メタクリル酸2－ヒドロキシエチルエステル

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

材料および方法 …… 3

結果および考察 …… 7

結　　論 …… 7

特　記　事　項 …… 8

文　　献 …… 8

Tables　1～3

【要　　約】

メタクリル酸2-ヒドロキシエチルエステルの変異原性の有無を、細菌を用いる復帰突然変異試験により検討し、陰性の結果を得た。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* の5菌株を用い、S9 mix 無添加および添加の条件でプレインキュベーション法により用量設定試験および2回の本試験を行った。用量設定試験を 50.0～5000 μg/プレート の用量で行ったところ、いずれの検定菌においても、S9 mix 無添加試験および添加試験とも抗菌性は認められなかった。したがって、本試験では S9 mix 無添加試験および添加試験を 313～5000 μg/プレート の範囲で用量を設定して実施した。

その結果、用いた5種類の検定菌のいずれの用量においても、溶媒対照値の2倍以上となる再現性のある復帰変異コロニー数の増加は認められなかったことから、メタクリル酸2-ヒドロキシエチルエステルは、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】

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、メタクリル酸2-ヒドロキシエチルエステルについて、細菌を用いる復帰突然変異試験をプレインキュベーション法[1)]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突然変異[2)]、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突然変異[3, 4)]を指標とした変異原性の検出系である。

試験は、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素（S9 mix）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 S9 mix 添加試験と、被験物質をそのまま検定菌に作用させる S9 mix 無添加試験とからなっている。

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毒性試験ガイドライン：471、472」に準拠し、「化学物質GLP基準」（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。

【材料および方法】

〔検　定　菌〕

Salmonella typhimurium TA100
Salmonella typhimurium TA1535
Escherichia coli WP2 *uvrA*
Salmonella typhimurium TA98
Salmonella typhimurium TA1537

S. typhimurium の４菌株は1975年10月31日に

から分与を受けた。

E. coli WP2 *uvrA* 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ものを用い、各菌株の特性確認は、凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、および膜変異（rfa）とアンピシリン耐性因子 pKM 101（プラスミド）の有無について調べ、特性が維持されていることを確認した。

試験に際して、ニュートリエントブロスNo.2（Oxoid）を入れたＬ字型試験管に解凍した種菌を一定量接種し、37℃で10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〕

メタクリル酸2-ヒドロキシエチルエステル（略称：HEMA、CAS No. 868-77-9）は、分子量 130.14 の無色透明液体である。構造式等は Appendix に示した。用いた被験物質は、ロット番号　　純度 97.6 wt%〔不純物：0.2-0.3% エチレングリコールジメタクリレート、2.0-2.5% ジエチレングリコールモノメタクリレート、50 ppm メトキノン（重合防止剤）〕であり、　　から供与された。被験物質は、使用時まで冷蔵した。なお、試験終了後に　　において、被験物質の化学分析を行った結果、純度は 97.3 wt% であった。

ＨＥＭＡは、局方注射用水（ロット番号：K5A80、㈱大塚製薬工場）に溶解して最高濃度の調製液を調製した後、同溶媒で公比約３ないし２で希釈し、速やかに試験に用いた。

〔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。

AF2	: 2-(2-ﾌﾘﾙ)-3-(5-ﾆﾄﾛ-2-ﾌﾘﾙ)ｱｸﾘﾙｱﾐﾄﾞ	(上野製薬㈱	ﾛｯﾄ番号 46,	純度99.9%)
SA	: ｱｼﾞ化ﾅﾄﾘｳﾑ	(和光純薬工業㈱	ﾛｯﾄ番号 TWR3330,	純度90%以上)
9AA	: 9-ｱﾐﾉｱｸﾘｼﾞﾝ	(Sigma Chem.Co.	ﾛｯﾄ番号 96F05641,	純度98%以上)
2AA	: 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%以上)

AF2 および 2AA はジメチルスルホキシド（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。9AA は DMSO に、SA は純水に溶解し、速やかに試験に用いた。

〔培地および S9 mix 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%	D-ﾋﾞｵﾁﾝ	0.5 mM

* ： WP2 *uvrA* 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、極東製薬工業㈱製の最少寒天培地（ロット番号：HY0302、1995年９月29日製造および HY0603、同年12月15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	水酸化ﾅﾄﾘｳﾑ	0.66ｇ
ｸｴﾝ酸･1水和物	2 ｇ	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
ﾘﾝ酸一ｱﾝﾓﾆｳﾑ	1.92ｇ		

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 mix（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	ﾅﾄﾘｳﾑ-ﾘﾝ酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μmol
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-333、1995年9月8日製造および RAA-338、同年12月15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、ラットの解剖および S9 の調製は5日目であった。

〔試 験 方 法〕

プレインキュベーション法により、S9 mix 無添加試験および S9 mix 添加試験を行った。

小試験管中に、被験物質調製液 0.1 mℓ、リン酸緩衝液 0.5 mℓ（S9 mix 添加試験においては S9 mix 0.5 mℓ）、検定菌液 0.1 mℓ を混合し、37℃で20分間往復振とう培養したのち、トップアガー2 mℓを加えて混和し、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使用溶媒、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各Table 中に示した。溶媒および陽性対照群は、同時に実施した他の試験と共通とした。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、溶媒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、結果の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 S9 mix 無添加あるいは S9 mix 添加条件において、被験物質を含有する平板上における変異コロニー数の平均値が、溶媒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。ただし、2回の本試験の一方でのみ変異コロニー数の平均値が溶媒対照値の2倍以上となる用量が認められた場合において、その溶媒対照値が10以下であり、変異コロニー数の増加に用量依存性が認められない場合は陰性とすることとした。

【結果および考察】

〔用量設定試験〕

ＨＥＭＡについて 50.0～5000 μg/プレート の範囲で公比を約３として、用量設定試験を実施した（Table １）。その結果、すべての検定菌の S9 mix 無添加試験および添加試験のいずれにおいても抗菌性は認められなかった。

したがって、本試験における最高用量は、S9 mix 無添加試験および添加試験とも 5000 μg/プレート とした。

〔本試験〕

S9 mix 無添加試験および添加試験で、ともに 313～5000 μg/プレート の範囲で公比を２として２回の本試験を実施した（Table ２、３）。その結果、いずれの検定菌においても、溶媒対照値の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。

ＨＥＭＡについて実施したすべての試験において、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、溶媒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、本試験系の有効性が確認された。

【結　　論】

以上の結果に基づき、メタクリル酸2-ヒドロキシエチルエステルは、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。

【特　記　事　項】

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。

【文　　献】

1）Matsushima, T., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A., Sawamura, M.: in "Short-Term Test Systems for Detecting Carcinogens" Norpoth, K.H., Garner, R.C. eds. Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1980) pp. 273-285

2）Maron, D.M., Ames, B.N.: Mutat. Res. 113: 173-215 (1983)

3）Venitt, S., Crofton-Sleigh, C.: in "Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens" de Serres, F.J., Ashby, J. eds, Elsevier/North-Holland, New York (1981) pp. 351-360

4）Green, M.H.L.: in "Handbook of Mutagenicity Test Procedures" Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C. eds, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford (1984) pp. 161-187

Table 1. Results of preliminary cytotoxicity test in reverse mutation test of 2-hydroxyethyl methacrylate on bacteria

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	WP2 *uvrA*	TA98	TA1537	
S9mix (-)	0	114 118 122 (118 ± 4.0)	14 9 11 (11 ± 2.5)	24 27 34 (28 ± 5.1)	30 30 37 (32 ± 4.0)	14 13 9 (12 ± 2.6)	
	50.0	141	15	30	18	9	
	150	127	7	20	34	11	
	500	135	12	25	23	18	
	1500	138	14	30	21	16	
	5000	158	10	31	20	14	
S9mix (+)	0	105 127 112 (115 ± 11.2)	13 16 7 (12 ± 4.6)	25 27 33 (28 ± 4.2)	41 42 26 (36 ± 9.0)	13 25 17 (18 ± 6.1)	
	50.0	125	12	23	28	11	
	150	139	13	31	33	12	
	500	139	15	27	39	14	
	1500	183	20	25	48	7	
	5000	180	15	23	24	21	
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	580 556 617 (584 ± 30.7)	247 278 265 (263 ± 15.6)	264 271 267 (267 ± 3.5)	511 562 589 (554 ± 39.6)	713 634 576 (641 ± 68.8)	
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate	553 680 677 (637 ± 72.5)	328 335 343 (335 ± 7.5)	497 505 454 (485 ± 27.4)	317 327 308 (317 ± 9.5)	281 275 310 (289 ± 18.7)	

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide , SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene
Purity was 97.6 wt% and 0.2-0.3 % ethylene glycol dimethacrylate, 2.0-2.5 % diethylene glycol monomethacrylate and 50 ppm methoquinone were contained as impurities.

Table 2. Results of reverse mutation test (I) of 2-hydroxyethyl methacrylate on bacteria

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	WP2 *uvrA*	TA98	TA1537	
S9mix (-)	0	154 171 159 (161 ± 8.7)	13 7 12 (11 ± 3.2)	28 26 29 (28 ± 1.5)	25 33 27 (28 ± 4.2)	11 15 10 (12 ± 2.6)	
	313	141 158 160 (153 ± 10.4)	13 9 10 (11 ± 2.1)	31 33 30 (31 ± 1.5)	23 28 19 (23 ± 4.5)	11 8 10 (10 ± 1.5)	
	625	141 147 139 (142 ± 4.2)	12 14 12 (13 ± 1.2)	30 34 31 (32 ± 2.1)	27 20 20 (22 ± 4.0)	9 12 8 (10 ± 2.1)	
	1250	151 133 149 (144 ± 9.9)	9 17 9 (12 ± 4.6)	31 37 22 (30 ± 7.5)	12 19 18 (16 ± 3.8)	14 8 9 (10 ± 3.2)	
	2500	137 137 157 (144 ± 11.5)	12 15 13 (13 ± 1.5)	30 26 20 (25 ± 5.0)	28 20 18 (22 ± 5.3)	12 9 12 (11 ± 1.7)	
	5000	154 141 160 (152 ± 9.7)	12 10 19 (14 ± 4.7)	29 26 23 (26 ± 3.0)	25 33 23 (27 ± 5.3)	15 12 15 (14 ± 1.7)	
S9mix (+)	0	156 193 150 (166 ± 23.3)	11 10 9 (10 ± 1.0)	40 39 40 (40 ± 0.6)	44 26 36 (35 ± 9.0)	11 20 9 (13 ± 5.9)	
	313	129 162 154 (148 ± 17.2)	11 15 13 (13 ± 2.0)	27 27 35 (30 ± 4.6)	20 29 33 (27 ± 6.7)	15 13 8 (12 ± 3.6)	
	625	157 183 181 (174 ± 14.5)	14 13 8 (12 ± 3.2)	48 36 31 (38 ± 8.7)	25 35 37 (32 ± 6.4)	12 15 7 (11 ± 4.0)	
	1250	177 180 182 (180 ± 2.5)	14 9 11 (11 ± 2.5)	36 28 41 (35 ± 6.6)	34 30 27 (30 ± 3.5)	8 11 10 (10 ± 1.5)	
	2500	172 177 172 (174 ± 2.9)	13 10 12 (12 ± 1.5)	33 40 29 (34 ± 5.6)	22 30 36 (29 ± 7.0)	6 10 8 (8 ± 2.0)	
	5000	162 175 160 (166 ± 8.1)	15 11 15 (14 ± 2.3)	37 30 33 (33 ± 3.5)	30 30 34 (31 ± 2.3)	9 11 12 (11 ± 1.5)	
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	689 685 779 (718 ± 53.2)	262 272 295 (276 ± 16.9)	337 289 301 (309 ± 25.0)	688 663 721 (691 ± 29.1)	1291 1123 1369 (1261 ± 125.7)	
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate	755 927 1012 (898 ± 130.9)	300 298 262 (287 ± 21.4)	582 746 652 (660 ± 82.3)	298 332 304 (311 ± 18.1)	367 346 313 (342 ± 27.2)	

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide , SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

Purity was 97.6 wt% and 0.2-0.3 % ethylene glycol dimethacrylate, 2.0-2.5 % diethylene glycol monomethacrylate and 50 ppm methoquinone were contained as impurities.

Table 3. Results of reverse mutation test (II) of 2-hydroxyethyl methacrylate on bacteria

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	WP2 *uvrA*	TA98	TA1537	
S9mix (-)	0	140 125 147 (137 ± 11.2)	11 18 13 (14 ± 3.6)	25 27 23 (25 ± 2.0)	20 31 20 (24 ± 6.4)	12 14 11 (12 ± 1.5)	
	313	124 122 145 (130 ± 12.7)	13 10 19 (14 ± 4.6)	26 22 28 (25 ± 3.1)	31 19 33 (28 ± 7.6)	4 8 9 (7 ± 2.6)	
	625	116 104 169 (130 ± 34.6)	8 8 10 (9 ± 1.2)	26 26 25 (26 ± 0.6)	26 26 19 (24 ± 4.0)	14 6 6 (9 ± 4.6)	
	1250	108 118 116 (114 ± 5.3)	14 10 13 (12 ± 2.1)	23 20 26 (23 ± 3.0)	30 22 14 (22 ± 8.0)	7 5 11 (8 ± 3.1)	
	2500	151 141 139 (144 ± 6.4)	19 10 8 (12 ± 5.9)	17 20 26 (21 ± 4.6)	22 15 25 (21 ± 5.1)	5 7 12 (8 ± 3.6)	
	5000	149 134 151 (145 ± 9.3)	10 9 10 (10 ± 0.6)	20 27 31 (26 ± 5.6)	20 27 30 (26 ± 5.1)	8 12 9 (10 ± 2.1)	
S9mix (+)	0	141 115 140 (132 ± 14.7)	9 14 11 (11 ± 2.5)	37 26 28 (30 ± 5.9)	34 22 31 (29 ± 6.2)	9 5 8 (7 ± 2.1)	
	313	141 138 137 (139 ± 2.1)	6 11 7 (8 ± 2.6)	37 23 29 (30 ± 7.0)	38 30 21 (30 ± 8.5)	6 8 6 (7 ± 1.2)	
	625	128 147 131 (135 ± 10.2)	10 18 17 (15 ± 4.4)	22 30 29 (27 ± 4.4)	26 27 28 (27 ± 1.0)	12 3 5 (7 ± 4.7)	
	1250	140 170 143 (151 ± 16.5)	10 20 13 (14 ± 5.1)	35 31 21 (29 ± 7.2)	24 24 21 (23 ± 1.7)	5 8 15 (9 ± 5.1)	
	2500	159 151 146 (152 ± 6.6)	10 12 17 (13 ± 3.6)	30 35 29 (31 ± 3.2)	24 28 29 (27 ± 2.6)	12 10 8 (10 ± 2.0)	
	5000	146 173 170 (163 ± 14.8)	5 10 15 (10 ± 5.0)	26 38 33 (32 ± 6.0)	28 27 32 (29 ± 2.6)	8 8 8 (8 ± 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	644 728 760 (711 ± 59.9)	347 386 359 (364 ± 20.0)	483 487 475 (482 ± 6.1)	672 665 608 (648 ± 35.1)	1320 1043 1130 (1164 ± 141.7)	
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate	658 680 770 (703 ± 59.3)	310 335 315 (320 ± 13.2)	473 407 420 (433 ± 35.0)	281 255 313 (283 ± 29.1)	269 274 260 (268 ± 7.1)	

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide , SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

Purity was 97.6 wt% and 0.2-0.3 % ethylene glycol dimethacrylate, 2.0-2.5 % diethylene glycol monomethacrylate and 50 ppm methoquinone were contained as impurities.