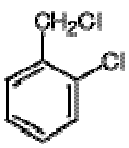


## 微生物を用いる変異原性試験結果報告書

### 1. 一般的事項

|                              |   |                       |                 |
|------------------------------|---|-----------------------|-----------------|
| 新規化学物質の名称<br>(IUPAC 命名法による)  | 1-クロロ-2-(クロロメチル)ベンゼン  |                       |                 |
| 別名                           | /   |                       |                 |
| 構造式又は示性式 (いずれも不明な場合はその製法の概要) |  |                       |                 |
| 試験に供した新規化学物質の純度              | 99.6%   | 試験に供した新規化学物質の Lot No. | PDR5833         |
| 不純物の名称及び濃度                   | /   |                       |                 |
| CAS 番号                       | 611-19-8  | 蒸気圧                   | 3 mmHg (84°C) * |
| 分子量                          | 161.03  | 分配係数                  | /               |
| 融点                           | -17°C*  | 常温における性状              | 液体              |
| 沸点                           | 217°C*  |                       |                 |
| 安定性                          | 光により変質するおそれがある  |                       |                 |
| 溶媒に対する溶解度等                   | 溶媒  | 溶解度                   | 溶媒中での安定性        |
|                              | 水   | ほとんど溶けない              | /               |
|                              | DMSO  | 50 mg/mL で溶解          | 発熱、ガスの発生等の反応性なし |
|                              | アセトン  | /                     | /               |
|                              | その他   | /                     | /               |

(備考) 上記被験物質情報は、製造元からの情報及び\*：独立行政法人製品評価技術基盤機構化学物質総合情報システム (CHRIP) の情報による。なお、DMSO の溶解度及び溶媒中の安定性については、株式会社ボゾリサーチセンターで実施した溶解性試験の結果である。

## 2. 試験に用いた菌株

| 菌株名                                     | 入手先                  | 入手年月日       |
|---|----------------------|-------------|
| <i>Salmonella typhimurium</i> TA98      | 国立医薬品食品衛生研究所         | 1997年10月9日  |
| <i>Salmonella typhimurium</i> TA100     | 国立医薬品食品衛生研究所         | 1997年10月9日  |
| <i>Salmonella typhimurium</i> TA1535    | 国立医薬品食品衛生研究所         | 1997年10月9日  |
| <i>Salmonella typhimurium</i> TA1537    | 国立医薬品食品衛生研究所         | 1997年10月9日  |
| <i>Escherichia coli</i> WP2 <i>uvrA</i> | 独立行政法人<br>製品評価技術基盤機構 | 2011年10月20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         | 2015年12月18日                                    |
| 購入の場合 Lot No. | RAA201512A                                     |
| 保存温度          | -86.1~-70.6°C<br>(保存期間: 2016年1月21日~2016年3月10日) |

### (2) S9の調製方法

| 使用動物 |           | 誘導物質                        |  |
|------|-----------|-----------------------------|--|
| 種・系統 | ラット・SD系   | 名称                          | PB& 5,6-BF   |
| 性    | 雄         | 投与方法                        | 腹腔内投与  |
| 週齢   | 7週齢       | 投与期間及び<br>投与量<br>(mg/kg 体重) | PB4日間連続投与:<br>30+60+60+60(mg/kg 体重)<br>PB投与3日目 BF投与:<br>80(mg/kg 体重) |
| 体重   | 190-243 g |                             |  |

### (3) S9Mixの組成

| 成分                | S9Mix 1mL 中の量 | 成分        | S9Mix 1mL 中の量 |
|-------------------|---------------|-----------|---------------|
| S9                | 0.1 mL        | NADPH     | 4 μmol        |
| MgCl <sub>2</sub> | 8 μmol        | NADH      | 4 μmol        |
| KCl               | 33 μmol       | Na-リン酸緩衝液 | 100 μmol      |
| グルコース-6-リン酸       | 5 μmol        | 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(%)   |
|                       | DMSO  | 和光純薬工業株式会社 | ECH3050 | JIS規格<br>試薬特級 | 99.0%以上 |
| 溶媒選択の理由               | 本被験物質は水にほとんど溶けないとの情報より、DMSOについて溶解性試験を実施した。その結果、DMSOに50 mg/mLで溶解し、発熱、ガスの発生等の反応性も認められなかったためDMSOを溶媒として試験を実施した。なお、被験液の調製には、モレキュラシーブス 4A 1/16（和光純薬工業株式会社；Lot No. HWL7297）で脱水したDMSOを使用した。 |            |         |               |         |
| 被験物質溶液の性状             | <input checked="" type="radio"/> 溶解 <input type="radio"/> 懸濁 <input type="radio"/> 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   | 用時調製・室温   |            |         |               |         |
| 純度換算の有無               | 有 <input checked="" type="radio"/> 無  |            |         |               |         |

#### 5. 前培養の条件

##### (1) 条件

|             |                     |            |   |
|-------------|---------------------|------------|---|
| ニュートリエントブロス | 名称                  | 製造元        | Lot No.   |
|             | Nutrient Broth No.2 | OXOID LTD. | 1239615   |
| 前培養時間       | 9時間                 |            |   |
| 培養容器(形状・容器) | L字管・48mL            |            |   |
| 培養液量        | 10 mL               | 接種菌量       | <i>S. typhimurium</i> 株 20 µL<br><i>E. coli</i> 株 10 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 | WP2 <i>uvrA</i> | TA98     | TA1537 |
| 生菌数<br>(× 10 <sup>9</sup> /mL) | 用量設定試験 | 4.44                               | 4.74   | 8.50            | 6.29     | 3.70   |
|                                | 本試験    | 4.43                               | 4.77   | 8.58            | 6.20     | 3.70   |
| 測定方法                           |        | ①. O.D.値より換算    2. 段階希釈法    3. その他 |        |                 |          |        |

6. 最小グルコース寒天平板培地

|                    |  |
|--------------------|--|
| 自製・購入の別            | 1. 自製 (2) 購入 (購入元 極東製薬工業株式会社)              |
| 製造年月日              | 2016年2月19日                                 |
| 購入の場合の Lot No.     | DZLH2J01                                   |
| 使用寒天の名称・製造・Lot No. | OXOID AGAR No.1・OXOID LTD.・Lot No. 1309432 |

7. 試験の方法

(1) 試験方法とその選択理由

|                   |                                     |
|-------------------|-------------------------------------|
| 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<br>3. その他 |
| その他の場合は<br>その選択理由 |                                     |

(2) 試験条件

|             |                      |        |
|-------------|----------------------|--------|
| 組 成         | 菌懸濁液                 | 0.1 mL |
|             | 被験物質溶液               | 0.1 mL |
|             | Na-リン酸緩衝液 (直接法による場合) | 0.5 mL |
|             | S9Mix (代謝活性化法による場合)  | 0.5 mL |
|             | トップアガー               | 2.0 mL |
| プレインキュベーション | 温度                   | 37°C   |
|             | 時間                   | 20分間   |
| インキュベーション   | 温度                   | 37°C   |
|             | 時間 (用量設定試験)          | 49時間   |
|             | 時間 (本試験)             | 48.5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 面積補正:補正值 1.21) |

## 9. 試験の結果

- (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別表 1 に、本試験の結果を別表 2 に示した。なお、図 1~10 は別表 2 より作成した。また、当該試験の参考データとして参照した背景データを Attached Data として添付した。</p> <p>用量設定試験及び本試験ともに、代謝活性化の有無にかかわらず <i>S. typhimurium</i> TA100 において復帰変異コロニー数の用量依存性を伴う増加が認められたが、陰性対照値の 2 倍以上となる増加は認められなかった。</p> <p>一方、陽性対照群では陰性対照群と比較して 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加を示したことから、使用菌株の復帰突然変異誘発物質に対する反応は適切であったことが確認され、試験は適切に実施されたものと考えられた。</p> <p>以上の試験結果より、本試験条件下において 1-クロロ-2-(クロロメチル)ベンゼンは、微生物に対する遺伝子突然変異誘発能を有しない（陰性）と判定した。</p> |    |    |

- (3) 参考事項

本被験物質によるプレート上の沈殿及び着色は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。

菌に対する生育阻害は、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての菌株の 156 µg/plate 以上の用量で認められた。

被験液の調製及び試験操作は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で実施した。

(別表1)

## 試験結果表(用量設定試験)

被験物質の名称: 1-クロロ-2-(クロロメチル)ベンゼン

No. T-2019

| 試験実施期間       |  | 2016年3月4日 より 2016年3月7日              |                    |                    |                     |                       |                 |
|--------------|--|-------------------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|-----------------------|-----------------|
| 代謝活性化系の有無    | 被験物質の用量<br>( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ ) | 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            | TA98                | TA1537                |                 |
| S9Mix<br>(-) | 陰性対照<br>(DMSO)                           | 128<br>139 ( 134 )                  | 12<br>10 ( 11 )    | 30<br>22 ( 26 )    | 19<br>13 ( 16 )     | 10<br>13 ( 12 )       |                 |
|              | 1.22                                     | 85<br>108 ( 97 )                    | 6<br>6 ( 6 )       | 28<br>30 ( 29 )    | 10<br>11 ( 11 )     | 12<br>8 ( 10 )        |                 |
|              | 4.88                                     | 148<br>153 ( 151 )                  | 5<br>8 ( 7 )       | 31<br>34 ( 33 )    | 15<br>12 ( 14 )     | 8<br>7 ( 8 )          |                 |
|              | 19.5                                     | 116<br>136 ( 126 )                  | 7<br>8 ( 8 )       | 24<br>21 ( 23 )    | 15<br>16 ( 16 )     | 11<br>7 ( 9 )         |                 |
|              | 78.1                                     | 245<br>207 ( 226 )                  | 10<br>12 ( 11 )    | 28<br>27 ( 28 )    | 16<br>20 ( 18 )     | 10<br>10 ( 10 )       |                 |
|              | 313                                      | 17 *<br>6 * ( 12 )                  | 0 *<br>0 * ( 0 )   | 0 *<br>0 * ( 0 )   | 0 *<br>0 * ( 0 )    | 0 *<br>0 * ( 0 )      |                 |
|              | 1250                                     | 0 *<br>0 * ( 0 )                    | 0 *<br>0 * ( 0 )   | 0 *<br>0 * ( 0 )   | 0 *<br>0 * ( 0 )    | 0 *<br>0 * ( 0 )      |                 |
|              | 5000                                     | 0 *<br>0 * ( 0 )                    | 0 *<br>0 * ( 0 )   | 0 *<br>0 * ( 0 )   | 0 *<br>0 * ( 0 )    | 0 *<br>0 * ( 0 )      |                 |
|              | S9Mix<br>(+)                             | 陰性対照<br>(DMSO)                      | 128<br>142 ( 135 ) | 12<br>9 ( 11 )     | 41<br>31 ( 36 )     | 32<br>24 ( 28 )       | 15<br>12 ( 14 ) |
|              |  | 1.22                                | 111<br>121 ( 116 ) | 10<br>8 ( 9 )      | 31<br>46 ( 39 )     | 21<br>34 ( 28 )       | 14<br>11 ( 13 ) |
| 4.88         |  | 126<br>120 ( 123 )                  | 14<br>8 ( 11 )     | 38<br>21 ( 30 )    | 33<br>23 ( 28 )     | 13<br>11 ( 12 )       |                 |
| 19.5         |  | 140<br>162 ( 151 )                  | 11<br>10 ( 11 )    | 29<br>36 ( 33 )    | 28<br>22 ( 25 )     | 14<br>13 ( 14 )       |                 |
| 78.1         |  | 184<br>215 ( 200 )                  | 8<br>13 ( 11 )     | 35<br>30 ( 33 )    | 24<br>22 ( 23 )     | 15<br>15 ( 15 )       |                 |
| 313          |  | 11 *<br>17 * ( 14 )                 | 0 *<br>0 * ( 0 )   | 0 *<br>0 * ( 0 )   | 20 *<br>22 * ( 21 ) | 0 *<br>0 * ( 0 )      |                 |
| 1250         |  | 0 *<br>0 * ( 0 )                    | 0 *<br>0 * ( 0 )   | 0 *<br>0 * ( 0 )   | 0 *<br>0 * ( 0 )    | 0 *<br>0 * ( 0 )      |                 |
| 5000         |  | 0 *<br>0 * ( 0 )                    | 0 *<br>0 * ( 0 )   | 0 *<br>0 * ( 0 )   | 0 *<br>0 * ( 0 )    | 0 *<br>0 * ( 0 )      |                 |
| 陽性対照         |  | 名 称                                 | AF-2               | SAZ                | AF-2                | AF-2                  | ICR-191         |
|              |  | 用量<br>( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ ) | 0.01               | 0.5                | 0.01                | 0.1                   | 1.0             |
|              | コロニ-数/プレート                               | 575<br>402 ( 489 )                  | 225<br>209 ( 217 ) | 76<br>66 ( 71 )    | 253<br>313 ( 283 )  | 1114<br>1022 ( 1068 ) |                 |
|              | 名 称                                      | B[a]P                               | 2AA                | 2AA                | B[a]P               | B[a]P                 |                 |
|              | 用量<br>( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )      | 5.0                                 | 2.0                | 10.0               | 5.0                 | 5.0                   |                 |
|              | コロニ-数/プレート                               | 807<br>898 ( 853 )                  | 300<br>286 ( 293 ) | 589<br>678 ( 634 ) | 321<br>428 ( 375 )  | 91<br>102 ( 97 )      |                 |

(備考)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

SAZ : アジ化ナトリウム

ICR-191 : 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl

2AA : 2-アミノアントラセン

B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

\*: 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。

( )内は、2枚のプレートの平均値を示す。

(別表2)

## 試験結果表 (本試験)

被験物質の名称： 1-クロロ-2-(クロロメチル)ベンゼン

No. T-2019

| 試験実施期間       |  | 2016年3月9日 より 2016年3月12日             |                        |                     |                     |                     |                    |
|--------------|--|-------------------------------------|------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| 代謝活性化系の有無    | 被験物質の用量<br>( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ ) | 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             | TA98                | TA1537              |                    |
| S9Mix<br>(-) | 陰性対照<br>(DMSO)                           | 117<br>125 ( 121 )                  | 7<br>5 ( 6 )           | 25<br>33 ( 29 )     | 18<br>13 ( 16 )     | 8<br>5 ( 7 )        |                    |
|              | 9.77                                     | 153<br>110 ( 132 )                  | 10<br>12 ( 11 )        | 24<br>23 ( 24 )     | 11<br>13 ( 12 )     | 4<br>5 ( 5 )        |                    |
|              | 19.5                                     | 143<br>123 ( 133 )                  | 4<br>6 ( 5 )           | 19<br>27 ( 23 )     | 19<br>17 ( 18 )     | 5<br>8 ( 7 )        |                    |
|              | 39.1                                     | 190<br>195 ( 193 )                  | 8<br>10 ( 9 )          | 17<br>23 ( 20 )     | 11<br>13 ( 12 )     | 5<br>6 ( 6 )        |                    |
|              | 78.1                                     | 238<br>233 ( 236 )                  | 4<br>7 ( 6 )           | 21<br>36 ( 29 )     | 13<br>13 ( 13 )     | 6<br>6 ( 6 )        |                    |
|              | 156                                      | 50 *<br>59 * ( 55 )                 | 0 *<br>0 * ( 0 )       | 10 *<br>20 * ( 15 ) | 4 *<br>6 * ( 5 )    | 0 *<br>0 * ( 0 )    |                    |
|              | 313                                      | 0 *<br>0 * ( 0 )                    | 0 *<br>0 * ( 0 )       | 0 *<br>0 * ( 0 )    | 0 *<br>0 * ( 0 )    | 0 *<br>0 * ( 0 )    |                    |
|              | S9Mix<br>(+)                             | 陰性対照<br>(DMSO)                      | 120<br>129 ( 125 )     | 7<br>11 ( 9 )       | 36<br>19 ( 28 )     | 33<br>27 ( 30 )     | 8<br>7 ( 8 )       |
|              |  | 9.77                                | 135<br>136 ( 136 )     | 10<br>12 ( 11 )     | 20<br>28 ( 24 )     | 25<br>23 ( 24 )     | 7<br>11 ( 9 )      |
|              |  | 19.5                                | 124<br>131 ( 128 )     | 10<br>12 ( 11 )     | 28<br>28 ( 28 )     | 28<br>28 ( 28 )     | 7<br>8 ( 8 )       |
|              |  | 39.1                                | 188<br>159 ( 174 )     | 4<br>7 ( 6 )        | 32<br>28 ( 30 )     | 19<br>29 ( 24 )     | 12<br>4 ( 8 )      |
|              |  | 78.1                                | 180<br>169 ( 175 )     | 5<br>7 ( 6 )        | 38<br>18 ( 28 )     | 20<br>22 ( 21 )     | 11<br>6 ( 9 )      |
|              |  | 156                                 | 131 *<br>127 * ( 129 ) | 4 *<br>5 * ( 5 )    | 27 *<br>27 * ( 27 ) | 27 *<br>27 * ( 27 ) | 8 *<br>14 * ( 11 ) |
|              |  | 313                                 | 0 *<br>0 * ( 0 )       | 0 *<br>0 * ( 0 )    | 0 *<br>0 * ( 0 )    | 0 *<br>0 * ( 0 )    | 0 *<br>0 * ( 0 )   |
| 陽性対照         |  | 名称                                  | AF-2                   | SAZ                 | AF-2                | AF-2                | ICR-191            |
|              |  | 用量<br>( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ ) | 0.01                   | 0.5                 | 0.01                | 0.1                 | 1.0                |
|              |  | コロニー数/プレート                          | 486<br>411 ( 449 )     | 259<br>263 ( 261 )  | 65<br>73 ( 69 )     | 379<br>443 ( 411 )  | 989<br>806 ( 898 ) |
|              |  | 名称                                  | B[a]P                  | 2AA                 | 2AA                 | B[a]P               | B[a]P              |
|              |  | 用量<br>( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ ) | 5.0                    | 2.0                 | 10.0                | 5.0                 | 5.0                |
|              |  | コロニー数/プレート                          | 856<br>839 ( 848 )     | 291<br>279 ( 285 )  | 543<br>669 ( 606 )  | 308<br>398 ( 353 )  | 117<br>114 ( 116 ) |

(備考)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

SAZ : アジ化ナトリウム

ICR-191 : 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl

2AA : 2-アミノアントラセン

B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

\* : 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。

( )内は、2枚のプレートの平均値を示す。

図 1

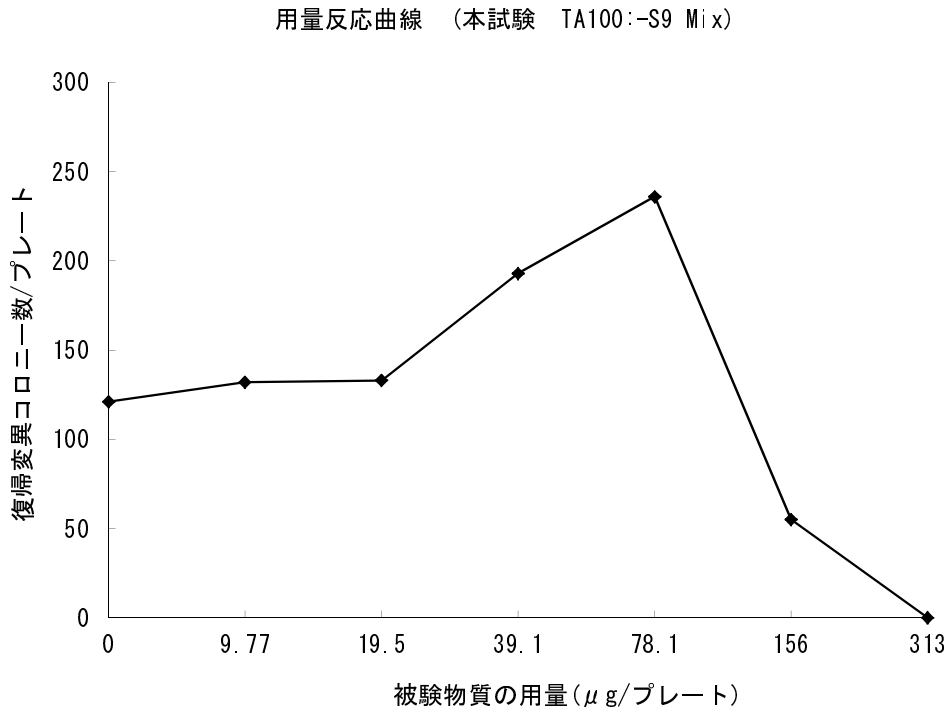


図 2

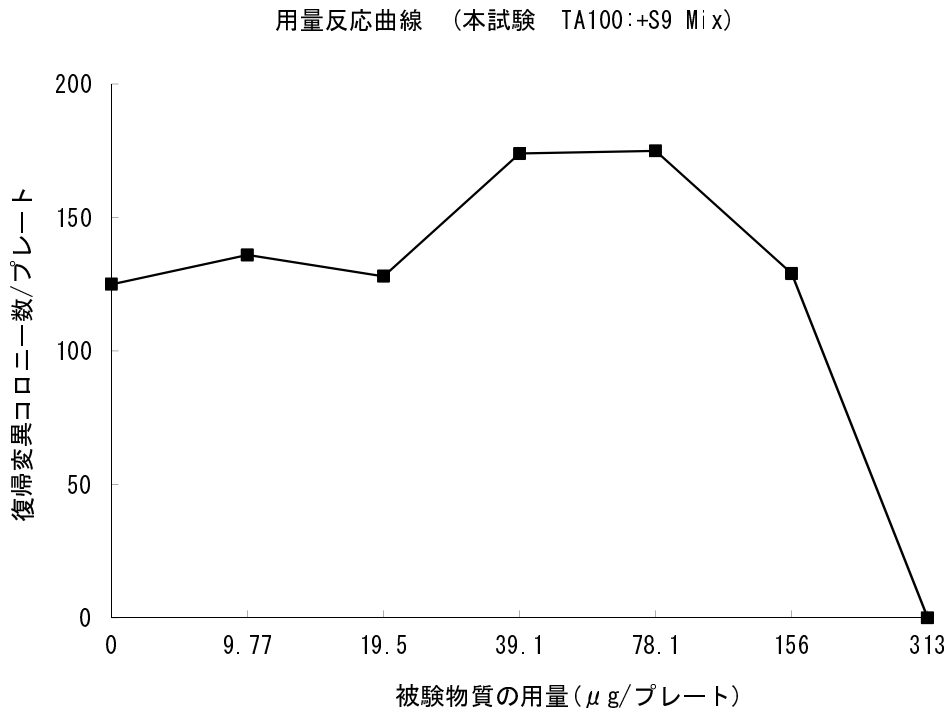




図 3

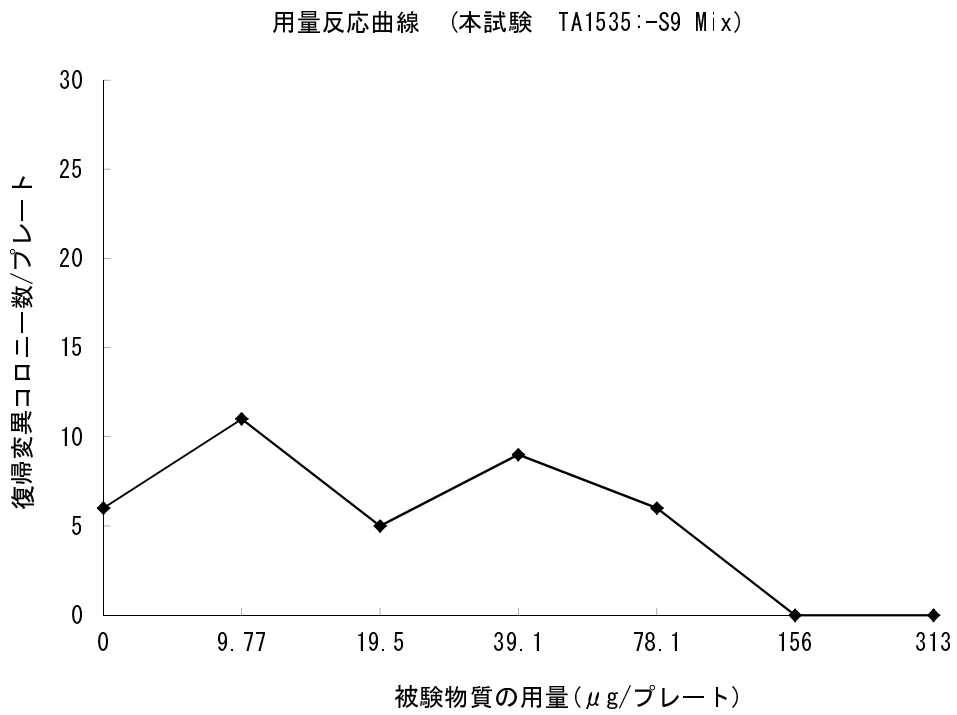


図 4

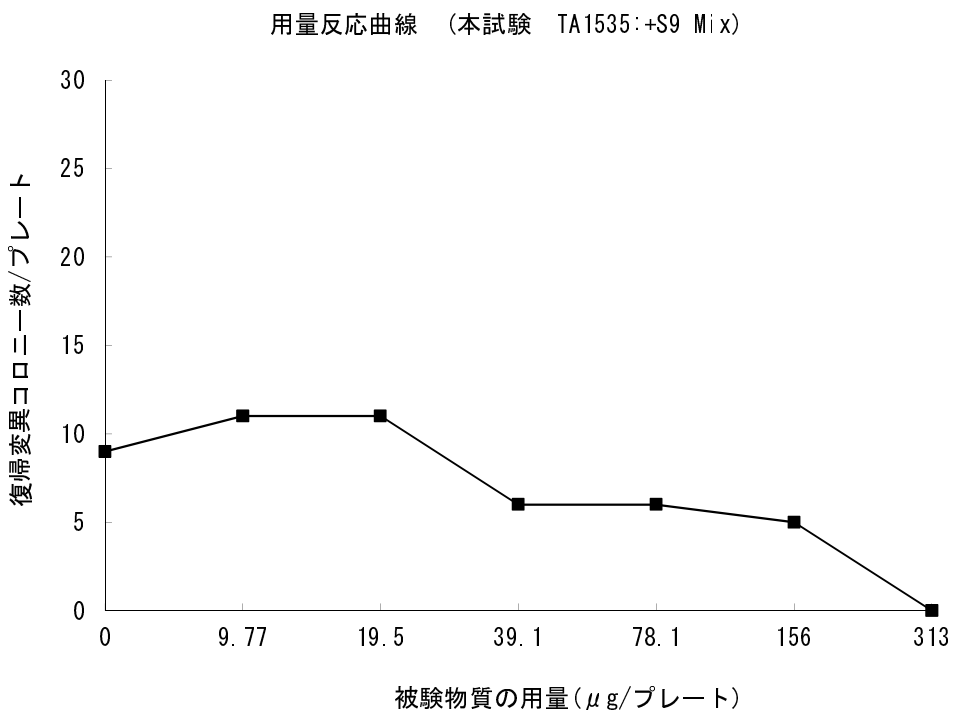


図 5

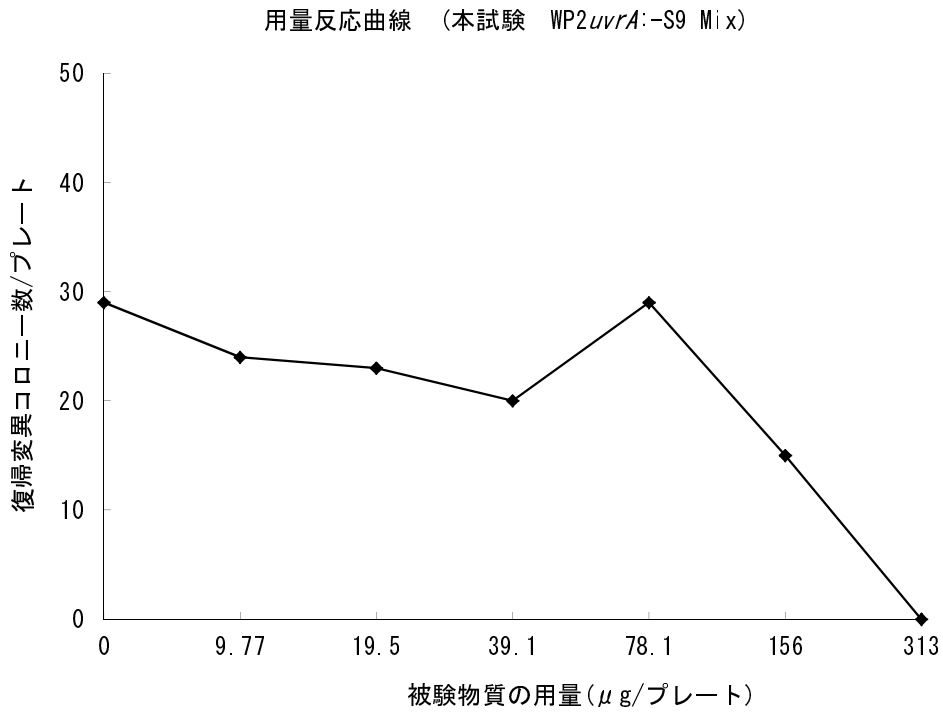


図 6

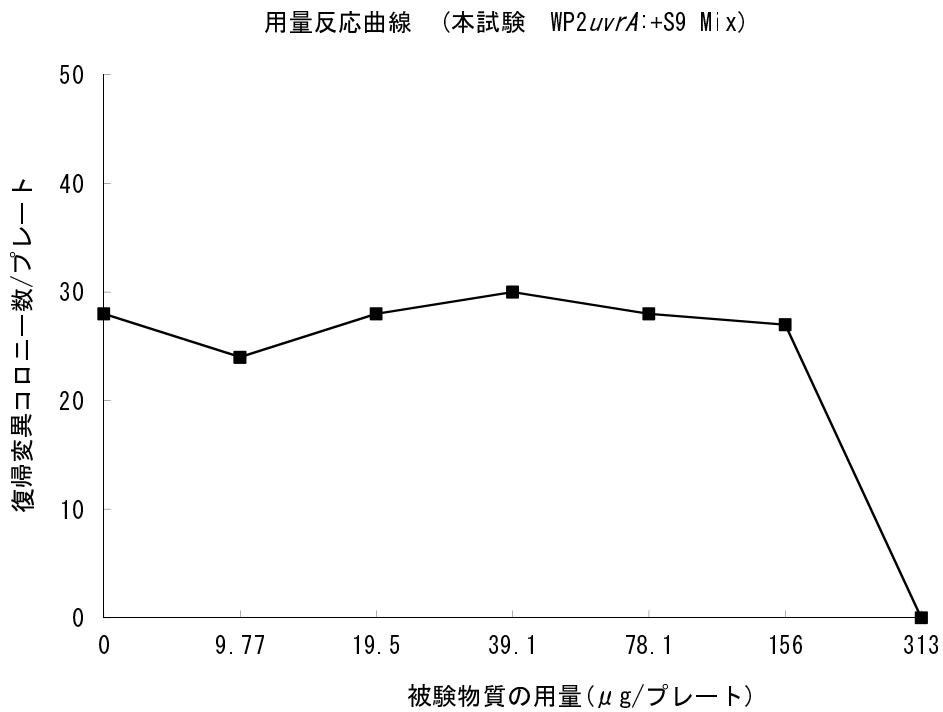


図 7

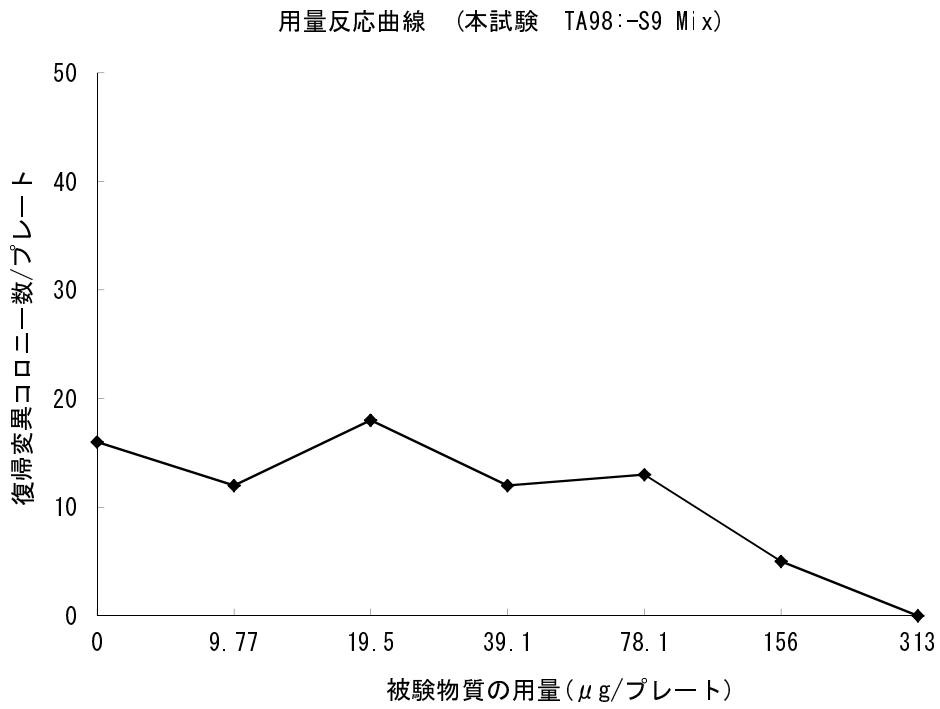


図 8

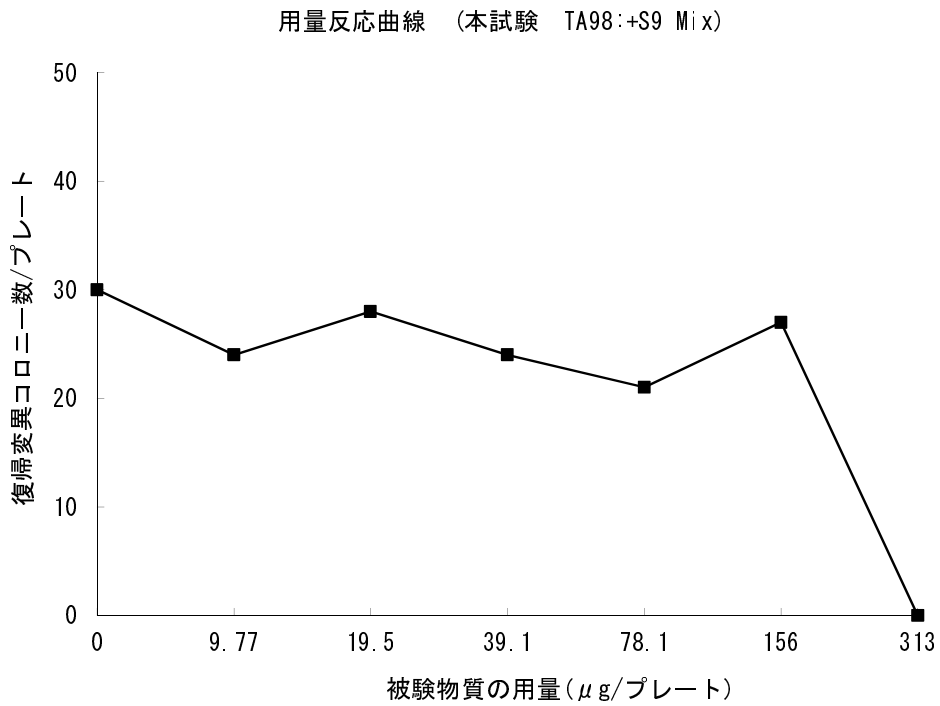


図 9

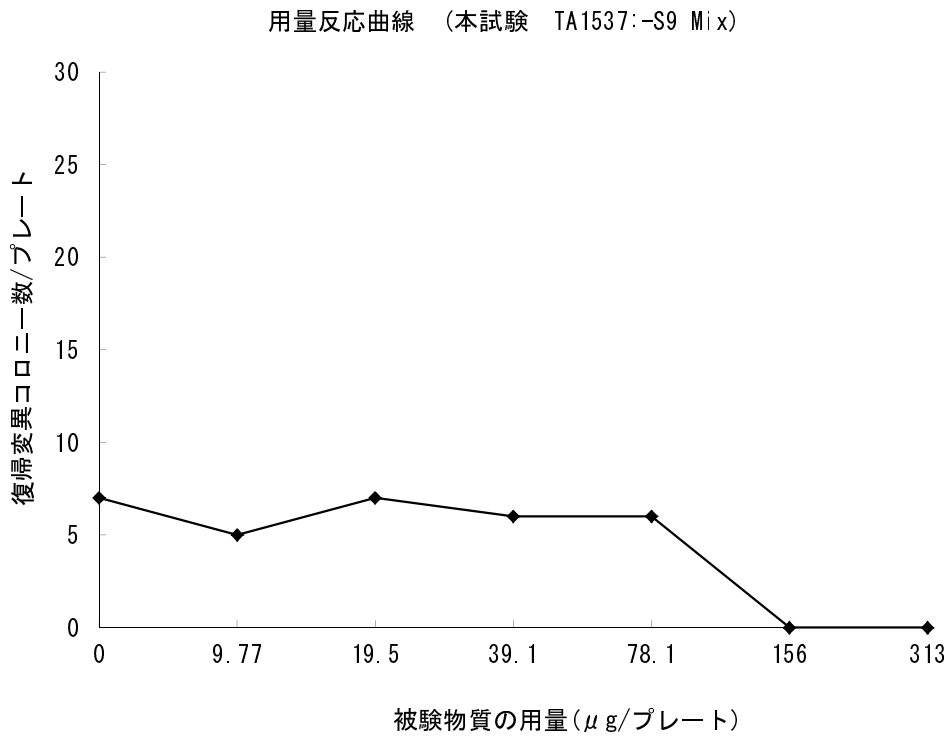


図 10

