1，4－ジシアノベンゼンの
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】

1,4-ジシアノ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 *uvr*A 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 μg/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 μg/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、1,4-ジシアノベンゼンは、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、1,4-ジシアノベンゼンについて、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 *uvr*A
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 *uvr*A 株は1979年5月9日に　　から分与を受けた。

検定菌は、－80℃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℃、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-ジシアノベンゼン（CAS No. 623-26-7、以下ＤＣＢと略）は、分子量 128 の白色結晶である。純度 99%以上のもの（ロット番号：　　不純物不明（１%未満）、　　）を　　から供与された。被験物質は、使用時まで室温遮光で保管した。

ＤＣＢは、ジメチルスルホキシド（以下 DMSO と略、ロット番号：APQ5928 および APJ3434、和光純薬工業㈱）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、ＤＣＢの DMSO 溶液中での安定性試験を、本試験での低濃度（3.125 mg/mℓ）および高濃度（50.00 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、101および 100%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、3.125 mg/mℓ 溶液の含量は既定濃度に対し、96.8～97.5%、50.00 mg/mℓ 溶液は、97.2～98.1%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、ＤＣＢ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	ﾌﾘﾙﾌﾗﾏｲﾄﾞ	（上野製薬㈱	ﾛｯﾄ番号 46,	純度99.9%）
SA	ｱｼﾞ化ﾅﾄﾘｳﾑ	（和光純薬工業㈱	ﾛｯﾄ番号 TWR3330,	純度90%以上）
9AA	9-ｱﾐﾉｱｸﾘｼﾞﾝ	（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㈱	ﾛｯﾄ番号 DSF2950,	純度90%以上）

AF2, 2AA は DMSO（和光純薬工業㈱）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）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（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	水酸化ﾅﾄﾘｳﾑ	0.66ｇ
ｸｴﾝ酸･1水和物	2 ｇ	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
ﾘﾝ酸一ｱﾝﾓﾆｳﾑ	1.92ｇ		

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
塩化ﾏｸﾞﾈｼｳﾑ	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
ｸﾞﾙｺｰｽ-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㈱、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。ＤＣＢについて、50～5000 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ 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抗菌性は認められなかった。

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 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ とすることとした。

〔本試験〕

結果を Table 2 、 3 に示した。ＤＣＢについて、すべての検定菌において、直接法、代謝活性化法ともに 312.5～5000 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ 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。なお、最高用量の 5000 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ 群において直接法、代謝活性化法のいずれにおいても被験物質に由来する沈殿が認められた。

ＤＣＢ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、ＤＣＢ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 1,4-Dicyanobenzene** 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	104 138 135 (126 ± 18.8)	11 12 14 (12 ± 1.5)	15 22 14 (17 ± 4.4)	22 24 14 (20 ± 5.3)	9 6 6 (7 ± 1.7)
	50	106	5	14	22	6
	150	116	13	17	15	8
	500	121	11	22	34	6
	1500	110	8	10	17	7
	5000 #	116	7	13	27	9
S9Mix (+)	0	151 137 123 (137 ± 14.0)	21 15 10 (15 ± 5.5)	32 33 24 (30 ± 4.9)	28 39 30 (32 ± 5.9)	6 15 8 (10 ± 4.7)
	50	110	10	21	37	8
	150	103	11	23	34	15
	500	126	9	25	27	9
	1500 #	120	11	24	32	7
	5000 #	109	8	9	24	2
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	493 456 502 (484 ± 24.4)	376 367 370 (371 ± 4.6)	183 173 197 (184 ± 12.1)	761 796 776 (778 ± 17.6)	985 1095 1152 (1077 ± 84.9)
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2
	Number of colonies / plate	937 879 941 (919 ± 34.7)	260 250 245 (252 ± 7.6)	1100 909 921 (977 ± 107.0)	300 337 342 (326 ± 22.9)	205 197 196 (199 ± 4.9)

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

#: Precipitant was observed on the surface of agar plates.

** : Purity was above 99 %.

Table 2. Results of reverse mutation test (I) of 1,4-Dicyanobenzene** 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	104	89	106	12	26	11	20	18	19		20	16	23	8	8	7
		(100 ± 9.3)			(16 ± 8.4)			(19 ± 1.0)				(20 ± 3.5)			(8 ± 0.6)		
	312.5	111	103	94	12	14	9	16	19	27		20	20	22	7	4	3
		(103 ± 8.5)			(12 ± 2.5)			(21 ± 5.7)				(21 ± 1.2)			(5 ± 2.1)		
	625	84	107	114	10	17	7	20	24	18		19	18	18	4	4	6
		(102 ± 15.7)			(11 ± 5.1)			(21 ± 3.1)				(18 ± 0.6)			(5 ± 1.2)		
	1250	102	89	86	12	10	4	15	14	18		17	21	19	4	5	4
		(92 ± 8.5)			(9 ± 4.2)			(16 ± 2.1)				(19 ± 2.0)			(4 ± 0.6)		
	2500	83	80	72	14	12	12	27	13	14		16	13	10	2	8	7
		(78 ± 5.7)			(13 ± 1.2)			(18 ± 7.8)				(13 ± 3.0)			(6 ± 3.2)		
	5000 #	88	75	63	17	10	10	12	12	9		18	18	10	2	5	8
		(75 ± 12.5)			(12 ± 4.0)			(11 ± 1.7)				(15 ± 4.6)			(5 ± 3.0)		
S9Mix (+)	0	124	122	155	8	14	17	27	31	20		35	39	22	6	20	11
		(134 ± 18.5)			(13 ± 4.6)			(26 ± 5.6)				(32 ± 8.9)			(12 ± 7.1)		
	312.5	127	118	127	5	18	10	16	30	19		24	28	26	11	12	18
		(124 ± 5.2)			(11 ± 6.6)			(22 ± 7.4)				(26 ± 2.0)			(14 ± 3.8)		
	625	115	121	126	11	13	13	27	28	23		24	27	25	9	12	9
		(121 ± 5.5)			(12 ± 1.2)			(26 ± 2.6)				(25 ± 1.5)			(10 ± 1.7)		
	1250	100	131	116	9	12	14	19	17	21		27	25	35	11	7	8
		(116 ± 15.5)			(12 ± 2.5)			(19 ± 2.0)				(29 ± 5.3)			(9 ± 2.1)		
	2500	89	94	109	11	14	14	17	28	21		22	18	31	10	5	6
		(97 ± 10.4)			(13 ± 1.7)			(22 ± 5.6)				(24 ± 6.7)			(7 ± 2.6)		
	5000 #	126	104	126	7	10	9	23	23	20		29	32	20	11	10	4
		(119 ± 12.7)			(9 ± 1.5)			(22 ± 1.7)				(27 ± 6.2)			(8 ± 3.8)		
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	635	556	616	242	233	248	212	203	207		898	968	992	2016	1736	2227
		(602 ± 41.2)			(241 ± 7.5)			(207 ± 4.5)				(953 ± 48.8)			(1993 ± 246.3)		
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA				2AA			2AA		
	Dose (μg /plate)	1			2			10				0.5			2		
	Number of colonies / plate	1293	1371	1277	396	338	343	1697	1689	1874		572	540	563	518	397	392
		(1314 ± 50.3)			(359 ± 32.1)			(1753 ± 104.6)				(558 ± 16.5)			(436 ± 71.3)		

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

#: Precipitant was observed on the surface of agar plates.

** : Purity was above 99 %.

Table 3. Results of reverse mutation test (II) of 1,4-Dicyanobenzene** 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	103	125	121	10	19	13	21	16	19		14	35	24	4	7	11
		(116 ± 11.7)			(14 ± 4.6)			(19 ± 2.5)				(24 ± 10.5)			(7 ± 3.5)		
	312.5	95	92	100	21	14	9	24	19	20		26	18	17	16	8	5
		(96 ± 4.0)			(15 ± 6.0)			(21 ± 2.6)				(20 ± 4.9)			(10 ± 5.7)		
	625	82	104	84	18	11	4	22	22	17		23	27	36	4	9	6
		(90 ± 12.2)			(11 ± 7.0)			(20 ± 2.9)				(29 ± 6.7)			(6 ± 2.5)		
	1250	112	97	99	7	12	13	13	13	16		19	25	16	11	7	5
		(103 ± 8.1)			(11 ± 3.2)			(14 ± 1.7)				(20 ± 4.6)			(8 ± 3.1)		
	2500	101	70	84	8	14	9	16	18	23		20	14	16	7	7	8
		(85 ± 15.5)			(10 ± 3.2)			(19 ± 3.6)				(17 ± 3.1)			(7 ± 0.6)		
	5000 #	80	85	84	10	4	12	14	15	9		21	21	24	7	6	6
		(83 ± 2.6)			(9 ± 4.2)			(13 ± 3.2)				(22 ± 1.7)			(6 ± 0.6)		
S9Mix (+)	0	116	126	125	12	11	9	18	23	26		43	27	31	18	22	15
		(122 ± 5.5)			(11 ± 1.5)			(22 ± 4.0)				(34 ± 8.3)			(18 ± 3.5)		
	312.5	105	128	98	16	15	17	23	17	15		30	38	33	14	9	14
		(110 ± 15.7)			(16 ± 1.0)			(18 ± 4.2)				(34 ± 4.0)			(12 ± 2.9)		
	625	116	108	124	13	9	14	15	17	22		37	34	34	14	12	11
		(116 ± 8.0)			(12 ± 2.6)			(18 ± 3.6)				(35 ± 1.7)			(12 ± 1.5)		
	1250	120	108	116	6	9	10	18	21	21		32	29	21	7	9	17
		(115 ± 6.1)			(8 ± 2.1)			(20 ± 1.7)				(27 ± 5.7)			(11 ± 5.3)		
	2500 #	101	102	117	10	10	11	15	17	14		25	16	25	12	9	9
		(107 ± 9.0)			(10 ± 0.6)			(15 ± 1.5)				(22 ± 5.2)			(10 ± 1.7)		
	5000 #	103	102	120	13	6	12	8	11	4		25	30	26	3	9	7
		(108 ± 10.1)			(10 ± 3.8)			(8 ± 3.5)				(27 ± 2.6)			(6 ± 3.1)		
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	611	620	600	264	301	317	251	261	214		1021	1080	1071	2140	1781	2191
		(610 ± 10.0)			(294 ± 27.2)			(242 ± 24.8)				(1057 ± 31.8)			(2037 ± 223.5)		
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA				2AA			2AA		
	Dose (μg /plate)	1			2			10				0.5			2		
	Number of colonies / plate	947	722	500	362	334	304	1439	1543	1591		353	765	307	343	366	411
		(723 ± 223.5)			(333 ± 29.0)			(1524 ± 77.7)				(475 ± 252.2)			(373 ± 34.6)		

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

#: Precipitant was observed on the surface of agar plates.

** : Purity was above 99 %.