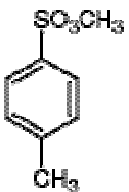


微生物を用いる変異原性試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	パラ-トルエンスルホン酸メチル		
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	99.5%	試験に供した新規化 学物質の Lot No.	ECN5597
不純物の名称及び濃度	/		
CAS 番号	80-48-8	蒸気圧	/
分子量	186.23	分配係数	/
融 点	24-29°C	常温における性状	液体 (比重 : 6.46)
沸 点	292°C		
安定性	/		
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 で不溶	発熱、ガスの発生等の反応性なし
	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 <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	2015年11月27日（RAA201511B） 2015年12月18日（RAA201512A）
購入の場合 Lot No.	RAA201511B（追加確認試験に使用） RAA201512A（用量設定試験、本試験に使用）
保存温度	-86.5~-70.6°C （保存期間：2016年12月17日~2016年3月8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 (RAA201511B) 190-243 g (RAA201512A)		

(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(%)
	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、DMSO について溶解性試験を実施した。その結果、水に 50 mg/mL で溶解せず、DMSO 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 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="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.	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 ⁹ /mL)	用量設定試験	4.30	4.80	8.50	6.02	3.70
	本試験	4.16	4.80	8.46	5.92	3.70
	追加確認試験	/	/	8.94	5.74	/
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 9日製造
購入の場合の Lot No.	DZLH2901
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
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	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 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、4 に、比活性値を別表 5 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の有無にかかわらず <i>S. typhimurium</i> TA100 及び代謝活性化した場合の <i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i> 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。代謝活性化しない場合の <i>S. typhimurium</i> TA98 及び <i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i> 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。代謝活性化した場合の <i>S. typhimurium</i> TA98 については本試験において 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が、追加確認試験において再現性が認められなかった。なお、最大比活性値は、用量設定試験の代謝活性化した場合の <i>S. typhimurium</i> TA100 の 3.76×10^3 (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パラ-トルエンスルホン酸メチルは、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* TA98 の 250 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1537 の 313 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA98 の 800 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *E. coli* WP2 *uvrA* の 1000 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535 及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1537 及び *E. coli* WP2 *uvrA* の 1250 µg/plate 以上の用量で認められた。

代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA98 及び代謝活性化しない場合の *E. coli* WP2 *uvrA* 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、より狭い用量域での公差による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：パラトルエンスルホン酸メチル

No. T-1995

試験実施期間		2016年3月2日 より 2016年3月5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)	129 136 (133)	13 15 (14)	31 24 (28)	19 22 (21)	8 10 (9)
	1.22	100 105 (103)	11 14 (13)	33 27 (30)	15 15 (15)	13 12 (13)
	4.88	108 110 (109)	11 10 (11)	21 27 (24)	19 16 (18)	8 8 (8)
	19.5	134 159 (147)	10 6 (8)	33 41 (37)	21 11 (16)	9 9 (9)
	78.1	232 218 (225)	9 11 (10)	34 40 (37)	19 22 (21)	14 7 (11)
	313	646 554 (600)	12 9 (11)	46 44 (45)	0 * 0 * (0)	7 * 10 * (9)
	1250	549 * 438 * (494)	0 * 0 * (0)	43 * 44 * (44)	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 (DMSO)	129 109 (119)	10 10 (10)	29 32 (31)	33 29 (31)
1.22		114 117 (116)	11 9 (10)	25 27 (26)	32 34 (33)	11 11 (11)
4.88		100 90 (95)	8 8 (8)	28 24 (26)	26 32 (29)	11 10 (11)
19.5		206 193 (200)	7 10 (9)	36 37 (37)	21 25 (23)	8 10 (9)
78.1		436 389 (413)	14 11 (13)	47 48 (48)	32 22 (27)	4 10 (7)
313		829 798 (814)	14 13 (14)	103 102 (103)	30 25 (28)	9 7 (8)
1250		986 * 865 * (926)	16 * 17 * (17)	53 * 77 * (65)	26 * 33 * (30)	0 * 0 * (0)
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	582 561 (572)	252 236 (244)	88 72 (80)	315 300 (308)	1245 1113 (1179)
	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	987 1162 (1075)	309 248 (279)	793 753 (773)	399 436 (418)	111 113 (112)

(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)

被験物質の名称：パラ-トルエンスルホン酸メチル

No. T-1995

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(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(DMSO)	120 106 (113)	13 12 (13)	30 31 (31)	18 20 (19)	8 12 (10)
	9.77	NT	NT	NT	21 18 (20)	8 9 (9)
	19.5	NT	NT	NT	18 15 (17)	8 10 (9)
	39.1	213 220 (217)	15 10 (13)	36 37 (37)	23 13 (18)	14 11 (13)
	78.1	317 320 (319)	12 15 (14)	42 42 (42)	24 29 (27)	15 14 (15)
	156	457 468 (463)	12 13 (13)	43 36 (40)	41 51 (46)	12 16 (14)
	313	557 586 (572)	14 18 (16)	57 48 (53)	26 * 30 * (28)	0 * 0 * (0)
	625	695 639 (667)	12 13 (13)	77 89 (83)	NT	NT
	1250	322 * 573 * (448)	0 * 0 * (0)	30 * 27 * (29)	NT	NT
	S9Mix (+)	陰性対照(DMSO)	129 123 (126)	14 14 (14)	36 31 (34)	28 28 (28)
39.1		247 232 (240)	12 13 (13)	51 35 (43)	22 25 (24)	16 7 (12)
78.1		365 386 (376)	12 14 (13)	62 67 (65)	33 28 (31)	11 10 (11)
156		627 666 (647)	16 14 (15)	96 113 (105)	42 34 (38)	11 12 (12)
313		833 826 (830)	22 18 (20)	136 128 (132)	37 34 (36)	13 11 (12)
625		983 997 (990)	16 21 (19)	178 156 (167)	68 57 (63)	10 10 (10)
1250		577 * 549 * (563)	11 * 11 * (11)	70 * 75 * (73)	38 * 24 * (31)	0 * 0 * (0)
陽性対照		名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2
	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	504 488 (496)	230 289 (260)	73 85 (79)	303 368 (336)	849 706 (778)
	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	831 870 (851)	209 201 (205)	575 731 (653)	438 423 (431)	91 117 (104)

(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、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 : TA98)

被験物質の名称 : パラトルエンスルホン酸メチル

No. T-1995

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 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)	
		フレームシフト型	
		TA98	
S9Mix (-)	陰性対照 (DMSO)	11 18	(15)
	50	18 19	(19)
	100	39 26	(33)
	150	57 53	(55)
	200	53 68	(61)
	250	33 * 46 *	(40)
	300	11 * 8 *	(10)
S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	23 31	(27)
	200	24 15	(20)
	400	24 12	(18)
	600	18 10	(14)
	800	5 * 12 *	(9)
	1000	5 * 8 *	(7)
	陽性対照	名称	AF-2
用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)		0.1	
コロニー数/プレート		319 324	(322)
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		322 309	(316)

(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)

試験結果表 (追加確認試験 : WP2uvrA)

被験物質の名称 : パラ-トルエンスルホン酸メチル

No. T-1995

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 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	復帰変異数(コロニー数/プレート)	
		塩基対置換型	
		WP2uvrA	
S9Mix (-)	陰性対照 (DMSO)	29 24	(27)
	200	56 51	(54)
	400	67 50	(59)
	600	83 85	(84)
	800	93 96	(95)
	1000	100 * 70 *	(85)
	陽性対照	S9Mixを必要としないもの	名称
		用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01
		コロニー数/プレート	75 67 (71)

(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

* : 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5)

比 活 性

被験物質の名称： パラ-トルエンスルホン酸メチル

No. T-1995

	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	1.49×10^3	313	3.76×10^3	78.1
	TA1535				
	WP2 <i>uvrA</i>			2.30×10^2	313
	TA98				
	TA1537				
本 試 験	TA100	2.64×10^3	78.1	3.34×10^3	156
	TA1535				
	WP2 <i>uvrA</i>	8.32×10^1	625	4.55×10^2	156
	TA98	1.73×10^2	156	5.60×10^1	625
	TA1537				
追 加 確 認 試 験	WP2 <i>uvrA</i>	1.35×10^2	200		
	TA98	2.67×10^2	150		

図 1

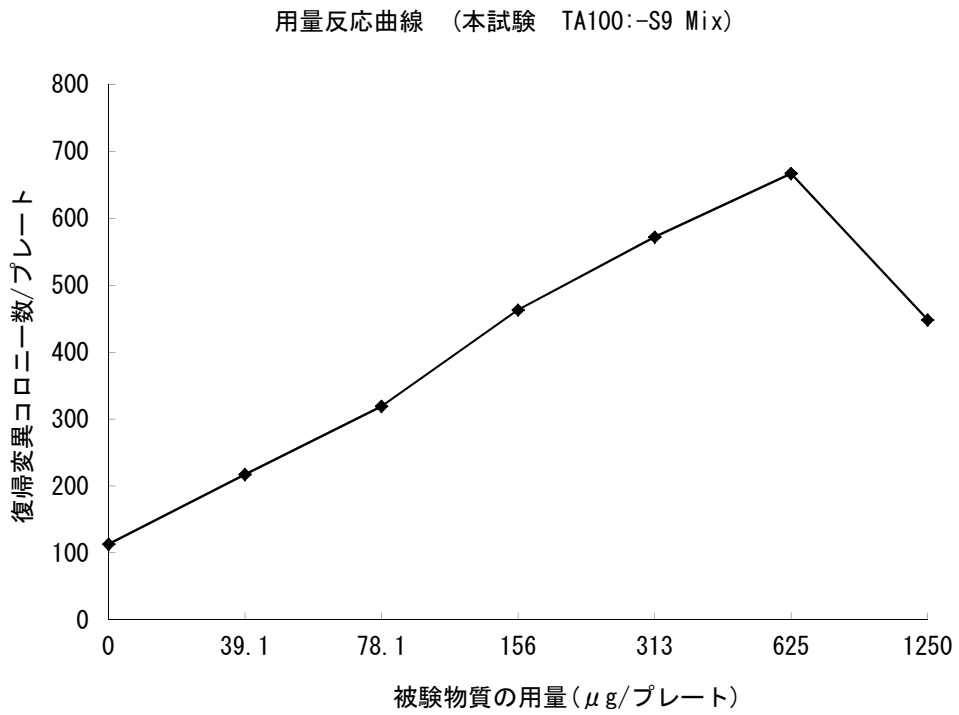


図 2

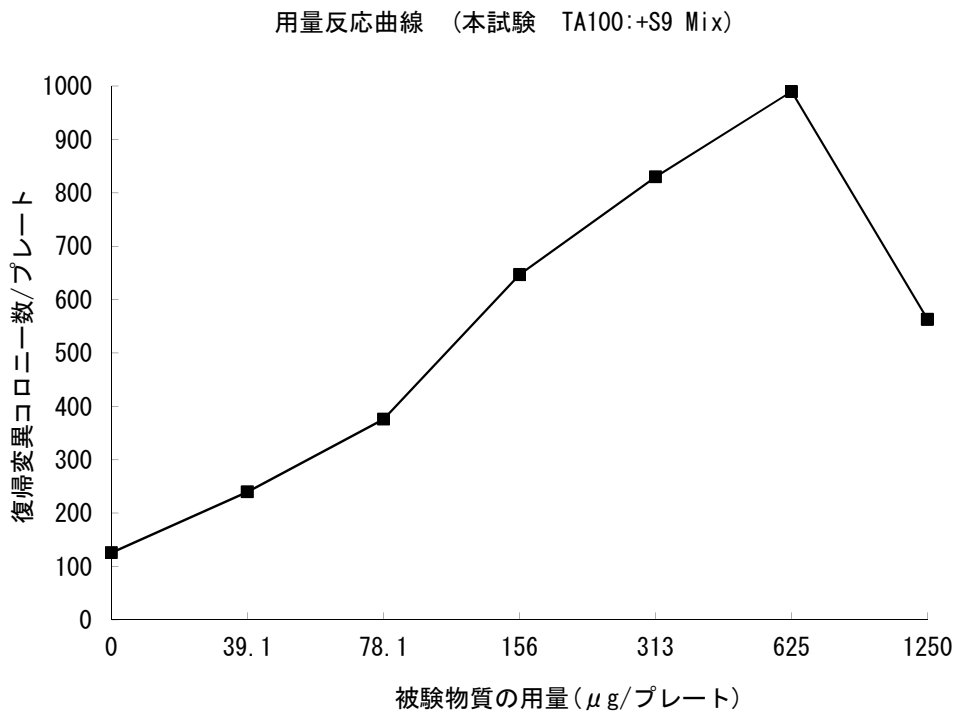


図 3

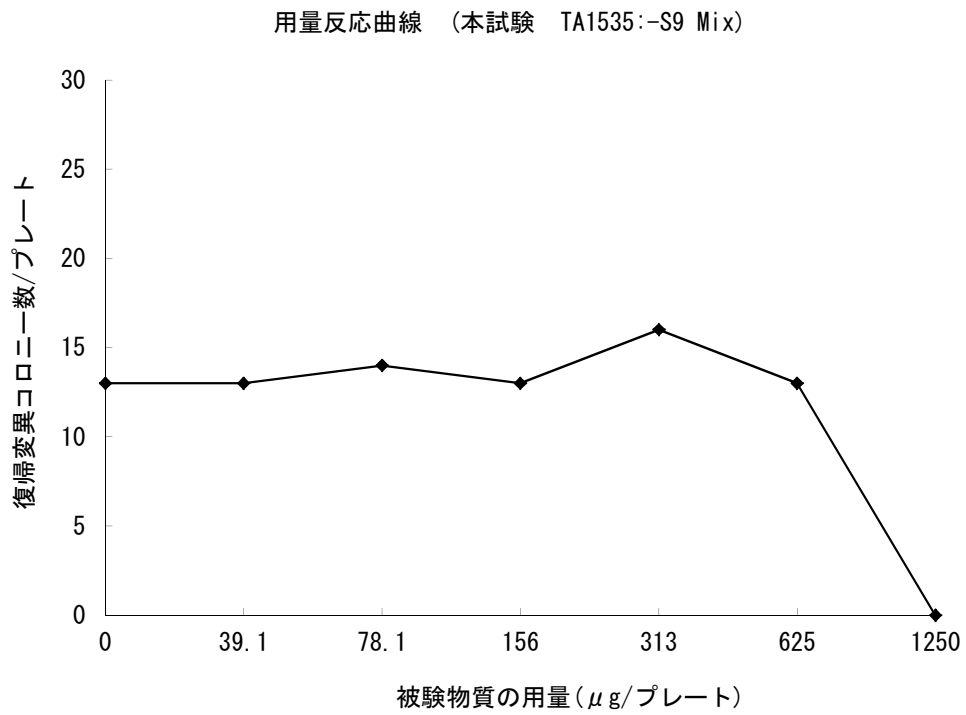


図 4

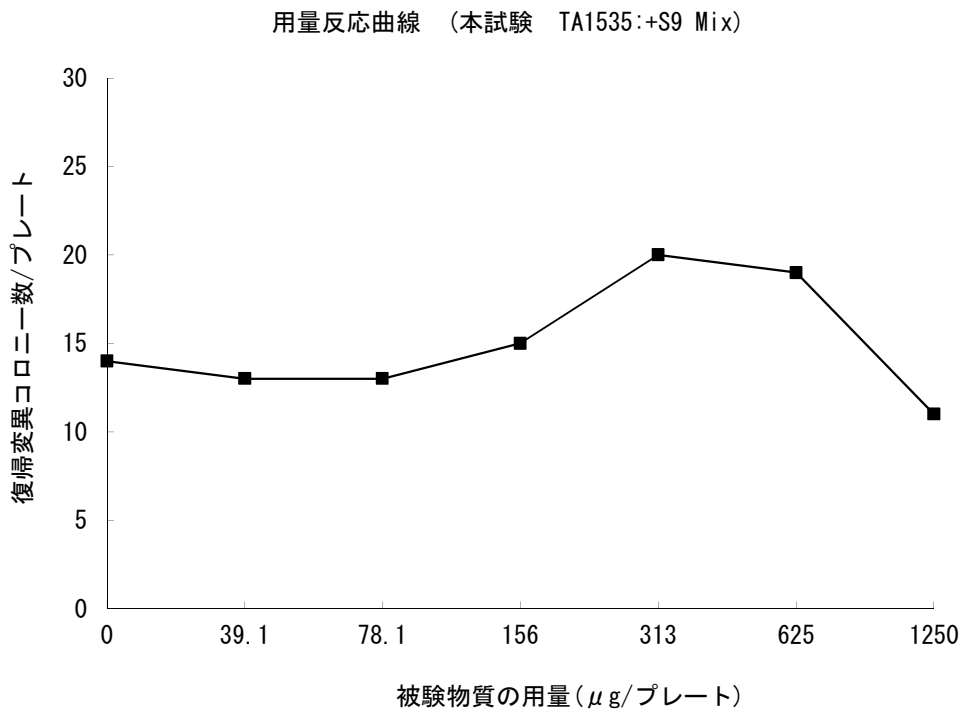


図 5

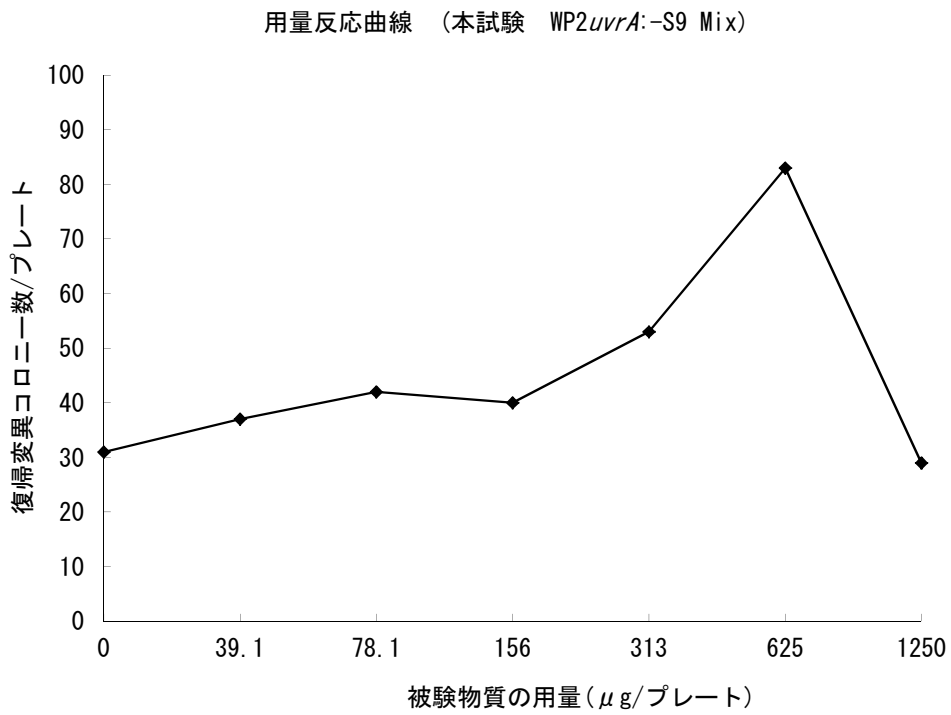


図 6

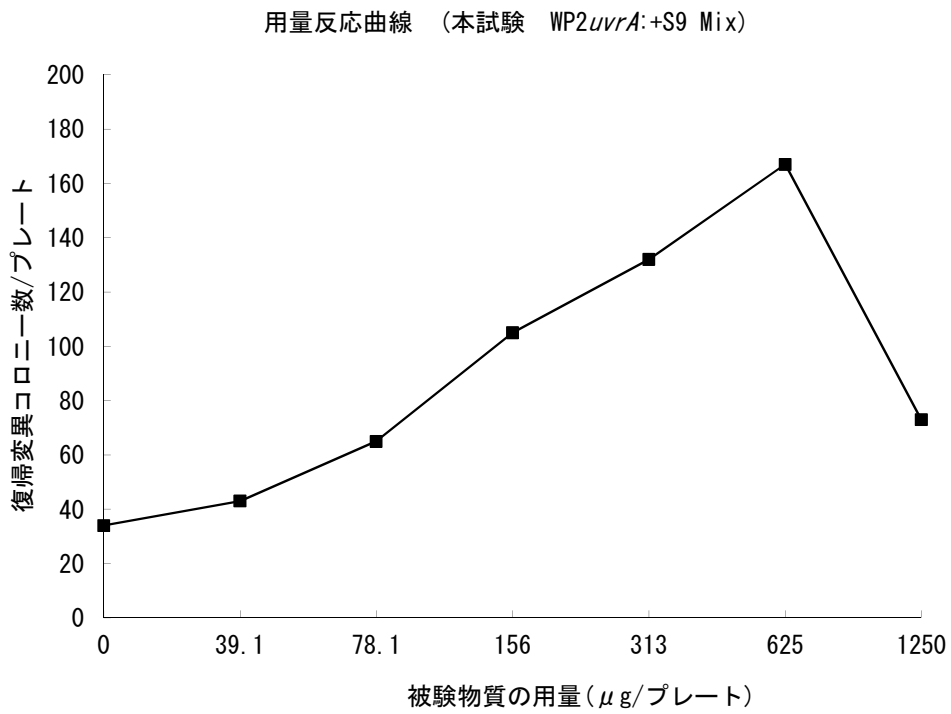


図 7

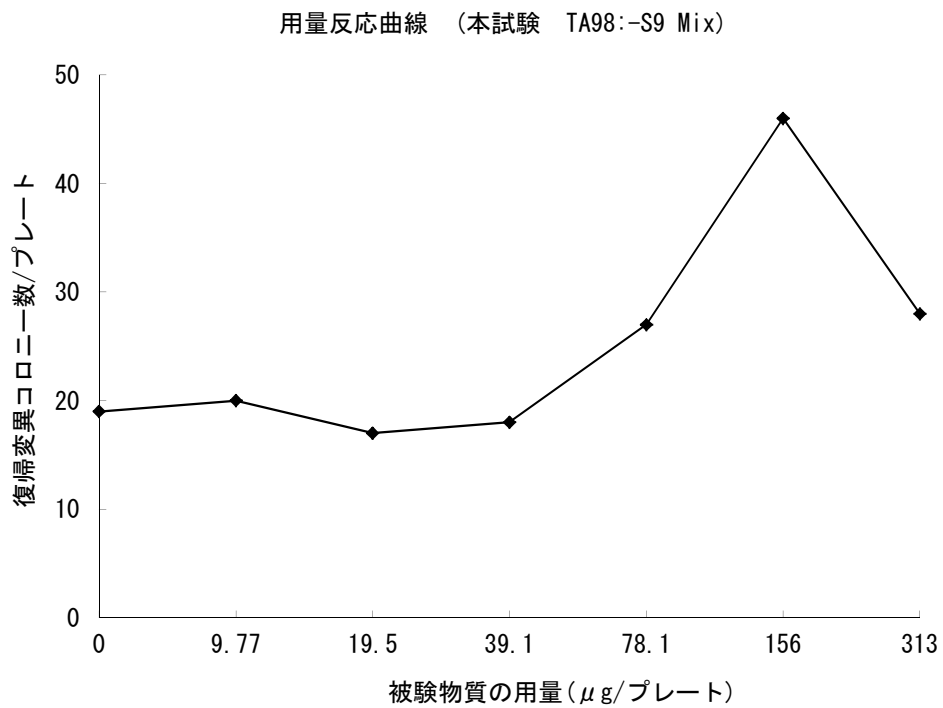


図 8

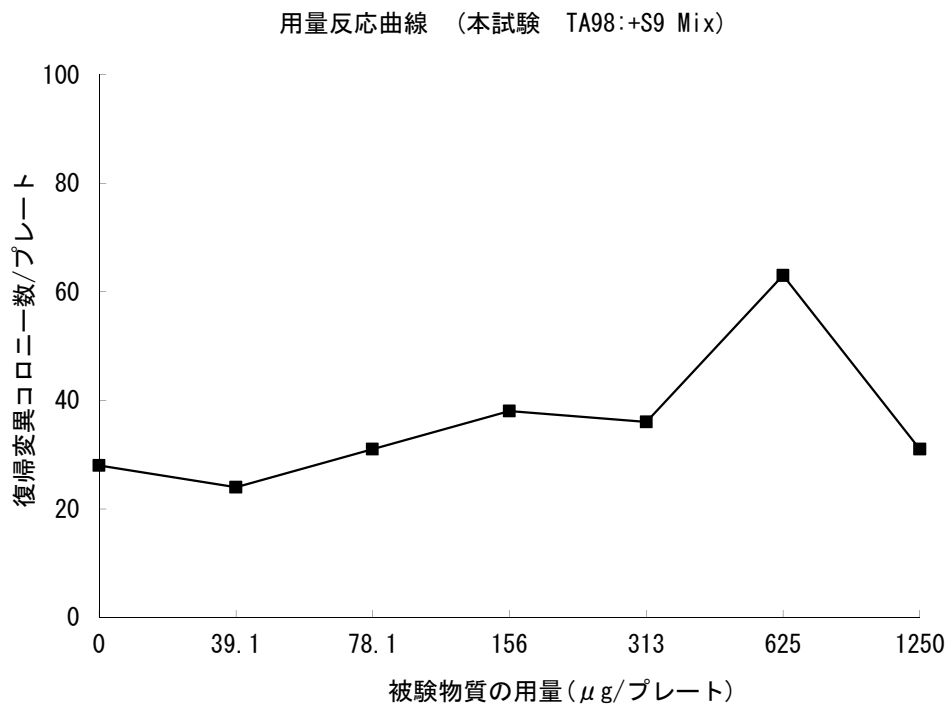


図 9

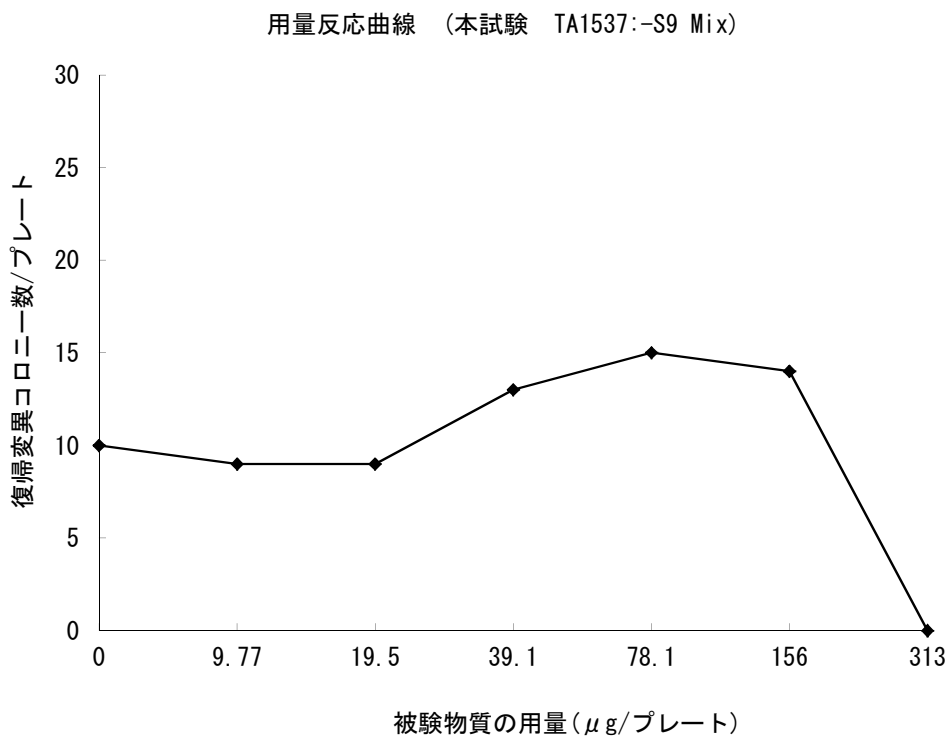


図 10

