

T-4074

最 終 報 告 書

N-エチルジエタノールアミン：細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号 T-4074

試験期間：2023年12月22日-2024年3月18日

試験施設

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

試験委託者

厚生労働省
〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1-2-2

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

T-4074

1. GLP 陳述書

試験番号 : T-4074

試験表題 : *N*-エチルジエタノールアミン : 細菌を用いる復帰突然変異試験

本試験は以下の GLP 基準を遵守して実施したものです。

- 「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」
(平成 23 年 3 月 31 日、薬食発 0331 第 8 号、平成 23・03・29 製局第 6 号、環
保企発第 110331010 号)

 2024 年 3 月 18 日

試験責任者
株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所 研究部

2. 目次

1.	GLP 陳述書	2
2.	目次	3
3.	試験実施概要	6
3.1	試験番号	6
3.2	試験表題	6
3.3	試験目的	6
3.4	遵守した基準及び準拠したガイドライン	6
3.4.1	GLP	6
3.4.2	ガイドライン	6
3.5	試験委託者	6
3.6	試験受託者	6
3.7	試験実施施設	7
3.8	試験日程	7
3.9	試験責任者	7
3.10	主な担当者	7
3.11	予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのあ る事態及び試験計画書に従わなかったこと	7
3.12	試資料の保存	7
3.13	試験責任者の署名	8
4.	要約	9
5.	緒言	10
6.	被験物質及び被験液の調製	10
6.1	被験物質及び溶媒	10
6.1.1	被験物質	10
6.1.2	溶媒	11
6.2	被験液の調製方法	11
6.2.1	用量設定試験用被験液の調製	11
6.2.2	本試験用被験液の調製	12
7.	試験材料及び方法	12
7.1	試験菌株	12
7.1.1	菌株の種類	12
7.1.2	菌株の選択理由	12
7.1.3	菌株の保存及び解凍	12
7.1.4	菌株の特性検査	13
7.2	対照物質	13
7.2.1	陰性対照物質	13

7.2.2	陽性対照物質.....	14
7.2.3	調製方法.....	14
7.3	試薬.....	15
7.3.1	S9 Mixの調製方法.....	15
7.3.2	培地.....	16
7.3.3	0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4)	16
7.3.4	トップアガー.....	17
7.4	試験方法.....	18
7.4.1	識別方法.....	18
7.4.1.1	菌株の識別.....	18
7.4.1.2	プレートの識別.....	18
7.4.2	前培養.....	18
7.4.3	プレート数.....	19
7.4.4	試験操作 (プレインキュベーション法)	19
7.5	無菌試験.....	19
7.6	判定基準.....	19
8.	試験結果.....	20
8.1	用量設定試験の観察結果及び本試験用量の設定.....	20
8.2	本試験の観察結果.....	20
8.3	試験の成立条件.....	20
9.	考察.....	21

Tables

別表 1	試験結果表 (用量設定試験)	22
別表 2	試験結果表 (本試験)	23

Figures

図 1	用量反応曲線 (本試験 TA100 : -S9Mix)	24
図 2	用量反応曲線 (本試験 TA100 : +S9Mix)	24
図 3	用量反応曲線 (本試験 TA1535 : -S9Mix)	25
図 4	用量反応曲線 (本試験 TA1535 : +S9Mix)	25
図 5	用量反応曲線 (本試験 WP2 <i>uvrA</i> : -S9Mix)	26
図 6	用量反応曲線 (本試験 WP2 <i>uvrA</i> : +S9Mix)	26
図 7	用量反応曲線 (本試験 TA98 : -S9Mix)	27
図 8	用量反応曲線 (本試験 TA98 : +S9Mix)	27
図 9	用量反応曲線 (本試験 TA1537 : -S9Mix)	28
図 10	用量反応曲線 (本試験 TA1537 : +S9Mix)	28

T-4074

Attachment

Attachment	背景データ (230426)	29
信頼性保証書		30

T-4074

3. 試験実施概要

3.1 試験番号

T-4074

3.2 試験表題

N-エチルジエタノールアミン：細菌を用いる復帰突然変異試験

3.3 試験目的

細菌を用いた復帰突然変異試験（プレインキュベーション法）により *N*-エチルジエタノールアミンの遺伝子突然変異誘発能を検討した。

3.4 遵守した基準及び準拠したガイドライン

3.4.1 GLP

- ・ 「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」
（平成 23 年 3 月 31 日、薬食発 0331 第 8 号、平成 23・03・29 製局第 6 号、環
保企発第 110331010 号）

3.4.2 ガイドライン

- ・ 「新規化学物質等に係る試験の方法について」
（平成 23 年 3 月 31 日付け薬食発 0331 第 7 号厚生労働省医薬食品局長、平成
23・03・29 製局第 5 号経済産業省製造産業局長、環保企発第 110331009 号環
境省総合環境政策局長連名通知）（最終改正：平成 30 年 3 月 29 日）
- ・ 「OECD Guidelines for Testing of Chemicals 471」
（OECD：2020 年 6 月 26 日）

3.5 試験委託者

厚生労働省

医薬局 医薬品審査管理課 化学物質安全対策室

〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1-2-2

3.6 試験受託者

株式会社ボゾリサーチセンター

〒151-0065 東京都渋谷区大山町 36-7

T-4074

3.7 試験実施施設

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

3.8 試験日程

試験開始日 : 2023年12月22日
用量設定試験開始日 : 2023年12月25日
用量設定試験終了日 : 2023年12月28日
本試験開始日 : 2024年1月9日
本試験終了日 : 2024年1月12日
試験終了日 : 2024年3月18日

3.9 試験責任者

株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所 研究部

■■■■ ■■■■

3.10 主な担当者

株式会社ボゾリサーチセンター東京研究所 研究部

被験物質管理責任者 : ■■■■ ■■■■

復帰突然変異試験 : ■■■■ ■■■■ ■■■■ ■■■■ ■■■■ ■■■■

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

本試験において予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったことはなかった。

3.12 試資料の保存

試験計画書、記録文書、被験物質、生データ及び報告書類（最終報告書の原本を含む）は、株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所の資料保存施設に保存する。なお、その期間は試験終了後10年間とする。期間終了後の取り扱いについては、厚生労働省 医薬局 医薬品審査管理課 化学物質安全対策室と株式会社ボゾリサーチセンター間で協議し、その処置を決定する。

T-4074

3.13 試験責任者の署名



2024年 3 月 18 日

株式会社ポゾリサーチセンター 東京研究所

4. 要約

N-エチルジエタノールアミンの遺伝子突然変異誘発能の有無を明らかにするため、ネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (以下、*S. typhimurium* と略す) TA100、TA1535、TA98、TA1537 及び大腸菌 *Escherichia coli* (以下、*E. coli* と略す) WP2 *uvrA* を用いて、代謝活性化する場合及び代謝活性化しない場合の条件下で、プレインキュベーション法により復帰突然変異試験を実施した。なお、被験物質の溶媒には注射用水を用いた。

本試験用量を設定するため、5000 µg/plate を最高用量として以下公比 4 で除した 1.22、4.88、19.5、78.1、313、1250、5000 µg/plate の計 7 用量の被験物質処理用量で用量設定試験を実施した。

その結果、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても、陰性対照値の 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加が認められなかったため、代謝活性化した場合のすべての菌株においては生育阻害の認められた最低用量の 5000 µg/plate を最高用量として以下公比 2 で除した計 6 用量の被験物質処理用量で本試験を実施した。代謝活性化しない場合のすべての菌株においては、生育阻害が認められなかったため 5000 µg/plate を最高用量として以下公比 2 で除した計 5 用量の被験物質処理用量で本試験を実施した。

1) 被験物質による沈殿

本被験物質による沈殿は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。

2) 生育阻害

菌に対する生育阻害は、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA 株の 2500 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の *E. coli* WP2 *uvrA* の 5000 µg/plate の用量で認められた。

3) 復帰変異コロニー数

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

以上の試験結果より、本試験条件下において *N*-エチルジエタノールアミンは、細菌に対する遺伝子突然変異誘発能を有さない（陰性）と判定した。

T-4074

5. 緒言

本試験は、厚生労働省の委託により、*N*-エチルジエタノールアミンの細菌を用いた復帰突然変異試験を実施したのでその成績を報告する。

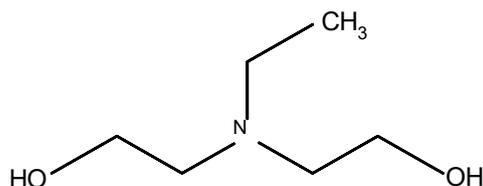
6. 被験物質及び被験液の調製

6.1 被験物質及び溶媒

6.1.1 被験物質

以下の情報は非 GLP で実施された分析結果に基づく。なお、溶解性及び溶媒中での安定性は株式会社ボゾリサーチセンターで実施した溶解性の結果による。

製造者 : ██████████
名称 : *N*-エチルジエタノールアミン
別名 : 2,2'-Ethyliminodiethanol、
N,N-Bis(2-hydroxyethyl)ethylamine
CAS 番号 : 139-87-7
官報公示整理番号 : (2)-2408 (化審法)
構造式 :



分子式 : C₆H₁₅NO₂
分子量 : 133.19
ロット番号 : ██████████
入手量 : 25 mL
純度 : 99.8%(GC)
不純物の名称及び濃度 : 不明
常温における性状 : ごくうすい黄色透明液体
沸点 : 251°C
引火点 : 124°C
安定性 : 適切な条件下においては安定
使用期限 : 不明
溶解度 : 水 ; 50 mg/mL で溶解
溶媒中での安定性 : 水 ; 発熱、ガスの発生等の反応性がなかった
保存条件 : 冷暗所 (許容範囲 : 1~15°C : 実測値は許容の範囲内であった) ・密栓 ・不活性ガス充填
保存場所 : 東京研究所 被験物質保存室

T-4074

- 取扱い上の注意 : 取扱いは換気のよい場所で行う。適切な保護具を着用する。漏れ、あふれ、飛散しないよう注意し、みだりに蒸気を発生させない。取扱い後は手や顔などをよく洗う。蒸気やエアゾールが発生する場合には、換気、局所排気を用いる。皮膚、眼および衣類との接触を避ける。
- 保存試料 : 被験物質約 1 g を保存試料として保存した。保存試料は染色体異常試験（試験番号：T-G796）と共通とした。
- 残余品の処理 : 使用後の残余は全て廃棄した。

6.1.2 溶媒

- 名称 : 注射用水
- 製造元 : 株式会社大塚製薬工場
- ロット番号 : K3G87
- 規格 : 日本薬局方
- 保存方法 : 室温
- 保存場所 : 東京研究所 被験物質調製室
- 溶媒の選択理由 : 試験で使用する溶媒を選択するため、水の 50 mg/mL について溶解性試験を実施した。その結果、溶解し、溶媒添加時に発熱、ガスの発生等の反応性等は認められなかった。溶媒添加一時間後も色調の変化は認められなかったため、注射用水を選択した。

6.2 被験液の調製方法

6.2.1 用量設定試験用被験液の調製

滅菌した調製用試験管に被験物質を 0.200 mL 分取し、電子天秤（株式会社エー・アンド・デイ：GR-120）を用いて秤量した。その秤量値 212.3 mg に最高調製濃度の 50 mg/mL となるように溶媒量を計算し、この溶媒量から分取した際の液量 0.200 mL を差し引いた 4.046 mL の注射用水を添加して溶解し、50 mg/mL の被験液を調製した。次いで、これを公比 4 で順次 6 段階希釈し、50、12.5、3.13、0.781、0.195、0.0488 及び 0.0122 mg/mL の計 7 濃度の被験液を調製した。なお、被験液の調製は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で使用時に行い、その過程において発熱、ガスの発生等の反応性は認められなかった。

T-4074

6.2.2 本試験用被験液の調製

滅菌した調製用試験管に被験物質を 0.250 mL 分取し、電子天秤（株式会社エー・アンド・デイ：GR-120）を用いて秤量した。その秤量値 260.7 mg に最高調製濃度の 50 mg/mL となるように溶媒量を計算し、この溶媒量から分取した際の液量 0.250 mL を差し引いた 4.964 mL の注射用水を添加して溶解し、50 mg/mL の被験液を調製した。次いで、これを公比 2 で順次 5 段階希釈し、50、25、12.5、6.25、3.13 及び 1.56 mg/mL の計 6 濃度の被験液を調製した。なお、被験液の調製は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で使用時に行い、その過程において発熱、ガスの発生等の反応性は認められなかった。

7. 試験材料及び方法

7.1 試験菌株

7.1.1 菌株の種類

次の 5 種類の菌株を用いた。

塩基対置換型

S. typhimurium TA100

S. typhimurium TA1535

E. coli WP2 *uvrA*

フレームシフト型

S. typhimurium TA98

S. typhimurium TA1537

なお菌株は [REDACTED] より 2017 年 4 月 12 日に入手した。

7.1.2 菌株の選択理由

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

7.1.3 菌株の保存及び解凍

入手した菌株から継代して凍結保存した菌懸濁液を培養し、得られた菌懸濁液 8.0 mL に対してジメチルスルホキシド（DMSO）（富士フィルム和光純薬株式会社、試薬特級、ロット番号 TPE5999）を 0.7 mL の割合で添加した。これを滅菌チューブに 0.3 mL ずつ分注した後、 -70°C 以下の超低温フリーザ（三洋電機バイオメディカ株式会社：MDF-192）で保存した。なお、使用する際は室温で解凍し、使用後の残液は廃棄した。

T-4074

	使用した菌株の凍結保存日
<i>S. typhimurium</i> TA98	2023年 7月20日
<i>S. typhimurium</i> TA100	2023年 7月20日
<i>S. typhimurium</i> TA1535	2023年 7月20日
<i>S. typhimurium</i> TA1537	2023年 7月20日
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	2023年 7月20日

7.1.4 菌株の特性検査

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

	使用した菌株の特性検査実施日
<i>S. typhimurium</i> TA98	2023年 7月20日 ~ 2023年 7月22日
<i>S. typhimurium</i> TA100	2023年 7月20日 ~ 2023年 7月22日
<i>S. typhimurium</i> TA1535	2023年 7月20日 ~ 2023年 7月22日
<i>S. typhimurium</i> TA1537	2023年 7月20日 ~ 2023年 7月22日
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	2023年 7月20日 ~ 2023年 7月22日

7.2 対照物質

7.2.1 陰性対照物質

被験液の調製に用いた注射用水を陰性対照物質とした。

7.2.2 陽性対照物質

以下の変異原物質を陽性対照物質とした。

表 1. 陽性対照物質

陽性対照物質 (略称)	ロット番号	純度 (%)	規格	保存方法	製造元
2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide (AF-2)	LEM5355	99.4	和光特級	室温遮光	富士フイルム和光純薬株式会社
Sodium azide (SAZ)	YLL7840	99.9	試薬特級	室温遮光	富士フイルム和光純薬株式会社
2-Methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)-aminopropylamino]acridine·2HCl (ICR-191)	SLBR0485V	—	—	冷蔵	SIGMA-Aldrich Co. LLC.
2-Aminoanthracene (2AA)	LEF5598	97.3	—	室温遮光	富士フイルム和光純薬株式会社
Benzo[a]pyrene (B[a]P)	DLP0786	100.0	環境分析用	冷蔵遮光	富士フイルム和光純薬株式会社

保存場所 東京研究所 微生物試験室

7.2.3 調製方法

AF-2、ICR-191、2AA 及び B[a]P は DMSO (富士フイルム和光純薬株式会社、試薬特級、ロット番号 DLE4609、TPE5999、ACH2155) に溶解し、SAZ は注射用水 (株式会社大塚製薬工場、日本薬局方、ロット番号 K1G74) に溶解し、約 1 mL ずつ小分けして -20°C 以下で凍結保存した。なお、試験実施時に解凍して使用した。それぞれの調製濃度を表 2 に示した。

表 2. 陽性対照物質調製濃度

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

() 内の数値は、プレートに処理したときの処理用量 (µg/plate) を示す。

T-4074

7.3 試薬

7.3.1 S9 Mix の調製方法

S9 及び補酵素を混合し、S9 Mix を調製した。調製は用時に行った。調製した S9 Mix は使用まで冷蔵で保存し、使用後の残液は廃棄した。

1) S9

名称 : エームス試験用 S9
製造元 : 株式会社ボゾリサーチセンター
ロット番号 : S9-230908
製造日 : 2023 年 9 月 8 日
使用期限 : 2024 年 3 月 7 日
種・系統 : ラット・SD 系
週齢・性 : 7 週齢・雄
体重 : 208.6-239.9 g
誘導物質 : フェノバルビタール (PB) 及び
5,6-ベンゾフラボン (BF)
投与方法 : 腹腔内投与
投与期間及び投与量 : PB 4 日間連続投与 : 30+60+60+60 (mg/kg 体重)
PB 投与 3 日目 BF 投与 : 80 (mg/kg 体重)
保存方法 : 冷凍保存 (-70°C 以下)
保存場所 : 東京研究所 微生物試験室

2) 補酵素

名称 : エームス試験用コファクターFA
製造元 : 株式会社ボゾリサーチセンター
ロット番号 : FA-230930
製造日 : 2023 年 9 月 30 日
使用期限 : 2024 年 3 月 29 日
保存方法 : 冷凍保存 (-70°C 以下)
保存場所 : 東京研究所 微生物試験室

3) S9 Mix の組成 (1 mL 中)

水 : 0.9 mL
S9 : 0.1 mL
MgCl₂ : 8 μmol
KCl : 33 μmol
グルコース-6-リン酸 : 5 μmol
還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH)
: 4 μmol
還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH)
: 4 μmol

T-4074

リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4)
: 100 μ mol

7.3.2 培地

1) 最小グルコース寒天平板培地

名称 : エームス試験用培地ファルメディア AM
製造元 : 株式会社アテクト
購入元 : 株式会社ファルマ
ロット番号 : AA113A1-3FB
製造日 : 2023年 11月 15日
有効期限 : 2024年 5月 15日
保存方法 : 4°C~25°C で保存
保存場所 : 東京研究所 寒天培地保存室
使用寒天 : TAIYO-AGAR BM-600
(製造元 : SSK セールス株式会社、Lot No. 107642)

2) ニュートリエントブロス No.2 培養液

ニュートリエントブロス No.2 を 2.5 wt% となるよう精製水で溶解し、オートクレーブにより滅菌処理 (121°C、20 分) を行い、調製した。調製後は使用時まで冷蔵で保存し、1 箇月以内に使用した。

名称 : ニュートリエントブロス No.2 (Nutrient Broth No.2)
ロット番号 : 3393549
製造元 : OXOID LTD.
保存方法 : 室温保存
保存場所 : 東京研究所 微生物試験室

7.3.3 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4)

りん酸緩衝剤粉末 3 包に対して 2 L の精製水を加えて溶解し、オートクレーブにより滅菌処理 (121°C、20 分) を行い、調製した。調製後は使用時まで冷蔵で保存し、1 箇月以内に使用した。

名称 : りん酸緩衝剤粉末 (1/15 mol/L pH 7.4)
製造元 : 富士フイルム和光純薬株式会社
ロット番号 : WTJ1134
保存方法 : 室温保存
保存場所 : 東京研究所 微生物試験室

7.3.4 トップアガー

以下に示す寒天を用いて、調製した軟寒天液（0.6 wt% Agar、0.6 wt% NaCl）をオートクレーブにより滅菌処理（121°C、20分）した後、0.5 mmol/L D-ビオチン-L-ヒスチジン-L-トリプトファン溶液を軟寒天液 10 に対して 1 の割合で加えて調製し、*S. typhimurium* TA 株と *E. coli* 株で共通で使用した。調製後は室温で保存し、1 箇月以内に使用した。

1) 寒天

名称	: Difco Agar
製造元	: Becton, Dickinson and Company
ロット番号	: 2278297
保存方法	: 室温保存
保存場所	: 東京研究所 微生物試験室

2) 塩化ナトリウム

製造元	: 富士フイルム和光純薬株式会社
ロット番号	: TPE5496
保存方法	: 室温保存
保存場所	: 東京研究所 微生物試験室

3) D-ビオチン

製造元	: 富士フイルム和光純薬株式会社
ロット番号	: WTP2367
保存方法	: 冷蔵保存、遮光
保存場所	: 東京研究所 微生物試験室

4) L-ヒスチジン塩酸塩一水和物

製造元	: 富士フイルム和光純薬株式会社
ロット番号	: CAK1893
保存方法	: 室温保存、遮光
保存場所	: 東京研究所 微生物試験室

5) L-トリプトファン

製造元	: 富士フイルム和光純薬株式会社
ロット番号	: CAP5231
保存方法	: 室温保存、遮光
保存場所	: 東京研究所 微生物試験室

7.4 試験方法

7.4.1 識別方法

7.4.1.1 菌株の識別

菌株の種類毎に、以下に示す色のマーカー等を使用して識別した。

<i>S. typhimurium</i> TA98	赤
<i>S. typhimurium</i> TA100	青
<i>S. typhimurium</i> TA1535	桃
<i>S. typhimurium</i> TA1537	緑
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	茶

7.4.1.2 プレートの識別

代謝活性化しない場合は「-」、代謝活性化する場合は「+」とし、これに続けて陰性対照 (Solvent Control) を「SC」、陽性対照 (Positive Control) を「PC」、被験物質処理群を濃度の低い方から「1」、「2」、「3」…の番号を各菌の色のマーカーでシャーレのふたに記載し、識別した。

7.4.2 前培養

- 1) ニュートリエントブロス No.2 培養液 40 mL を滅菌済みコニカルフラスコ (容量 200 mL) に入れ、凍結保存菌株を解凍して得た菌懸濁液を *S. typhimurium* TA 株は各 50 μ L、*E. coli* WP2 *uvrA* は 20 μ L 植菌し、振盪恒温器 (BIO-SHAKER BR-40 LF、タイテック株式会社) にセットした。
- 2) これをプログラム制御により前培養開始まで 4°C に放置した後、37°C で振盪 (130 回/分) しながら約 9 時間前培養した。
- 3) 前培養終了時に菌懸濁液の吸光度をデジタル比色計 (Mini photo 518R、タイテック株式会社) で測定し、生菌数が 1.0×10^9 個/mL 以上あることを確認した。なお、菌懸濁液は使用まで室温下に維持した。それぞれの菌株の換算生菌数を表 3 に示した。

表 3. 菌株の換算生菌数

菌 株	菌 数 ($\times 10^9$ 個/mL)	
	用量設定試験	本試験
<i>S. typhimurium</i> TA100	3.05	3.33
<i>S. typhimurium</i> TA1535	3.16	3.27
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	5.38	5.33
<i>S. typhimurium</i> TA98	4.44	4.46
<i>S. typhimurium</i> TA1537	2.46	2.54

7.4.3 プレート数

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

7.4.4 試験操作（プレインキュベーション法）

- 1) 滅菌した各小試験管に被験液、溶媒又は陽性対照溶液 0.1 mL をそれぞれ入れ、これに代謝活性化しない場合は 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL を、代謝活性化する場合は S9 Mix 0.5 mL を加えた後、さらに各菌懸濁液 0.1 mL を加え攪拌後、37°C で 20 分間振盪 (100 回/分) しながらプレインキュベーションした。
- 2) プレインキュベーション終了後、ユニット恒温槽で 45°C に保温されたトッパアガーを 2.0 mL 加え攪拌後、最小グルコース寒天平板培地に均一に重層した。なお、1)~2)の一連の操作は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で実施した。
- 3) 最小グルコース寒天平板培地に重層したトッパアガーが固化したことを確認し、最小グルコース寒天平板培地を逆さにしてインキュベータに入れ、37°C で 48 時間培養した。
- 4) 培養後、実体顕微鏡を用いて菌に対する生育阻害の有無を観察した。本被験物質による沈殿の有無を目視により確認した。復帰変異コロニー数の計数は、面積及び数え落としの補正をしたドットカウンター (DOT1、家田貿易株式会社) を用いて計数をした。

7.5 無菌試験

- 1) 最高用量の被験液 0.1 mL 及び調製した S9 Mix 0.5 mL をそれぞれ試験管に分取した。
- 2) これにトッパアガーを 2.0 mL 加えた後に最小グルコース寒天平板培地に重層した。なお、1)~2)の一連の操作は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で実施した。
- 3) トッパアガーが固化したことを確認し、最小グルコース寒天平板培地を逆さにしてインキュベータに入れ、37°C で約 48 時間培養した。
- 4) 培養後、雑菌の有無を確認した。

7.6 判定基準

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

8. 試験結果

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

8.1 用量設定試験の観察結果及び本試験用量の設定

本試験の試験用量を設定するため 1.22、4.88、19.5、78.1、313、1250、5000 µg/plate の用量にて用量設定試験を実施した。

用量設定試験の結果、本被験物質による沈殿は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。菌に対する生育阻害は、代謝活性化した場合のすべての菌株の 5000 µg/plate の用量で認められた。

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

無菌試験では、最高用量の被験液及び S9 Mix に雑菌の生育は認められなかった。

上記の結果より本試験は、代謝活性化した場合のすべての菌株においては、生育阻害の認められた最低用量の 5000 µg/plate を最高用量として以下公比 2 で除した 2500、1250、625、313 及び 156 µg/plate の計 6 用量、代謝活性化しない場合のすべての菌株においては、生育阻害が認められなかったため 5000 µg/plate を最高用量として以下公比 2 で除した 2500、1250、625 及び 313 µg/plate の計 5 用量の被験物質処理用量を設定した。

8.2 本試験の観察結果

本被験物質による沈殿は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。菌に対する生育阻害は、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA 株の 2500 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の *E. coli* WP2 *uvrA* の 5000 µg/plate の用量で認められた。

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

無菌試験では、最高用量の被験液及び S9 Mix に雑菌の生育は認められなかった。

8.3 試験の成立条件

陽性対照値がそれぞれの菌株の陰性対照値に比較して 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加を示し、陰性対照値及び陽性対照値の復帰変異コロニー数の平均値が背景データの管理値 (Mean ± 3SD : Attachment) 内であり、無菌試験及び試験操作において雑菌の混入などの異常も認められなかったため、試験が適切に実施されたものと判断した。

9. 考察

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

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

以上の試験結果より、本試験条件下において*N*-エチルジエタノールアミンは、細菌に対する遺伝子突然変異誘発能を有さない（陰性）と判定した。

T-4074

(別表1)

試験結果表 (用量設定試験)

被験物質の名称: N-エチルジエタノールアミン

No. T-4074

試験実施期間		2023年12月25日 より 2023年12月28日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/プレート)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9Mix (-)	陰性対照 (注射用水)	102 105 (104)	6 8 (7)	26 32 (29)	18 13 (16)	9 10 (10)
	1.22	101 108 (105)	11 7 (9)	24 27 (26)	20 18 (19)	6 7 (7)
	4.88	102 113 (108)	10 7 (9)	24 32 (28)	24 18 (21)	10 11 (11)
	19.5	110 94 (102)	6 7 (7)	27 28 (28)	19 14 (17)	10 10 (10)
	78.1	102 98 (100)	11 10 (11)	28 31 (30)	18 20 (19)	8 11 (10)
	313	117 109 (113)	8 7 (8)	28 30 (29)	14 15 (15)	5 7 (6)
	1250	97 109 (103)	13 11 (12)	32 27 (30)	14 15 (15)	13 7 (10)
	5000	131 120 (126)	6 8 (7)	30 31 (31)	23 15 (19)	6 9 (8)
	S9Mix (+)	陰性対照 (注射用水)	145 146 (146)	11 11 (11)	28 24 (26)	32 27 (30)
1.22		151 129 (140)	12 9 (11)	25 35 (30)	25 26 (26)	9 8 (9)
4.88		148 126 (137)	8 6 (7)	30 32 (31)	26 30 (28)	13 8 (11)
19.5		123 144 (134)	11 6 (9)	30 28 (29)	32 28 (30)	7 8 (8)
78.1		128 127 (128)	5 8 (7)	28 38 (33)	32 24 (28)	7 11 (9)
313		153 109 (131)	5 13 (9)	33 32 (33)	30 28 (29)	8 7 (8)
1250		136 121 (129)	7 5 (6)	28 28 (28)	32 27 (30)	8 5 (7)
5000		119 * 151 * (135)	11 * 5 * (8)	27 * 32 * (30)	27 * 32 * (30)	7 * 11 * (9)
陽性対照		S9Mixを必要としないもの	名称 AF-2	SAZ	AF-2	AF-2
	用量 (μg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	コロニー数/プレート	828 811 (820)	301 350 (326)	113 120 (117)	435 428 (432)	1171 1215 (1193)
	S9Mixを必要とするもの	名称 B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
	用量 (μg/プレート)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
	コロニー数/プレート	1234 1477 (1356)	204 202 (203)	642 519 (581)	263 245 (254)	94 101 (98)

(備考)

- AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
- SAZ : アジ化ナトリウム
- ICR-191 : 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl
- 2AA : 2-アミノアントラセン
- B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

* : 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。
()内は、2枚のプレートの平均値を示す。

T-4074

(別表2)

試験結果表 (本試験)

被験物質の名称: N-エチルジエタノールアミン

No. T-4074

試験実施期間		2024年1月9日 より 2024年1月12日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9Mix (-)	陰性対照 (注射用水)	114 102 (108)	8 6 (7)	32 39 (36)	24 15 (20)	11 8 (10)
	313	105 99 (102)	5 9 (7)	42 25 (34)	14 24 (19)	11 6 (9)
	625	102 99 (101)	8 10 (9)	24 27 (26)	23 18 (21)	14 7 (11)
	1250	94 109 (102)	9 6 (8)	27 30 (29)	22 16 (19)	11 9 (10)
	2500	115 115 (115)	5 7 (6)	46 40 (43)	19 15 (17)	12 11 (12)
	5000	116 131 (124)	8 10 (9)	20 41 (31)	20 17 (19)	8 8 (8)
	S9Mix (+)	陰性対照 (注射用水)	145 131 (138)	12 7 (10)	42 39 (41)	30 33 (32)
156		146 136 (141)	11 14 (13)	43 32 (38)	31 24 (28)	8 7 (8)
313		116 130 (123)	7 10 (9)	36 40 (38)	32 31 (32)	6 11 (9)
625		131 133 (132)	11 6 (9)	24 36 (30)	38 31 (35)	5 11 (8)
1250		127 123 (125)	10 6 (8)	31 31 (31)	32 31 (32)	11 13 (12)
2500		124 * 135 * (130)	6 * 8 * (7)	35 39 (37)	30 * 38 * (34)	9 * 6 * (8)
5000		162 * 146 * (154)	10 * 12 * (11)	32 * 35 * (34)	29 * 31 * (30)	10 * 5 * (8)
陽性対照	名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191
	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	コロニー数/プレート	850 865 (858)	294 331 (313)	168 166 (167)	467 456 (462)	1115 1086 (1101)
	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
S9Mixを必要とするもの	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
	コロニー数/プレート	1253 1357 (1305)	264 240 (252)	628 698 (663)	246 263 (255)	98 112 (105)

(備考)

- AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
- SAZ : アジ化ナトリウム
- ICR-191 : 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl
- 2AA : 2-アミノアントラセン
- B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

* : 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。
()内は、2枚のプレートの平均値を示す。

T-4074

図 1

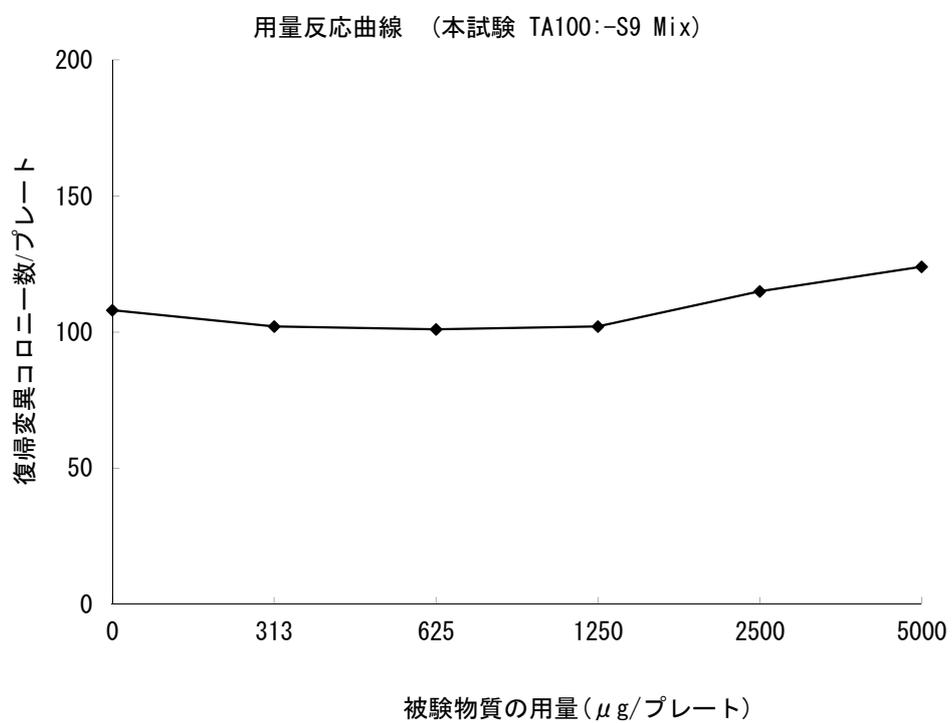


図 2

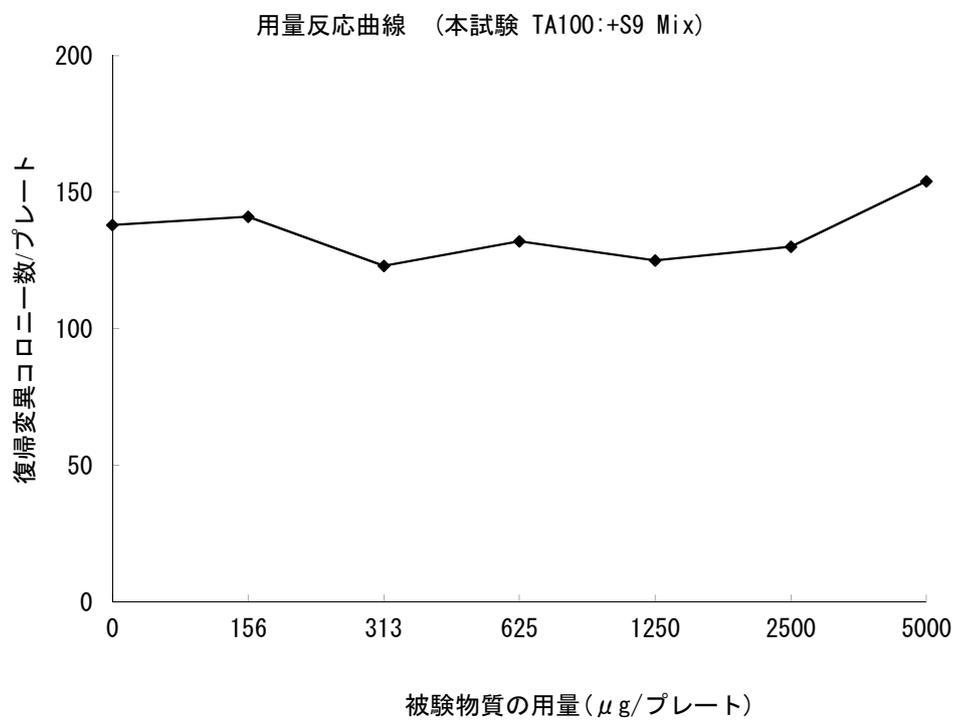


図 3

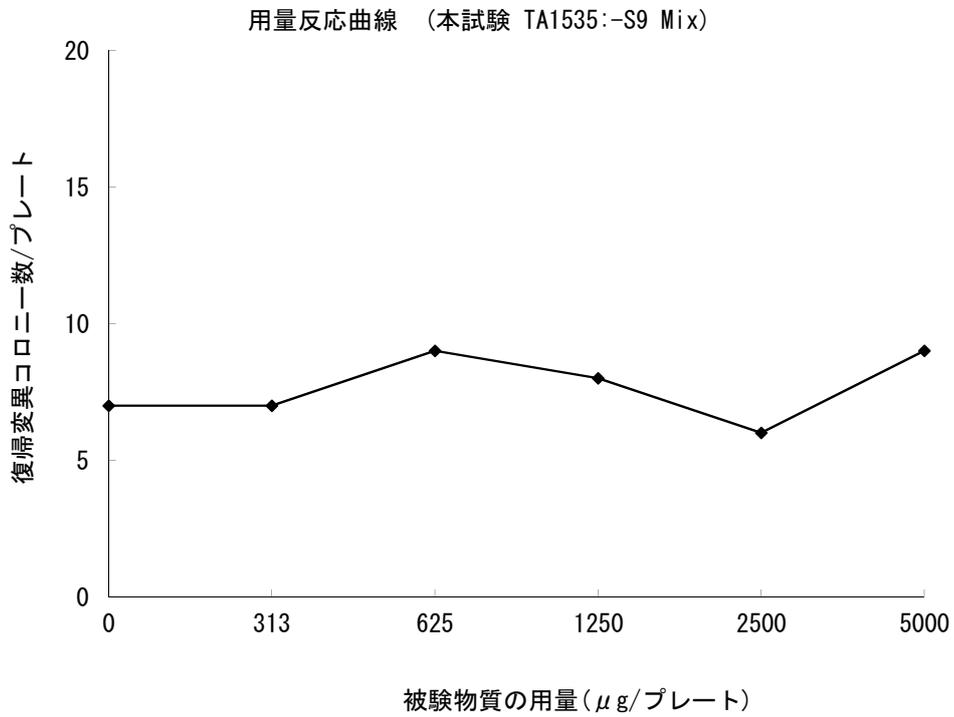


図 4

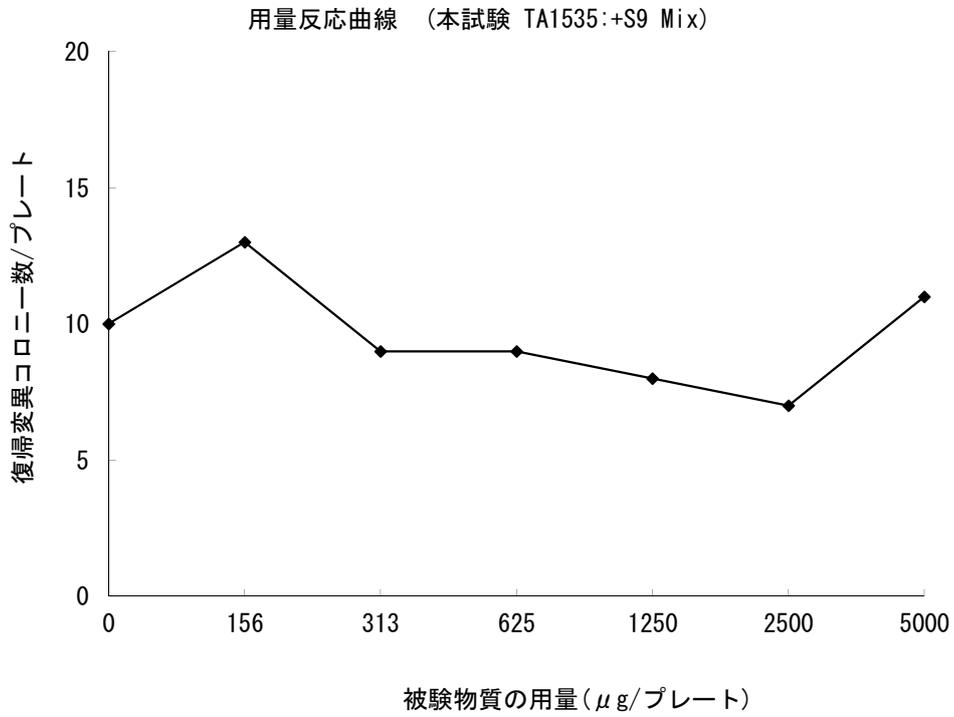


図 5

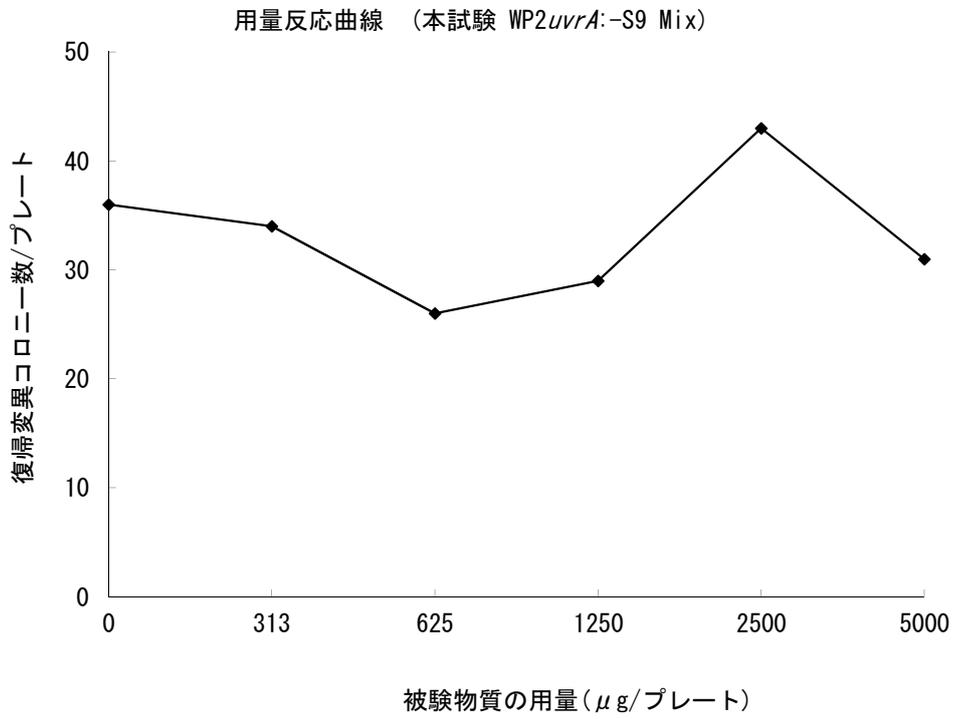


図 6

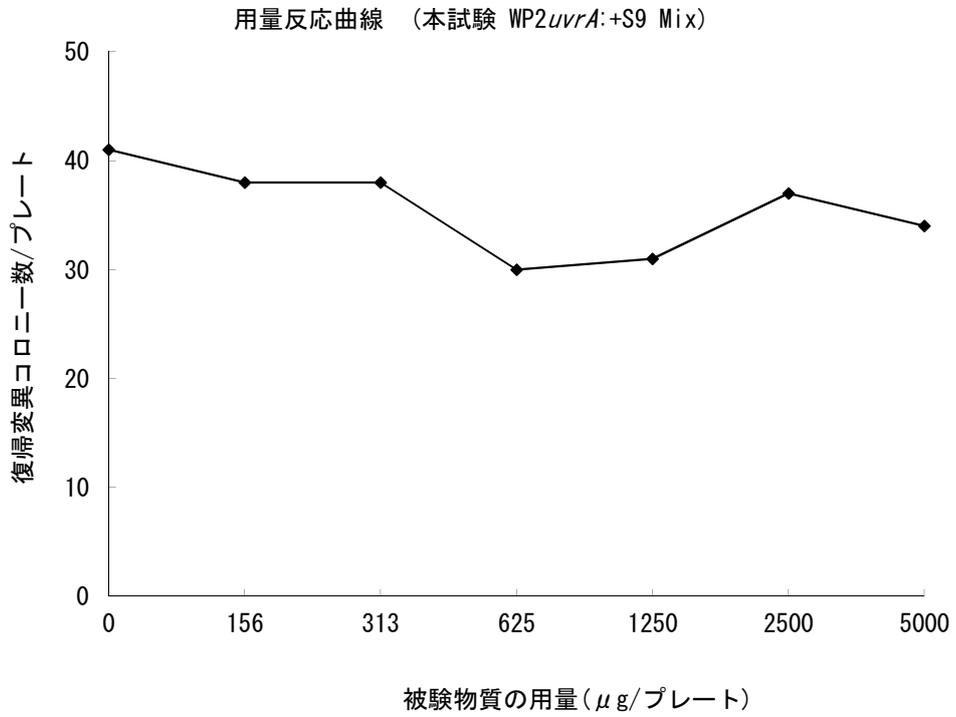


図 7

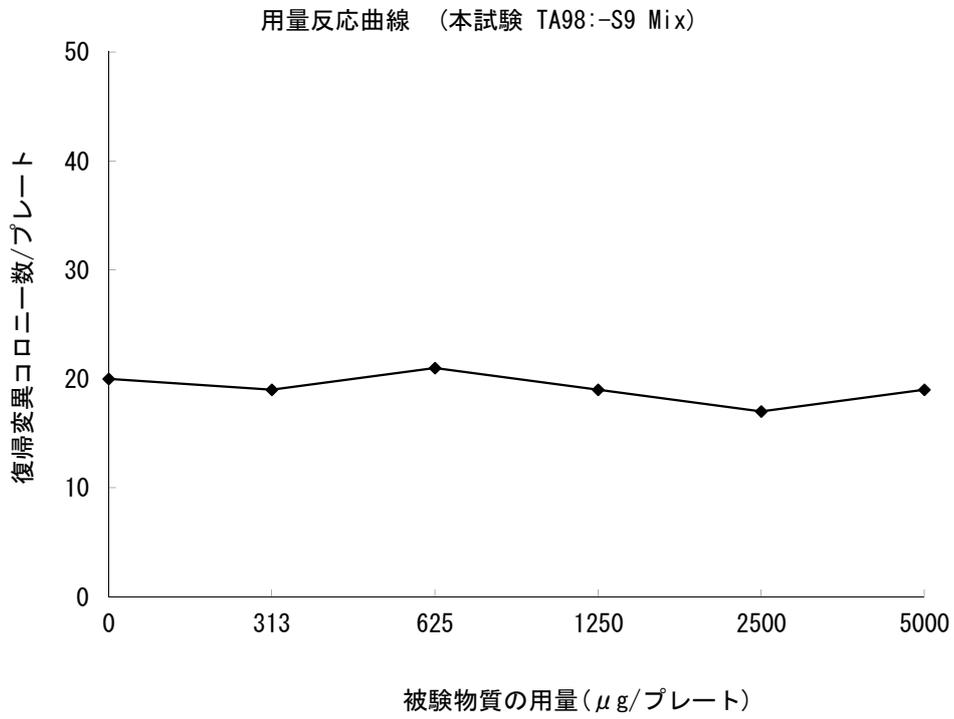


図 8

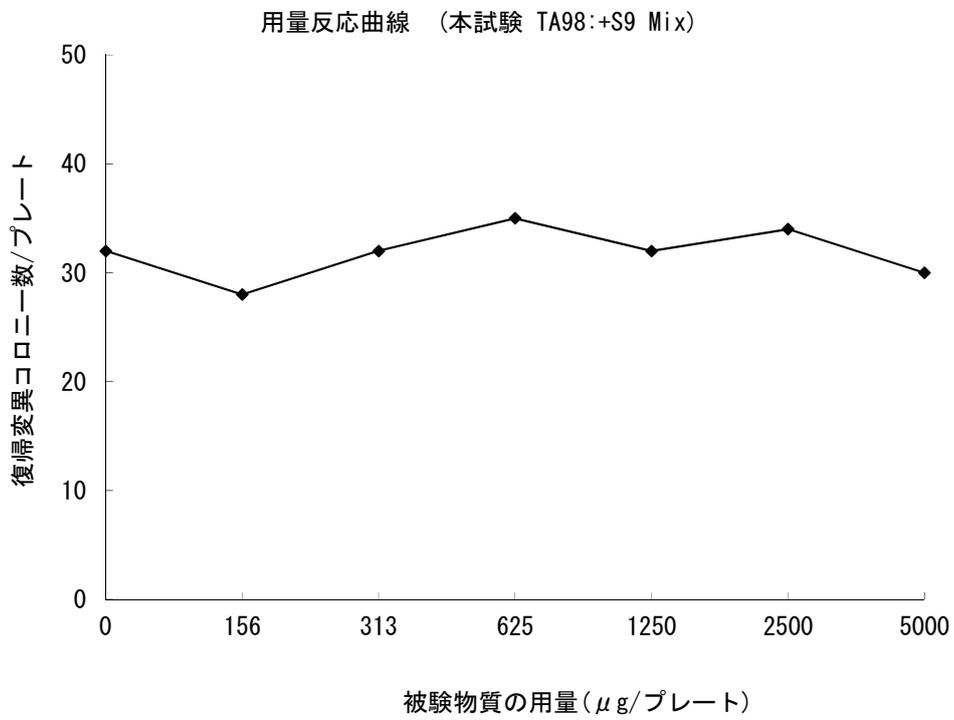


図 9

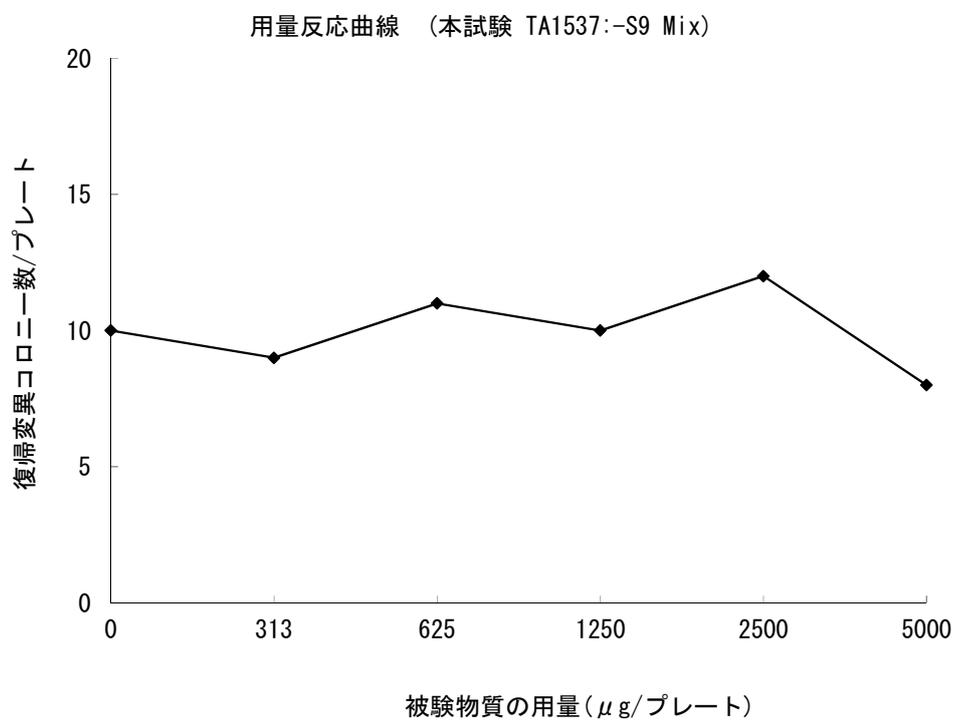
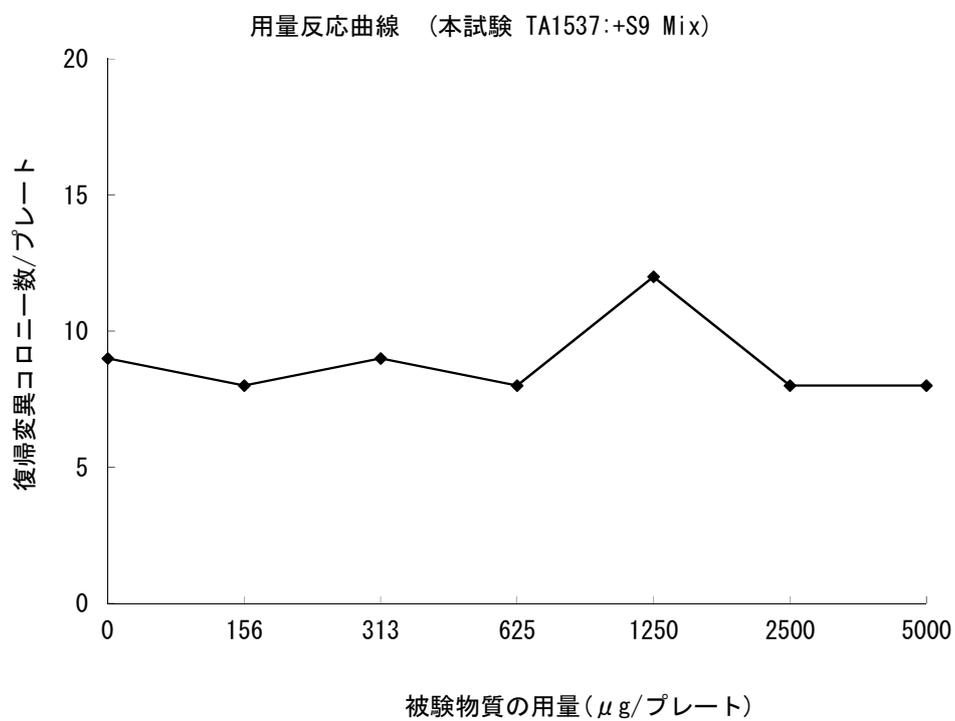


図 10



Background Data

Test Category : Bacterial reverse mutation test (Preincubation Method)

CODE No. : 230426

Period : From 24 September 2022 to 6 March 2023

Tester Strains	S9 Mix (-) or (+)	Classification	Mean	S.D.	Management ranges		Number of plates
					Lower limit	Upper limit	
TA100	-	Solvent control	124	15	80	168	474
		Positive control AF-2 (0.01 µg/plate)	722	85	468	976	474
	+	Solvent control	138	14	97	179	474
		Positive control B[a]P (5.0 µg/plate)	1084	122	719	1448	474
TA1535	-	Solvent control	11	3	2	19	474
		Positive control SAZ (0.5 µg/plate)	242	61	59	424	474
	+	Solvent control	11	3	3	20	474
		Positive control 2AA (2.0 µg/plate)	197	29	111	284	474
WP2 _{uvrA}	-	Solvent control	27	5	11	43	474
		Positive control AF-2 (0.01 µg/plate)	114	19	58	170	474
	+	Solvent control	30	5	14	47	474
		Positive control 2AA (10.0 µg/plate)	615	101	312	918	474
TA98	-	Solvent control	24	5	9	39	474
		Positive control AF-2 (0.1 µg/plate)	396	60	215	577	474
	+	Solvent control	32	4	20	44	474
		Positive control B[a]P (5.0 µg/plate)	232	28	149	316	474
TA1537	-	Solvent control	10	3	2	18	474
		Positive control ICR-191 (1.0 µg/plate)	1424	333	424	2424	474
	+	Solvent control	11	3	3	19	474
		Positive control B[a]P (5.0 µg/plate)	87	13	48	126	474

(Notice)

Positive controls AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide
SAZ : Sodium azide
ICR-191 : 2-Methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)aminopropylamino]acridine·2HCl
B[a]P : Benzo[a]pyrene
2AA : 2-Aminoanthracene
S9Mix (-) : without metabolic activation
(+) : with metabolic activation

T-4074

信頼性保証書（1/2）

試験番号 : T-4074

試験表題 : *N*-エチルジエタノールアミン：細菌を用いる復帰突然変異試験

本試験は以下に示す基準に従って実施されたことを保証致します。

- 「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」
（平成 23 年 3 月 31 日：薬食発 0331 第 8 号、平成 23・03・29 製局第 6 号、環
保企発第 110331010 号）

なお、調査は下記の通り実施し、報告致しました。

試験の調査

項目	担当者	調査日	試験責任者及び 運営管理者への 報告日
試験計画書		2023年12月22日	2023年12月29日
調製・保存（被験物質）、 被験物質の処理		2024年1月10日	2024年1月11日
計数		2024年1月12日	2024年1月16日
生データ		2024年2月16日	2024年2月21日
最終報告書草案 帳票 改善確認		2024年2月16日 2024年2月21日	2024年2月16日 2024年2月21日
生データ（被験物質関係）		2024年3月14日	2024年3月14日
最終報告書		2024年3月18日	2024年3月18日

信頼性保証書 (2/2)

施設調査

項目	担当者	調査日	部門責任者及び 運営管理者への 報告日	
菌株の特性検査		2023年 7月 20日		
		2023年 7月 22日		
		2023年 7月 24日	2023年 7月 27日	
陽性対照物質の管理		AF-2、ICR-191	2023年 3月 28日	2023年 3月 31日
		2AA	2023年 4月 20日	2023年 4月 25日
		B[a]P	2023年 7月 18日	2023年 7月 19日
		ICR-191	2023年 9月 4日	2023年 9月 5日
		2AA	2023年 10月 16日	2023年 10月 18日
		B[a]P	2023年 10月 23日	2023年 10月 25日
		SAZ	2023年 11月 22日	2023年 11月 22日
		AF-2	2023年 12月 7日	2023年 12月 12日
		ICR-191、2AA	2023年 12月 14日	2023年 12月 20日
		B[a]P	2023年 12月 27日	2023年 12月 29日
菌の前培養		2023年 9月 5日		
		2023年 9月 6日	2023年 9月 7日	

プロセス調査

項目	試験番号	担当者	調査日	試験責任者及び 運営管理者への 報告日
用量設定試験	T-4042		2023年 10月 6日	
(復帰突然変異試験)			2023年 10月 10日	2023年 10月 11日

2024年3月18日
株式会社ボゾリサーチセンター
信頼性保証部門