

—最終報告書—

表 題 : ポリオキシエチレン p-ノニルフェニルエーテルの細菌を用いる  
復帰突然変異試験

試験番号 : SBL 79-14

当該資料は原本の正式な複写で  
あり、原本と相違ないことを保証い  
たします。

試験施設 : 株式会社 新日本科学 安全性研究所  
鹿児島県鹿児島郡吉田町宮之浦 2438 番地(〒891-1394)  
電話(099)294-2600, ファクシミリ(099)294-3619

## 最終報告書の作成

表 題 : ポリオキシエチレン p-ノニルフェニルエーテルの細菌を用いる  
復帰突然変異試験

試験番号 : SBL 79-14

本試験の最終報告書は、私の責任の下に作成しました。

署 名



## 陳 述 書

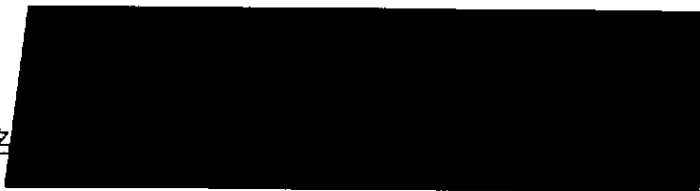
表 題 : ポリオキシエチレン p-ノニルフェニルエーテルの細菌を用いる  
復帰突然変異試験

試験番号 : SBL 79-14

本試験は、OECD Principles of Good Laboratory Practice (revision in 1997)および OECD Guidelines for Testing of Chemicals 471 (Bacterial Reverse Mutation Test, Adopted: 21st July 1997)に準拠して実施し、また、本試験の最終報告書は試験の方法を正確に記載し、生データを正確に反映したものに相違ありません。

試験責任者

(所 属) 株式会社 新日本科学 安全性研究所

署名  01 年 3 月 29 日

# QAU 陳述書

表 題 : ポリオキシエチレン p-ノニルフェニルエーテルの細胞を用いる  
復帰突然変異試験

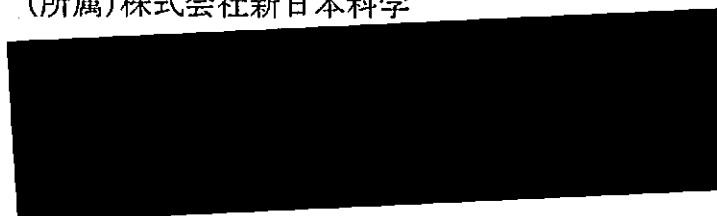
試験番号 : SBL 79-14

本試験は、OECD Principles of Good Laboratory Practice (revision in 1997)および OECD Guidelines for Testing of Chemicals 471 (Bacterial Reverse Mutation Test, Adopted: 21st July 1997)に準拠して実施され、また、本試験の最終報告書は試験の方法を正確に記載し、生データを正確に反映したものに相違ありません。

査察項目	査察実施日	試験責任者 への報告日	運営管理者 への報告日
試験計画書	2000 年 12 月 6 日	2000 年 12 月 6 日	2000 年 12 月 6 日
試験スケジュール	2000 年 12 月 6 日	2000 年 12 月 6 日	2000 年 12 月 6 日
被験物質保管状態	2000 年 12 月 26 日	2000 年 12 月 28 日	2000 年 12 月 28 日
被験物質溶液の調製	2000 年 12 月 26 日	2000 年 12 月 28 日	2000 年 12 月 28 日
被験物質溶液の濃度測定	2000 年 12 月 26 日	2000 年 12 月 28 日	2000 年 12 月 28 日
投与	2000 年 12 月 26 日	2000 年 12 月 28 日	2000 年 12 月 28 日
コロニーカウント	2000 年 12 月 28 日	2000 年 12 月 28 日	2000 年 12 月 28 日
被験物質溶液の調製	2001 年 1 月 24 日	2001 年 1 月 24 日	2001 年 1 月 29 日
被験物質溶液の濃度測定	2001 年 1 月 24 日	2001 年 1 月 24 日	2001 年 1 月 29 日
試験計画書変更確認書(No. 1)	2001 年 1 月 25 日	2001 年 1 月 25 日	2001 年 1 月 29 日
試験計画書変更確認書(No. 2)	2001 年 2 月 23 日	2001 年 2 月 23 日	2001 年 2 月 26 日
試験計画書変更確認書(No. 3)	2001 年 3 月 2 日	2001 年 3 月 2 日	2001 年 3 月 5 日
書類・生データ	2001 年 3 月 7 日	2001 年 3 月 7 日	2001 年 3 月 9 日
最終報告書草案	2001 年 3 月 7 日	2001 年 3 月 7 日	2001 年 3 月 9 日
最終報告書草案	2001 年 3 月 8 日	2001 年 3 月 8 日	2001 年 3 月 9 日
最終報告書	2001 年 3 月 29 日	2001 年 3 月 29 日	2001 年 3 月 29 日

QAU 責任者

(所属)株式会社新日本科学



2001 年 3 月 29 日

試験結果報告書の内容に関するお問い合わせには応じかねますので御了承下さい。

試験責任者, その他試験に従事した研究者全員の氏名および業務分担

・試験責任者

〒891-1394 鹿児島県鹿児島郡吉田町宮之浦 2438 番地

・最終報告書の作成

〒891-1394 鹿児島県鹿児島郡吉田町宮之浦 2438 番地

・被験物質溶液の調製

・被験物質溶液の分析

・復帰突然変異試験実施者

・試験物質管理責任者

記録および資料の保存場所

株式会社新日本科学内のデータ資料室(記録, 資料)

## 目 次

	頁
要 約	1
緒 言	2
材料および方法	3
1. 被験物質	3
2. 被験物質溶液の調製方法	3
3. 試験菌株の種類	4
4. 培地の組成および作製	4
5. S 9 Mix の調製	5
6. 陰性および陽性対照	5
7. 被験物質の用量設定	6
8. 試験操作, 処理時間およびプレート数	6
1) 試験菌株の前培養	6
2) 試験操作手順	6
9. 生育阻害の観察および復帰変異コロニー数の測定	7
10. 結果の判定基準	7
11. 統計学的手法	7
12. 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因 および試験計画書に従わなかったこと	8
結 果	9
考 察	10
文 献	11
表 1, 2	
図 1～4	
別紙 1～4	

## 要 約

ポリオキシエチレン p-ノニルフェニルエーテルの遺伝子突然変異誘発性を評価するため、細菌を用いる復帰突然変異試験を *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 および *Escherichia coli* WP2uvr A の 5 菌株を用いてプレインキュベーション法により実施した。

被験物質の用量は、非代謝活性化法および代謝活性化法ともに 5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  を最高用量に以下 2500, 1250, 625, 313, 156  $\mu\text{g}/\text{plate}$  の 6 段階とし、2 回の繰り返し試験を行った。

その結果、ポリオキシエチレン p-ノニルフェニルエーテルは 2 回の繰り返し試験において、使用した 5 菌株に対し、代謝活性化系の有無にかかわらず、陰性対照と比較して 2 倍以上の復帰変異コロニー数を増加させなかった。試験菌株に対する生育阻害および被験物質の析出は、5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  までみられなかった。

以上の結果から、本試験条件下では、ポリオキシエチレン p-ノニルフェニルエーテルは代謝活性化系の有無にかかわらず、遺伝子突然変異誘発性を示さないと結論した。

## 緒 言

本試験の目的は、ポリオキシエチレン p-ノニルフェニルエーテルの遺伝子突然変異誘発性を評価することである。本試験は、OECD Principles of Good Laboratory Practice (revision in 1997)および OECD Guidelines for Testing of Chemicals 471 (Bacterial Reverse Mutation Test, Adopted: 21st July 1997)に準拠して実施した。

試験開始日:2000 年 12 月 6 日

実験開始日:2000 年 12 月 25 日

実験終了日:2001 年 1 月 26 日

試験終了日:2001 年 3 月 29 日

試験委託者:経済産業省(旧通商産業省) 製品評価技術センター  
化学物質安全管理センター

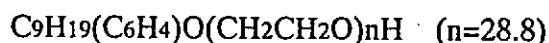
〒151-0066 東京都渋谷区西原 2-49-10



## 材料および方法

## 1. 被験物質

被験物質は、経済産業省(旧通商産業省) 製品評価技術センター 化学物質安全管理センターから2000年9月25日に提供を受けたポリオキシエチレン p-ノニルフェニルエーテル(ロ  
 [REDACTED])を使用した。ポリオキシエチレン p-ノニルフェニルエーテルは、分子量 1488, 純度 100 wt%, 融点 29.0℃の白色固体で、下記に示す示性式を有している。被験物質は、水およびイソプロパノールに可溶である。被験物質の安定性は、実験終了後に株式会社新日本科学で純度を測定し、安定性を確認した (Stability of the Test Article, Certificate No.:790210-3, 別紙 1)。被験物質は株式会社新日本科学試験物質保管所内の温度 20±4℃に設定した常温室[受領日～最終調製日(2000年9月25日～2001年1月24日):温度 18.5～23.9℃]に遮光下で密封容器内で保存した。なお、残余被験物質は、SBL79-02 での保存用被験物質(約 1 g)を除き、全て試験委託者に返却した。



ポリオキシエチレン p-ノニルフェニルエーテルの示性式

## 2. 被験物質溶液の調製方法

溶媒は、注射用水(ロット番号:0G73, 0J86, 株式会社大塚製薬工場)を使用した。被験物質を注射用水に溶解し、最高濃度溶液(50 mg/mL)を調製し、以下注射用水で順次希釈により各濃度溶液を調製した。なお、調製は用時に行った。ポリオキシエチレン p-ノニルフェニルエーテルの 0.1 および 200 mg/mL 濃度の調製液は、室温、遮光下で7日間の安定性があることが株式会社新日本科学で確認されている (Stability of the Test Article in the Dosing Preparation, Certificate No.:790210-2, 別紙 2)。また、本試験の最高および最低濃度である 50 および 1.56 mg/mL 調製液について、被験物質濃度を株式会社新日本科学において HPLC を用いて測定した結果、表示濃度の±5%の範囲内であったことを確認した (Concentration of the Test Article in the Dosing Preparation, Certificate No.:7914-1, 7914-2, 別紙 3, 4)。

### 3. 試験菌株の種類

試験菌株は、塩基対置換型の突然変異検出系として *Salmonella typhimurium* (ネズミチフス菌) TA100, TA1535 および *Escherichia coli* (大腸菌) WP2uvr A を、フレームシフト型の突然変異検出系として *Salmonella typhimurium* TA98, TA1537 の計 5 菌株を使用した。これらの菌株は、1993 年 4 月 20 日に国立医薬品食品衛生研究所(元国立衛生試験所)から分与を受けた。各菌株は、菌懸濁液 0.8 mL, DMSO 0.07 mL の容量比で凍結保存用菌懸濁液として調製し、少量ずつサンプルチューブに分注して、 $-80^{\circ}\text{C}$  に温度設定した超低温フリーザー (MDF- 290AT, サンヨー電機特機株式会社) 中で凍結保存した。これらの菌株は、定期的に遺伝特性<sup>1)</sup>を確認した(特性検査実施日:2000 年 12 月 5 日)ものを用時に解凍して使用した。

### 4. 培地の組成および作製

前培養液には、ニュートリエントブロス No.2(ロット番号:213519, Unipath Oxoid)の 2.5%水溶液を用いた。

最少グルコース寒天平板培地 3000 mL あたりの調製は、常法<sup>1), 2)</sup>に従った。すなわち、10 倍濃度の Vogel-Bonner E 培地 300 mL, 20%D-グルコース溶液 300 mL およびバクトアガー(ロット番号:143176, 0130004, Difco Laboratories) 45 g を含む寒天溶液 2400 mL をそれぞれ高圧蒸気滅菌( $121^{\circ}\text{C}$ , 20 分間)後に混合し、全 3000 mL とした。この混合液を  $\gamma$ 線滅菌済み 9 cm プラスチックシャーレに 30 mL ずつ分注して水平面上で固化させ、余分な水分を蒸発させたものを使用した。

重層用のトップアガーは、0.6 w/v%バクトアガー・0.5 w/v%塩化ナトリウム水溶液を調製し、高圧蒸気滅菌した軟寒天液に、ネズミチフス菌培養用には 0.5 mM L-ヒスチジン(ロット番号:DSQ3703, 和光純薬工業株式会社)・0.5 mM D-ビオチン(ロット番号:ACP3225, 和光純薬工業株式会社)水溶液を、また、大腸菌培養用には 0.5 mM L-トリプトファン(ロット番号:KSQ2830, 和光純薬工業株式会社)水溶液をそれぞれ 0.22  $\mu\text{m}$  シリンジフィルターで濾過滅菌し、試験直前に容量比 10:1 の割合で混合したものを使用した。なお、トップアガーは、試験に使用するまで  $45^{\circ}\text{C}$  に温度設定したウォーターバス中で保温した。

## 5. S 9 Mix の調製

S 9 Mix は常法<sup>1)</sup>に従って次頁に示した組成に用時調製した。なお、S 9 は、薬物代謝酵素系の誘導剤としてフェノバルビタールおよび5, 6 - ベンゾフラボンを経口投与した雄性ラット (SD 系, 7 週齢, 体重 213~252 g) の肝臓より 2000 年 11 月 10 日に調製した市販の S 9 (ロット番号: RAA-435, キッコーマン株式会社) を使用した。

[S 9 Mix 50 mL あたりの組成]	添加量
S 9	5.0 mL
0.4M MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1.0 mL
1.65M KCl	1.0 mL
G-6-P (ロット番号: 115002, オリエンタル酵母工業株式会社)	85.0 mg
NADPH (ロット番号: 050006, 050007, オリエンタル酵母工業株式会社)	181.0 mg
NADH (ロット番号: 010034, オリエンタル酵母工業株式会社)	152.5 mg
0.2M Na-リン酸緩衝液 (pH7.4)	25.0 mL
蒸留水	18.0 mL
G-6-P: D-Glucose 6-phosphate, disodium salt	
NADPH: $\beta$ -Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate reduced form	
NADH: $\beta$ -Nicotinamide-adenine dinucleotide reduced form	

調製方法は、次の通りとした。G-6-P, NADPH および NADH を蒸留水に溶解し、1.65 M KCl, 0.4M MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O および 0.2M Na-リン酸緩衝液を加え補酵素溶液とした。補酵素溶液を 0.22  $\mu$ m シリンジフィルターで濾過滅菌した後、S 9 を加え S 9 Mix とした。

## 6. 陰性および陽性対照

陰性対照は注射用水を使用し、陽性対照は以下に示す陽性対照物質を DMSO (ロット番号: 99H0020, 99.5% 以上, GC 分析用, シグマアルドリッチジャパン株式会社) に溶解後、設定濃度に希釈調製し、分注凍結保存 (-20℃) したものを試験の都度解凍して使用した<sup>1)</sup>。

菌株	非代謝活性化法		代謝活性化法	
	陽性対照物質	用量( $\mu$ g/plate)	陽性対照物質	用量( $\mu$ g/plate)
TA100	AF-2	0.01	2AA	1
TA1535	ENNG	5	2AA	2
WP2uvr A	ENNG	2	2AA	10
TA98	AF-2	0.1	2AA	0.5
TA1537	9AA	80	2AA	2

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (ロット番号: SAJ0748, 純度 99.4%, 特級, 和光純薬工業株式会社)

- ENNG : *N*-Ethyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (ロット番号: V1A8648, 純度 97%, 特級, ナカライテスク株式会社)
- 9AA : 9-Aminoacridine hydrochloride monohydrate (ロット番号: M0T3555, 純度 95%, 特級, ナカライテスク株式会社)
- 2AA : 2-Aminoanthracene (ロット番号: DSR3205, 純度 92.6%, 和光純薬工業株式会社)

## 7. 被験物質の用量設定

先に株式会社新日本科学で実施した用量設定試験(試験番号: SBL79-11, 用量: 0, 19.5, 78.1, 313, 1250, 5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ )において非代謝活性化法および代謝活性化法ともに, 用いた全ての菌株においても 5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  まで変異原性, 生育阻害および被験物質の析出がみられなかった. 従って, 本試験では, 5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  を最高用量にして公比 2 で 6 段階の用量を設定することとした.

## 8. 試験操作, 処理時間およびプレート数

### 1) 試験菌株の前培養

前培養は, 2.5% ニュートリエントブロス No.2 水溶液 10 mL をガラス製 L 字型試験管に分注し, 高圧蒸気滅菌(121°C, 20 分間)した後, -80°C に凍結保存した菌懸濁液を解凍して培養液 10 mL あたり 0.02 mL を接種した<sup>3)</sup>. 前培養は恒温振盪培養装置(DX-80, 大洋科学工業株式会社)で 37°C, 12 時間振盪培養(往復式, 90 回/分, 振幅 3.3 cm)した. なお, 培養終了後の菌懸濁液は, 菌濃度が  $1 \times 10^9$  以上であることを分光光度計(測定波長 660 nm, UV-120-02, 株式会社島津製作所)で確認し, 試験に使用した.

### 2) 試験操作手順

試験はプレインキュベーション法<sup>4), 5)</sup>を採用し, 非代謝活性化法および代謝活性化法で試験を実施した. なお, 試験は, OECD Guidelines for Testing of Chemicals 471 に従い, 2 回の繰り返し試験を実施した.

滅菌済みの小試験管(13×100 mm)に 0.1 M Na-リン酸緩衝液(pH 7.4, 非代謝活性化法)あるいは S 9 Mix(代謝活性化法)0.5 mL および前培養した菌懸濁液 0.1 mL を加えた.

次に、陰性対照液および被験物質溶液を 0.1 mL, または陽性対照溶液を 0.1 mL 加え、37℃の恒温振盪培養装置で 20 分間振盪(120 回/分)した。振盪培養終了後、保温しておいたトップアガー 2 mL を加え、混合した後、最少グルコース寒天平板培地上に重層し、プレート进行動かしながら一様に広げた。水平面上に放置し、トップアガーが固まった後、プレートを上下転倒して 37℃のヒーター式インキュベーター (MIR-260, サンヨー電機特機株式会社) 内で 48 時間培養した<sup>3)</sup>。プレート数は、非代謝活性化法および代謝活性化法のいずれにおいても各群 3 枚とした。

なお、使用した溶媒、被験物質溶液および S 9 Mix への雑菌の混入の有無を確認するため、溶媒、被験物質溶液 0.1 mL あるいは S 9 Mix 0.5 mL にトップアガー 2 mL を加え、混合した後、最少グルコース寒天平板培地上に注ぎ、同様に 37℃で 48 時間培養した。

#### 9. 生育阻害の観察および復帰変異コロニー数の測定

肉眼および実体顕微鏡(40 倍)を用いてバックグラウンドの菌の生育阻害の状態および被験物質の析出の有無を観察した。復帰変異コロニー数は、肉眼により測定した。ただし、陽性対照群については自動コロニーカウンター(CA-7A, 東洋測器株式会社)を用いて 1 枚のプレートにつき 2 回の読み取りを実施(約 90 度回転)し、その平均値を測定値とした。

#### 10. 結果の判定基準

結果は、被験物質処理群においてプレートあたりの復帰変異コロニー数(平均値)が陰性対照の 2 倍以上に増加し、用量の増加とともに復帰変異コロニー数が増加を示し、かつ、2 回の試験の間に再現性が確認された場合に陽性と判定することとし、それ以外の場合は陰性と判定することとした。

#### 11. 統計学的手法

結果についての統計学的処理は行わなかった。

12. 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因および試験計画書に従わなかったこと

試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因および試験計画書に従わなかったことはなかった。

## 結 果

1 回目試験の結果を表 1 に, 2 回目試験の結果を表 2 に示し, 1 回目試験の用量－反応曲線を図 1, 2 に, 2 回目試験の用量－反応曲線を図 3, 4 に示した.

1 回目および 2 回目試験ともに, 156, 313, 625, 1250, 2500 および 5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  の 6 段階で行った. その結果, 使用した 5 菌株に対し, 代謝活性化系の有無にかかわらず, 陰性対照と比較して 2 倍以上の復帰変異コロニー数を増加させなかった. 試験菌株に対する生育阻害および被験物質の析出は, 5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  までみられなかった. また, 1 回目および 2 回目試験ともに, 陰性対照および陽性対照の各菌株の復帰変異コロニー数は, 当社の背景データ<sup>6)</sup>の範囲内にあった.

なお, 使用した溶媒, 被験物質溶液および S 9 Mix への雑菌の混入の有無を確認するために行った確認試験では, 溶媒, 被験物質溶液および S 9 Mix ともに菌の生育は認められなかった.

## 考 察

ポリオキシエチレン p-ノニルフェニルエーテルの遺伝子突然変異誘発性の評価を *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 および *Escherichia coli* WP2uvr A の 5 菌株を用いてプレインキュベーション法で行った。被験物質の用量は、非代謝活性化法および代謝活性化法ともに 5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  を最高用量に、以下 2500, 1250, 625, 313, 156  $\mu\text{g}/\text{plate}$  の 6 段階とし、2 回の繰り返し試験を行った。

ポリオキシエチレン p-ノニルフェニルエーテルは、2 回の繰り返し試験のいずれにおいても、使用した 5 菌株に対し、代謝活性化系の有無にかかわらず、陰性対照と比較して 2 倍以上の復帰変異コロニー数を増加させなかったことから、ポリオキシエチレン p-ノニルフェニルエーテルの遺伝子突然変異誘発性は陰性であると判断した。試験菌株に対する生育阻害および被験物質の析出は、5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  までみられなかった。

また、陰性対照および陽性対照の各菌株の復帰変異コロニー数は、当社の背景データ<sup>6)</sup>の範囲内にあったことから、本試験は適切な条件下で実施されたと判断した。

以上の結果から、本試験条件下では、ポリオキシエチレン p-ノニルフェニルエーテルは代謝活性化系の有無にかかわらず、遺伝子突然変異誘発性を示さないと結論した。



## 文 献

- 1 労働省安全衛生部化学物質調査課:安衛法における変異原性試験, 中央労働災害防止協会, 東京, 1991
- 2 Maron, D. M. and Ames, B. N.: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutation Res.*, 113, 173-215, 1983
- 3 松島泰次郎:微生物変異原性試験, 31~42, 毒性試験講座 12, 変異原性・遺伝毒性, 地人書館, 東京, 1991
- 4 Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E.: Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays. *Mutation Res.*, 312, 217-233, 1994
- 5 Matsushima, T., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A., and Sawamura, M.: Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests. In: Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens. Ed. Norpoth K.H. and Garner, R.C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York., 273-285, 1980
- 6 復帰突然変異試験—対照群背景データ集(プレインキュベーション法, 1991~2000 年), 株式会社新日本科学社内資料

被験物質の名称:ポリオキシエチレンp-ノニルフェニルエーテル

代謝活性化系の有無		被験物質濃度 (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	WP2uvr A	TA98	TA1537
S 9 Mix  ( - )	陰 性 対 照 注射用水	129 , 125 , 126 ( 127 )	11 , 16 , 13 ( 13 )	24 , 23 , 18 ( 22 )	26 , 22 , 32 ( 27 )	9 , 6 , 10 ( 8 )	
	156	139 , 139 , 130 ( 136 )	10 , 18 , 12 ( 13 )	19 , 19 , 23 ( 20 )	38 , 33 , 28 ( 33 )	13 , 7 , 9 ( 10 )	
	313	134 , 115 , 140 ( 130 )	11 , 9 , 11 ( 10 )	25 , 21 , 18 ( 21 )	24 , 29 , 27 ( 27 )	13 , 5 , 11 ( 10 )	
	625	136 , 116 , 144 ( 132 )	13 , 15 , 15 ( 14 )	19 , 23 , 24 ( 22 )	30 , 36 , 21 ( 29 )	7 , 3 , 5 ( 5 )	
	1250	132 , 138 , 158 ( 143 )	16 , 13 , 9 ( 13 )	26 , 25 , 22 ( 24 )	34 , 38 , 32 ( 35 )	12 , 5 , 12 ( 10 )	
	2500	127 , 115 , 141 ( 128 )	9 , 9 , 14 ( 11 )	23 , 21 , 24 ( 23 )	38 , 40 , 46 ( 41 )	8 , 9 , 10 ( 9 )	
	5000	128 , 111 , 113 ( 117 )	12 , 16 , 9 ( 12 )	27 , 23 , 18 ( 23 )	51 , 32 , 41 ( 41 )	8 , 8 , 11 ( 9 )	
S 9 Mix  ( + )	陰 性 対 照 注射用水	124 , 125 , 122 ( 124 )	18 , 12 , 14 ( 15 )	24 , 25 , 27 ( 25 )	31 , 32 , 32 ( 32 )	13 , 9 , 9 ( 10 )	
	156	131 , 125 , 135 ( 130 )	10 , 14 , 17 ( 14 )	23 , 21 , 32 ( 25 )	33 , 48 , 29 ( 37 )	6 , 5 , 12 ( 8 )	
	313	129 , 119 , 121 ( 123 )	11 , 18 , 11 ( 13 )	29 , 32 , 43 ( 35 )	44 , 51 , 38 ( 44 )	8 , 12 , 8 ( 9 )	
	625	141 , 139 , 120 ( 133 )	10 , 12 , 5 ( 9 )	34 , 26 , 35 ( 32 )	45 , 46 , 49 ( 47 )	10 , 15 , 9 ( 11 )	
	1250	134 , 136 , 155 ( 142 )	11 , 10 , 12 ( 11 )	28 , 31 , 28 ( 29 )	40 , 38 , 53 ( 44 )	15 , 7 , 13 ( 12 )	
	2500	148 , 132 , 147 ( 142 )	16 , 16 , 11 ( 14 )	31 , 30 , 27 ( 29 )	59 , 36 , 49 ( 48 )	6 , 12 , 14 ( 11 )	
	5000	119 , 127 , 124 ( 123 )	11 , 11 , 16 ( 13 )	24 , 27 , 34 ( 28 )	58 , 43 , 46 ( 49 )	11 , 15 , 15 ( 14 )	
陽 性 対 照	S9Mixを 必要と しないもの	名 称	AF-2	ENNG	ENNG	AF-2	9AA
		濃度(μg/プレート)	0.01	5	2	0.1	80
		コロニー数/プレート	574 , 419 , 502 ( 498 )	177 , 197 , 207 ( 194 )	976 , 912 , 977 ( 955 )	416 , 405 , 414 ( 412 )	425 , 840 , 920 ( 728 )
	S9Mixを 必要と するもの	名 称	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
		濃度(μg/プレート)	1	2	10	0.5	2
		コロニー数/プレート	963 , 995 , 993 ( 984 )	146 , 183 , 162 ( 164 )	380 , 385 , 402 ( 389 )	728 , 832 , 796 ( 785 )	271 , 224 , 270 ( 255 )

(備考)

- ( )内の数値は3枚のプレートの平均値。
- 陽性対照物質の名称  
AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide  
ENNG: N-Ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine  
9AA: 9-Aminoacridine hydrochloride monohydrate  
2AA: 2-Aminoanthracene

被験物質の名称:ポリオキシエチレンp-ノニルフェニルエーテル

代謝活性化系の有無		被験物質濃度 (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	WP2uvr A	TA98	TA1537
S 9 Mix ( - )	陰 性 対 照 注射用水	118 , 125 , 113 ( 119 )	18 , 18 , 21 ( 19 )	29 , 32 , 30 ( 30 )	29 , 32 , 31 ( 31 )	14 , 8 , 7 ( 10 )	
	156	120 , 117 , 123 ( 120 )	19 , 19 , 15 ( 18 )	27 , 22 , 23 ( 24 )	37 , 39 , 34 ( 37 )	11 , 13 , 14 ( 13 )	
	313	129 , 143 , 145 ( 139 )	19 , 16 , 12 ( 16 )	29 , 31 , 21 ( 27 )	39 , 39 , 38 ( 39 )	15 , 15 , 10 ( 13 )	
	625	147 , 148 , 141 ( 145 )	18 , 21 , 16 ( 18 )	22 , 24 , 23 ( 23 )	38 , 42 , 39 ( 40 )	12 , 15 , 13 ( 13 )	
	1250	151 , 124 , 127 ( 134 )	12 , 20 , 21 ( 18 )	25 , 25 , 26 ( 25 )	37 , 39 , 33 ( 36 )	7 , 14 , 12 ( 11 )	
	2500	135 , 136 , 139 ( 137 )	17 , 21 , 15 ( 18 )	28 , 24 , 21 ( 24 )	43 , 54 , 40 ( 46 )	13 , 8 , 7 ( 9 )	
	5000	129 , 116 , 118 ( 121 )	16 , 17 , 13 ( 15 )	34 , 24 , 30 ( 29 )	46 , 46 , 36 ( 43 )	10 , 9 , 9 ( 9 )	
S 9 Mix ( + )	陰 性 対 照 注射用水	114 , 142 , 118 ( 125 )	12 , 15 , 19 ( 15 )	34 , 34 , 31 ( 33 )	47 , 41 , 39 ( 42 )	11 , 12 , 12 ( 12 )	
	156	108 , 113 , 104 ( 108 )	11 , 13 , 17 ( 14 )	29 , 31 , 34 ( 31 )	31 , 49 , 47 ( 42 )	10 , 10 , 11 ( 10 )	
	313	104 , 102 , 119 ( 108 )	12 , 23 , 11 ( 15 )	26 , 31 , 27 ( 28 )	43 , 49 , 40 ( 44 )	14 , 8 , 8 ( 10 )	
	625	115 , 134 , 122 ( 124 )	10 , 20 , 11 ( 14 )	34 , 35 , 35 ( 35 )	50 , 56 , 36 ( 47 )	12 , 15 , 10 ( 12 )	
	1250	118 , 119 , 114 ( 117 )	17 , 19 , 17 ( 18 )	37 , 36 , 26 ( 33 )	57 , 39 , 47 ( 48 )	14 , 7 , 14 ( 12 )	
	2500	127 , 153 , 118 ( 133 )	19 , 21 , 23 ( 21 )	35 , 29 , 31 ( 32 )	57 , 48 , 37 ( 47 )	6 , 14 , 7 ( 9 )	
	5000	114 , 110 , 124 ( 116 )	13 , 16 , 12 ( 14 )	20 , 38 , 24 ( 27 )	48 , 35 , 40 ( 41 )	11 , 6 , 12 ( 10 )	
陽 性 対 照	S9Mixを 必要と しないもの	名 称	AF-2	ENNG	ENNG	AF-2	9AA
		濃度(μg/プレート)	0.01	5	2	0.1	80
		コロニー数/プレート	417 , 450 , 435 ( 434 )	316 , 306 , 286 ( 303 )	754 , 705 , 710 ( 723 )	580 , 591 , 578 ( 583 )	677 , 537 , 716 ( 643 )
	S9Mixを 必要と するもの	名 称	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
		濃度(μg/プレート)	1	2	10	0.5	2
		コロニー数/プレート	1274 , 1229 , 1158 ( 1220 )	221 , 171 , 251 ( 214 )	414 , 423 , 396 ( 411 )	514 , 524 , 516 ( 518 )	270 , 243 , 242 ( 252 )

(備 考)

- ( ) 内の数値は 3 枚のプレートの平均値。
- 陽性対照物質の名称  
AF-2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide  
ENNG: N-Ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine  
9AA: 9-Aminoacridine hydrochloride monohydrate  
2AA: 2-Aminoanthracene

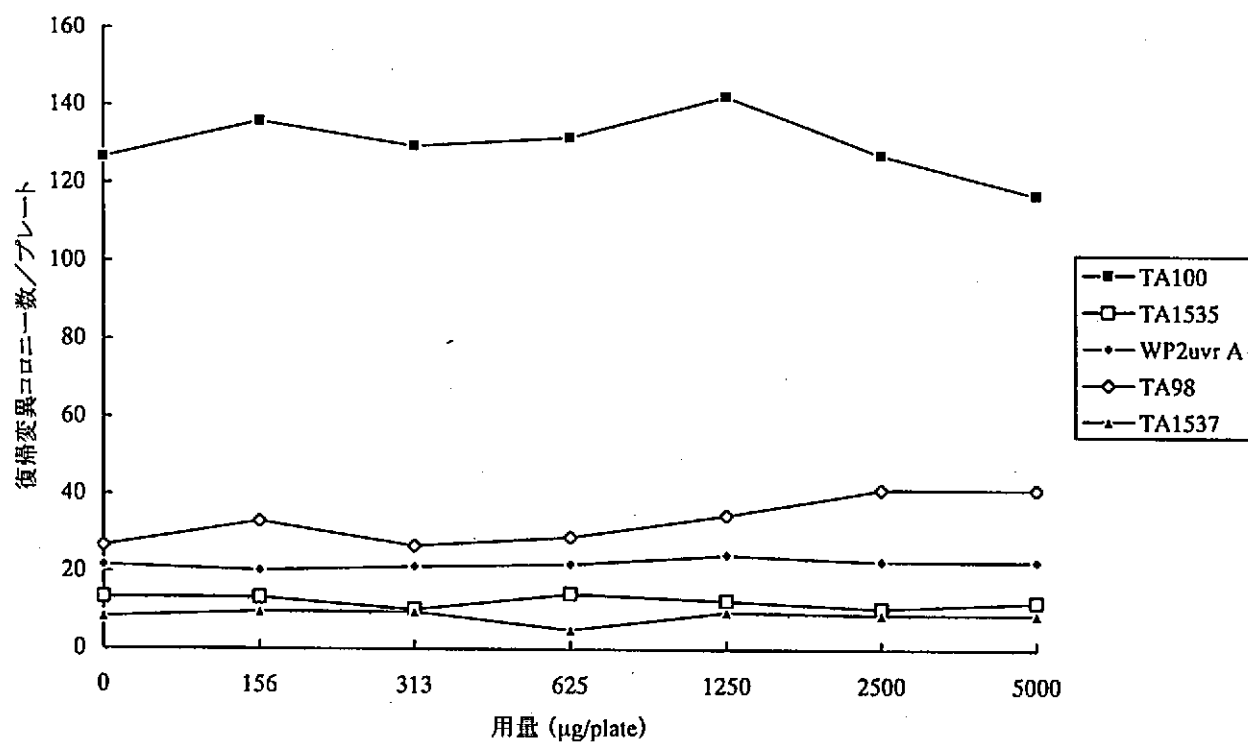


図1 1回目試験結果 (非代謝活性化法)

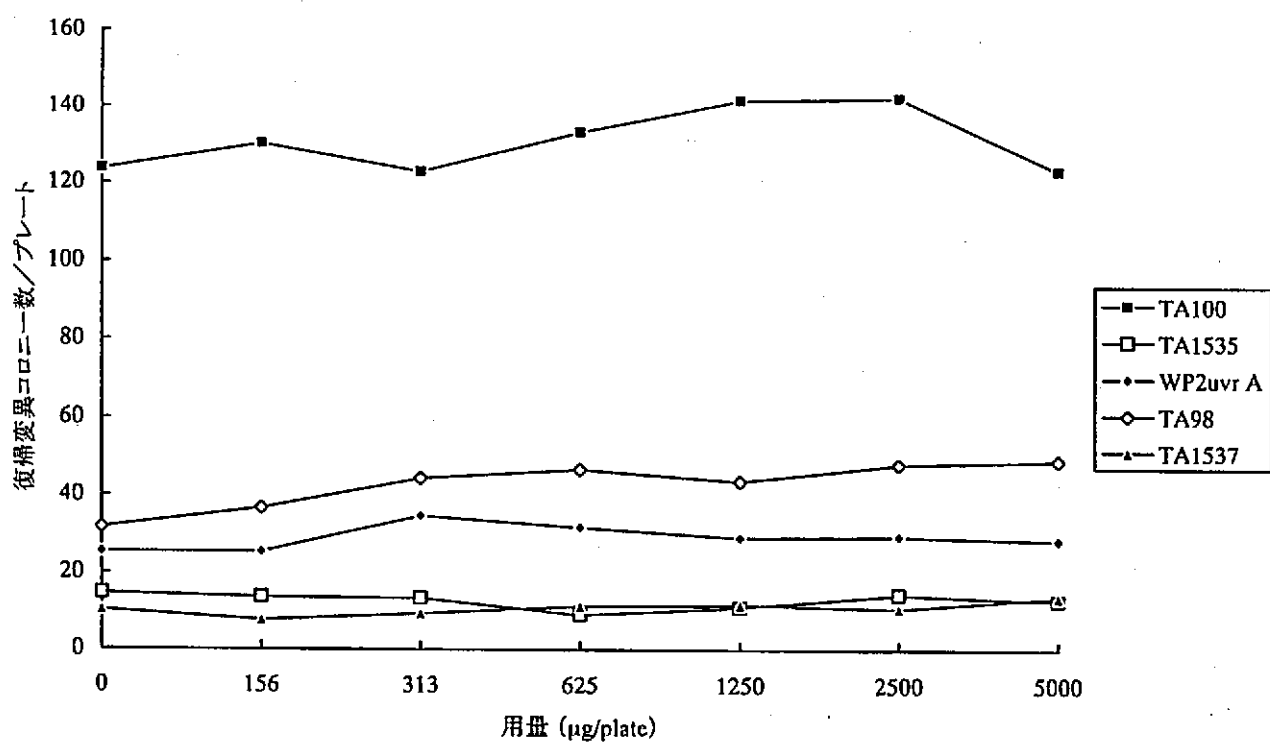


図2 1回目試験結果 (代謝活性化法)

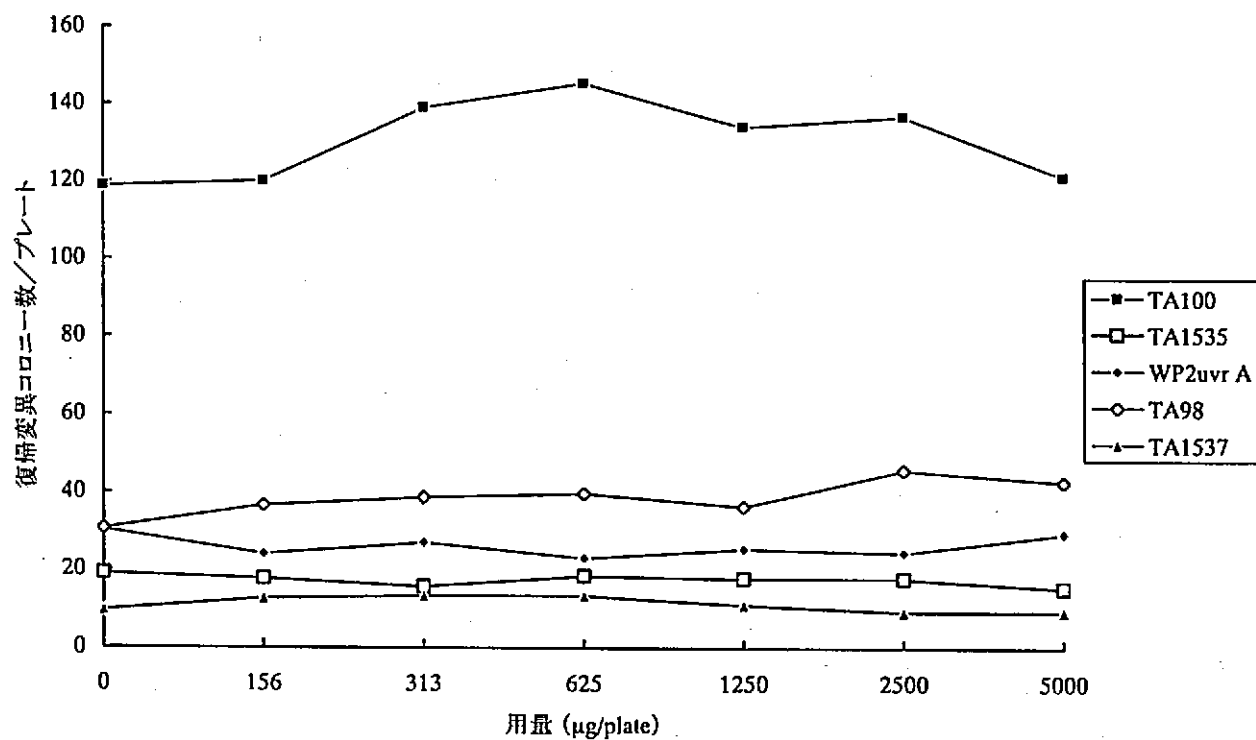


図 3 2回目試験結果 (非代謝活性化法)

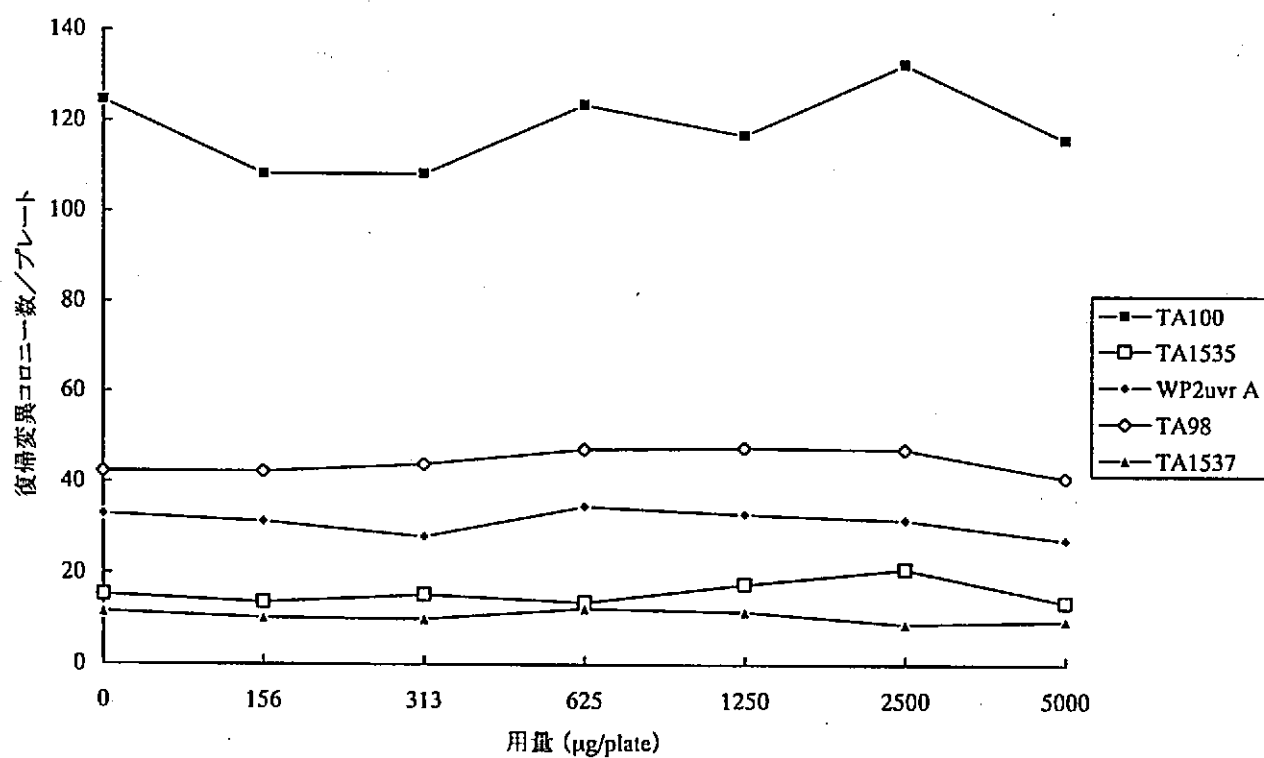


図 4 2回目試験結果 (代謝活性化法)

## Stability of the Test Article

## (1) Experimental

Test Article (Lot No.) : Polyoxyethylene *p*-nonylphenyl ether [REDACTED]  
Appearance : White solid  
Sampling Size : 20 mg  
Storage Conditions : Airtight container at room temperature under light protected conditions

## (2) Results

Container	Time Point	Assay * (%)
Glass bottle (amber)	Initial	99.26
	End of Study	99.14

\* % of total area (mean of 2 values).

Dates of analysis : October 10, 2000 and February 9, 2001

## Stability of the Test Article in the Dosing Preparation

## (1) Experimental

Test Article (Lot No.) : Polyoxyethylene *p*-nonylphenyl ether [REDACTED]  
Vehicle : Water for injection  
Form : Solution  
Sampling Size : 2.5 mL

## (2) Results

Storage Conditions		Stability*	
Container	Temperature and Duration	Conc. of Analyte (mg/mL)	
		0.1	200
Glass bottle (amber)	Initial	100.0	100.0
	After 24 hours at room temperature	101.1	97.5
	After 7 days at room temperature	102.4	99.9

Remaining % (mean of 2 values). Acceptable range:  $100 \pm 5\%$ 

Data of analysis : October 10, 2000 - October 17, 2000

Analyst: [REDACTED]

Date: October 18, 2000

Analyst: [REDACTED]

Date: October 18, 2000

Supervisor:  
(Responsible for [REDACTED])

Date: November 6, 2000

(Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd.)

試験結果報告書の内容に関するお問い合わせには応じかねますので御了承下さい。

## Concentration of the Test Article in the Dosing Preparation

## (1) Experimental

Test Article (Lot No.) : Polyoxyethylene *p*-nonylphenyl ether [REDACTED]  
Vehicle : Water for injection  
Form : Solution  
Sampling Size : 1 mL

## (2) Results

Date of Preparation	Date of Analysis	Target Conc. (mg/mL)	Found Conc. (mg/mL)	Found/Target* (%)
December 26, 2000	December 26, 2000	1.56	1.623	104.0
		50	51.447	102.9

Data are the mean values of 2 injections of 1 determination.

\*Acceptable range :  $100 \pm 5\%$ .

Analyst : [REDACTED]

Date : December 26, 2000

Supervisor : [REDACTED]

(Responsible for [REDACTED])

Date : January 17, 2001



## Concentration of the Test Article in the Dosing Preparation

## (1) Experimental

Test Article (Lot No.) : Polyoxyethylene *p*-nonylphenyl ether [REDACTED]  
Vehicle : Water for injection  
Form : Solution  
Sampling Size : 1 mL

## (2) Results

Date of Preparation	Date of Analysis	Target Conc. (mg/mL)	Found Conc. (mg/mL)	Found/Target* (%)
January 24, 2001	January 24, 2001	1.56	1.633	104.7
		50	51.021	102.0

Data are the mean values of 2 injections of 1 determination.

\*Acceptable range :  $100 \pm 5\%$ .

Analyst : [REDACTED]

Date : January 25, 2001

Supervisor : [REDACTED]

(Responsible for [REDACTED])

Date : February 1, 2001

ポリオキシエチレン p-ノニルフェニルエーテルの  
細菌を用いる復帰突然変異試験結果報告書

## 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)	ポリオキシエチレンp-ノニルフェニルエーテル					
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)	$\text{C}_9\text{H}_{19}(\text{C}_6\text{H}_4)\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H} \quad (n=28.8)$					
試験に供した新規 化学物質の純度	100 wt%		試験に供した新規 化学物質の Lot No.	<div style="background-color: black; width: 100px; height: 20px;"></div>		
不純物の名称及び濃度	—					
C A S 番号	9016-45-9		蒸気圧	—		
分子量	1488		分配係数	—		
融点	29.0°C		常温における性状	白色固体		
沸点	—					
安定性	常温, 遮光下で安定					
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	可溶	0.1, 200 mg/mL濃度: 室温, 遮光下で7日間安定	DMSO	—	—
	アセトン	—	—	イソプロパノール	可溶	—

## 2. 試験に用いた菌株

菌 株 名	入 手 先	入 手 年 月 日
TA 98	国立医薬品食品衛生研究所	1993 年 4 月 20 日
TA 100	国立医薬品食品衛生研究所	1993 年 4 月 20 日
TA 1535	国立医薬品食品衛生研究所	1993 年 4 月 20 日
TA 1537	国立医薬品食品衛生研究所	1993 年 4 月 20 日
WP2uvr A	国立医薬品食品衛生研究所	1993 年 4 月 20 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株式会社)
製 造 年 月 日	2000 年 11 月 10 日製造
購入の場合の Lot No.	RAA-435
保 存 温 度	- 80 °C

## (2) S9 の調製方法

使 用 動 物		誘 導 物 質	
種・系統	SD 系ラット (Slc : SD)	名 称	フェノバルビタール (PB) と 5,6-ベンゾフラボン (BF)
性	雄	投与方法	腹腔内
週 令	7 週	投与期間及び投与量 (mg/kg 体重)	1 日 目 PB30, 2 日 目 PB60, 3 日 目 PB60+BF80, 4 日 目 PB60
体 重	213 ~ 252 g		

## (3) S9 Mix の組成

成 分	S9 Mix1mL 中の量	成 分	S9 Mix1mL 中の量
S9	0.1 mL	NADPH	4 $\mu$ mol
MgCl <sub>2</sub>	8 $\mu$ mol	NADH	4 $\mu$ mol
KCl	33 $\mu$ mol	Na - リン酸緩衝液	100 $\mu$ mol
グルコース-6-リン酸	5 $\mu$ mol	その他 (蒸留水)	残量

## 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	0G73, 0J86	—	—
溶媒選択の理由	水に 50 mg/mL 以上溶解したため。				
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 における懸濁等の方法	—				
溶液の調製から使用ま での保存時間と温度	1 時間以内, 約 25 °C				
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.
	No. 2	Unipath Oxoid	213519
前培養時間	12 時間 0 分		
培養容器(形状・容量)	ガラス製 L 字試験管(容量 30 mL)		
培養液量	10 mL	接種菌量	20 $\mu$ L

## (2) 前培養終了時の生菌数等

		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2 <sub>uvr</sub> A	TA98	TA1537	—
生菌数 ( $\times 10^9$ /mL)	本試験-1	2.84	3.40	5.37	3.80	1.79	—
	本試験-2	2.67	2.95	4.65	3.82	1.71	—
測定方法 (いずれかを○で囲むこと)		① O.D.値よりの換算      2. 段階希釈法 3. その他( — )					

## 6. 最少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 — )
製造年月日	2000 年 12 月 22 日, 2001 年 1 月 23 日製造
購入の場合のLot No.	—
使用寒天の名称・ 製造元・Lot No.等	バクトアガー, Difco Laboratories, Lot No. 143176, 0130004

## 7. 試験の方法

## (1) 試験方法とその選定理由

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 その選定理由	—

## (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
	S 9 Mix (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 ( — )	— mL
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: 面積補正 )

## 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 (いずれかを○で囲むこと)	陽性	陰性
<p>判定の理由</p> <p>ポリオキシエチレンp-ニルフェニルエーテルは、2 回の本試験のいずれにおいても、使用した 5 菌株に対し、代謝活性化系の有無にかかわらず、陰性対照と比較して 2 倍以上の復帰変異コロニー数を増加させなかったことから、ポリオキシエチレンp-ニルフェニルエーテルの遺伝子突然変異誘発性は陰性であると判断した。</p> <p>試験菌株に対する生育阻害および被験物質の析出は、5000 <math>\mu</math> g/plate までみられなかった。</p>		

## (3) 参考事項

## 1) 用量設定の根拠

本試験の用量は、用量設定試験の結果から設定した。用量設定試験の用量は 0, 19.5, 78.1, 313, 1250, 5000  $\mu$  g/plate とした。その結果、全ての菌株においても 5000  $\mu$  g/plate まで変異原性、試験菌株に対する生育阻害および被験物質の析出はみられなかった。

従って、本試験の最高用量は、全ての菌株において非代謝活性化法および代謝活性化法ともに 5000  $\mu$  g/plate とし、以下公比 2 で 2500, 1250, 625, 313 および 156  $\mu$  g/plate の 6 段階とした。

## 2) 結果の判定基準

結果は、被験物質処理群においてプレートあたりの復帰変異コロニー数(平均値)が陰性対照の 2 倍以上に増加し、被験物質の用量依存性が認められ、かつ、用量設定試験と本試験の間に再現性が確認された場合に陽性と判定し、それ以外の場合は陰性と判定した。

## 10. その他

試験実施施設	名 称	株式会社新日本科学
	所在地	鹿児島県鹿児島郡吉田町宮之浦 2438 番地 電話 099 ( 294 ) 2600                      FAX 099 ( 294 ) 3619
試験責任者	職氏名	
	経験年数	
試験番号	SBL 79-14	
試験期間	2000 年 12 月 6 日 より 2001 年 3 月 29 日	



被験物質の名称:ポリオキシエチレンp-ノニルフェニルエーテル

試験実施期間		2000 年 12 月 25 日 ~ 2000 年 12 月 28 日					
代謝活性化系の有無		被験物質濃度 (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	WP2uvr A	TA98	TA1537
S 9 Mix  ( - )	陰 性 対 照 注射用水	129 , 125 , 126 ( 127 )	11 , 16 , 13 ( 13 )	24 , 23 , 18 ( 22 )	26 , 22 , 32 ( 27 )	9 , 6 , 10 ( 8 )	
	156	139 , 139 , 130 ( 136 )	10 , 18 , 12 ( 13 )	19 , 19 , 23 ( 20 )	38 , 33 , 28 ( 33 )	13 , 7 , 9 ( 10 )	
	313	134 , 115 , 140 ( 130 )	11 , 9 , 11 ( 10 )	25 , 21 , 18 ( 21 )	24 , 29 , 27 ( 27 )	13 , 5 , 11 ( 10 )	
	625	136 , 116 , 144 ( 132 )	13 , 15 , 15 ( 14 )	19 , 23 , 24 ( 22 )	30 , 36 , 21 ( 29 )	7 , 3 , 5 ( 5 )	
	1250	132 , 138 , 158 ( 143 )	16 , 13 , 9 ( 13 )	26 , 25 , 22 ( 24 )	34 , 38 , 32 ( 35 )	12 , 5 , 12 ( 10 )	
	2500	127 , 115 , 141 ( 128 )	9 , 9 , 14 ( 11 )	23 , 21 , 24 ( 23 )	38 , 40 , 46 ( 41 )	8 , 9 , 10 ( 9 )	
	5000	128 , 111 , 113 ( 117 )	12 , 16 , 9 ( 12 )	27 , 23 , 18 ( 23 )	51 , 32 , 41 ( 41 )	8 , 8 , 11 ( 9 )	
S 9 Mix  ( + )	陰 性 対 照 注射用水	124 , 125 , 122 ( 124 )	18 , 12 , 14 ( 15 )	24 , 25 , 27 ( 25 )	31 , 32 , 32 ( 32 )	13 , 9 , 9 ( 10 )	
	156	131 , 125 , 135 ( 130 )	10 , 14 , 17 ( 14 )	23 , 21 , 32 ( 25 )	33 , 48 , 29 ( 37 )	6 , 5 , 12 ( 8 )	
	313	129 , 119 , 121 ( 123 )	11 , 18 , 11 ( 13 )	29 , 32 , 43 ( 35 )	44 , 51 , 38 ( 44 )	8 , 12 , 8 ( 9 )	
	625	141 , 139 , 120 ( 133 )	10 , 12 , 5 ( 9 )	34 , 26 , 35 ( 32 )	45 , 46 , 49 ( 47 )	10 , 15 , 9 ( 11 )	
	1250	134 , 136 , 155 ( 142 )	11 , 10 , 12 ( 11 )	28 , 31 , 28 ( 29 )	40 , 38 , 53 ( 44 )	15 , 7 , 13 ( 12 )	
	2500	148 , 132 , 147 ( 142 )	16 , 16 , 11 ( 14 )	31 , 30 , 27 ( 29 )	59 , 36 , 49 ( 48 )	6 , 12 , 14 ( 11 )	
	5000	119 , 127 , 124 ( 123 )	11 , 11 , 16 ( 13 )	24 , 27 , 34 ( 28 )	58 , 43 , 46 ( 49 )	11 , 15 , 15 ( 14 )	
陽 性 対 照	S9Mixを 必要と しないもの	名 称	AF-2	ENNG	ENNG	AF-2	9AA
		濃度(μg/プレート)	0.01	5	2	0.1	80
		コロニー数/プレート	574 , 419 , 502 ( 498 )	177 , 197 , 207 ( 194 )	976 , 912 , 977 ( 955 )	416 , 405 , 414 ( 412 )	425 , 840 , 920 ( 728 )
	S9Mixを 必要と するもの	名 称	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
		濃度(μg/プレート)	1	2	10	0.5	2
		コロニー数/プレート	963 , 995 , 993 ( 984 )	146 , 183 , 162 ( 164 )	380 , 385 , 402 ( 389 )	728 , 832 , 796 ( 785 )	271 , 224 , 270 ( 255 )

(備 考)

1. ( ) 内の数値は 3 枚のプレートの平均値.

2. 陽性対照物質の名称

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

ENNG: N-Ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

9AA: 9-Aminoacridine hydrochloride monohydrate

2AA: 2-Aminoanthracene

被験物質の名称:ポリオキシエチレンp-ノニルフェニルエーテル

試験実施期間		2001 年 1 月 23 日 ~ 2001 年 1 月 26 日					
代謝活性化系の有無	被験物質濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	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	WP2uvr A	TA98	TA1537	
S 9 Mix ( - )	陰性対照 注射用水	118, 125, 113 ( 119 )	18, 18, 21 ( 19 )	29, 32, 30 ( 30 )	29, 32, 31 ( 31 )	14, 8, 7 ( 10 )	
	156	120, 117, 123 ( 120 )	19, 19, 15 ( 18 )	27, 22, 23 ( 24 )	37, 39, 34 ( 37 )	11, 13, 14 ( 13 )	
	313	129, 143, 145 ( 139 )	19, 16, 12 ( 16 )	29, 31, 21 ( 27 )	39, 39, 38 ( 39 )	15, 15, 10 ( 13 )	
	625	147, 148, 141 ( 145 )	18, 21, 16 ( 18 )	22, 24, 23 ( 23 )	38, 42, 39 ( 40 )	12, 15, 13 ( 13 )	
	1250	151, 124, 127 ( 134 )	12, 20, 21 ( 18 )	25, 25, 26 ( 25 )	37, 39, 33 ( 36 )	7, 14, 12 ( 11 )	
	2500	135, 136, 139 ( 137 )	17, 21, 15 ( 18 )	28, 24, 21 ( 24 )	43, 54, 40 ( 46 )	13, 8, 7 ( 9 )	
	5000	129, 116, 118 ( 121 )	16, 17, 13 ( 15 )	34, 24, 30 ( 29 )	46, 46, 36 ( 43 )	10, 9, 9 ( 9 )	
S 9 Mix ( + )	陰性対照 注射用水	114, 142, 118 ( 125 )	12, 15, 19 ( 15 )	34, 34, 31 ( 33 )	47, 41, 39 ( 42 )	11, 12, 12 ( 12 )	
	156	108, 113, 104 ( 108 )	11, 13, 17 ( 14 )	29, 31, 34 ( 31 )	31, 49, 47 ( 42 )	10, 10, 11 ( 10 )	
	313	104, 102, 119 ( 108 )	12, 23, 11 ( 15 )	26, 31, 27 ( 28 )	43, 49, 40 ( 44 )	14, 8, 8 ( 10 )	
	625	115, 134, 122 ( 124 )	10, 20, 11 ( 14 )	34, 35, 35 ( 35 )	50, 56, 36 ( 47 )	12, 15, 10 ( 12 )	
	1250	118, 119, 114 ( 117 )	17, 19, 17 ( 18 )	37, 36, 26 ( 33 )	57, 39, 47 ( 48 )	14, 7, 14 ( 12 )	
	2500	127, 153, 118 ( 133 )	19, 21, 23 ( 21 )	35, 29, 31 ( 32 )	57, 48, 37 ( 47 )	6, 14, 7 ( 9 )	
	5000	114, 110, 124 ( 116 )	13, 16, 12 ( 14 )	20, 38, 24 ( 27 )	48, 35, 40 ( 41 )	11, 6, 12 ( 10 )	
陽性対照	S9Mixを必要としないもの	名 称	AF-2	ENNG	ENNG	AF-2	9AA
		濃度( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	0.01	5	2	0.1	80
		コロニー数/プレート	417, 450, 435 ( 434 )	316, 306, 286 ( 303 )	754, 705, 710 ( 723 )	580, 591, 578 ( 583 )	677, 537, 716 ( 643 )
	S9Mixを必要とするもの	名 称	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
		濃度( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	1	2	10	0.5	2
		コロニー数/プレート	1274, 1229, 1158 ( 1220 )	221, 171, 251 ( 214 )	414, 423, 396 ( 411 )	514, 524, 516 ( 518 )	270, 243, 242 ( 252 )

(備 考)

- ( ) 内の数値は 3 枚のプレートの平均値。
- 陽性対照物質の名称  
AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide  
ENNG: N-Ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine  
9AA: 9-Aminoacridine hydrochloride monohydrate  
2AA: 2-Aminoanthracene

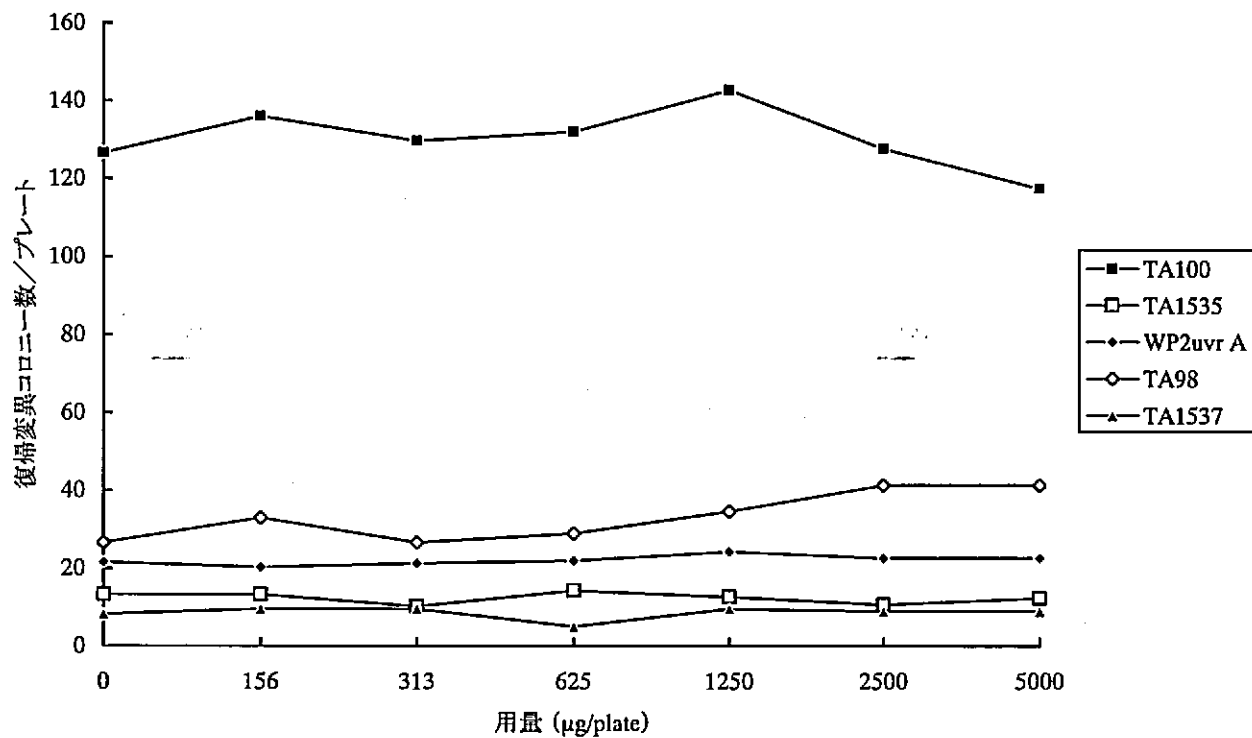


図1 1回目試験結果 (非代謝活性化法)

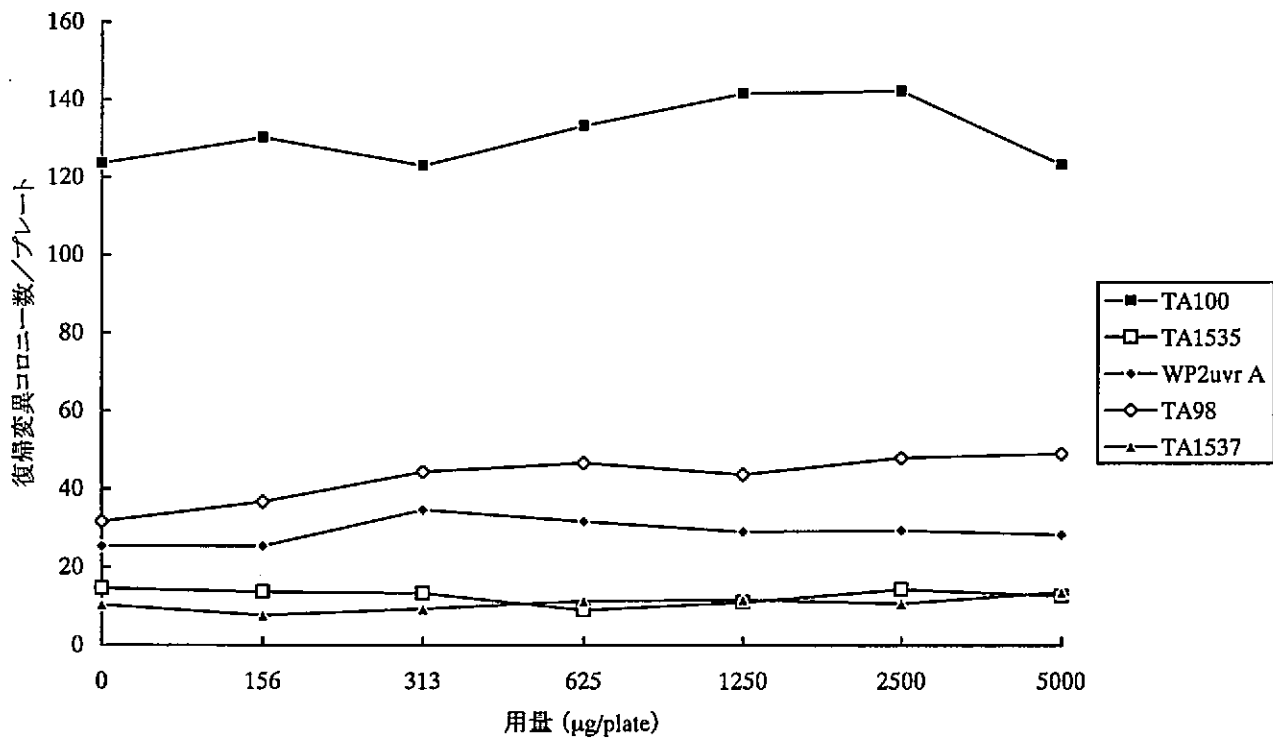


図2 1回目試験結果 (代謝活性化法)

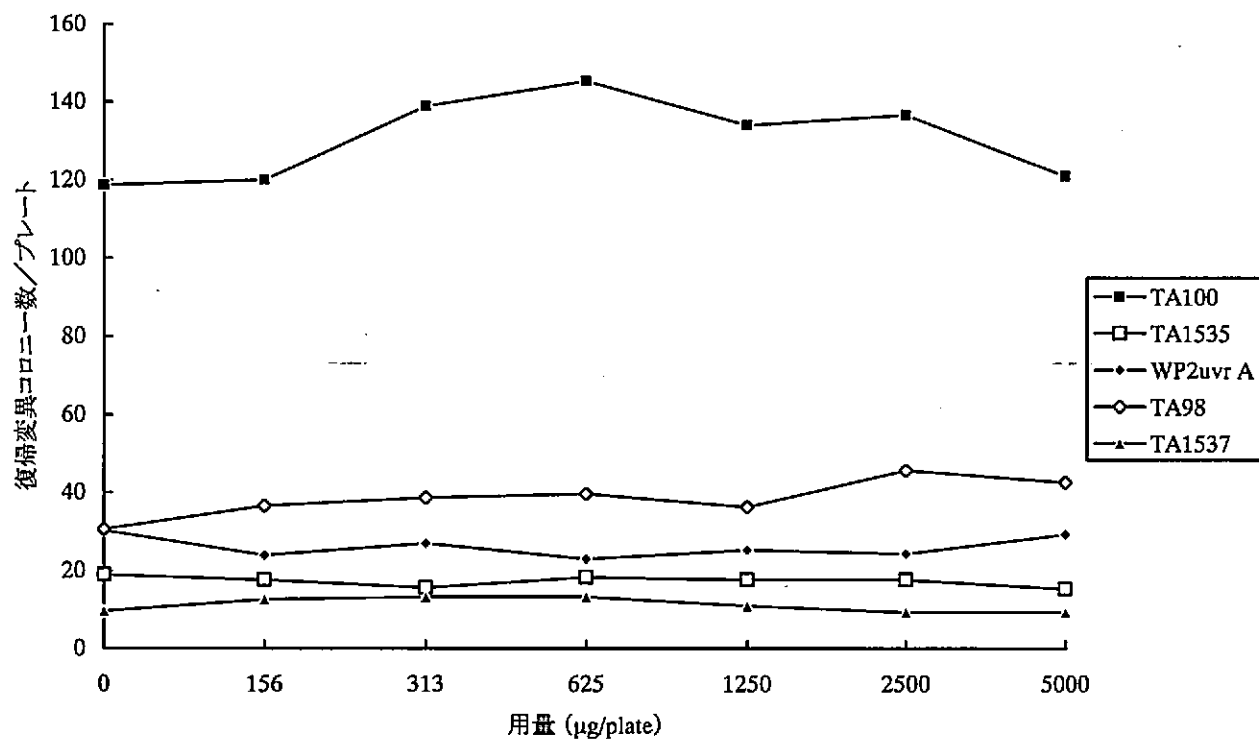


図 3 2回目試験結果 (非代謝活性化法)

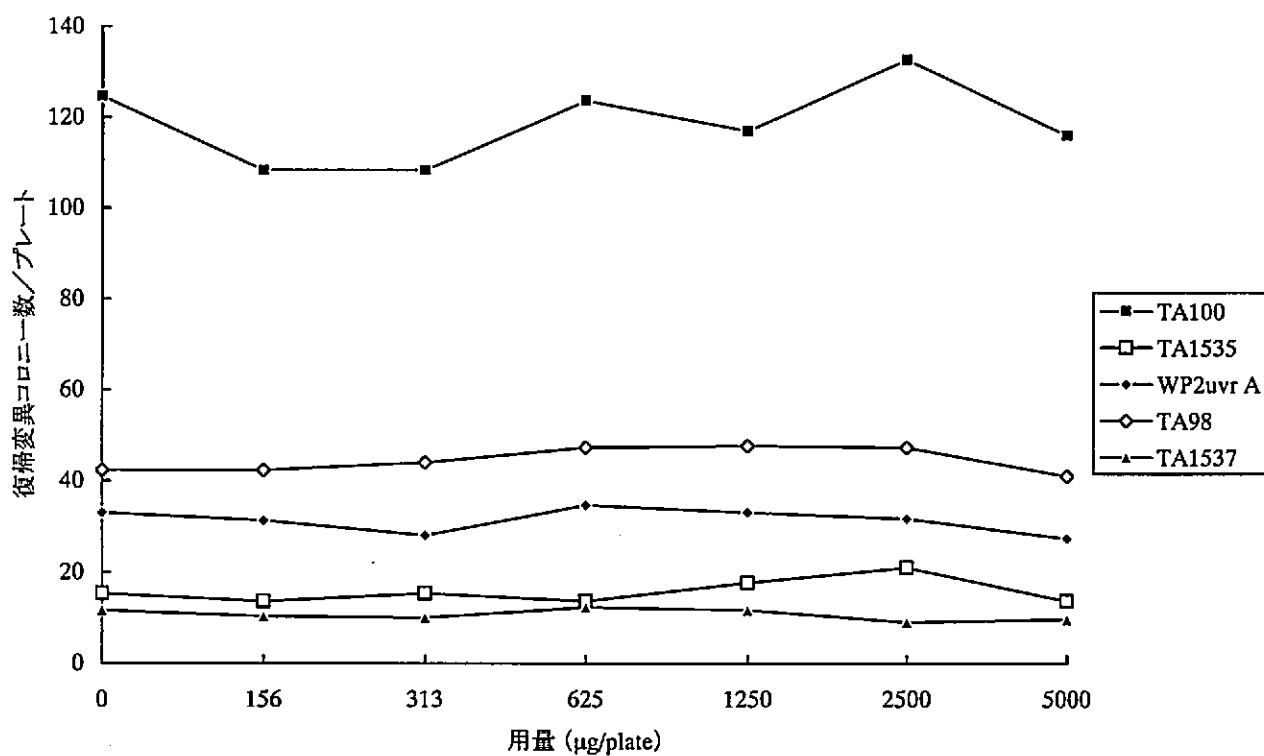


図 4 2回目試験結果 (代謝活性化法)

## 陳 述 書

表 題 : ポリオキシエチレン p-ノニルフェニルエーテルの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号 : SBL 79-14

本試験は、OECD Principles of Good Laboratory Practice (revision in 1997)および OECD Guidelines for Testing of Chemicals 471 (Bacterial Reverse Mutation Test, Adopted: 21st July 1997)に準拠して行われ、また、報告書は試験の方法を正確に記載し、生データを正確に反映したものに相違ありません。

試験責任者

(所 属) 株式会社 新日本科学



2001年3月29日

運営管理者

(所 属) 株式会社 新日本科学



2001年3月29日

## 信 頼 性 保 証 書

試験委託者 : 経済産業省(旧通商産業省) 製品評価技術センター  
化学物質安全管理センター

試験の表題 : ポリオキシエチレン p-ニルフェニルエーテルの細胞を用いる  
復帰突然変異試験

試験番号 : SBL 79-14

当試験は、株式会社新日本科学の信頼性保証部門が定期的に査察を実施しており、査察を行った日付、運営管理者および試験責任者に報告を行った日付は以下の通りである。

査察項目	査察実施日	試験責任者 への報告日	運営管理者 への報告日
試験計画書	2000年12月6日	2000年12月6日	2000年12月6日
試験スケジュール	2000年12月6日	2000年12月6日	2000年12月6日
被験物質保管状態	2000年12月26日	2000年12月28日	2000年12月28日
被験物質溶液の調製	2000年12月26日	2000年12月28日	2000年12月28日
被験物質溶液の濃度測定	2000年12月26日	2000年12月28日	2000年12月28日
投与	2000年12月26日	2000年12月28日	2000年12月28日
コロニーカウント	2000年12月28日	2000年12月28日	2000年12月28日
被験物質溶液の調製	2001年1月24日	2001年1月24日	2001年1月29日
被験物質溶液の濃度測定	2001年1月24日	2001年1月24日	2001年1月29日
試験計画書変更確認書(No. 1)	2001年1月25日	2001年1月25日	2001年1月29日
試験計画書変更確認書(No. 2)	2001年2月23日	2001年2月23日	2001年2月26日
試験計画書変更確認書(No. 3)	2001年3月2日	2001年3月2日	2001年3月5日
書類・生データ	2001年3月7日	2001年3月7日	2001年3月9日
最終報告書草案	2001年3月7日	2001年3月7日	2001年3月9日
最終報告書草案	2001年3月8日	2001年3月8日	2001年3月9日
最終報告書	2001年3月29日	2001年3月29日	2001年3月29日

本試験報告書には、試験で使用した方法、手順が記載されており、報告書は試験の生データを正確に反映している。

2001年3月29日

試験実施者

署名

2001 年 3 月 29 日

資料保管責任者

記録(生データ, 最終報告書)の保管場所

株式会社 新日本科学内のデータ資料室(記録, 資料)

## GENETIC TOXICITY IN VITRO (BACTERIAL TEST)

### TEST SUBSTANCE

- **Identity:** Polyoxyethylene p-nonylphenylether (CAS No. 9016-45-9)
- **Remarks:** Source: Chemical Substances Safety Management Center  
National Institute of Technology and Evaluation Ministry of  
Economy, Trade and Industry. Purity: 100 wt%. Stability during  
use confirmed by high performance liquid chromatography.

### METHOD

- **Method/guideline:** OECD Guidelines for Testing of Chemicals 471 (Bacterial Reverse Mutation Test, Adopted: 21st July 1997).
- **Test type:** A Bacterial Reverse Mutation Test
- **GLP:** OECD Principles of Good Laboratory Practice (revision in 1997)
- **Year:** December 6, 2000 to March 29, 2001.
- **Species/Strain:** *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537) and  
*Escherichia coli* (WP2uvr A)
- **Metabolic activation:** With and without S9 mix (S9 was prepared from the livers of  
male rats (SD strain, 7 weeks old) that had been given  
Phenobarbital and 5,6-benzoflavone intraperitoneally to induce  
drug-metabolizing enzymes.)
- **Statistical methods:** Statistical Analyses were not performed on the results.

### REMARKS FIELD FOR TEST CONDITIONS

- **Study Design:**

Concentration: -S9 mix: 0,156, 313, 625, 1250, 2500 and 5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$   
(five strains)



+S9 mix: 0,156, 313, 625, 1250, 2500 and 5000  $\mu$ g/plate  
(five strains)

Number of replicates: 2 times

Plates/test: 3 plates/dose/test

Procedure: Pre-incubation method

Solvent: Water for injection

Positive controls: -S9mix; AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide  
(TA100, TA98)

ENNG: *N*-Ethyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine  
(TA1535, WP2uvrA)

9AA: 9-Aminoacridine hydrochloride monohydrate  
(TA1537)

+S9mix; 2AA: 2-Aminoanthracene (five strains)

## RESULTS

- **Cytotoxic concentration:** Toxicity was not observed up to 5000  $\mu$ g/plate in five strains with and without metabolic activation.

- **Genotoxic effects:**

	+	?	-	+	?	-
With metabolic activation	[ ]	[ ]	[X]	[ ]	[ ]	[X]
Without metabolic activation	[ ]	[ ]	[X]	[ ]	[ ]	[X]

## REMARKS FIELD FOR RESULTS

## CONCLUTIONS

The results showed that compared with the negative control, Polyoxyethylene p-nonylphenylether did not cause a twofold or greater increase in the number of revertant colonies in any of the 5 test strains, with or without metabolic activation. It was concluded from the results described above, that under the conditions of this study, Polyoxyethylene p-nonylphenylether did not induce gene-mutation, with or without metabolic activation.

## DATE QUALITY

- **Reliabilities:** Valid without restriction.

## Remarks field for Data Reliability

Well conducted study, carried out by Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd.  
(Kagoshima, Japan)

## REFERENCES

'Mutagenicity Test on the Industrial Safety and Health Law', compiled by Chemical Substance Investigation Division, Industrial Safety and Health Department, Labor Standards Bureau, the Ministry of Labor, Japan, published by Japan Industrial Safety and Health Association, Tokyo, Japan, 1991.

Maron, D.M. and Ames, B.N.: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, Mut. Res., 113, 173 - 215, 1983.

Matsushima, T.: 'Bacterial Reverse Mutation Test ' Mutagenicity, Genetic Toxicology., p.31 - 42, Chijin Shokan, Tokyo, Japan, 1991.

Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Mathusima, T., Melcion, C., Nohmi, t., Venitt, S. and Zeiger, E.: Recommendations for the Performance of Bacterial Mutatation Assays. Mutation Res., 312, 217 - 233, 1994.

Mathusima, T., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A., and Sawamura, M. : Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests. In: Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens. Ed. Norpoth K.H. and Garner, R.C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York., 273 - 285, 1980.

## GENERAL REMAERKS

None.