



最 終 報 告 書

2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸ナトリウム
の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号 : T-1887

試験期間 : 2015年11月26日-2016年2月2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 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. 目次

1.	目次	2
2.	試験実施概要	5
2.1	試験番号	5
2.2	試験表題	5
2.3	試験目的	5
2.4	試験委託者	5
2.5	試験受託者	5
2.6	試験実施施設	5
2.7	試験日程	5
2.8	試験責任者	5
2.9	試験担当者	5
2.10	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	6
2.11	資料の保存	6
2.12	試験責任者の署名又は記名・押印	6
3.	要約	7
4.	緒言	8
5.	被験物質及び被験液の調製	9
5.1	被験物質及び溶媒	9
5.1.1	被験物質	9
5.1.2	溶媒	10
5.1.3	溶媒の選択理由	10
5.2	被験液の調製方法	10
5.2.1	用量設定試験用被験液の調製	10
5.2.2	本試験用被験液の調製	10
6.	試験材料及び方法	11
6.1	試験菌株	11
6.1.1	菌株の種類	11
6.1.2	菌株の選択理由	11
6.1.3	菌株の保存及び解凍	11
6.1.4	菌株の特性検査	12
6.2	対照物質	12
6.2.1	陰性対照物質	12
6.2.2	陽性対照物質	12
6.2.3	調製方法	12
6.3	試薬	13

6.3.1	S9 Mix の調製方法.....	13
6.3.2	培地.....	14
6.3.3	ニュートリエントブロス No.2 培養液.....	14
6.3.4	0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4)	15
6.3.5	トップアガー	15
6.4	試験方法.....	16
6.4.1	前培養.....	16
6.4.2	プレート数.....	16
6.4.3	試験操作 (プレインキュベーション法)	17
6.5	判定基準.....	17
7.	試験結果.....	18
7.1	用量設定試験の観察結果及び本試験用量の設定.....	18
7.2	本試験の観察結果.....	18
7.3	試験の成立条件	18
8.	考察.....	19
9.	参考文献.....	20

Tables

別表 1	試験結果表 (用量設定試験)	21
別表 2	試験結果表 (本試験)	22

Figures

図 1	用量反応曲線 (本試験 TA100 : -S9Mix)	23
図 2	用量反応曲線 (本試験 TA100 : +S9Mix)	23
図 3	用量反応曲線 (本試験 TA1535 : -S9Mix)	24
図 4	用量反応曲線 (本試験 TA1535 : +S9Mix)	24
図 5	用量反応曲線 (本試験 WP2 <i>uvrA</i> : -S9Mix)	25
図 6	用量反応曲線 (本試験 WP2 <i>uvrA</i> : +S9Mix)	25
図 7	用量反応曲線 (本試験 TA98 : -S9Mix)	26
図 8	用量反応曲線 (本試験 TA98 : +S9Mix)	26
図 9	用量反応曲線 (本試験 TA1537 : -S9Mix)	27
図 10	用量反応曲線 (本試験 TA1537 : +S9Mix)	27

添付資料

Attached Data 1	CERTIFICATE OF ANALYSIS (Stability of Test Article).....	28
Attached Data 2	背景データ (151111)	30

T-1887

信賴性保証書 31

T-1887

2. 試験実施概要

2.1 試験番号

T-1887

2.2 試験表題

2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸ナトリウムの細菌を用いる復帰突然変異試験

2.3 試験目的

細菌を用い、2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸ナトリウム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。

2.4 試験委託者

厚生労働省 医薬・生活衛生局 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

2.5 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

2.6 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


2.7 試験日程

試験開始日	: 2015年11月26日
用量設定試験開始日	: 2015年12月1日
用量設定試験終了日	: 2015年12月4日
本試験開始日	: 2015年12月10日
本試験終了日	: 2015年12月14日
試験終了日	: 2016年2月2日

2.8 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 第1研究室

2.9 試験担当者

用量設定試験
使用菌株の前培養 : 

T-1887

被験液の調製 :
試験操作 :

コロニーの計数 :
本試験
使用菌株の前培養 :
被験液の調製 :
試験操作 :

コロニーの計数 :



2.10 予見することができなかつ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つたこと

本試験において予見することができなかつ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つたことはなかつた。

2.11 資料の保存

試験計画書、記録文書、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 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。

2.12 試験責任者の署名又は記名・押印

 2016 年 2 月 2 日 

株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所

3. 要約

2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸ナトリウムの遺伝子突然変異誘発能の有無を明らかにするため、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、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生育阻害が認められず、被験物質による沈殿も認められなかったため、本試験は代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株についても 5000 µg /plate を最高用量として、313~5000 µg/plate の範囲の 5 用量で実施した。

1) 被験物質による沈殿及び着色

本被験物質によるプレート上の沈殿及び着色の有無を観察した結果、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれ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、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても認められなかった。

3) 復帰変異コロニー数

用量設定試験及び本試験ともに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 2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸ナトリウムは、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。

4. 緒言

本試験は、厚生労働省 医薬・生活衛生局 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) 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 号厚生労働省医薬食品局長、平成 23・03・29 製局第 6 号経済産業省製造産業局長、環境企発第 110331010 号環境省総合環境政策局長通知）

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：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、環境企発第 110331009 号環境省総合環境政策局長通知）

T-1887

上記被験物質情報は、製造元発行の MSDS 及び試験成績書からの情報による。なお、溶解性及び溶媒中での安定性は、株式会社ボゾリサーチセンターで実施した溶解性試験の結果による。

5.1.2 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	:	K5F99
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

5.1.3 溶媒の選択理由

溶解性試験を実施した結果、本被験物質は水、DMSO とともに 50 mg/mL で溶解し、いずれも発熱、ガスの発生等の反応性も認められなかったため、菌株に対する毒性の少ない注射用水を溶媒として試験を実施した。

5.2 被験液の調製方法

5.2.1 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 214.2 mg から最高調製濃度の 50 mg/mL となるように溶媒量を計算し、4.284 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、これを以下公比 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。

5.2.2 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 253.2 mg から最高調製濃度の 50 mg/mL となるように溶媒量を計算し、5.064 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、これを以下公比 2 で順次 4 段階希釈し、50、25、12.5、6.25 及び 3.13 mg/mL の計 5 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. 試験材料及び方法

6.1 試験菌株 ^{1), 2), 3), 4), 5)}

6.1.1 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

なお、*S. typhimurium* TA株は国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部より1997年10月9日に株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所で入手したものから、2005年7月21日に東京研究所に分与された。また、*E. coli* WP2 *uvrA*は、独立行政法人製品評価技術基盤機構より2011年10月20日に入手した。

6.1.2 菌株の選択理由

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。

6.1.3 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(和光純薬工業株式会社、JIS規格試薬特級、ロット番号KPR3450)を0.7 mLの割合で添加した。これを滅菌セラムチューブに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(保存期間中の実測温度2015年10月1日~2015年12月10日:-86.7~-78.7°C)。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
<i>S. typhimurium</i> TA98	2015年10月1日
<i>S. typhimurium</i> TA100	2015年10月1日
<i>S. typhimurium</i> TA1535	2015年10月1日
<i>S. typhimurium</i> TA1537	2015年10月1日
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	2015年10月1日

6.1.4 菌株の特性検査

6.1.3 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、菌増殖率、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
<i>S. typhimurium</i> TA98	2015年10月1日~2015年10月5日
<i>S. typhimurium</i> TA100	2015年10月1日~2015年10月5日
<i>S. typhimurium</i> TA1535	2015年10月1日~2015年10月5日
<i>S. typhimurium</i> TA1537	2015年10月1日~2015年10月5日
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	2015年10月1日~2015年10月5日

6.2 対照物質^{6), 7)}

6.2.1 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。

6.2.2 陽性対照物質

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

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)	STQ3987	99.7%	室温、遮光	和光純薬工業株式会社
Sodium azide (SAZ)	YSF7467	99.9%	室温、遮光	和光純薬工業株式会社
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	和光純薬工業株式会社
Benzo[a]pyrene (B[a]P)	KPK3371	99.8%	冷蔵、遮光	和光純薬工業株式会社

保存場所 東京研究所 微生物試験室

6.2.3 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、JIS 規格 試薬特級、ロット番号 KPR3450) 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 K2L86) に溶解し、約 1 mL ずつ小分けして-20℃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

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

6.3 試薬^{5), 6)}

6.3.1 S9 Mix の調製方法

Cofactor-I の 1 バイアルに滅菌精製水を 9.0 mL 加え、完全に溶解した後ろ過 (NALGENE 0.45 µm : Lot No. 1152192) 滅菌し、Cofactor-I の 1 バイアルに対して 1.0 mL の S9 を加えて S9 Mix とした。調製後、使用時まで冷蔵下で保存し、使用後の残液は廃棄した。

1) S9

名称	: S9
製造元	: キッコーマンバイオケミファ株式会社
ロット番号	: RAA201511A
製造日	: 2015年11月6日
購入日	: 2015年11月27日
種・系統	: ラット・SD系
週齢・性	: 7週齢・雄
体重	: 191-255 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)
保存場所	: 東京研究所 被験物質調製室内超低温フリーザ (三洋電機バイオメディカ株式会社 : MDF-192)
保存期間中の実測温度	: 2015年11月27日~2015年12月11日 : -86.7~-78.9°C

2) 補酵素

名称	: Cofactor-I
----	--------------

T-1887

製造元 : オリエンタル酵母工業株式会社
ロット番号 : 999502
製造日 : 2015年8月24日
購入日 : 2015年11月13日、2015年11月19日
保存場所 : 東京研究所 微生物試験室内冷蔵庫 (冷凍・冷蔵庫
MPR-411FR : 三洋電機バイオメディカ株式会社)
保存期間中の実測温度 : 2015年11月13日~2015年12月11日 : 4.2~4.9°C

3) S9 Mix の組成 (1mL 中)

水 : 0.9 mL
S9 : 0.1 mL
MgCl₂ : 8 μmol/mL
KCl : 33 μmol/mL
グルコース-6-リン酸 : 5 μmol/mL
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/mL
還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH)
: 4 μmol/mL
リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.4)
: 100 μmol/mL

6.3.2 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-O 培地
製造元 : 極東製薬工業株式会社
ロット番号 : DZLGAK01
製造日 : 2015年10月20日
購入日 : 2015年11月10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 : OXOID AGAR No.1
製造元 : OXOID LTD.
ロット番号 : 1309432

6.3.3 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た。

T-1887

名称 : ニュートリエントブロス No.2 (Nutrient Broth No.2)
ロット番号 : 1239615
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

6.3.4 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 2L の精製水を加えて溶解し、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た。

名称 : りん酸緩衝剤粉末 (1/15 mol/L pH 7.4)
製造元 : 和光純薬工業株式会社
ロット番号 : SAM0022
保存方法 : 室温保存
保存場所 : 東京研究所 微生物試験室

6.3.5 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 : 4045079
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 : 和光純薬工業株式会社
ロット番号 : KPN0068
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 : 和光純薬工業株式会社
ロット番号 : SAL6212
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 : 和光純薬工業株式会社
 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 : 和光純薬工業株式会社
 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

6.4 試験方法^{6), 7)}

6.4.1 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 μ L、*E. coli* WP2 *uvrA* は 10 μ L 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

菌 株	菌 数(個/mL)	
	用量設定試験	本試験
<i>S. typhimurium</i> TA100	4.52×10^9	3.34×10^9
<i>S. typhimurium</i> TA1535	4.78×10^9	4.65×10^9
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	7.53×10^9	8.96×10^9
<i>S. typhimurium</i> TA98	6.06×10^9	5.68×10^9
<i>S. typhimurium</i> TA1537	3.69×10^9	3.60×10^9

6.4.2 プレート数

被験物質処理群、陰性対照群及び陽性対照群について、用量設定試験及び本試験ともに用量ごとに 2 枚のプレートを用いた。

6.4.3 試験操作（プレインキュベーション法）

- 1) 滅菌した小試験管に被験液、溶媒又は陽性対照溶液を 0.1 mL 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株の培養液 0.1 mL を加えた。
- 2) 攪拌後 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た。
- 3) プレインキュベーション終了後、あらかじめ電子レンジを用いて溶解し、ユニット恒温槽で 45°C に保温されたトッパガーを小試験管に 2.0 mL 加えて攪拌後、最小グルコース寒天平板培地に均一に重層した。
- 4) 無菌試験として、調製した最高用量の被験液 0.1 mL 及び調製した S9 Mix 0.5 mL をそれぞれ小試験管に取り、これにトッパガーを 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)~4) の一連の操作は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で実施した。
- 5) 最小グルコース寒天平板培地に重層したトッパ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 で用量設定試験では 49 時間、本試験では 48 時間培養した。
- 6) 培養後、プレート上の被験物質による沈殿及び着色の有無を確認した結果、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかったため、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）を用いて計数（面積補正、補正值：1.21）した。また、実体顕微鏡を用いて生育阻害の有無を観察した。

6.5 判定基準 6), 7), 8)

被験物質処理群の復帰変異コロニー数が自然復帰変異コロニー数（陰性対照値）に対して 2 倍以上となる増加を示し、用量反応性及び再現性が認められた場合あるいは明確な用量反応性を示さない場合であっても自然復帰変異コロニー数の 2 倍以上となる増加を示し、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、判定に際して統計学的手法は用いなかった。

7. 試験結果

用量設定試験の結果を別表 1、本試験の結果を別表 2 に示した。なお、図 1~10 は別表 2 より作成した。

7.1 用量設定試験の観察結果及び本試験用量の設定

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。

その結果、本被験物質によるプレート上の沈殿及び着色は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれ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本被験物質処理による菌に対する生育阻害を観察した結果、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認められなかった。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、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株についても 5000 µg/plate を最高用量として、以下公比 2 で 4 段階希釈した計 5 用量を設定した。

7.2 本試験の観察結果

本被験物質によるプレート上の沈殿及び着色は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれ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本被験物質処理による菌に対する生育阻害を観察した結果、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認められなかった。

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。

7.3 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 (Attached Data2 参照) 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。

8. 考察

用量設定試験及び本試験ともに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2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸ナトリウムは、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。

9. 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・微生物を用いる変異原性試験ガイドブック, 中央労働災害防止協会, 1986.
- 8) 石館基 (監修) : 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, 1991.

(別表1)

試験結果表(用量設定試験)

被験物質の名称: 2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸ナトリウム

No. T-1887

試験実施期間		2015年12月1日 より 2015年12月4日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	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	TA98	TA1537	
S9Mix (-)	陰性対照 (注射用水)	117 108 (113)	4 6 (5)	25 33 (29)	17 23 (20)	7 5 (6)	
	1.22	116 102 (109)	8 7 (8)	21 19 (20)	12 19 (16)	4 5 (5)	
	4.88	97 85 (91)	5 5 (5)	18 25 (22)	18 19 (19)	4 6 (5)	
	19.5	128 114 (121)	7 7 (7)	30 21 (26)	21 17 (19)	7 3 (5)	
	78.1	114 91 (103)	5 12 (9)	26 22 (24)	12 14 (13)	8 4 (6)	
	313	89 100 (95)	8 8 (8)	22 29 (26)	19 19 (19)	3 3 (3)	
	1250	107 105 (106)	5 4 (5)	21 19 (20)	16 13 (15)	5 3 (4)	
	5000	116 93 (105)	7 5 (6)	16 14 (15)	17 15 (16)	2 1 (2)	
	S9Mix (+)	陰性対照 (注射用水)	108 115 (112)	10 7 (9)	26 21 (24)	25 28 (27)	8 5 (7)
1.22		112 136 (124)	8 11 (10)	19 30 (25)	39 37 (38)	9 5 (7)	
4.88		132 143 (138)	4 8 (6)	25 22 (24)	39 30 (35)	10 4 (7)	
19.5		106 105 (106)	8 8 (8)	23 30 (27)	30 29 (30)	7 5 (6)	
78.1		112 103 (108)	4 5 (5)	24 32 (28)	24 27 (26)	6 5 (6)	
313		137 114 (126)	5 11 (8)	25 23 (24)	31 28 (30)	5 8 (7)	
1250		126 117 (122)	6 9 (8)	27 33 (30)	28 30 (29)	5 7 (6)	
5000		111 128 (120)	6 2 (4)	31 20 (26)	34 30 (32)	10 11 (11)	
陽性対照		S9Mixを必要としないもの	名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2
	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0	
	コロニー数/プレート	500 485 (493)	267 227 (247)	69 72 (71)	421 381 (401)	942 1040 (991)	
	S9Mixを必要とするもの	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0	
	コロニー数/プレート	1043 1076 (1060)	280 250 (265)	603 634 (619)	457 407 (432)	110 124 (117)	

(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
2AA : 2-アミノアントラセン
B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

()内は、2枚のプレートの平均値を示す。

T-1887

(別表2)

試験結果表(本試験)

被験物質の名称：2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸ナトリウム

No. T-1887

試験実施期間		2015年12月10日 より 2015年12月14日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	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	TA98	TA1537
S9Mix (-)	陰性対照 (注射用水)	75 70 (73)	8 7 (8)	25 23 (24)	18 17 (18)	7 5 (6)
	313	73 82 (78)	8 10 (9)	27 47 (37)	12 16 (14)	6 8 (7)
	625	65 94 (80)	10 6 (8)	27 46 (37)	15 24 (20)	5 7 (6)
	1250	69 77 (73)	9 4 (7)	30 30 (30)	14 13 (14)	4 7 (6)
	2500	72 80 (76)	10 7 (9)	37 30 (34)	13 11 (12)	7 6 (7)
	5000	69 74 (72)	11 13 (12)	35 25 (30)	16 27 (22)	4 4 (4)
	S9Mix (+)	陰性対照 (注射用水)	85 83 (84)	7 9 (8)	36 31 (34)	33 30 (32)
313		74 93 (84)	5 11 (8)	36 38 (37)	34 35 (35)	15 8 (12)
625		84 102 (93)	13 13 (13)	34 39 (37)	47 37 (42)	10 8 (9)
1250		87 91 (89)	9 11 (10)	33 30 (32)	34 30 (32)	8 8 (8)
2500		87 73 (80)	10 10 (10)	30 24 (27)	27 45 (36)	4 7 (6)
5000		90 91 (91)	15 7 (11)	39 33 (36)	42 48 (45)	13 6 (10)
陽性対照		名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2
	S9Mixを必要としないもの 用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	コロニー数/プレート	505 465 (485)	320 316 (318)	77 80 (79)	423 423 (423)	960 879 (920)
	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
	S9Mixを必要とするもの 用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
	コロニー数/プレート	654 780 (717)	306 211 (259)	563 577 (570)	390 486 (438)	117 93 (105)

(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
2AA : 2-アミノアントラセン
B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

()内は、2枚のプレートの平均値を示す。

図 1

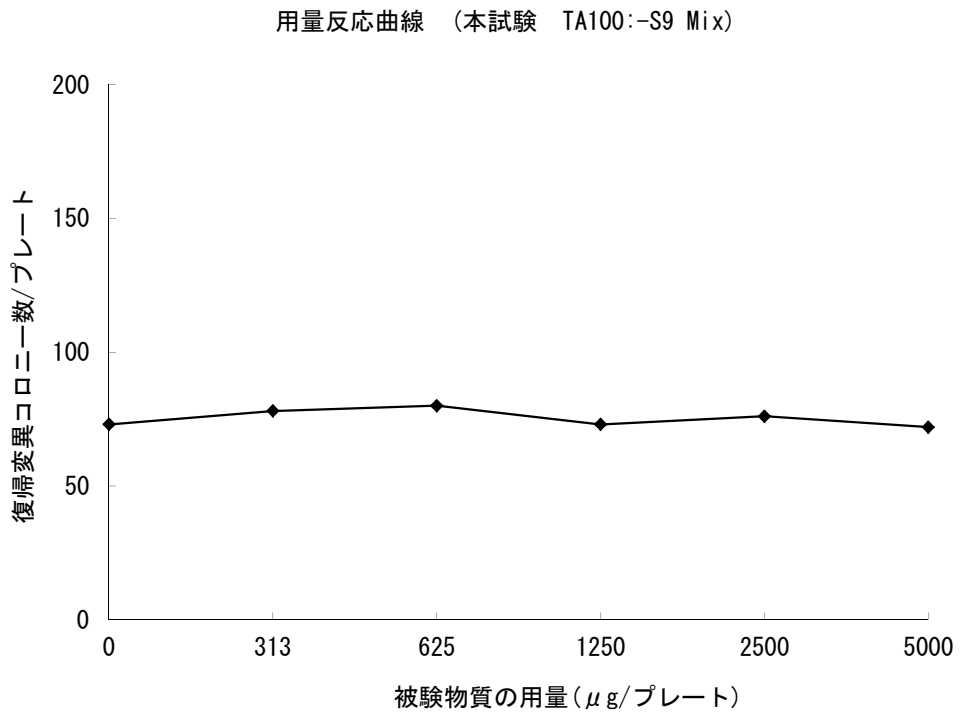


図 2

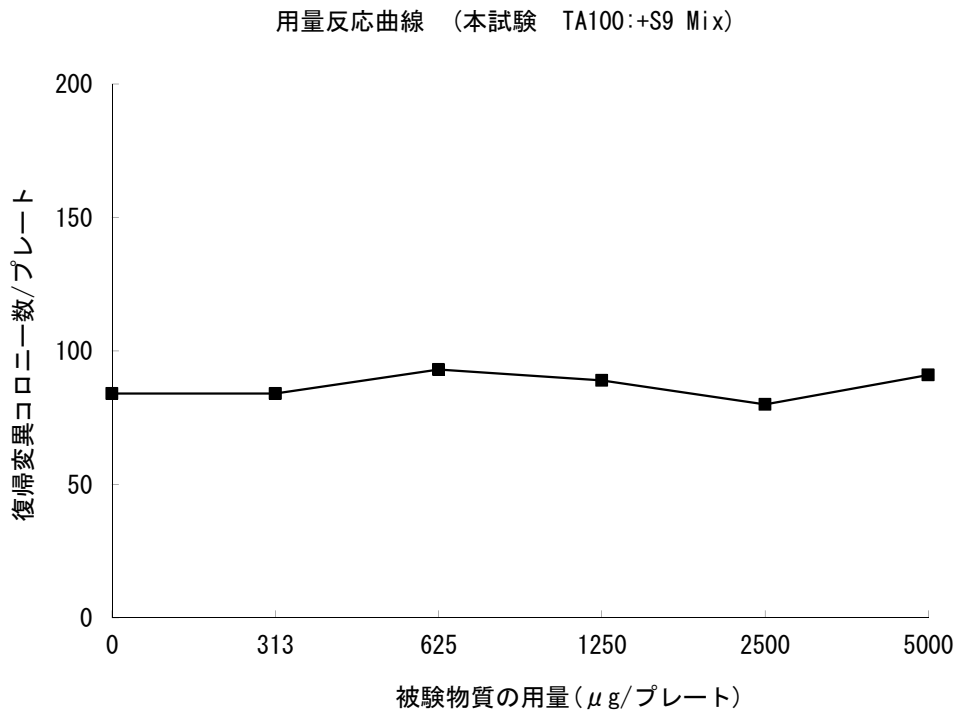


図 3

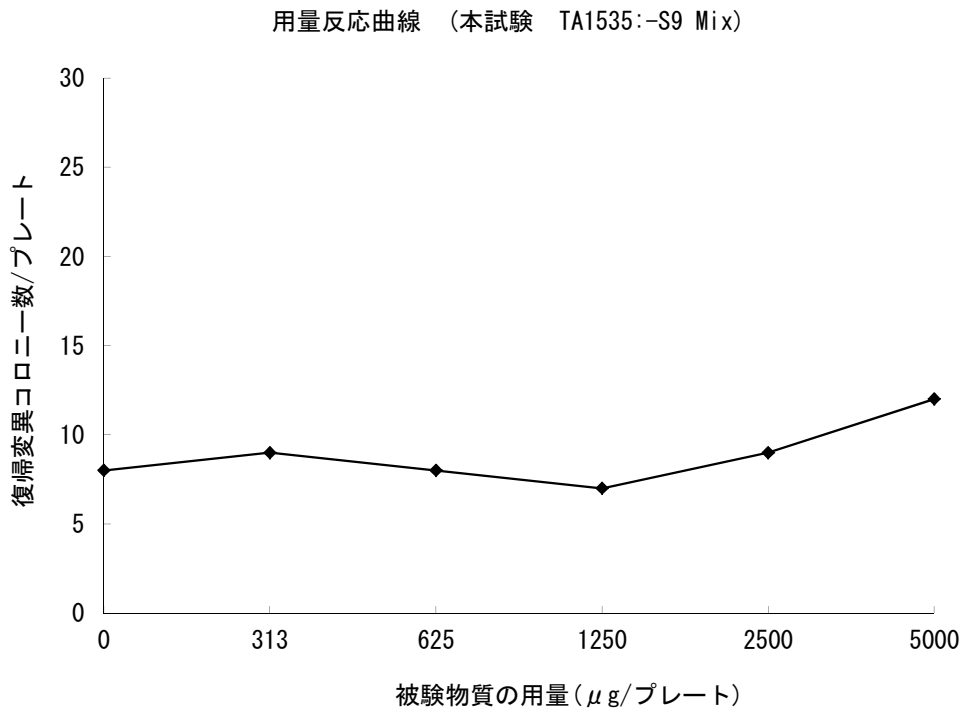


図 4

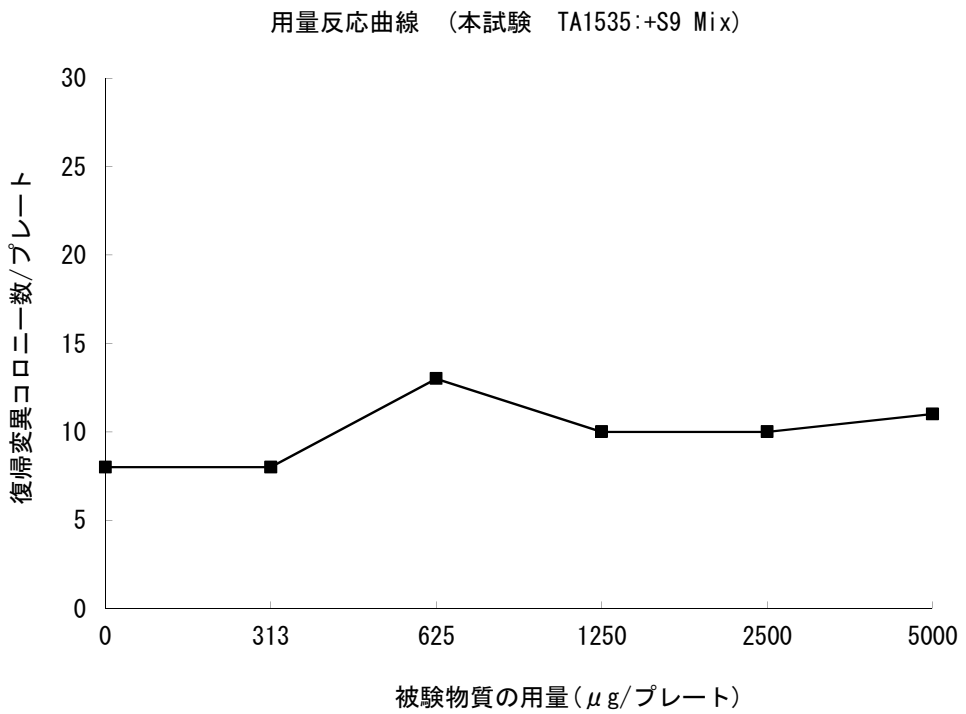


図 5

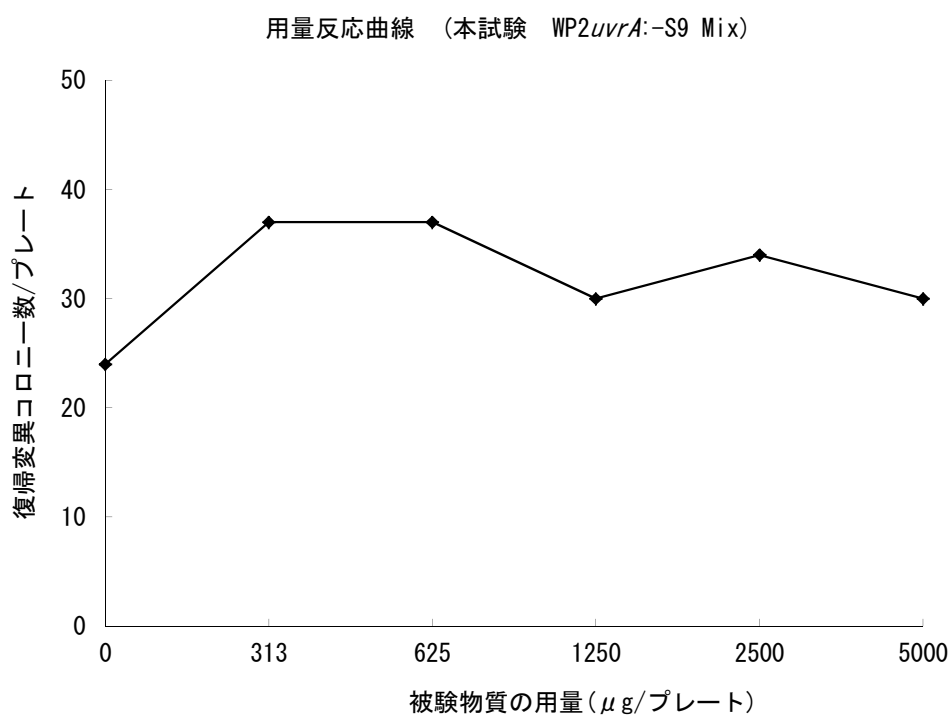


図 6

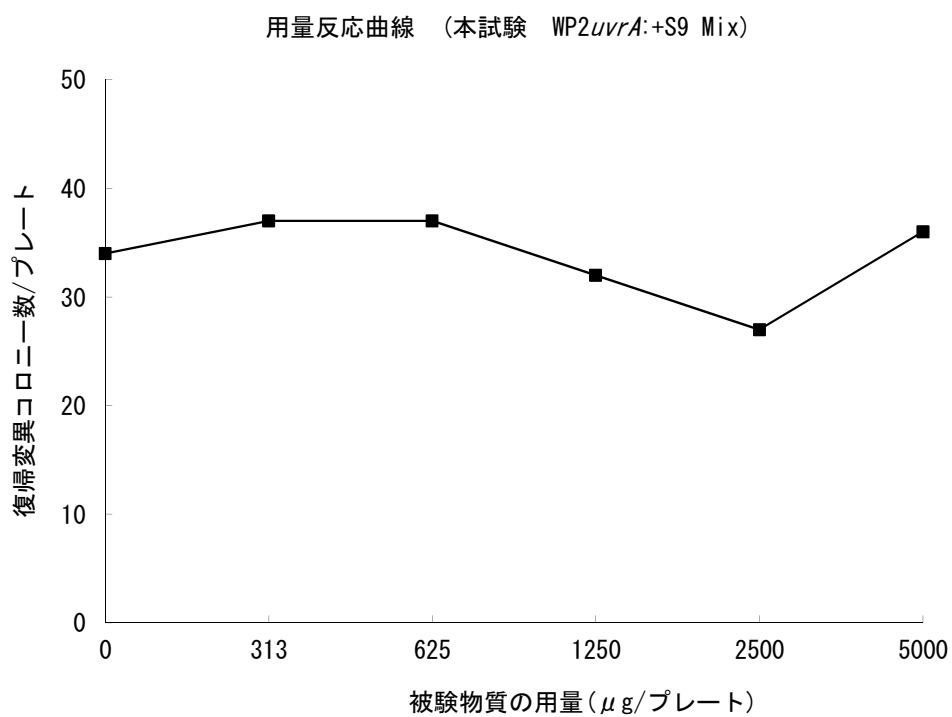


図 7

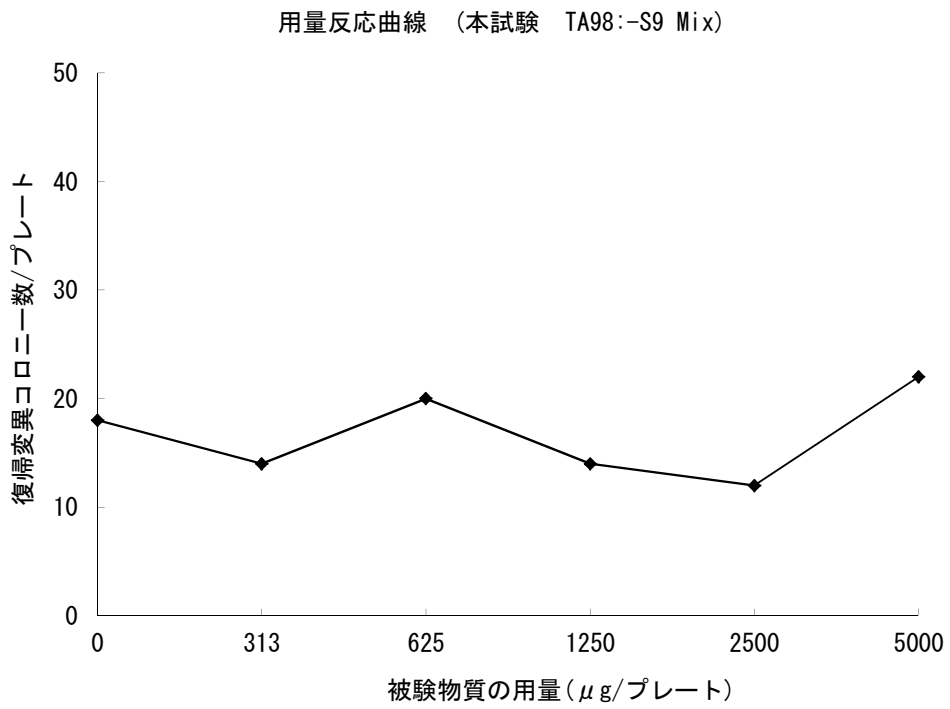


図 8

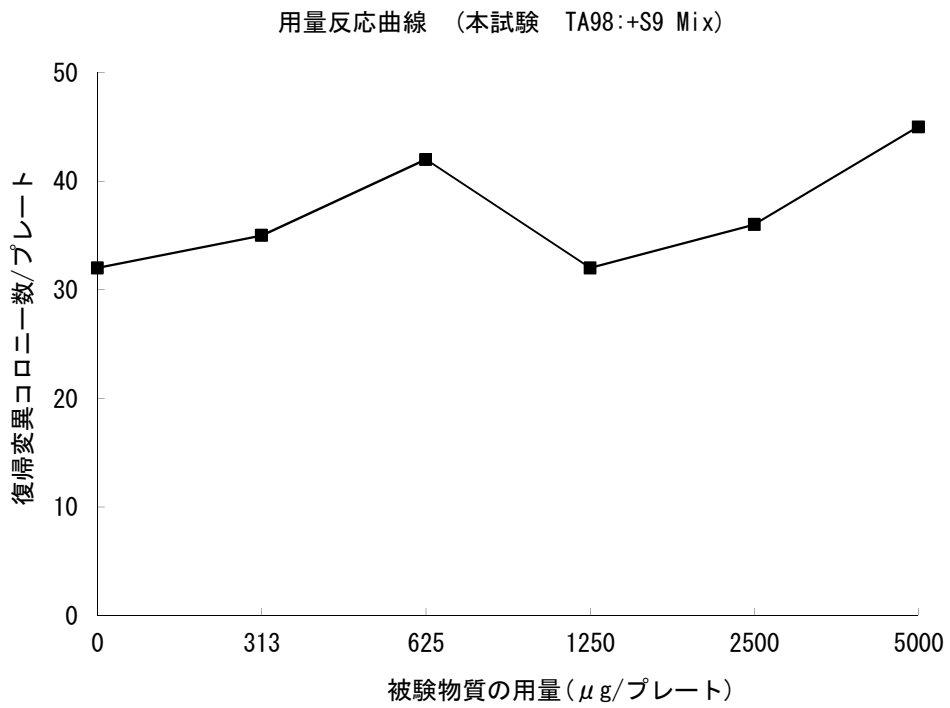


図 9

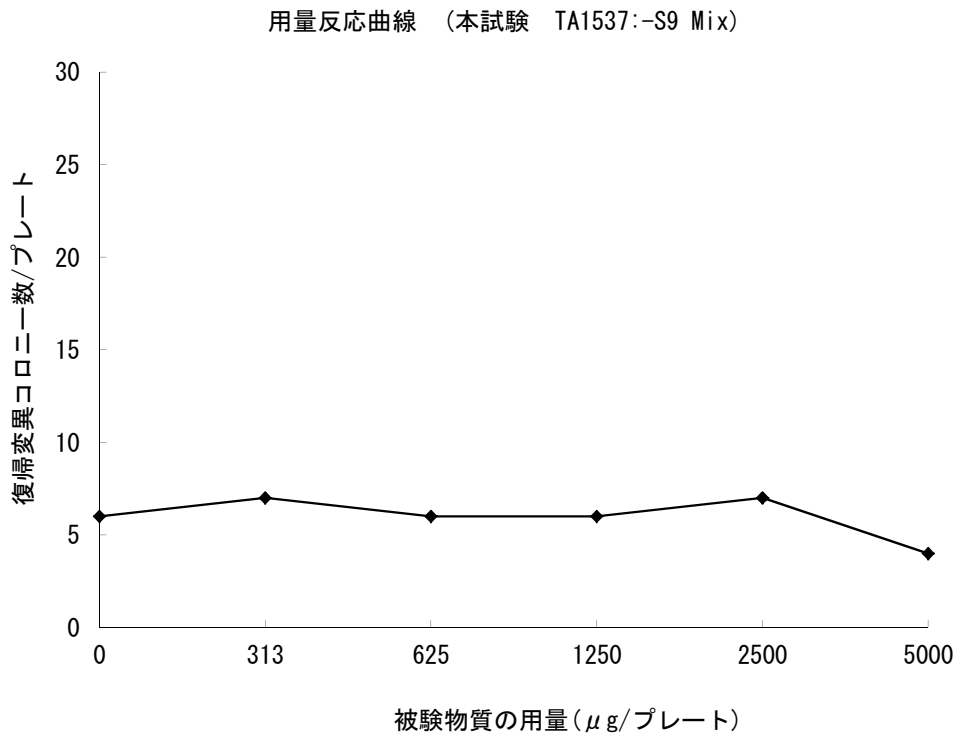
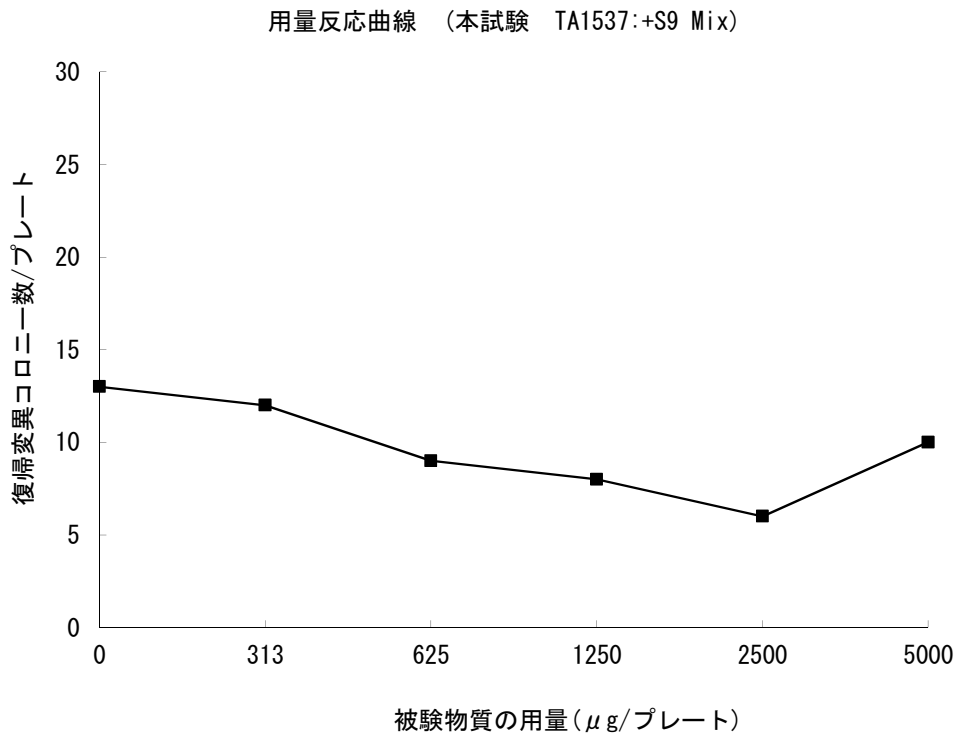


図 10



CERTIFICATE OF ANALYSIS
(Stability of Test Article)

Stage: After the end of experiment

Date of Analysis: December 18, 2015
October 19, 2015 (The spectrum of the characteristic test)

Test Article: 2, 4-Dimethylbenzenesulfonic acid sodium salt
(Lot number: U6BHB)

Test Item: Infrared absorption spectrum
[Attenuated total reflection method (ATR method)]

Acceptance Criteria: The spectrum of the stability test is compared to the spectrum of the characteristic test¹⁾: both spectra exhibit similar intensities of absorption at the same wave numbers.

1) [REDACTED] Characteristic study of 2,4-Dimethylbenzenesulfonic acid sodium salt (Study number: A-2784, Gotemba Laboratory, BoZo Research Center Inc.)

Results: The spectrum of the stability test was compared to the spectrum of the characteristic test: both spectra exhibited similar intensities of absorption at the same wave numbers.
The spectra are shown on the next page.

Judgment: Passed

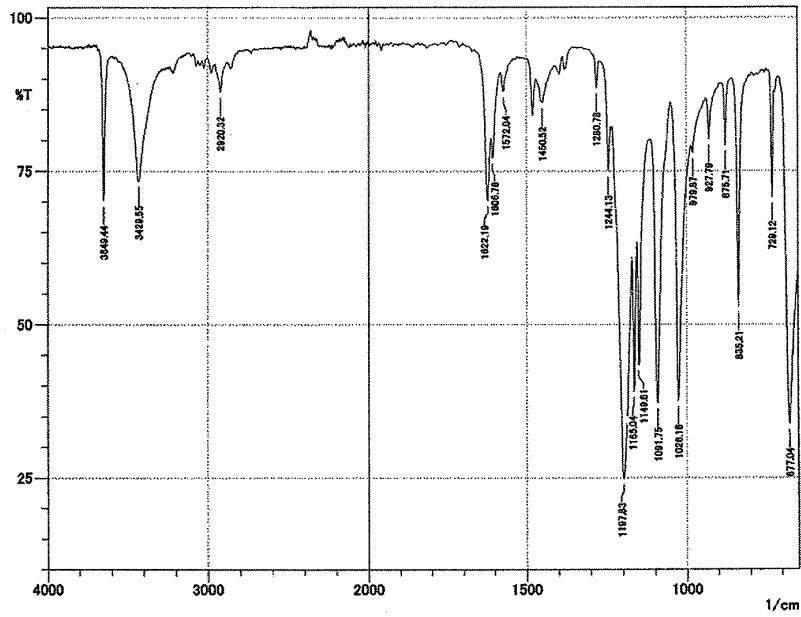
Regulation: "GLP Standards for Test Facilities on the Testing of New Chemical Articles", (Notification 0331 No.8 of Pharmaceutical and Food Safety Bureau, Ministry of Health, Labour and Welfare, Heisei 23-03-29 No.6 of Manufacturing Industries Bureau, Ministry of Economy, Trade and Industry, & No.110331010 of Environmental Policy Bureau, Ministry of the Environment, Japan, March 31, 2011)

[REDACTED]
Date: January 26, 2016

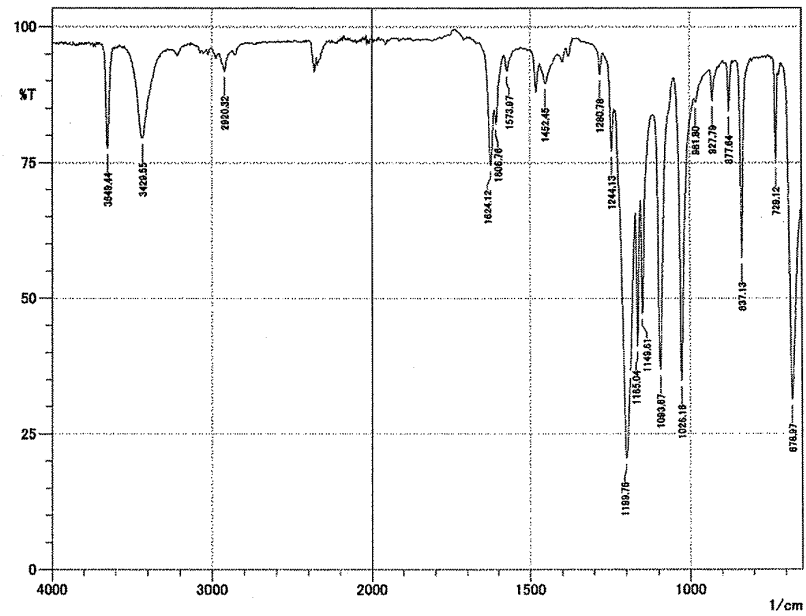
[REDACTED]
Person Responsible for Analysis
Gotemba Laboratory, BoZo Research Center Inc.

Results: Infrared absorption spectra

(Characteristic)



(Stability)



**Background Data of the reverse mutation tests in bacteria
at the Tokyo Laboratory of the BoZo Research Center Inc.**

CODE No. :151111

(Pre-incubation Method)

Tester Strains	S9 Mix (-) or (+)	Classification	Mean	S.D.	Management ranges		Number of plates
					Lower limit	Upper limit	
TA100	-	Solvent control	103	16.5	56	149	451
		Positive control AF-2(0.01µg/plate)	556	59.0	390	723	451
	+	Solvent control	130	17.0	83	176	451
		Positive control B[a]P(5.0µg/plate)	839	91	587	1090	451
TA1535	-	Solvent control	8	2.70	1	15	451
		Positive control SAZ(0.5µg/plate)	251	45.2	115	386	451
	+	Solvent control	10	2.96	1	18	451
		Positive control 2AA(2.0µg/plate)	222	29.3	142	302	451
WP2uvrA	-	Solvent control	19	5.37	8	31	451
		Positive control AF-2(0.01µg/plate)	63	8.9	44	82	451
	+	Solvent control	23	5.72	9	36	451
		Positive control 2AA(10.0µg/plate)	651	80	456	846	451
TA98	-	Solvent control	15	3.43	6	24	451
		Positive control AF-2(0.1µg/plate)	345	53.7	190	500	451
	+	Solvent control	29	5.98	11	46	451
		Positive control B[a]P(5.0µg/plate)	339	34.3	238	441	451
TA1537	-	Solvent control	7	2.38	1	13	451
		Positive control ICR-191(1.0µg/plate)	921	135	534	1307	451
	+	Solvent control	9	2.87	1	17	451
		Positive control B[a]P(5.0µg/plate)	87	13.0	50	123	451

(Notice)

Solvent controls Water, Dimethylsulfoxide(DMSO), Acetone, *N,N*-dimethylformamide (DMF) and 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-1887

信頼性保証書 (1/2)

試験番号 : T-1887

試験標題 : 2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸ナトリウム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を遵守し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 厚生労働省医薬食品局長、平成 23・03・29 製局第 6 号 経済産業省製造産業局長、環境企発第 110331010 号 環境省総合環境政策局長通知)

なお、調査は下記の通り実施致しました。

2016年2月2日
株式会社ボゾリサーチセンター
信頼性保証部門

試験における調査

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		2015年11月26日	2015年11月26日
調製・保存(被験物質)、 被験物質の処理		2015年12月11日	2015年12月14日
計数		2015年12月14日	2015年12月14日
被験物質の安定性測定		2015年12月18日	2015年12月18日
生データ		2015年12月28日	2015年12月28日
最終報告書草案・図・表		2015年12月28日	2015年12月28日
生データ(安定性測定)		2016年1月15日	2016年1月15日
最終報告書		2016年2月2日	2016年2月2日

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		2015年10月1日	
		2015年10月5日	
		2015年10月8日	2015年10月8日
改善確認		2015年10月8日	2015年10月13日
陽性対照物質の管理		2015年9月29日	2015年10月1日
		2015年10月20日	2015年10月22日
		2015年10月21日	2015年10月22日
		2015年11月13日	2015年11月16日

T-1887

試験責任者陳述書

試験番号 : T-1887

試験標題 : 2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸ナトリウムの細菌を用いる復帰突然変異試験

当該試験は、「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号厚生労働省医薬食品局長、平成23・03・29製局第6号経済産業省製造産業局長、環境企発第110331010号環境省総合環境政策局長通知）を満たす試験施設において、「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：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、環境企発第110331009号環境省総合環境政策局長通知）に準拠して実施されたものに相違ありません。

2016年 2月 2日
株式会社ボゾリサーチセンター

試験責任者

