



1. 4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの
細菌を用いる
復帰突然変異試験

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
Tables 1～3	

【要 約】

1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンの変異原性の有無について、細菌を用いる復帰突然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、直接法および代謝活性化法のいずれも用量設定試験を、50～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で行ったところ、抗菌性が認められたことから、本試験は最低用量を 39.06～156.3 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、最高用量を 1250～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ として実施した。

その結果、2回行った本試験において、TA100 の直接法と代謝活性化法および TA1535 の直接法で、溶媒対照値の2倍以上となる変異コロニー数の増加が認められたことから、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンは、用いた試験系において変異原性を有する（陽性）と判定された。

【緒 言】

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、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンについて、細菌を用いる復帰突然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突然変異⁽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突然変異⁽²⁾を指標とした変異原性の検出系である。

試験は、被験物質をそのまま検定菌に作用させる直接法と、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法とからなっている。

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毒性試験ガイドライン：471, 472 に準拠し、化学物質GLP基準（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 から分与
を受けた。

検定菌は、 -80°C 以下で凍結保存した。各検定菌は、凍結保存菌の調製時に、アミノ酸
要求性、UV感受性、および膜変異 (*rfa*) とアンピシリン耐性因子 (*pKM101*) の有無に
ついての特性確認を行った。

試験に際して、ニュートリエントブロスNo. 2 (Oxoid) を入れたL字型試験管に種菌
を接種し、 37°C 、約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〕

1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼン (CAS No. 89-61-2、以下DCNと略) は、分子量
192.0 の白黄色固体である。純度 99.5%以上のもの (ロット番号: 不純物
としてジクロロニトロベンゼンの異性体 0.5%以下を含む) を

から供与された。被験物質は、使用時まで冷暗所で保管した。

DCNをジメチルスルホキシド (DMSO、和光純薬工業株、ロット番号: APQ5928 および
APJ3434) に溶解して最高濃度の調製液を調製した後、同溶媒で更に公比2ないし約3
で希釈したものを、速やかに試験に用いた。

秦野研究所において、DMSO 溶液中での安定性試験を低濃度 (0.7813 mg/ml) および
高濃度 (50 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4
時間における各3サンプルの平均含量は、それぞれ初期値 (0時間) の平均に対して、
98.9および 99.6%であった。これらの値は、当研究所で規定した許容範囲内にあった
(Appendix 1)。

また、本試験Ⅱに用いた調製検体について、含量測定試験を行った結果、0.7813 mg/ml 溶液の含量は既定濃度に対し、105～107%、50 mg/ml 溶液は、96.9～99.5%であった。これらの値も当研究所の規定した許容範囲内であった（Appendix 2）。

以上の結果から、DCN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。

AF2	： フリルアマイド	（上野製薬(株)	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(株)	ロット番号 TWR3330,	純度90%以上）
9AA	： 9-アミノアクリジン	（Sigma Chem. Co.	ロット番号 96F05641,	純度98%以上）
2AA	： 2-アミノアトラゼン	（和光純薬工業(株)	ロット番号 DSF2950,	純度90%以上）

AF2, 2AA は DMSO（和光純薬工業(株)）に溶解したものを-20℃で凍結保存し、用時解凍した。9AA は DMSO に、SA は蒸留水に溶解し、速やかに試験に用いた。

〔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%	ピオチン	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（用量設定試験においてはロット番号：DJ020GI、1993年7月6日製造、本試験においては、ロット番号：DJ040LI、1993年12月18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	0.2 g	水酸化ナトリウム	0.66 g
クエン酸・1水和物	2 g	グルコース	20 g
リン酸水素二カリウム	10 g	バク7ガー (Difco)	15 g
リン酸一アンモニウム	1.92 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 μmol
塩化マグネシウム	8 μmol	NADPH	4 μmol
塩化カリウム	33 μmol	ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μmol
グルコース-6-リン酸	5 μmol		

^{**} : 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 (キッコーマン株、ロット番号 RAA-297 および RAA-304、1993年8月27日および1994年1月28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〕

プレート法を用いて、直接法および代謝活性化法によって試験を行った。

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 Table 1～3 に示した。培養は37℃で48時間行い、生じた変異コロニー数を算定した。抗菌性の有無については、肉眼的あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌膜の状態から判断

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、本試験は同一用量について2回実施し、再現性の確認を行った。

〔判定基準〕

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌の直接法あるいは代謝活性化法において、被験物質を含有する平板上における変異コロニー数の平均値が、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 Table 1 に示した。DCNについて、50～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で公比を約3とし、試験を実施したところ、TA100 および TA1537 の直接法と、すべての検定菌の代謝活性化法において、1500 以上または 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量群で抗菌性が認められた。

この結果から、本試験における最高用量を 2500 または 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とした。しかし、1 回目の本試験では TA1535 の直接法、TA98 の代謝活性化法および TA1537 の直接法と代謝活性化法において、抗菌性のない用量が4用量に達しなかったため、用量を下げてもう一度試験を行った。その結果においても、TA1535 と TA1537 の直接法では抗菌性のない用量が4用量に達しなかったため、さらに用量を下げてもう一度試験を行った。

〔本試験〕

結果を Table 2、3 に示した。最高用量を1回目の本試験では 1250～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、2回目の本試験では 2500～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とし、公比2で6用量を設定して、試験を行った。TA100 では直接法、代謝活性化法とも2回の試験を通して、用量に依存した変異コロニー数の増加が認められた。すなわち、直接法では 78.13 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上、代謝活性化法では 156.3 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量群で陰性対照値の2倍以上となった。TA1535 の直接法では1回目の本試験で 312.5 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上、2回目の本試験では 2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量群で変異コロニー数が陰性対照値の2倍以上となった。TA98 の直接法と TA1537 の代謝活性化法では、2回目の本試験でのみ変異コロニー数が陰性対照値の2倍以上となる用量群が認められた。その他では、変異コロニー数の増加は認められなかった。抗菌性は、2回目の本試験における WP2 *uvrA* の直接法を除くと、すべての検定菌の直接法と代謝活性化法において、高用量の1～2用量で認められた。

DCNについて実施した試験において、陽性対照群では、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、陰性対照群とともに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、本試験系の有効性が確認された。また、1回目の本試験においては、直接法の 1250 µg/プレート 以上の用量群で沈澱が認められた。

以上の結果に基づき、DCNは、用いた試験系において変異原性を有する（陽性）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.L. : in "Handbook of Mutagenicity Test Procedures." Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C. (eds.) Elsevier, Amsterdam, New York Oxford. (1984) pp. 161-187.

Table 1. Results of preliminary cytotoxicity test in reverse mutation test of 1, 4-Dichloro-2-nitrobenzene** on bacteria

With (+) or without (-) S9 Mix	Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean \pm S.D.)															
		Base - pair substitution type									Frameshift type						
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537			
S9Mix (-)	0	99	99	127	9	5	13	20	13	20	18	21	19	12	5	12	
		(108 \pm 16.2)			(9 \pm 4.0)			(18 \pm 4.0)			(19 \pm 1.5)			(10 \pm 4.0)			
	50	189			15			8			21			7			
	150	358			15			17			31			6			
	500	619			22			13			40			17			
	1500	811 *			22			15			64			5			
	5000	760 *			17			9			48			9 *			
S9Mix (+)	0	101	115	105	14	10	9	27	21	14	31	23	28	15	10	9	
		(107 \pm 7.2)			(11 \pm 2.6)			(21 \pm 6.5)			(27 \pm 4.0)			(11 \pm 3.2)			
	50	244			16			35			40			16			
	150	259			20			20			46			14			
	500	639			20			20			42			13			
	1500	867 *			19 *			8			44			7			
	5000	0 *			0 *			8 *			0 *			0 *			
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA			
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01			0.5			0.01			0.1			80			
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1			2			10			0.5			2			
Positive control S9 Mix (-)	Number of colonies / plate	590	536	564	167	154	163	189	153	166	673	682	742	1214	1231	1482	
		(563 \pm 27.0)			(161 \pm 6.7)			(169 \pm 18.2)			(699 \pm 37.5)			(1309 \pm 150.1)			
Positive control S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	375	377	386	215	226	201	979	852	1087	156	141	149	212	230	210	
		(379 \pm 5.9)			(214 \pm 12.5)			(973 \pm 117.6)			(149 \pm 7.5)			(217 \pm 11.0)			

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

** : Purity was above 99.5 % and isomer of dichloronitrobenzene was contained as impurity.

Table 2. Results of reverse mutation test (I) of 1, 4-Dichloro-2-nitrobenzene** on bacteria

With (+) or without (-) S9 Mix	Test substance dose (µg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate , Mean ± S.D.)																			
		Base - pair substitution type									Frameshift type										
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537							
S9Mix (-)	0	114	106	116	7	8	8	29	24	18	38	34	18	3	10	7	(112 ± 5.3)	(8 ± 0.6)	(24 ± 5.5)	(30 ± 10.6)	(7 ± 3.5)
	39.06	ND			18	9	11	ND			ND			11	8	5	(13 ± 4.7)	(8 ± 3.0)			
	78.13	240	254	232	10	16	19	ND			ND			9	5	4	(242 ± 11.1)	(15 ± 4.6)			(6 ± 2.6)
	156.3	292	372	381	11	11	11	18	22	18	27	21	26	9	8	8	(348 ± 49.0)	(11 ± 0.0)	(19 ± 2.3)	(25 ± 3.2)	(8 ± 0.6)
	312.5	573	555	545	22	18	18	20	19	17	30	32	27	9	4	8	(558 ± 14.2)	(19 ± 2.3)	(19 ± 1.5)	(30 ± 2.5)	(7 ± 2.6)
	625	664	720	700	21 *	17 *	17 *	12	21	14	19	22	32	7 *	10 *	6 *	(695 ± 28.4)	(18 ± 2.3)	(16 ± 4.7)	(24 ± 6.8)	(8 ± 2.1)
	1250 #	395 *	539 *	662 *	16 *	30 *	15 *	11	21	15	30	18	31	1 *	0 *	0 *	(532 ± 133.6)	(20 ± 8.4)	(16 ± 5.0)	(26 ± 7.2)	(0 ± 0.6)
	2500 #	591 *	354 *	527 *				11	7	14	32 *	30 *	50 *				(491 ± 122.6)		(11 ± 3.5)	(37 ± 11.0)	
	5000 #							14 *	11 *	12 *	28 *	28 *	26 *						(12 ± 1.5)	(27 ± 1.2)	
S9Mix (+)	0	113	124	95	8	8	7	19	25	26	28	31	30	8	11	9	(111 ± 14.6)	(8 ± 0.6)	(23 ± 3.8)	(30 ± 1.5)	(9 ± 1.5)
	78.13	208	231	186	6	10	9	ND			48	33	34	12	12	9	(208 ± 22.5)	(8 ± 2.1)		(38 ± 8.4)	(11 ± 1.7)
	156.3	240	254	240	13	14	7	18	21	10	28	34	27	13	9	12	(245 ± 8.1)	(11 ± 3.8)	(16 ± 5.7)	(30 ± 3.8)	(11 ± 2.1)
	312.5	329	380	286	9	11	11	14	18	15	27	43	35	6	6	11	(332 ± 47.1)	(10 ± 1.2)	(16 ± 2.1)	(35 ± 8.0)	(8 ± 2.9)
	625	438	415	460	6	6	14	14	11	25	37	37	39	9	15	12	(438 ± 22.5)	(9 ± 4.6)	(17 ± 7.4)	(38 ± 1.2)	(12 ± 3.0)
	1250	623 *	636 *	575 *	0 *	0 *	0 *	15	27	14	34 *	24 *	30 *	6 *	11 *	8 *	(611 ± 32.1)	(0 ± 0.0)	(19 ± 7.2)	(29 ± 5.0)	(8 ± 2.5)
	2500	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	10 *	10 *	13 *	7 *	6 *	2 *	0 *	0 *	0 *	(0 ± 0.0)	(0 ± 0.0)	(11 ± 1.7)	(5 ± 2.6)	(0 ± 0.0)
	5000							9 *	14 *	4 *									(9 ± 5.0)		
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA							
	Dose (µg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80							
	Number of colonies / plate	419	433	451	371	358	316	118	133	101	734	663	717	2417	2199	2136	(434 ± 16.0)	(348 ± 28.7)	(117 ± 16.0)	(705 ± 37.1)	(2251 ± 147.5)
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA							
	Dose (µg /plate)	1			2			10			0.5			2							
	Number of colonies / plate	925	804	994	303	289	279	1298	1222	1416	248	272	185	201	222	215	(908 ± 96.2)	(290 ± 12.1)	(1312 ± 97.8)	(235 ± 44.9)	(213 ± 10.7)

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide , SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria. #: Precipitant was observed on the surface of agar plates.

ND: Not done **: Purity was above 99.5 % and isomer of dichloronitrobenzene was contained as impurity.

Table 3. Results of reverse mutation test (II) of 1, 4-Dichloro-2-nitrobenzene** on bacteria

With (+) or without (-) S9 Mix	Test substance dose (µg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate , Mean ± S.D.)														
		Base - pair substitution type									Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
S9Mix (-)	0	108	92	101	9	7	9	14	18	17	17	19	19	7	6	6
		(100 ± 8.0)			(8 ± 1.2)			(16 ± 2.1)			(18 ± 1.2)			(6 ± 0.6)		
	78.13	245	235	197	18	9	6	ND			ND			6	5	10
		(226 ± 25.3)			(11 ± 6.2)									(7 ± 2.6)		
	156.3	346	324	336	14	9	15	18	18	18	22	33	26	4	4	12
		(335 ± 11.0)			(13 ± 3.2)			(18 ± 0.0)			(27 ± 5.6)			(7 ± 4.6)		
	312.5	635	531	536	12	10	12	21	21	18	43	32	59	8	4	10
		(567 ± 58.7)			(11 ± 1.2)			(20 ± 1.7)			(45 ± 13.6)			(7 ± 3.1)		
	625	761	709	719	13	18	12	15	12	20	47	34	48	7	8	8
	(730 ± 27.6)			(14 ± 3.2)			(16 ± 4.0)			(43 ± 7.8)			(8 ± 0.6)			
1250	720	816	800	11 *	13 *	19 *	13	11	16	37	44	38	3 *	7 *	8 *	
	(779 ± 51.4)			(14 ± 4.2)			(13 ± 2.5)			(40 ± 3.8)			(6 ± 2.6)			
2500	659 *	686 *	737 *	14 *	14 *	19 *	17	18	12	48	35	42	8 *	6 *	6 *	
	(694 ± 39.6)			(16 ± 2.9)			(16 ± 3.2)			(42 ± 6.5)			(7 ± 1.2)			
5000							19	22	16	45 *	48 *	33 *				
							(19 ± 3.0)			(42 ± 7.9)						
S9Mix (+)	0	140	109	113	9	11	18	12	17	17	20	29	26	9	6	7
		(121 ± 16.9)			(13 ± 4.7)			(15 ± 2.9)			(25 ± 4.6)			(7 ± 1.5)		
	78.13	229	212	203	11	19	11	ND			43	34	33	13	16	14
		(215 ± 13.2)			(14 ± 4.6)						(37 ± 5.5)			(14 ± 1.5)		
	156.3	270	267	301	8	19	16	26	17	28	32	26	29	15	10	12
		(279 ± 18.8)			(14 ± 5.7)			(24 ± 5.9)			(29 ± 3.0)			(12 ± 2.5)		
	312.5	396	342	413	16	9	11	25	21	19	34	26	39	8	8	13
		(384 ± 37.1)			(12 ± 3.6)			(22 ± 3.1)			(33 ± 6.6)			(10 ± 2.9)		
	625	536	546	554	15	12	19	21	16	20	23	33	26	15	8	11
	(545 ± 9.0)			(15 ± 3.5)			(19 ± 2.6)			(27 ± 5.1)			(11 ± 3.5)			
1250	697	686	611	12 *	13 *	12 *	14	18	15	21 *	19 *	42 *	5 *	7 *	11 *	
	(665 ± 46.8)			(12 ± 0.6)			(16 ± 2.1)			(27 ± 12.7)			(8 ± 3.1)			
2500	35 *	49 *	89 *	0 *	0 *	0 *	8 *	13 *	15 *	9 *	3 *	6 *	0 *	0 *	0 *	
	(58 ± 28.0)			(0 ± 0.0)			(12 ± 3.6)			(6 ± 3.0)			(0 ± 0.0)			
5000							3 *	5 *	5 *							
							(4 ± 1.2)									
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose (µg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose (µg /plate)	1			2			10			0.5			2		
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	357	322	366	212	225	228	115	140	149	593	624	696	1103	1060	993
		(348 ± 23.2)			(222 ± 8.5)			(135 ± 17.6)			(638 ± 52.8)			(1052 ± 55.4)		
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	898	784	873	343	337	291	1136	1229	1281	371	384	400	226	254	253
		(852 ± 59.9)			(324 ± 28.4)			(1215 ± 73.5)			(385 ± 14.5)			(244 ± 15.9)		

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria. ND: Not done

** : Purity was above 99.5 % and isomer of dichloronitrobenzene was contained as impurity.