

最終報告書

表 題：2,2'-ジクロロヒドラゾベンゼンの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：S R 0 7 1 6 6

株式会社 化合物安全性研究所

陳 述 書

表題：2,2'-ジクロロヒドラゾベンゼンの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：SR07166

1. 本試験は GLP 基準「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・平成 15・11・17 製局第 3 号・環境企発第 031121004 号 厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知)および『「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」の一部改正について』(平成 20 年 7 月 4 日薬食発第 0704001 号・平成 20・06・30 製局第 2 号・環境企発第 080704001 号 厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知)に従い、試験方法は「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・環境企発第 031121002 号厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・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」の一部改正について』(平成 18 年 11 月 20 日薬食発第 1120001 号・平成 18・11・13 製局第 2 号・環境企発第 061120001 号厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知)および OECD 試験法ガイドライン(OECD Guideline for Testing of Chemicals; Bacterial Reverse Mutation Test (471), 21st July 1997)に基づいて実施したものであります。
2. 本試験は、試験計画書に従って実施し、試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因は認められませんでした。

株式会社 化合物安全性研究所

試験責任者

[Redacted Signature]

[Redacted Signature]

2012 年 4 月 6 日

信 頼 性 保 証 書

表題：2,2'-ジクロロヒドラゾベンゼンの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：SR07166

本試験は、株式会社 化合物安全性研究所 QAUによって、下記のとおり査察された。

査 察 段 階	査 察 日	試 験 責 任 者 への 報 告 日	運 営 管 理 者 への 報 告 日
試験計画書	2008 年 9 月 8 日	2008 年 9 月 8 日	2008 年 9 月 8 日
試験計画書計画書(No. 1)	2008 年 9 月 9 日	2008 年 9 月 9 日	2008 年 9 月 9 日
試験計画書計画書(No. 2)	2008 年 9 月 12 日	2008 年 9 月 12 日	2008 年 9 月 12 日
試験計画書変更書(No. 3)	2011 年 10 月 3 日	2011 年 10 月 3 日	2011 年 10 月 3 日
試験計画書変更書(No. 4)	2012 年 3 月 30 日	2012 年 3 月 30 日	2012 年 3 月 30 日
被験物質の受入・表示・保存	2008 年 9 月 8 日	2008 年 9 月 8 日	2008 年 9 月 8 日
被験物質の調製	2008 年 9 月 9 日	2008 年 9 月 9 日	2008 年 9 月 9 日
試験の実施	2008 年 9 月 9 日	2008 年 9 月 9 日	2008 年 9 月 9 日
観察・コロニー計測	2008 年 9 月 11 日	2008 年 9 月 11 日	2008 年 9 月 11 日
生データ	2010 年 5 月 27 日	2010 年 5 月 27 日	2010 年 5 月 27 日
最終報告書(草案)：図表	2010 年 5 月 27 日	2010 年 5 月 27 日	2010 年 5 月 27 日
最終報告書(草案)：本文	2010 年 5 月 27 日	2010 年 5 月 27 日	2010 年 5 月 27 日
最終報告書	2012 年 4 月 6 日	2012 年 4 月 6 日	2012 年 4 月 6 日

1. 本試験は、「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・平成15・11・17製局第3号・環企発第031121004号 厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・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を実施する試験施設に関する基準について」の一部改正について」(平成20年7月4日薬食発第0704001号・平成20・06・30製局第2号・環企発第080704001号 厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・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」(平成15年11月21日薬食発第1121002号・平成15・11・13製局第2号・環企発第031121002号 厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・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」の一部改正について」(平成18年11月20日薬食発第1120001号・平成18・11・13製局第2号・環企発第061120001号 厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知)および OECD 試験法ガイドライン (OECD Guideline for Testing of Chemicals; Bacterial Reverse Mutation Test (471), 21st July 1997) に従い実施された。

2. 本試験は、試験計画書に従って実施され、また、本報告書には当該試験に使用した方法および手順が正確に記載されており、試験成績には当該試験の実施過程において得られた生データが正確に反映していることを確認した。

株式会社 化合物安全性研究所

QAU責任者

2012 年 4 月 6 日

目 次

	頁
表紙	1
陳述書	2
信頼性保証書	3
目次	4
表題、試験番号、試験目的、試験実施基準および試験法ガイドライン、試験委託者	6
試験施設、試験責任者、試験従事者およびその業務分担、試験期間	7
要約	8
緒言	9
材料および方法	9
成績	18
考察	19
試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因	20
資料の保存	20
試験責任者の記名なつ印	20

Tables

Table 1	Reverse mutation test of 2,2'-dichlorohydrazobenzene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537 and <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA without metabolic activation (dose-finding test) (SR07166)	21
Table 2	Reverse mutation test of 2,2'-dichlorohydrazobenzene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537 and <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA with metabolic activation (dose-finding test) (SR07166)	22
Table 3	Reverse mutation test of 2,2'-dichlorohydrazobenzene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537 and <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA without metabolic activation (I) (SR07166)	23
Table 4	Reverse mutation test of 2,2'-dichlorohydrazobenzene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537 and <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA with metabolic activation (I) (SR07166)	24
Table 5	Reverse mutation test of 2,2'-dichlorohydrazobenzene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537 and <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA without metabolic activation (II) (SR07166)	25

Table 6	Reverse mutation test of 2,2'-dichlorohydrazobenzene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537 and <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA with metabolic activation (II) (SR07166)	26
---------	--	----

Figures

Figure 1-1	Reverse mutation test of 2,2'-dichlorohydrazobenzene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100 without metabolic activation (dose-response curves) (SR07166)	27
Figure 1-2	Reverse mutation test of 2,2'-dichlorohydrazobenzene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA100 with metabolic activation (dose-response curves) (SR07166)	28
Figure 2-1	Reverse mutation test of 2,2'-dichlorohydrazobenzene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA1535 without metabolic activation (dose-response curves) (SR07166)	29
Figure 2-2	Reverse mutation test of 2,2'-dichlorohydrazobenzene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA1535 with metabolic activation (dose-response curves) (SR07166)	30
Figure 3-1	Reverse mutation test of 2,2'-dichlorohydrazobenzene in <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA without metabolic activation (dose-response curves) (SR07166)	31
Figure 3-2	Reverse mutation test of 2,2'-dichlorohydrazobenzene in <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA with metabolic activation (dose-response curves) (SR07166)	32
Figure 4-1	Reverse mutation test of 2,2'-dichlorohydrazobenzene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 without metabolic activation (dose-response curves) (SR07166)	33
Figure 4-2	Reverse mutation test of 2,2'-dichlorohydrazobenzene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 with metabolic activation (dose-response curves) (SR07166)	34
Figure 5-1	Reverse mutation test of 2,2'-dichlorohydrazobenzene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA1537 without metabolic activation (dose-response curves) (SR07166)	35
Figure 5-2	Reverse mutation test of 2,2'-dichlorohydrazobenzene in <i>Salmonella typhimurium</i> TA1537 with metabolic activation (dose-response curves) (SR07166)	36

Appendices

Appendix 1	検査成績報告書	37
Appendix 2	Historical control data for reverse mutation test	38

表題 : 2,2'-ジクロロヒドラゾベンゼンの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号 : S R 0 7 1 6 6

試験目的 : *Salmonella typhimurium* および *Escherichia coli* を用いて、2,2'-ジクロロヒドラゾ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検討することを目的とした。

試験実施基準および試験法ガイドライン

試験実施基準 (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 日薬食発第 1121003 号・平成 15・11・17 製局第 3 号・環保企発第 031121004 号 厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知) および『「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」の一部改正について』(平成 20 年 7 月 4 日薬食発第 0704001 号・平成 20・06・30 製局第 2 号・環保企発第 080704001 号 厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知)

試験法ガイドライン : 「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 厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・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」の一部改正について』(平成 18 年 11 月 20 日薬食発第 1120001 号・平成 18・11・13 製局第 2 号・環保企発第 061120001 号 厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知) および OECD 試験法ガイドライン (OECD Guideline for Testing of Chemicals; Bacterial Reverse Mutation Test (471), 21st July 1997)

試験委託者

名称 : 厚生労働省 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室

所在地 : 東京都千代田区霞が関 1-2-2 (〒100-8916)

試験施設

名称 : 株式会社 化合物安全性研究所
 所在地 : 札幌市清田区真栄 363 番 24(〒004-0839)
 運営管理者

試験責任者

氏名
 所属 : 株式会社 化合物安全性研究所 安全性研究部門

試験従事者およびその業務分担

被験物質管理

試験操作

試験期間

試験開始日 : 2008 年 9 月 8 日
 被験物質受入 : 2008 年 6 月 10 日
 実験開始日 : 2008 年 9 月 9 日
 用量設定試験
 前培養開始 : 2008 年 9 月 8 日
 被験物質処理 : 2008 年 9 月 9 日
 コロニー計数 : 2008 年 9 月 11 日
 本試験(1 回目)
 前培養開始 : 2008 年 9 月 30 日
 被験物質処理 : 2008 年 10 月 1 日
 コロニー計数 : 2008 年 10 月 3 日
 本試験(2 回目)
 前培養開始 : 2008 年 10 月 6 日
 被験物質処理 : 2008 年 10 月 7 日
 コロニー計数 : 2008 年 10 月 9 日
 実験終了日 : 2008 年 10 月 9 日
 試験終了日 : 2012 年 4 月 6 日

要 約

2,2'-ジクロロヒドラゾベンゼンの細菌における遺伝子突然変異誘発性を検討する目的で、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2uvrA を用いる復帰突然変異試験を実施した。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で実施した。

用量設定試験では、被験物質の最高用量を 5000 µg/plate とし、以下公比約 3 で低下させた計 7 用量(5~5000 µg/plate)を設定した。その結果、各試験系列いずれにおいても、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 2 倍未満であり、用量の増加に伴う復帰変異コロニーの増加もみられず結果は陰性であった。生育阻害が、直接法では各菌株の 50 µg/plate 以上、150 µg/plate 以上あるいは 1500 µg/plate 以上の用量で、代謝活性化法では各菌株の 150 µg/plate 以上、500 µg/plate 以上あるいは 1500 µg/plate 以上の用量で観察された。被験物質の析出が、直接法では各菌株の 500 µg/plate 以上、代謝活性化法では各菌株の 1500 µg/plate 以上の用量で観察された。

本試験は、被験物質の最高用量を、直接法については 125、250 あるいは 2000 µg/plate とし、以下公比 2 で低下させた計 6 あるいは 7 用量を設定し、代謝活性化法については 250、1000 あるいは 2000 µg/plate とし、以下公比 2 で低下させた計 6 あるいは 7 用量を設定し、2 回実施した。その結果、各試験系列のいずれの菌株においても、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値の 2 倍未満であり、用量の増加に伴う復帰変異コロニーの増加もみられず結果は陰性であった。生育阻害が、各試験系列において設定用量の高用量で観察された。被験物質の析出が、直接法では *S. typhimurium* TA98 の 500 µg/plate 以上、代謝活性化法では *S. typhimurium* TA98 の 1000 µg/plate および *E. coli* WP2uvrA の 1000 µg/plate 以上の用量で観察された。

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全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、それぞれにおける陰性対照群の値の 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、2,2'-ジクロロヒドラゾベンゼンは、当該試験条件下において試験菌株に対する遺伝子突然変異誘発性を有しないと判断した。

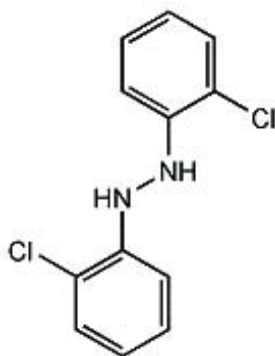
緒 言

2,2'-ジクロロヒドラゾベンゼンの細菌における遺伝子突然変異誘発性を、*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で実施した。

材料および方法

1. 被験物質

名称	: 2,2'-ジクロロヒドラゾベンゼン
英名	: 2,2'-Dichlorohydrazobenzene
CAS No.	: 782-74-1
官報公示整理番号	: 3-2756
構造式	:



分子式	: C ₁₂ H ₁₀ Cl ₂ N ₂
分子量	: 253.13
物理化学的性質	: 外観 ; 固体、淡黄色(目視確認)
	融点 ; データなし
	沸点 ; データなし
	引火点 ; データなし
	溶解性(溶媒に対する溶解性) ; データなし

試験施設において、蒸留水(日本薬局方注射用水)およびジメチルスルホキシドに対する溶解性を事前確認した。確認内容を、2. 被験物質の調製(10 頁)に記載した。

ロット番号 : ES-53026

純度(GC) : 99.9%(Appendix 1)

不純物の名称およびその濃度 : 水分 0.05%

製造者 : 名称 [REDACTED]
住所 [REDACTED]
電話 [REDACTED]

入手量 : 0.03 kg

安定性 : 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する。

保存場所 : 検体保存室および変異原性試験室

保存条件 : 密閉、遮光、冷所(実測範囲 1~8℃)

保存期間 : 2008 年 6 月 10 日(受入)~2008 年 10 月 7 日(最終使用日)

取扱上の注意 : マスク、手袋、防護メガネおよび白衣を着用し、吸引または眼、皮膚および衣類に触れないようにして取扱った。

残余被験物質の処置 : 安定性分析のため分析実施施設へ送付する。

2. 被験物質の調製

試験施設における溶解性確認において、被験物質は蒸留水(日本薬局方注射用水、50 mg/mL の濃度まで検討)には溶解せず、ジメチルスルホキシドには 500 mg/mL の濃度で溶解し反応性はみられなかったことから、当該試験の調製溶媒としてジメチルスルホキシドを選択した。

被験物質を精秤し、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)を用いて溶解し、所定の濃度に調製した。

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、20 mg/mL 調製液からジメチルスルホキシドを用いて公比 2 で段階希釈し 10、5、2.5、1.25、0.625、0.313、0.156、0.078、0.039 および 0.0195 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、用量設定試験では調製後 2.6 時間以内に、本試験(1 回目)では調製後 2.5 時間以内に、本試験(2 回目)では調製後 2.5 時間以内に試験に使用した。

調製液はクリーンベンチ内で用時に調製し、調製に際してはマスク、手袋、防護メガネおよび白衣を着用し、吸引または眼、皮膚および衣類に触れないようにして取扱った。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 VV035、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、遮光および冷所で保存した。

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、分注後-20℃以下で凍結保存したものを解凍後 2.7 時間以内に使用した。調製液は、調製日より 11 ヶ月以内(使用期限：調製後 1 年)に使用した。

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 7F74 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 (含量 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* TA100、TA1535、TA98、TA1537 ならびに *Escherichia coli* 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け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、試験チューブに分注後-80℃以下で凍結保存した。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、紫外線感受性および薬剤耐性)ならびに陰性対照物質および陽性対照物質に対する感受性の検査を行い、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)

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 DZL95902(2008 年 5 月 9 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 997531-02]	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。

重層用培地の組成	
(A) ソフトアガー	
Bacto™ Agar	0.6 %
(ロット番号 6228088、Becton, Dickinson and Company)	
塩化ナトリウム	0.5 %
(ロット番号 611F1714、関東化学株式会社)	
(B) アミノ酸溶液	
L-ヒスチジンおよび D-ビオチン溶液	各々 0.5 mmol/L
(L-ヒスチジン、ロット番号 ASP6644、和光純薬工業株式会社)	
(D-ビオチン、ロット番号 WKL1618、和光純薬工業株式会社)	
または	
L-トリプトファン溶液	0.5 mmol/L
(L-トリプトファン、ロット番号 ASG2385、和光純薬工業株式会社)	

7. S9 mix

S9 mix は、S9 (ロット番号 RAA-580、2008 年 8 月 1 日製造、キッコーマン株式会社)、S9 mix 用 Cofactor (Cofactor-I、ロット番号 999704、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℃以下で保存し、製造日より 3 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 μ mol
塩化カリウム	33 μ mol
グルコース-6-リン酸	5 μ 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 μ mol
還元型ニコチンアミド・アデニンジヌクレオチド(NADH)	4 μ mol
リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.4	100 μ mol

8. 試験群

(1) 用量設定試験

各菌株につき代謝活性化系 S9 mix の非存在下(直接法)および存在下(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被験物質の最高用量を 5000 µg/plate とし、以下公比約 3 で用量を低下させた計 7 用量の試験群(5000、1500、500、150、50、15 および 5 µg/plate)を設定した。

(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。

用量設定試験の結果、生育阻害が、*S. typhimurium* TA100、1535、1537 の直接法では 50 µg/plate 以上、代謝活性化法では 150 µg/plate 以上の用量で、*S. typhimurium* TA98 の直接法および代謝活性化法では 1500 µg/plate 以上の用量で、*E. coli* WP2uvrA の直接法では 150 µg/plate 以上、代謝活性化法では 500 µg/plate 以上の用量で認められた。そこで本試験では、被験物質の最高用量を、*S. typhimurium* TA100、1535、1537 の直接法では 125 µg/plate、代謝活性化法では 250 µg/plate、*S. typhimurium* TA98 の直接法および代謝活性化法では 2000 µg/plate、*E. coli* WP2uvrA の直接法では 250 µg/plate、代謝活性化法では 1000 µg/plate とし、以下公比 2 で低下させた計 6 あるいは 7 用量を設定した。

(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)および次表の陽性対照群を設定した。

供試菌株	陽性対照物質 (用量: µg/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	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

NaN₃ : 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、識別のための試験番号および試験群を記載したラベルを貼付した。

9. 試験方法

(1) 供試菌株の前培養

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、解凍した保存菌を 12 μ L 接種し、37℃、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。なお、菌株の接種後、L 字管は振盪培養開始まで冷却(氷冷)した。培養終了時に、得られた菌培養液の OD_{660nm} 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_{660nm} 相関式より生菌数を算出した。生菌数が 1×10^9 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(1 回目)	本試験(2 回目)
<i>S. typhimurium</i> TA100	2.88	2.62	2.88
<i>S. typhimurium</i> TA1535	3.24	3.24	3.10
<i>S. typhimurium</i> TA98	3.63	3.63	3.99
<i>S. typhimurium</i> TA1537	1.71	1.65	1.77
<i>E. coli</i> WP2uvrA	4.44	4.26	4.44

(2) 被験物質および対照物質調製液の処理

被験物質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(pH7.4) 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℃、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、最少グルコース寒天培地(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℃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)内で 48～49 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) 観察

各菌株の陰性対照群、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、各菌株の陰性対照群、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、生育阻害または被験物質の析出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、基準1以上を生育阻害有りとした。

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、陰性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

各試験群の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

各菌株の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、各菌株の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

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値の 2 倍以上となり、かつ用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加が、再現性を持って認められた場合に陽性であるとした。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。

成 績

用量設定試験の復帰変異コロニー数の計測結果を Table 1 および 2 に、本試験の復帰変異コロニー数の計測結果を Table 3～6 に示す。また、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 Figure 1-1～5-2 に示す。

用量設定試験 (5～5000 µg/plate) の結果、各菌株の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 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みられなかった。生育阻害が、直接法では 50 µg/plate 以上 (*S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1357)、150 µg/plate 以上 (*E. coli* WP2uvrA) あるいは 1500 µg/plate 以上 (*S. typhimurium* TA98) の用量で、代謝活性化法では 150 µg/plate 以上 (*S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1357)、500 µg/plate 以上 (*E. coli* WP2uvrA) あるいは 1500 µg/plate 以上 (*S. typhimurium* TA98) の用量で、各々観察された。被験物質の析出が、直接法では各菌株の 500 µg/plate 以上、代謝活性化法では各菌株の 1500 µg/plate 以上の用量で観察された。

本試験 (1.95～125 µg/plate : *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1537 の直接法、7.81～250 µg/plate : *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1537 の代謝活性化法および *E. coli* WP2uvrA の直接法、15.6～1000 µg/plate : *E. coli* WP2uvrA の代謝活性化法、62.5～2000 µg/plate : *S. typhimurium* TA98 の直接法および代謝活性化法) を 2 回実施した。その結果、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 2 倍未満であり、用量の増加に伴う復帰変異コロニーの増加もみられなかった。生育阻害が、直接法では *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1537 の 31.3 あるいは 62.5 µg/plate 以上、*E. coli* WP2uvrA の 125 µg/plate 以上、*S. typhimurium* TA98 の 1000 µg/plate 以上あるいは 2000 µg/plate の用量で、代謝活性化法では *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1537 の 125 µg/plate 以上、*E. coli* WP2uvrA の 500 µg/plate 以上、*S. typhimurium* TA98 (1 回目のみ) の 1000 µg/plate 以上の用量で観察された。被験物質の析出が、直接法では *S. typhimurium* TA98 の 500 µg/plate 以上、代謝活性化法では *S. typhimurium* TA98 の 1000 µg/plate 以上および *E. coli* WP2uvrA の 1000 µg/plate の用量で観察された。

用量設定試験および本試験いずれにおいても、各菌株の陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、全て試験施設の背景データに基づく管理値 (Appendix 2) の範囲内であり、また、陽性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、全て陰性対照群の値の 2 倍以上であった。

用量設定試験および本試験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 に雑菌の混入はみられなかった。

考 察

2,2'-ジクロロヒドラゾ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 で用量を低下させた計 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 125、250、1000 あるいは 2000 µg/plate とし、以下公比 2 で用量を低下させた計 6 あるいは 7 用量の試験群で実施した。

本試験の結果、各菌株の直接法および代謝活性化法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、当該被験物質の遺伝子突然変異誘発性は陰性であった。生育阻害が、直接法および代謝活性化法ともに、各菌株の検討した用量範囲での高用量で観察された。被験物質の析出が、直接法では 500 µg/plate 以上、代謝活性化法では 1000 µg/plate 以上の用量で観察された。これらの結果は、2 回実施した本試験において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、全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。各菌株の陽性対照群の復帰変異コロニー数の平均値には、それぞれの陰性対照群の値と比較して 2 倍以上の明確な増加が認められた。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、2,2'-ジクロロヒドラゾベンゼンは、当該試験条件下において試験菌株に対する遺伝子突然変異誘発性を有しないと判断した。

試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因はなかった。

資料の保存

1. 資料保存施設および保存資料

以下の資料を、株式会社 化合物安全性研究所の資料保存室に保存する。

- (1) 試験計画書、試験計画書変更書
- (2) 生データその他の記録文書
- (3) 最終報告書

2. 保存期間

試験終了後 10 年間保存し、その後の保存については試験委託者との協議により決定する。

試験責任者の記名なつ印

  2012 年 4 月 6 日

Table 1 Reverse mutation test of 2,2'-dichlorohydrazobenzene in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2uvr A without metabolic activation (dose-finding test) (SR07166)

Compound	Concentration (µg/plate)	Revertants per plate (Mean±S.D.)				
		S9 (-)				
		TA100	TA1535	WP2uvr A	TA98	TA1537
Control ^a		126 , 116 104 (115±11)	9 , 7 13 (10±3)	19 , 9 17 (15±5)	12 , 12 16 (13±2)	11 , 7 7 (8±2)
2,2'-Dichlorohydrazo- benzene	5	98 , 102 120 (107±12)	10 , 12 7 (10±3)	9 , 12 9 (10±2)	10 , 7 11 (9±2)	7 , 11 11 (10±2)
	15	103 , 109 99 (104±5)	7 , 10 1 (6±5)	13 , 18 11 (14±4)	22 , 9 13 (15±7)	8 , 7 8 (8±1)
	50	27 * , 35 * 35 * (32±5)	3 * , 7 * 7 * (6±2)	9 , 6 13 (9±4)	8 , 16 12 (12±4)	11 * , 4 * 6 * (7±4)
	150	37 * , 26 * 32 * (32±6)	5 * , 0 * 6 * (4±3)	3 * , 12 * 7 * (7±5)	6 , 7 5 (6±1)	5 * , 6 * 3 * (5±2)
	500	0 # * , 8 # * 6 # * (5±4)	1 # * , 8 # * 4 # * (4±4)	11 # * , 15 # * 7 # * (11±4)	9 # , 8 # 5 # (7±2)	4 # * , 2 # * 1 # * (2±2)
	1500	0 # * , 15 # * 0 # * (5±9)	4 # * , 5 # * 2 # * (4±2)	8 # * , 8 # * 7 # * (8±1)	4 # * , 2 # * 3 # * (3±1)	0 # * , 0 # * 0 # * (0±0)
	5000	0 # * , 25 # * 11 # * (12±13)	0 # * , 0 # * 0 # * (0±0)	7 # * , 5 # * 8 # * (7±2)	0 # * , 0 # * 0 # * (0±0)	0 # * , 0 # * 0 # * (0±0)
Positive control		AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA
	Concentration (µg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Rev./plate	610 , 607 661	231 , 243 231	86 , 83 93	344 , 353 320	133 , 125 125
	(Mean±S.D.)	(626±30)	(235±7)	(87±5)	(339±17)	(128±5)

a : Dimethyl sulfoxide

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

NaN₃ : Sodium azide

9-AA : 9-Aminoacridine hydrochloride hydrate

Rev. : Revertants

: Precipitation at the end of treatment

* : Growth inhibition

Table 2 Reverse mutation test of 2,2'-dichlorohydrazobenzene in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2uvr A with metabolic activation (dose-finding test) (SR07166)

Compound	Concentration (µg/plate)	Revertants per plate (Mean±S.D.)				
		S9(+)				
		TA100	TA1535	WP2uvr A	TA98	TA1537
Control ^a		132 , 104 149 (128±23)	5 , 7 9 (7±2)	13 , 19 18 (17±3)	23 , 20 30 (24±5)	12 , 16 15 (14±2)
2,2'-Dichlorohydrazo- benzene	5	153 , 117 139 (136±18)	5 , 7 7 (6±1)	18 , 13 20 (17±4)	43 , 25 31 (33±9)	14 , 6 11 (10±4)
	15	156 , 135 134 (142±12)	12 , 12 10 (11±1)	22 , 14 26 (21±6)	21 , 25 25 (24±2)	10 , 14 15 (13±3)
	50	204 , 185 200 (196±10)	13 , 7 6 (9±4)	17 , 16 15 (16±1)	32 , 26 31 (30±3)	12 , 15 9 (12±3)
	150	80 * , 91 * 120 * (97±21)	8 * , 5 * 16 * (10±6)	19 , 19 15 (18±2)	22 , 23 31 (25±5)	5 * , 5 * 7 * (6±1)
	500	49 * , 45 * 30 * (41±10)	6 * , 10 * 14 * (10±4)	14 * , 14 * 10 * (13±2)	20 , 30 19 (23±6)	8 * , 4 * 7 * (6±2)
	1500	47 # * , 41 # * 51 # * (46±5)	5 # * , 5 # * 1 # * (4±2)	8 # * , 9 # * 13 # * (10±3)	22 # * , 19 # * 21 # * (21±2)	5 # * , 4 # * 3 # * (4±1)
	5000	40 # * , 46 # * 39 # * (42±4)	3 # * , 1 # * 6 # * (3±3)	6 # * , 8 # * 8 # * (7±1)	21 # * , 15 # * 18 # * (18±3)	1 # * , 4 # * 4 # * (3±2)
Positive control		2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration (µg/plate)	1	2	10	0.5	2
	Rev./plate	867 , 1196 882	337 , 338 347	812 , 742 814	333 , 344 265	353 , 356 348
	(Mean±S.D.)	(982±186)	(341±6)	(789±41)	(314±43)	(352±4)

a : Dimethyl sulfoxide

2-AA : 2-Aminoanthracene

Rev. : Revertants

: Precipitation at the end of treatment

* : Growth inhibition

Table 3 Reverse mutation test of 2,2'-dichlorohydrazobenzene in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2uvr A without metabolic activation (I) (SR07166)

Compound	Concentration (µg/plate)	Revertants per plate (Mean±S.D.)				
		S9 (-)				
		TA100	TA1535	WP2uvr A	TA98	TA1537
Control ^a		96 , 102 94 (97±4)	6 , 10 10 (9±2)	12 , 13 8 (11±3)	10 , 14 14 (13±2)	12 , 13 11 (12±1)
2,2'-Dichlorohydrazo- benzene	1.95	87 , 93 83 (88±5)	7 , 8 6 (7±1)	-	-	14 , 11 12 (12±2)
	3.91	91 , 94 91 (92±2)	11 , 6 6 (8±3)	-	-	9 , 15 10 (11±3)
	7.81	97 , 99 102 (99±3)	6 , 6 2 (5±2)	11 , 13 8 (11±3)	-	10 , 17 11 (13±4)
	15.6	103 , 82 88 (91±11)	6 , 8 9 (8±2)	15 , 7 18 (13±6)	-	7 , 11 7 (8±2)
	31.3	64 *, 38 * 28 * (43±19)	5 *, 3 * 5 * (4±1)	9 , 12 11 (11±2)	-	5 , 8 7 (7±2)
	62.5	44 *, 30 * 40 * (38±7)	4 *, 1 * 5 * (3±2)	6 , 11 13 (10±4)	11 , 11 14 (12±2)	3 *, 3 * 6 * (4±2)
	125	23 *, 36 * 34 * (31±7)	2 *, 1 * 2 * (2±1)	9 *, 12 * 9 * (10±2)	13 , 19 18 (17±3)	2 *, 5 * 1 * (3±2)
	250	-	-	18 *, 8 * 15 * (14±5)	10 , 13 7 (10±3)	-
	500	-	-	-	11 # , 20 # 9 # (13±6)	-
	1000	-	-	-	4 # , 1 # 3 # (3±2)	-
	2000	-	-	-	1 # *, 3 # * 6 # * (3±3)	-
Positive control		AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA
	Concentration (µg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Rev./plate	614 , 599 598	223 , 231 167	86 , 94 83	232 , 301 281	184 , 105 102
	(Mean±S.D.)	(604±9)	(207±35)	(88±6)	(271±36)	(130±47)

a : Dimethyl sulfoxide

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

NaN₃ : Sodium azide

9-AA : 9-Aminoacridine hydrochloride hydrate

Rev. : Revertants

: Precipitation at the end of treatment

* : Growth inhibition

- : Blank

Table 4 Reverse mutation test of 2,2'-dichlorohydrazobenzene in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2uvr A with metabolic activation (I) (SR07166)

Compound	Concentration (µg/plate)	Revertants per plate (Mean±S.D.)				
		S9(+)				
		TA100	TA1535	WP2uvr A	TA98	TA1537
Control ^a		124 , 124 115 (121±5)	7 , 7 10 (8±2)	14 , 16 20 (17±3)	22 , 23 25 (23±2)	20 , 17 14 (17±3)
2,2'-Dichlorohydrazo- benzene	7.81	143 , 119 125 (129±12)	6 , 11 11 (9±3)	-	-	10 , 13 15 (13±3)
	15.6	149 , 136 137 (141±7)	11 , 10 10 (10±1)	20 , 16 16 (17±2)	-	8 , 9 17 (11±5)
	31.3	170 , 147 139 (152±16)	8 , 12 15 (12±4)	16 , 14 24 (18±5)	-	9 , 7 14 (10±4)
	62.5	142 , 183 141 (155±24)	8 , 9 7 (8±1)	14 , 8 14 (12±3)	22 , 36 24 (27±8)	17 , 22 16 (18±3)
	125	145 *, 128 * 115 * (129±15)	5 *, 11 * 6 * (7±3)	13 , 8 13 (11±3)	31 , 33 32 (32±1)	8 *, 10 * 6 * (8±2)
	250	107 *, 104 * 107 * (106±2)	7 *, 2 * 3 * (4±3)	18 , 10 14 (14±4)	26 , 31 22 (26±5)	11 *, 7 * 9 * (9±2)
	500	-	-	11 *, 9 * 17 * (12±4)	11 , 16 23 (17±6)	-
	1000	-	-	10 # *, 14 # * 11 # * (12±2)	30 # *, 17 # * 23 # * (23±7)	-
	2000	-	-	-	7 # *, 12 # * 5 # * (8±4)	-
Positive control		2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration (µg/plate)	1	2	10	0.5	2
	Rev./plate (Mean±S.D.)	1618 , 1563 1666 (1616±52)	315 , 403 366 (361±44)	1053 , 1079 1082 (1071±16)	340 , 365 332 (346±17)	247 , 304 315 (289±37)

a : Dimethyl sulfoxide

2-AA : 2-Aminoanthracene

Rev. : Revertants

: Precipitation at the end of treatment

* : Growth inhibition

- : Blank

Table 5 Reverse mutation test of 2,2'-dichlorohydrazobenzene in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2uvr A without metabolic activation (II) (SR07166)

Compound	Concentration (µg/plate)	Revertants per plate (Mean±S.D.)				
		S9 (-)				
		TA100	TA1535	WP2uvr A	TA98	TA1537
Control ^a		91 , 106 98 (98±8)	10 , 7 11 (9±2)	17 , 19 17 (18±1)	14 , 17 8 (13±5)	12 , 12 9 (11±2)
2,2'-Dichlorohydrazo- benzene	1.95	106 , 94 94 (98±7)	8 , 5 10 (8±3)	-	-	11 , 7 5 (8±3)
	3.91	120 , 114 110 (115±5)	5 , 8 7 (7±2)	-	-	9 , 6 6 (7±2)
	7.81	96 , 76 94 (89±11)	6 , 8 12 (9±3)	13 , 14 17 (15±2)	-	10 , 6 11 (9±3)
	15.6	77 , 88 100 (88±12)	4 , 8 8 (7±2)	15 , 18 17 (17±2)	-	5 , 3 8 (5±3)
	31.3	71 * , 52 * 52 * (58±11)	3 * , 6 * 2 * (4±2)	11 , 17 14 (14±3)	-	5 * , 10 * 5 * (7±3)
	62.5	43 * , 51 * 37 * (44±7)	3 * , 6 * 2 * (4±2)	5 , 12 17 (11±6)	7 , 12 10 (10±3)	6 * , 8 * 4 * (6±2)
	125	35 * , 31 * 46 * (37±8)	5 * , 1 * 3 * (3±2)	12 * , 18 * 10 * (13±4)	7 , 13 13 (11±3)	2 * , 3 * 6 * (4±2)
	250	-	-	7 * , 5 * 13 * (8±4)	11 , 11 13 (12±1)	-
	500	-	-	-	14 # , 13 # 9 # (12±3)	-
	1000	-	-	-	17 # * , 11 # * 21 # * (16±5)	-
	2000	-	-	-	4 # * , 7 # * 2 # * (4±3)	-
Positive control		AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA
	Concentration (µg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Rev./plate	675 , 528 648	224 , 194 214	81 , 101 92	326 , 328 328	175 , 131 225
	(Mean±S.D.)	(617±78)	(211±15)	(91±10)	(327±1)	(177±47)

a : Dimethyl sulfoxide

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

NaN₃ : Sodium azide

9-AA : 9-Aminoacridine hydrochloride hydrate

Rev. : Revertants

: Precipitation at the end of treatment

* : Growth inhibition

- : Blank

Table 6 Reverse mutation test of 2,2'-dichlorohydrazobenzene in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2uvr A with metabolic activation (II) (SR07166)

Compound	Concentration (µg/plate)	Revertants per plate (Mean±S.D.)				
		S9 (+)				
		TA100	TA1535	WP2uvr A	TA98	TA1537
Control ^a		116 , 117 139 (124±13)	8 , 12 7 (9±3)	22 , 19 26 (22±4)	20 , 19 30 (23±6)	16 , 9 9 (11±4)
2,2'-Dichlorohydrazo- benzene	7.81	154 , 157 146 (152±6)	7 , 7 5 (6±1)	-	-	15 , 8 10 (11±4)
	15.6	144 , 138 121 (134±12)	10 , 15 11 (12±3)	20 , 32 21 (24±7)	-	10 , 5 14 (10±5)
	31.3	162 , 170 198 (177±19)	5 , 10 7 (7±3)	27 , 17 18 (21±6)	-	16 , 11 13 (13±3)
	62.5	191 , 142 173 (169±25)	10 , 12 6 (9±3)	17 , 22 15 (18±4)	23 , 29 22 (25±4)	12 , 9 17 (13±4)
	125	169 [*] , 154 [*] 135 [*] (153±17)	2 [*] , 6 [*] 2 [*] (3±2)	22 , 17 21 (20±3)	20 , 21 19 (20±1)	8 [*] , 4 [*] 12 [*] (8±4)
	250	127 [*] , 113 [*] 131 [*] (124±9)	6 [*] , 10 [*] 8 [*] (8±2)	18 , 16 21 (18±3)	12 , 18 15 (15±3)	12 [*] , 10 [*] 4 [*] (9±4)
	500	-	-	4 [*] , 12 [*] 18 [*] (11±7)	15 , 26 15 (19±6)	-
	1000	-	-	11 [#] [*] , 21 [#] [*] 20 [#] [*] (17±6)	21 [#] , 14 [#] 16 [#] (17±4)	-
	2000	-	-	-	16 [#] , 14 [#] 17 [#] (16±2)	-
Positive control		2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration (µg/plate)	1	2	10	0.5	2
	Rev./plate (Mean±S.D.)	2315 , 2054 2191 (2187±131)	373 , 414 523 (437±78)	1193 , 1202 1263 (1219±38)	257 , 349 289 (298±47)	594 , 582 499 (558±52)

a : Dimethyl sulfoxide

2-AA : 2-Aminoanthracene

Rev. : Revertants

: Precipitation at the end of treatment

* : Growth inhibition

- : Blank

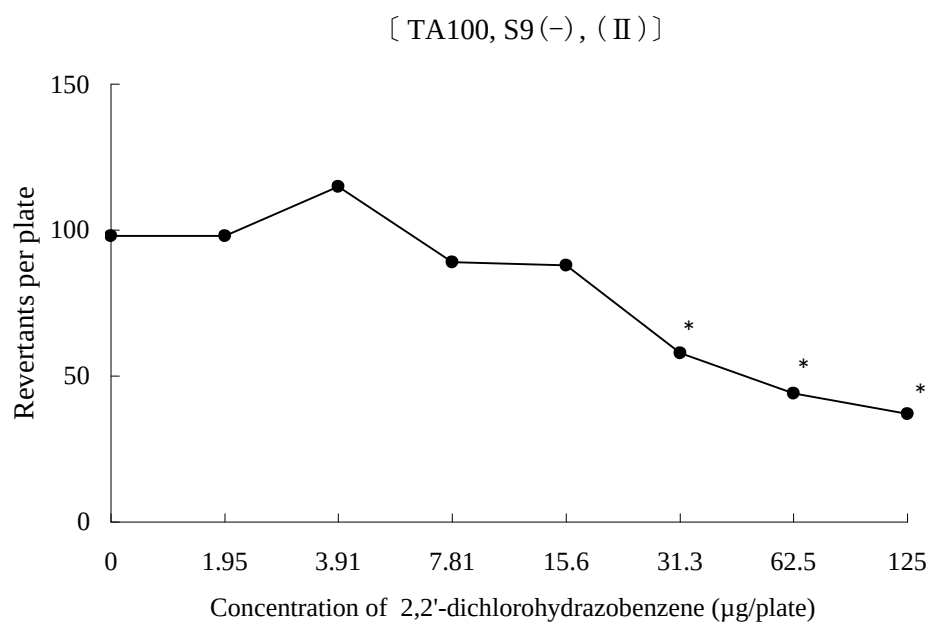
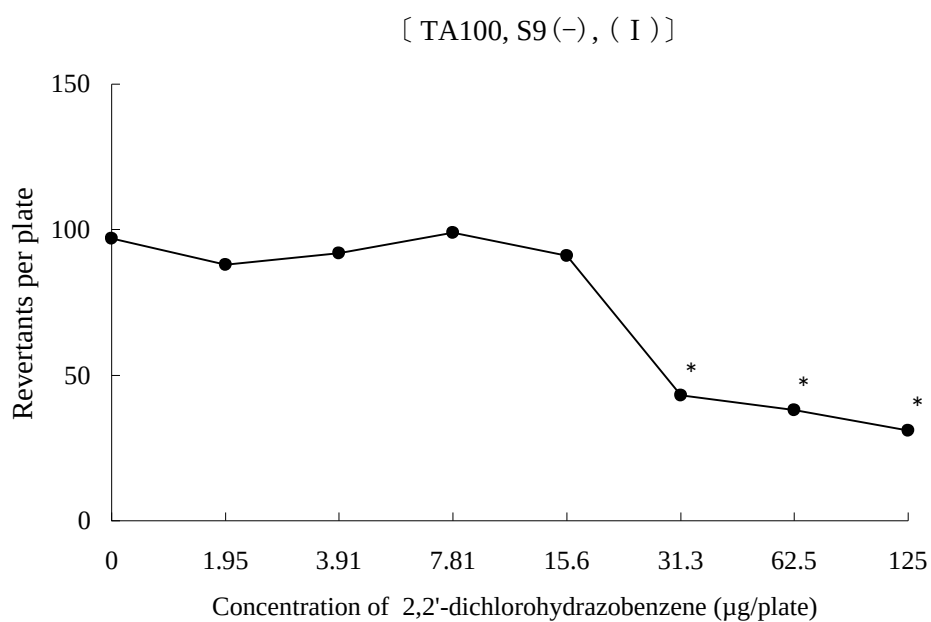


Figure 1-1 Reverse mutation test of 2,2'-dichlorohydrazobenzene in *Salmonella typhimurium* TA100 without metabolic activation (dose-response curves) (SR07166)

* : Growth inhibition

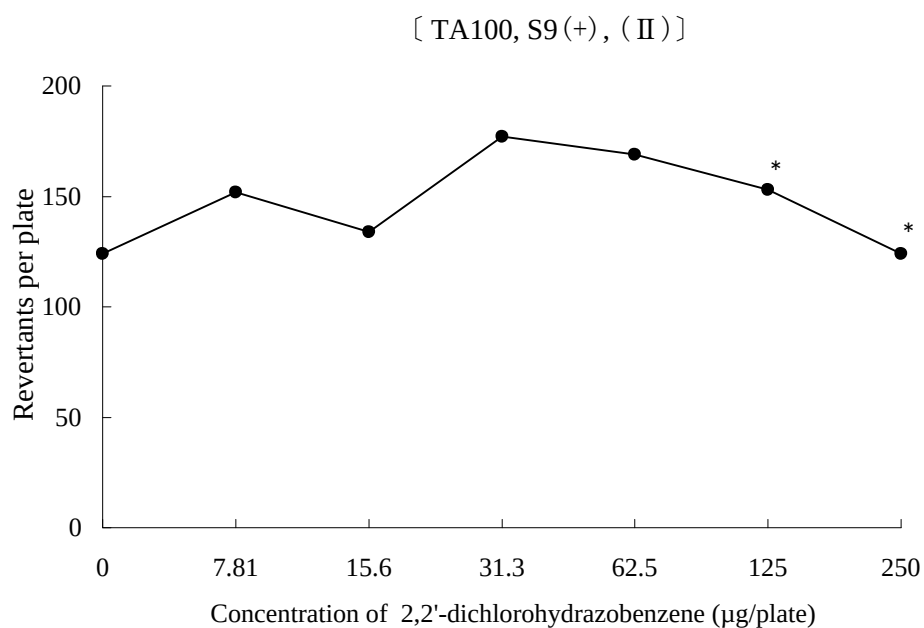
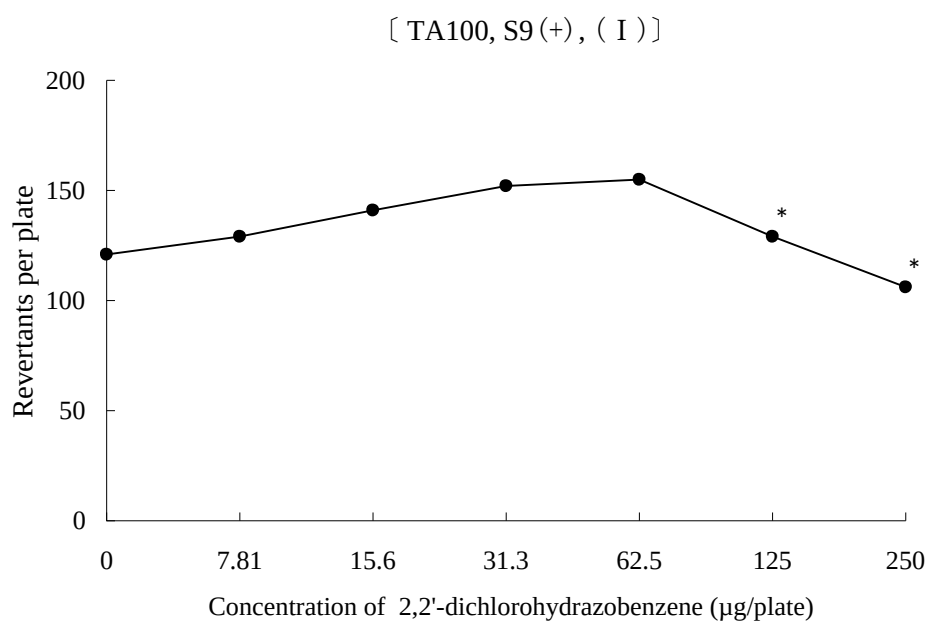


Figure 1-2 Reverse mutation test of 2,2'-dichlorohydrazobenzene in *Salmonella typhimurium* TA100 with metabolic activation (dose-response curves) (SR07166)

* : Growth inhibition

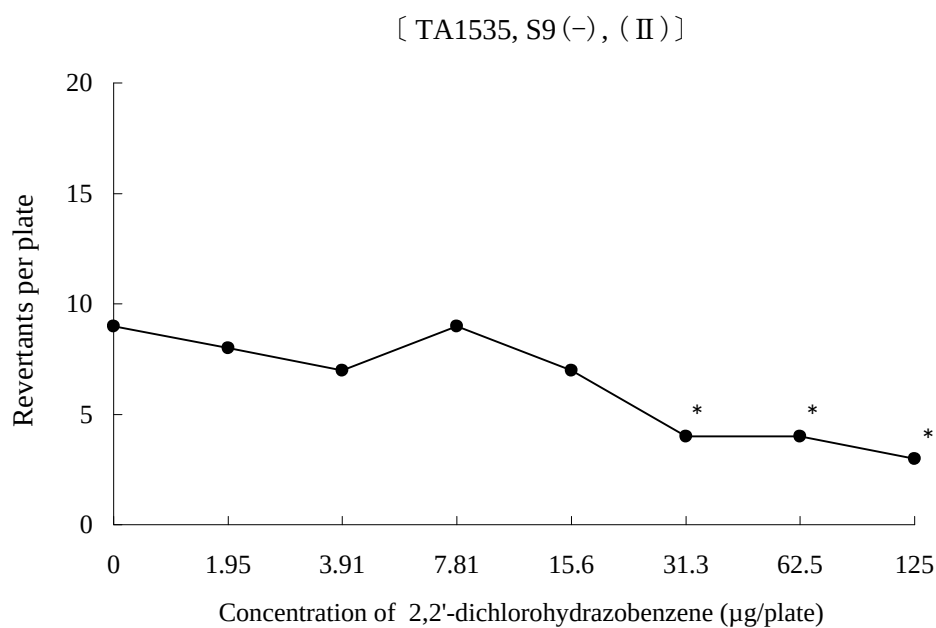
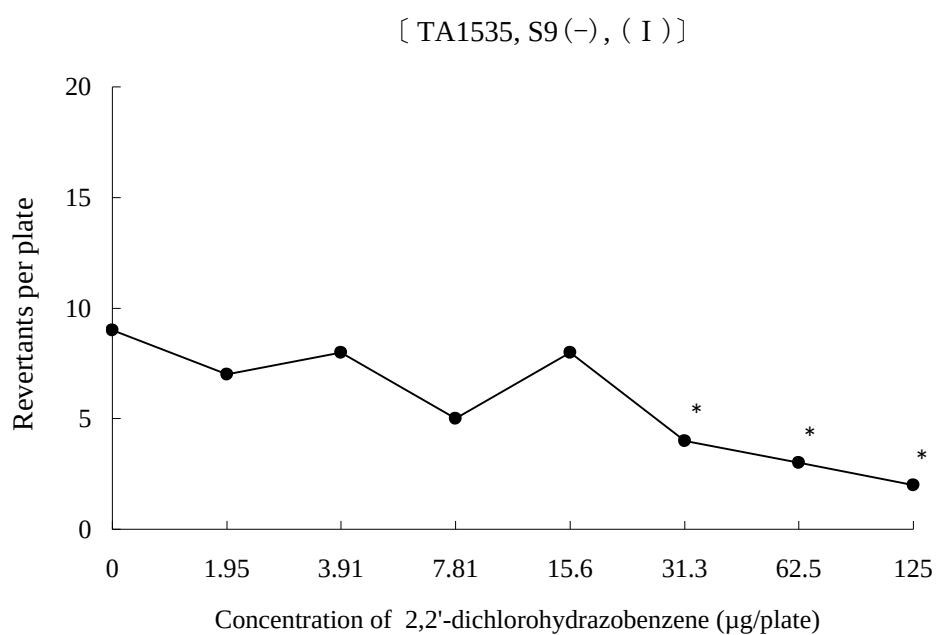


Figure 2-1 Reverse mutation test of 2,2'-dichlorohydrazobenzene in *Salmonella typhimurium* TA1535 without metabolic activation (dose-response curves) (SR07166)

* : Growth inhibition

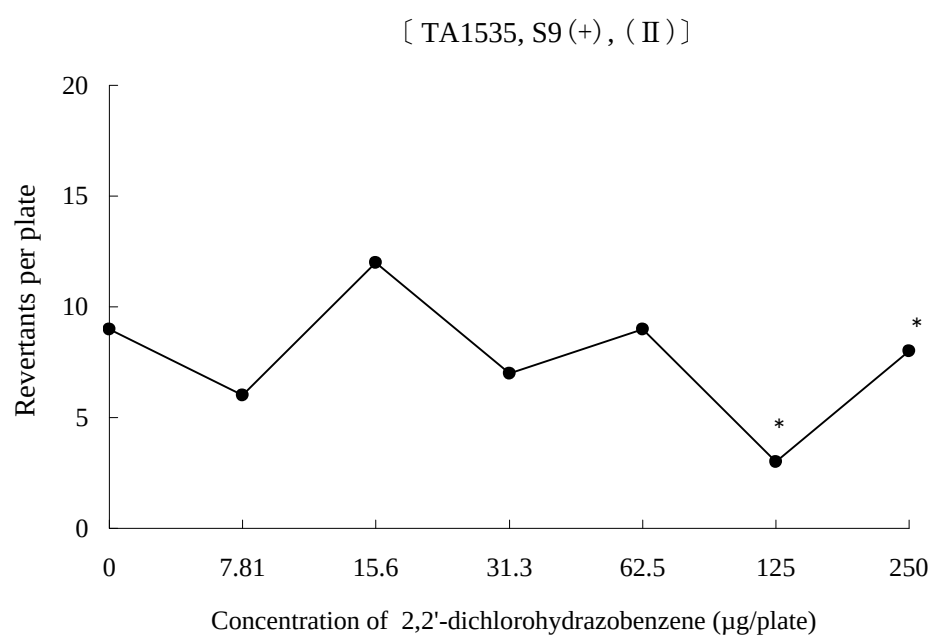
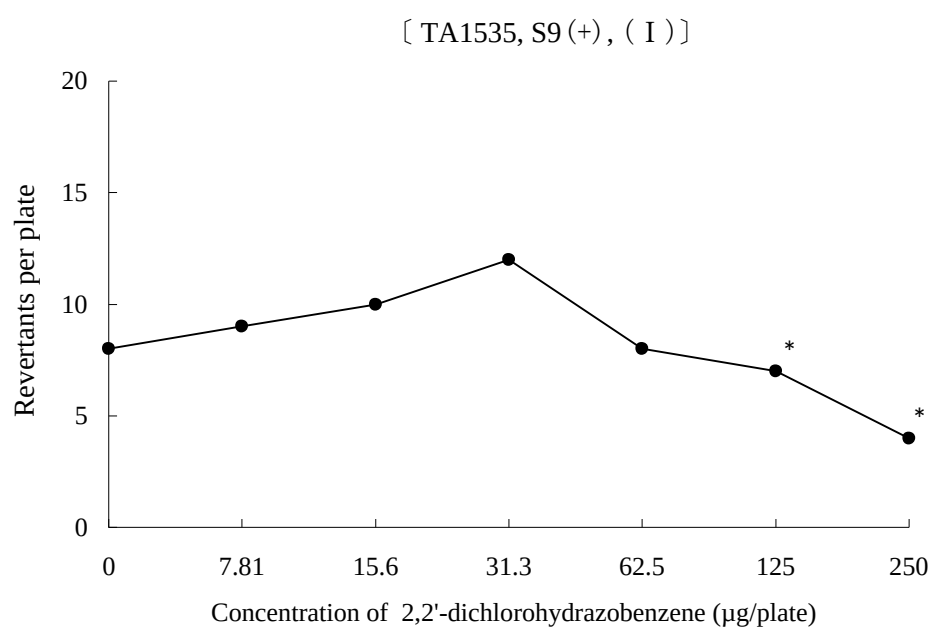


Figure 2-2 Reverse mutation test of 2,2'-dichlorohydrazobenzene in *Salmonella typhimurium* TA1535 with metabolic activation (dose-response curves) (SR07166)

* : Growth inhibition

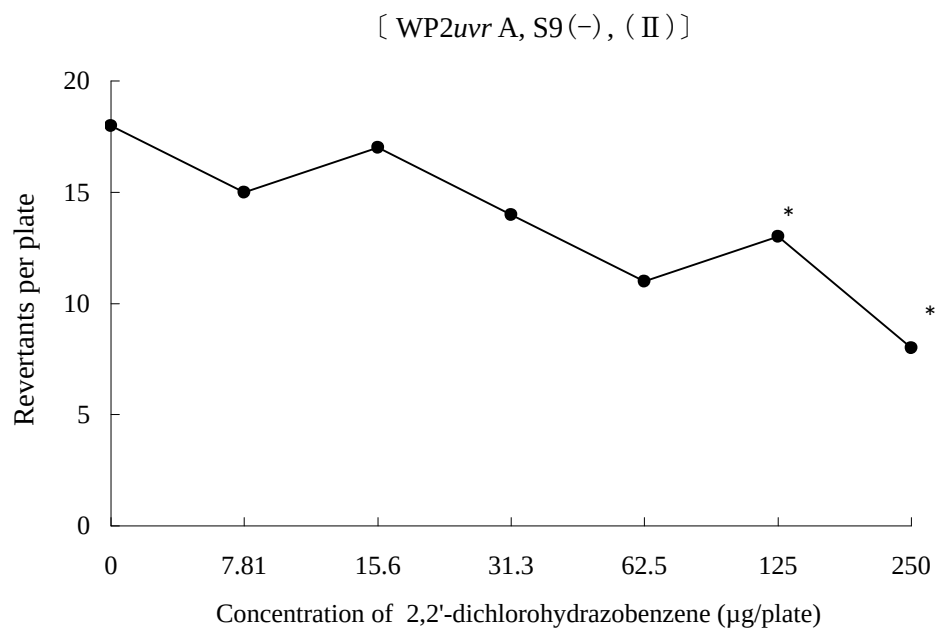
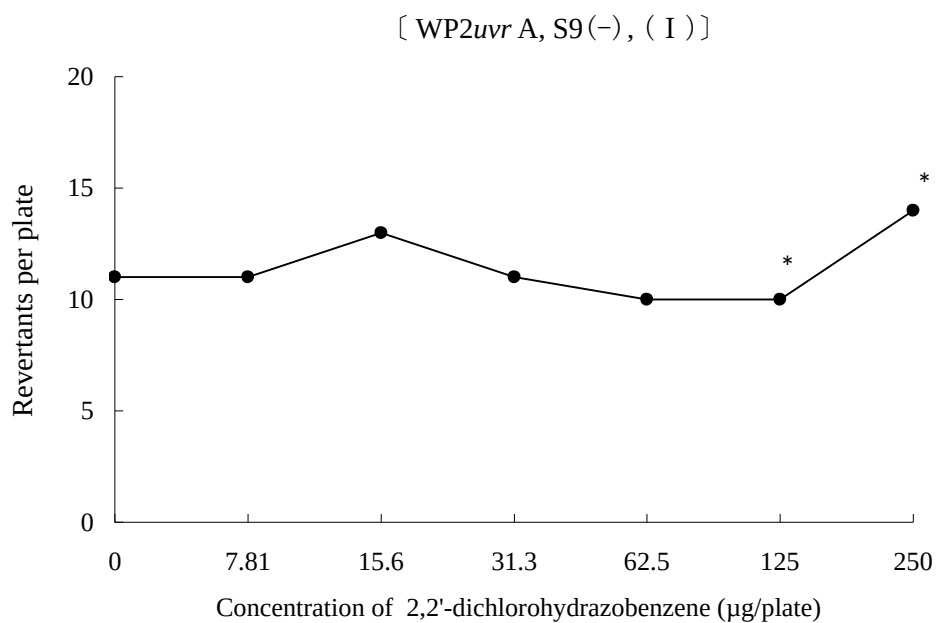


Figure 3-1 Reverse mutation test of 2,2'-dichlorohydrazobenzene in *Escherichia coli* WP2_{uvr} A without metabolic activation (dose-response curves) (SR07166)

* : Growth inhibition

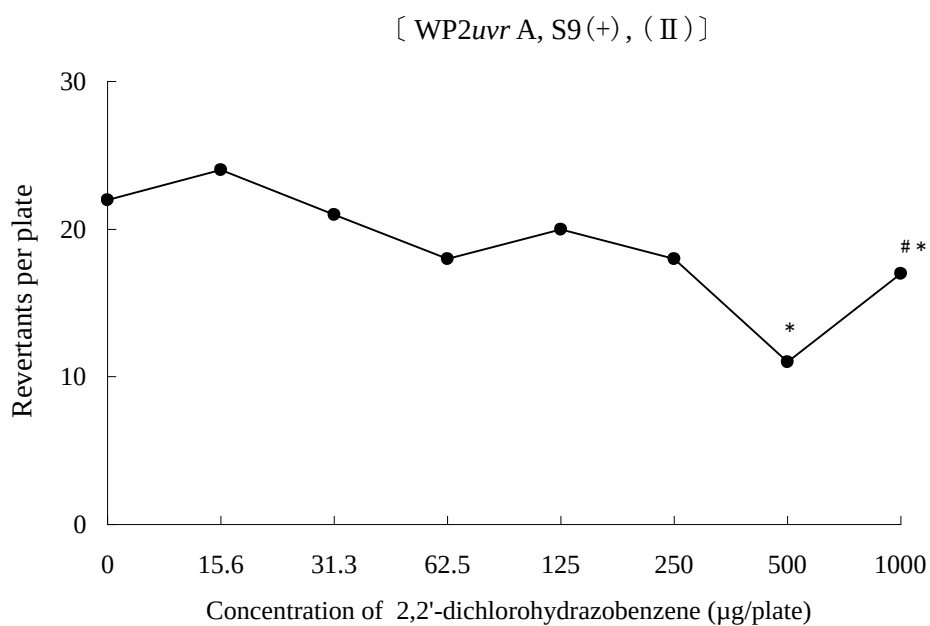
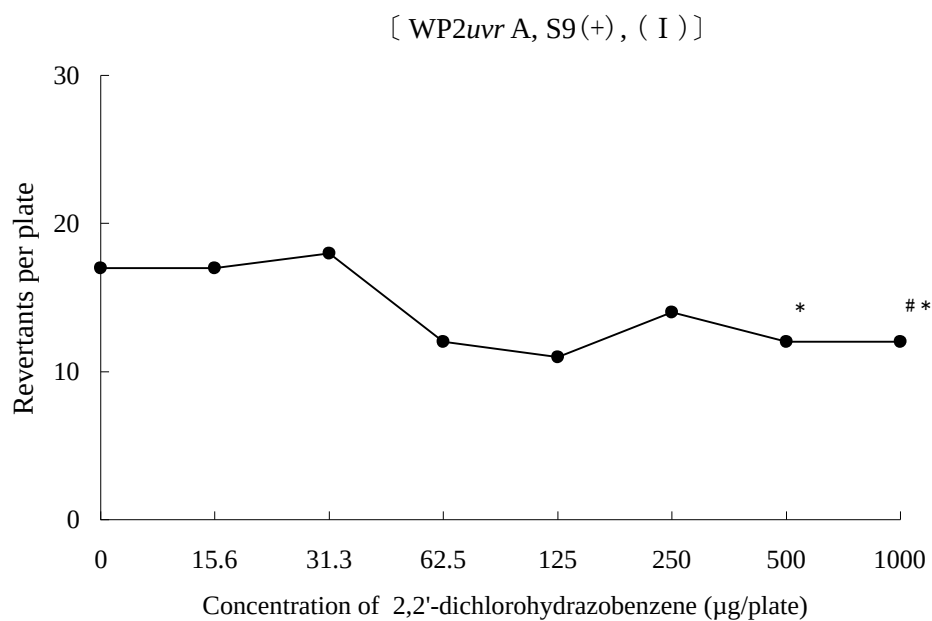


Figure 3-2 Reverse mutation test of 2,2'-dichlorohydrazobenzene in *Escherichia coli* WP2*uvr* A with metabolic activation (dose-response curves) (SR07166)

: Precipitation at the end of treatment

* : Growth inhibition

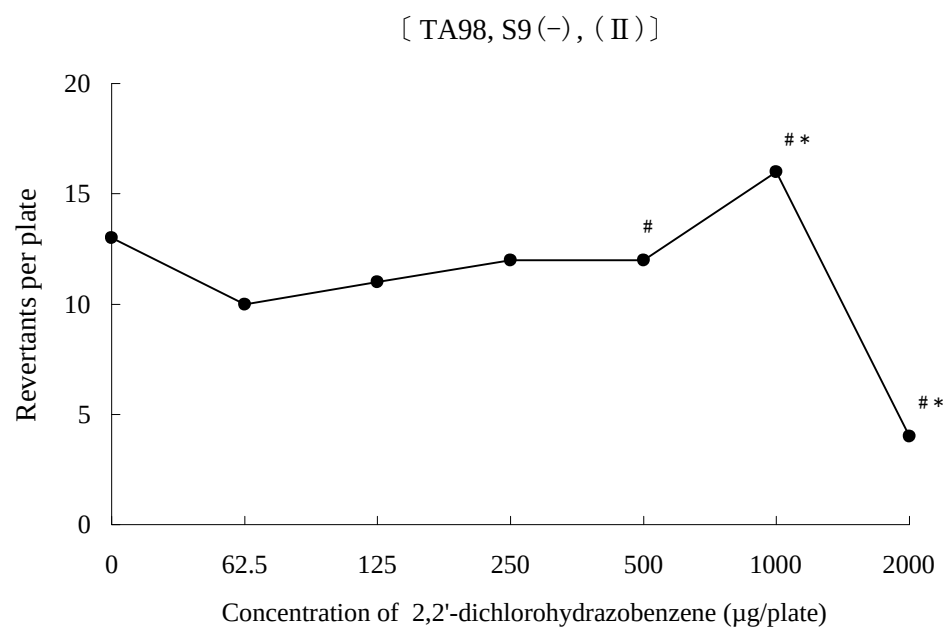
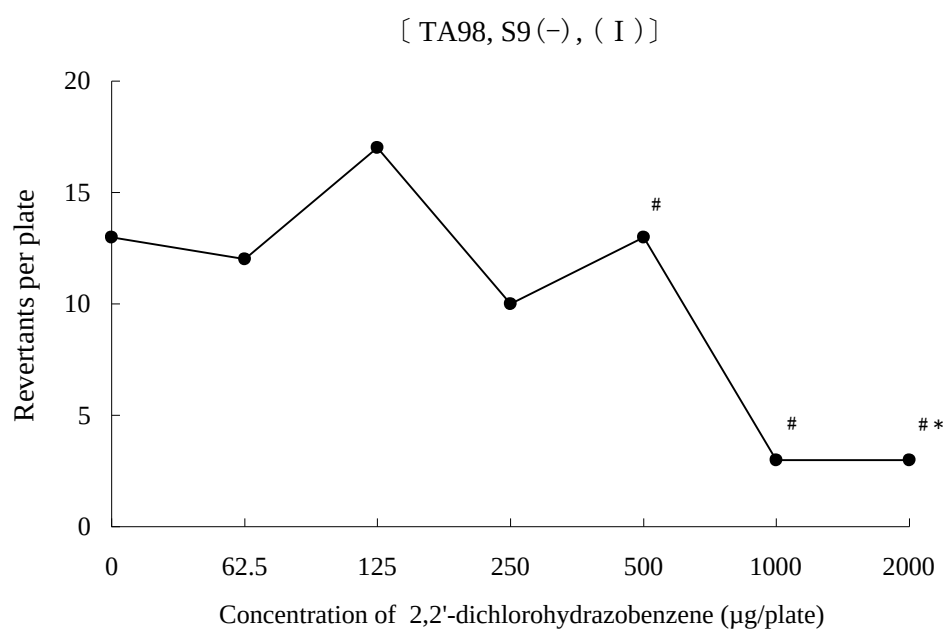


Figure 4-1 Reverse mutation test of 2,2'-dichlorohydrazobenzene in *Salmonella typhimurium* TA98 without metabolic activation (dose-response curves) (SR07166)

: Precipitation at the end of treatment
 * : Growth inhibition

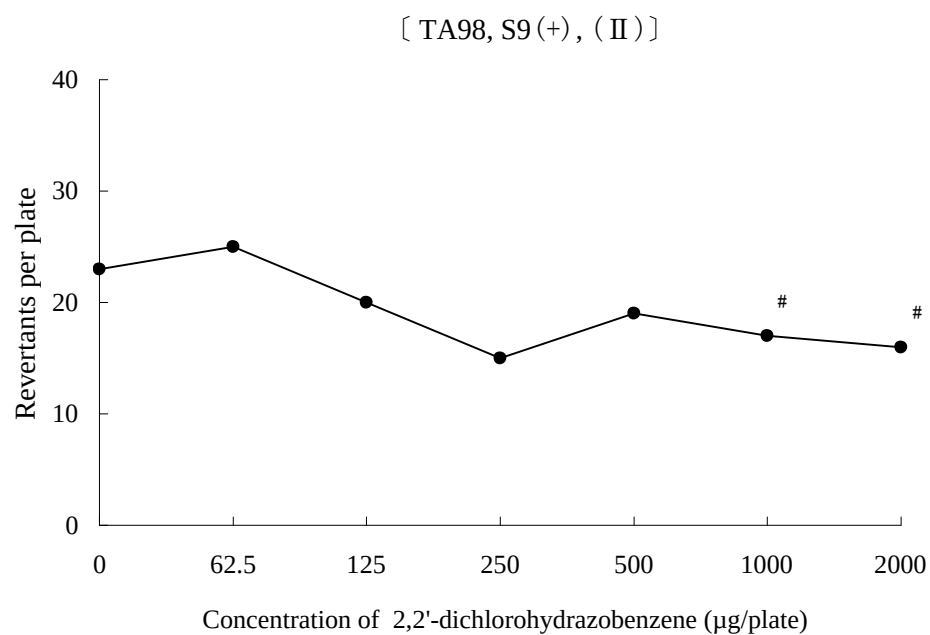
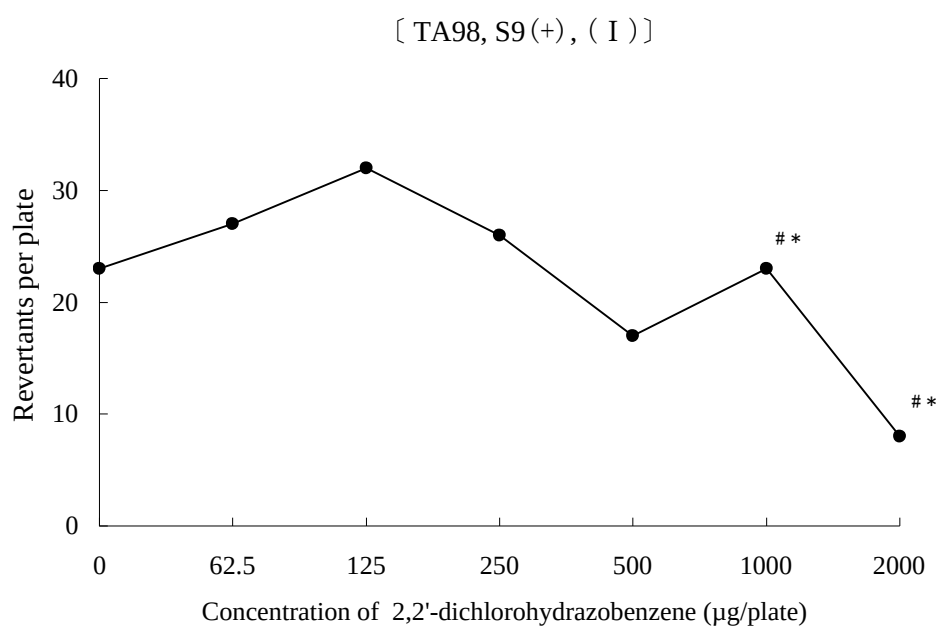


Figure 4-2 Reverse mutation test of 2,2'-dichlorohydrazobenzene in *Salmonella typhimurium* TA98 with metabolic activation (dose-response curves) (SR07166)

: Precipitation at the end of treatment
 * : Growth inhibition

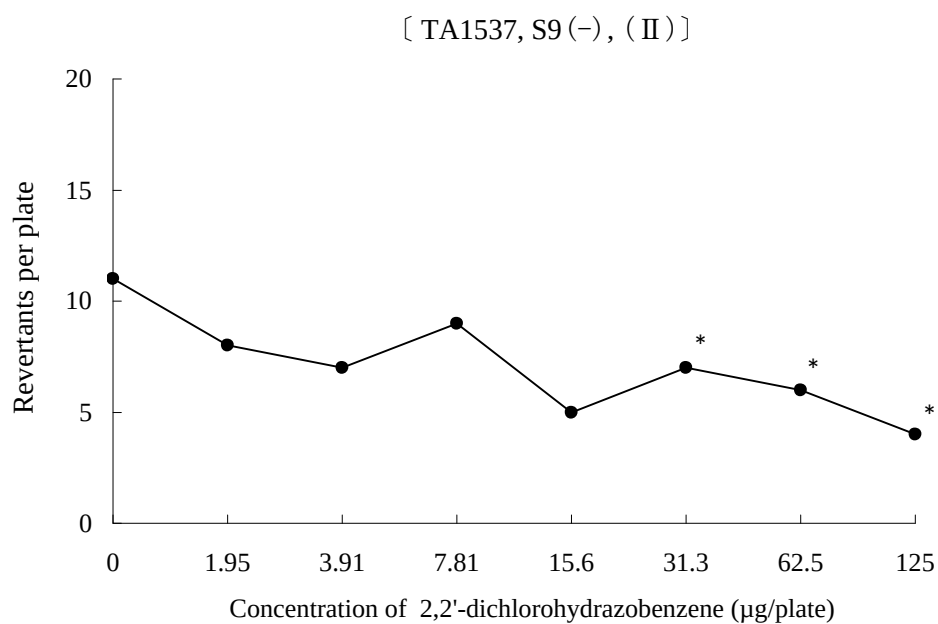
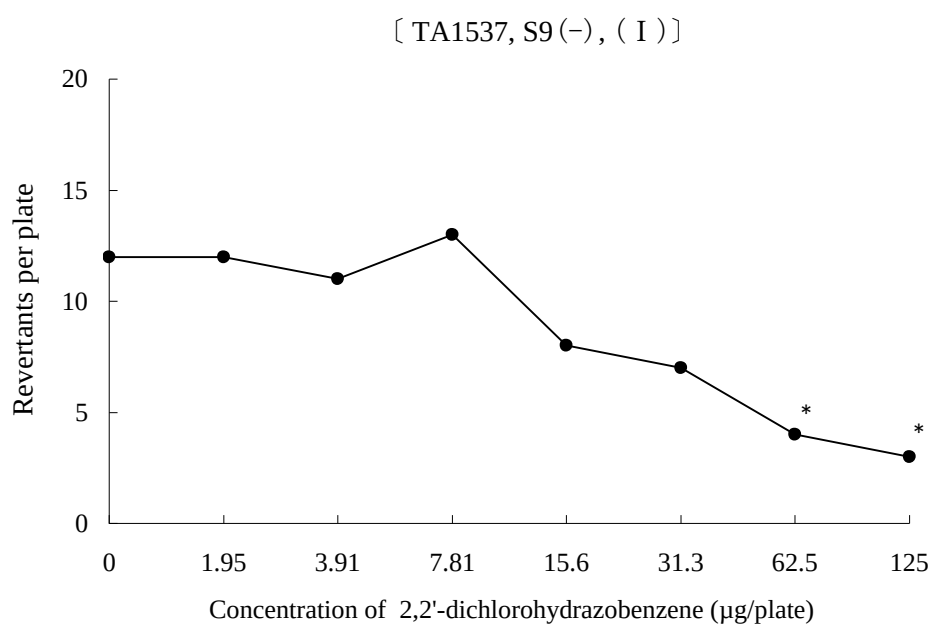


Figure 5-1 Reverse mutation test of 2,2'-dichlorohydrazobenzene in *Salmonella typhimurium* TA1537 without metabolic activation (dose-response curves) (SR07166)

* : Growth inhibition

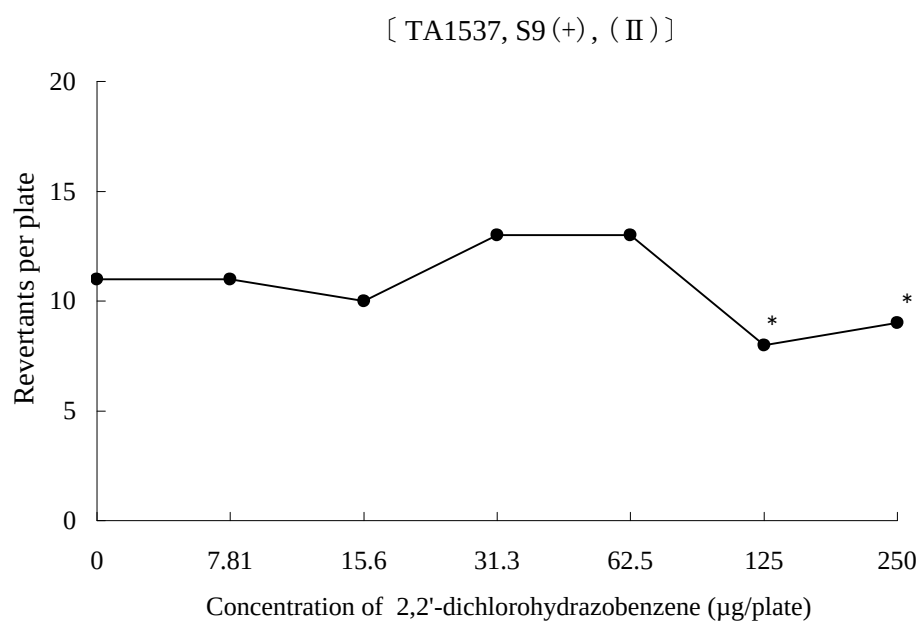
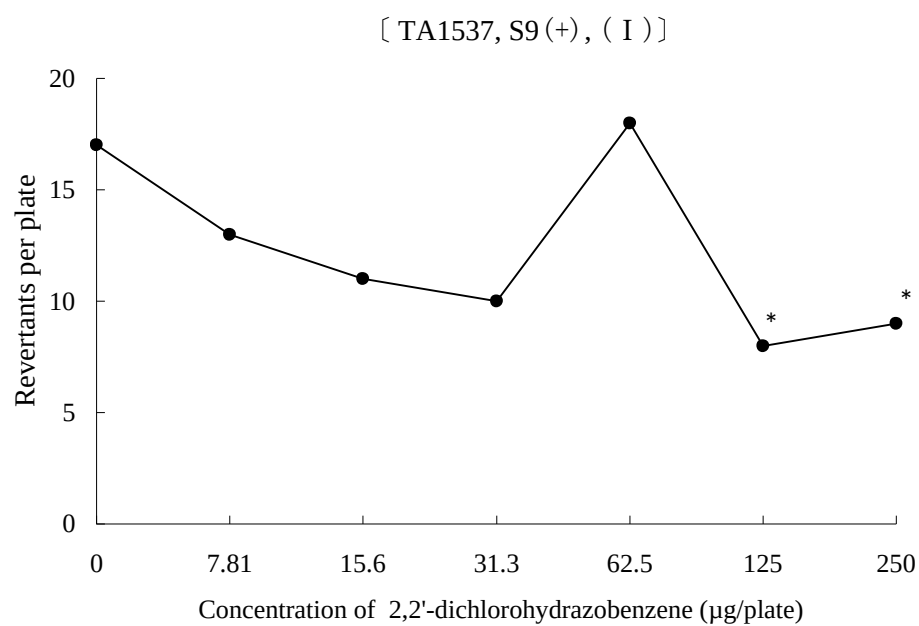


Figure 5-2 Reverse mutation test of 2,2'-dichlorohydrazobenzene in *Salmonella typhimurium* TA1537 with metabolic activation (dose-response curves) (SR07166)

* : Growth inhibition

検査成績報告書

PAGE- 1 / 1

株式会社 化合物安全性研究所

御中

原本は被験物質授受の記録に保存



和歌山精化工業株式会社

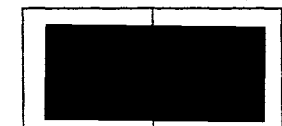
和歌山市小雑賀1丁目1番82号

Tel: 073-423-3247 (代)

Fax: 073-426-5378

品 名		D C H				出荷日	2008/6/6		合計数量		0.03 k g		
検査項目		GC純度	水 分	容 量	個数	数量							
Lot-No.		(%)	(%)	(kg)		(kg)							
ES-53026		99.9	0.05	0.03	1	0.03							
判 定		【合 格】				検査日	2008/6/6		品質保証部長				
備 考													

以上の通りご報告申し上げます。



Appendix 1

S R O 7 1 6 6

Historical control data for reverse mutation test

Control data (Date : 2005.4~2008.8)										
Strain	TA100		TA1535		WP2uvr A		TA98		TA1537	
Metabolic activation	S9 (-)	S9 (+)	S9 (-)	S9 (+)	S9 (-)	S9 (+)	S9 (-)	S9 (+)	S9 (-)	S9 (+)
No. of data	n = 188	n = 188	n = 183	n = 183	n = 179	n = 181	n = 191	n = 190	n = 185	n = 186
Mean $\pm$ S.D.	123 $\pm$ 13	138 $\pm$ 13	9 $\pm$ 2	10 $\pm$ 2	18 $\pm$ 3	20 $\pm$ 3	16 $\pm$ 3	28 $\pm$ 4	11 $\pm$ 4	15 $\pm$ 4
Maximum	147	166	13	14	28	28	25	39	20	26
Minimum	96	109	6	6	11	12	10	18	4	2
X-R-Rs ^a	88 ~ 158	101 ~ 175	4 ~ 14	5 ~ 15	7 ~ 29	9 ~ 31	8 ~ 24	17 ~ 39	3 ~ 19	4 ~ 26
Positive control data (Date : 2005.4~2008.8)										
Strain	TA100		TA1535		WP2uvr A		TA98		TA1537	
Metabolic activation	S9 (-)	S9 (+)	S9 (-)	S9 (+)	S9 (-)	S9 (+)	S9 (-)	S9 (+)	S9 (-)	S9 (+)
Compound	AF-2	2-AA	NaN ₃	2-AA	AF-2	2-AA	AF-2	2-AA	9-AA	2-AA
Concentration (μ g/plate)	0.01	1	0.5	2	0.01	10	0.1	0.5	80	2
No. of data	n = 188	n = 188	n = 183	n = 183	n = 179	n = 181	n = 191	n = 190	n = 185	n = 186
Mean $\pm$ S.D.	766 $\pm$ 108	1268 $\pm$ 213	282 $\pm$ 43	301 $\pm$ 53	105 $\pm$ 15	918 $\pm$ 116	340 $\pm$ 74	269 $\pm$ 46	261 $\pm$ 64	216 $\pm$ 69
Maximum	1158	2111	379	633	158	1277	594	396	471	558
Minimum	543	851	165	203	84	638	214	171	122	124
X-R-Rs ^a	569 ~ 963	872 ~ 1664	194 ~ 370	203 ~ 399	84 ~ 126	673 ~ 1163	202 ~ 478	184 ~ 354	104 ~ 418	115 ~ 317

^a X-R-Rs = $\bar{X} \pm 2.66R_s$

X = Mean

 R_s = Mean of $(X_i - X_{i-1})$