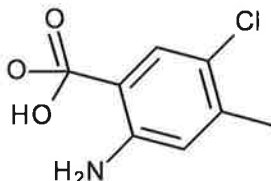


微生物を用いる変異原性試験結果報告書

1. 一般的事項

| | | | |
|------------------------------|---|----------------------------|-----------------|
| 新規化学物質の名称 (IUPAC 命名法による) | アミノクロロトルエンスルホン酸 | | |
| 別 名 | 5-アミノ-2-クロロトルエン-4-スルホン酸 | | |
| 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 | 99.9% (area%) | 試験に供した新規化学物質の Lot No. | GI01 |
| 不純物の名称及び濃度 | / | | |
| CAS 番号 | 88-53-9 | 蒸気圧 | / |
| 分子量 | 221.66 | 分配係数 | / |
| 融 点 | / | | 常温における性状 固体 |
| 沸 点 | / | | |
| 安定性 | 適切な条件下においては安定 | | |
| 溶媒に対する溶解度等 | 溶媒 | 溶解度 | 溶媒中での安定性 |
| | 水 | 難溶 (0.2 g/100 mL, 20°C) | / |
| | DMSO | 50 mg/mL では溶解 | 発熱、ガスの発生等の反応性なし |
| | アセトン | / | |
| | その他 | / | |

(備考) 上記被験物質情報は、製造元及び Chemical Book からの情報による。なお、DMSO の溶解性及び DMSO 中で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 | 2017年4月12日 |
| <i>Salmonella typhimurium</i> TA100 | 国立医薬品食品衛生研究所 | 2017年4月12日 |
| <i>Salmonella typhimurium</i> TA1535 | 国立医薬品食品衛生研究所 | 2017年4月12日 |
| <i>Salmonella typhimurium</i> TA1537 | 国立医薬品食品衛生研究所 | 2017年4月12日 |
| <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA | 国立医薬品食品衛生研究所 | 2017年4月12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 | 2017年11月10日 |
| 購入の場合 Lot No. | RAA201711A |
| 保存温度 | -86.1~-80.2°C (保存期間：2017年11月29日~2018年1月12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 | 196-240 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(%) |
| | DMSO | 和光純薬工業株式会社 | TGW1526 | JIS規格 試薬特級 | 99.0%以上 |
| 溶媒選択の理由 | 本被験物質は、水の難溶との情報より、DMSOの50 mg/mLの濃度での溶解性を確認した。その結果、溶解し、DMSOを添加した際、発熱、ガスの発生等の反応性も認められなかった。また、1時間経過後の溶液に色調変化は見られなかった。そのため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. JPF7829)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 <input type="checkbox"/> 懸濁 <input type="checkbox"/> 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="checkbox"/> 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. | 1554986 |
| 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 ($\times 10^9$ /mL) | 用量設定試験 | 2.79 | 3.94 | 6.24 | 4.19 | 5.27 |
| | 本試験 | 2.65 | 3.89 | 6.80 | 4.19 | 6.17 |
| 測定方法 | | <input checked="" type="checkbox"/> 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 <input type="checkbox"/> 2. <input checked="" type="checkbox"/> 購入 (購入元 極東製薬工業株式会社) |
| 製造年月日 | 2017年11月14日 |
| 購入の場合の Lot No. | DZAIBE01 |
| 使用寒天の名称・製造・Lot No. | 大洋寒天・SSK セールス株式会社・Lot No. BM-M5-268 |

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 | <input checked="" type="checkbox"/> 1. プレインキュベーション法 2. <input type="checkbox"/> プレート法 3. <input type="checkbox"/> 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 (用量設定試験) | 49 時間 |
| | 時間 (本試験) | 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 <input type="checkbox"/> 2. <input checked="" type="checkbox"/> 機器計測 |
| 補正の有無 | 1 無 <input type="checkbox"/> 2. <input checked="" type="checkbox"/> 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アミノクロロトルエンスルホン酸は、微生物に対する遺伝子突然変異誘発能を有しない（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。実体顕微鏡を用いて菌に対する生育阻害を観察した結果、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: アミノクロロトルエンスルホン酸

No. T-2584

| 試験実施期間 | | 2017年12月19日 より 2017年12月22日 | | | | |
|-----------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|
| 代謝活性化系の有無 | 被験物質の用量 (μ g/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) | 96 93 (95) | 12 9 (11) | 23 22 (23) | 21 25 (23) | 8 8 (8) |
| | 4.88 | 85 94 (90) | 6 10 (8) | 21 26 (24) | 24 22 (23) | 10 10 (10) |
| | 19.5 | 105 93 (99) | 5 9 (7) | 21 28 (25) | 22 21 (22) | 8 11 (10) |
| | 78.1 | 91 103 (97) | 6 10 (8) | 26 28 (27) | 20 22 (21) | 11 13 (12) |
| | 313 | 80 96 (88) | 7 5 (6) | 23 25 (24) | 24 18 (21) | 8 12 (10) |
| | 1250 | 108 94 (101) | 11 10 (11) | 31 27 (29) | 23 24 (24) | 9 8 (9) |
| | 5000 | 83 85 (84) | 11 6 (9) | 25 21 (23) | 22 23 (23) | 11 5 (8) |
| | S9Mix (+) | 陰性対照 (DMSO) | 104 127 (116) | 13 11 (12) | 32 33 (33) | 34 33 (34) |
| 4.88 | | 90 102 (96) | 10 8 (9) | 32 26 (29) | 35 33 (34) | 7 5 (6) |
| 19.5 | | 107 98 (103) | 5 10 (8) | 28 34 (31) | 33 32 (33) | 6 8 (7) |
| 78.1 | | 119 115 (117) | 5 11 (8) | 34 30 (32) | 27 33 (30) | 8 8 (8) |
| 313 | | 92 64 (78) | 7 12 (10) | 34 29 (32) | 31 26 (29) | 8 6 (7) |
| 1250 | | 122 136 (129) | 8 13 (11) | 28 31 (30) | 33 26 (30) | 6 7 (7) |
| 5000 | | 113 124 (119) | 8 8 (8) | 33 32 (33) | 36 29 (33) | 7 8 (8) |
| 陽性対照 | | 名称 | AF-2 | SAZ | AF-2 | AF-2 |
| | 用量 (μ g/プレート) | 0.01 | 0.5 | 0.01 | 0.1 | 1.0 |
| | コロニー数/プレート | 440 476 (458) | 341 308 (325) | 88 90 (89) | 301 369 (335) | 1139 1143 (1141) |
| | 名称 | B[a]P | 2AA | 2AA | B[a]P | B[a]P |
| 用量 (μ g/プレート) | 5.0 | 2.0 | 10.0 | 5.0 | 5.0 | |
| コロニー数/プレート | 1041 1032 (1037) | 252 299 (276) | 646 617 (632) | 331 331 (331) | 93 93 (93) | |

(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
B[a]P : ベンゾ[a]ピレン
2AA : 2-アミノアントラセン

()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: アミノクロトルエンスルホン酸

No. T-2584

| 試験実施期間 | | 2018年1月11日 より 2018年1月15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) | 103 117 (110) | 11 9 (10) | 21 22 (22) | 21 18 (20) | 10 7 (9) |
| | 313 | 110 102 (106) | 8 8 (8) | 21 20 (21) | 22 21 (22) | 4 5 (5) |
| | 625 | 112 124 (118) | 10 10 (10) | 17 16 (17) | 17 19 (18) | 7 9 (8) |
| | 1250 | 127 110 (119) | 5 6 (6) | 16 17 (17) | 18 17 (18) | 6 6 (6) |
| | 2500 | 100 129 (115) | 7 5 (6) | 21 24 (23) | 20 15 (18) | 6 6 (6) |
| | 5000 | 117 122 (120) | 7 6 (7) | 20 27 (24) | 18 18 (18) | 7 9 (8) |
| | S9Mix (+) | 陰性対照 (DMSO) | 122 133 (128) | 13 9 (11) | 26 27 (27) | 34 31 (33) |
| 313 | | 134 133 (134) | 7 5 (6) | 26 21 (24) | 32 27 (30) | 5 11 (8) |
| 625 | | 108 128 (118) | 10 11 (11) | 26 26 (26) | 29 34 (32) | 11 10 (11) |
| 1250 | | 139 131 (135) | 9 11 (10) | 25 21 (23) | 31 27 (29) | 5 8 (7) |
| 2500 | | 111 131 (121) | 6 11 (9) | 25 22 (24) | 27 24 (26) | 6 11 (9) |
| 5000 | | 131 117 (124) | 6 5 (6) | 25 27 (26) | 34 40 (37) | 8 11 (10) |
| 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 | 483 510 (497) | 342 320 (331) | 82 84 (83) | 322 358 (340) | 1197 1386 (1292) |
| | 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 | 945 1072 (1009) | 318 370 (344) | 670 665 (668) | 374 406 (390) | 95 103 (99) |

(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

B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

2AA : 2-アミノアントラセン

()内は、2枚のプレートの平均値を示す。

図 1

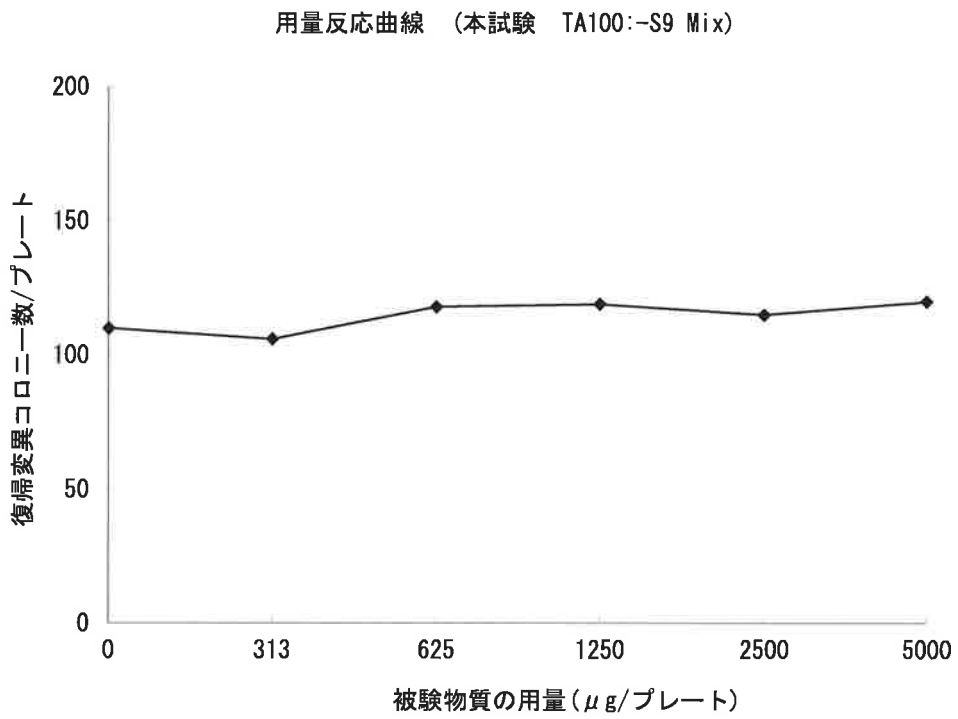


図 2

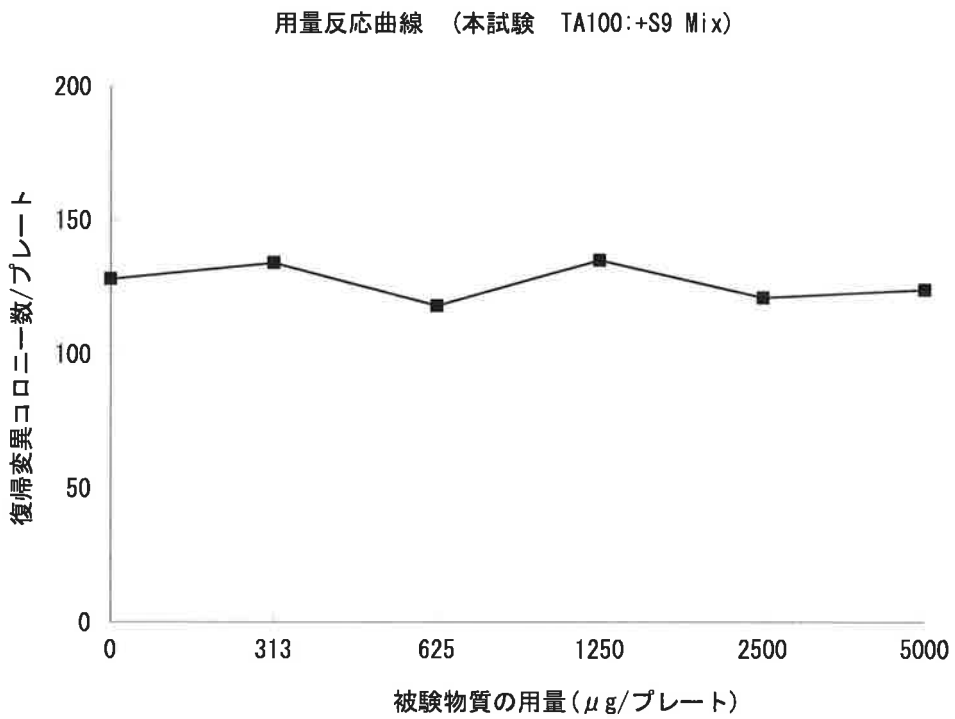


図 3

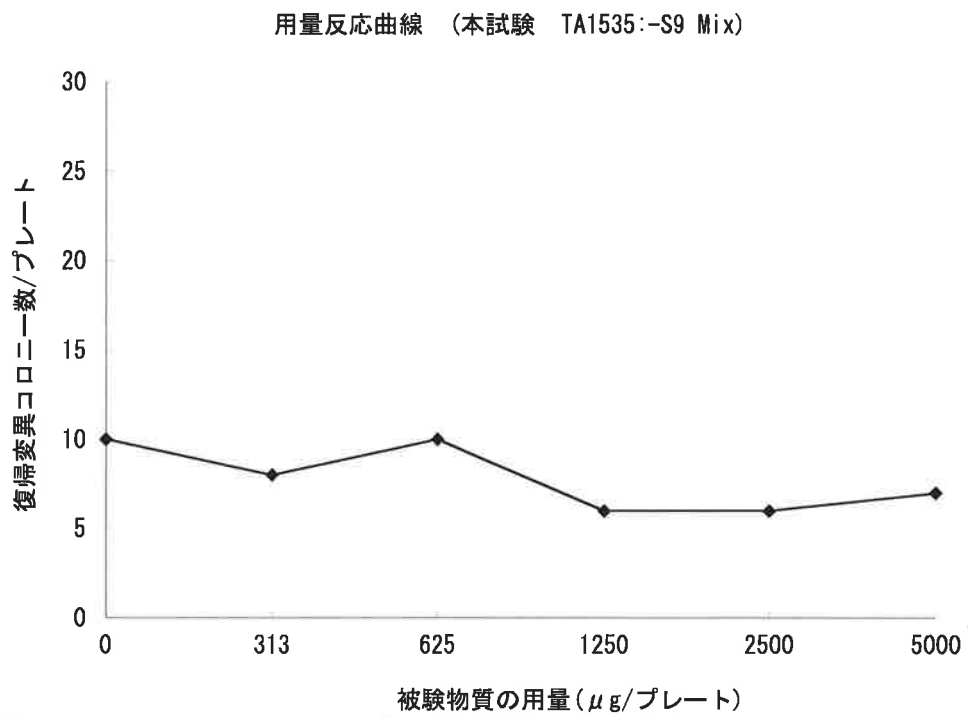


図 4

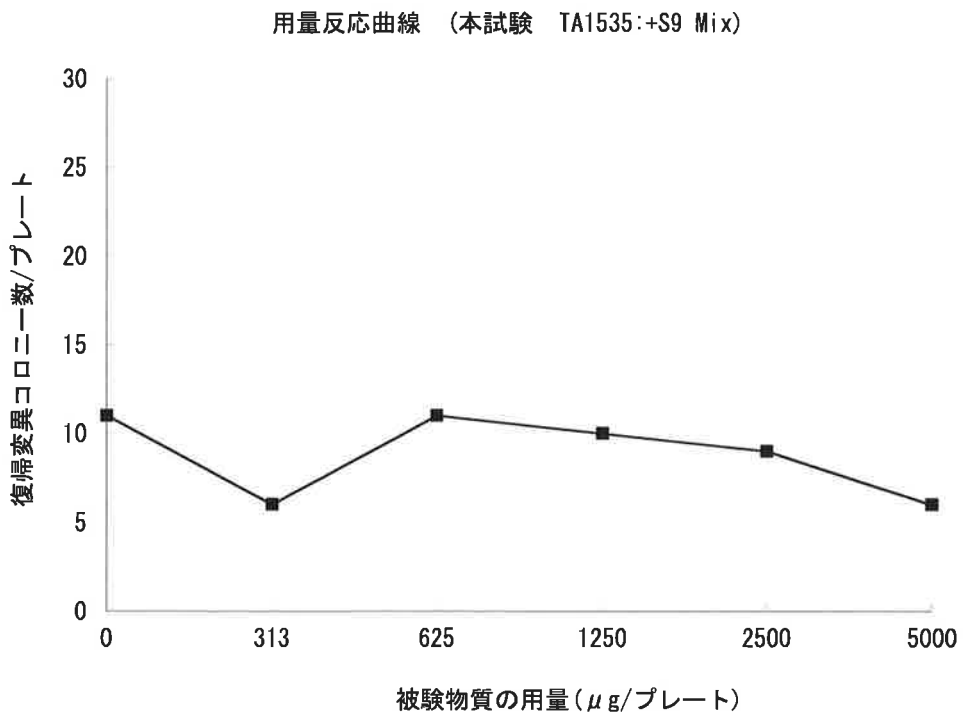


図 5

用量反応曲線 (本試験 WP2uvrA:-S9 Mix)

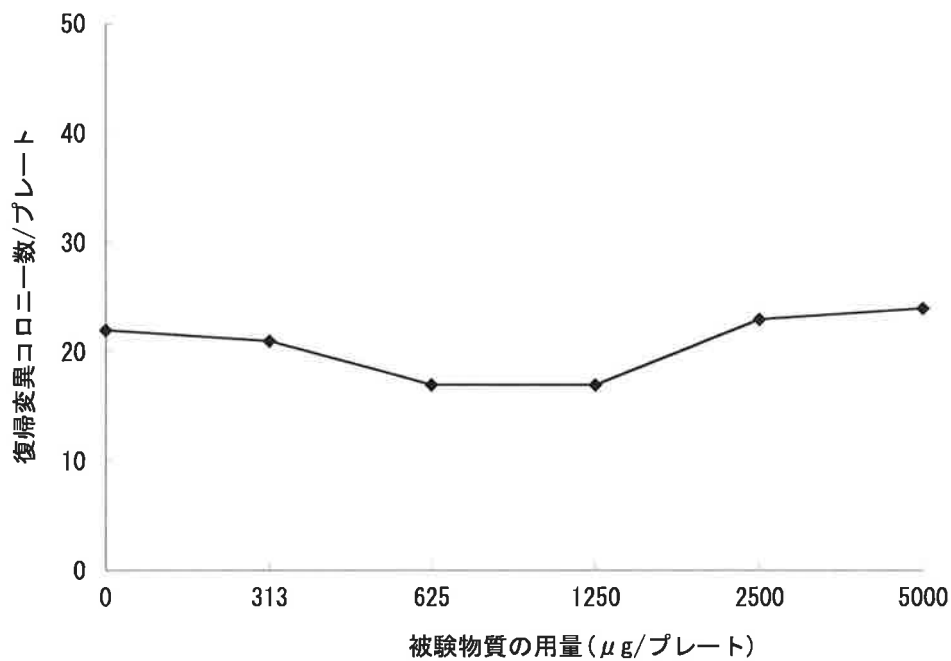


図 6

用量反応曲線 (本試験 WP2uvrA:+S9 Mix)

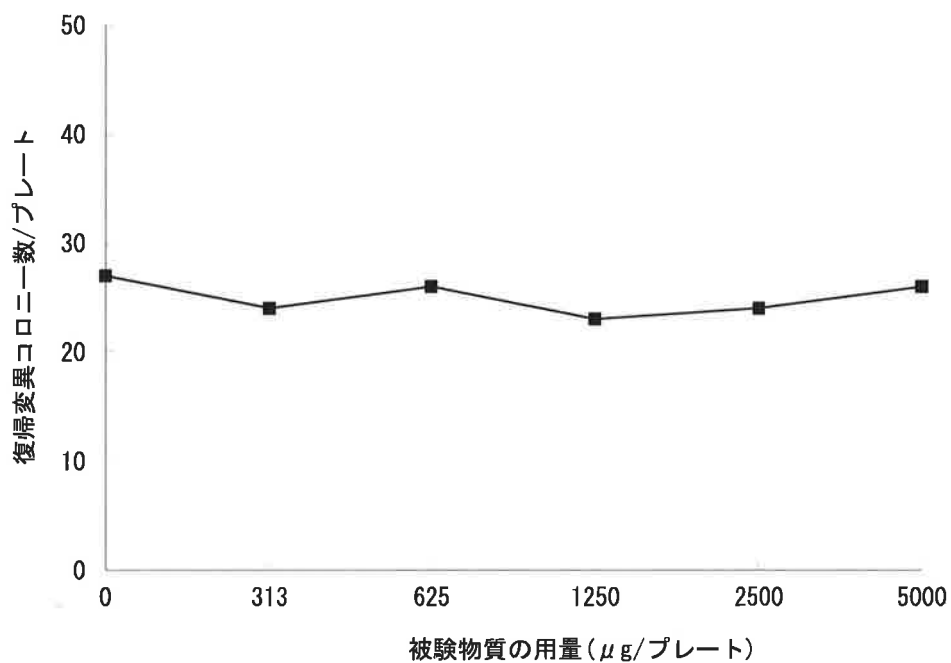


図 7

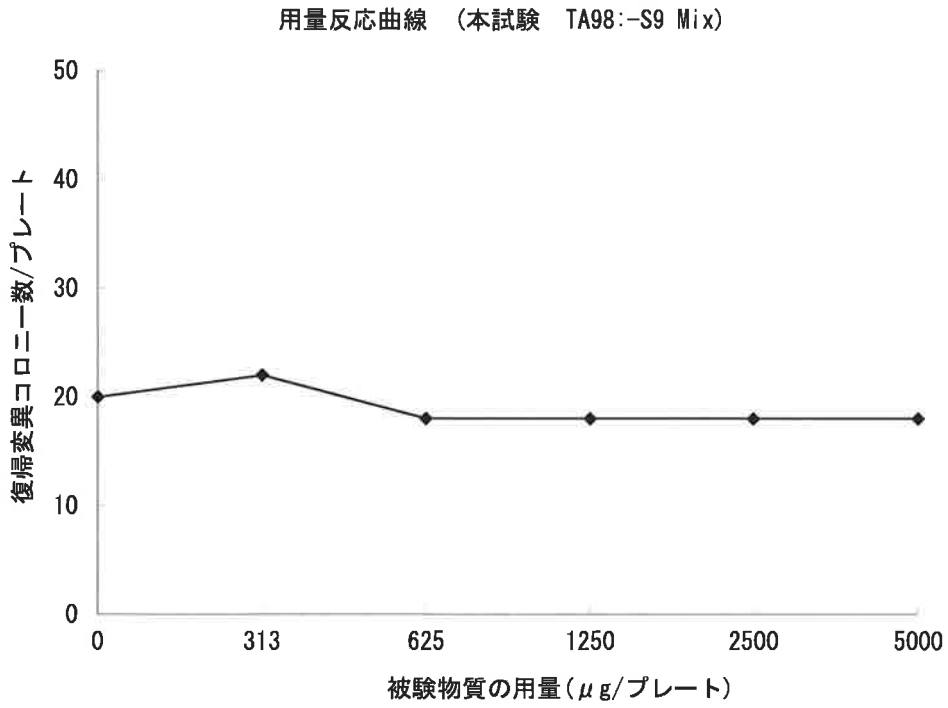


図 8

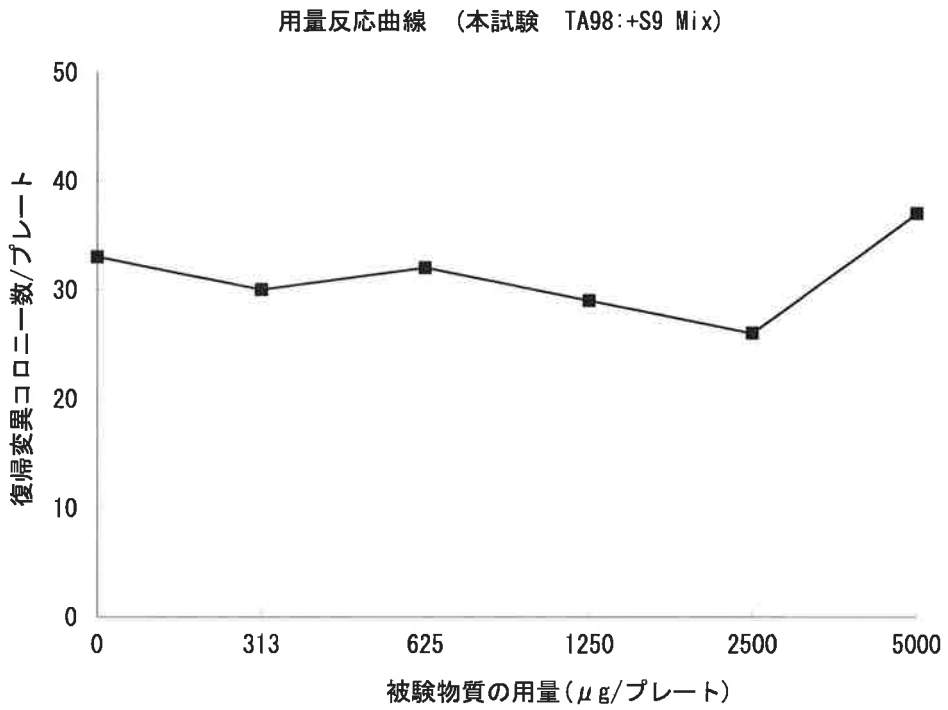


図 9

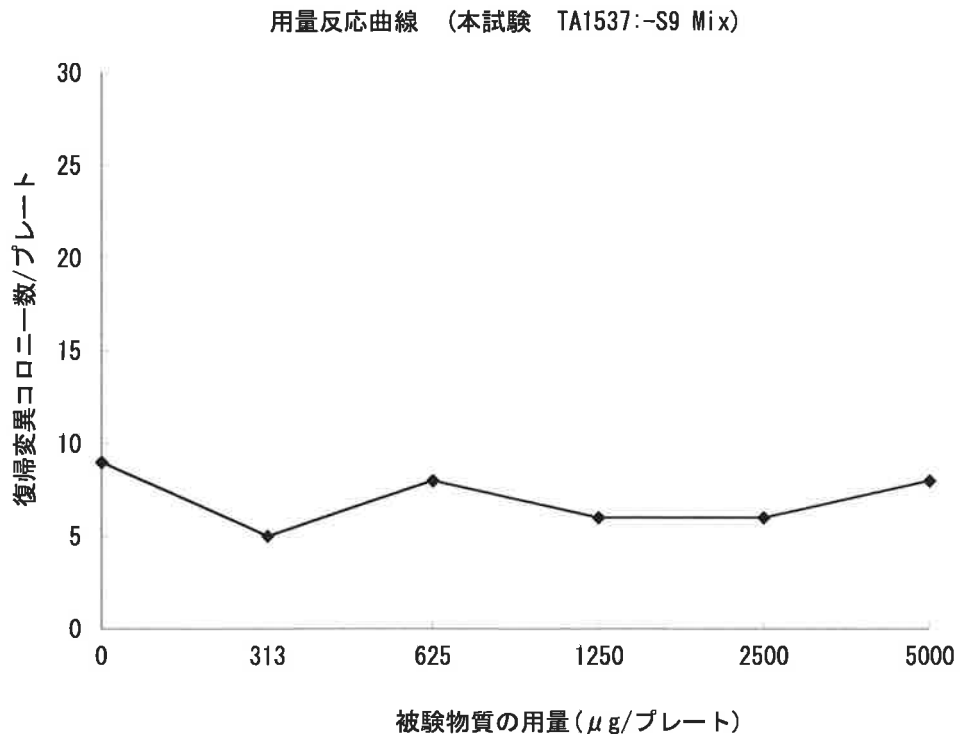
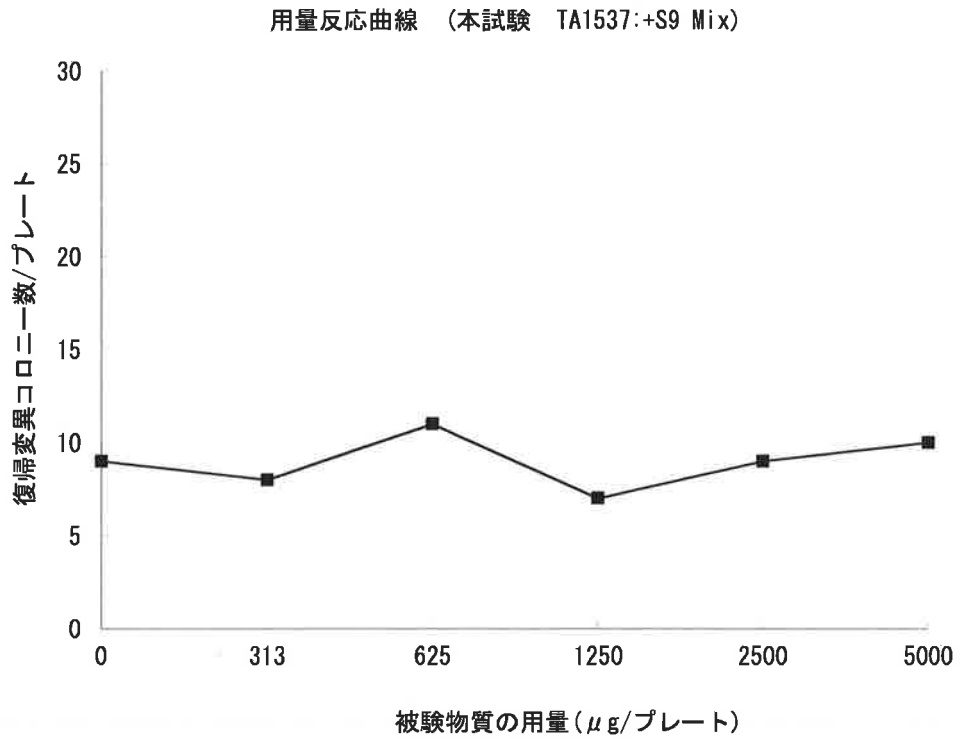


図 10



**Background Data of the reverse mutation tests in bacteria
at the Tokyo Laboratory of the BoZo Research Center Inc.**

CODE No. :170801

Period : From July 25, 2017 to July 31, 2017

(Pre-incubation Method)

| Tester Strains | S9 Mix (-) or (+) | Classification | Mean | S.D. | Management ranges | | Number of plates |
|---------------------|-------------------|---------------------------------------|------|------|-------------------|-------------|------------------|
| | | | | | Lower limit | Upper limit | |
| TA100 | - | Solvent control | 94 | 13.1 | 54 | 133 | 32 |
| | | Positive control AF-2(0.01µg/plate) | 510 | 65.1 | 326 | 693 | 32 |
| | + | Solvent control | 114 | 13.6 | 76 | 152 | 32 |
| | | Positive control B[a]P(5.0µg/plate) | 1004 | 96 | 733 | 1275 | 32 |
| TA1535 | - | Solvent control | 8 | 2.63 | 1 | 16 | 32 |
| | | Positive control SAZ(0.5µg/plate) | 252 | 73.5 | 33 | 471 | 32 |
| | + | Solvent control | 9 | 3.14 | 1 | 18 | 32 |
| | | Positive control 2AA(2.0µg/plate) | 267 | 71.5 | 59 | 475 | 32 |
| WP2 _{uvrA} | - | Solvent control | 20 | 6.02 | 3 | 38 | 32 |
| | | Positive control AF-2(0.01µg/plate) | 77 | 19.9 | 54 | 101 | 32 |
| | + | Solvent control | 20 | 6.20 | 2 | 39 | 32 |
| | | Positive control 2AA(10.0µg/plate) | 611 | 55 | 464 | 758 | 32 |
| TA98 | - | Solvent control | 18 | 4.31 | 2 | 33 | 32 |
| | | Positive control AF-2(0.1µg/plate) | 360 | 51.4 | 252 | 468 | 32 |
| | + | Solvent control | 29 | 7.05 | 10 | 49 | 32 |
| | | Positive control B[a]P(5.0µg/plate) | 372 | 30.2 | 282 | 461 | 32 |
| TA1537 | - | Solvent control | 12 | 3.58 | 1 | 22 | 32 |
| | | Positive control ICR-191(1.0µg/plate) | 1067 | 158 | 427 | 1708 | 32 |
| | + | Solvent control | 13 | 3.18 | 3 | 22 | 32 |
| | | Positive control B[a]P(5.0µg/plate) | 121 | 22.0 | 63 | 178 | 32 |

(Notice)

Solvent controls Dimethylsulfoxide(DMSO)

Positive controls AF-2 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

SAZ : Sodium azide

ICR-191 : 2-methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)aminopropylamino]acridine·2HCl

B[a]P : Benzo[a]pyrene

2AA : 2-aminoanthracene

S9Mix (-) : without metabolic activation

(+) : with metabolic activation