試験番号 M-12-017

最終報告書

N-[3-(N,N-ジメチルアミノ)プロパン-1-イル]ステアルアミド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

財団法人食品薬品[redacted]野研究所

〒257-8523 神[redacted]9-5

TEL[redacted]

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-12-017
被験物質	N-[3-(N,N-ジメチルアミノ)プロパン-1-イル]ステアルアミド
試験項目	細菌を用いる復帰突然変異試験
試験開始日	2012 年 11 月 6 日
実験開始日	2012 年 11 月 13 日
実験終了日	2012 年 12 月 13 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 [redacted]

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 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 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、環保企発第 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。

2013 年 03 月 15 日

試験責任者 [redacted]

試験従事者

試験責任者

試験担当者

検体調製

試験操作

被験物質管理

[redacted]

目次

要約 5
試験目的 5
試験ガイドラインと GLP 6
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 8
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 14
図 17
資料 21

(最終ページ:23 ページ)

信頼性保証書

要約

N-[3-(N,N-ジメチルアミノ)プロパン-1-イル]ステアルアミド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、以下の用量で生育阻害が認められた。

S9 mix 非存在下

TA100、TA1535、TA98 および TA1537:50.0 μg/plate 以上

WP2 *uvrA*:500 μg/plate 以上

S9 mix 存在下

すべての検定菌:500 μg/plate 以上

用量設定試験の結果に基づき、以下の用量を設定して 2 回の本試験(本試験 I および本試験 II)を行った。

S9 mix 非存在下

TA100、TA1535、TA98 および TA1537:1.95、3.91、7.81、15.6、31.3 および 62.5 μg/plate

WP2 *uvrA*:15.6、31.3、62.5、125、250 および 500 μg/plate

S9 mix 存在下

すべての検定菌:15.6、31.3、62.5、125、250 および 500 μg/plate

その結果、2 回の本試験ともに、以下の用量で生育阻害が認められた。

S9 mix 非存在下

TA100、TA1535、TA98 および TA1537:62.5 μg/plate

WP2 *uvrA*:500 μg/plate

S9 mix 存在下

すべての検定菌:500 μg/plate

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、N-[3-(N,N-ジメチルアミノ)プロパン-1-イル]ステアルアミドは、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

N-[3-(N,N-ジメチルアミノ)プロパン-1-イル]ステアルアミド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、環保企発第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N-[3-(N,N-ジメチルアミノ)プロパン-1-イル]ステアルアミド[別名:N-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]ステアラミド、ステアリン酸ジメチルアミノプロピルアミド、IUPAC 名:N-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]オクタデカンアミド、英名:N-[3-(Dimethylamino)propyl]stearamide、略称:N-DPS、CAS 番号:7651-02-7、分子式:$C_{23}H_{48}N_2O$、分子量:368.64、ロット番号:TLH9065、含量:98.6%、資料 1]は、白色の結晶性粉末である。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]から購入し、使用時まで室温(実測値:19.2～24.3℃)、密閉で保管した。

被験物質原体の安定性については、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:R-12-004)。

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)ｱｸﾘﾙｱﾐﾄﾞ	AF-2	STQ3987 (2010年8月6日)	[redacted]	99.7%
ｱｼﾞ化ﾅﾄﾘｳﾑ	SA	HLP7075 (2010年8月3日)	[redacted]	100.2%
9-ｱﾐﾉｱｸﾘｼﾞﾝ	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)	[redacted]	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:LAK5554、[redacted]に、SA は日局注射用水(製造番号:K1E86、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 物質名	調製濃度 (μg/mL)	添加量 (μL/plate)	用量 (μg/plate)	S9 mix 存在下 物質名	調製濃度 (μg/mL)	添加量 (μL/plate)	用量 (μg/plate)
Salmonella typhimurium								
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
Escherichia coli								
WP2 *uvrA*	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:DZAD9L01、2012 年 9 月 21 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、SSK セールス)	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	*S. typhimurium* 用	
	L-ヒスチジン	0.5 mmol/L
	D-ビオチン	0.5 mmol/L
③	*E. coli* 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-658、2012 年 11 月 1 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:205～237 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で水、DMSO およびアセトンのいずれにも溶解しないが、水中で均一性の良好な懸濁状態となった。したがって、媒体には日局注射用水を用いた。

試験に際しては、被験物質を乳鉢および乳棒を用いて磨砕したのち秤量し、日局注射用水(製造番号:C23VS1、光製薬)に懸濁して最高濃度(50.0 mg/mL あるいは 5.00 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 26 分以内(室温:26～27℃、用量設定試験)、31 分以内(室温:25℃、本試験 I)および 30 分以内(室温: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:0.01500、0.0500、0.150、0.500、1.50、5.00、15.0 および 50.0 mg/mL

本試験 I および II:0.0195、0.0391、0.0781、0.156、0.313、0.625、1.25、2.50 および 5.00 mg/mL

被験物質調製液(原液)の調製時に、目視により均一であることを確認した。

なお、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冷蔵、遮光下で保管した 1.00 mg/mL および 60.0 mg/mL の濃度の試験液については調製後 8 日間(試験番号:R-12-004)、0.100 mg/mL および 0.200 mg/mL の濃度の試験液については調製後 4 時間(試験番号:G-12-006)の安定性が確認されている。また、被験物質調製液(原液)の調製時に目視により、発熱、発泡などの変化がないことを確認した。

含量・均一性試験については、「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 µL(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 *uvrA*	TA98	TA1537
用量設定試験	OD_{660}	1.791	1.907	1.895	1.899	1.838
	生菌数 (×10^9 cells/mL)	2.02	2.77	3.89	2.57	1.33
本試験 I	OD_{660}	1.785	1.900	1.909	1.897	1.833
	生菌数 (×10^9 cells/mL)	1.91	2.82	3.60	2.55	1.32
本試験 II	OD_{660}	1.781	1.833	1.897	1.879	1.831
	生菌数 (×10^9 cells/mL)	2.06	2.63	3.35	2.55	1.78

各試験菌液の 660 nm の吸光度の測定値は、2011 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 μg/plate とし、1.50、5.00、15.0、50.0、150、500、1500 および 5000 μg/plate の 8 用量を設定した。

本試験 I および II においては、次頁の用量を設定した。

S9 mix 非存在下

TA100、TA1535、TA98 および TA1537:1.95、3.91、7.81、15.6、31.3 および 62.5 μg/plate

WP2 *uvrA*:15.6、31.3、62.5、125、250 および 500 μg/plate

S9 mix 存在下

すべての検定菌:15.6、31.3、62.5、125、250 および 500 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 のトップアガー(*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、用量設定試験および本試験 I において、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においては 2、本試験 I および II においては 1 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、用量設定試験においては 2、本試験 I および II においては 1 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±3×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、2011 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 3)。

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

N-[3-(N,N-ジメチルアミノ)プロパン-1-イル]ステアルアミドについて、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、以下の用量で生育阻害が認められた。

S9 mix 非存在下

TA100、TA1535、TA98 および TA1537:50.0 µg/plate 以上

WP2 *uvrA*:500 µg/plate 以上

S9 mix 存在下

すべての検定菌:500 µg/plate 以上

被験物質に由来する沈殿は、S9 mix 非存在下においては 50.0 µg/plate 以上の用量で、S9 mix 存在下においては 150 µg/plate 以上の用量で認められた。

以上の結果から、2 回の本試験(本試験 I および 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 62.5 µg/plate、WP2 *uvrA* では 500 µg/plate、S9 mix 存在下では用いたすべての検定菌で 500 µg/plate とした。

2. 本試験

以下の用量を設定して 2 回の本試験を行った(本試験 I:表 2、図 1および図 2、本試験 II:表 3、図 3および図 4)。

S9 mix 非存在下

TA100、TA1535、TA98 および TA1537:1.95、3.91、7.81、15.6、31.3 および 62.5 µg/plate

WP2 *uvrA*:15.6、31.3、62.5、125、250 および 500 µg/plate

S9 mix 存在下

すべての検定菌:15.6、31.3、62.5、125、250 および 500 µg/plate

その結果、2 回の本試験ともに、次頁の用量で生育阻害が認められた。

S9 mix 非存在下

TA100、TA1535、TA98 および TA1537:62.5 μg/plate

WP2 *uvrA*:500 μg/plate

S9 mix 存在下

すべての検定菌:500 μg/plate

被験物質に由来する沈殿は、S9 mix 非存在下および存在下ともに、62.5 μg/plate 以上の用量で認められた。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±3×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。

以上の結果から、N-[3-(N,N-ジメチルアミノ)プロパン-1-イル]ステアルアミドは、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。

N-[3-(N,N-ジメチルアミノ)プロパン-1-イル]ステアルアミドについては、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-12-006)で、陽性の結果が得られている。また、関連物質について、遺伝毒性に関する知見は得られなかった。

以上のことから、当該被験物質は、当該試験条件下においては遺伝子突然変異を誘発しないが、染色体異常を誘発する化合物であると考えられる。

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

表 1　N-[3-(N,N-ジメチルアミノ)プロパン-1-イル]ステアルアミド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 (μg/plate)	試験実施期間:2012年11月13日より2012年11月16日 復帰変異数 コロニー数/plate(平均) 塩基対置換型 TA100	TA1535	WP2 *uvrA*	フレームシフト型 TA98	TA1537
S9 mix (-)	0 (陰性対照)	80 83 (82)	12 17 (15)	25 21 (23)	13 24 (19)	8 10 (9)
	1.50	99	15	26	20	5
	5.00	95	6	28	24	5
	15.0	100	12	20	21	10
	50.0 †	102 *	10 *	26	21 *	8 *
	150 †	73 *	7 *	16	10 *	6 *
	500 †	0 *	0 *	21 *	0 *	0 *
	1500 †	0 *	0 *	19 *	0 *	0 *
	5000 †	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *
S9 mix (+)	0 (陰性対照)	125 100 (113)	11 8 (10)	26 25 (26)	26 22 (24)	19 12 (16)
	1.50	116	11	25	36	19
	5.00	93	9	34	23	24
	15.0	100	5	28	38	20
	50.0	113	12	20	38	18
	150 †	114	5	18	37	14
	500 †	40 *	3 *	26 *	12 *	5 *
	1500 †	0 *	0 *	12 *	0 *	0 *
	5000 †	0 *	0 *	5 *	0 *	0 *
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	395 363 (379)	552 522 (537)	83 84 (84)	344 436 (390)	213 259 (236)
陽性対照 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	1055 926 (991)	348 372 (360)	712 654 (683)	277 278 (278)	125 142 (134)

陰性対照、日局注射用水

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　N-[3-(N,N-ジメチルアミノ)プロパン-1-イル]ステアルアミド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:2012年12月3日より2012年12月6日 復帰変異数 コロニー数/plate(平均) 塩基対置換型 TA100	TA1535	WP2 *uvrA*	フレームシフト型 TA98	TA1537
S9 mix (-)	0 (陰性対照)	110 143 (127)	10 10 (10)	24 23 (24)	14 18 (16)	8 6 (7)
	1.95	133 131 (132)	11 15 (13)	NT	19 10 (15)	7 6 (7)
	3.91	150 118 (134)	7 13 (10)	NT	22 22 (22)	7 9 (8)
	7.81	141 122 (132)	12 16 (14)	NT	19 20 (20)	8 10 (9)
	15.6	119 145 (132)	13 9 (11)	26 24 (25)	18 20 (19)	6 4 (5)
	31.3	145 140 (143)	10 8 (9)	17 31 (24)	16 23 (20)	4 7 (6)
	62.5 †	149 * 140 * (145)	13 * 8 * (11)	25 21 (23)	17 * 20 * (19)	4 * 6 * (5)
	125 †	NT	NT	19 21 (20)	NT	NT
	250 †	NT	NT	25 23 (24)	NT	NT
	500 †	NT	NT	17 * 20 * (19)	NT	NT
S9 mix (+)	0 (陰性対照)	132 132 (132)	9 8 (9)	31 21 (26)	37 22 (30)	14 10 (12)
	15.6	154 135 (145)	11 7 (9)	29 30 (30)	33 20 (27)	15 13 (14)
	31.3	162 146 (154)	7 4 (6)	23 25 (24)	28 20 (24)	12 14 (13)
	62.5 †	134 119 (127)	6 10 (8)	20 24 (22)	19 22 (21)	11 17 (14)
	125 †	141 161 (151)	11 10 (11)	21 27 (24)	25 31 (28)	16 10 (13)
	250 †	175 140 (158)	14 10 (12)	23 27 (25)	25 29 (27)	7 17 (12)
	500 †	143 * 134 * (139)	10 * 16 * (13)	21 * 16 * (19)	21 * 22 * (22)	10 * 12 * (11)
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	443 422 (433)	574 553 (564)	86 101 (94)	483 482 (483)	326 249 (288)
陽性対照 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	1176 1043 (1110)	383 399 (391)	596 668 (632)	309 330 (320)	105 116 (111)

陰性対照, 日局注射用水

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　N-[3-(N,N-ジメチルアミノ)プロパン-1-イル]ステアルアミド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 (μg/plate)	試験実施期間:2012年12月10日より2012年12月13日 復帰変異数 コロニー数/plate(平均) 塩基対置換型 TA100	TA1535	WP2 *uvrA*	フレームシフト型 TA98	TA1537
S9 mix (-)	0 (陰性対照)	99 96 (98)	10 10 (10)	43 37 (40)	17 19 (18)	5 7 (6)
	1.95	102 94 (98)	12 12 (12)	NT	19 19 (19)	5 4 (5)
	3.91	95 96 (96)	11 7 (9)	NT	24 14 (19)	6 5 (6)
	7.81	106 110 (108)	10 12 (11)	NT	15 22 (19)	5 3 (4)
	15.6	115 109 (112)	13 10 (12)	39 34 (37)	20 22 (21)	5 4 (5)
	31.3	106 106 (106)	9 13 (11)	34 43 (39)	21 21 (21)	6 4 (5)
	62.5 †	115 * 94 * (105)	9 * 9 * (9)	42 36 (39)	20 * 12 * (16)	7 * 5 * (6)
	125 †	NT	NT	28 31 (30)	NT	NT
	250 †	NT	NT	28 36 (32)	NT	NT
	500 †	NT	NT	31 * 38 * (35)	NT	NT
S9 mix (+)	0 (陰性対照)	129 122 (126)	8 8 (8)	37 44 (41)	36 37 (37)	16 12 (14)
	15.6	128 119 (124)	12 12 (12)	44 37 (41)	34 35 (35)	11 14 (13)
	31.3	116 129 (123)	16 12 (14)	36 45 (41)	30 24 (27)	13 15 (14)
	62.5 †	146 121 (134)	12 10 (11)	34 34 (34)	40 29 (35)	12 11 (12)
	125 †	127 133 (130)	7 16 (12)	42 41 (42)	27 20 (24)	10 12 (11)
	250 †	155 118 (137)	12 8 (10)	44 40 (42)	30 28 (29)	11 6 (9)
	500 †	117 * 107 * (112)	7 * 16 * (12)	39 * 39 * (39)	21 * 20 * (21)	13 * 8 * (11)
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	380 422 (401)	558 571 (565)	108 96 (102)	434 472 (453)	211 260 (236)
陽性対照 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	1105 1009 (1057)	365 390 (378)	564 601 (583)	287 273 (280)	120 126 (123)

陰性対照, 日局注射用水

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。

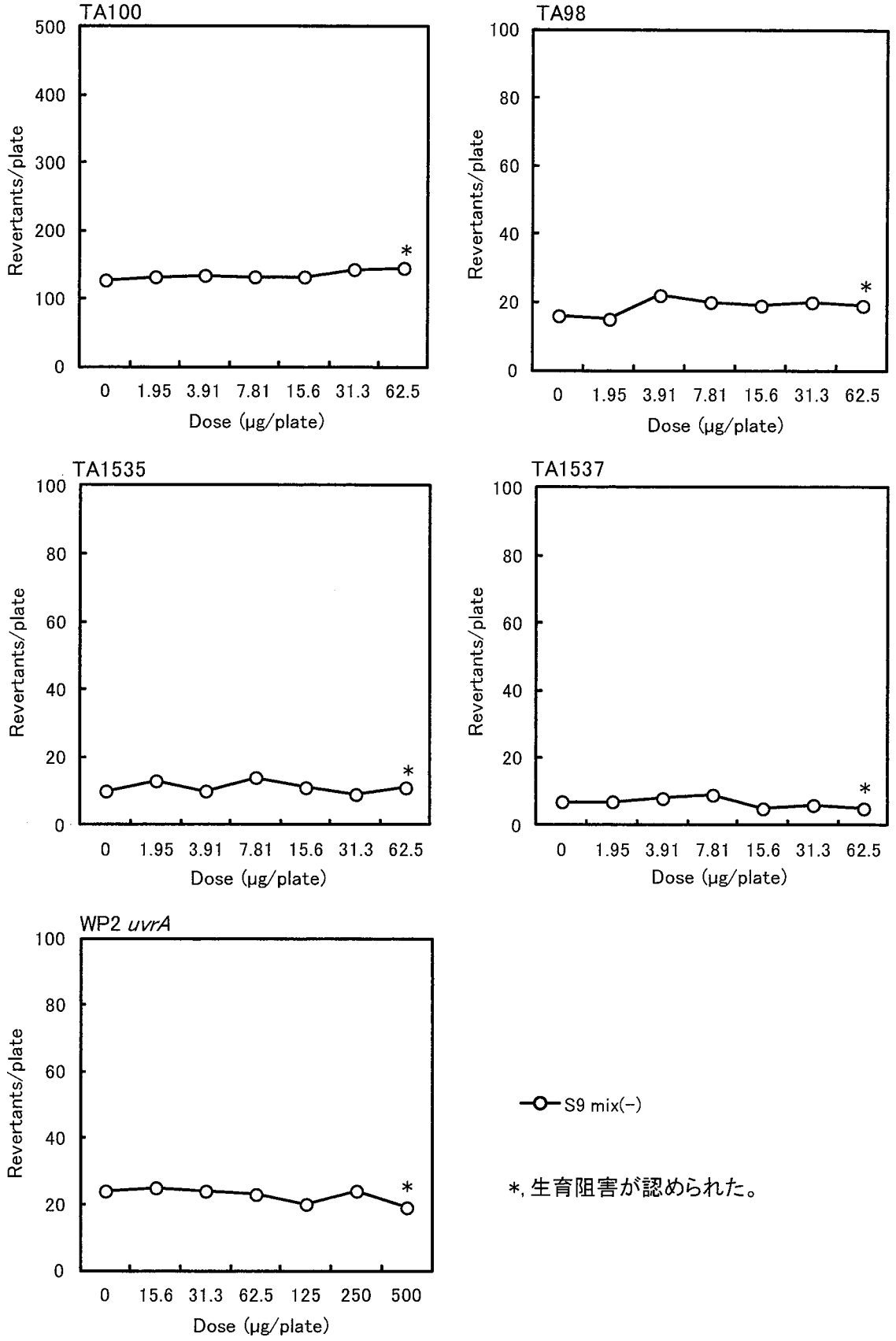


図 1　N-[3-(N,N-ジメチルアミノ)プロパン-1-イル]ステアルアミドの細菌を用いる復帰突然変異試験
（本試験 I、S9 mix 非存在下）

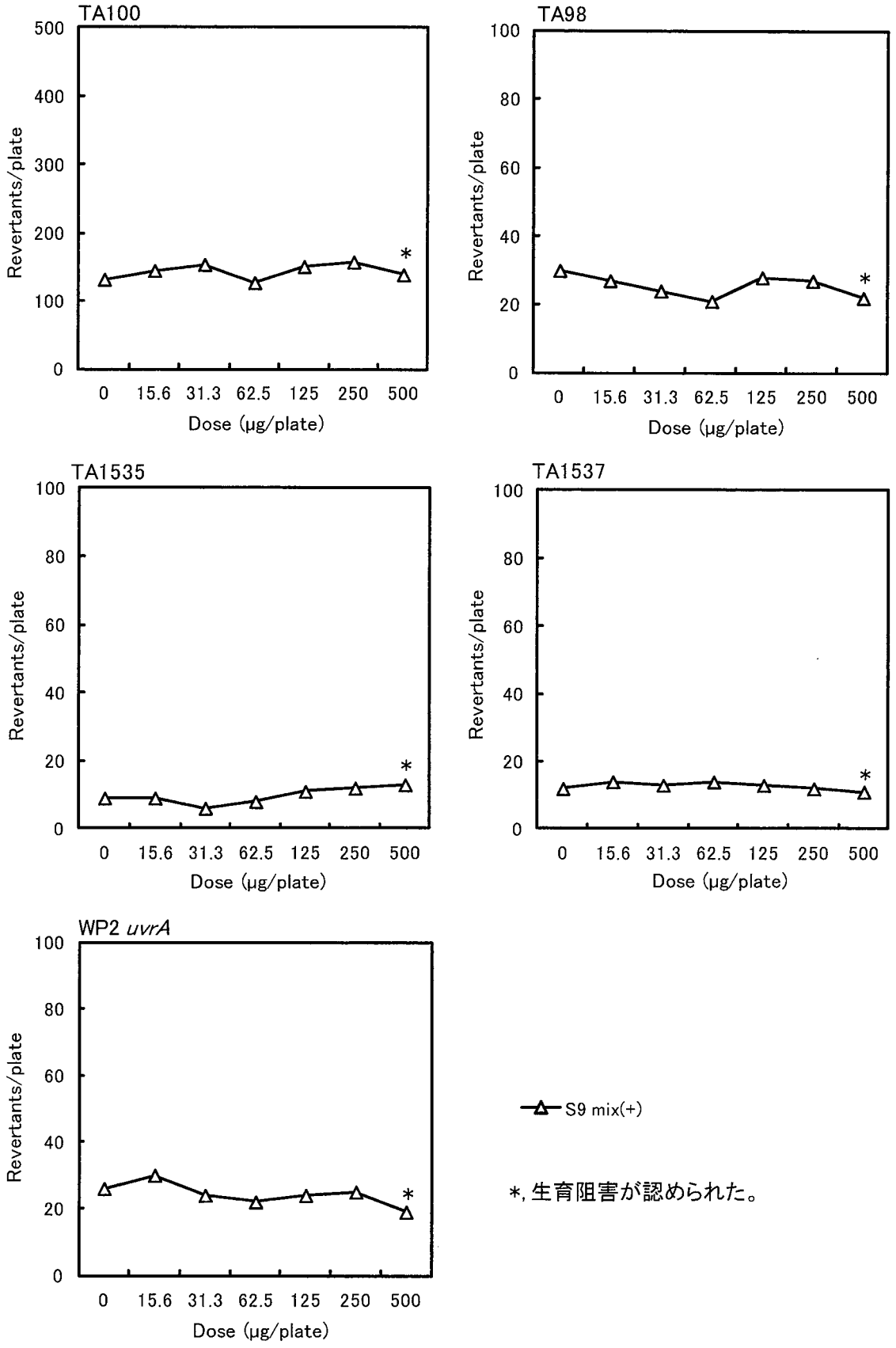


図 2　N-[3-(N,N-ジメチルアミノ)プロパン-1-イル]ステアルアミドの細菌を用いる復帰突然変異試験
(本試験 I、S9 mix 存在下)

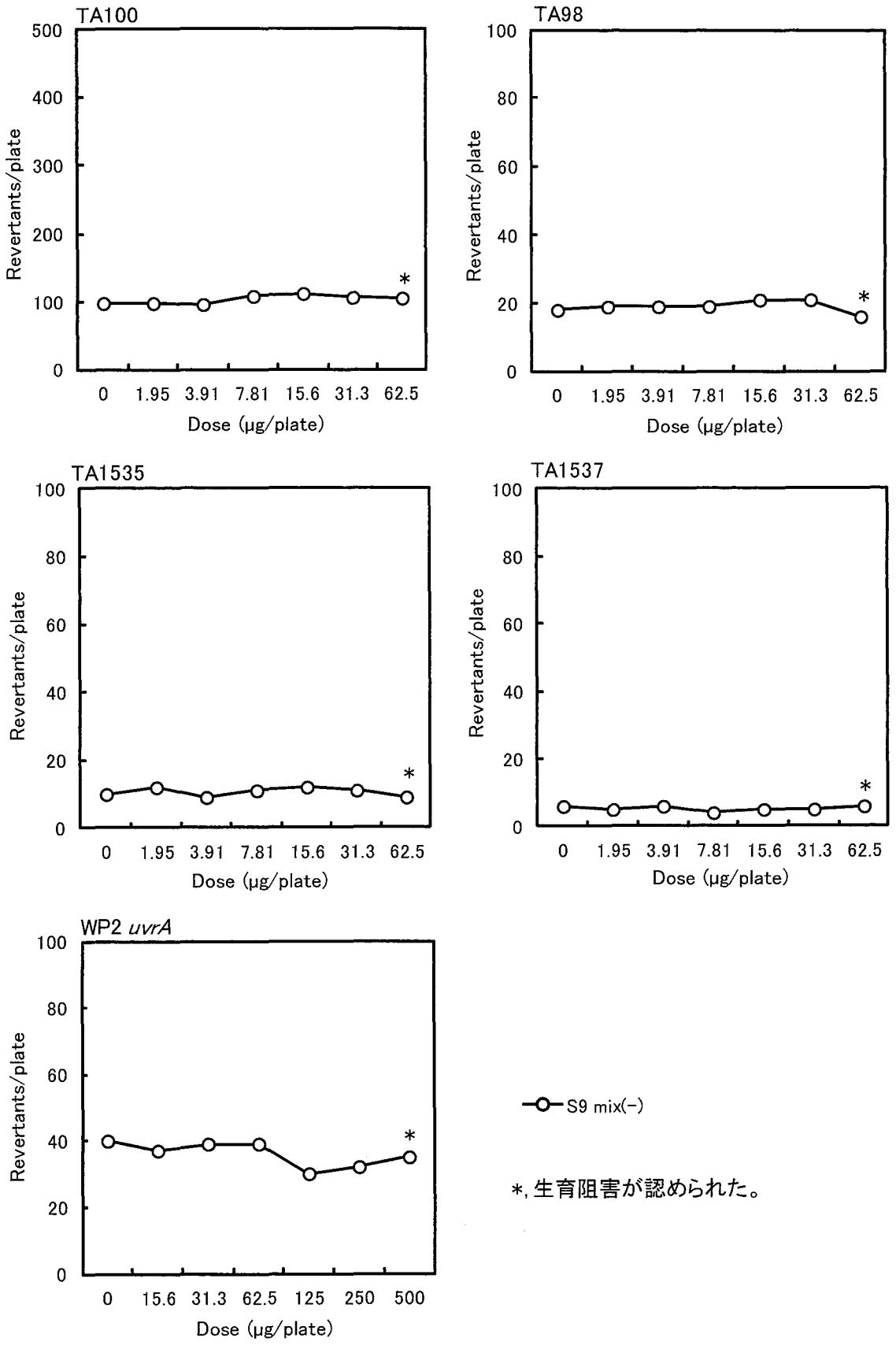


図 3　N-[3-(N,N-ジメチルアミノ)プロパン-1-イル]ステアルアミドの細菌を用いる復帰突然変異試験
（本試験 II、S9 mix 非存在下）

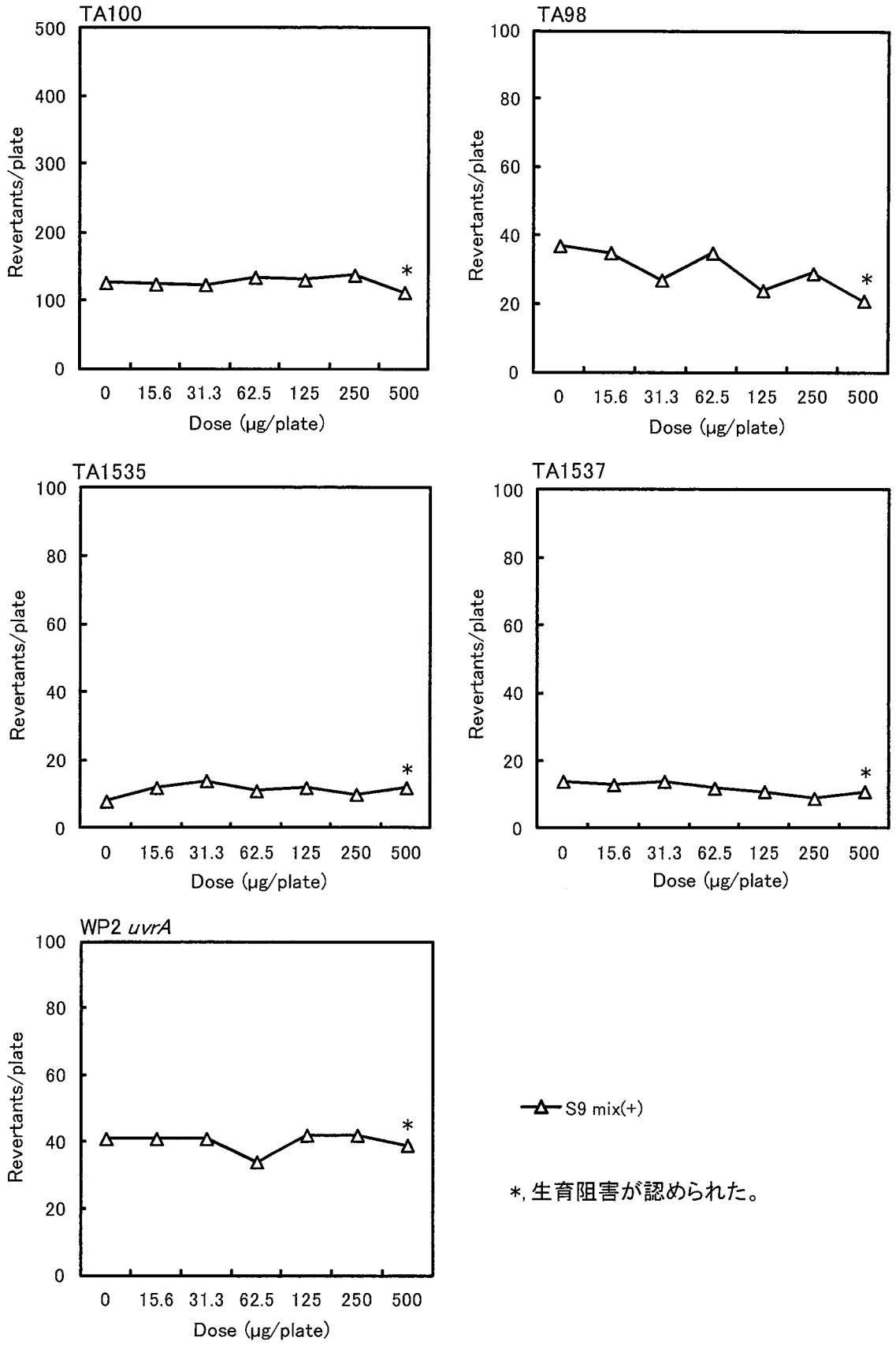


図 4　N-[3-(N,N-ジメチルアミノ)プロパン-1-イル]ステアルアミドの細菌を用いる復帰突然変異試験
(本試験 II、S9 mix 存在下)

資料 1

試験成績書

財団法人　食品薬品安全センター　御中

2012 年 9 月 24 日
和光純薬工業株式会社

品　名　N-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]ステアラミド

Code No.　287-15921
Lot No.　TLH9065
数　量　1kg

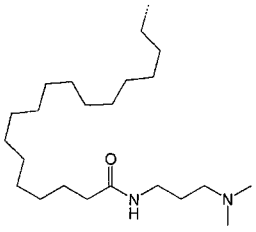
試験項目	測定値	品質目標
外観	白色の結晶性粉末	白色～うすい黄色、結晶性粉末～粉末
ジクロロメタン溶液	澄明	試験適合(ほとんど澄明以内)
水分	0.32%	実測値報告
含量(キャピラリーカラム GC)	98.6%	95.0%以上
定性(IR)	測定	試験適合
定性(^{1}H-NMR)	試験適合	試験適合
定性(LC/MS)	試験適合	試験適合
試験年月日	2012/09/24	

＊上記の通り御報告申し上げます。

試験責任者 [redacted]

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）	N-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]オクタデカンアミド
別名	N-[3-(N,N-ジメチルアミノ)プロパン-1-イル]ステアルアミド、 N-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]ステアラミド、 ステアリン酸ジメチルアミノプロピルアミド
CAS 番号	7651-02-7
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	368.64
試験に供した新規化学物質の純度（%）	98.6%
試験に供した新規化学物質のロット番号	TLH9065
不純物の名称及び含有率	水分 0.32%
蒸気圧	――――
対水溶解度	水に不溶
1-ｵｸﾀﾉｰﾙ／水分配係数	――――
融点	――――
沸点	――――
常温における性状	白色の結晶性粉末
安定性	――――

溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度 *	溶媒中の安定性 *
	水	50.0 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。調製後 8 日間(1.00 mg/mL および 60.0 mg/mL) および 4 時間 (0.100 mg/mL および 0.200 mg/mL) の冷蔵、遮光条件下における安定性を確認した（試験番号：R-12-004 、G-12-006)。
	DMSO	51.4 mg/mL で不溶	51.4 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。
	アセトン	377.2 mg/mL で不溶	377.2 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。

〔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

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)

(2011 年 4 月～2012 年 3 月)

	陰性対照値		陽性対照値	
	(- S9 mix)	(+ S9 mix)	(- S9 mix)	(+ S9 mix)
TA100	102 ± 12* (n=149)	101 ± 13 (n=156)	358 ± 39 (AF-2, 0.01 μg/plate) (n=145)	1016 ± 103 (B[a]P, 5 μg/plate) (n=85)
TA1535	11 ± 3 (n=143)	11 ± 3 (n=144)	551 ± 55 (SA, 0.5 μg/plate) (n=139)	399 ± 42 (2AA, 2 μg/plate) (n=140)
WP2 *uvrA*	28 ± 6 (n=141)	32 ± 6 (n=145)	99 ± 14 (AF-2, 0.01 μg/plate) (n=137)	630 ± 101 (2AA, 10 μg/plate) (n=141)
TA98	21 ± 4 (n=149)	30 ± 4 (n=155)	430 ± 61 (AF-2, 0.1 μg/plate) (n=145)	326 ± 38 (B[a]P, 5 μg/plate) (n=84)
TA1537	9 ± 2 (n=145)	17 ± 3 (n=150)	373 ± 95 (9AA, 80 μg/plate) (n=141)	149 ± 18 (B[a]P, 5 μg/plate) (n=85)

*: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　　N-[3-(N,N-ジメチルアミノ)プロパン-1-イル]ステアルアミドの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号　　M-12-017

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	2012年11月 6日	2012年11月 6日
試験計画書変更書 M-12-017-No.1	2012年11月22日	2012年11月22日
被験物質調製液の調製および検定菌処理	2012年12月 4日	2012年12月 4日
コロニー数の計測	2012年12月 6日	2012年12月 6日
報告書草案および生データ	2013年 2月21日	2013年 2月21日
最終報告書	2013年 3月15日	2013年 3月15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。

2013年3月15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 [redacted]