



最 終 報 告 書

ベンジル（ジメチル）（オクタン-1-イル）アンモニウム=クロリド
の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：T-1109

試験期間：2013年3月1日-2013年11月20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 医薬食品局 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	6
2.9	試験担当者	6
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	6
2.11	資料の保存	6
2.12	試験責任者の署名又は記名・なつ印	7
3.	要約	8
4.	緒言	9
5.	被験物質及び被験液の調製	10
5.1	被験物質及び溶媒	10
5.1.1	被験物質	10
5.1.2	溶媒	11
5.1.3	溶媒の選択理由	11
5.2	被験液の調製方法	11
5.2.1	用量設定試験用被験液の調製	11
5.2.2	本試験 1 回日用被験液の調製	11
5.2.3	本試験 2 回日用被験液の調製	11
5.2.4	被験液の保存条件	12
6.	試験材料及び方法	12
6.1	試験菌株 ^{1), 2), 3), 4), 5)}	12
6.1.1	菌株の種類	12
6.1.2	菌株の選択理由	12
6.1.3	菌株の保存及び解凍	12
6.1.4	菌株の特性検査	13
6.2	対照物質 ^{6), 7)}	13
6.2.1	陰性対照物質	13
6.2.2	陽性対照物質	13

6.2.3	調製方法	14
6.3	試薬 ^{5), 6)}	14
6.3.1	S9Mixの調製方法	14
6.3.2	培地	15
6.3.3	ニュートリエントブロスNo.2 培養液	16
6.3.4	0.1 mol/Lリン酸緩衝液 (pH 7.4)	16
6.3.5	トップアガー	16
6.4	試験方法 ^{6), 7)}	17
6.4.1	前培養	17
6.4.2	プレート数	18
6.4.3	試験操作 (プレインキュベーション法)	18
6.5	判定基準 ^{6), 7), 8)}	19
7.	試験結果	19
7.1	用量設定試験の観察結果及び本試験用量の設定	19
7.2	本試験 1 回目の観察結果	19
7.3	本試験 2 回目の観察結果	20
7.4	試験系の成立条件	20
8.	考察	20
9.	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 1 回目)	23
別表 3	試験結果表(本試験 2 回目: -S9Mix)	24
別表 4	試験結果表(本試験 2 回目: +S9Mix)	25
別表 5	比活性値表 (本試験 1 回目)	26
別表 6	比活性値表 (本試験 2 回目)	27

Figures

図 1	用量反応曲線(本試験 2 回目TA100: -S9Mix)	28
図 2	用量反応曲線(本試験 2 回目TA100: +S9Mix)	28
図 3	用量反応曲線(本試験 2 回目TA1535: -S9Mix)	29
図 4	用量反応曲線(本試験 2 回目TA1535: +S9Mix)	29
図 5	用量反応曲線(本試験 2 回目WP2uvrA: -S9Mix)	30
図 6	用量反応曲線(本試験 2 回目WP2uvrA: +S9Mix)	30
図 7	用量反応曲線(本試験 2 回目TA98: -S9Mix)	31
図 8	用量反応曲線(本試験 2 回目TA98: +S9Mix)	31
図 9	用量反応曲線(本試験 2 回目TA1537: -S9Mix)	32

T-1109

図 10	用量反応曲線(本試験 2 回目 TA1537 : +S9Mix)	32
------	--	----

添付資料

Attached Data 1	CERTIFICATE OF ANALYSIS (Stability of Test Article)	33
Attached Data 2	背景データ (130212)	36

信頼性保証書	37
--------------	----

T-1109

2. 試験実施概要

2.1 試験番号

T-1109

2.2 試験表題

ベンジル（ジメチル）（オクタン-1-イル）アンモニウム＝クロリド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、ベンジル（ジメチル）（オクタン-1-イル）アンモニウム＝クロリド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 医薬食品局 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

株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所
〒412-0039 静岡県御殿場市かまど 1284

2.7 試験日程

試験開始日	:	2013年	3月	1日
用量設定試験開始日	:	2013年	3月	12日
用量設定試験終了日	:	2013年	3月	15日
本試験1回目開始日	:	2013年	3月	22日
本試験1回目終了日	:	2013年	3月	25日
本試験2回目開始日	:	2013年	3月	26日
本試験2回目終了日	:	2013年	3月	29日
試験終了日	:	2013年	11月	20日

T-1109

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

被験液の調製

試験操作

コロニーの計数

本試験 1回目

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

本試験 2回目

使用菌株の前培養

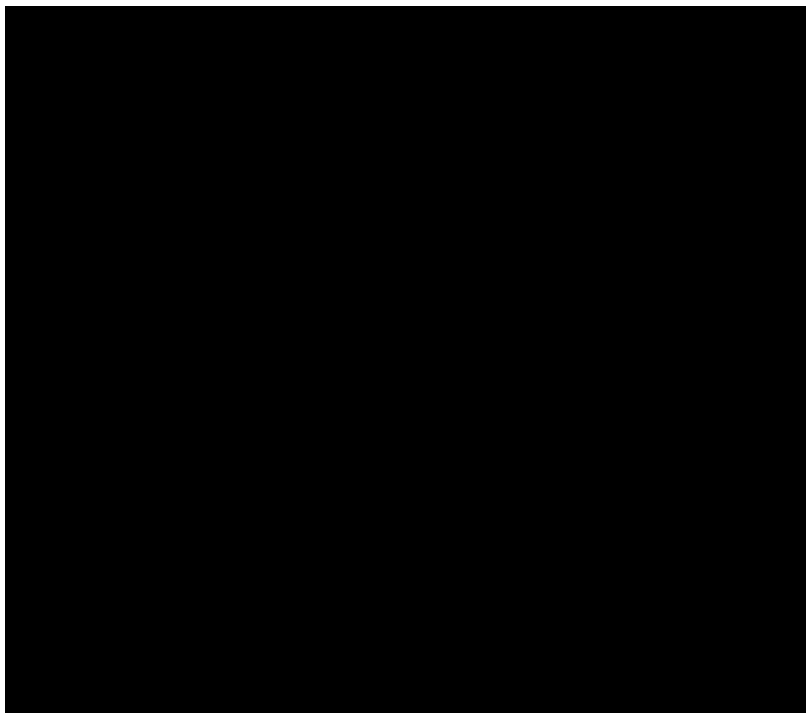
被験液の調製

試験操作

コロニーの計数

被験物質の分析

安定性試験



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


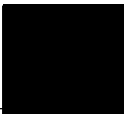
本試験において予見することができなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかつたことはなかつた。

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 医薬食品局 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。

T-1109

2.12 試験責任者の署名又は記名・なつ印

 2013 年 11 月 20 日 
株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所

3. 要約

ベンジル（ジメチル）（オクタン-1-イル）アンモニウム＝クロリド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試験を実施した。なお、被験物質の溶媒には注射用水を用いた。

試験は、19.5~5000 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、生育阻害を示した最低用量を最高用量として、代謝活性化の有無にかかわらずすべての菌株について 9.77~313 µg/ plate の範囲の 6 用量で実施した。なお、本試験は代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1537 を除き同一用量で 2 回実施した。代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1537 については、本試験 2 回目では低用量での復帰変異コロニー数を確認するため用量数を増やした。

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

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、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1537 の 156 µg/plate 以上、代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1537 の 313 µg/plate 以上の用量で認められた。

3) 復帰変異コロニー数

2 回の本試験ともに代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA1537 において、代謝活性化しない場合は 9.77 µg/plate、代謝活性化した場合は 19.5~78.1 µg/plate で陰性対照値の 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加が認められ、再現性を示した。なお、これらは非常に低い用量で認められたため最大となる比活性値は 1.05×10^4 （個/mg）となり、本被験物質の遺伝毒性は非常に強いものと判断された。

以上の試験結果より、本試験条件下においてベンジル（ジメチル）（オクタン-1-イル）アンモニウム＝クロリドは、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。

4. 緒言

本試験は、厚生労働省 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室からの委託により、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

- 「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(OECD：1997年11月26日)
- 「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

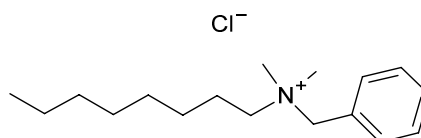
- 「OECD Guidelines for Testing of Chemicals 471」(OECD：1997年7月21日)
- 「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成23年3月31日：薬食発0331第7号厚生労働省医薬食品局長、平成23・03・29製局第5号経済産業省製造産業局長、環境企発第110331009号環境省総合環境政策局長通知)

5. 被験物質及び被験液の調製

5.1 被験物質及び溶媒

5.1.1 被験物質

官報公示整理番号	:	確認中
購入元	:	
製造者	:	
入手日	:	2012年11月6日（御殿場研究所）
Ames 試験用入手日	:	2013年1月25日（東京研究所）
入手量	:	25.00 g（Ames 試験用）
名称	:	ベンジル（ジメチル）（オクタノール）アンモニウムクロリド
英名	:	Benzyl dimethyloctyl ammonium chloride
CAS 番号	:	959-55-7
ロット番号	:	20120927
分子量	:	283.88
構造式	:	



分子式	:	C ₁₇ H ₃₀ ClN
純度	:	95%以上
常温における性状	:	白色粉末
安定性	:	本試験終了後に残余となった被験物質を株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所において分析し、実験期間中の安定性を確認した（Attached Data 1 参照）。
溶解性	:	水；50 mg/ mL で溶解
溶媒中での安定性	:	水；発熱、ガスの発生等の反応性なし
保存条件	:	冷所（冷蔵庫内、1～10℃）・気密・防湿
保存場所	:	東京研究所 被験物質調製保存室 御殿場研究所 被験物質保存室
保存温度	:	期間（2013.1.25～2013.3.27）中の実測温度；3.6～6.0℃
残量の処置	:	実験終了後の残量はすべて株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所へ送付し、安定性確認後の残余物質はすべて廃棄した。

上記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	:	K2D85
規格	:	日本薬局方
保存方法	:	室温保存
保存場所	:	東京研究所 被験物質調製保存室

5.1.3 溶媒の選択理由

溶解性試験を実施した結果、本被験物質は水に 50 mg/mL で溶解し、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。

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、その秤量値 262.4 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、5.248 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、これを公比 4 で順次 4 段階希釈し、50、12.5、3.13、0.781 及び 0.195 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。

5.2.2 本試験 1 回目用被験液の調製

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、その秤量値 41.1 mg に最高調製濃度の 12.5 mg/mL となるように溶媒量を計算し、3.288 mL の注射用水を添加して溶解し、12.5 mg/mL 溶液を調製した。次いで、これを 4 倍希釈して 3.13 mg/mL の被験液を調製した。これをさらに公比 2 で順次 5 段階希釈し 3.13、1.56、0.781、0.391、0.195 及び 0.0977 mg/mL の計 6 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。

5.2.3 本試験 2 回目用被験液の調製

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、その秤量値 45.4 mg に最高調製濃度の 12.5 mg/mL となるように溶媒量を計算し、3.632 mL の注射用水を添加して溶解し、12.5 mg/mL 溶液を調製した。次いで、これを 4 倍希釈して 3.13 mg/mL の被験液を調製した。これをさらに公比 2

T-1109

で順次 8 段階希釈し 3.13、1.56、0.781、0.391、0.195、0.0977、0.0488、0.0244 及び 0.0122 mg/mL の計 9 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。

5.2.4 被験液の保存条件

被験液は用時調製とし、保存はしなかった。

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 STG0588) 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 2013 年 1 月 31 日~2013 年 3 月 26 日 : $-87.4\sim-80.0^{\circ}\text{C}$)。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	2013年1月31日
<i>S. typhimurium</i> TA100	2013年1月31日
<i>S. typhimurium</i> TA1535	2013年1月31日
<i>S. typhimurium</i> TA1537	2013年1月31日
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	2013年2月5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	2013年2月5日~2013年2月8日
<i>S. typhimurium</i> TA100	2013年2月5日~2013年2月8日
<i>S. typhimurium</i> TA1535	2013年2月5日~2013年2月8日
<i>S. typhimurium</i> TA1537	2013年2月5日~2013年2月8日
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	2013年2月5日~2013年2月7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)	WKK3086	99.6%	室温、遮光	和光純薬工業株式会社
Sodium azide (SAZ)	HLP7075	100.2%	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)	KWL1226	95.4%	室温、遮光	和光純薬工業株式会社
Benzo[a]pyrene (B[a]P)	20732	99.8%	冷蔵、遮光	AccuStandard, Inc.

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WER5408）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K2D85）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 S9Mix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 0.45µm : Lot No.1079154) 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	:	キッコーマン株式会社
ロット番号	:	RAA-661
製造日	:	2013年1月25日
購入日	:	2013年2月8日
種・系統	:	ラット・SD系
週齢・性	:	7週齢・雄
体重	:	220-254 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 被験物質調製保存室内超低温フリーザ (三

T-1109

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

： 2013年2月8日~2013年3月27日：-87.3~-80.0°C

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：999203

製造日：2012年10月23日

購入日：2013年2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

： 2013年2月19日~2013年3月27日：1.5~5.8°C

3) S9Mix の組成（1 mL 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：DZLDCQ01

製造日：2012年12月26日

購入日：2013年2月22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.

T-1109

ロット番号 : 1199031-02

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。

名称 : ニュートリエントブロス No.2 (Nutrient Broth No.2)
ロット番号 : 876774
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 : LAF0459
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, 0.6wt% 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 : 1242926、2100388
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 : TLL2157
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 : STG1436
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 : STQ4562
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 : CDG0675
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 を入れた滅菌済み L 字型試験管 (容量 48 mL) に、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 1 回目	本試験 2 回目
<i>S. typhimurium</i> TA100	5.42×10^9	5.32×10^9	5.39×10^9
<i>S. typhimurium</i> TA1535	5.90×10^9	5.73×10^9	6.10×10^9
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	8.79×10^9	8.75×10^9	8.74×10^9
<i>S. typhimurium</i> TA98	6.84×10^9	6.57×10^9	6.72×10^9
<i>S. typhimurium</i> TA1537	4.48×10^9	4.30×10^9	4.50×10^9

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のいずれについても、用量設定試験では各用量につき 2 枚、2 回の本試験では各用量につき 3 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調製した被験液、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 1 回目及び本試験 2 回目では 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、2回の本試験で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、測定結果については、平均値±標準偏差も併せて記載した。

7. 試験結果

用量設定試験の結果を別表 1、本試験 1 回目の結果を別表 2、本試験 2 回目の結果を別表 3、4 に示した。また、比活性値表を別表 5、6 に示した。なお、図 1~10 は別表 3、4 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 4 段階希釈した計 5 用量（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 313 µg/plate 以上の用量で認められた。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なかった。

このため、本試験の試験用量は、生育阻害を示した最低用量を最高用量として、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 313 µg/plate を最高用量として、以下公比 2 で 5 段階希釈した計 6 用量を設定した。

7.2 本試験 1 回目の観察結果

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菌に対する生育阻害を観察した結果、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1537 の 156 µg/plate 以上、代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1537 の 313 µg/plate の用量で認められた。

本被験物質処理による復帰変異コロニー数は、*S. typhimurium* TA1537 において代謝活性化しない場合では 9.77 µg/plate、代謝活性化した場合では 19.5 µg/plate で最大となる陰性対照値の 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加が認められた。このため、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1537 については低用量での復帰変異

コロニー数を確認するため、本試験 2 回目での用量数を 9 用量とした。その他の菌株及び代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA1537 については同一用量で本試験 2 回目を実施した。

7.3 本試験 2 回目の観察結果

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菌に対する生育阻害を観察した結果、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1537 の 156 µg/plate 以上、代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1537 の 313 µg/plate の用量で認められた。

本被験物質処理による復帰変異コロニー数は、*S. typhimurium* TA1537 において代謝活性化しない場合では 9.77 µg/plate、代謝活性化した場合では 19.5 µg/plate で最大となる陰性対照値の 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加が認められた。

7.4 試験系の成立条件

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 2) 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

2 回の本試験ともに代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA1537 において、代謝活性化しない場合は 9.77 µg/plate、代謝活性化した場合は 19.5~78.1 µg/plate で陰性対照値の 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加が認められ、再現性を示した。なお、これらは非常に低い用量で認められたため最大となる比活性値は 1.05×10^4 (個/mg) となり、本被験物質の遺伝毒性は非常に強いものと判断された。その他の菌株においては陰性対照値の 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。

本被験物質は第 4 級アンモニウム塩型に属するカチオン界面活性剤であり、水に溶けたときに疎水基のついている部分がプラスイオンに電離することから、試験系で添加された他の成分の影響により低用量域の狭い範囲で構造的な変化が起こった可能性が考えられる。

なお、同時に実施しているほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験では陰性と報告された⁹⁾。

また、類縁化合物としてトリメチルベンジルアンモニウム＝クロリドでは、抹消血を用いた小核試験 (体細胞 *in vivo* 変異原性試験) で陽性 (NTB DB (1993)) の結果

があるが反応は極めて軽微であり、エームス試験では陰性(厚労省報告(Access on May, 2010)、NTB DB (1984))、CHL細胞を用いた染色体異常試験では擬陽性(厚労省報告(Access on May, 2010))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。

以上の試験結果より、本試験条件下においてベンジル(ジメチル)(オクタン-1-イル)アンモニウム=クロリドは、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。

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) 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・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.
- 9) (2013): ベンジル(ジメチル)(オクタン-1-イル)アンモニウム=クロリドのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験(試験番号:T-G057)、株式会社ボゾリサーチセンター

(別表1)

試験結果表(用量設定試験)

被験物質の名称: ベンジル(ジメチル)(オクタン-1-イル)アンモニウムクロリド

No. T-1109

試験実施期間		2013年3月12日 より 2013年3月15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)	109 90 (100)	9 10 (10)	22 20 (21)	13 20 (17)	7 11 (9)
	19.5	96 111 (104)	10 8 (9)	21 20 (21)	12 13 (13)	12 15 (14)
	78.1	99 93 (96)	7 10 (9)	26 21 (24)	17 15 (16)	10 15 (13)
	313	80 * 59 * (70)	5 * 5 * (5)	15 * 18 * (17)	11 * 10 * (11)	5 * 3 * (4)
	1250	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
	5000	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
	S9Mix (+)	陰性対照 (注射用水)	108 103 (106)	8 10 (9)	29 29 (29)	22 21 (22)
19.5		120 127 (124)	5 7 (6)	31 24 (28)	22 30 (26)	16 22 (19)
78.1		129 120 (125)	6 5 (6)	25 24 (25)	23 21 (22)	19 17 (18)
313		107 * 118 * (113)	7 * 7 * (7)	19 * 15 * (17)	25 * 32 * (29)	6 * 7 * (7)
1250		51 * 35 * (43)	0 * 0 * (0)	5 * 6 * (6)	7 * 10 * (9)	1 * 3 * (2)
5000		0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
陽性対照		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	619 618 (619)	329 313 (321)	89 101 (95)	406 388 (397)	1278 1289 (1284)
	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	958 1030 (994)	342 318 (330)	1050 1053 (1052)	381 410 (396)	102 136 (119)

(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

* : 被験物質による生育阻害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。

(別表2)

試験結果表 (本試験1回目)

被験物質の名称: ベンジル (ジメチル) (オクタン-1-イル) アンモニウム=クロリド No. T-1109

試験実施期間		2013年3月22日 より 2013年3月25日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (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	TA98	TA1537	
S9Mix (-)	陰性対照 (注射用水)	131 115 125 (124 ± 8.1)	10 10 7 (9 ± 1.7)	27 35 29 (30 ± 4.2)	26 26 19 (24 ± 4.0)	9 4 5 (6 ± 2.6)	
	9.77	96 117 84 (99 ± 16.7)	12 11 10 (11 ± 1.0)	34 24 25 (28 ± 5.5)	25 28 26 (26 ± 1.5)	113 111 104 (109 ± 4.7)	
	19.5	105 129 100 (111 ± 15.5)	11 10 13 (11 ± 1.5)	28 36 30 (31 ± 4.2)	23 22 19 (21 ± 2.1)	31 25 16 (24 ± 7.5)	
	39.1	117 117 129 (121 ± 6.9)	10 8 11 (10 ± 1.5)	25 22 31 (26 ± 4.6)	23 20 18 (20 ± 2.5)	7 10 14 (10 ± 3.5)	
	78.1	114 112 114 (113 ± 1.2)	9 10 8 (9 ± 1.0)	34 24 33 (30 ± 5.5)	20 16 21 (19 ± 2.6)	7 11 11 (10 ± 2.3)	
	156	103 113 126 (114 ± 11.5)	10 8 11 (10 ± 1.5)	38 28 33 (33 ± 5.0)	21 15 12 (16 ± 4.6)	7 10 7 (8 ± 1.7)	
	313	78 * 73 * 71 * (74 ± 3.6)	5 * 5 * 6 * (5 ± 0.6)	20 * 30 * 27 * (26 ± 5.1)	13 * 10 * 11 * (11 ± 1.5)	8 * 6 * 8 * (7 ± 1.2)	
	S9Mix (+)	陰性対照 (注射用水)	120 116 128 (121 ± 6.1)	13 16 17 (15 ± 2.1)	24 25 39 (29 ± 8.4)	44 36 36 (39 ± 4.6)	14 10 7 (10 ± 3.5)
		9.77	128 105 112 (115 ± 11.8)	16 16 7 (13 ± 5.2)	27 28 22 (26 ± 3.2)	30 28 25 (28 ± 2.5)	8 11 8 (9 ± 1.7)
		19.5	121 135 140 (132 ± 9.8)	11 11 13 (12 ± 1.2)	28 33 37 (33 ± 4.5)	30 32 35 (32 ± 2.5)	54 39 38 (44 ± 9.0)
		39.1	131 154 123 (136 ± 16.1)	14 10 16 (13 ± 3.1)	30 36 27 (31 ± 4.6)	41 32 40 (38 ± 4.9)	44 42 44 (43 ± 1.2)
		78.1	149 123 128 (133 ± 13.8)	13 11 7 (10 ± 3.1)	28 37 39 (35 ± 5.9)	34 34 36 (35 ± 1.2)	32 18 24 (25 ± 7.0)
156		113 * 140 * 127 * (127 ± 13.5)	8 * 7 * 10 * (8 ± 1.5)	24 24 18 (22 ± 3.5)	25 34 38 (32 ± 6.7)	21 * 13 * 11 * (15 ± 5.3)	
313		114 * 126 * 132 * (124 ± 9.2)	8 * 6 * 8 * (7 ± 1.2)	28 * 18 * 31 * (26 ± 6.8)	30 * 30 * 29 * (30 ± 0.6)	13 * 12 * 16 * (14 ± 2.1)	
陽性対照		名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191
		用量 (μg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
		コロニ数/プレート	595 525 581 (567 ± 37.0)	336 339 356 (344 ± 10.8)	101 91 94 (95 ± 5.1)	484 443 497 (475 ± 28.2)	1465 1326 1326 (1372 ± 80.3)
		名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
		用量 (μg/プレート)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
	コロニ数/プレート	804 999 901 (901 ± 97.5)	351 395 365 (370 ± 22.5)	841 811 793 (815 ± 24.2)	336 368 322 (342 ± 23.6)	101 103 103 (102 ± 1.2)	

(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

*: 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。
()内は、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

(別表3)

試験結果表 (本試験2回目:-S9Mix)

被験物質の名称: ベンジル (ジメチル) (オクタン-1-イル) アンモニウムニクロリド

No. T-1109

試験実施期間		2013年3月26日 より 2013年3月29日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (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	TA98	TA1537	
S9Mix (-)	陰性対照 (注射用水)	103 124 113 (113 ± 10.5)	10 7 10 (9 ± 1.7)	20 21 22 (21 ± 1.0)	13 12 11 (12 ± 1.0)	8 9 6 (8 ± 1.5)	
	1.22	NT	NT	NT	NT	4 5 5 (5 ± 0.6)	
	2.44	NT	NT	NT	NT	5 7 6 (6 ± 1.0)	
	4.88	NT	NT	NT	NT	4 5 4 (4 ± 0.6)	
	9.77	128 104 110 (114 ± 12.5)	10 11 10 (10 ± 0.6)	21 19 18 (19 ± 1.5)	10 11 10 (10 ± 0.6)	99 103 123 (108 ± 12.9)	
	19.5	118 132 117 (122 ± 8.4)	5 5 5 (5 ± 0.0)	25 20 21 (22 ± 2.6)	10 12 10 (11 ± 1.2)	16 11 11 (13 ± 2.9)	
	39.1	102 117 142 (120 ± 20.2)	8 8 5 (7 ± 1.7)	20 21 20 (20 ± 0.6)	10 10 18 (13 ± 4.6)	7 6 6 (6 ± 0.6)	
	78.1	106 102 100 (103 ± 3.1)	7 10 8 (8 ± 1.5)	23 20 22 (22 ± 1.5)	10 14 10 (11 ± 2.3)	5 8 5 (6 ± 1.7)	
	156	123 128 113 (121 ± 7.6)	6 6 8 (7 ± 1.2)	20 24 20 (21 ± 2.3)	14 19 14 (16 ± 2.9)	5 9 5 (6 ± 2.3)	
	313	76 * 83 * 73 * (77 ± 5.1)	5 * 8 * 5 * (6 ± 1.7)	22 * 21 * 21 * (21 ± 0.6)	7 * 10 * 6 * (8 ± 2.1)	4 * 5 * 3 * (4 ± 1.0)	
	陽性対照	S9Mixを必要としな いもの	667 609 678 (651 ± 37.1)	339 375 404 (373 ± 32.6)	105 112 97 (105 ± 7.5)	389 314 387 (363 ± 42.7)	2565 2435 2264 (2421 ± 151.0)
		名 称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191
		用量 (μg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	コロニー数/プレート	667 609 678 (651 ± 37.1)	339 375 404 (373 ± 32.6)	105 112 97 (105 ± 7.5)	389 314 387 (363 ± 42.7)	2565 2435 2264 (2421 ± 151.0)	

(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

*: 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。
 NT: 試験せず。
 ()内は、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

(別表4)

試験結果表 (本試験2回目:+S9Mix)

被験物質の名称: ベンジル (ジメチル) (オクタン-1-イル) アンモニウムニクロリド

No. T-1109

試験実施期間		2013年3月26日 より 2013年3月29日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (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	TA98	TA1537	
S9Mix (+)	陰性対照 (注射用水)	111 134 130 (125 ± 12.3)	13 10 7 (10 ± 3.0)	24 23 23 (23 ± 0.6)	27 19 22 (23 ± 4.0)	6 7 10 (8 ± 2.1)	
	9.77	143 128 132 (134 ± 7.8)	10 7 5 (7 ± 2.5)	22 19 19 (20 ± 1.7)	21 18 24 (21 ± 3.0)	7 9 5 (7 ± 2.0)	
	19.5	122 119 136 (126 ± 9.1)	11 5 6 (7 ± 3.2)	20 19 28 (22 ± 4.9)	24 21 26 (24 ± 2.5)	51 68 53 (57 ± 9.3)	
	39.1	133 125 131 (130 ± 4.2)	9 9 11 (10 ± 1.2)	22 22 20 (21 ± 1.2)	20 17 22 (20 ± 2.5)	44 31 34 (36 ± 6.8)	
	78.1	106 125 134 (122 ± 14.3)	6 7 9 (7 ± 1.5)	27 33 25 (28 ± 4.2)	24 38 28 (30 ± 7.2)	23 31 30 (28 ± 4.4)	
	156	120 * 118 * 130 * (123 ± 6.4)	8 * 11 * 7 * (9 ± 2.1)	25 23 31 (26 ± 4.2)	21 20 22 (21 ± 1.0)	15 * 18 * 19 * (17 ± 2.1)	
	313	125 * 116 * 117 * (119 ± 4.9)	4 * 6 * 7 * (6 ± 1.5)	25 * 16 * 21 * (21 ± 4.5)	24 * 24 * 22 * (23 ± 1.2)	10 * 6 * 13 * (10 ± 3.5)	
		名 称	B[<i>a</i>]P	2AA	2AA	B[<i>a</i>]P	B[<i>a</i>]P
		用量 (μg/プレート)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
		コロニー数/プレート	1016 923 1017 (985 ± 54.0)	371 361 358 (363 ± 6.8)	883 952 880 (905 ± 40.7)	361 365 373 (366 ± 6.1)	124 99 94 (106 ± 16.1)

(備考)

B[*a*]P : ベンゾ[*a*]ピレン
2AA : 2-アミノアントラセン

*: 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。
()内は、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

(別表5)

比 活 性 値 表 (本試験1回目)

被験物質の名称：ベンジル（ジメチル）（オクタン-1-イル）アンモニウム=クロリド

No. T-1109

試験実施期間		2013年3月22日 より 2013年3月25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	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9Mix (-)	9.77					1.05×10^4
	19.5					9.23×10^2
	39.1					
	78.1					
	156					
	313					
S9Mix (+)	9.77					
	19.5					1.74×10^3
	39.1					8.44×10^2
	78.1					1.92×10^2
	156					
	313					

(備考)

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用量のみ記載した。

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-1109

(別表6)

比 活 性 値 表 (本試験2回目)

被験物質の名称 : ベンジル (ジメチル) (オクタン-1-イル) アンモニウム=クロリド

No. T-1109

試験実施期間		2013年3月26日 より 2013年3月29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 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9Mix (-)	1.22					
	2.44					
	4.88					
	9.77					1.02×10^4
	19.5					
	39.1					
	78.1					
	156					
	313					
S9Mix (+)	9.77					
	19.5					2.51×10^3
	39.1					7.16×10^2
	78.1					2.56×10^2
	156					5.77×10^1
	313					

(備考)

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用量のみ記載した。

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

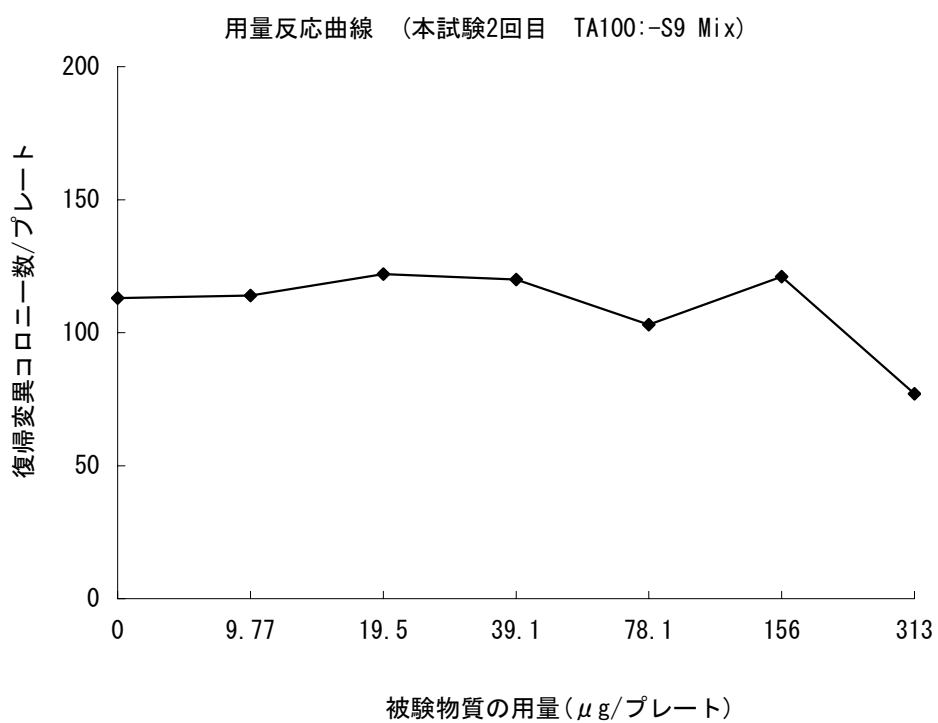


図 2

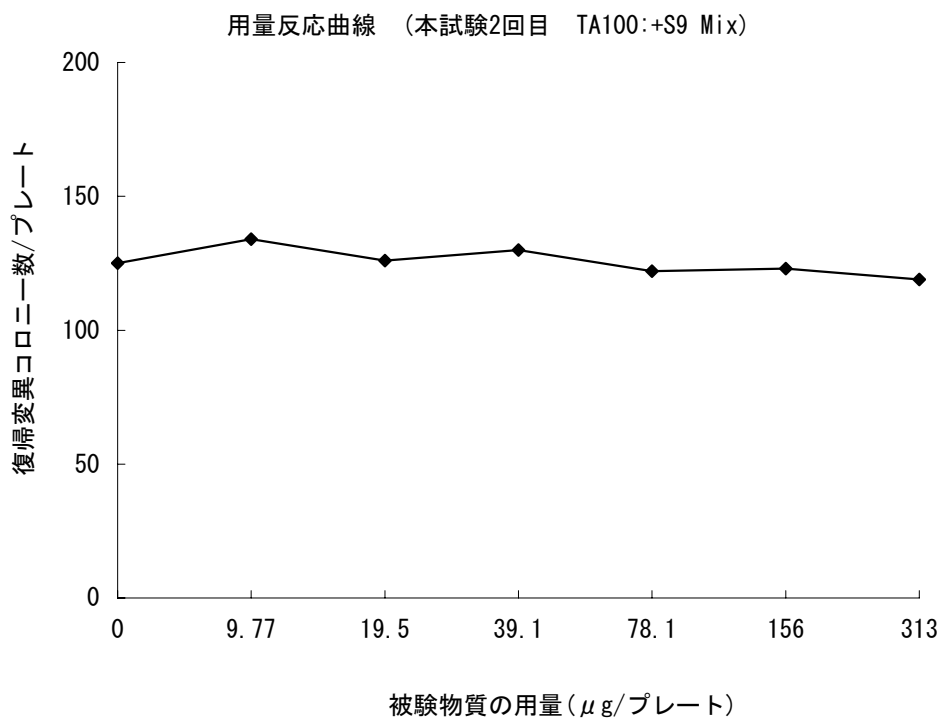


図 3

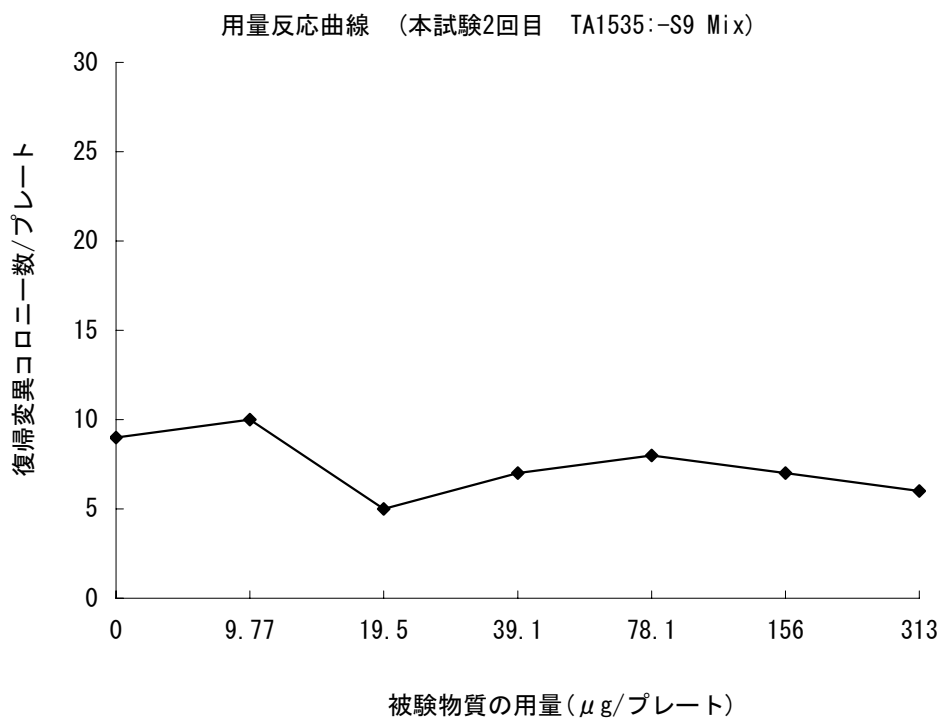


図 4

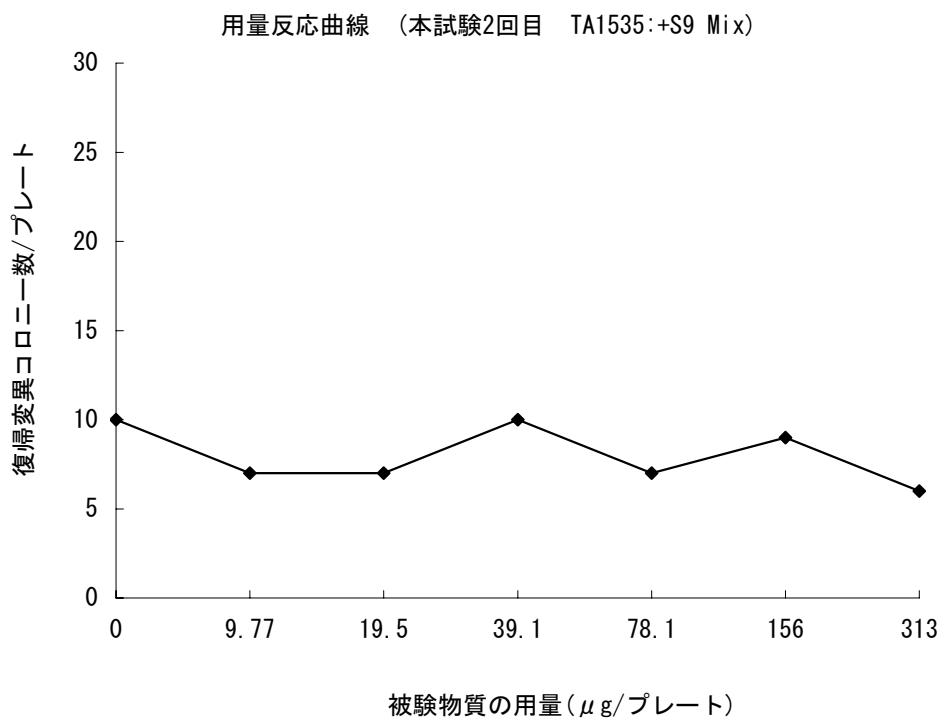


図 5

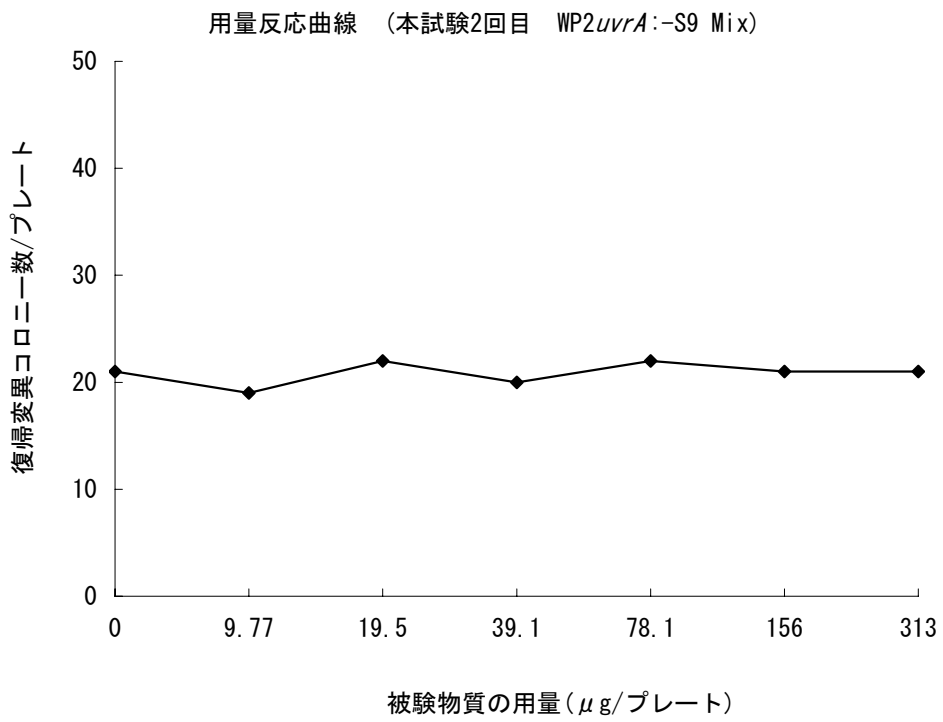


図 6

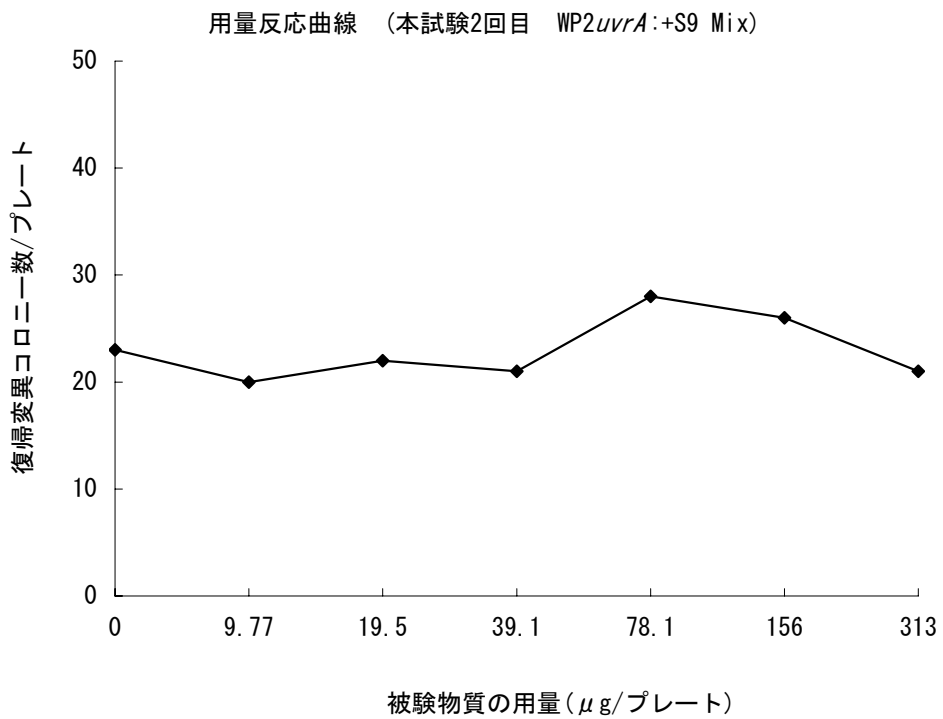


図 7

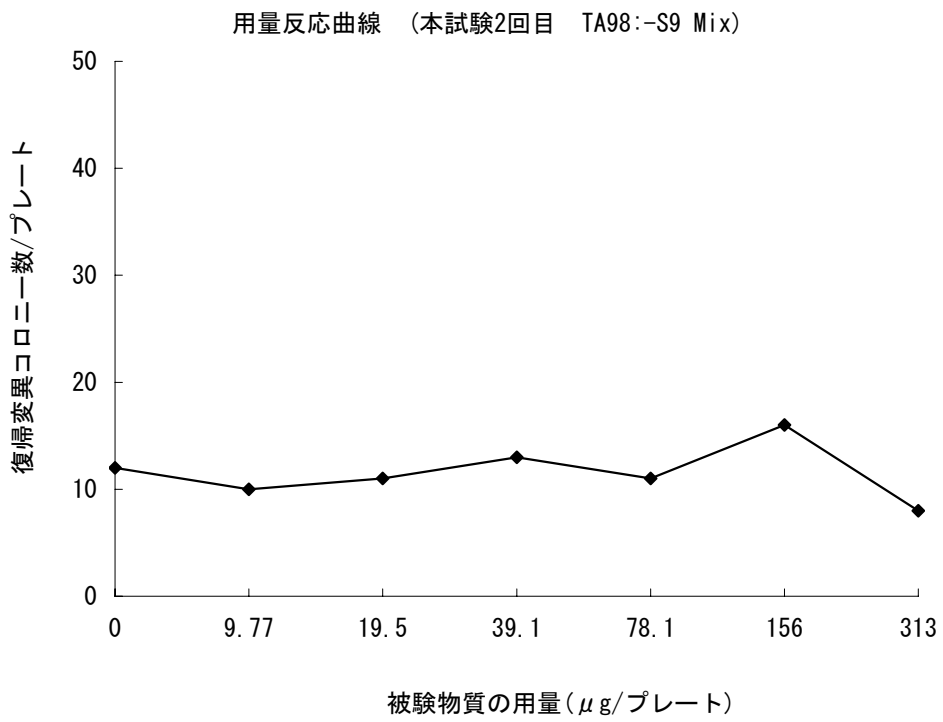


図 8

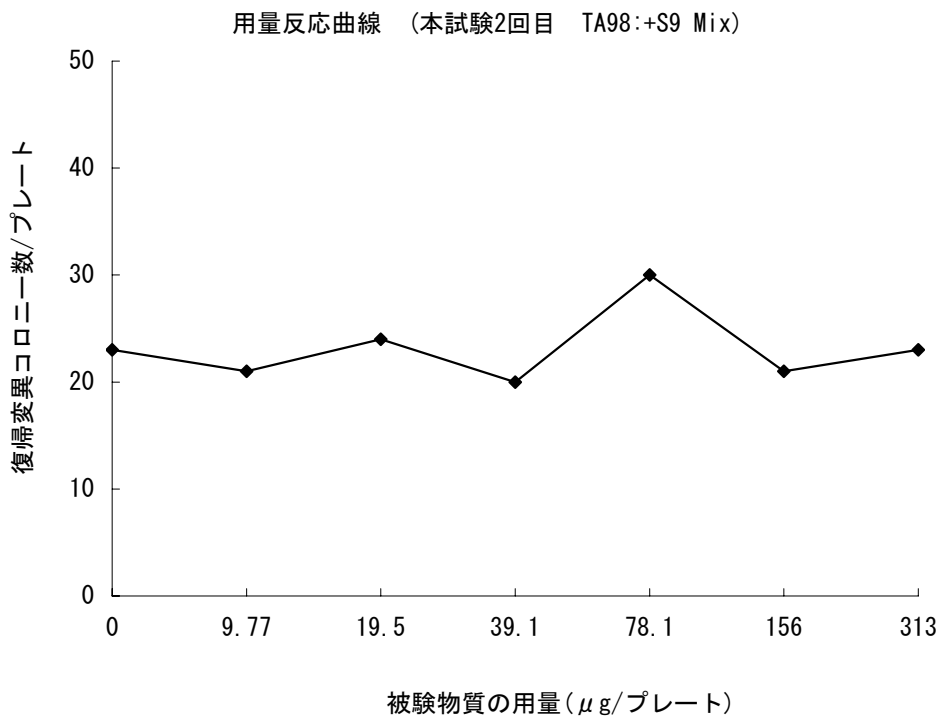


図 9

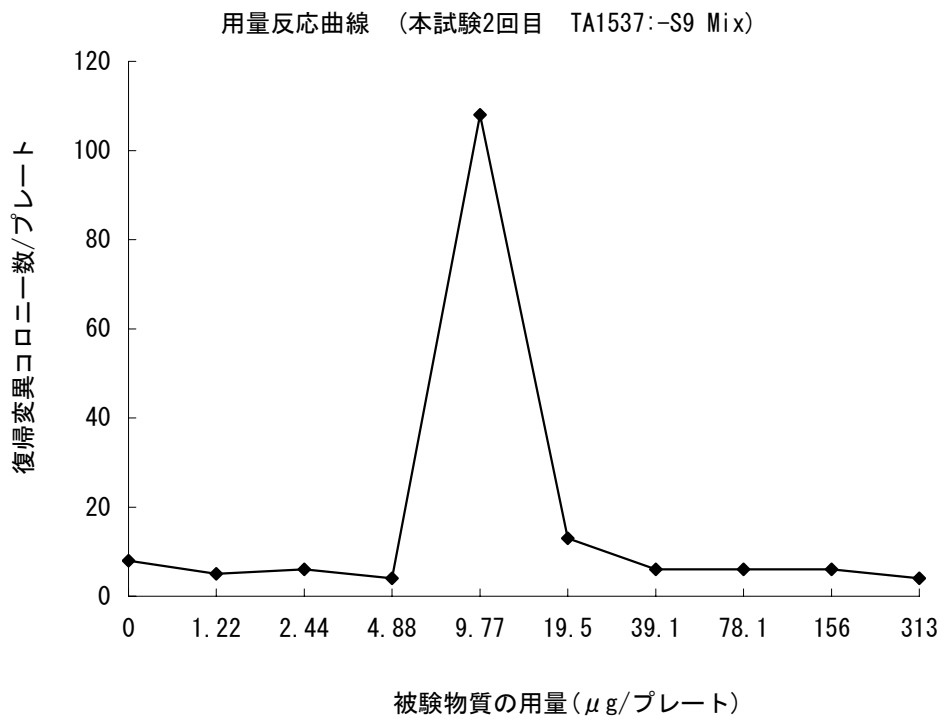
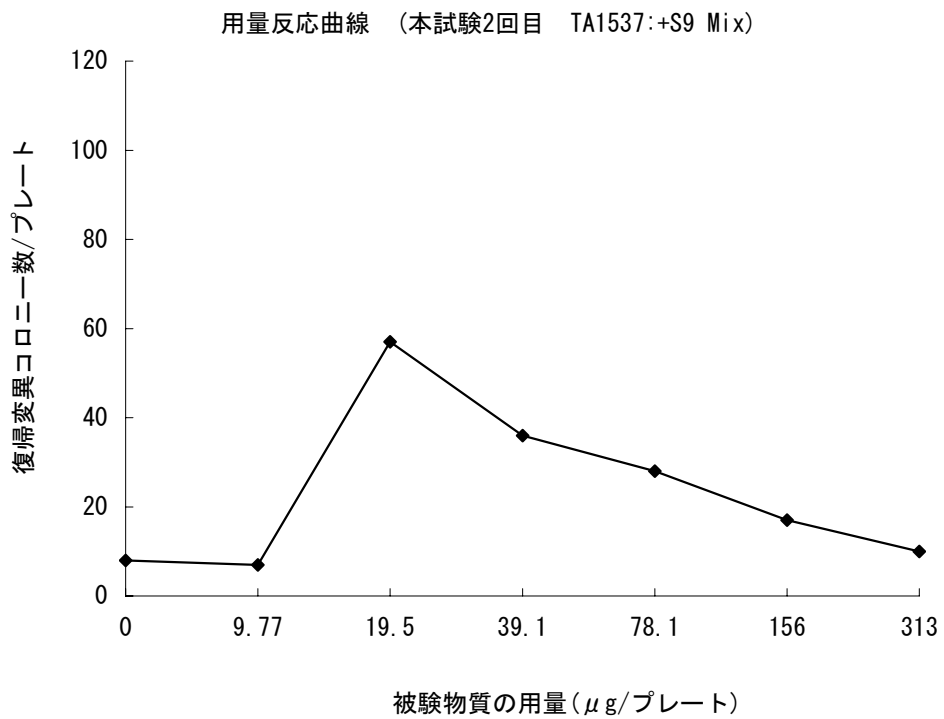
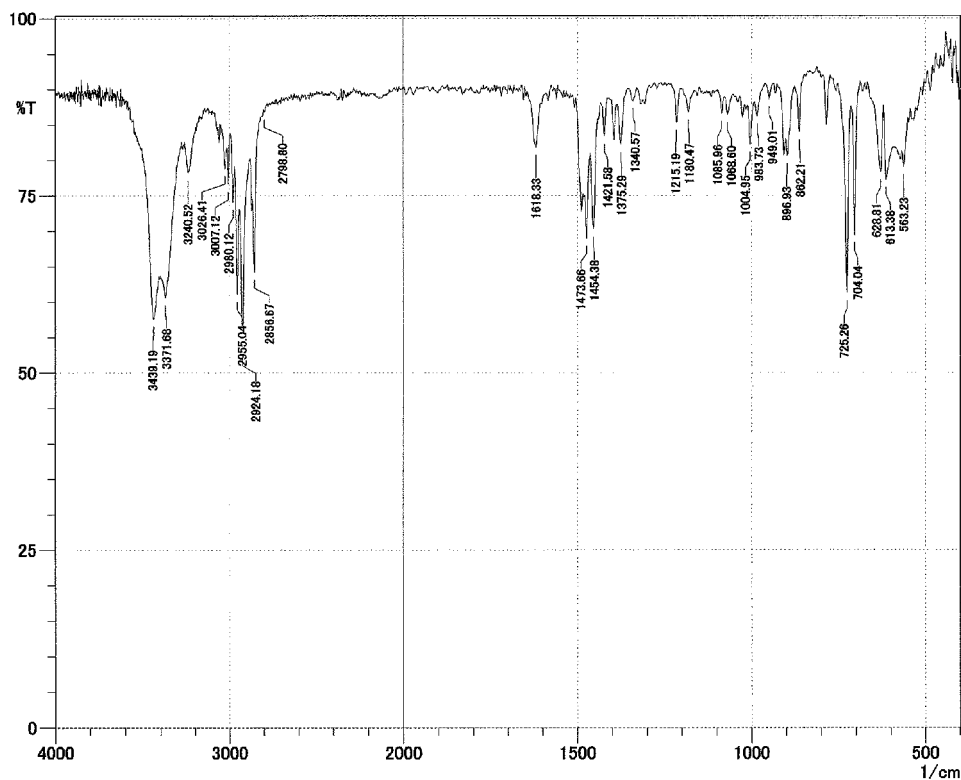


図 10



CERTIFICATE OF ANALYSIS
[Characteristic of Benzyl(dimethyl)(octan-1-yl)ammonium chloride]

Stage: Characteristic of test article
Date of Analysis: December 7, 2012
Test Article: Benzyl(dimethyl)(octan-1-yl)ammonium chloride
(Lot number: 20120927)
Test Item: Infrared spectrophotometry (KBr pellet method)
Result: The IR spectra are shown below.



Regulation: "Regulations of Testing Facilities for Studies on New Chemical Substances etc.", March 31, 2011, YakuShokuHatsu 0331 No. 8, Heisei 23-03-29 SeiKyoku No. 6, KanHoKiHatsu No. 110331010

(Sealed in the original)

December 19, 2012

Study director

Date

Gotemba Laboratory, Bozo Research Center Inc.

CERTIFICATE OF ANALYSIS
[Stability of Benzyl(dimethyl)(octan-1-yl)ammonium chloride]

Stage: Stability

Date of analysis: June 12, 2013
December 7, 2012 [reference spectrum (A-2513)]

Test article: Benzyl(dimethyl)(octan-1-yl)ammonium chloride
(Lot number: 20120927)

Test item: Infrared spectrophotometry (KBr pellet method)

Acceptance criteria: Obtain the spectrum similar to the reference spectrum
(A-2513).

Results: The spectrum similar to the reference spectrum
(A-2513) was obtained. In addition, the infrared
absorption spectra are described separately.

Judgment: Passed

Regulation:

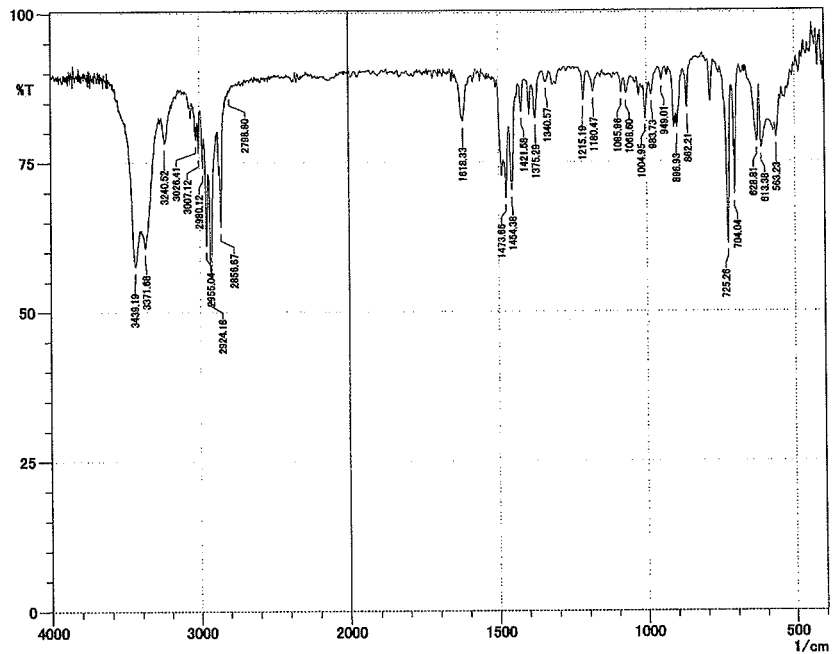
“Regulations of Testing Facilities for Studies on New Chemical Substances etc.”,
March 31, 2011, YakuShokuHatsu 0331 No. 8, Heisei 23-03-29 SeiKyoku No. 6,
KanHoKiHatsu No. 110331010



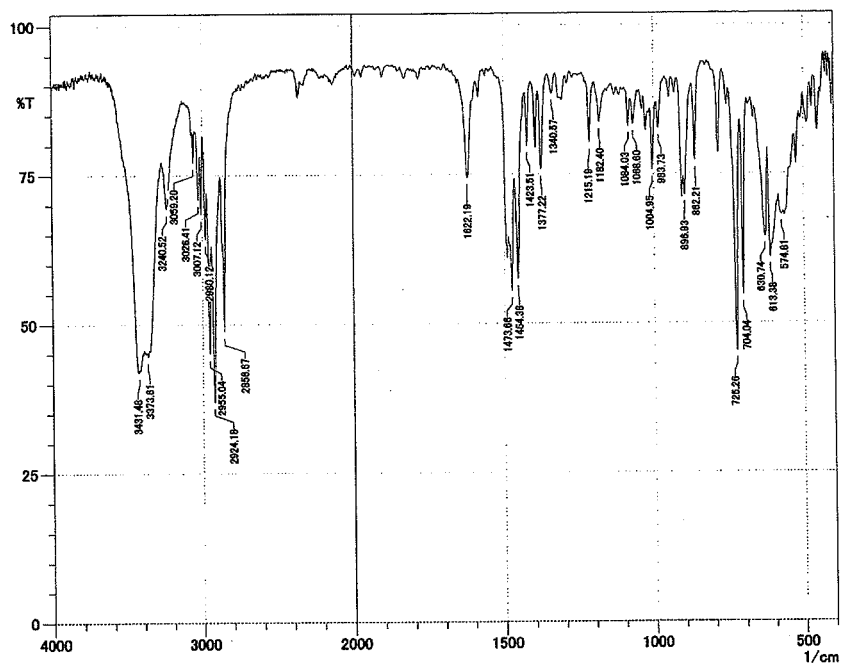
Person responsible for analysis
Gotemba Laboratory, Bozo Research Center Inc.

June 18, 2013
Date

Results:



[reference spectrum (A-2513)]



(Stability)

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

CODE No. :130212

Period : From October 18, 2012 to February 4, 2013

(Pre-incubation Method)

Tester Strains	S9 Mix (-) or (+)	Classification	Mean	S.D.	Management ranges		Number of plates
					Lower limit	Upper limit	
TA100	-	Solvent control	105	12.8	74	137	246
		Positive control AF-2(0.01µg/plate)	645	56.9	471	819	246
	+	Solvent control	118	13.9	83	153	246
		Positive control B[a]P(5.0µg/plate)	888	90	622	1155	246
TA1535	-	Solvent control	9	2.61	2	16	246
		Positive control SAZ(0.5µg/plate)	333	62.4	183	483	246
	+	Solvent control	10	2.47	2	17	246
		Positive control 2AA(2.0µg/plate)	397	63.4	218	576	246
WP2uvrA	-	Solvent control	34	6.23	16	53	246
		Positive control AF-2(0.01µg/plate)	127	11.9	89	165	246
	+	Solvent control	35	6.87	14	56	246
		Positive control 2AA(10.0µg/plate)	822	90	575	1068	246
TA98	-	Solvent control	17	3.79	7	27	246
		Positive control AF-2(0.1µg/plate)	422	49.8	295	548	246
	+	Solvent control	29	5.95	12	46	246
		Positive control B[a]P(5.0µg/plate)	314	35.4	219	408	246
TA1537	-	Solvent control	8	2.34	2	14	246
		Positive control AF-2(0.1µg/plate)	1664	332	666	2663	246
	+	Solvent control	9	2.80	1	17	246
		Positive control B[a]P(5.0µg/plate)	87	13.7	48	127	246

(Notice)

Solvent controls Water, Dimethylsulfoxide(DMSO) or 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

S9Mix (-) : without metabolic activation

(+) : with metabolic activation

信頼性保証書（1/2）

試験番号 : T-1109

試験表題 : ベンジル（ジメチル）（オクタン-1-イル）アンモニウムクロリド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。

- 「OECD Principles of Good Laboratory Practice」（OECD：1997年11月26日）
- 「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。

2013年11月20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		2013年 3月 1日	2013年 3月 1日
調製・保存（被験物質）、 被験物質の処理		2013年 3月 23日	2013年 3月 25日
計数		2013年 3月 25日	2013年 3月 25日
被験物質の安定性		2013年 6月 12日	2013年 6月 12日
生データ		2013年 6月 25日	2013年 6月 25日
最終報告書草案・図・表		2013年 6月 25日	2013年 6月 25日
改善確認		2013年 6月 28日	2013年 6月 28日

信頼性保証書 (2/2)

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
生データ（被験物質関係、 被験物質の安定性確認）	[REDACTED]	2013年11月20日	2013年11月20日
改善確認		2013年11月20日	2013年11月20日
最終報告書		2013年11月20日	2013年11月20日

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	[REDACTED]	2013年2月6日	
		2013年2月8日	
		2013年2月12日	2013年2月12日
改善確認		2013年2月18日	2013年2月18日
陽性対照物質の管理		2012年12月5日	2012年12月5日
		2013年1月7日	2013年1月8日
		2013年1月17日	2013年1月17日
		2013年1月28日	2013年1月28日
		2013年3月7日	2013年3月7日

試験責任者陳述書

試験番号 : T-1109

試験標題 : ベンジル (ジメチル) (オクタン-1-イル) アンモニウム=クロリド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、環保企発第 110331010 号環境省総合環境政策局長通知) 及び「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(OECD : 1997 年 11 月 26 日) 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、環保企発第 110331009 号環境省総合環境政策局長通知) 及び「OECD Guidelines for Testing of Chemicals 471」(OECD : 1997 年 7 月 21 日) に準拠して実施されたものに相違ありません。

2013 年 11 月 20 日
株式会社ボゾリサーチセンター
試験責任者 