



2,6-ジクロロトルエンの  
細菌を用いる  
復帰突然変異試験

厚生省生活衛生局 委託

財団法人食品薬品安全センター

秦野研究所

## 【目 次】

|                 | 頁 |
|-----------------|---|
| 要 約 .....       | 1 |
| 緒 言 .....       | 2 |
| 材料および試験方法 ..... | 3 |
| 試験結果および考察 ..... | 7 |
| 参 考 文 献 .....   | 8 |
| Tables 1～3      |   |

## 【要 約】

2,6-ジクロロトルエンの変異原性の有無について、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施することにより検討した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用い、直接法および代謝活性化法のいずれも、用量設定試験を 50～5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の用量で行ったところ、直接法では 150  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上 (TA1535 は 50  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上)、代謝活性化法では 500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上 (TA1535 は 150  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上) の用量で抗菌性が認められた。したがって、本試験では、直接法では 4.688～150  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  (TA1535 は 2.344～150  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )、代謝活性化法では 18.75～600  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  (TA1535 は 9.375～600  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ ) の用量で実施した。

その結果、2回の本試験とも、用いた5種類の検定菌について、いずれの用量でも復帰変異コロニー数の増加が認められなかったことから、2,6-ジクロロトルエンは、用いた試験系において変異原性を有しない(陰性)と判定された。

## 【結 言】

OECD既存化学物質安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、2,6-ジクロロトルエンについて、細菌を用いる復帰突然変異試験をプレート法により実施した。

この試験は、サルモネラ（ネズミチフス菌）におけるヒスチジン要求性から非要求性への復帰突然変異<sup>(1)</sup>、ならびに大腸菌におけるトリプトファン要求性から非要求性への復帰突然変異<sup>(2)</sup>を指標とした変異原性の検出系である。

試験は、被験物質をそのまま検定菌に作用させる直接法と、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素（S9 混液）によって産生される被験物質の代謝物の変異原性を試験する代謝活性化法とからなっている。

本試験は、「新規化学物質に係る試験の方法について」（昭和62年3月31日、環保業第237号、薬発第306号、62基局第303号）およびOECD毒性試験ガイドライン：471, 472に準拠し、化学物質GLP基準（昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、改訂昭和63年11月18日、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号）に基づいて実施した。

## 【材料および試験方法】

### 〔検定菌〕

*Salmonella typhimurium* TA100  
*Salmonella typhimurium* TA1535  
*Escherichia coli* WP2 *uvrA*  
*Salmonella typhimurium* TA98  
*Salmonella typhimurium* TA1537

*S. typhimurium* の 4 菌株は1975年10月31日にアメリカ合衆国、  
から分与を受けた。

*E. coli* WP2 *uvrA* 株は1979年 5 月 9 日に  
から分与  
を受けた。

検定菌は、 $-80^{\circ}\text{C}$ 以下で凍結保存した。各検定菌は、凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、および膜変異 (*rfa*) とアンピシリン耐性因子 (*pKM101*) の有無についての特性確認を行った。

試験に際して、ニュートリエントブロスNo.2 (Oxoid) を入れたL字型試験管に種菌を接種し、 $37^{\circ}\text{C}$ 、10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。

### 〔被験物質〕

2,6-ジクロロトルエン (CAS No. 118-69-4、以下D C Tと略) は、分子量 161.04 の透明な液体である。純度 99.6%のもの (ロット番号:            不純物: 2,5-ジクロロトルエン 0.13%、2,4-ジクロロトルエン 0.07%、2,3-ジクロロトルエン 0.05%、3,4-ジクロロトルエン 0.01%、3,5-ジクロロトルエン 0.01%            ) を

から供与された。被験物質は、使用時まで室温で遮光して保管した。

D C Tは、ジメチルスルホキシド (以下 DMSO と略、ロット番号: APJ3434、和光純薬工業(株)) に 50 あるいは  $6\text{ mg/ml}$  になるように調製した後、同溶媒で更に公比約 3 ないし 2 で希釈したものを、速やかに試験に用いた。

秦野研究所において、D C Tの DMSO 溶液中での安定性試験を溶媒が共通であるので、本試験での低濃度 ( $23.44\ \mu\text{g/ml}$ ) および当研究所で実施した染色体異常試験 (H-93-256) での高濃度 ( $20\ \text{mg/ml}$ ) の 2 濃度について、室温遮光条件下で実施した。その結果、調製後 4 時間における各 3 サンプルの平均含量は、それぞれ初期値 (0 時間) の平均に対して、

97.5および 101%であった。これらの値は、当研究所で規定した許容範囲内にあった (Appendix 1)。

また、本試験 I に用いた調製検体について、含量測定試験を行った結果、23.44  $\mu\text{g}/\text{ml}$  溶液の含量は既定濃度に対し、113~115%、6  $\text{mg}/\text{ml}$  溶液は、99.3~101%であった。6  $\text{mg}/\text{ml}$  溶液の含量の値は当研究所の規定した許容範囲内であったが、23.44  $\mu\text{g}/\text{ml}$  溶液の含量は許容範囲をやや超えていた (Appendix 2)。しかし、試験には影響しないものと判断した。

以上の結果から、DCTは DMSO 溶液中では安定であり、また調製液中の被験物質の含量は所定の値の範囲内にあることが確認された。

#### 〔陽性対照物質〕

用いた陽性対照物質およびその溶媒は以下のとおりである。

|     |               |                   |                 |          |
|-----|---------------|-------------------|-----------------|----------|
| AF2 | ： フリルアマイド     | (上野製薬(株))         | ロット番号 46,       | 純度99.9%) |
| SA  | ： アジ化ナトリウム    | (和光純薬工業(株))       | ロット番号 TWR3330,  | 純度90%以上) |
| 9AA | ： 9-アミノアクリン   | (Sigma Chem. Co.) | ロット番号 96F05641, | 純度98%以上) |
| 2AA | ： 2-アミノアントラセン | (和光純薬工業(株))       | ロット番号 DSF2950,  | 純度90%以上) |

AF2, 2AA は DMSO (和光純薬工業(株)) に溶解したものを $-20^{\circ}\text{C}$ で凍結保存し、用時解凍した。9AA は DMSO に、SA は蒸留水に溶解し、速やかに試験に用いた。

#### 〔培地および S9 混液の組成〕

##### 1) トップアガー (TA菌株用)

下記の水溶液 (A) および (B) を容量比 10:1 の割合で混合した。

|                   |      |             |        |
|-------------------|------|-------------|--------|
| (A) バクアガー (Difco) | 0.6% | (B) L-ヒスチジン | 0.5 mM |
| 塩化ナトリウム           | 0.5% | ピオチン        | 0.5 mM |

\* : WP2 用には、0.5 mM L-トリプトファン水溶液を用いた。

## 2) 合成培地

培地は、日清製粉株式会社製の最少寒天培地（用量設定試験においてはロット番号：DJ030JI、1993年10月4日製造、本試験においては、ロット番号：DJ040LI、1993年12月18日製造）を用いた。なお、培地 1 lあたりの組成は下記のとおりである。

|               |        |                |        |
|---------------|--------|----------------|--------|
| 硫酸マグネシウム・7水和物 | 0.2 g  | 水酸化ナトリウム       | 0.66 g |
| クエン酸・1水和物     | 2 g    | グルコース          | 20 g   |
| リン酸水素二カリウム    | 10 g   | バクトアガー (Difco) | 15 g   |
| リン酸一アンモニウム    | 1.92 g |                |        |

径 90 mm のシャーレ 1 枚あたり 30 ml を流して固めてある。

## 3) S9 混液（1 ml 中下記の成分を含む）

|                     |         |                          |          |
|---------------------|---------|--------------------------|----------|
| <sup>**</sup><br>S9 | 0.1 ml  | NADH                     | 4 μmol   |
| 塩化マグネシウム            | 8 μmol  | NADPH                    | 4 μmol   |
| 塩化カリウム              | 33 μmol | ナトリウム-リン酸緩衝液<br>(pH 7.4) | 100 μmol |
| グルコース-6-リン酸         | 5 μmol  |                          |          |

\*\* : 7 週齢の Sprague-Dawley 系雄ラットをフェノバルビタール(PB)および 5、6-ベンゾフラボン(BF)の併用投与で酵素誘導して作製した S9 (キッコーマン株、ロット番号 RAA-297 および RAA-304、1993 年 8 月 27 日および 1994 年 1 月 28 日製造)を用いた。PB および BF の投与量は 1 日目 PB 30 mg/kg、2 日目 PB 60 mg/kg、3 日目 PB 60 mg/kg および BF 80 mg/kg、4 日目 PB 60 mg/kg であり、いずれも腹腔内投与したものである。

## [試験方法]

プレート法を用いて、直接法および代謝活性化法によって試験を行った。

小試験管中にトッパアガー 2 ml、被験物質調製液 0.1 ml、リン酸緩衝液 0.5 ml（代謝活性化試験においては S9 混液 0.5 ml）、検定菌液 0.1 ml を混合したのち合成培地平板上に流して固めた。また、対照群として被験物質調製液の代わりに DMSO、または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとの陽性対照物質の名称および用量は Table 1～3 に示した。培養は 37°C で 48 時間行い、生じた変異コロニー数を算定した。抗菌性の有無については、肉眼的あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌膜の状態から判断

した。用いた平板は用量設定試験においては、陰性および陽性対照群では3枚ずつ、各用量については1枚ずつとした。また、本試験においては両対照群および各用量につき、3枚ずつを用い、それぞれその平均値と標準偏差を求めた。用量設定試験は1回、本試験は同一用量について2回実施し、再現性の確認を行った。

〔判定基準〕

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌の直接法あるいは代謝活性化法において、被験物質を含有する平板上における変異コロニー数の平均値が、陰性対照のそれに比べて2倍以上に増加し、かつ、その増加に再現性あるいは用量依存性が認められた場合に、当該被験物質は本試験系において変異原性を有する（陽性）と判定することとした。



## 【試験結果および考察】

試験の全過程を通して、信頼性に悪影響を及ぼすおそれのある予期し得なかった事態および試験計画書からの逸脱はなかった。

### 〔用量設定試験〕

結果を Table 1 に示した。DCTについて、50～5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の範囲で公比を約3とし、試験を実施したところ、直接法では TA1535 の 50  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、その他においては 150  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上、また、代謝活性化法では TA1535 の 150  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、その他においては 500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上の用量で強い抗菌性が認められた。

したがって、本試験における最高用量を、すべての検定菌において、直接法では 150  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、代謝活性化法では 600  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  とすることとした。

### 〔本試験〕

結果を Table 2、3 に示した。DCTについて、すべての検定菌について、直接法では 4.688～150  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  (TA1535 のみ 2.344～150  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )、代謝活性化法では 18.75～600  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  (TA1535 のみ 9.375～600  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ ) の範囲で、公比を2とし、試験を実施した。2回の試験を通して、用いた5種類の検定菌の直接法、代謝活性化法のいずれにおいても、用量依存性のある変異コロニー数の増加は認められなかった。なお、直接法および代謝活性化法のいずれにおいても、すべての検定菌において、高用量群で抗菌性が認められた。

DCTについて実施した試験において、陽性対照群では、いずれの検定菌においても変異コロニー数の増加が認められ、陰性対照群とともに計測された変異コロニー数はヒストリカルコントロール値の範囲内であったことから、本試験系の有効性が確認された。

以上の結果に基づき、DCTは、用いた試験系において変異原性を有しないもの（陰性）と判定した。

【参 考 文 献】

- (1) Maron, D.M. and Ames, B.N. : Mutation Research. 113: 173-215 (1983)
- (2) Green, M.H.L. : in "Handbook of Mutagenicity Test Procedures." Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C. (eds.) Elsevier, Amsterdam, New York Oxford. (1984) pp.161-187.

Table 1. Results of preliminary cytotoxicity test in reverse mutation test of 2,6-Dichlorotoluene\*\* on bacteria

| With (+) or without (-)<br>S9 Mix | Test substance dose<br>( $\mu\text{g}/\text{plate}$ ) | Number of revertants (number of colonies / plate , Mean $\pm$ S.D.) |     |     |                    |     |     |                      |      |      |                    |     |     |                     |      |      |  |
|-----------------------------------|---|---|-----|-----|--------------------|-----|-----|----------------------|------|------|--------------------|-----|-----|---------------------|------|------|--|
|                                   |   | Base - pair substitution type                                       |     |     |                    |     |     |                      |      |      | Frameshift type    |     |     |                     |      |      |  |
|                                   |   | TA100   |     |     | TA1535             |     |     | WP2uvrA              |      |      | TA98               |     |     | TA1537              |      |      |  |
| S9 Mix<br>(-)                     | 0   | 90  | 104 | 80  | 12                 | 6   | 7   | 29                   | 22   | 22   | 19                 | 20  | 21  | 10                  | 8    | 6    |  |
|                                   |   | ( 91 $\pm$ 12.1 )   |     |     | ( 8 $\pm$ 3.2 )    |     |     | ( 24 $\pm$ 4.0 )     |      |      | ( 20 $\pm$ 1.0 )   |     |     | ( 8 $\pm$ 2.0 )     |      |      |  |
|                                   | 50  | 89  |     |     | 6 *                |     |     | 22                   |      |      | 14                 |     |     | 9                   |      |      |  |
|                                   | 150   | 83 *  |     |     | 0 *                |     |     | 4 *                  |      |      | 12 *               |     |     | 1 *                 |      |      |  |
|                                   | 500   | 7 *   |     |     | 0 *                |     |     | 0 *                  |      |      | 0 *                |     |     | 0 *                 |      |      |  |
|                                   | 1500  | 0 *   |     |     | 0 *                |     |     | 0 *                  |      |      | 0 *                |     |     | 0 *                 |      |      |  |
|                                   | 5000  | 0 *   |     |     | 0 *                |     |     | 0 *                  |      |      | 0 *                |     |     | 0 *                 |      |      |  |
|                                   |   |   |     |     |                    |     |     |                      |      |      |                    |     |     |                     |      |      |  |
|                                   |   |   |     |     |                    |     |     |                      |      |      |                    |     |     |                     |      |      |  |
| S9 Mix<br>(+)                     | 0   | 104   | 117 | 114 | 5                  | 14  | 10  | 22                   | 31   | 24   | 42                 | 31  | 17  | 8                   | 8    | 15   |  |
|                                   |   | ( 112 $\pm$ 6.8 )   |     |     | ( 10 $\pm$ 4.5 )   |     |     | ( 26 $\pm$ 4.7 )     |      |      | ( 30 $\pm$ 12.5 )  |     |     | ( 10 $\pm$ 4.0 )    |      |      |  |
|                                   | 50  | 128   |     |     | 8                  |     |     | 29                   |      |      | 32                 |     |     | 10                  |      |      |  |
|                                   | 150   | 96  |     |     | 14 *               |     |     | 23                   |      |      | 33                 |     |     | 12                  |      |      |  |
|                                   | 500   | 95 *  |     |     | 0 *                |     |     | 18 *                 |      |      | 19 *               |     |     | 5 *                 |      |      |  |
|                                   | 1500  | 56 *  |     |     | 0 *                |     |     | 0 *                  |      |      | 17 *               |     |     | 0 *                 |      |      |  |
|                                   | 5000  | 0 *   |     |     | 0 *                |     |     | 0 *                  |      |      | 0 *                |     |     | 0 *                 |      |      |  |
|                                   |   |   |     |     |                    |     |     |                      |      |      |                    |     |     |                     |      |      |  |
|                                   |   |   |     |     |                    |     |     |                      |      |      |                    |     |     |                     |      |      |  |
| Positive control<br>S9 Mix (-)    | Chemical  | AF2   |     |     | SA                 |     |     | AF2                  |      |      | AF2                |     |     | 9AA                 |      |      |  |
|                                   | Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )                   | 0.01  |     |     | 0.5                |     |     | 0.01                 |      |      | 0.1                |     |     | 80                  |      |      |  |
| Positive control<br>S9 Mix (+)    | Chemical  | 2AA   |     |     | 2AA                |     |     | 2AA                  |      |      | 2AA                |     |     | 2AA                 |      |      |  |
|                                   | Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )                   | 1   |     |     | 2                  |     |     | 10                   |      |      | 0.5                |     |     | 2                   |      |      |  |
| S9 Mix (-)                        | Number of colonies / plate                            | 470   | 502 | 470 | 250                | 251 | 231 | 130                  | 155  | 139  | 748                | 765 | 762 | 1171                | 1192 | 1169 |  |
|                                   |   | ( 481 $\pm$ 18.5 )  |     |     | ( 244 $\pm$ 11.3 ) |     |     | ( 141 $\pm$ 12.7 )   |      |      | ( 758 $\pm$ 9.1 )  |     |     | ( 1177 $\pm$ 12.7 ) |      |      |  |
| S9 Mix (+)                        | Number of colonies / plate                            | 890   | 857 | 881 | 204                | 198 | 230 | 925                  | 1427 | 1285 | 347                | 321 | 315 | 224                 | 261  | 238  |  |
|                                   |   | ( 876 $\pm$ 17.1 )  |     |     | ( 211 $\pm$ 17.0 ) |     |     | ( 1212 $\pm$ 258.8 ) |      |      | ( 328 $\pm$ 17.0 ) |     |     | ( 241 $\pm$ 18.7 )  |      |      |  |

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide , SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

\*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

\*\* : Purity was 99.6 % and 2,5-dichlorotoluene (0.13%), 2,4-dichlorotoluene (0.07 %), 2,3-dichlorotoluene (0.05 %), 3,4-dichlorotoluene (0.01 %) and 3,5-dichlorotoluene (0.01 %) were contained as impurity.

Table 2. Results of reverse mutation test ( I ) of 2,6-Dichlorotoluene\*\* on bacteria

| With (+) or without (-) S9 Mix | Test substance dose ( $\mu\text{g}$ /plate) | Number of revertants (number of colonies / plate , Mean $\pm$ S.D.) |     |     |        |     |     |         |      |      |                 |     |     |        |      |      |                    |                    |                     |                    |                      |
|--------------------------------|---|---|-----|-----|--------|-----|-----|---------|------|------|-----------------|-----|-----|--------|------|------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|----------------------|
|                                |   | Base - pair substitution type                                       |     |     |        |     |     |         |      |      | Frameshift type |     |     |        |      |      |                    |                    |                     |                    |                      |
|                                |   | TA100   |     |     | TA1535 |     |     | WP2uvrA |      |      | TA98            |     |     | TA1537 |      |      |                    |                    |                     |                    |                      |
| S9Mix (-)                      | 0   | 108   | 94  | 118 | 10     | 10  | 9   | 24      | 16   | 23   | 20              | 23  | 19  | 5      | 8    | 8    | ( 107 $\pm$ 12.1 ) | ( 10 $\pm$ 0.6 )   | ( 21 $\pm$ 4.4 )    | ( 21 $\pm$ 2.1 )   | ( 7 $\pm$ 1.7 )      |
|                                | 2.344                                       | ND  |     |     | 16     | 10  | 7   | ND      |      |      | ND              |     |     | ND     |      |      | ( 11 $\pm$ 4.6 )   |                    |                     |                    |                      |
|                                | 4.688                                       | 84  | 92  | 99  | 9      | 20  | 7   | 21      | 34   | 26   | 18              | 18  | 25  | 10     | 5    | 7    | ( 92 $\pm$ 7.5 )   | ( 12 $\pm$ 7.0 )   | ( 27 $\pm$ 6.6 )    | ( 20 $\pm$ 4.0 )   | ( 7 $\pm$ 2.5 )      |
|                                | 9.375                                       | 117   | 92  | 101 | 10     | 9   | 13  | 15      | 27   | 21   | 19              | 20  | 16  | 7      | 7    | 9    | ( 103 $\pm$ 12.7 ) | ( 11 $\pm$ 2.1 )   | ( 21 $\pm$ 6.0 )    | ( 18 $\pm$ 2.1 )   | ( 8 $\pm$ 1.2 )      |
|                                | 18.75                                       | 97  | 108 | 107 | 11     | 8   | 8   | 26      | 24   | 30   | 21              | 25  | 24  | 4      | 5    | 10   | ( 104 $\pm$ 6.1 )  | ( 9 $\pm$ 1.7 )    | ( 27 $\pm$ 3.1 )    | ( 23 $\pm$ 2.1 )   | ( 6 $\pm$ 3.2 )      |
|                                | 37.5  | 115   | 104 | 110 | 15     | 4   | 4*  | 26      | 12   | 20   | 15              | 16  | 25  | 6      | 8    | 7    | ( 110 $\pm$ 5.5 )  | ( 8 $\pm$ 6.4 )    | ( 19 $\pm$ 7.0 )    | ( 19 $\pm$ 5.5 )   | ( 7 $\pm$ 1.0 )      |
|                                | 75  | 66*   | 61* | 87* | 1*     | 5*  | 6*  | 19*     | 18*  | 6*   | 11*             | 8*  | 8*  | 7*     | 3*   | 3*   | ( 71 $\pm$ 13.8 )  | ( 4 $\pm$ 2.6 )    | ( 14 $\pm$ 7.2 )    | ( 9 $\pm$ 1.7 )    | ( 4 $\pm$ 2.3 )      |
|                                | 150   | 31*   | 29* | 47* | 0*     | 0*  | 0*  | 5*      | 8*   | 7*   | 1*              | 2*  | 9*  | 4*     | 4*   | 4*   | ( 36 $\pm$ 9.9 )   | ( 0 $\pm$ 0.0 )    | ( 7 $\pm$ 1.5 )     | ( 4 $\pm$ 4.4 )    | ( 4 $\pm$ 0.0 )      |
|                                |   |   |     |     |        |     |     |         |      |      |                 |     |     |        |      |      |                    |                    |                     |                    |                      |
| S9Mix (+)                      | 0   | 96  | 101 | 101 | 7      | 14  | 4   | 26      | 14   | 18   | 31              | 37  | 31  | 12     | 8    | 8    | ( 99 $\pm$ 2.9 )   | ( 8 $\pm$ 5.1 )    | ( 19 $\pm$ 6.1 )    | ( 33 $\pm$ 3.5 )   | ( 9 $\pm$ 2.3 )      |
|                                | 9.375                                       | ND  |     |     | 14     | 18  | 17  | ND      |      |      | ND              |     |     | ND     |      |      | ( 16 $\pm$ 2.1 )   |                    |                     |                    |                      |
|                                | 18.75                                       | 82  | 98  | 84  | 13     | 8   | 12  | 31      | 24   | 24   | 34              | 28  | 31  | 13     | 17   | 8    | ( 88 $\pm$ 8.7 )   | ( 11 $\pm$ 2.6 )   | ( 26 $\pm$ 4.0 )    | ( 31 $\pm$ 3.0 )   | ( 13 $\pm$ 4.5 )     |
|                                | 37.5  | 106   | 109 | 90  | 15     | 17  | 12  | 24      | 30   | 21   | 26              | 28  | 23  | 10     | 11   | 17   | ( 102 $\pm$ 10.2 ) | ( 15 $\pm$ 2.5 )   | ( 25 $\pm$ 4.6 )    | ( 26 $\pm$ 2.5 )   | ( 13 $\pm$ 3.8 )     |
|                                | 75  | 90  | 114 | 90  | 14     | 7   | 18  | 28      | 21   | 24   | 35              | 26  | 31  | 10     | 14   | 11   | ( 98 $\pm$ 13.9 )  | ( 13 $\pm$ 5.6 )   | ( 24 $\pm$ 3.5 )    | ( 31 $\pm$ 4.5 )   | ( 12 $\pm$ 2.1 )     |
|                                | 150   | 91  | 112 | 81  | 9      | 15  | 9   | 24      | 28   | 26   | 23              | 23  | 32  | 16     | 12   | 10   | ( 95 $\pm$ 15.8 )  | ( 11 $\pm$ 3.5 )   | ( 26 $\pm$ 2.0 )    | ( 26 $\pm$ 5.2 )   | ( 13 $\pm$ 3.1 )     |
|                                | 300   | 90*   | 89* | 98* | 10*    | 11* | 15* | 19      | 18   | 20   | 17              | 21  | 19  | 15     | 12   | 15   | ( 92 $\pm$ 4.9 )   | ( 12 $\pm$ 2.6 )   | ( 19 $\pm$ 1.0 )    | ( 19 $\pm$ 2.0 )   | ( 14 $\pm$ 1.7 )     |
|                                | 600   | 68*   | 84* | 90* | 7*     | 6*  | 10* | 19*     | 18*  | 15*  | 18*             | 16* | 25* | 7*     | 8*   | 5*   | ( 81 $\pm$ 11.4 )  | ( 8 $\pm$ 2.1 )    | ( 17 $\pm$ 2.1 )    | ( 20 $\pm$ 4.7 )   | ( 7 $\pm$ 1.5 )      |
|                                |   |   |     |     |        |     |     |         |      |      |                 |     |     |        |      |      |                    |                    |                     |                    |                      |
| Positive control S9 Mix (-)    | Chemical                                    | AF2   |     |     | SA     |     |     | AF2     |      |      | AF2             |     |     | 9AA    |      |      |                    |                    |                     |                    |                      |
|                                | Dose ( $\mu\text{g}$ /plate)                | 0.01  |     |     | 0.5    |     |     | 0.01    |      |      | 0.1             |     |     | 80     |      |      |                    |                    |                     |                    |                      |
| Positive control S9 Mix (+)    | Chemical                                    | 2AA   |     |     | 2AA    |     |     | 2AA     |      |      | 2AA             |     |     | 2AA    |      |      |                    |                    |                     |                    |                      |
|                                | Dose ( $\mu\text{g}$ /plate)                | 1   |     |     | 2      |     |     | 10      |      |      | 0.5             |     |     | 2      |      |      |                    |                    |                     |                    |                      |
|                                | Number of colonies / plate                  | 304   | 371 | 371 | 390    | 384 | 389 | 190     | 187  | 173  | 799             | 769 | 736 | 2043   | 1821 | 1752 | ( 349 $\pm$ 38.7 ) | ( 388 $\pm$ 3.2 )  | ( 183 $\pm$ 9.1 )   | ( 768 $\pm$ 31.5 ) | ( 1872 $\pm$ 152.1 ) |
|                                | Number of colonies / plate                  | 795   | 824 | 896 | 279    | 300 | 319 | 1359    | 1201 | 1324 | 467             | 504 | 447 | 301    | 243  | 257  | ( 838 $\pm$ 52.0 ) | ( 299 $\pm$ 20.0 ) | ( 1295 $\pm$ 83.0 ) | ( 473 $\pm$ 28.9 ) | ( 267 $\pm$ 30.3 )   |

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

\*: Inhibition was observed against growth of the bacteria. ND :Not done

\*\* : Purity was 99.6 % and 2,5-dichlorotoluene (0.13%), 2,4-dichlorotoluene (0.07 %), 2,3-dichlorotoluene (0.05 %), 3,4-dichlorotoluene (0.01 %) and 3,5-dichlorotoluene (0.01 %) were contained as impurity.

Table 3. Results of reverse mutation test ( II ) of 2,6-Dichlorotoluene\*\* on bacteria

| With (+) or without (-)<br>S9 Mix | Test substance dose<br>( $\mu\text{g}$ /plate) | Number of revertants (number of colonies / plate , Mean $\pm$ S.D.) |       |                  |                    |      |                  |                      |      |                  |                    |      |                  |                     |      |      |  |
|-----------------------------------|--|---|-------|------------------|--------------------|------|------------------|----------------------|------|------------------|--------------------|------|------------------|---------------------|------|------|--|
|                                   |  | Base - pair substitution type                                       |       |                  |                    |      |                  | Frameshift type      |      |                  |                    |      |                  |                     |      |      |  |
|                                   |  | TA100   |       |                  | TA1535             |      |                  | WP2uvrA              |      |                  | TA98               |      |                  | TA1537              |      |      |  |
| S9Mix<br>(-)                      | 0  | 125   | 137   | 125              | 12                 | 10   | 17               | 16                   | 19   | 23               | 14                 | 16   | 16               | 10                  | 11   | 6    |  |
|                                   |  | ( 129 $\pm$ 6.9 )   |       |                  | ( 13 $\pm$ 3.6 )   |      |                  | ( 19 $\pm$ 3.5 )     |      |                  | ( 15 $\pm$ 1.2 )   |      |                  | ( 9 $\pm$ 2.6 )     |      |      |  |
|                                   | 2.344  | ND  |       |                  | 16                 | 16   | 13               | ND                   |      |                  | ND                 |      |                  | ND                  |      |      |  |
|                                   |  |   |       |                  | ( 15 $\pm$ 1.7 )   |      |                  |                      |      |                  |                    |      |                  |                     |      |      |  |
|                                   | 4.688  | 142   | 126   | 111              | 10                 | 15   | 12               | 23                   | 19   | 16               | 21                 | 26   | 21               | 9                   | 4    | 6    |  |
|                                   |  | ( 126 $\pm$ 15.5 )  |       |                  | ( 12 $\pm$ 2.5 )   |      |                  | ( 19 $\pm$ 3.5 )     |      |                  | ( 23 $\pm$ 2.9 )   |      |                  | ( 6 $\pm$ 2.5 )     |      |      |  |
|                                   | 9.375  | 115   | 129   | 123              | 6                  | 13   | 10               | 15                   | 18   | 18               | 22                 | 22   | 20               | 4                   | 4    | 9    |  |
|                                   |  | ( 122 $\pm$ 7.0 )   |       |                  | ( 10 $\pm$ 3.5 )   |      |                  | ( 17 $\pm$ 1.7 )     |      |                  | ( 21 $\pm$ 1.2 )   |      |                  | ( 6 $\pm$ 2.9 )     |      |      |  |
|                                   | 18.75  | 120   | 125   | 126              | 15                 | 11   | 12               | 20                   | 17   | 20               | 10                 | 17   | 13               | 8                   | 3    | 6    |  |
|                                   | ( 124 $\pm$ 3.2 )                              |   |       | ( 13 $\pm$ 2.1 ) |                    |      | ( 19 $\pm$ 1.7 ) |                      |      | ( 13 $\pm$ 3.5 ) |                    |      | ( 6 $\pm$ 2.5 )  |                     |      |      |  |
| 37.5                              | 137  | 119   | 109   | 14               | 12                 | 11   | 15               | 20                   | 14   | 12               | 17                 | 12   | 7                | 4                   | 5    |      |  |
|                                   | ( 122 $\pm$ 14.2 )                             |   |       | ( 12 $\pm$ 1.5 ) |                    |      | ( 16 $\pm$ 3.2 ) |                      |      | ( 14 $\pm$ 2.9 ) |                    |      | ( 5 $\pm$ 1.5 )  |                     |      |      |  |
| 75                                | 119  | 139   | 92    | 6                | 10                 | 18   | 11               | 20                   | 12   | 24               | 23                 | 18   | 8 *              | 4 *                 | 8 *  |      |  |
|                                   | ( 117 $\pm$ 23.6 )                             |   |       | ( 11 $\pm$ 6.1 ) |                    |      | ( 14 $\pm$ 4.9 ) |                      |      | ( 22 $\pm$ 3.2 ) |                    |      | ( 7 $\pm$ 2.3 )  |                     |      |      |  |
| 150                               | 119 *  | 121 *   | 117 * | 8 *              | 11 *               | 11 * | 18 *             | 9 *                  | 12 * | 19 *             | 12 *               | 19 * | 3 *              | 4 *                 | 4 *  |      |  |
|                                   | ( 119 $\pm$ 2.0 )                              |   |       | ( 10 $\pm$ 1.7 ) |                    |      | ( 13 $\pm$ 4.6 ) |                      |      | ( 17 $\pm$ 4.0 ) |                    |      | ( 4 $\pm$ 0.6 )  |                     |      |      |  |
| S9Mix<br>(+)                      | 0  | 127   | 129   | 125              | 20                 | 12   | 13               | 30                   | 26   | 26               | 37                 | 31   | 33               | 17                  | 12   | 18   |  |
|                                   |  | ( 127 $\pm$ 2.0 )   |       |                  | ( 15 $\pm$ 4.4 )   |      |                  | ( 27 $\pm$ 2.3 )     |      |                  | ( 34 $\pm$ 3.1 )   |      |                  | ( 16 $\pm$ 3.2 )    |      |      |  |
|                                   | 9.375  | ND  |       |                  | 12                 | 22   | 9                | ND                   |      |                  | ND                 |      |                  | ND                  |      |      |  |
|                                   |  |   |       |                  | ( 14 $\pm$ 6.8 )   |      |                  |                      |      |                  |                    |      |                  |                     |      |      |  |
|                                   | 18.75  | 139   | 138   | 136              | 15                 | 11   | 9                | 22                   | 25   | 20               | 32                 | 38   | 36               | 13                  | 13   | 19   |  |
|                                   |  | ( 138 $\pm$ 1.5 )   |       |                  | ( 12 $\pm$ 3.1 )   |      |                  | ( 22 $\pm$ 2.5 )     |      |                  | ( 35 $\pm$ 3.1 )   |      |                  | ( 15 $\pm$ 3.5 )    |      |      |  |
|                                   | 37.5   | 122   | 122   | 122              | 12                 | 17   | 13               | 19                   | 36   | 30               | 21                 | 29   | 31               | 18                  | 14   | 16   |  |
|                                   |  | ( 122 $\pm$ 0.0 )   |       |                  | ( 14 $\pm$ 2.6 )   |      |                  | ( 28 $\pm$ 8.6 )     |      |                  | ( 27 $\pm$ 5.3 )   |      |                  | ( 16 $\pm$ 2.0 )    |      |      |  |
|                                   | 75   | 121   | 137   | 131              | 7                  | 13   | 10               | 29                   | 13   | 21               | 28                 | 33   | 25               | 19                  | 15   | 14   |  |
|                                   | ( 130 $\pm$ 8.1 )                              |   |       | ( 10 $\pm$ 3.0 ) |                    |      | ( 21 $\pm$ 8.0 ) |                      |      | ( 29 $\pm$ 4.0 ) |                    |      | ( 16 $\pm$ 2.6 ) |                     |      |      |  |
| 150                               | 129  | 132   | 125   | 16               | 7                  | 18   | 27               | 21                   | 16   | 35               | 25                 | 23   | 11               | 11                  | 16   |      |  |
|                                   | ( 129 $\pm$ 3.5 )                              |   |       | ( 14 $\pm$ 5.9 ) |                    |      | ( 21 $\pm$ 5.5 ) |                      |      | ( 28 $\pm$ 6.4 ) |                    |      | ( 13 $\pm$ 2.9 ) |                     |      |      |  |
| 300                               | 138  | 115   | 140   | 10 *             | 6 *                | 11 * | 15 *             | 13 *                 | 11 * | 23 *             | 18 *               | 24 * | 19 *             | 8 *                 | 19 * |      |  |
|                                   | ( 131 $\pm$ 13.9 )                             |   |       | ( 9 $\pm$ 2.6 )  |                    |      | ( 13 $\pm$ 2.0 ) |                      |      | ( 22 $\pm$ 3.2 ) |                    |      | ( 15 $\pm$ 6.4 ) |                     |      |      |  |
| 600                               | 121 *  | 110 *   | 100 * | 6 *              | 0 *                | 0 *  | 12 *             | 21 *                 | 16 * | 20 *             | 18 *               | 26 * | 5 *              | 0 *                 | 0 *  |      |  |
|                                   | ( 110 $\pm$ 10.5 )                             |   |       | ( 2 $\pm$ 3.5 )  |                    |      | ( 16 $\pm$ 4.5 ) |                      |      | ( 21 $\pm$ 4.2 ) |                    |      | ( 2 $\pm$ 2.9 )  |                     |      |      |  |
| Positive control<br>S9 Mix (-)    | Chemical                                       | AF2   |       |                  | SA                 |      |                  | AF2                  |      |                  | AF2                |      |                  | 9AA                 |      |      |  |
|                                   | Dose ( $\mu\text{g}$ /plate)                   | 0.01  |       |                  | 0.5                |      |                  | 0.01                 |      |                  | 0.1                |      |                  | 80                  |      |      |  |
| Positive control<br>S9 Mix (+)    | Chemical                                       | 2AA   |       |                  | 2AA                |      |                  | 2AA                  |      |                  | 2AA                |      |                  | 2AA                 |      |      |  |
|                                   | Dose ( $\mu\text{g}$ /plate)                   | 1   |       |                  | 2                  |      |                  | 10                   |      |                  | 0.5                |      |                  | 2                   |      |      |  |
| S9 Mix (+)                        | Number of colonies / plate                     | 549   | 573   | 569              | 321                | 293  | 300              | 166                  | 160  | 163              | 854                | 888  | 805              | 1711                | 1713 | 1769 |  |
|                                   |  | ( 564 $\pm$ 12.9 )  |       |                  | ( 305 $\pm$ 14.6 ) |      |                  | ( 163 $\pm$ 3.0 )    |      |                  | ( 849 $\pm$ 41.7 ) |      |                  | ( 1731 $\pm$ 32.9 ) |      |      |  |
| S9 Mix (+)                        | Number of colonies / plate                     | 1211  | 1017  | 1138             | 254                | 316  | 323              | 1612                 | 1784 | 1893             | 531                | 422  | 444              | 279                 | 259  | 233  |  |
|                                   |  | ( 1122 $\pm$ 98.0 )   |       |                  | ( 298 $\pm$ 38.0 ) |      |                  | ( 1763 $\pm$ 141.7 ) |      |                  | ( 466 $\pm$ 57.6 ) |      |                  | ( 257 $\pm$ 23.1 )  |      |      |  |

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide , SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

\*: Inhibition was observed against growth of the bacteria. ND: Not done

\*\* : Purity was 99.6 % and 2,5-dichlorotoluene (0.13%), 2,4-dichlorotoluene (0.07 %), 2,3-dichlorotoluene (0.05 %), 3,4-dichlorotoluene (0.01 %) and 3,5-dichlorotoluene (0.01 %) were contained as impurity.