

最終報告書

ポリ(テトラフルオロエチレン)の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号:T-2264

試験期間: 2017年1月13日-2017年3月28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 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

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

1. GLP 陳述書

試験番号 : T-2264

試験表題 : ポリ (テトラフルオロエチレン) の細菌を用いる

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)

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	試験委託者	6
	3.5	試験受託者	6
	3.6	試験実施施設	6
	3.7	試験日程	6
	3.8	試験責任者	7
	3.9	試験担当者	7
	3.10	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
	3.11	試資料の保存	7
	3.12	試験責任者の署名又は記名・押印	7
4.	要約.		8
5.	緒言.		9
6.	被験织	物質及び被験液の調製	10
	6.1	被験物質及び溶媒	10
	6.1.1	被験物質	10
	6.1.2	溶媒	11
	6.1.3	溶媒の選択理由	11
	6.2	被験液の調製方法	11
	6.2.1	用量設定試験用被験液の調製	11
	6.2.2	本試験用被験液の調製	11
7.	試験	材料及び方法	12
	7.1	試験菌株	12
	7.1.1	菌株の種類	12
	7.1.2	菌株の選択理由	12
	7.1.3	菌株の保存及び解凍	12
	7.1.4	菌株の特性検査	13
	7.2	対照物質	13
	7.2.1	陰性対照物質	13
	7.2.2	陽性対照物質	13
	7.2.3	調製方法	13

7.3	括	、薬	14
7	.3.1	S9 Mix の調製方法	14
7	.3.2	培地	15
7	.3.3	ニュートリエントブロス No.2 培養液	16
7	.3.4	0.1 mol/L リン酸緩衝液(pH 7.4)	16
7	.3.5	トップアガー	16
7.4	活	、 験方法	17
7	.4.1	前培養	17
7	.4.2	プレート数	18
7	.4.3	試験操作(プレインキュベーション法)	18
7.5	判	定基準	18
8. 意	式験結り	果	19
8.1	用	量設定試験の観察結果及び本試験用量の設定	19
8.2	本	≒試験の観察結果	19
8.3	絬	∜験の成立条件	19
9. ≉	考察		20
10. 🦸	多考文献	献	20
Table			
別表		試験結果表(用量設定試験)	
別表	2	試験結果表(本試験)	22
Figure	es		
図 1		用量反応曲線(本試験 TA100:-S9Mix)	
図 2		用量反応曲線(本試験 TA100: +S9Mix)	
図 3		用量反応曲線(本試験 TA1535: -S9Mix)	
図 4		用量反応曲線(本試験 TA1535: +S9Mix)	
図 5		用量反応曲線(本試験 WP2 uvrA: -S9Mix)	
図 6		用量反応曲線(本試験 WP2 uvrA: +S9Mix)	
図 7		用量反応曲線(本試験 TA98: -S9Mix)	
図 8		用量反応曲線(本試験 TA98: +S9Mix)	
図 9	•	用量反応曲線(本試験 TA1537: -S9Mix)	
図 10)	用量反応曲線(本試験 TA1537: +S9Mix)	27
Λ tt o o l	204 D	Nata	
Attack	ched D		20
Atta	enea D	/aιa 月泉ノニク(100708)	∠ ð

_	1	$\hat{}$	-	1
Ι.	- /	1	h	4

信頼性保証陳述書	
----------	--

3. 試験実施概要

3.1 試験番号

T-2264

3.2 試験表題

ポリ (テトラフルオロエチレン) の細菌を用いる復帰突然変異試験

3.3 試験目的

細菌を用い、ポリ (テトラフルオロエチレン) の遺伝子突然変異誘発能の有無を明らかにすることを目的とした。

3.4 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

3.5 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

3.6 試験実施施設

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

3.7 試験日程

試験開始日 : 2017年 1月 13日 用量設定試験開始日: 2017年 1月 13日 用量設定試験終了日: 2017年 1月 16日 本試験開始日 : 2017年 1月 18日 本試験終了日 : 2017年 1月 23日 試験終了日 : 2017年 3月 28日

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 第1研究室

3.9 試験担当者

被験物質保存責任者:

試験担当者

3.10 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

本試験において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。

3.11 試資料の保存

試験計画書(試験計画書変更書を含む)、記録文書、被験物質、生データ及び報告書類(最終報告書の原本を含む)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、その期間は最終報告書提出後 10 年間とする。期間終了後の保存については、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。

3.12 試験責任者の署名又は記名・押印

株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所

4. 要約

ポリ(テトラフルオロエチレン)の遺伝子突然変異誘発能の有無を明らかにするため、ネズミチフス菌 Salmonella typhimurium(以下、S. typhimurium と略す)TA100、TA1535、TA98、TA1537 及び大腸菌 Escherichia coli(以下、E. coli と略す)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アセトンを用いた。

本試験用量を設定するため、 $1.22\sim5000~\mu g/plate~$ の範囲の被験物質処理用量で用量設定試験を実施した。その結果より本試験は、生育阻害が認められなかったため、沈殿の認められた最低用量を最高用量として、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての菌株において $4.88\sim78.1~\mu g/plate$ 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 39.1 μg/plate 以上の用量で認められた。本被験物質によるプレート上の着色は、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。

2) 生育阻害

菌に対する生育阻害は、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。

3) 復帰変異コロニー数

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。

以上の試験結果より、本試験条件下においてポリ(テトラフルオロエチレン)は、 細菌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。

5. 緒言

本試験は、厚生労働省 医薬・生活衛生局 医薬品審査管理課の委託により、株式会社ボゾリサーチセンターで実施した。なお、試験は以下の基準を遵守し、ガイドラインに準拠して行った。

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)

2) 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27年12月21日:薬食発1221第1号、20151209製局第1号、環保企発 第1512211号)

6. 被験物質及び被験液の調製

6.1 被験物質及び溶媒

6.1.1 被験物質

製造者:

名称 : ポリ (テトラフルオロエチレン)

CAS 番号 : 9002-84-0

官報公示整理番号 : (6)-939(化審法)

構造式:

F F n

分子式 : CF₃(CF₂CF₂)_nCF₃

分子量 : 16200 (規格値:5000~20000)

形状 : 白色粉末融点・凝固点 : 321°Cロット番号 : AWK4379

純度 : 不明。被験物質は重合物(高分子)であることから、

和光純薬工業株式会社で販売されている製品を 100%

として試験を行った。

溶解性 : 水、ジメチルスルホキシド(以下、DMSOと略す):

50 mg/mL で不溶

アセトン: 100 mg/mL で不溶

溶媒中での安定性: 水、DMSO、アセトン:発熱・ガスの発生等の反応性

なし

保存方法 宝温、遮光、密閉

保存場所 : 東京研究所 被験物質保存室

安定性 : 関連試験 (T-G255) の実験終了後、株式会社ボゾリサ

ーチセンター 御殿場研究所で被験物質が安定である

ことを確認した。

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。

保存温度 : 保存期間中の実測温度

(2016.11.14~2017.1.19:18.1~20.2°C)

使用後の処理: 使用後の残量は、試験終了後全て廃棄した。

上記被験物質情報は、製造者からの情報による。なお、溶解度及び溶媒中での安定性は、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。

6.1.2 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 : DSP1983

規格 : JIS 規格 試薬特級 99.5%以上

保存方法 : 室温

保存場所 : 東京研究所 被験物質調製室

6.1.3 溶媒の選択理由

水、DMSO 及びアセトンについて溶解性試験を実施した。その結果、水、DMSO の 50 mg/mL、アセトンの 100 mg/mL でいずれも不溶であったが、アセトンについては 均一に懸濁し、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溶媒 として試験を実施した。なお、被験液の調製には、モレキュラシーブス 4A 1/16 (和 光純薬工業株式会社; Lot No. HWG7622) で脱水したアセトンを使用した。

6.2 被験液の調製方法

6.2.1 用量設定試験用被験液の調製

滅菌した調製用試験管に被験物質を電子天秤(株式会社エー・アンド・ディ: GR-120)を用いて秤量した。その秤量値 214.6 mg に最高調製濃度の 100 mg/mL となるように溶媒量を計算し、2.146 mL のアセトンを添加して懸濁し、100 mg/mL の被験液を調製した。次いで、これを公比 4 で順次 6 段階希釈し、100、25、6.25、1.56、0.391、0.0977 及び 0.0244 mg/mL の計 7 濃度の被験液を調製した。なお、被験液の調製は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で使用時に行い、その過程において発熱、ガスの発生等の反応性は認められなかった。

6.2.2 本試験用被験液の調製

滅菌した調製用試験管に被験物質を電子天秤(株式会社エー・アンド・ディ: GR-120)を用いて秤量した。その秤量値 26.7 mg に最高調製濃度の 12.5 mg/mL となるように溶媒量を計算し、2.136 mL のアセトンを添加して懸濁し、12.5 mg/mL 溶液を調製した。次いで、これを 4 倍希釈して 3.13 mg/mL 溶液を調製した。これをさらに公比 2で順次 5 段階希釈し、1.56、0.781、0.391、0.195 及び 0.0977 の計 5 濃度の被験液を調製した。なお、被験液の調製は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で使用時に行い、その過程において発熱、ガスの発生等の反応性は認められなかった。

7. 試験材料及び方法

7.1 試験菌株

7.1.1 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、S. typhimurium TA 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 日に東京研究所に分与された。また、E. coli WP2 uvrA は、独立行政法人製品評価技術基盤機構より 2011 年 10 月 20 日に入手した。

7.1.2 菌株の選択理由

当該菌株は変異原性物質に対する感受性が高く、細菌を用いる復帰突然変異試験に最も一般的に使用されている。

7.1.3 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 ECE6658) を 0.7 mL の割合で添加した。これを滅菌チューブに 0.3 mL ずつ分注し、ドライアイス-アセトンで急速凍結した後、-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 2016 年 8 月 25 日~2017年 1 月 18 日:-85.9~-78.5°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

S. typhimurium TA982016年8月25日S. typhimurium TA1002016年8月25日S. typhimurium TA15352016年8月25日S. typhimurium TA15372016年8月25日E. coli WP2 uvrA2016年8月27日

7.1.4 菌株の特性検査

7.1.3 の凍結保存菌株を用いて、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	金杏?	実施日
12 / 13	\cup \cap		/ TN 1447	7C III.	

S. typhimurium TA98	2016年8月	25 日	~2016年	8月	27 日
S. typhimurium TA100	2016年8月	25 日	~2016年	8月	27 日
S. typhimurium TA1535	2016年8月	25 目	~2016年	8月	27 日
S. typhimurium TA1537	2016年8月	25 目	~2016年	8月	27 日
E. coli WP2 uvrA	2016年8月	27 日	~2016年	8月	29 日

7.2 対照物質

7.2.1 陰性対照物質

被験液の調製に用いたアセトンを陰性対照物質とした。

7.2.2 陽性対照物質

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

陽性対照物質 (略称)	ロット番号	純度(%)	保存方法	製造元
2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF-2)	STQ3987	99.7%	室温、遮光	和光純薬工業 株式会社
Sodium azide (SAZ)	YSF7467	99.9%	室温、遮光	和光純薬工業 株式会社
2-Methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)-aminopropylamino]acridine·2HCl (ICR-191)	562079	-	室温、遮光	Polysciences, Inc.
2-Aminoanthracene (2AA)	CTK0326	96.7%	室温、遮光	和光純薬工業 株式会社
Benzo[a]pyrene (B[a]P)	KPK3371	99.8%	冷蔵、遮光	和光純薬工業 株式会社

保存場所:東京研究所 微生物試験室

7.2.3 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 ECE6658)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 K6A80)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。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

	代謝活性化しない場合			代謝活性化する場合		
使用菌株	陽性対照 物質			127.		製濃度 g/mL)
S. typhimurium TA100	AF-2	0.1	(0.01)	B[a]P	50	(5.0)
S. typhimurium TA1535	SAZ	5	(0.5)	2AA	20	(2.0)
E. coli WP2 uvrA	AF-2	0.1	(0.01)	2AA	100	(10.0)
S. typhimurium TA98	AF-2	1	(0.1)	B[a]P	50	(5.0)
S. typhimurium 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。

7.3 試薬

7.3.1 S9 Mix 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 (NALGENE 0.45 μ m: Lot No. 1179181、1182704) 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 : キッコーマンバイオケミファ株式会社

ロット番号 : RAA201612A

製造日 : 2016年12月16日 購入日 : 2017年1月13日

種・系統: ラット・SD系週齢・性: 7週齢・雄

週齢・性 : 7週齢・雄 体重 : 194-261 g

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)

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

: 2017年1月13日~2017年1月19日:-85.9~-78.5°C

2) 補酵素

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 : 999603

製造日 : 2016年12月13日、2017年1月17日

使用期限 : 2017年 8月 26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-411FR: 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

: 2016年12月13日~2017年1月19日:3.9~4.7°C

3) S9 Mix の組成 (1mL 中)

水 : 0.9 mL S9 : 0.1 mL MgCl₂ : 8 μmol/mL KCl : 33 μmol/mL グルコース-6-リン酸 : 5 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)

: $4 \mu mol/mL$

還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH)

: $4 \mu mol/mL$

リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4)

: $100 \mu mol/mL$

7.3.2 培地

1) 最小グルコース寒天平板培地

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 : DZLHBF01

製造日 : 2016年11月15日 購入日 : 2017年1月7日

保存方法 : 室温保存

保存場所 : 東京研究所 寒天培地保存室

2) 使用寒天

名称 : OXOID AGAR No.1

製造元 : OXOID LTD.

ロット番号 : 1372870

7.3.3 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 2.5 wt%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 : 1239615

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

7.3.4 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 2L の精製水を加えて溶解し、オートクレーブにより滅菌処理 $(121^{\circ}C, 20$ 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 : りん酸緩衝剤粉末 (1/15 mol/L pH 7.4)

製造元 : 和光純薬工業株式会社

ロット番号:SAM0022保存方法:室温保存

保存場所 : 東京研究所 微生物試験室

7.3.5 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 wt% Agar、0.6 wt% NaCl)をオートクレーブにより滅菌処理($121^{\circ}C$ 、20 分)した後、0.5 mmol/L D-ビオチンーL-ヒスチジンーL-トリプトファン溶液を軟寒天液 10 に対して 1 の割合で加えて調製し、S. typhimurium TA 株と E. coli 株で共通で使用した。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 $45^{\circ}C$ の恒温槽で保温した。

1) 寒天

名称 : Bacto Agar

製造元 : Becton, Dickinson and Company

ロット番号:6097761保存方法:室温保存

保存場所 : 東京研究所 微生物試験室

2) 塩化ナトリウム

製造元 : 和光純薬工業株式会社

ロット番号:DSM3876保存方法:室温保存

保存場所 : 東京研究所 微生物試験室

3) D-ビオチン

製造元 : 和光純薬工業株式会社

ロット番号 : SAJ2076

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) L-ヒスチジン塩酸塩一水和物

製造元 : 和光純薬工業株式会社

ロット番号 : CTK0488

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) L-トリプトファン

製造元 : 和光純薬工業株式会社

ロット番号 : CTH2695

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

7.4 試験方法

7.4.1 前培養

- 1) ニュートリエントブロス No.2 培養液 10 mL を滅菌済み L字型試験管 (容量 48 mL) に入れ、凍結保存菌株を解凍して得た菌懸濁液を S. typhimurium TA 株は各 20 μL、 E. coli WP2 uvrA は 10 μL 植菌し、振盪恒温槽(COOL BATH SHAKER ML-10 PU-6 接続型、タイテック株式会社)にセットした。
- 2) これをプログラム制御により前培養開始まで 4°C の水浴中に放置(6 時間 30 分) した後、振盪(100 回/分) しながら 37°C に上昇後 9 時間前培養した。なお、使 用後の菌懸濁液は廃棄した。
- 3) 前培養終了時に培養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、生菌数が 1×10⁹ 個/mL 以上あることを確認した。なお、培養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

対	菌 数 (個/mL)			
菌株	用量設定試験	本試験		
S. typhimurium TA100	4.31×10^9	4.23×10^9		
S. typhimurium TA1535	4.78×10^9	4.79×10^9		
E. coli WP2 uvrA	5.92×10^9	8.59×10^9		
S. typhimurium TA98	5.96×10^9	5.63×10^9		
S. typhimurium TA1537	3.62 × 10 ⁹	3.70×10^9		

7.4.2 プレート数

被験物質処理群、陰性対照群及び陽性対照群について、用量設定試験及び本試験と もに用量ごとに2枚のプレートを用いた。

7.4.3 試験操作(プレインキュベーション法)

- 1) 滅菌した小試験管に被験液又は溶媒を 0.05 mL、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、それぞれの小試験管に各菌懸濁液 0.1 mLを加えた。
- 2) 小試験管を攪拌後すぐに 37°C で 20 分間振盪 (80 回/分) しながらプレインキュベーションし、これに 45°C に保温されているトップアガーを 2.0 mL 加え攪拌後、最小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 0.05 mL及び調製した S9 Mix 0.5 mL をそれぞれ小試験管に取り、これにトップアガーを 2.0 mL 加えた後に最小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) 最小グルコース寒天平板培地に重層したトップアガーが固化したことを確認し、 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℃で48時 間培養した。
- 5) 本被験物質による沈殿及び着色の有無を確認した結果、沈殿が認められたため、 目視による計数を行った。陽性対照群においては沈殿の影響がなかったため、自 動コロニーカウンタ(コロニーアナライザー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、補正値:1.21)した。また、実体顕微 鏡を用いて菌に対する生育阻害の有無を観察した。

7.5 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倍以上となる明確な増加を示し、再現性が認められた場合に陽性と判定することとした。なお、判定に際して統計学的手法は用いなかった。

8. 試験結果

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。

8.1 用量設定試験の観察結果及び本試験用量の設定

本試験の試験用量を設定するため、100 mg/mL の被験液を公比 4 で 6 段階希釈した計 7 用量(1.22、4.88、19.5、78.1、313、1250、5000 µg/plate)を用い、用量設定試験を実施した。

用量設定試験の結果、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 78.1 μg/plate 以上の用量で認められた。本被験物質によるプレート上の着色は、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。 菌に対する生育阻害は、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。

本被験物質処理による復帰変異コロニー数は、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陰性対照値の2倍以上となる増加は認められず、用量反応性も認められなかった。

このため本試験の試験用量は、生育阻害が認められなかったため、沈殿の認められた最低用量を最高用量として代謝活性化の有無にかかわらず、すべての菌株において $78.1~\mu g/plate$ を最高用量として以下公比 2~c~4 段階希釈した計 5~f 用量を設定した。

8.2 本試験の観察結果

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 39.1 μ g/plate 以上の用量で認められた。本被験物質によるプレート上の着色は、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。

本被験物質処理による復帰変異コロニー数は、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陰性対照値の2倍以上となる増加は認められず、用量反応性も認められなかった。

8.3 試験の成立条件

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の増加を示し、陰性対照値及び陽性対照値の復帰変異コロニー数の平均値が背景データの管理値(Attached Data)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。

9. 考察

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。

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。

また、本被験物質はポリ(テトラフルオロエチレン)のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験⁹⁾において陰性と報告されている。

以上の試験結果より、本試験条件下においてポリ(テトラフルオロエチレン)は、 細菌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。

10. 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.
- 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 + 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・細菌を用いる復帰突然変異試験ガイドブック,中央労働災害防止協会,1986.
- 8) 石館 基(監修):細菌を用いる復帰突然変異試験データ集(能美健彦,松井道子編集),株式会社エル・アイ・シー,東京,1991.
- 9) (2017): ポリ (テトラフルオロエチレン) のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験(試験番号: T-G255)、株式会社ボゾリサーチセンター

(別表1)

試 験 結 果 表 (用量設定試験)

被験物質の名称: ポリ (テトラフルオロエチレン)

No T-2264

試験実施期間			No. T-2264 2017年1月13日 より 2017年1月16日						
代謝活性 被験物質					異数(コロニー数/プ				
	比系の	板駅初員 の用量		塩基対置換型	20,1	シフト型			
	有無	(μg/プレート)	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537		
		陰性対照	94	4	18	19	4		
		(アセトン)	102 (98)	5 (5)	17 (18)	16 (18)	3 (4)		
			95	2	21	18	2		
		1. 22	105 (100)	4 (3)	23 (22)	23 (21)	5 (4)		
			92	5	20	20	3		
		4. 88	92 (92)	5 (5)	20 (20)	20 (20)	2 (3)		
			96	4	18	13	3		
;	S9Mix	19. 5	91 (94)	6 (5)	19 (19)	20 (17)	5 (4)		
	(-)	70.4	82	5	23	20	4		
		78.1 #	96 (89)	8 (7)	13 (18)	16 (18)	7 (6)		
		212 4	87	4	20	16	5		
		313 #	95 (91) 98	7	16 (18)	21 (19)	6 (6)		
		1250 #	100 (99)	6 (7)	17 19 (18)	11 16 (14)	2 3 (3)		
		1200 #	80	3	18	18	6		
		5000 #	78 (79)	3 (3)	13 (16)	15 (17)	7 (7)		
		陰性対照	127	4	25	30	6		
		(アセトン)	145 (136)	6 (5)	25 (25)	28 (29)	5 (6)		
			126	5	26	23	4		
		1. 22	123 (125)	9 (7)	20 (23)	23 (23)	4 (4)		
			125	11	17	23	7		
		4. 88	135 (130)	5 (8)	13 (15)	17 (20)	6 (7)		
			104	2	19	23	3		
	S9Mix	19. 5	120 (112)	5 (4)	23 (21)	18 (21)	11 (7)		
	(+)	70.4	136	5	22	19	6		
		78.1 #	102 (119)	4 (5)	17 (20)	22 (21)	5 (6)		
		212 #	93	7	22	30	5		
		313 #	131 (112)	2 (5)	20 (21)	21 (26)	7 (6)		
		1250 #	120 122 (121)	10 (9)	21 20 (21)	11 13 (12)	5 (6)		
		1230 #	76	6	20 (21)	15 (12)	5 (0)		
		5000 #	118 (97)	12 (9)	21 (21)	14 (15)	6 (6)		
		名 称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191		
	S9Mix	用量	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0		
	を必要 としな	(μg/プレート)	0. 01	0. 5	0. 01	0. 1	1. 0		
陽	いもの	コロニー数/プレート	463	189	74	396	1477		
性		コロー 致/ / レ ド	488 (476)	218 (204)	69 (72)	408 (402)	1327 (1402)		
対照		名 称	B[<i>a</i>]P	2AA	2AA	B[<i>a</i>]P	B[<i>a</i>]P		
ж	S9Mix を必要 とする	用量 (μg/プレート)	5. 0	2. 0	10.0	5. 0	5. 0		
	と 9 る もの	¬пжг/¬° 」	915	235	893	283	132		
		コロニー数/プレート	902 (909)	274 (255)	935 (914)	324 (304)	101 (117)		

(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

2AA : 2-アミノアントラセン B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

#:被験物質による沈殿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: ポリ (テトラフルオロエチレン)

No. T-2264

	計歸宝			2017年1月	18日 より 2017年		No. T-2264
代謝活性 被験物質					10日 より 2017 <u> </u> 数(コロニー数/プ		
	謝活性と系の	検験物員 の用量		塩基対置換型	2/ 2/ 2/ 2/ 2/ 2/ 2/ 2/ 2/ 2/ 2/ 2/ 2/ 2		シフト型
	有無	(μ g/プ レート)	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
		陰性対照	127	6	20	19	7
		(アセトン)	112 (120)	5 (6)	18 (19)	22 (21)	5 (6)
			107	4	26	16	8
		4. 88	112 (110)	5 (5)	29 (28)	21 (19)	5 (7)
			116	4	23	17	5
	S9Mix	9. 77	126 (121)	5 (5)	25 (24)	18 (18)	7 (6)
	(-)		102	4	25	15	4
		19. 5	114 (108)	5 (5)	27 (26)	12 (14)	3 (4)
			130	8	21	16	3
		39.1 #	96 (113)	9 (9)	27 (24)	28 (22)	5 (4)
		70.4	96	7	23	15	7
		78.1 #	121 (109)	8 (8)	18 (21)	18 (17)	4 (6)
		陰性対照 (アセトン)	160	7	29	27	7
		(アセトン)	145 (153)	6 (7)	28 (29)	31 (29)	6 (7)
		4.00	136	5	30	33	5
		4. 88	146 (141)	5 (5)	34 (32)	35 (34)	5 (5)
١,	OM:	9. 77	125	6 7 (7)	25	25	5
	89Mix (+)	9.77	129 (127) 160	7 (7)	20 (23)	39 (32)	6 (6)
	()	19.5	149 (155)	7 (6)	32 (29)	29 (26)	7 (7)
		10.0	134	6	22	27	5
		39.1 #	163 (149)	13 (10)	18 (20)	28 (28)	4 (5)
		σσ _#	136	6	23	24	5
		78.1 #	128 (132)	9 (8)	23 (23)	34 (29)	7 (6)
			AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191
	S9Mix を必要	用量 (μg/プレート)	0. 01	0.5	0. 01	0. 1	1. 0
	としないもの		569	227	84	357	1310
陽 性	0.007	コロニー数/プレート	502 (536)	231 (229)	76 (80)	276 (317)	1416 (1363)
対		名 称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
照	S9Mix を必要	用量 (μg/プレート)	5. 0	2. 0	10.0	5. 0	5. 0
	とする もの	364_ /=0 ,	962	231	793	343	91
	5 - 7	コロニー数/プレート	933 (948)	247 (239)	816 (805)	316 (330)	105 (98)

(備考)

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

2AA : 2-アミノアントラセン B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

#:被験物質による沈殿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。

図 1

用量反応曲線 (本試験 TA100:-S9 Mix)

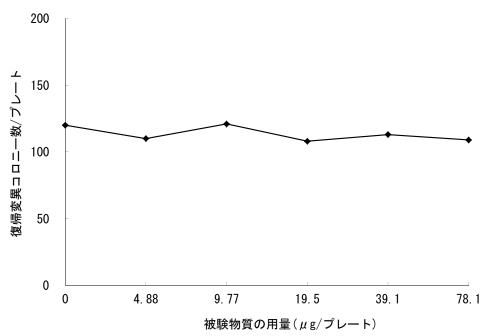
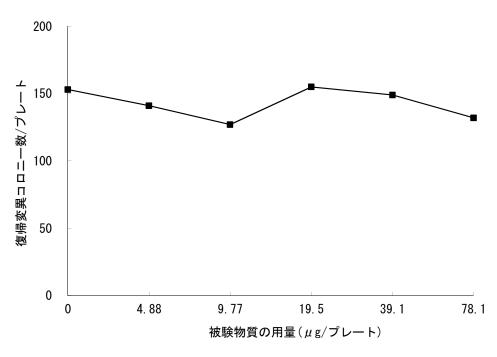
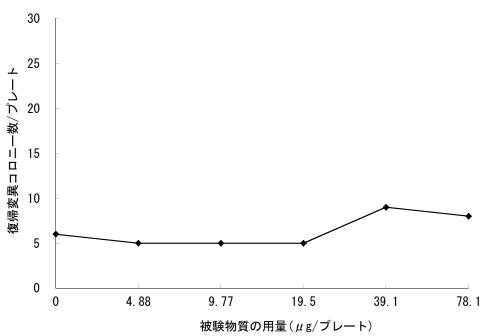


図 2

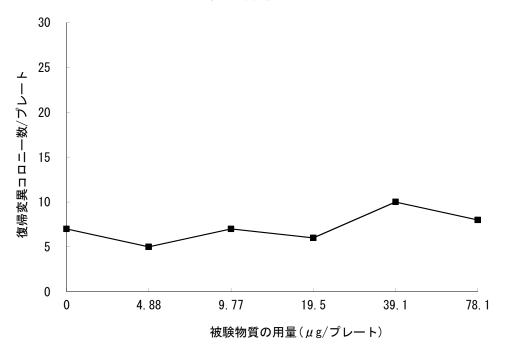
用量反応曲線 (本試験 TA100:+S9 Mix)



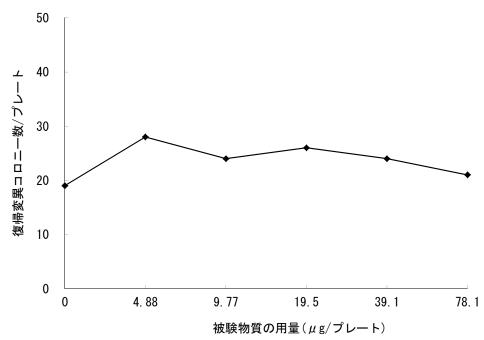
用量反応曲線 (本試験 TA1535:-S9 Mix)



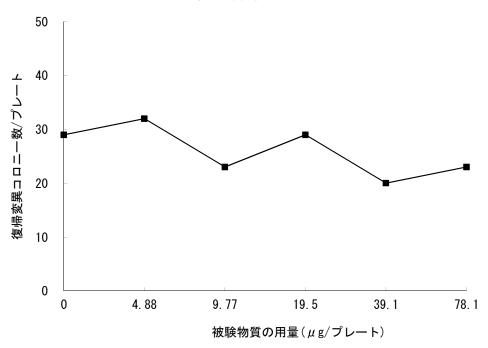
用量反応曲線 (本試験 TA1535:+S9 Mix)



用量反応曲線 (本試験 WP2uvrA:-S9 Mix)



用量反応曲線 (本試験 WP2uvrA:+S9 Mix)



用量反応曲線 (本試験 TA98:-S9 Mix)

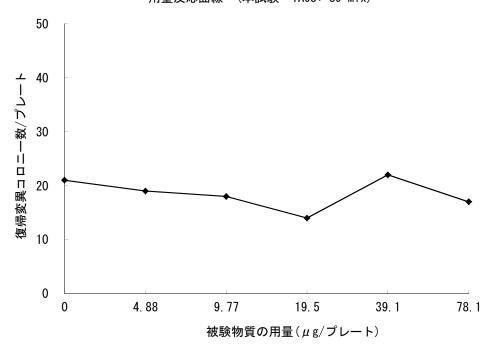
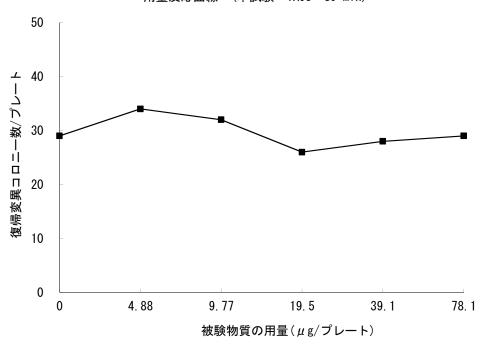
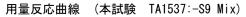


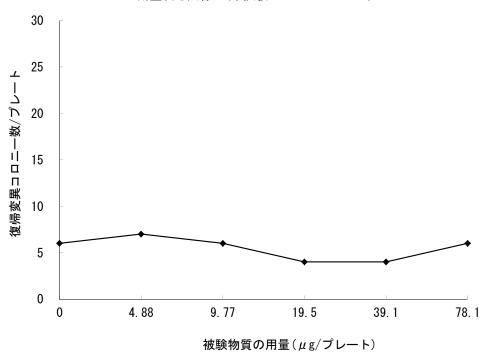
図 8

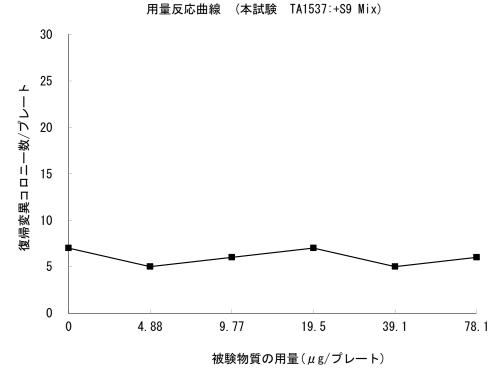
用量反応曲線 (本試験 TA98:+S9 Mix)



T-2264







T-2264 Attached Data

Background Data of the reverse mutation tests in bacteria at the Tokyo Laboratory of the BoZo Research Center Inc.

CODE No.:160908

(Pre-incubation Method)

Tester	G0 M; () ()	C1:Ct	M	a D	Managem	Number of	
Strains	S9 Mix (-) or (+)	Classification	Mean	S.D.	Lower limit	Upper limit	plates
		Solvent control	117	13.7	76	158	102
TA100	_	Positive control AF-2(0.01 µg/plate)	547	71.8	331	762	102
IAIOO		Solvent control	132	17.2	80	183	102
	+	Positive control B[<i>a</i>]P(5.0 μg/plate)	891	126	512	1269	102
		Solvent control	9	2.60	1	17	102
TA1535	_	Positive control SAZ(0.5 μg/plate)	233	26.4	154	312	102
1711333		Solvent control	10	2.75	2	18	102
	+	Positive control 2AA(2.0 µg/plate)	258	34.1	156	360	102
		Solvent control	27	3.98	15	39	102
WP2 <i>uvrA</i>	_	Positive control AF-2(0.01 μg/plate)	71	6.4	52	91	102
W1 20V111	+	Solvent control	30	4.41	17	44	102
		Positive control 2AA(10.0 µg/plate)	718	114	375	1062	102
	_	Solvent control	18	3.50	7	28	102
TA98		Positive control AF-2(0.1 μg/plate)	346	57.1	174	517	102
11170		Solvent control	32	5.45	15	48	102
	+	Positive control B[<i>a</i>]P(5.0 μg/plate)	384	46.4	245	523	102
		Solvent control	8	2.36	1	15	102
TA1537	-	Positive control ICR-191(1.0 μg/plate)	1011	193	431	1590	102
1111337		Solvent control	10	2.55	2	17	102
	+	Positive control B[a]P(5.0 μg/plate)	110	12.1	73	146	102

(Notice)

S9 Mix

Solvent controls Water, Dimethylsulfoxide(DMSO) and Acetone Positive controls AF-2 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

SAZ : Sodium azide

 $ICR-191: 2-methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)aminopropylamino] acridine \cdot 2HCl$

B[a]P : Benzo[a]pyrene
2AA : 2-aminoanthracene
(-): without metabolic activation

(+): with metabolic activation

信頼性保証書(1/2)

試験番号

: T-2264

試験表題

: ポリ (テトラフルオロエチレン) の細菌を用いる復帰

突然変異試験

本試験は以下に示す基準を遵守し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致しました。

20/2年 月 28日株式会社ボゾリサーチセンター信頼性保証部門



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		2017年 1月 13日	2017年 1月13日
調製・保存(被験物質)、		2017年 1月 19日	2017年 1月19日
被験物質の処理			
計数		2017年 1月 23日	2017年 1月 23日
試験計画書変更書(1)		2017年 3月 3日	2017年 3月 3日
生データ		2017年 3月14日	2017年 3月15日
改善確認		2017年 3月27日	2017年 3月 27日
最終報告書草案・図・表		2017年 3月14日	2017年 3月15日
改善確認		2017年 3月 27日	2017年 3月27日
最終報告書		2017年 3月 28日	2017年 3月 28日

T-2264

信頼性保証書(2/2)

施設調査

	70 PC 10-3		
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		2016年 8月 25日	
		2016年 8月 27日	
		2016年 8月30日	2016年 8月 30日
改善確認		2016年 8月30日	2016年 8月 30日
		2016年 8月 27日	
		2016年 8月 29日	Z*
		2016年 8月 30日	2016年 8月 30日
陽性対照物質の管理		2016年 11月 2日	2016年 11月 2日
		2016年 11月 29日	2016年 11月 29日
		2016年 11月 30日	2016年 11月 30日
		2016年 12月 20日	2016年 12月 21日
		2017年 1月 16日	2017年 1月 16日