



T-0879

最 終 報 告 書

試験名：1,3-Propanediol, 2-butyl-2-ethyl
の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：T-0879

試験期間：2011年11月1日-2012年3月22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 医薬食品局 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

1. 目次

1.	目次	2
2.	試験実施概要	5
2.1	試験番号	5
2.2	試験表題	5
2.3	試験目的	5
2.4	試験委託者	5
2.5	試験受託者	5
2.6	試験実施施設	5
2.7	試験日程	5
2.8	試験責任者	6
2.9	試験担当者	6
2.10	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	6
2.11	資料保存	7
2.12	試験責任者の署名又は記名・なつ印	7
3.	要約	8
4.	緒言	9
5.	被験物質及び被験液の調製	10
5.1	被験物質及び溶媒	10
5.1.1	被験物質	10
5.1.2	溶媒	11
5.1.3	溶媒の選択理由	11
5.2	被験液の調製方法	11
5.2.1	用量設定試験用被験液の調製	11
5.2.2	本試験 1 回日用被験液の調製	11
5.2.3	本試験 2 回日用被験液の調製	12
5.2.4	被験液の保存条件	12
6.	試験材料及び方法	12
6.1	試験菌株	12
6.1.1	菌株の種類	12
6.1.2	菌株の選択理由	12
6.1.3	菌株の保存及び解凍	12
6.1.4	菌株の特性検査	13
6.2	対照物質	13
6.2.1	陰性対照物質	13
6.2.2	陽性対照物質	13

6.2.3	調製方法	14
6.3	試薬	14
6.3.1	S9Mixの調製方法	14
6.3.2	培地	15
6.3.3	ニュートリエントブロス No.2 培養液	16
6.3.4	0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4)	16
6.3.5	トップアガー	16
6.4	試験方法	17
6.4.1	前培養	17
6.4.2	プレート数	18
6.4.3	試験操作 (プレインキュベーション法)	18
6.5	判定基準	18
7.	試験結果	18
7.1	用量設定試験の観察結果及び本試験用量の設定	19
7.2	本試験 1 回目及び本試験 2 回目の観察結果	19
7.3	試験系の成立条件	19
8.	考察	20
9.	参考文献	20

Tables

別表 1	試験結果表(用量設定試験)
別表 2	試験結果表(本試験 1 回目 : -S9Mix)
別表 3	試験結果表(本試験 1 回目 : +S9Mix)
別表 4	試験結果表(本試験 2 回目 : -S9Mix)
別表 5	試験結果表(本試験 2 回目 : +S9Mix)

Figures

図 1	用量反応曲線(本試験 1 回目 TA100 : -S9Mix)
図 2	用量反応曲線(本試験 1 回目 TA100 : +S9Mix)
図 3	用量反応曲線(本試験 1 回目 TA1535 : -S9Mix)
図 4	用量反応曲線(本試験 1 回目 TA1535 : +S9Mix)
図 5	用量反応曲線(本試験 1 回目 WP2uvrA : -S9Mix)
図 6	用量反応曲線(本試験 1 回目 WP2uvrA : +S9Mix)
図 7	用量反応曲線(本試験 1 回目 TA98 : -S9Mix)
図 8	用量反応曲線(本試験 1 回目 TA98 : +S9Mix)
図 9	用量反応曲線(本試験 1 回目 TA1537 : -S9Mix)
図 10	用量反応曲線(本試験 1 回目 TA1537 : +S9Mix)

別添 1
別添 2

試験成績書 (被験物質の安定性)
背景データ (110701)

2. 試験実施概要

2.1 試験番号

T-0879

2.2 試験表題

1,3-Propanediol, 2-butyl-2-ethyl の細菌を用いる復帰突然変異試験

2.3 試験目的

細菌を用い、1,3-Propanediol, 2-butyl-2-ethyl の復帰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。

2.4 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
〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1-2-2

2.5 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

2.6 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

株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所
〒412-0039 静岡県御殿場市かまど 1284

2.7 試験日程

試験開始日	:	2011年 11月 1日
用量設定試験開始日	:	2011年 11月 14日
用量設定試験終了日	:	2011年 11月 17日
本試験 1回目開始日	:	2011年 11月 29日
本試験 1回目終了日	:	2011年 12月 2日
本試験 2回目開始日	:	2011年 12月 8日
本試験 2回目終了日	:	2011年 12月 12日
試験終了日	:	2012年 3月 22日

2.8 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

■■■■■■■■■■

2.9 試験担当者

用量設定試験

使用菌株の前培養 :
被験液の調製 :
試験操作 :

■■■■■■■■■■
■■■■■■■■■■
■■■■■■■■■■
■■■■■■■■■■

コロニーの計数 :

本試験 1回目

使用菌株の前培養 :
被験液の調製 :
試験操作 :

■■■■■■■■■■
■■■■■■■■■■
■■■■■■■■■■
■■■■■■■■■■

コロニーの計数 :

本試験 2回目

使用菌株の前培養 :
被験液の調製 :
試験操作 :

■■■■■■■■■■
■■■■■■■■■■
■■■■■■■■■■
■■■■■■■■■■

コロニーの計数 :

被験物質の分析

安定性測定 :

■■■■■■■■■■

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

本試験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ったことはなかった。なお、S9Mix 調製用試薬として使用
している Cofactor-I において、保管期間中に保管用冷蔵庫の温度が瞬間的に -0.2°C を記録
したが、この試薬は凍結乾燥品であり、品質には影響しないと判断した。

2.11 資料保存

試験計画書、記録文書、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 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室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。

2.12 試験責任者の署名又は記名・なつ印

2012年 3月 22日

株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所

3. 要約

1,3-Propanediol, 2-butyl-2-ethyl の復帰突然変異誘発能の有無を検討するため、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試験を実施した。なお、被験物質の溶媒にはジメチルスルホキシド (以下、DMSO と略す) を用いた。

試験は、19.5~5000 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、生育阻害を示した最低用量を最高用量として、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1535、TA1537 については 9.77~313 µg/plate の範囲の 6 用量、代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA100 及び代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA1535、TA1537 については 39.1~1250 µg/ plate の範囲の 6 用量、代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* については 156~5000 µg/plate の範囲の 6 用量で実施した。なお、本試験は同一用量で 2 回実施した。

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及び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。

2) 生育阻害

実体顕微鏡を用いて菌に対する生育阻害を観察した結果、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1535、TA1537 の 313 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA1535 の 625 µg/plate 以上、代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA100 及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA1537 の 1250 µg/plate 以上、代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* の 2500 µg/ plate 以上の用量で認められた。

3) 復帰変異コロニー数

2 回の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った。

以上の試験結果より、本試験条件下において 1,3-Propanediol, 2-butyl-2-ethyl 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。

4. 緒言

本試験は、厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室からの委託により、株式会社ボゾ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

- 「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(OECD : 1997年11月26日)
- 「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)

2) ガイドライン

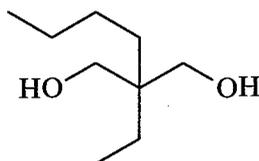
- 「OECD Guidelines for Testing of Chemicals 471」(OECD : 1997年7月21日)
- 「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成23年3月31日 : 薬食発0331第7号厚生労働省医薬食品局長、平成23・03・29製局第5号経済産業省製造産業局長、環保企発第110331009号環境省総合環境政策局長通知)

5. 被験物質及び被験液の調製

5.1 被験物質及び溶媒

5.1.1 被験物質

官報公示整理番号	:	(2)-240、(2)-2391
購入元	:	
製造者	:	
入手日	:	2011年9月15日（御殿場研究所）
Ames 試験用入手日	:	2011年9月28日（東京研究所）
入手量	:	25 g（Ames 試験用）
名称	:	1,3-Propanediol, 2-butyl-2-ethyl
和名	:	2-ブチル-2-エチル-1,3-プロパンジオール
別名	:	3,3-Bis(hydroxymethyl)heptane, 2-Ethyl-2-(hydroxymethyl)-1-hexanol
ロット番号	:	BLODO
CAS番号	:	115-84-4
純度 (GC)	:	99.8 %
分子量	:	160.25
構造式	:	



融点	:	44.7°C
沸点	:	178°C/6.7kPa
常温における性状	:	白色固体
安定性	:	適切な条件下においては安定。なお、本試験終了後に残余となった被験物質を株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所において分析した結果、実験期間中の安定性が確認された（別添1）。
溶解性	:	水；不溶 DMSO；50 mg/ mL で溶解
溶媒中での安定性	:	水、DMSO；発熱、ガスの発生等の反応性なし
保存条件	:	冷暗所（1~10°C）・密栓
保存場所	:	東京研究所 被験物質調製保存室 御殿場研究所 被験物質保存室
保存温度	:	期間(2011.9.28~2011.12.9)中の実測温度；2.2~9.6°C

残量の処置 : 試験終了後の残量はすべて株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所へ送付し、安定性確認後の残余物質はすべて廃棄した。

上記被験物質情報は、製造元からの情報による。なお、水及び DMSO の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り、水については 50 mg/mL で溶解しなかったため不溶とした。

5.1.2 溶媒

名称 : DMSO
 製造元 : 和光純薬工業株式会社
 ロット番号 : LAQ5643
 規格 : JIS 規格 試薬特級 99.0%以上
 保存方法 : 室温保存
 保存場所 : 東京研究所 被験物質調製保存室

5.1.3 溶媒の選択理由

水、DMSO について溶解性試験を実施した結果、本被験物質は水に 50 mg/mL で溶解せず、DMSO に 50 mg/mL で溶解し発熱、ガスの発生等の反応性も認められなかったため、DMSO を溶媒として試験を実施した。

5.2 被験液の調製方法

5.2.1 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、その秤量値 254.9 mg に最高調製濃度の 50 mg/mL となるように溶媒量を計算し、5.098 mL の DMSO を添加して溶解し、50 mg/mL の被験液を調製した。次いで、これを公比 4 で順次 4 段階希釈し、50、12.5、3.13、0.781 及び 0.195 mg/mL 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行い、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。

5.2.2 本試験 1 回目用被験液の調製

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、その秤量値 321.7 mg に最高調製濃度の 50 mg/mL となるように溶媒量を計算し、6.434 mL の DMSO を添加して溶解し、50 mg/mL の被験液を調製した。次いで、これを公比 2 で順次 9 段階希釈し 50、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.781、0.391、0.195 及び 0.0977 mg/mL の計 10 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行い、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。

5.2.3 本試験 2 回目用被験液の調製

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、その秤量値 310.7 mg に最高調製濃度の 50 mg/mL となるように溶媒量を計算し、6.214 mL の DMSO を添加して溶解し、50 mg/mL の被験液を調製した。次いで、これを公比 2 で順次 9 段階希釈し 50、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.781、0.391、0.195 及び 0.0977 mg/mL の計 10 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行い、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。

5.2.4 被験液の保存条件

被験液は用時調製とし、保存はしなかった。

6. 試験材料及び方法

6.1 試験菌株

6.1.1 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、菌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のから、2005 年 7 月 21 日に東京研究所へ分与された。

6.1.2 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。

6.1.3 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 STG0588）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 2011 年 9 月 27 日~2011 年 12 月 8 日： -87.4°C ~ -79.9°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	2011年 9月 27日
<i>S. typhimurium</i> TA100	2011年 9月 27日
<i>S. typhimurium</i> TA1535	2011年 10月 12日
<i>S. typhimurium</i> TA1537	2011年 9月 30日
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	2011年 11月 2日

6.1.4 菌株の特性検査

6.1.3 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	2011年 9月 27日~2011年 9月 29日
<i>S. typhimurium</i> TA100	2011年 9月 27日~2011年 9月 29日
<i>S. typhimurium</i> TA1535	2011年 10月 12日~2011年 10月 14日
<i>S. typhimurium</i> TA1537	2011年 9月 30日~2011年 10月 3日
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	2011年 11月 2日~2011年 11月 4日

6.2 対照物質

6.2.1 陰性対照物質

被験物質の調製に用いた DMSO を陰性対照物質とした。

6.2.2 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)	WKK3086	99.6%	室温、遮光	和光純薬工業株式会社
Sodium azide (SAZ)	HLP7075	100.2%	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)	KWL1226	95.4%	室温、遮光	和光純薬工業株式会社
Benzo[a]pyrene (B[a]P)	20732	99.8%	冷蔵、遮光	AccuStandard, Inc.

保存場所 東京研究所 微生物試験室

6.2.3 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 LAQ5643) 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 1D80N) に溶解し、1.0 mL ずつ小分けして -20℃ 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	
	陽性対照物質	調製濃度 (µg/mL)	陽性対照物質	調製濃度 (µg/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 (µg/plate) を示す。

6.3 試薬

6.3.1 S9Mix 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 0.45µm : Lot No.1051154、1044399) 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	: キッコーマン株式会社
ロット番号	: RAA-637
製造日	: 2011 年 9 月 16 日
購入日	: 2011 年 10 月 7 日
種・系統	: ラット・SD 系
週齢・性	: 7 週齢・雄
体重	: 212-253 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) PB 投与 3 日目 BF 投与 : 80 (mg/kg 体重)
保存場所	: 東京研究所 被験物質調製保存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

: 2011年10月7日~2011年12月9日: -87.4~-79.9°C

2) 補酵素

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 : 999102

製造日 : 2011年5月17日

購入日 : 2011年10月18日、2011年11月9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

: 2011年10月18日~2011年12月9日: -0.2~7.2°C

3) S9Mix の組成 (1 mL 中)

水 : 0.9 mL

S9 : 0.1 mL

MgCl₂ : 8 μmol/mL

KCl : 33 μmol/mL

グルコース-6-リン酸 : 5 μmol/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 μmol/mL

還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH)
: 4 μmol/mL

リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)
: 100 μmol/mL

6.3.2 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 : DZLCA701

製造日 : 2011年10月7日

購入日 : 2011年11月2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 : 1164200-02

6.3.3 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	:	876774
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

6.3.4 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4)

0.1mol/L リン酸水素二ナトリウム水溶液に、0.1mol/L リン酸二水素ナトリウム二水和物水溶液を加えながら pH 7.4 に調整し、0.1mol/L リン酸緩衝液とした。これをオートクレーブにより滅菌処理(121°C、20 分)を行った。調製後は使用時まで冷蔵で保存した。

1) リン酸二水素ナトリウム二水和物

製造元	:	和光純薬工業株式会社
ロット番号	:	STJ4879
保存方法	:	室温保存
保存場所	:	東京研究所 微生物試験室

2) リン酸水素二ナトリウム

製造元	:	和光純薬工業株式会社
ロット番号	:	EPK2940、DCK3839
保存方法	:	室温保存
保存場所	:	東京研究所 微生物試験室

6.3.5 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, 0.6wt% NaCl)をオートクレーブにより滅菌処理(121°C、20 分)した後、*S. typhimurium* TA 株は 0.5 mmol/L D-ビオチン-0.5 mmol/L L-ヒスチジン溶液、*E. coli* 株では 0.5 mmol/L L-トリプトファン溶液をそれぞれ 1/10 容量加えて調製した。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	:	0316164
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	:	DCP5994

- 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 : STG1436
 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 : STQ4562
 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 : CDG0675
 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

6.4 試験方法

6.4.1 前培養

- 1) ニュートリエントブロス No.2 培養液 10 mL を入れた滅菌済み L 字型試験管 (容量 48 mL) に、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 μ L、*E. coli* WP2 *uvrA* は 10 μ L 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。なお、使用後の菌懸濁液は廃棄した。
- 2) 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。
- 3) 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 1×10^9 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 菌株の換算生菌数一覧

菌 株	菌 数(個/mL)		
	用量設定試験	本試験 1 回目	本試験 2 回目
<i>S. typhimurium</i> TA100	5.39×10^9	6.31×10^9	4.71×10^9
<i>S. typhimurium</i> TA1535	5.24×10^9	5.26×10^9	5.13×10^9
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	8.95×10^9	9.37×10^9	8.29×10^9
<i>S. typhimurium</i> TA98	6.97×10^9	7.73×10^9	6.04×10^9
<i>S. typhimurium</i> TA1537	4.75×10^9	5.80×10^9	4.34×10^9

6.4.2 プレート数

被験物質処理群、陰性対照群及び陽性対照群のいずれについても、用量設定試験では各用量につき2枚、2回の本試験では各用量につき3枚のプレートを用いた。

6.4.3 試験操作（プレインキュベーション法）

- 1) 滅菌した小試験管に調製した被験液、溶媒又は陽性対照溶液を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株の培養液0.1 mLを加えた。
- 2) 攪拌後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た。
- 3) プレインキュベーション終了後、あらかじめ電子レンジを用いて溶解し、ユニット恒温槽で45°Cに保温されたトッパガーを小試験管に2.0 mL加えて攪拌後、最小グルコース寒天平板培地に均一に重層した。
- 4) 無菌試験として、調製した最高用量の被験液0.1 mL及び調製したS9 Mix 0.5 mLをそれぞれ小試験管に取り、これにトッパガーを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)~4)の一連の操作は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で実施した。
- 5) 最小グルコース寒天平板培地に重層したトッパガー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で用量設定試験では49時間、本試験1回目では50時間、本試験2回目では48時間培養した。
- 6) 培養後、プレート上の被験物質による沈殿及び着色の有無を確認した結果、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ため、自動コロニーカウンタ（コロニーアナライザー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生育阻害の有無を観察した。

6.5 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倍以上となる増加を示し、2回の本試験で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、測定結果については、平均値±標準偏差も併せて記載した。

7. 試験結果

用量設定試験の結果を別表1、本試験1回目の結果を別表2、3、本試験2回目の結果を別表4、5に示した。なお、図1~10は別表2、3より作成した。

7.1 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、50 mg/mL の被験液を公比 4 で 4 段階希釈した計 5 用量 (19.5、78.1、313、1250、5000 µg/plate) を用い、用量設定試験を実施した。

その結果、本被験物質によるプレート上の沈殿及び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。実体顕微鏡を用いて菌に対する生育阻害を観察した結果、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1535、TA1537 の 313 µg/plate 以上、代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA100 及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA1535、TA1537 の 1250 µg/plate 以上、代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* の 5000 µg/plate の用量で認められた。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、生育阻害を示した最低用量を最高用量として、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1535、TA1537 については 313 µg/plate、代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA100 及び代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA1535、TA1537 については 1250 µg/plate、代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* については 5000 µg/plate をそれぞれ最高用量として、以下公比 2 で 5 段階希釈した計 6 用量を設定した。なお、本試験は同一用量で 2 回実施した。

7.2 本試験 1 回目及び本試験 2 回目の観察結果

本被験物質によるプレート上の沈殿及び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。実体顕微鏡を用いて菌に対する生育阻害を観察した結果、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1535、TA1537 の 313 µg/plate、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA1535 の 625 µg/plate 以上、代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA100 及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA1537 の 1250 µg/plate、代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* の 2500 µg/plate 以上の用量で認められた。

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 倍以上となる増加は認められず、用量反応性も認められなかった。

7.3 試験系の成立条件

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 (別添 2) 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ったため、試験が適切に実施されたものと判断した。

8. 考察

2回の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。

以上の試験結果より、本試験条件下において1,3-Propanediol, 2-butyl-2-ethylは、細菌に対する復帰突然変異誘発能を有さない（陰性）と判定した。

9. 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・微生物を用いる変異原性試験ガイドブック, 中央労働災害防止協会, 1986.
- 8) 石館基(監修): 微生物を用いる変異原性試験データ集(能美健彦, 松井道子編集), 株式会社エル・アイ・シー, 東京, 1991.

(別表1)

試験結果表 (用量設定試験)

被験物質の名称: 1,3-Propanediol, 2-butyl-2-ethyl

Test No. T-0879

試験実施期間		2011年11月14日 より 2011年11月17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 (DMSO)	70 59 (65)	7 10 (9)	10 19 (15)	15 13 (14)	7 8 (8)
	19.5	97 94 (96)	8 6 (7)	15 5 (10)	7 18 (13)	7 4 (6)
	78.1	93 89 (91)	5 7 (6)	10 19 (15)	17 19 (18)	4 3 (4)
	313	102 94 (98)	6 * 6 * (6)	10 11 (11)	10 15 (13)	7 * 7 * (7)
	1250	72 * 77 * (75)	7 * 10 * (9)	7 11 (9)	16 13 (15)	4 * 3 * (4)
	5000	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
	S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	99 79 (89)	10 7 (9)	14 17 (16)	15 16 (16)
19.5		65 102 (84)	6 4 (5)	13 15 (14)	22 22 (22)	5 5 (5)
78.1		95 95 (95)	8 7 (8)	11 13 (12)	25 25 (25)	8 8 (8)
313		80 85 (83)	15 8 (12)	15 13 (14)	21 21 (21)	8 4 (6)
1250		74 * 77 * (76)	6 * 8 * (7)	19 13 (16)	21 18 (20)	3 * 8 * (6)
5000		0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
陽性対照		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	1.0
	コロニー数/プレート	635 609 (622)	189 203 (196)	41 57 (49)	483 410 (447)	1508 1655 (1582)
	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]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	990 1024 (1007)	281 237 (259)	957 1194 (1076)	301 276 (289)	79 80 (80)

(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[a]P : ベンゾ[a]ピレン

* : 被験物質による生育阻害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1回目:-S9Mix)

被験物質の名称: 1,3-Propanediol, 2-butyl-2-ethyl

No. T-0879

試験実施期間		2011年11月29日 より 2011年12月2日						
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/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 (DMSO)	110 128 123 (120 ± 9.3)	7 6 10 (8 ± 2.1)	21 16 18 (18 ± 2.5)	13 16 11 (13 ± 2.5)	10 6 10 (9 ± 2.3)		
	9.77	NT	8 8 4 (7 ± 2.3)	NT	NT	7 5 5 (6 ± 1.2)		
	19.5	NT	2 13 10 (8 ± 5.7)	NT	NT	5 7 11 (8 ± 3.1)		
	39.1	122 119 126 (122 ± 3.5)	8 11 7 (9 ± 2.1)	NT	NT	10 11 8 (10 ± 1.5)		
	78.1	119 108 110 (112 ± 5.9)	6 5 4 (5 ± 1.0)	NT	NT	10 5 4 (6 ± 3.2)		
	156	122 108 113 (114 ± 7.1)	2 2 7 (4 ± 2.9)	13 15 16 (15 ± 1.5)	18 10 17 (15 ± 4.4)	4 6 2 (4 ± 2.0)		
	313	153 100 103 (119 ± 29.8)	5 * 4 * 3 * (4 ± 1.0)	27 13 16 (19 ± 7.4)	15 16 16 (16 ± 0.6)	5 * 2 * 4 * (4 ± 1.5)		
	625	127 106 116 (116 ± 10.5)	NT	16 20 25 (20 ± 4.5)	12 11 19 (14 ± 4.4)	NT		
	1250	96 * 81 * 79 * (85 ± 9.3)	NT	12 14 20 (15 ± 4.2)	18 15 14 (16 ± 2.1)	NT		
	2500	NT	NT	6 * 8 * 8 * (7 ± 1.2)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	NT		
	5000	NT	NT	2 * 1 * 1 * (1 ± 0.6)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	NT		
	陽性対照	S9Mixを必要としないもの	名 称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	IGR-191
			用量 (μg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
			コロニー数/プレート	678 714 672 (688 ± 22.7)	156 157 167 (160 ± 6.1)	87 68 75 (77 ± 9.6)	438 418 412 (423 ± 13.6)	1202 1275 1398 (1292 ± 99.1)

(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
IGR-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

*: 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。
NT: 試験せず。
()内は、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

(別表3)

試験結果表 (本試験1回目:+S9Mix)

被験物質の名称: 1,3-Propanediol, 2-butyl-2-ethyl

No. T-0879

試験実施期間		2011年11月29日 より 2011年12月2日						
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/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 (DMSO)	121 117 118 (119 ± 2.1)	11 8 5 (8 ± 3.0)	13 15 13 (14 ± 1.2)	25 21 32 (26 ± 5.6)	10 13 9 (11 ± 2.1)		
	39.1	129 106 125 (120 ± 12.3)	6 12 4 (7 ± 4.2)	NT	NT	13 5 5 (8 ± 4.6)		
	78.1	152 122 119 (131 ± 18.2)	10 7 5 (7 ± 2.5)	NT	NT	8 6 5 (6 ± 1.5)		
	156	129 119 142 (130 ± 11.5)	6 11 9 (9 ± 2.5)	11 30 18 (20 ± 9.6)	23 30 28 (27 ± 3.6)	7 8 10 (8 ± 1.5)		
	313	155 148 121 (141 ± 18.0)	10 8 1 (6 ± 4.7)	16 16 11 (14 ± 2.9)	19 21 21 (20 ± 1.2)	4 8 10 (7 ± 3.1)		
	625	135 131 107 (124 ± 15.1)	8 * 11 * 7 * (9 ± 2.1)	15 16 18 (16 ± 1.5)	25 21 22 (23 ± 2.1)	3 7 6 (5 ± 2.1)		
	1250	106 * 86 * 99 * (97 ± 10.1)	7 * 9 * 7 * (8 ± 1.2)	16 11 13 (13 ± 2.5)	24 17 24 (22 ± 4.0)	3 * 4 * 4 * (4 ± 0.6)		
	2500	NT	NT	5 * 10 * 7 * (7 ± 2.5)	7 * 11 * 8 * (9 ± 2.1)	NT		
	5000	NT	NT	3 * 6 * 4 * (4 ± 1.5)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	NT		
	陽性対照	S9Mixを必要とするもの	名称 用量 (μg/プレート)	B[a]P 5.0	2AA 2.0	2AA 10.0	B[a]P 5.0	B[a]P 5.0
			コロニー数/プレート	1010 1041 962 (1004 ± 39.8)	238 287 304 (276 ± 34.3)	860 774 659 (764 ± 100.8)	295 342 374 (337 ± 39.7)	94 97 97 (96 ± 1.7)

(備考)

2AA : 2-アミノアントラセン
B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

* : 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。
NT : 試験せず。
()内は、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

(別表4)

試験結果表 (本試験2回目:-S9Mix)

被験物質の名称: 1,3-Propanediol, 2-butyl-2-ethyl

No. T-0879

試験実施期間		2011年12月8日 より 2011年12月12日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/プレート)	複播変異数 (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 (DMSO)	96 106 109 (104 ± 6.8)	8 7 8 (8 ± 0.6)	13 12 16 (14 ± 2.1)	22 27 27 (25 ± 2.9)	6 4 8 (6 ± 2.0)	
	9.77	NT	6 10 7 (8 ± 2.1)	NT	NT	8 5 4 (6 ± 2.1)	
	19.5	NT	5 7 12 (8 ± 3.6)	NT	NT	4 5 7 (5 ± 1.5)	
	39.1	97 104 105 (102 ± 4.4)	8 5 9 (7 ± 2.1)	NT	NT	5 6 5 (5 ± 0.6)	
	78.1	98 119 104 (107 ± 10.8)	8 4 10 (7 ± 3.1)	NT	NT	5 7 7 (6 ± 1.2)	
	156	85 91 98 (91 ± 6.5)	8 7 5 (7 ± 1.5)	16 13 18 (16 ± 2.5)	22 12 25 (20 ± 6.8)	5 5 11 (7 ± 3.5)	
	313	94 92 97 (94 ± 2.5)	5 * 11 * 8 * (8 ± 3.0)	11 12 10 (11 ± 1.0)	21 22 13 (19 ± 4.9)	1 * 4 * 4 * (3 ± 1.7)	
	625	102 110 92 (101 ± 9.0)	NT	11 10 12 (11 ± 1.0)	25 24 19 (23 ± 3.2)	NT	
	1250	82 * 74 * 100 * (85 ± 13.3)	NT	18 8 11 (12 ± 5.1)	21 21 16 (19 ± 2.9)	NT	
	2500	NT	NT	6 * 6 * 7 * (6 ± 0.6)	13 * 4 * 2 * (6 ± 5.9)	NT	
	5000	NT	NT	4 * 2 * 2 * (3 ± 1.2)	5 * 0 * 2 * (2 ± 2.5)	NT	
	陽性対照	名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191
	S9Mixを必要としなもの	用量 (μg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
		コロニー数/プレート	632 642 586 (620 ± 29.9)	184 223 177 (195 ± 24.8)	51 57 56 (55 ± 3.2)	335 384 333 (351 ± 28.9)	1305 1405 1203 (1304 ± 101.0)

(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-クロロエテル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl

* : 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。
NT : 試験せず。
()内は、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

(別表5)

試験結果表 (本試験2回目:+S9Mix)

被験物質の名称: 1,3-Propanediol, 2-butyl-2-ethyl

No. T-0879

試験実施期間		2011年12月8日 より 2011年12月12日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/プレート)	複帰変異数 (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 (DNSO)	99 117 88 (101 ± 14.6)	6 6 9 (7 ± 1.7)	11 15 22 (16 ± 5.6)	22 35 31 (29 ± 6.7)	5 6 7 (6 ± 1.0)	
	39.1	110 91 111 (104 ± 11.3)	14 7 7 (9 ± 4.0)	NT	NT	6 2 7 (5 ± 2.6)	
	78.1	106 98 93 (99 ± 6.6)	7 13 4 (8 ± 4.6)	NT	NT	8 4 5 (6 ± 2.1)	
	156	106 116 105 (109 ± 6.1)	4 7 7 (6 ± 1.7)	12 15 10 (12 ± 2.5)	19 28 31 (26 ± 6.2)	4 5 8 (6 ± 2.1)	
	313	104 105 99 (103 ± 3.2)	5 8 12 (8 ± 3.5)	11 12 13 (12 ± 1.0)	34 32 34 (33 ± 1.2)	9 7 6 (7 ± 1.5)	
	625	109 93 82 (95 ± 13.6)	4 * 7 * 5 * (5 ± 1.5)	11 16 17 (15 ± 3.2)	27 33 29 (30 ± 3.1)	3 6 4 (4 ± 1.5)	
	1250	73 * 84 * 89 * (82 ± 8.2)	5 * 6 * 4 * (5 ± 1.0)	15 16 11 (14 ± 2.6)	34 28 25 (29 ± 4.6)	1 * 3 * 4 * (3 ± 1.5)	
	2500	NT	NT	11 * 8 * 7 * (9 ± 2.1)	7 * 14 * 19 * (13 ± 6.0)	NT	
	5000	NT	NT	5 * 4 * 2 * (4 ± 1.5)	4 * 5 * 3 * (4 ± 1.0)	NT	
	陽性対照	名称	B[σ]P	2AA	2AA	B[σ]P	B[σ]P
	S9Mixを必要とするもの	用量 (μg/プレート)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
		コロニー数/プレート	930 951 918 (933 ± 16.7)	235 249 245 (243 ± 7.2)	796 718 746 (753 ± 39.5)	344 309 316 (323 ± 18.5)	100 88 93 (94 ± 6.0)

(備考)

2AA : 2-アミノアントラセン
B[σ]P : ベンゾ[σ]ピレン

*: 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。
NT: 試験せず。
()内は、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

図 1

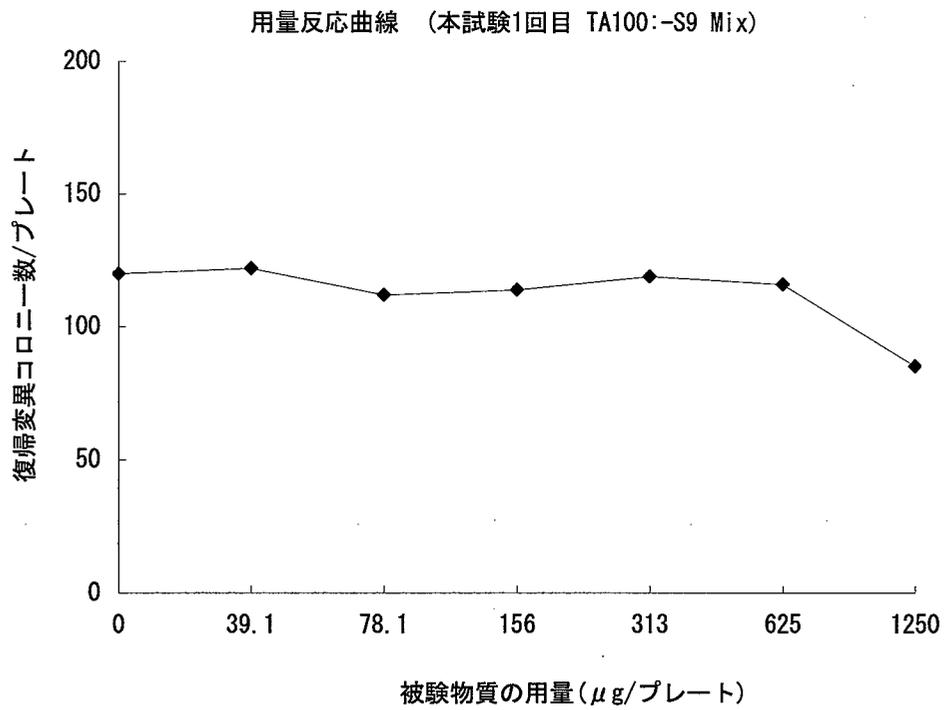


図 2

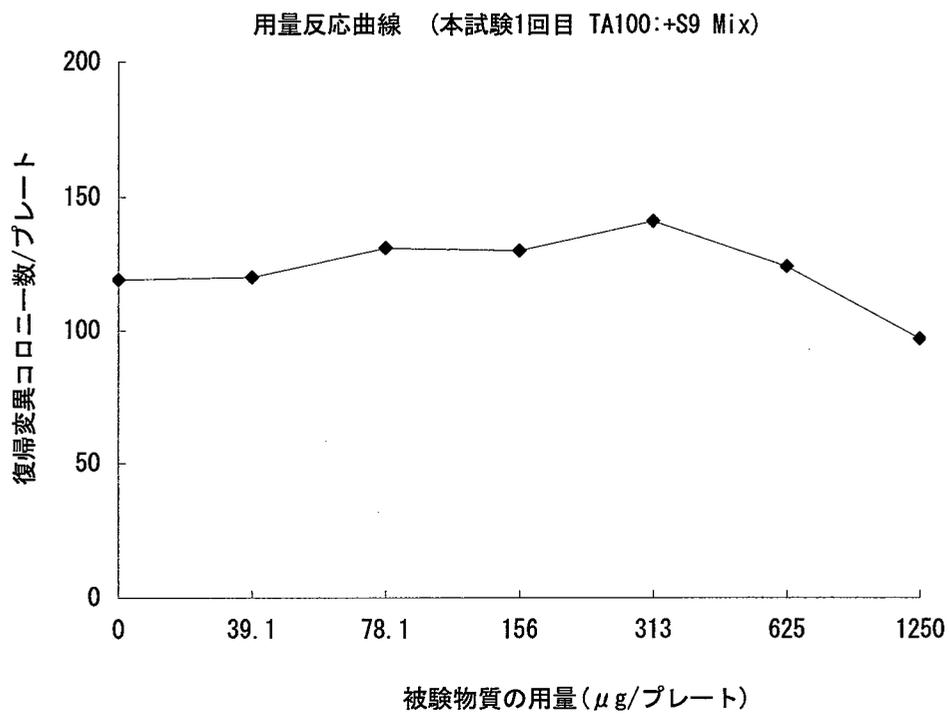


図 3

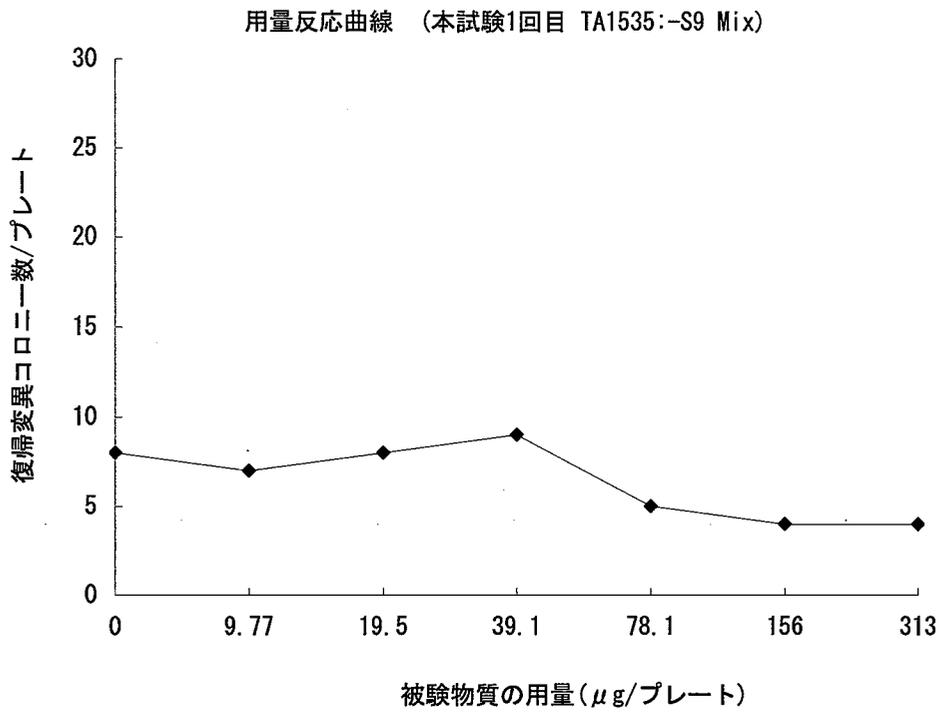


図 4

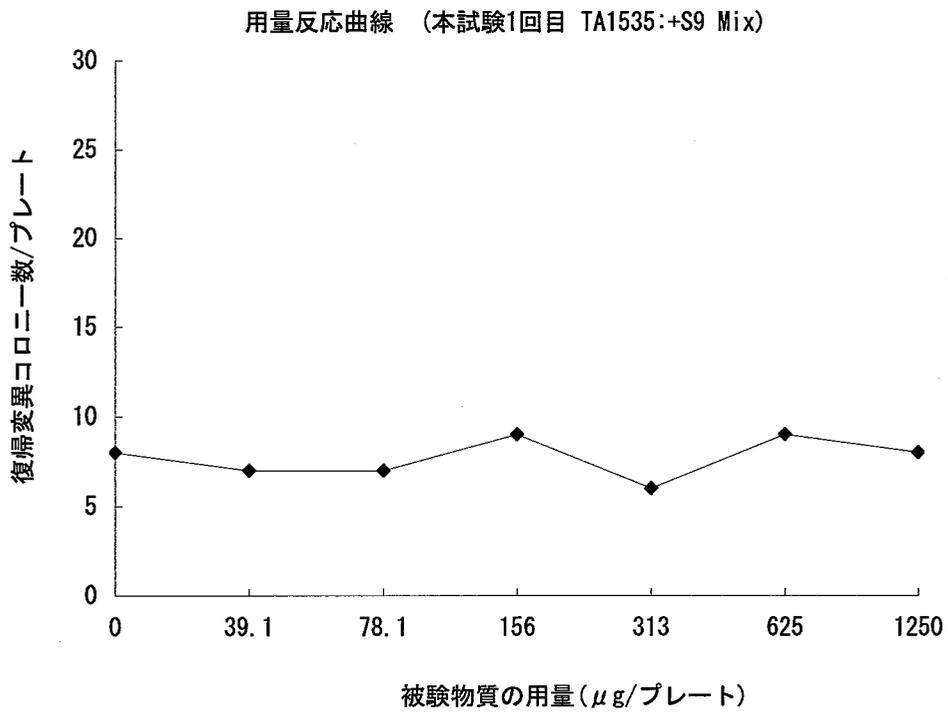


図 5

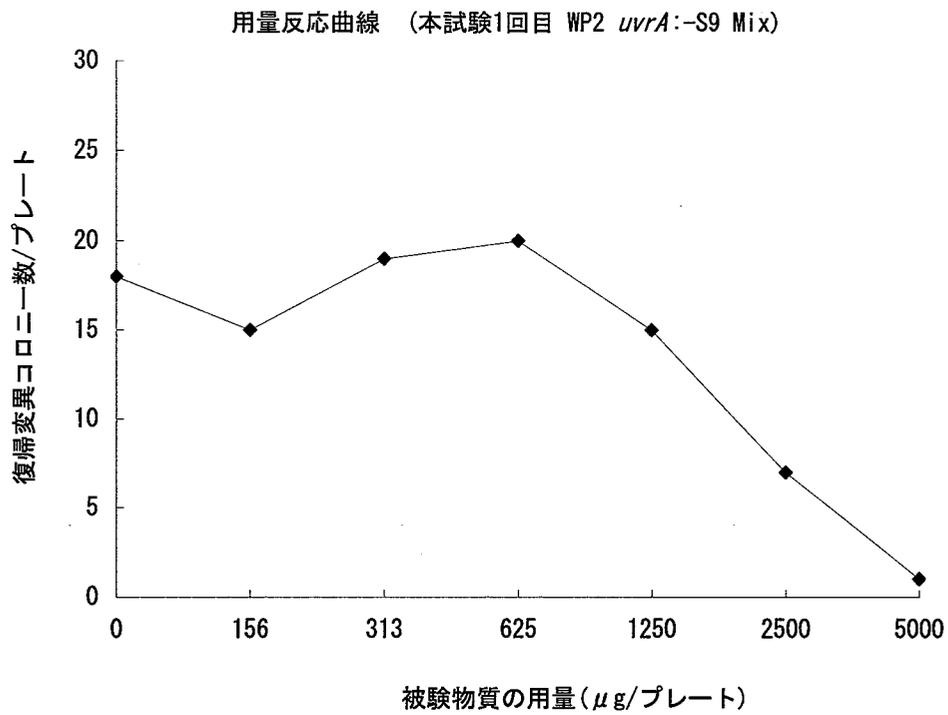


図 6

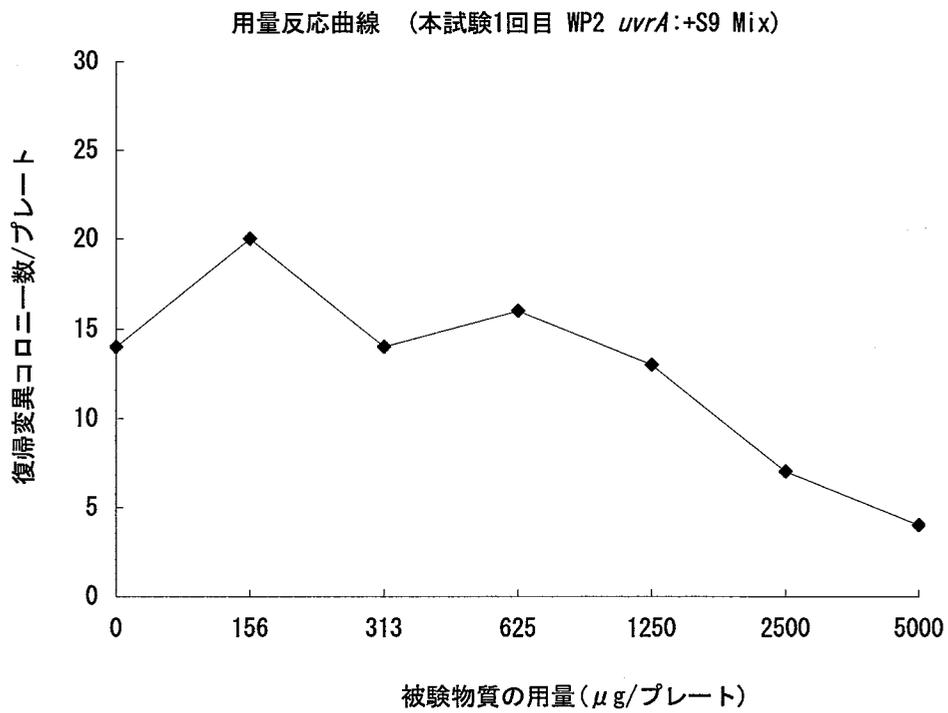


図 7

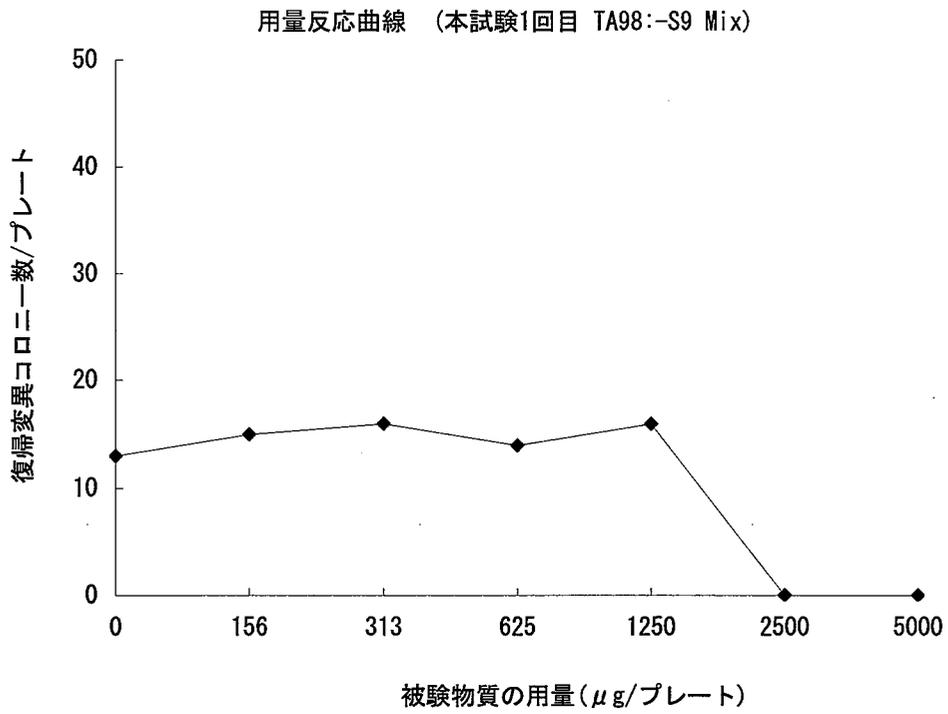


図 8

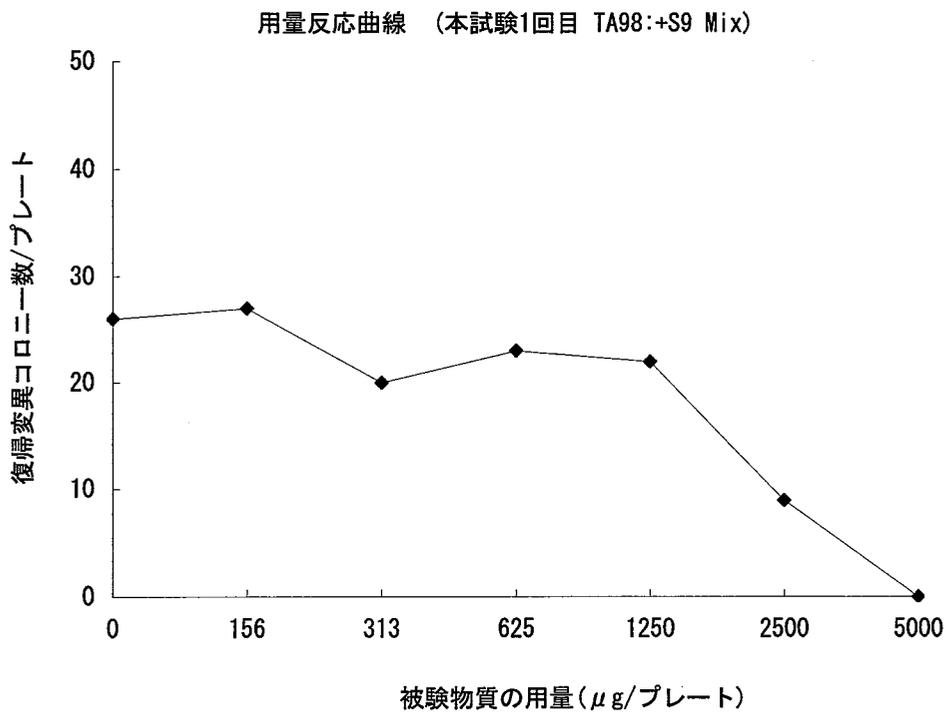


図 9

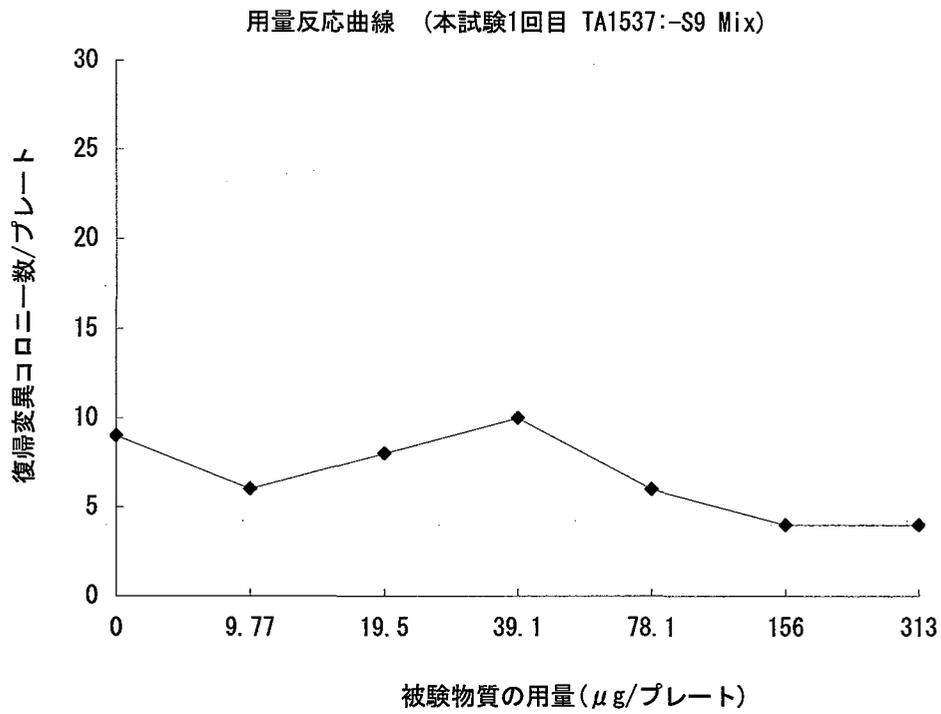
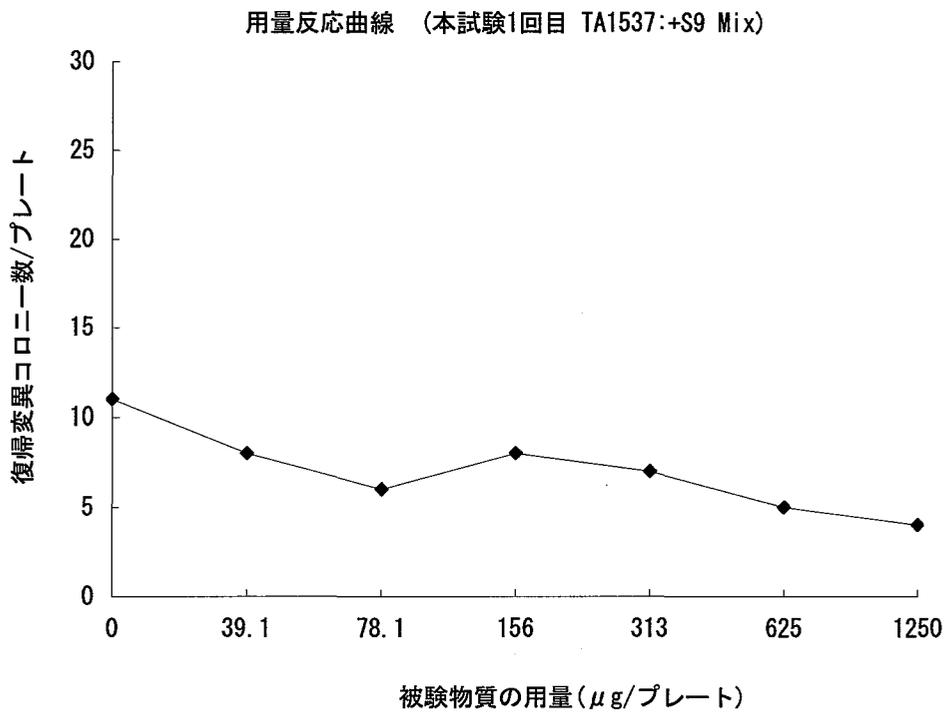


図 10



別添 1 (1/2)

試験番号 : T-0879

試験成績書
(被験物質の安定性)

試験番号 : T-0879

被験物質 : 1,3-Propanediol, 2-butyl-2-ethyl (ロット番号 : BLODO)

測定項目 : 赤外吸収スペクトルの確認 (ATR 法)

ステージ : 実験終了後

測定日 : 2011 年 12 月 21 日

判定基準 : 参照スペクトル¹⁾と同一波数のところに同様な強度の吸収を認める。

1) [REDACTED] 1,3-Propanediol, 2-butyl-2-ethyl の GC を用いた被験液中濃度測定法バリデーション及び均一性・安定性試験 (媒体 : 0.5 w/v%メチルセルロース溶液) 並びに IR を用いた特性及び安定性試験 (株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所、試験番号 : A-2425)

結果 : 参照スペクトルと同一波数のところに同様な強度の吸収を認めた。
なお、赤外吸収スペクトルは次のページに示す。

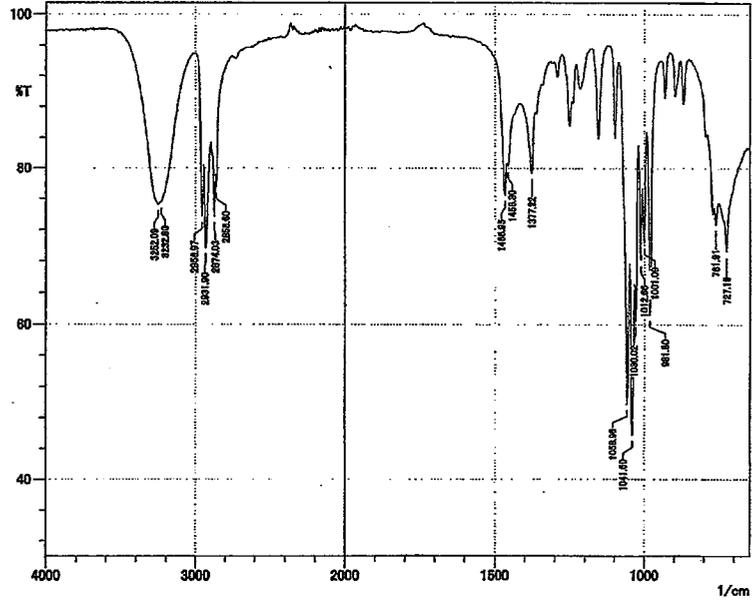
判定 : 適

基準 : 「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)

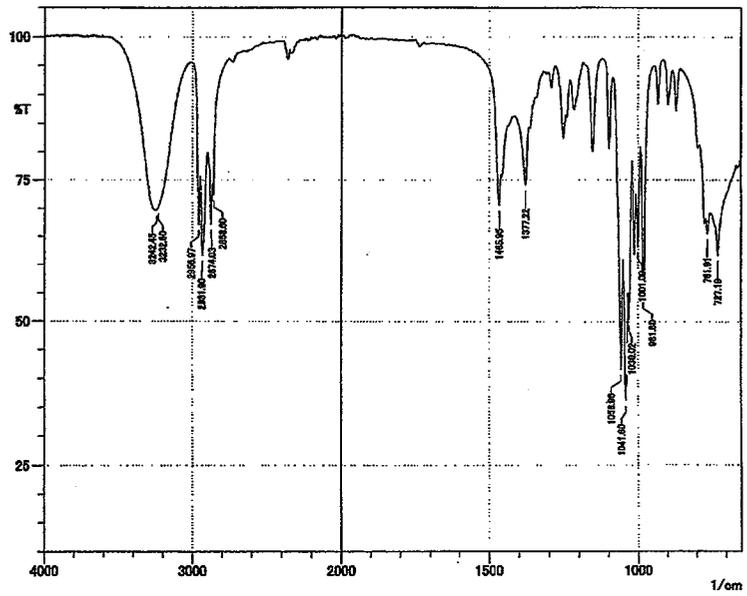
2012 年 1 月 4 日

化学分析責任者
株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所

結果 : 赤外吸収スペクトル



(実験終了後)



(参照スペクトル)

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

CODE No.: 110701

Period: From February 1, 2011 to June 17, 2011

(Pre-incubation Method)

Tester Strains	S9 Mix (-) or (+)	Classification	Mean	S.D.	Management ranges		Number of plates
					Lower limit	Upper limit	
TA100	-	Solvent control	103	16.5	57	149	324
		Positive control AF-2(0.01 μ g/plate)	603	55.3	440	765	324
	+	Solvent control	119	16.4	73	165	324
		Positive control B[a]P(5.0 μ g/plate)	845	118	592	1099	324
TA1535	-	Solvent control	10	3.54	1	19	324
		Positive control SAZ(0.5 μ g/plate)	231	53.0	127	336	324
	+	Solvent control	10	3.31	1	19	324
		Positive control 2AA(2.0 μ g/plate)	297	61.5	163	431	324
WP2uvrA	-	Solvent control	18	6.24	2	35	324
		Positive control AF-2(0.01 μ g/plate)	80	13.5	44	117	324
	+	Solvent control	20	6.00	5	35	324
		Positive control 2AA(10.0 μ g/plate)	940	117	658	1223	324
TA98	-	Solvent control	16	4.82	2	30	324
		Positive control AF-2(0.1 μ g/plate)	472	53.1	330	613	324
	+	Solvent control	32	7.51	13	51	324
		Positive control B[a]P(5.0 μ g/plate)	294	40.9	206	382	324
TA1537	-	Solvent control	7	2.78	1	14	324
		Positive control ICR-191(1.0 μ g/plate)	1509	303	830	2188	324
	+	Solvent control	10	3.34	1	19	324
		Positive control B[a]P(5.0 μ g/plate)	96	17.0	53	139	324

(Notice)

Solvent controls Water, Dimethylsulfoxide(DMSO) or 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 \cdot 2HCl

B[a]P :Benzo[a]pyrene

2AA :2-aminoanthracene

S9Mix (-) :without metabolic activation

(+) :with metabolic activation

信頼性保証書 (1/2)

試験番号 : T-0879

試験表題 : 1,3-Propanediol,2-butyl-2-ethyl 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。

- 「OECD Principles of Good Laboratory Practice」 (OECD : 1997年 11月 26日)
- 「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 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)

なお、調査は下記の通り実施致しました。

2012年 3月 22日
株式会社ボゾリサーチセンター
信頼性保証部門責任者

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		2011年 11月 1日	2011年 11月 1日
調製・保存 (被験物質)、 被験物質の処理		2011年 11月 30日	2011年 11月 30日
計数		2011年 12月 2日	2011年 12月 5日
被験物質の安定性測定		2011年 12月 21日	2011年 12月 21日
生データ		2012年 2月 2日	2012年 2月 2日
改善確認		2012年 2月 8日	2012年 2月 9日
最終報告書草案・図・表		2012年 2月 2日	2012年 2月 2日
最終報告書		2012年 3月 22日	2012年 3月 22日

信頼性保証書 (2/2)

プロセス調査

項目	担当者	調査日	部門責任者及び 運営管理者への 報告日
菌株の特性検査	[REDACTED]	2011年 9月 27日	
		2011年 9月 29日	
		2011年 10月 5日	2011年 10月 6日
		2011年 10月 6日	2011年 10月 6日
陽性対照物質の管理	[REDACTED]	2011年 11月 14日	2011年 11月 14日

試験責任者陳述書

試験番号 : T-0879

試験標題 : 1,3-Propanediol, 2-butyl-2-ethyl の細菌を用いる復帰突然変異試験

当該試験は、「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）及び「OECD Principles of Good Laboratory Practice」（OECD：1997 年 11 月 26 日）を満たす試験施設において、「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：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）及び「OECD Guidelines for Testing of Chemicals 471」（OECD：1997 年 7 月 21 日）に準拠して実施されたものに相違ありません。

2012 年 3 月 22 日
株式会社ボゾリサーチセンター
試験責任者 