

最 終 報 告 書

α , α' , α'' -プロパン-1, 2, 3-トリイルトリス
[ω -ヒドロキシーポリ(オキシエチレン)] :
細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号 T-3599

試験期間

2022 年 1 月 18 日-2022 年 3 月 23 日

試験施設

株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所
〒156-0042 東京都世田谷区羽根木 1-3-11

試験委託者

厚生労働省

〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1-2-2

試験受託者

株式会社ボゾリサーチセンター

〒151-0065 東京都渋谷区大山町 36-7

T-3599

1. GLP 陳述書

試験番号 : T-3599

試験表題 : α , α' , α'' -プロパン-1, 2, 3-トリイルトリス [ω -ヒドロキシーポリ (オキシエチレン)] : 細菌を用いる復帰突然変異試験

本試験は以下の GLP 基準を遵守して実施したものです。

- 「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」
(平成 23 年 3 月 31 日、薬食発 0331 第 8 号、平成 23・03・29 製局第 6 号、環保企発第 110331010 号)

 2022 年 3 月 23 日

試験責任者

株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所 研究部

2. 目次

1.	GLP 陳述書	2
2.	目次	3
3.	試験実施概要	6
3.1	試験番号	6
3.2	試験表題	6
3.3	試験目的	6
3.4	規制に関する情報	6
3.4.1	GLP	6
3.4.2	毒性試験ガイドライン	6
3.5	試験委託者	6
3.6	試験受託者	6
3.7	試験施設	7
3.8	試験責任者	7
3.9	主な担当者	7
3.10	試験日程	7
3.11	予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのあ る事態及び試験計画書に従わなかったこと	7
3.12	資料保存	7
3.13	試験責任者の署名	8
4.	要約	9
5.	緒言	10
6.	試験材料	10
6.1	被験物質及び陰性対照物質（溶媒）	10
6.1.1	被験物質	10
6.1.2	陰性対照物質（溶媒）	11
6.2	被験液の調製	11
6.2.1	用量設定試験	11
6.2.2	本試験	12
6.2.3	調製頻度	12
6.3	試験系及びその選択理由	12
6.3.1	菌株	12
6.4	陽性対照物質	13
6.4.1	陽性対照液の調製方法	13
6.5	試薬	14
6.5.1	S9 Mix	14
6.5.2	培地	15

6.5.3	0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4)	15
6.5.4	トップアガー.....	16
7.	試験方法.....	17
7.1	プレートの識別方法.....	17
7.2	用量設定.....	17
7.2.1	用量設定試験.....	17
7.2.2	本試験.....	17
7.3	前培養.....	17
7.4	試験操作 (プレインキュベーション法)	18
7.5	無菌試験.....	18
7.6	試験の成立条件.....	19
7.7	判定基準.....	19
8.	試験結果.....	19
8.1	用量設定試験の観察結果	19
8.2	本試験の観察結果	20
9.	考察.....	20
10.	結論.....	20

Tables

Table 1	Study Results (Dose-finding Test)	21
Table 2	Study Results (Main Test).....	22

Figures

Figure 1	Dose Response Curve (Main Test TA100 : -S9Mix)	23
Figure 2	Dose Response Curve (Main Test TA100 : +S9Mix)	23
Figure 3	Dose Response Curve (Main Test TA1535 : -S9Mix)	24
Figure 4	Dose Response Curve (Main Test TA1535 : +S9Mix)	24
Figure 5	Dose Response Curve (Main Test WP2 <i>uvrA</i> : -S9Mix)	25
Figure 6	Dose Response Curve (Main Test WP2 <i>uvrA</i> : +S9Mix)	25
Figure 7	Dose Response Curve (Main Test TA98 : -S9Mix)	26
Figure 8	Dose Response Curve (Main Test TA98 : +S9Mix)	26
Figure 9	Dose Response Curve (Main Test TA1537 : -S9Mix)	27
Figure 10	Dose Response Curve (Main Test TA1537 : +S9Mix)	27

T-3599

Attachment

Attachment 1	試験成績書.....	28
Attachment 2	Historical Control Data (210422)	31
信頼性保証書		32

T-3599

3. 試験実施概要

3.1 試験番号

T-3599

3.2 試験表題

α , α' , α'' -プロパン-1, 2, 3-トリイルトリス [ω -ヒドロキシーポリ(オキシエチレン)] : 細菌を用いる復帰突然変異試験

[$\alpha, \alpha', \alpha''$ -Propane-1,2,3-Triyltris [ω -hydroxy-poly (oxyethylene)]: Bacterial reverse mutation test]

3.3 試験目的

細菌を用いる復帰突然変異試験(プレインキュベーション法)により、 α , α' , α'' -プロパン-1, 2, 3-トリイルトリス [ω -ヒドロキシーポリ(オキシエチレン)] の遺伝子突然変異誘発能を検討した。

3.4 規制に関する情報

3.4.1 GLP

- 「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」
(平成 23 年 3 月 31 日、薬食発 0331 第 8 号、平成 23・03・29 製局第 6 号、環保企発第 110331010 号)

3.4.2 毒性試験ガイドライン

- 「新規化学物質等に係る試験の方法について」
(平成 23 年 3 月 31 日付け薬食発 0331 第 7 号厚生労働省医薬食品局長、平成 23・03・29 製局第 5 号経済産業省製造産業局長、環保企発第 110331009 号環境省総合環境政策局長連名通知) (最終改正: 平成 30 年 3 月 29 日)
- 「OECD Guideline for Testing of Chemicals 471: Bacterial Reverse Mutation Test」(2020 年 6 月 26 日)

3.5 試験委託者

厚生労働省

医薬・生活衛生局 医薬品審査管理課 化学物質安全対策室
〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1-2-2

3.6 試験受託者

株式会社ボゾリサーチセンター

〒151-0065 東京都渋谷区大山町 36-7

3.7 試験施設

株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所
〒156-0042 東京都世田谷区羽根木 1-3-11

3.8 試験責任者

株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所 研究部

3.9 主な担当者

被験物質管理責任者：

試験担当者：

3.10 試験日程

試験開始日	：	2022 年 1 月 18 日
被験物質入手日	：	2021 年 12 月 7 日
用量設定試験		
開始日	：	2022 年 1 月 18 日（実験開始日）
終了日	：	2022 年 1 月 21 日
本試験		
開始日	：	2022 年 1 月 31 日
終了日	：	2022 年 2 月 3 日（実験終了日）
試験終了日	：	2022 年 3 月 23 日

3.11 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと

本試験に関し、予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったことはなかった。

3.12 資料保存

試験計画書原本、記録文書、生データ、報告書類（最終報告書の原本を含む）及び被験物質保存試料は、株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所の資料保存施設に保存する。なお、その期間は試験終了後 10 年間とする。期間終了後の取り扱いについては、厚生労働省 医薬・生活衛生局 医薬品審査管理課 化学物質安全対策室と株式会社ボゾリサーチセンター間で協議し、その処置を決定する。

T-3599

3.13 試験責任者の署名



2022 年 3 月 23 日

株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所

4. 要約

α , α' , α'' -プロパン-1, 2, 3-トリイルトリス [ω -ヒドロキシーポリ (オキシエチレン)] の遺伝子突然変異誘発能を明らかにするため、ネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) TA100、TA1535、TA98 及び TA1537 並びに大腸菌 *Escherichia coli* (*E. coli*) WP2 *uvrA* を用いて、代謝活性化する場合及び代謝活性化しない場合の条件下で、復帰突然変異試験をプレインキュベーション法により実施した。なお、被験物質の溶媒には注射用水を用いた。

本試験の用量設定のため、最高用量を 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ として以下公比 4 で除した 1250、313、78.1、19.5、4.88 及び 1.22 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の 7 用量で用量設定試験を実施した。その結果、代謝活性化の有無に関わらず、すべての菌株において沈殿及び生育阻害が認められず、いずれの用量でも陰性対照値の 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加はみられなかった。したがって、本試験では代謝活性化の有無に関わらず、すべての菌株で最高用量を 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ とし、以下公比 2 で除した 2500、1250、625 及び 313 $\mu\text{g}/\text{plate}$ とする計 5 用量を設定した。

1) 被験物質による沈殿

被験物質による沈殿は、代謝活性化の有無に関わらず、いずれの用量においても認められなかった。

2) 生育阻害

代謝活性化の有無に関わらず、いずれの菌株においても認められなかった。

3) 復帰変異コロニー数

用量設定試験及び本試験共に代謝活性化の有無に関わらず、いずれの菌株のいずれの用量でも陰性対照値の 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加はみられず、用量反応性も認められなかった。

以上の試験結果より、本試験条件下において α , α' , α'' -プロパン-1, 2, 3-トリイルトリス [ω -ヒドロキシーポリ (オキシエチレン)] は、細菌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。

5. 緒言

厚生労働省 医薬・生活衛生局 医薬品審査管理課 化学物質安全対策室の依頼により、 α , α' , α'' -プロパン-1, 2, 3-トリイルトリス [ω -ヒドロキシポリ (オキシエチレン)] の細菌を用いた復帰突然変異試験を実施したのでその成績を報告する。

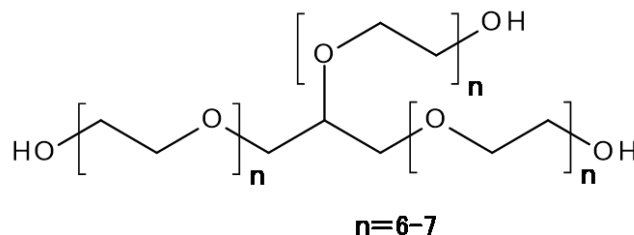
6. 試験材料

6.1 被験物質及び陰性対照物質 (溶媒)

6.1.1 被験物質

以下の情報は非 GLP で実施された分析結果に基づく。

製造者	:	
名称	:	α , α' , α'' -プロパン-1, 2, 3-トリイルトリス [ω -ヒドロキシポリ (オキシエチレン)]
別名	:	Glycerol ethoxylate
CAS 番号	:	31694-55-0
官報公示整理番号	:	(7)-758 (化審法)
構造式又は示性式	:	



分子式	:	$\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}[\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}]_2$
分子量	:	990 ^{*1}
外観	:	無色粘性液体
沸点/沸騰範囲	:	> 200°C-lit
溶解性	:	溶解性検討の結果、水に 50 mg/mL で溶解することを確認した。
溶媒中での安定性	:	溶解性検討の結果、水に発熱、ガスの発生等の反応性がなかったことを確認した。
ロット番号	:	
入手量	:	250 mL (T-G600 と共用)
純度	:	不明 ^{*2}
保存条件	:	室温、密閉、防湿
保存方法	:	気密容器に入れ、室温保存庫 (許容範囲: 1°C~30°C) に保存し、保存温度は許容の範囲内であった。

取扱い上の注意	: 作業場の換気を十分に行い、マスク、保護眼鏡、保護手袋等の適切な保護具を着用し、直接の接触を防ぐ。取り扱い後は、手、顔等を良く洗い、うがいをする。
保存場所	: 被験物質保存室
安定性確認	: 当試験に使用した被験物質の安定性は、同ロット品について別途実施される安定性試験(赤外吸収スペクトル法)結果から確認した(Attachment 1: 試験番号: A-3344)。
保存試料	: 被験物質約 1 g を保存試料として保存し、T-G600 と共通とした。
残余品の処理	: 使用後の残余は全て廃棄した。

*1 : Certificate of Analysis [REDACTED] 発行。

*2 : 被験物質は混合物のため、純度 100% として試験を実施した。

6.1.2 陰性対照物質（溶媒）

名称	: 注射用水
CAS 番号	: 7732-18-5
規格	: 日本薬局方
メーカー	: 株式会社大塚製薬工場
ロット番号	: K1G76
保存条件	: 室温
保存場所	: 被験物質調製室
溶媒の選択理由	: 被験物質は水に溶解性が良好であり、発熱、ガスの発生は認められず、調製 1 時間後で色調変化もみられなかった注射用水を選択した。

6.2 被験液の調製

6.2.1 用量設定試験

下記の操作は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で実施した。

必要量の被験物質を採取して秤量した。秤量値から 50 mg/mL 液を調製するための調製容量を計算した量の溶媒を被験物質に加えて 50 mg/mL 液（溶解）を調製した。次いで、50 mg/mL 液を溶媒で段階希釈して 12.5、3.13、0.781、0.195、0.0488 及び 0.0122 mg/mL 液を調製した（公比 4）。なお、50 mg/mL 液の調製時に発熱、ガスの発生等の反応性は認められなかった。これら 7 濃度の被験液を使用した場合の用量（細菌暴露量）は第 7.2.1 項参照。

6.2.2 本試験

下記の操作は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で実施した。

必要量の被験物質を採取して秤量した。秤量値から 50 mg/mL 液を調製するための調製用量を計算した量の溶媒を被験物質に加えて 50 mg/mL 液（溶解）を調製した。次いで、50 mg/mL 液を溶媒で段階希釈して 25、12.5、6.25 及び 3.13 mg/mL 液を調製した（公比 2）。なお、50 mg/mL 液の調製時に発熱、ガスの発生等の反応性は認められなかった。この時の用量（細菌曝露量）は第 7.2.2 項参照。

6.2.3 調製頻度

用時に調製した。

6.3 試験系及びその選択理由

当試験で使用する菌株はガイドラインで推奨され、細菌を用いる復帰突然変異試験に広く使用されており、また、背景データが豊富であることから選択した。

6.3.1 菌株

次の 5 種類の菌株を用いた。

塩基対置換型

S. typhimurium TA100

S. typhimurium TA1535

E. coli WP2 *uvrA*

フレームシフト型

S. typhimurium TA98

S. typhimurium TA1537

供給源	:	
入手日	:	2017 年 4 月 12 日
保存条件	:	冷凍（-70℃ 以下）
特性検査	:	アミノ酸要求性、膜変異 <i>rfa</i> 特性、薬剤耐性因子 R-factor プラスミド、紫外線感受性、生菌数、陰性対照値及び、陽性対照値及びもどり菌数の特性について検査を行い、それぞれの菌株に特有の性質が保持されていることを確認したものを用いた。（検査期間：2021 年 10 月 22 日～2021 年 10 月 25 日）

6.4 陽性対照物質

以下の5つの化合物を用いる。これらの陽性対照物質はガイドラインで推奨され、復帰突然変異試験に広く使用されていること、また、背景データが豊富であることから選択した。使用した陽性対照物質の詳細を表1に示す。

表 1. 陽性対照物質

陽物質名 (略称)	CAS 番号	規格	ロット番号	保存条件	メーカー
AF-2	3688-53-7	和光特級	PTR1925	室温、遮光	富士フイルム和光 純薬株式会社
SAZ	26628-22-8	試薬特級	YLL7840	室温、遮光	富士フイルム和光 純薬株式会社
ICR-191	17070-45-0	—	SLBR0485V	冷蔵	SIGMA-Aldrich Co. LLC.
2AA	613-13-8	—	CTK0326	室温、遮光	富士フイルム和光 純薬株式会社
B[a]P	50-32-8	環境分析用	KCH6617	冷蔵、遮光	富士フイルム和光 純薬株式会社

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

2AA : 2-Aminoanthracene

B[a]P : Benzo[a]pyrene

保存場所 : 変異原性試験室

6.4.1 陽性対照液の調製方法

SAZ は注射用水（株式会社大塚製薬工場、日本薬局方、ロット番号 K0F98）、その他の陽性対照物質は Dimethyl Sulfoxide（略称 : DMSO（富士フイルム和光純薬株式会社、試薬特級、ロット番号 KCN0182））に溶解し、約 1 mL ずつ小分けして -20°C 以下で凍結保存した。調製後 6 箇月以内の凍結陽性対照液を用時に解凍して使用した。各陽性対照物質の調製濃度及び用量（細菌への曝露容量）を表 2 に示す。

表 2. 陽性対照物質の調製濃度及び用量

菌株	代謝活性化無し			代謝活性化有り		
	陽性対照物質	調製濃度 (μg/mL)	用量 (μg/plate)	陽性対照物質	調製濃度 (μg/mL)	用量 (μg/plate)
<i>S. typhimurium</i> TA100	AF-2	0.1	0.01	B[a]P	50	5.0
<i>S. typhimurium</i> TA1535	SAZ	5	0.5	2AA	20	2.0
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	AF-2	0.1	0.01	2AA	100	10.0
<i>S. typhimurium</i> TA98	AF-2	1	0.1	B[a]P	50	5.0
<i>S. typhimurium</i> TA1537	ICR-191	10	1.0	B[a]P	50	5.0

6.5 試薬

6.5.1 S9 Mix

1) S9

名称	: エームス試験用 S9
メーカー	: 株式会社ボゾリサーチセンター
ロット番号	: S9-211210
由来	: SD 系雄ラット・肝臓
誘導物質	: フェノバルビタール(PB)及び 5,6-ベンゾフラボン(BF)
誘導物質の処理	: PB : 4 日間腹腔内投与 (30、60、60 及び 60 mg/kg) BF : PB 投与 3 日目に単回腹腔内投与 (80 mg/kg)
製造日	: 2021 年 12 月 10 日
使用期限	: 2022 年 6 月 9 日
週齢・性	: 7 週齢・雄
体重	: 230.0–257.3 g
保存条件	: 冷凍 (–70℃ 以下)
保存場所	: 変異原性試験室

2) コファクター

名称	: エームス試験用コファクターFA
メーカー	: 株式会社ボゾリサーチセンター
ロット番号	: FA-211117
使用期限	: 2022 年 5 月 16 日
保存条件	: 冷凍 (–70℃ 以下)
保存場所	: 変異原性試験室

3) S9 Mix の調製方法

用時に S9 とコファクターを 1:9 の割合で無菌的に混合して S9 Mix を調製した。
S9 Mix の組成 (1 mL 中) を以下に示す。

水	: 0.9 mL
S9	: 0.1 mL
MgCl ₂	: 8 μmol
KCl	: 33 μmol
グルコース-6-リン酸	: 5 μmol
還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH)	: 4 μmol
還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH)	: 4 μmol
リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4)	: 100 μmol

6.5.2 培地

1) 最小グルコース寒天平板培地

名称	: エームス試験用培地ファルメディア AM
メーカー	: 株式会社アテクト
購入先	: 株式会社ファルマ
ロット番号	: AA113A1-19C
製造日	: 2021 年 12 月 9 日
使用期限	: 2022 年 6 月 9 日
保存条件	: 室温
保存場所	: 寒天培地保存室
使用寒天	: TAIYO-AGAR BM-600
(製造元: SSK セールス株式会社 Lot No.107642)	

2) ニュートリエントブロス No.2 培養液

ニュートリエントブロス No.2 を 2.5 wt% となるよう精製水で溶解し、オートクレーブで滅菌 (121°C、20 分) して調製した。調製後冷蔵保存し、1 箇月以内に使用した。

名称	: ニュートリエントブロス No.2 (Nutrient Broth No.2)
メーカー	: OXOID LTD.
ロット番号	: 2202237
保存条件	: 室温
保存場所	: 微生物試験室

6.5.3 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4)

りん酸緩衝剤粉末 3 包に対して 2 L の精製水を加えて溶解し、オートクレーブで滅

菌（121°C、20 分）して調製した。調製後冷蔵保存し、1 箇月以内に使用した。

名称	: りん酸緩衝剤粉末（1/15 mol/L pH 7.4）
メーカー	: 富士フイルム和光純薬株式会社
ロット番号	: LEK6645
保存条件	: 室温
保存場所	: 微生物試験室

6.5.4 トップアガー

精製水に寒天及び塩化ナトリウムをそれぞれ 0.6 wt%及び 0.6 wt%の濃度で溶解し、オートクレーブで滅菌（121°C、20 分）して軟寒天液を調製した。軟寒天液 10 容に 0.5 mmol/L D-ビオチン-L-ヒスチジン-L-トリプトファン溶液を 1 容加えてトップアガーを調製した。調製後室温保存し、1 箇月以内に使用した。

1) 寒天

名称	: Bacto Agar
メーカー	: Becton, Dickinson and Company
ロット番号	: 1007116
保存条件	: 室温
保存場所	: 微生物試験室

2) 塩化ナトリウム

メーカー	: 富士フイルム和光純薬株式会社
規格	: 試薬特級
ロット番号	: DLP6649
保存条件	: 室温
保存場所	: 微生物試験室

3) D-ビオチン

メーカー	: 富士フイルム和光純薬株式会社
規格	: 和光一級
ロット番号	: SKG4827
保存条件	: 冷蔵、遮光
保存場所	: 微生物試験室

4) L-ヒスチジン塩酸塩一水和物

メーカー	: 富士フイルム和光純薬株式会社
規格	: 試薬特級
ロット番号	: CAK1893
保存条件	: 室温、遮光
保存場所	: 微生物試験室

5) L-トリプトファン

メーカー	: 富士フイルム和光純薬株式会社
------	------------------

規格	: 試薬特級
ロット番号	: CAP5231
保存条件	: 室温、遮光
保存場所	: 微生物試験室

7. 試験方法

7.1 プレーットの識別方法

プレートは試験番号、活性化処理を示す記号及び試験群を、菌株ごとに定めた色で記入して識別した。

7.2 用量設定

7.2.1 用量設定試験

最高用量は、ガイドラインに基づいて 5000 µg/plate とし、以下、公比 4 で除して 1250、313、78.1、19.5、4.88 及び 1.22 µg/plate とし、各菌株について計 7 用量をそれぞれ代謝活性化群及び非代謝活性化群に設定した。

被験物質処理群に加え、それぞれ陰性対照群及び陽性対照群を設けた。

7.2.2 本試験

用量設定試験では、代謝活性化の有無に関わらず、いずれの菌株のいずれの用量でも被験物質の沈殿及び生育阻害並びに復帰変異コロニー数の増加はみられなかった。以上より、代謝活性化の有無に関わらず、全ての菌株で最高用量は 5000 µg/plate に設定し、以下公比 2 で除して 2500、1250、625 及び 313 µg/plate とし、各菌株について計 5 用量をそれぞれ代謝活性化群及び非代謝活性化群に設定した。

被験物質処理群に加え、それぞれ陰性対照群及び陽性対照群を設けた。

7.3 前培養

各菌株について、凍結保存菌株を解凍し、10 mL のニュートリエントブロス No.2 培養液を入れた L 字型試験管（容量：48 mL）に *S. typhimurium* TA 株は 20 µL、*E. coli* WP2 *uvrA* は 10 µL を植菌して 37°C で 9 時間振盪培養した（振盪速度：約 100 rpm）。培養終了後、菌懸濁液の吸光度をデジタル比色計で測定することにより生菌数が 1.0×10^9 個/mL 以上あることを確認した。各菌株の生菌数を表 3 に示す。なお、菌懸濁液は使用時まで室温で保存した。

表 3. 各菌株の生菌数

菌 株	菌 数 ($\times 10^9$ 個/mL)	
	用量設定試験	本試験
<i>S. typhimurium</i> TA100	4.89	4.13
<i>S. typhimurium</i> TA1535	5.12	5.00
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	7.70	7.73
<i>S. typhimurium</i> TA98	5.56	5.54
<i>S. typhimurium</i> TA1537	4.25	4.50

7.4 試験操作（プレインキュベーション法）

用量設定試験、本試験ともに各群 2 枚のプレートを使用し、下記 1)、2) の操作は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で実施した。

- 1) 滅菌した小試験管に被験液、溶媒又は陽性対照溶液を 0.1 mL 入れ、これに代謝活性化しない場合は 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL を、代謝活性化する場合は S9 Mix 0.5 mL を加えた後、さらに各菌懸濁液 0.1 mL を加えて攪拌し、37°C で 20 分間振盪 (80 回/分) 培養した (プレインキュベーション)。
- 2) 培養後、溶解したトッパアガー 2.0 mL を小試験管に加えて攪拌し、最小グルコース寒天平板培地に均一に重層した。
- 3) トッパアガーの固化後、最小グルコース寒天平板培地を逆さにしてインキュベータに入れ、37°C で用量設定試験は 49 時間、本試験は 48 時間培養した。
- 4) 培養後、生育阻害を実体顕微鏡により、被験物質の沈殿を目視により確認した。復帰変異コロニー数の計数は、面積及び数え落としの補正をしたドットカウンターを用いて計数した。

7.5 無菌試験

被験液及び S9 Mix の無菌性を確認するため用量設定試験及び本試験時に無菌試験を行った。最高用量の被験液 0.1 mL 及び S9 Mix 0.5 mL をそれぞれ試験管に入れ、これにトッパアガー 2.0 mL を加えて攪拌後、最小グルコース寒天平板培地に重層した。トッパアガーの固化後に、最小グルコース寒天平板培地を逆さにしてインキュベータに入れ、37°C で用量設定試験は 49 時間、本試験は 48 時間培養した。用量設定試験及び本試験ともに、培養終了後に雑菌の繁殖がないことを目視にて確認した。

7.6 試験の成立条件

以下の全ての条件を満たした場合試験成立とみなすこととした。ただし、管理値の範囲を超える値が得られた場合であっても、背景データとの比較及び科学的知見に照らして試験責任者が試験成立と判断する場合がある。試験が成立しない場合は追加試験を行うこととした。

- 1) 陰性対照群及び陽性対照群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 ($\text{Mean} \pm 3\text{SD}$) である
- 2) 陽性対照群の復帰変異コロニー数の平均値が、対応する陰性対照群のその 2 倍以上を示す
- 3) 本試験において、菌株の生育阻害を示さない用量（有効用量）が 4 用量以上得られている
- 4) 培養条件、試験環境に異常が認められない

7.7 判定基準

- 1) 代謝活性化の有無に関わらず、いずれかの菌株において、被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値が、対応する陰性対照群のその 2 倍以上を示し、かつ、増加に用量依存性又は再現性がみられる場合、陽性と判断することとした。
- 2) 比活性値が概ね 1,000 rev/mg 以上である場合には、原則として、強い陽性と判断した。
- 3) 陽性の場合にあって、再現性や用量依存性に乏しい場合等には、原則として、軽微な陽性と判断した。
- 4) 1)~3) いずれにも該当しない場合は陰性と判断した。

8. 試験結果

用量設定試験の結果を Table 1 に、本試験の結果を Table 2 に示す。なお、本試験の結果から作成した用量反応曲線を Figure 1~10 に示す。

8.1 用量設定試験の観察結果

被験物質による沈殿は、代謝活性化の有無に関わらず、いずれの用量においても認められなかった。

生育阻害は、代謝活性化の有無に関わらず、いずれの菌株においても認められなかった。

復帰変異コロニー数は、代謝活性化の有無に関わらず、いずれの菌株においても陰性対照値の 2 倍以上となる増加を示さず、用量反応性も認められなかった。

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、使用菌株の陽性対照物質に対する反応は適切であった。また、陰性対照群及び陽性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は背景データの管理値内 (Attachment 2) であり、代謝活性化群及び非代謝活性化群の全ての菌株で 4 用量

以上の有効用量が得られ、培養条件及び試験環境に異常はみられなかった。

8.2 本試験の観察結果

被験物質による沈殿は、代謝活性化の有無に関わらず、いずれの用量においても認められなかった。

生育阻害は、代謝活性化の有無に関わらず、いずれの菌株においても認められなかった。

復帰変異コロニー数は、代謝活性化の有無に関わらず、いずれの菌株でも陰性対照値の2倍以上となる増加を示さず、用量反応性も認められなかった。

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、使用菌株の陽性対照物質に対する反応は適切であった。また、陰性対照群及び陽性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は背景データの管理値内（Attachment 2）であり、代謝活性化群及び非代謝活性化群の全ての菌株で4用量以上の有効用量が得られ、培養条件及び試験環境に異常はみられなかった。

9. 考察

用量設定試験及び本試験共に代謝活性化の有無に関わらず、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。

被験物質による沈殿は、代謝活性化の有無に関わらず、いずれの用量においても認められなかった。

生育阻害は、代謝活性化の有無に関わらず、いずれの菌株においても認められなかった。

用量設定試験及び本試験共に試験成立の条件を満たしたことから、試験は適切に実施されたと判断した。

10. 結論

以上の試験結果より、本試験条件下において α 、 α' 、 α'' —プロパン—1, 2, 3—トリイルトリス [ω—ヒドロキシ—ポリ（オキシエチレン）] は、細菌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。

T-3599

(Table 1)

Study Results (Range-finding Test)Name of test article: α,α',α'' -Propane-1,2,3-Triyltris [ω -hydroxy-poly (oxyethylene)]

No. T-3599

Term		From January 18, 2022 to January 21, 2022				
With (+) or Without (-) S9Mix	Test article dose (μ g/plate)	Number of revertants (number of colonies / plate)				
		Base-pair substitution type			Frame-shift type	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9Mix (-)	Negative control (Water)	120 117 (119)	13 13 (13)	26 26 (26)	20 19 (20)	10 13 (12)
	1.22	84 101 (93)	8 13 (11)	25 28 (27)	18 22 (20)	9 5 (7)
	4.88	112 117 (115)	10 13 (12)	20 27 (24)	16 23 (20)	7 13 (10)
	19.5	103 116 (110)	6 11 (9)	26 26 (26)	21 22 (22)	13 7 (10)
	78.1	113 132 (123)	14 10 (12)	20 24 (22)	15 17 (16)	8 15 (12)
	313	126 113 (120)	10 8 (9)	30 27 (29)	20 20 (20)	14 7 (11)
	1250	115 97 (106)	8 8 (8)	24 28 (26)	32 12 (22)	9 8 (9)
	5000	102 96 (99)	10 10 (10)	24 23 (24)	15 25 (20)	8 7 (8)
S9Mix (+)	Negative control (Water)	121 100 (111)	8 9 (9)	24 23 (24)	39 20 (30)	10 8 (9)
	1.22	140 141 (141)	6 7 (7)	18 25 (22)	25 31 (28)	8 11 (10)
	4.88	112 106 (109)	6 11 (9)	18 26 (22)	31 28 (30)	9 8 (9)
	19.5	121 109 (115)	7 9 (8)	24 20 (22)	28 34 (31)	11 9 (10)
	78.1	95 115 (105)	13 7 (10)	25 32 (29)	45 34 (40)	11 10 (11)
	313	104 108 (106)	9 7 (8)	17 24 (21)	22 39 (31)	11 9 (10)
	1250	113 128 (121)	8 12 (10)	29 20 (25)	38 22 (30)	8 14 (11)
	5000	114 119 (117)	9 8 (9)	26 26 (26)	30 28 (29)	9 12 (11)
Positive control S9Mix (-)	Name	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191
	Dose(μ g/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	Number of colonies/plate	847 725 (786)	257 249 (253)	126 180 (153)	477 495 (486)	1241 1298 (1270)
Positive control S9Mix (+)	Name	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
	Dose(μ g/plate)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
	Number of colonies/plate	1157 1347 (1252)	219 244 (232)	613 780 (697)	240 279 (260)	106 118 (112)

(Note)

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

2AA : 2-Aminoanthracene

B[a]P : Benzo[a]pyrene

Average of counted colony number of each plate is shown in parenthesis.

T-3599

(Table 2)

Study Results (Main Test)Name of test article: α,α',α'' -Propane-1,2,3-Triyltris [ω -hydroxy-poly (oxyethylene)]

No. T-3599

Term		From January 31, 2022 to February 3, 2022				
With (+) or Without (-) S9Mix	Test article dose (μ g/plate)	Number of revertants (number of colonies / plate)				
		Base-pair substitution type			Frame-shift type	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9Mix (-)	Negative control (Water)	92	10	30	18	9
		113 (103)	8 (9)	31 (31)	20 (19)	9 (9)
	313	95	9	26	18	6
		95 (95)	7 (8)	23 (25)	24 (21)	8 (7)
	625	117	5	25	17	10
		105 (111)	8 (7)	30 (28)	27 (22)	12 (11)
	1250	85	11	26	15	4
		128 (107)	11 (11)	25 (26)	20 (18)	9 (7)
	2500	82	8	29	26	8
		106 (94)	9 (9)	22 (26)	13 (20)	14 (11)
	5000	87	11	27	25	8
		81 (84)	7 (9)	26 (27)	22 (24)	8 (8)
S9Mix (+)	Negative control (Water)	132	9	30	30	9
		97 (115)	7 (8)	27 (29)	36 (33)	7 (8)
	313	112	9	25	32	11
		130 (121)	7 (8)	24 (25)	27 (30)	10 (11)
	625	109	5	31	31	10
		103 (106)	8 (7)	32 (32)	27 (29)	10 (10)
	1250	91	6	25	24	6
		116 (104)	10 (8)	22 (24)	21 (23)	11 (9)
	2500	126	11	21	29	9
		108 (117)	7 (9)	28 (25)	34 (32)	12 (11)
	5000	109	8	30	26	12
		107 (108)	9 (9)	27 (29)	22 (24)	8 (10)
Positive control S9Mix (-)	Name	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191
	Dose(μ g/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	Number of colonies/plate	740	281	162	404	1330
		757 (749)	214 (248)	160 (161)	441 (423)	1243 (1287)
Positive control S9Mix (+)	Name	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
	Dose(μ g/plate)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
	Number of colonies/plate	1082	252	626	221	86
		1214 (1148)	257 (255)	682 (654)	226 (224)	84 (85)

(Note)

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

2AA : 2-Aminoanthracene

B[a]P : Benzo[a]pyrene

Average of counted colony number of each plate is shown in parenthesis.

T-3599

Figure 1

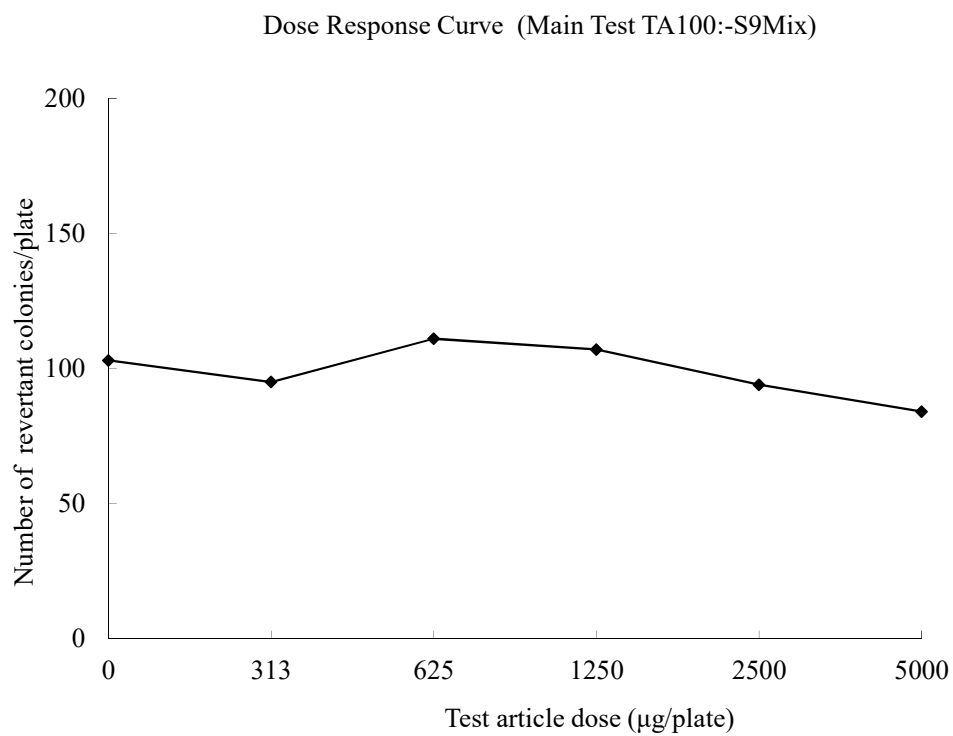
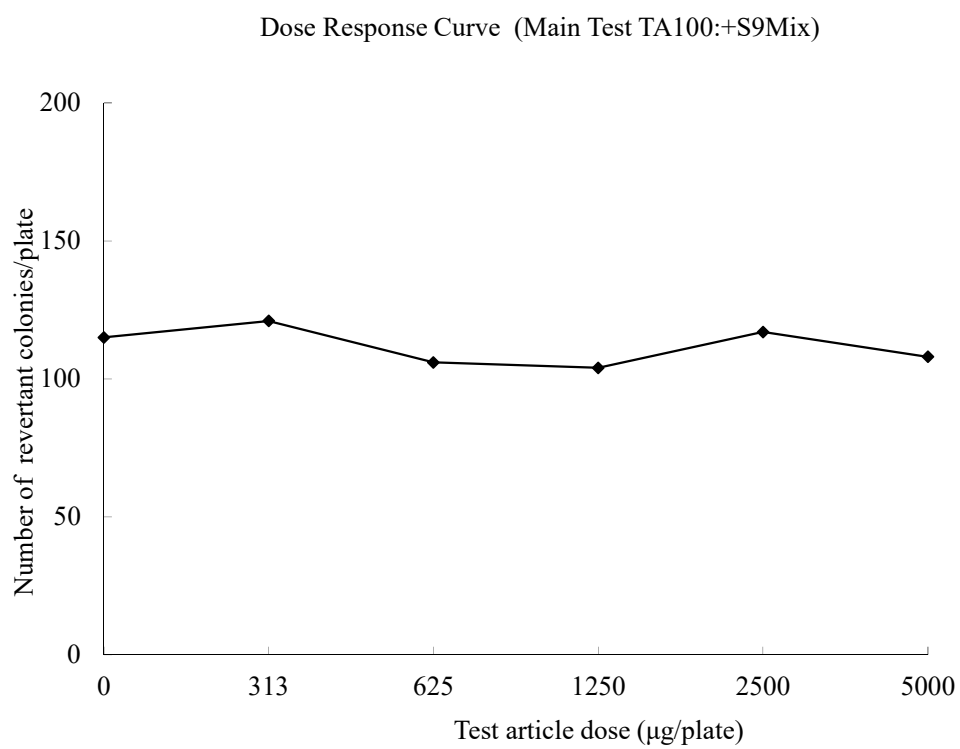


Figure 2



T-3599

Figure 3

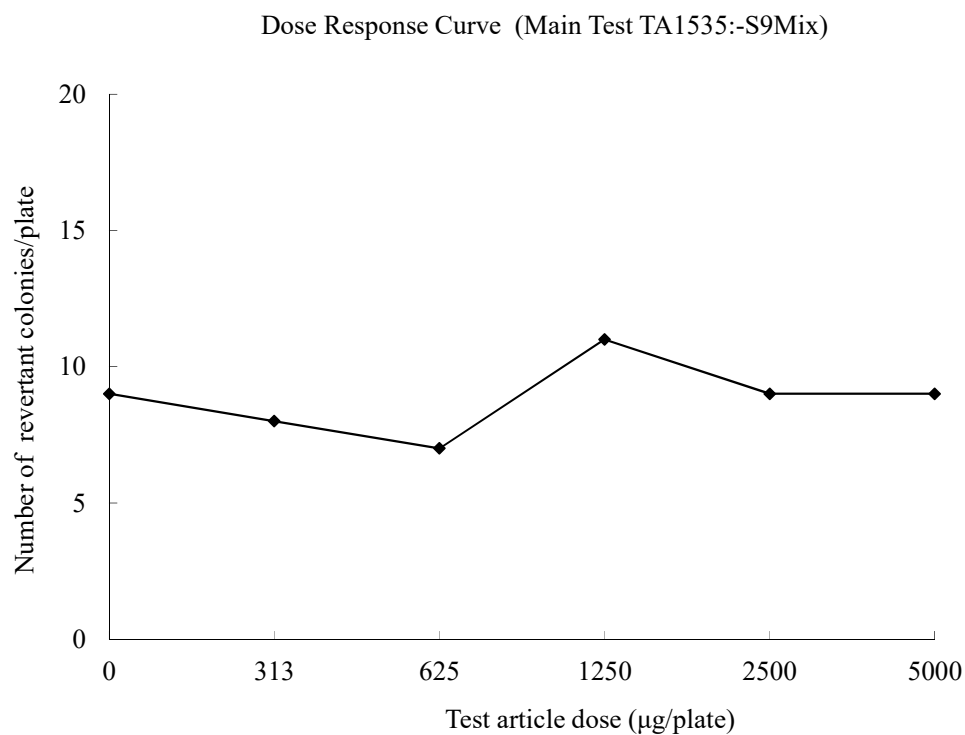
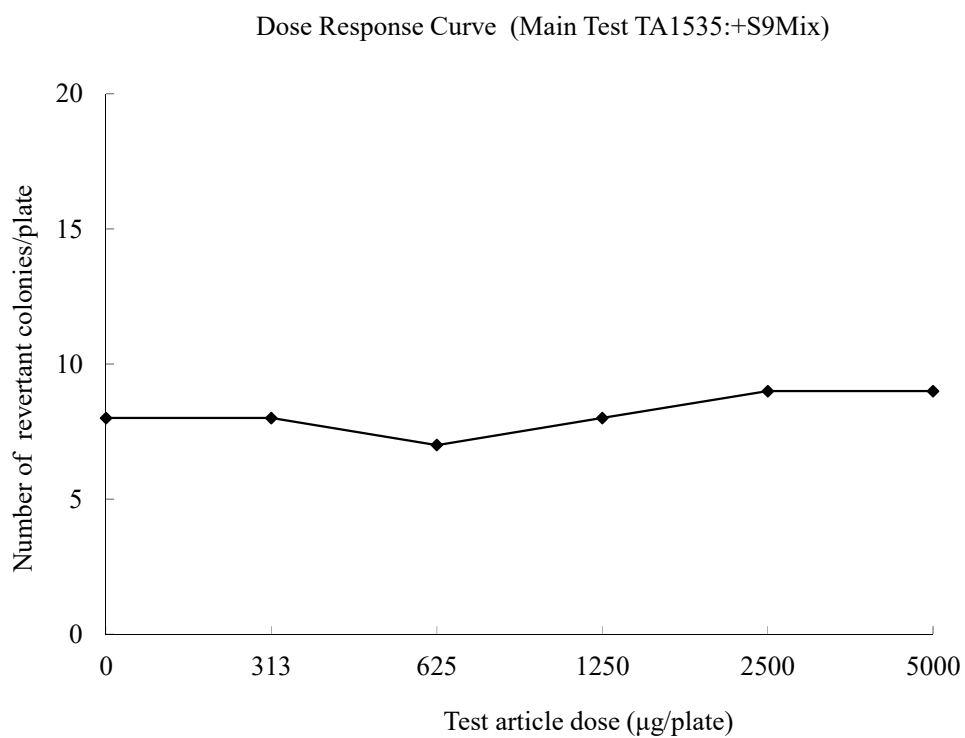


Figure 4



T-3599

Figure 5

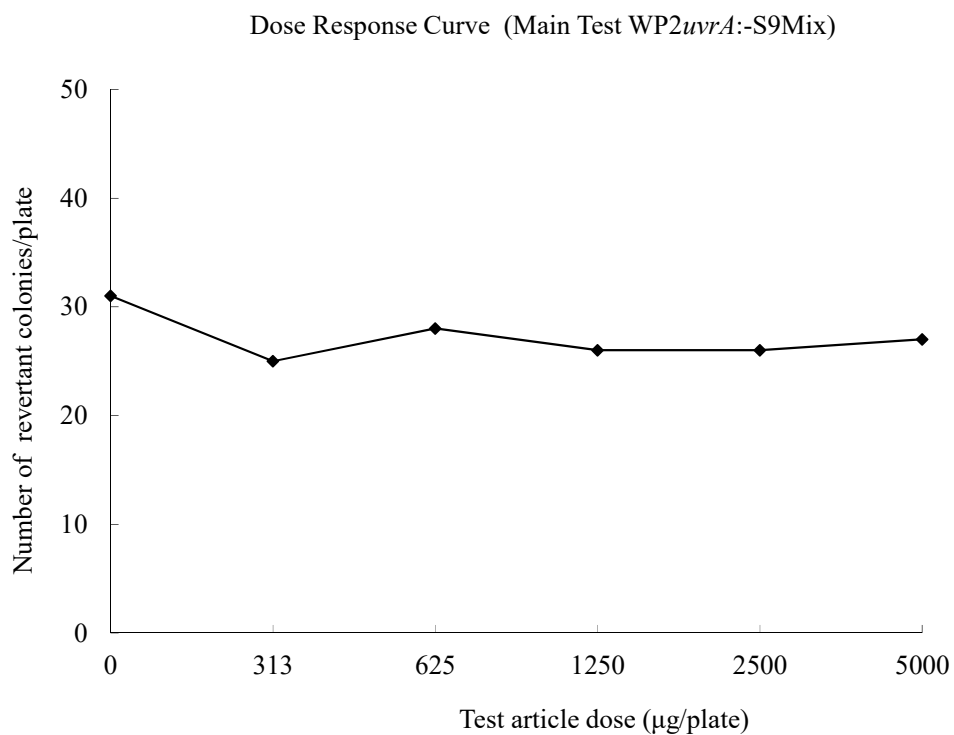
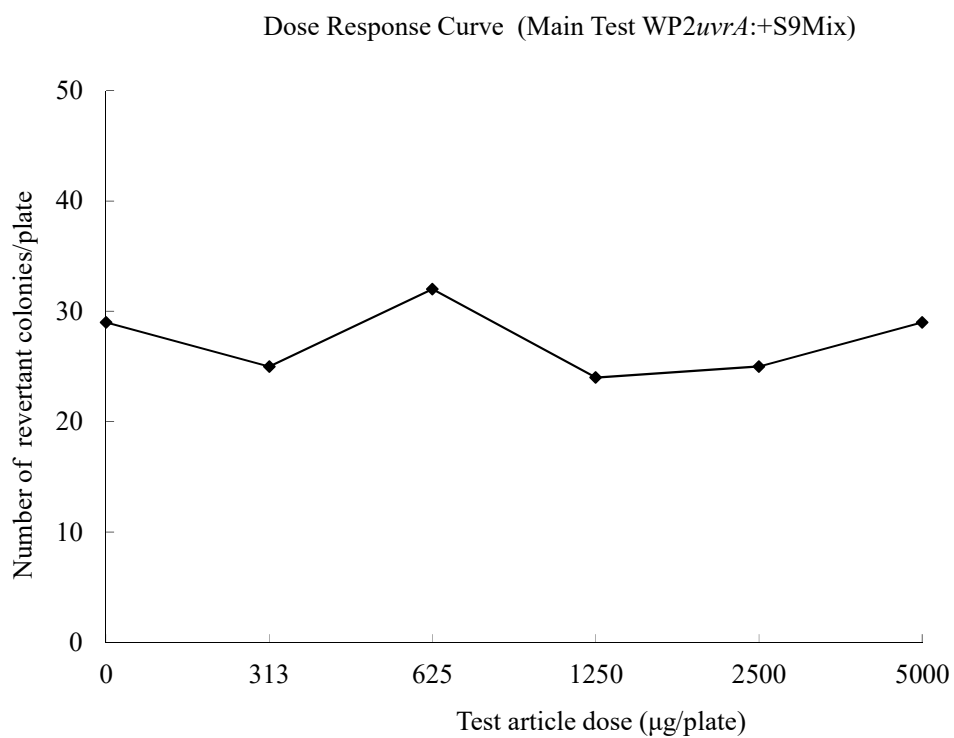


Figure 6



T-3599

Figure 7

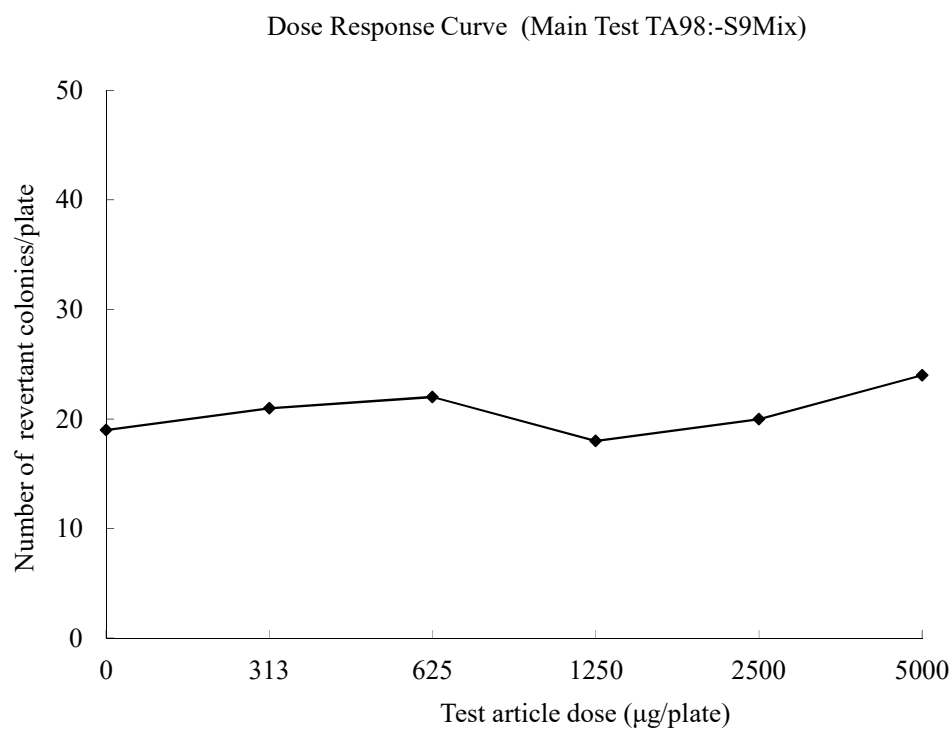
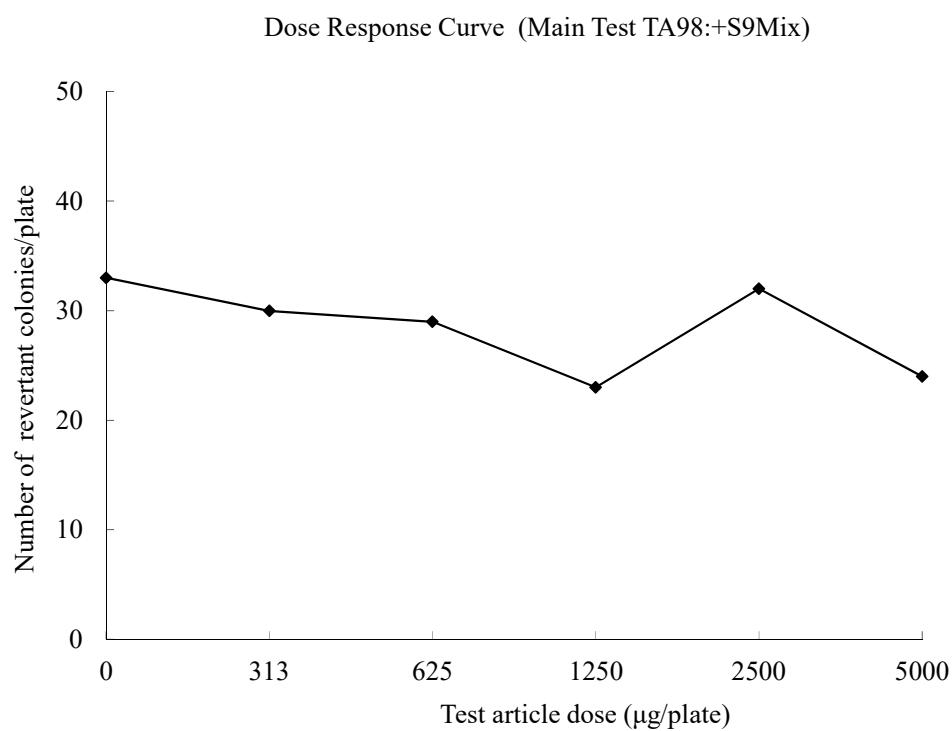


Figure 8



T-3599

Figure 9

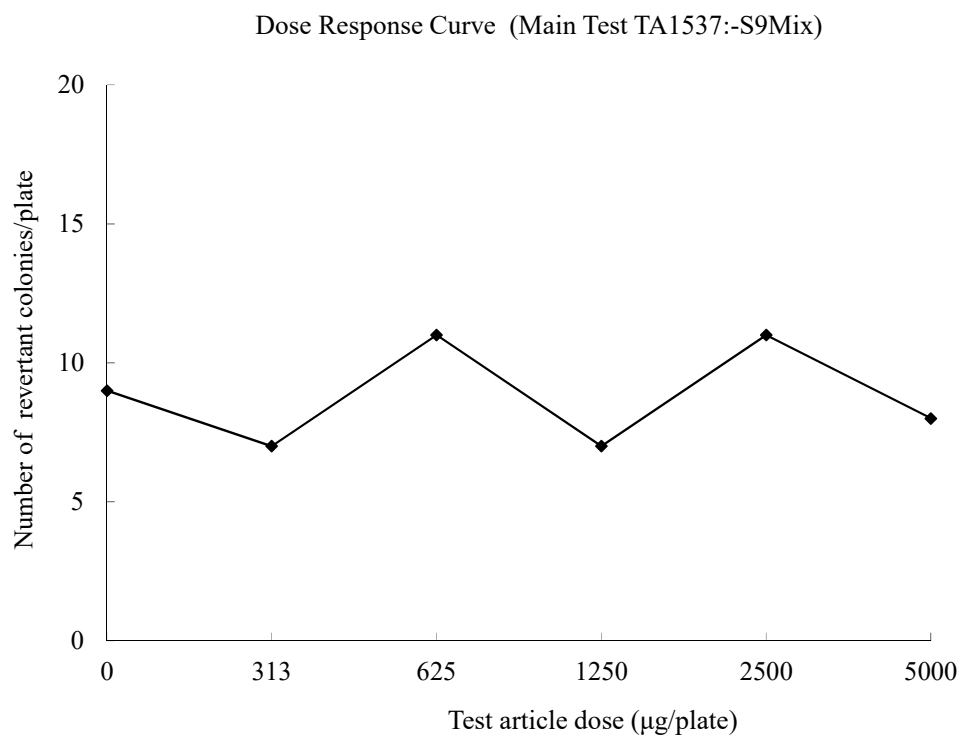
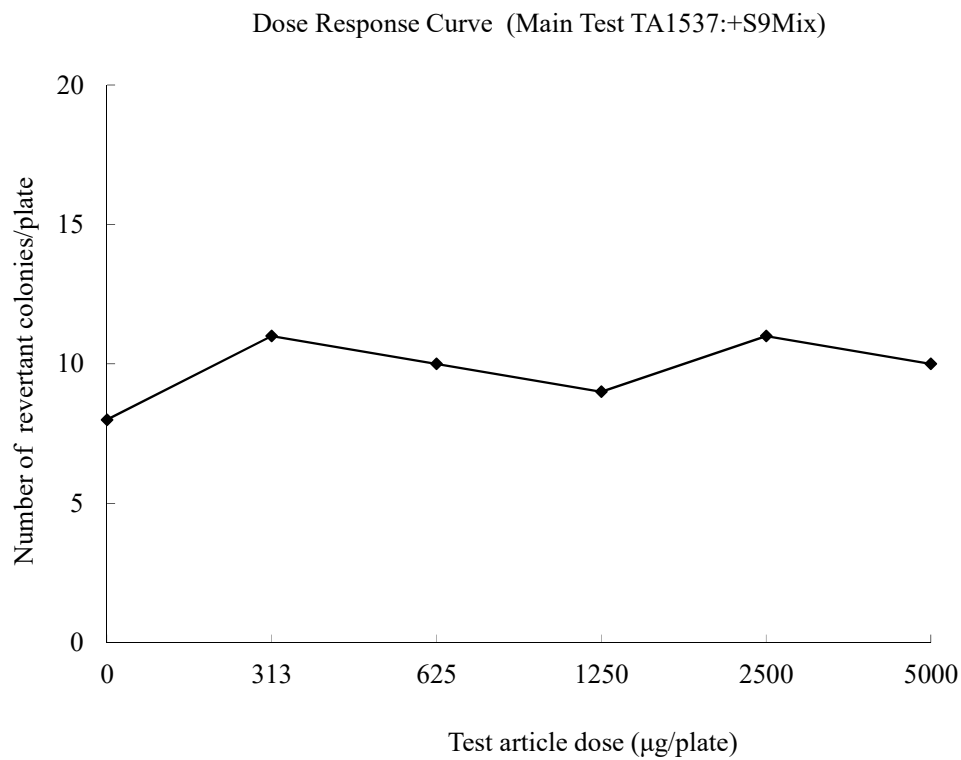


Figure 10



No. A3344-1/3

試驗成績書

試験番号	:	A-3344
試験項目	:	安定性試験
被験物質	:	α , α' , α'' - プロパン-1, 2, 3-トリイ トリス [ω - ヒドロキシ - ポリ (オキシエチレン)]
ロット番号	:	
保存条件	:	室温 (許容範囲: 1°C~30°C)、密閉、防湿 (シリカゲル入り)
試験施設	:	株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所
測定日	:	2021 年 12 月 28 日 (前値) 2022 年 2 月 22 日 (後値)
測定項目	:	赤外吸収スペクトル (液膜法)

判定基準

赤外吸収スペクトル： 前値で得られた赤外吸収スペクトルと同等（主な吸収について、同一波数域に同様な強度の吸収を認める）であることを確認する。

結果

赤外吸収スペクトル： 前値で得られた赤外吸収スペクトルと同等（主な吸収について、同一波数域に同様な強度の吸収を認める）であった。

赤外吸収スペクトルを次ページに示す。

判定：適

安定性評価 : 赤外吸収スペクトルが前値と同等であったことから、被験物質は 2021 年 12 月 28 日から 2022 年 2 月 22 日までの間、保存条件下で安定であったと判定した。

試験成績書

本試験は以下の GLP 基準を遵守して実施した。

「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」

(平成 23 年 3 月 31 日：薬食発 0331 第 8 号、平成 23・03・29 製局第 6 号、
環境企発第 110331010 号)

 2022 年 3 月 10 日

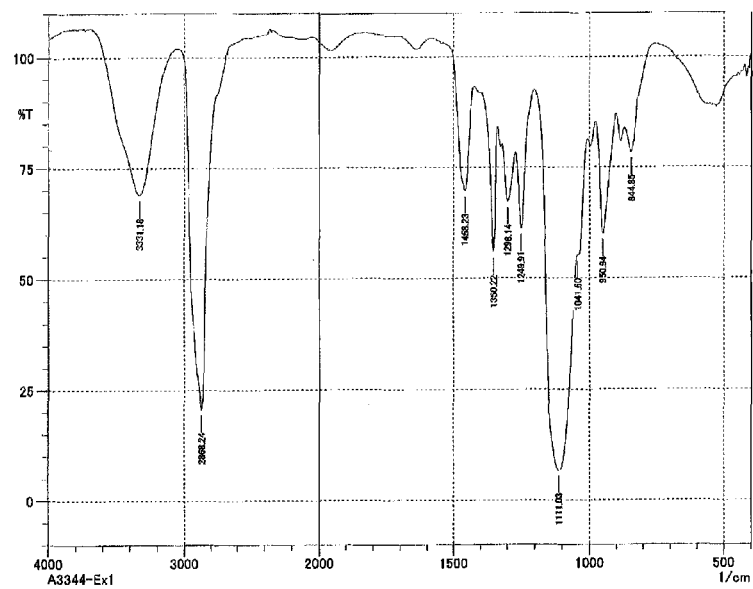
試験責任者

株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所

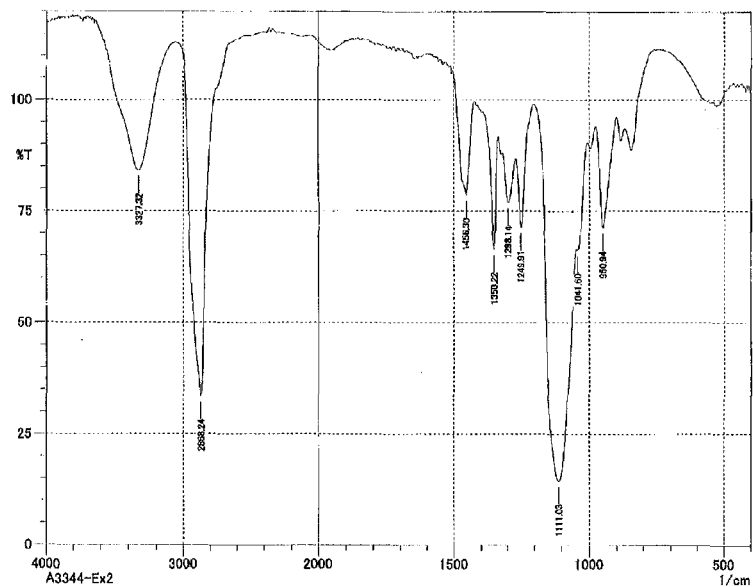
試験成績書

赤外吸収スペクトル：

前値



後値



Historical Control Data

Test Category : Bacterial reverse mutation test (Preincubation Method)

CODE No. : 210422

Period : From January 7, 2021 to March 18, 2021

Tester Strains	S9 Mix (-) or (+)	Classification	Mean	S.D.	Management ranges		Number of plates
					Lower limit	Upper limit	
TA100	-	Solvent control	112	13	72	152	92
		Positive control AF-2 (0.01 µg/plate)	602	70	392	812	92
	+	Solvent control	120	13	79	160	92
		Positive control B[a]P (5.0 µg/plate)	1114	132	719	1508	92
TA1535	-	Solvent control	10	2	5	15	92
		Positive control SAZ (0.5 µg/plate)	263	50	114	411	92
	+	Solvent control	10	2	4	15	92
		Positive control 2AA (2.0 µg/plate)	234	24	162	305	92
WP2 _{uvrA}	-	Solvent control	24	4	12	36	92
		Positive control AF-2 (0.01 µg/plate)	126	21	62	189	92
	+	Solvent control	26	5	12	40	92
		Positive control 2AA (10.0 µg/plate)	643	92	366	920	92
TA98	-	Solvent control	21	4	11	32	92
		Positive control AF-2 (0.1 µg/plate)	469	62	283	655	92
	+	Solvent control	31	6	15	48	92
		Positive control B[a]P (5.0 µg/plate)	272	36	163	381	92
TA1537	-	Solvent control	9	2	3	14	92
		Positive control ICR-191 (1.0 µg/plate)	1631	306	715	2548	92
	+	Solvent control	10	2	3	16	92
		Positive control B[a]P (5.0 µg/plate)	89	9	63	116	92

(Notice)

Solvent controls Water, Dimethyl sulfoxide(DMSO), Acetone, 1-4-Dioxane

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

T-3599

信頼性保証書（1/2）

試験番号 : T-3599

試験表題 : α , α' , α'' -プロパン-1, 2, 3-トリイルトリス [ω -ヒドロキシ-ポリ (オキシエチレン)] : 細菌を用いる復帰突然変異試験

本試験は以下に示す基準に従って実施されたことを保証致します。

- 「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」（平成 23 年 3 月 31 日: 薬食発 0331 第 8 号、平成 23・03・29 製局第 6 号、環保企発第 110331010 号）

なお、調査は下記の通り実施し、報告致しました。

試験の調査			
項 目	担当者	調 査 日	試験責任者及び 運営管理者への 報告日
試験計画書		2022 年 1 月 18 日	2022 年 1 月 18 日
調製・保存（被験物質）		2022 年 2 月 1 日	2022 年 2 月 7 日
被験物質の処理			
計数		2022 年 2 月 3 日	
		2022 年 2 月 4 日	2022 年 2 月 7 日
生データ		2022 年 3 月 7 日	2022 年 3 月 7 日
改善確認		2022 年 3 月 15 日	2022 年 3 月 15 日
最終報告書草案 図・表		2022 年 3 月 7 日	2022 年 3 月 7 日
改善確認		2022 年 3 月 15 日	2022 年 3 月 15 日
最終報告書		2022 年 3 月 23 日	2022 年 3 月 23 日

信頼性保証書 (2/2)

施設調査

項 目	担当者	調 査 日	部門責任者及び 運営管理者への 報告日
菌株の特性検査		2021 年 10 月 22 日	
		2021 年 10 月 25 日	
		2021 年 10 月 26 日	2021 年 10 月 28 日
陽性対照物質の管理		2021 年 11 月 10 日	2021 年 11 月 16 日
		2021 年 12 月 13 日	2021 年 12 月 14 日
		2021 年 12 月 20 日	2021 年 12 月 23 日
		2022 年 1 月 4 日	2022 年 1 月 6 日
菌の前培養		2022 年 1 月 11 日	
		2022 年 1 月 12 日	2022 年 1 月 14 日

プロセス調査

項 目	試験番号	担当者	調 査 日	試験責任者及び 運営管理者への 報告日
用量設定試験	T-3566		2021 年 10 月 5 日	
(復帰突然変異試験)			2021 年 10 月 7 日	2021 年 10 月 7 日

2022 年 3 月 23 日
 株式会社ボゾリサーチセンター
 信頼性保証部門