

17K5238G

## 最終報告書

試験表題：2-メチル-3-(3, 4-ジオキシフェニル)-プロパナールの  
細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：17K5238G

試験期間：2017年11月30日～2018年2月20日

シミックファーマサイエンス株式会社

試験責任者署名：



2018年2月20日

本報告書は表紙を含む24枚

## 目 次

(頁)

1. 要約.....	4
2. 試験表題.....	5
3. 試験番号.....	5
4. 試験目的.....	5
5. 試験委託者.....	5
6. 試験施設.....	5
7. 試験責任者.....	5
8. 担当責任者.....	5
9. 試験実施.....	5
10. GLP 及びガイドライン.....	6
11. 試験関係資料の保存.....	6
12. 被験物質及び対照物質.....	7
12.1. 被験物質 .....	7
12.2. 陰性対照物質 .....	7
12.3. 陽性対照物質 .....	8
13. 試験材料.....	8
13.1. 使用菌株 .....	8
13.2. S9 mix .....	9
13.3. 培地 .....	9
13.4. トップアガ .....	10
14. 試験方法.....	10
14.1. 識別方法 .....	10
14.2. 菌懸濁液の調製 .....	10
14.3. 被験物質液の調製 .....	10
14.4. 陽性対照物質液の調製 .....	11
14.5. 試験構成 .....	11
14.6. 用量段階 .....	12
14.7. 試験操作 .....	12
14.8. 無菌試験 .....	12
14.9. 観察及び復帰変異コロニー数の計測 .....	13
15. 試験の成立条件 .....	13
16. 結果の表示 .....	13
17. 統計学的処理 .....	13
18. 判定基準 .....	13
19. 結果及び考察 .....	13
20. 試験の信頼性に影響をおよぼした要素 .....	14

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）  
別表 3 試験結果表（確認試験 1）  
別表 4 試験結果表（確認試験 2）

図 1 用量反応曲線（用量設定試験）  
図 2 用量反応曲線（本試験）  
図 3 用量反応曲線（確認試験 1）  
図 4 用量反応曲線（確認試験 2）

添付資料 陰性対照値及び陽性対照値の背景データから算出した基準値

## 1. 要約

2-メチル-3-(3, 4-ジオキシフェニル)-プロパナールの遺伝子突然変異誘発性を、塩基対置換型変異株の *S. typhimurium* TA100, TA1535, *E. coli* WP2 *uvrA* 及びフレームシフト型変異株の *S. typhimurium* TA98, TA1537を用い, 37°C, 20分間のプレインキュベーション法により検討した。試験は、代謝活性化非存在下及び代謝活性化存在下の用量設定試験及び本試験により実施し、用量設定試験及び本試験での試験結果の再現性を確認した。また、代謝活性化存在下の *S. typhimurium* TA1535については、確認試験を実施し試験結果の再現性を確認した。その結果、本被験物質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復帰変異コロニー数を用量反応的に増加させず、陰性対照と比較して復帰変異コロニー数の2倍以上の増加も示さなかった。また、用量設定試験、本試験及び確認試験において、試験結果に再現性も得られた。一方、陽性対照は、代謝活性化の有無にかかわらずすべての菌株に対して、復帰変異コロニー数を陰性対照の2倍以上に増加させた。陰性対照及び陽性対照の平均値は、用量設定試験、本試験及び確認試験のいずれにおいても背景データから算出した変動範囲の範囲内であった。また、無菌試験の結果、雑菌の混入がないことが確認された。これらの結果は、試験が適切に実施されたことを示す。

以上の結果より、本試験条件下において本被験物質は遺伝子突然変異誘発性を有さないと判定する。

**2. 試験表題**

2-メチル-3-(3, 4-ジオキシフェニル)-プロパノールの細菌を用いる復帰突然変異試験

**3. 試験番号**

17K5238G

**4. 試験目的**

被験物質の遺伝子突然変異誘発性を、塩基対置換型変異株の *S. typhimurium* TA100, TA1535, *E. coli* WP2 *uvrA* 及びフレームシフト型変異株の *S. typhimurium* TA98, TA1537 を使用し検討した。

**5. 試験委託者**

厚生労働省

医薬・生活衛生局医薬品審査管理課 化学物質安全対策室

〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1-2-2

TEL 03-5253-1111 FAX 03-3593-8913

**6. 試験施設**

シミックファーマサイエンス株式会社 シミックバイオリサーチセンター

〒408-0044 山梨県北杜市小淵沢町 10221 番地

TEL 0551-36-2455 FAX 0551-36-3895

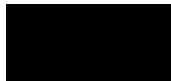
**7. 試験責任者**

[REDACTED]  
非臨床事業部、研究本部、シミックファーマサイエンス株式会社

**8. 担当責任者**

試験操作

被験物質管理



**9. 試験実施**

試験期間 2017年11月30日 ~ 2018年2月20日

試験開始日 2017年11月30日

実験開始日 2017年12月1日

実験終了日 2018年1月18日

溶解性試験 2017年12月1日

用量設定試験

前培養開始日 2017年12月4日

処理日 2017年12月5日

観察及びコロニー数計測 2017年12月7日

本試験

前培養開始日 2017年12月18日

処理日	2017年12月19日
観察及びコロニー数計測	2017年12月21日
確認試験1	
前培養開始日	2018年1月9日
処理日	2018年1月10日
観察及びコロニー数計測	2018年1月12日
確認試験2	
前培養開始日	2018年1月15日
処理日	2018年1月16日
観察及びコロニー数計測	2018年1月18日
試験終了日	2018年2月20日

## 10. GLP 及びガイドライン

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」（薬食発0331第8号、平成23・03・29製局第6号、環保企発第110331010号、平成23年3月31日）

適用したガイドライン:

「新規化学物質等に係る試験の方法について」（薬食発0331第7号、平成23・03・29製局第5号、環保企発第110331009号、平成23年3月31日、薬生発1221第1号、20151209製局第1号、環保企発第1512211号、平成27年12月21日による一部改正）

## 11. 試験関係資料の保存

保存場所：当試験施設、資料保存施設

保存資料：試験計画書（原本）

被験物質の受領、使用、廃棄、管理に関する記録

菌株の管理に関する記録

試験の実施に関する記録

最終報告書（原本）

その他GLPに規定される記録文書

保存期間：本試験終了後10年間保存

## 12. 被験物質及び対照物質

### 12.1. 被験物質

名称 : 2-メチル-3-(3, 4-ジオキシフェニル)-プロパナル

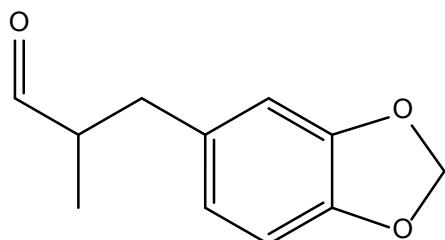
別名 : 2-Methyl-3-(3,4-methylenedioxyphenyl)propionaldehyde

CAS 番号 : 1205-17-0

化審法官報公示整理番号 : (5)-3560

示性式 : C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)CHO

構造式 :



ロット番号 : NXYUL

製造元及び入手日 : [REDACTED] 2017年 10月 26日

使用量 : 884.28 mg

純度 : 97.0%

沸点 : 154°C/0.8 kPa

不純物の名称及び濃度 : 不明

分子量 : 192.21

常温における性状 : わずかにうすい黄色～黄色の透明液体

安定性 : 保管条件下で安定

溶解性 : 水に不溶, ジメチルスルホキシドに 5 wt%以上, アセトンに 10 wt%以上溶解<sup>1)</sup>

溶媒中での安定性 : 水, ジメチルスルホキシド及びアセトンに安定<sup>1)</sup>

取扱い上の注意 : 刺激性

保存条件 : 密封, 冷蔵 (2~8°C)

保存場所 : 第3動物実験棟, 検体調製室, 低温保管庫 (許容範囲 : 2~8°C)

保存期間 : 2017年 10月 26日～2018年 1月 16日

保存温度 (実測値) : 5~7°C

残余被験物質の管理 : 試験操作終了後被験物質管理責任者に移管

1) 溶解性試験の結果による

### 12.2. 隠性対照物質

陰性対照物質は、被験物質液の調製に使用した下記のジメチルスルホキシドとした。

名称 : ジメチルスルホキシド

ロット番号 : DSF4148

純度 : 100.0%

規格等級 : 試薬特級

供給元：和光純薬工業株式会社

### 12.3. 陽性対照物質

陽性対照物質は、細菌を用いる復帰突然変異試験に汎用されている下記のものを使用した。

名称：2-(2-Furyl-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (以下 AF-2 と略す)

ロット番号：SAE0315

含量：99.7%

供給元：和光純薬工業株式会社

名称：Sodium azide (以下 AZI と略す)

ロット番号：JPG7700

純度：99.9%

供給元：和光純薬工業株式会社

名称：9-Aminoacridine (以下 9AA と略す)

ロット番号：BCBK1177V

純度：99.5%

供給元：SIGMA-ALDRICH

名称：2-Aminoanthracene (以下 2AA と略す)

ロット番号：LKP3851

含量：96.7%

供給元：和光純薬工業株式会社

## 13. 試験材料

### 13.1. 使用菌株

菌株は、既知変異誘発物質に対して高い感受性を有しており、細菌を用いる復帰突然変異試験に汎用されている下記の菌株を使用した。菌株の入手先及び入手年月日を以下に示す。入手した菌株は、-80°Cで保存した。

菌株名	入 手 先	入手年月日
塩基対置換型変異株； <i>S. typhimurium</i> TA100, TA1535	日本バイオアッセイ研究センター	2002年2月6日
フレームシフト型変異株 <i>S. typhimurium</i> TA98, TA1537		
塩基対置換型変異株； <i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	国立遺伝学研究所	2007年3月14日

### 13.2. S9 mix

#### 13.2.1. S9

S9は、オリエンタル酵母工業株式会社製造の以下のラット肝S9を使用した。S9は、使用するまで-80°Cで保存した。

使用動物	ラット：Sprague-Dawley系
性、週齢／体重範囲	雄、7週齢／204.4±8.2 g
Lot No.	17080405
製造年月日	2017年8月4日
誘導物質	Phenobarbital (PB) 及び 5,6-Benzoflavone (BF)
投与量及び投与回数	PB: 30 mg/kg 1回（1日目） 60 mg/kg 3回（2~4日目） BF: 80 mg/kg 1回（3日目）
投与方法	腹腔内投与

#### 13.2.2. コファクター

コファクターは、グルコース-6-リン酸、NADH及びNADPH（オリエンタル酵母工業株式会社）を0.22 mol/Lナトリウム-リン酸緩衝液に溶解し、濾過滅菌した後MgCl<sub>2</sub>-KCl溶液を加えたものを使用した。

#### 13.2.3. S9 mix の調製

-80°Cに凍結保存したS9を用時に解凍し、コファクターと1:9の割合で混合した。以下にS9 mix 1mL中の成分濃度を示す。調製したS9 mixは、氷冷下で保存した。

S9 塩化マグネシウム 塩化カリウム グルコース-6-リン酸 NADPH NADH リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4)	0.1 mL 8 μmol 33 μmol 5 μmol 4 μmol 4 μmol 100 μmol
--	---

### 13.3. 培地

ニュートリエントプロス液は、25 g/LのNutrient broth No. 2 (Lot No. 1772799, Oxoid Ltd.)を使用した。最少グルコース寒天平板培地は、極東製薬工業株式会社製造の以下の組成のバイタルメディアAMT-S培地 (Lot No. DZAIAP01, 2017年10月25日製造, 使用寒天；大洋寒天, Lot No. BM-M5-265, SSKセールス)を使用した。

硫酸マグネシウム・七水和物 クエン酸・一水和物 リン酸水素二カリウム リン酸二水素アンモニウム 水酸化ナトリウム ブドウ糖 寒天末	0.2 g/L 2.0 g/L 10.0 g/L 1.92 g/L 0.66 g/L 20.0 g/L 15.0 g/L
---	--

### 13.4. トップアガー

トップアガーは、軟寒天溶液 (Bacto Agar, Becton, Dickinson ; 0.6%, 塩化ナトリウム, 和光純薬工業株式会社 ; 0.5%) に、0.5 mmol/L ヒスチジン (関東化学株式会社), 0.5 mmol/L ビオチン (和光純薬工業株式会社) 及び 0.5 mmol/L トリプトファン (関東化学株式会社) を 1/10 の容量で加えて調製したものを使用した。

## 14. 試験方法

### 14.1. 識別方法

各菌株の前培養時には、油性マーカーペンで菌株名を培養容器に表記した。試験時の最少グルコース寒天平板培地には、試験番号、菌株名、用量、被験物質名（ロット番号を含む）、陰性対照物質名又は陽性対照物質名及び代謝活性化の有無を明記した。

### 14.2. 菌懸濁液の調製

三角フラスコ(容量 200 mL)に入れたニュートリエントブロス培養液 25 mL に菌懸濁液 50 µL を接種し、37°C で 10 時間、100 回/min で振盪培養した (ML-10F 及び PU-6, タイテック株式会社)。接種したニュートリエントブロス培養液は、培養開始まで 4°C に保存した。培養終了後培養液の濁度 (OD) を BioSpec-mini (株式会社島津製作所) を使用して波長 660 nm で測定し、菌数が  $1.0 \times 10^9$  個/mL 以上であることを確認した。以下に試験ごとの生菌数を示す。

試験	生菌数 ( $\times 10^9$ 個/mL)				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
用量設定試験	4.46	5.27	6.22	4.51	2.83
本試験	4.41	5.45	6.25	4.75	2.95
確認試験 1	--	5.31	--	--	--
確認試験 2	--	5.25	--	--	--

### 14.3. 被験物質液の調製

#### 14.3.1. 溶媒

本被験物質の溶媒は、溶解性試験の結果より設定した。溶解性試験は、日本薬局方注射用水、ジメチルスルホキシド (以下 DMSO と略す) 及びアセトンを溶媒に実施した。溶解性試験の調製濃度は、日本薬局方注射用水及び DMSO の場合は 50 mg/mL、アセトンの場合は 100 mg/mL とした。

所定量の被験物質を用時秤量した。これに 50 または 100 mg/mL の濃度になるよう各溶媒を加え、目視により発熱、発煙等の反応性の有無及び溶解性を確認した。その結果、本被験物質は DMSO 及びアセトンに対して溶解し、日本薬局方注射用水に対しては超音波処理によっても一様に懸濁しなかった。

一方、被験物質と溶媒との反応性については、いずれの溶媒においてもなんら認められなかつた。従って、本被験物質はこれらの溶媒に対して安定であると判断した。

以上の結果より、本被験物質の溶媒は溶液が得られ、また反応性が認められず溶媒中で本被験物質が安定であると判断されたDMSOとした。なお、調製に使用したDMSOは、Molecular Sieves (3A)により脱水した。

#### 14.3.2. 調製方法

調製時期：用時調製した（被験物質の秤量は調製の前日に行った）。

純度換算：純度換算を行った（秤量値×0.970）。

液量換算：秤量した被験物質の液量を添加する溶媒の液量から除いた。

調製方法：所定量の被験物質を秤量し、これにDMSOを加えて溶解させ最高濃度の被験物質液50 mg/mLを調製した。低用量の被験物質液は、最高濃度の被験物質液を同様のDMSOを使用して段階希釈し調製した。使用後の残余被験物質液は、感染性廃棄物として廃棄した。試験ごとの被験物質の秤量値、液量及びDMSOの添加量を下記に示す。

試験区分	秤量値(mg)	液量(mL)	添加量(mL)
用量設定試験	236.15	0.200	4.381
本 試 験	287.45	0.240	5.337
確認試験 1	142.45	0.120	2.644
確認試験 2	118.92	0.100	2.207

被験物質液の調製、分注終了からプレインキュベーション開始までの時間（保存温度）：

用量設定試験 2分間（室温）

本試験 3分間（室温）

確認試験 1 2分間（室温）

確認試験 2 3分間（室温）

#### 14.4. 陽性対照物質液の調製

陽性対照物質は、DMSO (Lot No. DSF4148, 純度 100.0%, 和光純薬工業株式会社) に溶解し-80°Cに凍結保存したものを、用時に解凍して使用した。調製濃度を下記に示す。使用後の残余陽性対照物質液は、感染性廃棄物として廃棄した。

化学物質名	濃度 (μg/mL)
AF-2	0.1, 1.0
AZI	5
9AA	800
2AA	5, 10, 20, 100

#### 14.5. 試験構成

菌株ごとに代謝活性化非存在下及び代謝活性化存在下について実施し、さらに陰性対照及び陽性対照を設けた。なお、陽性対照は、同日に実施した試験と共有した。用量当たりの最少グルコース寒天平板培地は、陰性対照、被験物質及び陽性対照のいずれも2枚とした。陽性対照物質の用量は、細菌を用いる復帰突然変異試験に広く使用されている下記の用量とした。

菌 株	代謝活性化非存在下		代謝活性化存在下	
	化学物質名	用 量 ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	化学物質名	用 量 ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )
TA100	AF-2	0.01	2AA	1.0
TA1535	AZI	0.5	2AA	2.0
WP2 <i>uvrA</i>	AF-2	0.01	2AA	10.0
TA98	AF-2	0.1	2AA	0.5
TA1537	9AA	80.0	2AA	2.0

#### 14.6. 用量段階

本試験の用量段階を設定するため、用量設定試験を実施し復帰変異コロニー数の計測及び生育阻害、析出の有無の観察を行った。用量設定試験の用量段階は、5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  を最高用量とした以下公比4の計6用量とした。用量設定試験の結果を別表1に示す。

本被験物質は、代謝活性化の有無にかかわらずすべての菌株に対して1250  $\mu\text{g}/\text{plate}$  以上の用量にて生育阻害を示した。また、代謝活性化存在下の *S. typhimurium* TA1535 の 4.88  $\mu\text{g}/\text{plate}$  の用量において復帰変異コロニー数の平均値が背景データから算出した基準値の範囲内であったが、陰性対照の平均値の2倍以上に増加した。それ以外のすべての菌株では復帰変異コロニー数の用量反応的な増加及び陰性対照と比較して復帰変異コロニー数の2倍以上の増加は認められなかつた。一方、被験物質の析出については、代謝活性化の有無にかかわらずいずれの用量段階においても観察されなかつた。

以上の結果より、本試験の用量段階は、代謝活性化の有無にかかわらずすべての菌株について1250  $\mu\text{g}/\text{plate}$  を最高用量とした以下公比2の計6用量とした（別表2）。また、代謝活性化存在下の *S. typhimurium* TA1535 の 4.88  $\mu\text{g}/\text{plate}$  の用量において復帰変異コロニー数の平均値が陰性対照の平均値の2倍以上に増加したことから、代謝活性化存在下の *S. typhimurium* TA1535について19.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$  を最高用量とした以下公比2の計5用量で確認試験を実施した（別表3,4）。

#### 14.7. 試験操作

菌株と被験物質液の処理方法は、細菌を用いる復帰突然変異試験の定法として用いられる37°C、20分間のプレインキュベーション法とした。

試験管に陰性対照物質、被験物質液及び陽性対照物質0.1 mLを分注した。これに代謝活性化非存在下の場合は1/15 mol/L ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)を、代謝活性化存在下の場合はS9 mixを0.5 mL加え、さらに菌懸濁液0.1 mLを加えて攪拌した後37°C、振盪回数105~116回/分(変動範囲)で20分間振盪した(BW201/BF-400、ヤマト科学株式会社)。振盪開始20分後これにトップアガーを2.0 mL加えて攪拌し、最少グルコース寒天平板培地に重層した。重層固化を確認した後最少グルコース寒天平板培地の上下を反転し、37°Cで48時間培養した(FMU-4041；福島工業株式会社)。

#### 14.8. 無菌試験

被験物質への雑菌の混入、試験操作時の雑菌の混入がないことを確認するため、被験物質液とS9 mixについて無菌試験を実施した。無菌試験における被験物質液及びS9 mixの添加量は、被験物質液と菌株との処理時の液量とした。最高濃度の被験物質液またはS9 mixにトップアガー

を 2.0 mL 加え、最少グルコース寒天平板培地に重層した。重層固化を確認した後最少グルコース寒天平板培地の上下を反転し、37°C で 48 時間培養した (FMU-4041 ; 福島工業株式会社)。

#### 14.9. 観察及び復帰変異コロニー数の計測

復帰変異コロニー数の計測時に目視で析出の有無を確認し、実体顕微鏡を用いて background lawn の生育を観察し生育阻害の有無を確認した。析出または生育阻害が認められた場合は、その旨を記録した。復帰変異コロニー数の計測は、*S. typhimurium* TA100 及び陽性対照は計数値を面積補正（補正值 1.20）したコロニーアナライザー (CA-11D, システムサイエンス株式会社) を用いて計測し、他は用手法で計測した。

#### 15. 試験の成立条件

下記の条件を満たしている場合に、試験は成立とした。

1. 陰性対照及び陽性対照の復帰変異コロニー数の平均値が背景データ（添付資料）の変動範囲内であること。変動範囲を外れる場合にあっては、背景データとの比較から偶発的な要因によるものと考えられること。
2. 陽性対照の復帰変異コロニー数の平均値が陰性対照の復帰変異コロニー数の平均値の 2 倍以上を示す。
3. 無菌試験の結果、雑菌による汚染が無い。
4. 計測値に欠落がない。

#### 16. 結果の表示

菌株ごとの被験物質の各用量、陰性及び陽性対照において計測した最少グルコース寒天平板培地ごとの実数値を表示し、用量あたりの復帰変異コロニー数の平均値も併せて表示した。さらに、菌株ごとの被験物質の用量と復帰変異コロニー数の用量反応曲線を図示した。

#### 17. 統計学的処理

統計学的処理は行わなかった。

#### 18. 判定基準

被験物質液処理の復帰変異コロニー数を陰性対照の復帰変異コロニー数と比較し、用量あたりの復帰変異コロニー数の平均値が背景データの陰性対照の変動範囲の上限を超えるか、かつ、陰性対照の平均値の 2 倍以上に増加しその増加に用量反応性及び再現性が認められた場合に陽性と判定した。

#### 19. 結果及び考察

2-メチル-3-(3, 4-ジオキシフェニル)-1-プロパノールの遺伝子突然変異誘発性を、塩基対置換型変異株の *S. typhimurium* TA100, TA1535, *E. coli* WP2 *uvrA* 及びフレームシフト型変異株の *S. typhimurium* TA98, TA1537 を用い、37°C、20 分間のプレインキュベーション法により検討した。試験は、代謝活性化非存在下及び代謝活性化存在下の用量設定試験及び本試験により実施し、用量設定試験及び本試験での試験結果の再現性を確認した。また、代謝活性化存在下の

*S. typhimurium* TA1535については、確認試験を実施し試験結果の再現性を確認した。用量設定試験の結果を別表1及び図1に、本試験の結果を別表2及び図2に、確認試験の結果を別表3,4及び図3,4に示す。

用量設定試験における代謝活性化存在下の*S. typhimurium* TA1535の4.88 µg/plateの用量で認められた陰性対照の平均値の2倍以上の増加は、その復帰変異コロニー数の平均値が背景データから算出した基準値の範囲内であったこと、確認試験においても復帰変異コロニー数を用量反応的に増加させず、陰性対照と比較して復帰変異コロニー数の2倍以上の増加も示さなかつたことから、偶発的な要因によるものと判断した。

本被験物質は、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復帰変異コロニー数を用量反応的に増加させず、陰性対照と比較して復帰変異コロニー数の2倍以上の増加も示さなかつた。また、用量設定試験、本試験及び確認試験において、試験結果に再現性も得られた。一方、陽性対照は、代謝活性化の有無にかかわらずすべての菌株に対して、復帰変異コロニー数を陰性対照の2倍以上に増加させた。陰性対照及び陽性対照の平均値は、用量設定試験、本試験及び確認試験のいずれにおいても背景データから算出した変動範囲の範囲内であった。また、無菌試験の結果、雑菌の混入がないことが確認された。これらの結果は、試験が適切に実施されたことを示す。

以上の結果より、本試験条件下において本被験物質の遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定する。

なお、本被験物質は、代謝活性化非存在下の*S. typhimurium* TA100, TA1535, TA98, 及びTA1537に対して625 µg/plate以上、他の菌株に対して1250 µg/plate以上の用量で生育阻害を示した。一方、本被験物質の析出は代謝活性化の有無にかかわらずいずれの用量段階においても観察されなかつた。

## 20. 試験の信頼性に影響をおよぼした要素

該当する事項はなかつた。

別表1

## 試験結果表(用量設定試験)

被験物質の名称: 2-メチル-3-(3, 4-ジオキシフェニル)-プロパナール

試験番号17K5238G

試験実施期間		2017年12月4日より2017年12月7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	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
-S9 mix	陰性対照	109 94	14 9	37 33	17 31	9 12
	4.88	98 86	11 10	32 30	22 12	10 9
	19.5	110 114	15 9	33 33	26 22	7 7
	78.1	103 85	13 12	34 30	24 17	9 7
	313	81 96	9 13	36 25	13 14	8 8
	1250	0 * 0 *	4 * 7 *	15 * 6 *	13 * 0 *	0 * 0 *
	5000	0 * 0 *	0 * 0 *	0 * 6 *	0 * 0 *	0 * 0 *
	陰性対照	103 122	8 10	32 37	36 37	14 16
+ S9 mix	4.88	120 109	16 20	39 30	42 26	15 15
	19.5	123 126	11 16	27 40	38 28	13 12
	78.1	158 105	15 15	50 29	28 29	11 14
	313	121 130	12 16	45 47	28 35	12 10
	1250	0 * 0 *	0 * 0 *	11 * 11 *	12 * 7 *	0 * 0 *
	5000	0 * 0 *	0 * 0 *	0 * 0 *	0 * 0 *	0 * 0 *
	陰性対照	AF-2	AZI	AF-2	AF-2	9AA
	S9 mixを 必要とし ないもの	用 量 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	0.01	0.5	0.01	0.1
陽性 対 照	S9 mixを 必要とす るもの	コロニー数/ プレート	514 525	593 610	148 156	477 490
	S9 mixを 必要とす るもの	名 称	2AA	2AA	2AA	2AA
	S9 mixを 必要とす るもの	用 量 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	1.0	2.0	10.0	0.5
	S9 mixを 必要とす るもの	コロニー数/ プレート	1364 1450	504 510	1177 1165	595 574

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, AZI: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene  
 陰性対照: ジメチルスルホキシド

( ): 平均値

\*: 生育阻害

別表2

## 試験結果表(本試験)

被験物質の名称: 2-メチル-3-(3, 4-ジオキシフェニル)-プロパナール

試験番号17K5238G

試験実施期間		2017年12月18日より2017年12月21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	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
-S9 mix	陰性対照	138 114	12 14	31 19	24 27	12 11
	39.1	145 132	13 14	19 20	17 11	6 10
	78.1	134 118	11 9	28 24	16 22	7 13
	156	135 119	14 7	27 24	19 23	12 10
	313	123 121	11 12	23 30	10 16	17 14
	625	83 * 61 *	6 * 3 *	26 27	14 * 12 *	3 * 7 *
	1250	0 * 0 *	0 * 0 *	0 * 0 *	0 * 0 *	0 * 0 *
	陰性対照	132 145	9 11	18 23	38 22	18 17
+ S9 mix	39.1	158 150	12 15	19 19	28 25	18 16
	78.1	145 113	10 8	27 27	35 34	13 18
	156	135 145	15 12	33 30	31 33	18 16
	313	138 144	10 9	36 40	31 25	19 13
	625	128 116	10 9	31 33	34 29	10 7
	1250	0 * 0 *	0 * 0 *	18 * 21 *	27 * 24 *	0 * 0 *
	陰性対照	132 145	9 11	18 23	38 22	18 17
	陰性対照	132 145	9 11	18 23	38 22	18 17
陽性 対照	S9 mixを 必要とし ないもの	名 称	AF-2	AZI	AF-2	AF-2
	S9 mixを 必要とし ないもの	用 量 (μg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1
	S9 mixを 必要とし ないもの	コロニー数/ プレート	571 609	(590) 683	(694) 131	(495) 471
陽性 対照	S9 mixを 必要とす るもの	名 称	2AA	2AA	2AA	2AA
	S9 mixを 必要とす るもの	用 量 (μg/プレート)	1.0	2.0	10.0	0.5
	S9 mixを 必要とす るもの	コロニー数/ プレート	1465 1564	(1515) 499	(527) 1528	(573) 569

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, AZI: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

陰性対照: ジメチルスルホキシド

( ): 平均値

\*: 生育阻害

別表3

## 試験結果表(確認試験1)

2-メチル-3-(3,4-ジオキシ  
被験物質の名称: フェニル)一プロパナール

試験番号17K5238G

試験実施期間		2018年1月9日より 2018年1月12日	
代謝活性化系 の有無	被験物質の 用 量 ( $\mu\text{g}$ /プレート)	復 帰 変 異 数 (コロニー数/プレート)	
		塩基対置換型	
		TA1535	
-S9 mix	陰性対照	10 7	( 9)
+ S9 mix	陰性対照	10 16	( 13)
	1.22	15 9	( 12)
	2.44	12 11	( 12)
	4.88	8 6	( 7)
	9.77	10 13	( 12)
	19.5	10 5	( 8)
陽 性 対 照	S9 mixを 必要とし ないもの	名 称 用 量 ( $\mu\text{g}$ /プレート)	AZI 0.5
		コロニー数/ プレート	501 (517) 532
	S9 mixを 必要とす るもの	名 称 用 量 ( $\mu\text{g}$ /プレート)	2AA 2.0
		コロニー数/ プレート	350 (359) 368

AZI: Sodium azide, 2AA: 2-Aminoanthracene

陰性対照: ジメチルスルホキシド

( ): 平均値

別表4

## 試験結果表(確認試験2)

2-メチル-3-(3,4-ジオキシ  
被験物質の名称: フェニル)一プロパナール

試験番号17K5238G

試験実施期間		2018年1月15日より 2018年1月18日	
代謝活性化系 の有無	被験物質の 用 量 ( $\mu\text{g}$ /プレート)	復 帰 変 異 数 (コロニー数/プレート)	
		塩基対置換型	
		TA1535	
-S9 mix	陰性対照	13 12	( 13)
+ S9 mix	陰性対照	12 10	( 11)
	1.22	8 9	( 9)
	2.44	10 13	( 12)
	4.88	12 8	( 10)
	9.77	13 12	( 13)
	19.5	11 11	( 11)
陽 性	S9 mixを 必要とし ないもの	名 称	AZI
		用 量 ( $\mu\text{g}$ /プレート)	0.5
		コロニー数/ プレート	537 (589) 640
対 照	S9 mixを 必要とす るもの	名 称	2AA
		用 量 ( $\mu\text{g}$ /プレート)	2.0
		コロニー数/ プレート	446 (437) 428

AZI: Sodium azide, 2AA: 2-Aminoanthracene

陰性対照: ジメチルスルホキシド

( ): 平均値

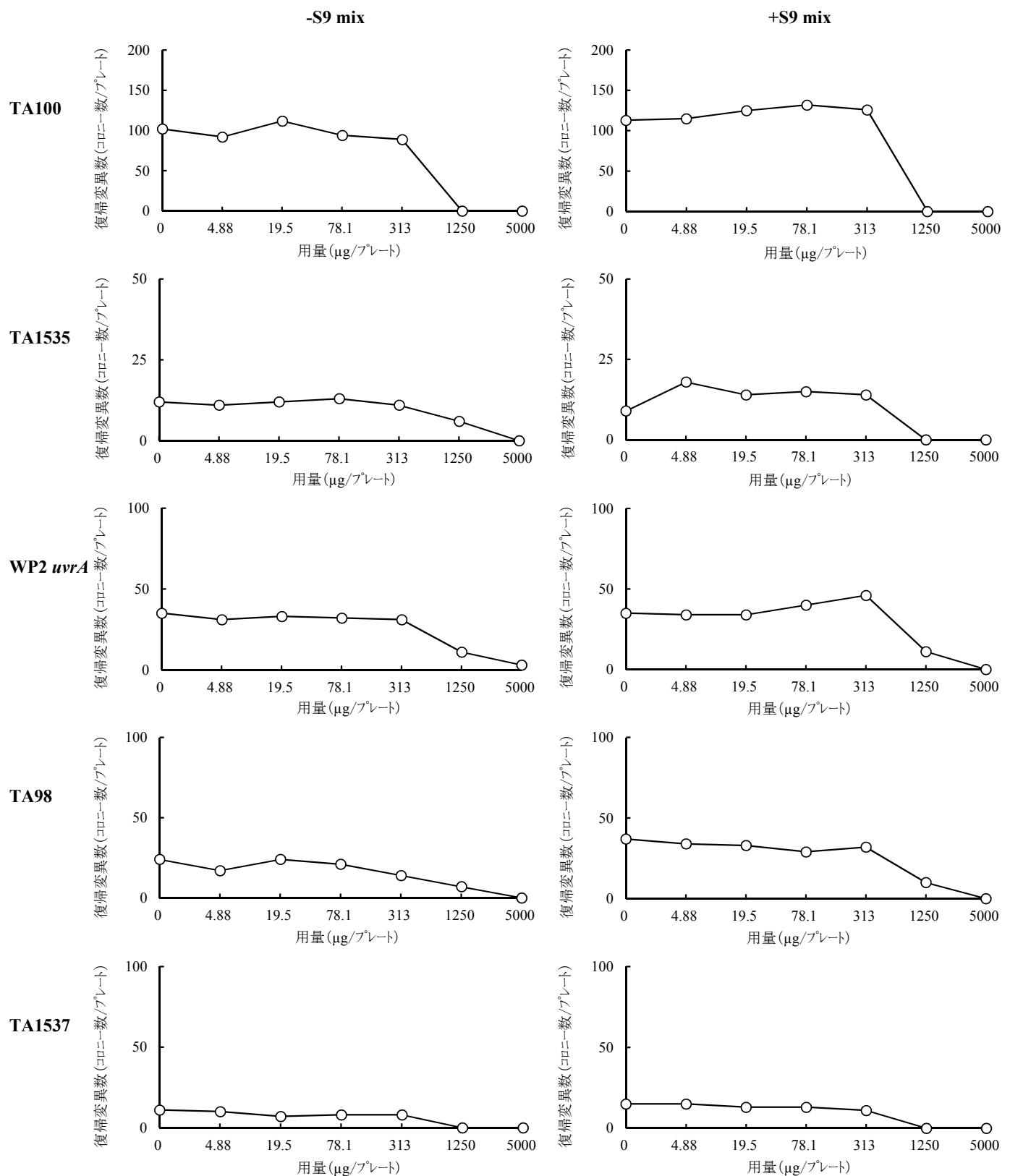


図1 用量反応曲線(試験番号17K5238G, 用量設定試験)

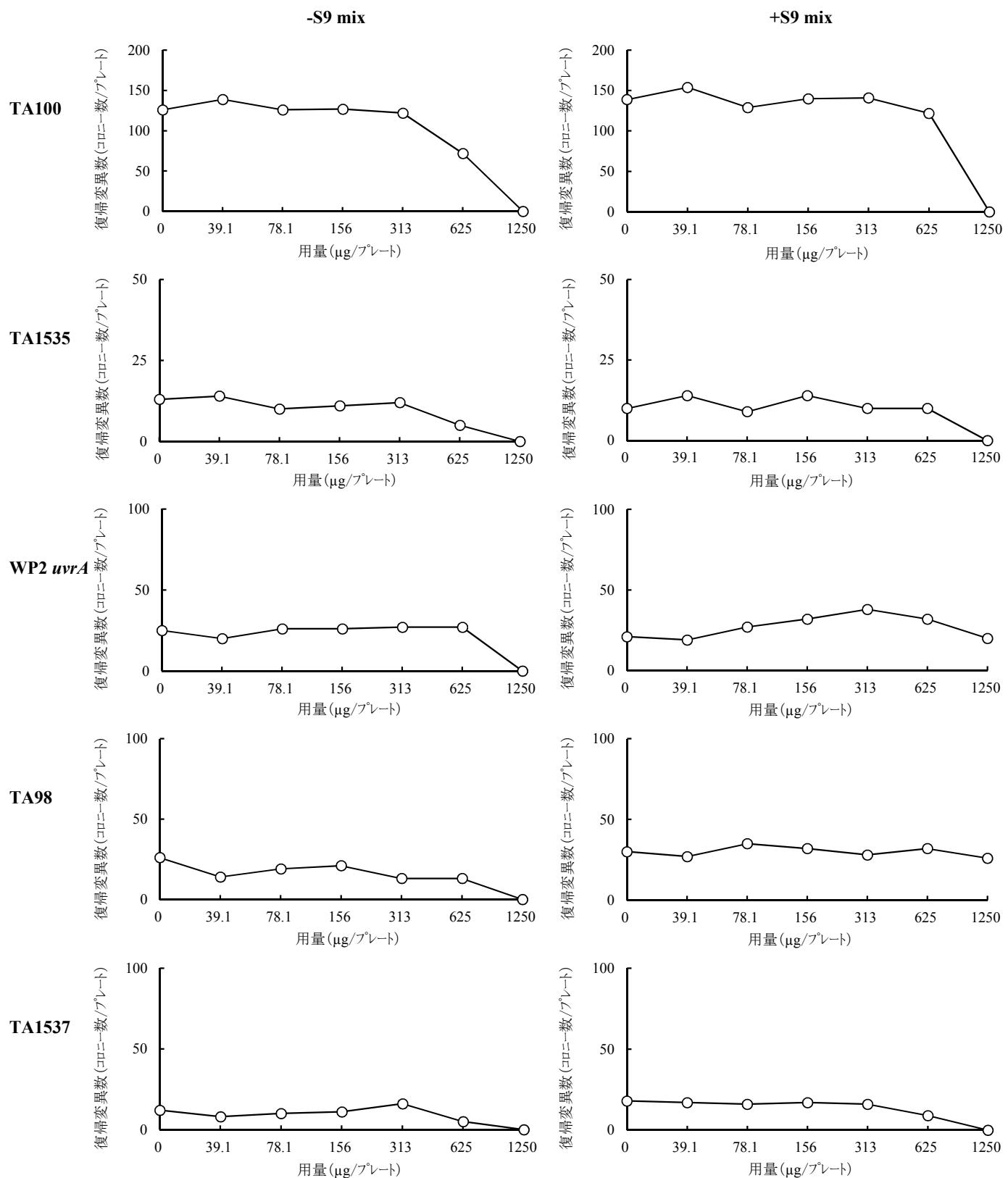


図2 用量反応曲線(試験番号17K5238G, 本試験)

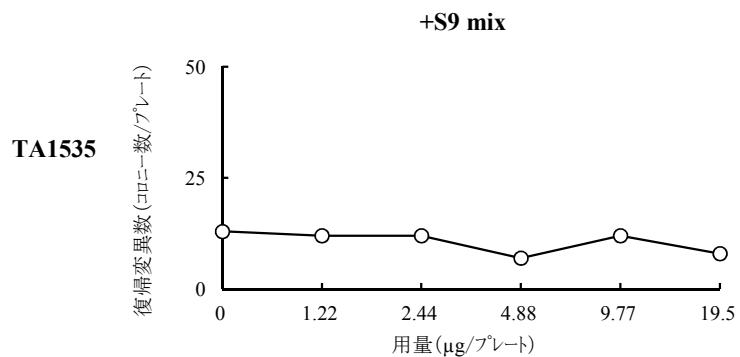


図3 用量反応曲線(試験番号17K5238G, 確認試験1)

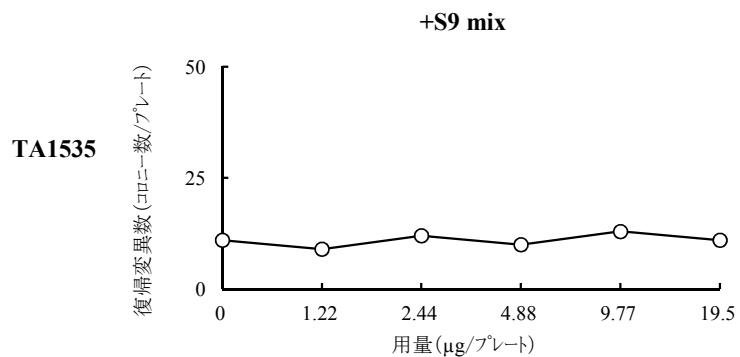


図4 用量反応曲線(試験番号17K5238G, 確認試験2)

添付資料

陰性対照値及び陽性対照値の背景データから算出した基準値

データ集計期間：2016年4月～2017年3月 (WP2 *uvrA*, TA98については2016年6月～2017年3月)  
(TA100については2017年5月～2017年6月)

菌株の保存ロット番号：  
*S. typhimurium* TA100 170427  
*S. typhimurium* TA1535 150730, 160625  
*E. coli* WP2 *uvrA* 160630  
*S. typhimurium* TA98 160627  
*S. typhimurium* TA1537 150709, 160630

陰性対照値

菌株名	S9 mix	背景データ					変動範囲
		データ数	最小値	最大値	平均値	標準偏差	
TA100	—	55	93	162	126	13.9	84 - 168
	+	55	103	181	143	17.8	90 - 196
TA1535	—	967	5	21	11	2.8	3 - 19
	+	951	4	24	11	2.8	3 - 19
WP2 <i>uvrA</i>	—	499	12	43	25	5.3	9 - 41
	+	493	15	49	29	5.8	12 - 46
TA98	—	571	10	49	23	5.5	7 - 40
	+	572	17	51	33	6.5	14 - 53
TA1537	—	944	2	18	9	2.4	2 - 16
	+	943	3	22	13	2.6	5 - 21

陽性対照値

菌株名	陽性対照物質 及び用量 ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	S9 mix	背景データ					変動範囲
			データ数	最小値	最大値	平均値	標準偏差	
TA100	AF-2:0.01	—	50	465	782	634	62.1	448 - 820
	2AA : 1.0	+	50	1053	1657	1345	141.9	919 - 1771
TA1535	AZI : 0.5	—	305	380	672	541	54.0	379 - 703
	2AA : 2.0	+	305	218	576	432	48.2	287 - 577
WP2 <i>uvrA</i>	AF-2:0.01	—	188	71	184	111	18.5	56 - 167
	2AA : 10.0	+	185	684	1333	1028	145.7	591 - 1465
TA98	AF-2: 0.1	—	186	174	534	330	62.0	144 - 516
	2AA : 0.5	+	188	305	667	501	67.5	299 - 704
TA1537	9AA : 80.0	—	296	116	553	268	71.3	54 - 482
	2AA : 2.0	+	291	127	365	217	40.6	95 - 339

菌株ごとに平均値 (M) 及び標準偏差 (S.D.) を算出し、変動範囲 ( $M \pm 3S.D.$ ) を設定した。変動範囲の下限値が 0 以下になった場合は、背景データのコロニー数の最小値を下限値とした。陽性対照値の変動範囲の下限値が陰性対照の変動範囲の上限以下になった場合は、陽性対照値の最小値を下限値とした。

## 信頼性保証陳述書

試験表題：2-メチル-3-(3, 4-ジオキシフェニル)-プロパナールの細菌を用いる  
復帰突然変異試験

試験番号：17K5238G

標記試験は下記 GLP を適用して実施され、最終報告書に試験の実施方法が正確に記載され、  
かつ生データが正確に反映されていることを確認した。

信頼性保証部門による調査及び報告は、下表の日程で実施した。

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／環保企発第  
110331010 号)

調査項目	調査日	試験責任者 報告日	運営管理者 報告日
試験計画書	2017 年 11 月 30 日	2017 年 11 月 30 日	2017 年 11 月 30 日
被験物質の配布・秤量	2017 年 12 月 4 日	2017 年 12 月 7 日	2017 年 12 月 7 日
前培養/検体調製 /検体と菌の混合・培養	2017 年 12 月 5 日	2017 年 12 月 7 日	2017 年 12 月 7 日
観察及びコロニー数の計測	2017 年 12 月 7 日	2017 年 12 月 7 日	2017 年 12 月 7 日
報告書第 1 稿及び生データ	2018 年 2 月 2 日	2018 年 2 月 2 日	2018 年 2 月 2 日
最終報告書	2018 年 2 月 20 日	2018 年 2 月 20 日	2018 年 2 月 20 日

(信頼性保証部門責任者)



2018 年 2 月 20 日

シミックファーマサイエンス株式会社 シミックバイオリサーチセンター