

Exp. No. 8360 ( 397-003 )  
FINAL REPORT

# 最終報告書

細葉山紫蘇抽出液 ( Mosla Chinensis Maxim Extract ) 商品名 : 紫蘇源のラットを  
用いた急性経口毒性試験

試験番号 : 8360 ( 397-003 )

2004年8月5日

試験委託者  
白田 禎喜

食品農医薬品安全性評価センター



Page 1 of 16

本試験報告書は  
原本より複写したものである。  
2004年8月5日  
試験責任者 XXXXXXXXXX

## 陳 述 書

表 題：細葉山紫蘇抽出液 ( Mosla Chinensis Maxim Extract ) 商品名：紫蘇源の  
ラットを用いた急性経口毒性試験

試験番号：8360 ( 397-003 )

本試験は、「農薬の毒性に関する試験の適正実施について」(平成11年10月1日  
11農産第6283号農林水産省農産園芸局長通知)に従って実施されたものである。

2004年 8月 5日

所属：財団法人

食品農医薬品安全性評価センター

試験責任者

氏名：

[Redacted Name]

[Redacted Address]

## 信 頼 性 保 証 書

表 題：細葉山紫蘇抽出液 ( Mosla Chinensis Maxim Extract ) 商品名：紫蘇源の  
ラットを用いた急性経口毒性試験

試験番号：8360 ( 397-003 )

本試験は、「農薬の毒性に関する試験の適正実施について」(平成11年10月1日  
11 農産第6283号農林水産省農産園芸局長通知)に従って実施され、本最終報告書  
に記載された成績は、試験の生データを正確に反映していることを保証する。

なお、本試験の信頼性保証部門による調査記録を次頁に示す。

2004年8月5日

所属：財団法人  
食品農医薬品安全性評価センター  
信頼性保証部門責任者

氏名：

[Redacted Name]

[Redacted Signature]

## 調 査 記 録

調査項目	調査実施日	試験責任者および 運営管理者への報告日	調査 担当者
試験計画書	2004年5月24日	2004年5月24日	名倉
投与液の調製、投与および 観察	2004年6月1日	2004年6月2日	名倉
剖検	2004年6月15日	2004年6月15日	名倉
試験計画書の変更書（I）	2004年6月28日	2004年6月28日	名倉
生データおよび最終報告書 草案	2004年6月28日	2004年6月29日	名倉
生データおよび最終報告書	2004年8月5日	2004年8月5日	名倉

目 次

1. 要約.....	3
2. 表題.....	4
3. 試験目的.....	4
4. 準拠したガイドラインおよび遵守した GLP.....	4
5. 試験番号.....	4
6. 試験施設.....	4
7. 試験委託者.....	4
8. 試験責任者.....	5
9. 試験責任者の署名および日付.....	5
10. 被験物質管理責任者.....	5
11. 試験日程.....	5
12. 被験物質.....	6
13. 試験材料および方法.....	7
14. 観察, 測定および検査.....	9
15. 試験結果.....	10
16. 考察および結論.....	11
17. 試験関係資料の保管.....	12
18. 予見することができなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態 および試験計画書に従わなかつたこと.....	12
Tables	
Table 1 Mortality	13
Table 2 Clinical observation	14
Table 3 Body weight	15
Table 4 Gross finding	16

## 1. 要約

細葉山紫蘇抽出液 ( Mosla Chinensis Maxim Extract ) 商品名 : 紫蘇源の毒性の有無を検索するため、ラットを用いた急性経口毒性試験を実施した。Slc: Wistar 系ラット雌 5 匹に約 16 時間絶食の条件下で細葉山紫蘇抽出液 ( Mosla Chinensis Maxim Extract ) 商品名 : 紫蘇源を 2000 mg/kg の用量で強制経口投与した。動物の生死と一般状態を 14 日間観察し、体重推移および剖検所見について記録した。その結果は次の通り要約される。

5/5 例が自発運動低下を、1/5 例が流涎を示したがいずれの症状も一過性であった。観察期間中、順調な体重推移を示し、死亡例は認められなかった。また、観察期間終了時における解剖では、全ての動物で検索した器官、組織に異常は認められなかった。

以上の結果から、本試験条件下における細葉山紫蘇抽出液 ( Mosla Chinensis Maxim Extract ) 商品名 : 紫蘇源のラットに対する単回経口投与毒性は弱く、最小致死量は 2000 mg/kg を超える用量であると判断された。

2. 表題

細葉山紫蘇抽出液 ( Mosla Chinensis Maxim Extract ) 商品名 : 紫蘇源のラットを用いた急性経口毒性試験

3. 試験目的

細葉山紫蘇抽出液 ( Mosla Chinensis Maxim Extract ) 商品名 : 紫蘇源をラットに単回経口投与して, 毒性の有無を検索した.

4. 準拠したガイドラインおよび遵守した GLP

ガイドライン

- 農薬の登録申請に係る試験成績について (平成 12 年 11 月 24 日 12 農産第 8147 号農林水産省農産園芸局長通知)
- 「農薬の登録申請に係る試験成績について」の一部改正について (平成 14 年 12 月 10 日 14 生産第 7269 号農林水産省生産局長通知)

GLP

- 農薬の毒性に関する試験の適正実施について (平成 11 年 10 月 1 日 11 農産第 6283 号農林水産省農産園芸局長通知)

5. 試験番号

8360 ( 397-003 )

6. 試験施設

郵便番号 437-1213

静岡県磐田郡福田町塩新田字荒浜 582-2

財団法人食品農医薬品安全性評価センター (略称 安評センター)

電話番号 0538-58-1266 Fax 番号 0538-58-1393

7. 試験委託者

郵便番号 179-0074

東京都練馬区春日町 2-16-4

白田 禎喜

電話番号 03-3251-4611 Fax 番号 03-3251-4470

8. 試験責任者

██████████ (第三毒性グループ)

電話番号 0538-58-3570 Fax 番号 0538-58-1393

9. 試験責任者の署名および日付

2004年8月5日

所属：財団法人

食品農医薬品安全性評価センター

試験責任者

氏名： \_\_\_\_\_

████████████████████

████████████████████

10. 被験物質管理責任者

██████████ (薬理薬効グループ)

11. 試験日程

試験開始日：	2004年5月21日
動物搬入日：	2004年5月24日
投与日（実験開始日）：	2004年6月1日
解剖日（実験完了日）：	2004年6月15日
試験終了日：	2004年8月5日



12. 被験物質

- 12.1. 被験物質名  
細葉山紫蘇抽出液 ( Mosla Chinensis Maxim Extract ) 商品名 : 紫蘇源
- 12.2. ロット番号  
00C-160517
- 12.3. 有効成分濃度  
Thymole 6.2%
- 12.4. 提供元  
試験委託者
- 12.5. 製造年月日  
2004年5月12日
- 12.6. 有効期限  
5年間
- 12.7. 保管条件  
気密容器に入れ直射日光を避ける.
- 12.8. 保管場所  
安評センター試験研究棟被験物質保管庫 (F-3)
- 12.9. 一般名  
細葉山紫蘇抽出液 ( Mosla Chinensis Maxim Extract ) 商品名 : 紫蘇源
- 12.10. 物質の状態  
白色~黄色の透明液でフェノール性の臭気を有する液体
- 12.11. 溶解性  
水に容易に混和する.
- 12.12. 安定性  
常温において安定
- 12.13. 取り扱い上の注意  
特になし
- 12.14. 残余被験物質の処理  
残余被験物質は全て試験委託者に返却した.

### 13. 試験材料および方法

#### 13.1. 供試動物

7週齢のSlc:Wistar系ラット[SPF]雌7匹を日本エスエルシー株式会社から入荷した。動物は搬入後、健康状態および体重推移を観察し、試験環境に9日間馴化させた。その結果、いずれの動物にも異常は認められなかった。投与時の週齢は8週齢で、体重は123~129gであった。

#### 13.2. 試験系の選択理由

試験ガイドラインで推奨されているラットを選択した。系統は、既知化学物質に対する感受性、遺伝的安定性等を考慮して選んだ。

#### 13.3. 飼育管理

動物は202号飼育室(W3.6×D10.0×H2.5m, 90.0m<sup>3</sup>)で飼育し、環境調節の基準値は温度23±3°C(実測値:23.5~24.2°C)、相対湿度55±20%(実測値:54~74%)、換気回数1時間20回、照明12時間(午前7時点灯、午後7時消灯)とした。株式会社東京技研サービスの水洗式飼育機を使用し、ステンレス製網目飼育ケージ(W21.5×D27.5×H19.5cm, 11529cm<sup>3</sup>)に動物を2または5匹ずつ収容した。飼育ケージは隔週1回、給餌器は週1回取り換えた。

飼料は固型飼料MF(オリエンタル酵母工業株式会社)を自由に摂取させた。飼料(Lot No. 040206)の汚染物質の分析は財団法人日本食品分析センターで行い、日本実験動物飼料協会案の許容基準値内であることを確認し、その分析結果を保管した。

飲料水は水道水を自動給水ノズルから自由に摂取させた。水道水の水質について、水道法に基づく水道水の検査を3ヵ月に1回、株式会社エコプロ・リサーチで行い、SOPに記載されている上水道水質基準(平成15年5月30日厚生労働省令第101号)の基準値内であることを確認し、その分析結果を保管した。

#### 13.4. 個体識別

動物の識別は、耳介に連続した番号を入れ墨するとともにケージに動物番号(Animal ID-No.)を明記したラベルを付けて行った。

### 13.5. 試験群の構成および用量設定理由

#### 13.5.1. 試験群の構成

試験群	用量 (mg/kg)	性	動物数	動物番号
1	2000	雌	5	2101~2105

#### 13.5.2. 用量設定理由

試験委託者からの情報により本被験物質の毒性は弱いと推定されたため、ガイドラインで定められた上限である 2000 mg/kg を設定した。

### 13.6. 投与経路選択理由および投与方法

投与経路は準拠する試験ガイドラインに従い経口とした。

投与前約 16 時間絶食させた動物に胃ゾンデを用いて単回強制経口投与した。投与容量は体重 100 g 当たり 1 mL とし、個体別に測定した体重に基づいて投与量を算出した。投与後約 3 時間に給餌した。

### 13.7. 被験物質投与液の調製

電子天秤 AT261 (メトラー・トレド社) を用いて必要量の被験物質を量り取り、これを蒸留水 (大塚蒸留水, 株式会社大塚製薬工場, Lot No. K2G79) に溶解させて 20%w/v 濃度の投与液を調製した。投与液の調製は用時に行った。

#### 14. 観察, 測定および検査

##### 14.1. 一般状態の観察

投与当日については投与後 6 時間まで 1 時間に 1 回, 投与翌日以降は投与後 14 日まで 1 日 1 回観察した。ただし, 毒性の発現がないと想定されたため, 土・日曜日における観察は実施しなかった。なお, 観察期間は被験物質投与後 14 日間とした。

##### 14.2. 体重

体重は投与直前, 投与後 7 および 14 日に電子天秤 PM4800 (メトラール・トレド社) を用いて測定した。

##### 14.3. 病理学検査

観察期間終了時に全ての動物をエーテル麻酔後放血安楽死させ解剖した。解剖では動物の器官, 組織等を検査した。

##### 14.4. 統計解析

統計学的解析は行わなかった。

##### 14.5. 余剰動物の処分

余剰動物は炭酸ガスにより安楽死させた。

## 15. 試験結果

### 15.1. 死亡率

観察期間中の経日死亡状況を Table 1 に示した。

観察期間を通して、死亡例はみられなかった。観察期間終了時の死亡率は0%であった。

### 15.2. 一般状態の観察

一般状態の観察所見を Table 2 に示した。

5/5 例が投与直後および投与後 1 時間に自発運動低下を示したが投与後 2 時間には 4/5 例で消失した。また、1/5 例が投与直後に流涎を示したが、流涎は投与後 1 時間に、自発運動低下は投与後 3 時間に消失した。

### 15.3. 体重

体重推移を Table 3 に示した。

投与後 7 日の平均体重が投与直前と、投与後 14 日の平均体重が投与後 7 日と比較して増加を示した。

### 15.4. 病理学検査

剖検所見を Table 4 に示した。

いずれの動物の器官、組織にも異常は認められなかった。

## 16. 考察および結論

細葉山紫蘇抽出液 ( Mosla Chinensis Maxim Extract ) を 2000 mg/kg の用量で雌のラットに単回経口投与した。その結果、5/5 例が自発運動低下を、1/5 例が流涎を示したがいずれの症状も一過性であった。観察期間中、順調な体重推移を示し、死亡例は認められなかった。また、観察期間終了時における解剖では、全ての動物で検索した器官、組織に異常は認められなかった。

以上の結果から、本試験条件下における細葉山紫蘇抽出液 ( Mosla Chinensis Maxim Extract ) 商品名：紫蘇源のラットに対する急性経口毒性は弱く、最小致死量は 2000 mg/kg を超える用量であると判断された。

17. 試験関係資料の保管

本試験の下記資料は安評センターにて農薬の登録取得後15年間保管する。その後の保管については試験委託者と安評センターで協議の上別途定める。

- 試験計画書 (正本)
- 被験物質に関する記録
- 動物および施設に関する記録
- 試験期間中に発生する生データ一式
- 最終報告書 (正本)

18. 予見することができなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態および試験計画書に従わなかつたこと

標準操作手順書に記載されている飼育室内の空気差圧の基準値が 1.5 mmH<sub>2</sub>O 以上であるのに対し 0.9~1.4 mmH<sub>2</sub>O の低値が、3 日間に認められた。これらはいずれも軽微な変化であり、試験に影響はないと判断された。

Table I. Mortality

Sex	Dose level (mg/kg)	Number of animals	Number of deaths on the day			Mortality (%)
			I	3 - 7	8 - 14	
Female	2000	5	0	0	0	0



Table 2. Clinical observation

Sex :	Female	Dose level : 2000 mg/kg						Number of animals : 5													
Signs	Hours						Days														
	0*	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
normal behavior	0	0	4	5	5	5	5	5	5	5	-	-	5	5	5	5	5	-	-	5	5
hypoactivity	5	5	5	1																	
mouth																					
salivation	1																				
dead																					
number of affected animals :	5																				
* : just after administration																					
- : not examined																					
number of recovered animals :	5																				
mortality :	0																				

Table 3. Body weight

Sex : Female					( unit : g )
Dose level (mg/kg)	Animal ID-No.	Days after administration			14
		0*	7	14	
2000	2101	123	140	152	
	2102	129	150	166	
	2103	128	141	154	
	2104	123	148	158	
	2105	125	143	153	
	mean ± S.D.	126 ± 3	144 ± 4	157 ± 6	

\* : just before administration

Table 4. Gross finding

Sex : Female		Dose level : 2000 mg/kg		Findings and comments
Animal ID-No.	Classification	Days after administration	Organ	
2101	sacrificed	14		no abnormality observed
2102	sacrificed	14		no abnormality observed
2103	sacrificed	14		no abnormality observed
2104	sacrificed	14		no abnormality observed
2105	sacrificed	14		no abnormality observed

製品安全データシート

チモール

作成日 2009年3月30日

改訂日

1. 化学物質等及び会社情報

化学物質等の名称	チモール、(Thymol)
製品コード	20A2147
会社名	〇〇〇株式会社
住所	東京都△△区△△町△丁目△△番地
電話番号	03-1234-5678
緊急時の電話番号	03-1234-5678
FAX番号	03-1234-5678
メールアドレス	
推奨用途及び使用上の制限	駆虫薬 抗細菌薬 殺菌薬 歯科用薬、香料、フレーバーの原料成分、ラベンダーの香気成分

2. 危険有害性の要約

GHS分類

分類実施日 H21.3.27、政府向けGHS分類ガイダンス(H20.9.5版)を使用

物理化学的危険性

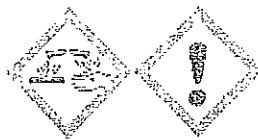
火薬類	分類対象外
可燃性・引火性ガス	分類対象外
可燃性・引火性エアゾール	分類対象外
支燃性・酸化性ガス類	分類対象外
高圧ガス	分類対象外
引火性液体	分類対象外
可燃性固体	分類できない
自己反応性化学品	分類対象外
自然発火性液体	分類対象外
自然発火性固体	区分外
自己発熱性化学品	分類できない
水反応可燃性化学品	分類対象外
酸化性液体	分類対象外
酸化性固体	分類対象外
有機過酸化物	分類対象外
金属腐食性物質	分類できない
急性毒性(経口)	区分4
急性毒性(経皮)	区分外
急性毒性(吸入:ガス)	分類対象外
急性毒性(吸入:蒸気)	分類できない
急性毒性(吸入:粉じん)	分類できない
急性毒性(吸入:ミスト)	分類対象外
皮膚腐食性・刺激性	区分1
眼に対する重篤な損傷・眼刺激性	区分1
呼吸器感作性	分類できない
皮膚感作性	分類できない
生殖細胞変異原性	区分外
発がん性	分類できない
生殖毒性	分類できない
特定標的臓器・全身毒性(単回ばく露)	分類できない
特定標的臓器・全身毒性(反復ばく露)	分類できない
吸引性呼吸器有害性	分類できない
水生環境急性有害性	区分2
水生環境慢性有害性	区分外

健康に対する有害性

環境に対する有害性

ラベル要素

絵表示又はシンボル



注意喚起語  
危険有害性情報

危険  
飲み込むと有害  
重篤な皮膚の薬傷・眼の損傷  
重篤な眼の損傷  
水生生物に毒性

注意書き

**【安全対策】**  
 取扱い後はよく手を洗うこと。  
 この製品を使用する時に、飲食又は喫煙をしないこと。  
 粉じん、蒸気、ヒューム、スプレーを吸入しないこと。  
 適切な保護手袋、保護衣を着用すること。  
 適切な保護眼鏡、保護面を着用すること。  
 環境への放出を避けること。

**【応急措置】**  
 飲み込んだ場合、気分が悪い時は、医師に連絡すること。  
 飲み込んだ場合、口をすすぐこと。  
 飲み込んだ場合、口をすすぐこと。無理に吐かせないこと。  
 皮膚又は毛に付着した場合、直ちに、汚染された衣類をすべて脱ぎ又は取り除くこと。皮膚を流水又はシャワーで洗うこと。  
 汚染された衣類を再使用する前に洗濯すること。  
 吸入した場合、被災者を新鮮な空気のある場所へ移動し、呼吸しやすい姿勢で休息させること。  
 皮膚に付着した場合、眼に入った場合、飲み込んだ場合、吸入した場合は、直ちに医師に連絡すること。  
 眼に入った場合、水で数分間注意深く洗うこと。次に、コンタクトレンズを着用していて容易に外せる場合は外すこと。その後も洗浄を続けること。

**【保管】**  
 施錠して保管すること。

**【廃棄】**  
 内容物、容器を都道府県知事の許可を受けた専門の廃棄物処理業者に業務委託すること。

国・地域情報

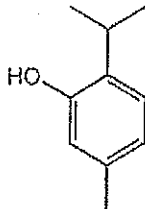
3. 組成及び成分情報

化学物質

化学名又は一般名  
別名

チモール  
 5-メチル-2-プロパン-2-イルフェノール、(5-Methyl-2-propan-2-ylphenol)、5-メチル-2-イソプロピルフェノール (5-Methyl-2-isopropylphenol)、3-ヒドロキシ-p-シメン (3-Hydroxy-p-cymene)、チムカンファー (Thyme camphor)  
 C10H14O(150.22)

分子式 (分子量)  
化学特性 (示性式又は構造式)



CAS番号  
 官報公示整理番号(化審法・安衛法)  
 分類に寄与する不純物及び安定化添加物  
 濃度又は濃度範囲

89-83-8  
 (3)-521  
 データなし  
 100%

4. 応急措置

吸入した場合

被災者を新鮮な空気のある場所へ移動し、呼吸しやすい姿勢で休息させること。  
 直ちに医師に連絡すること。

皮膚に付着した場合

直ちに、汚染された衣類をすべて脱ぐこと、又は取り去ること。

	皮膚を流水またはシャワーで洗うこと。 汚染された衣類を再使用する前に洗濯すること。 直ちに医師に連絡すること。
目に入った場合	水で数分間注意深く洗うこと。次に、コンタクトレンズを着用している場合、容易に外せる場合は外すこと。その後も洗浄を続けること。 直ちに医師に連絡すること。
飲み込んだ場合	口をすすぐこと。無理に吐かせないこと。 直ちに医師に連絡すること。
予想される急性症状及び遅発性症状	データなし
最も重要な兆候及び症状	データなし
応急措置をする者の保護	データなし
医師に対する特別注意事項	データなし

5. 火災時の措置

消火剤	水噴霧、泡消火剤、粉末消火剤、炭酸ガス、乾燥砂類
使ってはならない消火剤	棒状放水
特有の危険有害性	熱、火花及び火炎で発火するおそれがある。 激しく加熱すると燃焼する。 火災時に刺激性、腐食性及び毒性のガスを発生するおそれがある。
特有の消火方法	危険でなければ火災区域から容器を移動する。 安全に対処できるならば着火源を除去すること。
消火を行う者の保護	適切な空気呼吸器、防護服(耐熱性)を着用する。

6. 漏出時の措置

人体に対する注意事項、保護具および緊急措置	全ての着火源を取り除く。  直ちに、全ての方向に適切な距離を漏洩区域として隔離する。 関係者以外の立入りを禁止する。 密閉された場所に立入る前に換気する。 環境中に放出してはならない。
環境に対する注意事項	漏洩物を掃き集めて空容器に回収し、後で廃棄処理する。
回収・中和	水で湿らせ、空気中のダストを減らし分散を防ぐ。
封じ込め及び浄化方法・機材	すべての発火源を速やかに取除く(近傍での喫煙、火花や火炎の禁止)。
二次災害の防止策	プラスチックシートで覆いをし、散乱を防ぐ。

7. 取扱い及び保管上の注意

取扱い	
技術的対策	『8. ばく露防止及び保護措置』に記載の設備対策を行い、保護具を着用する。
局所排気・全体換気	『8. ばく露防止及び保護措置』に記載の局所排気、全体換気を行う。
安全取扱い注意事項	取扱い後はよく手を洗うこと。 この製品を使用する時に、飲食又は喫煙をしないこと。 粉じん、蒸気、ヒューム、スプレーを吸入しないこと。 飲み込まないこと。 皮膚と接触しないこと。 眼に入れないこと。 データなし
接触回避	
保管	
技術的対策	特別に技術的対策は必要としない。
混触危険物質	データなし
保管条件	酸化剤から離して保管する。 冷所、換気の良い場所で保管すること。 容器を密閉して保管すること。 施錠して保管すること。
容器包装材料	データなし

8. ばく露防止及び保護措置

管理濃度	未設定
------	-----

許容濃度 (ばく露限界値、生物学的ばく露指標)

日本産衛学会(2007年版)

ACGIH(2007年版)

設備対策

未設定

未設定

この物質を貯蔵ないし取扱う作業場には洗眼器と安全シャワーを設置すること。

作業場には全体換気装置、局所排気装置を設置すること。

保護具

呼吸器の保護具

適切な呼吸器保護具を着用すること。

手の保護具

適切な保護手袋を着用すること。

眼の保護具

適切な眼の保護具を着用すること。

皮膚及び身体の保護具

適切な保護衣を着用すること。

衛生対策

取扱い後はよく手を洗うこと。

この製品を使用する時に、飲食又は喫煙をしないこと。

## 9. 物理的及び化学的性質

物理的状态

形状

固体

色

無色

臭い

芳香

pH

6.3

融点・凝固点

51.5°C : Chapman (2008)

沸点、初留点及び沸騰範囲

233.5°C (101.3 kPa) : Ullmanns(E) (6th, 2003)

引火点

104°C (Closed cup) : IUCLID (2000)

自然発火温度

約285°C : GESTIS (access on 9. 2008)

燃焼性(固体、ガス)

データなし

爆発範囲

1.4 ~ 7.7 Vol% : GESTIS (access on 9. 2008)

蒸気圧

2.2E-3mmHg(25°C) : HSDB (2003)

蒸気密度

5.19 (dry air=1) : GESTIS (access on 9. 2008)

蒸発速度(酢酸ブチル=1)

データなし

比重(密度)

0.9756 (20.4°C) : Ullmanns(E) (6th, 2003)

0.970g/cm<sup>3</sup> (20°C) : GESTIS (access on 9. 2008)

溶解度

水 : 1g/L : Lide (88th, 2008)

メタノール、ヘキサン : 可溶 : Chapman (2008)

オクタノール・水分配係数

データなし

分解温度

データなし

粘度

データなし

粉じん爆発下限温度

データなし

最小発火エネルギー

データなし

体積抵抗率(導電率)

データなし

## 10. 安定性及び反応性

安定性

法規制に従った保管及び取扱においては安定と考えられる

危険有害反応可能性

データなし

避けるべき条件

データなし

混触危険物質

データなし

危険有害な分解生成物

データなし

## 11. 有害性情報

急性毒性

経口

ラットにおいてLD50=980 mg/kg (IUCLID(2000))であり、EU分類においてXn; R22に定められていることから区分4とした。

経皮

ラットにおいて2000 mg/kgの濃度における死亡例が10匹中0匹であった (IUCLID(2000))ことから区分外とした。

吸入

吸入(ガス) : GHSの定義における固体である。

吸入(蒸気) : データなし

吸入(粉じん) : データなし

皮膚腐食性・刺激性

ウサギの試験(OECD TG 404)において腐食性(Corrosive)とされ(IUCLID, 2000)、さらにEU分類がC; R34であることより区分1とした。

眼に対する重篤な損傷・刺激性

ウサギの試験(OECD TG 405)において重度の刺激性(Highly irritating)を示したこと(IUCLID, 2000)、および皮膚腐食性が区分1であることから区分1とした。

呼吸器感作性又は皮膚感作性

呼吸器感作性: データなし

皮膚感作性: ヒトにおけるパッチテストにおいて皮膚感作性を示したが、それぞれ、1/4および1/18程度であったとのデータがあるが(IUCLID(2000))他に情報がなく分類できない。

生殖細胞変異原性

マウスの骨髄細胞を用いた小核試験(OECDガイドライン474)(体細胞in vivo変異原性試験)において陰性であることから(厚労省報告, access on 9. 2008)区分外とした。なお, in vitro変異原性試験としてエームス試験において陰性、CHL細胞を用いた染色体異常試験において陽性を示している(厚労省報告, access on 9. 2008)。

発がん性

データなし

生殖毒性

ラットの経口投与試験(OECD TG422)において、親動物の性周期、交尾率、受胎率、妊娠期間、黄体数、着床数、出産率に対照群との有意差は見られず、仔動物では高い濃度において体重増加抑制が見られているが、出産児数、性比、出生率、および新生仔生存率に有意差は認められず、催奇形性を示唆する変化も見られていない(厚労省報告 (access on 9. 2008))。しかし、仔の発生毒性の情報が十分ではないことからデータ不足で分類できないとした。

特定標的臓器・全身毒性(単回ばく露)

データなし

特定標的臓器・全身毒性(反復ばく露)

ラットの強制経口投与試験(OECD TG422)(用量: 8, 40, 200 mg/kg/day; 雄: 43日間, 雌: 交配前14日から授乳期3日まで)において40 mg/kg/day以上の用量で雌雄ともに前胃において粘膜炎形成、炎症性細胞浸潤および浮腫が見られている(厚労省報告 (access on 9. 2008))。しかしこれらの所見は被験物質による刺激性によるものと推察され、ガイダンスの区分2を超える200 mg/kg/dayの用量において、雄で体重抑制および1匹の死亡例が確認され、雌で自発運動減少および歩行失調が確認されているだけで他に影響は認められていない。また、ラットの混餌による18週間経口投与試験(用量: 1000, 10000 ppm/kg (ca. 75, 750 mg/kg/day))においてガイダンスの区分2の750mg/kgの用量まで影響はみとめられていないことより(IUCLID(2000))区分外(経口)に相当するが他経路の情報がなく分類できないとした。

吸引性呼吸器有害性

データなし

## 12. 環境影響情報

水生環境急性有害性

甲殻類(オオミジンコ)の48時間EC50が4.5 mg/L(環境省生態影響試験, 2004)から区分2とした。

水生環境慢性有害性

急性毒性区分2であり、急速分解性が無い(難分解性、BODによる分解度: 0%(既存化学物質安全性点検データ, 1996))が、藻類(Pseudokirchneriella subcapitata)の72時間NOEC = 1.9 mg/L(環境省生態影響試験, 2004)であることから、区分外とした。

## 13. 廃棄上の注意

残余廃棄物

廃棄の前に、可能な限り無害化、安定化及び中和等の処理を行って危険有害性のレベルを低い状態にする。

汚染容器及び包装

廃棄においては、関連法規並びに地方自治体の基準に従うこと。容器は洗浄してリサイクルするか、関連法規並びに地方自治体の基準に従って適切な処分を行う。

空容器を廃棄する場合は、内容物を完全に除去すること。

## 14. 輸送上の注意

国際規制

海上規制情報

該当しない

航空規制情報

該当しない

UN No.

該当しない

国内規制

陸上規制情報

該当しない

海上規制情報

該当しない

航空規制情報

該当しない

特別安全対策

移送時にイエローカードの保持が必要。

食品や飼料と一緒に輸送してはならない。



輸送に際しては、直射日光を避け、容器の破損、腐食、漏れのないように積み込み、荷崩れの防止を確実に行う。  
重量物を上積みしない。

緊急時応急措置指針番号

15. 適用法令

16. その他の情報

参考文献

各データ毎に記載した。

---

—最終報告書—

表 題 : 細葉山紫蘇抽出液 (Mosla Chinensis Maxim Extract) の細菌を用いる  
復帰突然変異試験

試験番号 : SBL42-90

試験責任者 : [REDACTED]

署名 [REDACTED]

当該資料は原本を正確に複製した  
ものであり、原本と相違ないことを  
保証いたします。

株式会社新日本科学 安全性研究所

試験責任者 [REDACTED]

日付 2004 年 11 月 24 日

2004 年 11 月 24 日

株式会社新日本科学 安全性研究所

本報告書は表紙を含む 23 ページ

陳 述 書

表 題 : 細葉山紫蘇抽出液 (Mosla Chinensis Maxim Extract) の細菌を用いる  
復帰突然変異試験

試験番号 : SBL42-90

本試験は、農薬 GLP 基準「農薬の毒性に関する試験の適正実施に係る基準」(平成 11 年 10 月 1 日 11 農産第 6283 号農林水産省農産園芸局長通知, 平成 14 年 12 月 27 日 14 生産第 7739 号最終改正) を遵守して実施した。また、「農薬の登録申請時に提出される試験成績の作成に係る指針」(平成 12 年 11 月 24 日 12 農産第 8147 号農林水産省農産園芸局長通知, 平成 14 年 12 月 10 日 14 生産第 7269 号一部改正) に準拠して実施したものに相違ありません。

試験責任者

株式会社新日本科学 安全性研究所

[Redacted]

署名

[Redacted Signature]

2004 年 11 月 24 日

## 目 次

	頁
1. 試験責任者, その他の試験に従事した研究者全員の氏名及び業務分担	4
2. 記録及び資料の保管	4
3. 試験の種類及び目的	5
4. GLP の適用及び準拠したガイドライン	5
5. 試験委託者及び所在地	5
6. 試験施設名及び所在地	5
7. 試験日程	5
8. 要約	6
9. 材料及び方法	7
9.1 被験物質及び対照物質	7
9.1.1 被験物質	7
9.1.2 媒体 (陰性対照物質)	7
9.1.3 陽性対照物質	7
9.1.3.1 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF-2)	7
9.1.3.2 Sodium azide (NaN <sub>3</sub> )	8
9.1.3.3 9-Aminoacridine hydrochloride hydrate (9AA)	8
9.1.3.4 2-Aminoanthracene (2AA)	8
9.2 被験物質及び対照物質の調製	8
9.2.1 被験物質	8
9.2.2 陽性対照物質	8
9.3 試験系 (菌株)	9
9.4 代謝活性化系	9
9.4.1 S9	9
9.4.2 S9 mix の調製	10
9.5 培地	10
9.5.1 前培養液	10
9.5.2 最少グルコース寒天平板培地	10
9.5.3 トップアガー	11
9.6 群構成及び用量の設定	11
9.6.1 用量設定試験	11
9.6.2 用量設定再試験	12
9.7 用量設定	12
9.8 試験操作	12
9.8.1 菌の前培養	12

9.8.2	試験培養	13
9.8.3	無菌試験	13
9.8.4	生育阻害の分類, 被験物質の析出の観察及び復帰変異コロニー数の測定	13
9.9	結果の判定	14
9.9.1	結果の判定基準	14
9.9.2	統計学的手法	14
9.9.3	比活性	14
9.10	予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと	14
10.	結果	15
10.1	試験成立の判定	15
10.2	無菌試験	15
10.3	用量設定試験	15
10.3.1	被験物質の析出	15
10.3.2	菌株に対する生育阻害	15
10.4	用量設定再試験	15
10.4.1	被験物質の析出	15
10.4.2	菌株に対する生育阻害	15
10.4.3	復帰変異コロニー数の測定	15
10.5	本試験	16
10.5.1	被験物質の析出	16
10.5.2	菌株に対する生育阻害	16
10.5.3	復帰変異コロニー数の測定	16
11.	考察	17
12.	文献	18
表	1 用量設定再試験結果表	19
	2 本試験結果表	20
図	1 用量設定再試験結果 (代謝活性化を用いない系)	21
	2 用量設定再試験結果 (代謝活性化を用いる系)	21
	3 本試験結果 (代謝活性化を用いない系)	22
	4 本試験結果 (代謝活性化を用いる系)	22
別紙	1 CONTROL BACKGROUND DATA	23

1. 試験責任者, その他の試験に従事した研究者全員の氏名及び業務分担  
試験責任者 : 安全性研究グループ7 西郷和彦  
被験物質取扱い責任者 : 被験物質管理グループ 瀬戸山孔三郎  
被験物質及び対照物質の調製 : 安全性研究グループ7 大坪靖治  
復帰突然変異試験 : 安全性研究グループ7 大坪靖治, 小野友里子

2. 記録及び資料の保管

記録及び資料については, 以下の保管場所に農薬の登録取得後 15 年間保管する.

株式会社新日本科学 安全性研究所 データ資料室

試験計画書及び試験計画書変更書

試験スケジュール

被験物質及び対照物質に関する記録, 資料

試験系に関する記録, 資料

培地調製記録

S9 mix の調製記録

復帰変異試験操作記録

コロニーカウント記録

最終報告書草案

最終報告書

その他, GLP に関する全ての資料

3. 試験の種類及び目的

本試験は、細葉山紫蘇抽出液 (Mosla Chinensis Maxim Extract) の遺伝子突然変異誘発性を評価することを目的とし、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。

4. GLP の適用及び準拠したガイドライン

本試験は、農薬 GLP 基準「農薬の毒性に関する試験の適正実施に係る基準」(平成 11 年 10 月 1 日 11 農産第 6283 号農林水産省農産園芸局長通知, 平成 14 年 12 月 27 日 14 生産第 7739 号最終改正) を遵守し、「農薬の登録申請時に提出される試験成績の作成に係る指針」(平成 12 年 11 月 24 日 12 農産第 8147 号農林水産省農産園芸局長通知, 平成 14 年 12 月 10 日 14 生産第 7269 号一部改正) に準拠して実施した。

5. 試験委託者及び所在地

臼田 禎喜

〒179-0074 東京都練馬区春日町 2-16-4

TEL : 03-3990-0117

6. 試験施設名及び所在地

株式会社新日本科学 安全性研究所

〒891-1394 鹿児島県鹿児島市宮之浦町 2438 番地

TEL : 099-294-2600

FAX : 099-294-3619

7. 試験日程

試験開始日 : 2004 年 9 月 14 日

実験開始日 : 2004 年 9 月 21 日

実験完了日 : 2004 年 10 月 21 日

試験完了日 : 2004 年 11 月 24 日

## 8. 要約

細葉山紫蘇抽出液 (Mosla Chinensis Maxim Extract) の遺伝子突然変異誘発性を評価するため、細菌を用いる復帰突然変異試験を *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 及び *Escherichia coli* WP2uvrA の 5 菌株を用いてプレインキュベーション法により実施した。

用量設定試験、用量設定再試験及び本試験を以下の用量で行った。

用量設定試験：代謝活性化を用いない系及び用いる系

5, 10, 20, 40, 60, 80 及び 100  $\mu\text{L}/\text{plate}$  (全菌株)

用量設定試験の結果、5  $\mu\text{L}/\text{plate}$  まで菌株に対する生育阻害がみられたため、用量を変更して用量設定再試験を実施した。

用量設定再試験：代謝活性化を用いない系及び用いる系

0.001, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3 及び 1  $\mu\text{L}/\text{plate}$  (全菌株)

本試験：

代謝活性化を用いない系

0.016, 0.031, 0.063, 0.125, 0.25, 0.5 及び 1  $\mu\text{L}/\text{plate}$  (全菌株)

代謝活性化を用いる系

0.063, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 及び 4  $\mu\text{L}/\text{plate}$  (全菌株)

- 1) 用量設定再試験及び本試験ともに、代謝活性化系の有無にかかわらず、陰性対照の 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加はみられなかった。
- 2) 菌株に対する生育阻害は、代謝活性化を用いない系では TA98 及び TA100 の 0.3  $\mu\text{L}/\text{plate}$  以上, TA1535 及び TA1537 の 0.25  $\mu\text{L}/\text{plate}$  以上, WP2uvrA の 1  $\mu\text{L}/\text{plate}$  以上, 代謝活性化を用いる系では全菌株の 1  $\mu\text{L}/\text{plate}$  以上でみられた。
- 3) 被験物質の析出は、代謝活性化系の有無にかかわらず、100  $\mu\text{L}/\text{plate}$  まで認められなかった。

以上の結果から、本試験条件下では、細葉山紫蘇抽出液 (Mosla Chinensis Maxim Extract) は代謝活性化系の有無にかかわらず、遺伝子突然変異誘発性を示さないと結論した。



## 9. 材料及び方法

## 9.1 被験物質及び対照物質

## 9.1.1 被験物質

名称 : 細葉山紫蘇抽出液 (Mosla Chinensis Maxim Extract)  
 提供者 : 白田禎喜  
 ロット番号 : 00C-160517  
 純度 : 100%として換算  
 組成 : 主成分チモールを 6.2%含む液体  
 安定性 : 5年間安定  
 受領日 : 2004年9月8日  
 入手日 : 2004年9月16日  
 入手量 : 40 mL  
 保管条件 : 室温  
 保管場所 : 被験物質保管所内常温室  
           [入手日～返却日 (2004年9月16日～2004年11月8日) :  
           温度 18.0～23.1℃, 許容範囲 16～24℃]  
 取り扱い : マスク, キャップ及び手袋を着用した.  
 残余被験物質の処理 : 全て試験委託者に返却した.

## 9.1.2 媒体 (陰性対照物質)

名称 : 注射用水  
 製造者 : 株式会社大塚製薬工場  
 ロット番号 : 4F83  
 保管条件 : 室温  
 保管場所 : 被験物質管理室室温保管室  
           [初回使用日～最終使用日 (2004年9月22日～2004年10  
           月19日) : 温度 16.7～19.9℃, 許容範囲 1～30℃]

## 9.1.3 陽性対照物質

選択理由 : 既知の変異原物質であり, 陽性対照物質として一般的に  
 使用されているため.

## 9.1.3.1 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF-2)

製造者 : 和光純薬工業株式会社  
 ロット番号 : WAP0369  
 含量, グレード : 100.2%, 特級  
 保管条件 : 室温  
 保管場所 : 第1毒劇物保管室

9.1.3.2 Sodium azide ( $\text{NaN}_3$ )

製造者 : 和光純薬工業株式会社  
 ロット番号 : ASM7324  
 純度, グレード : 99.7%, 特級  
 保管条件 : 室温  
 保管場所 : 第1毒劇物保管室

## 9.1.3.3 9-Aminoacridine hydrochloride hydrate (9AA)

製造者 : Aldrich Chemical Company, Inc.  
 ロット番号 : 16323JR  
 純度 : 99.3%  
 保管条件 : 室温  
 保管場所 : 第1毒劇物保管室

## 9.1.3.4 2-Aminoanthracene (2AA)

製造者 : 和光純薬工業株式会社  
 ロット番号 : ACJ6050  
 含量 : 95.2%  
 保管条件 : 室温  
 保管場所 : 第1毒劇物保管室

## 9.2 被験物質及び対照物質の調製

## 9.2.1 被験物質

調製方法 : 用量設定試験は原液のまま使用した。  
 用量設定再試験は, 原液 50  $\mu\text{L}$  に注射用水 4950  $\mu\text{L}$  を加え, 最高濃度液を調製した。本試験は, 原液 200  $\mu\text{L}$  に注射用水 4800  $\mu\text{L}$  を加え, 最高濃度液を調製した。以下の濃度の調製液は注射用水により順次希釈して各濃度調製液を調製した。調製は用時に行った。

調製液の安定性 : 最高濃度液が定量限界以下のため実施しなかった。  
 調製液の濃度確認 : 最高濃度液が定量限界以下のため実施しなかった。

## 9.2.2 陽性対照物質

調製方法 : 陽性対照物質は, 次頁に示す濃度に  $\text{NaN}_3$  は注射用水 (ロット番号 4C71, 株式会社大塚製薬工場), AF-2, 9AA 及び 2AA は DMSO (ロット番号 072K0028, 純度 100.0%, SIGMA-ALDRICH CO.) で溶解, 希釈調製し, 分注凍結し,

保管したものを用時に解凍して用いた。使用後の残液は廃棄した。

溶液の保管条件 : 冷凍  
 溶液の保管場所 : 微生物操作室内フリーザ付薬用保冷庫 冷凍庫  
 (MPR-213FS, 三洋電機バイオメディカ株式会社)  
 [試験開始日～最終使用日(2004年9月14日～2004年10月19日): 実測値-24.9～-19.6℃, 許容範囲-10℃以下]

#### 陽性対照調製液の濃度

菌株	代謝活性化を用いない系		代謝活性化を用いる系	
	陽性対照物質	濃度(μg/mL)	陽性対照物質	濃度(μg/mL)
TA100	AF-2	0.1	2AA	10
TA1535	NaN <sub>3</sub>	5	2AA	20
WP2uvrA	AF-2	0.2	2AA	100
TA98	AF-2	1	2AA	5
TA1537	9AA	800	2AA	20

### 9.3 試験系 (菌株)

種 : ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA98, TA100, TA1535, TA1537 の 4 菌株及び大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2uvrA の 1 菌株, 計 5 菌株を用いた<sup>1)</sup>。

選択理由 : ガイドラインで指定されているため。

入手先 : 国立医薬品食品衛生研究所

入手日 : 2001年6月29日

保管方法 : 菌懸濁液 0.8 mL に対し DMSO 0.07 mL を加え, ドライアイス・アセトンで分注凍結し, ラベルで識別した後, 超低温フリーザーで保管した。用時に解凍して使用した。

保管場所 : 変異原性試験室内超低温フリーザー (MDF-392AT, 三洋電機バイオメディカ株式会社)

[試験開始日～本試験前培養日(2004年9月14日～2004年10月18日): 実測値-87.9～-80.8℃, 許容範囲-70℃以下]

特性検査日 : 2004年4月16日

特性検査項目 : アミノ酸要求性, 膜変異 *rfa*, 薬剤耐性因子, 紫外線感受性

ロット番号 : 20040415

### 9.4 代謝活性化系

#### 9.4.1 S9

製造元 : オリエンタル酵母工業株式会社

ロット番号	: 04070904
製造年月日	: 2004年7月9日
使用動物	: フェノバルビタール (PB) と 5, 6-ベンゾフラボン (BF) で薬物代謝酵素系を誘導 (投与期間及び投与量: 1日目 PB 30 mg/kg, 2日目 PB 60 mg/kg, 3日目 PB 60 mg/kg + BF 80 mg/kg, 4日目 PB 60 mg/kg) した SD 系雄ラット (7週齢, 体重: 221.4 ± 8.0 g)
保管場所	: 変異原性試験室内超低温フリーザー (MDF-392AT, 三洋電機バイオメディカ株式会社) [試験開始日～最終使用日 (2004年9月14日～2004年10月19日): 実測値 -87.9～-80.8°C, 許容範囲 -70°C 以下]
有効期限	: 2005年1月8日

#### 9.4.2 S9 mix の調製

S9 mix 10 mL あたりの調製: Cofactor-I (ロット番号 999401, オリエンタル酵母工業株式会社) 1 バイアルに 9 mL の蒸留水を加え溶解した。ポアサイズ 0.20 μm のシリンジフィルターでろ過滅菌した後, S9 を 1 mL 加え S9 mix とした。なお, S9 mix 1 mL あたりの各成分組成を以下に示す:

[S9 mix 1 mL あたりの各成分組成]

S9	0.1 mL
MgCl <sub>2</sub>	8 μmol
KCl	33 μmol
G-6-P	5 μmol
NADPH	4 μmol
NADH	4 μmol
Na-リン酸緩衝液, pH7.4	100 μmol

#### 9.5 培地

##### 9.5.1 前培養液

2.5 w/v% ニュートリエントブロス No. 2 (ロット番号 318794, Oxoid Ltd.) を 10 mL ずつガラス製 L 字管に分注し高圧蒸気滅菌 (121°C, 20 分間) したものを用了。

##### 9.5.2 最少グルコース寒天平板培地

名称	: テスメディア® AN
製造元	: オリエンタル酵母工業株式会社
ロット番号	: ANI690HT
製造日	: 2004年8月5日

使用寒天の名称, 製造元 : 伊那寒天 BA-30A, 伊那食品工業株式会社  
 使用寒天のロット番号 : 40127  
 保管条件 : 室温, 遮光  
 保管場所 : 変異原性試験室  
 有効期限 : 製造日より6ヵ月

### 9.5.3 トップアガー

- 0.6 w/v%バクトアガー・0.5 w/v%塩化ナトリウム水溶液を調製し, 高圧蒸気滅菌した(バクトアガー; ロット番号 3345853, Difco Laboratories, 塩化ナトリウム; ロット番号 7599, 和光純薬工業株式会社).
- 0.5 mmol/L L-ヒスチジン・0.5 mmol/L D-ビオチン水溶液及び0.5 mmol/L L-トリプトファン水溶液を調製し, 0.22 µm ボトルトップフィルターでろ過滅菌した(L-ヒスチジン; ロット番号 DWR2572, 和光純薬工業株式会社, D-ビオチン; ロット番号 ASH1929, 和光純薬工業株式会社, L-トリプトファン; ロット番号 ASG2385, 和光純薬工業株式会社).
- ネズミチフス菌の場合は1. で調製した液に0.5 mmol/L L-ヒスチジン・0.5 mmol/L D-ビオチン水溶液を, 大腸菌の場合は1. で調製した液に0.5 mmol/L L-トリプトファン水溶液を容量比10:1の割合で試験の直前に混合した.
- 調製したトップアガーは試験に使用するまで約45°Cに温度設定したウォーターバス中で保管した.

## 9.6 群構成及び用量の設定

### 9.6.1 用量設定試験

本試験に用いる被験物質の用量設定のために用量設定試験を実施した.

群構成 : 陰性対照群 (媒体処理群), 被験物質群及び陽性対照群

試験菌株 : TA98, TA100, TA1535, TA1537 及び WP2uvrA

代謝活性化系 : 代謝活性化を用いない系及び用いる系で実施した.

被験物質群の用量 : 5, 10, 20, 40, 60, 80 及び 100 µL/plate

#### 陽性対照群の用量

菌株	代謝活性化を用いない系		代謝活性化を用いる系	
	陽性対照物質	用量(µg/plate)	陽性対照物質	用量(µg/plate)
TA100	AF-2	0.01	2AA	1
TA1535	NaN <sub>3</sub>	0.5	2AA	2
WP2uvrA	AF-2	0.02	2AA	10
TA98	AF-2	0.1	2AA	0.5
TA1537	9AA	80	2AA	2

## 9.6.2 用量設定再試験

用量設定試験において、5  $\mu\text{L}/\text{plate}$  まで菌株に対する生育阻害がみられたため、0.001, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3 及び 1  $\mu\text{L}/\text{plate}$  に用量を変更して用量設定再試験を実施した。なお、試験菌株、代謝活性化系及び陽性対照群の用量は、用量設定試験と同様に実施した。

## 9.7 用量設定

用量設定試験及び用量設定再試験において、代謝活性化を用いない系及び用いる系ともに、全ての用量で陰性対照の 2 倍以上、かつ用量依存的な復帰変異コロニー数の増加及び被験物質の析出はみられなかった。菌株に対する生育阻害は、代謝活性化を用いない系の TA98, TA100, TA1535 及び TA1537 の 0.3  $\mu\text{L}/\text{plate}$  以上、WP2*uvrA* の 1  $\mu\text{L}/\text{plate}$  以上、代謝活性化を用いる系の全菌株の 1  $\mu\text{L}/\text{plate}$  以上でみられた。したがって、本試験では、生育阻害の発現用量付近を最高用量として以下公比 2 で 7 段階を設定することとした。なお、本試験の群構成、試験菌株、代謝活性化系及び陽性対照群の用量は、用量設定試験と同様に実施した。

代謝活性化を用いない系：0.016, 0.031, 0.063, 0.125, 0.25, 0.5 及び 1  $\mu\text{L}/\text{plate}$

代謝活性化を用いる系：0.063, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 及び 4  $\mu\text{L}/\text{plate}$

## 9.8 試験操作

## 9.8.1 菌の前培養

- 凍結保管しておいた菌懸濁液をすばやく解凍後、前培養液 10 mL に対して菌懸濁液 20  $\mu\text{L}$  をマイクロピペットにて接種し、37°C に設定した恒温振盪培養器 (PI-301, アズワン株式会社) で 12 時間振盪培養 (往復式, 70 回/分, 振幅 2 cm) した。
- 振盪培養の終わった菌懸濁液について菌濃度が  $1 \times 10^9$  cells/mL 以上であることを分光光度計 (UV-120-02, 島津製作所, 測定波長 660 nm) で OD 値による換算で確認した。結果を以下に示す。

菌株	菌濃度 ( $\times 10^9$ cells/mL)		
	用量設定試験	用量設定再試験	本試験
TA100	2.76	2.13	1.89
TA1535	2.97	2.71	2.30
WP2 <i>uvrA</i>	3.80	3.53	3.65
TA98	3.98	3.15	3.39
TA1537	3.02	2.66	2.67

- 前培養した菌懸濁液は試験に使用するまで微生物操作室内フリーザー付薬用保冷庫 (MPR-213FS, 三洋電機バイオメディカ株式会社) に保管し、試験に使用した。

### 9.8.2 試験培養

試験はプレインキュベーション法<sup>2)</sup>を採用した。代謝活性化を用いない系及び用いる系で試験を実施した。

1. 滅菌済みの小試験管 (13 × 100 mm) に 0.1 mol/L Na-リン酸緩衝液 (pH7.4, 代謝活性化を用いない系) あるいは S9 mix (代謝活性化を用いる系) 0.5 mL 及び前培養した菌懸濁液 0.1 mL を加えた。
2. 次に、陰性対照物質、被験物質調製液または陽性対照溶液 0.1 mL を入れ、37℃ に設定したシェイキングバス (BW201, ヤマト科学株式会社) で 20 分間振盪 (往復式, 120 回/分, 振幅 2 cm) した。振盪培養終了後、保温しておいたトッパアガー 2 mL を加え、混合した後、最少グルコース寒天平板培地上に注ぎ、プレートを動かしながら一様に広げた。なお、被験物質調製液を入れる際に析出の有無を観察した。
3. 水平面上に放置し、トッパアガーが固まった後、プレートを上下転倒して 37℃ に設定したインキュベータ (恒温培養器; TVA660DA, 株式会社東洋製作所) 内で 48 時間インキュベートした。
4. 各群 2 枚のプレートを使用し、プレートには群番号をマジックペンで記入することにより識別した。同じ群番号のプレートは個別に a, b と記入し識別した。

### 9.8.3 無菌試験

使用した媒体 (陰性対照物質)、被験物質調製液及び S9 mix への雑菌の混入の有無を確認するため、媒体 (陰性対照物質)、試験に使用した最高濃度の被験物質調製液 0.1 mL あるいは S9 mix 0.5 mL にトッパアガー 2 mL を加え、混合した後、最少グルコース寒天平板培地上に注ぎ、同様に 48 時間培養した。

### 9.8.4 生育阻害の分類、被験物質の析出の観察及び復帰変異コロニー数の測定

1. 肉眼及び実体顕微鏡 (×40, SPT-40L, カートン光学株式会社) により菌の生育阻害の有無 (バックグラウンドの菌の生育状態) を、また肉眼によりプレート上の被験物質の析出の有無を観察した。なお、生育阻害は次のように分類した。
  - (-) : プレート上のバックグラウンドの菌の生育が陰性対照群と同程度のもの。
  - (\*) : プレート上のバックグラウンドの菌の生育が陰性対照群のそれと比較して明らかに阻害されているもの。
  - (\*\*) : プレート上のバックグラウンドの菌の生育が被験物質により阻害され、バックグラウンドの菌が死滅し、肉眼的に微小コロニーを認めるもの。なお、この場合は、復帰変異コロニー数を「0」とした。
  - (\*\*\*) : プレート上のバックグラウンドの菌の生育が被験物質により強く阻害され、バックグラウンドの菌が死滅し、微小コロニーも認められないもの。

2. 復帰変異コロニー数は、肉眼により測定した。ただし、陽性対照群についてはコロニーアナライザー (MODEL CA-7A MACRO SYSTEM, 東洋測器株式会社) を用いて面積補正 (測定値=補正係数×コロニー数) 実施下で1枚のプレートにつき2回の測定を実施 (約90度回転) し、その平均値を測定値とした。

## 9.9 結果の判定

### 9.9.1 結果の判定基準

結果は、被験物質群においてプレートあたりの復帰変異コロニー数 (2枚のプレートの平均値) が陰性対照の2倍以上に増加し、用量の増加とともに復帰変異コロニー数が増加を示し、かつ、用量設定試験と本試験の間に再現性が確認された場合に陽性と判定し、それ以外の場合は陰性と判定した。

### 9.9.2 統計学的手法

結果についての統計学的処理は行わなかった。

### 9.9.3 比活性

結果が陰性であったため最大比活性値は求めなかった。

## 9.10 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと

本試験では、予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったことはなかった。