Study No. 901430

4,4'–ビス (クロロメチル) –1,1' –ビフェニルの細菌を用いる復帰突然変異試験

最 終 報 告 書

作成日: 2011年3月29日

株式会社日本バイオリサーチセンター
羽島研究所

全 34 頁

1. 目 次

表 紙 1
1. 目 次 2

15. 要 約 11
16. 緒 言 12
17. 方 法 12
17.1. 被験物質，媒体，陽性対照物質及び陰性対照物質 12
17.1.1. 被験物質 12
17.1.2. 媒体 12
17.1.3. 陽性対照物質 12
17.1.4. 陰性対照物質 13
17.2. 検体液 14
17.2.1. 被験物質 14
17.2.2. 陽性対照物質 14
17.2.3. 残余検体液の取り扱い 14
17.3. 試験系 15
17.3.1. 試験菌株 15
18. S9 mix 15
19. 培 地 16
20. 無菌試験 16
21. 試験方法 16

21.1. 試験操作 16
21.2. 用量設定試験 17
21.3. 本試験 17
22. 試験の成立条件 17
23. 統計学的方法 18
24. 判定基準 18
25. 試験結果 19
25.1. 用量設定試験 19
25.1.1. プレート上の析出物 19
25.1.2. 菌の生育阻害 19
25.1.3. 復帰変異コロニー数 19
25.1.4. 比活性値 19
25.1.5. 対照物質 19
25.2. 本試験 19
25.2.1. プレート上の析出物 19
25.2.2. 菌の生育阻害 19
25.2.3. 復帰変異コロニー数 19
25.2.4. 比活性値 20
25.2.5. 対照物質 20
26. 考　察 20
27. 文　献 20

Tables

Table 1-1, 1-2. Reverse mutation test of 4,4'-bis (chloromethyl)-1,1'-biphenyl with acteria (dose-finding test) 21
Table 2-1, 2-2. Reverse mutation test of 4,4'-bis (chloromethyl)-1,1'-biphenyl with bacteria (mutagenicity test) 23
Table 3. Maximum potency of test strains. 25

Figures

Figure 1. Chemical structure of 4,4'-bis (chloromethyl)-1,1'-biphenyl. 26
Figure 2-1. Reverse mutation test of 4,4'-bis (chloromethyl)-1,1'-biphenyl with bacteria. (dose-finding test: without S9 mix) 27
Figure 2-2. Reverse mutation test of 4,4'-bis (chloromethyl)-1,1'-biphenyl with bacteria. (dose-finding test: with S9 mix) 28

Figure 3-1. Reverse mutation test of 4,4'-bis (chloromethyl)-1,1'-biphenyl with bacteria. (mutagenicity test: without S9 mix) 29

Figure 3-2. Reverse mutation test of 4,4'-bis (chloromethyl)-1,1'-biphenyl with bacteria. (mutagenicity test: with S9 mix) 30

15. 要　約

4,4'–ビス (クロロメチル) –1,1'–ビフェニルの遺伝子突然変異誘発性の有無を，*Salmonella typhimurium* の TA100，TA98，TA1535 及び TA1537 並びに *Escherichia coli* の WP2*uvrA* を用い，プレインキュベーション法による復帰突然変異試験により検討した．試験は，S9 mix 無添加と S9 mix 添加について実施した．

4,4'–ビス (クロロメチル) –1,1'–ビフェニル処理群における試験濃度は，用量設定試験では，S9 mix 無添加及び S9 mix 添加とも，いずれの菌株も 5，15，50，150，500，1500 及び 5000 μg/plate を設定した．

用量設定試験の結果，TA100，TA1535，WP2*uvrA* 及び TA98 では，S9 mix 無添加及び S9 mix 添加ともに，TA1537 では，S9 mix 添加において復帰変異コロニー数が陰性対照の 2 倍以上に増加した．このことから，本試験の試験濃度は，復帰変異コロニー数の増加が認められた菌株では，用量反応性が求められるように公比約$\sqrt{10}$ により 5–11 濃度を設定した．S9 mix 無添加における TA1537 では，菌の生育阻害及び復帰変異コロニー数の増加は認められなかったことから，用量設定試験と同様に 5000 μg/plate を最高濃度として，以下公比約$\sqrt{10}$ で 5 濃度を設定した．すなわち，S9 mix 無添加の TA100，TA1535 及び TA98 では 0.05，0.15，0.5，1.5，5，15，50，150，500，1500 及び 5000 μg/plate，TA1537 及び WP2*uvrA* では 50，150，500，1500 及び 5000 μg/plate とした．S9 mix 添加の TA100 及び TA98 では 5，15，50，150，500，1500 及び 5000 μg/plate，TA1535 では 15，50，150，500，1500 及び 5000 μg/plate，TA1537 及び WP2*uvrA* では 50，150，500，1500 及び 5000 μg/plate とした．

試験の結果，S9 mix 無添加及び S9 mix 添加とも，TA100，TA1535，WP2*uvrA* 及び TA98 において，また，S9 mix 添加の TA1537 において復帰変異コロニー数が陰性対照の 2 倍以上の値を示し，更に濃度に依存して増加した．

復帰変異コロニー数の増加が認められた菌株について，比活性値を算出したところ，4,4'–ビス (クロロメチル) –1,1'–ビフェニルの最大比活性値は，142666.7 [本試験 (S9 mix 無添加): TA100，1.5 μg/plate]であった．

陽性対照では，復帰変異コロニー数が陰性対照の 2 倍以上に増加し，陰性対照では，試験施設のバックグラウンドデータの平均±2 S.D.の範囲内にあった．

用量設定試験及び本試験の結果には再現性が認められた．

以上の結果，当試験の条件下において，4,4'–ビス (クロロメチル) –1,1'–ビフェニルは遺伝子突然変異誘発性を有する (陽性) と判定する．

16. 緒　言

4,4'–ビス (クロロメチル) –1,1'–ビフェニルの細菌を用いる復帰突然変異試験を行い，その遺伝子突然変異誘発性の有無について検討した.

17. 方　法

17.1. 被験物質，媒体，陽性対照物質及び陰性対照物質

17.1.1. 被験物質

被験物質 4,4'–ビス (クロロメチル) –1,1'–ビフェニル [別名: 4,4'–ビス (クロロメチル) ビフェニル, 英語化学名: 4,4'-bis(chloromethyl)-1,1'-biphenyl，CAS No.: 1667-10-3，官報公示整理番号 (化審法): 4-798] は，化学式: $C_{14}H_{12}Cl_2$ (化学構造式は Figure 1.参照)，分子量: 251.15，物性・性状: 白色の結晶性粉末であり, エタノール及びアセトンに溶け, 水にほとんど溶けない. 融点: 141.7℃ である.
当試験には，　　入手したものを用いた [
　　純度 (GC): 99.8%]. 入手後は，試験施設の被験物質保管室の室温保管庫 [設定温度: 23℃ (実測値: 22.0 – 25.0℃)，設定湿度: 55% (実測値: 40.8 – 67.0%)] 内に，室温・遮光・気密・防湿の条件下で保管した.
「4,4'–ビス (クロロメチル) –1,1'–ビフェニルのラットを用いる経口投与による反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験」(試験番号: 100630) の投与期間終了後に試験施設で保管した被験物質 (Lot No.: ILJ4E) を製造元で再分析し，使用期間中の安定性を確認した.

17.1.2. 媒体

媒体として, ジメチルスルホキシド (以下 DMSO, 規格: 紫外部吸収スペクトル用, Lot No.: JT012, 使用期限: 2012 年 7 月 22 日，株式会社同仁化学研究所) を用いた. DMSO は，使用時まで試験施設の被験物質保管室の室温保管庫 [設定温度: 23℃ (実測値: 22.0 – 24.8℃)，設定湿度: 55% (実測値: 40.8 – 56.0%)] 内に，室温・遮光の条件下で保管した.

17.1.3. 陽性対照物質

陽性対照物質は, ポジコン AM マルチセット (セット番号: M0023，使用期限: 2011 年 12 月 9 日，製造元: オリエンタル酵母工業株式会社)を用いた. ポジコン AM マルチセットは，試験施設の被験物質保管室の保管庫 [冷凍庫: MDF-291AT，三洋電機株式会社，設定温度: -85℃ (実測値: -87 – -77℃)] 内に，冷凍の条件下で保管した.
下記にポジコン AM マルチセットの内容を記載した.

17.1.3.1. 2-アミノアントラセン (2-aminoanthracene，略名: 2AA)

調製液

5 μg/mL (Lot No.: 100510A205)，10 μg/mL (Lot No.: 100510A210),
20 μg/mL (Lot No.: 100510A220)，100 μg/mL (Lot No.: 100510A2100)
製造日: 2010 年 5 月 10 日
媒体: DMSO (紫外部吸収スペクトル用，Lot No.: JK066，株式会社同仁化学研究所)

原体

Lot No.: ALP5557

製造元: 和光純薬工業株式会社

17.1.3.2. アジ化ナトリウム (sodium azide，化学式: NaN_3)

調製液

5 μg/mL (Lot No.: 100510N)

製造日: 2010 年 5 月 10 日

媒体: 注射用水 (Lot No.: 6H98，株式会社大塚製薬工場)

原体

Lot No.: M8N8165

製造元: ナカライテスク株式会社

17.1.3.3. 9-アミノアクリジン (9-aminoacridine hydrochloride，略名: 9AA)

調製液

800 μg/mL (Lot No.: 100511A9)

製造日: 2010 年 5 月 11 日

媒体: DMSO (紫外部吸収スペクトル用，Lot No.: JK066，株式会社同仁化学研究所)

原体

Lot No.: M6K8637

製造元: ナカライテスク株式会社

17.1.3.4. 2- (2-フリル) -3- (5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド [2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide，略名: AF-2]

調製液

0.1 μg/mL (Lot No.: 100511AF01)，1.0 μg/mL (Lot No.: 100511AF10)

製造日: 2010 年 5 月 11 日

媒体: DMSO (紫外部吸収スペクトル用，Lot No.: JK066，株式会社同仁化学研究所)

原体

Lot No.: SDJ4376

製造元: 和光純薬工業株式会社

17.1.4. 陰性対照物質

被験物質の媒体である DMSO を用いた.

17.2. 検体液

17.2.1. 被験物質

17.2.1.1. 調製方法

用量設定試験及び本試験とも，被験物質 500 mg (実秤量値: 用量設定試験; 500.1 mg，本試験; 500.2 mg) を秤量 (電子天秤: AT261，メトラー・トレド株式会社) した後，DMSO に溶解して，最高濃度 (50 mg/mL) を 10 mL 調製した．最高濃度液以下の濃度液は，50 mg/mL 液の一部を DMSO で段階希釈して，用量設定試験では，15，5，1.5，0.5，0.15 及び 0.05 mg/mL を，本試験では，15，5，1.5，0.5，0.15，0.05，0.015，0.005，0.0015 及び 0.0005 mg/mL を調製した．

17.2.1.2. 被験物質調製液の安定性及び調製頻度

媒体としてDMSOを用いた被験物質調製液の安定性ついては，0.05 及び 260 mg/mLの濃度で調製後，室温 [設定温度: 23℃ (実測値: 22.8 – 23.1℃)]・遮光・気密で 6 時間まで問題がないことが確認されている[1)]．

なお，0.05 mg/mL 未満の被験物質調製液の安定性については確認されていないため，調製は用時に行い，速やかに使用した．

17.2.2. 陽性対照物質

17.2.2.1. 調製方法

試験の際に，ポジコン AM マルチセットを融解して使用した．

以下に各菌株に対する陽性対照物質名，濃度及び試験濃度を示した．

	菌株名	物質名	濃度 (μg/mL)	試験濃度 (μg/plate)
S9 mix (+)	TA100	2AA	10	1
	TA1535	2AA	20	2
	WP2*uvrA*	2AA	100	10
	TA98	2AA	5	0.5
	TA1537	2AA	20	2
S9 mix (–)	TA100	AF-2	0.1	0.01
	TA1535	NaN_3	5	0.5
	WP2*uvrA*	AF-2	0.1	0.01
	TA98	AF-2	1	0.1
	TA1537	9AA	800	80

17.2.3. 残余検体液の取り扱い

残余検体液は，使用後に廃棄した．

17.3. 試験系

17.3.1. 試験菌株

試験菌株は，「新規化学物質等に係る試験の方法について」に従い，S. *typhimurium* の TA100, TA98, TA1535 及び TA1537 並びに E. *coli* の WP2*uvrA* を使用した．TA100 及び TA98 は 1996 年 10 月 18 日に，TA1535，TA1537 及び WP2*uvrA* は 1995 年 2 月 25 日に，いずれも中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センターから入手した．

菌株の特性として「安衛法における変異原性試験-テストガイドラインとGLP-」[2)]に従い，アミノ酸要求性，紫外線感受性，膜変異rfa特性及び薬剤耐性因子R-factorプラスミドの有無を検査し(TA100 及びTA98 の検査日: 2009 年 7 月 28 日 – 7 月 30 日，TA1535，TA1537 及びWP2*uvrA*の検査日: 2010 年 8 月 25 日 – 8 月 27 日)，試験施設の基準に適合しているコロニーを選択した(Attachment 1).

菌株は，特性検査の結果から選択したコロニーを培養し，その菌懸濁液 0.8 mL に対して DMSO を 0.07 mL の割合で加えたものを，チューブ (2 mL 容セラムチューブ，住友ベークライト株式会社) に 200 µL ずつ分注し，-80°C 設定の超低温フリーザー (ULT-1386-5A，Kendro Laboratory Products) 内に凍結保管した (TA100 及び TA98 の分注日: 2009 年 8 月 19 日，TA1535，TA1537 及び WP2*uvrA* の分注日: 2010 年 9 月 15 日，使用期限: 分注後 2 年以内)．菌株の前培養には，ニュートリエントブロス(OXOID NUTRIENT BROTH No.2，Lot No.: 503274，OXOID LTD.) 2.0 g に注射用水 80 mL の割合で加えて高圧蒸気滅菌 (121 °C，15 分) したニュートリエントブロス培養液を使用した. 乾熱滅菌したモルトン栓付の L 字管 (容量: 約 40 mL) にニュートリエントブロス培養液を 10 mL 入れ，分注凍結菌液を融解してその 20 µL を接種した．これを 37°C 設定の往復振盪型式 (振盪数: 用量設定試験及び本試験とも 90 回／分) の振盪培養器 (MM-10，タイテック株式会社) を用いて，9 時間培養した.

培養終了後，菌懸濁液の濁度を分光光度計 (Novaspec II，GE ヘルスケア・ジャパン株式会社) を用いて測定し，その O.D.値から生菌数を求めた．また，菌懸濁液は使用時まで室温で保管した．用量設定試験及び本試験における各菌株の生菌数を以下に示した.

	生菌数 ($\times 10^9$ cells/mL)				
	TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
用量設定試験	3.5	3.9	4.9	2.9	1.8
本試験	3.4	3.7	5.1	2.9	1.7

なお，実験操作は空調管理された Ames 試験室 (G 棟) にて行った.

18. S9 mix

S9 [Lot No.: 10081305，オリエンタル酵母工業株式会社] は，フェノバルビタール及び 5,6-ベンゾフラボンを投与した 7 週齢の雄ラット[Crl:CD (SD)] 37 匹 (体重: 210.1 ± 10.2 g) の肝臓から製造[製造日: 2010 年 8 月 13 日，有効期限: 2011 年 2 月 12 日 (当試験施設の基準: 製造後 6 ヵ月)] されたものを使用した．S9 は，2010 年 9 月 2 日に購入し，-80°C 設定の超低温フリーザー (ULT-1386-5A，Kendro Laboratory Products) 内に凍結保管した.

S9 mix は，S9 mix 用の Cofactor (商品名: Cofactor-Ⅰ，Lot No.: 999002，オリエンタル酵母工業株式会社) 1 本につき注射用水を 9 mL 加えて溶解した後，メンブランフィルター (φ0.2 μm，NALGENE®) で濾過し，使用直前に S9 を 1 mL 加えて調製した．S9 mix の組成を以下に示した．

成　分	S9 mix 1 mL中の量	成　分	S9 mix 1 mL中の量
S9	0.1 mL	NADPH	4 μmol
$MgCl_2$	8 μmol	NADH	4 μmol
KCl	33 μmol	Na-phosphate buffer (pH 7.4)	100 μmol
Glucose-6-phosphate	5 μmol	Distilled water	0.9 mL

19. 培　地

最少グルコース寒天平板培地は，テスメディア AN 培地 (Lot No.: ANI410FZ，製造日: 2010 年 6 月 10 日，オリエンタル酵母工業株式会社) を使用した．テスメディア AN 培地の組成を Attachment 2 に示した．

トップアガーは，注射用水に Bacto Agar (Lot No.: 9265367，DIFCO) が 0.6%，塩化ナトリウムが 0.5%の割合になるように加えて高圧蒸気滅菌 (121°C，20 分) した．この水溶液に *S. typhimurium* の場合には 0.5 mmol/L L-ヒスチジンと 0.5 mmol/L D-ビオチンを混合した水溶液を，*E. coli* の場合には 0.5 mmol/L L-トリプトファン水溶液を，それぞれ容量比 10: 1 の割合で加えて調製した．

20. 無菌試験

被験物質の最高濃度液及び S9 mix の無菌試験は，用量設定試験及び本試験実施の際に，それぞれ 2 枚のプレートを用いて実施した．

試験は，被験物質の最高濃度液 0.1 mL 又は S9 mix 0.5 mL に，45°C に保温したトップアガー2 mL を加えて最少グルコース寒天平板培地上にまき広げ，プレートを転倒して 37°C 設定の低温恒温器 (IN802，ヤマト科学株式会社) 内で約 48 時間培養した後，コロニーの出現を調べた．被験物質の最高濃度液の無菌試験には，用量設定試験及び本試験とも 50 mg/mL 濃度液を用いた．

無菌試験の結果，用量設定試験及び本試験とも被験物質の最高濃度液及び S9 mix に雑菌の混入は認められなかった．

21. 試験方法

21.1. 試験操作

試験は，プレインキュベーション法により，代謝活性化によらない場合 (S9 mix 無添加) と代謝活性化による場合 (S9 mix 添加) で行った．すなわち，乾熱滅菌した試験管 (15.5 × 100 mm，清浄試験管ラルボ，テルモ株式会社) に，① 検体液 0.1 mL，② 高圧蒸気滅菌した 0.1 mol/L Na-リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL (代謝活性化によらない場合) 又は S9 mix 0.5 mL (代謝活性化による場合)，③ 菌懸濁液 0.1 mL の順に加え，往復振盪型式の振盪培養器を用いて 37°C で 20 分間インキュベーションした．その後，45°C に保温したトップアガーを 2 mL 加えて混合した後，最少グル

コース寒天平板培地上にまき広げ，プレートを転倒して 37°C 設定の低温恒温器内で約 48 時間培養した.
培養終了後，プレート上での析出物の有無を肉眼で観察した後，復帰変異コロニー数を，被験物質を処理したプレート上の析出物がコロニーに形状が類似しており，コロニーアナライザーでの測定ができないと判断されたため，陰性対照及び被験物質ではハンディコロニーカウンター (CC-1、アズワン株式会社) を用い，目算法で計測した．陽性対照では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) により計測した. 計測後，菌の生育阻害の有無を 100 倍の実体顕微鏡下で観察した．なお，プレート上での析出物の有無は，培養開始時にも肉眼で観察した.
プレートは，菌株，代謝活性化の有無及び濃度の組み合わせごとに 3 枚使用した．また，試験管及びプレートは，菌株ごとに油性インクで色分けすることで識別した.

21.2. 用量設定試験

用量設定試験の試験濃度は，「新規化学物質等に係る試験の方法について」に基づき，S9 mix 無添加及び S9 mix 添加とも，いずれの菌株も 5000 μg/plate を最高濃度として，以下 1500, 500, 150, 50，15 及び 5 μg/plate の計 7 濃度を設定した．対照として，全菌株に対し陰性対照及び陽性対照を設けた.

21.3. 本試験

用量設定試験の結果，TA100，TA1535，WP2*uvrA* 及び TA98 では，S9 mix 無添加及び S9 mix 添加ともに，TA1537 では，S9 mix 添加において復帰変異コロニー数が陰性対照の 2 倍以上に増加した．このことから，本試験の試験濃度は，復帰変異コロニー数の増加が認められた菌株では，用量反応性が求められるように公比約$\sqrt{10}$ により 5–11 濃度を設定した．S9 mix 無添加における TA1537 では，菌の生育阻害及び復帰変異コロニー数の増加は認められなかったことから，用量設定試験と同様に 5000 μg/plate を最高濃度として，以下公比約$\sqrt{10}$ で 5 濃度を設定した．すなわち，S9 mix 無添加の TA100，TA1535 及び TA98 では 0.05，0.15，0.5，1.5，5，15，50，150，500，1500 及び 5000 μg/plate，TA1537 及び WP2*uvrA* では 50，150，500，1500 及び 5000 μg/plate とした．S9 mix 添加の TA100 及び TA98 では 5，15，50，150，500，1500 及び 5000 μg/plate，TA1535 では 15，50，150，500，1500 及び 5000 μg/plate，TA1537 及び WP2*uvrA* では 50，150，500，1500 及び 5000 μg/plate とした．対照として，全菌株に対し陰性対照及び陽性対照を設けた.

22. 試験の成立条件

無菌試験で被験物質の最高濃度液及び S9 mix に雑菌の混入がなく，復帰変異コロニー数が陰性対照では試験施設のバックグラウンドデータ (Attachment 3) の平均±2 S.D.の範囲内にあり，陽性対照では陰性対照の 2 倍以上に増加し，また，用量設定試験と本試験との間に再現性が認められ，さらに試験系に影響した他の要因がない場合に試験成立とした.

23. 統計学的方法

復帰変異コロニー数は，濃度ごとに平均値及び標準偏差を算出した．なお，下記の判定基準に従ったため，有意差検定は実施しなかった．

24. 判定基準

試験の結果は，被験物質を処理したプレートにおける復帰変異コロニー数が陰性対照の 2 倍以上の値を示し，更に濃度に依存して増加した場合を陽性とした．

また，陽性と判定したことから，菌の生育阻害が認められない濃度について，次式により比活性を算出した．

$$\text{比活性} = \frac{(\text{当該試験濃度におけるプレート当りの復帰変異コロニー数}) - (\text{陰性対照におけるプレート当りの復帰変異コロニー数})}{\text{当該濃度値（mg/プレート）}}$$

25. 試験結果

25.1. 用量設定試験（Table1-1，1-2，3 及び Figure 2-1，2-2）

25.1.1. プレート上の析出物

培養開始時及び培養終了時とも，S9 mix 無添加では 500 μg/plate 以上の濃度において，S9 mix 添加では 1500 μg/plate 以上の濃度において白色の微細な析出物が認められた.

25.1.2. 菌の生育阻害

S9 mix 無添加及び S9 mix 添加とも，いずれの菌株においても菌の生育阻害は認められなかった.

25.1.3. 復帰変異コロニー数

復帰変異コロニー数は，TA100，TA1535，WP2*uvrA* 及び TA98 では，S9 mix 無添加及び S9 mix 添加ともに，TA1537 では，S9 mix 添加において復帰変異コロニー数が陰性対照の 2 倍以上の値を示し，更に濃度に依存して増加した．S9 mix 無添加の TA1537 では，復帰変異コロニー数の増加は認められなかった.

25.1.4. 比活性値

S9 mix 無添加及び S9 mix 添加とも，TA100，TA1535，WP2*uvrA* 及び TA98 において，また，S9 mix 添加の TA1537 において復帰変異コロニー数が陰性対照の 2 倍以上の値を示したことから，比活性値を算出した. その結果, 用量設定試験における最大比活性値は, 95200.0 (S9 mix 無添加: TA100, 5 μg/plate) であった.

25.1.5. 対照物質

陽性対照では，復帰変異コロニー数が陰性対照の 2 倍以上に増加し，陰性対照では，試験施設のバックグラウンドデータの平均±2 S.D.の範囲内にあった.

25.2. 本試験（Table2-1，2-2，3 及び Figure 3-1，3-2）

25.2.1. プレート上の析出物

培養開始時及び培養終了時とも，S9 mix 無添加では 500 μg/plate 以上の濃度において，S9 mix 添加では 1500 μg/plate 以上の濃度において白色の微細な析出物が認められた.

25.2.2. 菌の生育阻害

S9 mix 無添加及び S9 mix 添加とも，いずれの菌株においても菌の生育阻害は認められなかった.

25.2.3. 復帰変異コロニー数

復帰変異コロニー数は，TA100，TA1535，WP2*uvrA* 及び TA98 では，S9 mix 無添加及び S9 mix 添加ともに，TA1537 では，S9 mix 添加において復帰変異コロニー数が陰性対照の 2 倍以上の値を示し，更に濃度に依存して増加した．S9 mix 無添加の TA1537 では，復帰変異コロニー数の増加は認められなかった.

25.2.4. 比活性値

S9 mix 無添加及び S9 mix 添加とも，TA100，TA1535，WP2*uvrA* 及び TA98 において，また，S9 mix 添加の TA1537 において復帰変異コロニー数が陰性対照の 2 倍以上の値を示したことから，比活性値を算出した．その結果，本試験における最大比活性値は，142666.7 (S9 mix 無添加: TA100, 1.5 μg/plate) であった．

25.2.5. 対照物質

陽性対照では，復帰変異コロニー数が陰性対照の 2 倍以上に増加し，陰性対照では，試験施設のバックグラウンドデータの平均±2 S.D.の範囲内にあった．

26. 考　察

4,4'–ビス (クロロメチル)–1,1'–ビフェニルの遺伝子突然変異誘発性の有無を，細菌を用いる復帰突然変異試験により検討した．

4,4'–ビス (クロロメチル)–1,1'–ビフェニルは, S9 mix 無添加及び S9 mix 添加とも, TA100, TA1535, WP2*uvrA* 及び TA98 において，また，S9 mix 添加の TA1537 において復帰変異コロニー数が陰性対照の 2 倍以上の値を示し，更に濃度に依存して増加した．
復帰変異コロニー数の増加が認められた菌株について, 比活性値を算出したところ, 4,4'–ビス (クロロメチル) –1,1'–ビフェニルの最大比活性値は，142666.7 [本試験 (S9 mix 無添加): TA100, 1.5 μg/plate]であった．
無菌試験では，被験物質の最高濃度液及び S9 mix に雑菌の混入は認められなかった．
陽性対照では，復帰変異コロニー数が陰性対照の 2 倍以上に増加し，陰性対照では，試験施設のバックグラウンドデータの平均±2 S.D.の範囲内にあった．
用量設定試験及び本試験には再現性が認められた．

以上の結果，当試験の条件下において，4,4'–ビス (クロロメチル)–1,1'–ビフェニルは遺伝子突然変異誘発性を有する (陽性) と判定する．

27. 文　献

1) 4,4'–ビス (クロロメチル) –1,1'–ビフェニルの媒体中での安定性確認試験 (試験番号: 092530)，株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所; 2010.
2) 労働省安全衛生部化学物質調査課 (編): 安衛法における変異原性試験－テストガイドラインと GLP－，中央労働災害防止協会，平成 3 年 3 月

Table 1-1. Reverse mutation test of 4,4'-bis(chloromethyl)-1,1'-biphenyl with bacteria (dose-finding test)

S9 mix		Concentration (μg/plate)	Number of revertant colonies/plate				
			Base-pair substitution type			Frameshift type	
			TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
S9 mix (-)	Negative control	0	135 151 162 (149 ± 13.6)	6 8 14 (9 ± 4.2)	24 24 31 (26 ± 4.0)	23 29 31 (28 ± 4.2)	10 19 19 (16 ± 5.2)
	4,4'-bis(chloromethyl)-1,1'-biphenyl	5	602 633 639 (625 ± 19.9)	30 30 31 (30 ± 0.6)	20 29 31 (27 ± 5.9)	261 291 354 (302 ± 47.5)	12 17 20 (16 ± 4.0)
		15	1026 1053 1083 (1054 ± 28.5)	22 32 37 (30 ± 7.6)	26 33 44 (34 ± 9.1)	348 360 366 (358 ± 9.2)	10 15 16 (14 ± 3.2)
		50	879 905 938 (907 ± 29.6)	25 32 39 (32 ± 7.0)	32 39 50 (40 ± 9.1)	386 387 426 (400 ± 22.8)	10 14 20 (15 ± 5.0)
		150	914 1022 1033 (990 ± 65.8)	32 38 54 (41 ± 11.4)	35 43 55 (44 ± 10.1)	422 454 500 (459 ± 39.2)	10 13 18 (14 ± 4.0)
		500#	678 1084 1370 (1044 ± 347.7)	40 60 63 (54 ± 12.5)	56 58 80 (65 ± 13.3)	505 510 517 (511 ± 6.0)	17 21 30 (23 ± 6.7)
		1500#	944 973 1003 (973 ± 29.5)	42 44 45 (44 ± 1.5)	65 67 75 (69 ± 5.3)	532 576 616 (575 ± 42.0)	14 17 19 (17 ± 2.5)
		5000#	909 923 965 (932 ± 29.1)	61 65 70 (65 ± 4.5)	107 116 123 (115 ± 8.0)	718 736 817 (757 ± 52.7)	10 19 20 (16 ± 5.5)
	Positive control	Name	AF-2	NaN_3	AF-2	AF-2	9AA
		Concentration (μg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
		Number of revertant colonies/plate	449 497 503 (483 ± 29.6)	455 464 487 (469 ± 16.5)	91 110 116 (106 ± 13.1)	379 409 429 (406 ± 25.2)	280 291 319 (297 ± 20.1)

Negative control : Dimethyl sulfoxide.
AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; NaN_3 : Sodium azide; 9AA : 9-Aminoacridine hydrochloride.
( ): Mean ± S.D.
No growth inhibition of tester strains was observed.
#: Fine white precipitates were noted on the surface of agar plate at the start and completion of incubation.

Table 1-2. Reverse mutation test of 4,4'-bis(chloromethyl)-1,1'-biphenyl with bacteria (dose-finding test)

S9 mix		Concentration (μg/plate)	Number of revertant colonies/plate				
			Base-pair substitution type			Frameshift type	
			TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
S9 mix (+)	Negative control	0	119 129 135 (128 ± 8.1)	6 11 15 (11 ± 4.5)	24 25 30 (26 ± 3.2)	24 36 43 (34 ± 9.6)	11 12 19 (14 ± 4.4)
	4,4'-bis(chloromethyl)-1,1'-biphenyl	5	166 176 179 (174 ± 6.8)	11 11 13 (12 ± 1.2)	24 31 36 (30 ± 6.0)	42 53 58 (51 ± 8.2)	10 12 13 (12 ± 1.5)
		15	261 263 286 (270 ± 13.9)	10 11 13 (11 ± 1.5)	28 29 31 (29 ± 1.5)	102 107 110 (106 ± 4.0)	11 14 17 (14 ± 3.0)
		50	580 606 639 (608 ± 29.6)	21 25 26 (24 ± 2.6)	30 38 42 (37 ± 6.1)	406 419 432 (419 ± 13.0)	14 24 28 (22 ± 7.2)
		150	1332 1393 1466 (1397 ± 67.1)	89 104 113 (102 ± 12.1)	67 72 91 (77 ± 12.7)	702 752 758 (737 ± 30.7)	21 26 34 (27 ± 6.6)
		500	574 628 756 (653 ± 93.5)	105 112 112 (110 ± 4.0)	87 91 115 (98 ± 15.1)	733 745 825 (768 ± 50.0)	21 26 37 (28 ± 8.2)
		1500#	729 864 952 (848 ± 112.3)	86 105 113 (101 ± 13.9)	84 101 106 (97 ± 11.5)	751 772 782 (768 ± 15.8)	20 30 36 (29 ± 8.1)
		5000#	701 741 759 (734 ± 29.7)	78 80 97 (85 ± 10.4)	71 72 83 (75 ± 6.7)	655 795 830 (760 ± 92.6)	25 28 34 (29 ± 4.6)
	Positive control	Name	2AA				
		Concentration (μg/plate)	1	2	10	0.5	2
		Number of revertant colonies/plate	956 1025 1036 (1006 ± 43.4)	330 332 387 (350 ± 32.3)	813 840 1033 (895 ± 120.0)	401 405 417 (408 ± 8.3)	202 213 223 (213 ± 10.5)

Negative control : Dimethyl sulfoxide.
2AA : 2-Aminoanthracene.
( ): Mean ± S.D.
No growth inhibition of tester strains was observed.
#: Fine white precipitates were noted on the surface of agar plate at the start and completion of incubation.

Table 2-1. Reverse mutation test of 4,4'-bis(chloromethyl)-1,1'-biphenyl with bacteria (mutagenicity test)

S9 mix		Concentration (μg/plate)	Number of revertant colonies/plate				
			Base-pair substitution type			Frameshift type	
			TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
S9 mix (-)	Negative control	0	119 121 127 (122 ± 4.2)	17 17 20 (18 ± 1.7)	40 43 46 (43 ± 3.0)	25 25 32 (27 ± 4.0)	8 12 14 (11 ± 3.1)
	4,4'-bis(chloromethyl)-1,1'-biphenyl	0.05	133 145 146 (141 ± 7.2)	9 18 19 (15 ± 5.5)		29 42 43 (38 ± 7.8)	
		0.15	160 173 178 (170 ± 9.3)	12 19 28 (20 ± 8.0)		27 47 51 (42 ± 12.9)	
		0.5	205 216 222 (214 ± 8.6)	18 21 24 (21 ± 3.0)		79 84 94 (86 ± 7.6)	
		1.5	319 338 352 (336 ± 16.6)	13 13 21 (16 ± 4.6)		154 156 159 (156 ± 2.5)	
		5	623 652 738 (671 ± 59.8)	33 33 39 (35 ± 3.5)		323 326 333 (327 ± 5.1)	
		15	938 1036 1039 (1004 ± 57.5)	49 55 61 (55 ± 6.0)		470 473 475 (473 ± 2.5)	
		50	848 892 912 (884 ± 32.7)	41 45 51 (46 ± 5.0)	54 65 92 (70 ± 19.6)	466 467 507 (480 ± 23.4)	9 17 20 (15 ± 5.7)
		150	805 839 874 (839 ± 34.5)	43 51 65 (53 ± 11.1)	66 69 69 (68 ± 1.7)	461 479 486 (475 ± 12.9)	14 17 18 (16 ± 2.1)
		500#	819 876 914 (870 ± 47.8)	51 54 72 (59 ± 11.4)	59 67 71 (66 ± 6.1)	486 509 535 (510 ± 24.5)	15 16 17 (16 ± 1.0)
		1500#	1066 1133 1158 (1119 ± 47.6)	45 51 52 (49 ± 3.8)	79 86 101 (89 ± 11.2)	530 557 598 (562 ± 34.2)	9 15 17 (14 ± 4.2)
		5000#	966 1038 1069 (1024 ± 52.8)	51 55 66 (57 ± 7.8)	126 139 152 (139 ± 13.0)	700 728 747 (725 ± 23.6)	15 16 18 (16 ± 1.5)
	Positive control	Name	AF-2	NaN_3	AF-2	AF-2	9AA
		Concentration (μg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
		Number of revertant colonies/plate	450 454 470 (458 ± 10.6)	447 476 486 (470 ± 20.3)	107 126 134 (122 ± 13.9)	397 435 477 (436 ± 40.0)	342 391 439 (391 ± 48.5)

Negative control : Dimethyl sulfoxide.
AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; NaN_3 : Sodium azide; 9AA : 9-Aminoacridine hydrochloride.
( ): Mean ± S.D.
No growth inhibition of tester strains was observed.
#: Fine white precipitates were noted on the surface of agar plate at the start and completion of incubation.

Table 2-2. Reverse mutation test of 4,4'-bis(chloromethyl)-1,1'-biphenyl with bacteria (mutagenicity test)

S9 mix		Concentration (µg/plate)	Number of revertant colonies/plate				
			Base-pair substitution type			Frameshift type	
			TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
S9 mix (+)	Negative control	0	98 111 113 (107 ± 8.1)	11 17 20 (16 ± 4.6)	36 41 42 (40 ± 3.2)	34 37 38 (36 ± 2.1)	15 16 19 (17 ± 2.1)
	4,4'-bis(chloromethyl)-1,1'-biphenyl	5	116 132 141 (130 ± 12.7)			38 44 45 (42 ± 3.8)	
		15	214 238 240 (231 ± 14.5)	18 19 25 (21 ± 3.8)		101 123 125 (116 ± 13.3)	
		50	577 589 659 (608 ± 44.3)	30 32 34 (32 ± 2.0)	52 59 65 (59 ± 6.5)	354 401 404 (386 ± 28.0)	15 18 24 (19 ± 4.6)
		150	1490 1510 1513 (1504 ± 12.5)	115 128 137 (127 ± 11.1)	74 79 80 (78 ± 3.2)	767 773 875 (805 ± 60.7)	18 20 29 (22 ± 5.9)
		500	505 537 638 (560 ± 69.4)	116 122 126 (121 ± 5.0)	81 81 83 (82 ± 1.2)	700 747 762 (736 ± 32.3)	22 25 30 (26 ± 4.0)
		1500#	530 533 559 (541 ± 15.9)	108 117 120 (115 ± 6.2)	85 87 88 (87 ± 1.5)	754 767 782 (768 ± 14.0)	31 34 35 (33 ± 2.1)
		5000#	700 723 754 (726 ± 27.1)	85 101 108 (98 ± 11.8)	96 101 102 (100 ± 3.2)	699 738 739 (725 ± 22.8)	20 38 44 (34 ± 12.5)
	Positive control	Name	2AA				
		Concentration (µg/plate)	1	2	10	0.5	2
		Number of revertant colonies/plate	916 940 995 (950 ± 40.5)	348 349 363 (353 ± 8.4)	875 883 955 (904 ± 44.1)	390 397 421 (403 ± 16.3)	221 225 252 (233 ± 16.9)

Negative control : Dimethyl sulfoxide.
2AA : 2-Aminoanthracene.
( ): Mean ± S.D.
No growth inhibition of tester strains was observed.
#: Fine white precipitates were noted on the surface of agar plate at the start and completion of incubation.

Table 3. Maximum potency of test strains

		Maximum potency of test strains (number of colonies/mg)									
		TA100		TA1535		WP2*uvrA*		TA98		TA1537	
		Without S9 mix	With S9 mix	Without S9 mix	With S9 mix	Without S9 mix	With S9 mix	Without S9 mix	With S9 mix	Without S9 mix	With S9 mix
Dose-finding test	Dose (µg/plate)	5	50	5	150	500	150	5	50	–[a)]	500
	Maximum potency	95200.0	9600.0	4200.0	606.7	78.0	340.0	54800.0	7700.0	–	28.0
Mutagenicity test	Dose (µg/plate)	1.5	50	15	150	1500	500	0.5	50	–	5000
	Maximum potency	142666.7	10020.0	2466.7	740.0	30.7	84.0	118000.0	7000.0	–	3.4

a): Negative.

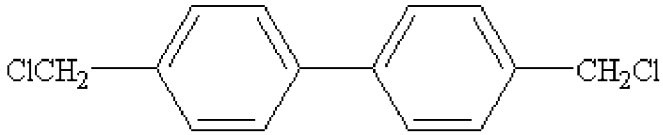

Figure 1. Chemical structure of 4,4'-bis(chloromethyl)-1,1'-biphenyl.

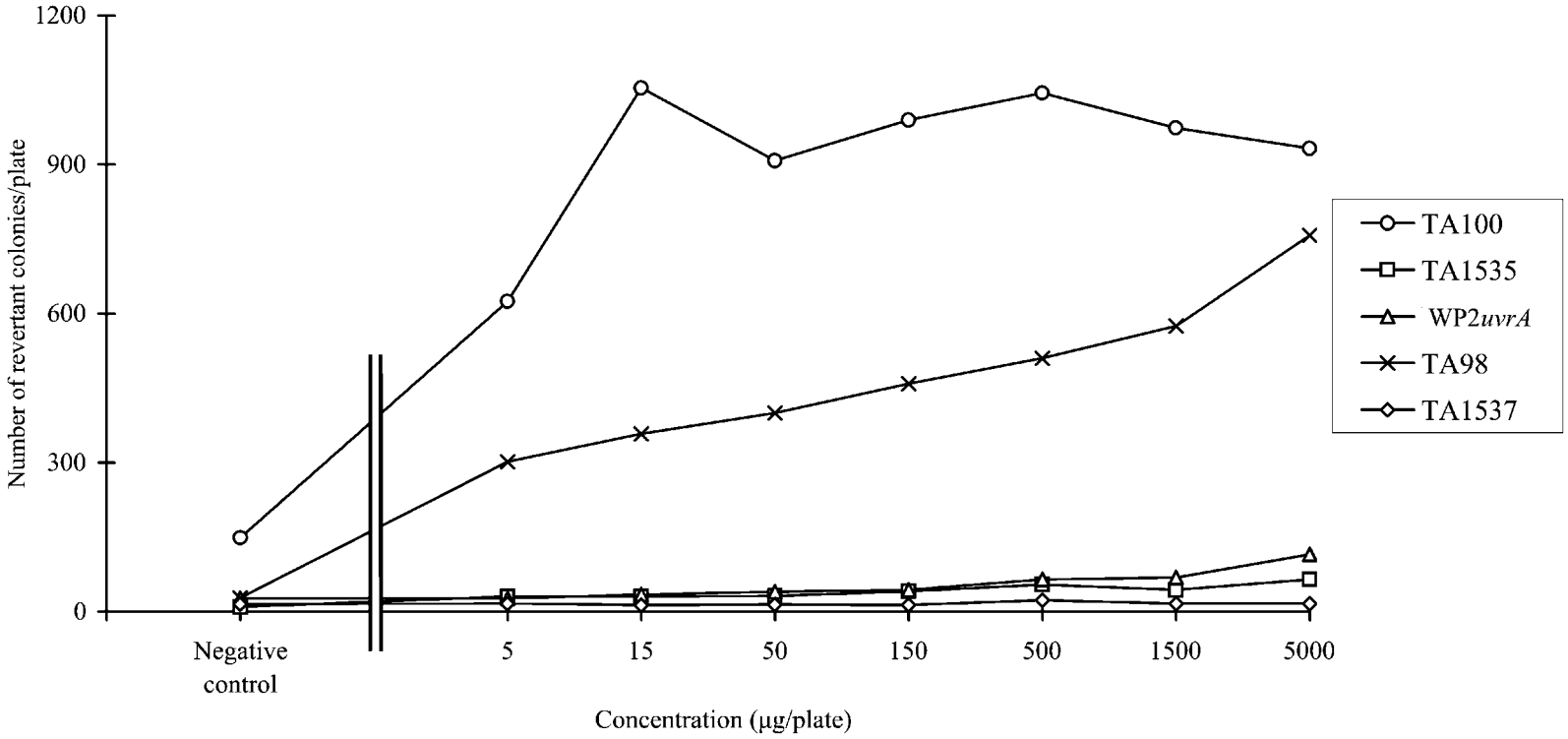

Figure 2-1. Reverse mutation test of 4,4'-bis(chloromethyl)-1,1'-biphenyl with bacteria.
(dose- finding test: without S9 mix)

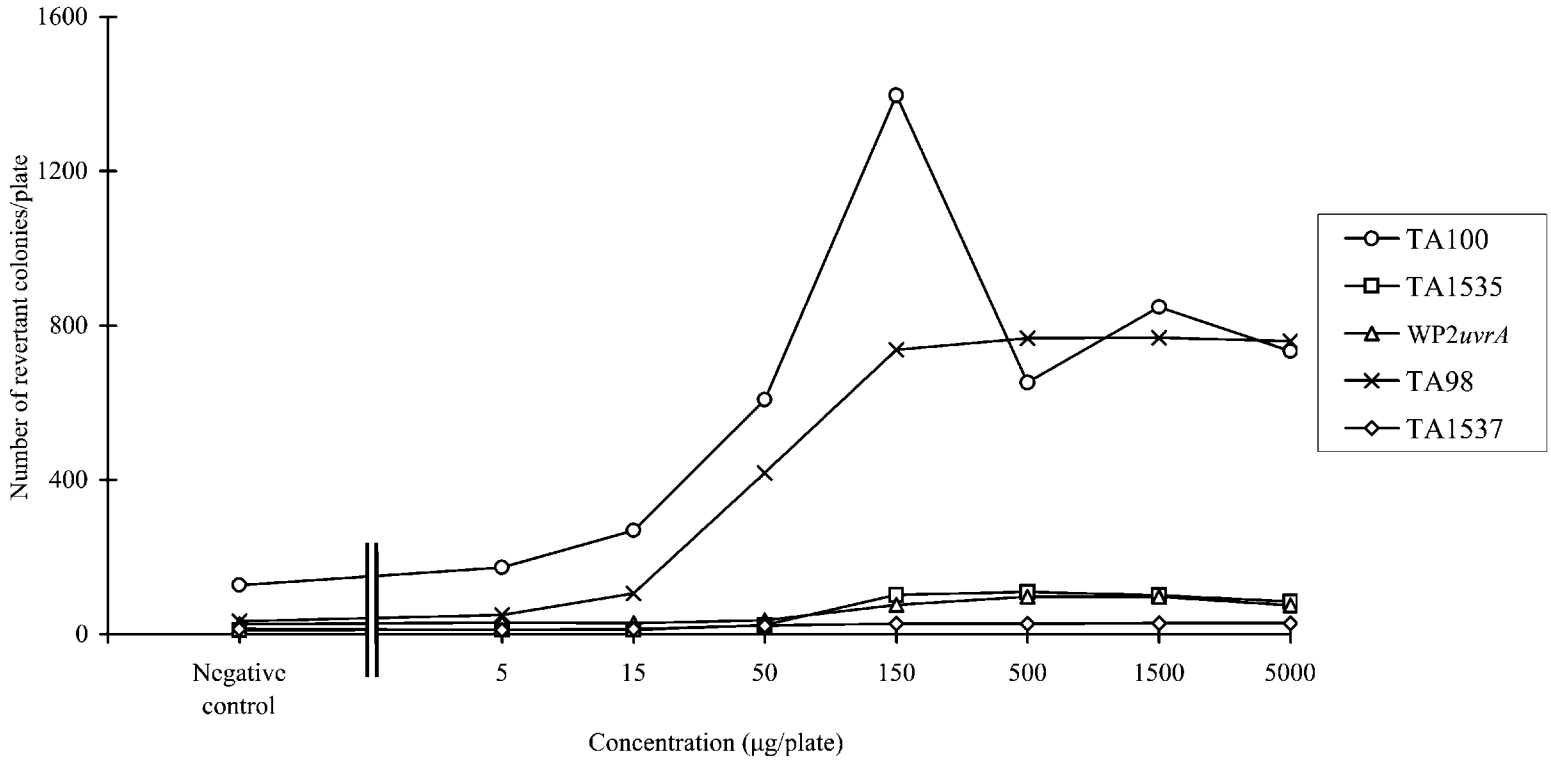

Figure 2-2. Reverse mutation test of 4,4'-bis(chloromethyl)-1,1'-biphenyl with bacteria.
(dose- finding test: with S9 mix)

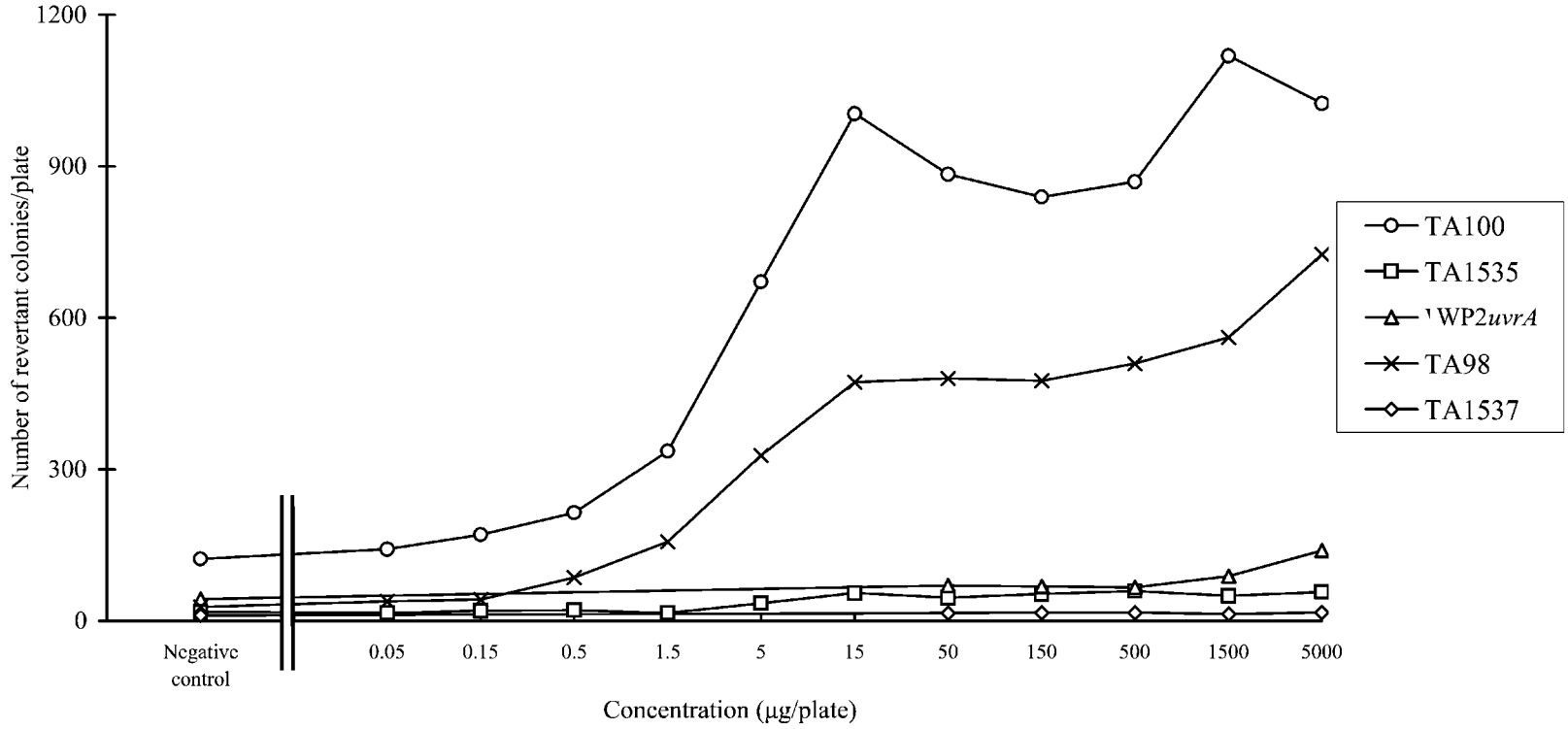

Figure 3-1. Reverse mutation test of 4,4'-bis(chloromethyl)-1,1'-biphenyl with bacteria.
(mutagenicity test: without S9 mix)

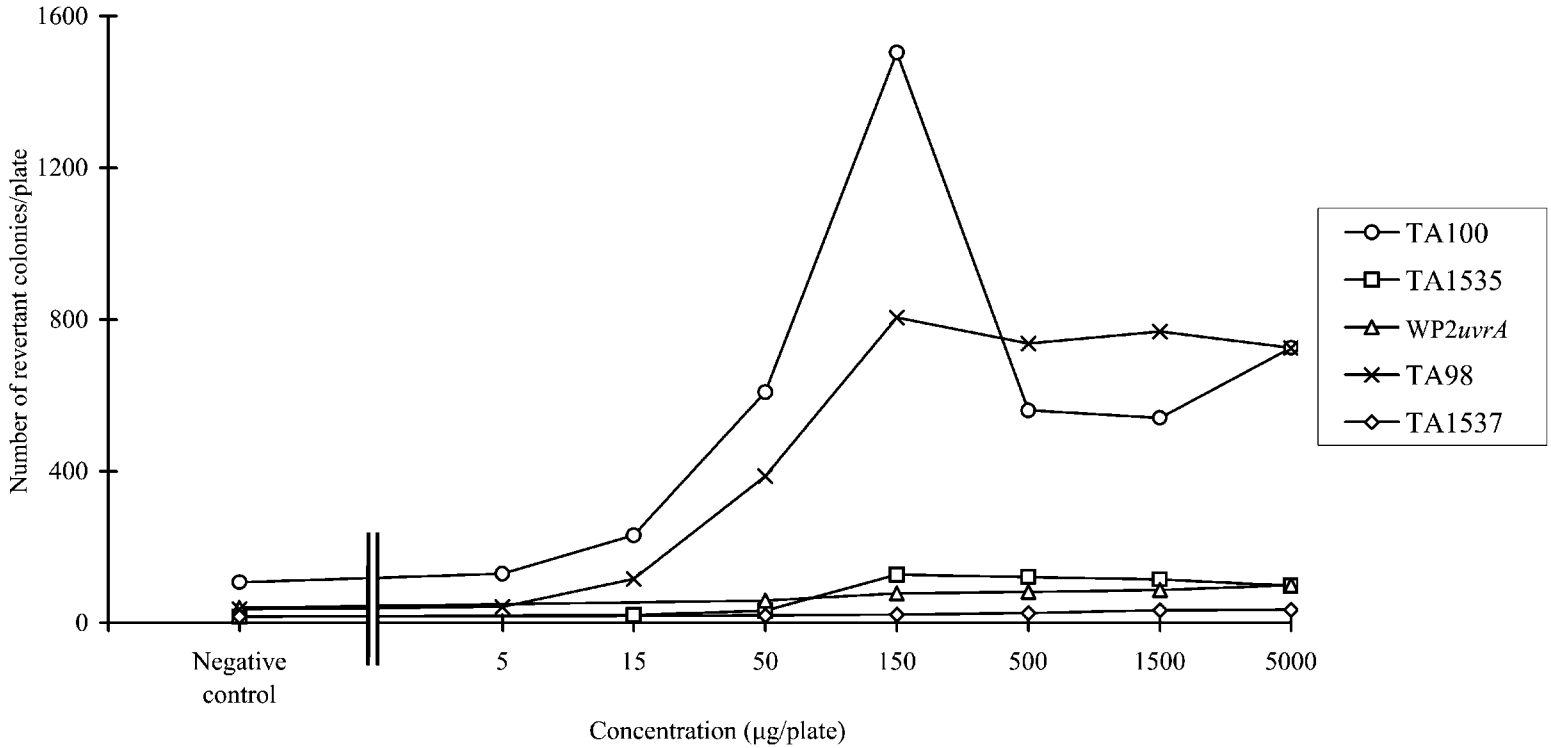

Figure 3-2. Reverse mutation test of 4,4'-bis(chloromethyl)-1,1'-biphenyl with bacteria.
(mutagenicity test: with S9 mix)