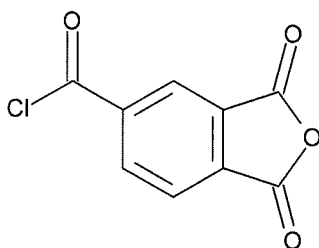


## 微生物を用いる変異原性試験結果報告書

### 1. 一般的事項

新規化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	無水トリメリト酸クロライド		
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%	試験に供した新規化学物質の Lot No.	8KZ4L
不純物の名称及び濃度	/		
CAS 番号	1204-28-0	蒸気圧	/
分子量	210.57	分配係数	/
融点	69.0°C	常温における性状	固体
沸点	195°C/2.0 kPa		
安定性	適切な条件下で安定		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中での安定性
	水	/	分解し、有毒なガスを発生する
	DMSO	/	反応する可能性あり
	アセトン	100 mg/mL で溶解	色調変化あり (無色→桃色)
	1,4-ジオキサン	100 mg/mL で溶解	発熱、ガスの発生等の反応性なし

(備考) 上記被験物質情報は、製造元からの情報による。なお、溶解度及び溶媒中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
<i>Salmonella typhimurium</i> TA98	国立医薬品食品衛生研究所	2017年4月12日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA100	国立医薬品食品衛生研究所	2017年4月12日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535	国立医薬品食品衛生研究所	2017年4月12日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1537	国立医薬品食品衛生研究所	2017年4月12日
<i>Escherichia coli</i> WP2uvrA	国立医薬品食品衛生研究所	2017年4月12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：株式会社ボゾリサーチセンター）
製造年月日	2019年8月2日製造
購入の場合 Lot No.	S9-190802
保存温度	-70°C 以下

### (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	221.4~250.8 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 <sub>2</sub>	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(%)
	1,4-ジオキササン	富士フィルム和光純薬株式会社	APJ5976	JIS 規格 試薬特級	100.0%
溶媒選択の理由	<p>本被験物質は、水に分解し、有毒なガスを発生するとの製造元の情報及び本被験物質のカルボン酸クロリドが DMSO と反応することから、アセトン及び 1,4-ジオキササンの 100 mg/mL での溶解性試験を実施した。その結果、共に溶解したが、アセトンでは溶媒添加直後は無色であったが、溶媒添加 1 時間後に桃色に変化していたためアセトンと反応していると判断した。1,4-ジオキササンにおいては、溶媒添加直後、発熱、ガスの発生等の反応性は認められなかった。溶媒添加 1 時間後においても色調変化等の反応性も認められなかったため 1,4-ジオキササンを溶媒として選択した。なお、被験液の調製には、モレキュラシーブス 4A 1/16（富士フィルム和光純薬株式会社；Lot No. YLP7563）で脱水した 1,4-ジオキササンを使用した。</p>				
被験物質溶液の性状	<input checked="" type="checkbox"/> 溶解	<input type="checkbox"/> 懸濁	<input type="checkbox"/> 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 <input checked="" type="checkbox"/> 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.	2202237
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	<i>S.typhimurium</i> 株 20 µL <i>E.coli</i> 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 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
生菌数 ( $\times 10^9$ /mL)	用量設定試験	5.07	4.41	7.74	5.41	4.22
	本試験	5.10	4.43	7.73	5.48	4.65
測定方法		<input checked="" type="checkbox"/> O.D.値より換算 <input type="checkbox"/> 段階希釈法 <input type="checkbox"/> 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 <input checked="" type="checkbox"/> 購入 (購入元 極東製薬工業株式会社)
製造年月日	2019年10月25日製造
購入の場合の Lot No.	DZAKAP02
使用寒天の名称・製造・Lot No.	大洋寒天・SSK セールス株式会社・Lot No. BM-M5-277

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	<input checked="" type="checkbox"/> プレインキュベーション法 <input type="checkbox"/> プレート法 <input type="checkbox"/> 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	0.05 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	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 <input type="checkbox"/> 2. 機器計測 <input checked="" type="checkbox"/>
補正の有無	1 無 <input type="checkbox"/> 2 有（補正の方法 面積補正） <input checked="" type="checkbox"/>

## 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
<p>判定の理由</p> <p>用量設定試験の結果を別表 1 に、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 Attachment として添付した。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>以上の試験結果より、本試験条件下において無水トリメリト酸クロライドは、微生物に対する遺伝子突然変異誘発能を有しない（陰性）と判定した。</p>		

(3) 参考事項

本被験物質による沈殿は、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。本被験物質による菌に対する生育阻害は、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98、TA1537 の 313 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、*E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化した場合のすべての菌株の 1250 µg/plate 以上の用量で認められた。

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。

本被験物質は湿気を避けるべきとの製造元からの情報より、容器の開封、被験物質の秤量は窒素を充填したパック内で行った。

溶媒の選定にあたり下記論文を参考とした。

Dorothy M. Maron, John Katzenellenbogen and Bruce N. Ames: COMPATIBILITY OF ORGANIC SOLVENTS WITH THE SALMONELLA/MICROSOME TEST, *Mutation Res.*, 88, pp.343-350, 1981

(別表1)

## 試験結果表 (用量設定試験)

被験物質の名称: 無水トリメリト酸クロライド

No. T-3096

試験実施期間		2019年11月28日 より 2019年12月2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	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9Mix (-)	陰性対照 (1,4-ジオキサ)	118 117 ( 118 )	10 13 ( 12 )	22 19 ( 21 )	24 25 ( 25 )	7 6 ( 7 )
	1.22	120 125 ( 123 )	8 12 ( 10 )	24 17 ( 21 )	18 17 ( 18 )	5 5 ( 5 )
	4.88	153 117 ( 135 )	7 6 ( 7 )	23 25 ( 24 )	18 24 ( 21 )	5 9 ( 7 )
	19.5	132 137 ( 135 )	12 11 ( 12 )	16 19 ( 18 )	24 16 ( 20 )	6 4 ( 5 )
	78.1	119 113 ( 116 )	12 11 ( 12 )	15 22 ( 19 )	22 25 ( 24 )	2 4 ( 3 )
	313	125 134 ( 130 )	12 10 ( 11 )	27 24 ( 26 )	14 * 19 * ( 17 )	6 * 7 * ( 7 )
	1250	0 * 0 * ( 0 )	0 * 0 * ( 0 )	13 * 19 * ( 16 )	7 * 10 * ( 9 )	0 * 0 * ( 0 )
	5000	0 * 0 * ( 0 )	0 * 0 * ( 0 )	0 * 0 * ( 0 )	0 * 0 * ( 0 )	0 * 0 * ( 0 )
	S9Mix (+)	陰性対照 (1,4-ジオキサ)	121 155 ( 138 )	8 10 ( 9 )	22 25 ( 24 )	36 36 ( 36 )
1.22		155 137 ( 146 )	5 7 ( 6 )	33 18 ( 26 )	37 25 ( 31 )	6 8 ( 7 )
4.88		129 122 ( 126 )	12 8 ( 10 )	30 19 ( 25 )	22 34 ( 28 )	6 13 ( 10 )
19.5		149 142 ( 146 )	6 7 ( 7 )	27 24 ( 26 )	24 25 ( 25 )	9 12 ( 11 )
78.1		142 131 ( 137 )	6 11 ( 9 )	17 21 ( 19 )	16 23 ( 20 )	12 9 ( 11 )
313		120 108 ( 114 )	10 7 ( 9 )	28 18 ( 23 )	26 23 ( 25 )	5 9 ( 7 )
1250		71 * 80 * ( 76 )	2 * 4 * ( 3 )	23 * 16 * ( 20 )	33 * 21 * ( 27 )	10 * 5 * ( 8 )
5000		0 * 0 * ( 0 )	0 * 0 * ( 0 )	0 * 0 * ( 0 )	0 * 0 * ( 0 )	0 * 0 * ( 0 )
陽性対照		名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2
	用量 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	コロニー数/プレート	659 688 ( 674 )	258 278 ( 268 )	121 142 ( 132 )	408 361 ( 385 )	1451 1390 ( 1421 )
	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
	用量 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
	コロニー数/プレート	1151 1226 ( 1189 )	243 247 ( 245 )	528 657 ( 593 )	287 289 ( 288 )	102 92 ( 97 )

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

\* : 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)

被験物質の名称：無水トリメリト酸クロライド

No. T-3096

試験実施期間		2019年12月17日 より 2019年12月20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	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9Mix (-)	陰性対照 (1,4-ジ'キサン)	108 116 ( 112 )	13 8 ( 11 )	29 35 ( 32 )	18 14 ( 16 )	7 12 ( 10 )
	9.77	NT	NT	NT	18 22 ( 20 )	7 5 ( 6 )
	19.5	NT	NT	NT	14 16 ( 15 )	11 10 ( 11 )
	39.1	97 105 ( 101 )	8 15 ( 12 )	25 20 ( 23 )	18 21 ( 20 )	7 8 ( 8 )
	78.1	103 119 ( 111 )	10 15 ( 13 )	19 29 ( 24 )	19 18 ( 19 )	10 7 ( 9 )
	156	106 93 ( 100 )	11 12 ( 12 )	18 25 ( 22 )	15 8 ( 12 )	7 11 ( 9 )
	313	110 90 ( 100 )	12 5 ( 9 )	18 20 ( 19 )	9* 12* ( 11 )	7* 7* ( 7 )
	625	105 103 ( 104 )	9 7 ( 8 )	32 21 ( 27 )	NT	NT
	1250	0* 0* ( 0 )	0* 0* ( 0 )	22* 16* ( 19 )	NT	NT
	S9Mix (+)	陰性対照 (1,4-ジ'キサン)	139 123 ( 131 )	7 10 ( 9 )	33 26 ( 30 )	28 33 ( 31 )
39.1		113 132 ( 123 )	6 9 ( 8 )	24 23 ( 24 )	24 24 ( 24 )	7 8 ( 8 )
78.1		116 117 ( 117 )	11 7 ( 9 )	27 22 ( 25 )	29 29 ( 29 )	12 13 ( 13 )
156		114 110 ( 112 )	8 11 ( 10 )	31 25 ( 28 )	26 32 ( 29 )	7 6 ( 7 )
313		111 105 ( 108 )	7 11 ( 9 )	26 28 ( 27 )	28 29 ( 29 )	10 5 ( 8 )
625		98 97 ( 98 )	7 12 ( 10 )	39 23 ( 31 )	21 31 ( 26 )	13 11 ( 12 )
1250		100* 86* ( 93 )	4* 8* ( 6 )	25* 30* ( 28 )	22* 13* ( 18 )	7* 2* ( 5 )
陽性対照		名 称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2
	用量 (μg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	コロニー数/プレート	625 642 ( 634 )	238 261 ( 250 )	113 116 ( 115 )	377 385 ( 381 )	1828 1588 ( 1708 )
	名 称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
	用量 (μg/プレート)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
	コロニー数/プレート	1227 1167 ( 1197 )	245 285 ( 265 )	590 528 ( 559 )	221 221 ( 221 )	77 88 ( 83 )

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

\* : 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、2枚のプレートの平均値を示す。



図 1

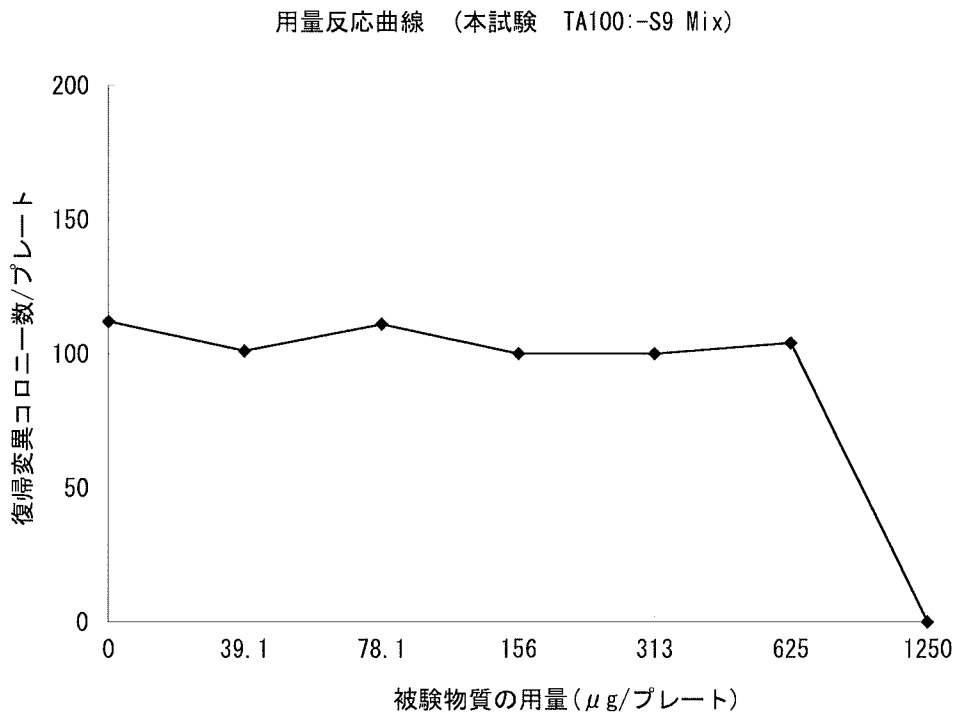


図 2

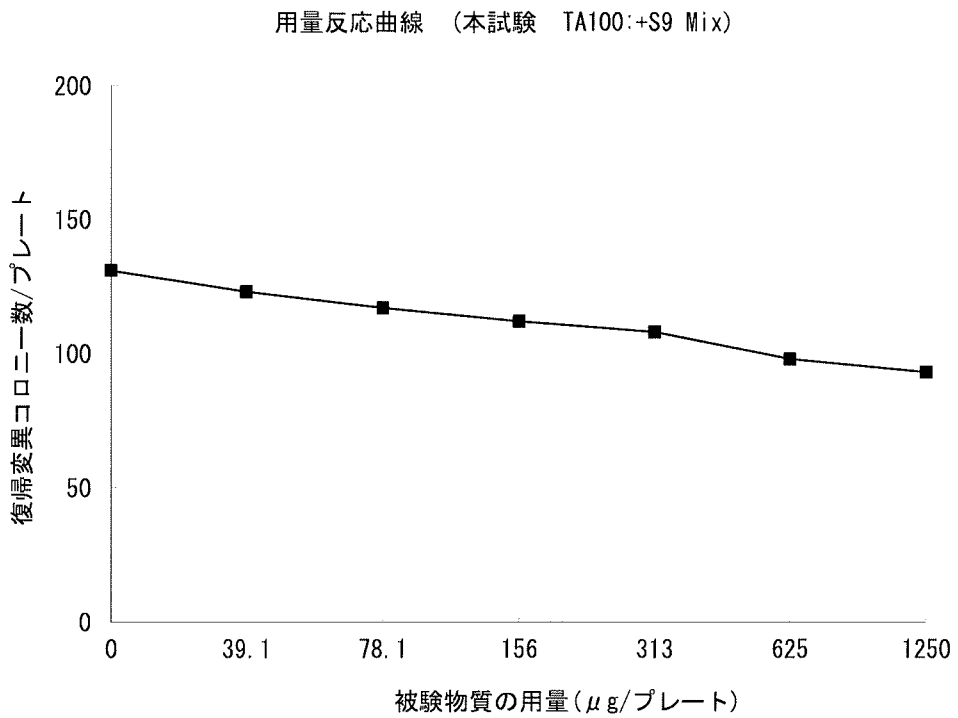


図 3

用量反応曲線 (本試験 TA1535:-S9 Mix)

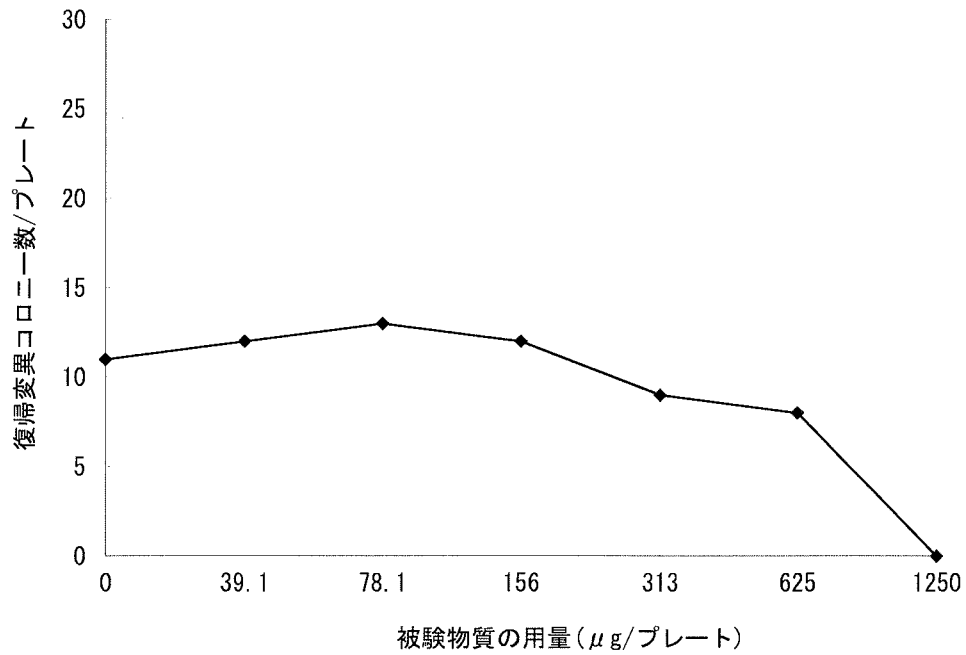


図 4

用量反応曲線 (本試験 TA1535:+S9 Mix)

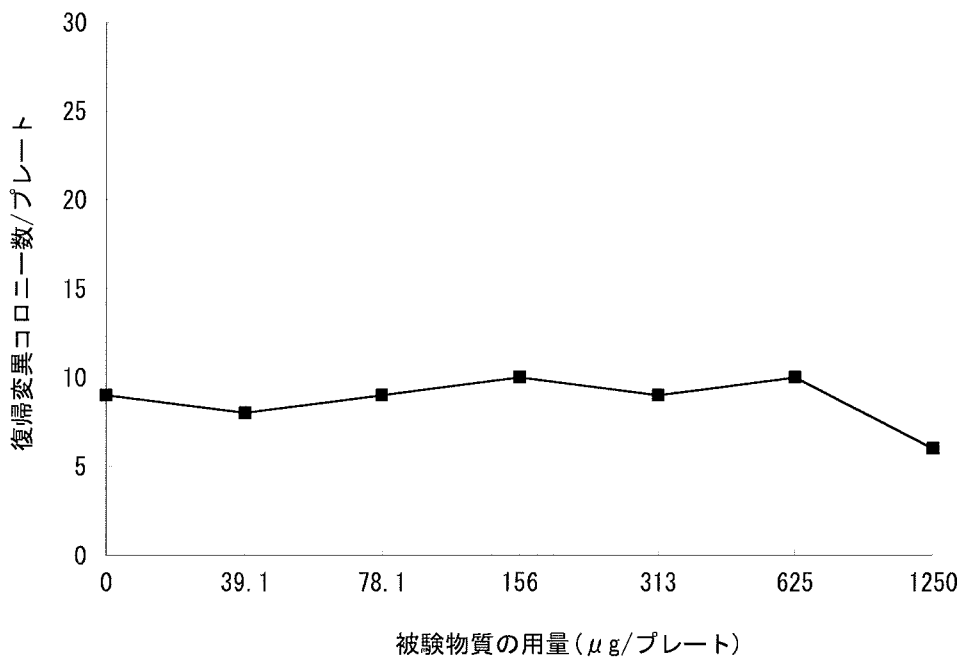


図 5

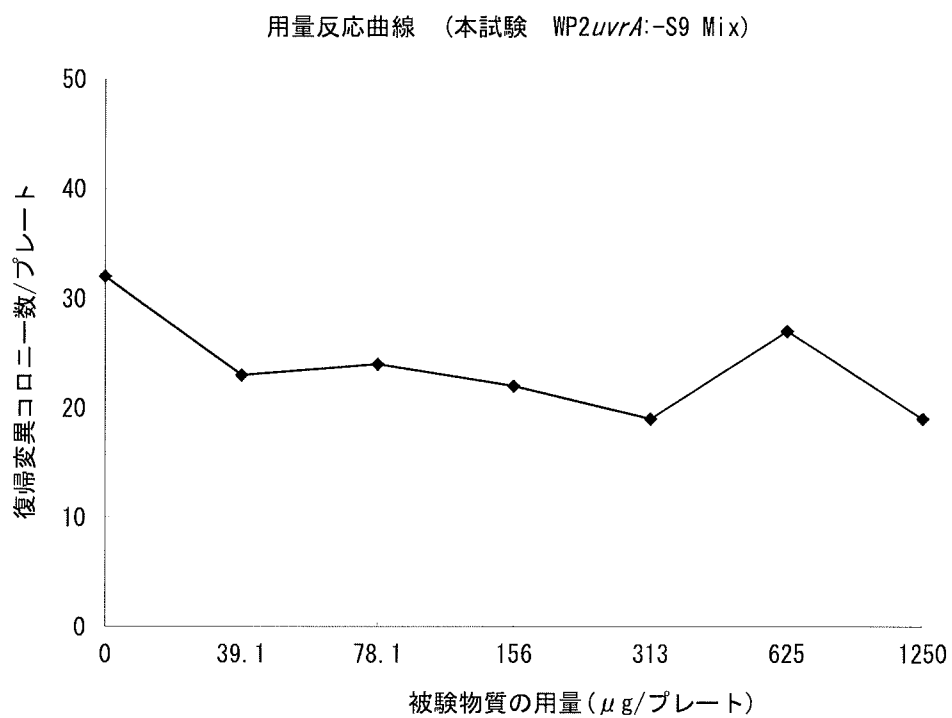


図 6

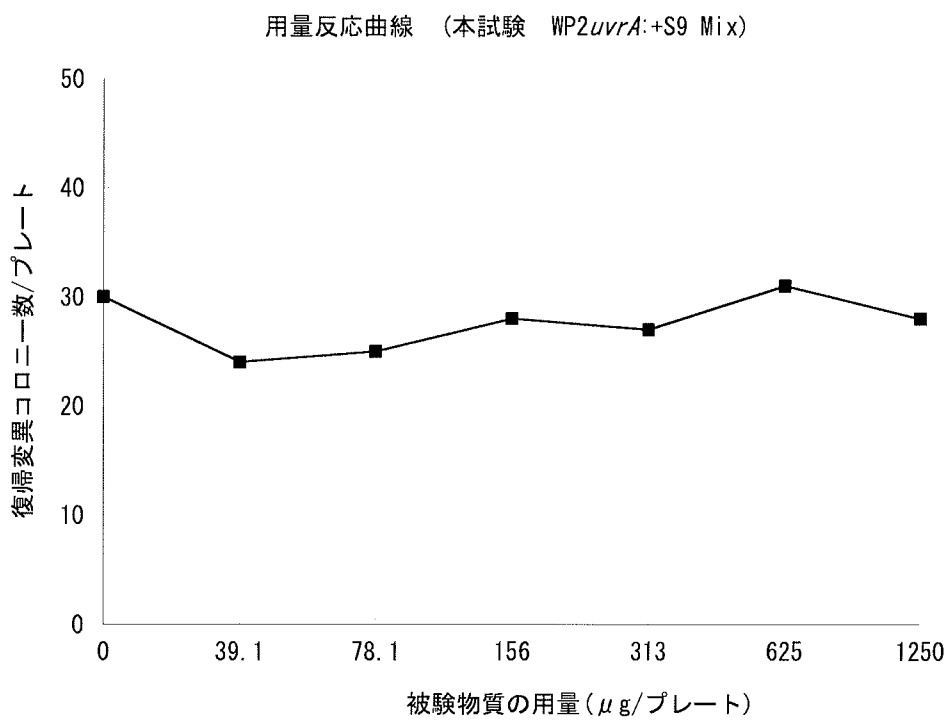


図 7

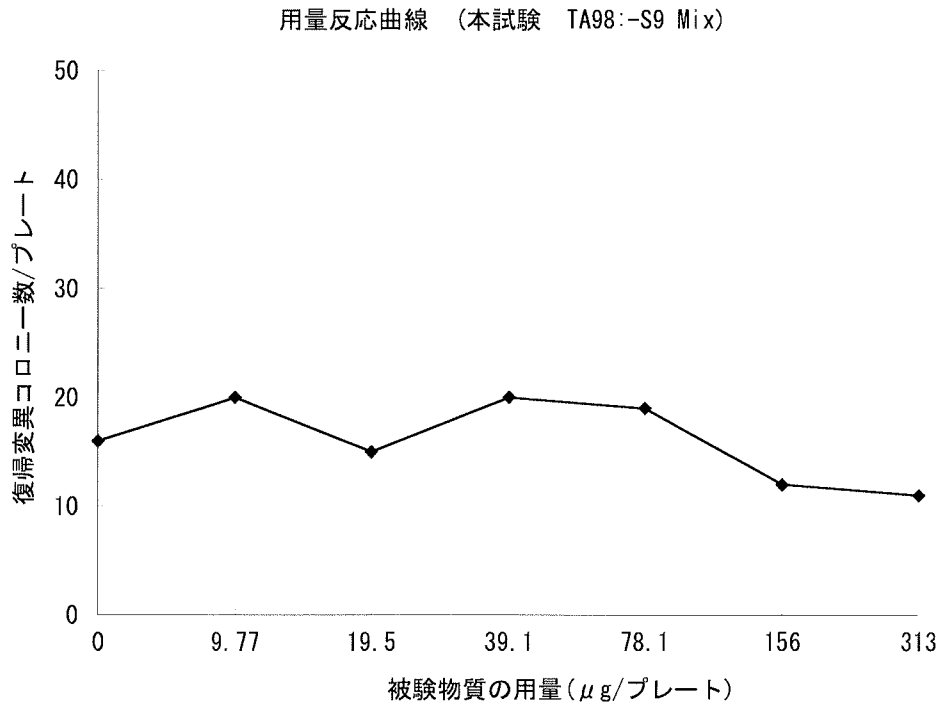


図 8

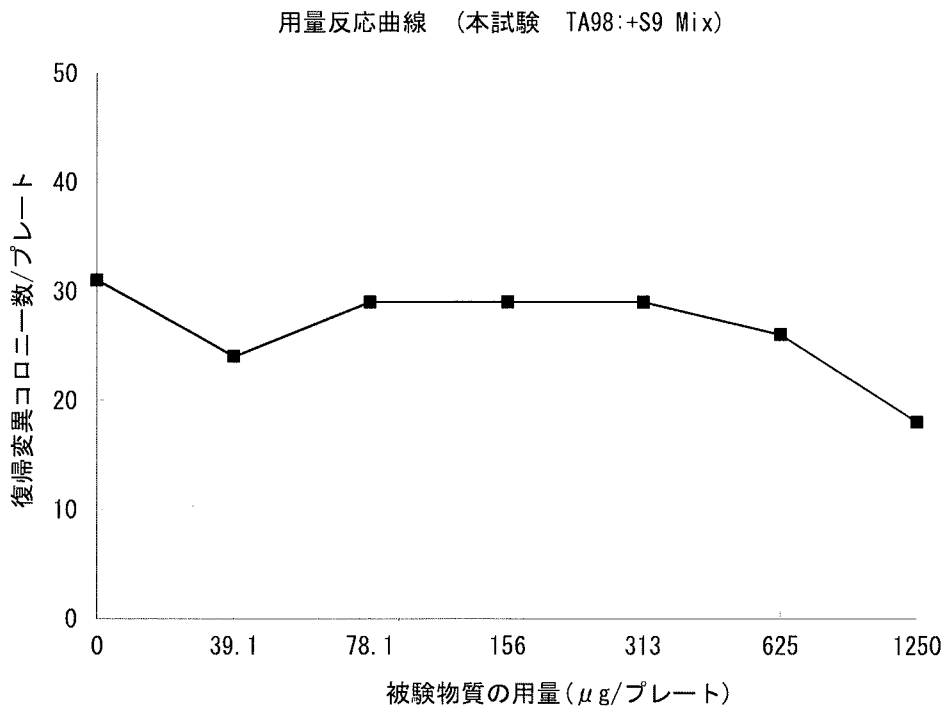


図 9

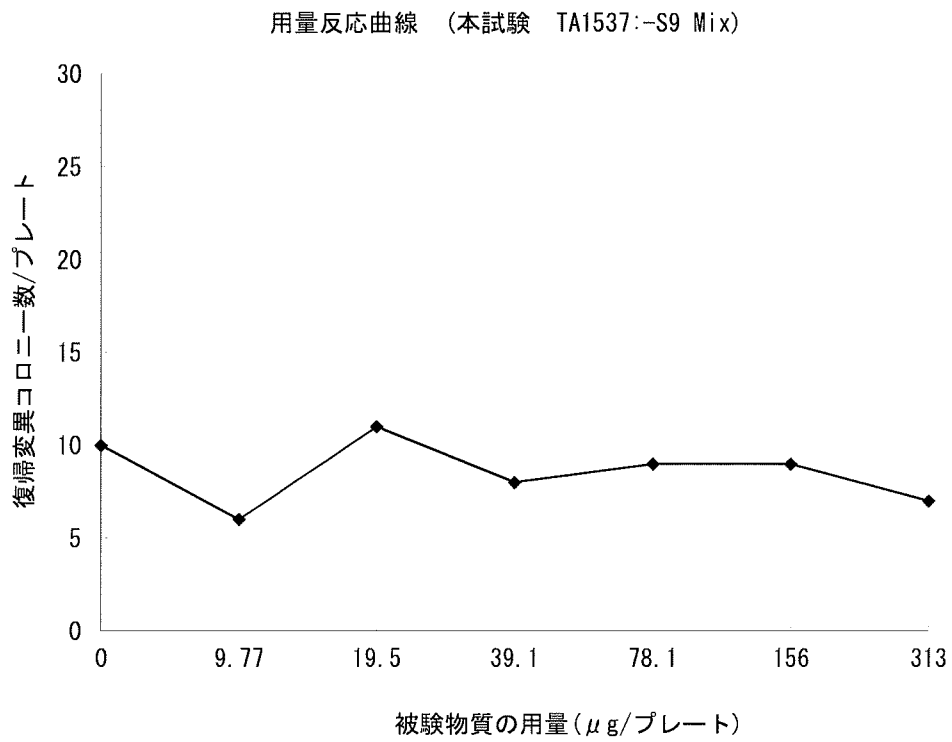
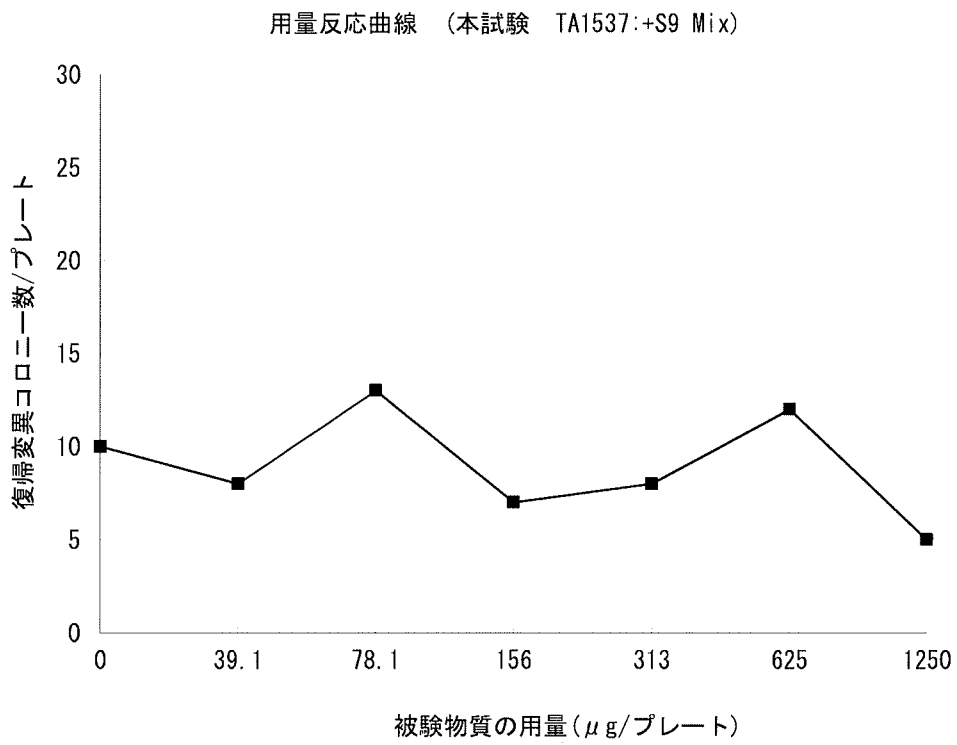


図 10



## Background Data

Test Category : Bacterial reverse mutation test (Preincubation Method)

CODE No. : 190924

Period : From September 20, 2019 to September 24, 2019

Tester Strains	S9 Mix (-) or (+)	Classification	Mean	S.D.	Management ranges		Number of plates
					Lower limit	Upper limit	
TA100	-	Solvent control	107	13	69	146	20
		Positive control AF-2 (0.01 µg/plate)	565	87	302	827	20
	+	Solvent control	121	11	87	154	20
		Positive control B[a]P (5.0 µg/plate)	977	90	708	1247	20
TA1535	-	Solvent control	10	4	1	20	20
		Positive control SAZ (0.5 µg/plate)	305	44	174	437	20
	+	Solvent control	10	3	1	20	20
		Positive control 2AA (2.0 µg/plate)	231	28	146	316	20
WP2uvrA	-	Solvent control	29	7	9	49	20
		Positive control AF-2 (0.01 µg/plate)	101	21	38	164	20
	+	Solvent control	30	7	9	52	20
		Positive control 2AA (10.0 µg/plate)	611	84	358	864	20
TA98	-	Solvent control	26	5	11	42	20
		Positive control AF-2 (0.1 µg/plate)	399	32	304	495	20
	+	Solvent control	37	7	16	57	20
		Positive control B[a]P (5.0 µg/plate)	282	22	218	347	20
TA1537	-	Solvent control	7	4	1	18	20
		Positive control ICR-191 (1.0 µg/plate)	1406	267	605	2208	20
	+	Solvent control	10	3	2	18	20
		Positive control B[a]P (5.0 µg/plate)	83	12	47	119	20

(Notice)

Solvent controls Water, Dimethyl sulfoxide(DMSO)

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

SAZ : Sodium azide

ICR-191 : 2-Methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)aminopropylamino]acridine·2HCl

B[a]P : Benzo[a]pyrene

2AA : 2-Aminoanthracene

S9Mix (-) : without metabolic activation

(+) : with metabolic activation