

微生物を用いる変異原性試験結果報告書

1 一般的事項

化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	2-[4-(ジブチルアミノ)サリチロイル]安息香酸		
別名	2-Hydroxy-4-(N,N-di-n-butyl)amino-2'-carboxybenzophenone		
構造式又は示性式			
試験に供した 化学物質の純度	99.8%	試験に供した 化学物質の Lot No.	02113AFV
不純物の名称及び 含有率(濃度)	—		
C A S 番号	54574-82-2	蒸気圧	—
分子量	369.45	分配係数 (1-オクタノール/水分配係数)	—
融点	—		
沸点	—	常温における性状	黄色粉末
安定性	水：— 光：— 熱：—		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	水	難溶[50mg/ml 未満]*	—
	DMSO	溶解[100mg/ml 以上]*	—

*日本バイオアッセイ研究センターの試験による。

2 試験に用いた菌株

菌 株 名	入 手 先	入 手 年 月 日
TA100	東京大学医科学研究所癌生物学研究部	1985年 6月 21日
TA1535	同 上	1988年 5月 16日
TA98	同 上	1988年 5月 16日
TA1537	同 上	1988年 5月 16日
WP2 <i>uvrA</i> / pKM101	同 上	1983年 6月 29日

3 S9 mix

(1) S9 の入手方法等

自 製 ・ 購 入 の 別	1. 自 製 ②. 購 入 (製造元: キッコーマンバイオケミファ株式会社)
製 造 年 月 日	2014年 7月 11日 製造
購入の場合のLot No.	RAA201407A
保 存 温 度	-80℃ (保存機器名 三洋電機株式会社 MDF-392AT)

(2) S9 の調製方法

使 用 動 物		誘 導 物 質	
種・系統	ラット・ Sprague-Dawley (Slc:SD)	名 称	フェノバルビタール(PB) 及び 5,6-ベンゾフラボン (BF)
性	雄		
週 齢	7 週	投与 方法	腹 腔 内 投 与
体 重	198~239 g	投与期間及び投与量 (g/kg 体重)	1日目(投与開始日) : PB 0.03 2日目~4日目 : PB 0.06 3日目 : BF 0.08

(3) S9 mix の組成

成 分	S9 mix 1 ml 中の量	成 分	S9 mix 1 ml 中の量
S9	0.1 ml	NADPH	4 μ mol
MgCl ₂	8 μ mol	NADH	4 μ mol
KCl	33 μ mol	Na-リン酸緩衝液	100 μ mol
グルコース-6-リン酸	5 μ mol	その他 (-)	-

4 被験物質溶液の調製

使用溶媒	名 称	製 造 元	Lot No.	グレード	純度(%)
	ジメチルスルホキシド (DMSO)	SIGMA-ALDRICH Co.	SHBF0107V	anhydrous	99.99
溶媒選択の理由	被験物質の溶解度は、水に 50 mg/ml 未満であるが、DMSO に 100 mg/ml [被験物質溶液量をプレート当り 50 μ l にした場合に 5000 μ g の被験物質に相当する] 以上であり、被験物質に DMSO を加えた際に、発色、発泡、発熱等の変化は見られなかったことから溶媒に DMSO を選択した。				
被験物質溶液の性状	溶解 懸濁 その他 ()				
被験物質が難溶性の場合における懸濁等の方法	—				
溶液の調製から使用までの保存時間と温度	用量設定試験	40分、	25°C		
	本試験	40分、	25°C		
	本試験-2	1時間 20分、	25°C		
純度換算の有無	有			無	

5 前培養の条件等

(1) 条件

ニュートリエントプロス	名 称	製 造 元	Lot No.
	Oxoid ニュートリエントプロス No.2	OXOID LTD.	941971
前 培 養 時 間	10時間00分		
培養容器 (形状・容量)	形 状 : 三角フラスコ	容 量 : 62.5 ml	
培 養 液 量	15 ml	接種菌量	30 μ l

(2) 前培養終了時の生菌数等

菌 株 名		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2uvrA/ pKM101	TA98	TA1537
生菌数 ($\times 10^9$ / ml)	用量設定試験	2.39	3.45	4.28	2.66	2.56
	本 試 験	2.27	3.23	4.03	2.55	2.43
	本 試 験 - 2	2.12	3.13	—	2.49	2.37
測定方法 (いずれかを○で囲むこと)		①. O.D. 値よりの換算 2. 段階希釈法 3. その他 ()				

6 最少グルコース寒天平板培地

自製・購入の別	1. 自製 <input type="radio"/> 2. <input checked="" type="radio"/> 購入(製造元：オリエンタル酵母工業株式会社)
製造年月日	2014年7月24日 製造
購入の場合の Lot No.	ANI360GD
使用寒天の名称・製造元・Lot No.等	使用寒天の名称：伊那寒天 BA-30A 製造元：伊那食品工業株式会社 Lot No. : 31122

7 試験の方法

(1) 試験方法とその選定理由

採用した試験方法	<input checked="" type="radio"/> 1. プレインキュベーション法 2. <input type="radio"/> プレート法 3. <input type="radio"/> その他 ()
その他の場合はその選定理由	—

(2) 試験条件 (プレート当たり)

プレインキュベーション法		
組 成	菌懸濁液	0.1 ml
	被験物質溶液	0.05 ml
	Na-リン酸緩衝液(直接法による場合)	0.5 ml
	S9 mix(代謝活性化法による場合)	0.5 ml
	トップアガー	2 ml
プレインキュベーション	温 度	37 ℃
	時 間	20 分
インキュベーション	温 度	37 ℃
	時 間	48 時間

8 コロニー計測の方法

計測方法	<input checked="" type="radio"/> 1. マニュアル計測 <input checked="" type="radio"/> 2. 機器計測
補正の有無	1. <input type="radio"/> 無 <input checked="" type="radio"/> 2. 有 (補正の方法 面積及び数え落とし補正)

9 試験結果

(1) 試験の結果は別表による。

(2) 結果の判定

判 定	陽性	陰性
<p>[判定の理由]</p> <p>用量設定試験の結果を表-1に、本試験の結果を表-2及び図-1~10に、本試験-2の結果を表-3及び図-11~18に示した。</p> <p>用量設定試験を最高用量5000 μg/7°プレートより公比4の7用量で実施したが、TA98、TA100、TA1535、TA1537及び WP2 <i>uvrA</i>/pKM101の直接法による場合及び代謝活性化法による場合に陰性対照(溶媒対照)値の2倍以上の復帰変異コロニー数の増加はみられなかった。</p> <p>最高用量を生育阻害を示す用量とし、公比2の7用量で本試験を実施したが、TA98、TA100、TA1535、TA1537及び WP2 <i>uvrA</i>/pKM101の直接法による場合及び代謝活性化法による場合に陰性対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数の増加はみられなかった。</p> <p>用量設定試験において TA98、TA100、TA1535、TA1537の直接法による場合と代謝活性化法による場合で、生育阻害を示さない用量が4段階以上得られなかったことから、本試験-2を実施したところ、陰性対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数の増加はみられなかった。</p> <p>陽性対照物質は、それぞれの試験菌株において陰性対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数を誘発した。また、陰性対照値及び陽性対照値は、当センターのヒストリカルデータより作成した基準の範囲内であった。これらの結果は試験が適切に実施されたことを示している。</p> <p>以上の結果より、2-[4-(ジブチルアミノ)サリチロイル]安息香酸の微生物に対する変異原性は、陰性と判定した。</p>		

(3) 参考事項

被験物質の沈澱が著しいプレートにマニュアルカウントを実施した。

表-1

試験結果表（用量設定試験）

被験物質の名称：2-[4-(ジブチルアミノ)サリチロイル]安息香酸

試験実施期間		2014年 11月 4日から 2014年 11月 7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/pKM101	TA98	TA1537		
S9 mix (-)	陰性対照 (溶媒対照)	121 113 108 107 (112)	17 7 10 11 (11)	115 111 70 98 (99)	16 13 16 15 (15)	8 8 9 10 (9)		
	1.22	84 99 (92)	5 6 (6)	100 77 (89)	20 7 (14)	6 3 (5)		
	4.88	83 63 (73)	8 5 (7)	90 126 (108)	8 9 (9)	2 2 (2)		
	19.5	51 61 (56)	2 1 (2)	96 96 (96)	8 6 (7)	1* 1* (1*)		
	78.1	6* 5* (6*)	0* 1* (1*)	69 79 (74)	3* 3* (3*)	0* 0* (0*)		
	313 †	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	78* 75* (77*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)		
	1250 †	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	37* 48* (43*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)		
	5000 †	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)		
	S9 mix (+)	陰性対照 (溶媒対照)	108 126 117 117 (117)	8 8 9 13 (10)	131 112 126 116 (121)	24 23 17 24 (22)	14 18 13 10 (14)	
		1.22	81 101 (91)	8 7 (8)	119 116 (118)	11 18 (15)	8 3 (6)	
4.88		70 81 (76)	3 8 (6)	116 115 (116)	16 9 (13)	3 3 (3)		
19.5		40 60 (50)	5 1 (3)	122 119 (121)	6 7 (7)	0* 0* (0*)		
78.1		15* 30* (23*)	1* 2* (2*)	91 102 (97)	2* 1* (2*)	0* 0* (0*)		
313 †		0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	85* 72* (79*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)		
1250 †		0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	55* 49* (52*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)		
5000 †		0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)		
陽性対照		S9 mixを必要とするもの	名称 用量(μg/プレート)	AF-2 0.01	NaN ₃ 0.5	AF-2 0.005	AF-2 0.1	9-AA 80
		S9 mixを必要とするもの	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	コロニー数/プレート		625 614 (620)	313 310 (312)	780 753 (767)	438 487 (463)	599 537 (568)	
	S9 mixを必要とするもの	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	
コロニー数/プレート		1425 1407 (1416)	305 256 (281)	1140 1086 (1113)	536 533 (535)	242 229 (236)		

【備考】

1. 菌の生育阻害(抗菌作用)が認められる場合は、該当する数値の右に*印を付した。
2. ()内には各プレートのコロニー数の平均値を記入した。
3. 復帰変異数は、被験物質用量の低い順に実測値及び平均値を記入した。
4. プレート上に沈澱が析出した場合は、その用量に†印を付した。
5. 陽性対照物質の名称 AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、NaN₃: ナトリウム・アジド、9-AA: 9-アミノアクリジン、2-AA: 2-アミノアントラセン

表-2

試験結果表 (本試験)

被験物質の名称：2-[4-(ジブチルアミノ)サリチロイル]安息香酸

試験実施期間		2014年11月10日から 2014年11月13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/pKM101	TA98		TA1537		
S9 mix (-)	陰性対照 (溶媒対照)	107	96	9	13	87	98	13	14	14	10
		87	87 (94)	11	7 (10)	70	111 (92)	15	15 (14)	10	10 (11)
	0.305	/		/		/		/		6	7 (7)
	0.61	/		/		/		/		11	8 (10)
	1.22	94	99 (97)	13	8 (11)	/		11	14 (13)	8	9 (9)
	2.44	96	114 (105)	8	13 (11)	/		9	13 (11)	6	9 (8)
	4.88	99	77 (88)	11	9 (10)	99	85 (92)	14	17 (16)	10	8 (9)
	9.77	90	101 (96)	11	9 (10)	98	92 (95)	16	13 (15)	8	13 (11)
	19.5	94	90 (92)	14	7 (11)	64	84 (74)	16	15 (16)	3*	7* (5*)
	39.1	90	78 (84)	7	7 (7)	86	96 (91)	21	14 (18)	/	
	78.1	82*	70* (76*)	6*	6* (6*)	107	90 (99)	8*	10* (9*)	/	
	156	/		/		82	108 (95)	/		/	
	313 †	/		/		119*	97* (108*)	/		/	
	S9 mix (+)	陰性対照 (溶媒対照)	100	106	6	9	120	107	23	30	14
		91	114 (103)	7	9 (8)	85	87 (100)	16	21 (23)	9	8 (10)
0.305		/		/		/		/		6	10 (8)
0.61		/		/		/		/		10	10 (10)
1.22		119	111 (115)	7	13 (10)	/		22	22 (22)	10	8 (9)
2.44		102	109 (106)	10	11 (11)	/		18	20 (19)	6	9 (8)
4.88		106	115 (111)	14	13 (14)	107	101 (104)	11	23 (17)	8	3 (6)
9.77		107	92 (100)	8	8 (8)	99	102 (101)	13	17 (15)	8	8 (8)
19.5		102	115 (109)	14	8 (10)	127	113 (120)	22	13 (18)	6*	8* (7*)
39.1		121	87 (104)	7	3 (5)	106	117 (112)	14	15 (15)	/	
78.1		84*	89* (87*)	8*	9* (9*)	121	113 (117)	23*	17* (20*)	/	
156		/		/		122	120 (121)	/		/	
313 †		/		/		121*	135* (128*)	/		/	
陽性対照		S9 mixを必要とするもの	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA			
	用量(μg/プレート)	0.01	0.5	0.005	0.1	80					
	コロニー数/プレート	596	317	765	404	475					
		616 (606)	334 (326)	741 (753)	459 (432)	440 (458)					
対照	S9 mixを必要とするもの	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA				
	用量(μg/プレート)	1	2	2	0.5	2					
	コロニー数/プレート	1474	275	778	487	234					
		1429 (1452)	285 (280)	784 (781)	447 (467)	216 (225)					

【備考】

1. 菌の生育阻害(抗菌作用)が認められる場合は、該当する数値の右に*印を付した。
2. ()内には各プレートのコロニー数の平均値を記入した。
3. 復帰変異数は、被験物質用量の低い順に実測値及び平均値を記入した。
4. プレート上に沈澱が析出した場合は、その用量に†印を付した。
5. 陽性対照物質の名称 AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、NaN₃: ナトリウム・アジド、9-AA: 9-アミノアクリジン、2-AA: 2-アミノアントラセン

表-3

試験結果表 (本試験-2)

被験物質の名称：2-[4-(ジブチルアミノ)サリチロイル]安息香酸

試験実施期間		2014年 11月 18日から 2014年 11月 21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/pKM101	TA98	TA1537	
S9 mix (-)	陰性対照 (溶媒対照)	106 92 84 101 (96)	16 15 16 11 (15)	/	17 21 11 22 (18)	10 14 18 16 (15)	
	1.22	/	/	/	/	10 14 (12)	
	2.44	/	/	/	/	17 9 (13)	
	4.88	81 97 (89)	14 5 (10)	/	8 18 (13)	9 9 (9)	
	9.77	76 74 (75)	13 11 (12)	/	15 13 (14)	7 8 (8)	
	19.5	76 75 (76)	10 13 (12)	/	18 17 (18)	2* 15* (9*)	
	39.1	83 84 (84)	14 9 (12)	/	13 13 (13)	/	
	78.1	63* 81* (72*)	10* 11* (11*)	/	11* 10* (11*)	/	
	S9 mix (+)	陰性対照 (溶媒対照)	101 120 113 112 (112)	15 11 16 14 (14)	/	30 33 17 28 (27)	18 17 16 17 (17)
		1.22	/	/	/	/	13 23 (18)
2.44		/	/	/	/	15 11 (13)	
4.88		98 85 (92)	18 18 (18)	/	23 28 (26)	13 8 (11)	
9.77		96 100 (98)	9 7 (8)	/	11 18 (15)	11 10 (11)	
19.5		89 100 (95)	20 13 (17)	/	21 14 (18)	8* 11* (10*)	
39.1		96 93 (95)	16 16 (16)	/	23 10 (17)	/	
78.1		89* 81* (85*)	20* 14* (17*)	/	11* 21* (16*)	/	
陽性対照		S9 mixを必要とするもの	名称 AF-2 用量(μg/プレート) 0.01	名称 NaN ₃ 用量(μg/プレート) 0.5	名称 AF-2 用量(μg/プレート) 0.005	名称 AF-2 用量(μg/プレート) 0.1	名称 9-AA 用量(μg/プレート) 30
		コロニー数/プレート	621 628 (625)	335 316 (326)	/	524 481 (503)	575 593 (584)
	S9 mixを必要とするもの	名称 2-AA 用量(μg/プレート) 1	名称 2-AA 用量(μg/プレート) 2	名称 2-AA 用量(μg/プレート) 2	名称 2-AA 用量(μg/プレート) 0.5	名称 2-AA 用量(μg/プレート) 2	
	コロニー数/プレート	1478 1427 (1453)	313 300 (307)	/	532 509 (521)	279 218 (249)	

【備考】

1. 菌の生育阻害(抗菌作用)が認められる場合は、該当する数値の右に*印を付した。
2. ()内には各プレートのコロニー数の平均値を記入した。
3. 復帰変異数は、被験物質用量の低い順に実測値及び平均値を記入した。
4. 陽性対照物質の名称 AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、NaN₃: ナトリウム・アジド、9-AA: 9-アミノアクリジン、2-AA: 2-アミノアントラセン

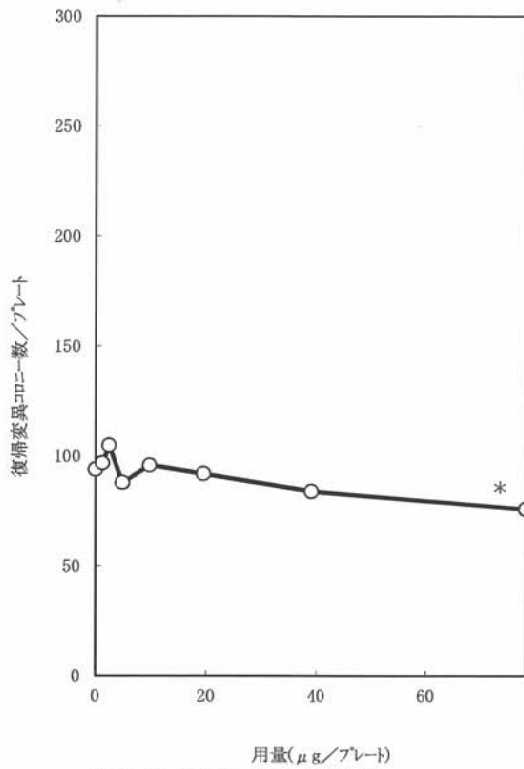


図-1 TA100における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験)

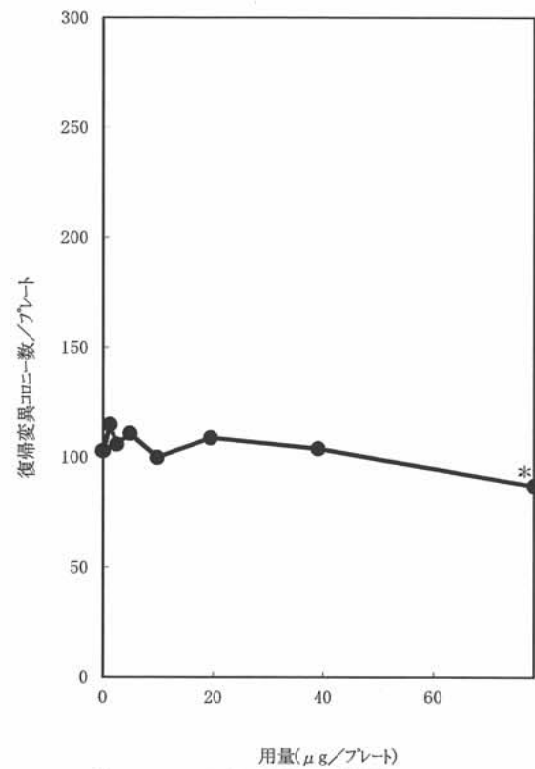


図-2 TA100における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)

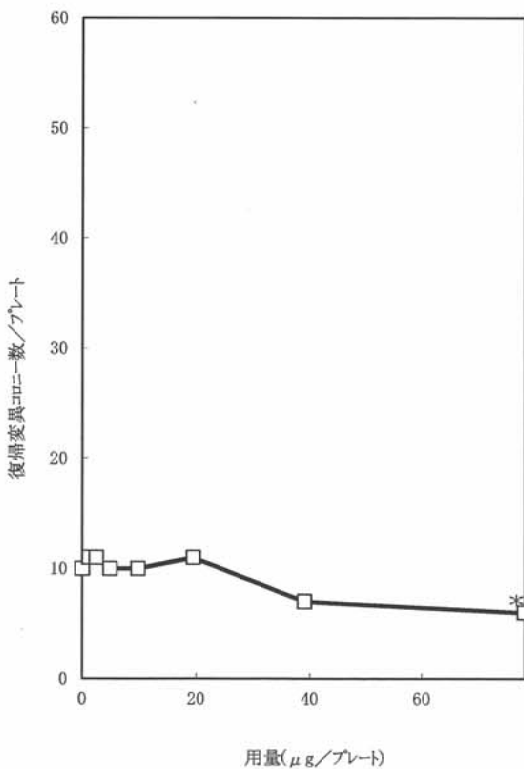


図-3 TA1535における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験)

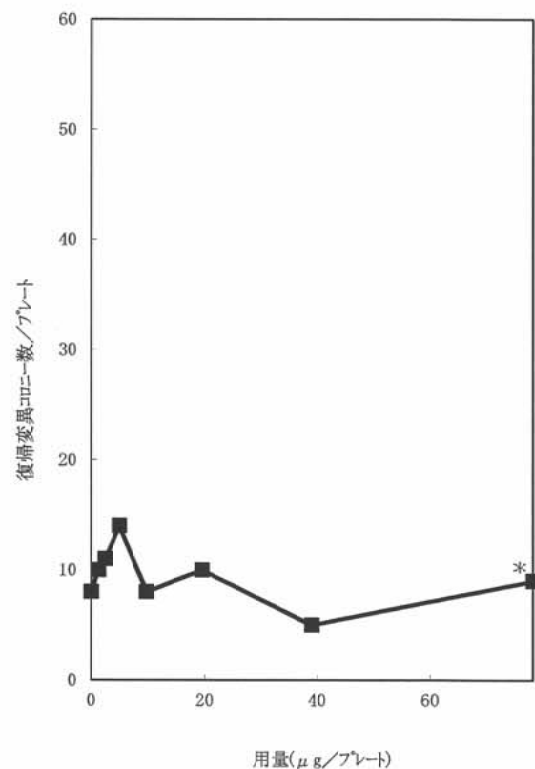


図-4 TA1535における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)

注：生育阻害が認められる場合は、該当するポイントの左上に*を付した。

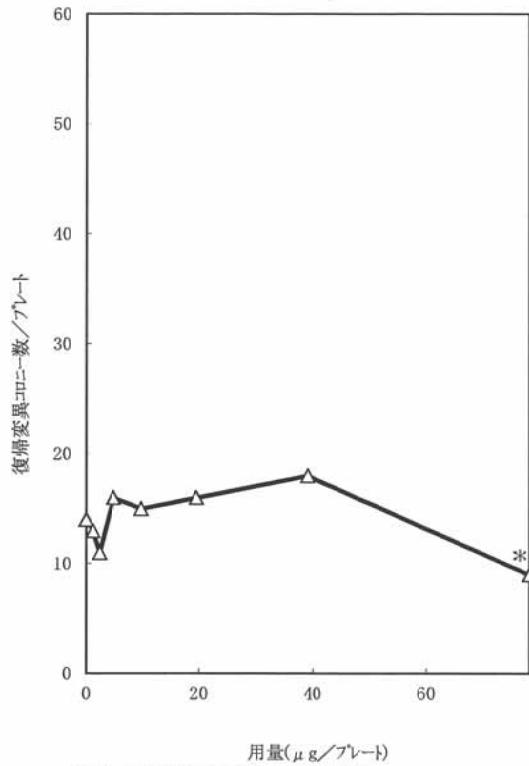


図-5 TA98における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験)

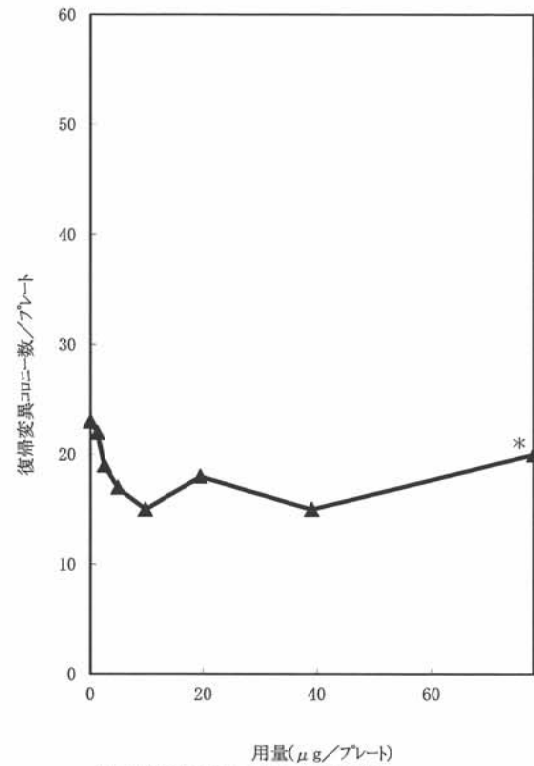


図-6 TA98における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)

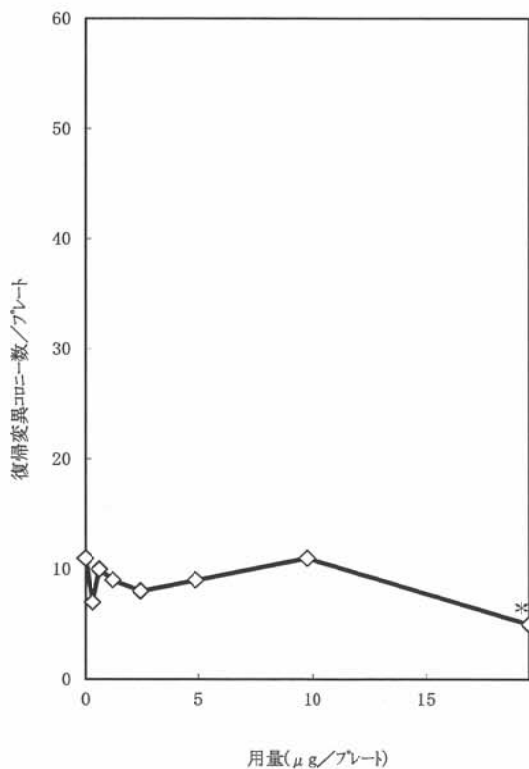


図-7 TA1537における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験)

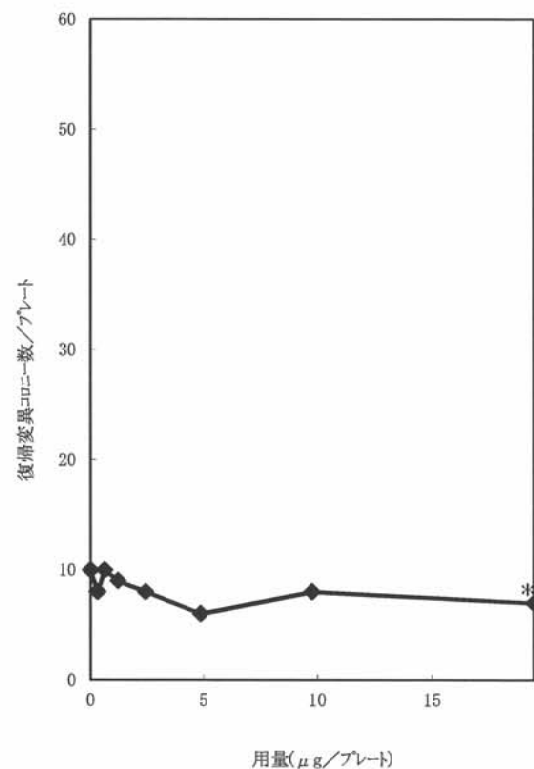


図-8 TA1537における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)

注：生育阻害が認められる場合は、該当するポイントの左上に*を付した。

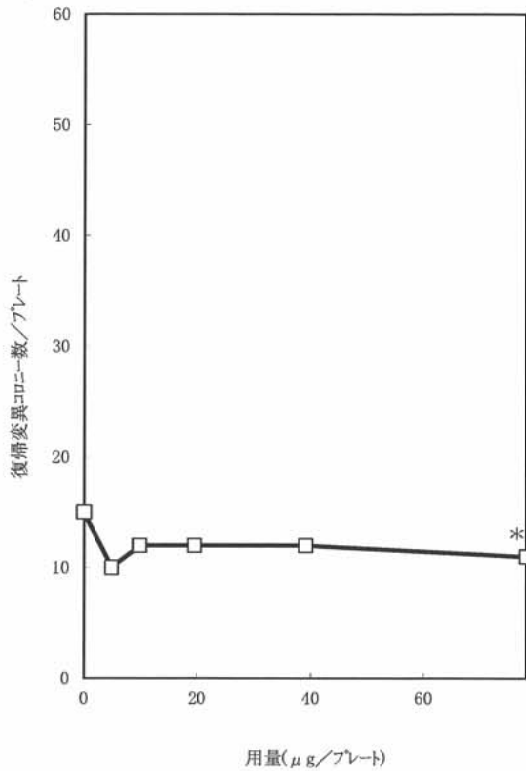


図-13 TA1535における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験-2)

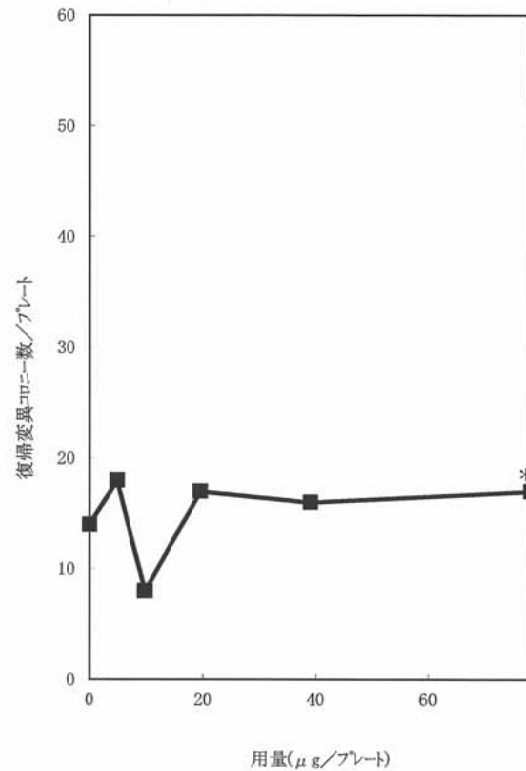


図-14 TA1535における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験-2)

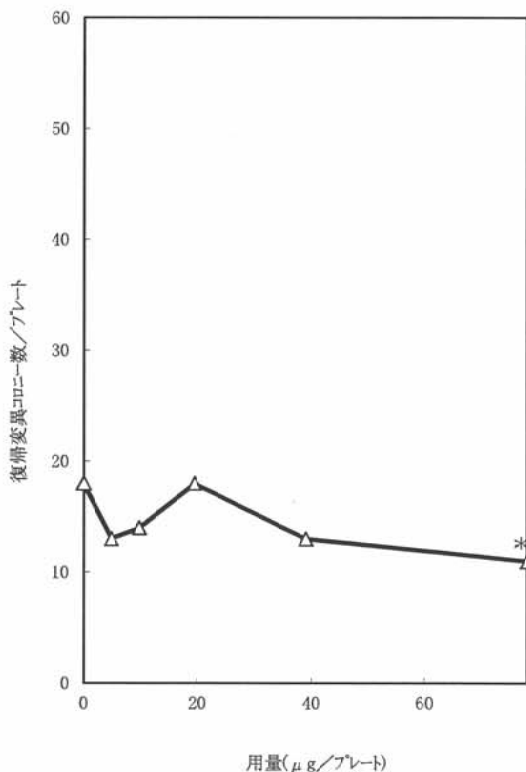


図-15 TA98における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験-2)

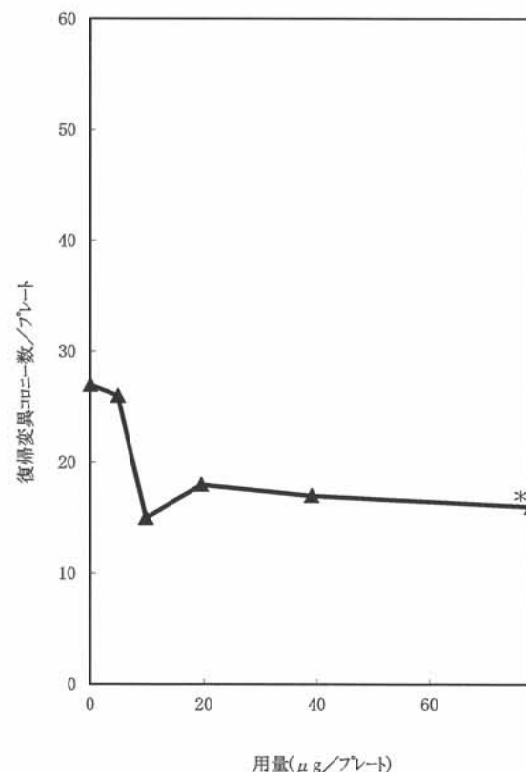
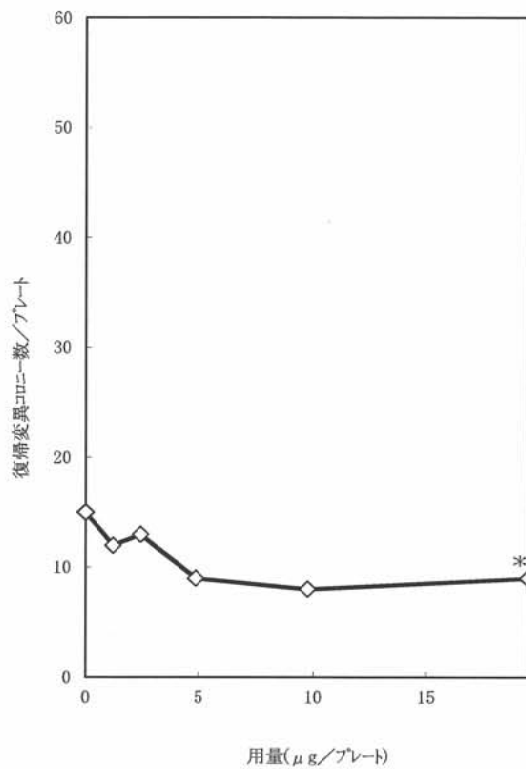
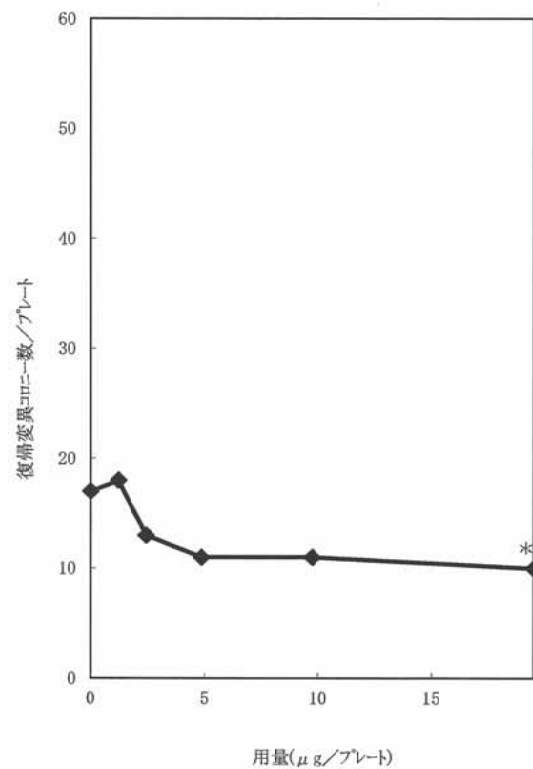


図-16 TA98における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験-2)

注：生育阻害が認められる場合は、該当するポイントの左上に*を付した。



用量(μg/プレート)
 図-17 TA1537における用量-反応曲線
 直接法による場合 (本試験-2)



用量(μg/プレート)
 図-18 TA1537における用量-反応曲線
 代謝活性化法による場合 (本試験-2)

注：生育阻害が認められる場合は、該当するポイントの左上に*を付した。