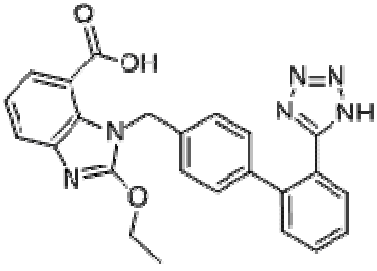


## 微生物を用いる変異原性試験結果報告書

### 1. 一般的事項

新規化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	2-エトキシ-1-[[2'-(1H-テトラゾール-5-イル)ビフェニル-4-イル]メチル]-ベンゾイミダゾール-7-カルボン酸		
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	95%	試験に供した新規化学物質の Lot No.	WZG100426-301
不純物の名称及び濃度			
CAS 番号	139481-59-7	蒸気圧	
分子量	440.45	分配係数	
融点	183-185°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
	アセトン	100 mg/mL で不溶	発熱、ガスの発生等の反応性なし
	DMF	100 mg/mL で溶解	発熱、ガスの発生等の反応性なし
	1,4-ジオキサン	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 <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	<p>水、DMSO、アセトン、DMF、1,4-ジオキサンについて溶解性試験を実施した。その結果、水に 50 mg/mL、アセトンと 1,4-ジオキサンに 100mg/mL で溶解せず、DMSO と DMF に 50 mg/mL で溶解した。どの溶媒も発熱、ガスの発生等の反応性も認められなかった。一度 DMSO での溶解性試験時に色調変化が見られたが、DMF の溶解性試験を確認した結果、DMSO の色調変化は被験物質本来の色によるものと判断したため、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。</p>				
被験物質溶液の性状	<p style="text-align: center;"> <input checked="" type="radio"/> 溶解      <input type="radio"/> 懸濁      <input type="radio"/> その他 </p>				
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="radio"/> 有 <input 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 <sup>9</sup> /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		<input checked="" type="radio"/> O.D.値より換算 <input type="radio"/> 段階希釈法 <input type="radio"/> 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
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
<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、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。</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-エトキシ-1-[[2'-(1H-テトラゾール-5-イル)ピフェニル-4-イル]メチル]-ベンゾイミダゾール-7-カルボン酸は、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。

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。

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-エトキシ-1-[[2'-(1H-テトラゾール-5-イル)ピフェニル-4-イル]メチル]-  
ベンゾイミダゾール-7-カルボン酸

No. T-2014

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 (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)	119 120 ( 120 )	9 10 ( 10 )	30 28 ( 29 )	10 11 ( 11 )	11 4 ( 8 )	
	1.22	110 119 ( 115 )	8 7 ( 8 )	25 27 ( 26 )	13 13 ( 13 )	7 4 ( 6 )	
	4.88	128 93 ( 111 )	7 13 ( 10 )	21 38 ( 30 )	13 13 ( 13 )	5 5 ( 5 )	
	19.5	89 93 ( 91 )	10 8 ( 9 )	25 26 ( 26 )	12 11 ( 12 )	7 10 ( 9 )	
	78.1	106 110 ( 108 )	11 10 ( 11 )	25 29 ( 27 )	15 13 ( 14 )	8 5 ( 7 )	
	313	93 97 ( 95 )	13 8 ( 11 )	23 24 ( 24 )	13 10 ( 12 )	7 9 ( 8 )	
	1250	116 103 ( 110 )	6 10 ( 8 )	22 30 ( 26 )	17 10 ( 14 )	7 4 ( 6 )	
	5000	120 * 137 * ( 129 )	7 * 9 * ( 8 )	23 26 ( 25 )	11 * 12 * ( 12 )	5 * 13 * ( 9 )	
	S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	102 132 ( 117 )	9 10 ( 10 )	35 27 ( 31 )	36 32 ( 34 )	5 10 ( 8 )
		1.22	124 125 ( 125 )	6 13 ( 10 )	25 23 ( 24 )	31 28 ( 30 )	11 15 ( 13 )
4.88		128 139 ( 134 )	9 13 ( 11 )	25 26 ( 26 )	37 27 ( 32 )	9 10 ( 10 )	
19.5		113 120 ( 117 )	4 5 ( 5 )	22 33 ( 28 )	22 22 ( 22 )	11 11 ( 11 )	
78.1		142 131 ( 137 )	8 10 ( 9 )	23 29 ( 26 )	21 30 ( 26 )	9 14 ( 12 )	
313		147 123 ( 135 )	7 8 ( 8 )	34 26 ( 30 )	37 21 ( 29 )	7 12 ( 10 )	
1250		133 123 ( 128 )	7 12 ( 10 )	21 37 ( 29 )	22 24 ( 23 )	8 11 ( 10 )	
5000		124 121 ( 123 )	9 8 ( 9 )	20 28 ( 24 )	22 31 ( 27 )	6 8 ( 7 )	
陽性対照		名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191
		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	489 467 ( 478 )	271 261 ( 266 )	67 69 ( 68 )	371 402 ( 387 )	1081 919 ( 1000 )	
	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	830 875 ( 853 )	233 257 ( 245 )	550 568 ( 559 )	445 414 ( 430 )	119 110 ( 115 )	

(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・2HG1  
 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: 2-エトキシ-1-[[2'-(1H-テトラゾール-5-イル)ピフェニル-4-イル]メチル]-  
ベンゾイミダゾール-7-カルボン酸

No. T-2014

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)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix (-)	陰性対照 (DMSO)	100 117 ( 109 )	13 8 ( 11 )	33 26 ( 30 )	25 20 ( 23 )	7 7 ( 7 )	
	156	112 108 ( 110 )	8 9 ( 9 )	NT	19 13 ( 16 )	6 7 ( 7 )	
	313	108 127 ( 118 )	16 9 ( 13 )	15 18 ( 17 )	14 20 ( 17 )	6 3 ( 5 )	
	625	103 96 ( 100 )	10 15 ( 13 )	30 34 ( 32 )	15 20 ( 18 )	5 8 ( 7 )	
	1250	119 111 ( 115 )	15 9 ( 12 )	25 17 ( 21 )	21 22 ( 22 )	10 6 ( 8 )	
	2500	103 149 ( 126 )	9 10 ( 10 )	29 30 ( 30 )	19 24 ( 22 )	6 6 ( 6 )	
	5000	90 * 129 * ( 110 )	8 * 7 * ( 8 )	24 31 ( 28 )	15 * 18 * ( 17 )	5 * 8 * ( 7 )	
	S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	123 104 ( 114 )	10 12 ( 11 )	24 29 ( 27 )	42 37 ( 40 )	15 11 ( 13 )
313		112 107 ( 110 )	10 11 ( 11 )	34 24 ( 29 )	28 30 ( 29 )	11 10 ( 11 )	
625		121 133 ( 127 )	9 5 ( 7 )	33 44 ( 39 )	33 34 ( 34 )	15 11 ( 13 )	
1250		127 107 ( 117 )	12 13 ( 13 )	28 30 ( 29 )	33 30 ( 32 )	11 8 ( 10 )	
2500		133 152 ( 143 )	7 11 ( 9 )	33 34 ( 34 )	44 28 ( 36 )	13 12 ( 13 )	
5000		108 131 ( 120 )	9 13 ( 11 )	36 25 ( 31 )	34 53 ( 44 )	11 8 ( 10 )	
陽性対照		名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191
		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	502 514 ( 508 )	278 253 ( 266 )	70 68 ( 69 )	356 422 ( 389 )	1032 1020 ( 1026 )	
	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	862 1062 ( 962 )	300 256 ( 278 )	789 802 ( 796 )	414 444 ( 429 )	103 116 ( 110 )	

(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。

図 1

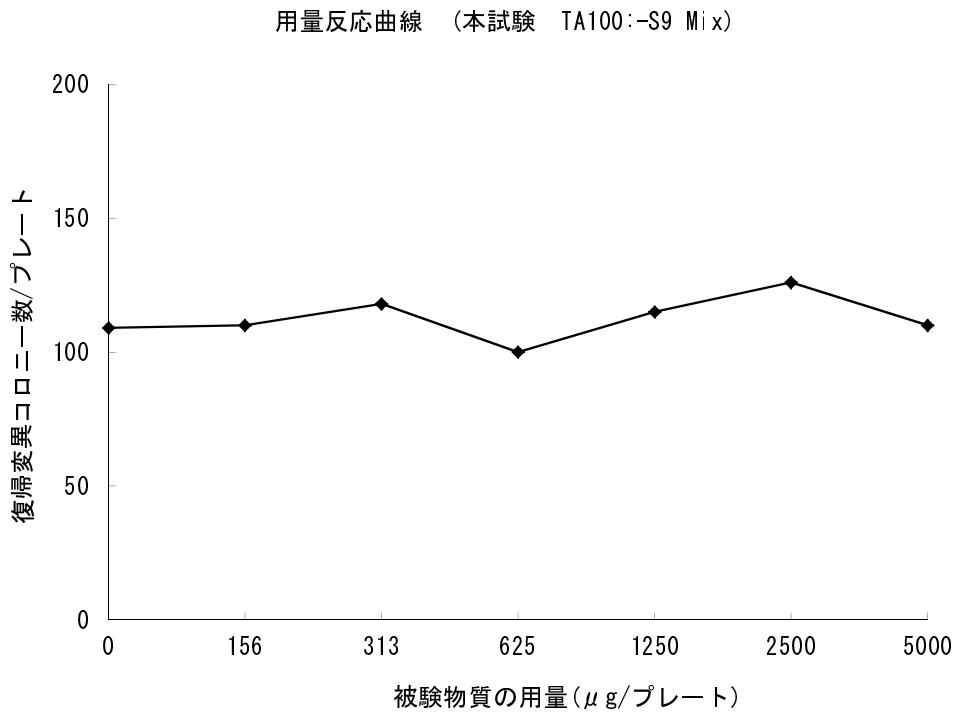


図 2

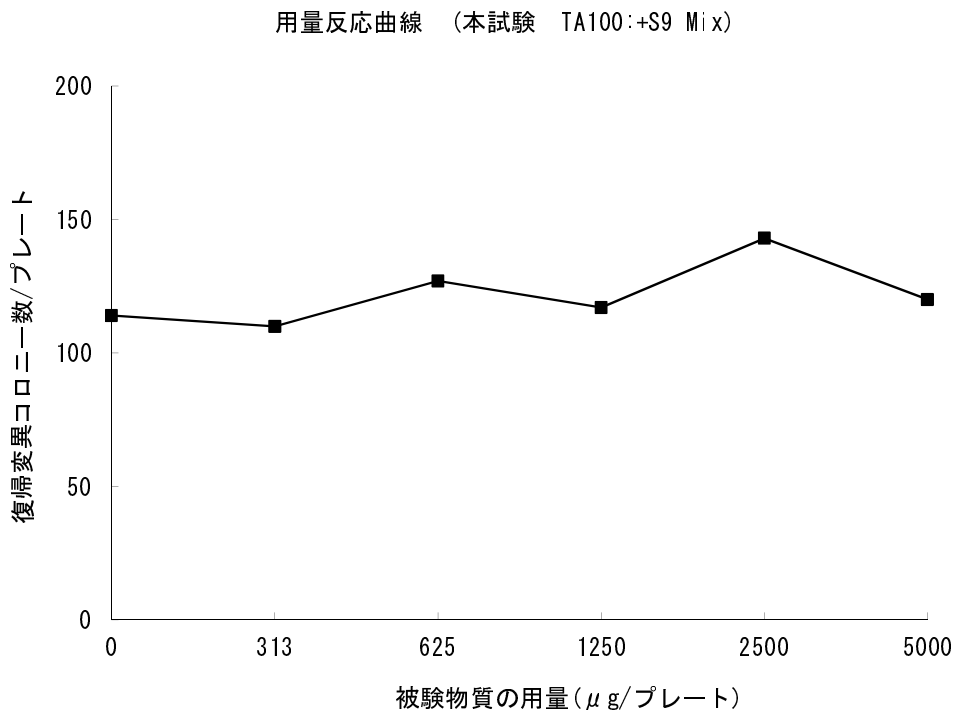




図 3

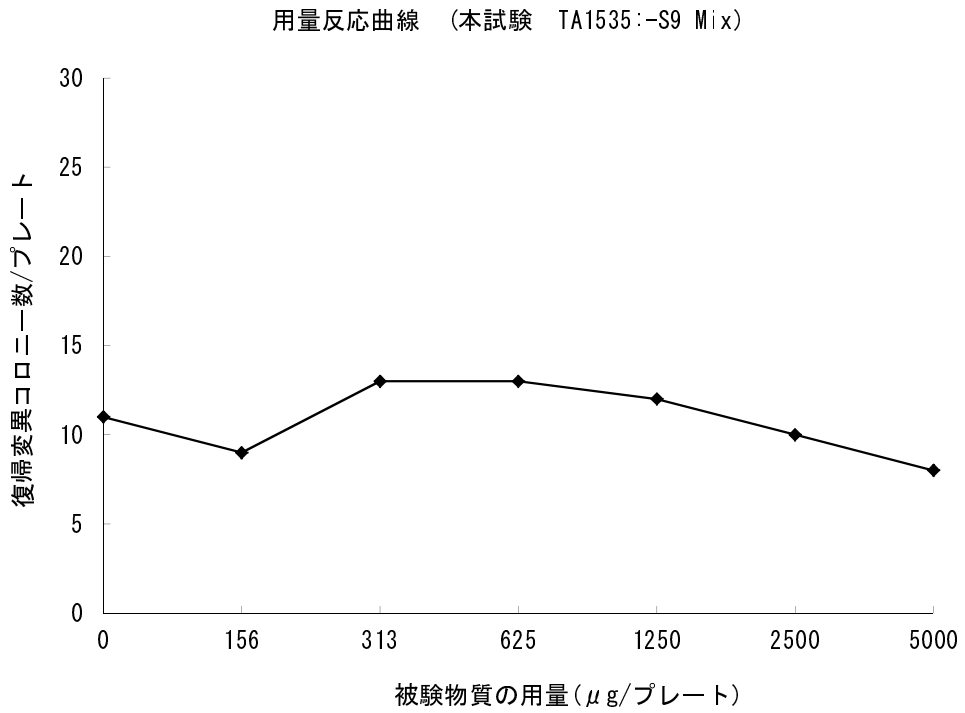


図 4

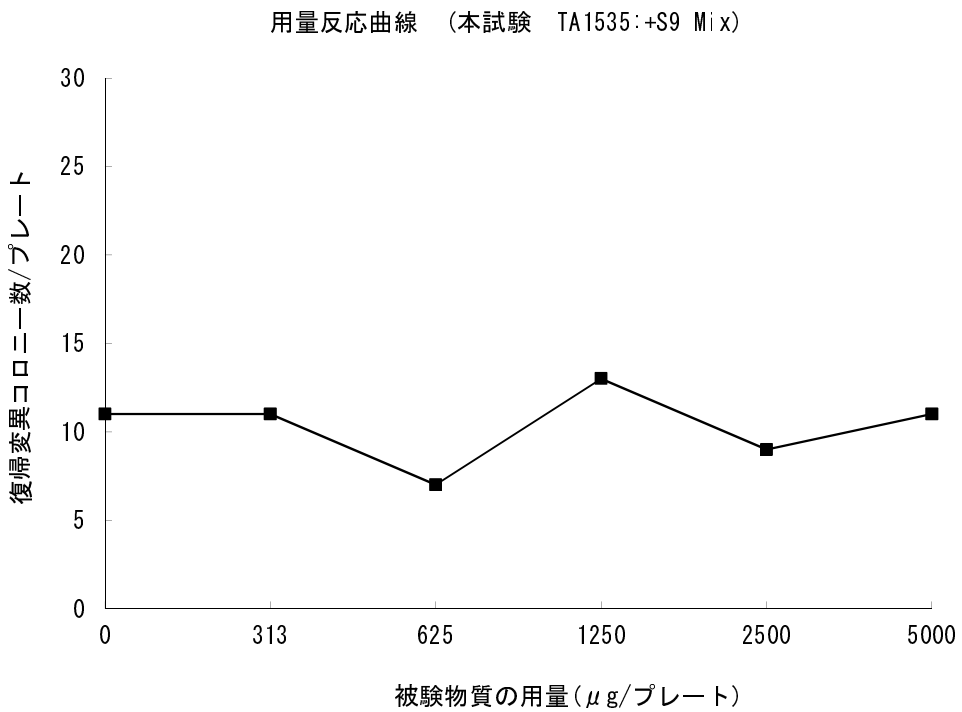


図 5

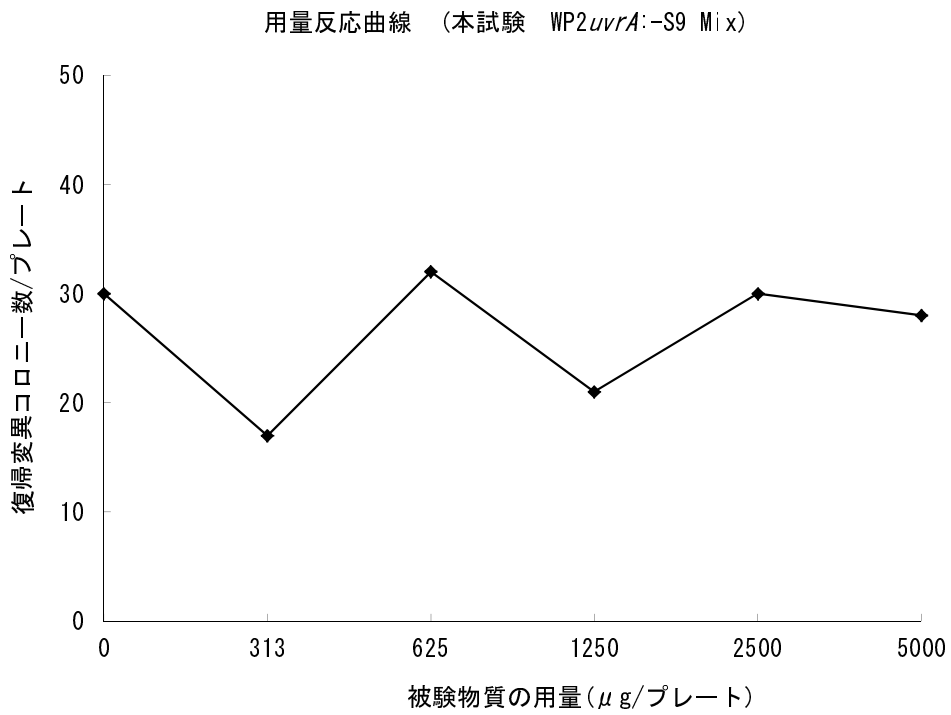


図 6

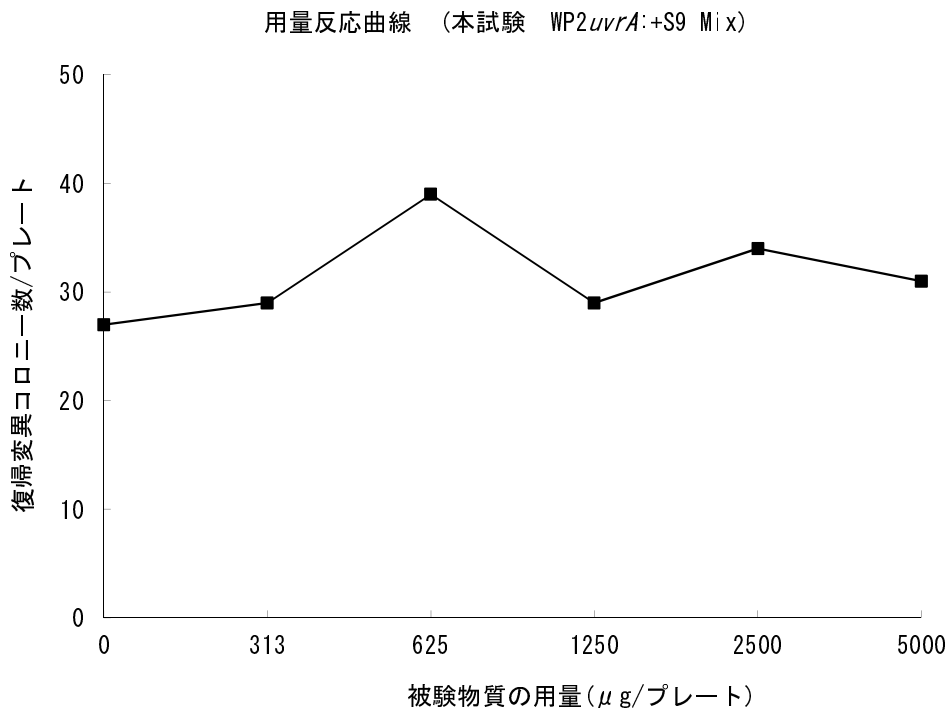


図 7

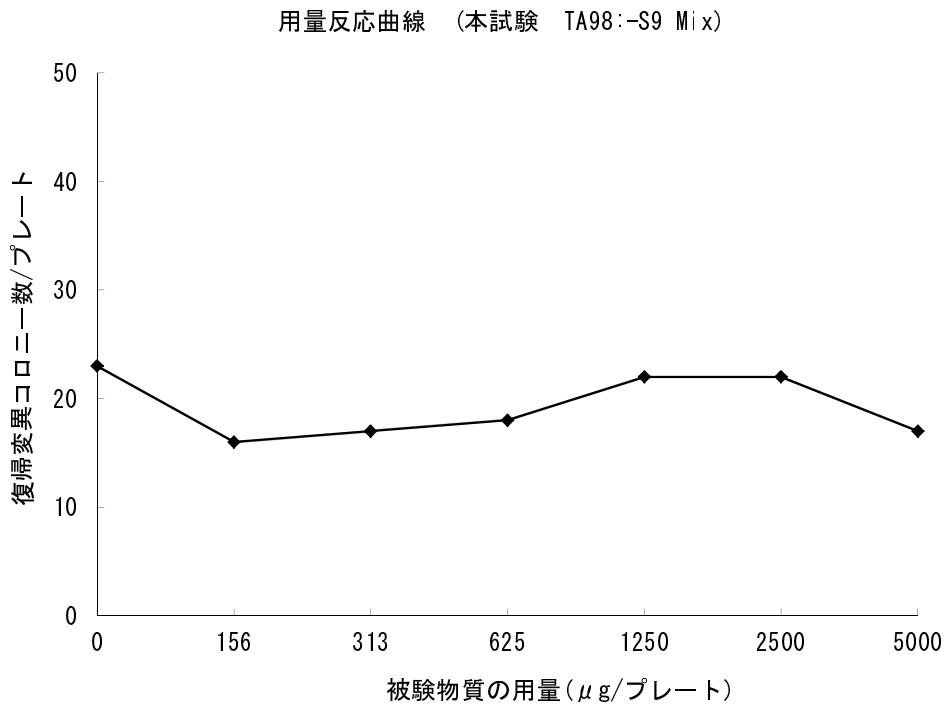


図 8

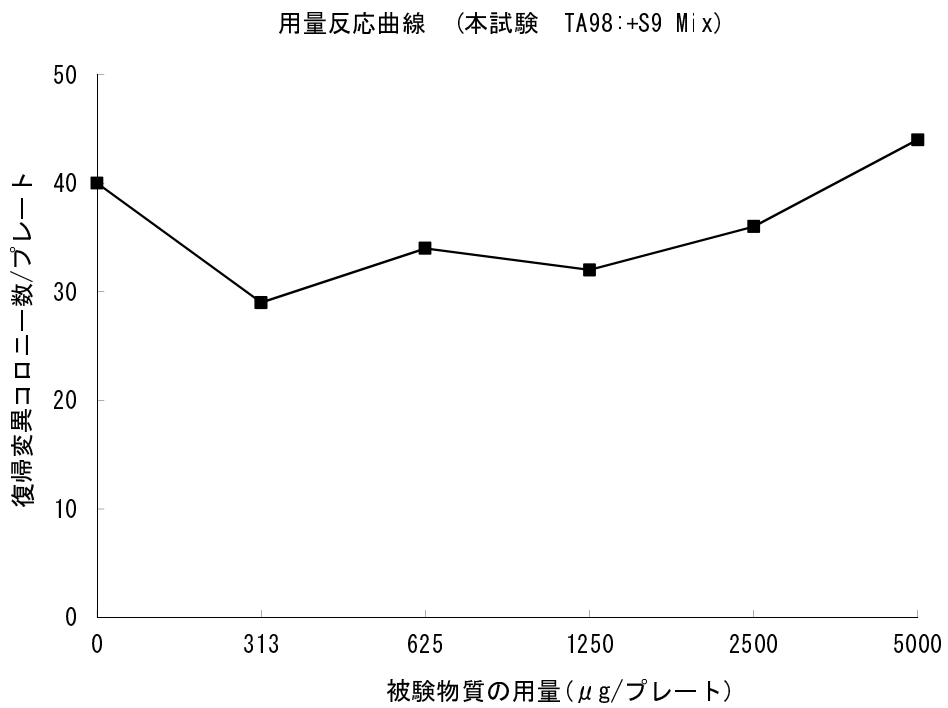


図 9

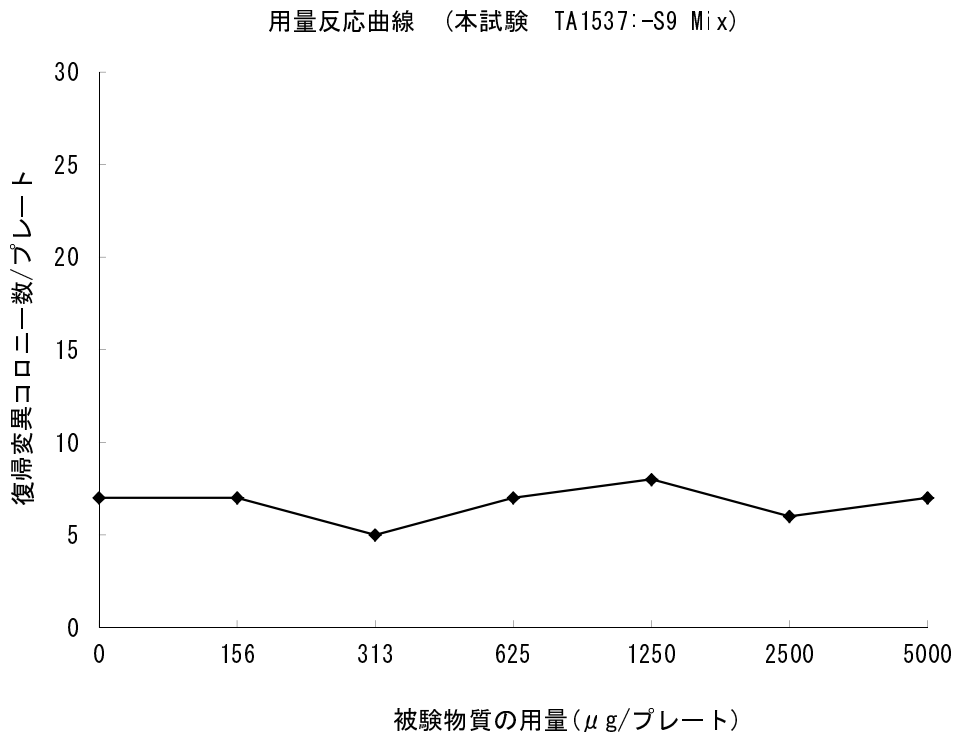


図 10

