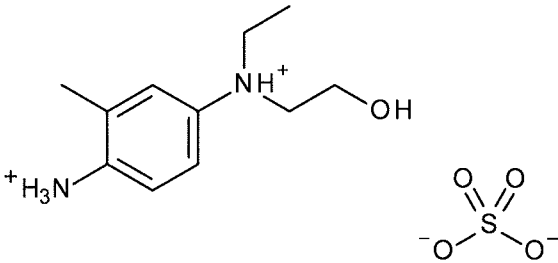


微生物を用いる変異原性試験結果報告書

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 - 3 - メチルフェニル) エチルアミノ] エタノール・硫酸塩		
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	99.8 area% (HPLC)	試験に供した新規 化学物質の Lot No.	XHZVB
不純物の名称及び濃度	/		
CAS 番号	25646-77-9	蒸気圧	/
分子量	292.35	分配係数	/
融 点	155°C	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	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、製造元及び職場のあんぜんサイト並びに Chemical Book からの情報による。なお、溶解性及び溶媒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: 家田貿易株式会社)
製造年月日	2017年12月1日
購入の場合 Lot No.	RAA201712A
保存温度	-86.8~-80.1°C (保存期間: 2017年12月21日~2018年2月2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	184-231 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	K6L74	日本薬局方	
溶媒選択の理由	本被験物質は、水の 50 mg/mL の濃度で溶解し、水を添加した際に発熱、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、注射用水を溶媒として試験を実施した。また、使用する水は超音波にて脱気し、窒素置換した水を使用した。				
被験物質溶液の性状	<input checked="" type="checkbox"/> 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 <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	2.74	3.87	6.61	4.22	6.40
	本試験	2.60	3.84	6.57	4.22	7.06
	追加確認試験		3.84			
測定方法		<input checked="" type="checkbox"/> 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12月22日
購入の場合の Lot No.	DZAICM01
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-M5-265

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、追加確認試験)	48 時間
	時間 (本試験)	48.5 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、追加確認試験の結果を別表 3 に、比活性値を別表 4 示した。なお、図 1~10 は別表 2、図 11~12 は別表 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の代謝活性化の有無にかかわらず <i>S. typhimurium</i> TA100、本試験及び追加確認試験の代謝活性化の有無にかかわらず <i>S. typhimurium</i> TA1535 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増加が認められ再現性を示した。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 2.58×10^2 (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-3-メチルフェニル)エチルアミノ]エタノール・硫酸塩は、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。本被験物質によるプレート上の着色は、代謝活性化の有無にかかわらず 1768 µg/plate 以上の用量で認められた。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、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1535 の 1768 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1537 の 2500 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98、TA100 及び *E. coli* WP2 *uvrA* の 5000 µg/plate の用量で認められた。代謝活性の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA1535 においては、復帰変異コロニーの増加の再現性を確認するため、代謝活性化しない場合においては 442~2500 µg/plate の範囲の 6 用量、代謝活性化する場合においては 884~5000 µg/plate の範囲の 6 用量で追加確認試験を実施した。

本被験物質は、空気酸化により徐々に分解、着色するとの情報より、被験物質の秤量及び被験液の調製は、無菌パック内を窒素雰囲気にして実施した。

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-3-メチルフェニル)エチルアミノ]エタノール・硫酸塩

No. T-2590

試験実施期間		2018年1月26日 より 2018年1月29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 (注射用水)	119 102 (111)	8 10 (9)	21 26 (24)	18 15 (17)	10 6 (8)	
	4.88	93 114 (104)	11 7 (9)	27 28 (28)	24 25 (25)	10 7 (9)	
	19.5	110 108 (109)	7 7 (7)	27 23 (25)	15 15 (15)	6 10 (8)	
	78.1	110 120 (115)	10 7 (9)	22 30 (26)	18 16 (17)	9 11 (10)	
	313	174 202 (188)	7 8 (8)	21 31 (26)	16 16 (16)	11 11 (11)	
	1250	368 382 (375)	10 15 (13)	38 34 (36)	15 13 (14)	10 11 (11)	
	5000	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	
	S9Mix (+)	陰性対照 (注射用水)	134 145 (140)	11 8 (10)	32 22 (27)	33 32 (33)	11 13 (12)
4.88		140 103 (122)	7 10 (9)	30 31 (31)	34 25 (30)	11 12 (12)	
19.5		126 149 (138)	8 8 (8)	21 33 (27)	30 40 (35)	10 8 (9)	
78.1		147 160 (154)	6 6 (6)	18 19 (19)	35 36 (36)	14 9 (12)	
313		220 207 (214)	8 10 (9)	29 25 (27)	39 39 (39)	15 16 (16)	
1250		382 345 (364)	16 22 (19)	24 26 (25)	20 28 (24)	10 4 (7)	
5000		563 609 (586)	16 14 (15)	24 27 (26)	24 23 (24)	3 6 (5)	
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 (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	593 629 (611)	223 257 (240)	100 94 (97)	324 315 (320)	1197 1024 (1111)	
	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P	
	S9Mixを必要とするもの	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	1059 1103 (1081)	226 248 (237)	582 684 (633)	367 374 (371)	93 96 (95)	

(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

* : 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-[(4-アミノ-3-メチルフェニル) エチルアミノ] エタノール・硫酸塩

No. T-2590

試験実施期間		2018年1月29日 より 2018年2月1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)	129 96 (113)	7 13 (10)	26 31 (29)	25 24 (25)	8 7 (8)
	156	171 175 (173)	11 13 (12)	25 20 (23)	18 25 (22)	7 4 (6)
	313	189 199 (194)	9 13 (11)	28 24 (26)	23 31 (27)	8 6 (7)
	625	285 263 (274)	15 22 (19)	28 41 (35)	25 23 (24)	6 3 (5)
	1250	374 373 (374)	23 20 (22)	39 39 (39)	24 31 (28)	9 5 (7)
	2500	543 567 (555)	0* 0* (0)	28 38 (33)	25 25 (25)	9* 5* (7)
	5000	501* 474* (488)	0* 0* (0)	6* 14* (10)	1* 12* (7)	8* 6* (7)
	S9Mix (+)	陰性対照 (注射用水)	107 127 (117)	10 9 (10)	26 29 (28)	41 36 (39)
156		172 174 (173)	10 10 (10)	NT	NT	NT
313		168 205 (187)	14 15 (15)	29 40 (35)	46 43 (45)	11 10 (11)
625		260 240 (250)	15 18 (17)	39 28 (34)	41 39 (40)	7 7 (7)
1250		339 350 (345)	22 17 (20)	31 27 (29)	34 31 (33)	4 5 (5)
2500		477 498 (488)	33 20 (27)	33 43 (38)	53 45 (49)	7 8 (8)
5000		528 613 (571)	13 14 (14)	34 25 (30)	28 29 (29)	6 6 (6)
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	543 536 (540)	298 332 (315)	88 97 (93)	318 310 (314)	1000 1017 (1009)
	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	1061 992 (1027)	288 316 (302)	616 679 (648)	341 368 (355)	93 108 (101)

(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

* : 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)

被験物質の名称：2-[(4-アミノ-3-メチルフェニル)エチル
アミノ]エタノール・硫酸塩

No. T-2590

試験実施期間		2018年2月1日 より 2018年2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	
		TA1535	
S9Mix (-)	陰性対照 (注射用水)	13 10	(12)
	442	15 24	(20)
	625	19 17	(18)
	884	24 30	(27)
	1250	24 30	(27)
	1768	13 * 5 *	(9)
	2500	0 * 0 *	(0)
	S9Mix (+)	陰性対照 (注射用水)	15 13
884		18 27	(23)
1250		28 27	(28)
1768		27 39	(33)
2500		23 35	(29)
3536		26 37	(32)
5000		13 18	(16)
陽性対照		名称	SAZ
	S9Mixを必要としないもの 用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.5	
	コロニー数/プレート	365 346	(356)
	名称	2AA	
	S9Mixを必要とするもの 用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	2.0	
	コロニー数/プレート	264 272	(268)

(備考)

SAZ : アジ化ナトリウム
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。
()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-3-メチルフェニル)エチルアミノ]エタノール・硫酸塩

No. T-2590

	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	2.11×10^2	1250	1.79×10^2	1250
	TA1535				
	WP2 <i>uvrA</i>				
	TA98				
	TA1537				
本 試 験	TA100	2.58×10^2	625	2.13×10^2	625
	TA1535	9.60×10^0	1250	8.00×10^0	1250
	WP2 <i>uvrA</i>				
	TA98				
	TA1537				
追 加 確 認 試 験	TA1535	1.70×10^1	884	1.12×10^1	1250

図 1

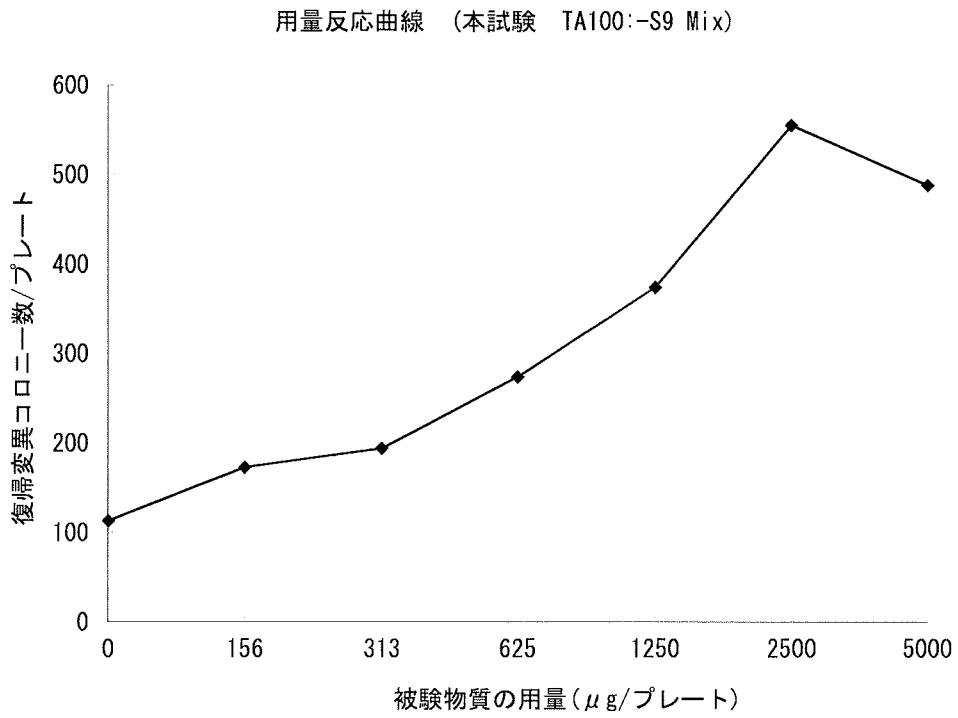


図 2

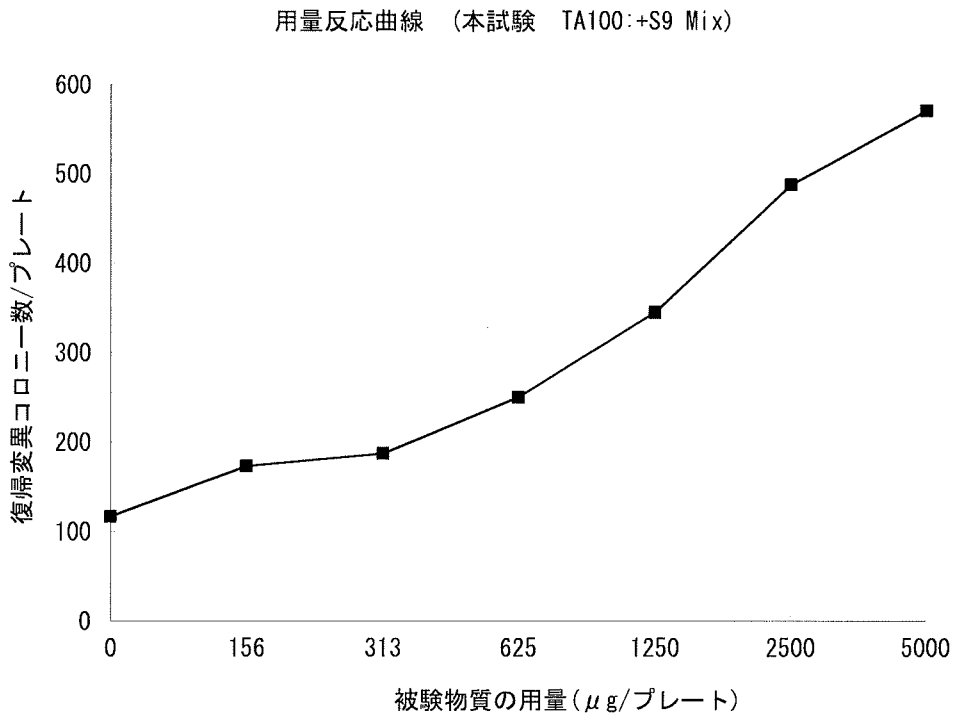


図 3

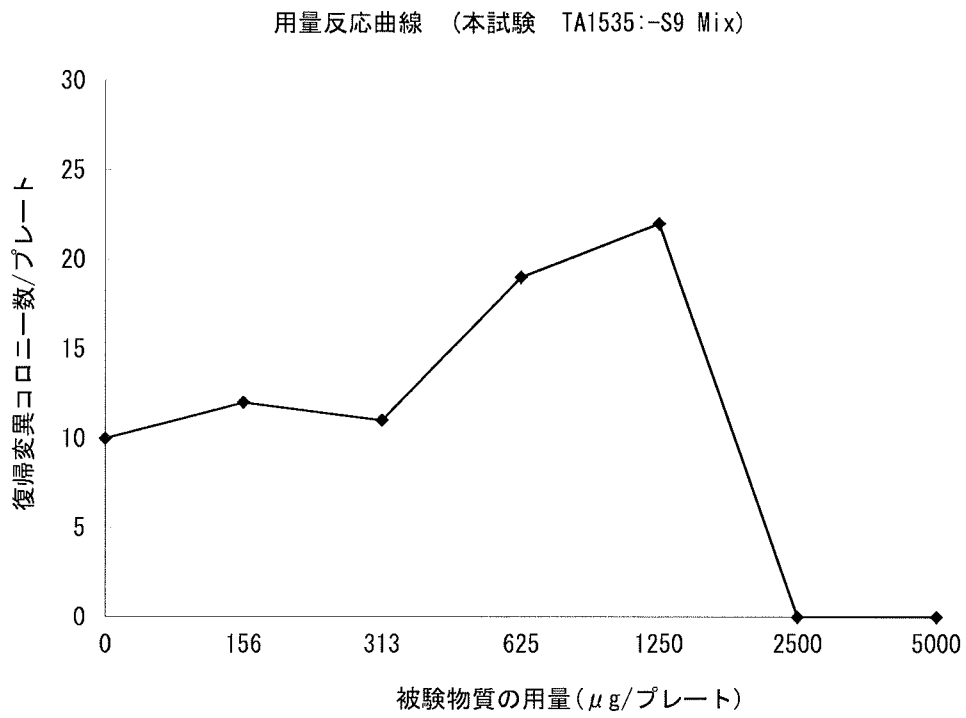


図 4

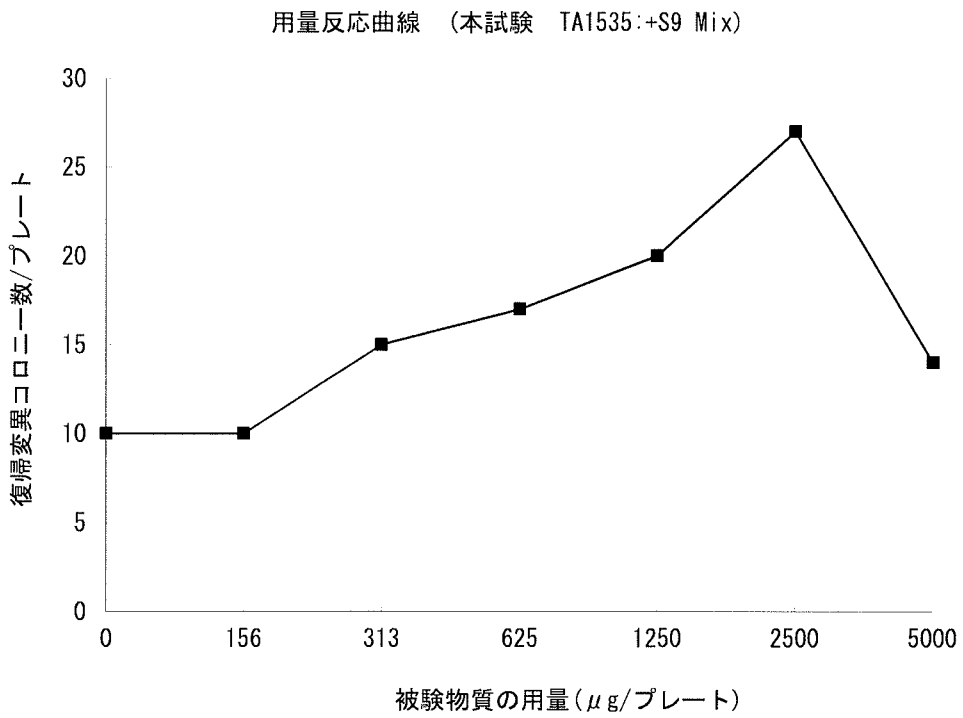


図 5

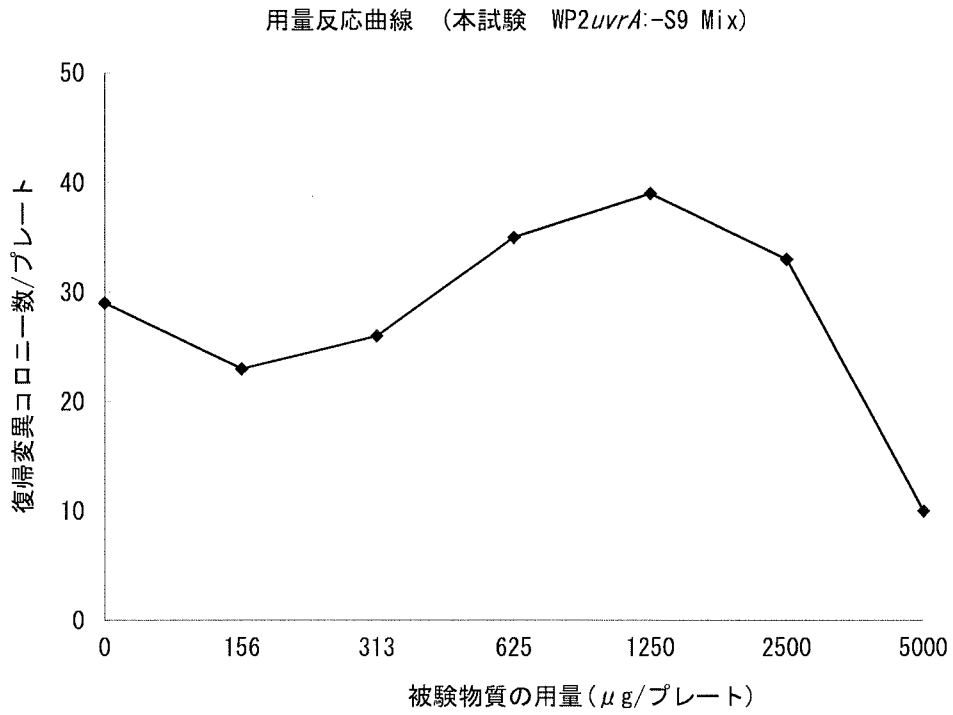


図 6

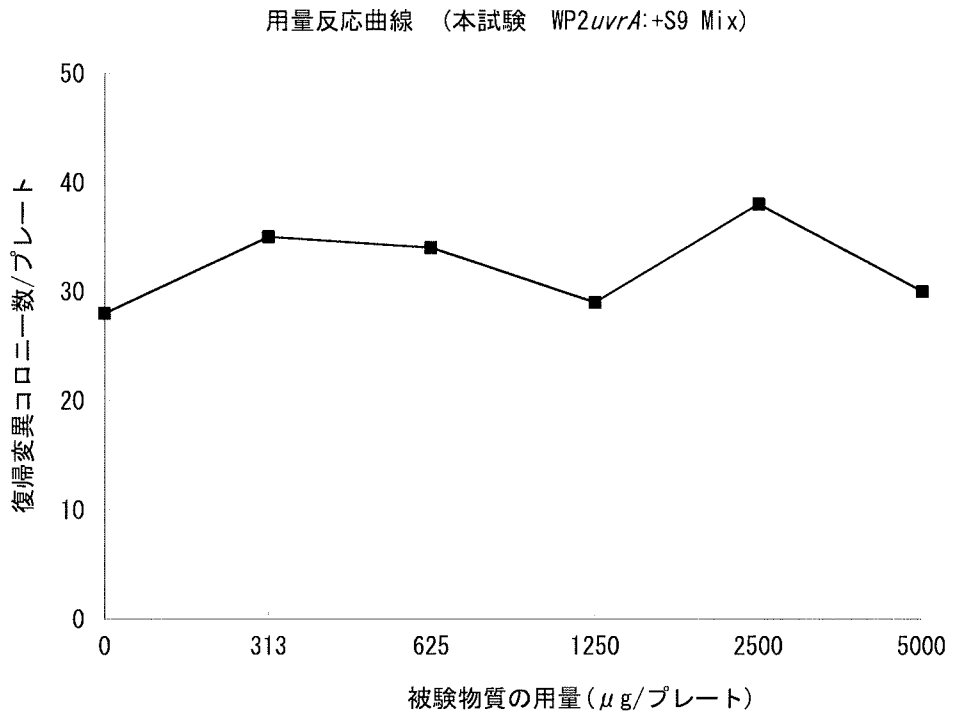


図 7

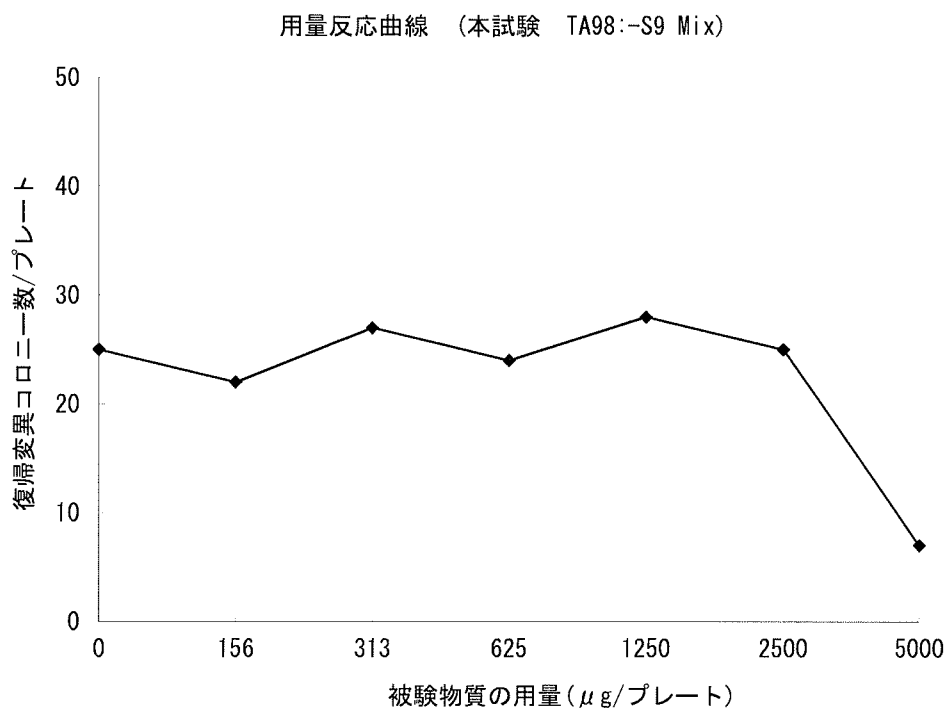


図 8

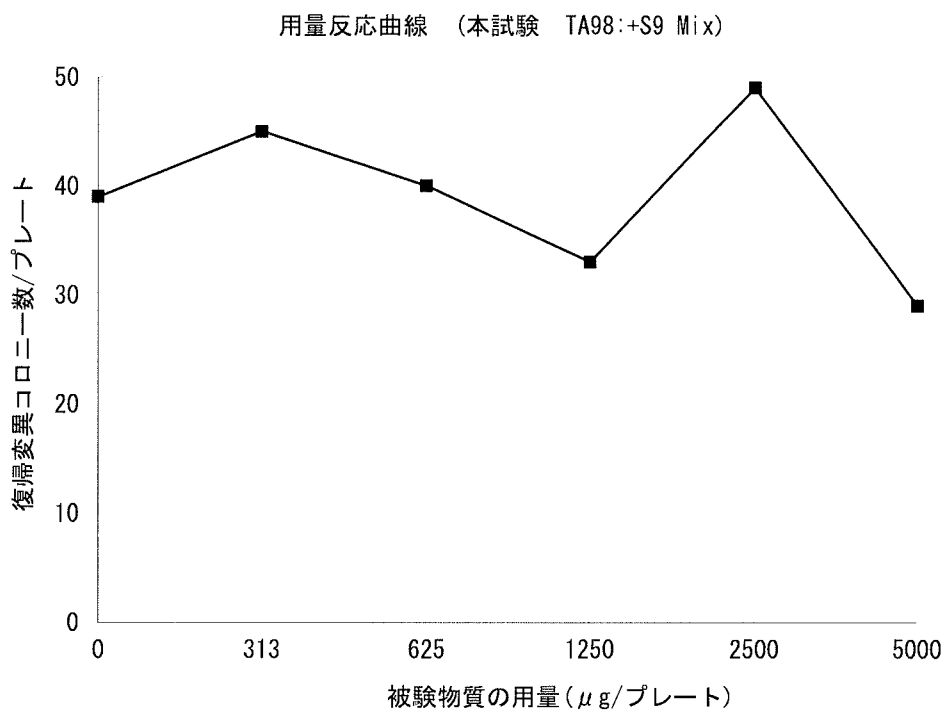


図 9

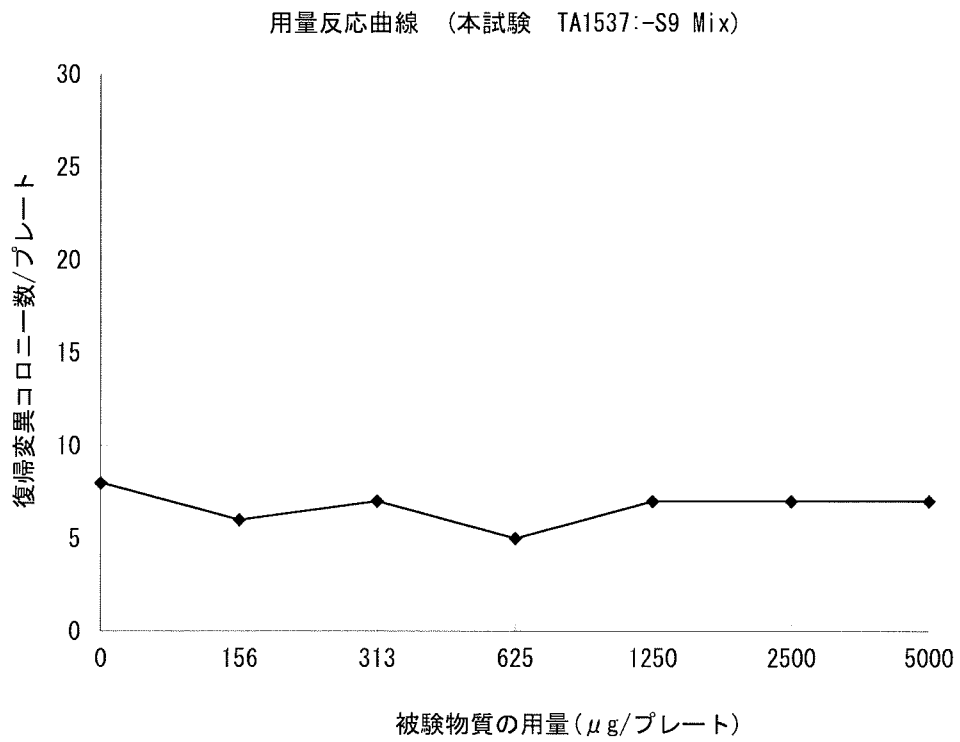


図 10

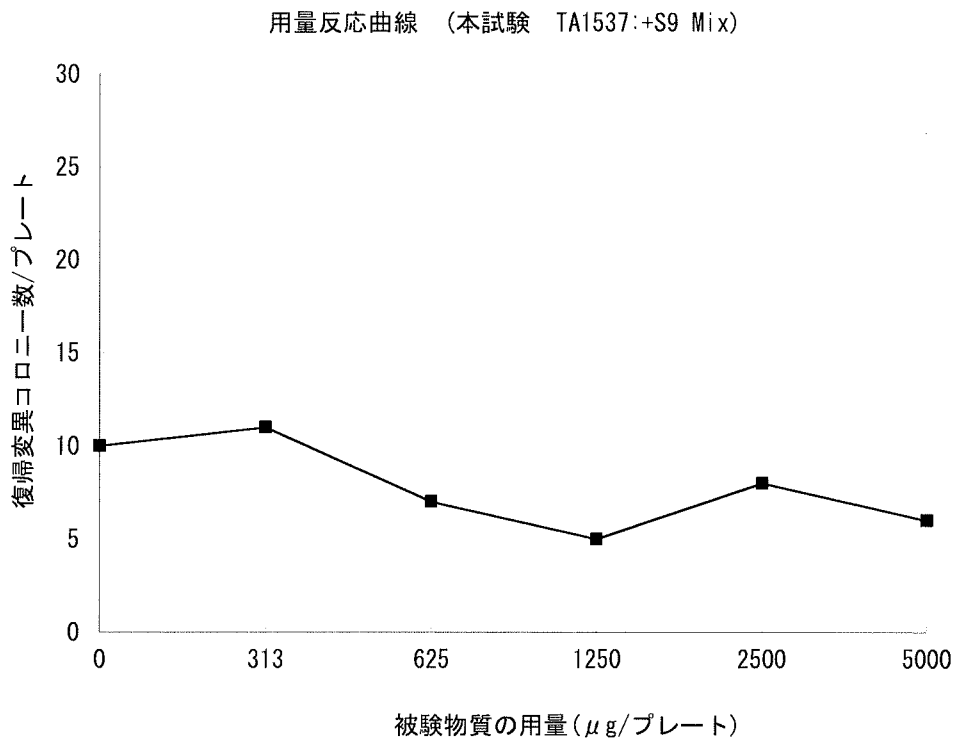


図 11

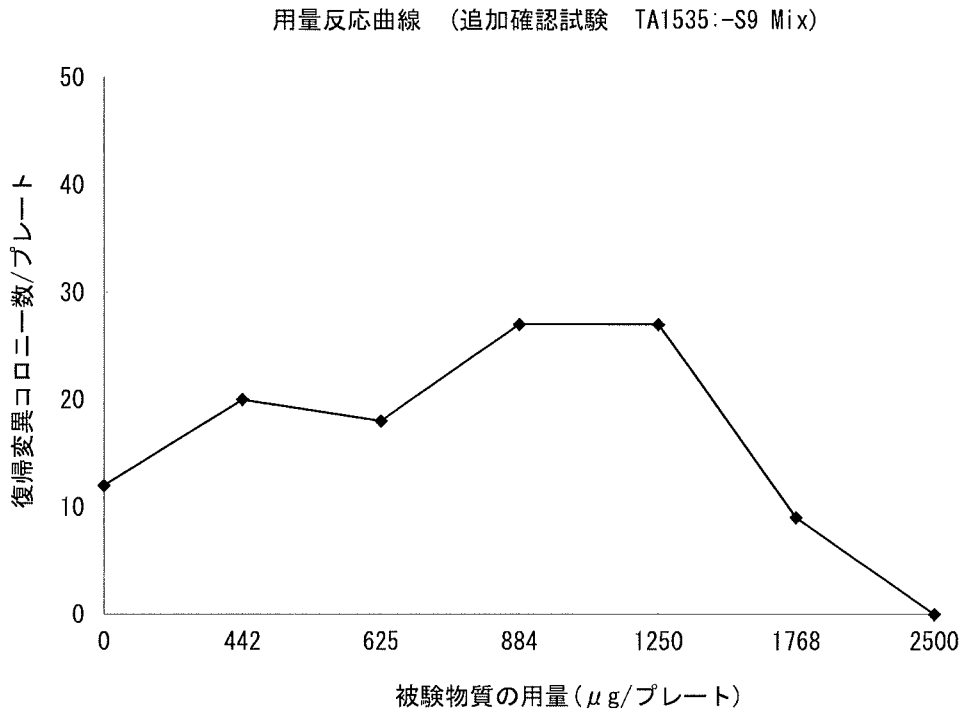
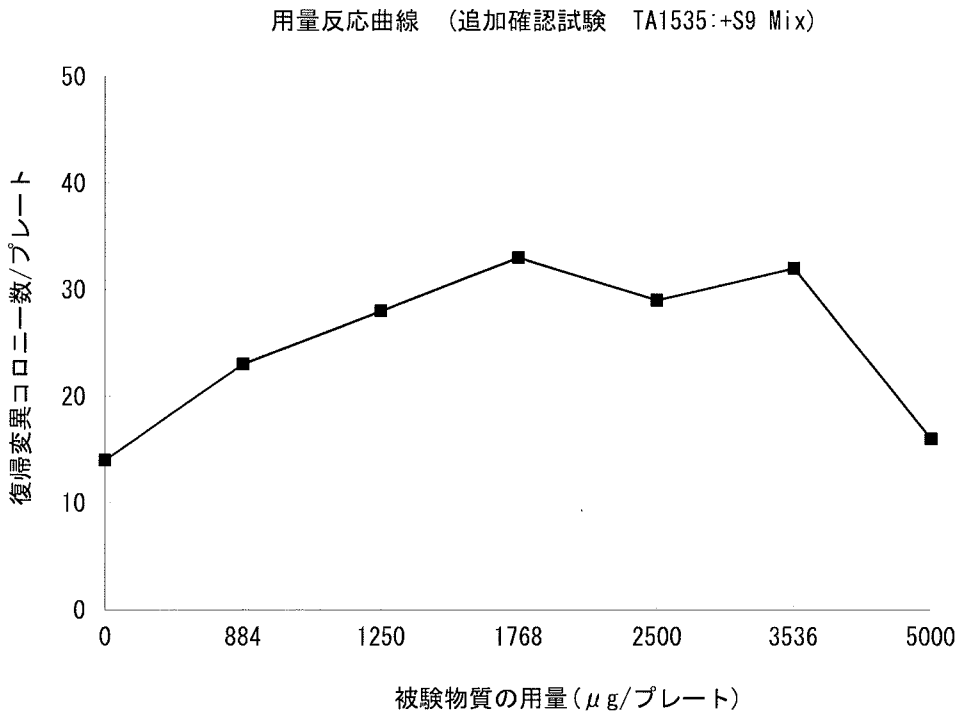


図 12



**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
WP2uvrA	-	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