最終報告書

表　　題：ペルフルオロテトラデカン酸の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：ＳＲ０６２００

株式会社 化合物安全性研究所

目　次

頁

表紙 ····· 1

目次 ····· 4

要約 ····· 8
緒言 ····· 9
材料および方法 ····· 9
成績 ····· 18
考察 ····· 19

Tables

Table 1　Reverse mutation test of perfluorotetradecanoic acid in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2*uvr*A without metabolic activation (dose-finding test) (SR06200) ····· 21

Table 2　Reverse mutation test of perfluorotetradecanoic acid in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2*uvr*A with metabolic activation (dose-finding test) (SR06200) ····· 22

Table 3　Reverse mutation test of perfluorotetradecanoic acid in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2*uvr*A without metabolic activation (main test) (SR06200) ····· 23

Table 4　Reverse mutation test of perfluorotetradecanoic acid in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2*uvr*A with metabolic activation (main test) (SR06200) ····· 24

Figures

Figure 1-1 Reverse mutation test of perfluorotetradecanoic acid in *Salmonella typhimurium* TA100 without metabolic activation (dose-response curves) (SR06200) ····· 25

Figure 1-2 Reverse mutation test of perfluorotetradecanoic acid in *Salmonella typhimurium* TA100 with metabolic activation (dose-response curves) (SR06200) ····· 26

Figure 2-1 Reverse mutation test of perfluorotetradecanoic acid in *Salmonella typhimurium* TA1535 without metabolic activation (dose-response curves) (SR06200) ····· 27

Figure 2-2 Reverse mutation test of perfluorotetradecanoic acid in *Salmonella typhimurium* TA1535 with metabolic activation (dose-response curves) (SR06200) ····· 28

Figure 3-1 Reverse mutation test of perfluorotetradecanoic acid in *Escherichia coli* WP2*uvr*A without metabolic activation (dose-response curves) (SR06200) ····· 29

Figure 3-2 Reverse mutation test of perfluorotetradecanoic acid in *Escherichia coli* WP2*uvr*A with metabolic activation (dose-response curves) (SR06200) ····· 30

Figure 4-1 Reverse mutation test of perfluorotetradecanoic acid in *Salmonella typhimurium* TA98 without metabolic activation (dose-response curves) (SR06200) ····· 31

Figure 4-2 Reverse mutation test of perfluorotetradecanoic acid in *Salmonella typhimurium* TA98 with metabolic activation (dose-response curves) (SR06200) ····· 32

Figure 5-1 Reverse mutation test of perfluorotetradecanoic acid in *Salmonella typhimurium* TA1537 without metabolic activation (dose-response curves) (SR06200) ····· 33

Figure 5-2 Reverse mutation test of perfluorotetradecanoic acid in *Salmonella typhimurium* TA1537 with metabolic activation (dose-response curves) (SR06200) ····· 34

要　約

ペルフルオロテトラデカン酸の細菌における遺伝子突然変異誘発性を検討する目的で、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2*uvr*A を用いる復帰突然変異試験を実施した。試験は代謝活性化系 S9 mix の非存在下(直接法)ならびに存在下(代謝活性化法)において、プレインキュベーション法で実施した。

用量設定試験では、直接法および代謝活性化法ともに被験物質の最高用量を 5000 μg/plate とし、以下公比約 3 で低下させた計 7 用量(5～5000 μg/plate)の試験群を設定した。試験の結果、各試験系列のいずれの菌株においても、被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の値の 2 倍未満であり、用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加もみられなかった。被験物質の析出が、各菌株の 5000 μg/plate の用量で観察された。生育阻害は、各試験系列のいずれの菌株においても観察されなかった。

本試験では、直接法および代謝活性化法ともに被験物質の最高用量を 5000 μg/plate とし、以下公比 2 で低下させた計 5 用量(313～5000 μg/plate)の試験群を設定した。試験の結果、各試験系列のいずれの菌株においても、被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の値の 2 倍未満であり、用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加もみられなかった。被験物質の析出が、各菌株の 5000 μg/plate の用量で観察された。生育阻害は、各試験系列のいずれの菌株においても観察されなかった。

用量設定試験および本試験のいずれにおいても、各菌株の陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は全て試験施設の背景データに基づく管理値の範囲内であった。また、各菌株の陽性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、それぞれにおける陰性対照群の値の 2 倍以上の明確な増加を示した。これらの結果から、各菌株が変異原物質に対し適切な感度を有していたことが確認された。

以上のことから、ペルフルオロテトラデカン酸は、当該試験条件下において試験菌株に対する遺伝子突然変異誘発性を有しないと判断した。

緒　言

ペルフルオロテトラデカン酸の細菌における遺伝子突然変異誘発性を、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2*uvr*A を用いる復帰突然変異試験により検討した。試験は、代謝活性化系 S9 mix の非存在下(直接法)ならびに存在下(代謝活性化法)において、プレインキュベーション法で実施した。

材料および方法

1. 被験物質

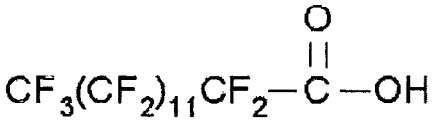
名称　：ペルフルオロテトラデカン酸

英名　：Perfluorotetradecanoic acid

CAS No.　：376-06-7

官報公示整理番号　：2-2658

構造式　：



分子式　：$C_{14}HF_{27}O_2$

分子量　：714.11

物理化学的性質　：外観　；白色結晶性粉末

溶解性；試験施設において、蒸留水、ジメチルスルホキシド、アセトンに対する溶解性を事前確認した。確認内容を、2. 被験物質の調製(10 頁)に記載した。

純度　：97.3% (Appendix 1)

不純物の名称およびその濃度：不明(データなし)

入手量	：5 g（関連試験と共通）
安定性	：安定 使用した被験物質の純度に関する分析成績を入手し、試験期間中の安定性について確認する。
保存場所	：検体保存室および変異原性試験室
保存条件	：遮光、密閉、冷所（実測範囲：2～9℃）
保存期間	：2007 年 6 月 27 日（受入）～2007 年 10 月 30 日（最終使用日）
取扱上の注意	：吸い込んだり、目、皮膚及び衣類に触れないように、適切な保護具を着用し取扱った。
残余被験物質の処置	：安定性分析のため製造者へ送付する。

2. 被験物質の調製

試験施設における溶解性確認において、被験物質はジメチルスルホキシドに溶解ならびに懸濁せず、アセトンには 200 mg/mL 濃度で懸濁可能であったが静置により沈殿した。また、被験物質は蒸留水（日本薬局方注射用水）には 50 mg/mL 濃度では溶解ならびに懸濁せず、10 mg/mL 濃度で懸濁可能であった。いずれの溶媒においても被験物質との反応性はみられなかった。従って、ジメチルスルホキシドおよび蒸留水の使用では被験物質の 5000 μg/plate の処理が困難であることから、溶媒としてアセトンを選択した。調製液は良く攪拌後、すみやかに分取し使用した。

被験物質を精秤し、アセトン（試薬特級、ロット番号 ASG7188、和光純薬工業株式会社）を用いて懸濁および希釈し、所定の濃度に調製した。

用量設定試験では、200 mg/mL 調製液から公比約 3 で段階希釈し 60、20、6、2、0.6 および 0.2 mg/mL 調製液を調製した。

本試験では、200 mg/mL 調製液から公比 2 で段階希釈し 100、50、25 および 12.5 mg/mL 調製液を調製した。

調製液の安定性では、用量設定試験および本試験ともに、被験物質調製時の目視確認において媒体との反応性（変色、発熱、発泡等）はみられなかった。

被験物質調製液は、用量設定試験では調製後 2.6 時間以内に、本試験では調製後 2.3 時間以内に試験に使用した。

調製液はクリーンベンチ内で用時に調製し、調製に際してはマスク、手袋、防護メガネおよび白衣を着用し、吸引または眼、皮膚および衣類に触れないようにして取扱った。残余調製液は、焼却処分するために、産業廃棄物として回収した。

3. 陰性対照物質

陰性対照物質として、被験物質の調製媒体であるアセトン(試薬特級、ロット番号ASG7188、和光純薬工業株式会社)を、モレキュラーシーブを用いて脱水処理を行い、原液のまま使用した。

4. 陽性対照物質およびその調製

陽性対照物質として、次表の既知変異原物質を使用した。これらの陽性対照物質は、遮光および冷所で保存した。

陽性対照物質は、含量補正をせずにそれぞれ次表の濃度に調製し、分注後-20℃以下で凍結保存したものを解凍後2.0時間以内に使用した。調製液は、調製日より12ヵ月以内(使用期限：調製後1年)に使用した。

陽性対照物質	調製濃度	調製媒体
2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド(含量98.3%) ロット番号SDJ4376 和光純薬工業株式会社	0.1および 1 μg/mL	ジメチルスルホキシド ロット番号TA026 株式会社同仁化学研究所
アジ化ナトリウム(純度99.8%) ロット番号SDH6348 和光純薬工業株式会社	5 μg/mL	日本薬局方注射用水 ロット番号5D73 株式会社大塚製薬工場
9-アミノアクリジン塩酸塩一水和物 (含量98.8%) ロット番号03024JR Aldrich Chemical Company, Inc.	800 μg/mL	ジメチルスルホキシド ロット番号TA026 株式会社同仁化学研究所
2-アミノアントラセン (含量97.4%) ロット番号TCG4316 和光純薬工業株式会社	5、10、20 および 100 μg/mL	ジメチルスルホキシド ロット番号TA026 株式会社同仁化学研究所

5. 試験菌株

試験には、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537ならびに*Escherichia coli* WP2*uvr*Aを使用した。これらの菌株は、1991年10月18日に国立衛生試験所(現 国立医薬品食品衛生研究所)より分与された。また、これらの菌株は遺伝毒性を有する化学物質の検索に適した細菌として広く受け入れられていることから選択した。

各菌株は、培養液8 mLに対しジメチルスルホキシド(ロット番号TA026、株式会社同仁化学研究所)0.7 mL を加え、試験チューブに分注後-80℃以下で凍結保存した。各菌株の培養液の一部を用いて、菌株の特性(アミノ酸要求性、膜変異 *rfa* 特性、紫外線感受性および薬剤耐性)ならびに陰性対照物質および陽性対照物質に対する感受性の検査を行い、これらの特性が正常に保持されていることが確認された菌株を試験に使用した。

6. 培地

(1) 前培養用培地

前培養用のニュートリエントブロス培地として、ニュートリエントブロス(OXOID NUTRIENT BROTH No.2、ロット番号 298714、OXOID LTD.)を日本薬局方注射用水(ロット番号7D85、株式会社大塚製薬工場)を用いて25 g/Lに調製した。*S. typhimurium* TA98およびTA100の培地には、使用時にアンピシリンナトリウム(ロット番号M3F9025、ナカライテスク株式会社)を25 μg/mLとなるように添加した。

(2) 試験用培地(最少グルコース寒天培地)

試験用培地として使用した最少グルコース寒天培地(バイタルメディア AMT-0 培地、ロット番号DZL87T01(2007年7月29日製造)極東製薬工業株式会社)1000 mL中の組成は次表の通りである。

試験用培地1000 mL中の組成	
硫酸マグネシウム・7水塩	0.2 g
クエン酸・1水塩	2.0 g
リン酸二カリウム・無水塩	10.0 g
リン酸一アンモニウム	1.92 g
水酸化ナトリウム	0.66 g
ブドウ糖	20.0 g
寒天末[OXOID AGAR No.1、ロット番号994025-02]	15.0 g

(3) 重層用培地

次頁の表の組成のソフトアガーおよびアミノ酸溶液を蒸留水を用いて調製し、使用時に(A):(B)=10:1 の容量比で混合した。*S. typhimurium* には L-ヒスチジンおよびD-ビオチンのアミノ酸溶液を、*E. coli* にはL-トリプトファンのアミノ酸溶液を使用した。

重層用培地の組成	
(A) ソフトアガー	
Bacto™ Agar	0.6 %
(ロット番号6228088、Becton, Dickinson and Company)	
塩化ナトリウム	0.5 %
(ロット番号611F1714、関東化学株式会社)	
(B) アミノ酸溶液	
L-ヒスチジンおよびD-ビオチン溶液	各々 0.5 mmol/L
(L-ヒスチジン、ロット番号ASP6644、和光純薬工業株式会社)	
(D-ビオチン、ロット番号LTH5667、和光純薬工業株式会社)	
または	
L-トリプトファン溶液	0.5 mmol/L
(L-トリプトファン、ロット番号ASG2385、和光純薬工業株式会社)	

7. S9 mix

S9 mixは、S9(ロット番号RAA-560、2007年5月11日製造、キッコーマン株式会社)、S9 mix用Cofactor(Cofactor-I、ロット番号999701、オリエンタル酵母工業株式会社)および日本薬局方注射用水(ロット番号7D85、株式会社大塚製薬工場)を用いて用時調製した。

S9は、購入後-80℃以下で保存し、製造日より6ヵ月以内(使用期限：製造後6ヵ月)に使用した。このS9は、フェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンの腹腔内投与で酵素誘導したSlc:SD系ラット(雄、7週齢)の肝ホモジネートより調製された。

S9 mix 1 mL中の組成は次表の通りである。

S9 mix 1 mL中の組成		
S9	0.1	mL
塩化マグネシウム	8	μmol
塩化カリウム	33	μmol
グルコース-6-リン酸	5	μmol
還元型ﾆｺﾁﾝｱﾐﾄﾞｱﾃﾞﾆﾝｼﾞﾇｸﾚｵﾁﾄﾞﾘﾝ酸(NADPH)	4	μmol
還元型ﾆｺﾁﾝｱﾐﾄﾞｱﾃﾞﾆﾝｼﾞﾇｸﾚｵﾁﾄﾞ(NADH)	4	μmol
リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.4	100	μmol

8. 試験群

(1) 用量設定試験

各菌株につき代謝活性化系 S9 mix の非存在下(直接法)および存在下(代謝活性化法)で試験を実施した。

直接法および代謝活性化法ともに被験物質の最高用量を 5000 μg/plate とし、以下公比約 3 で用量を低下させた計 7 用量の試験群(5000、1500、500、150、50、15 および 5 μg/plate)を設定した。

(2) 本試験

各菌株につき直接法および代謝活性化法で試験を実施した。

用量設定試験の結果、用量設定試験の結果、直接法および代謝活性化法いずれにおいても、被験物質による陽性反応は認められなかった。被験物質の析出が、直接法および代謝活性化法いずれにおいても 5000 μg/plate の用量で観察された。菌株の生育阻害は、いずれの菌株においても観察されなかった。これらのことから、本試験では、被験物質の最高用量を 5000 μg/plate とし、以下公比 2 で低下させた計 5 用量 (5000、2500、1250、625 および 313 μg/plate)を設定した。

(3) 陰性対照群および陽性対照群

用量設定試験および本試験いずれにおいても、試験系列毎に陰性対照群(アセトン)および次表の陽性対照群を設定した。

供試菌株	陽性対照物質 (用量：μg/plate)	
	直接法	代謝活性化法
S. typhimurium TA100	AF-2 (0.01)	2-AA (1)
S. typhimurium TA1535	NaN_3 (0.5)	2-AA (2)
E. coli WP2*uvr*A	AF-2 (0.01)	2-AA (10)
S. typhimurium TA98	AF-2 (0.1)	2-AA (0.5)
S. typhimurium TA1537	9-AA (80)	2-AA (2)

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：アジ化ナトリウム、 9-AA：9-アミノアクリジン塩酸塩一水和物
2-AA：2-アミノアントラセン

(4) プレート数およびプレートの識別

プレート数は、各試験群ともに 3 枚とした。

プレートには、識別のための試験番号および試験群を記載したラベルを貼付した。

9. 試験方法

(1) 試験菌株の前培養

容量約40 mLのL字管に前培養用培地(ニュートリエントブロス培地)12 mLを入れ、解凍した保存菌を12 μL接種し、37℃、振幅40 mm、振盪速度100回/分に設定した振盪恒温槽(Personal-11・EX、タイテック株式会社)で10時間の往復振盪培養を行った。なお、菌株の接種後、L字管は振盪培養開始まで冷却(氷冷)した。培養終了時に、得られた菌培養液のOD_{660nm}を比色計(mini photo 518、タイテック株式会社)で測定し、各菌株の生菌数－OD_{660nm}相関式より生菌数を算出した。生菌数が1×10^9 cells/mLより多く、十分に菌が生育していることが確認された菌培養液を試験に使用した。

各培養液の生菌数(計算値)は次表の通りであった。

供試菌株	生菌数(計算値)($\times10^9$ cells/mL)	
	用量設定試験	本試験
S. typhimurium TA100	2.96	2.68
S. typhimurium TA1535	3.62	3.01
S. typhimurium TA98	3.06	2.70
S. typhimurium TA1537	1.92	1.65
E. coli WP2*uvr*A	4.32	3.94

(2) 被験物質および対照物質調製液の処理

被験物質および対照物質調製液の処理を、プレインキュベーション法で行った。

蓋付きのポリエチレン製チューブ(5 mL容量)を使用して、被験物質調製液あるいは陰性対照物質の25 μLあるいは陽性対照物質の0.1 mLを、直接法の場合は0.1 mol/L Na-リン酸緩衝液(pH7.4) 0.5 mLと、代謝活性化法の場合はS9 mix 0.5 mLと、それぞれ混合した。その混合液に菌培養液0.1 mLを加え、37℃、振幅40 mm、振盪速度100回/分に設定した振盪恒温槽(Personal-11・EX、タイテック株式会社)で20分間振盪培養(プレインキュベーション)した。プレインキュベーション終了後、*S. typhimurium*には0.05 mmol/L L-ヒスチジンおよび0.05 mmol/L D-ビオチンを含む重層用培地2 mLを、*E. coli*には0.05 mmol/L L-トリプトファンを含む重層用培地2 mLを、それぞれ加えて混和し、最少グルコース寒天培地(プレート)に重層した。平坦な場所で重層用培地を固化させた後、プレートを37℃に設定したインキュベータ(MIR-262：三洋電機株式会社)内で48～49時間静置培養した。

用量設定試験および本試験それぞれにおいて、試験に使用した被験物質調製液の最高濃度およびS9 mix調製液について無菌試験を行い、雑菌の混入の有無を確認した。

(3) 観察

各菌株の陰性対照群、被験物質処理群および陽性対照群について、プレートでの生育阻害の有無を実体顕微鏡(SZ6045TR、オリンパス光学工業株式会社)で確認するとともに、被験物質処理群について、プレートでの被験物質の析出の有無を目視確認した。次に、各菌株の陰性対照群、被験物質処理群および陽性対照群の各プレートについて、コロニーアナライザー(CA-11D、システムサイエンス株式会社) を用いて復帰変異コロニー数の計測を行った。

菌株の生育阻害の有無の判定は標準操作手順書に基づき以下の基準(0～4)で行い、基準1以上を生育阻害有りとした。

0：生育阻害が認められない。

微細なバックグラウンドコロニー(50 倍程度の倍率で観察可能)が培地一面に観察され、陰性対照群のバックグラウンドコロニーとの差が認められない場合。

1：わずかな生育阻害が認められる。

陰性対照群に比べ、バックグラウンドコロニーが減少して個々のコロニーの大きさが大きくなっている場合。

2：中程度の生育阻害が認められる。

隆起した大きな復帰変異コロニーと、平坦で小さなバックグラウンドコロニーが並存している場合。

3：強い生育阻害が認められる。

バックグラウンドコロニーが復帰変異コロニーと同程度の大きさまで成長し、両者の判別が困難である場合。

4：生存菌が全く認められない。

(4) 観察結果の集計方法

各試験群の復帰変異コロニー数の平均値±標準偏差を求めた。

10. 試験結果の評価

(1) 試験系の感度確認

各菌株の陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値が、それぞれ試験施設の背景データに基づく管理値の範囲内であり、かつ、各菌株の陽性対照群の復帰変異コロニー数の平均値が陰性対照群の値の 2 倍以上である場合に、試験系が適切な感度を有しているものと判断した。

(2) 試験結果の判定基準

被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値が陰性対照群の値の 2 倍以上となり、かつ用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加が、再現性を持って認められた場合に陽性であるとした。試験結果の判定にあたって、統計学的手法は用いなかった。

成　績

用量設定試験の復帰変異コロニー数の計測結果をTable 1および2に、本試験の復帰変異コロニー数の計測結果をTable 3および4に示す。また、用量設定試験および本試験における被験物質用量と復帰変異コロニー数の用量-反応曲線をFigure 1-1～5-2に示す。

用量設定試験(5～5000 μg/plate)の結果、各菌株の被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の2倍未満であり、用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加もみられなかった。被験物質の析出が、各菌株の5000 μg/plateの用量で観察された。生育阻害は、各試験系列のいずれの菌株においても観察されなかった。

本試験(313～5000 μg/plate)の結果、各菌株の被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の2倍未満であり、用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加もみられなかった。被験物質の析出が、各菌株の5000 μg/plateの用量で観察された。生育阻害は、各試験系列のいずれの菌株においても観察されなかった。

用量設定試験および本試験いずれにおいても、各菌株の陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、全て試験施設の背景データに基づく管理値(Appendix 2)の範囲内であり、また、陽性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、全て陰性対照群の値の2倍以上であった。

用量設定試験および本試験いずれの無菌試験においても、被験物質調製液の最高濃度およびS9 mixに雑菌の混入はみられなかった。

考　察

ペルフルオロテトラデカン酸の細菌における遺伝子突然変異誘発性の有無を、*S. typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *E. coli* WP2*uvr*A を用いる復帰突然変異試験により検討した。

用量設定試験は、被験物質の最高用量を 5000 μg/plate とし、以下公比約 3 で用量を低下させた計 7 用量の試験群で実施した。本試験は、用量設定試験の結果に基づき、被験物質の最高用量を 5000 μg/plate とし、以下公比 2 で用量を低下させた計 5 用量の試験群で実施した。

試験の結果、用量設定試験および本試験ともに、各菌株の直接法および代謝活性化法のいずれの試験系列においても、被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の値の 2 倍未満であり、用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加も認められず、当該被験物質の遺伝子突然変異誘発性は陰性であった。また、用量設定試験および本試験いずれにおいても、被験物質の析出が、各菌株における直接法および代謝活性化法の最高用量(5000 μg/plate)で観察された。生育阻害は各試験系列のいずれの菌株においても観察されなかった。

用量設定試験および本試験のいずれにおいても、各菌株の陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、全て試験施設の背景データに基づく管理値の範囲内であった。各菌株の陽性対照群の復帰変異コロニー数の平均値には、それぞれの陰性対照群の値と比較して 2 倍以上の明確な増加が認められた。これらの結果から、各菌株が変異原物質に対し適切な感度を有していたことが確認された。

以上のことから、ペルフルオロテトラデカン酸は、当該試験条件下において試験菌株に対する遺伝子突然変異誘発性を有しないと判断した。

Table 1 Reverse mutation test of perfluorotetradecanoic acid in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2*uvr* A without metabolic activation (dose-finding test) (SR06200)

Compound	Concentration (μg/plate)	Revertants per plate (Mean±S.D.) S9 (−)				
		TA100	TA1535	WP2*uvr* A	TA98	TA1537
Control [a]		134 , 135 144 (138±6)	11 , 11 11 (11±0)	25 , 21 20 (22±3)	18 , 15 8 (14±5)	12 , 15 7 (11±4)
Perfluorotetradecanoic acid	5	114 , 135 135 (128±12)	8 , 6 7 (7±1)	20 , 13 21 (18±4)	18 , 15 18 (17±2)	11 , 13 16 (13±3)
	15	152 , 177 152 (160±14)	8 , 11 14 (11±3)	13 , 11 13 (12±1)	17 , 12 14 (14±3)	10 , 5 7 (7±3)
	50	144 , 145 131 (140±8)	4 , 18 12 (11±7)	24 , 29 31 (28±4)	15 , 19 17 (17±2)	10 , 9 21 (13±7)
	150	141 , 125 128 (131±9)	8 , 13 8 (10±3)	18 , 16 19 (18±2)	19 , 13 17 (16±3)	14 , 8 10 (11±3)
	500	126 , 126 136 (129±6)	20 , 7 12 (13±7)	21 , 13 18 (17±4)	25 , 11 19 (18±7)	13 , 15 10 (13±3)
	1500	71 , 144 113 (109±37)	11 , 6 10 (9±3)	12 , 19 16 (16±4)	18 , 14 12 (15±3)	11 , 5 6 (7±3)
	5000	158 #, 141 # 128 # (142±15)	23 #, 17 # 15 # (18±4)	14 #, 17 # 20 # (17±3)	17 #, 22 # 27 # (22±5)	20 #, 19 # 7 # (15±7)
Positive control		AF-2	NaN_3	AF-2	AF-2	9-AA
	Concentration (μg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Rev./plate	663 , 671 658	235 , 267 264	91 , 93 73	336 , 318 273	188 , 262 279
	(Mean±S.D.)	(664±7)	(255±18)	(86±11)	(309±32)	(243±48)

a : Acetone
AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide
NaN_3 : Sodium azide
9-AA : 9-Aminoacridine hydrochloride hydrate
Rev. : Revertants
: Precipitation at the end of treatment

Table 2 Reverse mutation test of perfluorotetradecanoic acid in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2*uvr* A with metabolic activation (dose-finding test) (SR06200)

Compound	Concentration (μg/plate)	Revertants per plate (Mean±S.D.) S9 (+)				
		TA100	TA1535	WP2*uvr* A	TA98	TA1537
Control [a]		152 , 157 154 (154±3)	12 , 12 5 (10±4)	18 , 15 15 (16±2)	19 , 26 33 (26±7)	15 , 11 16 (14±3)
Perfluorotetradecanoic acid	5	157 , 172 138 (156±17)	12 , 14 10 (12±2)	16 , 29 22 (22±7)	41 , 29 35 (35±6)	15 , 19 16 (17±2)
	15	149 , 128 135 (137±11)	12 , 15 10 (12±3)	22 , 16 17 (18±3)	20 , 22 34 (25±8)	14 , 13 11 (13±2)
	50	134 , 135 185 (151±29)	5 , 6 8 (6±2)	26 , 16 15 (19±6)	20 , 32 27 (26±6)	14 , 15 7 (12±4)
	150	148 , 128 124 (133±13)	16 , 8 9 (11±4)	24 , 16 20 (20±4)	25 , 27 28 (27±2)	18 , 20 14 (17±3)
	500	133 , 130 142 (135±6)	10 , 6 15 (10±5)	22 , 17 32 (24±8)	26 , 26 38 (30±7)	15 , 9 16 (13±4)
	1500	130 , 128 125 (128±3)	12 , 17 13 (14±3)	24 , 25 20 (23±3)	30 , 12 30 (24±10)	19 , 17 14 (17±3)
	5000	130 #, 136 # 140 # (135±5)	14 #, 16 # 13 # (14±2)	16 #, 25 # 23 # (21±5)	39 #, 32 # 24 # (32±8)	11 #, 23 # 16 # (17±6)
Positive control		2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration (μg/plate)	1	2	10	0.5	2
	Rev./plate (Mean±S.D.)	950 , 865 1762 (1192±495)	250 , 219 238 (236±16)	718 , 817 928 (821±105)	327 , 302 279 (303±24)	242 , 180 185 (202±34)

a : Acetone
2-AA : 2-Aminoanthracene
Rev. : Revertants
: Precipitation at the end of treatment

Table 3 Reverse mutation test of perfluorotetradecanoic acid in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2*uvr* A without metabolic activation (main test) (SR06200)

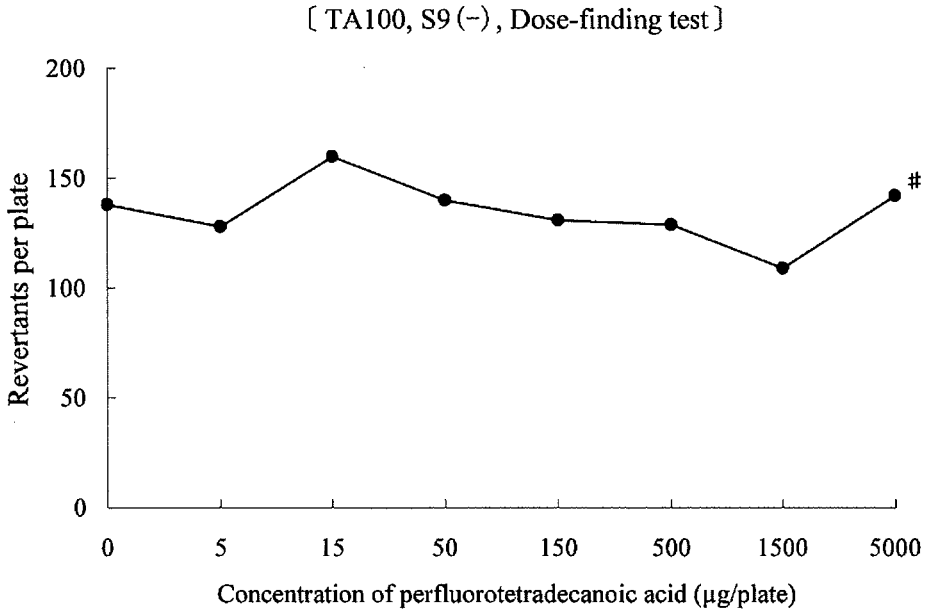
Compound	Concentration (μg/plate)	Revertants per plate (Mean±S.D.) S9 (−)				
		TA100	TA1535	WP2*uvr* A	TA98	TA1537
Control [a]		154 , 135 128 (139±13)	9 , 16 14 (13±4)	23 , 27 28 (26±3)	25 , 17 14 (19±6)	9 , 8 10 (9±1)
Perfluorotetradecanoic acid	313	120 , 134 137 (130±9)	17 , 14 11 (14±3)	26 , 30 21 (26±5)	16 , 16 18 (17±1)	7 , 8 8 (8±1)
	625	148 , 140 106 (131±22)	8 , 17 10 (12±5)	21 , 26 24 (24±3)	17 , 16 16 (16±1)	6 , 9 7 (7±2)
	1250	126 , 150 141 (139±12)	8 , 12 9 (10±2)	31 , 28 27 (29±2)	18 , 21 17 (19±2)	7 , 12 7 (9±3)
	2500	136 , 120 120 (125±9)	11 , 13 9 (11±2)	21 , 19 32 (24±7)	20 , 13 26 (20±7)	8 , 6 5 (6±2)
	5000	172 #, 158 # 164 # (165±7)	15 #, 12 # 6 # (11±5)	27 #, 26 # 21 # (25±3)	28 #, 28 # 20 # (25±5)	12 #, 10 # 7 # (10±3)
Positive control		AF-2	NaN_3	AF-2	AF-2	9-AA
	Concentration (μg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Rev./plate (Mean±S.D.)	750 , 701 677 (709±37)	230 , 261 256 (249±17)	103 , 98 103 (101±3)	378 , 397 414 (396±18)	437 , 292 392 (374±74)

a : Acetone
AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide
NaN_3 : Sodium azide
9-AA : 9-Aminoacridine hydrochloride hydrate
Rev. : Revertants
: Precipitation at the end of treatment

Table 4 Reverse mutation test of perfluorotetradecanoic acid in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2*uvr* A with metabolic activation (main test) (SR06200)

Compound	Concentration (μg/plate)	Revertants per plate (Mean±S.D.)				
		S9 (+)				
		TA100	TA1535	WP2*uvr* A	TA98	TA1537
Control [a]		130 , 150 138 (139±10)	7 , 13 9 (10±3)	20 , 26 28 (25±4)	35 , 29 35 (33±3)	11 , 13 6 (10±4)
Perfluorotetradecanoic acid	313	135 , 140 158 (144±12)	11 , 12 16 (13±3)	22 , 29 27 (26±4)	28 , 19 26 (24±5)	14 , 8 11 (11±3)
	625	149 , 122 135 (135±14)	11 , 17 11 (13±3)	27 , 26 19 (24±4)	21 , 26 21 (23±3)	7 , 6 11 (8±3)
	1250	148 , 160 155 (154±6)	6 , 13 11 (10±4)	27 , 29 37 (31±5)	21 , 36 29 (29±8)	7 , 9 11 (9±2)
	2500	132 , 169 162 (154±20)	19 , 13 12 (15±4)	29 , 22 28 (26±4)	31 , 23 23 (26±5)	14 , 17 15 (15±2)
	5000	136 #, 154 # 145 # (145±9)	16 #, 10 # 14 # (13±3)	37 #, 31 # 36 # (35±3)	27 #, 20 # 38 # (28±9)	18 #, 15 # 8 # (14±5)
Positive control		2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration (μg/plate)	1	2	10	0.5	2
	Rev./plate (Mean±S.D.)	968 , 1010 1116 (1031±76)	286 , 215 289 (263±42)	881 , 895 836 (871±31)	276 , 258 288 (274±15)	152 , 157 160 (156±4)

a : Acetone
2-AA : 2-Aminoanthracene
Rev. : Revertants
: Precipitation at the end of treatment



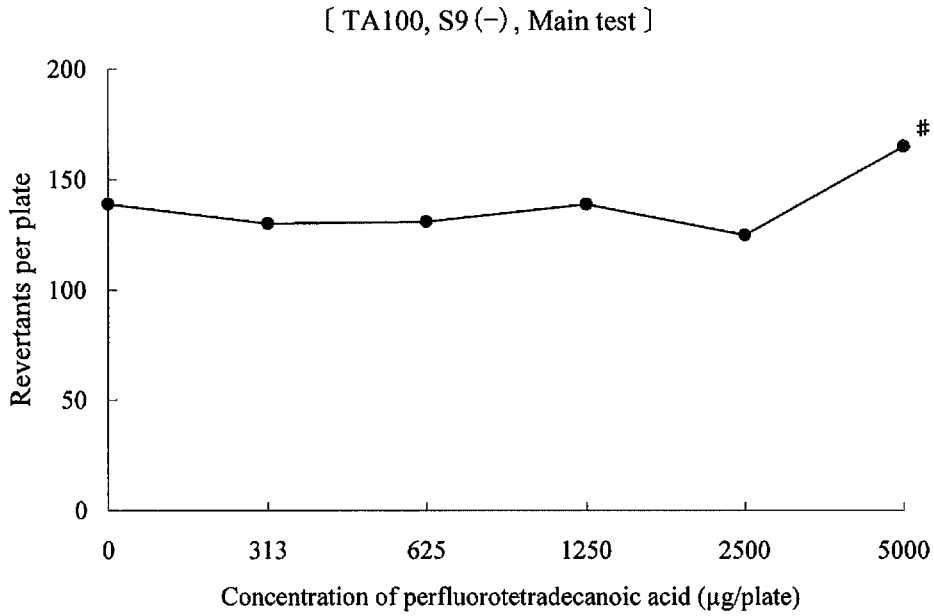
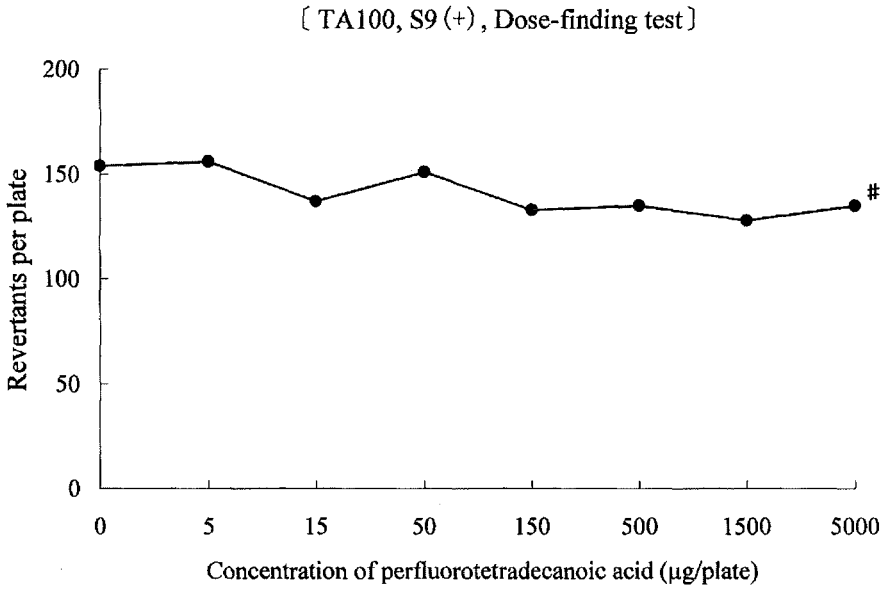


Figure 1-1 Reverse mutation test of perfluorotetradecanoic acid in *Salmonella typhimurium* TA100 without metabolic activation (dose-response curves) (SR06200)

: Precipitation at the end of treatment



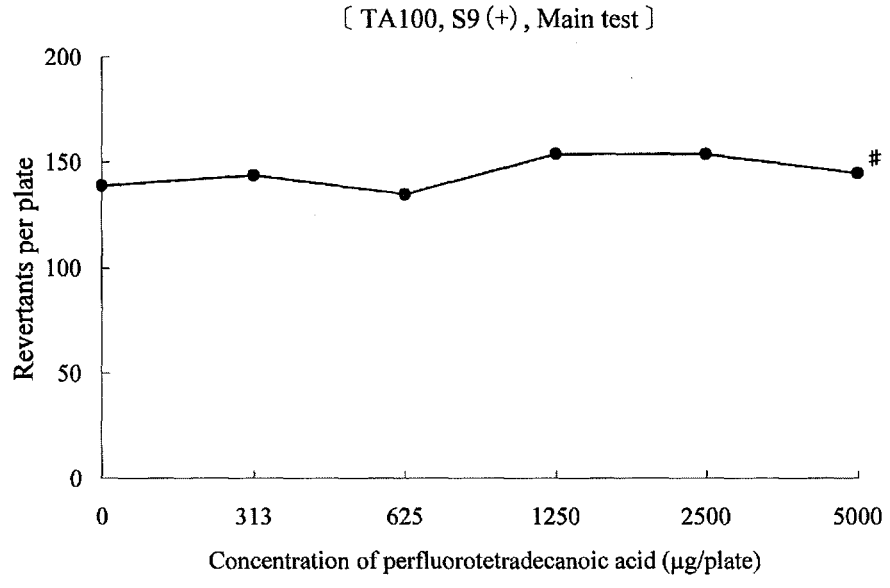
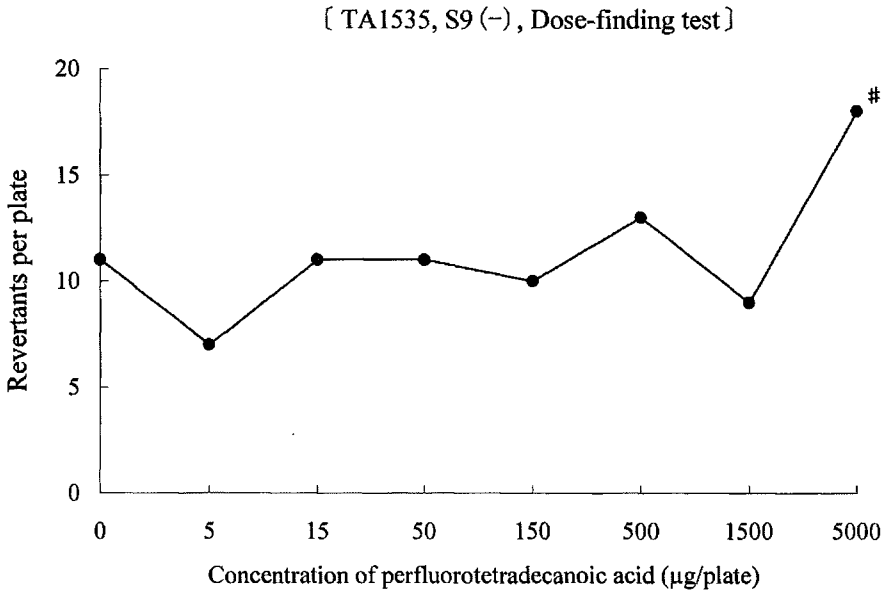


Figure 1-2 Reverse mutation test of perfluorotetradecanoic acid in *Salmonella typhimurium* TA100 with metabolic activation (dose-response curves) (SR06200)

: Precipitation at the end of treatment



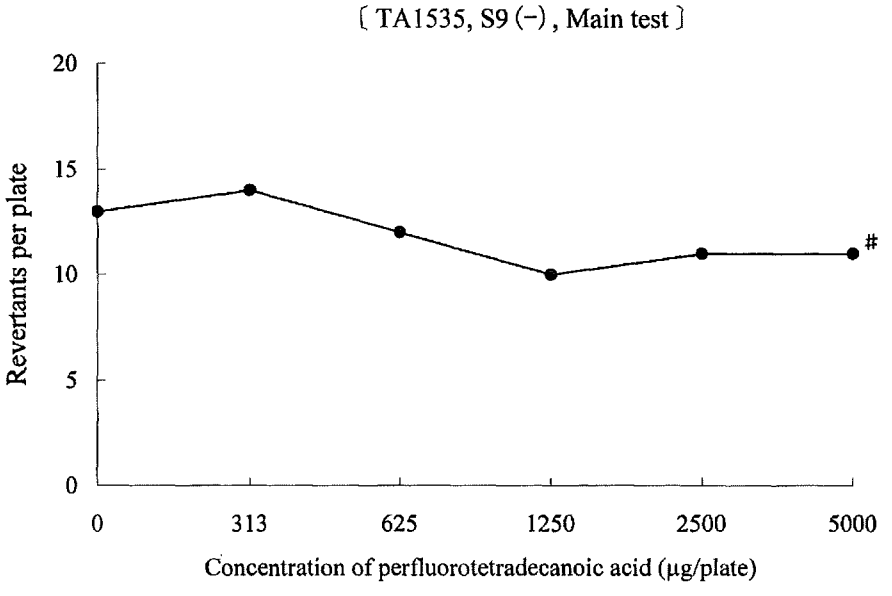
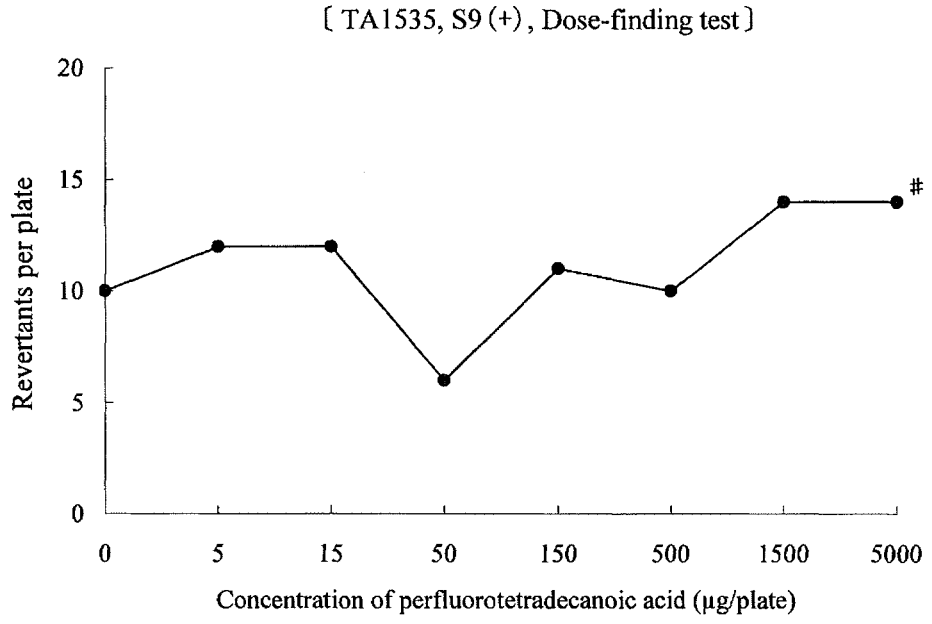


Figure 2-1 Reverse mutation test of perfluorotetradecanoic acid in *Salmonella typhimurium* TA1535 without metabolic activation (dose-response curves) (SR06200)

: Precipitation at the end of treatment



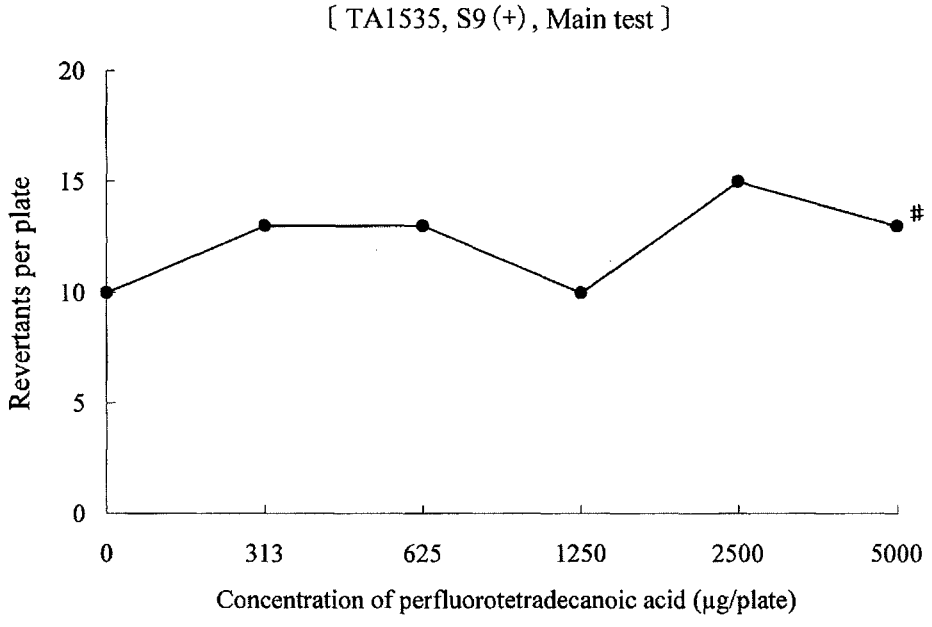
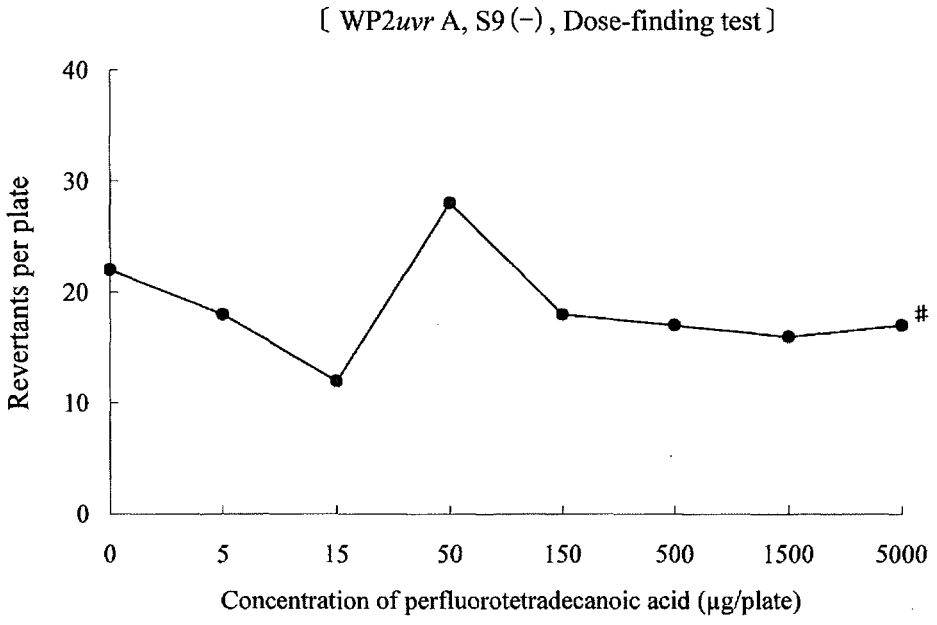


Figure 2-2 Reverse mutation test of perfluorotetradecanoic acid in *Salmonella typhimurium* TA1535 with metabolic activation (dose-response curves) (SR06200)

: Precipitation at the end of treatment



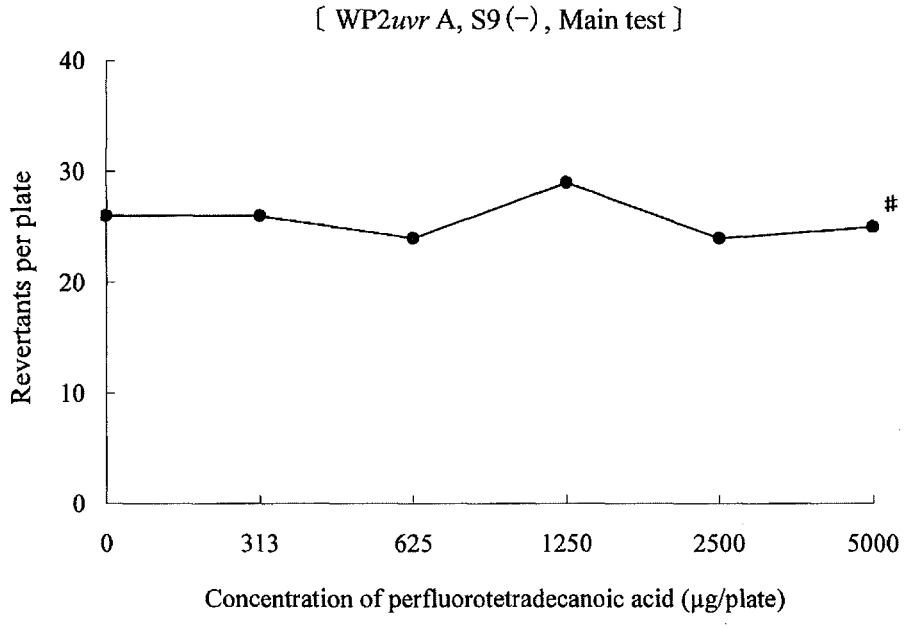
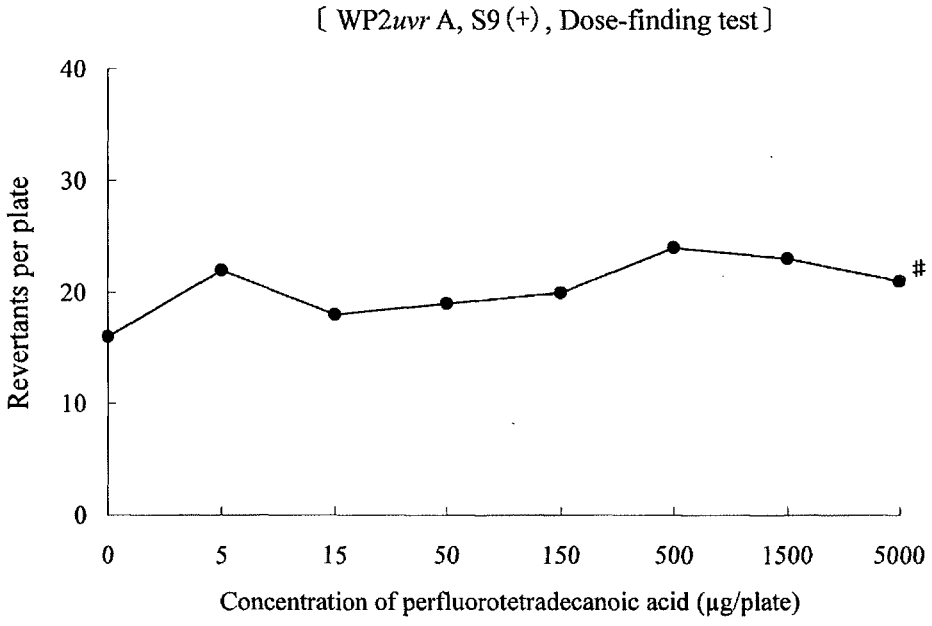


Figure 3-1 Reverse mutation test of perfluorotetradecanoic acid in *Escherichia coli* WP2*uvr* A without metabolic activation (dose-response curves) (SR06200)

: Precipitation at the end of treatment



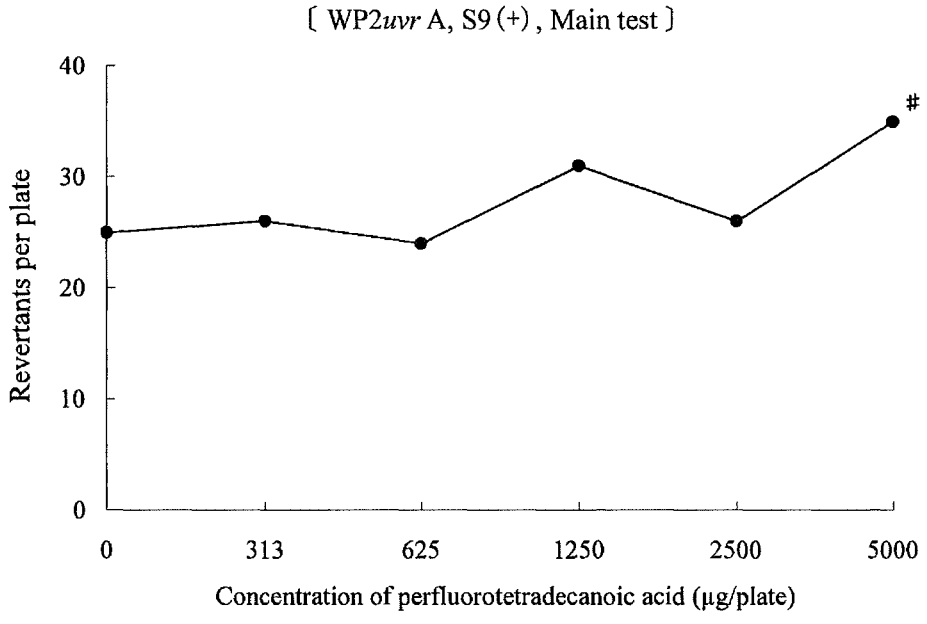
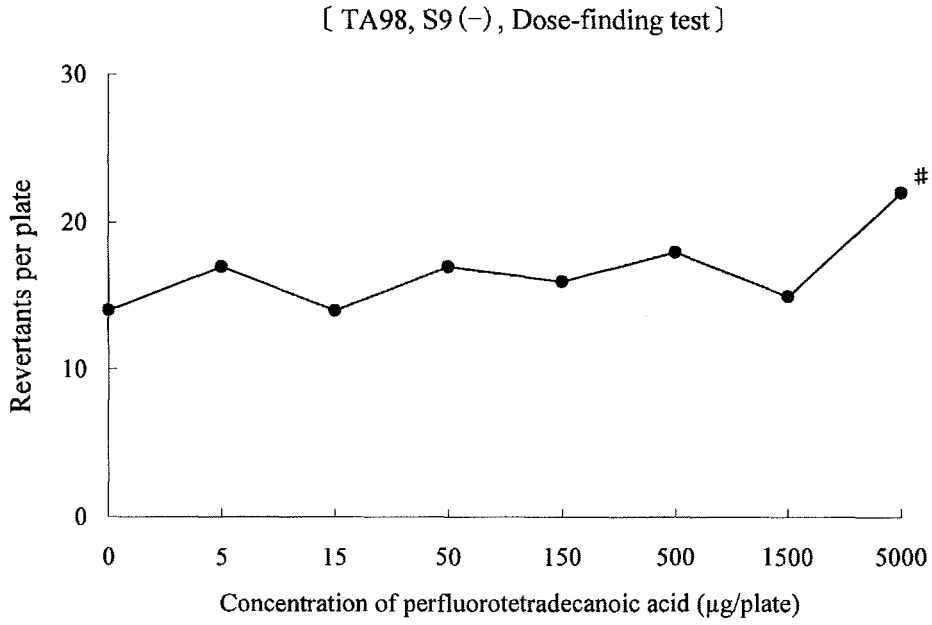


Figure 3-2 Reverse mutation test of perfluorotetradecanoic acid in *Escherichia coli* WP2*uvr* A with metabolic activation (dose-response curves) (SR06200)

: Precipitation at the end of treatment



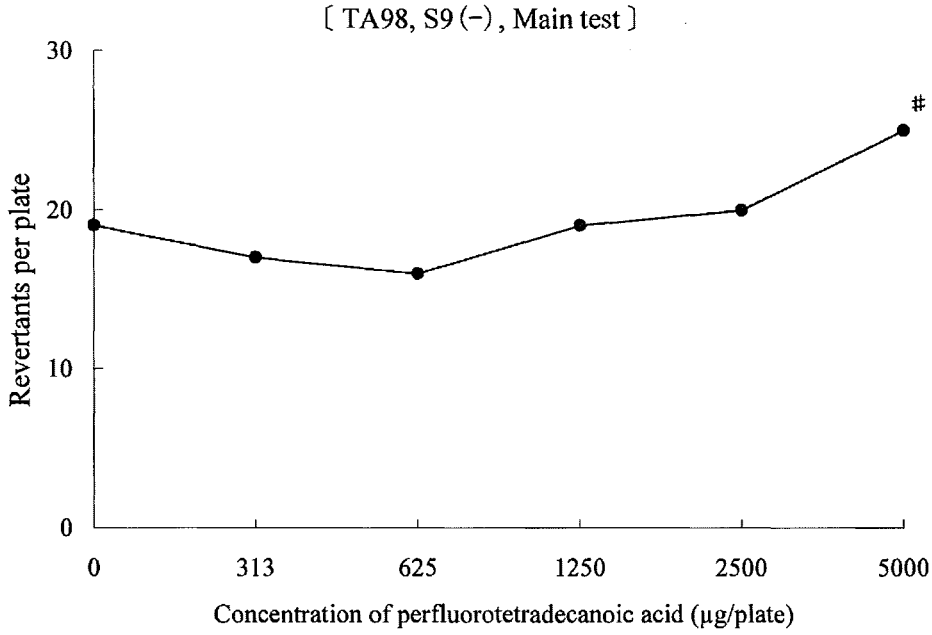
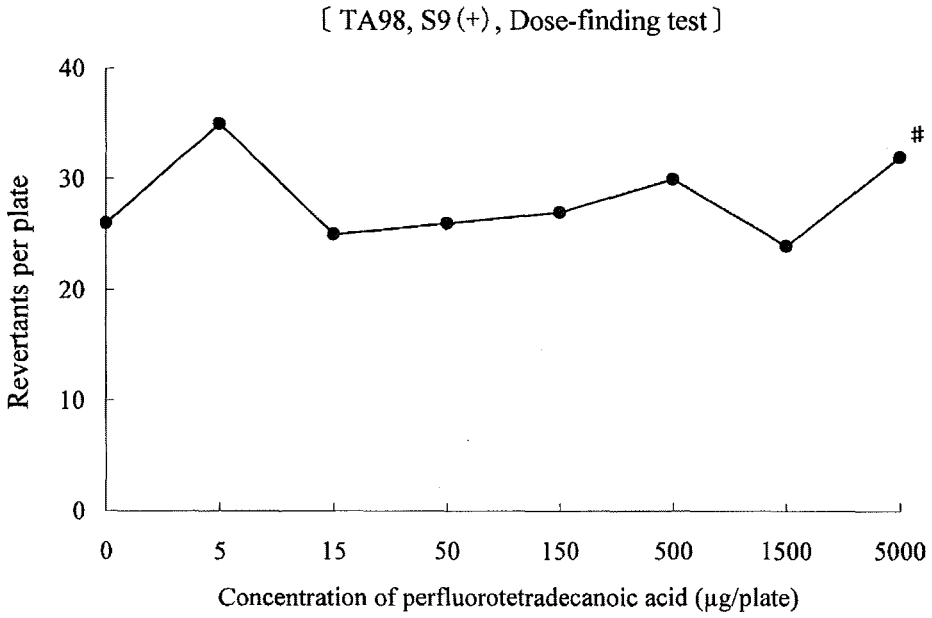


Figure 4-1 Reverse mutation test of perfluorotetradecanoic acid in *Salmonella typhimurium* TA98 without metabolic activation (dose-response curves) (SR06200)

: Precipitation at the end of treatment



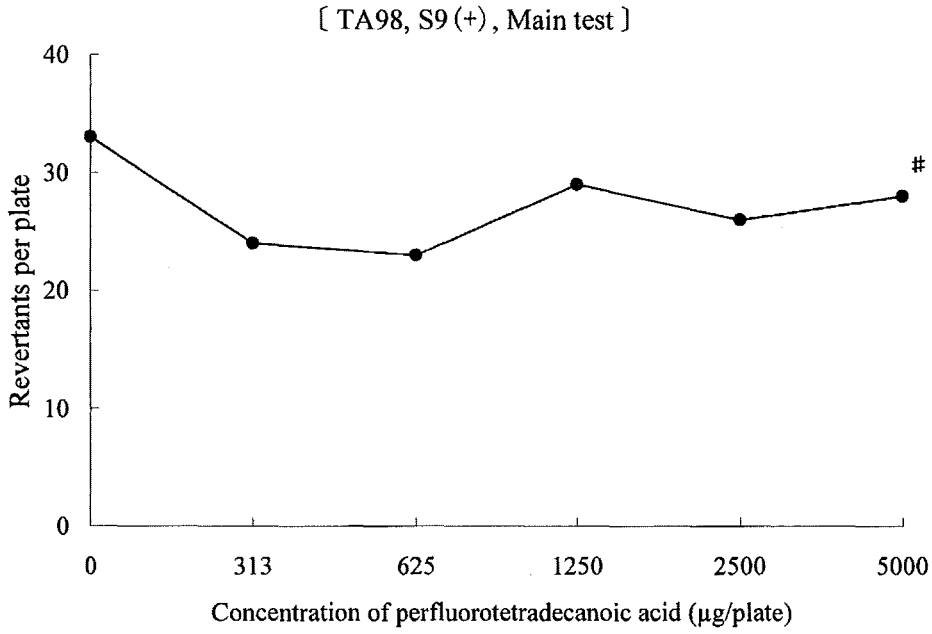
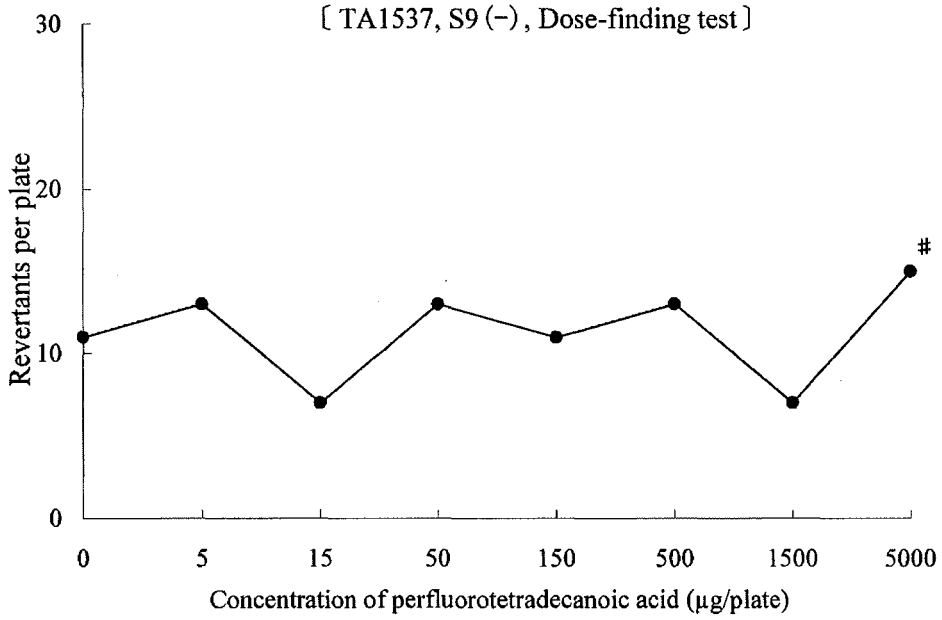


Figure 4-2 Reverse mutation test of perfluorotetradecanoic acid in *Salmonella typhimurium* TA98 with metabolic activation (dose-response curves) (SR06200)

: Precipitation at the end of treatment



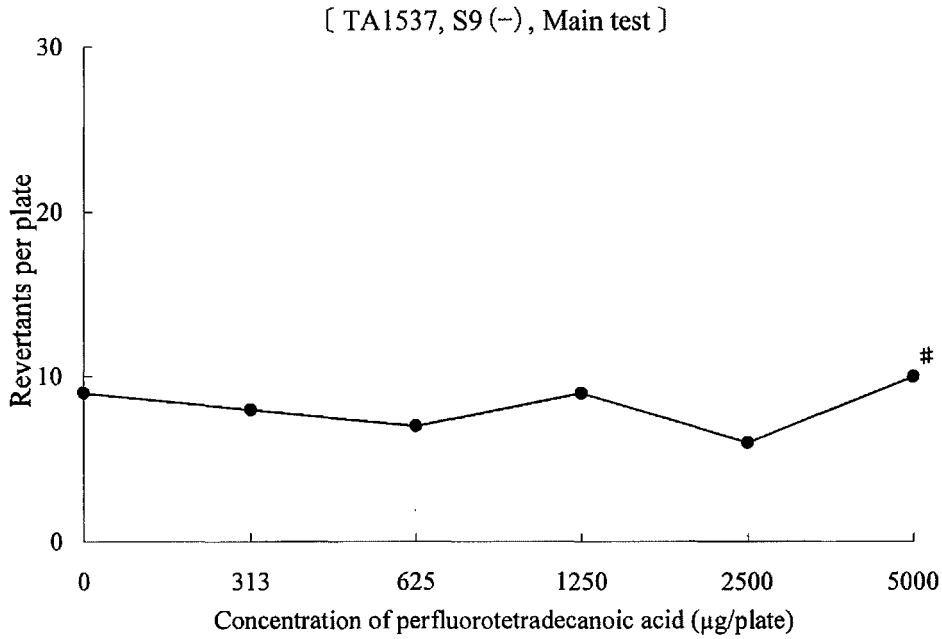
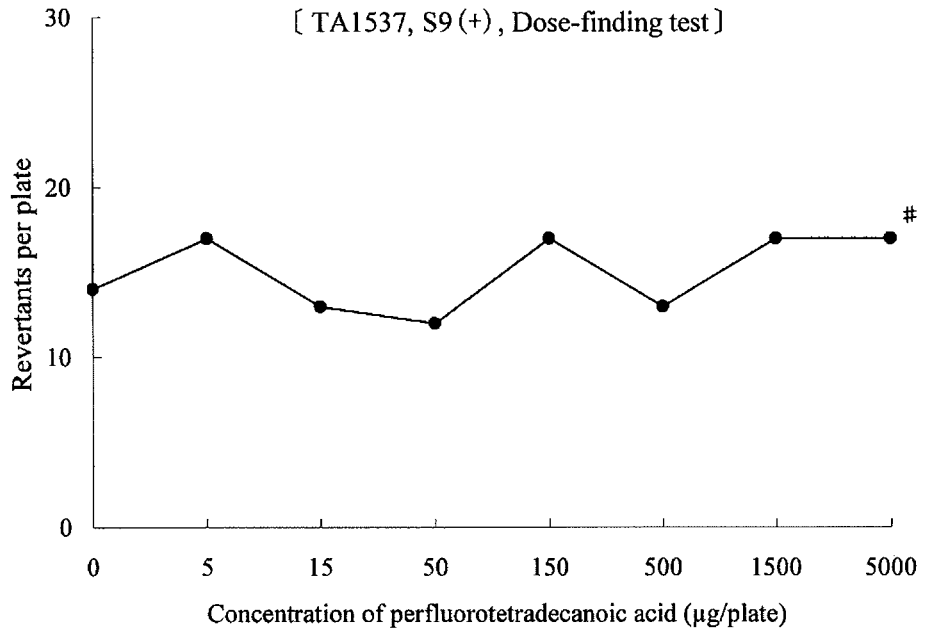


Figure 5-1 Reverse mutation test of perfluorotetradecanoic acid in *Salmonella typhimurium* TA1537 without metabolic activation (dose-response curves) (SR06200)

: Precipitation at the end of treatment



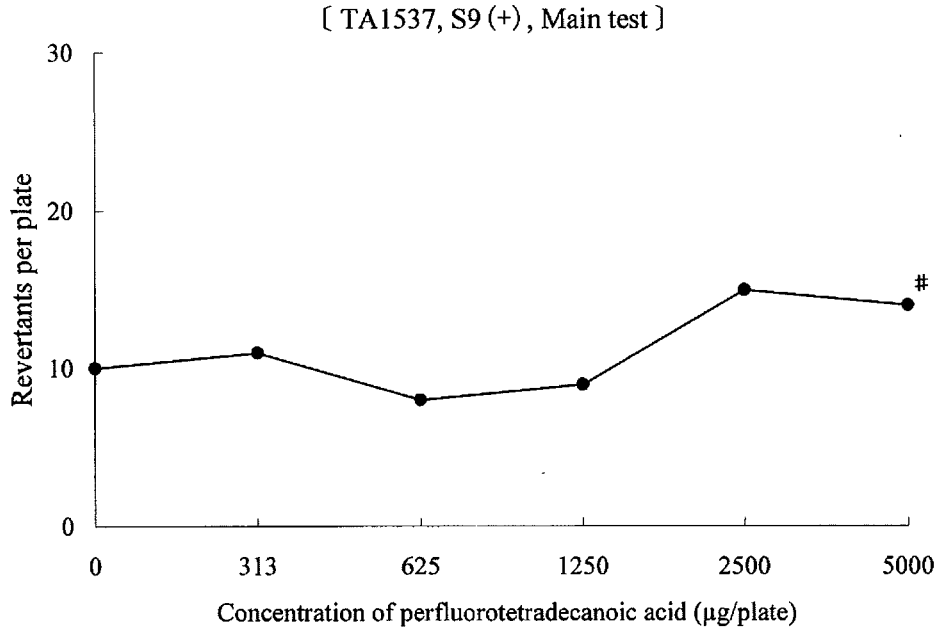


Figure 5-2 Reverse mutation test of perfluorotetradecanoic acid in *Salmonella typhimurium* TA1537 with metabolic activation (dose-response curves) (SR06200)

: Precipitation at the end of treatment