

最 終 報 告 書


2, 3, 5, 6-テトラクロロベンゾキノンの
細菌を用いる復帰突然変異試験
(試験番号 : 00-139)

財団法人 畜産生物科学安全研究所

陳 述 書

試験表題：2, 3, 5, 6-テトラクロロベンゾキノンの細菌を用いる復帰突然変異試験
試験番号： 00-139

本試験は、OECD の試験法ガイドライン“OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS, 471, Bacterial Reverse Mutation Test(1997)” および OECD の GLP “OECD PRINCIPLES OF GOOD LABORATORY PRACTICE(1997)” に定める基準に準拠して実施した。



平成13年 3月29日

試験表題：2, 3, 5, 6-テトラクロロベンゾキノンの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：00-139

試験委託者：

名 称 製品評価技術センター

所 在 地 東京都渋谷区西原二丁目 49 番 10 号

委託責任者

試験実施施設：

名 称 財団法人 畜産生物科学安全研究所

所 在 地 神奈川県相模原市橋本台三丁目 7 番 11 号

運営管理者

試験責任者

信頼性保証

責 任 者

試験期間：

試験開始日 平成 12 年 12 月 14 日

実験期間 開始日：平成 13 年 1 月 8 日

終了日：平成 13 年 2 月 8 日

試験終了日 平成 13 年 3 月 29 日

試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる要因：

本試験に関し、試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる要因はなかった。

資料の保管：

本試験における下記の資料は、最終報告書作成後 10 年間、財団法人 畜産生物科学安全研究所において保管する。その後の保管については、試験委託者と協議して決める。

1. 試験計画書
2. 被験物質に関する記録
3. 試験結果に関する記録
4. 信頼性保証に関する記録
5. 最終報告書

試験責任者、担当者および業務分担

[Redacted signature area]

平成13年 3月 29日

[Redacted signature area]

信頼性保証証明書

試験表題 : 2,3,5,6-テトラクロロベンゾキノンの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号 : 00-139

<u>審査・査察実施日</u>	<u>試験責任者への報告日</u>	<u>運営管理者への報告日</u>
-----------------	-------------------	-------------------

1. 試験実施状況査察

本試験(1回目): 指標菌株の前培養 平成13年01月24日	平成13年01月24日	平成13年01月24日
-----------------------------------	-------------	-------------

本試験(1回目): 被験物質の秤量・菌数チェック・被験物質調製・菌液の取扱い・ S9mixの使用・被験物質、対照物質及び菌液の添加・トップアガ ーの作製・指標菌株の検査・無菌試験 平成13年01月25日	平成13年01月25日	平成13年01月25日
--	-------------	-------------

本試験(1回目): 指標菌株検査結果の判定手順 平成13年01月26日	平成13年01月26日	平成13年01月26日
--	-------------	-------------

本試験(1回目): コロニー数の計測・無菌試験及びアミノ酸要求性検査の結果 判定手順 平成13年01月27日	平成13年01月27日	平成13年01月27日
--	-------------	-------------

2. 生データ査察 平成13年03月05日	平成13年03月05日	平成13年03月05日
--------------------------	-------------	-------------

3. 報告書(草案) 審査 平成13年03月05日	平成13年03月05日	平成13年03月05日
------------------------------	-------------	-------------

4. 報告書審査 平成13年03月29日	平成13年03月29日	平成13年03月29日
-------------------------	-------------	-------------

上記の審査・査察により、本試験が「OECDのGLP」に従って実施され、本報告書には、当該試験で使用方法・手順が忠実に記載され、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されていることを確認した。

平成 13 年 3 月 29 日
財団法人 畜産生物科学安全研究所

目 次

要約	1 頁
試験目的	2
材料および方法	2
1. 被験物質	2
2. 指標菌株	3
3. 指標菌株の検査	3
4. 指標菌株の保存と前培養	3
5. S9 mix	4
6. 被験物質の供試液の調製	5
7. 陰性対照および陽性対照	5
8. アミノ酸添加軟寒天培地の調製	6
9. 用量設定試験(予備試験)	6
10. 本試験	6
1) 用量設定	6
2) 実験方法	6
(1) プレインキュベーション法(直接法)	6
(2) プレインキュベーション法(代謝活性化法)	7
11. 無菌試験	7
12. 試験の有効性	8
13. 結果の判定	8
結果	8
結論	9
参考文献	9

表：

表1-1 S9 mix 非存在下における 2, 3, 5, 6-テトラクロロベンゾキノンの復帰突然変異試験結果 [本試験 1 回目-直接法]	10
表1-2 S9 mix 存在下における 2, 3, 5, 6-テトラクロロベンゾキノンの復帰突然変異試験結果 [本試験 1 回目-代謝活性化法]	11

表 2-1	S9 mix 非存在下における 2, 3, 5, 6-テトラクロロベンゾキノンの復帰突然変異試験結果 [本試験 2 回目-直接法]	12
表 2-2	S9 mix 存在下における 2, 3, 5, 6-テトラクロロベンゾキノンの復帰突然変異試験結果 [本試験 2 回目-代謝活性化法]	13
図 :		
図 1	2, 3, 5, 6-テトラクロロベンゾキノンの復帰突然変異試験結果-本試験 1 回目	14
図 2	2, 3, 5, 6-テトラクロロベンゾキノンの復帰突然変異試験結果-本試験 2 回目	19
添付資料	復帰変異コロニー数-背景データ	24

要 約

2, 3, 5, 6-テトラクロロベンゾキノンの遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため、復帰突然変異試験を指標菌株として *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2uvrA を用い、S9 mix 非存在(直接法) および存在(代謝活性化法) 下でプレインキュベーション法により行った。

用量は、用量設定試験(予備試験)の結果、生育阻害が認められた用量を最高用量とし、直接法の場合は *S. typhimurium* では 0.0781~2.5 μ g/プレートの範囲(公比 2)で、また、*E. coli* では 0.313~10 μ g/プレートの範囲(公比 2)でそれぞれ 6 用量を設定した。代謝活性化法の場合はいずれの菌株とも 19.5~625 μ g/プレートの範囲(公比 2)でそれぞれ 6 用量を設定した。

試験は 2 回実施した。その結果、全ての菌株において代謝活性化の有無にかかわらず、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。菌の生育阻害については、直接法の場合、TA100, TA1535, TA98 および TA1537 の 2.5 μ g/プレート、WP2uvrA の 10 μ g/プレートで認められ、代謝活性化法の場合は、いずれの菌株とも 625 μ g/プレートで認められた。

以上の成績から、本実験条件下では、2, 3, 5, 6-テトラクロロベンゾキノンの細菌に対する遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

試験目的

この試験は、2, 3, 5, 6-テトラクロロベンゾキノンの細菌に対する遺伝子突然変異誘発性の有無を明らかにするために実施した。

材料および方法^{1, 2)}

1. 被験物質

名称(略号) : 2, 3, 5, 6-テトラクロロベンゾキノ (TCBQ)

別名 クロラニル, テトラクロロ-1, 4-ベンゾキノ,

2, 3, 5, 6-テトラ-2, 5-シクロヘキサジエン-1, 4-ジオン

CAS番号 : 118-75-2

ロット番号 :

純度 : 99.5% (平成 11 年 11 月 10 日分析)

入手先(製造元) : 製

造の試薬を, 製品評価技術センターを通じて入手

入手日 : 平成 12 年 9 月 14 日

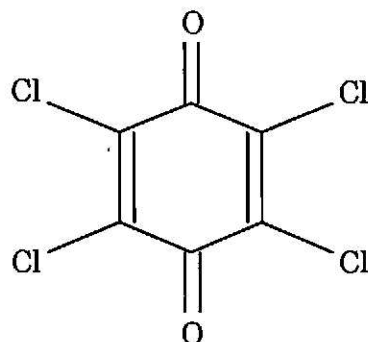
入手量 : 20 g

物性等 :

化学名 2, 3, 5, 6-テトラクロロベンゾキノ

(2, 3, 5, 6-Tetrachloro-*p*-benzoquinone)

構造式



分子式 $C_6Cl_4O_2$

分子量 245.87

性状(常温) 黄金色の結晶性粉末

融点 290℃

溶解性 油溶性〔水に殆ど溶けず (250 mg/L, 25℃), エチルアルコールに微溶, エチルエーテルに可溶〕

安定性 : 安定〔実験終了後, 残余被験物質を(財)畜産生物科学安全研究所において分析 (平成 13 年 3 月 5 日) した結果, 純度は 99.5% で, 実験期間中被験物質は安定であったことを確認した。〕

保管条件 : 冷暗所 (4℃), 密栓

2. 指標菌株

指標菌株は, 国立公衆衛生院より入手 (平成 6 年 12 月 19 日) した以下の 5 種類を用いた。

(塩基対置換型)

Salmonella typhimurium TA100, TA1535

Escherichia coli WP2uvrA

(フレームシフト型)

Salmonella typhimurium TA98, TA1537

3. 指標菌株の検査

次に示す指標菌株の遺伝的特性およびその他の諸性質に関する項目について検査し, 本来の特性を有することを確認する。

- (1) *S. typhimurium* におけるヒスチジンおよびビオチン要求性
E. coli におけるトリプトファン要求性
- (2) 紫外線感受性 (*uvrA*, *uvrB*)
- (3) *S. typhimurium* におけるクリスタルバイオレット感受性 (*rfa*)
- (4) *S. typhimurium* TA100 および TA98 におけるアンピシリン耐性(pKM101)
- (5) 自然突然変異体数
- (6) 陽性対照物質に対する反応性

4. 指標菌株の保存と前培養

菌液 0.8 mL にジメチルスルホキシド (DMSO, 和光純薬工業株式会社, ロット番号 ACH7185, 99.9%) を 0.07 mL の割合で加えて -80℃以下で保存した。この保

存菌株の 25 μ L をニュートリエントブロス (Bacto nutrient broth dehydrated, Difco Laboratories, ロット番号 44077JK) 液体培地に接種し, 37°C で 12 時間振盪培養した。培養後の懸濁菌液については, 分光光度計で吸光度 (OD_{660nm}) を測定し, 濁度と生菌数の換算式により 1 mL あたり 1×10^9 以上の生菌数が得られていることを確認した。

生菌数 ($\times 10^9$ /mL)

指標菌株	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
用量設定試験(直接法)	1.46	1.62	1.43	1.33	1.21
用量設定試験(代謝活性化法)	1.50	1.72	1.47	1.33	1.17
本試験(1 回目)	1.46	1.62	1.34	1.33	1.17
本試験(2 回目)	1.50	1.67	1.38	1.41	1.21

5. S9 mix

代謝活性化法に用いた S9 mix は, ラット肝臓のホモジネートの薬物代謝酵素分画 (S9) にコファクターを加えて凍結された市販品をキッコーマン株式会社から購入し, 使用した (用量設定試験: ロット番号 FSM-435・2000 年 11 月 10 日製造・2000 年 11 月 21 日購入, 本試験: ロット番号 FSM-438・2001 年 1 月 19 日製造・2001 年 1 月 30 日購入, ロット番号 FSM-435)。凍結 S9 mix は -80°C 以下で保存し, 使用時に冷水中で解凍して用いた。使用した S9 の製造法および S9 mix の 1 mL あたりの組成は, 次のとおりである。

S9 製造法

A. 使用動物

- a) 種・系統: Sprague-Dawley 系ラット (日本エスエルシー株式会社)
- b) 性・週齢: 雄・7 週齢
- c) 体 重: 213~252 g (FSM-435), 206~243 g (FSM-438)

B. 誘導法

- a) 誘導物質: phenobarbital (PB), 5, 6-benzoflavone (BF)
- b) 投与経路: 腹腔内投与
- c) 投与法 (投与開始日起算)
 - 1 日目-PB 30 mg/kg, 2, 3, 4 日目-PB 60 mg/kg
 - 3 日目-BF 80 mg/kg

C. 調製法

最終投与の翌日に肝臓ホモジネートを遠心分離($9000 \times g$)し, その上清を採取

S9 mix 1 mL 当たりの組成

MgCl ₂	8	μmol
KCl	33	μmol
G-6-P	5	μmol
NADH	4	μmol
NADPH	4	μmol
リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4)	100	μmol
S9	0.1	mL

6. 被験物質の供試液の調製

被験物質は水に難溶であり、予備的検討の結果、ジメチルスルホキシド (DMSO, 和光純薬工業株式会社, ロット番号 ELH7677, 99.9%) に懸濁可能 (50 mg/mL : 5000 μg/プレート用量の供試液) であったので、溶媒には DMSO を用いた。被験物質の供試液の調製は、実験の直前に行った。溶媒を用いて最高用量の供試液 (原液) を調製し、ついで、この原液を溶媒で順次希釈して所定の用量の被験物質供試液を作製した。なお、2500 μg/プレート以下の供試液は溶解液となった。

7. 陰性対照および陽性対照

陰性対照 (溶媒対照) には、被験物質用の溶媒である DMSO を用いた。陽性対照としては、以下の既知変異原物質を用いた。

AF-2 および 2-AA は DMSO (和光純薬工業株式会社, ロット番号 TPE7144, KSH7608, 99.9%) に、SA および 9-AA は蒸留水 (株式会社大塚製薬工場, ロット番号 K9G84, 局方) に溶解した。

指標菌株	直接法 (μg/プレート)	代謝活性化法 (μg/プレート)
TA100	AF-2 (0.01)	2-AA (1)
TA1535	SA (0.5)	2-AA (2)
WP2 _{uvrA}	AF-2 (0.04)	2-AA (10)
TA98	AF-2 (0.1)	2-AA (1)
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 (和光純薬工業株式会社, 98%, ロット番号 PTQ1296)

2-AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬工業株式会社, >90%, ロット番号 KCM2259)

SA : アジ化ナトリウム (和光純薬工業株式会社, 90%, ロット番号 KCG5232)

9-AA : 9-アミノアクリジン (Aldrich Chemical Company, 98%, ロット番号 07721MZ)

8. アミノ酸添加軟寒天培地の調製

0.6w/v%粉末寒天 (Difco Laboratories, ロット番号 132695XA) および 0.5w/v% 塩化ナトリウム (和光純薬工業株式会社, ロット番号 7001) の組成の軟寒天を調製した。溶解した軟寒天に, *S. typhimurium* 用には 0.5 mM D-ビオチン (Sigma Chemical Company, ロット番号 126H0568, 39H0679) および 0.5 mM L-ヒスチジン (和光純薬工業株式会社, ロット番号 DLJ5479) 水溶液, *E. coli* 用には 0.5 mM L-トリプトファン (和光純薬工業株式会社, ロット番号 KCK3898) 水溶液を 1/10 容加え, アミノ酸添加軟寒天培地とした。

9. 用量設定試験 (予備試験)

本試験における被験物質の適切な用量を把握するために, 直接法の場合は 1.25~5000 μg /プレートの範囲で, また, 代謝活性化法の場合は 39.1~5000 μg /プレートの範囲で用量を設定し, 本試験と同様の実験方法で試験を行った。試験は各用量 1 枚のプレートで行った。

その結果, 直接法の場合は, *S. typhimurium* では 2.5 μg /プレート以上, *E. coli* では 10 μg /プレート以上の用量で生育阻害が認められた。代謝活性化法の場合は, いずれの菌株とも 625 μg /プレート以上の用量において菌の生育阻害が認められた。

10. 本試験

本試験は, 同一菌株, 同一用量で 2 回行った。

1) 用量設定

用量設定試験の結果から, 被験物質の用量は, 直接法の場合は, *S. typhimurium* では 2.5 μg /プレートを最高用量とし, 以下公比 2 で 1.25, 0.625, 0.313, 0.156 および 0.781 μg /プレート, また, *E. coli* では 10 μg /プレートを最高用量とし, 以下公比 2 で 5, 2.5, 1.25, 0.625 および 0.313 μg /プレートの計 6 用量とした。代謝活性化法の場合は, 最高用量を 625 μg /プレートとし, 以下公比 2 で 313, 156, 78.1, 39.1 および 19.5 μg /プレートの計 6 用量とした。

2) 実験方法

(1) フレインキュベーション法 (直接法)

滅菌小試験管に前培養した懸濁菌液 0.1 mL, 被験物質の供試液 0.1 mL および

0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL (和光純薬工業株式会社, リン酸水素二ナトリウム・十二水塩: ロット番号 CAH3075, リン酸二水素ナトリウム・二水塩: ロット番号 CAJ2723) を分注し, 37°C で 20 分間振盪培養後, 45°C に保温したアミノ酸添加軟寒天培地 2 mL を加え, 最少グルコース寒天平板培地上に広げた。最少グルコース寒天平板培地 (テスメディア AN 培地, オリエンタル酵母工業株式会社, 用量設定試験: ロット番号 ANI560IP・2000 年 9 月 21 日製造・2000 年 11 月 8 日購入, 本試験: ロット番号 ANI730LP・2000 年 12 月 21 日製造・2001 年 1 月 29 日購入, ロット番号 ANI560IP) は, Vogel-Bonner E 培地 (0.2w/v% クエン酸・一水塩, 1w/v% リン酸二カリウム, 0.192w/v% リン酸一アンモニウム, 0.066w/v% 水酸化ナトリウム, 0.02w/v% 硫酸マグネシウム・七水塩) に寒天粉末を 1.5w/v% およびグルコースを 2w/v% となるように加え, 30 mL ずつ分注したものである。37°C で 48 時間培養後, 復帰変異コロニーを計数し, 同時に指標菌株の生育阻害の有無を実体顕微鏡を用いて観察した。陰性対照および陽性対照群においては, 上記の被験物質の供試液 0.1 mL にかわり, 溶媒 (DMSO) および陽性対照物質溶液 0.1 mL を用いて同様に実施した。試験は各用量 3 枚のプレートで行った。

(2) ブレインキューベーション法 (代謝活性化法)

滅菌小試験管に前培養した懸濁菌液 0.1 mL, 被験物質の供試液 0.1 mL および S9 mix 0.5 mL を分注し, 37°C で 20 分間振盪培養後, 45°C に保温したアミノ酸添加軟寒天培地 2 mL を加え, 最少グルコース寒天平板培地上に広げた。37°C で 48 時間培養後, 復帰変異コロニーを計数し, 同時に指標菌株の生育阻害の有無を実体顕微鏡を用いて観察した。陰性対照および陽性対照群においては, 上記の被験物質の供試液 0.1 mL にかわり, 溶媒 (DMSO) および陽性対照物質溶液 0.1 mL を用いて同様に実施した。試験は各用量 3 枚のプレートで行った。

11. 無菌試験

用量設定試験および本試験において, 用いた溶媒, S9 mix および最高用量の被験物質の供試液について, それぞれ 0.1 mL に 0.6w/v% 軟寒天培地 2 mL を加え, 最少グルコース寒天平板培地 (テスメディア AN 培地, オリエンタル酵母工業株式会社, ロット番号 ANI520IP・2000 年 9 月 5 日製造・2000 年 11 月 21 日購入, ロッ

ト番号 ANI560IP) に重層後、37℃で 48 時間培養し、菌の生育の有無を調べた。
最少グルコース寒天平板培地は、それぞれ 3 枚ずつ使用した。

12. 試験の有効性

以下の 3 基準を満たす場合に、試験は適切な条件下で実施され、試験は有効であると判定した。

- (1) 試験に用いた菌液、溶媒、被験物質の供試液および S9 mix に雑菌の混入がない。
- (2) 各指標菌株の陰性対照における復帰変異コロニー数が、当研究所における背景データの範囲内の値を示す（自然復帰変異体数）。
- (3) 各指標菌株の陽性対照における復帰変異コロニー数が、当研究所における陽性対照値の背景データの範囲あるいはその近くの値を示す。

13. 結果の判定

結果の判定は、各用量におけるプレートでの復帰変異コロニー数の平均値を基に、原則的に以下の 3 基準を満たす場合を陽性とした。

- (1) 被験物質処理群において陰性対照値の 2 倍以上の復帰変異コロニー数が出現する。
 - (2) 被験物質用量の増加とともに復帰変異コロニー数が増加する（用量依存性）。
 - (3) 2 回にわたる本試験の結果から復帰変異コロニー数の増加に再現性が認められる。
- 但し、明確な用量依存性が認められない場合においても、陽性値を示す試験結果に再現性が認められれば陽性と判定した。

結 果

試験を 2 回実施した結果（表 1-1, 1-2, 2-1, 2-2 および図 1-1, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 2-1, 2-2, 2-3, 2-4, 2-5）、直接法および代謝活性化法のいずれの場合も、供試したすべての菌株において復帰変異コロニー数は、陰性対照値の 2 倍を超えることはなかった。菌の生育阻害については、直接法の場合は TA100, TA1535, TA98 および TA1537 の 2.5 μg/プレート、WP2uvrA の 10 μg/プレートで認められ、また、代謝活性化法の

場合はいずれの菌株とも 625 μ g/プレートで認められた。

陰性対照群では背景データ（添付資料）の範囲内の復帰変異コロニー数が認められ、陽性対照群においても、それぞれ背景データ（添付資料）の範囲内もしくはその近く
の陽性を示す復帰変異コロニー数の増加が認められた。また試験に用いた菌液、溶媒、
被験物質の供試液および S9 mix などには、雑菌の混入は認められなかった。

結 論

2, 3, 5, 6-テトラクロロベンゾキノンについて遺伝子突然変異誘発性の有無を調べるため、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。その結果、代謝活性化の有無にかかわらず、全ての指標菌株で復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

試験の有効性については、2 回にわたる本試験ともに有効であることが確認された。

したがって、本実験条件下では 2, 3, 5, 6-テトラクロロベンゾキノンの遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

参考文献

- 1) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation. Research*, 113, 173-215.
- 2) Green, M. H. (1984). "Handbook of Mutagenicity Test Procedures" 1, Vol. 3, eds. by Kilbey, B. J., Legator, M., Nicols, W. and Ramel, C., Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, pp. 161-187.

表 1-1 S9 mix 非存在下における2,3,5,6-テトラクロロベンゾキノンの
復帰突然変異試験結果〔本試験1回目－直接法〕

用 量 〔μg/プレート〕	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 ^{uvrA}	TA98	TA1537
陰性対照	137	9	15	23	8
[DMSO]	126	8	18	30	11
	103	10	18	11	5
	(122 ± 17)	(9 ± 1)	(17 ± 2)	(21 ± 10)	(8 ± 3)
0.0781	125	9	—	23	8
	123	10	—	18	5
	110	7	—	25	5
	(119 ± 8)	(9 ± 2)	—	(22 ± 4)	(6 ± 2)
0.156	115	4	—	26	10
	118	8	—	30	12
	109	6	—	14	5
	(114 ± 5)	(6 ± 2)	—	(23 ± 8)	(9 ± 4)
0.313	103	13	19	25	8
	109	7	19	20	9
	111	7	18	19	8
	(108 ± 4)	(9 ± 3)	(19 ± 1)	(21 ± 3)	(8 ± 1)
0.625	108	9	13	25	7
	137	6	25	21	7
	115	5	22	17	4
	(120 ± 15)	(7 ± 2)	(20 ± 6)	(21 ± 4)	(6 ± 2)
1.25	107	8	16	19	4
	97	10	17	22	5
	129	8	25	29	12
	(111 ± 16)	(9 ± 1)	(19 ± 5)	(23 ± 5)	(7 ± 4)
2.5	92 *	11 *	12	28 *	4 *
	124 *	12 *	13	29 *	7 *
	94 *	10 *	21	30 *	14 *
	(103 ± 18)	(11 ± 1)	(15 ± 5)	(29 ± 1)	(8 ± 5)
5	—	—	14	—	—
	—	—	16	—	—
	—	—	12	—	—
	—	—	(14 ± 2)	—	—
10	—	—	13 *	—	—
	—	—	10 *	—	—
	—	—	15 *	—	—
	—	—	(13 ± 3)	—	—
陽性対照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
μg/プレート	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復帰変異	624	360	799	353	294
コロニー数	584	346	797	380	258
/プレート	619	363	752	338	219
	(609 ± 22)	(356 ± 9)	(783 ± 27)	(357 ± 21)	(257 ± 38)

DMSO: ジメチルスルホキシド

(): 平均値±標準偏差

*: 菌の生育阻害が認められた。

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

SA : アジ化ナトリウム

9-AA: 9-アミノアクリジン

表 1-2 S9 mix 存在下における2,3,5,6-テトラクロロベンゾキノンの
復帰突然変異試験結果〔本試験1回目－代謝活性化法〕

用 量 〔 μ g/プレート〕	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 _{uvrA}	TA98	TA1537
陰性対照	122	10	14	37	18
[DMSO]	115	9	21	30	16
	129	9	27	32	13
	(122 \pm 7)	(9 \pm 1)	(21 \pm 7)	(33 \pm 4)	(16 \pm 3)
19 .5	125	10	23	30	10
	156	12	19	26	15
	131	10	17	39	12
	(137 \pm 16)	(11 \pm 1)	(20 \pm 3)	(32 \pm 7)	(12 \pm 3)
39 .1	141	10	21	29	15
	127	4	28	34	16
	119	12	26	33	12
	(129 \pm 11)	(9 \pm 4)	(25 \pm 4)	(32 \pm 3)	(14 \pm 2)
78 .1	151	8	22	30	12
	127	9	23	38	15
	140	7	18	24	17
	(139 \pm 12)	(8 \pm 1)	(21 \pm 3)	(31 \pm 7)	(15 \pm 3)
156	145	11	13	24	12
	154	7	26	27	9
	127	11	25	25	12
	(142 \pm 14)	(10 \pm 2)	(21 \pm 7)	(25 \pm 2)	(11 \pm 2)
313	176	11	27	25	16
	166	9	25	38	19
	160	9	29	30	20
	(167 \pm 8)	(10 \pm 1)	(27 \pm 2)	(31 \pm 7)	(18 \pm 2)
625	10 *	0 *	23 *	0 *	0 *
	20 *	0 *	29 *	0 *	0 *
	3 *	0 *	39 *	0 *	0 *
	(11 \pm 9)	(0 \pm 0)	(30 \pm 8)	(0 \pm 0)	(0 \pm 0)
陽性対照	2- AA	2- AA	2- AA	2- AA	2- AA
μ g/プレート	1	2	10	1	2
復帰変異	431	119	540	269	89
コロニー数	397	149	569	273	88
/プレート	392	139	572	266	74
	(407 \pm 21)	(136 \pm 15)	(560 \pm 18)	(269 \pm 4)	(84 \pm 8)

DMSO: ジメチルスルホキシド

(): 平均値 \pm 標準偏差

*: 菌の生育阻害が認められた。

2-AA: 2-アミノアントラセン

表 2-1 S9 mix 非存在下における2,3,5,6-テトラクロロベンゾキノンの
復帰突然変異試験結果〔本試験2回目－直接法〕

用 量 〔 μ g/プレート〕	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 _{uvrA}	TA98	TA1537
陰性対照 [DMSO]	113	8	22	18	8
	130	14	20	25	9
	96	6	17	19	11
	(113 \pm 17)	(9 \pm 4)	(20 \pm 3)	(21 \pm 4)	(9 \pm 2)
0.0781	102	16	—	18	6
	90	10	—	24	5
	105	4	—	22	7
	(99 \pm 8)	(10 \pm 6)	—	(21 \pm 3)	(6 \pm 1)
0.156	121	7	—	21	11
	109	14	—	23	12
	109	6	—	20	5
	(113 \pm 7)	(9 \pm 4)	—	(21 \pm 2)	(9 \pm 4)
0.313	82	9	31	19	9
	104	5	17	20	15
	98	10	31	17	14
	(95 \pm 11)	(8 \pm 3)	(26 \pm 8)	(19 \pm 2)	(13 \pm 3)
0.625	103	9	27	25	14
	98	6	23	19	15
	105	11	33	17	14
	(102 \pm 4)	(9 \pm 3)	(28 \pm 5)	(20 \pm 4)	(14 \pm 1)
1.25	118	7	22	17	14
	103	7	22	17	12
	120	8	23	25	10
	(114 \pm 9)	(7 \pm 1)	(22 \pm 1)	(20 \pm 5)	(12 \pm 2)
2.5	107 *	12 *	33	20 *	8 *
	123 *	11 *	32	40 *	11 *
	117 *	8 *	32	20 *	13 *
	(116 \pm 8)	(10 \pm 2)	(32 \pm 1)	(27 \pm 12)	(11 \pm 3)
5	—	—	23	—	—
	—	—	30	—	—
	—	—	19	—	—
	—	—	(24 \pm 6)	—	—
10	—	—	23 *	—	—
	—	—	19 *	—	—
	—	—	25 *	—	—
	—	—	(22 \pm 3)	—	—
陽性対照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
μ g/プレート	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復帰変異	532	334	623	522	326
コロニー数	562	347	661	465	408
/プレート	501	348	667	435	393
	(532 \pm 31)	(343 \pm 8)	(650 \pm 24)	(474 \pm 44)	(376 \pm 44)

DMSO: ジメチルスルホキシド

(): 平均値 \pm 標準偏差

*: 菌の生育阻害が認められた。

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

SA : アジ化ナトリウム

9-AA: 9-アミノアクリジン

表 2-2 S9 mix 存在下における2,3,5,6-テトラクロロベンゾキノンの
復帰突然変異試験結果〔本試験2回目－代謝活性化法〕

用 量 〔 μ g/プレート〕	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 _{uvrA}	TA98	TA1537
陰性対照 [DMSO]	100	13	35	32	12
	105	8	21	39	13
	105	6	26	33	13
	(103 \pm 3)	(9 \pm 4)	(27 \pm 7)	(35 \pm 4)	(13 \pm 1)
19 .5	125	15	24	36	19
	134	16	20	21	15
	132	7	22	27	14
	(130 \pm 5)	(13 \pm 5)	(22 \pm 2)	(28 \pm 8)	(16 \pm 3)
39 .1	131	8	24	26	11
	117	7	41	29	16
	114	13	32	29	8
	(121 \pm 9)	(9 \pm 3)	(32 \pm 9)	(28 \pm 2)	(12 \pm 4)
78 .1	132	7	36	31	16
	130	10	29	25	17
	126	12	35	30	13
	(129 \pm 3)	(10 \pm 3)	(33 \pm 4)	(29 \pm 3)	(15 \pm 2)
156	151	10	40	26	16
	140	8	31	24	15
	142	8	29	30	14
	(144 \pm 6)	(9 \pm 1)	(33 \pm 6)	(27 \pm 3)	(15 \pm 1)
313	169	11	43	38	6
	140	12	29	19	16
	200	6	29	37	14
	(170 \pm 30)	(10 \pm 3)	(34 \pm 8)	(31 \pm 11)	(12 \pm 5)
625	20 *	0 *	33 *	2 *	0 *
	58 *	0 *	44 *	3 *	0 *
	66 *	0 *	44 *	0 *	0 *
	(48 \pm 25)	(0 \pm 0)	(40 \pm 6)	(2 \pm 2)	(0 \pm 0)
陽性対照	2- AA	2- AA	2- AA	2- AA	2- AA
μ g/プレート	1	2	10	1	2
復帰変異	408	137	538	225	101
コロニー数	430	141	593	240	84
/プレート	389	133	619	218	87
	(409 \pm 21)	(137 \pm 4)	(583 \pm 41)	(228 \pm 11)	(91 \pm 9)

DMSO: ジメチルスルホキシド

(): 平均値 \pm 標準偏差

*: 菌の生育阻害が認められた。

2-AA: 2-アミノアントラセン

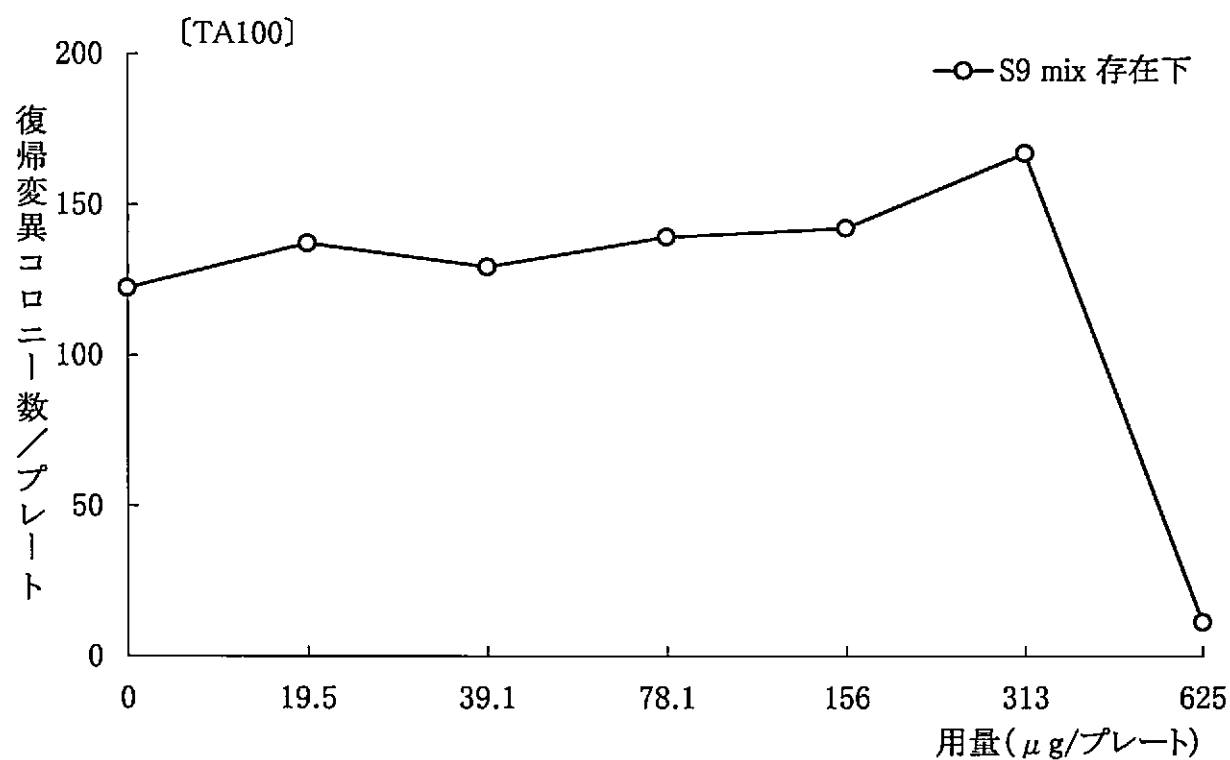
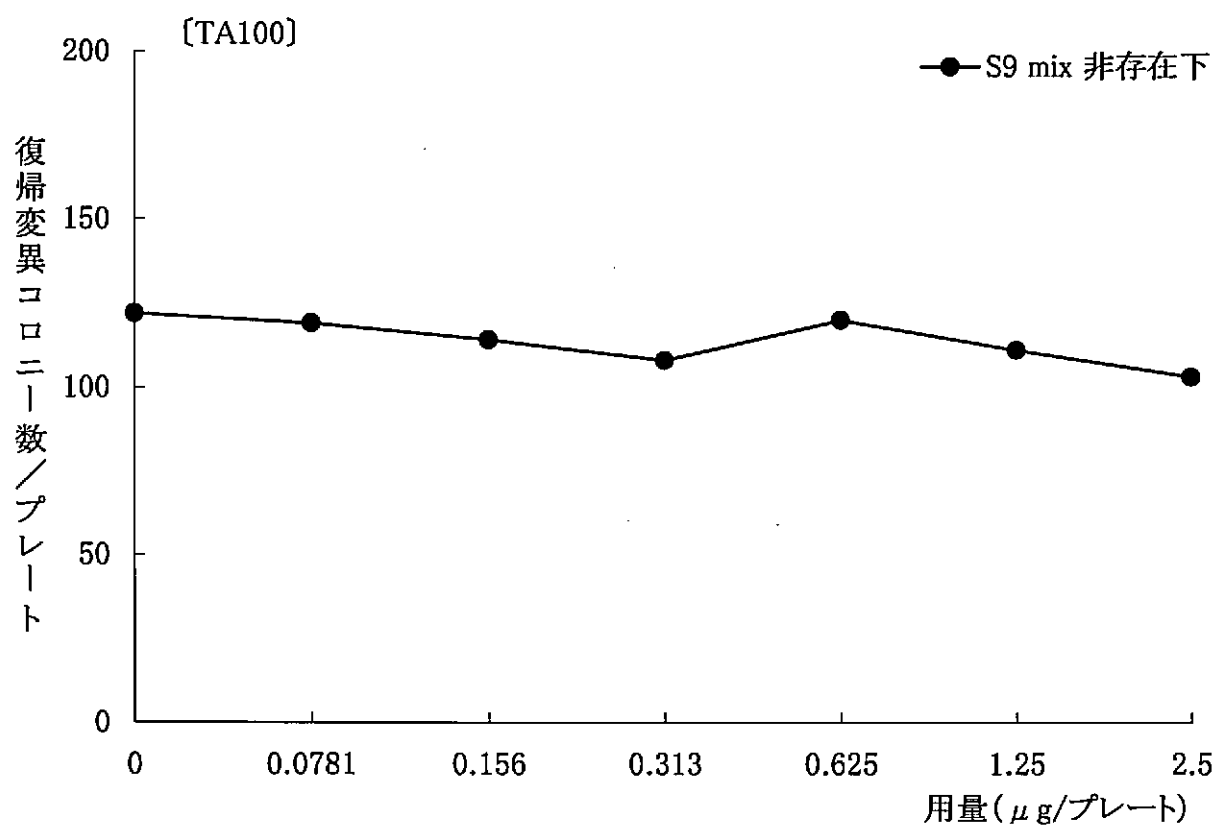


図 1-1 2,3,5,6-テトラクロロベンゾキノンの復帰突然変異試験結果一本試験1回目

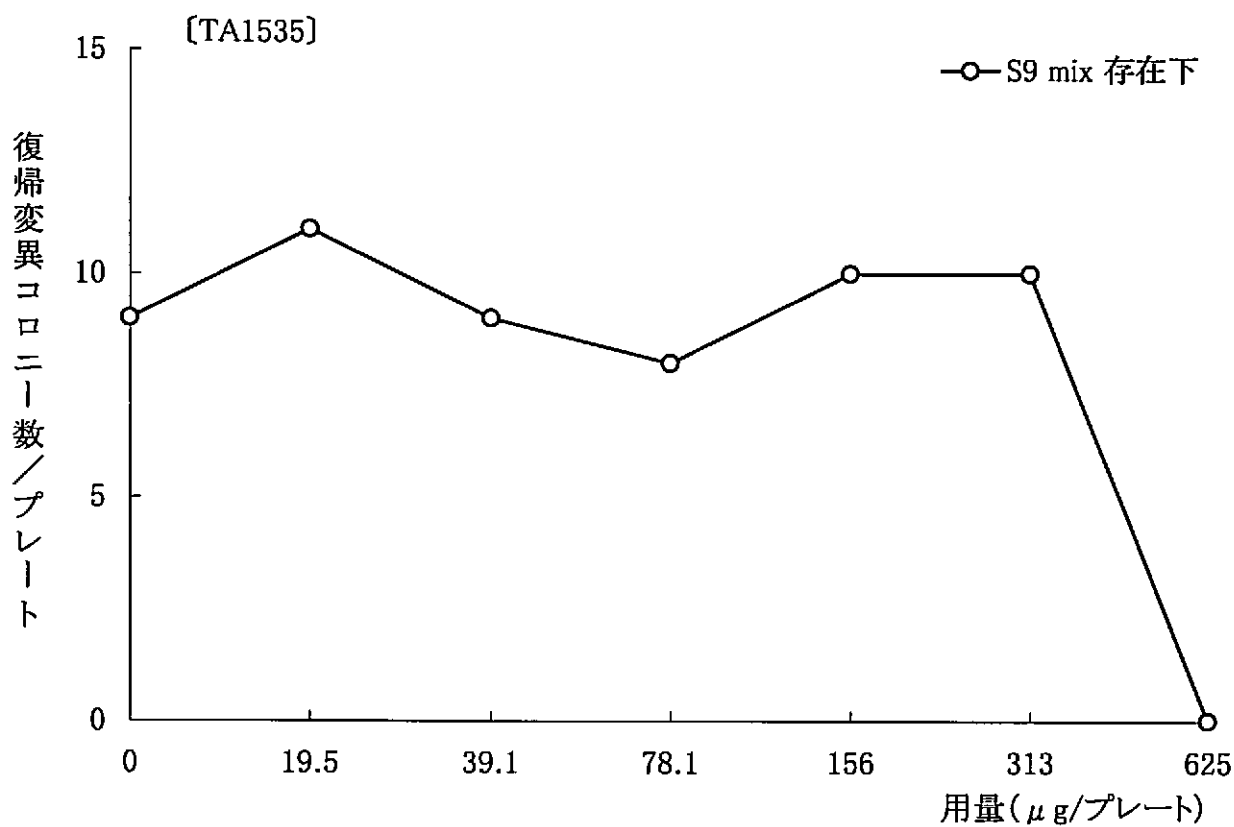
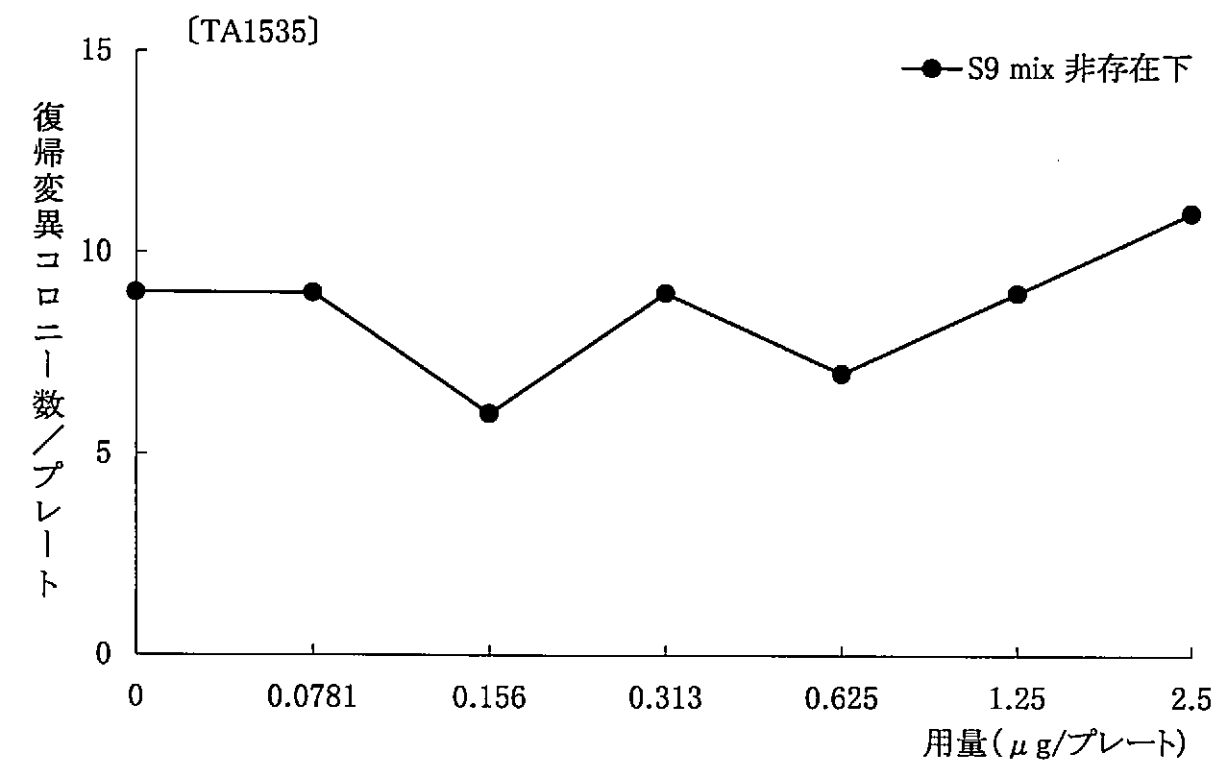


図 1-2 2,3,5,6-テトラクロロベンゾキノンの復帰突然変異試験結果—本試験1回目

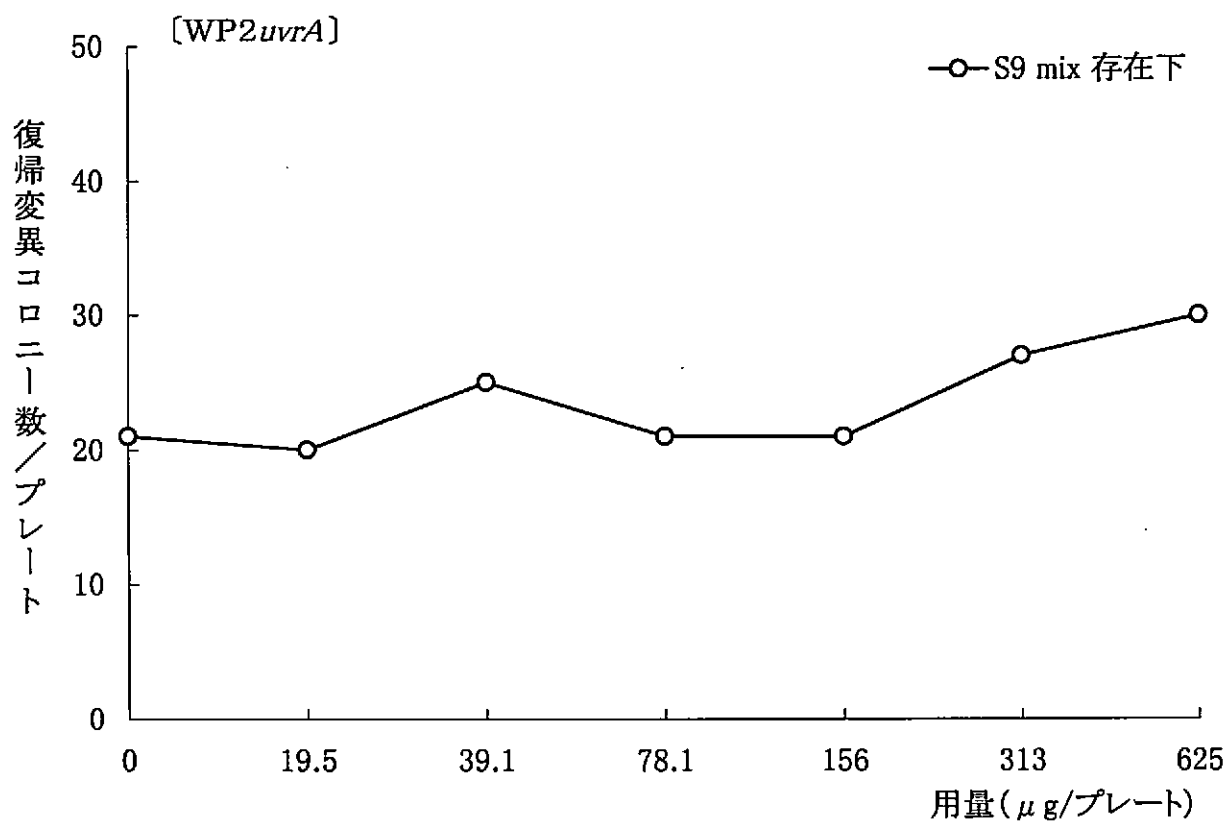
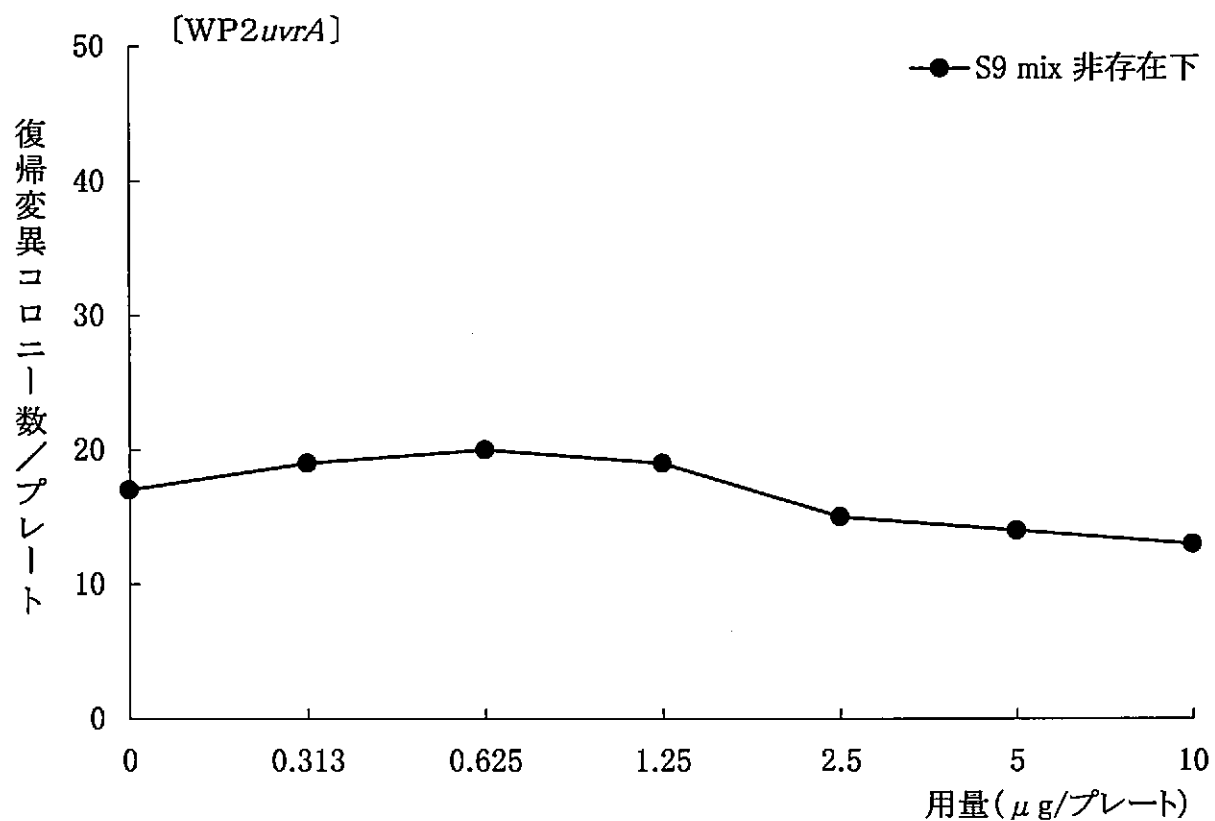


図 1-3 2,3,5,6-テトラクロロベンゾキノンの復帰突然変異試験結果一本試験1回目

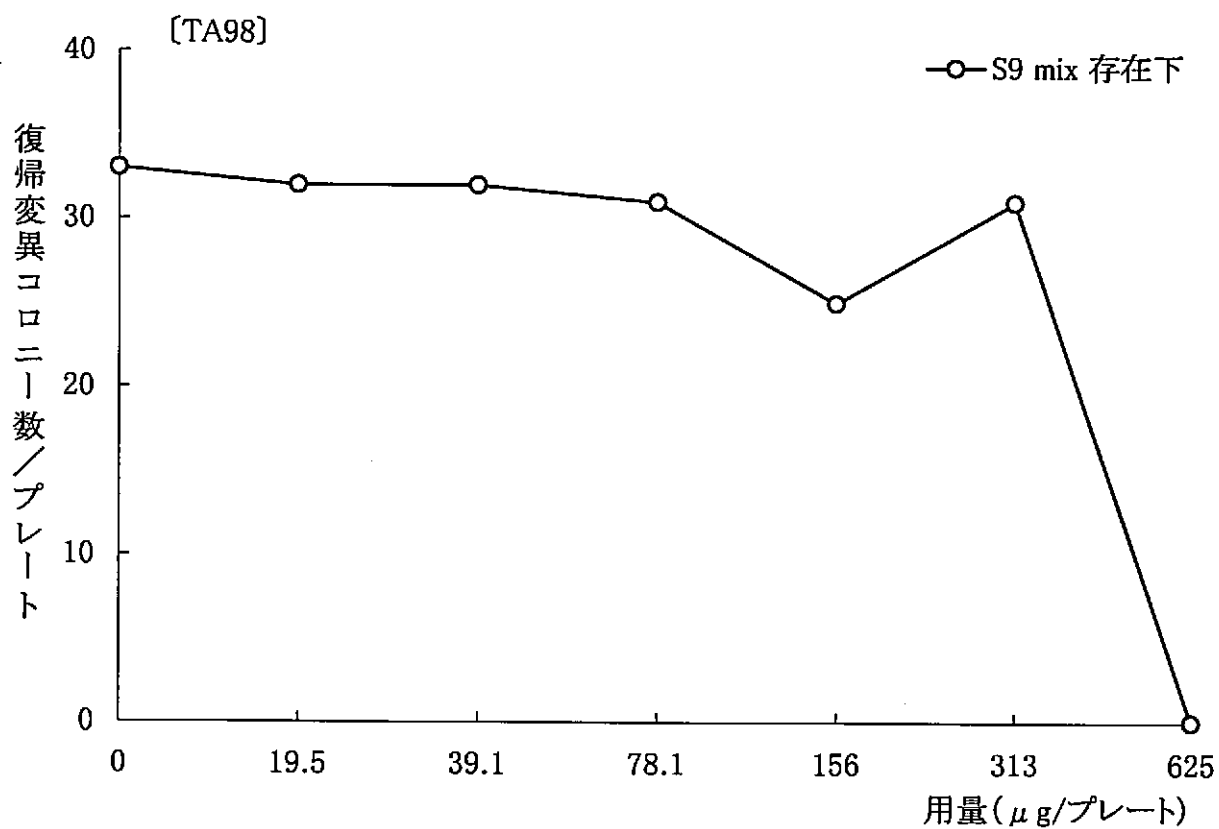
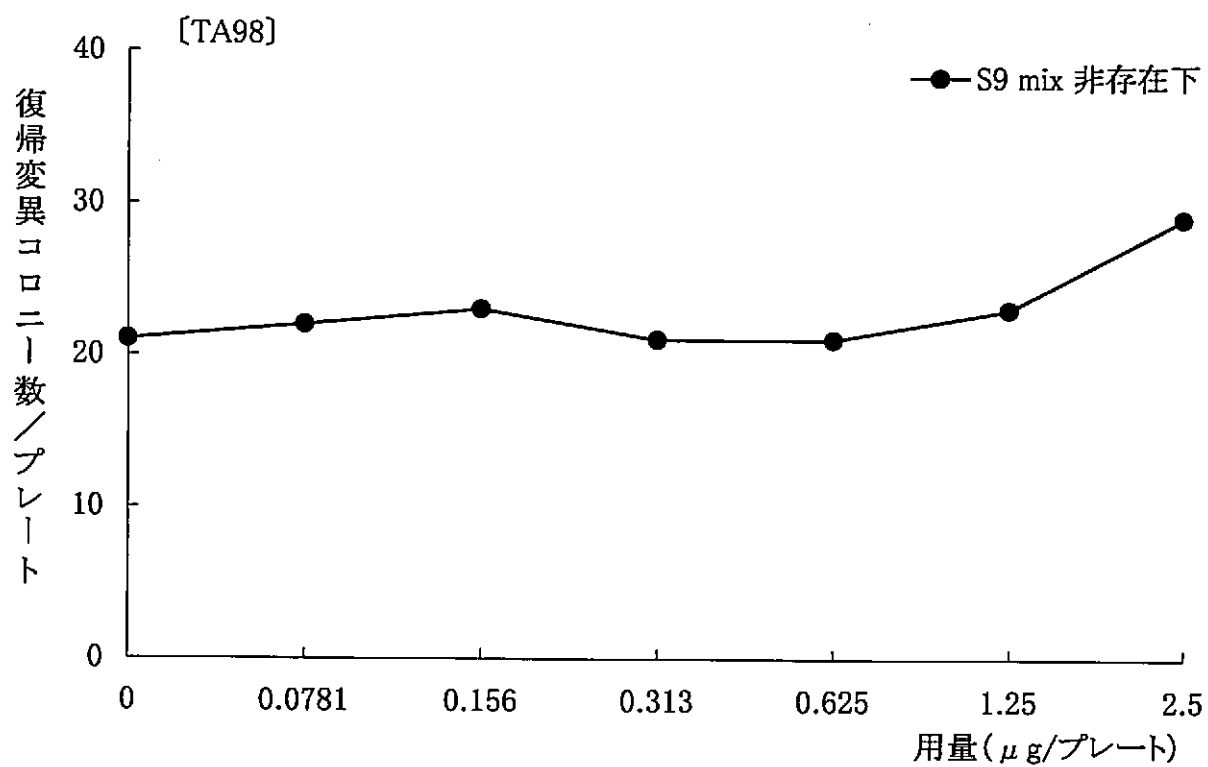


図 1-4 2,3,5,6-テトラクロロベンゾキノンの復帰突然変異試験結果—本試験1回目

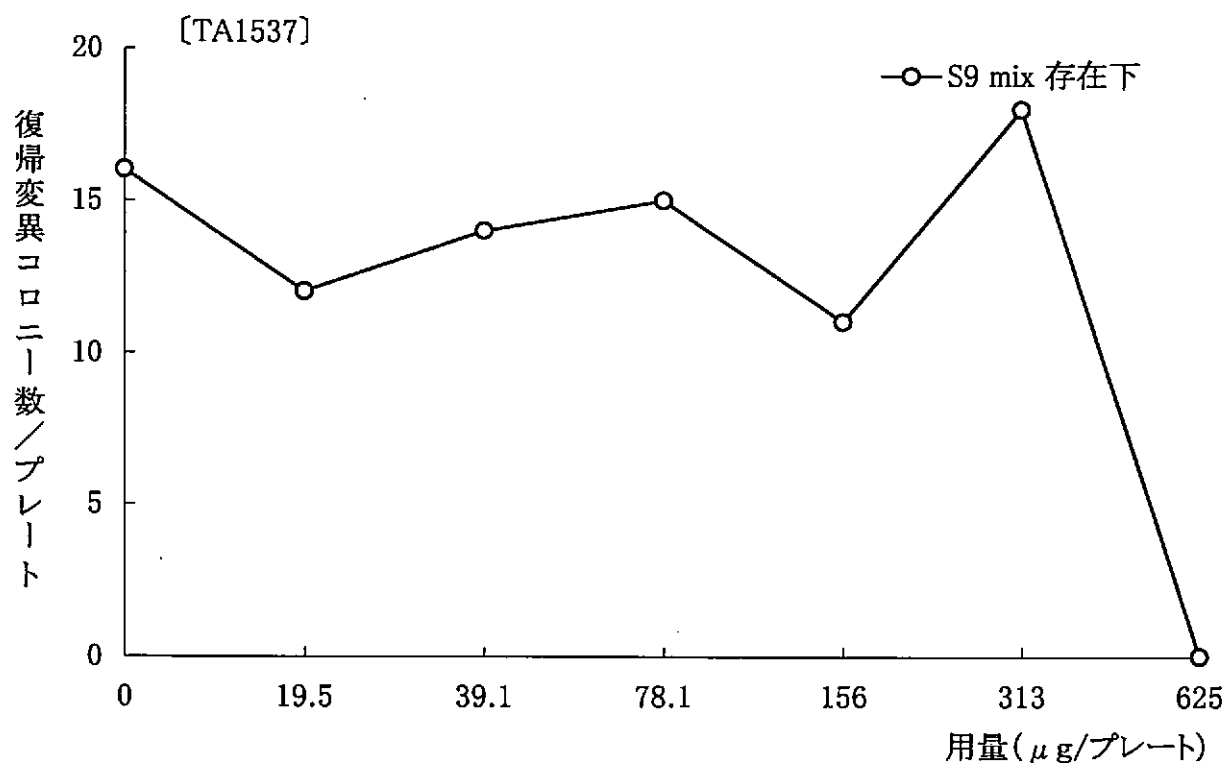
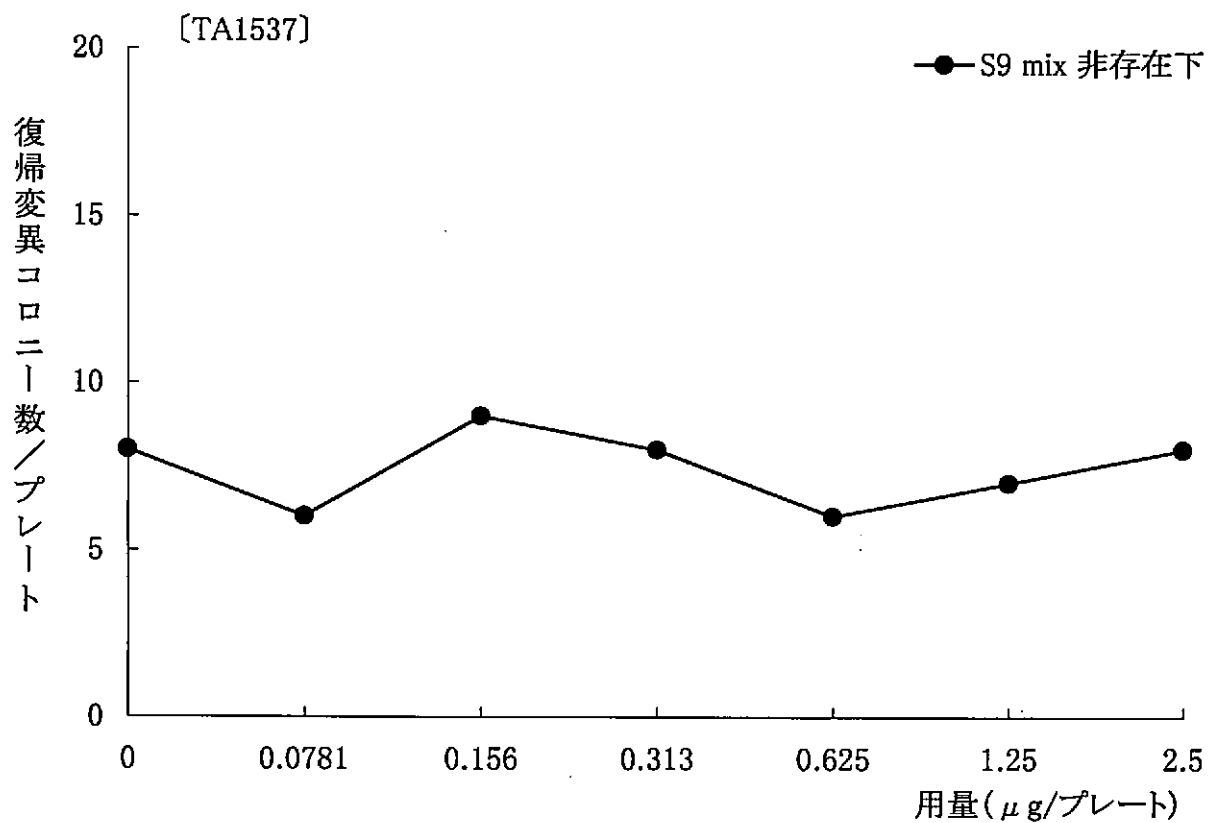


図 1-5 2,3,5,6-テトラクロロベンゾキノンの復帰突然変異試験結果一本試験1回目

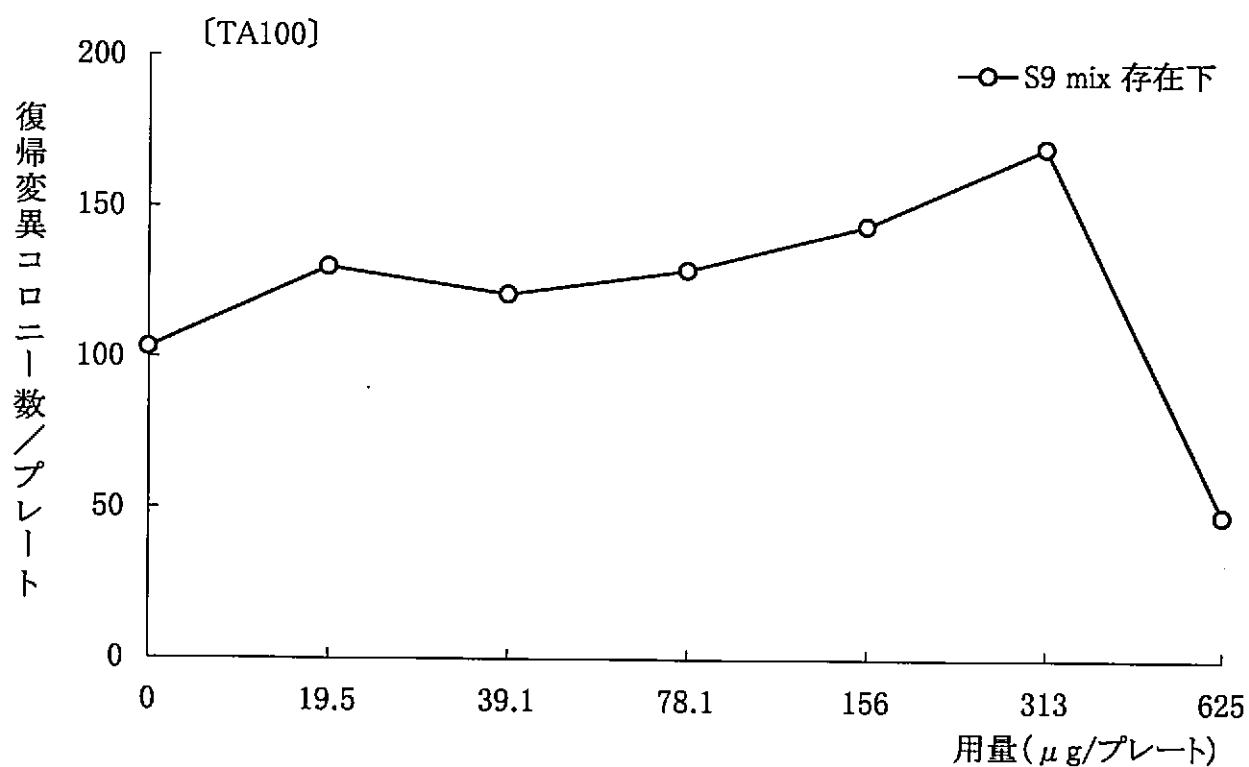
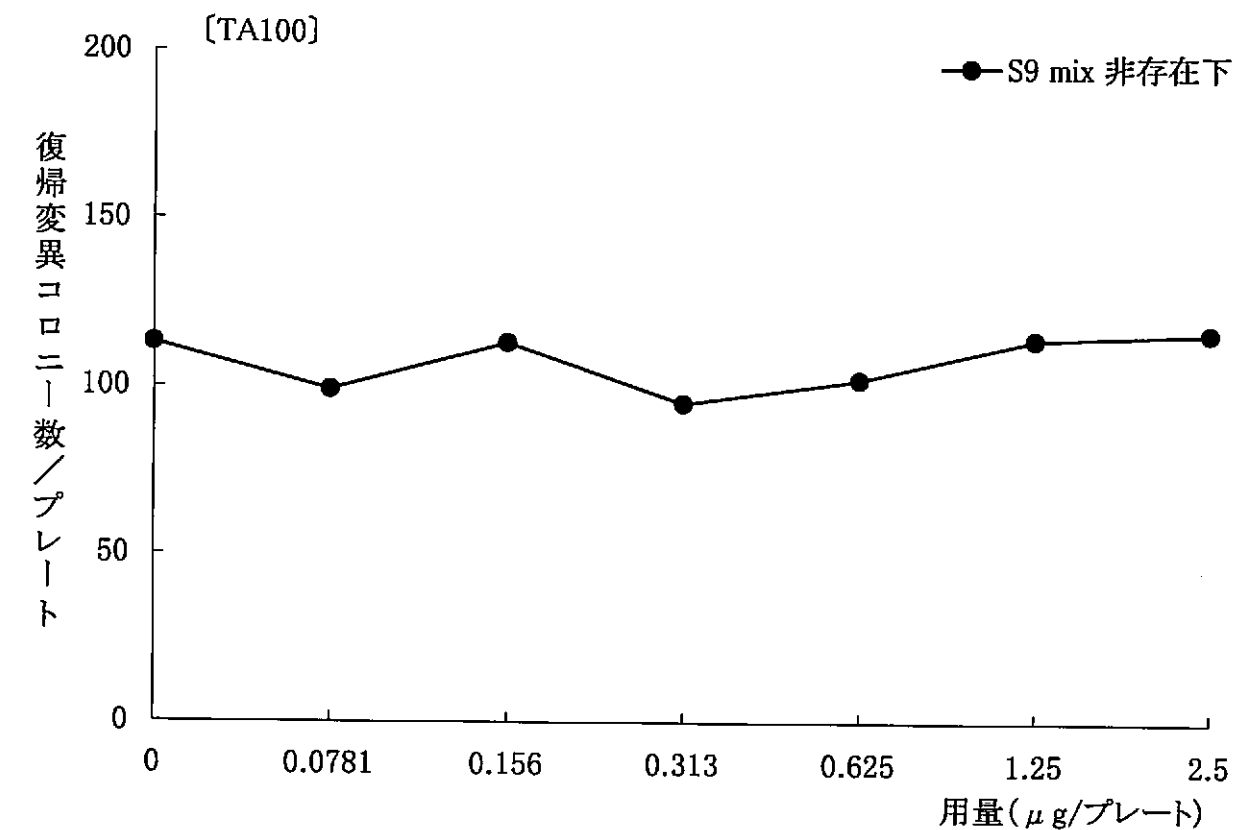


図 2-1 2,3,5,6-テトラクロロベンゾキノンの復帰突然変異試験結果—本試験2回目

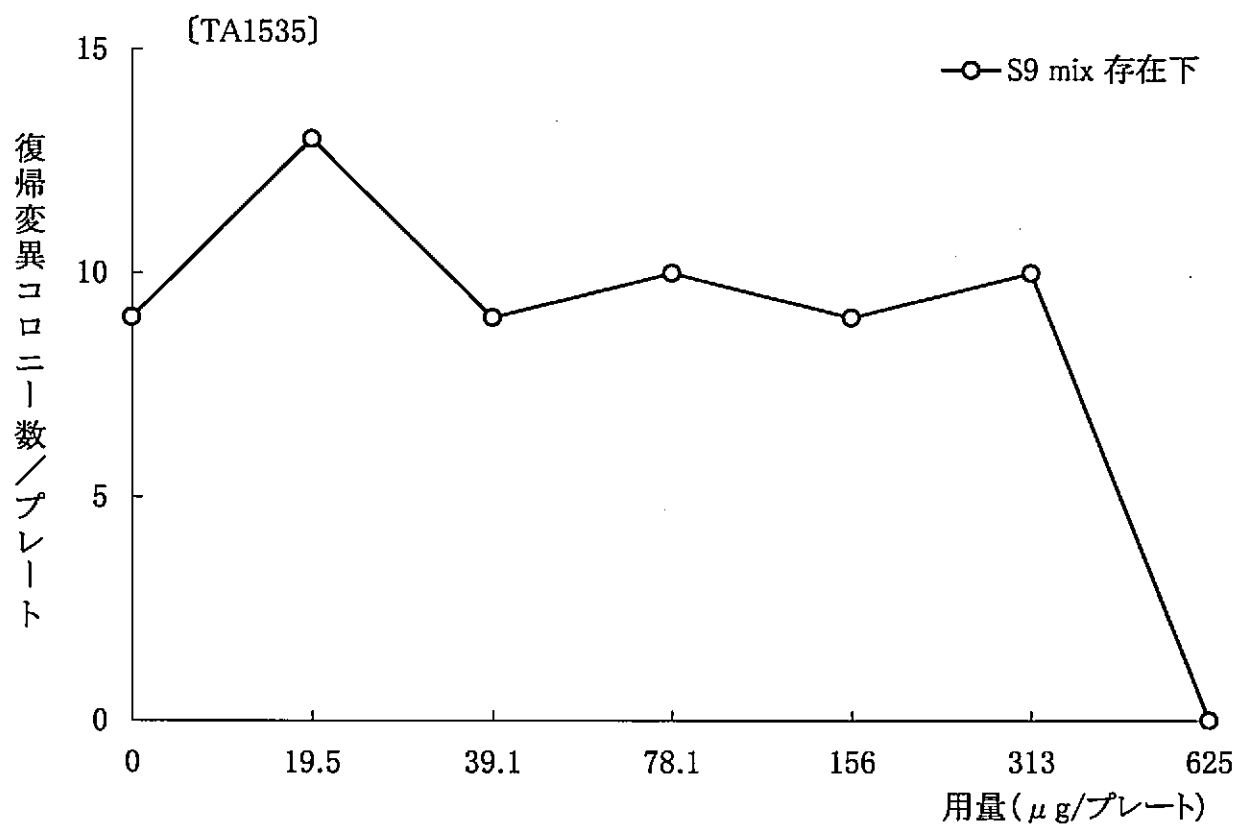
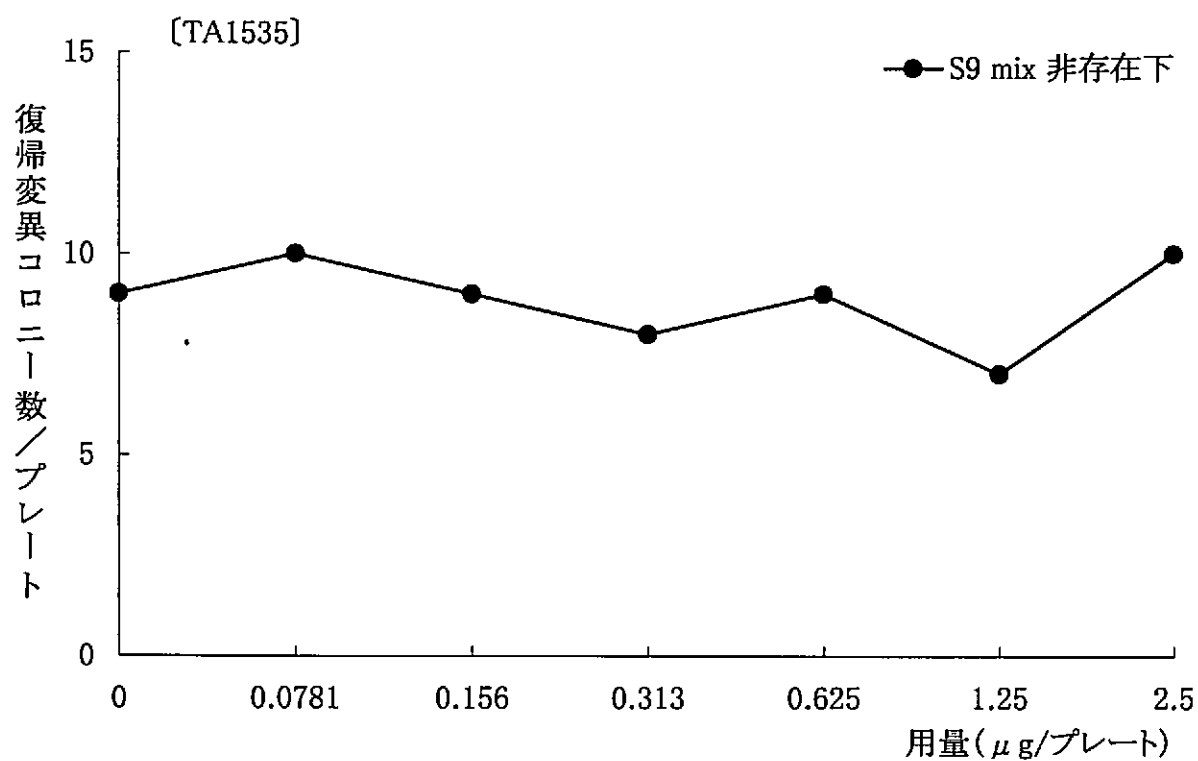


図 2-2 2,3,5,6-テトラクロロベンゾキノンの復帰突然変異試験結果一本試験2回目

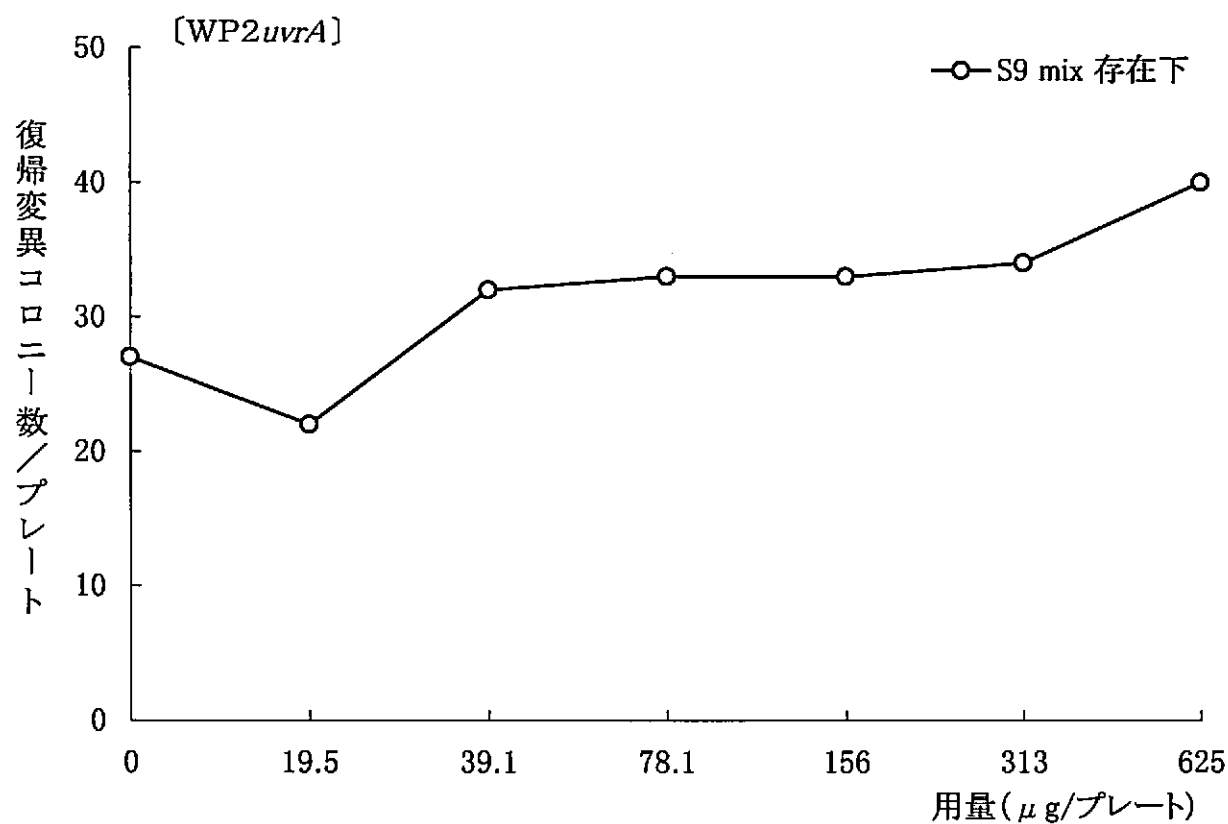
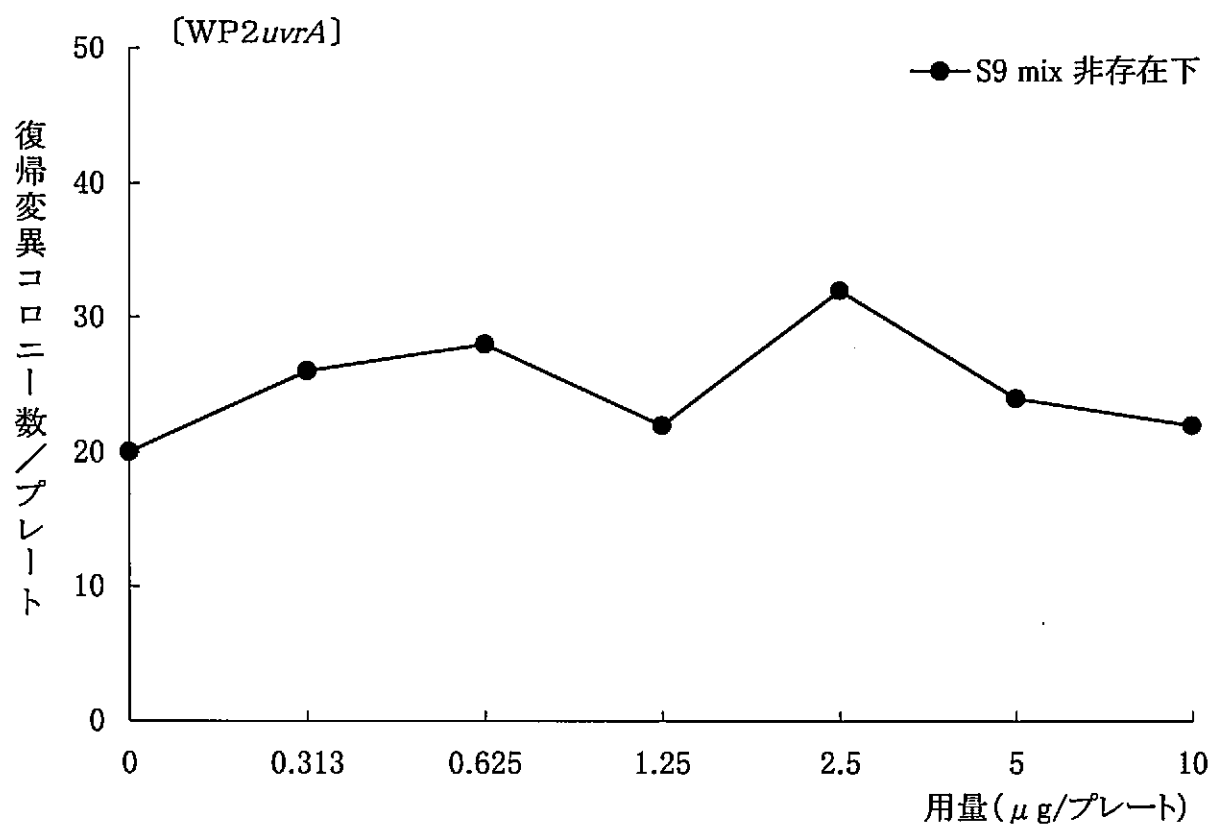


図 2-3 2,3,5,6-テトラクロロベンゾキノンの復帰突然変異試験結果一本試験1回目

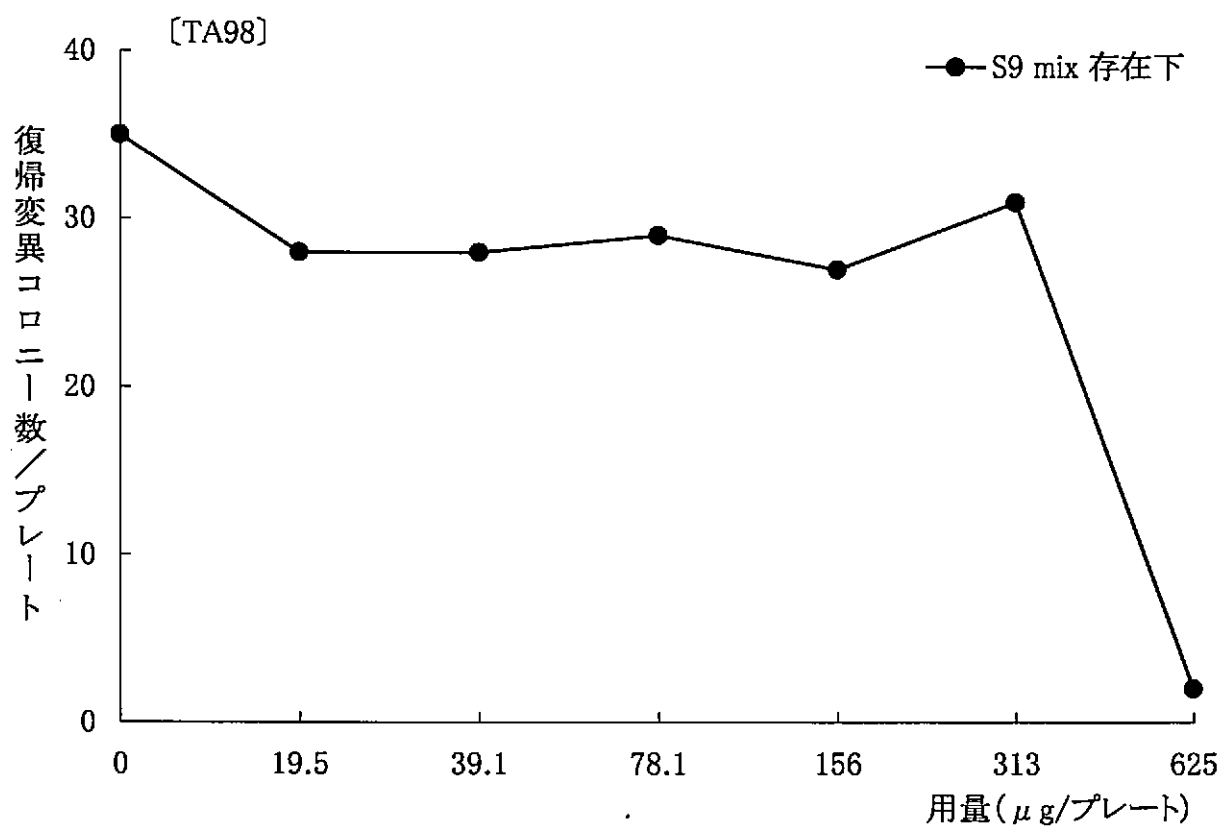
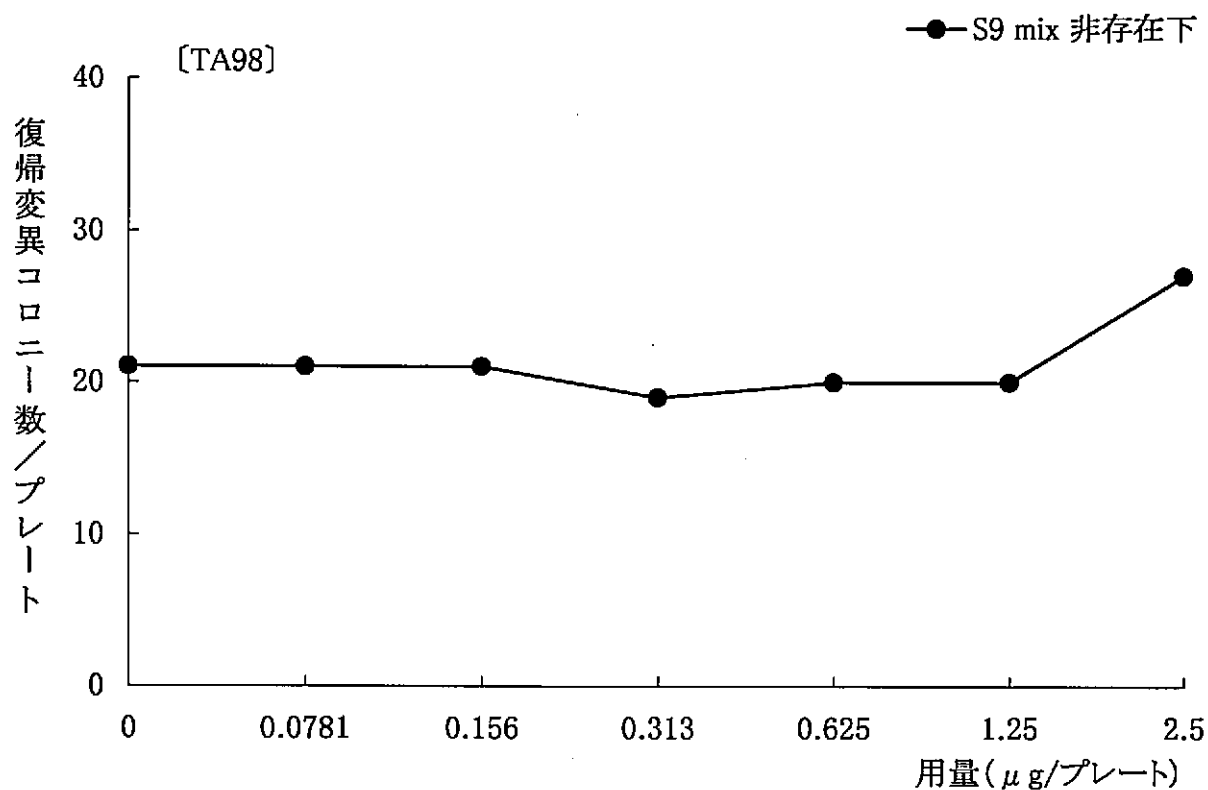


図 2-4 2,3,5,6-テトラクロロベンゾキノンの復帰突然変異試験結果一本試験2回目

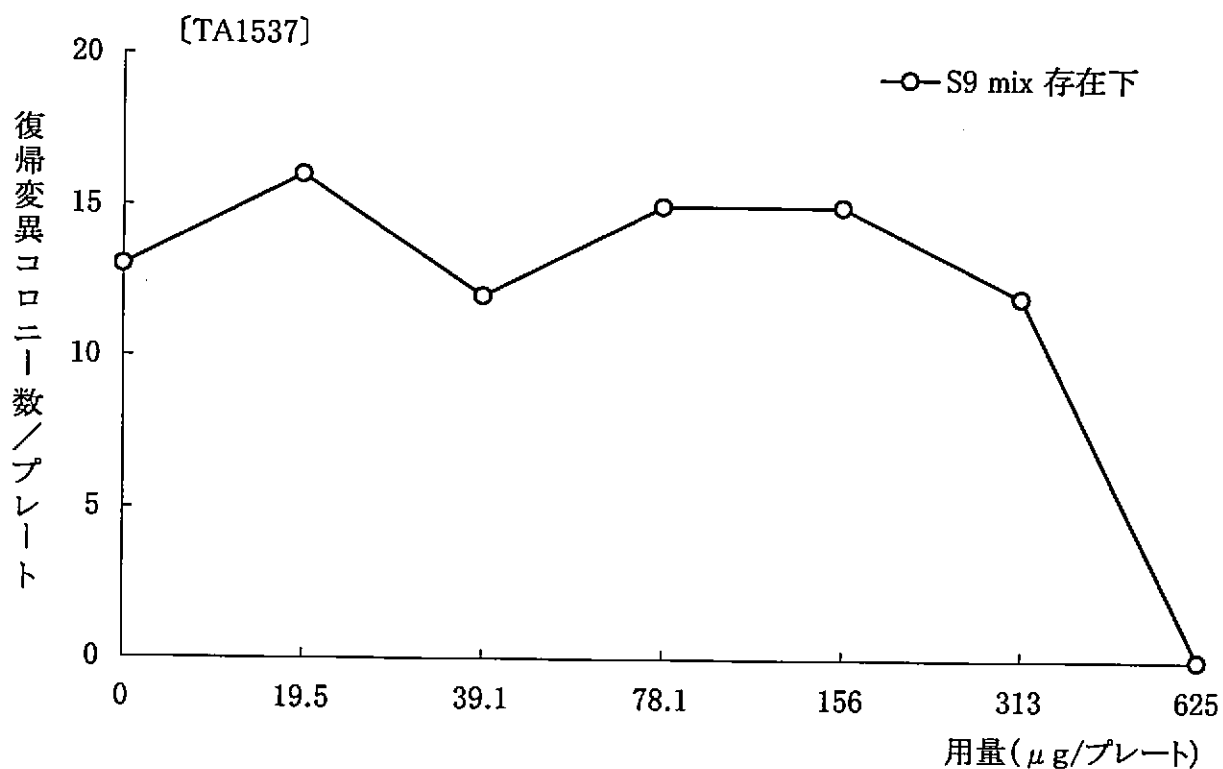
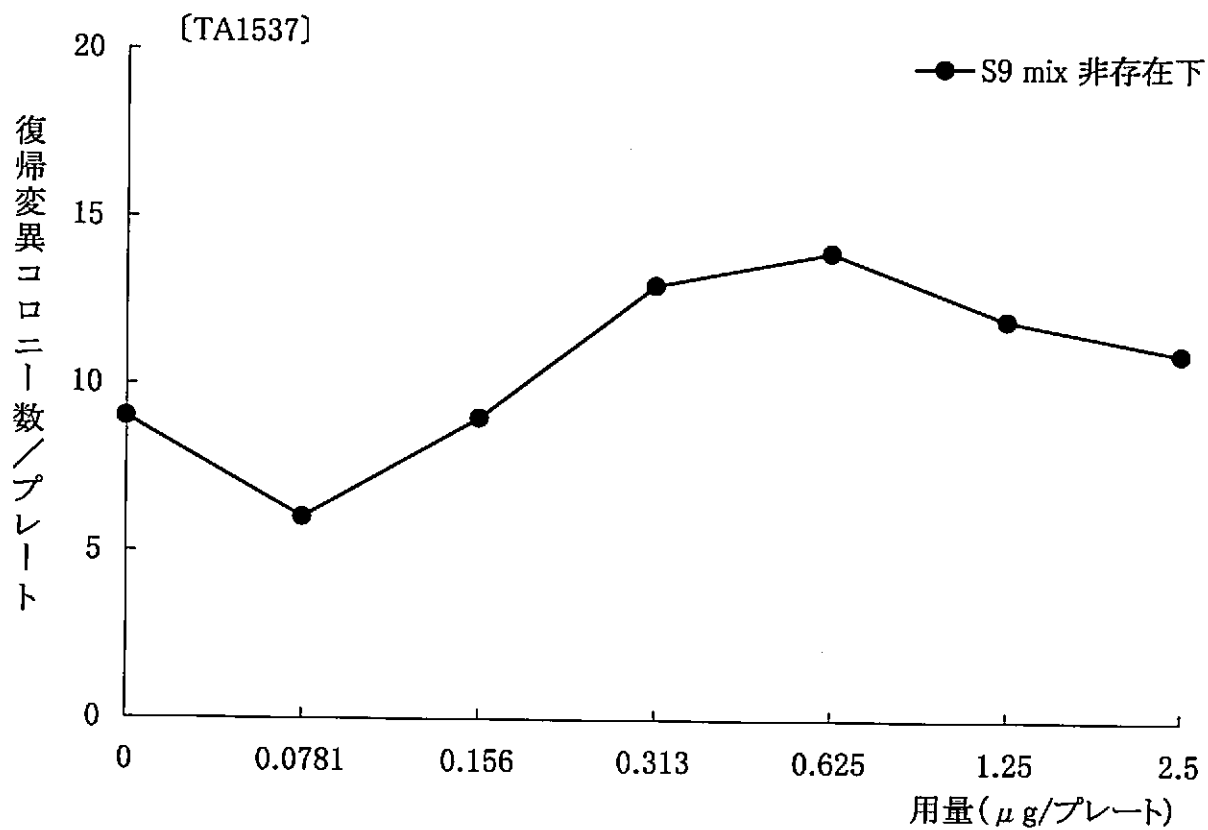


図 2-5 2,3,5,6-テトラクロロベンゾキノンの復帰突然変異試験結果—本試験2回目

添付資料

復帰変異コロニー数—背景データ

自然復帰変異値（復帰変異コロニー数／プレート）						
指標菌株		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
直接法	n	224	204	219	234	205
	平均	125	11	15	23	8
	標準偏差	17	4	4	7	3
	最大値	182	31	27	41	18
	最小値	94	6	6	10	1
代謝活性化法	n	235	196	215	211	203
	平均	120	10	20	35	12
	標準偏差	17	3	5	7	4
	最大値	164	20	33	56	28
	最小値	88	4	9	18	5
陽性対照値（復帰変異コロニー数／プレート）						
指標菌株		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
陽性対照物質		AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
用量（ μ g/プレート）		0.01	0.5	0.04	0.1	80
直接法	n	164	162	167	166	161
	平均	818	358	798	386	650
	標準偏差	174	86	185	71	201
	最大値	1139	842	1429	717	1510
	最小値	402	223	306	251	236
陽性対照物質		2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
用量（ μ g/プレート）		1	2	10	1	2
代謝活性化法	n	177	163	169	158	162
	平均	523	166	941	325	107
	標準偏差	133	53	185	97	42
	最大値	876	371	1540	759	245
	最小値	280	85	654	173	51

AF-2 : 2-(フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

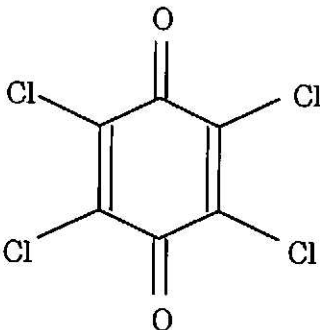

SA : アジ化ナトリウム

9-AA : 9-アミノアクリジン

2-AA : 2-アミノアントラセン

細菌を用いる復帰突然変異試験結果報告書

1. 一般的事項

既存化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	2, 3, 5, 6-テトラクロロベンゾキノン		
別 名	クロラニル テトラクロロ-1, 4-ベンゾキノン 2, 3, 5, 6-テトラ-2, 5-シクロヘキサンジエン-1, 4- ジオン		
構造式または示性式 (いずれも不明の場合は、その製法の概要)			
試験に供した既存 化学物質の純度	99.5%	試験に供した既存 化学物質の Lot.No.	
不純物の名称及び濃度	—		
C A S 番号	118-75-2		
分 子 量	245.87	蒸 気 圧	—
融 点	290℃	分配係数	—
沸 点	—	常温における性状	黄金色の結晶性粉末
安 定 性	常温で安定		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	水	250mg/L, 25℃	—
	DMSO	—	安定
	エタノール	微溶	—
	その他(エチルエーテル)	可溶	—

DMSO : ジメチルスルホキシド

2.試験に用いた菌株

菌 株 名	入 手 先	入 手 先
TA98	国 立 公 衆 衛 生 院	平成6年12月19日
TA100	国 立 公 衆 衛 生 院	平成6年12月19日
TA1535	国 立 公 衆 衛 生 院	平成6年12月19日
TA1537	国 立 公 衆 衛 生 院	平成6年12月19日
WP2uvrA	国 立 公 衆 衛 生 院	平成6年12月19日

3.S9 mix

(1) S9 mix の入手方法

自 製 ・ 購 入 の 別	1. 自 製 ② 購入 (製造元 キッコーマン株式会社)
製造年月日	平成12年11月10日 製造 (FSM-435) 平成13年 1月19日 製造 (FSM-438)
購入の場合の Lot No.	FSM-435, FSM-438
保 存 温 度	-80℃以下 (超低温槽 ウルトラディープ CF-41SD)

(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 および 5, 6-BF
性	雄	投 与 方 法	腹 腔 内 投 与
週 齢	7 週	投与期間及び投与量 (mg/kg 体重)	PB 30 mg/kg 1 回
体 重	213~252 g (FSM-435) 206~243 g (FSM-438)		PB 60 mg/kg 3 回 5, 6-BF 80 mg/kg 1 回

(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-リッ酸緩衝液 (pH 7.4)	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 (%)
	DMSO	和光純薬工業(株)	ECH7677	—	99.9
溶媒選択の理由	被験物質は水に難溶であり，予備的検討の結果，DMSO に懸濁可能 (5 mg/プレート用量の調製液：50 mg/mL) であったので，溶媒には DMSO を用いた。				
被験物質溶媒の性状	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	—				
溶媒の調製から使用までの保存時間と温度	1時間以内， 20℃				
純度換算の有無	有 (無)				

*：2.5 mg/プレート以下の用量の調製液

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.
	Bacto nutrient broth dehydrated	Difco Laboratories	44077JK
前 培 養 時 間	12時間		
培養容器 (形状・容量)	モルツン栓付三角コルベン， 300 mL		
培 養 液 量	15 mL	接 種 菌 量	25 μ L

(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	TA98	TA1537
(×10 ⁹ /mL)	用量設定試験 (直接法)	1.46	1.62	1.43	1.33	1.21
	用量設定試験 (代謝活性化法)	1.50	1.72	1.47	1.33	1.17
	本試験(1回目)	1.46	1.62	1.34	1.33	1.17
	本試験(2回目)	1.50	1.67	1.38	1.41	1.21
測 定 方 法		① O.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	平成12年9月21日 製造 (ANI560IP) 平成12年12月21日 製造 (ANI730LP) 平成12年9月5日 製造 (ANI520IP)
購入の場合のLot No.	ANI560IP, ANI730LP, ANI520IP
使用寒天の名称・製造元・Lot No.	伊那寒天 BA-30A, 伊那食品工業株式会社, 00222(ANI560IP, ANI730LP), 90705(ANI520IP)

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

組 成	懸濁菌液	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
	S9 mix(代謝活性化法による場合)	0.5 mL
	トッパアガー	2.0 mL
	その他 ()	
プレインキュベーション	温 度	37 °C
	時 間	20 分
インキュベーション	温 度	37 °C
	時 間	48 時間

8. コロニーの計測法

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)

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
判定の理由	<p>試験を2回行った結果、代謝活性化法 (S9 mix) の有無にかかわらず、すべての指標菌株において復帰変異コロニー数は、陰性 (溶媒) 対照値の2倍を超えるものではなかった。一方、陽性対照群では、それぞれの菌株に対して陰性対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数の増加が認められ、試験が適切に行われたことを示した。</p> <p>以上の結果より、本実験条件下において本被験物質の遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。</p>	

(3) 参考事項

用量設定試験 (予備試験) は、直接法の場合は 1.25~5000 μg /プレートの範囲で、代謝活性化法の場合は 39.1~5000 μg /プレートの範囲で行った。その結果、直接法の場合は、*S. typhimurium* では 2.5 μg /プレート以上、*E. coli* では 10 μg /プレート以上の用量で生育阻害が認められた。代謝活性化法の場合は、いずれの菌株とも 625 μg /プレート以上の用量において菌の生育阻害が認められた。

したがって、本試験は、直接法の場合は *S. typhimurium* では 0.0781~2.5 μg /プレート、*E. coli* では 0.313~10 μg /プレートの範囲の用量 (公比 2) を、また、代謝活性化法の場合は 19.5~625 μg /プレートの範囲の用量 (公比 2) を用いて行った。菌の生育阻害については、予備試験と同様、直接法における *S. typhimurium* の 2.5 μg /プレート、*E. coli* の 10 μg /プレート、また、代謝活性化法における 625 μg /プレートで認められた。

10. その他

試験実施施設	名 称	財団法人 畜産生物科学安全研究所
	所 在 地	神奈川県相模原市橋本台三丁目7番11号 電話 042 (762) 2775 FAX 042 (762) 7979
試験責任者	職 氏 名	
	経 験 年 数	
試 験 期 間	平成12年12月14日 より 平成13年3月29日	
試 験 番 号	00-139	

表 1-1 S9 mix 非存在下における2,3,5,6-テトラクロロベンゾキソンの
復帰突然変異試験結果〔本試験1回目－直接法〕

用 量 〔 μ g/プレート〕	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 _{uvrA}	TA98	TA1537
陰性対照 [DMSO]	137	9	15	23	8
	126	8	18	30	11
	103	10	18	11	5
	(122 \pm 17)	(9 \pm 1)	(17 \pm 2)	(21 \pm 10)	(8 \pm 3)
0.0781	125	9	—	23	8
	123	10	—	18	5
	110	7	—	25	5
	(119 \pm 8)	(9 \pm 2)	—	(22 \pm 4)	(6 \pm 2)
0.156	115	4	—	26	10
	118	8	—	30	12
	109	6	—	14	5
	(114 \pm 5)	(6 \pm 2)	—	(23 \pm 8)	(9 \pm 4)
0.313	103	13	19	25	8
	109	7	19	20	9
	111	7	18	19	8
	(108 \pm 4)	(9 \pm 3)	(19 \pm 1)	(21 \pm 3)	(8 \pm 1)
0.625	108	9	13	25	7
	137	6	25	21	7
	115	5	22	17	4
	(120 \pm 15)	(7 \pm 2)	(20 \pm 6)	(21 \pm 4)	(6 \pm 2)
1.25	107	8	16	19	4
	97	10	17	22	5
	129	8	25	29	12
	(111 \pm 16)	(9 \pm 1)	(19 \pm 5)	(23 \pm 5)	(7 \pm 4)
2.5	92 *	11 *	12	28 *	4 *
	124 *	12 *	13	29 *	7 *
	94 *	10 *	21	30 *	14 *
	(103 \pm 18)	(11 \pm 1)	(15 \pm 5)	(29 \pm 1)	(8 \pm 5)
5	—	—	14	—	—
	—	—	16	—	—
	—	—	12	—	—
	—	—	(14 \pm 2)	—	—
10	—	—	13 *	—	—
	—	—	10 *	—	—
	—	—	15 *	—	—
	—	—	(13 \pm 3)	—	—
陽性対照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
μ g/プレート	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復帰変異	624	360	799	353	294
コロニー数	584	346	797	380	258
/プレート	619	363	752	338	219
	(609 \pm 22)	(356 \pm 9)	(783 \pm 27)	(357 \pm 21)	(257 \pm 38)

DMSO: ジメチルスルホキシド

(): 平均値 \pm 標準偏差

*: 菌の生育阻害が認められた。

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

SA : アジ化ナトリウム

9-AA: 9-アミノアクリジン

表 1-2 S9 mix 存在下における2,3,5,6-テトラクロロベンゾキソンの
復帰突然変異試験結果〔本試験1回目－代謝活性化法〕

用 量 〔μg/プレート〕	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 ^{uvrA}	TA98	TA1537
陰性対照 [DMSO]	122	10	14	37	18
	115	9	21	30	16
	129	9	27	32	13
	(122 ± 7)	(9 ± 1)	(21 ± 7)	(33 ± 4)	(16 ± 3)
19 .5	125	10	23	30	10
	156	12	19	26	15
	131	10	17	39	12
	(137 ± 16)	(11 ± 1)	(20 ± 3)	(32 ± 7)	(12 ± 3)
39 .1	141	10	21	29	15
	127	4	28	34	16
	119	12	26	33	12
	(129 ± 11)	(9 ± 4)	(25 ± 4)	(32 ± 3)	(14 ± 2)
78 .1	151	8	22	30	12
	127	9	23	38	15
	140	7	18	24	17
	(139 ± 12)	(8 ± 1)	(21 ± 3)	(31 ± 7)	(15 ± 3)
156	145	11	13	24	12
	154	7	26	27	9
	127	11	25	25	12
	(142 ± 14)	(10 ± 2)	(21 ± 7)	(25 ± 2)	(11 ± 2)
313	176	11	27	25	16
	166	9	25	38	19
	160	9	29	30	20
	(167 ± 8)	(10 ± 1)	(27 ± 2)	(31 ± 7)	(18 ± 2)
625	10 *	0 *	23 *	0 *	0 *
	20 *	0 *	29 *	0 *	0 *
	3 *	0 *	39 *	0 *	0 *
	(11 ± 9)	(0 ± 0)	(30 ± 8)	(0 ± 0)	(0 ± 0)
陽性対照	2- AA	2- AA	2- AA	2- AA	2- AA
μg/プレート	1	2	10	1	2
復帰変異	431	119	540	269	89
コロニー数	397	149	569	273	88
/プレート	392	139	572	266	74
	(407 ± 21)	(136 ± 15)	(560 ± 18)	(269 ± 4)	(84 ± 8)

DMSO: ジメチルスルホキシド

(): 平均値±標準偏差

*: 菌の生育阻害が認められた。

2-AA: 2-アミノアントラセン

表 2-1 S9 mix 非存在下における2,3,5,6-テトラクロロベンゾキノンの
 復帰突然変異試験結果〔本試験2回目－直接法〕

用 量 〔 μ g/プレート〕	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
陰性対照 [DMSO]	113	8	22	18	8
	130	14	20	25	9
	96	6	17	19	11
	(113 \pm 17)	(9 \pm 4)	(20 \pm 3)	(21 \pm 4)	(9 \pm 2)
0.0781	102	16	--	18	6
	90	10	--	24	5
	105	4	--	22	7
	(99 \pm 8)	(10 \pm 6)	--	(21 \pm 3)	(6 \pm 1)
0.156	121	7	--	21	11
	109	14	--	23	12
	109	6	--	20	5
	(113 \pm 7)	(9 \pm 4)	--	(21 \pm 2)	(9 \pm 4)
0.313	82	9	31	19	9
	104	5	17	20	15
	98	10	31	17	14
	(95 \pm 11)	(8 \pm 3)	(26 \pm 8)	(19 \pm 2)	(13 \pm 3)
0.625	103	9	27	25	14
	98	6	23	19	15
	105	11	33	17	14
	(102 \pm 4)	(9 \pm 3)	(28 \pm 5)	(20 \pm 4)	(14 \pm 1)
1.25	118	7	22	17	14
	103	7	22	17	12
	120	8	23	25	10
	(114 \pm 9)	(7 \pm 1)	(22 \pm 1)	(20 \pm 5)	(12 \pm 2)
2.5	107 *	12 *	33	20 *	8 *
	123 *	11 *	32	40 *	11 *
	117 *	8 *	32	20 *	13 *
	(116 \pm 8)	(10 \pm 2)	(32 \pm 1)	(27 \pm 12)	(11 \pm 3)
5	--	--	23	--	--
	--	--	30	--	--
	--	--	19	--	--
	--	--	(24 \pm 6)	--	--
10	--	--	23 *	--	--
	--	--	19 *	--	--
	--	--	25 *	--	--
	--	--	(22 \pm 3)	--	--
陽性対照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
μ g/プレート	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復帰変異	532	334	623	522	326
コロニー数	562	347	661	465	408
/プレート	501	348	667	435	393
	(532 \pm 31)	(343 \pm 8)	(650 \pm 24)	(474 \pm 44)	(376 \pm 44)

DMSO: ジメチルスルホキシド

(): 平均値 \pm 標準偏差

*: 菌の生育阻害が認められた。

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

SA : アジ化ナトリウム

9-AA: 9-アミノアクリジン

表 2-2 S9 mix 存在下における2,3,5,6-テトラクロロベンゾキノンの
復帰突然変異試験結果〔本試験2回目－代謝活性化法〕

用 量 〔 μ g/プレート〕	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 _{uvrA}	TA98	TA1537
陰性対照 [DMSO]	100	13	35	32	12
	105	8	21	39	13
	105	6	26	33	13
	(103 \pm 3)	(9 \pm 4)	(27 \pm 7)	(35 \pm 4)	(13 \pm 1)
19 .5	125	15	24	36	19
	134	16	20	21	15
	132	7	22	27	14
	(130 \pm 5)	(13 \pm 5)	(22 \pm 2)	(28 \pm 8)	(16 \pm 3)
39 .1	131	8	24	26	11
	117	7	41	29	16
	114	13	32	29	8
	(121 \pm 9)	(9 \pm 3)	(32 \pm 9)	(28 \pm 2)	(12 \pm 4)
78 .1	132	7	36	31	16
	130	10	29	25	17
	126	12	35	30	13
	(129 \pm 3)	(10 \pm 3)	(33 \pm 4)	(29 \pm 3)	(15 \pm 2)
156	151	10	40	26	16
	140	8	31	24	15
	142	8	29	30	14
	(144 \pm 6)	(9 \pm 1)	(33 \pm 6)	(27 \pm 3)	(15 \pm 1)
313	169	11	43	38	6
	140	12	29	19	16
	200	6	29	37	14
	(170 \pm 30)	(10 \pm 3)	(34 \pm 8)	(31 \pm 11)	(12 \pm 5)
625	20 *	0 *	33 *	2 *	0 *
	58 *	0 *	44 *	3 *	0 *
	66 *	0 *	44 *	0 *	0 *
	(48 \pm 25)	(0 \pm 0)	(40 \pm 6)	(2 \pm 2)	(0 \pm 0)
陽性対照	2- AA	2- AA	2- AA	2- AA	2- AA
μ g/プレート	1	2	10	1	2
復帰変異	408	137	538	225	101
コロニー数	430	141	593	240	84
/プレート	389	133	619	218	87
	(409 \pm 21)	(137 \pm 4)	(583 \pm 41)	(228 \pm 11)	(91 \pm 9)

DMSO: ジメチルスルホキシド

(): 平均値 \pm 標準偏差

*: 菌の生育阻害が認められた。

2-AA: 2-アミノアントラセン

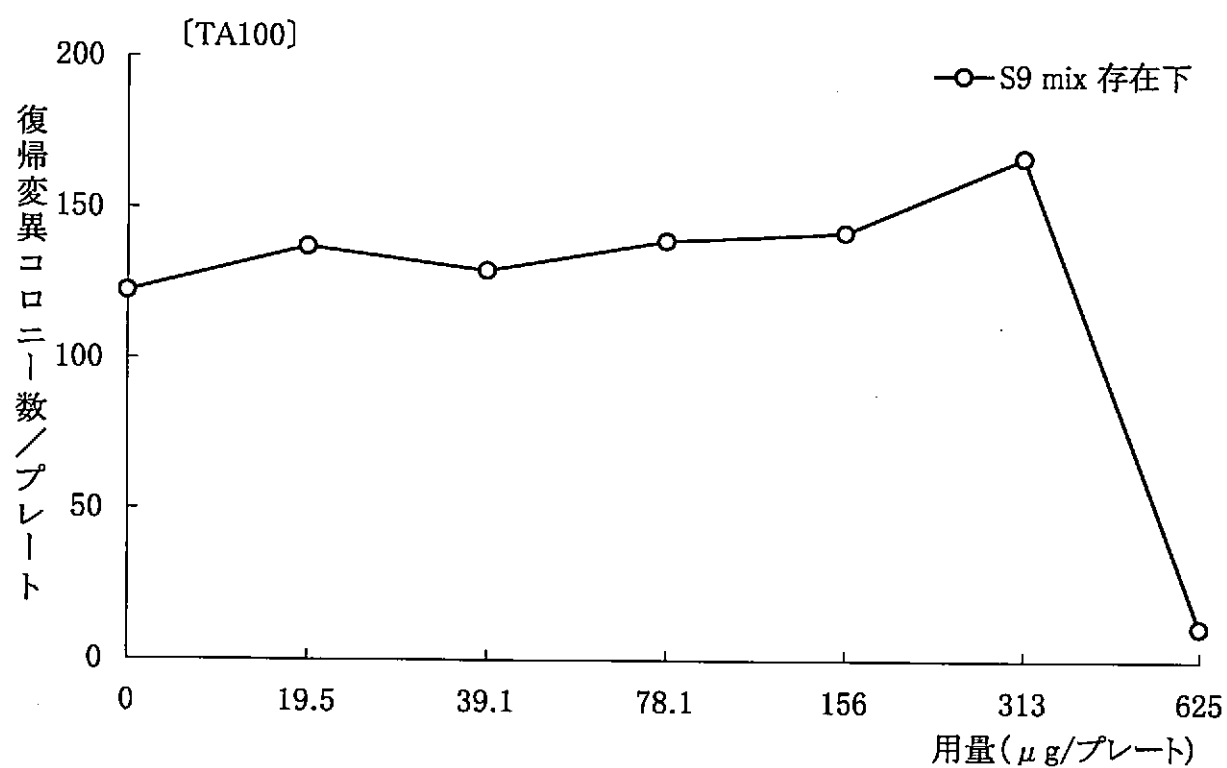
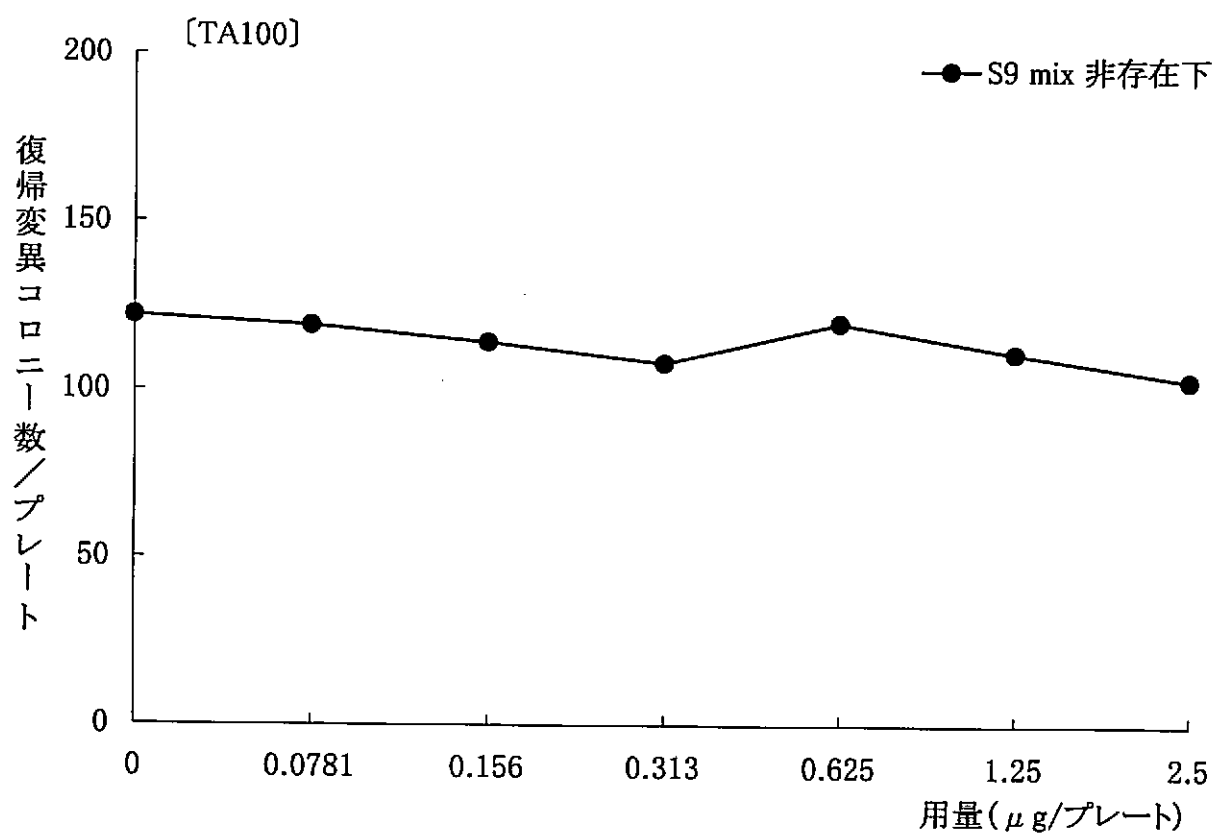


図 1-1 2,3,5,6-テトラクロロベンゾキノンの復帰突然変異試験結果一本試験1回目

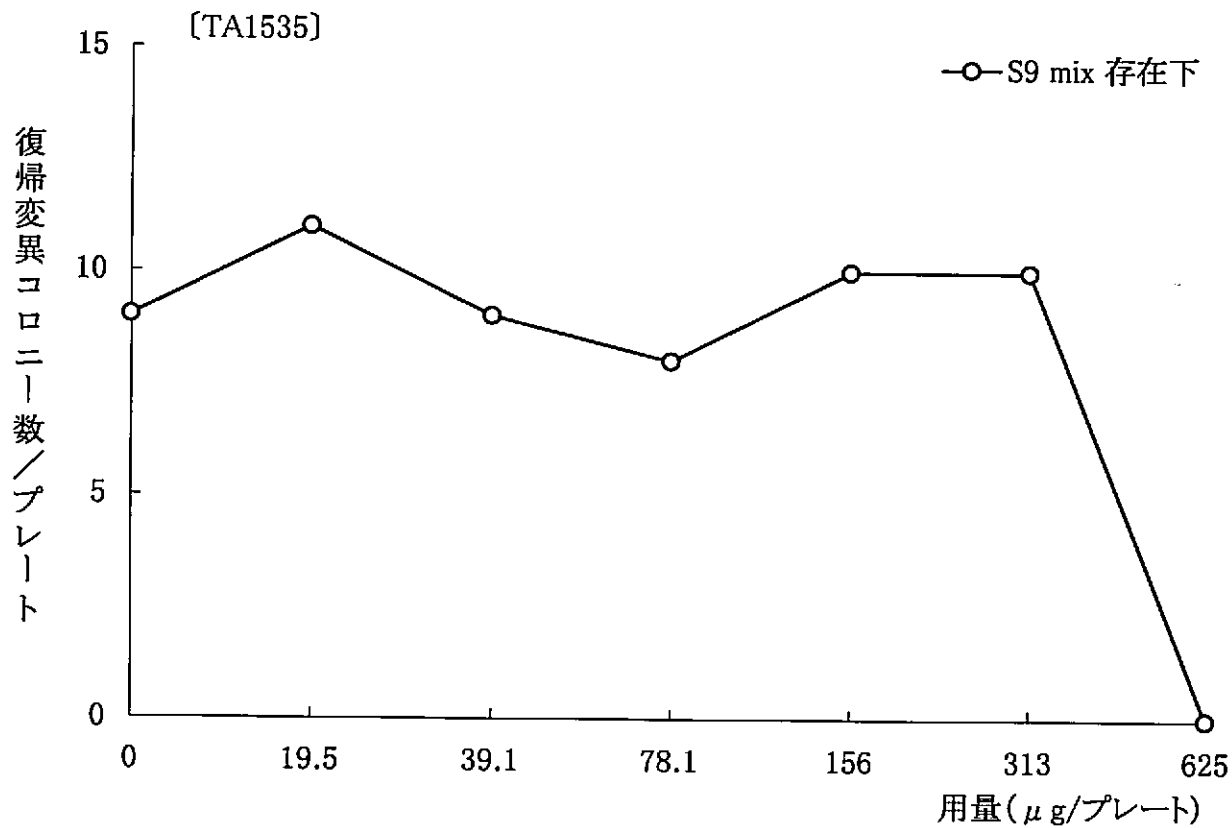
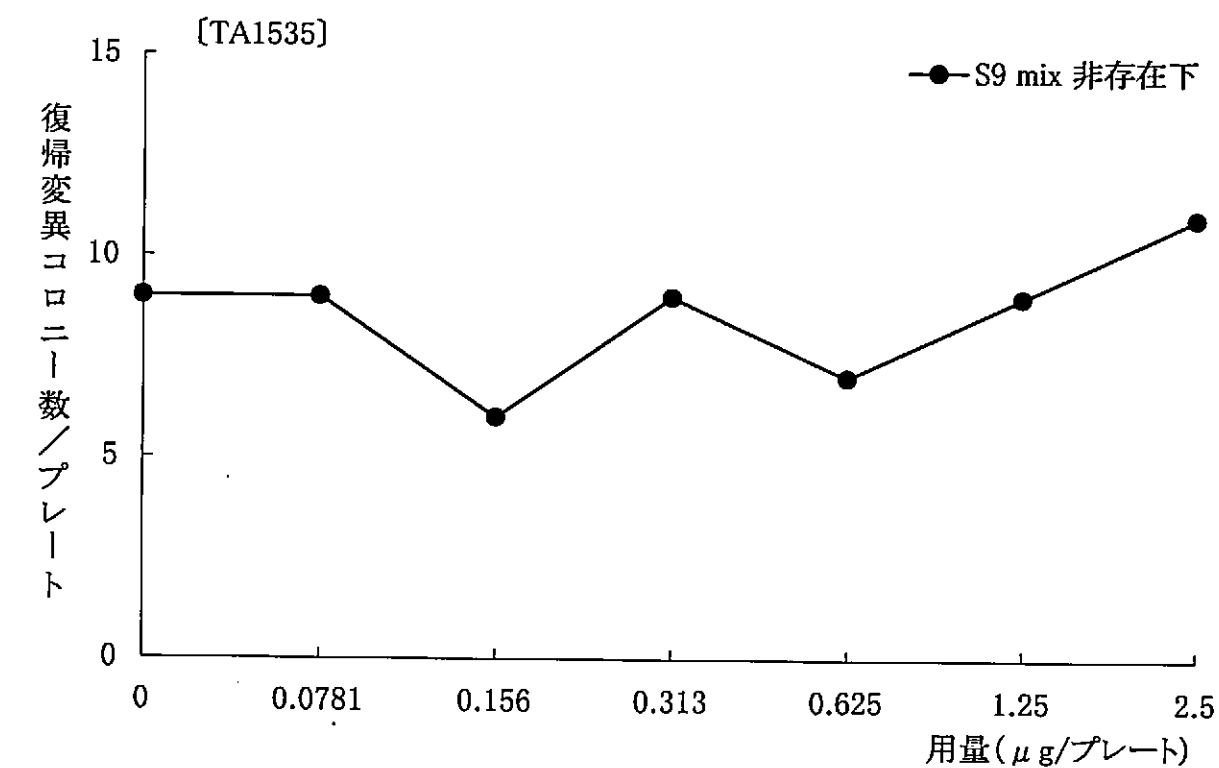


図 1-2 2,3,5,6-テトラクロロベンゾキノンの復帰突然変異試験結果一本試験1回目

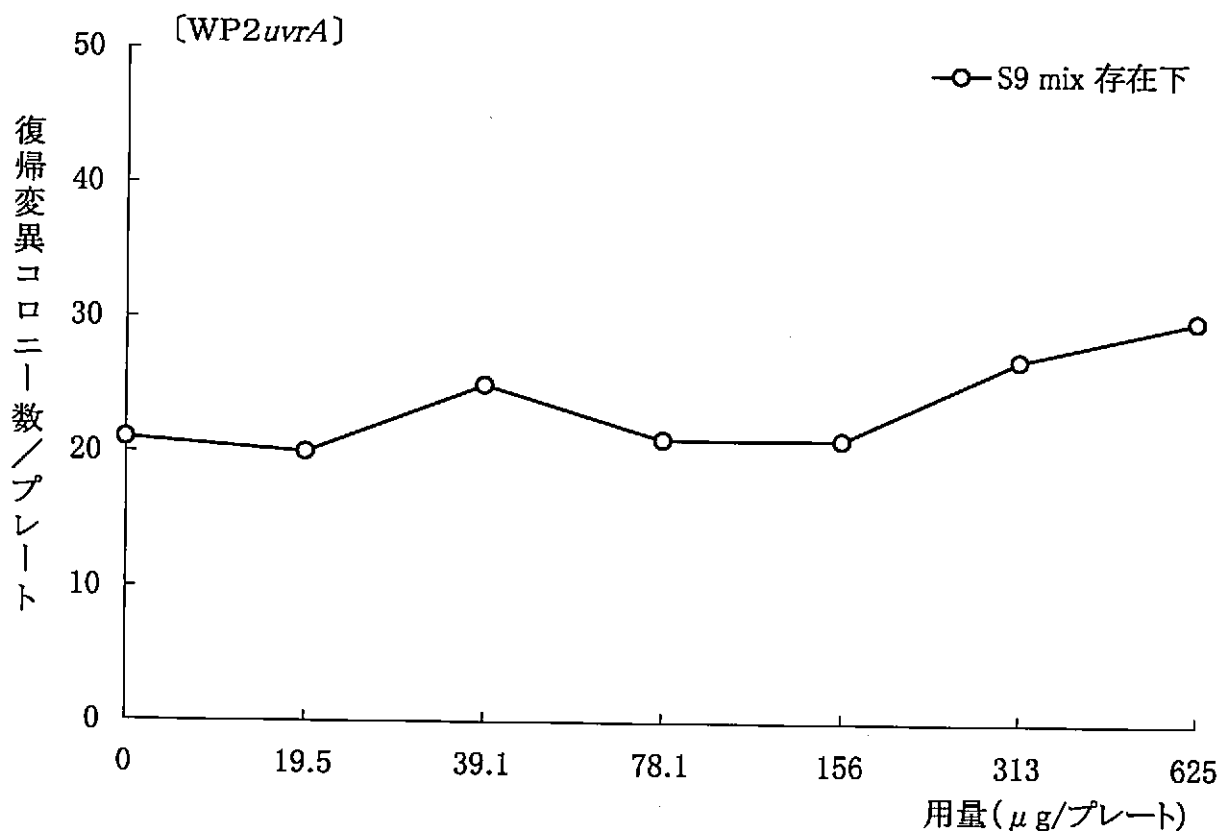
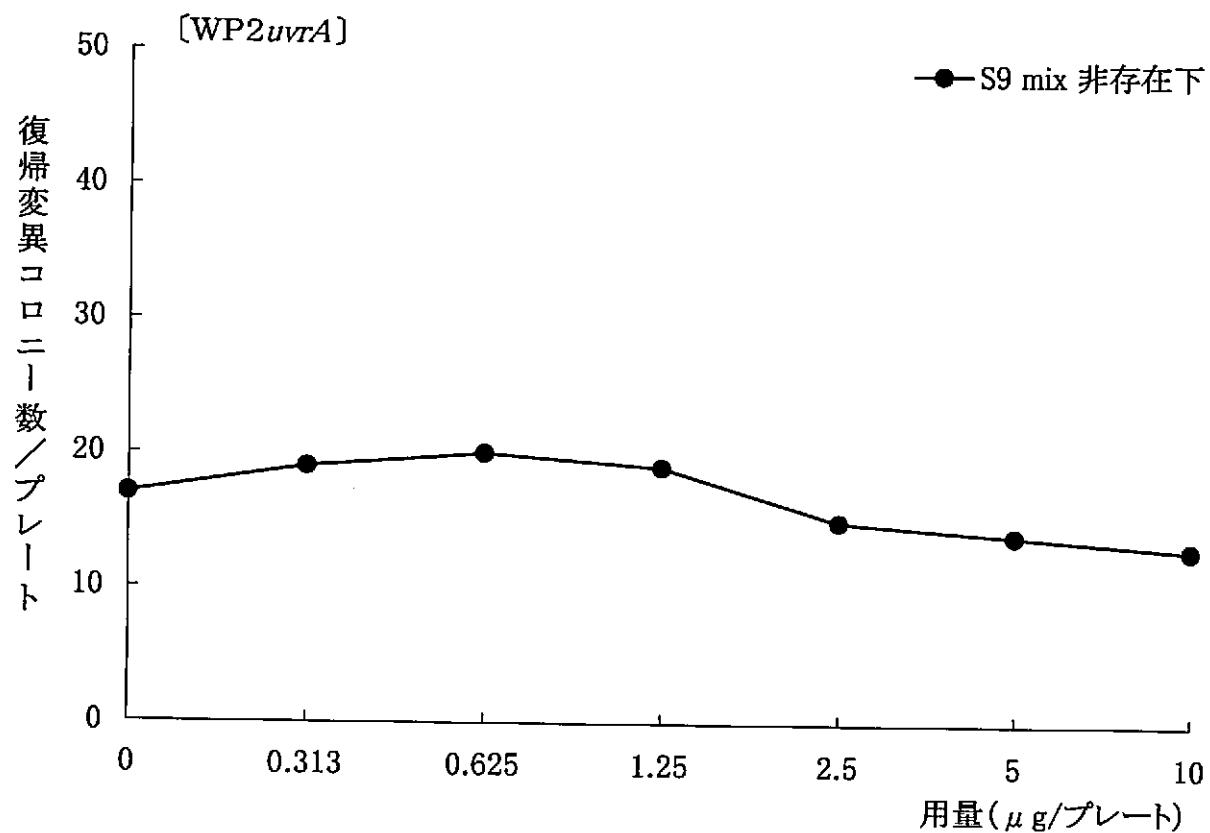


図 1-3 2,3,5,6-テトラクロロベンゾキノンの復帰突然変異試験結果一本試験1回目

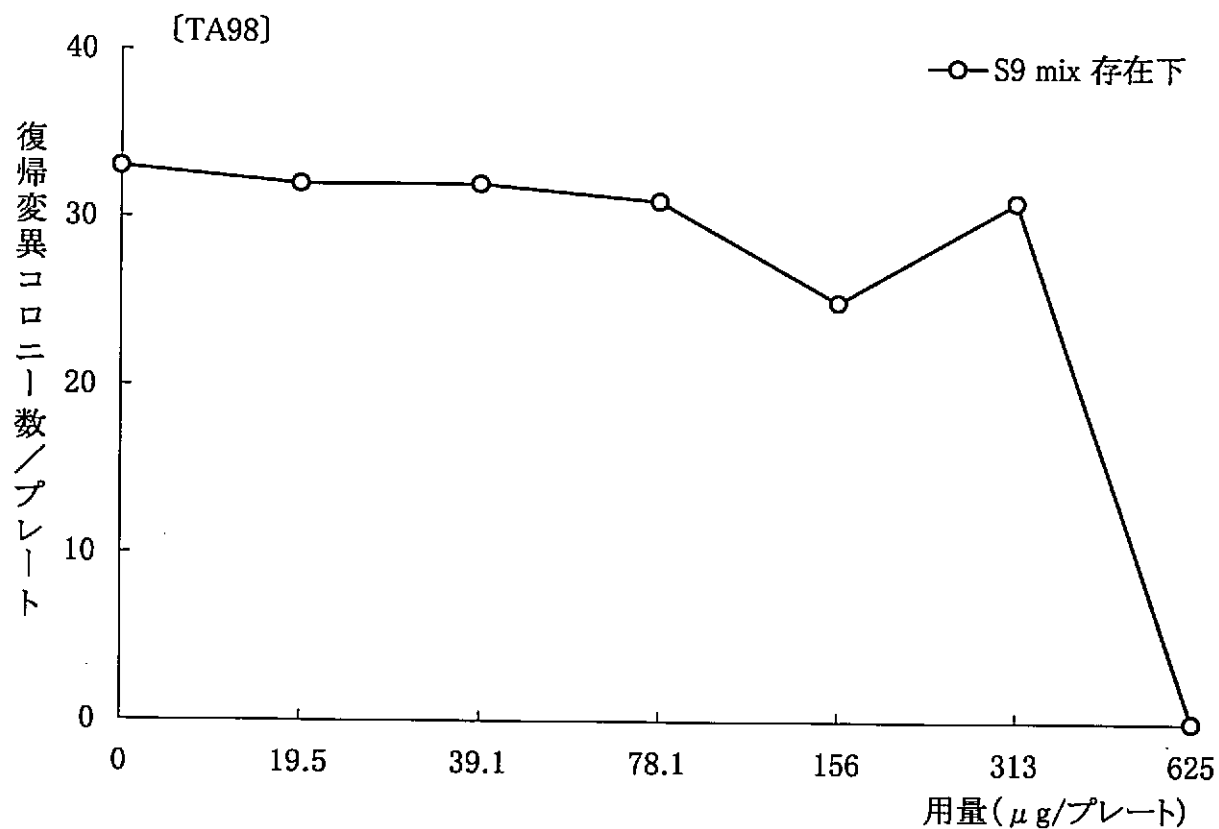
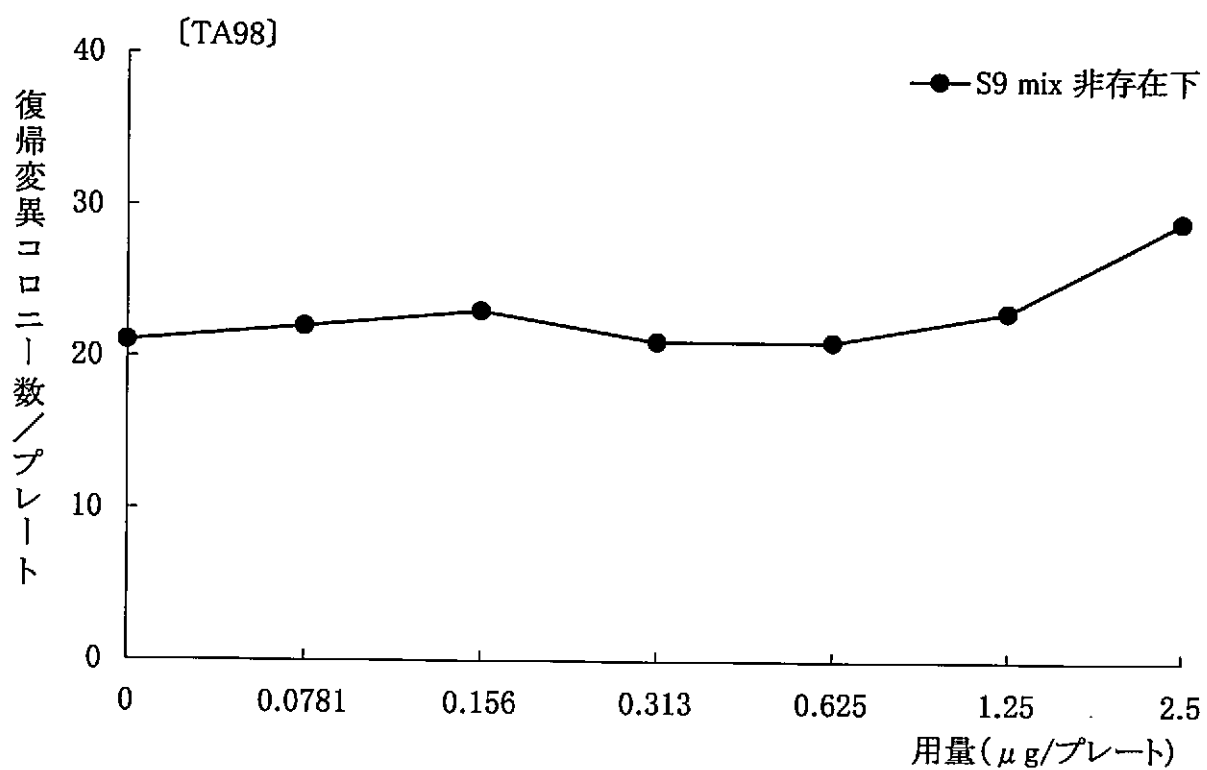


図 1-4 2,3,5,6-テトラクロロベンゾキノンの復帰突然変異試験結果—本試験1回目

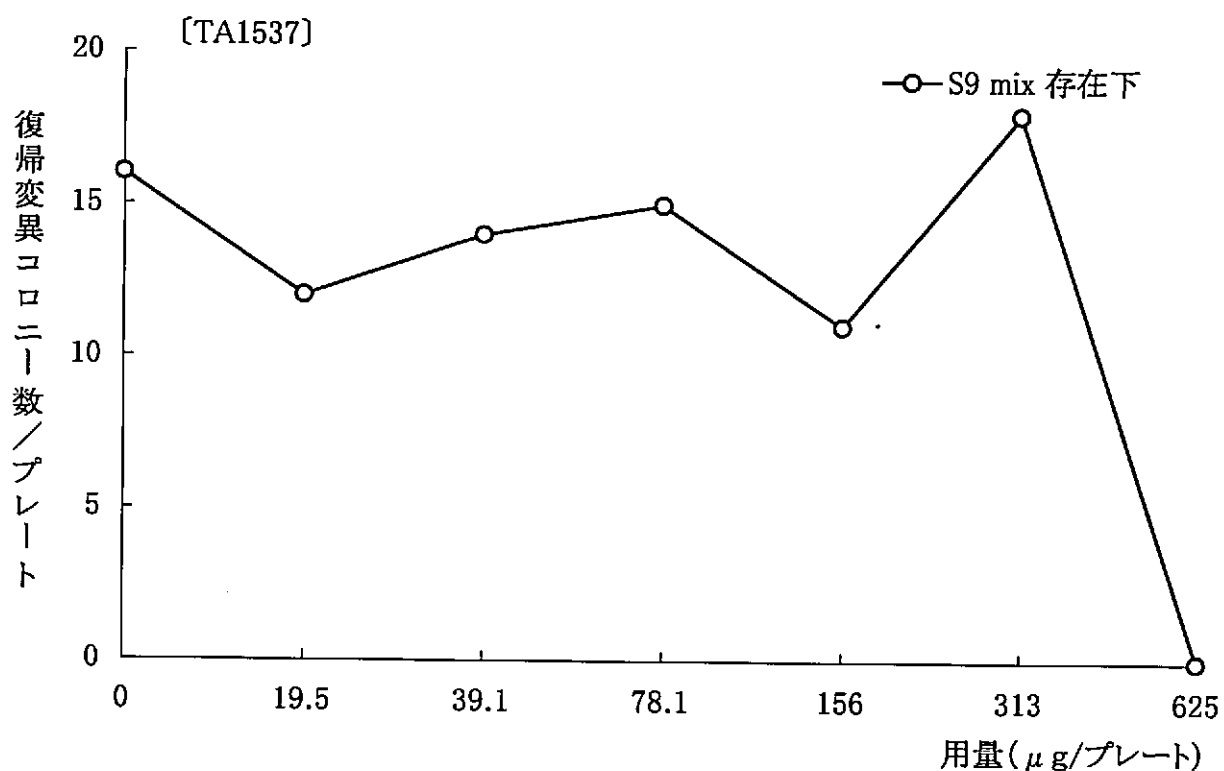
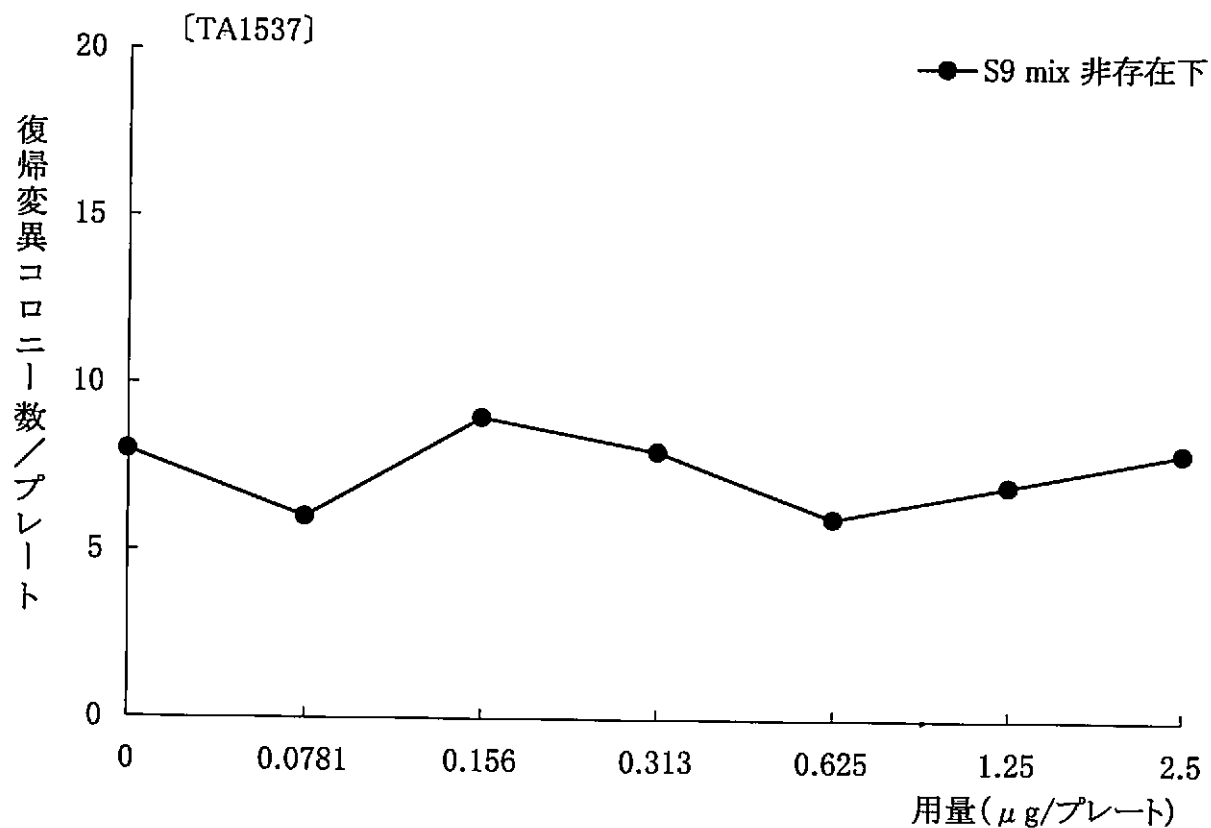


図 1-5 2,3,5,6-テトラクロロベンゾキノンの復帰突然変異試験結果—本試験1回目

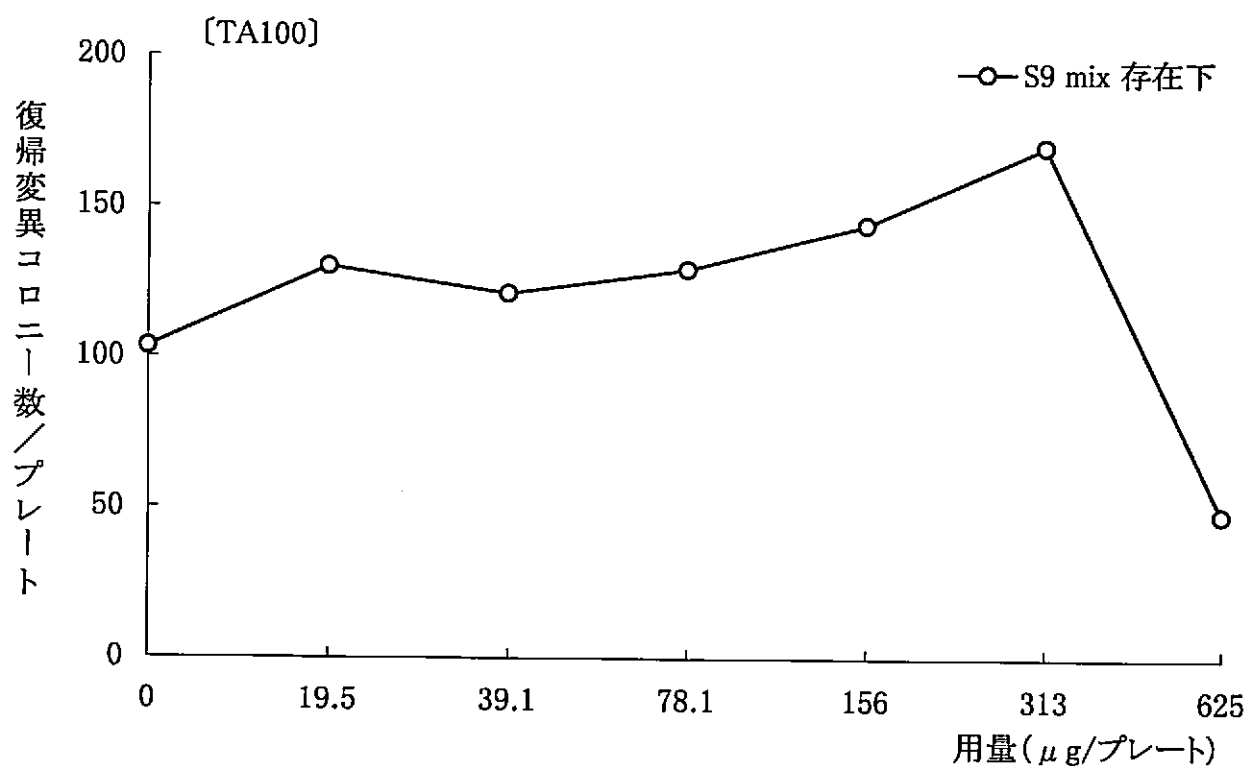
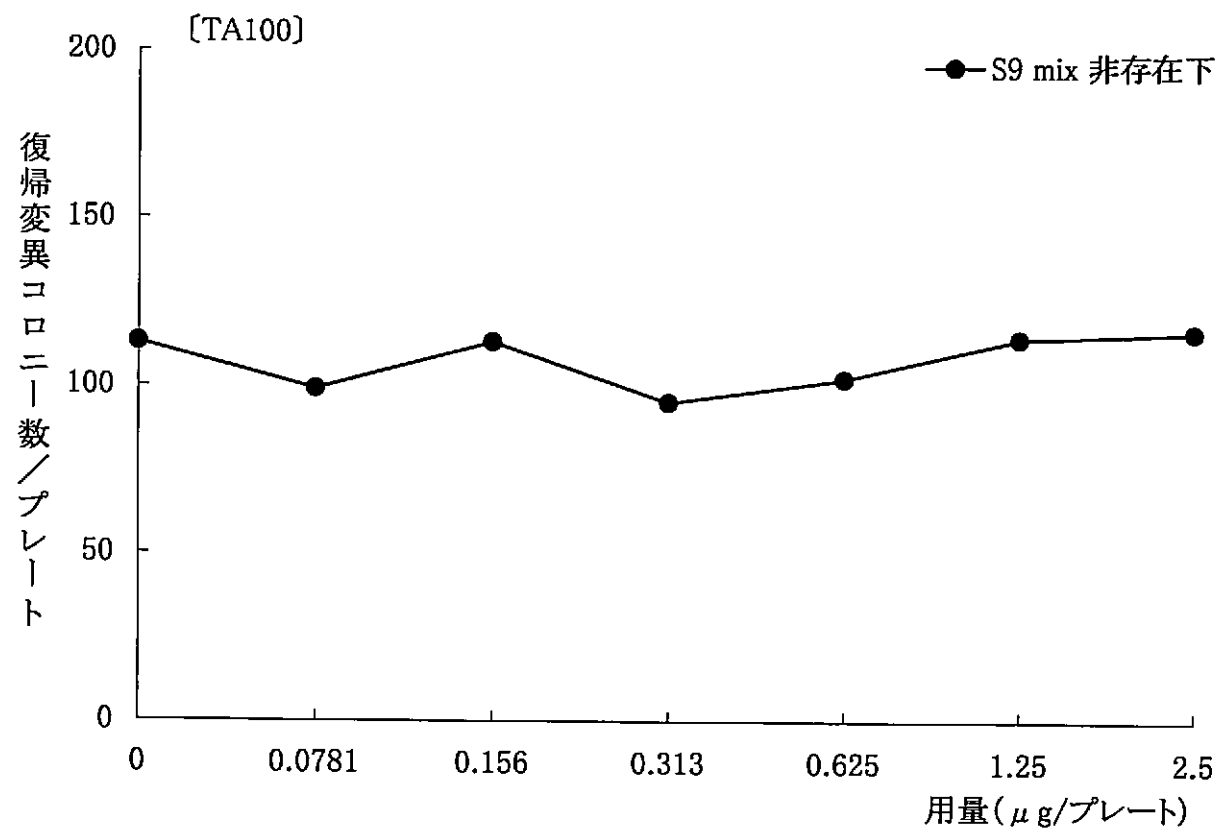


図 2-1 2,3,5,6-テトラクロロベンゾキノンの復帰突然変異試験結果一本試験2回目

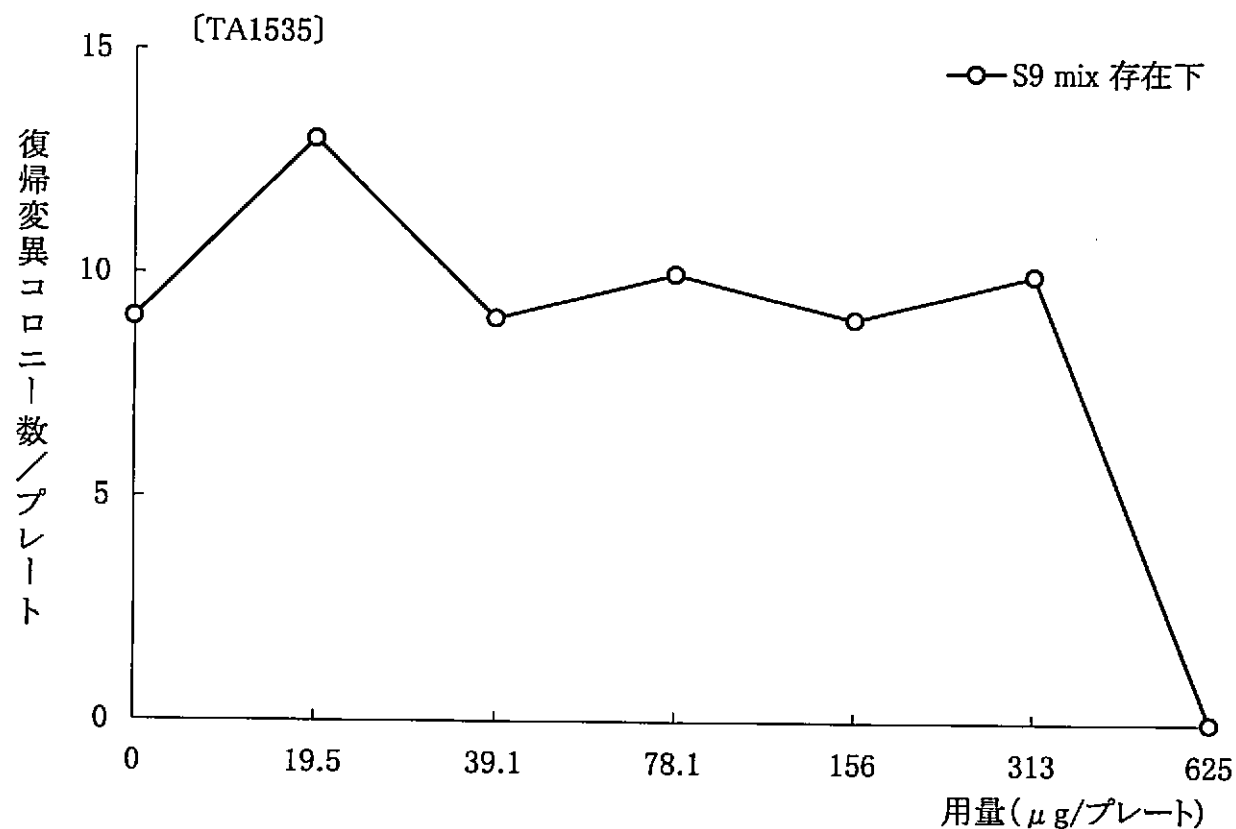
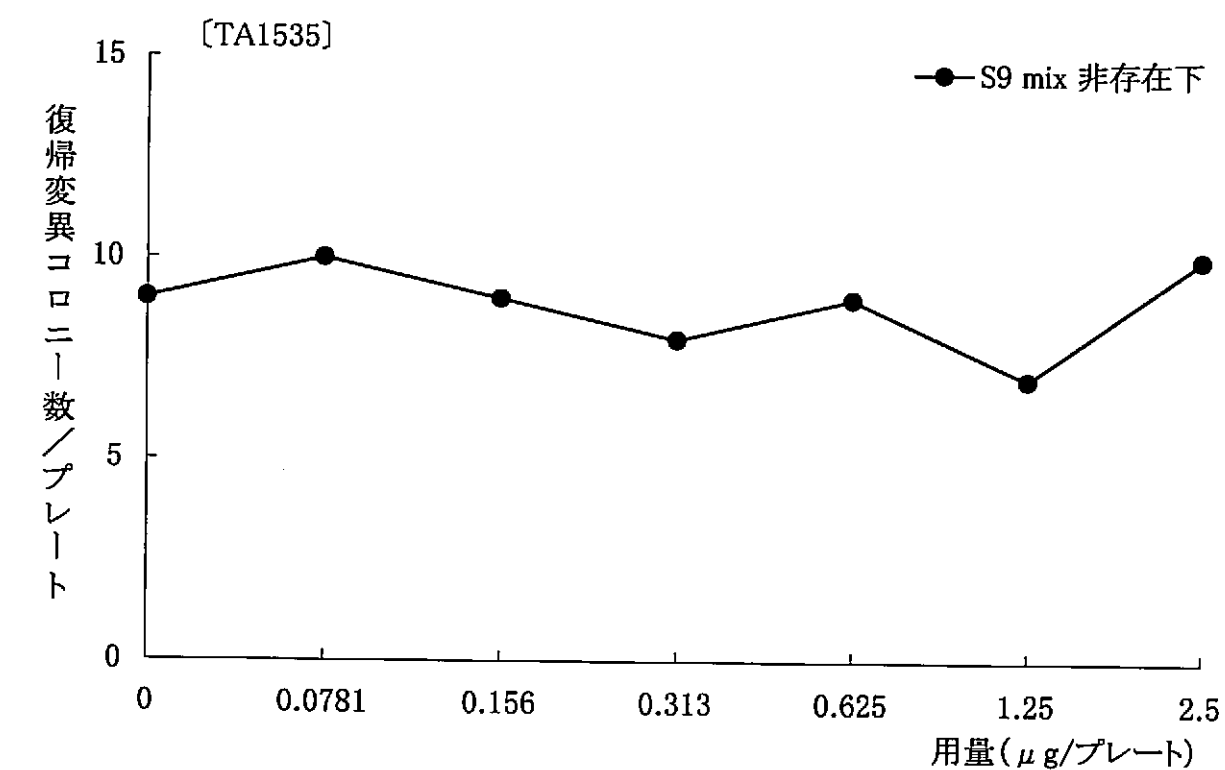


図 2-2 2,3,5,6-テトラクロロベンゾキソンの復帰突然変異試験結果一本試験2回目

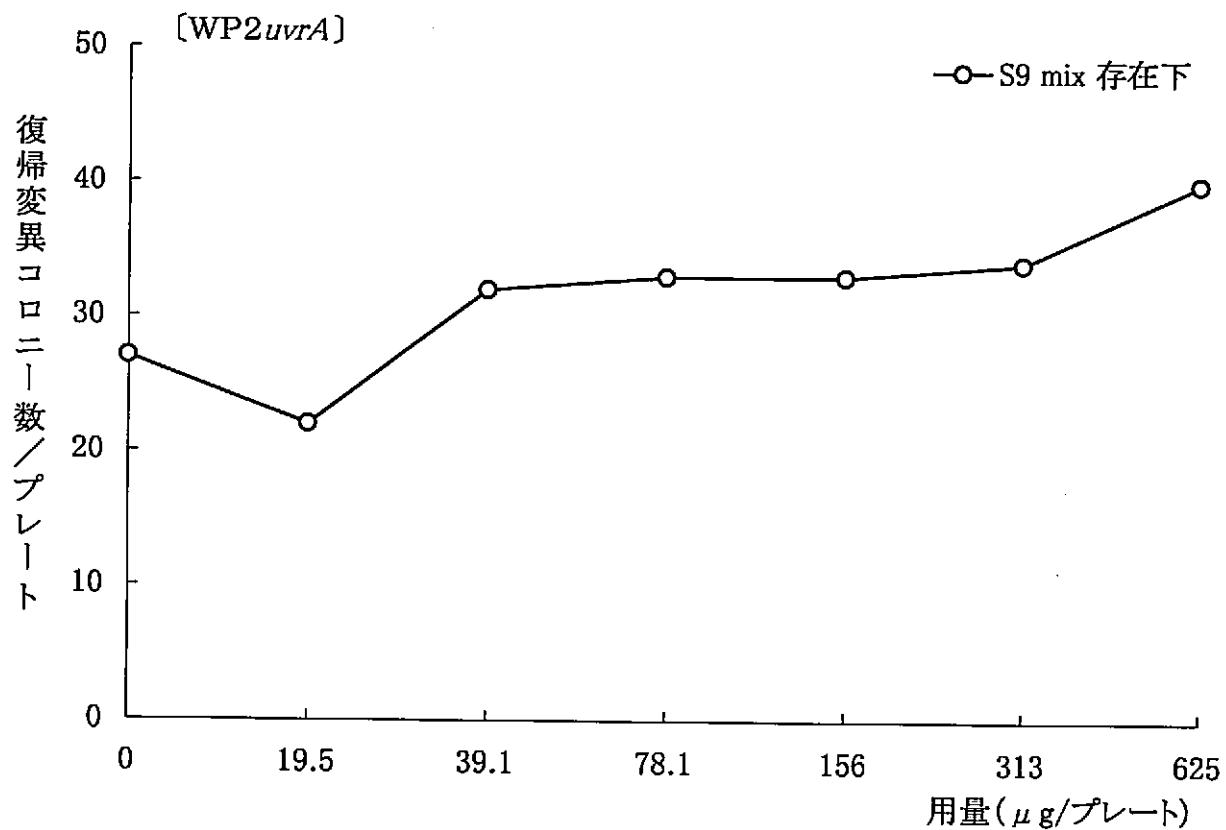
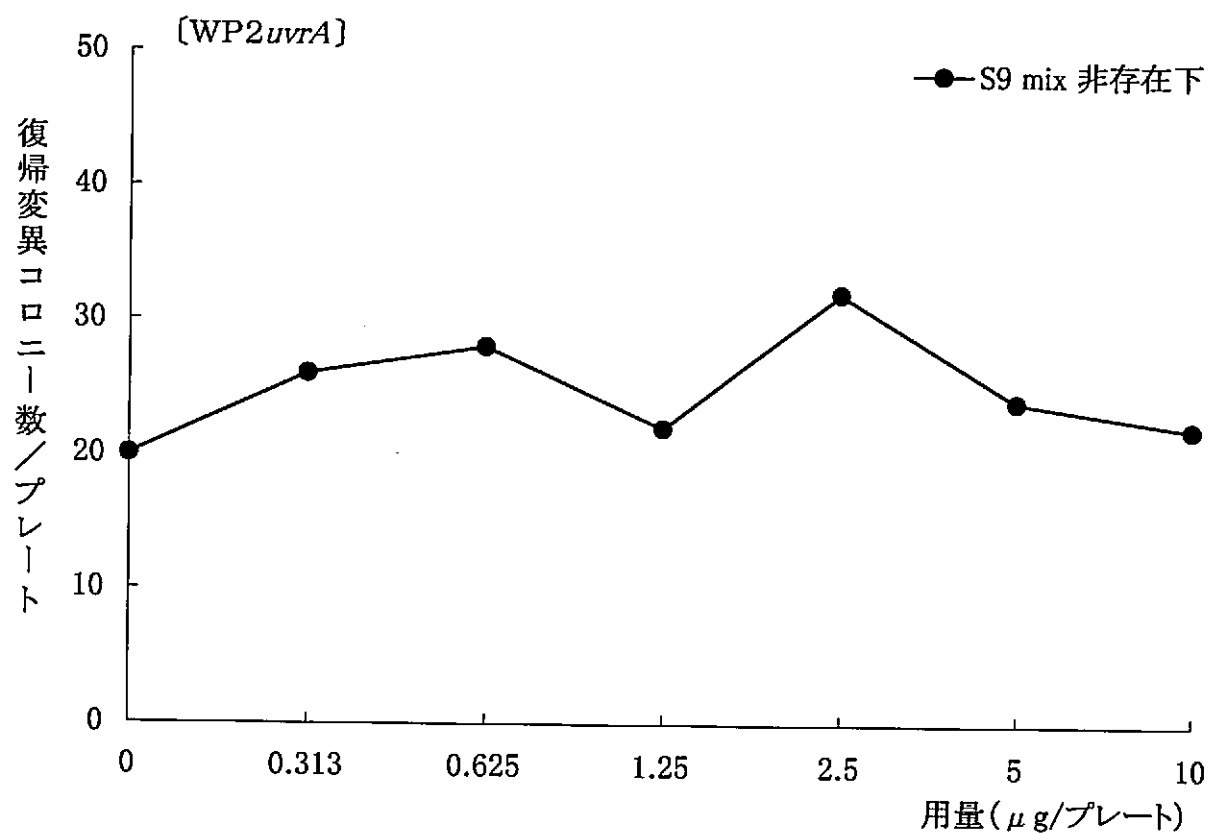


図 2-3 2,3,5,6-テトラクロロベンゾキノンの復帰突然変異試験結果—本試験1回目

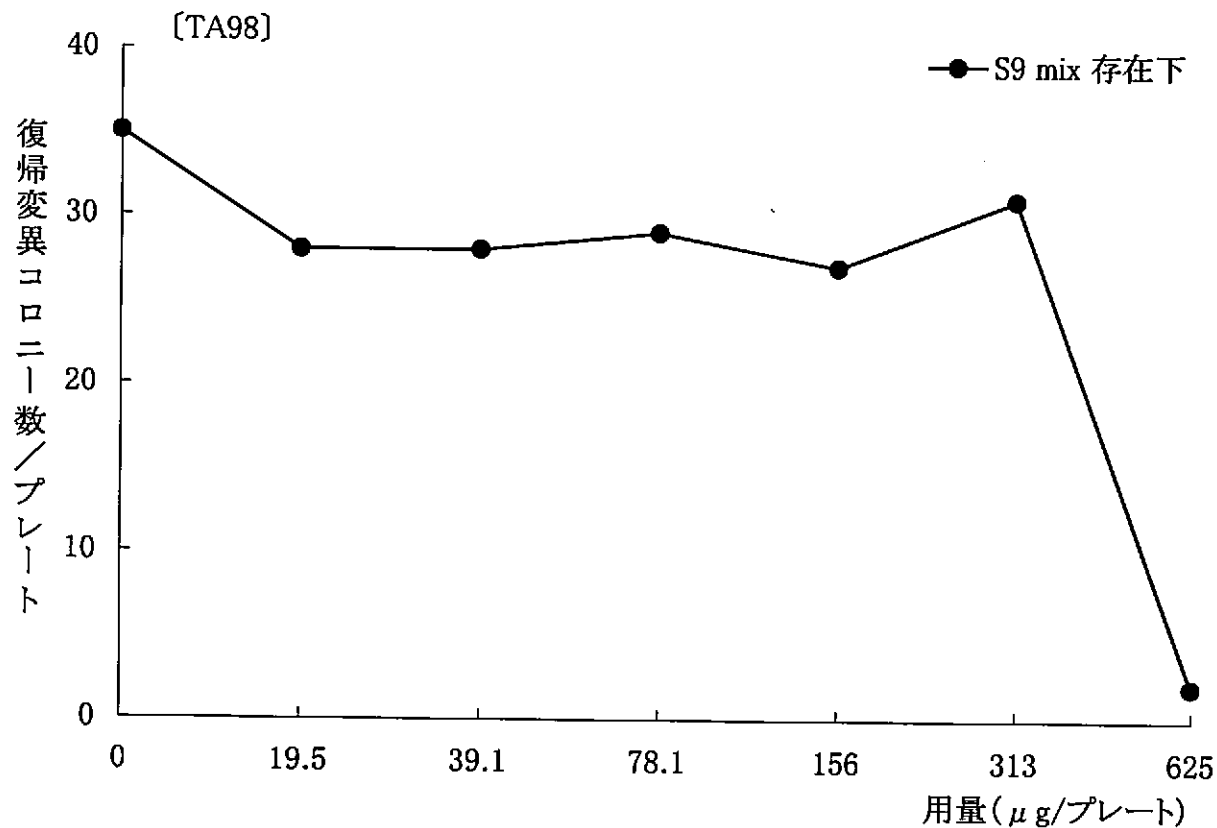
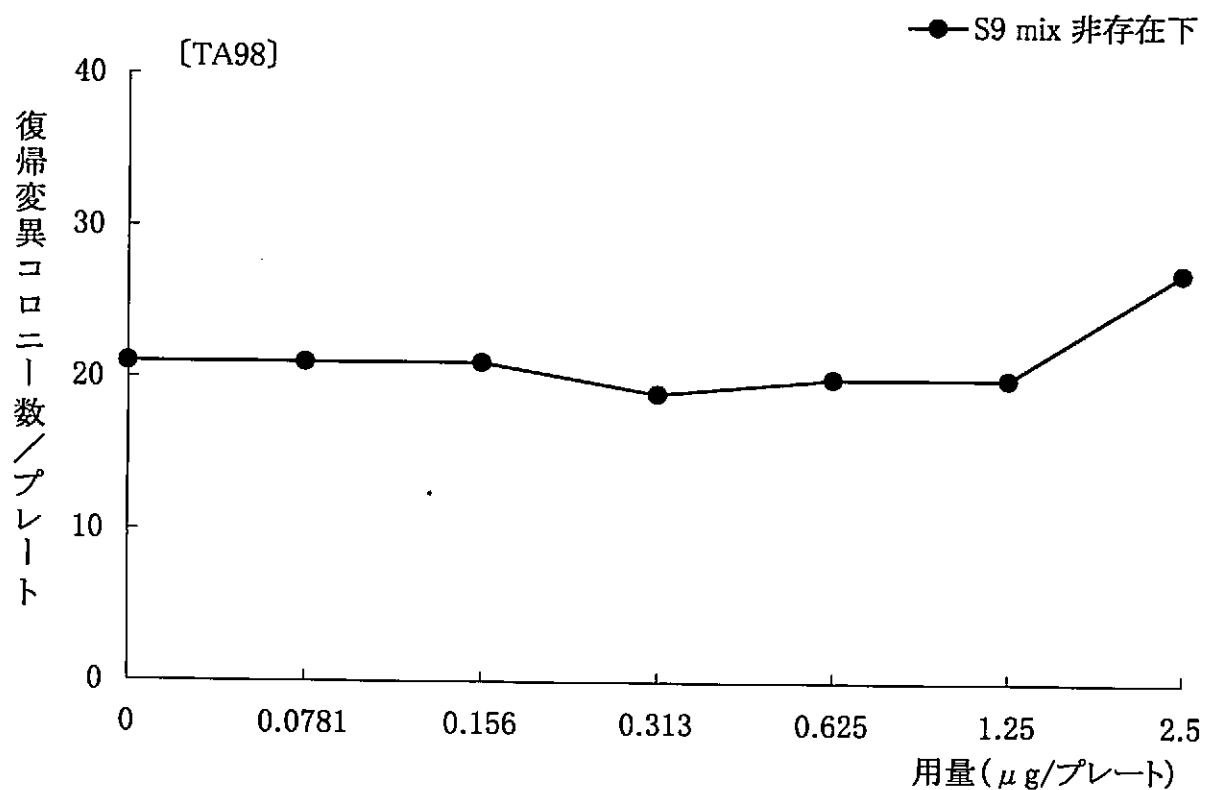


図 2-4 2,3,5,6-テトラクロロベンゾキノン₂の復帰突然変異試験結果一本試験2回目

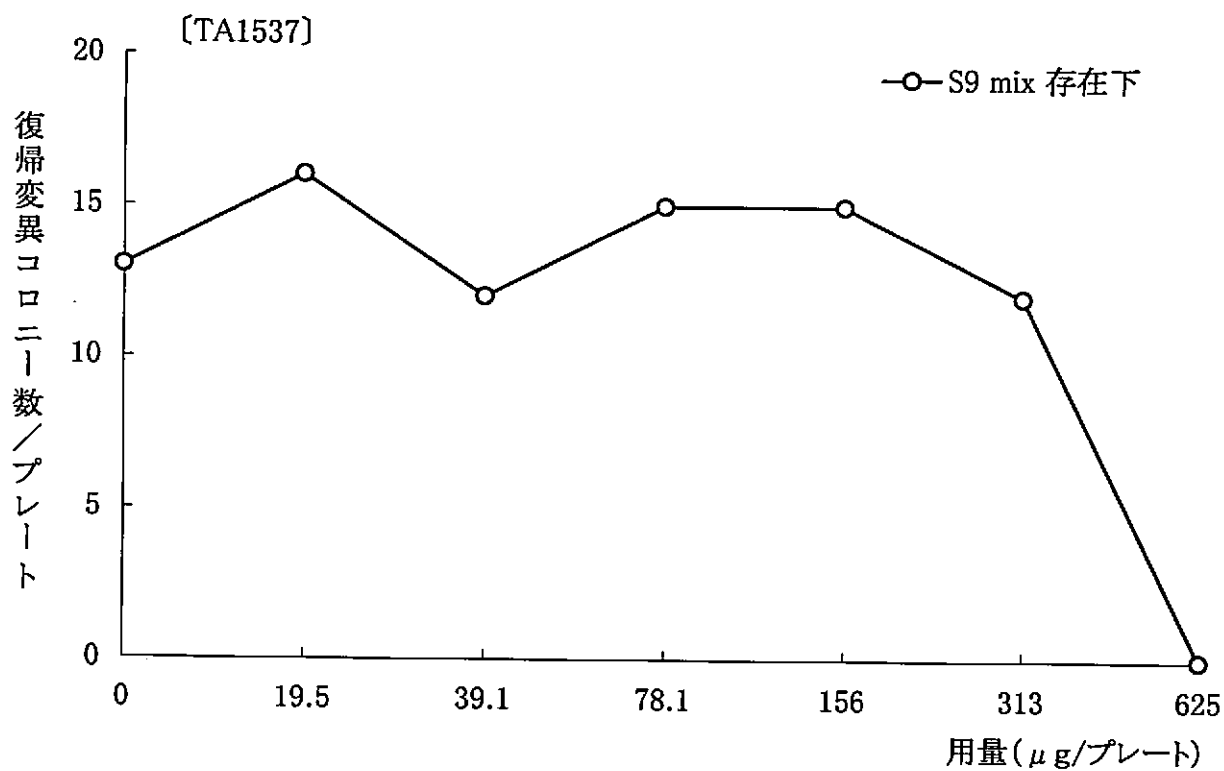
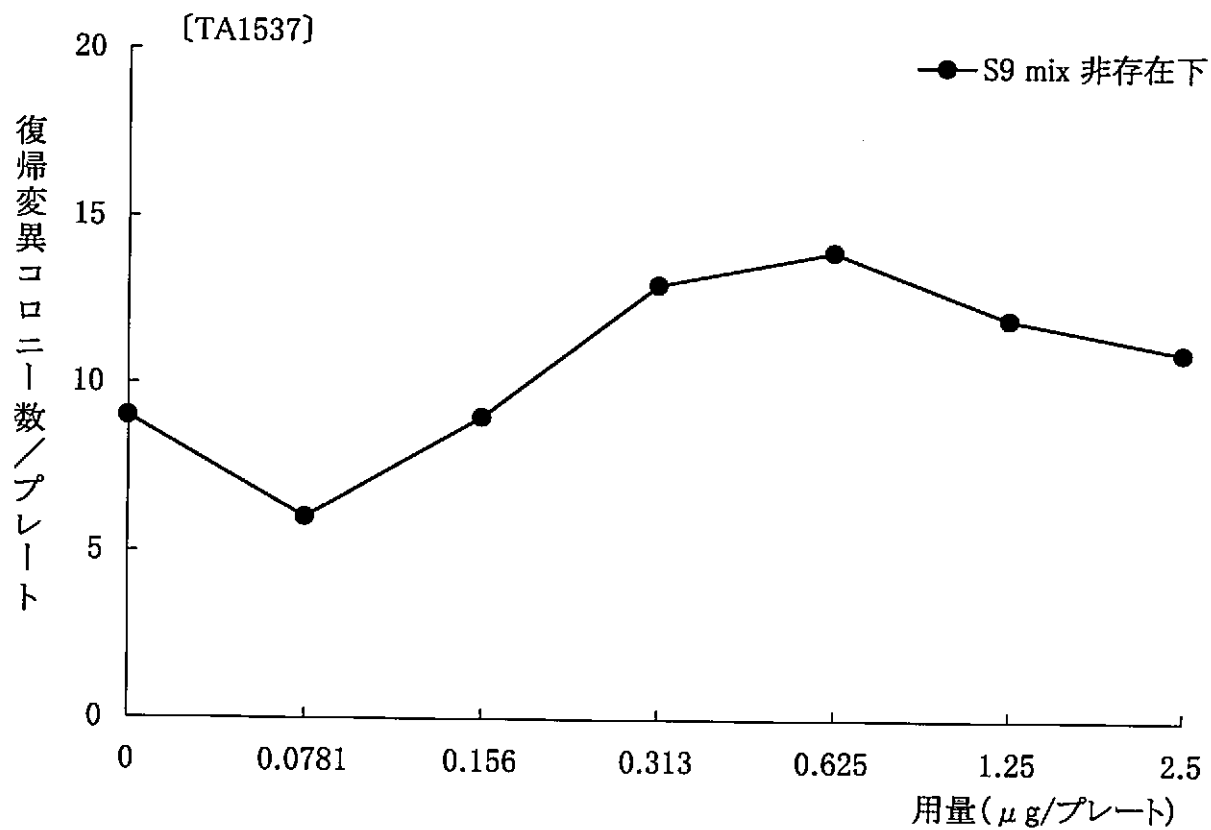



図 2-5 2,3,5,6-テトラクロロベンゾキノンの復帰突然変異試験結果—本試験2回目

陳 述 書

試験表題：2, 3, 5, 6-テトラクロロベンゾキノンの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号： 00-139

本試験は、OECD の試験法ガイドライン“OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS, 471, Bacterial Reverse Mutation Test(1997)” および OECD の GLP “OECD PRINCIPLES OF GOOD LABORATORY PRACTICE(1997)” に定める基準に準拠して実施した。



試験表題：2, 3, 5, 6-テトラクロロベンゾキノンの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：00-139

試験委託者：

名 称 製品評価技術センター

所 在 地 東京都渋谷区西原二丁目 49 番 10 号

委託責任者

試験実施施設：

名 称 財団法人 畜産生物科学安全研究所

所 在 地 神奈川県相模原市橋本台三丁目 7 番 11 号

運営管理者

試験責任者

信頼性保証

責 任 者

試験期間：

試験開始日 平成 12 年 12 月 14 日

実験期間 開始日：平成 13 年 1 月 8 日

終了日：平成 13 年 2 月 8 日

試験終了日 平成 13 年 3 月 29 日

試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる要因：

本試験に関し、試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる要因はなかった。

資料の保管：

本試験における下記の資料は、最終報告書作成後 10 年間、財団法人 畜産生物科学安全研究所において保管する。その後の保管については、試験委託者と協議して決める。

1. 試験計画書
2. 被験物質に関する記録
3. 試験結果に関する記録
4. 信頼性保証に関する記録
5. 最終報告書

試験責任者，担当者および業務分担

[Redacted]	
実験操作	: [Redacted]
データ整理	: [Redacted]

信頼性保証証明書

試験表題 : 2,3,5,6-テトラクロロベンゾキノンの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号 : 00-139

<u>審査・査察実施日</u>	<u>試験責任者への報告日</u>	<u>運営管理者への報告日</u>
-----------------	-------------------	-------------------

1. 試験実施状況査察

本試験(1回目): 指標菌株の前培養		
平成13年01月24日	平成13年01月24日	平成13年01月24日

本試験(1回目): 被験物質の秤量・菌数チェック・被験物質調製・菌液の取扱い・S9mixの使用・被験物質、対照物質及び菌液の添加・トップアガーの作製・指標菌株の検査・無菌試験		
平成13年01月25日	平成13年01月25日	平成13年01月25日

本試験(1回目): 指標菌株検査結果の判定手順		
平成13年01月26日	平成13年01月26日	平成13年01月26日

本試験(1回目): コロニー数の計測・無菌試験及びアミノ酸要求性検査の結果判定手順		
平成13年01月27日	平成13年01月27日	平成13年01月27日

2. 生データ査察		
平成13年03月05日	平成13年03月05日	平成13年03月05日

3. 報告書(草案) 審査		
平成13年03月05日	平成13年03月05日	平成13年03月05日

4. 報告書審査		
平成13年03月29日	平成13年03月29日	平成13年03月29日

上記の審査・査察により、本試験が「OECDのGLP」に従って実施され、本報告書には、当該試験で使用した方法・手順が忠実に記載され、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されていることを確認した。

平成 13 年 3 月 29 日
財団法人 畜産生物科学安全研究所

ROBUST SUMMARY TEMPLATE

GENETIC TOXICITY IN VITRO (BACTERIAL TEST)

TEST SUBSTANCE

2,3,5,6-Tetrachloro-*p*-benzoquinone (CAS No. 118-75-2)

Source : [REDACTED] — purity : 99.5%. Stability during use confirmed by titration method.

METHOD

- Method/guideline : OECD Test Guidelines 471
- Test type : Reverse mutation assay
- GLP : Yes (OECD)
- Year : 2001
- Species/Strain : *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537
Escherichia coli WP2uvrA
- Metabolic activation : with and without S9 mix
- Statistical methods : No

REMARKS FIELD FOR TEST CONDITIONS

- Study Design :
 - Concentration : without S9 mix : 0, 0.0781, 0.156, 0.313, 0.625, 1.25, 2.5 µg/plate (TA100, TA1535, TA98, TA1537)
0, 0.313, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 µg/plate (WP2uvrA)
with S9 mix : 0, 19.5, 39.1, 78.1, 156, 313, 625 µg/plate (all strains)
 - Number of replicates : 2
 - Plates/test : 3
 - Procedure : pre-incubation method
 - Solvent : dimethyl sulfoxide
 - Positive controls : without S9 mix : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (TA100, TA98, WP2uvrA), Sodium azide (TA1535) and 9-Aminoacridine (TA1537)
with S9 mix : 2-Aminoanthracene (all strains)

RESULTS

- Cytotoxic concentration : 2.5 µg/plate (TA100, TA1535, TA98, TA1537) and 10 µg/plate (WP2uvrA) without S9 mix, and 625 µg/plate (all strains) with S9 mix
- Genotoxic effects : negative in all strains with and without metabolic activation

CONCLUSIONS

This chemical was not mutagenic in the *S.typhimurium* and *E.coli* strains with or without metabolic activation.

DATA QUALITY

- Reliabilities : valid without restriction

REFERENCES (Free Text)

Maron, D.M. and Ames, B.N.(1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation. Research*, 113, 173-215.

Green, M.H. (1984). "Handbook of Mutagenicity Test Procedures" 1, Vol. 3, eds. By Kilbey, B.J., Legator, M., Nicols, W. and Ramel, C., Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, pp.161-187.