

表1

## 試験結果表 (用量設定試験)

被験物質の名称: ベイツガ・スギ・ヒノキ木酢液

試験実施期間		2004年 11月 24日より			2004年 11月 26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 (滅菌水)	117 109 ( 113 )	11 6 ( 9 )	70 89 ( 80 )	14 8 ( 11 )	13 2 ( 8 )	
	24.4	112 100 ( 106 )	12 11 ( 12 )	89 96 ( 93 )	21 14 ( 18 )	7 8 ( 8 )	
	97.7	119 116 ( 118 )	9 12 ( 11 )	70 102 ( 86 )	19 11 ( 15 )	4 8 ( 6 )	
	391	114 122 ( 118 )	11 14 ( 13 )	102 124 ( 113 )	22 12 ( 17 )	5 10 ( 8 )	
	1563	263 259 ( 261 )	11 11 ( 11 )	253 230 ( 242 )	19 23 ( 21 )	7 5 ( 6 )	
	6250	536 484 ( 510 )	17* 20* ( 19 )	795 754 ( 775 )	8* 5* ( 7 )	8* 5* ( 7 )	
	25000	0* 0* ( 0 )	3* 0* ( 2 )	58* 52* ( 55 )	0* 0* ( 0 )	0* 0* ( 0 )	
	100000	0* 0* ( 0 )	0* 0* ( 0 )	0* 0* ( 0 )	0* 0* ( 0 )	0* 0* ( 0 )	
+S9 Mix	陰性対照 (滅菌水)	124 118 ( 121 )	8 3 ( 6 )	99 119 ( 109 )	28 37 ( 33 )	12 17 ( 15 )	
	24.4	113 107 ( 110 )	6 9 ( 8 )	148 132 ( 140 )	31 27 ( 29 )	19 19 ( 19 )	
	97.7	106 121 ( 114 )	6 8 ( 7 )	131 115 ( 123 )	23 27 ( 25 )	12 21 ( 17 )	
	391	115 121 ( 118 )	13 4 ( 9 )	152 152 ( 152 )	16 19 ( 18 )	18 18 ( 18 )	
	1563	225 185 ( 205 )	17 11 ( 14 )	241 235 ( 238 )	31 40 ( 36 )	14 18 ( 16 )	
	6250	438 452 ( 445 )	19 24 ( 22 )	575 613 ( 594 )	58 74 ( 66 )	21 20 ( 21 )	
	25000	2* 0* ( 1 )	1* 0* ( 1 )	68* 84* ( 76 )	1* 0* ( 1 )	0* 2* ( 1 )	
	100000†	0* 0* ( 0 )	0* 0* ( 0 )	0* 0* ( 0 )	0* 0* ( 0 )	0* 0* ( 0 )	
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	440 417 ( 429 )	417 418 ( 418 )	933 875 ( 904 )	406 409 ( 408 )	778 833 ( 806 )
		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	560 611 ( 586 )	94 134 ( 114 )	481 464 ( 473 )	233 269 ( 251 )	124 119 ( 122 )

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

2-AA: 2-アミノアントセン

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

\*: 菌株の生育阻害を認める

†: 被験物質の析出を認める

表2

## 試験結果表 (本試験)

被験物質の名称: ベイツガ・スギ・ヒノキ木酢液

試験実施期間		2004年 11月 30日より			2004年 12月 2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 (滅菌水)	136 120 ( 128 )	12 13 ( 13 )	93 94 ( 94 )	17 14 ( 16 )	11 7 ( 9 )	
	195	/	14 11 ( 13 )	/	22 20 ( 21 )	7 8 ( 8 )	
	391	/	12 13 ( 13 )	/	13 22 ( 18 )	11 11 ( 11 )	
	781	155 148 ( 152 )	14 17 ( 16 )	159 179 ( 169 )	17 22 ( 20 )	13 6 ( 10 )	
	1563	245 278 ( 262 )	17 19 ( 18 )	314 306 ( 310 )	27 27 ( 27 )	12 16 ( 14 )	
	3125	419 394 ( 407 )	17 24 ( 21 )	524 517 ( 521 )	46 41 ( 44 )	17 12 ( 15 )	
	6250	596 532 ( 564 )	34* 22* ( 28 )	877 890 ( 884 )	15* 7* ( 11 )	7* 6* ( 7 )	
	12500	41* 94* ( 68 )	/	577* 605* ( 591 )	/	/	
	25000	0* 0* ( 0 )	/	0* 0* ( 0 )	/	/	
+S9 Mix	陰性対照 (滅菌水)	124 136 ( 130 )	10 10 ( 10 )	115 113 ( 114 )	18 17 ( 18 )	16 17 ( 17 )	
	781	161 164 ( 163 )	7 10 ( 9 )	151 197 ( 174 )	26 31 ( 29 )	8 16 ( 12 )	
	1536	199 209 ( 204 )	25 10 ( 18 )	285 275 ( 280 )	20 29 ( 25 )	13 20 ( 17 )	
	3125	345 315 ( 330 )	17 22 ( 20 )	466 411 ( 439 )	40 51 ( 46 )	10 17 ( 14 )	
	6250	488 526 ( 507 )	22 20 ( 21 )	658 731 ( 695 )	47 59 ( 53 )	28 16 ( 22 )	
	12500	664 676 ( 670 )	31 29 ( 30 )	1075 1132 ( 1104 )	47 53 ( 50 )	15 23 ( 19 )	
	25000	0* 0* ( 0 )	0* 0* ( 0 )	85* 13* ( 49 )	0* 0* ( 0 )	0* 0* ( 0 )	
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
		コロニー数/プレート	479 473 ( 476 )	439 471 ( 455 )	1042 1040 ( 1041 )	328 304 ( 316 )	511 561 ( 536 )
	S9 Mixを必要とするもの	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	652 641 ( 647 )	130 132 ( 131 )	553 585 ( 569 )	195 160 ( 178 )	124 111 ( 118 )

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-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>: アジ化ナトリウム

9-AA: 9-アミノアクリジン塩酸塩

( ): 内の数値は平均値

\*: 菌株の生育阻害を認める

表 3

## 比 活 性

	菌 株 名	-S9 Mix		+S9 Mix	
		比活性	計算に用いた 用量 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	比活性	計算に用いた 用量 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )
用 量 設 定 試 験	TA100	94.7	1563	51.8	6250
	TA1535	1.6	6250	5.1	1563
	WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	111.2	6250	82.5	1563
	TA98	—	—	5.3	6250
	TA1537	—	—	—	—
本 試 験	TA100	89.3	3125	64.0	3125
	TA1535	2.4	6250	3.2	3125
	WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	138.2	1563	106.2	1563
	TA98	9.0	6250	9.0	3125
	TA1537	—	—	—	—

比活性：被験物質 1mg 当たりの誘発復帰変異コロニー数。すなわち溶媒対照値の 2 倍以上の復帰変異コロニー数を示す用量において、下式より計算して得た値の最大値。

$$\frac{(\text{被験物質群の復帰変異コロニー数}) - (\text{溶媒対照群の復帰変異コロニー数})}{\text{用量 (mg/プレート)}}$$

用量 (mg/プレート)

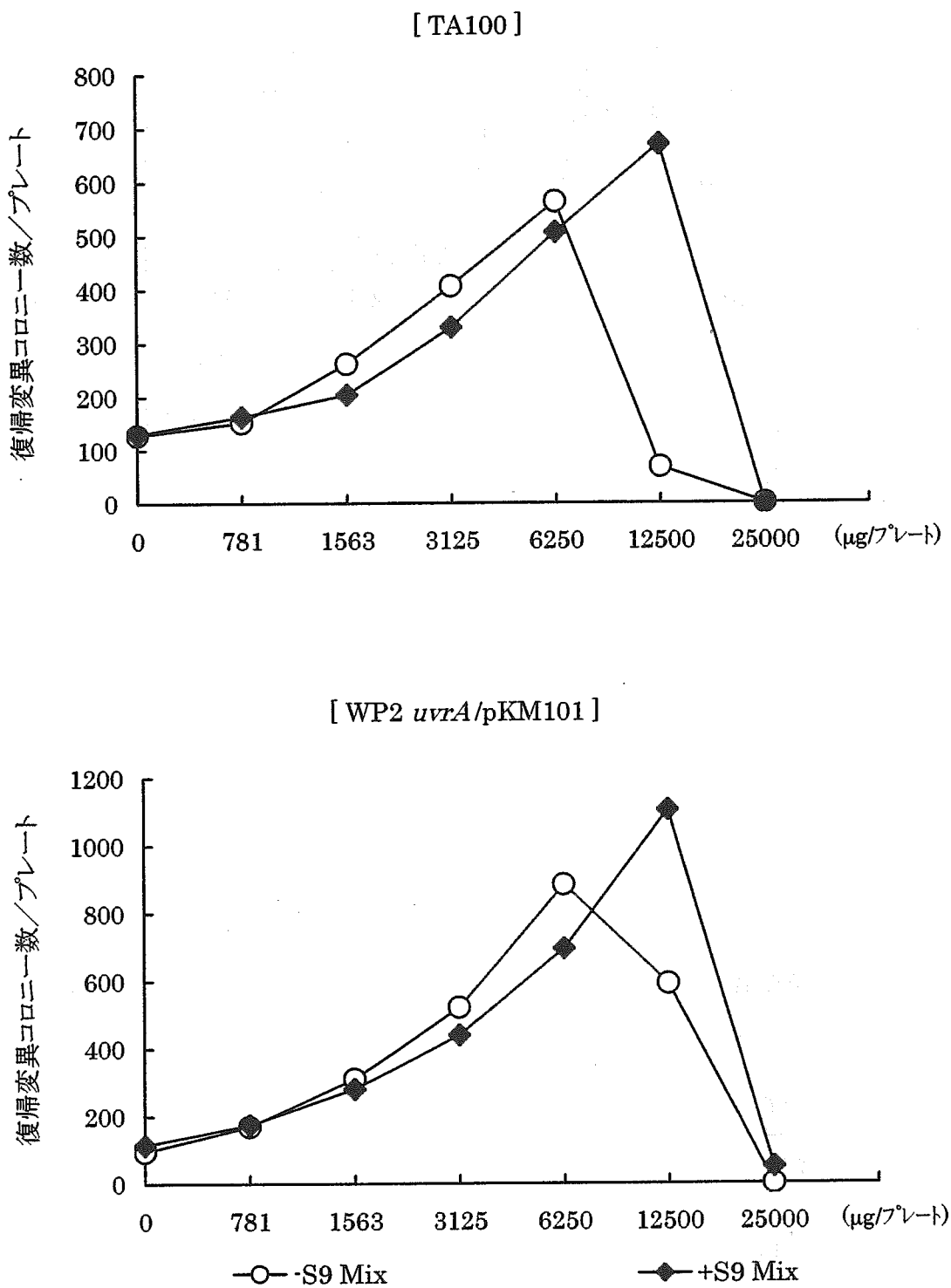


図1 用量-反応曲線 (本試験, TA100株およびWP2 *uvrA*/pKM101株)

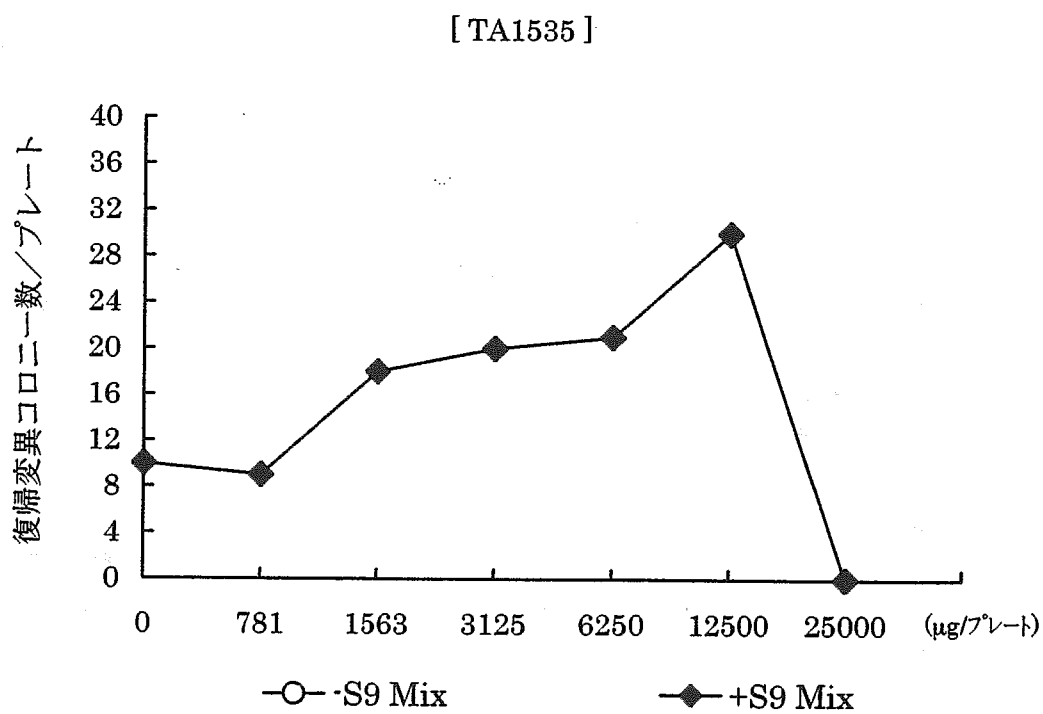
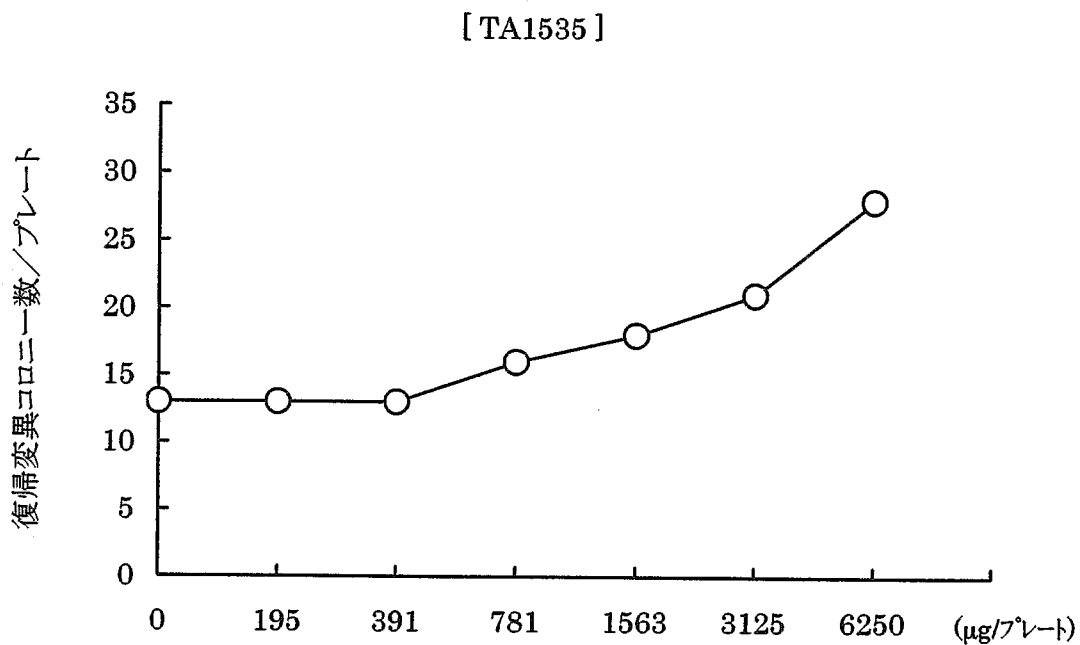


図2 用量-反応曲線 (本試験, TA1535株)

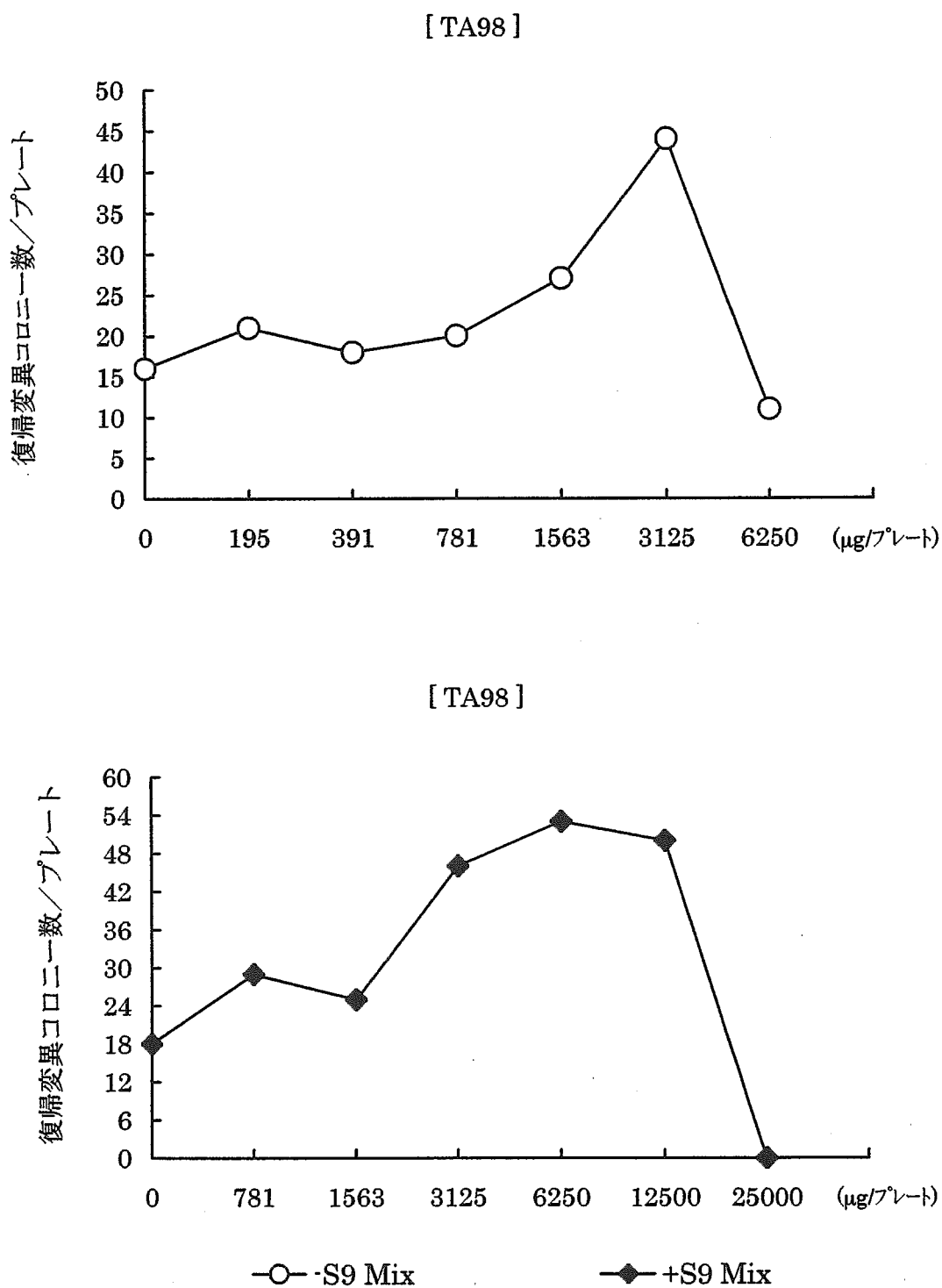


図3 用量-反応曲線 (本試験, TA98株)

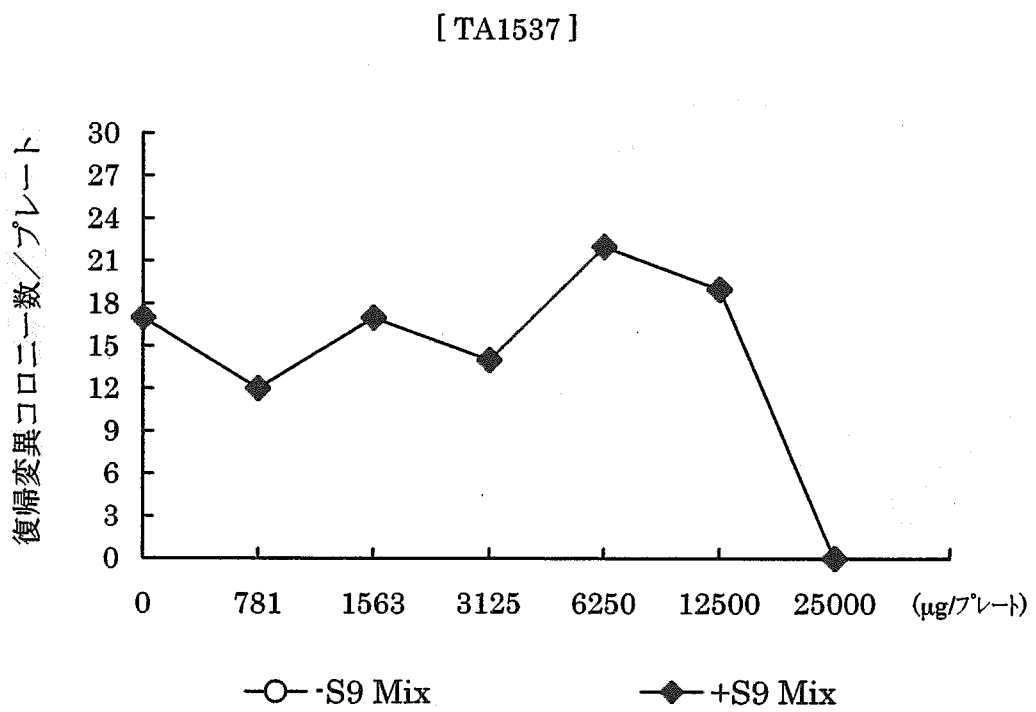
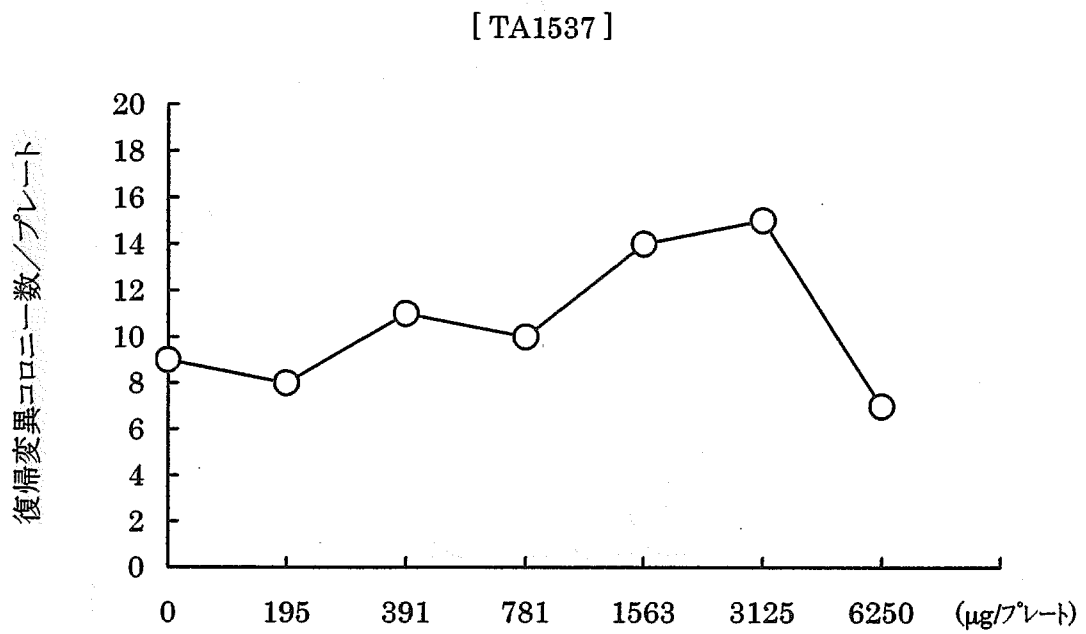


図4 用量-反応曲線 (本試験, TA1537株)

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-512  
 製造年月日 2004年11月05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 : 212-244g  
 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: 和光純薬工業(株)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 絞汁 → 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	26.72 mg/ml
2) フクロム P-450含量	1.03 nmol/mg protein
3) ジメチルニトロソアミン脱メチル酵素活性	4.66 nmol HCHO formed/mg protein/min
4) アリル水酸化酵素活性	26.41 nmol p-aminophenol formed/mg protein/hour
5) ベンゾ [a] ピレン酵素活性	20.72 無誘導の活性を1.00とした相対活性

## ミクロソーム (105,000×g) 画分

1) 蛋白含量	15.30 mg/ml
2) フクロム P-450含量	2.95 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) 溶媒: DMSO	5.0 * <sup>1</sup> (50 μl S-9/p)	TA100	942 ± 23
	5.0 * <sup>1</sup> (50 μl S-9/p)	TA98	297 ± 13
	5.0 * <sup>1</sup> (50 μl S-9/p)	TA1537	96 ± 3
2-アミノアントラセン (和光純薬製) 溶媒: DMSO	1.0 * <sup>1</sup> (50 μl S-9/p)	TA100	561 ± 39
	0.5 * <sup>1</sup> (50 μl S-9/p)	TA98	289 ± 16
	2.0 * <sup>1</sup> (50 μl S-9/p)	TA1537	118 ± 4
9,10-ジメチルアントラセン (アルリッチ社製) 溶媒: DMSO	50.0 * <sup>1</sup> (100 μl S-9/p)	TA100	906 ± 23
	50.0 * <sup>1</sup> (100 μl S-9/p)	TA98	365 ± 21
	50.0 * <sup>1</sup> (100 μl S-9/p)	TA1537	184 ± 7
	50.0 * <sup>1</sup> (50 μl S-9/p)	TA100	575 ± 13
	50.0 * <sup>1</sup> (50 μl S-9/p)	TA98	197 ± 18
	50.0 * <sup>1</sup> (50 μl S-9/p)	TA1537	155 ± 22
ジメチルニトロソアミン (和光純薬製) 溶媒: リン酸緩衝液 (pH5.5)	10.0 * <sup>2</sup> (50 μl S-9/p)	TA100	1,672 ± 86
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	92 ± 3
	(50 μl S-9/p)	TA98	27 ± 3
	(50 μl S-9/p)	TA1537	14 ± 0

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
-	124±18	8±3	109±18	17±5	8±3
+	130±22	8±3	135±22	24±6	14±5

データ蓄積期間：2003年1月～2003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
-	70～178	4～17	55～163	10～32	4～17
+	64～196	4～17	69～201	10～42	6～29

## 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
	434±75	510±69	1094±121	342±81	590±218
+	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
	755±109	139±35	478±96	258±54	104±27

データ蓄積期間：2003年1月～2003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
-	360～660	300～720	730～1460	90～590	150～1240
+	420～1080	40～240	410～770	90～420	60～190