



最 終 報 告 書

セルロースの 2-ヒドロキシエチル及びメチルエーテルの
細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：T-2265

試験期間：2017 年 1 月 13 日-2017 年 3 月 28 日

試験施設

株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所
〒156-0042 東京都世田谷区羽根木 1-3-11

試験委託者

厚生労働省 医薬・生活衛生局
医薬品審査管理課 化学物質安全対策室
〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1-2-2

株式会社ボゾリサーチセンター
〒151-0065 東京都渋谷区大山町 36-7

T-2265

1. GLP 陳述書

試験番号 : T-2265

試験表題 : セルロースの2-ヒドロキシエチル及びメチルエーテルの
細菌を用いる復帰突然変異試験

本試験は以下の GLP 基準を遵守して実施したものです。

- 「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」
(平成 23 年 3 月 31 日、薬食発 0331 第 8 号、平成 23・03・29 製局第 6 号、環
保企発第 110331010 号)

試験責任者

株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所 研究部

2. 目次

1.	GLP 陳述書	2
2.	目次	3
3.	試験実施概要	6
3.1	試験番号	6
3.2	試験表題	6
3.3	試験目的	6
3.4	試験委託者	6
3.5	試験受託者	6
3.6	試験実施施設	6
3.7	試験日程	6
3.8	試験責任者	7
3.9	試験担当者	7
3.10	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	7
3.11	試資料の保存	7
3.12	試験責任者の署名又は記名・押印	7
4.	要約	8
5.	緒言	9
6.	被験物質及び被験液の調製	10
6.1	被験物質及び溶媒	10
6.1.1	被験物質	10
6.1.2	溶媒	11
6.1.3	溶媒の選択理由	11
6.2	被験液の調製方法	11
6.2.1	用量設定試験用被験液の調製	11
6.2.2	本試験用被験液の調製	11
7.	試験材料及び方法	12
7.1	試験菌株	12
7.1.1	菌株の種類	12
7.1.2	菌株の選択理由	12
7.1.3	菌株の保存及び解凍	12
7.1.4	菌株の特性検査	13
7.2	対照物質	13
7.2.1	陰性対照物質	13
7.2.2	陽性対照物質	13
7.2.3	調製方法	13

7.3	試薬	14
7.3.1	S9 Mix の調製方法.....	14
7.3.2	培地	15
7.3.3	ニュートリエントブロス No.2 培養液	16
7.3.4	0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4)	16
7.3.5	トップアガー.....	16
7.4	試験方法.....	17
7.4.1	前培養.....	17
7.4.2	プレート数.....	18
7.4.3	試験操作 (プレーンキュベーション法)	18
7.5	判定基準.....	18
8.	試験結果	19
8.1	用量設定試験の観察結果及び本試験用量の設定.....	19
8.2	本試験の観察結果	19
8.3	試験の成立条件.....	19
9.	考察.....	20
10.	参考文献	21

Tables

別表 1	試験結果表 (用量設定試験)	22
別表 2	試験結果表 (本試験)	23
別表 3	比活性値表 (用量設定試験)	24
別表 4	比活性値表 (本試験)	25

Figures

図 1	用量反応曲線 (本試験 TA100 : -S9Mix)	26
図 2	用量反応曲線 (本試験 TA100 : +S9Mix)	26
図 3	用量反応曲線 (本試験 TA1535 : -S9Mix)	27
図 4	用量反応曲線 (本試験 TA1535 : +S9Mix)	27
図 5	用量反応曲線 (本試験 WP2 <i>uvrA</i> : -S9Mix)	28
図 6	用量反応曲線 (本試験 WP2 <i>uvrA</i> : +S9Mix)	28
図 7	用量反応曲線 (本試験 TA98 : -S9Mix)	29
図 8	用量反応曲線 (本試験 TA98 : +S9Mix)	29
図 9	用量反応曲線 (本試験 TA1537 : -S9Mix)	30
図 10	用量反応曲線 (本試験 TA1537 : +S9Mix)	30

Attached Data

Attached Data	背景データ (160908)	31
---------------	----------------------	----

T-2265

信賴性保證書	32
--------------	----

T-2265

3. 試験実施概要

3.1 試験番号

T-2265

3.2 試験表題

セルロースの 2-ヒドロキシエチル及びメチルエーテルの細菌を用いる復帰突然変異試験

3.3 試験目的

細菌を用い、セルロースの 2-ヒドロキシエチル及びメチルエーテルの遺伝子突然変異誘発能の有無を明らかにすることを目的とした。

3.4 試験委託者

厚生労働省 医薬・生活衛生局 医薬品審査管理課 化学物質安全対策室
〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1-2-2

3.5 試験受託者

株式会社ボゾリサーチセンター
〒151-0065 東京都渋谷区大山町 36-7

3.6 試験実施施設

株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所
〒156-0042 東京都世田谷区羽根木 1-3-11

3.7 試験日程

試験開始日	:	2017 年	1 月	13 日
用量設定試験開始日	:	2017 年	1 月	13 日
用量設定試験終了日	:	2017 年	1 月	16 日
本試験開始日	:	2017 年	1 月	18 日
本試験終了日	:	2017 年	1 月	23 日
試験終了日	:	2017 年	3 月	28 日

3.8 試験責任者

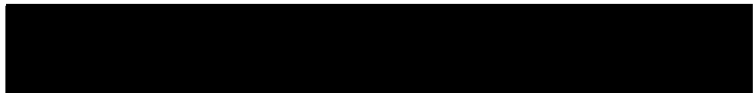
株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所 研究部 第1研究室



3.9 試験担当者

被験物質保存責任者：

試験担当者：



3.10 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

本試験において予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったことはなかった。

3.11 試験資料の保存

試験計画書（試験計画書変更書を含む）、記録文書、被験物質、生データ及び報告書類（最終報告書の原本を含む）は、株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所の資料保存施設に保存する。なお、その期間は最終報告書提出後 10 年間とする。期間終了後の保存については、厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課と株式会社ボゾリサーチセンター間で協議し、その処置を決定する。

3.12 試験責任者の署名又は記名・押印



株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所

4. 要約

セルロースの 2-ヒドロキシエチル及びメチルエーテル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。その結果より本試験は、代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA100 において復帰変異コロニー数の増加が認められたため、代謝活性化の有無にかかわらずすべての菌株において 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は、代謝活性化の有無にかかわらず 625 µg/plate 以上の用量で認められた。本被験物質によるプレート上の着色は、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。

2) 生育阻害

菌に対する生育阻害は、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 *S. typhimurium* TA100 において復帰変異コロニー数の用量依存性を伴う増加が認められ、代謝活性化しない場合においては、陰性対照値の 2 倍以上となる増加が認められた。なお、最大比活性値は本試験の 3.98×10^1 (Rev/mg) であった。

以上の試験結果より、本試験条件下においてセルロースの 2-ヒドロキシエチル及びメチルエーテルは、細菌に対する遺伝子突然変異誘発能を有する（陽性）と判定した。

5. 緒言

本試験は、厚生労働省 医薬・生活衛生局 医薬品審査管理課の委託により、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、平成 23・03・29 製局第 6 号、環保企発第 110331010 号)

2) ガイドライン

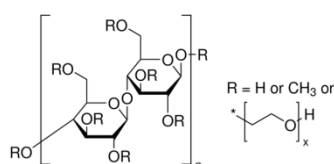
- 「新規化学物質等に係る試験の方法について」
(平成 27 年 12 月 21 日：薬食発 1221 第 1 号、20151209 製局第 1 号、環保企発第 1512211 号)

6. 被験物質及び被験液の調製

6.1 被験物質及び溶媒

6.1.1 被験物質

製造者	:	SIGMA-ALDRICH Co. LLC
名称	:	セルロースの 2-ヒドロキシエチル及びメチルエーテル
別名	:	Methyl 2-hydroxyethyl cellulose
CAS 番号	:	9032-42-2
官報公示整理番号	:	(8)-187 (化審法)
構造式又は示性式	:	



分子式	:	C34H66O24
分子量	:	858.9
形状	:	粉末
色	:	白色
ロット番号	:	MKBV8724V
純度	:	不明（水分 2.2%）被験物質は重合物（高分子）であることから [REDACTED] で販売されている製品を 100%として試験を行った。
溶解性	:	水、ジメチルスルホキシド（以下、DMSO と略す）：50 mg/mL で不溶 アセトン：100 mg/mL で不溶
溶媒中での安定性	:	水、DMSO、アセトン：発熱・ガスの発生等の反応性なし
保存方法	:	冷所、密閉、乾燥
保存場所	:	東京研究所 被験物質保存室
安定性	:	関連試験（T-G256）の実験終了後、株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所で被験物質が安定であることを確認した。
取扱い上の注意	:	作業場の換気を十分に行い、マスク、保護眼鏡、保護手袋等の適切な保護具を着用し、直接の接触を防ぐ。取り扱い後は、手、顔等を良く洗い、うがいをする。
保存温度	:	保存期間中の実測温度 (2016.11.17~2017.2.20 : 4.5~6.0°C)
使用後の処理	:	使用後の残量は、試験終了後全て廃棄した。

上記被験物質情報は、製造者からの情報による。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である。

6.1.2 溶媒

名称	:	注射用水
規格	:	日本薬局方
ロット番号	:	K6A80
製造元	:	株式会社大塚製薬工場
保存方法	:	室温
保存場所	:	東京研究所 被験物質調製室

6.1.3 溶媒の選択理由

水、DMSO 及びアセトンについて溶解性試験を実施した。その結果、水、DMSO の 50 mg/mL、アセトンの 100 mg/mL で、いずれも不溶であったが、水については均一に懸濁し、発熱、ガスの発生等の反応性も認められなかったため、注射用水を溶媒として試験を実施した。

6.2 被験液の調製方法

6.2.1 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 203.9 mg に最高調製濃度の 50 mg/mL となるように溶媒量を計算し、4.078 mL の注射用水を添加して懸濁し、50 mg/mL の被験液を調製した。次いで、これを公比 4 で順次 6 段階希釈し、50、12.5、3.13、0.781、0.195、0.0488 及び 0.0122 mg/mL の計 7 濃度の被験液を調製した。なお、被験液の調製は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で使用時に行い、その過程において発熱、ガスの発生等の反応性は認められなかった。

6.2.2 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 274.4 mg に最高調製濃度の 50 mg/mL となるように溶媒量を計算し、5.488 mL の注射用水を添加して懸濁し、50 mg/mL の被験液を調製した。次いで、これを公比 2 で順次 4 段階希釈し、50、25、12.5、6.25 及び 3.13 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。

7. 試験材料及び方法

7.1 試験菌株

7.1.1 菌株の種類

次の5種類の菌株を用いた。

塩基対置換型

S. typhimurium TA100

S. typhimurium TA1535

E. coli WP2 *uvrA*

フレームシフト型

S. typhimurium TA98

S. typhimurium TA1537

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。

7.1.2 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。

7.1.3 菌株の保存及び解凍

入手した菌株から継代して凍結保存した菌懸濁液を培養し、得られた菌懸濁液 8.0 mL に対して DMSO (和光純薬工業株式会社、JIS 規格試薬特級、ロット番号 ECE6658) を 0.7 mL の割合で添加した。これを滅菌チューブに 0.3 mL ずつ分注し、ドライアイス-アセトンで急速凍結した後、 -70°C 以下の超低温フリーザ (三洋電機バイオメディカ株式会社 : MDF-192) で保存した (保存期間中の実測温度 2016 年 8 月 25 日~2017 年 1 月 18 日 : -85.9°C ~ -78.5°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	2016 年 8 月 25 日
<i>S. typhimurium</i> TA100	2016 年 8 月 25 日
<i>S. typhimurium</i> TA1535	2016 年 8 月 25 日
<i>S. typhimurium</i> TA1537	2016 年 8 月 25 日
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	2016 年 8 月 27 日

7.1.4 菌株の特性検査

7.1.3 の凍結保存菌株を用いて、アミノ酸要求性、膜変異 *rfa* 特性、薬剤耐性因子 R-factor プラスミド、紫外線感受性、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	2016 年 8 月 25 日	~2016 年 8 月 27 日		
<i>S. typhimurium</i> TA100	2016 年 8 月 25 日	~2016 年 8 月 27 日		
<i>S. typhimurium</i> TA1535	2016 年 8 月 25 日	~2016 年 8 月 27 日		
<i>S. typhimurium</i> TA1537	2016 年 8 月 25 日	~2016 年 8 月 27 日		
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	2016 年 8 月 27 日	~2016 年 8 月 29 日		

7.2 対照物質

7.2.1 陰性対照物質

被験液の調製に用いた注射用水を陰性対照物質とした。

7.2.2 陽性対照物質

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

7.2.3 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 ECE6658）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 K6A80）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。

7.3 試薬

7.3.1 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. 1179181、1182704) 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	:	RAA201612A
製造日	:	2016 年 12 月 16 日
購入日	:	2017 年 1 月 13 日
種・系統	:	ラット・SD 系
週齢・性	:	7 週齢・雄
体重	:	194-261 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	:	2017 年 1 月 13 日~2017 年 1 月 19 日 : -85.9~-78.5°C

T-2265

2) 補酵素

名称 : Cofactor-I
製造元 : オリエンタル酵母工業株式会社
ロット番号 : 999603
製造日 : 2016 年 12 月 13 日、2017 年 1 月 17 日
使用期限 : 2017 年 8 月 26 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

: 2016 年 12 月 13 日~2017 年 1 月 19 日 : 3.9~4.7°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 (pH 7.4)

: 100 µmol/mL

7.3.2 培地

1) 最小グルコース寒天平板培地

名称 : バイタルメディア AMT-O 培地
製造元 : 極東製薬工業株式会社
ロット番号 : DZLHBF01
製造日 : 2016 年 11 月 15 日
購入日 : 2017 年 1 月 7 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 : 1372870

7.3.3 ニュートリエントブロス No.2 培養液

ニュートリエントブロス No.2 を 2.5 wt% となるよう精製水で溶解し、オートクレーブにより滅菌処理（121°C、20 分）を行い、調製した。調製後は使用時まで冷蔵で保存した。

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

7.3.4 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4)

りん酸緩衝剤粉末 3 包に対して 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

7.3.5 トップアガー

以下に示す寒天を用いて、調製した軟寒天液（0.6 wt% Agar、0.6 wt% NaCl）をオートクレーブにより滅菌処理（121°C、20 分）した後、0.5 mmol/L D-ビオチン-L-ヒスチジン-L-トリプトファン溶液を軟寒天液 10 に対して 1 の割合で加えて調製し、*S. typhimurium* TA 株と *E. coli* 株で共通で使用した。調製後は室温で保存し、使用時は電子レンジで溶解後、固化を防ぐため 45°C の恒温槽で保温した。

1) 寒天

名称	:	Bacto Agar
製造元	:	Becton, Dickinson and Company
ロット番号	:	6097761
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	:	DSM3876
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 : SAJ2076
 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

7.4 試験方法

7.4.1 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。
- 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。なお、使用後の菌懸濁液は廃棄した。
- 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	4.31×10^9	4.23×10^9
<i>S. typhimurium</i> TA1535	4.78×10^9	4.79×10^9
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	5.92×10^9	8.59×10^9
<i>S. typhimurium</i> TA98	5.96×10^9	5.63×10^9
<i>S. typhimurium</i> TA1537	3.62×10^9	3.70×10^9

7.4.2 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。

7.4.3 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又は溶媒、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懸濁液 0.1 mL を加えた。
- 2) 小試験管を攪拌後すぐに 37°C で 20 分間振盪 (80 回/分) しながらプレインキュベーションし、これに 45°C に保温されているトップアガーを 2.0 mL 加え攪拌後、最小グルコース寒天平板培地に均一に重層した。
- 3) 無菌試験として、調製した最高用量の被験液 0.1 mL 及び調製した S9 Mix 0.5 mL をそれぞれ小試験管に取り、これにトップアガーを 2.0 mL 加えた後に最小グルコース寒天平板培地に均一に重層した。なお、これら 1)~3) の一連の操作は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で実施した。
- 4) 最小グルコース寒天平板培地に重層したトップアガーが固化したことを確認し、最小グルコース寒天平板培地を逆さにしてインキュベータに入れ、37°C で 48 時間培養した。
- 5) 本被験物質による沈殿及び着色の有無を確認した結果、沈殿が認められたが、機器計測に支障がなかったため、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菌に対する生育阻害の有無を観察した。

7.5 判定基準

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倍以上となる明確な増加を示し、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。

8. 試験結果

用量設定試験の結果を別表 1 に、本試験の結果を別表 2 に、比活性値を別表 3~4 に示した。なお、図 1~10 は別表 2 より作成した。

8.1 用量設定試験の観察結果及び本試験用量の設定

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

用量設定試験の結果、本被験物質によるプレート上の沈殿は、代謝活性化の有無にかかわらず 1250 µg/plate 以上の用量で認められた。本被験物質によるプレート上の着色は、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。菌に対する生育阻害は、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 *S. typhimurium* TA100 において復帰変異コロニー数の増加が認められ、代謝活性化しない場合においては陰性対照値の 2 倍以上となる増加が認められた。

このため本試験の試験用量は、復帰変異コロニー数の増加が認められたため、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての菌株において 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。

8.2 本試験の観察結果

本被験物質によるプレート上の沈殿は、代謝活性化の有無にかかわらず 625 µg/plate 以上の用量で認められた。本被験物質によるプレート上の着色は、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。菌に対する生育阻害は、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 *S. typhimurium* TA100 において復帰変異コロニー数の増加が認められ、代謝活性化しない場合においては陰性対照値の 2 倍以上となる増加が認められた。

8.3 試験の成立条件

陽性対照値がそれぞれの菌株の陰性対照値に比較して 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加を示し、陰性対照値及び陽性対照値の復帰変異コロニー数の平均値が背景データの管理値（Attached Data）内であり、無菌試験及び試験操作において雑菌の混入などの異常も認められなかったため、試験が適切に実施されたものと判断した。

9. 考察

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 *S. typhimurium* TA100 において復帰変異コロニー数の用量依存性を伴う増加が認められ、代謝活性化しない場合においては、陰性対照値の 2 倍以上となる増加が認められた。なお、最大比活性値は本試験の 3.98×10^1 (Rev/mg) であった。

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。

また、本被験物質はセルロースの 2-ヒドロキシエチル及びメチルエーテルのは乳類培養細胞を用いる染色体異常試験において陰性と報告されている。

以上の試験結果より、本試験条件下においてセルロースの 2-ヒドロキシエチル及びメチルエーテルは、細菌に対する遺伝子突然変異誘発能を有する（陽性）と判定した。

10. 参考文献

- 1) B.N.Ames, F.D.Lee and W.E.Durston: An Improved Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens, Proc.Natl Acad.Sci.,USA, 70, No.3, pp.782-786, March 1973.
- 2) J.McCann, N.E.Spingarn, J.Kobori and B.N.Ames: Detection of Carcinogens as Mutagens: Bacterial Tester Strains with R Factor Plasmids, Proc.Natl Acad.Sci., USA, 72, No.3, pp.979-983, March 1975.
- 3) M.H.L.Green and W.J.Muriel: Mutagen Testing using Trp + Reversion in *Escherichia coli*, Mutation Res., 38, pp.3-32, 1976.
- 4) T.Yahagi, M.Nagao, Y.Seino, T.Matsushima, T.Sugimura and M.Okada: Mutagenicities of *N*-nitrosamines on *Salmonella*, Mutation Res., 48, pp.121-130, 1977.
- 5) Dorothy M. Maron and Bruce N. Ames: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, Mutation Res., 113, pp.173-215, 1983.
- 6) 田島彌太郎, 賀田恒夫, 近藤宗平, 外村晶 (編) : 環境変異原実験法, 講談社, pp.56-68, 1980.
- 7) 労働省安全衛生部化学物質調査課編 : 新・細菌を用いる復帰突然変異試験ガイドブック, 中央労働災害防止協会, 1986.
- 8) 石館 基 (監修) : 細菌を用いる復帰突然変異試験データ集 (能美健彦, 松井道子編集), 株式会社エル・アイ・シー, 東京, 1991.
- 9) (2017) : セルロースの 2-ヒドロキシエチル及びメチルエーテルのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験 (試験番号 : T-G256)、株式会社ボゾリサーチセンター

T-2265

(別表1)

試験結果表(用量設定試験)

被験物質の名称: セルロースの2-ヒドロキシエチル及びメチルエーテル

No. T-2265

試験実施期間		2017年1月13日 より 2017年1月16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)	139 100 (120)	12 10 (11)	22 25 (24)	18 17 (18)	11 8 (10)
	1.22	112 92 (102)	9 11 (10)	13 22 (18)	16 21 (19)	10 10 (10)
	4.88	79 97 (88)	11 8 (10)	17 24 (21)	24 21 (23)	5 6 (6)
	19.5	97 108 (103)	13 7 (10)	17 23 (20)	29 36 (33)	5 4 (5)
	78.1	93 123 (108)	11 15 (13)	17 22 (20)	28 16 (22)	5 4 (5)
	313	91 128 (110)	14 7 (11)	16 19 (18)	23 28 (26)	4 4 (4)
	1250 #	150 148 (149)	12 8 (10)	22 21 (22)	25 21 (23)	8 8 (8)
	5000 #	285 304 (295)	12 9 (11)	28 25 (27)	27 24 (26)	9 10 (10)
	陰性対照 (注射用水)	116 121 (119)	12 11 (12)	26 30 (28)	42 45 (44)	8 10 (9)
	1.22	116 122 (119)	10 16 (13)	32 31 (32)	34 30 (32)	12 11 (12)
S9Mix (+)	4.88	111 152 (132)	11 11 (11)	33 38 (36)	40 44 (42)	10 8 (9)
	19.5	103 153 (128)	11 14 (13)	24 25 (25)	48 38 (43)	8 11 (10)
	78.1	121 136 (129)	11 13 (12)	38 21 (30)	26 33 (30)	10 9 (10)
	313	130 129 (130)	10 6 (8)	28 30 (29)	25 37 (31)	5 5 (5)
	1250 #	142 124 (133)	11 10 (11)	34 30 (32)	33 28 (31)	4 4 (4)
	5000 #	160 168 (164)	15 13 (14)	31 38 (35)	35 38 (37)	10 12 (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
		コロニー数/プレート	411 547 (479)	206 237 (222)	78 77 (78)	385 357 (371)
	S9Mixを必要とするもの	名 称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P
		用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	5.0	2.0	10.0	5.0
		コロニー数/プレート	780 747 (764)	257 240 (249)	777 809 (793)	299 333 (316)

(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

: 被験物質による沈殿が認められたことを示す。
 ()内は、2枚のプレートの平均値を示す。

T-2265

(別表2)

試験結果表(本試験)

被験物質の名称: セルロースの2-ヒドロキシエチル及びメチルエーテル

No. T-2265

試験実施期間		2017年1月18日 より 2017年1月23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)	128 119 (124)	11 10 (11)	19 19 (19)	29 25 (27)	6 5 (6)
	313	142 98 (120)	8 8 (8)	31 22 (27)	24 21 (23)	7 8 (8)
	625 #	108 100 (104)	8 5 (7)	34 25 (30)	23 18 (21)	4 6 (5)
	1250 #	145 166 (156)	10 13 (12)	27 15 (21)	21 18 (20)	2 4 (3)
	2500 #	231 234 (233)	8 10 (9)	21 22 (22)	18 21 (20)	5 3 (4)
	5000 #	312 333 (323)	11 7 (9)	28 19 (24)	23 30 (27)	10 4 (7)
	陰性対照 (注射用水)	127 134 (131)	11 8 (10)	23 29 (26)	31 34 (33)	4 6 (5)
	313	162 163 (163)	3 11 (7)	32 34 (33)	24 30 (27)	5 8 (7)
S9Mix (+)	625 #	163 120 (142)	5 8 (7)	33 23 (28)	30 30 (30)	5 7 (6)
	1250 #	125 186 (156)	5 9 (7)	25 26 (26)	29 29 (29)	4 4 (4)
	2500 #	145 191 (168)	7 10 (9)	27 30 (29)	21 34 (28)	2 4 (3)
	5000 #	172 202 (187)	6 13 (10)	38 27 (33)	27 31 (29)	4 4 (4)
陽性対照	名 称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191
	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	492 489 (491)	220 203 (212)	87 72 (80)	312 349 (331)	1314 1248 (1281)
	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	827 1053 (940)	216 257 (237)	773 828 (801)	358 350 (354)	108 99 (104)

(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

: 被験物質による沈殿が認められたことを示す。

()内は、2枚のプレートの平均値を示す。

T-2265

(別表3)

比 活 性 値 表 (用量設定試験)

被験物質の名称： セルロースの2-ヒドロキシエチル及びメチルエーテル

No. T-2265

試験実施期間		2017年1月13日 より 2017年1月16日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
S9Mix (-)	1.22					
	4.88					
	19.5					
	78.1					
	313					
	1250					
	5000	3.50×10^{-1}				
S9Mix (+)	1.22					
	4.88					
	19.5					
	78.1					
	313					
	1250					
	5000					

(備考)

上記の比活性値は、陰性対照の2倍以上の復帰変異コロニー数を示したもののみに記載した。

比活性=被験物質1mgあたりの復帰変異コロニー数

下記の計算式により算出する。

比活性=(当該用量のコロニー数-陰性対照のコロニー数) $\times$ 1000 / 当該用量 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)

T-2265

(別表4)

比 活 性 値 表 (本試験)

被験物質の名称： セルロースの2-ヒドロキシエチル及びメチルエーテル

No. T-2265

試験実施期間		2017年1月18日 より 2017年1月23日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
S9Mix (-)	313					
	625					
	1250					
	2500					
	5000	3.98×10^{-1}				
S9Mix (+)	313					
	625					
	1250					
	2500					
	5000					

(備考)

上記の比活性値は、陰性対照の2倍以上の復帰変異コロニー数を示したもののみに記載した。

比活性=被験物質1mgあたりの復帰変異コロニー数

下記の計算式により算出する。

比活性=(当該用量のコロニー数-陰性対照のコロニー数) $\times$ 1000/当該用量 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)

図 1

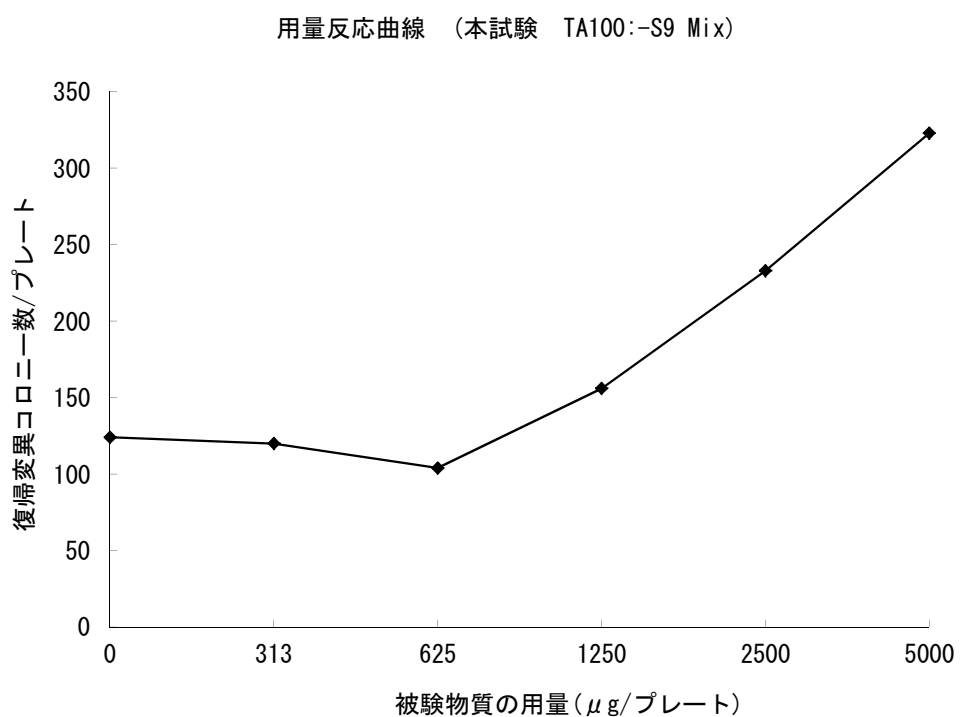


図 2

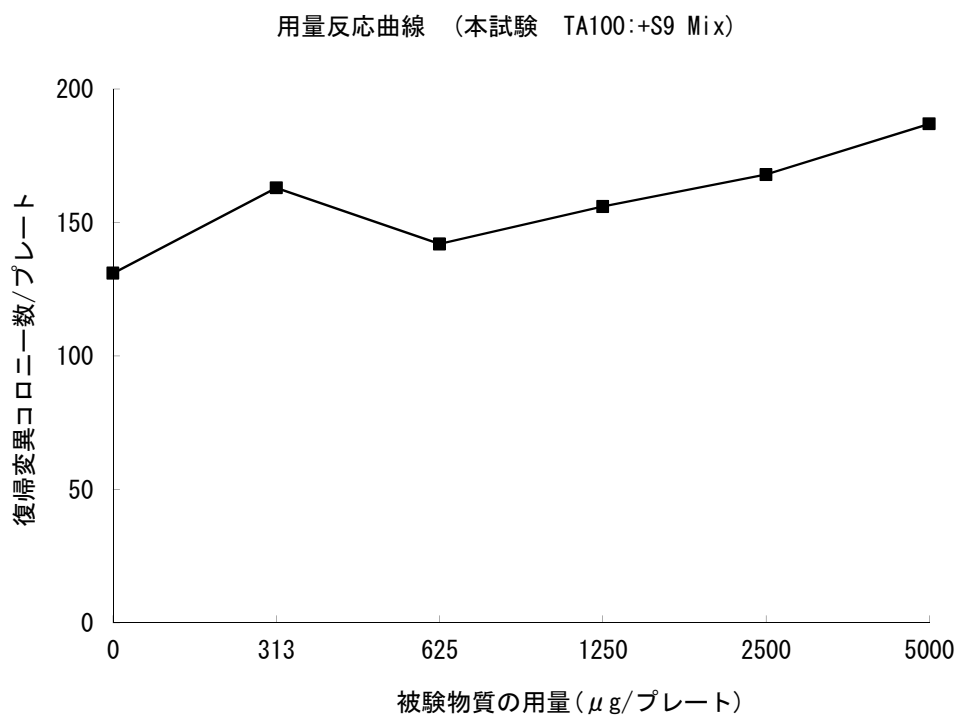


図 3

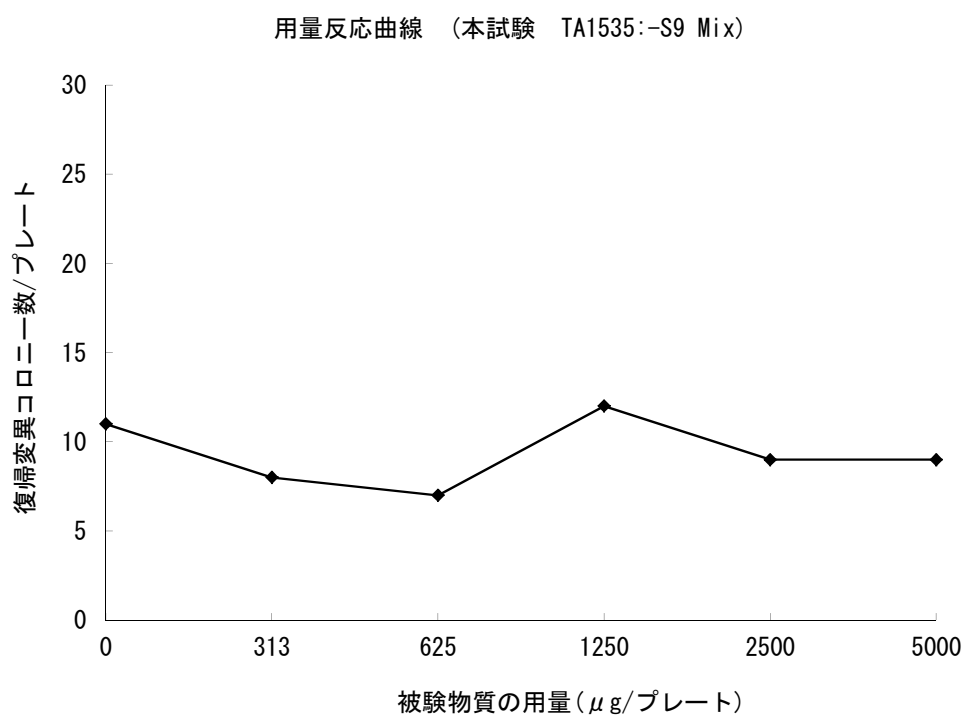


図 4

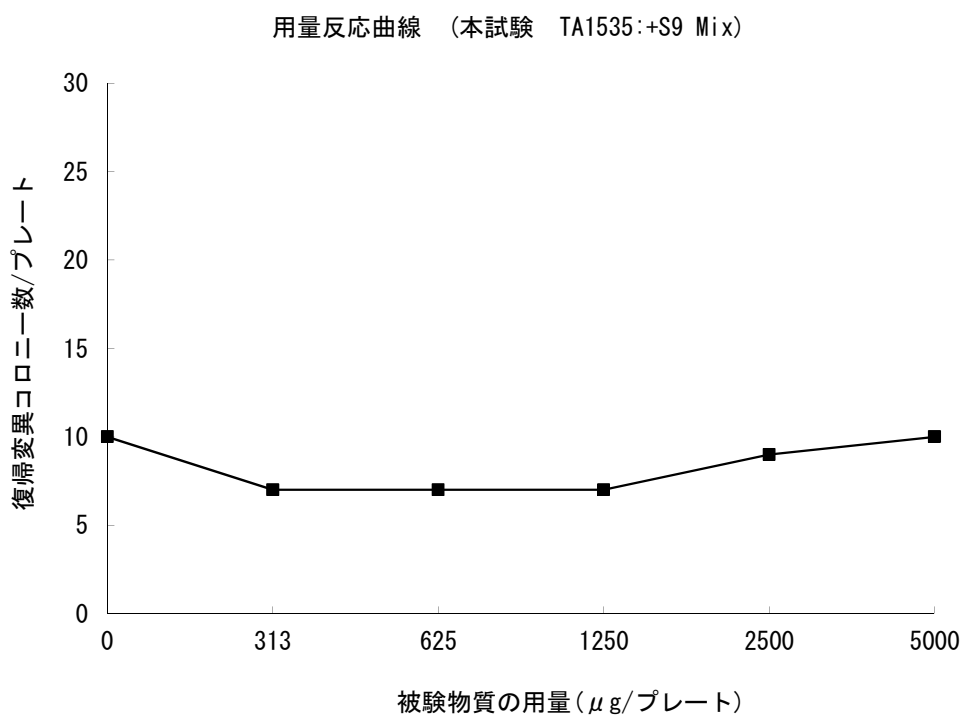


図 5

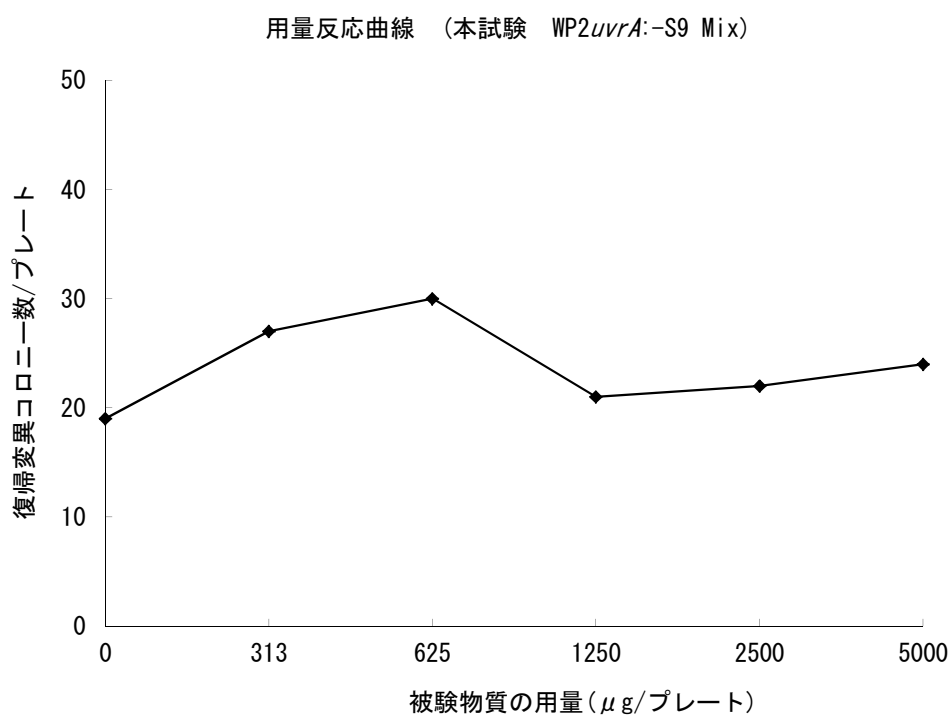
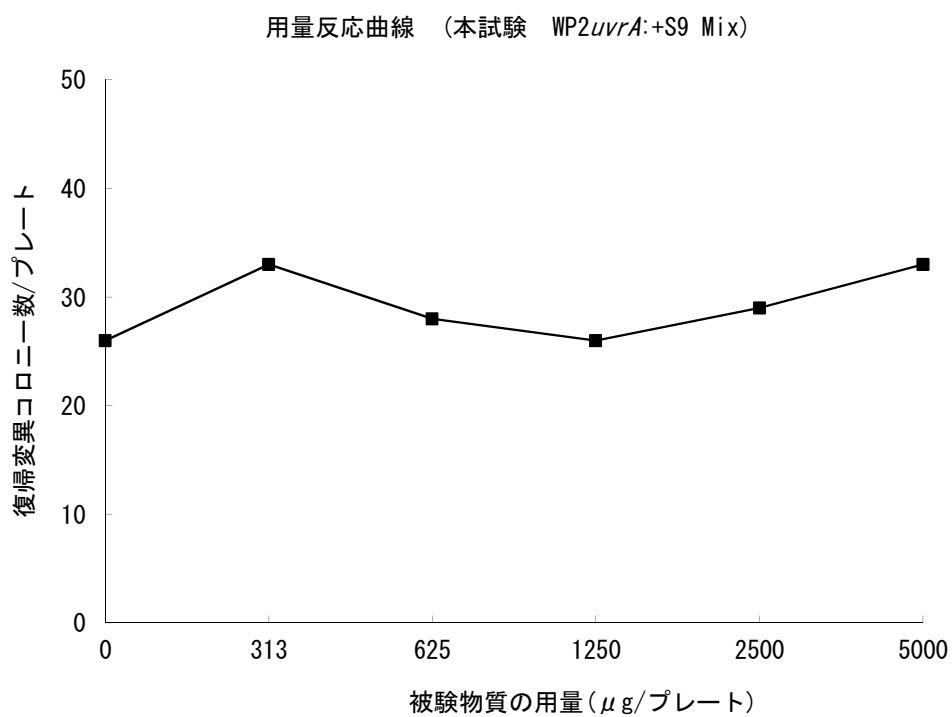


図 6



T-2265

図 7

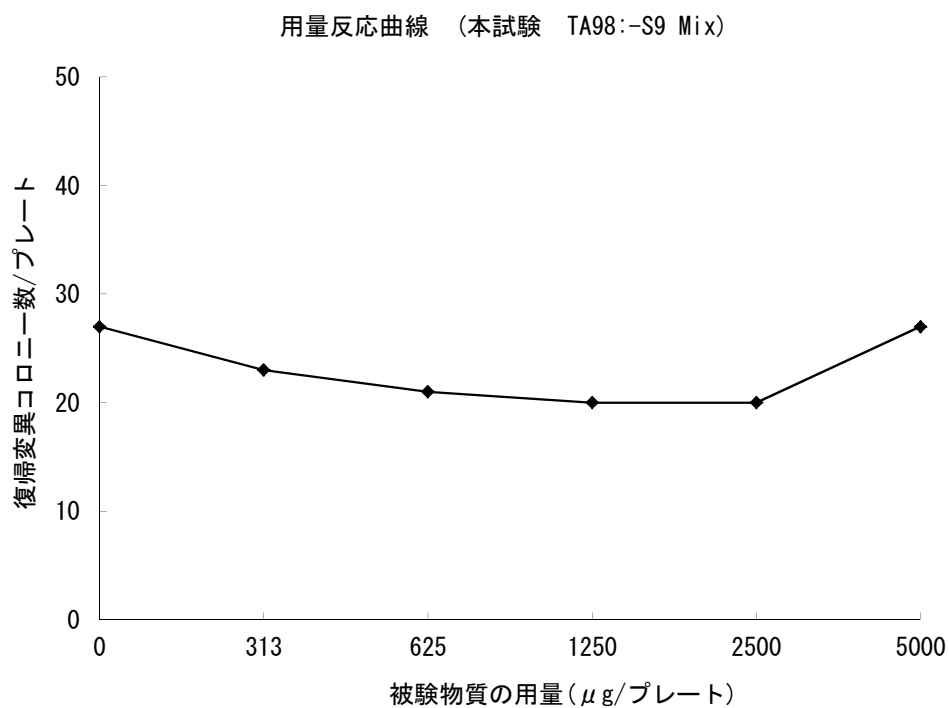
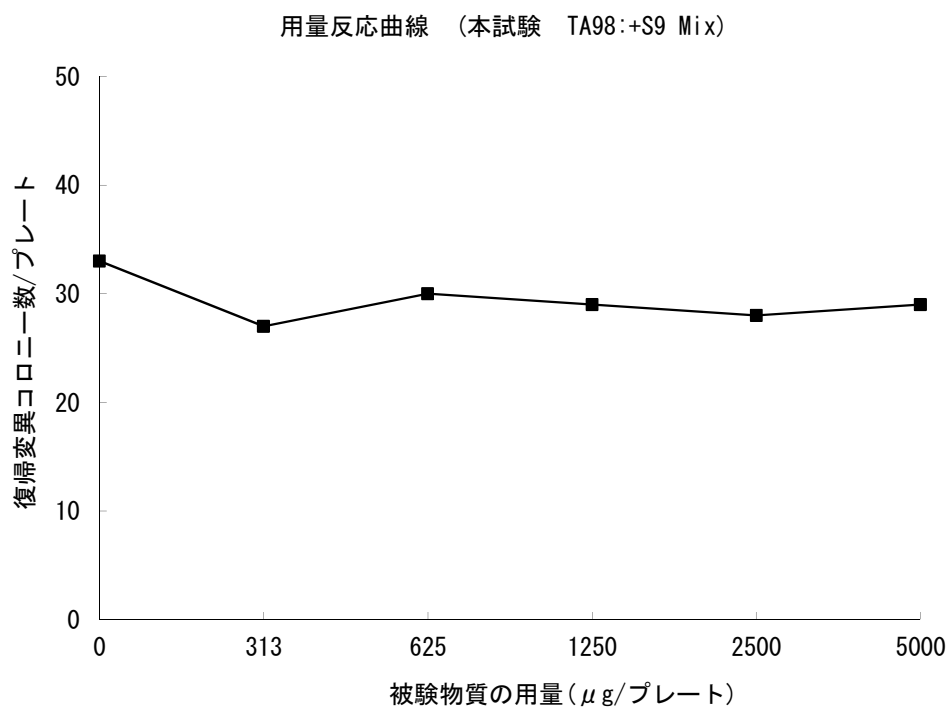


図 8



T-2265

図 9

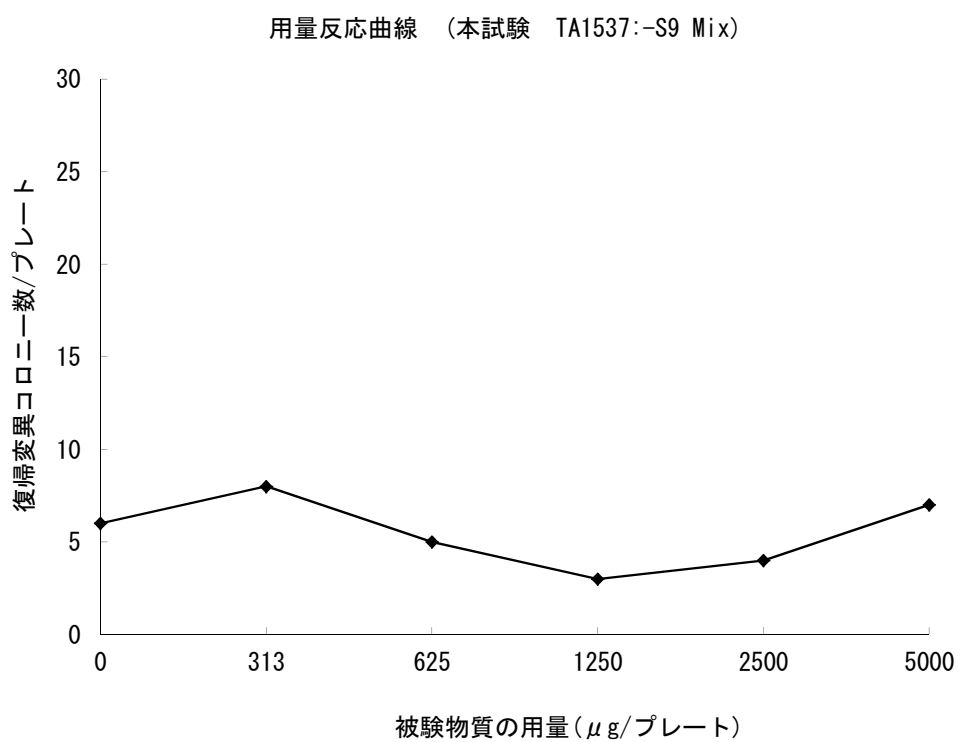
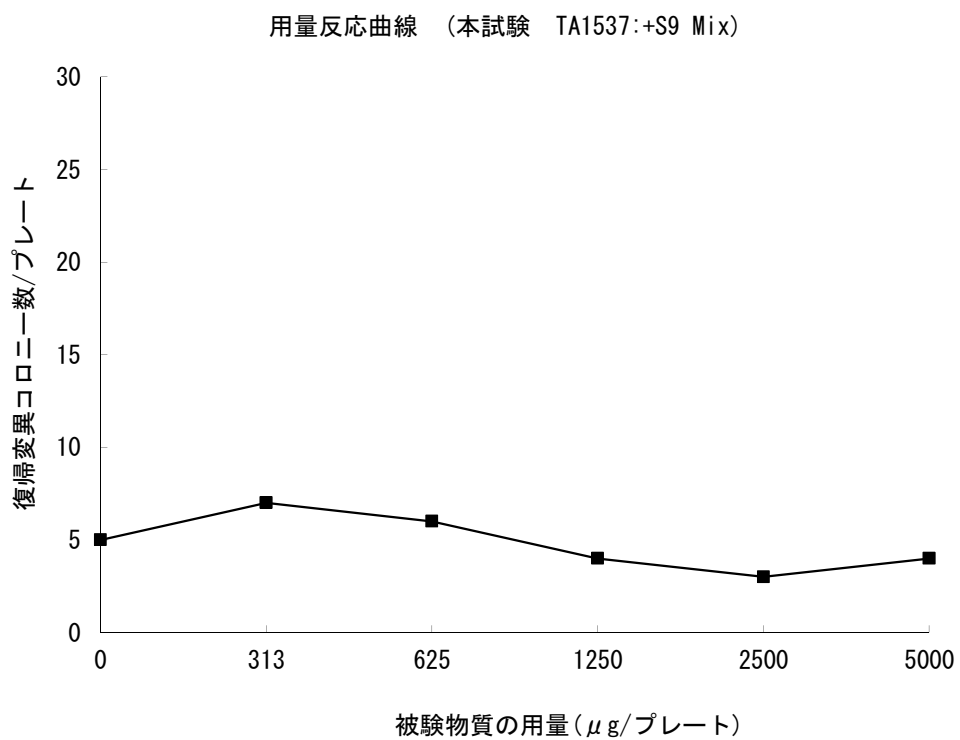


図 10



T-2265
Attached Data

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

CODE No. :160908

(Pre-incubation Method)

Tester Strains	S9 Mix (-) or (+)	Classification	Mean	S.D.	Management ranges		Number of plates
					Lower limit	Upper limit	
TA100	-	Solvent control	117	13.7	76	158	102
		Positive control AF-2(0.01 µg/plate)	547	71.8	331	762	102
	+	Solvent control	132	17.2	80	183	102
		Positive control B[a]P(5.0 µg/plate)	891	126	512	1269	102
TA1535	-	Solvent control	9	2.60	1	17	102
		Positive control SAZ(0.5 µg/plate)	233	26.4	154	312	102
	+	Solvent control	10	2.75	2	18	102
		Positive control 2AA(2.0 µg/plate)	258	34.1	156	360	102
WP2 ^{uvrA}	-	Solvent control	27	3.98	15	39	102
		Positive control AF-2(0.01 µg/plate)	71	6.4	52	91	102
	+	Solvent control	30	4.41	17	44	102
		Positive control 2AA(10.0 µg/plate)	718	114	375	1062	102
TA98	-	Solvent control	18	3.50	7	28	102
		Positive control AF-2(0.1 µg/plate)	346	57.1	174	517	102
	+	Solvent control	32	5.45	15	48	102
		Positive control B[a]P(5.0 µg/plate)	384	46.4	245	523	102
TA1537	-	Solvent control	8	2.36	1	15	102
		Positive control ICR-191(1.0 µg/plate)	1011	193	431	1590	102
	+	Solvent control	10	2.55	2	17	102
		Positive control B[a]P(5.0 µg/plate)	110	12.1	73	146	102

(Notice)

Solvent controls Water, Dimethylsulfoxide(DMSO) and Acetone

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

S9 Mix (-) : without metabolic activation

(+) : with metabolic activation

信頼性保証書 (1/2)

試験番号 : T-2265

試験表題 : セルロースの 2-ヒドロキシエチル及びメチルエーテル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、平成 23・03・29 製局第 6 号、環
保企発第 110331010 号)

なお、調査は下記の通り実施致しました。

2017 年 8 月 28 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		2017 年 1 月 13 日	2017 年 1 月 13 日
調製・保存（被験物質）、 被験物質の処理		2017 年 1 月 19 日	2017 年 1 月 19 日
計数		2017 年 1 月 23 日	2017 年 1 月 23 日
試験計画書変更書 (1)		2017 年 3 月 3 日	2017 年 3 月 3 日
生データ		2017 年 3 月 14 日	2017 年 3 月 16 日
改善確認		2017 年 3 月 25 日	2017 年 3 月 27 日
最終報告書草案・図・表		2017 年 3 月 14 日	2017 年 3 月 16 日
改善確認		2017 年 3 月 25 日	2017 年 3 月 27 日
最終報告書		2017 年 3 月 28 日	2017 年 3 月 28 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		2016 年 8 月 25 日	
		2016 年 8 月 27 日	
		2016 年 8 月 30 日	2016 年 8 月 30 日
改善確認		2016 年 8 月 30 日	2016 年 8 月 30 日
菌株の特性検査		2016 年 8 月 27 日	
		2016 年 8 月 29 日	
		2016 年 8 月 30 日	2016 年 8 月 30 日
陽性対照物質の管理		2016 年 11 月 2 日	2016 年 11 月 2 日
		2016 年 11 月 29 日	2016 年 11 月 29 日
		2016 年 11 月 30 日	2016 年 11 月 30 日
		2016 年 12 月 20 日	2016 年 12 月 21 日
		2017 年 1 月 16 日	2017 年 1 月 16 日