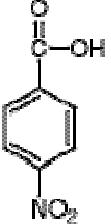


## 微生物を用いる変異原性試験結果報告書

### 1. 一般的な事項

新規化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	p-ニトロ安息香酸		
別 名			
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.	CTR6780
不純物の名称及び濃度			
CAS 番号	62-23-7	蒸気圧	
分子量	167.12	分配係数	1.89*
融 点	241.8°C*	常温における性状	わずかにうすい黄色、結晶性粉末
沸 点			
安定性	光により変質する		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中での安定性
	水	溶けない	
	DMSO	50 mg/mL で溶解	発熱、ガスの発生等の反応性なし

(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 (CHRIPI) の情報による。なお、溶解度及び溶媒中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度試験の結果である。

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 uvrA	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	2015年 11月 27日 製造
購入の場合 Lot No.	RAA201511B
保存温度	-86.5~ -70.6°C (保存期間: 2015年12月17日~2016年3月11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	197~252 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 <sub>2</sub>	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(%)
	DMSO	和光純薬工業 株式会社	ECH3050	JIS 規格 試薬特級	99.0%以上
溶媒選択の理由	水に溶けないと情報より、DMSO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 DMSO を溶媒として試験を実施した。なお、被験液の調製には、モレキュラーシーブス 4A 1/16（和光純薬工業株式会社；Lot No. HWL7297）で脱水した DMSO を使用した。				
被験物質溶液の性状	<input checked="" type="checkbox"/> 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	用時調製・室温				
純度換算の有無	<input checked="" type="checkbox"/> 有			<input type="checkbox"/> 無	

#### 5. 前培養の条件

##### (1) 条件

ニュートリエントプロス	名 称	製 造 元	Lot No.
	Nutrient Broth No.2	OXOID LTD.	1239615
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 <sup>9</sup> /mL)	用量設定試験	3.94	4.47	8.95	4.94
	本試験	4.15	4.74	8.40	6.34
	追加確認試験	4.35			
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	2016年 2月 5日 (DZLH2501) 2016年 2月 9日 (DZLH2901)
購入の場合のLot No.	DZLH2501 (用量設定試験に使用) DZLH2901 (本試験、追加確認試験に使用)
使用寒天の名称・製造・Lot No.	OXOID AGAR No.1・OXOID LTD.・Lot No. 1309432

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
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	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
判定の理由		
<p>用量設定試験の結果を別表1に、本試験の結果を別表2に、追加確認試験の結果を別表3に、比活性を別表4に示した。なお、図1~10は別表2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>用量設定試験及び本試験ともに代謝活性化しない場合の <i>S. typhimurium</i> TA100、TA1535において、陰性対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の用量反応性を伴う増加が認められた。代謝活性化した場合の <i>S. typhimurium</i> TA100においても、本試験及び追加確認試験において、陰性対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の用量反応性を伴う増加が認められた。なお、最大比活性値は、本試験の代謝活性化しない場合の <i>S. typhimurium</i> TA100の <math>8.18 \times 10^2</math> (Rev/mg) であった。</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p-ニトロ安息香酸は、微生物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。</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。

菌に対する生育阻害は、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA株の 1250 µg/plate以上、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA株の 2500 µg/plate以上の用量で認められた。

代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA100においては、本試験において復帰変異コロニー数の陰性対照値の2倍以上の増加が認められたため、同一用量で追加確認試験を実施し、再現性の確認をした。

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: p-ニトロ安息香酸

No. T-1993

試験実施期間		2016年2月19日より2016年2月22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(DMSO)	103 118 ( 111 )	8 7 ( 8 )	26 25 ( 26 )	20 24 ( 22 )	6 4 ( 5 )
	1.22	117 134 ( 126 )	4 5 ( 5 )	15 29 ( 22 )	22 31 ( 27 )	5 5 ( 5 )
	4.88	119 134 ( 127 )	7 12 ( 10 )	14 21 ( 18 )	13 20 ( 17 )	6 5 ( 6 )
	19.5	123 141 ( 132 )	8 14 ( 11 )	15 18 ( 17 )	18 16 ( 17 )	5 9 ( 7 )
	78.1	157 143 ( 150 )	11 15 ( 13 )	19 27 ( 23 )	13 19 ( 16 )	7 5 ( 6 )
	313	323 388 ( 356 )	68 50 ( 59 )	28 35 ( 32 )	23 20 ( 22 )	4 9 ( 7 )
	1250	442 * 517 * ( 480 )	12 * 14 * ( 13 )	15 23 ( 19 )	16 * 27 * ( 22 )	0 * 0 * ( 0 )
	5000	0 * 0 * ( 0 )	0 * 0 * ( 0 )	19 21 ( 20 )	16 * 14 * ( 15 )	0 * 0 * ( 0 )
	S9Mix(+)	陰性対照(DMSO)	148 160 ( 154 )	12 15 ( 14 )	33 35 ( 34 )	39 35 ( 37 )
		1.22	158 171 ( 165 )	15 10 ( 13 )	30 32 ( 31 )	38 40 ( 39 )
		4.88	154 166 ( 160 )	7 11 ( 9 )	28 35 ( 32 )	42 33 ( 38 )
		19.5	156 175 ( 166 )	10 12 ( 11 )	30 29 ( 30 )	26 33 ( 30 )
		78.1	181 168 ( 175 )	8 10 ( 9 )	33 37 ( 35 )	40 35 ( 38 )
		313	167 189 ( 178 )	11 9 ( 10 )	25 36 ( 31 )	42 36 ( 39 )
		1250	159 186 ( 173 )	10 14 ( 12 )	30 22 ( 26 )	29 35 ( 32 )
		5000	0 * 0 * ( 0 )	11 * 10 * ( 11 )	28 25 ( 27 )	33 * 32 * ( 33 )
		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
陽性対照	S9Mixを必要としないもの	コロニー数/プレート	568 566 ( 567 )	266 230 ( 248 )	69 66 ( 68 )	414 381 ( 398 )
	S9Mixを必要とするもの	名 称	B[α]P	2AA	2AA	B[α]P
		用量( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	5.0	2.0	10.0	B[α]P
		コロニー数/プレート	849 832 ( 841 )	192 217 ( 205 )	600 766 ( 683 )	430 400 ( 415 )
		名 称	B[α]P	2AA	2AA	B[α]P
		用量( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	5.0	2.0	10.0	B[α]P

(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[α]P : ベンゾ[α]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)

被験物質の名称: p-二トロ安息香酸

No. T-1993

試験実施期間		2016年3月7日より2016年3月10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(DMSO)	117 108 ( 113 )	10 12 ( 11 )	22 21 ( 22 )	18 27 ( 23 )	6 5 ( 6 )
	39.1	126 140 ( 133 )	11 11 ( 11 )	NT	20 18 ( 19 )	7 4 ( 6 )
	78.1	168 182 ( 175 )	12 9 ( 11 )	NT	19 20 ( 20 )	3 7 ( 5 )
	156	214 206 ( 210 )	21 17 ( 19 )	NT	15 19 ( 17 )	7 7 ( 7 )
	313	418 320 ( 369 )	42 36 ( 39 )	24 25 ( 25 )	22 16 ( 19 )	5 8 ( 7 )
	625	517 551 ( 534 )	29 39 ( 34 )	19 38 ( 29 )	17 19 ( 18 )	6 8 ( 7 )
	1250	608 * 612 * ( 610 )	0 * 0 * ( 0 )	22 26 ( 24 )	18 * 21 * ( 20 )	0 * 0 * ( 0 )
	2500	NT	NT	19 19 ( 19 )	NT	NT
	5000	NT	NT	30 32 ( 31 )	NT	NT
	陰性対照(DMSO)	145 123 ( 134 )	11 8 ( 10 )	20 24 ( 22 )	35 40 ( 38 )	9 8 ( 9 )
	S9Mix(+)	150 146 ( 148 )	11 11 ( 11 )	NT	36 33 ( 35 )	6 5 ( 6 )
陽性対照	313	189 229 ( 209 )	13 13 ( 13 )	26 29 ( 28 )	32 27 ( 30 )	7 8 ( 8 )
	625	290 316 ( 303 )	7 9 ( 8 )	27 19 ( 23 )	30 24 ( 27 )	8 8 ( 8 )
	1250	360 345 ( 353 )	7 9 ( 8 )	22 31 ( 27 )	27 25 ( 26 )	6 7 ( 7 )
	2500	0 * 0 * ( 0 )	0 * 0 * ( 0 )	30 27 ( 29 )	26 * 32 * ( 29 )	0 * 0 * ( 0 )
	5000	0 * 0 * ( 0 )	0 * 0 * ( 0 )	14 15 ( 15 )	16 * 24 * ( 20 )	0 * 0 * ( 0 )
	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	590 584 ( 587 )	230 217 ( 224 )	69 70 ( 70 )	225 302 ( 264 )	975 888 ( 932 )
	名 称	B[α]P	2AA	2AA	B[α]P	B[α]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	871 980 ( 926 )	245 273 ( 259 )	580 631 ( 606 )	391 352 ( 372 )	106 107 ( 107 )

(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[α]P : ベンゾ[α]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、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 : p-ニトロ安息香酸

No. T-1993

試験実施期間		2016年3月10日より2016年3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
		TA100
S9Mix (+)	陰性対照(DMSO)	127 116 ( 122 )
	陰性対照(DMSO)	149 133 ( 141 )
		156
		162 ( 159 )
		247
		313 ( 229 )
		300
		625 ( 304 )
		267
		1250 ( 245 )
陽性対照	名 称	AF-2
	用 量 ( μg/プレート)	0.01
	コロニー数/プレート	626 597 ( 612 )
	名 称	B[a]P
S9Mix を必要とするもの	用 量 ( μg/プレート)	5.0
	コロニー数/プレート	848 920 ( 884 )

(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

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4)

## 比活性

被験物質の名称 : p-ニトロ安息香酸

No. T-1993

	菌株名	-S9Mix		+S9Mix	
		比活性	計算に使用した用量 ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	比活性	計算に使用した用量 ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )
用 量 設 定 試 験	TA100	$7.83 \times 10^2$	313		
	TA1535	$1.63 \times 10^2$	313		
	WP2 <i>uvrA</i>				
	TA98				
	TA1537				
本 試 験	TA100	$8.18 \times 10^2$	313	$2.70 \times 10^2$	625
	TA1535	$8.95 \times 10^1$	313		
	WP2 <i>uvrA</i>				
	TA98				
	TA1537				
追 加 確 認 試 験	TA100			$2.61 \times 10^2$	625

図 1

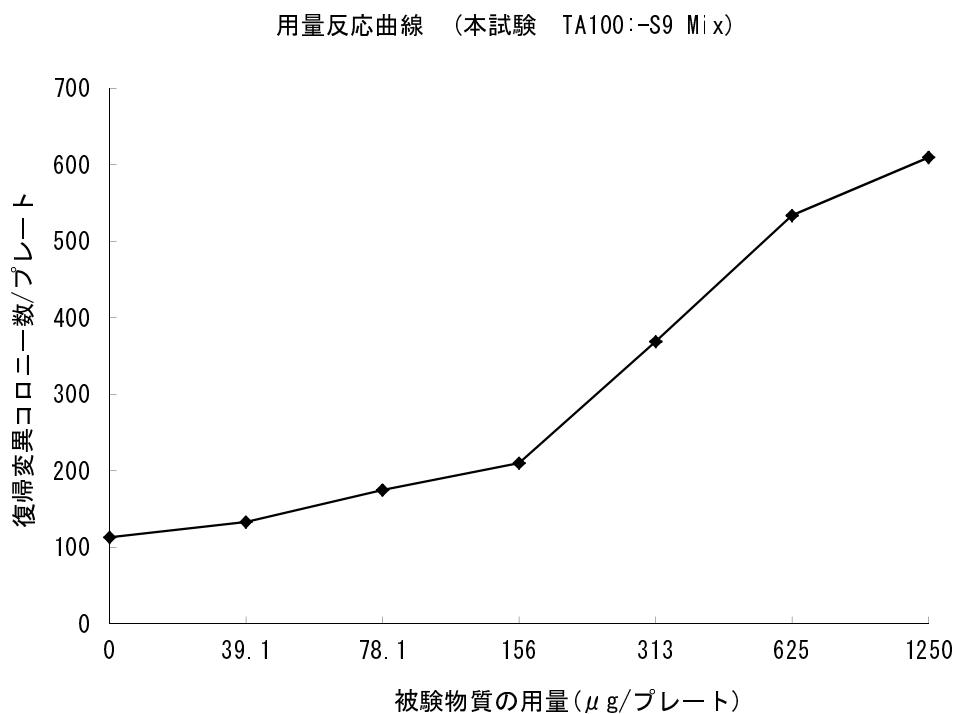


図 2

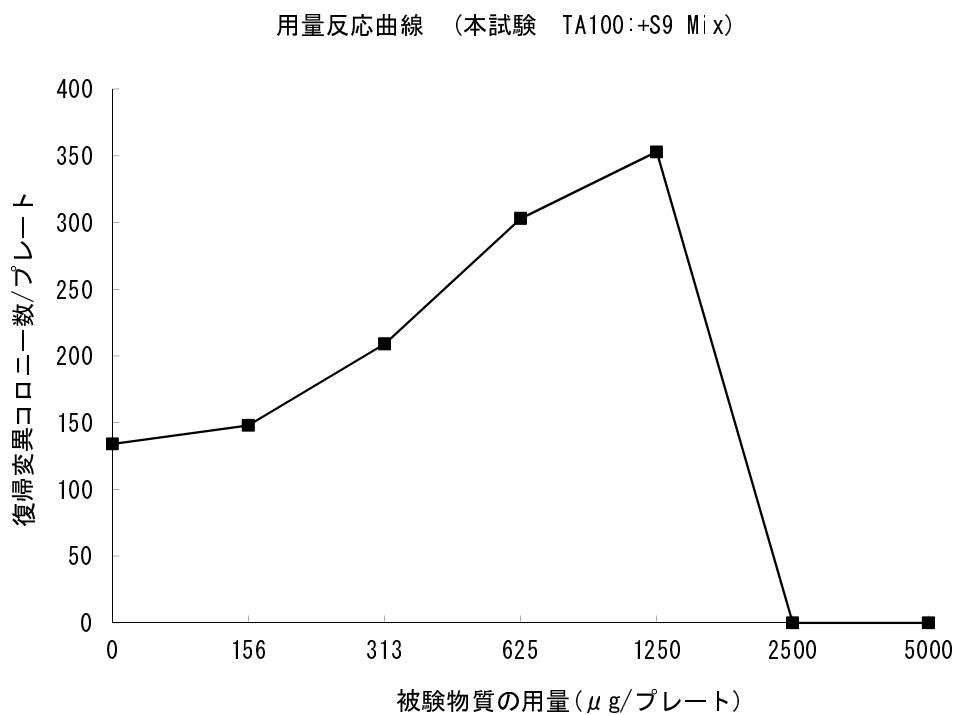


図 3

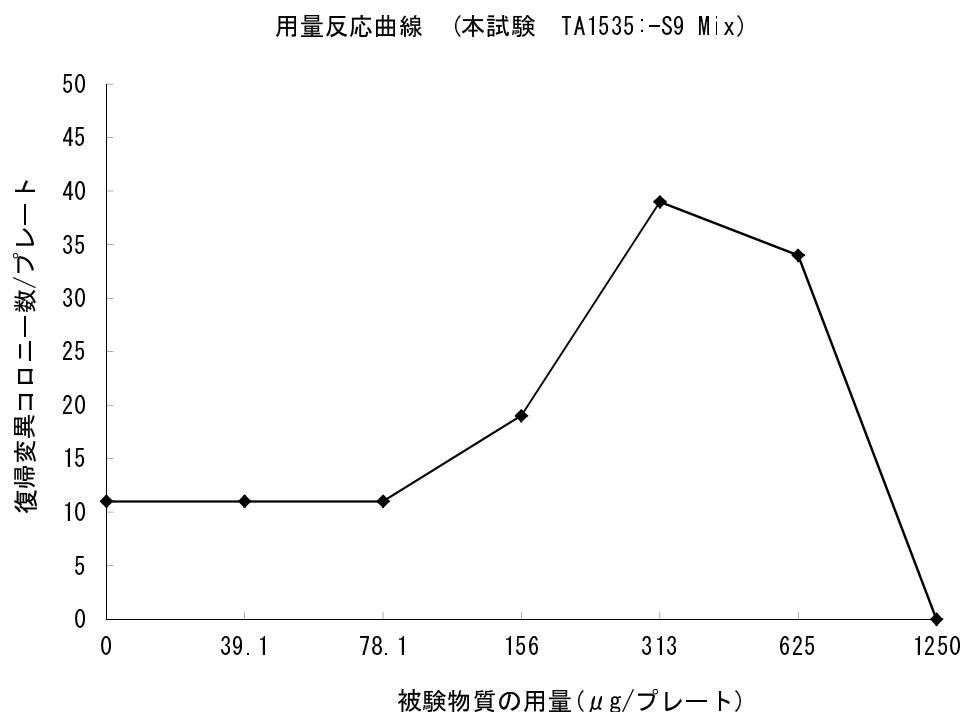


図 4

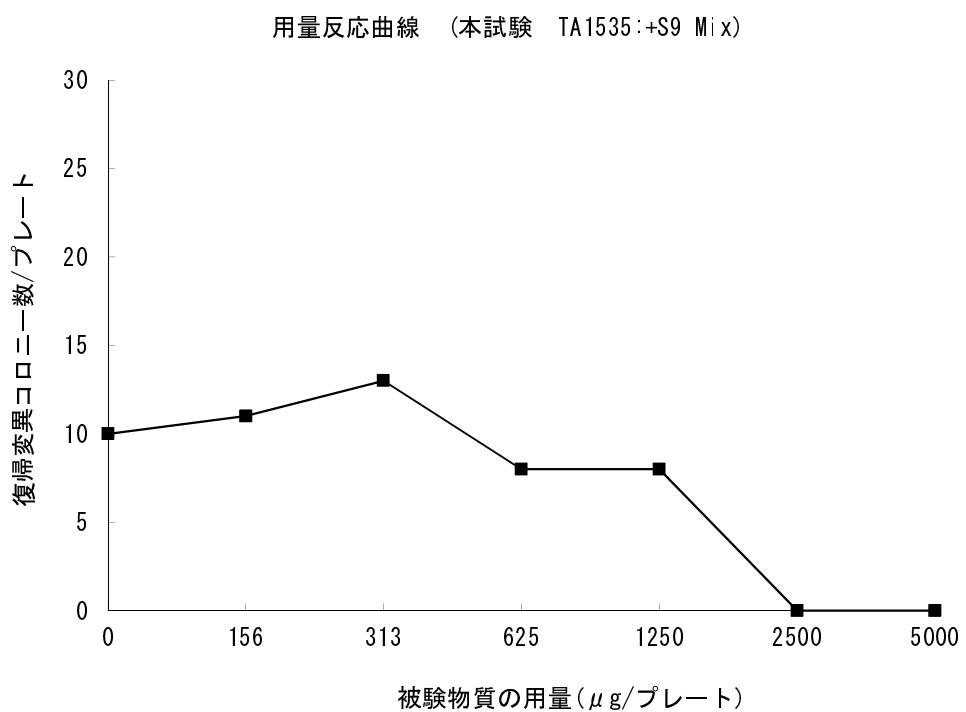


図 5

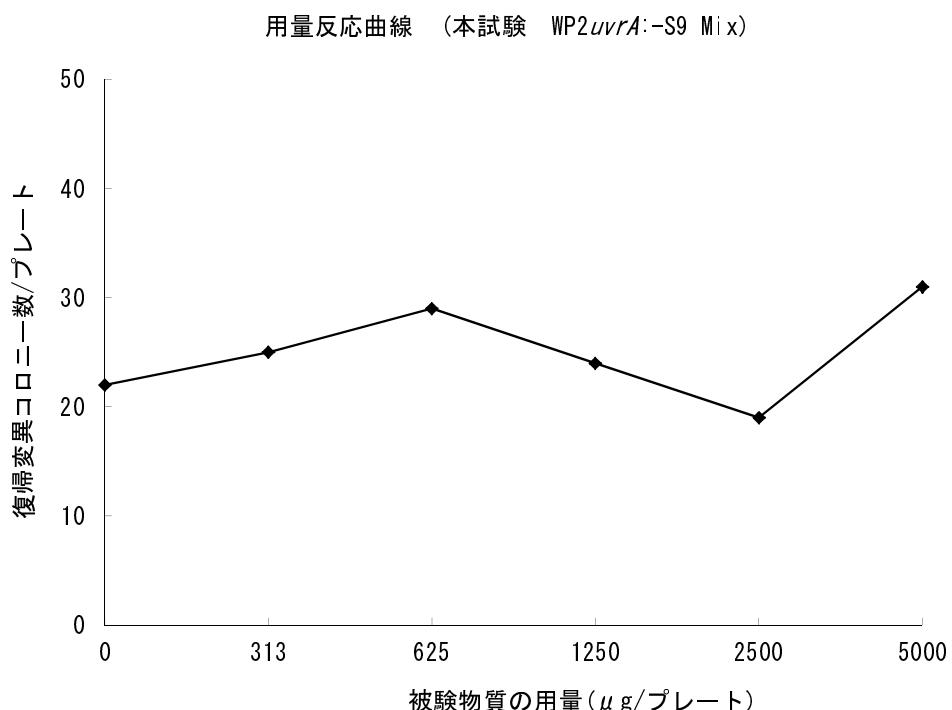


図 6

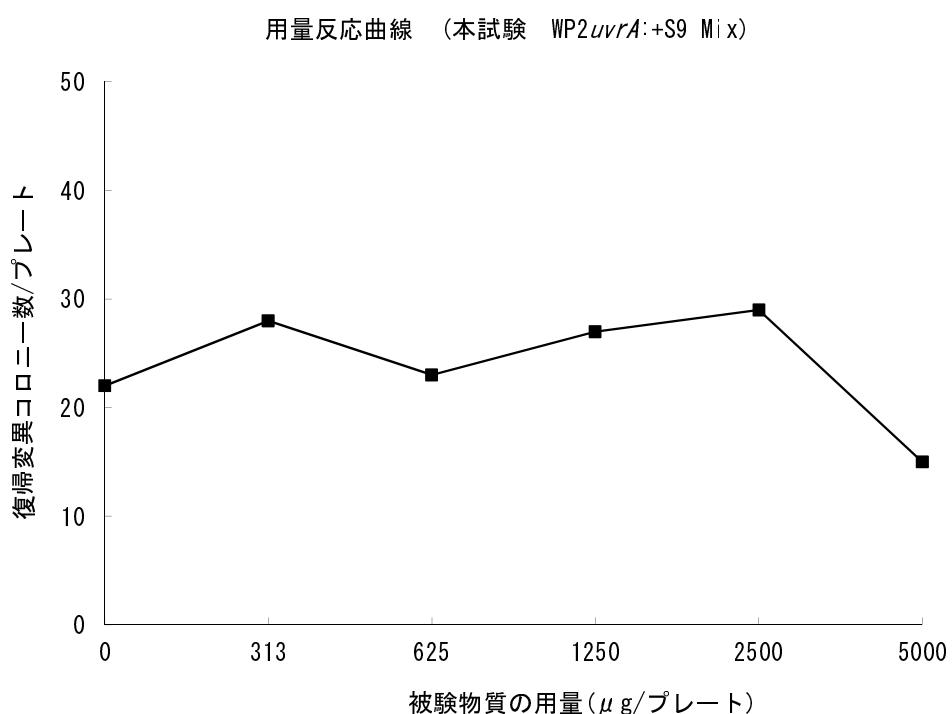


図 7

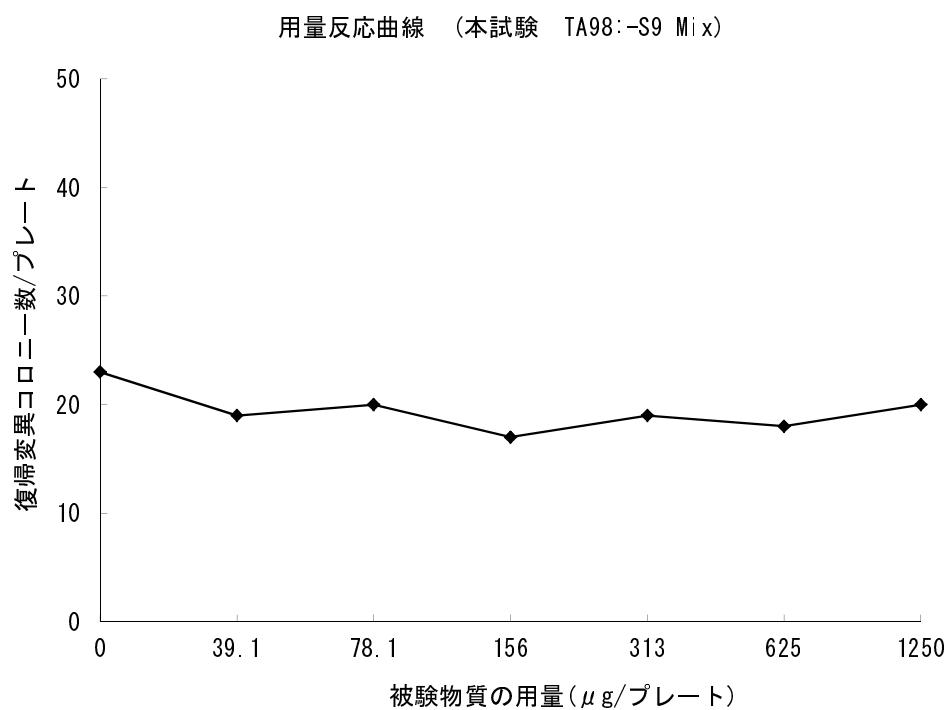


図 8

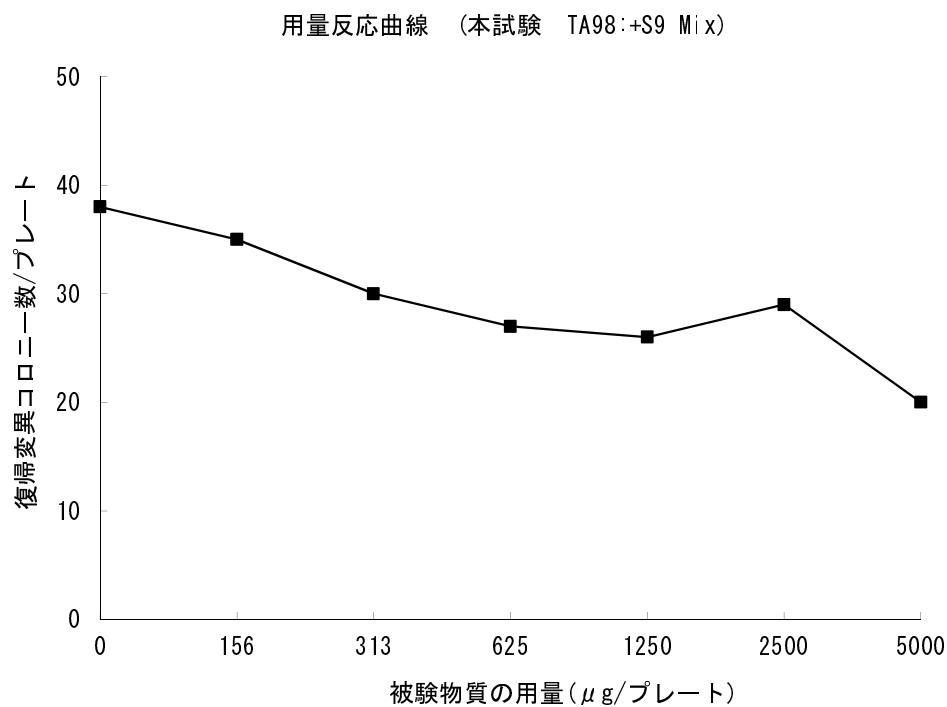


図 9

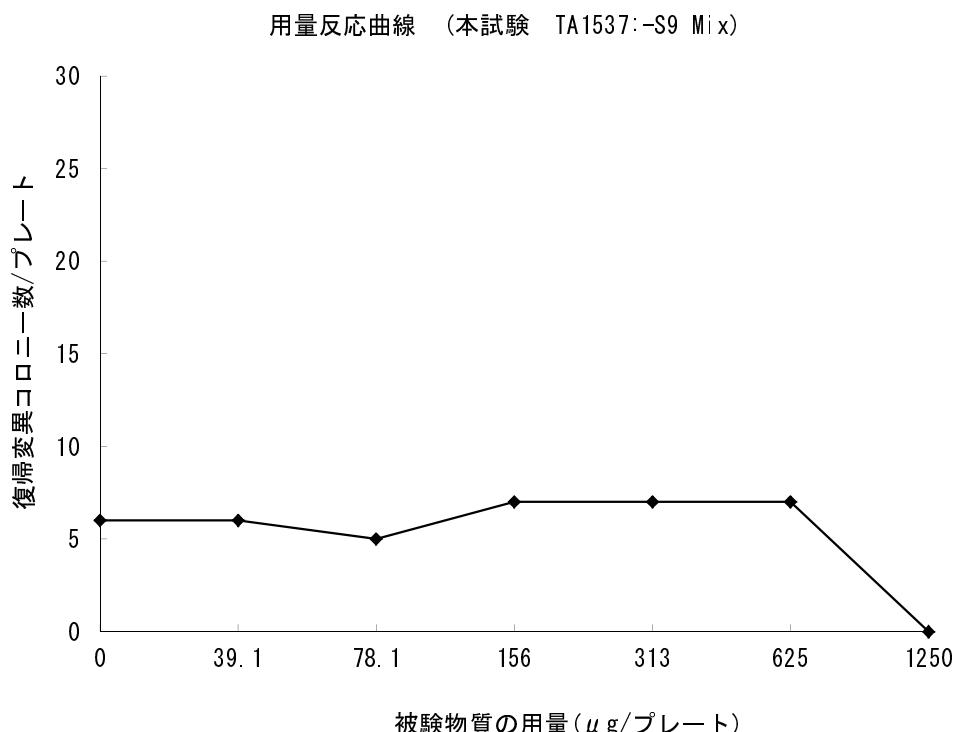


図 10

