

# 最終報告書

4-chlorobenzoyl chloride の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：9050 ( 115-201 )

平成 18 年 9 月 11 日

試験委託者  
厚生労働省 医薬食品局

財団法人 食品農医薬品安全性評価センター

目 次

1. 要約.....	4
12. 被験物質.....	7
13. 試験材料および方法.....	9
14. 試験結果.....	17
15. 考察および結論.....	19
16. 参考文献.....	20

Figures

Figure 1	Dose-finding study of 4-chlorobenzoyl chloride in strain TA100.....	22
Figure 2	Dose-finding study of 4-chlorobenzoyl chloride in strain TA1535.....	23
Figure 3	Dose-finding study of 4-chlorobenzoyl chloride in strain WP2 <i>uvrA</i> .....	24
Figure 4	Dose-finding study of 4-chlorobenzoyl chloride in strain TA98.....	25
Figure 5	Dose-finding study of 4-chlorobenzoyl chloride in strain TA1537.....	26
Figure 6	Bacterial reverse mutation test of 4-chlorobenzoyl chloride in strain TA100.....	27
Figure 7	Bacterial reverse mutation test of 4-chlorobenzoyl chloride in strain TA1535.....	28
Figure 8	Bacterial reverse mutation test of 4-chlorobenzoyl chloride in strain WP2 <i>uvrA</i> .....	29
Figure 9	Bacterial reverse mutation test of 4-chlorobenzoyl chloride in strain TA98.....	30
Figure 10	Bacterial reverse mutation test of 4-chlorobenzoyl chloride in strain TA1537.....	31

Figure 11	Bacterial reverse mutation test of 4-chlorobenzoyl chloride in strain TA1537 (Additional study).....	32
Tables		
Table 1	Summary data on dose-finding study of 4-chlorobenzoyl chloride [Non-activation method: -S9].....	33
Table 2	Summary data on dose-finding study of 4-chlorobenzoyl chloride [Activation method: +S9].....	34
Table 3	Summary data on bacterial reverse mutation test of 4-chlorobenzoyl chloride [Non-activation method: -S9].....	35
Table 4	Summary data on bacterial reverse mutation test of 4-chlorobenzoyl chloride [Activation method: +S9].....	36
Table 5	Summary data on bacterial reverse mutation test of 4-chlorobenzoyl chloride (Additional study) [Non-activation method: -S9].....	37

## 1. 要約

当該試験条件下において、4-chlorobenzoyl chloride には遺伝子突然変異を誘起する作用がないものと判断した。

4-chlorobenzoyl chloride の遺伝子突然変異誘発性を検討するため、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100 株, TA98 株, TA1535 株および TA1537 株ならびに大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2uvrA 株を用いた復帰突然変異試験を行った。

その結果、4-chlorobenzoyl chloride 処理では、3.91~5000  $\mu\text{g}$ /プレートのいずれの用量においても、ラット肝マイクロソーム (S9) 添加の有無にかかわらず、陰性対照の2倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

一方、陽性対照物質は、各試験菌株に対し明確な突然変異誘発作用を示した。

また、用量設定試験、本試験および追加試験により、試験結果の再現性が確認された。

12. 被験物質

12.1. 被験物質名

4-chlorobenzoyl chloride

12.2. ロット番号

12.3. 純度

99.14%

12.4. 不純物の名称および濃度

3-chlorobenzoyl chloride (MCOC) : 0.59%

2-chlorobenzoyl chloride (OCOC) : 0.24%

12.5. 提供元

12.6. 製造年月日

2005年3月9日

12.7. 使用期限

2005年9月9日

12.8. 保存条件

密閉, 室温 (1~30°C)

12.9. 保存場所

安評センター被験物質保管庫 (H-3 : 23.3~25.3°C, 2005年3月15日~2005年6月20日 ; C-3 : 22.1~26.6°C, 2005年6月20日~2005年8月25日 ; 7号館2階)

12.10. 化学名

4-クロロベンゾイルクロリド

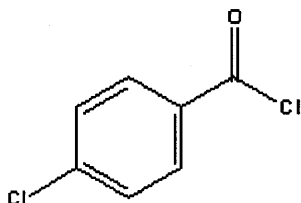
4-chlorobenzoyl chloride

p-chlorobenzoyl chloride

12.11. CAS No.

122-01-0

12.12. 化学構造



- 12.13. 分子式  
C<sub>7</sub>H<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>O
- 12.14. 分子量  
175.01
- 12.15. 物質の状態  
無色液体
- 12.16. 融点/沸点  
融点：12~14°C/沸点：222°C
- 12.17. 溶解性  
アセトンに易溶（溶解度：656 mg/mL）  
メタノール，エタノール，DMSO，DMF，エーテル，ケトン，トルエンに易溶，水に難溶
- 12.18. 蒸気圧  
110°C/20 mmHg
- 12.19. 比重  
1.377/20°C
- 12.20. 臭気  
強い刺激臭
- 12.21. 取り扱い上の注意  
適切な保護具（マスク・手袋等）を着用し，吸い込んだり，目，皮膚および衣類に触れたりしないようにした。
- 12.22. 毒性  
急性経口毒性（雄ラット） ; LD<sub>50</sub> 820 mg/kg  
急性経口毒性（雄マウス） ; LD<sub>50</sub> 325 mg/kg  
刺激性 ; 皮膚刺激，眼刺激（催涙性），粘膜刺激他  
感作性 ; 腐食性
- 12.23. 残余被験物質の処理  
実験終了後，1 g を資料保存施設管理責任者の管理下で安評センターに保存し，残りは安定性分析のため，被験物質等管理責任者を介して提供元に返却した．分析の結果（2005年9月2日付報告），被験物質が安定であることが確認された。

### 13. 試験材料および方法

#### 13.1. 試験菌株

細菌を用いる復帰突然変異試験において遺伝毒性ガイドラインでは試験菌株が指定されていることから、試験菌株として次の5種類の菌株を使用した。

ネズミチフス菌	TA100	(ヒスチジン要求性の塩基対置換型)
ネズミチフス菌	TA98	(ヒスチジン要求性のフレームシフト型)
ネズミチフス菌	TA1535	(ヒスチジン要求性の塩基対置換型)
ネズミチフス菌	TA1537	(ヒスチジン要求性のフレームシフト型)
大腸菌	WP2 $uvrA$	(トリプトファン要求性の塩基対置換型)

ネズミチフス菌は1983年9月9日にカリフォルニア大学から、また、大腸菌については1983年3月16日に国立衛生試験所(現 国立医薬品食品衛生研究所)から分与を受けた。

2004年9月6日～同年9月9日に菌株の特性検査を実施し、規定の特性を保持している菌株を試験に使用した。各菌株の菌懸濁液にジメチルスルホキシド(DMSO, GC用, 純度99.9%, Lot No. K30049278, Merck)を容量比80:7の割合で添加した後、凍結保存用チューブに0.2 mLずつ分注した。これを液体窒素を用いて凍結した後、超低温フリーザー(MDF-U71V, 三洋電機バイオメディカ; 設定値:-80°C, 基準値:-60°C以下)に保存した。

#### 13.2. 培地の調製

##### 13.2.1. 最少グルコース寒天平板培地(プレート)

テスメディア AN 培地(2005年3月8日製造, Lot No. ANI200CU, オリエンタル酵母工業)を試験に使用した。本プレートは, Vogel-Bonner 最少培地 E を含む溶液 30 mL を無菌的にシャーレに分注したものである。

最少グルコース寒天平板培地の組成を以下に示した。

硫酸マグネシウム七水和物	0.2	g
クエン酸一水和物	2	g
リン酸水素二カリウム	10	g
リン酸二水素アンモニウム	1.92	g
水酸化ナトリウム	0.66	g
D(+) グルコース	20	g
寒天 (BA-30A, Lot No. 40721, 伊那食品工業)	10.5	g
精製水	1000	mL

13.2.2. トップアガー

塩化ナトリウム 0.5 w/v%および寒天 (Bacto-agar, Lot No. 3069265, BD Diagnostic Systems) 0.6 w/v%を含む水溶液をオートクレーブで滅菌した。ネズミチフス菌を用いる試験の場合、0.5 mmol/L L-ヒスチジン (Lot No. 308C2055, 関東化学) および 0.5 mmol/L D-ビオチン (Lot No. 301C2275, 関東化学) 水溶液を寒天溶液 10 容量に対し 1 容量加え、大腸菌を用いる試験の場合、0.5 mmol/L L-トリプトファン (Lot No. 008D2026, 関東化学) 水溶液を同じく 1 容量加えた。

13.3. 試験菌株の前培養

内容量 200 mL のバツフル付三角フラスコに 2.5 w/v%ニュートリエントブロス (Nutrient Broth No. 2, Lot No. 298714, Oxoid) 培養液を 25 mL 分注し、これに融解した菌懸濁液を 50  $\mu$ L 接種した。フラスコをクールバスシェーカー (ML-10F, タイテック) に設置し、培養開始までの間、設定温度 4°C に静置した。その後、37°C の条件で 8 時間振盪 (100 回/分) 培養した。試験毎に菌株の培養を実施し、菌懸濁液は培養終了後速やかに使用した。

ATPフォトメーター (ルミテスターK-100, キッコーマン) を用い、試験菌株の生菌数が  $1.0 \times 10^9$  /mL以上であることを確認した。生菌数を次の表に示した。

試験	生菌数 ( $\times 10^9$ /mL)				
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
用量設定試験	2.72	2.67	3.26	2.41	1.47
本試験	4.05	3.85	4.33	4.09	2.04
追加試験	—	—	—	—	1.72

13.4. S9 mix

製造後 6 ヶ月以内の S9 mix (Lot No. FSM-520, キッコーマン) を試験に使用した。使用時まで超低温フリーザー (設定値: -80°C, 基準値: -60°C 以下) に保存した。

13.4.1. S9 の調製方法

S9 調製の際の動物種, 性, 臓器, 誘導物質ならびに誘導方法等を次の表に示した。



ロット番号	RAA-520
製造年月日	2005年4月28日 (誘導物質投与開始後5日目)
使用動物	ラット: Sprague-Dawley 系
性/週齢	雄/7週齢
体重	193~237 g
臓器	肝臓
誘導物質	Phenobarbital (PB) および 5,6-Benzoflavone (BF)
投与量および 投与回数	PB: 30 mg/kg 1回 (1日目) 60 mg/kg 3回 (2~4日目) BF: 80 mg/kg 1回 (3日目)
投与方法	腹腔内投与
蛋白含量	24.86 mg/mL

## 13.4.2. S9 mix の組成

S9 mix 1 mL 中の量を以下に示した.

S9	0.1	mL
MgCl <sub>2</sub>	8	μmol
KCl	33	μmol
G-6-P	5	μmol
NADPH	4	μmol
NADH	4	μmol
Na-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100	μmol

## 13.5. 被験物質液の調製

本被験物質は水に難溶で DMSO およびアセトンに易溶であるが, DMSO と混合すると, 直ちに反応して発熱, 結晶を生じる. アセトン中では短時間 (調製後 50 分以内) であれば安定 (発熱, 発色, 発煙等の変化がない) である. したがって, 溶媒にはモレキュラーシーブを用いて脱水処理を行ったアセトン (分光分析用, 含量 100.0%, Lot No. 501F1723, 関東化学) を使用し, 調製液は調製後 50 分以内に使用した.

用量設定試験では, 使用直前に被験物質 600 mg を目盛付き試験管に精密に量り, 約 2 mL のアセトン (使用溶媒) を加え, 攪拌しながら溶解させた. さらに, アセトンを加えて 3 mL に定容し, 調製原液 (200 mg/mL 溶液) を準備した. アセトン 1.5 mL にこの 200 mg/mL 調製原液 1 mL を加えることにより, 80.0 mg/mL 溶液を調製した. 以下同様な希釈を順次行うことにより, 32.0, 12.8, 5.12, 2.05, 0.819 および 0.328 mg/mL

溶液を調製した。

本試験では、使用直前に被験物質 120 mg を目盛付き試験管に精密に量り、約 2 mL のアセトンを加え、攪拌しながら溶解させた。さらに、アセトンを加えて 3 mL に定容し、調製原液 (40.0 mg/mL 溶液) を準備した。アセトン 1.5 mL にこの 40.0 mg/mL 調製原液 1.5 mL を加えることにより、20.0 mg/mL 溶液を調製した。以下同様な希釈を順次行うことにより、10.0, 5.00, 2.50, 1.25, 0.625, 0.313 および 0.156 mg/mL 溶液を調製した。

追加試験では、使用直前に被験物質 30 mg を目盛付き試験管に精密に量り、約 2 mL のアセトンを加え、攪拌しながら溶解させた。さらに、アセトンを加えて 3 mL に定容し、調製原液 (10.0 mg/mL 溶液) を準備した。アセトン 1 mL にこの 10.0 mg/mL 調製原液 1 mL を加えることにより、5.00 mg/mL 溶液を調製した。以下同様な希釈を順次行うことにより、2.50, 1.25, 0.625, 0.313 および 0.156 mg/mL 溶液を調製した。

### 13.6. 対照群

#### 13.6.1. 陰性 (溶媒) 対照

被験物質の溶媒であるアセトンを使用した。

#### 13.6.2. 陽性対照

調製済み陽性対照物質溶液 (保証期限: 2006 年 9 月 1 日, オリエンタル酵母工業) を試験に使用した。使用時まで超低温フリーザー (設定値:  $-80^{\circ}\text{C}$ , 基準値:  $-60^{\circ}\text{C}$  以下) に保存した。陽性対照物質名および用量等を以下に示した。

AF-2 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

NaN<sub>3</sub> アジ化ナトリウム

9-AA 9-アミノアクリジン塩酸塩

2-AA 2-アミノアントラセン

《代謝活性化系非存在下：-S9 処理》

菌株	化合物名	陽性対照調製日	用量 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	陽性対照溶液濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	ロット番号
ネズミチフス菌 TA100	AF-2	2005.2.3	0.01	0.1	050203AF01
ネズミチフス菌 TA98	AF-2	2005.2.3	0.1	1.0	050203AF10
ネズミチフス菌 TA1535	$\text{NaN}_3$	2005.2.2	0.5	5.0	050202N
ネズミチフス菌 TA1537	9-AA	2005.2.3	80	800	050203A9
大腸菌 WP2 <i>uvrA</i>	AF-2	2005.2.3	0.01	0.1	050203AF01

《代謝活性化系存在下：+S9 処理》

ネズミチフス菌 TA100	2-AA	2005.2.2	1.0	10	050202A210
ネズミチフス菌 TA98	2-AA	2005.2.2	0.5	5.0	050202A205
ネズミチフス菌 TA1535	2-AA	2005.2.2	2.0	20	050202A220
ネズミチフス菌 TA1537	2-AA	2005.2.2	2.0	20	050202A220
大腸菌 WP2 <i>uvrA</i>	2-AA	2005.2.2	10	100	050202A2100

なお、これらの用量は「安衛法における変異原性試験—テストガイドラインと GLP」(労働省安全衛生部化学物質調査課編, 1991 年) に準じて設定した。

13.6.3. 無菌試験

被験物質液 (調製原液) ならびに S9 mix については無菌試験を実施した。すなわち、調製原液 25  $\mu\text{L}$  あるいは S9 mix 500  $\mu\text{L}$  にトップアガーを 2 mL 添加し、プレート上に注いだ。37°C の条件で 48 時間培養した後、雑菌汚染の有無を確認した。調製原液および S9 mix のいずれについても 2 枚のプレートを用いて無菌試験を実施した。

4-chlorobenzoyl chloride 調製原液ならびに S9 mix の無菌試験において、菌の増殖は認められなかった。

13.7. 用量設定試験 (予備試験)

13.7.1. 用量

ガイドライン上定められた最高用量である 5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  を最高用量とし、以下 2000, 800, 320, 128, 51.2, 20.5 および 8.19  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の計 8 用量を設定した。

13.7.2. 使用プレート数および識別方法

用量当たり 3 枚のプレートを用いた。

油性インクを用いて試験菌株, S9 mix の有無および用量を明記することにより各プレートを識別した.

#### 13.7.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

試験管に, 陰性対照および被験物質処理の場合は使用溶媒あるいは被験物質液を 25  $\mu$ L, 陽性対照物質処理の場合は陽性対照物質溶液 100  $\mu$ L を添加した. 次いで代謝活性化系非存在下 (-S9 処理) の場合, 0.1 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液 (pH 7.4) を 500  $\mu$ L, 代謝活性化系存在下 (+S9 処理) の場合, S9 mix を 500  $\mu$ L 分注した. さらに前培養した試験菌株懸濁液 100  $\mu$ L を加えた後, ウォーターバスシェーカー (M-100<sup>N</sup> および MM-10, タイテック) を用いて 37°C の条件で 20 分間振盪 (120 回/分, プレインキューベーション) した. 振盪終了後, トップアガー 2 mL を添加し, 内容物を混合した. その後, 混合液をプレート上に注ぎ一様に広げた. 恒温器 (SSV-R11DA, 池田理化) を用い, 各プレートを 37°C の条件で 48 時間培養した.

#### 13.7.4. 析出等の観察

各処理法において, 処理開始時およびコロニー数計測時に被験物質析出等の有無を肉眼で観察した.

#### 13.7.5. コロニー数計測

被験物質の生育阻害作用を確認するため, プレート上の試験菌株 (背景菌) の生育状態について実体顕微鏡 ( $\times 40$ ) を用いて観察した. 次いで, 復帰突然変異により生じたコロニー数を計数した. 計測に際しては, コロニーアナライザー (CA-11, システムサイエンス) を用い, 面積補正ならびに数え落とし補正を実施してコロニー数を算出した. ただし, 被験物質の析出によりコロニーアナライザーの使用が不適当な場合は, 目視でコロニー数を計数した.

### 13.8. 本試験

#### 13.8.1. 用量

用量設定試験の結果, 全ての試験菌株において生育阻害が認められた. また, 変異原性は認められなかった. したがって, 本試験では生育阻害が認められると考えられる用量を最高用量とし, 次の表に示した 7 用量 (公比 2) を設定した.

《代謝活性化系非存在下：-S9 処理》

菌株	用量 (μg/プレート)						
TA100	7.81	15.6	31.3	62.5	125	250	500
TA1535	7.81	15.6	31.3	62.5	125	250	500
WP2 <i>uvrA</i>	15.6	31.3	62.5	125	250	500	1000
TA98	7.81	15.6	31.3	62.5	125	250	500
TA1537	3.91	7.81	15.6	31.3	62.5	125	250

《代謝活性化系存在下：+S9 処理》

菌株	用量 (μg/プレート)						
TA100	15.6	31.3	62.5	125	250	500	1000
TA1535	15.6	31.3	62.5	125	250	500	1000
WP2 <i>uvrA</i>	15.6	31.3	62.5	125	250	500	1000
TA98	15.6	31.3	62.5	125	250	500	1000
TA1537	15.6	31.3	62.5	125	250	500	1000

13.8.2. 使用プレート数および識別方法

13.7.2.に記載した方法に準じた。

13.8.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

13.7.3.に記載した方法に準じた。

13.8.4. 析出等の観察

13.7.4.に記載した方法に準じた。

13.8.5. コロニー数計測

13.7.5.に記載した方法に準じた。

13.9. 追加試験

用量設定試験において、-S9 処理の TA1537 株では生育阻害が低用量まで認められ、生育阻害を示さない用量が 4 用量に満たなかった。したがって、本試験の結果の再現性を確認するため、-S9 処理の TA1537 株についてのみ追加試験を実施した。

13.9.1. 用量

13.8.1.に記載した用量で-S9 処理の TA1537 株について実施した。

13.9.2. 使用プレート数および識別方法

13.7.2.に記載した方法に準じた。

13.9.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

13.7.3.に記載した方法に準じた。ただし、プレインキュベーションはウォーターバスシェーカー (M-100<sup>N</sup>) を用い、プレートの培養には恒温器 (ILL-60, 池田理化) を用いた。

13.9.4. 析出等の観察

13.7.4.に記載した方法に準じた。

13.9.5. コロニー数計測

13.7.5.に記載した方法に準じた。

13.10. 試験成立条件

陰性対照および陽性対照の平均復帰変異コロニー数は背景データから求めた基準値内であること。陽性対照のコロニー数は同時陰性対照値の2倍を越えること。以上の条件を満たした場合に試験は成立したと判断した。

13.11. 結果の解析

復帰変異コロニー数が陰性対照の2倍以上に増加し、かつその増加に用量依存性あるいは再現性が認められた場合に陽性と判定した。

統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

## 14. 試験結果

### 14.1. 用量設定試験

結果を Figure 1~5 および Table 1, 2 に示した.

4-chlorobenzoyl chloride 処理の場合, -S9 処理ならびに+S9 処理のいずれの試験菌株においても, 復帰変異コロニー数の増加は認められなかった. 試験菌株に対する生育阻害作用は-S9 処理および+S9 処理の全ての菌株において認められ, -S9 処理の TA1537 株では生育阻害を示さない用量が 4 用量に満たなかった.

一方, 陽性対照物質は, 各試験菌株に対して復帰突然変異を顕著に誘発した.

### 14.2. 被験物質の析出等 (用量設定試験)

処理開始時に, -S9 処理では 800  $\mu\text{g}$ /プレート以上の用量で透明油滴状の析出物が認められた. +S9 処理では 800  $\mu\text{g}$ /プレート以上の用量で白色粉末状の析出物および白濁が認められ, さらに 5000  $\mu\text{g}$ /プレートの用量では白色膜状の析出物も認められた.

コロニー数計測時には, -S9 処理では 800  $\mu\text{g}$ /プレート以上の用量で白色粉末状の析出物が認められた. +S9 処理では 320  $\mu\text{g}$ /プレート以上の用量で白色粉末状および繊維状の析出物が認められ, さらに 2000  $\mu\text{g}$ /プレート以上の用量では白色膜状の析出物が, 5000  $\mu\text{g}$ /プレートの用量では白色塊状の析出物が認められた.

析出物の影響により, -S9 処理の 800  $\mu\text{g}$ /プレート以上の用量および+S9 処理の 320  $\mu\text{g}$ /プレート以上の用量ではコロニーアナライザーの使用が不相当であったため, 目視でコロニーを計数した.

### 14.3. 本試験

結果を Figure 6~10 および Table 3, 4 に示した.

4-chlorobenzoyl chloride 処理の場合, -S9 処理ならびに+S9 処理のいずれの試験菌株においても, 復帰変異コロニー数の増加は認められなかった. また, 試験菌株に対する生育阻害作用は, 両処理の全ての菌株において高用量で認められた.

一方, 陽性対照物質は, 各試験菌株に対して復帰突然変異を顕著に誘発した.

### 14.4. 被験物質の析出等 (本試験)

処理開始時に, -S9 処理では 500  $\mu\text{g}$ /プレート以上の用量で透明油滴状の析出物が認められ, +S9 処理では 1000  $\mu\text{g}$ /プレートの用量で白色粉末状の析出物および白濁が認められた.

コロニー数計測時には, -S9 処理では 1000  $\mu\text{g}$ /プレートの用量で白色粉末状の析出物が認められ, +S9 処理では 250  $\mu\text{g}$ /プレート以上の用量で白色粉末状および繊維状の析出物が認められた.

析出物の影響により、-S9 処理の 1000 µg/プレート の用量および+S9 処理の 250 µg /プレート以上の用量ではコロニーアナライザーの使用が不適當であったため、目視でコロニーを計数した。

**14.5. 追加試験**

結果を Figure 11 および Table 5 に示した。

4-chlorobenzoyl chloride 処理の場合、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、試験菌株に対する生育阻害作用は高用量で認められた。

一方、陽性対照物質は、試験菌株に対して復帰突然変異を顕著に誘発した。

**14.6. 被験物質の析出等 (追加試験)**

処理開始時およびコロニー数計測時に、析出等の変化は観察されなかった。

以上、用量設定試験、本試験および追加試験により、代謝活性化系非存在下および代謝活性化系存在下の両処理法において再現性が確認された。



## 15. 考察および結論

4-chlorobenzoyl chloride の遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため、細菌（ネズミチフス菌・大腸菌）を用いたプレインキュベーション法による復帰突然変異試験を実施した。

ガイドライン上定められた最高用量である 5000 µg/プレートまで検討した結果、4-chlorobenzoyl chloride 処理群では、代謝活性化系非存在下および代謝活性化系存在下のいずれにおいても、陰性対照の 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

これら両処理法での試験結果は、用量設定試験、本試験および追加試験により再現性が確認された。

これまでに 4-chlorobenzoyl chloride の遺伝毒性について細菌を用いる復帰突然変異試験で陰性<sup>1)</sup>と報告されているが、発がん性の報告はない。

また、異性体である 2-chlorobenzoyl chloride または 3-chlorobenzoyl chloride の遺伝毒性ならびに発がん性に関する報告も検索した限り認められなかった。類縁体である p-chlorobenzyl chloride については、細菌を用いる復帰突然変異試験で陰性<sup>1)</sup>と報告されている。また、p-chlorobenzotrichloride については、細菌を用いる復帰突然変異試験で陽性<sup>1)</sup> (+S9 処理の TA100 株, TA98 株, TA1535 株, TA1537 株および WP2*uvrA* 株), CHL 細胞を用いた染色体異常試験で構造異常が陽性<sup>1)</sup> (短時間処理法-S9 および+S9 処理ならびに連続処理法 24 時間および 48 時間処理) と報告されている。

なお、陰性対照および陽性対照の平均復帰変異コロニー数は、いずれも当施設の背景データ (Appendix 1) から求めた基準値内であり、試験成立条件を満たしたことから、当該試験は適切な条件で実施されたものと判断された。

以上の試験結果から、当該試験条件下において、4-chlorobenzoyl chloride の細菌に対する遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

16. 参考文献

- 1) 労働省 労働基準局 安全衛生部 化学物質調査課監修 “労働安全衛生法 有害性調査制度に基づく 既存化学物質 変異原性試験データ集”, 日本化学物質安全・情報センター, 1996.

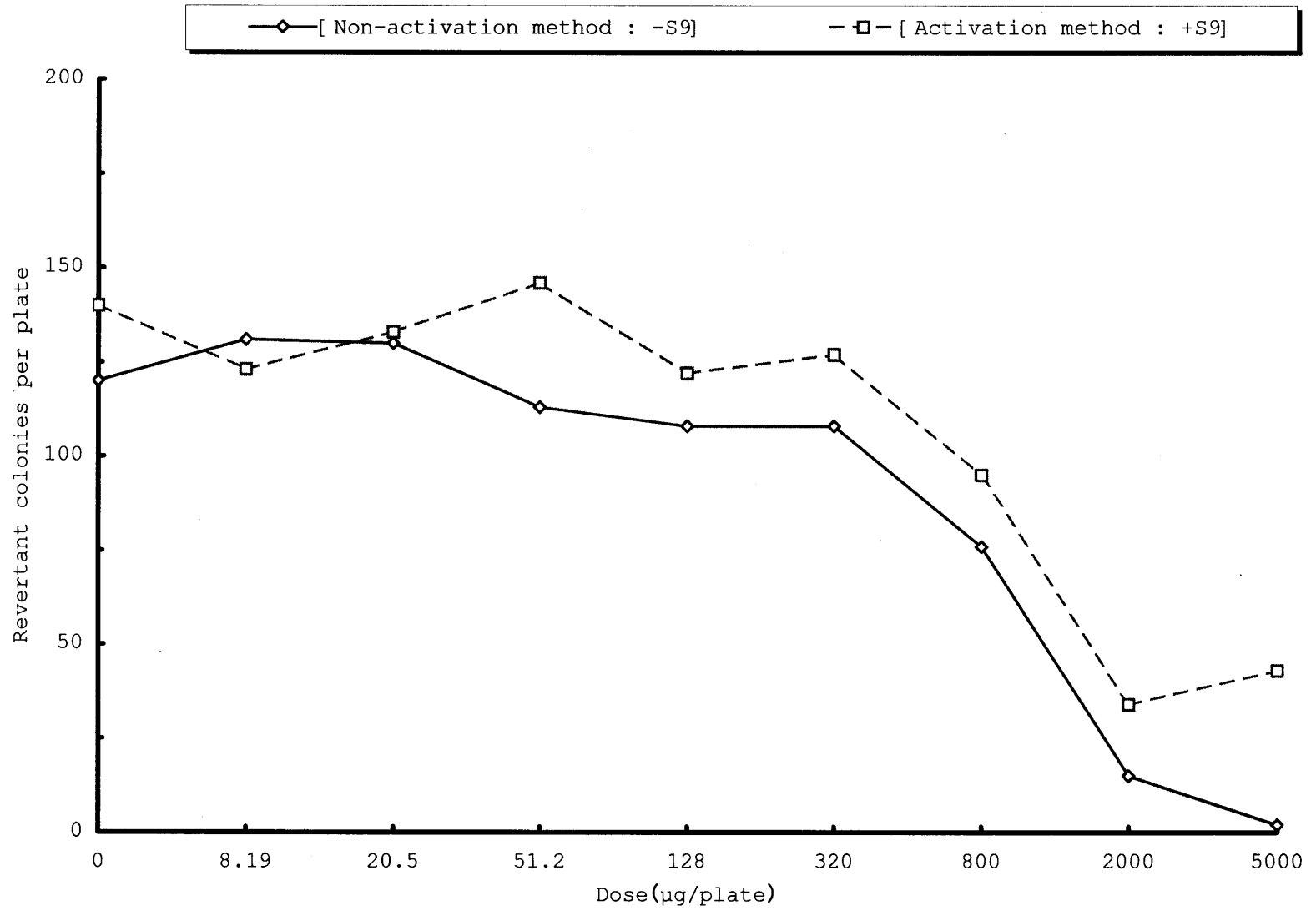


Figure 1. Dose-finding study of 4-chlorobenzoyl chloride in strain TA100

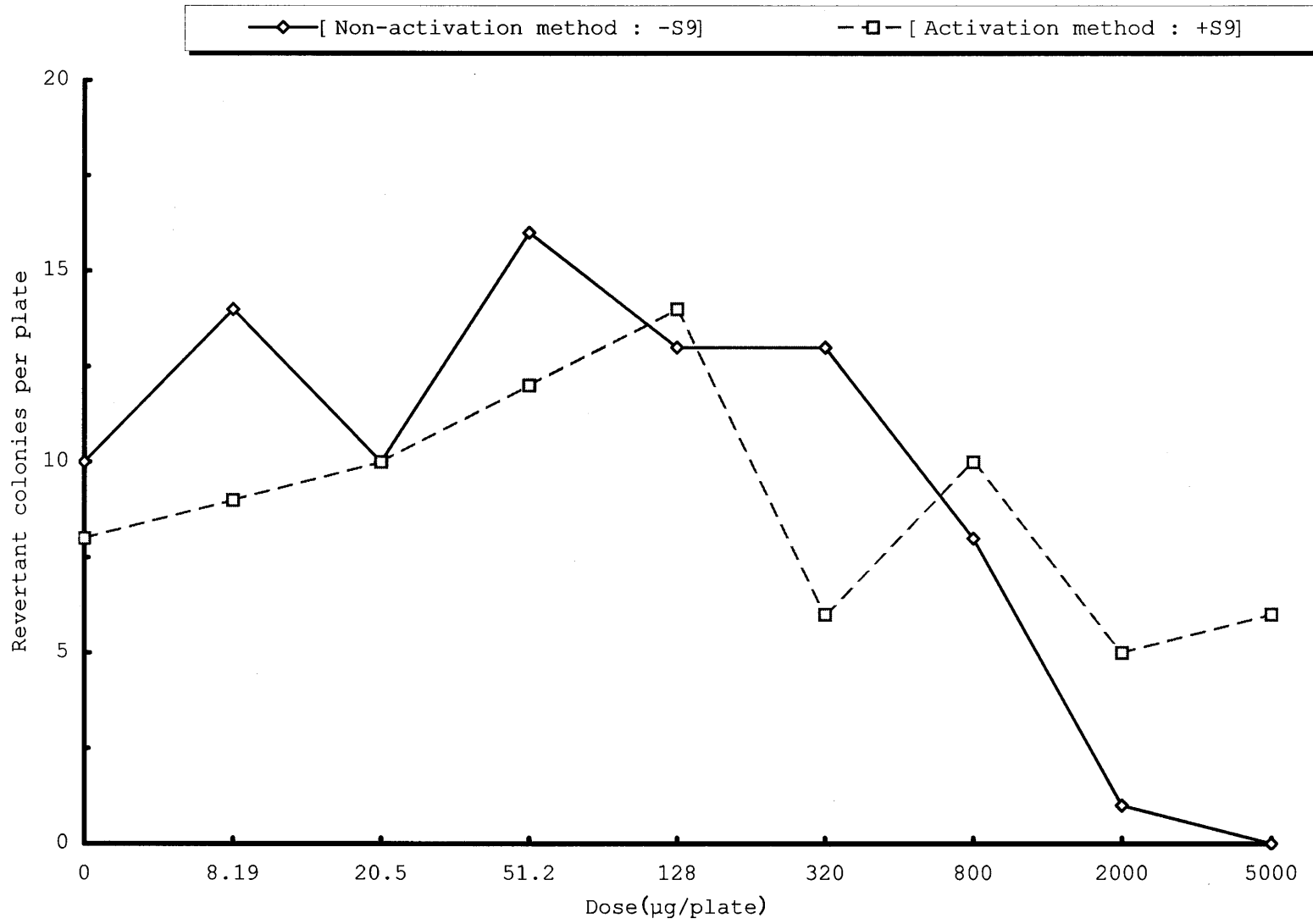


Figure 2. Dose-finding study of 4-chlorobenzoyl chloride in strain TA1535

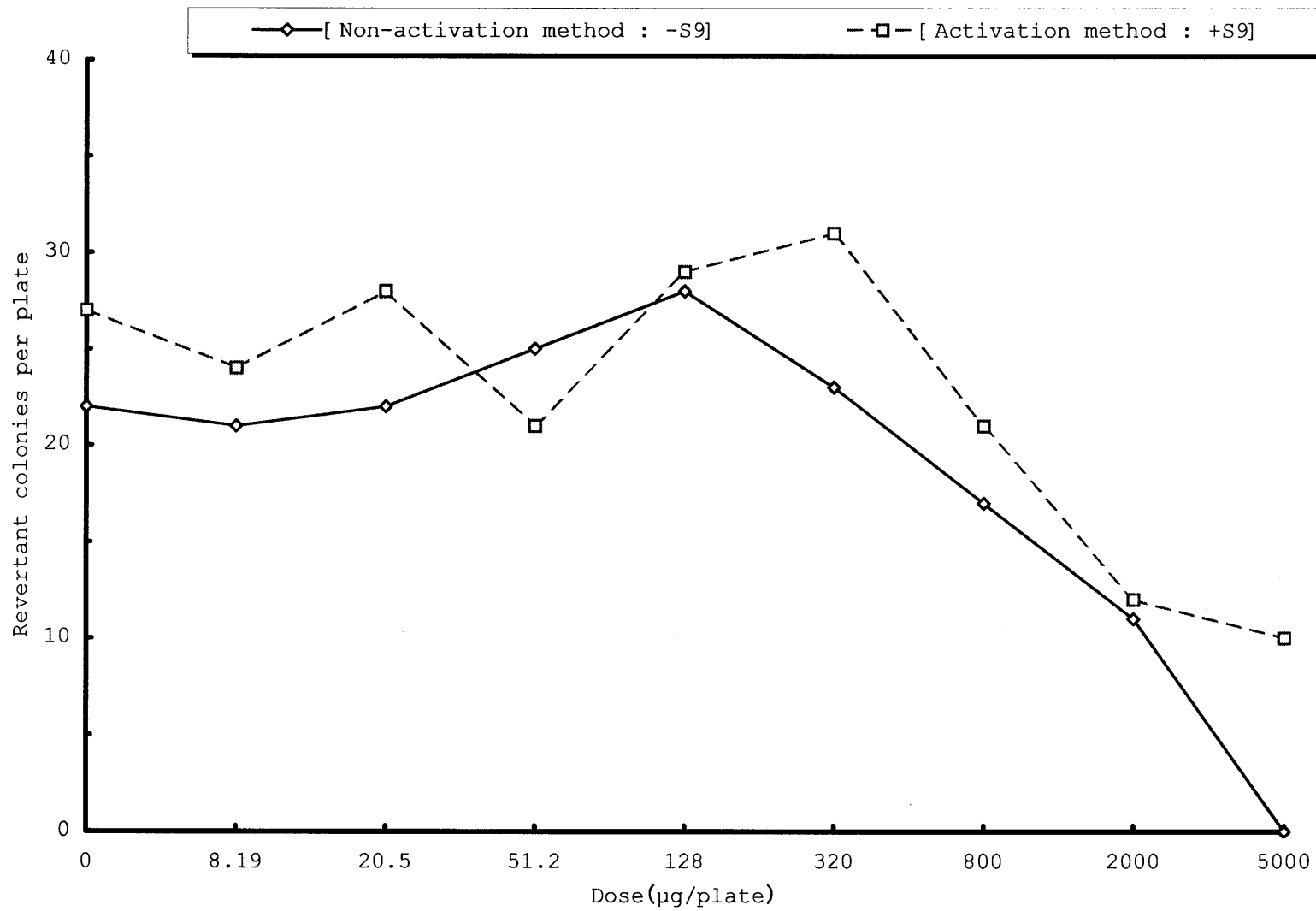


Figure 3. Dose-finding study of 4-chlorobenzoyl chloride in strain WP2uvrA

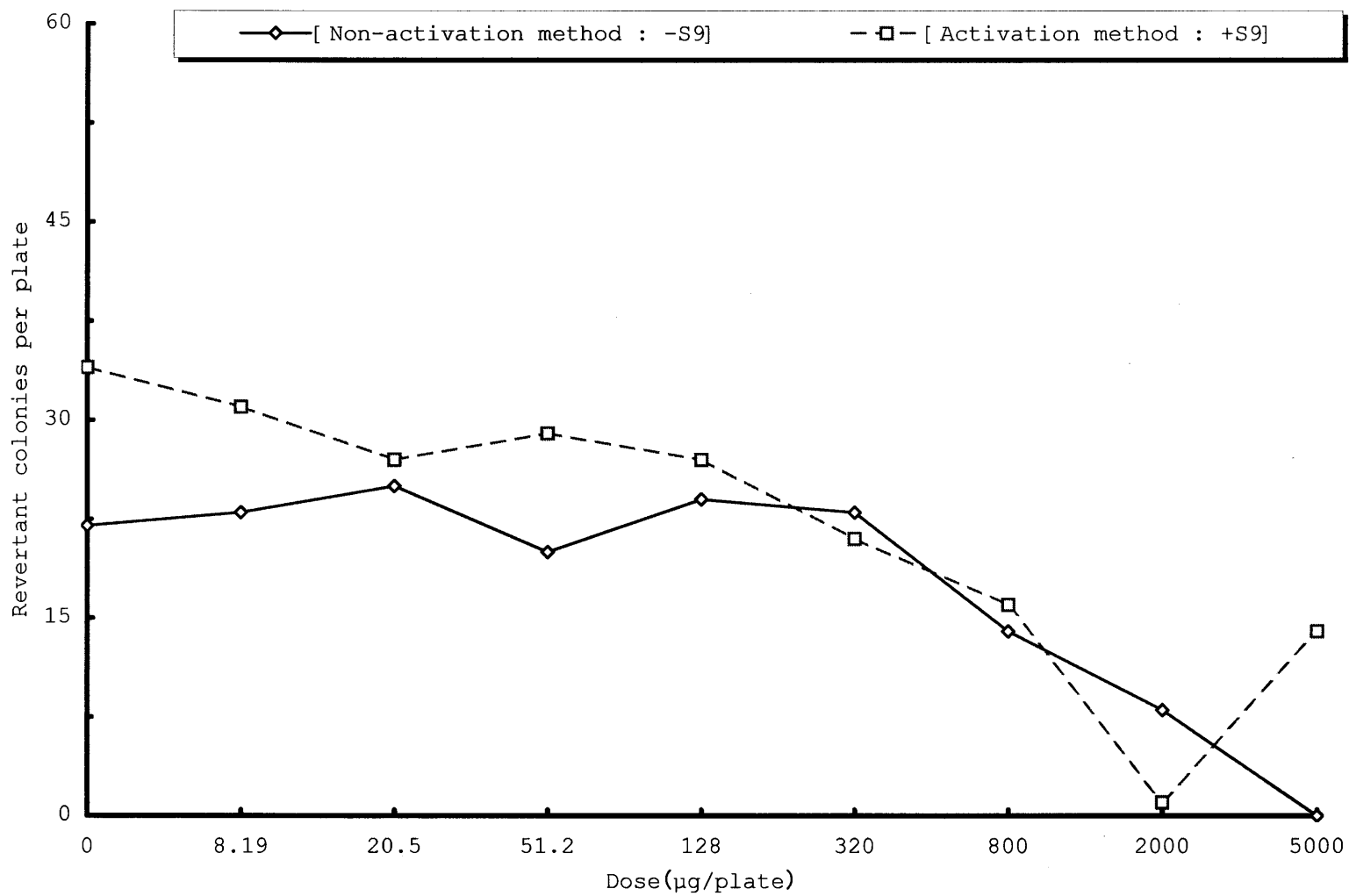


Figure 4. Dose-finding study of 4-chlorobenzoyl chloride in strain TA98

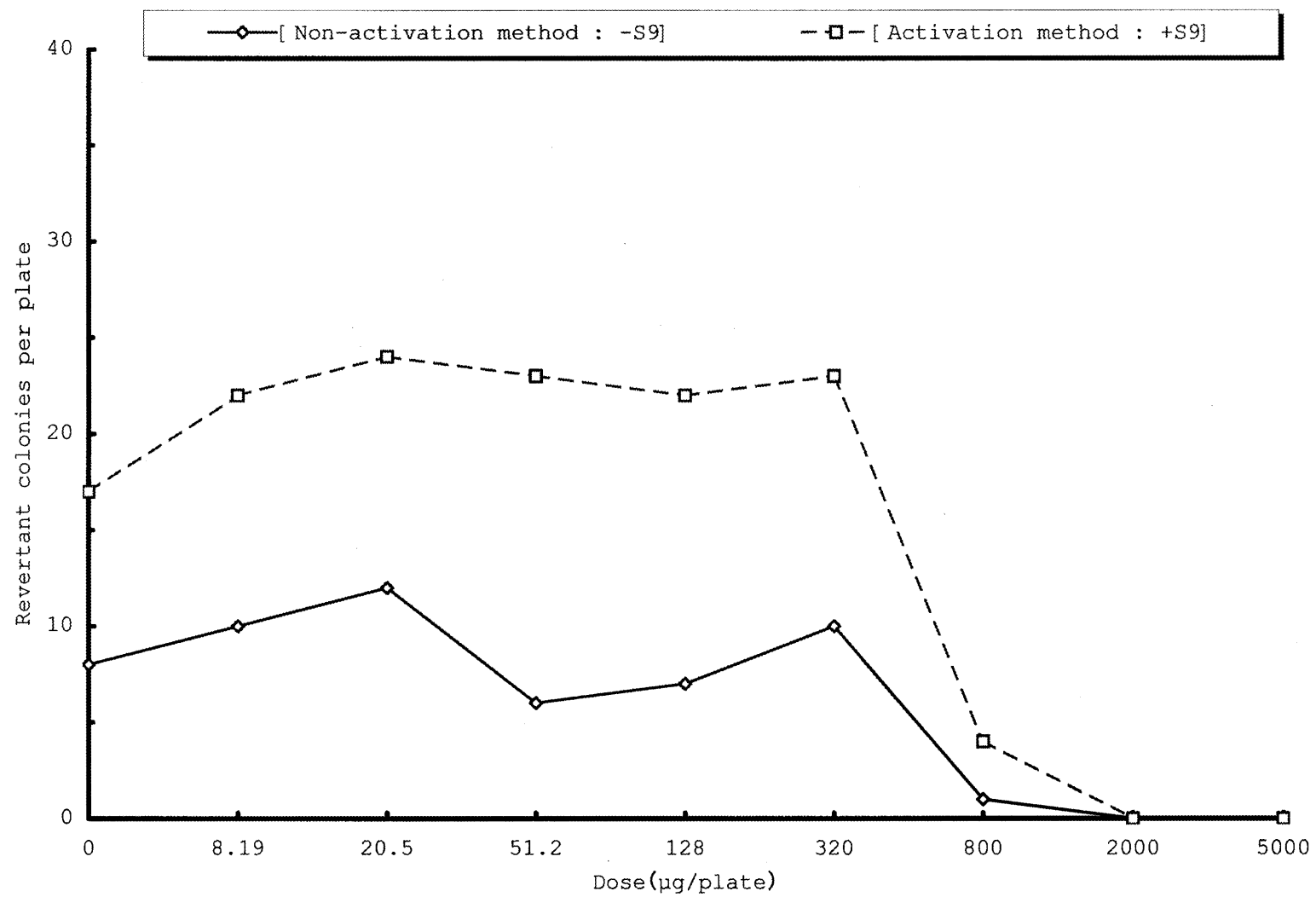


Figure 5. Dose-finding study of 4-chlorobenzoyl chloride in strain TA1537

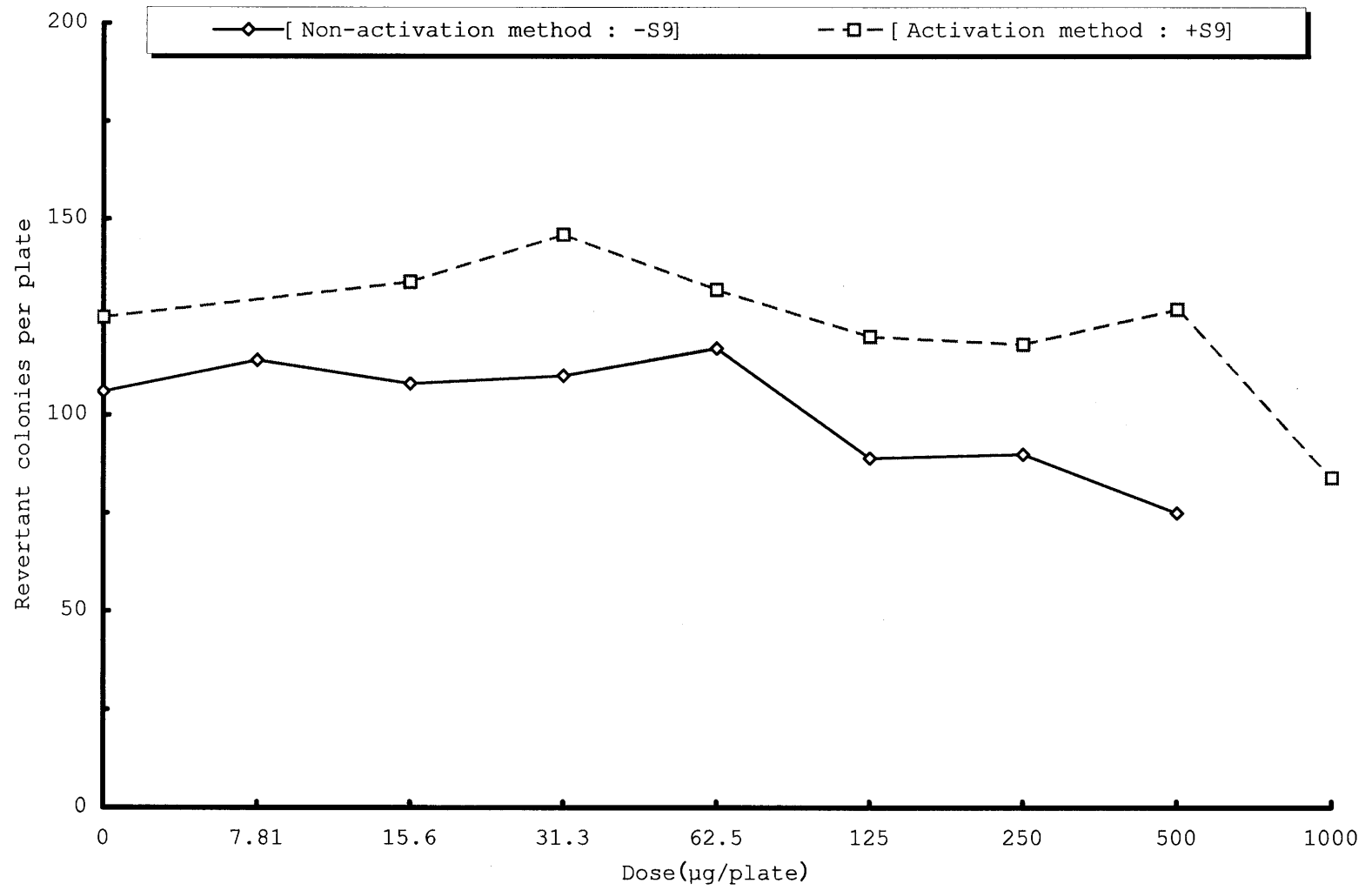


Figure 6. Bacterial reverse mutation test of 4-chlorobenzoyl chloride in strain TA100



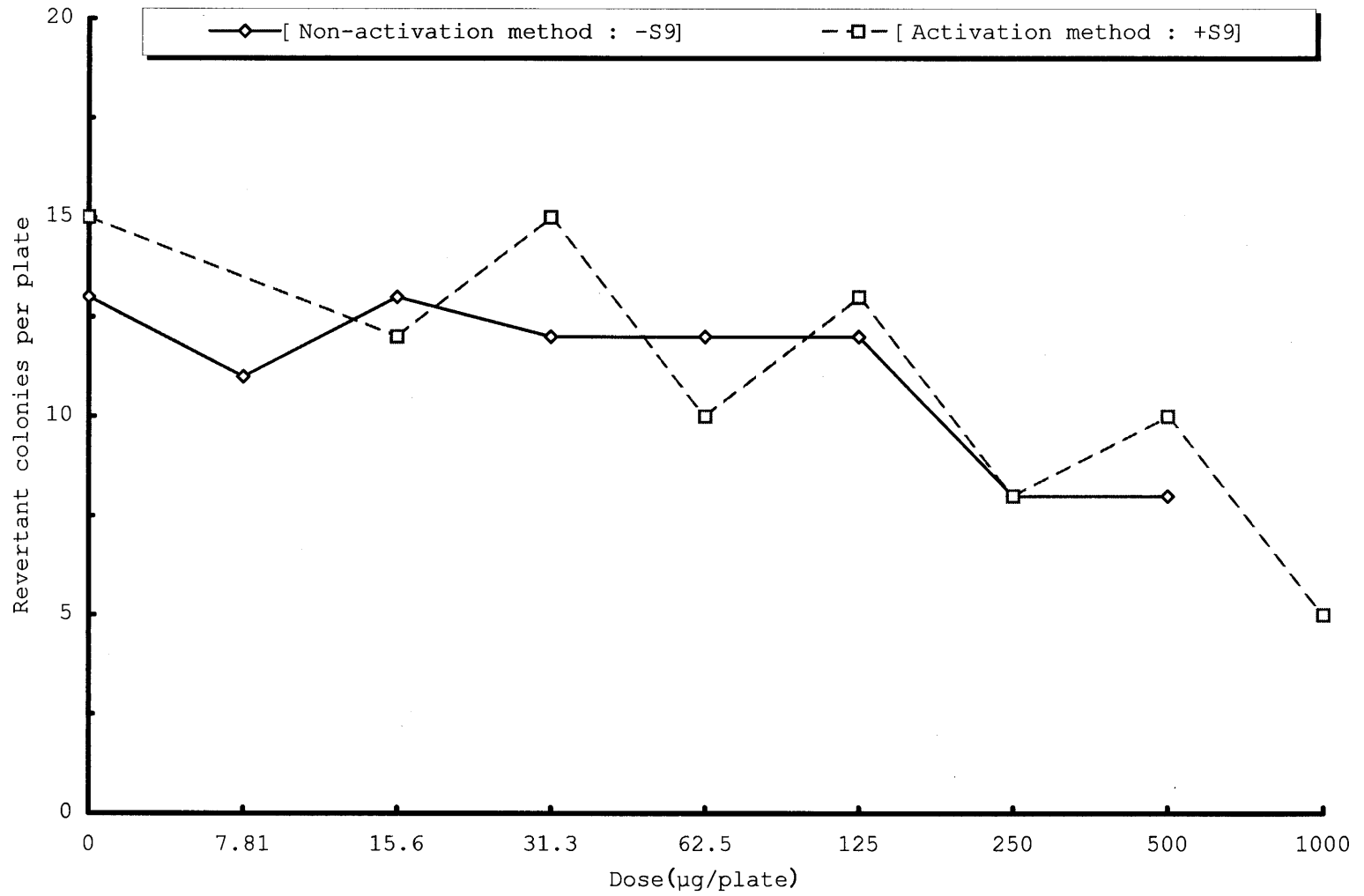


Figure 7. Bacterial reverse mutation test of 4-chlorobenzoyl chloride in strain TA1535

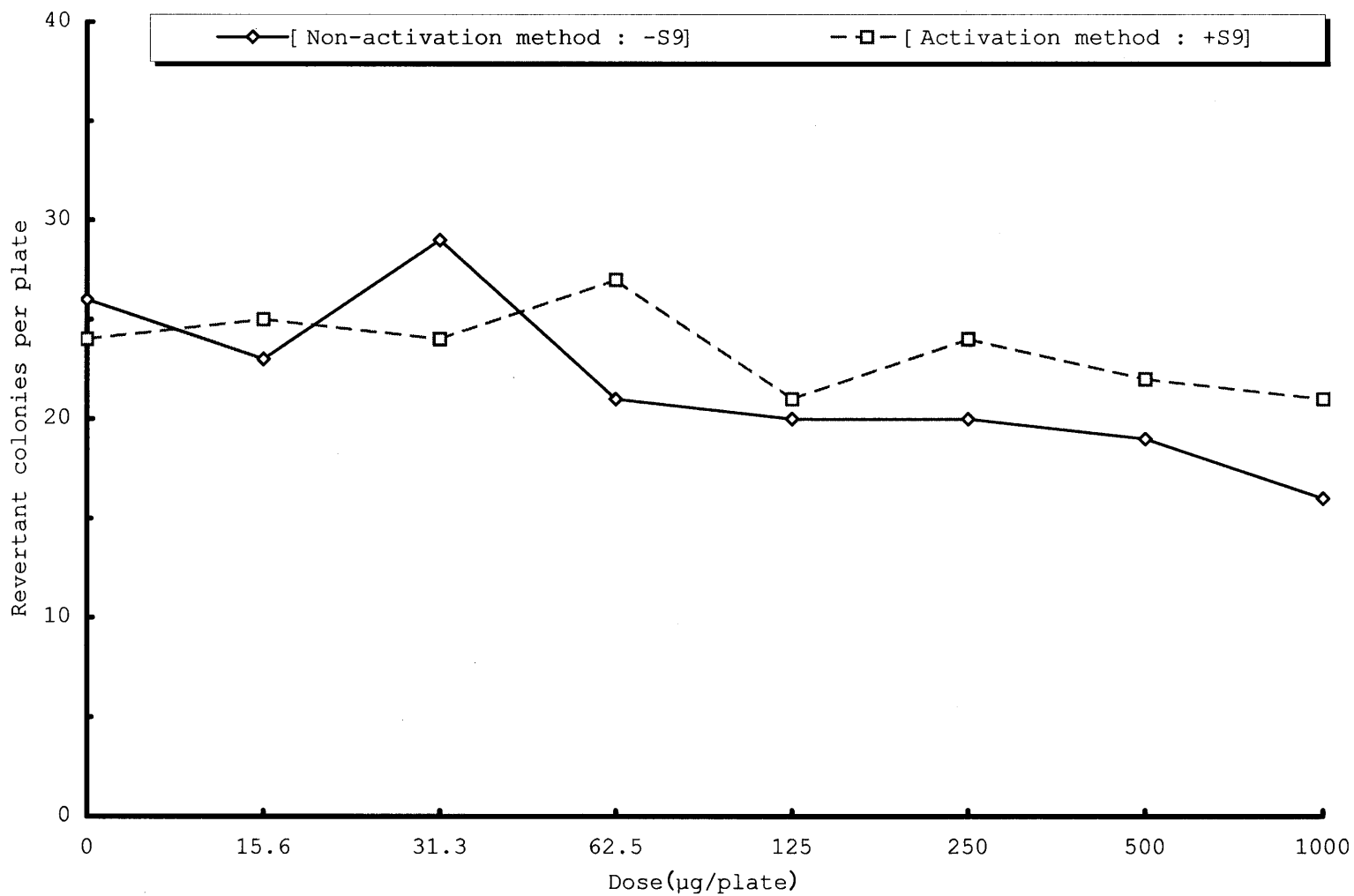


Figure 8. Bacterial reverse mutation test of 4-chlorobenzoyl chloride in strain WP2uvrA

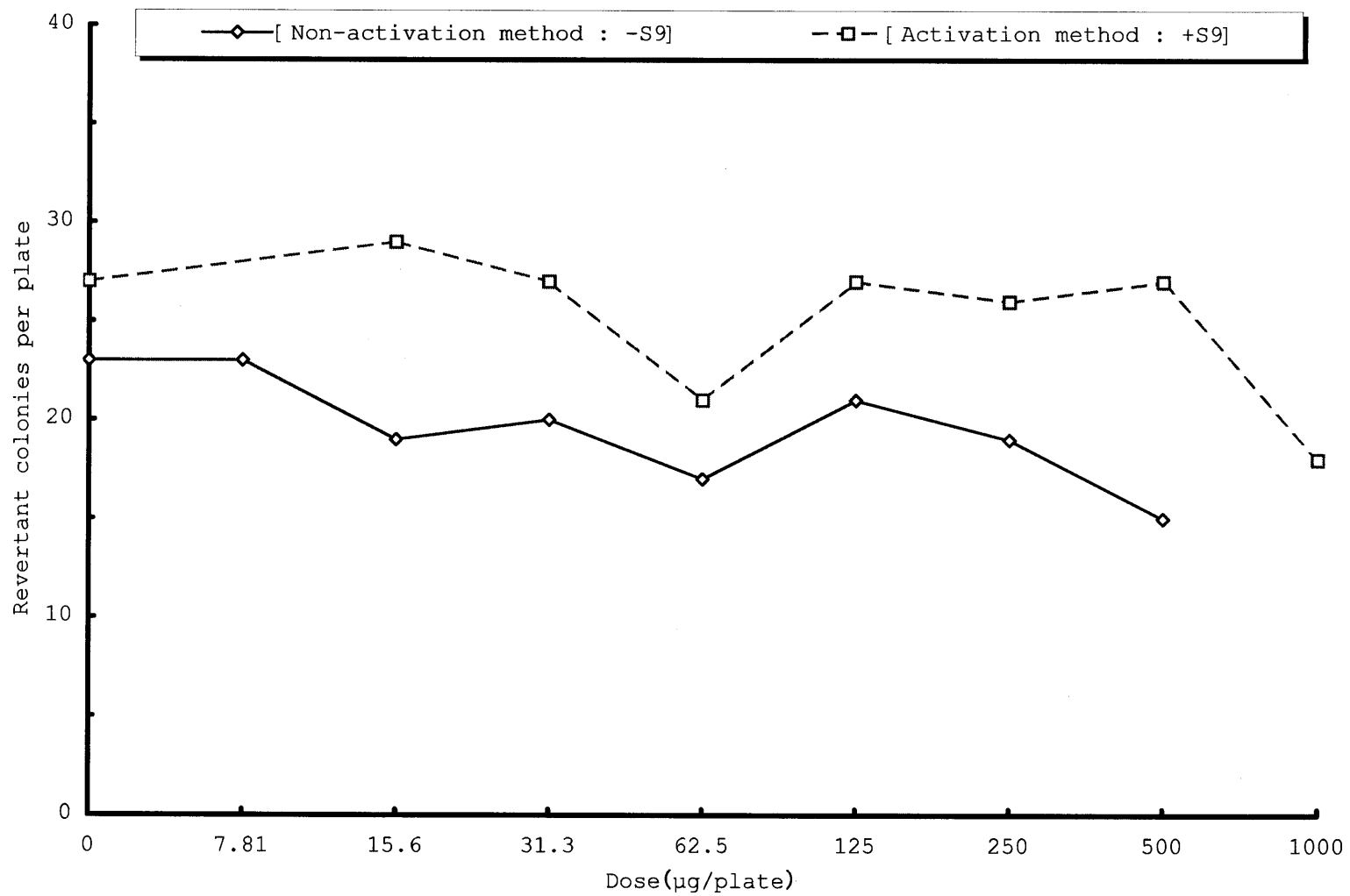


Figure 9. Bacterial reverse mutation test of 4-chlorobenzoyl chloride in strain TA98

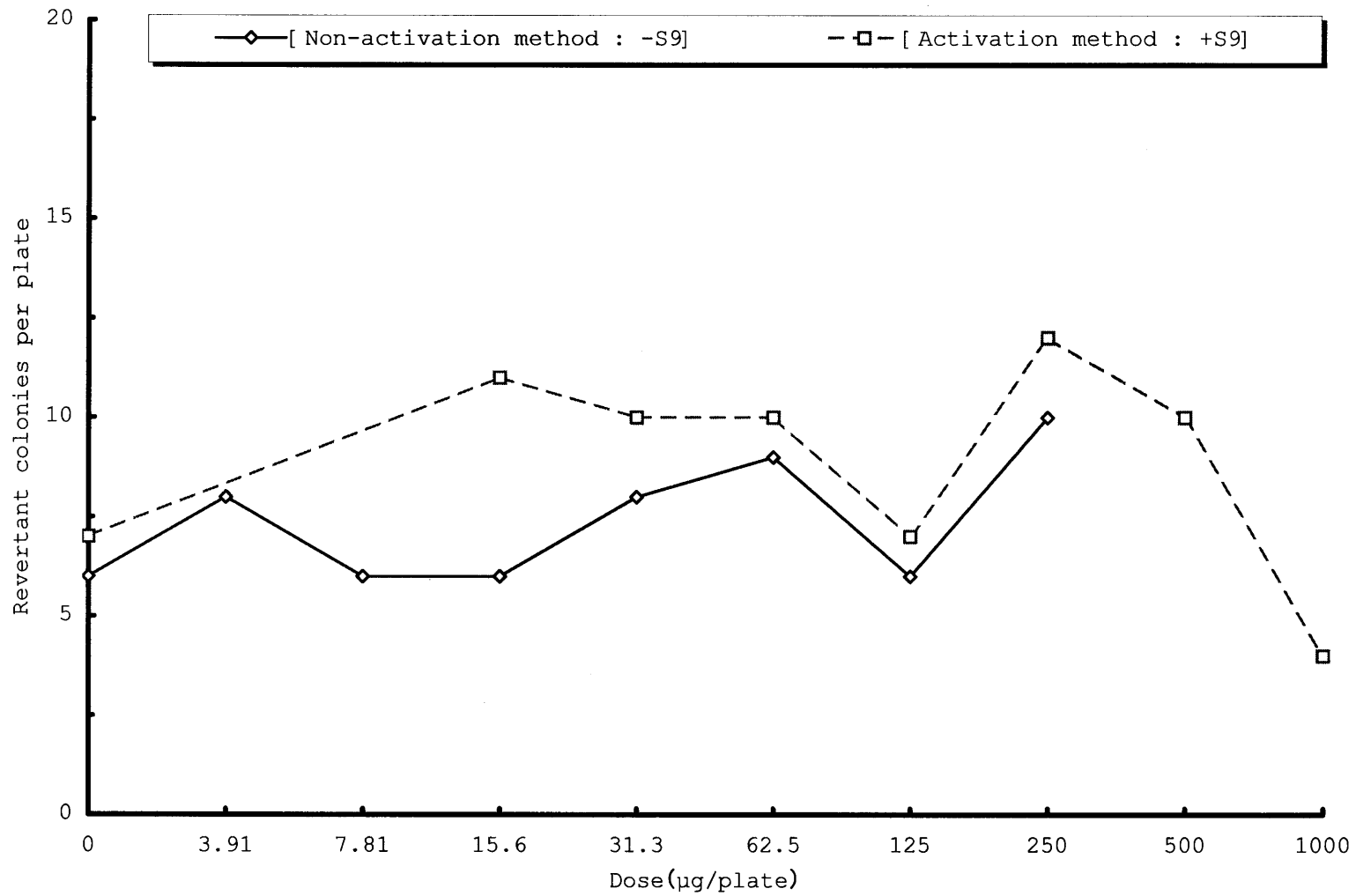


Figure 10. Bacterial reverse mutation test of 4-chlorobenzoyl chloride in strain TA1537

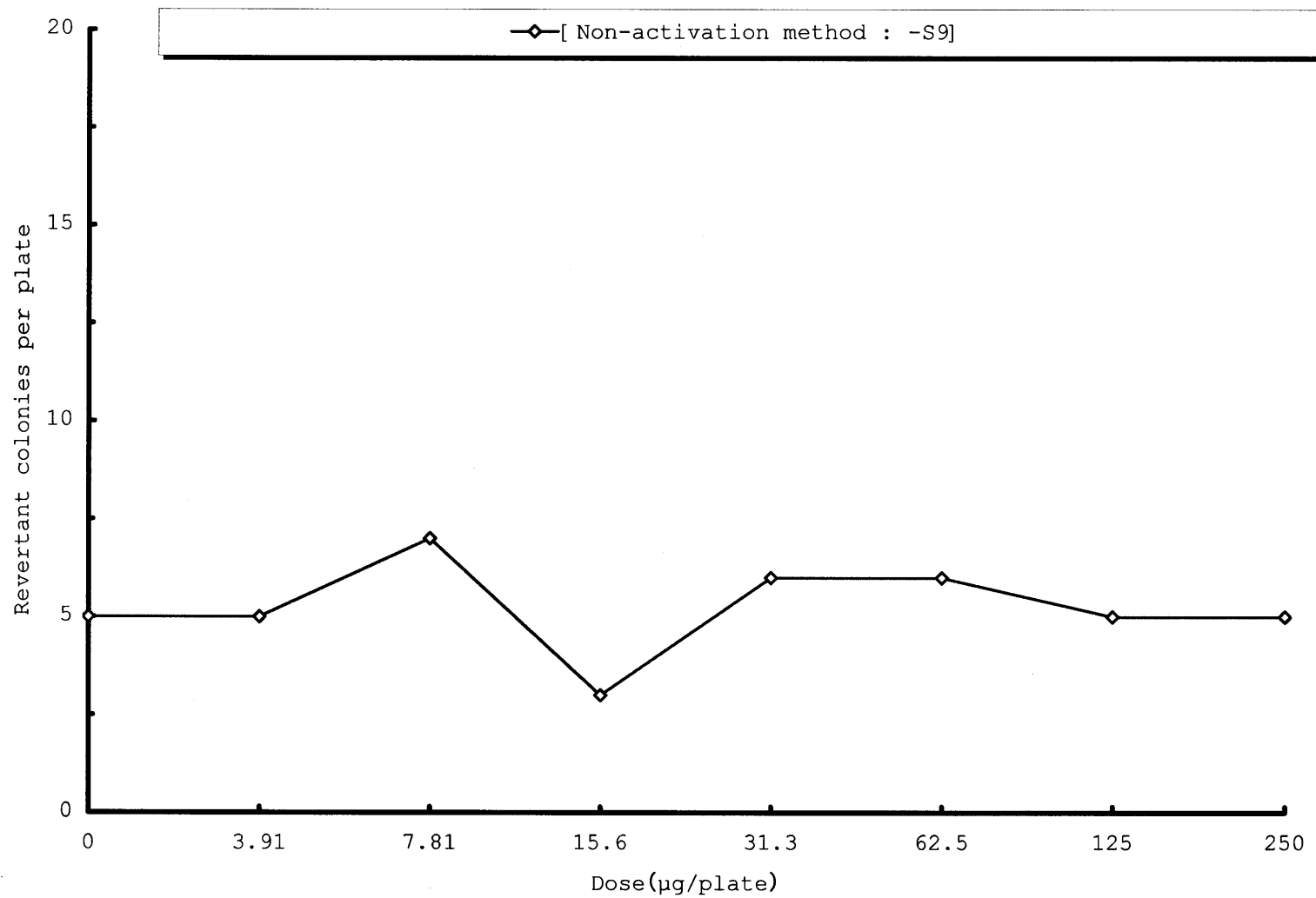


Figure 11. Bacterial reverse mutation test of 4-chlorobenzoyl chloride in strain TA1537 (Additional study)

Table 1. Summary data on dose-finding study of 4-chlorobenzoyl chloride  
 [ Non-activation method : -S9]

Exp. No. 9050 (115-201)

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [ Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
4-chlorobenzoyl chloride	0 a)	121	110	130	7	9	14	29	21	16	21	21	25	4	12	8
		[ 120	$\pm$	10 ]	[ 10	$\pm$	4 ]	[ 22	$\pm$	7 ]	[ 22	$\pm$	2 ]	[ 8	$\pm$	4 ]
	8.19	131	135	127	21	9	12	21	21	20	20	23	25	14	6	9
		[ 131	$\pm$	4 ]	[ 14	$\pm$	6 ]	[ 21	$\pm$	1 ]	[ 23	$\pm$	3 ]	[ 10	$\pm$	4 ]
	20.5	129	135	126	9	10	10	20	21	26	22	40	14	16	8	11
		[ 130	$\pm$	5 ]	[ 10	$\pm$	1 ]	[ 22	$\pm$	3 ]	[ 25	$\pm$	13 ]	[ 12	$\pm$	4 ]
	51.2	119	120	100	24	9	14	32	25	18	13	26	21	4	6	9
		[ 113	$\pm$	11 ]	[ 16	$\pm$	8 ]	[ 25	$\pm$	7 ]	[ 20	$\pm$	7 ]	[ 6	$\pm$	3 ]
128	117	107	100	16	5	18	29	23	32	29	28	15	8*	7*	6*	
	[ 108	$\pm$	9 ]	[ 13	$\pm$	7 ]	[ 28	$\pm$	5 ]	[ 24	$\pm$	8 ]	[ 7	$\pm$	1 ]	
320	122*	102*	99*	13*	10*	16*	26	18	24	26*	22*	22*	16*	10*	3*	
	[ 108	$\pm$	13 ]	[ 13	$\pm$	3 ]	[ 23	$\pm$	4 ]	[ 23	$\pm$	2 ]	[ 10	$\pm$	1 ]	
800 +	77*	88*	63*	9*	6*	10*	12*	17*	22*	17*	11*	13*	1*	1*	2*	
	[ 76	$\pm$	13 ]	[ 8	$\pm$	2 ]	[ 17	$\pm$	5 ]	[ 14	$\pm$	3 ]	[ 1	$\pm$	1 ]	
2000 +	10*	32*	2*	1*	1*	2*	14*	19*	1*	12*	8*	5*	0*	0*	0*	
	[ 15	$\pm$	16 ]	[ 1	$\pm$	1 ]	[ 11	$\pm$	9 ]	[ 8	$\pm$	4 ]	[ 0	$\pm$	0 ]	
5000 +	0*	0*	5*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	
	[ 2	$\pm$	3 ]	[ 0	$\pm$	0 ]	[ 0	$\pm$	0 ]	[ 0	$\pm$	0 ]	[ 0	$\pm$	0 ]	
Positive control		794	833	838 b)	618	609	620 c)	178	179	171 b)	659	736	714 d)	351	349	457 e)
		[ 822	$\pm$	24 ]	[ 616	$\pm$	6 ]	[ 176	$\pm$	4 ]	[ 703	$\pm$	40 ]	[ 386	$\pm$	62 ]

a): Negative control (Acetone, 25  $\mu\text{L}/\text{plate}$ )

b): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01  $\mu\text{g}/\text{plate}$  c):  $\text{NaN}_3$ ; Sodium azide, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$

d): AF-2, 0.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$  e): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80  $\mu\text{g}/\text{plate}$

\* : Growth inhibition was observed.

+ : Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 2. Summary data on dose-finding study of 4-chlorobenzoyl chloride  
 [ Activation method : +S9]

Exp. No. 9050 (115-201)

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [ Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
4-chlorobenzoyl chloride	0 a)	141	154	126	9	6	8	27	29	25	39	31	33	15	17	19
		[ 140	$\pm$ 14 ]	[ 8	$\pm$ 2 ]	[ 27	$\pm$ 2 ]	[ 34	$\pm$ 4 ]	[ 17	$\pm$ 2 ]					
	8.19	116	128	125	3	11	14	25	32	16	36	29	27	28	14	23
		[ 123	$\pm$ 6 ]	[ 9	$\pm$ 6 ]	[ 24	$\pm$ 8 ]	[ 31	$\pm$ 5 ]	[ 22	$\pm$ 7 ]					
	20.5	138	139	122	8	17	6	22	32	31	22	27	31	18	23	31
		[ 133	$\pm$ 10 ]	[ 10	$\pm$ 6 ]	[ 28	$\pm$ 6 ]	[ 27	$\pm$ 5 ]	[ 24	$\pm$ 7 ]					
	51.2	143	143	153	9	18	9	17	25	20	33	31	24	19	25	25
		[ 146	$\pm$ 6 ]	[ 12	$\pm$ 5 ]	[ 21	$\pm$ 4 ]	[ 29	$\pm$ 5 ]	[ 23	$\pm$ 3 ]					
128	130	124	112	11	14	16	28	33	25	27	23	32	14	27	25	
	[ 122	$\pm$ 9 ]	[ 14	$\pm$ 3 ]	[ 29	$\pm$ 4 ]	[ 27	$\pm$ 5 ]	[ 22	$\pm$ 7 ]						
320 +	132	116	134	4	8	7	30	33	30	21	17	26	21	26	23	
	[ 127	$\pm$ 10 ]	[ 6	$\pm$ 2 ]	[ 31	$\pm$ 2 ]	[ 21	$\pm$ 5 ]	[ 4	$\pm$ 4 ]						
800 +	97*	108*	79*	9*	10*	10*	25*	16*	23*	21*	12*	14*	3*	0*	8*	
	[ 95	$\pm$ 15 ]	[ 10	$\pm$ 1 ]	[ 21	$\pm$ 5 ]	[ 16	$\pm$ 5 ]	[ 4	$\pm$ 4 ]						
2000 +	12*	57*	32*	6*	6*	4*	18*	1*	18*	1*	1*	0*	0*	0*	0*	
	[ 34	$\pm$ 23 ]	[ 5	$\pm$ 1 ]	[ 12	$\pm$ 10 ]	[ 1	$\pm$ 1 ]	[ 0	$\pm$ 0 ]						
5000 +	69*	60*	0*	10*	6*	2*	11*	10*	9*	13*	13*	16*	0*	0*	0*	
	[ 43	$\pm$ 38 ]	[ 6	$\pm$ 4 ]	[ 10	$\pm$ 1 ]	[ 14	$\pm$ 2 ]	[ 0	$\pm$ 0 ]						
Positive control		1150	1111	1054 b)	284	338	361 c)	660	497	582 d)	391	422	353 e)	163	185	168 c)
		[ 1105	$\pm$ 48 ]	[ 328	$\pm$ 40 ]	[ 580	$\pm$ 82 ]	[ 389	$\pm$ 35 ]	[ 172	$\pm$ 12 ]					

a): Negative control (Acetone, 25  $\mu\text{L}/\text{plate}$ )

b): 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1  $\mu\text{g}/\text{plate}$  c): 2-AA, 2  $\mu\text{g}/\text{plate}$  d): 2-AA, 10  $\mu\text{g}/\text{plate}$  e): 2-AA, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$

\* : Growth inhibition was observed.

+ : Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 3. Summary data on bacterial reverse mutation test of 4-chlorobenzoyl chloride Exp. No. 9050 (115-201)  
 [ Non-activation method : -S9]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [ Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
4-chlorobenzoyl chloride	0 a)	114	98	107	11	14	15	26	31	21	21	30	17	5	6	8
		[ 106	$\pm$	8 ]	[ 13	$\pm$	2 ]	[ 26	$\pm$	5 ]	[ 23	$\pm$	7 ]	[ 6	$\pm$	2 ]
	3.91													7	5	11
														[ 8	$\pm$	3 ]
	7.81	110	115	116	8	8	17				21	28	19	7	8	3
		[ 114	$\pm$	3 ]	[ 11	$\pm$	5 ]				[ 23	$\pm$	5 ]	[ 6	$\pm$	3 ]
	15.6	118	105	102	14	18	8	23	24	22	16	22	20	9	5	5
		[ 108	$\pm$	9 ]	[ 13	$\pm$	5 ]	[ 23	$\pm$	1 ]	[ 19	$\pm$	3 ]	[ 6	$\pm$	2 ]
	31.3	92	126	111	13	9	14	29	37	22	17	20	23	8	7	10
		[ 110	$\pm$	17 ]	[ 12	$\pm$	3 ]	[ 29	$\pm$	8 ]	[ 20	$\pm$	3 ]	[ 8	$\pm$	2 ]
62.5	118	126	108	14	9	12	21	27	16	21	15	15	13	8	6	
	[ 117	$\pm$	9 ]	[ 12	$\pm$	3 ]	[ 21	$\pm$	6 ]	[ 17	$\pm$	3 ]	[ 9	$\pm$	4 ]	
125	85	86	95	12	12	11	16	31	12	22	23	18	6*	5*	6*	
	[ 89	$\pm$	6 ]	[ 12	$\pm$	1 ]	[ 20	$\pm$	10 ]	[ 21	$\pm$	3 ]	[ 6	$\pm$	1 ]	
250	104*	77*	90*	5	10	10	23*	16*	20*	25*	17*	14*	8*	13*	9*	
	[ 90	$\pm$	14 ]	[ 8	$\pm$	3 ]	[ 20	$\pm$	4 ]	[ 19	$\pm$	6 ]	[ 10	$\pm$	3 ]	
500	77*	65*	82*	7*	7*	11*	24*	16*	16*	13*	18*	15*				
	[ 75	$\pm$	9 ]	[ 8	$\pm$	2 ]	[ 19	$\pm$	5 ]	[ 15	$\pm$	3 ]				
1000 +							19*	8*	20*							
							[ 16	$\pm$	7 ]							
Positive control		564	578	559 b)	586	550	545 c)	129	179	171 b)	606	701	630 d)	282	239	317 e)
		[ 567	$\pm$	10 ]	[ 560	$\pm$	22 ]	[ 160	$\pm$	27 ]	[ 646	$\pm$	49 ]	[ 279	$\pm$	39 ]

a): Negative control (Acetone, 25  $\mu\text{L}/\text{plate}$ )

b): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01  $\mu\text{g}/\text{plate}$  c):  $\text{NaN}_3$ ; Sodium azide, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$

d): AF-2, 0.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$  e): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80  $\mu\text{g}/\text{plate}$

\* : Growth inhibition was observed.

+ : Visible precipitation was observed at the end of exposure period.



Table 4. Summary data on bacterial reverse mutation test of 4-chlorobenzoyl chloride Exp. No. 9050 (115-201)  
 [ Activation method : +S9]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [ Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
4-chlorobenzoyl chloride	0 a)	139	129	107	17	13	14	29	19	24	26	25	29	3	5	12
		125	$\pm$ 16 ]	[ 15	$\pm$ 2 ]	[ 24	$\pm$ 5 ]	[ 27	$\pm$ 2 ]	[ 7	$\pm$ 5 ]					
	15.6	120	136	145	13	9	14	29	24	23	24	21	41	13	10	11
		[ 134	$\pm$ 13 ]	[ 12	$\pm$ 3 ]	[ 25	$\pm$ 3 ]	[ 29	$\pm$ 11 ]	[ 11	$\pm$ 2 ]					
	31.3	153	146	139	13	17	15	23	26	23	30	29	22	11	5	13
		[ 146	$\pm$ 7 ]	[ 15	$\pm$ 2 ]	[ 24	$\pm$ 2 ]	[ 27	$\pm$ 4 ]	[ 10	$\pm$ 4 ]					
	62.5	142	131	123	9	9	11	29	28	25	24	22	17	12	8	9
		[ 132	$\pm$ 10 ]	[ 10	$\pm$ 1 ]	[ 27	$\pm$ 2 ]	[ 21	$\pm$ 4 ]	[ 10	$\pm$ 2 ]					
125	115	141	105	16	13	11	23	17	22	25	29	28	8	7	6	
	[ 120	$\pm$ 19 ]	[ 13	$\pm$ 3 ]	[ 21	$\pm$ 3 ]	[ 27	$\pm$ 2 ]	[ 7	$\pm$ 1 ]						
250 +	118	114	121	10	7	6	21	31	21	27	24	28	8	10	18	
	[ 118	$\pm$ 4 ]	[ 8	$\pm$ 2 ]	[ 24	$\pm$ 6 ]	[ 26	$\pm$ 2 ]	[ 12	$\pm$ 5 ]						
500 +	120	127	134	6	12	11	16	21	28	27	30	24	8	10	12	
	[ 127	$\pm$ 7 ]	[ 10	$\pm$ 3 ]	[ 22	$\pm$ 6 ]	[ 27	$\pm$ 3 ]	[ 10	$\pm$ 2 ]						
1000 +	73*	91*	87*	10*	3*	3*	18*	25*	20*	20*	15*	18*	4*	3*	4*	
	[ 84	$\pm$ 9 ]	[ 5	$\pm$ 4 ]	[ 21	$\pm$ 4 ]	[ 18	$\pm$ 3 ]	[ 4	$\pm$ 1 ]						
Positive control		1292	1251	1038 b)	374	441	387 c)	383	405	391 d)	374	346	355 e)	195	211	197 c)
		[ 1194	$\pm$ 136 ]	[ 401	$\pm$ 36 ]	[ 393	$\pm$ 11 ]	[ 358	$\pm$ 14 ]	[ 201	$\pm$ 9 ]					

a): Negative control (Acetone, 25  $\mu\text{L}/\text{plate}$ )

b): 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1  $\mu\text{g}/\text{plate}$  c): 2-AA, 2  $\mu\text{g}/\text{plate}$  d): 2-AA, 10  $\mu\text{g}/\text{plate}$  e): 2-AA, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$

\* : Growth inhibition was observed.

+ : Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 5. Summary data on bacterial reverse mutation test of 4-chlorobenzoyl chloride (Additional study)  
 [ Non-activation method : -S9 ]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [ Mean $\pm$ S.D.]		
		TA1537		
4-chlorobenzoyl chloride	0 a)	4	4	6
		[ 5	$\pm$	1 ]
	3.91	6	4	5
		[ 5	$\pm$	1 ]
	7.81	10	5	5
		[ 7	$\pm$	3 ]
	15.6	3	2	5
		[ 3	$\pm$	2 ]
	31.3	6	6	6
		[ 6	$\pm$	0 ]
	62.5	9	6	3
		[ 6	$\pm$	3 ]
	125	6*	5*	4*
		[ 5	$\pm$	1 ]
	250	7*	2*	6*
		[ 5	$\pm$	3 ]
Positive control		178	145	208 b)
		[ 177	$\pm$	32 ]

a): Negative control (Acetone, 25  $\mu\text{L}/\text{plate}$ )

b): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80  $\mu\text{g}/\text{plate}$

\* : Growth inhibition was observed.