

# 最終報告書

ペルフルオロヘプタンの細菌を用いる復帰突然変異試験

T-0062

2008年12月17日

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

	頁
目 次	1
要 約	6
被験物質及び被験液の調製	7
1. 被験物質及び溶媒	7
(1) 被験物質	7
(2) 溶媒	7
(3) 溶媒の選択理由	7
2. 被験液の調製方法	7
(1) 予備試験用被験液の調製	7
(2) 本試験 1 回目用被験液の調製	8
(3) 本試験 2 回目用被験液の調製	8
(4) 被験液の保存条件	8
試験材料及び試験方法	8
1. 試験菌株	8
(1) 菌株の種類	8
(2) 菌株の選択理由	8
(3) 菌株の保存及び解凍	9
(4) 菌株の特性検査	9
2. 対照物質	9
(1) 陰性対照物質	9
(2) 陽性対照物質	9
(3) 調製方法	10
3. 試薬	10
(1) S9Mix の調製方法	10
(2) 最少グルコース寒天平板培地	11
(3) ニュートリエントブロス No.2 培養液	11
(4) 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4)	12
(5) トップアガー	12
4. 試験方法	13
(1) 識別方法	13
(2) 前培養	13
(3) 本試験用量の設定	14
(4) プレート数	14
(5) 試験操作	14
5. 判定基準	14

試験結果及び考察	15
1. 試験結果	15
(1) 培養終了後の観察結果	15
(2) 復帰突然変異コロニー数	15
(3) 試験系の成立条件	15
2. 考察	15
参考文献	15

#### Tables

- ・別表 1 試験結果表(予備試験)
- ・別表 2 試験結果表(本試験 1 回目)
- ・別表 3 試験結果表(本試験 2 回目)

#### Figures

- ・図 1 用量反応曲線(-S9Mix)
- ・図 2 用量反応曲線(+S9Mix)

## 要 約

ペルフルオロヘプタンの遺伝子突然変異誘発能の有無を検討するため、ネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (以下、*S. typhimurium* と略した) TA100、TA1535、TA98、TA1537 及び大腸菌 *Escherichia coli* (以下、*E. coli* と略した) 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、プレート法により実施した。なお、被験物質の溶媒にはアセトンを用いた。

試験は、1.22～5000 µg/plate の範囲の被験物質処理用量で予備試験を実施した。その結果より本試験は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株についても 313～5000 µg/plate の範囲の 5 用量で実施した。

### 1. 被験物質による沈殿及び着色

本被験物質によるプレート上の沈殿は、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。また、本被験物質による着色も、代謝活性化の有無にかかわらず認められなかった。

### 2. 生育阻害

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生育阻害は認められなかった。

### 3. 復帰突然変異コロニー数

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、復帰突然変異コロニー数は陰性対照の 2 倍以上には増加せず、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、ペルフルオロヘプタンは、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。

## 被験物質及び被験液の調製

## 1. 被験物質及び溶媒

## (1) 被験物質

名 称	ペルフルオロヘプタン
CAS 番号	335-57-9
構造式	$\text{CF}_3(\text{CF}_2)_5\text{CF}_3$
純 度	98.1% (gc)
分 子 量	388.05
融 点	データなし
沸 点	80°C
蒸 気 圧	データなし
分配係数	データなし
常温における性状	透明液体 (比重: 1.72)
安 定 性	試験終了後の被験物質について含量分析を実施した結果、純度 91.1% で若干低値を示したが、安定性に問題がないことが確認された。
保存方法	室温
保存温度	保存期間(2007.5.16~2007.7.18)中の実測温度: 19~25°C
保存場所	東京研究所 被験物質調製保存室
廃棄方法	試験終了後の残量は焼却後、廃棄した。

## (2) 溶媒

名 称	アセトン
製 造 元	和光純薬工業株式会社
ロット番号	TSN0063
規 格	JIS 規格 試薬特級 99.5%以上
保存方法	室温保存
保存場所	東京研究所 被験物質調製保存室

## (3) 溶媒の選択理由

水、ジメチルスルホキシド (以下、DMSO と略す)、アセトン、*N,N*-ジメチルホルムアミド、1,4-ジオキサンについて溶解性試験を実施した結果、本被験物質は水、DMSO、*N,N*-ジメチルホルムアミド、1,4-ジオキサンの 50mg/mL 及びアセトンの 100mg/mL で溶解せず、アセトンの 50mg/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、アセトンを経験として試験を実施した。なお、アセトンを経験とし、小試験管への分注量を 0.1mL としたため、溶媒の菌株に対する毒性を考慮してプレート法で試験を実施した。

## 2. 被験液の調製方法

## (1) 予備試験用被験液の調製

滅菌した調製用試験管に被験物質 0.2 mL を分取し、その秤量値 341.6 mg に最高調製濃度の 50 mg/mL となるように溶媒量を計算し、これに分取した際の液量 0.2 mL を差し引いた 6.632 mL のアセトンを添加して溶解し、調製した。次いで、50 mg/mL 被験液を公

比 4 で順次 6 段階希釈し、50、12.5、3.13、0.781、0.195、0.0488 及び 0.0122 mg/mL の計 7 濃度の被験液を調製した。なお、被験液の調製において、発熱、ガスの発生等の反応性は認められなかった。また、被験液は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で用時調製した。

(2) 本試験 1 回目用被験液の調製

滅菌した調製用試験管に被験物質 0.3 mL を分取し、その秤量値 509.1 mg に最高調製濃度の 50 mg/mL となるように溶媒量を計算し、これに分取した際の液量 0.3 mL を差し引いた 9.882 mL のアセトンを追加して溶解し、調製した。次いで、50 mg/mL 被験液を公比 2 で順次 4 段階希釈し、50、25、12.5、6.25 及び 3.13 mg/mL の計 5 濃度の被験液を調製した。なお、被験液の調製において、発熱、ガスの発生等の反応性は認められなかった。また、被験液は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で用時調製した。

(3) 本試験 2 回目用被験液の調製

滅菌した調製用試験管に被験物質 0.3 mL を分取し、その秤量値 511.1 mg に最高調製濃度の 50 mg/mL となるように溶媒量を計算し、これに分取した際の液量 0.3 mL を差し引いた 9.922 mL のアセトンを追加して溶解し、調製した。次いで、50 mg/mL 被験液を公比 2 で順次 4 段階希釈し、50、25、12.5、6.25 及び 3.13 mg/mL の計 5 濃度の被験液を調製した。なお、被験液の調製において、発熱、ガスの発生等の反応性は認められなかった。また、被験液は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で用時調製した。

(4) 被験液の保存条件

被験液は用時調製とし、保存はしなかった。

## 試験材料及び試験方法

### 1. 試験菌株

(1) 菌株の種類

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

なお、菌株は国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部より 1997 年 10 月 9 日に株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所で入手したものから、2005 年 7 月 21 日に分与された。

(2) 菌株の選択理由

試験委託者からの依頼により選択した。また、当該菌株は変異原性物質に対する感受性が高く、細菌を用いる変異原性試験に最も一般的に使用され、毒性試験法ガイドラインで指定されている。

## (3) 菌株の保存及び解凍

入手した菌株から継代して凍結保存した菌懸濁液を培養し、得られた菌懸濁液 8.0 mL に対して、DMSO（和光純薬工業株式会社、JIS 規格試薬特級、ロット番号 LTH4791、WKP5050）を 0.7 mL の割合で添加して、滅菌チューブに 300  $\mu$ L ずつ分注し、-70°C 以下の超低温フリーザ（三洋電機バイオメディカ株式会社：MDF-192）で保存した（保存期間中の実測温度 2007 年 2 月 23 日～2007 年 7 月 17 日：-81～-73°C）。なお、使用する際は室温で解凍し、使用後の残液は廃棄した。

使用した菌株の凍結保存日

<i>S. typhimurium</i> TA98	2007 年 2 月 23 日
<i>S. typhimurium</i> TA100	2007 年 5 月 11 日
<i>S. typhimurium</i> TA1535	2007 年 6 月 1 日
<i>S. typhimurium</i> TA1537	2007 年 6 月 1 日
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	2007 年 3 月 2 日

## (4) 菌株の特性検査

凍結保存した菌株について、アミノ酸要求性、膜変異 *rfa* 特性、薬剤耐性因子 R-factor プラスミド、紫外線感受性、菌増殖率、陰性対照値及び陽性対照値等の特性を検査し、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て使用した。

使用した菌株の特性検査実施日

<i>S. typhimurium</i> TA98	2007 年 2 月 23 日～2007 年 2 月 26 日
<i>S. typhimurium</i> TA100	2007 年 5 月 11 日～2007 年 5 月 14 日
<i>S. typhimurium</i> TA1535	2007 年 6 月 1 日～2007 年 6 月 4 日
<i>S. typhimurium</i> TA1537	2007 年 6 月 1 日～2007 年 6 月 4 日
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	2007 年 3 月 2 日～2007 年 3 月 5 日

## 2. 対照物質

## (1) 陰性対照物質

被験物質の調製に用いたアセトン陰性対照物質とした。

## (2) 陽性対照物質

毒性試験法ガイドラインに準じて、以下の変異原物質を陽性対照物質とした。

表 1 陽性対照物質一覧

陽性対照物質（略称）	ロット番号	純度(%)	保存方法
2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF-2)	PKE1831	99.5%	室温、遮光
Sodium azide (SAZ)	SDL2565	99.8%	室温、遮光
2-Methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)-aminopropylamino]acridine·2HCl (ICR-191)	534652		室温、遮光
2-Aminoanthracene (2AA)	KLH1059	96.6%	室温、遮光
Benzo[a]pyrene (B[a]P)	KLG2702	101.0%	冷蔵、遮光

保存場所： 東京研究所 微生物試験室の室温保存庫

製造元： AF-2、SAZ、B[a]P 及び 2AA：和光純薬工業株式会社

ICR-191：Polysciences, Inc.

### (3) 調製方法

AF-2、ICR-191、2AA 及び B[a]P は DMSO（和光純薬工業株式会社、JIS 規格 試薬特級、ロット番号 LTH4791、WKP5050）に溶解し、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 K6F75）に溶解し、1.0 mL ずつ小分けして-20℃以下で凍結保存した。なお、試験実施時に解凍して使用した。それぞれの調製濃度を表 2 に示した。

表 2 陽性対照物質調製濃度一覧

使用菌株	代謝活性化しない場合		代謝活性化する場合	
	陽性対照物質	調製濃度 (µg/mL)	陽性対照物質	調製濃度 (µg/mL)
<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)

( ) 内の数値は、プレートに処理したときの処理用量 (µg/plate) を示す。

## 3. 試薬

### (1) S9Mix の調製方法

Cofactor-I の 1 バイアルに滅菌精製水を 9.0 mL 加え、完全に溶解した後ろ過 (Nalge Nunc Int. 0.45µM : Lot No.600845) 滅菌し、Cofactor-I の 1 バイアルに対して 1.0 mL の S9 を加えて S9 Mix とした。調製後、使用時まで冷蔵下で保存し、使用後の残液は廃棄した。

#### 1) S9

名 称	S9
製 造 元	オリエンタル酵母工業株式会社
ロット番号	07042001
製 造 口	2007 年 4 月 20 日
購 入 日	2007 年 6 月 19 日
種 ・ 系 統	ラット・SD 系
週 齢 ・ 性	7 週齢・雄
体 重	204.7±9.2g
誘 導 物 質	フェノバルビタール(PB)& 5,6-ベンゾフラボン(BF)
投 与 方 法	腹腔内投与
投 与 期 間 及 び 投 与 量	PB 4 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)
保 存 場 所	東京研究所 被験物質調製保存室内超低温フリーザ (三洋電機バイオメディカ株式会社：MDF-192)
保 存 期 間 中 の 実 測 温 度	2007 年 6 月 19 日～2007 年 7 月 18 日：-80～-74℃

## 2) コファクター

名 称 Cofactor-I  
 製 造 元 オリエンタル酵母工業株式会社  
 ロット番号 999701  
 製 造 日 2007年2月19日  
 購 入 日 2007年6月19日  
 保 存 場 所 東京研究所 微生物試験室内冷蔵庫 (冷凍・冷蔵庫 MPR  
 -211F : 三洋電機バイオメディカ株式会社)  
 保存期間中の実測温度 2007年6月19日~2007年7月18日 : 4~10°C

## 3) S9Mix の組成 (1mL 中)

水	0.9 mL
S9	0.1 mL
MgCl <sub>2</sub>	8.0 μmol/mL
KCl	33.0 μmol/mL
グルコース-6-リン酸	5.0 μmol/mL
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)	4.0 μmol/mL
還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH)	4.0 μmol/mL
リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)	100.0 μmol/mL

## (2) 最少グルコース寒天平板培地

- 1) 名 称 バイタルメディア AMT-O 培地  
 製 造 元 極東製薬工業株式会社  
 ロット番号 DZL84601(予備試験)、DZL86F01(本試験 1 回目、2 回目)  
 製 造 日 DZL84601 : 2007年4月6日  
 DZL86F01 : 2007年6月15日  
 購 入 日 DZL84601 : 2007年5月15日  
 DZL86F01 : 2007年6月29日  
 保 存 方 法 常温保存  
 保 存 場 所 東京研究所 変異原性試験室
- 2) 使用寒天  
 名 称 OXOID AGAR No.1  
 製 造 元 OXOID LTD.  
 ロット番号 946458-02

## (3) 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 2.5wt% となるよう精製水で溶解し、オートクレーブにより滅菌処理 (121°C、20 分) を行い、調製した。調製後は使用時まで冷蔵で保存した。

名 称 ニュートリエントブロス No.2 (Nutrient Broth No.2)  
 ロット番号 349915  
 製 造 元 OXOID LTD.  
 保 存 方 法 室温保存  
 保 存 場 所 東京研究所 微生物試験室

## (4) 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4)

0.1mol/L リン酸水素二ナトリウム水溶液に、0.1mol/L リン酸二水素ナトリウム二水和物水溶液を加えながら pH 7.4 に調製し、0.1mol/L リン酸緩衝液とした。これをオートクレーブにより滅菌処理(121℃、20 分)を行った。調製後は使用時まで冷蔵で保存した。

- |         |   |
|---------|---|
| 1) 名 称  | リン酸二水素ナトリウム二水和物 (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O) |
| 製 造 元   | 和光純薬工業株式会社  |
| ロット番号   | SDM1133   |
| 保 存 方 法 | 室温保存  |
| 保 存 場 所 | 東京研究所 微生物試験室  |
| 2) 名 称  | リン酸水素二ナトリウム (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )                       |
| 製 造 元   | 和光純薬工業株式会社  |
| ロット番号   | EWM2400   |
| 保 存 方 法 | 室温保存  |
| 保 存 場 所 | 東京研究所 微生物試験室  |

## (5) トップアガー

以下に示す寒天を用いて、調製した軟寒天液 (0.6 % Agar, 0.6 % NaCl) をオートクレーブにより滅菌 (121℃、20 分処理) した後、*S. typhimurium* TA 株では 0.5 mmol/L *D*-ビオチン-0.5 mmol/L *L*-ヒスチジン溶液、*E. coli* 株では 0.5 mmol/L *L*-トリプトファン溶液をそれぞれ 1/10 容量となるように加え、調製した。調製後は室温で保存し、使用時は電子レンジで溶解後、固化を防ぐため 45℃の恒温槽で保温した。

- |         |  |
|---------|--|
| 1) 名 称  | Bacto Agar   |
| 製 造 元   | Becton, Dickinson and Company  |
| ロット番号   | 6275177  |
| 保 存 方 法 | 室温保存   |
| 保 存 場 所 | 東京研究所 微生物試験室   |
| 2) 名 称  | NaCl   |
| 製 造 元   | 和光純薬工業株式会社   |
| ロット番号   | DPK1032  |
| 保 存 方 法 | 室温保存   |
| 保 存 場 所 | 東京研究所 微生物試験室   |
| 3) 名 称  | <i>D</i> -ビオチン ((+)-Biotin、Vitamin H)                                      |
| 製 造 元   | ICN Biomedicals, Inc.  |
| ロット番号   | 3559H(予備試験)、3558H(本試験 1 回目、2 回目)   |
| 保 存 方 法 | 冷蔵保存、遮光  |
| 保 存 場 所 | 東京研究所 微生物試験室   |
| 4) 名 称  | <i>L</i> -ヒスチジン塩酸塩一水和物<br>( <i>L</i> -Histidine Hydrochloride Monohydrate) |
| 製 造 元   | 和光純薬工業株式会社   |
| ロット番号   | EWQ6361  |
| 保 存 方 法 | 室温保存、遮光  |
| 保 存 場 所 | 東京研究所 微生物試験室   |

5) 名 称	L-トリプトファン(L-Tryptophan)
製 造 元	和光純薬工業株式会社
ロット番号	EWP0422
保 存 方 法	室温保存、遮光
保 存 場 所	東京研究所 微生物試験室

#### 4. 試験方法

##### (1) 識別方法

##### 1) 菌株の識別

以下に示す色のマーカーで識別した。

<i>S. typhimurium</i> TA100	青
<i>S. typhimurium</i> TA1535	桃
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	茶
<i>S. typhimurium</i> TA98	赤
<i>S. typhimurium</i> TA1537	緑

##### 2) 濃度の識別

代謝活性化しない場合は「-」、代謝活性化する場合は「+」とし、これに続けて陰性対照(Solvent Control)を「SC」、陽性対照(Positive Control)を「PC」、被験物質処理群を濃度の低い方から「1」、「2」、「3」…の番号を各菌の色のマーカーで記載し、識別した。

##### (2) 前培養

- 1) ニュートリエントブロス No.2 培養液 10mL を入れた滅菌済み L 字型試験管に凍結保存菌株を解凍した菌懸濁液を *S. typhimurium* TA 株は各 20  $\mu$ L、*E. coli* 株は 10  $\mu$ L 植菌した。なお、使用後の菌懸濁液は廃棄した。
- 2) これを振盪恒温槽 (COOL BATH SHAKER ML-10 PU-6 接続型、タイテック株式会社) にセットし、プログラム制御により前培養開始まで 4°C 水浴中で放置(6 時間 30 分)した後、37°C に上昇後 9 時間前培養した。
- 3) 前培養終了時に菌懸濁液の吸光度をデジタル比色計 (Mini photo 518R、タイテック株式会社) で測定した。なお、菌懸濁液は使用まで室温下に維持した。それぞれの菌株の換算生菌数を表 3 に示した。

表 3 菌株の換算生菌数一覧

菌 株	菌 数(cells/mL)		
	予備試験	本試験 1 回目	本試験 2 回目
<i>S. typhimurium</i> TA100	$5.85 \times 10^9$	$5.65 \times 10^9$	$5.44 \times 10^9$
<i>S. typhimurium</i> TA1535	$4.83 \times 10^9$	$4.84 \times 10^9$	$4.82 \times 10^9$
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	$7.02 \times 10^9$	$7.08 \times 10^9$	$7.04 \times 10^9$
<i>S. typhimurium</i> TA98	$4.95 \times 10^9$	$5.04 \times 10^9$	$5.04 \times 10^9$
<i>S. typhimurium</i> TA1537	$4.22 \times 10^9$	$4.24 \times 10^9$	$4.22 \times 10^9$

### (3) 本試験用量の設定

本試験の試験用量を設定するため、50 mg/mL の被験液を公比 4 で 6 段階希釈した 7 用量 (1.22, 4.88, 19.5, 78.1, 313, 1250, 5000 µg/plate) を用い、予備試験を実施した。なお、予備試験の結果を別表 1 に示した。

予備試験の結果、本被験物質処理による生育阻害は、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。また、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。

このため本試験の試験用量は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株についても 5000 µg/plate を最高用量として、以下公比 2 で 4 段階希釈した計 5 用量を設定した。

### (4) プレート数

被験物質処理群、陰性対照及び陽性対照処理群について、予備試験ではそれぞれ 2 枚、本試験ではそれぞれ 3 枚のプレートを用いた。

### (5) 試験操作

- 1) 滅菌した小試験管に調製した被験液、溶媒及び陽性対照溶液を 0.1mL 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、それぞれの小試験管に各菌懸濁液 0.1 mL を加えた。
- 2) 小試験管にトッパアガーを 2.0mL 加えて攪拌後、すぐに最少グルコース寒天平板培地に均一に重層した。
- 3) 無菌試験として、調製した最高用量の被験液 0.1 mL 及び調製した S9 Mix 0.5mL をそれぞれ小試験管に取り、これにトッパアガーを 2.0mL 加えた後に最少グルコース寒天平板培地に均一に重層した。なお、これら 1)~3)の一連の操作は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で実施した。
- 4) 最少グルコース寒天平板培地に重層したトッパアガーが固化したことを確認し、最少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 48 時間以上 (予備試験：49 時間、本試験 1 回目：50 時間、本試験 2 回目：48.5 時間) 培養した。
- 5) 培養後、寒天培地上の被験物質による沈殿を確認した結果、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ため、自動コロニーカウンタ (コロニアナライザー CA-11D Systems、システムサイエンス株式会社) を用いて計数 (面積補正、補正值：1.21) した。また、実体顕微鏡を用いて生育阻害の有無を観察した。

## 5. 判定基準

被験物質処理群の復帰変異コロニー数が自然復帰変異コロニー数 (陰性対照値) に対して 2 倍以上となる増加を示し、用量反応性及び再現性が認められた場合あるいは明確な用量反応性を示さない場合であっても自然復帰変異コロニー数の 2 倍以上に増加し、2 回の本試験で再現性が認められた場合に陽性と判定した。なお、本試験の測定結果については、平均値 ± 標準偏差も併せて記載した。

## 試験結果及び考察

### 1. 試験結果

試験の結果を別表 1～3 及び図 1、2 に示した。なお、図は別表 2 より作成した。

#### (1) 培養終了後の観察結果

本被験物質による沈殿及び着色は、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。なお、生育阻害の有無について実体顕微鏡を用いて観察した結果、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菌の生育阻害は認められなかった。

#### (2) 復帰突然変異コロニー数

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、陰性対照群と比較して 2 倍以上には増加せず、用量反応性も認められなかった。

#### (3) 試験系の成立条件

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が背景データの管理限界（平均値±3SD：別添）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。なお、背景データについては、プレート法による参考となる直近データがなかったため、当該試験の前後の期間にデータを収集し、背景データとした。

### 2. 考察

2 回の本試験ともに、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、本被験物質処理による復帰変異コロニー数は、いずれの試験用量においても陰性対照と比較して 2 倍以上となる再現性のある増加は認められず、用量反応性も認められなかった。なお、試験終了後の被験物質について含量分析を実施した結果、純度 91.1% で受領時よりも若干低値を示したが、変異原性の判定には影響しないと判断した。

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代謝活性化の有無にかかわらず、ペルフルオロヘプタンは、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。

## 参考文献

- (1) B.N.Ames, F.D.Lee and W.E.Durston: An Improved Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens, Proc.Natl Acad.Sci.,USA, 70, No.3, pp.782-786, March 1973.
- (2) J.McCann, N.E.Spingarn, J.Kobori and B.N.Ames: Detection of Carcinogens as Mutagens: Bacterial Tester Strains with R Factor Plasmids, Proc.Natl Acad.Sci., USA, 72, No.3, pp.979-983, March 1975.

- (3) M.H.L.Green and W.J.Muriel: Mutagen Testing using Trp<sup>+</sup> Reversion in *Escherichia coli*, Mutation Res., 38, pp.3-32, 1976.
- (4) T.Yahagi, M.Nagao, Y.Seino, T.Matsushima, T.Sugimura and M.Okada: Mutagenicities of *N*-nitrosamines on *Salmonella*, Mutation Res., 48, pp.121-130, 1977.
- (5) Dorothy M. Maron and Bruce N. Ames: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, Mutation Res., 113, pp.173-215, 1983.
- (6) 田島彌太郎, 賀田恒夫, 近藤宗平, 外村晶 (編) : 環境変異原実験法, 講談社, pp.56-68, 1980.
- (7) 労働省安全衛生部化学物質調査課編 : 新・微生物を用いる変異原性試験ガイドブック, 中央労働災害防止協会, 1986.
- (8) 石館 基 (監修) : 微生物を用いる変異原性試験データ集 (能美健彦, 松井道子編集), 株式会社エル・アイ・シー, 東京, 1991.

(別表1)

## 試験結果表(予備試験)

被験物質の名称:ペルフルオロヘプタン

No. T-0062

試験実施期間		2007年6月25日 より 2007年6月28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	WP2 <sub>uvrA</sub>	TA98	TA1537
S9Mix (-)	陰性対照(アセトン)	139 108 ( 124 )	7 7 ( 7 )	24 26 ( 25 )	26 34 ( 30 )	6 5 ( 6 )
	1.22	127 139 ( 133 )	11 13 ( 12 )	18 21 ( 20 )	18 23 ( 21 )	5 8 ( 7 )
	4.88	123 119 ( 121 )	7 13 ( 10 )	17 21 ( 19 )	26 33 ( 30 )	5 7 ( 6 )
	19.5	143 108 ( 126 )	10 9 ( 10 )	22 24 ( 23 )	24 33 ( 29 )	8 11 ( 10 )
	78.1	143 117 ( 130 )	13 7 ( 10 )	16 25 ( 21 )	19 20 ( 20 )	7 9 ( 8 )
	313	111 119 ( 115 )	11 7 ( 9 )	22 21 ( 22 )	36 27 ( 32 )	9 11 ( 10 )
	1250	123 110 ( 117 )	10 10 ( 10 )	14 16 ( 15 )	27 25 ( 26 )	4 8 ( 6 )
	5000	115 124 ( 120 )	10 5 ( 8 )	21 22 ( 22 )	20 33 ( 27 )	9 8 ( 9 )
	S9Mix (+)	陰性対照(アセトン)	158 169 ( 164 )	10 11 ( 11 )	21 28 ( 25 )	45 42 ( 44 )
1.22		136 148 ( 142 )	8 8 ( 8 )	22 26 ( 24 )	39 44 ( 42 )	12 15 ( 14 )
4.88		152 142 ( 147 )	10 16 ( 13 )	15 11 ( 13 )	39 34 ( 37 )	17 5 ( 11 )
19.5		143 158 ( 151 )	13 15 ( 14 )	21 20 ( 21 )	34 44 ( 39 )	9 5 ( 7 )
78.1		165 149 ( 157 )	7 14 ( 11 )	30 19 ( 25 )	36 25 ( 31 )	10 8 ( 9 )
313		147 168 ( 158 )	16 18 ( 17 )	22 18 ( 20 )	42 37 ( 40 )	12 6 ( 9 )
1250		135 143 ( 139 )	16 7 ( 12 )	16 22 ( 19 )	48 36 ( 42 )	13 8 ( 11 )
5000		143 170 ( 157 )	7 9 ( 8 )	17 22 ( 20 )	27 38 ( 33 )	6 9 ( 8 )
陽性対照		S9Mixを必要としないもの	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	330 336 ( 333 )	304 373 ( 339 )	53 53 ( 53 )	359 360 ( 360 )	449 501 ( 475 )
	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/プレート)	5.0	2.0	10	5.0	5.0	
コロニー数/プレート	1236 1266 ( 1251 )	555 510 ( 533 )	950 1095 ( 1023 )	421 436 ( 429 )	77 128 ( 103 )	

(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-メキシチロ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノ]ピロピルアミノ]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1回目)

被験物質の名称:ペルフルオロヘプタン

No. T-0062

試験実施期間		2007年7月3日 より 2007年7月6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(アセトン)	125	13	28	18	8	
		120	24	25	15	20	
		140 ( 128 ± 10.4 )	16 ( 18 ± 5.7 )	34 ( 29 ± 4.6 )	16 ( 16 ± 1.5 )	17 ( 15 ± 6.2 )	
	313	119	11	31	25	19	
		108	19	39	17	13	
		109 ( 112 ± 6.1 )	16 ( 15 ± 4.0 )	39 ( 36 ± 4.6 )	38 ( 27 ± 10.6 )	13 ( 15 ± 3.5 )	
	625	120	25	19	21	13	
		113	5	38	24	7	
		123 ( 119 ± 5.1 )	17 ( 16 ± 10.1 )	24 ( 27 ± 9.8 )	21 ( 22 ± 1.7 )	13 ( 11 ± 3.5 )	
	1250	137	28	39	18	15	
		107	12	28	17	11	
		120 ( 121 ± 15.0 )	17 ( 19 ± 8.2 )	28 ( 32 ± 6.4 )	17 ( 17 ± 0.6 )	19 ( 15 ± 4.0 )	
	2500	132	16	32	21	11	
		103	18	33	31	15	
		103 ( 113 ± 16.7 )	15 ( 16 ± 1.5 )	41 ( 35 ± 4.9 )	14 ( 22 ± 8.5 )	20 ( 15 ± 4.5 )	
	5000	117	29	42	33	15	
		120	31	24	27	15	
		108 ( 115 ± 6.2 )	24 ( 28 ± 3.6 )	33 ( 33 ± 9.0 )	14 ( 25 ± 9.7 )	24 ( 18 ± 5.2 )	
S9Mix (+)	陰性対照(アセトン)	136	10	28	32	13	
		145	9	31	39	19	
		133 ( 138 ± 6.2 )	12 ( 10 ± 1.5 )	23 ( 27 ± 4.0 )	47 ( 39 ± 7.5 )	17 ( 16 ± 3.1 )	
	313	146	19	41	37	13	
		119	15	36	64	30	
		134 ( 133 ± 13.5 )	15 ( 16 ± 2.3 )	34 ( 37 ± 3.6 )	46 ( 49 ± 13.7 )	19 ( 21 ± 8.6 )	
	625	159	13	39	42	21	
		163	15	38	52	15	
		134 ( 152 ± 15.7 )	11 ( 13 ± 2.0 )	29 ( 35 ± 5.5 )	50 ( 48 ± 5.3 )	21 ( 19 ± 3.5 )	
	1250	160	16	31	52	29	
		137	17	22	53	24	
		137 ( 145 ± 13.3 )	13 ( 15 ± 2.1 )	24 ( 26 ± 4.7 )	39 ( 48 ± 7.8 )	18 ( 24 ± 5.5 )	
	2500	175	20	48	39	24	
		138	14	33	58	19	
		159 ( 157 ± 18.6 )	17 ( 17 ± 3.0 )	45 ( 42 ± 7.9 )	39 ( 45 ± 11.0 )	16 ( 20 ± 4.0 )	
	5000	136	11	35	42	18	
		174	20	28	38	27	
		158 ( 156 ± 19.1 )	15 ( 15 ± 4.5 )	33 ( 32 ± 3.6 )	39 ( 40 ± 2.1 )	28 ( 24 ± 5.5 )	
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/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
		コロニー数/プレート	381 343 325 ( 350 ± 28.6 )	347 356 339 ( 347 ± 8.5 )	64 64 56 ( 61 ± 4.6 )	364 352 347 ( 354 ± 8.7 )	257 258 227 ( 247 ± 17.6 )
	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/プレート)	5.0	2.0	10	5.0	5.0
		コロニー数/プレート	1204 1166 1128 ( 1166 ± 38.0 )	583 537 536 ( 552 ± 26.9 )	1265 1246 1358 ( 1290 ± 59.9 )	394 370 393 ( 386 ± 13.6 )	111 109 119 ( 113 ± 5.3 )

(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-メキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノ]ピロヒルアミノ]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、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

(別表3)

## 試験結果表 (本試験 2回目)

被験物質の名称:ペルフルオロヘプタン

No. T-0062

試験実施期間		2007年7月17日 より 2007年7月20日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/プレート)	複帰変異数(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 (アセトン)	141	16	12	27	5	
		152	16	16	24	9	
		112 ( 135 ± 20.7 )	15 ( 16 ± 0.6 )	16 ( 15 ± 2.3 )	24 ( 25 ± 1.7 )	10 ( 8 ± 2.6 )	
	313	92	7	11	22	5	
		111	11	19	21	4	
		117 ( 107 ± 13.1 )	9 ( 9 ± 2.0 )	15 ( 15 ± 4.0 )	21 ( 21 ± 0.6 )	7 ( 5 ± 1.5 )	
	625	114	10	13	28	7	
		119	15	18	16	6	
		97 ( 110 ± 11.5 )	7 ( 11 ± 4.0 )	17 ( 16 ± 2.6 )	22 ( 22 ± 6.0 )	7 ( 7 ± 0.6 )	
	1250	97	14	21	19	4	
		131	14	18	13	7	
		128 ( 119 ± 18.8 )	4 ( 11 ± 5.8 )	13 ( 17 ± 4.0 )	15 ( 16 ± 3.1 )	12 ( 8 ± 4.0 )	
	2500	106	11	18	23	11	
		113	15	16	30	8	
		106 ( 108 ± 4.0 )	5 ( 10 ± 5.0 )	16 ( 17 ± 1.2 )	24 ( 26 ± 3.8 )	6 ( 8 ± 2.5 )	
	5000	91	18	22	25	15	
		122	19	20	25	10	
		124 ( 112 ± 18.5 )	16 ( 18 ± 1.5 )	10 ( 17 ± 6.4 )	22 ( 24 ± 1.7 )	10 ( 12 ± 2.9 )	
S9Mix (+)	陰性対照 (アセトン)	166	7	11	49	7	
		125	10	15	33	14	
		147 ( 146 ± 20.5 )	9 ( 9 ± 1.5 )	16 ( 14 ± 2.6 )	42 ( 41 ± 8.0 )	8 ( 10 ± 3.8 )	
	313	134	16	24	30	17	
		134	12	18	34	6	
		151 ( 140 ± 9.8 )	9 ( 12 ± 3.5 )	14 ( 19 ± 5.0 )	39 ( 34 ± 4.5 )	5 ( 9 ± 6.7 )	
	625	122	16	19	38	8	
		107	4	25	33	7	
		137 ( 122 ± 15.0 )	7 ( 9 ± 6.2 )	16 ( 20 ± 4.6 )	30 ( 34 ± 4.0 )	8 ( 8 ± 0.6 )	
	1250	158	9	17	36	12	
		132	16	19	39	7	
		154 ( 148 ± 14.0 )	8 ( 11 ± 4.4 )	13 ( 16 ± 3.1 )	44 ( 40 ± 4.0 )	10 ( 10 ± 2.5 )	
	2500	169	10	19	41	9	
		146	16	26	53	10	
		150 ( 155 ± 12.3 )	11 ( 12 ± 3.2 )	25 ( 23 ± 3.8 )	48 ( 47 ± 6.0 )	13 ( 11 ± 2.1 )	
	5000	136	11	18	48	13	
		157	15	26	44	15	
		143 ( 145 ± 10.7 )	18 ( 15 ± 3.5 )	19 ( 21 ± 4.4 )	38 ( 43 ± 5.0 )	14 ( 14 ± 1.0 )	
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/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
		コロニー数/プレート	328	538	47	390	369
	S9Mixを必要とするもの	330	540	46	345	424	
		303 ( 320 ± 15.0 )	521 ( 533 ± 10.4 )	50 ( 48 ± 2.1 )	425 ( 387 ± 40.1 )	336 ( 376 ± 44.5 )	
		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	5.0	5.0		
1001	555	901	328	94			
1030	579	1001	350	101			
1021 ( 1017 ± 14.8 )	612 ( 582 ± 28.6 )	981 ( 961 ± 52.9 )	368 ( 349 ± 20.0 )	102 ( 99 ± 4.4 )			

(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、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

図 1

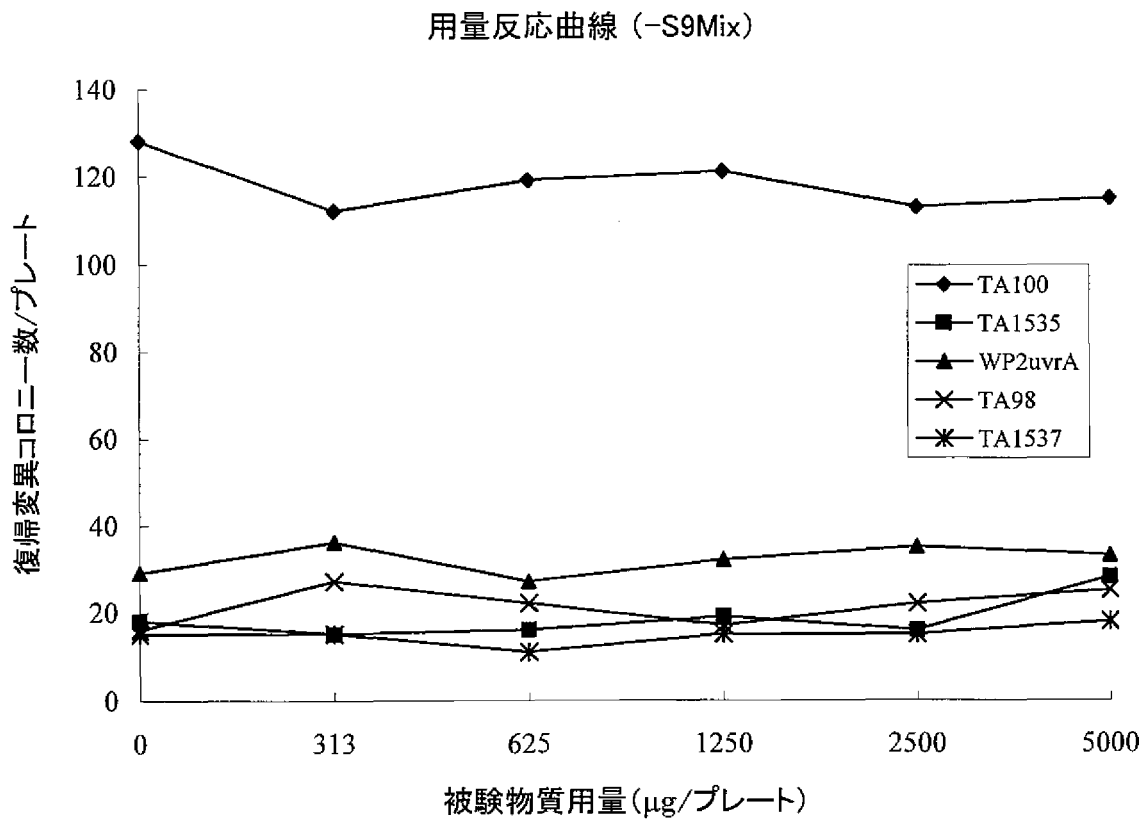


図 2

