

表1

## 試験結果表 (用量設定試験)

被験物質の名称: クヌギ木酢液

試験実施期間		2003年 11月 12日より			2003年 11月 14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	WP2 <i>uvrA</i> / pKM101	TA98	TA1537	
-S9 Mix	陰性対照 (H <sub>2</sub> O)	138 143 ( 141 )	10 5 ( 8 )	110 104 ( 107 )	13 14 ( 14 )	7 13 ( 10 )	
	19.5	129 129 ( 129 )	6 7 ( 7 )	84 116 ( 100 )	19 16 ( 18 )	15 9 ( 12 )	
	78.1	143 144 ( 144 )	7 2 ( 5 )	99 98 ( 99 )	12 15 ( 14 )	1 7 ( 4 )	
	313	140 135 ( 138 )	12 8 ( 10 )	112 106 ( 109 )	15 26 ( 21 )	5 8 ( 7 )	
	1250	147 180 ( 164 )	8 3 ( 6 )	113 122 ( 118 )	20 20 ( 20 )	7 12 ( 10 )	
	5000	148 124 ( 136 )	5 5 ( 5 )	94 126 ( 110 )	18 7 ( 13 )	8 7 ( 8 )	
+S9 Mix	陰性対照 (H <sub>2</sub> O)	148 131 ( 140 )	3 7 ( 5 )	119 104 ( 112 )	32 31 ( 32 )	11 12 ( 12 )	
	19.5	171 125 ( 148 )	10 8 ( 9 )	129 154 ( 142 )	24 28 ( 26 )	15 15 ( 15 )	
	78.1	130 121 ( 126 )	8 3 ( 6 )	142 115 ( 129 )	20 23 ( 22 )	10 15 ( 13 )	
	313	130 148 ( 139 )	11 12 ( 12 )	140 139 ( 140 )	30 34 ( 32 )	23 8 ( 16 )	
	1250	162 153 ( 158 )	14 7 ( 11 )	149 119 ( 134 )	20 34 ( 27 )	21 8 ( 15 )	
	5000	144 133 ( 139 )	8 10 ( 9 )	167 147 ( 157 )	20 30 ( 25 )	12 21 ( 17 )	
陽性対照	S9 Mixを必要としないもの	名称	AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2	9-AA
		用量 (μg/プレート)	0.01	0.5	0.005	0.1	80
	S9 Mixを必要とするもの	コロニー数/プレート	524 509 ( 517 )	513 512 ( 513 )	1295 1271 ( 1283 )	415 402 ( 409 )	838 642 ( 740 )
		名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		用量 (μg/プレート)	1	2	2	0.5	2
		コロニー数/プレート	820 761 ( 791 )	74 75 ( 75 )	409 444 ( 427 )	276 257 ( 267 )	115 94 ( 105 )

AF-2: 2-(2-フルル)-3-(5-ニトロ-2-フルル)アクリルアミド

2-AA: 2-アミノアントラセン

NaN<sub>3</sub>: ナトリウム

9-AA: 9-アミノアクリジン塩酸塩

( ): 内の数値は平均値

表2

## 試験結果表 (本試験)

被験物質の名称：クヌギ木酢液

試験実施期間		2003年 12月 16日より			2003年 12月 18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	WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	TA98	TA1537	
-S9 Mix	陰性対照 (H <sub>2</sub> O)	135 147 ( 141 )	9 10 ( 10 )	109 107 ( 108 )	25 11 ( 18 )	15 3 ( 9 )	
	313	152 158 ( 155 )	10 5 ( 8 )	110 103 ( 107 )	21 20 ( 21 )	5 14 ( 10 )	
	625	124 166 ( 145 )	12 8 ( 10 )	98 127 ( 113 )	16 19 ( 18 )	6 11 ( 9 )	
	1250	155 171 ( 163 )	7 6 ( 7 )	108 114 ( 111 )	11 18 ( 15 )	13 6 ( 10 )	
	2500	167 149 ( 158 )	3 8 ( 6 )	122 120 ( 121 )	16 17 ( 17 )	7 8 ( 8 )	
	5000	172 157 ( 165 )	6 6 ( 6 )	148 117 ( 133 )	17 16 ( 17 )	3 7 ( 5 )	
+S9 Mix	陰性対照 (H <sub>2</sub> O)	170 154 ( 162 )	8 12 ( 10 )	145 162 ( 154 )	30 35 ( 33 )	8 12 ( 10 )	
	313	168 132 ( 150 )	6 10 ( 8 )	166 162 ( 164 )	21 34 ( 28 )	16 15 ( 16 )	
	625	176 166 ( 171 )	10 9 ( 10 )	159 154 ( 157 )	19 36 ( 28 )	11 11 ( 11 )	
	1250	157 168 ( 163 )	5 10 ( 8 )	151 167 ( 159 )	29 19 ( 24 )	14 6 ( 10 )	
	2500	194 179 ( 187 )	5 7 ( 6 )	157 140 ( 149 )	24 27 ( 26 )	16 10 ( 13 )	
	5000	171 168 ( 170 )	6 6 ( 6 )	143 179 ( 161 )	30 18 ( 24 )	11 16 ( 14 )	
陽性対照	S9 Mixを必要としないもの	名称	AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2	9-AA
		用量 (μg/プレート)	0.01	0.5	0.005	0.1	80
	S9 Mixを必要とするもの	コロニー数/プレート	574 582 ( 578 )	591 566 ( 579 )	970 956 ( 963 )	473 461 ( 467 )	594 617 ( 606 )
		名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		用量 (μg/プレート)	1	2	2	0.5	2
		コロニー数/プレート	868 796 ( 832 )	134 139 ( 137 )	549 523 ( 536 )	328 345 ( 337 )	83 88 ( 86 )

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニコロ-2-フリル)アクリルアミド

2-AA : 2-アミノアントレン

NaN<sub>3</sub> : ナジ 化ナトリウム

9-AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩

( ) : 内の数値は平均値

表3

## 試験結果表 (確認試験)

被験物質の名称 : クヌギ木酢液

試験実施期間		2003年12月24日より 2003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	
+S9 Mix	陰性対照 ( $\text{H}_2\text{O}$ )	10 6	( 8 )
	313	5 9	( 7 )
	625	14 5	( 10 )
	1250	6 10	( 8 )
	2500	11 10	( 11 )
	5000	12 8	( 10 )
陽性対照	S9 Mixを必要とするもの	名称	2-AA
		用量 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	2
		コロニー数/プレート	105 114 ( 110 )

2-AA : 2-アミノアントラセン

( ) : 内の数値は平均値

付表 1

キッコーマン株式会社  
研究本部 第2研究部〒278-0037 千葉県野田市野田399  
04(7123)5574

## S-9 品質保証書

製造番号 RAA-491  
製造年月日 2003年10月10日

## ラット肝ホモジネート 9,000×g 上清

使用動物 : Sprague-Dawley Rat (Slc:SD)  
 性別 : 雄  
 週令 : 7週令  
 体重 : 211-260g  
 誘導物質 : フェノール (PB: 和光純薬工業(株)製) & 5,6-ベンゾフラボン (BF: アルドリッチ社製) 腹腔内投与  
 投与用量 : 1日目PB30mg/kg、2日目PB60mg/kg、3日目PB60mg/kg+BF80mg/kg、  
 4日目PB60mg/kg、5日目S-9調製  
 S-9調製法 : 断頭 → 灌流 (生理食塩水) → 灌流肝10gに0.15M KCl溶液を30ml加え  
 ホジナイズ → 9,000Gで10分間遠沈 → 上清分画 → 直ちに凍結

## 生化学活性:

## S-9 画分

- |                        |   |
|------------------------|---|
| 1) 蛋白含量                | 25.56 mg/ml                                     |
| 2) 升加-L P-450含量        | 1.19 nmol/mg protein                            |
| 3) ジメチルニトロソアミン脱メチル酵素活性 | 5.09 nmol HCHO formed/mg protein/min            |
| 4) アリル水酸化酵素活性          | 25.03 nmol p-aminophenol formed/mg protein/hour |
| 5) ベンゾ [a] ピレン酵素活性     | 18.14 無誘導の活性を1.00とした相対活性                        |

## マイクロソーム (105,000×g) 画分

- |                 |                      |
|-----------------|----------------------|
| 1) 蛋白含量         | 14.23 mg/ml          |
| 2) 升加-L P-450含量 | 3.39 nmol/mg protein |

生物学活性: 最少グルコース寒天平板培地にはクリメディアAM-N (三光純薬(株)) を使用し、  
 プレインキュベーション法 (37℃、20分) にて試験。

変異原物質	濃度 (* <sup>1</sup> : μg, * <sup>2</sup> : μl/plate)	菌株	Hist/plate
ベンゾ [a] ピレン (和光純薬製)	5.0 * <sup>1</sup> (50 μl S-9/p)	TA100	1,044 ± 65
	5.0 * <sup>1</sup> (50 μl S-9/p)	TA98	224 ± 9
	5.0 * <sup>1</sup> (50 μl S-9/p)	TA1537	104 ± 11
2-アミノアントラセン (和光純薬製)	1.0 * <sup>1</sup> (50 μl S-9/p)	TA100	589 ± 47
	0.5 * <sup>1</sup> (50 μl S-9/p)	TA98	243 ± 52
	2.0 * <sup>1</sup> (50 μl S-9/p)	TA1537	113 ± 12
9,10-ジメチルアントラセン (アルドリッチ社製)	50.0 * <sup>1</sup> (100 μl S-9/p)	TA100	1,005 ± 24
	50.0 * <sup>1</sup> (100 μl S-9/p)	TA98	502 ± 44
	50.0 * <sup>1</sup> (100 μl S-9/p)	TA1537	231 ± 24
	50.0 * <sup>1</sup> (50 μl S-9/p)	TA100	722 ± 141
	50.0 * <sup>1</sup> (50 μl S-9/p)	TA98	282 ± 23
	50.0 * <sup>1</sup> (50 μl S-9/p)	TA1537	159 ± 17
ジメチルニトロソアミン (和光純薬製)	10.0 * <sup>2</sup> (50 μl S-9/p)	TA100	1,250 ± 125
自然復帰コロニー	プレインキュベーション → 30℃、35分 (50 μl S-9/p)	TA100	115 ± 16
	(50 μl S-9/p)	TA98	28 ± 3
	(50 μl S-9/p)	TA1537	17 ± 1

無菌試験 (500 μl S-9/plate): 合格

保存上の注意: 直ちに-80℃で保存して下さい。

使用期限: 製造日より6ヵ月以内にご使用下さい。

担当者: 永野、斉藤

付表 2

## 復帰突然変異試験における対照群の背景データ

## 1. 陰性対照群（溶媒対照群）の背景データ

S9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート（平均±S.D.）				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	TA98	TA1537
-	117±16	8±3	103±20	18±6	7±2
+	119±16	8±3	144±21	25±6	13±4

データ蓄積期間：2002年1月～2002年12月

## 2. 陰性対照群（溶媒対照群）の管理範囲

S9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	TA98	TA1537
-	69～165	4～17	43～163	10～36	4～13
+	71～167	4～17	81～207	10～43	6～25

## 3. 陽性対照群の背景データ

S9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート（平均±S.D.）				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	TA98	TA1537
-	AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2	9-AA
	0.01 µg/プレート	0.5 µg/プレート	0.005 µg/プレート	0.1 µg/プレート	80 µg/プレート
	449±59	508±54	1402±477	393±109	685±257
+	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	1 µg/プレート	2 µg/プレート	2 µg/プレート	0.5 µg/プレート	2 µg/プレート
	852±162	166±31	549±63	260±54	111±32

データ蓄積期間：2002年1月～2002年12月

陽性対照物質の略名は報告書本文を参照

## 4. 陽性対照群の管理範囲

S9 Mix	復帰変異コロニー数/プレート				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	TA98	TA1537
-	340～630	340～670	440～2830	80～720	170～1460
+	360～1340	70～260	420～740	90～420	50～210