
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

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 WP2uvrA 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, WP2uvrA 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 WP2uvrA 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 WP2uvrA 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, WP2uvrA 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 \pm 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°C である。

当試験には,

入手したものをを用いた [

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°C (実測値: 22.0–25.0°C), 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°C (実測値: 22.0–24.8°C), 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°C (実測値: -87–-77°C)] 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Lot No.: 100511A9)

製造日: 2010年5月11日

媒体: DMSO (紫外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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Lot No.: 100511AF01), 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Lot No.: 100511AF10)

製造日: 2010年5月11日

媒体: DMSO (紫外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については, 0.05 及び 260 mg/mLの濃度で調製後, 室温 [設定温度: 23°C(実測値: 22.8 – 23.1°C)]・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 <i>uvrA</i> | 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 <i>uvrA</i> | 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 μ L 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 μ L 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 <i>uvrA</i> | 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 [CrI: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 (φ 0.2 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 枚を使用した。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.の範囲内であった。

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.の範囲内であった。

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 ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | Number of revertant colonies/plate | | | | |
|------------------|---|---|--------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---------------------|
| | | | Base-pair substitution type | | | Frameshift type | |
| | | | TA100 | TA1535 | WP2 $uvrA$ | TA98 | TA1537 |
| S9 mix (-) | Negative control | 0 | 135 | 6 | 24 | 23 | 10 |
| | | | 151 | 8 | 24 | 29 | 19 |
| | | | 162 (149 \pm 13.6) | 14 (9 \pm 4.2) | 31 (26 \pm 4.0) | 31 (28 \pm 4.2) | 19 (16 \pm 5.2) |
| | 4,4'- bis(chloromethyl)- 1,1'-biphenyl | 5 | 602 | 30 | 20 | 261 | 12 |
| | | | 633 | 30 | 29 | 291 | 17 |
| | | | 639 (625 \pm 19.9) | 31 (30 \pm 0.6) | 31 (27 \pm 5.9) | 354 (302 \pm 47.5) | 20 (16 \pm 4.0) |
| | | 15 | 1026 | 22 | 26 | 348 | 10 |
| | | | 1053 | 32 | 33 | 360 | 15 |
| | | | 1083 (1054 \pm 28.5) | 37 (30 \pm 7.6) | 44 (34 \pm 9.1) | 366 (358 \pm 9.2) | 16 (14 \pm 3.2) |
| | | 50 | 879 | 25 | 32 | 386 | 10 |
| | | | 905 | 32 | 39 | 387 | 14 |
| | 938 (907 \pm 29.6) | | 39 (32 \pm 7.0) | 50 (40 \pm 9.1) | 426 (400 \pm 22.8) | 20 (15 \pm 5.0) | |
| | 150 | 914 | 32 | 35 | 422 | 10 | |
| | | 1022 | 38 | 43 | 454 | 13 | |
| | | 1033 (990 \pm 65.8) | 54 (41 \pm 11.4) | 55 (44 \pm 10.1) | 500 (459 \pm 39.2) | 18 (14 \pm 4.0) | |
| 500# | 678 | 40 | 56 | 505 | 17 | | |
| | 1084 | 60 | 58 | 510 | 21 | | |
| | 1370 (1044 \pm 347.7) | 63 (54 \pm 12.5) | 80 (65 \pm 13.3) | 517 (511 \pm 6.0) | 30 (23 \pm 6.7) | | |
| 1500# | 944 | 42 | 65 | 532 | 14 | | |
| | 973 | 44 | 67 | 576 | 17 | | |
| | 1003 (973 \pm 29.5) | 45 (44 \pm 1.5) | 75 (69 \pm 5.3) | 616 (575 \pm 42.0) | 19 (17 \pm 2.5) | | |
| 5000# | 909 | 61 | 107 | 718 | 10 | | |
| | 923 | 65 | 116 | 736 | 19 | | |
| | 965 (932 \pm 29.1) | 70 (65 \pm 4.5) | 123 (115 \pm 8.0) | 817 (757 \pm 52.7) | 20 (16 \pm 5.5) | | |
| Positive control | Name | AF-2 | NaN ₃ | AF-2 | AF-2 | 9AA | |
| | Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | 0.01 | 0.5 | 0.01 | 0.1 | 80 | |
| | Number of revertant colonies/plate | 449 497 503 (483 \pm 29.6) | 455 464 487 (469 \pm 16.5) | 91 110 116 (106 \pm 13.1) | 379 409 429 (406 \pm 25.2) | 280 291 319 (297 \pm 20.1) | |

Negative control : Dimethyl sulfoxide.

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; NaN₃ : Sodium azide; 9AA : 9-Aminoacridine hydrochloride.

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

Negative control : Dimethyl sulfoxide.

2AA : 2-Aminoanthracene.

(): Mean \pm 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 ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | Number of revertant colonies/plate | | | | | |
|------------|--|---|---|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| | | | Base-pair substitution type | | | Frameshift type | | |
| | | | TA100 | TA1535 | WP2 <i>uvrA</i> | TA98 | TA1537 | |
| S9 mix (-) | Negative control | 0 | 119 121 127 (122 \pm 4.2) | 17 17 20 (18 \pm 1.7) | 40 43 46 (43 \pm 3.0) | 25 25 32 (27 \pm 4.0) | 8 12 14 (11 \pm 3.1) | |
| | 4,4'- bis(chloromethyl)- 1,1'-biphenyl | 0.05 | 133 145 146 (141 \pm 7.2) | 9 18 19 (15 \pm 5.5) | / | 29 42 43 (38 \pm 7.8) | / | |
| | | 0.15 | 160 173 178 (170 \pm 9.3) | 12 19 28 (20 \pm 8.0) | / | 27 47 51 (42 \pm 12.9) | / | |
| | | 0.5 | 205 216 222 (214 \pm 8.6) | 18 21 24 (21 \pm 3.0) | / | 79 84 94 (86 \pm 7.6) | / | |
| | | 1.5 | 319 338 352 (336 \pm 16.6) | 13 13 21 (16 \pm 4.6) | / | 154 156 159 (156 \pm 2.5) | / | |
| | | 5 | 623 652 738 (671 \pm 59.8) | 33 33 39 (35 \pm 3.5) | / | 323 326 333 (327 \pm 5.1) | / | |
| | | 15 | 938 1036 1039 (1004 \pm 57.5) | 49 55 61 (55 \pm 6.0) | / | 470 473 475 (473 \pm 2.5) | / | |
| | | 50 | 848 892 912 (884 \pm 32.7) | 41 45 51 (46 \pm 5.0) | 54 65 92 (70 \pm 19.6) | 466 467 507 (480 \pm 23.4) | 9 17 20 (15 \pm 5.7) | |
| | | 150 | 805 839 874 (839 \pm 34.5) | 43 51 65 (53 \pm 11.1) | 66 69 69 (68 \pm 1.7) | 461 479 486 (475 \pm 12.9) | 14 17 18 (16 \pm 2.1) | |
| | | 500# | 819 876 914 (870 \pm 47.8) | 51 54 72 (59 \pm 11.4) | 59 67 71 (66 \pm 6.1) | 486 509 535 (510 \pm 24.5) | 15 16 17 (16 \pm 1.0) | |
| | | 1500# | 1066 1133 1158 (1119 \pm 47.6) | 45 51 52 (49 \pm 3.8) | 79 86 101 (89 \pm 11.2) | 530 557 598 (562 \pm 34.2) | 9 15 17 (14 \pm 4.2) | |
| | | 5000# | 966 1038 1069 (1024 \pm 52.8) | 51 55 66 (57 \pm 7.8) | 126 139 152 (139 \pm 13.0) | 700 728 747 (725 \pm 23.6) | 15 16 18 (16 \pm 1.5) | |
| | | Positive control | Name | AF-2 | NaN ₃ | AF-2 | AF-2 | 9AA |
| | | | Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | 0.01 | 0.5 | 0.01 | 0.1 | 80 |
| | | | Number of revertant colonies/plate | 450 454 470 (458 \pm 10.6) | 447 476 486 (470 \pm 20.3) | 107 126 134 (122 \pm 13.9) | 397 435 477 (436 \pm 40.0) | 342 391 439 (391 \pm 48.5) |

Negative control : Dimethyl sulfoxide.

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; NaN₃ : Sodium azide; 9AA : 9-Aminoacridine hydrochloride.

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

Negative control : Dimethyl sulfoxide.

2AA : 2-Aminoanthracene.

(): Mean \pm 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.

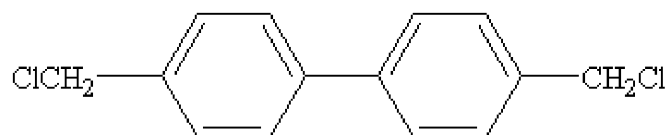


Figure 1. Chemical structure of 4,4'-bis(chloromethyl)-1,1'-biphenyl.

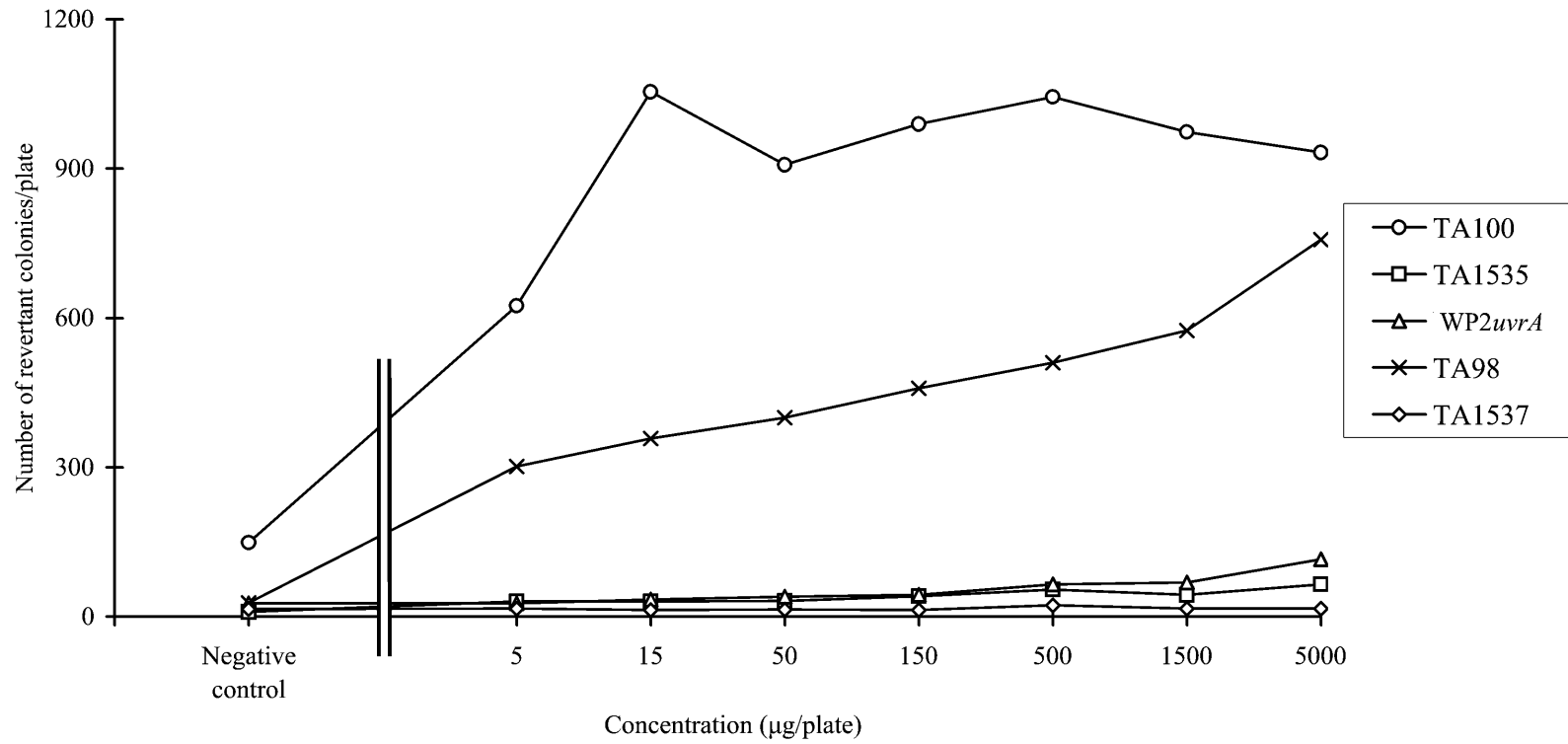


Figure 2-1. Reverse mutation test of 4,4'-bis(chloromethyl)-1,1'-biphenyl with bacteria. (dose- finding test: without S9 mix)

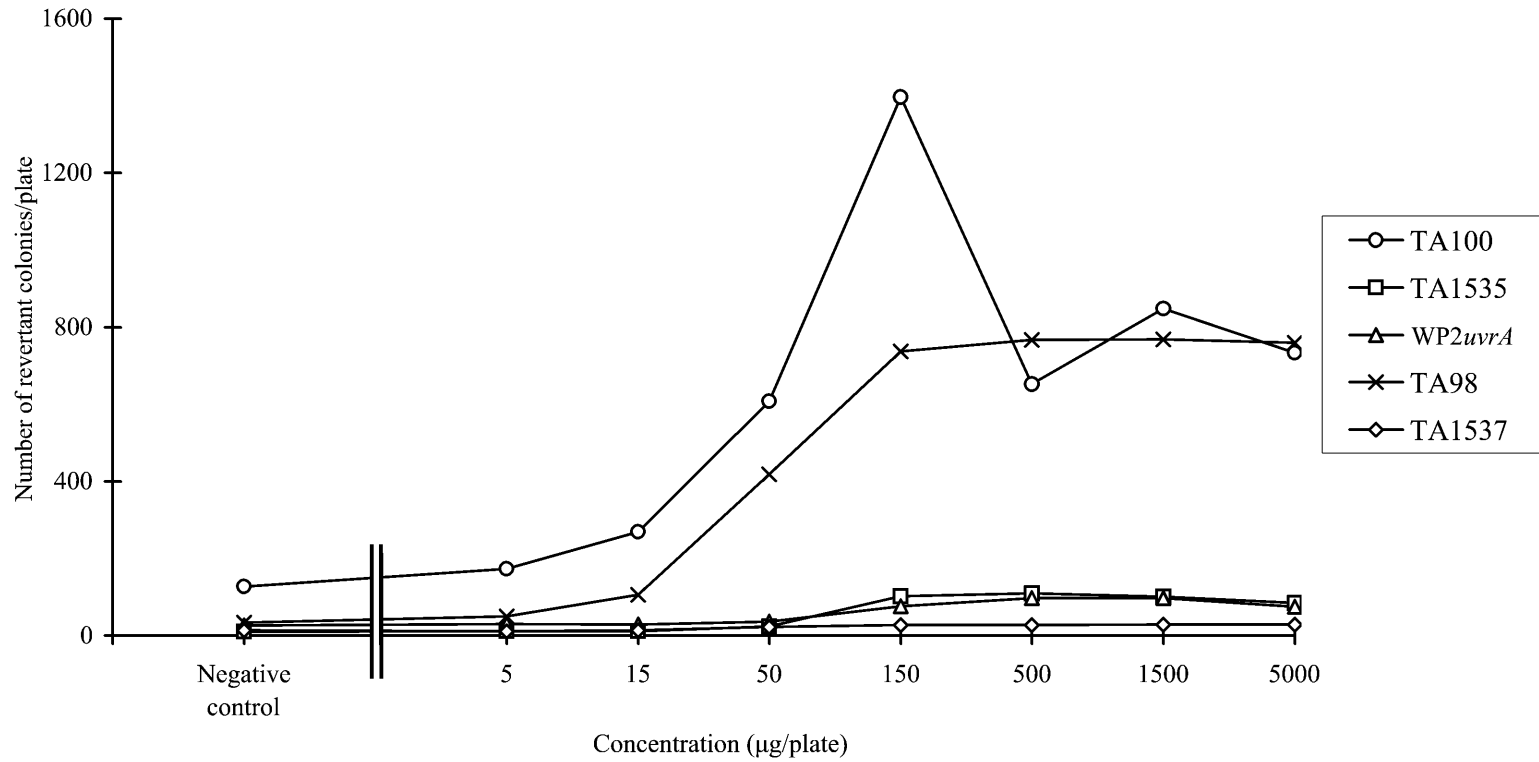


Figure 2-2. Reverse mutation test of 4,4'-bis(chloromethyl)-1,1'-biphenyl with bacteria.
(dose- finding test: with S9 mix)

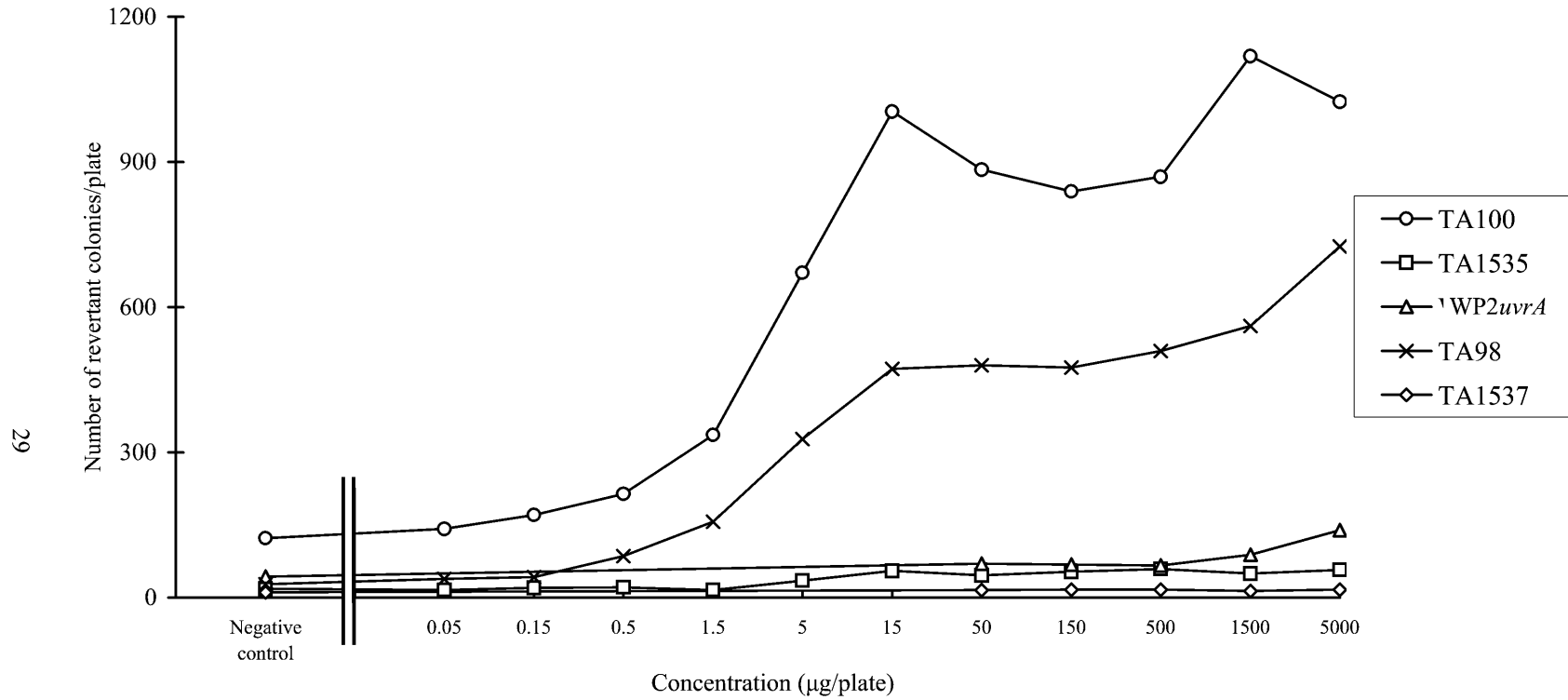


Figure 3-1. Reverse mutation test of 4,4'-bis(chloromethyl)-1,1'-biphenyl with bacteria.
(mutagenicity test: without S9 mix)

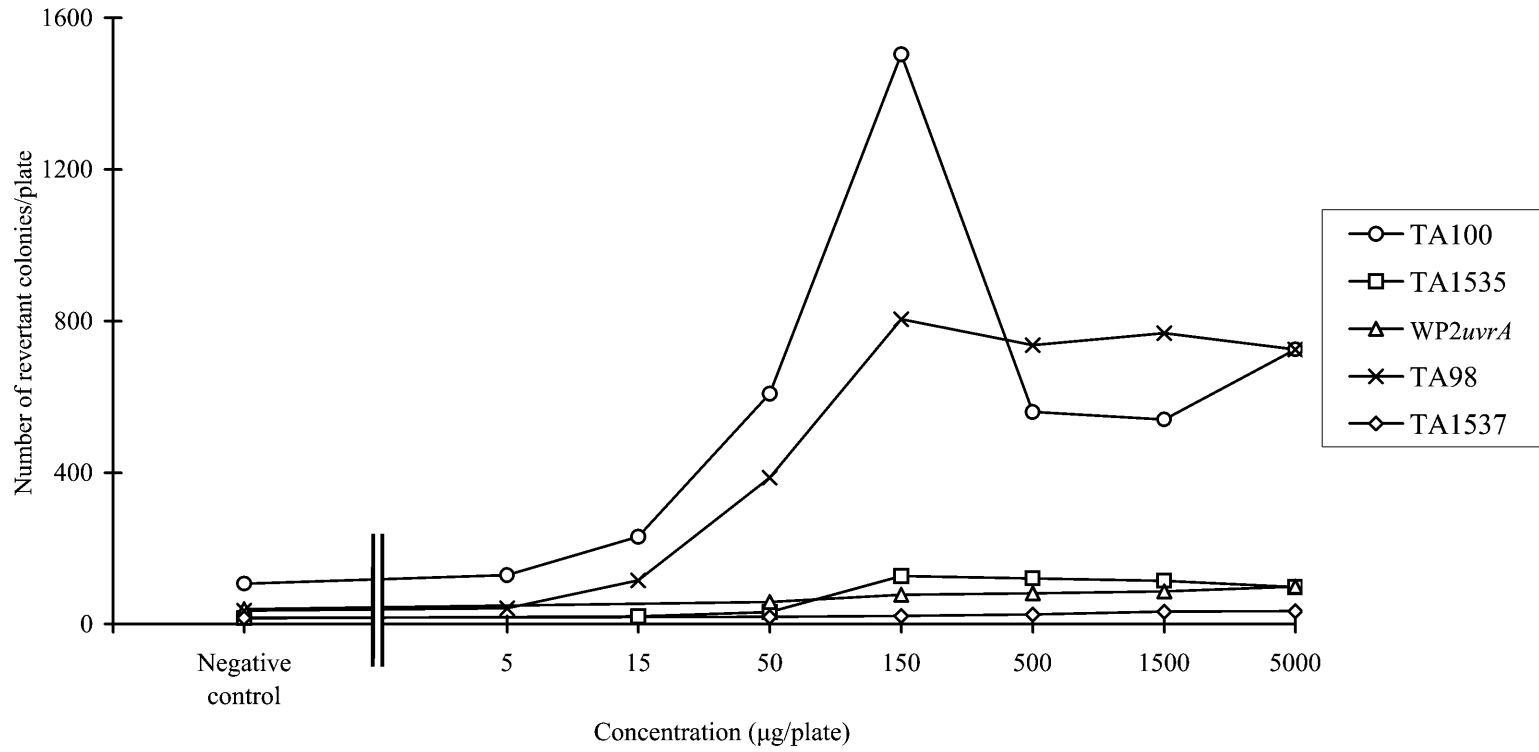


Figure 3-2. Reverse mutation test of 4,4'-bis(chloromethyl)-1,1'-biphenyl with bacteria. (mutagenicity test: with S9 mix)