

# 最終報告書

トランスジェニックマウスを用いる 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid の遺伝子突然変異試験

試験番号 : E437 ( 115-229 )

平成 25 年 6 月 14 日

試験委託者  
厚生労働省

公益財団法人食料衛生安全評価センター

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 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid の遺伝子突然  
変異試験

試験番号： E437 ( 115-229 )

試験責任者：



平成 25 年 6 月 14 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.....	6
1. 表題.....	7
2. 試験目的.....	7
3. 遵守した GLP と動物実験関連規則，遺伝子組換え生物等関連規則および準拠した ガイドライン.....	7
4. 試験番号.....	7
5. 試験施設.....	8
6. 試験委託者.....	8
7. 試験責任者.....	8
8. 被験物質等管理責任者.....	8
9. 分担責任者.....	8
10. 試験日程.....	8
11. 被験物質.....	9
12. 対照物質.....	11
13. 試験材料および方法.....	12
14. 試験成立条件.....	29
15. 結果.....	29
16. 考察および結論.....	32
17. 参考文献.....	33
18. 試験関係資料の保存.....	33
19. 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.....	34

Tables

Table 1	Induction of mutation ( <i>gpt</i> assay) in liver of transgenic mice treated with 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	35
Table 2	Induction of mutation ( <i>gpt</i> assay) in bone marrow of transgenic mice treated with 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	36
Table 3	Induction of mutation ( <i>gpt</i> assay) in stomach of transgenic mice treated with 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	37

Table 4	Induction of mutation ( <i>gpt</i> assay) in testis of transgenic mice treated with 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	38
Table 5	Induction of mutation ( <i>Spi</i> <sup>-</sup> assay) in liver of transgenic mice treated with 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	39
Table 6	Induction of mutation ( <i>Spi</i> <sup>-</sup> assay) in bone marrow of transgenic mice treated with 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	40
Table 7	Induction of mutation ( <i>Spi</i> <sup>-</sup> assay) in stomach of transgenic mice treated with 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	41
Table 8	Induction of mutation ( <i>Spi</i> <sup>-</sup> assay) in testis of transgenic mice treated with 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	42
Appendices		
Appendix 1	Body weight in the gene mutation assay of 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	43
Appendix 2	Clinical observations in the gene mutation assay of 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	45
Appendix 3	Organ weight in the gene mutation assay of 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	52
Appendix 4	Individual gross findings on 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid -treated transgenic mice for the gene mutation assay [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....	54
Reference data 1	試験成績書 .....	60
Reference data 2	試験成績書 (被験物質の安定性分析結果) .....	62
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

2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid 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、胃 (腺胃) 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/gam*) を検討した。

予備試験【試験番号 E436 ( 115-228 )】<sup>1)</sup>の結果を基に、最大耐量付近と考えられる 700 mg/kg を最高用量とし、以下 500, 250 および 125 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、胃 (腺胃) 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頻度を求めた。なお、700 mg/kg において 6 例中 3 例の死亡が認められたため、500, 250 および 125 mg/kg の 3 用量を評価対象とした。

その結果、2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid 投与群の肝臓、骨髄、胃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。

陽性対照のエチルニトロソウレア (ENU) 腹腔内投与群 (100 mg/kg) では、肝臓、骨髄および胃で *gpt* assay による遺伝子突然変異頻度が上昇しており、遺伝子突然変異頻度は陰性対照と比較して統計学的に有意 ( $p \leq 0.05$ ) な増加を示した。また、*Spi* assay が適切に行われたか否かを確認するため、*Spi* assay で陽性であることが確認された別試験の肝臓を陽性対照として用いて *Spi* assay を実施した結果、遺伝子突然変異頻度は陰性対照群に比べて統計学的に有意な増加 ( $p \leq 0.05$ ) 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、2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid 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 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid 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/gam*) .

3. 遵守したGLPと動物実験関連規則, 遺伝子組換え生物等関連規則および準拠したガイドライン

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) 動物実験関連規則

動物の飼育および動物の取り扱いについては, 「動物の愛護及び管理に関する法律」, 「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」 および当該施設の「動物実験に関する指針」を遵守し, 動物を適正に使用した (安評センター動物実験倫理委員会承認番号 12-0267A) .

遺伝子組換え生物等関連規則

遺伝子組換え生物等の取り扱いについては, 「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」および当該施設の「遺伝子組換え生物等の使用等に関する安全管理規程」を遵守し, 遺伝子組換え生物等を適正に使用した (安評センター組換え DNA 実験安全委員会承認番号 76) .

ガイドライン等

- OECD Guideline for the Testing of Chemicals 488 (28 July 2011: Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays)
- Environmental Health Criteria 233 (United Nations WHO 2006; Transgenic Animal Mutagenicity Assays)

4. 試験番号

E437 ( 115-229 )

5. 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

6. 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

7. 試験責任者

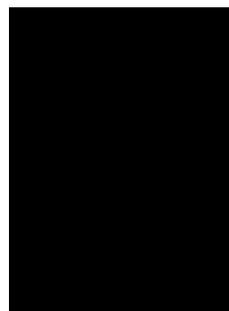
  
公益財団法人食品農医薬品安全性評価センター  
〒437-1213 静岡県磐田市塩新田 582 番地 2  
Tel: 0538-58-1291 Fax: 0538-58-1368  


8. 被験物質等管理責任者



9. 分担責任者

変異原性実験：  
検疫：  
被験物質液調製：  
被験物質液の分析：  
飼育管理：  
病理学検査：



10. 試験日程

試験開始日：	平成 24 年 12 月 25 日
実験開始日：	平成 25 年 1 月 16 日
動物入荷日：	平成 25 年 1 月 9 日
被験物質液調製日：	平成 25 年 1 月 15, 22, 29 日および 2 月 5 日
被験物質液の濃度測定日：	平成 25 年 1 月 15 日および 2 月 5 日

《陰性対照群, 被験物質群》

投与開始日 (Day 1) : 平成 25 年 1 月 16 日

投与終了日 (Day 28) : 平成 25 年 2 月 12 日

標的器官 (臓器) 摘出日 (Day 31) : 平成 25 年 2 月 15 日

《陽性対照群》

投与日 (Day 2, Day 3) : 平成 25 年 1 月 17, 18 日

標的器官 (臓器) 摘出日 (Day 13) : 平成 25 年 1 月 28 日

アッセイ終了日 : 平成 25 年 3 月 29 日

実験終了日 : 平成 25 年 3 月 29 日

試験終了日 : 平成 25 年 6 月 14 日

## 11. 被験物質

### 11.1. 被験物質名

2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid

(和名 : 2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸)

### 11.2. ロット番号

HAM01

### 11.3. 純度 (中和滴定)

96.2% (無水物換算, 硫酸分差引き後) (Reference data 1)

### 11.4. その他の成分

水 (H<sub>2</sub>O) : 17.5%

硫酸塩 (SO<sub>4</sub>) : 2.7%

### 11.5. 製造元

XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

### 11.6. 保存条件

遮光, 気密, 冷所 (基準値 : 1~15°C)

### 11.7. 保存場所

被験物質調製室, 冷蔵保管庫

- プレハブ低温庫 ch. 73

保存期間 : 2012 年 10 月 2 日 ~ 2013 年 1 月 11 日 (受領日 ~ 試験責任者への配布日)

実測値 : 8.0 ~ 11.8°C

電気年次点検作業のため, 2012 年 12 月 9 日 9 : 30 ~ 14 : 00 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：8～11°C, 2012年12月9日8:22～12月10日10:21)

● バイオマルチクーラー ch. 41

保存期間：2013年1月11日～2月5日(試験責任者受領日～最終使用日)

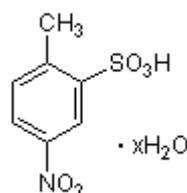
実測値：4.6～6.3°C

温度集中管理システムのOSに一時的な高負荷がかかったことにより、温度データの書き込み処理が停止し、2013年1月18日3:40～21日8:30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：4.3～5.6°C, 2013年1月18日3:32～1月21日8:32).]

11.8. CAS No.

121-03-9

11.9. 化学構造



11.10. 分子式

C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>5</sub>S · xH<sub>2</sub>O

11.11. 分子量

217.20 (無水物として)

11.12. 物質の状態

固体

11.13. 融点

135°C

11.14. 溶解性

水, アルコール, エーテルおよびクロロホルムに可溶

11.15. 安定性

実験終了後に残余被験物質を製造元に返却し、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)。

**11.16. 取り扱い上の注意**

マスクおよび手袋を着用する。

**11.17. 残余被験物質の処理**

実験終了後、残余被験物質の一部 (2 g) 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、残りを被験物質等管理責任者へ返却した。

**12. 対照物質**

**12.1. 陰性対照物質**

被験物質液調製に溶媒として使用する注射用水を陰性対照物質に選択した。

12.1.1. 対照物質名

日本薬局方注射用水 (大塚蒸留水)

12.1.2. ロット番号

2E80N

12.1.3. 製造元

株式会社大塚製薬工場

12.1.4. 保存条件

室温 (基準値 : 1~30°C)

12.1.5. 保存場所

被験物質調製室

**12.2. 陽性対照**

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。

12.2.1. 対照物質名

エチルニトロソウレア (ENU)

12.2.2. ロット番号

4-RFS-48-2

12.2.3. 製造元

Toronto Research Chemicals Inc.

12.2.4. 保存条件

冷凍 (基準値 : -30~-5°C)

12.2.5. 保存場所

被験物質調製室, 冷凍保管庫

### 13. 試験材料および方法

TG 試験で使用する動物が *gpt delta* トランスジェニックマウスであることから、PIA レベルの拡散防止処置とした。

#### 13.1. 試験動物

##### 13.1.1. 種

マウス (*gpt delta* トランスジェニックマウス)

##### 13.1.2. 系統

C57BL/6JmsSlc-Tg (*gpt delta*)

##### 13.1.3. 生産場

日本エスエルシー株式会社

##### 13.1.4. 週齢および体重

購入時：9 週齢

群分け時：10 週齢 (体重 23.5～28.3 g)

##### 13.1.5. 購入動物数

雄 38 匹

##### 13.1.6. 使用動物数

雄 36 匹

##### 13.1.7. 種・系統選択理由

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。

#### 13.2. 飼育管理

##### 13.2.1. 飼育環境

バリアシステムの 7-208 号飼育室 (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、次のとおりとした。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：22.9～23.1°C]

湿度 35～70%RH [実測値：49.8～58.2%RH]

換気回数 12 回以上/h

空気差圧 +30 Pa 以上 (扉閉鎖時)

照明 12 時間 (午前 7 時点灯, 午後 7 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。飼育ケージは約 2 週間に 1 回、給餌器は週 1 回の頻度で交換した。

#### 13.2.2. 飼料

放射線滅菌固型飼料 (CRF-1, Lot No. 120705, 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-12-JP-002736-02) 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。

#### 13.2.3. 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 2012 年 10 月に株式会社エコプロ・リサーチで行い、2012 年 12 月、2013 年 1 および 2 月に安評センターで細菌検査 (一般細菌および大腸菌検査) を実施した。検査結果 (水質検査: 第 126014-3 号, 細菌検査: 第 GT12-12 号, 第 GT13-01 号および第 GT13-02 号) については、上水道水質基準の基準値内であることおよび細菌が検出されていないことを確認した。

### 13.3. 検疫・馴化

搬入後、動物の一般状態および体重の推移を観察し、試験環境に馴化させた。1 日 1 回、7 日間一般状態を観察し、搬入日 (Day -7) および検疫・馴化期間終了日 (Day 1) に体重を測定した。なお、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 M006 および M008 の動物は搬入時に比較し体重が低値を示したため、群分けから除外した。

### 13.4. 群分け

群分けは、Day 1 に測定した体重を基に、LATOX-F/V5 (FFC) システムを用いて行った。余剰動物については、別の試験【試験番号: E642 ( 000-139 )】に移管した。

### 13.5. 個体識別

動物入荷時に通し番号 (仮動物番号) を割り当て、検疫・馴化期間中は個体別飼育ケージに仮動物番号カードを付け、油性インクで動物の尾部に仮動物番号を記入し個体の識別を行った。さらに、検疫・馴化期間中に、動物の耳介に仮動物番号を入墨した。

群分け後は、試験番号、飼育室番号、試験群、仮動物番号および個体識別番号を明記した個体識別カード (ID カード) を飼育ケージに付して識別した。

### 13.6. ゲノム DNA 抽出試薬の調製

#### 13.6.1. ダウンス緩衝液

以下の割合で調製した。

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (関東化学)	1.75	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (関東化学)	0.25	g
NaCl (関東化学)	8	g
KCl (関東化学)	0.2	g
0.5 mol/L EDTA [pH 8.0] (Lot No. 01572B, ニッポンジーン)	20	mL
調製量	1000	mL

ビーカーに調製量の 8 割程度の超純水を入れ、スターラーで攪拌しながら上記の試薬を添加した。溶解後 1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を用いて pH を 8.0 に調整し、超純水を用いて定容した。その後オートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌し、室温 (基準値 : 1~30°C) で保存した。

13.6.2. RNase A 含有ダウンス緩衝液

以下の割合で調製した。

ダウンス緩衝液	100	mL
RNase 溶液 (10 mg/mL, Lot No. 91002J, ニッポンジーン)	2.0	mL

用時調製した。

13.6.3. 0.5 mol/L ショ糖溶液

以下の割合で調製した。

ショ糖 (M.W. = 342.30, 関東化学)	17.1	g
ダウンス緩衝液	100	mL

フィルター (孔径 0.2 μm) ろ過除菌後、冷蔵 (基準値 : 1~9°C) 保存した。

13.6.4. 組織破碎用緩衝液

以下の割合で調製した。

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 (10 mg/mL)	2	mL

用時調製した。

13.6.5. 10 w/v% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) 溶液

以下の割合で調製した。

SDS (Lot No. WEH8904, 和光純薬工業)	10	g
遺伝子工学用滅菌水 (Lot No. 02712B, ニッポンジーン)	100	mL

フィルター (孔径 0.2 μm) ろ過除菌後、室温 (基準値 : 1~30°C) 保存した。

13.6.6. プロテナーゼ K 溶液

以下の割合で調製した.

プロテナーゼ K (Lot No. LAM2357, 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. 01572B, 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.

13.6.7. フェノール/クロロホルム (Ph/Cl) 混液

以下の割合で調製した.

クロロホルム (Lot No. 412N1079, 関東化学)	100	mL
TE 飽和フェノール (Lot No. 08152L または 08102J, ニッポンジーン)	100	mL

用時調製した.

13.7. 培地および培養液等の調製

13.7.1. LB 培養液

以下の割合で調製した.

Bacto tryptone (Lot No. 1285257, BD Diagnostic)	10	g
Bacto yeast extract (Lot No. 1105209, BD Diagnostic)	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 (基準値: 1~9°C) 保存した.

3 ヶ月以内に使用した.

13.7.2. SM 緩衝液

以下の割合で調製した.

NaCl	5.84	g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> 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
調製量	1000	mL

ビーカーに超純水を適量入れ, スターラーで攪拌しながら上記の試薬を添加した. 溶

解後，超純水で調製量に定容した．オートクレーブ（121°C，20分）で滅菌した後，室温（基準値：1～30°C）で保存した．

13.7.3. 200 mg/mL マルトース水溶液

以下の割合で調製した．

マルトース一水和物（和光純薬工業）	20	g
調製量	100	mL

ビーカーに調製量の8割程度の超純水を入れ，スターラーで攪拌しながら上記の試薬を添加した．溶解後，超純水で調製量に定容した．フィルター（孔径0.2 μm）ろ過除菌後，冷蔵（基準値：1～9°C）保存した．

13.7.4. 5 × M9 salt

以下の割合で調製した．

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	33.9	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15.0	g
NaCl	2.50	g
NH <sub>4</sub> Cl（和光純薬工業）	5.00	g
調製量	1000	mL

ビーカーに超純水を適量入れ，スターラーで攪拌しながら，各試薬を少量ずつ添加した．溶解後，超純水を用いて定容した．オートクレーブ（121°C，20分）で滅菌した後，冷蔵（基準値：1～9°C）保存した．

13.7.5. 50 w/v%グリセロール

以下の割合で調製した．

グリセリン（1.260 g/mL，和光純薬工業）	39.7	mL
調製量	100	mL

ビーカーに超純水を適量入れ，スターラーで攪拌しながら少しずつグリセリンを添加した．溶解後，超純水を用いて定容した．オートクレーブ（121°C，20分）で滅菌した後，冷蔵（基準値：1～9°C）保存した．

13.7.6. 1 mol/L 硫酸マグネシウム水溶液

以下の割合で調製した．

MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	24.6	g
調製量	100	mL

ビーカーに調製量の8割程度の超純水を入れ，スターラーで攪拌しながら MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O を添加した．溶解後，超純水で調製量に定容した．オートクレーブ（121°C，20分）滅菌後，室温（基準値：1～30°C）保存した．

13.7.7. 1 mol/L 塩化カルシウム水溶液

以下の割合で調製した.

CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O (和光純薬工業)	1.47	g
調製量	10	mL

ビーカーに調製量の8割程度の超純水を入れ, スターラーで攪拌しながら CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O を添加した. 溶解後, 超純水で調製量に定容した. オートクレーブ (121°C, 20分) 滅菌後, 冷蔵 (基準値: 1~9°C) 保存した.

13.7.8. 1 w/v%チアミン水溶液

以下の割合で調製した.

チアミン塩酸塩 (Lot No. WEM3630, 和光純薬工業)	0.1	g
調製量	10	mL

ビーカーに調製量の8割程度の超純水を入れ, スターラーで攪拌しながらチアミン塩酸塩を添加した. 溶解後, 超純水で調製量に定容した. フィルター (孔径 0.2 μm) ろ過除菌後, 冷蔵 (基準値: 1~9°C) 保存した.

13.7.9. 10 mg/mL アミノ酸水溶液

以下の割合で調製した.

L(-)-プロリン (Lot No. PEE2878, 和光純薬工業)	1	g
L-ロイシン (Lot No. CDJ4982, 和光純薬工業)	1	g
L(+)-イソロイシン (Lot No. ALH4672, 和光純薬工業)	1	g
調製量	100	mL

ビーカーに調製量の8割程度の超純水を入れ, スターラーで攪拌しながら各試薬を添加した. 溶解後, 超純水で調製量に定容した. フィルター (孔径 0.2 μm) ろ過除菌後, 冷蔵 (基準値: 1~9°C) 保存した.

13.7.10. 20 mg/mL カナマイシン水溶液

以下の割合で調製した.

カナマイシン硫酸塩 (Lot No. LAR4778, 和光純薬工業)	20	mg
注射用水	1	mL

フィルター (孔径 0.2 μm) ろ過除菌後, 冷凍保存した.

13.7.11. 25 mg/mL クロラムフェニコール (Cm) 溶液

以下の割合で調製した.

クロラムフェニコール (Lot No. LAJ6910, 和光純薬工業)	250	mg
調製量	10	mL

クロラムフェニコールに調製量の 8 割程度のエタノール (関東化学) を加え溶解した。溶解後、エタノールで調製量に定容した。フィルター (孔径 0.2  $\mu\text{m}$ ) をろ過除菌後、冷凍保存した。

13.7.12. 25 mg/mL 6-チオグアニン溶液 (6-TG 溶液)

以下の割合で調製した。

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。

13.7.13. ソフトアガー

以下の割合で調製した。

NaCl	6	g
バクトアガー (Lot No. 2046914, BD Diagnostic)	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 (用時調製) を使用直前に 1 mL 添加した。

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

以下の割合で調製した。

バクトアガー	15	g
超純水	800	mL

上記の試薬を秤量し、所定量の超純水を添加後、スターラーを入れてオートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌した。スターラーの上に 50°C の湯煎を置き、オートクレーブが終了したアガーを保温した。

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

アガーの温度が下がったら、スターラーを用いて攪拌しながら、上記の試薬を添加し

た. シャーレ (直径 90 mm) に寒天培地 25 mL を添加し, 寒天培地が固化した後, プレーンをラックに入れ, 上からアルミホイルを掛けることで遮光し, 室温で保存した.

#### 13.7.15. 1/15 mol/L Na-K 緩衝液

以下の割合で調製した.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7.57	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.82	g
調製量	1000	mL

ビーカーに調製量の 8 割程度の超純水を入れ, スターラーで攪拌しながら各試薬を添加した. 溶解後, 超純水で調製量に定容した. オートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌した後, 室温 (基準値: 1~30°C) で保存した.

#### 13.7.16. λ-trypticase 寒天培地

以下の割合で調製した.

BBL trypticase peptone (Lot No. 1362705, BD Diagnostic)	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 MgSO<sub>4</sub> 10 mL を添加した (最終濃度 10 mmol/L). シャーレ (直径 90 mm) に本寒天培地 25 mL を添加し, 寒天培地が固化した後にプレートをラックに入れ, 冷蔵保存した.

#### 13.7.17. λ-trypticase トップアガー

以下の割合で調製した.

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, 室温で約 60°C まで冷却し, 1 mol/L MgSO<sub>4</sub> 1 mL を添加した (最終濃度 10 mmol/L). 使用時までウォーターバスを用いて 50°C の条件で保温した.

### 13.8. 被験物質液等

#### 13.8.1. 被験物質液の調製

被験物質を注射用水に溶解させた. なお, 被験物質は水および硫酸塩を合計 20.2%含むため, その分を補正して秤量した. 換算係数は 1.253 とした.

被験物質を 2193, 1566, 783 および 392 mg (2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid として 1750, 1250, 625 および 313 mg) 秤量し, それぞれメスシリンダーに移した. 注射用水を加え, 25 mL とすることにより 70.0, 50.0, 25.0 および 12.5 mg/mL 液を準備した. 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: 2.8~8.2°C) にて保存後, それぞれの投与に用いた.

#### 13.8.2. 被験物質液の安定性

外部機関によって実施された「2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸のラットを用いた経口投与による反復投与毒性および生殖発生毒性併合試験」<sup>2)</sup>において, 1~20 w/v% の被験物質液 (溶媒: 注射用水) は, 室温 24 時間保存後および冷蔵 8 日間保存後さらに室温 24 時間保存後に安定であることが確認されている.

#### 13.8.3. 被験物質液の濃度分析

「媒体中 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid の濃度測定法バリデーション: 試験番号 E435 ( 115-227 )」において, 1.0~100 mg/mL の濃度範囲で, 注射用水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, 溶媒から 1 mL を 1 回, 12.5, 25.0, 50.0 および 70.0 mg/mL の被験物質液から 1 mL ずつ 3 回, 無作為に分析試料を採取し, 濃度を測定した. 被験物質液は設定濃度に対して 100.0±10.0%以内であれば, 適切に調製されていると判断した. 溶媒は, 測定を妨害するピークが認められないこと, また, 認められた場合は定量用標準溶液 (設定濃度: 5.0 µg/mL) のピーク面積の 1/10 未満であれば, 被験物質による汚染はないものと判断した.

濃度分析の結果, 溶媒では測定を妨害する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は, 初回調製時で 98.8~102.2%であり, 最終調製時では 101.4~104.0%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.

#### 13.8.4. 残余被験物質液の処分

専用の容器 (安全廃棄システム, NALGENE®) に廃棄した.

#### 13.8.5. 陽性対照物質液の調製

ENU 50 mg を量り, 目盛り付試験管に移した後, 1/15 mol/L リン酸緩衝液 (pH 6) を加えて 5 mL に定容し, 10 mg/mL 液を準備した. 陽性対照物質液は, 用時調製した.

#### 13.8.6. 残余対照物質液の処分

専用の容器 (安全廃棄システム, NALGENE®) に廃棄した.

### 13.9. 対照群

#### 13.9.1. 陰性対照群

被験物質液調製に用いる溶媒である注射用水を使用した。

#### 13.9.2. 陽性対照群

*gpt* assay では、ガイドラインで推奨されている ENU を選択した。用量は文献<sup>3)</sup>により 100 mg/kg とし、すべての臓器（肝臓、大腿骨、胃および精巣）を評価対象とした。*Spi* assay では、2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-*b*]pyridine (PhIP) を 400 ppm 混餌投与され、陽性であることが確認された別試験<sup>4)</sup>の肝臓の DNA を用いた。

### 13.10. トランスジェニック (TG) 試験<sup>5-7)</sup>

#### 13.10.1. 用量

「トランスジェニックマウスを用いる 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid 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 E436」<sup>1)</sup>において、被験物質をマウスに 250, 500, 750 および 1000 mg/kg の用量で 1 週間経口投与した結果、1000 mg/kg 群では Day 2 に 2/3 例、Day 5 に 1/3 例が瀕死状態と判断され、安楽死させた。750 mg/kg 群では Day 1, Day 2 および Day 3 (いずれも投与後 0.5 時間) に異常呼吸音が 1/3 例認められ、また、2/3 例において体重が減少した。500 mg/kg 群以下の投与群では毒性兆候を示す一般状態の変化は認められず、体重の減少も認められなかった。解剖時の肉眼的観察において、750 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。なお、「2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸のラットを用いた経口投与による反復投与毒性および生殖発生毒性併合試験」<sup>2)</sup>において、雄の 700 mg/kg 群では 12 例中死亡例は認められていないが、雌の 700 mg/kg 群では死亡が 1 例および切迫屠殺が 1 例認められている。また、雌雄の 350 および 700 mg/kg 群で被験物質による一般毒性学的影響が認められている。したがって、最大耐量付近と考えられる 700 mg/kg を高用量とし、以下 500, 250 および 125 mg/kg の 4 用量を被験物質群として設定した。

13.10.2. 試験群の構成

試験群	用量 (mg/kg)	動物数		動物番号
		投与匹数	評価匹数	
陰性対照*	0	6	5	1001～1006
被験物質	125	6	5	1101～1106
	250	6	5	1201～1206
	500	6	5	1301～1306
	700	6	5	1401～1406
陽性対照**	100	6	5	1501～1506

\* : 注射用水    \*\* : ENU

13.10.3. 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。700 mg/kg において 3 例死亡が認められたことから、被験物質投与群については 125, 250 および 500 mg/kg の 3 用量を評価対象とした。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、13.10.7.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。

13.10.4. 投与方法および投与回数

被験物質の投与経路は経口とし、ディスポーザブルシリンジおよびテフロン製胃ゾンデを用いて、1 日 1 回、28 日間連続強制投与した。被験物質液の投与液量 (mL) は、体重 100 g 当たり 1 mL とし、13.10.6.の項で測定した最新の体重から求めた。

陽性対照物質の投与は、腹腔内投与とし、25G 注射針を装着したディスポーザブルシリンジを用いて 1 日 1 回、2 日間腹腔内投与した。投与液量は、体重 100 g 当たり 1 mL とし、Day 1 の体重を基に算出した。

13.10.5. 投与期間および発現期間

投与開始日を Day 1 と定め、搬入日 (Day -7) から群分け日 (Day 1) までを検疫・馴化期間、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 2 および 3 に投与し、投与後 10 日 (Day 13) に器官を摘出した。

なお、発現期間は、OECD Guideline for the Testing of Chemicals 488 に準じて設定した。

13.10.6. 体重測定および一般状態観察

Day -7 (動物搬入時), 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, 電子天秤 (XS4001S, メトラー・トレド) を用いて体重を測定した. 陽性対照群については, Day -7 (動物搬入時), 1 (群分け日) および 13 (器官摘出直前) に電子天秤を用いて体重を測定した. また, 死亡動物については, 死亡発見時に体重を測定した.

器官摘出まで, 1日1回以上, 動物の一般状態を観察した.

13.10.7. 器官 (臓器) 摘出, 器官重量測定, 肉眼観察および保存

炭酸ガスを用いて安楽死させた動物から, 肝臓, 大腿骨, 胃および精巣を摘出し, これら器官の肉眼観察を行った. なお, 解剖室の出入り口にはネズミ返しを設置した. また, 摘出した肝臓および精巣の重量を, 電子天秤 (XS603S, メトラー・トレド) を用いて測定し, 記録した. 測定単位は g (小数第2位まで) とした. 器官重量/体重比 (相対重量) を, 剖検日の体重および器官重量から算出した [(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.

肝臓: 左葉の外側辺縁を生検トレパン (BP-50F, 貝印) を用いて 4 ヶ所程度くり抜いた. 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 (LN<sub>2</sub>) 中で凍結させた. 残った左葉およびその他の葉は, ビニール袋に入れ, LN<sub>2</sub> 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, LN<sub>2</sub> で凍結させた.

胃: 噴門部は食道, 幽門部は十二指腸を含めた形で摘出し, 大弯側を切開した後, 内容物を生理食塩液で洗い出した. その後, 粘膜を観察した上で前胃と腺胃に分割した. 腺胃については保存袋に入れ, LN<sub>2</sub> 中で凍結させた.

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, LN<sub>2</sub> 中で凍結させた.

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) 中に保存した.

すべての摘出器官 (臓器) は, 最終報告書作成後まで保存される. 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.

13.10.8. 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: 骨髄が分裂・増殖が盛んな組織であるため.

胃： 経口投与では初期に被験物質と接触する器官であるため、また、本被験物質の反復投与による影響（境界縁の肥厚，腺胃の暗赤色点および糜爛等）が知られているため<sup>2)</sup>。

精巢： 生殖組織への影響を確認するため。

#### 13.10.9. アッセイ対象器官

*Spi* assay は、陰性対照群，被験物質投与群および陽性対照群の肝臓，大腿骨，胃および精巣について実施した。

*Spi* assay は、陰性対照群および被験物質投与群の肝臓，大腿骨，胃および精巣について実施した。陽性対照としては、PhIP を投与された別試験<sup>4)</sup>の肝臓を用いた。

#### 13.10.10. ゲノム DNA の抽出

肝臓，胃および精巣の場合，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し，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）。

これらの核／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。本操作を 2 回繰り返した。ただし，加える Ph/Cl 混液の量は回収した水相と等量とした。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（容量比 24 : 1）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，2500 r/min（1190 G）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。適量（50～150  $\mu$ L）の TE 緩衝液（ニッポンジーン）を加え，一晚室温に放置し，残渣の DNA を溶解させた。調製後は，冷蔵にて保存した。

*Spi* assay の陽性対照は，別試験<sup>4)</sup>の肝臓から抽出した DNA を用いた。

すべての DNA 溶液は、最終報告書作成後 3 ヶ月以内に処分する。

#### 13.10.11. 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, マルトース水溶液 (200 mg/mL) 300  $\mu$ L およびカナマイシン水溶液 (20 mg/mL) 30  $\mu$ L を添加した。これに凍結保存 (設定値:  $-80^{\circ}\text{C}$ ) しておいた大腸菌 YG6020 株を融解した後, 50  $\mu$ 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, マルトース水溶液 (200 mg/mL) 1 mL およびカナマイシン水溶液 (20 mg/mL) 100  $\mu$ 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, 回収した菌液の 1/2 量の LB 培養液 (10 mmol/L 硫酸マグネシウムを含む) で再懸濁した (大腸菌懸濁液)。

#### 13.10.12. 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, これに凍結保存 (設定値:  $-80^{\circ}\text{C}$ ) 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  $\mu$ 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。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 およびマルトース水溶液 (200 mg/mL) 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, 回収した菌液の 1/2 量の LB 培養液 (10 mmol/L 硫酸マグネシウムを含む) をそれぞれ添加し, 再懸濁した (大腸菌懸濁液)。

Confirmation では容量 200 mL のバツフル付三角フラスコ 3 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:  $-80^{\circ}\text{C}$ ) しておいた大腸菌 (XL-1 Blue MRA), 大腸菌 [XL-1 Blue MRA (P2)] および大腸菌 [WL95 (P2)] を融解した後, それぞれ 50  $\mu$ 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, 大腸菌懸濁液とした。

#### 13.10.13. 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  $\mu\text{g}/\text{mL}$  程度の濃度に調製したゲノム DNA 溶液のおよそ 10  $\mu\text{L}$  をチューブ (RED) に加え, ピペッティングにより混合した後, 30 $^{\circ}\text{C}$  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  $\mu\text{L}$  をチューブ (RED) に加え, 同様に混合した。さらに, 30 $^{\circ}\text{C}$  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  $\mu$ L 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。

#### 13.10.14. 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 (セクション用) 小試験管 5 本に 200  $\mu$ L 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  $\mu$ L ずつ分注した。希釈用チューブにパッケージング溶液 5  $\mu$ L 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  $\mu$ L ずつ添加し、ボルテックスミキサーで攪拌した。パッケージング溶液をセクション用小試験管 5 本に約 60  $\mu$ L ずつ添加し、ボルテックスミキサーで攪拌した (5 本目のセ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、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、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。セクション用小試験管に 6TG 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、M9 + Cm + 6TG 寒天培地に全量を重層した。これをセ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。

#### 13.10.15. 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  $\mu$ L 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 (セクション用) 小試験管 2 本に 200  $\mu$ L 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  $\mu$ L ずつ分注した。希釈用チューブにパッケージング溶液 5  $\mu$ L 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  $\mu$ L ずつ添加し、ボルテックスミキサーで攪拌した。パッケージング溶液をセクション用チューブ 2 本に約 150  $\mu$ L ずつ添加し、ボルテックスミキサーでゆるやかに攪拌した (2 本目のセ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クション用チューブに、 $\lambda$ -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、 $\lambda$ -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クション用プレートとした。タイター用およびセ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、動物番号 1101 の精巢は 2 回のパッケージング操作により、その他については 1 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。

13.10.16. 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。

13.10.17. 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、Confirmation を実施するまでの間、セレクション用プレートを冷蔵で保存した。

13.10.18. 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 buffer を 50  $\mu$ 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。爪楊枝の先を 1/15 mol/L Na-K buffer でよく洗った。爪楊枝を 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。

13.10.19. 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  $\mu$ L ずつ分注した。分注した小試験管に、 $\lambda$ -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  $\lambda$ -trypticase 寒天培地に全量を重層した。重層後、プレートを約 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プラークに、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プ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  $\mu$ L ずつ分注した。セレクション用プレートのプ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いた。SM 緩

衝液 50  $\mu\text{L}$  を分注したマイクロチューブにくり抜いた寒天を入れた。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  $\lambda$ -trypticase 寒天培地に Confirmation 液をそれぞれ 1~2  $\mu\text{L}$  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 つのプレート上でプラークを形成したものを変異プラークとした。変異プラークの値は、Confirmation 後の値を用いた。

13.10.20. 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 (N) を計数し、下記の式を用いて総コロニー数を求めた。

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

13.10.21. 突然変異頻度 (Mutant Frequency) の算出 (*gpt* assay)

突然変異頻度は、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頻度を求めた。

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

13.10.22. 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 (N) を計数し、下記の式を用いて総プラーク数を求めた。

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

13.10.23. 突然変異頻度 (Mutant Frequency) の算出 (*Spi* assay)

突然変異頻度は、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頻度を求めた。

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

### 13.11. 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頻度は、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。

### 14. 試験成立条件

陽性対照群の肝臓における突然変異頻度において、陰性対照値と比較して統計学的に有意な増加が認められた場合に、試験は成立したと判断した。

### 15. 結果

#### 15.1. 肝臓

##### 15.1.1. *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頻度の平均値±SD は  $3.33 \pm 1.50 \times 10^{-6}$  ( $2.07 \sim 5.91 \times 10^{-6}$ ) であった。

2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid 投与群での各個体の突然変異頻度の平均値±SD は、低用量の 125 mg/kg 群で  $1.70 \pm 0.71 \times 10^{-6}$ 、中用量の 250 mg/kg 群で  $1.23 \pm 0.67 \times 10^{-6}$ 、高用量の 500 mg/kg 群で  $1.62 \pm 1.04 \times 10^{-6}$  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頻度の平均値±SD は  $11.05 \pm 4.19 \times 10^{-6}$  であり、陰性対照群と比べて統計学的に有意 ( $p \leq 0.05$ ) な増加が認められた。

##### 15.1.2. *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頻度の平均値±SD は  $2.78 \pm 3.19 \times 10^{-6}$  ( $0.00 \sim 7.71 \times 10^{-6}$ ) であった。

2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid 投与群での各個体の突然変異頻度の平均値±SD は、

125 mg/kg 群で  $1.42 \pm 0.98 \times 10^{-6}$ , 250 mg/kg 群で  $2.23 \pm 1.43 \times 10^{-6}$ , 500 mg/kg 群で  $3.04 \pm 2.09 \times 10^{-6}$  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.

陽性対照サンプルにおける各個体の突然変異頻度の平均値 $\pm$ SD は  $23.79 \pm 0.93 \times 10^{-6}$  であり, 陰性対照群と比べて統計学的に有意 ( $p \leq 0.05$ ) な増加が認められた.

## 15.2. 骨髓

### 15.2.1. *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頻度の平均値 $\pm$ SD は  $2.14 \pm 1.41 \times 10^{-6}$  ( $0.99 \sim 4.59 \times 10^{-6}$ ) であった.

2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid 投与群での各個体の突然変異頻度の平均値 $\pm$ SD は, 125 mg/kg 群で  $1.32 \pm 0.51 \times 10^{-6}$ , 250 mg/kg 群で  $1.98 \pm 2.34 \times 10^{-6}$ , 500 mg/kg 群で  $1.86 \pm 0.78 \times 10^{-6}$  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頻度の平均値 $\pm$ SD は  $56.64 \pm 10.84 \times 10^{-6}$  であり, 陰性対照群と比べて統計学的に有意 ( $p \leq 0.05$ ) な増加が認められた.

### 15.2.2. *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頻度の平均値 $\pm$ SD は  $3.15 \pm 3.03 \times 10^{-6}$  ( $0.00 \sim 7.05 \times 10^{-6}$ ) であった.

2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid 投与群での各個体の突然変異頻度の平均値 $\pm$ SD は, 125 mg/kg 群で  $2.57 \pm 1.49 \times 10^{-6}$ , 250 mg/kg 群で  $1.98 \pm 1.78 \times 10^{-6}$ , 500 mg/kg 群で  $1.62 \pm 1.11 \times 10^{-6}$  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.

## 15.3. 胃 (腺胃)

### 15.3.1. *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頻度の平均値 $\pm$ SD は  $1.76 \pm 1.25 \times 10^{-6}$  ( $0.56 \sim 3.35 \times 10^{-6}$ ) であった.

2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid 投与群での各個体の突然変異頻度の平均値 $\pm$ SD は, 125 mg/kg 群で  $1.37 \pm 0.61 \times 10^{-6}$ , 250 mg/kg 群で  $2.35 \pm 0.52 \times 10^{-6}$ , 500 mg/kg 群で  $1.92 \pm 1.12 \times 10^{-6}$  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頻度の平均値 $\pm$ SD は  $56.91 \pm 25.15 \times 10^{-6}$  であり, 陰性対照群と比べて統計学的に有意 ( $p \leq 0.05$ ) な増加が認められた.

15.3.2. Spi assay

試験結果を Table 7 に示す.

陰性対照群における各個体の突然変異頻度の平均値±SD は  $2.70 \pm 2.30 \times 10^{-6}$  ( $0.00 \sim 5.80 \times 10^{-6}$ ) であった.

2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid 投与群での各個体の突然変異頻度の平均値±SD は, 125 mg/kg 群で  $2.28 \pm 2.25 \times 10^{-6}$ , 250 mg/kg 群で  $1.36 \pm 1.89 \times 10^{-6}$ , 500 mg/kg 群で  $4.80 \pm 3.28 \times 10^{-6}$  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.

15.4. 精巢

15.4.1. *gpt* 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頻度の平均値±SD は  $0.93 \pm 0.47 \times 10^{-6}$  ( $0.41 \sim 1.65 \times 10^{-6}$ ) であった.

2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid 投与群での各個体の突然変異頻度の平均値±SD は, 125 mg/kg 群で  $0.87 \pm 0.64 \times 10^{-6}$ , 250 mg/kg 群で  $0.52 \pm 0.22 \times 10^{-6}$ , 500 mg/kg 群で  $0.50 \pm 0.10 \times 10^{-6}$  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頻度の平均値±SD は  $1.50 \pm 0.43 \times 10^{-6}$  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.

15.4.2. Spi assay

試験結果を Table 8 に示す.

陰性対照群における各個体の突然変異頻度の平均値±SD は  $1.04 \pm 1.60 \times 10^{-6}$  ( $0.00 \sim 3.64 \times 10^{-6}$ ) であった.

2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid 投与群での各個体の突然変異頻度の平均値±SD は, 125 mg/kg 群で  $1.96 \pm 1.71 \times 10^{-6}$ , 250 mg/kg 群で  $2.13 \pm 1.51 \times 10^{-6}$ , 500 mg/kg 群で  $1.37 \pm 2.34 \times 10^{-6}$  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.

15.5. 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.

2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid の 700 mg/kg 群では, 3/6 例に自発運動低下, 体温下降あるいは被毛の汚れが認められ, 当該動物は Day 4 または Day 6 に死亡が認められた. 陰性対照群および 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid のその他の投与群では, 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.

15.6. 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 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid 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。

#### 15.7. 解剖時の肉眼所見

試験結果を Appendix 4 に示す。

いずれの 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid 投与群においても、特筆すべき変化は認められなかった。

#### 16. 考察および結論

2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid の肝臓、骨髄、胃（腺胃）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誘発性（レポーター遺伝子：*gpt* および *red/gam*）を実施した。

最大耐量付近と考えられる 700 mg/kg を高用量とし、以下 500, 250 および 125 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、胃（腺胃）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頻度を求めた。なお、700 mg/kg において 6 例中 3 例の死亡が認められたため、500, 250 および 125 mg/kg の 3 用量を評価対象とした。

その結果、2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid 投与群の肝臓、骨髄、胃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。

2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid は、細菌を用いる復帰突然変異試験<sup>8)</sup>において、代謝活性化系の存在下および非存在下で陽性であるが、既知変異原物質と比較して変異原性は非常に弱いものと考えられた。CHL 細胞を用いる染色体異常試験<sup>9)</sup>においては、陰性との報告がある。*gpt delta* マウスでは被験物質が直接的に、かつ大量に暴露される胃（腺胃）ならびに代謝器官である肝臓、その他の器官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。

陽性対照物質のエチルニトロソウレア (ENU) 腹腔内投与群 (100 mg/kg) は、肝臓、骨髄および胃で *gpt assay* による遺伝子突然変異頻度が上昇しており、遺伝子突然変異頻度は陰性対照と比較して統計学的に有意 ( $p \leq 0.05$ ) な増加を示した。

*Spi* assay で陽性結果が出ることが確認された別試験の肝臓を陽性対照として用いて *Spi* assay を実施した結果、遺伝子突然変異頻度は明確な高値を示し、陰性対照群に比べて統計学的に有意な増加 ( $p \leq 0.05$ ) が認められた。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、2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid 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。

#### 17. 参考文献

- 1) [ ] トランスジェニックマウスを用いる 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid の遺伝子突然変異試験－投与量設定のための予備試験－, (公財) 食品農医薬品安全性評価センター
- 2) [ ] 2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸のラットを用いた経口投与による反復投与毒性および生殖発生毒性併合試験, (株) ボゾリサーチセンター 御殿場研究所
- 3) 能美健彦：変異原性試験で何がわかるか：21 世紀の展望, Environ. Mutagen Res., 24 (2002) 75-80.
- 4) K. Masumura, K. Matsui, M. Yamada, M. Horiguchi, K. Ishida, M. Watanabe, O. Ueda, H. Suzuki, Y. Kanke, K.R. Tindall, K. Wakabayashi, T. Sofuni and T. Nohmi, Mutagenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-*b*]pyridine (PhIP) in the new gpt delta transgenic mouse. Cancer Letters 143 (1999) 241-244.
- 5) T. Nohmi, M. Katoh, H. Suzuki, M. Matsui, M. Yamada, M. Watanabe, M. Suzuki, N. Horiya, O. Ueda, T. Shibuya, H. Ikeda and T. Sofuni, A new transgenic mouse mutagenesis test system using Spi<sup>r</sup> and 6-thioguanine selections, Environmental Molecular Mutagenesis 28 (1996) 465-470.
- 6) T. Nohmi, T. Suzuki and K. Masumura, Recent advance in the protocols of transgenic mouse mutation assays, Mutation Research 455 (2000) 191-215.
- 7) V. Thybaud, S. Dean, T. Nohmi, J. de Boer, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.A. Heddle, R.H. Heflich, I. Lambert, H.J. Martus, J.C. Mirsalis, T. Suzuki and N. Yajima, In vivo transgenic mutation assays. Mutation Research 540 (2003) 141-151.
- 8) [ ] 2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸の細菌を用いる復帰突然変異試験, (財) 食品農医薬品安全性評価センター
- 9) [ ] 2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸のチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験, (財) 食品農医薬品安全性評価センター

#### 18. 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。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。

- 試験計画書（原本）
- 被験物質（2g）
- 被験物質に関する資料（使用記録，調製記録，その他）
- 生データ（投与記録，体重測定記録，症状観察記録，ゲノム DNA 抽出記録，突然変異頻度測定結果，その他）
- 最終報告書（原本）
- その他の試験関係資料

19. 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 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid [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 mutants	Mutant frequency ( $\times 10^{-6}$ )	Group Mean $\pm$ S.D. ( $\times 10^{-6}$ )
D.W.	0	1001	1,989,000	5	2.51	3.33 $\pm$ 1.50
		1002	1,449,000	3	2.07	
		1003	1,593,000	5	3.14	
		1004	1,992,000	6	3.01	
		1005	1,860,000	11	5.91	
Test substance	125	1101	1,851,000	3	1.62	1.70 $\pm$ 0.71
		1102	1,494,000	1	0.67	
		1103	2,178,000	5	2.30	
		1104	1,647,000	4	2.43	
		1105	2,700,000	4	1.48	
	250	1201	3,087,000	3	0.97	1.23 $\pm$ 0.67
		1202	2,484,000	2	0.81	
		1203	3,702,000	6	1.62	
		1204	1,836,000	1	0.54	
		1205	2,274,000	5	2.20	
	500	1301	2,439,000	4	1.64	1.62 $\pm$ 1.04
		1302	1,995,000	4	2.01	
		1303	2,571,000	4	1.56	
		1304	1,692,000	0	0.00	
		1305	2,427,000	7	2.88	
ENU	100	1501	2,052,000	30	14.62	11.05 $\pm$ 4.19 * (S)
		1502	2,100,000	21	10.00	
		1503	1,707,000	10	5.86	
		1504	1,365,000	12	8.79	
		1505	939,000	15	15.97	

D.W.: Negative control (Water for injection, 10 mL/kg)

ENU: Positive control (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, 10 mL/kg, i.p., dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)

(S): Student t test

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

Table 2. Induction of mutation (*gpt* assay) in bone marrow of transgenic mice treated with 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid [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 mutants	Mutant frequency ( $\times 10^{-6}$ )	Group Mean $\pm$ S.D. ( $\times 10^{-6}$ )
D.W.	0	1001	1,812,000	3	1.66	2.14 $\pm$ 1.41
		1002	1,962,000	9	4.59	
		1003	3,036,000	3	0.99	
		1004	2,415,000	4	1.66	
		1005	2,229,000	4	1.79	
Test substance	125	1101	1,704,000	3	1.76	1.32 $\pm$ 0.51
		1102	2,430,000	3	1.23	
		1103	2,634,000	5	1.90	
		1104	3,081,000	2	0.65	
		1105	1,872,000	2	1.07	
	250	1201	1,920,000	2	1.04	1.98 $\pm$ 2.34
		1202	1,878,000	0	0.00	
		1203	1,905,000	2	1.05	
		1204	1,647,000	3	1.82	
		1205	2,166,000	13	6.00	
	500	1301	2,361,000	6	2.54	1.86 $\pm$ 0.78
		1302	1,743,000	4	2.29	
		1303	2,154,000	5	2.32	
		1304	1,998,000	3	1.50	
		1305	3,021,000	2	0.66	
ENU	100	1501	2,169,000	104	47.95	56.64 $\pm$ 10.84 *(A)
		1502	1,548,000	74	47.80	
		1503	1,968,000	145	73.68	
		1504	1,896,000	101	53.27	
		1505	2,016,000	122	60.52	

D.W.: Negative control (Water for injection, 10 mL/kg)

ENU: Positive control (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, 10 mL/kg, i.p., dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)

(A): Aspin-Welch t test

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

Table 3. Induction of mutation (*gpt* assay) in stomach of transgenic mice treated with 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid [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 mutants	Mutant frequency ( $\times 10^{-6}$ )	Group Mean $\pm$ S.D. ( $\times 10^{-6}$ )
D.W.	0	1001	1,410,000	4	2.84	1.76 $\pm$ 1.25
		1002	1,785,000	1	0.56	
		1003	1,785,000	2	1.12	
		1004	2,205,000	2	0.91	
		1005	1,494,000	5	3.35	
Test substance	125	1101	1,221,000	1	0.82	1.37 $\pm$ 0.61
		1102	2,394,000	5	2.09	
		1103	1,212,000	2	1.65	
		1104	1,842,000	3	1.63	
		1105	1,572,000	1	0.64	
	250	1201	1,338,000	2	1.49	2.35 $\pm$ 0.52
		1202	1,869,000	5	2.68	
		1203	1,731,000	4	2.31	
		1204	1,785,000	5	2.80	
		1205	2,013,000	5	2.48	
	500	1301	2,433,000	3	1.23	1.92 $\pm$ 1.12
		1302	1,683,000	5	2.97	
		1303	1,794,000	1	0.56	
		1304	1,578,000	5	3.17	
		1305	1,779,000	3	1.69	
ENU	100	1501	927,000	80	86.30	56.91 $\pm$ 25.15 *(A)
		1502	1,890,000	70	37.04	
		1503	2,376,000	118	49.66	
		1504	1,992,000	62	31.12	
		1505	1,380,000	111	80.43	

D.W.: Negative control (Water for injection, 10 mL/kg)

ENU: Positive control (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, 10 mL/kg, i.p., dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)

(A): Aspin-Welch t test

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

Table 4. Induction of mutation (*gpt* assay) in testis of transgenic mice treated with 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid [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 mutants	Mutant frequency ( $\times 10^{-6}$ )	Group Mean $\pm$ S.D. ( $\times 10^{-6}$ )
D.W.	0	1001	2,691,000	3	1.11	0.93 $\pm$ 0.47
		1002	3,036,000	5	1.65	
		1003	4,848,000	2	0.41	
		1004	2,700,000	2	0.74	
		1005	2,760,000	2	0.72	
Test substance	125	1101	2,274,000	3	1.32	0.87 $\pm$ 0.64
		1102	2,670,000	2	0.75	
		1103	4,020,000	1	0.25	
		1104	2,310,000	4	1.73	
		1105	3,192,000	1	0.31	
	250	1201	2,901,000	2	0.69	0.52 $\pm$ 0.22
		1202	2,445,000	1	0.41	
		1203	5,514,000	1	0.18	
		1204	2,841,000	2	0.70	
		1205	3,216,000	2	0.62	
	500	1301	3,813,000	2	0.52	0.50 $\pm$ 0.10
		1302	4,302,000	2	0.46	
		1303	3,294,000	2	0.61	
		1304	2,823,000	1	0.35	
		1305	3,567,000	2	0.56	
ENU	100	1501	2,511,000	4	1.59	1.50 $\pm$ 0.43
		1502	3,375,000	3	0.89	
		1503	3,570,000	5	1.40	
		1504	2,886,000	6	2.08	
		1505	3,228,000	5	1.55	

D.W.: Negative control (Water for injection, 10 mL/kg)

ENU: Positive control (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, 10 mL/kg, i.p., dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)

Table 5. Induction of mutation (Spi<sup>-</sup> assay) in liver of transgenic mice treated with 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid [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 mutants	Mutant frequency ( $\times 10^{-6}$ )	Group Mean $\pm$ S.D. ( $\times 10^{-6}$ )
D.W.	0	1001	1,329,000	2	1.50	2.78 $\pm$ 3.19
		1002	519,000	4	7.71	
		1003	2,721,000	0	0.00	
		1004	723,000	3	4.15	
		1005	3,819,000	2	0.52	
Test substance	125	1101	2,565,000	5	1.95	1.42 $\pm$ 0.98
		1102	438,000	1	2.28	
		1103	1,224,000	0	0.00	
		1104	486,000	1	2.06	
		1105	2,529,000	2	0.79	
	250	1201	978,000	4	4.09	2.23 $\pm$ 1.43
		1202	663,000	1	1.51	
		1203	4,125,000	3	0.73	
		1204	696,000	1	1.44	
		1205	591,000	2	3.38	
	500	1301	546,000	1	1.83	3.04 $\pm$ 2.09
		1302	984,000	1	1.02	
		1303	519,000	3	5.78	
		1304	420,000	2	4.76	
		1305	1,098,000	2	1.82	
PhIP #	400 ppm	4-1	1,761,000	40	22.71	23.79 $\pm$ 0.93 * (S)
		4-2	1,194,000	29	24.29	
		4-3	2,709,000	66	24.36	

D.W.: Negative control (Water for injection, 10 mL/kg)

PhIP: Positive control (2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, dietary administration)

#: The samples stored for other experiment were used in this study.

(S): Student t test

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

Table 6. Induction of mutation (Spi<sup>-</sup> assay) in bone marrow of transgenic mice treated with 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid [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 mutants	Mutant frequency ( $\times 10^{-6}$ )	Group Mean $\pm$ S.D. ( $\times 10^{-6}$ )
D.W.	0	1001	612,000	0	0.00	3.15 $\pm$ 3.03
		1002	531,000	3	5.65	
		1003	660,000	1	1.52	
		1004	654,000	1	1.53	
		1005	567,000	4	7.05	
Test substance	125	1101	648,000	1	1.54	2.57 $\pm$ 1.49
		1102	813,000	3	3.69	
		1103	867,000	4	4.61	
		1104	1,536,000	2	1.30	
		1105	588,000	1	1.70	
	250	1201	966,000	1	1.04	1.98 $\pm$ 1.78
		1202	1,122,000	3	2.67	
		1203	648,000	1	1.54	
		1204	645,000	3	4.65	
		1205	573,000	0	0.00	
	500	1301	609,000	2	3.28	1.62 $\pm$ 1.11
		1302	906,000	1	1.10	
		1303	2,301,000	1	0.43	
		1304	465,000	1	2.15	
		1305	1,746,000	2	1.15	

D.W.: Negative control (Water for injection, 10 mL/kg)

Table 7. Induction of mutation (Spi<sup>-</sup> assay) in stomach of transgenic mice treated with 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid [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 mutants	Mutant frequency ( $\times 10^{-6}$ )	Group Mean $\pm$ S.D. ( $\times 10^{-6}$ )
D.W.	0	1001	345,000	2	5.80	2.70 $\pm$ 2.30
		1002	582,000	0	0.00	
		1003	600,000	1	1.67	
		1004	711,000	3	4.22	
		1005	558,000	1	1.79	
Test substance	125	1101	405,000	1	2.47	2.28 $\pm$ 2.25
		1102	804,000	0	0.00	
		1103	489,000	2	4.09	
		1104	618,000	3	4.85	
		1105	498,000	0	0.00	
	250	1201	507,000	0	0.00	1.36 $\pm$ 1.89
		1202	672,000	2	2.98	
		1203	522,000	2	3.83	
		1204	423,000	0	0.00	
		1205	723,000	0	0.00	
	500	1301	777,000	2	2.57	4.80 $\pm$ 3.28
		1302	504,000	1	1.98	
		1303	489,000	5	10.22	
		1304	384,000	2	5.21	
		1305	495,000	2	4.04	

D.W.: Negative control (Water for injection, 10 mL/kg)

Table 8. Induction of mutation (Spi<sup>-</sup> assay) in testis of transgenic mice treated with 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid  
 [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 mutants	Mutant frequency ( $\times 10^{-6}$ )	Group Mean $\pm$ S.D. ( $\times 10^{-6}$ )
D.W.	0	1001	495,000	0	0.00	1.04 $\pm$ 1.60
		1002	582,000	0	0.00	
		1003	633,000	1	1.58	
		1004	513,000	0	0.00	
		1005	549,000	2	3.64	
Test substance	125	1101	1,011,000	1	0.99	1.96 $\pm$ 1.71
		1102	624,000	0	0.00	
		1103	741,000	3	4.05	
		1104	582,000	2	3.44	
		1105	744,000	1	1.34	
	250	1201	591,000	2	3.38	2.13 $\pm$ 1.51
		1202	423,000	0	0.00	
		1203	471,000	1	2.12	
		1204	537,000	2	3.72	
		1205	693,000	1	1.44	
	500	1301	714,000	0	0.00	1.37 $\pm$ 2.34
		1302	690,000	1	1.45	
		1303	555,000	3	5.41	
		1304	585,000	0	0.00	
		1305	585,000	0	0.00	

D.W.: Negative control (Water for injection, 10 mL/kg)

Appendix 1. Body weight in the gene mutation assay of 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid  
 [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)	
D.W.	0	1001	25.7	25.8	26.5	26.8	27.9	27.4	27.8	2.0
		1002	23.7	24.1	24.2	23.8	24.1	24.4	24.9	0.8
		1003	25.3	25.1	24.7	25.4	24.9	26.2	26.3	1.2
		1004	26.2	26.2	26.7	26.6	27.3	27.2	27.5	1.3
		1005	23.8	24.8	24.2	24.7	25.1	25.6	25.6	0.8
		1006	26.5	26.8	26.6	26.2	26.8	26.7	27.0	0.2
		Mean±S.D.	25.2±1.2	25.5±1.0	25.5±1.2	25.6±1.2	26.0±1.5	26.3±1.1	26.5±1.1	1.1±0.6
Test substance	125	1101	25.8	27.9	27.3	27.1	27.5	27.0	27.3	-0.6
		1102	24.3	24.2	24.6	25.3	26.7	26.5	26.7	2.5
		1103	22.2	25.1	24.1	23.7	24.7	25.6	25.2	0.1
		1104	25.7	26.0	27.4	26.0	25.3	25.9	25.9	-0.1
		1105	24.9	24.3	25.8	25.0	25.9	25.5	25.3	1.0
		1106	25.9	25.6	26.2	26.4	26.3	26.6	27.2	1.6
		Mean±S.D.	24.8±1.4	25.5±1.4	25.9±1.4	25.6±1.2	26.1±1.0	26.2±0.6	26.3±0.9	0.8±1.2
	250	1201	23.8	24.2	25.4	25.5	25.2	25.9	26.2	2.0
		1202	25.1	24.9	24.7	24.5	24.7	24.8	25.2	0.3
		1203	26.5	27.1	27.9	27.5	27.5	28.4	27.8	0.7
		1204	25.3	25.9	25.9	26.1	26.8	27.6	27.6	1.7
		1205	23.7	25.1	25.8	24.9	24.8	25.1	25.7	0.6
		1206	25.4	25.4	26.0	26.7	26.4	26.4	26.4	1.0
		Mean±S.D.	25.0±1.1	25.4±1.1	26.0±1.1	25.9±1.1	25.9±1.2	26.4±1.4	26.5±1.0	1.1±0.7
	500	1301	24.7	25.3	25.5	25.2	25.2	25.7	26.1	0.8
		1302	23.1	23.5	23.8	23.8	25.1	24.4	25.0	1.5
		1303	23.8	25.3	25.4	25.7	27.1	27.3	27.9	2.6
		1304	24.2	24.5	24.7	24.7	24.6	24.6	24.7	0.2
		1305	25.1	26.5	26.6	27.0	27.5	27.6	28.2	1.7
		1306	25.6	26.1	25.5	25.5	26.2	25.5	26.2	0.1
		Mean±S.D.	24.4±0.9	25.2±1.1	25.3±0.9	25.3±1.1	26.0±1.2	25.9±1.3	26.4±1.4	1.2±1.0

D.W.: Negative control (Water for injection, 10 mL/kg)

Gain= 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)	
Test substance	700	1401	25.2	25.9	24.7	24.2	23.0	25.0	25.4	-0.5
		1402	23.9	26.0	23.8 D*					
		1403	24.1	23.8	23.5	23.8	24.5	25.0	26.2	2.4
		1404	26.0	25.2	24.3	25.6	25.7	26.2	26.9	1.7
		1405	24.7	24.3	20.1 D*					
		1406	27.7	28.3	23.4 D**					
		Mean±S.D.	25.3±1.4	25.6±1.6	24.2±0.6	24.5±0.9	24.4±1.4	25.4±0.7	26.2±0.8	1.2±1.5
ENU	100	1501	23.6	24.1					24.3 #	0.2
		1502	24.1	25.2					24.3 #	-0.9
		1503	26.8	26.5					26.1 #	-0.4
		1504	24.7	24.8					24.6 #	-0.2
		1505	24.3	25.4					24.5 #	-0.9
		1506	26.5	26.8					25.9 #	-0.9
		Mean±S.D.	25.0±1.3	25.5±1.0					25.0±0.8	-0.5±0.5

ENU: Positive control (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, 10 mL/kg, i.p., dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)

D: Dead, \*: Dead at Day 4, \*\*: Dead at Day 6

Gain= Sacrificed-Day 1(Allocated)

#: Day 13

Appendix 2. Clinical observations in the gene mutation assay of 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid  
 [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
D.W.	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
Test substance	125	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
	250	1201	N	N	N	N	N	N	N
		1202	N	N	N	N	N	N	N
		1203	N	N	N	N	N	N	N
		1204	N	N	N	N	N	N	N
		1205	N	N	N	N	N	N	N
		1206	N	N	N	N	N	N	N

D.W.: Negative control (Water for injection, 10 mL/kg)

N: Normal

## Appendix 2. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment							
			1	2	3	4	5	6	7	
Test substance	500	1301	N	N	N	N	N	N	N	N
		1302	N	N	N	N	N	N	N	N
		1303	N	N	N	N	N	N	N	N
		1304	N	N	N	N	N	N	N	N
		1305	N	N	N	N	N	N	N	N
		1306	N	N	N	N	N	N	N	N
	700	1401	N	N	N	N	N	N	N	N
		1402	N	N	DLA, H	D				
		1403	N	N	N	N	N	N	N	N
		1404	N	N	N	N	N	N	N	N
		1405	N	DLA	DLA, H, SFA	D				
		1406	N	N	N	DLA, H, SFA	DLA, H, SFA	D		
	ENU	100	1501	N	N	N	N	N	N	N
1502			N	N	N	N	N	N	N	N
1503			N	N	N	N	N	N	N	N
1504			N	N	N	N	N	N	N	N
1505			N	N	N	N	N	N	N	N
1506			N	N	N	N	N	N	N	N

ENU: Positive control (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, 10 mL/kg, i.p., dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)

N: Normal, D: Dead

DLA: Decrease in locomotor activity, H: Hypothermia, SFA: Soiled fur (Anogenital region)

## Appendix 2. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment						
			8	9	10	11	12	13	14
D.W.	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
Test substance	125	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
	250	1201	N	N	N	N	N	N	N
		1202	N	N	N	N	N	N	N
		1203	N	N	N	N	N	N	N
		1204	N	N	N	N	N	N	N
		1205	N	N	N	N	N	N	N
		1206	N	N	N	N	N	N	N

D.W.: Negative control (Water for injection, 10 mL/kg)

N: Normal

## Appendix 2. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment						
			8	9	10	11	12	13	14
Test substance	500	1301	N	N	N	N	N	N	N
		1302	N	N	N	N	N	N	N
		1303	N	N	N	N	N	N	N
		1304	N	N	N	N	N	N	N
		1305	N	N	N	N	N	N	N
		1306	N	N	N	N	N	N	N
	700	1401	N	N	N	N	N	N	N
		1403	N	N	N	N	N	N	N
		1404	N	N	N	N	N	N	N
ENU	100	1501	N	N	N	N	N	N	
		1502	N	N	N	N	N	N	
		1503	N	N	N	N	N	N	
		1504	N	N	N	N	N	N	
		1505	N	N	N	N	N	N	
		1506	N	N	N	N	N	N	

ENU: Positive control (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, 10 mL/kg, i.p., dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)

N: Normal

## Appendix 2. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment						
			15	16	17	18	19	20	21
D.W.	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
Test substance	125	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
	250	1201	N	N	N	N	N	N	N
		1202	N	N	N	N	N	N	N
		1203	N	N	N	N	N	N	N
		1204	N	N	N	N	N	N	N
		1205	N	N	N	N	N	N	N
		1206	N	N	N	N	N	N	N
	500	1301	N	N	N	N	N	N	N
		1302	N	N	N	N	N	N	N
		1303	N	N	N	N	N	N	N
		1304	N	N	N	N	N	N	N
		1305	N	N	N	N	N	N	N
		1306	N	N	N	N	N	N	N
	700	1401	N	N	N	N	N	N	N
		1403	N	N	N	N	N	N	N
		1404	N	N	N	N	N	N	N

D.W.: Negative control (Water for injection, 10 mL/kg)

N: Normal

## Appendix 2. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment						
			22	23	24	25	26	27	28
D.W.	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
Test substance	125	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
	250	1201	N	N	N	N	N	N	N
		1202	N	N	N	N	N	N	N
		1203	N	N	N	N	N	N	N
		1204	N	N	N	N	N	N	N
		1205	N	N	N	N	N	N	N
		1206	N	N	N	N	N	N	N
	500	1301	N	N	N	N	N	N	N
		1302	N	N	N	N	N	N	N
		1303	N	N	N	N	N	N	N
		1304	N	N	N	N	N	N	N
		1305	N	N	N	N	N	N	N
		1306	N	N	N	N	N	N	N
	700	1401	N	N	N	N	N	N	N
		1403	N	N	N	N	N	N	N
		1404	N	N	N	N	N	N	N

D.W.: Negative control (Water for injection, 10 mL/kg)

N: Normal

## Appendix 2. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment		
			29	30	31
D.W.	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
Test substance	125	1101	N	N	N
		1102	N	N	N
		1103	N	N	N
		1104	N	N	N
		1105	N	N	N
		1106	N	N	N
	250	1201	N	N	N
		1202	N	N	N
		1203	N	N	N
		1204	N	N	N
		1205	N	N	N
		1206	N	N	N
	500	1301	N	N	N
		1302	N	N	N
		1303	N	N	N
		1304	N	N	N
		1305	N	N	N
		1306	N	N	N
700	1401	N	N	N	
	1403	N	N	N	
	1404	N	N	N	

D.W.: Negative control (Water for injection, 10 mL/kg)

N: Normal

Appendix 3. Organ weight in the gene mutation assay of 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid  
 [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		Testes	
				(g)	(%)	(g)	(%)
D.W.	0	1001	27.8	1.51	5.43	0.22	0.79
		1002	24.9	1.41	5.66	0.21	0.84
		1003	26.3	1.40	5.32	0.21	0.80
		1004	27.5	1.49	5.42	0.22	0.80
		1005	25.6	1.36	5.31	0.18	0.70
		1006	27.0	1.44	5.33	0.21	0.78
		Mean±S.D.	26.5±1.1	1.44±0.06	5.41±0.13	0.21±0.01	0.79±0.05
Test substance	125	1101	27.3	1.38	5.05	0.20	0.73
		1102	26.7	1.39	5.21	0.22	0.82
		1103	25.2	1.27	5.04	0.20	0.79
		1104	25.9	1.34	5.17	0.21	0.81
		1105	25.3	1.40	5.53	0.19	0.75
		1106	27.2	1.41	5.18	0.18	0.66
		Mean±S.D.	26.3±0.9	1.37±0.05	5.20±0.18	0.20±0.01	0.76±0.06
	250	1201	26.2	1.39	5.31	0.21	0.80
		1202	25.2	1.29	5.12	0.21	0.83
		1203	27.8	1.46	5.25	0.20	0.72
		1204	27.6	1.41	5.11	0.27	0.98
		1205	25.7	1.33	5.18	0.21	0.82
		1206	26.4	1.10	4.17	0.17	0.64
		Mean±S.D.	26.5±1.0	1.33±0.13	5.02±0.43	0.21±0.03	0.80±0.11

D.W.: Negative control (Water for injection, 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		Testes	
				(g)	(%)	(g)	(%)
Test substance	500	1301	26.1	1.39	5.33	0.21	0.80
		1302	25.0	1.30	5.20	0.22	0.88
		1303	27.9	1.46	5.23	0.20	0.72
		1304	24.7	1.25	5.06	0.18	0.73
		1305	28.2	1.55	5.50	0.22	0.78
		1306	26.2	1.32	5.04	0.20	0.76
	Mean±S.D.	26.4±1.4	1.38±0.01	5.23±0.17	0.21±0.02	0.78±0.06	
700	1401	25.4	1.47	5.79	0.19	0.75	
	1403	26.2	1.39	5.31	0.21	0.80	
	1404	26.9	1.40	5.20	0.21	0.78	
	Mean±S.D.	26.2±0.8	1.42±0.04	5.43±0.31	0.20±0.01	0.78±0.03	
ENU	100	1501	24.3	1.33	5.47	0.17	0.70
		1502	24.3	1.31	5.39	0.17	0.70
		1503	26.1	1.43	5.48	0.16	0.61
		1504	24.6	1.30	5.28	0.15	0.61
		1505	24.5	1.31	5.35	0.16	0.65
		1506	25.9	1.35	5.21	0.16	0.62
	Mean±S.D.	25.0±0.8	1.34±0.05	5.36±0.11	0.16±0.01	0.65±0.04	

ENU: Positive control (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, 10 mL/kg, i.p., dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)

Appendix 4. Individual gross findings on 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid-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
D.W.	0	1001	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		1002	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		1003	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		1004	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		1005	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		1006	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-

D.W.: Negative control (Water for injection, 10 mL/kg)

-: No remarkable change

## Appendix 4. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Organs	Findings		
Test substance	125	1101	Liver	-		
			Bone marrow	-		
			Stomach	-		
		1102	Testis	-		
			Liver	-		
			Bone marrow	-		
		1103	Stomach	-		
			Testis	-		
			Liver	-		
		1104	Bone marrow	-		
			Stomach	-		
			Testis	-		
		1105	Liver	-		
			Bone marrow	-		
			Stomach	-		
		1106	Testis	-		
			Liver	-		
			Bone marrow	-		
					Stomach	-
					Testis	-

-: No remarkable change

## Appendix 4. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Organs	Findings		
Test substance	250	1201	Liver	-		
			Bone marrow	-		
			Stomach	-		
		1202	Testis	-		
			Liver	-		
			Bone marrow	-		
		1203	Stomach	-		
			Testis	-		
			Liver	-		
		1204	Bone marrow	-		
			Stomach	-		
			Testis	-		
		1205	Liver	-		
			Bone marrow	-		
			Stomach	-		
		1206	Testis	-		
			Liver	-		
			Bone marrow	-		
					Stomach	-
					Testis	-

-: No remarkable change

## Appendix 4. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Organs	Findings		
Test substance	500	1301	Liver	-		
			Bone marrow	-		
			Stomach	-		
		1302	Testis	-		
			Liver	-		
			Bone marrow	-		
		1303	Stomach	-		
			Testis	-		
			Liver	-		
		1304	Bone marrow	-		
			Stomach	-		
			Testis	-		
		1305	Liver	-		
			Bone marrow	-		
			Stomach	-		
		1306	Testis	-		
			Liver	-		
			Bone marrow	-		
					Stomach	-
					Testis	-

-: No remarkable change

## Appendix 4. Continued

Substance	Dose (mg/kg, p.o.)	Animal ID No.	Organs	Findings
Test substance	700	1401	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		1403	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		1404	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-

-: No remarkable change

## Appendix 4. Continued

Substance	Dose (mg/kg, i.p.)	Animal ID No.	Organs	Findings
ENU	100	1501	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		1502	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		1503	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		1504	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		1505	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-
		1506	Liver	-
			Bone marrow	-
			Stomach	-
			Testis	-

ENU: Positive control (N-ethyl-N-nitrosourea, 10 mL/kg, dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)

-: No remarkable change

Reference data 1

試験成績書



## 試験成績書

2012年10月02日

東京化成工業株式会社 品質保証  
 〒103-0023  
 東京都中央区日本橋本町4丁目10  
 TEL: 03(5640)8860 FAX: 03(56

製品名：4-Nitrotoluene-2-sulfonic Acid Hydrate			
製品コード：N0277	等級：	製品ロット：HAM01	判定：合格
項目	結果	規格値	
純度(中和滴定)	96.2 %	95.0 %以上(無水物換算)(硫酸分差引き後)	
水分	17.5 %	20.0 %以下	
硫酸塩(SO4)	2.7 %	5.0 %以下	

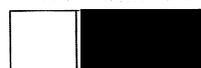
Reference data 2

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 御中

整理 No.X0042  
2013 年 5 月 14 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



4-Nitrotoluene-2-sulfonic Acid Hydrate の分析につきましてご報告致します。

分析試料  
N0277 4-Nitrotoluene-2-sulfonic Acid Hydrate  
Lot No. HAM01-NFDH [東京化成工業(株) 製]

分析項目	結果
純度 (中和法)	96.8% (無水物換算)(硫酸分差引き後)
水分 (KF 法)	17.9%
硫酸塩 (重量法)	2.6%

この報告書に関するご質問は 兎澤 までお願い致します。

Reference data 3

被験物質液中の被験物質濃度測定

## 1. 試薬の調製

## 1.1. リン酸水溶液 (pH 3.0)

使用試薬	蒸留水 (HPLC 用, 和光純薬工業)
	りん酸 (試薬特級, 和光純薬工業)
調製方法	蒸留水に薄めたりん酸 (1→10) を加えて pH 3.0 に調整した.
使用期限	室温保存で 1 週間

## 1.2. 移動相 [りん酸水溶液/アセトニトリル (7/3, v/v)]

使用試薬	りん酸水溶液 (pH 3.0)
	アセトニトリル (HPLC 用, 和光純薬工業)
調製方法	りん酸水溶液 (pH 3.0) 7 容量およびアセトニトリル 3 容量を混和した.
使用期限	室温保存で 1 ヶ月

## 1.3. インジェクター洗浄液 [アセトニトリル/蒸留水 (1/1, v/v)]

使用試薬	アセトニトリル (HPLC 用, 和光純薬工業)
	蒸留水 (HPLC 用, 和光純薬工業)
調製方法	アセトニトリルおよび蒸留水を等量混和した.
使用期限	室温保存で 1 ヶ月

## 2. 標準溶液の調製

## 2.1. 標準物質

被験物質を用いた.

## 2.2. 標準原液

被験物質 125.28 および 125.32 mg (純度補正量として 100 mg, 被験物質が含む水および硫酸塩の合計 20.2%を考慮し補正, 換算係数を 1.253 とした.) を量り, 蒸留水 (HPLC 用, 和光純薬工業) を加えて正確に 100 mL とした (設定濃度 1000 µg/mL). 使用期限は調製同日とした.

## 2.3. 定量用標準溶液

標準原液 1 mL を正確に量り, 蒸留水 (HPLC 用, 和光純薬工業) を加えて正確に 100 mL とした. さらにこの液から 5 mL を正確に量り, 蒸留水を加えて正確に 10 mL とした (設定濃度 5.0 µg/mL). 使用期限は調製同日とした.

### 3. 試料溶液の調製

下表に従い、溶媒（注射用水）は1回、各被験物質液は3回、無作為に分析試料を採取し、蒸留水（HPLC用、和光純薬工業）で希釈した。

設定濃度 (mg/mL)	被験物質液 採取量 (mL)	1次定容 (mL)	2次希釈 (mL)	希釈倍率
溶媒 (注射用水)	1	20	1→10	200
12.5	1	100	1→25	2500
25.0	1	100	1→50	5000
50.0	1	100	1→100	10000
70.0	1	200	1→100	20000

### 4. 測定条件

#### 4.1. HPLC 条件

カラム	CAPCELL PAK C8 UG120 (4.6 mm × 150 mm, 5.0 μm, 資生堂)	
カラム温度	40°C	
移動相	りん酸水溶液 (pH 3.0) / アセトニトリル (7/3, v/v)	
流量	1.0 mL/min	
測定波長	276 nm	
注入量	10 μL	
オートサンプラー	設定温度	15°C
	インジェクター 洗浄液	アセトニトリル/蒸留水 (1/1, v/v)

#### 4.2. 測定機器

日立 D-7000 高速液体クロマトグラフシステム

インタフェース	日立 D-7000 形インタフェース
ポンプ	日立 L-7100 形ポンプ
オートサンプラー	日立 L-7200 形オートサンプラー 日立サーモスタットドロック
カラム恒温槽	日立 L-7300 形カラムオーブン 日立冷却ユニット
検出器	日立 L-7405 形 UV 検出器

### 5. データ処理

日立 Model D-7000 Chromatography Data Station HPLC System Manager Ver 4.1

## 6. システム適合性

HPLC システム稼動時毎に、定量用標準溶液（設定濃度 5.0 µg/mL）を繰り返し 6 回測定した。被験物質の保持時間の相対標準偏差は 0.0 および 0.1%、ピーク面積の相対標準偏差は 0.7 および 1.3%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。

## 7. 測定

以下に従い測定した。精度管理の結果は 99.6 および 101.3%であり、判定基準（100.0±5.0%以内）を満たしていたため、測定結果を採用した。なお、「媒体中 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid の濃度測定法バリデーション：試験番号 E435（115-227）」において、定量用標準溶液（設定濃度 5.0 µg/mL）および試料溶液は、オートサンプラー上（設定温度 15°C）で 24 時間安定であることが確認されている。

繰り返し数	試料
3	定量用標準溶液（設定濃度 5.0 µg/mL）
1	溶媒の試料溶液
各 1	各被験物質液の試料溶液
1	定量用標準溶液（設定濃度 5.0 µg/mL, 精度管理として）

## 8. 測定結果の解析および数値の取り扱い

以下に従い算出し、表示桁について特に記載がない場合、四捨五入にて表示した。

項目	単位	算出方法	表示桁
保持時間	min	データ処理ソフト	小数点以下 2 桁
ピーク面積	µV × sec	データ処理ソフト	整数
平均	得られる 値と同じ	$\frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$ x : 得られる値 n : 繰り返し数	得られる値 と同桁
相対標準偏差	%	相対標準偏差：標準偏差 / 平均 × 100  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	小数点以下 1 桁

項目	単位	算出方法	表示桁
定量用標準溶液理論濃度	μg/mL	$W_s / 1.253 / 100 \times 1000 / D_{st}$ $W_s$ : 標準原液調製時の被験物質秤量値 (mg) 1.253 : 換算係数 $D_{st}$ : 標準原液からの希釈率	有効数字 4桁
試料溶液中被験物質濃度	μg/mL	データ処理ソフト 検量線 : 定量用標準溶液 (5.0 μg/mL) の理論濃度を用いた1点検量線	有効数字 4桁
被験物質液濃度	mg/mL	$A_t \times D / 1000$ $A_t$ : 試料溶液中被験物質濃度 (μg/mL) D : 希釈倍率	有効数字 4桁
設定濃度に対する割合	%	被験物質液濃度の平均 / 被験物質液の設定濃度 $\times 100$	小数点以下 1桁
精度管理	%	$A_{qt} / A_{st} \times 100$ $A_{qt}$ : 定量用標準溶液の被験物質のピーク面積 (精度管理) $A_{st}$ : 定量用標準溶液の被験物質のピーク面積の平均	小数点以下 1桁

## 9. 結果

濃度分析の結果を表1に示す。

各被験物質液における設定濃度に対する割合は、初回調製時および最終調製時ともにすべて判定基準 (100.0±10.0%以内) を満たしたため、被験物質液は適切に調製されたと判断した。また、溶媒では測定を妨害する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。

表 1. 濃度

	設定濃度 (mg/mL)	測定濃度 (mg/mL)		設定濃度に対する 割合 (%)
		検出せず	平均	
初回調製	溶媒	検出せず	-	-
	12.5	13.01	12.78	102.2
		12.60		
		12.74		
	25.0	25.41	25.22	100.9
		25.12		
25.14				
50.0	50.30	49.70	99.4	
	49.57			
	49.22			
70.0	69.52	69.13	98.8	
	68.84			
	69.04			
最終調製	溶媒	検出せず	-	-
	12.5	12.87	12.80	102.4
		12.85		
		12.68		
	25.0	25.99	25.80	103.2
		25.20		
26.20				
50.0	51.33	51.99	104.0	
	52.83			
	51.80			
70.0	71.50	70.97	101.4	
	70.34			
	71.08			

# 信 頼 性 保 証 書

表 題： トランスジェニックマウスを用いる 2-methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid の遺伝子突然  
変異試験

試験番号： E437 ( 115-229 )

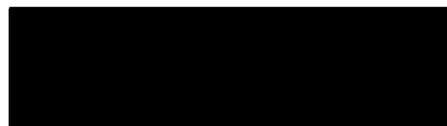
本試験は、新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について（平成 23 年 3 月 31 日薬食発 0331 第 8 号，平成 23・03・29 製局第 6 号，環企発第 110331010 号）に従って実施され、本最終報告書に記載された成績は、試験の生データを正確に反映していることを保証する。

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~~25~~年 6 月 14 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：



## 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 24 年 12 月 28 日	平成 24 年 12 月 28 日	
コンピュータプロトコール	平成 25 年 1 月 8 日	平成 25 年 1 月 8 日	
動物搬入	平成 25 年 1 月 9 日	平成 25 年 1 月 9 日	
投与液の調製および濃度分析	平成 25 年 1 月 15 日	平成 25 年 1 月 15 日	
群分けおよび投与 (初回)	平成 25 年 1 月 16 日	平成 25 年 1 月 16 日	
標的器官の摘出	平成 25 年 2 月 15 日	平成 25 年 2 月 18 日	
ゲノム DNA の抽出	平成 25 年 2 月 20 日	平成 25 年 2 月 20 日	
ゲノム DNA のパッケージ ングおよびプレーティング (Spi assay)	平成 25 年 2 月 26 日	平成 25 年 2 月 26 日	
プラークの計数 (Spi assay)	平成 25 年 2 月 27 日	平成 25 年 2 月 27 日	
プラークの Confirmation (Spi assay)	平成 25 年 2 月 28 日	平成 25 年 2 月 28 日	
ゲノム DNA のパッケージ ングおよびプレーティング (gpt assay)	平成 25 年 3 月 22 日	平成 25 年 3 月 22 日	
コロニーの計数 (gpt assay)	平成 25 年 3 月 25 日	平成 25 年 3 月 25 日	
コロニーの Confirmation (gpt assay)	平成 25 年 3 月 27 日	平成 25 年 3 月 27 日	
生データおよび最終報告書 草案	平成 25 年 5 月 13~15 日	平成 25 年 5 月 15 日	
生データおよび最終報告書	平成 25 年 6 月 14 日	平成 25 年 6 月 14 日	