

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

化学物質リスク評価における  
(定量的) 構造活性相関((Q)SAR)に関する研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 本間正充

平成21(2009)年3月

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

化学物質リスク評価における(定量的)構造活性相関  
((Q)SAR)に関する研究

平成 20 年度 総括研究報告書

研究代表者 本間正充

平成 21 (2009) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告	
化学物質リスク評価における(定量的)構造活性相関((Q)SAR)に関する研究_____	1
本間正充、林 真、江馬眞、鎌田 栄一、広瀬 明彦	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表(別添4)_____	85
III. 研究成果の刊行物・別冊_____	87

平成 20 年度厚生労働科学研究費補助金 (化学物質リスク研究事業)  
総括・分担研究報告書

化学物質リスク評価における(定量的)構造活性相関((Q)SAR)に関する研究

研究代表者	本間 正充	国立医薬品食品衛生研究所	変異遺伝部	室長
研究分担者	林 真	(財)食品農医薬品安全性評価センター		技術総括部長
研究分担者	江馬 眞	(独)産業技術総合研究所	安全科学研究部門	招聘研究員
研究分担者	鎌田 栄一	国立医薬品食品衛生研究所	総合評価研究室	主任研究官
研究分担者	広瀬 明彦	国立医薬品食品衛生研究所	総合評価研究室	室長
研究協力者	平田 睦子	国立医薬品食品衛生研究所	総合評価研究室	主任研究官
研究協力者	菅谷 芳雄	国立環境研究所	環境リスクセンター	主任研究官
研究協力者	宮地 繁樹	(財)化学物質評価研究機構	安全性評価技術研究所	主任
研究協力者	茂木 邦夫	株シーティシー・ラボラトリーシステムズ		
研究協力者	スィロイ ホセ	株富士通九州システムエンジニアリング		
研究協力者	田中 仁	(財)食品農医薬品安全性評価センター	環境毒性試験室	
研究協力者	益森 勝志	(財)食品農医薬品安全性評価センター	環境毒性試験室	
研究協力者	古屋有佳子	(財)食品農医薬品安全性評価センター	環境毒性試験室	

**研究要旨：**

化審法は 2003 年に改正が行われ、年間 1t から 10t 未満の物質(低生産量物質)については、スクリーニング毒性試験の実施は不要とされた。しかし、低生産量であってもその毒性を把握することが望ましく、また、動物愛護の観点からも動物を使用せずに毒性の強さを把握できる最良な方法が望まれ、(定量的)構造活性相関((Q)SAR)が理想的な評価手法であると考えられる。平成 15 年度より 19 年度まで実施したプロジェクトにおいて、(Q)SAR に関する基礎的研究や国際比較を実施し、国際的に使用されているいくつかの(Q)SAR モデルの中から 3 つのモデル(DEREK, MultiCase, AdmeWorks)を選択し検証を行った。化審法のスクリーニング試験の一つとして定められている AMES 試験について検討した結果、これら 3 つの(Q)SAR モデルを組み合わせることで、実試験と高い相関性を得ることに成功し、変異原性を予測するための決定樹を提案した。しかし、新規化学物質の予測を行う際には各モデルのモジュールにはアラートが無い場合があり、今年度はハフニウム及びボロンとその類似構造物質について AMES 試験を実施し、アラート作製をした。反復投与試験については、市販のモデルにはモジュールが無いことから、各モデルの開発元と協力して、反復投与毒性試験用のモジュールの開発を行うとともに、パターン分析手法を用いて個々の毒性指標に基づいた構造分類を行い、それらの情報を基に「反復投与毒性判定(Q)SAR モデル」の作成を行った。その結果、DEREK に 34 個の肝毒性アラートと 35 個の腎毒性アラートが実装され、肝毒性は 61%、腎毒性は 62%の感度が得られた。AdmeWorks については、文献情報から肝に対するモデルを作製した結果、信頼性で比較的高い値が得られた。LeadScope を用いた相補的モデルの組み合わせにより、予測精度の高い肝毒性予測モデル構築の可能性が示された。

日本では年間約 10 万種の化学物質が生産されているが、安全性が明らかであるものは非常に少ない。これらの化学物質の安全情報を得るためには毒性試験を実施する必要があるが、全ての物質について試験を実施するには多大な時間と予算が必要である。そこで、類似した化学物質を一つのカテゴリに分類し、既存の毒性情報からカテゴリ全体の毒性学的特徴を推測する手法が検討されている。本研究はこのカテゴリアプローチ手法の開発を目的とする。本年度は、Japan チャレンジプログラムの候補物質の 2-sec ブルフェノールについてカテゴリアプローチを行い、ヒト毒性以外のカテゴリ化が可能である事が示唆され、更にコンソシアム提案の 22 のカテゴリについて検討した。

既存化学物質の安全性評価をする際に、現在得られている毒性情報から、または、情報が得られない場合には(Q)SAR で安全性予測し、複数の化学物質をカテゴリとして一括評価することが可能となることから化学物質の評価に係る時間の短縮及び費用の軽減が可能であり、動物愛護の面からも有益な手法となる事が期待できる。



## A. 研究目的

昭和48年10月16日に「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」(化審法)が制定され、平成15年に化審法改正が行われた。それに関連して、衆参両議院の経済産業委員会は化審法改正に対する付帯決議で「既存化学物質の安全性点検については、・・・その有害性評価の計画的推進を図ること」と明文化された。しかし、1化合物のスクリーニング試験を実施するにあたり約1億8千～2億4千万円の費用が必要であり、時間的にも最低で半年を必要としている。未点検の既存化学物質を国内の委託ラボの総力を挙げて安全性試験を実施したとしても年間約100物質が限度である。従って、既存化学物質の全てについて試験を行うと、単純計算で200年かかることになる。

OECDの高生産量化学物質安全性点検計画(HPV)においては、生産量が多く、安全性情報が少ない既存化学物質の安全性点検を加盟各国の協力で行うもので、1993年度から3年間で154物質について安全性評価に必要な試験を各国の分担で行うことで開始された。その後、ICCA(国際化学工業協会協議会)もこの取り組みに参画し、2005年10月の時点で752の化学物質の評価を行うことを表明し、現在までに334物質しか評価が終了していない。この様に国際協力の下に既存化学物質の安全性評価済み物質を加算しても全ての物質の評価作業が終了するまでにはおぼろしい時間と費用がかかる。

この問題の解決策の一案として構造活性相関(SAR)が考慮されている。信頼されるSARモデルが開発されれば、多額の費用と時間がかかる安全性試験を行わなくても、その評価を行うことが出来る。また更に、これらのSARモデルを使用して、大量の物質数から安全性試験を実施しなければいけない物質選定も可能となる。

更に、平成15年の化審法改正により、年間1t以上10t未満の物質(低生産量物質)については、スクリーニング毒性試験の実施は不要とされ、既存の毒性情報に基づき審査が行われることとなった。しかし、この低生産量物質の申請数は、スクリーニング試験結果を行った物質を大きく上回っている。低生産量であっても、ヒト健康の上からはその毒性を把握することが望ましく、効率よく評価を行うことが期待される。また、動物愛護の観点からも動物を使用せずに毒性の強さを把握できる最適な方法として(定量的)構造活性相関((Q)SAR)が有力候補である。

本研究では主に反復投与試験について、その(Q)SARモデルの開発及び検討を行う。つまり、昨年度までの第一期の成果を踏まえて汎用性のある毒性指標についてモデルを作成し、反復投与毒性結果の為の決定樹作製を行う。AMES試験および染色体異常試験については、更なるモデルの改良を行い、個々の

(Q)SARモデルの性能を上げると共に、信頼性と汎用性の高いモデルに基づく決定樹を再構築する。これらのモデルを組み合わせるにより、化審法で求められているスクリーニング毒性情報を効率よく提供することができ、安全性に対する危機管理体制の構築に役立つ。また、既存化学物質については毒性予測をデータベース(DB)化することで実試験実施における優先順位付けの情報提供を行う。

本年度は、AMES試験及び染色体試験について諸外国の情報を考慮し、改良された決定樹を用いて、新規化学物質や既存化学物質を用いて決定樹の信頼性を検証し、評価結果が実試験結果と異なった場合には、類似物質等との比較を行い、必要に応じ実試験を行い、モデルの改良を行う。

反復投与毒性予測モデルについて、肝毒性モデルの改良を行うと共に、腎の毒性指標について種々のデータベースから試験結果を検索し、その化学構造をデータベース化し、パターン分析ソフトで分類を行い、それらの情報に基づいて(Q)SARモデルの構築または既存モデルの改良を行う。

毒性試験結果の欠落している既存化学物質について、構築された決定樹を適応し、化審法で求められている3試験に関する評価予測を行う。

AMES試験・染色体試験・反復投与試験の予測結果をデータベース化し、国が行わなければならない試験の優先順位付け資料を作成する。また、国内外の情報をもとに決定樹に更なる改良を加え、確立する決定樹を基に、予備的なヒト健康影響への危機管理体制の構築を目指す。また、本決定樹や改良された個々の(Q)SARモデルについて、OECDの(Q)SARワーキンググループへ報告するとともに国際協力体制を構築する。

カテゴリーアプローチにおける(Q)SARモデルの応用について、各国の状況を調査すると共に、種々の化合物についてマトリックスを作製し、データギャップを補完する最適な(Q)SARモデルの検討を行う。

## B. 研究方法

### 1. AMES-(Q)SARモデルの信頼性向上の為の試験研究

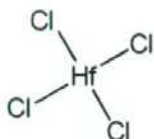
#### 1.1. 目的

現在、化審法で届けられる化合物について、本プロジェクトで提案を行っているAMES試験結果予測決定樹を用いてAMES試験結果を予測しているが、新規化学物質であることから予測精度の上でアラートまたはToxicophoreを作製する上で資料が無いが不足している。このことから本年度はハフニウム及びポロンとその類似構造物質について、AMES試験を実施した。

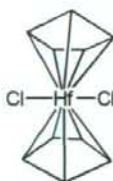
## 1.2. 方法

### 1.2.1. 被験物質

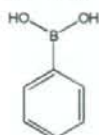
a. Hafnium(IV) chloride [CAS No. 13499-05-3]  
(Sigma-Aldrich 製、純度 99.9%、Lot No. I5469EJ)



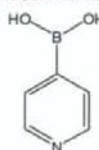
b. Hafnocene dichloride [CAS No. 12116-66-4]  
(Sigma-Aldrich 製、純度 46.6%HF (燃焼酸化後)、  
Lot No. 14408BE)



c. Phenylboronic acid [CAS No. 98-80-6]  
(Sigma-Aldrich 製、純度 100%(HPLC)、Lot No.  
1350998)



d. 4-Pyridineboronic acid [CAS No. 1692-15-5]  
(Sigma-Aldrich 製、純度 96.2% (滴定)、Lot No.  
06512DH)



### 1.2.2 試験材料および方法

#### 1.2.2.1. 試験菌株

細菌を用いる復帰突然変異試験のガイドライン  
で指定されている次の5種類の菌株を使用した。

ネズミチフス菌	TA100 株	(ヒスチジン要求性の塩基対置換型)
ネズミチフス菌	TA98 株	(ヒスチジン要求性のフレームシフト型)
ネズミチフス菌	TA1535 株	(ヒスチジン要求性の塩基対置換型)
ネズミチフス菌	TA1537 株	(ヒスチジン要求性のフレームシフト型)
大腸菌	WP2uvzA 株	(トリプトファン要求性の塩基対置換型)

ネズミチフス菌は、1983年9月6日にカリフォルニア大学 (エイムス教授) から、また、大腸菌については、1983年3月16日に国立衛生試験所 (現国立医薬品食品衛生研究所) から分与を受けたものを使用した。

各菌株の保存は次のように行った。菌懸濁液にジメチルスルホキシド (DMSO、SeccoSolv®、純度 99.5%以上、Lot No. K36323231、Merck) を容量比 80 : 7 の割合で添加した後、凍結保存用チューブに 0.2 mL ずつ分注し、これを液体窒素を用いて凍結した後、超低温フリーザー (MDF-U71V、三洋電機、設定値：-80°C、基準値：-90~-60°C) に保

存した。

2008年8月11日~同年8月14日に菌株の特性検査を実施し、規定の特性を保持していることを確認した。

#### 1.2.2.2. 培地の調製

##### 1.2.2.2.1. 最少グルコース寒天平板培地 (プレート)

テスメディア AN 培地 (オリエンタル酵母工業) を試験に使用した。本プレートは、下記組成の最少グルコース寒天培地 30 mL を無菌的にシャーレに分注したものである。

硫酸マグネシウム七水和物	0.2	g
--------------	-----	---



クエン酸一水和物	2	g
リン酸水素二カリウム	10	g
リン酸二水素アンモニウム	1.92	g
水酸化ナトリウム	0.66	g
D(+) グルコース	20	g
寒天 (BA-30A, Lot No. 80206, 伊那食品工業)	12.0	g
精製水	1000	mL

#### 1.2.2.2.2. トップアガー

0.5 w/v% 塩化ナトリウム / 0.6 w/v% 寒天 (Bacto-agar, Lot No. 6207558, BD Diagnostic Systems) 水溶液をオートクレーブで滅菌した。この寒天溶液 10 容量に、ネズミチフス菌を用いる試験の場合は、0.5 mmol/L L-ヒスチジン (関東化学) / 0.5 mmol/L D-ビオチン (関東化学) 水溶液 1 容量を加え、大腸菌を用いる試験の場合は、0.5 mmol/L L-トリプトファン (関東化学) 水溶液 1 容量を加えた。

#### 1.2.2.3. 試験菌株の前培養

内容量 200 mL のバツフル付三角フラスコに 2.5 w/v% ニュートリエントブロス (Oxoid) 培養液 25 mL を分注し、これに融解した菌懸濁液 50  $\mu$ L を接種した。フラスコをクールパスシェーカー (タイテック) に設置し、培養開始までの間、設定温度 4°C に静置した。その後、37°C の条件で 8 時間振盪 (100 回/分) 培養した。試験毎に菌株の培養を実施し、菌懸濁液は培養終了後速やかに使用された。

ATP フォトメーター (ルミテスター-C-110、キッコーマン) および ATP 測定用試薬キット (ルシフェール 250 プラス、キッコーマン) を用い、試験菌株の生菌数が  $1.0 \times 10^9$  細胞/mL 以上であることを確認した。生菌数を次の表に示す。

試験	生菌数 ( $\times 10^9$ 細胞/mL)				
	TA100	TA1535	WP2uvz4	TA98	TA1537
用量設定試験	2.75	3.62	4.56	1.86	1.38
本試験	2.94	4.33	5.91	1.94	1.23

#### 1.2.2.4. S9Mix

製造後 6 ヶ月以内の S9 mix (AMES 試験用凍結 S-9Mix、キッコーマン) を試験に使用した。使用時

まで超低温フリーザー中に保存した。

#### 1.2.2.4.3. S9Mix の組成

S9 mix 1 mL 中の量を以下に示す。

S9	0.1	mL
MgCl <sub>2</sub>	8	$\mu$ mol
KCl	33	$\mu$ mol
G-6-P	5	$\mu$ mol
NADPH	4	$\mu$ mol
NADH	4	$\mu$ mol

Na-リン酸緩衝液 (pH 7.4)

100

μmol

### 1.2.2.5. 被験物質の調整

#### a. Hafnium(IV) chloride の場合

被験物質は、水、DMSO およびアセトンに対して溶解直後、懸濁直後または 2.5 時間放置後に安定性が疑われる変化（発煙、発泡、発色、発熱のいずれか 1 つ以上）を示した。被験物質をアセトニトリルに懸濁後に発熱が認められたが、わずかであり、2.5 時間放置後、更なる発煙、発泡、発色、発熱などの変化は観察されなかった。以上のことから、被験物質をモレキュラーシーブを用いて脱水処理を行ったアセトニトリル (Lot No. ALF0842、和光純薬工業) に懸濁させた。

用量設定試験では、被験物質 400 mg を秤量し、目盛り付き試験管に移した後、アセトニトリル約 1.6 mL を加え、攪拌しながら懸濁させた。さらに、アセトニトリルを加えて 2 mL に定容し、200 mg/mL 調製原液を準備した。この 200 mg/mL 調製原液 0.8 mL をアセトニトリルを用いて 2 mL に定容することにより、80.0 mg/mL 液を調製した。以下同様に希釈を行い、32.0、12.8、5.12、2.05、0.819 および 0.328 mg/mL 液を調製した。

用量設定試験（追加試験）では、被験物質 24.0 mg を秤量し、目盛り付き試験管に移した後、アセトニトリル約 8 mL を加え、攪拌しながら溶解させた。さらにアセトニトリルを加えて 10 mL に定容し、2.40 mg/mL 調製原液を準備した。この 2.40 mg/mL 液 0.8 mL にアセトニトリルを用いて 2 mL に定容することにより、0.960 mg/mL 液を調製した。以下同様に希釈を行い、0.384、0.154、0.0614、0.0246、0.0983、0.0393、0.0157 および 0.00629 mg/mL 液を調製した。

本試験では、被験物質 400 mg を秤量し、目盛り付き試験管に移した後、アセトニトリル約 1.6 mL を加え、攪拌しながら懸濁させた。さらに、アセトニトリルを加えて 2 mL に定容し、200 mg/mL 調製原液を準備した。この 200 mg/mL 調製原液 1 mL にアセトニトリルを用いて 2 mL に定容することにより、100 mg/mL 液を調製した。以下同様に希釈を行い、50.0、25.0、12.5、6.25、3.13、1.56、0.781、0.391、0.195、0.0977、0.0488、0.0244、0.0122、0.00610 および 0.00305 mg/mL 液を調製した。

#### b. Hafnocene dichloride の場合

被験物質は水への暴露で分解する可能性があるとの情報があったが、水に可溶（試験施設データ）であり、溶解後ならびに 2 時間放置後、発煙、発泡、発色、発熱などの変化が溶液に観察されていないことから、被験物質を注射用水（日本薬局方注射用水、

大塚製薬工場）に溶解して調製した。

用量設定試験では、被験物質 25.0 mg を秤量し、小試験管に移した後、注射用水 500 μL を加え、攪拌しながら溶解し、50.0 mg/mL 調製原液を準備した。同様な作業を計 8 回繰り返して、50.0 mg/mL 調製原液を 4 mL 調製した。次いで 50.0 mg/mL 調製原液 1.6 mL を注射用水を用いて 4 mL に定容することにより 20.0 mg/mL 液を調製した。同様に希釈を行い、8.00、3.20、1.28、0.512、0.205 および 0.0819 mg/mL 液を調製した。

本試験では、被験物質 25.0 mg を秤量し、小試験管に移した後、注射用水 500 μL を加え、攪拌しながら溶解し、50.0 mg/mL 調製原液を準備した。同様な作業を計 10 回繰り返して、50.0 mg/mL 調製原液を 5 mL 調製した。次いで注射用水 2.5 mL に、この 50.0 mg/mL 調製原液 2.5 mL を加えることにより、25.0 mg/mL 液を調製した。以下同様に希釈を行い、12.5、6.25、3.13 および 1.56 mg/mL 液を調製した。

#### c. Phenylboronic acid の場合

被験物質は水に不溶で、DMSO に可溶（試験施設データ）であることから、被験物質をモレキュラーシーブを用いて脱水処理を行った。DMSO (SeccoSolv<sup>®</sup>、純度 99.5% 以上、Lot No. K36566231、Merck) に溶解された。

用量設定試験では、被験物質 250 mg を秤量し、目盛り付き試験管に移した後、DMSO 約 4 mL を加え、攪拌しながら溶解させた。さらに、DMSO を加えて 5 mL に定容し、50.0 mg/mL 調製原液を準備した。DMSO 3 mL にこの 50.0 mg/mL 調製原液 2 mL を加えることにより、20.0 mg/mL 液を調製した。以下同様に希釈を行い、8.00、3.20、1.28、0.512、0.205 および 0.0819 mg/mL 液を調製した。

本試験では、被験物質 300 mg を秤量し、目盛り付き試験管に移した後、DMSO 約 5 mL を加え、攪拌しながら溶解させた。さらに DMSO を加えて 6 mL に定容し、50.0 mg/mL 調製原液を準備した。DMSO 3 mL に、この 50.0 mg/mL 調製原液 3 mL を加えることにより、25.0 mg/mL 液を調製した。以下同様に希釈を行い、12.5、6.25、3.13、1.56、0.781 および 0.391 mg/mL 液を調製した。

#### d. 4-Pyridineboronic acid の場合



被験物質は水および DMSO に不溶（試験施設データ）であるが、水における懸濁性が良好（試験施設データ）であることから、被験物質を注射用水（日本薬局方注射用水、大塚製薬工場）に懸濁させた。

用量設定試験では、被験物質 250 mg を秤量し、目盛り付き試験管に移した後、注射用水約 4 mL を加え、攪拌しながら懸濁させた。さらに、注射用水を加えて 5 mL に定容し、50.0 mg/mL 調製原液を準備した。注射用水 3 mL に、この 50.0 mg/mL 調製原液 2 mL を加えることにより、20.0 mg/mL 液を調製した。以下同様に希釈を行い、8.00、3.20、1.28、0.512、0.205 および 0.0819 mg/mL 液を調製した。

本試験では、被験物質 250 mg を精密に秤量し、目盛り付き試験管に移した後、注射用水約 4 mL を加え、攪拌しながら懸濁させた。さらに注射用水を加えて 5 mL に定容し、50.0 mg/mL 調製原液を準備した。注射用水 2.5 mL に、この 50.0 mg/mL 調製原液 2.5 mL を加えることにより、25.0 mg/mL 液を調製した。以下同様に希釈を行い、12.5、6.25、3.13 および 1.56 mg/mL 液を調製した。

## 1.2.2.6. 対照群

### 1.2.2.6.1. 陰性対照

Hafnium(IV) chloride に用いた溶媒にはアセトニトリルを、Hafnocene dichloride には注射用水を、Phenylboronic acid には DMSO、4-Pyridineboronic acid には注射用水を使用した。

### 1.2.2.6.2. 陽性対照

予め安評センターで調製された以下に示す陽性対照物質溶液を試験に使用した。AF-2、9-AA および 2-AA 溶液は、DMSO（純度 99.5%以上、Lot No. K36566231、Merck）を用いて調製され、NaN<sub>3</sub> 溶液は、注射用水（日本薬局方注射用水、Lot No. 8A86N、大塚製薬工場）を用いて調製した。各調製液を 0.5 mL ずつ分注した後、凍結（設定値：-80°C、基準値：-90~-60°C）保存したものを試験に用いた。（使用期限：2010年2月9日）

AF-2 :	2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド (含量 98.3%, 和光純薬工業)
NaN <sub>3</sub> :	アジ化ナトリウム (純度 99.5%, 和光純薬工業)
9-AA :	9-アミノアクリジン塩酸塩 (純度 99.3%, Sigma-Aldrich)
2-AA :	2-アミノアントラセン (含量 95.0%, 和光純薬工業)

### 《代謝活性化系非存在下：-S9 処理》

菌株	陽性対照物質	陽性対照物質 溶液調製日	用量 (µg/ プレート)	陽性対照物質溶 液濃度 (µg/mL)
ネズミチフス菌 TA100	AF-2	2008.7.10	0.01	0.1
ネズミチフス菌 TA98	AF-2	2008.7.10	0.1	1.0
ネズミチフス菌 TA1535	NaN <sub>3</sub>	2008.7.10	0.5	5.0
ネズミチフス菌 TA1537	9-AA	2008.7.10	80	800
大腸菌 WP2uvrA	AF-2	2008.7.10	0.01	0.1

### 《代謝活性化系存在下：+S9 処理》

菌株	陽性対照物質	陽性対照物質 溶液調製日	用量 (µg/ プレート)	陽性対照物質溶 液濃度 (µg/mL)
ネズミチフス菌 TA100	2-AA	2008.7.10	1.0	10
ネズミチフス菌 TA98	2-AA	2008.7.10	0.5	5.0

ネズミチフス菌 TA1535	2-AA	2008.7.10	2.0	20
ネズミチフス菌 TA1537	2-AA	2008.7.10	2.0	20
大腸菌 WP2uvrA	2-AA	2008.7.10	10	100

なお、これらの用量は「安衛法における変異原性試験—テストガイドラインとGLP」(労働省安全衛生部化学物質調査課編, 1991年)に準じて設定した。

## 1.2.2.7. 用量設定試験 (予備試験)

### 1.2.2.7.1. 用量

用量設定試験における被験物質の用量として、ガイドライン上定められた 5000 µg/プレート を最高用量とし、以下 2000、800、320、128、51.2、20.5 および 8.19 µg/プレート について試験を実施した。

Hafnium(IV) chloride の用量設定試験において、代謝活性化系非存在下 (-S9 処理) の TA100 株の

51.2 および 128 µg/プレート、TA1535 および TA98 株の 8.19~128 µg/プレート ならびに TA1537 株の 8.19~800 µg/プレート で生育阻害作用が認められ、評価に必要な用量が確保できなかったため、生育阻害が認められると考えられる用量を最高用量とし、下記の 6 または 8 用量を設定し、追加試験を実施した。

#### 《代謝活性化系非存在下: -S9 処理》

菌株	用量 (µg/プレート)							
TA100		0.614	1.54	3.84	9.60	24.0	60.0	
TA1535	0.0157	0.0393	0.0983	0.246	0.614	1.54	3.84	9.60
TA98	0.0157	0.0393	0.0983	0.246	0.614	1.54	3.84	9.60
TA1537	0.0157	0.0393	0.0983	0.246	0.614	1.54	3.84	9.60

### 1.2.2.7.2. 使用プレート数および識別方法

1 用量当たり 2 枚のプレートを用いた。

油性インクを用いて、蓋に試験菌株、S9 mix の有無および用量等を明記することにより各プレートを識別した。

### 1.2.2.7.3. 被験物質あるいは対照物質の処理及び培養条件

試験管に使用溶媒、被験物質液あるいは陽性対照物質溶液を 100 µL、次いで、代謝活性化系非存在下 (-S9 処理) の場合は、0.1 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液 (pH 7.4) 500 µL を、代謝活性化系存在下 (+S9 処理) の場合は、S9 mix 500 µL を分注した。さらに、前培養した試験菌株懸濁液 100 µL を加えた後、ウォーターバスシェーカー (MM-10、タイテック) を用いて、37°C、120 回/分の条件で、20 分間振盪した。(プレインキュベーション) 振盪終了後、トップアガー 2 mL を添加し、内容を混合した。その後、混合液をプレート上に注ぎ、一様に広げた。恒温器 (SSV-R11DA、池田理化) を用い、各プレートを 37°C の条件で 48 時間培養した。

### 1.2.2.7.4. 被験物質の析出等の観察

各処理法において、処理開始時およびコロニー数計測時に析出等の有無を肉眼で観察した。

### 1.2.2.7.5. コロニー数計測

被験物質の生育阻害作用を確認するため、プレート上の試験菌株 (背景菌) の生育状態について実体顕微鏡 (40 倍) を用いて観察した。次いで、復帰突然変異により生じたコロニー数を計測した。計測に際しては、コロニーアナライザー (CA-11、システムサイエンス) を用い、面積補正ならびに数え落とし補正を実施して、コロニー数を算出した。

## 1.2.2.8. 本試験

### 1.2.2.8.1. 用量

#### a. Hafnium(IV) chloride

用量設定試験および追加試験の結果、代謝活性化系非存在下 (-S9 処理) および代謝活性化系存在下 (+S9 処理) の全ての菌株において変異原性は認められなかった。試験菌株に対する生育阻害作用は、



-S9 処理の TA100 株の 24.0 µg/プレート以上、TA1535、TA98 および TA1537 株の 3.84 µg/プレート以上ならびに+S9 処理の TA100 株の 5000 µg/プレート、TA1535 および TA98 株の 2000 µg/プレート以上、TA1537 株の 800 µg/プレート以上において認められた。したがって、本試験における被験物質の用量として、生育阻害が認められた。菌

株については生育阻害が認められると考えられる用量を最高用量とし、以下に示す 6 または 7 用量を設定した。また、変異原性および生育阻害が認められなかった菌株については、ガイドラインで定められた 5000 µg/プレートを最高用量とし、以下に示す 6 用量を設定した。

《代謝活性化系非存在下：-S9 処理》

菌株	用量 (µg/プレート)						
TA100	1.22	2.44	4.88	9.77	19.5	39.1	
TA1535	0.0763	0.153	0.305	0.610	1.22	2.44	4.88
WP2uvrA	156	313	625	1250	2500	5000	
TA98	0.0763	0.153	0.305	0.610	1.22	2.44	4.88
TA1537	0.0763	0.153	0.305	0.610	1.22	2.44	4.88

《代謝活性化系存在下：+S9 処理》

菌株	用量 (µg/プレート)						
TA100	156	313	625	1250	2500	5000	
TA1535	78.1	156	313	625	1250	2500	
WP2uvrA	156	313	625	1250	2500	5000	
TA98	78.1	156	313	625	1250	2500	
TA1537	39.1	78.1	156	313	625	1250	

b. Hafnocene dichloride

用量設定試験の結果、代謝活性化系非存在下 (-S9 処理) および代謝活性化系存在下 (+S9 処理) の全ての菌株において変異原性は認められなかった。試験菌株に対する生育阻害作用は、全ての菌株において認められなかった。また、コロニー数計測時に被

験物質の析出も認められなかった。したがって、本試験における被験物質の用量として、ガイドラインで定められた 5000 µg/プレートを最高用量とし、以下に示す 6 用量を設定した。

《代謝活性化系非存在下：-S9 処理》

菌株	用量 (µg/プレート)						
TA100	156	313	625	1250	2500	5000	
TA1535	156	313	625	1250	2500	5000	
WP2uvrA	156	313	625	1250	2500	5000	
TA98	156	313	625	1250	2500	5000	
TA1537	156	313	625	1250	2500	5000	

《代謝活性化系存在下：+S9 処理》



菌株	用量 (µg/プレート)					
	156	313	625	1250	2500	5000
TA100	156	313	625	1250	2500	5000
TA1535	156	313	625	1250	2500	5000
WP2uvrA	156	313	625	1250	2500	5000
TA98	156	313	625	1250	2500	5000
TA1537	156	313	625	1250	2500	5000

### c. Phenylboronic acid

用量設定試験の結果、代謝活性化系の有無にかかわらずTA1537株において陰性対照群の2倍以上の復帰変異コロニー数の増加が認められた。その他の菌株については、変異原性は認められなかった。また、菌株に対する生育阻害作用は、-S9処理のTA100およびTA1537株の5000 µg/プレートならびに+S9処理のTA100株の5000 µg/プレートにおいて認められた。コロニー数計測時に被験物質の

析出は認められなかった。したがって、本試験における被験物質の用量として、ガイドライン上定められた5000 µg/プレートを最高用量とし、TA1537株については陰性対照群の2倍以上の復帰変異コロニー数の増加が認められた。用量の再現性が確認できるように7~8用量を、それ以外の菌株では6用量を設定した。

#### 《代謝活性化系非存在下：-S9処理》

菌株	用量 (µg/プレート)						
	156	313	625	1250	2500	5000	
TA100	-	156	313	625	1250	2500	5000
TA1535	-	156	313	625	1250	2500	5000
WP2uvrA	-	156	313	625	1250	2500	5000
TA98	-	156	313	625	1250	2500	5000
TA1537	78.1	156	313	625	1250	2500	5000

#### 《代謝活性化系存在下：+S9処理》

菌株	用量 (µg/プレート)							
	156	313	625	1250	2500	5000		
TA100	-	-	156	313	625	1250	2500	5000
TA1535	-	-	156	313	625	1250	2500	5000
WP2uvrA	-	-	156	313	625	1250	2500	5000
TA98	-	-	156	313	625	1250	2500	5000
TA1537	39.1	78.1	156	313	625	1250	2500	5000

### d. 4-Pyridineboronic acid

用量設定試験の結果、-S9処理のTA1537株および+S9処理のWP2uvrA株において、最高用量の5000 µg/プレートで陰性対照群の2倍を超える復帰変異コロニー数の増加が認められた。また、-S9処理のTA100およびWP2uvrA株においては、最

高用量の5000 µg/プレートで陰性対照群と比較して1.9倍程度の復帰変異コロニー数の増加が認められた。試験菌株に対する生育阻害作用は、全ての菌株において認められなかった。したがって、本試験における被験物質の用量として、ガイドラインで定

められた 5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  を最高用量とし、以下

に示す 6 用量を設定した。

《代謝活性化系非存在下：-S9 処理》

菌株	用量 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )					
TA100	156	313	625	1250	2500	5000
TA1535	156	313	625	1250	2500	5000
WP2uvrA	156	313	625	1250	2500	5000
TA98	156	313	625	1250	2500	5000
TA1537	156	313	625	1250	2500	5000

《代謝活性化系存在下：+S9 処理》

菌株	用量 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )					
TA100	156	313	625	1250	2500	5000
TA1535	156	313	625	1250	2500	5000
WP2uvrA	156	313	625	1250	2500	5000
TA98	156	313	625	1250	2500	5000
TA1537	156	313	625	1250	2500	5000

### 1.2.2.8.2. 観察方法

使用プレート数、培養条件、被験物質の析出等の観察などについては用量設定試験に準じた。

## 1.3. 結果

### a. Hafnium(IV) chloride

用量設定試験結果を Figure 1、2、Table 1、2 に示す。

Hafnium (IV) chloride 処理群の復帰変異コロニー数は、-S9 処理および+S9 処理のいずれの試験菌

株においても、陰性対照群の 2 倍以上を示す増加は認められなかった。試験菌株に対する生育阻害作用は、-S9 処理の WP2uvrA 株以外の菌株 (TA100 株：51.2 および 128  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、TA1535 および TA98 株：8.19~128  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、TA1537 株：8.19~800  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ ) および+S9 処理の WP2uvrA 株以外の菌株 (TA100 株：5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、TA1535 および TA98 株：2000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上、TA1537 株：800  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上) において認められた。用量設定追加試験結果を Figure 3、Table 3 に示す。

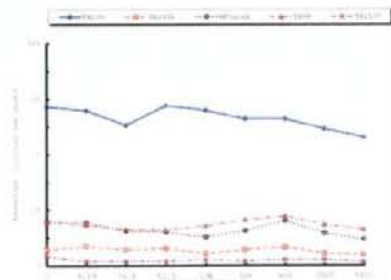


Figure 1. Dose-finding study of Hafnium(IV)chloride (bio-activation method -S9)

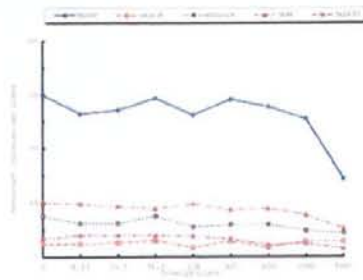


Figure 2. Dose-finding study of Hafnium(IV)chloride (bio-activation method +S9)

Table 1. Results of dose-finding study of hafnium(IV)chloride  
[Non-activation method: -S9]

Compound	Dose (µg/plate)	Mean revertant colonies per plate				
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
Acetonitrile	0	129	13	36	35	8
Non treatment	0	125	11	35	32	11
Hafnium(IV)chloride	8.19	126	16 *	35	33 *	4 *
	20.5	114	13 *	28	29 *	4 *
	51.2	130 *	14 *	27	29 *	4 *
	128	126 *	10 *	23	32 *	5 *
	320 +	119	13	28	37	4 *
	800 +	119	10	26	40	5 *
	2000 +	111	10	26	33	5
	5000 +	104	9	21	29	3
Positive control compound		AF-2	Na <sub>2</sub> S	AF-2	AF-2	9-AA
Dose(µg/plate)		0.01	0.5	0.01	0.1	80
Mean revertant colonies per plate		716	715	190	800	311

Acetonitrile : Negative control (25 µl/plate)

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide Na<sub>2</sub>S: Sodium azide 9-AA: 9-Aminoacridine hydrochloride

\* : Growth inhibition was observed.

+ : Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 2. Results of dose-finding study of hafnium(IV)chloride  
[Activation method: +S9]

Compound	Dose (µg/plate)	Mean revertant colonies per plate				
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
Acetonitrile	0	135	11	34	45	15
Non treatment	0	117	13	26	40	17
Hafnium(IV)chloride	8.19	119	11	28	44	18
	20.5	122	12	28	42	18
	51.2	132	14	34	40	18
	128	118	8	25	44	17
	320 +	131	13	27	39	15
	800 +	125	8	27	40	10 *
	2000 +	115	13 *	22	35 *	11 *
	5000 +	65 *	13 *	20	24 *	7 *
Positive control compound		2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
Dose(µg/plate)		1	2	10	0.5	2
Mean revertant colonies per plate		895	376	916	472	202

Acetonitrile : Negative control (25 µl/plate)

2-AA: 2-Aminanthracene

\* : Growth inhibition was observed.

+ : Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

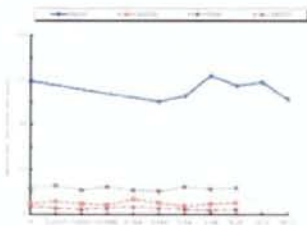


Figure 2. Mean revertant study of hafnium(IV)chloride (Additional study)  
[Non-activation method: -S9]

Table 3. Results of dose-finding study of hafnium(IV)chloride(Additional study)  
[Non-activation method: -S9]

Compound	Dose (µg/plate)	Mean revertant colonies per plate			
		TA100	TA1535	TA98	TA1537
Acetonitrile	0	118	10	24	7
Non treatment	0	117	9	21	5
Hafnium(IV)chloride	0.0187	12	26	6	6
	0.0393	10	22	5	5
	0.0983	9	25	6	6
	0.246	14	22	7	7
	0.614	11	21	6	6
	1.54	106	8	28	5
	3.84	124	10 *	23 *	4 *
	9.60	115	11 *	24 *	5 *
	24.0	118 *			
	60.0	103 *			
Positive control compound		AF-2	Na <sub>2</sub> S	AF-2	9-AA
Dose(µg/plate)		0.01	0.5	0.1	80
Mean revertant colonies per plate		534	668	738	231

Acetonitrile : Negative control (25 µl/plate)

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

Na<sub>2</sub>S: Sodium azide

9-AA: 9-Aminoacridine hydrochloride

\* : Growth inhibition was observed.



Hafnium (IV) chloride 処理群の復帰変異コロニー数は、いずれの試験菌株においても、陰性対照群の2倍以上を示す増加は認められなかった。試験菌株に対する生育阻害作用は、全ての菌株の高用量(TA100株:24.0  $\mu\text{g}$ /プレート以上、TA1535、TA98

およびTA1537株:3.84  $\mu\text{g}$ /プレート以上)で認められた。

本試験結果を Figure 4~8、Table 4、5に示す。

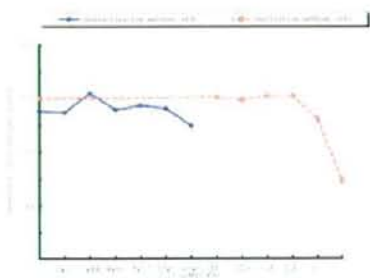


Figure 4. Bacterial reverse mutation test of Hafnium(IV)chloride in strain TA98

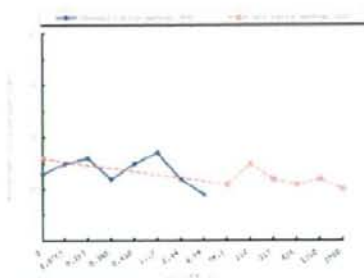


Figure 5. Bacterial reverse mutation test of Hafnium(IV)chloride in strain TA1535

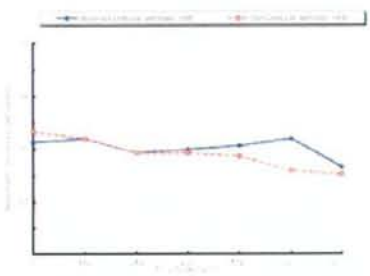


Figure 6. Bacterial reverse mutation test of Hafnium(IV)chloride in strain TA98

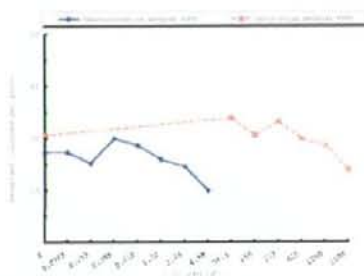


Figure 7. Bacterial reverse mutation test of Hafnium(IV)chloride in strain TA98

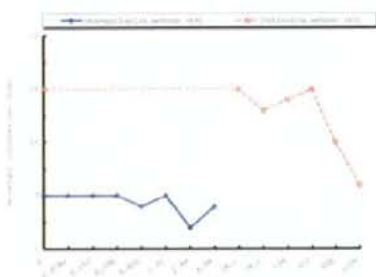


Figure 8. Bacterial reverse mutation test of Hafnium(IV)chloride in strain TA1537

Table 4. Results of bacterial reverse mutation test of hafnium(IV) chloride [Non-activation method: -S9]

Compound	Dose (µg/plate)	Mean revertant colonies per plate				
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
Acetonitrile	0	111	13	32	26	5
Non treatment	0	117	12	14	22	6
Hafnium(IV) chloride	0.0763		15		26	5
	0.153		16		23	5
	0.305		13		30	5
	0.610		15		26	4
	1.22	110	17		24	5
	2.44	124	13 *		22 *	2 *
	4.88	112	9 *		15 *	4 *
	9.77	115				
	19.5	113				
	39.1	100 *				
	156			33		
	313 +			29		
	625 +			30		
	1250 +			31		
	2500 +			33		
5000 +			25			
Positive control compound		AF-2	HaH <sub>2</sub>	AF-2	AF-2	9-AA
Dose(µg/plate)		0.01	0.5	0.01	0.1	80
Mean revertant colonies per plate		585	622	162	697	208

Acetonitrile : Negative control (25 µl/plate)

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide NaH<sub>2</sub>: Sodium azide 9-AA: 9-Aminoacridine hydrochloride

\* : Growth inhibition was observed.

+ : Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 5. Results of bacterial reverse mutation test of hafnium(IV) chloride [Activation method: +S9]

Compound	Dose (µg/plate)	Mean revertant colonies per plate					
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
Acetonitrile	0	120	16	35	31	15	
Non treatment	0	116	13	33	32	11	
Hafnium(IV) chloride	39.1					15	
	78.1		11		36	13	
	156	121	15	33	31	14	
	313 +	119	12	29	35	15	
	625 +	122	11	29	30	10 *	
	1250 +	122	12	28	28 *	6 *	
	2500 +	105	10 *	24	21 *		
	5000 +	59 *		23			
	Positive control compound		2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Dose(µg/plate)		1	2	10	0.5	2
Mean revertant colonies per plate		836	260	909	488	150	

Acetonitrile : Negative control (25 µl/plate)

2-AA: 2-Aminanthracene

\* : Growth inhibition was observed.

+ : Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Hafnium (IV) chloride 処理群の復帰変異コロニー数は、-S9 処理および+S9 処理のいずれの試験菌株においても、陰性対照群の2倍以上を示す増加は認められなかった。試験菌株に対する生育阻害作用は、-S9 処理の WP2uvrA 株以外の菌株 (TA100 株: 39.1 µg/プレート、TA1535、TA98 および TA1537 株: 2.44 µg/プレート以上) および+S9 処理の WP2uvrA 株以外の菌株 (TA100 株: 5000 µg/プレート、TA1535 株: 2500 µg/プレート、TA98 株: 1250 µg/プレート以上、TA1537 株: 625 µg/プレート以上) において認められた。

## b. Hafnocene dichloride

用量設定試験結果を Figure 9、10、Table 6、7 に示す。

Hafnocene dichloride 処理群の復帰変異コロニー数は、-S9 処理および+S9 処理のいずれの試験菌株においても、陰性対照群の2倍以上を示す増加は認められなかった。試験菌株に対する生育阻害作用は、全ての菌株において認められなかった。

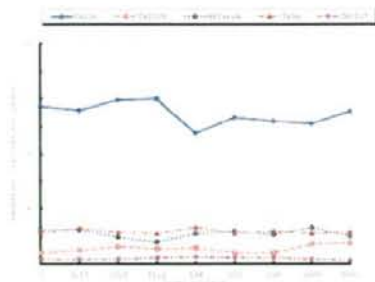


Figure 9. Dose-finding study of hafnoicene dichloride (Non-activation method: -S9)

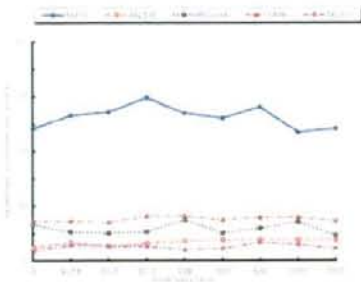


Figure 10. Dose-finding study of hafnoicene dichloride (Activation method: +S9)

Table 6. Results of dose-finding study of hafnoicene dichloride (Non-activation method: -S9)

Compound	Dose (µg/plate)	Mean revertant colonies per plate				
		TA100	TA1538	WP2uvrA	TA98	TA1537
D.W.	0	129	9	28	26	4
Hafnoicene dichloride	8.19	126	11	28	29	4
	20.5	134	14	22	26	4
	51.2	135	12	18	25	5
	120	107	13	25	30	6
	320	120	9	27	25	5
	800	117	9	24	27	5
	2000	115	16	30	25	4
5000	125	17	23	26	3	

Positive control compound AF-2 NaM<sub>2</sub> AF-2 AF-2 9-AA  
 Dose(µg/plate) 0.01 0.5 0.01 0.1 80  
 Mean revertant colonies per plate 809 654 168 771 308  
 D.W.: Negative control (Water for injection, 100 µl/plate)  
 AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide NaM<sub>2</sub>: Sodium azide 9-AA: 9-Aminoacridine hydrochloride

Table 7. Results of dose-finding study of hafnoicene dichloride (Activation method: +S9)

Compound	Dose (µg/plate)	Mean revertant colonies per plate				
		TA100	TA1538	WP2uvrA	TA98	TA1537
D.W.	0	109	11	30	33	8
Hafnoicene dichloride	8.19	120	15	24	33	13
	20.5	123	12	23	32	12
	51.2	134	14	24	37	12
	120	122	14	34	37	9
	320	118	17	23	34	10
	800	127	17	27	36	15
	2000	106	17	32	36	13
5000	109	17	21	33	10	

Positive control compound 2-AA 2-AA 2-AA 2-AA 2-AA  
 Dose(µg/plate) 1 2 10 0.5 2  
 Mean revertant colonies per plate 1170 456 817 379 160  
 D.W.: Negative control (Water for injection, 100 µl/plate)  
 2-AA: 2-Aminoanthracene

本試験の結果を、Figure11~15、Table 8、9に示す。

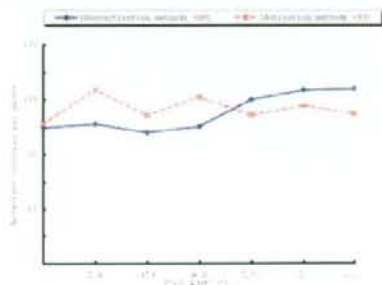


Figure 11. Bacterial reverse mutation test of hafnoicene dichloride in strain TA100

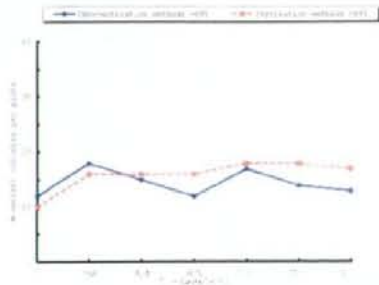


Figure 12. Bacterial reverse mutation test of hafnoicene dichloride in strain TA1538



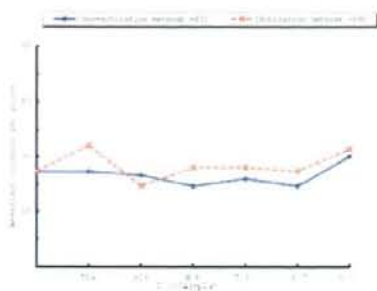


Figure 13. Bacterial reverse mutation test of hafnocene dichloride in strain WP2uvrA

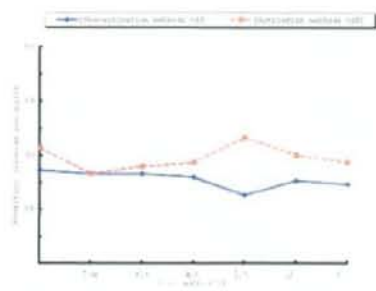


Figure 14. Bacterial reverse mutation test of hafnocene dichloride in strain TAI98

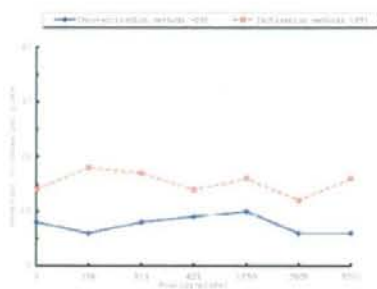


Figure 15. Bacterial reverse mutation test of hafnocene dichloride in strain TAI537

Table 8. Results of bacterial reverse mutation test of hafnocene dichloride [Non-activation method: -S9]

Compound	Dose (pp/plate)	Mean revertant colonies per plate				
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
D.W.	0	112	12	26	26	8
Hafnocene dichloride	156	115	18	26	25	6
	313	108	15	25	25	8
	625	113	12	22	24	9
	1250	135	17	24	19	10
	2500	143	14	22	23	6
5000	144	13	30	22	6	
Positive control compound	AF-2	NaN	NaN	AF-2	AF-2	9-AA
Dose(pp/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
Mean revertant colonies per plate		659	646	160	772	140

D.W.: Negative control (Water for injection, 100 µl/plate)  
 AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide    NaN: Sodium azide    9-AA: 9-Aminoacridine hydrochloride

Table 9. Results of bacterial reverse mutation test of hafnocene dichloride [Activation method: +S9]

Compound	Dose (ug/plate)	Mean revertant colonies per plate				
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
D.W.	0	115	10	26	32	14
Hafnocene dichloride	156	143	16	33	25	18
	313	122	16	22	27	17
	625	137	16	27	28	14
	1250	122	18	27	35	16
	2500	130	18	24	30	12
5000	123	17	32	28	16	
Positive control compound		2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
Dose(pp/plate)	5	2	10	0.5	2	
Mean revertant colonies per plate		1302	372	754	423	238

D.W.: Negative control (Water for injection, 100 µl/plate)  
 2-AA: 2-Aminoanthracene

Hafnocene dichloride 処理群の復帰変異コロニー数は、-S9 処理および+S9 処理のいずれの試験菌株においても、陰性対照群の2倍以上を示す増加は

認められなかった。試験菌株に対する生育阻害作用は、全ての菌株において認められなかった。

### c. Phenylboronic acid

用量設定試験結果を Figure 16、17、Table 10、11 に示す。

Phenylboronic acid 処理群の復帰変異コロニー数は、-S9 処理および+S9 処理の TA1537 株においてのみ、陰性対照群の 2 倍以上を示す増加が認めら

れたが、明確な用量依存性は認められなかった。試験菌株に対する生育阻害作用は、-S9 処理の TA100 および TA1537 株の 5000 µg/プレートならびに +S9 処理の TA100 株の 5000 µg/プレートにおいて認められた。

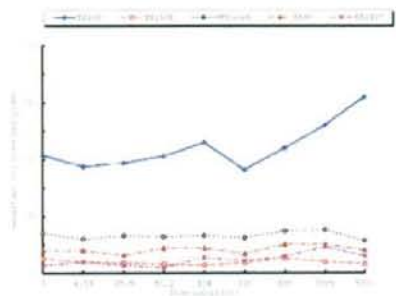


Figure 16. Dose-finding study of phenylboronic acid (Non-activation method: -S9).

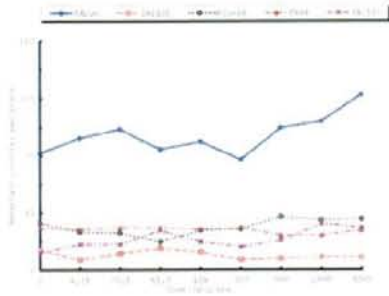


Figure 17. Dose-finding study of phenylboronic acid (Activation method: +S9).

Table 10. Results of dose-finding study of phenylboronic acid (Non-activation method: -S9)

Compound	Dose (µg/plate)	Mean revertant colonies per plate				
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
DMSO	0	104	13	35	20	7
Phenylboronic acid	8.19	94	10	30	20	10
	20.5	97	9	33	16	7
	51.2	103	8	32	22	5
	128	115	7	33	22	14
	320	91	9	31	17	11
	800	110	13	37	25	15
	2000	130	10	38	25	23
	5000	155 *	8	26	30	15 *
Positive control compound	AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2	9-AA	
Dose (µg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	90	
Mean revertant colonies per plate	800	623	155	792	272	

DMSO: Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 µl/plate)  
 AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide    NaN<sub>3</sub>: Sodium azide    9-AA: 9-Aminoacridine hydrochloride  
 \*: Growth inhibition was observed.

Table 11. Results of dose-finding study of phenylboronic acid (Activation method: +S9)

Compound	Dose (µg/plate)	Mean revertant colonies per plate				
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
DMSO	0	92	16	37	33	14
Phenylboronic acid	8.19	104	8	30	32	20
	20.5	111	13	29	33	20
	51.2	98	17	22	33	31
	128	101	14	31	32	22
	320	97	8	32	33	18
	800	112	9	42	27	23
	2000	117	10	39	27	36
	5000	138 *	10	40	31	33
Positive control compound	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	
Dose (µg/plate)	1	2	10	0.5	2	
Mean revertant colonies per plate	949	374	762	396	172	

DMSO: Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 µl/plate)  
 2-AA: 2-Aminanthracene  
 \*: Growth inhibition was observed.

本試験結果を Figure 18~22、Table 12、13 に示す。

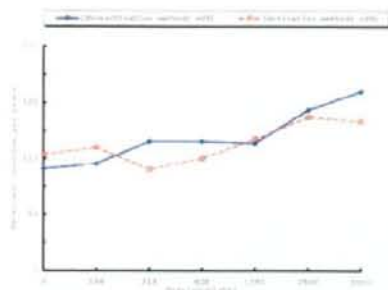


Figure 18. Bacterial reverse mutation test of phenylboronic acid in strain TA100

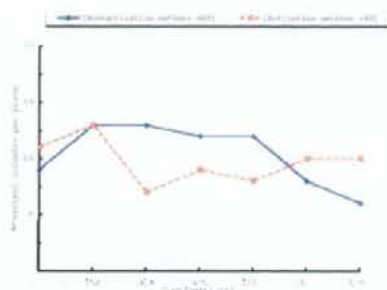


Figure 19. Bacterial reverse mutation test of phenylboronic acid in strain TA1535

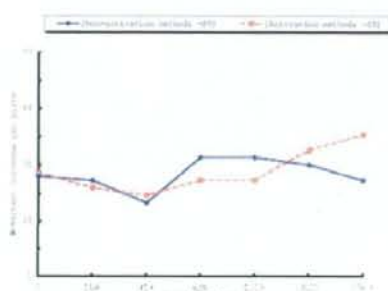


Figure 20. Bacterial reverse mutation test of phenylboronic acid in strain W9804

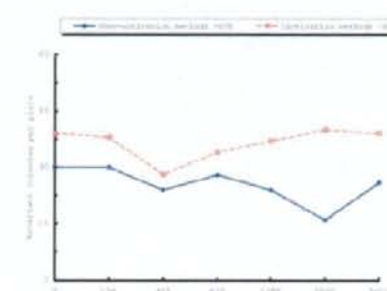


Figure 21. Bacterial reverse mutation test of phenylboronic acid in strain TA98

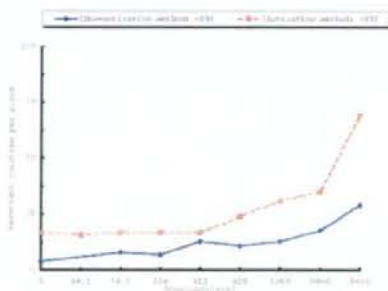


Figure 22. Bacterial reverse mutation test of phenylboronic acid in strain TA1537

Table 12. Results of bacterial reverse mutation test of phenylboronic acid (Non-activation method: -S9)

Compound	Dose (pp/plate)	Mean revertant colonies per plate				
		TA100	TA1535	W9804	TA98	TA1537
Phenylboronic acid	0	100	9	27	30	4
	78.1	105	13	24	30	7
	156	105	13	24	30	7
	313	127	13	20	24	13
	625	127	12	32	28	11
	1250	125	12	32	24	13
	2500	156	8	30	16	18
5000	176*	6	26	26	29*	
Positive control compound	AF-2	NaH <sub>2</sub>	AF-2	AF-2	S-AA	
Dose (pp/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
Mean revertant colonies per plate	645	658	170	802	316	

DMSO: Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 µl/plate)  
 AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-Furyl)acrylamide    NaH<sub>2</sub>: Sodium azide    S-AA: S-Aminoacridine hydrochloride  
 \*: Growth inhibition was observed.