

ジシクロヘキシルカルボジイミド の
細菌を用いる
復帰変異試験

厚生省生活衛生局 委託

財団法人食品薬品安全センター

秦野研究所

目 次

	頁
要 約	1
緒 言	2
材料および試験方法	3
試験結果および考察	7
参 考 文 献	9
表 1～3	

要 約

ジシクロヘキシルカルボジイミドの変異原性の有無について、細菌を用いる復帰変異試験を実施することにより検討した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用い、直接試験および代謝活性化試験のいずれも、用量設定試験は 50~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で、本試験は TA100, TA1535 および TA98 では 78.1~2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、WP2 では 156.3~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、TA1537 では 39.1~1250 (1回目の代謝活性化試験のみ 78.1~2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$) の用量で2回実施した。

その結果、2回の本試験とも、用いた5種類の検定菌について、いずれの用量でも復帰変異コロニー数の増加が認められなかったことから、ジシクロヘキシルカルボジイミドは、用いた試験系において変異原性を有しない(陰性)と判定された。

緒 言

OECD既存化学物質安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、日本が独自に選定した既存化学物質の1つである、ジシクロヘキシルカルボジイミドについて、細菌を用いる復帰変異試験をプレート法により実施した。

この試験は、サルモネラ（ネズミチフス菌）におけるヒスチジン要求性から非要求性への復帰変異⁽¹⁾、ならびに大腸菌におけるトリプトファン要求性から非要求性への復帰変異⁽²⁾を指標とした変異原の検出系である。

試験は、被験物質をそのまま検定菌に作用させる直接試験と、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素（S9 混液）によって産生される被験物質の代謝物の変異原性を試験する代謝活性化試験とからなっている。

本試験は、「新規化学物質に係る試験の方法について」（昭和62年3月31日、環保業第237号、薬発第306号、62基局第303号）およびOECD化学品試験法ガイドライン：471, 472 に準拠し、化学物質GLP（昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、改訂昭和63年11月18日、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号）に基づいて実施した。

材料および試験方法

〔検定菌〕

Salmonella typhimurium TA100
Salmonella typhimurium TA1535
Escherichia coli WP2 *uvrA*
Salmonella typhimurium TA98
Salmonella typhimurium TA1537

S. typhimurium の4菌株は1975年10月31日にアメリカ合衆国、
から分与を受けた。

E. coli WP2 *uvrA* 株は1979年5月9日に の から
分与を受けた。

検定菌は、-80℃以下で凍結保存した。

試験に際して、0.5%塩化ナトリウム添加ニュートリエントブロス (Difco) を入
れたL字型試験管に種菌を接種し、37℃、10時間往復振とう培養したものを検定菌
液とした。

〔被験物質〕

ジシクロヘキシルカルボジイミド (CAS No. 538-75-0、以下DCCと略) は、分
子量 206.34、比重 0.946、融点 35~36℃、沸点 154~156℃の性状を有する白色
固体である。純度99.7%のもの (ロット番号:)
を から供与された。被験物質は、試験使用時まで室温で遮光し
て保存した。

DCCは、ジメチルスルホキシド (ロット番号: DSL 5887、和光純薬、以下DMSO
と略) に 50 mg/ml になるように調製した後、同溶媒で更に公比2ないし3で希釈
したものを、速やかに試験に用いた。

試験の開始に先立って、秦野研究所においてDCCのDMSO溶液中での安定
性試験を行った。本試験における最高濃度 (50 mg/ml) および最低濃度以下の濃度

(0.25 mg/ml) の 2 濃度について、室温遮光条件下で実施した。その結果、調製後 3 時間における、各々 3 サンプルの平均含量は、それぞれ初期値の平均 (0 時間) に対して、99.7 および 100%であった。これらの値は、当研究所の標準操作手順書の基準 (初回の測定平均値の 90%以上) を満たしていた (Appendix 1)。

また、本試験に用いた調製検体について、含量測定試験を行った結果、50 mg/ml 溶液の含量は既定濃度に対し、97.4~101%、0.781 mg/ml 溶液は、106~107%、さらに 0.391 mg/ml 溶液については、91.1~103%であった。これらの値も、当研究所の標準操作手順書の基準 (平均含量は添加量の 85%以上) を満たしていた (Appendixes 2, 3)。

以上の結果から、DCCはDMSO溶液中では安定であり、また調製液中の被験物質の含量は所定の値の範囲内にあることが確認された。

[陽性対照物質]

用いた陽性対照物質およびその溶媒は以下のとおりである。

AF-2 : フリルフラマイド	(上野製薬㈱)	ロット番号 46,	純度99.9%)
SA : アジ化ナトリウム	(和光純薬工業㈱)	ロット番号 TLN5556,	純度>90%)
9-AA : 9-アミノアクリジン	(東京化成工業㈱)	ロット番号 AM 01,	純度>98%)
2-AA : 2-アミノアントラセン	(和光純薬工業㈱)	ロット番号 EDE7881,	純度>90%)

AF-2, 9-AA, 2-AA は DMSO (和光純薬工業㈱) ロット番号 DSL5887およびECJ7001) に、SA は蒸留水に溶解して試験に用いた。

[培地および S9 混液の組成]

1) トップアガー (TA菌株用)

下記の水溶液 (A) および (B) を容量比 10:1 の割合で混合した。

(A) バクト・アガー (Difco) 0.6% (B) L-ヒスチジン 0.5 mM

塩化ナトリウム 0.5% ビオチン 0.5 mM

* : WP2 用には、0.5 mM L-トリプトファン水溶液を用いた。

2) 合成培地

培地は、日清製粉株式会社製の最少寒天培地（用量設定試験では、ロット番号：DJ050GG, 1991年7月9日製造, 本試験においては、ロット番号：DJ070JG, 1991年10月21日製造）を用いた。なお、培地1ℓあたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム・7水和物	0.2 g	リン酸水素アンモニウムナトリウム・4水和物	3.5 g
クエン酸・1水和物	2 g	グルコース	20 g
リン酸水素二カルシウム	10 g	バクト・アガー (Difco)	15 g

径 90 mm のシャーレ1枚あたり 30 ml を流して固めてある。

3) S9 混液（1 ml 中下記の成分を含む）

S9 ^{**}	0.1 ml	NADH	4 μmole
塩化マグネシウム	8 μmole	NADPH	4 μmole
塩化カルシウム	33 μmole	0.2M リン酸緩衝液 (pH 7.4)	0.5 ml
グルコース-6リン酸	5 μmole		

** : 7週齢の Sprague-Dawley 系雄ラットをフェノバルビタール(PB)および5、6-ベンゾフラボン(BF)の併用投与で酵素誘導して作製した S9 (キッコーマン種、ロット番号 RAA-258、1991年8月23日製造) を用いた。PBおよびBFの投与量は1日目 PB 30 mg/kg、2日目 PB 60 mg/kg、3日目 PB 60 mg/kg および BF 80 mg/kg、4日目 PB 60 mg/kg であり、いずれも腹腔内投与したものである。

(試験方法)

プレート法により直接試験および代謝活性化試験を行った。

小試験管中にトッブアガー 2 ml、被験物質調製液 0.1 ml、リン酸緩衝液 0.5 ml (代謝活性化試験においては S9 混液 0.5 ml)、検定菌液 0.1 ml を混合したのち合成培地平板上に流して固めた。また、対照群として被験物質調製液の代わりに

DMSO、または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとの陽性対照物質の名称および用量は表中に示した。培養は37℃で48時間行い、生じた復帰変異コロニー数を算定した。用いた平板は用量設定試験においては、陰性および陽性対照群では3枚ずつ、各用量については1枚ずつとした。また、本試験においては両対照群および各用量につき、3枚ずつを用い、それぞれその平均値と標準偏差を求めた。用量設定試験は1回、本試験は同一用量（TA1537の代謝活性化試験のみは異なる用量）について2回実施し、再現性の確認を行った。

〔判定基準〕

被験物質を含有する平板上における復帰変異コロニー数が、陰性対照のそれに比べて2倍以上に増加し、かつ、その増加に再現性あるいは用量依存性が認められた場合に、当該被験物質は本試験系において変異原性を有する（陽性）と判定することとした。

試験結果および考察

試験の全過程を通して、信頼性に悪影響を及ぼすおそれのある予期し得なかった事態および試験計画書からの逸脱はなかった。

〔用量設定試験〕

結果を表1に示した。50～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で試験を実施したところ、WP2を除く *S. typhimurium* のすべての検定菌の直接試験、代謝活性化試験において、高用量の1～2用量群で抗菌性が認められた。

したがって、1回目の本試験における最高用量を直接試験および代謝活性化試験ともに TA1537を除く *S. typhimurium* の3菌株では、2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、WP2では5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とし、以下公比2でそれぞれ6用量を設定することとした。TA1537については、直接試験では1250 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、代謝活性化試験では2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ を最高用量とし、同様に6用量を設定した。

〔本試験〕

1回目の本試験の結果を表2に示した。DCCについて、上記の用量範囲で試験を実施した。その結果、すべての検定菌において、直接試験および代謝活性化試験のいずれにおいても、高用量の1～2用量群において抗菌性が認められたものの、用量依存性のある変異コロニー数の増加は認められなかった。

2回目の試験においては、TA1537の代謝活性化試験の最高用量を直接試験と同様に1250 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ としたほかは、それぞれの検定菌について1回目の試験と同じ用量で試験を実施した。結果を表3に示した。

その結果、すべての検定菌において高用量の1～2用量群で、抗菌性が認められたものの、用量依存性のある変異コロニー数の増加は認められなかった。

DCCについて実施した試験において、陽性対照物質では、いずれの検定菌においても変異コロニー数の増加が認められ、陰性対照群の変異コロニー数とも、計測された変異コロニー数はヒストリカルコントロール値の範囲内であったことから、本試験に用いた各検定菌の感受性および各陽性対照物質の変異原活性についての安定性が確認された。

以上の結果に基づき、DCCは、用いた試験系において変異原性を有しないもの（陰性）と判定した。

参 考 文 献

- (1) Maron, D.M. and Ames, B.N.: Mutation Research. 113: 173-215 (1983)
- (2) Green, M.H.: in "Handbook of Mutagenicity Test Procedures." Kilby, B. J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C.(eds.)Elsevier Science Publisher, New York. (1984) pp.161-187.

用量設定試験結果表

表 1
被験物質：ジシクロヘキシルカルボジイミド

M-91-186

物質	検体濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	SSMixの有無	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			WP2uvrA			TA98			TA1537		
溶媒対照		-	130 (138 \pm)	143 (142 \pm 7.2)	142 (142 \pm 7.2)	14 (12 \pm)	13 (13 \pm)	10 (10 \pm 2.1)	2 (11 \pm)	15 (15 \pm)	17 (17 \pm 8.1)	23 (26 \pm)	28 (28 \pm)	27 (27 \pm 2.6)	7 (8 \pm)	7 (7 \pm)	10 (10 \pm 1.7)
検 体	50	-	76			9			8			21			8		
	150	-	82			5			14			13			8		
	500	-	62			11			10			10			7		
	1500	-	59*			5*			9			7			0*		
	5000	-	2*			0*			9			0*			0*		
溶媒対照		+	138 (139 \pm)	146 (146 \pm 7.0)	132 (132 \pm 7.0)	11 (15 \pm)	18 (18 \pm)	17 (17 \pm 3.8)	16 (15 \pm)	17 (17 \pm)	13 (13 \pm 2.1)	38 (39 \pm)	36 (36 \pm)	42 (42 \pm 3.1)	10 (11 \pm)	9 (9 \pm)	13 (13 \pm 2.1)
検 体	50	+	115			15			17			21			7		
	150	+	138			13			22			22			12		
	500	+	88			8			24			28			6		
	1500	+	55*			8			13			8			5*		
	5000	+	22*			2*			8			3*			0*		
隔 性 対 照	SSMixを必要としないもの	名 称	AF2 0.01			SA 0.5			AF2 0.01			AF2 0.1			9AA 80		
		濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	AF2 0.01			SA 0.5			AF2 0.01			AF2 0.1			9AA 80		
	コロニー数/プレート	669 (669 \pm)	699 (699 \pm 30.0)	639 (639 \pm 30.0)	306 (319 \pm)	313 (313 \pm)	338 (338 \pm 16.8)	131 (139 \pm)	128 (128 \pm)	157 (157 \pm 15.9)	556 (561 \pm)	548 (548 \pm)	578 (578 \pm 15.5)	1945 (2329 \pm)	2032 (2032 \pm)	3009 (3009 \pm 590.8)	
	SSMixを必要とするもの	名 称	2AA 1			2AA 2			2AA 10			2AA 0.5			2AA 2		
濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	2AA 1			2AA 2			2AA 10			2AA 0.5			2AA 2				
コロニー数/プレート	759 (798 \pm)	857 (857 \pm)	777 (777 \pm 52.2)	248 (245 \pm)	238 (238 \pm)	249 (249 \pm 6.1)	519 (498 \pm)	505 (505 \pm)	471 (471 \pm 24.7)	196 (189 \pm)	201 (201 \pm)	169 (169 \pm 17.2)	171 (182 \pm)	203 (203 \pm)	172 (172 \pm 18.2)		

* : 検定薬の生育阻害

表 2
 検体物質：ジシクロヘキシルカルボジイミド

復帰変異試験結果表 I

M-91-186

物質	検体濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	SSMixの有無	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			WP2uvrA			TA98			TA1537		
溶媒対照		-	123 (124 \pm)	132 (7.5)	117	13 (15 \pm)	14 (2.1)	17	9 (13 \pm)	15 (3.8)	16	19 (22 \pm)	22 (3.0)	25	10 (10 \pm)	11 (0.6)	10
検体	39.1	-													7 (8 \pm)	10 (1.5)	8
	78.1	-	112 (118 \pm)	118 (6.5)	125	15 (11 \pm)	10 (3.2)	9				26 (19 \pm)	16 (6.1)	15	4 (7 \pm)	9 (2.6)	8
	156.3	-	107 (108 \pm)	97 (11.5)	120	9 (8 \pm)	4 (3.6)	11	14 (13 \pm)	13 (0.6)	13	15 (20 \pm)	24 (4.5)	20	9 (10 \pm)	11 (1.0)	10
	312.5	-	103 (103 \pm)	95 (8.0)	111	8 (10 \pm)	11 (1.7)	11	12 (15 \pm)	12 (4.6)	20	18 (20 \pm)	18 (4.0)	25	8 (7 \pm)	7 (1.5)	5
	625	-	98 (105 \pm)	109 (6.1)	108	13 (11 \pm)	8 (2.9)	13	10 (13 \pm)	16 (3.1)	14	16 (18 \pm)	21 (2.5)	18	5 (6 \pm)	6 (1.0)	7
	1250	-	100 (96 \pm)	105 (11.5)	83	8* (9 \pm)	10* (1.2)	10*	14 (11 \pm)	12 (3.1)	8	21 (16 \pm)	16 (5.0)	11	5* (2 \pm)	0* (2.9)	0*
	2500	-	86* (85 \pm)	76* (8.1)	92*	5* (6 \pm)	5* (1.2)	7*	14 (11 \pm)	6 (4.4)	13	10* (11 \pm)	13* (2.1)	9*			
5000	-							8* (6 \pm)	2* (3.8)	9*							
溶媒対照		+	187 (157 \pm)	142 (26.3)	141	15 (13 \pm)	10 (2.6)	14	15 (17 \pm)	12 (6.2)	24	38 (41 \pm)	39 (3.8)	45	11 (14 \pm)	13 (4.2)	19
検体	78.1	+	140 (128 \pm)	122 (10.7)	121	24 (17 \pm)	10 (7.0)	16				36 (35 \pm)	35 (1.0)	34	6 (10 \pm)	15 (4.5)	10
	156.3	+	111 (125 \pm)	135 (12.7)	130	14 (13 \pm)	13 (0.6)	13	12 (12 \pm)	14 (2.0)	10	28 (27 \pm)	29 (2.1)	25	8 (8 \pm)	9 (1.5)	6
	312.5	+	123 (124 \pm)	129 (5.0)	119	13 (8 \pm)	8 (4.5)	4	13 (13 \pm)	13 (0.0)	13	32 (30 \pm)	29 (1.5)	30	8 (8 \pm)	9 (1.5)	6
	625	+	111 (117 \pm)	136 (16.8)	104	5 (11 \pm)	16 (5.7)	13	12 (14 \pm)	17 (2.9)	12	39 (41 \pm)	43 (2.1)	42	5 (6 \pm)	6 (1.0)	7
	1250	+	92* (96 \pm)	115* (16.9)	82*	6 (7 \pm)	6 (1.2)	8	9 (11 \pm)	10 (3.2)	15	31 (28 \pm)	25 (3.1)	29	3* (3 \pm)	3* (0.0)	3*
	2500	+	102* (101 \pm)	103* (2.6)	98*	7* (8 \pm)	9* (1.2)	7*	16* (15 \pm)	15* (1.0)	14*	18* (20 \pm)	30* (8.7)	13*	1* (2 \pm)	0* (2.1)	4*
	5000	+							9* (9 \pm)	10* (0.6)	9*						
隔壁性対照	SSMixを必要としないもの	名称	AF2 0.01			SA 0.5			AF2 0.01			AF2 0.1			9AA 80		
		コロニー数/プレート	649 (626 \pm)	618 (20.2)	611	214 (228 \pm)	225 (15.2)	244	145 (152 \pm)	162 (8.9)	149	572 (560 \pm)	607 (54.0)	501	3006 (2955 \pm)	2895 (56.0)	2964
	SSMixを必要とするもの	名称	2AA 1			2AA 2			2AA 10			2AA 0.5			2AA 2		
		コロニー数/プレート	725 (750 \pm)	748 (26.1)	777	216 (212 \pm)	207 (4.6)	213	288 (273 \pm)	285 (22.9)	247	215 (226 \pm)	234 (9.7)	228	171 (164 \pm)	170 (10.7)	152

*: 検定値の生育阻害

復帰変異試験結果表 II

表 3 被験物質：ジシクロヘキシルカルボジミド

M-91-188

物 質	検 体 濃 度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	SSMix の 有 無	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			WP2uvrA			TA98			TA1537		
溶 媒 対 照		-	168 (150 ±	141 142 15.3)	18 (16 ±	17 14 2.1)	15 (15 ±	19 11 4.0)	20 (21 ±	22 21 1.0)	9 (8 ±	8 7 1.0)					
検 体	39.1	-									8 (10 ±	16 7 4.9)					
	78.1	-	153 (123 ±	100 116 27.2)	11 (11 ±	17 6 5.5)			22 (21 ±	26 15 5.6)	9 (6 ±	4 4 2.9)					
	156.3	-	118 (125 ±	125 132 7.0)	10 (11 ±	9 13 2.1)	11 (16 ±	26 11 8.7)	26 (21 ±	14 22 6.1)	2 (5 ±	5 9 3.5)					
	312.5	-	144 (122 ±	109 113 19.2)	10 (9 ±	8 8 1.2)	11 (14 ±	19 12 4.4)	24 (24 ±	23 25 1.0)	4 (4 ±	4 5 0.6)					
	625	-	102 (115 ±	129 115 13.5)	11 (10 ±	11 7 2.3)	13 (13 ±	14 11 1.5)	17 (21 ±	21 25 4.0)	4* (5 ±	5* 7* 1.5)					
	1250	-	127* (127 ±	130* 124* 3.0)	6* (7 ±	7* 7* 0.6)	9 (12 ±	14 14 2.9)	18 (19 ±	18 20 1.2)	4* (4 ±	1* 6* 2.5)					
	2500	-	121* (101 ±	91* 91* 17.3)	2* (5 ±	6* 6* 2.3)	5* (7 ±	12* 3* 4.7)	12* (17 ±	17* 21* 4.5)							
	5000	-					0* (3 ±	4* 5* 2.6)									
	溶 媒 対 照		+	169 (160 ±	141 170 16.5)	12 (16 ±	16 21 4.5)	16 (17 ±	17 17 0.6)	56 (50 ±	46 48 5.3)	11 (12 ±	15 10 2.6)				
検 体	39.1	+									9 (7 ±	7 6 1.5)					
	78.1	+	176 (167 ±	143 181 20.6)	22 (17 ±	13 16 4.6)			32 (33 ±	39 29 5.1)	9 (10 ±	11 9 1.2)					
	156.3	+	144 (147 ±	143 153 5.5)	15 (12 ±	9 11 3.1)	14 (15 ±	14 17 1.7)	26 (34 ±	39 36 6.8)	9 (7 ±	7 6 1.5)					
	312.5	+	137 (138 ±	149 128 10.5)	17 (14 ±	11 15 3.1)	15 (15 ±	12 19 3.5)	33 (34 ±	42 27 7.5)	7 (5 ±	3 5 2.0)					
	625	+	153 (147 ±	154 133 11.8)	13 (13 ±	15 11 2.0)	12 (16 ±	15 20 4.0)	27 (31 ±	34 32 3.6)	6 (5 ±	3 5 1.5)					
	1250	+	118 (110 ±	110 103 7.5)	8 (10 ±	11 10 1.5)	19 (17 ±	14 19 2.9)	27 (24 ±	22 23 2.6)	1* (3 ±	6* 2* 2.6)					
	2500	+	127* (126 ±	125* 126* 1.0)	6* (8 ±	8* 9* 1.5)	13 (15 ±	16 15 1.5)	21* (24 ±	29* 23* 4.2)							
	5000	+					10* (6 ±	8* 0* 5.3)									
	対 照	SSMix を 必要と しないも の	名 称	AF2 0.01			SA 0.5			AF2 0.01			AF2 0.1			9AA 80	
濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)																	
コロニー数 プレート		709 (700 ±	678 714 19.5)	178 (175 ±	185 163 11.2)	174 (162 ±	157 154 10.8)	753 (759 ±	747 776 15.3)	4447 (4064 ±	4216 3528 478.1)						
SSMix を 必要と するもの		名 称	2AA 1			2AA 2			2AA 10			2AA 0.5			2AA 2		
濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)																	
コロニー数 プレート	919 (922 ±	904 942 19.1)	241 (228 ±	213 229 14.0)	761 (711 ±	658 715 51.6)	334 (304 ±	289 288 26.3)	196 (203 ±	208 204 6.1)							

*: 検定値の生確率