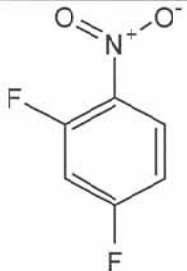


微生物を用いる変異原性試験結果報告書

1 一般的事項

化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	2,4-ジフルオロニトロベンゼン		
別 名	—		
構造式又は示性式			
試験に供した 化学物質の純度	99.8%	試験に供した 化学物質の Lot No.	6F10H-FC
不純物の名称及び 含有率(濃度)	—		
C A S 番 号	446-35-5	蒸 気 圧	—
分 子 量	159.09	分 配 係 数 (1-オクタノール/水分配係数)	—
融 点	9°C (凝固点)		
沸 点	207°C	常温における性状	薄い黄色～赤みの黄色の 液体
安 定 性	水：— 光：— 熱：—		
溶媒に対する溶解度等	溶 媒	溶 解 度	溶媒中の安定性
	水	難溶[50mg/ml 未満]*	—
	DMSO	溶解[100mg/ml 以上]*	—

*日本バイオアッセイ研究センターの試験による。

2 試験に用いた菌株

菌 株 名	入 手 先	入 手 年 月 日
TA100	東京大学医科学研究所癌生物学研究部	1985年 6月 21日
TA1535	同 上	1988年 5月 16日
TA98	同 上	1988年 5月 16日
TA1537	同 上	1988年 5月 16日
WP2 <i>uvrA</i> / pKM101	同 上	1983年 6月 29日

3 S9 mix

(1) S9の入手方法等

自 製 ・ 購 入 の 別	1. 自 製 ②. 購 入 (製造元: キッコーマンバイオケミファ株式会社)
製 造 年 月 日	2014年 3月 20日 製造
購入の場合のLot No.	RAA-20140320
保 存 温 度	-80℃ (保存機器名 三洋電機株式会社 MDF-392AT)

(2) S9の調製方法

使 用 動 物		誘 導 物 質	
種・系統	ラット・ Sprague-Dawley (Slc:SD)	名 称	フェノバルビタール (PB) 及び 5,6-ベンゾフラボン (BF)
性	雄		
週 齢	7 週	投 与 方 法	腹 腔 内 投 与
体 重	179~229 g	投与期間及び投与量 (g/kg 体重)	1日目(投与開始日) : PB 0.03 2日目~4日目 : PB 0.06 3日目 : BF 0.08

(3) S9 mixの組成

成 分	S9 mix 1 ml 中の量	成 分	S9 mix 1 ml 中の量
S9	0.1 ml	NADPH	4 μ mol
MgCl ₂	8 μ mol	NADH	4 μ mol
KCl	33 μ mol	Na-リン酸緩衝液	100 μ mol
グルコース-6-リン酸	5 μ mol	その他 (-)	-

4 被験物質溶液の調製

使用溶媒	名 称	製 造 元	Lot No.	グ レ ード	純 度 (%)
	ジメチルスルホキシド (DMSO)	SIGMA-ALDRICH Co.	SHBB367 1V	anhydrous	≥99.9
溶媒選択の理由	被験物質の溶解度は、水に 50 mg/ml 未満であるが、DMSO に 100 mg/ml [被験物質溶液量をプレート当り 50 μl にした場合に 5000 μg の被験物質質量に相当する] 以上であり、被験物質に DMSO を加えた際に、発色、発泡、発熱等の変化は見られなかったことから溶媒に DMSO を選択した。				
被験物質溶液の性状	溶解 懸濁 その他 ()				
被験物質が難溶性の場合における懸濁等の方法	—				
溶液の調製から使用までの保存時間と温度	用量設定試験	1 時間	20分、	25°C	
	本試験	1 時間	40分、	25°C	
	確認試験	1 時間	30分、	25°C	
純度換算の有無	有			無	

5 前培養の条件等

(1) 条件

ニュートリエントプロス	名 称	製 造 元	Lot No.
	Oxoid ニュートリエントプロス No.2	OXOID LTD.	941971
前 培 養 時 間	10 時間 00 分		
培養容器 (形状・容量)	形 状 : 三角フラスコ	容 量 : 62.5 ml	
培 養 液 量	15 ml	接 種 菌 量	30 μl

(2) 前培養終了時の生菌数等

菌 株 名		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2uvrA/ pKM101	TA98	TA1537
生菌数 (×10 ⁹ /ml)	用量設定試験	2.30	3.62	4.52	2.70	2.61
	本 試 験	2.23	3.23	4.12	2.47	2.36
	確 認 試 験	—	3.45	—	—	—
測 定 方 法 (いずれかを○で囲むこと)	①. 0.D. 値よりの換算 2. 段階希釈法 3. その他 ()					

6 最少グルコース寒天平板培地

自製・購入の別	1. 自製 (2.) 購入(製造元：オリエンタル酵母工業株式会社)
製造年月日	2014年4月15日 製造
購入の場合の Lot No.	ANI200DD
使用寒天の名称・ 製造元・Lot No. 等	使用寒天の名称：伊那寒天 BA-30A 製造元：伊那食品工業株式会社 Lot No. : 31122

7 試験の方法

(1) 試験方法とその選定理由

採用した試験方法	(1.) プレインキュベーション法 2. プレート法 3. その他 ()
その他の場合は その選定理由	—

(2) 試験条件 (プレート当たり)

プレインキュベーション法		
組 成	菌懸濁液	0.1 ml
	被験物質溶液	0.05 ml
	Na-リン酸緩衝液(直接法による場合)	0.5 ml
	S9 mix(代謝活性化法による場合)	0.5 ml
	トップアガー	2 ml
プレインキュベーション	温 度	37 ℃
	時 間	20 分
インキュベーション	温 度	37 ℃
	時 間	48 時間

8 コロニー計測の方法

計測方法	1. マニュアル計測 (2.) 機器計測
補正の有無	1. 無 (2.) 有(補正の方法 面積及び数え落とし補正)

9 試験結果

(1) 試験の結果は別表による。

(2) 結果の判定

判 定	陽性	陰性
<p>[判定の理由]</p> <p>用量設定試験の結果を表-1に、本試験の結果を表-2及び図-1～10に、確認試験の結果を表-3及び図-11に示した。変異原性の強さを比活性としてまとめ、表-4に示した。</p> <p>用量設定試験を最高用量5000 μg/プレートより公比4の7用量で実施したところ、TA98、TA100の直接法による場合と代謝活性化法による場合及び TA1535の代謝活性化法による場合に陰性対照(溶媒対照)値の2倍以上の復帰変異コロニー数の増加が認められた。</p> <p>用量反応関係が得られるよう用量を設定し本試験を実施したところ、TA98、TA100、TA1535の直接法による場合及び代謝活性化法による場合に陰性対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数の増加が認められた。</p> <p>TA1535の直接法による場合について、結果の再現性を確認するため確認試験を実施したところ、用量設定試験同様、陰性対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。</p> <p>陽性対照物質は、それぞれの試験菌株において陰性対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数を誘発した。また、陰性対照値及び陽性対照値は、当センターのヒストリカルデータより作成した基準の範囲内であった。これらの結果は試験が適切に実施されたことを示している。</p> <p>以上の結果より、2,4-ジフルオロニトロベンゼンの微生物に対する変異原性は、陽性と判定した。</p>		

(3) 参考事項

特記事項なし。

10 その他

試験実施施設	名 称	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	
	所 在 地	〒257-0015 神奈川県秦野市平沢 2445	電話 0463 (82) 3911 FAX 0463 (82) 3860
試験責任者	職 氏 名	[REDACTED]	
	経 験 年 数	[REDACTED]	
試験番号	6368		
試験期間	2014年 6月 17日 ～ 2014年 9月 26日		

表-1

試験結果表（用量設定試験）

被験物質の名称：2,4-ジフルオロニトロベンゼン

試験実施期間		2014年 7月 1日から 2014年 7月 4日									
代謝活性化系の有無	被験物質の用量(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 (溶媒対照)	101 113 86 94 (99)	15 13 15 16 (15)	70 100 74 92 (84)	16 13 16 15 (15)	8 13 10 9 (10)					
	1.22	89 121 (105)	8 15 (12)	84 104 (94)	17 10 (14)	9 7 (8)					
	4.88	111 129 (120)	7 17 (12)	79 100 (90)	8 16 (12)	8 7 (8)					
	19.5	167 165 (166)	16 18 (17)	86 94 (90)	20 10 (15)	10 11 (11)					
	78.1	261 274 (278)	15 11 (13)	100 107 (104)	26 16 (21)	5 8 (7)					
	313	650 626 (638)	8 21 (15)	86 99 (93)	61 39 (50)	9 8 (9)					
	1250	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	82* 63* (73*)	0* 0* (0*)	6* 3* (5*)					
	5000	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)					
	S9 mix (+)	陰性対照 (溶媒対照)	93 128 97 92 (103)	9 9 9 7 (9)	87 91 108 92 (95)	29 24 22 23 (25)	11 11 14 11 (12)				
		1.22	128 108 (118)	13 10 (12)	109 83 (96)	17 14 (16)	15 6 (11)				
		4.88	123 116 (120)	8 15 (12)	112 101 (107)	30 20 (25)	11 9 (10)				
		19.5	171 162 (167)	15 15 (15)	117 127 (122)	20 16 (18)	8 13 (11)				
		78.1	299 310 (305)	5 13 (9)	101 109 (105)	26 38 (32)	6 11 (9)				
		313	736 688 (712)	28 23 (26)	97 90 (94)	60 57 (59)	6 11 (9)				
		1250	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	75* 93* (84*)	70* 79* (75*)	14* 18* (15*)				
		5000	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)				
陽性対照		S9 mixを必要とするもの	名称 用量(μg/プレート)	AF-2 0.01	NaN ₃ 0.5	AF-2 0.005	AF-2 0.1	9-AA 80			
	名称 コロニー数/プレート	2-AA 1	2-AA 2	2-AA 2	2-AA 0.5	2-AA 2					
	名称 コロニー数/プレート	AF-2 1326 1342 (1334)	NaN ₃ 275 292 (284)	AF-2 1092 973 (1033)	AF-2 355 501 (428)	9-AA 252 225 (239)					
	名称 コロニー数/プレート	AF-2 652 665 (659)	NaN ₃ 318 304 (311)	AF-2 902 779 (841)	AF-2 512 547 (530)	9-AA 609 579 (594)					

【備考】

1. 菌の生育阻害(抗菌作用)が認められる場合は、該当する数値の右に*印を付した。
2. ()内には各プレートのコロニー数の平均値を記入した。
3. 復帰変異数は、被験物質用量の低い順に実測値及び平均値を記入した。
4. 陽性対照物質の名称 AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、NaN₃: ナトリウム・アジド、9-AA: 9-アミノアクリジン、2-AA: 2-アミノアントラセン

表-2

試験結果表（本試験）

被験物質の名称：2,4-ジフルオロクロロベンゼン

試験実施期間		2014年 7月 7日から 2014年 7月 10日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量(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 (溶媒対照)	136 126 119 143 (131)	10 9 9 10 (10)	97 92 81 83 (88)	16 22 17 20 (19)	10 9 13 16 (12)
	9.77	124 153 (139)	/	/	/	/
	19.5	186 165 (176)	13 14 (14)	85 100 (93)	14 17 (16)	11 9 (10)
	39.1	218 273 (246)	11 9 (10)	83 78 (81)	18 15 (17)	13 9 (11)
	78.1	297 291 (264)	13 13 (13)	92 92 (92)	21 29 (25)	8 13 (11)
	156	397 452 (425)	18 11 (15)	104 96 (100)	25 34 (30)	9 10 (10)
	313	613 666 (640)	18 15 (17)	84 81 (83)	46 46 (46)	17 13 (15)
	625	857 923 (890)	30 25 (28)	90 97 (94)	76 75 (76)	10 14 (12)
	1250	0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	79* 67* (73*)	0* 0* (0*)	7* 9* (8*)
	S9 mix (+)	陰性対照 (溶媒対照)	124 143 108 115 (123)	11 14 16 15 (14)	101 105 114 98 (105)	23 23 20 24 (23)
9.77		121 121 (121)	/	/	/	/
19.5		155 163 (159)	11 11 (11)	111 109 (110)	23 16 (20)	6 10 (8)
39.1		216 218 (217)	14 10 (12)	100 94 (97)	21 25 (23)	5 13 (9)
78.1		313 287 (300)	17 15 (16)	101 122 (112)	30 22 (26)	10 6 (8)
156		394 432 (413)	20 20 (20)	105 113 (109)	29 34 (32)	16 8 (12)
313		688 717 (703)	30 28 (29)	100 111 (106)	46 39 (43)	11 11 (11)
625		1034 1009 (1022)	45 30 (38)	77 89 (83)	89 89 (89)	9 10 (10)
1250		0* 0* (0*)	0* 0* (0*)	86* 94* (90*)	81* 91* (86*)	11* 14* (13*)
陽性対照		名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2
	用量(μg/プレート)	0.01	0.5	0.005	0.1	80
S9 mixを必要とするもの	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
S9 mixを必要とするもの	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA
	コロニー数/プレート	579 593 (586)	319 322 (321)	1114 930 (1022)	517 509 (513)	429 553 (496)
S9 mixを必要とするもの	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	コロニー数/プレート	1188 1244 (1216)	254 288 (271)	906 871 (889)	432 472 (477)	233 294 (264)

【備考】

- 菌の生育阻害(抗菌作用)が認められる場合は、該当する数値の右に*印を付した。
- ()内には各プレートのコロニー数の平均値を記入した。
- 復帰変異数は、被験物質用量の低い順に実測値及び平均値を記入した。
- 陽性対照物質の名称 AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、NaN₃: ナトリウム・アジド、9-AA: 9-アミノアクリジン、2-AA: 2-アミノアントラセン

表-3

試験結果表（確認試験）

被験物質の名称：2,4-ジフルオロクロロベンゼン

試験実施期間		2014年 7月 22日から 2014年 7月 25日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	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 (溶媒対照)	/	13 10 11 13 (12)	/	/	/
	19.5	/	9 3 (6)	/	/	/
	39.1	/	8 14 (11)	/	/	/
	78.1	/	14 7 (11)	/	/	/
	156	/	6 11 (9)	/	/	/
	313	/	11 8 (10)	/	/	/
	625	/	21 18 (20)	/	/	/
	1250	/	0* 0* (0*)	/	/	/
	陽性対照も必要としない	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2
用量($\mu\text{g}/\text{プレート}$)		0.01	0.5	0.005	0.1	80
コロニー数/プレート		/	320 314 (317)	/	/	/

【備考】

1. 菌の生育阻害(抗菌作用)が認められる場合は、該当する数値の右に*印を付した。
2. ()内には各プレートのコロニー数の平均値を記入した。
3. 復帰変異数は、被験物質用量の低い順に実測値及び平均値を記入した。
4. 陽性対照物質の名称 AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド、NaN₃: ナトリウム・アジド、9-AA: 9-アミノアクリジン

表-4

試験結果表 (比活性)

被験物質の名称：2,4-ジフルオロニトロベンゼン

	菌株名	-S9 mix		+S9 mix	
		比活性	計算に用いた用量	比活性	計算に用いた用量
		Rev./mg	μg /プレート	Rev./mg	μg /プレート
用量 設定 試験	TA100	2.29×10^3	78.1	2.59×10^3	78.1
	TA1535	—	—	5.43×10	313
	WP2 <i>uvrA</i> / pKM101	—	—	—	—
	TA98	1.12×10^2	313	1.09×10^2	313
	TA1537	—	—	—	—
本 試 験	TA100	2.09×10^3	78.1	2.27×10^3	78.1
	TA1535	2.88×10	625	4.79×10	313
	WP2 <i>uvrA</i> / pKM101	—	—	—	—
	TA98	9.12×10	625	1.06×10^2	625
	TA1537	—	—	—	—
確 認 試 験	TA100	/	/	/	/
	TA1535	—	—	—	—
	WP2 <i>uvrA</i> / pKM101	/	/	/	/
	TA98	/	/	/	/
	TA1537	/	/	/	/

(注) 横線(—)は当該菌株について陰性対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数を誘発しなかったことを示し、斜線(/)は当該菌株について試験を実施しなかったことを示す。

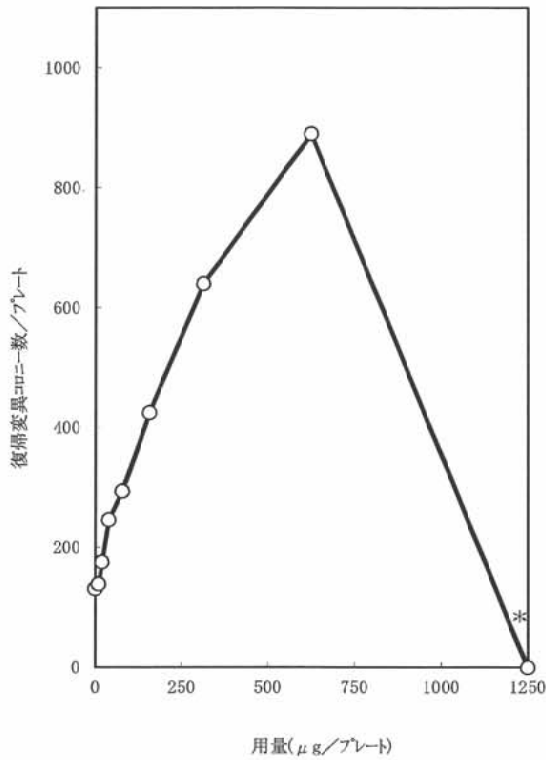


図-1 TA100における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験)

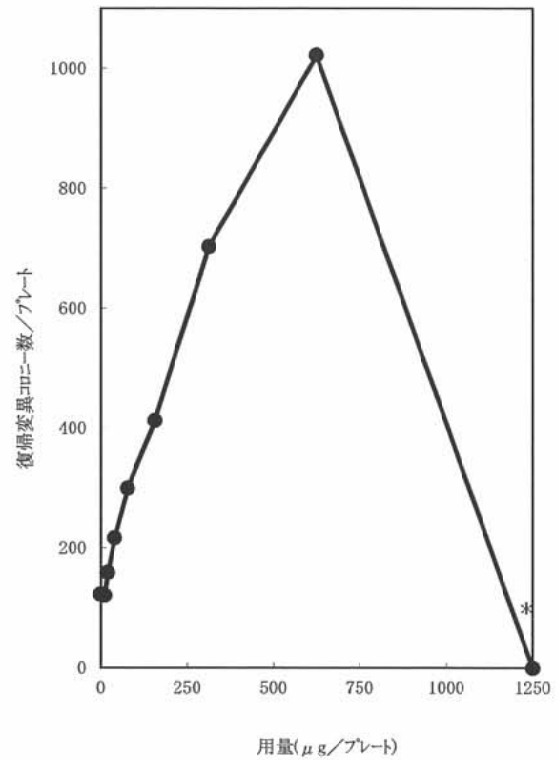


図-2 TA100における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)

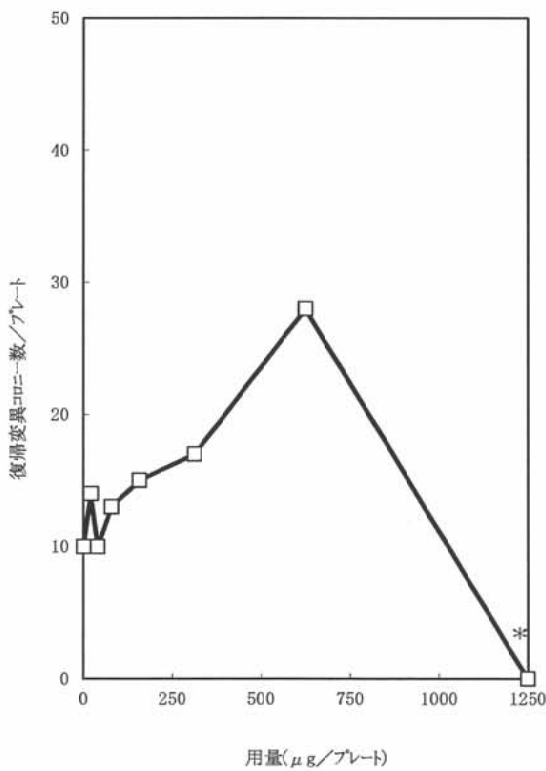


図-3 TA1535における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験)

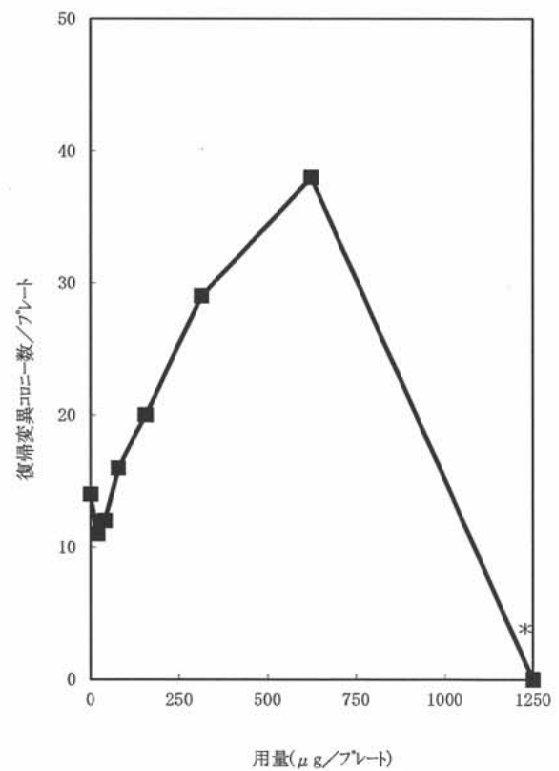


図-4 TA1535における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)

注：生育阻害が認められる場合は、該当するポイントの左上に*を付した。

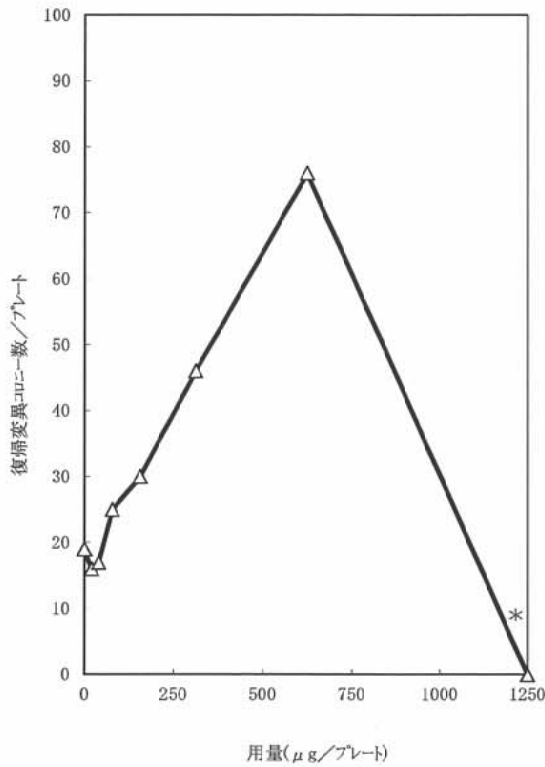


図-5 TA98における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験)

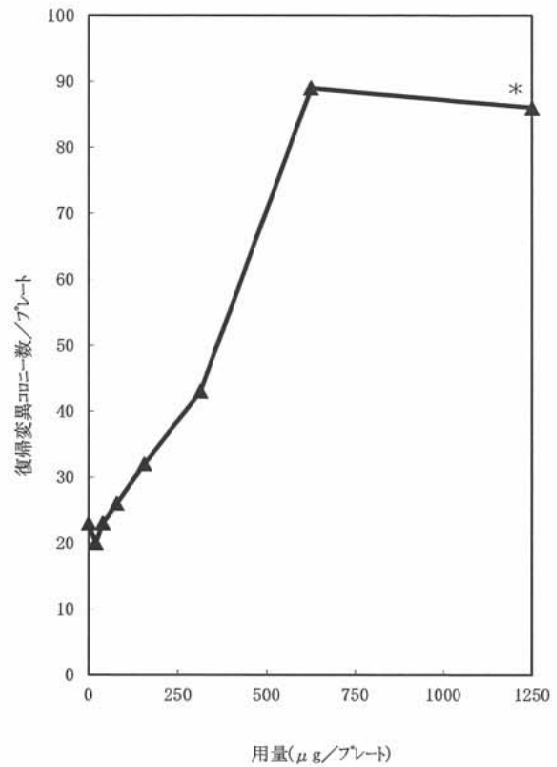


図-6 TA98における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)

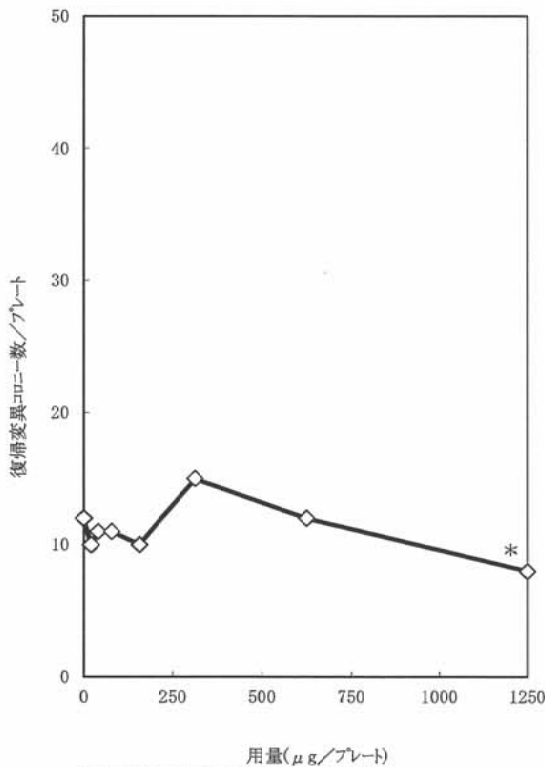


図-7 TA1537における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験)

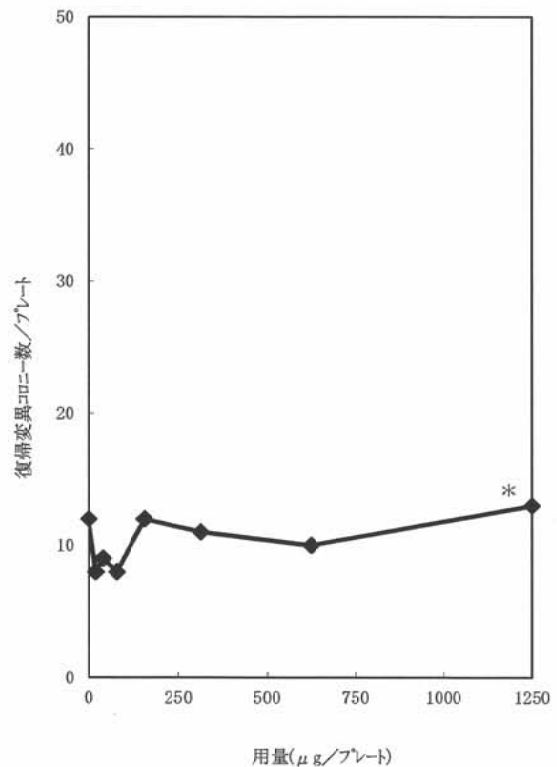


図-8 TA1537における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)

注：生育阻害が認められる場合は、該当するポイントの左上に*を付した。

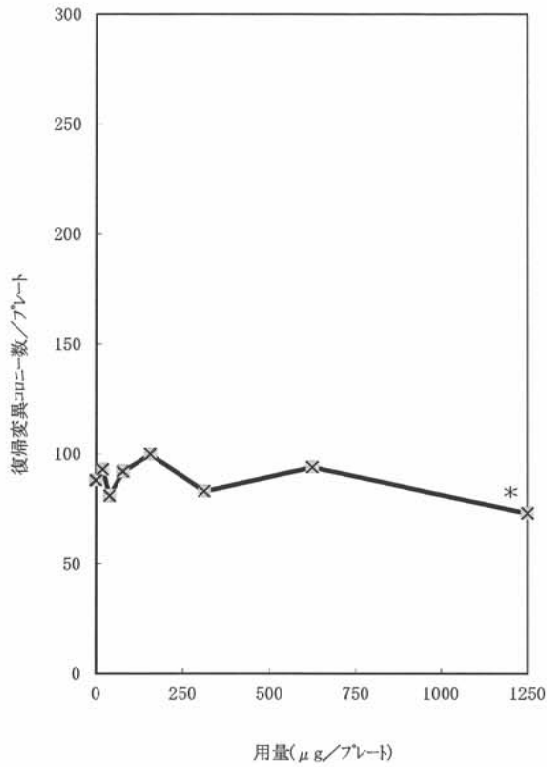


図-9 WP2uvrA/pKM101における用量-反応曲線
直接法による場合 (本試験)

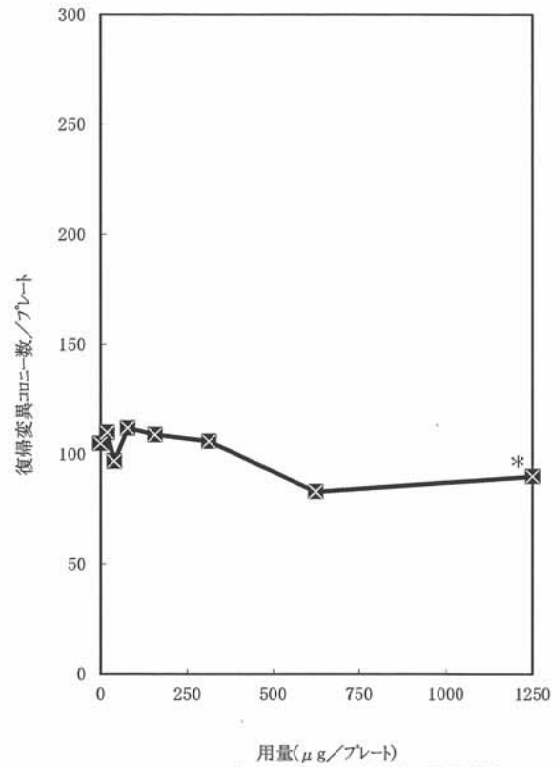


図-10 WP2uvrA/pKM101における用量-反応曲線
代謝活性化法による場合 (本試験)

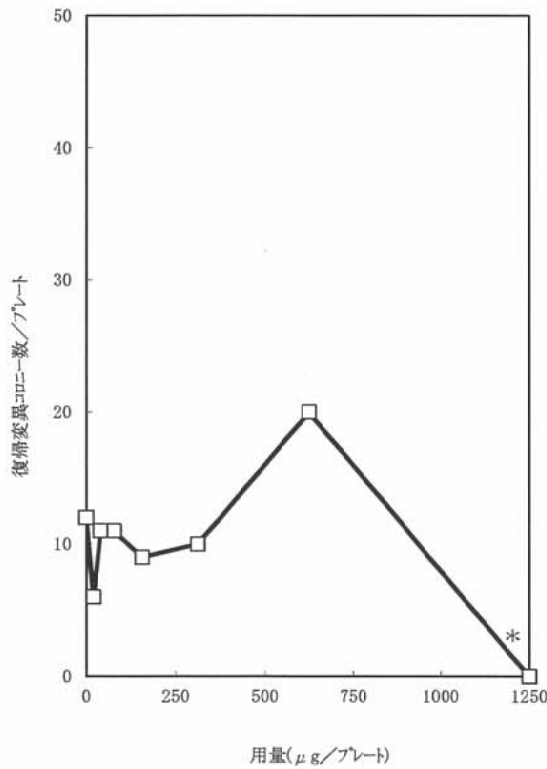


図-11 TA1535における用量-反応曲線
直接法による場合 (確認試験)

注：生育阻害が認められる場合は、該当するポイントの左上に*を付した。