

最終報告書

o-ジクロロベンゼンの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：4189（115-107）

平成12年7月13日

試験委託者
厚生省 生活衛生局

財団法人
食品農医薬品安全性評価センター

目次

1. 要約.....	2
2. 表題.....	3
3. 試験目的.....	3

11. 被験物質.....	5
12. 試験材料および方法.....	7
13. 試験結果.....	14
14. 考察および結論.....	15
15. 参考文献.....	16

Figures		F-1～5
Figure 1	Bacterial reversion test of o-Dichlorobenzene in strain TA100	F-1
Figure 2	Bacterial reversion test of o-Dichlorobenzene in strain TA1535	F-2
Figure 3	Bacterial reversion test of o-Dichlorobenzene in strain WP2 $uvrA$	F-3
Figure 4	Bacterial reversion test of o-Dichlorobenzene in strain TA98	F-4
Figure 5	Bacterial reversion test of o-Dichlorobenzene in strain TA1537	F-5
Tables		T-1～4
Table 1	Results of the bacterial reversion test of o-Dichlorobenzene (1st trial) [direct method : -S9]	T-1
Table 2	Results of the bacterial reversion test of o-Dichlorobenzene (1st trial) [activation method : +S9]	T-2
Table 3	Results of the bacterial reversion test of o-Dichlorobenzene (2nd trial) [direct method : -S9]	T-3
Table 4	Results of the bacterial reversion test of o-Dichlorobenzene (2nd trial) [activation method : +S9]	T-4

1. 要約

本試験条件下において、*o*-ジクロロベンゼンには遺伝子突然変異を誘起する作用がないものと判断した。

o-ジクロロベンゼンの変異原性について、遺伝子突然変異誘発性を検討するため、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100, TA98, TA1535 および TA1537 株ならびに大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2 *uvrA* 株を用いた復帰突然変異試験を行った。

その結果、*o*-ジクロロベンゼン処理では 2.44~313 μg /プレート のいずれの試験用量においても、ラット肝マイクロソーム (S9) 添加の有無にかかわらず、陰性対照に比べ復帰突然変異コロニー数の明確な増加は認められなかった。

一方、直接法および代謝活性化法での陽性対照物質は、それぞれの試験菌株に対し明確な突然変異誘発作用を示した。

2. 表題

o-ジクロロベンゼンの細菌を用いる復帰突然変異試験

3. 試験目的

被験物質の *in vitro* における遺伝子突然変異誘発性を検討した。

11. 被験物質**11.1. 被験物質名**

o-ジクロロベンゼン
(o-Dichlorobenzene)

11.2. ロット番号**11.3. 純度**

99.7 wt%

11.4. 保管条件

直射日光を避け密封, 室温保管

11.5. 別名

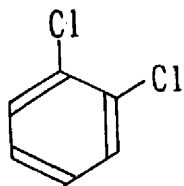
1,2-ジクロロベンゼン

11.6. 化学名

1,2-ジクロロベンゼン

11.7. CAS 番号

95-50-1

11.8. 構造式または示性式**11.9. 分子量**

146.94

11.10. 常温における性状

無色透明液体

11.11. 融点/沸点

融点: -17°C

沸点: 180°C

11.12. 溶媒に対する溶解度等

20℃の水 100 mL に 0.013 g 溶解する.

ほとんどの有機溶剤に可溶.

11.13. 安定性

この物質を強く加熱すると空気と空気より重い爆発性の混合気を生じる. 高温で分解すると腐食性の塩化水素が生じる.

11.14. 蒸気圧

0.13 KPa (20℃)

11.15. 取り扱い上の注意

保護具を着用し, 目, 皮膚, 粘膜等へ直接触れないようにした. 空気と混合して爆発の危険性があるので, 蒸気漏れには充分注意した.

取り扱い後は水または石鹼を用いて手洗い, 洗顔を行った. 揮発性物質の可能性があるので, 秤量, 希釈操作ならび処理の際には十分に配慮した.

11.16. 残余被験物質料の処理

被験物質の残余は, 染色体異常試験 (試験番号 4190) 終了後, 被験物質提供元に返却する.

12. 試験材料および方法

12.1. 試験菌株

細菌を用いる復帰突然変異試験において広く使用されていることから、試験菌株として次の5種類の菌株を使用した。

- | | | | |
|----|---------|-----------------|---------------------|
| a. | ネズミチフス菌 | TA100 | (ヒスチジン要求性の塩基対置換型) |
| b. | ネズミチフス菌 | TA98 | (ヒスチジン要求性のフレームシフト型) |
| c. | ネズミチフス菌 | TA1535 | (ヒスチジン要求性の塩基対置換型) |
| d. | ネズミチフス菌 | TA1537 | (ヒスチジン要求性のフレームシフト型) |
| e. | 大腸菌 | WP2 <i>uvrA</i> | (トリプトファン要求性の塩基対置換型) |

ネズミチフス菌は昭和58年9月9日にカリフォルニア大学から、また、大腸菌については昭和58年3月16日に国立医薬品食品衛生研究所から分与を受けた。

平成11年1月5日ならびに平成11年3月31日に菌株の特性検査を実施し、規定の特性を保持している菌株を試験に使用した。各菌株の菌懸濁液にジメチルスルホキシド (DMSO:GC 用; Merck KGaA; 純度 99.7%以上, Lot No. K24605778 803) を容量比 80:7 の割合で添加した後、凍結保存用チューブに 0.2 mL ずつ分注した。これを液体窒素を用いて凍結した後、超低温フリーザー (MDF-390AT; 三洋電機メディカシステム株式会社) に保存 (-80°C) した。

12.2. 培地の調製

12.2.1. 最少グルコース寒天平板培地（プレート）

テスメディア AN 培地（オリエンタル酵母工業株式会社：平成 11 年 1 月 19 日製造，Lot No. AN040AO）を試験に使用した。本プレートは，Vogel-Bonner 最少培地 E を含む下記の組成の溶液 30 mL を無菌的にシャーレに分注したものである。

硫酸マグネシウム・7水塩	0.2	g
クエン酸・1水塩	2	g
リン酸二カリウム・無水塩	10	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
精製水	200	mL
<hr/>		
グルコース	20	g
精製水	100	mL
<hr/>		
寒天 (No.1 ; Oxoid Limited ; Lot No. 802436)	15	g
精製水	700	mL

12.2.2. トップアガー（軟寒天）

塩化ナトリウム 0.5% を含む 0.6% 寒天 (Bacto-agar : Difco Laboratories ; Lot No. 120535JD) 水溶液をオートクレーブで滅菌した後，ネズミチフス菌を用いる試験の場合，0.5 mmol/L L-ヒスチジン（関東化学株式会社；Lot No. 412E1389）－0.5 mmol/L D-ビオチン（関東化学株式会社；Lot No. 811S2086）水溶液を寒天溶液 10 容量に対し 1 容量加え，大腸菌を用いる試験の場合，0.5 mmol/L L-トリプトファン（関東化学株式会社；Lot No. 608E1385）水溶液を同じく 1 容量加えた。

12.3. 試験菌株の前培養

内容量 200 mL のバツフル付三角フラスコに 2.5% ニュートリエントブロス (Nutrient Broth No.2 : Oxoid Limited ; Lot No. 028 59365) 培養液を 25 mL 分注し、これに融解した菌懸濁液を 50 μ L 接種した。培養開始までの間冷却ユニット (ECS-1 : 東京理化器械株式会社) を用いて 4°C に保存し、その後ウォーターバスシェーカー (MM-10 : タイテック株式会社) を用い、37°C で 8 時間振盪 (100 回/分) 培養した。試験毎に菌株の培養を実施し、菌懸濁液は培養終了後直ちに使用した。

ATP フォトメーター (ルミテスター K-100 : キッコーマン株式会社) を用いて計測した生菌数を以下に示した。

試験	試験生菌数 ($\times 10^9$ / mL)				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
本試験 1 回目	3.57	3.49	3.92	3.00	2.07
本試験 2 回目	3.40	3.10	3.50	3.01	1.90

12.4. S9 mix

製造後 6 ヶ月以内の S9 mix (キッコーマン株式会社 ; Lot No. FSM-397) を試験に使用した。

12.4.1. S9 の調製方法

S9 調製の際の動物種、性、臓器、誘導物質ならびに誘導方法を以下に示した。

- | | |
|-----------------------|--|
| a. ロット番号 | RAA-397 |
| b. 調製日 | 平成 11 年 2 月 5 日 (誘導物質投与開始後 5 日目) |
| c. 使用動物 | ラット : Sprague-Dawley 系 |
| d. 性/週齢 | 雄/7 週齢 |
| e. 体重 | 192~237g |
| f. 臓器 | 肝臓 |
| g. 誘導物質 | Phenobarbital(PB)および 5,6-Benzoflavone(BF) |
| h. 投与量
および
投与回数 | PB : 30 mg/kg 1 回 (1 日目),
60 mg/kg 3 回 (2~4 日目)
BF : 80 mg/kg 1 回 (3 日目) |
| i. 投与方法 | 腹腔内投与 |
| j. 蛋白含量 | 25.4 mg/mL |

12.4.2. S9 mix の組成

S9 mix 1 mL 中の量を以下に示す.

S9	0.1	mL
MgCl ₂	8	μmol
KCl	33	μmol
G-6-P	5	μmol
NADPH	4	μmol
NADH	4	μmol
Na-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100	μmol

12.5. 被験物質液の調製

本被験物質は DMSO に易溶であり、かつ、溶液中で安定であったことから被験物質を DMSO (Lot No. K24605778 803) に溶解させ調製原液とした。この調製原液を使用溶媒を用いて所定濃度に希釈した後、直ちに処理を行った。

なお、本被験物質情報から揮発性が疑われたため、調製には蓋付きの試験管を用いた。

モレキュラーシーブを用いて脱水処理を行った DMSO を被験物質の調製に使用した。

12.6. 対照群

12.6.1. 陰性 (溶媒) 対照

使用溶媒のみで試験した。

12.6.2. 陽性対照

陽性対照として以下の物質を使用した。各陽性対照物質は DMSO (Lot No. K24605778 803) を用いて溶解し、500 あるいは 1000 μL ずつ小分けした後、凍結保存 (-20℃) したものを試験に使用した。

AF-2	2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド (和光純薬工業株式会社; 純度 98.0~102.0%; Lot No. PAN0050)
NaN ₃	アジ化ナトリウム (和光純薬工業株式会社; 純度 99.0%以上; Lot No. TPR1596)
9-AA	9-アミノアクリジン塩酸塩 (Aldrich Chemical Co., Inc.; 純度 98.0%; Lot No. AQ08326HN)
2-AA	2-アミノアントラセン (和光純薬工業株式会社; 純度 90.0%以上; Lot No. DLH6052)

《直接法》

a.	AF-2	0.01 $\mu\text{g}/\text{プレート}$	(ネズミチフス菌：TA100)
b.	AF-2	0.1 $\mu\text{g}/\text{プレート}$	(ネズミチフス菌：TA98)
c.	NaN_3	0.5 $\mu\text{g}/\text{プレート}$	(ネズミチフス菌：TA1535)
d.	9-AA	80 $\mu\text{g}/\text{プレート}$	(ネズミチフス菌：TA1537)
e.	AF-2	0.01 $\mu\text{g}/\text{プレート}$	(大腸菌：WP2 <i>uvrA</i>)

《代謝活性化法》

a.	2-AA	1.0 $\mu\text{g}/\text{プレート}$	(ネズミチフス菌：TA100)
b.	2-AA	0.5 $\mu\text{g}/\text{プレート}$	(ネズミチフス菌：TA98)
c.	2-AA	2.0 $\mu\text{g}/\text{プレート}$	(ネズミチフス菌：TA1535)
d.	2-AA	2.0 $\mu\text{g}/\text{プレート}$	(ネズミチフス菌：TA1537)
e.	2-AA	10.0 $\mu\text{g}/\text{プレート}$	(大腸菌：WP2 <i>uvrA</i>)

なお、これらの試験用量は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」に準じて設定した。

12.6.3. 無菌試験

被験物質液（調製原液）ならびに S9 mix について無菌試験を実施した。すなわち、調製原液 100 μL あるいは S9 mix 500 μL にトッパアガーをそれぞれ 2 mL 添加し、プレート上に注いだ。37°C の条件で 48 時間培養した後、雑菌汚染の有無を確認した。

調製原液および S9 mix のいずれについても 2 枚のプレートを用いて無菌試験を実施した。

o-ジクロロベンゼン調製原液ならびに S9mix の無菌試験において、菌の増殖は認められなかった。

12.7. 復帰突然変異試験

12.7.1. 試験用量

1枚のプレートを用いて実施した予備的な試験の結果を以下に示す。

試験用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9 Mix	復帰突然変異コロニー数				
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
0	-	111	12	22	15	7
19.5	-	117	12	29	24	3
78.1	-	95*	20	28	26	6
313	-	51*	16*	5*	15*	4*
1250	-	38*	12*	1*	6*	2*
0	+	113	11	21	18	7
19.5	+	149	14	14	17	9
78.1	+	159	18	26	29	6
313	+	71*	11*	16*	11*	8*
1250	+	0*	0*	10*	0*	0*

*：生育阻害作用

直接法の TA100 の 78.1 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上、その他の菌株および代謝活性化法の全菌株については 313 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上において試験菌株に対する生育阻害作用が観察された。しかしながら、いずれの試験菌株とも復帰突然変異コロニー数の明確な増加傾向は認められなかった。本結果を基に、本試験においては以下に示した用量を最高用量とし、それぞれ6用量（公比2）を設定した。

復帰突然変異試験で用量当たり3枚のプレートを用いた。

試験系	最高用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
直接法	78.1	313	313	313	313
代謝活性化法	313	313	313	313	313

12.7.2. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養時間

蓋付き試験管に、使用溶媒、被験物質液あるいは陽性対照物質溶液を 100 μ L、次いで直接法の場合、0.1 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液 (pH 7.4) を 500 μ L、代謝活性化法の場合、S9 mix を 500 μ L 分注した。さらに前培養した試験菌株の懸濁液 100 μ L を加えた後、振盪恒温器 (M-100^N:タイテック株式会社) を用いて 37℃ で 20 分間振盪 (プレインキュベーション) した。振盪終了後、トッペアガーを 2 mL 添加し、内容物を混合した。その後、混合液をプレート上に注ぎ一様に広げた。各プレートをビニールテープで密封した後、恒温器を用いて 37℃ の条件で 48 時間各プレートを培養した。再現性を確認するため、本試験を独立して 2 回実施した。

12.7.3. コロニー数計測

被験物質の生育阻害作用を確認するため、プレート上の試験菌株の生育状態について実体顕微鏡 ($\times 60$) を用いて観察 (背景菌の観察) した。さらに被験物質の沈殿状態を肉眼で観察した。次いで、復帰突然変異により生じたコロニーを計測した。計測に際しては、コロニーアナライザー (CA-11; システムサイエンス株式会社) を用い、面積補正ならびに数え落とし補正を実施してコロニー数を算出した。

12.8. 結果の解析

復帰突然変異コロニー数が溶媒対照のほぼ 2 倍以上の増加を示し、かつ再現性あるいは被験物質の用量に依存性が認められた場合に陽性と判定した。統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

13. 試験結果

13.1. 試験結果 (1回目)

結果を Figure 1~5 および Table 1, 2 に示した。

o-ジクロロベンゼン処理群の場合、直接法、代謝活性化法とも全ての菌株の高用量群において試験菌株に対する生育阻害作用が観察された。しかしながら、復帰突然変異コロニー数は、各試験菌株のいずれの用量においても陰性対照とほぼ同等の値であり、明確な増加傾向は認められなかった。

一方、陽性対照物質はそれぞれの菌株において、陰性対照の2倍以上の復帰突然変異コロニーを誘発した。

なお、コロニー計数時に析出等の特筆すべき変化は観察されなかった。

13.2. 試験結果 (2回目)

試験結果を Figure 1~5 および Table 3, 4 に示した。

被験物質処理群の場合、直接法、代謝活性化法とも全ての菌株の高用量群において試験菌株に対する生育阻害作用が観察されたが、いずれの菌株においても復帰突然変異コロニー数の明確な増加傾向は認められなかった。

一方、陽性対照物質は各試験菌株に対し、復帰突然変異を顕著に誘発した。

なお、コロニー計数時に析出等の特筆すべき変化は観察されなかった。

以上、2回繰り返し実施した本試験において、直接法および代謝活性化法の両試験系とも再現性が確認された。

14. 考察および結論

o-ジクロロベンゼンの変異原性，すなわち遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため，微生物（ネズミチフス菌・大腸菌）を用いたプレインキュベーション法による復帰突然変異試験を実施した。

最高用量として試験菌株に生育阻害を示す用量まで検討した。その結果，o-ジクロロベンゼン処理群では直接法および代謝活性化法のいずれにおいても，陰性対照と比較し復帰突然変異コロニー数の明確な増加は認められなかった。また，本被験物質（o-ジクロロベンゼン）についてはすでに Ames 試験で陰性¹⁾との報告がある。一方，ヒト鼻粘膜細胞に染色体異常を誘発する²⁾との報告がある。類縁体である p-ジクロロベンゼンについては Ames 試験で陰性³⁾，染色体異常試験で陰性⁴⁾，ヒトリンパ球に対して姉妹染色体交換を誘発する⁵⁾との報告があるが，m-ジクロロベンゼンの変異原性に関する報告はなかった。

なお，陰性対照群あるいは陽性対照群でのコロニー数はいずれも当施設での背景データの範囲内であり，本試験は適切な条件でなされたと判断された。

以上の試験結果から，本試験条件下において o-ジクロロベンゼンの微生物に対する遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

15. 参考文献

- 1) 石館基：微生物を用いる変異原性試験データ集, life-science Information center, 1991.
- 2) Zapata-Gayon C., Zapata-Gayon N. and Gonzalez-Angulo A. : Arch. Environ. Health 37(4), 231-235, 1982.
- 3) Loeser E and Litchfield MH : Food Chem. Toxicol.21(6), 825-832, 1983.
- 4) 石館基：染色体異常試験データ集, life-science Information center, 1987.
- 5) Carbonell E., Puig M., Xamena N., Creus A. and Marcos R. : Mutat. Res. 263(1), 57-59, 1991.

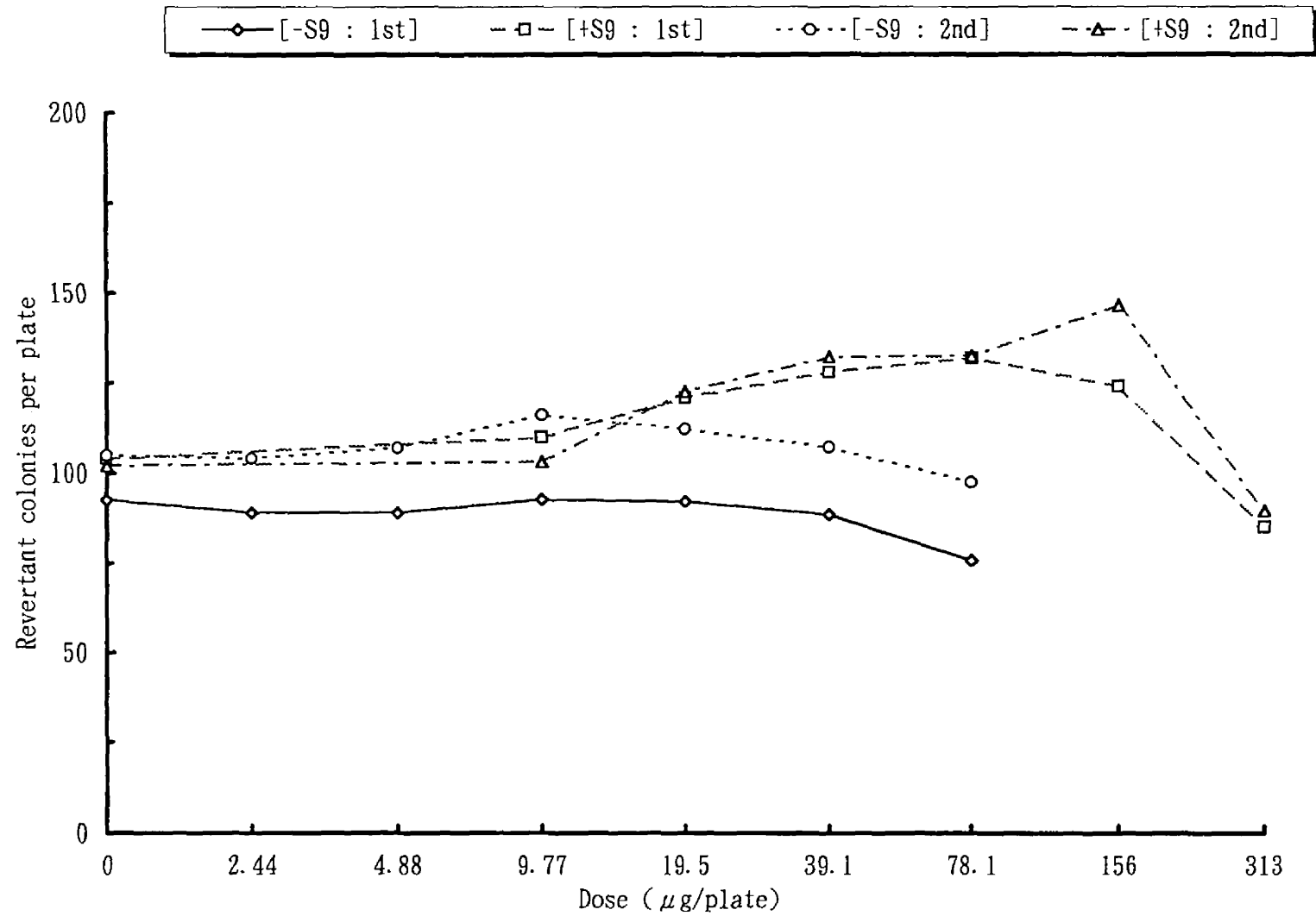


Figure 1. Bacterial reversion test of o-Dichlorobenzene in strain TA100

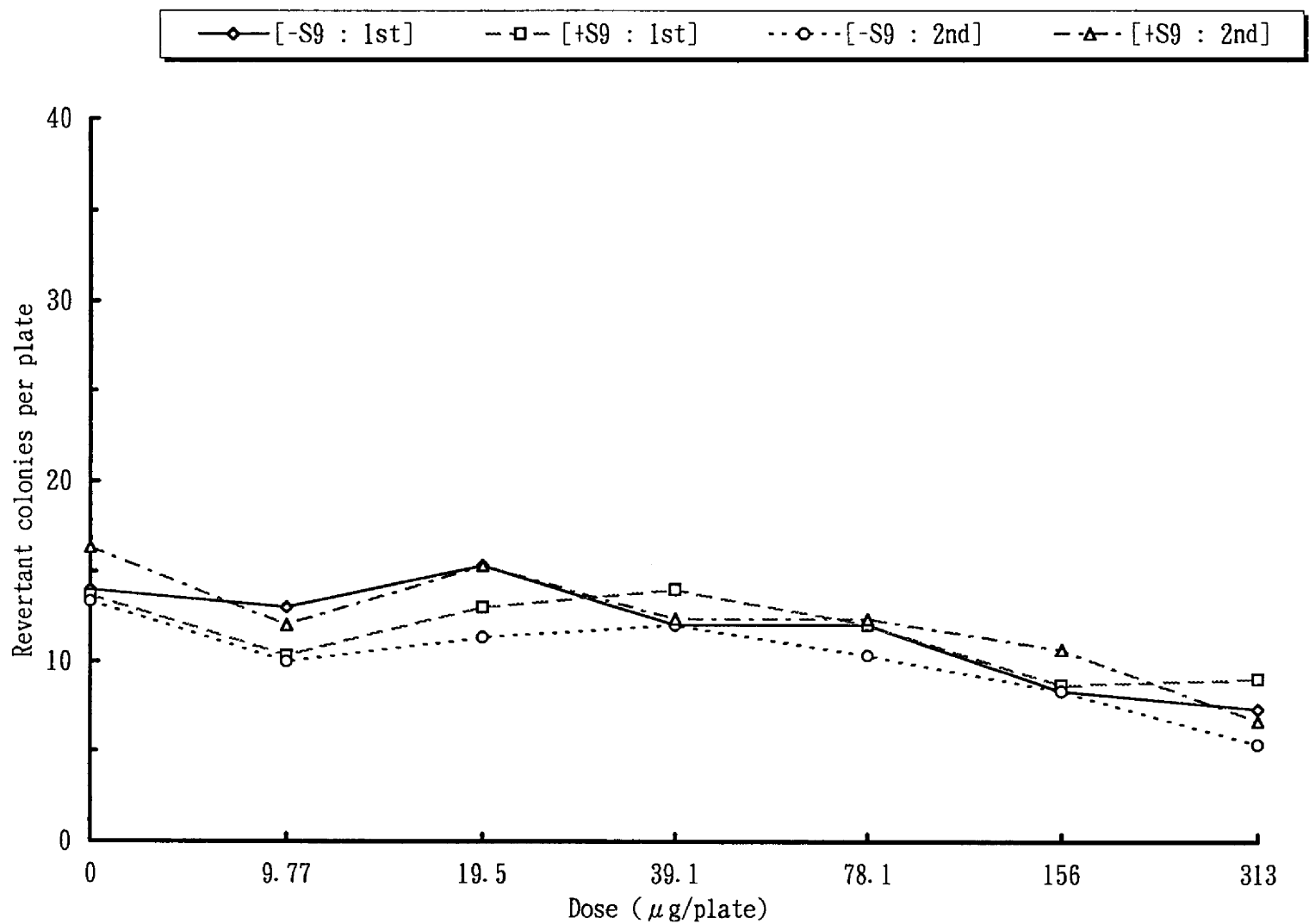


Figure 2. Bacterial reversion test of o-Dichlorobenzene in strain TA1535

F-3

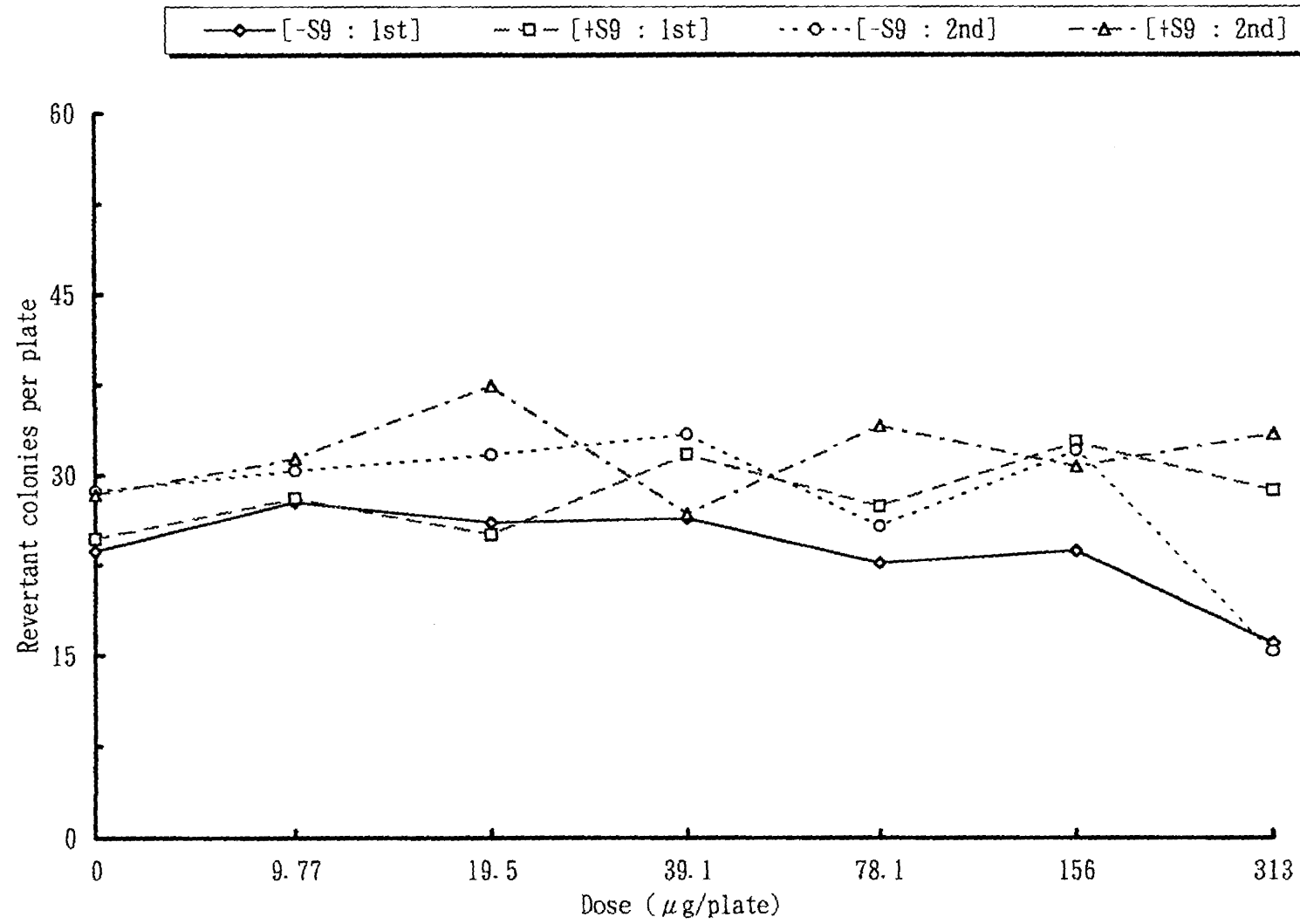


Figure 3. Bacterial reversion test of o-Dichlorobenzene in strain WP2uvrA

F-4

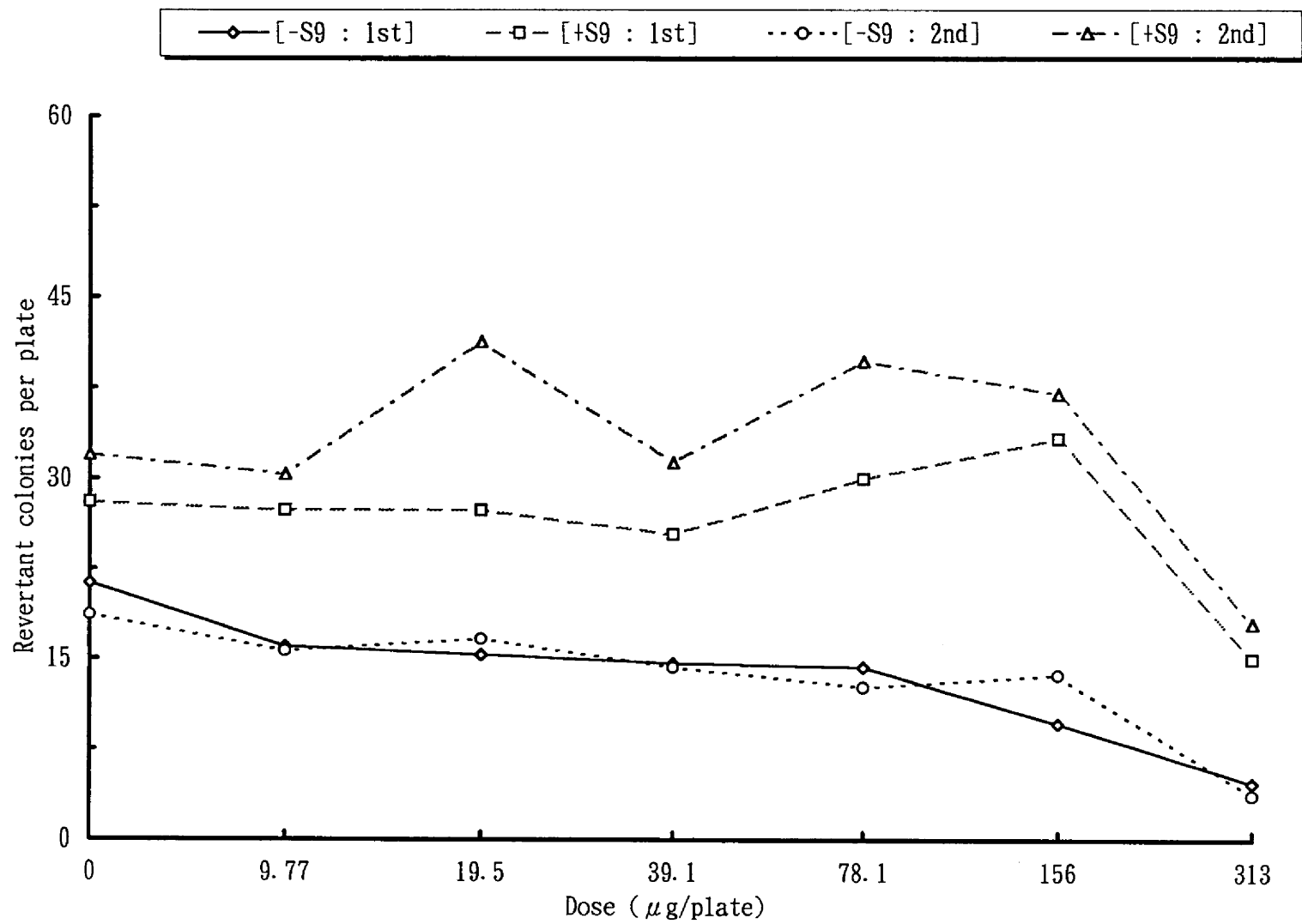


Figure 4. Bacterial reversion test of o-Dichlorobenzene in strain TA98

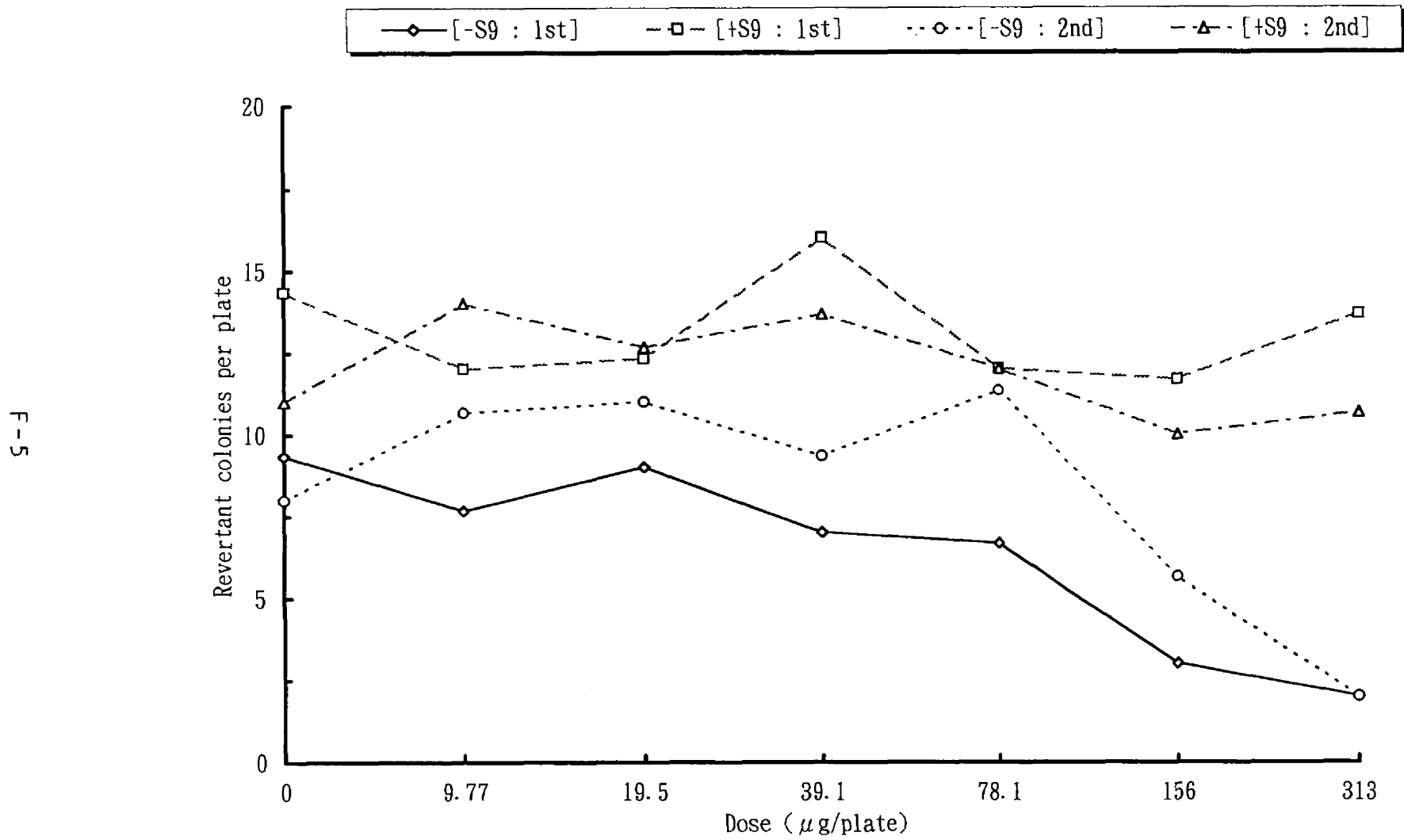


Figure 5. Bacterial reversion test of o-Dichlorobenzene in strain TA1537

Table 1. Results of the bacterial reversion test of o-Dichlorobenzene (1st trial)
[direct method : -S9]

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
Test substance	0	99	88	91	13	15	14	24	23	24	17	24	23	9	11	8
		[93 \pm	6]	[14 \pm	1]	[24 \pm	1]	[21 \pm	4]	[9 \pm	2]					
	2.44	82	90	95												
		[89 \pm	7]													
	4.88	100	86	81												
		[89 \pm	10]													
	9.77	100	83	95	17	11	11	28	22	33	14	20	14	10	7	6
		[93 \pm	9]	[13 \pm	3]	[28 \pm	6]	[16 \pm	3]	[8 \pm	2]					
	19.5	92	85	99	13	19	14	31	23	24	17	16	13	10	9	8
	[92 \pm	7]	[15 \pm	3]	[26 \pm	4]	[15 \pm	2]	[9 \pm	1]						
39.1	85	95	85	12	14	10	25	25	29	13	18	13	7	7	7	
	[88 \pm	6]	[12 \pm	2]	[26 \pm	2]	[15 \pm	3]	[7 \pm	0]						
78.1	83 *	72 *	72 *	11	12	13	21	22	25	17	13	13	6	6	8	
	[76 \pm	6]	[12 \pm	1]	[23 \pm	2]	[14 \pm	2]	[7 \pm	1]						
156				10 *	6 *	9 *	25	23	23	11 *	11 *	7 *	3 *	3 *	3 *	
				[8 \pm	2]	[24 \pm	1]	[10 \pm	2]	[3 \pm	0]					
313				8 *	7 *	7 *	15 *	20 *	13 *	6 *	2 *	6 *	1 *	3 *	2 *	
				[7 \pm	1]	[16 \pm	4]	[5 \pm	2]	[2 \pm	1]					
Positive control		548	541	559 ^{a)}	455	473	469 ^{b)}	134	161	153 ^{a)}	644	640	655 ^{c)}	609	599	601 ^{d)}
		[549 \pm	9]	[466 \pm	9]	[149 \pm	14]	[646 \pm	8]	[603 \pm	5]					

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 μ g/plate b): NaN₃; Sodium azide, 0.5 μ g/plate

c): AF-2, 0.1 μ g/plate d): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 μ g/plate

* : Growth inhibition was observed

Table 2. Results of the bacterial reversion test of o-Dichlorobenzene (1st trial)
[activation method : +S9]

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
Test substance	0	107	102	103	16	14	11	26	23	25	29	27	28	13	14	16
		[104 \pm		3]	[14 \pm		3]	[25 \pm		2]	[28 \pm		1]	[14 \pm		2]
	9.77	111	108	110	10	11	10	26	31	27	24	28	30	10	14	12
		[110 \pm		2]	[10 \pm		1]	[28 \pm		3]	[27 \pm		3]	[12 \pm		2]
	19.5	112	117	133	14	14	11	22	26	27	28	27	27	11	16	10
		[121 \pm		11]	[13 \pm		2]	[25 \pm		3]	[27 \pm		1]	[12 \pm		3]
	39.1	127	128	128	16	10	16	33	29	33	24	25	27	17	14	17
	[128 \pm		1]	[14 \pm		3]	[32 \pm		2]	[25 \pm		2]	[16 \pm		2]	
78.1	124	135	136	14	10	12	32	23	27	29	31	30	10	11	15	
	[132 \pm		7]	[12 \pm		2]	[27 \pm		5]	[30 \pm		1]	[12 \pm		3]	
156	114 *	119 *	138 *	10 *	7 *	9 *	28	35	35	33 *	33 *	34 *	15 *	8 *	12 *	
	[124 \pm		13]	[9 \pm		2]	[33 \pm		4]	[33 \pm		1]	[12 \pm		4]	
313	74 *	90 *	91 *	7 *	10 *	10 *	30 *	28 *	28 *	14 *	16 *	15 *	17 *	11 *	13 *	
	[85 \pm		10]	[9 \pm		2]	[29 \pm		1]	[15 \pm		1]	[14 \pm		3]	
Positive control		775	806	840 ^{a)}	361	392	364 ^{b)}	813	833	816 ^{c)}	489	467	403 ^{d)}	179	181	173 ^{b)}
		[807 \pm		33]	[372 \pm		17]	[821 \pm		11]	[453 \pm		45]	[178 \pm		4]

a) : 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 μ g/plate b) : 2-AA, 2 μ g/plate c) : 2-AA, 10 μ g/plate d) : 2-AA, 0.5 μ g/plate

* : Growth inhibition was observed

Table 3. Results of the bacterial reversion test of o-Dichlorobenzene (2nd trial)
[direct method : -S9]

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]															
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537			
Test substance	0	104	103	108	13	17	10	30	31	25	21	17	18	8	9	7	
		[105 \pm	3]	[13 \pm	4]	[29 \pm	3]	[19 \pm	2]	[8 \pm	1]						
	2.44	114	95	103													
		[104 \pm	10]														
	4.88	91	113	117													
		[107 \pm	14]														
	9.77	123	108	117	8	10	12	28	31	32	14	16	17	11	13	8	
		[116 \pm	8]	[10 \pm	2]	[30 \pm	2]	[16 \pm	2]	[11 \pm	3]						
	19.5	132	88	116	11	12	11	33	30	32	17	18	15	11	11	11	
	[112 \pm	22]	[11 \pm	1]	[32 \pm	2]	[17 \pm	2]	[11 \pm	0]							
39.1	86	123	112	8	14	14	37	31	32	14	14	15	9	10	9		
	[107 \pm	19]	[12 \pm	3]	[33 \pm	3]	[14 \pm	1]	[9 \pm	1]							
78.1	103 *	92 *	97 *	10	9	12	25	26	26	11	14	13	10	11	13		
	[97 \pm	6]	[10 \pm	2]	[26 \pm	1]	[13 \pm	2]	[11 \pm	2]							
156				8 *	8 *	9 *	30 *	35 *	31 *	17 *	12 *	12 *	6 *	5 *	6 *		
				[8 \pm	1]	[32 \pm	3]	[14 \pm	3]	[6 \pm	1]						
313				5 *	8 *	3 *	17 *	15 *	14 *	1 *	5 *	5 *	1 *	3 *	2 *		
				[5 \pm	3]	[15 \pm	2]	[4 \pm	2]	[2 \pm	1]						
Positive control		600	554	590 ^{a)}	434	488	449 ^{b)}	158	153	154 ^{a)}	540	544	541 ^{c)}	593	592	579 ^{d)}	
		[581 \pm	24]	[457 \pm	28]	[155 \pm	3]	[542 \pm	2]	[588 \pm	8]						

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 μ g/plate b): NaN₃; Sodium azide, 0.5 μ g/plate

c): AF-2, 0.1 μ g/plate d): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 μ g/plate

* : Growth inhibition was observed

Table 4. Results of the bacterial reversion test of o-Dichlorobenzene (2nd trial)
[activation method : +S9]

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
Test substance	0	108	98	100	14	17	18	28	29	28	32	31	33	11	10	12
		[102 \pm	5]	[16 \pm	2]	[28 \pm	1]	[32 \pm	1]	[11 \pm	1]					
	9.77	100	118	91	10	14	12	33	25	36	33	30	28	15	13	14
		[103 \pm	14]	[12 \pm	2]	[31 \pm	6]	[30 \pm	3]	[14 \pm	1]					
	19.5	115	134	118	13	15	18	42	30	40	39	43	42	11	14	13
		[122 \pm	10]	[15 \pm	3]	[37 \pm	6]	[41 \pm	2]	[13 \pm	2]					
	39.1	147	137	112	12	13	12	23	28	29	30	35	29	14	14	13
	[132 \pm	18]	[12 \pm	1]	[27 \pm	3]	[31 \pm	3]	[14 \pm	1]						
78.1	123	136	138	15	10	12	32	38	32	39	36	44	13	13	10	
	[132 \pm	8]	[12 \pm	3]	[34 \pm	3]	[40 \pm	4]	[12 \pm	2]						
156	152 *	155 *	132 *	8 *	13 *	11 *	29	34	29	38 *	40 *	33 *	11 *	10 *	9 *	
	[146 \pm	13]	[11 \pm	3]	[31 \pm	3]	[37 \pm	4]	[10 \pm	1]						
313	115 *	74 *	79 *	8 *	7 *	5 *	36 *	32 *	32 *	17 *	19 *	18 *	13 *	10 *	9 *	
	[89 \pm	22]	[7 \pm	2]	[33 \pm	2]	[18 \pm	1]	[11 \pm	2]						
Positive control	790	779	783 ^{a)}	373	395	382 ^{b)}	756	816	828 ^{c)}	502	499	480 ^{d)}	162	168	164 ^{b)}	
	[784 \pm	6]	[383 \pm	11]	[800 \pm	39]	[494 \pm	12]	[165 \pm	3]						

a) : 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 μ g/plate b) : 2-AA, 2 μ g/plate c) : 2-AA, 10 μ g/plate d) : 2-AA, 0.5 μ g/plate

* : Growth inhibition was observed