

食薬セ研第10-1641号

2000年12月 1日

1,2-ベンゼンジカルボニトリル
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
材料および方法	3
結果および考察	7
文 献	8
Tables 1～3	

【要 約】

1,2-ベンゼンジカルボニトリルの変異原性の有無を、細菌を用いる復帰突然変異試験により検討し、陰性の結果を得た。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* の5菌株を用い、S9 mix 無添加および添加の条件でプレインキュベーション法により用量設定試験および2回の本試験を行った。用量設定試験を50.0~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で行ったところ、いずれの検定菌においても、S9 mix 無添加試験および添加試験とともに抗菌性は認められなかった。したがって、本試験では S9 mix 無添加試験および添加試験について 313~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で5用量を設定して実施した。

その結果、用いた5種類の検定菌のいずれの用量においても、陰性対照値の2倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかったことから、1,2-ベンゼンジカルボニトリルは、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。

【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、1,2-ベンゼンジカルボニトリルについて、細菌を用いる復帰突然変異試験をプレインキュベーション法¹⁾により実施した。

この試験は、サルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) 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²⁾、ならびに大腸菌 (*Escherichia coli*) 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³⁾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 S9 mix 無添加試験と、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素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 S9 mix 添加試験とからなっている。

この試験は、「新規化学物質等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、一部改正平成9年10月31日、環保安第 287号、衛生第 127号、平成09・10・31基局第 2号）および「OECD 毒性試験ガイドライン：471」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。

【材料および方法】

1. 被験物質

1,2-ベンゼンジカルボニトリル (CAS No. 91-15-6) は、分子式 $C_8H_4N_2$ 、分子量 128.13 の黄色粉末である。構造式等は Appendix 1 に示した。用いた被験物質は、ロット番号 純度 98.7wt% であり、 から供与された。被験物質は、使用時まで室温で保管した。本ロットについては、実験期間中安定であることが確認された。

本被験物質は、ジメチルスルホキシド (DMSO、ロット番号: ACQ2095 および ACL5008、和光純薬工業(株)) に溶解して最高濃度の調製液を調製した後、同溶媒で順次希釈して速やかに試験に用いた。

50 mg/mL 溶液の調製時に、発熱、発泡、変色等の変化は認められなかったことから、被験物質は溶媒中で安定であることが確認された。

2. 陽性対照物質

用いた陽性対照物質および調製法は以下のとおりである。

各検定菌ごとに用いた陽性対照物質は、当研究所で十分な蓄積データが得られている物質および用量とし、それぞれ Table 中に示した。

2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド

(AF2、和光純薬工業(株) ロット番号 WTQ0059、純度98%以上)

アジ化ナトリウム (SA、和光純薬工業(株) ロット番号 DLL3931、純度98%以上)

9-アミノアクリジン (9AA、Sigma Chem. Co. ロット番号 106F06681、純度97%以上)

2-アミノアントラセン (2AA、和光純薬工業(株) ロット番号 DLH6052、純度90%以上)

AF2、9AA および 2AA は DMSO に、SA は超純水に溶解し、所定の濃度に調製したものを -20°C で凍結保存し、解凍後速やかに試験に用いた。

3. 検定菌

試験には、*S. typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *E. coli* WP2 *uvrA* を用いた。

S. typhimurium の4菌株は1997年8月7日に、*E. coli* WP2 *uvrA* 株は1997年

4月9日に日本バイオアッセイ研究センターの から分与された。

検定菌は-80℃で凍結保存したものを用いた。各菌株の凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、膜変異 (*rfa*) およびアンピシリン耐性因子 pKM 101 (プラスミド) の有無について調べ、特性が維持されていることを確認した。

試験に際して、ニュートリエントブロスNo.2 (Oxoid Ltd.) を入れたL字型試験管に解凍した菌液を一定量加え、37℃で10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。分光光度計により 660 nm の吸光度を測定し、検定菌液の増殖を確認した。試験に用いた検定菌液の、段階希釈法により求めた生菌数を Appendix 2 に示した。

4. 試験材料

1) 合成培地

培地は、極東製薬工業(株)製の最少グルコース寒天培地 (ロット番号: HY3902、1998年9月17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
クエン酸・1水和物	2 g
リン酸水素二カリウム	10 g
リン酸一アンモニウム	1.92 g
水酸化ナトリウム	0.66 g
グルコース	20 g
大洋寒天 (清水食品)	15 g

径 90 mm のシャーレ 1 枚あたり 30 mL を流して固めたものである。

2) トップアガー

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

(A) バクトアガー (Difco Lab.)	0.6 %
塩化ナトリウム	0.5 %
(B) <i>Salmonella typhimurium</i> 用	
L-ヒスチジン	0.5 mM

D-ビオチン	0.5 mM
(C) <i>Escherichia coli</i> 用	
L-トリプトファン	0.5 mM

3) S9 mix

S9 mix 1 mL あたりの組成は下記のとおりである。

S9*	0.1 mL
塩化マグネシウム	8 μ mol
塩化カリウム	33 μ mol
グルコース-6-リン酸	5 μ mol
NADH	4 μ mol
NADPH	4 μ mol
ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μ mol

* : 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-389、1998年8月21日製造) を購入し、-80°Cで凍結保存し、用時に解凍して用いた。

5. 試験操作

プレインキュベーション法により、S9 mix 無添加試験および S9 mix 添加試験を行った。

小試験管中に、被験物質調製液 0.1 mL、リン酸緩衝液 0.5 mL (S9 mix 添加試験においては S9 mix 0.5 mL)、検定菌液 0.1 mL を混合し、37°Cで20分間プレインキュベーションしたのち、トップアガー 2 mL を加えて混和し、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使用溶媒 (陰性対照) または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各 Table 中に示した。同時に実施した試験については、陰性および陽性対照群を共通とした。

培養は37°Cで48時間行い、発生した変異コロニー数をコロニーアナライザーまたは目視によって算定した。被験物質に由来する沈殿の有無は、肉眼により確認した。また、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。

最高用量の被験物質 0.1 mL および S9 mix 0.5 mL を、それぞれ最少グルコース寒天培地上に滴下して、培養終了時に雑菌の混入の有無を調べた。

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、結果の再現性の確認を行った。

6. 判定

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌の S9 mix 無添加試験あるいは S9 mix 添加試験において、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、陰性対照値の2倍以上に増加し、その増加に再現性および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。

【結果および考察】

1. 用量設定試験

「新規化学物質等に係る試験の方法について」および「OECD 毒性試験ガイドライン：471」の記載に準拠し、50.0～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で公比を約3として、試験を実施した (Table 1)。その結果、すべての検定菌の S9 mix 無添加試験および添加試験のいずれにおいても抗菌性は認められなかった。また、被験物質に由来する沈殿もすべての用量で認められなかった。

したがって、本試験における最高用量は、S9 mix 無添加試験および添加試験とも 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とした。

2. 本試験

S9 mix 無添加試験および添加試験のいずれにおいても、313～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で公比を2として2回の本試験を実施した (Table 2、3)。その結果、すべての検定菌において、2回の試験とも陰性対照値の2倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。

すべての試験において、用いた最高用量の調製液および S9 mix への雑菌の混入は認められなかった。また、陽性対照試験では、いずれの検定菌においても陽性対照物質の変異原性が検出され、陰性対照値とともに計測された変異コロニー数は背景データ (Appendix 3) の変動範囲内 (平均値 $\pm 3 \times$ 標準偏差) であったことから、本試験系の有効性が確認された。

1,2-ベンゼンジカルボニトリルは、復帰突然変異試験で陰性の結果が得られており⁴⁾、当研究所で本試験と並行して実施した、チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験では倍数性細胞が誘発され、陽性であった⁵⁾。また、関連物質である 1,3-ジシアノベンゼンと 1,4-ジシアノベンゼンについては、復帰突然変異試験および染色体異常試験とともに陰性の結果が得られている^{6, 7)}。

以上の結果に基づき、1,2-ベンゼンジカルボニトリルは、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。

【文 献】

- 1) Matsushima, T., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A., Sawamura, M.: Factors modulating mutagenicity in microbial tests. in "Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens" Norpoth, K.H., Garner, R.C. eds, Springer, Berlin (1980) pp. 273-285
- 2) Maron, D.M., Ames, B.N. : Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutation Research 113 : 173-215 (1983)
- 3) Green, M.H.L. : Mutagen testing using Trp⁺ reversion in *Escherichia coli*. in "Handbook of Mutagenicity Test Procedures." Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C. eds, Elsevier, Amsterdam (1984) pp. 161-187
- 4) 労働省労働基準局安全衛生部化学物質調査課監修, "労働安全衛生法有害性調査制度に基づく既存化学物質変異原性試験データ集," 社団法人日本化学物質安全・情報センター, 東京, 1996, p. 80.
- 5) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修, "化学物質毒性試験報告," Vol. 8, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 2000 (投稿準備中)
- 6) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修, "化学物質毒性試験報告," Vol. 4, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 1996, pp. 507-527.
- 7) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修, "化学物質毒性試験報告," Vol. 3, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 1996, pp. 355-381.

Table 1. Cytotoxicity of 1,2-benzenedicarbonitrile on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (μg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, mean \pm S.D.)														
		Base - pair substitution type									Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
S9 mix (-)	0	118	145	122	18	18	11	27	23	20	28	22	21	11	9	9
		(128 \pm 14.6)			(16 \pm 4.0)			(23 \pm 3.5)			(24 \pm 3.8)			(10 \pm 1.2)		
	50.0	113			15			19			21			4		
	150	104			10			18			22			12		
	500	151			16			14			11			4		
	1500	117			10			14			31			6		
	5000	92			12			19			8			12		
S9 mix (+)	0	108	138	156	15	13	18	36	25	28	29	24	38	19	10	15
		(134 \pm 24.2)			(15 \pm 2.5)			(30 \pm 5.7)			(30 \pm 7.1)			(15 \pm 4.5)		
	50.0	125			11			31			33			18		
	150	134			14			26			44			14		
	500	126			13			28			32			15		
	1500	129			21			24			30			14		
	5000	120			12			17			27			22		
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		
Positive control S9 mix (+)	Number of colonies / plate	449	472	526	648	636	623	207	209	207	611	625	635	344	708	441
		(482 \pm 39.5)			(636 \pm 12.5)			(208 \pm 1.2)			(624 \pm 12.1)			(498 \pm 188.5)		
Positive control S9 mix (+)	Number of colonies / plate	893	877	906	408	401	430	447	480	521	472	462	432	389	413	360
		(892 \pm 14.5)			(413 \pm 15.1)			(483 \pm 37.1)			(455 \pm 20.8)			(387 \pm 26.5)		

The purity of the test substance was 98.7wt%. This substance contained 0.1% benzonitrile, 0.9% *o*-tolunitrile and 0.3% TPN/IPN as impurities. AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

Table 2. Mutagenicity of 1,2-benzenedicarbonitrile on bacteria (I)

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			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
S9 mix (-)	0	139	155	150	10	8	8	27	23	29	32	23	26	12	15	17
		(148 ± 8.2)			(9 ± 1.2)			(26 ± 3.1)			(27 ± 4.6)			(15 ± 2.5)		
	313	163	145	150	12	13	16	38	22	25	17	27	31	5	13	12
		(153 ± 9.3)			(14 ± 2.1)			(28 ± 8.5)			(25 ± 7.2)			(10 ± 4.4)		
	625	152	134	121	9	12	12	22	20	20	23	34	42	7	13	14
		(136 ± 15.6)			(11 ± 1.7)			(21 ± 1.2)			(33 ± 9.5)			(11 ± 3.8)		
	1250	144	144	135	5	10	10	18	21	27	28	31	18	5	10	14
		(141 ± 5.2)			(8 ± 2.9)			(22 ± 4.6)			(26 ± 6.8)			(10 ± 4.5)		
2500	115	133	148	8	12	6	23	28	25	33	25	20	14	15	15	
	(132 ± 16.5)			(9 ± 3.1)			(25 ± 2.5)			(26 ± 6.6)			(15 ± 0.6)			
5000	126	119	144	12	5	9	18	24	9	27	20	28	9	13	11	
	(130 ± 12.9)			(9 ± 3.5)			(17 ± 7.5)			(25 ± 4.4)			(11 ± 2.0)			
S9 mix (+)	0	170	156	137	15	16	15	29	27	35	23	38	22	17	24	26
		(154 ± 16.6)			(15 ± 0.6)			(30 ± 4.2)			(28 ± 9.0)			(22 ± 4.7)		
	313	153	121	132	7	11	5	32	29	27	30	36	26	6	19	16
		(135 ± 16.3)			(8 ± 3.1)			(29 ± 2.5)			(31 ± 5.0)			(14 ± 6.8)		
	625	134	139	157	10	10	9	35	34	29	35	29	28	19	17	16
		(143 ± 12.1)			(10 ± 0.6)			(33 ± 3.2)			(31 ± 3.8)			(17 ± 1.5)		
	1250	127	142	169	11	6	12	29	26	25	33	42	44	20	16	17
		(146 ± 21.3)			(10 ± 3.2)			(27 ± 2.1)			(40 ± 5.9)			(18 ± 2.1)		
2500	151	145	173	9	9	10	31	21	33	28	33	27	15	14	15	
	(156 ± 14.7)			(9 ± 0.6)			(28 ± 6.4)			(29 ± 3.2)			(15 ± 0.6)			
5000	173	156	135	7	8	9	11	25	27	33	28	29	21	15	16	
	(155 ± 19.0)			(8 ± 1.0)			(21 ± 8.7)			(30 ± 2.6)			(17 ± 3.2)			
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		
Positive control S9 mix (+)	Number of colonies / plate	778	741	751	714	748	710	222	222	276	642	639	660	863	972	856
		(757 ± 19.1)			(724 ± 20.9)			(240 ± 31.2)			(647 ± 11.4)			(897 ± 65.0)		
Positive control S9 mix (+)	Number of colonies / plate	1172	1092	1120	387	344	304	782	858	730	521	511	449	397	381	426
		(1128 ± 40.6)			(345 ± 41.5)			(790 ± 64.4)			(494 ± 39.0)			(401 ± 22.8)		

The purity of the test substance was 98.7wt%. This substance contained 0.1% benzonitrile, 0.9% *o*-tolunitrile and 0.3% TPNI/IPN as impurities. AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

Table 3. Mutagenicity of 1,2-benzenedicarbonitrile on bacteria (II)

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			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
S9 mix (-)	0	165	168	156	13	11	10	27	25	21	26	24	22	15	10	9
		(163 ± 6.2)			(11 ± 1.5)			(24 ± 3.1)			(24 ± 2.0)			(11 ± 3.2)		
	313	150	152	166	13	6	12	26	21	21	24	18	23	7	4	17
		(156 ± 8.7)			(10 ± 3.8)			(23 ± 2.9)			(22 ± 3.2)			(9 ± 6.8)		
	625	152	171	162	9	13	9	25	22	27	30	28	24	12	11	15
		(162 ± 9.5)			(10 ± 2.3)			(25 ± 2.5)			(27 ± 3.1)			(13 ± 2.1)		
	1250	158	134	142	18	12	10	24	23	27	22	30	15	15	11	14
		(145 ± 12.2)			(13 ± 4.2)			(25 ± 2.1)			(22 ± 7.5)			(13 ± 2.1)		
2500	112	139	146	17	4	11	24	17	27	28	19	22	12	11	18	
	(132 ± 18.0)			(11 ± 6.5)			(23 ± 5.1)			(23 ± 4.6)			(14 ± 3.8)			
5000	122	115	120	11	18	10	17	24	12	18	24	17	13	9	9	
	(119 ± 3.6)			(13 ± 4.4)			(18 ± 6.0)			(20 ± 3.8)			(10 ± 2.3)			
S9 mix (+)	0	159	156	191	18	16	14	34	28	28	25	28	25	15	16	15
		(169 ± 19.4)			(16 ± 2.0)			(30 ± 3.5)			(26 ± 1.7)			(15 ± 0.6)		
	313	166	165	166	16	14	9	24	30	19	42	24	26	14	19	11
		(166 ± 0.6)			(13 ± 3.6)			(24 ± 5.5)			(31 ± 9.9)			(15 ± 4.0)		
	625	159	181	171	11	8	18	23	22	25	29	27	30	20	18	11
		(170 ± 11.0)			(12 ± 5.1)			(23 ± 1.5)			(29 ± 1.5)			(16 ± 4.7)		
	1250	170	161	185	18	11	14	21	30	28	31	31	21	17	19	18
		(172 ± 12.1)			(14 ± 3.5)			(26 ± 4.7)			(28 ± 5.8)			(18 ± 1.0)		
2500	177	159	195	7	9	9	23	18	24	30	38	28	19	18	21	
	(177 ± 18.0)			(8 ± 1.2)			(22 ± 3.2)			(32 ± 5.3)			(19 ± 1.5)			
5000	157	164	177	13	10	11	27	20	25	41	35	42	13	14	20	
	(166 ± 10.1)			(11 ± 1.5)			(24 ± 3.6)			(39 ± 3.8)			(16 ± 3.8)			
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		
Positive control S9 mix (+)	Number of colonies / plate	982	1010	1025	377	372	399	921	946	1062	438	481	441	321	335	285
		(1006 ± 21.8)			(383 ± 14.4)			(976 ± 75.2)			(453 ± 24.0)			(314 ± 25.8)		

The purity of the test substance was 98.7wt%. This substance contained 0.1% benzonitrile, 0.9% *o*-tolunitrile and 0.3% TPN/IPN as impurities. AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene