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 μg/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 μg/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。

【緒　　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 *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。

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℃、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℃）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㈱）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 μg/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 μg/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㈱	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㈱	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㈱	ﾛｯﾄ番号 DSF2950,	純度>90%）

AF-2, 2-AA 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。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) 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	0.2 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	ｸﾞﾙｺｰｽ	20 g
ﾘﾝ酸水素二ｶﾘｳﾑ	10 g	ﾊﾞｸﾄｱｶﾞｰ (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
塩化ﾏｸﾞﾈｼｳﾑ	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
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-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。

小試験管中にトップアガー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 μg/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 μg/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 μg/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 μg/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 (μg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean ± S.D.)					
		Base - pair substitution type			Frameshift type		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9 Mix (-)	0	132 94 132 (119 ± 21.9)	18 16 15 (16 ± 1.5)	22 21 22 (22 ± 0.6)	20 20 22 (21 ± 1.2)	12 11 9 (11 ± 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 *	
S9Mix (+)	0	122 118 130 (123 ± 6.1)	22 17 14 (18 ± 4.0)	21 23 23 (22 ± 1.2)	26 36 31 (31 ± 5.0)	6 9 5 (7 ± 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 S9 Mix (-)	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose (μg /plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
	Number of colonies / plate	585 615 586 (595 ± 17.0)	269 244 267 (260 ± 13.9)	125 130 138 (131 ± 6.6)	724 702 674 (700 ± 25.1)	3390 3420 3453 (3421 ± 31.5)	
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate	983 983 973 (980 ± 5.8)	281 266 245 (264 ± 18.1)	267 393 373 (344 ± 67.7)	429 371 386 (395 ± 30.1)	251 238 182 (224 ± 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 (-) 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	102 99 102 (101 ± 1.7)	13 13 12 (13 ± 0.6)	18 22 20 (20 ± 2.0)	19 32 22 (24 ± 6.8)	5 10 13 (9 ± 4.0)
	78.12	130 92 105 (109 ± 19.3)	13 17 16 (15 ± 2.1)	10 14 20 (15 ± 5.0)	30 29 22 (27 ± 4.4)	9 7 12 (9 ± 2.5)
	156.2	116 110 87 (104 ± 15.3)	19 18 19 (19 ± 0.6)	11 12 17 (13 ± 3.2)	21 30 20 (24 ± 5.5)	5 11 10 (9 ± 3.2)
	312.5	103 122 99 (108 ± 12.3)	10 14 13 (12 ± 2.1)	7 14 16 (12 ± 4.7)	26 17 26 (23 ± 5.2)	9 12 2 (8 ± 5.1)
	625	95 82 85 (87 ± 6.8)	13 13 12 (13 ± 0.6)	7 6 7 (7 ± 0.6)	21 25 27 (24 ± 3.1)	12 6 7 (8 ± 3.2)
	1250	64 * 75 * 70 * (70 ± 5.5)	7 * 10 * 17 * (11 ± 5.1)	0 * 2 * 2 * (1 ± 1.2)	28 * 17 * 18 * (21 ± 6.1)	0 * 4 * 7 * (4 ± 3.5)
	2500	18 * 20 * 21 * (20 ± 1.5)	11 * 0 * 0 * (4 ± 6.4)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	4 * 14 * 9 * (9 ± 5.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)
ix (+)	0	113 111 107 (110 ± 3.1)	11 9 14 (11 ± 2.5)	20 28 27 (25 ± 4.4)	36 41 39 (39 ± 2.5)	12 16 12 (13 ± 2.3)
	78.12	121 126 108 (118 ± 9.3)	14 17 16 (16 ± 1.5)	27 22 32 (27 ± 5.0)	30 31 20 (27 ± 6.1)	15 9 16 (13 ± 3.8)
	156.2	117 107 103 (109 ± 7.2)	12 12 16 (13 ± 2.3)	18 28 22 (23 ± 5.0)	29 22 29 (27 ± 4.0)	13 11 9 (11 ± 2.0)
	312.5	95 100 103 (99 ± 4.0)	8 15 22 (15 ± 7.0)	10 7 16 (11 ± 4.6)	31 28 23 (27 ± 4.0)	11 14 11 (12 ± 1.7)
	625	101 115 97 (104 ± 9.5)	14 19 10 (14 ± 4.5)	10 4 9 (8 ± 3.2)	24 24 30 (26 ± 3.5)	9 4 10 (8 ± 3.2)
	1250	86 * 58 * 75 * (73 ± 14.1)	13 * 9 * 10 * (11 ± 2.1)	4 * 3 * 4 * (4 ± 0.6)	16 * 24 * 22 * (21 ± 4.2)	7 * 2 * 3 * (4 ± 2.6)
	2500	15 * 23 * 22 * (20 ± 4.4)	0 * 2 * 2 * (1 ± 1.2)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	5 * 8 * 6 * (6 ± 1.5)	0 * 1 * 1 * (1 ± 0.6)
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	556 533 565 (551 ± 16.5)	281 266 290 (279 ± 12.1)	244 235 237 (239 ± 4.7)	664 665 687 (672 ± 13.0)	2796 3125 2913 (2945 ± 166.8)
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2
	Number of colonies / plate	687 771 609 (689 ± 81.0)	252 228 271 (250 ± 21.5)	545 505 523 (524 ± 20.0)	348 331 339 (339 ± 8.5)	241 202 253 (232 ± 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 ± S.D.)					
		Base - pair substitution type			Frameshift type		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix (-)	0	181 185 145 (170 ± 22.0)	13 17 13 (14 ± 2.3)	20 19 16 (18 ± 2.1)	21 19 27 (22 ± 4.2)	8 14 11 (11 ± 3.0)	
	78.12	90 92 93 (92 ± 1.5)	22 17 18 (19 ± 2.6)	17 15 11 (14 ± 3.1)	26 29 20 (25 ± 4.6)	13 9 9 (10 ± 2.3)	
	156.2	123 108 94 (108 ± 14.5)	8 17 8 (11 ± 5.2)	14 11 16 (14 ± 2.5)	21 27 19 (22 ± 4.2)	8 8 9 (8 ± 0.6)	
	312.5	124 125 85 (111 ± 22.8)	10 11 19 (13 ± 4.9)	19 9 12 (13 ± 5.1)	30 17 24 (24 ± 6.5)	7 15 7 (10 ± 4.6)	
	625	101 99 103 (101 ± 2.0)	13 15 11 (13 ± 2.0)	4 8 7 (6 ± 2.1)	22 11 17 (17 ± 5.5)	6 4 5 (5 ± 1.0)	
	1250	86 * 72 * 74 * (77 ± 7.6)	7 * 8 * 5 * (7 ± 1.5)	2 * 0 * 1 * (1 ± 1.0)	16 * 15 * 14 * (15 ± 1.0)	4 * 4 * 13 * (7 ± 5.2)	
	2500	5 * 6 * 0 * (4 ± 3.2)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	0 * 0 * 2 * (1 ± 1.2)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	
(+)	0	161 149 125 (145 ± 18.3)	20 16 17 (18 ± 2.1)	23 21 21 (22 ± 1.2)	35 34 30 (33 ± 2.6)	11 12 10 (11 ± 1.0)	
	78.12	120 100 113 (111 ± 10.1)	15 13 13 (14 ± 1.2)	24 24 13 (20 ± 6.4)	26 23 37 (29 ± 7.4)	9 7 11 (9 ± 2.0)	
	156.2	110 97 117 (108 ± 10.1)	10 17 12 (13 ± 3.6)	20 22 17 (20 ± 2.5)	35 36 36 (36 ± 0.6)	13 14 22 (16 ± 4.9)	
	312.5	114 112 107 (111 ± 3.6)	15 23 10 (16 ± 6.6)	23 19 24 (22 ± 2.6)	38 24 28 (30 ± 7.2)	13 13 11 (12 ± 1.2)	
	625	107 103 117 (109 ± 7.2)	12 8 17 (12 ± 4.5)	4 10 9 (8 ± 3.2)	32 31 23 (29 ± 4.9)	12 12 15 (13 ± 1.7)	
	1250	76 * 74 * 86 * (79 ± 6.4)	2 * 3 * 5 * (3 ± 1.5)	0 * 1 * 0 * (0 ± 0.6)	31 * 13 * 21 * (22 ± 9.0)	5 * 6 * 5 * (5 ± 0.6)	
	2500	0 * 1 * 2 * (1 ± 1.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	2 * 1 * 0 * (1 ± 1.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 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	545 529 539 (538 ± 8.1)	239 271 259 (256 ± 16.2)	141 132 127 (133 ± 7.1)	633 610 577 (607 ± 28.1)	2723 2907 2685 (2772 ± 118.7)	
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate	743 666 722 (710 ± 39.8)	257 266 222 (248 ± 23.2)	679 753 743 (725 ± 40.1)	321 343 346 (337 ± 13.7)	246 227 231 (235 ± 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.