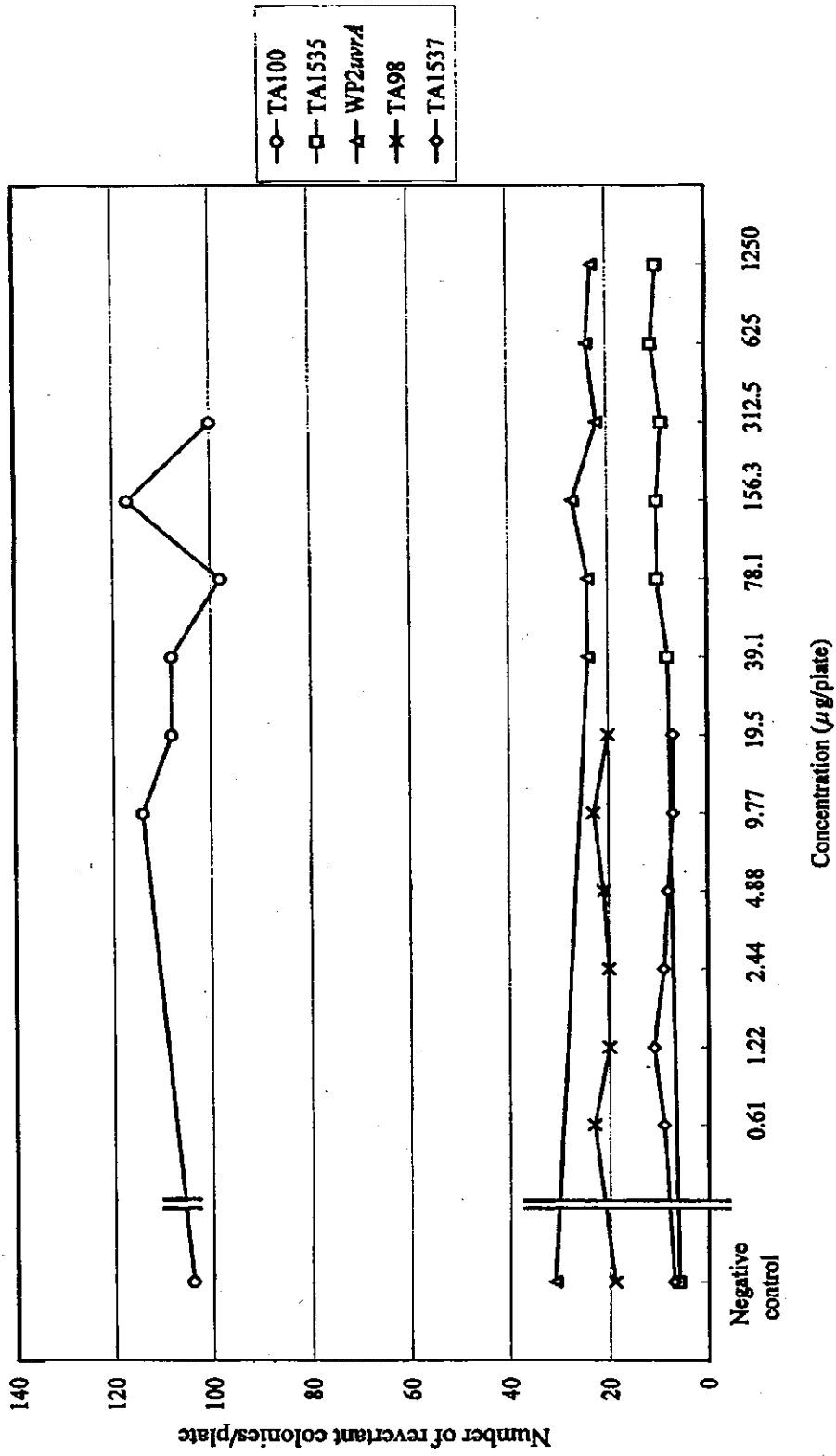


Figure 3-1. Reverse mutation test of bumetrizole in bacteria (mutagenicity test II: -S9 mix).

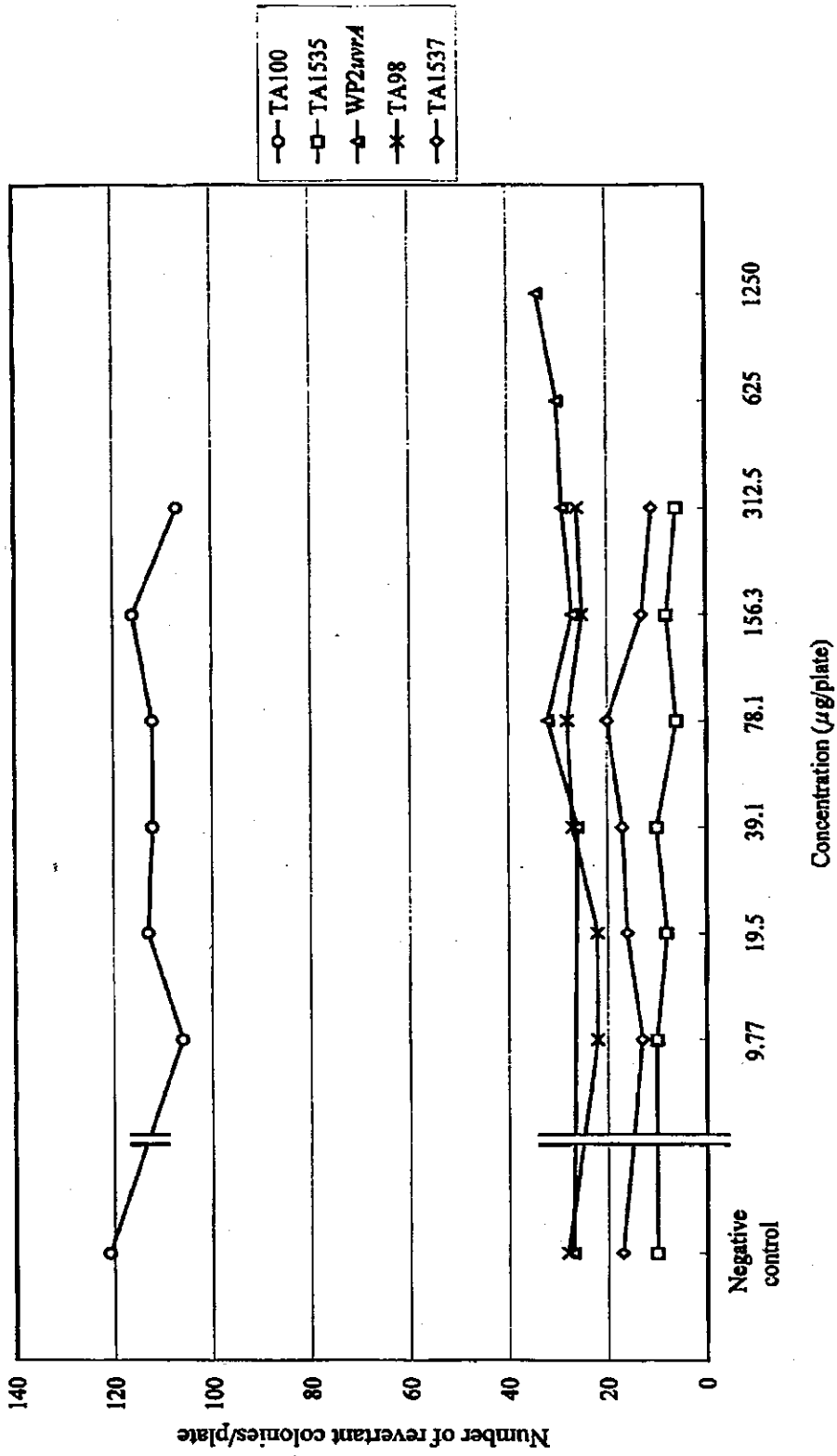


Figure 3-2. Reverse mutation test of bumetizole in bacteria (mutagenicity test II: +S9 mix).

The short treatment method
 ◆ Treated for 6hr with S9 mix
 ■ Treated for 6hr without S9 mix
 The continuous treatment method
 ▲ Treated for 24hr

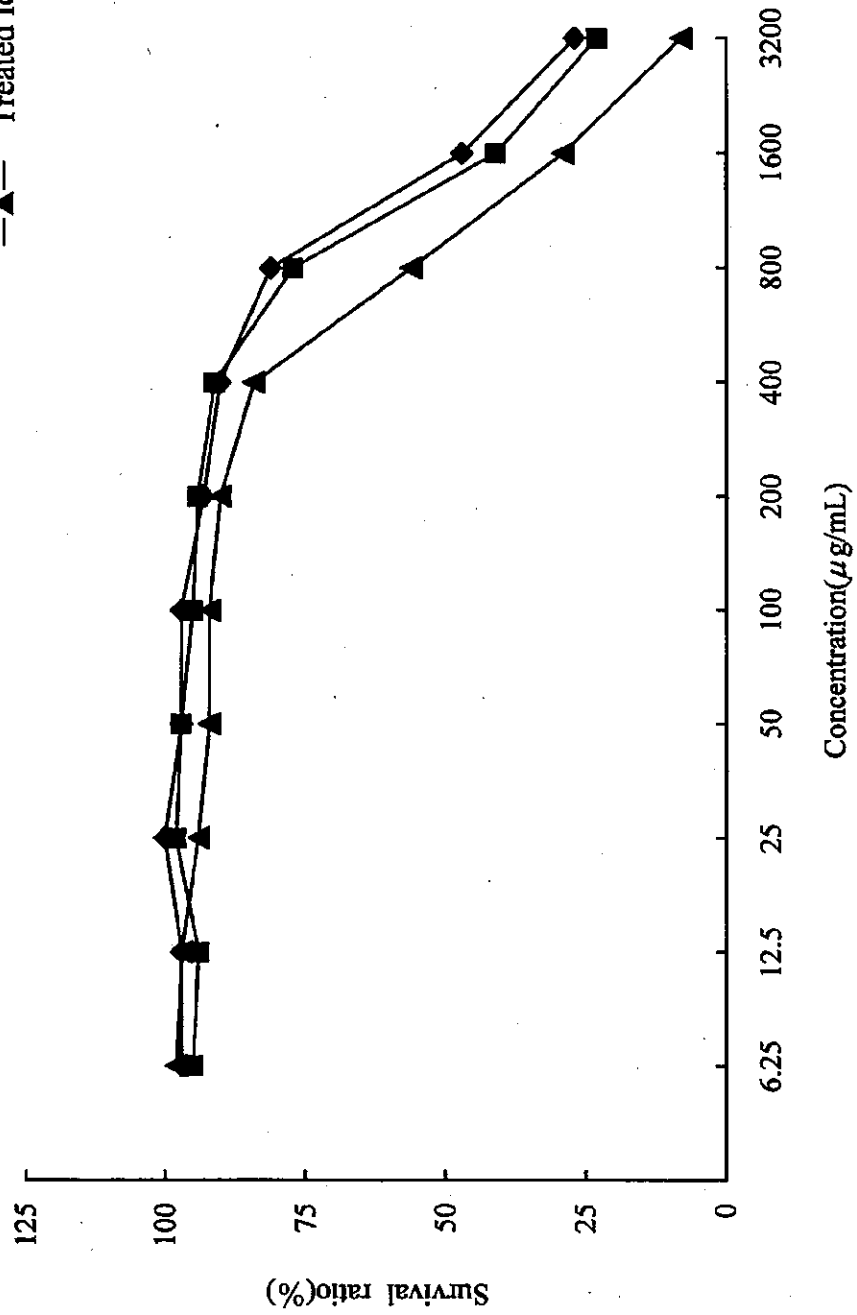


Figure 1. Cell growth inhibition test of bumetrizole in cultured CHL cells.

Study No. 971124

Appendix 1-1. Chromosomal aberration test of bumetizole in cultured CHL cells
-The short treatment method-

Test substance	Concentration (µg/mL)	With (+) or without (-) S9 mix	No. of metaphase examined	Numerical aberration				Structural aberrations										Survival ratio ^{e)} (%)		
				No. of Polyploid cells	No. of endoreduplication cells	Incidence ^{a)} (%)	Judgement ^{b)}	Types ^{c)} and numbers (cumulative)											Incidence ^{d)} (%)	Judgement ^{b)}
								No. of cells with chromosome aberration												
				gap	ctb	csb	cte	cse	fig	(+g)	(-g)	(+g)	(-g)							
Negative control (Dimethyl sulfoxide)	-	+	100	0	0	0	0	0.5	-	0	0	0	0	0	0	0	0	100		
	150*	+	100	0	0	0	0	0.5	-	0	0	0	0	0	0	0	0	96		
	300*	+	100	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	91		
	600*	+	100	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	85		
	1200*	+	100	1	0	0	0	1.5	-	0	0	0	0	0	0	0	0	51		
	2400*	+	100	2	0	0	0	1.5	-	0	0	0	0	0	0	0	0	34		
Dimethylnitrosamine	500	+	100	0	0	0	0	0	-	0	32	0	63	1	0	73	73	85		
			100	0	0	0	0	0	-	0	34	0	61	1	0	72	72.5	85		

a): (Numerical aberration cells / observed metaphase cells) × 100.

b): Judged on the basis of incidence as; -: negative (less than 5.0%); ±: equivocal (5.0% or higher to less than 10.0%); +: positive (10.0% or higher).

c): ctb: chromatid break; csb: chromosome break; cte: chromatid exchange; cse: chromosome exchange; fig: fragmentation.

d): (Cells with structural chromosome aberration / observed metaphase cells) × 100.

e): (bumetizole treated group or positive control / negative control) × 100.

(+g): Total aberrant cells including the gap; (-g): total aberrant cells excluding the gap.

*: White oily membrane-like precipitations and white fine precipitations were noted in culture fluid.

Appendix 2. Chromosomal aberration test of bumetrizole in cultured CHL cells
 —The continuous treatment method—

Test substance	Concentration (µg/mL)	Time of treatment (hr)	No. of metaphase examined	Numerical aberration				Structural aberrations										Survival ratio ^{a)} (%)		
				No. of Polyploid cells	No. of endoreduplication cells	Incidence ^{b)} (%)	Judgement ^{b)}	No. of cells with chromosome aberration												
								Types ^{c)} and numbers (cumulative)											Incidence ^{b)} (%)	
gap		ctb	csb	cte	cse	fig	(+g)	(-g)	(+g)	(-g)	Incidence ^{b)} (%)		Judgement ^{b)}							
Negative control (Dimethyl sulfoxide)	—	24	100	0	0	0	—	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0.5	0.5	—
	75*	24	100	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	97
bumetrizole	150*	24	100	1	0	1.0	—	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1.0	1.0	—	92
	300*	24	100	1	0	0.5	—	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0.5	0.5	—	88
bumetrizole	600*	24	100	2	0	1.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0.5	—	62
	1200*	24	100	2	0	1.0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	34
Mitomycin C	0.05	24	100	0	0	0	—	0	20	0	26	0	0	44	44	43.5	43.5	+	88	
	—	24	100	0	0	0	—	0	20	0	30	0	0	43	43	43.5	43.5	+	88	

a): (Numerical aberration cells / observed metaphase cells) × 100.
 b): Judged on the basis of incidence as; —: negative (less than 5.0%) ; ±: equivocal (5.0% or higher to less than 10.0%) ; +: positive (10.0% or higher) .
 c): ctb: chromatid break; csb: chromosome break; cte: chromatid exchange; cse: chromosome exchange; fig: fragmentation.
 d): (Cells with structural chromosome aberration / observed metaphase cells) × 100.
 e): (bumetrizole treated group or positive control / negative control) × 100.
 (+g): Total aberrant cells including the gap; (-g): total aberrant cells excluding the gap.
 *: White oily membrane-like precipitations and white fine precipitations were noted in culture fluid.