

## 最終報告書

*N,N*-ジメチル-*N*-ドデシルグリシンの細菌を用いる復帰突然変異試験

(試験番号：B031637)

2005年12月7日

株式会社三菱化学安全科学研究所

## 2. 目次

2. 目次.....	3
------------	---

5. 要約.....	9
6. 材料および方法 .....	10
6.1 被験物質 .....	10
6.1.1 名称 .....	10
6.1.2 CAS 番号.....	10
6.1.3 構造式 .....	10
6.1.4 ロット番号.....	10
6.1.5 純度 .....	10
6.1.6 不純物 .....	10
6.1.7 分子量 .....	10
6.1.8 常温における性状 .....	10
6.1.9 溶解性 .....	10
6.1.10 保存条件.....	10
6.1.11 入手先 .....	10
6.1.12 入手日 .....	11
6.1.13 安定性の確認.....	11
6.1.14 変異原性に関する情報 .....	11
6.2 対照物質 .....	11
6.2.1 陰性対照物質.....	11
6.2.2 陽性対照物質 .....	11

6.3	試験菌株	12
6.3.1	試験菌株	12
6.3.2	試験菌株の選択理由	12
6.3.3	試験菌株の遺伝的特性	12
6.3.4	試験菌株の保存	13
6.3.5	菌懸濁液	13
6.4	培地	14
6.4.1	液体完全培地の調製	14
6.4.2	トッペアガールの調製	14
6.4.3	最少グルコース寒天平板培地	14
6.5	S9 mix	15
6.5.1	S9	15
6.5.2	Cofactor mix	15
6.5.3	S9 mix	16
6.6	被験物質溶液および陽性対照物質溶液の調製	16
6.6.1	被験物質溶液の調製	16
6.6.2	陽性対照物質溶液の調製	16
6.7	被験物質および陽性対照物質用量	17
6.7.1	被験物質用量	17
6.7.2	陽性対照物質用量	18
6.8	復帰突然変異試験	18
6.8.1	試験法の選択	18
6.8.2	プレインキュベーション法	18
6.8.3	観察	19
6.8.4	コロニー計測	19
6.8.5	プレート数	19
6.8.6	結果の集計	19
6.8.7	無菌試験	19
6.8.8	実験の成立基準	19
6.8.9	試験結果の判定	20
6.8.10	再現性の確認	20
7.	結果	20
7.1	無菌試験	20
7.2	沈殿物	20
7.3	菌の生育阻害	20
7.4	復帰変異コロニー数	21
8.	考察および結論	21
9.	参考文献	21

## 試験結果表

表 1	試験結果表 (予備試験) .....	22
表 2	試験結果表 (本試験 1) .....	23
表 3	試験結果表 (本試験 2) .....	24

## 図

図 1-1	用量-反応曲線 (本試験 1 ; -S9 mix) .....	25
図 1-2	用量-反応曲線 (本試験 1 ; +S9 mix) .....	25
図 2-1	用量-反応曲線 (本試験 2 ; -S9 mix) .....	26
図 2-2	用量-反応曲線 (本試験 2 ; +S9 mix) .....	26

## 5. 要約

ネズミチフス菌株 TA100, TA1535, TA98 および TA1537 ならびに大腸菌株 WP2*uvrA*/pKM101 の 5 菌株を用いる復帰突然変異試験で *N, N*-ジメチル-*N*-ドデシルグリシンの変異原性を調べた。試験は S9 mix 非存在下および存在下でプレインキュベーション法により実施した。

予備試験の結果に基づいて、以下の用量を設定して本試験を実施した。

S9 mix 非存在下：

TA100, TA1535 : 2.44, 4.88, 9.77, 19.5, 39.1, 78.1  $\mu\text{g}$ /プレート

WP2*uvrA*/pKM101 : 2.44, 4.88, 9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156  $\mu\text{g}$ /プレート

TA98, TA1537 : 0.610, 1.22, 2.44, 4.88, 9.77, 19.5, 39.1  $\mu\text{g}$ /プレート

S9 mix 存在下：

TA100, TA1535 : 9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156, 313  $\mu\text{g}$ /プレート

WP2*uvrA*/pKM101 : 39.1, 78.1, 156, 313, 625, 1250, 2500  $\mu\text{g}$ /プレート

TA98, TA1537 : 9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156, 313, 625  $\mu\text{g}$ /プレート

2 回の本試験の結果、S9 mix の有無にかかわらず、いずれの試験菌株においても被験物質処理群における復帰変異コロニー数は陰性（溶媒）対照値の 2 倍未満であった。また、すべての試験菌株で生育阻害が認められ、S9 mix の有無にかかわらず、いずれの用量においてもプレート上に沈殿物は認められなかった。

当該試験の陰性（溶媒）対照値および陽性対照値は、当研究所の適正範囲内であった。また、陽性対照により誘発された復帰変異コロニー数は、S9 mix 非存在下および存在下のいずれの試験菌株においても陰性（溶媒）対照値の 2 倍を超えて増加し、明らかな陽性結果を示した。従って、本試験の妥当性が確認された。

以上の結果から、*N, N*-ジメチル-*N*-ドデシルグリシンは本試験条件下において変異原性を有しないと結論した。

## 6. 材料および方法

### 6.1 被験物質

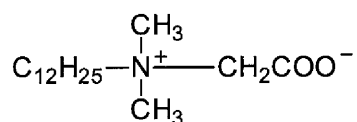
#### 6.1.1 名称

*N,N*-ジメチル-*N*-ドデシルグリシン [別名 ; アンヒトール 24B (Amphitol 24B)]

#### 6.1.2 CAS 番号

683-10-3

#### 6.1.3 構造式



#### 6.1.4 ロット番号

#### 6.1.5 純度

27.1%

#### 6.1.6 不純物

石油エーテル可溶分 0.1%, 乾燥減量 65.8%, 強熱残分 7.0%

#### 6.1.7 分子量

271.25

#### 6.1.8 常温における性状

微黄色透明液体

#### 6.1.9 溶解性

水および生理食塩液に 50 mg/mL で可溶  
(当研究所における溶媒検討・試験結果による)

#### 6.1.10 保存条件

室温 (実測値 : 14.5°C ~ 23.9°C) , 遮光, 密閉容器

#### 6.1.11 入手先

**6.1.12 入手日**

2003年11月19日

**6.1.13 安定性の確認**

被験物質の入手先より安定性を保証する資料を入手し、確認した。

**6.1.14 変異原性に関する情報**

類似化合物の変異原性に関する情報を添付資料2にまとめた。

**6.2 対照物質****6.2.1 陰性対照物質****6.2.1.1 名称**

日本薬局方 注射用水 (DW と略す)

**6.2.1.2 製造元**

株式会社大塚製薬工場

**6.2.1.3 ロット番号**

K3J98

**6.2.1.4 陰性対照物質の選択理由**

本被験物質は水溶液であることから、本被験物質の溶媒（陰性対照物質）にはDWを選択した。

**6.2.2 陽性対照物質****6.2.2.1 名称, 製造元等**

名称 (略称)	製造元	ロット番号	含量 (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)	和光純薬工業株式会社	SEL1402	99.0%
アジ化ナトリウム (NaN <sub>3</sub> )	和光純薬工業株式会社	TCK7533	99.2%
9-アミノアクリジン塩酸塩 (9-AA)	Sigma-Aldrich Fine Chemicals	080K1684	98%
2-アミノアントラセン (2-AA)	和光純薬工業株式会社	TCM6741	93.3%

**6.2.2.2 陽性対照物質の選択理由**

細菌を用いる復帰突然変異試験において広く使用され、OECD ガイドラインにおいて推奨されている。

### 6.3 試験菌株 [1], [2]

#### 6.3.1 試験菌株

試験菌株	入手先 (入手日)
<i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535 TA98, TA1537	カリフォルニア大学 B.N. (1983 年 5 月 27 日)
<i>Escherichia coli</i> WP2 <u>uvrA</u> /pKM101	日本バイオアッセイ研究センター (1997 年 9 月 18 日)

#### 6.3.2 試験菌株の選択理由

細菌を用いる復帰突然変異試験において広く使用され、OECD ガイドラインおよび化審法ガイドラインにおいて推奨されている。

#### 6.3.3 試験菌株の遺伝的特性

##### 6.3.3.1 遺伝的特性

試験菌株	アミノ酸要求性 <sup>(a)</sup>	DNA 修復 <sup>(b)</sup>	膜変異 <sup>(c)</sup>	薬剤耐性 <sup>(d)</sup>
TA100	<i>his</i> (塩基対置換)	$\Delta uvrB$	<i>rfa</i>	+ (pKM101)
TA1535	<i>his</i> (塩基対置換)	$\Delta uvrB$	<i>rfa</i>	-
TA98	<i>his</i> (フレームシフト)	$\Delta uvrB$	<i>rfa</i>	+ (pKM101)
TA1537	<i>his</i> (フレームシフト)	$\Delta uvrB$	<i>rfa</i>	-
WP2 <u>uvrA</u> /pKM101	<i>trp</i> (塩基対置換)	$\Delta uvrA$	Wild type	+ (pKM101)

(a) *his* はヒスチジン要求性, *trp* はトリプトファン要求性を示す。

(b)  $\Delta uvrA$  および  $\Delta uvrB$  は DNA 修復遺伝子の欠失を示し、紫外線感受性を示す。

(c) *rfa* は細胞壁のリポ多糖類の欠失を示し、クリスタルバイオレット感受性を示す。

(d) + (pKM101) は薬剤耐性因子を保持していることを示し、アンピシリン耐性を示す。

##### 6.3.3.2 遺伝的特性の確認

以下の遺伝的特性を事前に調べ、これらの特性を備えた菌株を用いた。

- (1) アミノ酸要求性
- (2) 紫外線感受性
- (3) 膜変異
- (4) 薬剤耐性

##### 6.3.3.3 遺伝的特性の確認日

試験菌株	確認日
TA100, TA1535, TA98 TA1537, WP2 <u>uvrA</u> /pKM101	2003 年 11 月 7 日



### 6.3.4 試験菌株の保存

#### 6.3.4.1 保存方法

分注凍結（分注量：0.2 mL）

#### 6.3.4.2 保存条件

超低温冷凍庫（日本フリーザー株式会社，CL-322，実測値：-78°C ~ -85°C）

#### 6.3.4.3 組成

ジメチルスルホキシド（DMSO と略す，関東化学株式会社，ロット番号 503F1960，2.1 mL） / 菌懸濁液（37°C で 8 時間振盪培養，24 mL）

#### 6.3.4.4 保存日および使用期限

試験菌株	保存日（ロット番号）	使用期限
TA100, TA1535, TA98 TA1537, WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	2003 年 11 月 5 日（031105）	2004 年 11 月 4 日

### 6.3.5 菌懸濁液

#### 6.3.5.1 培養

培養温度：37°C（培養開始まで 10°C に保冷）

培養時間：8 時間

培養方法：往復振盪（振盪回数：90 回/分）

培養容器：L 字管（容量 22 mL）

培養液：液体完全培地（10 mL）

菌株および接種量：保存菌株（6.3.4 項参照）を処理前日に融解し，0.02 mL 接種

#### 6.3.5.2 菌懸濁液の菌濃度

培養終了後，濁度計（コロナ電気株式会社，UT-11）を用いて濁度を測定し，濁度からの換算により生菌数を算出した．菌懸濁液は菌濃度が  $1 \times 10^9$  /mL 以上であることを確認した後，試験に使用した．菌懸濁液は用時調製し，調製後は室温で保存した．

各菌懸濁液の生菌数を以下に示す．

試験菌株		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i> / pKM101	TA98	TA1537
生菌数 ( $\times 10^9$ /mL)	予備試験	2.30	1.80	5.74	3.60	2.11
	本試験 1	2.44	1.92	5.86	3.43	2.07
	本試験 2	2.44	1.91	6.05	3.48	1.55

## 6.4 培地

### 6.4.1 液体完全培地の調製

精製水 300 mL に Oxoid Nutrient Broth No.2 (Oxoid 社, ロット番号 261002) を 7.5 g 加えて溶解した. これを 121°C で 15 分間オートクレーブ滅菌し, 冷所で保存した.

### 6.4.2 トップアガールの調製

#### 6.4.2.1 軟寒天の調製

精製水 300 mL に Bacto-agar (Difco 社, ロット番号 137635JA) 1.8 g および塩化ナトリウム (関東化学株式会社, ロット番号 404F1819) 1.5 g を加え, これを 121°C で 15 分間オートクレーブ滅菌して, 室温で保存した.

#### 6.4.2.2 トップアガールの調製

軟寒天を電子レンジで液化し, 以下に示すアミノ酸水溶液をそれぞれ使用直前に 1/10 量添加した. トップアガーは用時調製し, 約 45°C に保温した.

ネズミチフス菌: 0.5 mmol/L D-ビオチン\*・L-ヒスチジン\*混合水溶液

大腸菌: 0.5 mmol/L L-トリプトファン\*水溶液

\*: D-ビオチン (和光純薬工業株式会社, ロット番号 TCJ2254)

L-ヒスチジン (和光純薬工業株式会社, ロット番号 TCN4471)

L-トリプトファン (和光純薬工業株式会社, ロット番号 TCJ2266)

### 6.4.3 最少グルコース寒天平板培地

#### 6.4.3.1 名称

クリメディア AM-N 培地

#### 6.4.3.2 製造元

オリエンタル酵母工業株式会社

#### 6.4.3.3 使用寒天

伊那寒天 BA-30A (伊那食品工業株式会社, ロット番号 30730)

#### 6.4.3.4 ロット番号

ANI040AT

#### 6.4.3.5 製造日および入手日

2004年 1月 15日製造

2004年 2月 12日入手

## 6.5 S9 mix

### 6.5.1 S9

#### 6.5.1.1 製造元

キッコーマン株式会社

#### 6.5.1.2 ロット番号

RAA-497

#### 6.5.1.3 製造日および入手日

2004年2月6日製造

2004年2月17日入手

#### 6.5.1.4 製造方法

フェノバルビタール（1日目 30 mg/kg を1回腹腔内投与，2日目以降 60 mg/kg を1日1回3日間腹腔内投与）と5,6-ベンゾフラボン（フェノバルビタール投与3日目に80 mg/kg を1回腹腔内投与）で酵素誘導した7週齢SD系雄ラット（体重215 - 245 g）の肝臓より調製された。

#### 6.5.1.5 蛋白含量

25.02 mg/mL

#### 6.5.1.6 保存条件

超低温冷凍庫（日本フリーザー株式会社，CL-322，実測値：-78°C ~ -85°C）

#### 6.5.1.7 使用期限

2004年8月5日（製造日から6カ月間）

## 6.5.2 Cofactor mix

### 6.5.2.1 名称

Cofactor-I

### 6.5.2.2 製造元

オリエンタル酵母工業株式会社

### 6.5.2.3 ロット番号

999305

### 6.5.2.4 調製

Cofactor-I に滅菌精製水 9 mL を加えて溶解し，メンブレンフィルター（孔径：0.45 μm）でろ過して Cofactor mix とした。Cofactor mix は用時調製した。

### 6.5.3 S9 mix

Cofactor mix 9 mL に対して、S9 を 1 mL の割合で加え S9 mix とした。S9 mix は用時調製し、使用時まで氷槽中に保存した。

S9 mix 1 mL あたりの組成を以下の表に示す。

S9	0.1 mL
塩化マグネシウム	8 $\mu$ mol
塩化カリウム	33 $\mu$ mol
D-グルコース 6-リン酸	5 $\mu$ mol
$\beta$ -NADPH	4 $\mu$ mol
$\beta$ -NADH	4 $\mu$ mol
ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 $\mu$ mol

## 6.6 被験物質溶液および陽性対照物質溶液の調製

### 6.6.1 被験物質溶液の調製

#### 6.6.1.1 調製

被験物質の秤量、溶液の希釈、分注および被験物質処理を含む全ての操作は室温、黄色灯下で行った。

- (1) 所定量の被験物質を秤量して DW を加え、振盪攪拌により溶解させて 50 mg/mL 溶液とした。
- (2) 被験物質の秤量に際しては純度換算 (27.1%) を実施した。
- (3) 予備試験では、この溶液の一部を DW で段階希釈して 12.5, 3.13, 0.781, 0.195, 0.0488 および 0.0122 mg/mL 溶液を調製した。
- (4) 本試験では、この溶液の一部を DW で段階希釈して 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.781, 0.391, 0.195, 0.0977, 0.0488, 0.0244, 0.0122 および 0.00610 mg/mL 溶液を調製した。

#### 6.6.1.2 保存時間

予備試験： 10 分

本試験 1： 30 分

本試験 2： 25 分

### 6.6.2 陽性対照物質溶液の調製

#### 6.6.2.1 調製

$\text{NaN}_3$  は DW (株式会社大塚製薬工場, ロット番号 K2K75) に、AF-2, 9-AA および 2-AA は DMSO (関東化学株式会社, ロット番号 503F1960) に溶解した。

#### 6.6.2.2 保存方法

分注凍結 (分注量：0.5 mL)

## 6.6.2.3 保存条件

超低温冷凍庫（日本フリーザー株式会社，CL-322，実測値：-78°C ~ -85°C）

## 6.6.2.4 使用

陽性対照物質溶液は事前に調製し，分注凍結保存したものを用時融解して使用した。

## 6.6.2.5 調製濃度および使用期限

名称および濃度 (μg/mL)	調製日	使用期限
AF-2 0.05, 0.1, 1 NaN <sub>3</sub> 5 9-AA 800 2-AA 5, 10, 20	2003年10月16日	2004年10月15日

## 6.6.2.6 陽性対照値の確認

凍結保存した陽性対照物質溶液について，プレーンキュベーション法（6.8.2項参照）で試験を実施し，陽性対照値が当該年度の適正範囲内であることを確認した。

## 6.7 被験物質および陽性対照物質用量

## 6.7.1 被験物質用量

## 6.7.1.1 予備試験

S9 mix 非存在下および存在下のすべての菌株について以下の用量で実施した。

用量： 1.22, 4.88, 19.5, 78.1, 313, 1250 および 5000 μg/プレート

## 6.7.1.2 本試験

予備試験の結果を基に，本試験は S9 mix 非存在下および存在下について以下の用量で実施した。本試験用量は明らかな菌の生育阻害を示す用量を最高用量とした。

試験菌株	用量 (μg/プレート)	
	S9 mix 非存在下	S9 mix 存在下
TA100, TA1535	2.44, 4.88, 9.77, 19.5, 39.1, 78.1	9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156, 313
WP2 <sub>uvrA</sub> /pKM101	2.44, 4.88, 9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156	39.1, 78.1, 156, 313, 625, 1250, 2500
TA98, TA1537	0.610, 1.22, 2.44, 4.88, 9.77, 19.5, 39.1	9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156, 313, 625

## 6.7.2 陽性対照物質用量

### 6.7.2.1 名称および用量

試験菌株	名称および用量 (μg/プレート)	
	S9 mix 非存在下	S9 mix 存在下
TA100	AF-2 0.01	2-AA 1
TA1535	NaN <sub>3</sub> 0.5	2-AA 2
TA98	AF-2 0.1	2-AA 0.5
TA1537	9-AA 80	2-AA 2
WP2uvrA/pKM101	AF-2 0.005	2-AA 2

### 6.7.2.2 陽性対照物質用量の選択理由

これらの用量はいずれも、それぞれの試験菌株に対して陽性を示すことが知られている。

## 6.8 復帰突然変異試験 [3]

### 6.8.1 試験法の選択

試験はプレインキュベーション法を用いて、S9 mix 非存在下および存在下で実施した。

### 6.8.2 プレインキュベーション法

- (1) 各用量につき、滅菌した試験管に被験物質溶液、陰性（溶媒）対照物質または陽性対照物質を 0.1 mL 添加した。
- (2) S9 mix 非存在下の場合、0.1 mol/L ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4) \*を 0.5 mL 加えて混和し、さらに菌懸濁液を 0.1 mL 加えた。
- (3) S9 mix 存在下の場合、S9 mix を 0.5 mL 加えて混和し、さらに菌懸濁液を 0.1 mL 加えた。
- (4) この混合液を 37°C で 20 分間緩やかに振盪してインキュベーションした（プレインキュベーション）。
- (5) プレインキュベーション後、この混合液に融解したトッパアガーを 2 mL 加え、最少グルコース寒天平板培地上に重層した。
- (6) 重層したトッパアガーが凝固した後、37°C で 48 時間培養した。
- (7) 培養終了後、コロニー計測までの間、プレートは 4°C で保冷した。

\*: リン酸水素二ナトリウム無水塩:和光純薬工業株式会社(ロット番号 TCP3820)  
リン酸二水素ナトリウム二水和物:和光純薬工業株式会社(ロット番号 CKM3817)

### 6.8.3 観察

48 時間培養後；

沈殿物： 目視

菌の生育阻害： 実体顕微鏡（Nikon, 型式 SMZ-10）

### 6.8.4 コロニー計測

プレート上の復帰変異コロニー数を自動コロニーカウンター（システムサイエンス株式会社, 型式 CA-11）で計測した。機器計測に際しては面積補正および数え落とし補正を行った。

### 6.8.5 プレート数

予備試験： 1 プレート/用量

本試験： 3 プレート/用量

### 6.8.6 結果の集計

陰性（溶媒）対照，陽性対照および被験物質の各処理について，計測したコロニー数の平均値および標準偏差を算出した。平均値および標準偏差は小数点以下を四捨五入して表示した。

### 6.8.7 無菌試験

被験物質溶液および S9 mix それぞれにつき 1 枚のプレートを使用し，試験毎に実施した。

- (1) 最高用量の被験物質溶液 0.1 mL または S9 mix 0.5 mL にトッパアガー 2 mL を加えて混和した。
- (2) それぞれ最少グルコース寒天平板培地上に重層した。
- (3) 重層したトッパアガーが凝固した後，37°C で 48 時間培養した。
- (4) 培養終了後，雑菌混入の確認までの間，プレートは約 4°C で保冷した。
- (5) 雑菌の混入について目視で確認した。

### 6.8.8 実験の成立基準

下記の条件をすべて満たしている場合に成立とした。

- (1) 陰性（溶媒）対照値（平均値）および陽性対照値（平均値）が試験施設における背景データの適正範囲内にあること。
- (2) 陽性対照値（平均値）が，対応する試験菌株の陰性（溶媒）対照値と比較して明らかに 2 倍を越えて増加していること。
- (3) 生育阻害の認められない用量が 4 用量以上あり，かつ評価可能な用量が 5 用量以上あること。
- (4) 無菌試験の結果，雑菌による汚染が無いこと。
- (5) 試験プレートが汚染あるいは他の不測の事態によって計測不能になり，失わ

れていないこと。

#### 6.8.9 試験結果の判定

いずれかの試験菌株で、S9 mixの有無にかかわらず、被験物質用量の増加にともなって復帰変異コロニー数(平均値)が陰性(溶媒)対照値の2倍以上に増加し、さらにその増加に再現性が認められる場合に、当該被験物質は変異原性を有する(陽性)と判定した。その他の場合は陰性と判定した。試験結果には統計学的検定を実施しなかった。

#### 6.8.10 再現性の確認

試験結果の再現性は2回の本試験で確認した。

### 7. 結果

#### 7.1 無菌試験

予備試験および本試験1,2のいずれにおいても、最高用量の被験物質溶液およびS9 mixには菌、カビの混入は認められなかった。

#### 7.2 沈殿物

予備試験および本試験1,2のいずれにおいても、S9 mixの有無にかかわらず、いずれの被験物質処理群においてもプレート上に沈殿物は認められなかった。

#### 7.3 菌の生育阻害

下記の被験物質処理群において菌の生育阻害が認められた。

予備試験：

S9 mix 非存在下： 78.1 µg/プレート以上 (TA100, TA1535 および WP2uvrA/pKM101)  
19.5 µg/プレート以上 (TA98 および TA1537)

S9 mix 存在下： 313 µg/プレート以上 (TA100, TA1535, TA98 および TA1537)  
1250 µg/プレート以上 (WP2uvrA/pKM101)

本試験：

S9 mix 非存在下： 39.1 µg/プレート以上 (TA100 および TA1535)  
78.1 µg/プレート以上 (WP2uvrA/pKM101)

19.5 µg/プレート以上 (TA98 および TA1537)

S9 mix 存在下： 313 µg/プレート (TA100 および TA1535)  
313 µg/プレート以上 (TA98 および TA1537)  
1250 µg/プレート以上 (WP2uvrA/pKM101)



#### 7.4 復帰変異コロニー数

本試験 1, 2 のいずれにおいても, S9 mix の有無にかかわらず, いずれの試験菌株においても被験物質処理群における復帰変異コロニー数は陰性 (溶媒) 対照値の 2 倍未満であった。

#### 8. 考察および結論

予備試験の結果に基づいて, 菌の生育阻害の認められる用量を最高用量として本試験を 2 回実施した結果, S9 mix の有無にかかわらず, いずれの試験菌株においても被験物質処理群における復帰変異コロニー数は陰性 (溶媒) 対照値の 2 倍未満であった。

本試験の陰性 (溶媒) 対照値および陽性対照値は, 当研究所の適正範囲内であった (添付資料 1)。また, 陽性対照により誘発された復帰変異コロニー数は, S9 mix 非存在下および存在下のいずれの試験菌株においても陰性 (溶媒) 対照値の 2 倍を超えて増加し, 明らかな陽性結果を示した。従って, 本試験の妥当性が確認された。

以上の結果から, *N, N*-ジメチル-*N*-ドデシルグリシンは本試験条件下において変異原性を有さないと結論した。

なお, 類似化合物の変異原性に関する情報を添付資料 2 にまとめた。

#### 9. 参考文献

- [1] Maron DM and Ames BN. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 1983; 113: 173-215.
- [2] Green MHL and Muriel WJ. Mutagen testing using *Trp*<sup>+</sup> reversion in *Escherichia coli*. *Mutat Res* 1976; 38: 3-32.
- [3] Chemical Substance Investigation Division of the Industrial Safety and Health Department of the Ministry of Labor of Japan, Japan Industrial Safety and Health Association, editors. *Mutagenicity Tests in Industrial Safety and Health Law*. 1991.

表1 試験結果表 (予備試験)

試験期間		2004年4月5日 より 2004年4月8日				
代謝活性化 系の有無	被験物質用量 ( $\mu\text{g}$ /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/pKM101	TA98	TA1537
S9 mix (-)	陰性対照	123	10	62	16	8
	1.22	113	8	67	24	9
	4.88	127	17	62	22	9
	19.5	108	11	74	13 *	9 *
	78.1	0 *	0 *	42 *	0 *	0 *
	313	0 *	0 *	27 *	0 *	0 *
	1250	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *
	5000	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *
S9 mix (+)	陰性対照	124	11	82	22	11
	1.22	119	11	89	20	15
	4.88	118	14	99	22	14
	19.5	117	13	83	26	17
	78.1	129	13	95	19	15
	313	48 *	8 *	84	25 *	10 *
	1250	0 *	0 *	64 *	0 *	0 *
	5000	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *
陽性対照 S9 mix (-)	名称	AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2	9-AA
	用量 ( $\mu\text{g}$ /プレート)	0.01	0.5	0.005	0.1	80
	(コロニー数/プレート)	616	437	587	651	257
陽性対照 S9 mix (+)	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	用量 ( $\mu\text{g}$ /プレート)	1	2	2	0.5	2
	(コロニー数/プレート)	1554	206	574	397	191

(備考) \*: 菌の生育阻害が認められた。  
陰性対照: 注射用水 (DW)

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド, NaN<sub>3</sub>: アジ化ナトリウム, 9-AA: 9-アミノアクリジン塩酸塩, 2-AA: 2-アミノアントラセン

表2 試験結果表 (本試験1)

試験期間		2004年4月12日 より 2004年4月15日					
代謝活性化系の有無	被験物質用量 (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/pKM101	TA98	TA1537	
S9 mix (-)	陰性対照	123 99 ( 112 ) 113 ( 12 )	13 9 ( 11 ) 10 ( 2 )	84 95 ( 89 ) 87 ( 6 )	19 18 ( 20 ) 23 ( 3 )	10 8 ( 9 ) 10 ( 1 )	
	0.610	/	/	/	18 21 ( 19 ) 19 ( 2 )	11 11 ( 11 ) 12 ( 1 )	
	1.22	/	/	/	17 17 ( 18 ) 20 ( 2 )	11 8 ( 10 ) 10 ( 2 )	
	2.44	135 114 ( 117 ) 101 ( 17 )	11 14 ( 13 ) 14 ( 2 )	91 94 ( 89 ) 82 ( 6 )	17 18 ( 17 ) 17 ( 1 )	9 11 ( 11 ) 13 ( 2 )	
	4.88	100 99 ( 101 ) 104 ( 3 )	10 10 ( 10 ) 11 ( 1 )	72 71 ( 79 ) 95 ( 14 )	18 18 ( 18 ) 18 ( 0 )	13 10 ( 12 ) 12 ( 2 )	
	9.77	98 117 ( 110 ) 114 ( 10 )	10 11 ( 10 ) 9 ( 1 )	97 86 ( 91 ) 90 ( 6 )	17 22 ( 18 ) 16 ( 3 )	9 10 ( 10 ) 10 ( 1 )	
	19.5	101 99 ( 103 ) 108 ( 5 )	13 10 ( 10 ) 8 ( 3 )	83 75 ( 78 ) 75 ( 5 )	14 * 14 * ( 14 ) 13 * ( 1 )	9 * 12 * ( 10 ) 8 * ( 2 )	
	39.1	85 * 69 * ( 75 ) 70 * ( 9 )	6 * 7 * ( 9 ) 14 * ( 4 )	71 92 ( 84 ) 88 ( 11 )	9 * 8 * ( 9 ) 11 * ( 2 )	0 * 0 * ( 0 ) 0 * ( 0 )	
	78.1	0 * 0 * ( 0 ) 0 * ( 0 )	0 * 0 * ( 0 ) 0 * ( 0 )	61 * 68 * ( 68 ) 76 * ( 8 )	/	/	
	156	/	/	71 * 58 * ( 68 ) 75 * ( 9 )	/	/	
	S9 mix (+)	陰性対照	126 108 ( 115 ) 111 ( 10 )	15 13 ( 14 ) 13 ( 1 )	104 94 ( 97 ) 93 ( 6 )	21 21 ( 23 ) 26 ( 3 )	23 16 ( 18 ) 16 ( 4 )
		9.77	118 119 ( 119 ) 120 ( 1 )	9 11 ( 11 ) 14 ( 3 )	/	24 22 ( 24 ) 26 ( 2 )	17 24 ( 19 ) 17 ( 4 )
19.5		100 104 ( 105 ) 111 ( 6 )	11 14 ( 12 ) 11 ( 2 )	/	24 22 ( 23 ) 24 ( 1 )	24 18 ( 20 ) 19 ( 3 )	
39.1		121 129 ( 120 ) 111 ( 9 )	10 14 ( 13 ) 14 ( 2 )	101 101 ( 102 ) 104 ( 2 )	23 24 ( 22 ) 20 ( 2 )	17 19 ( 18 ) 19 ( 1 )	
78.1		119 105 ( 115 ) 121 ( 9 )	10 16 ( 12 ) 11 ( 3 )	98 99 ( 100 ) 102 ( 2 )	21 25 ( 23 ) 23 ( 2 )	18 24 ( 20 ) 17 ( 4 )	
156		116 121 ( 113 ) 101 ( 10 )	10 14 ( 13 ) 14 ( 2 )	104 92 ( 99 ) 102 ( 6 )	25 26 ( 26 ) 26 ( 1 )	22 16 ( 19 ) 19 ( 3 )	
313		63 * 68 * ( 61 ) 51 * ( 9 )	7 * 6 * ( 7 ) 9 * ( 2 )	100 101 ( 98 ) 92 ( 5 )	21 * 23 * ( 21 ) 20 * ( 2 )	11 * 15 * ( 13 ) 13 * ( 2 )	
625		/	/	96 105 ( 98 ) 94 ( 6 )	0 * 0 * ( 0 ) 0 * ( 0 )	0 * 0 * ( 0 ) 0 * ( 0 )	
1250		/	/	81 * 86 * ( 79 ) 70 * ( 8 )	/	/	
2500		/	/	50 * 40 * ( 48 ) 55 * ( 8 )	/	/	
陽性対照 S9 mix (-)		名称	AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2	9-AA
		用量 (μg/プレート)	0.01	0.5	0.005	0.1	80
陽性対照 S9 mix (+)	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	
	用量 (μg/プレート)	1	2	2	0.5	2	
		1286 1147 ( 1192 ) 1143 ( 81 )	207 211 ( 220 ) 241 ( 19 )	944 941 ( 949 ) 961 ( 11 )	344 359 ( 366 ) 395 ( 26 )	216 209 ( 209 ) 202 ( 7 )	

(備考) \*: 菌の生育阻害が認められた. (平均値)  
陰性対照: 注射用水 (DW) (±標準偏差)

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド, NaN<sub>3</sub>: アジ化ナトリウム, 9-AA: 9-アミノアクリジン塩酸塩, 2-AA: 2-アミノアントラセン

表3 試験結果表 (本試験2)

試験期間		2004年4月19日 より 2004年4月22日							
代謝活性化系の有無	被験物質用量 (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	WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	TA98	TA1537			
S9 mix (-)	陰性対照	109 111 ( 106 ) 98 ( 7 )	10 7 ( 9 ) 10 ( 2 )	66 70 ( 67 ) 64 ( 3 )	18 18 ( 17 ) 16 ( 1 )	8 12 ( 9 ) 7 ( 3 )			
	0.610	/	/	/	16 18 ( 17 ) 17 ( 1 )	11 10 ( 10 ) 9 ( 1 )			
					18 17 ( 18 ) 18 ( 1 )	11 10 ( 10 ) 9 ( 1 )			
	1.22	/	/	/	17 17 ( 18 ) 18 ( 1 )	10 10 ( 10 ) 9 ( 1 )			
					104 107 ( 104 ) 100 ( 4 )	9 14 ( 11 ) 9 ( 3 )	65 63 ( 64 ) 63 ( 1 )	17 18 ( 17 ) 17 ( 1 )	10 11 ( 11 ) 11 ( 1 )
	2.44	/	/	/	117 101 ( 111 ) 114 ( 9 )	9 9 ( 9 ) 8 ( 1 )	73 65 ( 72 ) 77 ( 6 )	21 19 ( 20 ) 20 ( 1 )	8 11 ( 10 ) 11 ( 2 )
					105 118 ( 109 ) 103 ( 8 )	10 14 ( 13 ) 14 ( 2 )	66 68 ( 66 ) 64 ( 2 )	20 17 ( 18 ) 16 ( 2 )	10 8 ( 9 ) 9 ( 1 )
	4.88	/	/	/	105 110 ( 107 ) 105 ( 3 )	10 8 ( 9 ) 8 ( 1 )	63 76 ( 68 ) 65 ( 7 )	14 * 13 * ( 13 ) 11 * ( 2 )	7 * 9 * ( 8 ) 8 * ( 1 )
					73 * 78 * ( 77 ) 79 * ( 3 )	7 * 7 * ( 7 ) 6 * ( 1 )	74 71 ( 70 ) 64 ( 5 )	10 * 7 * ( 9 ) 11 * ( 2 )	0 * 0 * ( 0 ) 0 * ( 0 )
	78.1	/	/	/	0 * 0 * ( 0 ) 0 * ( 0 )	0 * 0 * ( 0 ) 0 * ( 0 )	48 * 58 * ( 52 ) 50 * ( 5 )	/	/
					156	/	/	49 * 52 * ( 49 ) 45 * ( 4 )	/
	S9 mix (+)	陰性対照	121 122 ( 118 ) 110 ( 7 )	13 10 ( 11 ) 9 ( 2 )	77 99 ( 88 ) 88 ( 11 )	24 20 ( 21 ) 20 ( 2 )	18 16 ( 16 ) 14 ( 2 )		
9.77		/	/	/	26 20 ( 22 ) 21 ( 3 )	16 15 ( 17 ) 19 ( 2 )			
					106 101 ( 104 ) 104 ( 3 )	14 11 ( 14 ) 16 ( 3 )	87 90 ( 83 ) 73 ( 9 )	24 19 ( 22 ) 24 ( 3 )	17 13 ( 15 ) 15 ( 2 )
19.5		/	/	/	126 108 ( 123 ) 135 ( 14 )	13 9 ( 11 ) 12 ( 2 )	94 92 ( 90 ) 85 ( 5 )	23 27 ( 25 ) 25 ( 2 )	15 14 ( 14 ) 13 ( 1 )
					130 124 ( 126 ) 123 ( 4 )	11 10 ( 10 ) 10 ( 1 )	94 92 ( 90 ) 85 ( 5 )	23 27 ( 25 ) 25 ( 2 )	15 14 ( 14 ) 13 ( 1 )
39.1		/	/	/	105 110 ( 108 ) 108 ( 3 )	15 11 ( 12 ) 10 ( 3 )	87 97 ( 89 ) 84 ( 7 )	25 23 ( 23 ) 20 ( 3 )	14 13 ( 14 ) 16 ( 2 )
					75 * 66 * ( 72 ) 74 * ( 5 )	6 * 8 * ( 6 ) 5 * ( 2 )	81 91 ( 82 ) 74 ( 9 )	17 * 15 * ( 17 ) 19 * ( 2 )	8 * 11 * ( 10 ) 10 * ( 2 )
625		/	/	/	95 86 ( 86 ) 77 ( 9 )	0 * 0 * ( 0 ) 0 * ( 0 )	0 * 0 * ( 0 ) 0 * ( 0 )	/	/
					1250	/	/	67 * 66 * ( 66 ) 66 * ( 1 )	/
2500		/	/	/	41 * 43 * ( 40 ) 36 * ( 4 )	/	/	/	/
					名称	AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2
陽性対照 S9 mix (-)		用量 (μg/プレート)	0.01	0.5	0.005	0.1	80		
	(コロニー数/プレート)	590 695 ( 666 ) 712 ( 66 )	422 465 ( 430 ) 403 ( 32 )	1059 1230 ( 1209 ) 1338 ( 141 )	588 639 ( 626 ) 650 ( 33 )	149 141 ( 150 ) 160 ( 10 )			
陽性対照 S9 mix (+)	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA			
	用量 (μg/プレート)	1	2	2	0.5	2			
	(コロニー数/プレート)	1042 1199 ( 1175 ) 1284 ( 123 )	199 200 ( 207 ) 222 ( 13 )	1065 1026 ( 1036 ) 1016 ( 26 )	430 393 ( 407 ) 397 ( 20 )	211 187 ( 201 ) 204 ( 12 )			

(備考) \*：菌の生育阻害が認められた。  
陰性対照：注射用水(DW)

(平均値)  
(±標準偏差)

AF-2: 2-(2-フルル)-3-(5-ニトロ-2-フルル)アクリルアミド, NaN<sub>3</sub>: アジ化ナトリウム, 9-AA: 9-アミノアクリジン塩酸塩, 2-AA: 2-アミノアントラセン

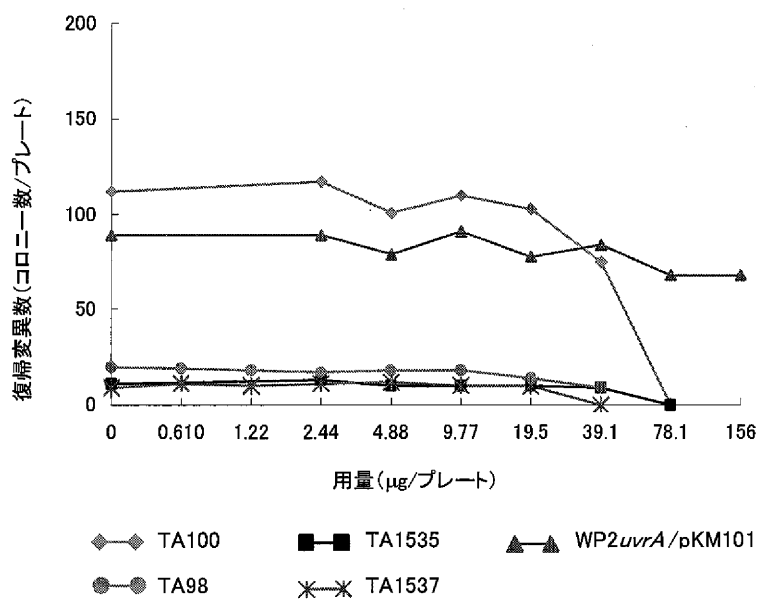


図 1-1 用量-反応曲線 (本試験 1; -S9 mix)

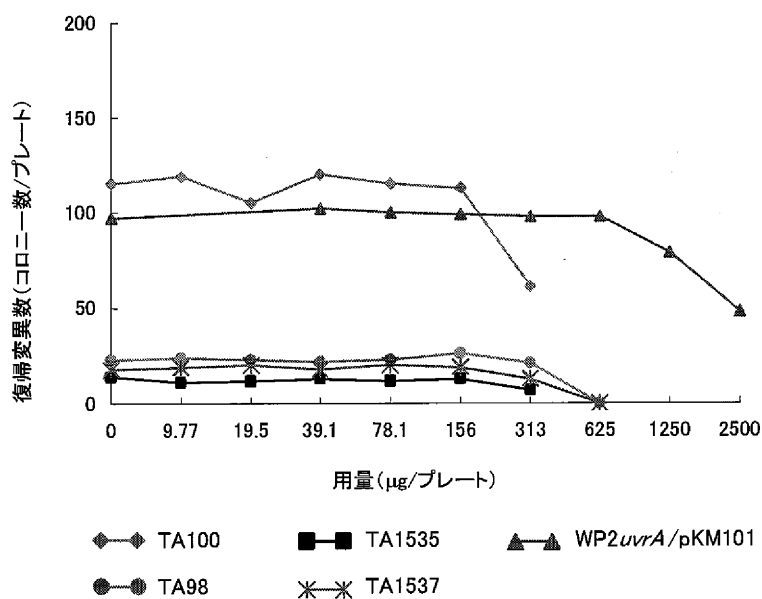


図 1-2 用量-反応曲線 (本試験 1; +S9 mix)

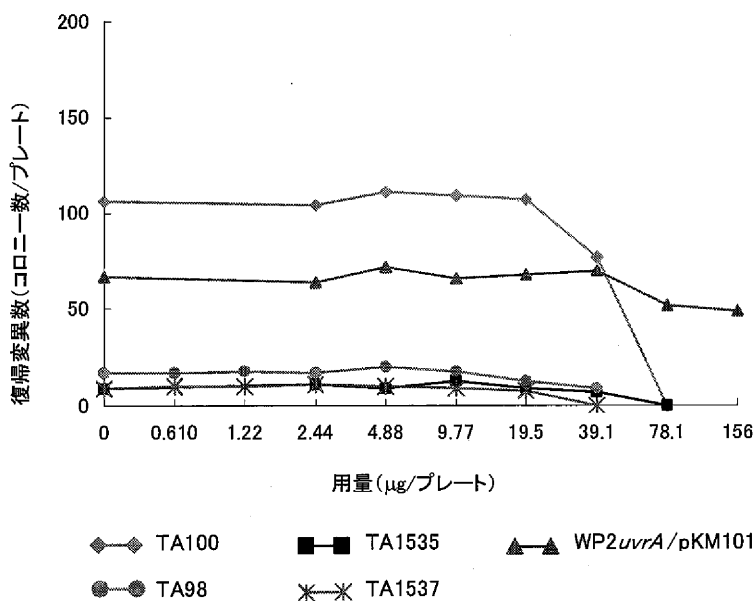


図 2-1 用量-反応曲線 (本試験 2; -S9 mix)

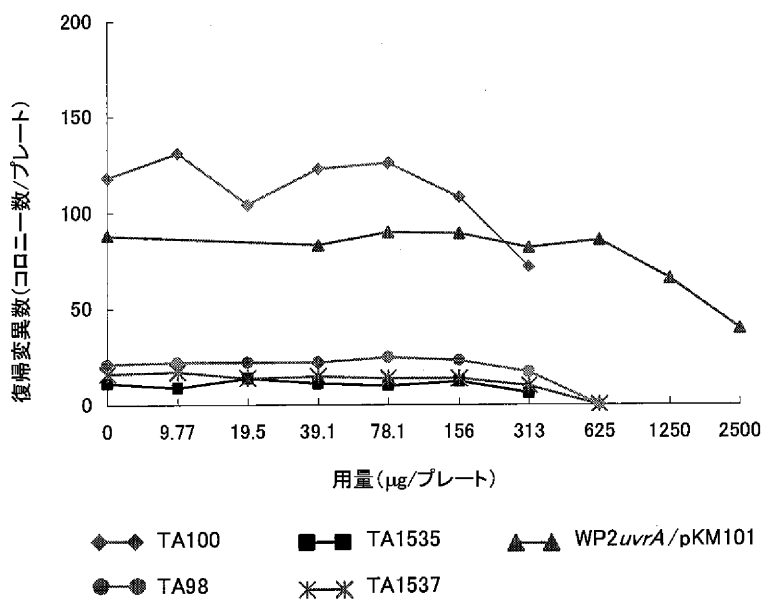


図 2-2 用量-反応曲線 (本試験 2; +S9 mix)