

T-2179



## 最 終 報 告 書

エチル＝ステアラートの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号 : T-2179

試験期間 : 2017年1月13日-2017年3月28日

### 試験施設

株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所  
〒156-0042 東京都世田谷区羽根木 1-3-11

### 試験委託者

厚生労働省 医薬・生活衛生局  
医薬品審査管理課 化学物質安全対策室  
〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1-2-2

株式会社ボゾリサーチセンター  
〒151-0065 東京都渋谷区大山町 36-7

T-2179

## 1. GLP 陳述書

試験番号 : T-2179

試験表題 : エチル＝ステアラートの細菌を用いる復帰突然変異試験

本試験は以下の GLP 基準を遵守して実施したものです。

- 「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)

\_\_\_\_\_



試験責任者  
株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所 研究部

## 2. 目次

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1.    | GLP 陳述書 .....   | 2  |
| 2.    | 目次 .....  | 3  |
| 3.    | 試験実施概要 .....  | 6  |
| 3.1   | 試験番号 .....  | 6  |
| 3.2   | 試験表題 .....  | 6  |
| 3.3   | 試験目的 .....  | 6  |
| 3.4   | 試験委託者 .....   | 6  |
| 3.5   | 試験受託者 .....   | 6  |
| 3.6   | 試験実施施設 .....  | 6  |
| 3.7   | 試験日程 .....  | 6  |
| 3.8   | 試験責任者 .....   | 7  |
| 3.9   | 試験担当者 .....   | 7  |
| 3.10  | 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及び試験計画書に従わなかつたこと ..... | 7  |
| 3.11  | 試資料の保存 .....  | 7  |
| 3.12  | 試験責任者の署名又は記名・押印 .....                                   | 7  |
| 4.    | 要約 .....  | 8  |
| 5.    | 緒言 .....  | 9  |
| 6.    | 被験物質及び被験液の調製 .....                                      | 10 |
| 6.1   | 被験物質及び溶媒 .....  | 10 |
| 6.1.1 | 被験物質 .....  | 10 |
| 6.1.2 | 溶媒 .....  | 11 |
| 6.1.3 | 溶媒の選択理由 .....   | 11 |
| 6.2   | 被験液の調製方法 .....  | 11 |
| 6.2.1 | 用量設定試験用被験液の調製 .....                                     | 11 |
| 6.2.2 | 本試験用被験液の調製 .....  | 11 |
| 7.    | 試験材料及び方法 .....  | 12 |
| 7.1   | 試験菌株 .....  | 12 |
| 7.1.1 | 菌株の種類 .....   | 12 |
| 7.1.2 | 菌株の選択理由 .....   | 12 |
| 7.1.3 | 菌株の保存及び解凍 .....   | 12 |
| 7.1.4 | 菌株の特性検査 .....   | 13 |
| 7.2   | 対照物質 .....  | 13 |
| 7.2.1 | 陰性対照物質 .....  | 13 |
| 7.2.2 | 陽性対照物質 .....  | 13 |
| 7.2.3 | 調製方法 .....  | 13 |

|       |                                 |    |
|-------|---------------------------------|----|
| 7.3   | 試薬 .....                        | 14 |
| 7.3.1 | S9 Mix の調製方法.....               | 14 |
| 7.3.2 | 培地 .....                        | 15 |
| 7.3.3 | ニュートリエントプロス No.2 培養液 .....      | 16 |
| 7.3.4 | 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) ..... | 16 |
| 7.3.5 | トップアガー.....                     | 16 |
| 7.4   | 試験方法.....                       | 17 |
| 7.4.1 | 前培養.....                        | 17 |
| 7.4.2 | プレート数.....                      | 18 |
| 7.4.3 | 試験操作 (プレインキュベーション法) .....       | 18 |
| 7.5   | 判定基準.....                       | 18 |
| 8.    | 試験結果 .....                      | 19 |
| 8.1   | 用量設定試験の観察結果及び本試験用量の設定.....      | 19 |
| 8.2   | 本試験の観察結果 .....                  | 19 |
| 8.3   | 試験の成立条件.....                    | 19 |
| 9.    | 考察 .....                        | 20 |
| 10.   | 参考文献 .....                      | 20 |

**Tables**

|      |                      |    |
|------|----------------------|----|
| 別表 1 | 試験結果表 (用量設定試験) ..... | 21 |
| 別表 2 | 試験結果表 (本試験) .....    | 22 |

**Figures**

|      |   |    |
|------|---|----|
| 図 1  | 用量反応曲線 (本試験 TA100 : -S9Mix) .....           | 23 |
| 図 2  | 用量反応曲線 (本試験 TA100 : +S9Mix) .....           | 23 |
| 図 3  | 用量反応曲線 (本試験 TA1535 : -S9Mix) .....          | 24 |
| 図 4  | 用量反応曲線 (本試験 TA1535 : +S9Mix) .....          | 24 |
| 図 5  | 用量反応曲線 (本試験 WP2 <i>uvrA</i> : -S9Mix) ..... | 25 |
| 図 6  | 用量反応曲線 (本試験 WP2 <i>uvrA</i> : +S9Mix) ..... | 25 |
| 図 7  | 用量反応曲線 (本試験 TA98 : -S9Mix) .....            | 26 |
| 図 8  | 用量反応曲線 (本試験 TA98 : +S9Mix) .....            | 26 |
| 図 9  | 用量反応曲線 (本試験 TA1537 : -S9Mix) .....          | 27 |
| 図 10 | 用量反応曲線 (本試験 TA1537 : +S9Mix) .....          | 27 |

**Attached Data**

|               |                      |    |
|---------------|----------------------|----|
| Attached Data | 背景データ (160908) ..... | 28 |
|---------------|----------------------|----|

T-2179

信賴性保証書 ..... 29

T-2179

### 3. 試験実施概要

#### 3.1 試験番号

T-2179

#### 3.2 試験表題

エチル＝ステアラートの細菌を用いる復帰突然変異試験

#### 3.3 試験目的

細菌を用い、エチル＝ステアラートの遺伝子突然変異誘発能の有無を明らかにすることを目的とした。

#### 3.4 試験委託者

厚生労働省 医薬・生活衛生局 医薬品審査管理課 化学物質安全対策室  
〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1-2-2

#### 3.5 試験受託者

株式会社ボゾリサーチセンター  
〒151-0065 東京都渋谷区大山町 36-7

#### 3.6 試験実施施設

株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所  
〒156-0042 東京都世田谷区羽根木 1-3-11

#### 3.7 試験日程

試験開始日 : 2017年 1月 13日  
用量設定試験開始日 : 2017年 1月 13日  
用量設定試験終了日 : 2017年 1月 16日  
本試験開始日 : 2017年 1月 18日  
本試験終了日 : 2017年 1月 23日  
試験終了日 : 2017年 3月 28日

### 3.8 試験責任者

株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所 研究部 第1研究室  
[REDACTED]

### 3.9 試験担当者

被験物質保存責任者 :

試験担当者 :

[REDACTED]

### 3.10 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つたこと

本試験において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つたことはなかった。

### 3.11 試資料の保存

試験計画書（試験計画書変更書を含む）、記録文書、被験物質、生データ及び報告書類（最終報告書の原本を含む）は、株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所の資料保存施設に保存する。なお、その期間は最終報告書提出後 10 年間とする。期間終了後の保存については、厚生労働省 医薬・生活衛生局 医薬品審査管理課と株式会社ボゾリサーチセンター間で協議し、その処置を決定する。

### 3.12 試験責任者の署名又は記名・押印

株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所  
[REDACTED]

#### 4. 要約

エチル＝ステアラートの遺伝子突然変異誘発能の有無を明らかにするため、ネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium*（以下、*S. typhimurium* と略す）TA100、TA1535、TA98、TA1537 及び大腸菌 *Escherichia coli*（以下、*E. coli* と略す）WP2 *uvrA* を用いて、代謝活性化する場合及び代謝活性化しない場合の条件下で、プレインキュベーション法により実施した。なお、被験物質の溶媒にはアセトンを用いた。

本試験用量を設定するため、1.22~5000 µg/plate の範囲の被験物質処理用量で用量設定試験を実施した。その結果より本試験は、生育阻害が認められなかつたため沈殿の認められた最低用量を最高用量として、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての菌株において 78.1~1250 µg/plate の範囲の 5 用量で実施した。

##### 1) 被験物質による沈殿及び着色

本被験物質によるプレート上の沈殿は、代謝活性化の有無にかかわらず 625 µg/plate 以上の用量で認められた。本被験物質によるプレート上の着色は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかつた。

##### 2) 生育阻害

菌に対する生育阻害は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても認められなかつた。

##### 3) 復帰変異コロニー数

用量設定試験及び本試験ともに、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても陰性対照値の 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量反応性も認められなかつた。

以上の試験結果より、本試験条件下においてエチル＝ステアラートは、細菌に対する遺伝子突然変異誘発能を有さない（陰性）と判定した。

## 5. 緒言

本試験は、厚生労働省 医薬・生活衛生局 医薬品審査管理課の委託により、株式会社ボヅリサーチセンターで実施した。なお、試験は以下の基準を遵守し、ガイドラインに準拠して行った。

### 1) GLP

- 「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)

### 2) ガイドライン

- 「新規化学物質等に係る試験の方法について」  
(平成 27 年 12 月 21 日：薬食発 1221 第 1 号、20151209 製局第 1 号、環保企発第 1512211 号)

## 6. 被験物質及び被験液の調製

### 6.1 被験物質及び溶媒

#### 6.1.1 被験物質

|              |   |   |
|--------------|---|---|
| 製造者          | : | [REDACTED]  |
| 名称           | : | エチル=ステアラート  |
| CAS 番号       | : | 111-61-5  |
| 官報公示整理番号     | : | (2)-798 (化審法)   |
| 構造式又は示性式     | : | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}-\overset{\text{O}}{\underset{  }{\text{C}}}-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ |
| 分子式          | : | $\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{O}_2$  |
| 分子量          | : | 312.54  |
| 物理的状態 (20°C) | : |   |
|              | : | 固体  |
| 形状           | : | 結晶  |
| 色            | : | 白色～ごくうすい黄色  |
| 融点           | : | 30°C (凝固点)  |
| 沸点／沸騰範囲      | : | 199°C / 1.3kPa  |
| ロット番号        | : | 3DX4G   |
| 純度           | : | 98.9%   |
| 溶解性          | : | 水、ジメチルスルホキシド (以下、DMSO と略す) :<br>50 mg/mL で不溶<br>アセトン : 100 mg/mL で溶解                                |
| 溶媒中での安定性     | : | 水、DMSO、アセトン : 発熱・ガスの発生等の反応性なし   |
| 保存方法         | : | 冷暗所、密栓  |
| 保存場所         | : | 東京研究所 被験物質保存室及び御殿場研究所 被験物質保存室   |
| 保存温度         | : | 保存期間中の実測温度<br>(2016.10.4~2017.1.19 : 3.5~6.0°C)   |
| 安定性          | : | 関連試験 (T-G240) の実験終了後、株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所で被験物質が安定であることを確認した。                                       |
| 取扱い上の注意      | : | 作業場の換気を十分に行い、マスク、保護眼鏡、保護手袋等の適切な保護具を着用し、直接の接触を防ぐ。取り扱い後は、手、顔等を良く洗い、うがいをする。                            |
| 使用後の処理       | : | 使用後の残量は、試験終了後全て廃棄した。  |

上記被験物質情報は、製造者からの情報による。なお、溶解性及び溶媒中での安定性は、株式会社ボゾリサーチセンターで実施した溶解性試験の結果である。

### 6.1.2 溶媒

|       |   |                     |
|-------|---|---------------------|
| 名称    | : | アセトン                |
| 製造元   | : | 和光純薬工業株式会社          |
| ロット番号 | : | DSP1983             |
| 規格    | : | JIS 規格 試薬特級 99.5%以上 |
| 保存方法  | : | 室温                  |
| 保存場所  | : | 東京研究所 被験物質調製室       |

### 6.1.3 溶媒の選択理由

水、DMSO 及びアセトンについて溶解性試験を実施した。その結果、水、DMSO の 50 mg/mL では不溶であったが、アセトンの 100 mg/mL では溶解し、発熱、ガスの発生等の反応性も認められなかったためアセトンを溶媒として試験を実施した。なお、被験液の調製には、モレキュラーシーブス 4A 1/16 (和光純薬工業株式会社 ; Lot No. HWG7622) で脱水したアセトンを使用した。

## 6.2 被験液の調製方法

### 6.2.1 用量設定試験用被験液の調製

滅菌した調製用試験管に被験物質を電子天秤(株式会社エー・アンド・ディ:GR-120)を用いて秤量した。その秤量値 230.0 mg に最高調製濃度の 100 mg/mL となるように溶媒量を計算し、2.300 mL のアセトンを添加して溶解し、100 mg/mL の被験液を調製した。次いで、これを公比 4 で順次 6 段階希釈し、100、25、6.25、1.56、0.391、0.0977 及び 0.0244 mg/mL の計 7 濃度の被験液を調製した。なお、被験液の調製は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で使用時に、その過程において発熱、ガスの発生等の反応性は認められなかった。

### 6.2.2 本試験用被験液の調製

滅菌した調製用試験管に被験物質を電子天秤(株式会社エー・アンド・ディ:GR-120)を用いて秤量した。その秤量値 273.6 mg に最高調製濃度の 100 mg/mL となるように溶媒量を計算し、2.736 mL のアセトンを添加して溶解し、100 mg/mL 溶液を調製した。次いで、これを 4 倍希釈して 25 mg/mL の被験液を調製した。これをさらに公比 2 で順次 4 段階希釈し、25、12.5、6.25、3.13 及び 1.56 の計 5 濃度の被験液を調製した。なお、被験液の調製は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で使用時に、その過程において発熱、ガスの発生等の反応性は認められなかった。

## 7. 試験材料及び方法

### 7.1 試験菌株

#### 7.1.1 菌株の種類

次の5種類の菌株を用いた。

塩基対置換型

*S. typhimurium* TA100

*S. typhimurium* TA1535

*E. coli* WP2 *uvrA*

フレームシフト型

*S. typhimurium* TA98

*S. typhimurium* TA1537

なお、*S. typhimurium* TA 株は国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部より 1997 年 10 月 9 日に株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所で入手したものから、2005 年 7 月 21 日に東京研究所に分与された。また、*E. coli* WP2 *uvrA* は、独立行政法人製品評価技術基盤機構より 2011 年 10 月 20 日に入手した。

#### 7.1.2 菌株の選択理由

当該菌株は変異原性物質に対する感受性が高く、細菌を用いる復帰突然変異試験に最も一般的に使用されている。

#### 7.1.3 菌株の保存及び解凍

入手した菌株から継代して凍結保存した菌懸濁液を培養し、得られた菌懸濁液 8.0 mL に対して DMSO(和光純薬工業株式会社、JIS 規格試薬特級、ロット番号 ECE6658) を 0.7 mL の割合で添加した。これを滅菌チューブに 0.3 mL ずつ分注し、ドライアイス-アセトンで急速凍結した後、-70°C 以下の超低温フリーザ（三洋電機バイオメディカ株式会社：MDF-192）で保存した（保存期間中の実測温度 2016 年 8 月 25 日～2017 年 1 月 18 日：-85.9～-78.5°C）。なお、使用する際は室温で解凍し、使用後の残液は廃棄した。

|                                | 使用した菌株の凍結保存日    |
|--------------------------------|-----------------|
| <i>S. typhimurium</i> TA98     | 2016 年 8 月 25 日 |
| <i>S. typhimurium</i> TA100    | 2016 年 8 月 25 日 |
| <i>S. typhimurium</i> TA1535   | 2016 年 8 月 25 日 |
| <i>S. typhimurium</i> TA1537   | 2016 年 8 月 25 日 |
| <i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i> | 2016 年 8 月 27 日 |

### 7.1.4 菌株の特性検査

7.1.3 の凍結保存菌株を用いて、アミノ酸要求性、膜変異 *rfa* 特性、薬剤耐性因子 R-factor プラスミド、紫外線感受性、菌増殖率、陰性対照値及び陽性対照値等の特性を検査し、それぞれの菌株に特有の性質が保持されていることを確認して使用した。

| 使用した菌株の特性検査実施日                 |              |               |  |  |  |
|--------------------------------|--------------|---------------|--|--|--|
| <i>S. typhimurium</i> TA98     | 2016年 8月 25日 | ~2016年 8月 27日 |  |  |  |
| <i>S. typhimurium</i> TA100    | 2016年 8月 25日 | ~2016年 8月 27日 |  |  |  |
| <i>S. typhimurium</i> TA1535   | 2016年 8月 25日 | ~2016年 8月 27日 |  |  |  |
| <i>S. typhimurium</i> TA1537   | 2016年 8月 25日 | ~2016年 8月 27日 |  |  |  |
| <i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i> | 2016年 8月 27日 | ~2016年 8月 29日 |  |  |  |

## 7.2 対照物質

### 7.2.1 陰性対照物質

被験液の調製に用いたアセトンを陰性対照物質とした。

### 7.2.2 陽性対照物質

以下の変異原物質を陽性対照物質とした。

表 1 陽性対照物質

| 陽性対照物質（略称）   | ロット番号   | 純度(%) | 保存方法  | 製造元                |
|--|---------|-------|-------|--------------------|
| 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF-2)                                 | STQ3987 | 99.7% | 室温、遮光 | 和光純薬工業株式会社         |
| Sodium azide (SAZ)   | YSF7467 | 99.9% | 室温、遮光 | 和光純薬工業株式会社         |
| 2-Methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)-aminopropylamino]acridine・2HCl (ICR-191) | 562079  | —     | 室温、遮光 | Polysciences, Inc. |
| 2-Aminoanthracene (2AA)  | CTK0326 | 96.7% | 室温、遮光 | 和光純薬工業株式会社         |
| Benzo[ <i>a</i> ]pyrene (B[ <i>a</i> ]P)   | KPK3371 | 99.8% | 冷蔵、遮光 | 和光純薬工業株式会社         |

保存場所：東京研究所 微生物試験室

### 7.2.3 調製方法

AF-2、ICR-191、2AA 及び B[*a*]P は DMSO（和光純薬工業株式会社、JIS 規格 試薬特級、ロット番号 ECE6658）に溶解し、SAZ は注射用水（株式会社大塚製薬工場、日本薬局方、ロット番号 K6A80）に溶解し、約 1 mL ずつ小分けして -20°C 以下で凍結保存した。なお、試験実施時に解凍して使用した。それぞれの調製濃度を表 2 に示した。

表 2 陽性対照物質調製濃度

| 使用菌株                           | 代謝活性化しない場合 |                              | 代謝活性化する場合  |                              |
|--------------------------------|------------|------------------------------|------------|------------------------------|
|                                | 陽性対照<br>物質 | 調製濃度<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | 陽性対照<br>物質 | 調製濃度<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) |
| <i>S. typhimurium</i> TA100    | AF-2       | 0.1 (0.01)                   | B[a]P      | 50 (5.0)                     |
| <i>S. typhimurium</i> TA1535   | SAZ        | 5 (0.5)                      | 2AA        | 20 (2.0)                     |
| <i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i> | AF-2       | 0.1 (0.01)                   | 2AA        | 100 (10.0)                   |
| <i>S. typhimurium</i> TA98     | AF-2       | 1 (0.1)                      | B[a]P      | 50 (5.0)                     |
| <i>S. typhimurium</i> TA1537   | ICR-191    | 10 (1.0)                     | B[a]P      | 50 (5.0)                     |

( ) 内の数値は、プレートに処理したときの処理用量 ( $\mu\text{g/plate}$ ) を示す。

### 7.3 試薬

#### 7.3.1 S9 Mix の調製方法

Cofactor-I の 1 バイアルに滅菌精製水を 9.0 mL 加え、完全に溶解した後ろ過 (NALGENE 0.45  $\mu\text{m}$  : Lot No. 1179181、1182704) 滅菌し、Cofactor-I の 1 バイアルに対して 1.0 mL の S9 を加えて S9 Mix とした。調製後、使用時まで冷蔵下で保存し、使用後の残液は廃棄した。

##### 1) S9

|            |   |  |
|------------|---|--|
| 名称         | : | S9   |
| 製造元        | : | キッコーマンバイオケミファ株式会社  |
| ロット番号      | : | RAA201612A   |
| 製造日        | : | 2016 年 12 月 16 日   |
| 購入日        | : | 2017 年 1 月 13 日  |
| 種・系統       | : | ラット・SD 系   |
| 週齢・性       | : | 7 週齢・雄   |
| 体重         | : | 194–261 g  |
| 誘導物質       | : | フェノバルビタール (PB) 及び 5,6-ベンゾフラボン (BF)                                       |
| 投与方法       | : | 腹腔内投与  |
| 投与期間及び投与量  | : | PB 4 日間連続投与 : 30+60+60+60 (mg/kg 体重)<br>PB 投与 3 日目 BF 投与 : 80 (mg/kg 体重) |
| 保存場所       | : | 東京研究所 被験物質調製室内超低温フリーザ (三洋電機バイオメディカ株式会社 : MDF-192)                        |
| 保存期間中の実測温度 | : | 2017 年 1 月 13 日~2017 年 1 月 19 日 : -85.9~ -78.5°C                         |

2) 標準液

名称 : Cofactor-I  
製造元 : オリエンタル酵母工業株式会社  
ロット番号 : 999603  
製造日 : 2016年12月13日、2017年1月17日  
使用期限 : 2017年8月26日  
保存場所 : 東京研究所 微生物試験室内冷蔵庫（冷凍・冷蔵庫  
MPR-411FR : 三洋電機バイオメディカ株式会社）  
保存期間中の実測温度  
: 2016年12月13日~2017年1月19日 : 3.9~4.7°C

3) S9 Mix の組成 (1mL 中)

水 : 0.9 mL  
S9 : 0.1 mL  
 $MgCl_2$  : 8  $\mu\text{mol}/\text{mL}$   
 $KCl$  : 33  $\mu\text{mol}/\text{mL}$   
グルコース-6-リン酸 : 5  $\mu\text{mol}/\text{mL}$   
還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH)  
: 4  $\mu\text{mol}/\text{mL}$   
還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH)  
: 4  $\mu\text{mol}/\text{mL}$   
リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4)  
: 100  $\mu\text{mol}/\text{mL}$

### 7.3.2 培地

1) 最小グルコース寒天平板培地

名称 : バイタルメディア AMT-O 培地  
製造元 : 極東製薬工業株式会社  
ロット番号 : DZLHBF01  
製造日 : 2016年11月15日  
購入日 : 2017年1月7日  
保存方法 : 室温保存  
保存場所 : 東京研究所 寒天培地保存室

2) 使用寒天

名称 : OXOID AGAR No.1  
製造元 : OXOID LTD.  
ロット番号 : 1372870

### 7.3.3 ニュートリエントブロス No.2 培養液

ニュートリエントブロス No.2 を 2.5 wt% となるよう精製水で溶解し、オートクレーブにより滅菌処理（121°C、20 分）を行い、調製した。調製後は使用時まで冷蔵で保存した。

|       |   |  |
|-------|---|--|
| 名称    | : | ニュートリエントブロス No.2 (Nutrient Broth No.2) |
| ロット番号 | : | 1239615                                |
| 製造元   | : | OXOID LTD.                             |
| 保存方法  | : | 室温保存                                   |
| 保存場所  | : | 東京研究所 微生物試験室                           |

### 7.3.4 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4)

りん酸緩衝剤粉末 3 包に対して 2L の精製水を加えて溶解し、オートクレーブにより滅菌処理（121°C、20 分）を行い、調製した。調製後は使用時まで冷蔵で保存した。

|       |   |                              |
|-------|---|------------------------------|
| 名称    | : | りん酸緩衝剤粉末 (1/15 mol/L pH 7.4) |
| 製造元   | : | 和光純薬工業株式会社                   |
| ロット番号 | : | SAM0022                      |
| 保存方法  | : | 室温保存                         |
| 保存場所  | : | 東京研究所 微生物試験室                 |

### 7.3.5 トップアガー

以下に示す寒天を用いて、調製した軟寒天液（0.6 wt% Agar、0.6 wt% NaCl）をオートクレーブにより滅菌処理（121°C、20 分）した後、0.5 mmol/L D-ビオチン-L-ヒスチジン-L-トリプトファン溶液を軟寒天液 10 に対して 1 の割合で加えて調製し、*S. typhimurium* TA 株と *E. coli* 株で共通で使用した。調製後は室温で保存し、使用時は電子レンジで溶解後、固化を防ぐため 45°C の恒温槽で保温した。

#### 1) 寒天

|       |   |                               |
|-------|---|-------------------------------|
| 名称    | : | Bacto Agar                    |
| 製造元   | : | Becton, Dickinson and Company |
| ロット番号 | : | 6097761                       |
| 保存方法  | : | 室温保存                          |
| 保存場所  | : | 東京研究所 微生物試験室                  |

#### 2) 塩化ナトリウム

|       |   |              |
|-------|---|--------------|
| 製造元   | : | 和光純薬工業株式会社   |
| ロット番号 | : | DSM3876      |
| 保存方法  | : | 室温保存         |
| 保存場所  | : | 東京研究所 微生物試験室 |

## 3) D-ビオチン

製造元 : 和光純薬工業株式会社  
 ロット番号 : SAJ2076  
 保存方法 : 冷蔵保存、遮光  
 保存場所 : 東京研究所 微生物試験室

## 4) L-ヒスチジン塩酸塩一水和物

製造元 : 和光純薬工業株式会社  
 ロット番号 : CTK0488  
 保存方法 : 室温保存、遮光  
 保存場所 : 東京研究所 微生物試験室

## 5) L-トリプトファン

製造元 : 和光純薬工業株式会社  
 ロット番号 : CTH2695  
 保存方法 : 室温保存、遮光  
 保存場所 : 東京研究所 微生物試験室

## 7.4 試験方法

## 7.4.1 前培養

- ニュートリエントプロス No.2 培養液 10 mL を滅菌済み L 字型試験管(容量 48 mL)に入れ、凍結保存菌株を解凍して得た菌懸濁液を *S. typhimurium* TA 株は各 20 µL、*E. coli* WP2 *uvrA* は 10 µL 植菌し、振盪恒温槽 (COOL BATH SHAKER ML-10 PU-6 接続型、タイテック株式会社) にセットした。
- これをプログラム制御により前培養開始まで 4°C の水浴中に放置(6 時間 30 分)した後、振盪 (100 回/分) しながら 37°C に上昇後 9 時間前培養した。なお、使用後の菌懸濁液は廃棄した。
- 前培養終了時に培養液の吸光度をデジタル比色計 (Mini photo 518R、タイテック株式会社) で測定し、生菌数が  $1 \times 10^9$  個/mL 以上あることを確認した。なお、培養液は使用まで室温下に維持した。それぞれの菌株の換算生菌数を表 3 に示した。

表 3 菌株の換算生菌数

| 菌 株                            | 菌 数 (個/mL)         |                    |
|--------------------------------|--------------------|--------------------|
|                                | 用量設定試験             | 本試験                |
| <i>S. typhimurium</i> TA100    | $4.31 \times 10^9$ | $4.23 \times 10^9$ |
| <i>S. typhimurium</i> TA1535   | $4.78 \times 10^9$ | $4.79 \times 10^9$ |
| <i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i> | $5.92 \times 10^9$ | $8.59 \times 10^9$ |
| <i>S. typhimurium</i> TA98     | $5.96 \times 10^9$ | $5.63 \times 10^9$ |
| <i>S. typhimurium</i> TA1537   | $3.62 \times 10^9$ | $3.70 \times 10^9$ |

#### 7.4.2 プレート数

被験物質処理群、陰性対照群及び陽性対照群について、用量設定試験及び本試験とともに用量ごとに2枚のプレートを用いた。

#### 7.4.3 試験操作（プレインキュベーション法）

- 1) 清潔した小試験管に被験液又は溶媒を0.05 mL、陽性対照溶液を0.1 mL入れ、これに代謝活性化しない場合は0.1 mol/Lリン酸緩衝液（pH 7.4）0.5 mLを、代謝活性化する場合はS9 Mix 0.5 mLを加えた後、それぞれの小試験管に各菌懸濁液0.1 mLを加えた。
- 2) 小試験管を攪拌後すぐに37°Cで20分間振盪（80回/分）しながらプレインキュベーションし、これに45°Cに保温されているトップアガーパウチを2.0 mL加え攪拌後、最小グルコース寒天平板培地に均一に重層した。
- 3) 無菌試験として、調製した最高用量の被験液0.05 mL及び調製したS9 Mix 0.5 mLをそれぞれ小試験管に取り、これにトップアガーパウチを2.0 mL加えた後に最小グルコース寒天平板培地に均一に重層した。なお、これら1)~3)の一連の操作は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で実施した。
- 4) 最小グルコース寒天平板培地に重層したトップアガーパウチが固化したことを確認し、最小グルコース寒天平板培地を逆さにしてインキュベータに入れ、37°Cで48時間培養した。
- 5) 本被験物質による沈殿及び着色の有無を確認した結果、沈殿が認められ、機器計測に支障があったため、目視による計数を行った。陽性対照群においては機器計測に支障がなかったため、自動コロニーカウンタ（コロニーアナライザーカー CA-11D systems、システムサイエンス株式会社）を用いて計数（面積補正、補正值：1.21）した。また、実体顕微鏡を用いて菌に対する生育阻害の有無を観察した。

#### 7.5 判定基準

被験物質処理群の復帰変異コロニー数が自然復帰変異コロニー数（陰性対照値）に対して2倍以上となる増加を示し、用量反応性及び再現性が認められた場合あるいは明確な用量反応性を示さない場合であっても自然復帰変異コロニー数の2倍以上となる明確な増加を示し、再現性が認められた場合に陽性と判定することとした。なお、判定に際して統計学的手法は用いなかった。

## 8. 試験結果

用量設定試験の結果を別表 1 に、本試験の結果を別表 2 に示した。なお、図 1~10 は別表 2 より作成した。

### 8.1 用量設定試験の観察結果及び本試験用量の設定

本試験の試験用量を設定するため、100 mg/mL の被験液を公比 4 で 6 段階希釈した計 7 用量 (1.22、4.88、19.5、78.1、313、1250、5000 µg/plate) を用い、用量設定試験を実施した。

用量設定試験の結果、本被験物質によるプレート上の沈殿は、代謝活性化の有無にかかわらず 1250 µg/plate 以上の用量で認められた。本被験物質によるプレート上の着色は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。菌に対する生育阻害は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても認められなかった。

本被験物質処理による復帰変異コロニー数は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても陰性対照値の 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量反応性も認められなかった。

このため本試験の試験用量は、生育阻害が認められなかつたため、沈殿の認められた最低用量を最高用量として代謝活性化の有無にかかわらず、すべての菌株において 1250 µg/plate を最高用量として以下公比 2 で 4 段階希釈した計 5 用量を設定した。

### 8.2 本試験の観察結果

本被験物質によるプレート上の沈殿は、代謝活性化の有無にかかわらず 625 µg/plate 以上の用量で認められた。本被験物質によるプレート上の着色は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかつた。菌に対する生育阻害は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても認められなかつた。

代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても陰性対照値の 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量反応性も認められなかつた。

### 8.3 試験の成立条件

陽性対照値がそれぞれの菌株の陰性対照値に比較して 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加を示し、陰性対照値及び陽性対照値の復帰変異コロニー数の平均値が背景データの管理値 (Attached Data) 内であり、無菌試験及び試験操作において雑菌の混入などの異常も認められなかつたため、試験が適切に実施されたものと判断した。

## 9. 考察

用量設定試験及び本試験とともに、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても陰性対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量反応性も認められなかった。

一方、陽性対照群では陰性対照群と比較して2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加を示したことから、使用菌株の復帰突然変異誘発物質に対する反応は適切であったことが確認され、試験は適切に実施されたものと考えられた。

また、本被験物質はエチル＝ステアラートのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験<sup>9)</sup>において陰性と報告されている。

以上の試験結果より、本試験条件下においてエチル＝ステアラートは、細菌に対する遺伝子突然変異誘発能を有しない（陰性）と判定した。

## 10. 参考文献

- 1) B.N.Ames, F.D.Lee and W.E.Durston: An Improved Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens, Proc.Natl Acad.Sci.,USA, 70, No.3, pp.782-786, March 1973.
- 2) J.McCann, N.E.Spingarn, J.Kobori and B.N.Ames: Detection of Carcinogens as Mutagens: Bacterial Tester Strains with R Factor Plasmids, Proc.Natl Acad.Sci., USA, 72, No.3, pp.979-983, March 1975.
- 3) M.H.L.Green and W.J.Muriel: Mutagen Testing using Trp + Reversion in *Escherichia coli*, Mutation Res., 38, pp.3-32, 1976.
- 4) T.Yahagi, M.Nagao, Y.Seino, T.Matsushima, T.Sugimura and M.Okada: Mutagenicities of N-nitrosamines on *Salmonella*, Mutation Res., 48, pp.121-130, 1977.
- 5) Dorothy M. Maron and Bruce N. Ames: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, Mutation Res., 113, pp.173-215, 1983.
- 6) 田島彌太郎, 賀田恒夫, 近藤宗平, 外村晶(編) : 環境変異原実験法, 講談社, pp.56-68, 1980.
- 7) 労働省安全衛生部化学物質調査課編 : 新・細菌を用いる復帰突然変異試験ガイドブック, 中央労働災害防止協会, 1986.
- 8) 石館基(監修) : 細菌を用いる復帰突然変異試験データ集(能美健彦, 松井道子編集), 株式会社エル・アイ・シー, 東京, 1991.
- 9) (2017) : エチル＝ステアラートのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験(試験番号:T-G240)、株式会社ボゾリサーチセンター

(別表1)

## 試験結果表(用量設定試験)

被験物質の名称: エチルニステアラー卜

No. T-2179

| 試験実施期間  |                                      | 2017年1月13日より2017年1月16日          |                    |                    |                    |                       |  |
|---|--------------------------------------|---------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|--|
| 代謝活性化系の有無   | 被験物質の用量( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ ) | 復帰変異数(コロニー数/プレート)               |                    |                    |                    |                       |  |
|   |                                      | 塩基対置換型                          |                    |                    | フレームシフト型           |                       |  |
|   |                                      | TA100                           | TA1535             | WP2uvrA            | TA98               | TA1537                |  |
| S9Mix(-)  | 陰性対照(アセトン)                           | 111<br>112 ( 112 )              | 8<br>7 ( 8 )       | 24<br>27 ( 26 )    | 20<br>18 ( 19 )    | 7<br>8 ( 8 )          |  |
|   | 1.22                                 | 91<br>98 ( 95 )                 | 9<br>4 ( 7 )       | 29<br>23 ( 26 )    | 23<br>16 ( 20 )    | 5<br>7 ( 6 )          |  |
|   | 4.88                                 | 115<br>103 ( 109 )              | 3<br>4 ( 4 )       | 25<br>27 ( 26 )    | 19<br>17 ( 18 )    | 9<br>7 ( 8 )          |  |
|   | 19.5                                 | 114<br>114 ( 114 )              | 4<br>7 ( 6 )       | 24<br>26 ( 25 )    | 18<br>15 ( 17 )    | 5<br>6 ( 6 )          |  |
|   | 78.1                                 | 100<br>98 ( 99 )                | 8<br>9 ( 9 )       | 23<br>23 ( 23 )    | 22<br>18 ( 20 )    | 3<br>5 ( 4 )          |  |
|   | 313                                  | 102<br>96 ( 99 )                | 7<br>3 ( 5 )       | 24<br>22 ( 23 )    | 17<br>19 ( 18 )    | 7<br>4 ( 6 )          |  |
|   |                                      | 97                              | 10                 | 26                 | 14                 | 8                     |  |
|   | 1250 #                               | 112 ( 105 )                     | 12 ( 11 )          | 25 ( 26 )          | 14 ( 14 )          | 5 ( 7 )               |  |
|   | 5000 #                               | 114<br>107 ( 111 )              | 10<br>5 ( 8 )      | 25<br>23 ( 24 )    | 12<br>13 ( 13 )    | 7<br>5 ( 6 )          |  |
|   | S9Mix(+)                             | 陰性対照(アセトン)                      | 145<br>123 ( 134 ) | 8<br>7 ( 8 )       | 29<br>25 ( 27 )    | 31<br>34 ( 33 )       |  |
|   |                                      | 1.22                            | 120<br>132 ( 126 ) | 5<br>8 ( 7 )       | 21<br>27 ( 24 )    | 28<br>25 ( 27 )       |  |
|   |                                      | 4.88                            | 132<br>136 ( 134 ) | 10<br>8 ( 9 )      | 28<br>23 ( 26 )    | 35<br>29 ( 32 )       |  |
|   |                                      | 19.5                            | 120<br>142 ( 131 ) | 8<br>8 ( 8 )       | 25<br>21 ( 23 )    | 32<br>29 ( 31 )       |  |
|   |                                      | 78.1                            | 137<br>144 ( 141 ) | 9<br>7 ( 8 )       | 29<br>21 ( 25 )    | 30<br>37 ( 34 )       |  |
|   |                                      | 313                             | 110<br>120 ( 115 ) | 10<br>9 ( 10 )     | 25<br>20 ( 23 )    | 31<br>30 ( 31 )       |  |
|   |                                      | 1250 #                          | 149<br>143 ( 146 ) | 8<br>10 ( 9 )      | 29<br>26 ( 28 )    | 35<br>32 ( 34 )       |  |
|   |                                      | 5000 #                          | 136<br>120 ( 128 ) | 10<br>3 ( 7 )      | 18<br>21 ( 20 )    | 29<br>38 ( 34 )       |  |
|   |                                      | 名 称                             | AF-2               | SAZ                | AF-2               | AF-2                  |  |
|   |                                      | 用量( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ ) | 0.01               | 0.5                | 0.01               | 0.1                   |  |
| 陽性対照  | S9Mixを必要としないもの                       | コロニー数/プレート                      | 470<br>509 ( 490 ) | 182<br>192 ( 187 ) | 87<br>79 ( 83 )    | 382<br>356 ( 369 )    |  |
|   |                                      | 名 称                             | B[α]P              | 2AA                | 2AA                | ICR-191               |  |
|   | S9Mixを必要とするもの                        | 用量( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ ) | 5.0                | 2.0                | 10.0               | 1.0                   |  |
|   |                                      | コロニー数/プレート                      | 894<br>857 ( 876 ) | 241<br>275 ( 258 ) | 760<br>806 ( 783 ) | 1320<br>1364 ( 1342 ) |  |
| (備考)  |                                      |                                 |                    |                    |                    |                       |  |
| AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド                     |                                      |                                 |                    |                    |                    |                       |  |
| SAZ : アジ化ナトリウム  |                                      |                                 |                    |                    |                    |                       |  |
| ICR-191 : 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl |                                      |                                 |                    |                    |                    |                       |  |
| 2AA : 2-アミノアントラセン   |                                      |                                 |                    |                    |                    |                       |  |
| B[α]P : ベンゾ[α]ピレン   |                                      |                                 |                    |                    |                    |                       |  |

# : 被験物質による沈殿が認められたことを示す。

( )内は、2枚のプレートの平均値を示す。

(別表2)

## 試験結果表(本試験)

被験物質の名称: エチル=ステアラート

No. T-2179

| 試験実施期間    |                                      | 2017年1月18日より2017年1月23日          |                       |                    |                    |                       |
|-----------|--------------------------------------|---------------------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|
| 代謝活性化系の有無 | 被験物質の用量( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ ) | 復帰変異数(コロニー数/プレート)               |                       |                    |                    |                       |
|           |                                      | 塩基対置換型                          |                       |                    | フレームシフト型           |                       |
|           |                                      | TA100                           | TA1535                | WP2uvrA            | TA98               | TA1537                |
| S9Mix(-)  | 陰性対照(アセトン)                           | 119<br>135 ( 127 )              | 12<br>12 ( 12 )       | 32<br>15 ( 24 )    | 18<br>20 ( 19 )    | 5<br>6 ( 6 )          |
|           | 78.1                                 | 113<br>118 ( 116 )              | 9<br>10 ( 10 )        | 19<br>23 ( 21 )    | 18<br>16 ( 17 )    | 6<br>7 ( 7 )          |
|           | 156                                  | 135<br>128 ( 132 )              | 10<br>9 ( 10 )        | 33<br>31 ( 32 )    | 31<br>22 ( 27 )    | 3<br>3 ( 3 )          |
|           | 313                                  | 109<br>112 ( 111 )              | 9<br>10 ( 10 )        | 27<br>25 ( 26 )    | 22<br>22 ( 22 )    | 6<br>2 ( 4 )          |
|           | 625 #                                | 121<br>109 ( 115 )              | 5<br>7 ( 6 )          | 15<br>31 ( 23 )    | 22<br>17 ( 20 )    | 4<br>2 ( 3 )          |
|           |                                      | 114<br>110 ( 112 )              | 8<br>4 ( 6 )          | 22<br>26 ( 24 )    | 13<br>13 ( 13 )    | 2<br>4 ( 3 )          |
|           | 陰性対照(アセトン)                           | 142<br>162 ( 152 )              | 7<br>18 ( 13 )        | 34<br>32 ( 33 )    | 45<br>29 ( 37 )    | 10<br>13 ( 12 )       |
|           | 78.1                                 | 136<br>161 ( 149 )              | 5<br>5 ( 5 )          | 28<br>27 ( 28 )    | 31<br>24 ( 28 )    | 5<br>5 ( 5 )          |
|           | 156                                  | 145<br>144 ( 145 )              | 15<br>10 ( 13 )       | 36<br>23 ( 30 )    | 26<br>28 ( 27 )    | 9<br>5 ( 7 )          |
|           | 313                                  | 137<br>147 ( 142 )              | 7<br>7 ( 7 )          | 20<br>26 ( 23 )    | 25<br>35 ( 30 )    | 6<br>6 ( 6 )          |
| S9Mix(+)  | 625 #                                | 143<br>156 ( 150 )              | 8<br>9 ( 9 )          | 32<br>34 ( 33 )    | 29<br>35 ( 32 )    | 4<br>5 ( 5 )          |
|           |                                      | 150<br>142 ( 146 )              | 9<br>6 ( 8 )          | 26<br>28 ( 27 )    | 35<br>35 ( 35 )    | 4<br>6 ( 5 )          |
|           | 名 称                                  | AF-2                            | SAZ                   | AF-2               | AF-2               | ICR-191               |
|           | 用量( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )      | 0.01                            | 0.5                   | 0.01               | 0.1                | 1.0                   |
|           | コロニー数/プレート                           | 538<br>587 ( 563 )              | 258<br>243 ( 251 )    | 86<br>95 ( 91 )    | 305<br>347 ( 326 ) | 1372<br>1333 ( 1353 ) |
|           | 名 称                                  | B[ $\alpha$ ]P                  | 2AA                   | 2AA                | B[ $\alpha$ ]P     | B[ $\alpha$ ]P        |
|           | 用量( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )      | 5.0                             | 2.0                   | 10.0               | 5.0                | 5.0                   |
|           | コロニー数/プレート                           | 1076<br>1166 ( 1121 )           | 275<br>278 ( 277 )    | 849<br>880 ( 865 ) | 381<br>331 ( 356 ) | 107<br>84 ( 96 )      |
|           | 名 称                                  | B[ $\alpha$ ]P                  | 2AA                   | 2AA                | B[ $\alpha$ ]P     | B[ $\alpha$ ]P        |
|           | 用量( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )      | 5.0                             | 2.0                   | 10.0               | 5.0                | 5.0                   |
|           | コロニー数/プレート                           | 1076<br>1166 ( 1121 )           | 275<br>278 ( 277 )    | 849<br>880 ( 865 ) | 381<br>331 ( 356 ) | 107<br>84 ( 96 )      |
| 陽性対照      | S9Mixを必要としないもの                       | 名 称                             | AF-2                  | SAZ                | AF-2               | ICR-191               |
|           |                                      | 用量( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ ) | 0.01                  | 0.5                | 0.01               | 1.0                   |
|           |                                      | コロニー数/プレート                      | 538<br>587 ( 563 )    | 258<br>243 ( 251 ) | 86<br>95 ( 91 )    | 305<br>347 ( 326 )    |
|           | S9Mixを必要とするもの                        | 名 称                             | B[ $\alpha$ ]P        | 2AA                | B[ $\alpha$ ]P     | B[ $\alpha$ ]P        |
|           |                                      | 用量( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ ) | 5.0                   | 2.0                | 5.0                | 5.0                   |
|           |                                      | コロニー数/プレート                      | 1076<br>1166 ( 1121 ) | 275<br>278 ( 277 ) | 849<br>880 ( 865 ) | 381<br>331 ( 356 )    |
|           |                                      | 名 称                             | B[ $\alpha$ ]P        | 2AA                | B[ $\alpha$ ]P     | B[ $\alpha$ ]P        |
|           |                                      | 用量( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ ) | 5.0                   | 2.0                | 5.0                | 5.0                   |
|           |                                      | コロニー数/プレート                      | 1076<br>1166 ( 1121 ) | 275<br>278 ( 277 ) | 849<br>880 ( 865 ) | 381<br>331 ( 356 )    |

(備考)

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

SAZ : アジ化ナトリウム

ICR-191 : 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl

2AA : 2-アミノアントラセン

B[ $\alpha$ ]P : ベンゾ[ $\alpha$ ]ピレン

# : 被験物質による沈殿が認められたことを示す。

( )内は、2枚のプレートの平均値を示す。

T-2179

図 1

用量反応曲線 (本試験 TA100:-S9 Mix)

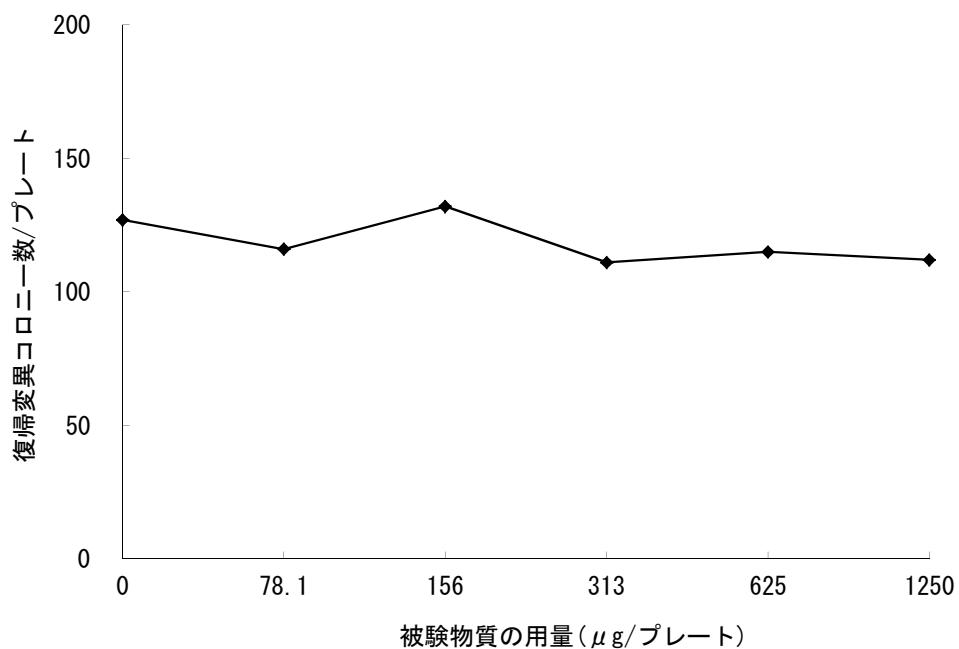
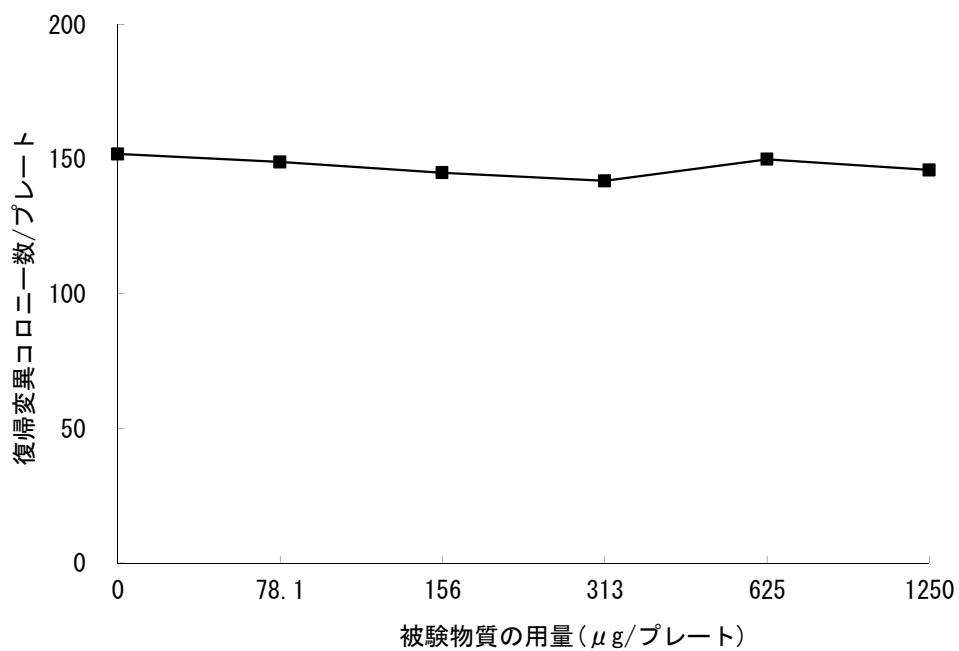


図 2

用量反応曲線 (本試験 TA100:+S9 Mix)



T-2179

図 3

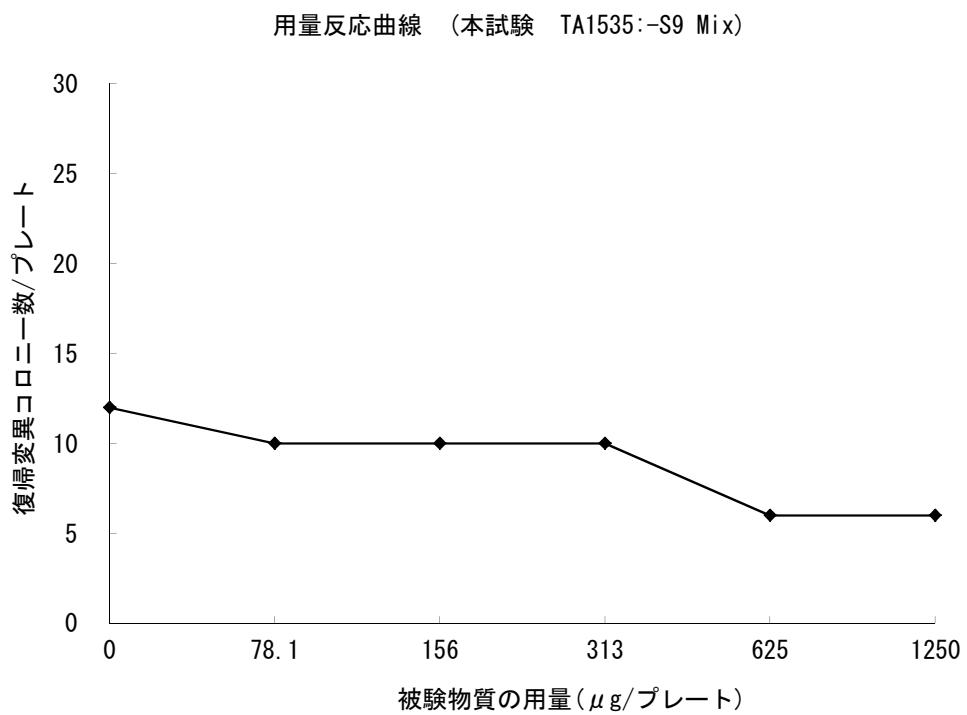
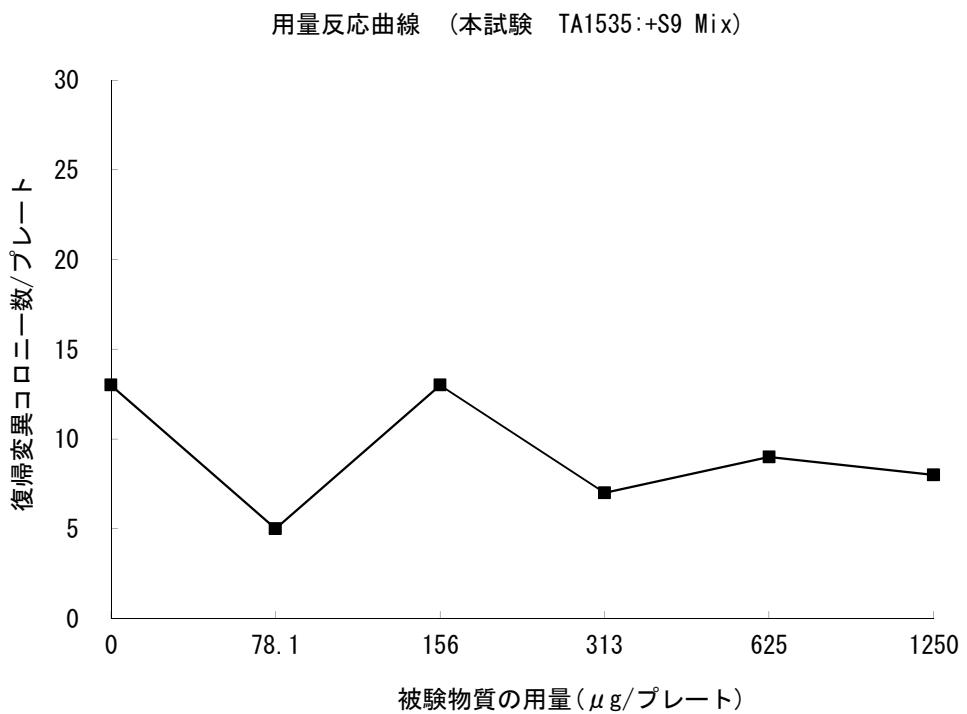


図 4



T-2179

図 5

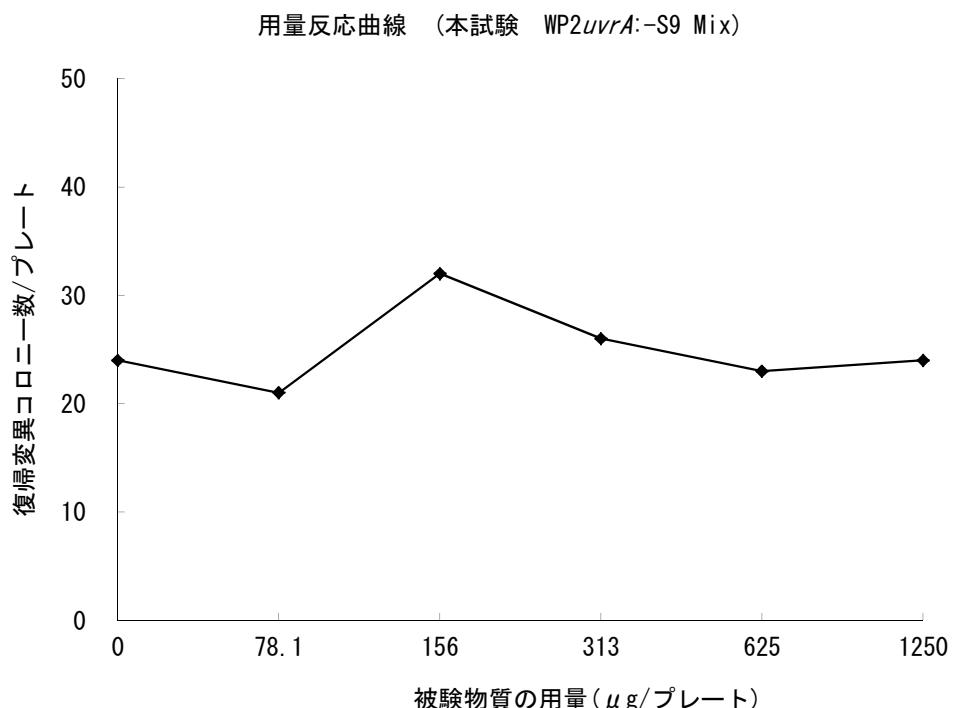
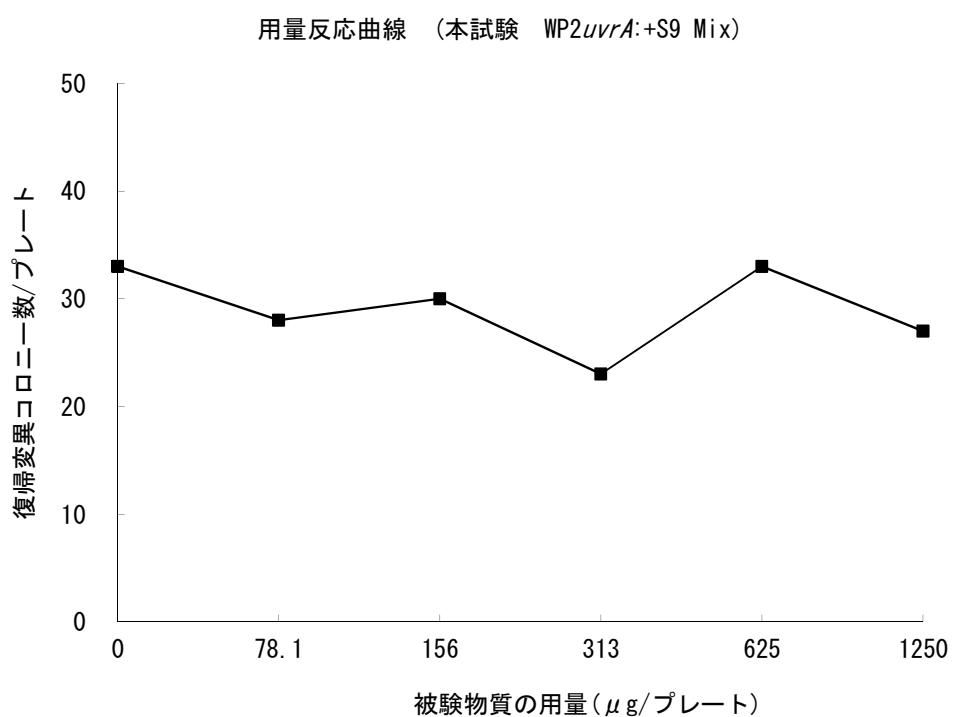


図 6



T-2179

図 7

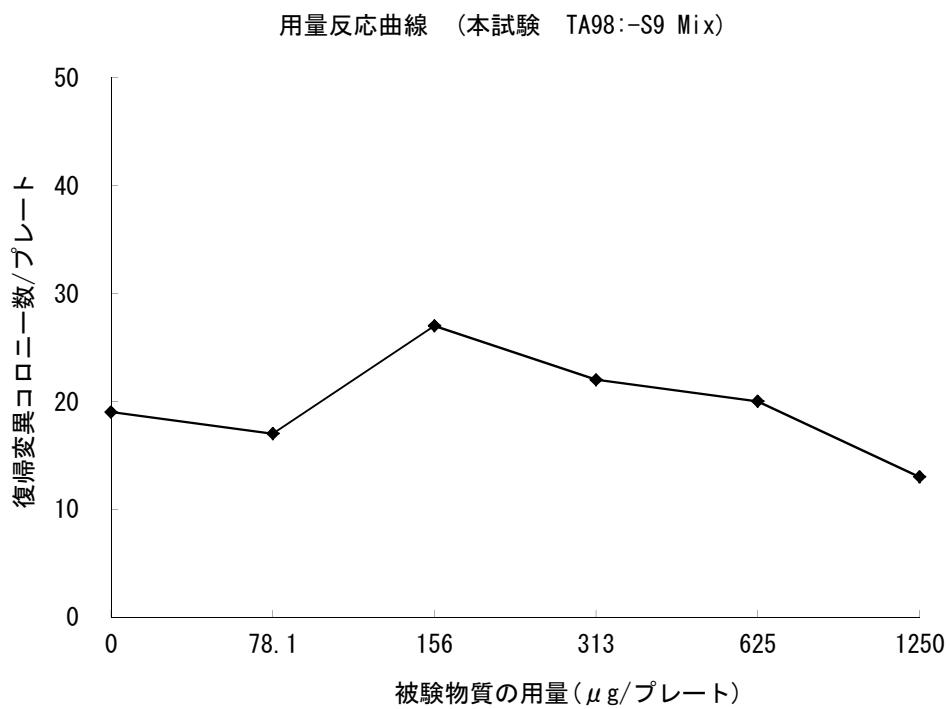
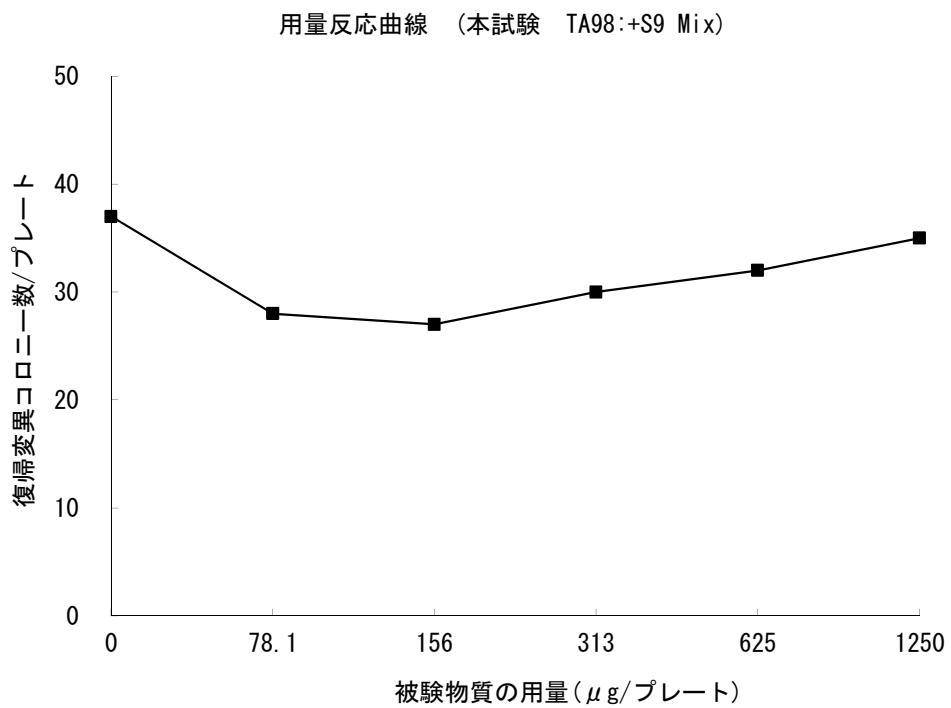


図 8



T-2179

図 9

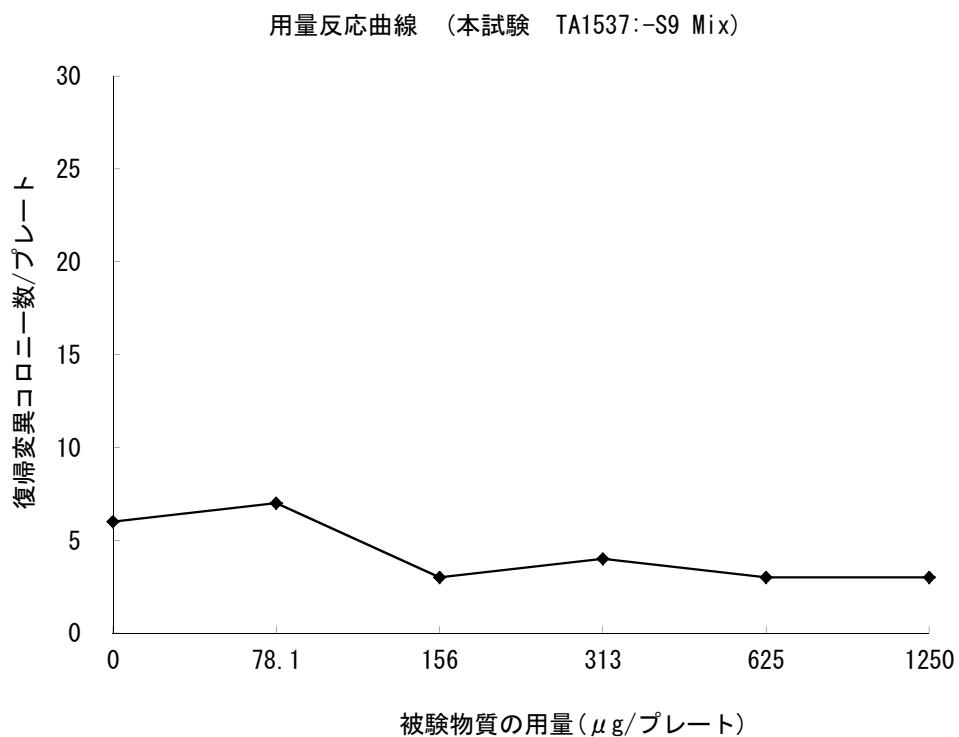
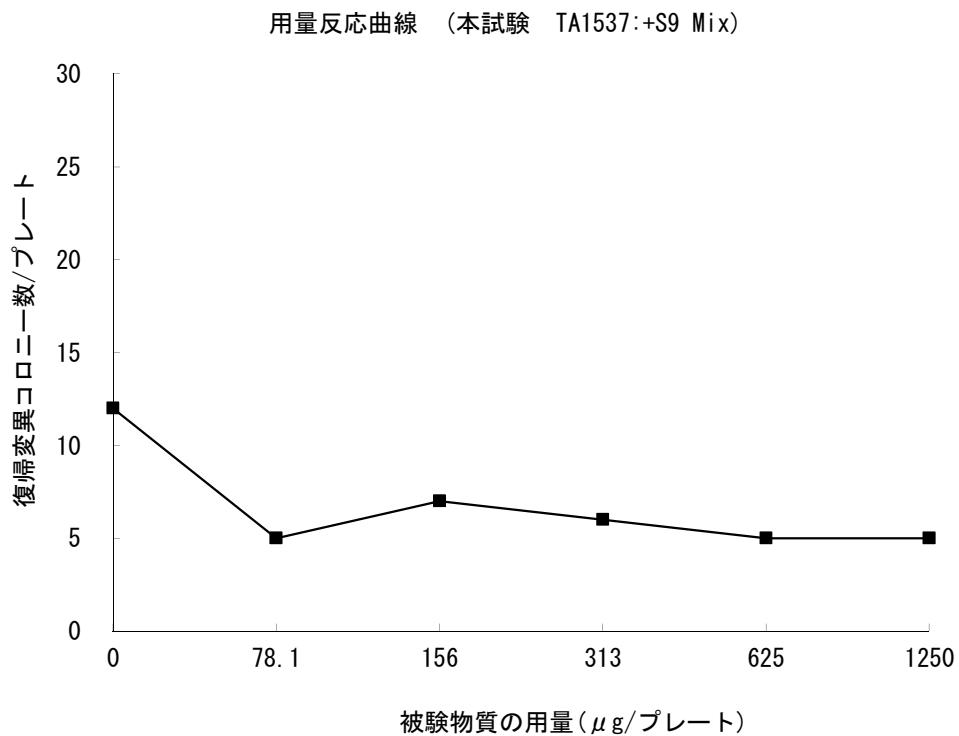


図 10



T-2179  
Attached Data

**Background Data of the reverse mutation tests in bacteria  
at the Tokyo Laboratory of the BoZo Research Center Inc.**

CODE No. :160908

(Pre-incubation Method)

| Tester Strains  | S9 Mix (-) or (+) | Classification                         | Mean | S.D. | Management ranges |             | Number of plates |
|-----------------|-------------------|--|------|------|-------------------|-------------|------------------|
|                 |                   |  |      |      | Lower limit       | Upper limit |                  |
| TA100           | -                 | Solvent control                        | 117  | 13.7 | 76                | 158         | 102              |
|                 |                   | Positive control AF-2(0.01 µg/plate)   | 547  | 71.8 | 331               | 762         | 102              |
|                 | +                 | Solvent control                        | 132  | 17.2 | 80                | 183         | 102              |
|                 |                   | Positive control B[a]P(5.0 µg/plate)   | 891  | 126  | 512               | 1269        | 102              |
| TA1535          | -                 | Solvent control                        | 9    | 2.60 | 1                 | 17          | 102              |
|                 |                   | Positive control SAZ(0.5 µg/plate)     | 233  | 26.4 | 154               | 312         | 102              |
|                 | +                 | Solvent control                        | 10   | 2.75 | 2                 | 18          | 102              |
|                 |                   | Positive control 2AA(2.0 µg/plate)     | 258  | 34.1 | 156               | 360         | 102              |
| WP2 <u>uvrA</u> | -                 | Solvent control                        | 27   | 3.98 | 15                | 39          | 102              |
|                 |                   | Positive control AF-2(0.01 µg/plate)   | 71   | 6.4  | 52                | 91          | 102              |
|                 | +                 | Solvent control                        | 30   | 4.41 | 17                | 44          | 102              |
|                 |                   | Positive control 2AA(10.0 µg/plate)    | 718  | 114  | 375               | 1062        | 102              |
| TA98            | -                 | Solvent control                        | 18   | 3.50 | 7                 | 28          | 102              |
|                 |                   | Positive control AF-2(0.1 µg/plate)    | 346  | 57.1 | 174               | 517         | 102              |
|                 | +                 | Solvent control                        | 32   | 5.45 | 15                | 48          | 102              |
|                 |                   | Positive control B[a]P(5.0 µg/plate)   | 384  | 46.4 | 245               | 523         | 102              |
| TA1537          | -                 | Solvent control                        | 8    | 2.36 | 1                 | 15          | 102              |
|                 |                   | Positive control ICR-191(1.0 µg/plate) | 1011 | 193  | 431               | 1590        | 102              |
|                 | +                 | Solvent control                        | 10   | 2.55 | 2                 | 17          | 102              |
|                 |                   | Positive control B[a]P(5.0 µg/plate)   | 110  | 12.1 | 73                | 146         | 102              |

(Notice)

Solvent controls Water, Dimethylsulfoxide(DMSO) and Acetone

Positive controls AF-2 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

SAZ : Sodium azide

ICR-191 : 2-methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)aminopropylamino]acridine·2HCl

B[a]P : Benzo[a]pyrene

2AA : 2-aminoanthracene

S9 Mix (-) : without metabolic activation

(+) : with metabolic activation

## 信頼性保証書（1/2）

試験番号 : T-2179

試験表題 : エチル＝ステアラートの細菌を用いる復帰突然変異試験

本試験は以下に示す基準を遵守して実施されたことを保証致します。

- 「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)

なお、調査は下記の通り実施致しました。

2017 年 3 月 28 日  
 株式会社ボゾリサーチセンター  
 信頼性保証部門

## 試験における調査

| 項目                      | 担当者 | 調査日          | 試験責任者及び運営管理者への報告日 |
|-------------------------|-----|--------------|-------------------|
| 試験計画書                   |     | 2017年 1月 13日 | 2017年 1月 13日      |
| 調製・保存（被験物質）、<br>被験物質の処理 |     | 2017年 1月 19日 | 2017年 1月 19日      |
| 計数                      |     | 2017年 1月 23日 | 2017年 1月 23日      |
| 生データ                    |     | 2017年 3月 14日 | 2017年 3月 16日      |
| 改善確認                    |     | 2017年 3月 27日 | 2017年 3月 27日      |
| 最終報告書草案・図・表             |     | 2017年 3月 14日 | 2017年 3月 16日      |
| 改善確認                    |     | 2017年 3月 27日 | 2017年 3月 27日      |
| 試験計画書変更書（1）             |     | 2017年 3月 27日 | 2017年 3月 27日      |
| 最終報告書                   |     | 2017年 3月 28日 | 2017年 3月 28日      |

## 信頼性保証書（2/2）

## 施設調査

| 項目        | 担当者 | 調査日   | 部門責任者及び<br>運営管理者への<br>報告日   |
|-----------|-----|---|---|
| 菌株の特性検査   |     | 2016年 8月 25日<br>2016年 8月 27日<br>2016年 8月 30日                                    | 2016年 8月 30日  |
| 改善確認      |     | 2016年 8月 30日  | 2016年 8月 30日  |
| 菌株の特性検査   |     | 2016年 8月 27日<br>2016年 8月 29日<br>2016年 8月 30日                                    | 2016年 8月 30日  |
| 陽性対照物質の管理 |     | 2016年 11月 2日<br>2016年 11月 29日<br>2016年 11月 30日<br>2016年 12月 20日<br>2017年 1月 16日 | 2016年 11月 2日<br>2016年 11月 29日<br>2016年 11月 30日<br>2016年 12月 21日<br>2017年 1月 16日 |