試験番号 M-12-023

最終報告書

2-Decyltetradecanol の
細菌を用いる復帰突然変異試験

厚生労働省医薬食品局審査管理課　化学物質安全対策室　委託

試験施設

財団法人食品薬品安全センター秦野[redacted]

〒257-8523　神奈川県秦野市落合 729-[redacted]

TEL　0463-82-4751

試験委託者	厚生労働省医薬食品局審査管理課　化学物質安全対策室 (東京都千代田区霞が関 1-2-2)
試験番号	M-12-023
被験物質	2-Decyltetradecanol
試験項目	細菌を用いる復帰突然変異試験
試験開始日	2012 年 9 月 10 日
実験開始日	2012 年 10 月 30 日
実験終了日	2012 年 11 月 15 日
試験終了日	試験責任者の捺印日
試資料保管場所	秦野研究所資料保存室
保管期間	試験終了後 10 年間 その後の保管については試験委託者と協議する。
運営管理者	財団法人食品薬品安全センター秦野研究所 所長 [redacted]

この試験は、「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成 23 年 3 月 31 日付け、薬食発 0331 第 7 号厚生労働省医薬食品局長、平成 23・03・29 製局第 5 号経済産業省製造産業局長、環保企発第 110331009 号環境省総合環境政策局長通知)に準拠し、「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」(平成 23 年 3 月 31 日付け、薬食発 0331 第 8 号厚生労働省医薬食品局長、平成 23・03・29 製局第 6 号経済産業省製造産業局長、環保企発第 110331010 号環境省総合環境政策局長通知)を遵守して実施したものである。

2013 年 03 月 22 日

試験責任者 [redacted]

試験従事者

試験責任者

試験担当者

検体調製

試験操作

化学分析

被験物質管理

[redacted]

目次

要約 5
試験目的 5
試験ガイドラインと GLP 5
材料と方法 5
1. 被験物質 5
2. 陽性対照物質 6
3. 検定菌 7
4. 試験材料 7
5. 被験物質調製液の調製 8
6. 試験操作 9
7. 結果の表示 11
8. 判定 11
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 11
試験成績と考察 11
1. 用量設定試験 11
2. 本試験 11
参考文献 12
表 13
図 16
資料 18

(最終ページ:24 ページ)

信頼性保証書

要約

2-Decyltetradecanol の遺伝子突然変異誘発性の有無を調べるため、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施し、陰性の結果を得た。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用い、プレインキュベーション法により、S9 mix 非存在下および存在下で試験を行った。

1.50、5.00、15.0、50.0、150、500、1500 および 5000 μg/plate の 8 用量を設定して用量設定試験を行ったところ、S9 mix 非存在下および存在下とも、用いたいずれの用量においても生育阻害は認められなかった。

用量設定試験の結果に基づき、すべての検定菌について、313、625、1250、2500 および 5000 μg/plate の 5 用量を設定して、2 回の本試験(本試験 I および II)を行った。その結果、2 回の本試験ともに、用いたいずれの検定菌においても、S9 mix の有無にかかわらず、陰性対照値の 2 倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果に基づき、2-decyltetradecanol は、用いた試験系において遺伝子突然変異誘発性を有しない(陰性)と判定した。

試験目的

2-Decyltetradecanol の遺伝子突然変異誘発性(変異原性)の有無を検討し、安全性評価の資料とするために、細菌を用いる復帰突然変異試験をプレインキュベーション法[1)]により実施した。

試験ガイドラインと GLP

この試験は、「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成 23 年 3 月 31 日付け、薬食発 0331 第 7 号厚生労働省医薬食品局長、平成 23・03・29 製局第 5 号経済産業省製造産業局長、環保企発第 110331009 号環境省総合環境政策局長通知)に準拠し、「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」(平成 23 年 3 月 31 日付け、薬食発 0331 第 8 号厚生労働省医薬食品局長、平成 23・03・29 製局第 6 号経済産業省製造産業局長、環保企発第 110331010 号環境省総合環境政策局長通知)を遵守して実施した。

材料と方法

1. 被験物質

被験物質である 2-decyltetradecanol[化学名(別名):2-デシル-1-テトラデカノール、デシルテトラデカノール、IUPAC 名:2-デシルテトラデカン-1-オル、略称:2-DT、CAS 番号:58670-89-6、分子式:

$C_{24}H_{50}O$、分子量:354.65、ロット番号:08403DOV、含量:98.4%(GC)、資料 1]は、粘性のある無色液体である。被験物質の物理化学的性状等を資料 2に示す。被験物質は[redacted]から購入し、使用時まで冷蔵(実測値:3～7℃)、密閉して保管した。

被験物質原体の安定性については、実験開始前(測定日:2012年9月20日)および実験終了後(測定日:2013年3月5日)に、秦野研究所においてフーリエ変換赤外分光光度計を用いて被験物質の赤外吸収スペクトルを測定し、両者の測定結果に変化がないことを確認した(資料 3)。

2. 陽性対照物質

用いた陽性対照物質および調製法は以下のとおりである。

名称	略称	ロット番号(購入日)	製造者	純度
2-(2-ﾌﾘﾙ)-3-(5-ﾆﾄﾛ-2-ﾌﾘﾙ)ｱｸﾘﾙｱﾐﾄﾞ	AF-2	STQ3987 (2010年8月6日)	和光純薬工業	99.7%
ｱｼﾞ化ﾅﾄﾘｳﾑ	SA	HLP7075 (2010年8月3日)	和光純薬工業	100.2%
9-ｱﾐﾉｱｸﾘｼﾞﾝ	9AA	4785KA (2010年8月24日)	MP Biomedicals	98.6%
ﾍﾞﾝｿﾞ[a]ﾋﾟﾚﾝ	B[a]P	L16T027 (2010年8月6日)	Alfa Aesar	97.6%
2-ｱﾐﾉｱﾝﾄﾗｾﾝ	2AA	EPM0250 (2010年8月3日)	和光純薬工業	96.3%

AF-2、9AA、B[a]PおよびAAはジメチルスルホキシド(DMSO、ロット番号:LAK5554、和光純薬工業)に、SA は日局注射用水(製造番号:K1E86、大塚製薬工場)に溶解して所定の濃度に調製したのち、冷凍保存(設定温度:-20℃)し、調製後 6 か月以内に用時解凍して用いた。各陽性対照物質調製液の調製濃度および添加量を以下に示す。

	S9 mix 非存在下				S9 mix 存在下			
菌　株	物質名	調製濃度 (μg/mL)	添加量 (μL/plate)	用量 (μg/plate)	物質名	調製濃度 (μg/mL)	添加量 (μL/plate)	用量 (μg/plate)
Salmonella typhimurium								
TA100	AF-2	0.1	100	0.01	B[a]P	50	100	5
TA1535	SA	5	100	0.5	2AA	100	20	2
TA98	AF-2	1	100	0.1	B[a]P	50	100	5
TA1537	9AA	800	100	80	B[a]P	50	100	5
Escherichia coli								
WP2 *uvrA*	AF-2	0.1	100	0.01	2AA	100	100	10

各検定菌に用いた陽性対照物質は、秦野研究所で十分な蓄積データが得られている物質および用量とした。

3. 検定菌

「新規化学物質等に係る試験の方法について」に従い、試験には、ネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*)TA100、TA1535、TA98、TA1537 および大腸菌(*Escherichia coli*)WP2 *uvrA* を用いた。

S. typhimurium TA100、TA1535、TA98、TA1537 の 4 菌株は 1997 年 8 月 7 日に、*E. coli* WP2 *uvrA* 株は 1997 年 4 月 9 日に、いずれも日本バイオアッセイ研究センターの松島泰次郎博士より分与された。*S. typhimurium* の 4 菌株を用いる試験は、ヒスチジン要求性から非要求性への復帰突然変異[2)]、*E. coli* WP2 *uvrA* 株を用いる試験は、トリプトファン要求性から非要求性への復帰突然変異[3)]を指標とした遺伝子突然変異誘発性の検出系である。

検定菌は冷凍保存(設定温度:-80℃)したもの(凍結保存菌)を、調製後 6 か月以内に用時解凍して試験に用いた。凍結保存菌は、液体培地にて37℃で静止期の初期まで培養した菌液0.8 mLに対し、滅菌DMSOを0.07 mLの割合で加えて混合したものをプラスチックチューブに分注し、急速凍結して調製したものであり、調製時に、アミノ酸要求性、UV 感受性、膜変異(*rfa*)、アンピシリン耐性因子 pKM101(プラスミド)の有無および陰性対照と陽性対照の変異コロニー数について調べ、特性が適正であることが確認されている。

4. 試験材料

1)最少グルコース寒天平板培地

最少グルコース寒天平板培地(ロット番号:DZAD9L01、2012 年 9 月 21 日製造、極東製薬工業)を購入して用いた。なお、培地 1 L あたりの組成は以下のとおりで、径 90 mm のシャーレ 1 枚あたり 30 mL を流して固めたものである。

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
グルコース	20	g
大洋寒天(ロット番号:BM-M5-249、SSK セールス)	15	g

2)トップアガー

①の水溶液をオートクレーブ滅菌後、フィルター滅菌した②または③を容量比 10:1 の割合で混合して用いた。

①	バクトアガー(Difco)	0.6 w/v%
	塩化ナトリウム	0.5 w/v%
②	*S. typhimurium* 用	
	L-ヒスチジン	0.5 mmol/L
	D-ビオチン	0.5 mmol/L

③ *E. coli* 用

L-トリプトファン　　0.5 mmol/L

3) S9 mix の組成および調製

S9 mix 1 mL あたりの組成は以下のとおりで、用時氷冷下で混合して調製した。

成　分	S9 mix 1 mL 中の量	濃度
S9*1	0.1 mL	10 vol%
0.2 mol/L ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)	0.5 mL	100 μmol/mL
補酵素溶液*2	0.38 mL	―――
塩化カリウム	―――	33 μmol/mL
グルコース-6-リン酸	―――	5 μmol/mL
NADH	―――	4 μmol/mL
NADPH	―――	4 μmol/mL
0.4 mol/L 塩化マグネシウム溶液	0.02 mL	8 μmol/mL

NADH: Nicotinamide-adenine dinucleotide, reduced form, disodium salt

NADPH: Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, reduced form, tetrasodium salt

*1:S9(ロット番号:RAA-655、2012 年 9 月 14 日製造、キッコーマン)は、フェノバルビタール(PB)および 5,6-ベンゾフラボン(BF)を腹腔内投与(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 7 週齢の雄 Sprague-Dawley 系ラット(体重:212～248 g)の肝臓から調製したものを購入後、冷凍保存(設定温度:-80℃)して、製造後 6 か月以内に用時解凍して試験に用いた。

*2:補酵素溶液は、上記の成分を混合してフィルター滅菌したのち、冷凍保存(設定温度:-80℃)し、調製後 6 か月以内に用時解凍して試験に用いた。

5. 被験物質調製液の調製

溶解性の予備検討の結果、被験物質は試験に必要な濃度(50.0 mg/mL)で水および DMSO に不溶であったが、アセトンには 350 mg/mL で溶解したことから、媒体にはアセトンを用いた。

試験に際しては、被験物質を秤量し、アセトン(ロット番号:EPE1169、和光純薬工業、試薬特級、純度 99.5%以上)に溶解して最高濃度(100 mg/mL)の被験物質調製液を調製し(用量設定試験:2.0 mL 以上、本試験 I、II:3.0 mL 以上)、以下同媒体で段階希釈した。被験物質調製液は用時調製し、媒体添加後 31 分以内(室温:26～28℃、用量設定試験)、31 分以内(室温:26℃、本試験 I)および 23 分以内(室温:26～27℃、本試験 II)に使用した。調製濃度を以下に示す。

用量設定試験:0.0300、0.100、0.300、1.00、3.00、10.0、30.0 および 100 mg/mL

本試験 I および II:6.25、12.5、25.0、50.0 および 100 mg/mL

媒体中での被験物質の安定性については、秦野研究所において室温(実測値:21.1～23.8℃)、遮光下で保管した 0.0500 mg/mL および 350 mg/mL の濃度の試験液について、調製後 24 時間の安定性を確認した。分析法を資料 4に示す。その結果、各被験物質調製液(0.0500 mg/mL および 350 mg/mL)の平均含量は 104.0%および 101.1%(調製直後)、104.8%および 103.3%(調製後 24 時間)であった。各測定値のばらつきは 99.0～100.6%および 98.8～100.7%(調製直後)、98.7～101.1%および 97.4～104.8%

(調製後 24 時間)であった。また、調製後 24 時間における各被験物質調製液(0.0500 mg/mL および 350 mg/mL)の平均残存率は 100.8%および 102.2%であった(資料 5)。これらの値は、いずれも試験計画書に記載した許容基準(平均含量:90.0～110.0%、各測定値のばらつき:平均値の 90.0～110.0%以内、平均残存率:90.0%以上)内であった。なお、被験物質調製液(原液)の調製時に目視により、発熱、発泡などの変化がないことを確認した。

含量試験については、「医薬品・化学物質 GLP 解説(2002)、薬事日報社」に基づき実施しなかった。

6. 試験操作

1)試験菌液の作製

ニュートリエントブロス No. 2(ロット番号:612715、Oxoid)を 12 mL 入れた L 字型試験管(容積:29 mL)に、解凍した凍結保存菌 24 µL(TA100、TA1535、TA98、TA1537 および WP2 *uvrA*)をすみやかに接種し、4℃で保冷後、37℃で 10 時間、往復振とう培養したものを試験菌液とした。振とうには DOUBLE SHAKER NR-3(TAITEC)を用い、振幅は 25 mm、振とう回数は毎分 100 回とした。検定菌の増殖の確認のため、レシオビーム分光光度計(日立 U-1900 形)(HITACHI)により、試験菌液の吸光度を 660 nm で測定した。また、段階希釈法により生菌数を求めた。660 nm の吸光度の測定値および生菌数を以下に示す。

試験の種類		検定菌				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2 *uvrA*	TA98	TA1537
用量設定試験	OD_{660}	1.775	1.893	1.895	1.906	1.841
	生菌数 (×10^9 cells/mL)	1.77	2.54	3.11	2.49	1.31
本試験 I	OD_{660}	1.777	1.839	1.869	1.905	1.866
	生菌数 (×10^9 cells/mL)	2.18	2.79	3.73	2.43	1.80
本試験 II	OD_{660}	1.789	1.890	1.884	1.894	1.857
	生菌数 (×10^9 cells/mL)	1.98	2.66	3.41	2.77	1.73

各試験菌液の 660 nm の吸光度の測定値は、2011 年度の背景データ(秦野研究所)の平均値の 90%以上であった。また、各試験菌液の生菌数は 1×10^9 cells/mL 以上であった。

2)試験法

Ames らの標準法[2)]を参考にして、プレインキュベーション法[1)]により、1 回の用量設定試験と 2 回の本試験を実施した。試験は、被験物質をそのまま検定菌に作用させる S9 mix 非存在下および哺乳動物(ラット)のもつ薬物代謝酵素によって産生される被験物質の代謝物の遺伝子突然変異誘発性を試験する S9 mix 存在下で行った。

小試験管中に被験物質調製液 0.05 mL、S9 mix 非存在下では 0.1 mol/L ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)0.5 mL、S9 mix 存在下では S9 mix 0.5 mL、試験菌液 0.1 mL を混合し、37℃で 20 分間プレインキュベーションしたのち、2 mL のトップアガーを加えて混和し、最少グルコース寒天平板培地上に流して固めた。また、被験物質調製液のかわりに使用媒体 0.05 mL または陽性対照物質溶液を加えて、それぞれ陰性対照および陽性対照とした。

培養は 37℃で 48 時間行い、出現した変異コロニー数を、コロニーアナライザー(CA-11、システムサイエンス、面積補正有り)または目視により計測した。被験物質に由来する沈殿の有無は、目視により観察した。また、生育阻害の有無については、目視あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌叢の状態から判断した。平板は各用量につき用量設定試験では 1 枚、本試験では 2 枚を使用し、陰性および陽性対照では、各試験とも 2 枚を使用した。陰性および陽性対照の変異コロニー数の平均値を、それぞれ陰性対照値および陽性対照値とした。

3)試験用量

用量設定試験においては、「新規化学物質等に係る試験の方法について」に従い、すべての検定菌で最高用量を 5000 μg/plate とし、1.50、5.00、15.0、50.0、150、500、1500 および 5000 μg/plate の 8 用量を設定した。

本試験 I および II においては、すべての検定菌で最高用量を 5000 μg/plate とし、313、625、1250、2500 および 5000 μg/plate の 5 用量を設定した。

4)無菌試験

小試験管中に、最高用量の被験物質調製液 0.05 mL と 0.1 mol/L ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4) 0.5 mL、あるいは S9 mix 0.5 mL のみを入れ、37℃で 20 分間プレインキュベーションしたのち、2 mL のトップアガー(*S. typhimurium* 用)を加えて混合し、それぞれ最少グルコース寒天平板培地上に流して固めた。37℃で 48 時間培養後、雑菌の混入の有無を調べた。なお、S9 mix の無菌試験については、同日に実施した他の試験と共通に用いた。

5)識別法

平板側面に識別番号を記載した。S9 mix 非存在下は黒、S9 mix 存在下は赤の色で識別した。菌の識別は、TA100 は 0、TA1535 は 5、TA98 は 9、TA1537 は 7、WP2 *uvrA* は W とした。用量の識別は、菌の識別番号の右に用量の低いものから 1、2、3、・・・と記入した。陰性対照および陽性対照は、菌の識別番号の右に各々0 および P と記入して識別した。試験の識別は、試験番号のかわりに菌の識別番号の左に 1 と記入した。生菌数測定における平板の識別は、菌の識別番号の左に VC と記入した。無菌試験における平板の識別は、被験物質については 1 のみを記入し、S9 mix については S9 と記入した。

6)背景データによる管理

陰性対照値および陽性対照値が、秦野研究所における背景データの変動範囲内(平均値±3×標準偏差)から外れた場合には、該当する検定菌について再度、同一用量を用いて試験を実施し、再試験のデータを採用することとした。なお、2011 年度に実施した各試験の陰性対照値および陽性対照値を背景データとした(資料 6)。

7. 結果の表示

結果の表示は、各々の平板における変異コロニー数の実測値とその平均値(小数点以下第一位を四捨五入)を示し、用量－反応曲線の図を添付した。また、被験物質に由来する沈殿および生育阻害が認められた場合は、その旨表示することとした。

8. 判定

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌のS9 mix非存在下あるいはS9 mix存在下において、被験物質を含有する平板上における変異コロニー数の平均値が、陰性対照値の2倍以上に増加し、かつ、その増加に用量依存性あるいは再現性が認められた場合に、当該試験系において遺伝子突然変異誘発性を有する(陽性)と判定することとした。なお、結果の判定に統計学的手法は用いなかった。

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

試験期間中に、「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。

試験成績と考察

1. 用量設定試験

2-Decyltetradecanolについて、1.50、5.00、15.0、50.0、150、500、1500および5000 µg/plateの8用量を設定して用量設定試験を行った(表 1)。その結果、S9 mix非存在下および存在下とも、用いたいずれの検定菌においても生育阻害は認められなかった。被験物質に由来する沈殿は、S9 mix非存在下においては150 µg/plate以上の用量で、S9 mix存在下においては1500 µg/plate以上の用量で認められた。

以上の結果から、2回の本試験(本試験 I および II)における最高用量を、すべての検定菌で5000 µg/plateとした。

2. 本試験

すべての検定菌について、313、625、1250、2500および5000 µg/plateの5用量を設定して、本試験IおよびIIを行った(本試験I:表 2および図 1、本試験II:表 3および図 2)。その結果、2回の本試験ともに、S9 mix非存在下および存在下とも、用いたいずれの検定菌においても生育阻害は認められなかった。被験物質に由来する沈殿は、S9 mix非存在下においてはすべての用量で、S9 mix存在下においては625 µg/plate以上の用量で認められた。また、2回の本試験ともに、用いたいずれの検定菌においても、

S9 mix の有無にかかわらず、陰性対照値の 2 倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。

すべての試験において、用いた最高用量の被験物質調製液および S9 mix への雑菌の混入は認められなかった。また、いずれの検定菌においても陽性対照物質の遺伝子突然変異誘発性が検出され、陽性対照値および陰性対照値は、ともに背景データの変動範囲内(平均値±3×標準偏差)であったことから、当該試験系の妥当性が確認された。

以上の結果から、2-decyltetradecanol は、用いた試験系において遺伝子突然変異誘発性を有しない(陰性)と判定した。

2-Decyltetradecanol については、当研究所で実施したチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験(試験番号:G-12-012)で、陰性の結果が得られている。

また、関連物質である 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate に関しては、復帰突然変異試験で陰性、チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験で陰性の結果が報告されている[4)]。

以上のことから、当該被験物質は、類縁化合物も含め、遺伝子突然変異および染色体異常を誘発しない化合物であると考えられる。

参考文献

1) Matsushima, T., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A., Sawamura, M.: Factors modulating mutagenicity in microbial tests. in "Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens" Norpoth, K. H., Garner, R. C. eds, Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1980) pp. 273-285

2) Maron, D. M., Ames, B. N.: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutation Research 113: 173-215 (1983)

3) Green, M. H. L.: Mutagen testing using Trp^- reversion in *Escherichia coli*. in "Handbook of Mutagenicity Test Procedures" Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C. eds, Elsevier, Amsterdam (1984) pp. 161-187

4) 祖父尼俊雄 監修、染色体異常試験データ集、改訂 1998 年版、Life-Science Information Center、東京(1998)、p.485-486

表 1　2-Decyltetradecanol の細菌を用いる復帰突然変異試験（用量設定試験）

代謝活性化系の有無	被験物質用量 (μg/plate)	試験実施期間：2012年10月30日より2012年11月2日 復帰変異数 コロニー数/plate（平均） 塩基対置換型 TA100	TA1535	WP2 *uvrA*	フレームシフト型 TA98	TA1537
S9 mix (-)	0 (陰性対照)	112 113 (113)	6 11 (9)	24 25 (25)	16 14 (15)	7 5 (6)
	1.50	117	13	29	15	6
	5.00	119	11	26	18	10
	15.0	118	11	25	15	3
	50.0	118	9	24	18	4
	150 †	122	11	22	17	4
	500 †	112	10	25	11	5
	1500 †	119	11	26	15	6
	5000 †	101	5	18	13	6
S9 mix (+)	0 (陰性対照)	117 119 (118)	11 7 (9)	29 34 (32)	31 34 (33)	15 14 (15)
	1.50	126	10	31	41	14
	5.00	126	10	29	31	12
	15.0	126	14	33	39	15
	50.0	138	7	28	27	17
	150	135	9	30	35	21
	500	118	10	28	27	14
	1500 †	155	9	31	18	13
	5000 †	143	6	33	31	16
陽性対照 S9 mixを必要としないもの	名称	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9AA
	用量(μg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	コロニー数/plate	427 386 (407)	537 494 (516)	87 70 (79)	417 399 (408)	183 176 (180)
陽性対照 S9 mixを必要とするもの	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
	用量(μg/plate)	5	2	10	5	5
	コロニー数/plate	1026 960 (993)	380 363 (372)	623 695 (659)	263 263 (263)	127 157 (142)

陰性対照, アセトン

AF-2, 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; SA, Sodium azide; 9AA, 9-Aminoacridine; B[a]P, Benzo[a]pyrene; 2AA, 2-Aminoanthracene

†, 沈殿が認められた。

表 2　2-Decyltetradecanol の細菌を用いる復帰突然変異試験(本試験 I)

代謝活性化系の有無	被験物質用量 (μg/plate)	試験実施期間:2012年11月6日より2012年11月9日 復帰変異数 コロニー数/plate(平均) 塩基対置換型 TA100	TA1535	WP2 *uvrA*	フレームシフト型 TA98	TA1537
S9 mix (-)	0 (陰性対照)	82 86 (84)	13 12 (13)	30 33 (32)	17 11 (14)	7 5 (6)
	313 †	107 81 (94)	16 13 (15)	32 27 (30)	21 22 (22)	8 6 (7)
	625 †	80 106 (93)	12 17 (15)	23 32 (28)	17 18 (18)	4 7 (6)
	1250 †	83 99 (91)	14 8 (11)	27 36 (32)	23 18 (21)	5 8 (7)
	2500 †	97 104 (101)	15 14 (15)	31 26 (29)	15 16 (16)	10 5 (8)
	5000 †	87 118 (103)	15 11 (13)	29 25 (27)	12 18 (15)	5 8 (7)
S9 mix (+)	0 (陰性対照)	98 101 (100)	10 14 (12)	34 35 (35)	28 24 (26)	12 13 (13)
	313	107 99 (103)	16 10 (13)	40 32 (36)	34 36 (35)	19 15 (17)
	625 †	122 100 (111)	15 11 (13)	38 38 (38)	36 29 (33)	17 14 (16)
	1250 †	113 106 (110)	13 15 (14)	31 25 (28)	33 28 (31)	13 14 (14)
	2500 †	100 136 (118)	10 16 (13)	21 29 (25)	29 36 (33)	9 8 (9)
	5000 †	120 103 (112)	18 9 (14)	38 26 (32)	27 28 (28)	12 14 (13)
陽性対照 S9 mixを必要としないもの	名称	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9AA
	用量(μg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	コロニー数/plate	360 351 (356)	580 541 (561)	71 103 (87)	421 446 (434)	207 256 (232)
陽性対照 S9 mixを必要とするもの	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
	用量(μg/plate)	5	2	10	5	5
	コロニー数/plate	909 848 (879)	394 415 (405)	754 705 (730)	295 287 (291)	153 124 (139)

陰性対照, アセトン

AF-2, 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; SA, Sodium azide; 9AA, 9-Aminoacridine; B[a]P, Benzo[a]pyrene; 2AA, 2-Aminoanthracene

†, 沈殿が認められた。

表 3　2-Decyltetradecanol の細菌を用いる復帰突然変異試験(本試験 II)

代謝活性化系の有無	被験物質用量 (μg/plate)	試験実施期間:2012年11月12日より2012年11月15日 復帰変異数 コロニー数/plate(平均) 塩基対置換型 TA100	TA1535	WP2 *uvrA*	フレームシフト型 TA98	TA1537
S9 mix (-)	0 (陰性対照)	89 102 (96)	13 12 (13)	32 39 (36)	23 13 (18)	5 6 (6)
	313 †	86 84 (85)	11 8 (10)	35 39 (37)	19 12 (16)	5 4 (5)
	625 †	90 99 (95)	14 11 (13)	39 28 (34)	19 20 (20)	10 3 (7)
	1250 †	110 94 (102)	11 13 (12)	31 39 (35)	18 16 (17)	4 4 (4)
	2500 †	101 99 (100)	12 11 (12)	44 33 (39)	21 21 (21)	8 5 (7)
	5000 †	100 93 (97)	9 11 (10)	39 35 (37)	25 17 (21)	6 8 (7)
S9 mix (+)	0 (陰性対照)	106 117 (112)	8 8 (8)	42 42 (42)	31 36 (34)	21 19 (20)
	313	87 104 (96)	13 12 (13)	42 39 (41)	28 36 (32)	17 17 (17)
	625 †	128 87 (108)	8 8 (8)	47 39 (43)	32 30 (31)	15 25 (20)
	1250 †	106 120 (113)	11 8 (10)	33 33 (33)	31 27 (29)	16 14 (15)
	2500 †	115 108 (112)	8 9 (9)	27 38 (33)	19 26 (23)	17 19 (18)
	5000 †	109 124 (117)	10 13 (12)	27 32 (30)	27 22 (25)	18 23 (21)
陽性対照 S9 mixを必要としないもの	名称	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9AA
	用量(μg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	コロニー数/plate	380 393 (387)	569 508 (539)	103 90 (97)	394 432 (413)	264 221 (243)
陽性対照 S9 mixを必要とするもの	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
	用量(μg/plate)	5	2	10	5	5
	コロニー数/plate	1062 948 (1005)	403 369 (386)	582 566 (574)	270 278 (274)	133 148 (141)

陰性対照, アセトン

AF-2, 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; SA, Sodium azide; 9AA, 9-Aminoacridine; B[a]P, Benzo[a]pyrene; 2AA, 2-Aminoanthracene

†, 沈殿が認められた。

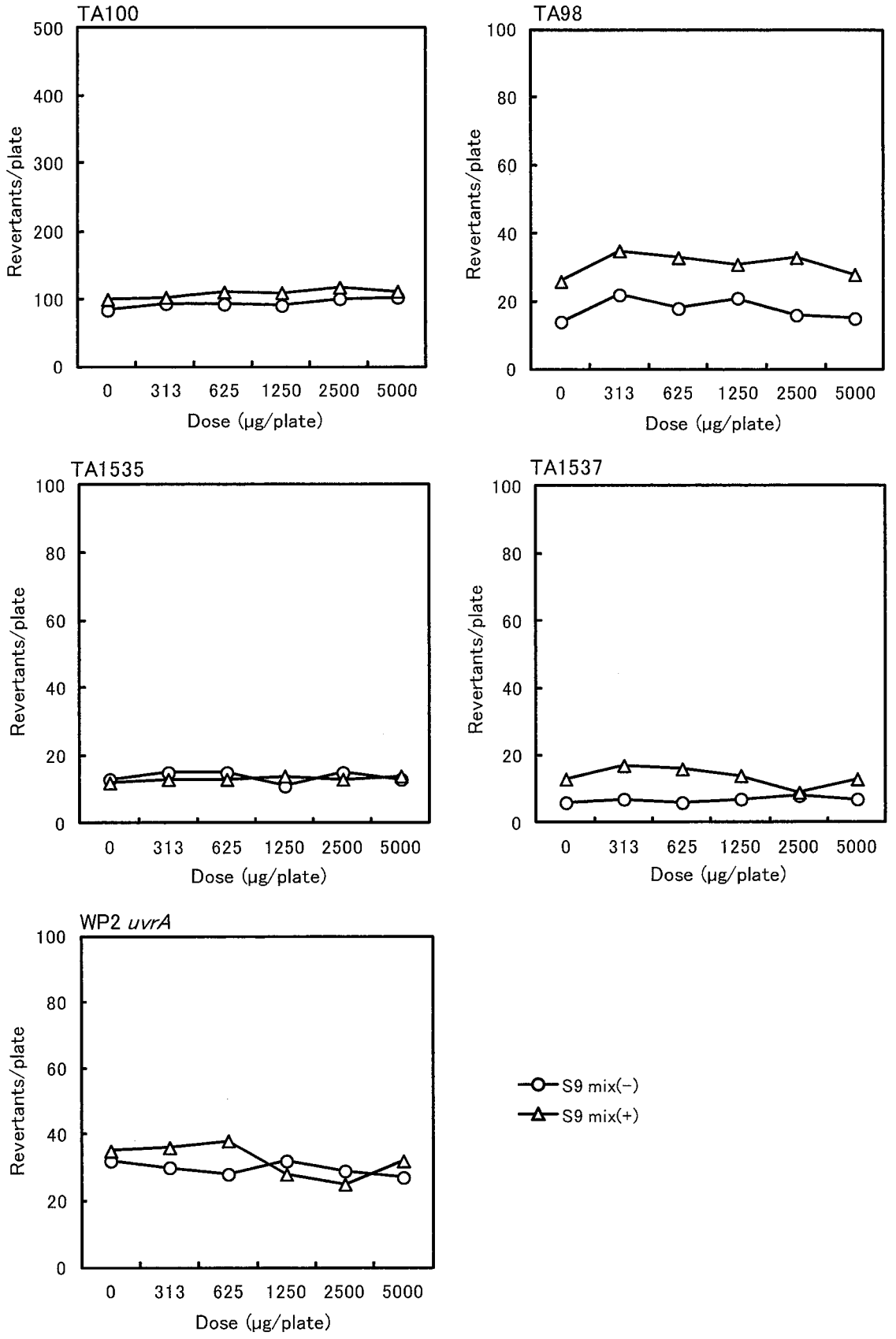


図 1　2-Decyltetradecanol の細菌を用いる復帰突然変異試験（本試験 I）

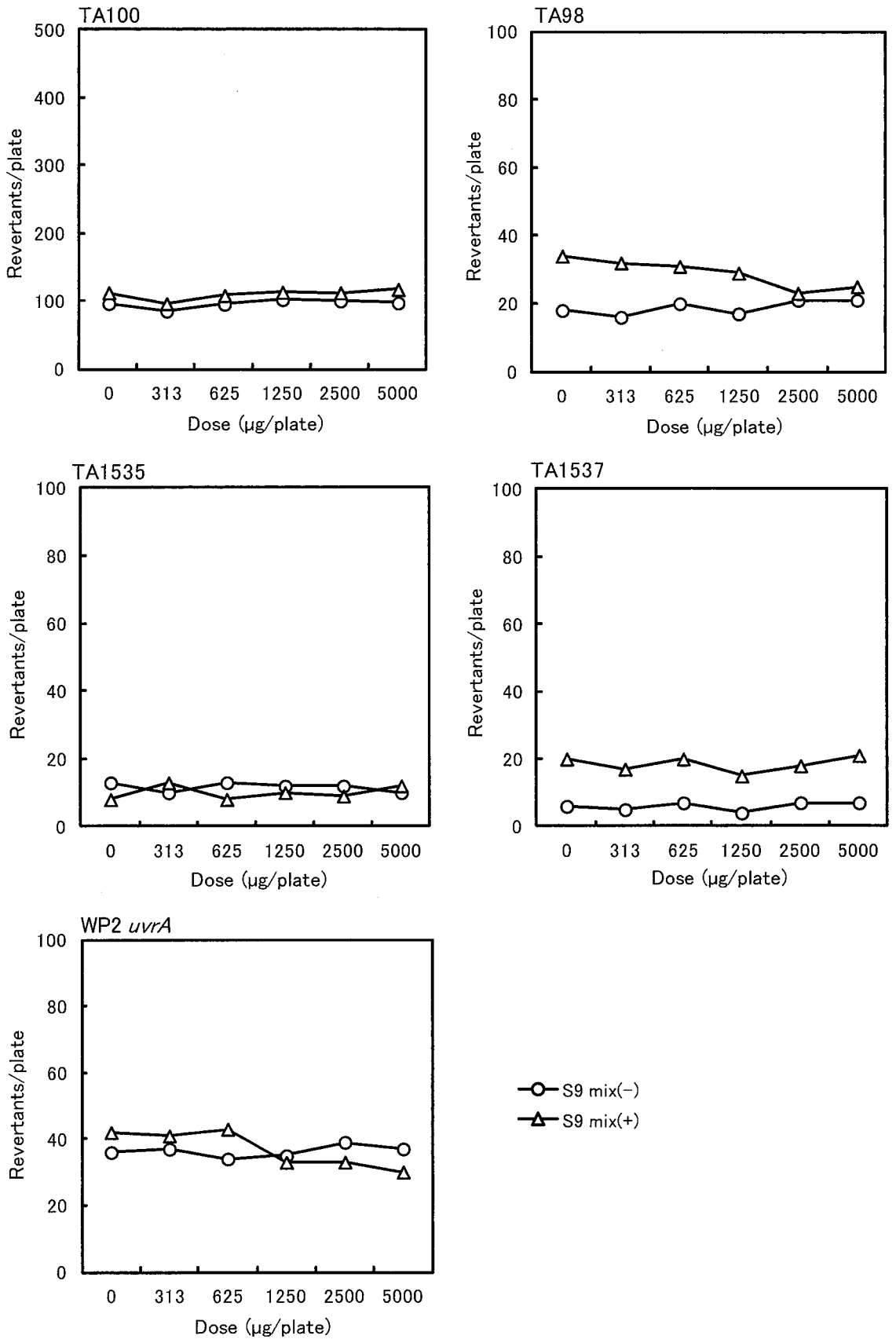


図 2　2-Decyltetradecanol の細菌を用いる復帰突然変異試験（本試験 II）

資料 1

Certificate of Analysis

SIGMA-ALDRICH

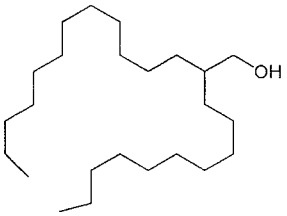
Product Name	2-Decyl-1-tetradecanol, 97%
Product Number	464503
Product Brand	ALDRICH
CAS Number	58670-89-6
Molecular Formula	$CH_3(CH_2)_{11}CH[(CH_2)_9CH_3]CH_2OH$
Molecular Weight	354.65

TEST	**LOT 08403DOV RESULTS**
APPEARANCE	VISCOUS COLORLESS LIQUID
INFRARED SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE.
PROTON NMR SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE.
GAS LIQUID CHROMATOGRAPHY	98.4 %
QUALITY CONTROL ACCEPTANCE DATE	APRIL 2001

[redacted] Supervisor
Quality Control
Milwaukee, Wisconsin USA

資料 2

被験物質の一般的事項

新規化学物質等の名称 (IUPAC 命名法による)	2-デシルテトラデカン-1-オル
別名	2-Decyltetradecanol、2-デシル-1-テトラデカノール、 デシルテトラデカノール
CAS番号	58670-89-6
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合は、その製法の概要)	
分子量	354.65
試験に供した新規化学物質の純度(%)	98.4%(GC)
試験に供した新規化学物質のロット番号	08403DOV
不純物の名称及び含有率	――――
蒸気圧	――――
対水溶解度	――――
1-オクタノール／水分配係数	――――
融点	17～20℃
沸点	271～275℃/33 mmHg
常温における性状	粘性のある無色液体
安定性	――――

溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度 *	溶媒中の安定性 *
	水	50.0 mg/mL で不溶	50.0 mg/mL の濃度では、調製時に発熱、発泡および変色は認められなかった。
	DMSO	50.0 mg/mL で不溶	50.0 mg/mL の濃度では、調製時に発熱、発泡および変色は認められなかった。
	アセトン	350 mg/mL で溶解	350 mg/mL の濃度では、調製時に発熱、発泡および変色は認められなかった。調製後 24 時間の安定性(0.0500 mg/mL および 350 mg/mL、室温、遮光保管)を確認した。

〔備考〕物理化学的性状は、可能な限り記入すること。
1.「蒸気圧」の欄には、被験物質の蒸気圧を記入すること。
2.「安定性」の欄には、温度、光等に対する安定性を記入すること。
3.「溶媒に対する溶解度等」の欄には、被験物質の溶媒に対する溶解度及びその溶媒中での安定性を記入すること。
*:(財)食品薬品安全センター秦野研究所において確認した。

資料 3

被験物質原体の安定性の測定方法

① 使用機器

フーリエ変換赤外分光光度計(FTIR-8300)　　島津製作所

② 測定条件

測定方法　　液膜法

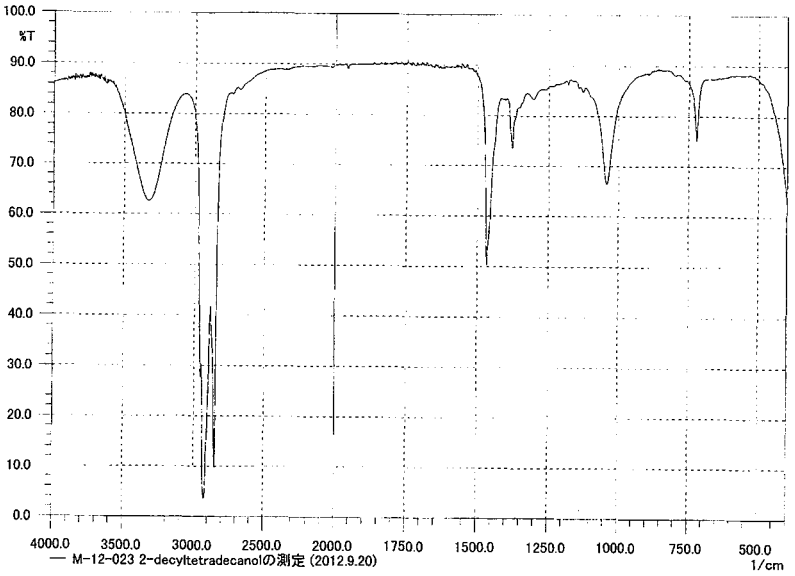
波数範囲　　4000～400 cm^{-1}

③ 測定方法

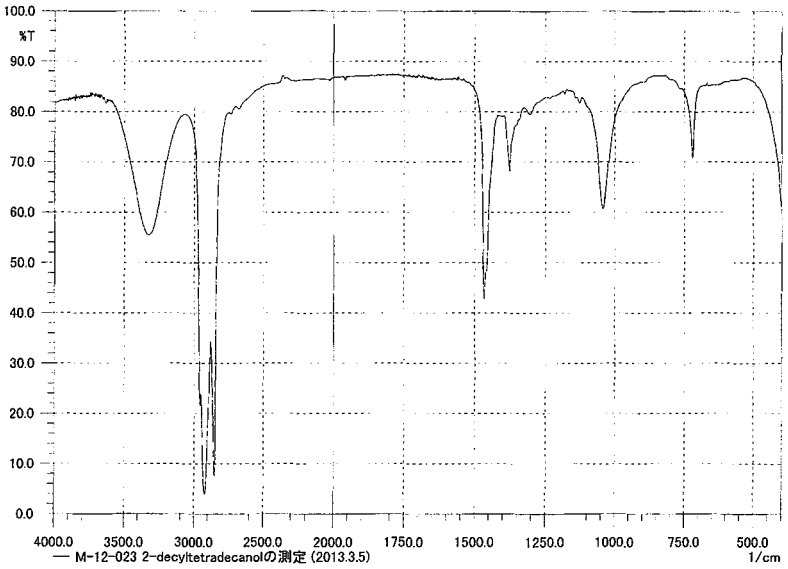
被験物質 1、2 滴を 2 枚の窓板(臭化カリウム)の間に挟み、測定した。対照は、測定雰囲気のバックグラウンド吸収とした。

2-Decyltetradecanol の赤外吸収スペクトル測定結果

実験開始前



実験終了後



資料 4

被験物質調製液中の被験物質濃度測定法

① 試薬

アセトン(HPLC 用)　和光純薬工業

安息香酸ベンジル(東京化成特級)　東京化成工業

② 使用機器

電子天秤(R200D)　ザルトリウス

ガスクロマトグラフ(GC)システム　島津製作所

主要構成: GC-14B(ガスクロマトグラフ)、AOC-20i(オートインジェクタ)、C-R7A plus(データ処理装置)

③ 内部標準溶液(以下、IS 溶液)の調製

安息香酸ベンジル約 10 mg を精密に量り(調製直後:10.25 mg、調製後 24 時間:10.44 mg)、アセトンに溶解して正確に 10 mL とした(調製直後:1025 μg/mL、調製後 24 時間:1044 μg/mL)。この液 2.5 mL を正確に採り、アセトンを加えて正確に 50 mL とし、IS 溶液とした(調製直後:51.25 μg/mL、調製後 24 時間:52.20 μg/mL)。

④ 標準溶液の調製

被験物質約 50 mg を精密に量り(調製直後:50.50 mg、調製後 24 時間:52.25 mg)、アセトンに溶解して正確に 25 mL として、標準原液(調製直後:2.020 mg/mL、調製後 24 時間:2.090 mg/mL)とした。この標準原液 2.0 mL を正確に採り、アセトンを加えて正確に 20 mL とし、標準溶液(調製直後:202.0 μg/mL、調製後 24 時間:209.0 μg/mL)とした。この標準溶液 1.0、2.5 および 2.5 mL を正確にとり、アセトンを加えてそれぞれ正確に 10、10 および 5 mL とし、標準溶液(調製直後:20.20、50.50 および 101.0 μg/mL、調製後 24 時間:20.90、52.25 および 104.5 μg/mL、各濃度 n=1)を調製した。これらの標準溶液と IS 溶液を 1:1 (v/v)の割合で混合し、測定用標準溶液とした。

⑤ 試料溶液の調製

被験物質調製液の 1 mL を正確にとり、アセトンで適宜希釈し、検量線の範囲内となるように試料溶液を調製した。これらの試料溶液と IS 溶液を 1:1 (v/v)の割合で混合し、測定用試料溶液とした。測定用試料溶液は、被験物質調製液の採取から n=3 で調製した。

⑥ 検量線の作成および被験物質調製液中被験物質濃度の算出

測定用試料溶液および測定用標準溶液をガスクロマトグラフィーにより測定した。測定用標準溶液は n=2 で測定し、得られた IS のピーク面積に対する 2-DT のピーク面積比と調製濃度を基に、最小二乗法により検量線を作成した。測定用試料溶液は、各 n=1 で測定し、得られた 2-DT のピーク面積比から、先の検量線を用いて、試料溶液中の 2-DT の濃度を求めた。さらに、希釈係数を乗じて被験物質調製液中の 2-DT 濃度を算出し、調製濃度に対する割合(含量、%)および各測定濃度の平均値に対するばらつき(%)を算出した。

⑦ ガスクロマトグラフ測定条件

検出器	水素炎イオン化検出器(FID) 水素 60 kPa、空気 50 kPa、メイクアップガス 30 kPa(ヘリウム)
分析カラム	DB-5 (長さ 30 m、内径 0.32 mm、膜厚 0.25 μm、J&W Scientific)
キャリヤガス	ヘリウム (100 kPa)
カラム温度	200℃ (0 分) → 30℃/分 → 320℃ (1.5 分)
注入口設定温度	300℃
検出器設定温度	320℃
試料注入量	3.0 μL
試料注入方式	スプリット
オートインジェクタ洗浄液	アセトン
モニター時間	5.5 分
システムの適合性	分析開始前に、測定用標準溶液(調製直後:101.0 μg/mL、調製後 24 時間:104.5 μg/mL を 3 回測定し、2-DT のピーク保持時間および IS に対するピーク面積比の相対標準偏差(%)がそれぞれ±3.0%以内および±5.0%以内であることを確認した。

⑧ 数値の取り扱い

1) システム適合性におけるピーク保持時間、ピーク面積は機器の出力値をそのまま使用した。ピーク保持時間の平均値は、四捨五入して小数点以下第 3 位まで、ピーク面積比およびその平均値は切り捨てて小数点以下第3位まで表示した。また、相対標準偏差は四捨五入して小数点以下第1位まで求めた。

2)被験物質の秤量: 有効数字 3 桁以上

標準物質の秤量: 有効数字 4 桁以上

投与検体の濃度: 有効数字 3 桁(有効数字 4 桁目を四捨五入)

標準溶液の濃度: 有効数字 4 桁(有効数字 5 桁目を切り捨て)

測定結果の濃度およびそれらの平均値:

有効数字 4 桁(有効数字 5 桁目を切り捨て)

測定結果の含量(%)、ばらつき(%)および残存率(%)ならびにそれらの平均値:

小数点以下第 1 位(小数点以下第 2 位を四捨五入)

資料 5

安定性試験結果

試験番号	M－12－023

被験物質：2-decyltetradecanol
ロット番号：08403DOV
媒　　体：アセトン

調製年月日　2012年10月22日
測定年月日　A　2012年10月22日（調製直後）
　　B　2012年10月23日（調製後24時間）
保管条件　室温、遮光

調製濃度 (mg/mL)	A				B				
	試料番号	測定濃度 (mg/mL)	含量[a] (%)	ばらつき[b] (%)	試料番号	測定濃度 (mg/mL)	含量[a] (%)	ばらつき[b] (%)	残存率[c] (%)
0.0500	1	0.05146	102.9	99.0	7	0.05252	105.0	100.2	101.0
	2	0.05231	104.6	100.6	8	0.05173	103.5	98.7	99.5
	3	0.05218	104.4	100.4	9	0.05296	105.9	101.1	101.9
	平均	0.05198	104.0		平均	0.05240	104.8		100.8
350	4	355.6	101.6	100.5	10	353.9	101.1	97.9	100.1
	5	349.6	99.9	98.8	11	352.1	100.6	97.4	99.5
	6	356.1	101.7	100.7	12	378.7	108.2	104.8	107.1
	平均	353.7	101.1		平均	361.5	103.3		102.2

a)：各測定時の測定濃度／調製濃度×100　b)：各測定時の測定濃度／各測定時の平均測定濃度×100　c)：各測定時の測定濃度／初回の平均測定濃度×100

安定性の判断基準（溶液検体）

調製直後および保管後の平均含量がそれぞれ調製濃度の90.0～110.0%、また、各測定値のばらつきがそれぞれ平均値の90.0～110.0%以内であり、かつ、調製直後の測定平均値に対する保管後の残存率が平均値の90.0%以上を示す期間。

資料 6

試験に用いた検定菌の復帰変異コロニー数の背景データ（プレインキュベーション法）

（2011 年 4 月～2012 年 3 月）

	陰性対照値		陽性対照値	
	(- S9 mix)	(+ S9 mix)	(- S9 mix)	(+ S9 mix)
TA100	102 ± 12* (n=149)	101 ± 13 (n=156)	358 ± 39 (AF-2, 0.01 μg/plate) (n=145)	1016 ± 103 (B[a]P, 5 μg/plate) (n=85)
TA1535	11 ± 3 (n=143)	11 ± 3 (n=144)	551 ± 55 (SA, 0.5 μg/plate) (n=139)	399 ± 42 (2AA, 2 μg/plate) (n=140)
WP2 *uvrA*	28 ± 6 (n=141)	32 ± 6 (n=145)	99 ± 14 (AF-2, 0.01 μg/plate) (n=137)	630 ± 101 (2AA, 10 μg/plate) (n=141)
TA98	21 ± 4 (n=149)	30 ± 4 (n=155)	430 ± 61 (AF-2, 0.1 μg/plate) (n=145)	326 ± 38 (B[a]P, 5 μg/plate) (n=84)
TA1537	9 ± 2 (n=145)	17 ± 3 (n=150)	373 ± 95 (9AA, 80 μg/plate) (n=141)	149 ± 18 (B[a]P, 5 μg/plate) (n=85)

*:平均値の平均 ± 標準偏差
n:試験数

AF-2 :2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide
SA :Sodium azide
9AA :9-Aminoacridine
B[a]P :Benzo[a]pyrene
2AA :2-Aminoanthracene

信頼性保証書

表題　　2-Decyltetradecanol の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号　　M-12-023

この試験に関する信頼性保証部門による査察および監査状況等は下記のとおりであった。

査察・監査項目	査察・監査年月日	運営管理者および試験責任者への報告年月日
試験計画書	2012 年 9 月 11 日	2012 年 9 月 11 日
被験物質原体の安定性(実験開始前)	2012 年 9 月 20 日	2012 年 9 月 20 日
媒体中の安定性(調製直後)	2012 年 10 月 22 日	2012 年 10 月 22 日
被験物質調製液の調製および検定菌処理	2012 年 11 月 7 日	2012 年 11 月 7 日
コロニー数の計測	2012 年 11 月 9 日	2012 年 11 月 9 日
報告書草案および生データ	2013 年 3 月 7、8 日	2013 年 3 月 8 日
最終報告書	2013 年 3 月 22 日	2013 年 3 月 22 日

試験は、「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」(平成 23 年 3 月 31 日、薬食発 0331 第 8 号、平成 23・03・29 製局第 6 号、環保企発第 110331010 号)を遵守して実施され、また、この報告書は試験に使用された方法および手順を正確に記載し、記載された結果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。

2013 年 3 月 22 日

財団法人食品薬品安全センター秦野研究所
信頼性保証部門責任者 [redacted]