

食薬セ研第6-527号

1994年12月 7日

1,3-ビス(アミノメチル)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	6
参 考 文 献	7
Tables 1～3	

【要 約】

1,3-ビス（アミノメチル）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、用量設定試験では、50～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で実施したところ、抗菌性が認められなかったので、本試験では直接法、代謝活性化法ともに 312.5～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で試験を実施した。

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、いずれの用量でも陰性対照の2倍以上となる変異コロニー数の増加が認められなかったことから、1,3-ビス（アミノメチル）ベンゼンは、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】

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、1,3-ビス（アミノメチル）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、カリフォルニア大学の から分与を受けた。

E. coli WP2 *uvrA* 株は1979年 5 月 9 日に国立遺伝学研究所の 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〕

1,3-ビス (アミノメチル) ベンゼン (CAS No. 1477-55-0、以下B A Bと略) は、分子量136.2 の無色透明液体である。純度 99.8%のもの (ロット番号: 不純物として水分 0.018%を含む、 製造) を(株)日本化学工業協会から供与された。被験物質は、使用時まで冷暗所に保管した。

B A Bは、純水に 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、B A Bの純水中での安定性試験を、溶媒が共通であるので、当研究所で同時に実施した染色体異常試験 (H-93-271) での低濃度 (0.825 mg/ml) および本試験での高濃度 (50.00 mg/ml) の2濃度について、冷蔵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、98.6および 96.2%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、2)。

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、3.125 mg/ml 溶液の含量は既定濃度に対し、104~107%、50 mg/ml 溶液は、100~104%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 3）。

以上の結果から、B A Bは純水中では安定であり、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-アミノアントラセン	(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：DJ020GI、1993年7月6日製造および本試験では、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
リン酸水素二カルシウム	10 g	バクアガー (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、1993年 8 月 27 日製造および RAA-304、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。

小試験管中にトッパアガー 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純水、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°C 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。B A B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、すべての検定菌において直接法、代謝活性化法ともに抗菌性が認められなかった。

したがって、本試験における最高用量を、すべての検定菌において、直接法、代謝活性化法ともに 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とすることとした。

〔本試験〕

結果を Table 2、3 に示した。B A Bについて、すべての検定菌について、直接法、代謝活性化法ともに 312.5～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で、公比を2とし、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法、代謝活性化法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。

B A B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。

以上の結果に基づき、B A B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.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 1,3-Bis(aminomethyl)benzene** 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			WP2uvrA			TA98			TA1537			
S9Mix (-)	0	152	122	118	17	15	9	18	22	25	16	27	31	8	6	7	
		(131 \pm 18.6)			(14 \pm 4.2)			(22 \pm 3.5)			(25 \pm 7.8)			(7 \pm 1.0)			
	50	128			14			18			19			6			
	150	120			7			16			22			4			
	500	105			11			20			10			3			
	1500	121			12			34			17			5			
	5000	123			12			28			22			8			
S9Mix (+)	0	174	135	127	14	14	20	22	28	28	32	21	31	8	10	14	
		(145 \pm 25.1)			(16 \pm 3.5)			(26 \pm 3.5)			(28 \pm 6.1)			(11 \pm 3.1)			
	50	148			17			37			31			11			
	150	135			14			32			25			17			
	500	155			19			21			35			11			
	1500	159			11			26			29			17			
	5000	165			10			33			36			11			
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	493	456	502	376	367	370	183	173	197	761	796	776	985	1095	1152	
		(484 \pm 24.4)			(371 \pm 4.6)			(184 \pm 12.1)			(778 \pm 17.6)			(1077 \pm 84.9)			
Positive control S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	937	879	941	260	250	245	1100	909	921	300	337	342	205	197	196	
		(919 \pm 34.7)			(252 \pm 7.6)			(977 \pm 107.0)			(326 \pm 22.9)			(199 \pm 4.9)			

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

** : Purity was 99.8 % and H₂O (0.018%) was contained as impurity.

Table 2. Results of reverse mutation test (I) of 1,3-Bis(aminomethyl)benzene** 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								
S9 Mix (-)	0	123	109	118	11	12	16	13	18	25	34	17	26	8	6	6	(117 ± 7.1)	(13 ± 2.6)	(19 ± 6.0)	(26 ± 8.5)	(7 ± 1.2)	
	312.5	144	106	122	11	15	14	20	28	19	19	24	20	6	10	5	(124 ± 19.1)	(13 ± 2.1)	(22 ± 4.9)	(21 ± 2.6)	(7 ± 2.6)	
	625	92	107	105	14	17	17	14	23	24	25	20	18	2	5	6	(101 ± 8.1)	(16 ± 1.7)	(20 ± 5.5)	(21 ± 3.6)	(4 ± 2.1)	
	1250	111	102	87	10	13	9	19	23	25	21	28	25	5	9	6	(100 ± 12.1)	(11 ± 2.1)	(22 ± 3.1)	(25 ± 3.5)	(7 ± 2.1)	
	2500	104	133	139	12	9	13	20	24	21	24	28	21	14	8	3	(125 ± 18.7)	(11 ± 2.1)	(22 ± 2.1)	(24 ± 3.5)	(8 ± 5.5)	
	5000	92	127	111	6	10	12	23	28	24	22	9	23	7	8	5	(110 ± 17.5)	(9 ± 3.1)	(25 ± 2.6)	(18 ± 7.8)	(7 ± 1.5)	
S9 Mix (+)	0	130	136	123	12	14	10	17	16	22	26	29	28	7	7	8	(130 ± 6.5)	(12 ± 2.0)	(18 ± 3.2)	(28 ± 1.5)	(7 ± 0.6)	
	312.5	133	135	154	17	12	13	20	19	22	29	51	24	8	17	14	(141 ± 11.6)	(14 ± 2.6)	(20 ± 1.5)	(35 ± 14.4)	(13 ± 4.6)	
	625	110	137	126	9	16	8	27	16	34	26	37	22	11	10	8	(124 ± 13.6)	(11 ± 4.4)	(26 ± 9.1)	(28 ± 7.8)	(10 ± 1.5)	
	1250	129	130	118	12	6	13	20	25	27	30	18	30	16	13	10	(126 ± 6.7)	(10 ± 3.8)	(24 ± 3.6)	(26 ± 6.9)	(13 ± 3.0)	
	2500	136	147	125	16	13	12	21	36	31	29	33	44	11	9	14	(136 ± 11.0)	(14 ± 2.1)	(29 ± 7.6)	(35 ± 7.8)	(11 ± 2.5)	
	5000	163	148	161	18	10	16	26	21	19	36	34	18	6	12	8	(157 ± 8.1)	(15 ± 4.2)	(22 ± 3.6)	(29 ± 9.9)	(9 ± 3.1)	
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	500	466	567	160	163	129	129	106	146	874	867	804	916	913	845	(511 ± 51.4)	(151 ± 18.8)	(127 ± 20.1)	(848 ± 38.6)	(891 ± 40.2)	
	Number of colonies / plate	939	902	984	217	283	244	979	1116	952	279	358	370	349	367	317	(942 ± 41.1)	(248 ± 33.2)	(1016 ± 87.9)	(336 ± 49.4)	(344 ± 25.3)	

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

** : Purity was 99.8 % and H₂O (0.018 %) was contained as impurity.

Table 3. Results of reverse mutation test (II) of 1,3-Bis(aminomethyl)benzene** 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	136	127	127	9	14	15	28	18	23	24	22	23	15	6	12	(130 \pm 5.2)	(13 \pm 3.2)	(23 \pm 5.0)	(23 \pm 1.0)	(11 \pm 4.6)
	312.5	134	136	123	10	8	9	25	22	20	16	16	23	2	9	7	(131 \pm 7.0)	(9 \pm 1.0)	(22 \pm 2.5)	(18 \pm 4.0)	(6 \pm 3.6)
	625	146	140	145	16	12	17	22	35	20	26	26	20	10	5	5	(144 \pm 3.2)	(15 \pm 2.6)	(26 \pm 8.1)	(24 \pm 3.5)	(7 \pm 2.9)
	1250	126	139	119	14	15	10	27	21	26	17	30	33	5	9	11	(128 \pm 10.1)	(13 \pm 2.6)	(25 \pm 3.2)	(27 \pm 8.5)	(8 \pm 3.1)
	2500	151	157	161	9	11	7	27	20	34	20	20	16	4	8	11	(156 \pm 5.0)	(9 \pm 2.0)	(27 \pm 7.0)	(19 \pm 2.3)	(8 \pm 3.5)
	5000	155	162	154	11	11	9	36	30	27	35	19	23	5	7	8	(157 \pm 4.4)	(10 \pm 1.2)	(31 \pm 4.6)	(26 \pm 8.3)	(7 \pm 1.5)
S9Mix (+)	0	136	149	134	14	11	15	31	26	37	32	35	28	10	11	13	(140 \pm 8.1)	(13 \pm 2.1)	(31 \pm 5.5)	(32 \pm 3.5)	(11 \pm 1.5)
	312.5	130	130	139	10	7	14	32	36	22	33	29	28	8	16	16	(133 \pm 5.2)	(10 \pm 3.5)	(30 \pm 7.2)	(30 \pm 2.6)	(13 \pm 4.6)
	625	164	148	149	8	14	19	32	24	30	45	39	27	14	9	11	(154 \pm 9.0)	(14 \pm 5.5)	(29 \pm 4.2)	(37 \pm 9.2)	(11 \pm 2.5)
	1250	149	135	140	14	12	13	31	28	30	34	38	36	18	14	17	(141 \pm 7.1)	(13 \pm 1.0)	(30 \pm 1.5)	(36 \pm 2.0)	(16 \pm 2.1)
	2500	140	148	175	10	8	9	31	31	29	40	35	29	16	11	14	(154 \pm 18.3)	(9 \pm 1.0)	(30 \pm 1.2)	(35 \pm 5.5)	(14 \pm 2.5)
	5000	173	190	185	11	12	15	32	31	35	31	35	35	18	16	10	(183 \pm 8.7)	(13 \pm 2.1)	(33 \pm 2.1)	(34 \pm 2.3)	(15 \pm 4.2)
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							
	Number of colonies / plate	628	660	662	185	195	234	221	210	221	758	843	888	1723	1542	1867	(650 \pm 19.1)	(205 \pm 25.9)	(217 \pm 6.4)	(830 \pm 66.0)	(1711 \pm 162.9)
		648	620	760	345	296	325	951	1175	1053	406	395	400	279	308	356	(676 \pm 74.1)	(322 \pm 24.6)	(1060 \pm 112.1)	(400 \pm 5.5)	(314 \pm 38.9)

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

** : Purity was 99.8 % and H₂O (0.018 %) was contained as impurity.