2，4－ジクロロトルエンの
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　　1～4

要　　約

2,4-ジクロロトルエン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 5～5000 μg/プレート の用量で、本試験は 15.625～1000 μg/プレート の用量で試験を行った。

その結果、2回の本試験とも、用いた5種類の検定菌において、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、2,4-ジクロロトルエンは、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

高生産量既存化学物質で、現在十分な安全性資料のない、2,4-ジクロロトルエンについて、ＯＥＣＤを中心として行われている国際協力による、安全性点検評価事業の一環として、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、

の　　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〕

2,4-ジクロロトルエン（CAS No.95-73-8、以下ＤＣＴと略）は分子量 161.03、比重 1.25、沸点 196℃、無色透明の液体である。純度 98.96%のもの（ロット番号：　　）を　　から供与された。被験物質は、使用時まで室温で遮光して保存した。

ＤＣＴは、ジメチルスルホキシド（DMSO：ロット番号：DSL5887、和光純薬工業㈱）を用いて 50 mg/mℓ（用量設定試験）、10 mg/mℓ（本試験）に調製した後、同溶媒でさらに公比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ＤＣＴのDMSO溶液中での安定性試験を行った。安定性試験における溶媒は当研究所で実施される、培養細胞を用いる染色体異常試験と共通なことから、両試験における最高濃度（13 mg/mℓ）および最低

濃度（156 μg/mℓ）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99.1%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、10 mg/mℓ溶液の含量は既定濃度に対し、101～103%、156 μg/mℓ 溶液は、109～111%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（Appendix 2）。

以上の結果から、ＤＣＴ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）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) ﾊﾞｸﾄ･ｱｶﾞｰ (Difco)	0.6%	(B) L-ﾋｽﾁｼﾞﾝ*	0.5 mM
塩化ﾅﾄﾘｳﾑ	0.5%	ﾋﾞｵﾁﾝ	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（ロット番号：DJ050GG（1991年7月9日製造）および DJ060IG（1991年9月3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。

硫酸ﾏｸﾞﾈｼｳﾑ・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
ｸｴﾝ酸・1水和物	2g	ｸﾞﾙｺｰｽ	20g
ﾘﾝ酸水素二ｶﾘｳﾑ	10g	ﾊﾞｸﾄ・ｱｶﾞｰ (Difco)	15g

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（1mℓ中下記の成分を含む）

S9**	0.1 mℓ	NADH	4 μmole
塩化ﾏｸﾞﾈｼｳﾑ	8 μmole	NADPH	4 μmole
塩化ｶﾘｳﾑ	33 μmole	0.2M リン酸緩衝液 (pH 7.4)	0.5 mℓ
ｸﾞﾙｺｰｽ・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㈱、ロット番号 RAA-254（1991年5月23日製造）および 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2mℓ、被験物質調製液 0.1mℓ、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。用量設定試験は抗菌性を認めたことから２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〕

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、2に示した。5～5000 μg/プレート の範囲で試験を実施したところ、5菌株すべてにおいて、直接試験では 500 μg/プレート 以上、代謝活性化試験では、500または 1500 μg/プレート 以上で抗菌性が認められた。従って、本試験における最高用量を、すべての菌種において、直接試験では、500 μg/プレート 、代謝活性化試験では1000 μg/プレート とし、公比2でそれぞれ6、7用量を設定した。

〔本試験〕

結果を表3、4に示した。ＤＣＴについて、15.625～1000 μg/プレート の範囲で試験を実施した。2回の試験を通して、用いた5種類の検定菌の直接試験、代謝活性化試験のいずれにおいても、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。また、すべての菌種において、直接試験では 250 μg/プレート 以上、代謝活性化試験では 500 または 1000 μg/プレート 以上で抗菌性を認めたが、復帰変異試験の評価には影響はなかった。

ＤＣＴについて実施したすべての試験において、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、ＤＣＴ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.

表 1
被験物質：2,4-ジクロロトルエン

用量設定試験結果表 I

M-91-174

物質	検体濃度 (μg/プレート)	S9Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート 塩基対置換型 TA100	TA1535	WP2uvrA	フレームシフト型 TA98	TA1537
溶媒対照		-	115 123 111 (116 ± 6.1)	11 12 19 (14 ± 4.4)	13 7 18 (13 ± 5.5)	15 21 19 (18 ± 3.1)	8 10 11 (10 ± 1.5)
検体	50	-	84	8	11	18	5
	150	-	73	7	16	21	6
	500	-	66*	0*	8*	20*	3*
	1500	-	0*	0*	8*	16*	2*
	5000	-	0*	0*	5*	0*	4*
溶媒対照		+	104 134 101 (113 ± 18.2)	14 12 12 (13 ± 1.2)	15 17 11 (14 ± 3.1)	36 39 34 (36 ± 2.5)	6 7 10 (8 ± 2.1)
検体	50	+	109	10	9	40	7
	150	+	71	6	14	37	7
	500	+	85	0*	6	21*	1*
	1500	+	0*	0*	5*	66*	4*
	5000	+	0*	0*	2*	0*	0*
陽性対照 S9Mix を必要としないもの	名称		AF2	SA	AF2	AF2	9AA
	濃度 (μg/プレート)		0.01	0.5	0.01	0.1	80
	コロニー数/プレート		600 622 626 (616 ± 14.0)	400 354 335 (363 ± 33.4)	308 289 279 (292 ± 14.7)	285 266 327 (293 ± 31.2)	2642 2410 2428 (2493 ± 129.1)
陽性対照 S9Mix を必要とするもの	名称		2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
	濃度 (μg/プレート)		1	2	10	0.5	2
	コロニー数/プレート		773 681 691 (715 ± 50.5)	157 153 156 (155 ± 2.1)	425 453 521 (466 ± 49.4)	149 155 159 (154 ± 5.0)	148 108 153 (136 ± 24.7)

＊：検定菌の生育阻害

表 2

用量設定試験結果表 II

被験物質：2,4-ジクロロトルエン

M-91-174

物質	検体濃度 (μg/プレート)	S9Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート 塩基対置換型 TA100	TA1535	WP2uvrA	フレームシフト型 TA98	TA1537
溶媒対照		-	127 124 121 (124 ± 3.0)	23 16 19 (19 ± 3.5)	11 25 14 (17 ± 7.4)	25 22 23 (23 ± 1.5)	6 7 13 (9 ± 3.8)
検体	5	-	155	13	19	10	12
	15	-	125	21	21	23	13
	50	-	127	18	20	24	6
	150	-	118	16	12	20	7
	500	-	60*	0*	5*	13*	7*
溶媒対照		+	126 113 119 (119 ± 6.5)	16 11 16 (14 ± 2.9)	24 21 25 (23 ± 2.1)	42 46 26 (38 ± 10.6)	14 12 9 (12 ± 2.5)
検体	5	+	111	11	16	29	15
	15	+	126	15	21	33	13
	50	+	115	12	19	42	6
	150	+	103	7	15	42	7
	500	+	92*	0*	20	21*	7*
	1500	+	0*		0*		
陽性対照 S9Mix を必要としないもの	名称 / 濃度 (μg/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		662 561 591 (605 ± 51.9)	211 188 169 (189 ± 21.0)	257 245 254 (252 ± 6.2)	634 638 662 (645 ± 15.1)	3000 3007 2918 (2975 ± 49.5)
陽性対照 S9Mix を必要とするもの	名称 / 濃度 (μg/プレート)		2AA 1	2AA 2	2AA 10	2AA 0.5	2AA 2
	コロニー数/プレート		831 793 777 (800 ± 27.7)	206 213 208 (209 ± 3.6)	540 532 481 (518 ± 32.0)	192 166 159 (172 ± 17.4)	209 201 228 (213 ± 13.9)

*：検定菌の生育阻害

表 3
被験物質：2,4-ジクロロトルエン

復帰変異試験結果表 I

M-91-174

物質	検体濃度 (μg/プレート)	S9Mix の有無	復帰変異 コロニー数/プレート 塩基対置換型 TA100	TA1535	WP2uvrA	フレームシフト型 TA98	TA1537
溶媒対照		-	135 133 123 (130 ± 6.4)	9 13 10 (11 ± 2.1)	14 9 12 (12 ± 2.5)	21 19 27 (22 ± 4.2)	9 15 8 (11 ± 3.8)
検体	15.625	-	134 112 128 (125 ± 11.4)	22 12 9 (14 ± 6.8)	12 15 14 (14 ± 1.5)	26 18 21 (22 ± 4.0)	9 4 5 (6 ± 2.6)
	31.25	-	99 117 112 (109 ± 9.3)	19 7 13 (13 ± 6.0)	11 12 15 (13 ± 2.1)	20 28 20 (23 ± 4.6)	12 10 11 (11 ± 1.0)
	62.5	-	103 102 119 (108 ± 9.5)	11 13 9 (11 ± 2.0)	8 16 11 (12 ± 4.0)	22 16 21 (20 ± 3.2)	4 4 8 (5 ± 2.3)
	125	-	97 85 74 (85 ± 11.5)	9 10 10 (10 ± 0.6)	12 10 6 (9 ± 3.1)	23 21 22 (22 ± 1.0)	3 7 4 (5 ± 2.1)
	250	-	127* 48* 85* (87 ± 39.5)	9* 5* 4* (6 ± 2.6)	9* 6* 9* (8 ± 1.7)	17* 17* 14* (16 ± 1.7)	9* 6* 5* (7 ± 2.1)
	500	-	0* 0* 0* (0 ± 0.0)	0* 0* 0* (0 ± 0.0)	2* 9* 3* (5 ± 3.8)	22* 19* 13* (18 ± 4.6)	6* 2* 2* (3 ± 2.3)
溶媒対照		+	147 140 112 (133 ± 18.5)	14 11 17 (14 ± 3.0)	17 19 16 (17 ± 1.5)	48 42 35 (42 ± 6.5)	8 9 12 (10 ± 2.1)
検体	15.625	+	118 135 128 (127 ± 8.5)	6 13 12 (10 ± 3.8)	16 11 11 (13 ± 2.9)	42 39 46 (42 ± 3.5)	11 9 10 (10 ± 1.0)
	31.25	+	104 119 122 (115 ± 9.6)	16 12 17 (15 ± 2.6)	14 20 16 (17 ± 3.1)	38 40 35 (38 ± 2.5)	11 10 11 (11 ± 0.6)
	62.5	+	156 132 110 (133 ± 23.0)	9 15 7 (10 ± 4.2)	18 12 13 (14 ± 3.2)	28 36 37 (34 ± 4.9)	10 8 9 (9 ± 1.0)
	125	+	131 136 142 (136 ± 5.5)	7 12 9 (9 ± 2.5)	12 14 13 (13 ± 1.0)	39 35 35 (36 ± 2.3)	7 16 10 (11 ± 4.6)
	250	+	82 121 116 (106 ± 21.2)	14 16 10 (13 ± 3.1)	8 12 5 (8 ± 3.5)	33 36 35 (35 ± 1.5)	9 14 12 (12 ± 2.5)
	500	+	10* 101* 127 (79 ± 61.4)	9* 12* 9* (10 ± 1.7)	8* 7 9 (8 ± 1.0)	10* 24* 21* (18 ± 7.4)	9* 3* 9* (7 ± 3.5)
	1000	+	0* 0* 0* (0 ± 0.0)		4* 6* 8* (6 ± 2.0)		
陽性対照 S9Mix を必要としないもの	名称		AF2	SA	AF2	AF2	9AA
	濃度 (μg/プレート)		0.01	0.5	0.01	0.1	80
	コロニー数/プレート		616 588 599 (601 ± 14.1)	213 222 213 (216 ± 5.2)	122 129 122 (124 ± 4.0)	652 589 616 (619 ± 31.6)	2164 2075 1922 (2054 ± 122.4)
陽性対照 S9Mix を必要とするもの	名称		2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
	濃度 (μg/プレート)		1	2	10	0.5	2
	コロニー数/プレート		956 945 883 (928 ± 39.4)	155 120 136 (137 ± 17.5)	333 289 310 (311 ± 22.0)	289 267 280 (279 ± 11.1)	201 194 212 (202 ± 9.1)

*：検定菌の生育阻害

表 4
被験物質：2,4-ジクロロトルエン

復帰変異試験結果表 II

M−91−174

物質	検体濃度 (μg/プレート)	S9Mix の有無	復帰変異 コロニー数/プレート 塩基対置換型 TA100	TA1535	WP2uvrA	フレームシフト型 TA98	TA1537
溶媒対照		−	110 119 129 (119 ± 9.5)	21 16 12 (16 ± 4.5)	19 14 14 (16 ± 2.9)	22 11 23 (19 ± 6.7)	6 11 8 (8 ± 2.5)
検体	15.625	−	138 130 132 (133 ± 4.2)	16 15 16 (16 ± 0.6)	17 20 11 (16 ± 4.6)	22 36 24 (27 ± 7.6)	9 12 11 (11 ± 1.5)
	31.25	−	134 123 146 (134 ± 11.5)	21 14 11 (15 ± 5.1)	17 8 5 (10 ± 6.2)	28 18 34 (27 ± 8.1)	10 12 9 (10 ± 1.5)
	62.5	−	107 132 137 (125 ± 16.1)	9 18 11 (13 ± 4.7)	9 6 9 (8 ± 1.7)	12 26 24 (21 ± 7.6)	10 9 8 (9 ± 1.0)
	125	−	129 139 118 (129 ± 10.5)	11 14 10 (12 ± 2.1)	13 10 15 (13 ± 2.5)	24 22 21 (22 ± 1.5)	6 9 11 (9 ± 2.5)
	250	−	101* 115* 85* (100 ± 15.0)	6* 10* 9* (8 ± 2.1)	8* 11* 17* (12 ± 4.6)	27* 27* 32* (29 ± 2.9)	4* 11* 8* (8 ± 3.5)
	500	−	35* 11* 51* (32 ± 20.1)	13* 15* 7* (12 ± 4.2)	3* 6* 1* (3 ± 2.5)	24* 23* 14* (20 ± 5.5)	3* 6* 7* (5 ± 2.1)
溶媒対照		+	126 133 137 (132 ± 5.6)	19 20 16 (18 ± 2.1)	10 15 23 (16 ± 6.6)	29 27 41 (32 ± 7.6)	14 11 9 (11 ± 2.5)
検体	15.625	+	151 130 141 (141 ± 10.5)	17 15 17 (16 ± 1.2)	15 12 15 (14 ± 1.7)	48 47 48 (48 ± 0.6)	14 11 11 (12 ± 1.7)
	31.25	+	162 126 148 (145 ± 18.1)	17 18 19 (18 ± 1.0)	12 12 8 (11 ± 2.3)	58 26 39 (41 ± 16.1)	8 8 20 (12 ± 6.9)
	62.5	+	121 133 139 (131 ± 9.2)	11 24 15 (17 ± 6.7)	12 10 17 (13 ± 3.6)	39 53 33 (42 ± 10.3)	11 12 11 (11 ± 0.6)
	125	+	153 139 122 (138 ± 15.5)	14 16 20 (17 ± 3.1)	12 22 14 (16 ± 5.3)	39 35 42 (39 ± 3.5)	11 9 18 (13 ± 4.7)
	250	+	102 124 112 (113 ± 11.0)	5 7 8 (7 ± 1.5)	19 11 23 (18 ± 6.1)	37 45 31 (38 ± 7.0)	8 11 8 (9 ± 1.7)
	500	+	119 121 85* (108 ± 20.2)	14* 10* 15* (13 ± 2.6)	15 14 15 (15 ± 0.6)	34* 35* 32* (34 ± 1.5)	4* 6* 3* (4 ± 1.5)
	1000	+	97* 78* 87* (87 ± 9.5)		7* 10* 16* (11 ± 4.6)		
陽性対照 S9Mix を必要としないもの	名称		AF2	SA	AF2	AF2	9AA
	濃度 (μg/プレート)		0.01	0.5	0.01	0.1	80
	コロニー数/プレート		635 617 596 (616 ± 19.5)	188 208 213 (203 ± 13.2)	95 102 114 (104 ± 9.6)	751 727 748 (742 ± 13.1)	1581 1963 2173 (1906 ± 300.1)
陽性対照 S9Mix を必要とするもの	名称		2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
	濃度 (μg/プレート)		1	2	10	0.5	2
	コロニー数/プレート		774 948 924 (882 ± 94.3)	198 180 182 (187 ± 9.9)	193 194 219 (202 ± 14.7)	192 234 261 (229 ± 34.8)	208 114 176 (166 ± 47.8)

＊：検定菌の生育阻害