

最終報告書

ナフタレンスルホン酸とホルムアルデヒドの重合物のナトリウム塩の 細菌を用いる復帰突然変異試験

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 委託

試験施設

一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所

〒257-8523 神奈川県秦野市落合 729 番地の 5

TEL 0463-82-4751

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
(東京都千代田区霞が関 1-2-2)

試験番号 M-16-075

被験物質 ナフタレンスルホン酸とホルムアルデヒドの重合物のナトリウム塩

試験項目 細菌を用いる復帰突然変異試験

試験開始日 2016 年 11 月 11 日

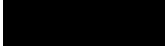
実験開始日 2016 年 12 月 8 日

実験終了日 2016 年 12 月 22 日

試験終了日 試験責任者の押印日

試験資料保管場所 秦野研究所資料保存施設

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 一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所
所長 


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、環境企発第 110331009 号環境省総合環境政策局長通知、一部改正平成 27 年 12 月 21 日、薬生発 1221 第 1 号厚生労働省医薬・生活衛生局長、20151209 製局第 1 号経済産業省製造産業局長、環境企発第 1512211 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、環境企発第 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。

年 月 日

試験責任者  印

試験従事者

試験責任者  (安全性評価室)

試験担当主任者 

試験担当者

検体調製

試験操作

化学分析

被験物質管理

目次

要約	5
試験目的.....	5
試験ガイドラインと GLP	5
材料と方法	6
1. 被験物質	6
2. 陽性対照物質	7
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	12
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	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	19

(最終ページ: 23 ページ)

信頼性保証書

要約

ナフタレンスルホン酸とホルムアルデヒドの重合物のナトリウム塩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。

5.00、15.0、50.0、150、500、1500 および 5000 µg/plate の 7 用量を設定して用量設定試験を行ったところ、S9 mix 非存在下および存在下ともに、用いたいずれの検定菌においても生育阻害は認められなかった。また、WP2 *uvrA* の S9 mix 存在下においては 150 µg/plate の用量で、陰性対照値の 2 倍となる変異コロニー数の増加が認められた。

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 II）を行った。

S9 mix 非存在下

すべての検定菌: 313、625、1250、2500 および 5000 µg/plate

S9 mix 存在下

TA100、TA1535、TA98 および TA1537: 313、625、1250、2500 および 5000 µg/plate

WP2 *uvrA*: 39.1、78.1、156、313、625、1250、2500 および 5000 µg/plate

その結果、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、ナフタレンスルホン酸とホルムアルデヒドの重合物のナトリウム塩は、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

生物学的安全性の情報を得るために、ナフタレンスルホン酸とホルムアルデヒドの重合物のナトリウム塩の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、ナフタレンスルホン酸とホルムアルデヒドの重合物のナトリウム塩の遺伝子突然変異誘発性（変異原性）の有無を検討した。

試験ガイドラインと GLP

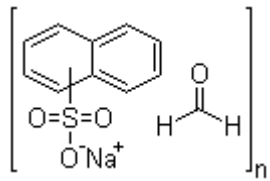
この試験は、「新規化学物質等に係る試験の方法について」（平成 23 年 3 月 31 日付け、薬食発 0331 第 7 号厚生労働省医薬食品局長、平成 23・03・29 製局第 5 号経済産業省製造産業局長、環境企発第 110331009 号環境省総合環境政策局長通知、一部改正平成 27 年 12 月 21 日、薬生発 1221 第 1 号厚生労働省医薬・生活衛生局長、20151209 製局第 1 号経済産業省製造産業局長、環境企発第 1512211 号環境省総合環境政策局長通知）に準拠し、「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」（平成 23 年 3 月 31 日付け、薬食発 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

被験物質の情報を、下記および資料 1、資料 2に示す。

- | | |
|-------------------|---|
| 1) 名称 | ナフタレンスルホン酸とホルムアルデヒドの重合物のナトリウム塩 |
| 2) 官報公示整理番号 (化審法) | (4)-557 |
| 3) 商品名 | デモール N |
| 4) 英名 | Sodium poly[(naphthaleneformaldehyde)sulfonate] |
| 5) 化学名 (IUPAC 名) | Disodium 5-[(6-sulfonatophthalen-1-yl)methyl]naphthalene-2-sulfonate |
| 6) CAS 番号 | 9084-06-4 |
| 7) 分子式 | $(C_{11}H_7O_4SNa)_n$ |
| 8) 分子量 | 情報なし |
| 9) 物理化学的性質 | 性状: うすい黄褐色の粉末
融点: 購入元からのデータなし
沸点: 購入元からのデータなし
1-オクタノール/水分分配係数: 購入元からのデータなし
蒸気圧: 購入元からのデータなし
溶解性: 水に溶ける。 |
| 10) 構造式 |  |
| 11) ロット番号 | CTM4138 |
| 12) 純度 | 被験物質は重合物 (高分子) であることから、和光純薬工業株式会社で販売されている製品を 100%として試験を行った。 |
| 13) 不純物 | 情報なし |
| 14) 安定性 | 推奨保管条件下で安定 (購入元からの安全データシートより)。なお、当試験施設において、本被験物質を用いる各種毒性試験の実験開始前と終了後に目視による性状確認と赤外吸収スペクトルを測定した。その結果、2 時点間で性状、スペクトルに変化がないことを確認した (資料 3および資料 4)。 |
| 15) 保管条件 | 室温 (1~30°C、実測値: 14.9~24.3°C)、遮光、密閉 |

16) 購入元 和光純薬工業株式会社

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)アクリルアミド	AF-2	PDG6230 (2014年8月13日)	和光純薬工業	100.1%
アジ化ナトリウム	SA	YSM7891 (2014年8月13日)	和光純薬工業	100.3%
9-アミノアクリジン	9AA	BCBM9887V (2014年8月19日)	Sigma-Aldrich	100.0%
ベンゾ[a]ピレン	B[a]P	I12Y023 (2014年5月27日)	Alfa Aesar	97%
2-アミノアントラセン	2AA	TLH6618 (2014年8月13日)	和光純薬工業	98.7%

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: DSR0111、和光純薬工業) に、SA は日局注射用水 (製造番号: K5J75、大塚製薬工場) に溶解して所定の濃度に調製したものを、冷凍保存 (設定温度: -20°C) して、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				S9 mix 存在下			
	物質名	調製濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	添加量 ($\mu\text{L}/\text{plate}$)	用量 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	物質名	調製濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	添加量 ($\mu\text{L}/\text{plate}$)	用量 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)
<i>Salmonella typhimurium</i>								
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
<i>Escherichia coli</i>								
WP2 <i>uvrA</i>	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、当試験施設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松島泰次郎博士より分与された。*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: DZAH8J01、2016 年 8 月 19 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、直径 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-M5-265、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	<i>S. typhimurium</i> 用	
	L-ヒスチジン	0.5 mmol/L
	D-ビオチン	0.5 mmol/L
③	<i>E. coli</i> 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: RAA201609A、2016年9月9日製造、キッコーマンバイオケミファ) 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: 184~227 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°C) 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°C) 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に溶解した。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、秤量した被験物質を日局注射用水 (製造番号: K6D73、大塚製薬工場) に溶解して最高濃度 (50.0 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19分以内 (室温: 23~24°C、用量設定試験および本試験 I)、21分以内 (室温: 23~24°C、本試験 II) に使用した。被験物質調製液の調製濃度を以下に示す。

用量設定試験: 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: 0.391、0.781、1.56、3.13、6.25、12.5、25.0 および 50.0 mg/mL

媒体中での被験物質の安定性については、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: 1704954、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°C で保冷後、37°C 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。検定菌の増殖を確認するため、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 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
用量設定試験	OD ₆₆₀	1.862	1.926	1.939	1.908	1.879
	生菌数 ($\times 10^9$ cells/mL)	3.06	3.46	5.57	2.98	1.82
本試験 I	OD ₆₆₀	1.864	1.915	1.896	1.900	1.845
	生菌数 ($\times 10^9$ cells/mL)	2.84	3.41	5.22	2.94	1.47
本試験 II	OD ₆₆₀	1.864	1.918	1.939	1.907	1.886
	生菌数 ($\times 10^9$ cells/mL)	2.70	3.28	4.82	3.05	2.13

各試験菌液の 660 nm の吸光度の測定値は、2015 年度の背景データ（当試験施設）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°C 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°C 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。なお、培養終了後からコロニー計測まで、用量設定試験においては 1 日間、平板培地を冷蔵（設定温度: 4°C）で保管した。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。陰性対照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、5.00、15.0、50.0、150、500、1500 および 5000 µg/plate の 7 用量を設定した。

本試験 I および II においては、以下の用量を設定した。

S9 mix 非存在下

すべての検定菌: 313、625、1250、2500 および 5000 µg/plate

S9 mix 存在下

TA100、TA1535、TA98 および TA1537: 313、625、1250、2500 および 5000 µg/plate

WP2 *uvrA*: 39.1、78.1、156、313、625、1250、2500 および 5000 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°C で 20 分間プレインキュベーションしたのち、2 mL のトッペアガー(*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°C で 48 時間培養後、用量設定試験においては 1 日間、平板培地を冷蔵 (設定温度: 4°C) で保管したのち、雑菌の混入の有無を調べた。なお、用量設定試験における S9 mix の無菌試験については、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 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、当試験施設における背景データの変動範囲内 (平均値 $\pm 3 \times$ 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、2015 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 5)。

当該試験においては、再試験は実施しなかった。

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

ナフタレンスルホン酸とホルムアルデヒドの重合物のナトリウム塩について、5.00、15.0、50.0、150、500、1500 および 5000 µg/plate の7用量を設定して用量設定試験を行った（表1）。その結果、S9 mix非存在下および存在下ともに、用いたいずれの検定菌においても生育阻害は認められなかった。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、いずれの用量においても認められなかった。また、WP2 *uvrA* のS9 mix存在下においては150 µg/plateの用量で、陰性対照値の2倍となる変異コロニー数の増加が認められた。

2. 本試験

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II）を行った（本試験I: 表2および図1、本試験II: 表3および図2）。

S9 mix 非存在下

すべての検定菌: 313、625、1250、2500 および 5000 µg/plate

S9 mix 存在下

TA100、TA1535、TA98 および TA1537: 313、625、1250、2500 および 5000 µg/plate

WP2 *uvrA*: 39.1、78.1、156、313、625、1250、2500 および 5000 µg/plate

2回の本試験の結果、S9 mix非存在下および存在下ともに、用いたいずれの検定菌においても生育阻害は認められなかった。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、いずれの用量においても認められなかった。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。

ナフタレンスルホン酸とホルムアルデヒドの重合物のナトリウム塩については、当試験施設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-16-049）で、陰性の結果が得られている。なお、当該被験物質の関連物質である naphthalene に関しては、細菌を用いる復帰突然変異試験で陰性⁴⁾、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で陽性の結果が報告されている⁵⁾。4-Amino-1-naphthalene sulfonic acid に関しては、細菌を用いる復帰突然変異試験で陰性の結果が報告されている⁶⁾。

以上の結果から、ナフタレンスルホン酸とホルムアルデヒドの重合物のナトリウム塩は、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。

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
- 4) 労働省労働基準局安全衛生部化学物質調査課 監修、労働安全衛生法 有害性調査制度に基づく既存化学物質 変異原性試験データ集、社団法人日本化学物質安全・情報センター 編集・発行、東京 (1996)、p.193
- 5) 祖父尼俊雄 監修、染色体異常試験データ集、改訂 1998 年版、Life-Science Information Center、東京 (1998)、p.346
- 6) L.E. Kier, D.J. Brusick, A.E. Auletta, et al.: The Salmonella typhimurium/mammalian microsomal assay A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox program. Mutation Research, 168: 69-240 (1986)

表 1 ナフタレンスルホン酸とホルムアルデヒドの重合物のナトリウム塩の細菌を用いる
 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: 2016年12月8日より2016年12月12日										
		復帰変異数 (コロニー数/plate)										
		塩基対置換型					フレームシフト型					
		TA100		TA1535		WP2 <i>uvrA</i>		TA98		TA1537		
S9 mix (-)	0 (陰性対照)	155	122	17	18	23	33	21	27	13	12	
		(139)		(18)		(28)		(24)		(13)		
	5.00	109		18		26		26		15		
	15.0	132		14		27		24		12		
	50.0	124		23		24		25		14		
	150	125		19		20		24		18		
	500	96		17		27		13		16		
	1500	110		10		20		33		8		
5000	125		16		16		22		13			
S9 mix (+)	0 (陰性対照)	154	143	14	16	29	24	27	24	18	26	
		(149)		(15)		(27)		(26)		(22)		
	5.00	139		10		30		24		26		
	15.0	123		13		20		31		27		
	50.0	136		13		25		16		28		
	150	123		14		54		39		20		
	500	140		12		33		22		17		
	1500	112		27		34		22		16		
5000	121		10		28		18		27			
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	490	475	559	504	116	128	592	630	461	550
			(483)		(532)		(122)		(611)		(506)	
	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	1472	1339	499	468	582	542	456	425	153	158	
		(1406)		(484)		(562)		(441)		(156)		

() 内の数値はコロニー数の平均値を示す。

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

表 2 ナフタレンスルホン酸とホルムアルデヒドの重合物のナトリウム塩の細菌を用いる
 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 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	試験実施期間: 2016年12月13日より2016年12月16日										
		復帰変異数 (コロニー数/plate)										
		塩基対置換型						フレームシフト型				
		TA100		TA1535		WP2 <i>uvrA</i>		TA98		TA1537		
S9 mix (-)	0 (陰性対照)	128	146	14	12	38	28	21	20	7	13	
		(137)		(13)		(33)		(21)		(10)		
	313	120	123	13	11	30	30	17	25	8	9	
		(122)		(12)		(30)		(21)		(9)		
	625	108	129	8	12	33	25	19	26	11	12	
		(119)		(10)		(29)		(23)		(12)		
S9 mix (+)	0 (陰性対照)	128	150	7	14	26	41	24	35	18	22	
		(139)		(11)		(34)		(30)		(20)		
	39.1	NT		NT		28	29	NT		NT		
						(29)						
	78.1	NT		NT		27	31	NT		NT		
						(29)						
S9 mix (+)	156	NT		NT		45	35	NT		NT		
						(40)						
	313	134	138	17	11	32	26	22	25	21	12	
		(136)		(14)		(29)		(24)		(17)		
	625	133	134	9	12	33	32	22	20	26	18	
		(134)		(11)		(33)		(21)		(22)		
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 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01		0.5		0.01		0.1		80	
	S9 mixを 必要とす るもの	コロニー数/plate	474	479	549	553	147	161	680	652	551	506
			(477)		(551)		(154)		(666)		(529)	
	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 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	5		2		10		5		5	
	コロニー数/plate	1502	1305	398	451	559	604	457	405	149	163	
		(1404)		(425)		(582)		(431)		(156)		

() 内の数値はコロニー数の平均値を示す。

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
 NT, 実施せず。

表 3 ナフタレンスルホン酸とホルムアルデヒドの重合物のナトリウム塩の細菌を用いる
 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 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	試験実施期間: 2016年12月19日より2016年12月22日										
		復帰変異数 (コロニー数/plate)										
		塩基対置換型						フレームシフト型				
		TA100		TA1535		WP2 <i>uvrA</i>		TA98		TA1537		
S9 mix (-)	0 (陰性対照)	119	125	9	10	26	39	22	17	12	5	
		(122)		(10)		(33)		(20)		(9)		
	313	113	118	8	10	32	32	21	19	7	7	
		(116)		(9)		(32)		(20)		(7)		
	625	124	122	8	4	28	29	21	19	7	13	
		(123)		(6)		(29)		(20)		(10)		
S9 mix (+)	0 (陰性対照)	134	166	10	9	37	33	36	21	15	13	
		(150)		(10)		(35)		(29)		(14)		
	39.1	NT		NT		49	38	NT		NT		
						(44)						
	78.1	NT		NT		33	28	NT		NT		
						(31)						
S9 mix (+)	156	NT		NT		40	51	NT		NT		
						(46)						
	313	147	132	9	12	30	41	29	22	10	16	
		(140)		(11)		(36)		(26)		(13)		
	625	152	126	10	12	44	30	22	20	17	17	
		(139)		(11)		(37)		(21)		(17)		
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 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01		0.5		0.01		0.1		80	
	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 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	5		2		10		5		5	
		コロニー数/plate	506	470	509	474	112	135	633	651	526	493
			(488)		(492)		(124)		(642)		(510)	
	コロニー数/plate	1490	1329	481	467	781	787	501	432	161	136	
		(1410)		(474)		(784)		(467)		(149)		

() 内の数値はコロニー数の平均値を示す。

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
 NT, 実施せず。

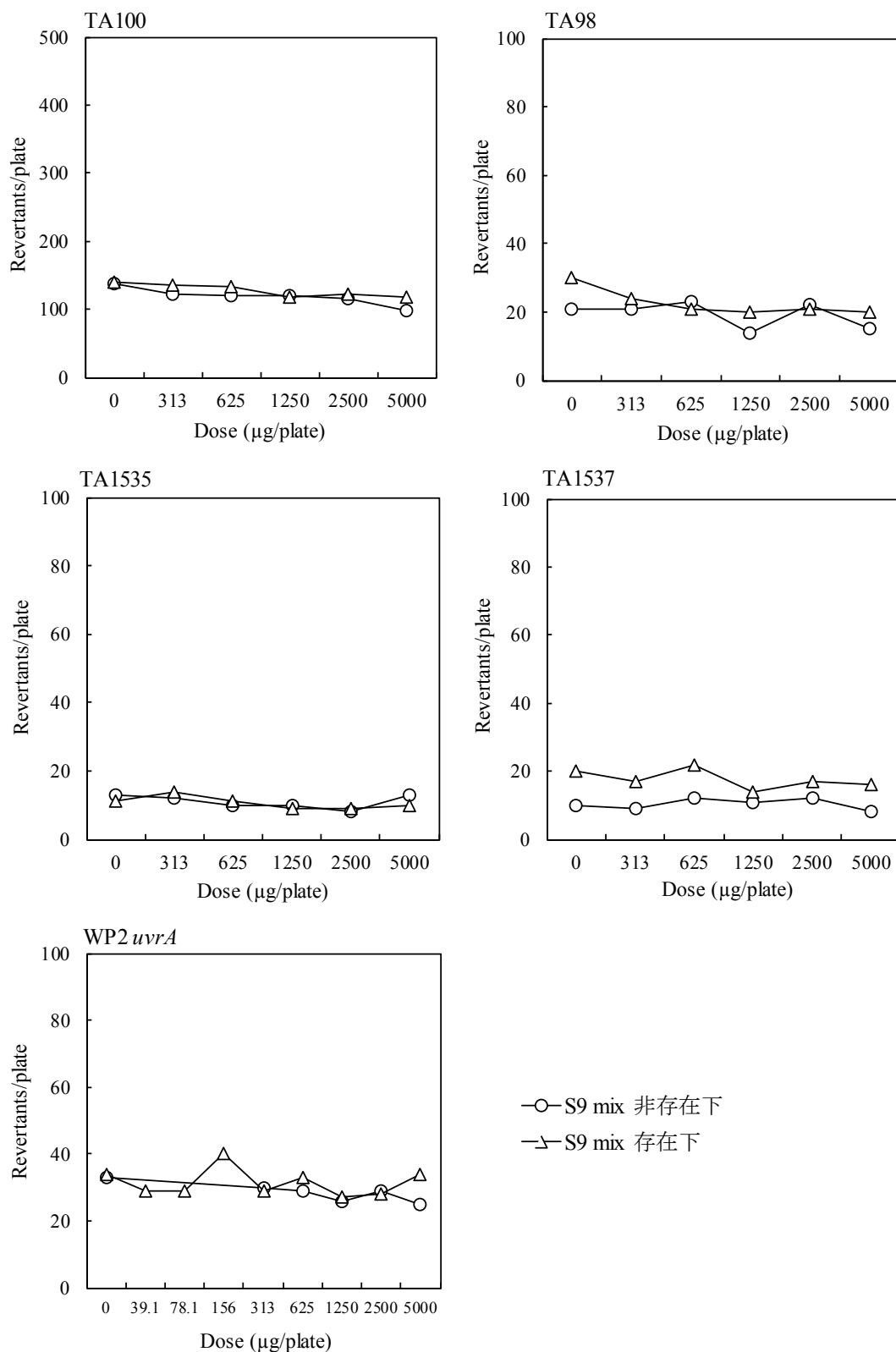


図 1 ナフタレンスルホン酸とホルムアルデヒドの重合物のナトリウム塩の細菌を用いる復帰突然変異試験 (本試験 I)

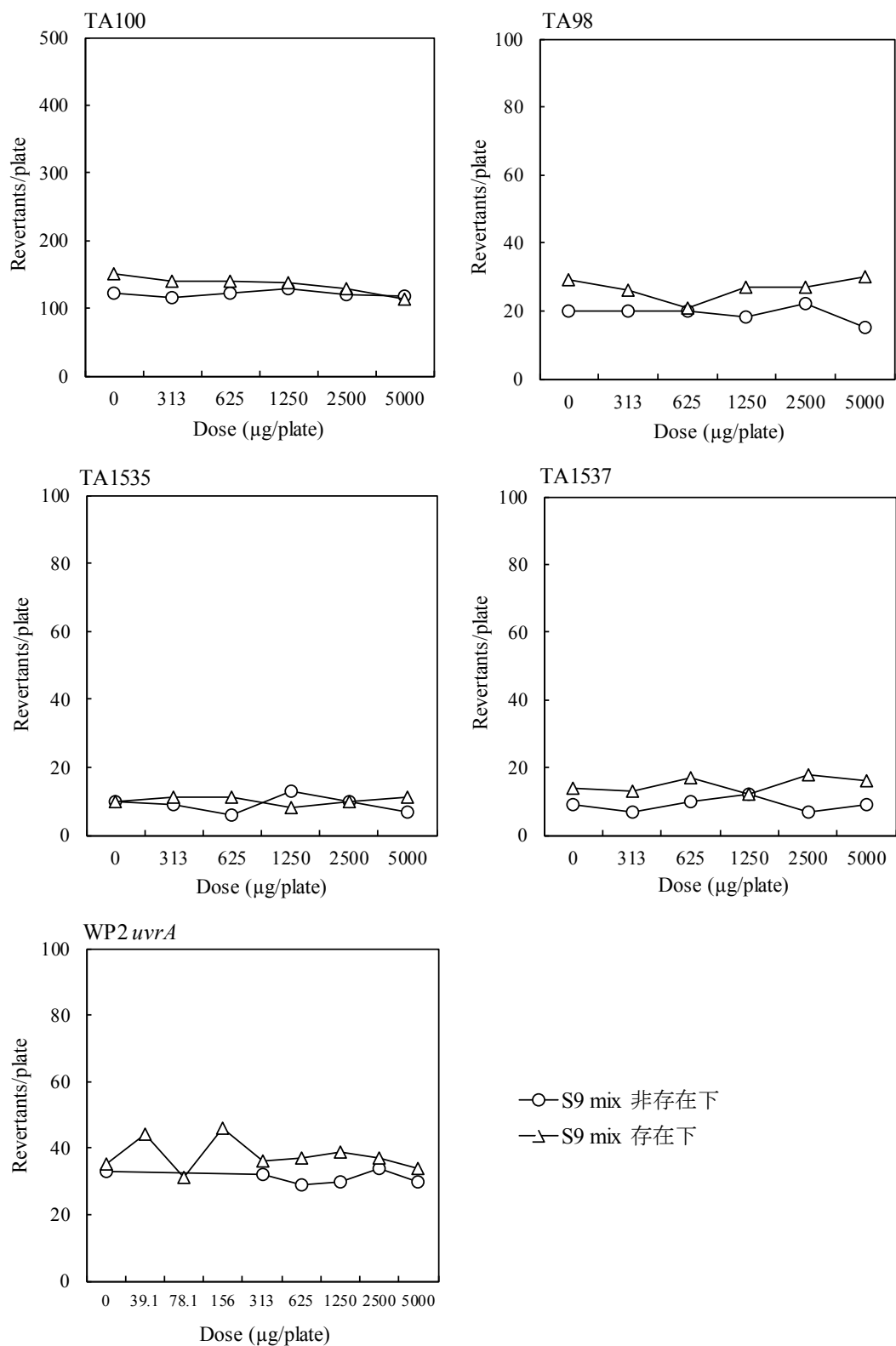


図 2 ナフタレンスルホン酸とホルムアルデヒドの重合物のナトリウム塩の細菌を用いる
 復帰突然変異試験 (本試験 II)

資料 1

検査成績書

一般財団法人 食品薬品安全センター 御中


2016年10月4日
和光純薬工業株式会社

Code No.049-18345

デモールN



規格/等級	-	
Lot No.	CTM4138	
数量	500g	
検査項目	検査成績	規格値
外観	うすい黄褐色の粉末	うすい黄褐色の粉末
水溶状	澄明	試験適合(わずかな微濁以内)
乾燥減量(105°C)	2.7%	5.0%以下
pH(20g/l、25°C)	7.4	6.0~9.0
検査年月日	2014/04/24	

判定	合格	検査責任者	
----	----	-------	--

(1/1)

成績書発行番号

9681564

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)	ジナトリウム=5-[(6-スルフォネートナフタレン-1-イル)メチル] ナフタレン-2-スルフォネート		
別 名	ナフタレンスルホン酸とホルムアルデヒドの重合物のナトリウム塩 Disodium 5-[(6-sulfonatonaphthalen-1-yl)methyl]naphthalene-2-sulfonate Sodium poly[(naphthaleneformaldehyde)sulfonate]		
C A S 番 号	9084-06-4		
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	_____		
試験に供した新規 化学物質の純度 (%)	被験物質は重合物（高分子）であることから、和光純薬工業株式会社で販売されて いる製品を 100%として試験を行う。		
試験に供した新規 化学物質のロット番号	CTM4138		
不 純 物 の 名 称 及び含有率	_____		
蒸 気 圧	_____		
対 水 溶 解 度	水に溶解 (50.0 mg/mL)*		
1-オクタノール/水分配係数	_____		
融 点	_____		
沸 点	_____		
常 温 に お け る 性 状	うすい黄褐色の粉末		
安 定 性	推奨保管条件下で安定（購入元からの安全データシートより）。		
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 で溶解	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。
	D M S O	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。
	アセトン	100 mg/mL で不溶	100 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。

*: 一般財団法人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

被験物質原体の安定性の確認方法

1. 材料

赤外分光用臭化カリウム 島津製作所

2. 機器

電子天秤 (LA230S) ザルトリウス
フーリエ変換赤外分光光度計 (FTIR-8300) 島津製作所

3. 原体の安定性試験

被験物質原体の安定性の確認として、本被験物質を用いる各種毒性試験の実験開始前と実験終了後に以下の項目について確認した。

1) 性状

目視により被験物質の外観および色調を観察し、比較した。

2) 確認試験 (赤外吸収スペクトル)

被験物質 1.5 mg をとり、めのう製乳鉢で粉末とした。これに赤外分光用臭化カリウム 0.1000 g を加え、湿気を吸わないように注意し、速やかによくすり混ぜた後、錠剤成型器に入れて加圧製錠した。これを 4000~400 cm^{-1} の範囲で赤外吸収スペクトルを測定し、得られたスペクトルを比較した。

3) 安定性の判定基準

判定の目安は、実験開始前と実験終了後で被験物質の性状に変化がなく、かつ、赤外吸収スペクトルに変化がないこととした。

被験物質原体の安定性の確認結果

1) 性状

実験開始前: うすい黄褐色の粉末

実験終了後: うすい黄褐色の粉末

2) 確認試験 (赤外吸収スペクトル)

資料 4 参照

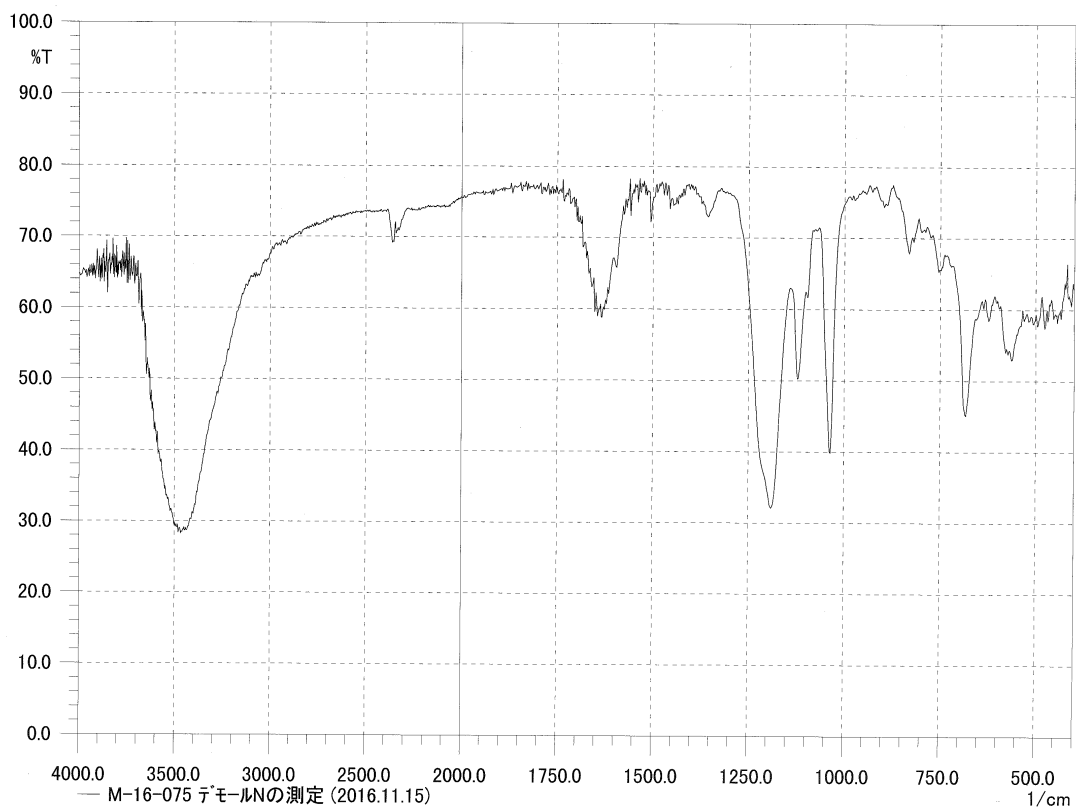
3) 被験物質の保管条件

室温 (1~30°C、実測値: 14.0~29.4°C)、遮光、密閉

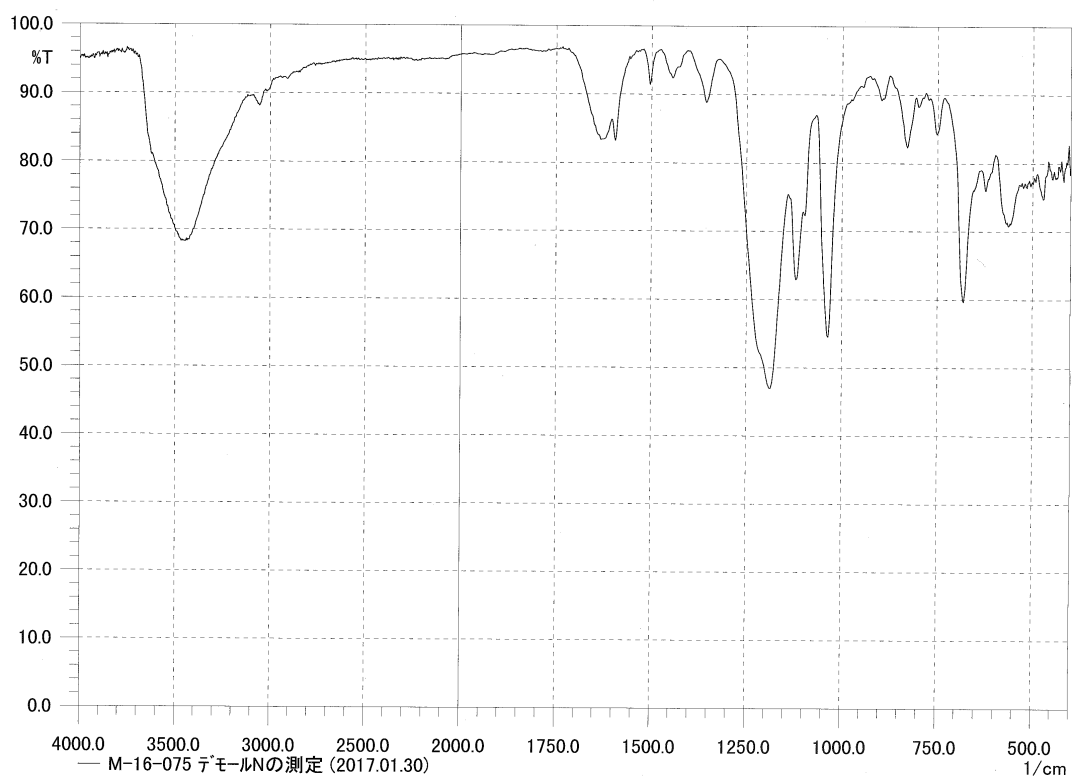
以上の結果から、実験開始前と実験終了後で被験物質の性状に変化がなく、かつ、赤外吸収スペクトルに変化がないことを確認した。

資料 4

実験開始前



実験終了後



資料 5

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)

(2015年4月~2016年3月)

	陰性対照値		陽性対照値	
	(- S9 mix)	(+ S9 mix)	(- S9 mix)	(+ S9 mix)
TA100	121 ± 12* (n=175)	130 ± 14 (n=180)	473 ± 55 (AF-2, 0.01 µg/plate) (n=166)	1113 ± 119 (B[a]P, 5 µg/plate) (n=158)
TA1535	12 ± 3 (n=172)	12 ± 3 (n=177)	560 ± 48 (SA, 0.5 µg/plate) (n=162)	427 ± 76 (2AA, 2 µg/plate) (n=167)
WP2 <i>uvrA</i>	28 ± 6 (n=168)	31 ± 6 (n=174)	130 ± 17 (AF-2, 0.01 µg/plate) (n=159)	583 ± 164 (2AA, 10 µg/plate) (n=164)
TA98	21 ± 4 (n=181)	30 ± 4 (n=186)	504 ± 68 (AF-2, 0.1 µg/plate) (n=170)	402 ± 43 (B[a]P, 5 µg/plate) (n=160)
TA1537	10 ± 3 (n=177)	20 ± 3 (n=181)	580 ± 145 (9AA, 80 µg/plate) (n=167)	180 ± 26 (B[a]P, 5 µg/plate) (n=156)

*, 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