



2, 3-ジプロモサクシネートの
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】

2,3-ジプロモサクシネート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、50～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、本試験では、直接法は 156.3～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、代謝活性化法では 312.5～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で試験を実施した。

その結果、2回の本試験とも、用いた5種類の検定菌について、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、2,3-ジプロモサクシネートは、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】

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、難分解性化学物質の1つである、2,3-ジブロモサクシネートについて、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°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Na 2 (OXOID, ロット番号: B-1674/1 およ
び B-1674/2) を入れたL字型試験管に種菌を接種し、 37°C 、約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〕

2,3-ジプロモサクシネート (CAS No. 526-78-3、以下DBSと略) は、分子量 275.88
の白色の粉末である。純度 98%以上のもの (ロット番号:) を
から供与された。被験物質は、使用時まで室温に保管した。

DBSは、アセトン (ロット番号: DSR 3251 および DSM 4173、和光純薬工業(株)) 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、純度換算は行わなかった。

秦野研究所においてDBSのアセトン溶液中での安定性試験を行った。本試験およびチ
ャイニーズ・ハムスターの培養細胞を用いる染色体異常試験 (H-92-296) における最高濃
度 (233.5 mg/ml) および最低濃度 (0.7812 mg/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、99.4%および98.4%であった。これらの値は、当研究所
の標準操作手順書の基準を満たしていた (Appendix 1)。

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、 50 mg/ml 溶液の
含量は既定濃度に対し、101~105%、 1.563 mg/ml 溶液は、96.0~104%であった。これ

らの値も当研究所の標準操作手順書の基準を満たしていた (Appendix 2)。

以上の結果から、D B S 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 : フリルアラマイド	(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-アミノアハチセン	(和光純薬工業(株))	ロット番号 DSF2950,	純度>90%

AF-2, 9-AA, 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、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) バクトアガー (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 : DJ030BH, 1992年5月14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 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	バクトアガー (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
塩化カルシウム	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1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。DBSについて、50～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で公比を約3とし、試験を実施したところ、すべての検定菌の直接法において、最高用量の 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ でのみ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を直接法、代謝活性化法ともに、すべての検定菌において、5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とし、公比2で、直接法は6用量、代謝活性化法は5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。DBSについて直接法では 156.3～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、代謝活性化法では 312.5～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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、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。

なお、直接法において、すべての検定菌で最高用量の 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ においてのみ抗菌性が認められた。

DBS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、DBS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." Kilby, 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 2,3-dibromosuccinate

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	97	112	126	15	7	9	11	20	18	20	23	15	7	7	7	
		(112 \pm 14.5)			(10 \pm 4.2)			(16 \pm 4.7)			(19 \pm 4.0)			(7 \pm 0.0)			
	50	97			15			16			26			13			
	150	106			11			14			11			6			
	500	113			11			14			7			12			
	1500	111			9			14			21			8			
	5000	78 *			3 *			16 *			11 *			4 *			
S9 Mix (-)	0	127	119	124	10	19	9	20	17	18	24	32	32	12	20	13	
		(123 \pm 4.0)			(13 \pm 5.5)			(18 \pm 1.5)			(29 \pm 4.6)			(15 \pm 4.4)			
	50	127			16			21			20			13			
	150	114			9			14			30			15			
	500	117			12			25			30			19			
	1500	102			23			17			27			15			
	5000	104			13			23			33			13			
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	432	427	440	156	160	185	158	176	171	583	563	592	3533	3729	3659	
		(433 \pm 6.6)			(167 \pm 15.7)			(168 \pm 9.3)			(579 \pm 14.8)			(3640 \pm 99.3)			
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose (μg / plate)	1			2			10			0.5			2			
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	788	789	818	230	222	250	531	583	549	238	268	300	176	214	250	
		(798 \pm 17.0)			(234 \pm 14.4)			(554 \pm 26.4)			(269 \pm 31.0)			(213 \pm 37.0)			

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.

Table 2. Results of bacterial reverse mutation assay (I) with 2,3-dibromosuccinate

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			
S9Mix (-)	0	129	123	120	15	15	12	31	29	23	29	55	46	5	12	6	
		(124 \pm 4.6)			(14 \pm 1.7)			(28 \pm 4.2)			(43 \pm 13.2)			(8 \pm 3.8)			
	156.3	114	140	109	18	6	9	21	26	19	48	60	50	9	9	7	
		(121 \pm 16.6)			(11 \pm 6.2)			(22 \pm 3.6)			(53 \pm 6.4)			(8 \pm 1.2)			
	312.5	115	131	115	13	10	18	22	24	34	32	34	31	4	12	12	
		(120 \pm 9.2)			(14 \pm 4.0)			(27 \pm 6.4)			(32 \pm 1.5)			(9 \pm 4.6)			
	625	120	109	118	15	11	11	18	32	22	34	28	32	8	8	7	
		(116 \pm 5.9)			(12 \pm 2.3)			(24 \pm 7.2)			(31 \pm 3.1)			(8 \pm 0.6)			
1250	105	119	121	11	13	9	32	18	24	35	35	33	7	7	7		
	(115 \pm 8.7)			(11 \pm 2.0)			(25 \pm 7.0)			(34 \pm 1.2)			(7 \pm 0.0)				
2500	125	101	116	10	8	14	40	22	30	26	29	30	10	9	5		
	(114 \pm 12.1)			(11 \pm 3.1)			(31 \pm 9.0)			(28 \pm 2.1)			(8 \pm 2.6)				
5000	0*	0*	0*	10*	0*	0*	0*	0*	0*	18*	20*	14*	0*	0*	0*		
	(0 \pm 0.0)			(3 \pm 5.8)			(0 \pm 0.0)			(17 \pm 3.1)			(0 \pm 0.0)				
S9Mix	0	125	132	129	15	12	16	18	39	25	56	41	38	9	12	12	
		(129 \pm 3.5)			(14 \pm 2.1)			(27 \pm 10.7)			(45 \pm 9.6)			(11 \pm 1.7)			
	312.5	149	131	131	23	9	11	18	19	28	40	52	45	11	13	12	
		(137 \pm 10.4)			(14 \pm 7.6)			(22 \pm 5.5)			(46 \pm 6.0)			(12 \pm 1.0)			
	625	120	150	130	10	19	17	21	31	34	55	53	55	12	16	12	
		(133 \pm 15.3)			(15 \pm 4.7)			(29 \pm 6.8)			(54 \pm 1.2)			(13 \pm 2.3)			
	1250	131	125	109	15	18	23	27	23	40	44	47	47	7	18	9	
	(122 \pm 11.4)			(19 \pm 4.0)			(30 \pm 8.9)			(46 \pm 1.7)			(11 \pm 5.9)				
2500	128	129	158	22	20	11	23	16	23	61	49	58	11	7	12		
	(138 \pm 17.0)			(18 \pm 5.9)			(21 \pm 4.0)			(56 \pm 6.2)			(10 \pm 2.6)				
5000	114	120	127	17	22	15	31	38	14	59	36	48	16	7	11		
	(120 \pm 6.5)			(18 \pm 3.6)			(28 \pm 12.3)			(48 \pm 11.5)			(11 \pm 4.5)				
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA			
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01			0.5			0.01			0.1			80			
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1			2			10			0.5			2			
	Number of colonies / plate	410	373	394	122	126	106	168	134	154	545	502	555	1818	1698	1982	
		(392 \pm 18.6)			(118 \pm 10.6)			(152 \pm 17.1)			(534 \pm 28.2)			(1833 \pm 142.6)			
	Number of colonies / plate	439	599	620	211	181	192	860	829	726	235	277	222	171	175	155	
		(553 \pm 99.0)			(195 \pm 15.2)			(805 \pm 70.1)			(245 \pm 28.7)			(167 \pm 10.6)			

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.

Table 3. Results of bacterial reverse mutation assay (II) with 2,3-dibromosuccinate

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	119	100	110	9	9	14	20	19	22	30	31	28	10	5	9	(110 ± 9.5)	(11 ± 2.9)	(20 ± 1.5)	(30 ± 1.5)	(8 ± 2.6)
	156.3	90	135	104	12	15	12	27	32	26	20	27	32	6	6	6	(110 ± 23.0)	(13 ± 1.7)	(28 ± 3.2)	(26 ± 6.0)	(6 ± 0.0)
	312.5	109	131	110	13	9	16	19	19	21	26	28	23	10	9	10	(117 ± 12.4)	(13 ± 3.5)	(20 ± 1.2)	(26 ± 2.5)	(10 ± 0.6)
	625	124	126	135	23	14	15	21	24	14	23	22	24	8	8	5	(128 ± 5.9)	(17 ± 4.9)	(20 ± 5.1)	(23 ± 1.0)	(7 ± 1.7)
	1250	125	117	134	10	12	12	19	26	20	31	28	40	8	7	2	(125 ± 8.5)	(11 ± 1.2)	(22 ± 3.8)	(33 ± 6.2)	(6 ± 3.2)
	2500	122	106	124	16	22	13	16	17	27	25	25	26	6	8	4	(117 ± 9.9)	(17 ± 4.6)	(20 ± 6.1)	(25 ± 0.6)	(6 ± 2.0)
	5000	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)
S9Mix (+)	0	109	136	131	18	9	12	16	19	25	37	45	39	10	10	11	(125 ± 14.4)	(13 ± 4.6)	(20 ± 4.6)	(40 ± 4.2)	(10 ± 0.6)
	312.5	130	124	123	14	12	10	21	28	14	31	33	36	17	15	13	(126 ± 3.8)	(12 ± 2.0)	(21 ± 7.0)	(33 ± 2.5)	(15 ± 2.0)
	625	102	126	143	17	16	10	22	20	13	38	42	31	10	15	12	(124 ± 20.6)	(14 ± 3.8)	(18 ± 4.7)	(37 ± 5.6)	(12 ± 2.5)
	1250	140	122	120	18	12	21	21	17	24	32	34	30	12	8	17	(127 ± 11.0)	(17 ± 4.6)	(21 ± 3.5)	(32 ± 2.0)	(12 ± 4.5)
	2500	125	128	119	16	11	19	25	31	19	36	37	40	14	13	11	(124 ± 4.6)	(15 ± 4.0)	(25 ± 6.0)	(38 ± 2.1)	(13 ± 1.5)
	5000	123	113	128	15	14	17	23	18	25	25	48	27	14	14	17	(121 ± 7.6)	(15 ± 1.5)	(22 ± 3.6)	(33 ± 12.7)	(15 ± 1.7)
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA							
	Dose (µg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80							
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA							
	Dose (µg /plate)	1			2			10			0.5			2							
Positive control S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	441	413	419	127	147	161	122	128	144	495	500	501	2204	2208	2290	(424 ± 14.7)	(145 ± 17.1)	(131 ± 11.4)	(499 ± 3.2)	(2234 ± 48.5)
	Number of colonies / plate	724	674	713	217	226	229	864	856	888	286	253	282	149	128	117	(704 ± 26.3)	(224 ± 6.2)	(869 ± 16.7)	(274 ± 18.0)	(131 ± 16.3)

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.