

『 β -アラニンの細菌を用いる復帰突然変異試験』

PROJECT No. H-00353

平成 13 年 3 月 30 日

群馬県吾妻郡吾妻町大字大戸 3303-58

株式会社 実医研

細菌を用いる復帰突然変異試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	β-アラニン					
別 名	_____					
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合は、その製法の概要)	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$ $\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$					
試験に供した新規 化学物質の純度	98.2%	試験に供した新規 化学物質の Lot No.	[REDACTED]			
不純物の名称及び濃度	_____					
C A S 番 号	107-95-9	蒸 気 圧	_____			
分 子 量	89.09	分 配 係 数	_____			
融 点	197℃	常温における性状	斜方結晶			
沸 点	_____					
安 定 性	_____					
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	水	55.5g/dL (25℃)溶解	安定	DMSO	_____	_____
	アセトン	_____	_____	その他 ()	_____	_____

2. 試験に用いた菌株

菌株名	入 手 先	入手年月日
TA98	中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター	2000 年 8 月 22 日
TA100	中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター	2000 年 8 月 22 日
TA1535	中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター	2000 年 8 月 22 日
TA1537	中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター	2000 年 8 月 22 日
WP2uvrA	中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター	2000 年 8 月 22 日

3.S9 mix

(1) S9 の入手方法等

自製・購入の別	1.自製 ②.購入（製造年月日：キッコーマン株式会社）
製造年月日	2000 年 9 月 1 日
購入の場合の Lot No.	RAA-432
保存温度	-80℃以下（設定温度；-85℃）

(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 および 5,6-BF
性	雄	投与方法	腹腔内投与
週 令	7 週	投与期間及び投与量 (g/kg 体重)	PB 0.03g/kg 1 回
体 重	198~231g		PB 0.06g/kg 3 回
			5,6-BF 0.08g/kg 1 回

(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 (%)
	注射用蒸留水	扶桑薬品工業株式会社	00603D	局方	—
溶媒選択の理由	水に 55.5g/dL 溶解し、かつ、安定であるとされていることから注射用蒸留水を選択した。				
被験物質溶液の性状	(溶解) 懸濁 その他 ()				
被験物質が難溶性の場合における懸濁の方法	—				
溶液の調製から使用までの 保存時間と温度	0 時間 00 分 (用時調製) 室温				
純度換算の有無	(有) 無				

5.前培養の条件等

(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 社	028 59355
前 培 養 時 間	10 時間 00 分		
培養容器 (形状・容量)	L 字型試験管・15×80×180mm		
培 養 液 量	12mL	接 種 菌 量	24 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	WP2uvrA	TA98	TA1537
生菌数 ($\times 10^9/\text{mL}$)	用 量 設 定 試 験	1.3	1.5	2.9	2.1	1.5
	本 試 験	1.2	1.4	2.5	1.8	1.2
	確 認 試 験	1.3	1.5	2.7	2.1	1.4
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 ②.購入 (製造元: 極東製薬工業株式会社)
製 造 年 月 日	2000 年 11 月 16 日 製造
購 入 の 場 合 の L o t N o .	DZA1BG01
使用寒天の名称・製造元・Lot No.	Agar、OXOID、Lot No.802714

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	①.プレインキュベーション法 ②.プレート法 3.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
	そ の 他 ()	_____
プレインキュベーション	温 度	37 °C
	時 間	20 分
インキュベーション	温 度	37 °C
	時 間	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 ②.機器計測
補 正 の 有 無	①.無 2.有 (補正の方法)

9.結果の判定及び参考事項

(1) 試験結果は別表および図による

(2) 結果の判定

判 定 (いずれかを○で囲むこと)	陽性	陰性
<p>判定の理由</p> <p>本被験物質の復帰変異コロニー数は用量設定試験、本試験および確認試験ともに用量依存性ならびに陰性対照群の2倍以上の増加を認めなかった。また、生育阻害および被験物質の沈澱は認められなかった。</p> <p>一方、各試験菌株の陽性対照群の復帰変異コロニー数はいずれも陰性対照群と比較して顕著な増加が認められた。</p> <p>以上の結果より、当該試験条件下におけるβ-アラニンの変異原性は陰性と判断された。</p> <p>データの統計学的処理はしていない。</p> <p>その他、試験の信頼性に影響を及ぼした要因はない。</p>		

(3) 考事項

<p>本被験物質は、用量設定試験（プレート法）の結果、生育阻害および被験物質の沈澱は認められなかった。このことから、本試験の最高用量を5000μg/plateに設定し、以下公比2で2500、1250、625および312.5μg/plateの計5用量で実施した。</p> <p>本試験（プレート法）の結果、各試験菌株の被験物質群の復帰変異コロニー数は用量依存性ならびに陰性対照群の2倍以上の増加を認めなかったことから陰性と判定した。</p> <p>本試験の結果が陰性であった場合には、別の方法で再現性を確認する必要があるため、確認試験をプレインキュベーション法で実施した。確認試験では本試験とほぼ同様な結果が得られ、再現性が確認された。</p> <p>各陰性対照群および陽性対照群の復帰変異コロニー数は、用量設定試験および本試験のいずれもバックグランドデータ（添付資料 1、2）の近似値であったことから、当該試験が適正な条件下で実施されたことが確認された。</p> <p>用量設定試験および本試験で実施した無菌試験では、雑菌の汚染は認められなかった。</p>	
--	--

10.その他

試験実施施設	名称	株式会社 実医研 榛名試験所
	所在地	
試験責任者	職氏名	
	経験年数	
試験期間		
試験番号		H-00353

[別表 1]

用量設定試験結果表

被験物質の名称 : β -アラニン

試験実施期間		2000年12月21日より2000年12月25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	
		TA 100	TA 1535	WP2 uvrA	TA 98	TA 1537
-S9 mix	陰性対照 (注射用蒸留水)	129 126 (128)	11 18 (15)	41 27 (34)	25 31 (28)	11 10 (11)
	5	133 134 (134)	15 21 (18)	24 33 (29)	26 29 (28)	16 13 (15)
	10	137 137 (137)	8 9 (9)	25 47 (36)	37 37 (37)	15 12 (14)
	50	167 150 (159)	14 12 (13)	35 34 (35)	22 29 (26)	15 15 (15)
	100	124 122 (123)	11 11 (11)	47 32 (40)	34 38 (36)	9 15 (12)
	500	135 136 (136)	9 16 (13)	31 43 (37)	32 29 (31)	8 7 (8)
	1000	111 118 (115)	12 12 (12)	35 32 (34)	31 23 (27)	10 12 (11)
	5000	111 127 (119)	8 11 (10)	39 40 (40)	26 27 (27)	13 12 (13)
+S9 mix	陰性対照 (注射用蒸留水)	156 145 (151)	14 18 (16)	42 49 (46)	42 42 (42)	11 17 (14)
	5	162 155 (159)	10 14 (12)	28 31 (30)	41 45 (43)	8 7 (8)
	10	160 162 (161)	14 15 (15)	40 40 (40)	42 26 (34)	13 12 (13)
	50	152 145 (149)	16 18 (17)	45 47 (46)	42 38 (40)	13 14 (14)
	100	160 155 (158)	17 12 (15)	56 54 (55)	42 37 (40)	13 18 (16)
	500	135 150 (143)	15 7 (11)	47 37 (42)	44 44 (44)	21 17 (19)
	1000	123 147 (135)	10 18 (14)	35 40 (38)	46 43 (45)	18 12 (15)
	5000	114 119 (117)	13 25 (19)	39 41 (40)	35 37 (36)	13 11 (12)
陽性対照	S9 mix を必要としないもの	名 称	AF-2	SA	AF-2	9-AA
		用量(μg /プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1
		コロニー数 /プレート	470 532 (501)	556 529 (543)	268 242 (255)	477 536 (507)
	S9 mix を必要とするもの	名 称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		用量(μg /プレート)	1	2	10	0.5
		コロニー数 /プレート	920 1000 (960)	230 251 (241)	852 913 (883)	603 616 (610)

[備考]

() : 復帰変異コロニー数の平均値

PROJECT No. H-00353

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide、SA : Sodium azide、9-AA : 9-Aminoacridine

2-AA : 2-Aminoanthracene

DMSO : Dimethyl sulfoxide

被験物質の名称 : β -アラニン

試験実施期間		2001年2月13日より2001年2月16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	
		TA 100	TA 1535	WP 2 uvrA	TA 98	TA 1537
-S9 mix	陰 性 対 照 (注射用蒸留水)	149	15	31	30	7
		142 (149)	7 (12)	24 (27)	30 (31)	9 (9)
		156	15	25	32	12
	312.5	127	16	26	39	12
		131 (131)	10 (12)	28 (30)	42 (39)	11 (11)
		134	11	35	35	10
	625	136	9	34	32	10
		139 (140)	19 (14)	23 (27)	27 (29)	10 (10)
		144	15	24	27	9
	1250	152	14	27	35	13
		144 (148)	17 (13)	26 (29)	43 (38)	11 (11)
		147	8	33	36	10
+S9 mix	陰 性 対 照 (注射用蒸留水)	130	12	21	24	8
		128 (130)	13 (13)	40 (30)	29 (28)	12 (9)
		132	14	30	31	8
	5000	148	15	29	38	10
		143 (148)	17 (16)	30 (29)	33 (35)	8 (12)
		152	16	28	33	17
	312.5	152	7	35	37	12
		162 (154)	19 (14)	31 (32)	34 (40)	9 (13)
		149	16	29	49	17
	625	147	19	37	48	17
		150 (148)	17 (20)	32 (33)	47 (45)	18 (17)
		146	24	29	40	16
陽 性 対 照	S9 mix を必要とし ないもの	145	15	36	50	13
		149 (148)	16 (16)	35 (34)	47 (47)	18 (14)
		150	18	31	44	11
	1250	132	27	29	46	13
		148 (148)	14 (20)	41 (35)	50 (43)	12 (11)
		164	18	35	33	9
	2500	161	16	30	50	10
		158 (159)	18 (15)	22 (30)	46 (48)	14 (13)
		158	12	37	47	16
	5000	131	18	27	32	10
		143 (140)	24 (20)	35 (31)	38 (35)	14 (12)
		146	19	32	36	13
対 照	名 称	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
		用量(μg /プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1
		コロニー数 /プレート	478	476	170	526
	S9 mix を必要と するもの	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		用量(μg /プレート)	1	2	10	0.5
		コロニー数 /プレート	853	239	886	636

[備考]

() : 復帰変異コロニー数の平均値

PROJECT No. H-00353

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA : Sodium azide, 9-AA : 9-Aminoacridine

2-AA : 2-Aminoanthracene

被験物質の名称 : β -アラニン

試験実施期間		2001年2月22日より2001年2月26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	
		TA 100	TA 1535	WP 2 uvrA	TA 98	TA 1537
-S9 mix	陰 性 対 照 (注射用蒸留水)	143	13	29	29	10
		153 (147)	12 (15)	19 (25)	31 (32)	14 (13)
		146	19	27	37	16
	312.5	155	14	29	41	17
		138 (148)	12 (12)	32 (30)	44 (41)	14 (16)
		151	10	29	38	17
	625	143	17	38	30	14
		158 (151)	11 (13)	13 (27)	40 (37)	10 (13)
		151	11	29	40	16
	1250	155	12	28	29	14
		154 (155)	16 (13)	28 (29)	35 (33)	13 (12)
		156	11	31	34	9
+S9 mix	陰 性 対 照 (注射用蒸留水)	143	13	23	34	15
		139 (143)	15 (14)	20 (27)	32 (37)	14 (13)
		147	13	37	45	11
	312.5	133	17	20	25	9
		126 (132)	11 (14)	30 (29)	38 (34)	11 (11)
		136	13	38	38	14
	625	149	20	26	39	17
		155 (153)	13 (14)	37 (33)	41 (44)	14 (15)
		154	10	37	51	15
	1250	153	23	35	42	18
		154 (155)	16 (18)	36 (33)	46 (45)	15 (17)
		158	15	29	47	18
陽 性 対 照	S9 mix を必要とし ないもの	148	14	36	43	18
		141 (142)	13 (16)	32 (34)	46 (46)	18 (18)
		136	20	33	50	17
	S9 mix を必要と するもの	149	16	30	42	10
		143 (146)	22 (18)	38 (35)	39 (40)	14 (12)
		147	17	37	38	13
	名 称	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
		用量(μ g/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1
		コロニー数 /プレート	555	519	222	466
	名 称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		用量(μ g/プレート)	1	2	10	0.5
		コロニー数 /プレート	1041	270	960	597
	名 称	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
		用量(μ g/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1
		コロニー数 /プレート	555	519	222	466
	名 称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		用量(μ g/プレート)	1	2	10	0.5
		コロニー数 /プレート	1041	270	960	597

[備考]

() : 復帰変異コロニー数の平均値

PROJECT No. H-00353

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA : Sodium azide, 9-AA : 9-Aminoacridine

2-AA : 2-Aminoanthracene

被験物質の名称： β -アラニン

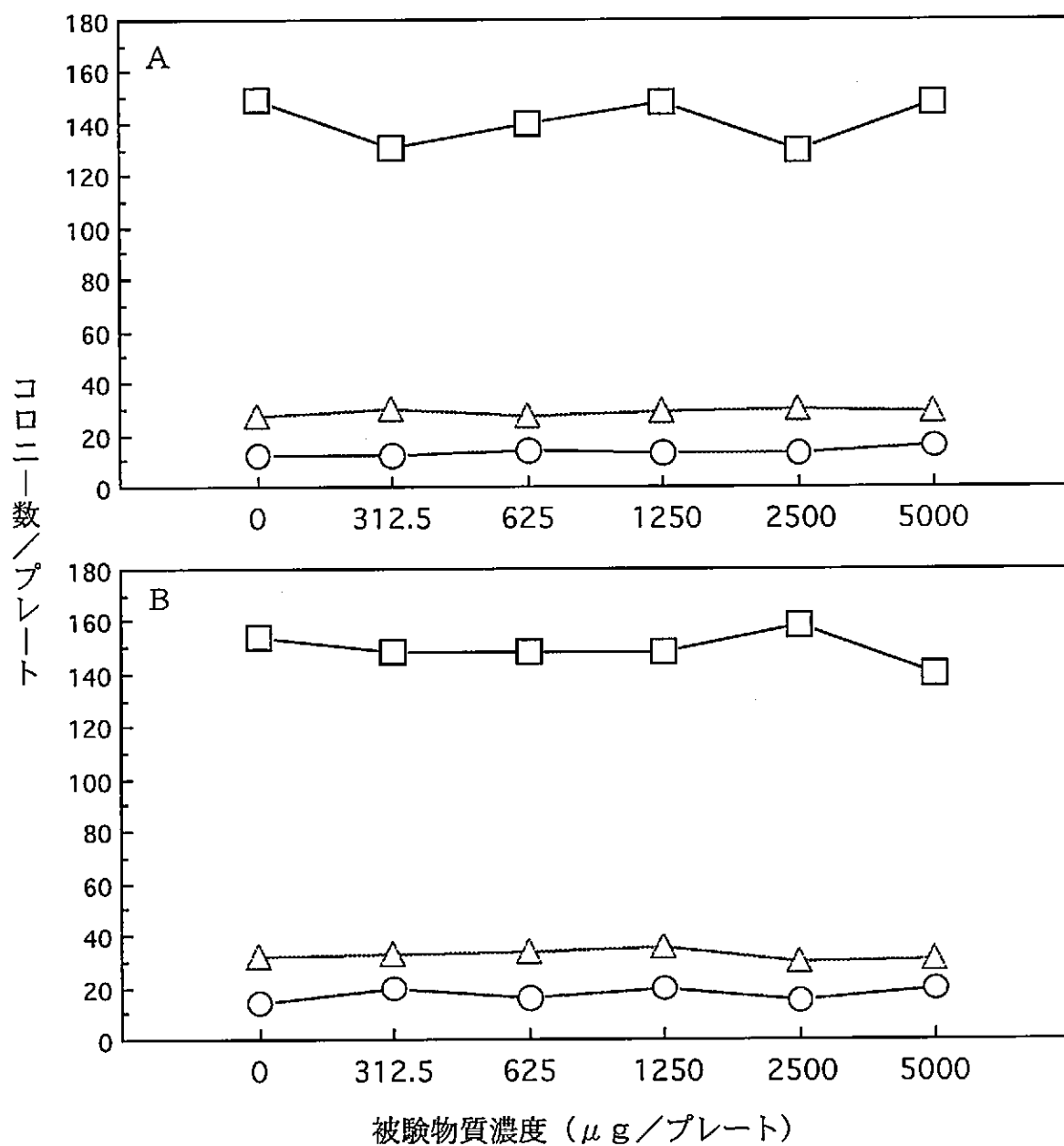


図1 用量—反応曲線 (塩基対置換型菌株, 本試験)

A : 代謝活性化によらない場合 (-S9)

B : 代謝活性化による場合 (+S9)

□ : TA100; ○ : TA1535; △ : WP2uvrA

PROJECT No. H-00353

被験物質の名称： β -アラニン

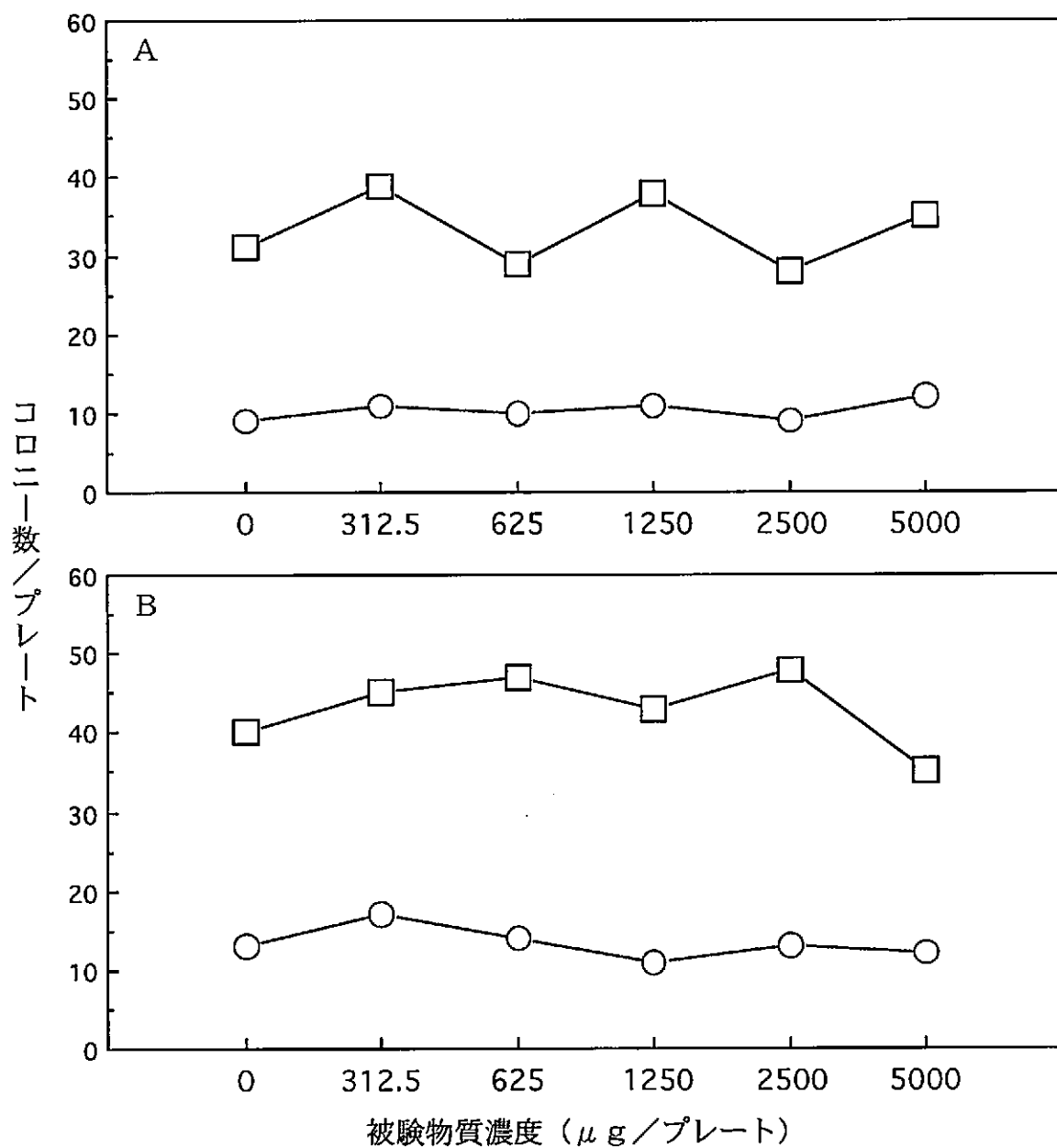


図2 用量-反応曲線 (フレームシフト型菌株, 本試験)

A: 代謝活性化によらない場合 (-S9)

B: 代謝活性化による場合 (+S9)

□: TA98 ; ○: TA1537

PROJECT No. H-00353

被験物質の名称：β-アラニン

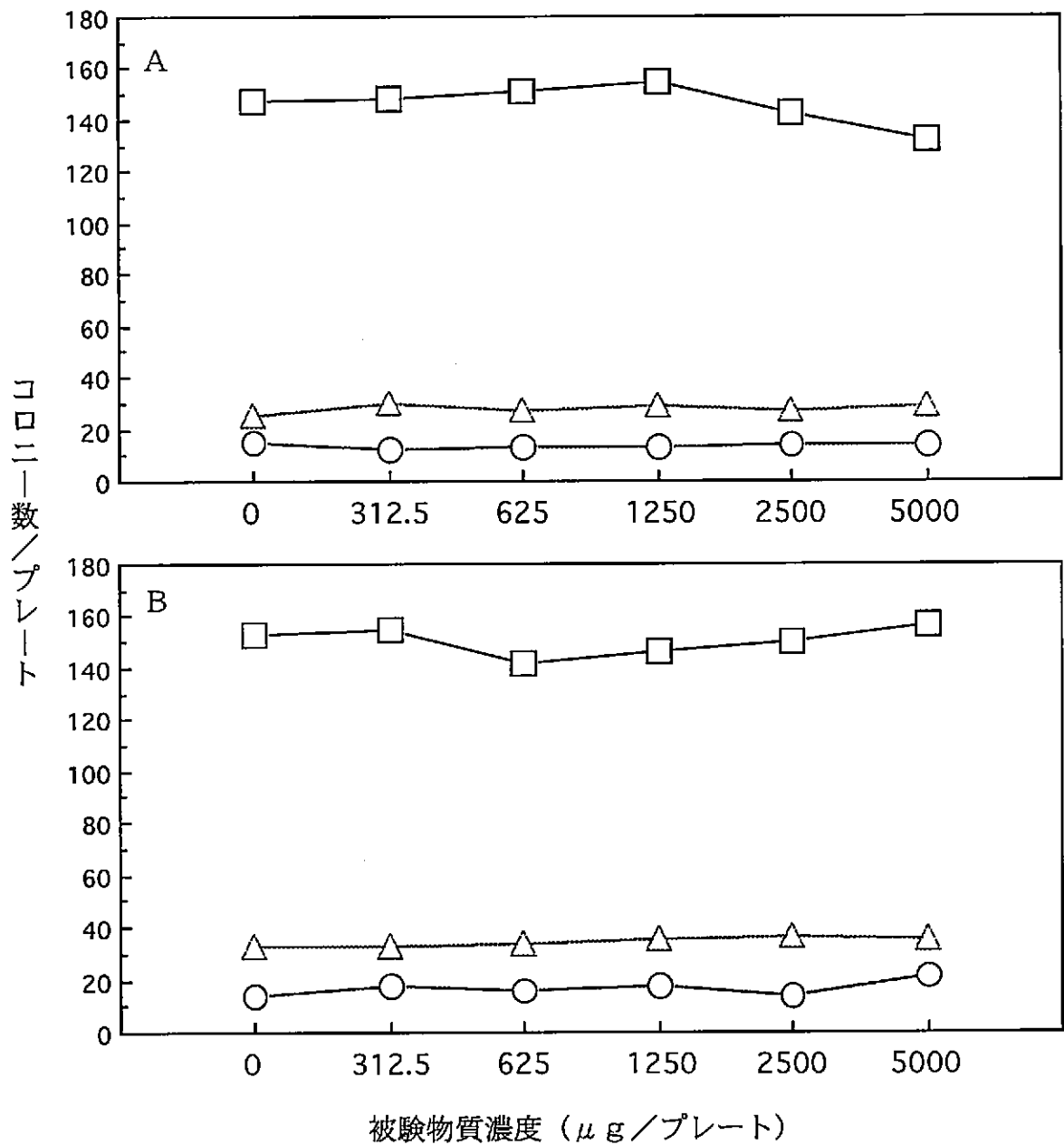


図3 用量-反応曲線（塩基対置換型菌株，確認試験）

A：代謝活性化によらない場合（-S9）

B：代謝活性化による場合（+S9）

□：TA100；○：TA1535；△：WP2uvrA

PROJECT No. H-00353

被験物質の名称： β -アラニン

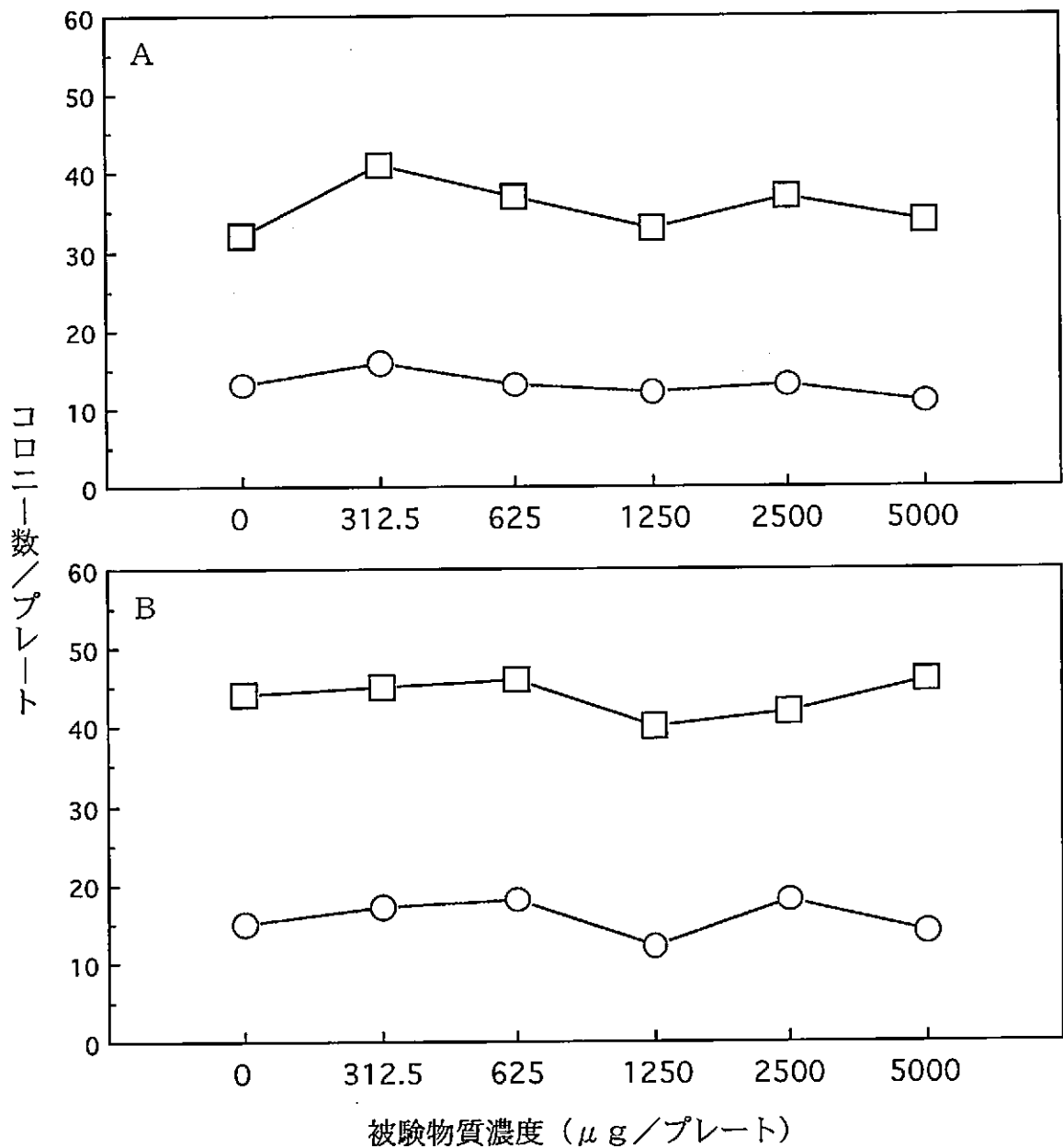


図4 用量-反応曲線（フレームシフト型菌株，確認試験）

A：代謝活性化によらない場合（-S9）

B：代謝活性化による場合（+S9）

□：TA98；○：TA1537

PROJECT No. H-00353

添付資料 1

背景データ (Plate法)

陰性対照	注射用蒸留水									
S 9 mix	-					+				
菌株名	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
N	47	17	37	47	17	45	17	35	45	17
Mean	131	13	36	25	9	140	14	40	35	15
S.D.	12	3	6	5	3	10	4	8	6	3
2S.D.	24	6	12	10	6	20	8	16	12	6
Mean-2S.D.	107	7	24	15	3	120	6	24	23	9
Mean+2S.D.	155	19	48	35	15	160	22	56	47	21

陽性対照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
S 9 mix	-					+				
菌株名	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
N	128	74	102	130	74	124	74	98	126	74
Mean	510	528	217	531	597	993	223	974	569	222
S.D.	42	47	35	37	60	97	29	103	47	37
2S.D.	84	94	70	74	120	194	58	206	94	74
Mean-2S.D.	426	434	147	457	477	799	165	768	475	148
Mean+2S.D.	594	622	287	605	717	1187	281	1180	663	296

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide、SA : Sodium azide、9-AA : 9-Aminoacridine、

2-AA : 2-Aminoanthracene

収集期間： 2000年 1月 4日～2000年12月28日

PROJECT No. H-00353

添付資料 1

背景データ (Preincubation法)

陰性対照	DMSO									
S 9 mix	-					+				
菌株名	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
N	261	250	232	247	268	253	241	226	241	258
Mean	133	12	35	24	9	142	14	41	34	14
S.D.	11	3	6	4	2	10	3	6	5	3
2S.D.	22	6	12	8	4	20	6	12	10	6
Mean-2S.D.	111	6	23	16	5	122	8	29	24	8
Mean+2S.D	155	18	47	32	13	162	20	53	44	20

陽性対照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
S 9 mix	-					+				
菌株名	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
N	251	237	223	237	255	245	233	219	233	245
Mean	512	516	216	519	592	966	223	941	557	221
S.D.	40	63	30	31	56	95	33	91	43	32
2S.D.	80	126	60	62	112	190	66	182	86	64
Mean-2S.D.	432	390	156	457	480	776	157	759	471	157
Mean+2S.D	592	642	276	581	704	1156	289	1123	643	285

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide、SA : Sodium azide、9-AA : 9-Aminoacridine、

2-AA : 2-Aminoanthracene

DMSO:Dimethyl sulfoxide

収集期間： 2000年1月4日～2000年12月28日

PROJECT No. H-00353

GENETIC TOXICITY IN VITRO (BACTERIAL TEST)

TEST SUBSTANCE

- Identity: β-Alanine (CAS No. 107-95-9)
- Remarks (source):
Purity: 98.2%
Stored at 4°C in dark until use. Stability during the period of use was confirmed by HPLC.

METHOD

- Method/guideline: OECD #471 and #472
- Type of test: Bacterial reverse mutation assay
- GLP: Yes
- Year (study performed): December 21, 2000 ~ February 26, 2001
- Species/Strain: Salmonella typhimurium TA100, TA1535, TA98, TA1537
Escherichia coli Wp2uvrA
- Metabolic activation:
Species and cell type:
Sprague-Dawley male rat liver homogenates (S9)
Quantity: The S9 of 50 μ L/plate was used.
Induced or not induced:
Induced with phenobarbital and 5,6-benzoflavone.
- Concentrations tested:
- S9: 0, 312.5, 625, 1250, 2500, 5000 μ g/plate (five strains)
+ S9: 0, 312.5, 625, 1250, 2500, 5000 μ g/plate (five strains)
- Statistical methods: No statistical method was followed.

Remarks field for Test Conditions

Test Design:

Procedure

- (1) Plate incorporation test with and without S9 using five strains
- (2) Pre-incubation test with and without S9 using five strains

Number of replicates: 2

Plates/dose: 3

Negative control: The solvent, pure water was used

Positive controls:

- S9 mix; 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide (TA100, TA98, WP2uvrA), sodium azide (TA1535) and 9-aminoacridine (TA1537)
+ S9 mix; 2-aminoanthracene (five strains).

Description of follow up repeat study:

A confirmation test was carried out in pre-incubation method as negative mutagenic effect (－) was noted in plate incorporation test.

Criteria for evaluating results:

The test substance was judged positive (+) when the number of revertant colonies in the test substance treated plates increased dose dependently and became two-fold or more compared to that of the negative control and this effect was reasonably reproducible or significant reproducible increase was noted at one or more concentrations at least in one strain with or without metabolic activation system and negative (－) when any of the above criteria were not fulfilled.

RESULTS

• Cytotoxic concentration:

Toxicity was not noted up to 5,000 μ g/plate in five strains with and without metabolic activation (S9 mix)

• Genotoxic effects:

- With metabolic activation
- Without metabolic activation

• Statistical analysis:

Statistical analysis was not done.

CONCLUSION

• Bacterial gene mutation:

- With metabolic activation
- Without metabolic activation

DATA QUALITY

• Reliabilities: Valid without restriction

Remarks field for Data Reliability

Well conducted study, carried out by Nippon Experimental Medical Research Institute Co. Ltd., Gunma, Japan.

REFERENCES

None

GENERAL REMARKS

None