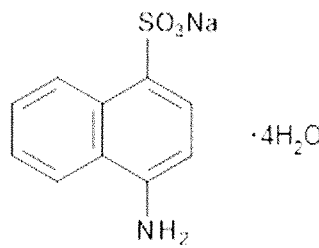


## 微生物を用いる変異原性試験結果報告書

### 1. 一般的事項

新規化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	ナフチオン酸ナトリウム		
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	100.5%	試験に供した新規化学物質の Lot No.	MEIRA
不純物の名称及び濃度	/		
CAS 番号	130-13-2	蒸気圧	/
分子量	245.23	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	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、製造元からの情報による。なお、溶解性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	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：株式会社ボゾリサーチセンター つくば研究所)
製造年月日	2018年7月27日製造
購入の場合 Lot No.	S9-180727-1
保存温度	-70°C 以下

### (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	207.8~235.6 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(%)
	注射用水	株式会社大塚 製薬工場	K8H76	日本薬局方	
溶媒選択の理由	本試験で使用する溶媒を選定するため、水の 50 mg/mL での溶解性試験を実施した。その結果、溶解し、溶媒添加直後、発熱、ガスの発生、溶媒添加 1 時間後、色調変化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="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	2.94	3.92	6.71	4.23	6.67
	本試験	3.06	3.92	6.91	4.23	6.10
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	2018年 12月 14日製造
購入の場合の Lot No.	DZAJCE01
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-M5-273

## 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)	48 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 <span style="float: right;">陰性</span>
<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 Attachment として添付した。</p> <p>用量設定試験、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フチオン酸ナトリウムは、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、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： ナフチオン酸ナトリウム

No. T-2865

試験実施期間		2019年1月4日 より 2019年1月7日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ( $\mu$ 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)	115 128 ( 122 )	10 11 ( 11 )	33 20 ( 27 )	16 18 ( 17 )	6 9 ( 8 )	
	1.22	112 100 ( 106 )	7 12 ( 10 )	26 26 ( 26 )	15 16 ( 16 )	5 8 ( 7 )	
	4.88	117 105 ( 111 )	6 5 ( 6 )	24 27 ( 26 )	15 22 ( 19 )	8 8 ( 8 )	
	19.5	117 107 ( 112 )	5 5 ( 5 )	31 23 ( 27 )	22 15 ( 19 )	5 5 ( 5 )	
	78.1	110 91 ( 101 )	6 4 ( 5 )	30 21 ( 26 )	15 15 ( 15 )	4 7 ( 6 )	
	313	107 103 ( 105 )	8 8 ( 8 )	28 26 ( 27 )	16 12 ( 14 )	6 7 ( 7 )	
	1250	99 126 ( 113 )	5 6 ( 6 )	26 28 ( 27 )	18 15 ( 17 )	4 4 ( 4 )	
	5000	90 129 ( 110 )	4 5 ( 5 )	28 26 ( 27 )	18 15 ( 17 )	8 10 ( 9 )	
	S9Mix (+)	陰性対照 (注射用水)	114 126 ( 120 )	10 6 ( 8 )	33 29 ( 31 )	30 35 ( 33 )	6 10 ( 8 )
		1.22	120 132 ( 126 )	6 4 ( 5 )	31 29 ( 30 )	31 34 ( 33 )	7 8 ( 8 )
4.88		125 128 ( 127 )	10 9 ( 10 )	34 28 ( 31 )	24 29 ( 27 )	6 6 ( 6 )	
19.5		126 108 ( 117 )	6 7 ( 7 )	33 28 ( 31 )	34 31 ( 33 )	8 6 ( 7 )	
78.1		120 108 ( 114 )	7 10 ( 9 )	25 32 ( 29 )	26 23 ( 25 )	5 7 ( 6 )	
313		125 117 ( 121 )	11 7 ( 9 )	26 32 ( 29 )	29 26 ( 28 )	7 8 ( 8 )	
1250		122 108 ( 115 )	4 7 ( 6 )	34 29 ( 32 )	24 35 ( 30 )	8 6 ( 7 )	
5000		114 131 ( 123 )	8 5 ( 7 )	31 34 ( 33 )	29 36 ( 33 )	8 10 ( 9 )	
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 ( $\mu$ g/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	コロニー数/プレート	585 624 ( 605 )	265 277 ( 271 )	90 87 ( 89 )	397 404 ( 401 )	1510 1735 ( 1623 )	
	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P	
S9Mixを必要とするもの	用量 ( $\mu$ g/プレート)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0	
	コロニー数/プレート	1143 1243 ( 1193 )	200 207 ( 204 )	709 592 ( 651 )	293 328 ( 311 )	87 90 ( 89 )	

(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：ナフチオン酸ナトリウム

No. T-2865

試験実施期間		2019年1月8日 より 2019年1月11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)	111 117 ( 114 )	8 12 ( 10 )	22 21 ( 22 )	23 19 ( 21 )	7 12 ( 10 )
	313	108 106 ( 107 )	13 13 ( 13 )	21 19 ( 20 )	18 17 ( 18 )	7 9 ( 8 )
	625	130 104 ( 117 )	10 12 ( 11 )	21 29 ( 25 )	25 19 ( 22 )	7 11 ( 9 )
	1250	117 125 ( 121 )	11 8 ( 10 )	23 30 ( 27 )	19 11 ( 15 )	6 7 ( 7 )
	2500	134 110 ( 122 )	8 8 ( 8 )	21 27 ( 24 )	19 19 ( 19 )	10 10 ( 10 )
	5000	117 104 ( 111 )	6 12 ( 9 )	19 23 ( 21 )	23 21 ( 22 )	4 8 ( 6 )
	S9Mix (+)	陰性対照 (注射用水)	116 114 ( 115 )	15 10 ( 13 )	38 20 ( 29 )	28 33 ( 31 )
313		126 145 ( 136 )	10 7 ( 9 )	21 19 ( 20 )	28 34 ( 31 )	13 9 ( 11 )
625		122 125 ( 124 )	10 7 ( 9 )	19 16 ( 18 )	25 30 ( 28 )	7 13 ( 10 )
1250		126 133 ( 130 )	5 11 ( 8 )	20 28 ( 24 )	34 35 ( 35 )	11 9 ( 10 )
2500		142 144 ( 143 )	10 9 ( 10 )	33 29 ( 31 )	25 32 ( 29 )	8 10 ( 9 )
5000		141 140 ( 141 )	11 10 ( 11 )	21 32 ( 27 )	35 21 ( 28 )	11 10 ( 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	642 620 ( 631 )	266 239 ( 253 )	106 103 ( 105 )	332 348 ( 340 )	1700 1659 ( 1680 )
	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	1251 1365 ( 1308 )	239 203 ( 221 )	611 620 ( 616 )	283 320 ( 302 )	85 103 ( 94 )

(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

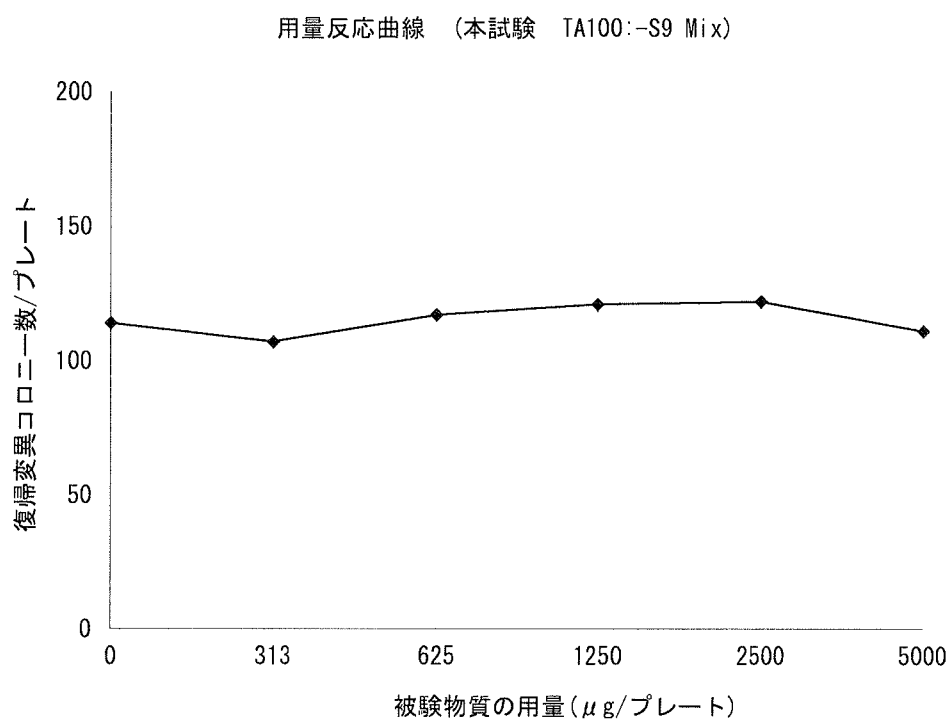


図 2

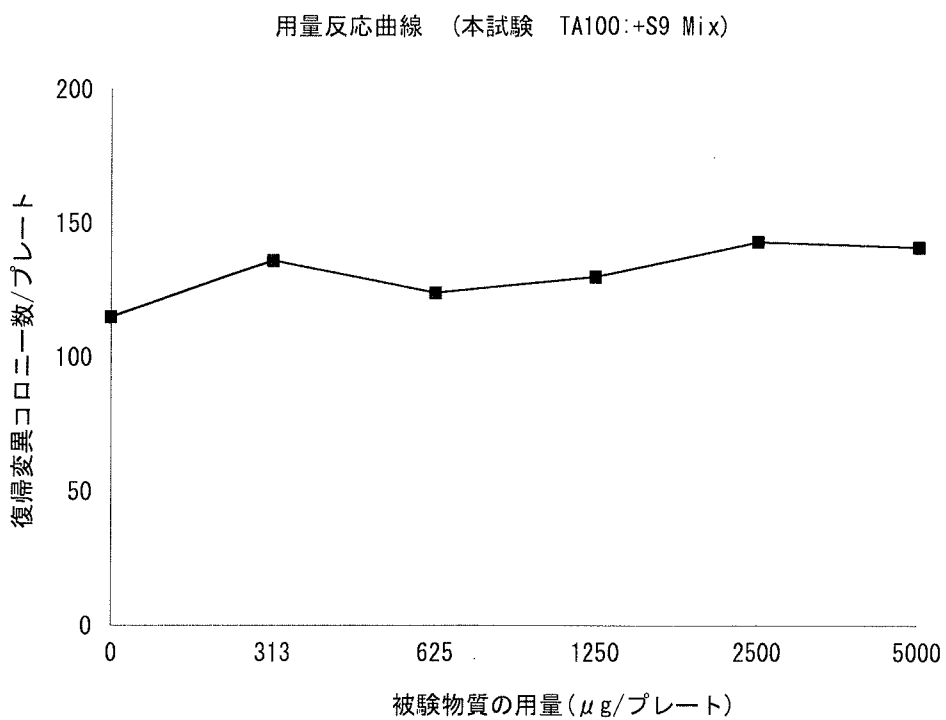




図 3

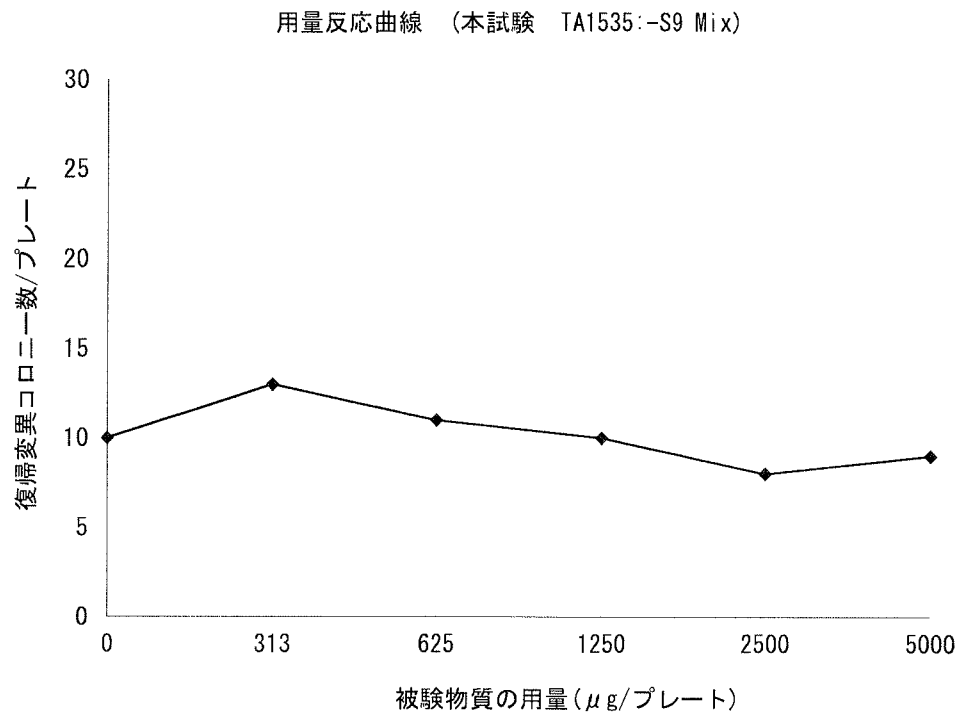


図 4

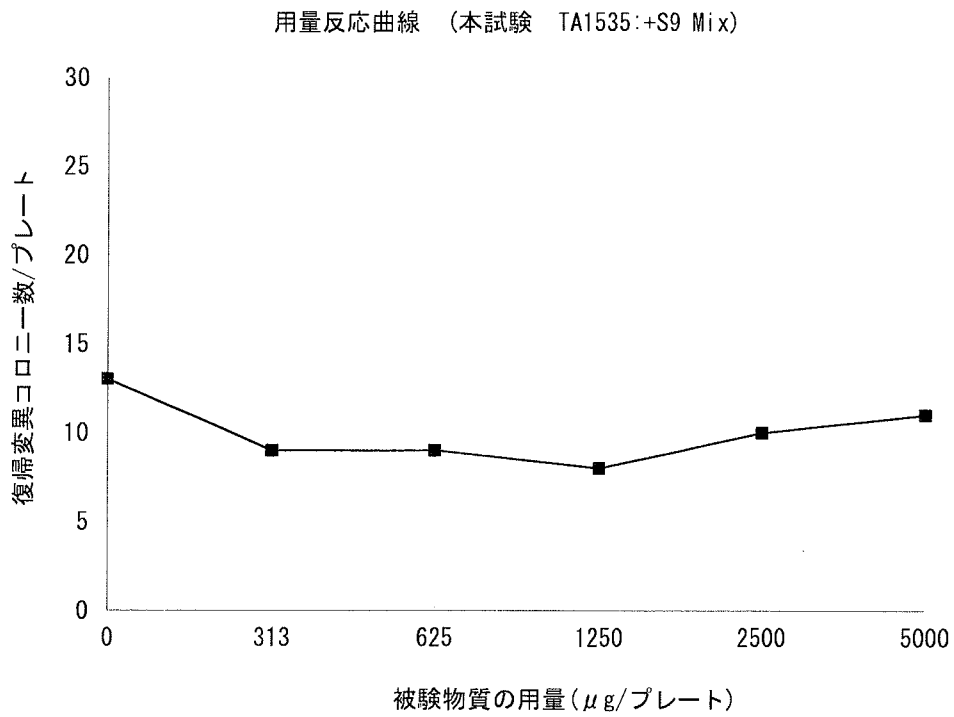


図 5

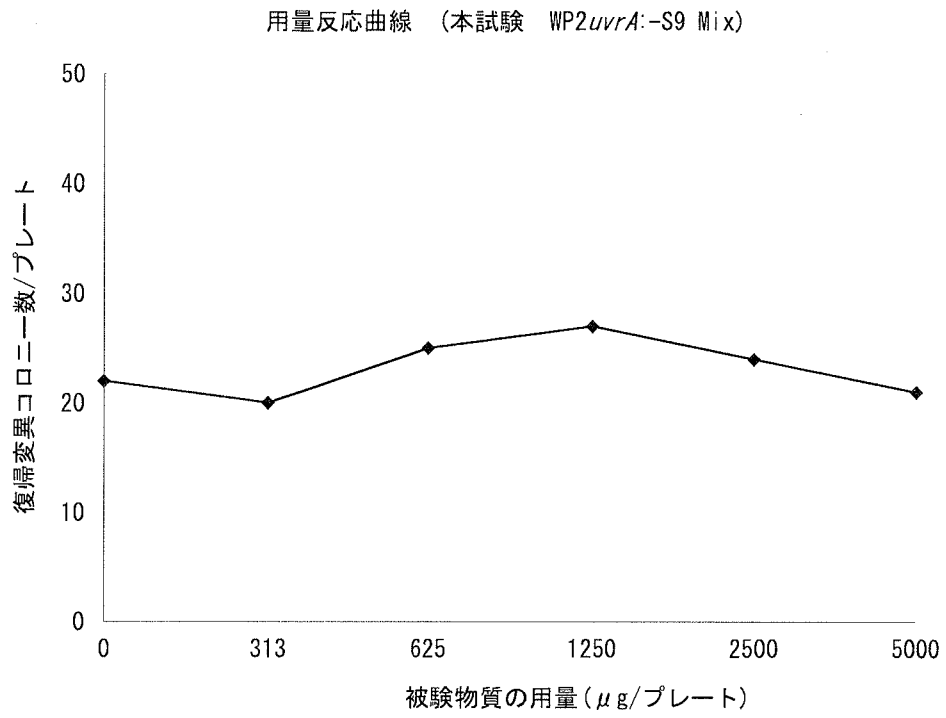


図 6

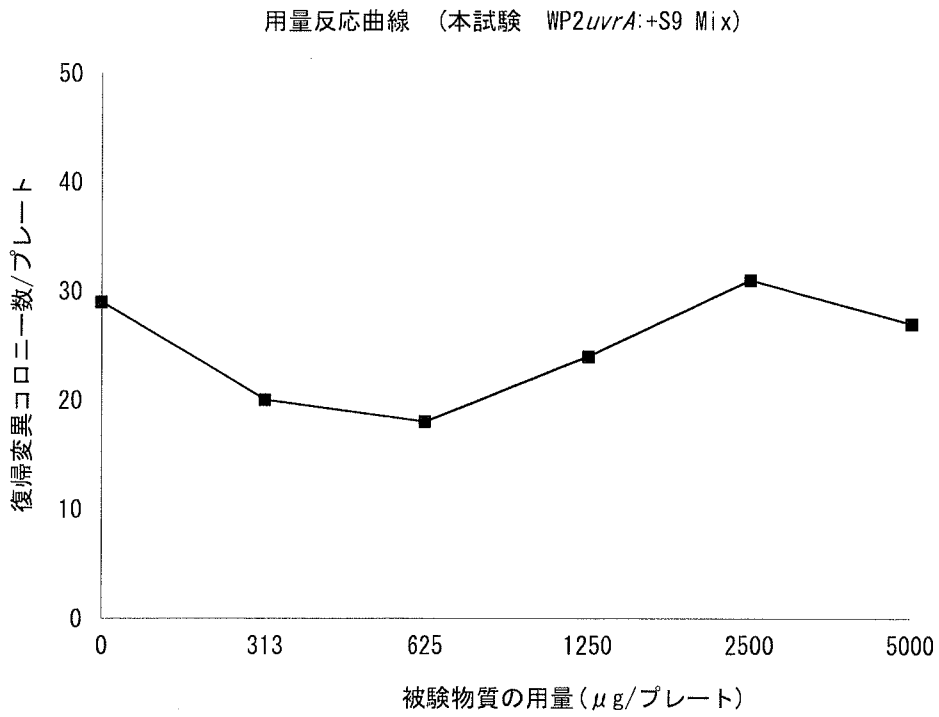


図 7

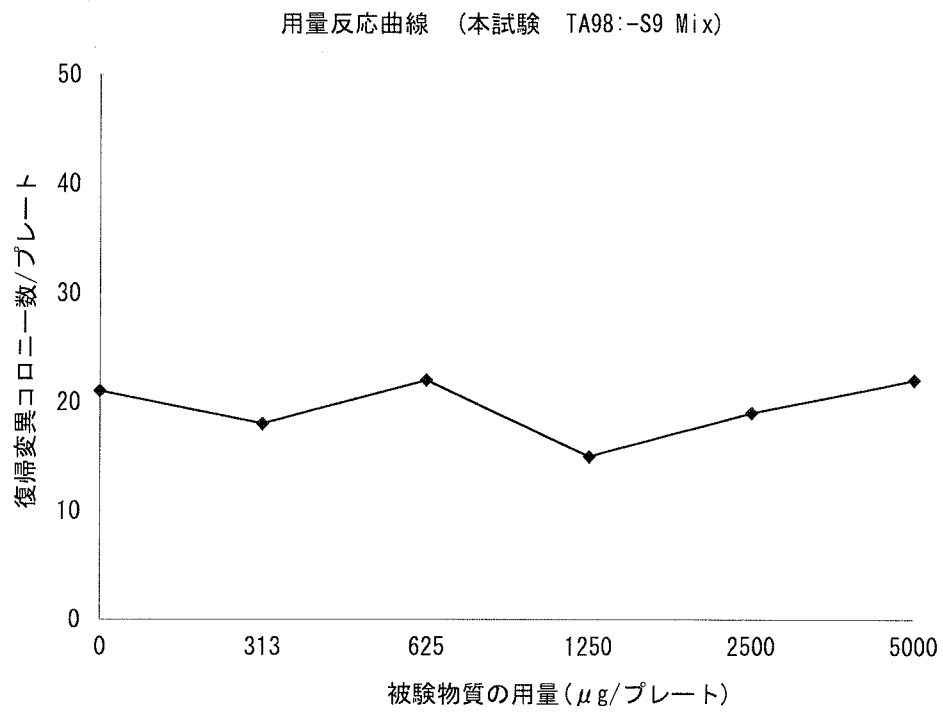


図 8

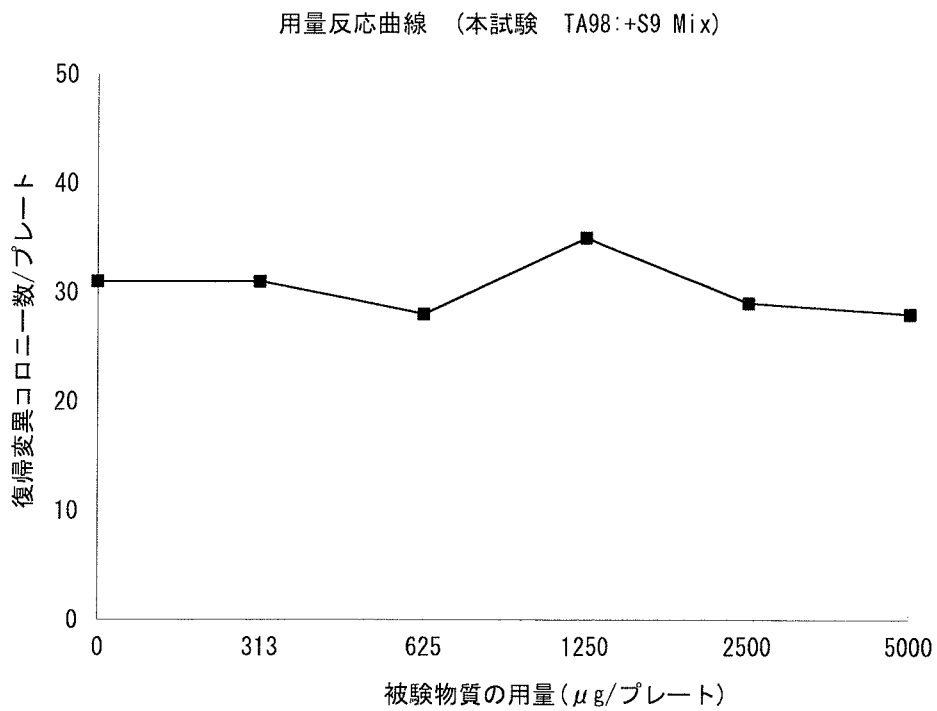


図 9

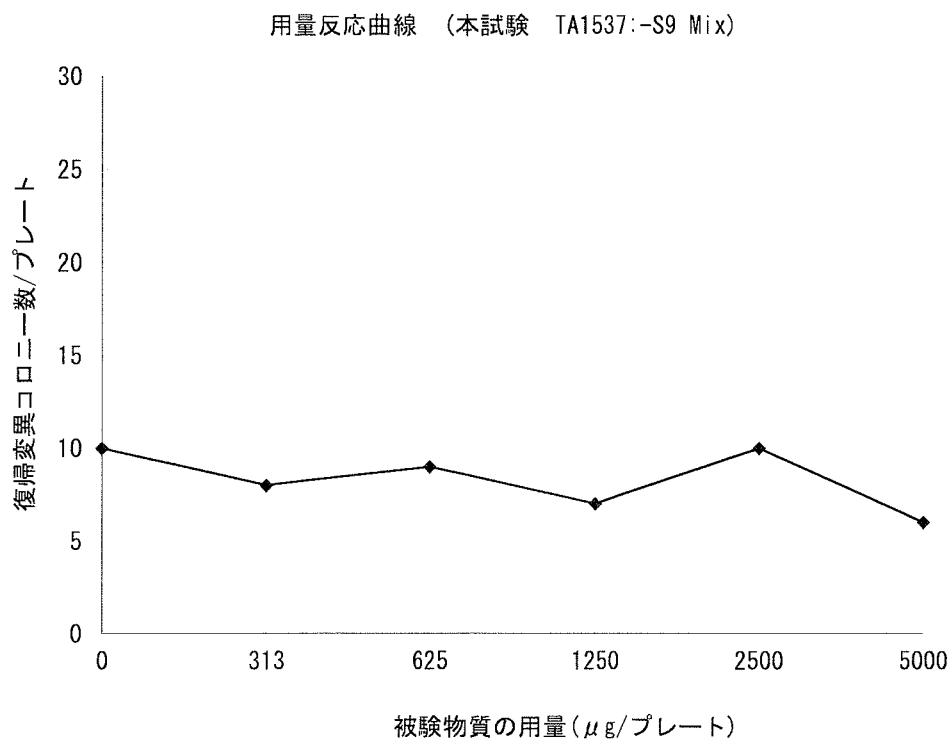
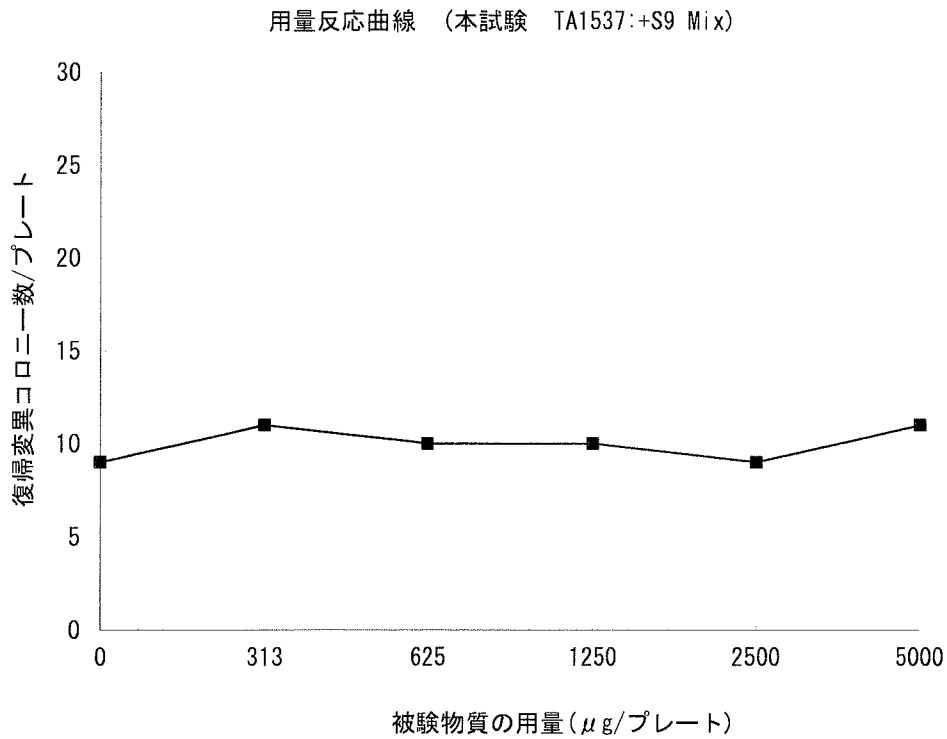


図 10



## Background Data

Test Category : Bacterial reverse mutation test (Preincubation Method)

CODE No. : 180728

Period : From May 29, 2018 to July 12, 2018

Tester Strains	S9 Mix (-) or (+)	Classification	Mean	S.D.	Management ranges		Number of plates
					Lower limit	Upper limit	
TA100	-	Solvent control	104	11	72	137	100
		Positive control AF-2 (0.01 µg/plate)	568	40	449	687	100
	+	Solvent control	112	14	71	153	100
		Positive control B[a]P (5.0 µg/plate)	1105	90	836	1375	100
TA1535	-	Solvent control	8	2	2	14	100
		Positive control SAZ (0.5 µg/plate)	318	47	177	459	100
	+	Solvent control	8	2	1	15	100
		Positive control 2AA (2.0 µg/plate)	253	30	163	342	100
WP2uvrA	-	Solvent control	25	5	10	39	100
		Positive control AF-2 (0.01 µg/plate)	90	9	64	116	100
	+	Solvent control	27	5	13	41	100
		Positive control 2AA (10.0 µg/plate)	622	46	485	759	100
TA98	-	Solvent control	19	4	8	30	100
		Positive control AF-2 (0.1 µg/plate)	366	34	263	469	100
	+	Solvent control	27	5	14	41	100
		Positive control B[a]P (5.0 µg/plate)	377	36	267	486	100
TA1537	-	Solvent control	7	2	2	13	100
		Positive control ICR-191 (1.0 µg/plate)	1246	174	726	1767	100
	+	Solvent control	9	2	2	15	100
		Positive control B[a]P (5.0 µg/plate)	98	10	68	128	100

(Notice)

Solvent controls Water, Dimethyl sulfoxide(DMSO), Acetone, *N,N*-Dimethylformamide(DMF), 1,4-Dioxane

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