最終報告書

『3,4-ジクロロベンジルクロリドの細菌を用いる復帰突然変異試験』

試験受託者試験番号: N-171 試験番号 H-09002

群馬県渋川市有馬 1967-11 株式会社 SRD 生物センター

最終報告書の訂正(1)

試験名称:3,4-ジクロロベンジルクロリドの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験受託者試験番号: N-171 試験番号 H-09002

1. 訂正日:

2. 訂正者:

試験責任者

3.訂正の内容

訂正箇所	訂正内容	訂正理由
2 頁 Ⅲ. 試験材料および方法 1. 被験物質 (4)化学式	[訂正前]: C ₇ H ₅ O ₁₃ [訂正後]: C ₇ H ₅ Cl ₃	記載ミス。

試験実施の概括

試験名称:3,4·ジクロロベンジルクロリドの細菌を用いる復帰突然変異試験 試験受託者試験番号 N-171 試験番号 H-09002

1.試験目的

3,4·ジクロロベンジルクロリドについて復帰突然変異試験を行い、遺伝子突然変異誘発性の有無をネズミチフス菌および大腸菌を用いて検討する。

2.遵守した GLP

厚生労働省、経済産業省ならびに環境省の「新規化学物質等に係る試験を実施する 試験施設に関する基準について」 [平成 15 年 11 月 21 日 (薬食発第 1121003 号) 厚 生労働省医薬食品局長、(平成 15・11・17 製局第 3 号) 経済産業省製造産業局長、 (環保企発第 031121004 号) 環境省総合環境政策局長連名基準、最終改正:平成 20 年 7 月 4 日]

3.参照したガイドライン

「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成 15 年 11 月 21 日薬食発第 1121002 号、平成 15・11・13 製局第 2 号、環保企発第 031121002 号、最終改正: 平成 18 年 11 月 20 日)ならびに「OECD Guideline for the Testing of Chemicals #471 (adopted on July 21, 1997)」(以下、ガイドラインと略す)

4.試験委託者

名 称

国立医薬品食品衛生研究所

所在地

東京都世田谷区上用賀 1-18-1

5.試験受託者

名 称

日生研株式会社

所在地

東京都青梅市新町 9-2221-1

6.試験施設

名 称

株式会社 SRD 生物センター 渋川ラボラトリー

所在地

群馬県渋川市有馬 1967-11

7.記録および資料の保存

(1) 保存期間

最終報告書提出から10年とし、その後の保存については試験受託者と協議の上決定する。

(2) 保存物、保存場所

試験計画書(原本)、試験に関する記録文書、最終報告書(原本)、 試験実施によって得られた生データ、資料類、被験物質保存サンプル : 株式会社 SRD 生物センター 渋川ラボラトリー

目 次

			貝
			(4の1)
試験実施	施の概	既括	(4の2)
予見する	ること	こができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態	
及び試験	検計画	『書からの逸脱・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	(4 の 4)
Ι. ξ	要約	句 • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	••••1
II.	試験目	目的 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	2
Ⅲ. į́	試験材	材料および方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	2
IV.	試験紀	吉果 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	9
V. 7	考察ま	うよび結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	··· 10
VI.	参考文	文献 · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	11
Fig	1.	Dose depending effect of 3,4-Dichlorobenzyl chloride in the strains of base	e-pair
		substitution (Mutagenicity test).	$\cdots 12$
Fig	2 .	Dose depending effect of 3,4 Dichlorobenzyl chloride in the strains of fram	neshift
		(Mutagenicity test).	13
Fig	3.	Dose depending effect of 3,4-Dichlorobenzyl chloride in the strains of base	e-pair
		substitution (Mutagenicity test 2).	14
Fig	4 .	Dose depending effect of 3,4 Dichlorobenzyl chloride in the strains of fram	
		(Mutagenicity test 2).	… 15
Ap_{I}	pendi	ix 1. Reverse mutation test of 3,4-Dichlorobenzyl chloride in $S. typhimuriv$	ım and
		E.coli (Dose determination test)	16
App	pendi	ix 2. Reverse mutation test of 3,4-Dichlorobenzyl chloride in S.typhimuric	ım and
		E.coli (Mutagenicity test)	17
App	pendi	ix 3. Reverse mutation test of 3,4 Dichlorobenzyl chloride in S.typhimuria	un and
		F. coli (Mutaganicity tast 2)	18

I. 要 約

3,4・ジクロロベンジルクロリドについて、ネズミチフス菌のヒスチジン要求性である TA98、TA100、TA1535、TA1537 株および大腸菌のトリプトファン要求性である WP2uvrA 株にそれぞれ処理し、その変異原性、すなわち遺伝子突然変異誘発性の有無を代謝活性化によらない場合(・S9mix)および代謝活性化による場合(+S9mix)で検討した。

本試験は、各試験菌株の最高用量を生育阻害が認められる用量に設定し、以下公比 2 で計 6~7 用量とした。すなわち各試験菌株の・S9mix では 100、50、25、12.5、6.25、3.13、1.56 μ g/plate、+S9mix では 200、100、50、25、12.5、6.25 μ g/plate で実施した。

本試験の結果、各試験菌株の被験物質群の復帰変異コロニー数は、用量依存性ならびに陰性対照群の 2 倍以上の増加は認められなかった。なお、生育阻害は各試験菌株の \cdot S9mix では $50~\mu$ g/plate 以上、+S9mix の TA98 株では $200~\mu$ g/plate、その他の菌株では $100~\mu$ g/plate 以上で認められた。被験物質の沈殿は認められなかった。

用量設定試験ではいずれの試験菌株においても生育阻害の認められない用量が 4 用量に満たなかった。したがって、再現性を確認するために本試験 2 回目を実施した。用量として、本試験で生育阻害が認められた用量を最高用量に設定し、以下公比 2 で計 5 用量とした。すなわち、各試験菌株の-S9mix では 50、25、12.5、6.25、3.13 μ g/plate、+S9mix の TA98 株では 200、100、50、25、12.5 μ g/plate、その他の菌株では 100、50、25、12.5、6.25 μ g/plate で実施した。

本試験 2 回目の結果、各試験菌株の被験物質群の復帰変異コロニー数は、用量依存性ならびに陰性対照群の 2 倍以上の増加は認められなかった。なお、生育阻害は各試験菌株の・S9mix では $50~\mu$ g/plate、+S9mix の TA98 株では $200~\mu$ g/plate、 その他の菌株では $100~\mu$ g/plate で認められた。被験物質の沈殿は認められなかった。また、全試験菌株について再現性が確認された。

一方、各試験菌株の陽性対照群の復帰変異コロニー数は、いずれも陰性対照群と 比較して顕著な増加が認められた。

以上の結果より、当該試験条件下における 3,4·ジクロロベンジルクロリドの遺伝子突然変異誘発性は、陰性と判断された。

Ⅱ. 試験目的

3,4・ジクロロベンジルクロリドについて復帰突然変異試験を行い、遺伝子突然変異 誘発性の有無をネズミチフス菌および大腸菌を用いて検討する。

Ⅲ. 試験材料および方法

1.被験物質

(1) 名 称

3,4-ジクロロベンジルクロリド

(2) 別名(商品名) 3,4-Dichlorobenzyl chloride, 97%

(3) CAS No.

102-47-6

(4) 化学式

C7H5O13

(5) 分子量

195.47

(6) Lot No.

(7) 純 度

99.9%

(8) 外 観

無色透明液体

(9) 保管条件

室温

(10) 同一性

提供された情報と送付された被験物質のラベルを目視により比較

し、同一であることを確認した。

(11) 安定性

試験受託者で保管している同じロット番号の被験物質について、

試験受託者にて安定性分析を実施した。その結果、約16週間保存 後において安定であったため、当該試験の実験期間中においても安

定であったと判断した。

(12) 提供者(試験受託者)

(13) 残余被験物質の処分

残余被験物質はサンプルとして少量採取した後、速やかに試験 受託者に返却する。

2.被験物質の調製

(1) 用量

用量設定試験では 6.86、20.6、61.7、185.2、555.6、1667、5000 μ g/plate とした。本試験は、各試験菌株の・S9mix では 1.56、3.13、6.25、12.5、25、50、100 μ g/plate、+S9mix では 6.25、12.5、25、50、100、200 μ g/plate とした。本試験 2 回目は、各試験菌株の・S9mix では 3.13、6.25、12.5、25、50 μ g/plate、+S9mix の TA98 株では 12.5、12.50、1000、1000 1000

(2) 使用した溶媒の名称とその選択理由

DMSO (特級、Lot No. CDQ4624、和光純薬工業株式会社)を用いた。事前に溶媒に対する溶解性の検討を実施した結果、水には不溶であったが DMSO には任意の割合で溶解したことから、DMSO を選択した。

(3) 被験物質液の調製

被験物質を高精度・分析用セミ・ミクロ電子天びん(型式:ER-182A、株式会社エー・アンド・デイ)で、用量設定試験では250 mg(実秤量値:251.5 mg)を秤量後、DMSOを加え溶解させ、5 mL にメスアップしたものを最高用量とし、段階希釈して試験に供した。同様に、本試験および本試験2回目では200 mg(実秤量値:200.1 mg【本試験】、201.3 mg【本試験2回目】)を秤量後、DMSOを加え溶解させ、10 mL にメスアップした。これを10 倍希釈したものを最高用量とし、段階希釈して試験に供した。なお、被験物質液は用時調製した。

3.対照物質

(1) 陰性対照物質

DMSO (特級、Lot No. CDQ4624、和光純薬工業株式会社)を用いた。

(2) 陽性対照物質

①使用した陽性対照物質

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

(Lot No. PKE1831、純度: 99.0%、和光純薬工業株式会社)

SA : Sodium azide

(Lot No. ELJ6565、純度:99.7%、和光純薬工業株式会社)

9-AA : 9-Aminoacridine

(Lot No. 106F06682、純度: 97%、Sigma-Aldrich Co.)

2-AA : 2-Aminoanthracene

(Lot No. TSP5974、純度:97.2%、和光純薬工業株式会社)

②各試験菌株に対する処理量

菌株	代謝活性化に	よらない場合(·S9)	代謝活性化による場合(+S9)		
	物質名	用量(μg/plate)	物質名	用量(μg/plate)	
ネズミチフス菌			1. 200		
TA98	AF-2	0.1	2-AA	0.5	
TA100	AF-2	0.01	2-AA	1	
TA1535	SA	0.5	2-AA	2	
TA1537	9-AA	80	2-AA	2	
大腸菌					
WP2uvrA	AF-2	0.01	2-AA	10	

(0.1 mL/plate)

③陽性対照物質の調製

AF-2、9-AA、2-AA には DMSO(特級、Lot No.PEF1678、和光純薬工業株式会社)、SA には注射用蒸留水(局方、Lot No. 80306D、扶桑薬品工業株式会社)をそれぞれ溶媒として溶液を調製し、-80^{\circ}C以下(サンヨー超低温フリーザー、型式:MDF-192AT、三洋電機メディカシステム株式会社)で凍結保存した、調製後 1 年以内のものを用時に解凍して用いた。

4.試験菌株

(1) 菌株名、選択の理由および保存方法

以下の特性を持つ菌株を使用した。

	アミノ酸要求性 a	膜変異 rfa 特性 b	薬剤耐性因子。	紫外線感受性d
ネズミチフス菌				
TA98	his-	rfa	+pKM101	uvrB
TA100	his-	rfa	+pKM101	uvrB
TA1535	his-	rfa	_	uvrB
TA1537	his-	rfa	-	uvrB
大腸菌				
WP2uvrA	trp-	wild type		uvrA

ネズミチフス菌: Salmonella typhimurium

大腸菌: Escherichia coli

a :ヒスチジン要求性 (his-) 、トリプトファン要求性 (trp-) を示す。

b:rfa は膜変異特性を持ち、クリスタルバイオレット致死感受性を示す。

。: +pKM101 は薬剤耐性プラスミドを持ち、アンピシリン耐性を示す。

d: uvrA、uvrB は DNA 修復遺伝子の欠損を示し、紫外線致死感受性を示す。

変異原物質に対する感受性が高く、微生物を用いる変異原性試験に最も一般的に使用されている上記ネズミチフス菌(2008年5月14日、製品評価技術基盤機構、所在地:千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8より入手)および大腸菌(2004年3月26日、日本バイオアッセイ研究センター、所在地:神奈川県秦野市平沢2445より入手)を使用した。なお、入手後8時間培養した各試験菌株8mLに、DMSOを0.7 mLの割合で加え、急速凍結(分注保存、サンヨー超低温フリーザー、型式:MDF-192AT、三洋電機メディカシステム株式会社、−80℃以下)した。また、各試験菌株の保存ロットについて遺伝的特性の確認を行い、適合したものを使用した。

(2) 前培養

試験菌株保存液を解凍後、その 50 μL を無菌操作にて 25 mL の液体栄養培地 (Nutrient broth No.2、Lot No. 464616、OXOID 社) に接種し、クールバスシェイカー (型式: ML-10F PU-6 接続型、タイテック株式会社)を用い、培養開始までの間、設定温度 7.5°C に静置した。その後 37.0℃にて 10 時間振盪 (100 回/分) 培養して試験菌液とした。前培養終了後、各菌懸濁液の吸光度をクレット光電光度計 (富士工業株式会社、測定波長 660 nm)を用いて測定し、菌数の確認を行った結果、各菌株は 1.8~3.8×109/mL であった。菌液は使用時まで氷冷した。

5.使用培地

(1) 液体栄養培地

Nutrient broth No.2 を 2.5%となるよう純水に溶解した。三角フラスコ(容量 100 mL)に 25 mL ずつ分注した後、オート高圧滅菌器 (型式: HA-300M II、株式会社平山製作所) で滅菌した。

(2) 最少グルコース寒天平板培地

バイタルメディア AMT-O 培地 (Lot No. DZLA2601 極東製薬工業株式会社 より購入した生培地) を使用した。製造後6ヵ月以内のものを用いた。

(3) シャーレの識別

シャーレの側面および蓋に、油性インキで識別番号を記入した。

(4) トップアガー

0.5% NaCl を含む 0.6% 軟寒天 (Bacto Agar、Lot No.8120597、Difco Laboratories) 溶液に、ネズミチフス菌の場合 0.5 mmol/L L-ヒスチジン (Lot No.057K0730、 Sigma-Aldrich Co.) - 0.5 mmol/L D-ビオチン (Lot

No.066K1060、Sigma-Aldrich Co.) 溶液を、大腸菌の場合 0.5 mmol/L L·トリプトファン (Lot No. LTE1399、和光純薬工業株式会社) 溶液を容量比 10:1 で混合した。

6.ラット肝ホモジネート (S9) および S9 mix

(1) S9 の種類と購入先および保存法

Phenobarbital および 5,6-Benzoflavone で誘導された Sprague – Dawley 系雄性ラットの S9 (Lot No. RAA-590) をキッコーマン株式会社から購入し、−80℃以下(サンヨー超低温フリーザー、型式: MDF-192AT、三洋電機メディカシステム株式会社)で保存した製造後 6ヵ月以内のものを用時に解凍して用いた。

(2) S9 mix の組成と調製法

成 分	組	成
S9	0.1	mL (10%)
$MgCI_2$	8	μ mol
KCl	33	μ mol
グルコースー6ーリン酸	5	μ mol
NADH	4	$\mu \mathbf{mol}$
NADPH	4	$\mu \mathbf{mol}$
Na-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100	$\mu \mathrm{mol}$
		(1 T) 1 + V

(1 mL 当たり)

S9 mix は上記組成で必要量を用時調製した。調製方法として、グルコースー6-リン酸 (Lot No. 118805)、NADH (Lot No. 010807) および NADPH (Lot No. 050804 以上、オリエンタル酵母工業株式会社) を純水に溶解し、これに 0.4 mol/L MgCl₂、1.65 mol/L KCl の混合液、さらに 0.2 mol/L Na-リン酸緩衝液(pH 7.4)を混合させ、シリンジフィルター(0.20 μm、IWAKI GLASS)で濾過滅菌した後、解凍した S9 を加えた。なお、使用中は氷冷した。

7.試験方法

プレインキュベーション法 1,2) で実施した。いずれの試験も培養系列として、代謝 活性化によらない場合と代謝活性化による場合の 2 系列とした。

8.試験の操作

(1) 処理方法

試験物質液(陰性対照物質液、被験物質液、陽性対照物質液)0.1 mL および0.1 mol/L Na-リン酸緩衝液 (pH 7.4、代謝活性化によらない場合)あるいはS9 mix(代謝活性化による場合)0.5 mL を乾熱滅菌したガラスチューブ(径:13 mm

×長さ:100 mm) に入れ、その後、菌懸濁液 0.1 mL を加え 37.0℃に設定した恒温振盪機 (型式:SHK·100B、岩城硝子株式会社【用量設定試験】および型式:Personal·11 EX、タイテック株式会社【本試験および本試験 2 回目】)中で 20分間振盪 (80 回/分)した。20分間の振盪後、45.0℃に加温したトップアガー2 mL を加えて撹拌し、最少グルコース寒天平板培地(AMT·O 培地)に重層して固めた。なお、1 用量あたりの使用プレート数は、陰性対照群は 3 枚 (ただし、用量設定試験は 2 枚)、被験物質群および陽性対照群は 2 枚とした。なお、用量設定試験、本試験および本試験 2 回目において陽性対照群を他の試験と兼用した。

(2) 無菌試験

被験物質液(最高用量) および S9 mix について無菌試験を行った。

(3) 培養法および培養時間

トップアガーの固化後、最少グルコース寒天平板培地を倒置して 37.0℃に設定したインキュベーター (型式: MIR·253、三洋電機メディカシステム株式会社) に入れ 48 時間培養し、培養時間経過後は冷却した。培養時間の管理はインキュベーターのプログラム機能を用いて行った。

9.観察および測定

(1) コロニー数の計測

培養後、各プレートに発生した復帰変異コロニー数を計測した。陰性対照群および被験物質群の場合には肉眼によるマニュアル計測で行い、陽性対照群の場合にはコロニーカウンター(型式:Olympus、OL-502A、吉川工業株式会社)による機器計測を行った。機器計測ではプレート1枚につき3回(約120°ずつ回転させる)計測し、平均値を算出した。計測で得られた1用量当たり2ないし3プレートの復帰変異コロニー数について、それぞれ平均値を算出し、その値を当該用量のコロニー数とした。

(2) バックグランドローンの観察

計測の際は同時にバックグランドローンの生育の状態および被験物質の沈殿 の状態について双眼実体顕微鏡(型式:CSZ、株式会社内田洋行)で観察した。

10.結果の判定

被験物質で処理した各用量の復帰変異コロニー数が陰性対照群の 2 倍以上に増加し、その結果に再現性および被験物質との用量依存性が認められた場合、または単独な用量で陰性対照群の 2 倍以上に増加し、再現性が認められた場合の結果は陽性(+)と判定し、それ以外は陰性(-)と判定した。生育阻害の判定基準は、被験物質群のバックグランドローンが陰性対照群のものに比べ、明らかに粗、あるいは透明である場合とした。

11.統計学的解析

統計学的手法は用いなかった。

IV. 試験結果

被験物質の各試験菌株に対する生育阻害および沈殿の有無を確認し、本試験の用量を設定するため、-S9mixおよび+S9mixにより 5000、1667、555.6、185.2、61.7、20.6、6.86 μ g/plate で用量設定試験を行った。

その結果、各試験菌株において復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。なお、生育阻害は-S9mix では $61.7~\mu$ g/plate 以上、+S9mix では $185.2~\mu$ g/plate 以上で各試験菌株に認められた。被験物質の沈殿は認められなかった(Appendix 1)。

これらのことから、本試験では各試験菌株の最高用量を生育阻害が認められる用量に設定し、以下公比 2 で計 6~7 用量とした。すなわち、各試験菌株の·S9mix では 100、50、25、12.5、6.25、3.13、1.56 μ g/plate、+S9mix では 200、100、50、25、12.5、6.25 μ g/plate で実施した。

本試験の結果、各試験菌株の被験物質群の復帰変異コロニー数は、用量依存性ならびに陰性対照群の 2 倍以上の増加は認められなかった。なお、生育阻害は各試験菌株の-S9mix では $50~\mu$ g/plate 以上、+S9mix の TA98 株では $200~\mu$ g/plate、その他の試験菌株では $100~\mu$ g/plate 以上で認められた。被験物質の沈殿は認められなかった(Fig 1、2、Appendix 2)。

用量設定試験ではいずれの試験菌株においても生育阻害の認められない用量が 4 用量に満たなかった。したがって、再現性を確認するために本試験 2 回目を実施した。用量として、本試験で生育阻害が認められた用量を最高用量に設定し、以下公比 2 で計 5 用量とした。すなわち、各試験菌株の・S9mix では 50、25、12.5、6.25、3.13 μ g/plate、+S9mix の TA98 株では 200、100、50、25、12.5 μ g/plate、その他の菌株では 100、50、25、12.5、6.25 μ g/plate で実施した。

本試験 2 回目の結果、各試験菌株の被験物質群の復帰変異コロニー数は、用量依存性ならびに陰性対照群の 2 倍以上の増加は認められなかった。なお、生育阻害は各試験菌株の・S9mix では 50 μ g/plate、+S9mix の TA98 株では 200 μ g/plate、その他の試験菌株では 100 μ g/plate で認められた。被験物質の沈殿は認められなかった(Fig 3、4、Appendix 3)。

一方、各試験菌株の陽性対照群の復帰変異コロニー数は、いずれも陰性対照群と 比較して顕著な増加が認められた。

V. 考察および結論

3,4-ジクロロベンジルクロリドの遺伝子突然変異誘発性について、ネズミチフス菌 (TA98、TA100、TA1535、TA1537 株) および大腸菌 (WP2uvrA 株) を用いる復帰突然変異試験 (-S9mix および+S9mix) により検討した。

本試験の用量を設定するため $6.86\sim5000~\mu$ g/plate で用量設定試験を実施した。その結果、各試験菌株において復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。なお、生育阻害は各試験菌株の-S9mix では $61.7~\mu$ g/plate 以上、+S9mix では $185.2~\mu$ g/plate 以上で各試験菌株に認められた。被験物質の沈殿は認められなかった。これらのことから、本試験では各試験菌株の最高用量を・S9mix では $100~\mu$ g/plate、+S9mix では $200~\mu$ g/plate 設定し、以下公比 $2~\tau$ 計 $6\sim7~$ 用量とした。

本試験の結果、各試験菌株の被験物質群の復帰変異コロニー数は、用量依存性ならびに陰性対照群の 2 倍以上の増加は認められなかった。なお、生育阻害は各試験菌株の-S9mix では $50~\mu$ g/plate 以上、+S9mix の TA98 株では $200~\mu$ g/plate、その他の試験菌株では $100~\mu$ g/plate 以上で認められた。被験物質の沈殿は認められなかった。

用量設定試験ではいずれの試験菌株においても生育阻害の認められない用量が 4 用量に満たなかった。したがって、再現性を確認するために本試験 2 回目を実施した。用量として、本試験で生育阻害が認められた用量、すなわち各試験菌株の \cdot S9mix では 50 μ g/plate、+S9mix の TA98 株では 200 μ g/plate、その他の試験 菌株では 100 μ g/plate を最高用量に設定し、以下公比 2 で計 5 用量とした。

本試験 2 回目の結果、各試験菌株の被験物質群の復帰変異コロニー数は、用量依存性ならびに陰性対照群の 2 倍以上の増加は認められなかった。なお、生育阻害は各試験菌株の-S9mix では $50~\mu$ g/plate、+S9mix の TA98 株では $200~\mu$ g/plate、その他の菌株では $100~\mu$ g/plate で認められた。被験物質の沈殿は認められなかった。

以上のことから、全試験菌株について再現性が確認された。

陰性および陽性対照群のそれぞれの復帰変異コロニー数は、共に背景データ (Attached sheet 1) の Mean ± 2.5 S.D.の範囲内であったことから、当該試験が適正な条件下で実施されたことが確認された。

なお、無菌試験では、雑菌の汚染は認められなかった。

以上の結果より、当該試験条件下における 3,4·ジクロロベンジルクロリドの遺伝子突然変異誘発性は、陰性と判断された。

VI. 参考文献

- Maron, D.M., Ames, B.N., : Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, Mutation Res., 113, 173-215, 1983.
- Yahagi, T., Nagao, M., Seino, Y., Matsushima, T., Sugimura, T., and Okada, M., : Mutagenicities of N-nitrosamines on Salmonella, Mutation Res., 48, 121-129, 1977.

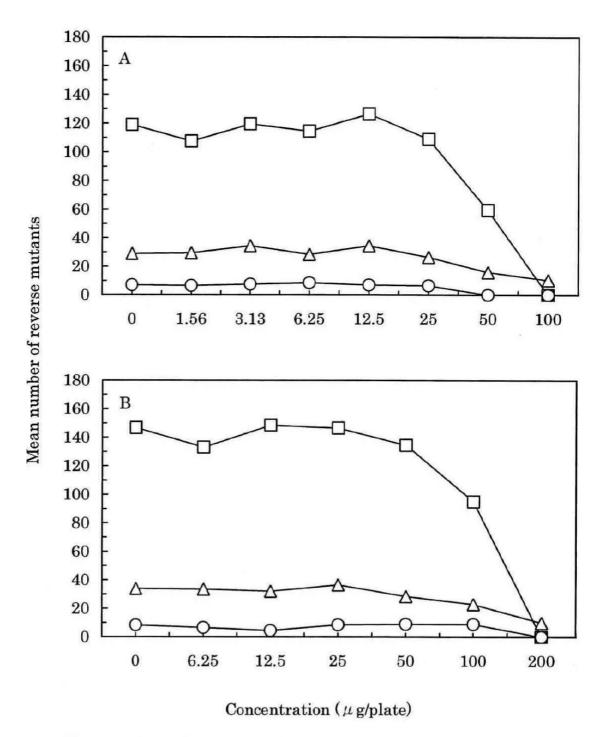


Fig. 1. Dose depending effect of 3,4-Dichlorobenzyl chloride in the strains of base-pair substitution (Mutagenicity test).

B: With metabolic activation system (+S9mix)

□ : TA100 ; ○ : TA1535 ; △ : WP2uvrA

Study No. H-09002

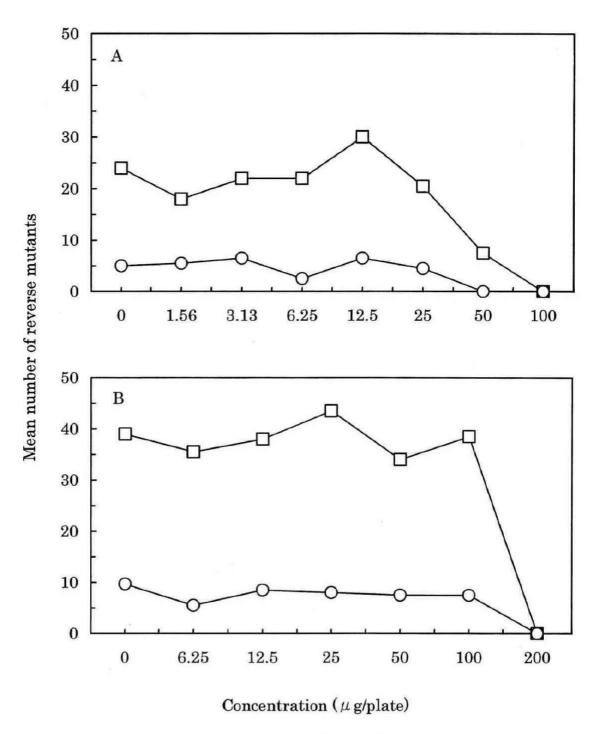


Fig. 2. Dose depending effect of 3,4-Dichlorobenzyl chloride in the strains of frameshift (Mutagenicity test).

B: With metabolic activation system (+S9mix)

 \square : TA98; \bigcirc : TA1537

Study No. H-09002

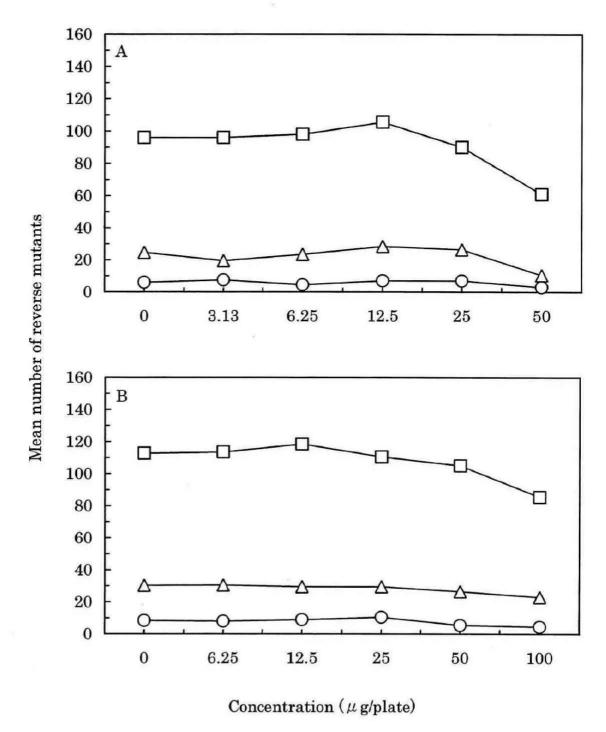


Fig. 3. Dose depending effect of 3,4-Dichlorobenzyl chloride in the strains of base-pair substitution (Mutagenicity test 2).

B: With metabolic activation system (+S9mix)

 \square : TA100; \bigcirc : TA1535; \triangle : WP2uvrA

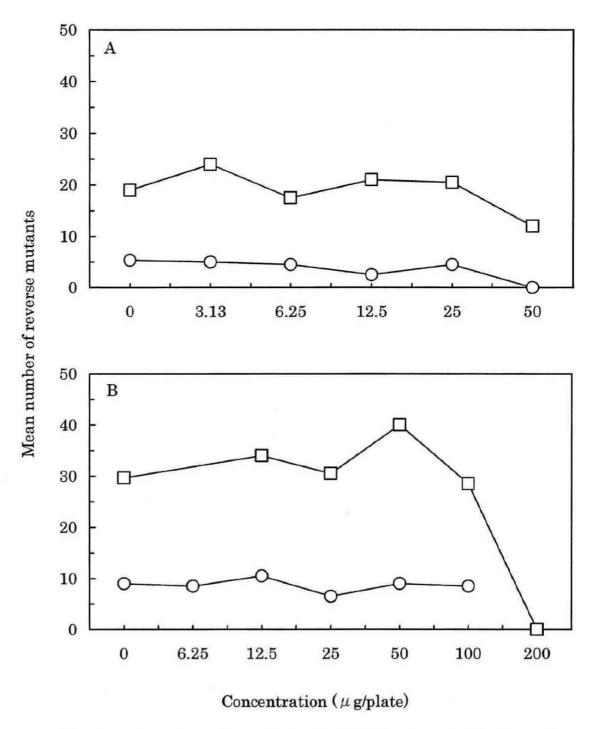


Fig. 4. Dose depending effect of 3,4-Dichlorobenzyl chloride in the strains of frameshift (Mutagenicity test 2).

B: With metabolic activation system (+S9mix)

□: TA98; ○: TA1537

Appendix 1. Reverse mutation test of 3,4-Dichlorobenzyl chloride in S.typhimurium and E.coli (Dose determination test)

With(+) or	Test substance	Number of revertants(number of colonies/plate) ^{a)}					
Without(-)	concentration	Base-pair substitution type			Frameshift type		
S9 mix	(μg/plate)	TA 100	TA 1535	WP2 uvrA	TA 98	TA 1537	
	Solvent control	148 136 (142)	7 4 (6)	29 20 (25)	22 22 (22)	5 6 (6	
	6.86	166 146 (156)	7 9 (8)	24 23 (24)	21 23 (22)	6 3 (5	
SALE OF	20.6	139 107 (123)	11 5 (8)	29 16 (23)	19 21 (20)	4 4 (4	
S9mix	61.7	3 * 1 *(2)	0 * 0 *(0)	0*(0)	28 * 4 * (16)	0 * 0 * ((
(-)	185.2	0 * (0)	0 * 0 *(0)	0 * (0)	18 * 2 *(10)	0 * 0 *(0	
	555.6	0*(0)	0 * 0 *(0)	0*(0)	0 * 0 *(0)	0 * 0 * ((
	1667	0*(0)	0 * 0 *(0)	0 * (0)	0 * 0 *(0)	0 * 0 * (
	5000	0 * (0)	0 * 0 *(0)	0 * 0 *(0)	0 * 0 *(0)	0 * 0 * (
	Solvent control	150 146 (148)	9 (9)	30 29 (30)	41 45 (43)	7 7 7	
	6.86	129 141 (135)	9 8 (9)	29 22 (26)	37 34 (36)	7 5 (6	
	20.6	132 124 (128)	7 6 (7)	29 28 (29)	41 42 (42)	8 (10	
S9mix	61.7	108 127 (118)	8 5 (7)	26 27 (27)	35 40 (38)	8 6 (7	
(+)	185.2	0*(0)	6*(3)	0*(0)	40 * 11 *(26)	0*(
	555.6	0*(0)	0*(0)	0*(0)	5 * 0 *(3)	0 * 0 *(0	
	1667	0*(0)	0*(0)	0*(0)	0 * 0 *(0)	0 * 0 * ((
	5000	0*(0)	0 * (0)	0 * 0 *(0)	0 * 0 * (0)	0*(0	
Positive control not requiring S9 mix	Name Concentration (µg/plate)	AF-2 0.01	SA 0.5	AF-2 0.01	AF-2 0.1	9-AA 80	
	Number of colonies/plate	396 428 (412)	342 327 (335)	186 179 (183)	367 387 (377)	348 351 (350	
Positive control	Name Concentration (µg/plate)	2-AA 1	2-AA 2	2-AA 10	2-AA 0.5	2-AA 2	
requiring S9 mix	Number of colonies/plate	1037 1106 (1072)	319 298 (309)	1048 1088 (1068)	430 397 (414)	299 282 (291	

a): The average number of colonies in each concentration.

Solvent: Dimethyl sulfoxide

^{* :} Inhibition against growth of bacteria.

AF-2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, SA:Sodium azide, 9-AA:9-Aminoacridine,

²⁻AA: 2-Aminoanthracene

Appendix 2. Reverse mutation test of 3,4-Dichlorobenzyl chloride in S.typhimurium and E.coli (Mutagenicity test)

With(+) or	Test substance	Number of revertants(number of colonies/plate) ^{a)}					
Without(-)	concentration	Base-pair substitution type			Frameshift type		
S9 mix	(μg/plate)	TA 100	TA 1535	WP2 uvrA	TA 98	TA 1537	
	Solvent control	115 111 (119) 131	6 6 (7) 9	31 23 (29) 33	28 26 (24) 18	4 5 (5) 6	
	1.56	121 94 (108)	5 8 (7)	32 27 (30)	14 22 (18)	5 6 (6)	
go:-	3.13	114 125 (120)	5 10 (8)	32 37 (35)	24 20 (22)	8 5 (7)	
S9mix (-)	6.25	117 112 (115)	9 8 (9) 6	30 27 (29) 37	26 18 (22)	3 (3)	
(-)	12.5	134 119 (127) 99	8 (7)	32 (35) 21	35 25 (30) 19	6 7 (7)	
	25	119 (109) 49 *	5 (7)	32 (27) 20 *	22 (21)	3 (5)	
	50	70 *(60)	0*(0)	12 *(16) 12 *	7*(8)	0 *(0)	
	100	0*(0)	0 *(0)	9 *(11)	0 *(0)	0 *(0	
	Solvent control	150 150 (147) 140	5 9 (8) 11	31 35 (34) 36	38 39 (39) 40	9 (10) 9	
	6.25	133 133 (133)	7 6 (7)	36 31 (34)	34 37 (36)	5 6 (6)	
S9mix	12.5	147 150 (149) 134	5 4 (5) 9	31 33 (32) 36	43 33 (38) 42	8 9 (9)	
(+)	25	159 (147) 148	8 (9)	37 (37) 30	45 (44) 37	6 (8)	
	50	121 (135) 97 *	8 (9)	27 (29) 28 *	31 (34) 33	10 (8)	
	100	93 *(95)	8*(9)	18 *(23) 10 *	44 (39) 0 *	7 *(8)	
	200 Name	0*(0)	0*(0)	10 *(10) AF-2	0*(0)	0 *(0)	
Positive control not requiring S9 mix	Concentration (µg/plate)	AF-2 0.01	0.5	0.01	AF-2 0.1	9-AA 80	
	Number of colonies/plate	441 413 (427)	245 258 (252)	170 185 (178)	441 474 (458)	437 411 (424)	
Positive control	Name Concentration (μg/plate)	2-AA 1	2-AA 2	2-AA 10	2-AA 0.5	2-AA 2	
requiring S9 mix	Number of colonies/plate	968 1064 (1016)	231 231 (231)	1166 1051 (1109)	490 426 (458)	202 220 (211)	

a): The average number of colonies in each concentration.

Solvent: Dimethyl sulfoxide

^{* :} Inhibition against growth of bacteria.

AF-2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, SA:Sodium azide, 9-AA:9-Aminoacridine,

²⁻AA: 2-Aminoanthracene

Appendix 3. Reverse mutation test of 3,4-Dichlorobenzyl chloride in S.typhimurium and E.coli (Mutagenicity test 2)

With(+) or	Test substance	Number of revertants(number of colonies/plate) ^{a)}					
Without(-)	concentration		pair substitution		Framesl		
S9 mix	(μg/plate)	TA 100	TA 1535	WP2 uvrA	TA 98	TA 1537	
	Solvent control	102 91 (96) 95	7 6 (6) 5	25 23 (25) 26	17 17 (19) 23	6 5 (5 5	
S9mix	3.13	99 93 (96)	10 5 (8)	24 15 (20)	23 25 (24)	7 3 (5	
(–)	6.25	95 101 (98)	6 3 (5)	28 19 (24)	14 21 (18)	4 5 (5	
	12.5	102 109 (106)	6 8 (7)	28 29 (29)	20 22 (21)	3 2 (3	
	25	89 91 (90) 53 *	6 8 (7) 2 *	23 30 (27)	19 22 (21)	5 4 (5	
	50	69 *(61)	4*(3)	8 *(11)	14 *(12)	0*(0	
	Solvent control	112 111 (113) 115	7 9 (8) 9	27 28 (30) 36	31 30 (30) 28	8 7 (9 12	
	6.25	107 120 (114)	8 8 (8)	25 36 (31)	- - (-)	10 7 (9	
S9mix	12.5	125 112 (119)	9 (9)	35 24 (30)	34 34 (34)	12 9 (11	
(+)	25	107 114 (111)	13 8 (11)	30 29 (30)	31 30 (31)	8 5 (7	
	50	95 (105)	7 4 (6)	23 30 (27)	39 41 (40)	9 (9	
	100	81 * 90 *(86)	4 * 5 *(5)	21 * 25 *(23)	21 36 (29)	8 * 9 *(9	
	200 Name	- - (-)		- - (-) AF-2	0*(0)	(
Positive control not	Concentration (µg/plate)	AF-2 0.01	0.5	0.01	AF-2 0.1	9-AA 80	
requiring S9 mix	Number of colonies/plate	387 415 (401)	321 308 (315)	195 211 (203)	552 527 (540)	395 410 (403	
Positive control	Name Concentration (μg/plate)	2-AA 1	2-AA 2	2-AA 10	2-AA 0.5	2-AA 2	
requiring S9 mix	Number of colonies/plate	1010 1118 (1064)	272 255 (264)	1142 1054 (1098)	527 522 (525)	245 222 (234	

 $[\]ensuremath{\mathbf{a}}\xspace)$: The average number of colonies in each concentration.

Solvent: Dimethyl sulfoxide

AF-2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, SA:Sodium azide, 9-AA:9-Aminoacridine,

Study No. H-09002

^{* :} Inhibition against growth of bacteria.

²⁻AA: 2-Aminoanthracene