

最終報告書

1,3-Benzenedicarboxylic acid, dimethyl ester の 細菌を用いる復帰突然変異試験

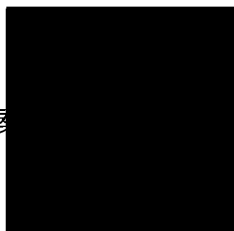
厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室 委託

試験施設

財団法人食品薬品安全センター

〒257-8523 神奈川県秦野市落合

TEL 0463-82-4751



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
(東京都千代田区霞が関 1-2-2)

試験番号 M-11-043

被験物質 1,3-Benzenedicarboxylic acid, dimethyl ester

試験項目 細菌を用いる復帰突然変異試験

試験開始日 2011 年 11 月 2 日

実験開始日 2011 年 11 月 28 日

実験終了日 2011 年 12 月 15 日

試験終了日 試験責任者の捺印日

試資料保管場所 秦野研究所資料保存室

保管期間 試験終了後 10 年間
その後の保管については試験委託者と協議する。

運営管理者 財団法人食品薬品安全センター秦野研究所
所長 

この試験は、「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、薬食発第 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、環境企発第 110331009 号環境省総合環境政策局長通知)に準拠し、「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 日付け、薬食発第 0331 第 8 号厚生労働省医薬食品局長、平成 23・03・29 製局第 6 号経済産業省製造産業局長、環境企発第 110331010 号環境省総合環境政策局長通知)を遵守して実施したものである。

2012 年 3 月 9 日

試験責任者  

試験従事者

試験責任者

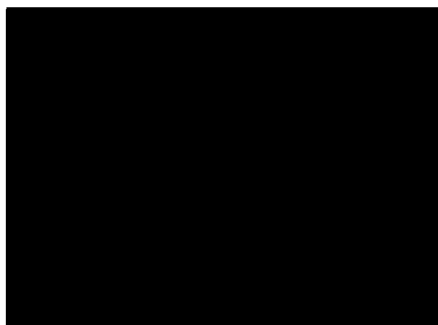
試験担当者

検体調製

試験操作

化学分析

被験物質管理



目次

要約	5
試験目的	5
試験ガイドラインと GLP	5
材料と方法	6
1. 被験物質	6
2. 陽性対照物質	6
3. 検定菌	7
4. 試験材料	7
5. 被験物質調製液の調製	9
6. 試験操作	9
7. 結果の表示	11
8. 判定	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	12
試験成績と考察	12
1. 用量設定試験	12
2. 本試験	12
参考文献	13
表	15
図	18
資料	20

(最終ページ:25 ページ)

信頼性保証書

要約

1,3-Benzenedicarboxylic acid, dimethyl ester の遺伝子突然変異誘発性の有無を調べるため、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施し、陰性の結果を得た。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用い、プレインキュベーション法により、S9 mix 非存在下および存在下で試験を行った。

1.50、5.00、15.0、50.0、150、500、1500 および 5000 µg/plate の 8 用量を設定して用量設定試験を行ったところ、S9 mix 非存在下の TA100、TA1535、TA98 および TA1537 では 1500 µg/plate 以上の用量で、WP2 *uvrA* では 5000 µg/plate の用量で、S9 mix 存在下の TA100 および TA1535 では 1500 µg/plate 以上の用量で生育阻害が認められた。S9 mix 存在下の WP2 *uvrA*、TA98 および TA1537 では生育阻害は認められなかった。

用量設定試験の結果に基づき、S9 mix 非存在下の TA100、TA1535、TA98 および TA1537 では 39.1、78.1、156、313、625、1250 および 2500 µg/plate の 7 用量を、WP2 *uvrA* では 156、313、625、1250、2500 および 5000 µg/plate の 6 用量を、S9 mix 存在下の TA100 および TA1535 では 39.1、78.1、156、313、625、1250 および 2500 µg/plate の 7 用量を、WP2 *uvrA*、TA98 および TA1537 では 313、625、1250、2500 および 5000 µg/plate の 5 用量をそれぞれ設定して、2 回の本試験（本試験 I および本試験 II）を行った。その結果、2 回の本試験ともに、S9 mix 非存在下の TA100 では 1250 µg/plate 以上の用量で、TA1535、TA98 および TA1537 では 2500 µg/plate の用量で、WP2 *uvrA* では 5000 µg/plate の用量で、S9 mix 存在下の TA100 および TA1535 では 2500 µg/plate の用量で生育阻害が認められた。S9 mix 存在下の WP2 *uvrA*、TA98 および TA1537 では生育阻害は認められなかった。また、2 回の本試験ともに、用いたいずれの検定菌においても、S9 mix の有無にかかわらず、陰性対照値の 2 倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果に基づき、1,3-benzenedicarboxylic acid, dimethyl ester は、用いた試験系において遺伝子突然変異誘発性を有しない（陰性）と判定した。

試験目的

1,3-Benzenedicarboxylic acid, dimethyl ester の遺伝子突然変異誘発性（変異原性）の有無を検討し、安全性評価の資料とするために、細菌を用いる復帰突然変異試験をプレインキュベーション法¹⁾により実施した。

試験ガイドラインと GLP

この試験は、「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、薬食発第 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、環境企

発第 110331009 号環境省総合環境政策局長通知)に準拠し、「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 日付け、薬食発第 0331 第 8 号厚生労働省医薬食品局長、平成 23・03・29 製局第 6 号経済産業省製造産業局長、環境企発第 110331010 号環境省総合環境政策局長通知)を遵守して実施した。

材料と方法

1. 被験物質

被験物質である 1,3-benzenedicarboxylic acid, dimethyl ester[化学名(別名):Dimethyl isophthalate、Isophthalic acid dimethyl ester、略称:DMIP、CAS 番号:1459-93-4、分子式: $C_{10}H_{10}O_4$ 、分子量:194.18、ロット番号:FGM01、純度:99.9%(GC)、資料 1]は、白色〜ほとんど白色の、結晶〜粉末である。被験物質の物理化学的性状等を資料 2に示す。被験物質は [REDACTED] から入手し、使用時まで冷蔵(実測値:3~6℃)、暗所で保管した。

被験物質原体の安定性については、製品安全データシート中に、適切な条件下においては安定であることが記載されている。また、実験開始前と実験終了後に、秦野研究所において被験物質の赤外吸収スペクトルを測定し、スペクトルに変化がないことが確認された(試験番号:G-11-032)。

2. 陽性対照物質

用いた陽性対照物質および調製法は以下のとおりである。

名称	略称	ロット番号(購入日)	製造者	純度
2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド	AF-2	STQ3987 (2010 年 8 月 6 日)	和光純薬工業	99.7%
アジ化ナトリウム	SA	HLP7075 (2010 年 8 月 3 日)	和光純薬工業	100.2%
9-アミノアクリシン	9AA	4785KA (2010 年 8 月 24 日)	MP Biomedicals	98.6%
ベンゾ[a]ピレン	B[a]P	L16T027 (2010 年 8 月 6 日)	Alfa Aesar	97.6%
2-アミノアントラセン	2AA	EPM0250 (2010 年 8 月 3 日)	和光純薬工業	96.3%

AF-2、9AA、B[a]P および 2AA はジメチルスルホキシド(DMSO、ロット番号:STF3833、和光純薬工業)に、SA は日局注射用水(製造番号:K0J81、大塚製薬工場)に溶解して所定の濃度に調製したのち、冷凍保存(設定温度:-20℃)し、調製後 6 か月以内に用時解凍して用いた。各陽性対照物質調製液の調製濃度および添加量を以下に示す。

菌 株	S9 mix 非存在下				S9 mix 存在下			
	物質名	調製濃度 (μg/mL)	添加量 (μL/plate)	用量 (μg/plate)	物質名	調製濃度 (μg/mL)	添加量 (μL/plate)	用量 (μg/plate)
<i>Salmonella typhimurium</i>								
TA100	AF-2	0.1	100	0.01	B[a]P	50	100	5
TA1535	SA	5	100	0.5	2AA	100	20	2
TA98	AF-2	1	100	0.1	B[a]P	50	100	5
TA1537	9AA	800	100	80	B[a]P	50	100	5
<i>Escherichia coli</i>								
WP2 <i>uvrA</i>	AF-2	0.1	100	0.01	2AA	100	100	10

各検定菌に用いた陽性対照物質は、秦野研究所で十分な蓄積データが得られている物質および用量とした。

3. 検定菌

「新規化学物質等に係る試験の方法について」に従い、試験には、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100、TA1535、TA98、TA1537 および大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2 *uvrA* を用いた。

S. typhimurium TA100、TA1535、TA98、TA1537 の 4 菌株は 1997 年 8 月 7 日に、*E. coli* WP2 *uvrA* 株は 1997 年 4 月 9 日に、いずれも日本バイオアッセイ研究センターの [redacted] より分与された。

S. typhimurium の 4 菌株を用いる試験は、ヒスチジン要求性から非要求性への復帰突然変異²⁾、*E. coli* WP2 *uvrA* 株を用いる試験は、トリプトファン要求性から非要求性への復帰突然変異³⁾を指標とした遺伝子突然変異誘発性の検出系である。

検定菌は冷凍保存(設定温度:-80℃)したもの(凍結保存菌)を、調製後 6 か月以内に用時解凍して試験に用いた。凍結保存菌は、液体培地にて37℃で静止期の初期まで培養した菌液 0.8 mL に対し、滅菌 DMSO を 0.07 mL の割合で加えて混合したものをプラスチックチューブに分注し、急速凍結して調製したものであり、調製時に、アミノ酸要求性、UV 感受性、膜変異(*rfa*)、アンピシリン耐性因子 pKM101(プラスミド)の有無および陰性対照と陽性対照の変異コロニー数について調べ、特性が適正であることが確認されている。

4. 試験材料

1) 最少グルコース寒天平板培地

最少グルコース寒天平板培地(ロット番号:DZAC9G01、2011 年 9 月 16 日製造、極東製薬工業)を購入して用いた。なお、培地 1 L あたりの組成は以下のとおりで、径 90 mm のシャーレ 1 枚あたり 30 mL を流して固めたものである。

硫酸マグネシウム・七水和物 0.2 g

クエン酸・一水和物	2	g
リン酸水素二カリウム	10	g
リン酸二水素アンモニウム	1.92	g
水酸化ナトリウム	0.66	g
グルコース	20	g
大洋寒天(ロット番号:BM-M5-249、清水食品)	15	g

2) トップアガー

①の水溶液をオートクレーブ滅菌後、フィルター滅菌した②または③を容量比 10:1 の割合で混合して用いた。

① バクトアガー (Difco)	0.6 w/v%
塩化ナトリウム	0.5 w/v%
② <i>S. typhimurium</i> 用	
L-ヒスチジン	0.5 mmol/L
D-ビオチン	0.5 mmol/L
③ <i>E. coli</i> 用	
L-トリプトファン	0.5 mmol/L

3) S9 mix の組成および調製

S9 mix 1 mL あたりの組成は以下のとおりで、用時氷冷下で混合して調製した。

成 分	S9 mix 1 mL 中の量	濃度
S9 ^{*1}	0.1 mL	10 vol%
0.2 mol/L ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)	0.5 mL	100 µmol/mL
補酵素溶液 ^{*2}	0.38 mL	—
塩化カリウム	—	33 µmol/mL
グルコース-6-リン酸	—	5 µmol/mL
NADH	—	4 µmol/mL
NADPH	—	4 µmol/mL
0.4 mol/L 塩化マグネシウム溶液	0.02 mL	8 µmol/mL

NADH: Nicotinamide-adenine dinucleotide, reduced form, disodium salt

NADPH: Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, reduced form, tetrasodium salt

^{*1}: S9(ロット番号: RAA-636、2011 年 9 月 2 日製造、キッコーマン)は、フェノバルビタール(PB)および 5,6-ベンゾフラボン(BF)を腹腔内投与(1 日目 PB 30 mg/kg、2 日目 PB 60 mg/kg、3 日目 PB 60 mg/kg + BF 80 mg/kg、4 日目 PB 60 mg/kg)した 7 週齢の雄 Sprague-Dawley 系ラット(体重: 207~250 g)の肝臓から調製したものを購入後、冷凍保存(設定温度: -80℃)して、製造後 6 か月以内に用時解凍して試験に用いた。

^{*2}: 補酵素溶液は、上記の成分を混合してフィルター滅菌したのち、冷凍保存(設定温度: -80℃)し、調製後 6 か月以内に用時解凍して試験に用いた。

5. 被験物質調製液の調製

溶解性の予備検討の結果、被験物質は試験に必要な濃度 (50.0 mg/mL) で水に不溶であったが、DMSO には溶解したことから、媒体には DMSO を用いた。

試験に際しては、被験物質を秤量し、DMSO (ロット番号: ALM9502、和光純薬工業、分光分析用、純度 99.9% 以上) に溶解して最高濃度 (50.0 mg/mL) の被験物質調製液を調製し [調製量: (用量設定試験) 3.0 mL 以上、(本試験 I および II) 5.0 mL 以上]、以下同媒体で段階希釈した。被験物質調製液は用時調製し、媒体添加後 31 分以内 (室温: 25~26℃、用量設定試験)、39 分以内 (室温: 25~26℃、本試験 I) および 30 分以内 (室温: 23~25℃、本試験 II) に使用した。調製濃度を以下に示す。

用量設定試験: 0.0150、0.0500、0.150、0.500、1.50、5.00、15.0、50.0 mg/mL

本試験 I および II: 0.391、0.781、1.56、3.13、6.25、12.5、25.0、50.0 mg/mL

媒体中での被験物質の安定性については、秦野研究所において室温、遮光下で保管した 0.0100 mg/mL および 50.0 mg/mL の濃度の試験液について、調製後 24 時間の安定性を確認した。分析法を資料 3 に示す。その結果、それぞれの平均含量は 99.7% および 98.5% (調製直後)、101.1% および 101.6% (調製後 24 時間)、各測定値のばらつきがそれぞれ 99.7~100.4% および 99.6~100.8% (調製直後)、99.6~100.3% および 99.8~100.2% (調製後 24 時間)、残存率の平均値がそれぞれ 101.4% および 103.1% であった (資料 4)。これらの値は、いずれも試験計画書に記載した許容基準 (平均含量: 90.0~110.0%、各測定値のばらつき: 平均値の 90.0~110.0% 以内、残存率: 90.0% 以上) 内であった。

含量試験については、「医薬品・化学物質 GLP 解説 (2002)、薬事日報社」に基づき実施しなかった。

6. 試験操作

1) 試験菌液の作製

ニュートリエントブロス No. 2 (ロット番号: 612715、Oxoid) を 12 mL 入れた L 字型試験管 (容積: 29 mL) に、解凍した凍結保存菌 24 μ L (TA100、TA1535、TA98、TA1537 および WP2 *uvrA*) をすみやかに接種し、4℃ で保冷後、37℃ で 10 時間、往復振とう培養したものを試験菌液とした。振とうには DOUBLE SHAKER NR-3 (TAITEC) を用い、振幅は 25 mm、振とう回数は毎分 100 回とした。検定菌の増殖の確認のため、レシオビーム分光光度計 (日立 U-1900 形) (HITACHI) により、試験菌液の吸光度を 660 nm で測定した。また、段階希釈法により生菌数を求めた。660 nm の吸光度の測定値および生菌数を以下に示す。

試験の種類		検定菌				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
用量設定試験	OD ₆₆₀	1.866	1.864	1.871	1.885	1.869
	生菌数 ($\times 10^9$ cells/mL)	2.13	2.82	4.02	2.62	2.33
本試験 I	OD ₆₆₀	1.870	1.876	1.857	1.910	1.855
	生菌数 ($\times 10^9$ cells/mL)	1.66	2.71	4.04	2.80	1.52
本試験 II	OD ₆₆₀	1.882	1.845	1.866	1.915	1.873
	生菌数 ($\times 10^9$ cells/mL)	1.77	2.95	3.95	2.79	1.97

各試験菌液の 660 nm の吸光度の測定値は、2010 年度の背景データ(秦野研究所)の平均値の 90% 以上であった。また、各試験菌液の生菌数は 1×10^9 cells/mL 以上であった。

2) 試験法

Ames らの標準法²⁾を参考にして、プレインキュベーション法¹⁾により、1 回の用量設定試験と 2 回の本試験を実施した。試験は、被験物質をそのまま検定菌に作用させる S9 mix 非存在下および哺乳動物(ラット)のもつ薬物代謝酵素によって産生される被験物質の代謝物の遺伝子突然変異誘発性を試験する S9 mix 存在下で行った。

小試験管中に被験物質調製液 0.1 mL、S9 mix 非存在下では 0.1 mol/L ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL、S9 mix 存在下では S9 mix 0.5 mL、試験菌液 0.1 mL を混合し、37℃で 20 分間プレインキュベーションしたのち、2 mL のトップアガーを加えて混和し、最少グルコース寒天平板培地上に流して固めた。また、被験物質調製液のかわりに使用媒体 0.1 mL または陽性対照物質溶液を加えて、それぞれ陰性対照および陽性対照とした。

培養は 37℃で 48 時間行い、出現した変異コロニー数を、コロニーアナライザー(CA-11、システムサイエンス、面積補正有り)または目視により計測した。被験物質に由来する沈殿の有無は、目視により観察した。また、生育阻害の有無については、目視あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌叢の状態から判断した。平板は各用量につき用量設定試験では 1 枚、本試験では 2 枚を使用し、陰性および陽性対照では、各試験とも 2 枚を使用した。陰性および陽性対照の変異コロニー数の平均値を、それぞれ陰性対照値および陽性対照値とした。

3) 試験用量

用量設定試験においては、「新規化学物質等に係る試験の方法について」に従い、すべての検定菌で最高用量を 5000 μ g/plate とし、1.50、5.00、15.0、50.0、150、500、1500 および 5000 μ g/plate の 8 用量を設定した。

本試験 I および II においては、以下の用量を設定した。

(S9 mix 非存在下)

TA100、TA1535、TA98 および TA1537: 39.1、78.1、156、313、625、1250、2500 µg/plate

WP2 *uvrA* : 156、313、625、1250、2500、5000 µg/plate

(S9 mix 存在下)

TA100 および TA1535: 39.1、78.1、156、313、625、1250、2500 µg/plate

WP2 *uvrA*、TA98 および TA1537: 313、625、1250、2500、5000 µg/plate

4) 無菌試験

小試験管中に、最高用量の被験物質調製液 0.1 mL と 0.1 mol/L ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL、あるいは S9 mix 0.5 mL のみを入れ、37℃で 20 分間プレインキュベーションしたのち、2 mL のトッパガー (*S. typhimurium* 用)を加えて混合し、それぞれ最少グルコース寒天平板培地上に流して固めた。37℃で 48 時間培養後、雑菌の混入の有無を調べた。なお、S9 mix の無菌試験については、同日に実施した他の試験と共通に用いた。

5) 識別法

平板側面に識別番号を記載した。S9 mix 非存在下は黒、S9 mix 存在下は赤の色で識別した。菌の識別は、TA100 は 0、TA1535 は 5、TA98 は 9、TA1537 は 7、WP2 *uvrA* は W とした。用量の識別は、菌の識別番号の右に用量の低いものから 1、2、3、・・・と記入した。陰性対照および陽性対照は、菌の識別番号の右に各々 0 および P と記入して識別した。試験の識別は、試験番号のかわりに菌の識別番号の左に用量設定試験では 3、本試験 I および本試験 II では 2 と記入した。生菌数測定における平板の識別は、菌の識別番号の左に VC と記入した。無菌試験における平板の識別は、被験物質については用量設定試験では 3、本試験 I および本試験 II では 2 のみを記入し、S9 mix については S9 と記入した。

6) 背景データによる管理

陰性対照値および陽性対照値が、秦野研究所における背景データの変動範囲内 (平均値 $\pm 3 \times$ 標準偏差) から外れた場合には、該当する検定菌について再度、同一用量を用いて試験を実施し、再試験のデータを採用することとした。なお、2010 年度に実施した各試験の陰性対照値および陽性対照値を背景データとした (資料 5)。

7. 結果の表示

結果の表示は、各々の平板における変異コロニー数の実測値とその平均値 (小数点以下第一位を四捨五入) を示し、用量-反応曲線の図を添付した。また、被験物質に由来する沈殿および生育阻害が認められた場合は、その旨表示することとした。

8. 判定

用いた 5 種の検定菌のうち、1 種以上の検定菌の S9 mix 非存在下あるいは S9 mix 存在下において、被験物質を含有する平板上における変異コロニー数の平均値が、陰性対照値の 2 倍以上に増加し、か

つ、その増加に用量依存性あるいは再現性が認められた場合に、当該試験系において遺伝子突然変異誘発性を有する(陽性)と判定することとした。なお、結果の判定に統計学的手法は用いなかった。

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

試験期間中に、「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。

試験成績と考察

1. 用量設定試験

1,3-Benzenedicarboxylic acid, dimethyl ester について、1.50、5.00、15.0、50.0、150、500、1500 および 5000 µg/plate の 8 用量を設定して用量設定試験を行った(表 1)。その結果、S9 mix 非存在下の TA100、TA1535、TA98 および TA1537 では 1500 µg/plate 以上の用量で、WP2 *uvrA* では 5000 µg/plate の用量で、S9 mix 存在下の TA100 および TA1535 では 1500 µg/plate 以上の用量で生育阻害が認められた。S9 mix 存在下の WP2 *uvrA*、TA98 および TA1537 では生育阻害は認められなかった。被験物質に由来する沈殿は、S9 mix 非存在下では 5000 µg/plate の用量で認められ、S9 mix 存在下では認められなかった。

用量設定試験の結果から、2 回の本試験(本試験 I および本試験 II)における最高用量を、S9 mix 非存在下の TA100、TA1535、TA98 および TA1537 では 2500 µg/plate、WP2 *uvrA* では 5000 µg/plate、S9 mix 存在下の TA100 および TA1535 では 2500 µg/plate、WP2 *uvrA*、TA98 および TA1537 では 5000 µg/plate とした。

2. 本試験

S9 mix 非存在下の TA100、TA1535、TA98 および TA1537 では 39.1、78.1、156、313、625、1250 および 2500 µg/plate の 7 用量を、WP2 *uvrA* では 156、313、625、1250、2500、5000 µg/plate の 6 用量を、S9 mix 存在下の TA100 および TA1535 では 39.1、78.1、156、313、625、1250 および 2500 µg/plate の 7 用量を、WP2 *uvrA*、TA98 および TA1537 では 313、625、1250、2500 および 5000 µg/plate の 5 用量をそれぞれ設定して、本試験 I および本試験 II を行った。(本試験 I: 表 2 および図 1、本試験 II: 表 3 および図 2)。その結果、2 回の本試験ともに、S9 mix 非存在下の TA100 では 1250 µg/plate 以上の用量で、TA1535、TA98 および TA1537 では 2500 µg/plate の用量で、WP2 *uvrA* では 5000 µg/plate の用量で、S9 mix 存在下の TA100 および TA1535 では 2500 µg/plate の用量で生育阻害が認められた。S9 mix 存在下の WP2 *uvrA*、TA98 および TA1537 では生育阻害は認められなかった。被験物質に由来する沈殿は、S9 mix 非存在下では 5000 µg/plate の用量で認められ、S9 mix 存在下では認められなかった。また、

2 回の本試験ともに、用いたいずれの検定菌においても、S9 mix の有無にかかわらず、陰性対照値の 2 倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。

すべての試験において、用いた最高用量の被験物質調製液および S9 mix への雑菌の混入は認められなかった。また、いずれの検定菌においても陽性対照物質の遺伝子突然変異誘発性が検出され、陽性対照値および陰性対照値は、ともに背景データの変動範囲内(平均値 $\pm$ 3 $\times$ 標準偏差)であったことから、当該試験系の妥当性が確認された。

1,3-Benzenedicarboxylic acid, dimethyl ester については、当研究所で実施したチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験(試験番号:G-11-032)で、S9 mix 存在下の短時間処理で陽性の結果が得られている。

また、関連物質である isophthalic acid については復帰突然変異試験で陰性⁴⁾、terephthalic acid については復帰突然変異試験で陰性⁵⁾、dimethyl terephthalate については復帰突然変異試験で陰性⁶⁾の結果が報告されている。

以上の結果から、1,3-benzenedicarboxylic acid, dimethyl ester は、用いた試験系において遺伝子突然変異誘発性を有しない(陰性)と判定した。

参考文献

- 1) Matsushima, T., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A., Sawamura, M.: Factors modulating mutagenicity in microbial tests. in “Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens” Norpoth, K. H., Garner, R. C. eds, Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1980) pp. 273-285
- 2) Maron, D. M., Ames, B. N.: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutation Research 113: 173-215 (1983)
- 3) Green, M. H. L.: Mutagen testing using Trp⁺ reversion in *Escherichia coli*. in “Handbook of Mutagenicity Test Procedures” Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C. eds, Elsevier, Amsterdam (1984) pp. 161-187
- 4) 労働省労働基準局安全衛生部化学物質調査課 監修、労働安全衛生法有害性調査制度に基づく既存化学物質変異原性試験データ集、社団法人日本化学物質安全・情報センター、東京 (1996)p84
- 5) 労働省労働基準局安全衛生部化学物質調査課 監修、労働安全衛生法有害性調査制度に基づく既存化学物質変異原性試験データ集、社団法人日本化学物質安全・情報センター、東京 (1996)p201

- 6) 労働省労働基準局安全衛生部化学物質調査課 監修、労働安全衛生法有害性調査制度に基づく既存化学物質変異原性試験データ集、社団法人日本化学物質安全・情報センター、東京 (1996)p174

表 1 1,3-Benzenedicarboxylic acid, dimethyl ester の細菌を用いる復帰突然変異試験
(用量設定試験)

代謝活性化 系の有無	被験物質用量 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	試験実施期間:2011年11月28日より2011年12月1日					
		復 帰 変 異 数 コロニー数/plate(平均)					
		塩 基 対 置 換 型			フ レ ー ム シ フ ト 型		
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
S9 mix (-)	0 (陰性対照)	90 81 (86)	8 9 (9)	39 33 (36)	15 14 (15)	4 8 (6)	
	1.50	75	10	27	15	5	
	5.00	86	9	32	15	4	
	15.0	99	8	40	11	7	
	50.0	114	10	30	14	5	
	150	100	17	21	17	8	
	500	102	10	34	18	7	
	1500	62 *	7 *	30	13 *	2 *	
	5000 †	60 *	5 *	34 *	10 *	5 *	
S9 mix (+)	0 (陰性対照)	93 81 (87)	12 6 (9)	40 35 (38)	37 31 (34)	12 15 (14)	
	1.50	81	8	40	25	15	
	5.00	93	11	33	30	11	
	15.0	102	10	43	32	17	
	50.0	83	9	44	21	19	
	150	69	9	49	32	19	
	500	70	15	44	46	17	
	1500	73 *	4 *	43	31	13	
	5000	79 *	10 *	44	49	12	
陽 性 対 照	S9 mixを 必要とし ないもの	名称	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9AA
		用量($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
		コロニー数/plate	327 335 (331)	458 485 (472)	86 75 (81)	351 382 (367)	383 333 (358)
	S9 mixを 必要とす るもの	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
		用量($\mu\text{g}/\text{plate}$)	5	2	10	5	5
		コロニー数/plate	1180 1058 (1119)	352 378 (365)	696 572 (634)	359 329 (344)	186 160 (173)

陰性対照, ジメチルスルホキシド

AF-2, 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; SA, Sodium azide; 9AA, 9-Aminoacridine; B[a]P, Benzo[a]pyrene; 2AA, 2-Aminoanthracene

†, 沈殿が認められた。

*, 生育阻害が認められた。

表 2 1,3-Benzenedicarboxylic acid, dimethyl ester の細菌を用いる復帰突然変異試験(本試験 I)

代謝活性化 系の有無		被験物質用量 (μg/plate)	試験実施期間:2011年12月5日より2011年12月8日									
			復 帰 変 異 数 コロニー数/plate(平均)									
			塩 基 対 置 換 型					フ レ ー ム シ フ ト 型				
			TA100		TA1535		WP2 <i>uvrA</i>		TA98		TA1537	
S9 mix (-)	0 (陰性対照)	88 108 (98)	14 13 (14)	30 33 (32)	29 19 (24)	11 6 (9)						
	39.1	97 97 (97)	16 15 (16)	NT	22 16 (19)	6 6 (6)						
	78.1	100 108 (104)	11 7 (9)	NT	25 26 (26)	9 9 (9)						
	156	102 107 (105)	13 18 (16)	24 22 (23)	34 21 (28)	5 8 (7)						
	313	113 79 (96)	16 8 (12)	25 25 (25)	25 31 (28)	7 7 (7)						
	625	79 69 (74)	16 12 (14)	28 27 (28)	22 34 (28)	8 11 (10)						
	1250	80 * 83 * (82)	10 14 (12)	21 18 (20)	21 27 (24)	7 8 (8)						
	2500	69 * 74 * (72)	15 * 10 * (13)	16 25 (21)	23 * 20 * (22)	5 * 4 * (5)						
	5000 †	NT	NT	25 * 22 * (24)	NT	NT						
S9 mix (+)	0 (陰性対照)	91 88 (90)	13 12 (13)	31 21 (26)	24 37 (31)	20 20 (20)						
	39.1	83 86 (85)	11 11 (11)	NT	NT	NT						
	78.1	91 105 (98)	11 11 (11)	NT	NT	NT						
	156	76 95 (86)	16 16 (16)	NT	NT	NT						
	313	76 88 (82)	10 8 (9)	28 28 (28)	33 28 (31)	16 18 (17)						
	625	79 95 (87)	10 9 (10)	36 41 (39)	24 35 (30)	18 19 (19)						
	1250	89 73 (81)	14 15 (15)	29 30 (30)	50 24 (37)	14 21 (18)						
	2500	73 * 92 * (83)	8 * 7 * (8)	37 29 (33)	42 42 (42)	13 19 (16)						
	5000	NT	NT	31 43 (37)	50 41 (46)	16 15 (16)						
陽 性 対 照	S9 mixを 必要とし ないもの	名称	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9AA					
		用量(μg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80					
		コロニー数/plate	319 388 (354)	585 577 (581)	106 82 (94)	435 424 (430)	293 326 (310)					
	S9 mixを 必要とす るもの	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P					
		用量(μg/plate)	5	2	10	5	5					
		コロニー数/plate	1110 1055 (1083)	362 408 (385)	475 528 (502)	361 344 (353)	162 173 (168)					

陰性対照, ジメチルスルホキシド

AF-2, 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; SA, Sodium azide; 9AA, 9-Aminoacridine; B[a]P, Benzo[a]pyrene; 2AA, 2-Aminoanthracene

†, 沈殿が認められた。

*, 生育阻害が認められた。

NT, 実施せず。

表 3 1,3-Benzenedicarboxylic acid, dimethyl ester の細菌を用いる復帰突然変異試験(本試験 II)

代謝活性化 系の有無	被験物質用量 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	試験実施期間:2011年12月12日より2011年12月15日					
		復帰突然変異数 コロニー数/plate(平均)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
S9 mix (-)	0 (陰性対照)	92 113 (103)	17 16 (17)	39 37 (38)	25 14 (20)	13 8 (11)	
	39.1	95 96 (96)	14 13 (14)	NT	24 18 (21)	4 8 (6)	
	78.1	102 91 (97)	18 13 (16)	NT	19 22 (21)	5 4 (5)	
	156	93 100 (97)	16 17 (17)	29 40 (35)	35 18 (27)	8 9 (9)	
	313	106 112 (109)	18 13 (16)	34 32 (33)	25 29 (27)	9 14 (12)	
	625	100 112 (106)	15 8 (12)	40 28 (34)	26 28 (27)	5 8 (7)	
	1250	74 * 90 * (82)	16 15 (16)	25 24 (25)	19 28 (24)	7 6 (7)	
	2500	75 * 74 * (75)	8 * 12 * (10)	34 26 (30)	19 * 17 * (18)	8 * 4 * (6)	
	5000 †	NT	NT	36 * 36 * (36)	NT	NT	
S9 mix (+)	0 (陰性対照)	100 90 (95)	13 13 (13)	44 34 (39)	37 27 (32)	22 21 (22)	
	39.1	94 99 (97)	17 15 (16)	NT	NT	NT	
	78.1	98 107 (103)	13 12 (13)	NT	NT	NT	
	156	102 103 (103)	15 15 (15)	NT	NT	NT	
	313	96 90 (93)	7 16 (12)	47 38 (43)	36 40 (38)	22 25 (24)	
	625	109 112 (111)	8 11 (10)	49 30 (40)	43 45 (44)	19 20 (20)	
	1250	84 94 (89)	12 10 (11)	37 47 (42)	40 40 (40)	24 22 (23)	
	2500	99 * 95 * (97)	9 * 8 * (9)	45 47 (46)	39 39 (39)	25 25 (25)	
	5000	NT	NT	31 35 (33)	42 53 (48)	23 22 (23)	
陽性 対照	S9 mixを 必要とし ないもの	名称	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9AA
		用量($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	S9 mixを 必要とす るもの	コロニー数/plate	428 388 (408)	533 512 (523)	122 132 (127)	483 451 (467)	421 368 (395)
		名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
		用量($\mu\text{g}/\text{plate}$)	5	2	10	5	5
		コロニー数/plate	1167 1118 (1143)	390 352 (371)	547 591 (569)	406 389 (398)	153 152 (153)

陰性対照、ジメチルスルホキシド

AF-2, 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; SA, Sodium azide; 9AA, 9-Aminoacridine; B[a]P, Benzo[a]pyrene; 2AA, 2-Aminoanthracene

†, 沈殿が認められた。

*, 生育阻害が認められた。

NT, 実施せず。

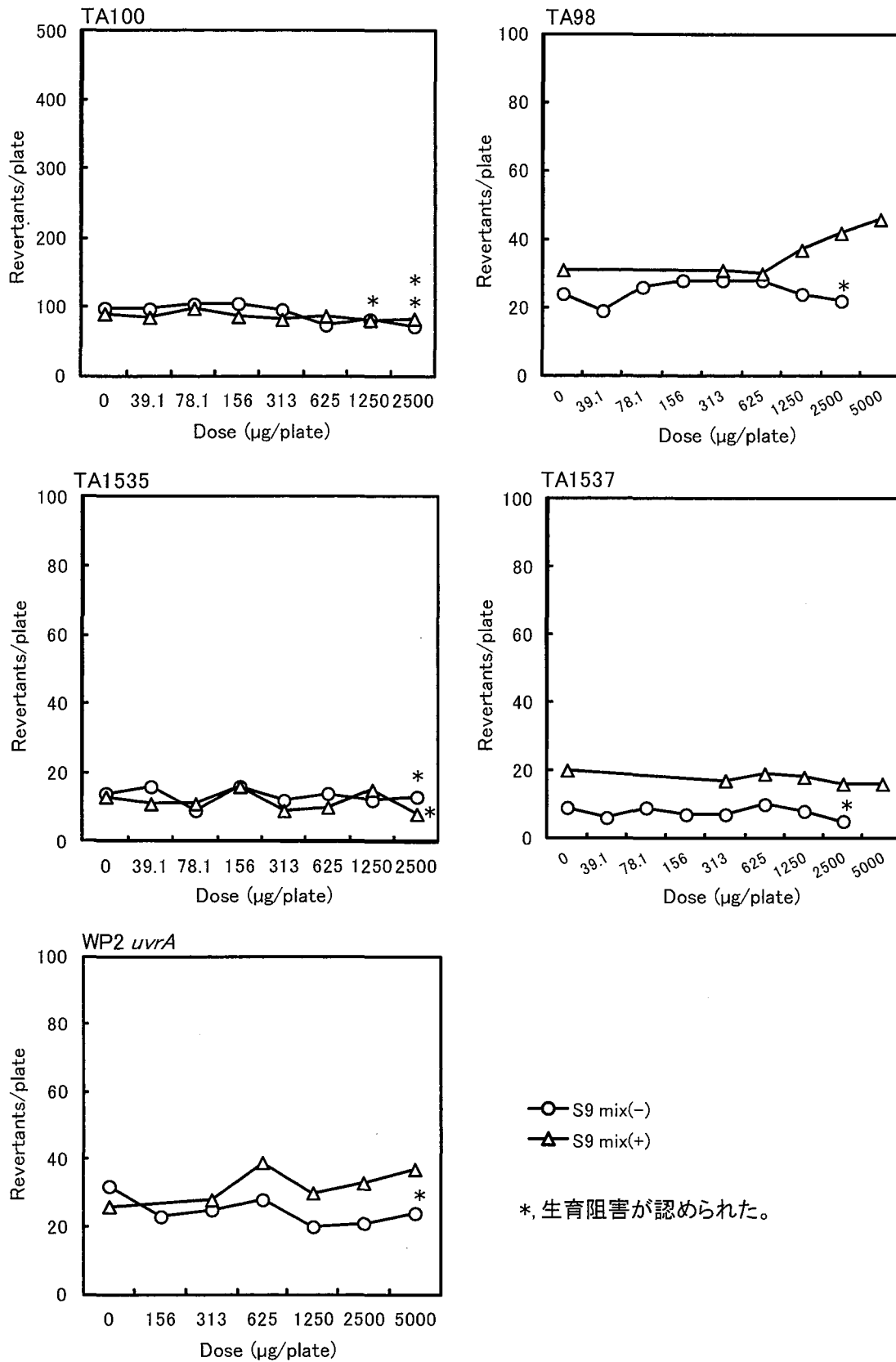


図 1 1,3-Benzenedicarboxylic acid, dimethyl ester の細菌を用いる復帰突然変異試験(本試験 I)

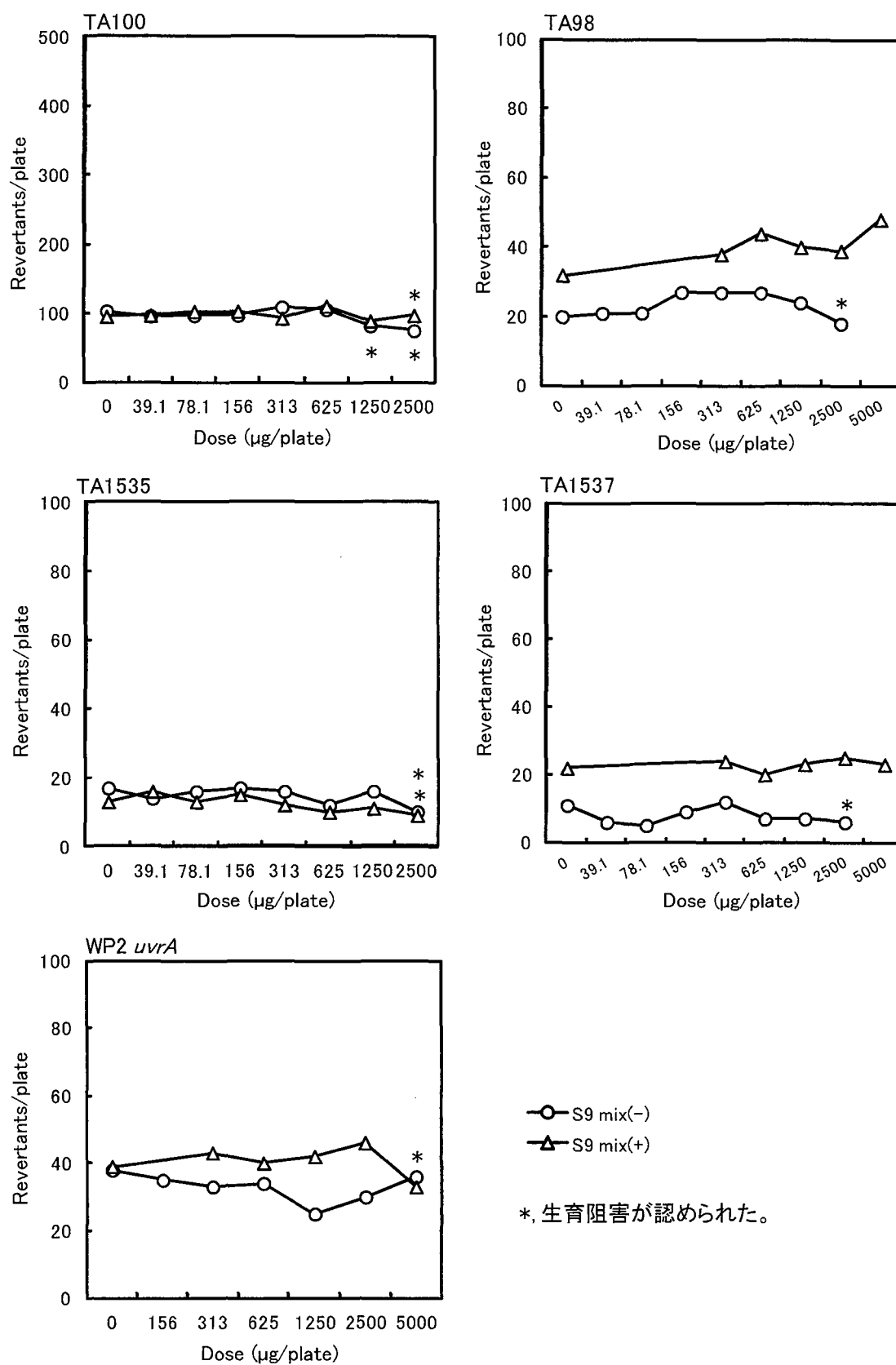


図 2 1,3-Benzenedicarboxylic acid, dimethyl ester の細菌を用いる復帰突然変異試験(本試験 II)

資料 1



試験成績書

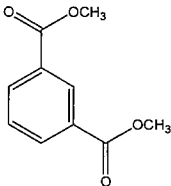
2011年09月27日

東京化成工業株式会社 品質保証部
〒103-0023
東京都中央区日本橋本町4丁目10番1号
TEL: 03(5640)8860 FAX: 03(5640)8861

製品名: Dimethyl Isophthalate					
製品コード: I0157	等級: EP	製品ロット: FGM01	判定: 合格		
項目	結果		規格値		
外観/溶解性	透明		ほとんど透明以内		
純度(GC)	99.9 %		99.0 %以上		
融点	68.9 deg-C		67.0 ~ 71.0 deg-C		
酸価	0.1		0.5 以下		

資料 2

被験物質の一般的事項

新規化学物質等の名称 (IUPAC 命名法による)	イソフタル酸ジメチル		
別 名	1,3-Benzenedicarboxylic acid, dimethyl ester、Dimethyl isophthalate、Isophthalic acid dimethyl ester		
C A S 番 号	1459-93-4		
構 造 式 又 は 示 性 式 (いずれも不明の場合は、その製法の概要)			
分 子 量	194.18		
試 験 に 供 し た 新 規 化学物質の純度 (%)	99.9% (GC)		
試 験 に 供 し た 新 規 化学物質のロット番号	FGM01		
不 純 物 の 名 称 及び含有率	_____		
蒸 気 圧	1.3Pa/25℃		
対 水 溶 解 度	メタノールに可溶、水に不溶 (290 mg/L)		
1-オクタノール／水分配係数	1.7		
融 点	69℃		
沸 点	124℃/0.3 kPa		
常 温 に お け る 性 状	白色～ほとんど白色、結晶～粉末		
安 定 性	適切な条件下においては安定 (製品安全データシートより)。		
溶媒に対する溶解度等	溶 媒	溶 解 度 *	溶 媒 中 の 安 定 性 *
	水	20.0 mg/mL で不溶	50.0 mg/mL の濃度では、調製時に発熱、発泡および変色は認められなかった。
	D M S O	50.0 mg/mL で溶解	50.0 mg/mL の濃度では、調製時に発熱、発泡および変色は認められなかった。調製後 24 時間の安定性 (0.01 mg/mL および 50.0 mg/mL、室温、遮光保管) を確認した (試験番号: M-11-043)。
	アセトン	200 mg/mL で溶解	194 mg/mL の濃度では、調製時に発熱、発泡および変色は認められなかった。調製後 24 時間の安定性 (0.01 mg/mL および 200 mg/mL、室温、遮光保管) を確認した (試験番号: G-11-032)。

〔備考〕物理化学的性状は、可能な限り記入すること。

1. 「蒸気圧」の欄には、被験物質の蒸気圧を記入すること。
2. 「安定性」の欄には、温度、光等に対する安定性を記入すること。
3. 「溶媒に対する溶解度等」の欄には、被験物質の溶媒に対する溶解度及びその溶媒中での安定性を記入すること。

*: (財)食品薬品安全センター秦野研究所において確認した。

資料 3

投与検体中の被験物質濃度測定法

① 試薬

蒸留水(HPLC 用)	和光純薬工業
アセトニトリル(HPLC 用)	和光純薬工業

② 使用機器

電子天秤(R200D)	ザルトリウス
高速液体クロマトグラフ(HPLC)システム	島津製作所

主要構成: LC-10AD VP(ポンプ)、SIL-10AD VP(オートインジェクタ)、CTO-10AC VP(カラムオーブン)、SPD-10A VP(検出器)、SCL-10A VP(システムコントローラ)、デガッサ(DGU-20A3)、C-R7A plus(データ処理装置)

③ 標準溶液の調製

被験物質 10.00 mg を精密に量り、アセトニトリルに溶解して正確に 50 mL とした。この液 1 mL を正確にとり、アセトニトリルを加えて正確に 20 mL とし、標準原液とした。さらに、この標準原液 1、1 および 4 mL を正確にとり、アセトニトリルを加えてそれぞれ正確に 20、10 および 10 mL とし、標準溶液(0.500、1.00 および 4.00 $\mu\text{g/mL}$ 、各濃度 $n=1$)を調製した。

④ 試料溶液の調製

投与検体の 1 mL を正確にとり、アセトニトリルで適宜希釈し、試料溶液(1.00 $\mu\text{g/mL}$)を調製した。試料溶液は、投与検体の採取から $n=3$ で調製した。

⑤ 検量線の作成および投与検体中被験物質濃度の算出

試料溶液および標準溶液を高速液体クロマトグラフ(HPLC)法により測定した。標準溶液は $n=3$ で測定し、得られた DMIP のピーク面積と調製濃度を基に、最小二乗法により検量線を作成した。試料溶液は、各 $n=1$ で測定し、得られた DMIP のピーク面積から、先の検量線を用いて、試料溶液中の DMIP の濃度を求めた。さらに、希釈係数を乗じて投与検体中の DMIP 濃度を算出し、調製濃度に対する割合(%)および各測定濃度の平均値に対するばらつき(%)を算出した。

⑥ HPLC 測定条件

検出器	紫外分光光度計(測定波長 210 nm)
分析カラム	XTerra RP18 (内径 4.6 mm、長さ 100 mm、粒子径 3.5 μm 、Waters)
移動相	蒸留水/アセトニトリル混液(65:35 v/v)
流量	1 mL/min
カラム設定温度	40°C
試料設定温度	室温
試料注入量	10 μL
オートインジェクタ洗浄液	アセトニトリル

システムの適合性 測定開始前および測定終了後に標準溶液(1.000 $\mu\text{g/mL}$)を 1 回ずつ測定し、ピーク保持時間および強度(ピーク面積)の変動(測定開始前に対する測定終了後の偏差%)が許容基準内(ピーク保持時間が $\pm 3.0\%$ 以内、ピーク強度が $\pm 5.0\%$ 以内)であることを確認した。

⑦ 数値の取り扱い

被験物質の秤量: 有効数字 3 桁以上

標準物質の秤量: 有効数字 4 桁以上

投与検体の濃度: 有効数字 3 桁(有効数字 4 桁目を四捨五入)

標準溶液の濃度: 有効数字 4 桁(有効数字 5 桁目を切り捨て)

測定結果の濃度およびそれらの平均値:

有効数字 4 桁(有効数字 5 桁目を切り捨て)

測定結果の含量(%), ばらつき(%), および残存率(%), ならびにそれらの平均値:

小数点以下第 1 位(小数点以下第 2 位を四捨五入)

資料 4

安定性試験結果

試験番号	M - 11 - 043
------	--------------

被験(対照)物質: 1,3-Benzenedicarboxylic acid, dimethyl ester

調製年月日 2011年11月17日

ロット番号:FGM01

測定年月日 A 2011年11月17日(調製直後)

媒体:ジメチルスルホキシド

B 2011年11月18日(調製後24時間)

保存条件 室温、遮光

調製濃度 (mg/mL)	A				B				
	試料 番号	測定濃度 (mg/mL)	含量 ^{a)} (%)	ばらつき ^{b)} (%)	試料 番号	測定濃度 (mg/mL)	含量 ^{a)} (%)	ばらつき ^{b)} (%)	残存率 ^{c)} (%)
0.0100	1	0.01001	100.1	100.4	7	0.01006	100.6	99.6	100.9
	2	0.009949	99.5	99.7	8	0.01013	101.3	100.3	101.6
	3	0.009964	99.6	99.9	9	0.01013	101.3	100.3	101.6
	平均	0.009974	99.7		平均	0.01010	101.1		101.4
50.0	4	49.67	99.3	100.8	10	50.69	101.4	99.8	102.9
	5	49.11	98.2	99.7	11	50.75	101.5	100.0	103.0
	6	49.05	98.1	99.6	12	50.89	101.8	100.2	103.3
	平均	49.27	98.5		平均	50.77	101.6		103.1

a):各測定時の測定濃度/調製濃度×100

b):各測定時の測定濃度/各測定時の平均測定濃度×100

c):各測定時の測定濃度/初回の平均測定濃度×100

安定性の判断基準(溶液検体)

調製直後および保管後の平均含量がそれぞれ調製濃度の90.0～110.0%、また、各測定値のばらつきがそれぞれ平均値の90.0～110.0%以内であり、かつ、調製直後の測定平均値に対する保管後の残存率の平均値が90.0%以上を示す期間とする。

資料 5

試験に用いた検定菌の復帰変異コロニー数の
背景データ(プレインキュベーション法)

(2010年4月～2011年3月)

	陰性対照値		陽性対照値	
	(- S9 mix)	(+ S9 mix)	(- S9 mix)	(+ S9 mix)
TA100	105 ± 11* (n=122)	105 ± 13 (n=132)	359 ± 32 (AF-2, 0.01 µg/plate) (n=111)	938 ± 81 (B[a]P, 5 µg/plate) (n=60)
TA1535	12 ± 3 (n=106)	12 ± 3 (n=109)	508 ± 50 (SA, 0.5 µg/plate) (n=97)	398 ± 36 (2AA, 2 µg/plate) (n=100)
WP2 <i>uvrA</i>	27 ± 4 (n=101)	30 ± 5 (n=108)	102 ± 14 (AF-2, 0.01 µg/plate) (n=94)	675 ± 73 (2AA, 10 µg/plate) (n=98)
TA98	22 ± 4 (n=128)	33 ± 6 (n=136)	433 ± 57 (AF-2, 0.1 µg/plate) (n=118)	297 ± 34 (B[a]P, 5 µg/plate) (n=67)
TA1537	9 ± 2 (n=108)	16 ± 3 (n=119)	377 ± 76 (9AA, 80 µg/plate) (n=98)	145 ± 20 (B[a]P, 5 µg/plate) (n=55)

*: 平均値の平均 ± 標準偏差
n: 試験数

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide
SA : Sodium azide
9AA : 9-Aminoacridine
B[a]P : Benzo[a]pyrene
2AA : 2-Aminoanthracene

信頼性保証書

表題 1,3-Benzenedicarboxylic acid, dimethyl ester の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号 M-11-043

この試験に関する信頼性保証部門による査察および監査状況等は下記のとおりであった。

査察・監査項目	査察・監査年月日	運営管理者および試験責任者への報告年月日
試験計画書	2011 年 11 月 2 日	2011 年 11 月 2 日
試験計画書変更書		
M-11-043-No.1	2011 年 11 月 17 日	2011 年 11 月 17 日
M-11-043-No.2	2011 年 12 月 5 日	2011 年 12 月 5 日
媒体中での安定性	2011 年 11 月 17 日	2011 年 11 月 17 日
被験物質調製液の調製および検定菌処理	2011 年 12 月 6 日	2011 年 12 月 6 日
コロニー数の計測	2011 年 12 月 8 日	2011 年 12 月 8 日
報告書草案・生データ	2012 年 2 月 13、14 日	2012 年 2 月 15 日
最終報告書	2012 年 3 月 9 日	2012 年 3 月 9 日

試験は、「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」(平成 23 年 3 月 31 日、薬食発 0331 第 8 号、平成 23・03・29 製局第 6 号、環保企発第 110331010 号)を遵守して実施され、また、この報告書は試験に使用された方法および手順を正確に記載し、記載された結果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。

2012 年 3 月 9 日

財団法人食品薬品安全センター秦野研究所

信頼性保証部門責任者

