食薬セ研第１０－１６４２号

２０００年１２月　１日

２－メチル－２－プロペンニトリル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

文　　献 …… 9

Tables　1～3

【要　　約】

2-メチル-2-プロペンニトリル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インキュベーション法により用量設定試験および2回の本試験を行った。用量設定試験を50.0～5000 μg/プレート の用量で行ったところ、いずれの検定菌においても、S9 mix 無添加試験および添加試験でともに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について 313～5000 μg/プレート の範囲で5用量を設定して実施した。

その結果、用いた5種類の検定菌のいずれの用量においても、陰性対照値の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ことから、2-メチル-2-プロペンニトリルは、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。

【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、2-メチル-2-プロペンニトリルについて、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、サルモネラ菌（*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 無添加試験と、哺乳動物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 添加試験とからなっている。

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 毒性試験ガイドライン：471」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】

1．被験物質

2-メチル-2-プロペンニトリル（CAS No. 126-98-7）は、分子式 C_4H_5N、分子量 67.09 の無色透明の液体である。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 99wt%であり、　　から供与された。被験物質は、使用時まで遮光して冷蔵した。本ロットについては、実験期間中安定であることが確認された。

本被験物質は、ジメチルスルホキシド（DMSO、ロット番号：ACQ2095、和光純薬工業㈱）に溶解して最高濃度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。

50 mg/mL 溶液の調製時に、発熱、発泡、変色等の変化は認められなかったことから、被験物質は溶媒中で安定であることが確認された。

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。

各検定菌ごと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 Table 中に示した。

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㈱　ロット番号 WTQ0059、　純度98%以上）

アジ化ナトリウム　（SA、和光純薬工業㈱　ロット番号 DLL3931、　純度98%以上）

9-アミノアクリジン　（9AA、Sigma Chem. Co.　ロット番号 106F06681、純度97%以上）

2-アミノアントラセン（2AA、和光純薬工業㈱　ロット番号 DLH6052、　純度90%以上）

AF2、9AA および 2AA は DMSO に、SA は超純水に溶解し、所定の濃度に調製したものを－20℃で凍結保存し、解凍後速やかに試験に用いた。

3．検定菌

試験には、*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用いた。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*）およびアンピシリン耐性因子 pKM 101（プラスミド）の有無について調べ、特性が維持されていることを確認した。

試験に際して、ニュートリエントブロスNo.2（Oxoid Ltd.）を入れたL字型試験管に解凍した菌液を一定量加え、37℃で10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。分光光度計により 660 nm の吸光度を測定し、検定菌液の増殖を確認した。試験に用いた検定菌液の、段階希釈法により求めた生菌数を 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㈱製の最少グルコース寒天培地（ロット番号：HY3902、1998年9月17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）	15 g

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。

2）トップアガー

下記の水溶液（A）および（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 %
塩化ナトリウム	0.5 %
(B) *Salmonella typhimurium* 用	
L-ヒスチジン	0.5 mM

D-ビオチン　　0.5 mM

(C) *Escherichia coli* 用

L-トリプトファン　　0.5 mM

3） S9 mix

S9 mix 1 mL あたりの組成は下記のとおりである。

S9*	0.1 mL
塩化マグネシウム	8 μmol
塩化カリウム	33 μmol
グルコース-6-リン酸	5 μmol
NADH	4 μmol
NADPH	4 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（キッコーマン㈱、ロット番号：RAA-389、1998年8月21日製造）を購入し、-80℃で凍結保存し、用時に解凍して用いた。

5．試験操作

プレインキュベーション法により、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 を混合し、37℃で20分間プレインキュベーションしたのち、トップアガー 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、対照群として被験物質調製液の代わりに使用溶媒（陰性対照）または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。同時に実施した試験については、陰性および陽性対照群を共通とした。

培養は37℃で48時間行い、発生した変異コロニー数をコロニーアナライザーまたは目視によって算定した。被験物質に由来する沈殿の有無は、肉眼により観察した。また、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。

最高用量の被験物質 0.1 mL および S9 mix 0.5 mL を、それぞれ最少グルコース寒天培地上に滴下して、培養終了時に雑菌の混入の有無を調べた。

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。

6．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 無添加試験あるいは S9 mix 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、陰性対照値の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、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】

1．用量設定試験

「新規化学物質等に係る試験の方法について」および「OECD 毒性試験ガイドライン：471」の記載に準拠し、50.0～5000 μg/プレート の範囲で公比を約3として、試験を実施した（Table 1）。その結果、すべての検定菌の S9 mix 無添加試験および添加試験のいずれにおいても抗菌性は認められなかった。また、被験物質に由来する沈殿もすべての用量で認められなかった。

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 μg/プレート とした。

2．本試験

S9 mix 無添加試験および添加試験のいずれにおいても、313～5000 μg/プレート の範囲で公比を2として2回の本試験を実施した（Table 2、3）。その結果、すべての検定菌において、2回の試験とも陰性対照値の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。

すべての試験において、用いた最高用量の調製液および S9 mix への雑菌の混入は認められなかった。また、陽性対照試験では、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、陰性対照値とともに計測された変異コロニー数は背景データ（Appendix 3）の変動範囲内（平均値±3×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。

2-メチル-2-プロペンニトリルは、復帰突然変異試験およびショウジョウバエを用いた伴性劣性致死突然変異試験でともに陰性の結果が得られており[4, 5]、当研究所で本試験と並行して実施した、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は染色体の構造異常および倍数性細胞が誘発され、陽性であった[6]。また、関連物質であるアクリロニトリルについては、復帰突然変異試験および染色体異常試験でともに陽性の結果が[7]、メチルメタクリレートについては、復帰突然変異試験で陰性、染色体異常試験および培養細胞を用いた突然変異試験で陽性の結果が得られている[8-10]。

以上の結果に基づき、2-メチル-2-プロペンニトリルは、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) Matsushima, T., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A., Sawamura, M.: Factors modulating mutagenicity in microbial tests. in "Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens" Norpoth, K.H., Garner, R.C. eds, Springer, Berlin (1980) pp. 273-285

2) Maron, D.M., Ames, B.N. : Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutation Research 113 : 173-215 (1983)

3) Green, M.H.L. : Mutagen testing using Trp^+ reversion in *Escherichia coli*. in "Handbook of Mutagenicity Test Procedures." Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C. eds, Elsevier, Amsterdam (1984) pp. 161-187

4) Zeiger, E., *et al.*: *Salmonella* mutagenicity tests:Ⅲ. Results from the testing of 255 chemicals. Environmental Mutagenesis 9, Suppl. 9 : 1-109 (1987)

5) Zimmering, S., *et al.*: Chemical mutagenesis testing in *Drosophila*. Ⅶ. Results of 22 coded compounds tested in larval feeding experiments. Environmental and Molecular Mutagenesis 14 : 245-251 (1989)

6) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修, "化学物質毒性試験報告," Vol.8, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 2000 (投稿準備中)

7) 石館　基　監修：<改定>染色体異常試験データ集, ㈱エル・アイ・シー, 東京, 1987, p.9.

8) Waegemaekers, T. H. J. M. and Bensink, M. P. M.: Non-mutagenicity of 27 aliphatic acrylate esters in the Salmonella-microsome test. Mutation Research 137 : 95-102 (1984)

9) Doerr, C. L., *et al.*: Micronucleus, chromosome aberration, and small-colony TK mutant analysis to quantitate chromosomal damage in L5178Y mouse lymphoma cells. Mutation Research 222 : 191-203 (1989)

10) Schweikl, H., *et al.*: The mutagenic activity of unpolymerized resin monomers in *Salmonella typhimurium* and V79 cells. Mutation Research 415 : 119-130 (1998)

Table 1. Cytotoxicity of 2-methyl-2-propenenitrile 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	WP2 *uvrA*	TA98	TA1537	
S9 mix (-)	0	154 134 139 (142 ± 10.4)	8 13 12 (11 ± 2.6)	18 20 28 (22 ± 5.3)	29 25 33 (29 ± 4.0)	13 15 15 (14 ± 1.2)	
	50.0	154	10	22	33	10	
	150	150	9	17	27	8	
	500	158	7	29	30	10	
	1500	131	15	19	18	12	
	5000	142	13	23	26	12	
S9 mix (+)	0	149 159 132 (147 ± 13.7)	14 12 15 (14 ± 1.5)	24 31 33 (29 ± 4.7)	42 34 36 (37 ± 4.2)	18 17 18 (18 ± 0.6)	
	50.0	161	7	29	39	10	
	150	170	16	21	27	23	
	500	169	10	37	33	25	
	1500	164	7	25	35	15	
	5000	185	12	28	22	16	
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	599 623 632 (618 ± 17.1)	645 647 602 (631 ± 25.4)	226 267 247 (247 ± 20.5)	666 676 658 (667 ± 9.0)	556 615 462 (544 ± 77.2)	
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate	830 869 860 (853 ± 20.4)	520 378 434 (444 ± 71.5)	781 749 793 (774 ± 22.7)	398 402 404 (401 ± 3.1)	336 379 352 (356 ± 21.7)	

The purity of the test substance was 99wt%. This substance contained 51 wtppm *p* -methoxyphenol as polymerization inhibitor, and 19 wtppm acetone, 59 wtppm acrylonitrile, 55 wtppm propionitrile, 72 wtppm methacrolein, 48 wtppm isobutylonitrile, 35 wtppm hydrogen cyanide, and trace amount of acetonitrile and *cis* -crotonitrile 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 2-methyl-2-propenenitrile on bacteria (I)

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 *uvrA*			TA98			TA1537		
S9 mix (-)	0	137	138	138	6	11	12	32	22	19	20	28	23	15	15	12
		(138 ± 0.6)			(10 ± 3.2)			(24 ± 6.8)			(24 ± 4.0)			(14 ± 1.7)		
	313	134	145	143	11	7	15	25	26	19	20	23	22	2	4	12
		(141 ± 5.9)			(11 ± 4.0)			(23 ± 3.8)			(22 ± 1.5)			(6 ± 5.3)		
	625	117	167	155	10	15	8	27	22	33	20	24	31	18	9	12
		(146 ± 26.1)			(11 ± 3.6)			(27 ± 5.5)			(25 ± 5.6)			(13 ± 4.6)		
	1250	122	145	143	12	13	11	19	17	30	19	26	27	10	14	7
		(137 ± 12.7)			(12 ± 1.0)			(22 ± 7.0)			(24 ± 4.4)			(10 ± 3.5)		
	2500	145	117	147	7	8	15	15	23	31	20	21	18	17	11	7
		(136 ± 16.8)			(10 ± 4.4)			(23 ± 8.0)			(20 ± 1.5)			(12 ± 5.0)		
	5000	136	148	168	10	10	10	25	24	25	18	27	27	10	11	11
		(151 ± 16.2)			(10 ± 0.0)			(25 ± 0.6)			(24 ± 5.2)			(11 ± 0.6)		
S9 mix (+)	0	176	146	154	8	10	10	25	28	27	38	29	26	9	14	19
		(159 ± 15.5)			(9 ± 1.2)			(27 ± 1.5)			(31 ± 6.2)			(14 ± 5.0)		
	313	159	168	142	7	13	4	21	27	28	20	28	31	12	17	15
		(156 ± 13.2)			(8 ± 4.6)			(25 ± 3.8)			(26 ± 5.7)			(15 ± 2.5)		
	625	147	170	166	13	7	8	34	29	20	29	26	21	8	14	15
		(161 ± 12.3)			(9 ± 3.2)			(28 ± 7.1)			(25 ± 4.0)			(12 ± 3.8)		
	1250	166	157	130	9	14	9	23	31	22	18	34	28	12	18	20
		(151 ± 18.7)			(11 ± 2.9)			(25 ± 4.9)			(27 ± 8.1)			(17 ± 4.2)		
	2500	148	147	154	6	8	12	32	25	32	33	29	30	16	20	16
		(150 ± 3.8)			(9 ± 3.1)			(30 ± 4.0)			(31 ± 2.1)			(17 ± 2.3)		
	5000	148	160	154	7	11	16	35	36	33	28	19	30	13	16	20
		(154 ± 6.0)			(11 ± 4.5)			(35 ± 1.5)			(26 ± 5.9)			(16 ± 3.5)		
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	598	557	565	714	702	739	183	260	252	639	628	654	380	585	453
		(573 ± 21.7)			(718 ± 18.9)			(232 ± 42.3)			(640 ± 13.1)			(473 ± 103.9)		
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose (μg /plate)	1			2			10			0.5			2		
	Number of colonies / plate	980	1121	1117	459	402	408	777	891	969	490	535	485	348	395	364
		(1073 ± 80.3)			(423 ± 31.3)			(879 ± 96.6)			(503 ± 27.5)			(369 ± 23.9)		

The purity of the test substance was 99wt%. This substance contained 51 wtppm *p* -methoxyphenol as polymerization inhibitor, and 19 wtppm acetone, 59 wtppm acrylonitrile, 55 wtppm propionitrile, 72 wtppm methacrolein, 48 wtppm isobutylonitrile, 35 wtppm hydrogen cyanide, and trace amount of acetonitrile and *cis* -crotonitrile 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 2-methyl-2-propenenitrile on 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 *uvrA*	TA98	TA1537	
S9 mix (-)	0	134 163 129 (142 ± 18.4)	13 13 11 (12 ± 1.2)	26 22 31 (26 ± 4.5)	24 26 19 (23 ± 3.6)	7 12 7 (9 ± 2.9)	
	313	151 147 128 (142 ± 12.3)	16 17 12 (15 ± 2.6)	14 24 19 (19 ± 5.0)	31 21 21 (24 ± 5.8)	5 8 9 (7 ± 2.1)	
	625	111 148 138 (132 ± 19.1)	7 8 20 (12 ± 7.2)	12 20 10 (14 ± 5.3)	24 28 29 (27 ± 2.6)	12 15 4 (10 ± 5.7)	
	1250	144 138 124 (135 ± 10.3)	17 17 17 (17 ± 0.0)	21 21 20 (21 ± 0.6)	26 17 17 (20 ± 5.2)	9 5 10 (8 ± 2.6)	
	2500	140 134 123 (132 ± 8.6)	6 5 11 (7 ± 3.2)	20 23 11 (18 ± 6.2)	30 21 26 (26 ± 4.5)	9 11 8 (9 ± 1.5)	
	5000	134 132 129 (132 ± 2.5)	15 8 18 (14 ± 5.1)	15 18 12 (15 ± 3.0)	20 36 34 (30 ± 8.7)	9 10 10 (10 ± 0.6)	
S9 mix (+)	0	148 144 132 (141 ± 8.3)	8 12 12 (11 ± 2.3)	28 19 20 (22 ± 4.9)	31 34 34 (33 ± 1.7)	10 18 16 (15 ± 4.2)	
	313	129 150 168 (149 ± 19.5)	13 16 12 (14 ± 2.1)	25 18 24 (22 ± 3.8)	35 38 33 (35 ± 2.5)	15 12 19 (15 ± 3.5)	
	625	138 166 145 (150 ± 14.6)	12 16 12 (13 ± 2.3)	22 32 25 (26 ± 5.1)	32 34 30 (32 ± 2.0)	17 18 18 (18 ± 0.6)	
	1250	148 168 154 (157 ± 10.3)	15 9 11 (12 ± 3.1)	28 16 27 (24 ± 6.7)	43 32 42 (39 ± 6.1)	15 19 9 (14 ± 5.0)	
	2500	155 152 167 (158 ± 7.9)	10 13 11 (11 ± 1.5)	23 31 29 (28 ± 4.2)	26 25 34 (28 ± 4.9)	12 20 13 (15 ± 4.4)	
	5000	160 163 154 (159 ± 4.6)	15 16 13 (15 ± 1.5)	34 34 31 (33 ± 1.7)	33 29 35 (32 ± 3.1)	11 18 16 (15 ± 3.6)	
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	637 601 526 (588 ± 56.6)	792 701 662 (718 ± 66.7)	260 236 212 (236 ± 24.0)	622 586 637 (615 ± 26.2)	507 568 625 (567 ± 59.0)	
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate	939 994 968 (967 ± 27.5)	324 358 433 (372 ± 55.8)	825 803 912 (847 ± 57.6)	478 427 428 (444 ± 29.2)	386 322 395 (368 ± 39.8)	

The purity of the test substance was 99wt%. This substance contained 51 wtppm *p* -methoxyphenol as polymerization inhibitor, and 19 wtppm acetone, 59 wtppm acrylonitrile, 55 wtppm propionitrile, 72 wtppm methacrolein, 48 wtppm isobutylonitrile, 35 wtppm hydrogen cyanide, and trace amount of acetonitrile and *cis* -crotonitrile as impurities.

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