

Table 9 Summary of histopathological findings in rats treated orally with 1,4-dicyanobenzene in the 28-day repeated dose toxicity test - Administration period -

Item	(Grade) <sup>a)</sup>	Male					Female				
		1,4-dicyanobenzene (mg/kg)					1,4-dicyanobenzene (mg/kg)				
		0	1.25	5	20	80	0	1.25	5	20	80
No. of animals examined		7	7	7	7	7	7	7	7	7	
Organ : Findings											
Liver : Centrilobular hypertrophy of hepatocytes	(+)	0 <sup>b)</sup>	0	0	0	5	0	0	0	0	
Kidney (right/left)											
: Hyaline droplets deposition in tubular epithelium, mainly proximal tubules	(+)	1	0	5	4	0	0	0	0	0	
	(++)	0	0	0	3	5	0	0	0	0	
	(+++)	0	0	0	0	2	0	0	0	0	
Dilation of tubules, mainly distal tubules	(+)	0	0	0	0	2	0	0	0	0	
Atrophy of tubular epithelium, mainly distal tubules	(+)	0	0	0	0	2	0	0	0	0	
Spleen : Atrophy of lymph follicles	(+)	0	0	0	0	2	0	0	0	0	
Thyroids : Irregularity in shape of follicles	(+)	0	0	0	0	3	0	0	0	0	
Decrease in colloid	(+)	0	0	0	0	1	3	0	0	0	

a: + = slight change, ++ = moderate change and +++ = severe change.

b: Values are no. of animals with findings.

Table 10 Summary of histopathological findings in rats treated orally with 1,4-dicyanobenzene in the 28-day repeated dose toxicity test - Recovery period -

Item	(Grade) <sup>a)</sup>	Male		Female	
		1,4-dicyanobenzene (mg/kg)		1,4-dicyanobenzene (mg/kg)	
		0	80	0	80
No. of animals examined		7	7	7	7
Organ : Findings					
Kidney (right/left)					
: Hyaline droplets deposition in tubular epithelium, mainly proximal tubules	(+)	1 <sup>b)</sup>	4	0	0
: Focal regeneration of tubular epithelium	(+)	1	5	0	0

a: + = slight change.

b: Values are no. of animals with findings.

り甲状腺ホルモンレベルが低下し、TSHの作用によって甲状腺の機能が亢進し、二次的に増生性の変化が生じたもの<sup>3)</sup>と考えられた。

腎臓に対する影響として、肉眼的に褪色が5 mg/kg以上の群の雄で認められた。組織学的には近位尿細管を主とする尿細管上皮の硝子滴沈着が認められ、その出現例数は5 mg/kg以上の群で対照群よりも多く、程度は用量相関的に重くなる傾向が認められた。また、14日間の休業により80 mg/kg群でみられた硝子滴は自然発生と同じ程度にまで回復したものの、尿細管上皮に限局性の再生像が対照群よりも多数例に認められた。薬物がライソソーム内に蓄積したりライソソーム酵素を阻害することにより

尿細管上皮への硝子滴の蓄積が生じるといわれている<sup>2)</sup>が、1,4-ジシアノベンゼンも同様の機序により腎臓に障害を与えたと考えられた。腎機能の低下を示唆する所見としては、尿比重の低下、尿中電解質の減少、血中のカルシウムの増加および無機リンの減少などが80 mg/kg群の雌雄で、血中のクロールの減少が20 mg/kg以上の群の雄および80 mg/kg群の雌で認められた。このうち、カルシウムの変動については、大量の甲状腺ホルモン投与によって骨組織中の蛋白質の異化が促進され、血中のカルシウムが増加すること<sup>4)</sup>から、1,4-ジシアノベンゼンの甲状腺への影響との関連も考えられた。なお、雌では血中尿素窒素の減少が5 mg/kg以上の群で、血中クレアチニン

の減少が80 mg/kg群で認められたが、いずれも背景データ範囲内のわずかな変動であることから、1,4-ジシアノベンゼン投与との関連はないと考えられた。

その他に、網状赤血球数の上昇が80 mg/kg群の雌で認められ、1,4-ジシアノベンゼン投与により赤血球の生成亢進状態であったことが示唆されたが、赤血球数には変化は認められなかった。また、分節好中球率の上昇が80 mg/kg群の雄で認められた。同変化は100 mg/kgの14日間投与でも認められており、1,4-ジシアノベンゼン投与による影響と考えられたが、その機序については不明であった。前述以外の器官では、脾臓に重量の減少およびリンパ球の萎縮、胸腺に重量の減少、副腎に体重重量比の上昇が80 mg/kg群で認められ、体重増加抑制が同群で認められていることを考慮すると、これらの変化は1,4-ジシアノベンゼン投与による全身的な影響を示唆するものと考えられた。また、5および80 mg/kg群の雄で頸部皮膚に潰瘍や水腫などが認められたが、投与操作時に被験物質が付着したため生じた1,4-ジシアノベンゼンの刺激に対する反応性の変化と考えられた。なお、単回投与試験では500 mg/kg以上の群で1,4-ジシアノベンゼンの刺激による変化が前胃に認められたが、本試験では80 mg/kgの28日間反復投与でも異常は認められなかった。

上述の変化はその多くが14日間の休薬により消失し、回復傾向はあるものと考えられた。以上、雄では5 mg/kg群で腎臓の褪色および尿細管上皮の硝子滴沈着が、雌では20 mg/kg群で血中トリグリセリドの増加が認められたことから、本試験条件下における1,4-ジシアノベンゼン投与による無影響量(NOEL)は雄で1.25 mg/kg/day、雌で5 mg/kg/dayであると考えられた。

#### 参考文献

- 1) 長瀬すみら, "実験動物の臨床生化学データー病理組織像との関連," ソフトサイエンス社, 東京, 1976, pp. 345-352.
- 2) J.R. Glaister, "Principles of Toxicological Pathology," Taylor & Francis, London, 1986. [高橋道人監訳, "毒性病理学の基礎", ソフトサイエンス社, 東京, 1992, p. 260]
- 3) S. Hosokawa et al., *J. Toxicol. Sci.*, 17, 155-166 (1992).
- 4) 中野 昭一ら, "主要疾患の病態生理," 南山堂, 東京, 1981, pp. 337-338.

#### 連絡先

試験責任者: 八幡 昭子  
 試験担当者: 山田 高士, 長谷 淳一,  
 小林 裕幸  
 運営管理者: 井本 精一  
 (株)化合物安全性研究所  
 〒004 北海道札幌市豊平区真栄363番24号  
 Tel 011-885-5031 Fax 011-885-5313

#### Correspondence

Authors: Akiko Yahata (Study director)  
 Takashi Yamada, Jun-ichi Nagaya,  
 Hiroyuki Kobayashi,  
 Seiichi Imoto (Management)  
 Safety Research Institute for Chemical  
 Compounds Co., Ltd.  
 363-24 Shin-ei, Toyohira-ku, Sapporo, Hokkaido, 004,  
 Japan  
 Tel +81-11-885-5031 Fax +81-11-885-5313

# 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

## Reverse Mutation Test of 1,4-Dicyanobenzene on Bacteria

### 要約

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。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537<sup>1)</sup> および *Escherichia coli* WP2 *uvrA*<sup>2)</sup> を用い、S9 Mix 無添加および添加試験のいずれも、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ため、本試験では S9 Mix 無添加および添加試験ともに 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、いずれの用量でも溶媒対照の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。

### 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B.N. Ames 博士から分与を受けた。*E. coli* WP2 *uvrA* 株は1979年5月9日に国立遺伝学研究所の賀田恒夫博士から分与を受けた。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)は、分子量128.14の白色結晶である。純度99%以上のもの(ロット番号: 930825, 不純物不明(1%未満), 昭和電工(株)製造)を(社)日本化学工業協会から供与された。被験物質は、使用時まで室温遮光で保管した。

1,4-ジシアノベンゼンは、ジメチルスルホキシド(以下DMSOと略, 和光純薬工業(株))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。

1,4-ジシアノベンゼンの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。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。その結果、1,4-ジシアノベンゼンは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 : フリルフラマイド (上野製薬(株))  
SA : アジ化ナトリウム (和光純薬工業(株))  
9AA : 9-アミノアクリジン (Sigma Chem. Co.)  
2AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬工業(株))

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 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) バクトアガー (Difco)	0.6%
塩化ナトリウム	0.5%
(B) * L-ヒスチジン	0.5 mM
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)製の最少寒天培地を用いた。なお、培地1リットル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
リン酸水素二カリウム	10 g
リン酸一アンモニウム	1.92 g
バクトアガー (Difco)	15 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
NADPH	4 μmol
グルコース-6-リン酸	5 μmol
塩化マグネシウム	8 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

\*\* : 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))を用いた。

〔試験方法〕

プレート法を用いて, S9 Mix 無添加および添加条件下で試験を行った。

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 を混和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 1~2 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。

〔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 無添加あるいは添加試験において, 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〕

1,4-ジシアノベンゼンについて, 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, 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, S9 Mix 無添加および添加試験ともに, 5000 μg/プレートとすることとした。

〔本試験〕

結果を Table 1, 2 に示した。1,4-ジシアノベンゼンについて, すべての検定菌において, S9 Mix 無添加および添加試験ともに 312.5~5000 μg/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 S9 Mix 無添加および添加試験のいずれにお

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。

なお, 最高用量の 5000 μg/プレート群において S9 Mix 無添加および添加試験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。

以上の結果に基づき, 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もの(陰性)と判定した。

文献

- 1) D.M. Maron, B.N. Ames, *Mutation Research*, 113, 173-215 (1983).
- 2) M.H.L. Green, in "Handbook of Mutagenicity Test Procedures." B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel, (eds.) Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, pp. 161-187.

連絡先

試験責任者: 澁谷 徹  
 試験担当者: 堀谷尚古, 坂本京子, 原 巧,  
 川上久美子, 松木容彦,  
 飯田さやか, 中込まどか  
 (財)食品薬品安全センター 秦野研究所  
 〒257 神奈川県秦野市落合 729-5  
 Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors : Tohru Shibuya (Study Director)  
 Naoko Horiya, Kyoko Sakamoto,  
 Takumi Hara, Kumiko Kawakami,  
 Yasuhiko Matsuki,  
 Sayaka Iida and Madoka Nakagomi  
 Hatano Research Institute, Food and Drug Safety  
 Center  
 729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa 257, Japan  
 Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Results of reverse mutation test ( I ) of 1,4-Dicyanobenzene\*\* on bacteria

With (+) or without (-)	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			WP2 <i>uvr</i> A			TA98			TA1537		
S9 Mix (-)	0	104	89	106	12	26	11	20	18	19	20	16	23	8	8	7
		( 100 $\pm$ 9.3 )			( 16 $\pm$ 8.4 )			( 19 $\pm$ 1.0 )			( 20 $\pm$ 3.5 )			( 8 $\pm$ 0.6 )		
	312.5	111	103	94	12	14	9	16	19	27	20	20	22	7	4	3
		( 103 $\pm$ 8.5 )			( 12 $\pm$ 2.5 )			( 21 $\pm$ 5.7 )			( 21 $\pm$ 1.2 )			( 5 $\pm$ 2.1 )		
	625	84	107	114	10	17	7	20	24	18	19	18	18	4	4	6
		( 102 $\pm$ 15.7 )			( 11 $\pm$ 5.1 )			( 21 $\pm$ 3.1 )			( 18 $\pm$ 0.6 )			( 5 $\pm$ 1.2 )		
	1250	102	89	86	12	10	4	15	14	18	17	21	19	4	5	4
	( 92 $\pm$ 8.5 )			( 9 $\pm$ 4.2 )			( 16 $\pm$ 2.1 )			( 19 $\pm$ 2.0 )			( 4 $\pm$ 0.6 )			
S9 Mix (+)	2500	83	80	72	14	12	12	27	13	14	16	13	10	2	8	7
		( 78 $\pm$ 5.7 )			( 13 $\pm$ 1.2 )			( 18 $\pm$ 7.8 )			( 13 $\pm$ 3.0 )			( 6 $\pm$ 3.2 )		
	5000 #	88	75	63	17	10	10	12	12	9	18	18	10	2	5	8
	( 75 $\pm$ 12.5 )			( 12 $\pm$ 4.0 )			( 11 $\pm$ 1.7 )			( 15 $\pm$ 4.6 )			( 5 $\pm$ 3.0 )			
S9 Mix (+)	0	124	122	155	8	14	17	27	31	20	35	39	22	6	20	11
		( 134 $\pm$ 18.5 )			( 13 $\pm$ 4.6 )			( 26 $\pm$ 5.6 )			( 32 $\pm$ 8.9 )			( 12 $\pm$ 7.1 )		
	312.5	127	118	127	5	18	10	16	30	19	24	28	26	11	12	18
		( 124 $\pm$ 5.2 )			( 11 $\pm$ 6.6 )			( 22 $\pm$ 7.4 )			( 26 $\pm$ 2.0 )			( 14 $\pm$ 3.8 )		
	625	115	121	126	11	13	13	27	28	23	24	27	25	9	12	9
		( 121 $\pm$ 5.5 )			( 12 $\pm$ 1.2 )			( 26 $\pm$ 2.6 )			( 25 $\pm$ 1.5 )			( 10 $\pm$ 1.7 )		
S9 Mix (+)	1250	100	131	116	9	12	14	19	17	21	27	25	35	11	7	8
		( 116 $\pm$ 15.5 )			( 12 $\pm$ 2.5 )			( 19 $\pm$ 2.0 )			( 29 $\pm$ 5.3 )			( 9 $\pm$ 2.1 )		
	2500	89	94	109	11	14	14	17	28	21	22	18	31	10	5	6
	( 97 $\pm$ 10.4 )			( 13 $\pm$ 1.7 )			( 22 $\pm$ 5.6 )			( 24 $\pm$ 6.7 )			( 7 $\pm$ 2.6 )			
S9 Mix (+)	5000 #	126	104	126	7	10	9	23	23	20	29	32	20	11	10	4
		( 119 $\pm$ 12.7 )			( 9 $\pm$ 1.5 )			( 22 $\pm$ 1.7 )			( 27 $\pm$ 6.2 )			( 8 $\pm$ 3.8 )		
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		
Positive control S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	1293	1371	1277	396	338	343	1697	1689	1874	572	540	563	518	397	392
		( 1314 $\pm$ 50.3 )			( 359 $\pm$ 32.1 )			( 1753 $\pm$ 104.6 )			( 558 $\pm$ 16.5 )			( 436 $\pm$ 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 2 Results of reverse mutation test ( II ) of 1,4-Dicyanobenzene\*\* on bacteria

With (+) or without (-)	Test substance dose (µg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate , Mean ± S.D.)														
		Base - pair substitution type									Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvr</i> A			TA98			TA1537		
S9 Mix (-)	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 )			
S9 Mix (+)	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	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose (µg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
S9 Mix (-)	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	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose (µg /plate)	1			2			10			0.5			2		
S9 Mix (+)	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 %.

# 1,4-ジシアノベンゼンの チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

## *In Vitro* Chromosomal Aberration Test of 1,4-Dicyanobenzene on Cultured Chinese Hamster Cells

### 要約

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-ジシアノベンゼンの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響を評価するため、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて試験管内染色体異常試験を実施した。

連続処理(48時間)、短時間処理(6時間)ともに、1.3 mg/ml(約10 mM)の濃度においても50%を越える増殖抑制は認められなかったことから、すべての試験において1.3 mg/mlの濃度を最高処理濃度とした。最高処理濃度の1/2および1/4を、それぞれ中濃度および低濃度として設定した。連続処理では、S9 mix 非存在下における24時間および48時間連続処理後、短時間処理ではS9 mix 存在下および非存在下で6時間処理(18時間の回復時間)後、標本作製し、検鏡することにより染色体異常誘発性を検討した。

CHL/IU細胞を24時間および48時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。短時間処理では、S9 mix 存在下および非存在下で6時間処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

以上の結果より、1,4-ジシアノベンゼンは、上記の試験条件下で、試験管内のCHL/IU細胞に染色体異常を誘発しないと結論した。

### 方法

#### 1. 使用した細胞

リサーチ・リソースバンク(JCRB)から入手(1988年2月、入手時:継代4代、現在12代)したチャイニーズ・ハムスター由来のCHL/IU細胞を、解凍後継代10代以内で試験に用いた。

#### 2. 培養液の調製

培養には、牛胎児血清(FCS: JRH BIOSCIENCES)を10%添加したイーグルMEM(日水製薬(株))培養液を用いた。

#### 3. 培養条件

$2 \times 10^4$ 個のCHL/IU細胞を、培養液5 mlを入れたディッシュ(径6 cm, Corning)に播き、37°CのCO<sub>2</sub>インキュベ-

ーター(5% CO<sub>2</sub>)内で培養した。連続処理では、細胞播種3日目に被験物質を加え、24時間および48時間処理した。また、短時間処理では、細胞播種3日目にS9 mix 存在下および非存在下で6時間処理し、処理終了後新鮮な培養液でさらに18時間培養した。

#### 4. 被験物質

1,4-ジシアノベンゼン(略号: DCB, CAS No.: 623-26-7, ロット番号: 930825, 昭和電工(株)製造, (社)日本化学工業協会提供)は、白色結晶固体で、水に対する溶解度は0.03 wt%, アセトンおよびジメチルスルホキシド(DMSO)に可溶(それぞれ34 wt%未満, および5 wt%以上17 wt%未満), 融点224°C, 沸点284°C, 蒸気圧0.01 mmHg(60°C), 分子式C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>, 分子量128.14, 純度99%以上の物質である。被験物質原体は、室温・遮光保存条件下で1年間は安定であり、媒体中(0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液, 以下0.5% CMC Naと略す)では、3.25~13.0 mg/mlの濃度範囲で4時間は安定であった。

#### 5. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。媒体は0.5% CMC Na(ナカライテスク(株))を用いた。原体を媒体に懸濁して原液を調製し、ついで原液を媒体で順次希釈して所定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液は、すべての試験において培養液の10% (v/v)になるように加えた。染色体異常試験に用いた被験物質調製液の濃度は、許容範囲内(媒体中の平均含量が添加量の85.0~115%)の値であった。なお、濃度の記載について、純度換算は行なわなかった。

#### 6. 細胞増殖抑制試験による処理濃度の決定

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。被験物質のCHL/IU細胞に対する増殖抑制作用は、単層培養細胞密度計(Monocellater™, オリパス光学工業(株))を用いて各群の増殖度を計測し、被験物質処理群の陰性対照群に対する細胞増殖の比をもって指標とした。

その結果、連続処理、短時間処理ともに、処理したすべて濃度範囲で50%を明らかに越える増殖抑制は認められなかった(Fig. 1)。

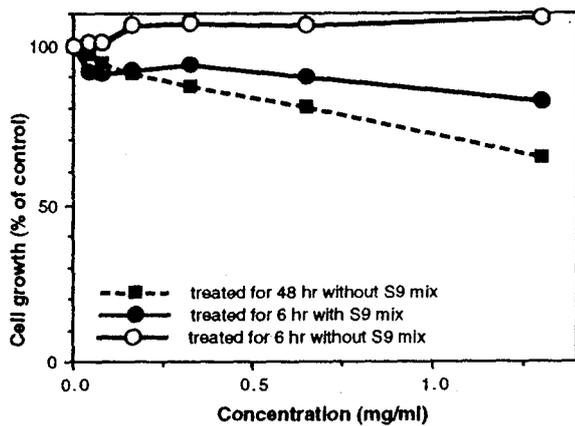


Fig.1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 1,4-dicyanobenzene

7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験で用いる被験物質の高濃度群を、連続処理、短時間処理とも1.3 mg/ml(10 mM相当)とし、それぞれ高濃度群の1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度とした。陽性対照物質として用いたマイトマイシンC(MC, 協和醗酵工業(株))およびシクロホスファミド(CPA, Sigma Chemical Co.)は、注射用水((株)大塚製薬工場)に溶解して調製した。それぞれ染色体異常を誘発することが知られている濃度を適用した。

8. 染色体標本作製法

培養終了の2時間前に、コルセミドを最終濃度が約0.1 µg/mlになるように培養液に加えた。染色体標本の作製は常法に従って行った。スライド標本は、各ディッシュにつき6枚作製した。作製した標本を3%ギムザ液で染色した。

9. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1つのディッシュから得られた異なるスライドを、4名の観察者がそれぞれ処理条件が分からないようにコード化した状態で分析した。染色体の分析は、日本環境変異原学会、哺乳動物試験(MMS)分科会<sup>1)</sup>による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色体型のギャップ、切断、交換などの構造異常の有無と倍数性細胞(polyploid)の有無について観察した。また構造異常については、1群200個、倍数性細胞については1群800個の分裂中期細胞を分析することとした。

10. 記録と判定

無処理対照、陰性および陽性対照群と被験物質処理群についての分析結果は、観察した細胞数、構造異常の種類と数、倍数性細胞の数について集計し、各群の値を記録用紙に記入した。

染色体異常を有する細胞の出現頻度について、フィッシャーの exact probability test 法により、陰性対照群と被験物質処理群間および陰性対照群と陽性対照群間の有意差検定(p<0.05)を行った。

被験物質の染色体異常誘発性についての最終判定は、石館ら<sup>2)</sup>の判定基準に従い、染色体異常を有する細胞の頻度が5%未満を陰性、5%以上10%未満を疑陽性、10%以上を陽性とした。

結果および考察

連続処理による染色体分析の結果を Table 1 に示した。

1,4-ジシアノベンゼンを加えて24時間および48時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発は認められなかった。

短時間処理による染色体分析の結果を Table 2 に示した。

1,4-ジシアノベンゼンを加えて S9 mix 存在下および非存在下で6時間処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

従って、1,4-ジシアノベンゼンは、上記の試験条件下で、試験管内の CHL/IU 細胞に染色体異常を誘発しないと結論した。

文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, "化学物質による染色体異常アトラス," 朝倉書店, 東京, 1988.
- 2) 石館 基 監修, "<改訂>染色体異常試験データ集," エル・アイ・シー社, 東京, 1987.

連絡先

試験責任者: 田中憲穂  
 試験担当者: 山影康次, 若栗 忍, 中川ゆづき,  
 日下部博一, 橋本恵子  
 (財)食品薬品安全センター 秦野研究所  
 〒257神奈川県秦野市落合729-5  
 Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Noriho Tanaka ( Study director )  
 Kohji Yamakage, Shinobu Wakuri,  
 Yuzuki Nakagaw, Hirokazu Kusakabe,  
 Keiko Hashimoto  
 Hatano Research Institute, Food and Drug Safety  
 Center  
 729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa, 257, Japan  
 Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 1,4-dicyanobenzene (DCB)\*\* without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others <sup>3)</sup>	No. of cells with aberrations		Polyploid (%) <sup>4)</sup>	Judgement <sup>5)</sup>	
				gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul <sup>2)</sup>	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control <sup>1)</sup>			200	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1 ( 0.5 )	1 ( 0.5 )	0.25		
Solvent	0	24	200	0	1	0	1	1	1	0	4	0	4 ( 2.0 )	4 ( 2.0 )	0.38		
DCB	0.3	24	200	1	0	2	2	0	0	0	5	0	4 ( 2.0 )	3 ( 1.5 )	0.13	-	-
DCB	0.7	24	200	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1 ( 0.5 )	1 ( 0.5 )	0.00	-	-
DCB	1.3	24	200	0	1	0	0	0	1	0	2	0	2 ( 1.0 )	2 ( 1.0 )	0.13	-	-
MC	0.00005	24	200	4	35	92	5	2	4	0	142	3	85 *( 42.5 )	85 *( 42.5 )	0.38	+	-
Solvent <sup>1)</sup>	0	48	200	1	1	0	0	0	0	0	2	0	2 ( 1.0 )	1 ( 0.5 )	0.00		
DCB	0.3	48	200	0	0	0	0	0	0	10	10	0	1 ( 0.5 )	1 ( 0.5 )	0.50	-	-
DCB	0.7	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0.00	-	-
DCB	1.3	48	200	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1 ( 0.5 )	1 ( 0.5 )	0.13	-	-
MC	0.00005	48	200	5	14	48	4	5	3	0	79	6	57 *( 28.5 )	53 *( 26.5 )	0.13	+	-

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte : chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : acentric fragment (chromatid type), mul : multiple aberrations, TAG : total no. of cells with aberrations, TA : total no. of cells with aberrations except gap, SA : structural aberration, NA : numerical aberration, MC : mitomycin C. 1) 0.5% carboxymethyl cellulose sodium solution was used as solvent. 2) More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987). \* : Significantly different from solvent control at  $p < 0.05$ . \*\* : Purity was more than 99%.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 1,4-dicyanobenzene (DCB)\*\* with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	S9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others <sup>3)</sup>	No. of cells with aberrations		Polyploid (%) <sup>4)</sup>	Judgement <sup>5)</sup>	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul <sup>2)</sup>	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control <sup>1)</sup>				200	0	3	0	0	0	0	0	3	0	2 ( 1.0 )	2 ( 1.0 )	0.00		
Solvent	0	-	6-(18)	200	0	0	2	6	0	0	0	8	1	3 ( 1.5 )	3 ( 1.5 )	0.38		
DCB	0.3	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0.13	-	-
DCB	0.7	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1 ( 0.5 )	1 ( 0.5 )	0.38	-	-
DCB	1.3	-	6-(18)	200	0	1	4	0	0	0	0	5	0	1 ( 0.5 )	1 ( 0.5 )	0.38	-	-
CPA	0.005	-	6-(18)	200	0	3	1	1	0	0	0	5	0	2 ( 1.0 )	2 ( 1.0 )	0.00	-	-
Solvent <sup>1)</sup>	0	+	6-(18)	200	0	0	0	2	1	1	0	4	1	3 ( 1.5 )	3 ( 1.5 )	0.50		
DCB	0.3	+	6-(18)	200	1	0	0	3	0	0	0	4	1	2 ( 1.0 )	1 ( 0.5 )	0.38	-	-
DCB	0.7	+	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1 ( 0.5 )	1 ( 0.5 )	0.75	-	-
DCB	1.3	+	6-(18)	200	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1 ( 0.5 )	1 ( 0.5 )	0.88	-	-
CPA	0.005	+	6-(18)	200	11	80	242	4	1	2	20	360	1	127 *( 63.5 )	125 *( 62.5 )	0.13	+	-

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte : chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : acentric fragment (chromatid type), mul : multiple aberrations, TAG : total no. of cells with aberrations, TA : total no. of cells with aberrations except gap, SA : structural aberration, NA : numerical aberration, CPA : cyclophosphamide. 1) 0.5% carboxymethyl cellulose sodium solution was used as solvent. 2) More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987). \* : Significantly different from solvent control at  $p < 0.05$ . \*\* : Purity was more than 99%.

# 1,3-ビス(アミノメチル)ベンゼンのラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験

## Twenty-eight-day Repeat Dose Oral Toxicity Test of 1,3-Bis(aminomethyl)benzene in Rats

### 要約

エポキシ樹脂硬化剤, X繊維, ポリウレタン, 有機合成などに使用されている既存化学物質1,3-ビス(アミノメチル)ベンゼンの反復投与毒性試験を, SD系[Crj:CD(SD)]ラットを用い, 0(対照), 10, 40, 150および600 mg/kg/day用量の28日間経口投与により実施した. 動物数は1群雌雄各6匹とし, 7群を設け, 5群は投与終了後屠殺群, 2群は対照および600 mg/kgの14日間回復群とした.

10, 40および150 mg/kg群では, 被験物質の投与に起因する変化は認められなかった. 600 mg/kg群では, 流涎, 自発運動の低下, 立毛, 腹部膨満などの症状が雌雄に, 摂餌量の減少および体重増加の抑制が雄に認められ, 雄の1匹および雌の4匹が死亡した. さらに, 胃の前胃部粘膜に潰瘍および角化亢進を伴う上皮の過形成, 骨髓に顆粒球系増血細胞の増加, 副腎に皮質細胞の肥大・空胞化, 盲腸の拡張が雌雄に, 白血球好中球比, 尿タンパクおよび血清無機リンの増加, 血色素量およびヘマトクリット値の減少, プロトロンビン時間の延長, 活性化部分トロンボプラスチン時間の短縮が雄に, トリグリセライドの増加が雌に認められた. 回復群においては, 前胃部粘膜の変化は回復傾向を示し, その他の変化はいずれも回復した.

以上の結果から, 1,3-ビス(アミノメチル)ベンゼンのラットに対する主な反復投与毒性は, 投与経路である胃粘膜に対する障害であった. また, 無影響量は, 150 mg/kg/dayと推定された.

### 方法

#### 1. 被験物質

被験物質1,3-ビス(アミノメチル)ベンゼンは分子量136.22, 融点14°C, 蒸気圧 $1.6 \times 10^{-3}$  mmHg (25°C)の水に溶け易い無色透明の液体で, 三菱瓦斯化学(株)(東京)で製造されたもの(ロット番号30817, 純度99.8%)を入手し, 室温暗所で密栓保管した. 投与液は, 局法精製水(共栄製薬)に溶解して調製し, 使用時まで冷暗条件下で密栓保管した. 被験物質原液および投与液中の被験物質は, 安定であることを確認した.

#### 2. 使用動物および飼育条件

日本チャールス・リバー(株)より搬入したSD系[Crj:CD(SD)]ラットを12~13日間検疫・馴化飼育し, 5週齢(雄

173-188 g, 雌139-162 g)で, 1群雌雄各6匹として試験に用いた. ラットは, 温度 $22 \pm 3^\circ\text{C}$ , 湿度 $55 \pm 10\%$ , 換気回数10回以上/時, 照明12時間(6時~18時)に設定された飼育室で, 金網ケージに個別に収容し, 固型飼料[日本農産工業(株), ラボMRストック]および水を自由摂取させた.

#### 3. 投与量および投与方法

1,3-ビス(アミノメチル)ベンゼンのラットへの単回経口投与における $LD_{50}$ は, 930 mg/kgと報告されている. 投与量設定試験を, ラットを1群雌雄各3匹とし, 0, 30, 80, 200および500 mg/kg用量の14日間経口投与により実施した. 500 mg/kg群で, 摂餌量の減少および体重増加の抑制が雄に認められた. しかし, 一般状態, 剖検所見および主要器官の重量には変化は認められなかった. したがって, 本試験における投与量は, より明らかな毒性影響の発現が予測される600 mg/kgを最高用量とし, 以下150, 40, 10 mg/kgの4用量および対照を設定した. 試験群は, 以上の5群の他に, 600 mg/kgおよび対照の14日間回復群を設けた. 投与は, 胃ゾンデを装着した注射筒を用いて, 投与液を1日1回, 28日間にわたって経口投与した. 対照群には局方精製水を同様に投与した.

#### 4. 観察および検査項目

##### 1) 一般状態観察

投与および回復期間中毎日, 生死および外観, 行動等を観察した.

##### 2) 体重および摂餌量測定

体重は, 投与期間中においては毎日投与直前に, 回復期間中は週1回測定した. 摂餌量は, ケージごとに週1回, 24時間の消費量を測定した.

##### 3) 尿検査

投与25日および投与終了後11日に腰背部を刺激して強制排尿させ, pH, 潜血, タンパク, 糖, ケトン体, ビリルビン, ウロビリノーゲン[以上, マイルス・三共(株), マルティスティックス]および外観を検査した.

##### 4) 血液学検査

供試血液の採取は, 投与期間および回復期間終了翌日における屠殺剖検時に行った. 動物は採血前日の午後5時より除餌し, 水のみを給与した. 採取した血液は3分割し, その一部はEDTA-2Kで凝固防止処理し, 多項目自動

血球計数装置[東亜医用電子(株), E-4000]により, 赤血球数(電気抵抗検出方式), 血色素量(ラウリル硫酸ナトリウム-ヘモグロビン法), ヘマトクリット値(パルス検出方式), 平均赤血球容積, 平均赤血球血色素量, 平均赤血球血色素濃度(以上, 計算値), 白血球数および血小板数(以上, 電気抵抗検出方式)を, また塗抹標本を作製して網状赤血球数(Brilliant cresyl blue染色)および白血球百分率(May-Giemsa染色)を測定した。さらに一部は3.8%クエン酸ナトリウム液で処理して血漿を得, 血液凝固自動測定装置(アメルング社, KC-10A)により, プロトロンビン時間(Quick一段法)および活性化部分トロンボプラスチン時間(エラジン酸活性化法)を測定した。

#### 5) 血液生化学検査

採取した血液の一部から血清を分離し, 生化学自動分析装置[日本電子(株), JCA-VX-1000型クリナライザー]により, 総タンパク(Biuret法), アルブミン(BCG), A/G比(計算値), 血糖, トリグリセライド, 総コレステロール(以上, 酵素法), 総ビリルビン(Jendrassik法), 尿素窒素(Urease-UV法), クレアチニン(Jaffé法), GOT, GPT,  $\gamma$ -GTP(以上, SSCC法), アルカリフォスファターゼ(GSCC法), カルシウム(OCPC法)および無機リン(酵素法)を, 電解質自動分析装置[東亜電波工業(株), NAKL-1]により, ナトリウム, カリウムおよび塩素を測定した。

#### 6) 病理学検査

採血に続いて剖検し, 脳, 肝臓, 腎臓, 副腎および精巣/卵巣を秤量した。病理組織学検査は, 採取した器官を10%中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定後, 対照および600 mg/kg群では心臓, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 副腎, 骨髄, 胃, 腸(十二指腸・空腸・回腸・盲腸・結腸・直腸), 胸腺を, 10, 40, 150 mg/kg群および回復群は600 mg/kg群で変化の認められた副腎, 胃, 骨髄について, 常法に従いパラフィン切片を作製し, ヘマトキシリン・エオジン(H-E)染色を施して鏡検した。

#### 5. 統計処理

得られた平均値あるいは頻度について, DunnettあるいはScheffé(群の大きさが異なる場合)の多重比較検定を行った。ただし, 回復群については, t検定およびU検定を行った。

### 結果

10, 40および150 mg/kg群においては, 全ての観察および検査項目で, 被験物質の投与に起因する変化は認められなかった。

#### 1. 一般状態および死亡

投与期間の概ね後半において, 600 mg/kg群の各12匹中, 流涎が雄10匹, 雌8匹, 自発運動低下が雄3匹, 雌7匹, 立毛が雄1匹, 雌6匹, 腹部膨満が雄1匹に認められ,

雄1匹および雌4匹は死亡(投与15~19日)した。回復期間においては, 異常は認められなかった。

#### 2. 体重(Fig. 1)および摂餌量

投与期間において, 600 mg/kg群の雄の体重は, 投与2日から増加抑制の傾向を示し, 投与の経過につれて対照群との差は拡大する傾向にあり, 4日以降, 7日を除いて, 有意差が認められた。しかし, 回復期間においては, 回復傾向を示した。摂餌量についても, 600 mg/kgの雄は, 投与期間中対照群を下回って推移し, 投与4週では有意に少なかった。回復期間では, 対照群との差は認められなかった。

#### 3. 尿所見

雄の尿タンパクは, 対照群で多くは+(30 mg/dl)であったのに対し, 600 mg/kg群では多くが++(100 mg/dl)となり, 有意に増加した。回復群では, 各検査項目に有意な変化は認められなかった。

#### 4. 血液学所見(Table 1, 2)

有意な血色素量およびヘマトクリット値の減少, プロトロンビン時間の延長, 活性化部分トロンボプラスチン時間の短縮, 白血球百分率における分節核好中球比の増加およびリンパ球比の減少が600 mg/kg群の雄に認められた。600 mg/kg群の雌においても, 統計学的有意差は認められなかったものの, ヘマトクリット値の減少傾向および主に好中球の増加による白血球数の増加傾向が認められた。回復群においては, 各検査項目に有意な変化は認められなかった。

#### 5. 血液生化学所見(Table 3, 4)

有意な総タンパクの減少および無機リンの増加が600 mg/kg群の雄に, トリグリセライドの増加が600 mg/kg群の雌に認められた。回復群においては, これらの変化は認められなかった。しかし, 投与期間終了後屠殺動物でみられた変化とは別に有意な総コレステロールおよびA/G比の増加ならびに塩素の減少が雄に, アルブミンの減少が雌に認められた。

#### 6. 剖検所見

600 mg/kg群で, 前胃部の肥厚および潰瘍, ならびに盲腸の内容物増量による拡張が雌雄全例に, 副腎の肥大が雌の半数に認められた。投与期間中に死亡した600 mg/kg群の雄1匹および雌4匹では, 前胃部に生存例と類似した変化が認められたほか, 腺胃部にも粘膜の赤色化および潰瘍が認められ, 胃および腸はガスが貯留して拡張していた。さらに, 雌では盲腸粘膜に赤色斑, 副腎の赤色化, 胸腺および脾臓の萎縮などを認める例があった。回復群においても, 前胃部壁の肥厚がほぼ全例に認められたが, 投与期間終了後屠殺動物に比べて軽度な変化であった。