

厚生省生活衛生局 殿

試 験 報 告 書

3- シアピ°リジンの細菌を用いる復帰変異試験

(試験番号 : 5L550)

株式会社三菱化学安全科学研究所

目 次

要 約	7
材料および方法	8
1. 試験物質	8
2. テスト菌株	8
3. 培 地	9
4. S9 mix	10
5. 試験方法	10
結果および結論	12
参考文献	12
表	13
図	16

要 約

3-シアピリジンについて、*Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 および *Escherichia coli* WP2uvrA の 5 菌株を指標とする復帰変異試験を実施した。

予備試験を 5000 ~ 1.22 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (公比 4) の 7 濃度で実施した結果、S9 mix の有無によらず、いずれの菌株においても抗菌性は認められなかった。従って、5000 ~ 313 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (公比 2) の 5 濃度で本試験を 2 回繰り返した。2 回の本試験ともに、S9 mix の有無によらず、いずれの菌株においても陰性対照値の 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。

以上の結果から、3-シアピリジンは本試験条件下では変異原性を有しないと結論した。

材料および方法

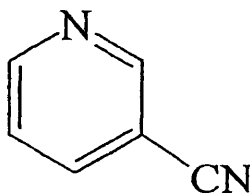
1. 試験物質

1.1 被験物質

から送付された 3-シヒピリジン (CAS No. 100-54-9, ロット番号 : 純度 99.9%) を冷暗所で保存し, 使用した. 被験物質は下記の化学名, 構造式および分子量を有する水に可溶の白色固体である. 試験に使用したロットの安定性は, 被験物質供給元が実験開始前および実験終了後に分析し, 確認した.

化学名 : ニチピニトリル

構造式 :



分子量 : 104.11

1.2 対照物質

陰性 (溶媒) 対照物質および陽性対照物質として, 以下のものを用いた.

対照物質名	略称	入手先	ロット番号	純度 (%)
陰性対照 注射用水	DW	(株)大塚製薬工場	K5A81	—
陽性対照 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)	PTQ1296	98.8
アジ化ナトリウム	NaN ₃	和光純薬工業(株)	KWE6685	96.5
N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン	ENNG	Sigma Chemical Company	56F-3651	99.0
9-アミノアクリジン	9-AA	Sigma Chemical Company	80F-0186	99
2-アミノアントラセン	2-AA	和光純薬工業(株)	TWH2355	98.0

2. テスト菌株^{1) 2)}

2.1 テスト菌株

より 1983 年 5 月 27 日に入手した *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 および よ

り 1985 年 10 月 14 日に入手した *Escherichia coli* WP2uvrA の 5 菌株を用いた。

これら菌株の遺伝的特性は以下のとおりである。

菌 株	変異遺伝子	付帯突然変異			突然変異型
		修復	膜	R 因子	
TA98	<i>hisD</i>	<i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	pKM101	フレームシフト
TA100	<i>hisG</i>	<i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	pKM101	塩基対置換
TA1535	<i>hisG</i>	<i>uvrB</i>	<i>rfa</i>		塩基対置換
TA1537	<i>hisC</i>	<i>uvrB</i>	<i>rfa</i>		フレームシフト
WP2 <u>uvrA</u>	<i>trpE</i>	<i>uvrA</i>	+		塩基対置換

2.2 特性検査

各テスト菌株のアミノ酸要求性、紫外線感受性、膜変異、薬剤耐性などの遺伝的特徴を事前に調べ、これらの特性を備えた菌株を用いた。

2.3 保存方法

液体完全培地中で 37 °C で 8 時間振盪培養した各菌懸濁液 4 ml に対し、0.35 ml の割合でジメチルスルホキシド (DMSO と略す；関東化学㈱，ロット番号 610E1229) を加える。これを 200 μ l ずつ小分けしてドライアイス・アセトン中で急速凍結し、超低温槽に -80 °C 以下で凍結保存したものを使用した。

2.4 菌懸濁液

凍結保存した各菌懸濁液を解凍後、各々 20 μ l を液体完全培地 10 ml に接種し、37 °C で 8 時間振盪培養した。菌懸濁液は、濁度計を用いて菌濃度を測定した。

3. 培 地

3.1 液体完全培地

精製水 1 l に対し、ニュートリエントブロス (Oxoid Nutrient Broth No.2 ; Unipath 社，ロット番号 067 54134) 20 g の割合で溶解し、オートクレーブ滅菌 (121 °C，15 分間；以下同様) した。

3.2 最少グルコース寒天平板培地

クリメディア AM-N 培地 (オリエンタル酵母工業㈱，ロット番号 AN020IK) を購入し、使用した。

3.3 トップアガー

精製水 100 ml に対して、粉末寒天 (Bacto-Agar ; Difco 社，ロット番号 37430AJA)

0.6 g, 塩化ナトリウム 0.5 g の割合で加え, オートクレーブ滅菌し完全に溶解した。その後, 予め調製しておいた 0.5 mM D- ビオチン, L- ヒスチジンおよび L- トリプトファン混合水溶液を 1/10 量添加した。使用時まで約 45 °C に保温した。

4. S9 mix

4.1 S9

フェノバルビタール(1日目 30 mg/kg, 2日目以降 60 mg/kg を3回反復腹腔内投与)および 5,6-ベンゾフラボン(3日目に 80 mg/kg を1回腹腔内投与)で酵素誘導したSD系雄ラット肝由来S9(キッコーマン株, ロット番号 RAA-337)を購入し, 使用した。使用時まで -80 °C 以下で保存した。

4.2 S9 mix

S9 mix 1ml あたり以下の組成で調製し, 使用時まで氷中に保存した。

S9	0.1 ml
塩化マグネシウム六水塩	8 μ mol
塩化カリウム	33 μ mol
D-グルコース 6-リン酸	5 μ mol
β -NADPH	4 μ mol
β -NADH	4 μ mol
ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μ mol
滅菌精製水	

5. 試験方法 ³⁾

5.1 被験物質溶液および陽性対照物質溶液の調製

溶媒検討の結果, 50 mg/ml の濃度で水に溶解したため, 溶媒には注射用水 (DW) を用いた。

被験物質を 50 mg/ml の濃度で DW に溶解し, これを希釈して各濃度の被験物質溶液を調製した。

陽性対照物質の NaN₃ は DW に, その他は DMSO(ロット番号 708S1611) に溶解した。

5.2 被験物質濃度

予備試験を 5000, 1250, 313, 78.1, 19.5, 4.88, 1.22 μ g/プレート の各濃度で実施した結果, S9 mix の有無によらず, いずれの菌株においても抗菌性は認められなかった。従って, 5000, 2500, 1250, 625, 313 μ g/プレート の 5 濃度を設定し, 本試験を 2 回実施した。

5.3 復帰変異試験

試験はプレインキュベーション法で実施した。

滅菌した試験管に被験物質溶液を 0.1 ml, 0.1 M ナトリウムーリン酸緩衝液 (pH7.4) を 0.5 ml および菌懸濁液を 0.1 ml 加え, 37 °C で 20 分間振盪培養した。S9 mix を共存させる場合には, 0.1 M ナトリウムーリン酸緩衝液の代わりに S9 mix を 0.5 ml 添加した。トップアガー 2 ml を上記の混合液に加え混和し, 最少グルコース寒天平板培地上に重層した。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。

実体顕微鏡を用いて菌叢の生育状態を観察し, 被験物質による抗菌性の有無を調べた後, 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で計測した。予備試験は各濃度あたり 1 枚のプレートを使用した。本試験は各濃度あたり 3 枚のプレートを使用し, 再現性を確認するため 2 回実施した。

陰性対照物質および陽性対照物質についても同様に実施した。

菌 株	S9 mix 非共存下 ($\mu\text{g}/7^\circ\text{V-t}$)		S9 mix 共存下 ($\mu\text{g}/7^\circ\text{V-t}$)	
TA98	AF-2	0.1	2-AA	0.5
TA100	AF-2	0.01	2-AA	1
TA1535	NaN ₃	0.5	2-AA	2
TA1537	9-AA	80	2-AA	2
WP2uvrA	ENNG	2	2-AA	10

5.4 無菌試験

最高濃度の被験物質溶液または S9 mix のみを, トップアガーとともに最少グルコース寒天平板培地上に播き, 雑菌の混入がないことを確認した。

5.5 試験結果の判定

いずれかの試験菌株で, S9 mix の有無によらず, 被験物質濃度の増加にともなって復帰変異コロニー数 (平均値) が陰性対照値の 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, その他の場合はすべて陰性と判定した。試験結果の判定には統計学的手法は用いなかった。

結果および結論

結果を表1～3および図1～10に示す。

予備試験を5000, 1250, 313, 78.1, 19.5, 4.88, 1.22 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の各濃度で実施した結果、S9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても抗菌性は認められなかった。

この結果をもとに、5000, 2500, 1250, 625, 313 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の5濃度で本試験を2回繰り返した。2回の本試験ともに、S9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても陰性(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、抗菌性も、S9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても認められなかった。

以上の結果から、3-ツピリゾンは本試験条件下では変異原性を有さない(陰性)と結論した。

参考文献

- 1) Maron, D.M. and Ames, B.N.; Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutat. Res.*, 113, 173-215. (1983)
- 2) Green, M.H.L., Muriel, W.J.; Mutagen testing using *trp*⁺ reversion in *Escherichia coli*, *Mutat. Res.*, 38,3-32. (1976)
- 3) 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”, 中央労働災害防止協会, 東京. (1991)

表 1

予備試験結果表

被験物質の名称 : 3-シアノピリジン (No. 5L550)

代謝活性化系の有無	被験物質濃度 ($\mu\text{g}/7^\circ\text{プレート}$)	復帰変異数(コロニ-数/ 7°プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2 uvrA	TA98	TA1537
S 9 mix (-)	溶媒対照	115	15	25	30	6
	1. 2 2	91	15	24	25	6
	4. 8 8	116	13	21	20	8
	1 9. 5	103	18	26	27	7
	7 8. 1	127	18	35	27	7
	3 1 3	97	19	17	25	8
	1 2 5 0	122	19	18	20	8
	5 0 0 0	101	18	20	20	4
S 9 mix (+)	溶媒対照	130	17	37	30	11
	1. 2 2	129	18	26	41	8
	4. 8 8	129	24	34	22	16
	1 9. 5	124	19	31	46	11
	7 8. 1	130	24	21	35	9
	3 1 3	117	23	24	28	16
	1 2 5 0	134	26	26	43	8
	5 0 0 0	123	20	26	35	10

表 2

試験結果表 (本試験 1)

被験物質の名称 : 3-シアノピリジン (No. 5L550)

代謝活性化系の有無	被験物質濃度 (μg/プレート)	復帰変異数(コロニ-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	
S9mix (-)	溶媒対照	121 131 (116) 97 (± 17)	15 14 (15) 15 (± 1)	38 50 (40) 33 (± 9)	24 24 (21) 15 (± 5)	7 12 (10) 10 (± 3)	
	3 1 3	113 92 (110) 126 (± 17)	11 14 (13) 14 (± 2)	66 25 (45) 45 (± 21)	18 19 (18) 17 (± 1)	10 8 (9) 10 (± 1)	
	6 2 5	105 113 (113) 121 (± 8)	13 21 (16) 15 (± 4)	40 41 (41) 42 (± 1)	11 18 (15) 15 (± 4)	10 7 (9) 11 (± 2)	
	1 2 5 0	141 123 (137) 146 (± 12)	11 11 (11) 12 (± 1)	34 37 (38) 43 (± 5)	18 18 (17) 16 (± 1)	10 8 (9) 8 (± 1)	
	2 5 0 0	123 118 (123) 127 (± 5)	16 20 (15) 10 (± 5)	38 47 (39) 32 (± 8)	25 21 (22) 20 (± 3)	7 10 (8) 8 (± 2)	
	5 0 0 0	116 96 (110) 117 (± 12)	17 10 (13) 13 (± 4)	33 32 (35) 40 (± 4)	14 18 (15) 13 (± 3)	7 10 (10) 12 (± 3)	
	溶媒対照	127 137 (133) 135 (± 5)	14 16 (18) 23 (± 5)	36 46 (41) 41 (± 5)	33 23 (29) 31 (± 5)	13 11 (11) 9 (± 2)	
	3 1 3	146 149 (147) 147 (± 2)	19 15 (17) 17 (± 2)	38 37 (39) 43 (± 3)	27 32 (30) 30 (± 3)	14 16 (15) 15 (± 1)	
	6 2 5	144 147 (139) 126 (± 11)	18 28 (20) 15 (± 7)	46 34 (42) 45 (± 7)	33 23 (27) 24 (± 6)	13 9 (12) 15 (± 3)	
	1 2 5 0	127 129 (130) 135 (± 4)	19 20 (19) 19 (± 1)	46 33 (40) 41 (± 7)	34 28 (29) 24 (± 5)	12 15 (12) 8 (± 4)	
	2 5 0 0	122 138 (132) 137 (± 9)	14 26 (19) 17 (± 6)	36 36 (40) 48 (± 7)	25 19 (24) 28 (± 5)	9 12 (11) 12 (± 2)	
	5 0 0 0	122 134 (123) 114 (± 10)	22 13 (15) 10 (± 6)	53 43 (50) 53 (± 6)	19 29 (24) 25 (± 5)	22 22 (20) 17 (± 3)	
	陽性対照	名称	AF-2	NaN ₃	ENNG	AF-2	9-AA
		濃度 (μg/プレート)	0.01	0.5	2	0.1	80
		コロニ-数 / プレート	552 640 (617) 659 (± 57)	253 310 (281) 279 (± 29)	530 557 (533) 513 (± 22)	501 504 (506) 514 (± 7)	654 565 (630) 672 (± 57)
		名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		濃度 (μg/プレート)	1	2	10	0.5	2
		コロニ-数 / プレート	845 900 (864) 848 (± 31)	276 321 (290) 272 (± 27)	1112 1102 (1139) 1202 (± 55)	464 430 (415) 352 (± 57)	185 183 (182) 177 (± 4)

(平均値)
(±標準偏差)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド, NaN₃ : 7% 化ナトリウム,
ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトログアニジン, 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 (本試験 2)

被験物質の名称 : 3-シアノピリジン

(No. 5L550)

代謝活性化系の有無	被験物質濃度 ($\mu\text{g}/7^\circ\text{プレート}$)	復帰変異数(コロニ-数/ 7°プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2 uvrA	TA98	TA1537	
S 9 mix (-)	溶媒対照	114 98 (109) 116 (± 10)	11 11 (11) 12 (± 1)	34 31 (34) 37 (± 3)	33 27 (31) 32 (± 3)	7 9 (8) 8 (± 1)	
	3 1 3	99 97 (101) 106 (± 5)	15 9 (13) 15 (± 3)	29 32 (30) 28 (± 2)	22 19 (22) 25 (± 3)	10 10 (9) 8 (± 1)	
	6 2 5	111 118 (120) 130 (± 10)	13 14 (12) 8 (± 3)	37 37 (35) 31 (± 3)	30 27 (29) 29 (± 2)	7 10 (11) 16 (± 5)	
	1 2 5 0	97 125 (111) 110 (± 14)	11 13 (11) 10 (± 2)	39 37 (36) 31 (± 4)	32 33 (31) 28 (± 3)	9 8 (9) 9 (± 1)	
	2 5 0 0	97 115 (105) 104 (± 9)	16 10 (14) 16 (± 3)	30 27 (28) 28 (± 2)	22 30 (27) 28 (± 4)	5 11 (8) 8 (± 3)	
	5 0 0 0	96 88 (91) 88 (± 5)	10 5 (8) 9 (± 3)	29 29 (26) 19 (± 6)	26 29 (26) 23 (± 3)	10 15 (12) 10 (± 3)	
S 9 mix (+)	溶媒対照	132 111 (119) 114 (± 11)	21 16 (18) 18 (± 3)	37 36 (36) 35 (± 1)	35 35 (34) 32 (± 2)	8 13 (14) 20 (± 6)	
	3 1 3	143 112 (129) 132 (± 16)	20 16 (17) 15 (± 3)	39 33 (36) 37 (± 3)	42 30 (38) 43 (± 7)	10 10 (10) 10 (± 0)	
	6 2 5	124 121 (125) 130 (± 5)	19 18 (18) 18 (± 1)	41 28 (36) 40 (± 7)	37 44 (43) 49 (± 6)	15 11 (13) 13 (± 2)	
	1 2 5 0	137 109 (122) 120 (± 14)	12 16 (16) 19 (± 4)	37 39 (36) 33 (± 3)	37 33 (39) 47 (± 7)	13 13 (12) 11 (± 1)	
	2 5 0 0	106 94 (105) 114 (± 10)	19 18 (17) 14 (± 3)	38 34 (37) 39 (± 3)	33 34 (38) 47 (± 8)	14 16 (12) 5 (± 6)	
	5 0 0 0	117 126 (115) 101 (± 13)	18 16 (16) 14 (± 2)	43 39 (40) 38 (± 3)	33 25 (32) 39 (± 7)	14 10 (11) 10 (± 2)	
陽性	S9mixを必要としなもの	名称 濃度 ($\mu\text{g}/7^\circ\text{プレート}$)	AF-2 0.01	NaN ₃ 0.5	ENNG 2	AF-2 0.1	9-AA 80
	コロニ-数/ 7°プレート	733 688 (699) 677 (± 30)	343 345 (345) 348 (± 3)	837 806 (806) 775 (± 31)	520 449 (485) 487 (± 36)	541 531 (515) 472 (± 37)	
対照	S9mixを必要とするもの	名称 濃度 ($\mu\text{g}/7^\circ\text{プレート}$)	2-AA 1	2-AA 2	2-AA 10	2-AA 0.5	2-AA 2
	コロニ-数/ 7°プレート	971 940 (944) 920 (± 26)	351 377 (377) 402 (± 26)	1169 1159 (1179) 1210 (± 27)	262 283 (276) 284 (± 12)	188 183 (175) 155 (± 18)	

(平均値)
(\pm 標準偏差)AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド, NaN₃ : アジ化ナトリウム,
ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン, 9-AA : 9-アミノアクリジン, 2-AA : 2-アミノアントラセン

図 1 (本試験 1)

被験物質名: 3-シアノピリジン

No.5L550

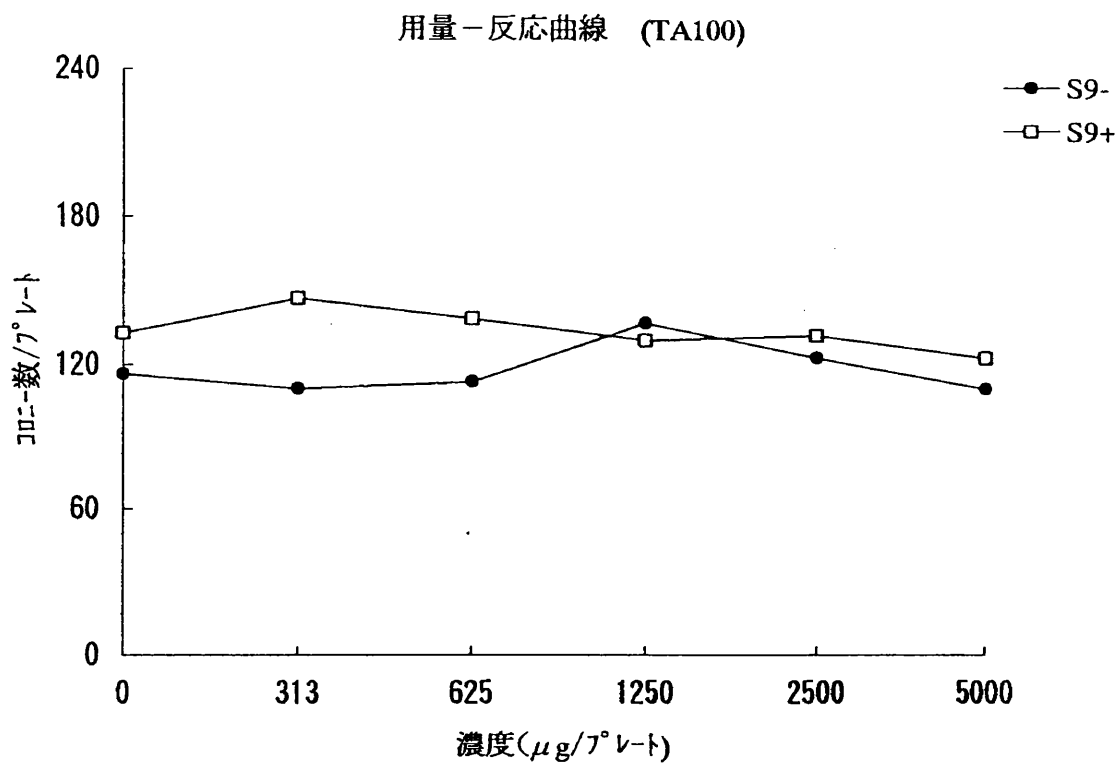


図 2 (本試験 1)

被験物質名: 3-シアノピリジン

No.5L550

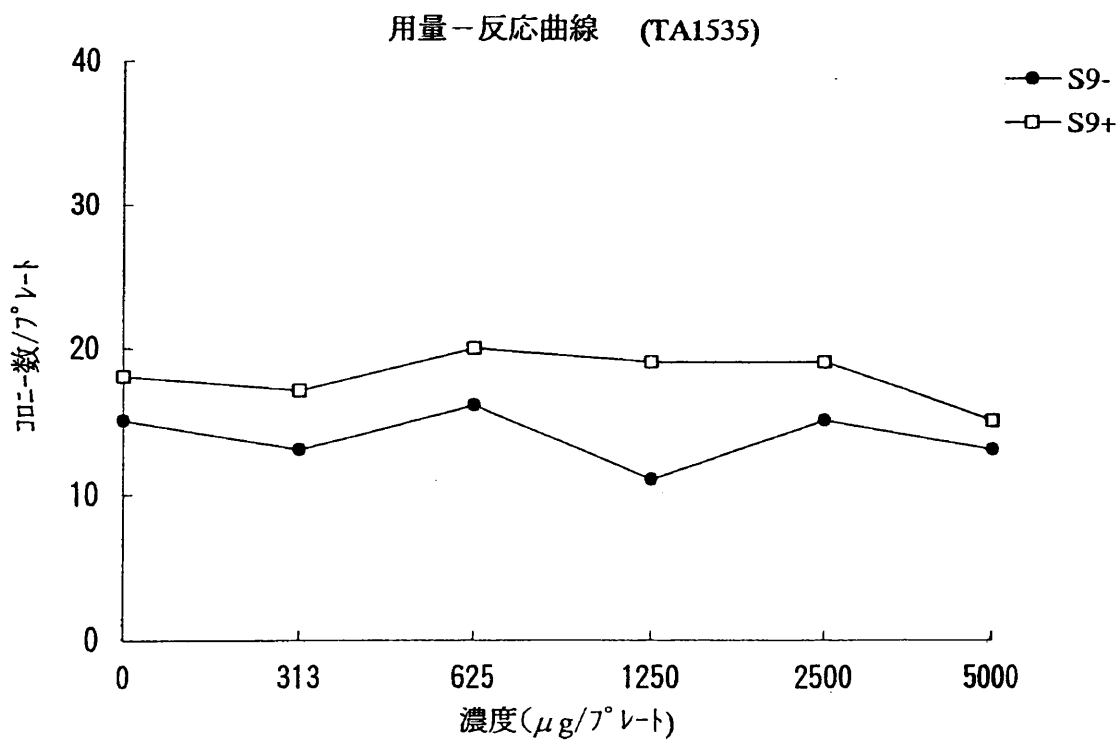


図 3 (本試験 1)

被験物質名: 3-シアノピリジン

No.5L550

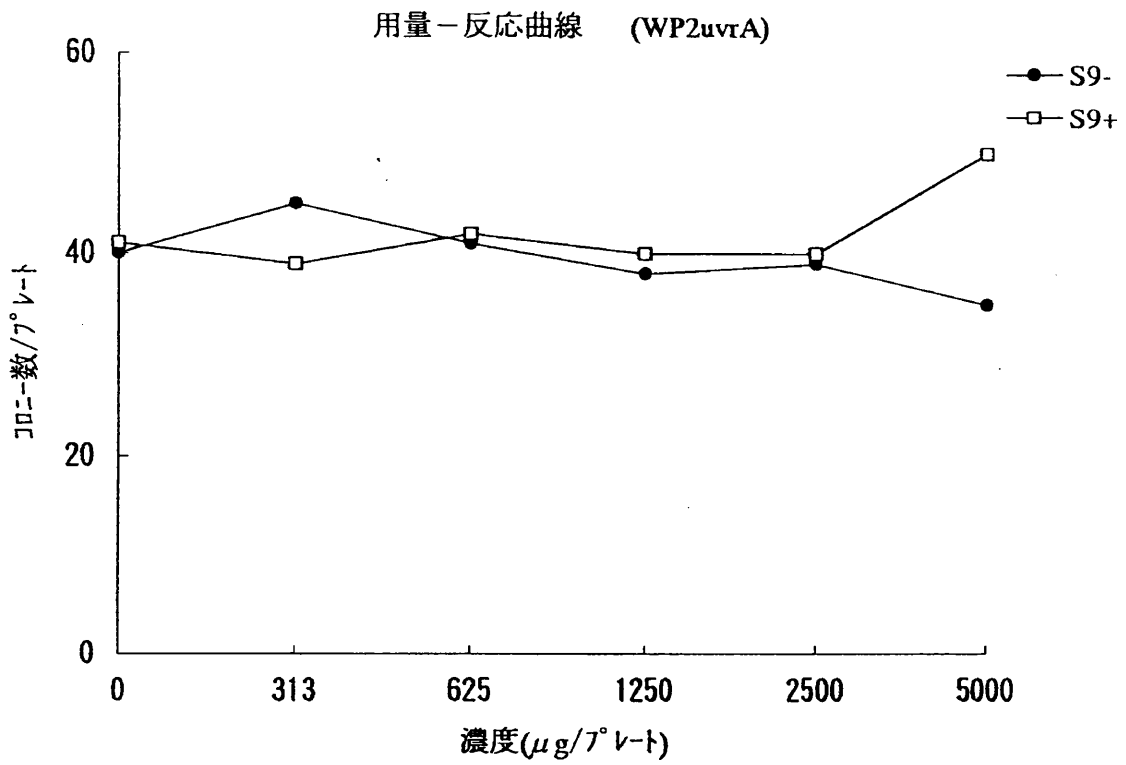


図 4 (本試験 1)

被験物質名: 3-シアノピリジン

No.5L550

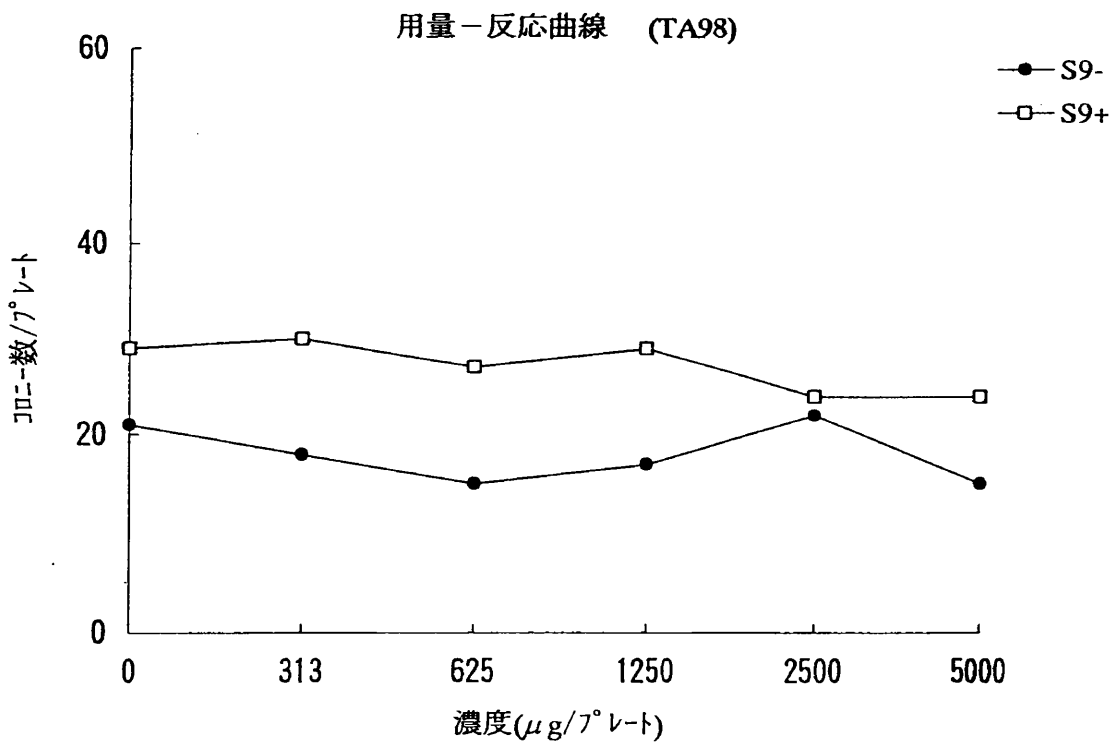


図 5 (本試験 1)

被験物質名 : 3-シアノピリジン

No.5L550

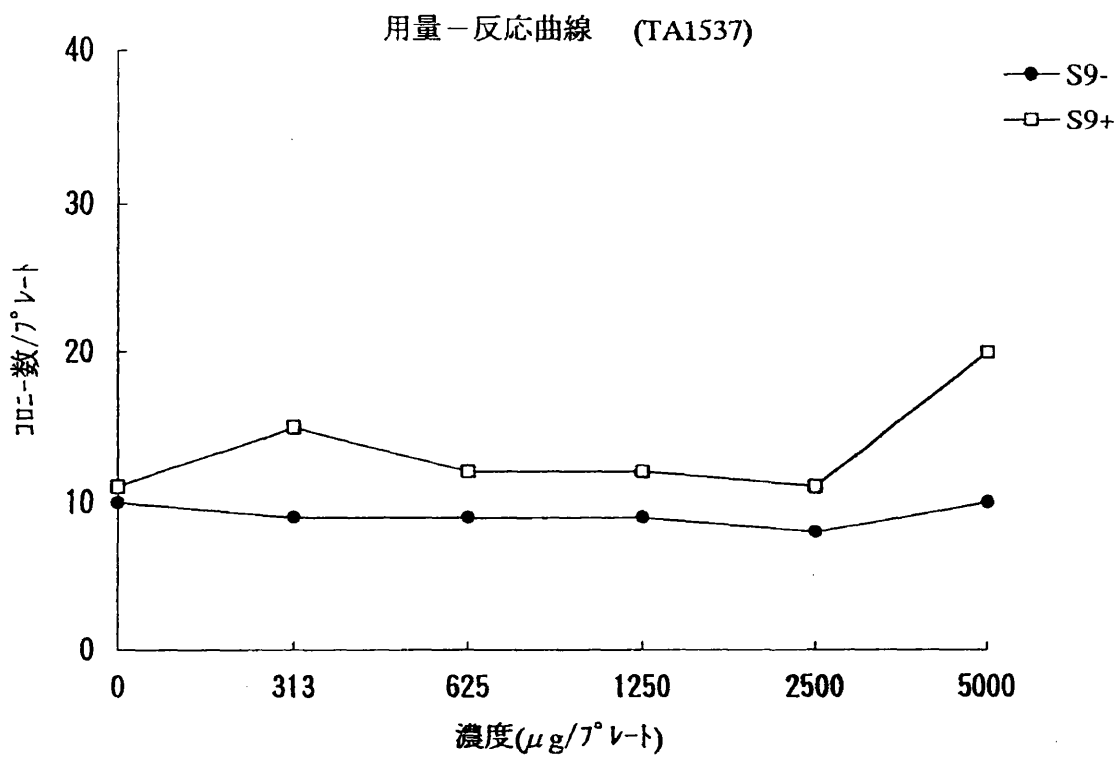


図 6 (本試験 2)

被験物質名 : 3-シアノピリジン

No.5L550

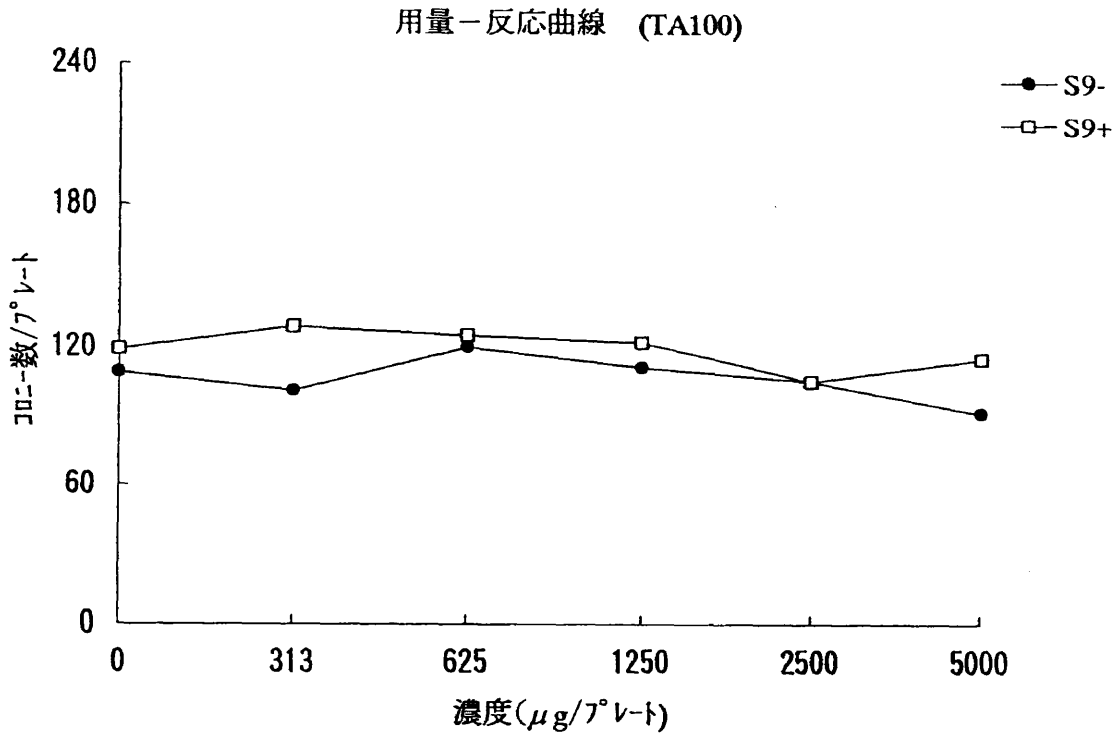


図 7 (本試験 2)

被験物質名 : 3-シアノピリジン

No.5L550

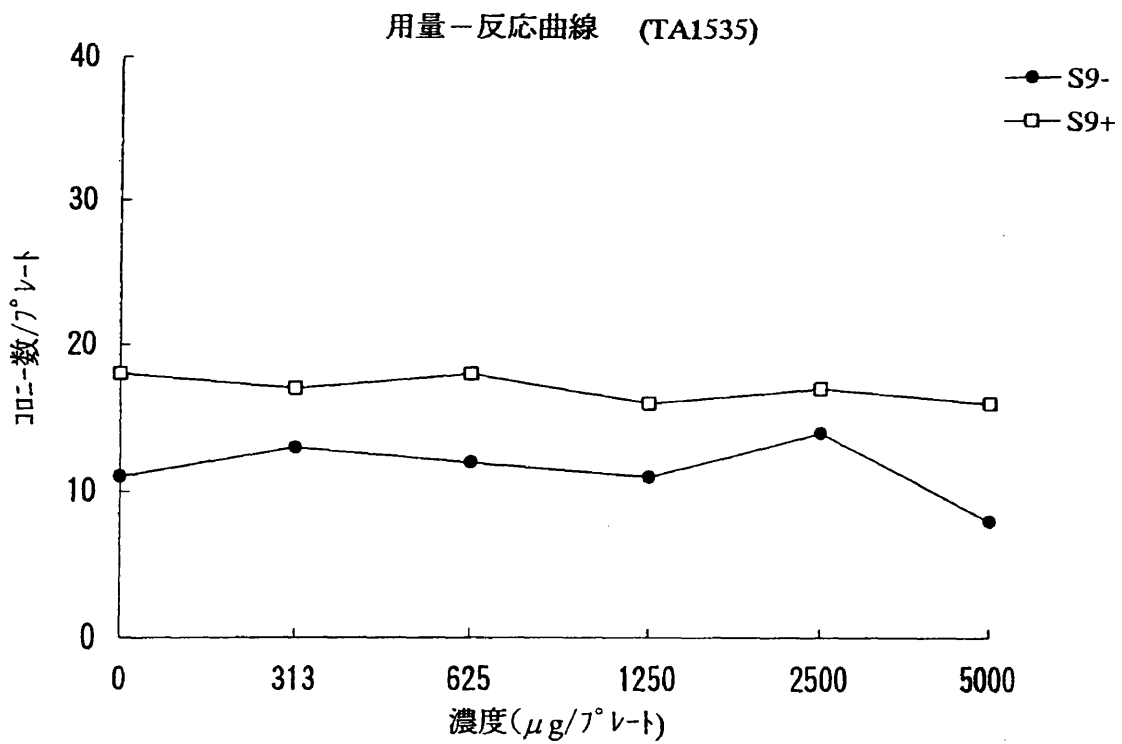


図 8 (本試験 2)

被験物質名: 3-シアノピリジン

No.5L550

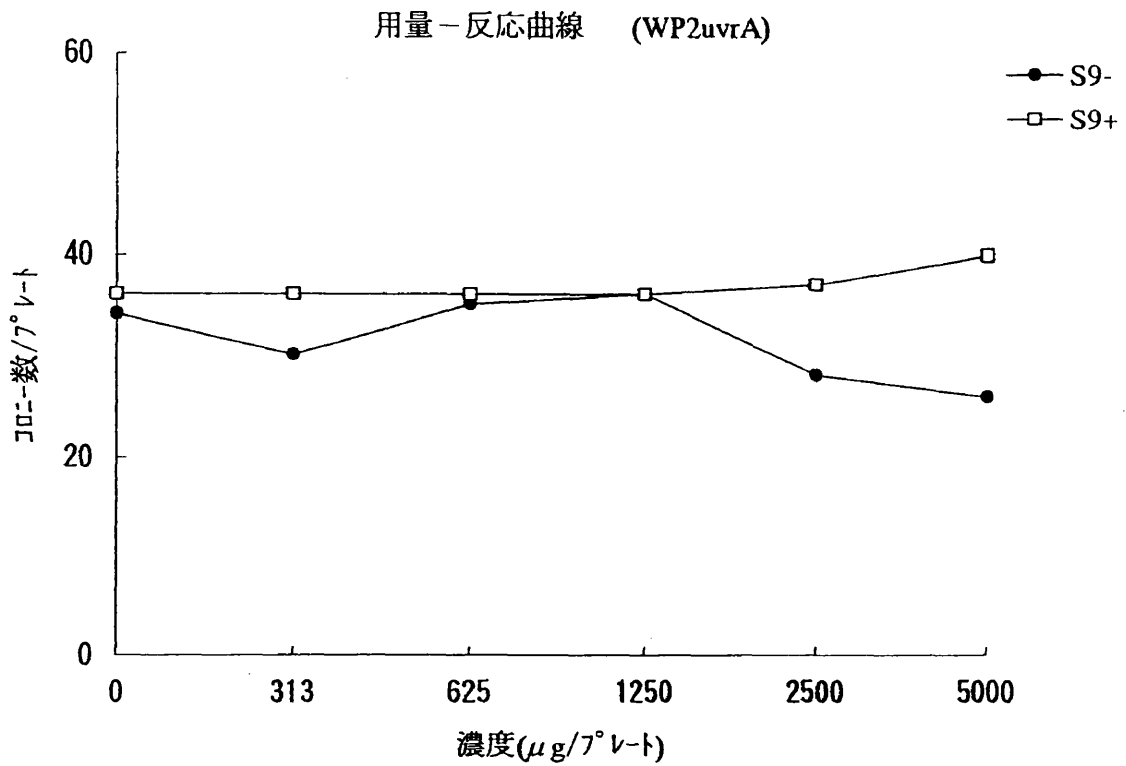


図 9 (本試験 2)

被験物質名: 3-シアノピリジン

No.5L550

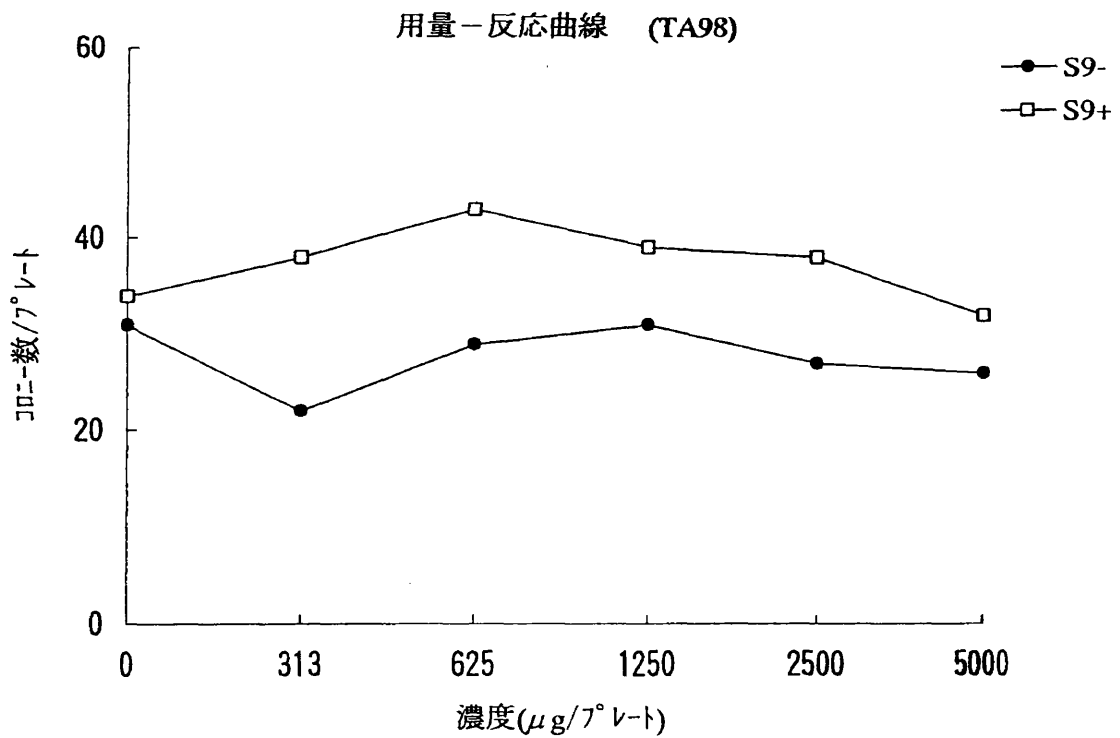


図 10 (本試験 2)

被験物質名: 3-シアノピリジン

No.5L550

