

## 最終報告書

4-クロロ-2-ニトロアニリンの細菌を用いる復帰突然変異試験

(試験番号：B060318)

株式会社三菱化学安全科学研究所

## 2. 目次

1. 陳述書.....	2
2. 目次.....	3
3. 試験実施概要.....	5
3.1 表題.....	5
3.2 試験番号.....	5
3.3 試験目的.....	5
3.4 適用ガイドライン.....	5
3.5 適用 GLP.....	5
3.6 試験委託者.....	5
3.7 試験受託者.....	5
3.8 試験施設.....	5
3.9 試験責任者.....	6
3.10 試験従事者.....	6
3.11 試験日程.....	6
3.12 保存.....	6
3.13 保存する資料.....	6
4. 試験責任者署名.....	7
5. 要約.....	8
6. 材料および方法.....	9
6.1 被験物質.....	9
6.2 対照物質.....	10
6.3 試験菌株.....	11
6.4 培地.....	13
6.5 S9 mix.....	14
6.6 被験物質溶液および陽性対照物質溶液の調製.....	15
6.7 被験物質および陽性対照物質用量.....	16
6.8 復帰突然変異試験.....	17
7. 結果.....	19
7.1 予備試験.....	19
7.2 本試験.....	19
7.3 無菌試験.....	20
8. 考察および結論.....	20
9. 参考文献.....	20

## 試験結果表

表 1	試験結果表 (予備試験) .....	21
表 2	試験結果表 (本試験 1) .....	22
表 3	試験結果表 (本試験 2) .....	23
表 4	比活性表 .....	24

## 図

図 1-1	用量-反応曲線 (本試験 1 ; -S9 mix) .....	25
図 1-2	用量-反応曲線 (本試験 1 ; +S9 mix) .....	25
図 2-1	用量-反応曲線 (本試験 2 ; -S9 mix) .....	26
図 2-2	用量-反応曲線 (本試験 2 ; +S9 mix) .....	26

### 3. 試験実施概要

#### 3.1 表題

4-クロロ-2-ニトロアニリンの細菌を用いる復帰突然変異試験

#### 3.2 試験番号

B060318

#### 3.3 試験目的

ネズミチフス菌株および大腸菌株を用いる復帰突然変異試験を実施し、4-クロロ-2-ニトロアニリンの変異原性を検討する。

#### 3.4 適用ガイドライン

(1) 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 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, 環境企発第 031121002 号 環境省総合環境政策局長連名通知)

(2) OECD Guideline for the Testing of Chemicals (No.471, 1997)

#### 3.5 適用 GLP

(1) 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

(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基準, 薬食発第 1121003 号, 平成 15・11・17 製局第 3 号, 環境企発第 031121004 号, 平成 15 年 11 月 21 日)

(2) OECD Principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997)

#### 3.6 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  
東京都千代田区霞ヶ関一丁目 2 番 2 号

#### 3.7 試験受託者

株式会社三菱化学安全科学研究所  
東京都港区芝浦四丁目 2 番 8 号  
(平成 19 年 3 月 31 日以前は, 東京都港区芝二丁目 1 番 30 号)

#### 3.8 試験施設

株式会社三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所  
茨城県神栖市砂山 14 番地

## 5. 要約

ネズミチフス菌株 TA100, TA1535, TA98 および TA1537 ならびに大腸菌株 WP2uvrA/pKM101 の5菌株を用いる復帰突然変異試験で4-クロロ-2-ニトロアニリンの変異原性を調べた。試験は S9 mix 非存在下および存在下でプレインキュベーション法により実施した。

予備試験を 1.22, 4.88, 19.5, 78.1, 313, 1250 および 5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の7用量で実施した結果、S9 mix 存在下の TA100 および TA98 において、陰性（溶媒）対照値の2倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加が認められた。また、S9 mix 非存在下および存在下の TA100, TA1535, TA98, TA1537 については 1250  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上の用量で、WP2uvrA/pKM101 については 5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の用量で菌の生育阻害が認められた。なお、S9 mix 非存在下および存在下の 5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  でプレート上に沈殿が認められた。

予備試験の結果から本試験は、S9 mix 非存在下の TA100, TA1535, TA98, TA1537 については 39.1, 78.1, 156, 313, 625, 1250  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の6用量、WP2uvrA/pKM101 については 78.1, 156, 313, 625, 1250, 2500, 5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の7用量で、S9 mix 存在下の TA100 については 39.1, 78.1, 156, 313, 625, 1250, 2500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の7用量、TA1535, TA98 および TA1537 については 39.1, 78.1, 156, 313, 625, 1250  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の6用量、WP2uvrA/pKM101, については 78.1, 156, 313, 625, 1250, 2500, 5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の7用量で実施した。

2回の本試験の結果、S9 mix 存在下の TA100 および TA98 において、復帰変異コロニー数が用量相関的に増加し、陰性（溶媒）対照値の2倍以上を示した。S9 mix 非存在下のすべての菌株および S9 mix 存在下の TA1535, WP2uvrA/pKM101, TA1537 においては陰性（溶媒）対照値の2倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、S9 mix 非存在下および存在下の TA100, TA1535, TA98, TA1537 については 625  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上の用量で、WP2uvrA/pKM101 については 5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の用量で菌の生育阻害が認められた。なお、S9 mix 非存在下および存在下の 5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  でプレート上に沈殿が認められた。

本試験の陰性（溶媒）対照値および陽性対照値は、当研究所の適正範囲内であった。また、陽性対照により誘発された復帰変異コロニー数は、S9 mix 非存在下および存在下のいずれの試験菌株においても陰性（溶媒）対照値の2倍を超えて増加し、明らかな陽性結果を示した。従って、本試験の妥当性が確認された。

以上の結果から、4-クロロ-2-ニトロアニリンは本試験条件下において変異原性を有する（陽性）と結論した。

## 6. 材料および方法

### 6.1 被験物質

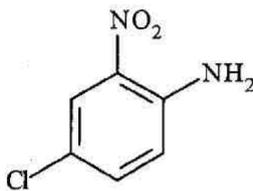
#### 6.1.1 名称

4-クロロ-2-ニトロアニリン

#### 6.1.2 CAS 番号

89-63-4

#### 6.1.3 構造式



#### 6.1.4 分子量

172.57

#### 6.1.5 ロット番号

#### 6.1.6 純度 (含量)

100.0%

#### 6.1.7 性状

僅かにくすんだ結晶性粉末

#### 6.1.8 その他の物理化学的性状

蒸気圧：0.000485 mmHg (25°C)

対水溶解度：284 mg/L (25°C)

1-オクタノール/水分配係数：2.72

融点：117.6°C

#### 6.1.9 製造元

#### 6.1.10 入手量

25 g

### 6.1.11 保存条件

室温（許容範囲：10～30°C；実測値：21.1～25.3°C），遮光

### 6.1.12 保管場所

被験物質保管場所（52）

### 6.1.13 安定性の確認

当研究所で実施する「4-クロロ-2-ニトロアニリンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験（試験番号：B060319）」において、実験開始前と実験終了後に赤外吸収スペクトル（IR）法で赤外吸収スペクトルを測定し、被験物質の特性に変化がないことを確認した。

測定機器：島津フーリエ変換赤外分光光度計（FTIR-8300，株式会社島津製作所）

方法：KBr 打錠法

### 6.1.14 残余被験物質の処理

被験物質の残余は実験終了後に廃棄した。

## 6.2 対照物質

### 6.2.1 陰性対照物質

#### 6.2.1.1 名称

ジメチルスルホキシド（DMSO と略す）

#### 6.2.1.2 製造元

関東化学株式会社

#### 6.2.1.3 規格

分光分析用

#### 6.2.1.4 ロット番号

510F1666

#### 6.2.1.5 含量（純度）

100.0%

#### 6.2.1.6 陰性対照物質の選択理由

溶媒検討の結果、被験物質は 50 mg/mL で注射用水に不溶であったが、DMSO には溶解した。また、被験物質を DMSO と混合した際に発熱、発泡、変色は認められなかった。これらの結果から、本被験物質の溶媒（陰性対照物質）には DMSO を選択した。

## 6.2.2 陽性対照物質

### 6.2.2.1 名称, 製造元等

名称 (略称)	製造元	ロット番号	含量 (純度)
2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド (AF-2)	和光純薬工業株式会社	SEL1402	99.0%
アジ化ナトリウム (NaN <sub>3</sub> )	和光純薬工業株式会社	TCK7533	99.2%
9-アミノアクリジン塩酸塩 (9-AA)	Sigma-Aldrich Co.	092K3441	99%
2-アミノアントラセン (2-AA)	和光純薬工業株式会社	TCM6741	93.3%

### 6.2.2.2 陽性対照物質の選択理由

細菌を用いる復帰突然変異試験において広く使用され、適用ガイドラインにおいて推奨されている。

## 6.3 試験菌株

### 6.3.1 試験菌株

試験菌株 [1], [2]	入手先 (入手日)
<i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535 TA98, TA1537	カリフォルニア大学 (1983年5月27日)
<i>Escherichia coli</i> WP2uvrA/pKM101	日本バイオアッセイ研究センター (1997年9月18日)

### 6.3.2 試験菌株の選択理由

細菌を用いる復帰突然変異試験において広く使用され、適用ガイドラインにおいて推奨されている。

### 6.3.3 試験菌株の保存

#### 6.3.3.1 組成

液体完全培地中にて 37°C で 8 時間前培養を行った菌懸濁液 24 mL に 2.1 mL の DMSO (関東化学株式会社, ロット番号 508F1409) を混合した。

#### 6.3.3.2 保存方法

分注凍結 (分注量: 0.2 mL)

#### 6.3.3.3 保存条件

超低温冷凍庫 (日本フリーザー株式会社, CL-322, 実測値: -85°C ~ -79°C)

### 6.3.3.4 保存日および使用期限

試験菌株	保存日 (ロット番号)	使用期限
TA100, TA1535, TA98 TA1537, WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	2005年11月30日 (051130)	2006年11月29日

### 6.3.4 試験菌株の遺伝的特性

#### 6.3.4.1 遺伝的特性

試験菌株	アミノ酸要求性 <sup>(1)</sup>	紫外線感受性 <sup>(2)</sup>	膜変異 <sup>(3)</sup>	薬剤耐性 <sup>(4)</sup>
TA100	<i>his</i> <sup>-</sup> (塩基対置換)	$\Delta$ <i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	+ (pKM101)
TA1535	<i>his</i> <sup>-</sup> (塩基対置換)	$\Delta$ <i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	-
TA98	<i>his</i> <sup>-</sup> (フレームシフト)	$\Delta$ <i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	+ (pKM101)
TA1537	<i>his</i> <sup>-</sup> (フレームシフト)	$\Delta$ <i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	-
WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	<i>trp</i> <sup>-</sup> (塩基対置換)	$\Delta$ <i>uvrA</i>	Wild type	+ (pKM101)

(1) *his*<sup>-</sup>はヒスチジン要求性, *trp*<sup>-</sup>はトリプトファン要求性を示す。

(2)  $\Delta$  *uvrA* および  $\Delta$  *uvrB* はDNA修復遺伝子の欠失を示し, 紫外線感受性を示す。

(3) *rfa* は細胞壁のリポ多糖類の欠失を示し, クリスタルバイオレット感受性を示す。

(4) + (pKM101) は薬剤耐性因子を保持していることを示し, アンピシリン耐性を示す。

#### 6.3.4.2 遺伝的特性の確認

試験菌株の遺伝的特性を2005年12月2日に確認した。試験には上記の特性を備えた菌株を用いた。

### 6.3.5 菌懸濁液

#### 6.3.5.1 培養

培養温度：37°C (培養開始まで10°Cに保冷)

培養時間：8時間

培養方法：往復振とう (振とう回数：90回/分)

培養容器：L字管 (容量22 mL)

培養液：液体完全培地 (10 mL)

菌株および接種量：保存菌株を融解し, 0.02 mL 接種

#### 6.3.5.2 菌懸濁液の菌濃度

培養終了後, 濁度計 (コロナ電気株式会社, UT-11) を用いて濁度を測定し, 濁度からの換算により生菌数を算出した。菌懸濁液は菌濃度が  $1 \times 10^9$  /mL 以上であることを確認した後, 試験に使用した。菌懸濁液は用時調製し, 調製後は室温で保存した。

各菌懸濁液の生菌数を以下に示す。

試験菌株		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	TA98	TA1537
生菌数 ( $\times 10^9$ /mL)	予備試験	2.44	1.92	5.74	3.46	2.03
	本試験 1	2.39	1.91	5.86	3.18	1.94
	本試験 2	2.39	1.87	5.86	3.26	2.04

## 6.4 培地

### 6.4.1 液体完全培地の調製

Oxoid Nutrient Broth No.2 (Oxoid 社, ロット番号 261002) 7.5 g に精製水 300 mL を加えて溶解した。これを 121°C で 15 分間オートクレーブ滅菌し、冷蔵保存した。

### 6.4.2 トップアガールの調製

#### 6.4.2.1 軟寒天の調製

Bacto-agar (Becton, Dickinson and Company, ロット番号 3345853) 1.8 g および塩化ナトリウム (関東化学株式会社, ロット番号 705X1484) 1.5 g に精製水 300 mL を加え、これを 121°C で 15 分間オートクレーブ滅菌して、室温で保存した。

#### 6.4.2.2 トップアガールの調製

軟寒天を電子レンジで液化し、以下に示すアミノ酸水溶液をそれぞれ使用直前に 1/10 量添加した。トップアガーは用時調製し、約 45°C に保温した。

ネズミチフス菌： 0.5 mmol/L D-ビオチン<sup>†</sup>・L-ヒスチジン<sup>†</sup>混合水溶液

大腸菌： 0.5 mmol/L L-トリプトファン<sup>†</sup>水溶液

†： D-ビオチン (和光純薬工業株式会社, ロット番号 EWL2869)

L-ヒスチジン塩酸塩一水和物 (和光純薬工業株式会社, ロット番号 TCN4471)

L-トリプトファン (和光純薬工業株式会社, ロット番号 TCJ2266)

### 6.4.3 最少グルコース寒天平板培地

#### 6.4.3.1 名称

クリメディア AM-N 培地 (寒天：伊那寒天 [BA-30A], 伊那食品工業株式会社, ロット番号 51115)

#### 6.4.3.2 製造元

オリエンタル酵母工業株式会社

**6.4.3.3 ロット番号**

ANI580FV

**6.4.3.4 製造日および入手日**

2006年6月10日製造

2006年7月13日入手

**6.5 S9 mix**

**6.5.1 S9**

**6.5.1.1 製造元**

キッコーマン株式会社

**6.5.1.2 ロット番号**

RAA-542

**6.5.1.3 製造日および入手日**

2006年4月21日製造

2006年5月19日入手

**6.5.1.4 製造方法**

フェノバルビタール（1日目 30 mg/kg を1回腹腔内投与，2日目以降 60 mg/kg を1日1回3日間腹腔内投与）と 5, 6-ベンゾフラボン（フェノバルビタール投与3日目に 80 mg/kg を1回腹腔内投与）で酵素誘導した7週齢SD系雄ラット（体重 210 - 245 g）の肝臓より調製された。

**6.5.1.5 蛋白含量**

25.48 mg/mL

**6.5.1.6 保存条件**

超低温冷凍庫（日本フリーザー株式会社，CL-322，実測値：-85°C ~ -80°C）

**6.5.1.7 使用期限**

2006年10月20日（製造日から6ヵ月間）

**6.5.2 Cofactor mix**

**6.5.2.1 名称**

Cofactor-I

**6.5.2.2 製造元**

オリエンタル酵母工業株式会社

### 6.5.2.3 ロット番号

999603

### 6.5.2.4 調製

Cofactor-I に滅菌精製水 9 mL を加えて溶解し、メンブレンフィルター（孔径：0.45  $\mu\text{m}$ ）でろ過して Cofactor mix とした。Cofactor mix は用時調製した。

### 6.5.3 S9 mix

Cofactor mix 9 mL に対して、S9 を 1 mL の割合で加え S9 mix とした。S9 mix は用時調製し、使用時まで氷槽中に保存した。

S9 mix 1 mL あたりの組成を以下の表に示す。

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 $\mu\text{mol}$
NADPH	4 $\mu\text{mol}$
NADH	4 $\mu\text{mol}$
リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4)	100 $\mu\text{mol}$
滅菌精製水	残量

## 6.6 被験物質溶液および陽性対照物質溶液の調製

### 6.6.1 被験物質溶液の調製

- (1) 被験物質を秤量（予備試験：250 mg，本試験：500 mg）して DMSO を加え、振とう攪拌により溶解させて 50 mg/mL 溶液とした。
- (2) 予備試験では、50 mg/mL 溶液の一部を DMSO で段階希釈して 12.5, 3.13, 0.781, 0.195, 0.0488 および 0.0122 mg/mL 溶液を調製した。
- (3) 本試験では、50 mg/mL 溶液の一部を DMSO で段階希釈して 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.781 および 0.391 mg/mL 溶液を調製した。
- (4) 被験物質溶液は用時調製し、調製後は使用までの間室温、黄色灯下で保存した（予備試験：60 分，本試験 1, 2：20 分）。
- (5) 被験物質の秤量，溶液の希釈，分注および被験物質処理を含む全ての操作は室温，黄色灯下で行った。

### 6.6.2 陽性対照物質溶液

#### 6.6.2.1 陽性対照物質溶液の調製

陽性対照物質溶液は、2006 年 3 月 24 日に調製した保存液を用時融解して試験に使用した。

- (1)  $\text{NaN}_3$  は注射用水 (株式会社大塚製薬工場, ロット番号 K5D74) に, AF-2, 9-AA および 2-AA は DMSO (関東化学株式会社, ロット番号 510F1666) に溶解した.
- (2) これを同じ溶媒で希釈して所定濃度の陽性対照物質溶液とした.

#### 6.6.2.2 保存方法

分注凍結 (分注量 : 0.5 mL)

#### 6.6.2.3 保存条件

超低温冷凍庫 (日本フリーザー株式会社, CL-322, 実測値 :  $-85^{\circ}\text{C} \sim -79^{\circ}\text{C}$ )

#### 6.6.2.4 調製濃度および使用期限

名称および濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	調製日	使用期限
AF-2 0.05, 0.1, 1 $\text{NaN}_3$ 5 9-AA 800 2-AA 5, 10, 20	2006年3月24日	2007年3月23日

#### 6.6.2.5 陽性対照値の確認

凍結保存した陽性対照物質溶液について, プレインキュベーション法で試験を実施し, 陽性対照値が当該年度の適正範囲内であることを確認している.

### 6.7 被験物質および陽性対照物質用量

#### 6.7.1 被験物質用量

##### 6.7.1.1 予備試験

ガイドラインに従い 5000  $\mu\text{g}$ /プレート を最高用量とし, 以下の用量を設定した.

試験菌株	用量 ( $\mu\text{g}$ /プレート)
	S9 mix 非存在下および存在下
TA100, TA1535, TA98 TA1537, WP2uvrA/pKM101	1.22, 4.88, 19.5, 78.1, 313, 1250, 5000

##### 6.7.1.2 本試験

予備試験の結果, S9 mix 存在下の TA100 および TA98 において, 陰性 (溶媒) 対照値の 2 倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加が認められた. また, S9 mix 非存在下および存在下の TA100, TA1535, TA98, TA1537 については 1250  $\mu\text{g}$ /プレート以上の用量で, WP2uvrA/pKM101 については 5000  $\mu\text{g}$ /プレートの用量で菌の生育阻害が認められた. なお, S9 mix 非存在下および存在下の 5000  $\mu\text{g}$ /プレートでプレート上に沈殿が認められた.

以上の結果をもとに、本試験では明らかな菌の生育阻害が認められると考えられる用量を最高用量として以下の用量を設定した。

試験菌株	用量 (µg/プレート)	
	S9 mix 非存在下	S9 mix 存在下
TA100	39.1, 78.1, 156, 313, 625, 1250	39.1, 78.1, 156, 313, 625, 1250, 2500
TA1535, TA98, TA1537	39.1, 78.1, 156, 313, 625, 1250	
WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	78.1, 156, 313, 625, 1250, 2500, 5000	

## 6.7.2 陽性対照物質用量

### 6.7.2.1 名称および用量

試験菌株	名称および用量 (µg/プレート)		
	S9 mix 非存在下		S9 mix 存在下
TA100	AF-2	0.01	2-AA 1
TA1535	NaN <sub>3</sub>	0.5	2-AA 2
TA98	AF-2	0.1	2-AA 0.5
TA1537	9-AA	80	2-AA 2
WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	AF-2	0.005	2-AA 2

### 6.7.2.2 陽性対照物質用量の選択理由

これらの用量は、各試験菌株に対して陽性を示すことが知られている。

## 6.8 復帰突然変異試験

### 6.8.1 試験法の選択

試験はプレインキュベーション法を用いて、S9 mix 非存在下および存在下で実施した[3].

### 6.8.2 プレインキュベーション法

- (1) 各用量につき、滅菌した試験管に被験物質溶液、陰性（溶媒）対照物質または陽性対照物質溶液を 0.1 mL 添加した。
- (2) S9 mix 非存在下の場合、0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液<sup>†</sup> (pH 7.4) を 0.5 mL 加えて混和し、さらに菌懸濁液を 0.1 mL 加えた。
- (3) S9 mix 存在下の場合、S9 mix を 0.5 mL 加えて混和し、さらに菌懸濁液を 0.1 mL 加えた。
- (4) この混合液を 37°C で 20 分間緩やかに振とう（振とう回数：90 回/分）してインキュベーションした（プレインキュベーション）。
- (5) プレインキュベーション後、この混合液に融解したトッパアガーを 2 mL 加え、最少グルコース寒天平板培地上に重層した。

(6) 重層したトップアガーが凝固した後、37°Cで48時間培養した。

†: リン酸水素二ナトリウム無水塩 (和光純薬工業株式会社, ロット番号 KLL4270)  
リン酸二水素ナトリウム二水和物 (和光純薬工業株式会社, ロット番号 CER2739)

### 6.8.3 観察

沈殿物: 48時間培養後に目視で観察した

菌の生育阻害: 48時間培養後に実体顕微鏡 (Nikon, SMZ-10) で観察した

### 6.8.4 コロニー計測

プレート上の復帰変異コロニー数を自動コロニーカウンター (システムサイエンス株式会社, CA-11) で計測した。機器計測に際しては面積補正および数え落とし補正を行った。

### 6.8.5 プレート数

予備試験: 1プレート/用量

本試験: 3プレート/用量

### 6.8.6 結果の集計

陰性 (溶媒) 対照, 陽性対照および被験物質の各処理について, 計測したコロニー数の平均値および標準偏差を算出した。平均値および標準偏差は小数点以下を四捨五入して表示した。

### 6.8.7 無菌試験

被験物質溶液および S9 mix それぞれ1枚のプレートを使用し, 試験毎に実施した。

- (1) 最高用量の被験物質溶液 0.1 mL または S9 mix 0.5 mL にトップアガー 2 mL を加えて混和した。
- (2) それぞれ最少グルコース寒天平板培地上に重層した。
- (3) 重層したトップアガーが凝固した後, 37°C で 48 時間培養し, 雑菌の混入について目視で確認した。

### 6.8.8 実験の成立基準

本試験については, 下記の条件をすべて満たしている場合に成立とした。

- (1) 陰性 (溶媒) 対照値 (平均値) および陽性対照値 (平均値) が試験施設における背景データの適正範囲内にあること。
- (2) 陽性対照値 (平均値) が, 対応する試験菌株の陰性 (溶媒) 対照値と比較して明らかに2倍を越えて増加していること。
- (3) 生育阻害の認められない用量が4用量以上あり, かつ評価可能な用量が5用

- 量以上あること。
- (4) 無菌試験の結果，雑菌による汚染が無いこと。
  - (5) 試験プレートが汚染あるいは他の不測の事態によって計測不能になり，失われていないこと。

#### 6.8.9 試験結果の判定

いずれかの試験菌株で，S9 mixの有無にかかわらず，被験物質用量の増加にともなって復帰変異コロニー数（平均値）が陰性（溶媒）対照値（平均値）の2倍以上に増加し，さらにその増加に再現性が認められる場合に，当該被験物質は変異原性を有する（陽性）と判定した。その他の場合は陰性と判定した。以上の判定基準により，被験物質が陽性と判断された場合は，比活性（1 mgあたりの誘発復帰変異コロニー数）を算出した。試験結果の評価には統計学的検定を実施しなかった。

#### 6.8.10 再現性の確認

試験結果の再現性は2回の本試験で確認した。

### 7. 結果

#### 7.1 予備試験（表1）

S9 mix存在下のTA100およびTA98において，陰性（溶媒）対照値の2倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加が認められた。また，S9 mix非存在下および存在下のTA100, TA1535, TA98, TA1537については1250 µg/プレート以上の用量で，WP2uvrA/pKM101については5000 µg/プレートの用量で菌の生育阻害が認められた。なお，S9 mix非存在下および存在下の5000 µg/プレートでプレート上に沈殿が認められた。

#### 7.2 本試験（表2～4および図1-1～2-2）

2回の本試験ともに，S9 mix存在下のTA100およびTA98において，陰性（溶媒）対照値の2倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加が認められた。S9 mix非存在下のすべての菌株およびS9 mix存在下のTA1535, WP2uvrA/pKM101, TA1537においては陰性（溶媒）対照値の2倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また，S9 mix非存在下および存在下のTA100, TA1535, TA98, TA1537については625 µg/プレート以上の用量で，WP2uvrA/pKM101については5000 µg/プレートの用量で菌の生育阻害が認められた。なお，S9 mix非存在下および存在下の5000 µg/プレートでプレート上に沈殿が認められた。

本被験物質が示した最大比活性値は，S9 mix存在下のTA100が156 µg/プレートで示した $7.88 \times 10^2$  revertants/mgであった。

### 7.3 無菌試験

予備試験および本試験のいずれにおいても、最高用量の被験物質溶液および S9 mix には菌、カビの混入は認められなかった。

## 8. 考察および結論

予備試験の結果に基づいて、菌の生育阻害を示す用量を最高用量として本試験を実施した結果、S9 mix 存在下の TA100 および TA98 において、復帰変異コロニー数が用量相関的に増加し、陰性（溶媒）対照値の 2 倍以上を示した。また、2 回実施した本試験で試験結果の再現性が確認された。S9 mix 非存在下のすべての菌株および S9 mix 存在下の TA1535, WP2*uvrA*/pKM101, TA1537 においては、陰性（溶媒）対照値の 2 倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

本試験の陰性（溶媒）対照値および陽性対照値は、当研究所の適正範囲内であった（添付資料 1）。また、陽性対照物質により誘発された復帰変異コロニー数は、S9 mix 非存在下および存在下のいずれの試験菌株においても陰性（溶媒）対照値の 2 倍を超えて増加し、明らかな陽性結果を示した。さらに、いずれの試験においても生育阻害の認められない用量が 4 用量以上あり、かつ評価可能な用量が 5 用量以上得られた。従って、本試験の妥当性が確認された。

以上の結果から、4-クロロ-2-ニトロアニリンは本試験条件下において変異原性を有する（陽性）と結論した。

なお、類似化合物の変異原性に関する情報を添付資料 2 にまとめた。

## 9. 参考文献

- [1] Maron DM and Ames BN. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 1983; 113: 173-215.
- [2] Green MHL and Muriel WJ. Mutagen testing using *Trp*<sup>+</sup> reversion in *Escherichia coli*. *Mutat Res* 1976; 38: 3-32.
- [3] 労働省安全衛生部化学物質調査課編（1991）：安衛法における変異原性試験，中央労働災害防止協会，東京

表 1 試験結果表 (予備試験)

試験期間		2006年 8月 8日 ~ 2006年 8月11日				
代謝活性化系の有無	被験物質用量 (μg/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	WP2 <sub>uvrA</sub> /pKM101	TA98	TA1537
S9 mix (-)	陰性対照	92	13	86	15	15
	1.22	99	11	79	11	19
	4.88	107	11	83	18	11
	19.5	94	11	89	17	11
	78.1	109	13	72	15	16
	313	111	9	74	11	8
	1250	14 *	2 *	42	5 *	6 *
	5000 †	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *
S9 mix (+)	陰性対照	119	10	105	26	21
	1.22	95	8	119	23	23
	4.88	135	16	108	32	24
	19.5	161	9	106	34	24
	78.1	191	19	94	39	25
	313	300	15	100	54	25
	1250	273 *	9 *	59	35 *	3 *
	5000 †	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *
陽性対照 S9 mix (-)	名称	AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2	9-AA
	用量 (μg/プレート)	0.01	0.5	0.005	0.1	80
	(コロニー数/プレート)	732	601	742	794	484
陽性対照 S9 mix (+)	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	用量 (μg/プレート)	1	2	2	0.5	2
	(コロニー数/プレート)	1367	255	838	469	223

(備考) \*: 菌の生育阻害が認められた。  
†: 沈殿物が認められた。  
陰性対照: ジメチルスルホキシド (DMSO)

AF-2: 2-(2-フルル)-3-(5-ニトロ-2-フルル)アクリルアミド, NaN<sub>3</sub>: アジ化ナトリウム, 9-AA: 9-アミノアクリジン塩酸塩, 2-AA: 2-アミノアントラセン

表 2 試験結果表 (本試験 1)

試験期間		2006年9月12日 ~ 2006年9月15日					
代謝活性化系の有無	被験物質用量 (μg/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	WP2uvrA/pKM101	TA98	TA1537	
S9 mix (-)	陰性対照	120 112 ( 118 ) 122 ( 5 )	6 7 ( 8 ) 7 ( 2 )	83 78 ( 79 ) 77 ( 3 )	17 19 ( 19 ) 20 ( 2 )	12 14 ( 13 ) 13 ( 1 )	
	39.1	123 105 ( 116 ) 121 ( 10 )	9 9 ( 10 ) 12 ( 2 )	/	23 18 ( 22 ) 24 ( 3 )	14 11 ( 13 ) 15 ( 2 )	
	78.1	105 108 ( 108 ) 111 ( 3 )	7 15 ( 12 ) 15 ( 5 )	74 78 ( 79 ) 84 ( 5 )	18 20 ( 19 ) 19 ( 1 )	10 14 ( 13 ) 14 ( 2 )	
	156	113 111 ( 109 ) 104 ( 5 )	12 7 ( 10 ) 12 ( 3 )	72 81 ( 76 ) 74 ( 5 )	23 21 ( 21 ) 18 ( 3 )	10 11 ( 11 ) 11 ( 1 )	
	313	97 101 ( 106 ) 119 ( 12 )	13 8 ( 9 ) 7 ( 3 )	80 69 ( 76 ) 79 ( 6 )	22 23 ( 22 ) 21 ( 1 )	9 7 ( 8 ) 9 ( 1 )	
	625	21 * 22 * ( 22 ) 24 * ( 2 )	6 * 4 * ( 7 ) 10 * ( 3 )	59 65 ( 62 ) 62 ( 3 )	10 * 9 * ( 10 ) 11 * ( 1 )	5 * 7 * ( 7 ) 8 * ( 2 )	
	1250	16 * 17 * ( 13 ) 6 * ( 6 )	8 * 3 * ( 6 ) 7 * ( 3 )	39 46 ( 44 ) 48 ( 5 )	3 * 4 * ( 4 ) 4 * ( 1 )	4 * 4 * ( 4 ) 5 * ( 1 )	
	2500	/	/	6 3 ( 4 ) 4 ( 2 )	/	/	
	5000 †	/	/	0 * 0 * ( 0 ) 0 * ( 0 )	/	/	
	S9 mix (+)	陰性対照	117 126 ( 123 ) 125 ( 5 )	8 12 ( 11 ) 12 ( 2 )	100 91 ( 100 ) 110 ( 10 )	21 27 ( 26 ) 29 ( 4 )	17 13 ( 15 ) 15 ( 2 )
		39.1	192 196 ( 187 ) 172 ( 13 )	8 13 ( 11 ) 11 ( 3 )	/	28 31 ( 30 ) 30 ( 2 )	17 17 ( 18 ) 19 ( 1 )
		78.1	192 224 ( 200 ) 185 ( 21 )	17 10 ( 14 ) 14 ( 4 )	99 101 ( 102 ) 105 ( 3 )	43 46 ( 42 ) 38 ( 4 )	18 17 ( 19 ) 21 ( 2 )
156		261 234 ( 238 ) 218 ( 22 )	13 10 ( 12 ) 14 ( 2 )	99 93 ( 97 ) 99 ( 3 )	40 48 ( 46 ) 51 ( 6 )	20 19 ( 19 ) 19 ( 1 )	
313		282 246 ( 262 ) 257 ( 18 )	13 14 ( 15 ) 19 ( 3 )	99 95 ( 101 ) 109 ( 7 )	64 60 ( 63 ) 65 ( 3 )	23 21 ( 20 ) 17 ( 3 )	
625		215 * 213 * ( 222 ) 238 * ( 14 )	9 * 10 * ( 10 ) 10 * ( 1 )	86 79 ( 79 ) 73 ( 7 )	78 * 75 * ( 80 ) 88 * ( 7 )	23 * 21 * ( 23 ) 26 * ( 3 )	
1250		248 * 213 * ( 222 ) 204 * ( 23 )	10 * 15 * ( 12 ) 10 * ( 3 )	44 46 ( 46 ) 47 ( 2 )	29 * 25 * ( 26 ) 24 * ( 3 )	11 * 8 * ( 8 ) 6 * ( 3 )	
2500		0 * 0 * ( 0 ) 0 * ( 0 )	/	5 8 ( 8 ) 12 ( 4 )	/	/	
5000 †		/	/	0 * 0 * ( 0 ) 0 * ( 0 )	/	/	
陽性対照 S9 mix (-)		名称	AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2	9-AA
		用量 (μg/プレート)	0.01	0.5	0.005	0.1	80
		(コロニー数/プレート)	770 678 ( 701 ) 655 ( 61 )	580 583 ( 573 ) 555 ( 15 )	911 958 ( 937 ) 942 ( 24 )	621 745 ( 689 ) 700 ( 63 )	375 385 ( 380 ) 380 ( 5 )
陽性対照 S9 mix (+)	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	
	用量 (μg/プレート)	1	2	2	0.5	2	
	(コロニー数/プレート)	1669 1440 ( 1513 ) 1431 ( 135 )	250 268 ( 255 ) 246 ( 12 )	848 850 ( 855 ) 866 ( 10 )	458 496 ( 473 ) 466 ( 20 )	222 259 ( 230 ) 209 ( 26 )	

(備考)

\*: 菌の生育阻害が認められた。

†: 沈殿物が認められた。

陰性対照: ジメチルスルホキシド (DMSO)

(平均値)

(±標準偏差)

AF-2: 2-(2-フルル)-3-(5-ニトロ-2-フルル)アクリルアミド, NaN<sub>3</sub>: アジ化ナトリウム, 9-AA: 9-アミノアクリジン塩酸塩, 2-AA: 2-アミノアントラセン

表 3 試験結果表 (本試験 2)

試験期間		2006年9月19日 ~ 2006年9月22日				
代謝活性化系の有無	被験物質用量 (µg/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	WP2uvrA/pKM101	TA98	TA1537
S9 mix (-)	陰性対照	110 102 ( 104 ) 100 ( 5 )	11 12 ( 12 ) 13 ( 1 )	68 71 ( 70 ) 70 ( 2 )	21 23 ( 22 ) 23 ( 1 )	15 9 ( 12 ) 11 ( 3 )
	39.1	117 105 ( 111 ) 110 ( 6 )	9 10 ( 10 ) 12 ( 2 )	/	26 19 ( 22 ) 21 ( 4 )	10 10 ( 10 ) 11 ( 1 )
	78.1	100 103 ( 104 ) 108 ( 4 )	11 8 ( 10 ) 11 ( 2 )	68 66 ( 66 ) 63 ( 3 )	23 22 ( 24 ) 28 ( 3 )	8 13 ( 10 ) 8 ( 3 )
	156	104 108 ( 105 ) 103 ( 3 )	12 8 ( 10 ) 9 ( 2 )	65 63 ( 66 ) 69 ( 3 )	33 33 ( 35 ) 39 ( 3 )	8 9 ( 9 ) 11 ( 2 )
	313	109 108 ( 109 ) 110 ( 1 )	11 9 ( 11 ) 12 ( 2 )	70 62 ( 66 ) 65 ( 4 )	24 35 ( 30 ) 31 ( 6 )	9 10 ( 11 ) 15 ( 3 )
	625	39 * 43 * ( 37 ) 28 * ( 8 )	6 * 5 * ( 6 ) 8 * ( 2 )	56 53 ( 54 ) 52 ( 2 )	6 * 2 * ( 5 ) 6 * ( 2 )	7 * 5 * ( 5 ) 3 * ( 2 )
	1250	17 * 11 * ( 14 ) 13 * ( 3 )	3 * 6 * ( 4 ) 4 * ( 2 )	36 40 ( 34 ) 27 ( 7 )	2 * 7 * ( 5 ) 5 * ( 3 )	6 * 3 * ( 4 ) 3 * ( 2 )
	2500	/	/	4 8 ( 6 ) 5 ( 2 )	/	/
	5000 †	/	/	0 * 0 * ( 0 ) 0 * ( 0 )	/	/
	S9 mix (+)	陰性対照	117 120 ( 115 ) 109 ( 6 )	13 10 ( 11 ) 11 ( 2 )	86 93 ( 87 ) 83 ( 5 )	28 35 ( 30 ) 28 ( 4 )
39.1		181 180 ( 183 ) 188 ( 4 )	10 15 ( 12 ) 11 ( 3 )	/	40 49 ( 44 ) 44 ( 5 )	24 15 ( 21 ) 23 ( 5 )
78.1		196 218 ( 213 ) 226 ( 16 )	13 15 ( 13 ) 11 ( 2 )	83 81 ( 85 ) 92 ( 6 )	43 47 ( 47 ) 51 ( 4 )	16 17 ( 19 ) 23 ( 4 )
156		238 236 ( 238 ) 241 ( 3 )	10 13 ( 13 ) 15 ( 3 )	90 92 ( 89 ) 84 ( 4 )	59 63 ( 58 ) 53 ( 5 )	25 23 ( 24 ) 24 ( 1 )
313		272 277 ( 275 ) 277 ( 3 )	11 11 ( 11 ) 12 ( 1 )	83 85 ( 83 ) 82 ( 2 )	74 65 ( 67 ) 61 ( 7 )	25 26 ( 25 ) 24 ( 1 )
625		224 * 227 * ( 221 ) 213 * ( 7 )	10 * 9 * ( 9 ) 8 * ( 1 )	74 65 ( 69 ) 67 ( 5 )	66 * 70 * ( 67 ) 65 * ( 3 )	18 * 8 * ( 15 ) 19 * ( 6 )
1250		221 * 217 * ( 213 ) 202 * ( 10 )	8 * 8 * ( 7 ) 6 * ( 1 )	47 31 ( 40 ) 43 ( 8 )	58 * 78 * ( 59 ) 41 * ( 19 )	8 * 3 * ( 6 ) 6 * ( 3 )
2500		0 * 0 * ( 0 ) 0 * ( 0 )	/	5 5 ( 5 ) 6 ( 1 )	/	/
5000 †		/	/	0 * 0 * ( 0 ) 0 * ( 0 )	/	/
陽性対照 S9 mix (-)		名称	AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2
	用量 (µg/プレート)	0.01	0.5	0.005	0.1	80
陽性対照 S9 mix (+)	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	用量 (µg/プレート)	1	2	2	0.5	2
(備考)	(コロニー数/プレート)	756 710 ( 735 ) 740 ( 23 )	543 514 ( 528 ) 527 ( 15 )	959 913 ( 949 ) 974 ( 32 )	923 984 ( 918 ) 847 ( 69 )	306 281 ( 323 ) 381 ( 52 )
		1572 1598 ( 1568 ) 1535 ( 32 )	297 235 ( 258 ) 243 ( 34 )	783 830 ( 806 ) 804 ( 24 )	469 397 ( 447 ) 476 ( 44 )	190 226 ( 205 ) 198 ( 19 )

(備考) \* : 菌の生育阻害が認められた。

† : 沈殿物が認められた。

陰性対照 : ジメチルスルホキシド (DMSO)

(平均値)

(±標準偏差)

AF-2: 2-(2-フルル)-3-(5-ニトロ-2-フルル)アクリルアミド, NaN<sub>3</sub>: アジ化ナトリウム, 9-AA: 9-アミノアクリジン塩酸塩, 2-AA: 2-アミノアントラセン

表 4 比活性表

	菌株名	-S9 mix		+S9 mix	
		比活性 * <sup>1</sup> ( revertants/mg)	用量 * <sup>2</sup> ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	比活性 * <sup>1</sup> ( revertants/mg)	用量 * <sup>2</sup> ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )
本試験 1	TA100	—	—	$4.44 \times 10^2$	313
	TA1535	—	—	—	—
	WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	—	—	—	—
	TA98	—	—	$1.18 \times 10^2$	313
	TA1537	—	—	—	—
本試験 2	TA100	—	—	$7.88 \times 10^2$	156
	TA1535	—	—	—	—
	WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	—	—	—	—
	TA98	—	—	$1.18 \times 10^2$	313
	TA1537	—	—	—	—

\*1 : 被験物質 1 mg あたりの誘発コロニー数

\*2 : 本試験 1, 本試験 2 のいずれも最大値の用量を採用した。

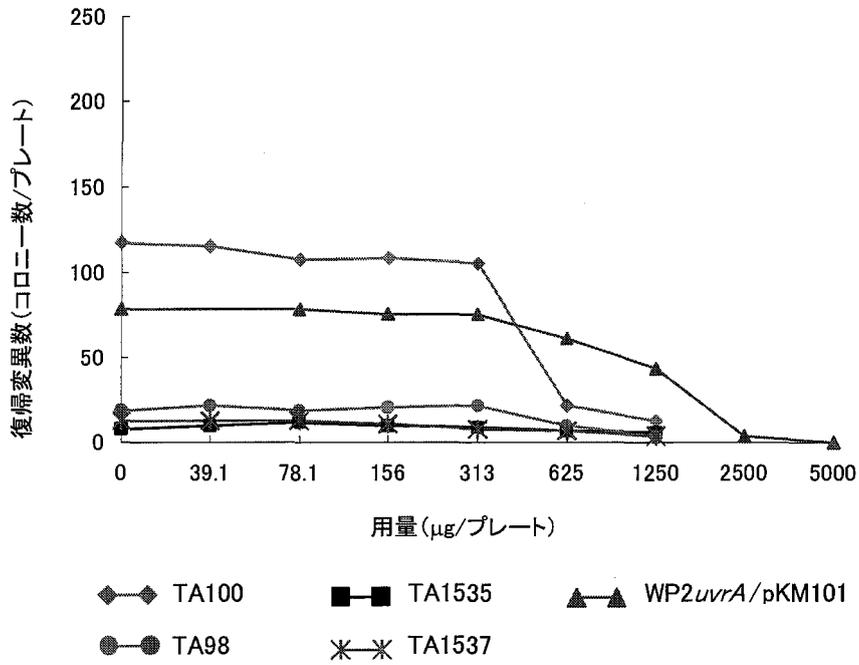


図 1-1 用量-反応曲線 (本試験 1; -S9 mix)

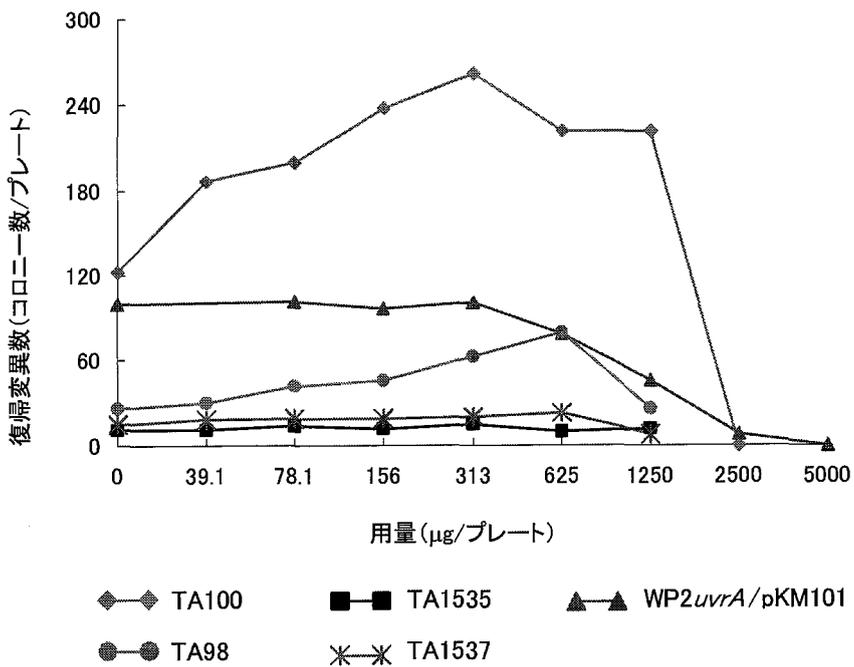


図 1-2 用量-反応曲線 (本試験 1; +S9 mix)

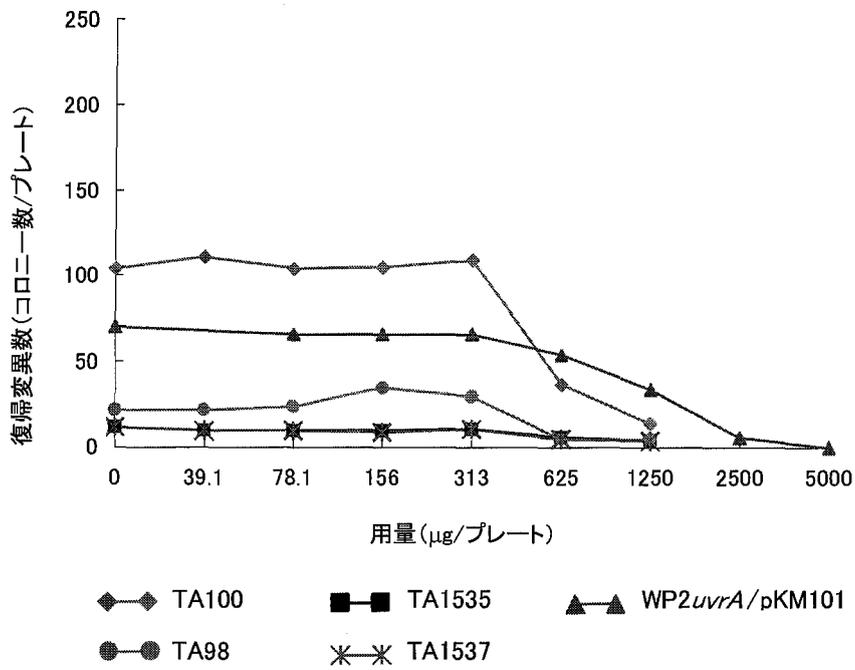


図 2-1 用量-反応曲線 (本試験 2; -S9 mix)

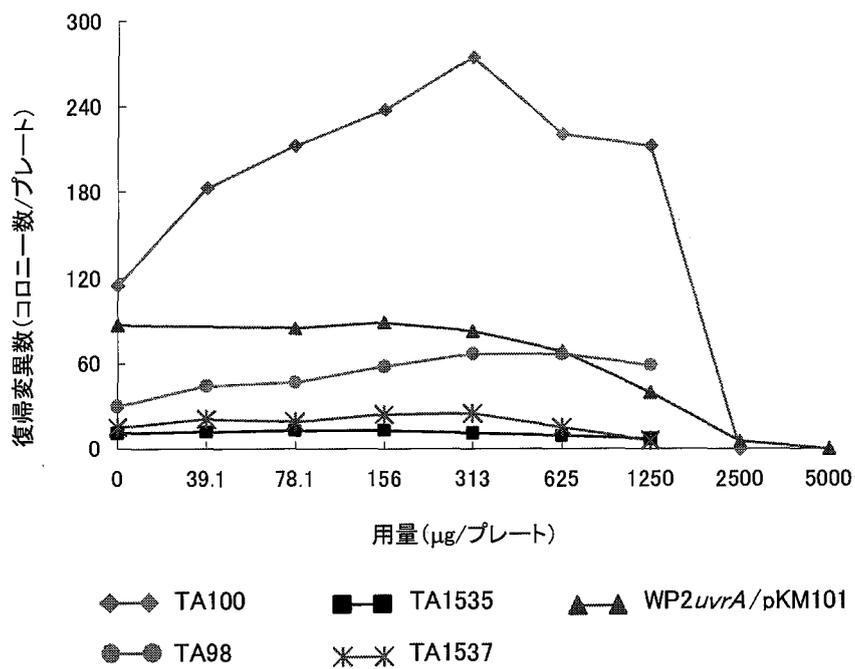


図 2-2 用量-反応曲線 (本試験 2; +S9 mix)