



3-メチル-4-ニトロフェノール 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
材料および試験方法	3
試験結果および考察	6
参 考 文 献	7
Tables 1～3	

【要 約】

3-メチル-4-ニトロフェノール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 *uvrA* を用い、用量設定試験は直接法および代謝活性化法のいずれも、1.5~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で、本試験は直接法および代謝活性化法のいずれも 78.12~2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で試験を実施した。

その結果、それぞれ2回実施した本試験において、用いた5種類の検定菌とも、いずれの用量でも復帰変異コロニー数の増加が認められなかったことから、3-メチル-4-ニトロフェノールは、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。

【結 言】

OECD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、3-メチル-4-ニトロフェノールについて、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変異⁽²⁾を指標とした変異原の検出系である。

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化学品試験法ガイドライン：471, 472 に準拠し、化学物質GLP（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 *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。

試験に際して、ニュートリエントブロスNo.2 (OXOID, B-1674/1) を入れたL字型試験
管に種菌を接種し、 37°C 、10~12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〕

3-メチル-4-ニトロフェノール (CAS No. 2581-34-2、以下MNPと略) は、分子量
153.14、比重 (128°C) 1.208 の淡黄褐色の結晶である。純度 99.9%のもの (ロット番号
) を
から供与された。被験物質
は、使用時まで密栓して冷所に保管した。

MNPは、ジメチルスルホキシド (DMSO, ロット番号: TWP 5445、和光純薬工業(株))
を用いて 50 mg/ml なるように調製した後、同溶媒で更に公比2ないし3で希釈したもの
を、速やかに試験に用いた。なお、調製にあたって、純度および比重換算は行わなかった。

試験の開始に先立って、秦野研究所においてMNPのDMSO溶液中での安定性試験を行っ
た。すなわち、本試験および染色体異常試験 (H-92-210) における最高濃度 (30 mg/ml)
および最低濃度 ($781.2\text{ }\mu\text{g/ml}$) 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、いずれも 99.8%であった。これらの値は、当研究所の基準を満たしてい
た (Appendixes 1, 2)。

また、本試験に用いた調製検体について、含量測定試験を行った結果、 25.00 mg/ml
溶液の含量は既定濃度に対し、102~103%、また、 $781.2\text{ }\mu\text{g/ml}$ 溶液は、106~

108%であった。これらの値も当研究所の基準を満たしていた (Appendix 3)。

以上の結果から、MNPはアセトン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。

AF-2 : フリルフラマイド	(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%
9-AA : 9-アミノアクリジン	(Sigma Chem. Co.)	ロット番号 96F05641,	純度>98%
2-AA : 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%

AF-2, 2-AA は 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。9-AA は DMSO に、SA は蒸留水に溶解して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) バク7ガー (Difco)	0.6%	(B) L-ヒスチジン	0.5 mM
塩化ナトリウム	0.5%	ピオニン	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 (用量設定試験および本試験とも、ロット番号 : DJ040IH, 1992年9月4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	リン酸水素アンモニウムナトリウム・4水和物	3.5 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7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
塩化マグネシウム	8 μmol	NADPH	4 μmol
塩化カリウム	33 μmol	0.2M リン酸緩衝液 (pH 7.4)	0.5 ml
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 (キッコーマン株、ロット番号 RAA-280、1992年7月24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。

小試験管中にトッパアガー 2 ml、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アセトン、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表中に示した。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、寒天表面上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。用量設定試験は抗菌性を認めたことから2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復帰変異コロニー数が、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。MNP について、1.5～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で公比約 3 とし試験を実施したところ、すべての検定菌の直接法および代謝活性化法において、1500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上で抗菌性が認められた。

以上の結果から、本試験における最高用量の決定は、直接法、代謝活性化法とも抗菌性の認められる用量範囲の 2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とし、以下 6 用量を設定することとした。

〔本試験〕

結果を Tables 2、3 に示した。MNP について上記の用量範囲で試験を実施した。2 回の試験を通して、用いた 5 種類の検定菌の直接法、代謝活性化法のいずれにおいても、用量依存性のある陰性対照の 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。直接法および代謝活性化法の試験において、1250 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上において、抗菌性が認められた。

MNP 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、本試験に用いた各検定菌の感受性および各陽性対照物質の変異原活性についての安定性が確認された。

以上の結果に基づき、MNP 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。

【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 bacterial reverse mutation assay with 3-Methyl-4-nitrophenol

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			WP2uvrA			TA98			TA1537			
S9 Mix (-)	0	132	94	132	18	16	15	22	21	22	20	20	22	12	11	9	
		(119 \pm 21.9)			(16 \pm 1.5)			(22 \pm 0.6)			(21 \pm 1.2)			(11 \pm 1.5)			
	1.5	152			31			26			19			9			
	5	131			18			24			25			15			
	15	126			20			22			22			12			
	50	128			22			17			14			8			
	150	139			14			14			26			12			
	500	116			22			9 *			21			7			
	1500	100 *			4 *			2 *			8 *			0 *			
5000	0 *			0 *			0 *			0 *			0 *				
S9 Mix (+)	0	122	118	130	22	17	14	21	23	23	26	36	31	6	9	5	
		(123 \pm 6.1)			(18 \pm 4.0)			(22 \pm 1.2)			(31 \pm 5.0)			(7 \pm 2.1)			
	1.5	133			12			21			38			14			
	5	142			17			12			36			10			
	15	141			11			24			36			14			
	50	137			17			23			16			14			
	150	122			9			16			32			13			
	500	112			10			15			20			9			
	1500	104 *			3 *			3 *			29 *			0 *			
5000	0 *			1 *			0 *			0 *			0 *				
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA			
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01			0.5			0.01			0.1			80			
S9 Mix (-)	Number of colonies / plate	585	615	586	269	244	267	125	130	138	724	702	674	3390	3420	3453	
		(595 \pm 17.0)			(260 \pm 13.9)			(131 \pm 6.6)			(700 \pm 25.1)			(3421 \pm 31.5)			
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1			2			10			0.5			2			
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	983	983	973	281	266	245	267	393	373	429	371	386	251	238	182	
		(980 \pm 5.8)			(264 \pm 18.1)			(344 \pm 67.7)			(395 \pm 30.1)			(224 \pm 36.7)			

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.

Table 2. Results of bacterial reverse mutation assay (I) with 3-Methyl-4-nitrophenol

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			WP2uvrA			TA98			TA1537							
S9 Mix	0	102	99	102	13	13	12	18	22	20	19	32	22	5	10	13	(101 \pm 1.7)	(13 \pm 0.6)	(20 \pm 2.0)	(24 \pm 6.8)	(9 \pm 4.0)
	78.12	130	92	105	13	17	16	10	14	20	30	29	22	9	7	12	(109 \pm 19.3)	(15 \pm 2.1)	(15 \pm 5.0)	(27 \pm 4.4)	(9 \pm 2.5)
	156.2	116	110	87	19	18	19	11	12	17	21	30	20	5	11	10	(104 \pm 15.3)	(19 \pm 0.6)	(13 \pm 3.2)	(24 \pm 5.5)	(9 \pm 3.2)
	312.5	103	122	99	10	14	13	7	14	16	26	17	26	9	12	2	(108 \pm 12.3)	(12 \pm 2.1)	(12 \pm 4.7)	(23 \pm 5.2)	(8 \pm 5.1)
	625	95	82	85	13	13	12	7	6	7	21	25	27	12	6	7	(87 \pm 6.8)	(13 \pm 0.6)	(7 \pm 0.6)	(24 \pm 3.1)	(8 \pm 3.2)
	1250	64 *	75 *	70 *	7 *	10 *	17 *	0 *	2 *	2 *	28 *	17 *	18 *	0 *	4 *	7 *	(70 \pm 5.5)	(11 \pm 5.1)	(1 \pm 1.2)	(21 \pm 6.1)	(4 \pm 3.5)
	2500	18 *	20 *	21 *	11 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	4 *	14 *	9 *	0 *	0 *	0 *	(20 \pm 1.5)	(4 \pm 6.4)	(0 \pm 0.0)	(9 \pm 5.0)	(0 \pm 0.0)
ix (+)	0	113	111	107	11	9	14	20	28	27	36	41	39	12	16	12	(110 \pm 3.1)	(11 \pm 2.5)	(25 \pm 4.4)	(39 \pm 2.5)	(13 \pm 2.3)
	78.12	121	126	108	14	17	16	27	22	32	30	31	20	15	9	16	(118 \pm 9.3)	(16 \pm 1.5)	(27 \pm 5.0)	(27 \pm 6.1)	(13 \pm 3.8)
	156.2	117	107	103	12	12	16	18	28	22	29	22	29	13	11	9	(109 \pm 7.2)	(13 \pm 2.3)	(23 \pm 5.0)	(27 \pm 4.0)	(11 \pm 2.0)
	312.5	95	100	103	8	15	22	10	7	16	31	28	23	11	14	11	(99 \pm 4.0)	(15 \pm 7.0)	(11 \pm 4.6)	(27 \pm 4.0)	(12 \pm 1.7)
	625	101	115	97	14	19	10	10	4	9	24	24	30	9	4	10	(104 \pm 9.5)	(14 \pm 4.5)	(8 \pm 3.2)	(26 \pm 3.5)	(8 \pm 3.2)
	1250	86 *	58 *	75 *	13 *	9 *	10 *	4 *	3 *	4 *	16 *	24 *	22 *	7 *	2 *	3 *	(73 \pm 14.1)	(11 \pm 2.1)	(4 \pm 0.6)	(21 \pm 4.2)	(4 \pm 2.6)
	2500	15 *	23 *	22 *	0 *	2 *	2 *	0 *	0 *	0 *	5 *	8 *	6 *	0 *	1 *	1 *	(20 \pm 4.4)	(1 \pm 1.2)	(0 \pm 0.0)	(6 \pm 1.5)	(1 \pm 0.6)
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA							
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01			0.5			0.01			0.1			80							
S9 Mix (-)	Number of colonies / plate	556	533	565	281	266	290	244	235	237	664	665	687	2796	3125	2913	(551 \pm 16.5)	(279 \pm 12.1)	(239 \pm 4.7)	(672 \pm 13.0)	(2945 \pm 166.8)
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA							
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1			2			10			0.5			2							
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	687	771	609	252	228	271	545	505	523	348	331	339	241	202	253	(689 \pm 81.0)	(250 \pm 21.5)	(524 \pm 20.0)	(339 \pm 8.5)	(232 \pm 26.7)

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.

Table 3. Results of bacterial reverse mutation assay (II) with 3-Methyl-4-nitrophenol

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			
S9 Mix (-)	0	181	185	145	13	17	13	20	19	16	21	19	27	8	14	11	
		(170 \pm 22.0)			(14 \pm 2.3)			(18 \pm 2.1)			(22 \pm 4.2)			(11 \pm 3.0)			
	78.12	90	92	93	22	17	18	17	15	11	26	29	20	13	9	9	
		(92 \pm 1.5)			(19 \pm 2.6)			(14 \pm 3.1)			(25 \pm 4.6)			(10 \pm 2.3)			
	156.2	123	108	94	8	17	8	14	11	16	21	27	19	8	8	9	
		(108 \pm 14.5)			(11 \pm 5.2)			(14 \pm 2.5)			(22 \pm 4.2)			(8 \pm 0.6)			
	312.5	124	125	85	10	11	19	19	9	12	30	17	24	7	15	7	
		(111 \pm 22.8)			(13 \pm 4.9)			(13 \pm 5.1)			(24 \pm 6.5)			(10 \pm 4.6)			
625	101	99	103	13	15	11	4	8	7	22	11	17	6	4	5		
	(101 \pm 2.0)			(13 \pm 2.0)			(6 \pm 2.1)			(17 \pm 5.5)			(5 \pm 1.0)				
1250	86 *	72 *	74 *	7 *	8 *	5 *	2 *	0 *	1 *	16 *	15 *	14 *	4 *	4 *	13 *		
	(77 \pm 7.6)			(7 \pm 1.5)			(1 \pm 1.0)			(15 \pm 1.0)			(7 \pm 5.2)				
2500	5 *	6 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	2 *	0 *	0 *	0 *		
	(4 \pm 3.2)			(0 \pm 0.0)			(0 \pm 0.0)			(1 \pm 1.2)			(0 \pm 0.0)				
S9 Mix (+)	0	161	149	125	20	16	17	23	21	21	35	34	30	11	12	10	
		(145 \pm 18.3)			(18 \pm 2.1)			(22 \pm 1.2)			(33 \pm 2.6)			(11 \pm 1.0)			
	78.12	120	100	113	15	13	13	24	24	13	26	23	37	9	7	11	
		(111 \pm 10.1)			(14 \pm 1.2)			(20 \pm 6.4)			(29 \pm 7.4)			(9 \pm 2.0)			
	156.2	110	97	117	10	17	12	20	22	17	35	36	36	13	14	22	
		(108 \pm 10.1)			(13 \pm 3.6)			(20 \pm 2.5)			(36 \pm 0.6)			(16 \pm 4.9)			
	312.5	114	112	107	15	23	10	23	19	24	38	24	28	13	13	11	
		(111 \pm 3.6)			(16 \pm 6.6)			(22 \pm 2.6)			(30 \pm 7.2)			(12 \pm 1.2)			
625	107	103	117	12	8	17	4	10	9	32	31	23	12	12	15		
	(109 \pm 7.2)			(12 \pm 4.5)			(8 \pm 3.2)			(29 \pm 4.9)			(13 \pm 1.7)				
1250	76 *	74 *	86 *	2 *	3 *	5 *	0 *	1 *	0 *	31 *	13 *	21 *	5 *	6 *	5 *		
	(79 \pm 6.4)			(3 \pm 1.5)			(0 \pm 0.6)			(22 \pm 9.0)			(5 \pm 0.6)				
2500	0 *	1 *	2 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	2 *	1 *	0 *	0 *	0 *	0 *		
	(1 \pm 1.0)			(0 \pm 0.0)			(0 \pm 0.0)			(1 \pm 1.0)			(0 \pm 0.0)				
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	545	529	539	239	271	259	141	132	127	633	610	577	2723	2907	2685	
		(538 \pm 8.1)			(256 \pm 16.2)			(133 \pm 7.1)			(607 \pm 28.1)			(2772 \pm 118.7)			
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose (μg /plate)	1			2			10			0.5			2			
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	743	666	722	257	266	222	679	753	743	321	343	346	246	227	231	
		(710 \pm 39.8)			(248 \pm 23.2)			(725 \pm 40.1)			(337 \pm 13.7)			(235 \pm 10.0)			

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