原本

# 最 終 報 告 書

ラウリルリン酸ナトリウムの細菌を用いる復帰突然変異試験

M-1147

2005年　11月24日

株式会社ボゾリサーチセンター

東　京　本　部　〒151-0065　東京都渋谷区大山町36－7
本社・東京研究所　〒156-0042　東京都世田谷区羽根木1－3－11
御殿場研究所　〒412-0039　静岡県御殿場市かまど1284
函南研究所　〒419-0101　静岡県田方郡函南町桑原三本松1308-125

# 目　次

頁

目　次 …… 1

要　約 …… 7

緒　言 …… 8

試験材料及び方法 …… 9
1. 被験物質及び媒体 …… 9
1) 被験物質 …… 9
2) 媒体 …… 9
2. 被験液の調製 …… 10
1) 調製方法 …… 10
2) 調製頻度 …… 10
3) 安定性 …… 11
3. 使用菌株 …… 11
1) 菌株 …… 11
2) 菌株の選択理由 …… 11
3) 菌株の保存及び解凍 …… 11
4) 菌株の特性検査 …… 11
4. 対照物質 …… 12
1) 陰性対照物質 …… 12
2) 陽性対照物質 …… 12

頁

3) 陽性対照物質の調製方法 …… 12
5. S9 mix 及び培地の調製 …… 12
1) S9 mix …… 12
2) 培地 …… 13
6. 試験方法 …… 16
1) 識別方法 …… 16
2) 前培養 …… 16
3) 用量の設定 …… 17
4) プレート数 …… 17
5) 濃度設定試験 …… 17
6) 本試験 …… 18
7) 追加確認試験 …… 18
7. 判定基準 …… 18

試験結果 …… 19
1. 濃度設定試験 …… 19
1) 培養終了後の寒天平板培地観察 …… 19
2) 復帰突然変異コロニー数 …… 19
3) 試験系の成立条件 …… 19
2. 本試験 …… 20
1) 培養終了後の寒天平板培地観察 …… 20
2) 復帰突然変異コロニー数 …… 20
3) 試験系の成立条件 …… 20

考察及び結論 …… 21

参考文献 …… 22

Tables

Table 1 Results of the Dose-Range Finding Test on Phosphoric acid, dodecyl ester, sodium salt without Metabolic Activation in the Bacterial Reverse Mutation Test

Table 2 Results of the Dose-Range Finding Test on Phosphoric acid, dodecyl ester, sodium salt with Metabolic Activation in the Bacterial Reverse Mutation Test

Table 3 Results of the Main Test on Phosphoric acid, dodecyl ester, sodium salt without Metabolic Activation in the Bacterial Reverse Mutation Test

Table 4 Results of the Main Test on Phosphoric acid, dodecyl ester, sodium salt with Metabolic Activation in the Bacterial Reverse Mutation Test

Figures

Figure 1 Results of the Reverse Mutation Test on Phosphoric acid, dodecyl ester, sodium salt with *Salmonella typhimurium* TA100

Figure 2 Results of the Reverse Mutation Test on Phosphoric acid, dodecyl ester, sodium salt with *Salmonella typhimurium* TA98

Figure 3 Results of the Reverse Mutation Test on Phosphoric acid, dodecyl ester, sodium salt with *Salmonella typhimurium* TA1535

Figure 4 Results of the Reverse Mutation Test on Phosphoric acid, dodecyl ester, sodium salt with *Salmonella typhimurium* TA1537

Figure 5 Results of the Reverse Mutation Test on Phosphoric acid, dodecyl ester, sodium salt with *Escherichia coli* WP2 *uvrA*

# 要　約

ラウリルリン酸ナトリウム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* と略した）TA100、TA98、TA1535、TA1537 及び大腸菌 *Escherichia coli*（以下、*E. coli* と略した）WP2 *uvrA* の 5 菌株を用いて復帰突然変異誘発試験を実施した。

試験は濃度設定試験及び本試験を実施し、代謝活性化系非存在下及び代謝活性化系存在下の条件で、プレインキュベーション法により実施した。また、被験物質の媒体には 0.5w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液を用いた。なお、被験液の処理用量は濃度設定試験で 0.305～5000 μg/plate の範囲で 8 用量、本試験で 156～5000 μg/plate の範囲で 6 用量を設定した。

1. 沈殿/結晶又は着色

使用した 5 菌株において、代謝活性化系の有無にかかわらず、濃度設定試験で 78.1 μg/plate 以上の被験物質処理群で、本試験では 156 μg/plate 以上の被験物質処理群で白色の析出物が認められた。

2. 生育阻害

使用した 5 菌株において、代謝活性化系の有無にかかわらず、全被験物質処理群（濃度設定試験：0.305～5000 μg/plate、本試験：156～5000 μg/plate）で、菌株に対する生育阻害は認められなかった。

3. 復帰突然変異コロニー数

使用した 5 菌株において、代謝活性化系の有無にかかわらず、全被験物質処理群（濃度設定試験：0.305～5000 μg/plate、本試験：156～5000 μg/plate）で、陰性対照群と比較して 2 倍以上及び用量依存的な復帰突然変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下において、ラウリルリン酸ナトリウムの復帰突然変異誘発能は陰性と判定した。

# 緒　言

厚生労働省医薬食品局審査管理課　化学物質安全対策室の依頼により、ラウリルリン酸ナトリウムの安全性試験の一環として、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施したので、その成績を報告する。

## 試験材料及び方法

### 1. 被験物質及び媒体

1) 被験物質

被験物質は　　より被験物質情報（添付資料1、2及び3）とともに供給された。これらの情報は　　における非GLP下での分析に基づくものである。

供　給　者　：

製　造　者　：

被験物質名　：　ラウリルリン酸ナトリウム

Phosphoric acid, dodecyl ester, sodium salt

CAS番号　：　50957-96-5

構造式又は示性式

：　$CH_3(CH_2)_{11}PO_3OHNa$　($C_{12}H_{26}NaO_4P$)

純　　度　：　情報提供なし。

性　　状　：　白色粉末、わずかに特異な臭いがある。

分　子　量　：　288.30

ロット番号　：

安　定　性　：　実験終了後に被験物質の残量を製造者　　において、安定性を分析した結果、実験期間中の被験物質は安定であったことが確認された（添付資料4）。

保存方法　：　室温、密封（保存期間中の実測保存温度：8～28℃）

保存場所　：　御殿場研究所　被験物質保存室及び変異原室

取扱い上の注意

：　作業場の換気を十分に行い、保護眼鏡、保護手袋等の適切な保護具を着用し、直接の接触を防いだ。取扱い後は、手、顔等をよく洗い、うがいをした。

返　　却　：　関連試験終了後、被験物質の残量は全て被験物質製造者に返却した。

2) 媒体

名　　称　：　カルボキシメチルセルロースナトリウム

ロット番号　：　4Y01

規　　格　：　日本薬局方

製 造 元　：　丸石製薬株式会社

使用期限　：　2007年11月30日

保存方法　：　室温

保存場所　：　御殿場研究所　第1研究棟被験物質調製室

媒体の選択理由

：　供試前の媒体検討の結果、注射用水、エタノール、ジメチルスルホキシド及びアセトンに不溶であったため、0.5w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液を媒体とし、懸濁することとした。

媒体の調製　：　カルボキシメチルセルロースナトリウム 1.0000 g を注射用水 200 mL に溶解し、オートクレーブによる滅菌処理（121℃、20 分）を行い、調製した。調製後は使用時まで冷蔵保存した。

2. 被験液の調製

1) 調製方法

(1) 濃度設定試験

被験物質 0.5000 g を 10 mL 容量メスフラスコに秤取した。ミキサーを用いて媒体で懸濁した後に、メスアップして最高濃度の 50.0 mg/mL 懸濁液（最少グルコース寒天平板培地に添加した際の最終用量：5000 μg/plate）の被験液を調製した。次いで、50.0 mg/mL 懸濁液を公比 4（各濃度の被験液 1.50 mL:媒体 4.50 mL）で順次 7 段階希釈し、12.5、3.13、0.781、0.195、0.0488、0.0122 及び 0.00305 mg/mL の 8 濃度を調製した。

(2) 本試験

濃度設定試験と同様に 50.0 mg/mL 懸濁液を調製した。次いで、50.0 mg/mL 懸濁液を公比 2（各濃度の被験液 5.00 mL：媒体 5.00 mL）で順次 5 段階希釈し、25.0、12.5、6.25、3.13 及び 1.56 mg/mL の 6 濃度を調製した。

2) 調製頻度

被験液は用時に調製し、保存は行わなかった。

3) 安定性

被験物質に 0.5w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液を添加した際に、発泡が認められたが、約 10 分で発泡がおさまった。また、発熱、吸熱、色調変化、臭気、固化、凝集、乳化、層分離、急速な蒸発及び発光は認められなかった。

3. 使用菌株

1) 菌株

次の 5 種類の菌株を用いた。

① 塩基対置換型

*S. typhimurium* TA100

*S. typhimurium* TA1535

*E. coli* WP2 *uvrA*

② フレームシフト型

*S. typhimurium* TA98

*S. typhimurium* TA1537

上記菌株は、国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部より入手（1997 年 10 月 9 日）した。

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

3) 菌株の保存及び解凍

入手した菌株を培養して得られた菌懸濁液 30 mL にジメチルスルホキシド（以下、DMSO と略す、和光純薬工業株式会社、試薬特級、ロット番号 CEQ5898）を 2.625 mL 添加し、500 μL ずつ分注して－70℃以下の超低温フリーザ（日本フリーザ株式会社：CL-312）で保存した（保存実測温度：－83～－69℃）。使用する時は室温で解凍した。

4) 菌株の特性検査

凍結保存した菌株について、アミノ酸要求性、膜変異 *rfa* 特性、薬物耐性因子 R-factor プラスミド、紫外線感受性、菌増殖率、陰性対照値及び陽性対照値の各特性を 2004 年 9 月 29 日から 2004 年 10 月 1 日に検査し、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、試験に使用した。

## 4. 対照物質

1) 陰性対照物質

媒体（0.5w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液）を陰性対照とした。

2) 陽性対照物質

毒性試験法ガイドラインに準じて、以下、5種類の化学物質を陽性対照とした。

| 陽性対照物質（略称） | ロット番号 | 純度(%) | 保存方法 |
|---|---|---|---|
| 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF-2) | WAP0369 | 99.0 | 室温、遮光 |
| Sodium azide (SAZ) | ELP2778 | 98.0 | 室温、遮光 |
| Benzo[*a*]pyrene (B[*a*]P) | ASH1182 | 101.0 | 室温、遮光 |
| 2-Aminoanthracene (2AA) | ASM1101 | 97.4 | 冷蔵、遮光 |
| 2-Methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)-amino propylamino] acridine·2HCl (ICR-191) | 534652 | 98.0 | 冷蔵、遮光 |

保存場所： 御殿場研究所 変異原室及び変異原室内の冷蔵庫

製 造 元： AF-2、SAZ、B[*a*]P 及び 2AA：和光純薬工業株式会社

ICR-191：Polysciences, Inc.

3) 陽性対照物質の調製方法

AF-2、ICR-191、2AA 及び B[*a*]P は DMSO（和光純薬工業株式会社、試薬特級、ロット番号：CEQ5898）に溶解し、SAZ は注射用水（日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号：4J97N）に溶解した。使用した菌株及びそれぞれの調製濃度を表 1 に示した。

**表 1 陽性対照物質一覧**

| 使用菌株 | 非代謝活性化系（−S9 mix） | | 代謝活性化系（+S9 mix） | |
|---|---|---|---|---|
| | 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* TA98 | AF-2 | 1.0 (0.1) | B[*a*]P | 50 (5.0) |
| *S. typhimurium* TA1535 | SAZ | 5.0 (0.5) | 2AA | 20 (2.0) |
| *S. typhimurium* TA1537 | ICR-191 | 10 (1.0) | B[*a*]P | 50 (5.0) |
| *E. coli* WP2 *uvrA* | AF-2 | 0.1 (0.01) | 2AA | 100 (10.0) |

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

## 5. S9 mix 及び培地の調製

1) S9 mix

S9 及び補酵素は、オリエンタル酵母工業株式会社（S9/コファクターA セット、 ロッ

ト番号：A040806051）から購入し、御殿場研究所　変異原室内の－70℃以下超低温フリーザ（日本フリーザ株式会社：CL-312）に保存されているものを使用した。S9 mix は用時に S9 及び補酵素を混合し、調製した。

(1) S9

名　　称　：　S9

ロット番号　：　04080605

製　造　日　：　2004 年 8 月 6 日

保 存 方 法　：　冷凍保存（保存期間中の実測温度：－83～－69℃）

使 用 期 限　：　2005 年 2 月 5 日（製造後 6 箇月以内）

(2) 補酵素

名　　称　：　コファクターA

ロット番号　：　A04080405

製　造　日　：　2004 年 8 月 4 日

保 存 方 法　：　冷凍保存（保存期間中の実測温度：－83～－69℃）

使 用 期 限　：　2005 年 2 月 3 日（製造後 6 箇月以内）

(3) S9 mix の組成

| | | | |
|---|---|---|---|
| S9 | 1 mL | | |
| 補酵素 | 9 mL | 0.4 mol/L 塩化マグネシウム水溶液 | 0.2 mL |
| | | 1.65 mol/L 塩化カリウム水溶液 | 0.2 mL |
| | | 1.0 mol/L グルコース-6-リン酸水溶液 | 0.05 mL |
| | | 0.1 mol/L 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)水溶液 | 0.4 mL |
| | | 0.1 mol/L 還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH)水溶液 | 0.4 mL |
| | | 0.2 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.4) | 5.0 mL |
| | | 精製水 | 2.75 mL |

2) 培地

(1) 最少グルコース寒天平板培地

名　　称　：テスメディア AN 培地

製　造　元　：オリエンタル酵母工業株式会社

ロット番号　：ANI780IT

製　造　日　：2004年 9月　9日

使用期限　：2005年 3月　8日（製造後6箇月以内）

保存方法　：室温保存

保存場所　：御殿場研究所　変異原室

(2) ニュートリエントブロス培養液

ニュートリエントブロス 12.50 g を精製水 500 mL に溶解し、オートクレーブによる滅菌処理（121℃、20 分）を行い、調製した。調製後は使用時まで室温で保存した。

名　　称　：ニュートリエントブロス (Nutrient Broth No.2)

ロット番号　：59365

製　造　元　：UNIPATH LTD.

保存方法　：室温保存

保存場所　：御殿場研究所　変異原室

(3) 0.1 mol/L リン酸緩衝液（pH 7.4）

リン酸二水素ナトリウム二水和物 3.90 g を精製水 250 mL に溶解し、調製した。次に、リン酸水素二ナトリウム 14.20 g を精製水 1000 mL に溶解し、調製した。以上、二つの水溶液を混合し、0.1 mol/L リン酸緩衝液（pH 7.4）とし、オートクレーブによる滅菌処理（121℃、20 分）を行い、調製した。調製後は使用時まで室温で保存した。

① 名　　称　：リン酸二水素ナトリウム二水和物 ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$)

ロット番号　：SEG2423

製　造　元　：和光純薬工業株式会社

保存方法　：室温保存

保存場所　：御殿場研究所　変異原室

② 名　　称　：リン酸水素二ナトリウム ($Na_2HPO_4$)

ロット番号　：MOR2526

製　造　元　：ナカライテスク株式会社

保存方法　：室温保存

保存場所　：御殿場研究所　変異原室

(4) 0.5 mmol/L *D*-ビオチン－0.5 mmol/L *L*-ヒスチジン溶液

*D*-ビオチン 0.0305 g を 1 mol/L 水酸化ナトリウム（和光純薬工業株式会社、ロッ

ト番号：WAL7492） 0.3 mL に溶解し、*L*-ヒスチジン塩酸塩一水和物 0.0262 g を加え、精製水 250 mL に溶解し、フィルター（IWAKI、0.2 μm、ロット番号：06502003）滅菌を行い、調製した。調製後は使用時まで冷蔵保存した。

① 名　　称 ： *D*-ビオチン ((+)-Biotin、Vitamin H)
　ロット番号 ： ASQ7637
　製 造 元 ： 和光純薬工業株式会社
　保 存 方 法 ： 冷蔵保存、遮光
　保 存 場 所 ： 御殿場研究所　変異原室

② 名　　称 ： *L*-ヒスチジン塩酸塩一水和物
　(*L*-Histidine Hydrochloride Monohydrate)
　ロット番号 ： TCN4471
　製 造 元 ： 和光純薬工業株式会社
　保 存 方 法 ： 冷蔵保存、遮光
　保 存 場 所 ： 御殿場研究所　変異原室

(5) 0.5 mmol/L *L*-トリプトファン溶液

*L*-トリプトファン 0.0252 g を精製水 250 mL に溶解し、フィルター（IWAKI、0.2 μm、ロット番号：06502003）滅菌を行い、調製した。調製後は使用時まで冷蔵保存した。

名　　称 ： *L*-Tryptophan
ロット番号 ： TCL2695
製 造 元 ： 和光純薬工業株式会社
保 存 方 法 ： 冷蔵保存、遮光
保 存 場 所 ： 御殿場研究所　変異原室

(6) 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 % Agar, 0.6 % NaCl：試薬特級、ロット番号：V2F7063、ナカライテスク株式会社)をオートクレーブによる滅菌（121℃、20 分処理）した後、*S. typhimurium* TA 株は 0.5 mmol/L *D*-ビオチン－0.5 mmol/L *L*-ヒスチジン溶液、*E. coli* 株では 0.5 mmol/L *L*-トリプトファン溶液をそれぞれ 1/10 容量加え、調製した。調製後は使用時まで固化を防ぐため 45℃の恒温槽で保温した。

名　　称 ： Bacto Agar

ロット番号　：　3323561

製　造　元　：　DIFCO LABORATORIES

保 存 方 法　：　室温保存

保 存 場 所　：　御殿場研究所　変異原室

## 6. 試験方法 [1-5)]

1) 識別方法

(1) 菌株の識別

菌株の種類ごとに、以下に示す色のラベルを貼り識別した。

*S. typhimurium* TA100　青

*S. typhimurium* TA98　緑

*S. typhimurium* TA1535　桃

*S. typhimurium* TA1537　赤

*E. coli* WP2 *uvrA*　黄

(2) 濃度の識別

非代謝活性化系を「－」、代謝活性化系を「＋」とし、これに続けて陰性対照(Negative Control)を「NC」、陽性対照 (Positive Control)を「PC」、被験物質処理を濃度の低い方から「1」、「2」、「3」・・・の番号を明記したラベルで識別した。

2) 前培養

(1) ニュートリエントブロス培養液 30 mL を入れた培養用三角フラスコに、*S. typhimurium* TA 株は各 60 μL、*E. coli* 株は 30 μL の菌懸濁液を植菌した。

(2) 試験には、37℃で8時間前培養(プログラム設定器付き振盪恒温水槽:ML-10F、タイテック株式会社) した後の菌懸濁液を用いた。前培養終了時に菌懸濁液の吸光度を測定（分光光度計：UVIDEC-66、協和医科器械株式会社）し、生菌数が 1 ×$10^9$個/mL 以上であることを確認した（表 2）。なお、菌懸濁液は、使用まで室温下で維持した。

表 2　菌株の生菌数

| 菌株 | 濃度設定試験 | 本試験 |
|---|---|---|
| *S. typhimurium* TA100 | $1.78\times10^9$/mL | $1.81\times10^9$/mL |
| *S. typhimurium* TA98 | $1.96\times10^9$/mL | $2.00\times10^9$/mL |
| *S. typhimurium* TA1535 | $1.92\times10^9$/mL | $1.94\times10^9$/mL |
| *S. typhimurium* TA1537 | $1.58\times10^9$/mL | $1.61\times10^9$/mL |
| *E. coli* WP2 *uvrA* | $3.58\times10^9$/mL | $3.63\times10^9$/mL |

3)　用量の設定

(1)　濃度設定試験

被験物質の最高用量を 5000 μg/plate とし、以下公比 4 で除した 1250、313、78.1、19.5、4.88、1.22 及び 0.305 μg/plate の計 8 用量を設定した。

(2)　本試験

濃度設定試験の結果、最少グルコース寒天平板培地上の観察において、使用菌株の種類及び代謝活性化系の有無にかかわらず、全被験物質処理群（0.305～5000 μg/plate）で使用菌株に対する生育阻害は認められなかった。また、78.1 μg/plate 以上の被験物質処理群で白色の析出物が認められたが、復帰突然変異コロニー数の計数は可能であった。一方、全ての菌株で代謝活性化系の有無にかかわらず、被験物質による用量依存的な復帰突然変異コロニー数の増加は認められなかった。よって、本試験は、5000 μg/plate を最高用量とし、これを公比 2 で 5 段階除した 2500、1250、625、313 及び 156 μg/plate の計 6 用量を設定した。

4)　プレート数

濃度設定試験及び本試験とも、各処理群当たり 3 枚のプレートを用いた。

5)　濃度設定試験

(1)　非代謝活性化系では 0.1 mol/L リン酸緩衝液（pH 7.4）0.5 mL を、代謝活性化系では S9 mix 0.5 mL を加えた後、被験液、陰性対照物質又は陽性対照物質を 0.1 mL 添加し、それぞれに各菌懸濁液 0.1 mL を加えた。

(2)　37℃で 20 分間振盪（プレインキュベーション）し、これにあらかじめ 45℃に維持されているトップアガーを 2.0 mL 加えて攪拌後、最少グルコース寒天平板培地に重層した。

(3)　37℃で 48 時間培養した後、寒天平板培地上を実体顕微鏡を用いて、使用菌株の生育阻害、沈殿及び結晶物の析出の有無及び着色の有無を観察した。この結果、

78.1 μg/plate 以上の被験物質処理群で白色の析出物が認められた。よって、出現した各被験物質処理群の復帰突然変異コロニー数は肉眼で手動コロニーカウンタ（コロニーカウンタペン Lite、アズワン株式会社）を用いて計数し、陽性対照群及び陰性対照群における復帰突然変異コロニー数は自動コロニーカウンタ（バイオマルチスキャナー BMS-400、東洋測器株式会社）を用いて計数した。なお、陰性対照群の復帰突然変異コロニー数の計数値は手動及び自動コロニーカウンタ値に差がないことを確認し、手動による計数値を採用し、自動コロニーカウンタによる計数値を参考データとした。

6) 本試験

操作は濃度設定試験と同じ手順で行った。

7) 追加確認試験

必要性が認められなかったため実施しなかった。

## 7. 判定基準

陰性対照群、陽性対照群及び被験物質処理群各 3 枚のプレートの復帰突然変異コロニー数の平均値と標準偏差値を算出した。結果の判定は、被験物質処理における復帰突然変異コロニー数が自然復帰突然変異コロニー数に対して顕著に増加（陰性対照群の 2 倍以上を目安とした）し、この増加に用量反応性が認められ、また濃度設定試験及び本試験の各成績に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、判定に際しては統計学的手法は用いなかった。

## 試験結果

### 1. 濃度設定試験

濃度設定試験の結果を Table 1, 2 及び Figure 1～5（上段）に示した。

1) 培養終了後の寒天平板培地観察

培養終了後の実体顕微鏡を用いた観察から、使用した 5 菌株において、代謝活性化系の有無にかかわらず、全被験物質処理群（0.305～5000 μg/plate）で、生育阻害は認められなかった。一方、使用した 5 菌株において、代謝活性化系の有無にかかわらず、78.1 μg/plate 以上の被験物質処理群で白色の析出物が認められた。

2) 復帰突然変異コロニー数

使用した 5 菌株において、代謝活性化系の有無にかかわらず、全被験物質処理群（0.305～5000 μg/plate）で、陰性対照群と比較して 2 倍以上及び用量依存的な復帰突然変異コロニー数の増加は認められなかった。

3) 試験系の成立条件

(1) 陽性対照群においては、各菌株の陰性対照群に比較して 2 倍以上となる復帰突然変異コロニー数の増加が認められた。

(2) すべての被験物質処理群について、3 枚のプレートにおける個々の復帰突然変異コロニー数に顕著な差は認められなかった。

(3) 各菌株の代謝活性化系の有無による陰性対照群及び陽性対照群の復帰突然変異コロニー数は試験実施施設における背景データ管理値（添付資料 5）の範囲内であった。

以上より、試験系は成立したものと判断した。

## 2. 本試験

本試験の結果を Table 3, 4 及び Figure 1～5（下段）に示した。

1) 培養終了後の寒天平板培地観察

培養終了後の実体顕微鏡を用いた観察から、使用した 5 菌株において、代謝活性化系の有無にかかわらず、全被験物質処理群（156～5000 μg/plate）で、生育阻害は認められなかった。一方、使用した 5 菌株において、代謝活性化系の有無にかかわらず、156 μg/plate 以上の被験物質処理群で白色の析出物が認められた。

2) 復帰突然変異コロニー数

使用した 5 菌株において、代謝活性化系の有無にかかわらず、全被験物質処理群（156～5000 μg/plate）で、陰性対照群と比較して 2 倍以上及び用量依存的な復帰突然変異コロニー数の増加は認められなかった。

3) 試験系の成立条件

(1) 陽性対照群においては、各菌株の陰性対照群に比較して 2 倍以上となる復帰突然変異コロニー数の増加が認められた。

(2) すべての被験物質処理群について、3 枚のプレートにおける個々の復帰突然変異コロニー数に顕著な差は認められなかった。

(3) 各菌株の代謝活性化系の有無による陰性対照群及び陽性対照群の復帰突然変異コロニー数は試験実施施設における背景データ管理値（添付資料 5）の範囲内であった。

以上より、試験系は成立したものと判断した。

## 考察及び結論

濃度設定試験及び本試験のいずれにおいても、使用菌株に対して、被験物質の濃度及び代謝活性化系の有無にかかわらず、陰性対照群と比較して 2 倍以上及び用量依存的な復帰突然変異コロニー数の増加は認められなかった。

一方、陽性対照群では各菌株の陰性対照群と比較して 2 倍以上となる復帰突然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た。更に、各菌株の代謝活性化系の有無による陰性対照群及び陽性対照群の復帰突然変異コロニー数は試験実施施設における背景データと比較して異常と考えられる数値を示さず、試験は適切に実施されたものと考えられた。

ラウリルリン酸ナトリウムの類縁体である sulfuric acid, monododecyl ester, sodium salt (CAS No.: 151-21-3) はマウスリンフォーマ試験で非代謝活性化系において陰性であることが報告されている[6]。

以上の試験結果より、ラウリルリン酸ナトリウムは本試験条件下において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。

## 参考文献


1) Bruce N. Ames, Joyce McCann and Edith Yamasaki (1975): Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutation Research. 31, 347-364.

2) Dorothy M. Maron and Bruce N. Ames (1983): Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutation Research. 113, 173-215.

3) 石館 基 (監修) (1991): 微生物を用いる変異原性試験データ集 (能美健彦、松井道子編集)、株式会社エル・アイ・シー、東京

4) 日本製薬工業協会・医薬品評価委員会・基礎研究部会 変異原性試験検討グループ編集 (1992): 厚生省医薬品毒性試験法ガイドラインに基づく変異原性試験 Q & A、pp.1-21 及び 81-89、サイエンティスト社、東京

5) 日本バイオアッセイ研究センター編集 (1999) : 微生物を用いる変異原性試験手法解説、pp.1-86、富士オフセット株式会社、東京

6) McGregor D B, Brown A, Cattanach P, Wdwards I, McBride D, Riach C, Caspary WJ (1988): Responses of the L5178Y tk+/tk- mouse lymphoma cell forward mutation assay: III. 72 coded chemicals. Environ. Mol. Mutagen. 12(1), 85-154.

Table 1 Results of the Dose-Range Finding Test on Phosphoric acid, dodecyl ester, sodium salt without Metabolic Activation in the Bacterial Reverse Mutation Test

| | Dose (μg/plate) | S9 mix | Number of revertant colonies/plate (Mean±Standard Deviation) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Base substitution type | | | Frameshift type | |
| | | | *S.typhimurium* TA100 | *S.typhimurium* TA1535 | *E.coli* WP2 *uvrA* | *S.typhimurium* TA98 | *S.typhimurium* TA1537 |
| Negative control | 0 | (−) | 116<br>106<br>106 ( 109 ± 5.8 ) | 16<br>12<br>12 ( 13 ± 2.3 ) | 31<br>29<br>32 ( 31 ± 1.5 ) | 22<br>21<br>19 ( 21 ± 1.5 ) | 14<br>17<br>13 ( 15 ± 2.1 ) |
| Test article | 0.305 | | 107<br>111<br>101 ( 106 ± 5.0 ) | 12<br>11<br>9 ( 11 ± 1.5 ) | 32<br>27<br>27 ( 29 ± 2.9 ) | 19<br>20<br>17 ( 19 ± 1.5 ) | 17<br>12<br>15 ( 15 ± 2.5 ) |
| | 1.22 | | 105<br>97<br>110 ( 104 ± 6.6 ) | 9<br>11<br>12 ( 11 ± 1.5 ) | 24<br>30<br>31 ( 28 ± 3.8 ) | 19<br>19<br>21 ( 20 ± 1.2 ) | 12<br>13<br>12 ( 12 ± 0.6 ) |
| | 4.88 | | 100<br>97<br>96 ( 98 ± 2.1 ) | 15<br>13<br>11 ( 13 ± 2.0 ) | 25<br>36<br>26 ( 29 ± 6.1 ) | 21<br>23<br>18 ( 21 ± 2.5 ) | 11<br>13<br>17 ( 14 ± 3.1 ) |
| | 19.5 | | 98<br>89<br>99 ( 95 ± 5.5 ) | 12<br>9<br>11 ( 11 ± 1.5 ) | 29<br>24<br>29 ( 27 ± 2.9 ) | 19<br>19<br>17 ( 18 ± 1.2 ) | 16<br>17<br>11 ( 15 ± 3.2 ) |
| | 78.1 | | 93 †<br>101 †<br>98 † ( 97 ± 4.0 ) | 11 †<br>9 †<br>9 † ( 10 ± 1.2 ) | 33 †<br>31 †<br>27 † ( 30 ± 3.1 ) | 19 †<br>21 †<br>16 † ( 19 ± 2.5 ) | 12 †<br>20 †<br>15 † ( 16 ± 4.0 ) |
| | 313 | | 101 †<br>98 †<br>87 † ( 95 ± 7.4 ) | 9 †<br>9 †<br>10 † ( 9 ± 0.6 ) | 30 †<br>33 †<br>28 † ( 30 ± 2.5 ) | 21 †<br>20 †<br>23 † ( 21 ± 1.5 ) | 19 †<br>15 †<br>14 † ( 16 ± 2.6 ) |
| | 1250 | | 89 †<br>78 †<br>90 † ( 86 ± 6.7 ) | 13 †<br>11 †<br>10 † ( 11 ± 1.5 ) | 30 †<br>34 †<br>28 † ( 31 ± 3.1 ) | 19 †<br>19 †<br>21 † ( 20 ± 1.2 ) | 14 †<br>11 †<br>11 † ( 12 ± 1.7 ) |
| | 5000 | | 96 †<br>80 †<br>82 † ( 86 ± 8.7 ) | 8 †<br>10 †<br>7 † ( 8 ± 1.5 ) | 26 †<br>19 †<br>17 † ( 21 ± 4.7 ) | 14 †<br>14 †<br>17 † ( 15 ± 1.7 ) | 13 †<br>15 †<br>12 † ( 13 ± 1.5 ) |
| Positive control | Name | | AF-2[#1] | SAZ[#2] | AF-2[#1] | AF-2[#1] | ICR-191[#3] |
| | Dose (μg/plate) | | 0.01 | 0.50 | 0.01 | 0.10 | 1.00 |
| | Number of revertant colonies/plate | | 476<br>497<br>487 ( 487 ± 10.5 ) | 342<br>361<br>330 ( 344 ± 15.6 ) | 325<br>351<br>363 ( 346 ± 19.4 ) | 339<br>340<br>356 ( 345 ± 9.5 ) | 1192<br>1083<br>1113 ( 1129 ± 56.3 ) |

Negative control: 0.5%(w/v) sodium carboxymethyl cellulose solution
#1: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide , #2: Sodium azide
#3: 2-Methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)-aminopropylamino]acridine・2HCl
†: White-deposition was observed on the surface of agar plate.
No growth inhibition of tester strains was observed.

Table 2 Results of the Dose-Range Finding Test on Phosphoric acid, dodecyl ester, sodium salt with Metabolic Activation in the Bacterial Reverse Mutation Test

| | Dose (μg/plate) | S9 mix | Number of revertant colonies/plate (Mean±Standard Deviation) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Base substitution type | | | Frameshift type | |
| | | | *S.typhimurium* TA100 | *S.typhimurium* TA1535 | *E.coli* WP2 *uvrA* | *S.typhimurium* TA98 | *S.typhimurium* TA1537 |
| Negative control | 0 | (+) | 109<br>120<br>109 ( 113 ± 6.4 ) | 14<br>12<br>11 ( 12 ± 1.5 ) | 36<br>27<br>32 ( 32 ± 4.5 ) | 25<br>22<br>20 ( 22 ± 2.5 ) | 17<br>13<br>15 ( 15 ± 2.0 ) |
| Test article | 0.305 | | 110<br>120<br>102 ( 111 ± 9.0 ) | 9<br>14<br>11 ( 11 ± 2.5 ) | 30<br>32<br>28 ( 30 ± 2.0 ) | 23<br>24<br>28 ( 25 ± 2.6 ) | 12<br>18<br>19 ( 16 ± 3.8 ) |
| | 1.22 | | 104<br>110<br>118 ( 111 ± 7.0 ) | 8<br>9<br>11 ( 9 ± 1.5 ) | 26<br>21<br>31 ( 26 ± 5.0 ) | 29<br>25<br>23 ( 26 ± 3.1 ) | 20<br>21<br>17 ( 19 ± 2.1 ) |
| | 4.88 | | 109<br>118<br>115 ( 114 ± 4.6 ) | 12<br>15<br>12 ( 13 ± 1.7 ) | 29<br>31<br>27 ( 29 ± 2.0 ) | 25<br>29<br>21 ( 25 ± 4.0 ) | 20<br>19<br>14 ( 18 ± 3.2 ) |
| | 19.5 | | 105<br>113<br>102 ( 107 ± 5.7 ) | 9<br>12<br>11 ( 11 ± 1.5 ) | 33<br>28<br>24 ( 28 ± 4.5 ) | 27<br>27<br>29 ( 28 ± 1.2 ) | 19<br>17<br>16 ( 17 ± 1.5 ) |
| | 78.1 | | 103 †<br>114 †<br>96 † ( 104 ± 9.1 ) | 10 †<br>12 †<br>9 † ( 10 ± 1.5 ) | 34 †<br>29 †<br>31 † ( 31 ± 2.5 ) | 27 †<br>28 †<br>23 † ( 26 ± 2.6 ) | 22 †<br>18 †<br>15 † ( 18 ± 3.5 ) |
| | 313 | | 101 †<br>97 †<br>86 † ( 95 ± 7.8 ) | 9 †<br>14 †<br>12 † ( 12 ± 2.5 ) | 31 †<br>31 †<br>37 † ( 33 ± 3.5 ) | 25 †<br>18 †<br>25 † ( 23 ± 4.0 ) | 17 †<br>21 †<br>18 † ( 19 ± 2.1 ) |
| | 1250 | | 84 †<br>77 †<br>87 † ( 83 ± 5.1 ) | 9 †<br>10 †<br>12 † ( 10 ± 1.5 ) | 27 †<br>28 †<br>22 † ( 26 ± 3.2 ) | 24 †<br>20 †<br>19 † ( 21 ± 2.6 ) | 16 †<br>14 †<br>20 † ( 17 ± 3.1 ) |
| | 5000 | | 90 †<br>79 †<br>86 † ( 85 ± 5.6 ) | 8 †<br>7 †<br>7 † ( 7 ± 0.6 ) | 18 †<br>18 †<br>21 † ( 19 ± 1.7 ) | 19 †<br>12 †<br>14 † ( 15 ± 3.6 ) | 12 †<br>12 †<br>16 † ( 13 ± 2.3 ) |
| Positive control | Name | | B[*a*]P#4 | 2AA#5 | 2AA#5 | B[*a*]P#4 | B[*a*]P#4 |
| | Dose (μg/plate) | | 5.00 | 2.00 | 10.0 | 5.00 | 5.00 |
| | Number of revertant colonies/plate | | 502<br>471<br>489 ( 487 ± 15.6 ) | 120<br>105<br>104 ( 110 ± 9.0 ) | 404<br>383<br>409 ( 399 ± 13.8 ) | 361<br>340<br>345 ( 349 ± 11.0 ) | 106<br>114<br>115 ( 112 ± 4.9 ) |

Negative control: 0.5%(w/v) sodium carboxymethyl cellulose solution
#4: Benzo[*a*]pyrene 、#5: 2-Aminoanthracene
†: White-deposition was observed on the surface of agar plate.
No growth inhibition of tester strains was observed.

Table 3 Results of the Main Test on Phosphoric acid, dodecyl ester, sodium salt without Metabolic Activation in the Bacterial Reverse Mutation Test

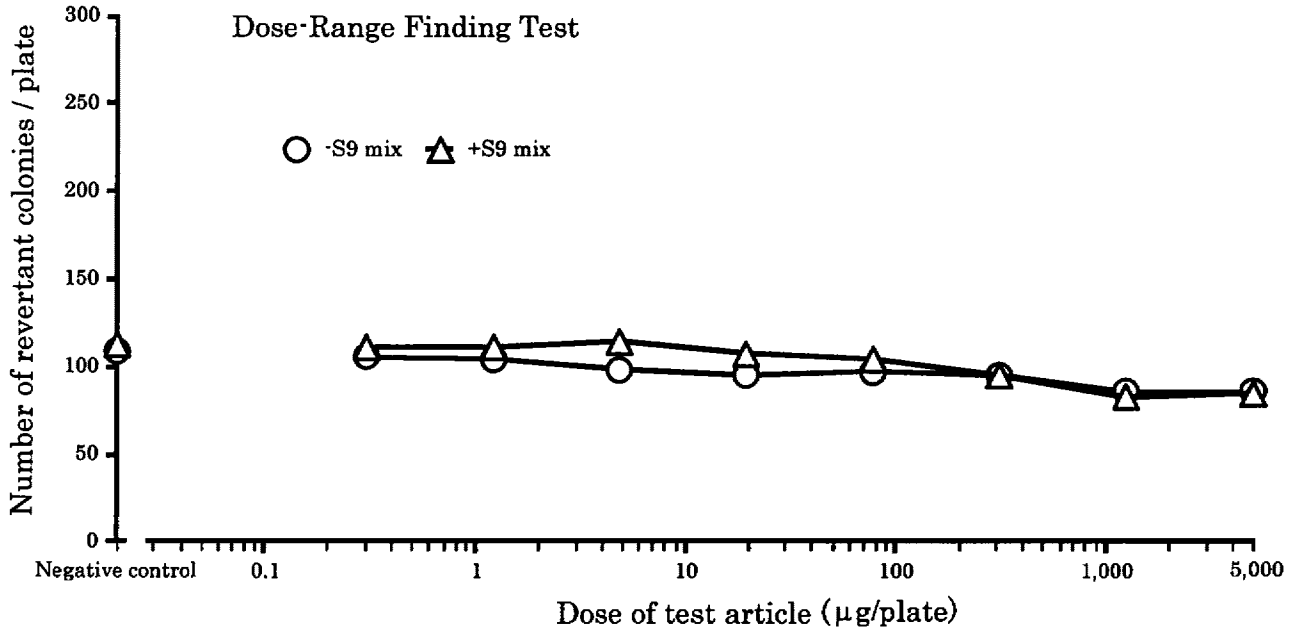
| | Dose (μg/plate) | S9 mix | Number of revertant colonies/plate (Mean±Standard Deviation) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Base substitution type | | | Frameshift type | |
| | | | *S.typhimurium* TA100 | *S.typhimurium* TA1535 | *E.coli* WP2 *uvrA* | *S.typhimurium* TA98 | *S.typhimurium* TA1537 |
| Negative control | 0 | (−) | 112<br>116<br>101 (110 ± 7.8) | 15<br>12<br>12 (13 ± 1.7) | 28<br>32<br>27 (29 ± 2.6) | 21<br>19<br>18 (19 ± 1.5) | 17<br>11<br>14 (14 ± 3.0) |
| Test article | 156 | | 116 †<br>107 †<br>102 † (108 ± 7.1) | 9 †<br>11 †<br>12 † (11 ± 1.5) | 29 †<br>35 †<br>25 † (30 ± 5.0) | 24 †<br>18 †<br>17 † (20 ± 3.8) | 14 †<br>17 †<br>18 † (16 ± 2.1) |
| | 313 | | 100 †<br>101 †<br>96 † (99 ± 2.6) | 11 †<br>10 †<br>14 † (12 ± 2.1) | 34 †<br>29 †<br>25 † (29 ± 4.5) | 16 †<br>23 †<br>18 † (19 ± 3.6) | 19 †<br>14 †<br>17 † (17 ± 2.5) |
| | 625 | | 118 †<br>114 †<br>108 † (113 ± 5.0) | 18 †<br>12 †<br>13 † (14 ± 3.2) | 31 †<br>28 †<br>31 † (30 ± 1.7) | 19 †<br>15 †<br>17 † (17 ± 2.0) | 14 †<br>11 †<br>17 † (14 ± 3.0) |
| | 1250 | | 112 †<br>115 †<br>108 † (112 ± 3.5) | 11 †<br>9 †<br>11 † (10 ± 1.2) | 28 †<br>24 †<br>25 † (26 ± 2.1) | 16 †<br>21 †<br>16 † (18 ± 2.9) | 15 †<br>9 †<br>11 † (12 ± 3.1) |
| | 2500 | | 104 †<br>119 †<br>114 † (112 ± 7.6) | 11 †<br>9 †<br>11 † (10 ± 1.2) | 21 †<br>19 †<br>24 † (21 ± 2.5) | 16 †<br>13 †<br>20 † (16 ± 3.5) | 10 †<br>13 †<br>8 † (10 ± 2.5) |
| | 5000 | | 94 †<br>86 †<br>98 † (93 ± 6.1) | 10 †<br>11 †<br>7 † (9 ± 2.1) | 19 †<br>19 †<br>14 † (17 ± 2.9) | 19 †<br>12 †<br>18 † (16 ± 3.8) | 14 †<br>13 †<br>11 † (13 ± 1.5) |
| Positive control | Name | | AF-2[#1] | SAZ[#2] | AF-2[#1] | AF-2[#1] | ICR-191[#3] |
| | Dose (μg/plate) | | 0.01 | 0.50 | 0.01 | 0.10 | 1.00 |
| | Number of revertant colonies/plate | | 480<br>473<br>459 (471 ± 10.7) | 306<br>309<br>316 (310 ± 5.1) | 347<br>363<br>348 (353 ± 9.0) | 340<br>350<br>328 (339 ± 11.0) | 1061<br>1109<br>1135 (1102 ± 37.5) |

Negative control: 0.5%(w/v) sodium carboxymethyl cellulose solution
#1: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide , #2: Sodium azide
#3: 2-Methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)-aminopropylamino]acridine・2HCl
†: White-deposition was observed on the surface of agar plate.
No growth inhibition of tester strains was observed.

Table 4 Results of the Main Test on Phosphoric acid, dodecyl ester, sodium salt with Metabolic Activation in the Bacterial Reverse Mutation Test

| | Dose (μg/plate) | S9 mix | Number of colonies/plate (Mean ± Standard Deviation) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Base substitution type | | | Frameshift type | |
| | | | *S.typhimurium* TA100 | *S.typhimurium* TA1535 | *E.coli* WP2 *uvrA* | *S.typhimurium* TA98 | *S.typhimurium* TA1537 |
| Negative control | 0 | (+) | 104<br>115<br>102 (107 ± 7.0) | 13<br>15<br>12 (13 ± 1.5) | 35<br>31<br>32 (33 ± 2.1) | 21<br>23<br>18 (21 ± 2.5) | 16<br>15<br>16 (16 ± 0.6) |
| Test article | 156 | | 120 †<br>104 †<br>115 † (113 ± 8.2) | 12 †<br>17 †<br>12 † (14 ± 2.9) | 33 †<br>26 †<br>25 † (28 ± 4.4) | 17 †<br>22 †<br>20 † (20 ± 2.5) | 18 †<br>19 †<br>20 † (19 ± 1.0) |
| | 313 | | 110 †<br>107 †<br>104 † (107 ± 3.0) | 13 †<br>16 †<br>11 † (13 ± 2.5) | 32 †<br>33 †<br>27 † (31 ± 3.2) | 22 †<br>24 †<br>19 † (22 ± 2.5) | 21 †<br>16 †<br>16 † (18 ± 2.9) |
| | 625 | | 113 †<br>111 †<br>108 † (111 ± 2.5) | 11 †<br>9 †<br>13 † (11 ± 2.0) | 29 †<br>23 †<br>25 † (26 ± 3.1) | 19 †<br>20 †<br>16 † (18 ± 2.1) | 17 †<br>14 †<br>15 † (15 ± 1.5) |
| | 1250 | | 111 †<br>106 †<br>99 † (105 ± 6.0) | 9 †<br>12 †<br>9 † (10 ± 1.7) | 24 †<br>26 †<br>22 † (24 ± 2.0) | 19 †<br>15 †<br>19 † (18 ± 2.3) | 19 †<br>14 †<br>20 † (18 ± 3.2) |
| | 2500 | | 98 †<br>104 †<br>89 † (97 ± 7.5) | 8 †<br>10 †<br>7 † (8 ± 1.5) | 26 †<br>27 †<br>21 † (25 ± 3.2) | 19 †<br>16 †<br>13 † (16 ± 3.0) | 18 †<br>21 †<br>15 † (18 ± 3.0) |
| | 5000 | | 101 †<br>94 †<br>83 † (93 ± 9.1) | 8 †<br>11 †<br>7 † (9 ± 2.1) | 21 †<br>15 †<br>18 † (18 ± 3.0) | 14 †<br>19 †<br>14 † (16 ± 2.9) | 11 †<br>15 †<br>9 † (12 ± 3.1) |
| Positive control | Name | | B[*a*]P#4 | 2AA#5 | 2AA#5 | B[*a*]P#4 | B[*a*]P#4 |
| | Dose (μg/plate) | | 5.00 | 2.00 | 10.0 | 5.00 | 5.00 |
| | Number of revertant colonies/plate | | 471<br>490<br>505 (489 ± 17.0) | 126<br>124<br>105 (118 ± 11.6) | 401<br>413<br>390 (401 ± 11.5) | 334<br>342<br>345 (340 ± 5.7) | 125<br>111<br>112 (116 ± 7.8) |

Negative control: 0.5%(w/v) sodium carboxymethyl cellulose solution
#4: Benzo[*a*]pyrene , #5: 2-Aminoanthracene
†: White-deposition was observed on the surface of agar plate.
No growth inhibition of tester strains was observed.



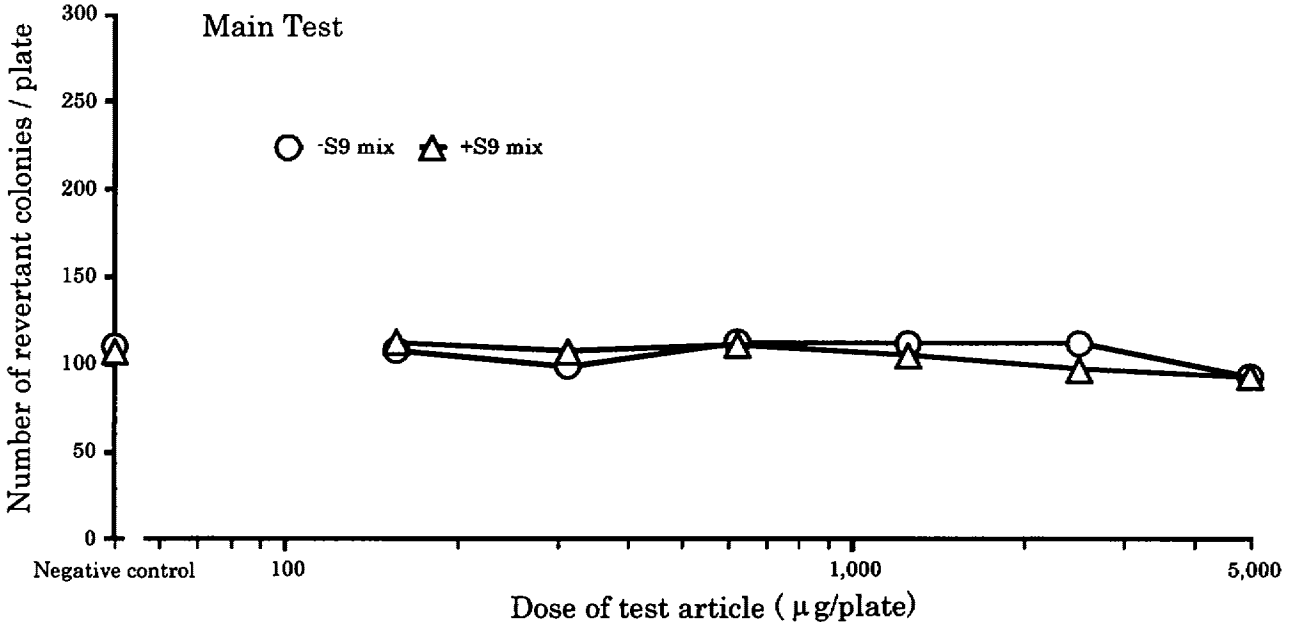
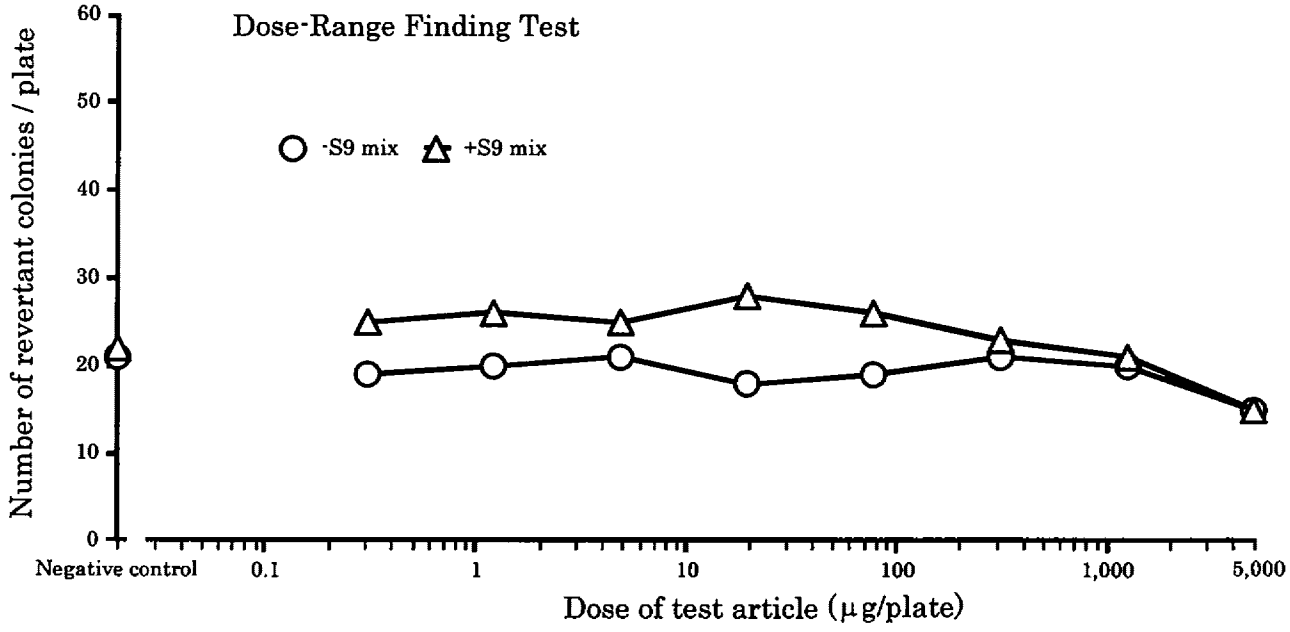




**Figure 1**

**Results of the Reverse Mutation Test on Phosphoric acid, dodecyl ester, sodium salt with *Salmonella typhimurium* TA100**



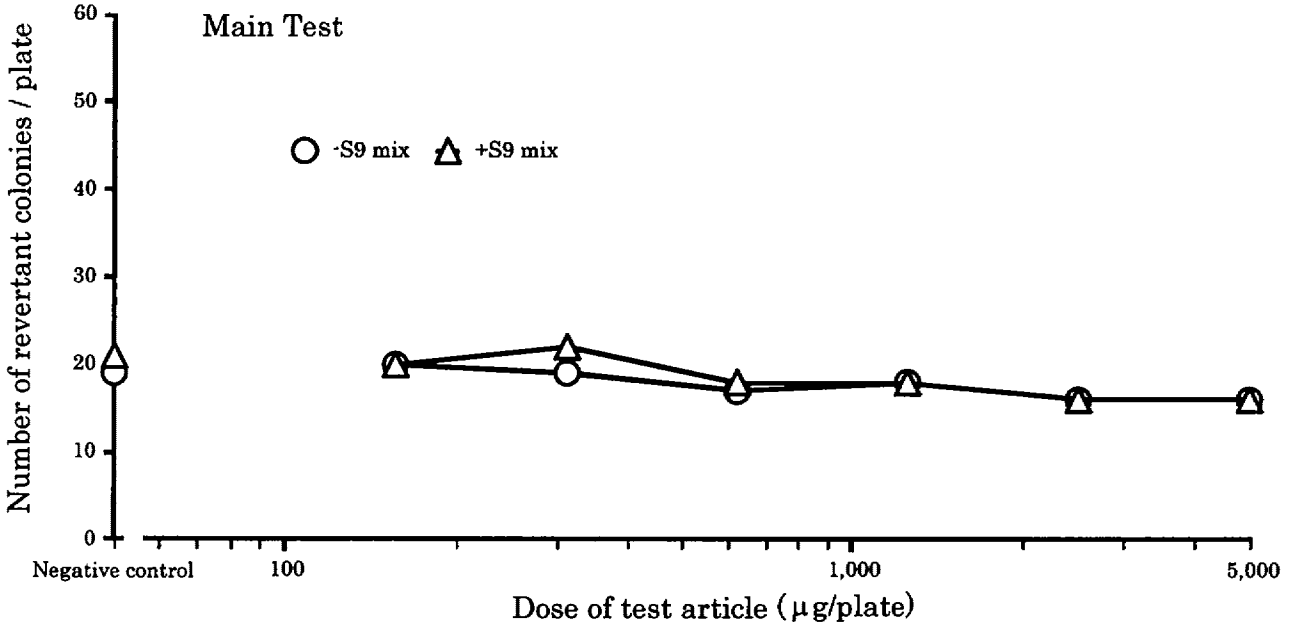
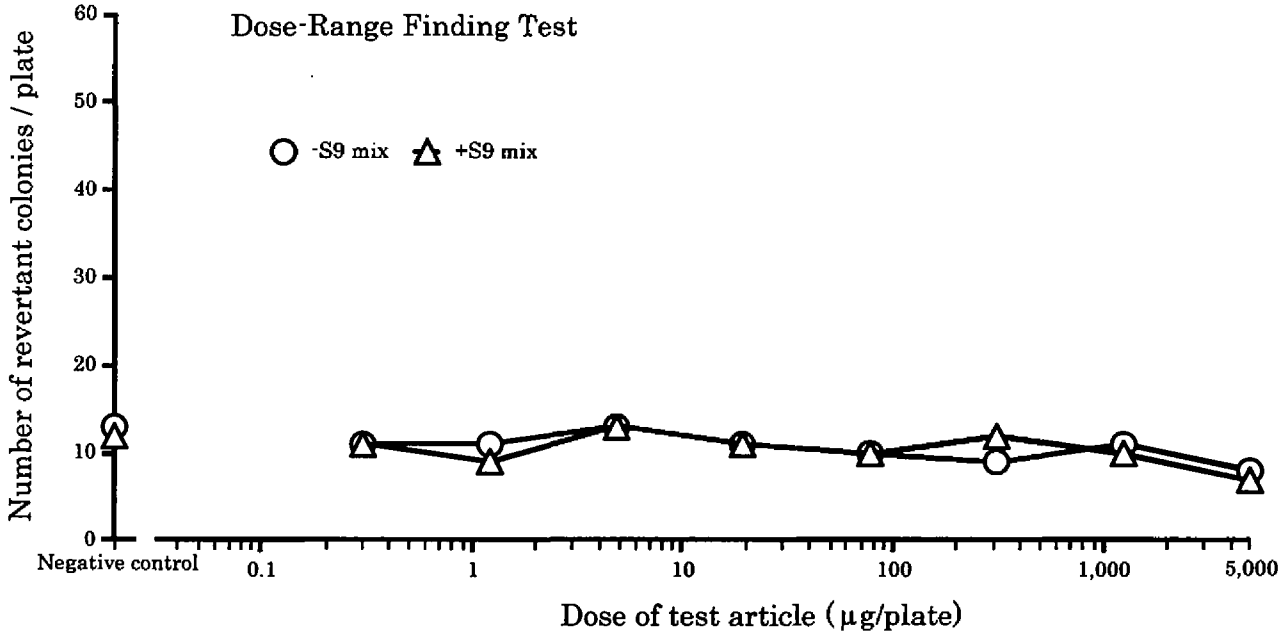




**Figure 2**

**Results of the Reverse Mutation Test on Phosphoric acid, dodecyl ester, sodium salt with *Salmonella typhimurium* TA98**



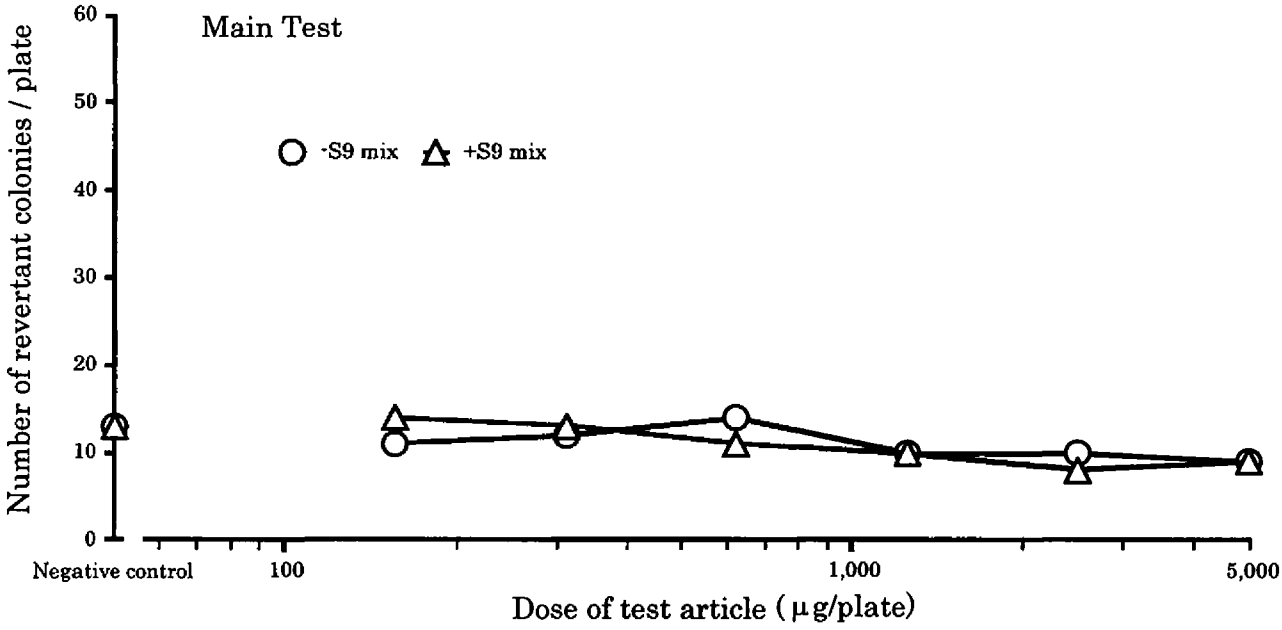
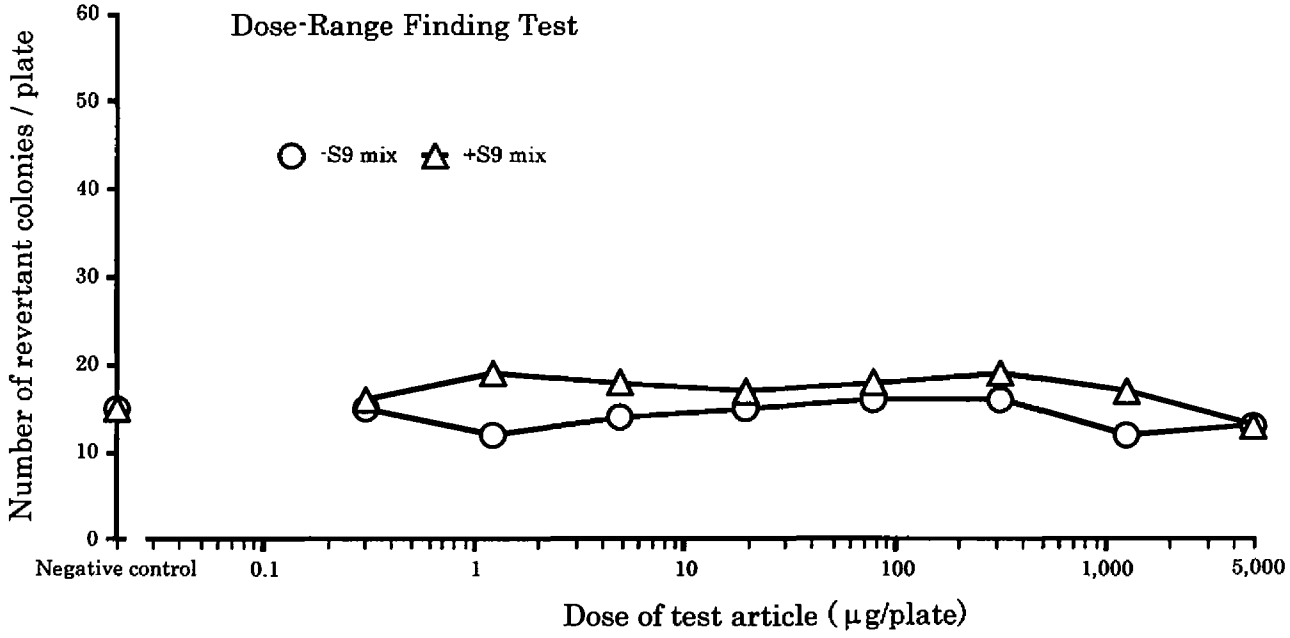




**Figure 3**

**Results of the Reverse Mutation Test on Phosphoric acid, dodecyl ester, sodium salt with *Salmonella typhimurium* TA1535**



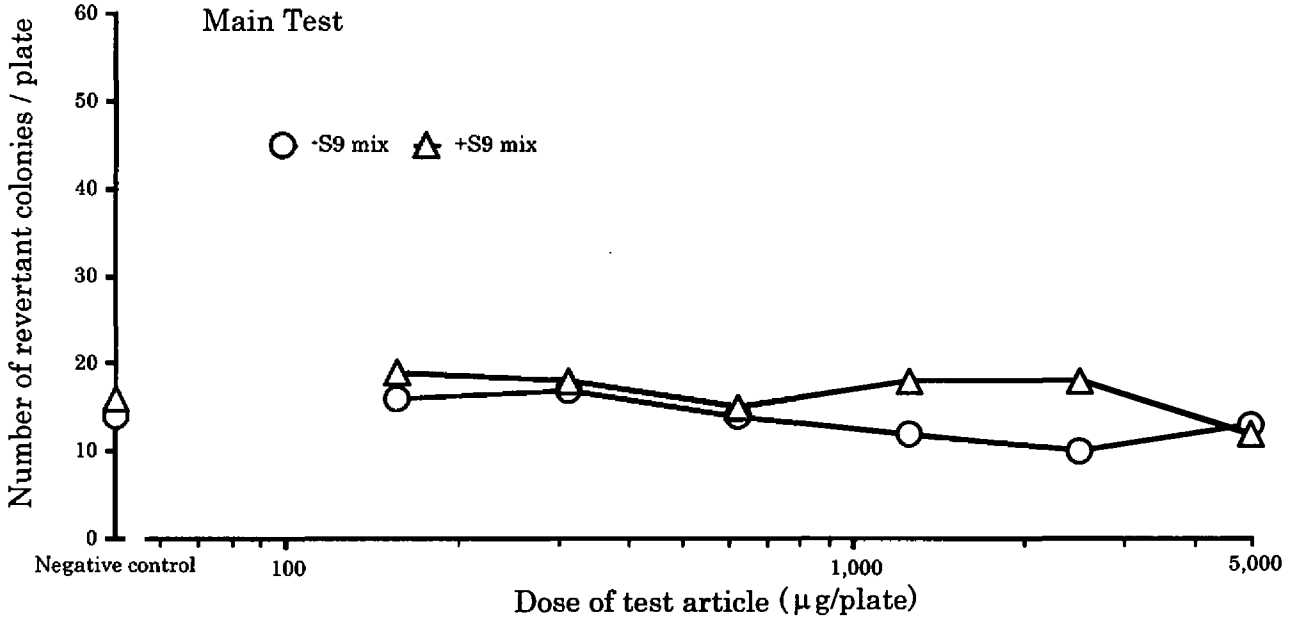
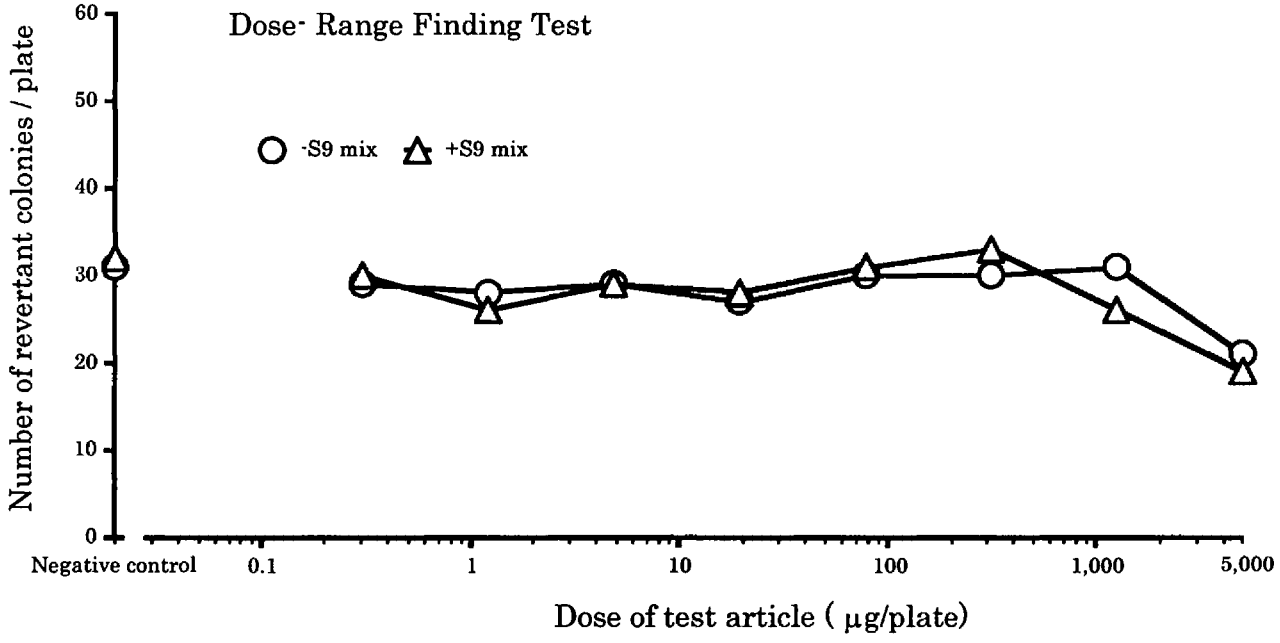




**Figure 4**

**Results of the Reverse Mutation Test on Phosphoric acid, dodecyl ester, sodium salt with *Salmonella typhimurium* TA1537**



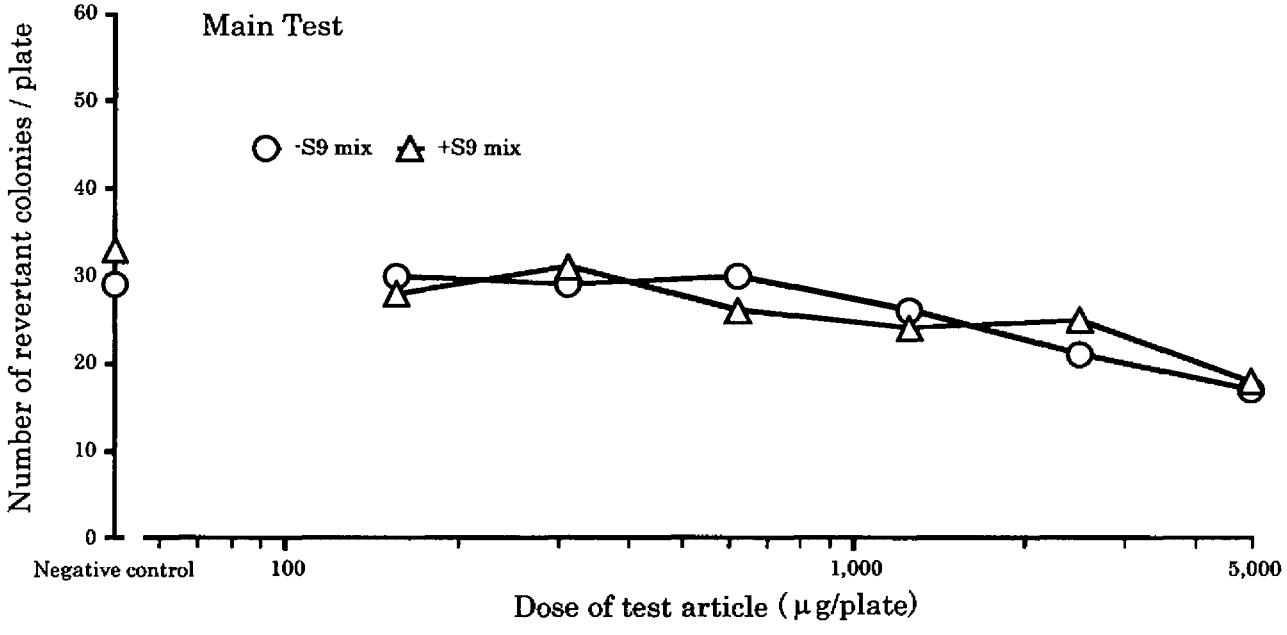




**Figure 5**

**Results of the Reverse Mutation Test on Phosphoric acid, dodecyl ester, sodium salt with *Escherichia coli* WP2 *uvrA***