

# 最終報告書

表 題：(2-クロロエチル)ベンゼンの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：SR08201

株式会社 化合物安全性研究所

## 目 次

	頁
表紙 .....	1
目次 .....	4

## 表

表 1	試験結果表(用量設定試験) .....	21
表 2	試験結果表(本試験) .....	22

## 図

図 1-1	Salmonella typhimurium TA100 の用量—反応曲線(直接法) .....	23
図 1-2	Salmonella typhimurium TA100 の用量—反応曲線(代謝活性化法) .....	24
図 2-1	Salmonella typhimurium TA1535 の用量—反応曲線(直接法) .....	25
図 2-2	Salmonella typhimurium TA1535 の用量—反応曲線(代謝活性化法) .....	26
図 3-1	Escherichia coli WP2uvrA の用量—反応曲線(直接法) .....	27
図 3-2	Escherichia coli WP2uvrA の用量—反応曲線(代謝活性化法) .....	28
図 4-1	Salmonella typhimurium TA98 の用量—反応曲線(直接法) .....	29
図 4-2	Salmonella typhimurium TA98 の用量—反応曲線(代謝活性化法) .....	30
図 5-1	Salmonella typhimurium TA1537 の用量—反応曲線(直接法) .....	31
図 5-2	Salmonella typhimurium TA1537 の用量—反応曲線(代謝活性化法) .....	32

## 要 約

(2-クロロエチル)ベンゼンの細菌における遺伝子突然変異誘発性の有無を、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2uvrA を用いる復帰突然変異試験により検討した。試験は、代謝活性化系(S9 mix)の非存在下(直接法)ならびに存在下(代謝活性化法)において、プレインキュベーション法により実施した。

用量設定試験は、直接法および代謝活性化法ともに被験物質の最高用量を 5000 µg/plate とし、以下公比約 3 で 6 段階の計 7 用量(5~5000 µg/plate)の試験群で実施した。本試験は、用量設定試験の結果に基づき、直接法および代謝活性化法ともに被験物質の最高用量として 500 µg/plate を選択し、以下公比 2 で 5 段階の計 6 用量(15.6~500 µg/plate)の試験群で実施した。

用量設定試験の結果、各菌株のいずれの試験系列においても、被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の平均値の 2 倍未満であり、用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加も認められず、結果は陰性であった。生育阻害が、各菌株の各試験系列において、500 µg/plate 以上の用量で観察された。被験物質の析出は、各菌株のいずれの試験系列においても観察されなかった。

本試験の結果、各菌株のいずれの試験系列においても、被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の平均値の 2 倍未満であり、用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加も認められず、結果は陰性であった。生育阻害が、各菌株の各試験系列において、250 µg/plate 以上または 500 µg/plate の用量で観察された。被験物質の析出は、各菌株のいずれの試験系列においても観察されなかった。

用量設定試験および本試験のいずれにおいても、各菌株の陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、すべて試験施設の背景データに基づく管理値の範囲内であった。また、各菌株の陽性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、陰性対照群の平均値の 2 倍以上の明確な増加を示した。これらの結果から、各菌株が変異原物質に対し適切な感度を有していたことが確認された。

以上のことから、(2-クロロエチル)ベンゼンは、当該試験条件下において細菌における遺伝子突然変異誘発性を有しないと判断した。

## 緒 言

(2-クロロエチル)ベンゼンの細菌における遺伝子突然変異誘発性の有無を、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2uvrA を用いる復帰突然変異試験により検討した。試験は、代謝活性化系(S9 mix)の非存在下(直接法)ならびに存在下(代謝活性化法)において、プレインキュベーション法により実施した。

## 材料および方法

### 1. 被験物質

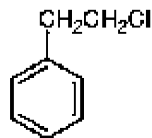
名称 : (2-クロロエチル)ベンゼン

英名 : (2-Chloroethyl)benzene

CAS No. : 622-24-2

官報公示整理番号 : 化審法 ; (3)-33

構造式 :



分子式 : C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>Cl

分子量 : 140.613

物理化学的性質 : 外観等 ; 無色透明液体

比重(20/20) ; 1.0724(資料1)

屈折率 n<sub>20/D</sub> ; 1.5300(資料1)

溶解度 ; 蒸留水に溶解せず、懸濁すると分離がみられる(日本薬局方注射用水 50 mg/mL まで確認)。ジメチルスルホキシドおよびアセトンに 500 mg/mL まで溶解する(試験施設における確認)。

引火点 ; 66°C

純度(GC) : 99.5%(資料1)

- 入手量 : 1000 g (500 g×2、関連試験と共通)
- 保存条件 : 密栓した後、着火源から遠ざけ、冷暗所に保存した(2~8°C、実測範囲 2~8°C)。
- 保存場所 : 株式会社 化合物安全性研究所 検体保存室(受入日 2009 年 4 月 6 日~5 月 11 日)および変異原性試験室(2009 年 5 月 11 日~本試験 被験物質処理 2009 年 6 月 10 日)
- 安定性および反応性 : 通常の手扱い条件においては安定。実験終了後に、使用した被験物質の純度に関する分析成績を入手し、被験物質の安定性について確認した(資料 2)。
- 取扱上の注意 : 換気のよい場所で取扱い、漏れ、あふれ、飛散しないように注意した。適切な保護具を着用し、吸い込んだり、眼、皮膚および衣類に触れないようにした。
- 残余被験物質の処置: 試験操作終了後、安定性分析のため分析者へ送付した。

## 2. 被験物質の調製

被験物質の調製は、保護眼鏡・保護面等、マスク、手袋および白衣等を着用し、吸引または眼、皮膚および衣類に触れないようにして、クリーンベンチ内で行った。

被験物質は水に不溶で、ジメチルスルホキシドまたはアセトンに溶解するため、その溶媒として、ジメチルスルホキシド(ロット番号 WF032、株式会社同仁化学研究所)を使用した。

用量設定試験では、50 mg/mL 調製液からジメチルスルホキシドを用いて公比約 3 で段階希釈し、15、5、1.5、0.5、0.15 および 0.05 mg/mL 調製液を調製した。

本試験では、50 mg/mL 調製液(希釈原液であり試験には使用しなかった)をジメチルスルホキシドを用いて 10 倍希釈して 5 mg/mL 調製液を調製したのち公比 2 で段階希釈し、2.5、1.25、0.625、0.313 および 0.156 mg/mL 調製液を調製した。

調製液の安定性では、用量設定試験および本試験ともに、被験物質調製時の目視確認において媒体との反応性(変色、発熱、発泡等)はみられなかった。

被験物質調製液は用時調製とし、用量設定試験は調製後 2.8 時間以内に、本試験は調製後 2.5 時間以内に試験に使用した。

残余調製液は、焼却処分するために、産業廃棄物として回収した。

## 3. 陰性対照物質

陰性対照物質として、被験物質の調製媒体であるジメチルスルホキシド(ロット番号 WF032、株式会社同仁化学研究所)を、モレキュラーシーブを用いて脱水処理を行い、原液のまま使用した。

## 4. 陽性対照物質およびその調製

陽性対照物質として、次表の既知変異原物質を使用した。これらの陽性対照物質は冷暗所(2~8℃設定)で保存した。

陽性対照物質は、含量補正をせずにそれぞれ次表の濃度に調製し、-20℃以下で分注凍結保存したものを解凍後 2.4 時間以内に使用した。調製液は、調製日より 8 ヶ月以内(使用期限：調製後 1 年)に使用した。残余調製液は焼却処分するために産業廃棄物として回収した。

陽性対照物質	調製濃度	調製媒体
2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド(含量 98.3%) ロット番号 SDJ4376 和光純薬工業株式会社	0.1 および 1 µg/mL	ジメチルスルホキシド ロット番号 VV035 株式会社同仁化学研究所
アジ化ナトリウム(純度 99.8%) ロット番号 SDH6348 和光純薬工業株式会社	5 µg/mL	日本薬局方注射用水 ロット番号 7K81 株式会社大塚製薬工場
9-アミノアクリジン塩酸塩水和物 (純度 99.9%) ロット番号 S32398-347 Sigma-Aldrich Corporation	800 µg/mL	ジメチルスルホキシド ロット番号 VV035 株式会社同仁化学研究所
2-アミノアントラセン(含量 97.2%) ロット番号 TSP5974 和光純薬工業株式会社	5、10、20 および 100 µg/mL	ジメチルスルホキシド ロット番号 VV035 株式会社同仁化学研究所

## 5. 試験菌株

試験には、*Salmonella typhimurium* (以下 *S. typhimurium* と称する)TA100、TA1535、TA98 および TA1537 ならびに *Escherichia coli* (以下 *E. coli* と称する)WP2uvrA を使用した。これらの菌株は、1991 年 10 月 18 日に国立衛生試験所(現 国立医薬品食品衛生研究所)より分与された。また、これらの菌株は遺伝毒性を有する化学物質の検索に適した細菌として広く受入れられていることから選択した。

各菌株は、培養液 8 mL に対しジメチルスルホキシド(ロット番号 VV035、株式会社同仁化学研究所)0.7 mL を加え、-80℃以下で分注凍結保存した。各菌株の培養液の一部

を用いて、菌株の特性(アミノ酸要求性、膜変異 *rfa* 特性、紫外線感受性、薬剤耐性ならびに陰性対照値および陽性対照値に対する感度)について検査し、これらの特性が正常に保持されていることが確認された菌株を試験に使用した。

## 6. 培地

### (1) 前培養用培地

前培養用のニュートリエントブロス培地として、ニュートリエントブロス(OXOID NUTRIENT BROTH No. 2、ロット番号 464616、OXOID LTD.)を日本薬局方注射用水(ロット番号 7K81、株式会社大塚製薬工場)を用いて 25 g/L に調製した。*S. typhimurium* TA98 および TA100 の培地には、使用時にアンピシリンナトリウム(ロット番号 M8B0619、ナカライテスク株式会社)を 25 µg/mL となるように添加した。

### (2) 試験用培地(最少グルコース寒天培地：以下プレートと称する)

試験用培地として使用した最少グルコース寒天培地(バイタルメディア AMT-0 培地、ロット番号 DZLA1R01、2009年1月27日製造、極東製薬工業株式会社)1000 mL 中の組成は次表の通りである。

試験用培地 1000 mL 中の組成	
硫酸マグネシウム・7水塩	0.2 g
クエン酸・1水塩	2.0 g
リン酸二カリウム・無水塩	10.0 g
リン酸一アンモニウム	1.92 g
水酸化ナトリウム	0.66 g
ブドウ糖	20.0 g
寒天末[OXOID AGAR No. 1、ロット番号 1050942-02]	15.0 g

### (3) 重層用培地

次頁の表の組成のソフトアガーおよびアミノ酸溶液を蒸留水(日本薬局方注射用水)を用いて調製し、使用時に(A) : (B) = 10:1 の容量比で混合した。*S. typhimurium* には L-ヒスチジンおよび D-ビオチンのアミノ酸溶液を、*E. coli* には L-トリプトファンのアミノ酸溶液を使用した。これらの重層用培地は使用時まで 47°C に保温した。

## 重層用培地の組成

(A) ソフトアガー	
Bacto™ Agar (ロット番号 7284263 および 8284757、Becton, Dickinson and Company)	0.6 %
塩化ナトリウム (ロット番号 611F1714、関東化学株式会社)	0.5 %
(B) アミノ酸溶液	
L-ヒスチジンおよびD-ビオチン溶液 (L-ヒスチジン、ロット番号 WKK2889、和光純薬工業株式会社) (D-ビオチン、ロット番号 PEN6828、和光純薬工業株式会社)	各々 0.5 mmol/L
または	
L-トリプトファン溶液 (L-トリプトファン、ロット番号 PEP6208、和光純薬工業株式会社)	0.5 mmol/L

## 7. S9 mix

S9 mix は、S9 (ロット番号 RAA-590、2009 年 1 月 16 日製造、キッコーマン株式会社)、S9 mix 用 Cofactor (Cofactor-I、ロット番号 999802、オリエンタル酵母工業株式会社) および日本薬局方注射用水 (ロット番号 7K81、株式会社大塚製薬工場) を用いて用時調製した。

S9 は、購入後  $-80^{\circ}\text{C}$  以下で保存し、製造日より 5 ヶ月以内 (使用期限: 製造後 6 ヶ月) に使用した。この S9 は、フェノバルビタールおよび 5,6-ベンゾフラボンの腹腔内投与で酵素誘導した Slc:SD 系ラット (雄、7 週齢) の肝ホモジネートより調製された。

S9 mix 1 mL 中の組成は次表の通りである。

S9 mix 1 mL 中の組成	
S9	0.1 mL
塩化マグネシウム	8 $\mu\text{mol}$
塩化カリウム	33 $\mu\text{mol}$
グルコース-6-リン酸	5 $\mu\text{mol}$
還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH)	4 $\mu\text{mol}$
還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH)	4 $\mu\text{mol}$
リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.4	100 $\mu\text{mol}$

## 8. 試験群

## (1) 用量設定試験

各菌株につき、直接法 (代謝活性化系 S9 mix の非存在下) および代謝活性化法 (代謝活性化系 S9 mix の存在下) で試験を実施した。



直接法および代謝活性化法ともに被験物質の最高用量を 5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  とし、以下公比約 3 で 6 段階の計 7 用量の試験群 (5000、1500、500、150、50、15 および 5  $\mu\text{g}/\text{plate}$ ) を設定した。これらの試験群を次表に示す。

試験系列	試験群	用量( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	プレート数
直接法	被験物質処理群	5	3
		15	3
		50	3
		150	3
		500	3
		1500	3
		5000	3
代謝活性化法	被験物質処理群	5	3
		15	3
		50	3
		150	3
		500	3
		1500	3
		5000	3

## (2) 本試験

各菌株につき、直接法および代謝活性化法で試験を実施した。

直接法および代謝活性化法ともに、用量設定試験の結果 500  $\mu\text{g}/\text{plate}$  以上の用量で生育阻害が観察されたことから、本試験では、被験物質の最高用量を 500  $\mu\text{g}/\text{plate}$  とし、以下公比 2 で 5 段階の計 6 用量 (500、250、125、62.5、31.3 および 15.6  $\mu\text{g}/\text{plate}$ ) を設定した。これらの試験群を次表に示す。

試験系列	試験群	用量( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	プレート数
直接法	被験物質処理群	15.6	3
		31.3	3
		62.5	3
		125	3
		250	3
		500	3
代謝活性化法	被験物質処理群	15.6	3
		31.3	3
		62.5	3
		125	3
		250	3
		500	3

## (3) 陰性対照群および陽性対照群

用量設定試験および本試験いずれにおいても、試験系列毎に陰性対照群 (ジメチルスルホキシド) および次頁の表の陽性対照群を設定した。

供試菌株	陽性対照物質 (用量: $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	
	直接法	代謝活性化法
<i>S. typhimurium</i> TA100	AF-2 (0.01)	2-AA (1)
<i>S. typhimurium</i> TA1535	$\text{NaN}_3$ (0.5)	2-AA (2)
<i>E. coli</i> WP2uvrA	AF-2 (0.01)	2-AA (10)
<i>S. typhimurium</i> TA98	AF-2 (0.1)	2-AA (0.5)
<i>S. typhimurium</i> TA1537	9-AA (80)	2-AA (2)

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド  
 $\text{NaN}_3$ : アジ化ナトリウム、 9-AA: 9-アミノアクリジン塩酸塩水和物  
2-AA: 2-アミノアントラセン

## (4) プレート数およびプレートの識別

プレート数は、各試験群ともに3枚とした。

プレートには、試験番号および試験群を特定できるようにラベルを貼付した。

## 9. 試験方法

## (1) 試験菌株の前培養

容量約40 mLのL字管に前培養用培地(ニュートリエントブロス培地)12 mLを入れ、これに解凍した保存菌を12  $\mu\text{L}$  接種し、L字管を氷冷(用量設定試験: 7.7時間、本試験: 7.5時間)後、37°C、振幅40 mm、振盪速度100回/分に設定した振盪恒温槽(Personal-11・EX、タイテック株式会社)で10時間の往復振盪培養を行った。培養終了時に、得られた菌培養液のOD<sub>660nm</sub>を比色計(mini photo 518、タイテック株式会社)で測定し、各菌株の生菌数-OD<sub>660nm</sub> 相関式より生菌数を算出した。生菌数が $1 \times 10^9$  cells/mLより多く、十分に菌が生育していることが確認された菌培養液を試験に使用した。

各培養液の生菌数(計算値)は次表の通りであった。

供試菌株	生菌数(計算値) ( $\times 10^9$ cells/mL)	
	用量設定試験	本試験
<i>S. typhimurium</i> TA100	3.53	2.75
<i>S. typhimurium</i> TA1535	3.82	3.39
<i>E. coli</i> WP2uvrA	5.17	4.63
<i>S. typhimurium</i> TA98	4.69	3.99
<i>S. typhimurium</i> TA1537	1.89	1.71

## (2) 被験物質調製液および対照物質調製液の処理

被験物質調製液および対照物質調製液の処理を、プレインキュベーション法で行った。

蓋付きのポリエチレン製チューブ(5 mL 容量)を使用して、被験物質調製液あるいは対照物質調製液 0.1 mL を、直接法の場合は 0.1 mol/L Na-リン酸緩衝液(pH 7.4) 0.5 mL と、代謝活性化法の場合は S9 mix 0.5 mL と、それぞれ混合した。その混合液に菌培養液 0.1 mL を加え、37°C、振幅 40 mm、振盪速度 100 回/分に設定した振盪恒温槽(Personal-11・EX、タイテック株式会社)で 20 分間振盪培養(プレインキュベーション)した。プレインキュベーション終了後、*S. typhimurium* には 0.05 mmol/L L-ヒスチジンおよび 0.05 mmol/L D-ビオチンを含む重層用培地 2 mL を、*E. coli* には 0.05 mmol/L L-トリプトファンを含む重層用培地 2 mL を、それぞれ加えて混和し、プレートに重層した。平坦な場所で重層用培地を固化させた後、プレートを 37°C に設定したインキュベータ(MIR-262:三洋電機バイオメディカ株式会社)で 49 時間静置培養した。

用量設定試験および本試験それぞれにおいて、試験に使用した被験物質調製液の最高濃度および S9 mix 調製液について無菌試験を行い、雑菌の混入の有無を確認した。

### (3) プレートの観察

各試験系の陰性対照群、被験物質処理群および陽性対照群について、プレートでの生育阻害の有無を実体顕微鏡(SZ6045TR、オリンパス光学工業株式会社)で確認するとともに、被験物質処理群について、プレートでの被験物質の析出の有無を目視確認した。次に、試験系の陰性対照群、被験物質処理群および陽性対照群の各プレートについて、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)を用いて復帰変異コロニー数の計測を行った。なお、生育阻害がコロニーアナライザー計数に影響すると考えられるプレートについては、実体顕微鏡を用いて復帰変異コロニー数の目視計測を行った。

菌株の生育阻害の有無の判定は標準操作手順書に基づき以下の基準(0~4)で行い、1 以上を生育阻害有とした。

0: 生育阻害が認められない。

微細なバックグラウンドコロニー(50 倍程度の倍率で観察可能)が培地一面に観察され、対照群のバックグラウンドコロニーとの差が認められない場合。

1: わずかな生育阻害が認められる。

陰性対照群に比べ、バックグラウンドコロニーが減少して個々のコロニーの大きさが大きくなっている場合。

2: 中程度の生育阻害が認められる。

隆起した大きな復帰変異コロニーと、平坦で小さなバックグラウンドコロニーが並存している場合。

3：強い生育阻害が認められる。

バックグラウンドコロニーが復帰変異コロニーと同程度の大きさまで成長し、両者の判別が困難である場合。

4：生存菌が全く認められない。

#### (4) 観察結果の集計方法

各試験系の陰性対照群、被験物質処理群(用量毎)および陽性対照群について、復帰変異コロニー数の平均値±標準偏差を求めた。

### 10. 試験結果の評価

#### (1) 試験系の感度確認

陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値が、それぞれ試験施設の背景データに基づく管理値の範囲内であり、かつ、陽性対照群の復帰変異コロニー数の平均値が陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値の2倍以上である場合に、試験系が適切な感度を有しているものと判断した。

#### (2) 試験結果の判定基準

少なくとも1つの試験系において、被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値が陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値の2倍以上となり、かつ被験物質用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加が、用量設定試験と本試験で再現性を持って認められた場合に、当該被験物質の遺伝子突然変異誘発性は陽性であるとした。試験結果の判定にあたって、統計学的手法は用いなかった。

#### (3) 変異原比活性の算出

本実験において陽性結果は得られなかったため、変異原比活性の算出は実施しなかった。

## 成 績

用量設定試験の結果を表 1 に、本試験の結果を表 2 に示す。また、用量設定試験および本試験における被験物質用量と復帰変異コロニー数の用量-反応曲線を図 1-1～5-2 に示す。

用量設定試験(5～5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ )の結果、各菌株のいずれの試験系列においても、被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の平均値の 2 倍未満であり、用量の増加にともなう復帰変異コロニーの増加も認められなかった。生育阻害が、直接法および代謝活性化法いずれにおいても、500  $\mu\text{g}/\text{plate}$  以上の用量で観察された。被験物質の析出は各菌株の直接法および代謝活性化法、いずれの試験系列においても観察されなかった。

本試験(15.6～500  $\mu\text{g}/\text{plate}$ )の結果、各菌株のいずれの試験系列においても、被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の平均値の 2 倍未満であり、用量の増加にともなう復帰変異コロニーの増加も認められなかった。生育阻害が、直接法および代謝活性化法いずれにおいても、TA100 および TA1535 では 250  $\mu\text{g}/\text{plate}$  以上の用量で、TA98、TA1537 および WP2*uvrA* では 500  $\mu\text{g}/\text{plate}$  の用量で、各々観察された。被験物質の析出は各菌株の直接法および代謝活性化法、いずれの試験系列においても観察されなかった。

用量設定試験および本試験のいずれにおいても、各菌株の陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値はすべて試験施設の背景データに基づく管理値(資料 3)の範囲内であった。また、各菌株の陽性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、陰性対照群の平均値の 2 倍以上の明確な増加を示した。

用量設定試験および本試験のいずれの無菌試験においても、被験物質調製液の最高濃度および S9 mix 調製液に雑菌の混入は認められなかった。

## 考 察

(2-クロロエチル)ベンゼンの細菌における遺伝子突然変異誘発性の有無を、*S. typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *E. coli* WP2uvrA を用いる復帰突然変異試験により検討した。

用量設定試験は、被験物質の最高用量を 5000 µg/plate とし、以下公比約 3 で 6 段階の計 7 用量の試験群で実施した。本試験は、用量設定試験の結果に基づき、被験物質の最高用量を 500 µg/plate とし、以下公比 2 で 5 段階の計 6 用量の試験群で実施した。

試験の結果、用量設定試験および本試験ともに、各菌株のいずれの試験系列においても、被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の平均値の 2 倍未満であり、用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加も認められず、結果は陰性であった。生育阻害が、各菌株の各試験系列において、250 µg/plate 以上または 500 µg/plate 以上の用量で観察された。被験物質の析出は、各菌株のいずれの試験系列においても観察されなかった。このように、用量設定試験および本試験の結果には再現性が確認された。

用量設定試験および本試験のいずれにおいても、各菌株の陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、すべて試験施設の背景データに基づく管理値の範囲内であった。また、各菌株の陽性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、陰性対照群の平均値の 2 倍以上の明確な増加を示した。これらの結果から、各菌株が変異原物質に対し適切な感度を有していたことが確認された。

以上のことから、(2-クロロエチル)ベンゼンは、当該試験条件下において細菌における遺伝子突然変異誘発性を有しないと判断した。

表 1

## 試験結果表 (用量設定試験)

被験物質の名称 : (2-クロロエチル)ベンゼン

試験実施期間		2009年5月20日～2009年5月22日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ( $\mu\text{g}$ /プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2uvr A	TA98	TA1537	
-S9 mix	陰性対照	125 , 104 123 (117 $\pm$ 12)	11 , 13 13 (12 $\pm$ 1)	9 , 20 18 (16 $\pm$ 6)	18 , 24 21 (21 $\pm$ 3)	24 , 14 9 (16 $\pm$ 8)	
	5	111 , 104 107 (107 $\pm$ 4)	5 , 7 10 (7 $\pm$ 3)	16 , 19 14 (16 $\pm$ 3)	19 , 10 12 (14 $\pm$ 5)	12 , 13 9 (11 $\pm$ 2)	
	15	130 , 104 132 (122 $\pm$ 16)	12 , 8 9 (10 $\pm$ 2)	9 , 25 20 (18 $\pm$ 8)	12 , 25 15 (17 $\pm$ 7)	8 , 13 12 (11 $\pm$ 3)	
	50	128 , 97 129 (118 $\pm$ 18)	4 , 14 7 (8 $\pm$ 5)	8 , 12 17 (12 $\pm$ 5)	25 , 12 26 (21 $\pm$ 8)	12 , 12 8 (11 $\pm$ 2)	
	150	85 , 90 89 (88 $\pm$ 3)	10 , 13 5 (9 $\pm$ 4)	16 , 11 17 (15 $\pm$ 3)	12 , 8 12 (11 $\pm$ 2)	11 , 8 11 (10 $\pm$ 2)	
	500	0* , 32* 0* (11 $\pm$ 18)	6* , 10* 10* (9 $\pm$ 2)	11* , 12* 19* (14 $\pm$ 4)	0* , 7* 4* (4 $\pm$ 4)	1* , 3* 3* (2 $\pm$ 1)	
	1500	37* , 0* 0* (12 $\pm$ 21)	3* , 10* 0* (4 $\pm$ 5)	0* , 10* 0* (3 $\pm$ 6)	0* , 0* 11* (4 $\pm$ 6)	3* , 2* 2* (2 $\pm$ 1)	
	5000	0* , 0* 22* (7 $\pm$ 13)	0* , 0* 0* (0 $\pm$ 0)	0* , 0* 0* (0 $\pm$ 0)	0* , 9* 8* (6 $\pm$ 5)	0* , 0* 0* (0 $\pm$ 0)	
+S9 mix	陰性対照	145 , 124 143 (137 $\pm$ 12)	11 , 10 7 (9 $\pm$ 2)	16 , 26 19 (20 $\pm$ 5)	34 , 33 31 (33 $\pm$ 2)	11 , 17 15 (14 $\pm$ 3)	
	5	147 , 108 133 (129 $\pm$ 20)	12 , 11 16 (13 $\pm$ 3)	15 , 25 20 (20 $\pm$ 5)	35 , 28 34 (32 $\pm$ 4)	13 , 15 15 (14 $\pm$ 1)	
	15	137 , 139 136 (137 $\pm$ 2)	6 , 12 9 (9 $\pm$ 3)	16 , 16 18 (17 $\pm$ 1)	36 , 29 30 (32 $\pm$ 4)	15 , 18 12 (15 $\pm$ 3)	
	50	140 , 134 148 (141 $\pm$ 7)	6 , 6 15 (9 $\pm$ 5)	25 , 28 19 (24 $\pm$ 5)	25 , 38 40 (34 $\pm$ 8)	8 , 9 10 (9 $\pm$ 1)	
	150	106 , 112 137 (118 $\pm$ 16)	14 , 11 15 (13 $\pm$ 2)	14 , 18 12 (15 $\pm$ 3)	24 , 21 33 (26 $\pm$ 6)	11 , 17 10 (13 $\pm$ 4)	
	500	54* , 71* 39* (55 $\pm$ 16)	4* , 8* 5* (6 $\pm$ 2)	22* , 20* 20* (21 $\pm$ 1)	18* , 11* 22* (17 $\pm$ 6)	2* , 1* 4* (2 $\pm$ 2)	
	1500	75* , 85* 55* (72 $\pm$ 15)	0* , 2* 0* (1 $\pm$ 1)	0* , 9* 0* (3 $\pm$ 5)	19* , 17* 18* (18 $\pm$ 1)	4* , 2* 2* (3 $\pm$ 1)	
	5000	0* , 0* 0* (0 $\pm$ 0)	0* , 0* 0* (0 $\pm$ 0)	0* , 19* 16* (12 $\pm$ 10)	0* , 0* 0* (0 $\pm$ 0)	0* , 0* 0* (0 $\pm$ 0)	
陽性対照	S9 mixを必要としないもの	名称	AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2	9-AA
		用量( $\mu\text{g}$ /プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
対照	S9 mixを必要とするもの	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		用量( $\mu\text{g}$ /プレート)	1	2	10	0.5	2
		コロニー数/プレート	721 , 721 618 (687 $\pm$ 59)	361 , 371 379 (370 $\pm$ 9)	125 , 95 96 (105 $\pm$ 17)	444 , 424 478 (449 $\pm$ 27)	173 , 274 137 (195 $\pm$ 71)
		コロニー数/プレート	1752 , 1663 1771 (1729 $\pm$ 58)	559 , 539 602 (567 $\pm$ 32)	1253 , 1362 1439 (1351 $\pm$ 93)	387 , 352 380 (373 $\pm$ 19)	471 , 486 482 (480 $\pm$ 8)

( ) : 各プレートのコロニー数の平均値および標準偏差

\* : 菌株の生育阻害

陰性対照 : ジメチルスルホキシド

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

9-AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩水和物

NaN<sub>3</sub> : アジ化ナトリウム

2-AA : 2-アミノアントラセン

表 2

## 試 験 結 果 表 (本試験)

被験物質の名称 : (2-クロロエチル)ベンゼン

試験実施期間		2009年6月10日～2009年6月12日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ( $\mu$ g/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2uvr A	TA98	TA1537	
-S9 mix	陰性対照	94 , 88 81 (88 $\pm$ 7)	8 , 6 7 (7 $\pm$ 1)	16 , 23 35 (25 $\pm$ 10)	27 , 15 14 (19 $\pm$ 7)	27 , 17 14 (19 $\pm$ 7)	
	15.6	85 , 126 81 (97 $\pm$ 25)	7 , 15 13 (12 $\pm$ 4)	16 , 18 19 (18 $\pm$ 2)	25 , 16 13 (18 $\pm$ 6)	13 , 21 21 (18 $\pm$ 5)	
	31.3	83 , 110 116 (103 $\pm$ 18)	11 , 7 6 (8 $\pm$ 3)	19 , 22 24 (22 $\pm$ 3)	21 , 13 23 (19 $\pm$ 5)	21 , 9 17 (16 $\pm$ 6)	
	62.5	97 , 89 75 (87 $\pm$ 11)	8 , 4 8 (7 $\pm$ 2)	22 , 20 16 (19 $\pm$ 3)	12 , 7 11 (10 $\pm$ 3)	19 , 25 18 (21 $\pm$ 4)	
	125	88 , 88 97 (91 $\pm$ 5)	6 , 7 11 (8 $\pm$ 3)	27 , 16 20 (21 $\pm$ 6)	21 , 21 21 (21 $\pm$ 0)	11 , 18 17 (15 $\pm$ 4)	
	250	44 * , 40 * 43 * (42 $\pm$ 2)	5 * , 7 * 8 * (7 $\pm$ 2)	9 , 13 9 (10 $\pm$ 2)	11 , 16 12 (13 $\pm$ 3)	6 , 9 6 (7 $\pm$ 2)	
	500	41 * , 36 * 28 * (35 $\pm$ 7)	5 * , 3 * 4 * (4 $\pm$ 1)	11 * , 11 * 9 * (10 $\pm$ 1)	4 * , 10 * 6 * (7 $\pm$ 3)	4 * , 2 * 0 * (2 $\pm$ 2)	
+S9 mix	陰性対照	126 , 133 136 (132 $\pm$ 5)	11 , 7 7 (8 $\pm$ 2)	15 , 22 22 (20 $\pm$ 4)	28 , 29 31 (29 $\pm$ 2)	17 , 12 12 (14 $\pm$ 3)	
	15.6	129 , 113 118 (120 $\pm$ 8)	7 , 10 13 (10 $\pm$ 3)	24 , 28 15 (22 $\pm$ 7)	38 , 19 24 (27 $\pm$ 10)	18 , 19 12 (16 $\pm$ 4)	
	31.3	153 , 112 125 (130 $\pm$ 21)	9 , 12 8 (10 $\pm$ 2)	17 , 12 14 (14 $\pm$ 3)	33 , 33 24 (30 $\pm$ 5)	8 , 12 13 (11 $\pm$ 3)	
	62.5	105 , 130 125 (120 $\pm$ 13)	16 , 12 11 (13 $\pm$ 3)	21 , 17 15 (18 $\pm$ 3)	34 , 39 18 (30 $\pm$ 11)	14 , 19 17 (17 $\pm$ 3)	
	125	112 , 108 141 (120 $\pm$ 18)	12 , 18 13 (14 $\pm$ 3)	27 , 23 16 (22 $\pm$ 6)	20 , 25 31 (25 $\pm$ 6)	26 , 25 17 (23 $\pm$ 5)	
	250	84 * , 72 * 72 * (76 $\pm$ 7)	5 * , 12 * 8 * (8 $\pm$ 4)	21 , 13 15 (16 $\pm$ 4)	20 , 34 37 (30 $\pm$ 9)	15 , 13 12 (13 $\pm$ 2)	
	500	0 * , 36 * 58 * (31 $\pm$ 29)	8 * , 8 * 12 * (9 $\pm$ 2)	11 * , 11 * 4 * (9 $\pm$ 4)	20 * , 20 * 20 * (20 $\pm$ 0)	6 * , 4 * 6 * (5 $\pm$ 1)	
陽性	S9 mixを必要としないもの	名 称	AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2	9-AA
		用量( $\mu$ g/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
対照	S9 mixを必要とするもの	コロニー数/プレート	789 , 762 667 (739 $\pm$ 64)	326 , 314 358 (333 $\pm$ 23)	130 , 101 117 (116 $\pm$ 15)	445 , 426 461 (444 $\pm$ 18)	452 , 173 203 (276 $\pm$ 153)
		名 称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		用量( $\mu$ g/プレート)	1	2	10	0.5	2
		コロニー数/プレート	1698 , 1686 1718 (1701 $\pm$ 16)	514 , 553 673 (580 $\pm$ 83)	1273 , 1303 1357 (1311 $\pm$ 43)	292 , 329 321 (314 $\pm$ 19)	654 , 688 628 (657 $\pm$ 30)

( ) : 各プレートのコロニー数の平均値および標準偏差

\* : 菌株の生育阻害

陰性対照 : ジメチルスルホキシド

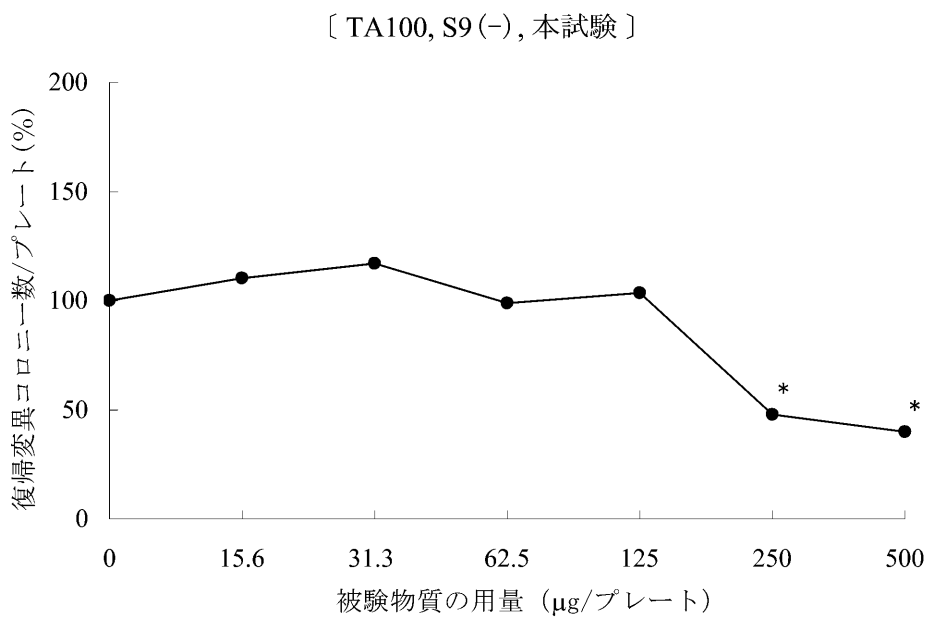
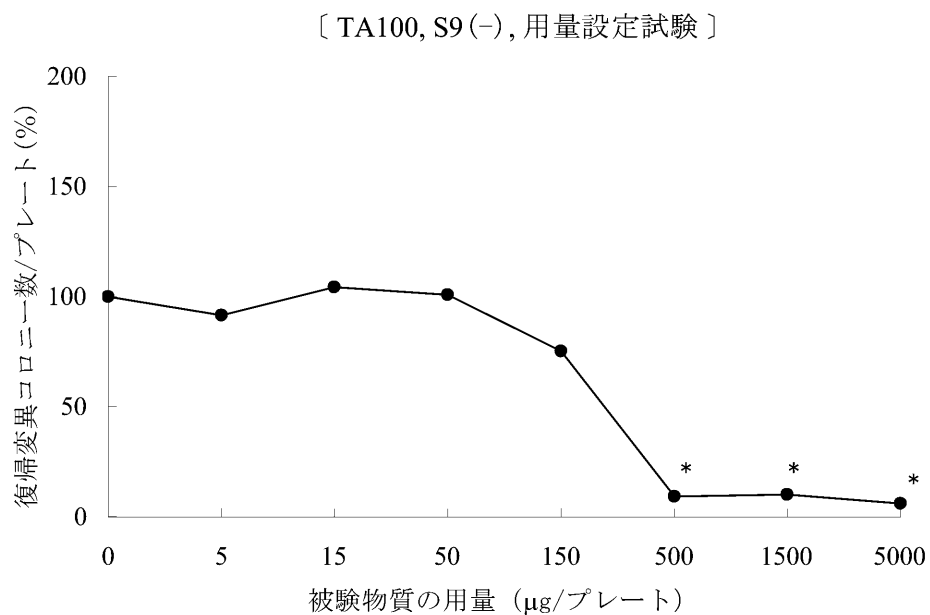
AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

9-AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩水和物

NaN<sub>3</sub> : アジ化ナトリウム

2-AA : 2-アミノアントラセン



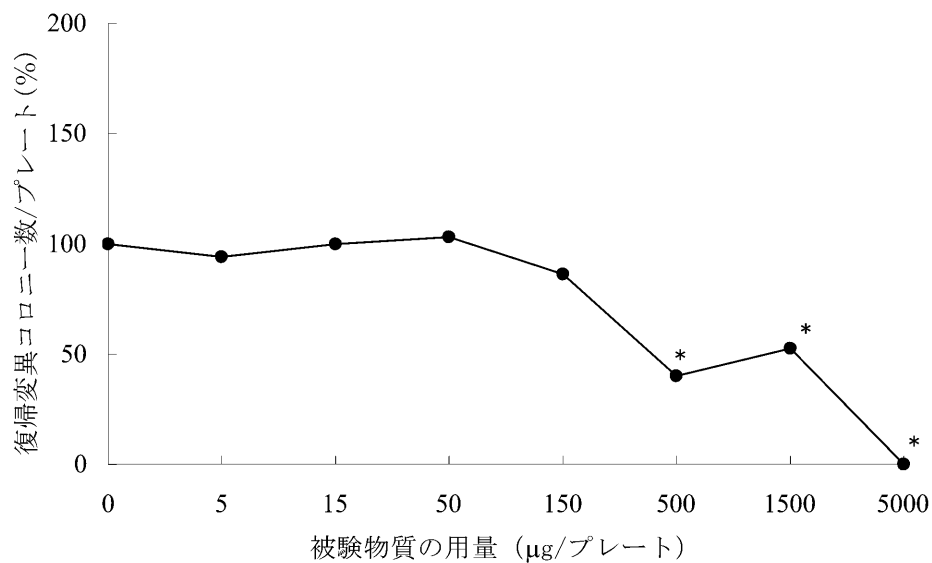


被験物質の名称 : (2-クロロエチル)ベンゼン

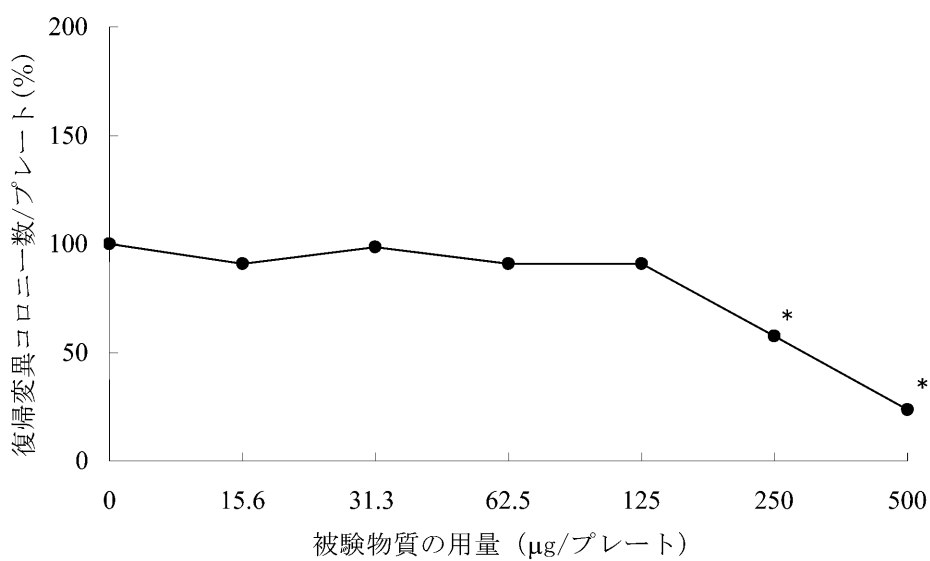
図 1-1 *Salmonella typhimurium* TA100 の用量—反応曲線(直接法)

\* : 菌株の生育阻害

〔TA100, S9(+), 用量設定試験〕



〔TA100, S9(+), 本試験〕

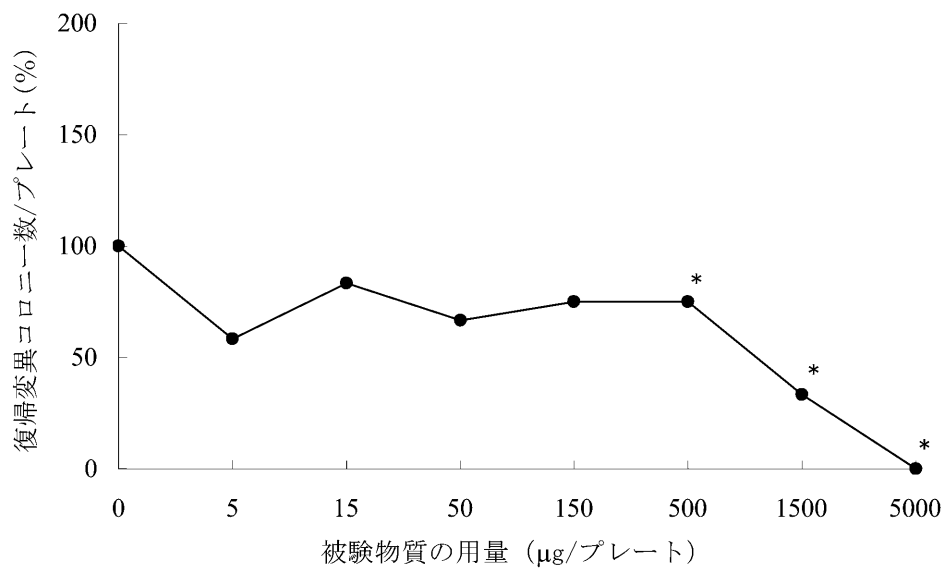


被験物質の名称 : (2-クロロエチル)ベンゼン

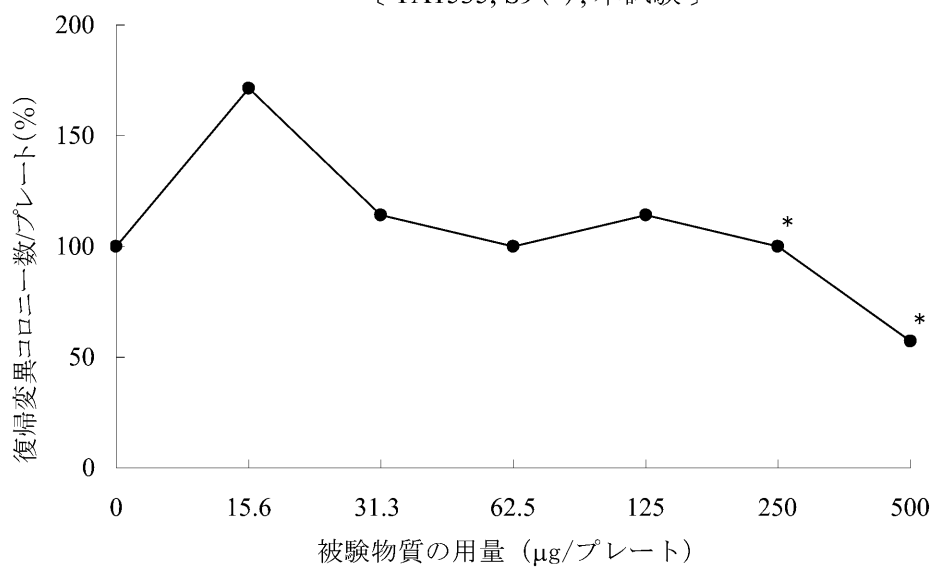
図 1-2 *Salmonella typhimurium* TA100 の用量—反応曲線  
(代謝活性化法)

\* : 菌株の生育阻害

〔TA1535, S9(-), 用量設定試験〕



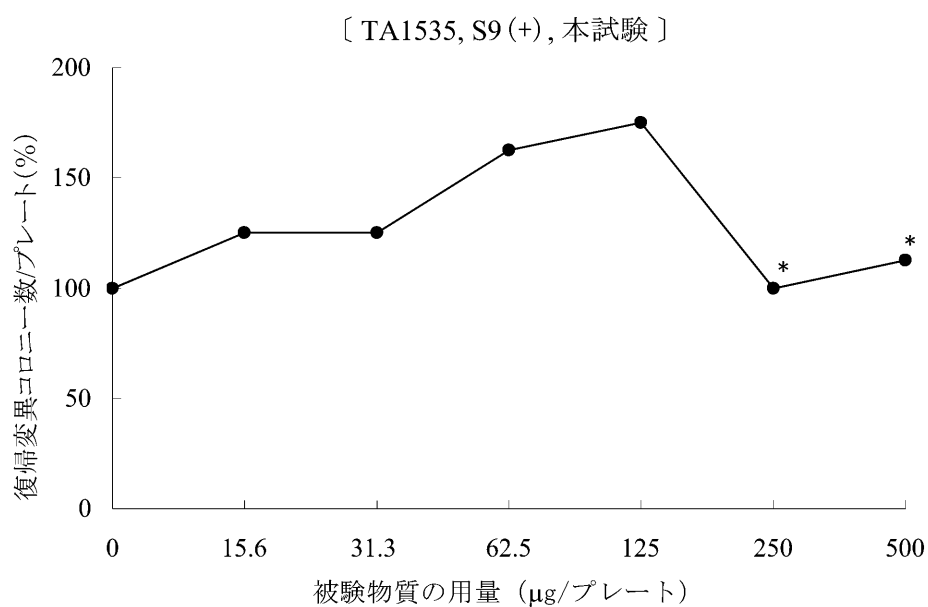
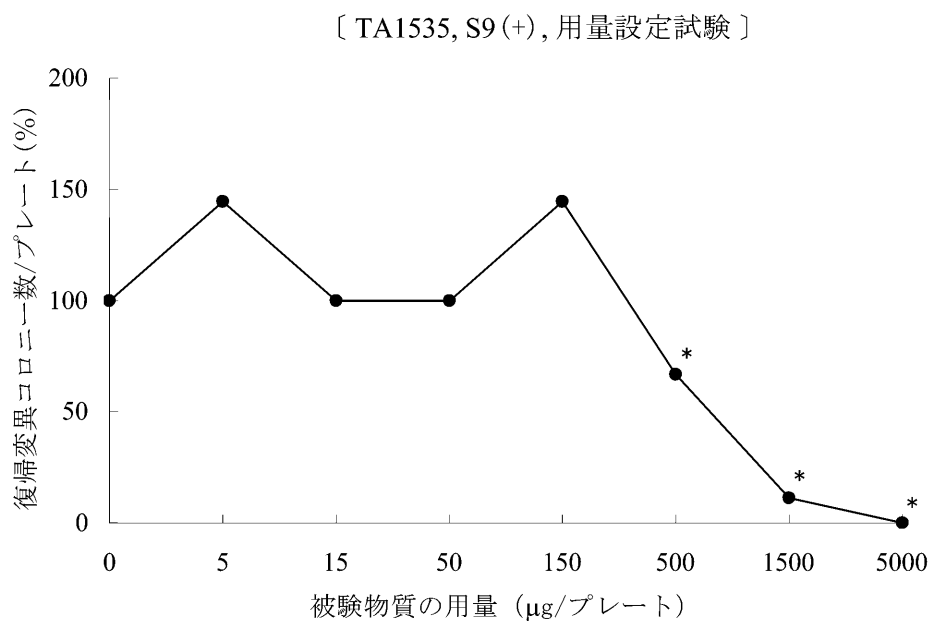
〔TA1535, S9(-), 本試験〕



被験物質の名称 : (2-クロロエチル)ベンゼン

図 2-1 *Salmonella typhimurium* TA1535 の用量—反応曲線(直接法)

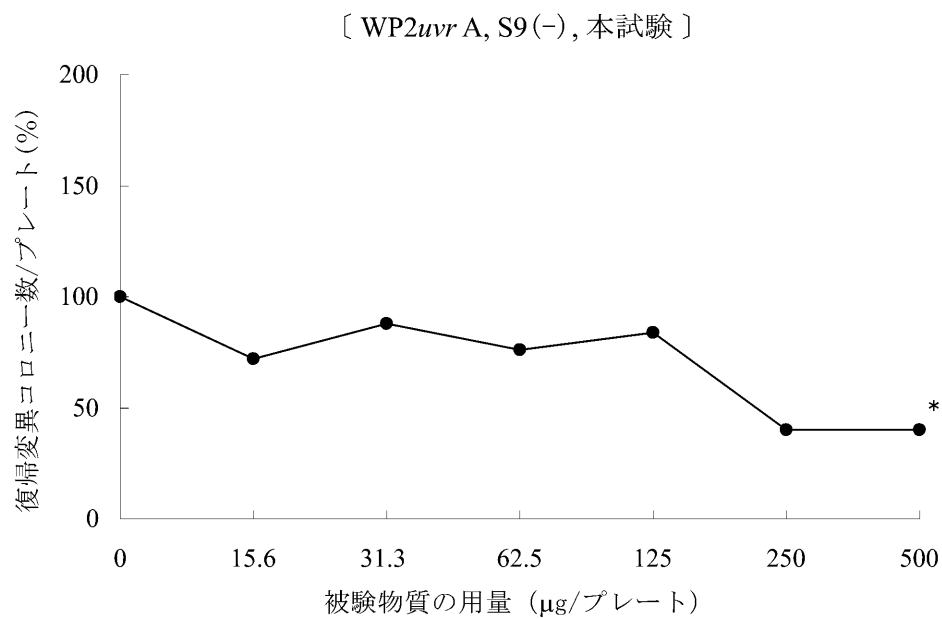
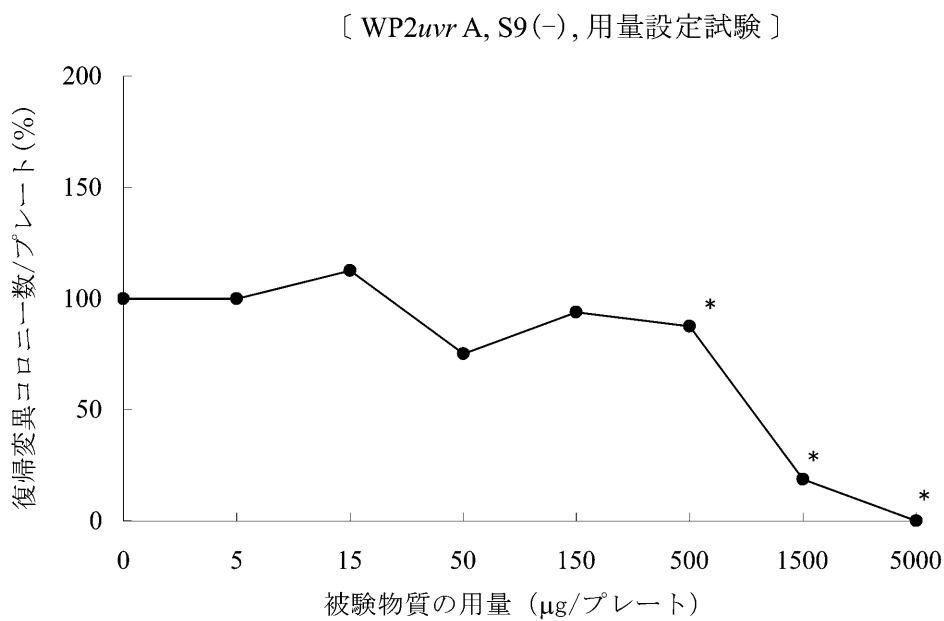
\* : 菌株の生育阻害



被験物質の名称 : (2-クロロエチル)ベンゼン

図 2-2 *Salmonella typhimurium* TA1535 の用量—反応曲線  
(代謝活性化法)

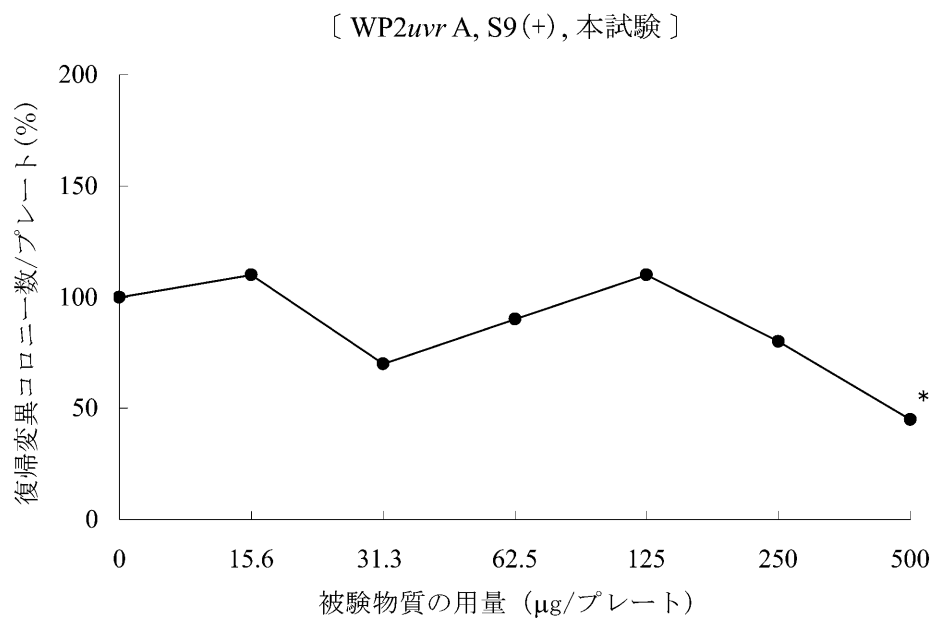
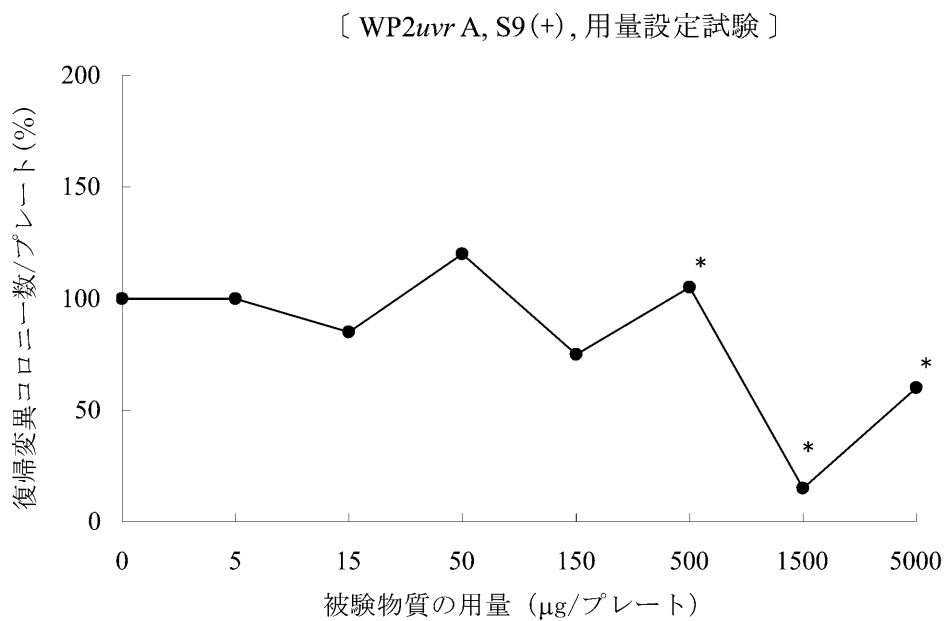
\* : 菌株の生育阻害



被験物質の名称 : (2-クロロエチル)ベンゼン

図 3-1 *Escherichia coli* WP2 $uvr$  A の用量—反応曲線(直接法)

\* : 菌株の生育阻害

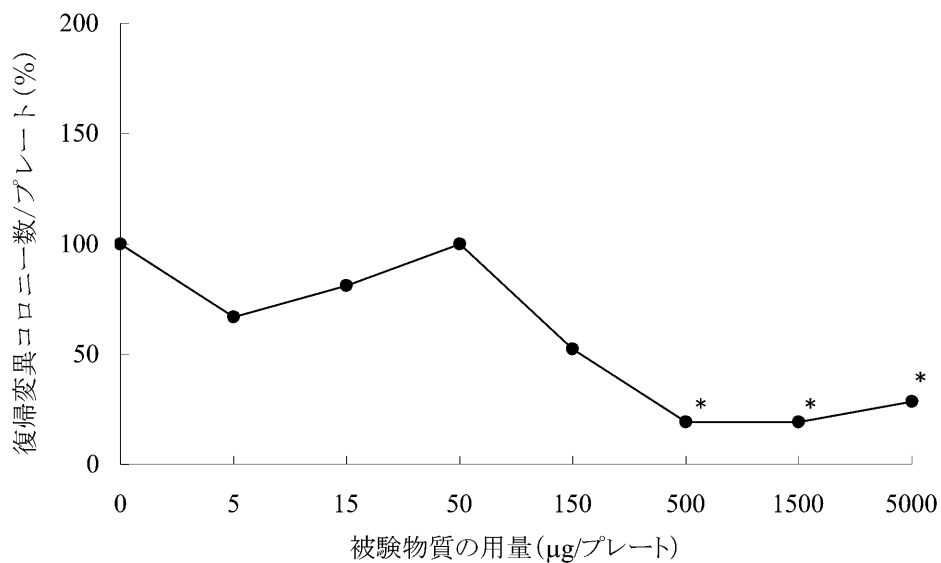


被験物質の名称 : (2-クロロエチル)ベンゼン

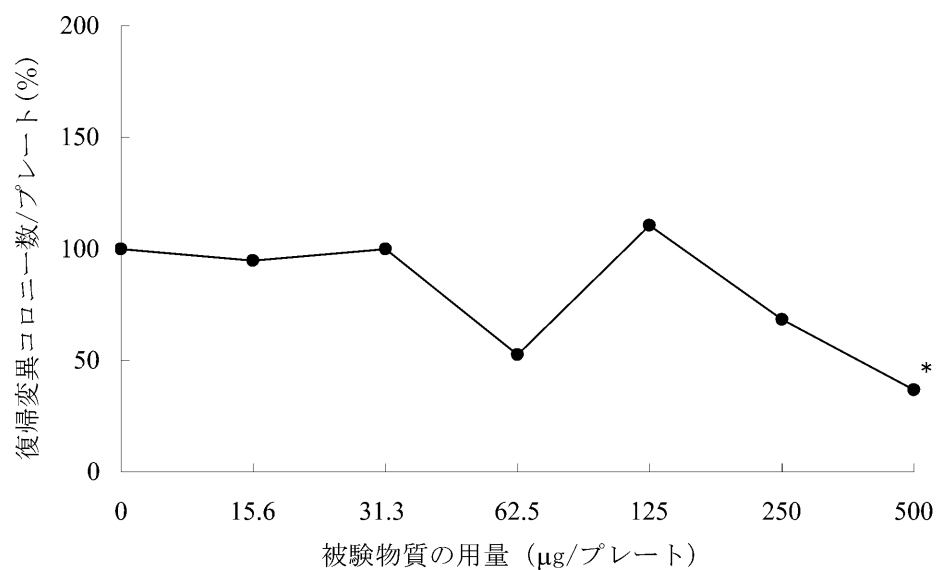
図 3-2 *Escherichia coli* WP2 $uvr$  A の用量—反応曲線  
(代謝活性化法)

\* : 菌株の生育阻害

〔TA98, S9(-), 用量設定試験〕



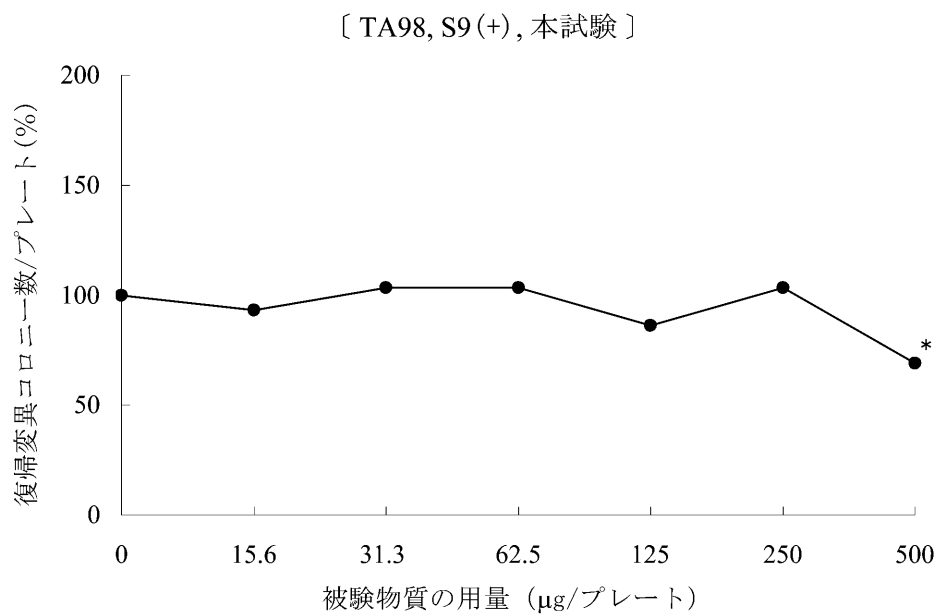
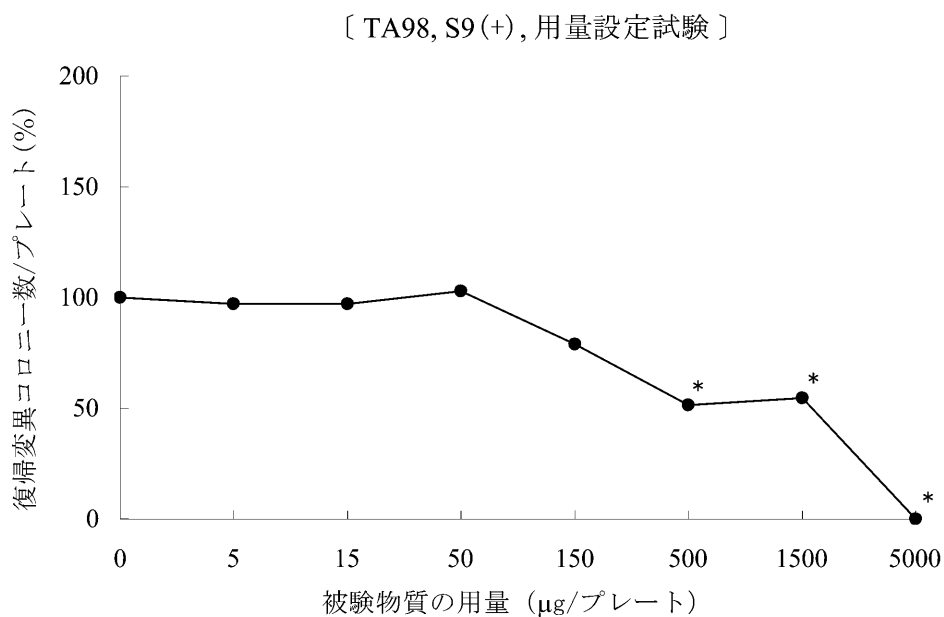
〔TA98, S9(-), 本試験〕



被験物質の名称 : (2-クロロエチル)ベンゼン

図 4-1 *Salmonella typhimurium* TA98 の用量—反応曲線(直接法)

\* : 菌株の生育阻害



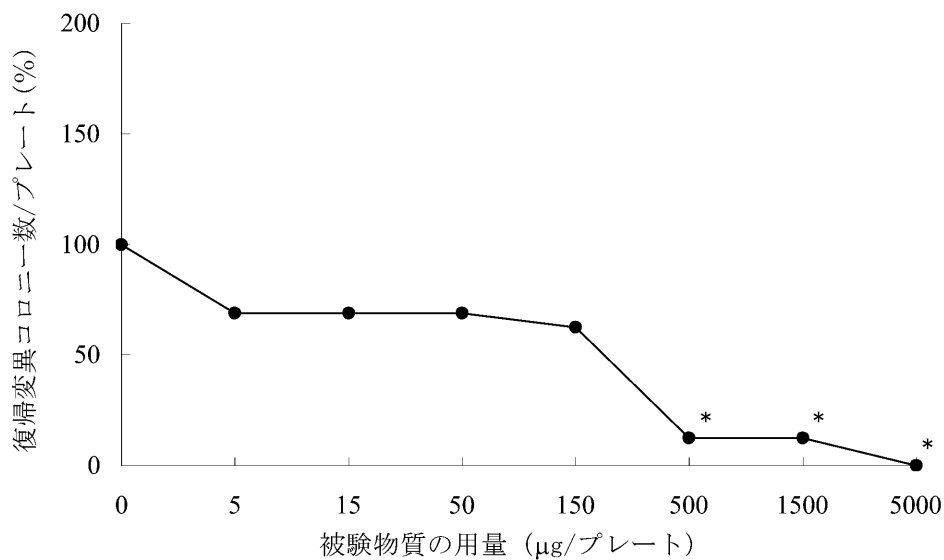
被験物質の名称 : (2-クロロエチル)ベンゼン

図 4-2 *Salmonella typhimurium* TA98 の用量—反応曲線  
(代謝活性化法)

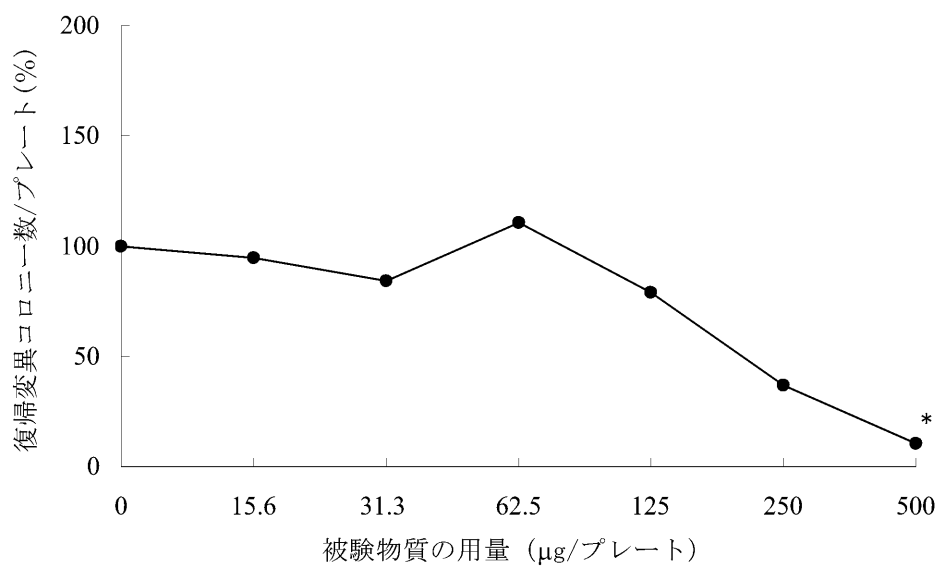
\* : 菌株の生育阻害



〔TA1537, S9(-), 用量設定試験〕



〔TA1537, S9(-), 本試験〕

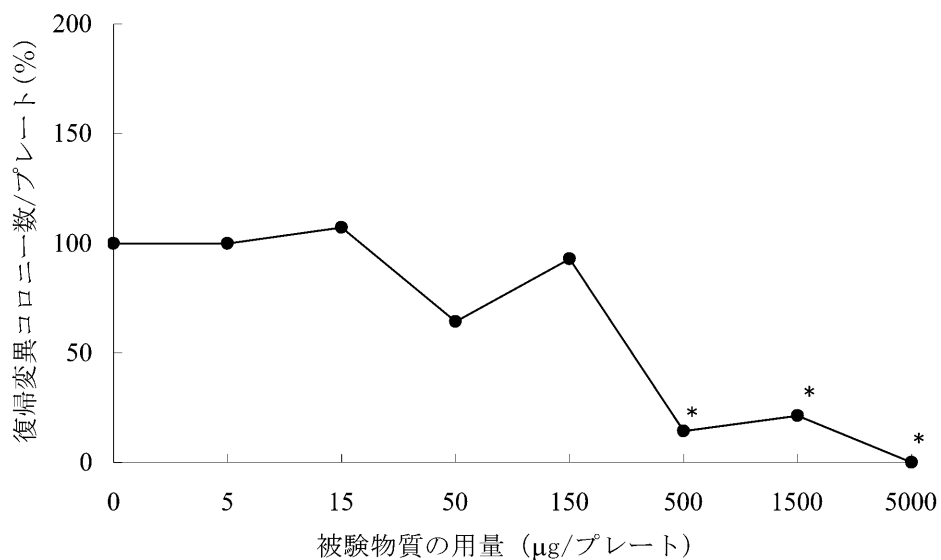


被験物質の名称 : (2-クロロエチル)ベンゼン

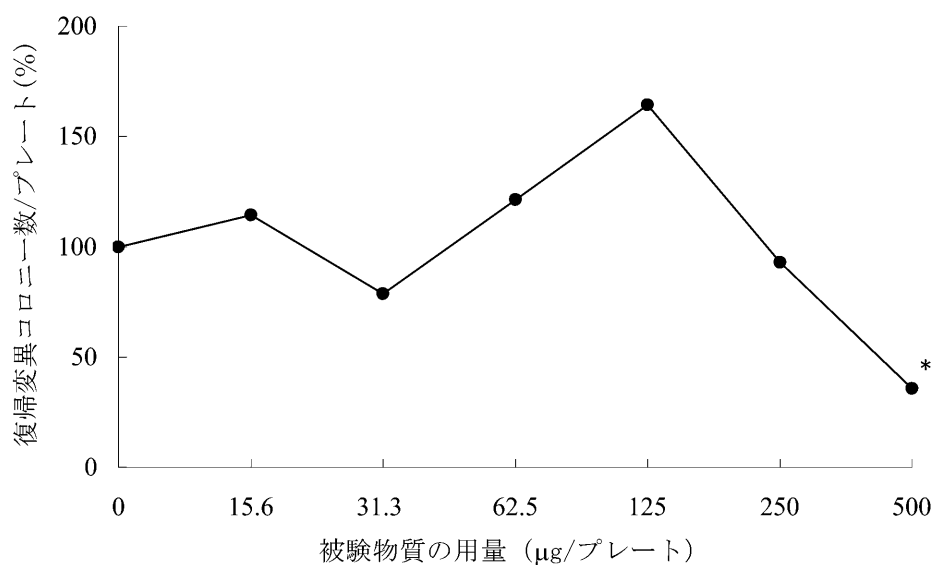
図 5-1 *Salmonella typhimurium* TA1537 の用量—反応曲線(直接法)

\* : 菌株の生育阻害

〔TA1537, S9(+), 用量設定試験〕



〔TA1537, S9(+), 本試験〕



被験物質の名称 : (2-クロロエチル)ベンゼン

図 5-2 *Salmonella typhimurium* TA1537 の用量—反応曲線  
(代謝活性化法)

\* : 菌株の生育阻害