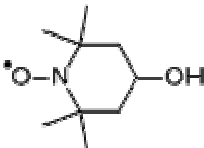


微生物を用いる変異原性試験結果報告書

1. 一般的事項

| | | | |
|------------------------------|---|-----------------------|-----------------|
| 新規化学物質の名称 (IUPAC 命名法による) | 4-ヒドロキシ-2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-N-オキシド | | |
| 別 名 | 4-Hydroxy-TEMPO | | |
| 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 | 97% | 試験に供した新規化学物質の Lot No. | BCBN2650V |
| 不純物の名称及び濃度 | / | | |
| CAS 番号 | 2226-96-2 | 蒸気圧 | / |
| 分子量 | 172.24 | 分配係数 | / |
| 融 点 | 67-70°C* | 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10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(%) |
| | 注射用水 | 株式会社 大塚製薬工場 | K5F99 | 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、水に 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. | 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 | 4.44 | 4.74 | 8.50 | 6.29 | 3.70 |
| | 本試験 | 4.43 | 4.77 | 8.58 | 6.20 | 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19日製造 |
| 購入の場合の Lot No. | DZLH2J01 |
| 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 |
|--|----|----|
| 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、比活性を別表 3 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 において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、代謝活性化しない場合の <i>S. typhimurium</i> TA100 においては、陰性対照値の 2 倍以上に増加し、再現性も認められた。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 2.50×10^1 (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 4-ヒドロキシ-2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-N-オキシドは、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。

予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態として、本被験物質の実験期間中の保存温度が一時的（約 90 分及び約 50 分の 2 回）に最高 11.5°C まで上昇し、保存条件の許容範囲（2~8°C）から外れる結果となった。しかし、逸脱時間は短時間であり、被験物質は密封された容器で保存されているため、安定性に影響は無いと判断した。

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: 4-ヒドロキシ-2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-N-オキシド

No. T-2013

| 試験実施期間 | | 2016年3月4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 (注射用水) | 110 103 (107) | 7 8 (8) | 31 28 (30) | 12 16 (14) | 15 7 (11) |
| | 1.22 | 117 121 (119) | 11 4 (8) | 27 31 (29) | 18 14 (16) | 3 10 (7) |
| | 4.88 | 86 111 (99) | 11 15 (13) | 28 31 (30) | 10 18 (14) | 4 6 (5) |
| | 19.5 | 91 125 (108) | 7 11 (9) | 25 26 (26) | 17 15 (16) | 15 8 (12) |
| | 78.1 | 110 106 (108) | 4 5 (5) | 37 30 (34) | 15 14 (15) | 10 7 (9) |
| | 313 | 126 91 (109) | 5 6 (6) | 29 24 (27) | 12 13 (13) | 7 8 (8) |
| | 1250 | 114 155 (135) | 8 12 (10) | 30 22 (26) | 18 13 (16) | 5 6 (6) |
| | 5000 | 227 232 (230) | 9 4 (7) | 33 47 (40) | 22 20 (21) | 7 8 (8) |
| | S9Mix (+) | 陰性対照 (注射用水) | 145 146 (146) | 11 11 (11) | 36 26 (31) | 32 38 (35) |
| 1.22 | | 148 133 (141) | 17 12 (15) | 29 28 (29) | 29 22 (26) | 12 11 (12) |
| 4.88 | | 127 134 (131) | 13 4 (9) | 27 22 (25) | 23 27 (25) | 11 9 (10) |
| 19.5 | | 148 132 (140) | 5 10 (8) | 26 22 (24) | 26 30 (28) | 15 9 (12) |
| 78.1 | | 132 108 (120) | 9 10 (10) | 27 37 (32) | 25 23 (24) | 10 16 (13) |
| 313 | | 145 132 (139) | 5 8 (7) | 35 36 (36) | 36 25 (31) | 10 16 (13) |
| 1250 | | 166 171 (169) | 10 6 (8) | 24 44 (34) | 21 31 (26) | 14 10 (12) |
| 5000 | | 220 238 (229) | 9 9 (9) | 40 43 (42) | 30 41 (36) | 13 15 (14) |
| 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 | 580 459 (520) | 297 265 (281) | 70 68 (69) | 446 405 (426) | 843 721 (782) |
| | 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 | 895 901 (898) | 280 276 (278) | 682 522 (602) | 425 414 (420) | 107 136 (122) |

(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： 4-ヒドロキシ-2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-N-オキシド

No. T-2013

| 試験実施期間 | | 2016年3月9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) | 118 110 (114) | 10 11 (11) | 30 24 (27) | 22 21 (22) | 8 10 (9) |
| | 313 | 114 137 (126) | 13 11 (12) | 25 30 (28) | 25 16 (21) | 12 8 (10) |
| | 625 | 120 136 (128) | 14 11 (13) | 39 37 (38) | 24 20 (22) | 9 8 (9) |
| | 1250 | 154 143 (149) | 11 8 (10) | 37 21 (29) | 33 39 (36) | 11 5 (8) |
| | 2500 | 168 176 (172) | 10 10 (10) | 43 44 (44) | 29 27 (28) | 10 8 (9) |
| | 5000 | 242 236 (239) | 9 10 (10) | 47 40 (44) | 24 29 (27) | 9 8 (9) |
| | S9Mix (+) | 陰性対照 (注射用水) | 145 122 (134) | 7 11 (9) | 31 31 (31) | 39 28 (34) |
| 313 | | 145 121 (133) | 11 10 (11) | 25 34 (30) | 45 35 (40) | 7 9 (8) |
| 625 | | 152 140 (146) | 12 10 (11) | 35 27 (31) | 32 38 (35) | 8 11 (10) |
| 1250 | | 157 140 (149) | 9 10 (10) | 31 18 (25) | 39 27 (33) | 8 9 (9) |
| 2500 | | 159 138 (149) | 12 8 (10) | 35 44 (40) | 44 41 (43) | 11 11 (11) |
| 5000 | | 215 218 (217) | 7 10 (9) | 45 45 (45) | 43 40 (42) | 10 12 (11) |
| 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 | 557 523 (540) | 208 270 (239) | 66 70 (68) | 362 374 (368) | 1002 1201 (1102) |
| | 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 | 672 791 (732) | 250 225 (238) | 735 845 (790) | 393 393 (393) | 120 111 (116) |

(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)

比 活 性

被験物質の名称： 4-ヒドロキシ-2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-N-オキシド

No. T-2013

| | 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 | 2.46×10^1 | 5000 | | |
| | TA1535 | | | | |
| | WP2 <i>uvrA</i> | | | | |
| | TA98 | | | | |
| | TA1537 | | | | |
| 本 試 験 | TA100 | 2.50×10^1 | 5000 | | |
| | TA1535 | | | | |
| | WP2 <i>uvrA</i> | | | | |
| | TA98 | | | | |
| | TA1537 | | | | |

図 1

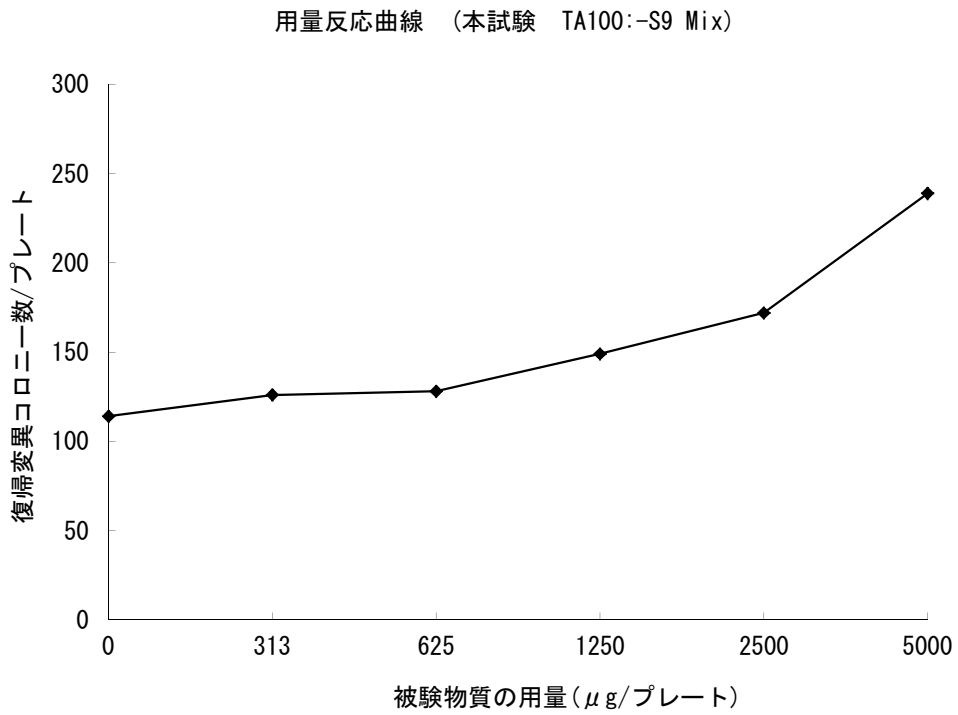


図 2

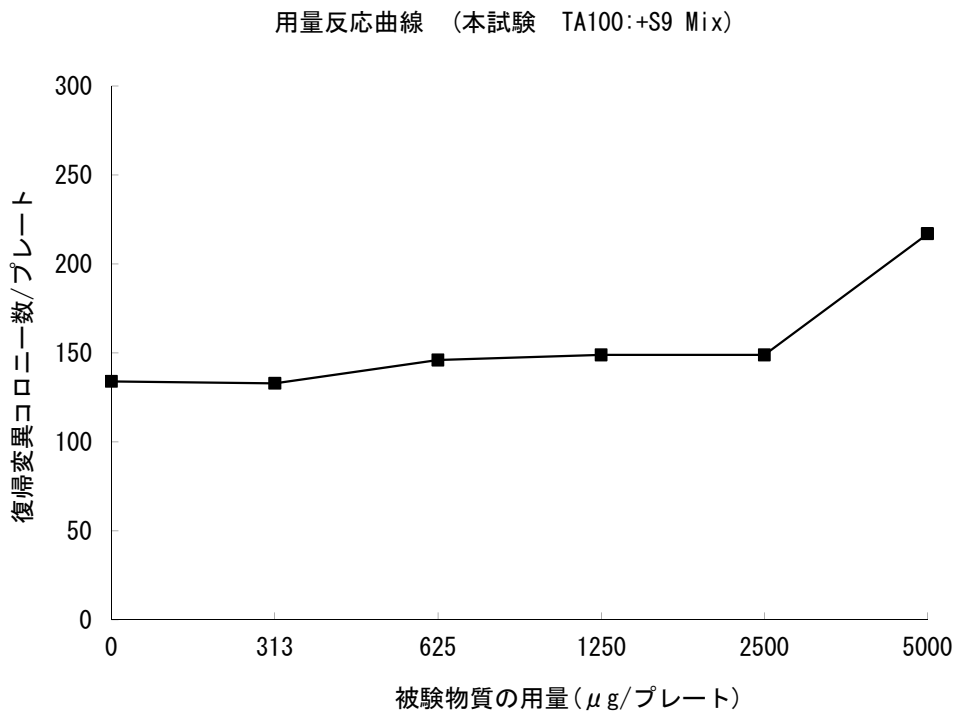


図 3

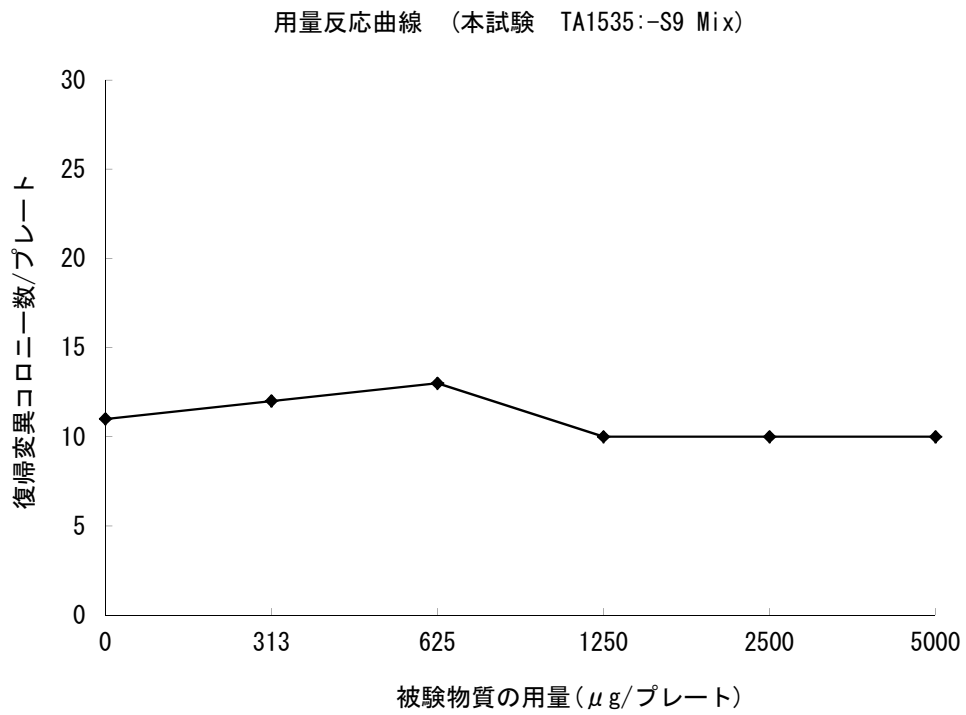


図 4

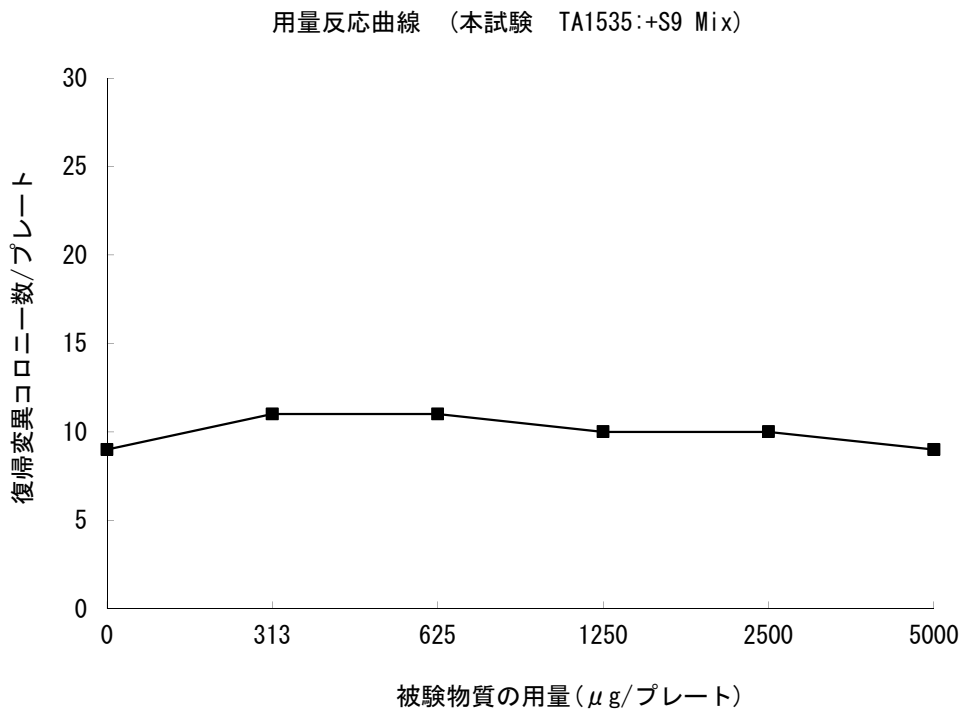


図 5

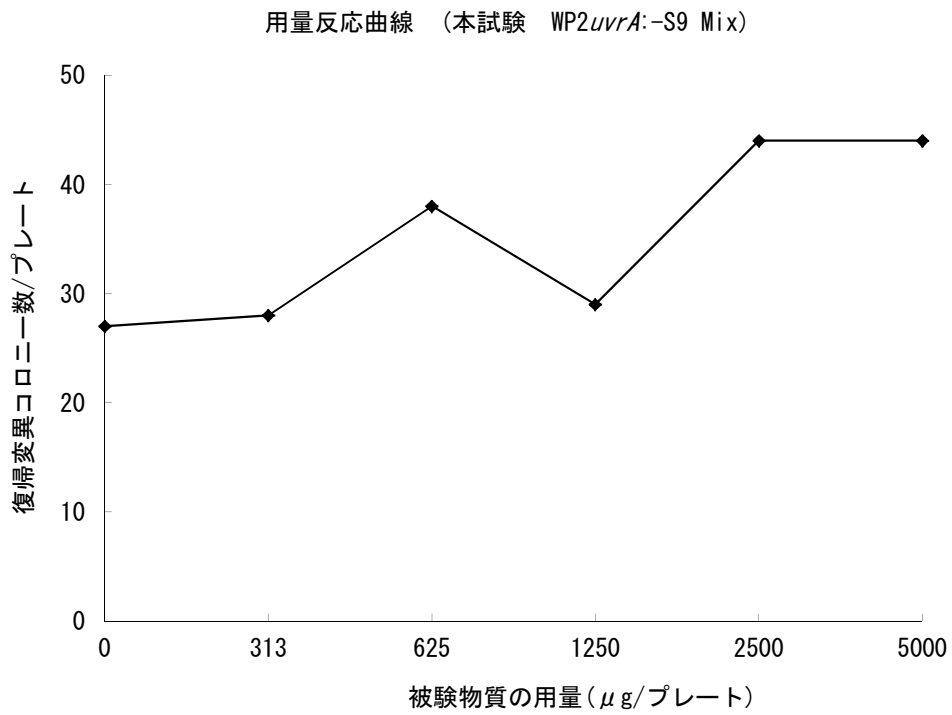


図 6

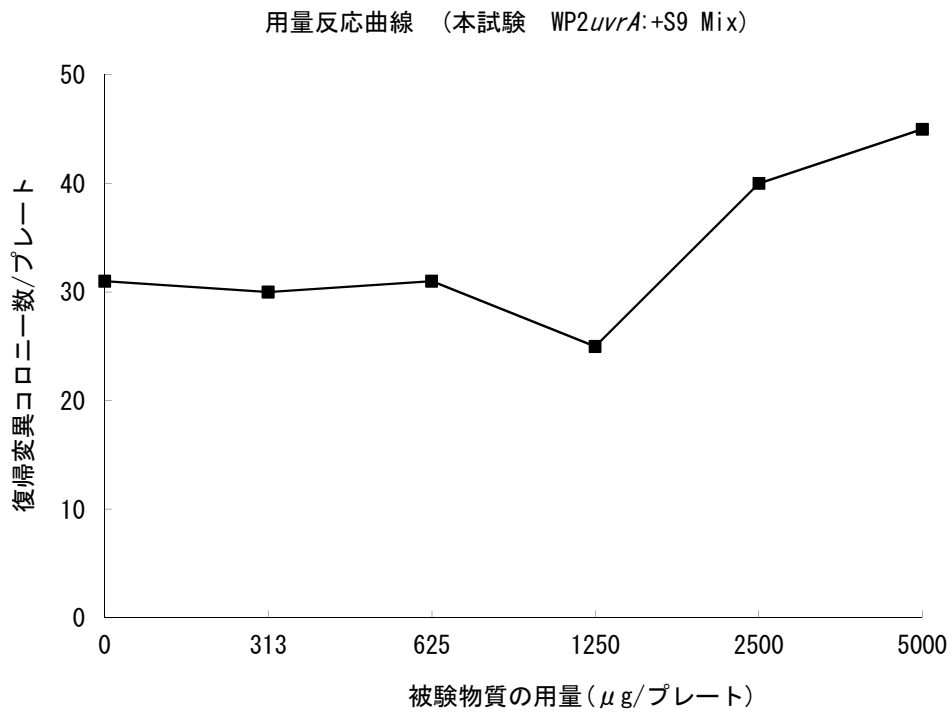


図 7

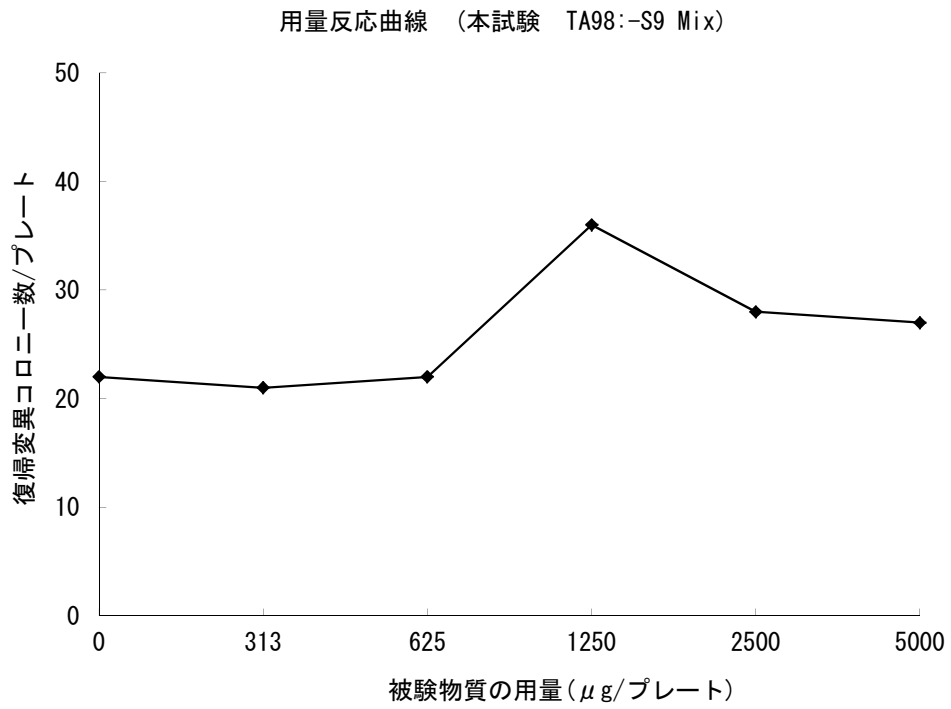


図 8

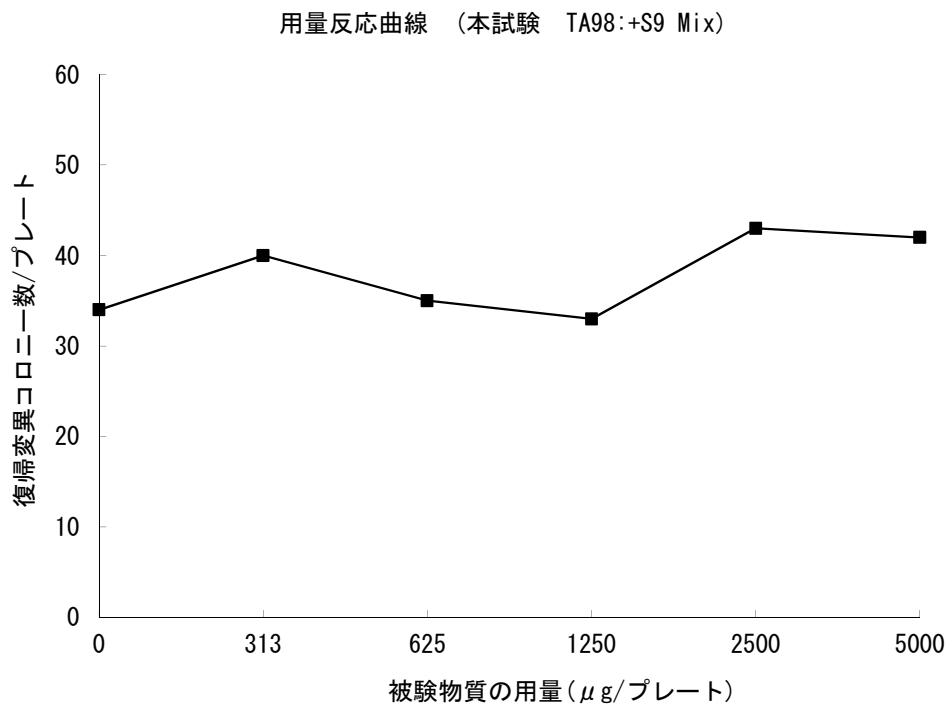


図 9

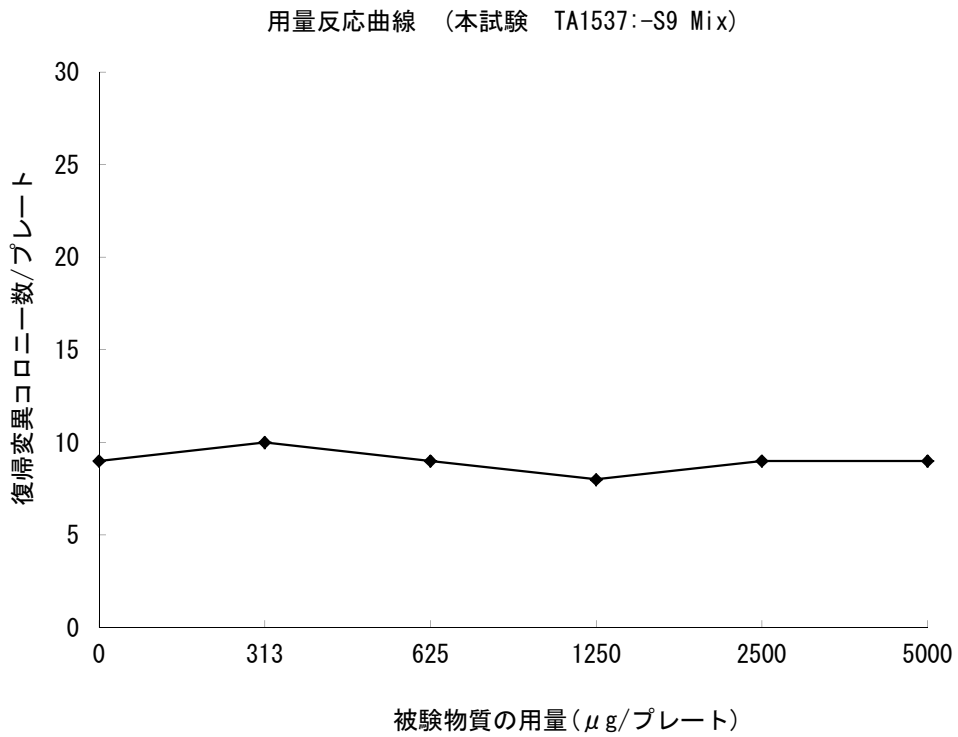


図 10

