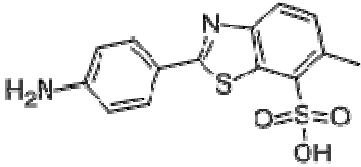


微生物を用いる変異原性試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	2-(4'-アミノフェニル)-6-メチルベンゾチアゾール-7-スルホン酸		
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	≧ 100%	試験に供した新規化学物質の Lot No.	
不純物の名称及び濃度			
CAS 番号	130-17-6	蒸気圧	
分子量	320.39	分配係数	
融点		常温における性状	固体
沸点			
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 で不溶	発熱、ガスの発生等の反応性なし
	アセトン	100 mg/mL で不溶	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	2015年12月18日 製造
購入の場合 Lot No.	RAA201512A
保存温度	-86.1~-70.6°C (保存期間: 2016年1月21日~2016年3月9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	190-243 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(%)
	アセトン	和光純薬工業株式会社	ECR1399	JIS規格 試薬特級	99.5%以上
溶媒選択の理由	水、DMSO、アセトンについて溶解性試験を実施した。その結果、水、DMSOの50 mg/mL、アセトンの100 mg/mLでいずれも不溶であったが、アセトンについては均一に懸濁し、発熱、ガスの発生等の反応性も認められなかったため、アセトン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）で脱水したアセトンを使用した。				
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	用時調製・室温				
純度換算の有無	有 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	4.33	4.73	8.16	6.31	3.61
	本試験	4.37	4.80	8.52	5.69	3.70
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	0.05 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、3 に、比活性を別表 4 に示した。なお、図 1~10 は別表 2、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>用量設定試験及び本試験ともに代謝活性化した場合の <i>S. typhimurium</i> TA98、TA100 及び TA1537 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た場合の <i>S. typhimurium</i> TA98 の 5.37×10^3 (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 2-(4'-アミノフェニル)-6-メチルベンゾチアゾール-7-スルホン酸は、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* TA100、TA1535 の 2500 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA98、TA1537 の 5000 µg/plate の用量で認められた。

本試験の試験用量は、代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA98 及び TA1537 においては、復帰変異コロニー数の増加が認められた用量を参考にして、*S. typhimurium* TA98 については 313 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、TA1537 については 1250 µg/plate を最高用量として、以下公比 2 で 7 段階希釈した計 8 用量を設定した。代謝活性化しない場合のすべての菌株及び代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535 については、生育阻害が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すべての菌株においては 1250 µg/plate、代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535 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。復帰変異コロニー数の増加及び生育阻害が認められなかった代謝活性化する場合の *E. coli* WP2 *uvrA* については 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。

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: 2-(4'-アミノフェニル)-6-メチルベンゾチアゾール-7-スルホン酸

No. T-2001

試験実施期間		2016年3月3日 より 2016年3月7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 (アセトン)	129 147 (138)	10 11 (11)	31 28 (30)	18 14 (16)	10 7 (9)
	1.22	132 134 (133)	7 7 (7)	35 31 (33)	26 15 (21)	9 2 (6)
	4.88	121 165 (143)	9 7 (8)	39 27 (33)	27 21 (24)	10 7 (9)
	19.5	123 128 (126)	10 14 (12)	34 33 (34)	22 11 (17)	10 10 (10)
	78.1	128 146 (137)	12 16 (14)	39 38 (39)	30 21 (26)	13 14 (14)
	313	117 146 (132)	7 8 (8)	29 46 (38)	19 22 (21)	10 10 (10)
	1250	86 * 95 * (91)	0 * 0 * (0)	34 38 (36)	28 * 30 * (29)	7 * 5 * (6)
	5000	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	16 * 11 * (14)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
	S9Mix (+)	陰性対照 (アセトン)	166 168 (167)	11 9 (10)	36 35 (36)	35 44 (40)
1.22		169 126 (148)	7 8 (8)	56 45 (51)	39 54 (47)	13 8 (11)
4.88		148 166 (157)	12 11 (12)	39 36 (38)	51 63 (57)	11 11 (11)
19.5		162 143 (153)	11 11 (11)	39 48 (44)	95 106 (101)	19 12 (16)
78.1		205 229 (217)	11 12 (12)	51 60 (56)	335 352 (344)	20 21 (21)
313		312 290 (301)	13 11 (12)	40 41 (41)	1007 1096 (1052)	22 29 (26)
1250		350 378 (364)	10 7 (9)	41 42 (42)	1315 1415 (1365)	46 35 (41)
5000		111 * 102 * (107)	5 * 10 * (8)	62 52 (57)	123 * 155 * (139)	22 * 24 * (23)
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	561 604 (583)	266 255 (261)	68 70 (69)	355 421 (388)	1139 923 (1031)
	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	1062 863 (963)	300 289 (295)	595 640 (618)	457 407 (432)	126 110 (118)

(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:-S9Mix)

被験物質の名称 : 2-(4'-アミノフェニル)-6-メチルベンゾチアゾール-7-スルホン酸

No. T-2001

試験実施期間		2016年3月8日 より 2016年3月11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 (一)	陰性対照 (アセトン)	126 122 (124)	12 14 (13)	31 28 (30)	15 18 (17)	5 9 (7)	
	39.1	93 106 (100)	11 8 (10)	NT	23 15 (19)	4 10 (7)	
	78.1	137 116 (127)	7 10 (9)	NT	26 16 (21)	6 5 (6)	
	156	100 124 (112)	6 9 (8)	22 28 (25)	17 18 (18)	7 3 (5)	
	313	128 110 (119)	8 9 (9)	25 25 (25)	22 23 (23)	6 8 (7)	
	625	117 107 (112)	8 9 (9)	21 29 (25)	24 22 (23)	8 5 (7)	
	1250	59 * 88 * (74)	0 * 0 * (0)	18 27 (23)	25 * 16 * (21)	0 * 0 * (0)	
	2500	NT	NT	16 7 (12)	NT	NT	
	5000	NT	NT	6 * 6 * (6)	NT	NT	
	陽性対照	S9Mixを必要としなもの	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	520 452 (486)	265 239 (252)	70 71 (71)	356 376 (366)	1125 1202 (1164)

(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

* : 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 (本試験:+S9Mix)

被験物質の名称: 2-(4'-アミノフェニル)-6-メチルベンゾチアゾール-7-スルホン酸

No. T-2001

試験実施期間		2016年3月8日 より 2016年3月11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 (アセトン)	142 111 (127)	11 15 (13)	31 30 (31)	44 31 (38)	10 9 (10)	
	9.77	NT	NT	NT	70 70 (70)	7 14 (11)	
	19.5	NT	NT	NT	106 122 (114)	12 10 (11)	
	39.1	NT	NT	NT	194 208 (201)	8 13 (11)	
	78.1	NT	NT	NT	356 521 (439)	19 18 (19)	
	156	258 258 (258)	10 15 (13)	NT	688 1061 (875)	22 19 (21)	
	313	320 300 (310)	17 10 (14)	37 28 (33)	1400 1364 (1382)	22 27 (25)	
	625	378 317 (348)	16 13 (15)	31 33 (32)	NT	29 39 (34)	
	1250	424 405 (415)	16 14 (15)	29 31 (30)	NT	49 36 (43)	
	2500	234 * 185 * (210)	11 * 13 * (12)	26 22 (24)	NT	NT	
	5000	81 * 83 * (82)	5 * 5 * (5)	17 19 (18)	NT	NT	
	陽性対照	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		1106 1023 (1065)	251 223 (237)	752 897 (825)	406 456 (431)	127 114 (121)	

(備考)

B[a]P : ベンゾ[a]ピレン
2AA : 2-アミノアントラセン

* : 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4)

比 活 性

被験物質の名称： 2-(4'-アミノフェニル)-6-メチルベンゾチアゾール-7-スルホン Na

No. T-2001

	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			1.58×10^2	1250
	TA1535				
	WP2 <i>uvrA</i>				
	TA98			3.89×10^3	78.1
	TA1537			4.10×10^2	19.5
本試験	TA100			8.40×10^2	156
	TA1535				
	WP2 <i>uvrA</i>				
	TA98			5.37×10^3	156
	TA1537			7.05×10^1	156

図 1

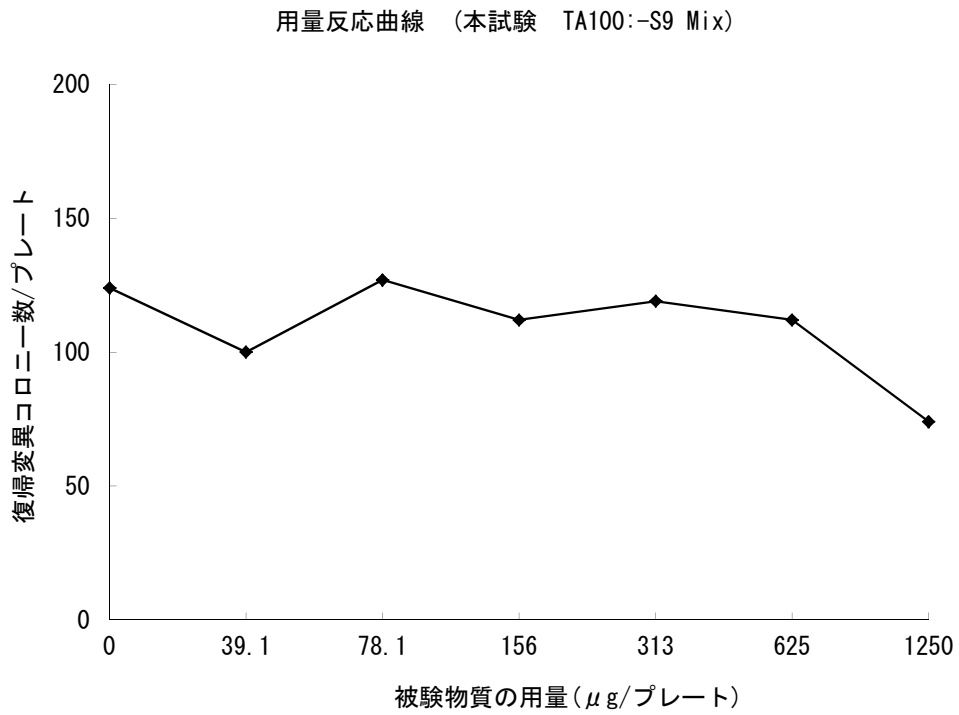


図 2

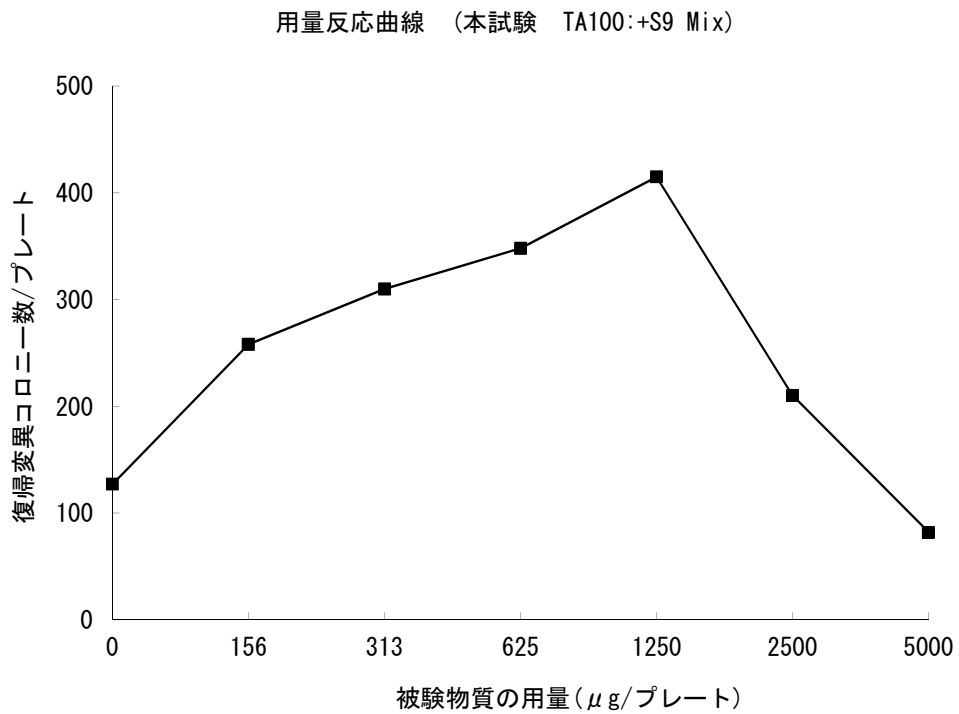


図 3

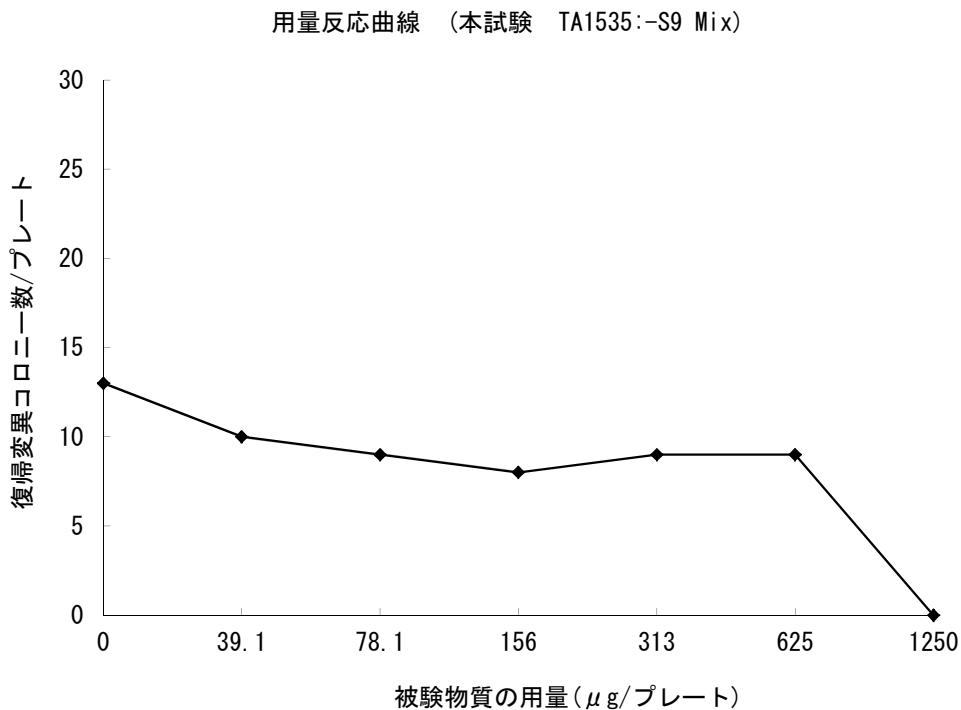


図 4

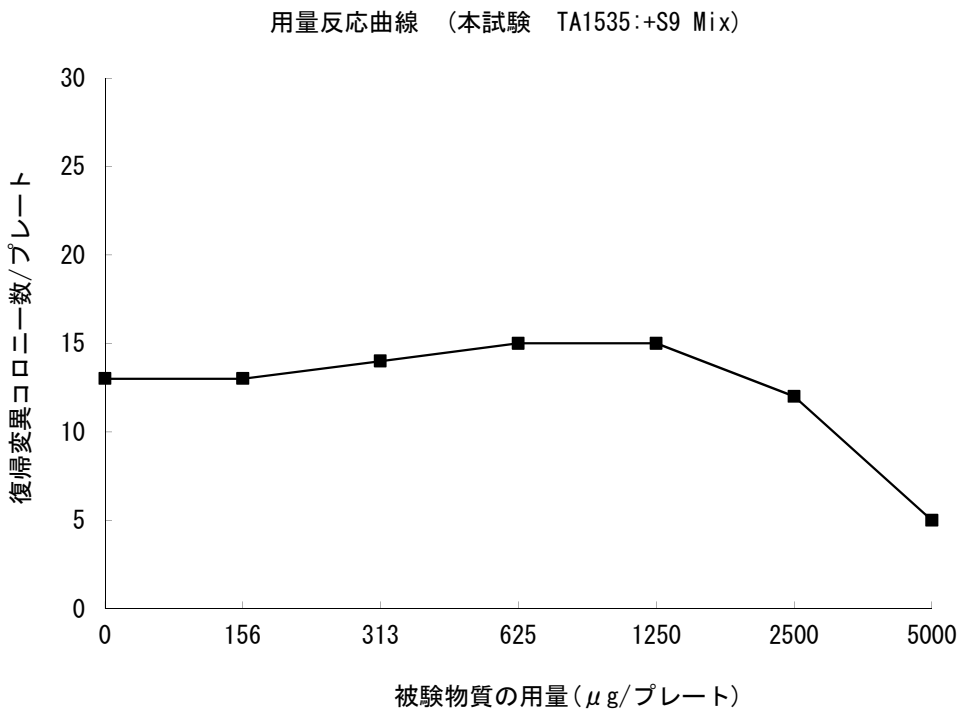


図 5

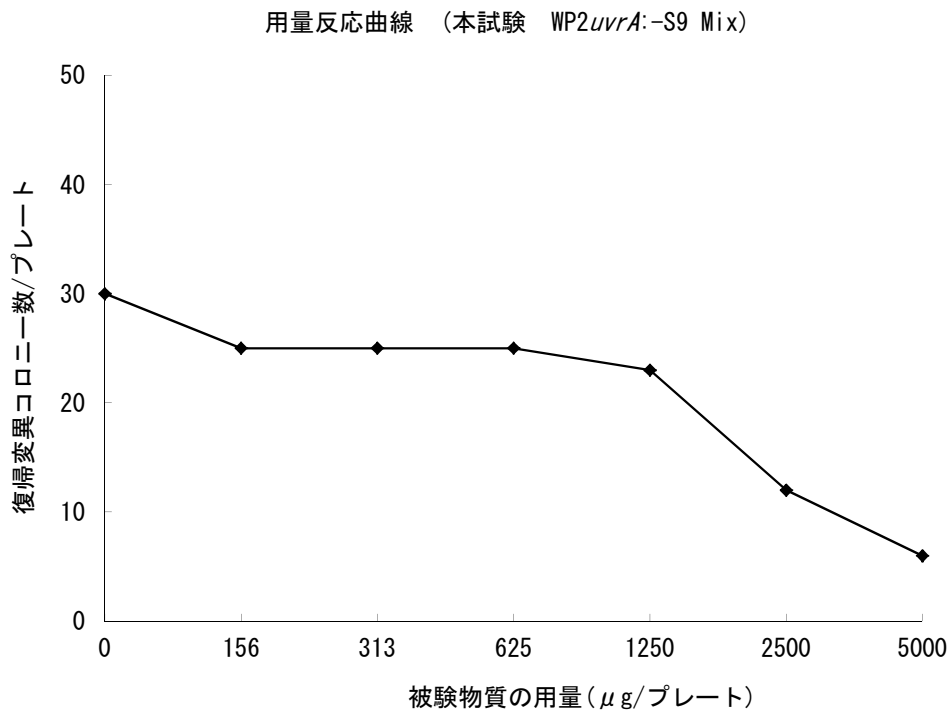


図 6

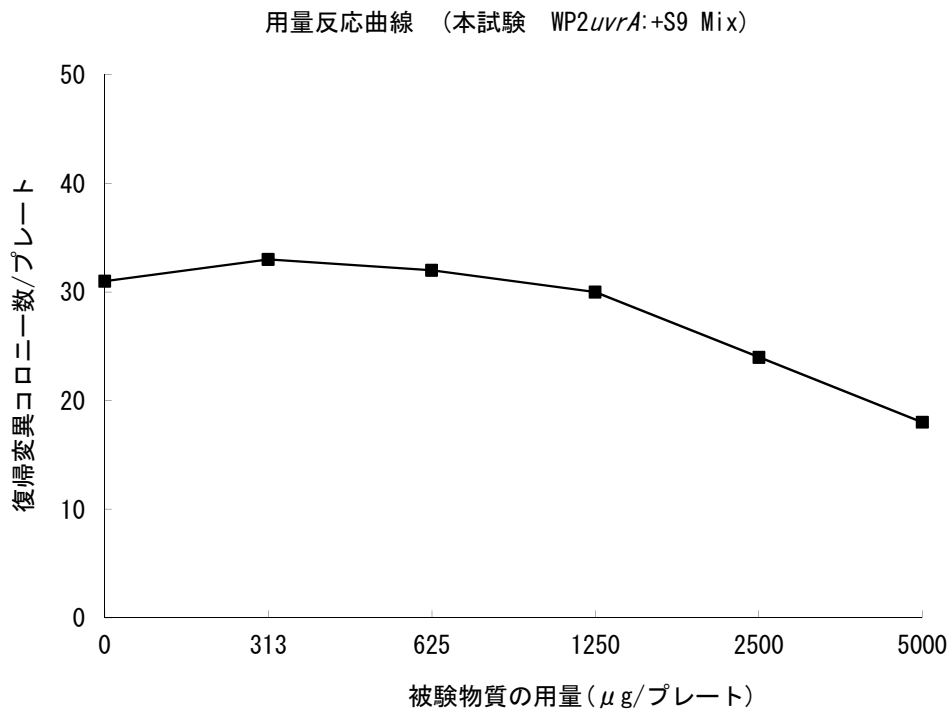


図 7

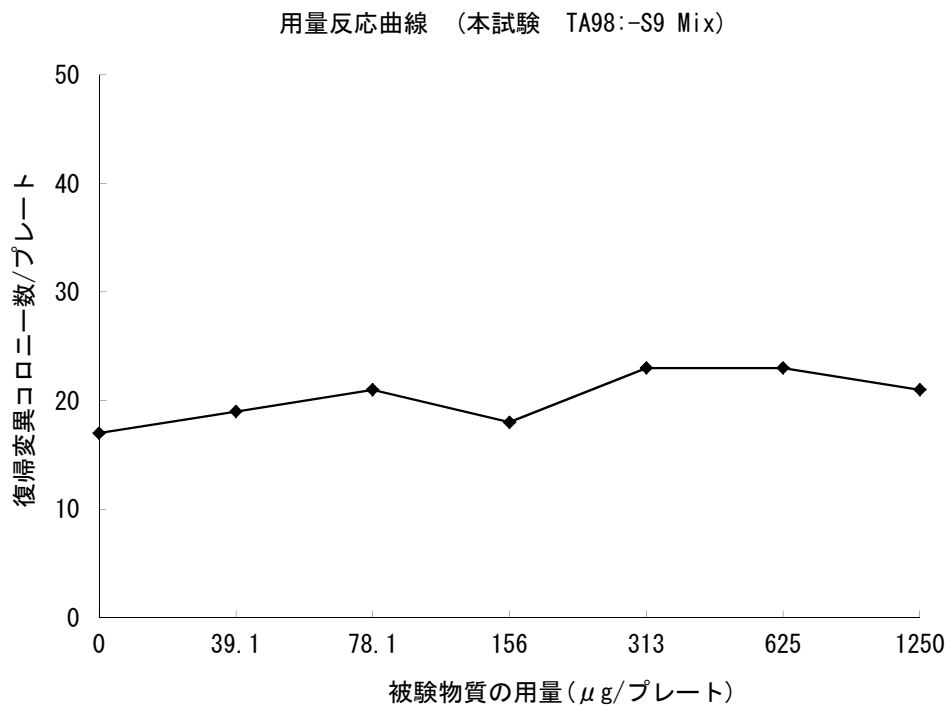


図 8

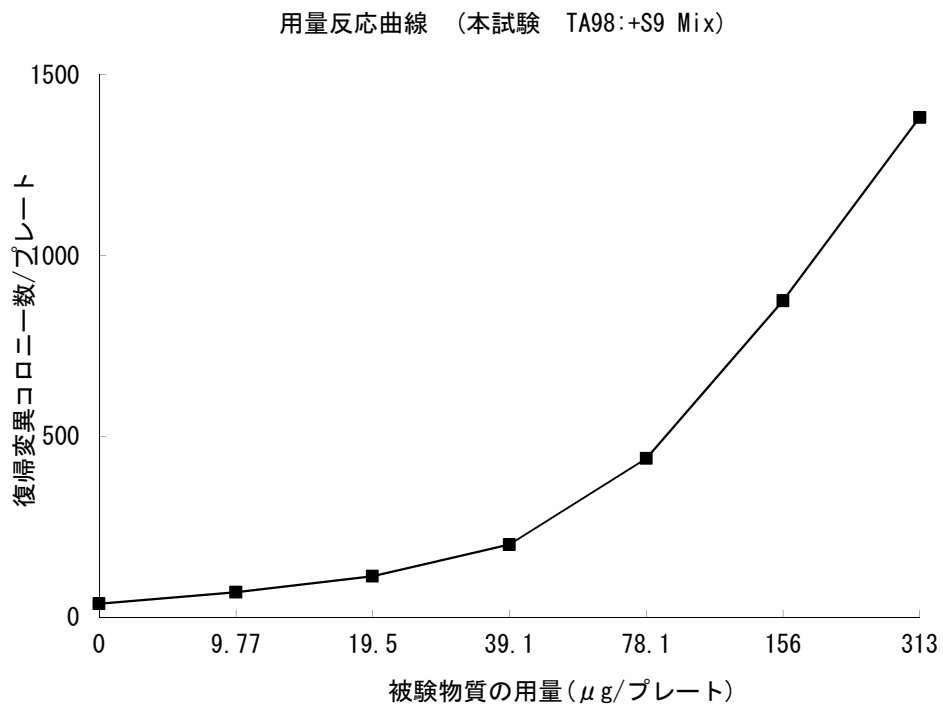


図 9

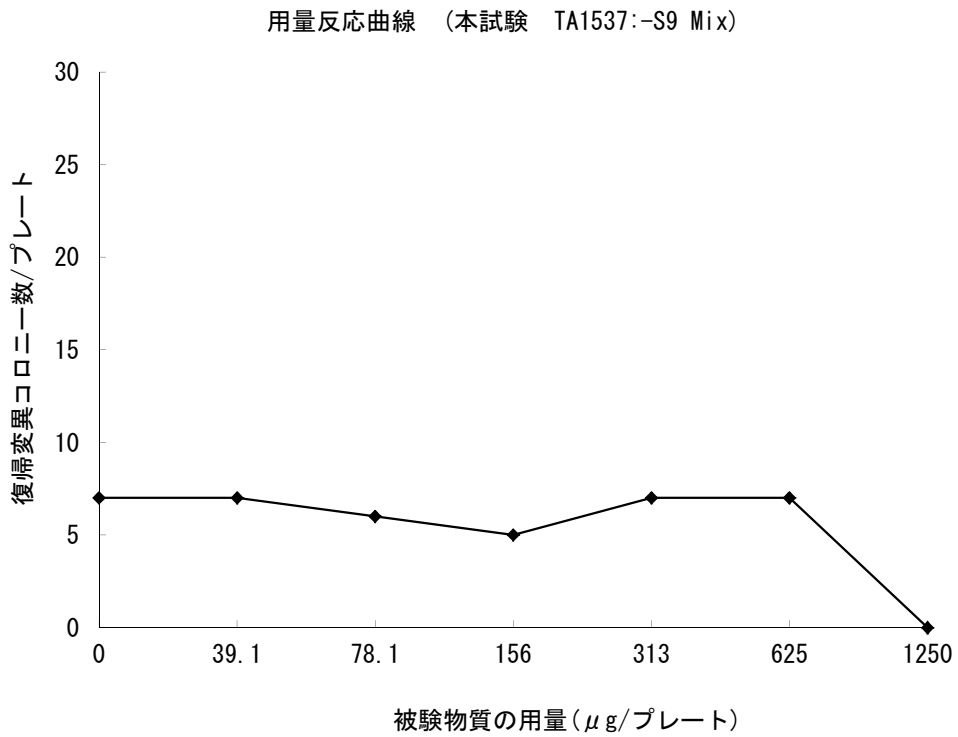


図 10

