メトキシメタノールの
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】

メトキシメタ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 *uvr*A 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 *Salmonella* 4菌株では 19.53～625 μg/プレート、*E. coli* では 39.06～2500 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種類の検定菌うち TA100, TA98 において復帰変異コロニー数が、陰性対照の2倍以上に増加し、再現性も認められたことから、メトキシメタノールは、用いた試験系において変異原性を有する（陽性）ものと判定された。

【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、メトキシメタノールについて、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℃、11～12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〕

メトキシメタノール（CAS No. 4461-52-3、以下ＭＯＭと略）は、分子量62の無色透明の液体である。純度 46.73%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。

ＭＯＭは、アセトン（ロット番号：DSR 3251、和光純薬工業㈱）を用いて 50 mg/mℓ に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。

ＭＯＭの本試験に用いた調製検体は秦野研究所に於いて含量測定試験を行った。含量測定試験は、原則として高濃度溶液および低濃度溶液各３サンプルについて実施するものであるが、化学分析条件の検討結果から、ＭＯＭについては、最高濃度（25 mg/mℓ）および測定可能な中濃度（1.562 mg/mℓ）で行った。その結果、25 mg/mℓ 溶液の含量は、既定濃度に対し、81.6～107%（平均 98.2%）、1.562 mg/mℓ 溶液は、69.9～85.9%（平均 78.1%）であった（Appendix 1）。高濃度溶液については基準を満たしていたが、中濃度溶液については基準を外れていた。また、各濃度の３サンプル間のばらつきも当研究所の基準を外れていた。以上の結果が得られた原因として、被験物質が易揮発性の性質をもつため、検体調製の希釈操作中およびサンプル採取操作中にその一部が揮発したため

と考えられる。

なお、MOMのアセトン溶液中での安定性試験については、サンプル間の測定値のばらつきが大きく、上記の操作法により安定性を確認することは困難と考え、実施しなかった。

〔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（用量設定試験においてはロット番号：DJ040IH, 1992年9月4日製造、本試験においては、ロット番号：DJ050JH, 1992年10月12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	0.2g	ﾘﾝ酸水素ｱﾝﾓﾆｳﾑﾅﾄﾘｳﾑ・4水和物	3.5g
ｸｴﾝ酸・1水和物	2g	ｸﾞﾙｺｰｽ	20g
ﾘﾝ酸水素二ｶﾘｳﾑ	10g	ﾊﾞｸﾄｱｶﾞｰ (Difco)	15g

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-284、1992年10月30日製造および RAA-285、1992年11月20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。MOMについて、50～5000 μg/プレート の範囲で公比約 3 の 5 用量で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、抗菌性が認められた。すなわち、直接法および代謝活性化法とも *Salmonella* は 500 μg/プレート 以上、*E. coli* は 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は、*Salmonella* 4 菌株は 625 μg/プレート、*E. coli* は 2500 μg/プレート とした。なお、本試験では、直接法、代謝活性化法とも抗菌性を考慮して 6 ～ 7 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。MOM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 種類の検定菌のうち、TA100, TA98 において復帰変異コロニーが陰性対照の 2 倍以上に増加し、かつその増加に用量依存性が認められたことから、MOMは、変異原性を有するものと判定した。すなわち、TA100 は、2 回の本試験のうち 1 回、TA98 は、2 回の本試験において、直接法、代謝活性化法ともに復帰変異コロニー数の増加が認められ、かつ再現性も得られた。直接法および代謝活性化法での 2 回の本試験において、高用量域で抗菌性を認めたが、いずれも 4 用量以上で抗菌性は認められず、本試験は成立した。

なお、MOMは純度50%未満であり、易揮発性であるため、含量測定試験の結果、既定濃度から著しく低い値のまま実施した。試験は、用時調製後速やかに処理した平板を同一濃度毎に滅菌袋に入れ培養を行った。

MOM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、ＭＯＭは、用いた試験系において変異原性を有する（陽性）ものと判定した。

【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 Methoxymethanol

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	124 151 154 (143 ± 16.5)	22 32 18 (24 ± 7.2)	16 14 21 (17 ± 3.6)	20 14 17 (17 ± 3.0)	9 12 10 (10 ± 1.5)	
	1.5	119	25	20	25	16	
	5	127	19	16	16	15	
	15	175	22	22	37	11	
	50	140	13	19	23	12	
	150	307	28	27	64	7	
	500	0 *	0 *	20	5 *	0 *	
	1500	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	
	5000	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	
S9Mix (+)	0	128 126 110 (121 ± 9.9)	11 25 29 (22 ± 9.5)	12 21 20 (18 ± 4.9)	34 36 26 (32 ± 5.3)	13 22 16 (17 ± 4.6)	
	1.5	151	15	21	33	12	
	5	156	19	32	30	24	
	15	155	27	24	45	24	
	50	162	20	20	44	23	
	150	329	27	16	94	12	
	500	58 *	6 *	22	49 *	4 *	
	1500	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	
	5000	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	644 605 617 (622 ± 20.0)	290 281 294 (288 ± 6.7)	125 110 165 (133 ± 28.4)	684 653 636 (658 ± 24.3)	2365 2110 2604 (2360 ± 247.0)	
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (µg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate	742 728 756 (742 ± 14.0)	198 176 196 (190 ± 12.2)	419 378 403 (400 ± 20.7)	203 247 225 (225 ± 22.0)	161 182 149 (164 ± 16.7)	

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 Methoxymethanol

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	152 112 122 (129 ± 20.8)	13 17 10 (13 ± 3.5)	18 17 21 (19 ± 2.1)	21 13 18 (17 ± 4.0)	10 17 15 (14 ± 3.6)	
	19.53	104 95 89 (96 ± 7.5)	13 13 13 (13 ± 0.0)		15 25 23 (21 ± 5.3)	15 18 15 (16 ± 1.7)	
	39.06	94 104 95 (98 ± 5.5)	18 15 9 (14 ± 4.6)	16 13 13 (14 ± 1.7)	30 29 26 (28 ± 2.1)	14 12 15 (14 ± 1.5)	
	78.12	121 119 107 (116 ± 7.6)	19 20 14 (18 ± 3.2)	15 12 17 (15 ± 2.5)	48 62 67 (59 ± 9.8)	13 15 17 (15 ± 2.0)	
	156.2	161 165 271 (199 ± 62.4)	17 16 11 (15 ± 3.2)	23 20 19 (21 ± 2.1)	96 98 91 (95 ± 3.6)	10 14 10 (11 ± 2.3)	
	312.5	210 * 115 * 202 * (176 ± 52.7)	4 * 4 * 7 * (5 ± 1.7)	25 26 34 (28 ± 4.9)	39 * 35 * 39 * (38 ± 2.3)	2 * 3 * 1 * (2 ± 1.0)	
	625	5 * 1 * 0 * (2 ± 2.6)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	11 22 13 (15 ± 5.9)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	
	1250			3 * 0 * 0 * (1 ± 1.7)			
	2500			0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)			
S9Mix (+)	0	129 136 137 (134 ± 4.4)	22 18 13 (18 ± 4.5)	27 14 20 (20 ± 6.5)	29 27 24 (27 ± 2.5)	22 23 13 (19 ± 5.5)	
	19.53	152 119 149 (140 ± 18.2)	11 12 13 (12 ± 1.0)		32 34 26 (31 ± 4.2)	12 17 10 (13 ± 3.6)	
	39.06	154 153 154 (154 ± 0.6)	11 8 10 (10 ± 1.5)	17 15 12 (15 ± 2.5)	38 38 26 (34 ± 6.9)	17 15 16 (16 ± 1.0)	
	78.12	163 149 183 (165 ± 17.1)	14 15 18 (16 ± 2.1)	11 12 21 (15 ± 5.5)	39 43 49 (44 ± 5.0)	12 18 10 (13 ± 4.2)	
	156.2	203 264 247 (238 ± 31.5)	19 12 13 (15 ± 3.8)	25 30 15 (23 ± 7.6)	49 64 60 (58 ± 7.8)	11 16 13 (13 ± 2.5)	
	312.5	88 * 188 * 111 * (129 ± 52.4)	3 * 2 * 5 * (3 ± 1.5)	30 23 21 (25 ± 4.7)	25 35 39 (33 ± 7.2)	2 * 0 * 4 * (2 ± 2.0)	
	625	39 * 10 * 9 * (19 ± 17.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	21 25 26 (24 ± 2.6)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	
	1250			2 * 0 * 0 * (1 ± 1.2)			
	2500			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	625 614 554 (598 ± 38.2)	169 150 153 (157 ± 10.2)	127 148 121 (132 ± 14.2)	673 644 631 (649 ± 21.5)	2010 1990 2020 (2007 ± 15.3)	
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate	486 485 487 (486 ± 1.0)	194 236 219 (216 ± 21.1)	664 651 912 (742 ± 147.1)	171 147 166 (161 ± 12.7)	224 187 163 (191 ± 30.7)	

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 Methoxymethanol

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	110 133 125 (123 ± 11.7)	6 9 7 (7 ± 1.5)	14 17 20 (17 ± 3.0)	15 14 28 (19 ± 7.8)	5 7 6 (6 ± 1.0)
	19.53	144 136 143 (141 ± 4.4)	8 14 12 (11 ± 3.1)		31 26 30 (29 ± 2.6)	7 3 9 (6 ± 3.1)
	39.06	205 182 198 (195 ± 11.8)	8 18 10 (12 ± 5.3)	22 18 17 (19 ± 2.6)	49 51 64 (55 ± 8.1)	8 6 4 (6 ± 2.0)
	78.12	368 317 330 (338 ± 26.5)	7 18 13 (13 ± 5.5)	25 35 22 (27 ± 6.8)	75 71 77 (74 ± 3.1)	4 4 2 (3 ± 1.2)
	156.2	290 262 133 (228 ± 83.7)	14 3 6 (8 ± 5.7)	35 26 28 (30 ± 4.7)	53 51 54 (53 ± 1.5)	3 3 6 (4 ± 1.7)
	312.5	19 * 15 * 14 * (16 ± 2.6)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	11 18 16 (15 ± 3.6)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)
	625	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)
	1250			0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)		
	2500			0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)		
S9Mix (+)	0	123 121 120 (121 ± 1.5)	11 11 8 (10 ± 1.7)	22 11 14 (16 ± 5.7)	25 18 26 (23 ± 4.4)	5 11 6 (7 ± 3.2)
	19.53	123 128 140 (130 ± 8.7)	15 8 8 (10 ± 4.0)		50 28 37 (38 ± 11.1)	6 7 5 (6 ± 1.0)
	39.06	184 196 170 (183 ± 13.0)	8 4 7 (6 ± 2.1)	24 15 20 (20 ± 4.5)	43 39 36 (39 ± 3.5)	9 10 7 (9 ± 1.5)
	78.12	374 383 349 (369 ± 17.6)	10 10 9 (10 ± 0.6)	16 20 19 (18 ± 2.1)	48 51 41 (47 ± 5.1)	6 11 8 (8 ± 2.5)
	156.2	230 241 320 (264 ± 49.1)	4 4 3 (4 ± 0.6)	16 22 18 (19 ± 3.1)	55 59 31 (48 ± 15.1)	3 3 4 (3 ± 0.6)
	312.5	83 * 121 * 85 * (96 ± 21.4)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	7 19 14 (13 ± 6.0)	10 * 8 * 13 * (10 ± 2.5)	0 * 0 * 4 * (1 ± 2.3)
	625	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	6 5 11 (7 ± 3.2)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)
	1250			0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)		
	2500			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	614 603 589 (602 ± 12.5)	171 168 117 (152 ± 30.3)	203 208 190 (200 ± 9.3)	576 618 677 (624 ± 50.7)	2574 2521 2594 (2563 ± 37.7)
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2
	Number of colonies / plate	915 968 924 (936 ± 28.4)	215 231 189 (212 ± 21.2)	605 696 575 (625 ± 63.0)	379 383 426 (396 ± 26.1)	246 288 209 (248 ± 39.5)

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.