

最終報告書

トランスジェニックマウスを用いる ethyl (1-naphthyl) amine の遺伝子突然変異試験

試験番号 : E783 (115-233)

平成26年3月11日

試験委託者
厚生労働省

公益財団法人食品衛生性評価センター

試験責任者の署名および日付

表 題： トランスジェニックマウスを用いる ethyl (1-naphthyl) amine の遺伝子突然変異試験

試験番号： E783 (115-233)

試験責任者：

平成 26 年 3 月 11 日

公益財団法人食品農医薬品安全性評価センター

目 次

要 約.....	5
1. 表題.....	6
2. 試験目的.....	6
3. 遵守した GLP.....	6
4. 準拠したガイドライン.....	6
5. 遵守した動物実験関連規則および遺伝子組換え生物等関連規則.....	6
6. 試験番号.....	6
7. 試験施設.....	6
8. 試験委託者.....	7
9. 試験責任者.....	7
10. 被験物質等管理責任者.....	7
11. 分担責任者.....	7
12. 試験日程.....	7
13. 被験物質.....	8
14. 対照物質.....	10
15. 試験材料および方法.....	10
16. データ処理.....	27
17. 結果の解析.....	27
18. 試験成立条件.....	27
19. 結果.....	28
20. 考察および結論.....	30
21. 参考文献.....	31
22. 試験関係資料の保存.....	32
23. 予見することの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および 試験計画書に従わなかつたこと.....	32

Tables

Table 1	Induction of mutation (<i>gpt</i> assay) in liver of transgenic mice treated with ethyl (1-naphthyl) amine [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	33
Table 2	Induction of mutation (<i>gpt</i> assay) in bone marrow of transgenic mice treated with ethyl (1-naphthyl) amine [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	34

Table 3	Induction of mutation (<i>gpt</i> assay) in testis of transgenic mice treated with ethyl (1-naphthyl) amine [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	35
Table 4	Induction of mutation (<i>Spi</i> ⁻ assay) in liver of transgenic mice treated with ethyl (1-naphthyl) amine [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	36
Table 5	Induction of mutation (<i>Spi</i> ⁻ assay) in bone marrow of transgenic mice treated with ethyl (1-naphthyl) amine [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	37
Table 6	Induction of mutation (<i>Spi</i> ⁻ assay) in testis of transgenic mice treated with ethyl (1-naphthyl) amine [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	38
Appendices		
Appendix 1	Body weight in the gene mutation assay of ethyl (1-naphthyl) amine [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	39
Appendix 2	Clinical observations in the gene mutation assay of ethyl (1-naphthyl) amine [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	41
Appendix 3	Organ weight in the gene mutation assay of ethyl (1-naphthyl) amine [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	51
Appendix 4	Individual gross findings on ethyl (1-naphthyl) amine -treated transgenic mice for the gene mutation assay [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	53
Reference data		
Reference data 1	試験成績書	56
Reference data 2	試験成績書 (被験物質の安定性分析結果)	58
Reference data 3	被験物質液中の被験物質濃度測定	64
	信頼性保証書	70

要 約

ethyl (1-naphthyl) amine の変異原性について、トランスジェニックマウス (*gpt delta*) を用いて肝臓、骨髄および精巣における遺伝子突然変異誘発性 (レポーター遺伝子: *gpt* および, *red* と *gam*) を検討した。

予備試験^[1]の結果を基に、最大耐量付近と考えられる 200 mg/kg を最高用量とし、以下 100, 50.0 および 25.0 mg/kg の計 4 用量を被験物質群として設定した。

被験物質をトランスジェニックマウスに 28 日間反復強制経口投与し、最終投与後 3 日の肝臓、骨髄および精巣について *gpt assay* および *Spi* assay により遺伝子突然変異体頻度を求めた。なお、いずれの群においても死亡例が認められなかったため、200, 100 および 50.0 mg/kg の 3 用量を評価対象とした。

その結果、ethyl (1-naphthyl) amine 投与群の肝臓、骨髄および精巣のいずれにおいても、*gpt assay* および *Spi* assay による遺伝子突然変異体頻度に、陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加は認められなかった。

陽性対照のベンゾ[a]ピレン経口投与群 (125 mg/kg) では、肝臓および骨髄で *gpt assay* および *Spi* assay による遺伝子突然変異体頻度に、陰性対照と比較して統計学的に有意 ($p \leq 0.05$) な増加が認められた。したがって、当該試験はいずれも適切に実施されたと判断した。

以上の結果から、当該試験条件下において、ethyl (1-naphthyl) amine はトランスジェニックマウスに対して遺伝子突然変異誘発性を示さないもの (陰性) と判定された。

1. 表題

トランスジェニックマウスを用いる ethyl (1-naphthyl) amine の遺伝子突然変異試験

2. 試験目的

被験物質による標的器官での遺伝子突然変異誘発性を *in vivo* で検討する (レポーター遺伝子: *gpt* および, *red* と *gam*).

3. 遵守した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について (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, 環企発第 110331010 号)

4. 準拠したガイドライン

- OECD Guidelines for the Testing of Chemicals 488 (26 July 2013: Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays)

5. 遵守した動物実験関連規則および遺伝子組換え生物等関連規則

- 「動物の愛護及び管理に関する法律」 (平成 24 年 9 月 5 日法律第 79 号)
- 「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」 (平成 18 年 4 月 28 日環境省告示第 88 号)
- 「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」 (平成 15 年 6 月 18 日法律第 97 号, 最終改正: 平成 19 年 3 月 30 日法律第 8 号)
- 「動物実験に関する指針」 (平成 25 年 5 月 13 日安評センター内規)

上記の法等を遵守し, 遺伝子組換え生物等を適正に使用した (安評センター動物実験委員会承認番号 13-0185A, 遺伝子組換え実験承認受付番号 13-3).

6. 試験番号

E783 (115-233)

7. 試験施設

公益財団法人食品農医薬品安全性評価センター (略称 安評センター)

〒437-1213 静岡県磐田市塩新田 582 番地 2

Tel: 0538-58-1266 Fax: 0538-58-1293

8. 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一丁目 2 番 2 号
Tel: 03-3595-2298 Fax: 03-3593-8913

9. 試験責任者

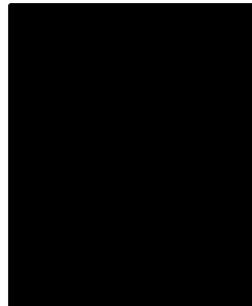
(遺伝毒性試験室)

公益財団法人食品農医薬品安全性評価センター
〒437-1213 静岡県磐田市塩新田 582 番地 2
Tel: 0538-58-1291 Fax: 0538-58-1368

10. 被験物質等管理責任者

11. 分担責任者

検疫：
飼育管理：
遺伝子突然変異試験：
被験物質液等調製：
被験物質液の被験物質分析：
病理学的検査：



12. 試験日程

試験開始日：	平成 25 年 9 月 30 日
実験開始日：	平成 25 年 10 月 9 日
動物搬入口 (Day -7)：	平成 25 年 10 月 2 日
被験物質液調製日：	平成 25 年 10 月 7, 15, 22 および 28 日
被験物質液の濃度／均一性分析日：	平成 25 年 10 月 7 および 28 日
群分け日 (Day 1)：	平成 25 年 10 月 9 日

《陰性対照群, 被験物質群》

投与開始日 (Day 1, 実験開始日) : 平成 25 年 10 月 9 日
投与終了日 (Day 28) : 平成 25 年 11 月 5 日
標的器官 (臓器) 摘出日 (Day 31) : 平成 25 年 11 月 8 日

《陽性対照群》

投与日 (Day 13~17) : 平成 25 年 10 月 21~25 日
標的器官 (臓器) 摘出日 (Day 31) : 平成 25 年 11 月 8 日
アッセイ終了日 : 平成 26 年 2 月 7 日
実験終了日 : 平成 26 年 2 月 7 日
試験終了日 : 平成 26 年 3 月 11 日

【Day の定義】

投与開始日を Day 1 と定義し, その前日を Day -1 とした.

13. 被験物質

13.1. 被験物質名

ethyl (1-naphthyl) amine
和名 : *N*-エチル-1-アミノナフタレン

13.2. ロット番号

4M33M

13.3. 純度 (中和滴定)

98.4% (GC) (Reference data 1)

13.4. 保存条件

冷蔵, 気密, 遮光 (不活性ガス充填)

13.5. 保存場所

被験物質調製室, 冷蔵保管庫 (プレハブ低温庫 ch. 72 またはバイオマルチクーラー ch. 41)

保存期間 : 2013 年 6 月 11 日 ~ 2013 年 10 月 28 日 (受領日 ~ 最終使用日)

実測値 : 3.0 ~ 7.5°C

[サーバー室の無停電電源装置の更新作業に伴い, 2013 年 7 月 6 日 9:40 ~ 12:40 の間, 温度集中監視システムによる温度データの収集ができなかった. この間の保存温度は, バックアップデータで確認した (実測値 : 3 ~ 6°C, 2013 年 7 月 5 ~ 8 日).]

13.6. 取り扱い上の注意

吸入、皮膚への直接接触を避けるため、取り扱い時には、保護具（マスク、手袋、ゴーグル）を着用する。

13.7. 製造元

東京化成工業株式会社

13.8. 製品名

N-ethyl-1-naphthylamine

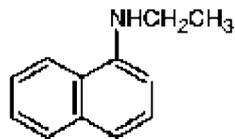
13.9. CAS No.

118-44-5

13.10. 分子式

C₁₂H₁₃N

13.11. 化学構造



13.12. 分子量

171.24

13.13. 物質の状態

黄色～赤みの黄色の透明液体

13.14. 沸点

189°C

13.15. 溶解性

水に不溶

13.16. 安定性

投与終了後に残余被験物質を製造元に返却し、製造元にて特性分析を実施した。その結果、被験物質は試験期間中安定であったことが確認された（Reference data 2）。

13.17. 残余被験物質の処理

2 g の被験物質を資料保存施設管理責任者の管理下で安評センターに保存し、残りは被験物質等管理責任者に返却した。

14. 対照物質

14.1. 陰性対照物質

被験物質液調製に媒体として使用するコーン油を陰性対照物質に選択した.

14.1.1. 物質名

コーン油

14.1.2. ロット番号

PDQ0071

14.1.3. 製造元

和光純薬工業株式会社

14.1.4. 保存条件

室温

14.1.5. 保存場所

被験物質調製室, 室温保管庫

14.2. 陽性対照物質

ガイドラインで推奨されている, 下記の物質を陽性対照物質に選択した.

14.2.1. 物質名

ベンゾ[a]ピレン (B[a]P)

14.2.2. ロット番号

TLG0548

14.2.3. 製造元

和光純薬工業株式会社

14.2.4. 保存条件

冷蔵 (基準値 : 1~9°C)

14.2.5. 保存場所

被験物質調製室, 冷蔵保管庫

15. 試験材料および方法

使用する動物がトランスジェニックマウスであることから, P1A レベルの拡散防止処置をとった.

15.1. 試験動物

15.1.1. 種

マウス (*gpt delta* トランスジェニックマウス)

15.1.2. 系統 [グレード]

C57BL/6JmsSlc-Tg (*gpt delta*) [SPF]

15.1.3. 生産者

日本エスエルシー株式会社

15.1.4. 試験系の選択理由

遺伝子導入マウスとして広く利用されており、入手のし易さ等を考慮して本系統のトランスジェニックマウスを選択した。

15.1.5. 週齢および体重

9週齢の動物を購入し、被験物質の投与は10週齢（体重24.1～28.3 g）に開始した。

15.1.6. 購入動物数

雄40匹

15.1.7. 使用動物数

雄36匹

15.2. 飼育管理

15.2.1. 飼育環境

バリアシステムの7-208号飼育室[陽圧] (W 4.8 × D 10.3 × H 2.6 m) で動物を飼育し、環境調節の基準値は以下のとおりとした。なお、飼育期間中、出入り口にネズミ返しを設置した。

温度： 20～26°C [実測値：22.9～23.2°C]

湿度： 35～70%RH [実測値：47.7～62.2%RH]

換気回数： 12回以上/h

照明： 12時間（7時点灯，19時消灯）

水洗式飼育機（東洋理工）を使用し、金属製網目飼育ケージ（W 10.0 × D 19.6 × H 13.0 cm）に動物を1匹ずつ収容した。飼育ケージは隔週1回、給餌器は週1回の頻度で取り替えた。

15.2.2. 飼料

放射線滅菌固型飼料（CRF-1, Lot No. 121207, オリエンタル酵母工業）を自由に摂取させた。

飼料中の汚染物質に関する分析成績書 (No. AR-13-JP-000009-01) を製造元から入手し、その値が日本実験動物飼料協会案の許容基準値内であることを確認した。なお、餌の補給は、給餌器の交換と同時に行った。

15.2.3. 給水

水道水を自動給水ノズルから自由に摂取させた。

水道法に基づく水質検査を 2013 年 10 月に外部機関で行い、検査結果が上水道水質基準の基準値内であることを確認した (成績書 No. K13-1021)。また、細菌検査 (一般細菌および大腸菌検査) を 2013 年 9 および 11 月に安評センターで実施し、細菌が検出されていないことを確認した (第 GT13-09 号および第 GT13-11 号)。

15.3. 検疫・馴化

搬入後、動物の一般状態および体重推移を観察した。Day -7~1 の間動物を検疫・馴化させ、この間一般状態を 1 日 1 回観察した。体重を搬入時 (Day -7) および検疫・馴化期間終了時 (Day 1) に測定した。

一般状態に異常を示した動物はみられなかったが、仮動物番号 M011, M028, M034 および M040 の動物は搬入時に比較し体重が低値を示したため、群分け前に試験系から除外し、余剰動物とした。

15.4. 群分け

群分けは、Day 1 に行った。

動物を直前に測定した体重によって層別化し、無作為割り付け法により各試験群を構成するように割り付けた。

試験に用いた動物の体重範囲は、平均体重 \pm 20%以内であった。

15.5. 個体識別

動物入荷時に通し番号 (仮動物番号) を付し、仮動物番号カードを飼育ケージに掲示して識別した。検疫・馴化期間中に、動物の耳介にその仮動物番号を入れ墨した。

群分け時、仮動物番号と動物番号とが記載された動物識別番号カード (ID カード) を飼育ケージに掲示し、動物を識別した。

15.6. 余剰動物の取り扱い

炭酸ガスを用いて安楽死させた。

15.7. ゲノム DNA 抽出試薬の調製

15.7.1. ダウンス緩衝液

約 1600 mL の超純水に下記の試薬を溶解させた.

Na ₂ HPO ₄ (関東化学)	3.50 g
KH ₂ PO ₄ (関東化学)	0.50 g
NaCl (関東化学)	16 g
KCl (関東化学)	0.4 g
0.5 mol/L EDTA [pH 8.0] (Lot No. 01703F, ニッポンジーン)	40 mL

1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を用いて pH を 8.0 に調整後, 超純水を用いて 2000 mL に定容した. オートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌し, 室温保存した.

15.7.2. RNase A 含有ダウンス緩衝液

以下の割合で試薬を混合した.

ダウンス緩衝液	100 mL
RNase 溶液 (10 mg/mL, Lot No. 92003E, ニッポンジーン)	2.0 mL

用時調製した.

15.7.3. 0.5 mol/L ショ糖溶液

ショ糖 (MW=342.30) 68.4 g を約 320 mL のダウンス緩衝液に溶解し, ダウンス緩衝液を用いて 400 mL に定容した. フィルター (孔径 0.20 μm) をろ過除菌後, 冷蔵保存した.

15.7.4. 組織破碎用緩衝液

以下の割合で試薬を混合した.

ダウンス緩衝液	45 mL
0.5 mol/L ショ糖溶液	45 mL
0.5 mol/L EDTA [pH 8.0]	10 mL
RNase 溶液 (RNase A 10 mg/mL)	2 mL

用時調製した.

15.7.5. 10 w/v% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) 溶液

SDS (Lot No. WEH8904, 和光純薬工業) 10 g を約 80 mL の遺伝子工学用滅菌水 (Lot No. 02712B, ニッポンジーン) に溶解し, 遺伝子工学用滅菌水を用いて 100 mL に定容

した。フィルター（孔径 0.20 μm ）ろ過除菌後、室温保存した。

15.7.6. プロテナーゼ K 溶液

以下の割合で試薬を混合した。

プロテナーゼ K (Lot No. WEK6459, 和光純薬工業)	200	mg
遺伝子工学用滅菌水	60	mL
10 w/v% SDS 溶液	20	mL
0.5 mol/L EDTA [pH 7.5] ^{注1)}	20	mL

注1) pH 8.0 の EDTA 溶液 (Lot No. 01703F, ニッポンジーン) を 1 mol/L の塩酸
で pH 7.5 に調整した後に使用した。

用時調製した。

15.7.7. フェノール/クロロホルム (Ph/Cl) 混液

以下の割合で試薬を混合した。

クロロホルム (Lot No. 509B1162, 関東化学)	100	mL
TE 飽和フェノール (Lot No. 08323I, ニッポンジーン)	100	mL

用時調製した。

15.7.8. クロロホルム/イソアミルアルコール混液

以下の割合で試薬を混合した。

クロロホルム (Lot No. 509B1162, 関東化学)	96	mL
イソアミルアルコール (Lot No. LAK4834, 和光純薬工業)	4	mL

用時調製した。

15.8. 培地および培養液等の調製

15.8.1. LB 培養液

以下の割合で調製した.

Bacto tryptone (Lot No. 2299007, Becton, Dickinson and Company)	10 g
Bacto yeast extract (Lot No. 1105209 または 3070489, Becton, Dickinson and Company)	5 g
NaCl	5 g
超純水	1000 mL

オートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌した後, 冷蔵保存した.

15.8.2. 200 mg/mL マルトース水溶液

マルトース水和物 (和光純薬工業) 21.1 g を約 80 mL の超純水に溶解し, 超純水を用いて 100 mL に定容した. フィルター (孔径 0.20 μm) をろ過除菌後, 冷蔵保存した.

15.8.3. 20 mg/mL カナマイシン水溶液

カナマイシン硫酸塩 (Lot No. LAR4778, 和光純薬工業) 24 mg を適量の超純水に溶解し, 超純水を用いて 1 mL に定容した. フィルター (孔径 0.20 μm) をろ過除菌後, 冷凍保存した.

15.8.4. SM 緩衝液

約 800 mL の超純水に下記の試薬を溶解させた.

NaCl	5.84 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O (関東化学)	2.03 g
1 mol/L Tris-HCl [pH 7.5] (Lot No. 00691C, ニッポンジーン)	50.0 mL
ゼラチン末 (Lot No. 409N4018, 関東化学)	100 mg

超純水を用いて 1000 mL に定容し, オートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌した後, 室温保存した.

15.8.5. 5 × M9 salt

約 3200 mL の超純水に下記の試薬を溶解させた.

Na ₂ HPO ₄	135.6 g
KH ₂ PO ₄	60.0 g
NaCl	10.0 g
NH ₄ Cl (和光純薬工業)	20.0 g

超純水を用いて 4000 mL に定容し, オートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌した後, 冷蔵保存した.

15.8.6. 50 w/v%グリセロール

グリセリン (1.260 g/mL, 和光純薬工業) 397 mL を約 400 mL の超純水に少しずつ添加した. 溶解後, 超純水を用いて 1000 mL に定容した. オートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌した後, 冷蔵保存した.

15.8.7. 1 mol/L 硫酸マグネシウム水溶液

硫酸マグネシウム七水和物 123 g を約 400 mL の超純水に溶解し, 超純水を用いて 500 mL に定容した. オートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌した後, 室温保存した.

15.8.8. 1 mol/L 塩化カルシウム水溶液

CaCl₂·2H₂O (和光純薬工業) 14.7 g を約 80 mL の超純水に溶解し, 超純水を用いて 100 mL に定容した. オートクレーブ (121°C, 20 分) 滅菌した後, 冷蔵保存した.

15.8.9. 1 w/v%チアミン水溶液

チアミン塩酸塩 (Lot No. WEG2109, 和光純薬工業) 0.224 g を約 16 mL の超純水に溶解し, 超純水を用いて 20 mL に定容した. フィルター (孔径 0.20 μm) ろ過除菌後, 冷蔵保存した.

15.8.10. 10 mg/mL アミノ酸水溶液

約 160 mL の超純水に下記の試薬を溶解させた.

L(-)-プロリン (Lot No. PEE2878, 和光純薬工業)	2.00 g
L-ロイシン (Lot No. CDJ4982, 和光純薬工業)	2.00 g
L(+)-イソロイシン (Lot No. ALH4672, 和光純薬工業)	2.00 g

超純水を用いて 200 mL に定容した. フィルター (孔径 0.20 μm) ろ過除菌後, 冷蔵保存した.

15.8.11. 25 mg/mL クロラムフェニコール (Cm) 溶液

クロラムフェニコール (Lot No. WEP1003, 和光純薬工業) 2500 mg に約 80 mL のエタノールを加え, 溶解させた. エタノールを用いて 100 mL に定容した. フィルター (孔径 0.20 μm) をろ過除菌後, 冷凍保存した.

15.8.12. 25 mg/mL 6-チオグアニン溶液 (6-TG 溶液)

以下の割合で試薬を混合した.

6-チオグアニン (Lot No. AEHGH, 東京化成工業)	25	mg
DMSO (和光純薬工業)	1	mL

アルミホイルを巻いて遮光し, 1 時間程度室温に放置した. 用時調製した.

15.8.13. M9 + Cm 寒天培地および M9 + Cm + 6TG 寒天培地

バクトアガー 15 g に対し超純水を 800 mL の割合で添加した後, オートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌し, ウォーターバスを用いて 50°C の条件で保温した. スターラーを用いて攪拌しながら, 下記の割合で試薬を添加した.

5 × M9 salt	200	mL
50 w/v% グリセロール	20	mL
1 mol/L 硫酸マグネシウム水溶液	2	mL
1 mol/L 塩化カルシウム水溶液	0.1	mL
1 w/v% チアミン水溶液	0.5	mL
10 mg/mL アミノ酸水溶液	4	mL
25 mg/mL クロラムフェニコール溶液	1	mL
25 mg/mL 6TG 溶液 (M9 + Cm + 6TG 寒天培地のみ)	1	mL

シャーレ (直径 90 mm) に寒天培地を 25 mL ずつ分注し, 室温, 遮光 (M9 + Cm + 6TG 寒天培地のみ) で保存した.

15.8.14. ソフトアガー

以下の割合で試薬を混合した.

NaCl	6	g
バクトアガー (Lot No. 2326162, Becton, Dickinson and Company)	6	g
超純水	1000	mL

オートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌した後, 使用時までウォーターバスを用いて 50°C に保温した.

6-TG ソフトアガーの場合は、さらに 25 mg/mL 6-TG 溶液を使用直前に 1 mL 添加した。

15.8.15. λ -trypticase 寒天培地

以下の割合で試薬を混合した。

BBL trypticase peptone (Lot No. 2124441, Becton, Dickinson and Company)	10	g
NaCl	5	g
バクトアガー	10	g
超純水	1000	mL

オートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌した後、室温で約 60°C まで冷却し、1 mol/L MgSO₄ 10 mL を添加した (最終濃度 10 mmol/L)。シャーレ (直径 90 mm) に 25 mL ずつ分注し、寒天培地が固化した後、冷蔵保存した。

15.8.16. λ -trypticase トップアガー

以下の割合で試薬を混合した。

BBL trypticase peptone	1	g
NaCl	0.5	g
バクトアガー	0.6	g
超純水	100	mL

オートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌した後、ウォーターバスを用いて 50°C の条件で保温した。1 mol/L MgSO₄ 1 mL を添加した (最終濃度 10 mmol/L)。

15.8.17. 1/15 mol/L Na-K 緩衝液

約 800 mL の超純水に下記の試薬を溶解させた。

Na ₂ HPO ₄	7.57	g
KH ₂ PO ₄	1.82	g

超純水を用いて 1000 mL に定容した。オートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌した後、室温で保存した。

15.9. 被験物質液等

15.9.1. 被験物質液の調製

被験物質 600 および 300 mg を、それぞれメスフラスコに秤量し、コーン油を加えて 30 mL とすることにより 20.0 および 10.0 mg/mL 液を調製した。別途、被験物質 250

および 125 mg を、それぞれメスフラスコに秤量し、コーン油を加えて 50 mL とすることにより 5.00 および 2.50 mg/mL 液を調製した。各調製液を各投与用に気密容器に小分けし、冷蔵（温度基準 1~9°C，実測値：3.2~7.4°C），遮光条件で保存後，安定性が確認されている期間内にそれぞれの投与に用いた。

15.9.2. 被験物質液の安定性

当該被験物質を用いた 28 日間反復投与毒性試験「*N*-エチル-1-アミノナフタレンのラットを用いた 2 週間回復性観察を含む 28 日間反復経口投与毒性試験^[2]，試験番号 B-6580」において，0.1 および 200 mg/mL の被験物質液について冷蔵および遮光条件下で 8 日間，その後室温で 24 時間の安定性が確認されている。

15.9.3. 被験物質液の濃度／均一性分析

「コーン油中 ethyl (1-naphthyl) amine の濃度測定法バリデーション^[3]：試験番号 E780 (115-230)」において，0.1~100 mg/mL の濃度範囲で，コーン油中の濃度測定法が確立されている。濃度測定法および結果の詳細を Reference data 3 に示す。

初回および最終調製時に，媒体ならびに 2.50，5.00，10.0 および 20.0 mg/mL の被験物質液から分析試料を採取し，濃度を測定した。得られた濃度平均値から設定濃度に対する割合を，また，得られた濃度値から相対標準偏差を算出した。得られた値が判定基準を満たしていれば，被験物質液は，適切に調製されていると判断した。

	判定基準
媒体	定量用標準溶液のピーク面積の 1/10 未満であること。
被験物質液	濃度：設定濃度に対する割合が 100.0±10.0%以内であること。 均一性：相対標準偏差が 5.0%以下であること。

濃度分析の結果，媒体ではクロマトグラム上に被験物質のピークが認められなかったため，被験物質による汚染はないと判断した。各被験物質液における設定濃度に対する割合および相対標準偏差は，初回調製時で 103.7~110.0%および 0.7~3.5%であり，最終調製時では 99.4~107.4%および 0.4~3.6%であった。したがって，被験物質液は適切に調製されたと判断した。

15.9.4. 残余被験物質液の処分

専用の容器に廃棄した。

15.9.5. 陽性対照物質液の調製

B[a]P 37.5 mg を秤量し，目盛り付試験管に移した後，オリーブ油を適量加えて超音波処理により十分に分散させた。オリーブ油を加えて 3 mL に定容し，12.5 mg/mL 液を準備した。陽性対照物質液は，用時調製した。

15.9.6. 残余陽性対照物質液の処分
専用の容器に廃棄した。

15.10. 対照群

15.10.1. 陰性対照群

被験物質液調製に用いる媒体であるコーン油を使用した。

15.10.2. 陽性対照群

B[a]P を使用し、用量は文献⁴⁾を参考に、125 mg/kg とした。すべての臓器（肝臓、大腿骨および精巣）を評価対象とした。

15.11. トランスジェニックマウスを用いる遺伝子突然変異試験⁵⁻⁷⁾

15.11.1. 試験群の構成

用量 (mg/kg)	投与液 の濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	性	動物数	動物番号
0*	0	10	雄	6	1001～1006
25.0	2.50	10	雄	6	1101～1106
50.0	5.00	10	雄	6	1201～1206
100	10.0	10	雄	6	1301～1306
200	20.0	10	雄	6	1401～1406
125**	12.5	10	雄	6	1501～1506

*：陰性対照（媒体のみを投与した。） **：陽性対照（B[a]P）

15.11.2. 用量設定根拠

「トランスジェニックマウスを用いる ethyl (1-naphthyl) amine の遺伝子突然変異試験－投与量設定のための予備試験－：試験番号 E782 (115-232)」¹⁾において、被験物質をマウスに 75.0, 150, 300 および 600 mg/kg の用量で 1 日 1 回、7 日間経口投与した結果、600 mg/kg 群では 3/3 例の死亡が認められ、300 mg/kg 群では 2/3 例の死亡（瀕死状態のため安楽死させた動物を 1 例含む）が認められた。150 および 75.0 mg/kg 群では褐色尿がそれぞれ 2 例および 1 例認められたが、その他の毒性兆候を示す一般状態の変化は認められず、体重の顕著な減少も認められなかった。解剖時の肉眼的観察において、150 mg/kg 群以下の投与群では被験物質投与に関連する変化は認められなかった。したがって、最大耐量付近と考えられる 200 mg/kg を最高用量とし、以下、100, 50.0 および 25.0 mg/kg の計 4 用量を被験物質群として設定した。

15.11.3. 投与動物数および評価対象

評価数 5 匹を確保するため、いずれの群においても 6 匹に投与した。いずれの群においても死亡例が認められなかったため、被験物質投与群については 50.0, 100 および 200 mg/kg の 3 用量について遺伝子突然変異解析を実施した。それぞれ動物番号の小さい順に 5 匹を評価に使用した。評価に使用しない動物については、15.11.7.に記載する各器官（臓器）を摘出した後に凍結保存し、ゲノム DNA の抽出は行わなかった。

15.11.4. 投与方法および投与回数

媒体、被験物質および陽性対照物質の投与経路は、経口とした。

プラスチック製注射筒およびテフロン製胃ゾンデを用いて投与液を強制経口投与した。投与容量は、体重 10 g 当たり 0.1 mL とし、15.11.6.の項で測定した最新の体重に基づいて算出した。

媒体および被験物質は、ガイドラインに従い、1 日 1 回、28 日間連続投与を行った。陽性対照物質は 1 日 1 回、5 日間連続投与を行った。

15.11.5. 投与期間および発現期間

陰性対照群および被験物質群については、Day 1 から Day 28 までを投与期間、Day 29 から Day 31 までを発現期間とするとともに、Day 1～7 を Week 1、Day 8～14 を Week 2、Day 15～21 を Week 3、Day 22～28 を Week 4 とした。最終投与後 3 日（Day 31）に器官を摘出した。

陽性対照群については、Day 13 から Day 17 までを投与期間、Day 18 から Day 31 までを発現期間とし、最終投与後 14 日（Day 31）に器官を摘出した。

15.11.6. 体重測定および一般状態観察

Day 1 [群分け日（投与開始日）]、8, 15, 22, 29 および 31（器官摘出直前）に体重を測定した。陽性対照群については、Day 13（投与開始前）および 31（器官摘出直前）に体重を測定した。

器官摘出まで、1 日 1 回以上、動物の一般状態を観察した。陽性対照群については、群分け後、投与開始までも同様に 1 日 1 回、動物の一般状態を観察した。

15.11.7. 器官（臓器）摘出、器官重量測定、肉眼的観察および保存

炭酸ガスを用いて安楽死させた動物から肝臓、大腿骨および精巣を摘出し、これら器官の肉眼的観察を行った。肝臓および精巣については、器官重量を測定した（測定単位:g、小数第 2 位まで）。また、器官重量/体重比（相対重量）を算出した [(器官重量 / 剖検日の体重) × 100]。

各器官の摘出・保存は、以下の方法に従った。なお、解剖室の出入り口にはネズミ返しを設置した。

肝臓： 左葉の外側辺縁を生検トレパン (BP-50F, 貝印) を用いて 2 ヶ所くり抜いた。
くり抜いた肝臓は、それぞれ別のマイクロチューブに入れ、液体窒素 (LN₂)
で凍結させた。残った左葉およびその他の葉は、ビニール袋に入れ、LN₂ を入
れた底面が平らな金属性容器を用いて上から押し潰し、凍結させた。

大腿骨： 左右の大腿骨を摘出した後、それぞれ別のマイクロチューブに入れ、LN₂ で凍
結させた。

精巣： 左右の精巣を摘出した後、それぞれ別のマイクロチューブに入れ、LN₂ で凍結
させた。

凍結後は、超低温フリーザー (CLN-35CW, 日本フリーザー, 設定値: -80°C, 基準
値: -90~-60°C) に保存した。

15.11.8. 摘出器官の選択理由

肝臓： 主要な代謝器官であり、被験物質が比較的高濃度で存在すると考えられるため。

大腿骨： 骨髄は、分裂/増殖の速い組織であるため。

精巣： 生殖細胞への影響を確認するため。

15.11.9. アッセイ対象器官

gpt assay および *Sp1* assay とともに、肝臓、骨髄および精巣について実施した。

15.11.10. ゲノム DNA の抽出

肝臓および精巣の場合、ダウンス型ホモジナイザーに組織破碎用緩衝液 (RNase A を
含む) 3 mL を分注し、氷中で冷却した。次いで、凍結組織片を入れ、ペッスルを用い
てホモジナイズした。あらかじめ 0.5 mol/L ショ糖溶液 3 mL を入れて氷冷した 15 mL
容の遠心管に上記の組織破碎液を静かに重層し、遠心機 (LC-122, トミー精工) を用い
て 3000 r/min (1710 G) で 10 分間遠心した。上清をスポイト等で除去後、冷却した RNase A
含有ダウンス緩衝液 3 mL を加え、よく懸濁した (核/細胞懸濁液)。

骨髄の場合は、適量の RNase A 含有ダウンス緩衝液を用いて大腿骨から骨髄を洗い出
し、ペッスルを用いてホモジナイズした (核/細胞懸濁液)。

上記の核/細胞懸濁液にプロテナーゼ K 溶液 3 mL を加えて静かに転倒混和し、1~5
時間程度 (懸濁液が透明になるまで) 50°C の条件で保温し、消化させた。等量 (6 mL)
の Ph/Cl 混液を加え、数回転倒混和し、10 分間ローテーターを用いて回転混和後、遠心
機 (LC-122) を用いて 2500 r/min (1190 G) で 10 分間遠心した。上層 (水相) をトラン
スファーピペットで静かに回収し、新たな 15 mL 容の遠心管に移した。回収した水相と
等量の Ph/Cl 混液を加え、数回転倒混和し、さらに 10 分間回転混和させた後、2500 r/min
で 10 分間遠心し、水相を回収した。回収した水相と等量のクロロホルム/イソアミル
アルコール混液を加え、数回転倒混和し、さらに 10 分間回転混和させた後、2500 r/min

で 10 分間遠心した。水相を回収し、新しい 50 mL 容の遠心管に移した。遠心管にエタノールを徐々に加え、ゲノム DNA を析出させた。析出したゲノム DNA を 70%エタノールの入ったマイクロチューブに移し、およそ 10 分間浸した。次いで、遠心機 (MX-160, トミー精工) を用いて 13000 r/min (13240 G) で 10 分間遠心した。上清をマイクロピペットで可能な限り除いた後、チューブを室温に放置することにより残ったエタノールを蒸散させた。TE 緩衝液 (ニッポンジーン) を 100 μ L 加え、一晩室温に放置し、残渣の DNA を溶解させた。溶解後は、冷蔵にて保存した。ゲノム DNA 溶液中の DNA 濃度を NanoDrop (旭テクノグラス) を用いて測定した。DNA 濃度が 100~600 μ g/mL 程度の濃度になるように、適量の TE 緩衝液を用いて希釈した。

15.11.11. 試験菌株の準備 (*gpt* assay)

容量 200 mL のバツフル付三角フラスコに LB 培養液 30 mL, 200 mg/mL マルトース水溶液 300 μ L および 20 mg/mL カナマイシン水溶液 30 μ L を添加した。これに凍結保存 (設定値: -80°C) しておいた大腸菌 YG6020 株を融解した後、50 μ L 接種した。37 $^{\circ}\text{C}$, 120 回/分の振盪条件で一晩 (14~18 時間) 培養し、前培養液とした。

容量 500 mL のバツフル付三角フラスコに、LB 培養液 100 mL, 200 mg/mL マルトース水溶液 1 mL および 20 mg/mL カナマイシン水溶液 100 μ L を添加し、次いで、先の前培養液 1.5 mL を殖菌した後、同様に 2~6 時間程度培養を続けた。培養終了後、培養液を 10 分間遠心分離 (2000 r/min) した。上清を捨て、10 mmol/L 硫酸マグネシウムを含む LB 培養液 50 mL で再懸濁した (大腸菌懸濁液)。使用時まで冷蔵または氷冷で保存した。

15.11.12. 試験菌株の準備 (*Spi* assay)

容量 200 mL のバツフル付三角フラスコ 2 本に LB 培養液を 30 mL ずつ添加した。これに凍結保存 (設定値: -80°C) しておいた大腸菌 (XL-1 Blue MRA) および大腸菌 [XL-1 Blue MRA (P2)] を融解した後、それぞれ 50 μ L ずつ接種した。37 $^{\circ}\text{C}$, 120 回/分の振盪条件で一晩 (14~18 時間) 培養し、前培養液とした。次いで、容量 500 mL のバツフル付三角フラスコ 2 本に、LB 培養液 100 mL および 200 mg/mL マルトース水溶液 1 mL を添加し、前培養液をそれぞれ 1.5 mL ずつ殖菌した後、同様に 2~6 時間程度培養した。培養終了後、培養液を 10 分間遠心分離 (2000 r/min) した。上清を捨て、10 mmol/L 硫酸マグネシウムを含む LB 培養液 50 mL をそれぞれ添加し、再懸濁した (大腸菌懸濁液)。使用時まで冷蔵または氷冷で保存し、3 日以内に使用した。

Confirmation では別途、上記の方法と同様に大腸菌 [WL95 (P2)] の懸濁液を準備し、すみやかに使用した。

15.11.13. ゲノム DNA を用いた *in vitro* パッケージング (以後パッケージング) (*gpt*, *Spi*⁺ assay 共通)

Transpack (Stratagene) 製品添付の Instruction Manual に従ってパッケージングを実施した。Transpack のチューブ (RED) を解凍した。100~600 µg/mL 程度の濃度に調製したゲノム DNA 溶液を約 10 µL チューブ (RED) に加え、ピペッティングにより混合した後、30°C の条件で 90 分間インキュベートした。次いで、チューブ (BLUE) を解凍し、その 10 µL をチューブ (RED) に加え、同様に混合した。さらに、30°C の条件で 90 分間インキュベートを続けた。インキュベート終了後、各チューブ内の合計液量が 300 µL になるように SM 緩衝液を加え、十分に攪拌した (パッケージング溶液)。パッケージング溶液は使用時まで、氷中にて保存した。

15.11.14. パッケージング溶液のプレーティング (*gpt* assay)

大腸菌懸濁液 (YG6020 株) を、総プラーク算出用 (タイター用) 小試験管 2 本および突然変異算出用 (セレクション用) 小試験管 5 本に 200 µL ずつ分注しておいた。10 mmol/L 硫酸マグネシウムを含む LB 培養液を希釈用チューブに 495 µL ずつ分注した。希釈用チューブにパッケージング溶液 5 µL を添加し、ボルテックスミキサーで攪拌し、これを希釈液とした。希釈液をタイター用小試験管 2 本に 5 µL ずつ添加し、攪拌した。パッケージング溶液をセレクション用小試験管 5 本に約 60 µL ずつ添加し、攪拌した (5 本目のセレクション用小試験管には残っているパッケージング溶液全量を添加した)。タイター用小試験管およびセレクション用小試験管を 37°C で 20 分程度静置した。静置後、37°C、120 回/分の振盪条件で 30 分間培養した。タイター用小試験管に、ソフトアガー 2.5 mL を加え、ボルテックスミキサーで攪拌し、M9 + Cm 寒天培地に全量を重層した。これをタイター用プレートとした。セレクション用小試験管に 6TG ソフトアガー 2.5 mL を加え、ボルテックスミキサーで攪拌し、M9 + Cm + 6TG 寒天培地に全量を重層した。これをセレクション用プレートとした。タイター用プレートは 37°C の条件で 3 日間、セレクション用プレートは 37°C の条件で 5 日間培養した。

なお、1 回のパッケージング操作により総コロニー数が 30 万に達した。

15.11.15. パッケージング溶液のプレーティング (*Spi*⁺ assay)

大腸菌懸濁液 (XL-1 Blue MRA) を、総プラーク算出用 (タイター用) 小試験管 2 本に 200 µL ずつ分注しておいた。大腸菌懸濁液 [XL-1 Blue MRA (P2)] を、突然変異算出用 (セレクション用) 小試験管 2 本に 200 µL ずつ分注しておいた。10 mmol/L 硫酸マグネシウムを含む LB 培養液を希釈用チューブに 495 µL ずつ分注した。希釈用チューブにパッケージング溶液 5 µL を添加し、ボルテックスミキサーで攪拌し、希釈液とした。希釈液をタイター用チューブ 2 本に 5 µL ずつ添加し、攪拌した。パッケージング

溶液をセレクション用チューブ 2 本に約 150 μ L ずつ添加し、ゆるやかに攪拌した (2 本目のセレクション用チューブには残っているパッケージング溶液全量を添加した)。タイター用チューブおよびセレクション用チューブを 37°C で 20 分程度静置した。タイター用チューブおよびセレクション用チューブに、 λ -trypticase トップアガー 2.5 mL を加え、ボルテックスミキサーで攪拌し、 λ -trypticase 寒天培地に全量を重層した。これをタイター用プレートおよびセレクション用プレートとした。タイター用およびセレクション用プレートは 37°C で一晩 (14~18 時間) 培養した。

なお、1 回または 2 回のパッケージング操作により、総プラーク数が 30 万に達した。

15.11.16. コロニーの計数 (*gpt* assay)

培養終了後、コロニー数を用手法にて計数した。ただし、セレクション用プレートのコロニーは、培養開始 5 日目で 6TG の析出により、コロニーの識別が困難になるため、3 および 4 日目の時点で候補コロニーも確認した。コロニー計数後すぐに Confirmation を実施した。

15.11.17. プラークの計数 (*Spi* assay)

培養終了後、プラーク数を用手法にて計数した。計数後すぐに Confirmation を実施しない場合は、セレクション用プレートを冷蔵で保存した。

15.11.18. コロニーの Confirmation (*gpt* assay)

すべての *gpt* 変異体候補コロニーについて、Confirmation を実施した。

未使用の M9 + Cm 寒天培地および M9 + Cm + 6TG 寒天培地に方眼紙を貼り付けた。

セレクション用プレートのコロニーに、ストリーク箇所の通し番号をつけた。セレクション用プレートのコロニー数と同数の滅菌済みマイクロチューブを準備した。準備したマイクロチューブに 1/15 mol/L Na-K 緩衝液を 50 μ L ずつ分注した。セレクション用プレートのコロニーを滅菌済み爪楊枝の先で軽く触れた後、爪楊枝の先を 1/15 mol/L Na-K 緩衝液でよく洗い、これを Confirmation 液とした。その爪楊枝を用いて Confirmation 液を M9 + Cm 寒天培地、M9 + Cm + 6TG 寒天培地の順にストリークした。37°C の条件で 2 日間培養した。M9 + Cm 寒天培地および M9 + Cm + 6TG 寒天培地の両方に生育が認められたコロニーを変異コロニーとした。変異コロニーの値は、Confirmation 後の値を用いた。

15.11.19. プラークの Confirmation (*Spi* assay)

すべての *Spi* 変異体候補プラークについて WL95 (P2) 株を含めた confirmation を実施した。

XL-1 Blue MRA, XL-1 Blue MRA (P2) および WL95 (P2) の大腸菌懸濁液を小試験管に 200 μ L ずつ分注した。分注した小試験管に、 λ -trypticase トップアガーを 2.5 mL

ずつ加え、ボルテックスミキサーで攪拌し、未使用のλ-trypticase 寒天培地に全量を重層した。重層後、プレートに約 1 時間乾燥させた。乾燥後、重層したプレートに方眼紙を貼り付けた。

セレクション用プレートのパラークに、スポット箇所の通し番号をつけた。セレクション用プレートのパラーク数と同数の滅菌済みマイクロチューブを準備した。準備したマイクロチューブに SM 緩衝液を 50 μL ずつ分注した。セレクション用プレートのパラークをパスツールピペットあるいは広口チップを用いて寒天ごとくり抜き、先のマイクロチューブに入れた。これを Confirmation 液とした。大腸菌 XL-1 Blue MRA, XL-1 Blue MRA (P2) および WL95 (P2) を重層したλ-trypticase 寒天培地に Confirmation 液をそれぞれ 1~2 μL ずつスポットした。37°C の条件で一晩 (14~18 時間) 培養した。大腸菌 XL-1 Blue MRA, XL-1 Blue MRA (P2) および WL95 (P2) の 3 つのプレート上でパラークを形成したものを変異パラークとした。変異パラークの値は、Confirmation 後の値を用いた。

15.11.20. 総コロニー数の算出 (gpt assay)

タイター用プレートに出現したコロニー数を計数し、下記の式を用いて総コロニー数を求めた。

$$\begin{aligned} \text{総コロニー数} &= \text{タイター用プレートに出現したコロニー数の平均値 (N)} \times \\ &\quad \text{Dilution Factor} \\ \text{総コロニー数} &= \frac{N \times 100 \times 300 (\mu\text{L})}{5 (\mu\text{L})} \\ &= 6000 \times N \end{aligned}$$

15.11.21. 突然変異体頻度 (Mutant Frequency) の算出 (gpt assay)

突然変異体頻度は、セレクション用プレートのコロニー総数 (Confirmation 後の値) を総コロニー数で除して、当該組織での突然変異体頻度を求めた。

$$\text{突然変異体頻度} = \frac{\text{セレクション用プレートのコロニー総数 (Confirmation 後の値)}}{\text{総コロニー数}}$$

15.11.22. 総プラーク数の算出 (Spi assay)

タイター用プレートに出現したプラーク数を計数し、下記の式を用いて総プラーク数を求めた。

$$\begin{aligned} \text{総プラーク数} &= \text{タイター用プレートに出現したプラーク数の平均値 (N)} \times \\ &\quad \text{Dilution Factor} \\ \text{総プラーク数} &= \frac{N \times 100 \times 300 (\mu\text{L})}{5 (\mu\text{L})} \\ &= 6000 \times N \end{aligned}$$

15.11.23. 突然変異体頻度 (Mutant Frequency) の算出 (Spi assay)

突然変異体頻度は、セレクション用プレートのプラーク総数 (Confirmation 後の値) を総プラーク数で除して、当該組織での突然変異体頻度を求めた。

$$\text{突然変異体頻度} = \frac{\text{セレクション用プレートのプラーク総数 (Confirmation 後の値)}}{\text{総プラーク数}}$$

16. データ処理

当該試験の磁気データは、コンピュータ・システム (LATOX-F/V5) を用いて記録し、処理した。

17. 結果の解析

陽性対照群を除く各被験物質投与群の突然変異体頻度について、最初に Bartlett の等分散検定を実施した。等分散 (有意差が認められない) の場合は、Dunnett の多重比較検定で対照群と各被験物質投与群間の有意差を検定し、不等分散 (有意差が認められる) の場合は、Steel の検定で対照群と各被験物質投与群間の有意差を検定した。

陰性対照群と陽性対照群での突然変異体頻度の比較は、最初に F 検定を実施し、有意差が認められない場合には、Student の t 検定を実施した。F 検定で有意差が認められた場合は、Aspin-Welch の t 検定を実施した。

各検定の有意水準は両側 5%とした。

陰性対照群と比較し、被験物質群の突然変異体頻度において統計学的な有意差が認められた場合に、陽性と判定した。ただし、最終的な判定は、試験条件下での生物学的な妥当性も考慮して行った。

18. 試験成立条件

陽性対照群の突然変異体頻度において、陰性対照値と比較して統計学的に有意な増加が 1 つ以上の対象器官で認められた場合に、試験は成立したと判断した。

19. 結果

19.1. 肝臓

19.1.1. *gpt* assay

試験結果を Table 1 に示す.

陰性対照群における各個体の突然変異体頻度の平均値±SD は $2.92 \pm 0.80 \times 10^{-6}$ ($1.94 \sim 4.07 \times 10^{-6}$) であった.

ethyl (1-naphthyl) amine 投与群での各個体の突然変異体頻度の平均値±SD は, 低用量の 50.0 mg/kg 群で $2.44 \pm 1.39 \times 10^{-6}$, 中用量の 100 mg/kg 群で $2.68 \pm 0.74 \times 10^{-6}$, 高用量の 200 mg/kg 群で $3.36 \pm 1.06 \times 10^{-6}$ であり, 陰性対照群と比べて統計学的に有意な増加は認められなかった.

陽性対照群における各個体の突然変異体頻度の平均値±SD は $25.17 \pm 7.85 \times 10^{-6}$ であり, 陰性対照群と比べて統計学的に有意な増加が認められた.

19.1.2. *Spi* assay

試験結果を Table 4 に示す.

陰性対照群における各個体の突然変異体頻度の平均値±SD は $4.97 \pm 3.52 \times 10^{-6}$ ($1.70 \sim 9.59 \times 10^{-6}$) であった.

ethyl (1-naphthyl) amine 投与群での各個体の突然変異体頻度の平均値±SD は, 50.0 mg/kg 群で $2.27 \pm 1.34 \times 10^{-6}$, 100 mg/kg 群で $3.10 \pm 1.87 \times 10^{-6}$, 200 mg/kg 群で $2.52 \pm 1.41 \times 10^{-6}$ であり, 陰性対照群と比べて統計学的に有意な増加は認められなかった.

陽性対照群における各個体の突然変異体頻度の平均値±SD は $20.27 \pm 5.36 \times 10^{-6}$ であり, 陰性対照群と比べて統計学的に有意な増加が認められた.

19.2. 骨髄

19.2.1. *gpt* assay

試験結果を Table 2 に示す.

陰性対照群における各個体の突然変異体頻度の平均値±SD は $2.42 \pm 1.09 \times 10^{-6}$ ($0.67 \sim 3.55 \times 10^{-6}$) であった.

ethyl (1-naphthyl) amine 投与群での各個体の突然変異体頻度の平均値±SD は, 50.0 mg/kg 群で $2.01 \pm 1.42 \times 10^{-6}$, 100 mg/kg 群で $1.74 \pm 0.91 \times 10^{-6}$, 200 mg/kg 群で $2.21 \pm 1.19 \times 10^{-6}$ であり, 陰性対照群と比べて統計学的に有意な増加は認められなかった.

陽性対照群における各個体の突然変異体頻度の平均値±SD は $61.99 \pm 17.63 \times 10^{-6}$ であり, 陰性対照群と比べて統計学的に有意な増加が認められた.

19.2.2. Spi assay

試験結果を Table 5 に示す.

陰性対照群における各個体の突然変異体頻度の平均値±SD は $1.89 \pm 0.60 \times 10^{-6}$ ($1.29 \sim 2.87 \times 10^{-6}$) であった.

ethyl (1-naphthyl) amine 投与群での各個体の突然変異体頻度の平均値±SD は、50.0 mg/kg 群で $3.44 \pm 2.14 \times 10^{-6}$ 、100 mg/kg 群で $3.87 \pm 1.37 \times 10^{-6}$ 、200 mg/kg 群で $1.56 \pm 0.98 \times 10^{-6}$ であり、陰性対照群と比べて統計学的に有意な増加は認められなかった.

陽性対照群における各個体の突然変異体頻度の平均値±SD は $25.40 \pm 7.26 \times 10^{-6}$ であり、陰性対照群と比べて統計学的に有意な増加が認められた.

19.3. 精巢

19.3.1. gpt assay

試験結果を Table 3 に示す.

陰性対照群における各個体の突然変異体頻度の平均値±SD は $0.66 \pm 0.23 \times 10^{-6}$ ($0.28 \sim 0.87 \times 10^{-6}$) であった.

ethyl (1-naphthyl) amine 投与群での各個体の突然変異体頻度の平均値±SD は、50.0 mg/kg 群で $0.72 \pm 0.28 \times 10^{-6}$ 、100 mg/kg 群で $0.63 \pm 0.38 \times 10^{-6}$ 、200 mg/kg 群で $0.53 \pm 0.34 \times 10^{-6}$ であり、陰性対照群と比べて統計学的に有意な増加は認められなかった.

陽性対照群における各個体の突然変異体頻度の平均値±SD は $0.89 \pm 0.56 \times 10^{-6}$ であり、陰性対照群と比べて統計学的に有意な増加は認められなかった.

19.3.2. Spi assay

試験結果を Table 6 に示す.

陰性対照群における各個体の突然変異体頻度の平均値±SD は $1.06 \pm 0.72 \times 10^{-6}$ ($0.00 \sim 1.95 \times 10^{-6}$) であった.

ethyl (1-naphthyl) amine 投与群での各個体の突然変異体頻度の平均値±SD は、50.0 mg/kg 群で $0.46 \pm 0.37 \times 10^{-6}$ 、100 mg/kg 群で $1.34 \pm 0.66 \times 10^{-6}$ 、200 mg/kg 群で $1.15 \pm 0.62 \times 10^{-6}$ であり、陰性対照群と比べて統計学的に有意な増加は認められなかった.

陽性対照群における各個体の突然変異体頻度の平均値±SD は $3.74 \pm 2.26 \times 10^{-6}$ であり、陰性対照群と比べて統計学的に有意な増加は認められなかった.

19.4. 体重および一般状態観察

試験結果を Appendix 1 および 2 に示す.

ethyl (1-naphthyl) amine の 200 mg/kg 群では、1/6 例に自発運動低下および呼吸不整が、6/6 例に褐色尿が認められた. 100 mg/kg 群では 6/6 例に褐色尿が認められ、50.0 mg/kg 群では 4/6 例に褐色尿が認められた. 陰性対照群および 25.0 mg/kg 群では、明確な体重

減少および一般状態の変化は観察されなかった。陽性対照群では、1/6 例に口角部の腫脹が認められた。

いずれの群においても、明確な体重減少は認められなかった。

19.5. 器官重量および器官重量/体重比

試験結果を Appendix 3 に示す。

いずれの ethyl (1-naphthyl) amine 投与群においても、陰性対照群と比較し、明確な器官重量および器官重量/体重比の変化は認められなかった。

19.6. 解剖時の肉眼所見

試験結果を Appendix 4 に示す。

いずれの ethyl (1-naphthyl) amine 投与群においても、特筆すべき変化は認められなかった。

20. 考察および結論

ethyl (1-naphthyl) amine の肝臓、骨髄および精巣における遺伝子突然変異誘発性を検討するため、トランスジェニックマウス (*gpt delta*) を用いた遺伝子突然変異試験 (レポーター遺伝子: *gpt* および, *red* と *gam*) を実施した。

最大耐量付近と考えられる 200 mg/kg を高用量とし、以下 100, 50.0 および 25.0 mg/kg の計 4 用量を被験物質群として設定した。

被験物質をトランスジェニックマウスに 28 日間強制経口投与し、3 日間の遺伝子突然変異発現期間をおいた後、各器官を摘出した。肝臓、骨髄および精巣について *gpt assay* および *Spi* assay により遺伝子突然変異体頻度を求めた。なお、いずれの群においても死亡例が認められなかったため、200, 100 および 50.0 mg/kg の 3 用量を評価対象とした。

その結果、ethyl (1-naphthyl) amine 投与群の肝臓、骨髄および精巣のいずれにおいても、*gpt assay* および *Spi* assay による遺伝子突然変異体頻度に、陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加は認められなかった。

ethyl (1-naphthyl) amine は、細菌を用いる復帰突然変異試験^[8]において陰性との報告がある。CHL 細胞を用いる染色体異常試験^[9]においては、代謝活性化系存在下の 50%以上の細胞増殖抑制が起こる濃度でのみ陽性であった。*gpt delta* マウスでは代謝器官である肝臓においても突然変異の誘発は認められていないことから、遺伝毒性に関しては生体で特段の懸念はないものと考えられた。

陽性対照物質の B[a]P 経口投与群 (125 mg/kg) は、肝臓および骨髄で *gpt assay* および *Spi* assay による遺伝子突然変異体頻度が上昇しており、遺伝子突然変異体頻度は陰性対照と比較して統計学的に有意な増加を示した。したがって、試験成立条件を満たし

たことから、当該試験が適切な条件下でなされたと判断された。

以上の結果から、当該試験条件下において、ethyl (1-naphthyl) amine はトランスジェニックマウスに対して遺伝子突然変異誘発性を示さないもの（陰性）と判定された。

21. 参考文献

- [1] ████████ トランスジェニックマウスを用いる ethyl (1-naphthyl) amine の遺伝子突然変異試験—投与量設定のための予備試験—. 試験番号 E782 (115-232). 安評センター ; 2013.
- [2] *N*-エチル-1-アミノナフタレンのラットを用いた 2 週間回復性観察を含む 28 日間反復経口投与毒性試験. 試験番号 B-6580 最終報告書. (株) ボゾリサーチセンター ; 2011.
- [3] ████████ コーン油中 ethyl (1-naphthyl) amine の濃度測定法バリデーション. 試験番号 E780 (115-230). 安評センター ; 2013.
- [4] A. Hakura, Y. Tsutsui, J. Sonoda, J. Kai, T. Imade, M. Shimada, et al. Comparison between *in vivo* mutagenicity and carcinogenicity in multiple organs by benzo[a]pyrene in the *lacZ* transgenic mouse (MutaTM Mouse). *Mutation Research* 1998; 398: 123-1.
- [5] T. Nohmi, M. Katoh, H. Suzuki, M. Matsui, M. Yamada, M. Watanabe, et al. A new transgenic mouse mutagenesis test system using Spi⁻ and 6-thioguanine selections. *Environmental Molecular Mutagenesis* 1996; 28: 465-70.
- [6] T. Nohmi, T. Suzuki and K. Masumura. Recent advance in the protocols of transgenic mouse mutation assays. *Mutation Research* 2000; 455: 191-215.
- [7] V. Thybaud, S. Dean, T. Nohmi, J. de Boer, G.R. Douglas, B.W. Glickman, et al. *In vivo* transgenic mutation assays. *Mutation Research* 2003; 540: 141-51.
- [8] *N*-エチル-1-アミノナフタレンの細菌を用いる復帰突然変異試験. 試験番号 T-0304 最終報告書. (株) ボゾリサーチセンター ; 2009.
- [9] *N*-エチル-1-アミノナフタレンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験. 試験番号 M-1344 最終報告書. (株) ボゾリサーチセンター

22. 試験関係資料の保存

当該試験の下記資料は、安評センター資料保存施設にて最終報告書作成後 10 年間保存される。ただし、化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（昭和 48 年法律第 117 号）第 4 条第 1 項もしくは第 2 項，第 5 条第 2 項，第 3 項もしくは第 8 項，第 10 条第 3 項または第 14 条第 2 項の規定による通知を受けた場合には，通知を受けた後 10 年間とする。その後の保存については，試験委託者と安評センターで協議し，別途定める。DNA 溶液は，最終報告書作成前に処分した。摘出器官（臓器）の保存または処分については，試験委託者と安評センターで協議し，別途定める。

- 試験計画書（原本）
- 被験物質に関する資料
- 被験物質（2 g）
- 試験期間中に発生した生データ一式（磁気媒体を含む）
- 最終報告書（原本）
- その他の試験関係資料

23. 予見することの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および試験計画書に従わなかつたこと

該当する事態はなかつた。

Table 1. Induction of mutation (*gpt* assay) in liver of transgenic mice treated with ethyl(1-naphthyl)amine
 [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Number of colony forming units	Number of packagings	Number of mutants	Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)	Group Mean \pm S.D. ($\times 10^{-6}$)	
Corn oil	0	1001	984,000	1	4	4.07	2.92 \pm 0.80	
		1002	1,077,000	1	3	2.79		
		1003	1,194,000	1	3	2.51		
		1004	1,224,000	1	4	3.27		
		1005	1,029,000	1	2	1.94		
Ethyl(1-naphthyl)amine	50.0	1201	1,431,000	1	6	4.19	2.44 \pm 1.39	
		1202	1,479,000	1	2	1.35		
		1203	1,350,000	1	5	3.70		
		1204	1,392,000	1	2	1.44		
		1205	1,332,000	1	2	1.50		
	100	1301	1,302,000	1	3	2.30	2.68 \pm 0.74	
		1302	855,000	1	3	3.51		
		1303	1,203,000	1	4	3.33		
		1304	1,743,000	1	3	1.72		
		1305	1,182,000	1	3	2.54		
	200	1401	1,293,000	1	5	3.87	3.36 \pm 1.06	
		1402	1,095,000	1	3	2.74		
		1403	1,644,000	1	3	1.82		
		1404	675,000	1	3	4.44		
		1405	1,020,000	1	4	3.92		
B[a]P	125	1501	918,000	1	22	23.97	25.17 \pm 7.85	* (A)
		1502	1,311,000	1	22	16.78		
		1503	609,000	1	23	37.77		
		1504	1,035,000	1	27	26.09		
		1505	1,176,000	1	25	21.26		

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

B[a]P: Positive control (1,2-Benzopyrene, 10 mL/kg, dosed once a day for 5 days, expression period; 14 days)

(A): Aspin-Welch t test

*: Significant difference from negative control ($p \leq 0.05$)

Table 2. Induction of mutation (gpt assay) in bone marrow of transgenic mice treated with ethyl(1-naphthyl)amine
 [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Number of colony forming units	Number of packagings	Number of mutants	Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)	Group Mean \pm S.D. ($\times 10^{-6}$)	
Corn oil	0	1001	1,542,000	1	4	2.59	2.42 \pm 1.09	
		1002	1,407,000	1	5	3.55		
		1003	2,214,000	1	5	2.26		
		1004	1,482,000	1	1	0.67		
		1005	1,656,000	1	5	3.02		
Ethyl(1-naphthyl)amine	50.0	1201	1,299,000	1	1	0.77	2.01 \pm 1.42	
		1202	1,734,000	1	4	2.31		
		1203	1,998,000	1	3	1.50		
		1204	1,845,000	1	8	4.34		
		1205	1,737,000	1	2	1.15		
	100	1301	1,584,000	1	1	0.63	1.74 \pm 0.91	
		1302	2,493,000	1	7	2.81		
		1303	1,653,000	1	3	1.81		
		1304	1,941,000	1	2	1.03		
		1305	1,653,000	1	4	2.42		
	200	1401	1,173,000	1	3	2.56	2.21 \pm 1.19	
		1402	1,713,000	1	7	4.09		
		1403	2,844,000	1	3	1.05		
		1404	1,944,000	1	3	1.54		
		1405	2,226,000	1	4	1.80		
B[a]P	125	1501	1,479,000	1	132	89.25	61.99 \pm 17.63	* (A)
		1502	2,097,000	1	117	55.79		
		1503	1,284,000	1	53	41.28		
		1504	1,506,000	1	87	57.77		
		1505	1,275,000	1	84	65.88		

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

B[a]P: Positive control (1,2-Benzopyrene, 10 mL/kg, dosed once a day for 5 days, expression period; 14 days)

(A): Aspin-Welch t test

*: Significant difference from negative control ($p \leq 0.05$)

Table 3. Induction of mutation (*gpt* assay) in testis of transgenic mice treated with ethyl(1-naphthyl)amine
 [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Number of colony forming units	Number of packagings	Number of mutants	Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)	Group Mean \pm S.D. ($\times 10^{-6}$)
Corn oil	0	1001	2,604,000	1	2	0.77	0.66 \pm 0.23
		1002	3,147,000	1	2	0.64	
		1003	3,591,000	1	1	0.28	
		1004	2,289,000	1	2	0.87	
		1005	2,649,000	1	2	0.76	
Ethyl(1-naphthyl)amine	50.0	1201	2,103,000	1	2	0.95	0.72 \pm 0.28
		1202	2,064,000	1	1	0.48	
		1203	3,057,000	1	2	0.65	
		1204	2,175,000	1	1	0.46	
		1205	2,769,000	1	3	1.08	
	100	1301	1,995,000	1	1	0.50	0.63 \pm 0.38
		1302	5,424,000	1	1	0.18	
		1303	2,226,000	1	2	0.90	
		1304	2,637,000	1	3	1.14	
		1305	2,274,000	1	1	0.44	
	200	1401	2,415,000	1	1	0.41	0.53 \pm 0.34
		1402	2,349,000	1	2	0.85	
		1403	2,523,000	1	2	0.79	
		1404	2,175,000	1	0	0.00	
		1405	1,683,000	1	1	0.59	
B[a]P	125	1501	1,962,000	1	1	0.51	0.89 \pm 0.56
		1502	2,352,000	1	1	0.43	
		1503	5,331,000	1	4	0.75	
		1504	2,184,000	1	2	0.92	
		1505	1,644,000	1	3	1.82	

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

B[a]P: Positive control (1,2-Benzopyrene, 10 mL/kg, dosed once a day for 5 days, expression period; 14 days)

Table 4. Induction of mutation (Spi⁻ assay) in liver of transgenic mice treated with ethyl(1-naphthyl)amine
 [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Number of plaque forming units	Number of packagings	Number of mutants	Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)	Group Mean \pm S.D. ($\times 10^{-6}$)	
Corn oil	0	1001	417,000	1	4	9.59	4.97 \pm 3.52	
		1002	510,000	1	4	7.84		
		1003	396,000	1	1	2.53		
		1004	630,000	1	2	3.17		
		1005	588,000	1	1	1.70		
Ethyl(1-naphthyl)amine	50.0	1201	774,000	1	1	1.29	2.27 \pm 1.34	
		1202	513,000	1	1	1.95		
		1203	648,000	1	3	4.63		
		1204	618,000	1	1	1.62		
		1205	534,000	1	1	1.87		
	100	1301	630,000	1	1	1.59	3.10 \pm 1.87	
		1302	438,000	1	1	2.28		
		1303	663,000	1	1	1.51		
		1304	351,000	1	2	5.70		
		1305	678,000	1	3	4.42		
	200	1401	645,000	1	2	3.10	2.52 \pm 1.41	
		1402	441,000	1	0	0.00		
		1403	315,000	1	1	3.17		
		1404	306,000	1	1	3.27		
		1405	657,000	2	2	3.04		
B[a]P	125	1501	447,000	1	8	17.90	20.27 \pm 5.36	* (S)
		1502	420,000	1	12	28.57		
		1503	642,000	2	10	15.58		
		1504	540,000	1	9	16.67		
		1505	309,000	1	7	22.65		

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

B[a]P: Positive control (1,2-Benzopyrene, 10 mL/kg, dosed once a day for 5 days, expression period; 14 days)

(S): Student t test

*: Significant difference from negative control ($p \leq 0.05$)

Table 5. Induction of mutation (Spi⁻ assay) in bone marrow of transgenic mice treated with ethyl(1-naphthyl)amine
 [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Number of plaque forming units	Number of packagings	Number of mutants	Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)	Group Mean \pm S.D. ($\times 10^{-6}$)	
Corn oil	0	1001	522,000	1	1	1.92	1.89 \pm 0.60	
		1002	1,260,000	1	2	1.59		
		1003	2,241,000	1	4	1.78		
		1004	348,000	1	1	2.87		
		1005	3,111,000	1	4	1.29		
Ethyl(1-naphthyl)amine	50.0	1201	1,029,000	1	3	2.92	3.44 \pm 2.14	
		1202	1,161,000	3	8	6.89		
		1203	696,000	2	1	1.44		
		1204	516,000	1	2	3.88		
		1205	1,455,000	1	3	2.06		
	100	1301	408,000	1	2	4.90	3.87 \pm 1.37	
		1302	960,000	2	4	4.17		
		1303	390,000	1	2	5.13		
		1304	1,167,000	1	4	3.43		
		1305	579,000	2	1	1.73		
	200	1401	492,000	1	1	2.03	1.56 \pm 0.98	
		1402	348,000	1	1	2.87		
		1403	3,465,000	1	1	0.29		
		1404	1,983,000	1	2	1.01		
		1405	1,857,000	1	3	1.62		
B[a]P	125	1501	624,000	2	17	27.24	25.40 \pm 7.26	* (A)
		1502	654,000	1	24	36.70		
		1503	432,000	1	9	20.83		
		1504	450,000	1	8	17.78		
		1505	654,000	2	16	24.46		

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

B[a]P: Positive control (1,2-Benzopyrene, 10 mL/kg, dosed once a day for 5 days, expression period; 14 days)

(A): Aspin-Welch t test

*: Significant difference from negative control ($p < 0.05$)

Table 6. Induction of mutation (Spi⁻ assay) in testis of transgenic mice treated with ethyl(1-naphthyl)amine
 [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Number of plaque forming units	Number of packagings	Number of mutants	Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)	Group Mean \pm S.D. ($\times 10^{-6}$)
Corn oil	0	1001	513,000	1	1	1.95	1.06 \pm 0.72
		1002	933,000	1	1	1.07	
		1003	1,434,000	1	2	1.39	
		1004	333,000	1	0	0.00	
		1005	2,283,000	1	2	0.88	
Ethyl(1-naphthyl)amine	50.0	1201	2,763,000	1	1	0.36	0.46 \pm 0.37
		1202	987,000	1	0	0.00	
		1203	2,577,000	1	2	0.78	
		1204	2,265,000	1	2	0.88	
		1205	3,657,000	1	1	0.27	
	100	1301	2,280,000	1	2	0.88	1.34 \pm 0.66
		1302	1,494,000	1	2	1.34	
		1303	2,976,000	1	2	0.67	
		1304	690,000	1	1	1.45	
		1305	840,000	1	2	2.38	
	200	1401	1,431,000	1	3	2.10	1.15 \pm 0.62
		1402	1,509,000	1	1	0.66	
		1403	675,000	1	1	1.48	
		1404	2,820,000	1	2	0.71	
		1405	1,230,000	1	1	0.81	
B[a]P	125	1501	1,254,000	1	2	1.59	3.74 \pm 2.26
		1502	1,125,000	1	4	3.56	
		1503	1,284,000	1	2	1.56	
		1504	600,000	1	4	6.67	
		1505	564,000	1	3	5.32	

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

B[a]P: Positive control (1,2-Benzopyrene, 10 mL/kg, dosed once a day for 5 days, expression period; 14 days)

Appendix 1. Body weight in the gene mutation assay of ethyl(1-naphthyl)amine
 [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Body weight (g)							Gain
			Day -7 (Received)	Day 1 (Allocated)	Day 8	Day 15	Day 22	Day 29	Day 31 (Sacrificed)	
Corn oil	0	1001	25.4	26.2	26.0	26.7	26.2	26.0	27.2	1.0
		1002	23.4	25.1	24.3	24.8	24.6	24.5	25.5	0.4
		1003	26.0	27.2	26.8	27.6	28.4	27.1	27.7	0.5
		1004	24.9	25.4	25.4	25.5	26.0	26.8	27.2	1.8
		1005	26.6	27.2	26.2	26.6	26.2	25.8	26.6	-0.6
		1006	27.4	27.6	26.3	27.0	27.6	27.7	27.8	0.2
		Mean±S.D.	25.6±1.4	26.5±1.0	25.8±0.9	26.4±1.0	26.5±1.3	26.3±1.1	27.0±0.9	0.6±0.8
Ethyl(1-naphthyl)amine	25.0	1101	26.7	27.6	27.0	27.3	27.2	27.6	28.1	0.5
		1102	26.0	28.3	27.4	28.2	28.3	28.8	29.7	1.4
		1103	25.3	25.5	24.0	24.8	24.9	25.1	25.3	-0.2
		1104	25.9	26.8	25.3	26.0	26.2	26.5	27.8	1.0
		1105	24.3	26.0	25.1	25.7	25.4	25.5	26.7	0.7
		1106	23.7	24.8	24.9	25.1	24.9	24.8	25.9	1.1
		Mean±S.D.	25.3±1.1	26.5±1.3	25.6±1.3	26.2±1.3	26.2±1.4	26.4±1.6	27.3±1.6	0.8±0.6
	50.0	1201	24.2	25.7	25.5	25.2	25.8	26.9	27.8	2.1
		1202	25.1	25.2	25.8	26.1	25.8	26.3	26.2	1.0
		1203	25.2	27.4	27.9	26.6	27.4	27.5	28.7	1.3
		1204	25.8	26.2	25.4	25.7	25.5	26.4	27.3	1.1
		1205	24.4	26.3	25.9	25.8	25.3	25.7	26.1	-0.2
		1206	26.8	27.9	27.9	27.9	27.7	28.2	28.6	0.7
Mean±S.D.	25.3±1.0	26.5±1.0	26.4±1.2	26.2±0.9	26.3±1.0	26.8±0.9	27.5±1.1	1.0±0.8		
100	1301	23.3	24.8	24.4	24.7	24.5	25.0	25.8	1.0	
	1302	27.4	28.0	28.1	26.9	26.6	26.9	27.2	-0.8	
	1303	23.5	26.4	25.6	25.4	25.2	25.8	26.5	0.1	
	1304	24.7	26.0	26.0	26.2	25.4	25.6	26.6	0.6	
	1305	26.2	27.6	26.6	26.0	25.8	26.6	27.2	-0.4	
	1306	24.9	25.2	24.3	24.7	24.5	24.2	24.5	-0.7	
	Mean±S.D.	25.0±1.6	26.3±1.3	25.8±1.4	25.7±0.9	25.3±0.8	25.7±1.0	26.3±1.0	0.0±0.7	

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

Gain= Day 31(Sacrificed) - Day 1(Allocated)

Appendix 1. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Body weight (g)							Gain
			Day -7 (Received)	Day 1 (Allocated)	Day 8	Day 15	Day 22	Day 29	Day 31 (Sacrificed)	
Ethyl(1-naphthyl)amine	200	1401	23.4	24.4	23.5	24.4	25.3	24.8	25.8	1.4
		1402	25.5	27.2	26.8	26.4	27.1	27.0	27.9	0.7
		1403	25.6	25.4	24.5	24.3	24.2	24.4	25.3	-0.1
		1404	26.8	27.0	25.1	26.1	26.4	26.4	27.6	0.6
		1405	25.3	27.9	25.5	28.1	26.9	27.3	26.9	-1.0
		1406	25.0	25.7	23.5	24.8	25.6	25.3	26.0	0.3
		Mean±S.D.	25.3±1.1	26.3±1.3	24.8±1.3	25.7±1.5	25.9±1.1	25.9±1.2	26.6±1.0	0.3±0.8
B[a]P	125	1501	22.6	24.1		25.4*			26.6	2.5
		1502	26.6	27.6		29.5*			28.6	1.0
		1503	24.4	25.7		26.5*			27.4	1.7
		1504	25.9	26.2		26.4*			27.4	1.2
		1505	26.6	26.7		26.1*			27.8	1.1
		1506	26.4	27.8		27.7*			29.0	1.2
		Mean±S.D.	25.4±1.6	26.4±1.4		26.9±1.5			27.8±0.9	1.5±0.6

B[a]P: Positive control (1,2-Benzopyrene, 10 mL/kg, dosed once a day for 5 days, expression period; 14 days)

*: Day 13

Gain= Day 31(Sacrificed) - Day 1(Allocated)

Appendix 2. Clinical observations in the gene mutation assay of ethyl(1-naphthyl)amine
 [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment						
			1	2	3	4	5	6	7
Corn oil	0	1001	N	N	N	N	N	N	N
		1002	N	N	N	N	N	N	N
		1003	N	N	N	N	N	N	N
		1004	N	N	N	N	N	N	N
		1005	N	N	N	N	N	N	N
		1006	N	N	N	N	N	N	N
Ethyl(1-naphthyl)amine	25.0	1101	N	N	N	N	N	N	N
		1102	N	N	N	N	N	N	N
		1103	N	N	N	N	N	N	N
		1104	N	N	N	N	N	N	N
		1105	N	N	N	N	N	N	N
		1106	N	N	N	N	N	N	N
	50.0	1201	N	N	N	N	N	N	N
		1202	N	N	N	N	N	N	Bu
		1203	N	N	N	N	N	N	N
		1204	N	N	N	N	N	N	N
		1205	N	N	N	N	N	N	Bu
		1206	N	N	N	N	N	N	N
100	1301	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	
	1302	N	N	Bu	Bu	N	N	Bu	
	1303	N	Bu	N	N	Bu	Bu	N	
	1304	Bu	N	N	N	Bu	Bu	Bu	
	1305	N	Bu	Bu	N	Bu	Bu	Bu	
	1306	N	N	Bu	Bu	N	N	N	

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

N: Normal, Bu: Brown urine

Appendix 2. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment						
			1	2	3	4	5	6	7
Ethyl(1-naphthyl)amine	200	1401	Bu, DLA, IR	Bu, DLA, IR	Bu, DLA, IR	Bu, IR	Bu, IR	Bu	Bu
		1402	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu
		1403	N	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu
		1404	N	Bu	N	N	Bu	Bu	N
		1405	N	N	Bu	Bu	N	N	Bu
		1406	N	Bu	Bu	Bu	Bu	N	Bu
B[a]P	125	1501	N	N	N	N	N	N	N
		1502	N	N	N	N	N	N	N
		1503	N	N	N	N	N	N	N
		1504	N	N	N	N	N	N	N
		1505	N	N	N	N	N	N	N
		1506	N	N	N	N	N	N	N

B[a]P: Positive control (1,2-Benzopyrene, 10 mg/kg, dosed once a day for 5 days, expression period; 14 days)

N: Normal, Bu: Brown urine, DLA: Decrease in locomotor activity, IR: Irregular respiration

Appendix 2. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment						
			8	9	10	11	12	13	14
Corn oil	0	1001	N	N	N	N	N	N	N
		1002	N	N	N	N	N	N	N
		1003	N	N	N	N	N	N	N
		1004	N	N	N	N	N	N	N
		1005	N	N	N	N	N	N	N
		1006	N	N	N	N	N	N	N
Ethyl(1-naphthyl)amine	25.0	1101	N	N	N	N	N	N	N
		1102	N	N	N	N	N	N	N
		1103	N	N	N	N	N	N	N
		1104	N	N	N	N	N	N	N
		1105	N	N	N	N	N	N	N
		1106	N	N	N	N	N	N	N
	50.0	1201	N	N	N	N	N	N	N
		1202	Bu	N	N	N	N	N	N
		1203	N	N	N	N	Bu	Bu	Bu
		1204	N	N	N	N	N	N	N
		1205	N	N	N	N	N	N	N
		1206	N	N	N	N	N	N	N
100	1301	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	
	1302	Bu	N	N	N	N	N	N	
	1303	Bu	Bu	Bu	Bu	N	Bu	Bu	
	1304	Bu	N	N	N	N	Bu	N	
	1305	N	N	Bu	N	Bu	Bu	Bu	
	1306	Bu	Bu	N	N	N	Bu	Bu	

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

N: Normal, Bu: Brown urine

Appendix 2. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment						
			8	9	10	11	12	13	14
Ethyl(1-naphthyl)amine	200	1401	Bu	Bu	Bu	Bu	N	N	Bu
		1402	Bu	Bu	Bu	Bu	N	Bu	Bu
		1403	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu
		1404	N	N	N	N	N	N	N
		1405	Bu	N	N	N	N	Bu	Bu
		1406	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu
B[a]P	125	1501	N	N	N	N	N	N	N
		1502	N	N	N	N	N	N	N
		1503	N	N	N	N	N	N	N
		1504	N	N	N	N	N	N	N
		1505	N	N	N	N	N	N	N
		1506	N	N	N	N	N	N	N

B[a]P: Positive control (1,2-Benzopyrene, 10 mL/kg, dosed once a day for 5 days, expression period; 14 days)

N: Normal, Bu: Brown urine

Appendix 2. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment						
			15	16	17	18	19	20	21
Corn oil	0	1001	N	N	N	N	N	N	N
		1002	N	N	N	N	N	N	N
		1003	N	N	N	N	N	N	N
		1004	N	N	N	N	N	N	N
		1005	N	N	N	N	N	N	N
		1006	N	N	N	N	N	N	N
Ethyl (1-naphthyl) amine	25.0	1101	N	N	N	N	N	N	N
		1102	N	N	N	N	N	N	N
		1103	N	N	N	N	N	N	N
		1104	N	N	N	N	N	N	N
		1105	N	N	N	N	N	N	N
		1106	N	N	N	N	N	N	N
	50.0	1201	N	N	N	N	N	N	N
		1202	N	N	N	N	N	N	N
		1203	N	N	N	N	N	Bu	N
		1204	N	N	N	N	N	N	N
		1205	N	N	N	N	N	Bu	N
		1206	N	N	N	N	N	N	N
100	1301	Bu	N	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	
	1302	N	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	
	1303	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	
	1304	N	N	N	N	N	Bu	N	
	1305	N	N	Bu	Bu	Bu	Bu	N	
	1306	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

N: Normal, Bu: Brown urine

Appendix 2. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment						
			15	16	17	18	19	20	21
Ethyl(1-naphthyl)amine	200	1401	N	Bu	Bu	Bu	N	Bu	Bu
		1402	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu
		1403	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu
		1404	N	N	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu
		1405	N	N	Bu	Bu	Bu	Bu	N
		1406	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu
B[a]P	125	1501	N	N	N	N	N	N	N
		1502	N	N	N	N	N	N	N
		1503	N	N	N	N	N	N	N
		1504	N	N	N	N	N	N	N
		1505	N	N	N	N	N	N	N
		1506	N	N	N	N	N	N	N

B[a]P: Positive control (1,2-Benzopyrene, 10 mL/kg, dosed once a day for 5 days, expression period; 14 days)

N: Normal, Bu: Brown urine

Appendix 2. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment						
			22	23	24	25	26	27	28
Corn oil	0	1001	N	N	N	N	N	N	N
		1002	N	N	N	N	N	N	N
		1003	N	N	N	N	N	N	N
		1004	N	N	N	N	N	N	N
		1005	N	N	N	N	N	N	N
		1006	N	N	N	N	N	N	N
Ethyl(1-naphthyl)amine	25.0	1101	N	N	N	N	N	N	N
		1102	N	N	N	N	N	N	N
		1103	N	N	N	N	N	N	N
		1104	N	N	N	N	N	N	N
		1105	N	N	N	N	N	N	N
		1106	N	N	N	N	N	N	N
	50.0	1201	N	N	N	N	N	N	N
		1202	N	N	N	N	N	N	N
		1203	N	N	Bu	Bu	Bu	N	N
		1204	N	N	N	N	N	N	N
		1205	N	N	Bu	N	N	N	N
		1206	N	N	N	N	N	Bu	N
100	1301	N	Bu	N	Bu	Bu	N	N	
	1302	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	N	Bu	
	1303	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	
	1304	N	Bu	Bu	N	N	N	N	
	1305	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	N	Bu	
	1306	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

N: Normal, Bu: Brown urine

Appendix 2. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment						
			22	23	24	25	26	27	28
Ethyl(1-naphthyl)amine	200	1401	Bu	Bu	N	N	N	N	Bu
		1402	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	N	Bu
		1403	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu
		1404	Bu	Bu	Bu	N	Bu	N	Bu
		1405	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	N	N
		1406	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu
B[a]P	125	1501	N	N	N	N	N	N	N
		1502	N	N	N	N	N	N	N
		1503	N	N	N	N	N	N	N
		1504	N	Sw	Sw	Sw	Sw	Sw	Sw
		1505	N	N	N	N	N	N	N
		1506	N	N	N	N	N	N	N

B[a]P: Positive control (1,2-Benzopyrene, 10 mL/kg, dosed once a day for 5 days, expression period; 14 days)

N: Normal, Bu: Brown urine, Sw: Swelling Angulus oris

Appendix 2. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment		
			29	30	31 Sacrificed
Corn oil	0	1001	N	N	N
		1002	N	N	N
		1003	N	N	N
		1004	N	N	N
		1005	N	N	N
		1006	N	N	N
Ethyl(1-naphthyl) amine	25.0	1101	N	N	N
		1102	N	N	N
		1103	N	N	N
		1104	N	N	N
		1105	N	N	N
		1106	N	N	N
	50.0	1201	N	N	N
		1202	N	N	N
		1203	Bu	N	N
		1204	N	N	N
		1205	N	N	N
		1206	N	N	N
100	1301	Bu	N	N	
	1302	Bu	N	N	
	1303	Bu	N	N	
	1304	Bu	N	N	
	1305	N	N	N	
	1306	Bu	N	N	

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)
 N: Normal, Bu: Brown urine

Appendix 2. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment		
			29	30	31 Sacrificed
Ethyl(1-naphthyl)amine	200	1401	Bu	N	N
		1402	Bu	N	N
		1403	Bu	N	N
		1404	Bu	N	N
		1405	N	N	N
		1406	Bu	N	N
B[a]P	125	1501	N	N	N
		1502	N	N	N
		1503	N	N	N
		1504	Sw	Sw	Sw
		1505	N	N	N
		1506	N	N	N

B[a]P: Positive control (1,2-Benzopyrene, 10 mL/kg, dosed once a day for 5 days, expression period; 14 days)

N: Normal, Bu: Brown urine, Sw: Swelling angulus oris

Appendix 3. Organ weight in the gene mutation assay of ethyl(1-naphthyl)amine
 [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Body weight (g)	Organ weight(g) and organ weight per body weight(%)			
				Liver		Testis	
				(g)	(%)	(g)	(%)
Corn oil	0	1001	27.2	1.42	5.22	0.23	0.85
		1002	25.5	1.22	4.78	0.21	0.82
		1003	27.7	1.39	5.02	0.23	0.83
		1004	27.2	1.12	4.12	0.20	0.74
		1005	26.6	1.28	4.81	0.22	0.83
		1006	27.8	1.39	5.00	0.22	0.79
		Mean±S.D.	27.0±0.9	1.30±0.12	4.83±0.38	0.22±0.01	0.81±0.04
Ethyl(1-naphthyl)amine	25.0	1101	28.1	1.43	5.09	0.23	0.82
		1102	29.7	1.56	5.25	0.21	0.71
		1103	25.3	1.34	5.30	0.19	0.75
		1104	27.8	1.32	4.75	0.26	0.94
		1105	26.7	1.38	5.17	0.22	0.82
		1106	25.9	1.28	4.94	0.23	0.89
		Mean±S.D.	27.3±1.6	1.39±0.10	5.08±0.21	0.22±0.02	0.82±0.09
	50.0	1201	27.8	1.42	5.11	0.22	0.79
		1202	26.2	1.27	4.85	0.20	0.76
		1203	28.7	1.11	3.87	0.20	0.70
		1204	27.3	1.45	5.31	0.22	0.81
		1205	26.1	1.25	4.79	0.21	0.80
		1206	28.6	1.40	4.90	0.22	0.77
Mean±S.D.	27.5±1.1	1.32±0.13	4.81±0.50	0.21±0.01	0.77±0.04		
100	1301	25.8	1.24	4.81	0.19	0.74	
	1302	27.2	1.38	5.07	0.22	0.81	
	1303	26.5	1.37	5.17	0.22	0.83	
	1304	26.6	1.32	4.96	0.20	0.75	
	1305	27.2	1.28	4.71	0.20	0.74	
	1306	24.5	1.11	4.53	0.23	0.94	
	Mean±S.D.	26.3±1.0	1.28±0.10	4.88±0.24	0.21±0.02	0.80±0.08	

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

Appendix 3. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Body weight (g)	Organ weight (g) and organ weight per body weight (%)			
				Liver		Testis	
				(g)	(%)	(g)	(%)
Ethyl (1-naphthyl) amine	200	1401	25.8	1.30	5.04	0.20	0.78
		1402	27.9	1.47	5.27	0.22	0.79
		1403	25.3	1.31	5.18	0.19	0.75
		1404	27.6	1.21	4.38	0.22	0.80
		1405	26.9	1.35	5.02	0.21	0.78
		1406	26.0	1.30	5.00	0.24	0.92
		Mean±S.D.	26.6±1.0	1.32±0.09	4.98±0.31	0.21±0.02	0.80±0.06
B[a]P	125	1501	26.6	1.28	4.81	0.17	0.64
		1502	28.6	1.41	4.93	0.21	0.73
		1503	27.4	1.35	4.93	0.21	0.77
		1504	27.4	1.36	4.96	0.19	0.69
		1505	27.8	1.32	4.75	0.20	0.72
		1506	29.0	1.46	5.03	0.21	0.72
		Mean±S.D.	27.8±0.9	1.36±0.06	4.90±0.10	0.20±0.02	0.71±0.04

B[a]P: Positive control (1,2-Benzopyrene, 10 mL/kg, dosed once a day for 5 days, expression period; 14 days)

Appendix 4. Individual gross findings on ethyl(1-naphthyl)amine-treated transgenic mice for the gene mutation assay
[Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Organs	Findings
Corn oil	0	1001	Liver	-
			Femur	-
			Testis	-
		1002	Liver	-
			Femur	-
			Testis	-
		1003	Liver	-
			Femur	-
			Testis	-
		1004	Liver	-
			Femur	-
			Testis	-
1005	Liver	-		
	Femur	-		
	Testis	-		
1006	Liver	-		
	Femur	-		
	Testis	-		
Ethyl(1-naphthyl)amine	25.0	1101	Liver	-
			Femur	-
			Testis	-
		1102	Liver	-
			Femur	-
			Testis	-
		1103	Liver	-
			Femur	-
			Testis	-
		1104	Liver	-
			Femur	-
			Testis	-
		1105	Liver	-
			Femur	-
			Testis	-
		1106	Liver	-
			Femur	-
			Testis	-

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

-: No remarkable change

Appendix 4. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Organs	Findings
Ethyl (1-naphthyl) amine	50.0	1201	Liver	-
			Femur	-
			Testis	-
		1202	Liver	-
			Femur	-
			Testis	-
		1203	Liver	-
			Femur	-
			Testis	-
	1204	Liver	-	
		Femur	-	
		Testis	-	
	1205	Liver	-	
		Femur	-	
		Testis	-	
	1206	Liver	-	
		Femur	-	
		Testis	-	
	100	1301	Liver	-
			Femur	-
			Testis	-
		1302	Liver	-
			Femur	-
			Testis	-
		1303	Liver	-
			Femur	-
			Testis	-
	1304	Liver	-	
		Femur	-	
		Testis	-	
	1305	Liver	-	
		Femur	-	
		Testis	-	
	1306	Liver	-	
		Femur	-	
		Testis	-	

-: No remarkable change

Appendix 4. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Organs	Findings
Ethyl (1-naphthyl) amine	200	1401	Liver	-
			Femur	-
			Testis	-
		1402	Liver	-
			Femur	-
			Testis	-
		1403	Liver	-
			Femur	-
			Testis	-
		1404	Liver	-
			Femur	-
			Testis	-
1405	Liver	-		
	Femur	-		
	Testis	-		
1406	Liver	-		
	Femur	-		
	Testis	-		
B[a]P	125	1501	Liver	-
			Femur	-
			Testis	-
		1502	Liver	-
			Femur	-
			Testis	-
		1503	Liver	-
			Femur	-
			Testis	-
		1504	Liver	-
			Femur	-
			Testis	-
1505	Liver	-		
	Femur	-		
	Testis	-		
1506	Liver	-		
	Femur	-		
	Testis	-		

B[a]P: Positive control (1,2-Benzopyrene, 10 mL/kg, dosed once a day for 5 days, expression period; 14 days)

-: No remarkable change

Reference data 1

試験成績書



試験成績書

2013年06月10日

公益財団法人 食品農医薬品安全性評価センター 御中

東京化成工業株式会社 品質保証部
〒103-0023
東京都中央区日本橋本町4丁目10番
TEL:03(5640)8860、FAX:03(5640)802

製品名：N-エチル-1-ナフチルアミン				
製品コード：E0148 CAS:118-44-5	等級：	製品ロット：4M33M	判定：合格	数量：600g
項目	結果	規格値		
純度 (GC)	98.4 %	97.0 %以上		
純度 (非水法)	100.1 %	97.0 %以上		
比重 (20/20)	1.0629	1.0610 ~ 1.0640		
屈折率 n _{20/D}	1.6457	1.6440 ~ 1.6470		

Reference data 2

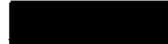
試験成績書 (被験物質の安定性分析結果)

報告書

公益財団法人

食品農医薬品安全性評価センター

環境分析試験室



整理 No.X0182

2013 年 12 月 18 日

東京化成工業株式会社 深谷工場

分析センター

〒366-0816 埼玉県深谷市榎合 725 番地

TEL 048-571-3466

FAX 048-571-1810



試料名 N-エチル-1-ナフチルアミンの分析につきましてご報告致します。

分析試料

E0148 N-エチル-1-ナフチルアミン 入目 100g の残分

Lot No. 4M33M-IM [東京化成工業(株) 製]

1. 純度(GC)

(1) 分析条件

カラム : 5%Diphenyl 95%Dimethylpolysiloxane
0.25 μ m \times 30m \times 0.25mm

カラム温度 : 最初 180 $^{\circ}$ C で 10 分間保ち、その後 20 $^{\circ}$ C/min で 300 $^{\circ}$ C まで昇温し、
その温度に 9 分間保つ。

気化室温度 : 300 $^{\circ}$ C

検出器温度 : 300 $^{\circ}$ C

キャリアガス : ヘリウム 線速度 30cm/sec.

検出器 : FID

注入法 : スプリット法 スプリット比 (1 : 150)

注入量 : 1.0 μ L (試料 50mg+Acetonitrile 1mL)

定量法 : 未補正面積百分率法

機器 : Agilent 6890N

(2) 結果 (未補正面積百分率) 添付データ 3 枚

①98.37% ②98.37% 平均 98.4%

2. 純度(非水滴定)

(1)操作

試料 0.25g(0.1mg のけたまではかる) → ビーカー-100mL にとる + 酢酸 50mL に溶かす → 0.1mol/L 過塩素酸 (酢酸溶媒) で JIS K 0113 の 5 (電位差滴定方法) による。

別に同一条件で空試験を行い、滴定量を補正する。

0.1mol/L 過塩素酸溶液 1ml は 0.017124gC₁₂H₁₃N に相当する。

(2)結果

	試料量(g)	滴定量(mL)	純度(%)
1 回目	0.2530	14.2042	100.11
2 回目	0.2427	13.5961	99.89

ファクター = 1.0420 ブランク = 0.0077mL 平均 100.0%

3. 比重 SG_{26}^{26} 1.0629

測定装置：京都電子製 DA-505

4. 屈折率 n_D^{20} 1.6459

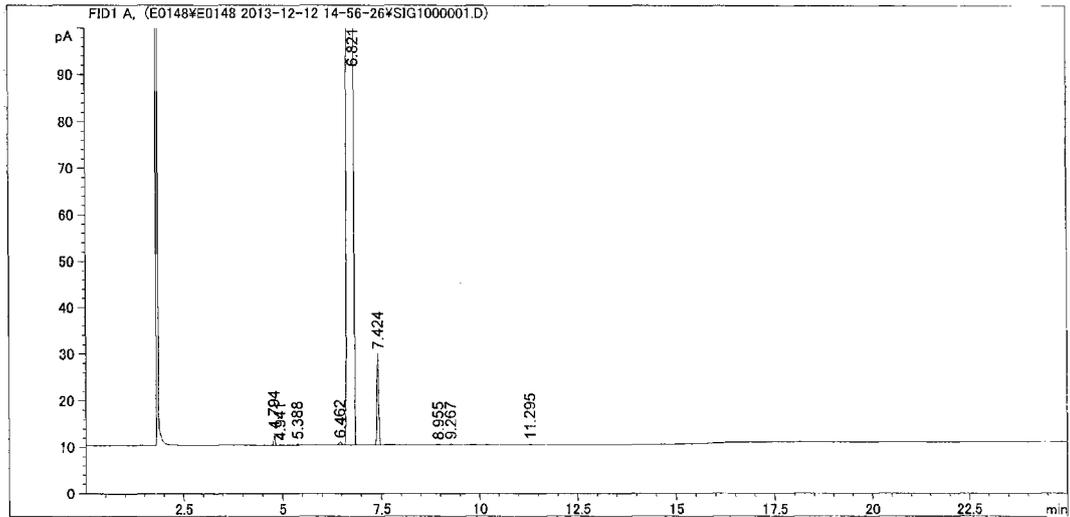
測定装置：京都電子製 RA-500N

この報告書に関するご質問は 田部井 までお願い致します。

データ ファイル D:\DATA2\E0148\E0148 2013-12-12 14-56-26\SIG1000001.D
 サンプル名 : 4M33M

```

=====
測定オペレータ :                               Seq-ライン :    1
分析機器       : 機器 2                       ロケーション :   パイル 101
注入日        : 12-Dec-13, 14:57:34          注入         :    1
                                                注入量       : 1 µl
分析メソッド   : D:\DATA2\E0148\E0148 2013-12-12 14-56-26\E0148.M
最終変更      : 2013/12/12 13:44:06
解析メソッド   : C:\CHEM32\METHODS\E0148.M
最終変更      : 2013/12/12 17:12:55
                (読み込み後変更)
サンプル情報   : 分析センター 依頼No. X0182
                E0148 N-Ethyl-1-naphthylamine Lot. 4M33M-1M
=====
    
```



面積パーセント レポート

```

=====
表示順          :      シグナル
倍率            :              1.0000
希釈率          :              1.0000
ISTD に対し倍率と希釈率ファクタを使用
    
```

シグナル 1: FID1 A,

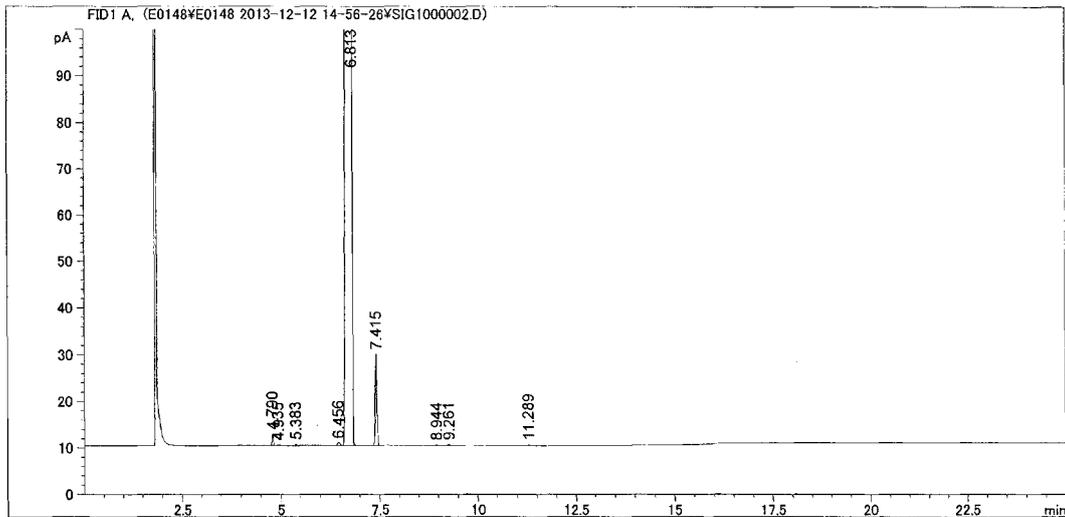
ピーク #	RT [min]	タイプ	ピーク幅 [min]	面積 [pA*s]	高さ [pA]	面積 %
1	4.794	BB	0.0344	5.65887	2.60289	0.12604
2	4.941	BB	0.0534	4.82865e-1	1.24126e-1	0.01076
3	5.388	BB	0.0355	7.26231e-1	3.19474e-1	0.01618
4	6.462	BV	0.0701	2.75662	6.29239e-1	0.06140
5	6.821	VB	0.0856	4416.51807	664.39282	98.37172
6	7.424	BB	0.0494	61.11972	19.60333	1.36136
7	8.955	BB	0.0582	6.37768e-1	1.72275e-1	0.01421
8	9.267	BB	0.0649	1.07340	2.61533e-1	0.02391
9	11.295	BB	0.0454	6.48177e-1	2.19722e-1	0.01444

トータル : 4489.62172 688.32541

データ ファイル D:\DATA2\E0148\E0148 2013-12-12 14-56-26\SIG1000002.D
 サンプル名 : 4M33M

```

=====
測定オペレータ :                               Seq-ライン :    1
分析機器       : 機器 2                       ロケーション : ハイム 101
注入日        : 12-Dec-13, 15:27:43          注入       :    2
                                                注入量    : 1 µl
分析メソッド   : D:\DATA2\E0148\E0148 2013-12-12 14-56-26\E0148.M
最終変更      : 2013/12/12 13:44:06
解析メソッド   : C:\CHEM32\METHODS\E0148.M
最終変更      : 2013/12/12 17:12:55
                (読み込み後変更)
サンプル情報   : 分析センター 依頼No. X0182
                E0148 N-Ethyl-1-naphthylamine Lot. 4M33M-1M
=====
    
```



面積パーセント レポート

```

=====
表示順          :      シグナル
倍率            :              1.0000
希釈率          :              1.0000
ISTD に対し倍率と希釈率ファクタを使用
    
```

シグナル 1: FID1 A,

ピーク #	RT [min]	タイプ	ピーク幅 [min]	面積 [pA*s]	高さ [pA]	面積 %
1	4.790	BB	0.0363	5.68557	2.52319	0.12684
2	4.935	BB	0.0540	6.00093e-1	1.52079e-1	0.01339
3	5.383	BB	0.0384	7.65510e-1	3.14719e-1	0.01708
4	6.456	BV	0.0733	2.69709	6.01473e-1	0.06017
5	6.813	VB	0.0855	4409.55420	663.65509	98.37287
6	7.415	BB	0.0490	60.88271	19.74594	1.35823
7	8.944	BB	0.0595	6.49166e-1	1.70181e-1	0.01448
8	9.261	BB	0.0586	1.02319	2.73996e-1	0.02283
9	11.289	BB	0.0439	6.32716e-1	2.24534e-1	0.01412

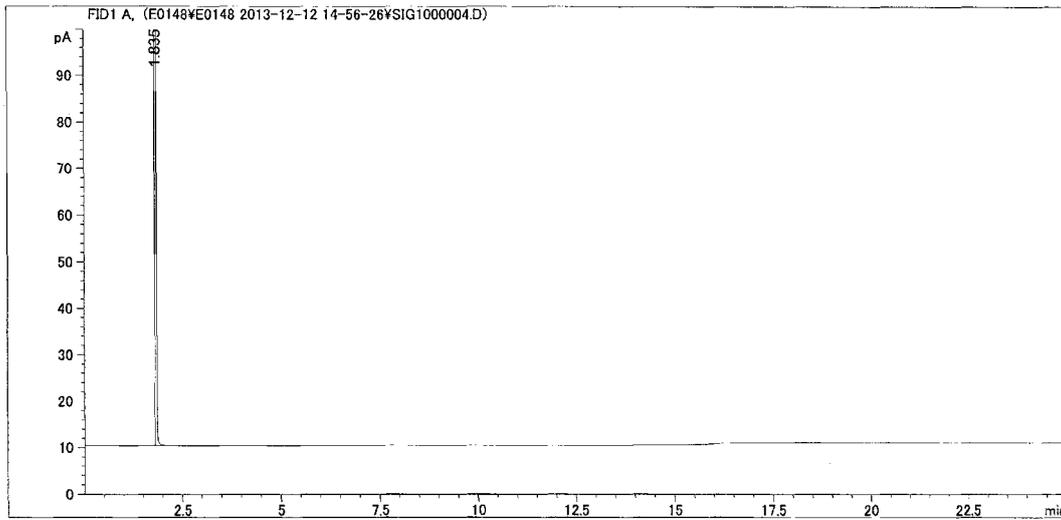
トータル : 4482.49024 687.66121

データ ファイル D:\DATA2\E0148\E0148 2013-12-12 14-56-26\SIG1000004.D
 サンプル名 : CH3CN

```

=====
測定オペレータ   :                               Seq-ライン   :    2
分析機器         :   機器 2                     ロケーション   :   パイプ 102
注入日          :   12-Dec-13, 16:28:11        注入          :    1
                                                    注入量       :   1 µl

分析メソッド     :   D:\DATA2\E0148\E0148 2013-12-12 14-56-26\E0148.M
最終変更        :   2013/12/12 13:44:06
解析メソッド     :   C:\CHEM32\METHODS\E0148.M
最終変更        :   2013/12/12 17:12:37
                  (読み込み後変更)
サンプル情報     :   分析センター 依頼No. X0182
                  Blank (Acetonitrile)
=====
    
```



=====
 面積パーセント レポート
 =====

表示順 : シグナル
 倍率 : 1.0000
 希釈率 : 1.0000
 ISTD に対し倍率と希釈率ファクタを使用

シグナル 1: FID1 A,

ピーク #	RT [min]	タイプ	ピーク幅 [min]	面積 [pA*s]	高さ [pA]	面積 %
1	1.835	BB S	0.0200	2.75033e4	2.29039e4	1.000e2

トータル : 2.75033e4 2.29039e4

=====
 *** レポート終了 ***

Reference data 3

被験物質液中の被験物質濃度測定

1. 濃度測定法

1.1. 試薬の調製

1.1.1. 移動相 [メタノール/蒸留水 (3:1, v/v)]

使用試薬	メタノール (HPLC 用, 和光純薬工業)
	蒸留水 (HPLC 用, 和光純薬工業)
調製方法	メタノール 3 容量および蒸留水 1 容量を混和した.
使用期限	室温保存で 1 ヶ月

1.2. 標準溶液の調製

1.2.1. 標準物質

被験物質を用いた.

1.2.2. 標準原液

被験物質約 20 mg (実測値 : 20.835 および 20.872 mg) を量り, アセトン (試薬特級, 和光純薬工業) を加え溶解した. さらにアセトンを加えて正確に 20 mL とした (設定濃度 1 mg/mL). 使用期限は調製同日とした.

1.2.3. 定量用標準溶液

標準原液 1 mL を正確に採取し, アセトン (試薬特級, 和光純薬工業) を加えて正確に 10 mL とした. さらにこの液 5 mL を正確に採取し, アセトンを加えて正確に 50 mL とした (設定濃度 0.01 mg/mL). 標準溶液はフィルター (Millex[®]-LH, 孔径 0.45 μm, Millipore) をろ過し, HPLC 用試料とした. 使用期限は調製同日とした.

1.3. 試料溶液の調製

媒体の試料溶液は 1 回, 各被験物質液の試料溶液は 3 回, メスピペットを用いて分析試料を採取した. 採取した分析試料をメスフラスコに排出後, そのメスピペットの内側を, アセトン (試薬特級, 和光純薬工業) を用いて数回洗い, その液もメスフラスコに入れた. 下表に従い, アセトンを用いて希釈し, 試料溶液を調製した. 試料溶液はフィルター (Millex[®]-LH, 孔径 0.45 μm, Millipore) をろ過し, HPLC 用試料溶液とした.

被験物質液 設定濃度 (mg/mL)	20.0	10.0	5.00	2.50	媒体 (コーン油)
被験物質液採取量 (mL)	1	1	5	5	1
↓	↓	↓	↓	↓	↓
1 次定容量 (mL)	100	50	100	50	10
1 次定容液採取量 (mL)	1	1	1	1	/
↓	↓	↓	↓	↓	
2 次定容量 (mL)	20	20	25	25	
希釈倍率	2000	1000	500	250	10

1.4. 測定条件

1.4.1. HPLC 条件

カラム	InertsilODS-2 (内径 4.6 mm, 長さ 150 mm, 粒子径 5 μm, GL Sciences)	
カラム温度	40°C	
移動相	メタノール/蒸留水 (3:1, v/v)	
流量	1.0 mL/min	
測定波長	340 nm	
注入量	10 μL	
オートサンプラー	設定温度	4°C
	インジェクター洗浄液	アセトン (試薬特級, 和光純薬工業)

1.4.2. 測定機器

島津 LC-2010CHT 高速液体クロマトグラフシステム

1.4.3. データ処理ソフト

島津 Lab Solutions LC/GC Ver. 6

1.5. システムの適合性

HPLC システム稼動時ごとに、定量用標準溶液 (設定濃度 0.01 mg/mL) を繰り返し 6 回測定した。その結果、保持時間およびピーク面積の相対標準偏差は 0.0~1.2% および 0.6~2.2% と判定基準 (3.0%以下) を満たしていたため、HPLC システムは適正に稼動していると判断した。

1.6. 測定

下表に従い測定した。採用データにおける精度管理の結果は 97.0~101.6% であり、判定基準 (100.0±5.0%以内) を満たしたため、測定結果を採用した。なお、標準溶液 (設定濃度 0.01 mg/mL) および試料溶液は、気密条件でオートサンプラー上 (設定温度 4°C)

24 時間まで安定であることが、「コーン油中 ethyl (1-naphthyl) amine の濃度測定法バリデーション [試験番号 E780 (115-230)]」において確認されている。よって標準溶液と試料溶液について、それぞれ2つのバイアルをセットし、再実測の場合には気密状態が保たれているバイアルから測定した。

繰り返し数	試料
3	定量用標準溶液
1	各試料溶液
1	定量用標準溶液 (精度管理として)

1.7. 測定結果の解析および数値の取り扱い

項目	単位	算出方法	表示桁
保持時間	min	データ処理ソフト	表示値
ピーク面積	$\mu\text{V} \times \text{sec}$	データ処理ソフト	表示値
標準溶液理論濃度	mg/mL	$w / 20 / 100$ w : 標準原液調製時の被験物質秤量値 (mg) 100 : 標準原液からの希釈倍率	有効数字 4 桁
被験物質液濃度	mg/mL	$C_S \times A_T / A_S \times D$ C _S : 定量用標準溶液の理論濃度 A _T : 試料溶液のピーク面積 A _S : 定量用標準溶液のピーク面積平均 D : 希釈率	有効数字 4 桁
平均	%	$\frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$ x : 得られる値 n : 繰り返し数	得られる値と同桁
設定濃度に対する割合	%	被験物質液濃度の平均値 / 設定濃度 × 100	小数点以下 1 桁
相対標準偏差	%	標準偏差 : $\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$ x : 得られる値 n : 繰り返し数 \bar{x} : 平均 標準偏差 / 平均 × 100	小数点以下 1 桁

項目	単位	算出方法	表示桁
精度管理	%	$A_Q / A_S \times 100$ A_Q : 定量用標準溶液 (精度管理) の面積 A_S : 定量用標準溶液のピーク面積平均	小数点以下1桁

2. 結果

濃度/均一性の結果を表1に示す。

初回調製時の測定において精度管理の結果が判定基準を満たさなかったため、再実測し、その結果を採用した。また、最終調製時の測定において 10 mg/mL 被験物質液の繰り返し1回目の値が低値を示した。繰り返し2および3回目の値が判定基準（設定濃度に対する割合が $100.0 \pm 10.0\%$ 以内）を満たしていることから、繰り返し1回目についてサンプリングミスと判断した。そのため 10 mg/mL 被験物質液の残余より再分析 (n=1)、再再分析を試みたが、その測定の際、精度管理が判定基準を満たさなかった。よってカラムを洗浄後、オートサンプラー上の安定性が保証されている 24 時間以内に標準溶液および 10 mg/mL 被験物質液を再分析および再実測した。

その結果、設定濃度に対する割合が $100.0 \pm 10.0\%$ 以内かつ相対標準偏差が 5.0% 以下とすべて判定基準を満たしたため、被験物質液は適切に調製されていると判断した。また、媒体の試料溶液のクロマトグラム上に、被験物質のピークが認められないことから、媒体の被験物質による汚染はないと判断した。

表 1. 濃度／均一性

	設定濃度 (mg/mL)	被験物質液濃度 (mg/mL)		設定濃度に 対する割合 (%)	相対標準 偏差 (%)
		平均			
初回調製時	媒体	N.D. ¹⁾	-	-	-
	2.50	2.572	2.593	103.7	0.8
		2.592			
		2.615			
	5.00	5.379	5.311	106.2	1.1
		5.291			
		5.264			
	10.0	10.93	11.00	110.0	0.7
		11.09			
		10.98			
	20.0	20.78	21.51	107.6	3.5
		22.28			
21.47					
最終調製時	媒体	N.D. ¹⁾	-	-	-
	2.50	2.489	2.536	101.4	1.6
		2.562			
		2.557			
	5.00	4.824	4.969	99.4	2.6
		5.058			
		5.026			
	10.0	10.73	10.74	107.4	0.4
		10.78			
		10.70			
	20.0	19.41	20.24	101.2	3.6
		20.56			
20.75					

1) Not Detectable

信 頼 性 保 証 書

表 題： トランスジェニックマウスを用いる ethyl(1-naphthyl) amine の遺伝子突然変異試験

試験番号： E783 (115-233)

本試験は、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について（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，環企発第110331010号）に従って実施され、本最終報告書に記載された成績は、試験の生データを正確に反映していることを保証する。

なお、本試験の信頼性保証部門による調査記録を次頁に示す。

平成~~23~~年~~3~~月~~11~~日

所属： 公益財団法人食品農医薬品安全性評価センター
信頼性保証部門責任者

氏名：

[Redacted Name]

調 査 記 録

調査項目	調査実施日	試験責任者および 運営管理者への報告日	調査 担当者
試験計画書	平成 25 年 10 月 2 日	平成 25 年 10 月 2 日	磯部
コンピュータプロトコール	平成 25 年 10 月 2 日	平成 25 年 10 月 2 日	磯部
動物搬入	平成 25 年 10 月 2 日	平成 25 年 10 月 2 日	小澤 松井
被験物質液の調製, 濃度/ 均一性分析	平成 25 年 10 月 7 日	平成 25 年 10 月 8 日	木下 磯部
群分け	平成 25 年 10 月 9 日	平成 25 年 10 月 9 日	町野
投与開始	平成 25 年 10 月 9 日	平成 25 年 10 月 9 日	磯部
器官摘出	平成 25 年 11 月 8 日	平成 25 年 11 月 12 日	磯部
ゲノム DNA の抽出	平成 25 年 11 月 26 日	平成 25 年 11 月 26 日	磯部
ゲノム DNA のパッケージ ングおよびプレーティング (<i>gpt</i> assay)	平成 25 年 12 月 13 日	平成 25 年 12 月 13 日	磯部
プラーク計数 (<i>gpt</i> assay)	平成 25 年 12 月 18 日	平成 25 年 12 月 18 日	磯部
ゲノム DNA のパッケージ ング, プレーティング, プ ラーク計数 (<i>Spi</i> assay)	平成 26 年 1 月 29, 30 日	平成 26 年 1 月 30 日	磯部
生データおよび最終報告書 草案	平成 26 年 2 月 27 日	平成 26 年 2 月 27 日	磯部
生データおよび最終報告書	平成 26 年 3 月 11 日	平成 26 年 3 月 11 日	磯部