



1,3-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 方 法	3
結 果 お よ び 考 察	7
結 論	7
特 記 事 項	8
文 献	8
Tables 1～3	

【要 約】

1,3-ジシアノベンゼン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ート法により用量設定試験および本試験を行った。用量設定試験を50~5000 µg/プレート の用量で行ったところ、すべての検定菌においてS9 mix 無添加試験および添加試験のいずれも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を313~5000 µg/プレート の範囲で用量を設定して実施した。

その結果、2回の本試験とも、用いた5種類の検定菌のいずれの用量においても溶媒対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められなかったことから、1,3-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、1,3-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、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素（S9 mix）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、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ものを用い、各菌株の特性確認は、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 pKM 101 (プラスミド) の有無について行った。

試験に際して、ニュートリエントプロスNo.2 (Oxoid) を入れたL字型試験管に解凍した種菌を一定量接種し、 37°C で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-ジシアノベンゼン (DCB、CAS No. 626-17-5) は、分子量 128.13 の白色針状結晶である。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 99.9% (不純物：水分 0.03%) であり、
から供与された。被験物質は、使用時まで室温保管した。

DCBは、アセトン (ロット番号：DSM4173、和光純薬工業株) に 50 mg/ml になるように溶解した後、同溶媒で公比約 3 ないし 2 で希釈し、速やかに試験に用いた。

DCBのアセトン溶液中での安定性試験および含量測定試験を秦野研究所において実施した。安定性試験においては、本試験 I で調製した低濃度 (3.13 mg/ml) 溶液および高濃度 (50.0 mg/ml) 溶液について、室温遮光条件下で、調製後 4 時間までの安定性を調べた。その結果、調製 4 時間後における各濃度の平均含量は、それぞれ初期値 (0 時間) の平均値に対して、99.3 および 99.9% であった。これらの値は当研究所で規定している基準内 (4 時間後における平均含量が初期値の90%以上) であった (Appendix 2)。

また、本試験 I で調製した被験物質調製液について含量測定試験を行った結果、調製液の濃度は、いずれも当研究所の規定している基準内（溶媒中での平均含量が添加量の90～110%）であった（Appendix 3）。

〔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	: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (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 はジメチルスルホキシド（DMSO、和光純薬工業(株)）に溶解したものを -20°C で凍結保存し、用時解凍した。9AA は DMSO に、SA は純水に溶解し、速やかに試験に用いた。

〔培地および S9 mix 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%	ピオチン	0.5 mM

* : WP2 *uvrA* 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)製の最少寒天培地（ロット番号：DJ030HJ、1994年8月11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 mix (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
塩化カルウム	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 (キッコマン株、ロット番号 RAA-317、1994年10月27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、ラットの解剖および S9 の調製は 5 日目であった。

[試験方法]

プレート法により、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 およびトップアガー 2 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使用溶媒、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各Table 中に示した。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、溶媒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、結果の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 S9 mix 無添加あるいは S9 mix 添加条件において、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、溶媒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。

【結果および考察】

〔用量設定試験〕

結果を Table 1 に示した。DCBについて 50～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で公比を約 3 として、試験を実施したところ、すべての検定菌において S9 mix 無添加試験および添加試験のいずれも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。

〔本試験〕

2 回の本試験の結果をそれぞれ Table 2、3 に示した。DCBの用量を、S9 mix 無添加試験および添加試験とともに 313～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で公比を 2 として試験を実施した。その結果、2 回の試験のいずれも、用いた 5 種類の検定菌の S9 mix 無添加試験および添加試験において、溶媒対照値の 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。

DCB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、溶媒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。

【結 論】

以上の結果に基づき、1,3-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もの（陰性）と判定した。

【特 記 事 項】

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。

【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-dicyanobenzene ** on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (μg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, $\text{Mea} \pm \text{S.D.}$)															
		Base - pair substitution type									Frameshift type						
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537			
S9mix (-)	0	112	106	107	11	11	11	31	42	21	21	21	25	9	9	8	
		(108 \pm 3.2)			(11 \pm 0.0)			(31 \pm 10.5)			(22 \pm 2.3)			(9 \pm 0.6)			
	50	134			13			26			24			14			
	150	131			18			27			22			9			
	500	119			3			33			25			13			
	1500	114			11			23			13			11			
	5000	74			11			23			8			10			
S9mix (+)	0	147	138	144	9	13	23	19	25	22	43	39	29	5	10	13	
		(143 \pm 4.6)			(15 \pm 7.2)			(22 \pm 3.0)			(37 \pm 7.2)			(9 \pm 4.0)			
	50	152			18			24			34			8			
	150	131			18			30			36			18			
	500	138			11			24			33			17			
	1500	133			14			39			15			18			
	5000	119			16			35			39			14			
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			
	Number of colonies / plate	2008	1637	1544	212	229	230	1407	1386	1261	573	498	438	262	217	221	
		(1730 \pm 245.5)			(224 \pm 10.1)			(1351 \pm 78.9)			(503 \pm 67.6)			(233 \pm 24.9)			

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

** : Purity was 99.9% and water (0.03%) was contained as impurity.

Table 2. Results of reverse mutation test (I) of 1,3-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	101	98	102	11	7	11	15	20	18	14	15	20	8	7	5	(100 ± 2.1)	(10 ± 2.3)	(18 ± 2.5)	(16 ± 3.2)	(7 ± 1.5)
	313	99	107	125	9	14	16	22	24	19	21	30	17	10	10	8	(110 ± 13.3)	(13 ± 3.6)	(22 ± 2.5)	(23 ± 6.7)	(9 ± 1.2)
	625	106	108	87	10	12	11	22	29	27	10	17	20	9	3	7	(100 ± 11.6)	(11 ± 1.0)	(26 ± 3.6)	(16 ± 5.1)	(6 ± 3.1)
	1250	95	95	113	14	11	12	20	21	18	20	21	18	6	3	8	(101 ± 10.4)	(12 ± 1.5)	(20 ± 1.5)	(20 ± 1.5)	(6 ± 2.5)
	2500	92	84	97	8	13	8	16	14	18	13	19	10	9	10	8	(91 ± 6.6)	(10 ± 2.9)	(16 ± 2.0)	(14 ± 4.6)	(9 ± 1.0)
	5000	92	83	75	17	7	17	19	11	19	20	12	12	6	8	9	(83 ± 8.5)	(14 ± 5.8)	(16 ± 4.6)	(15 ± 4.6)	(8 ± 1.5)
S9mix (+)	0	116	124	121	11	10	11	27	23	19	25	29	28	23	18	11	(120 ± 4.0)	(11 ± 0.6)	(23 ± 4.0)	(27 ± 2.1)	(17 ± 6.0)
	313	115	112	126	8	10	12	22	21	27	34	37	34	12	13	25	(118 ± 7.4)	(10 ± 2.0)	(23 ± 3.2)	(35 ± 1.7)	(17 ± 7.2)
	625	127	124	123	15	13	17	30	21	22	32	42	41	9	11	10	(125 ± 2.1)	(15 ± 2.0)	(24 ± 4.9)	(38 ± 5.5)	(10 ± 1.0)
	1250	101	102	110	12	14	18	19	25	35	27	36	28	6	10	8	(104 ± 4.9)	(15 ± 3.1)	(26 ± 8.1)	(30 ± 4.9)	(8 ± 2.0)
	2500	94	97	114	11	12	18	17	27	18	27	32	31	18	15	9	(102 ± 10.8)	(14 ± 3.8)	(21 ± 5.5)	(30 ± 2.6)	(14 ± 4.6)
	5000	84	92	89	9	10	7	13	18	21	24	31	25	10	5	7	(88 ± 4.0)	(9 ± 1.5)	(17 ± 4.0)	(27 ± 3.8)	(7 ± 2.5)
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	555	468	575	268	257	282	146	138	104	587	613	567	628	786	686	(533 ± 56.9)	(269 ± 12.5)	(129 ± 22.3)	(589 ± 23.1)	(700 ± 79.9)
	Number of colonies / plate	970	981	1008	243	223	213	1423	1378	1280	259	263	258	184	179	194	(986 ± 19.6)	(226 ± 15.3)	(1360 ± 73.1)	(260 ± 2.6)	(186 ± 7.6)

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene
 **: Purity was 99.9% and water (0.03%) was contained as impurity.

Table 3. Results of reverse mutation test (II) of 1,3-dicyanobenzene ** 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	91	104	88	8	22	18	32	29	26	10	22	16	12	10	8
		(94 \pm 8.5)			(16 \pm 7.2)			(29 \pm 3.0)			(16 \pm 6.0)			(10 \pm 2.0)		
	313	77	110	90	15	7	17	26	36	29	24	24	28	7	3	9
		(92 \pm 16.6)			(13 \pm 5.3)			(30 \pm 5.1)			(25 \pm 2.3)			(6 \pm 3.1)		
	625	91	94	79	14	19	10	31	27	28	24	33	18	13	14	10
		(88 \pm 7.9)			(14 \pm 4.5)			(29 \pm 2.1)			(25 \pm 7.5)			(12 \pm 2.1)		
	1250	111	96	81	15	13	9	34	45	32	24	18	27	4	8	7
		(96 \pm 15.0)			(12 \pm 3.1)			(37 \pm 7.0)			(23 \pm 4.6)			(6 \pm 2.1)		
2500	101	98	99	12	10	12	15	26	29	18	22	29	2	3	12	
	(99 \pm 1.5)			(11 \pm 1.2)			(23 \pm 7.4)			(23 \pm 5.6)			(6 \pm 5.5)			
5000	81	84	84	16	19	15	18	25	19	31	15	14	14	8	7	
	(83 \pm 1.7)			(17 \pm 2.1)			(21 \pm 3.8)			(20 \pm 9.5)			(10 \pm 3.8)			
S9mix (+)	0	130	127	118	10	18	15	27	19	24	40	36	31	21	21	18
		(125 \pm 6.2)			(14 \pm 4.0)			(23 \pm 4.0)			(36 \pm 4.5)			(20 \pm 1.7)		
	313	106	99	110	10	12	14	25	34	31	49	34	26	8	7	15
		(105 \pm 5.6)			(12 \pm 2.0)			(30 \pm 4.6)			(36 \pm 11.7)			(10 \pm 4.4)		
	625	117	128	94	18	15	13	25	30	34	29	46	39	14	15	12
		(113 \pm 17.3)			(15 \pm 2.5)			(30 \pm 4.5)			(38 \pm 8.5)			(14 \pm 1.5)		
	1250	100	145	122	13	16	14	29	49	34	36	45	38	16	16	14
		(122 \pm 22.5)			(14 \pm 1.5)			(37 \pm 10.4)			(40 \pm 4.7)			(15 \pm 1.2)		
2500	93	116	121	13	11	11	39	37	25	39	31	46	12	18	8	
	(110 \pm 14.9)			(12 \pm 1.2)			(34 \pm 7.6)			(39 \pm 7.5)			(13 \pm 5.0)			
5000 #	94	88	97	16	9	14	36	30	26	29	31	42	12	11	13	
	(93 \pm 4.6)			(13 \pm 3.6)			(31 \pm 5.0)			(34 \pm 7.0)			(12 \pm 1.0)			
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose (μg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
S9 mix (-)	Number of colonies / plate	506	526	513	207	224	235	128	132	124	671	676	705	890	726	734
		(515 \pm 10.1)			(222 \pm 14.1)			(128 \pm 4.0)			(684 \pm 18.4)			(783 \pm 92.5)		
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose (μg /plate)	1			2			10			0.5			2		
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	1164	1206	1145	254	288	268	913	869	854	372	303	455	163	180	169
		(1172 \pm 31.2)			(270 \pm 17.1)			(879 \pm 30.7)			(377 \pm 76.1)			(171 \pm 8.6)		

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

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

** : Purity was 99.9% and water (0.03%) was contained as impurity.