T-1296

原本

最　終　報　告　書

乳酸エチルの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：T-1296

試験期間：2013 年 10 月 10 日-2014 年 3 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

Tables

Figures

添付資料

2. 試験実施概要

2.1 試験番号

T-1296

2.2 試験表題

乳酸エチル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、乳酸エチ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。

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 10 月 10 日
用量設定試験開始日	:	2013 年 10 月 28 日
用量設定試験終了日	:	2013 年 10 月 31 日
本試験 1 回目開始日	:	2013 年 11 月 11 日
本試験 1 回目終了日	:	2013 年 11 月 14 日
本試験 2 回目開始日	:	2013 年 11 月 27 日
本試験 2 回目終了日	:	2013 年 11 月 30 日
試験終了日	:	2014 年 3 月 20 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

[redacted]

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　:

[redacted]

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

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。

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。

2.12　試験責任者の署名又は記名・なつ印

[redacted]　2014 年 3 月 20 日　[redacted]

株式会社ボゾリサーチセンター　東京研究所

3. 要約

乳酸エチ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、生育阻害の認められた最低用量を最高用量として、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1537 においては 156~5000 μg/plate の範囲の 6 用量で実施した。代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化する場合のすべての菌株においては生育阻害が認められなかったため 313~5000 μg/plate の範囲の 5 用量で実施した。なお、本試験は同一用量で 2 回実施した。

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、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1537 の 5000 μg/ plate 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、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乳酸エチルは、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、環保企発第110331010号環境省総合環境政策局長通知）

2) ガイドライン

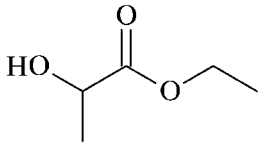
- 「OECD Guidelines for Testing of Chemicals 471」(OECD：1997年7月21日)
- 「新規化学物質等に係る試験の方法について」（平成23年3月31日：薬食発0331第7号厚生労働省医薬食品局長、平成23・03・29製局第5号経済産業省製造産業局長、環保企発第110331009号環境省総合環境政策局長通知）

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

購入元	:	理科研株式会社
製造者	:	Sigma-Aldrich Co. LLC.
入手量	:	20.6392 g
入手年月日	:	2013 年 7 月 2 日
名称	:	乳酸エチル
英名	:	Ethyl lactate
ロット番号	:	MKBJ 4932V
CAS 番号	:	97-64-3
構造式	:	



分子式	:	$C_5H_{10}O_3$
分子量	:	118.13
純度	:	≧98.0%
融点	:	−25°C *
沸点	:	154°C *
蒸気圧	:	3.75 mmHg（25°C）*
分配係数	:	−0.18 *
密度	:	1.042 g/cm^3 *
ヘンリー定数	:	5.83×10^{-7} atm m^3/mol（25°C）*
引火点	:	46.1°C *
発火点	:	400°C *
常温における性状	:	無色液体
安定性	:	適切な条件下においては安定。なお、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；1000000 mg/L *
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°C）・密栓
保存場所	:	東京研究所　被験物質保存室

		御殿場研究所　生化学室
保存温度	:	保存期間中の実測温度(2013.7.2~2013.12.9;2.7~8°C)
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。

上記被験物質情報は、製造者からの情報及び*：独立行政法人製品評価技術基盤機構化学物質総合情報システム（CHRIP）の情報による。なお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。

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	:	K2L79
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

水について溶解性試験を実施した結果、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 0.200 mL 分取し、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 208.3 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、この溶媒量から分取した際の液量 0.200 mL を差し引いた、3.966 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 0.350 mL 分取し、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 397.7 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、この溶媒量から分取した際の液量 0.350 mL を差し引いた、7.604 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。これを公比 2 で順次 5 段階希釈し 50、25、1.25、6.25、3.13 及び 1.56 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 0.350 mL 分取し、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 362.1 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、この溶媒量から分取した際の液量 0.350 mL を差し引いた、6.892 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。これを公比 2 で順次 5 段階希釈し 50、25、1.25、6.25、3.13 及び 1.56 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。

5.2.4 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 に対してジメチルスルホキシド（以下 DMSO と略す。和光純薬工業株式会社、JIS 規格試薬特級、ロット番号 PDR5321）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 8 月 1 日~2013 年 11 月 27 日：−88.1~−70.6°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
S. typhimurium TA98	2013 年8 月　1 日
S. typhimurium TA100	2013 年8 月　1 日
S. typhimurium TA1535	2013 年8 月　1 日
S. typhimurium TA1537	2013 年8 月　1 日
E. coli WP2 *uvrA*	2013 年8 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
S. typhimurium TA98	2013 年8 月 1 日~2013 年 8 月 5 日
S. typhimurium TA100	2013 年8 月 1 日~2013 年 8 月 5 日
S. typhimurium TA1535	2013 年8 月 1 日~2013 年 8 月 5 日
S. typhimurium TA1537	2013 年8 月 1 日~2013 年 8 月 5 日
E. coli WP2 *uvrA*	2013 年8 月 1 日~2013 年 8 月 8 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）	23224	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、PDR5321）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°C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)
S. typhimurium TA100	AF-2	0.1 （ 0.01）	B[*a*]P	50 （ 5.0）
S. typhimurium TA1535	SAZ	5 （ 0.5 ）	2AA	20 （ 2.0）
E. coli WP2 *uvrA*	AF-2	0.1 （ 0.01）	2AA	100 （ 10.0）
S. typhimurium TA98	AF-2	1 （ 0.1 ）	B[*a*]P	50 （ 5.0）
S. typhimurium 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 0.45 μm：Lot No.1097255、1100158）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	:	RAA20130802（用量設定試験及び本試験 1 回目に使用） RAA20130926（本試験 2 回目に使用）
製造日	:	2013 年8 月 2 日 （RAA20130802） 2013 年9 月26 日 （RAA20130926）
購入日	:	2013 年8 月28 日 （RAA20130802） 2013 年10 月23 日（RAA20130926）
種・系統	:	ラット・SD 系
週齢・性	:	7 週齢・雄
体重	:	189–237 g（RAA20130802） 187–230 g（RAA20130926）
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	:	2013 年 8 月 28 日~2013 年 11 月 28 日:−88.1~−70.6°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	:	999301
製造日	:	2013 年 3 月 1 日
購入日	:	2013 年 9 月 11 日、2013 年 10 月 10 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 9 月 11 日~2013 年 11 月 28 日：3.4~4.5°C

3) S9Mix の組成（1 mL 中）

水	:	0.9 mL
S9	:	0.1 mL
$MgCl_2$	:	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

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	:	DZLE9A01
製造日	:	2013 年 9 月10 日
購入日	:	2013 年10 月11 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	:	1213483-02

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	:	WEH5240

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　　:　　2090181
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、AWK4121
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　　:　　WEP0568
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 µL、*E. coli* WP2 *uvrA* は 10 µL 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　菌株の換算生菌数一覧

菌　株	菌　数(個/mL)		
	用量設定試験	本試験 1 回目	本試験 2 回目
S. typhimurium TA100	5.43×10^9	5.36×10^9	5.37×10^9
S. typhimurium TA1535	6.02×10^9	6.30×10^9	6.43×10^9
E. coli WP2 *uvrA*	8.84×10^9	8.78×10^9	8.84×10^9
S. typhimurium TA98	6.70×10^9	6.19×10^9	6.65×10^9
S. typhimurium TA1537	4.95×10^9	5.22×10^9	5.19×10^9

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 に保温されたトップアガーを小試験管に 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)~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 で用量設定試験では 48.5 時間、本試験 1 回目では 49 時間、本試験 2 回目では 49.5 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、補正値：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 に、本試験 1 回目の結果を別表 2 に、本試験 2 回目の結果を別表 3 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 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、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1537 の 5000 µg/plate 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、生育阻害の認められた最低用量を最高用量として、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1537 においては 5000 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。代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化する場合のすべての菌株においては生育阻害が認められなかったため 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 1 回目及び 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、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1537 の 5000 µg/plate 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。

7.3 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、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。

本被験物質は染色体異常試験で陰性[9)]、他の施設のAmes試験で陰性[10)]と報告されている。また、類縁化合物である乳酸ではAmes試験で陰性[7)]、染色体異常試験で陽性[10)]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乳酸エチルは、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) 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) （2014）：乳酸エチ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-G092）、株式会社ボゾリサーチセンター

10) European Food Safety Authority (EFSA),
http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/975.pdf、
(accessed 2014-02-18)

（別表1）

試 験 結 果 表（用量設定試験）

被験物質の名称： 乳酸エチル

No. T-1296

試験実施期間			2013年10月28日　より　2013年10月31日				
代謝活性化系の有無		被験物質の用量（μg/ﾌﾟﾚｰﾄ）	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	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
S9Mix（－）		陰性対照（注射用水）	98 120　（　109）	18 12　（　15）	30 23　（　27）	15 13　（　14）	4 5　（　5）
		19.5	102 107　（　105）	16 10　（　13）	29 23　（　26）	13 10　（　12）	5 8　（　7）
		78.1	110 102　（　106）	10 13　（　12）	26 21　（　24）	14 13　（　14）	5 5　（　5）
		313	113 99　（　106）	12 8　（　10）	24 18　（　21）	10 16　（　13）	7 3　（　5）
		1250	92 93　（　93）	10 7　（　9）	21 32　（　27）	17 15　（　16）	7 5　（　6）
		5000	113＊ 122＊（　118）	10＊ 5＊（　8）	25 26　（　26）	12 10　（　11）	4＊ 4＊（　4）
S9Mix（＋）		陰性対照（注射用水）	119 102　（　111）	14 13　（　14）	24 29　（　27）	27 22　（　25）	8 8　（　8）
		19.5	130 102　（　116）	13 15　（　14）	20 30　（　25）	28 19　（　24）	8 5　（　7）
		78.1	108 134　（　121）	7 10　（　9）	22 30　（　26）	20 19　（　20）	5 5　（　5）
		313	91 111　（　101）	7 13　（　10）	21 32　（　27）	29 21　（　25）	8 10　（　9）
		1250	110 112　（　111）	9 7　（　8）	24 23　（　24）	26 22　（　24）	10 4　（　7）
		5000	96 111　（　104）	11 15　（　13）	27 24　（　26）	19 18　（　19）	8 10　（　9）
陽性対照	S9Mixを必要としないもの	名　称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191
		用量（μg/ﾌﾟﾚｰﾄ）	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
		ｺﾛﾆｰ数/ﾌﾟﾚｰﾄ	600 568　（　584）	250 248　（　249）	58 62　（　60）	361 336　（　349）	1113 1773　（　1443）
	S9Mixを必要とするもの	名　称	B[*a*]P	2AA	2AA	B[*a*]P	B[*a*]P
		用量（μg/ﾌﾟﾚｰﾄ）	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
		ｺﾛﾆｰ数/ﾌﾟﾚｰﾄ	971 1001　（　986）	446 453　（　450）	1003 1078　（　1041）	274 293　（　284）	75 94　（　85）

（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： 乳酸エチル　　No. T-1296

試験実施期間		2013年11月11日 より 2013年11月14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	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
S9Mix（－）	陰性対照（注射用水）	113 94 89 （ 99±12.7 ）	10 4 9 （ 8±3.2 ）	25 28 35 （ 29±5.1 ）	15 21 18 （ 18±3.0 ）	4 6 12 （ 7±4.2 ）
	156	100 130 98 （ 109±17.9 ）	6 7 11 （ 8±2.6 ）	NT	NT	8 11 5 （ 8±3.0 ）
	313	92 122 80 （ 98±21.6 ）	5 5 6 （ 5±0.6 ）	19 31 32 （ 27±7.2 ）	12 16 20 （ 16±4.0 ）	8 7 6 （ 7±1.0 ）
	625	103 88 100 （ 97±7.9 ）	14 5 5 （ 8±5.2 ）	19 24 22 （ 22±2.5 ）	22 15 13 （ 17±4.7 ）	8 8 8 （ 8±0.0 ）
	1250	100 102 102 （ 101±1.2 ）	10 11 13 （ 11±1.5 ）	24 27 31 （ 27±3.5 ）	14 24 15 （ 18±5.5 ）	10 6 7 （ 8±2.1 ）
	2500	99 99 119 （ 106±11.5 ）	5 7 5 （ 6±1.2 ）	20 25 26 （ 24±3.2 ）	23 17 17 （ 19±3.5 ）	6 7 6 （ 6±0.6 ）
	5000	117 ＊ 94 ＊ 90 ＊（ 100±14.6 ）	4 ＊ 4 ＊ 6 ＊（ 5±1.2 ）	19 25 21 （ 22±3.1 ）	17 12 11 （ 13±3.2 ）	7 ＊ 7 ＊ 5 ＊（ 6±1.2 ）
S9Mix（＋）	陰性対照（注射用水）	114 108 120 （ 114±6.0 ）	10 9 10 （ 10±0.6 ）	31 28 31 （ 30±1.7 ）	27 31 30 （ 29±2.1 ）	9 11 6 （ 9±2.5 ）
	313	117 125 114 （ 119±5.7 ）	6 8 10 （ 8±2.0 ）	28 29 29 （ 29±0.6 ）	34 34 21 （ 30±7.5 ）	8 5 9 （ 7±2.1 ）
	625	113 108 126 （ 116±9.3 ）	9 9 15 （ 11±3.5 ）	41 23 24 （ 29±10.1 ）	24 21 42 （ 29±11.4 ）	6 5 11 （ 7±3.2 ）
	1250	128 106 134 （ 123±14.7 ）	10 9 11 （ 10±1.0 ）	25 25 39 （ 30±8.1 ）	22 24 36 （ 27±7.6 ）	8 10 7 （ 8±1.5 ）
	2500	119 119 122 （ 120±1.7 ）	10 7 7 （ 8±1.7 ）	28 28 38 （ 31±5.8 ）	31 24 31 （ 29±4.0 ）	7 6 6 （ 6±0.6 ）
	5000	108 139 122 （ 123±15.5 ）	7 13 5 （ 8±4.2 ）	28 34 25 （ 29±4.6 ）	26 29 29 （ 28±1.7 ）	12 10 7 （ 10±2.5 ）
陽性対照 S9Mixを必要としないもの	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	613 584 573 （ 590±20.7 ）	249 252 215 （ 239±20.6 ）	66 64 70 （ 67±3.1 ）	385 439 408 （ 411±27.1 ）	1627 1535 1531 （ 1564±54.3 ）
陽性対照 S9Mixを必要とするもの	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
	コロニー数/プレート	923 940 939 （ 934±9.5 ）	440 478 506 （ 475±33.1 ）	1104 1214 1033 （ 1117±91.2 ）	312 340 343 （ 332±17.1 ）	86 97 83 （ 89±7.4 ）

（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。
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3)

試 験 結 果 表（本試験2回目）

被験物質の名称： 乳酸エチル　　No. T-1296

試験実施期間		2013年11月27日 より 2013年11月30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	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
S9Mix（－）	陰性対照（注射用水）	101 103 99 （ 101±2.0 ）	10 4 7 （ 7±3.0 ）	19 26 24 （ 23±3.6 ）	13 13 13 （ 13±0.0 ）	5 4 8 （ 6±2.1 ）
	156	87 111 87 （ 95±13.9 ）	9 10 9 （ 9±0.6 ）	NT	NT	4 8 4 （ 5±2.3 ）
	313	102 109 119 （ 110±8.5 ）	6 10 14 （ 10±4.0 ）	21 22 21 （ 21±0.6 ）	12 13 15 （ 13±1.5 ）	5 5 5 （ 5±0.0 ）
	625	95 101 85 （ 94±8.1 ）	9 13 6 （ 9±3.5 ）	22 29 22 （ 24±4.0 ）	15 10 10 （ 12±2.9 ）	4 6 7 （ 6±1.5 ）
	1250	105 114 107 （ 109±4.7 ）	9 12 5 （ 9±3.5 ）	30 18 14 （ 21±8.3 ）	10 17 11 （ 13±3.8 ）	4 5 5 （ 5±0.6 ）
	2500	99 120 106 （ 108±10.7 ）	8 8 7 （ 8±0.6 ）	27 28 29 （ 28±1.0 ）	11 10 12 （ 11±1.0 ）	10 6 8 （ 8±2.0 ）
	5000	102 ＊ 100 ＊ 82 ＊（ 95±11.0 ）	10 ＊ 7 ＊ 11 ＊（ 9±2.1 ）	24 19 18 （ 20±3.2 ）	11 12 10 （ 11±1.0 ）	7 ＊ 6 ＊ 7 ＊（ 7±0.6 ）
S9Mix（＋）	陰性対照（注射用水）	125 124 126 （ 125±1.0 ）	8 7 10 （ 8±1.5 ）	20 25 19 （ 21±3.2 ）	23 18 24 （ 22±3.2 ）	10 10 15 （ 12±2.9 ）
	313	112 142 119 （ 124±15.7 ）	11 5 8 （ 8±3.0 ）	20 22 21 （ 21±1.0 ）	22 13 26 （ 20±6.7 ）	9 5 6 （ 7±2.1 ）
	625	109 106 129 （ 115±12.5 ）	7 10 8 （ 8±1.5 ）	30 28 24 （ 27±3.1 ）	29 23 28 （ 27±3.2 ）	7 7 6 （ 7±0.6 ）
	1250	122 110 126 （ 119±8.3 ）	10 8 7 （ 8±1.5 ）	19 22 25 （ 22±3.0 ）	28 19 22 （ 23±4.6 ）	8 7 5 （ 7±1.5 ）
	2500	110 101 131 （ 114±15.4 ）	9 11 7 （ 9±2.0 ）	19 19 21 （ 20±1.2 ）	28 25 21 （ 25±3.5 ）	11 10 8 （ 10±1.5 ）
	5000	119 131 116 （ 122±7.9 ）	5 11 8 （ 8±3.0 ）	29 23 24 （ 25±3.2 ）	27 30 21 （ 26±4.6 ）	10 13 6 （ 10±3.5 ）
陽性対照 S9Mixを必要としないもの	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	610 631 616 （ 619±10.8 ）	253 315 319 （ 296±37.0 ）	75 74 68 （ 72±3.8 ）	374 345 345 （ 355±16.7 ）	1603 1644 1434 （ 1560±111.3 ）
陽性対照 S9Mixを必要とするもの	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
	コロニー数/プレート	950 957 989 （ 965±20.8 ）	515 489 386 （ 463±68.2 ）	866 825 1055 （ 915±122.7 ）	304 301 318 （ 308±9.1 ）	73 74 78 （ 75±2.6 ）

（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。
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。

図 1

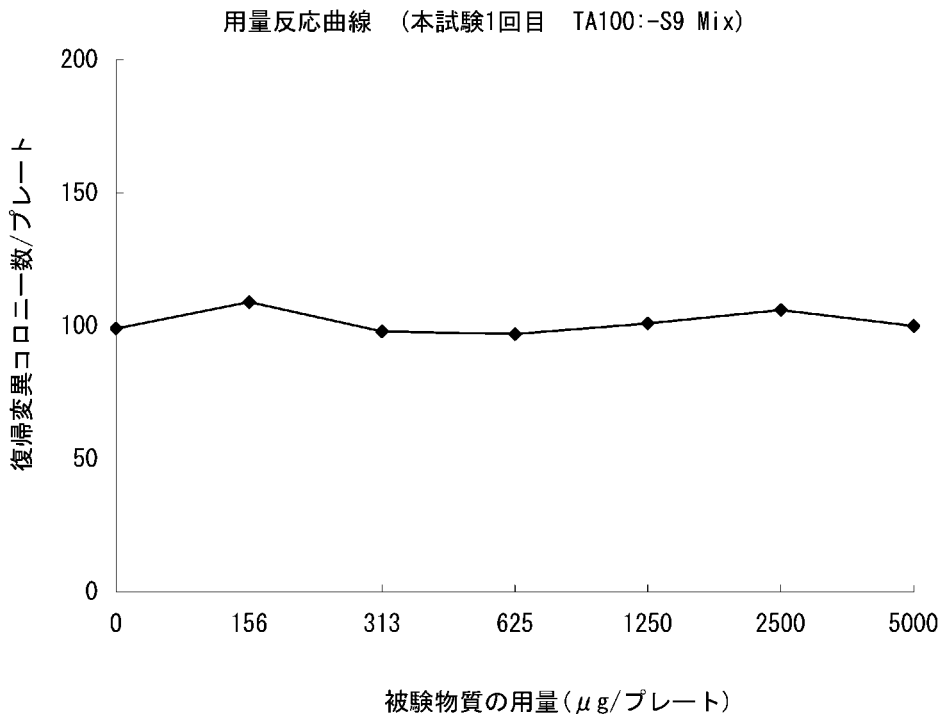

用量反応曲線　(本試験1回目　TA100:-S9 Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
200
150
100
50
0
0
156
313
625
1250
2500
5000
被験物質の用量(μg/プレート)

図 2

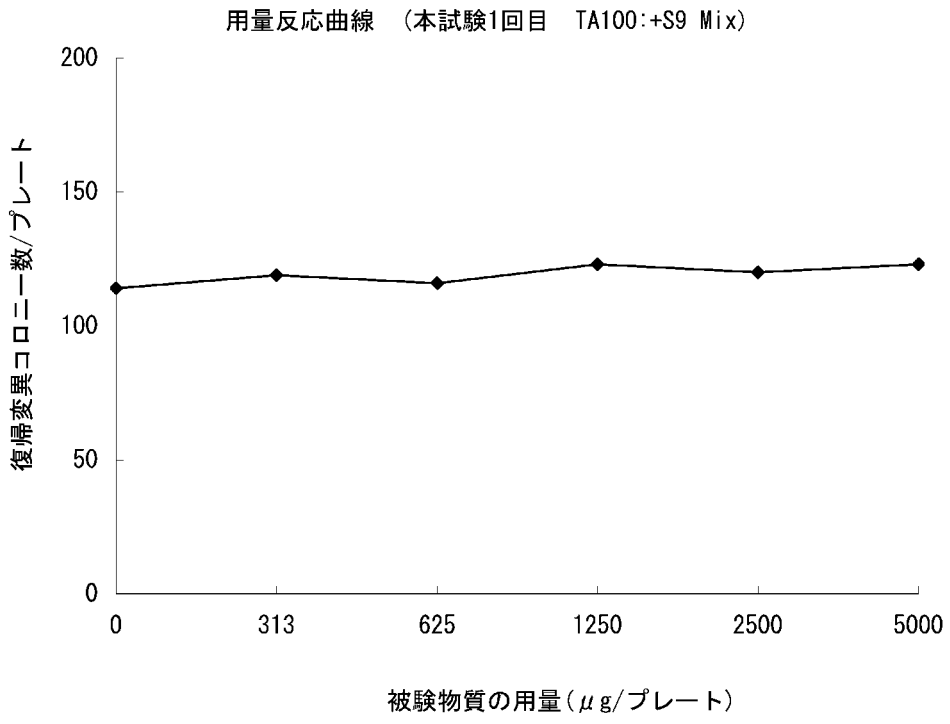

用量反応曲線　(本試験1回目　TA100:+S9 Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
200
150
100
50
0
0
313
625
1250
2500
5000
被験物質の用量(μg/プレート)

図 3

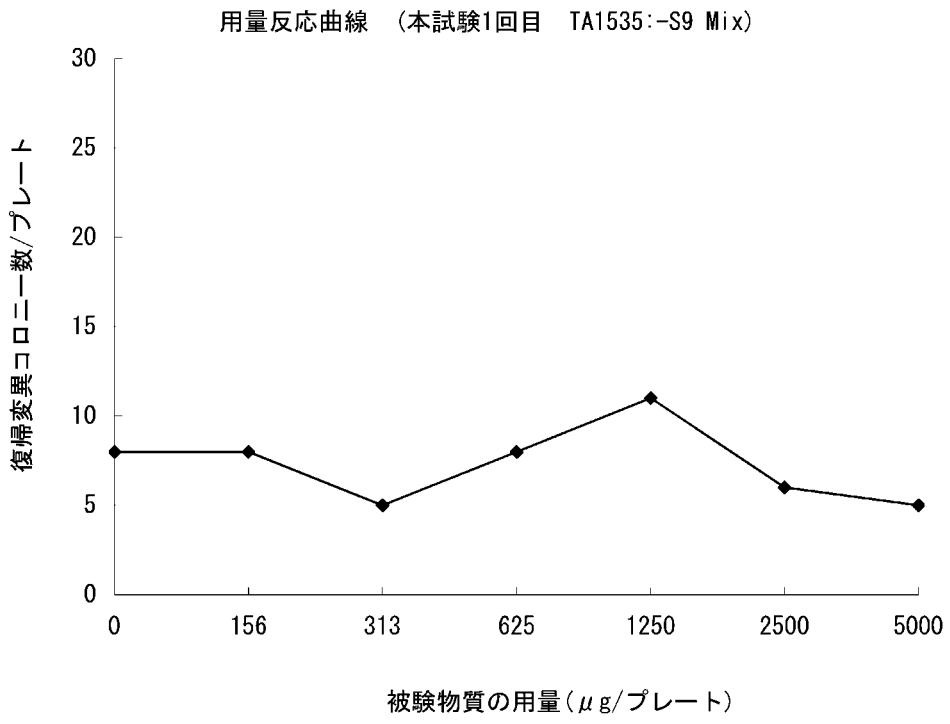

用量反応曲線　(本試験1回目　TA1535:-S9 Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
30
25
20
15
10
5
0
0
156
313
625
1250
2500
5000
被験物質の用量(μg/プレート)

図 4

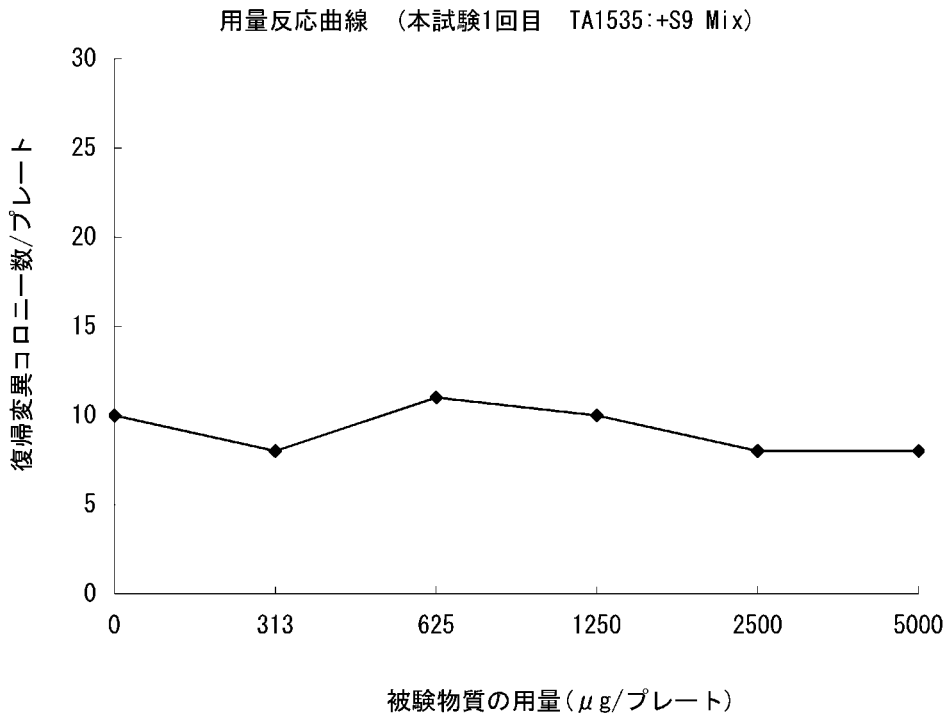

用量反応曲線　(本試験1回目　TA1535:+S9 Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
30
25
20
15
10
5
0
0
313
625
1250
2500
5000
被験物質の用量(μg/プレート)

図 5

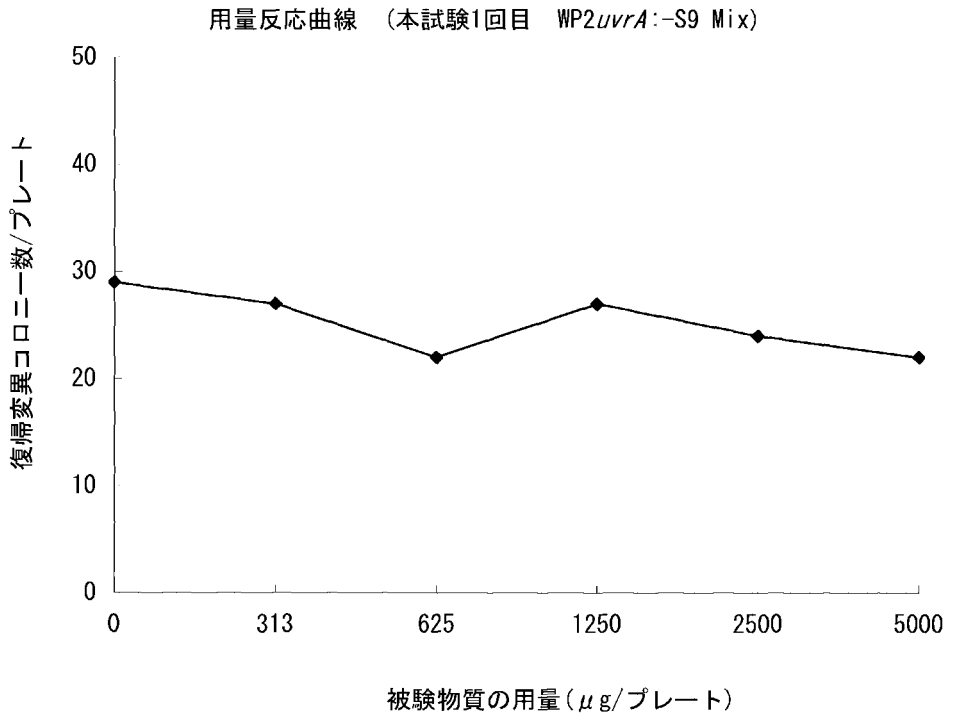

用量反応曲線　(本試験1回目　WP2uvrA:-S9 Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
50
40
30
20
10
0
0
313
625
1250
2500
5000
被験物質の用量(μg/プレート)

図 6

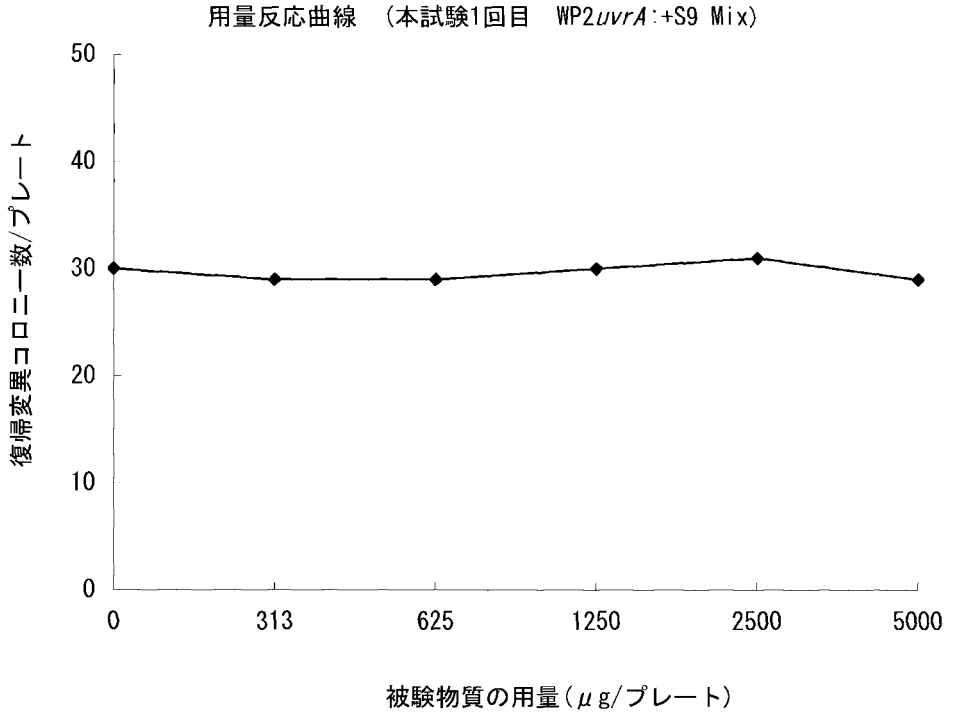

用量反応曲線　(本試験1回目　WP2uvrA:+S9 Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
50
40
30
20
10
0
0
313
625
1250
2500
5000
被験物質の用量(μg/プレート)

図 7

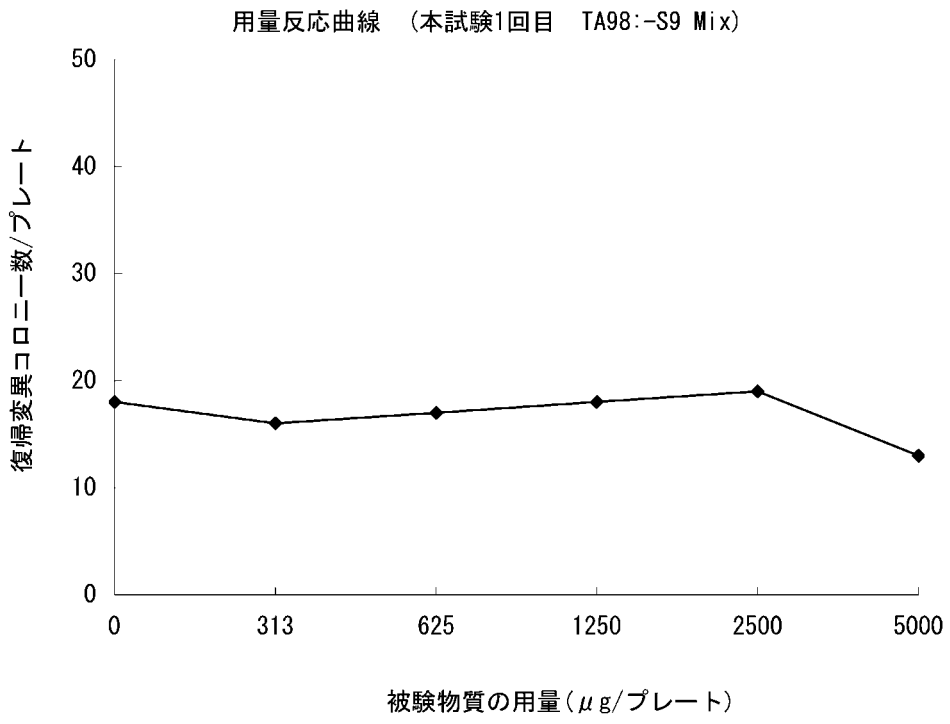

用量反応曲線　(本試験1回目　TA98:-S9 Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
50
40
30
20
10
0
0
313
625
1250
2500
5000
被験物質の用量(μg/プレート)

図 8

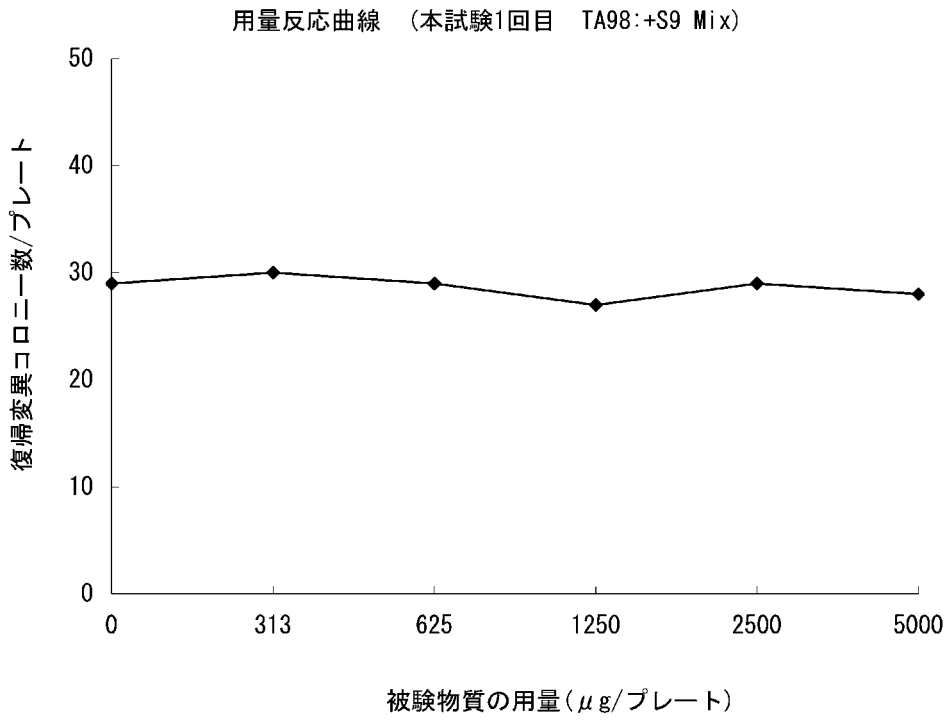

用量反応曲線　(本試験1回目　TA98:+S9 Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
50
40
30
20
10
0
0
313
625
1250
2500
5000
被験物質の用量(μg/プレート)

図 9

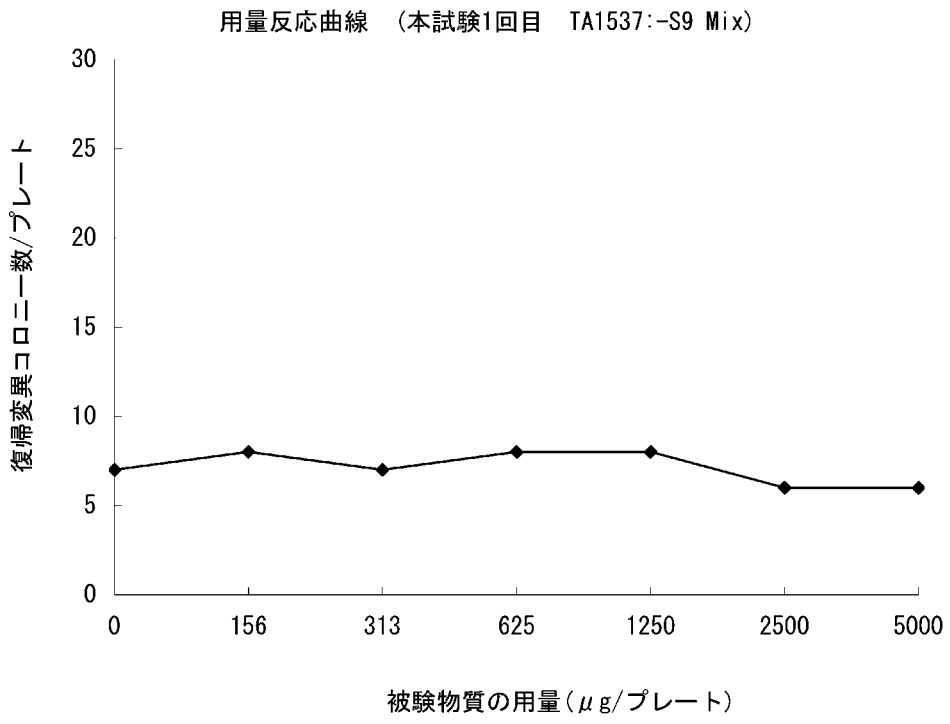
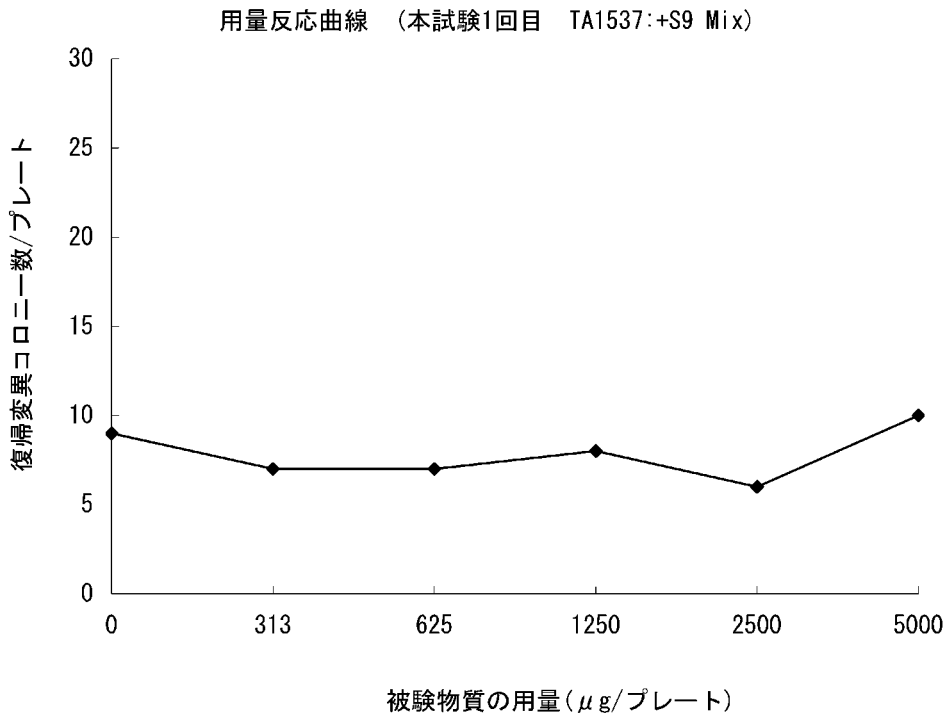

用量反応曲線　(本試験1回目　TA1537:-S9 Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
30
25
20
15
10
5
0
0
156
313
625
1250
2500
5000
被験物質の用量(μg/プレート)

図 10


用量反応曲線　(本試験1回目　TA1537:+S9 Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
30
25
20
15
10
5
0
0
313
625
1250
2500
5000
被験物質の用量(μg/プレート)

Study number: T-1296

CERTIFICATE OF ANALYSIS
(Stability of Test Article)

Stage:	After the end of main study
Date of Analysis:	December 4, 2013 July 11, 2013 (The spectrum for characteristics[1)])
Test Article:	Ethyl lactate (Lot number: MKBJ4932V)
Test Item:	Infrared spectrophotometry (Liquid film method)
Acceptance Criteria:	The spectrum for stability is comparable with that for characteristics[1)]. 1) [redacted] Characteristic study of ethyl lactate (Study number: A-2586, Gotemba Laboratory, BoZo Research Center Inc.)
Results:	The spectrum for stability was comparable with that for characteristics. The Infrared absorption spectra are shown on the next page.
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

[redacted]

December 11, 2013
Date

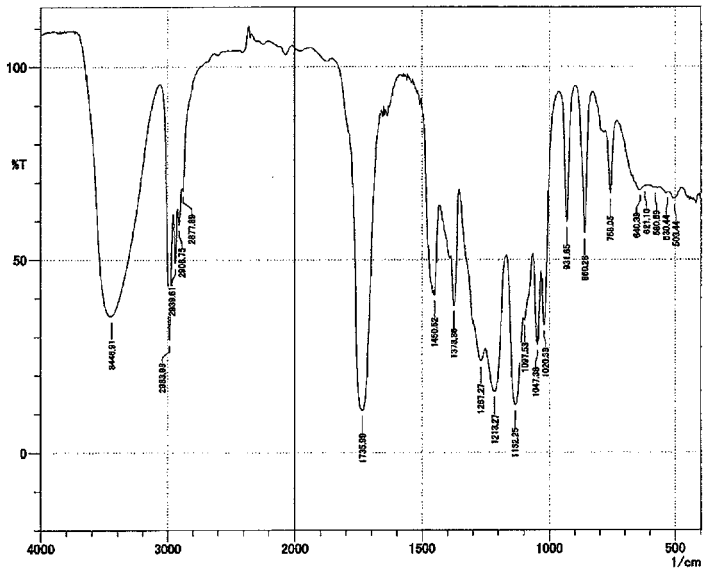
Person Responsible for Analysis
Gotemba Laboratory, BoZo Research Center Inc.

Study number: T-1296

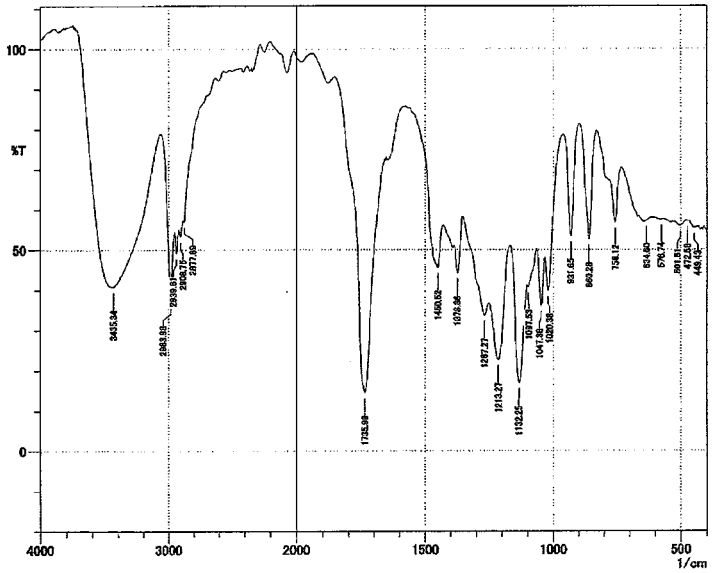
CERTIFICATE OF ANALYSIS
(Stability of Test Article)

Results: Infrared absorption spectra

(Characteristics)



(Stability)



T-1296
Attached Data 2

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

CODE No. :131024
Period : From July 25, 2013 to October 11, 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	97	12.0	62	132	330
		Positive control AF-2(0.01μg/plate)	610	64.2	427	793	330
	+	Solvent control	114	14.0	73	155	330
		Positive control B[*a*]P(5.0μg/plate)	915	108	640	1189	330
TA1535	–	Solvent control	9	2.76	2	16	330
		Positive control SAZ(0.5μg/plate)	264	68.6	105	422	330
	+	Solvent control	9	2.81	2	16	330
		Positive control 2AA(2.0μg/plate)	342	74.7	137	546	330
WP2*uvrA*	–	Solvent control	22	7.17	6	39	330
		Positive control AF-2(0.01μg/plate)	73	11.7	40	106	330
	+	Solvent control	24	6.93	6	42	330
		Positive control 2AA(10.0μg/plate)	925	124	648	1203	330
TA98	–	Solvent control	16	3.98	4	28	330
		Positive control AF-2(0.1μg/plate)	381	53.6	267	496	330
	+	Solvent control	29	7.03	11	46	330
		Positive control B[*a*]P(5.0μg/plate)	332	52.0	183	482	330
TA1537	–	Solvent control	7	2.36	2	13	330
		Positive control ICR-191(1.0μg/plate)	1791	408	717	2866	330
	+	Solvent control	9	2.89	2	16	330
		Positive control B[*a*]P(5.0μg/plate)	89	15.1	49	130	330

(Notice)

Solvent controls Water, Dimethylsulfoxide(DMSO), Acetone, *N,N*-dimethylformamid (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

信頼性保証書（1/2）

試験番号　：　T-1296

試験表題　：　乳酸エチ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。

- 「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、環保企発第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。

2014年 3月20日
株式会社ボゾリサーチセンター
信頼性保証部門 [redacted]

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	[redacted]	2013年 10月 10日	2013年 10月 10日
調製・保存（被験物質）、被験物質の処理		2013年 11月 12日	2013年 11月 12日
計数		2013年 11月 14日	2013年 11月 15日
被験物質の安定性確認		2013年 12月 4日	2013年 12月 5日
生データ		2014年 1月 9日	2014年 1月 10日
最終報告書草案・図・表		2014年 1月 9日	2014年 1月 10日
最終報告書		2014年 3月 20日	2014年 3月 20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	[redacted]	2013年 8月 2日	
		2013年 8月 5日	
		2013年 8月 7日	2013年 8月 7日
		2013年 8月 6日	
		2013年 8月 8日	
		2013年 8月 13日	2013年 8月 13日
陽性対照物質の管理		2013年 7月 18日	2013年 7月 18日
		2013年 8月 27日	2013年 8月 27日
		2013年 9月 12日	2013年 9月 12日
		2013年 10月 2日	2013年 10月 2日
		2013年 10月 17日	2013年 10月 17日

T-1296

試験責任者陳述書

試験番号　：T-1296

試験標題　：乳酸エチル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。

2014年 3月 20日

株式会社ボゾリサーチセンター

試験責任者 [redacted]