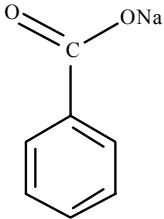


微生物を用いる変異原性試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	安息香酸ナトリウム		
別 名	ナトリウム=ベンゾアート*		
構造式又は示性式 (い ずれも不明な場合はそ の製法の概要)			
試験に供した新規 化学物質の純度	99.8%	試験に供した新規化 学物質の Lot No.	U2289
不純物の名称及び濃度	塩基 (NaOH) ; 0.04%以下、塩素化合物 (Cl) ; 0.02%以下、硫酸 塩 (SO ₄) ; 0.3%以下、フタル酸塩 ; 0.005%以下、重金属 (Pb) 、 鉄 (Fe) ; 0.001%以下、砒素 (As) ; 3 ppm 以下		
CAS 番号	532-32-1	蒸気圧	3.67×10 ⁻⁹ mmHg (25°C) *
分子量	144.10	分配係数	-2.13*
融 点	>300°C*	常温における性状	固体
沸 点	/		
安定性	適切な条件下においては安定。		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中での安定性
	水	50 mg/mL で溶解	発熱、ガスの発生等の反応性なし
	DMSO	/	/
	アセトン	/	/
	その他	/	/

(備考) 上記被験物質情報は、製造元からの情報及び*：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、溶解度及び溶媒中での安
定性については、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。

2. 試験に用いた菌株

菌株名	入手先	入手年月日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA98	国立医薬品食品衛生研究所	1997年10月9日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA100	国立医薬品食品衛生研究所	1997年10月9日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535	国立医薬品食品衛生研究所	1997年10月9日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1537	国立医薬品食品衛生研究所	1997年10月9日
<i>Escherichia coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	独立行政法人 製品評価技術基盤機構	2011年10月20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	2013年9月26日製造
購入の場合 Lot No.	RAA20130926
保存温度	-88.1~-78.8°C (保存期間: 2013年10月23日~2014年1月31日)

(2) S9の調製方法

使用動物		誘導物質	
種・系統	ラット・SD系	名称	PB& 5,6-BF
性	雄	投与方法	腹腔内投与
週齢	7週齢	投与期間及び 投与量 (mg/kg 体重)	PB4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)
体重	187-230 g		

(3) S9Mixの組成

成分	S9Mix 1mL 中の量	成分	S9Mix 1mL 中の量
S9	0.1 mL	NADPH	4 μmol
MgCl ₂	8 μmol	NADH	4 μmol
KCl	33 μmol	Na-リン酸緩衝液	100 μmol
グルコース-6-リン酸	5 μmol	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(%)
	注射用水	株式会社 大塚製薬工場	K2L79	日本薬局方	
溶媒選択の理由	水について溶解性試験を実施した。その結果、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。				
被験物質溶液の性状	<input checked="" type="radio"/> 溶解 <input type="radio"/> 懸濁 <input type="radio"/> 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	用時調製・室温				
純度換算の有無	有 <input checked="" type="radio"/> 無				

5. 前培養の条件

(1) 条件

ニュートリエントブロス	名 称	製 造 元	Lot No.
	Nutrient Broth No.2	OXOID LTD.	876774
前培養時間	9時間		
培養容器(形状・容器)	L字管・48mL		
培養液量	10 mL	接種菌量	<i>S. typhimurium</i> 株 20 µL <i>E. coli</i> 株 10 µL

(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	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
生菌数 (× 10 ⁹ /mL)	用量設定試験	5.43	6.11	8.77	6.69	4.67
	本試験	5.41	6.33	8.84	6.62	4.75
	追加確認試験					4.84
測定方法		①. O.D.値より換算 2. 段階希釈法 3. その他				

6. 最小グルコース寒天平板培地

自製・購入の別	1. 自製 (2) 購入 (購入元 極東製薬工業株式会社)
製造年月日	2013年10月16日製造 ¹⁾ 2013年10月11日製造 ²⁾
購入の場合の Lot No.	DZLEAG01 ¹⁾ DZLEAB01 ²⁾
使用寒天の名称・製造・Lot No.	OXOID AGAR No.1・OXOID LTD.・Lot No. 1213483-02

1) 用量設定試験及び追加確認試験に使用 2) 本試験に使用

7. 試験の方法

(1) 試験方法とその選択理由

採用した試験方法	(1) プレインキュベーション法 2. プレート法 3. その他
その他の場合は その選択理由	

(2) 試験条件

組 成	菌懸濁液	0.1 mL
	被験物質溶液	0.1 mL
	Na-リン酸緩衝液 (直接法による場合)	0.5 mL
	S9Mix (代謝活性化法による場合)	0.5 mL
	トップアガー	2.0 mL
プレインキュベーション	温度	37°C
	時間	20 分間
インキュベーション	温度	37°C
	時間 (用量設定試験)	48 時間
	時間 (本試験)	49 時間
	時間 (追加確認試験)	48 時間

8. コロニー計測の方法

計測方法	1. マニュアル計測 (2) 機器計測
補正の有無	1. 無 (2) 有 (補正の方法 面積補正:補正值 1.21)

9. 試験の結果

- (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別表 1、本試験の結果を別表 2、追加確認試験の結果を別表 3 に示した。なお、図 1~10 は別表 2、図 11 は別表 3 より作成した。また、当該試験の参考データとして参照した背景データを Attached Data として添付した。</p> <p>用量設定試験、本試験及び追加確認試験のいずれも、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。なお、代謝活性化した場合の <i>S. typhimurium</i> TA1537 について用量設定試験において、最低用量で陰性対照値の 2 倍には満たないが復帰変異コロニー数の増加が認められたため追加確認試験を実施したが、その結果復帰変異コロニー数の増加も用量反応性も認められなかったため、用量設定試験における復帰変異コロニー数の増加は変異の誘発によるものではなく、偶発的な要因によるものと判断した。</p> <p>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。</p> <p>以上の試験結果より、本試験条件下において安息香酸ナトリウムは、微生物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。</p>		

(3) 参考事項

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認められなかった。

代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA1537 については、より低用量での復帰変異コロニー数の増加も考えられるため、4.88 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 用量による追加確認試験を実施した。

被験液の調製及び試験操作は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で実施した。

(別表1)

試験結果表(用量設定試験)

被験物質の名称：安息香酸ナトリウム

No. T-1445

試験実施期間		2014年1月16日 より 2014年1月20日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	復帰変異数(コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix (-)	陰性対照 (注射用水)	73 78 (76)	7 8 (8)	14 12 (13)	19 11 (15)	15 11 (13)	
	1.22	82 89 (86)	13 11 (12)	15 17 (16)	21 15 (18)	7 11 (9)	
	4.88	66 72 (69)	11 10 (11)	22 24 (23)	18 22 (20)	13 11 (12)	
	19.5	70 73 (72)	10 9 (10)	14 20 (17)	16 13 (15)	10 11 (11)	
	78.1	87 99 (93)	9 7 (8)	12 15 (14)	21 13 (17)	9 13 (11)	
	313	89 73 (81)	7 10 (9)	15 22 (19)	21 23 (22)	7 15 (11)	
	1250	81 80 (81)	7 6 (7)	11 15 (13)	10 18 (14)	13 6 (10)	
	5000	73 73 (73)	6 8 (7)	16 26 (21)	24 10 (17)	4 8 (6)	
S9Mix (+)	陰性対照 (注射用水)	111 113 (112)	8 5 (7)	23 25 (24)	34 25 (30)	11 13 (12)	
	1.22	111 129 (120)	3 10 (7)	18 22 (20)	38 46 (42)	22 20 (21)	
	4.88	113 123 (118)	9 10 (10)	16 15 (16)	47 50 (49)	16 14 (15)	
	19.5	116 148 (132)	8 7 (8)	21 16 (19)	47 55 (51)	12 13 (13)	
	78.1	117 102 (110)	6 8 (7)	18 20 (19)	36 38 (37)	17 17 (17)	
	313	111 119 (115)	11 11 (11)	15 11 (13)	39 38 (39)	19 17 (18)	
	1250	102 99 (101)	7 10 (9)	19 30 (25)	31 33 (32)	15 16 (16)	
	5000	111 76 (94)	15 11 (13)	24 16 (20)	39 36 (38)	12 20 (16)	
陽性対照	S9Mixを必要とするもの	名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191
	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0	
	コロニー数/プレート	502 483 (493)	255 249 (252)	68 54 (61)	340 289 (315)	1137 1145 (1141)	
	S9Mixを必要とするもの	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0	
	コロニー数/プレート	994 966 (980)	283 284 (284)	1031 1065 (1048)	381 368 (375)	108 104 (106)	

(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

()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)

被験物質の名称：安息香酸ナトリウム

No. T-1445

試験実施期間		2014年1月24日 より 2014年1月27日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9Mix (-)	陰性対照 (注射用水)	88 101 (95)	10 6 (8)	12 14 (13)	17 12 (15)	5 4 (5)
	313	75 83 (79)	15 8 (12)	16 21 (19)	17 19 (18)	4 4 (4)
	625	96 100 (98)	11 8 (10)	19 15 (17)	14 16 (15)	6 5 (6)
	1250	94 94 (94)	6 8 (7)	15 24 (20)	15 17 (16)	6 4 (5)
	2500	102 97 (100)	5 8 (7)	19 12 (16)	14 11 (13)	3 6 (5)
	5000	95 87 (91)	10 11 (11)	16 21 (19)	15 11 (13)	5 5 (5)
	S9Mix (+)	陰性対照 (注射用水)	116 114 (115)	10 12 (11)	14 15 (15)	39 27 (33)
313		121 114 (118)	10 14 (12)	22 15 (19)	29 25 (27)	8 7 (8)
625		114 138 (126)	11 8 (10)	20 14 (17)	21 23 (22)	5 9 (7)
1250		104 90 (97)	9 7 (8)	22 13 (18)	21 37 (29)	6 6 (6)
2500		82 105 (94)	8 7 (8)	11 16 (14)	23 27 (25)	10 5 (8)
5000		118 99 (109)	8 10 (9)	17 19 (18)	26 20 (23)	9 4 (7)
陽性対照		名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2
	S9Mixを必要としないもの 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	554 538 (546)	226 257 (242)	61 64 (63)	426 412 (419)	1230 1180 (1205)
	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
	S9Mixを必要とするもの 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	973 910 (942)	356 294 (325)	834 770 (802)	295 290 (293)	85 84 (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

()内は、2枚のプレートの平均値を示す。

(別表3)

試験結果表 (追加確認試験)

被験物質の名称：安息香酸ナトリウム

No. T-1445

試験実施期間		2014年1月30日 より 2014年2月3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)	
		フレームシフト型	
		TA1537	
S9Mix (-)	陰性対照 (注射用水)	9	
		7	(8)
S9Mix (+)	陰性対照 (注射用水)	11	
		7	(9)
	0.31	6	
		8	(7)
	0.61	13	
		7	(10)
	1.22	7	
	5	(6)	
	2.44	11	
		9	(10)
	4.88	6	
		7	(7)
陽性対照	S9Mixを必要としないもの	名 称	ICR-191
		用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	1.0
		コロニー数/プレート	1110 1041 (1076)
	S9Mixを必要とするもの	名 称	B[a]P
		用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	5.0
		コロニー数/プレート	87 102 (95)

(備考)

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

B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

()内は、2枚のプレートの平均値を示す。

図 1

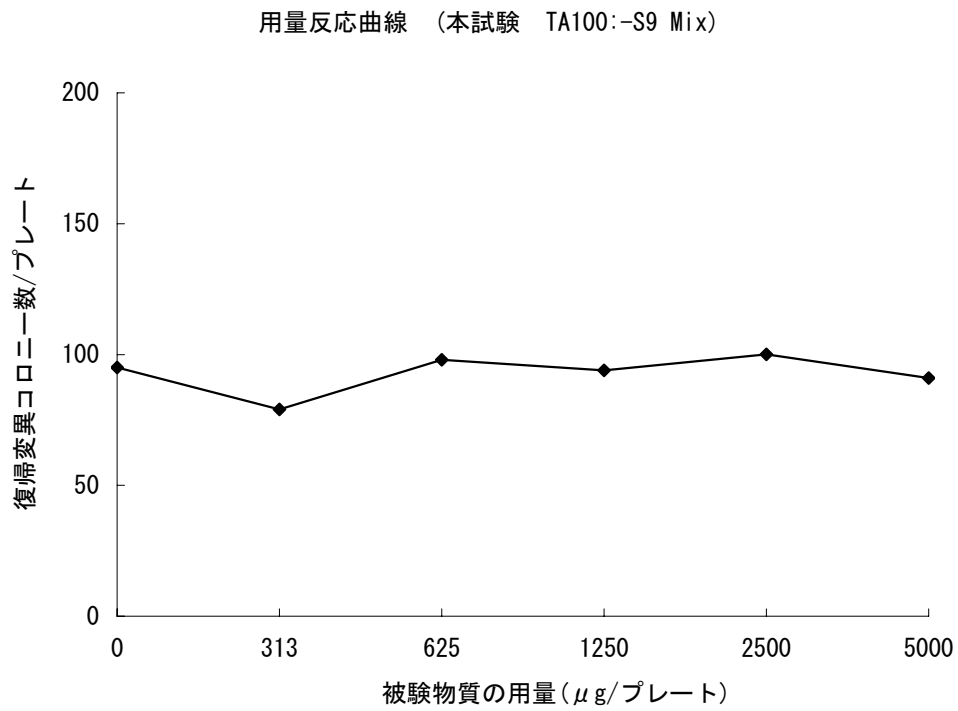


図 2

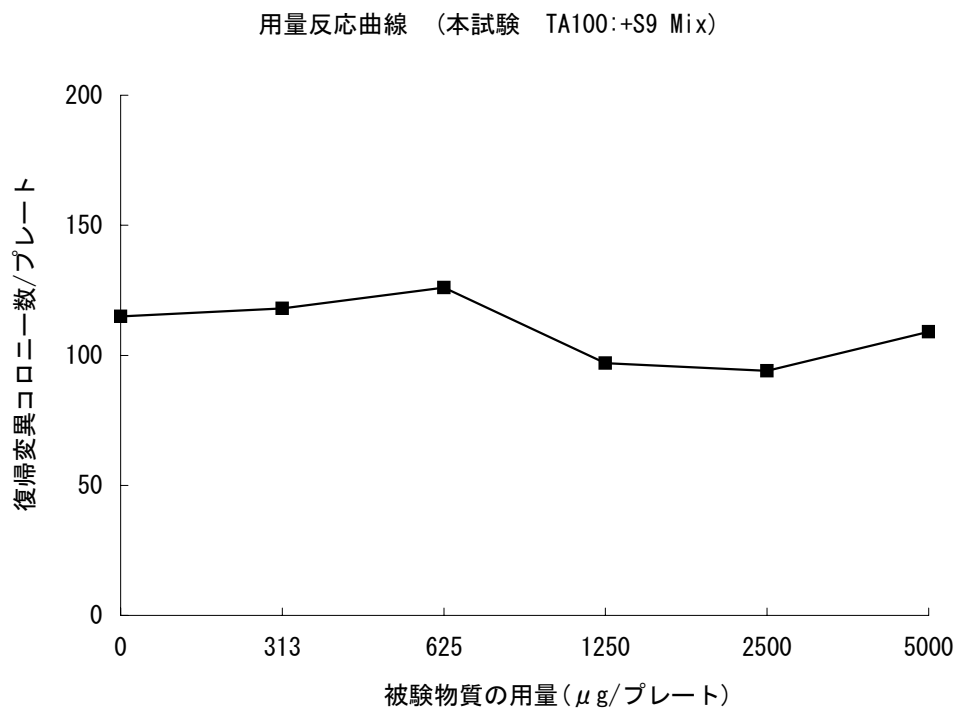


図 3

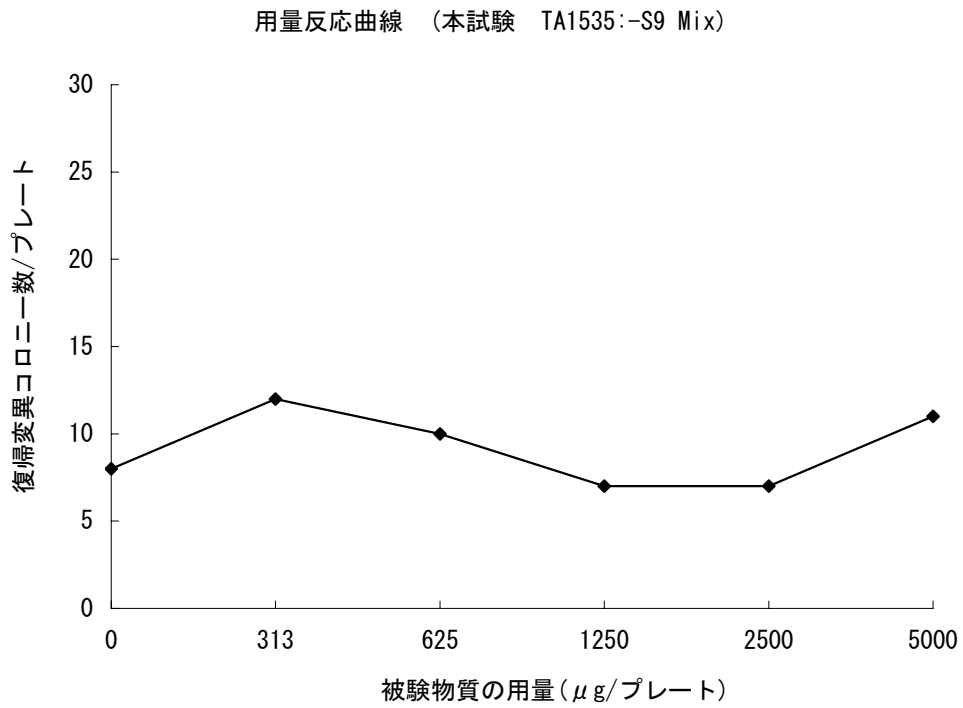


図 4

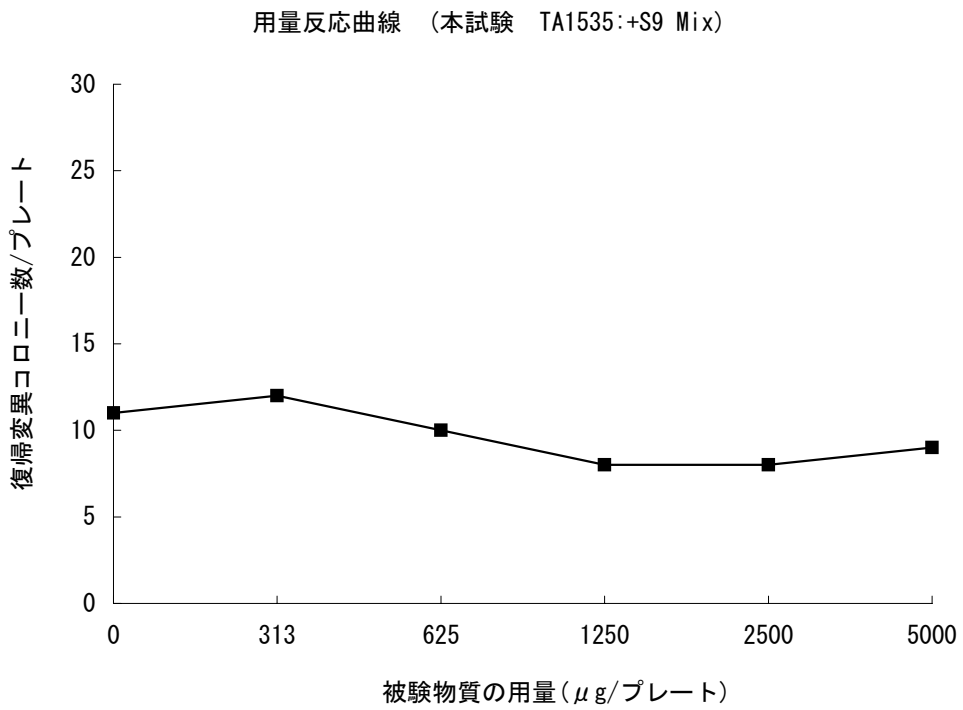


図 5

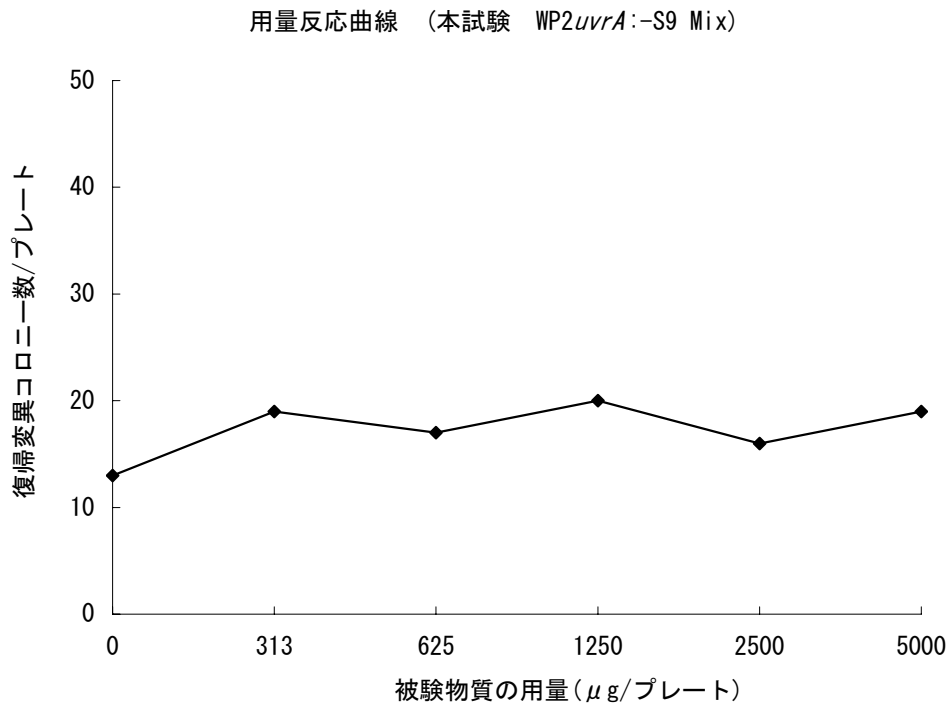


図 6

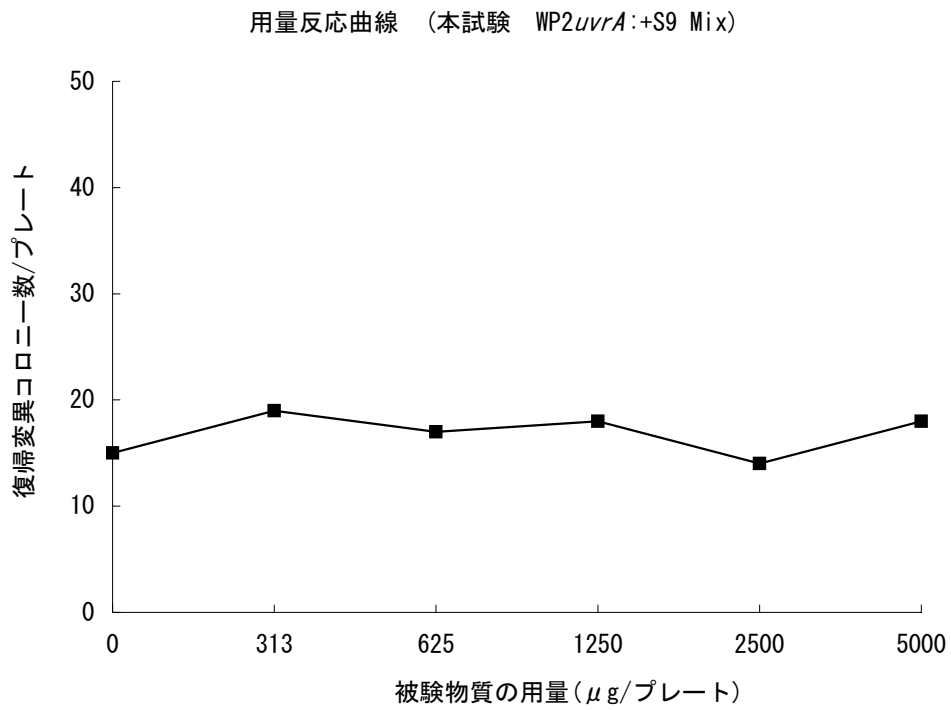


図 7

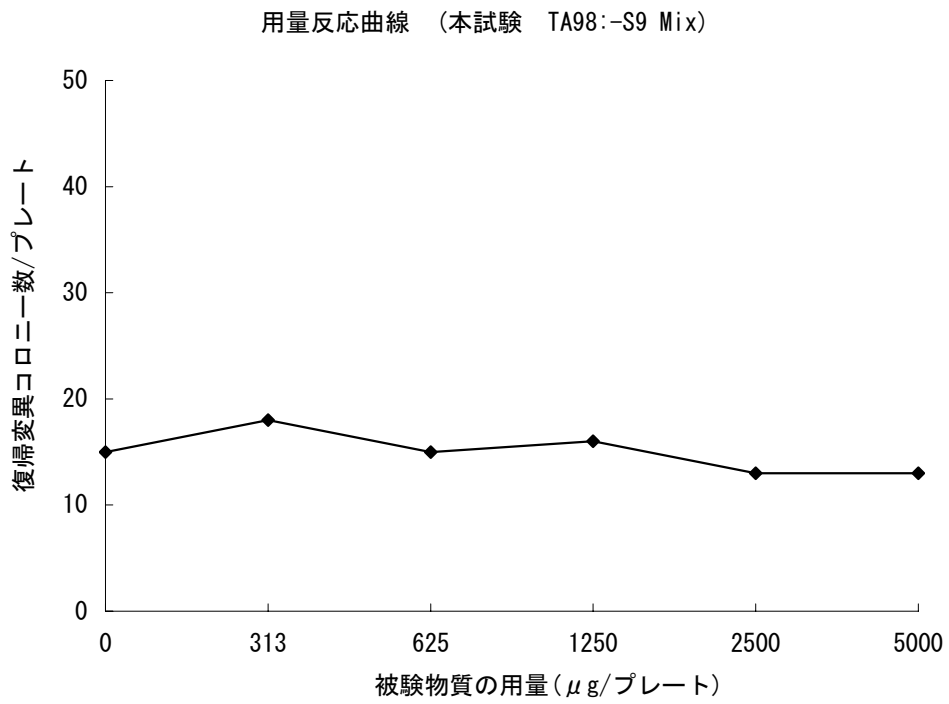


図 8

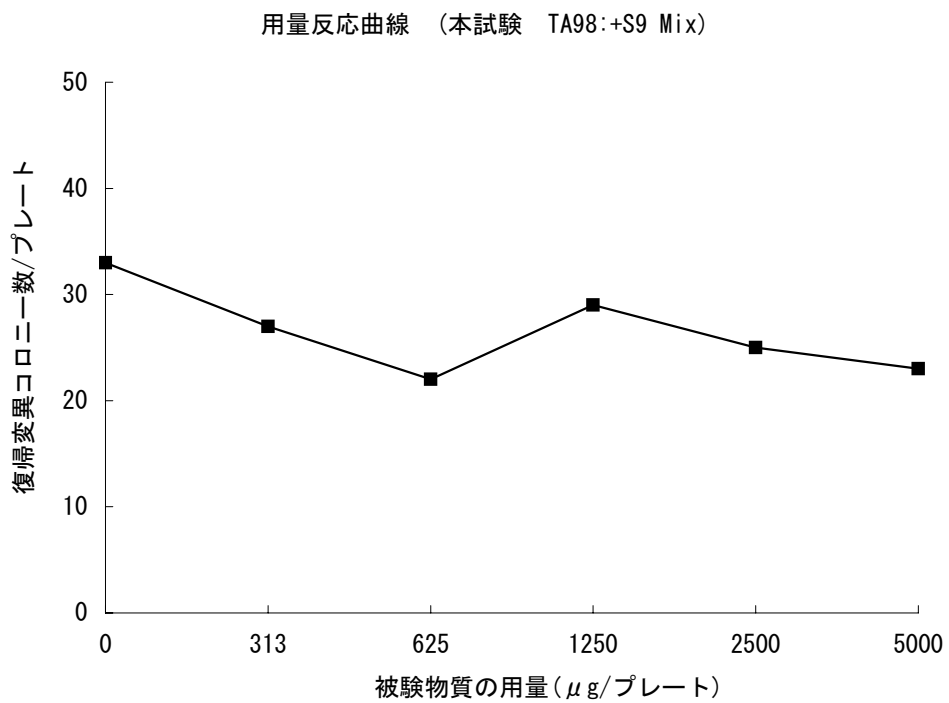


図 9

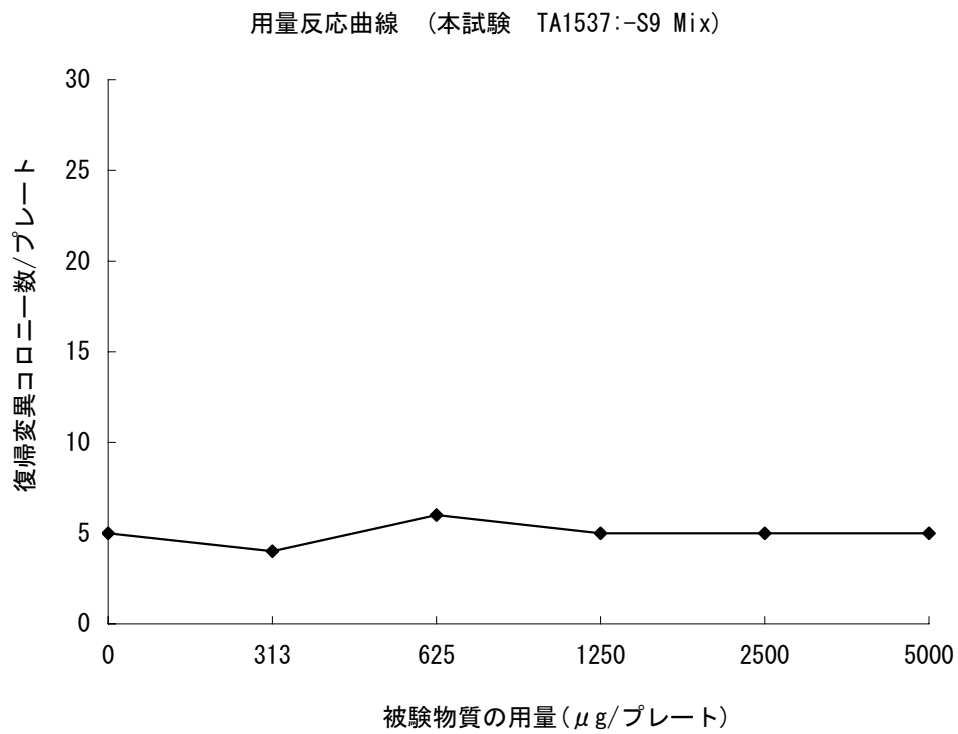


図 10

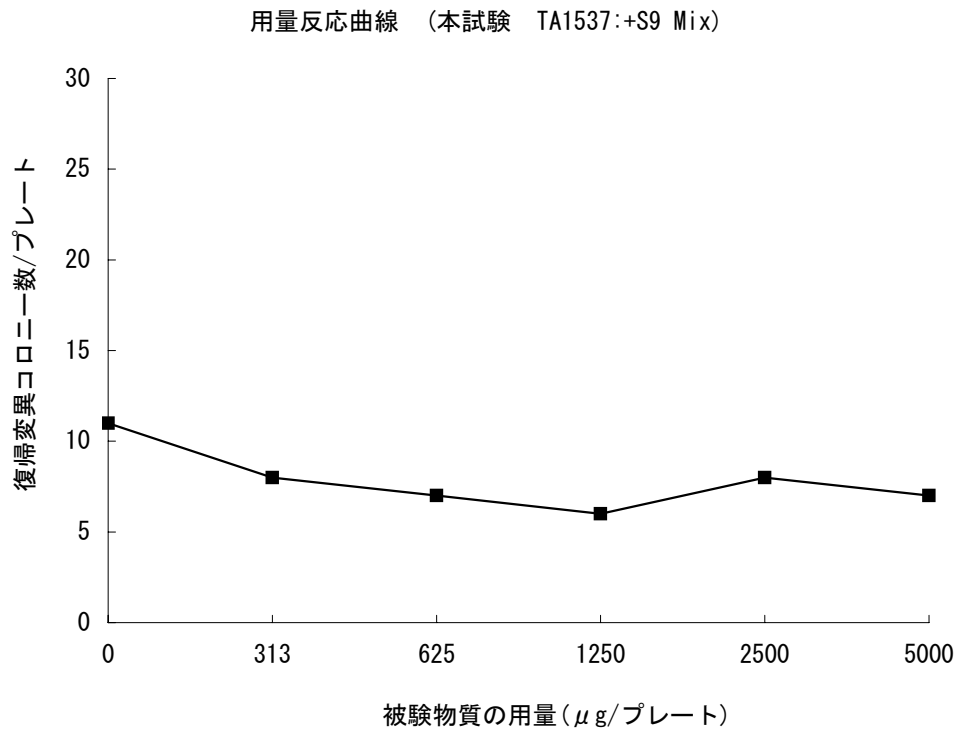


図 11

用量反応曲線 (追加確認試験 TA1537:+S9 Mix)

