

-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 :

当該資料は原本を正確に複写した
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

日付 2004 年 11 月 24 日

署名

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]

[Redacted]

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_3)	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 (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 μL に注射用水 4950 μL を加え, 最高濃度液を調製した. 本試験は, 原液 200 μL に注射用水 4800 μL 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 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 ₃	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¹⁾。

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℃, 許容範囲-70℃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 μ m 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 ₂	8 μ mol
KCl	33 μ mol
G-6-P	5 μ mol
NADPH	4 μ mol
NADH	4 μ mol
Na-リン酸緩衝液, pH7.4	100 μ mol

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℃, 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 μ m 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℃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 μ L/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(μ g/plate)	陽性対照物質	用量(μ g/plate)
TA100	AF-2	0.01	2AA	1
TA1535	NaN ₃	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 μL をマイクロピペットにて接種し、37℃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 1×10^9 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 $uvrA$	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付薬用保冷庫 冷蔵庫 (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

試験はブレインキュベーション法²⁾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。

10. 結果

10.1 試験成立の判定

陰性対照及び陽性対照の復帰変異コロニー数は、背景データの範囲内 ($\text{Mean} \pm 3\text{S.D.}$) の適切な値 (別紙 1) を示したことから、本試験は適切な条件下で実施されたと判断した。

10.2 無菌試験

用量設定試験、用量設定再試験及び本試験ともに、媒体 (陰性対照物質)、被験物質調製液及び S9 mix に雑菌の生育は認められなかった。

10.3 用量設定試験

被験物質群の用量：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)

10.3.1 被験物質の析出

代謝活性化を用いない系及び用いる系ともに、100 $\mu\text{L}/\text{plate}$ までみられなかった。

10.3.2 菌株に対する生育阻害

代謝活性化を用いない系及び用いる系ともに、5 $\mu\text{L}/\text{plate}$ までみられた。

10.4 用量設定再試験 (表 1, 図 1 及び 2)

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。

被験物質群の用量：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)

10.4.1 被験物質の析出

代謝活性化を用いない系及び用いる系ともに、1 $\mu\text{L}/\text{plate}$ までみられなかった。

10.4.2 菌株に対する生育阻害

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, WP2uvrA の 1 $\mu\text{L}/\text{plate}$, 代謝活性化を用いる系の全菌株の 1 $\mu\text{L}/\text{plate}$ でみられた。

10.4.3 復帰変異コロニー数の測定

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。

10.5 本試験 (表 2, 図 3 及び 4)

被験物質群の用量: 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)

10.5.1 被験物質の析出

代謝活性化を用いない系及び用いる系ともに, 析出はみられなかった.

10.5.2 菌株に対する生育阻害

代謝活性化を用いない系の TA98 及び TA100 の 0.5 $\mu\text{L}/\text{plate}$ 以上, TA1535 及び TA1537 の 0.25 $\mu\text{L}/\text{plate}$ 以上, WP2*uvrA* の 1 $\mu\text{L}/\text{plate}$, 代謝活性化を用いる系の全菌株の 2 $\mu\text{L}/\text{plate}$ 以上でみられた.

10.5.3 復帰変異コロニー数の測定

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.

11. 考察

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 菌株を用いてプレー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)

細葉山紫蘇抽出液 (Mosla Chinensis Maxim Extract) は、用量設定再試験及び本試験ともに、試験に用いた菌株に対して、代謝活性化系の有無にかかわらず、陰性対照と比較して復帰変異コロニー数を 2 倍以上に増加させなかったことから、細葉山紫蘇抽出液 (Mosla Chinensis Maxim Extract) の遺伝子突然変異誘発性は陰性であると判断した。また、陰性対照及び陽性対照の復帰変異コロニー数が適切な値を示したことから、試験は適切な条件下で実施されたと判断した。

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。

12. 文献

- 1) Maron DM and Ames BN. Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Research 1983; 113: 173-215.
- 2) Gatehouse D, Haworth S, Cebula T, Gocke E, Kier L, Matsushima T, et al. Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays. Mutation Research 1994; 312: 217-233.

表 1

用 量 設 定 再 試 験 結 果 表

Study No.: SBL42-90

被験物質の名称：細葉山紫蘇抽出液 (Mosla Chinensis Maxim Extract)

代謝活性化	被験物質の用量 (μ L/plate)	復 帰 変 異 数 (コロニー数/plate)					
		塩 基 対 置 換 型			フ レ ー ム シ フ ト 型		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
用いない系	陰性対照 注射用水	101, 96 (99)	8, 7 (8)	21, 19 (20)	21, 22 (22)	7, 8 (8)	
	0.001	96, 100 (98)	6, 7 (7)	14, 17 (16)	16, 21 (19)	8, 6 (7)	
	0.003	98, 92 (95)	7, 9 (8)	16, 15 (16)	14, 20 (17)	7, 10 (9)	
	0.01	94, 91 (93)	6, 6 (6)	16, 21 (19)	14, 16 (15)	6, 4 (5)	
	0.03	99, 98 (99)	8, 8 (8)	23, 24 (24)	15, 18 (17)	9, 6 (8)	
	0.1	78, 79 (79)	3, 4 (4)	20, 25 (23)	18, 20 (19)	9, 4 (7)	
	0.3	58*, 58* (58)	2*, 6* (4)	24, 19 (22)	12*, 11* (12)	1*, 1* (1)	
	1	0**, 0** (0)	0**, 0** (0)	0**, 17* (9)	0**, 0** (0)	0***, 0*** (0)	
用いる系	陰性対照 注射用水	111, 113 (112)	9, 7 (8)	18, 23 (21)	20, 28 (24)	8, 10 (9)	
	0.001	102, 104 (103)	8, 5 (7)	18, 19 (19)	23, 26 (25)	14, 9 (12)	
	0.003	127, 124 (126)	10, 8 (9)	22, 21 (22)	26, 30 (28)	7, 10 (9)	
	0.01	110, 118 (114)	10, 10 (10)	19, 23 (21)	25, 24 (25)	6, 11 (9)	
	0.03	118, 107 (113)	8, 11 (10)	22, 24 (23)	28, 22 (25)	10, 15 (13)	
	0.1	117, 109 (113)	8, 8 (8)	22, 26 (24)	38, 27 (33)	14, 14 (14)	
	0.3	120, 127 (124)	8, 9 (9)	21, 23 (22)	24, 28 (26)	13, 9 (11)	
	1	90*, 85* (88)	5*, 8* (7)	17*, 14* (16)	17*, 18* (18)	6*, 6* (6)	
陽 性 対 照	名 称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9AA	
	代謝活性化を 用いない系	用量 (μ g/plate)	0.01	0.5	0.02	0.1	80
		コロニー数/plate	364, 349 (357)	250, 312 (281)	322, 331 (327)	456, 477 (467)	501, 537 (519)
	名 称	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	代謝活性化を 用いる系	用量 (μ g/plate)	1	2	10	0.5	2
		コロニー数/plate	847, 835 (841)	154, 167 (161)	148, 183 (166)	453, 478 (466)	209, 167 (188)

(備 考)

1. () 内の数値は 2 枚のプレートの平均値

2. 陽性対照物質の名称

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

9AA: 9-Aminoacridine hydrochloride hydrate

NaN₃: Sodium azide

2AA: 2-Aminoanthracene

3. * : 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。

*** : 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。

表2

本 試 験 結 果 表

Study No.: SBL42-90

被験物質の名称: 細葉山紫蘇抽出液 (Mosla Chinensis Maxim Extract)

代謝活性化	被験物質の用量 (μ L/plate)	復 帰 変 異 数 (コロニー数/plate)					
		塩 基 対 置 換 型			フ レ ー ム シ フ ト 型		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
用いない系	陰性対照 注射用水	98, 103 (101)	10, 11 (11)	22, 16 (19)	15, 20 (18)	10, 9 (10)	
	0.016	113, 107 (110)	9, 9 (9)	25, 15 (20)	20, 23 (22)	8, 13 (11)	
	0.031	105, 102 (104)	5, 9 (7)	17, 23 (20)	18, 21 (20)	7, 8 (8)	
	0.063	106, 106 (106)	9, 12 (11)	19, 22 (21)	22, 23 (23)	6, 7 (7)	
	0.125	102, 105 (104)	12, 8 (10)	20, 25 (23)	23, 23 (23)	6, 7 (7)	
	0.25	103, 104 (104)	9*, 11* (10)	17, 17 (17)	14, 20 (17)	5*, 4* (5)	
	0.5	25*, 42* (34)	0**, 0** (0)	23, 24 (24)	6*, 6* (6)	0**, 0** (0)	
	1	0**, 0** (0)	0***, 0*** (0)	14*, 25* (20)	0**, 0** (0)	0***, 0*** (0)	
用いる系	陰性対照 注射用水	111, 106 (109)	11, 13 (12)	17, 22 (20)	21, 22 (22)	14, 12 (13)	
	0.063	118, 106 (112)	5, 8 (7)	25, 27 (26)	34, 30 (32)	15, 10 (13)	
	0.125	114, 109 (112)	10, 11 (11)	27, 31 (29)	29, 31 (30)	17, 15 (16)	
	0.25	103, 104 (104)	5, 7 (6)	24, 20 (22)	28, 26 (27)	9, 9 (9)	
	0.5	116, 113 (115)	10, 7 (9)	20, 18 (19)	33, 31 (32)	10, 14 (12)	
	1	103, 96 (100)	8, 7 (8)	25, 20 (23)	23, 27 (25)	15, 17 (16)	
	2	0**, 0** (0)	0**, 0** (0)	12*, 11* (12)	5*, 3* (4)	0**, 0** (0)	
	4	0***, 0*** (0)	0***, 0*** (0)	0**, 0** (0)	0***, 0*** (0)	0***, 0*** (0)	
陽性対照	名 称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9AA	
	代謝活性化を用いない系 用量 (μ g/plate)	0.01	0.5	0.02	0.1	80	
	コロニー数/plate	388, 401 (395)	319, 342 (331)	314, 334 (324)	432, 456 (444)	314, 375 (345)	
	名 称	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	代謝活性化を用いる系 用量 (μ g/plate)	1	2	10	0.5	2	
	コロニー数/plate	822, 788 (805)	158, 156 (157)	152, 150 (151)	486, 456 (471)	207, 179 (193)	

(備 考)

1. () 内の数値は2枚のプレートの平均値

2. 陽性対照物質の名称

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

9AA: 9-Aminoacridine hydrochloride hydrate

NaN₃: Sodium azide

2AA: 2-Aminoanthracene

3. * : 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。

*** : 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。

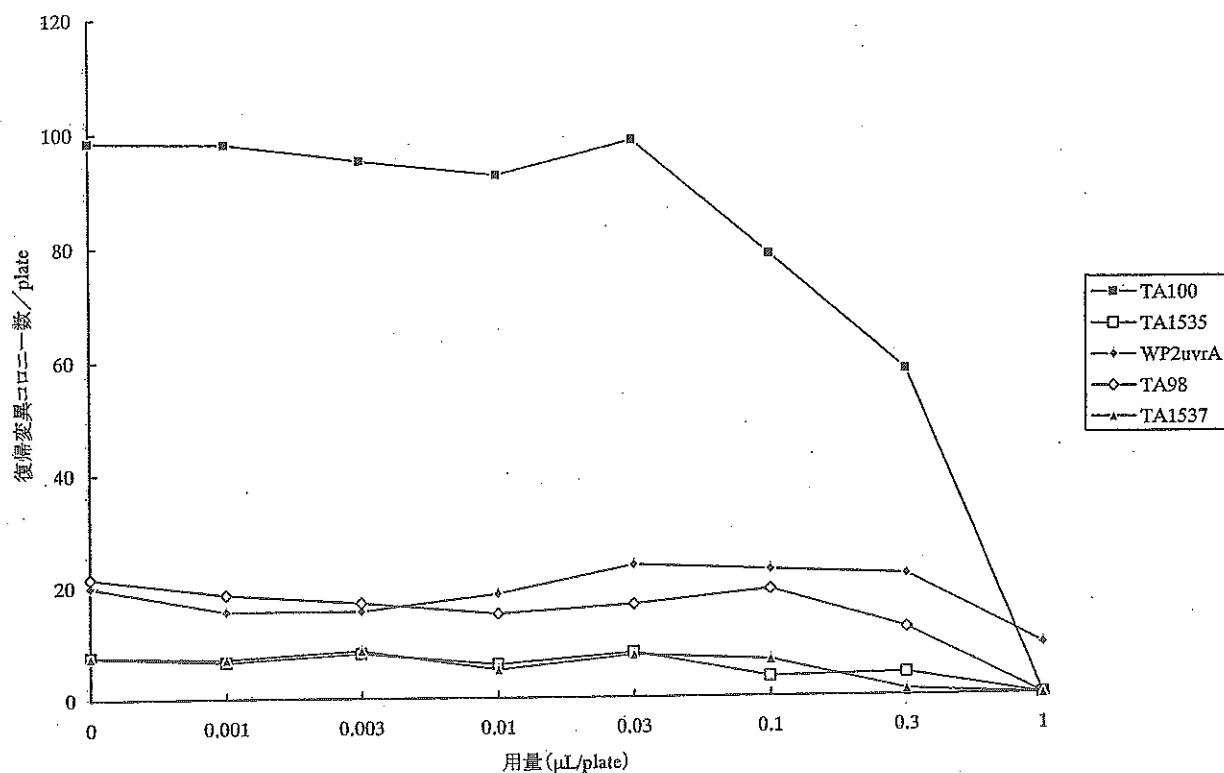


図1 用量設定再試験結果 (代謝活性化を用いない系)

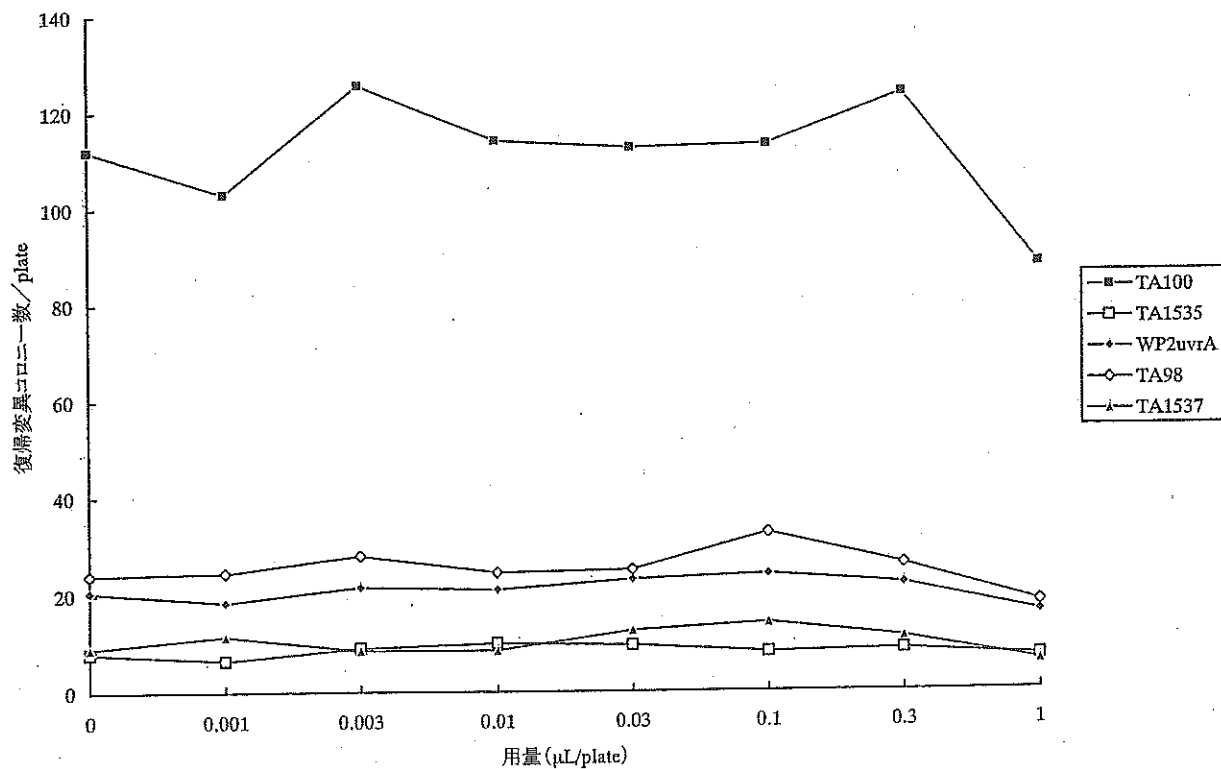


図2 用量設定再試験結果 (代謝活性化を用いる系)

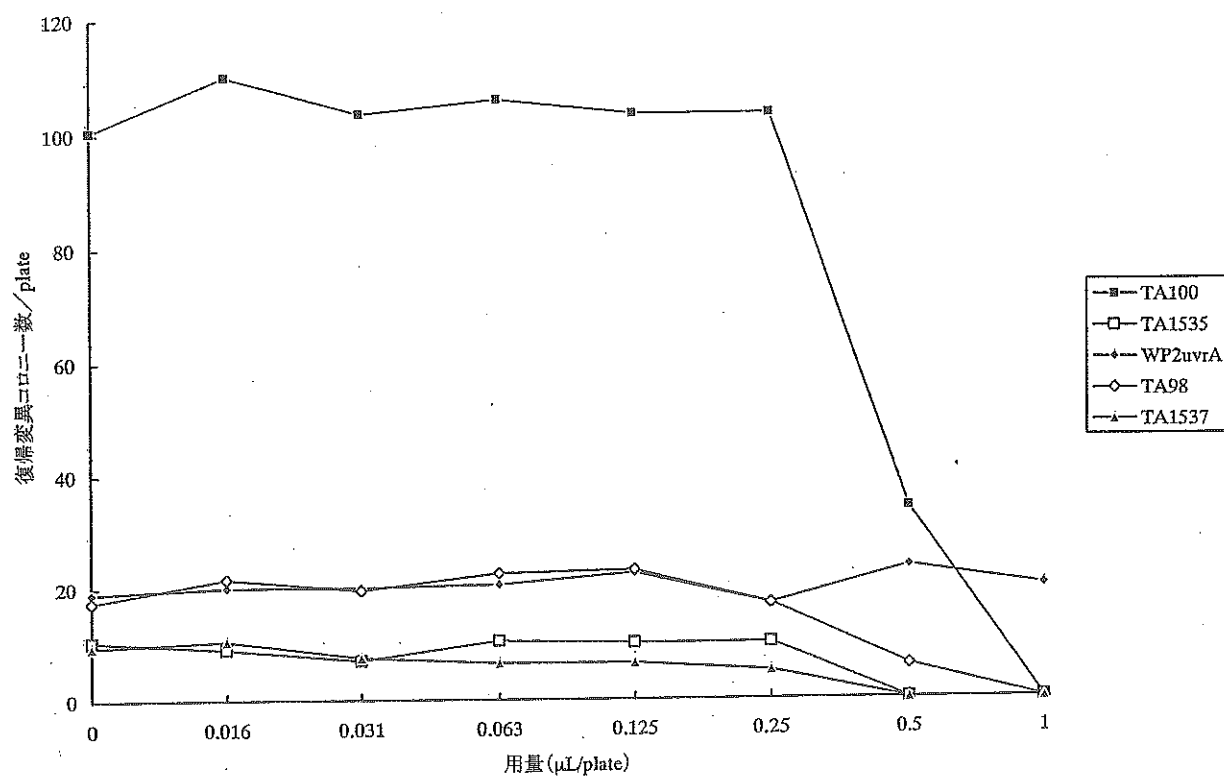


図3 本試験結果 (代謝活性化を用いない系)

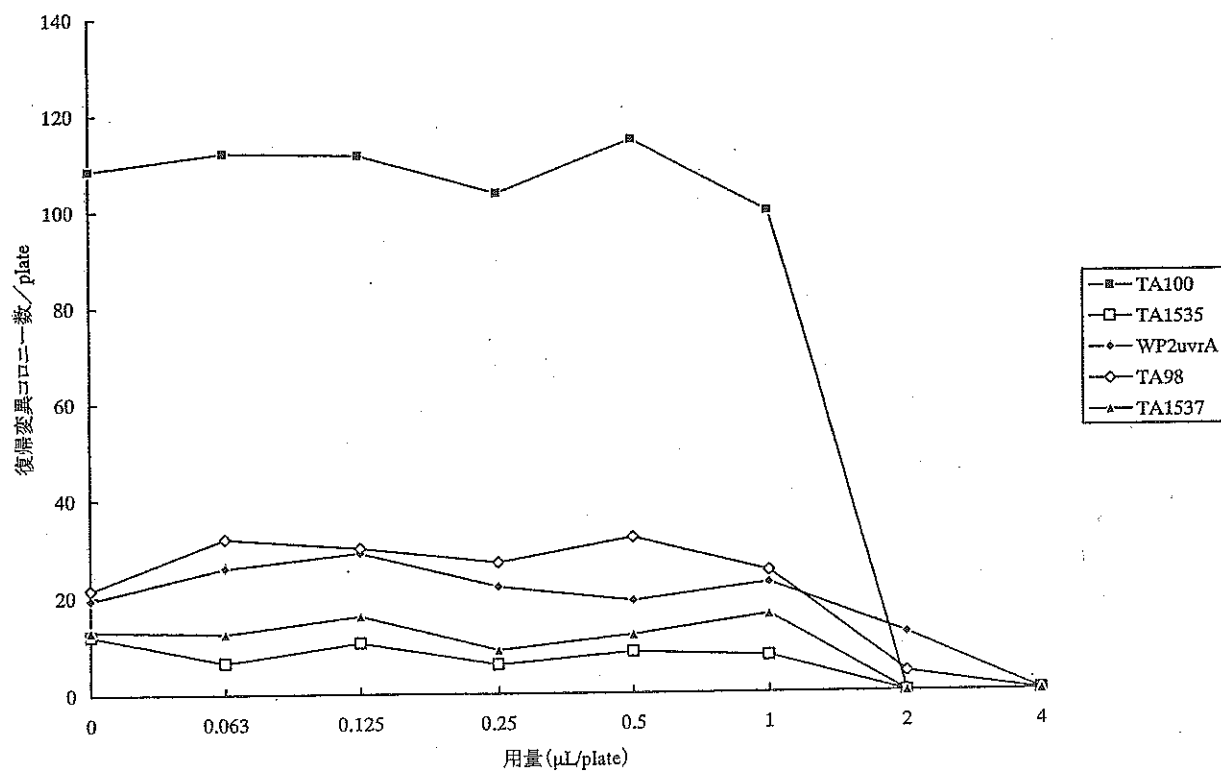


図4 本試験結果 (代謝活性化を用いる系)

CONTROL BACKGROUND DATA

Bacterial reverse mutation test (pre-incubation method)

Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd.

Drug Safety Research Laboratories

(Data collection period: January 2003 to December 2003) , n = 108

Positive control group (+S9 mix)			Mean	S.D.	Min. (-3S.D.)	Max. (+3S.D.)
Test strain	Positive control article	Dose (µg/plate)				
TA100	2AA	1	1207.1	155.7	740	1674
TA1535	2AA	2	263.8	42.1	138	390
WP2uvrA	2AA	10	274.0	86.1	51*	532
TA98	2AA	0.5	717.9	110.3	387	1049
TA1537	2AA	2	223.9	43.7	93	355
Positive control group (-S9 mix)						
Test strain	Positive control article	Dose (µg/plate)				
TA100	AF-2	0.01	439.4	53.0	280	598
TA1535	NaN ₃	0.5	384.5	58.8	208	561
WP2uvrA	AF-2	0.02	255.4	40.2	135	376
TA98	AF-2	0.1	406.9	51.7	252	562
TA1537	9AA	80	492.2	75.2	267	718
Negative control group (+S9 mix)						
TA100			111.3	13.5	71	152
TA1535			10.1	2.1	4	16
WP2uvrA			25.5	4.7	11	40
TA98			27.2	4.9	13	42
TA1537			11.3	2.7	3	19
Negative control group (-S9 mix)						
TA100			106.4	11.2	73	140
TA1535			9.7	1.9	4	15
WP2uvrA			23.9	4.1	12	36
TA98			20.3	3.3	10	30
TA1537			9.0	2.4	2	16

Negative control articles: DMSO, Water for injection, and Acetone

*: The minimum value was set at twice that of the negative control, because value was two times lower than the value of the negative control.

信頼性保証書

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) を遵守して実施され, 「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) に準拠して実施されました。また, 最終報告書は試験の方法を正確に記載され, 生データを正確に反映されたものに相違ありません。

検閲対象	検閲実施日	試験責任者 への報告日	運営管理者 への報告日
試験計画書	2004 年 9 月 14 日	2004 年 9 月 14 日	2004 年 9 月 14 日
試験スケジュール	2004 年 9 月 14 日	2004 年 9 月 14 日	2004 年 9 月 14 日
被験物質保管状態	2004 年 9 月 22 日	2004 年 9 月 22 日	2004 年 9 月 22 日
被験物質の調製	2004 年 9 月 22 日	2004 年 9 月 22 日	2004 年 9 月 22 日
被験物質の処理	2004 年 9 月 22 日	2004 年 9 月 22 日	2004 年 9 月 22 日
コロニーカウント	2004 年 9 月 24 日	2004 年 9 月 24 日	2004 年 9 月 24 日
試験計画書変更書 (No. 1)	2004 年 10 月 4 日	2004 年 10 月 4 日	2004 年 10 月 4 日
試験スケジュール	2004 年 10 月 4 日	2004 年 10 月 4 日	2004 年 10 月 4 日
被験物質の調製	2004 年 10 月 5 日	2004 年 10 月 5 日	2004 年 10 月 5 日
コロニーカウント	2004 年 10 月 7 日	2004 年 10 月 7 日	2004 年 10 月 7 日
試験計画書変更書 (No. 2)	2004 年 10 月 15 日	2004 年 10 月 15 日	2004 年 10 月 18 日
被験物質の調製	2004 年 10 月 19 日	2004 年 10 月 19 日	2004 年 10 月 19 日
試験計画書変更書 (No. 3)	2004 年 11 月 1 日	2004 年 11 月 1 日	2004 年 11 月 1 日
記録及び資料	2004 年 11 月 4 日	2004 年 11 月 4 日	2004 年 11 月 4 日
最終報告書草案	2004 年 11 月 4 日	2004 年 11 月 4 日	2004 年 11 月 4 日
最終報告書草案	2004 年 11 月 5 日	2004 年 11 月 5 日	2004 年 11 月 5 日
最終報告書草案	2004 年 11 月 24 日	2004 年 11 月 24 日	2004 年 11 月 24 日
記録及び資料	2004 年 11 月 24 日	2004 年 11 月 24 日	2004 年 11 月 24 日
最終報告書	2004 年 11 月 24 日	2004 年 11 月 24 日	2004 年 11 月 24 日

信頼性保証部門責任者

(所属) 株式会社新日本科学 安全性研究所

(氏名) [REDACTED]

署名 [REDACTED]

2004 年 11 月 24 日