



エチルメチルケトキシムの
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	7
文 献	8
Tables 1～3	

【要 約】

エチルメチルケトキシム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ート法により用量設定試験および本試験を行った。用量設定試験を50～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で行ったところ、すべての検定菌においてS9 mix 無添加試験および添加試験のいずれ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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で用量を設定して実施した。

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、エチルメチルケトキシムは、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、エチルメチルケトキシムについて、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突然変異⁽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突然変異⁽²⁾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ものであります。

間)の平均値に対して、99.4 および 101%であった。これらの値は当研究所で規定している基準内(4時間後における平均含有量が初期値の90%以上)であった(Appendix 2、3)。

また、本試験Ⅱで調製した被験物質調製液について含量測定を行った結果、調製液の濃度は、いずれも当研究所の規定している基準内(溶媒中での平均含量が添加量の90~110%)であった(Appendix 4)。

[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%以上)
9AA	: 9-アミノアクリジン (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(株) ロット番号 DSF2950, 純度90%以上)

AF2, 2AA はジメチルスルホキシド(DMSO、和光純薬工業(株))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) バクアガー (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 *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、日清製粉(株)製の最少寒天培地(ロット番号: DJ030HJ、1994年8月11日製造、DJ040KJ、同年11月21日製造および DJ010BK、1995年2月6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	水酸化ナトリウム	0.66 g
クエン酸・1水和物	2 g	グルコース	20 g
リン酸水素二カリウム	10 g	バクトアガー (Difco)	15 g
リン酸一アンモニウム	1.92 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 mix (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
塩化カリウム	33 μmol	ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μmol
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-309、1994年 5 月 13 日製造および RAA-317、同年 10 月 27 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]

プレート法により、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 およびトッパアガー 2 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。培養は 37°C 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。

【結果および考察】

〔用量設定試験〕

結果を Table 1 に示した。EMKについて 50～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で公比を約 3 として、試験を実施したところ、すべての検定菌において S9 mix 無添加試験および添加試験のいずれ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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とした。

〔本試験〕

2回の本試験の結果をそれぞれ Table 2、3 に示した。EMKの用量を、S9 mix 無添加試験および添加試験とともに 313～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で公比を 2 として試験を実施した。その結果、2回の試験のいずれも、用いた 5 種類の検定菌の S9 mix 無添加試験および添加試験において、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。

EMK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、エチルメチルケトキシムは、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) 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 reverse mutation test of ethyl methyl ketoxime ** on bacteria

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			
S9mix (-)	0	105	135	133	15	11	9	23	21	19	27	34	37	9	8	10	
		(124 \pm 16.8)			(12 \pm 3.1)			(21 \pm 2.0)			(33 \pm 5.1)			(9 \pm 1.0)			
	50	122			11			15			24			8			
	150	125			13			23			17			13			
	500	114			14			22			25			9			
	1500	111			15			27			25			9			
	5000	112			10			30			22			7			
S9mix (+)	0	125	106	112	9	8	11	27	16	25	34	34	34	7	14	7	
		(114 \pm 9.7)			(9 \pm 1.5)			(23 \pm 5.9)			(34 \pm 0.0)			(9 \pm 4.0)			
	50	180			18			27			33			16			
	150	146			22			28			46			19			
	500	123			11			26			35			11			
	1500	132			14			34			29			12			
	5000	126			16			32			31			13			
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			
	Number of colonies / plate	574	592	587	340	411	372	139	153	125	816	841	931	1166	1218	1272	
		(584 \pm 9.3)			(374 \pm 35.6)			(139 \pm 14.0)			(863 \pm 60.5)			(1219 \pm 53.0)			
	Number of colonies / plate	1154	1249	1225	186	200	230	823	998	989	489	486	501	325	339	362	
		(1209 \pm 49.4)			(205 \pm 22.5)			(937 \pm 98.5)			(492 \pm 7.9)			(342 \pm 18.7)			

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

** : Purity was 99.98% and water (0.01%) was contained as impurity.

Table 2. Results of reverse mutation test (I) of ethyl methyl ketoxime ** 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			WP2uvrA			TA98			TA1537			
S9mix (-)	0	124	136	115	14	10	15	27	18	25	18	29	21	8	7	6	
		(125 ± 10.5)			(13 ± 2.6)			(23 ± 4.7)			(23 ± 5.7)			(7 ± 1.0)			
	313	107	114	131	24	17	25	23	37	32	29	33	23	9	7	7	
		(117 ± 12.3)			(22 ± 4.4)			(31 ± 7.1)			(28 ± 5.0)			(8 ± 1.2)			
	625	114	130	122	10	20	16	26	19	25	26	23	17	8	11	10	
		(122 ± 8.0)			(15 ± 5.0)			(23 ± 3.8)			(22 ± 4.6)			(10 ± 1.5)			
	1250	127	128	134	13	15	14	23	28	16	28	16	13	11	8	3	
	(130 ± 3.8)			(14 ± 1.0)			(22 ± 6.0)			(19 ± 7.9)			(7 ± 4.0)				
S9mix (-)	2500	113	127	117	22	17	14	25	19	26	20	19	21	11	9	9	
		(119 ± 7.2)			(18 ± 4.0)			(23 ± 3.8)			(20 ± 1.0)			(10 ± 1.2)			
	5000	125	110	127	14	15	16	28	36	24	19	19	14	11	6	3	
	(121 ± 9.3)			(15 ± 1.0)			(29 ± 6.1)			(17 ± 2.9)			(7 ± 4.0)				
S9mix (+)	0	149	145	149	8	16	17	28	13	37	36	34	48	16	12	7	
		(148 ± 2.3)			(14 ± 4.9)			(26 ± 12.1)			(39 ± 7.6)			(12 ± 4.5)			
	313	165	157	140	10	15	10	19	31	31	33	32	43	10	10	11	
		(154 ± 12.8)			(12 ± 2.9)			(27 ± 6.9)			(36 ± 6.1)			(10 ± 0.6)			
	625	138	150	140	20	12	16	30	15	28	27	31	35	12	13	12	
		(143 ± 6.4)			(16 ± 4.0)			(24 ± 8.1)			(31 ± 4.0)			(12 ± 0.6)			
	1250	135	130	148	11	14	11	21	25	28	32	30	27	7	10	3	
	(138 ± 9.3)			(12 ± 1.7)			(25 ± 3.5)			(30 ± 2.5)			(7 ± 3.5)				
S9mix (+)	2500	140	146	133	15	15	12	25	19	29	22	31	22	11	7	10	
		(140 ± 6.5)			(14 ± 1.7)			(24 ± 5.0)			(25 ± 5.2)			(9 ± 2.1)			
	5000	128	127	131	14	14	16	21	21	30	29	35	35	8	10	8	
	(129 ± 2.1)			(15 ± 1.2)			(24 ± 5.2)			(33 ± 3.5)			(9 ± 1.2)				
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			
S9 mix (+)	Number of colonies /plate	881	812	807	207	185	173	193	200	158	926	930	889	1352	1507	1423	
		(833 ± 41.4)			(188 ± 17.2)			(184 ± 22.5)			(915 ± 22.6)			(1427 ± 77.6)			
S9 mix (+)	Number of colonies /plate	1277	1407	1470	260	264	272	1181	1298	1213	423	384	396	272	323	331	
		(1385 ± 98.4)			(265 ± 6.1)			(1231 ± 60.5)			(401 ± 20.0)			(309 ± 32.0)			

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

** : Purity was 99.98% and water (0.01%) was contained as impurity.

Table 3. Results of reverse mutation test (II) of ethyl methyl ketoxime ** on bacteria

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	124	133	116	16	18	10	19	23	24	23	28	26	7	9	10	
		(124 \pm 8.5)			(15 \pm 4.2)			(22 \pm 2.6)			(26 \pm 2.5)			(9 \pm 1.5)			
	313	143	148	139	22	18	13	23	21	24	26	25	23	5	5	7	
		(143 \pm 4.5)			(18 \pm 4.5)			(23 \pm 1.5)			(25 \pm 1.5)			(6 \pm 1.2)			
	625	133	131	122	25	18	18	19	25	31	32	26	29	8	10	6	
		(129 \pm 5.9)			(20 \pm 4.0)			(25 \pm 6.0)			(29 \pm 3.0)			(8 \pm 2.0)			
	1250	141	155	153	22	23	38	23	20	25	22	27	28	8	15	4	
		(150 \pm 7.6)			(28 \pm 9.0)			(23 \pm 2.5)			(26 \pm 3.2)			(9 \pm 5.6)			
2500	143	137	126	17	19	19	28	21	23	24	24	22	7	3	11		
	(135 \pm 8.6)			(18 \pm 1.2)			(24 \pm 3.6)			(23 \pm 1.2)			(7 \pm 4.0)				
5000	129	104	114	19	18	21	32	22	22	22	21	15	11	10	4		
	(116 \pm 12.6)			(19 \pm 1.5)			(25 \pm 5.8)			(19 \pm 3.8)			(8 \pm 3.8)				
S9mix (+)	0	136	133	146	17	15	13	27	25	28	30	35	23	16	19	8	
		(138 \pm 6.8)			(15 \pm 2.0)			(27 \pm 1.5)			(29 \pm 6.0)			(14 \pm 5.7)			
	313	147	148	149	14	12	19	26	27	22	39	45	35	11	13	8	
		(148 \pm 1.0)			(15 \pm 3.6)			(25 \pm 2.6)			(40 \pm 5.0)			(11 \pm 2.5)			
	625	126	159	175	11	13	18	29	31	25	36	27	49	16	12	12	
		(153 \pm 25.0)			(14 \pm 3.6)			(28 \pm 3.1)			(37 \pm 11.1)			(13 \pm 2.3)			
	1250	155	152	145	12	16	11	25	30	28	37	34	40	17	12	19	
		(151 \pm 5.1)			(13 \pm 2.6)			(28 \pm 2.5)			(37 \pm 3.0)			(16 \pm 3.6)			
2500	169	158	145	18	18	15	26	28	24	34	30	35	22	12	17		
	(157 \pm 12.0)			(17 \pm 1.7)			(26 \pm 2.0)			(33 \pm 2.6)			(17 \pm 5.0)				
5000	146	141	127	14	19	17	28	31	25	23	42	45	15	10	8		
	(138 \pm 9.8)			(17 \pm 2.5)			(28 \pm 3.0)			(37 \pm 11.9)			(11 \pm 3.6)				
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	710	720	732	151	160	143	185	177	154	907	864	881	1052	1228	1133	
		(721 \pm 11.0)			(151 \pm 8.5)			(172 \pm 16.1)			(884 \pm 21.7)			(1138 \pm 88.1)			
	Number of colonies / plate	1572	1689	1695	300	299	304	1534	1532	1608	457	462	517	410	384	349	
		(1652 \pm 69.3)			(301 \pm 2.6)			(1558 \pm 43.3)			(479 \pm 33.3)			(381 \pm 30.6)			

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

** : Purity was 99.98% and water (0.01%) was contained as impurity.