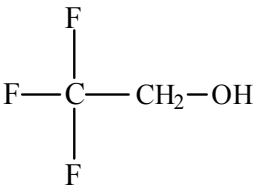
微生物を用いる変異原性試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	２，２，２－トリフルオロエタノール		
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	100.0%	試験に供した新規化学物質の Lot No.	312N2204
不純物の名称及び濃度			
CAS 番号	75-89-8*	蒸気圧	71.3 mmHg（25°C）*
分子量	100.04	分配係数	0.41*
融　点	−43.5°C*	常温における性状	液体
沸　点	74°C*		
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	169000 mg/L（25°C）*	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、製造元からの情報及び*：独立行政法人製品評価技術基盤機構化学物質総合情報システム（CHRIP）の情報による。なお、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
Salmonella typhimurium TA98	国立医薬品食品衛生研究所	1997 年 10 月 9 日
Salmonella typhimurium TA100	国立医薬品食品衛生研究所	1997 年 10 月 9 日
Salmonella typhimurium TA1535	国立医薬品食品衛生研究所	1997 年 10 月 9 日
Salmonella typhimurium TA1537	国立医薬品食品衛生研究所	1997 年 10 月 9 日
Escherichia coli WP2 *uvrA*	独立行政法人 製品評価技術基盤機構	2011 年 10 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：キッコーマンバイオケミファ株式会社）
製造年月日	2013 年 9 月 26 日製造
購入の場合 Lot No.	RAA20130926
保存温度	−88.1~−78.8°C （保存期間：2013 年 10 月 23 日~2013 年 12 月 28 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	187–230 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

	名　称	製　造　元	Lot No.	グレード	純度(%)
使 用 溶 媒	注射用水	株式会社 大塚製薬工場	K2L79	日本薬局方	
溶媒選択の理由	水について溶解性試験を実施した。その結果、50 mg/mL で溶解し、発熱、ガスの発生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　　(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.	876774

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	*S. typhimurium* 株　20 μL *E. coli* 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 *uvrA*	TA98	TA1537
生菌数 ($\times 10^9$/mL)	用量設定試験	5.38	6.75	8.83	5.84	4.75
	本試験	5.42	6.63	8.73	6.56	5.05
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（購入元　極東製薬工業株式会社）
製 造 年 月 日	2013 年 10 月 11 日製造
購入の場合の Lot No.	DZLEAB01
使用寒天の名称･製造･Lot No.	OXOID AGAR No.1･OXOID LTD.･Lot No. 1213483-02

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
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）	48.5 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:補正値　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)

判定の理由

用量設定試験の結果を別表 1、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 Attached Data として添付した。

用量設定試験及び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。

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。

以上の試験結果より、本試験条件下において２，２，２－トリフルオロエタノールは、微生物に対する遺伝子突然変異誘発能を有さない（陰性）と判定した。

(3) 参考事項

本被験物質によるプレート上の沈殿及び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。

用量設定試験の代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98 の陰性対照値の復帰変異コロニー数の平均値が背景データの管理値（Attached Data）を超えていたが、わずかであり、代謝活性化しない場合の陽性対照値及び代謝活性化した場合の陰性対照値及び陽性対照値がそれぞれ適切な値を示しているため、適切な遺伝的特性を有しており、通常の試験操作において起こりうる値であり、試験結果の評価には影響ないと判断した。その他の菌株については、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、陰性対照値及び陽性対照値の復帰変異コロニー数の平均値が背景データの管理値内であり、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。

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。

10. その他

試験実施施設	名　称	株式会社ボゾリサーチセンター　東京研究所
	所在地	東京都世田谷区羽根木 1-3-11　電話 03(3327)2114 FAX03(3327)2115
試験責任者	職氏名	[redacted]
	経験年数	[redacted]
試験番号	T-1435	
試験期間	2013 年 12 月 11 日より 2014 年 2 月 14 日	

(別表1)

試 験 結 果 表 (用量設定試験)

被験物質の名称： ２，２，２－トリフルオロエタノール

No. T-1435

試験実施期間			2013年12月16日　より　2013年12月19日				
代謝活性化系の有無		被験物質の用量 (μg/ﾌﾟﾚｰﾄ)	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	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
S9Mix (－)		陰性対照 (注射用水)	137 123 (130)	11 7 (9)	15 15 (15)	26 32 (29)	6 8 (7)
		1.22	150 120 (135)	7 11 (9)	22 14 (18)	18 28 (23)	4 4 (4)
		4.88	130 140 (135)	5 8 (7)	13 16 (15)	16 19 (18)	4 5 (5)
		19.5	157 139 (148)	5 6 (6)	19 21 (20)	19 28 (24)	6 5 (6)
		78.1	148 132 (140)	5 6 (6)	14 21 (18)	14 20 (17)	7 4 (6)
		313	152 141 (147)	6 8 (7)	21 19 (20)	27 30 (29)	5 5 (5)
		1250	134 146 (140)	7 5 (6)	14 26 (20)	19 28 (24)	5 7 (6)
		5000	157 161 (159)	10 7 (9)	16 13 (15)	16 24 (20)	5 13 (9)
S9Mix (＋)		陰性対照 (注射用水)	131 152 (142)	10 14 (12)	16 27 (22)	33 28 (31)	10 10 (10)
		1.22	174 137 (156)	10 10 (10)	22 18 (20)	25 33 (29)	3 4 (4)
		4.88	153 144 (149)	6 12 (9)	28 23 (26)	34 28 (31)	7 5 (6)
		19.5	126 162 (144)	5 7 (6)	17 15 (16)	36 37 (37)	5 5 (5)
		78.1	138 126 (132)	10 10 (10)	17 18 (18)	27 31 (29)	6 4 (5)
		313	138 137 (138)	7 11 (9)	21 18 (20)	34 29 (32)	3 7 (5)
		1250	131 152 (142)	10 6 (8)	15 22 (19)	31 31 (31)	4 5 (5)
		5000	154 148 (151)	7 6 (7)	20 22 (21)	43 26 (35)	10 8 (9)
陽性対照	S9Mix を必要としないもの	名　称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191
		用量 (μg/ﾌﾟﾚｰﾄ)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
		ｺﾛﾆｰ数/ﾌﾟﾚｰﾄ	632 657 (645)	240 278 (259)	69 88 (79)	356 383 (370)	2364 2104 (2234)
	S9Mix を必要とするもの	名　称	B[*a*]P	2AA	2AA	B[*a*]P	B[*a*]P
		用量 (μg/ﾌﾟﾚｰﾄ)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
		ｺﾛﾆｰ数/ﾌﾟﾚｰﾄ	1129 1115 (1122)	339 362 (351)	842 906 (874)	480 442 (461)	96 80 (88)

(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
2AA　：2-アミノアントラセン
B[*a*]P　：ベンゾ[*a*]ピレン

(　)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： ２，２，２－トリフルオロエタノール

No. T-1435

試験実施期間			2013年12月25日　より　2013年12月28日				
代謝活性化系の有無		被験物質の用量（μg/ﾌﾟﾚｰﾄ）	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	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
S9Mix（－）		陰性対照（注射用水）	106 103　（　105）	8 5　（　7）	19 16　（　18）	17 16　（　17）	5 6　（　6）
		313	86 91　（　89）	4 7　（　6）	13 14　（　14）	18 18　（　18）	4 4　（　4）
		625	103 90　（　97）	5 4　（　5）	22 19　（　21）	19 11　（　15）	5 6　（　6）
		1250	109 88　（　99）	11 11　（　11）	16 12　（　14）	19 21　（　20）	5 4　（　5）
		2500	85 93　（　89）	9 5　（　7）	12 17　（　15）	19 19　（　19）	4 6　（　5）
		5000	82 90　（　86）	4 7　（　6）	22 19　（　21）	12 15　（　14）	4 7　（　6）
S9Mix（＋）		陰性対照（注射用水）	119 98　（　109）	7 8　（　8）	20 19　（　20）	28 34　（　31）	5 6　（　6）
		313	121 91　（　106）	13 12　（　13）	12 19　（　16）	27 21　（　24）	10 5　（　8）
		625	118 117　（　118）	10 4　（　7）	22 16　（　19）	31 28　（　30）	8 6　（　7）
		1250	120 129　（　125）	8 4　（　6）	25 27　（　26）	36 30　（　33）	10 6　（　8）
		2500	113 134　（　124）	5 7　（　6）	18 16　（　17）	34 28　（　31）	6 5　（　6）
		5000	116 123　（　120）	7 10　（　9）	14 24　（　19）	22 25　（　24）	4 9　（　7）
陽性対照	S9Mixを必要としないもの	名　称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191
		用量（μg/ﾌﾟﾚｰﾄ）	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
		ｺﾛﾆｰ数/ﾌﾟﾚｰﾄ	657 518　（　588）	257 239　（　248）	61 66　（　64）	397 441　（　419）	1736 1889　（　1813）
	S9Mixを必要とするもの	名　称	B[*a*]P	2AA	2AA	B[*a*]P	B[*a*]P
		用量（μg/ﾌﾟﾚｰﾄ）	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
		ｺﾛﾆｰ数/ﾌﾟﾚｰﾄ	857 799　（　828）	240 214　（　227）	673 763　（　718）	361 383　（　372）	77 85　（　81）

（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
2AA　：2-アミノアントラセン
B[*a*]P　：ベンゾ[*a*]ピレン

（　）内は、2枚のプレートの平均値を示す。

図 1

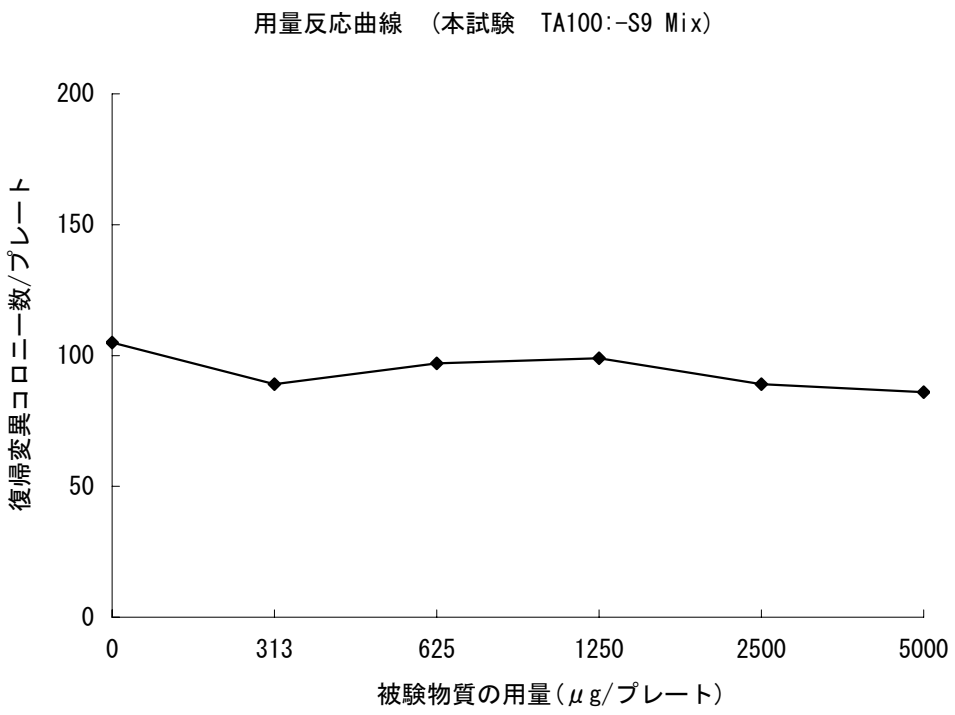

用量反応曲線　(本試験　TA100:-S9 Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
200
150
100
50
0
0
313
625
1250
2500
5000
被験物質の用量(μg/プレート)

図 2

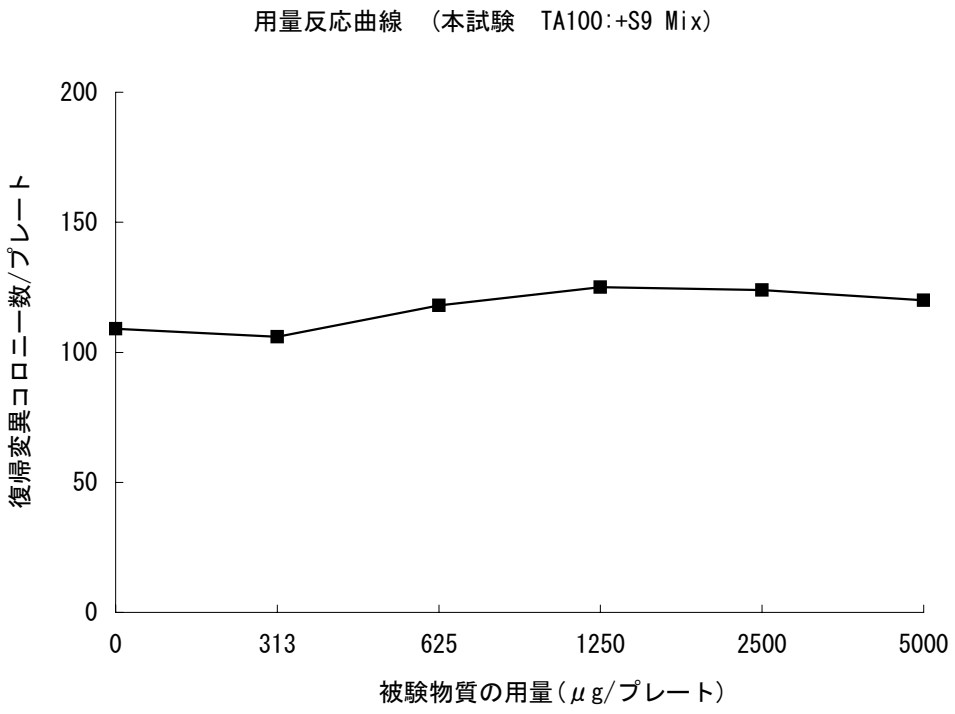

用量反応曲線　(本試験　TA100:+S9 Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
200
150
100
50
0
0
313
625
1250
2500
5000
被験物質の用量(μg/プレート)

図 3

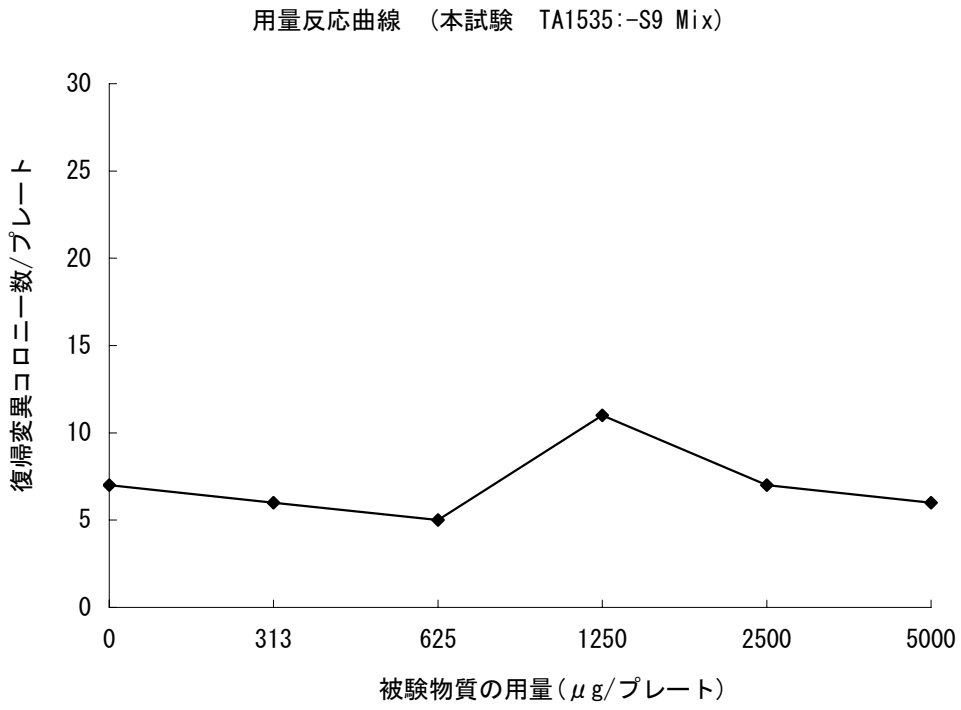

用量反応曲線　(本試験　TA1535:-S9 Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
30
25
20
15
10
5
0
0
313
625
1250
2500
5000
被験物質の用量(μg/プレート)

図 4

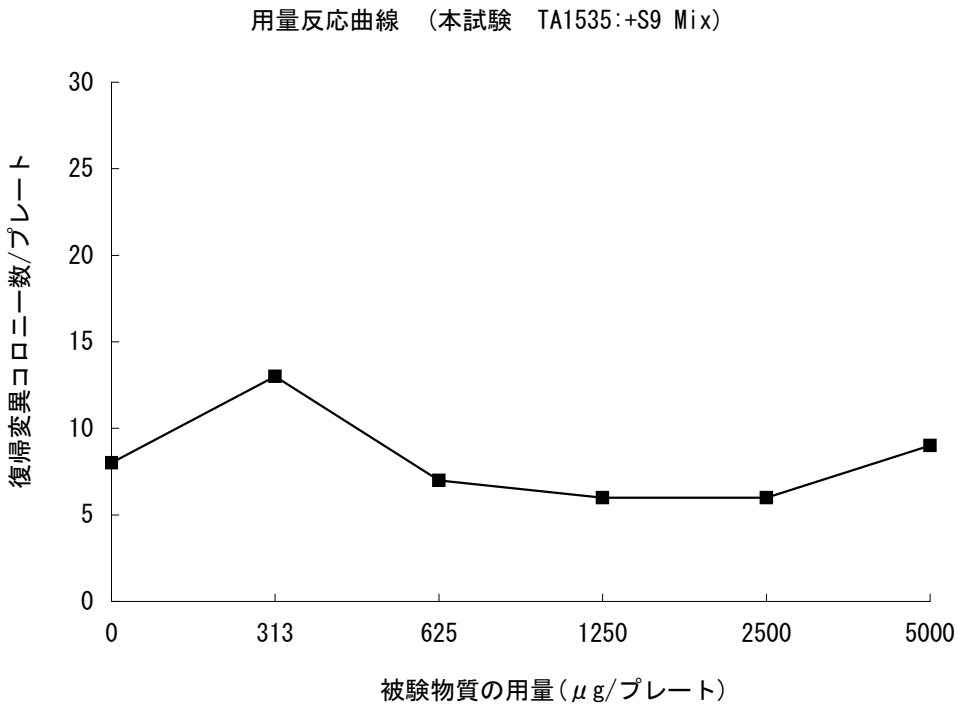

用量反応曲線　(本試験　TA1535:+S9 Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
30
25
20
15
10
5
0
0
313
625
1250
2500
5000
被験物質の用量(μg/プレート)

図 5

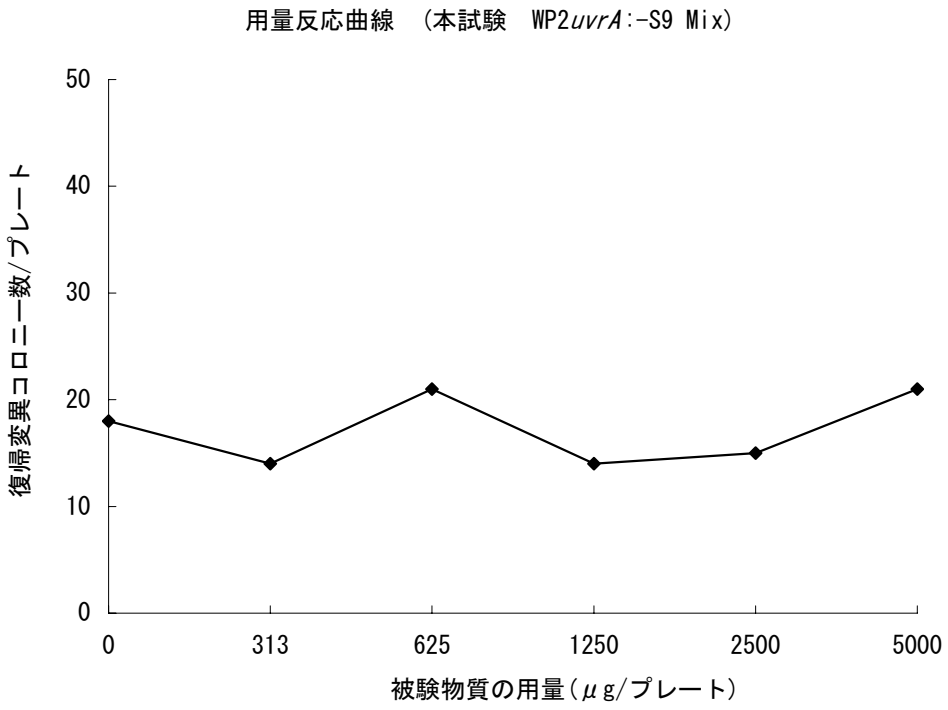

用量反応曲線　(本試験　WP2*uvrA*:-S9 Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
50
40
30
20
10
0
0
313
625
1250
2500
5000
被験物質の用量(μg/プレート)

図 6

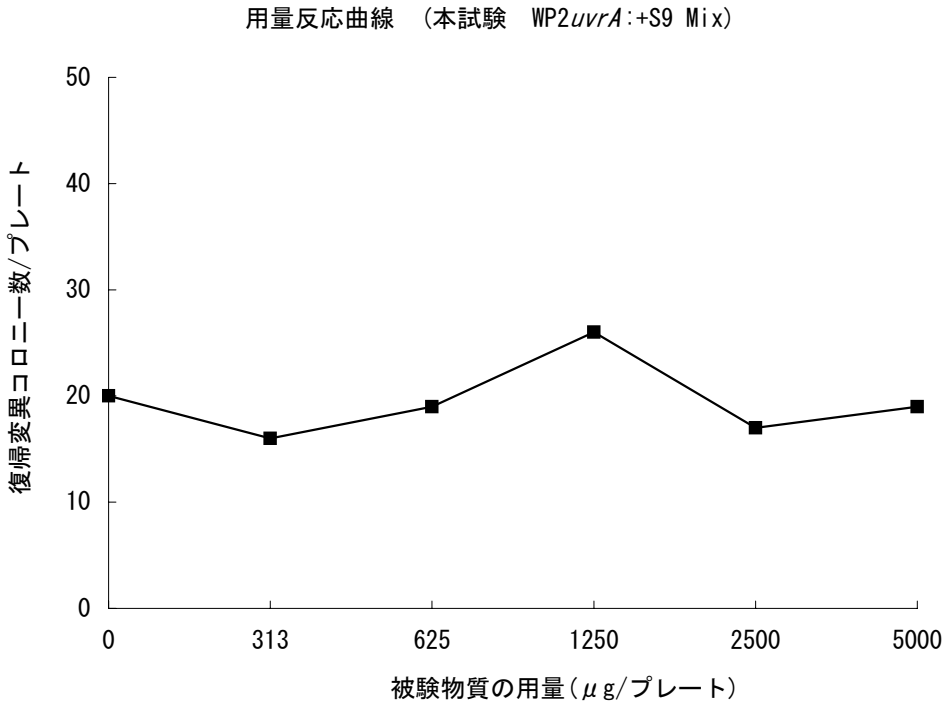

用量反応曲線　(本試験　WP2*uvrA*:+S9 Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
50
40
30
20
10
0
0
313
625
1250
2500
5000
被験物質の用量(μg/プレート)

図 7

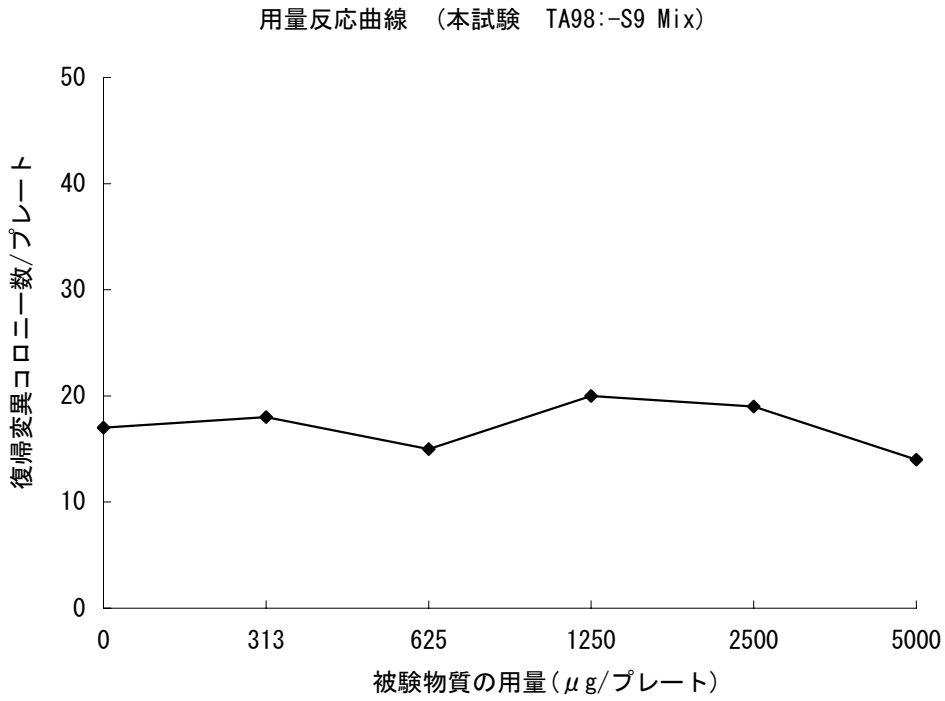

用量反応曲線　(本試験　TA98:-S9 Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
50
40
30
20
10
0
0
313
625
1250
2500
5000
被験物質の用量(μg/プレート)

図 8

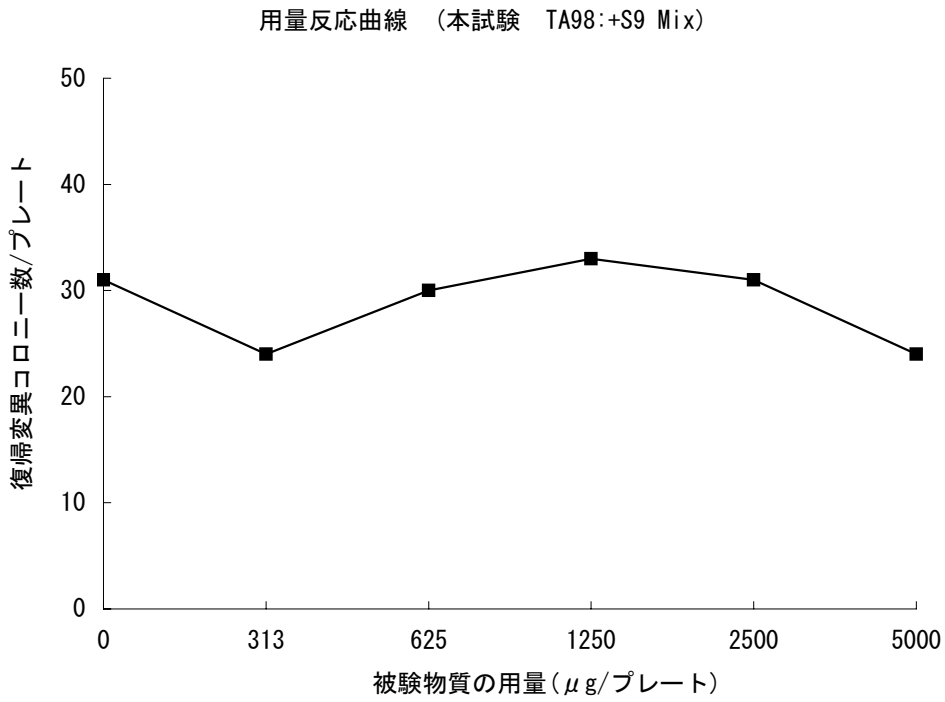

用量反応曲線　(本試験　TA98:+S9 Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
50
40
30
20
10
0
0
313
625
1250
2500
5000
被験物質の用量(μg/プレート)

図 9

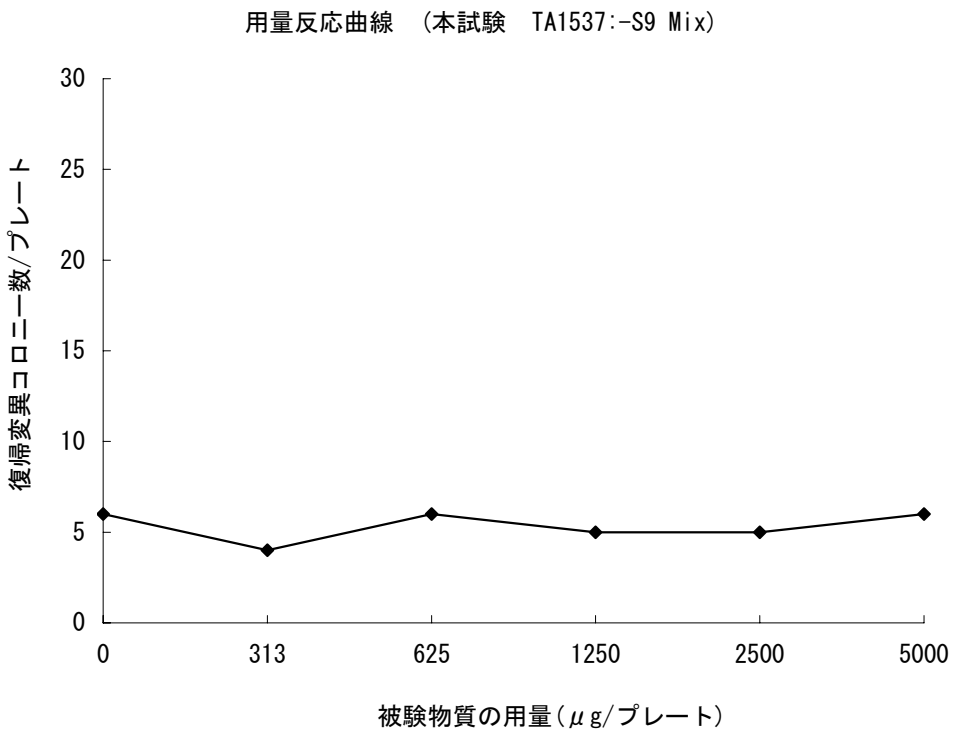
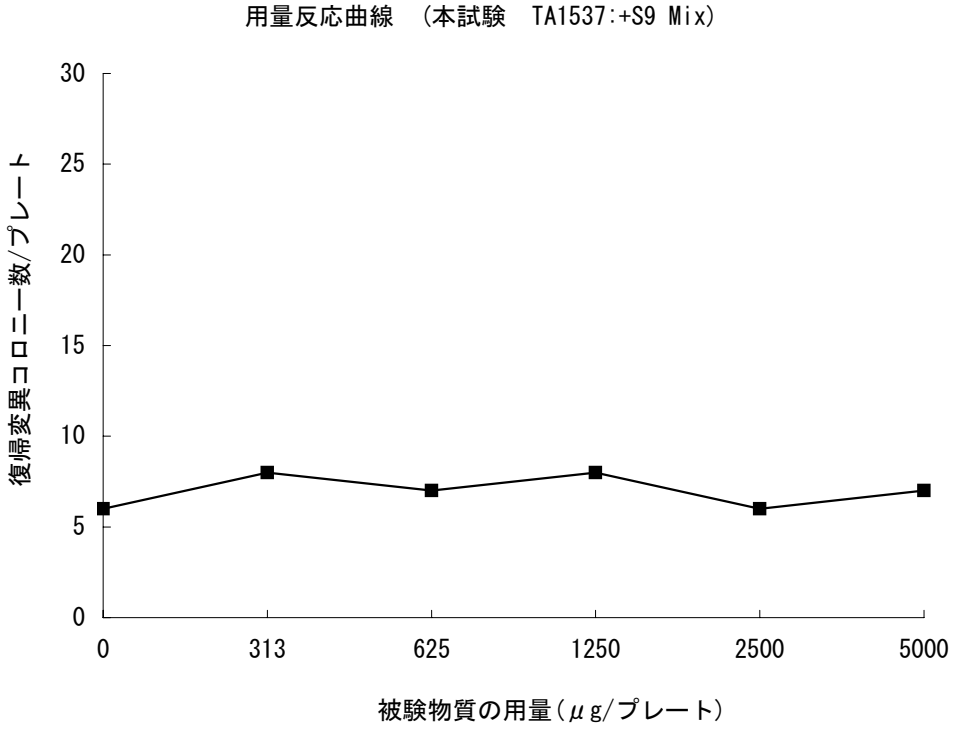

用量反応曲線　(本試験　TA1537:-S9 Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
30
25
20
15
10
5
0
0
313
625
1250
2500
5000
被験物質の用量(μg/プレート)

図 10


用量反応曲線　(本試験　TA1537:+S9 Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
30
25
20
15
10
5
0
0
313
625
1250
2500
5000
被験物質の用量(μg/プレート)