
1,8-ジクロロオクタンの細菌を用いる復帰突然変異試験

最 終 報 告 書

作成日 2009年 10月 30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
2. 最終報告書作成者署名.....	4
3. 試験概要.....	5
4. 試験従事者及び業務分担.....	7
5. 要 約.....	8
6. 緒 言.....	9
7. 試験材料及び試験方法.....	9
7.1. 被験物質, 媒体 (陰性対照物質) 及び陽性対照物質.....	9
7.1.1. 被験物質.....	9
7.1.2. 媒体 (陰性対照物質)	9
7.1.3. 陽性対照物質.....	9
7.2. 検体液.....	10
7.2.1. 被験物質.....	10
7.2.2. 陽性対照物質.....	11
7.3. 試験菌株.....	11
7.4. S9 mix.....	12
7.5. 培地.....	12
7.6. 無菌試験.....	13
7.7. 試験方法.....	13
7.7.1. 試験操作.....	13
7.7.2. 用量設定試験.....	13
7.7.3. 本試験 (I) 及び本試験 (II)	14
7.8. 試験の成立条件.....	14
7.9. 統計学的方法.....	14
7.10. 判定基準.....	14
8. 試験成績.....	15
8.1. 用量設定試験.....	15
8.1.1. プレート上の析出物.....	15
8.1.2. 菌の生育阻害.....	15
8.1.3. 復帰変異コロニー数.....	15
8.1.4. 無菌試験.....	15
8.1.5. 対照物質.....	15
8.2. 本試験 (I)	15
8.2.1. プレート上の析出物.....	15
8.2.2. 菌の生育阻害.....	15
8.2.3. 復帰変異コロニー数.....	16
8.2.4. 無菌試験.....	16
8.2.5. 対照物質.....	16
8.3. 本試験 (II)	16
8.3.1. プレート上の析出物.....	16
8.3.2. 菌の生育阻害.....	16
8.3.3. 復帰変異コロニー数.....	16
8.3.4. 無菌試験.....	16

8.3.5. 対照物質	16
9. 考 察	17
10. 文 献	17
Table 1. Reverse mutation test of 1,8-Dichlorooctane with bacteria (dose-finding test).....	18
Table 2-1. Reverse mutation test of 1,8-Dichlorooctane with bacteria (mutagenicity test I: - S9 mix).....	19
Table 2-2. Reverse mutation test of 1,8-Dichlorooctane with bacteria (mutagenicity test I: +S9 mix).....	20
Table 3-1. Reverse mutation test of 1,8-Dichlorooctane with bacteria (mutagenicity test II: - S9 mix)	21
Table 3-2. Reverse mutation test of 1,8-Dichlorooctane with bacteria (mutagenicity test II: +S9 mix)	22
Figure 1-1. Reverse mutation test of 1,8-Dichlorooctane with bacteria (dose-finding test: without S9 mix)	23
Figure 1-2. Reverse mutation test of 1,8-Dichlorooctane with bacteria (dose-finding test: with S9 mix)	24
Figure 2-1. Reverse mutation test of 1,8-Dichlorooctane with bacteria (mutagenicity test I: without S9 mix)	25
Figure 2-2. Reverse mutation test of 1,8-Dichlorooctane with bacteria (mutagenicity test I: with S9 mix).....	26
Figure 3-1. Reverse mutation test of 1,8-Dichlorooctane with bacteria (mutagenicity test II: without S9 mix)	27
Figure 3-2. Reverse mutation test of 1,8-Dichlorooctane with bacteria (mutagenicity test II: with S9 mix)	28
Attachment 1. Specificity of test bacterial strains	29
Attachment 2. Number of surviving cells in bacterial suspensions	29
Attachment 3. Preparation of S9	30
Attachment 4. Composition of S9 mix.....	30
Attachment 5. Composition of minimum glucose agar plate medium	30
Attachment 6. Test conditions	31
Attachment 7. Background data of reverse mutation tests with bacteria	32

2. 最終報告書作成者署名

試験番号: 902027

表 題: 1,8-ジクロロオクタンの細菌を用いる復帰突然変異試験

2009 年 10 月 20 日

株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所

試験責任者

3. 試験概要

被験物質名: 1,8-ジクロロオクタン

試験系: *Salmonella typhimurium*: TA100, TA98, TA1535, TA1537
Escherichia coli: WP2uvrA

試験委託者: 厚生労働省 医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室
東京都千代田区霞が関1丁目2番2号

試験施設: 株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所
岐阜県羽島市福寿町間島六丁目104番地

試験目的: 1,8-ジクロロオクタン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。

準拠したガイドライン:

「OECD 化学品テストガイドライン, 471 細菌を用いる復帰突然変異試験」(1997年7月21日採択), 平成15年11月21日付(平成18年11月20日最終改正)(薬食発第1121002号: 厚生労働省医薬食品局長, 平成15・11・13製局第2号: 経済産業省製造産業局長, 環保企発第031121002号: 環境省総合環境政策局長連名通知)「新規化学物質等に係る試験の方法について」の別添「化学物質の慢性毒性試験, 生殖能及び後世代に及ぼす影響に関する試験, 催奇形性試験, 変異原性試験, がん原性試験, 生体内運命に関する試験及び薬理学的試験」

遵守した GLP:

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日付(平成20年7月4日最終改正), 薬食発第1121003号, 平成15・11・17製局第3号, 環保企発第031121004号]

OECD PRINCIPLES OF GOOD LABORATORY PRACTICE (OECD 化学物質の安全性試験の実施に関する基準)

試験開始日: 2008年 7月 9日

試験終了日: 2009年 10月 30日

試験実施日: 用量設定試験

菌株の前培養実施日	2008 年 7 月 22 日
試験の実施日	2008 年 7 月 23 日
判定日	2008 年 7 月 25 日
本試験 (I)	
菌株の前培養実施日	2008 年 8 月 18 日
試験の実施日	2008 年 8 月 19 日
判定日	2008 年 8 月 21 日
本試験 (II)	
菌株の前培養実施日	2008 年 8 月 25 日
試験の実施日	2008 年 8 月 26 日
判定日	2008 年 8 月 28 日

資料の保存場所:

この試験において試験施設で発生する資料（試験計画書及びその変更書の原本、生データ、最終報告書の原本）は、株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所の資料保存室に保存する。保存期間は最終報告書提出後 10 年間とする。

SOP 及び試験計画書に従わなかったこと:

当試験において、SOP 及び試験計画書に従わなかったことはなかった。

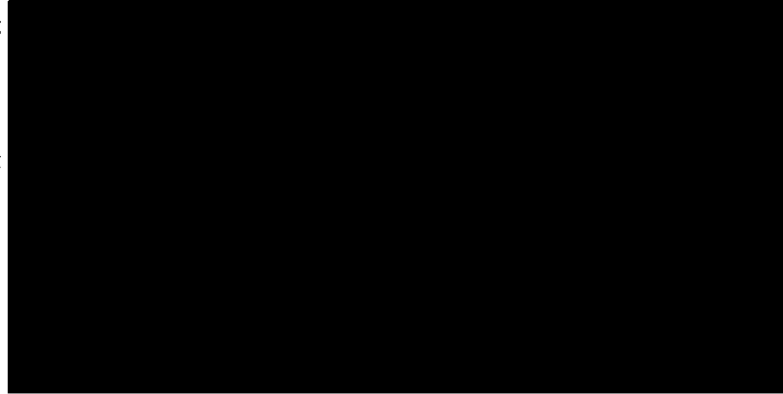
予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態:

当試験において、予見すること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は認められなかった。

4. 試験従事者及び業務分担

試験責任者:

試験従事者:



5. 要 約

1,8-ジクロロオクタン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 添加の場合について実施した.

1,8-ジクロロオクタン処理群における復帰変異コロニー数は, いずれの菌株とも S9 mix 無添加及び S9 mix 添加の場合にかかわらず, 陰性対照の 2 倍以上の増加はみられなかった.

陽性対照物質は, 明らかな復帰変異コロニー数の増加を示し, 陰性対照及び陽性対照における復帰変異コロニー数は, 試験施設のバックグラウンドデータの範囲内にあった.

本試験 (I) 及び本試験 (II) 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, 1,8-ジクロロオクタンに遺伝子突然変異誘発性はないと判定する.

6. 結 言

1,8-ジクロロオクタン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。

7. 試験材料及び試験方法

7.1. 被験物質、媒体（陰性対照物質）及び陽性対照物質

7.1.1. 被験物質

被験物質の 1,8-ジクロロオクタン（英語名称: 1,8-Dichlorooctane, CAS No. 2162-99-4, 引火点: 118°C, 発火点: 215°C, 比重: 1.0280, 分子量: 183.12）は、無色透明の液体である。当試験には、東京化成工業株式会社から入手したもの〔ロット番号: FGN01, 純度 (GC) : 99.9%〕を用いた。入手後は、試験施設の被験物質保管室の保管庫〔冷蔵庫: BMS-500F3, 日本フリーザー株式会社, 設定温度: 4°C (実測値: 2.1~6.4°C)〕内に冷蔵・遮光・密閉の条件下で保管した。

なお、1,8-ジクロロオクタンのラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験及び 14 日間回復試験（試験番号: 502227, 株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所）の投与期間終了後に製造元で再分析した結果、含量は 99.9%であり、使用期間中の安定性が確認された。

7.1.2. 媒体（陰性対照物質）

媒体には、ジメチルスルホキシド（以下 DMSO, 紫外外部吸収スペクトル用, ロット番号: WF032, 使用期限: 2013 年 3 月 18 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保管庫〔設定温度: 23°C (実測値: 21.6~23.2°C)〕内に室温・遮光の条件下で保管した。

7.1.3. 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: M0013, 使用期限: 2008 年 12 月 15 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、使用時まで試験施設の被験物質保管室の保管庫〔設定温度: -85°C (実測値: -87~-77°C), 冷凍庫: MDF-291AT, 三洋電機株式会社〕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。

7.1.3.1. 2-アミノアントラセン (2-aminoanthracene, 略名: 2AA)

調製液

5 µg/mL (ロット番号: 070516A205), 10 µg/mL (ロット番号: 070516A210),
20 µg/mL (ロット番号: 070608A220), 100 µg/mL (ロット番号: 070516A2100)

製 造 日: 2007 年 5 月 16 日 (20 µg/mL のみ: 2007 年 6 月 8 日)

媒 体: DMSO [紫外外部吸収スペクトル用, ロット番号: VV035 (20 µg/mL のみ: TA026), 株式会社同仁化学研究所]

原体

ロット番号: EWL3616

製 造 元: 和光純薬工業株式会社

7.1.3.2. アジ化ナトリウム (sodium azide, 略名: NaN₃)

調製液

5 µg/mL (ロット番号: 070516N)

製造 日: 2007 年 5 月 16 日

媒 体: 注射用水 (ロット番号: 6H98, 株式会社大塚製薬工場)

原体

ロット番号: M6N0789

製造 元: ナカライテスク株式会社

7.1.3.3. 9-アミノアクリジン (9-aminoacridine hydrochloride, 略名: 9AA)

調製液

800 µg/mL (ロット番号: 070517A9)

製造 日: 2007 年 5 月 17 日

媒 体: DMSO (紫外吸収スペクトル用, ロット番号: SV113, 株式会社同仁化学研究所)

原体

ロット番号: M6K8637

製造 元: ナカライテスク株式会社

7.1.3.4. 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 (ロット番号: 070517AF01) , 1.0 µg/mL (ロット番号: 070517AF10)

製造 日: 2007 年 5 月 17 日

媒 体: DMSO (紫外吸収スペクトル用, ロット番号: VV035, 株式会社同仁化学研究所)

原体

ロット番号: SDJ4376

製造 元: 和光純薬工業株式会社

7.2. 検体液

7.2.1. 被験物質

7.2.1.1. 調製方法

用量設定試験では, 1,8-ジクロロオクタン 500 mg (実秤量値: 500.0 mg) を秤量 (電子天秤: AT261, メトラー・トレド株式会社) し, DMSO 10 mL に溶解して最高濃度液 (50 mg/mL) を調製した. 50 mg/mL 液の一部を DMSO で段階希釈して, 12.5, 3.125, 0.781, 0.195, 0.0488 及び 0.0122 mg/mL を調製した.

本試験 (I) 及び本試験 (II) では, 1,8-ジクロロオクタン 25 mg [実秤量値: 本試験 (I) 及び本試験 (II) とも 25.2 mg] を秤量 (電子天秤: AT261, メトラー・トレド株式会社) し, DMSO 8 mL に溶解して最高濃度液 (3.125 mg/mL) を調製した. 3.125 mg/mL 液の一部を DMSO で段階希釈して, 1.563, 0.781, 0.391, 0.195, 0.0977, 0.0488, 0.0244, 0.0122 及び 0.0061 mg/mL を調製した.

7.2.1.2. 被験物質調製液の安定性及び濃度確認

被験物質調製液の安定性及び濃度確認は実施しなかった.

7.2.1.3. 調製頻度

用時に調製した.

7.2.2. 陽性対照物質

試験の際に, ポジコン AM マルチセットを融解して使用し, 使用後の残液は廃棄処分した. 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 ($\mu\text{g/mL}$)	試験濃度 ($\mu\text{g/plate}$)
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

7.3. 試験菌株

試験菌株には, 適用ガイドラインにおいて規定されており, 変異原性物質に対する感受性が高く, 細菌を用いる変異原性試験に最も一般的に使用されている, *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-」¹⁾に従い、アミノ酸要求性（最少グルコース寒天平板培地に、*S. typhimurium* の場合は 0.5 mmol/L D-ビオチンを含むトップアガー 2 mL を、*E. coli* の場合はプレーンのトップアガー 2 mL を通常行っている試験方法で前培養した菌懸濁液 0.1 mL と共に重層し、48 時間培養して 0.1 mL 中に含まれる復帰変異コロニー数を調べた）、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: 2007 年 8 月 22 日～8 月 24 日、TA1535, TA1537 及び WP2*uvrA* の検査日: 2006 年 11 月 9 日～11 月 13 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 設定の冷凍庫〔型式: BFV-130（LR）、エスベック株式会社〕内に凍結保管した（TA100 及び TA98 の分注日: 2007 年 9 月 14 日、TA1535, TA1537 及び WP2*uvrA* の分注日: 2006 年 11 月 24 日、使用期限: 分注後 2 年以内）。菌株の前培養には、OXOID NUTRIENT BROTH No.2（ロット番号: 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）に先の培養液を 10 mL 分注し、ここへ融解した菌液を 20 μ L 接種した。これを往復振盪型式〔振盪数: 設定; 90 回/分, 実測値; 用量設定試験, 本試験 (I) 及び本試験 (II) とも 89 回/分〕の振盪器（型式: M-100^N, タイテック株式会社）を用いて、37°C で 9 時間振盪培養した。

培養終了後、菌懸濁液の濁度を分光光度計（型式: Novaspec II, アマシャム バイオサイエンス株式会社）を用いて測定し、その O.D. 値から生菌数を求めた（Attachment 2）。また、菌懸濁液は使用時まで室温で保管した。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。

7.4. S9 mix

S9 は、Attachment 3 の条件により 2008 年 4 月 11 日にオリエンタル酵母工業株式会社で製造されたもの（ロット番号: 08041101）を使用した。S9 は、2008 年 5 月 13 日に購入し、使用時まで -80°C 設定の冷凍庫〔型式: BFV-130（LR）、エスベック株式会社〕内に凍結保管した。

S9 mix は、S9 mix 用の Cofactor（商品名: Cofactor-I, ロット番号: 999801, 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 μ m, 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 Attachment 4 に示した。

7.5. 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（ロット番号: ANI260DX, 製造日: 2008 年 4 月 17 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 5 に示した。

トップアガーは、注射用水に Bacto Agar（ロット番号: 7085995, 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℃, 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。

7.6. 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、本試験 (I) 及び本試験 (II) 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℃ 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播き広げ、プレートを転倒して 37℃ 設定の恒温器（型式: 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、用量設定試験では、50 mg/mL 濃度液を、本試験 (I) 及び本試験 (II) では 3.125 mg/mL 濃度液を用いた。

7.7. 試験方法

7.7.1. 試験操作

試験条件を Attachment 6 に示した。

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 ナリン酸緩衝液（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器を用いて 37℃ で 20 分間インキュベーションした。その後、45℃ 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播き広げ、プレートを転倒して 37℃ 設定の恒温器内で約 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、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。コロニーアナライザーによる計測は、プレート 1 枚につき 2 回行い、その平均値を採用した。計測後、菌の生育阻害の有無を 100 倍の顕微鏡下で観察した。

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、用量設定試験では 1 枚、本試験 (I) 及び本試験 (II) では 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。

7.7.2. 用量設定試験

用量設定試験の試験濃度は、適用ガイドラインに基づき、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、以下公比 4 で 1250, 312.5, 78.1, 19.5, 4.88 及び 1.22 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。

7.7.3. 本試験（Ⅰ）及び本試験（Ⅱ）

用量設定試験の結果、S9 mix 無添加の場合、TA100, TA1535, TA98 及び TA1537 では 19.5 µg/plate 以上の濃度において、WP2*uvrA* では 78.1 µg/plate 以上の濃度において菌の生育阻害が認められた。S9 mix 添加の場合、TA100, TA1535, TA98 及び TA1537 では 78.1 µg/plate 以上の濃度において、WP2*uvrA* では 312.5 µg/plate 以上の濃度において菌の生育阻害が認められた。従って、いずれの菌株とも、菌の生育阻害を示さないと考えられる濃度が 4 濃度以上含まれるように公比 2 で 6 濃度を設定した。すなわち、S9 mix 無添加の場合、TA100, TA1535, TA98 及び TA1537 では 0.61, 1.22, 2.44, 4.88, 9.77 及び 19.5 µg/plate , WP2*uvrA* では 2.44, 4.88, 9.77, 19.5, 39.1 及び 78.1 µg/plate. S9 mix 添加の場合、TA100, TA1535, TA98 及び TA1537 では 2.44, 4.88, 9.77, 19.5, 39.1 及び 78.1 µg/plate, WP2*uvrA* では 9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156.3 及び 312.5 µg/plate. 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。

7.8. 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、陰性対照及び陽性対照の復帰変異コロニー数が、試験施設のバックグラウンドデータ（Attachment 7）のほぼ範囲内にあり、さらに試験系に影響した他の要因がない場合に試験が成立するものとした。

7.9. 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。

7.10. 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。

8. 試験成績

8.1. 用量設定試験 (Table 1 及び Figure 1-1, 1-2)

8.1.1. 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 無添加の場合、1250 及び 5000 µg/plate において透明な油滴状の析出物が、S9 mix 添加の場合、312.5 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。

8.1.2. 菌の生育阻害

S9 mix 無添加の場合、TA100, TA1535, TA98 及び TA1537 では 19.5 µg/plate 以上の濃度において、WP2*uvrA* では 78.1 µg/plate 以上の濃度において菌の生育阻害が認められた。S9 mix 添加の場合、TA100, TA1535, TA98 及び TA1537 では 78.1 µg/plate 以上の濃度において、WP2*uvrA* では 312.5 µg/plate 以上の濃度において菌の生育阻害が認められた。

8.1.3. 復帰変異コロニー数

S9 mix 無添加及び S9 mix 添加の場合とも、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数は陰性対照の 2 倍未満であった。

8.1.4. 無菌試験

被験物質の最高濃度液 (50 mg/mL) 及び S9 mix に雑菌の混入は認められなかった。

8.1.5. 対照物質

陽性対照物質は、明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。また、陰性対照及び陽性対照における復帰変異コロニー数は、試験施設のバックグラウンドデータの範囲内にあった。

8.2. 本試験 (I) (Table 2-1, 2-2 及び Figure 2-1, 2-2)

8.2.1. プレート上の析出物

S9 mix 無添加の場合、いずれの濃度においてもプレート上に析出物は認められなかったが、S9 mix 添加の場合、培養開始時及び培養終了時に 312.5 µg/plate において白色の微細な析出物が認められた。

8.2.2. 菌の生育阻害

S9 mix 無添加の場合、TA100, TA1535, TA98 及び TA1537 では 19.5 µg/plate において、WP2*uvrA* では 39.1 及び 78.1 µg/plate において菌の生育阻害が認められた。S9 mix 添加の場合、TA100, TA98 及び TA1537 では 78.1 µg/plate において、TA1535 では 39.1 及び 78.1 µg/plate において、WP2*uvrA* では 312.5 µg/plate において菌の生育阻害が認められた。

8.2.3. 復帰変異コロニー数

S9 mix 無添加及び S9 mix 添加の場合とも、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数は陰性対照の 2 倍未満であった。

8.2.4. 無菌試験

被験物質の最高濃度液 (3.125 mg/mL) 及び S9 mix に雑菌の混入は認められなかった。

8.2.5. 対照物質

陽性対照物質は、明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。また、陰性対照及び陽性対照における復帰変異コロニー数は、試験施設のバックグラウンドデータの範囲内にあった。

8.3. 本試験 (II) (Table 3-1, 3-2 及び Figure 3-1, 3-2)

8.3.1. プレート上の析出物

S9 mix 無添加の場合、いずれの濃度においてもプレート上に析出物は認められなかったが、S9 mix 添加の場合、培養開始時及び培養終了時に 312.5 µg/plate において白色の微細な析出物が認められた。

8.3.2. 菌の生育阻害

S9 mix 無添加の場合、TA100, TA1535, TA98 及び TA1537 では 19.5 µg/plate において、WP2_{uvrA} では 39.1 及び 78.1 µg/plate において菌の生育阻害が認められた。S9 mix 添加の場合、TA100, TA98 及び TA1537 では 78.1 µg/plate において、TA1535 では 39.1 及び 78.1 µg/plate において、WP2_{uvrA} では 312.5 µg/plate において菌の生育阻害が認められた。

8.3.3. 復帰変異コロニー数

S9 mix 無添加及び S9 mix 添加の場合とも、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数は陰性対照の 2 倍未満であった。

8.3.4. 無菌試験

被験物質の最高濃度液 (3.125 mg/mL) 及び S9 mix に雑菌の混入は認められなかった。

8.3.5. 対照物質

陽性対照物質は、明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。また、陰性対照及び陽性対照における復帰変異コロニー数は、試験施設のバックグラウンドデータの範囲内にあった。

9. 考察

1,8-ジクロロオクタン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。

1,8-ジクロロオクトンは、S9 mix 無添加及び S9 mix 添加の場合とも、いずれの菌株のすべての濃度において、復帰変異コロニー数は陰性対照の 2 倍以上に増加しなかった。

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。

陽性対照物質は、明らかな復帰変異コロニー数の増加を示し、陰性対照及び陽性対照における復帰変異コロニー数は、試験施設のバックグラウンドデータの範囲内にあった。

本試験 (I) 及び本試験 (II) 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、1,8-ジクロロオクタんに遺伝子突然変異誘発性はないと判定する。なお、1,8-ジクロロオクトンは当試験施設で同時期に実施した哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験で陽性の結果が得られている²⁾。

10. 文献

- 1) 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
- 2) XXXXXXXXXX 1,8-ジクロロオクタンの哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験 (試験番号: 971127), 株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所 (2009)。

Table 1. Reverse mutation test of 1,8-Dichlorooctane with bacteria
(dose-finding test)

With(+) or without(-) S9 mix	Compound concentration (µg/plate)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2 _{uvrA}	TA98	TA1537
S9 mix (-)	Negative control	107	17	38	21	5
	1.22	75	18	38	11	7
	4.88	122	13	33	20	6
	19.5	57*	4*	38	10*	6*
	78.1	19*	0*	14*	6*	0*
	312.5	2*	0*	14*	7*	0*
	1250 [†]	0*	0*	17*	3*	0*
	5000 [†]	0*	0*	12*	0*	0*
S9 mix (+)	Negative control	91	14	44	20	25
	1.22	103	9	38	27	18
	4.88	98	16	45	24	17
	19.5	86	17	32	26	9
	78.1	73*	8*	44	15*	3*
	312.5 ^{††}	28*	2*	19*	8*	0*
	1250 ^{††}	0*	0*	16*	6*	0*
	5000 ^{††}	0*	0*	12*	0*	0*
Positive control not requiring S9 mix	Name	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9AA
	Concentration (µg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Number of colonies/plate	401	584	113	389	324
Positive control requiring S9 mix	Name	2AA				
	Concentration (µg/plate)	1	2	10	0.5	2
	Number of colonies/plate	796	372	1037	370	219

Negative control: Dimethyl sulfoxide.

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

2AA: 2-Aminoanthracene.

* : Bacterial growth inhibition was observed.

[†] : Clear oil drop-like precipitations were observed on the surface of agar plate.

^{††} : White fine precipitations were observed on the surface of agar plate.

Table 2-1. Reverse mutation test of 1,8-Dichlorooctane with bacteria
(mutagenicity test I: -S9 mix)

Compound concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
	Base-pair substitution type			Frameshift type	
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
Negative control	95, 98, 108 (100 $\pm$ 6.8)	10, 11, 12 (11 $\pm$ 1.0)	25, 29, 29 (28 $\pm$ 2.3)	25, 30, 32 (29 $\pm$ 3.6)	16, 19, 23 (19 $\pm$ 3.5)
0.61	81, 95, 97 (91 $\pm$ 8.7)	4, 8, 10 (7 $\pm$ 3.1)		26, 27, 34 (29 $\pm$ 4.4)	18, 22, 25 (22 $\pm$ 3.5)
1.22	107, 109, 118 (111 $\pm$ 5.9)	4, 10, 11 (8 $\pm$ 3.8)		29, 33, 33 (32 $\pm$ 2.3)	21, 25, 28 (25 $\pm$ 3.5)
2.44	99, 106, 110 (105 $\pm$ 5.6)	5, 14, 17 (12 $\pm$ 6.2)	19, 32, 38 (30 $\pm$ 9.7)	18, 26, 27 (24 $\pm$ 4.9)	24, 25, 26 (25 $\pm$ 1.0)
4.88	90, 94, 108 (97 $\pm$ 9.5)	8, 10, 11 (10 $\pm$ 1.5)	19, 31, 36 (29 $\pm$ 8.7)	29, 34, 34 (32 $\pm$ 2.9)	23, 24, 26 (24 $\pm$ 1.5)
9.77	91, 93, 100 (95 $\pm$ 4.7)	4, 6, 11 (7 $\pm$ 3.6)	27, 27, 28 (27 $\pm$ 0.6)	25, 27, 28 (27 $\pm$ 1.5)	18, 19, 23 (20 $\pm$ 2.6)
19.5	56*, 63*, 71* (63 $\pm$ 7.5)	2*, 3*, 4* (3 $\pm$ 1.0)	17, 20, 24 (20 $\pm$ 3.5)	8*, 14*, 20* (14 $\pm$ 6.0)	3*, 6*, 11* (7 $\pm$ 4.0)
39.1			7*, 14*, 17* (13 $\pm$ 5.1)		
78.1			11*, 16*, 18* (15 $\pm$ 3.6)		
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 colonies/plate	377, 398, 434 (403 $\pm$ 28.8)	426, 458, 486 (457 $\pm$ 30.0)	100, 101, 106 (102 $\pm$ 3.2)	362, 369, 380 (370 $\pm$ 9.1)	219, 318, 392 (310 $\pm$ 86.8)

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.

*: Bacterial growth inhibition was observed.

Table 2-2. Reverse mutation test of 1,8-Dichlorooctane with bacteria
(mutagenicity test I : +S9 mix)

Compound concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
	Base-pair substitution type			Frameshift type	
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
Negative control	107, 110, 121 (113 $\pm$ 7.4)	5, 7, 10 (7 $\pm$ 2.5)	21, 28, 28 (26 $\pm$ 4.0)	28, 39, 45 (37 $\pm$ 8.6)	24, 25, 32 (27 $\pm$ 4.4)
2.44	117, 123, 127 (122 $\pm$ 5.0)	4, 5, 10 (6 $\pm$ 3.2)		35, 37, 41 (38 $\pm$ 3.1)	32, 34, 38 (35 $\pm$ 3.1)
4.88	121, 126, 138 (128 $\pm$ 8.7)	5, 8, 11 (8 $\pm$ 3.0)		40, 42, 45 (42 $\pm$ 2.5)	17, 28, 33 (26 $\pm$ 8.2)
9.77	104, 114, 115 (111 $\pm$ 6.1)	6, 7, 8 (7 $\pm$ 1.0)	23, 31, 38 (31 $\pm$ 7.5)	40, 40, 42 (41 $\pm$ 1.2)	24, 31, 34 (30 $\pm$ 5.1)
19.5	106, 117, 119 (114 $\pm$ 7.0)	2, 8, 9 (6 $\pm$ 3.8)	26, 28, 34 (29 $\pm$ 4.2)	21, 32, 40 (31 $\pm$ 9.5)	20, 21, 31 (24 $\pm$ 6.1)
39.1	103, 104, 122 (110 $\pm$ 10.7)	3*, 5*, 5* (4 $\pm$ 1.2)	34, 34, 34 (34 $\pm$ 0.0)	32, 35, 36 (34 $\pm$ 2.1)	20, 27, 33 (27 $\pm$ 6.5)
78.1	81*, 85*, 96* (87 $\pm$ 7.8)	2*, 4*, 6* (4 $\pm$ 2.0)	27, 31, 35 (31 $\pm$ 4.0)	15*, 20*, 25* (20 $\pm$ 5.0)	6*, 8*, 11* (8 $\pm$ 2.5)
156.3			25, 25, 28 (26 $\pm$ 1.7)		
312.5 [†]			20*, 22*, 24* (22 $\pm$ 2.0)		
Positive control					
Name	2AA				
Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2
Number of colonies/plate	906, 912, 968 (929 $\pm$ 34.2)	338, 379, 420 (379 $\pm$ 41.0)	924, 950, 994 (956 $\pm$ 35.4)	351, 380, 385 (372 $\pm$ 18.4)	231, 243, 253 (242 $\pm$ 11.0)

Negative control : Dimethyl sulfoxide.

2AA : 2-Aminoanthracene.

() : Mean $\pm$ S.D.

* : Bacterial growth inhibition was observed.

[†] : White fine precipitations were observed on the surface of agar plate.

Table 3-1. Reverse mutation test of 1,8-Dichlorooctane with bacteria
(mutagenicity test II: -S9 mix)

Compound concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
	Base-pair substitution type			Frameshift type	
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
Negative control	92, 109, 114 (105 $\pm$ 11.5)	8, 12, 12 (11 $\pm$ 2.3)	42, 50, 55 (49 $\pm$ 6.6)	17, 25, 29 (24 $\pm$ 6.1)	8, 9, 9 (9 $\pm$ 0.6)
0.61	102, 104, 109 (105 $\pm$ 3.6)	7, 10, 10 (9 $\pm$ 1.7)		12, 14, 19 (15 $\pm$ 3.6)	10, 10, 11 (10 $\pm$ 0.6)
1.22	104, 118, 121 (114 $\pm$ 9.1)	10, 10, 11 (10 $\pm$ 0.6)		16, 21, 21 (19 $\pm$ 2.9)	5, 5, 8 (6 $\pm$ 1.7)
2.44	104, 105, 128 (112 $\pm$ 13.6)	8, 9, 11 (9 $\pm$ 1.5)	37, 44, 46 (42 $\pm$ 4.7)	10, 15, 24 (16 $\pm$ 7.1)	3, 8, 10 (7 $\pm$ 3.6)
4.88	99, 121, 128 (116 $\pm$ 15.1)	9, 10, 12 (10 $\pm$ 1.5)	40, 40, 45 (42 $\pm$ 2.9)	10, 14, 28 (17 $\pm$ 9.5)	5, 6, 9 (7 $\pm$ 2.1)
9.77	95, 106, 116 (106 $\pm$ 10.5)	5, 6, 10 (7 $\pm$ 2.6)	35, 37, 53 (42 $\pm$ 9.9)	17, 18, 27 (21 $\pm$ 5.5)	7, 10, 11 (9 $\pm$ 2.1)
19.5	67*, 71*, 80* (73 $\pm$ 6.7)	5*, 5*, 10* (7 $\pm$ 2.9)	33, 34, 41 (36 $\pm$ 4.4)	7*, 10*, 13* (10 $\pm$ 3.0)	2*, 5*, 6* (4 $\pm$ 2.1)
39.1			6*, 11*, 14* (10 $\pm$ 4.0)		
78.1			15*, 17*, 17* (16 $\pm$ 1.2)		
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 colonies/plate	352, 379, 447 (393 $\pm$ 49.0)	454, 484, 497 (478 $\pm$ 22.1)	108, 118, 125 (117 $\pm$ 8.5)	348, 359, 386 (364 $\pm$ 19.6)	195, 278, 308 (260 $\pm$ 58.5)

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.

*: Bacterial growth inhibition was observed.

Table 3-2. Reverse mutation test of 1,8-Dichlorooctane with bacteria
(mutagenicity test II: +S9 mix)

Compound concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
	Base-pair substitution type			Frameshift type	
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
Negative control	101, 105, 137 (114 $\pm$ 19.7)	4, 7, 10 (7 $\pm$ 3.0)	44, 50, 53 (49 $\pm$ 4.6)	18, 28, 39 (28 $\pm$ 10.5)	15, 16, 18 (16 $\pm$ 1.5)
2.44	88, 116, 127 (110 $\pm$ 20.1)	5, 6, 7 (6 $\pm$ 1.0)		25, 26, 29 (27 $\pm$ 2.1)	9, 15, 16 (13 $\pm$ 3.8)
4.88	102, 113, 121 (112 $\pm$ 9.5)	4, 5, 7 (5 $\pm$ 1.5)		15, 23, 27 (22 $\pm$ 6.1)	17, 17, 22 (19 $\pm$ 2.9)
9.77	105, 108, 115 (109 $\pm$ 5.1)	6, 6, 7 (6 $\pm$ 0.6)	37, 54, 56 (49 $\pm$ 10.4)	19, 20, 25 (21 $\pm$ 3.2)	14, 16, 18 (16 $\pm$ 2.0)
19.5	105, 106, 107 (106 $\pm$ 1.0)	9, 9, 9 (9 $\pm$ 0.0)	42, 44, 48 (45 $\pm$ 3.1)	20, 23, 26 (23 $\pm$ 3.0)	9, 18, 18 (15 $\pm$ 5.2)
39.1	108, 111, 113 (111 $\pm$ 2.5)	5*, 6*, 8* (6 $\pm$ 1.5)	44, 55, 57 (52 $\pm$ 7.0)	23, 24, 27 (25 $\pm$ 2.1)	7, 11, 19 (12 $\pm$ 6.1)
78.1	85*, 96*, 96* (92 $\pm$ 6.4)	3*, 4*, 8* (5 $\pm$ 2.6)	37, 41, 56 (45 $\pm$ 10.0)	10*, 16*, 25* (17 $\pm$ 7.5)	11*, 12*, 17* (13 $\pm$ 3.2)
156.3			20, 26, 47 (31 $\pm$ 14.2)		
312.5 [†]			20*, 22*, 23* (22 $\pm$ 1.5)		
Positive control					
Name	2AA				
Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2
Number of colonies/plate	868, 883, 894 (882 $\pm$ 13.1)	326, 328, 343 (332 $\pm$ 9.3)	910, 939, 1008 (952 $\pm$ 50.3)	306, 375, 387 (356 $\pm$ 43.7)	214, 245, 250 (236 $\pm$ 19.5)

Negative control: Dimethyl sulfoxide.

2AA: 2-Aminoanthracene.

() : Mean $\pm$ S.D.

*: Bacterial growth inhibition was observed.

[†]: White fine precipitations were observed on the surface of agar plate.

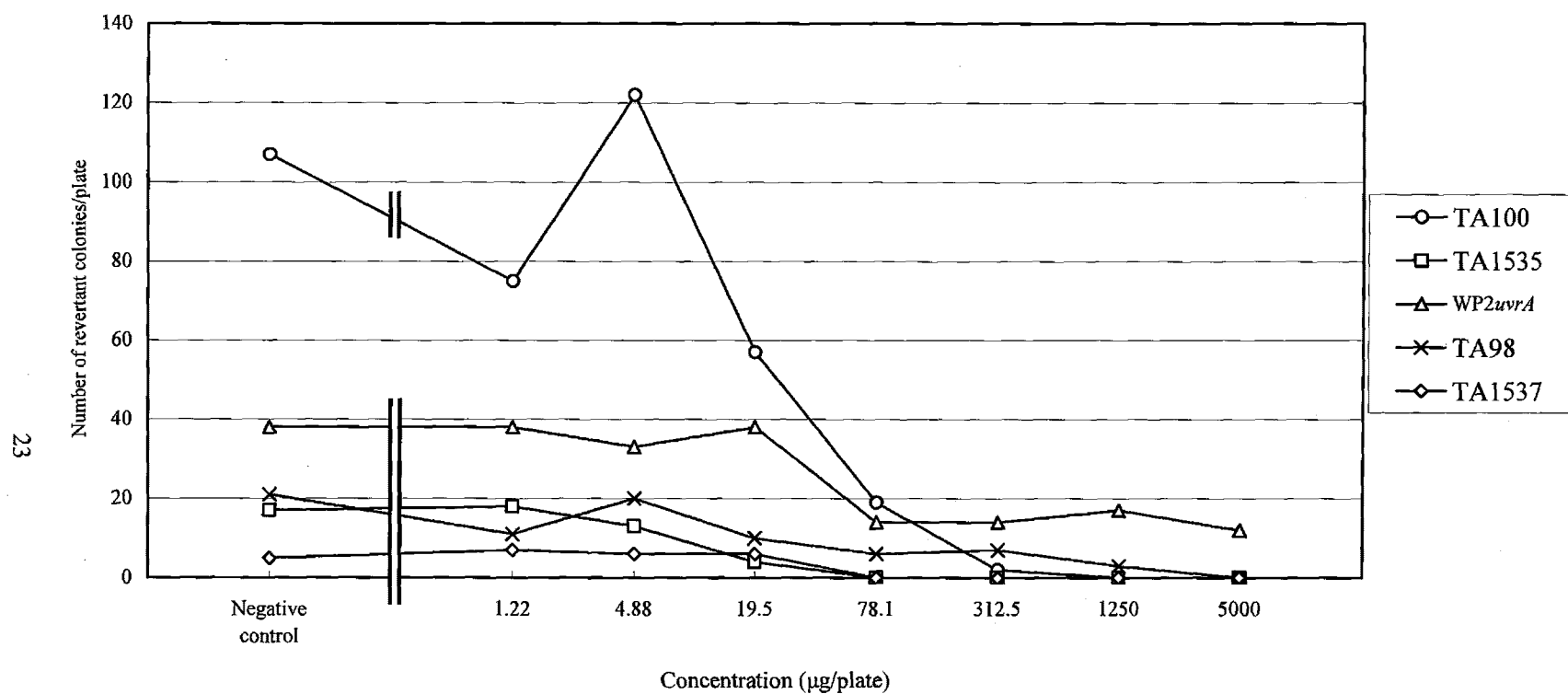


Figure 1-1. Reverse mutation test of 1,8-Dichlorooctane with bacteria (dose- finding test: without S9 mix)

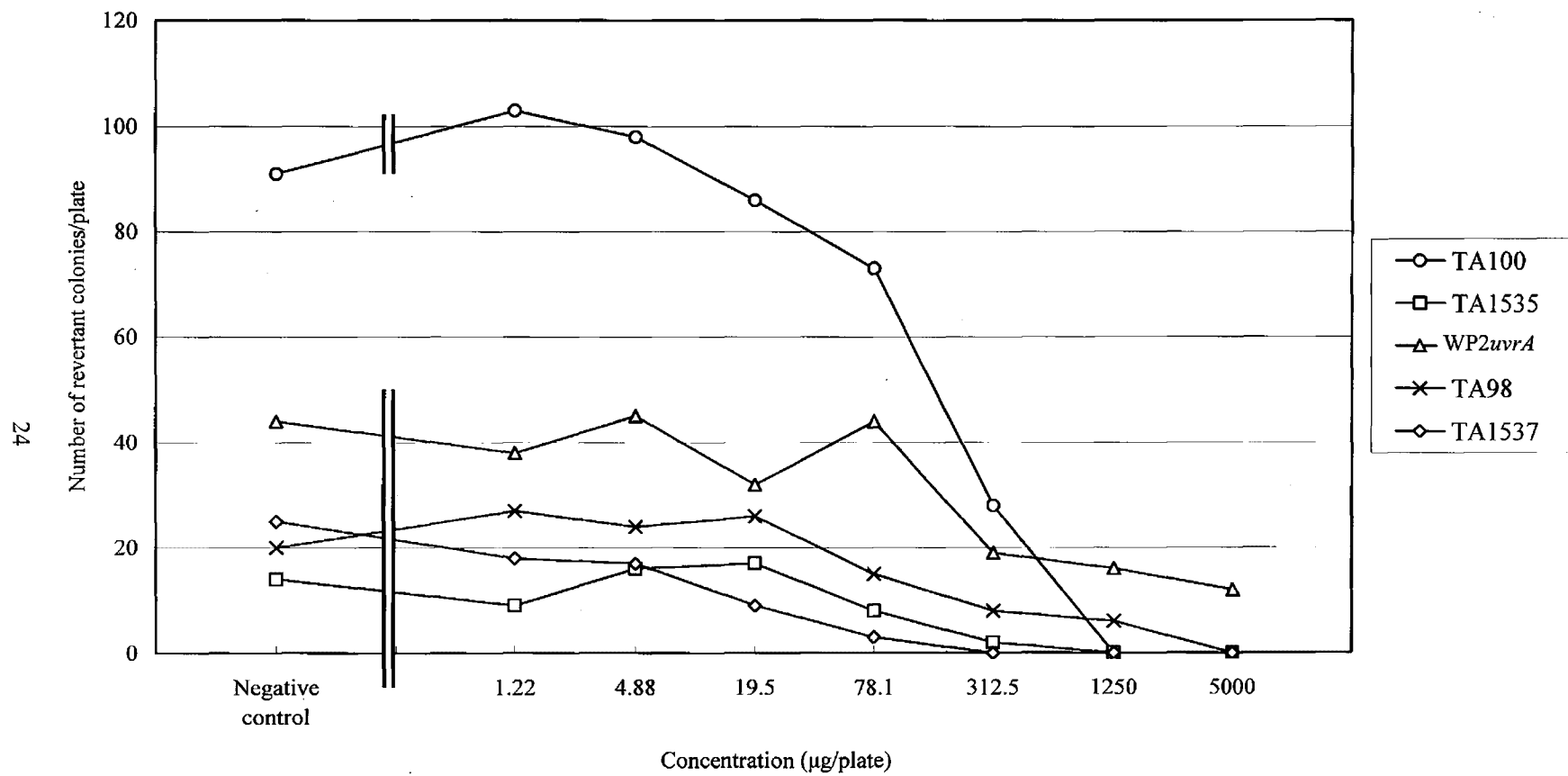


Figure 1-2. Reverse mutation test of 1,8-Dichlorooctane with bacteria (dose- finding test: with S9 mix)

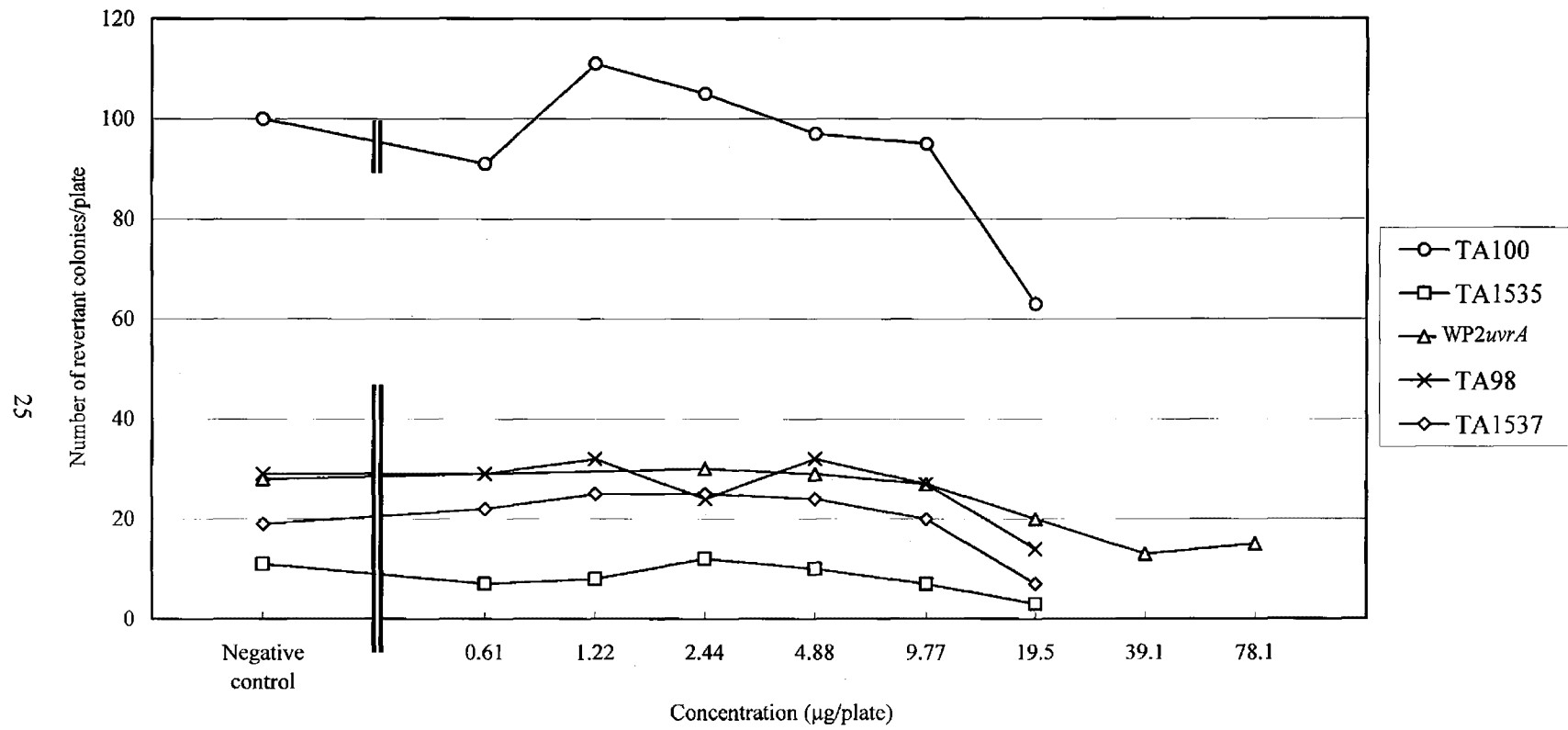


Figure 2-1. Reverse mutation test of 1,8-Dichlorooctane with bacteria (mutagenicity test I: without S9 mix)

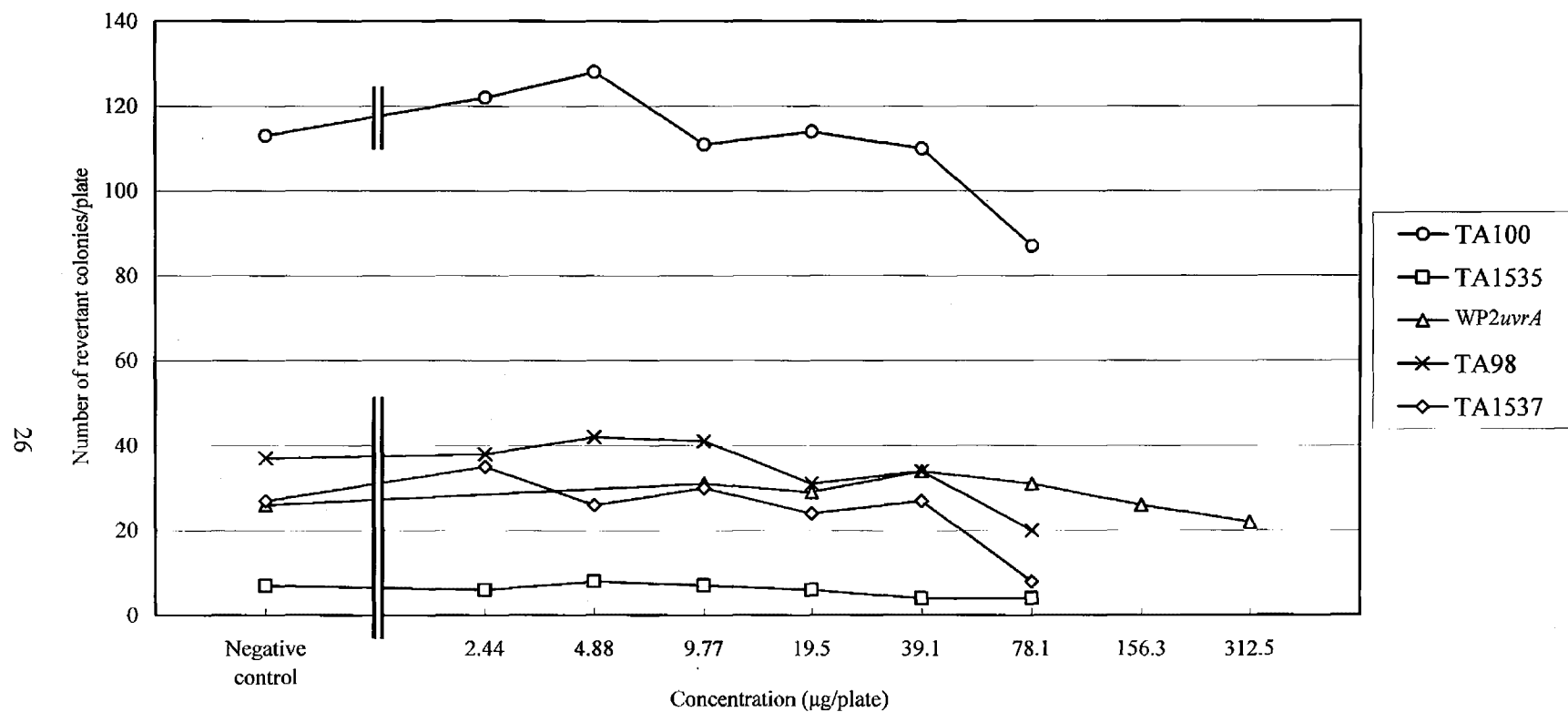


Figure 2-2. Reverse mutation test of 1,8-Dichlorooctane with bacteria (mutagenicity test I: with S9 mix)

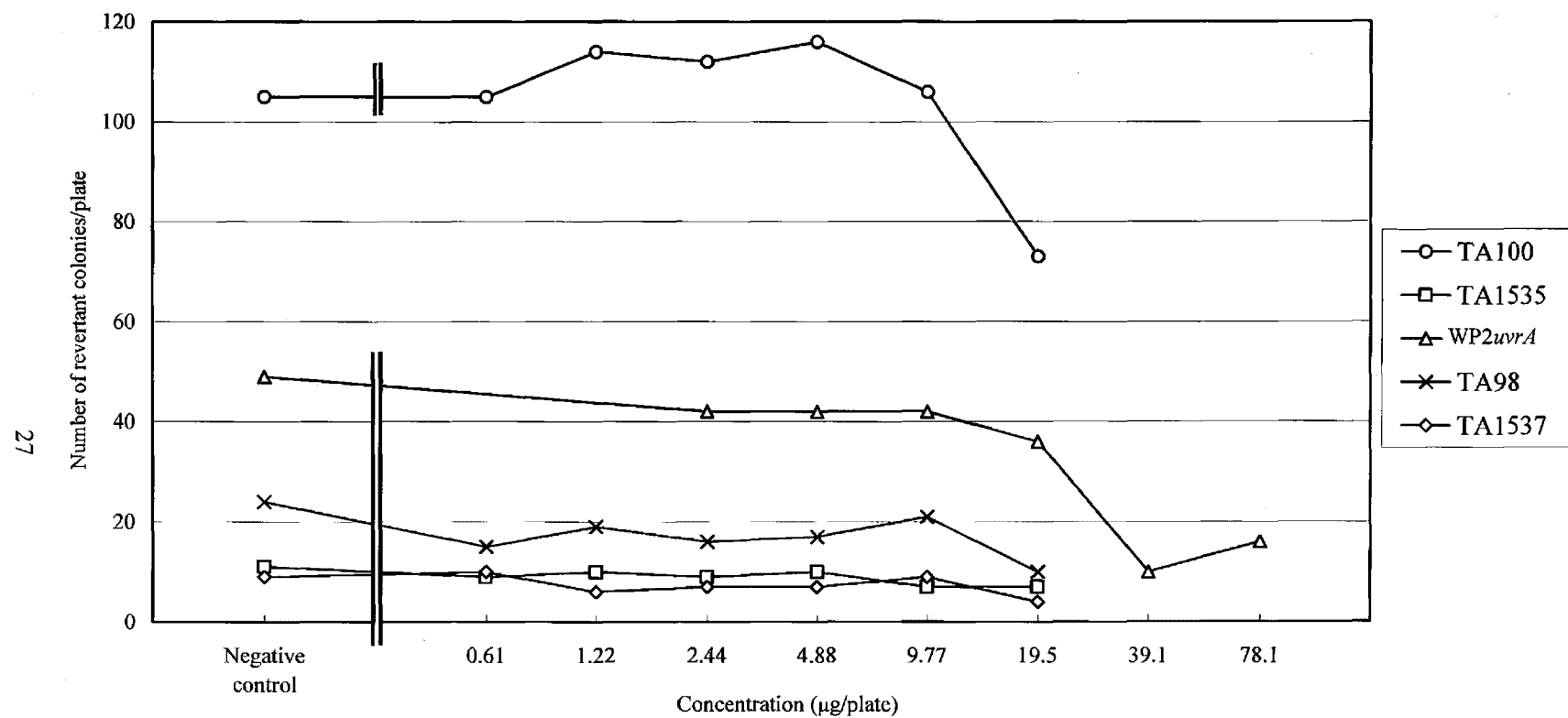


Figure 3-1. Reverse mutation test of 1,8-Dichlorooctane with bacteria (mutagenicity test II: without S9 mix)

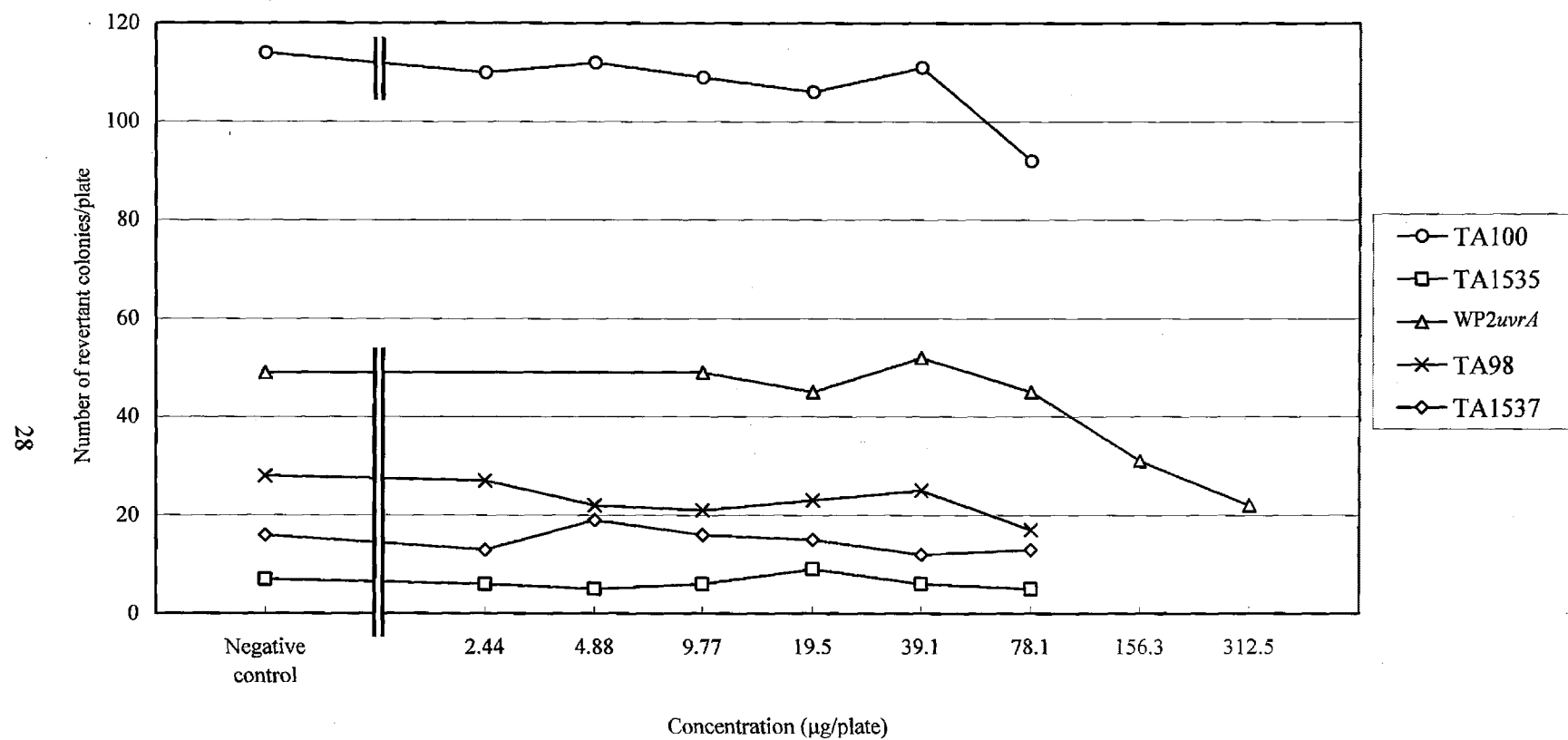


Figure 3-2. Reverse mutation test of 1,8-Dichlorooctane with bacteria (mutagenicity test II: with S9 mix)

Attachment 1. Specificity of test bacterial strains

		TA100	TA1535	WP2 _{uvrA}	TA98	TA1537
Amino acid requirement	His ^{-a)}	26 ^{b)} 34	3 6	4 8	7 8	1 2
	Trp ⁻					
Sensitivity to UV radiation		+ ^{c)}	+	+	+	+
rfa specificity		12.6 mm ^{d)}	11.9 mm	0.0 mm	12.1 mm	11.8 mm
R-factor presence		0.0 mm ^{e)}	10.8 mm	18.4 mm	0.0 mm	17.8 mm

a): D-biotin was contained in plates.

b): Number of revertant colonies/plate.

c): +; Presence of sensitivity.

d): Diameter of inhibition zone induced by crystal violet (10 µg / 10 µL) on paper disk (diameter: 6 mm).

e): Diameter of inhibition zone induced by ampicillin sodium (10 µg / 10 µL) on paper disk (diameter: 6 mm).

Attachment 2. Number of surviving cells in bacterial suspensions

	Number of surviving cells ($\times 10^9$ cells/mL)				
	TA100	TA1535	WP2 _{uvrA}	TA98	TA1537
Dose-finding test	3.5	3.9	5.1	2.9	1.7
Mutagenicity test (I)	3.4	3.8	5.1	2.9	1.7
Mutagenicity test (II)	3.5	3.9	5.0	2.9	1.8

Attachment 3. Preparation of S9

Animal used		Inducing substance	
Species, strain	Rat, CrI : CD (SD)	Name	Phenobarbital (PB)
Sex	Male		5,6-Benzoflavone (BF)
Age	7 weeks	Administration method	i.p.
Body weight	217.2 ± 10.3g* (n=92)	Day of administration and dose	Day 1 PB 30 mg/kg
			Days 2,3 and 4 PB 60 mg/kg
			Day 3 BF 80 mg/kg

*: Mean ± S.D.

Attachment 4. Composition of S9 mix

Constituents	Quantity in 1 mL S9 mix	Constituents	Quantity in 1 mL S9 mix
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

Attachment 5. Composition of minimum glucose agar plate medium

Amount in 1000 mL minimum glucose agar plate		
A	MgSO ₄ • 7H ₂ O	0.2 g
	Citric acid • H ₂ O	2 g
	K ₂ HPO ₄	10 g
	NaNH ₄ HPO ₄ • 4H ₂ O	1.92 g
	NaOH	0.66 g
	Distilled water	200 mL
B	Glucose	20 g
	Distilled water	100 mL
C	Agar	15 g
	Distilled water	700 mL

Each medium A, B, C was autoclaved, refrigerated and mixed with each other.

The mixed medium in a volume of 30 mL was dispensed into a petri plate sterilized by gamma rays and then solidified.

Attachment 6. Test conditions

Method		Pre-incubation method
Test condition		
Test substance solution		0.1 mL
0.1mol/L Na-phosphate buffer (pH 7.4) (in case of non-metabolic activation method)		0.5 mL
S9 mix (in case of metabolic activation method)		0.5 mL
Bacteria suspension		0.1 mL
Pre-incubation	Temperature	37°C
	Time	20 minutes
Top agar solution		2 mL
Incubation	Temperature	37°C
	Time	48 hours

Attachment 7. Background data of reverse mutation tests with bacteria

Supplier of bacteria: Japan Bioassay Laboratory, Japan Industrial Safety and Health Association.

Date of procurement of bacteria: 1995. 2. 25 (TA1535, TA1537, WP2*uvrA*) and 1996. 10. 18 (TA98, TA100).

Period of accumulation of data: 2006.1 ~ 2007. 12.

Culture media: Minimum glucose agar plate medium.

		Revertant colonies/plate				
Bacteria strains		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9 mix (-)	Negative control	64 ~ 166 (n=218)	4 ~ 22 (n=214)	18 ~ 62 (n=218)	10 ~ 32 (n=218)	3 ~ 23 (n=212)
		114 ± 41.0 (73 ~ 155)	10 ± 7.9 (2 ~ 18)	34 ± 19.1 (14 ~ 53)	23 ± 10.4 (13 ~ 33)	11 ± 8.2 (2 ~ 19)
	Positive control	AF-2 0.01 µg/plate	NaN ₃ 0.5 µg/plate	AF-2 0.01 µg/plate	AF-2 0.1 µg/plate	9AA 80 µg/plate
		325 ~ 616 (n=218)	426 ~ 640 (n=214)	98 ~ 187 (n=218)	344 ~ 579 (n=218)	167 ~ 822 (n=212)
		501 ± 131.6 (369 ~ 633)	501 ± 105.7 (395 ~ 606)	133 ± 40.5 (92 ~ 173)	463 ± 132.0 (331 ~ 595)	414 ± 247.0 (167 ~ 662)
S9 mix (+)	Negative control	72 ~ 167 (n=218)	3 ~ 21 (n=214)	18 ~ 58 (n=218)	14 ~ 45 (n=218)	7 ~ 32 (n=212)
		119 ± 44.1 (75 ~ 163)	9 ± 6.2 (3 ~ 15)	34 ± 18.1 (16 ~ 52)	30 ± 14.6 (16 ~ 45)	17 ± 10.0 (7 ~ 27)
	Positive control	2AA 1 µg/plate	2AA 2 µg/plate	2AA 10 µg/plate	2AA 0.5 µg/plate	2AA 2 µg/plate
		604 ~ 1284 (n=218)	219 ~ 421 (n=214)	645 ~ 1182 (n=218)	280 ~ 571 (n=218)	103 ~ 254 (n=212)
		916 ± 222.6 (693 ~ 1138)	301 ± 80.4 (221 ~ 381)	875 ± 253.5 (621 ~ 1129)	435 ± 103.5 (332 ~ 539)	185 ± 66.6 (118 ~ 252)

Upper row: Minimum~maximum (n=number of plates).

Lower row: Mean ± 2 × S.D.

Hashima Laboratory, Nihon Bioresearch Inc.

信頼性保証陳述書

試験番号 : 902027

表 題 : 1,8-ジクロロオクタンの細菌を用いる復帰突然変異試験

当試験に関して、2008年7月10日から2009年10月30日にかけて調査を実施し、その結果は運営管理者及び試験責任者に報告した。

当試験が「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(平成20年7月4日最終改正)、薬食発第1121003号、平成15・11・17製局第3号、環保企発第031121004号]及びOECD PRINCIPLES OF GOOD LABORATORY PRACTICE(OECD化学物質の安全性試験の実施に関する基準)に従って実施され、この最終報告書には試験の方法が正確に記載され、かつ生データが正確に反映されていることを保証する。

(調査の状況は、別紙1のとおりである。)

2009年10月30日

株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所

信頼性保証部門責任者



別紙 1

調 査 項 目	調査実施日	調査結果報告日
1. 試験計画書	2008年 7月 10日	2008年 7月 10日
2. 菌株の前培養 (用量設定試験)	2008年 7月 22日	2008年 7月 25日
3. 被験物質の管理	2008年 7月 23日	2008年 7月 25日
4. 検体の調製 (用量設定試験)	2008年 7月 23日	2008年 7月 25日
5. 実施 (用量設定試験)	2008年 7月 23日	2008年 7月 25日
6. 判定 (用量設定試験)	2008年 7月 25日	2008年 7月 25日
7. 試験計画書変更書 (No.1)	2008年 8月 12日	2008年 8月 12日
8. 試験計画書 (再調査)	2008年 8月 18日	2008年 8月 18日
9. 実施〔本試験 (I) 〕	2008年 8月 19日	2008年 8月 19日
10. 実施〔本試験 (II) 〕	2008年 8月 26日	2008年 8月 26日
11. 生データ	2008年 10月 24日 ～ 10月 27日	2008年 10月 28日
12. 最終報告書 (一次案)	2008年 10月 27日	2008年 10月 28日
13. 生データ (再調査)	2008年 10月 31日	2008年 10月 31日
14. 最終報告書 (一次案) (再調査)	2008年 10月 31日	2008年 10月 31日
15. 最終報告書	2009年 10月 30日	2009年 10月 30日