T-2844

原本

最　終　報　告　書

Ethyl ethyldimethyltetradecylammonium sulphate の
細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：T-2844

試験期間：2019 年 1 月 22 日-2019 年 3 月 27 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　医薬・生活衛生局　医薬品審査管理課　化学物質安全対策室
〒100-8916　東京都千代田区霞が関 1-2-2

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

1. GLP 陳述書

試験番号 : T-2844

試験表題 : Ethyl ethyldimethyltetradecylammonium sulphate の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 号環境省総合環境政策局長通知）

[redacted] 2019年 3月 27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 試験委託者 6
3.5 試験受託者 6
3.6 試験実施施設 6
3.7 試験日程 6
3.8 試験責任者 7
3.9 被験物質保存責任者 7
3.10 試験担当者 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 試資料保存 7
3.13 試験責任者の署名 7
4. 要約 8
5. 緒言 10
6. 被験物質及び被験液の調製 11
6.1 被験物質及び溶媒 11
6.1.1 被験物質 11
6.1.2 溶媒 12
6.1.3 溶媒の選択理由 12
6.1.4 被験液の調製方法 12
6.1.4.1 用量設定試験用被験液の調製 12
6.1.4.2 本試験用被験液の調製 12
6.1.4.3 追加試験用被験液の調製 13
7. 試験材料及び方法 14
7.1 試験菌株 14
7.1.1 菌株の種類 14
7.1.2 菌株の選択理由 14
7.1.3 菌株の保存及び解凍 14
7.1.4 菌株の特性検査 15
7.2 対照物質 15
7.2.1 陰性対照物質 15

7.2.2 陽性対照物質 15
7.2.3 調製方法 16
7.3 試薬 16
7.3.1 S9 Mix の調製方法 16
7.3.2 培地 17
7.3.3 ニュートリエントブロス No.2 培養液 18
7.3.4 0.1 mol/L リン酸緩衝液（pH 7.4） 18
7.3.5 トップアガー 18
7.4 試験方法 19
7.4.1 識別方法 19
7.4.2 前培養 20
7.4.3 プレート数 20
7.4.4 試験操作（プレインキュベーション法） 20
7.5 判定基準 21
8. 試験結果 22
8.1 用量設定試験の観察結果及び本試験用量の設定及び追加試験の設定 22
8.2 本試験及び追加試験の観察結果 22
8.3 試験の成立条件 23
9. 考察 24
10. 参考文献 25

別表

別表 1 試験結果表（用量設定試験） 26
別表 2 試験結果表（本試験：−S9Mix） 27
別表 3 試験結果表（本試験：+S9Mix） 28
別表 4 試験結果表（追加試験：−S9Mix） 29
別表 5 試験結果表（追加試験：+S9Mix） 30

図

図 1 用量反応曲線（本試験 TA100：−S9Mix） 31
図 2 用量反応曲線（本試験 TA100：+S9Mix） 31
図 3 用量反応曲線（本試験 TA1535：−S9Mix） 32
図 4 用量反応曲線（本試験 TA1535：+S9Mix） 32
図 5 用量反応曲線（本試験 WP2 *uvrA*：−S9Mix） 33
図 6 用量反応曲線（本試験 WP2 *uvrA*：+S9Mix） 33
図 7 用量反応曲線（本試験 TA98：−S9Mix） 34
図 8 用量反応曲線（本試験 TA98：+S9Mix） 34
図 9 用量反応曲線（本試験 TA1537：−S9Mix） 35

図 10　用量反応曲線（本試験 TA1537：+S9Mix）..... 35

Attachment

Attachment　Background Data（180728）..... 36

信頼性保証書 37

3. 試験実施概要

3.1 試験番号

T-2844

3.2 試験表題

Ethyl ethyldimethyltetradecylammonium sulphate の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、Ethyl ethyldimethyltetradecylammonium sulphate の遺伝子突然変異誘発能の有無を明らかにすることを目的とした。

3.4 試験委託者

厚生労働省　医薬・生活衛生局　医薬品審査管理課　化学物質安全対策室

〒100-8916　東京都千代田区霞が関 1-2-2

3.5 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

3.6 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

3.7 試験日程

試験開始日	:	2019 年　1 月　22 日
用量設定試験開始日	:	2019 年　1 月　23 日
用量設定試験終了日	:	2019 年　1 月　26 日
本試験開始日	:	2019 年　1 月　28 日
本試験終了日	:	2019 年　1 月　31 日
追加試験開始日	:	2019 年　1 月　29 日
追加試験終了日	:	2019 年　2 月　1 日
試験終了日	:	2019 年　3 月　27 日

3.8　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

[redacted]

3.9　被験物質保存責任者

株式会社ボゾリサーチセンター　東京研究所　研究部

[redacted]

3.10　試験担当者

株式会社ボゾリサーチセンター　東京研究所　研究部

担当者：[redacted]

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、その期間は最終報告書提出後 10 年間とする。期間終了後の保存については、厚生労働省　医薬・生活衛生局　医薬品審査管理課　化学物質安全対策室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。

3.13　試験責任者の署名

[redacted]　2019年 3月 27日

株式会社ボゾリサーチセンター　東京研究所

4. 要約

Ethyl ethyldimethyltetradecylammonium sulphate の遺伝子突然変異誘発能の有無を検討するため、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、1.22~5000 μg/plate の範囲の被験物質処理用量で用量設定試験を実施した。その結果より本試験は、生育阻害が認められた最低用量を最高用量として、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1537 においては 0.15~4.88 μg/plate の範囲の 6 用量、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1537 においては 0.61~19.5 μg/plate の範囲の 6 用量、代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* においては 2.44~78.1 μg/plate の範囲の 6 用量で実施した。

用量設定試験の結果、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての菌株において生育阻害が認められない用量数が 4 用量以上得られなかったため本試験と同一用量で追加試験を実施し、再現性の確認をした。

1) 被験物質による沈殿

本被験物質によるプレート上の沈殿は、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての用量においても認められなかった。

2) 生育阻害

実体顕微鏡を用いて菌に対する生育阻害を観察した結果、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1537 の 2.44 μg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* の 9.77 μg/plate 以上、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1537 の 19.5 μg/plate 以上、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* の 39.1 μg/plate 以上の用量で認められた。

3)　復帰変異コロニー数

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 Ethyl ethyldimethyltetradecyl ammonium sulphate は、細菌に対する遺伝子突然変異誘発能を有しない（陰性）と判定した。

5. 緒言

厚生労働省　医薬・生活衛生局　医薬品審査管理課　化学物質安全対策室の委託により、株式会社ボゾリサーチセンターで実施した。なお、試験は以下の基準を遵守し、ガイドラインに準拠して行った。

1) Good Laboratory Practice（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 号環境省総合環境政策局長通知）

2) ガイドライン

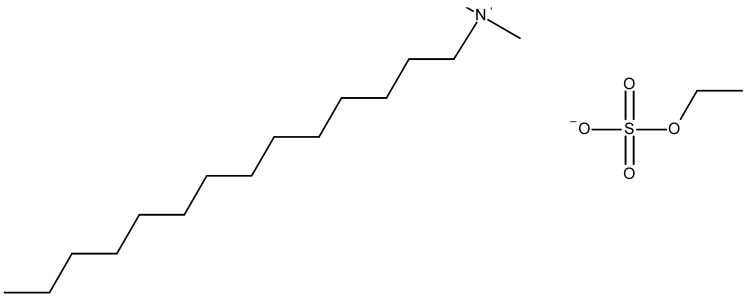
- 「新規化学物質等に係る試験の方法について」
  （平成 23 年 3 月 31 日付け薬食発 0331 第 7 号厚生労働省医薬食品局長、平成 23・03・29 製局第 5 号経済産業省製造産業局長、環保企発第 110331009 号環境省総合環境政策局長連名通知）（最終改正：平成 30 年 3 月 29 日）
- 「新規化学物質の判定及び監視化学物質への該当性の判定等に係る試験方法及び判定基準」（最終改正：平成 30 年 4 月 13 日）

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

供給元	:	[redacted]
入手量	:	29.3480 g（風袋込量）（T-G396 と共通）
入手年月日	:	2019 年 1 月 8 日
名称	:	Ethyl ethyldimethyltetradecylammonium sulphate
CAS 番号	:	19309-23-0
ロット番号	:	[redacted]
構造式	:	



示性式	:	$C_{18}H_{40}N.C_2H_5O_4S$
純度	:	99.1 wt%
不純物の名称及び濃度		
	:	Tetradecyldimethylamine：0.4 wt%
		Ethylsulfuric acid：0.4 wt%
分子量	:	395.64
沸点	:	150°C（分解）
常温における性状	:	白色固体
安定性	:	常温で安定、吸湿性あり
溶解性	:	水、ジメチルスルホキシド（以下、DMSO と略す）、
		アセトン：> 2000 mg/mL
溶媒中での安定性	:	水：発熱、ガスの発生等の反応性なし
保存条件	:	冷暗所・密栓
保存場所	:	東京研究所　被験物質保存室
保存温度	:	保存期間中の実測温度
		（2019.1.8~2019.1.30：3.0~3.9°C）
残余の処置	:	関連試験終了後の残量はすべて供給元に返却した。

上記被験物質情報は、供給元からの情報による。なお、水中での安定性は、株式会社ボゾリサーチセンターで実施した被験液の調製時の結果である。

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	:	K8H76
規格	:	日本薬局方
保存方法	:	室温保存
保存場所	:	東京研究所　被験物質調製室

6.1.3 溶媒の選択理由

被験物質供給元からの水に対する溶解度が> 2000 mg/mL との情報より、注射用水を溶媒として試験を実施した。

6.1.4 被験液の調製方法

6.1.4.1 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電子天秤(株式会社エー・アンド・ディ:GR-120)を用いて秤量した。その秤量値 361.8 mg に最高調製濃度の 50 mg/mL となるように 7.236 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。

6.1.4.2 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電子天秤(株式会社エー・アンド・ディ:GR-120)を用いて秤量した。その秤量値 135.4 mg に最高調製濃度の 50 mg/mL となるように 2.708 mL の注射用水を添加して溶解し、50 mg/mL の溶液を調製した。次いでこれを公比 4 で 3 段階希釈して 0.781 mg/mL の被験液を調製した。これをさらに公比 2 で順次 9 段階希釈し 0.781、0.391、0.195、0.0977、0.0488、0.0244、0.0122、0.0061、0.0031 及び 0.0015 mg/mL の計 10 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。

6.1.4.3　　追加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電子天秤(株式会社エー・アンド・ディ:GR-120)を用いて秤量した。その秤量値 190.8 mg に最高調製濃度の 50 mg/mL となるように 3.816 mL の注射用水を添加して溶解し、50 mg/mL の溶液を調製した。次いでこれを公比 4 で 3 段階希釈して 0.781 mg/mL の被験液を調製した。これをさらに公比 2 で順次 9 段階希釈し 0.781、0.391、0.195、0.0977、0.0488、0.0244、0.0122、0.0061、0.0031 及び 0.0015 mg/mL の計 10 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

菌株は国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部より 2017 年 4 月 12 日に入手した。

7.1.2 菌株の選択理由

毒性試験法ガイドラインに準じて選択した。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 DMSO（富士フイルム和光純薬株式会社、JIS 規格試薬特級、ロット番号 ECE6658）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、ドライアイス-アセトンで急速凍結した後、−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。

	使用した菌株の凍結保存日
S. typhimurium TA98	2018 年11 月21 日
S. typhimurium TA100	2018 年11 月21 日
S. typhimurium TA1535	2018 年11 月21 日
S. typhimurium TA1537	2018 年11 月21 日
E. coli WP2 *uvrA*	2018 年11 月21 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、陰性対照値及び陽性対照値等の特性を検査し、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
S. typhimurium TA98	2018 年11 月21 日 ～ 2018 年11 月26 日
S. typhimurium TA100	2018 年11 月21 日 ～ 2018 年11 月26 日
S. typhimurium TA1535	2018 年11 月21 日 ～ 2018 年11 月26 日
S. typhimurium TA1537	2018 年11 月21 日 ～ 2018 年11 月26 日
E. coli WP2 *uvrA*	2018 年11 月21 日 ～ 2018 年11 月26 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

毒性試験法ガイドラインに準じて、以下の変異原物質を陽性対照物質とした。

表 1　陽性対照物質一覧

陽性対照物質（略称）	ロット番号	純度(%)	保存方法	製造元
2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide（AF-2）	PTR1925	99.6	室温、遮光	富士フイルム和光純薬株式会社
Sodium azide（SAZ）	YSF7467	99.9	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）	562079	－	室温、遮光	Polysciences, Inc.
2-Aminoanthracene（2AA）	CTK0326	96.7	室温、遮光	富士フイルム和光純薬株式会社
Benzo[*a*]pyrene（B[*a*]P）	ECF5055	99.6	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、JIS 規格 試薬特級、ロット番号 TWK5488）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 K8A74）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一覧

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)
S. typhimurium TA100	AF-2	0.1　(0.01)	B[*a*]P	50　(5.0)
S. typhimurium TA1535	SAZ	5　(0.5)	2AA	20　(2.0)
E. coli WP2 *uvrA*	AF-2	0.1　(0.01)	2AA	100　(10.0)
S. typhimurium TA98	AF-2	1　(0.1)	B[*a*]P	50　(5.0)
S. typhimurium 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。

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	:	S9
製造元	:	株式会社ボゾリサーチセンター　つくば研究所
ロット番号	:	S9-181214
製造日	:	2018 年 12 月　14 日
使用期限	:	2019 年　6 月　13 日
種・系統	:	ラット・SD 系
週齢・性	:	7 週齢・雄
体重	:	242.1~266.1 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　変異原性試験室

2) 補酵素

名称	:	コファクターFA
製造元	:	株式会社ボゾリサーチセンター　つくば研究所
ロット番号	:	FA-181127
製造日	:	2018 年　11 月　27 日
使用期限	:	2019 年　5 月　26 日
保存方法	:	冷凍保存（−70°C 以下）
保存場所	:	東京研究所　変異原性試験室

3) S9 Mix の組成（1 mL 中）

水	:	0.9 mL
S9	:	0.1 mL
$MgCl_2$	:	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
リン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.4）	:	100 µmol

7.3.2　培地

1) 最小グルコース寒天平板培地

名称	:	バイタルメディア AMT-S 培地
製造元	:	極東製薬工業株式会社
ロット番号	:	DZAJB601
製造日	:	2018 年 11 月　6 日
使用期限	:	2019 年　5 月　5 日
保存方法	:	室温保存
保存場所	:	東京研究所　寒天培地保存室

2) 使用寒天

名称	:	大洋寒天
製造元	:	SSK セールス株式会社
ロット番号	:	BM-M5-273

7.3.3　　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、使用期限（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　　：　1554986
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

7.3.4　　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た。これを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　　：　LKG3644
保存方法　　：　室温保存
保存場所　　：　東京研究所　微生物試験室

7.3.5　　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、使用時は電子レンジで溶解後、固化を防ぐため 45°C の恒温槽で保温した。

1)　寒天

名称　　：　Bacto Agar
製造元　　：　Becton, Dickinson and Company
ロット番号　　：　7306672
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　　：　APP0520
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	:	WDM0381
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	:	CTK0488
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	:	CTH2695
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

1) 菌株の識別

以下に示す色のマーカーで識別した。

S. typhimurium TA100	青
S. typhimurium TA1535	桃
E. coli WP2 *uvrA*	茶
S. typhimurium TA98	赤
S. typhimurium TA1537	緑

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（溶媒対照：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10 mLを滅菌済みL字型試験管(容量48 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20 µL、*E. coli* WP2 *uvrA*は10 µL植菌し、振盪恒温槽（COOL BATH SHAKER ML-10 PU-6 接続型、タイテック株式会社）にセットした。なお、使用後の菌懸濁液は廃棄した。
2) これをプログラム制御により前培養開始まで4°Cの水浴中に放置(6時間30分)した後、振盪（100回/分）しながら37°Cに上昇後9時間前培養した。
3) 前培養終了時に培養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 1×10^9 個/mL以上あることを確認した。なお、培養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　菌株の換算生菌数一覧

菌　株	菌　数(× 10^9 個/mL)		
	用量設定試験	本試験	追加試験
S. typhimurium TA100	2.28	2.71	2.95
S. typhimurium TA1535	3.93	3.89	3.96
E. coli WP2 *uvrA*	6.61	6.88	6.92
S. typhimurium TA98	4.22	4.22	4.22
S. typhimurium TA1537	7.18	6.43	7.54

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のいずれについても、用量設定試験、本試験及び追加試験ともに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､溶媒または陽性対照溶液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、それぞれの小試験管に各菌懸濁液0.1 mLを加え、攪拌した。
2) 小試験管を攪拌後すぐに37°Cで20分間振盪（80回/分）しながらプレインキュベーションし､これに45°Cに保温されていたトップアガーを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。
3) 無菌試験として、調製した最高用量の被験液 0.1 mL または調製した S9 Mix 0.5 mLをそれぞれ小試験管に取り、これにトップアガーを2.0 mL加えた後に最小グルコース寒天平板培地に均一に重層した。なお、これら1）~3）の一連の操作は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で実施した。

4) 最小グルコース寒天平板培地に重層したトップ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 で用量設定試験は 48.5 時間、本試験及び追加試験は 48 時間培養した。
5) 培養後、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、自動コロニーカウンタ（コロニーアナライザーCA-11D systems、システムサイエンス株式会社（面積補正、補正値：1.21））を使用した。また、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。

7.5 判定基準

1) 下記の項目に該当する結果が得られた場合に陽性と判定する。

- いずれかの試験系で陰性対照（溶媒対照）の 2 倍を超えて復帰変異コロニー数が増加し、その作用に再現性又は用量依存性が認められること。
- 比活性値が概ね 1,000 rev/mg 以上である場合に、原則として、強い陽性と判断する。
- 陽性の場合にあって、再現性や用量依存性に乏しい場合等には、原則として、軽微な陽性と判断する。

2) 下記の項目に該当する結果が得られた場合に陰性と判定する。

- 陽性でないこと。

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、3 に、追加試験の結果を別表 4、5 に示した。なお、図 1~10 は別表 2、3 よりより作成した。

8.1 用量設定試験の観察結果及び本試験用量の設定及び追加試験の設定

本試験の試験用量を設定するため、50 mg/mL の被験液を公比 4 で 6 段階希釈した計 7 用量（1.22、4.88、19.5、78.1、313、1250、5000 µg/plate）を用い、用量設定試験を実施した。

用量設定試験の結果、本被験物質によるプレート上の沈殿は、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての用量においても認められなかった。実体顕微鏡を用いて菌に対する生育阻害を観察した結果、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1537 の 4.88 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1537 の 19.5 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* の 78.1 µg/plate 以上の用量で認められた。

本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、いずれの菌株においても陰性対照値の 2 倍以上となる増加は認められず、用量反応性も認められなかった。

このため本試験の試験用量は、生育阻害が認められた最低用量を最高用量として、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1537 においては 4.88 µg/plate、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1537 においては 19.5 µg/plate、代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* においては 78.1 µg/plate を最高用量として以下公比 2 で 5 段階希釈した計 6 用量を設定した。

用量設定試験の結果、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての菌株において生育阻害が認められない用量数が 4 用量以上得られなかったため本試験と同一用量で追加試験を実施し、再現性の確認をした。

8.2 本試験及び追加試験の観察結果

本被験物質によるプレート上の沈殿は、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての用量においても認められなかった。実体顕微鏡を用いて菌に対する生育阻害を観察した結果、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1537 の 2.44 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* の 9.77 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1537 の 19.5 µg/plate、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* の 39.1 µg/plate 以上の用量で認められた。

本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、いずれの菌株においても陰性対照値の 2 倍以上となる増加は認められず、用量反応性も認められなかった。

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（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

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、Ethyl ethyldimethyltetradecyl ammonium sulphate は、細菌に対する遺伝子突然変異誘発能を有しない（陰性）と判定した。

10. 参考文献

1) B.N.Ames, F.D.Lee and W.E.Durston: An Improved Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens, Proc.Natl Acad.Sci.,USA, 70, No.3, pp.782-786, March 1973.
2) J.McCann, N.E.Spingarn, J.Kobori and B.N.Ames: Detection of Carcinogens as Mutagens: Bacterial Tester Strains with R Factor Plasmids, Proc.Natl Acad.Sci., USA, 72, No.3, pp.979-983, March 1975.
3) M.H.L.Green and W.J.Muriel: Mutagen Testing using Trp＋ Reversion in *Escherichia coli*, Mutation Res., 38, pp.3-32, 1976.
4) T.Yahagi, M.Nagao, Y.Seino, T.Matsushima, T.Sugimura and M.Okada: Mutagenicities of N-nitrosamines on *Salmonella*, Mutation Res., 48, pp.121-130, 1977.
5) D.M.Maron and B.N.Ames: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, Mutation Res., 113, pp.173-215, 1983.
6) 田島彌太郎，賀田恒夫，近藤宗平，外村晶（編）：環境変異原実験法，講談社，pp.56-68，1980.
7) 労働省安全衛生部化学物質調査課編：新・細菌を用いる復帰突然変異試験ガイドブック,中央労働災害防止協会，1986.
8) 石館 基 （監修）：細菌を用いる復帰突然変異試験データ集 （能美健彦，松井道子編集），株式会社エル・アイ・シー，東京，1991.

(別表1)

試 験 結 果 表 (用量設定試験)

被験物質の名称： Ethyl ethyldimethyltetradecylammonium sulphate

No. T-2844

試験実施期間			2019年1月23日 より 2019年1月26日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/ﾌﾟﾚｰﾄ)		復帰変異数(コロニー数/プレート)				
			塩基対置換型			フレームシフト型	
			TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
S9Mix (−)	陰性対照 (注射用水)		120 124 (122)	8 10 (9)	18 23 (21)	16 19 (18)	5 8 (7)
	1.22		136 139 (138)	12 12 (12)	20 16 (18)	20 23 (22)	6 6 (6)
	4.88		100 ＊ 52 ＊(76)	7 ＊ 3 ＊(5)	16 15 (16)	18 22 (20)	3 ＊ 5 ＊(4)
	19.5		45 ＊ 40 ＊(43)	0 ＊ 1 ＊(1)	9 ＊ 7 ＊(8)	6 ＊ 7 ＊(7)	0 ＊ 0 ＊(0)
	78.1		0 ＊ 0 ＊(0)	0 ＊ 0 ＊(0)	0 ＊ 0 ＊(0)	0 ＊ 0 ＊(0)	0 ＊ 0 ＊(0)
	313		0 ＊ 0 ＊(0)	0 ＊ 0 ＊(0)	0 ＊ 0 ＊(0)	0 ＊ 0 ＊(0)	0 ＊ 0 ＊(0)
	1250		0 ＊ 0 ＊(0)	0 ＊ 0 ＊(0)	0 ＊ 0 ＊(0)	0 ＊ 0 ＊(0)	0 ＊ 0 ＊(0)
	5000		0 ＊ 0 ＊(0)	0 ＊ 0 ＊(0)	0 ＊ 0 ＊(0)	0 ＊ 0 ＊(0)	0 ＊ 0 ＊(0)
S9Mix (＋)	陰性対照 (注射用水)		140 133 (137)	11 12 (12)	23 25 (24)	28 29 (29)	12 7 (10)
	1.22		127 132 (130)	9 14 (12)	22 21 (22)	28 20 (24)	6 8 (7)
	4.88		154 124 (139)	7 8 (8)	19 23 (21)	20 28 (24)	11 12 (12)
	19.5		60 ＊ 63 ＊(62)	5 ＊ 4 ＊(5)	24 28 (26)	23 24 (24)	2 ＊ 2 ＊(2)
	78.1		43 ＊ 24 ＊(34)	0 ＊ 2 ＊(1)	16 ＊ 18 ＊(17)	10 ＊ 9 ＊(10)	0 ＊ 0 ＊(0)
	313		0 ＊ 0 ＊(0)	0 ＊ 0 ＊(0)	0 ＊ 0 ＊(0)	0 ＊ 0 ＊(0)	0 ＊ 0 ＊(0)
	1250		0 ＊ 0 ＊(0)	0 ＊ 0 ＊(0)	0 ＊ 0 ＊(0)	0 ＊ 0 ＊(0)	0 ＊ 0 ＊(0)
	5000		0 ＊ 0 ＊(0)	0 ＊ 0 ＊(0)	0 ＊ 0 ＊(0)	0 ＊ 0 ＊(0)	0 ＊ 0 ＊(0)
陽性対照	S9Mixを必要としないもの	名 称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191
		用量 (μg/ﾌﾟﾚｰﾄ)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
		ｺﾛﾆｰ数/ﾌﾟﾚｰﾄ	523 510 (517)	215 229 (222)	101 124 (113)	428 445 (437)	1698 1684 (1691)
	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/ﾌﾟﾚｰﾄ)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
		ｺﾛﾆｰ数/ﾌﾟﾚｰﾄ	970 1239 (1105)	234 221 (228)	595 692 (644)	326 325 (326)	91 122 (107)

(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
B[*a*]P ：ベンゾ[*a*]ピレン
2AA ：2-アミノアントラセン

＊：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。

(別表2)

試 験 結 果 表 (本試験:-S9Mix)

被験物質の名称： Ethyl ethyldimethyltetradecylammonium sulphate

No. T-2844

試験実施期間		2019年1月28日 より 2019年1月31日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/ﾌﾟﾚｰﾄ)	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
S9Mix (−)	陰性対照 (注射用水)	126 108 (117)	12 10 (11)	27 16 (22)	20 23 (22)	8 12 (10)
	0.15	122 145 (134)	12 10 (11)	NT	NT	7 10 (9)
	0.31	95 126 (111)	9 11 (10)	NT	NT	9 8 (9)
	0.61	140 128 (134)	8 8 (8)	21 19 (20)	17 19 (18)	10 5 (8)
	1.22	152 128 (140)	11 14 (13)	16 15 (16)	17 19 (18)	7 8 (8)
	2.44	118＊ 112＊(115)	6＊ 5＊(6)	19 27 (23)	19 19 (19)	8＊ 10＊(9)
	4.88	108＊ 90＊(99)	4＊ 5＊(5)	22 16 (19)	21 22 (22)	4＊ 6＊(5)
	9.77	NT	NT	22＊ 16＊(19)	17＊ 18＊(18)	NT
	19.5	NT	NT	11＊ 12＊(12)	18＊ 10＊(14)	NT
陽性対照 S9Mixを必要としないもの	名 称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191
	用量 (μg/ﾌﾟﾚｰﾄ)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	ｺﾛﾆｰ数/ﾌﾟﾚｰﾄ	613 569 (591)	278 269 (274)	92 111 (102)	384 413 (399)	1374 1316 (1345)

(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

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

（別表3）

試 験 結 果 表（本試験:+S9Mix）

被験物質の名称： Ethyl ethyldimethyltetradecylammonium sulphate

No. T-2844

試験実施期間		2019年1月28日　より　2019年1月31日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量（μg/ﾌﾟﾚｰﾄ）	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
S9Mix（＋）	陰性対照（注射用水）	133 121　（ 127）	10 6　（ 8）	25 21　（ 23）	29 32　（ 31）	11 9　（ 10）
	0.61	138 111　（ 125）	13 8　（ 11）	NT	NT	11 8　（ 10）
	1.22	127 131　（ 129）	8 15　（ 12）	NT	NT	11 12　（ 12）
	2.44	122 146　（ 134）	8 13　（ 11）	22 23　（ 23）	32 28　（ 30）	11 12　（ 12）
	4.88	144 128　（ 136）	10 8　（ 9）	19 25　（ 22）	33 29　（ 31）	11 13　（ 12）
	9.77	125 124　（ 125）	11 7　（ 9）	22 19　（ 21）	24 31　（ 28）	10 11　（ 11）
	19.5	103＊ 95＊（ 99）	7＊ 7＊（ 7）	21 29　（ 25）	26 31　（ 29）	5＊ 5＊（ 5）
	39.1	NT	NT	23＊ 25＊（ 24）	19＊ 19＊（ 19）	NT
	78.1	NT	NT	17＊ 17＊（ 17）	12＊ 17＊（ 15）	NT
陽性対照 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/ﾌﾟﾚｰﾄ）	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
	ｺﾛﾆｰ数/ﾌﾟﾚｰﾄ	1190 1218　（ 1204）	243 214　（ 229）	664 653　（ 659）	292 356　（ 324）	113 91　（ 102）

（備考）

B[*a*]P　：ベンゾ[*a*]ピレン

2AA　：2-アミノアントラセン

＊：被験物質による生育阻害が認められたことを示す。

NT：試験せず。

（　）内は、2枚のプレートの平均値を示す。

(別表4)

試 験 結 果 表 (追加試験:-S9Mix)

被験物質の名称： Ethyl ethyldimethyltetradecylammonium sulphate

No. T-2844

試験実施期間		2019年1月29日 より 2019年2月1日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/ﾌﾟﾚｰﾄ)	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
S9Mix (−)	陰性対照 (注射用水)	138 121 (130)	13 10 (12)	23 21 (22)	21 19 (20)	5 7 (6)
	0.15	133 128 (131)	9 11 (10)	NT	NT	8 7 (8)
	0.31	142 116 (129)	7 12 (10)	NT	NT	5 4 (5)
	0.61	130 108 (119)	15 9 (12)	21 25 (23)	22 25 (24)	7 5 (6)
	1.22	132 126 (129)	8 12 (10)	19 22 (21)	28 21 (25)	6 5 (6)
	2.44	108＊ 105＊(107)	9＊ 7＊(8)	21 17 (19)	23 16 (20)	2＊ 1＊(2)
	4.88	97＊ 85＊(91)	6＊ 5＊(6)	18 19 (19)	22 16 (19)	2＊ 2＊(2)
	9.77	NT	NT	7＊ 11＊(9)	0＊ 0＊(0)	NT
	19.5	NT	NT	0＊ 0＊(0)	0＊ 0＊(0)	NT
陽性対照 S9Mixを必要としないもの	名 称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191
	用量 (μg/ﾌﾟﾚｰﾄ)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	ｺﾛﾆｰ数/ﾌﾟﾚｰﾄ	547 588 (568)	236 257 (247)	109 91 (100)	358 394 (376)	1140 1139 (1140)

(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

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

（別表5）

試 験 結 果 表（追加試験:+S9Mix）

被験物質の名称： Ethyl ethyldimethyltetradecylammonium sulphate

No. T-2844

試験実施期間		2019年1月29日　より　2019年2月1日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量（μg/ﾌﾟﾚｰﾄ）	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
S9Mix（＋）	陰性対照（注射用水）	143 148　（ 146）	11 8　（ 10）	25 22　（ 24）	28 33　（ 31）	8 8　（ 8）
	0.61	145 152　（ 149）	6 11　（ 9）	NT	NT	13 8　（ 11）
	1.22	133 133　（ 133）	12 13　（ 13）	NT	NT	11 4　（ 8）
	2.44	140 128　（ 134）	11 12　（ 12）	29 17　（ 23）	35 35　（ 35）	7 5　（ 6）
	4.88	137 140　（ 139）	15 8　（ 12）	27 22　（ 25）	27 23　（ 25）	4 11　（ 8）
	9.77	148 125　（ 137）	8 6　（ 7）	24 20　（ 22）	23 24　（ 24）	11 5　（ 8）
	19.5	77＊ 94＊（ 86）	7＊ 6＊（ 7）	17 25　（ 21）	23 20　（ 22）	0＊ 0＊（ 0）
	39.1	NT	NT	20＊ 17＊（ 19）	11＊ 15＊（ 13）	NT
	78.1	NT	NT	11＊ 9＊（ 10）	11＊ 12＊（ 12）	NT
陽性対照 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/ﾌﾟﾚｰﾄ）	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
	ｺﾛﾆｰ数/ﾌﾟﾚｰﾄ	1280 1356　（ 1318）	234 246　（ 240）	655 719　（ 687）	316 341　（ 329）	85 114　（ 100）

（備考）

B[*a*]P　：ベンゾ[*a*]ピレン

2AA　：2-アミノアントラセン

＊：被験物質による生育阻害が認められたことを示す。

NT：試験せず。

（　）内は、2枚のプレートの平均値を示す。

図 1

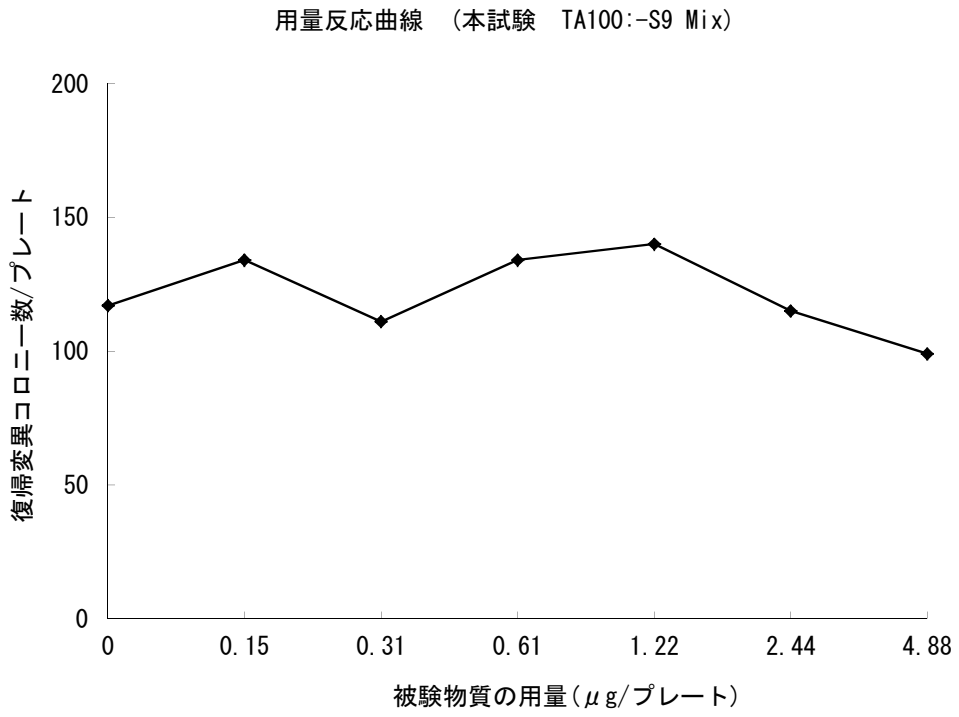

用量反応曲線　(本試験　TA100:-S9 Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
200
150
100
50
0
0
0.15
0.31
0.61
1.22
2.44
4.88
被験物質の用量(μg/プレート)

図 2

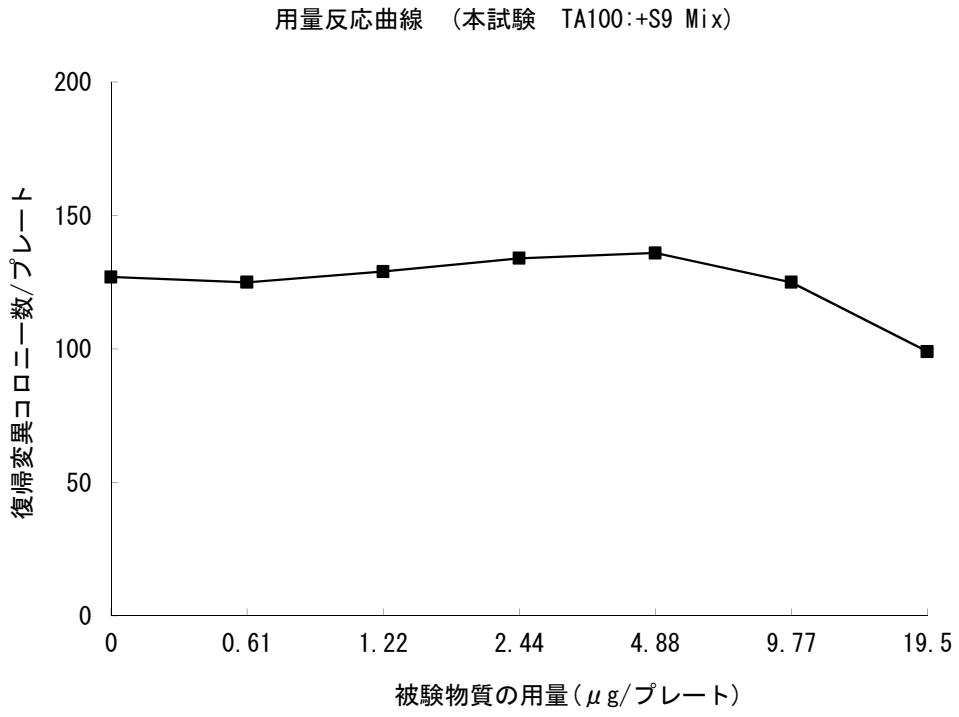

用量反応曲線　(本試験　TA100:+S9 Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
200
150
100
50
0
0
0.61
1.22
2.44
4.88
9.77
19.5
被験物質の用量(μg/プレート)

図 3

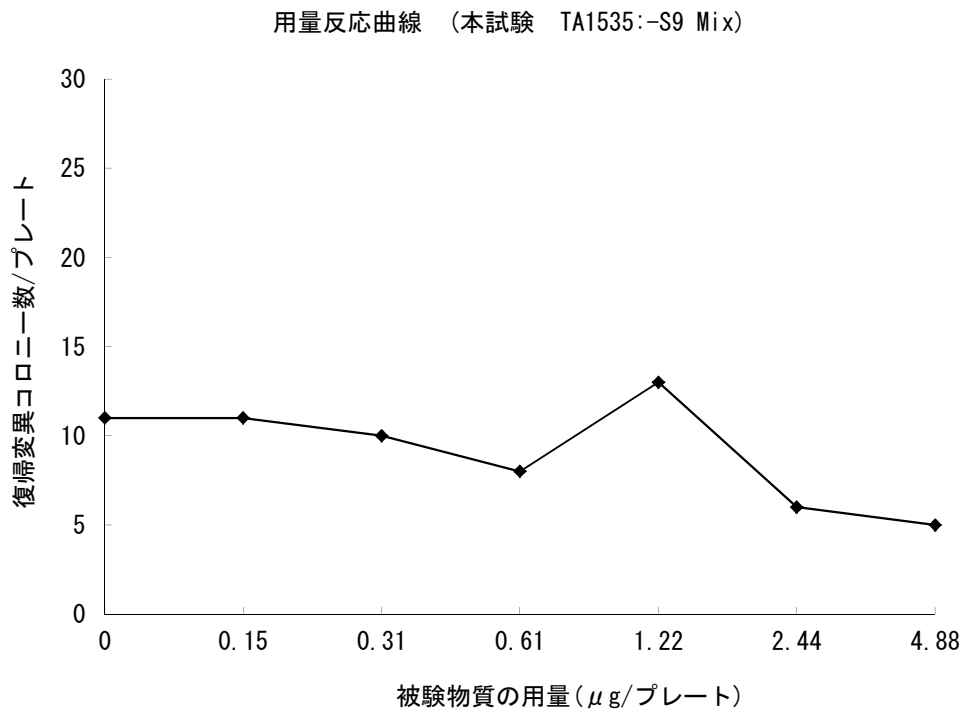

用量反応曲線　(本試験　TA1535:-S9 Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
30
25
20
15
10
5
0
0
0.15
0.31
0.61
1.22
2.44
4.88
被験物質の用量(μg/プレート)

図 4

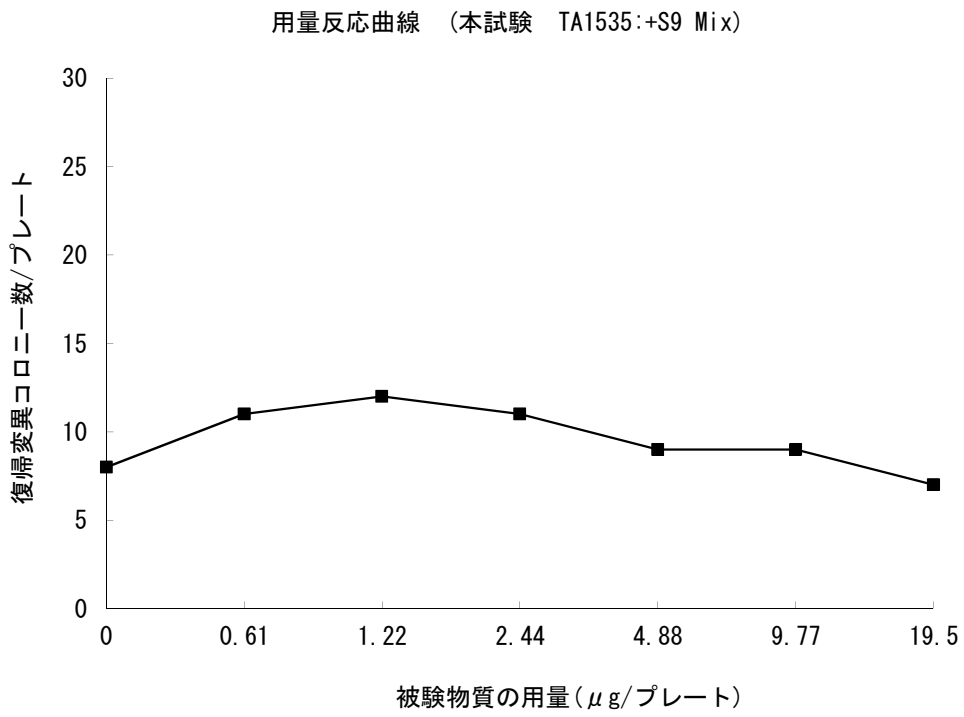

用量反応曲線　(本試験　TA1535:+S9 Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
30
25
20
15
10
5
0
0
0.61
1.22
2.44
4.88
9.77
19.5
被験物質の用量(μg/プレート)

図 5

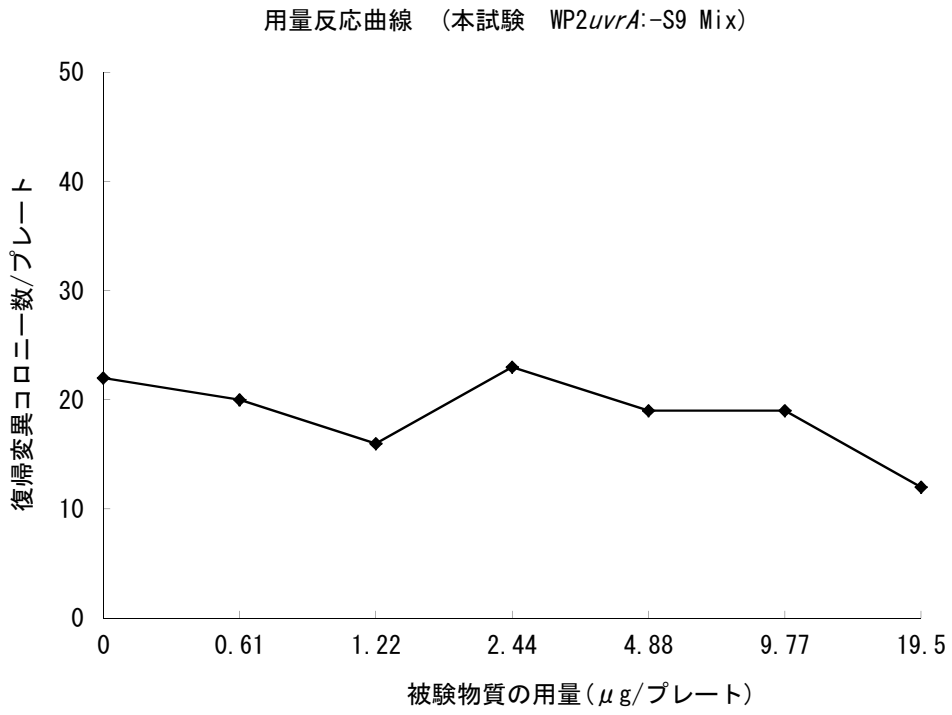

用量反応曲線　(本試験　WP2*uvrA*:-S9 Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
50
40
30
20
10
0
0
0.61
1.22
2.44
4.88
9.77
19.5
被験物質の用量(μg/プレート)

図 6

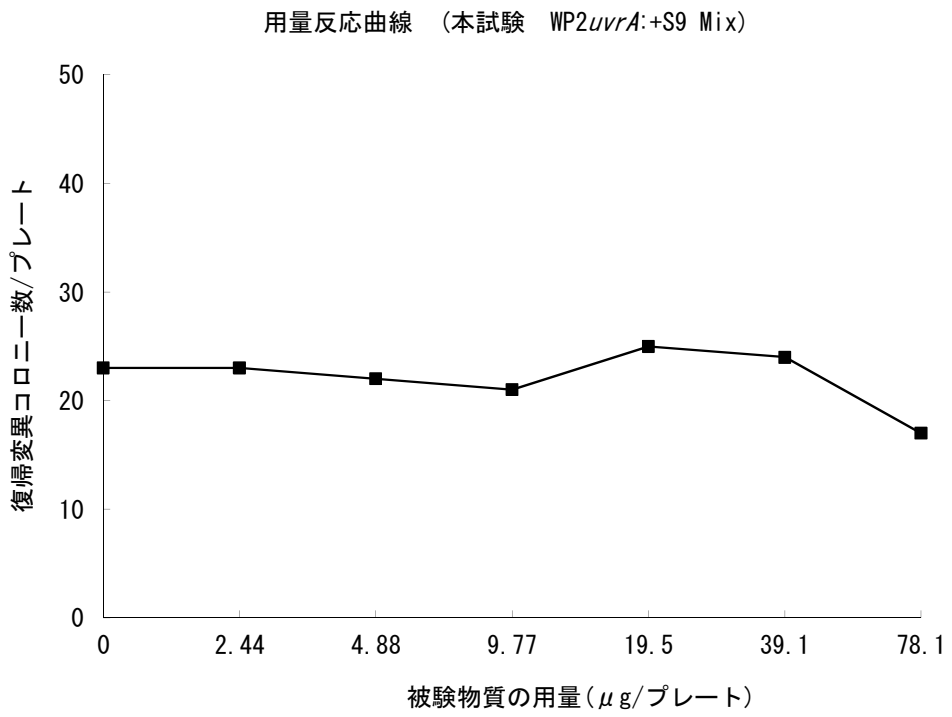

用量反応曲線　(本試験　WP2*uvrA*:+S9 Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
50
40
30
20
10
0
0
2.44
4.88
9.77
19.5
39.1
78.1
被験物質の用量(μg/プレート)

図 7

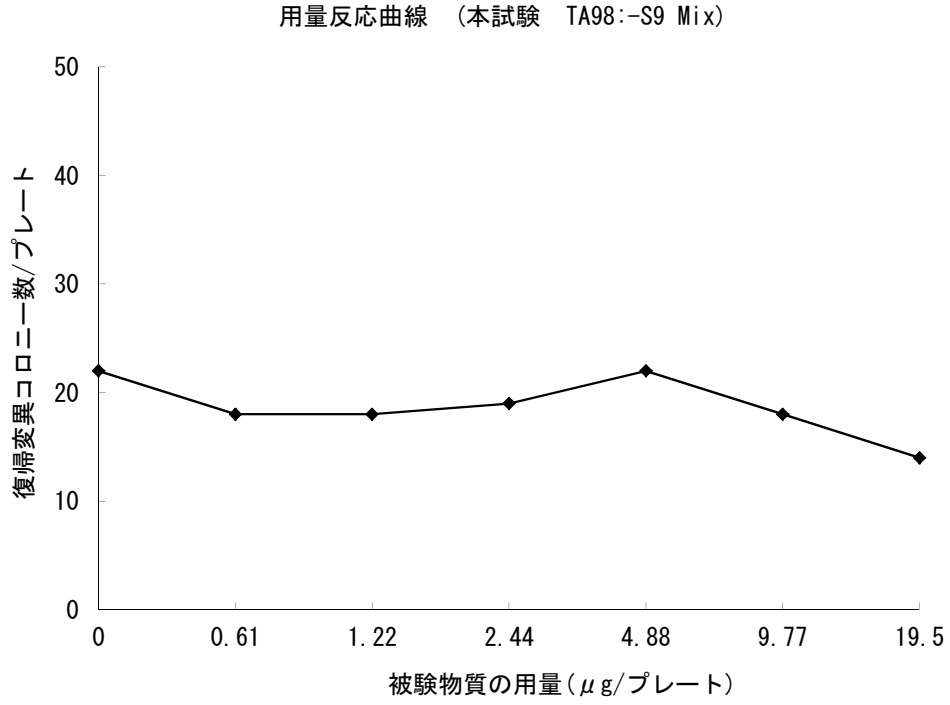

用量反応曲線　(本試験　TA98:-S9 Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
50
40
30
20
10
0
0
0.61
1.22
2.44
4.88
9.77
19.5
被験物質の用量(μg/プレート)

図 8

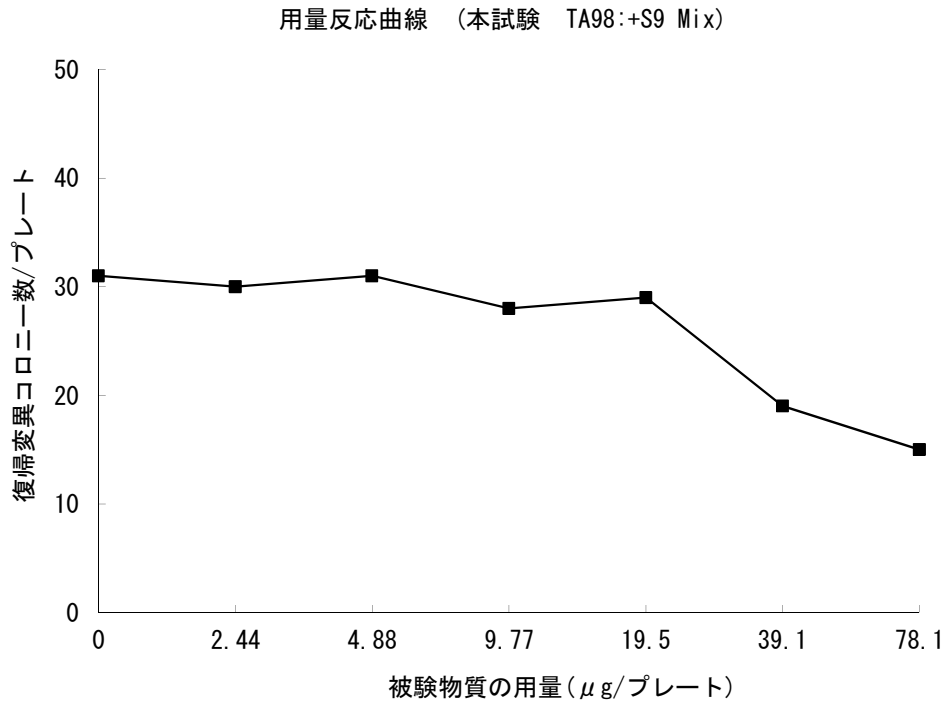

用量反応曲線　(本試験　TA98:+S9 Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
50
40
30
20
10
0
0
2.44
4.88
9.77
19.5
39.1
78.1
被験物質の用量(μg/プレート)

図 9

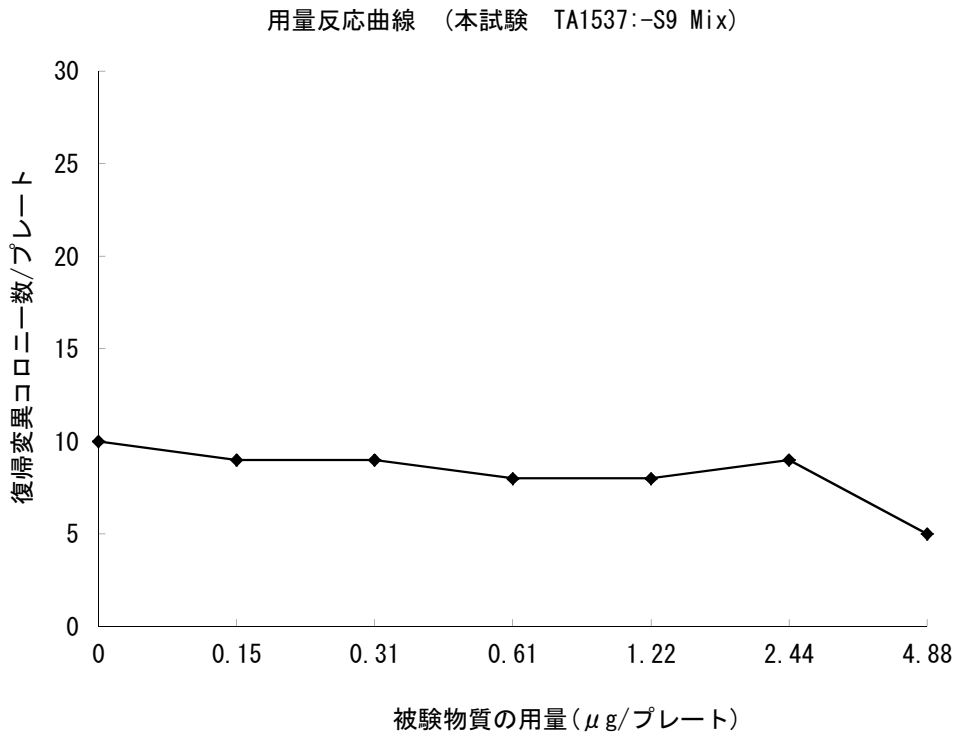
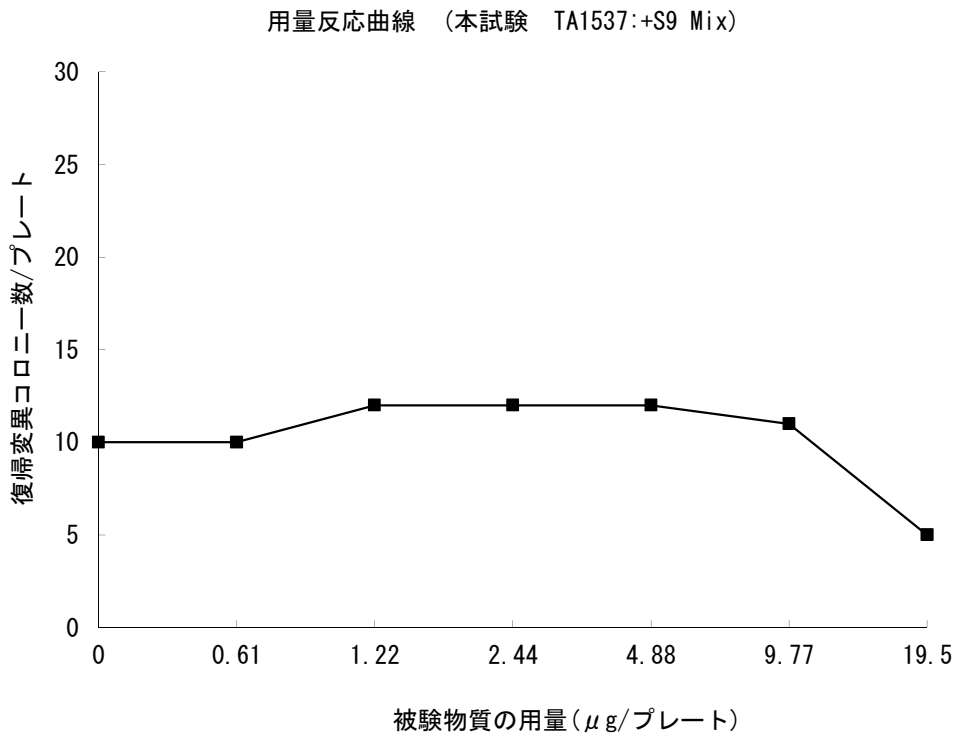

用量反応曲線　(本試験　TA1537:-S9 Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
30
25
20
15
10
5
0
0
0.15
0.31
0.61
1.22
2.44
4.88
被験物質の用量(μg/プレート)

図 10


用量反応曲線　(本試験　TA1537:+S9 Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
30
25
20
15
10
5
0
0
0.61
1.22
2.44
4.88
9.77
19.5
被験物質の用量(μg/プレート)

T-2844
Attachment

Background Data

Test Category : Bacterial reverse mutation test (Preincubation Method)
CODE No. : 180728
Period : From May 29, 2018 to July 12, 2018

Tester Strains	S9 Mix (–) or (+)	Classification	Mean	S.D.	Management ranges		Number of plates
					Lower limit	Upper limit	
TA100	–	Solvent control	104	11	72	137	100
		Positive control AF-2 (0.01 μg/plate)	568	40	449	687	100
	+	Solvent control	112	14	71	153	100
		Positive control B[*a*]P (5.0 μg/plate)	1105	90	836	1375	100
TA1535	–	Solvent control	8	2	2	14	100
		Positive control SAZ (0.5 μg/plate)	318	47	177	459	100
	+	Solvent control	8	2	1	15	100
		Positive control 2AA (2.0 μg/plate)	253	30	163	342	100
WP2*uvrA*	–	Solvent control	25	5	10	39	100
		Positive control AF-2 (0.01 μg/plate)	90	9	64	116	100
	+	Solvent control	27	5	13	41	100
		Positive control 2AA (10.0 μg/plate)	622	46	485	759	100
TA98	–	Solvent control	19	4	8	30	100
		Positive control AF-2 (0.1 μg/plate)	366	34	263	469	100
	+	Solvent control	27	5	14	41	100
		Positive control B[*a*]P (5.0 μg/plate)	377	36	267	486	100
TA1537	–	Solvent control	7	2	2	13	100
		Positive control ICR-191 (1.0 μg/plate)	1246	174	726	1767	100
	+	Solvent control	9	2	2	15	100
		Positive control B[*a*]P (5.0 μg/plate)	98	10	68	128	100

(Notice)
Solvent controls Water, Dimethyl sulfoxide(DMSO), Acetone, *N*,*N*-Dimethylformamide(DMF), 1,4-Dioxane
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-2844

信頼性保証書（1/2）

試験番号　：　T-2844

試験表題　：　Ethyl ethyldimethyltetradecylammonium sulphate の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	[redacted]	2019 年　1 月 22 日	2019 年　1 月 22 日
調製・保存（被験物質） 被験物質の処理		2019 年　1 月 29 日	2019 年　1 月 29 日
計数		2019 年　1 月 31 日 2019 年　2 月　6 日	2019 年　2 月　6 日
生データ		2019 年　3 月　5 日	2019 年　3 月　5 日
最終報告書草案　図・表		2019 年　3 月　5 日	2019 年　3 月　5 日
最終報告書		2019 年　3 月 27 日	2019 年　3 月 27 日

T-2844

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	[redacted]	2018年 11月 22日	
		2018年 11月 26日	
		2018年 11月 28日	2018年 11月 28日
陽性対照物質の管理		2018年 11月 28日	2018年 11月 28日
		2018年 12月 18日	2018年 12月 18日
		2018年 12月 19日	2018年 12月 19日
		2019年　1月 17日	2019年　1月 17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
調製・処理 （用量設定試験）	T-2875	[redacted]	2019年　1月　8日	2019年　1月　9日

2019年 3月27日

株式会社ボゾリサーチセンター

信頼性保証責任者 [redacted]