

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)	ナノクレイ		
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)	含有物：トリメチルステアリルアンモニウムクロリド (CAS No. 112-03-8) : >=30-<40%		
試験に供した新規 化学物質の純度	100%として実施	試験に供した新規 化学物質の Lot No.	MKBZ9019V
不純物の名称及び濃度	/		
CAS 番号	/	蒸気圧	/
分子量	/	分配係数	/
融 点	/	常温における性状	固体
沸 点	/		
安定性	保管条件下で安定と推察される		
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 では不溶	/
	DMSO	50 mg/mL では不溶	発熱、ガスの発生等の反応性なし
	アセトン	100 mg/mL では不溶	/
	その他	/	/

(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: 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11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	TWG1526	JIS 規格 試薬特級
溶媒選択の理由	<p>本被験物質は、水の 50 mg/mL、アセトンの 100 mg/mL の濃度では溶解しなかったが、DMSO の 50 mg/mL では懸濁可能であり、発熱、ガスの発生等の反応性も認められなかった。また、1 時間経過後の懸濁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。</p>				
被験物質溶液の性状	<p>溶解 <input checked="" type="checkbox"/> 懸濁 <input type="checkbox"/> その他 <input type="checkbox"/></p>				
被験物質が難溶性の場合における懸濁等の方法	<p>超音波処理</p>				
溶液の調製から使用までの保存時間と温度	<p>用時調製・室温</p>				
純度換算の有無	<p>有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/></p>				

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 μ L <i>E.coli</i> 株 10 μ L

(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	2.50	3.90	6.25	4.21	5.73
	本試験 1 回目	2.59	3.91	6.75	4.22	7.89
	本試験 2 回目	2.91	3.86	6.65	4.22	4.90
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 <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 (用量設定試験及び本試験 1 回目)	48 時間
	時間 (本試験 2 回目)	50 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 1 回目の結果を別表 2、3 に、本試験 2 回目の結果を別表 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 2 回の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ナノクレイは、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は、代謝活性化の有無にかかわらず 1250 µg/plate 以上の用量で認められた。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、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、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1535、TA1537 の 39.1 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA98 の 78.1 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *E. coli* WP2 *uvrA* の 156 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA1535、TA1537 の 313 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、TA98 の 625 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の *E. coli* WP2 *uvrA* の 1250 µg/plate 以上の用量で認められた。

なお、用量設定試験の結果、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* TA1535 及び TA1537 においては、生育阻害の認められない用量数が 4 用量以上認められなかったため、同一用量で本試験を 2 回実施し、再現性の確認をした。

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: ナノクレイ

No. T-2597

試験実施期間		2017年12月21日 より 2017年12月25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)	116 110 (113)	10 7 (9)	19 22 (21)	17 16 (17)	11 14 (13)
	4.88	130 116 (123)	7 8 (8)	15 20 (18)	18 16 (17)	11 11 (11)
	19.5	126 91 (109)	8 11 (10)	17 15 (16)	21 17 (19)	7 13 (10)
	78.1	88 * 60 * (74)	5 * 3 * (4)	20 16 (18)	15 * 4 * (10)	5 * 4 * (5)
	313	0 * 0 * (0)	4 * 2 * (3)	10 * 16 * (13)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
	1250 #	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
	5000 #	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
	S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	105 132 (119)	8 11 (10)	20 23 (22)	37 35 (36)
4.88	124 115 (120)	4 7 (6)	29 24 (27)	33 36 (35)	13 14 (14)	
19.5	113 122 (118)	11 8 (10)	20 24 (22)	23 28 (26)	11 7 (9)	
78.1	97 121 (109)	10 4 (7)	20 23 (22)	32 25 (29)	10 14 (12)	
313	116 116 (116)	12 * 8 * (10)	28 31 (30)	27 25 (26)	9 * 4 * (7)	
1250 #	18 * 17 * (18)	11 * 8 * (10)	22 * 18 * (20)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	
5000 #	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	
陽性対照	名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191
	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	482 467 (475)	358 315 (337)	81 75 (78)	362 360 (361)	1173 1162 (1168)
	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	1005 1081 (1043)	246 297 (272)	592 596 (594)	380 391 (386)	103 97 (100)

(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。

: 被験物質による沈殿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1回目:-S9Mix)

被験物質の名称: ナノクレイ

No. T-2597

試験実施期間		2018年1月4日 より 2018年1月9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)	104 98 (101)	8 11 (10)	18 20 (19)	18 19 (19)	6 5 (6)	
	2.44	93 105 (99)	10 13 (12)	NT	22 21 (22)	5 4 (5)	
	4.88	98 96 (97)	7 10 (9)	NT	15 18 (17)	6 8 (7)	
	9.77	87 98 (93)	7 6 (7)	15 15 (15)	18 15 (17)	7 3 (5)	
	19.5	77 88 (83)	10 7 (9)	11 15 (13)	19 16 (18)	10 8 (9)	
	39.1	76 91 (84)	6 * 4 * (5)	13 12 (13)	22 15 (19)	7 * 5 * (6)	
	78.1	42 * 79 * (61)	5 * 4 * (5)	14 16 (15)	5 * 6 * (6)	2 * 2 * (2)	
	156	NT	NT	18 * 10 * (14)	NT	NT	
	313	NT	NT	9 * 11 * (10)	NT	NT	
	陽性対照	S9Mixを必要としな いもの	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		547 558 (553)	351 371 (361)	93 105 (99)	453 376 (415)	1148 1052 (1100)

(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1回目:+S9Mix)

被験物質の名称: ナノクレイ

No. T-2597

試験実施期間		2018年1月4日 より 2018年1月9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)	113 96 (105)	6 11 (9)	24 24 (24)	18 22 (20)	12 8 (10)
	9.77	NT	6 10 (8)	NT	NT	10 8 (9)
	19.5	NT	7 3 (5)	NT	NT	7 11 (9)
	39.1	90 92 (91)	5 9 (7)	17 23 (20)	19 27 (23)	7 10 (9)
	78.1	112 104 (108)	5 4 (5)	18 21 (20)	25 23 (24)	6 10 (8)
	156	117 135 (126)	8 8 (8)	18 17 (18)	27 25 (26)	7 8 (8)
	313	90 109 (100)	9 * 4 * (7)	21 18 (20)	16 21 (19)	6 * 1 * (4)
	625	47 * 59 * (53)	NT	20 14 (17)	13 * 6 * (10)	NT
	1250 #	58 * 73 * (66)	NT	5 * 12 * (9)	0 * 0 * (0)	NT
	陽性対照	名称	B[a]P	2AA	2AA	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	938 940 (939)	256 247 (252)	545 594 (570)	352 347 (350)	94 96 (95)

(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。

#: 被験物質による沈殿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)

試験結果表 (本試験2回目)

被験物質の名称: ナノクレイ

No. T-2597

試験実施期間		2018年1月10日 より 2018年1月13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)	122 133 (128)	8 10 (9)	30 29 (30)	23 16 (20)	12 7 (10)
	2.44	125 120 (123)	10 8 (9)	NT	16 18 (17)	10 7 (9)
	4.88	123 115 (119)	10 10 (10)	NT	19 16 (18)	8 11 (10)
	9.77	129 118 (124)	7 13 (10)	25 29 (27)	19 20 (20)	4 6 (5)
	19.5	110 104 (107)	12 10 (11)	21 28 (25)	15 23 (19)	6 10 (8)
	39.1	86 99 (93)	7* 7* (7)	26 31 (29)	15 15 (15)	5* 5* (5)
	78.1	82* 59* (71)	0* 0* (0)	28 23 (26)	7* 11* (9)	0* 0* (0)
	156	NT	NT	22* 22* (22)	NT	NT
	313	NT	NT	0* 0* (0)	NT	NT
	S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	/	8 11 (10)	/	/
9.77		/	9 5 (7)	/	/	11 13 (12)
19.5		/	10 10 (10)	/	/	11 12 (12)
39.1		/	10 7 (9)	/	/	10 8 (9)
78.1		/	6 10 (8)	/	/	10 8 (9)
156		/	10 7 (9)	/	/	13 9 (11)
313		/	7* 11* (9)	/	/	0* 0* (0)
陽性対照		名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2
	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	492 543 (518)	335 292 (314)	84 90 (87)	338 290 (314)	1146 1222 (1184)
	名称	/	2AA	/	/	B[a]P
	用量 (μg/プレート)	/	2.0	/	/	5.0
	コロニー数/プレート	/	275 285 (280)	/	/	108 90 (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

* : 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。

図 1

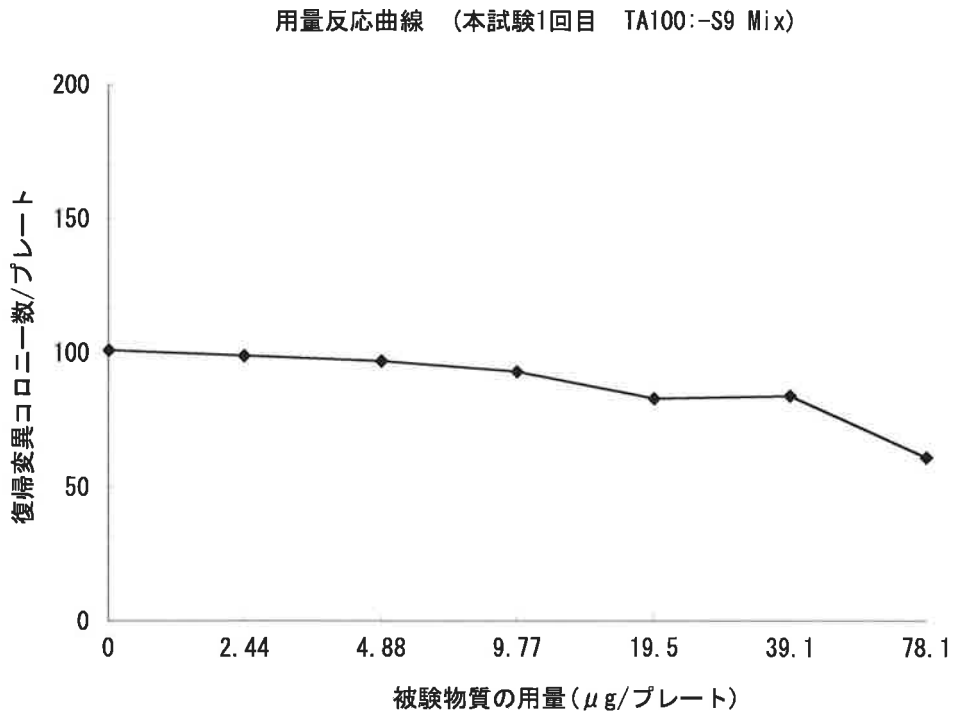


図 2

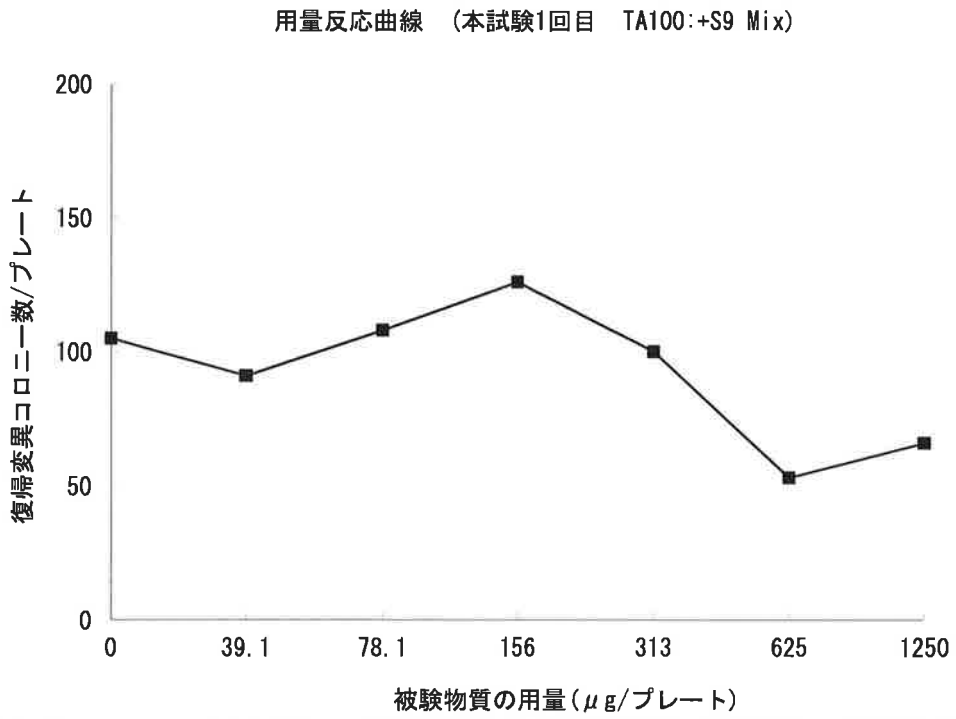


図 3

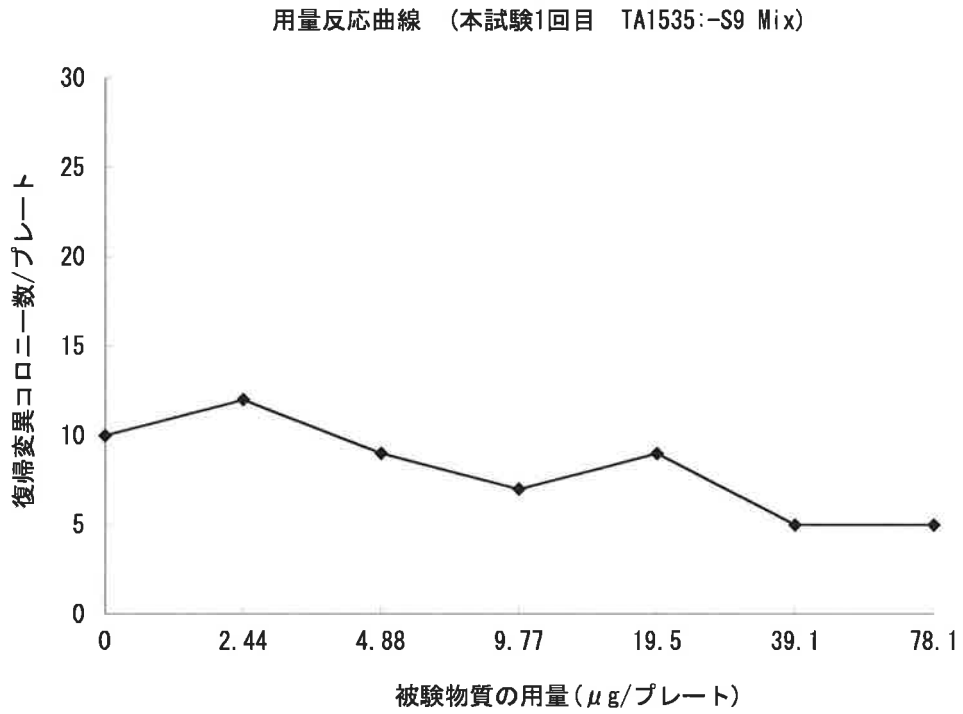


図 4

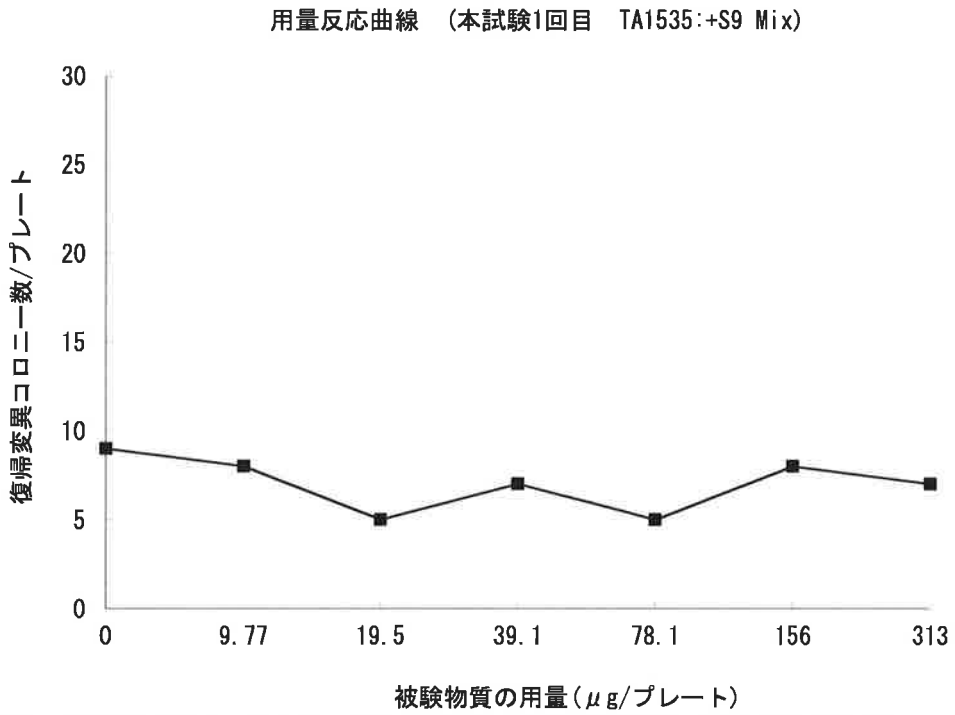


図 5

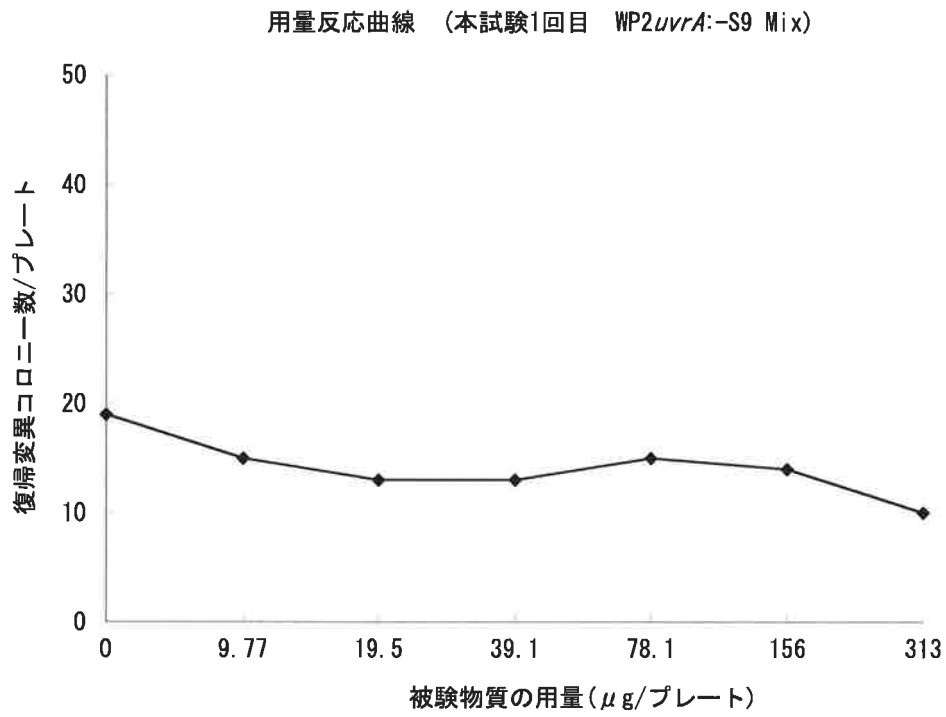


図 6

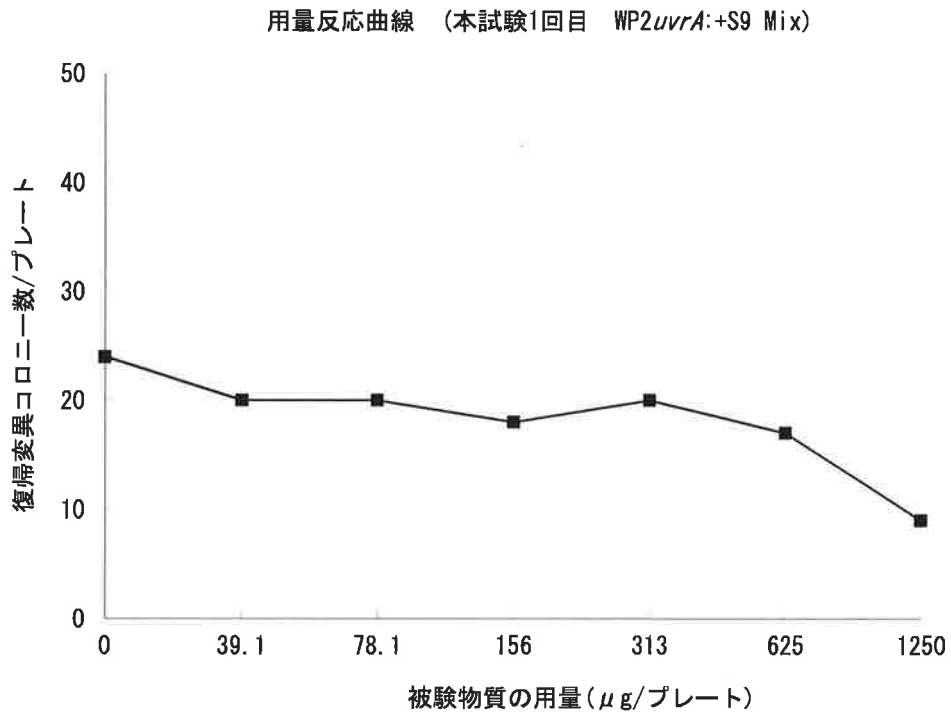


図 7

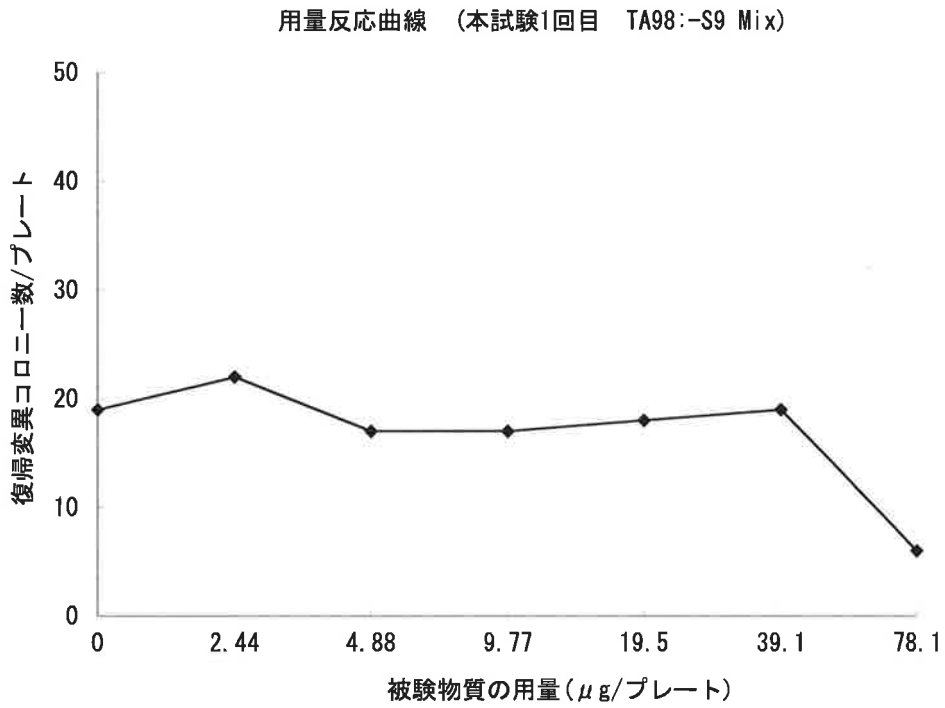


図 8

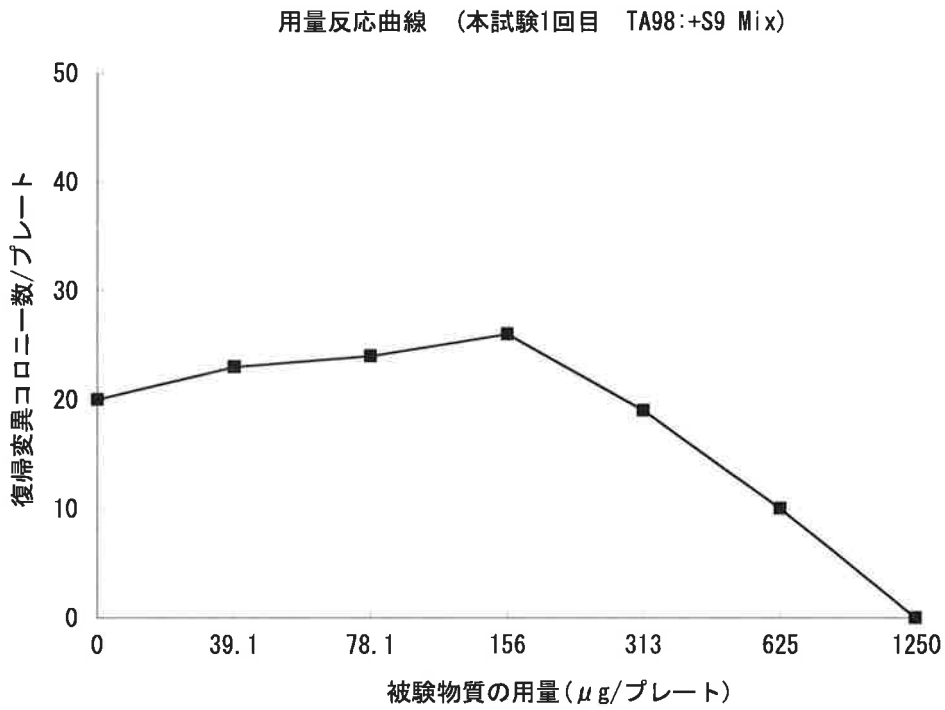


図 9

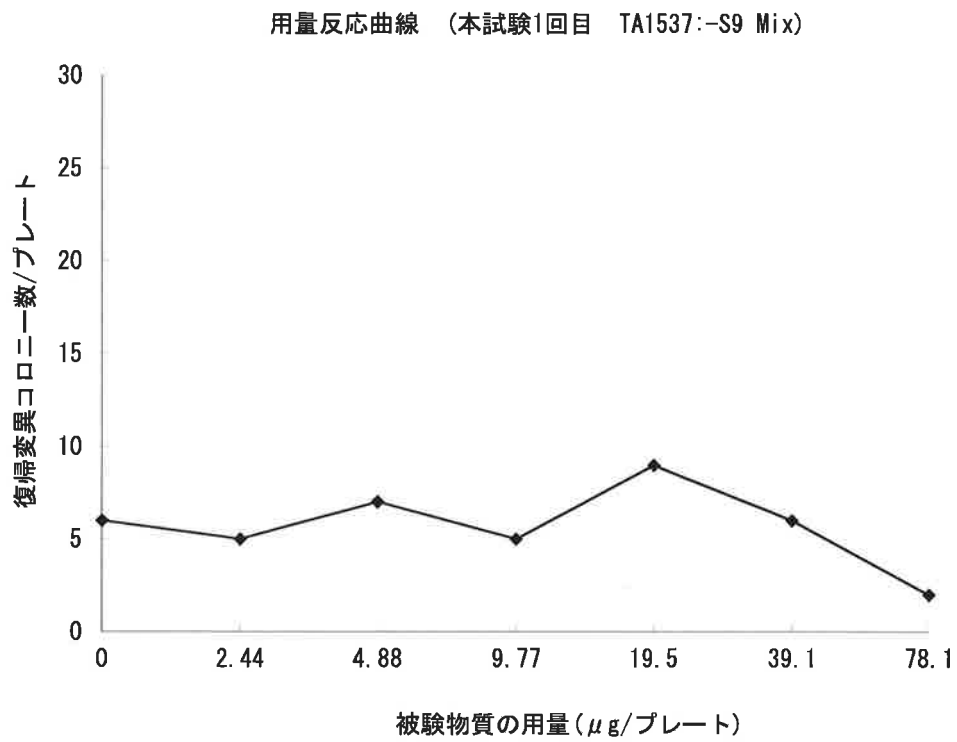
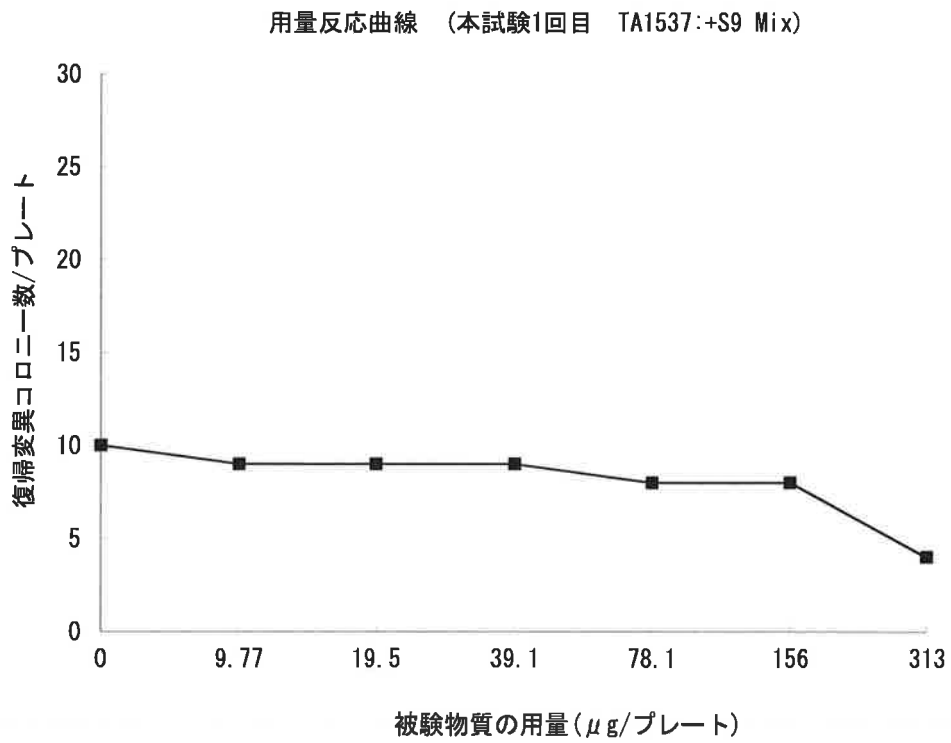


図 10



**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