1，4－ジクロロ－2－ニトロベンゼンの
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 …… 7

参　考　文　献 …… 9

Tables　　1～3

【要　　約】

1,4-ジクロロ-2-ニトロ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を、50～5000 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ の用量で行ったところ、抗菌性が認められたことから、本試験は最低用量を 39.06～156.3 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ、最高用量を 1250～5000 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ として実施した。

その結果、2回行った本試験において、TA100 の直接法と代謝活性化法および TA1535 の直接法で、溶媒対照値の2倍以上となる変異コロニー数の増加が認められたことから、1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼンは、用いた試験系において変異原性を有する（陽性）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-ジクロロ-2-ニトロベンゼンについて、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-ジクロロ-2-ニトロベンゼン（CAS No. 89-61-2、以下ＤＣＮと略）は、分子量192.0 の白黄色固体である。純度 99.5%以上のもの（ロット番号：　　不純物としてジクロロニトロベンゼンの異性体 0.5%以下を含む　　）を

から供与された。被験物質は、使用時まで冷暗所で保管した。

ＤＣＮをジメチルスルホキシド（DMSO、和光純薬工業㈱、ロット番号：APQ5928 および APJ3434）に溶解して最高濃度の調製液を調製した後、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、DMSO 溶液中での安定性試験を低濃度（0.7813 mg/mℓ）および高濃度（50 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、98.9および 99.6%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、0.7813 mg/mℓ 溶液の含量は既定濃度に対し、105～107%、50 mg/mℓ 溶液は、96.9～99.5%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、ＤＣＮ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（用量設定試験においてはロット番号：DJ020GI、1993年7月6日製造、本試験においては、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	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
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（1mℓ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 および RAA-304、1993年8月27日および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2mℓ、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。ＤＣＮについて、50～5000 μg/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、TA100 および TA1537 の直接法と、すべての検定菌の代謝活性化法において、1500 以上または 5000 μg/プレート の用量群で抗菌性が認められた。

この結果から、本試験における最高用量を 2500 または 5000 μg/プレート とした。しかし、１回目の本試験では TA1535 の直接法、TA98 の代謝活性化法および TA1537 の直接法と代謝活性化法において、抗菌性のない用量が４用量に達しなかったため、用量を下げて再度試験を行った。その結果においても、TA1535 と TA1537 の直接法では抗菌性のない用量が４用量に達しなかったため、さらに用量を下げて試験を行った。

〔本試験〕

結果を Table 2 、 3 に示した。最高用量を１回目の本試験では 1250～5000 μg/プレート、２回目の本試験では 2500～5000 μg/プレート とし、公比２で６用量を設定して、試験を行った。TA100 では直接法、代謝活性化法とも２回の試験を通して、用量に依存した変異コロニー数の増加が認められた。すなわち、直接法では 78.13 μg/プレート 以上、代謝活性化法では 156.3 μg/プレート 以上の用量群で陰性対照値の２倍以上となった。TA1535 の直接法では１回目の本試験で 312.5 μg/プレート 以上、２回目の本試験では 2500 μg/プレート の用量群で変異コロニー数が陰性対照値の２倍以上となった。TA98 の直接法と TA1537 の代謝活性化法では、２回目の本試験でのみ変異コロニー数が陰性対照値の２倍以上となる用量群が認められた。その他では、変異コロニー数の増加は認められなかった。抗菌性は、２回目の本試験における WP2 *uvr*A の直接法を除くと、すべての検定菌の直接法と代謝活性化法において、高用量の１～２用量で認められた。

ＤＣＮ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。また、１回目の本試験においては、直接法の 1250 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ 以上の用量群で沈澱が認められた。

以上の結果に基づき、ＤＣＮは、用いた試験系において変異原性を有する（陽性）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-Dichloro-2-nitrobenzene** 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	99 99 127 (108 ± 16.2)	9 5 13 (9 ± 4.0)	20 13 20 (18 ± 4.0)	18 21 19 (19 ± 1.5)	12 5 12 (10 ± 4.0)	
	50	189	15	8	21	7	
	150	358	15	17	31	6	
	500	619	22	13	40	17	
	1500	811 *	22	15	64	5	
	5000	760 *	17	9	48	9 *	
S9Mix (+)	0	101 115 105 (107 ± 7.2)	14 10 9 (11 ± 2.6)	27 21 14 (21 ± 6.5)	31 23 28 (27 ± 4.0)	15 10 9 (11 ± 3.2)	
	50	244	16	35	40	16	
	150	259	20	20	46	14	
	500	639	20	20	42	13	
	1500	867 *	19 *	8	44	7	
	5000	0 *	0 *	8 *	0 *	0 *	
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	590 536 564 (563 ± 27.0)	167 154 163 (161 ± 6.7)	189 153 166 (169 ± 18.2)	673 682 742 (699 ± 37.5)	1214 1231 1482 (1309 ± 150.1)	
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate	375 377 386 (379 ± 5.9)	215 226 201 (214 ± 12.5)	979 852 1087 (973 ± 117.6)	156 141 149 (149 ± 7.5)	212 230 210 (217 ± 11.0)	

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

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

**: Purity was above 99.5 % and isomer of dichloronitrobenzene was contained as impurity.

Table 2. Results of reverse mutation test (I) of 1, 4-Dichloro-2-nitrobenzene** 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	114 106 116 (112 ± 5.3)	7 8 8 (8 ± 0.6)	29 24 18 (24 ± 5.5)	38 34 18 (30 ± 10.6)	3 10 7 (7 ± 3.5)	
	39.06	ND	18 9 11 (13 ± 4.7)	ND	ND	11 8 5 (8 ± 3.0)	
	78.13	240 254 232 (242 ± 11.1)	10 16 19 (15 ± 4.6)	ND	ND	9 5 4 (6 ± 2.6)	
	156.3	292 372 381 (348 ± 49.0)	11 11 11 (11 ± 0.0)	18 22 18 (19 ± 2.3)	27 21 26 (25 ± 3.2)	9 8 8 (8 ± 0.6)	
	312.5	573 555 545 (558 ± 14.2)	22 18 18 (19 ± 2.3)	20 19 17 (19 ± 1.5)	30 32 27 (30 ± 2.5)	9 4 8 (7 ± 2.6)	
	625	664 720 700 (695 ± 28.4)	21 * 17 * 17 * (18 ± 2.3)	12 21 14 (16 ± 4.7)	19 22 32 (24 ± 6.8)	7 * 10 * 6 * (8 ± 2.1)	
	1250 #	395 * 539 * 662 * (532 ± 133.6)	16 * 30 * 15 * (20 ± 8.4)	11 21 15 (16 ± 5.0)	30 18 31 (26 ± 7.2)	1 * 0 * 0 * (0 ± 0.6)	
	2500 #	591 * 354 * 527 * (491 ± 122.6)		11 7 14 (11 ± 3.5)	32 * 30 * 50 * (37 ± 11.0)		
	5000 #			14 * 11 * 12 * (12 ± 1.5)	28 * 28 * 26 * (27 ± 1.2)		
S9Mix (+)	0	113 124 95 (111 ± 14.6)	8 8 7 (8 ± 0.6)	19 25 26 (23 ± 3.8)	28 31 30 (30 ± 1.5)	8 11 9 (9 ± 1.5)	
	78.13	208 231 186 (208 ± 22.5)	6 10 9 (8 ± 2.1)	ND	48 33 34 (38 ± 8.4)	12 12 9 (11 ± 1.7)	
	156.3	240 254 240 (245 ± 8.1)	13 14 7 (11 ± 3.8)	18 21 10 (16 ± 5.7)	28 34 27 (30 ± 3.8)	13 9 12 (11 ± 2.1)	
	312.5	329 380 286 (332 ± 47.1)	9 11 11 (10 ± 1.2)	14 18 15 (16 ± 2.1)	27 43 35 (35 ± 8.0)	6 6 11 (8 ± 2.9)	
	625	438 415 460 (438 ± 22.5)	6 6 14 (9 ± 4.6)	14 11 25 (17 ± 7.4)	37 37 39 (38 ± 1.2)	9 15 12 (12 ± 3.0)	
	1250	623 * 636 * 575 * (611 ± 32.1)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	15 27 14 (19 ± 7.2)	34 * 24 * 30 * (29 ± 5.0)	6 * 11 * 8 * (8 ± 2.5)	
	2500	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	10 * 10 * 13 * (11 ± 1.7)	7 * 6 * 2 * (5 ± 2.6)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	
	5000			9 * 14 * 4 * (9 ± 5.0)			
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	419 433 451 (434 ± 16.0)	371 358 316 (348 ± 28.7)	118 133 101 (117 ± 16.0)	734 663 717 (705 ± 37.1)	2417 2199 2136 (2251 ± 147.5)	
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate	925 804 994 (908 ± 96.2)	303 289 279 (290 ± 12.1)	1298 1222 1416 (1312 ± 97.8)	248 272 185 (235 ± 44.9)	201 222 215 (213 ± 10.7)	

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

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria. #: Precipitant was observed on the surface of agar plates.

ND: Not done **: Purity was above 99.5 % and isomer of dichloronitrobenzene was contained as impurity.

Table 3. Results of reverse mutation test (II) of 1, 4-Dichloro-2-nitrobenzene** 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	108 92 101 (100 ± 8.0)	9 7 9 (8 ± 1.2)	14 18 17 (16 ± 2.1)	17 19 19 (18 ± 1.2)	7 6 6 (6 ± 0.6)
	78.13	245 235 197 (226 ± 25.3)	18 9 6 (11 ± 6.2)	ND	ND	6 5 10 (7 ± 2.6)
	156.3	346 324 336 (335 ± 11.0)	14 9 15 (13 ± 3.2)	18 18 18 (18 ± 0.0)	22 33 26 (27 ± 5.6)	4 4 12 (7 ± 4.6)
	312.5	635 531 536 (567 ± 58.7)	12 10 12 (11 ± 1.2)	21 21 18 (20 ± 1.7)	43 32 59 (45 ± 13.6)	8 4 10 (7 ± 3.1)
	625	761 709 719 (730 ± 27.6)	13 18 12 (14 ± 3.2)	15 12 20 (16 ± 4.0)	47 34 48 (43 ± 7.8)	7 8 8 (8 ± 0.6)
	1250	720 816 800 (779 ± 51.4)	11 * 13 * 19 * (14 ± 4.2)	13 11 16 (13 ± 2.5)	37 44 38 (40 ± 3.8)	3 * 7 * 8 * (6 ± 2.6)
	2500	659 * 686 * 737 * (694 ± 39.6)	14 * 14 * 19 * (16 ± 2.9)	17 18 12 (16 ± 3.2)	48 35 42 (42 ± 6.5)	8 * 6 * 6 * (7 ± 1.2)
	5000			19 22 16 (19 ± 3.0)	45 * 48 * 33 * (42 ± 7.9)	
S9Mix (+)	0	140 109 113 (121 ± 16.9)	9 11 18 (13 ± 4.7)	12 17 17 (15 ± 2.9)	20 29 26 (25 ± 4.6)	9 6 7 (7 ± 1.5)
	78.13	229 212 203 (215 ± 13.2)	11 19 11 (14 ± 4.6)	ND	43 34 33 (37 ± 5.5)	13 16 14 (14 ± 1.5)
	156.3	270 267 301 (279 ± 18.8)	8 19 16 (14 ± 5.7)	26 17 28 (24 ± 5.9)	32 26 29 (29 ± 3.0)	15 10 12 (12 ± 2.5)
	312.5	396 342 413 (384 ± 37.1)	16 9 11 (12 ± 3.6)	25 21 19 (22 ± 3.1)	34 26 39 (33 ± 6.6)	8 8 13 (10 ± 2.9)
	625	536 546 554 (545 ± 9.0)	15 12 19 (15 ± 3.5)	21 16 20 (19 ± 2.6)	23 33 26 (27 ± 5.1)	15 8 11 (11 ± 3.5)
	1250	697 686 611 (665 ± 46.8)	12 * 13 * 12 * (12 ± 0.6)	14 18 15 (16 ± 2.1)	21 * 19 * 42 * (27 ± 12.7)	5 * 7 * 11 * (8 ± 3.1)
	2500	35 * 49 * 89 * (58 ± 28.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	8 * 13 * 15 * (12 ± 3.6)	9 * 3 * 6 * (6 ± 3.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)
	5000			3 * 5 * 5 * (4 ± 1.2)		
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	357 322 366 (348 ± 23.2)	212 225 228 (222 ± 8.5)	115 140 149 (135 ± 17.6)	593 624 696 (638 ± 52.8)	1103 1060 993 (1052 ± 55.4)
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2
	Number of colonies / plate	898 784 873 (852 ± 59.9)	343 337 291 (324 ± 28.4)	1136 1229 1281 (1215 ± 73.5)	371 384 400 (385 ± 14.5)	226 254 253 (244 ± 15.9)

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

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria. ND: Not done

**: Purity was above 99.5 % and isomer of dichloronitrobenzene was contained as impurity.