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並デオー 秦 野 研 究 蔣

目 次

					貝
要			約		1
緒			돌		2
材料	およて	、試験	方法		3
試験	結果を	っよび	考察		7
参	考	文	献		9
表		1 -	~ 3	·v	

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 μg/jv-ト の用量で、本試験は TA100, TA1535 および TA98 では 78.1~2500 μg/jv-ト、WP2 では 156.3~5000 μg/jv-ト、TA1537 では 39.1~1250 (1回目の代謝活性化試験のみ 78.1~2500 μg/jv-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ィミドは、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、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0ECD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

から

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 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プロス (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、和光純菜、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 (和光純菜工業㈱ 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% ヒオチン 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1 ℓ 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 0.2g リン酸水素アンモニウムナトリウム・4水和物 3.5g
ケエン酸・1水和物 2g グルコース 20g
リン酸水素ニカリウム 10g バクト・アガー (Difco) 15g

径 90 m 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 S9	0.1 ml	NADH 4	µmole
塩化マクネシウム	8 µmole	NADPH 4	µmole
塩化かりか	33 µmole	0.2M リン酸緩衝液 (pH 7.4)	0 5 ma
グルコース・6小酸	5 µmole	(bu 1.4)	U.J ME

** : 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㈱、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。

小試験管中にトップアガー 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った用量)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。 $50\sim5000$ $\mu g/iv-iv$ 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 $1\sim2$ 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、 $2500~\mu g/ j v$ ート、WP2~ cは $5000~\mu g/ j v$ 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 $1250~\mu g/ j v$ ート、代謝活性化試験では $2500~\mu g/ j v$ 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 µg/flu-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髙用量の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 被物質:ジンクロヘキシルカルボジイミド

M-91-186

		検 体	S9Mix			復	帰		変		異	20=	一数/フレート	
物	質	濃 度	စ	塩	基	対		換	型	-	フリ	/ - ム	シフト型	
		(p=/1/-h)	有無	TA100		TA1535			WP2JVrA		TA98		TA153	7
溶	媒		-	130 143 (138 ±	142 7.2)	14 13	10	2	15	17	23 28	27	7 7	10
対	照			(138 ±	7.2)	14 13 ±	10 2.1)	2(1	1 ±	17 8. 1)	23 28 (26 ±	27 2.6)	7 8 ±	10 L.7)
		50	-	76		9		8			21		8	
		150	-	82		5		14			13		8	
		500	-	62		11		10			10		7	
検	体	1500	-	59*		5 °		9			7		0*	
		5000	-	2*		0•		9			0*		0•	
							į							
溶	媒							<u> </u>	·					
対	照		+	138 146 (139 ±	132 7.0)	11 18 (15 ±	17 3.8)	16 (1	17 5 ±	13 2, 1)	38 36 (39 ±	42 3. 1)	10 9 (11 ±	13 2,1)
		50	+	115		15		17			21		7	
,		150	+	138		13		22			22		12	
		500	+	88		8		24			28		6	
検	体	1500	+	55*		8		13			8	,	5*	·
i I	l	5000	+	22*		2*		8			3*		0*	
	·			1								}		
				ı										
	S9Mix 8	名	称											
陽	必要と	≝度 (#€	/プレート)	AP2 0.01		SA 0.5		AF	2 0.01		AF2 0.1		9AA 80	
性	しないも			669 699 (669 ±	639 30, 0)	306 313 (319 ±	338 16, 8)	131	128 3 ±	157 15. 9)	556 548 (561 ±	578 15. 5)	1945 2032 (2329 ±	3009 590, 8)
対	S9Mix *	名称					·		-					
	必要と	濃度 (ロタ/フレート)		2AA 1		2AA 2		2/	VA 10		2AA 0.5		2AA 2	
照	するもの		文 ~ ト	759 857 (798 ±	777 52. 2)	248 238 (245 ±	249 6. l)	519 (498	505 3 ±	471 24.7)	196 201 (189 ±	169 17. 2)	171 203 (182 ±	172 18, 2)
اا	. 14-	か生育阻害									·			

*:検定圏の生剤語

復帰変異試験結果表Ⅰ

表 2 - 被駆動催!ジシクロヘキシルカルボジイミド

M-91-186

$\overline{}$				レホンイミト		Gira		M-91-186					
- Lu		検 体	ļ			復	帰	変	_	異		一数/フレート	
物	質	濃 度 (ps//t/	ł	塩 TA100	基	対 TA1535		換型 WP2uvrA			/ -	·シフト型	
溶	媒	(T-V(10-4)	rs ##			INIOOO		WEZIVER	1	TA98		TA1537	<u> </u>
対	照		-	123 132 (124 ±	117 7.5)	13 14 (15 ±	17 2.1)	9 15 (13 ±	16 3. 8)	19 22 (22 ±	25 3, 0)	10 11 ±	10 0.6)
		39. 1	-									7 10 (8 ±	8 1. 5)
		78, 1	-	112 118 (118 ±	125 6.5)	15 10 (11 ±	9 3. 2)			26 16 (19 ±	15 6, 1)		8 2.6)
	ļ	156.3	-	107 97 (108 ±	120 11, 5)	9 4 (8±	11 3.6)	14 13 (13 ±	13 0. 6)	15 24 (20 ±	20 4. 5)	1	10 1, 0)
検	体	312.5	-	103 95 (103 ±	111 8,0)	8 11 (10 ±	11 1.7)	12 12 (15 ±	20 4. 6)	18 18 20 ±	25 4, 0)	8 7 (7 ±	5 1.5)
		625	-	98 109 (105 ±	108 6. 1)	13 8 11 ±	13 2, 9)	10 16 13 ±	14 3.1)	16 21 (18 ±	18 2.5)	5 6 ±	7 1.0)
		1250		100 105 (96 ±	83 11.5)	8* 10* (9 ±	10° 1. 2)	14 12 (11 ±	3. i)	21 16 (16 ±	11 5. 0)	5° 0° (2 ±	0° 2.9)
		2500	-	86* 76* (85 ±	92* 8. 1)	5° 5° (6±	7° 1.2)	14 6 (11 ±	13 4.4)	10* 13* (11 ±	9° 2, 1)		
		5000	-			1		8* 2* (6 ±	9* 3.8)				
溶	媒		+	187 142 (157 ±	141 26.3)	15 10 (13 ±	14 2.6)	15 12 (17 ±	24 6. 2)	38 39 (41 ±	45	11 13	19
対	黑	50			-			(17 ±	6. 2)		3. 8)	11 13 ±	19 4. 2)
		78, 1 156, 3	+	140 122 (128 ±	121 10, 7)	24 10 (17 ±	16 7.0)	10 14	,,	36 35 35 ±	34 1.0)	6 15 (10 ±	10 4.5)
		312.5	+	111 135 (125 ±	130 12.7)	14 13 ±	13 0. 6)	12 14 ±	10 2.0)	28 29 (27 ±	25 2.1)	8 (8 ±	6 1. 5)
検	体	625	+	123 129 (124 ±	119 5.0)	13 8 (8±	4 4.5)	13 13 ±	13 0, 0)	32 29 (30 ±	30 1.5)	8 (8 ±	6 1. 5)
	rr	1250	' +	111 136 (117 ± 92° 115°	104 16. 8) 82*	5 16 (11 ±	13 5.7)		12 2.9)	39 43 (41 ±	42 2.1)	1	7 1,0)
	,	2500	+	(96±	82* 16, 9) 98*	6 6 (7 ± 7° 9°	8 1. 2) 7*	9 10 (11 ± 16° 15°	15 3. 2) 14°	31 25 (28 ±	29 3. 1)	3* 3* (3 ±	0.0)
		5000	+	102° 103° (101 ±	98* 2.6)	7° 9° (8 ±	7* 1.2)	16° 15° (15 ± 9° 10°	14* 1. 0) 9*	18° 30° (20 ±	13* 8. 7)	1° 0° (2 ±	2.1)
								9* 10* (9 ±	0.6)				
-		77	31-										
	S9Mix *	名と濃度(加	称(///	AF2 0.01		SA 0.5		AF2 0.01		AF2 0.1		9AA 80	
	しないも	コロニー		649 618	611	214 295	244	145 169	149	579 cog	E0:		
性	<u>の</u>		レ ─ト	626 ±	611 20.2)	214 225 (228 ±	244 15. 2)	145 162 (152 ±	149 8, 9)	572 607 (560 ±	501 54.0)	3006 2895 (2955 ±	2964 56, 0)
対	S9Mix 8	ł		2AA 1	:	2AA 2		2AA 10		2AA 0.5		2AA 2	
照		と濃度(四		725 748	יניני	916 mg	912	000 nor	046		000		
			└ ─⊦	725 748 (750 ±	777 26, 1)	216 207 (212 ±	213 4, 6)	288 285 (273 ±	247 22.9)	215 234 (226 ±	228 9. 7)	171 170 (164 ±	152 10. 7)
	. 14	的中部阳宝											

*:検定数7生育狂害

復帰変異試験結果表Ⅱ

麦 3 - 被動物質:ジシクロヘキシルカルボジイミド

а		22200	キシルカノ	レボジイミド								M-91-18	8 8
		検 体	S9Mix			復	帰	変		異	コロニ	一数/フレート	
物	質	濃 度	o l	塩	基		ť	換型		フレ	/ — <u>Д</u>	シフト型	
		(pe/7b-+)	有無	TA100	-	TA1535		WP2uvrA	<u>.</u>	TA98		TA1537	7
溶対	媒照		-	168 141 (150 ±	142 15, 3)	18 17 (16 ±	14 2.1)	15 19 (15 ±	11 4.0)	20 22 (21 ±	21 1.0)	9 8 ±	7 1. 0)
	i	39, 1	-									8 16 ±	7 4.9)
		78, 1	-	153 100 (123 ±	116 27. 2)	11 17 17 ±	6 5. 5)			22 26 (21 ±	15 5. 6)	9 4 ±	4 2.9)
		156.3	-	118 125 (125 ±	132 7.0)	10 9 (11 ±	13 2.1)	11 26 16 ±	8.7)	26 14 (21 ±	22 6, 1)	2 5 (5 ±	9 3.5)
検	体	312, 5 625	-	144 109 (122 ±	113 19. 2)	10 8 (9±	8 L 2)	11 19 (14 ±	12 4.4)	24 23 (24 ±	25 1.0)	4 (4 ±	5 0.6)
		1250	_	102 129 (115 ±	115 13.5)	11 11 11 6° 7°	7 2,3)	13 14 (13 ±	11 1.5)	17 21 (21 ±	25 4. 0)	4* 5* (5 ±	7* 1.5)
		2500	_	127° 130° (127 ± 121° 91° (101 ±	124° 3.0) 91°	6° 7° (7 ± 2° 6° (5 ±	7* 0.6) 6*	9 14 (12 ± 5° 12° (7 ±	14 2.9) 3*	18 18 18 12* 17*	20 1, 2)	4° 1° (4 ±	6* 2,5)
		5000	-	(101 ±	91° 17.3)	2° 6° (5±	6* 2, 3)	5° 12° (7 ± 0° 4° (3 ±	3* 4.7) 5*	12* 17* (17 ±	21* 4,5)		
•	_							(3 ±	2.6)				
溶対	媒 照		+	169 141 (160 ±	170 16, 5)	12 16 (16 ±	21 4.5)	16 17 ±	17 0, 6)	56 46 (50 ±	48 5. 3)	11 15 (12 ±	10 2.6)
		39.1	+									9 7 (7 ±	6 L 5)
	ļ	78. 1	+	176 143 (167 ±	181 20. 6)	22 13 (17 ±	16 4.6)			32 39 (33 ±	29 5. 1)	9 11 (10 ±	9
		156, 3	+	144 143 (147 ±	153 5. 5)	15 9 (12 ±	11 3, 1)	14 14 (15 ±	17 L.7)	26 39 (34 ±	36 6.8)	9 7 (7 ±	6 1.5)
検	体	312.5		137 149 (138 ±	128 10.5)	l	15 3. 1)		19 3. 5)		27 7. 5)		5 2.0)
		625	+	153 154 (147 ±	133 11.8)	13 15 (13 ±	11 2.0)	12 15 (16 ±	20 4.0)	27 34 (31 ±	32 3.6)	6 3 (5 ±	5 1.5)
		1250 2500	+	118 110 (110 ±	103 7.5)	8 11 (10 ±	10 1.5)	19 14 (17 ±	19 2.9)	27 22 22 ±	23 2.6)	1° 6° (3 ±	2* 2.6)
		5000	+	127° 125° (126 ±	126° 1.0)	6* 8* (8 ±	9 • 1.5)	13 16 (15 ±	15 1.5)	21° 29° (24 ±	23° 4, 2)		
		***************************************		ļi.				10° 8° (6 ±	0* 5.3)				
	SSMix *	名	称	170		A	-	.=-	-				
陽	必要と	濃度(四		AF2 0.01		SA 0.5		AF2 0.01		AF2 0.1		9AA 80	
性	0	/	₩ / — -	709 678 (700 ±	714 19. 5)	178 185 (175 ±	163 11. 2)	174 157 (162 ±	154 10. 8)	753 747 (759 ±	776 15.3)	4447 4216 (4064 ±	3528 478. 1)
対	S9Mix *	名	称										
	必要 と	濃度 (#8	//V-H)	2AA 1		2AA 2		2AA 10		2AA 0.5		2AA 2	
照	するもの	コロニー数フレート		919 904 (922 ±	942 19. 1)	241 213 (228 ±	229 14.0)	761 658 (711 ±	715 51. 6)	334 289 (304 ±	288 26. 3)	196 208 (203 ±	204 6, 1)
		の生育阻害				<u> </u>				·			