

厚生省生活衛生局 殿

## 試験報告書

フタリミドの細菌を用いる復帰突然変異試験

(試験番号：7L632)

株式会社三菱化学安全科学研究所

## 目 次

要 約	7
材料および方法	8
1. 試験物質	8
2. テスト菌株	8
3. 培 地	9
4. S9 mix	10
5. 試験方法	10
結果および結論	12
参考文献	13
表	14
図	17

## 要 約

フタリミドについて、*Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 および *Escherichia coli* WP2uvrA の 5 菌株を指標とする復帰変異試験を実施した。

予備試験を 5000, 1250, 313, 78.1, 19.5, 4.88, 1.22  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の 7 濃度で実施した結果、S9 mix の有無によらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数の増加および抗菌性は認められなかった。この結果をもとに本試験では 5000 ~ 313  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  (公比 2) の 5 濃度を設定した。

本試験 1, 2 の結果、S9 mix の有無によらず、いずれの菌株においても陰性(溶媒)対照値の 2 倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果から、フタリミドは細菌を用いる復帰突然変異試験において変異原性を有さない(陰性)と結論した。

## 材料および方法

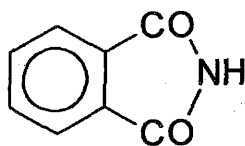
### 1. 試験物質

#### 1.1 被験物質

から提供されたフタリミド(CAS 番号 85-41-6, ロット番号 純度 99.9 %)は, 使用時まで冷暗所に密閉保存した。被験物質は下記の構造式および分子量を有する水に 0.5 g/l(20 °C)で溶解の白色粉末である。

被験物質の安定性は, 被験物質供給者より安定性を保証する資料を入手し, 確認した。

構造式:



分子量: 147.13

不純物: なし

#### 1.2 対照物質

陰性(溶媒)対照物質および陽性対照物質として, 以下のものを用いた。

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)	810S1815	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)	PTQ1296	98.8
アジ化ナトリウム	NaN <sub>3</sub>	和光純薬工業(株)	KWE6685	96.5
N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン	ENNG	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)	TWH2355	98.0

### 2. テスト菌株<sup>1) 2)</sup>

#### 2.1 テスト菌株

より 1983 年 5 月 27 日に入手した *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 および

り 1985 年 10 月 14 日に入手した *Escherichia coli* WP2uvrA の 5 菌株を用いた。

これら菌株の遺伝的特性は以下のとおりである。

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>hisD</i>	<i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	pKM101	フレームシフト
TA100	<i>hisG</i>	<i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	pKM101	塩基対置換
TA1535	<i>hisG</i>	<i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	—	塩基対置換
TA1537	<i>hisC</i>	<i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	—	フレームシフト
WP2 <i>uvrA</i>	<i>trpE</i>	<i>uvrA</i>	+	—	塩基対置換

## 2.2 特性検査

各テスト菌株のアミノ酸要求性、紫外線感受性、膜変異、薬剤耐性などの遺伝的特性を事前に調べ、これらの特性を備えた菌株を用いた。

## 2.3 保存方法

液体完全培地中に 37℃ で 8 時間振盪培養した各菌懸濁液 4 ml に対し、0.35 ml の割合で DMSO (関東化学株, ロット番号 810S1814) を加えた。これを 200  $\mu$ l ずつ小分けしてドライアイス・アセトン中で急速凍結し、超低温槽で -80℃ 以下に凍結保存したものを使用した。

## 2.4 菌懸濁液

凍結保存した菌懸濁液を解凍後、20  $\mu$ l を液体完全培地 10 ml に接種し、37℃ で 8 時間振盪培養した。培養終了後の菌懸濁液は、濁度計を用いて菌濃度を測定し、各菌株共に生菌数が  $1 \times 10^9$ /ml 以上であることを確認した。

## 3. 培 地

### 3.1 液体完全培地

精製水 1 l に対し、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 の割合で溶解し、オートクレーブ滅菌 (121℃, 15 分間, 以下同様) した。

### 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 (オリエンタル酵母工業株, ロット番号 AN750LM) を購入し、使用した。

### 3.3 トップアガー

精製水 100 ml に対して、粉末寒天 (Bacto-Agar, Difco 社, ロット番号 58007AJA) 0.6 g,

塩化ナトリウム 0.5 g の割合で加え、オートクレーブ滅菌し完全に溶解した。その後、あらかじめ調製しておいた 0.5 mM D-ビオチン, L-ヒスチジン混合水溶液(サルモネラ用)または L-トリプトファン水溶液(大腸菌用)を 1/10 量添加した。使用時まで約 45 °C に保温した。

#### 4. S9 mix

##### 4.1 S9

フェノバルビタール(1 日目 30 mg/kg, 2 日目以降 60 mg/kg を 3 回腹腔内投与)と 5,6-ベンゾフラボン(3 日目に 80 mg/kg を 1 回腹腔内投与)で酵素誘導した SD 系雄ラット肝由来 S9(キッコーマン㈱, ロット番号 RAA-374:1997 年 12 月 4 日製造)を購入し、使用した。使用時まで -80 °C 以下で保存した。

##### 4.2 S9 mix

S9 mix 1 ml あたり以下の組成で調製し、使用時まで氷中に保存した。

S9	0.1 ml
塩化マグネシウム六水塩	8 $\mu\text{mol}$
塩化カリウム	33 $\mu\text{mol}$
D-グルコース 6-リン酸	5 $\mu\text{mol}$
$\beta$ -NADPH	4 $\mu\text{mol}$
$\beta$ -NADH	4 $\mu\text{mol}$
ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)	100 $\mu\text{mol}$
滅菌精製水	残量

#### 5. 試験方法<sup>3)</sup>

##### 5.1 被験物質溶液および陽性対照物質溶液の調製

溶媒検討の結果、50 mg/ml の濃度で水に不溶、DMSO に溶解したため、溶媒には DMSO を用いた。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て各濃度の被験物質溶液を調製した。

陽性対照物質の  $\text{NaN}_3$  は注射用水(㈱大塚製薬工場, ロット番号 K7B87)に、その他は DMSO(関東化学㈱, ロット番号 810S1815)に溶解した。

##### 5.2 被験物質濃度

予備試験を 5000, 1250, 313, 78.1, 19.5, 4.88, 1.22  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の 7 濃度で実施した結果、S9 mix の有無によらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数の増加および抗菌性は認められなかった。この結果をもとに本試験では 5000, 2500, 1250, 625, 313  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の 5 濃度を設定した。

### 5.3 復帰変異試験

試験はプレインキュベーション法で実施した。

滅菌した試験管に被験物質溶液を 0.1 ml, 0.1 M ナトリウムリン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 ml および菌懸濁液を 0.1 ml 加え, 37 °C で 20 分間振盪培養した。S9 mix を共存させる場合には, 0.1 M ナトリウムリン酸緩衝液の代わりに S9 mix を 0.5 ml 添加した。プレインキュベーション後, トップアガー 2 ml を上記の混合液に加え混和し, 最少グルコース寒天平板培地上に重層した。重層したトップアガーが凝固した後, 37 °C で 48 時間培養した。

実体顕微鏡を用いて菌叢の生育状態を観察し, 被験物質による抗菌性の有無を調べた後, 目視により被験物質の沈殿の有無を確認した。プレート上の復帰変異コロニー数を自動コロニーカウンターで計測した。予備試験は各濃度につき 1 枚のプレートを使用した。本試験は各濃度につき 3 枚のプレートを使用し, 再現性を確認するため 2 回実施した。

陰性(溶媒)対照物質および以下の陽性対照物質についても同様に実施した。

菌 株	S9 mix 非共存下 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )		S9 mix 共存下 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	
TA98	AF-2	0.1	2-AA	0.5
TA100	AF-2	0.01	2-AA	1
TA1535	NaN <sub>3</sub>	0.5	2-AA	2
TA1537	9-AA	80	2-AA	2
WP2uvrA	ENNG	2	2-AA	10

### 5.4 無菌試験

最高濃度の被験物質溶液または S9 mix をトップアガーと混和し, 最少グルコース寒天平板培地上に重層し, 雑菌の混入がないことを確認した。

### 5.5 試験結果の判定

いずれかの試験菌株で, S9 mix の有無によらず, 被験物質濃度の増加にともなって復帰変異コロニー数(平均値)が陰性(溶媒)対照値の 2 倍以上に増加し, さらにその増加に再現性が認められる場合に, 当該被験物質は変異原性を有する(陽性)と判定した。その他の場合は陰性と判定した。試験結果の判定には統計学的手法は用いなかった。

## 結果および結論

予備試験の結果を表 1 に、本試験の結果を表 2, 3 および図 1~10 に示す。

予備試験を 5000, 1250, 313, 78.1, 19.5, 4.88, 1.22  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の 7 濃度で実施した結果, S9 mix の有無によらず, いずれの菌株においても復帰変異コロニー数の増加および抗菌性は認められなかった。この結果をもとに本試験では 5000 ~ 313  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  (公比 2) の 5 濃度を設定した。

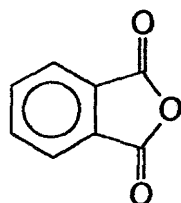
本試験 1, 2 の結果, S9 mix の有無によらず, いずれの菌株においても陰性(溶媒)対照値の 2 倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

なお, S9 mix 非共存下および共存下において陽性対照が各菌株に誘発した復帰変異コロニー数は, 各菌株の陰性対照の復帰変異コロニー数と比較して, 明らかに 2 倍を超えて増加し, 陽性の結果を示した。また, 最高濃度の被験物質溶液および S9 mix について行った無菌試験の結果, 試験の成立に影響を及ぼすような菌, カビ等の発育は認められなかった。

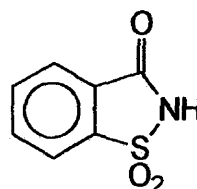
以上の結果から, フタリミドは細菌を用いる復帰突然変異試験において変異原性を有さない(陰性)と結論した。

なお, 以下に示す類似化合物はいずれも細菌を用いる復帰突然変異試験で陰性の結果が報告されている<sup>4) 5)</sup>。

無水フタル酸



不溶性サッカリン





## 参 考 文 献

- 1) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983): Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutat. Res.*, **113**, 173-215
- 2) Green, M.H.L. and Muriel, W.J. (1976): Mutagen testing using *trp*<sup>+</sup> reversion in *Escherichia coli*, *Mutat. Res.*, **38**, 3-32
- 3) 労働省安全衛生部化学物質調査課編(1991):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
- 4) 労働省安全衛生部化学物質調査課監修(1996):労働安全衛生法 有害性調査制度に基づく既存化学物質変異原性試験データ集, (社)日本化学物質安全・情報センター, 東京
- 5) 石館 基 監修(1991):微生物を用いる変異原性試験データ集, 株式会社 エル・アイ・シー, 東京

表 1

## 試験結果表 (予備試験)

被験物質の名称 : フタリミド

(No.7L632)

試験実施期間		1998年 2月 23日 より 1998年 2月 26日					
代謝活性化系の有無	被験物質濃度 (μg/プレート)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S 9 mix (-)	溶媒対照	121	10	26	16	8	
	1.22	155	12	24	13	5	
	4.88	133	12	28	15	6	
	19.5	138	18	20	18	4	
	78.1	129	11	22	23	10	
	313	148	16	28	23	11	
	1250	160	18	22	23	5	
	5000	88	15	18	12	9	
S 9 mix (+)	溶媒対照	136	17	30	37	13	
	1.22	136	26	32	30	10	
	4.88	154	16	22	22	10	
	19.5	177	16	23	28	16	
	78.1	174	25	37	29	14	
	313	133	19	28	26	16	
	1250	182	22	29	38	12	
	5000	141	15	38	37	13	
陽性対照	S9 mixを必要としな いもの	名称	AF-2	NaN <sub>3</sub>	ENNG	AF-2	9-AA
		濃度 (μg/プレート)	0.01	0.5	2	0.1	80
		コロニー数 / プレート	524	498	481	361	249
	S9 mixを必要とするもの	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		濃度 (μg/プレート)	1	2	10	0.5	2
		コロニー数 / プレート	909	335	1289	338	132

(備考)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド, NaN<sub>3</sub> : アジ化ナトリウム

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン, 9-AA : 9-アミノアクリジン, 2-AA : 2-アミノアントラセン

試験結果表 (本試験 1)

被験物質の名称 : フタリミド

(No.7L632)

試験実施期間		1998年 3月 9日 より 1998年 3月 12日					
代謝活性化系の有無	被験物質濃度 (μg/プレート)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S 9 mix (-)	溶媒対照	162	6	27	9	10	
		150 (162)	10 (8)	30 (28)	19 (16)	5 (8)	
		174 (± 12)	9 (± 2)	28 (± 2)	19 (± 6)	8 (± 3)	
	3 1 3	157	8	35	25	8	
		166 (158)	11 (8)	20 (28)	17 (21)	8 (7)	
		152 (± 7)	6 (± 3)	28 (± 8)	22 (± 4)	4 (± 2)	
	6 2 5	141	10	33	20	7	
		154 (161)	7 (10)	30 (33)	19 (18)	6 (7)	
		188 (± 24)	13 (± 3)	35 (± 3)	15 (± 3)	9 (± 2)	
	1 2 5 0	156	8	32	23	10	
		167 (159)	15 (11)	30 (29)	17 (19)	9 (9)	
		154 (± 7)	9 (± 4)	26 (± 3)	18 (± 3)	9 (± 1)	
	2 5 0 0	154	10	30	18	5	
		172 (168)	12 (11)	31 (32)	14 (15)	5 (5)	
		177 (± 12)	10 (± 1)	35 (± 3)	12 (± 3)	4 (± 1)	
	5 0 0 0	133	12	27	18	8	
		149 (143)	10 (11)	29 (27)	14 (15)	6 (6)	
		146 (± 9)	11 (± 1)	24 (± 3)	14 (± 2)	5 (± 2)	
S 9 mix (+)	溶媒対照	176	15	38	38	12	
		189 (187)	18 (15)	26 (33)	19 (27)	13 (12)	
		197 (± 11)	11 (± 4)	36 (± 6)	24 (± 10)	12 (± 1)	
	3 1 3	176	16	36	35	8	
		201 (188)	10 (12)	36 (35)	28 (30)	5 (7)	
		188 (± 13)	11 (± 3)	32 (± 2)	27 (± 4)	7 (± 2)	
	6 2 5	150	16	33	31	9	
		143 (164)	15 (16)	34 (33)	29 (30)	8 (9)	
		198 (± 30)	16 (± 1)	32 (± 1)	29 (± 1)	11 (± 2)	
	1 2 5 0	185	15	32	20	5	
		178 (170)	9 (11)	29 (33)	20 (20)	8 (7)	
		147 (± 20)	10 (± 3)	37 (± 4)	21 (± 1)	7 (± 2)	
	2 5 0 0	146	11	35	23	9	
		164 (164)	8 (9)	22 (31)	30 (27)	7 (8)	
		181 (± 18)	9 (± 2)	37 (± 8)	29 (± 4)	8 (± 1)	
	5 0 0 0	162	17	41	19	10	
		145 (154)	15 (16)	30 (33)	38 (27)	6 (8)	
		154 (± 9)	15 (± 1)	29 (± 7)	23 (± 10)	8 (± 2)	
陽性対照	S9 mixを必要としな いもの	名称	AF-2	NaN <sub>3</sub>	ENNG	AF-2	9-AA
		濃度 (μg/プレート)	0.01	0.5	2	0.1	80
	S9 mixを必要とするもの	コロニー数 / プレート	532	511	397	389	219
			505 (531)	499 (517)	410 (392)	392 (372)	179 (197)
			556 (± 26)	542 (± 22)	369 (± 21)	336 (± 32)	192 (± 20)
		名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
濃度 (μg/プレート)	1	2	10	0.5	2		
コロニー数 / プレート	1075	426	1452	328	158		
	1132 (1127)	375 (390)	1527 (1555)	245 (299)	156 (178)		
	1175 (± 50)	369 (± 31)	1685 (± 119)	324 (± 47)	220 (± 36)		

(備考)

(平均値)  
(±標準偏差)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド, NaN<sub>3</sub> : アジ化ナトリウム  
ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン, 9-AA : 9-アミノアクリジン, 2-AA : 2-アミノアントラセン

表 3

試験結果表 (本試験 2)

被験物質の名称 : フタリミド

(No.7L632)

試験実施期間		1998年 3月 23日 より 1998年 3月 26日					
代謝活性化系の有無	被験物質濃度 (µg/プレート)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S 9 mix (-)	溶媒対照	137	9	30	19	5	
		120 (132)	10 (11)	17 (23)	25 (19)	9 (8)	
		138 (± 10)	13 (± 2)	21 (± 7)	13 (± 6)	9 (± 2)	
	3 1 3	112	9	35	16	7	
		128 (120)	13 (11)	30 (29)	17 (17)	4 (7)	
		120 (± 8)	12 (± 2)	21 (± 7)	19 (± 2)	9 (± 3)	
	6 2 5	124	8	27	16	10	
		113 (119)	8 (9)	28 (27)	16 (18)	5 (6)	
		121 (± 6)	10 (± 1)	26 (± 1)	22 (± 3)	4 (± 3)	
	1 2 5 0	123	10	20	19	4	
		137 (130)	8 (9)	20 (20)	17 (19)	7 (5)	
		130 (± 7)	8 (± 1)	19 (± 1)	21 (± 2)	5 (± 2)	
	2 5 0 0	108	8	18	21	9	
		132 (122)	8 (9)	22 (19)	18 (23)	9 (8)	
		126 (± 12)	10 (± 1)	18 (± 2)	30 (± 6)	5 (± 2)	
	5 0 0 0	110	9	26	13	5	
		104 (105)	12 (10)	16 (22)	19 (15)	8 (8)	
		101 (± 5)	8 (± 2)	24 (± 5)	13 (± 3)	11 (± 3)	
S 9 mix (+)	溶媒対照	158	10	29	33	10	
		138 (144)	19 (13)	28 (27)	34 (32)	18 (13)	
		135 (± 13)	9 (± 6)	25 (± 2)	28 (± 3)	10 (± 5)	
	3 1 3	166	18	31	20	8	
		137 (151)	16 (19)	27 (28)	28 (24)	9 (9)	
		150 (± 15)	23 (± 4)	27 (± 2)	23 (± 4)	11 (± 2)	
	6 2 5	155	9	27	39	15	
		158 (154)	10 (10)	23 (27)	27 (35)	15 (13)	
		148 (± 5)	12 (± 2)	32 (± 5)	39 (± 7)	10 (± 3)	
	1 2 5 0	157	22	23	36	10	
		144 (142)	13 (16)	37 (30)	28 (30)	12 (11)	
		124 (± 17)	13 (± 5)	30 (± 7)	25 (± 6)	12 (± 1)	
	2 5 0 0	127	17	33	27	11	
		151 (139)	13 (14)	25 (26)	24 (28)	9 (8)	
		139 (± 12)	12 (± 3)	21 (± 6)	33 (± 5)	5 (± 3)	
	5 0 0 0	144	10	23	31	9	
		145 (138)	10 (9)	24 (24)	34 (28)	9 (9)	
		124 (± 12)	8 (± 1)	26 (± 2)	20 (± 7)	10 (± 1)	
陽性対照	S9 mixを必要とするもの	名称	AF-2	NaN <sub>3</sub>	ENNG	AF-2	9-AA
		濃度 (µg/プレート)	0.01	0.5	2	0.1	80
		コロニー数 / プレート	474 448 (462) 463 (± 13)	535 533 (525) 508 (± 15)	639 625 (630) 625 (± 8)	372 333 (355) 361 (± 20)	249 210 (246) 278 (± 34)
	S9 mixを必要とするもの	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		濃度 (µg/プレート)	1	2	10	0.5	2
		コロニー数 / プレート	979 999 (1033) 1121 (± 77)	307 261 (297) 322 (± 32)	1193 1221 (1246) 1325 (± 70)	345 338 (341) 339 (± 4)	136 136 (145) 164 (± 16)

(備考)

(平均値)  
(±標準偏差)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド, NaN<sub>3</sub> : アジ化ナトリウム

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン, 9-AA : 9-アミノアクリジン, 2-AA : 2-アミノアントラセン

図 1 (本試験 1)

被験物質名：フタリミド

No. 7L632

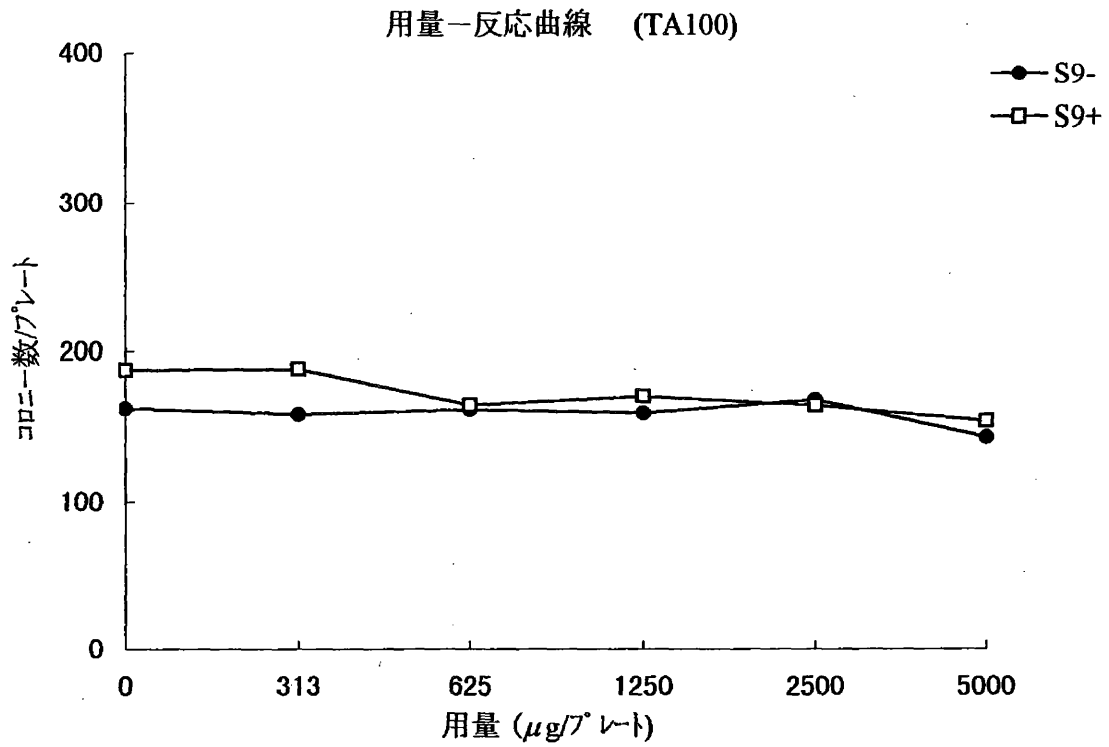


図 2 (本試験 1)

被験物質名：フタリミド

No. 7L632

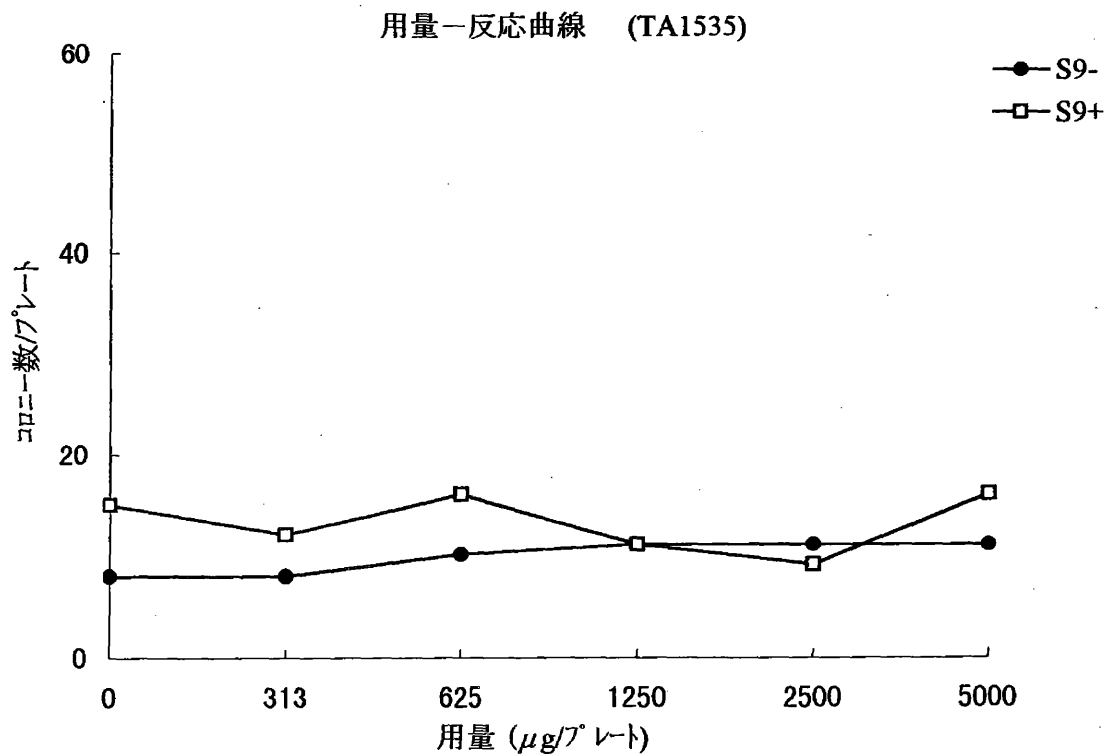


図 3 (本試験 1)

被験物質名：フタリミド

No. 7L632

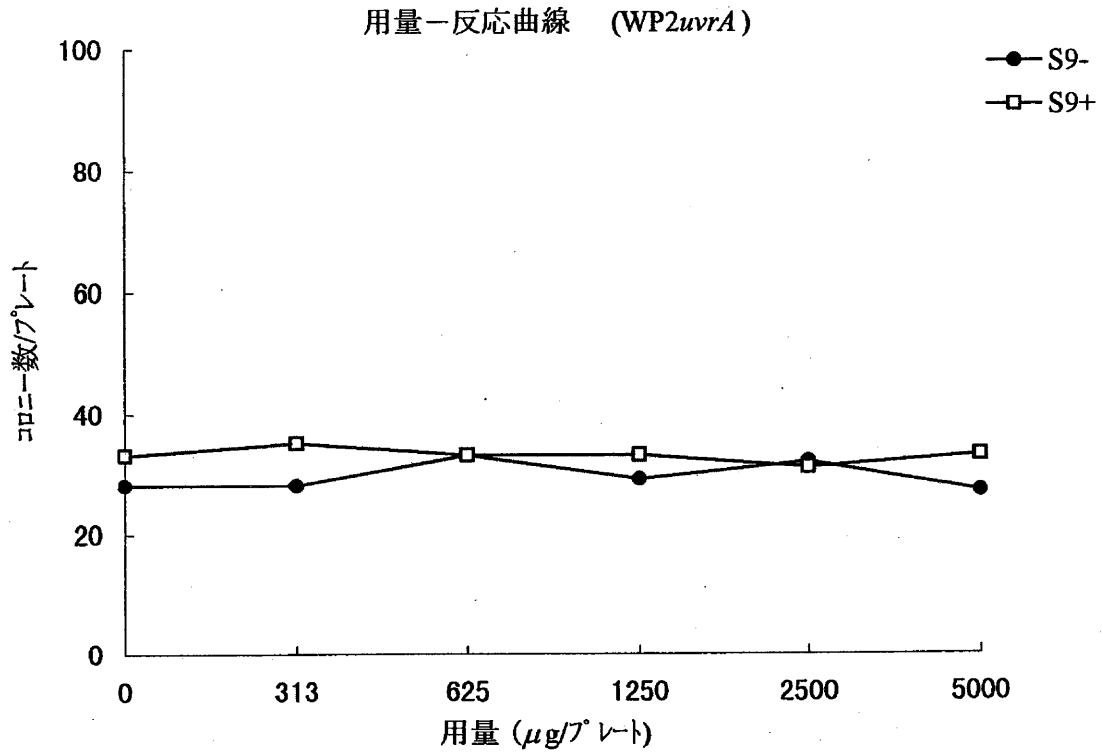


図 4 (本試験 1)

被験物質名：フタリミド

No. 7L632

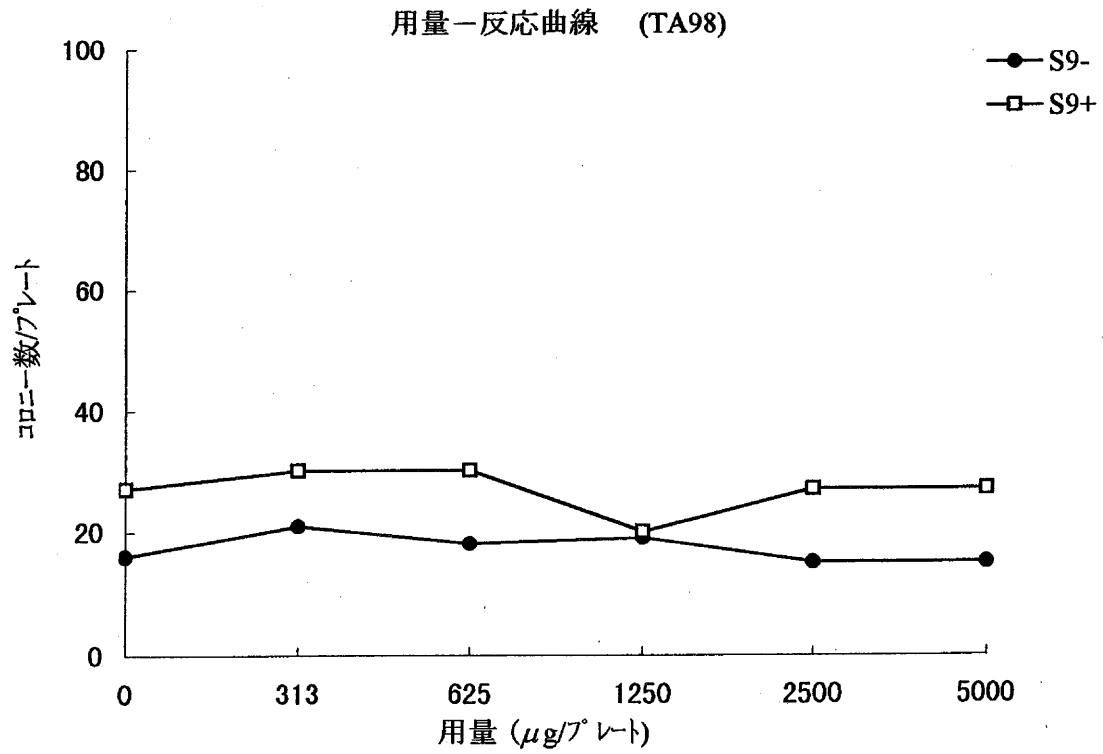


図 5 (本試験 1)

被験物質名：フタリミド

No. 7L632

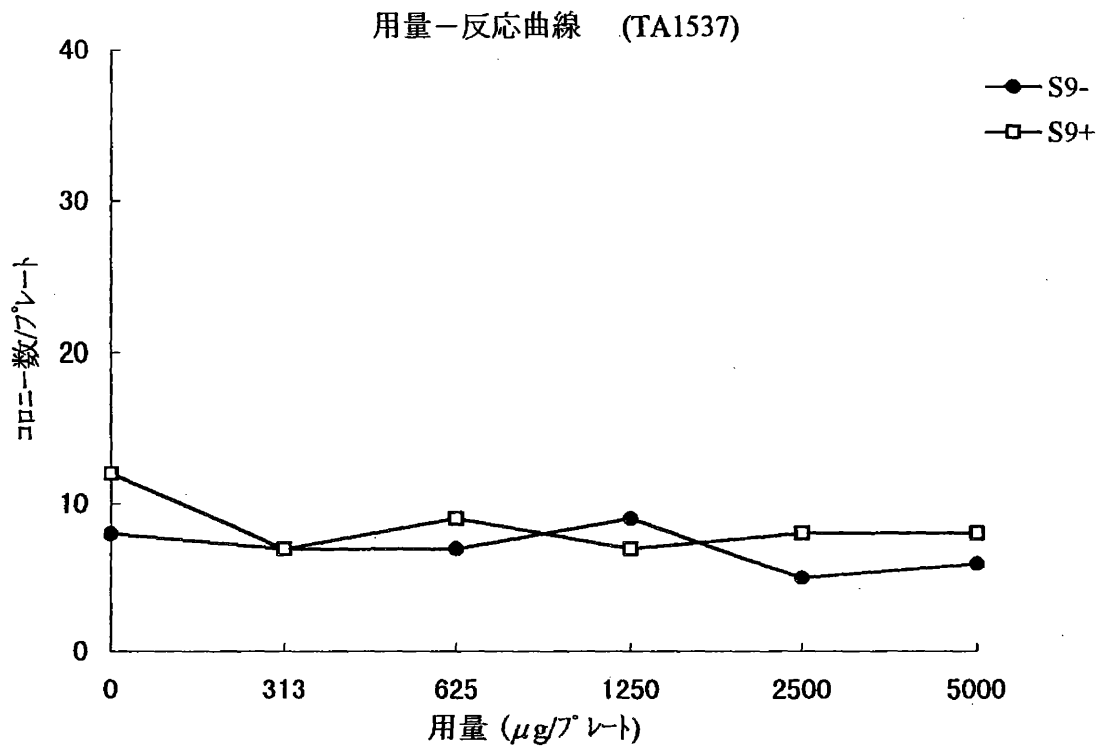


図 6 (本試験 2)

被験物質名：フタリミド

No. 7L632

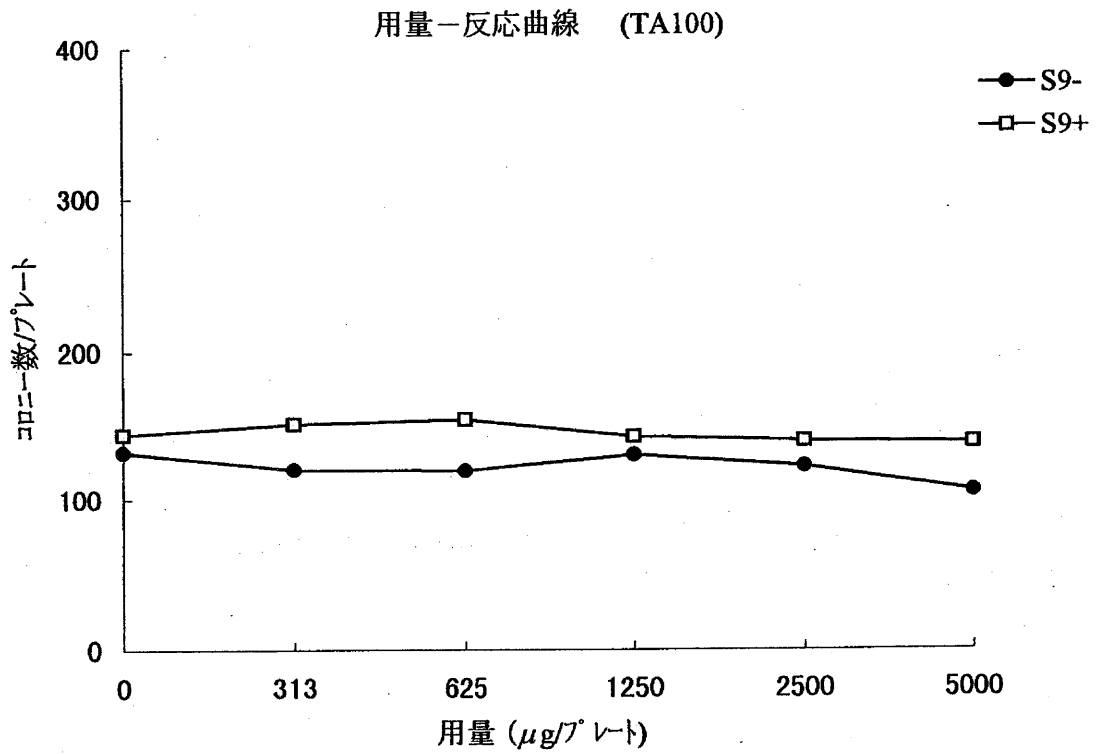


図 7 (本試験 2)

被験物質名：フタリミド

No. 7L632

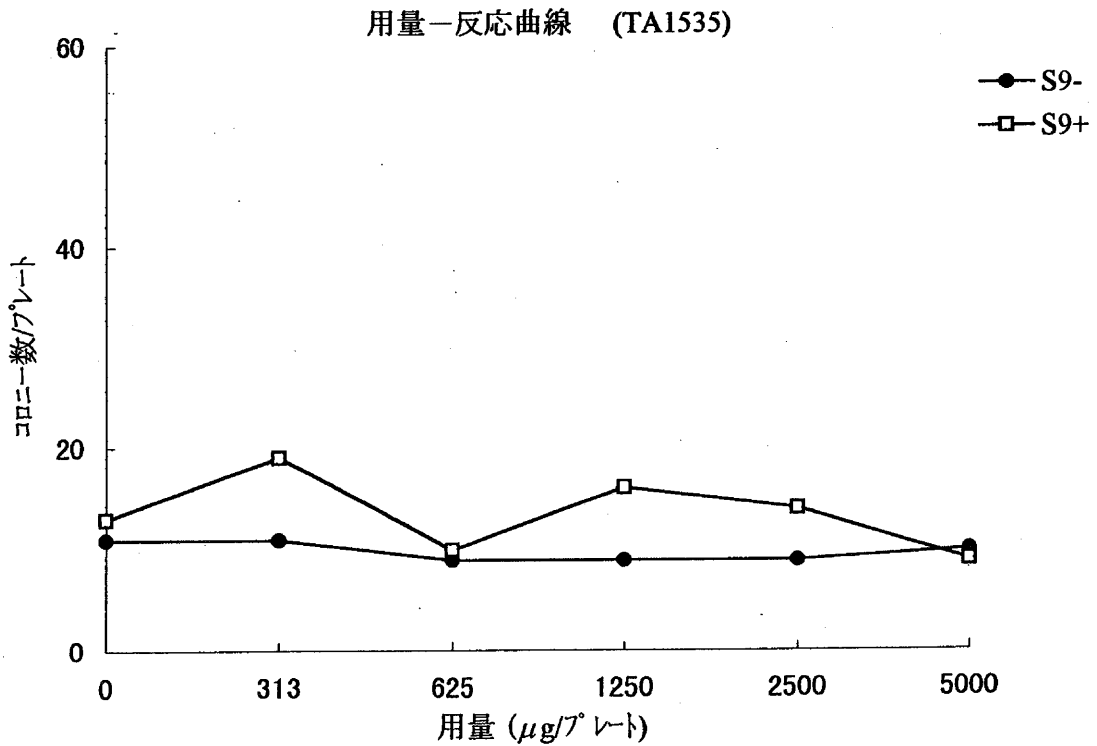




図 8 (本試験 2)

被験物質名：フタリミド

No. 7L632

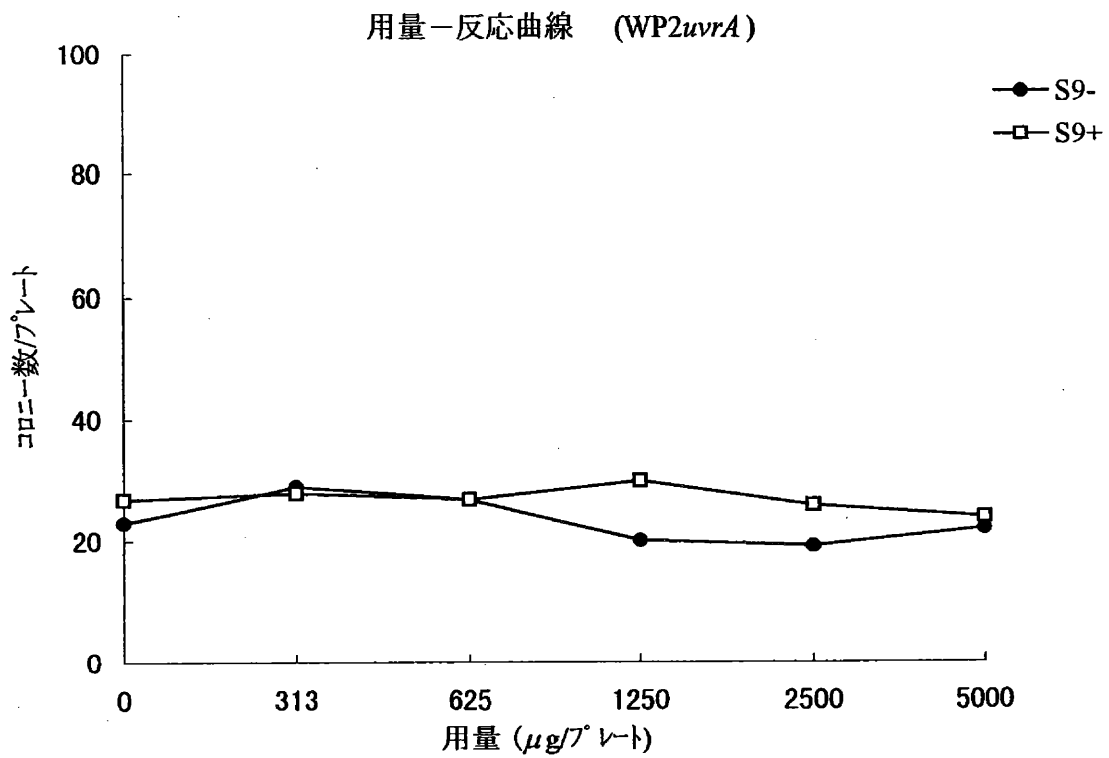


図 9 (本試験 2)

被験物質名：フタリミド

No. 7L632

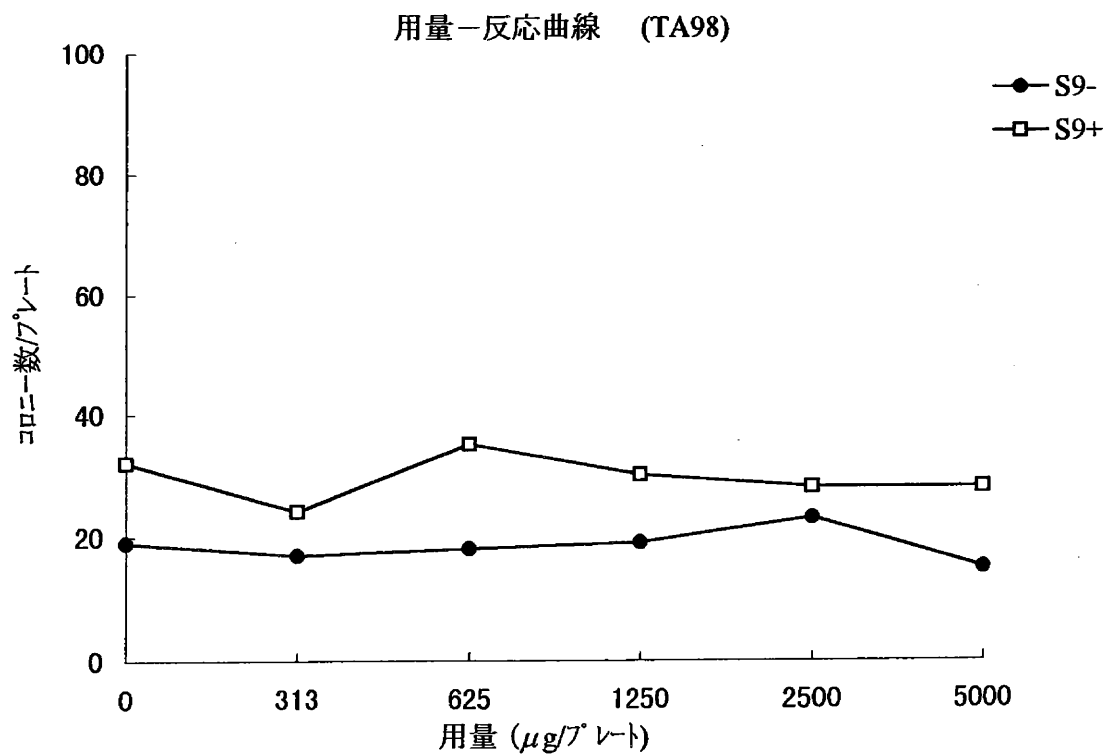


図 10 (本試験 2)

被験物質名：フタリミド

No. 7L632

