

薬生食基発 0226 第 1 号  
令和 3 年 2 月 26 日

内閣府食品安全委員会事務局評価第二課長 殿

厚生労働省医薬・生活衛生局  
食品基準審査課長  
(公印省略)

食品健康影響評価に係る追加資料の提出について

令和 2 年 2 月 13 日付け厚生労働省発生食 0213 第 8 号をもって厚生労働大臣から食品安全委員会委員長あて意見を求めた動物用医薬品ジニトルミドについて、農林水産省からニトロ還元酵素が欠損した *Salmonella typhimurium* TA100 株及び TA98 株を用いた復帰突然変異試験に係る追加資料の提出がありましたので、別添のとおり提出します。

ラットの肝臓及び大腸を用いた *in vivo* コメット試験については、新型コロナウイルス感染症の影響等で試験の開始が遅れしており、年度内の試験終了が困難な状況である旨の報告がありました。当該試験の資料については、試験報告書が提出され次第提出します。



2 消 安 第 5548 号  
令 和 3 年 2 月 24 日

厚生労働省医薬・生活衛生局  
食品基準審査課長 殿

農林水産省消費・安全局  
畜水産安全管理課長

#### 食品健康影響評価に係る追加資料提出について

食品健康影響評価に係る追加資料提出等の依頼について（依頼）（令和2年4月1日付け薬生食基発0401第1号厚生労働省医薬・生活衛生局食品基準審査課長通知）により、資料の提出依頼のあった動物用医薬品ジニトルミドに係る資料のうちニトロ還元酵素が欠損した*Salmonella typhimurium* TA100株及びTA98株を用いた復帰突然変異試験について、別添のとおり資料を提出します。当該資料の公開の場での取扱い及び開示については、特段の配慮をお願いします。

なお、ジニトルミドを有効成分とする動物用医薬品の製造販売業者から、ラットの肝臓及び大腸を用いた *in vivo*コメット試験については、新型コロナウイルス感染症の影響等で試験の開始が遅れており、年度内の試験終了が困難な状況である旨の報告がありましたので、申し添えます。当該試験の資料については、当該製造販売業者から試験報告書が提出され次第、提出します。

# 最終報告書

ジニトルミドの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号 [REDACTED]

試験期間：2020年11月24日-2021年2月5日

試験施設

試験委託者  
株式会社養日化学研究所  
〒463-0072 愛知県名古屋市守山区金屋2-393



## 1. GLP 陳述書

試験番号 :

試験表題 : ジニトルミドの細菌を用いる復帰突然変異試験

本試験は以下の GLP 基準を遵守して実施したものです。

- ・ 「動物用医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令」  
(平成 9 年 10 月 21 日農林水産省令第 74 号)
- ・ 「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(OECD : 1997 年 11 月 26 日)

2021年 2 月 5 日

試験責任者

## 2. 目次

1. GLP 陳述書 .....	2
2. 目次 .....	3
3. 試験実施概要 .....	6
3.1    試験番号 .....	6
3.2    試験表題 .....	6
3.3    試験目的 .....	6
3.4    試験委託者 .....	6
3.5    試験受託者 .....	6
3.6    試験実施施設 .....	6
3.7    試験日程 .....	6
3.8    試験責任者 .....	7
3.9    試験担当者 .....	7
3.10   予見することができなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかつたこと .....	7
3.11   資料の保存 .....	7
3.12   試験責任者の署名 .....	8
4. 要約 .....	9
5. 緒言 .....	11
6. 被験物質及び被験液の調製 .....	12
6.1    被験物質及び溶媒 .....	12
6.1.1    被験物質 .....	12
6.1.2    溶媒 .....	13
6.1.3    溶媒の選択理由 .....	13
6.2    被験液の調製方法 .....	13
6.2.1    用量設定試験用被験液の調製 .....	13
6.2.2    本試験 1 回目用被験液の調製 .....	13
6.2.3    本試験 2 回目用被験液の調製 .....	14
7. 試験材料及び方法 .....	14
7.1    試験菌株 .....	14
7.1.1    菌株の種類 .....	14
7.1.2    菌株の選択理由 .....	14
7.1.3    菌株の保存及び解凍 .....	14
7.1.4    菌株の特性検査 .....	15
7.2    対照物質 .....	15
7.2.1    陰性対照物質 .....	15
7.2.2    陽性対照物質 .....	15

7.2.3	ニトロ還元酵素の欠損を確認するための対照物質 .....	16
7.2.4	調製方法 .....	16
7.3	試薬 .....	16
7.3.1	S9 Mix の調製方法 .....	16
7.3.2	培地 .....	17
7.3.3	ニュートリエントプロス No.2 培養液 .....	18
7.3.4	0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) .....	18
7.3.5	トップアガー .....	18
7.4	試験方法 .....	19
7.4.1	識別方法 .....	19
7.4.2	前培養 .....	20
7.4.3	プレート数 .....	20
7.4.4	試験操作 (ブレインキュベーション法) .....	20
7.5	判定基準 .....	21
8.	試験結果 .....	21
8.1	用量設定試験の観察結果及び本試験用量の設定 .....	21
8.2	本試験の観察結果 .....	22
8.3	試験の成立条件 .....	22
9.	考察 .....	22
10.	参考文献 .....	23

#### Tables

別表 1	試験結果表 (用量設定試験) .....	24
別表 2	試験結果表 (本試験 1 回目 : -S9 Mix) .....	25
別表 3	試験結果表 (本試験 1 回目 : +S9 Mix) .....	26
別表 4	試験結果表 (本試験 2 回目 : -S9 Mix) .....	27
別表 5	試験結果表 (本試験 2 回目 : +S9 Mix) .....	28

#### Figures

図 1	用量反応曲線 (本試験 1 回目 TA100 : -S9Mix) .....	29
図 2	用量反応曲線 (本試験 1 回目 TA100 : +S9Mix) .....	29
図 3	用量反応曲線 (本試験 1 回目 TA100NR : -S9Mix) .....	30
図 4	用量反応曲線 (本試験 1 回目 TA100NR : +S9Mix) .....	30
図 5	用量反応曲線 (本試験 1 回目 TA98 : -S9Mix) .....	31
図 6	用量反応曲線 (本試験 1 回目 TA98 : +S9Mix) .....	31
図 7	用量反応曲線 (本試験 1 回目 TA98NR : -S9Mix) .....	32
図 8	用量反応曲線 (本試験 1 回目 TA98NR : +S9Mix) .....	32

**Attachment**

Attachment      Background Data ..... 33

信賴性保証陳述書 ..... 34

### **3. 試験実施概要**

#### **3.1 試験番号**

#### **3.2 試験表題**

ジニトルミドの細菌を用いる復帰突然変異試験

#### **3.3 試験目的**

ニトロ還元酵素欠損菌株及びその野生株を用い、ジニトルミドの遺伝子突然変異誘発能の有無を明らかにし、遺伝子突然変異誘発能が認められた場合は、その反応が細菌特有のニトロ還元酵素によるものかを考察することとした。

#### **3.4 試験委託者**

株式会社養日化学研究所

〒463-0072 愛知県名古屋市守山区金屋 2-393

#### **3.5 試験受託者**

#### **3.6 試験実施施設**

#### **3.7 試験日程**

試験開始日 : 2020年 11月 24 日

用量設定試験開始日 : 2020年 11月 26 日

用量設定試験終了日 : 2020年 11月 30 日

本試験 1回目開始日 : 2020年 12月 1日

本試験 1回目終了日 : 2020年 12月 4日

本試験 2回目開始日 : 2020年 12月 3日

本試験 2回目終了日 : 2020年 12月 7日

試験終了日 : 2021年 2月 5日

### 3.8 試験責任者

### 3.9 試験担当者

### 3.10 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかつたこと

本試験において予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかつたことはなかつた。

### 3.11 資料の保存

試験計画書、記録文書、生データ及び報告書類（最終報告書の原本を含む）は、  
の資料保存施設に保存する。なお、その期間は最終報告書提出後 5 年間とする。期間終了後の保存については、株式会社養日化学研究所と  
間で協議し、その処置を決定する。

3.12 試験責任者の署名

2021 年 2 月 5 日

#### 4. 要約

ジニトルミドの遺伝子突然変異誘発能の有無を明らかにするため、ネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium*（以下、*S. typhimurium* と略す）TA98、TA100 及びそのニトロ還元酵素欠損菌株である *S. typhimurium* TA98NR、TA100NR を用いて、代謝活性化する場合及び代謝活性化しない場合の条件下で、プレインキュベーション法により実施した。なお、被験物質の溶媒にはジメチルスルホキシド（以下、DMSO と略す）を用いた。

本試験用量を設定するため、19.5~5000 µg/plate の範囲の被験物質処理用量で用量設定試験を実施した。その結果より本試験は、復帰変異コロニー数の増加が認められた用量を参考にして、代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA100 については、1250 µg/plate を最高用量として以下公比 2 で 6 段階除した計 7 用量、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98 については 5000 µg/plate を最高用量として以下公比 2 で 6 段階除した計 7 用量、代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA98 については 5000 µg/plate を最高用量として以下公比 2 で 5 段階除した計 6 用量で実施した。代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA98NR 及び TA100NR については、復帰変異コロニー数の増加が認められなかったため、生育阻害が認められた最低用量の 5000 µg/plate を最高用量として以下公比 2 で 5 段階除した計 6 用量で実施した。なお、本試験は同一用量で 2 回実施した。

##### 1) 被験物質による沈殿

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。

##### 2) 生育阻害

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* TA98 及び代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA98NR、TA100NR の 2500 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA98 及び代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA100 の 5000 µg/plate の用量で認められた。

##### 3) 復帰変異コロニー数

2 回の本試験ともに代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA98 及び TA100 において陰性対照値の 2 倍以上の用量依存的な復帰変異コロニー数の増加が認められた。しかし、ニトロ還元酵素欠損菌株である *S. typhimurium* TA98NR 及び TA100NR においては、復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量依存性も認められなかった。

以上の試験結果より、本試験条件下においてジニトルミドは、細菌に対する遺伝子突然変異誘発能を有する（陽性）と判定するが、細菌特有のニトロ還元酵素による影響が示唆される結果であった。

## 5. 緒言

本試験は、株式会社養日化学研究所の委託により、  
で実施した。なお、試験は以下の基準を遵守し、ガイドラインに準拠して行った。

### 1) GLP

- ・「動物用医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令」  
(平成9年10月21日農林水産省令第74号)
- ・「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(OECD:1997年11月26日)

### 2) ガイドライン

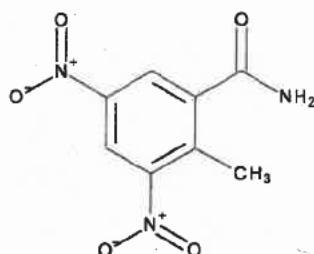
- ・「OECD Guidelines for Testing of Chemicals 471」(OECD:2020年6月26日)

## 6. 被験物質及び被験液の調製

### 6.1 被験物質及び溶媒

#### 6.1.1 被験物質

供給者	: 株式会社養日化学研究所
入手量	: 5 g
入手年月日	: 2020年11月13日
名称	: ジニトルミド
別名	: Zoalene (ゾーリン、ゾーレン)
CAS番号	: 148-01-6
ロット番号	: DNT20051
構造式	:



純度 : 99.4 wt% (強熱残分 0.1%)

不純物の名称及び濃度

: 不詳 出発原料は、2-メチル3,5-ジニトロ安息香酸であるため、ごくわずかに未反応物として副産物と共に存している可能性がある。

分子量

: 255.16

融点

: 177°C

蒸気圧

:  $6.78 \times 10^{-8}$  mmHg (25°C)

分配係数

: Log Pow = 0.19 (推定値)

常温における性状

: 淡黄色の結晶性粉末

安定性

: 製造後1年安定 (2020年6月4日製造)

溶解度

: 水 : 0.5 mg/mL

DMSO : 200 mg/mL

アセトン : 50 mg/mL

溶媒中での安定性

: DMSO、アセトン：良好

保存条件

: 室温、遮光、密閉

保存温度

: 保存期間中の実測温度 (2020.11.13~2020.12.4 : 19.4~24.4°C)

保存場所

: [REDACTED]

残余の処置

: 実験終了後の残余はすべて返却した。

上記被験物質情報は、試験委託者からの情報（非 GLP：社内規格）に基づく。

### 6.1.2 溶媒

名称	: DMSO
製造元	: 富士フィルム和光純薬株式会社
ロット番号	: ESQ5456
規格	: 試薬特級
純度	: 100.0%
保存方法	: 室温
保存場所	: [REDACTED]

### 6.1.3 溶媒の選択理由

委託者からの情報より、本被験物質は DMSO に対する溶解度が 200 mg/mL で安定性が良好であることから DMSO を溶媒として選択した。なお、被験液の調製には、モレキュラーシーブス 4A 1/16 (富士フィルム和光純薬株式会社 ; Lot No. YLH7074) で脱水した DMSO を使用した。

## 6.2 被験液の調製方法

### 6.2.1 用量設定試験用被験液の調製

滅菌した調製用試験管に被験物質を分取し、電子天秤（株式会社エー・アンド・ディ : GR-120）を用いて秤量した。その秤量値 202.0 mg に最高調製濃度の 50 mg/mL となるように溶媒量を計算した 4.040 mL の DMSO を添加して溶解し、50 mg/mL の被験液を調製した。次いで、これを公比 4 で順次 4 段階希釈し 50、12.5、3.13、0.781 及び 0.195 mg/mL の計 5 濃度の被験液を調製した。なお、被験液の調製は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で使用時に行い、その過程において発熱、ガスの発生等の反応性は認められなかった。

### 6.2.2 本試験 1 回目用被験液の調製

滅菌した調製用試験管に被験物質を分取し、電子天秤（株式会社エー・アンド・ディ : GR-120）を用いて秤量した。その秤量値 384.6 mg に最高調製濃度の 50 mg/mL となるように溶媒量を計算した 7.692 mL の DMSO を添加して溶解し、50 mg/mL の被験液を調製した。次いで、これを公比 2 で順次 8 段階希釈し、50、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.781、0.391 及び 0.195 mg/mL の計 9 濃度の被験液を調製した。なお、被験液の調製は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で使用時に行い、その過程において発熱、ガスの発生等の反応性は認められなかった。

### 6.2.3 本試験2回目用被験液の調製

滅菌した調製用試験管に被験物質を分取し、電子天秤（株式会社エー・アンド・ディ：GR-120）を用いて秤量した。その秤量値 350.9 mg に最高調製濃度の 50 mg/mL となるように溶媒量を計算した 7.018 mL の DMSO を添加して溶解し、50 mg/mL の被験液を調製した。次いで、これを公比 2 で順次 8 段階希釈し、50、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.781、0.391 及び 0.195 mg/mL の計 9 濃度の被験液を調製した。なお、被験液の調製は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で使用時に行い、その過程において発熱、ガスの発生等の反応性は認められなかった。

## 7. 試験材料及び方法

### 7.1 試験菌株

#### 7.1.1 菌株の種類

次の 4 種類の菌株を用いた。

塩基対置換型

*S. typhimurium* TA100

*S. typhimurium* TA100NR

フレームシフト型

*S. typhimurium* TA98

*S. typhimurium* TA98NR

*S. typhimurium* TA98 及び TA100 は 2017 年 4 月 12 日に、*S. typhimurium* TA98NR 及び TA100NR は 2020 年 7 月 9 日に国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部より入手した。

#### 7.1.2 菌株の選択理由

*S. typhimurium* TA100 及び TA98 はガイドライン（OECD 471）で推奨された菌株であり、細菌を用いる復帰突然変異試験で広く用いられている。*S. typhimurium* TA100NR 及び TA98NR は、*S. typhimurium* TA100 及び TA98 をそれぞれ野生型とするニトロ還元酵素欠損菌株であり、細菌特有のニトロ還元酵素活性の影響をみる系として一般的に用いられているため選択した。

#### 7.1.3 菌株の保存及び解凍

入手した菌株から継代して凍結保存した菌懸濁液を培養し、得られた菌懸濁液 8.0 mL に対して DMSO（富士フィルム和光純薬株式会社、JIS 規格試薬特級、ロット番号 ECE6658、ESQ5453）を 0.7 mL の割合で添加した。これを滅菌チューブに 0.3 mL ずつ分注し、ドライアイス-アセトンで急速凍結した後、-70°C 以下の超低温フリーザ（三洋電機バイオメディカ株式会社：MDF-192）で保存した。なお、使用する際は室温で解凍し、使用後の残液は廃棄した。

使用した菌株の凍結保存日

<i>S. typhimurium</i> TA98	2020年9月3日
<i>S. typhimurium</i> TA100	2020年9月3日
<i>S. typhimurium</i> TA98NR	2020年11月18日
<i>S. typhimurium</i> TA100NR	2020年11月18日

#### 7.1.4 菌株の特性検査

7.1.3 の凍結保存菌株を用いて、アミノ酸要求性、膜変異 *rfa* 特性、薬剤耐性因子 R-factor プラスミド、紫外線感受性、生菌数、もどり菌数、陰性対照値及び陽性対照値の特性を検査し、それぞれの菌株に特有の性質が保持されていることを確認して使用した。

使用した菌株の特性検査実施日

<i>S. typhimurium</i> TA98	2020年9月3日～2020年9月7日
<i>S. typhimurium</i> TA100	2020年9月3日～2020年9月7日
<i>S. typhimurium</i> TA98NR	2020年11月18日～2020年11月20日
<i>S. typhimurium</i> TA100NR	2020年11月18日～2020年11月20日

## 7.2 対照物質

### 7.2.1 陰性対照物質

被験液の調製に用いた DMSO を陰性対照物質とした。

### 7.2.2 陽性対照物質

以下の変異原性物質を陽性対照物質とした。

1) アジ化ナトリウム（略称：SAZ）

CAS 番号	: 26628-22-8
規格	: 試薬特級
メーカー	: 富士フィルム和光純薬株式会社
ロット番号	: YLL7840
保存条件	: 室温、遮光
保存場所	: [REDACTED]

2) ケルセチン水和物（略称：QT）

CAS 番号	: 849061-97-8
メーカー	: 東京化成工業株式会社
ロット番号	: L6BBE
保存条件	: 密栓、冷暗所

3) ベンツピレン (略称: B[*a*]P)

CAS 番号 : 50-32-8  
 規格 : 環境分析用  
 メーカー : 富士フィルム和光純薬株式会社  
 ロット番号 : TWH3205  
 保存条件 : 冷蔵、遮光  
 保存場所 : [REDACTED]

7.2.3 ニトロ還元酵素の欠損を確認するための対照物質

4) フリルフラマイド (略称: AF-2)

CAS 番号 : 3688-53-7  
 規格 : 和光特級  
 メーカー : 富士フィルム和光純薬株式会社  
 ロット番号 : PTR1925  
 保存条件 : 室温、遮光  
 保存場所 : [REDACTED]

7.2.4 調製方法

AF-2、QT 及び B[*a*]P は DMSO (富士フィルム和光純薬株式会社、試薬特級、ロット番号 KCN0182) に溶解し、SAZ は注射用水 (株式会社大塚製薬工場、日本薬局方、ロット番号 K8A74) に溶解し、約 1 mL ずつ小分けして -20°C 以下で凍結保存した。なお、試験実施時に解凍して使用した。それぞれの調製濃度を表 1 に示した。

表 1 対照物質調製濃度

代謝活性化	菌株	名称	調製濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	プレート中の濃度 ( $\mu\text{g/plate}$ )
無し	<i>S. typhimurium</i> TA98	AF-2	1.0	0.1
	<i>S. typhimurium</i> TA98NR	QT	500	50
	<i>S. typhimurium</i> TA100	AF-2	0.1	0.01
	<i>S. typhimurium</i> TA100NR	SAZ	5.0	0.5
有り	<i>S. typhimurium</i> TA98 <i>S. typhimurium</i> TA98NR <i>S. typhimurium</i> TA100 <i>S. typhimurium</i> TA100NR	B[ <i>a</i> ]P	50	5

7.3 試薬

7.3.1 S9 Mix の調製方法

S9 及び補酵素を混合し、S9 Mix を調製した。調製は用時に行った。調製した S9 Mix は使用まで冷蔵で保存し、使用後の残液は廃棄した。

1) S9

■

名称	: エームス試験用 S9
製造元	: [REDACTED]
ロット番号	: S9-200626
製造日	: 2020年 6月 26日
使用期限	: 2020年 12月 25日
種・系統	: ラット・SD系
週齢・性	: 7週齢・雄
体重	: 262.8-315.3 g
誘導物質	: フエノバルビタール(PB)及び5,6-ベンゾフラボン(BF)
投与方法	: 腹腔内投与
投与期間及び投与量	: PB 4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)
保存方法	: 冷凍保存 (-70°C 以下)
保存場所	: [REDACTED]
2) 補酵素	
名称	: エームス試験用コファクターFA
製造元	: [REDACTED]
ロット番号	: FA-200716
製造日	: 2020年 7月 16日
使用期限	: 2021年 1月 15日
保存方法	: 冷凍保存 (-70°C 以下)
保存場所	: [REDACTED]
3) S9 Mix の組成 (1 mL 中)	
水	: 0.9 mL
S9	: 0.1 mL
MgCl <sub>2</sub>	: 8 μmol
KCl	: 33 μmol
グルコース-6-リン酸	: 5 μmol
還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH)	: 4 μmol
還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH)	: 4 μmol
リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4)	: 100 μmol

### 7.3.2 培地

#### 1) 最小グルコース寒天平板培地

名称 : エームス試験用培地ファルメディア AM

製造元	: 株式会社アテクト
購入元	: 株式会社ファルマ
ロット番号	: 201013
製造日	: 2020年10月13日
有効期限	: 2021年4月13日
保存方法	: 室温保存
保存場所	: [REDACTED]
2) 使用寒天	
名称	: TAIYO-AGAR BM
製造元	: SSK セールス株式会社
ロット番号	: 007711

### 7.3.3 ニュートリエントプロス No.2 培養液

ニュートリエントプロス No.2 を 2.5 wt% となるよう精製水で溶解し、オートクレーブにより滅菌処理 (121°C、20 分) を行い、調製した。調製後は使用時まで冷蔵で保存し、1箇月以内のものを使用した。

名称 : ニュートリエントプロス No.2 (Nutrient Broth No.2)  
ロット番号 : 2202237  
製造元 : OXOID LTD.  
保存方法 : 室温保存  
保存場所 : [REDACTED]

#### 7.3.4 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4)

りん酸緩衝剤粉末3包に対して2Lの精製水を加えて溶解し、オートクレープにより滅菌処理(121°C、20分)を行い、調製した。調製後は使用時まで冷蔵で保存し、1箇月以内のものを使用した。

名称	: りん酸緩衝剤粉末 (1/15 mol/L pH 7.4)
製造元	: 富士フィルム和光純薬株式会社
ロット番号	: PTH4077
保存方法	: 室温保存
保存場所	: [REDACTED]

### 7.3.5 トップアガー

以下に示す寒天を用いて、調製した軟寒天液（0.6 wt% Agar, 0.6 wt% NaCl）をオートクレープにより滅菌処理（121°C、20 分）した後、0.5 mmol/L D-ビオチン-L-ヒスチジン-L-トリプトファン溶液を軟寒天液 10 に対して 1 の割合で加えて調製し使用した。調製後は使用時まで室温で保存し、1箇月以内のものを使用した。

### 1) 寒天

名称	: Bacto Agar
製造元	: Becton, Dickinson and Company
ロット番号	: 9239282
保存方法	: 室温保存
保存場所	: [REDACTED]
2) 塩化ナトリウム	
製造元	: 富士フィルム和光純薬株式会社
ロット番号	: KCR4668
保存方法	: 室温保存
保存場所	: [REDACTED]
3) D-ビオチン	
製造元	: 富士フィルム和光純薬株式会社
ロット番号	: PTF1039
保存方法	: 冷藏保存、遮光
保存場所	: [REDACTED]
4) L-ヒスチジン塩酸塩一水和物	
製造元	: 富士フィルム和光純薬株式会社
ロット番号	: CAK1893
保存方法	: 室温保存、遮光
保存場所	: [REDACTED]
5) L-トリプトファン	
製造元	: 富士フィルム和光純薬株式会社
ロット番号	: CAP5231
保存方法	: 室温保存、遮光
保存場所	: [REDACTED]

## 7.4 試験方法

### 7.4.1 識別方法

#### 7.4.1.1 菌株の識別

菌株の種類毎に、以下に示す色のマーカー等を使用して識別した。

<i>S. typhimurium</i> TA98	赤
<i>S. typhimurium</i> TA98NR	黄
<i>S. typhimurium</i> TA100	青
<i>S. typhimurium</i> TA100NR	水

#### 7.4.1.2 プレートの識別

代謝活性化しない場合は「-」、代謝活性化する場合は「+」とし、これに続けて陰性対照（溶媒対照：Solvent Control）を「SC」、陽性対照（Positive Control）を「PC」、被験物質処理群を濃度の低い方から「1」、「2」、「3」…の番号を各菌の色のマーカーでシヤーレのふたに記載し、識別した。

#### 7.4.2 前培養

- 1) ニュートリエントプロスNo.2培養液10 mLを滅菌済みL字型試験管(容量48 mL)に入れ、凍結保存菌株を解凍して得た菌懸濁液を各 20 µL 植菌し、振盪恒温槽(COOL BATH SHAKER ML-10 PU-6 接続型、タイトック株式会社)にセットした。
- 2) これをプログラム制御により前培養開始まで4°Cの水浴中に放置(6時間30分)した後、振盪(100回/分)しながら37°Cに上昇後9時間前培養した。
- 3) 前培養終了時に菌懸濁液の吸光度をデジタル比色計(Mini photo 518R、タイトック株式会社)で測定し、生菌数が $1\times10^9$ 個/mL以上あることを確認した。なお、菌懸濁液は使用まで室温下に維持した。それぞれの菌株の換算生菌数を表2に示した。

表2 菌株の換算生菌数

菌 株	菌 数( $\times 10^9$ 個/mL)		
	用 量 設 定 試 験	本 試 験 1 回 目	本 試 験 2 回 目
S. typhimurium TA100	5.07	5.08	5.08
S. typhimurium TA100NR	2.22	2.33	2.22
S. typhimurium TA98	5.23	5.25	5.40
S. typhimurium TA98NR	3.14	3.18	3.14

#### 7.4.3 プレート数

被験物質処理群、陰性対照群及び陽性対照群のいずれも用量ごとに、用量設定試験については2枚、本試験については3枚のプレートを用いた。

#### 7.4.4 試験操作（プレインキュベーション法）

- 1) 滅菌した各小試験管に被験液、溶媒又は陽性対照溶液0.1 mLをそれぞれ入れ、これに代謝活性化しない場合は0.1 mol/Lリン酸緩衝液(pH 7.4)0.5 mLを、代謝活性化する場合はS9 Mix 0.5 mLを加えた後、それぞれの小試験管に各菌懸濁液0.1 mLを加えた。
- 2) 小試験管を攪拌後すぐに37°Cで20分間振盪(80回/分)しながらプレインキュベーションし、これに45°Cに保温されているトップアガードを2.0 mL加え攪拌後、最小グルコース寒天平板培地に均一に重層した。

- 3) 無菌試験として、調製した最高用量の被験液 0.1 mL 及び調製した S9 Mix 0.5 mL をそれぞれ小試験管に取り、これにトップアガーを 2.0 mL 加えた後に最小グルコース寒天平板培地に均一に重層した。なお、これら 1)~3)の一連の操作は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で実施した。
- 4) 最小グルコース寒天平板培地に重層したトップアガーが固化したことを確認し、最小グルコース寒天平板培地を逆さにしてインキュベータに入れ、37°C で用量設定及び本試験 2 回目については 48 時間、本試験 1 回目については 49 時間培養した。
- 5) 培養後、実体顕微鏡を用いて菌に対する生育阻害の有無を観察した。本被験物質による沈殿の有無を目視により確認した。復帰変異コロニー数の計数は、面積及び数え落としの補正をしたドットカウンターを用いて実施した。

## 7.5 判定基準

被験物質処理群の復帰変異コロニー数が自然復帰変異コロニー数（陰性対照値）に対して 2 倍以上となる増加を示し、用量反応性及び再現性が認められた場合あるいは明確な用量反応性を示さない場合であっても自然復帰変異コロニー数の 2 倍以上となる増加を示し、2 回の本試験又は追加・確認試験において再現性が認められた場合に陽性と判定することとした。なお、測定結果については、平均値±標準偏差も併せて記載した。

## 8. 試験結果

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、5 に示した。なお、図 1~10 は別表 2、3 より作成した。

### 8.1 用量設定試験の観察結果及び本試験用量の設定

本試験の試験用量を設定するため 5000 µg/plate を最高用量に以下、公比 4 で 4 段階希釈した計 5 用量 (19.5、78.1、313、1250、5000 µg/plate) を用い、用量設定試験を実施した。

その結果、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、すべての菌株の 5000 µg/plate の用量で認められた。

本被験物質による復帰変異コロニー数は、代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA98 及び TA100 において用量依存性のある陰性対照値の 2 倍以上の増加が認められた。しかし、ニトロ還元酵素欠損菌株である *S. typhimurium* TA98NR 及び TA100NR においては、復帰変異コロニー数の増加は認められず用量依存性も認められなかった。

このため本試験の試験用量は、復帰変異コロニー数の増加が認められた用量を参考

にして、代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA100 については、1250 µg/plate を最高用量として以下公比 2 で 6 段階除した計 7 用量、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98 については 5000 µg/plate を最高用量として以下公比 2 で 6 段階除した計 7 用量、代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA98 については 5000 µg/plate を最高用量として以下公比 2 で 5 段階除した計 6 用量を設定した。代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA98NR 及び TA100NR については、復帰変異コロニー数の増加が認められなかったため、生育阻害が認められた最低用量の 5000 µg/plate を最高用量として以下公比 2 で 5 段階除した計 6 用量を設定した。なお、本試験は同一用量で 2 回実施した。

## 8.2 本試験の観察結果

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、代謝活性化しない場合の TA98 及び代謝活性化の有無にかかわらず TA98NR、TA100NR の 2500 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の TA98 の 5000 µg/plate の用量で認められた。

本被験物質による復帰変異コロニー数は、代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA98 及び TA100 において用量依存性のある陰性対照値の 2 倍以上の増加が認められた。しかし、ニトロ還元酵素欠損菌株である *S. typhimurium* TA98NR 及び TA100NR においては、復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量依存性も認められなかった。

## 8.3 試験の成立条件

ニトロ還元酵素欠損を確認するための対照物質のニトロ還元酵素欠損菌株の値が、それぞれの野生株の値と比較して十分に低く、陽性対照値がそれぞれの菌株の陰性対照値に比較して 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加を示し、全ての対照値の復帰変異コロニー数の平均値が背景データ (Attachment) の管理値内であり、無菌試験及び試験操作において雑菌の混入などの異常も認められなかったため、試験が適切に実施されたものと判断した。

## 9. 考察

2 回の本試験とともに代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA98 及び TA100 において陰性対照値の 2 倍以上の用量依存的な復帰変異コロニー数の増加が認められた。しかし、ニトロ還元酵素欠損菌株である *S. typhimurium* TA98NR 及び TA100NR においては、復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量依存性も認められなかった。

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、ニトロ還元酵素の欠損を確認するための対照群において、ニトロ還元酵

素欠損菌株はそれぞれの野生株と比較して、十分に低い値を示したため、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。

以上の試験結果より、本試験条件下においてジニトルミドは、細菌に対する遺伝子突然変異誘発能を有する（陽性）と判定するが、細菌特有のニトロ還元酵素による影響が示唆される結果であった。

## 10. 参考文献

- 1) B.N.Ames, F.D.Lee and W.E.Durston: An Improved Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens, Proc.Natl Acad.Sci.,USA, 70, No.3, pp.782-786, March 1973.
- 2) J.McCann, N.E.Spingarn, J.Kobori and B.N.Ames: Detection of Carcinogens as Mutagens: Bacterial Tester Strains with R Factor Plasmids, Proc.Natl Acad.Sci., USA, 72, No.3, pp.979-983, March 1975.
- 3) M.H.L.Green and W.J.Muriel: Mutagen Testing using Trp<sup>+</sup> Reversion in *Escherichia coli*, Mutation Res., 38, pp.3-32, 1976.
- 4) T.Yahagi, M.Nagao, Y.Seino, T.Matsushima, T.Sugimura and M.Okada: Mutagenicities of *N*-nitrosamines on *Salmonella*, Mutation Res., 48, pp.121-130, 1977.
- 5) Dorothy M. Maron and Bruce N. Ames: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, Mutation Res., 113, pp.173-215, 1983.
- 6) 田島彌太郎, 賀田恒夫, 近藤宗平, 外村晶 (編) : 環境変異原実験法, 講談社, pp.56-68, 1980.
- 7) 労働省安全衛生部化学物質調査課編 : 新・微生物を用いる変異原性試験ガイドブック, 中央労働災害防止協会, 1986.
- 8) 石館基 (監修) : 微生物を用いる変異原性試験データ集 (能美健彦, 松井道子編集), 株式会社エル・アイ・シー, 東京, 1991.

(別表1)

## 試験結果表(用意設定試験)

被験物質の名称: ジニトルミド		No.			
試験実施期間		2020年11月26日より2020年11月30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	TA98	TA98NR
S9Mix(-)	陰性対照(DMSO)	109 99 ( 104 )	98 105 ( 102 )	24 28 ( 26 )	25 24 ( 25 )
	19.5	162 188 ( 175 )	114 112 ( 113 )	26 22 ( 24 )	22 30 ( 26 )
	78.1	589 582 ( 586 )	101 109 ( 105 )	34 30 ( 32 )	23 29 ( 26 )
	313	2187 2584 ( 2386 )	112 120 ( 116 )	89 91 ( 90 )	35 26 ( 31 )
	1250	4983 4267 ( 4625 )	107 94 ( 101 )	250 220 ( 235 )	33 28 ( 31 )
	5000	89 * 49 * ( 69 )	0 * 0 * ( 0 )	7 * 5 * ( 6 )	11 * 2 * ( 7 )
	陰性対照(DMSO)	136 138 ( 137 )	118 117 ( 118 )	32 43 ( 38 )	39 35 ( 37 )
	19.5	193 181 ( 187 )	142 138 ( 140 )	42 42 ( 42 )	39 42 ( 41 )
	78.1	242 267 ( 255 )	139 143 ( 141 )	40 44 ( 42 )	43 35 ( 39 )
	313	1158 1034 ( 1096 )	146 133 ( 140 )	61 40 ( 51 )	42 35 ( 39 )
S9Mix(+)	1250	3939 3951 ( 3945 )	116 129 ( 123 )	124 123 ( 124 )	49 59 ( 54 )
	5000	3925 * 3823 * ( 3874 )	0 * 0 * ( 0 )	214 * 216 * ( 215 )	0 * 0 * ( 0 )
	名 称	AF-2	AF-2	AF-2	AF-2
	用 量( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	0.01	0.01	0.1	0.1
	コロニー数/プレート	547 557 ( 552 )	145 148 ( 147 )	525 506 ( 516 )	128 124 ( 126 )
	名 称	SAZ	SAZ	QT	QT
	用 量( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	0.5	0.5	50	50
	コロニー数/プレート	646 486 ( 566 )	468 497 ( 483 )	538 488 ( 513 )	648 729 ( 689 )
	名 称	B[ $\alpha$ ]P	B[ $\alpha$ ]P	B[ $\alpha$ ]P	B[ $\alpha$ ]P
	用 量( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	5.0	5.0	5.0	5.0
	コロニー数/プレート	995 990 ( 993 )	968 933 ( 951 )	281 295 ( 288 )	271 329 ( 300 )

(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

QT : ケルセチン水和物

B[ $\alpha$ ]P : ベンゾ[ $\alpha$ ]ビレン

\*: 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1回目:-S9Mix)

被験物質の名称: ジニトルミド		No.			
試験実施期間		2020年12月1日 より 2020年12月4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)		フレームシフト型	
		TA100	TA100NR	TA98	TA98NR
S9Mix (-)	陰性対照(DMSO)	107 115 122 ( 115 ± 7.5 )	114 112 103 ( 110 ± 5.9 )	25 23 24 ( 24 ± 1.0 )	24 27 25 ( 25 ± 1.5 )
	183 205 19.5	188 ( 192 ± 11.5 )	NT	NT	NT
	363 347 39.1	347 ( 352 ± 9.2 )	NT	NT	NT
	692 590 78.1	712 ( 665 ± 65.4 )	NT	28 41 27 ( 32 ± 7.8 )	NT
	1216 1384 156	1401 ( 1334 ± 102.3 )	107 ( 113 ± 10.4 )	59 66 37 ( 54 ± 15.1 )	25 23 28 ( 25 ± 2.5 )
	1907 1919 313	1903 ( 1903 ± 18.9 )	106 119 112 ( 112 ± 6.5 )	85 88 72 ( 82 ± 8.5 )	25 39 27 ( 30 ± 7.6 )
	2522 2441 625	2747 ( 2570 ± 158.5 )	105 122 133 ( 120 ± 14.1 )	150 139 132 ( 140 ± 9.1 )	23 38 33 ( 31 ± 7.6 )
	2926 2863 1250	2863 ( 2768 ± 221.9 )	127 112 89 ( 109 ± 19.1 )	201 199 186 ( 195 ± 8.1 )	34 41 29 ( 35 ± 6.0 )
	2500	NT	14 * 17 * 36 * ( 22 ± 11.9 )	89 * 95 * 81 * ( 88 ± 7.0 )	12 * 5 * 7 * ( 8 ± 3.6 )
	5000	NT	0 * 0 * 0 * ( 0 ± 0.0 )	0 * 0 * 0 * ( 0 ± 0.0 )	0 * 0 * 0 * ( 0 ± 0.0 )
ニトロ還元酵素の欠損を確認するための対照	名 称	AF-2	AF-2	AF-2	AF-2
	用 量(μg/プレート)	0.01	0.01	0.1	0.1
	コロニー数/プレート	508 546 567 ( 540 ± 29.9 )	145 138 147 ( 143 ± 4.7 )	436 425 429 ( 430 ± 5.6 )	94 77 88 ( 86 ± 8.6 )
	名 称	SAZ	SAZ	QT	QT
陽性対照 S9Mix を必要としないもの	用 量(μg/プレート)	0.5	0.5	50	50
	コロニー数/プレート	577 580 583 ( 580 ± 3.0 )	494 518 530 ( 514 ± 18.3 )	605 574 582 ( 587 ± 16.1 )	619 590 630 ( 613 ± 20.7 )

(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

QT : ケルセチン水和物

\*: 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、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

(別表3)

## 試験結果表 (本試験1回目:+S9Mix)

被験物質の名称: ジニトルミド		試験実施期間 2020年12月1日より 2020年12月4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	TA100NR	TA98	TA98NR
S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	120 105 103 ( 109 ± 9.3 )	133 140 131 ( 135 ± 4.7 )	25 27 27 ( 26 ± 1.2 )	30 36 31 ( 32 ± 3.2 )
	19.5	186 158 153 ( 166 ± 17.8 )	NT	NT	NT
	39.1	184 173 162 ( 173 ± 11.0 )	NT	NT	NT
	78.1	246 248 240 ( 245 ± 4.2 )	NT	NT	NT
	156	505 435 490 ( 477 ± 36.9 )	145 129 150 ( 141 ± 11.0 )	30 33 25 ( 29 ± 4.0 )	30 35 33 ( 33 ± 2.5 )
	313	1547 1486 1450 ( 1494 ± 49.0 )	148 162 125 ( 145 ± 18.7 )	35 33 35 ( 34 ± 1.2 )	35 28 33 ( 32 ± 3.6 )
	625	2565 2140 2461 ( 2389 ± 221.5 )	112 92 154 ( 119 ± 31.6 )	52 70 58 ( 60 ± 9.2 )	37 33 23 ( 31 ± 7.2 )
	1250	2962 3175 3002 ( 3046 ± 113.2 )	107 104 105 ( 105 ± 1.5 )	97 88 128 ( 104 ± 21.0 )	31 40 39 ( 37 ± 4.9 )
	2500	81 * NT 58 *	145 148 146 ( 146 ± 1.5 )	20 * 15 * 25 * ( 20 ± 5.0 )	20 * 15 * 25 * ( 20 ± 5.0 )
	5000	0 * 0 * 0 * ( 0 ± 0.0 )	24 * 41 * 50 * ( 38 ± 13.2 )	0 * 0 * 0 * ( 0 ± 0.0 )	0 * 0 * 0 * ( 0 ± 0.0 )
陽性対照 S9Mix を必要とする もの	名 称	B[α]P	B[α]P	B[α]P	B[α]P
	用量 (μg/プレート)	5.0	5.0	5.0	5.0
	コロニー数/プレート	953 984 992 ( 976 ± 20.6 )	994 958 965 ( 972 ± 19.1 )	288 295 270 ( 284 ± 12.9 )	296 308 314 ( 306 ± 9.2 )

(備考)

B[α]P : ベンゾ[α]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。

NT: 試験せず。

( )内は、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

(別表4)

## 試験結果表 (本試験2回目:-S9Mix)

被験物質の名称: ジニトロミド		No.			
代謝活性化系の有無	被験物質の用量(μg/プレート)	2020年12月3日より2020年12月7日			
		復帰変異数(コロニー数/プレート)		フレームシフト型	
		TA100	TA100NR	TA98	TA98NR
S9Mix (-)	陰性対照(DMSO)	98 98 99 ( 98 ± 0.6 )	98 94 105 ( 99 ± 5.6 )	23 21 22 ( 22 ± 1.0 )	25 23 26 ( 25 ± 1.5 )
	187				
	208				
	19.5	175 ( 190 ± 16.7 )	NT	NT	NT
	39.1	398 333 343 ( 358 ± 35.0 )	NT	NT	NT
	78.1	600 638 560 ( 599 ± 39.0 )	NT	33 30 33 ( 32 ± 1.7 )	NT
	156	1472 1360 1493 ( 1442 ± 71.5 )	124 116 96 ( 112 ± 14.4 )	56 40 61 ( 52 ± 11.0 )	36 23 29 ( 29 ± 6.5 )
	313	2523 2257 2472 ( 2417 ± 141.2 )	97 111 109 ( 106 ± 7.6 )	116 99 82 ( 99 ± 17.0 )	34 26 25 ( 28 ± 4.9 )
	625	3682 3561 3528 ( 3590 ± 81.1 )	88 87 111 ( 95 ± 13.6 )	150 168 172 ( 163 ± 11.7 )	32 34 30 ( 32 ± 2.0 )
	1250	4571 4386 4487 ( 4481 ± 92.6 )	89 95 80 ( 88 ± 7.5 )	200 203 222 ( 208 ± 11.9 )	37 35 36 ( 36 ± 1.0 )
	2500	12 * 15 * NT	102 * 99 * 11 * ( 13 ± 2.1 )	14 * 13 * 100 * ( 100 ± 1.5 )	10 * ( 12 ± 2.1 )
	5000	0 * 0 * NT	0 * 0 * 0 * ( 0 ± 0.0 )	0 * 0 * 0 * ( 0 ± 0.0 )	0 * ( 0 ± 0.0 )
	名 称	AF-2	AF-2	AF-2	AF-2
ニトロ還元酵素の欠損を確認するための対照	用量(μg/プレート)	0.01	0.01	0.1	0.1
	コロニー数/プレート	557 541 520 ( 539 ± 18.6 )	148 147 111 ( 135 ± 21.1 )	444 478 432 ( 451 ± 23.9 )	123 121 116 ( 120 ± 3.6 )
	名 称	SAZ	SAZ	QT	QT
陽性対照 S9Mix を必要としないもの	用量(μg/プレート)	0.5	0.5	50	50
	コロニー数/プレート	577 566 576 ( 573 ± 6.1 )	496 456 472 ( 475 ± 20.1 )	600 528 621 ( 583 ± 48.8 )	672 642 598 ( 637 ± 37.2 )

(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

QT : ケルセチン水和物

\*: 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、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

(別表5)

## 試験結果表 (本試験2回目:+S9Mix)

被験物質の名稱：ジニトルミド		No.			
代謝活性化系の有無	被験物質の用量(μg/プレート)	2020年12月3日より2020年12月7日			
		塩基対置換型 復帰変異数(コロニー数/プレート)		フレームシフト型	
		TA100	TA100NR	TA98	TA98NR
S9Mix(+)	陰性対照(DMSO)	106 119 101 ( 109 ± 9.3 )	111 111 121 ( 114 ± 5.8 )	33 31 26 ( 30 ± 3.6 )	30 33 31 ( 31 ± 1.5 )
	19.5	178 172 191 ( 180 ± 9.7 )	NT	NT	NT
	39.1	206 171 180 ( 186 ± 18.2 )	NT	NT	NT
	78.1	262 264 243 ( 256 ± 11.6 )	NT	NT	NT
	156	544 452 480 ( 492 ± 47.2 )	115 123 112 ( 117 ± 5.7 )	30 42 41 ( 38 ± 6.7 )	38 32 39 ( 36 ± 3.8 )
	313	1455 1639 1588 ( 1561 ± 95.0 )	123 92 92 ( 102 ± 17.9 )	48 49 36 ( 44 ± 7.2 )	27 38 30 ( 32 ± 5.7 )
	625	3035 2910 3047 ( 2997 ± 75.9 )	138 107 129 ( 125 ± 15.9 )	78 82 88 ( 83 ± 5.0 )	32 33 42 ( 36 ± 5.5 )
	1250	4400 4352 4401 ( 4384 ± 28.0 )	109 95 90 ( 98 ± 9.8 )	128 108 112 ( 116 ± 10.6 )	36 42 43 ( 40 ± 3.8 )
	2500	77 * 70 * NT	178 184 70 * ( 72 ± 4.0 )	25 * 26 * 169 ( 177 ± 7.5 )	25 * 26 * 35 * ( 29 ± 5.5 )
	5000	0 * 0 * NT	0 * 23 * 0 * ( 0 ± 0.0 )	0 * 22 * 21 * ( 22 ± 1.0 )	0 * 0 * 0 * ( 0 ± 0.0 )
陽性対照 S9Mixを必要とするもの	名 称	B[a]P	B[a]P	B[a]P	B[a]P
	用 量 (μg/プレート)	5.0	5.0	5.0	5.0
	コロニー数/プレート	999 980 943 ( 974 ± 28.5 )	999 990 998 ( 996 ± 4.9 )	288 298 337 ( 308 ± 25.9 )	333 270 263 ( 289 ± 38.6 )

(備考)

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。

NT : 試験せず。

( )内は、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

図 1

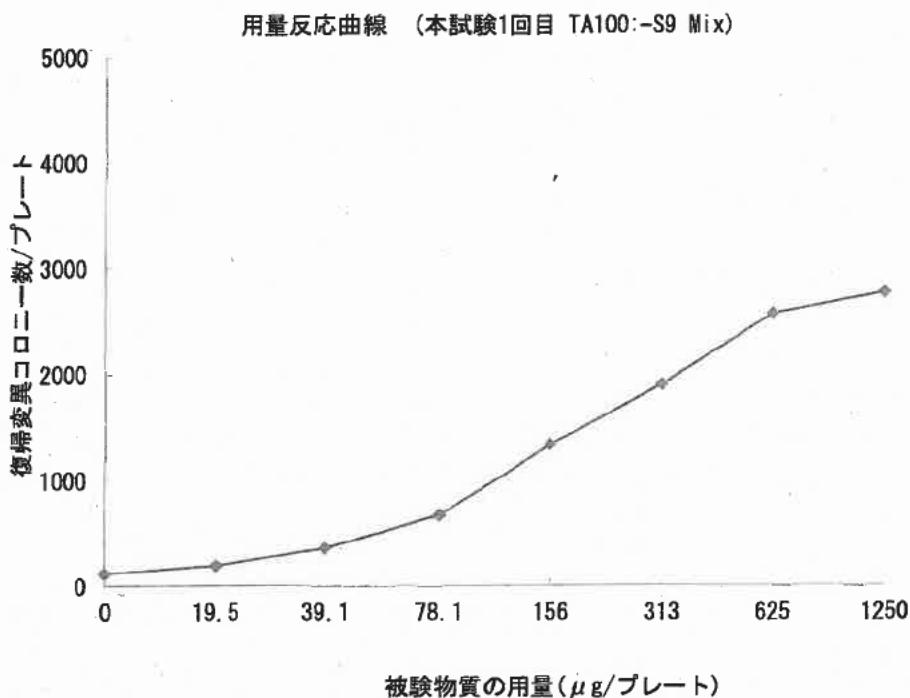


図 2

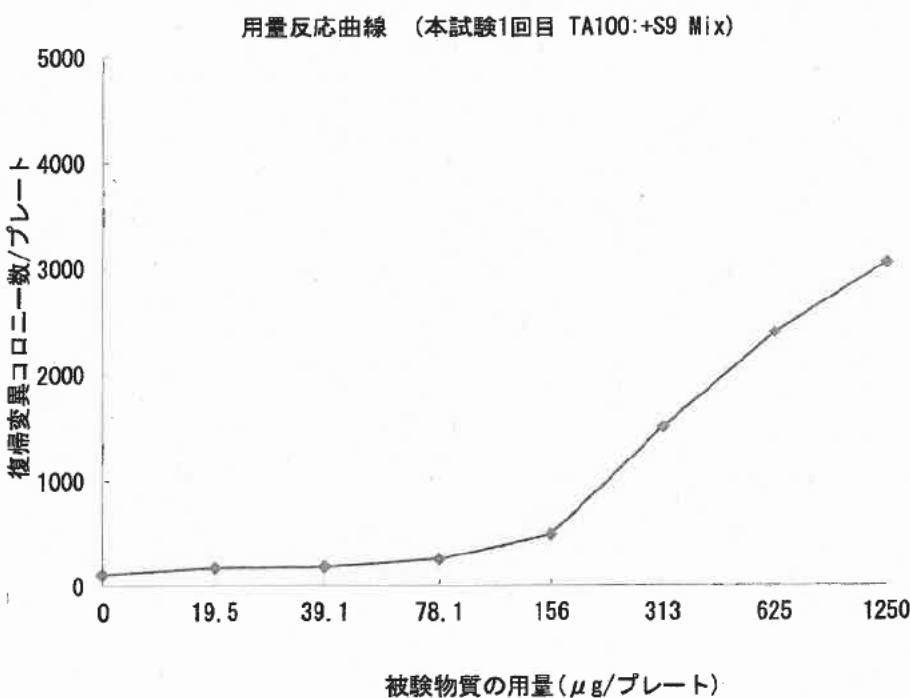


図 3

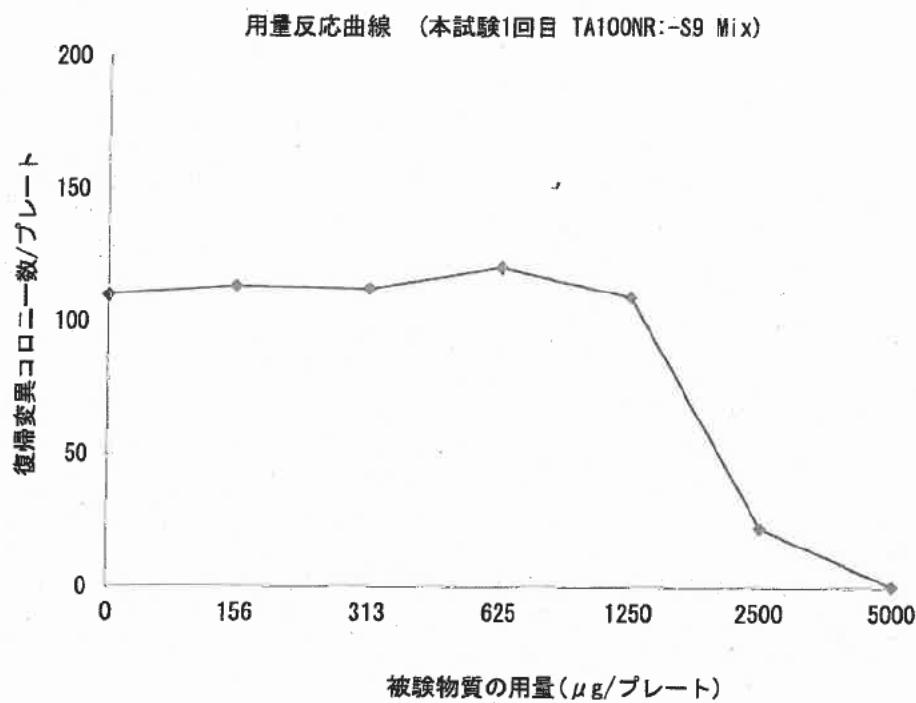


図 4

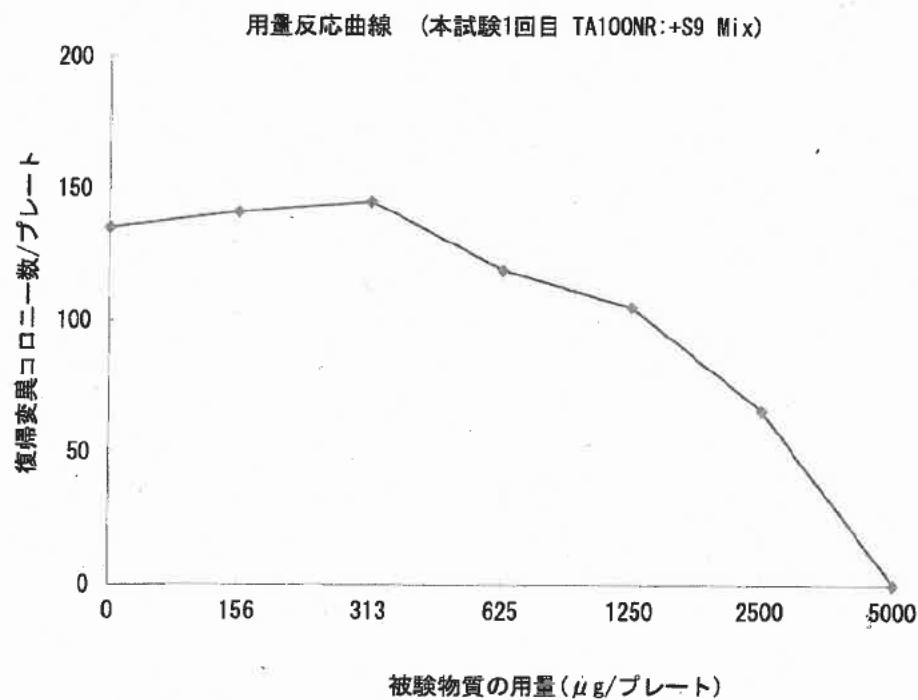




図 5

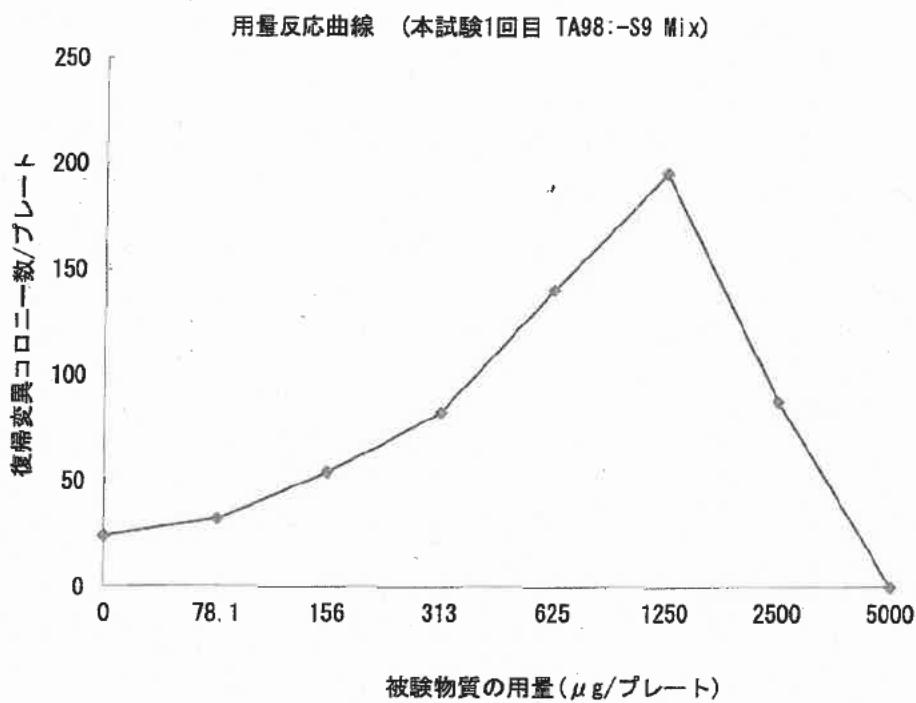


図 6

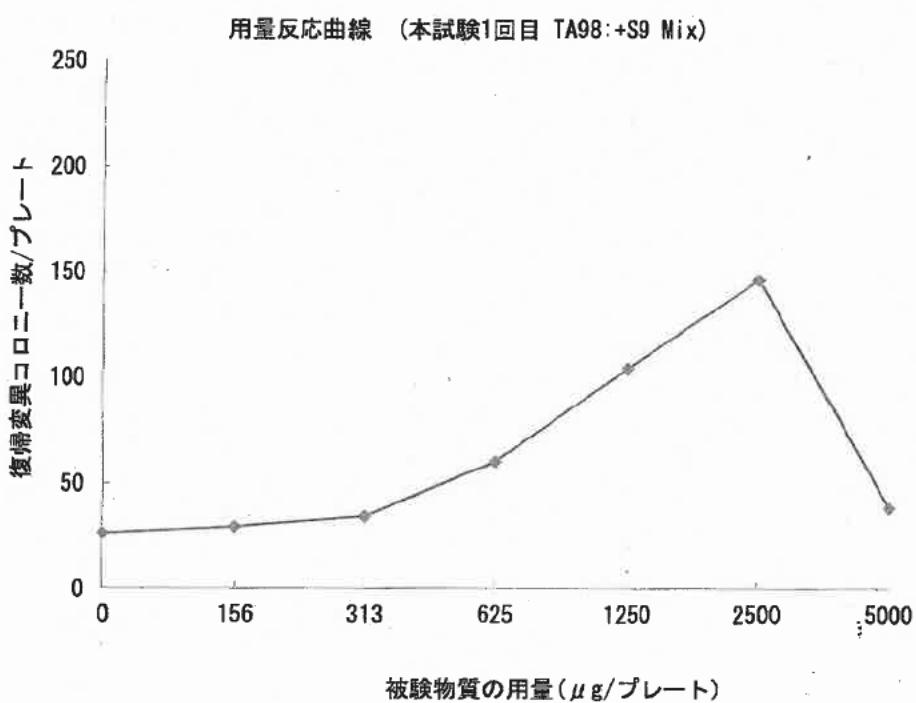




図 7

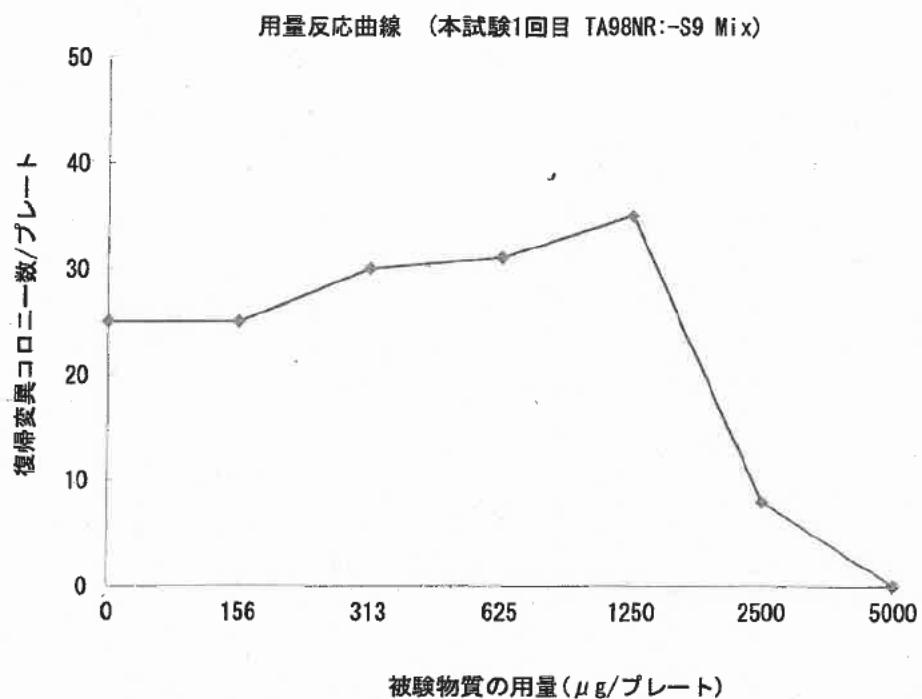
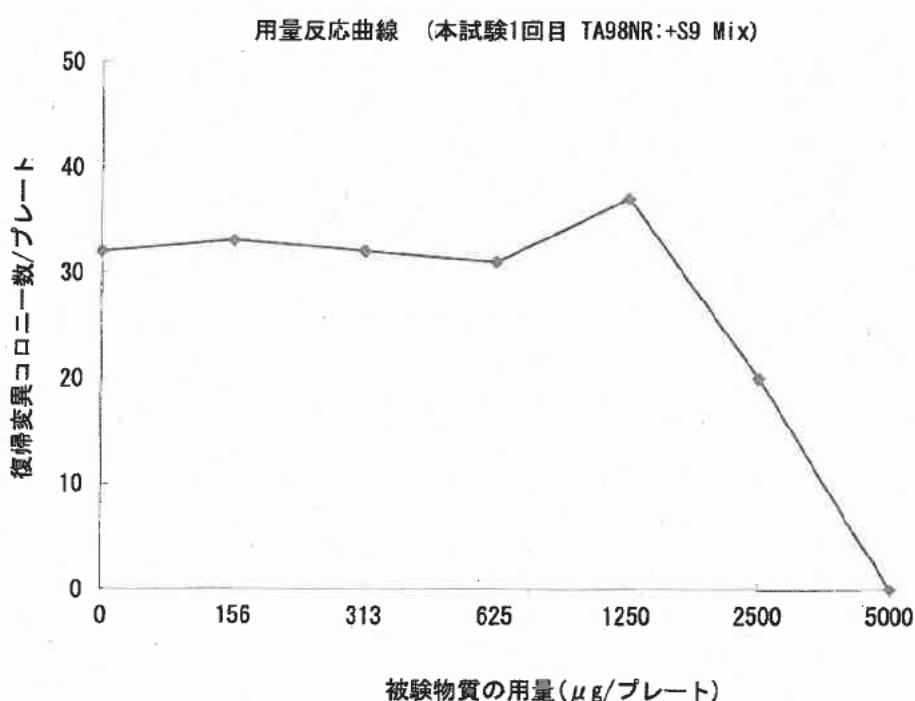


図 8



## Background Data

**Test Category : Bacterial reverse mutation test (Preincubation Method)**

Tester Strains	S9 Mix (-) or (+)	Classification	Mean	S.D.	Management ranges		Number of plates
					Lower limit	Upper limit	
TA100	-	Control to confirm deficiency of nitroreductase AF-2 (0.01 µg/plate)	675	63	486	864	88
		Solvent control	112	13	74	151	88
		Positive control SAZ (0.5 µg/plate)	594	43	464	724	20
	+	Solvent control	115	13	76	155	88
		Positive control B[a]P (5.0 µg/plate)	1168	88	905	1431	88
TA100NR	-	Control to confirm deficiency of nitroreductase AF-2 (0.01 µg/plate)	139	9	113	164	20
		Solvent control	95	9	69	122	20
		Positive control SAZ (0.5 µg/plate)	471	61	288	654	20
	+	Solvent control	112	15	67	157	20
		Positive control B[a]P (5.0 µg/plate)	816	151	362	1270	20
TA98	-	Control to confirm deficiency of nitroreductase AF-2 (0.1 µg/plate)	413	49	266	559	88
		Solvent control	22	5	6	37	88
		Positive control QT (50 µg/plate)	494	84	243	744	20
	+	Solvent control	32	5	18	47	88
		Positive control B[a]P (5.0 µg/plate)	286	27	204	368	88
TA98NR	-	Control to confirm deficiency of nitroreductase AF-2 (0.1 µg/plate)	89	26	12	166	20
		Solvent control	24	5	8	40	20
		Positive control QT (50 µg/plate)	654	133	256	1051	20
	+	Solvent control	36	8	12	61	20
		Positive control B[a]P (5.0 µg/plate)	292	29	204	380	20

(Notice)

Solvent controls Water, Dimethyl sulfoxide(DMSO)

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

SAZ : Sodium azide

QT : Quercetin hydrate

B[a]P : Benzo[a]pyrene

S9Mix (-) : without metabolic activation

(+) : with metabolic activation

## 信頼性保証陳述書（1/2）

試験番号 :

試験表題 : ジニトルミドの細菌を用いる復帰突然変異試験

本試験は以下に示す基準に従って実施されたことを保証致します。

- 「動物用医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令」  
(平成9年10月21日農林水産省令第74号)
- 「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(OECD:1997年11月26日)

なお、調査は下記の通り実施し、報告致しました。

### 試験の調査

項目	担当者	調査日	試験責任者及び運営管理者への報告日
試験計画書		2020年11月24日	2020年11月24日
調製・保存（被験物質）、 被験物質の処理		2020年12月2日	2020年12月3日
計数		2020年12月4日	
生データ		2020年12月8日	2020年12月9日
改善確認		2021年1月8日	2021年1月8日
最終報告書草案 図・表		2021年1月19日	2021年1月20日
最終報告書		2021年1月8日	2021年1月12日
		2021年2月5日	2021年2月5日

## 信頼性保証陳述書（2/2）

### 施設調査

項目	担当者	調査日	部門責任者及び運営管理者への報告日
菌株の特性検査		2020年 9月 3日 2020年 9月 7日 2020年 9月 14日	2020年 9月 17日
菌株の特性検査		2020年 11月 18日 2020年 11月 20日 2020年 11月 26日	2020年 11月 26日
改善確認		2020年 11月 27日	2020年 11月 30日
陽性対照物質の管理		2020年 10月 1日 2020年 10月 8日 2020年 10月 14日 2020年 11月 18日	2020年 10月 7日 2020年 10月 14日 2020年 10月 15日 2020年 11月 18日
菌の前培養		2020年 9月 1日 2020年 9月 2日	2020年 9月 2日

### プロセス調査

項目	試験番号	担当者	調査日	試験責任者及び運営管理者への報告日
用量設定試験 (復帰突然変異試験)			2020年 10月 2日 2020年 10月 5日	2020年 10月 7日

2021年2月5日

信頼性保証部門責任者