



1-クロロ-2-(クロロメチル)ベンゼン
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
材料および方法	3
結果および考察	6
結 論	7
特 記 事 項	7
文 献	7
Tables 1～6	

【要 約】

1-クロロ-2-(クロロメチル)ベンゼンの変異原性の有無を、細菌を用いる復帰突然変異試験により検討し、疑陽性の結果を得た。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* の5菌株を用い、S9 mix 無添加および添加の条件でプレインキュベーション法により用量設定試験および2回の本試験を行った。用量設定試験を50.0~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で行ったところ、いずれの検定菌においても、S9 mix 無添加試験および添加試験とも500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で抗菌性が認められた。したがって、本試験はS9 mix 無添加試験および添加試験を15.6~500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で6用量を設定して行った。また、TA100のS9 mix 無添加試験では2回の本試験で変異コロニー数の用量依存的な増加が認められたが、溶媒対照値の2倍に達しなかったため、変異原性の確認のために最高用量を240 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、公差を30 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ として、6用量を設定して2回の追加試験および再現性試験を行った。

その結果、TA100のS9 mix 無添加試験では、変異コロニー数の用量依存的な増加が繰り返し認められたが、溶媒対照値の2倍を超えたのは追加試験Iだけであった。TA100のS9 mix 添加試験およびその他の検定菌では、溶媒対照値の2倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。以上の結果から、1-クロロ-2-(クロロメチル)ベンゼンは、用いた試験系において変異原性を有する疑いがあるもの(疑陽性)と判定した。

【緒 言】

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、1-クロロ-2-(クロロメチル)ベンゼンについて、細菌を用いる復帰突然変異試験をプレインキュベーション法¹⁾により実施した。

この試験は、サルモネラ菌（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²⁾、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³⁾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 S9 mix 無添加試験と、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素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 S9 mix 添加試験とからなっている。

本試験は、「新規化学物質等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、一部改正平成9年10月31日、環保安第287号、衛生第127号、平成09・10・31基局第2号）および「OECD毒性試験ガイドライン：471」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1997年8月7日に、*E. coli* WP2 *uvrA* 株は1997年4月9日から分与された。

検定菌は -80°C 以下で凍結保存したものを用いた。各菌株の凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、膜変異 (*rfa*) およびアンピシリン耐性因子 pKM 101 (プラスミド) の有無について調べ、特性が維持されていることを確認した。

試験に際して、ニュートリエントブロスNo.2 (Oxoid Ltd.) を入れたL字型試験管に解凍した菌液を一定量加え、 37°C で10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。試験に用いた検定菌液の生菌数を Appendix 1 に示した。

〔被験物質〕

1-クロロ-2-(クロロメチル)ベンゼン (略称: CCMB、CAS No. 611-19-8) は、分子量 161.03 の無色液体である。構造式等は Appendix 2 に示した。用いた被験物質は、ロット番号 純度 99.65wt% [不純物: 0.16% 1-クロロ-4-(クロロメチル)ベンゼン、0.17% 1-クロロ-2-(ジクロロメチル)ベンゼン] であり、から供与された。被験物質は、使用時まで室温で保管した。

CCMBは、ジメチルスルホキシド (DMSO、ロット番号: TPJ5678、和光純薬工業株) に溶解して最高濃度の調製液を調製した後、同溶媒で順次希釈して速やかに試験に用いた。

〔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 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
(和光純薬工業株) ロット番号 WTQ0059, 純度98%以上
SA : アジ化ナトリウム (和光純薬工業株) ロット番号 DLL3931, 純度98%以上
9AA : 9-アミノアクリジン (Sigma Chem. Co. ロット番号 106F06681, 純度97%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 DLH6052, 純度90%以上)
 AF2、9AA および 2AA は DMSO に、SA は超純水に溶解したものを -20°C で凍結
 保存し、解凍後速やかに試験に用いた。

[培地および S9 mix 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) バクトアガー (Difco Lab.)	0.6 %	(B)* L-ヒスチジン	0.5 mM
塩化ナトリウム	0.5 %	D-ビオチン	0.5 mM

* : WP2 *uvrA* 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、極東製薬工業(株)製の最少グルコース寒天培地 (ロット番号 : HY2802、
 1997年10月16日製造、および HY2901、1997年11月21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
リン酸水素二カルシウム	10 g	大洋寒天 (清水食品)	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 を流して固めたものである。

3) S9 mix (1 mL 中下記の成分を含む)

S9**	0.1 mL	NADH	4 μmol
塩化マグネシウム	8 μmol	NADPH	4 μmol
塩化カルシウム	33 μmol	ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μmol
グルコース-6-リン酸	5 μmol		

** : 7 週齢の Sprague-Dawley 系雄ラットにフェノバルビタール(PB)およ
 び 5,6-ベンゾフラボン(BF)の併用投与を行い、酵素誘導して作製
 したS9 (キッコーマン(株)、ロット番号 : RAA-370、1997年10月3日
 製造および RAA-376、1998年1月23日製造) を購入し、-80°C で
 凍結保存し、用時に解凍して用いた。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、いずれも
 腹腔内投与したものである。肝臓の摘出および S9 の調製は5日目。

〔試験方法〕

プレインキュベーション法により、S9 mix 無添加試験および S9 mix 添加試験を行った。小試験管中に、被験物質調製液 0.1 mL、リン酸緩衝液 0.5 mL (S9 mix 添加試験においては S9 mix 0.5 mL)、検定菌液 0.1 mL を混合し、37°Cで20分間プレインキュベーションしたのち、トッパアガー 2 mL を加えて混和し、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使用溶媒または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各Table中に示した。同時に実施した試験については、溶媒および陽性対照群を共通とした。培養は37°Cで48時間行い、発生した変異コロニー数を目視またはコロニーカウンターを用いて算定した。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、溶媒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、追加試験および再現性試験においては、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、結果の再現性の確認を行った。また、TA100 の S9 mix 無添加試験については、結果の確認のために2回の追加試験と再現性試験を実施した。なお、最高用量の被験物質 0.1 mL および S9 mix 0.5 mL を、それぞれ最少グルコース寒天培地上に滴下して、培養終了時に雑菌の混入の有無を調べた。

〔判定基準〕

結果の判定に統計学的手法は用いないこととした。

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌の S9 mix 無添加試験あるいは S9 mix 添加試験において、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、溶媒対照値の2倍以上に増加し、その増加に再現性および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。

【結果および考察】

〔用量設定試験〕

CCMBについて 50.0~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で公比を約3として、試験を実施した (Table 1)。その結果、すべての検定菌の S9 mix 無添加試験および添加試験のいずれにおいても 500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で抗菌性が認められた。

したがって、本試験における最高用量は、S9 mix 無添加試験および添加試験とも 500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とした。

〔本試験〕

S9 mix 無添加試験および添加試験のいずれにおいても、15.6~500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で公比を2として6用量を設定して2回の本試験を実施した (Table 2、3)。その結果、TA100 の S9 mix 無添加試験では、2回の試験とも 15.6~125 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で変異コロニー数の用量依存的な増加が認められたが、溶媒対照値の2倍を超えなかった。しかし、250 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量では、抗菌性のために変異コロニーの形成が抑制されていたため、用量の設定を細かくすることで、溶媒対照値の2倍以上となる用量が得られる可能性があるものと判断して、最高用量を 240 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とし、公差 30 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で6用量を設定して、2回の追加試験を実施した (Table 4、5)。その結果、2回の試験とも 90.0~120 または 150 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で変異コロニー数の用量依存的な増加が認められ、溶媒対照値と比較して追加試験 I では2倍以上となったが、追加試験 II では2倍に達しなかった。そこで、さらに再現性を確認するために追加試験と同一用量で再現性試験を実施した (Table 6)。その結果、変異コロニー数はやはり用量依存的に増加したが、溶媒対照値の2倍には達しなかった。したがって、判定基準によれば陽性とは判定できないが、5回の試験で常に変異コロニー数が用量依存的に増加し、その最大値が溶媒対照値の 1.5~2.1 倍に達したことから、当被験物質は復帰突然変異誘発能を有する可能性が高い。

また、CCMBは当研究所で本試験と並行して実施されたチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験でも、S9 mix 非存在下で染色体の構造異常が S9 mix 存在下で染色体の構造異常および倍数性細胞が誘発され陽性であった (食薬セ研第9-1941号)。さらに、CCMBの類縁化合物の 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンも復帰突然変異

試験において TA100 で陽性の結果が得られている¹⁾。

C CMBについて実施したすべての試験において、用いた最高用量の調製液および S9 mix への雑菌の混入は認められなかった。また、陽性対照試験では、いずれの検定菌においても陽性対照物質の変異原性が検出され、溶媒対照値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。

【結 論】

以上の結果に基づき、1-クロロ-2-(クロロメチル)ベンゼンは、用いた試験系において変異原性を有する疑いがあるもの(疑陽性)と判定した。

【特 記 事 項】

試験の全過程を通して、試験の信頼性に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。

【文 献】

- 1) Matsushima, T., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A., Sawamura, M.: in "Short-Term Test Systems for Detecting Carcinogens" Norpoth, K.H., Garner, R.C. eds. Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1980) pp. 273-285

- 2) Maron, D.M., Ames, B.N.: Mutation Research 113: 173-215 (1983)
- 3) Venitt, S., Crofton-Sleigh, C.: in "Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens" de Serres, F.J., Ashby, J. eds, Elsevier/North-Holland, New York (1981) pp. 351-360
- 4) 労働省労働基準局安全衛生部化学物質調査課 監修: 「既存化学物質 変異原性試験データ集」, (社)日本化学物質安全・情報センター 編集・発行 (1996) p. 181

Table 1. Cytotoxicity of 1-chloro-2-(chloromethyl) benzene on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (µg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, mean ± S.D.)															
		Base - pair substitution type									Frameshift type						
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537			
S9 mix (-)	0	148	150	124	9	12	9	26	25	12	16	14	24	7	10	6	
		(141 ± 14.5)			(10 ± 1.7)			(21 ± 7.8)			(18 ± 5.3)			(8 ± 2.1)			
	50.0	240			16			22			26			11			
	150	248			10			24			20			8			
	500	0 *			0 *			0 *			0 *			0 *			
	1500	0 *			0 *			0 *			0 *			0 *			
	5000	0 *			0 *			0 *			0 *			0 *			
S9 mix (+)	0	169	172	144	17	12	14	25	25	19	25	30	35	8	5	7	
		(162 ± 15.4)			(14 ± 2.5)			(23 ± 3.5)			(30 ± 5.0)			(7 ± 1.5)			
	50.0	162			8			35			27			7			
	150	203			6			37			31			14			
	500	0 *			0 *			0 *			0 *			0 *			
	1500	0 *			0 *			0 *			0 *			0 *			
	5000	0 *			0 *			0 *			0 *			0 *			
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA			
	Dose (µg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80			
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose (µg /plate)	1			2			10			0.5			2			
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	999	1127	1090	423	401	350	769	810	736	508	498	536	345	403	369	
		(1072 ± 65.9)			(391 ± 37.4)			(772 ± 37.1)			(514 ± 19.7)			(372 ± 29.1)			

Purity was 99.65wt% and 0.16% 1-chloro-4-(chloromethyl) benzene and 0.17% 1-chloro-2-(dichloromethyl) benzene were contained as impurities.

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.

Table 2. Mutagenicity of 1-chloro-2-(chloromethyl) benzene on bacteria (I)

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (μg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, mean \pm S.D.)																			
		Base - pair substitution type									Frameshift type										
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537							
S9 mix (-)	0	116	131	127	8	11	8	15	30	28	26	20	19	7	7	6	(125 \pm 7.8)	(9 \pm 1.7)	(24 \pm 8.1)	(22 \pm 3.8)	(7 \pm 0.6)
	15.6	122	146	159	11	13	6	30	29	19	9	24	14	7	5	8	(142 \pm 18.8)	(10 \pm 3.6)	(26 \pm 6.1)	(16 \pm 7.6)	(7 \pm 1.5)
	31.3	172	167	169	14	14	4	21	21	21	28	18	19	9	7	8	(169 \pm 2.5)	(11 \pm 5.8)	(21 \pm 0.0)	(22 \pm 5.5)	(8 \pm 1.0)
	62.5	188	192	202	12	8	7	23	21	30	23	26	23	14	6	8	(194 \pm 7.2)	(9 \pm 2.6)	(25 \pm 4.7)	(24 \pm 1.7)	(9 \pm 4.2)
	125	212	211	193	13	8	10	29	21	26	23	23	31	12	9	9	(205 \pm 10.7)	(10 \pm 2.5)	(25 \pm 4.0)	(26 \pm 4.6)	(10 \pm 1.7)
	250	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	2 *	0 *	0 *	0 *	0 *	2 *	0 *	0 *	(0 \pm 0.0)	(0 \pm 0.0)	(1 \pm 1.2)	(0 \pm 0.0)	(1 \pm 1.2)
	500	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	(0 \pm 0.0)	(0 \pm 0.0)	(0 \pm 0.0)	(0 \pm 0.0)	(0 \pm 0.0)
S9 mix (+)	0	126	152	147	12	14	6	37	28	33	40	32	26	14	10	15	(142 \pm 13.8)	(11 \pm 4.2)	(33 \pm 4.5)	(33 \pm 7.0)	(13 \pm 2.6)
	15.6	125	120	137	11	13	12	32	32	36	28	18	24	12	11	12	(127 \pm 8.7)	(12 \pm 1.0)	(33 \pm 2.3)	(23 \pm 5.0)	(12 \pm 0.6)
	31.3	159	188	151	9	9	12	38	31	31	35	42	31	12	17	14	(166 \pm 19.5)	(10 \pm 1.7)	(33 \pm 4.0)	(36 \pm 5.6)	(14 \pm 2.5)
	62.5	147	184	146	9	12	15	35	32	30	32	28	24	16	10	18	(159 \pm 21.7)	(12 \pm 3.0)	(32 \pm 2.5)	(28 \pm 4.0)	(15 \pm 4.2)
	125	175	163	178	12	9	10	34	35	28	36	30	31	10	13	16	(172 \pm 7.9)	(10 \pm 1.5)	(32 \pm 3.8)	(32 \pm 3.2)	(13 \pm 3.0)
	250	0 *	105 *	100 *	6 *	4 *	8 *	29	41	35	21 *	20 *	23 *	4 *	15 *	6 *	(68 \pm 59.2)	(6 \pm 2.0)	(35 \pm 6.0)	(21 \pm 1.5)	(8 \pm 5.9)
	500	0 *	0 *	0 *	2 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	10 *	0 *	0 *	0 *	0 *	(0 \pm 0.0)	(1 \pm 1.2)	(0 \pm 0.0)	(3 \pm 5.8)	(0 \pm 0.0)
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA							
	Dose (μg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80							
S9 mix (-)	Number of colonies / plate	531	569	548	566	654	355	208	212	195	619	601	605	323	400	342	(549 \pm 19.0)	(525 \pm 153.7)	(205 \pm 8.9)	(608 \pm 9.5)	(355 \pm 40.1)
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA							
	Dose (μg /plate)	1			2			10			0.5			2							
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	1026	1064	1092	454	467	430	794	762	878	517	535	557	448	418	459	(1061 \pm 33.1)	(450 \pm 18.8)	(811 \pm 59.9)	(536 \pm 20.0)	(442 \pm 21.2)

Purity was 99.65wt% and 0.16% 1-chloro-4-(chloromethyl) benzene and 0.17% 1-chloro-2-(dichloromethyl) benzene were contained as impurities.

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.

Table 3. Mutagenicity of 1-chloro-2-(chloromethyl) benzene on bacteria (II)

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (µg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, mean ± S.D.)															
		Base - pair substitution type									Frameshift type						
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537			
S9 mix (-)	0	145	153	140	7	11	11	15	21	30	26	23	28	17	8	6	
		(146 ± 6.6)			(10 ± 2.3)			(22 ± 7.5)			(26 ± 2.5)			(10 ± 5.9)			
	15.6	183	161	161	9	13	12	24	21	15	20	15	19	8	7	9	
		(168 ± 12.7)			(11 ± 2.1)			(20 ± 4.6)			(18 ± 2.6)			(8 ± 1.0)			
	31.3	180	158	176	7	10	9	27	20	31	17	18	23	2	6	9	
		(171 ± 11.7)			(9 ± 1.5)			(26 ± 5.6)			(19 ± 3.2)			(6 ± 3.5)			
	62.5	205	213	189	11	13	9	26	21	27	26	23	30	15	10	13	
	(202 ± 12.2)			(11 ± 2.0)			(25 ± 3.2)			(26 ± 3.5)			(13 ± 2.5)				
125	214	244	224	11	15	16	27	24	31	24	17	28	12	9	10		
	(227 ± 15.3)			(14 ± 2.6)			(27 ± 3.5)			(23 ± 5.6)			(10 ± 1.5)				
250	0 *	0 *	75 *	0 *	0 *	0 *	14 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	2 *		
	(25 ± 43.3)			(0 ± 0.0)			(5 ± 8.1)			(0 ± 0.0)			(1 ± 1.2)				
500	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *		
	(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)				
S9 mix (+)	0	143	141	130	16	8	17	29	30	21	27	37	34	8	13	14	
		(138 ± 7.0)			(14 ± 4.9)			(27 ± 4.9)			(33 ± 5.1)			(12 ± 3.2)			
	15.6	165	155	134	13	14	5	31	35	25	32	35	34	15	13	12	
		(151 ± 15.8)			(11 ± 4.9)			(30 ± 5.0)			(34 ± 1.5)			(13 ± 1.5)			
	31.3	161	152	147	8	9	15	33	30	23	34	31	28	11	17	11	
		(153 ± 7.1)			(11 ± 3.8)			(29 ± 5.1)			(31 ± 3.0)			(13 ± 3.5)			
	62.5	150	147	174	6	13	9	26	27	31	32	34	19	18	12	10	
	(157 ± 14.8)			(9 ± 3.5)			(28 ± 2.6)			(28 ± 8.1)			(13 ± 4.2)				
125	198	187	177	12	14	8	36	37	33	29	34	33	12	11	6		
	(187 ± 10.5)			(11 ± 3.1)			(35 ± 2.1)			(32 ± 2.6)			(10 ± 3.2)				
250	99 *	124 *	105 *	7 *	4 *	8 *	35	24	37	24 *	22 *	26 *	6 *	12 *	4 *		
	(109 ± 13.1)			(6 ± 2.1)			(32 ± 7.0)			(24 ± 2.0)			(7 ± 4.2)				
500	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *		
	(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)				
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA			
	Dose (µg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80			
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose (µg /plate)	1			2			10			0.5			2			
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	1079	999	1015	438	392	383	727	722	748	459	500	459	317	321	372	
		(1031 ± 42.3)			(404 ± 29.5)			(732 ± 13.8)			(473 ± 23.7)			(337 ± 30.7)			

Purity was 99.65wt% and 0.16% 1-chloro-4-(chloromethyl) benzene and 0.17% 1-chloro-2-(dichloromethyl) benzene were contained as impurities.

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.

Table 5. Mutagenicity of 1-chloro-2-(chloromethyl) benzene on bacteria (Additional test (II))

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (μg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, mean \pm S.D.)					
		Base - pair substitution type					
		TA100					
S9 mix (-)	0	155	155	138			
		(149 \pm 9.8)					
	90.0	184	216	183			
		(194 \pm 18.8)					
	120	221	258	242			
		(240 \pm 18.6)					
	150	258	282	256			
	(265 \pm 14.5)						
S9 mix (-)	180	144 *	139 *	146 *			
		(143 \pm 3.6)					
	210	0 *	0 *	0 *			
	(0 \pm 0.0)						
	240	0 *	0 *	0 *			
	(0 \pm 0.0)						
Positive control	Chemical	AF2					
	Dose (μg /plate)	0.01					
S9 mix (-)	Number of colonies / plate	555	518	493			
		(522 \pm 31.2)					

Purity was 99.65wt% and 0.16% 1-chloro-4-(chloromethyl) benzene and 0.17% 1-chloro-2-(dichloromethyl) benzene were contained as impurities.

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

Table 6. Confirmation of mutagenicity of 1-chloro-2-(chloromethyl) benzene on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (μg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, mean ± S.D.)					
		Base - pair substitution type					
		TA100					
S9 mix (-)	0	125	146	125			
		(132 ± 12.1)					
	90.0	195	187	202			
		(195 ± 7.5)					
	120	244	231	235			
		(237 ± 6.7)					
	150	245	225	201			
	(224 ± 22.0)						
S9 mix (-)	180	124 *	138 *	165 *			
		(142 ± 20.8)					
	210	49 *	0 *	0 *			
	(16 ± 28.3)						
S9 mix (-)	240	0 *	0 *	0 *			
		(0 ± 0.0)					
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2					
	Dose (μg /plate)	0.01					
	Number of colonies / plate	492	525	468			
		(495 ± 28.6)					

Purity was 99.65wt% and 0.16% 1-chloro-4-(chloromethyl) benzene and 0.17% 1-chloro-2-(dichloromethyl) benzene were contained as impurities.

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.