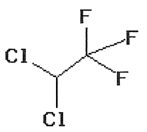
微生物を用いる変異原性試験結果報告書

1　一般的事項

化学物質の名称（IUPAC命名法による）	ジクロロトリフルオロエタン		
別名	2,2-dichloro-1,1,1-trifluoroethane、HCFC-123		
構造式又は示性式（構造が単一で示せない場合はその組成）	 $C_2HCl_2F_3$		
試験に供する化学物質の純度	99.9%	試験に供する化学物質の Lot No.	3SJ3F-DP
不純物の名称及び含有率（濃度）	—		
CAS番号	306-83-2	蒸気圧	94kPa(25℃)
分子量	152.91	分配係数（1-オクタノール/水分配係数）	2.31
融点	-107℃		
沸点	27.6℃	常温における性状	無色～わずかに薄い黄色の透明液体(25℃)
安定性	水：— 光：— 熱：—		

溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	水	2.1 g/L(25℃)	—
	DMSO	—	—

＊日本バイオアッセイ研究センターの試験による。

2　試験に用いた菌株

菌　株　名	入　手　先	入手年月日
TA100	東京大学医科学研究所癌生物学研究部	1985年 6月21日
TA1535	同　上	1988年 5月16日
TA98	同　上	1988年 5月16日
TA1537	同　上	1988年 5月16日
WP2*uvrA*/pKM101	同　上	1983年 6月29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	2014年 9月 5日 製造
購入の場合のLot No.	RAA201409A
保存温度	－80℃（保存機器名　三洋電機株式会社 MDF-392AT）

(2) S9 の調製方法

使用動物		誘導物質	
種・系統	ラット・Sprague-Dawley (Slc:SD)	名　称	フェノバルビタール(PB) 及び 5,6-ベンゾフラボン (BF)
性	雄		
週齢	7　週	投与方法	腹腔内投与
体重	188～236 g	投与期間及び投与量 (g/kg体重)	1日目(投与開始日)：PB 0.03 2日目～4日目：PB 0.06 3日目：BF 0.08

(3) S9 mix の組成

成　分	S9 mix 1 ml 中の量	成　分	S9 mix 1 ml 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(%)
使用希釈気体	空気	日本バイオアッセイ研究センターで、空気をヘパフィルターで濾過したもの	—	—	—
希釈気体選択の理由	被験物質ガスは空気中で自燃性でないことから、空気を希釈気体に選択した。				
希釈被験物質の性状	空気との混合ガス				
調製の方法	テドラバッグ®(暴露容器)中に所定量の空気を導入した後、計算量の液体被験物質を注入し、加熱蒸散させ所定の濃度に調製した。				
希釈調製から使用までの保存時間と温度	暴露容器中で被験物質を直接気化させる方法を用いたので、希釈から使用までの時間経過はない。				
純度換算の有無	有　　　　(無)				

5　前培養の条件等

(1) 条件

	名称	製造元	Lot No.
ニュートリエントブロス	Oxoid ﾆｭｰﾄﾘｴﾝﾄﾌﾞﾛｽ No.2	OXOID LTD.	941971
前培養時間	10時間00分		
培養容器（形状・容量）	形　状：三角フラスコ	容　量：62.5 ml	
培養液量	15 ml	接種菌量	30 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*/pKM101	TA98	TA1537
生菌数 ($\times 10^9$ ／ml)	用量設定試験	2.24	3.39	4.02	2.66	2.47
	本試験	2.25	3.26	4.08	2.78	2.47
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：オリエンタル酵母工業株式会社)
製造年月日	2014年9月2日 製造
購入の場合の Lot No.	ANI440ID
使用寒天の名称・製造元・Lot No. 等	使用寒天の名称：伊那寒天 BA-30A 製造元：伊那食品工業株式会社　Lot No. ：31122

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 (　ガス暴露法　)
その他の場合はその選定理由	被験物質は、37℃、1気圧で気体であることから、ガス暴露法を選択した。

(2) 試験条件 (プレート当たり)

プレインキュベーション法			
組成	菌懸濁液	0.1	ml
	被験物質ガス容積	500	ml
	Na-ﾘﾝ酸緩衝液(直接法による場合)	0.5	ml
	S9 mix(代謝活性化法による場合)	0.5	ml
	トップアガー	2	ml
暴露	温度	37	℃
	時間	24	時間
インキュベーション	温度	37	℃
	時間	24	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　面積及び数え落とし補正)

9　試験結果

(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表-1に、本試験の結果を表-2及び図-1～10に示した。 用量設定試験を0.05、0.1、0.5、1、5、10、50%の7用量段階で実施したところ、TA98、TA100、TA1535、TA1537及びWP2*uvrA*/pKM101の代謝活性化法による場合及び直接法による場合のいずれの場合においても陰性対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数の増加はみられなかった。 最高用量を生育阻害を示した用量である50%として本試験を実施したところ、用量設定試験と同様、TA98、TA100、TA1535、TA1537及びWP2*uvrA*/pKM101の代謝活性化法による場合及び直接法による場合のいずれの場合においても陰性対照値の 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加はみられなかった。 プレート法で実施した陽性対照物質は、それぞれの試験菌株において陰性対照値の 2倍以上の復帰変異コロニー数を誘発した。また、陰性対照値及び陽性対照値は、当センターのヒストリカルデータより作成した基準の範囲内であった。これらの結果は、試験が適切に実施されたことを示している。 以上の結果より、ジクロロトリフルオロエタンの微生物に対する変異原性は、陰性と判定した。	

(3) 参考事項

ガス暴露法の手順
S9 mixあるいは0.1M Na-リン酸緩衝液0.5 mlと菌懸濁液0.1 mlを試験管に入れ、良く混合した後、トップアガー2.0 ml を加え、直ちに最少グルコース寒天平板培地(プレート)上に広げて固めた(重層法)。固化したプレートのふたをはずし、プレートを代謝活性化の有無別、用量別にシャーレホルダーに固定して入れた。あらかじめ一辺を切断したテドラバッグ®(暴露容器)中に、プレート入りのシャーレホルダーを入れ、切断面をビニールテープを用いて密封した後、所定量の希釈気体（空気）を導入し、低温室（室温：約5℃）で被験物質(液体)を注入した。被験物質量は、加熱蒸散した被験物質(気体)と空気を混合した被験物質ガスがプレート1枚当たり500 mlの容積で、所定の濃度になるように計算で求めた。37℃で24時間遮光して暴露した後、テドラバッグ®からプレートの入ったシャーレホルダーを取り出し、クリーンベンチ内で20～30分間放置し、被験物質ガスを飛散させた。被験物質ガスを飛散させた後、シャーレホルダーからプレートをはずし、プレートにふたをして代謝活性化の有無別、用量別に袋に入れ、さらに37℃で24時間遮光して培養し、暴露とあわせて37℃で48時間培養した。培養後、試験菌株の生育阻害状況を調べ復帰突然変異コロニー数を測定した。

１０　その他

試験実施施設	名　　称	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
	所在地	〒257－0015　神奈川県秦野市平沢 2445　電話 0463 (82) 3911　FAX 0463 (82) [redacted]
試験責任者	職氏名	[redacted]
	経験年数	[redacted]
試験番号	6386	
試験期間	2014 年 11 月 17 日　～　2015 年 2 月 6 日	

表-1

試験結果表（用量設定試験）

被験物質の名称：ジクロロトリフルオロエタン

代謝活性化系の有無	被験物質の暴露用量 (%)	TA100	TA1535	WP2*uvrA*/pKM101	TA98	TA1537
試験実施期間	2014年 12月 2日から 2014年 12月 5日					
		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	
S9 mix (−)	陰性対照（空気）	86 89 99 91 (91)	8 9 8 8 (8)	90 82 66 84 (81)	15 17 20 17 (17)	14 9 13 16 (13)
	0.05	108 113 (111)	6 7 (7)	85 87 (86)	10 9 (10)	14 17 (16)
	0.1	104 93 (99)	9 9 (9)	79 97 (88)	18 14 (16)	18 20 (19)
	0.5	96 97 (97)	6 13 (10)	61 84 (73)	8 15 (12)	18 9 (14)
	1	81 107 (94)	7 11 (9)	82 111 (97)	14 14 (14)	10 11 (11)
	5	74 92 (83)	2 3 (3)	61 74 (68)	9 9 (9)	17 13 (15)
	10	55 68 (62)	11 3 (7)	47 39 (43)	7 8 (8)	15 20 (18)
	50	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)
S9 mix (+)	陰性対照（空気）	102 104 97 120 (106)	15 8 10 8 (10)	104 87 99 83 (93)	17 24 20 17 (20)	9 11 18 16 (14)
	0.05	111 119 (115)	8 11 (10)	91 107 (99)	23 15 (19)	13 11 (12)
	0.1	96 115 (106)	10 7 (9)	79 98 (89)	13 20 (17)	11 11 (11)
	0.5	102 102 (102)	8 8 (8)	76 89 (83)	28 16 (22)	7 13 (10)
	1	93 115 (104)	8 10 (9)	79 89 (84)	17 21 (19)	14 18 (16)
	5	99 86 (93)	7 9 (8)	69 69 (69)	16 20 (18)	20 14 (17)
	10	74 78 (76)	6 2 (4)	51 54 (53)	26 17 (22)	14 11 (13)
	50	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)
陽性対照 S9 mixを必要としないもの	名称	AF−2	NaN_3	AF−2	AF−2	9−AA
	用量(μg/プレート)	0.01	0.5	0.005	0.1	80
	コロニー数／プレート	397 418 (408)	313 330 (322)	618 517 (568)	605 616 (611)	875 1047 (961)
陽性対照 S9 mixを必要とするもの	名称	2−AA	2−AA	2−AA	2−AA	2−AA
	用量(μg/プレート)	1	2	2	0.5	2
	コロニー数／プレート	1305 1400 (1353)	254 241 (248)	879 850 (865)	393 397 (395)	228 206 (217)

[備考]
1．菌の生育阻害(抗菌作用)が認められる場合は、該当する数値の右に＊印を付した。
2．（ ）内には各プレートのコロニー数の平均値を記入した。
3．復帰変異数は、被験物質用量の低い順に実測値及び平均値を記入した。
4．陽性対照物質の名称 AF-2：2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、NaN_3：ナトリウム・アジド、9-AA：9-アミノアクリジン、
2-AA：2-アミノアントラセン

表-2

試 験 結 果 表 （本 試 験）

被験物質の名称：ジクロロトリフルオロエタン

試験実施期間	2014年 12月 15日から 2014年 12月 18日						
代謝活性化系の有無		被験物質の暴露用量 (%)	復帰変異数（コロニー数／プレート） 塩基対置換型 TA100	塩基対置換型 TA1535	塩基対置換型 WP2*uvrA*/pKM101	フレームシフト型 TA98	フレームシフト型 TA1537
S9 mix (−)		陰性対照 （空気）	120 116 122 113 (118)	15 8 11 11 (11)	78 90 93 106 (92)	17 20 23 17 (19)	11 14 13 11 (12)
		0.5	128 114 (121)	15 13 (14)	75 75 (75)	22 14 (18)	13 14 (14)
		1	121 121 (121)	7 10 (9)	69 75 (72)	11 20 (16)	7 6 (7)
		2	96 111 (104)	7 7 (7)	92 78 (85)	20 10 (15)	13 15 (14)
		5	100 91 (96)	8 6 (7)	76 76 (76)	15 21 (18)	9 11 (10)
		10	62 64 (63)	7 2 (5)	33 23 (28)	13 15 (14)	10 8 (9)
		20	66 68 (67)	6 7 (7)	13* 15* (14*)	15 21 (18)	8 11 (10)
		50	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)
S9 mix (＋)		陰性対照 （空気）	93 117 124 113 (112)	16 7 11 7 (10)	86 85 93 89 (88)	26 26 21 20 (23)	10 11 13 10 (11)
		0.5	86 138 (112)	9 6 (8)	97 87 (92)	16 24 (20)	7 14 (11)
		1	114 94 (104)	9 8 (9)	77 83 (80)	25 21 (23)	11 10 (11)
		2	114 106 (110)	8 11 (10)	69 84 (77)	14 15 (15)	14 13 (14)
		5	86 76 (81)	7 10 (9)	76 84 (80)	14 18 (16)	16 15 (16)
		10	70 83 (77)	5 7 (6)	40 40 (40)	23 26 (25)	13 7 (10)
		20	11* 22* (17*)	1* 3* (2*)	0* 0* (0*)	11 15 (13)	0* 0* (0*)
		50	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)
陽性対照	S9 mixを必要としないもの	名 称	ＡＦ－２	NaN_3	ＡＦ－２	ＡＦ－２	９－ＡＡ
		用量(μg/プレート)	０．０１	０．５	０．００５	０．１	８０
		コロニー数／プレート	438 487 (463)	364 401 (383)	621 542 (582)	698 721 (710)	1032 1056 (1044)
	S9 mixを必要とするもの	名 称	２－ＡＡ	２－ＡＡ	２－ＡＡ	２－ＡＡ	２－ＡＡ
		用量(μg/プレート)	1	2	2	０．５	2
		コロニー数／プレート	1397 1402 (1400)	299 285 (292)	1016 980 (998)	413 408 (411)	285 274 (280)

［備考］
1． 菌の生育阻害(抗菌作用)が認められる場合は、該当する数値の右に＊印を付した。
2． （ ）内には各プレートのコロニー数の平均値を記入した。
3． 復帰変異数は、被験物質用量の低い順に実測値及び平均値を記入した。
4． 陽性対照物質の名称 AF-2：2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、NaN_3：ナトリウム・アジド、9-AA：9-アミノアクリジン、
2-AA：2-アミノアントラセン

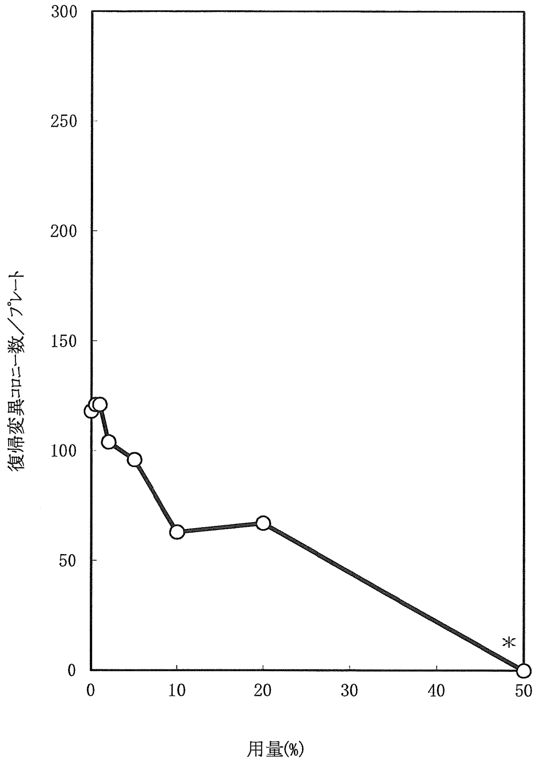


図-1 TA100における用量－反応曲線
直接法による場合（本試験）

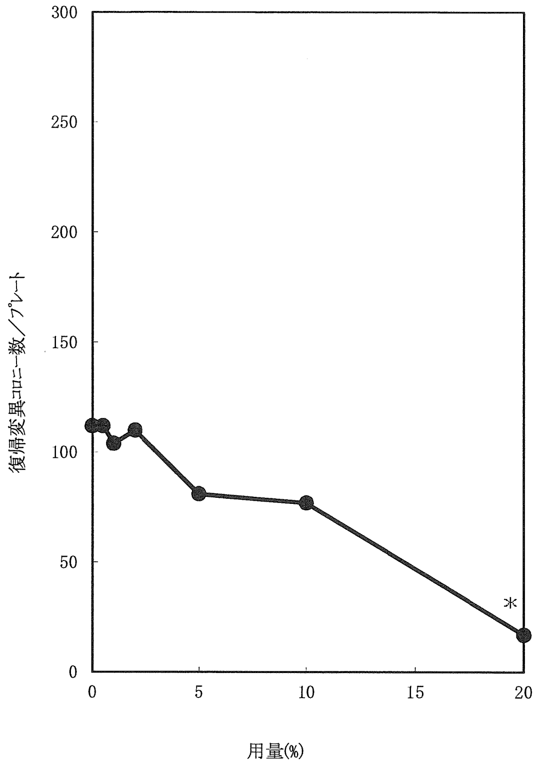


図-2 TA100における用量－反応曲線
代謝活性化法による場合（本試験）
（20%までプロットした。）

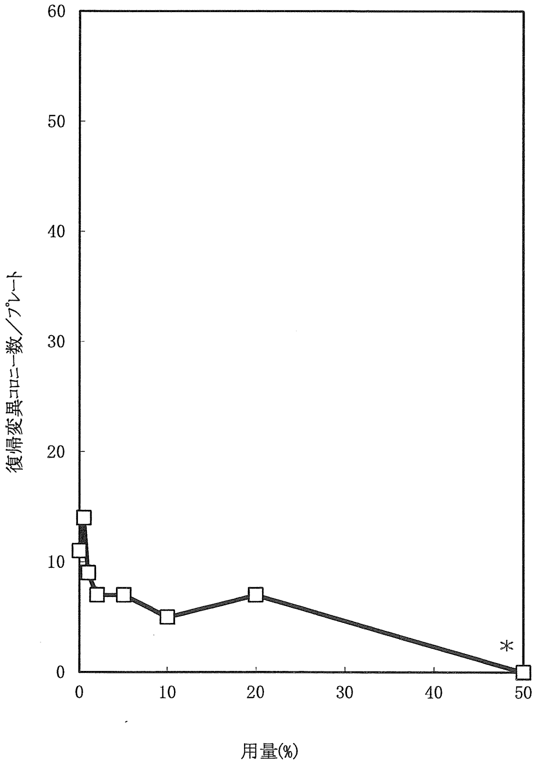


図-3 TA1535における用量－反応曲線
直接法による場合（本試験）

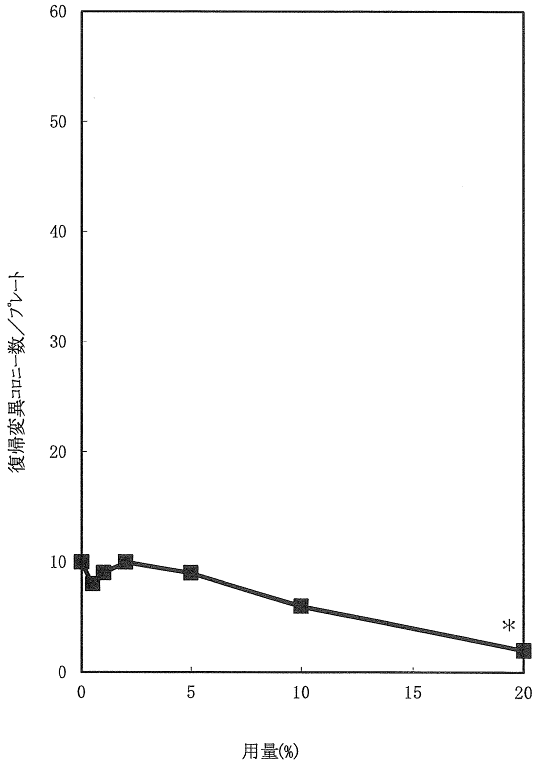


図-4 TA1535における用量－反応曲線
代謝活性化法による場合（本試験）
（20%までプロットした。）

注：生育阻害が認められる場合は、該当するポイントの左上に＊を付した。

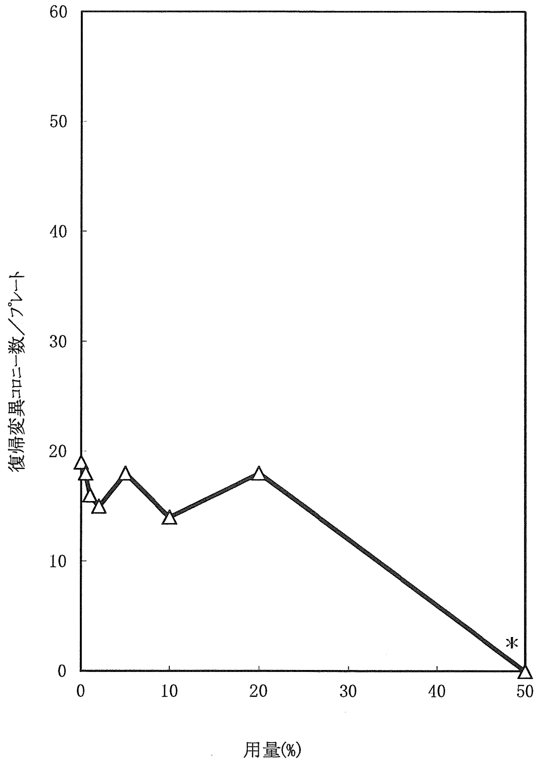


図-5 TA98における用量－反応曲線
直接法による場合（本試験）

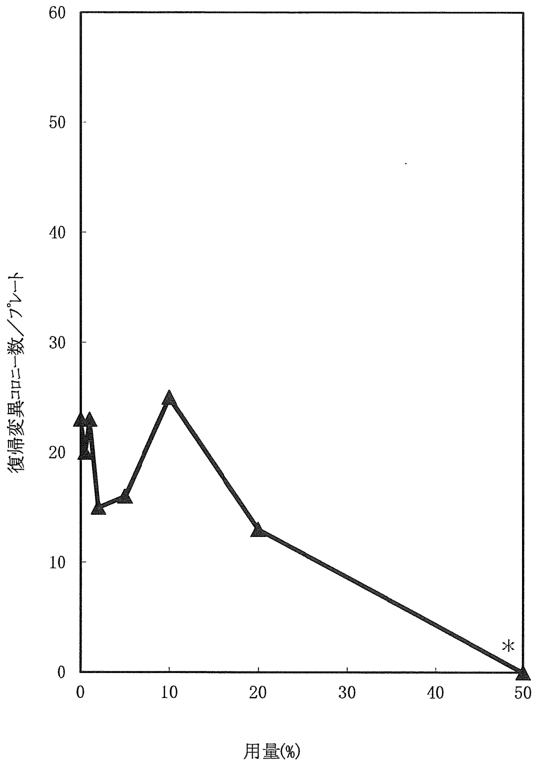


図-6 TA98における用量－反応曲線
代謝活性化法による場合（本試験）

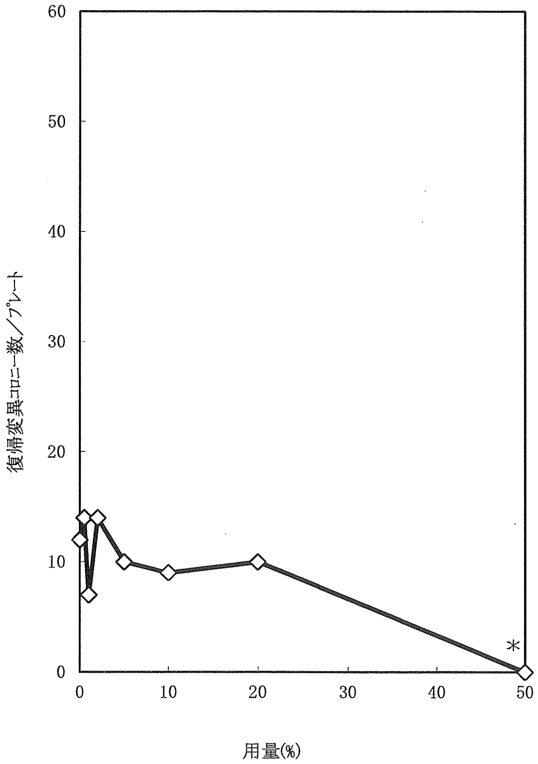


図-7 TA1537における用量－反応曲線
直接法による場合（本試験）

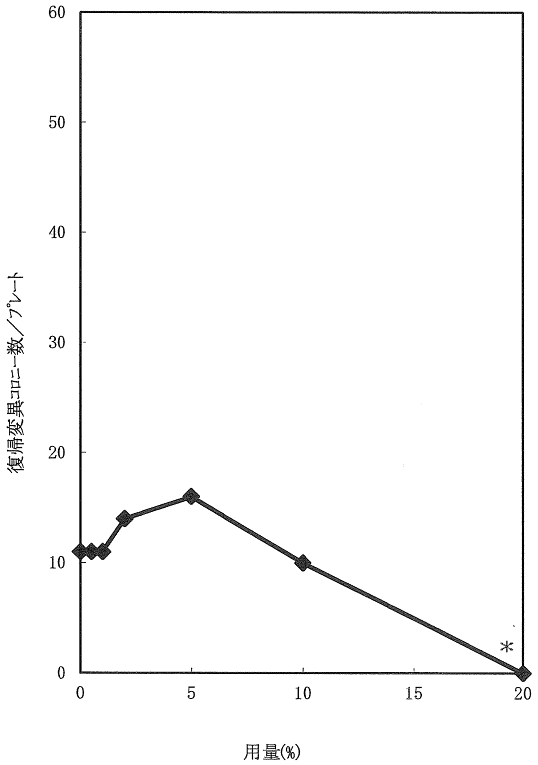


図-8 TA1537における用量－反応曲線
代謝活性化法による場合（本試験）
(20%までプロットした。)

注：生育阻害が認められる場合は、該当するポイントの左上に＊を付した。

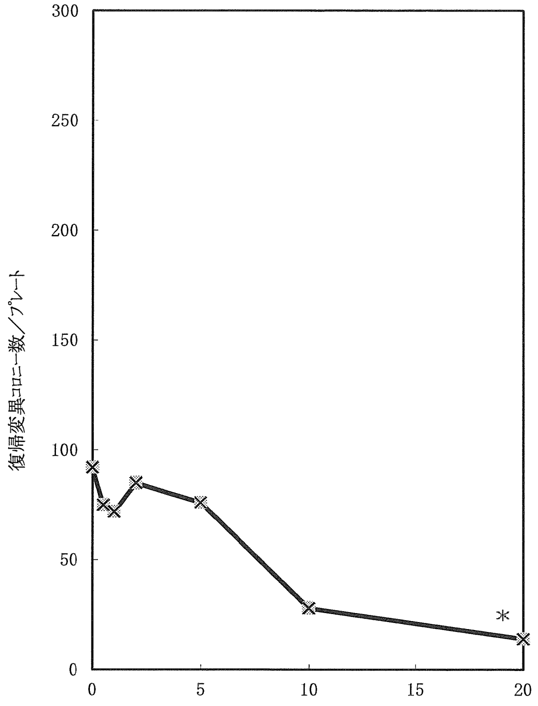


図-9 WP2*uvrA*/pKM101における用量－反応曲線
直接法による場合（本試験）
(20%までプロットした。)

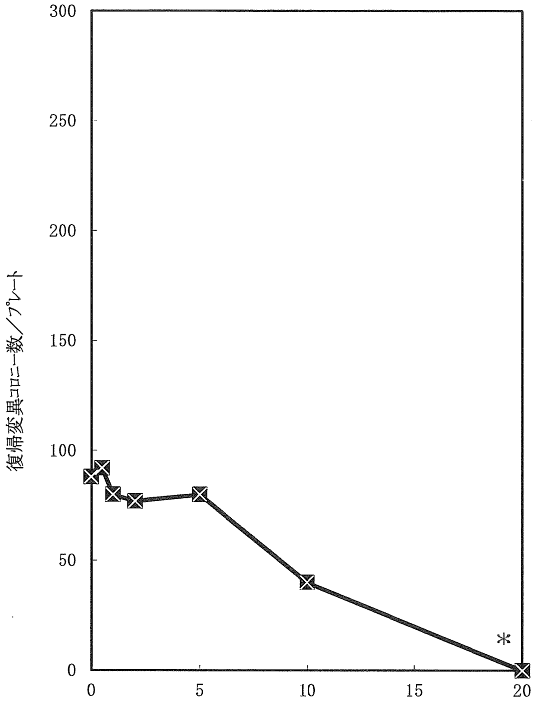


図-10 WP2*uvrA*/pKM101における用量－反応曲線
代謝活性化法による場合（本試験）
(20%までプロットした。)

注：生育阻害が認められる場合は、該当するポイントの左上に＊を付した。