

試 験 報 告 書

フタル酸ジヘキシルエステルの細菌を用いる復帰突然変異試験

(試験番号：4 L 4 3 3)

株式会社三菱化学安全科学研究所

目 次

	頁
要 約	7
材料及び方法	
1. 試験物質	8
2. テスト菌株	8
3. 培 地	9
4. S 9 Mix	10
5. 試験方法	10
結果及び結論	11
参考文献	12
補足資料	12
別表	13
図	16

要 約

フタル酸ハフチルエステル について、*Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 及び *Escherichia coli* WP2 *uvrA*⁻ の 5 菌株を指標とする復帰突然変異試験を実施した。

予備試験を 5000, 2500, 1250, 625, 313, 156, 78.1, 39.1 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の濃度で実施したところ、S 9 Mix 非共存下及び共存下のいずれにおいても、すべての菌株で抗菌性は認められなかった。従って、本試験では 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ を最高濃度に 2500, 1250, 625, 313 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の 5 濃度を設定した。本試験を実施した結果、被験物質により誘発された復帰変異コロニー数は、いずれのテスト菌株においても陰性対照値の 2 倍以上を示さなかった。

以上の結果から、フタル酸ハフチルエステル の変異原性は陰性と結論した。

材料及び方法

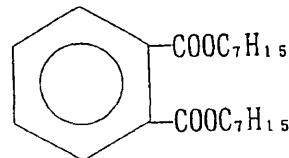
1. 試験物質

1.1 被験物質

より提供された フタル酸ヘプチルエステル (Lot No.

純度 99.56%以上) を使用した。被験物質は、融点 -55°C 、沸点 $235\sim 245^{\circ}\text{C}/10\text{mmHg}$ の無色透明液体であり、水、熱、光等に安定である。また、水にほとんど溶けず、DMSO、アセトン、芳香族炭化水素に易溶である。なお、本ロットについては実験開始前及び実験終了後に被験物質製造者が分析したデータを入力し、安定であることの確認を行った。

化学名：フタル酸ヘプチルエステル
 化学式： $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_4$
 構造式：



分子量：362.48
 CAS No.：3648-21-3

1.2 対照物質

陰性対照物質及び陽性対照物質として下記のものを用いた。

使用目的	対照物質名	略称	入手先	ロット番号	純度(%)
陰性対照	ジメチルスルホキシド	DMSO	関東化学株式会社	603E2089	99.7
陽性対照	2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド	AF-2	和光純薬工業株式会社	PTQ1296	98.0
	アジ化ナトリウム	NaN_3	和光純薬工業株式会社	KWE6685	96.5
	N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロジゲンジン	BNNG	Sigma Chemical Company	56F-3651	99.0
	9-アミノアクリジン	9-AA	Sigma Chemical Company	80F-0186	99
	2-アミノアントラセン	2-AA	和光純薬工業株式会社	TWH2355	95.0

2. テスト菌株

2.1 テスト菌株^{1, 2)}

より 1983 年 5月27日に入手した *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 及び
 より 1985年10月14日に入手した *Escherichia coli* WP2 *wvrA*⁻の 5 菌株を用いた。

これらの菌株の遺伝的特性は下記のとおりである。

菌 株	変異遺伝子	付帯突然変異			突然変異型
		修復	膜	R因子	
TA98	<i>his D</i>	<i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	pKM 101	フレームシフト
TA100	<i>his G</i>	<i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	pKM 101	塩基対置換
TA1535	<i>his G</i>	<i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	—	塩基対置換
TA1537	<i>his C</i>	<i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	—	フレームシフト
WP2 <i>uvrA</i> ⁻	<i>trp E</i>	<i>uvrA</i>	+	—	塩基対置換

2.2 特性検査

各テスト菌株についてアミノ酸要求性、紫外線感受性、膜変異、薬剤耐性などの遺伝的特徴をロット毎に事前に調べ、これらの特性を備えた菌株を用いた。

2.3 保存方法

液体完全培地により 37 °Cで8時間振盪培養した 4 mlの各菌懸濁液に 0.35 mlの割合で DMSO を加えて、ドライアイス・アセトン中で急速凍結後、超低温槽で-80°C以下に凍結保存した。

3. 培地

3.1 液体完全培地

ニュートリエントブロス (Oxoid Nutrient Broth No.2 ; Unipath 社, ロット 番号 067 54134) 25 gを 1 lの精製水に溶解し、オートクレーブ (121 °C, 15分間) で滅菌した。本培地は各テスト菌株の増菌用培地として用いた。

3.2 最少グルコース寒天平板培地

クリメディアAM-N培地 (日清製粉株式会社, ロット 番号 AN500JJ) を購入し、使用した。本培地は復帰変異菌の検出に用いた。

3.3 トップアガー

アミノ酸水溶液として、精製水を用いて D-ビオチン、L-ヒスチジン 及び L-トリプトファンの 0.5 mM 混合水溶液を調製し、これをマイクロフィルター (孔径 0.45 μm) でろ過滅菌後、冷蔵庫に保管した。

精製水 100mlに対して、粉末寒天 (Bacto-Agar ; Difco社, ロット 番号 37430AJA) 0.6 g, 塩化ナトリウム0.5 gの割合で加え、オートクレーブで滅菌し完全に溶解させる。その後、上記のアミノ酸水溶液を 1/10 量加えて混和し、約 45 °Cに保温した。本

培地は菌懸濁液、被験物質溶液及びS 9 Mix と混合後、最少グルコース寒天平板培地に重層するために用いた。

4. S 9 Mix

4.1 S 9

購入したS 9（キッコーマン株式会社；1994年10月6日製造，ロット番号 RAA-316）を使用した。このS 9は，7週齢の雄のSD系ラットにフェノバルビタールを30mg/kgで1回，60mg/kgで3回，24時間間隔で腹腔内投与し，5,6-ベンゾフラボン80mg/kgをフェノバルビタールの第3回投与時に1回併用投与して作製した肝ホモジネートの9000×g遠心上清分画である。S 9は-80°C以下で保存した。

4.2 S 9 Mix

S 9 Mix 1 mlあたり以下の組成で調製し，使用時まで水中に保存した。

S 9	0.1 ml
塩化マグネシウム六水塩	8 μmol
塩化カリウム	33 μmol
D-グルコース 6-リン酸	5 μmol
β-NADPH	4 μmol
β-NADH	4 μmol
ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μmol
滅菌精製水	残量

5. 試験方法³⁾

5.1 被験物質溶液及び陽性対照物質溶液の調製

被験物質を所定濃度でDMSOに溶解し，これを同じ溶媒を用いて希釈し各濃度の被験物質溶液を調製した。

陽性対照物質のNaN₃は，注射用水（株式会社大塚製薬工場）に，その他はDMSOに溶解した。

5.2 被験物質濃度

予備試験を5000，2500，1250，625，313，156，78.1，39.1 μg/プレート濃度で実施したところ，S 9 Mix 非共存下及び共存下のいずれにおいても，すべての菌株で抗菌性は認められなかった。従って，本試験では5000 μg/プレートを最高濃度に2500，1250，625，313 μg/プレートの5濃度を設定した。

5.3 被験物質溶液の濃度確認

本試験1回目に用いた最高及び最低濃度の被験物質溶液について濃度分析を実施し，

いずれも所定濃度の100±5%以内であることを確認した(12頁, 補足資料参照)。

5.4 復帰突然変異試験

試験はプレインキュベーション法で実施した。

凍結保存された各種の菌懸濁液20 μ lを液体完全培地10mlに接種し、37°Cで8時間振盪培養した。菌懸濁液は菌濃度を測定した後、試験に使用した。滅菌した試験管に被験物質溶液0.1mlを分注し、S9Mix 0.5mlと菌懸濁液0.1mlを加え、37°Cで20分間振盪し、プレインキュベーションを行った。S9Mixを共存させない場合には、S9Mixの代わりに0.1Mナトリウムリン酸緩衝液(pH 7.4) 0.5mlを加えた。プレインキュベーション後、トップアガー2mlを上記の試験管に加えて混和し、最少グルコース寒天平板培地に重層した。重層したトップアガーが凝固した後、37°Cで48時間培養し、復帰変異コロニー数を数えた。計測は自動コロニーカウンターで行った。同時に実体顕微鏡を用いてバックグラウンドの菌の生育を観察し、被験物質の抗菌性の有無を調べた。予備試験は各濃度あたり1枚のプレートを使用した。本試験は各濃度あたり3枚のプレートを用い、2回実施した。

5.5 試験結果の判定基準

被験物質処理プレートにおける復帰変異コロニー数(平均値)が陰性対照値の2倍以上を示し、明確な用量相関性及び再現性が認められる場合に陽性と判定する。

結果及び結論

結果を別表1～3及び図1～10に示す。

本試験1回目及び2回目における被験物質により誘発されたテスト菌株の復帰変異コロニー数は、S9Mix非共存下及び共存下のいずれにおいても、陰性(溶媒)対照値の2倍以上を示さなかった。

S9Mix非共存下及び共存下の1250 μ g/プレート以上の濃度で、沈殿物が認められた。以上の結果から、7-カルボキシフルビル酸の変異原性は陰性と結論した。

参考文献

- 1) Maron, D.M. and Ames, B.N.; Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutat. Res.*, 113, 173-215 (1983)
- 2) Green, M.H.L., Muriel, W.J.; Mutagen testing using trp⁺ reversion in *Escherichia coli*, *Mutat. Res.*, 38 3-32 (1976)
- 3) 労働省安全衛生部化学物質調査課(編), “安衛法における変異原性試験”, 中央労働災害防止協会, 東京(1991)

補足資料

本試験1回目に調製した最高及び最低濃度の被験物質溶液を分析した。その結果を下表に示す。

単位: mg/ml		
設定濃度	50	3.13
分析結果	51.9	3.25
	51.3	3.26
MEAN	51.6(103)	3.26(104)

かっこ内は設定濃度に対する割合(%)を示す。

予 備 試 験 結 果 表

被 験 物 質 の 名 称 : フタル酸ジヘプチルエステル

(No. 4L433)

S9Mix	被 験 物 質 濃 度 ($\mu\text{g}/7^\circ\text{プレート}$)	復帰変異数(コロニ数/ 7°プレート)				
		塩 基 対 置 換 型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2 uvrA	TA98	TA1537
-	溶媒対照	64 (\pm 64)	8 (\pm 8)	28 (\pm 28)	22 (\pm 22)	5 (\pm 5)
	3 9. 1	65 (\pm 65)	13 (\pm 13)	22 (\pm 22)	10 (\pm 10)	4 (\pm 4)
	7 8. 1	92 (\pm 92)	11 (\pm 11)	19 (\pm 19)	15 (\pm 15)	4 (\pm 4)
	1 5 6	75 (\pm 75)	12 (\pm 12)	26 (\pm 26)	18 (\pm 18)	8 (\pm 8)
	3 1 3	85 (\pm 85)	14 (\pm 14)	24 (\pm 24)	14 (\pm 14)	10 (\pm 10)
	6 2 5	95 (\pm 95)	7 (\pm 7)	26 (\pm 26)	10 (\pm 10)	5 (\pm 5)
	1 2 5 0	83 C (\pm 83)	7 C (\pm 7)	21 C (\pm 21)	17 C (\pm 17)	5 C (\pm 5)
	2 5 0 0	80 C (\pm 80)	10 C (\pm 10)	27 C (\pm 27)	15 C (\pm 15)	10 C (\pm 10)
	5 0 0 0	67 C (\pm 67)	9 C (\pm 9)	21 C (\pm 21)	18 C (\pm 18)	5 C (\pm 5)
+	溶媒対照	84 (\pm 84)	10 (\pm 10)	31 (\pm 31)	28 (\pm 28)	13 (\pm 13)
	3 9. 1	72 (\pm 72)	7 (\pm 7)	23 (\pm 23)	24 (\pm 24)	10 (\pm 10)
	7 8. 1	61 (\pm 61)	7 (\pm 7)	44 (\pm 44)	18 (\pm 18)	15 (\pm 15)
	1 5 6	74 (\pm 74)	10 (\pm 10)	27 (\pm 27)	35 (\pm 35)	10 (\pm 10)
	3 1 3	75 (\pm 75)	10 (\pm 10)	20 (\pm 20)	16 (\pm 16)	3 (\pm 3)
	6 2 5	77 (\pm 77)	8 (\pm 8)	28 (\pm 28)	27 (\pm 27)	5 (\pm 5)
	1 2 5 0	64 C (\pm 64)	7 C (\pm 7)	29 C (\pm 29)	21 C (\pm 21)	14 C (\pm 14)
	2 5 0 0	72 C (\pm 72)	10 C (\pm 10)	30 C (\pm 30)	25 C (\pm 25)	15 C (\pm 15)
	5 0 0 0	64 C (\pm 64)	5 C (\pm 5)	19 C (\pm 19)	20 C (\pm 20)	8 C (\pm 8)
-	陽性対照					
	濃 度 ($\mu\text{g}/7^\circ\text{プレート}$) コロニ数 / 7°プレート	{ }	{ }	{ }	{ }	{ }
+	陽性対照					
	濃 度 ($\mu\text{g}/7^\circ\text{プレート}$) コロニ数 / 7°プレート	{ }	{ }	{ }	{ }	{ }

(備 考) C: 沈殿物が認められた.

(平 均 値)

図 1 (本試験 1)

被験物質名：フタル酸ジヘプチルエステル

No. 4L433

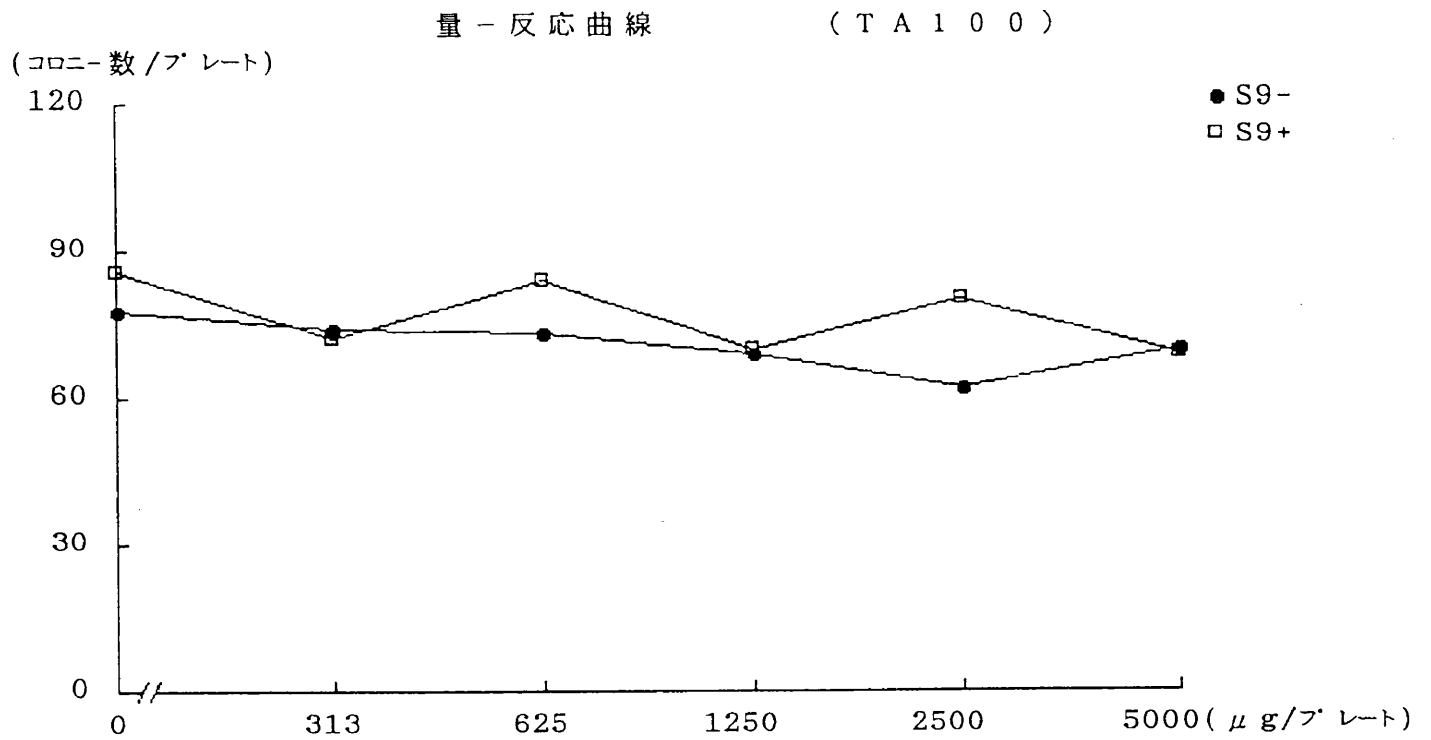


図 2 (本試験 1)

被験物質名：フタル酸ジヘプチルエステル

No. 4L433

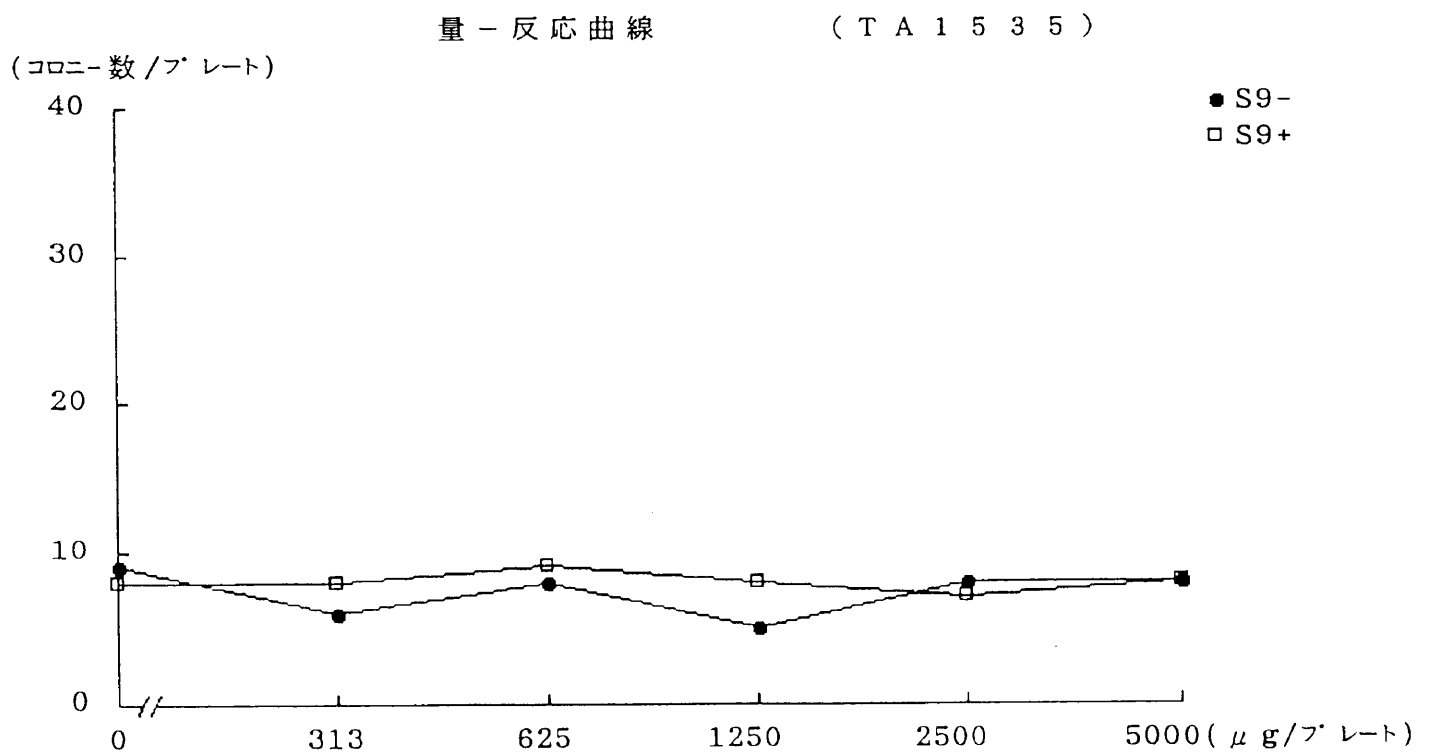


図 3 (本試験 1)

被験物質名：フタル酸ジヘプチルエステル

No. 4L433

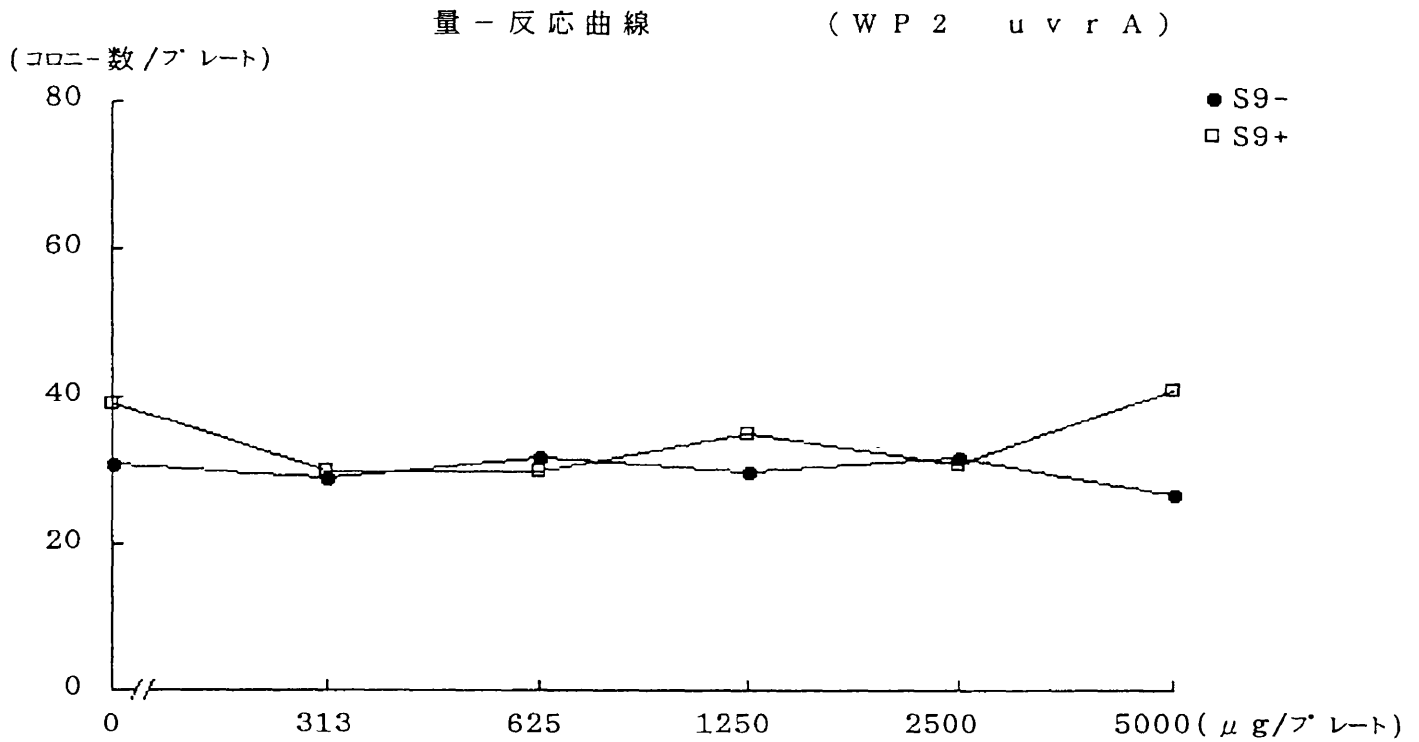


図 4 (本試験 1)

被験物質名：フタル酸ジヘプチルエステル

No. 4L433

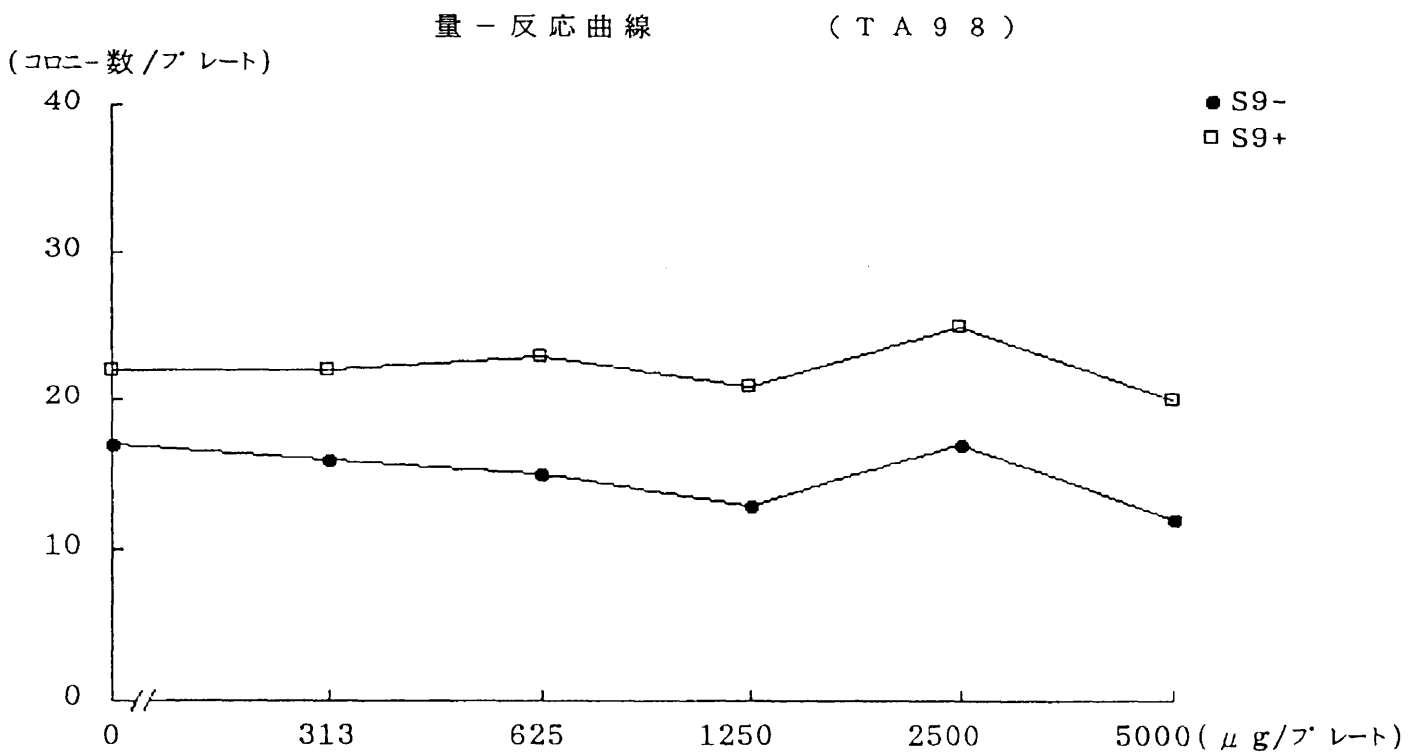


図 5 (本 試 験 1)

被 験 物 質 名 : フ タ ル 酸 ジ ヘ プ チ ル エ ス テ ル

No. 4L433

量 - 反 応 曲 線

(T A 1 5 3 7)

(コ ロ ニ - 数 / プ レ ー ト)

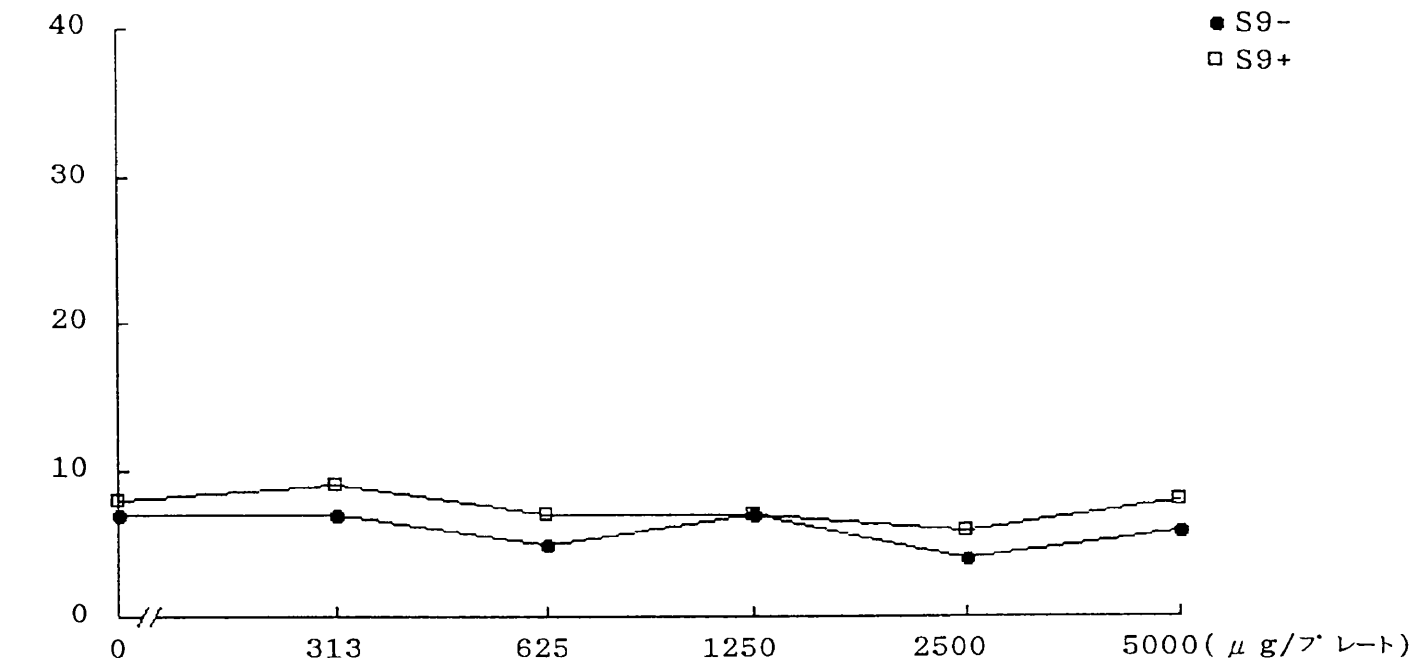


図 6 (本試験 2)

被験物質名：フタル酸ジヘプチルエステル

No. 4L433

量 - 反応曲線 (T A 1 0 0)

(コロニー数/プレート)

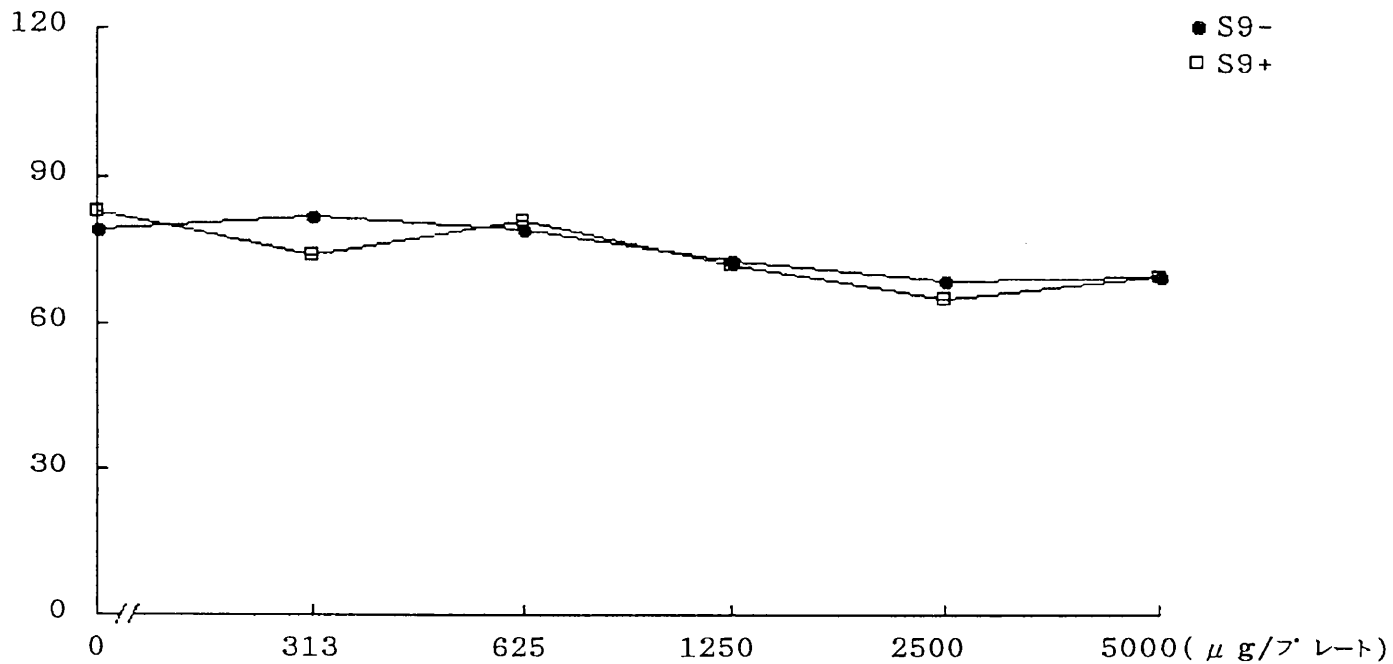


図 7 (本試験 2)

被験物質名：フタル酸ジヘプチルエステル

No. 4L433

量 - 反応曲線 (T A 1 5 3 5)

(コロニー数/プレート)

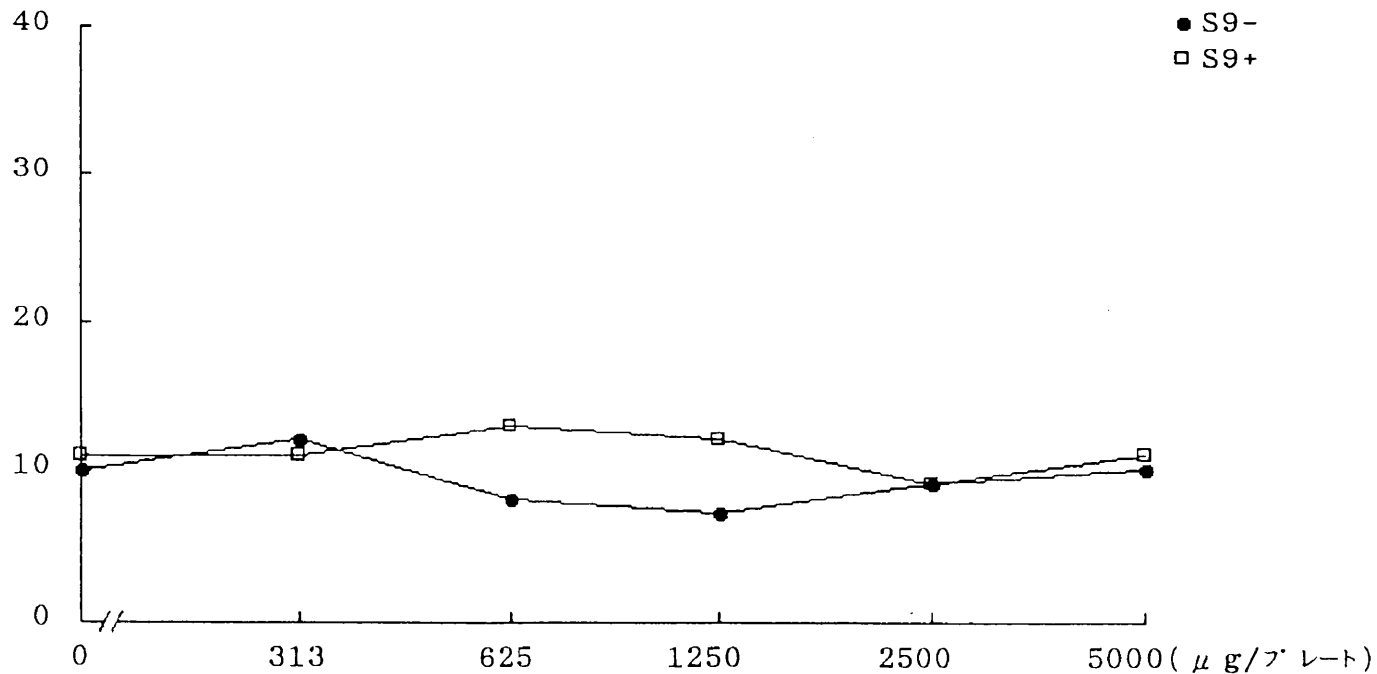


図 8 (本試験 2)

被験物質名：フタル酸ジヘプチルエステル

No. 4L433

量 - 反応曲線 (W P 2 u v r A)

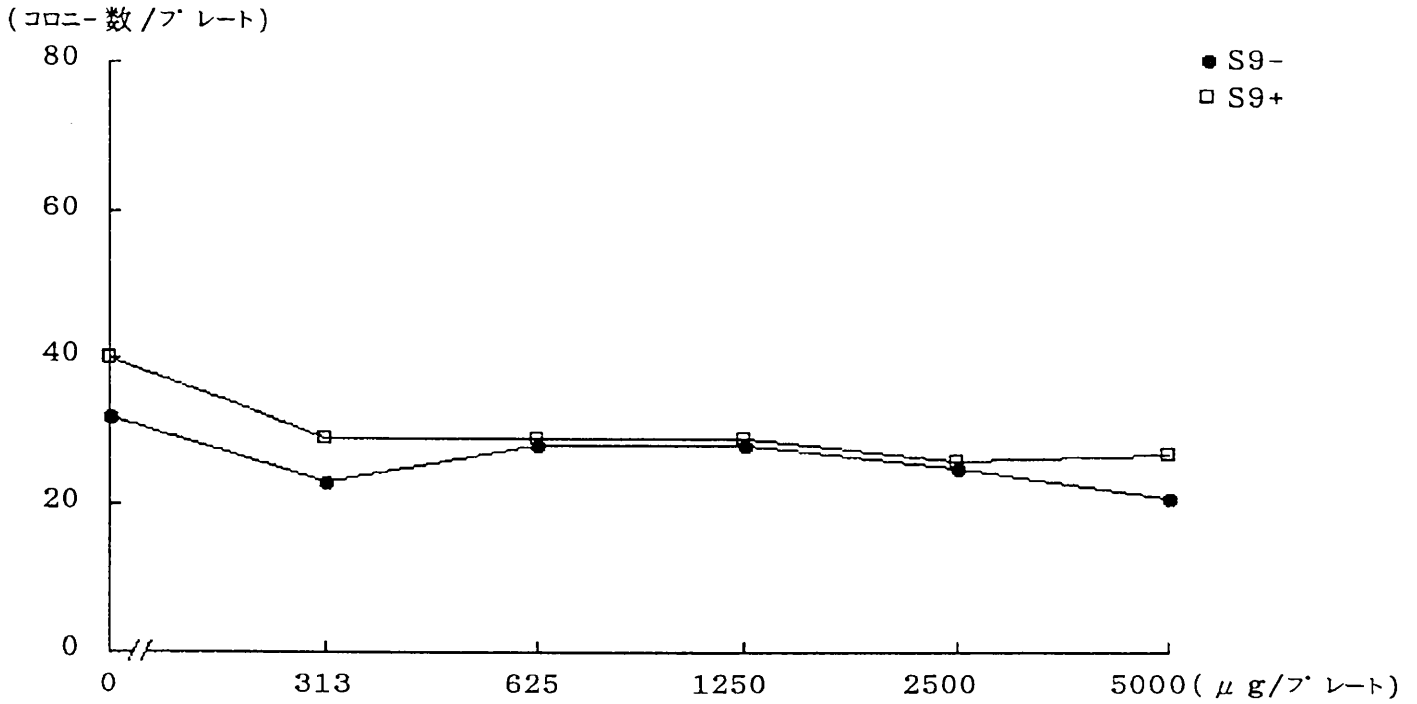


図 9 (本試験 2)

被験物質名：フタル酸ジヘプチルエステル

No. 4L433

量 - 反応曲線 (T A 9 8)

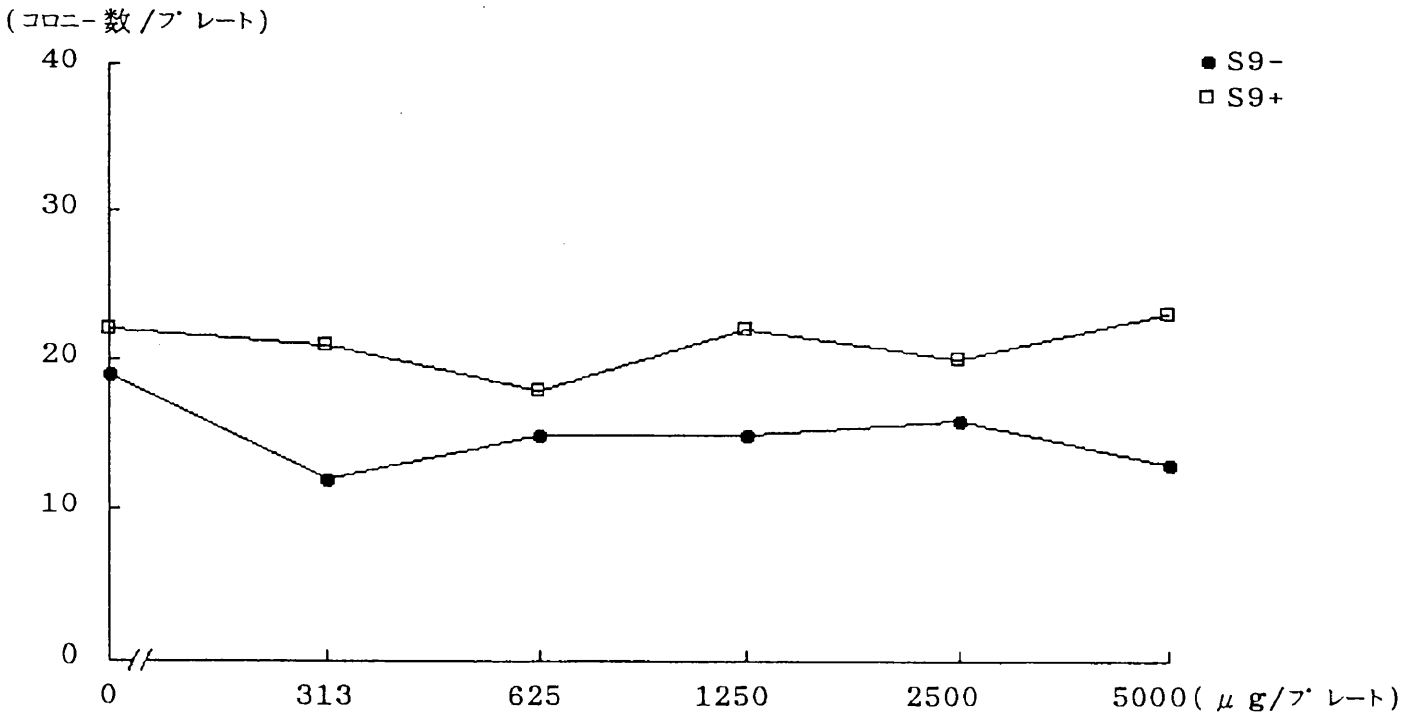


図 10 (本試験 2)

被験物質名：フタル酸ジヘプチルエステル

No. 4L433

量 - 反応曲線

(T A 1 5 3 7)

(コロニー数/プレート)

