

2004年3月22日

1,2-ビス (2-クロロエトキシ) エタンの
細菌を用いる復帰突然変異試験

厚生労働省医薬局審査管理課化学物質安全対策室 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
1. 被験物質 -----	3
2. 陽性対照物質 -----	3
3. 検定菌 -----	3
4. 試験材料 -----	4
5. 被験物質調製液の調製 -----	5
6. 試験操作 -----	5
7. 判定 -----	6
結果および考察 -----	7
1. 用量設定試験 -----	7
2. 本試験 -----	7
参 考 文 献 -----	9
Tables 1～3	
Figures 1、2	

【要 約】

1,2-ビス (2-クロロエトキシ) エタンについて、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施し、陽性の結果を得た。

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、プレインキュベーション法により、S9 mix 無添加および添加条件で試験を行った。

用量設定試験を 50.0～5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の範囲に公比約 3 で 5 用量を設定して行ったところ、S9 mix 無添加および添加条件ともに、いずれの検定菌においても生育阻害は認められなかった。

これらの結果に基づき、すべての検定菌で最高用量を 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ とし、公比 2 で 5 用量 (313～5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$) を設定して 2 回の本試験を行った。その結果、TA1535 においては、S9 mix 無添加および添加条件ともに、陰性対照値の 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加が認められ、その増加には再現性および用量依存性がみられた。TA1535 以外の検定菌においては、S9 mix の添加の有無にかかわらず、陰性対照値の 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。

以上の結果から、1,2-ビス (2-クロロエトキシ) エタンは、用いた試験系において変異原性を有するもの (陽性) と判定した。

【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、1,2-ビス(2-クロロエトキシ)エタンについて、細菌を用いる復帰突然変異試験をプレインキュベーション法¹⁾により実施した。

この試験は、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) 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²⁾、ならびに大腸菌 (*Escherichia coli*) 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³⁾ 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 S9 mix 無添加条件および哺乳動物(ラット)のもつ薬物代謝酵素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 添加条件で行った。

この試験は、「新規化学物質等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、一部改正平成 9 年 10 月 31 日、環保安第 287 号、衛生第 127 号、平成 09・10・31 基局第 2 号) および「OECD 化学物質試験法ガイドライン 471/細菌を用いる復帰突然変異試験」(1997 年 7 月 21 日採択)に基づき、「化学物質 GLP」(平成 12 年 3 月 1 日改正、環保安第 41 号、生衛発第 268 号、平成 12・02・14 基局第 1 号)に準拠して実施した。

【材料および方法】

1. 被験物質

被験物質である 1,2-ビス (2-クロロエトキシ) エタン [英名: 1,2-bis (2-chloroethoxy) ethane、ロット番号: 提供者] は無色透明の液体 (刺激臭をもつ) であり、 から提供を受けた。被験物質の物理化学的性状等を Appendix 1 に示す。被験物質は、使用時まで冷暗所で密閉して保管した。

本ロットは、実験期間中安定であったことが被験物質提供者により確認されている。

2. 陽性対照物質

用いた陽性対照物質および調製法は以下のとおりである。

各検定菌に用いた陽性対照物質は、当研究所で十分な蓄積データが得られている物質および用量とし、それぞれを結果の各 Table 中に示した。

名称	略称	製造者	ロット番号 (購入日)	純度
2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド	AF2	和光純薬工業(株)	CKQ1402 (2001年9月13日)	98%以上
アジ化ナトリウム	SA	和光純薬工業(株)	ELE2329 (2001年5月15日)	98%以上
9-アミノアクリジン	9AA	Sigma Chem. Co.	106F06681 (2001年5月15日)	97%以上
2-アミノアントラセン	2AA	和光純薬工業(株)	DWK5667 (2001年9月13日)	90%以上

AF2、9AA および 2AA はジメチルスルホキシド [DMSO、和光純薬工業(株)、ロット番号: LDQ5170 (用量設定試験) および WAR5208 (本試験 I、II)] に、SA は超純水に溶解し、所定の濃度に調製した後-20℃で凍結保存し、調製後 6 か月以内のものを用時に解凍して用いた。

3. 検定菌

「OECD 化学物質試験法ガイドライン 471/細菌を用いる復帰突然変異試験」のガイドラインに従って、*S. typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *E. coli* WP2 *uvrA* を用いた。

S. typhimurium の4菌株は1997年8月7日に、*E. coli* WP2 *uvrA* 株は1997年4月9日に日本バイオアッセイ研究センターの から分与された。

検定菌は-80℃で凍結保存したものを、特性確認は各菌株の凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、膜変異 (*rfa*)、アンピシリン耐性因子 pKM101 (プラスミド) の有無および陰性対照と陽性対照の変異コロニー数について調べた。

試験に際して、ニュートリエントブロス No. 2 (Unipath Ltd.) 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℃で10時間往復振とう培養したものを試験菌液とした。分光光度計 (株島津製作所、型式: UV-120-02) により 660 nm の吸光度を測定し、試験菌液の増殖を確認した。試験に用いた検定菌の生菌数を段階希釈法により求め、Appendix 2 に示した。

4. 試験材料

1) 合成培地

培地は、極東製薬工業(株)製の最少グルコース寒天培地 (ロット番号: DZA32801、2002年2月8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、径90 mm のシャーレ1枚あたり30 mL を流して固めたものである。

硫酸マグネシウム・7水和物	0.2 g
クエン酸・1水和物	2 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
水酸化ナトリウム	0.66 g
グルコース	20 g
大洋寒天 (清水食品(株))	15 g

2) トップアガー

下記の水溶液 (A) に (B) または (C) を容量比 10:1 の割合で混合した。

(A) バクトアガー (Difco Lab.)	0.6 w/v%
塩化ナトリウム	0.5 w/v%
(B) <i>Salmonella typhimurium</i> 用	
L-ヒスチジン	0.5 mmol/L
D-ビオチン	0.5 mmol/L

(C) *Escherichia coli* 用

L-トリプトファン 0.5 mmol/L

3) S9 mix

S9 mix 1 mL あたりの組成は下記のとおりで、用時氷冷下で混合して調製した。

S9*	0.1 mL
塩化マグネシウム	8 μ mol
塩化カリウム	33 μ mol
グルコース-6-リン酸	5 μ mol
NADH	4 μ mol
NADPH	4 μ mol
ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μ mol

* : 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-460、2002 年 3 月 15 日製造) を購入し、 -80°C で凍結保存し、用時に解凍して用いた。

5. 被験物質調製液の調製

被験物質は、50 mg/mL の濃度で水には溶解しないが、DMSO には溶解することから、試験に際しては、DMSO (和光純薬工業株、ロット番号 : SEF4723 および WAR5208) に溶解して最高用量の調製液を調製した後、同溶媒で順次希釈して、速やかに試験に用いた。調製時に、発熱、発泡、変色等の変化はみられなかった。

6. 試験操作

プレインキュベーション法により、S9 mix 無添加条件および S9 mix 添加条件で試験を行った。

小試験管中に被験物質調製液 0.1 mL、0.1 mol/L ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4) または S9 mix 0.5 mL、試験菌液 0.1 mL を混合し、 37°C で 20 分間プレインキュベーションした後、トッパアガー 2 mL を加えて混和し、合成培地平板上に流して固めた。また、被験物質調製液の代わりに溶媒 0.1 mL または陽性対照物質溶液を加えて、それぞれ陰性対照および

陽性対照とした。陰性および陽性対照の結果については、同時に実施した他試験と共通に用いた。

培養は37℃で48時間行い、発生した復帰変異コロニー数を、コロニーアナライザー（システムサイエンス㈱、CA-11）または目視により算定した。被験物質に由来する沈澱の有無は、肉眼により観察した。また、生育阻害の有無については、肉眼あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌叢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、両対照および各用量につき3枚ずつを用い、それぞれの平均値と標準偏差を求めた。陰性および陽性対照の復帰変異コロニー数の平均値を、それぞれ陰性対照値および陽性対照値とした。陰性および陽性対照の結果については、同時に実施した他試験と共通に用いた。

なお、最高用量の被験物質調製液0.1 mLおよびS9 mix 0.5 mLを、それぞれ合成培地平板上に滴下して、培養終了時に雑菌の混入の有無を調べた。

上記の方法により、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、結果の再現性を確認した。

7. 判定

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌のS9 mix 無添加条件あるいは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復帰変異コロニー数の平均値が、陰性対照値のそれに比べて2倍以上に増加し、その増加に再現性および用量依存性が認められた場合に、本試験系において変異原性を有するもの（陽性）と判定することとした。

【結果および考察】

1. 用量設定試験

上記のガイドラインに従って、50.0～5000 µg/plate の範囲で公比を約 3 とし、5 段階の用量を設定して用量設定試験を行った (Table 1)。その結果、S9 mix 無添加および添加条件ともに、いずれの検定菌においても生育阻害は認められなかった。また、被験物質に由来する沈澱も、S9 mix 無添加および添加条件ともに認められなかった。

以上の結果から、本試験における最高用量をすべての検定菌で 5000 µg/plate とした。

2. 本試験

最高用量を 5000 µg/plate とし、公比 2 で 5 用量 (313～5000 µg/plate) を設定して 2 回の本試験を行った (Table 2,3、Figure 1,2)。その結果、TA1535 において、S9 mix 無添加および添加条件ともに陰性対照値の 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加が認められ、その増加には再現性および用量依存性がみられた。すなわち、1 あるいは 2 回目の本試験において、S9 mix 無添加条件については、2500 あるいは 625 µg/plate 以上の用量で、S9 mix 添加条件については、いずれも 313 µg/plate 以上の用量で陰性対照値の 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加が認められた。TA1535 以外の検定菌においては、S9 mix の添加の有無にかかわらず、陰性対照値の 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。

これらの結果から、1,2-ビス (2-クロロエトキシ) エタンは、TA1535 の S9 mix 無添加条件と S9 mix 添加条件で復帰変異を誘発するものと考えられる。TA1535 に関して、本試験で変異コロニー数が陰性対照値の 2 倍以上となった用量について、変異コロニー数の平均値から陰性対照値を差し引いた値を、用量で除して比活性 (誘発復帰変異コロニー数/mg) を求めた (Appendix 3)。その結果、当被験物質の最大比活性は 60.7 (本試験 I、S9 mix 添加条件の 313 µg/plate) で、同一条件下における陽性対照物質 2AA の値の約 3000 分の 1 であった。

すべての試験において、最高用量の被験物質調製液および S9 mix への雑菌の混入は認められなかった。また、いずれの検定菌においても陽性対照物質の変異原性が検出され、陽

性対照値および陰性対照値は、ともに背景データ (Appendix 4) の変動範囲内 (平均値 \pm 3 \times 標準偏差) であったことから、本試験系の有効性が確認された。

なお、1,2-ビス (2-クロロエトキシ) エタンについては、当研究所で実施したチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験で陽性の⁴⁾結果が得られている。

以上の結果に基づき、1,2-ビス (2-クロロエトキシ) エタンは、用いた試験系において変異原性を有するもの (陽性) と判定した。

【参 考 文 献】

- 1) T. Matsushima, T. Sugimura, M. Nagano, T. Yahagi, A. Shirai, M. Sawamura, "Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens," eds. by K. H. Norpoth, R. C. Garner, Springer, Berlin, 1980, pp. 273-285.
- 2) D. M. Maron, B. N. Ames, *Mutat. Res.*, 113, 173 (1983).
- 3) M. H. L. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," eds. by B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, pp. 161-187.
- 4) 「1,2-ビス (2-クロロエトキシ) エタンのチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験」, 試験計画番号 : G-01-079 (2002) .

Table 1. Cytotoxicity of 1,2-bis(2-chloroethoxy)ethane in 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			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
S9 mix (-)	0	141	134	140	22	22	19	39	38	26	25	27	27	6	8	13
		(138 \pm 4)			(21 \pm 2)			(34 \pm 7)			(26 \pm 1)			(9 \pm 4)		
	50.0	135			20			31			23			14		
	150	129			17			25			21			11		
	500	134			36			36			17			11		
	1500	161			40			38			18			6		
	5000	175			64			31			24			3		
S9 mix (+)	0	171	148	144	19	20	15	42	41	41	45	43	48	22	22	18
		(154 \pm 15)			(18 \pm 3)			(41 \pm 1)			(45 \pm 3)			(21 \pm 2)		
	50.0	145			24			50			45			24		
	150	169			20			42			40			17		
	500	190			34			43			37			25		
	1500	172			52			62			29			19		
	5000	207			88			60			37			15		
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		
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	470	536	497	709	751	755	205	237	226	534	567	571	675	496	646
		(501 \pm 33)			(738 \pm 25)			(223 \pm 16)			(557 \pm 20)			(606 \pm 96)		
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	555	574	564	320	343	378	1009	947	1098	239	264	257	221	252	232
		(564 \pm 10)			(347 \pm 29)			(1018 \pm 76)			(253 \pm 13)			(235 \pm 16)		

The purity of the test substance was 99.7 wt%.

This substance contained 0.1 wt% triglycolmonochloride and 0.2 wt% unspecified as impurities.

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

Table 2. Mutagenicity of 1,2-bis(2-chloroethoxy)ethane in bacteria (I)

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			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
S9 mix (-)	0	109	118	100	17	14	11	28	18	17	23	32	23	5	10	7
		(109 \pm 9)			(14 \pm 3)			(21 \pm 6)			(26 \pm 5)			(7 \pm 3)		
	313	107	106	110	15	21	27	33	21	34	25	21	22	6	4	10
		(108 \pm 2)			(21 \pm 6)			(29 \pm 7)			(23 \pm 2)			(7 \pm 3)		
	625	113	100	118	29	25	25	20	34	26	27	18	32	9	7	3
		(110 \pm 9)			(26 \pm 2)			(27 \pm 7)			(26 \pm 7)			(6 \pm 3)		
	1250	126	100	137	27	32	23	25	26	34	32	22	31	6	11	10
		(121 \pm 19)			(27 \pm 5)			(28 \pm 5)			(28 \pm 6)			(9 \pm 3)		
2500	117	131	141	52	53	54	26	28	24	24	15	28	5	5	5	
	(130 \pm 12)			(53 \pm 1)			(26 \pm 2)			(22 \pm 7)			(5 \pm 0)			
5000	144	174	175	81	74	81	25	34	31	20	18	28	5	9	7	
	(164 \pm 18)			(79 \pm 4)			(30 \pm 5)			(22 \pm 5)			(7 \pm 2)			
S9 mix (+)	0	136	120	107	14	17	15	31	32	36	30	40	37	16	7	18
		(121 \pm 15)			(15 \pm 2)			(33 \pm 3)			(36 \pm 5)			(14 \pm 6)		
	313	159	145	149	40	32	30	31	26	29	32	35	20	11	15	16
		(151 \pm 7)			(34 \pm 5)			(29 \pm 3)			(29 \pm 8)			(14 \pm 3)		
	625	147	158	177	44	41	36	38	31	38	32	30	41	11	15	11
		(161 \pm 15)			(40 \pm 4)			(36 \pm 4)			(34 \pm 6)			(12 \pm 2)		
	1250	183	182	133	47	53	49	43	41	39	33	31	34	13	12	10
	(166 \pm 29)			(50 \pm 3)			(41 \pm 2)			(33 \pm 2)			(12 \pm 2)			
2500	152	169	149	55	78	60	43	36	37	34	38	34	15	12	8	
	(157 \pm 11)			(64 \pm 12)			(39 \pm 4)			(35 \pm 2)			(12 \pm 4)			
5000	189	206	222	90	108	98	57	43	44	28	38	33	15	5	11	
	(206 \pm 17)			(99 \pm 9)			(48 \pm 8)			(33 \pm 5)			(10 \pm 5)			
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	650	755	794	376	406	371	1021	1096	1010	464	467	455	239	261	292
		(733 \pm 74)			(384 \pm 19)			(1042 \pm 47)			(462 \pm 6)			(264 \pm 27)		

The purity of the test substance was 99.7 wt%.

This substance contained 0.1 wt% triglycolmonochloride and 0.2 wt% unspecified as impurities.

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

Table 3. Mutagenicity of 1,2-bis(2-chloroethoxy)ethane in bacteria (II)

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			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
S9 mix (-)	0	106	110	99	9	6	7	27	26	24	27	21	23	3	14	10
		(105 ± 6)	(7 ± 2)	(26 ± 2)	(24 ± 3)	(9 ± 6)										
	313	91	113	108	12	8	10	34	26	31	22	17	34	13	9	5
		(104 ± 12)	(10 ± 2)	(30 ± 4)	(24 ± 9)	(9 ± 4)										
	625	120	115	131	12	17	19	28	25	27	18	27	30	8	5	10
		(122 ± 8)	(16 ± 4)	(27 ± 2)	(25 ± 6)	(8 ± 3)										
	1250	127	133	128	25	29	25	34	36	24	20	21	23	6	9	6
		(129 ± 3)	(26 ± 2)	(31 ± 6)	(21 ± 2)	(7 ± 2)										
2500	120	139	126	47	43	34	31	17	38	31	23	18	6	7	7	
	(128 ± 10)	(41 ± 7)	(29 ± 11)	(24 ± 7)	(7 ± 1)											
5000	161	162	163	61	67	89	30	34	47	30	22	26	9	6	7	
	(162 ± 1)	(72 ± 15)	(37 ± 9)	(26 ± 4)	(7 ± 2)											
S9 mix (+)	0	108	124	128	10	11	8	36	29	41	25	31	23	14	22	16
		(120 ± 11)	(10 ± 2)	(35 ± 6)	(26 ± 4)	(17 ± 4)										
	313	146	134	158	26	22	18	35	50	36	24	38	30	12	12	11
		(146 ± 12)	(22 ± 4)	(40 ± 8)	(31 ± 7)	(12 ± 1)										
	625	161	153	151	32	31	28	37	49	41	22	33	32	13	9	14
		(155 ± 5)	(30 ± 2)	(42 ± 6)	(29 ± 6)	(12 ± 3)										
	1250	164	179	155	46	28	36	58	60	59	34	32	17	12	15	11
	(166 ± 12)	(37 ± 9)	(59 ± 1)	(28 ± 9)	(13 ± 2)											
2500	184	170	183	45	66	71	49	38	54	27	19	39	7	6	17	
	(179 ± 8)	(61 ± 14)	(47 ± 8)	(28 ± 10)	(10 ± 6)											
5000	207	175	179	88	95	89	44	41	57	25	26	24	14	11	14	
	(187 ± 17)	(91 ± 4)	(47 ± 9)	(25 ± 1)	(13 ± 2)											
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	368	331	427	529	642	642	174	201	215	445	522	580	485	487	418
		(375 ± 48)	(604 ± 65)	(197 ± 21)	(516 ± 68)	(463 ± 39)										

The purity of the test substance was 99.7 wt%.

This substance contained 0.1 wt% triglycolmonochloride and 0.2 wt% unspecified as impurities.

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

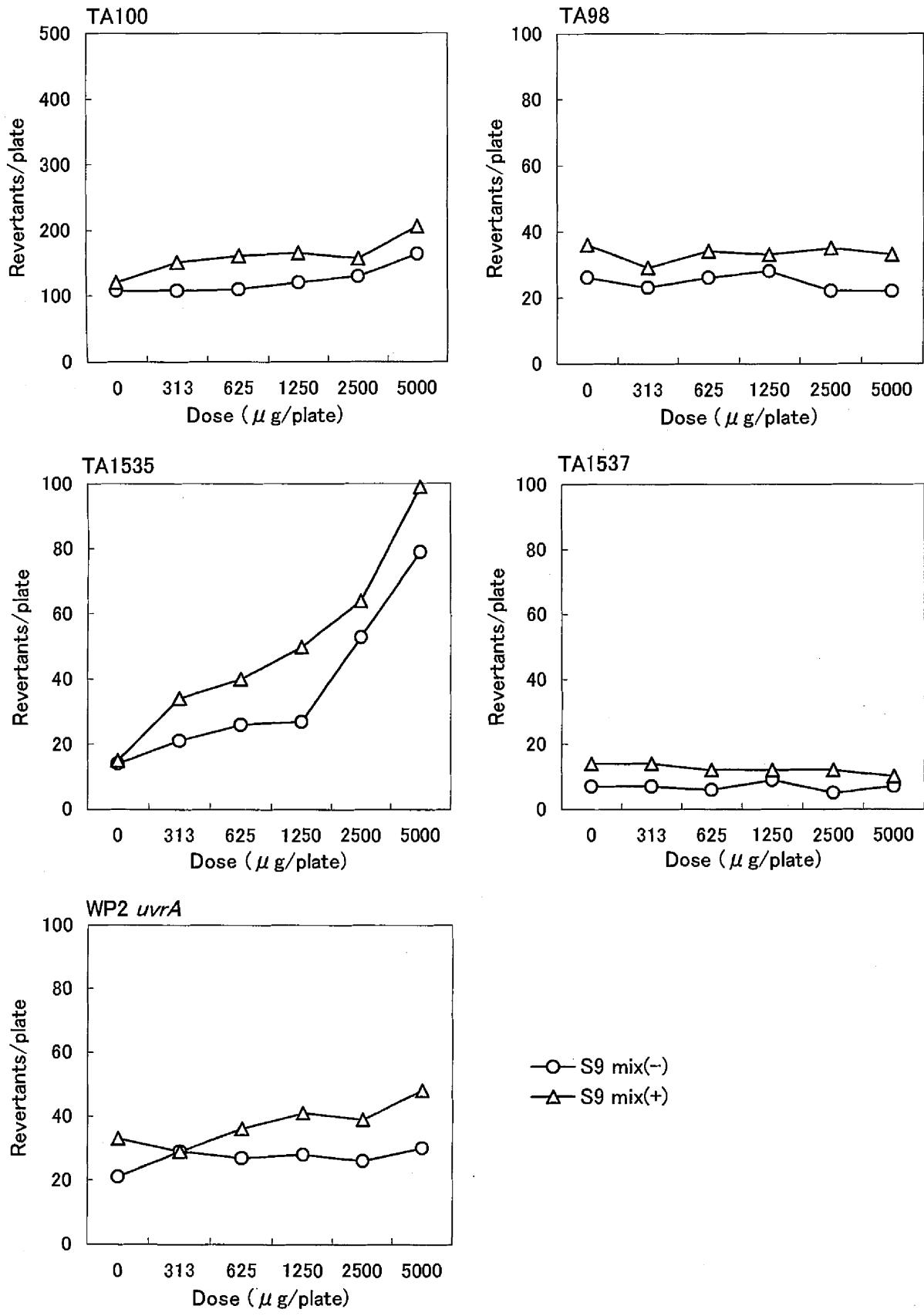


Figure 1. Dose response curves in mutagenicity test (I) of 1,2-bis(2-chloroethoxy)ethane in bacteria

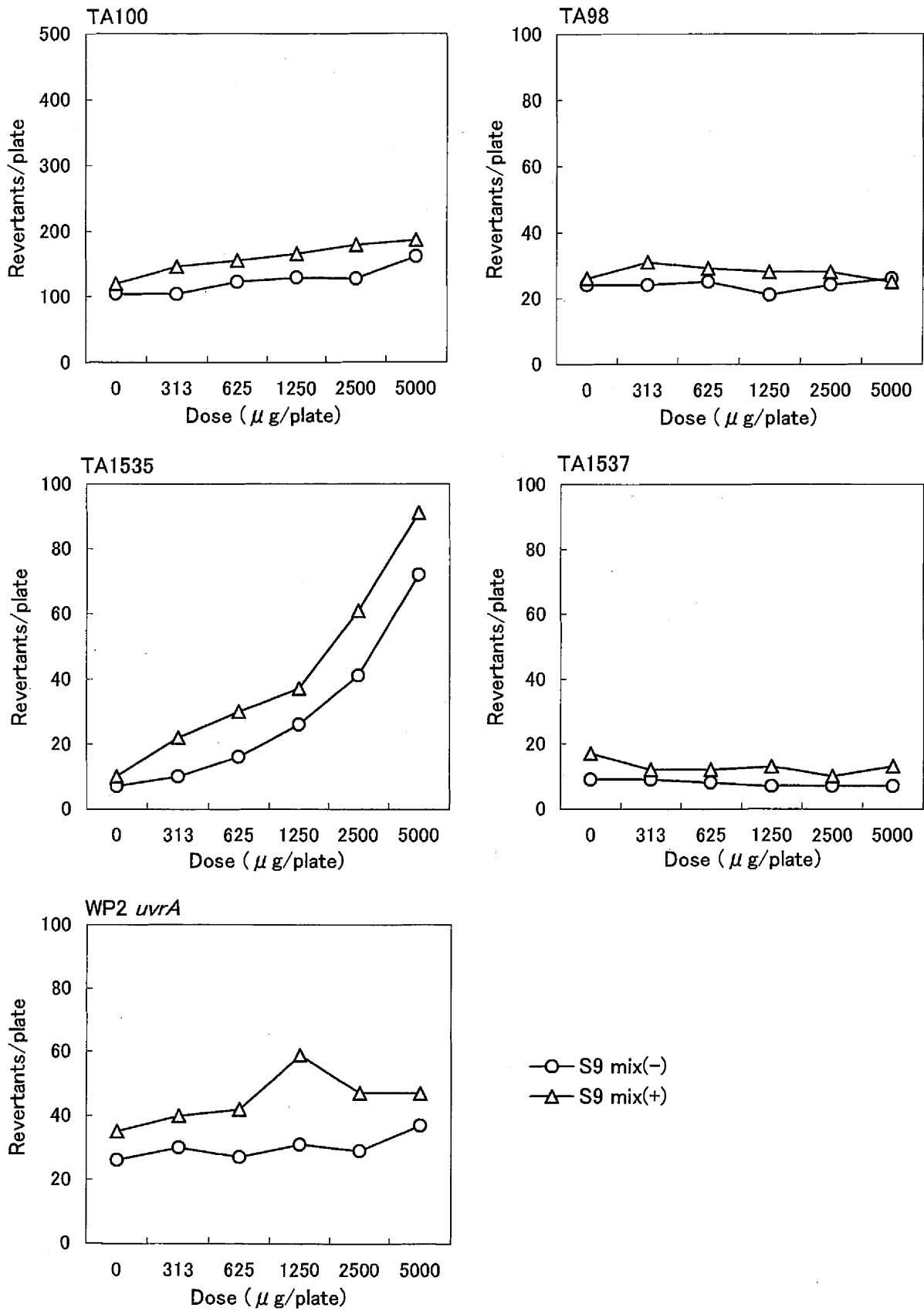


Figure 2. Dose response curves in mutagenicity test (II) of 1,2-bis(2-chloroethoxy)ethane in bacteria