

最 終 報 告 書

2-ethylhexyl vinyl ether の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号 : 9046 (115-197)

平成 18 年 9 月 11 日

試験委託者

厚生労働省 医薬食品局

財団法人 食品農医薬品安全性評価センター

目 次

1. 要約.....	4
2. 表題.....	5
3. 試験目的.....	5
4. 準拠したガイドラインおよび遵守したGLP.....	5
5. 試験番号.....	5
6. 試験施設.....	5
7. 試験委託者.....	5
8. 試験責任者.....	5
9. 被験物質等管理責任者.....	6
10. 主担当者および試験従事者.....	6
11. 試験日程.....	6
12. 被験物質.....	6
13. 試験材料および方法.....	8
14. 試験結果.....	16
15. 考察および結論.....	17
16. 参考とした資料.....	18
17. 試験関係資料の保存.....	18
18. 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態および試験計画書 に從わなかったこと.....	19
19. 試験責任者の署名および日付.....	19

Figures

Figure 1	Dose-finding study of 2-ethylhexyl vinyl ether in strain TA100.....	20
Figure 2	Dose-finding study of 2-ethylhexyl vinyl ether in strain TA1535.....	21
Figure 3	Dose-finding study of 2-ethylhexyl vinyl ether in strain WP2 <i>uvrA</i>	22
Figure 4	Dose-finding study of 2-ethylhexyl vinyl ether in strain TA98.....	23
Figure 5	Dose-finding study of 2-ethylhexyl vinyl ether in strain TA1537.....	24
Figure 6	Dose-finding study of 2-ethylhexyl vinyl ether in strain TA100 (Additional study).....	25
Figure 7	Dose-finding study of 2-ethylhexyl vinyl ether in strain TA1535 (Additional study).....	26
Figure 8	Dose-finding study of 2-ethylhexyl vinyl ether in strain TA98 (Additional study).....	27
Figure 9	Dose-finding study of 2-ethylhexyl vinyl ether in strain TA1537 (Additional study).....	28
Figure 10	Bacterial reverse mutation test of 2-ethylhexyl vinyl ether in strain TA100.....	29
Figure 11	Bacterial reverse mutation test of 2-ethylhexyl vinyl ether in strain TA1535.....	30

Figure 12	Bacterial reverse mutation test of 2-ethylhexyl vinyl ether in strain WP2 <i>uvrA</i>	31
Figure 13	Bacterial reverse mutation test of 2-ethylhexyl vinyl ether in strain TA98.....	32
Figure 14	Bacterial reverse mutation test of 2-ethylhexyl vinyl ether in strain TA1537.....	33

Tables

Table 1	Summary data on dose-finding study of 2-ethylhexyl vinyl ether [Non-activation method: -S9].....	34
Table 2	Summary data on dose-finding study of 2-ethylhexyl vinyl ether [Activation method: +S9].....	35
Table 3	Summary data on dose-finding study of 2-ethylhexyl vinyl ether (Additional study) [Non-activation method: -S9].....	36
Table 4	Summary data on dose-finding study of 2-ethylhexyl vinyl ether (Additional study) [Activation method: +S9].....	37
Table 5	Summary data on bacterial reverse mutation test of 2-ethylhexyl vinyl ether [Non-activation method: -S9].....	38
Table 6	Summary data on bacterial reverse mutation test of 2-ethylhexyl vinyl ether [Activation method: +S9].....	40

1. 要約

当該試験条件下において、2-ethylhexyl vinyl ether には遺伝子突然変異を誘起する作用がないものと判断した。

2-ethylhexyl vinyl ether の遺伝子突然変異誘発性を検討するため、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100 株, TA98 株, TA1535 株および TA1537 株ならびに大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2uvrA 株を用いた復帰突然変異試験を行った。

2-ethylhexyl vinyl ether 処理では、0.610～5000 μg /プレート of いずれの用量においても、ラット肝ミクロソーム (S9) 添加の有無にかかわらず、陰性対照の2倍を超えるような復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

一方、陽性対照物質は、各試験菌株に対し明確な突然変異誘発作用を示した。

また、用量設定試験、同追加試験および本試験により、試験結果の再現性が確認された。

2. 表題

2-ethylhexyl vinyl ether の細菌を用いる復帰突然変異試験

3. 試験目的

被験物質の *in vitro* における遺伝子突然変異誘発性を検討する。

4. 準拠したガイドラインおよび遵守した GLP

ガイドライン

- 新規化学物質等に係る試験の方法について (平成 15 年 11 月 21 日薬食発第 1121002 号, 平成 15・11・13 製局第 2 号, 環企発第 031121002 号)
- OECD Guideline for the Testing of Chemicals 471 (21st July 1997: Bacterial Reverse Mutation Test)

GLP

- 新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について (平成 15 年 11 月 21 日薬食発第 1121003 号, 平成 15・11・17 製局第 3 号, 環企発第 031121004 号)
- OECD Principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997), ENV/MC/CHEM(98)17

5. 試験番号

9046 (115-197)

6. 試験施設

〒437-1213 静岡県磐田市塩新田 582-2

財団法人 食品農医薬品安全性評価センター (略称 安評センター)

Tel: 0538-58-1266 Fax: 0538-58-1393

7. 試験委託者

〒100-8916 東京都千代田区霞が関一丁目 2 番 2 号

厚生労働省 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室

Tel: 03-3595-2298 Fax: 03-3593-8913

8. 試験責任者

〒437-1213 静岡県磐田市塩新田 582-2

財団法人 食品農医薬品安全性評価センター

11. 試験日程

試験開始日：	平成 17 年 7 月 13 日
実験開始日：	平成 17 年 7 月 27 日
【用量設定試験】	
被験物質液調製日：	平成 17 年 7 月 27 日
被験物質処理日：	平成 17 年 7 月 27 日
コロニー計数日：	平成 17 年 7 月 29 日
【用量設定試験（追加試験）】	
被験物質液調製日：	平成 17 年 8 月 10 日
被験物質処理日：	平成 17 年 8 月 10 日
コロニー計数日：	平成 17 年 8 月 12 日
【本試験】	
被験物質液調製日：	平成 17 年 8 月 23 日
被験物質処理日：	平成 17 年 8 月 23 日
コロニー計数日：	平成 17 年 8 月 25 日
実験終了日：	平成 17 年 8 月 25 日
試験終了日：	平成 18 年 9 月 11 日

12. 被験物質

12.1. 被験物質名

2-ethylhexyl vinyl ether (2-エチルヘキシル=ビニル=エーテル)

12.2. ロット番号

12.3. 純度

99.9%

12.4. 提供元

12.5. 出荷年月日

2005 年 3 月 11 日

12.6. 保存条件

遮光, 冷暗所 (1~9°C)

12.7. 保存場所

安評センター被験物質保管庫 (H-2 : 実測値 3.4~4.8°C, 2005 年 3 月 14 日~2005 年 7 月 25 日 ; 6 号館 2 階被験物質調製室内バイオマルチクーラーch. 41 : 実測値 4.8~7.7°C, 2005 年 7 月 25 日~2005 年 10 月 6 日)

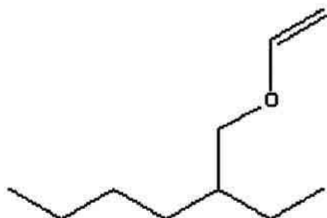
12.8. 化学名

2-ethylhexyl vinyl ether

12.9. CAS No.

103-44-6

12.10. 化学構造



12.11. 分子式

C₁₀H₂₀O

12.12. 分子量

156.27

12.13. 物質の状態

無色透明液体

12.14. 溶解性

溶解度 : 0.05 g/100 g 水, 約 157 mg/mL DMSO (当施設の試験による)

12.15. 安定性／反応性

酸化剤、重金属には不安定（重合、分解を起こす）。
高温化では不安定。

12.16. 蒸気圧

3.3 kPa (25 mmHg)

12.17. 取り扱い上の注意

危険性：可燃性液体で、蒸気は爆発性ガスを作りやすい。

有害性：蒸気は咽喉、目、鼻などの粘膜を刺激する。

軽度の麻酔作用がある。

液体が目に入ると粘膜を侵し、炎症を起こす。

適切な保護具（マスク・手袋等）を着用し、吸い込んだり、目、皮膚および衣類に触れないようにした。

12.18. 毒性

急性経口毒性（ラット）：LD₅₀, 1350 mg/kg

12.19. 残余被験物質の処理

実験終了後、1.0 g を資料保存施設管理責任者の管理下で安評センターに保存し、残りは安定性分析のため、被験物質等管理責任者を介して
返却した。分析の結果（2005 年 11 月 22 日付報告）、被験物質が試験期間中安定であったことが確認された。

13. 試験材料および方法

13.1. 試験菌株

細菌を用いる復帰突然変異試験において遺伝毒性ガイドラインでは試験菌株が指定されていることから、試験菌株として次の 5 種類の菌株を使用した。

ネズミチフス菌	TA100	（ヒスチジン要求性の塩基対置換型）
ネズミチフス菌	TA98	（ヒスチジン要求性のフレームシフト型）
ネズミチフス菌	TA1535	（ヒスチジン要求性の塩基対置換型）
ネズミチフス菌	TA1537	（ヒスチジン要求性のフレームシフト型）
大腸菌	WP2uvrA	（トリプトファン要求性の塩基対置換型）

ネズミチフス菌は 1983 年 9 月 9 日にカリフォルニア大学 から、また、大腸菌については 1983 年 3 月 16 日に国立衛生試験所（現 国立医薬品食品衛生研究所）から分与を受けた。

2004 年 9 月 6 日～同年 9 月 9 日に菌株の特性検査を実施し、規定の特性を保持して

いる菌株を試験に使用した。各菌株の菌懸濁液にジメチルスルホキシド (DMSO, GC 用, 純度 99.9%, Lot No. K30049278, Merck) を容量比 80 : 7 の割合で添加した後, 凍結保存用チューブに 0.2 mL ずつ分注した。これを液体窒素を用いて凍結した後, 超低温フリーザー (MDF-U71V, 三洋電機バイオメディカ; 設定値: -80°C , 基準値: -60°C 以下) に保存した。

13.2. 培地の調製

13.2.1. 最少グルコース寒天平板培地 (プレート)

テスメディア AN 培地 (2005 年 3 月 8 日製造, Lot No. ANI200CU, オリエンタル酵母工業) を試験に使用した。本プレートは, Vogel-Bonner 最少培地 E を含む溶液 30 mL を無菌的にシャーレに分注したものである。

最少グルコース寒天平板培地の組成を以下に示した。

硫酸マグネシウム七水和物	0.2	g
クエン酸一水和物	2	g
リン酸水素二カリウム	10	g
リン酸二水素アンモニウム	1.92	g
水酸化ナトリウム	0.66	g
D(+) グルコース	20	g
寒天 (BA-30A, Lot No. 40721, 伊那食品工業)	10.5	g
精製水	1000	mL

13.2.2. トップアガー

塩化ナトリウム 0.5 w/v% および寒天 (Bacto-agar, Lot No. 3069265, BD Diagnostic Systems) 0.6 w/v% を含む水溶液をオートクレーブで滅菌した。ネズミチフス菌を用いる試験の場合, 0.5 mmol/L L-ヒスチジン (Lot No. 308C2055, 関東化学) および 0.5 mmol/L D-ビオチン (Lot No. 301C2275, 関東化学) 水溶液を寒天溶液 10 容量に対し 1 容量加え, 大腸菌を用いる試験の場合, 0.5 mmol/L L-トリプトファン (Lot No. 008D2026 【用量設定試験】, Lot No. 211D2047 【本試験】 関東化学) 水溶液を同じく 1 容量加えた。

13.3. 試験菌株の前培養

内容量 200 mL のバツフル付三角フラスコに 2.5 w/v% ニュートリエントブロス (Nutrient Broth No. 2, Lot No. 298714, Oxoid) 培養液を 25 mL 分注し, これに融解した菌懸濁液を 50 μL 接種した。フラスコをクールバスシェーカー (ML-10F, タイテック) に設置し, 培養開始までの間, 設定温度 4°C に静置した。その後, 37°C の条件で 8 時間振盪 (100 回/分) 培養した。試験毎に菌株の培養を実施し, 菌懸濁液は培養終了後速やかに使用した。

ATPフォトメーター（ルミテスターK-100，キッコーマン）を用い，試験菌株の生菌数が 1.0×10^9 /mL以上であることを確認した．生菌数を次の表に示した．

試験	生菌数 ($\times 10^9$ /mL)				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
用量設定試験	3.50	3.22	4.70	3.92	1.47
追加試験	3.79	3.65	—	3.21	1.72
本試験	3.02	2.79	3.03	2.49	1.20

13.4. S9 mix

製造後 6 ヶ月以内の S9 mix (Lot No. FSM-523【用量設定試験および追加試験】，Lot No. FSM-526【本試験】，キッコーマン) を試験に使用した．使用時まで超低温フリーザー（設定値：-80℃，基準値：-60℃以下）に保存した．

13.4.1. S9 の調製方法

S9 調製の際の動物種，性，臓器，誘導物質ならびに誘導方法等を以下に示した．

	用量設定試験，追加試験	本試験
ロット番号	RAA-523	RAA-526
製造年月日	2005 年 6 月 17 日 (誘導物質投与開始後 5 日目)	2005 年 7 月 29 日 (同左)
使用動物	ラット：Sprague-Dawley 系	
性／週齢	雄／7 週齢	
体重	207～243 g	215～259 g
臓器	肝臓	
誘導物質	Phenobarbital (PB) および 5,6-Benzoflavone (BF)	
投与量 および 投与回数	PB : 30 mg/kg 1 回 (1 日目)， 60 mg/kg 3 回 (2～4 日目) BF : 80 mg/kg 1 回 (3 日目)	
投与方法	腹腔内投与	
蛋白含量	26.05 mg/mL	25.58 mg/mL

13.4.2. S9 mix の組成

S9 mix 1 mL 中の量を以下に示した.

S9	0.1	mL
MgCl ₂	8	μmol
KCl	33	μmol
G-6-P	5	μmol
NADPH	4	μmol
NADH	4	μmol
Na-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100	μmol

13.5. 被験物質液の調製

本被験物質は水に難溶で DMSO に溶解することから, 被験物質をモレキュラーシーブを用いて脱水処理を行った DMSO (Lot No. K31758278, Merck) に溶解し, 調製原液とした.

用量設定試験では, 使用直前に被験物質 400 mg を精密に量り, 目盛付き試験管に移した後, 約 6 mL の DMSO (使用溶媒) を加え, 攪拌しながら溶解させた. さらに, DMSO を加えて 8 mL に定容し, 調製原液 (50.0 mg/mL 溶液) を準備した. 4.5 mL の DMSO にこの 50.0 mg/mL 調製原液 3 mL を加えることにより 20.0 mg/mL 溶液を調製した. 以下同様な希釈を順次行うことにより, 8.00, 3.20, 1.28, 0.512, 0.205 および 0.0819 mg/mL 溶液を調製した. 調製後, 速やかに使用した. また, 用量設定試験 (追加試験) では, 使用直前に被験物質 20.0 mg を精密に量り, 目盛付き試験管に移した後, 約 8 mL の DMSO (使用溶媒) を加え, 攪拌しながら溶解させた. さらに, DMSO を加えて 10 mL に定容し, 調製原液 (2.00 mg/mL 溶液) を準備した. 3 mL の DMSO にこの 2.00 mg/mL 調製原液 3 mL を加えることにより 1.00 mg/mL 溶液を調製した. 以下同様な希釈を順次行うことにより, 0.500, 0.250, 0.125, 0.0625, 0.0313, 0.0156 および 0.00781 mg/mL 溶液を調製した. 調製後, 速やかに使用した.

本試験では, 使用直前に被験物質 300 mg を精密に量り, 目盛付き試験管に移した後, 約 4 mL の DMSO (使用溶媒) を加え, 攪拌しながら溶解させた. さらに, DMSO を加えて 6 mL に定容し, 調製原液 (50.0 mg/mL 溶液) を準備した. 3.0 mL の DMSO にこの 50.0 mg/mL 調製原液 3.0 mL を加えることにより 25.0 mg/mL 溶液を調製した. 以下同様な希釈を順次行うことにより, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.781, 0.391, 0.195, 0.0977, 0.0488, 0.0244, 0.0122 および 0.00610 mg/mL 溶液を調製した. 調製後, 速やかに使用した.

13.6. 対照群

13.6.1. 陰性（溶媒）対照

被験物質の溶媒である DMSO を使用した。

13.6.2. 陽性対照

調製済み陽性対照物質溶液（保証期限：2006 年 9 月 1 日，オリエンタル酵母工業）を試験に使用した。使用時まで超低温フリーザー（設定値：-80℃，基準値：-60℃ 以下）に保存した。陽性対照物質名および用量等を以下に示した。

AF-2 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
NaN₃ アジ化ナトリウム
9-AA 9-アミノアクリジン塩酸塩
2-AA 2-アミノアントラセン

《代謝活性化系非存在下：-S9 処理》

菌株	化合物名	陽性対照調製日	用量 (μg/プレート)	陽性対照 溶液濃度 (μg/mL)	ロット番号
ネズミチフス菌 TA100	AF-2	2005.2.3	0.01	0.1	050203AF01
ネズミチフス菌 TA98	AF-2	2005.2.3	0.1	1.0	050203AF10
ネズミチフス菌 TA1535	NaN ₃	2005.2.2	0.5	5.0	050202N
ネズミチフス菌 TA1537	9-AA	2005.2.3	80	800	050203A9
大腸菌 WP2 _{uvrA}	AF-2	2005.2.3	0.01	0.1	050203AF01

《代謝活性化系存在下：+S9 処理》

ネズミチフス菌 TA100	2-AA	2005.2.2	1.0	10	050202A210
ネズミチフス菌 TA98	2-AA	2005.2.2	0.5	5.0	050202A205
ネズミチフス菌 TA1535	2-AA	2005.2.2	2.0	20	050202A220
ネズミチフス菌 TA1537	2-AA	2005.2.2	2.0	20	050202A220
大腸菌 WP2 _{uvrA}	2-AA	2005.2.2	10	100	050202A2100

なお、これらの用量は「安衛法における変異原性試験ーテストガイドラインと GLP」（労働省安全衛生部化学物質調査課編，1991 年）に準じて設定した。

13.6.3. 無菌試験

被験物質液（調製原液）ならびに S9 mix については無菌試験を実施した。すなわち、調製原液 100 μ L あるいは S9 mix 500 μ L にトップアガーを 2 mL 添加し、プレート上に注いだ。37°C の条件で 48 時間培養した後、雑菌汚染の有無を確認した。調製原液および S9 mix のいずれについても 2 枚のプレートを用いて無菌試験を実施した。

2-ethylhexyl vinyl ether 調製原液ならびに S9 mix の無菌試験において、菌の増殖は認められなかった。

13.7. 用量設定試験（予備試験）

13.7.1. 用量

ガイドライン上定められた最高用量である 5000 μ g/プレート を最高用量とし、以下 2000, 800, 320, 128, 51.2, 20.5 および 8.19 μ g/プレートの計 8 用量を設定した。

13.7.2. 使用プレート数および識別方法

用量当たり 3 枚のプレートを用いた。

油性インクを用いて試験菌株、S9 mix の有無および用量を明記することにより各プレートを識別した。

13.7.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

試験管に、使用溶媒、被験物質液あるいは陽性対照物質溶液を 100 μ L、次いで代謝活性化系非存在下（-S9 処理）の場合、0.1 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液（pH 7.4）を 500 μ L、代謝活性化系存在下（+S9 処理）の場合、S9 mix を 500 μ L 分注した。さらに前培養した試験菌株懸濁液 100 μ L を加えた後、ウォーターバスシェーカー（M-100^N，タイテック）を用いて 37°C の条件で 20 分間振盪（120 回/分，プレインキュベーション）した。振盪終了後、トップアガー 2 mL を添加し、内容物を混合した。その後、混合液をプレート上に注ぎ一様に広げた。恒温器（SSV-R11DA，池田理化）を用い、各プレートを 37°C の条件で 48 時間培養した。

13.7.4. 析出等の観察

各処理法において、処理開始時およびコロニー数計測時に被験物質析出等の有無を肉眼で観察した。

13.7.5. コロニー数計測

被験物質の生育阻害作用を確認するため、プレート上の試験菌株（背景菌）の生育状態について実体顕微鏡（ $\times 40$ ）を用いて観察した。次いで、復帰突然変異により生じたコロニー数を計数した。計測に際しては、コロニーアナライザー（CA-11，システムサイエンス）を用い、面積補正ならびに数え落とし補正を実施してコロニー数を算出した。

ただし、試験菌株に対する強度の生育阻害作用により、-S9 処理、TA100 株の 320 µg /プレート以上の用量ではコロニーアナライザーの使用は不適切と判断し、目視にて復帰コロニーの計数を実施した。

13.8. 用量設定試験（追加試験）

用量設定試験の結果、両処理法の TA100 株、TA1535 株、TA98 株および TA1537 株において生育阻害が低用量までみられ、評価群数が 4 用量に満たなかったことから追加試験を実施した。

13.8.1. 用量

用量設定試験の結果を基に、生育阻害が認められると考えられる用量を最高用量に、次の表に示した 6~7 用量を設定した。

《代謝活性化系非存在下：-S9 処理》

菌株	用量 (µg/プレート)						
TA100	0.781	1.56	3.13	6.25	12.5	25.0	50.0
TA1535	0.781	1.56	3.13	6.25	12.5	25.0	50.0
TA98	0.781	1.56	3.13	6.25	12.5	25.0	50.0
TA1537	0.781	1.56	3.13	6.25	12.5	25.0	50.0

《代謝活性化系存在下：+S9 処理》

菌株	用量 (µg/プレート)					
TA100	6.25	12.5	25.0	50.0	100	200
TA1535	6.25	12.5	25.0	50.0	100	200
TA98	6.25	12.5	25.0	50.0	100	200
TA1537	6.25	12.5	25.0	50.0	100	200

13.8.2. 使用プレート数および識別方法

13.7.2.に記載の方法に準じた。

13.8.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

13.7.3.に記載の方法に準じた。ただし、ウォーターバスシェーカーは MM-10 (タイテック) を用いた。

13.8.4. 析出等の観察

13.7.4.に記載の方法に準じた。

13.8.5. コロニー数計測

13.7.5.に記載の方法に準じた。

13.9. 本試験

13.9.1. 用量

用量設定試験および用量設定試験（追加試験）の結果、全ての試験菌株において生育阻害が認められた。また、変異原性は認められなかった。したがって、本試験では生育阻害が認められると考えられる用量を最高用量とし、次の表に示した6用量を設定した。

《代謝活性化系非存在下：-S9 処理》

菌株	用量 (μg/プレート)					
TA100	0.610	1.22	2.44	4.88	9.77	19.5
TA1535	0.610	1.22	2.44	4.88	9.77	19.5
WP2 <i>uvrA</i>	156	313	625	1250	2500	5000
TA98	1.22	2.44	4.88	9.77	19.5	39.1
TA1537	0.610	1.22	2.44	4.88	9.77	19.5

《代謝活性化系存在下：+S9 処理》

菌株	用量 (μg/プレート)					
TA100	4.88	9.77	19.5	39.1	78.1	156
TA1535	4.88	9.77	19.5	39.1	78.1	156
WP2 <i>uvrA</i>	78.1	156	313	625	1250	2500
TA98	9.77	19.5	39.1	78.1	156	313
TA1537	4.88	9.77	19.5	39.1	78.1	156

13.9.2. 使用プレート数および識別方法

13.7.2.に記載した方法に準じた。

13.9.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

13.7.3.に記載した方法に準じた。ただし、ウォーターバスシェーカーはMM-10（タイテック）を用いた。

13.9.4. 析出等の観察

13.7.4.に記載した方法に準じた。

13.9.5. コロニー数計測

13.7.5.に記載した方法に準じた。

13.10. 試験成立条件

陰性対照および陽性対照の平均復帰変異コロニー数は背景データから求めた基準値内であること。陽性対照のコロニー数は同時陰性対照値の2倍を超えること。以上の条

件を満たした場合に試験は成立したと判断した。

13.11. 結果の解析

復帰変異コロニー数が陰性対照の2倍以上に増加し、かつその増加に用量依存性あるいは再現性が認められた場合に陽性と判定した。

統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

14. 試験結果

14.1. 用量設定試験

結果を Figure 1～5 および Table 1, 2 に示した。

2-ethylhexyl vinyl ether 処理の場合、-S9 処理ならびに+S9 処理のいずれの試験菌株においても、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。試験菌株に対する生育阻害作用は、-S9 処理および+S9 処理の全ての菌株において認められ、TA100 株、TA1535 株、TA98 株および TA1537 株では生育阻害を示さない用量が4用量に満たなかった。

一方、陽性対照物質は、各試験菌株に対して復帰突然変異を顕著に誘発した。

14.2. 被験物質の析出等（用量設定試験）

処理開始時に、+S9 処理の 5000 µg/プレート の用量で油膜状の析出物が認められた。

コロニー数計測時には、析出等の変化は観察されなかった。

14.3. 用量設定試験（追加試験）

結果を Figure 6～9 および Table 3, 4 に示した。

2-ethylhexyl vinyl ether 処理の場合、-S9 処理ならびに+S9 処理のいずれの試験菌株においても、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、試験菌株に対する生育阻害作用は、両処理の全ての菌株において高用量群で認められた。

一方、陽性対照物質は、各試験菌株に対して復帰突然変異を顕著に誘発した。

14.4. 用量設定試験（追加試験）

処理開始時およびコロニー数計測時に、析出等の変化は観察されなかった。

14.5. 本試験

結果を Figure 10～14 および Table 5, 6 に示した。

2-ethylhexyl vinyl ether 処理の場合、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、試験菌株に対する生育阻害作用は、いずれも高用量群で認められた。

一方、陽性対照物質は、試験菌株に対して復帰突然変異を顕著に誘発した。

14.6. 被験物質の析出等（追加試験）

処理開始時およびコロニー数計測時に、析出等の変化は観察されなかった。

15. 考察および結論

2-ethylhexyl vinyl ether の遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため、細菌（ネズミチフス菌・大腸菌）を用いたブレインキューベーション法による復帰突然変異試験を実施した。

ガイドライン上定められた最高用量である 5000 µg/プレートあるいは試験菌株の生育を阻害する用量まで検討した結果、2-ethylhexyl vinyl ether 処理群では、代謝活性化系非存在下および代謝活性化系存在下のいずれにおいても、陰性対照の 2 倍を超えるような復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

これら両処理法での試験結果は、用量設定試験、同追加試験および本試験により再現性が確認された。

本被験物質 2-ethylhexyl vinyl ether についての遺伝毒性ならびに発がん性に関する報告はなかった。

類縁体すなわち、異性体である hexanol, 2-ethyl-および ethylhexyl acrylate の遺伝毒性ならびに発がん性に関する報告もなかった。

なお、陰性対照および陽性対照の平均復帰変異コロニー数は、いずれも当施設の背景データ（Appendix 1）から求めた基準値内であり、試験成立条件を満たしたことから、当該試験は適切な条件で実施されたものと判断された。

以上の試験結果から、当該試験条件下において、2-ethylhexyl vinyl ether の細菌に対する遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

16. 参考とした資料

- Ames BN, Lee FD, Durston WE. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. Proc Nat Acad Sci 1973; 70: 782-6.
- Ames BN, Durston WE, Yamasaki E, Lee FD. Carcinogens are mutagens. a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proc Nat Acad Sci USA. 1973; 70 (8): 2281-5.
- Ames BN, McCann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutat Res 1975; 31: 347-64.
- Yahagi T. [Screening methods using microbes for the environmental carcinogens (author's transl)]. [Article in Japanese]. Protein, Nucleic Acid and Enzyme 1975; 20: 16-27.
- Ministry of Labor, Industrial Safety and Health Department. [Test Guidelines and GLP for Mutagenicity Test using Microorganisms in the Safety and Health Law]. Tokyo; Japan Industrial Safety and Health Association; 1991.
- Ishidate M Jr editor. [The data book for mutagenicity assay using microorganisms]. [Article in Japanese]. Life-science Information Center Press; 1991.

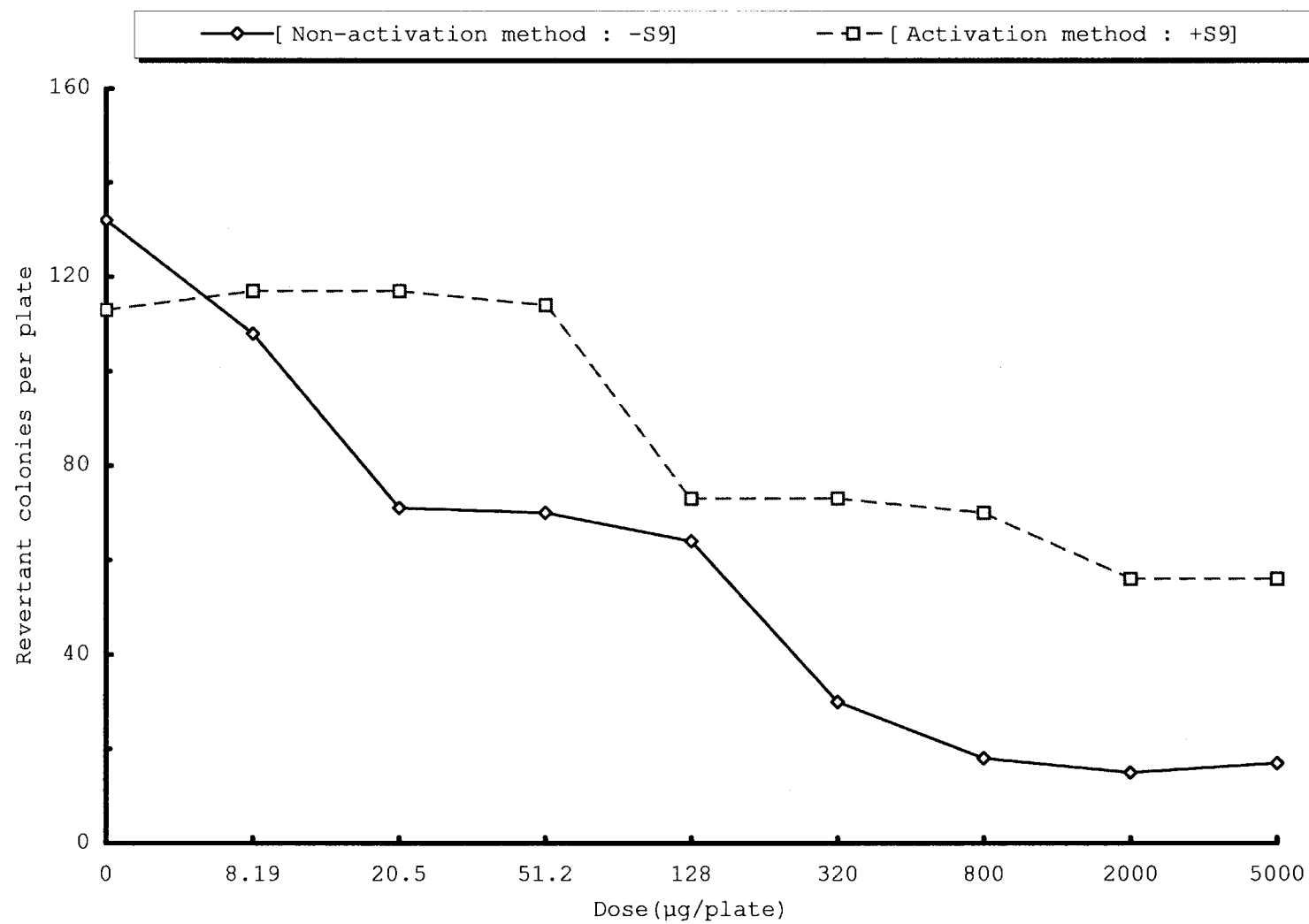


Figure 1. Dose-finding study of 2-ethylhexyl vinyl ether in strain TA100

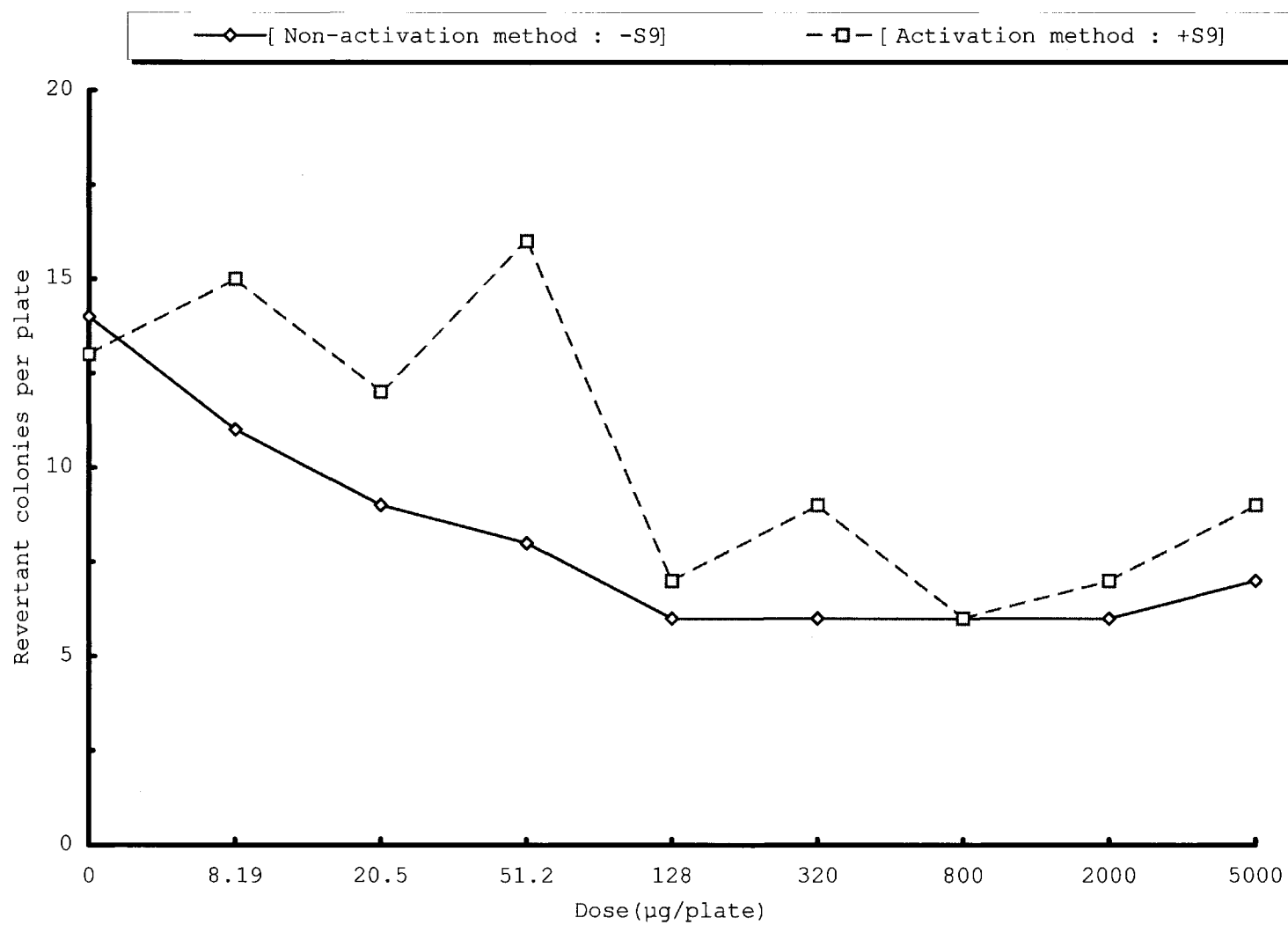


Figure 2. Dose-finding study of 2-ethylhexyl vinyl ether in strain TA1535

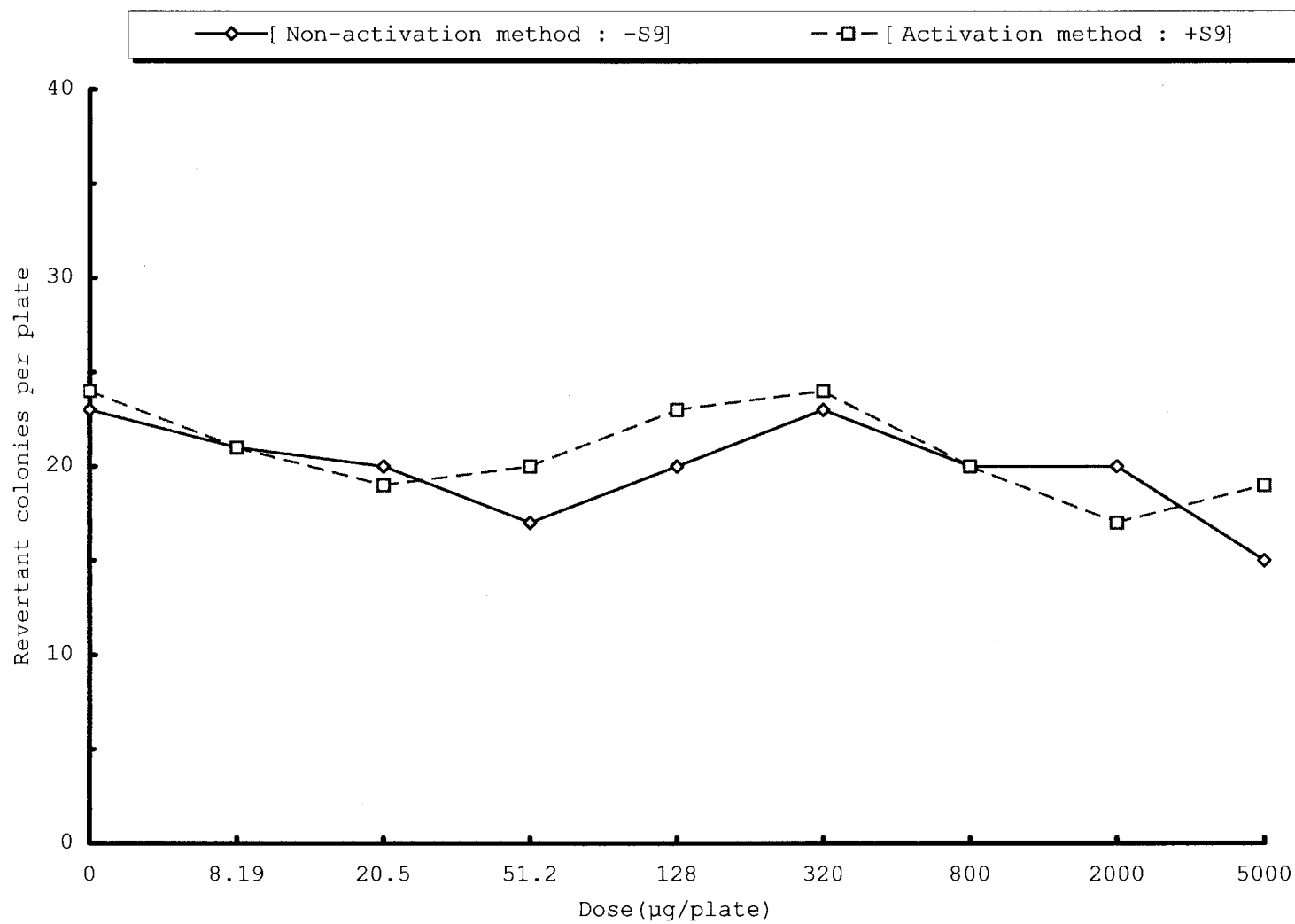


Figure 3. Dose-finding study of 2-ethylhexyl vinyl ether in strain WP2uvrA

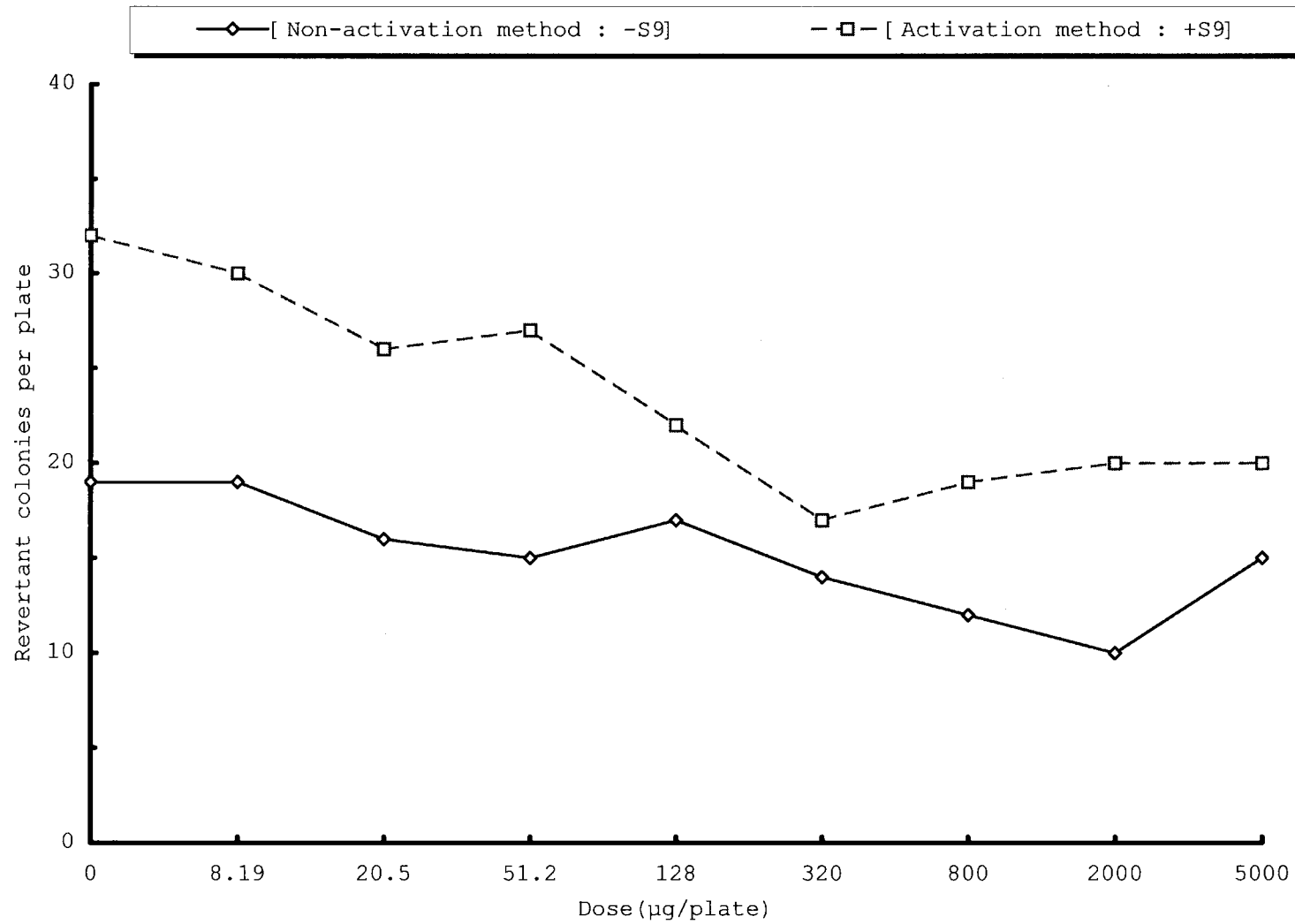


Figure 4. Dose-finding study of 2-ethylhexyl vinyl ether in strain TA98

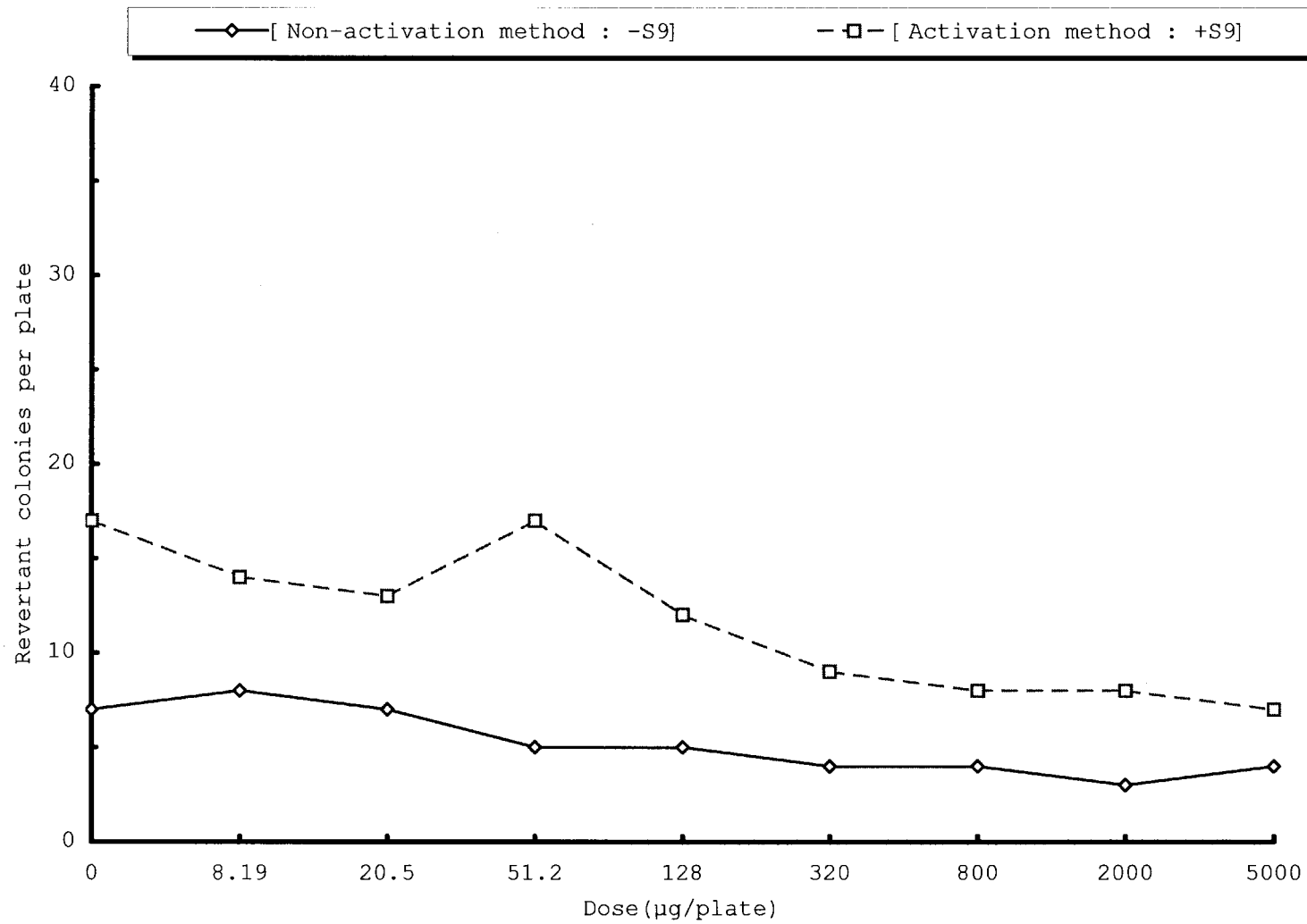


Figure 5. Dose-finding study of 2-ethylhexyl vinyl ether in strain TA1537

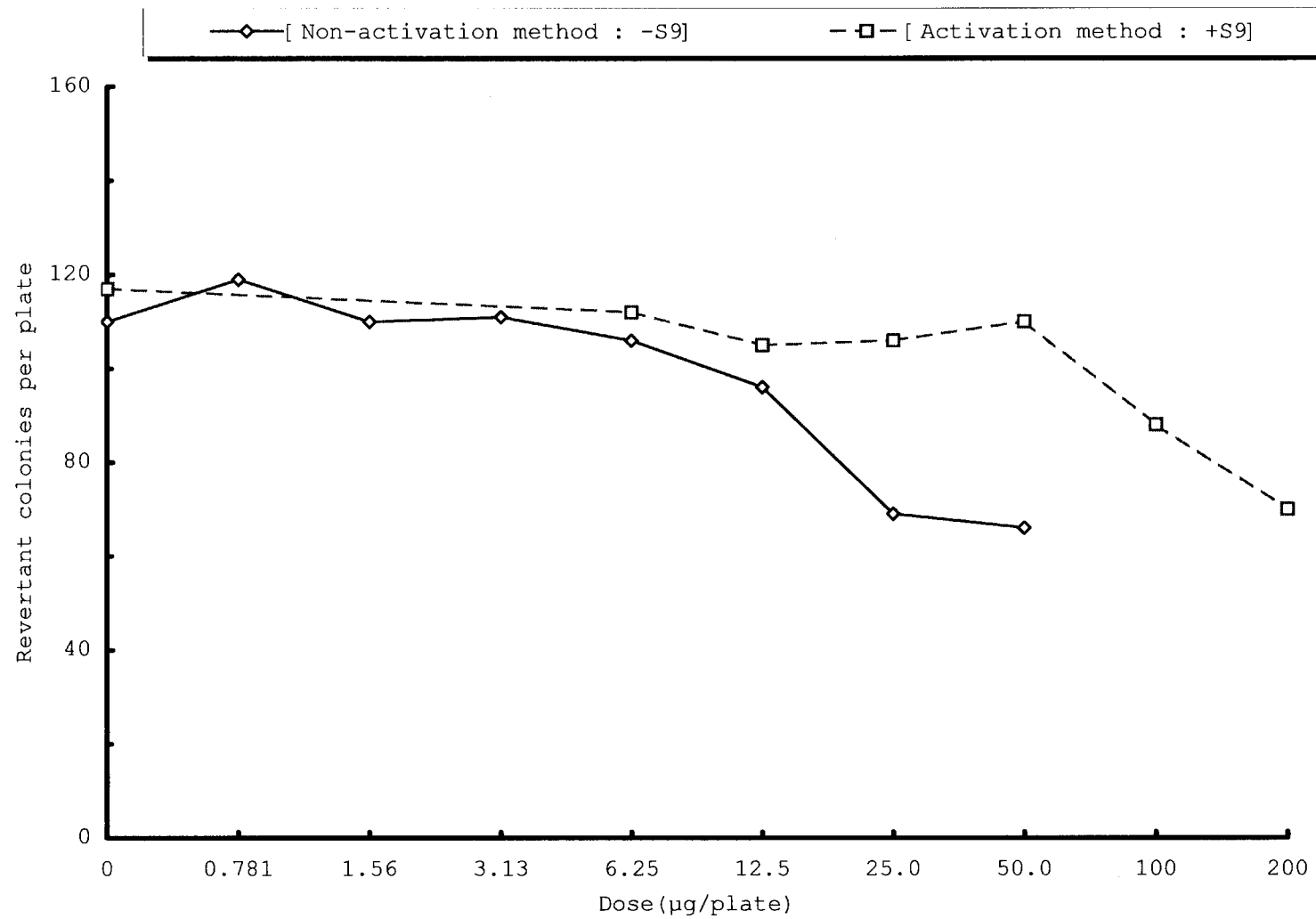


Figure 6. Dose-finding study of 2-ethylhexyl vinyl ether in strain TA100 (Additional study)

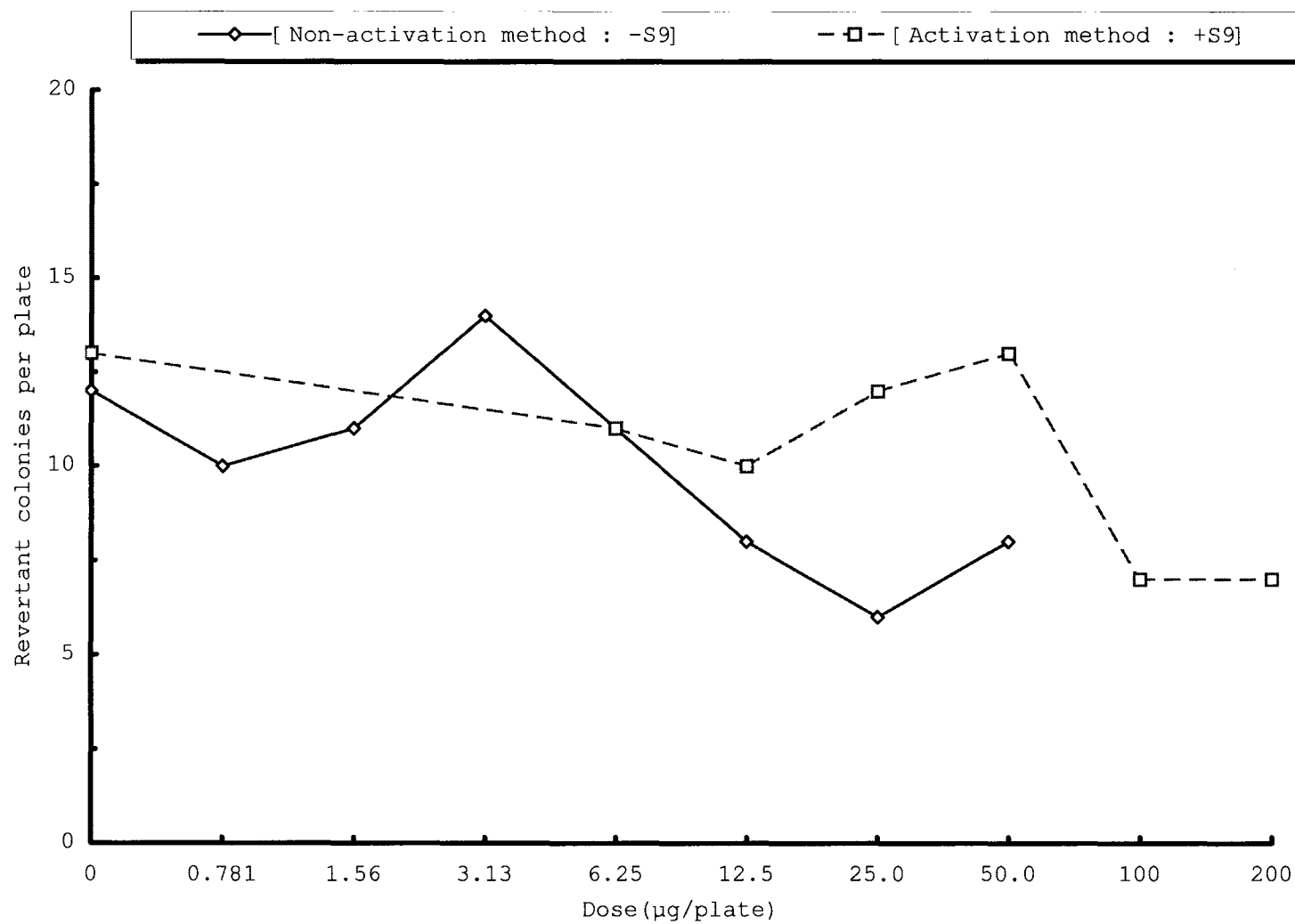


Figure 7. Dose-finding study of 2-ethylhexyl vinyl ether in strain TA1535 (Additional study)

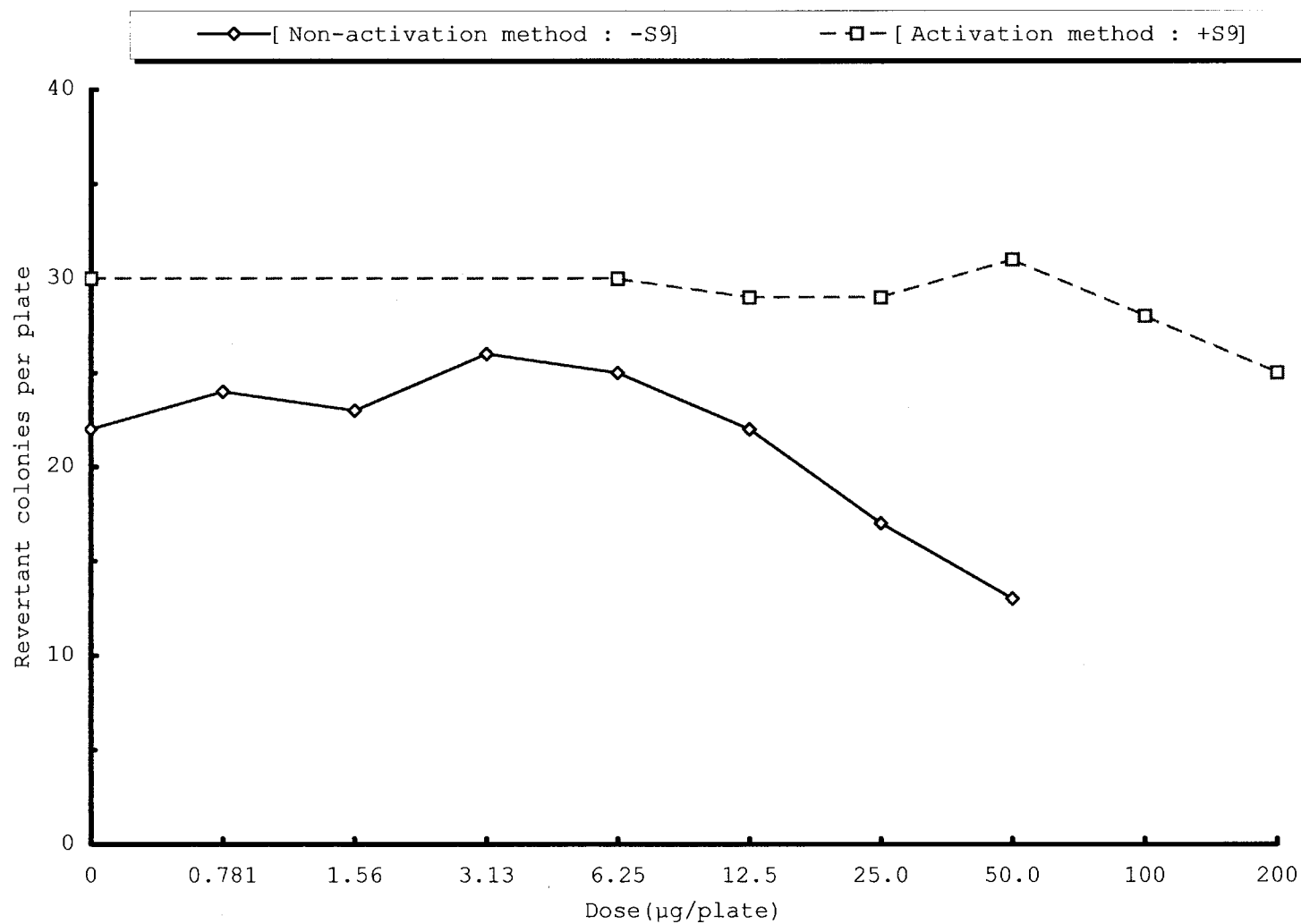


Figure 8. Dose-finding study of 2-ethylhexyl vinyl ether in strain TA98(Additional study)

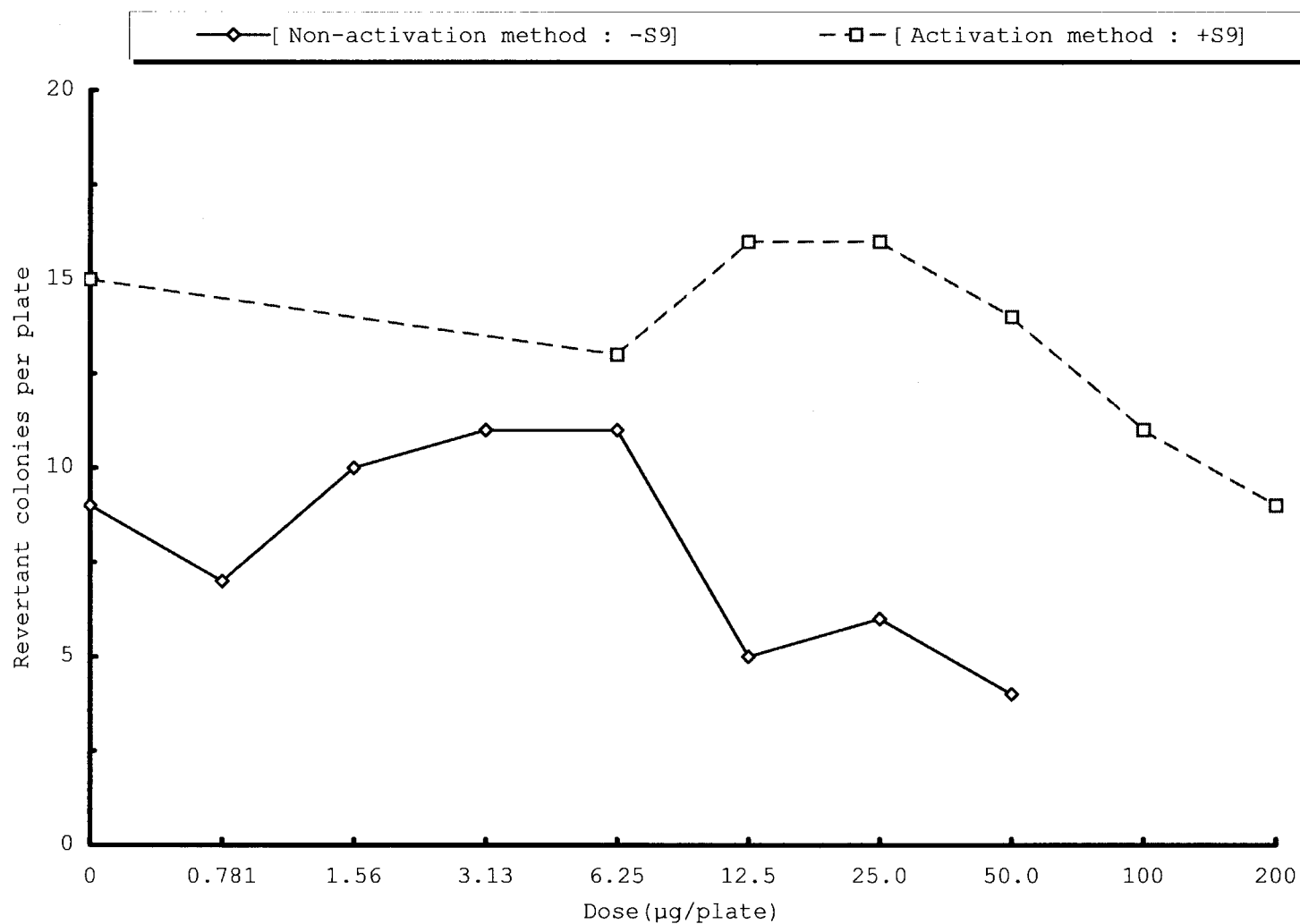


Figure 9. Dose-finding study of 2-ethylhexyl vinyl ether in strain TA1537 (Additional study)

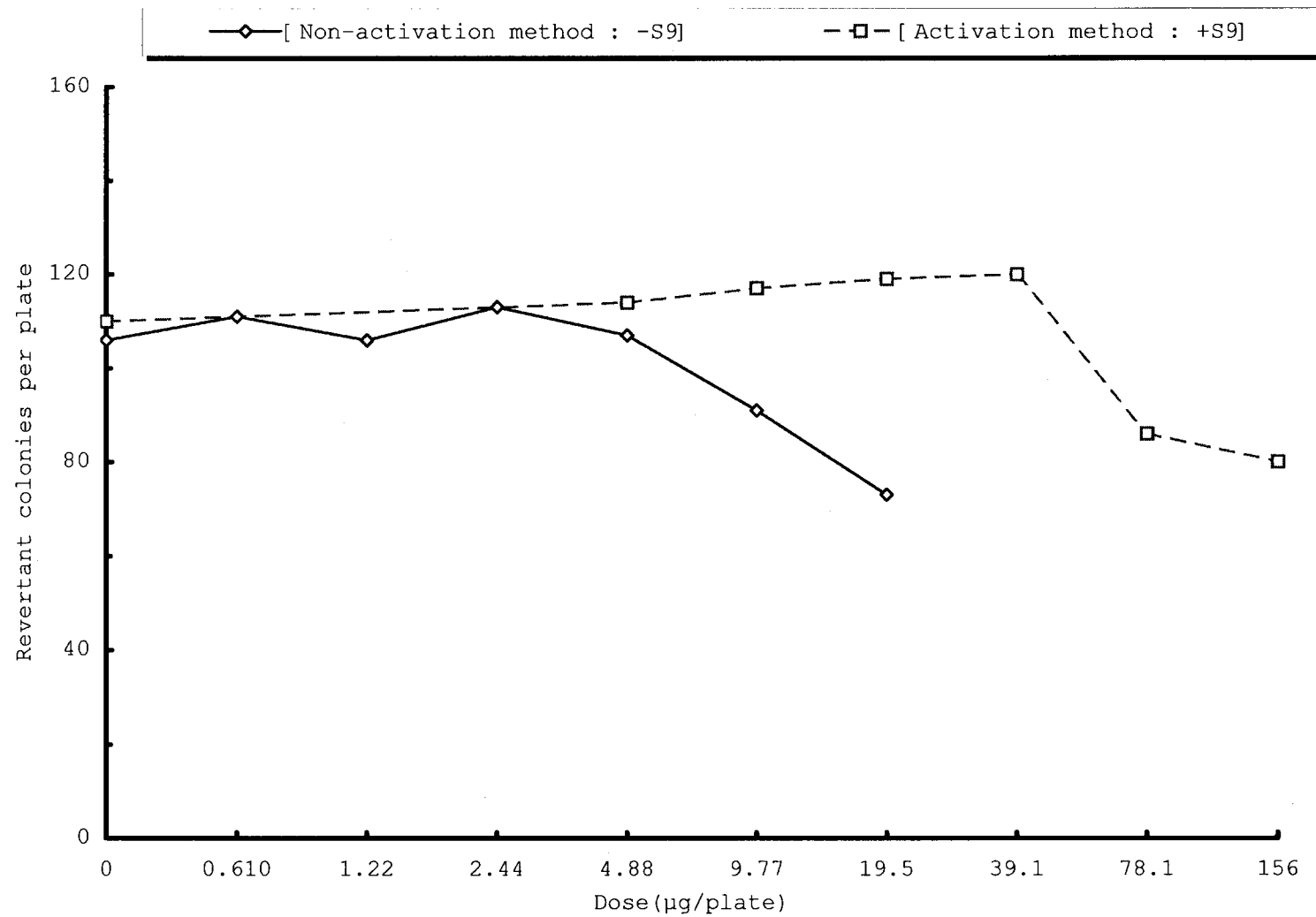


Figure 10. Bacterial reverse mutation test of 2-ethylhexyl vinyl ether in strain TA100

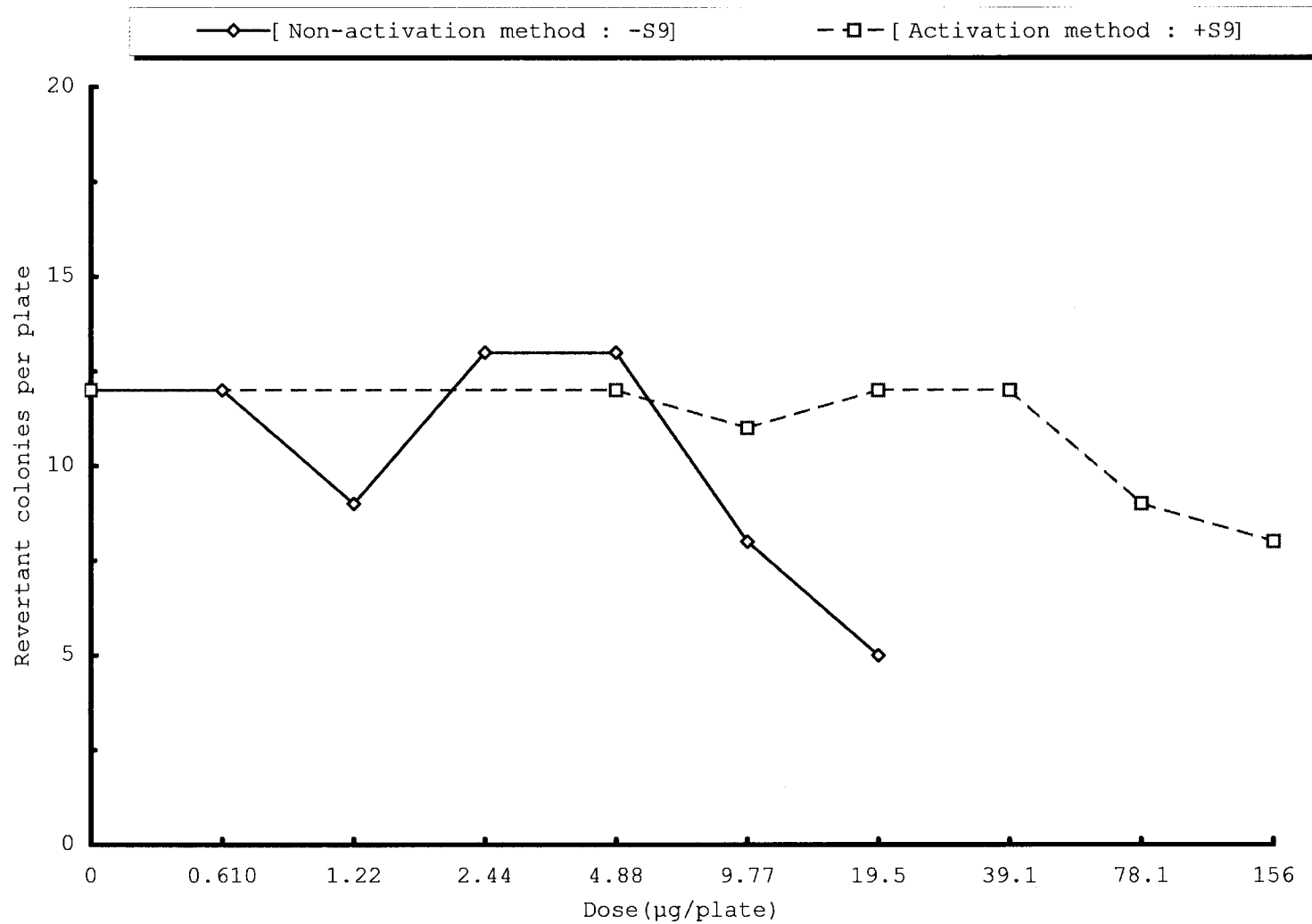


Figure 11. Bacterial reverse mutation test of 2-ethylhexyl vinyl ether in strain TA1535

-31-

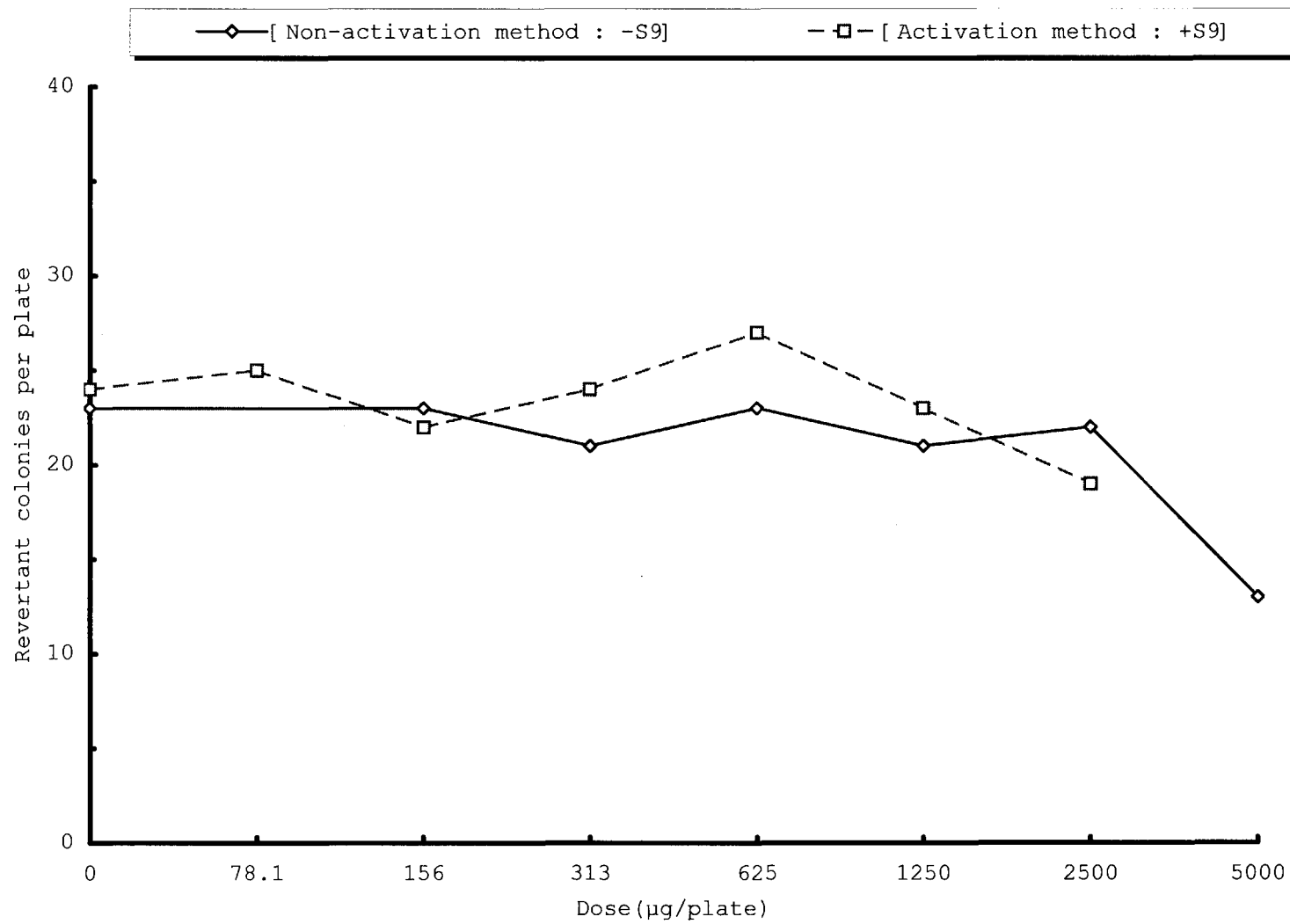


Figure 12. Bacterial reverse mutation test of 2-ethylhexyl vinyl ether in strain WP2uvrA

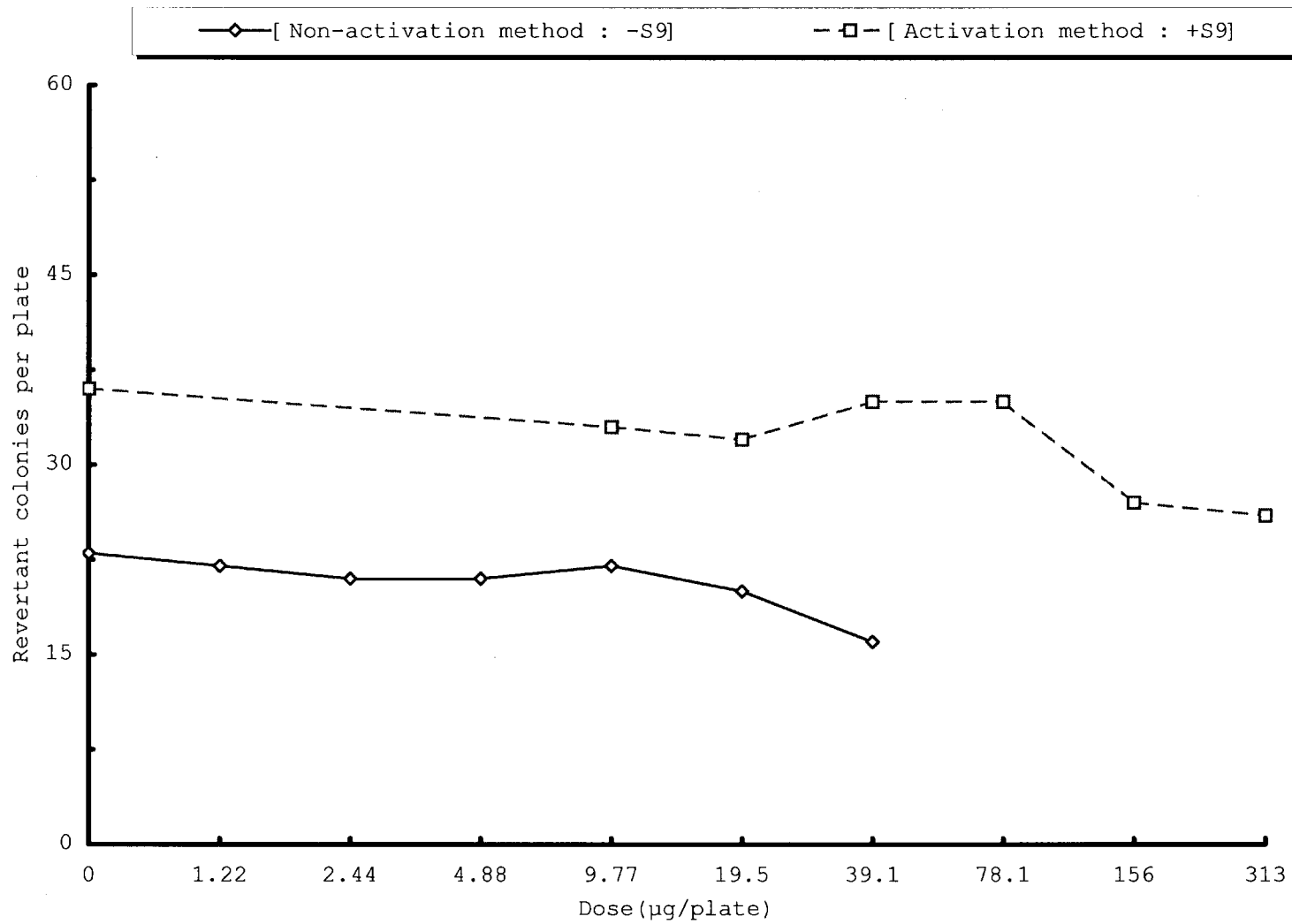


Figure 13. Bacterial reverse mutation test of 2-ethylhexyl vinyl ether in strain TA98

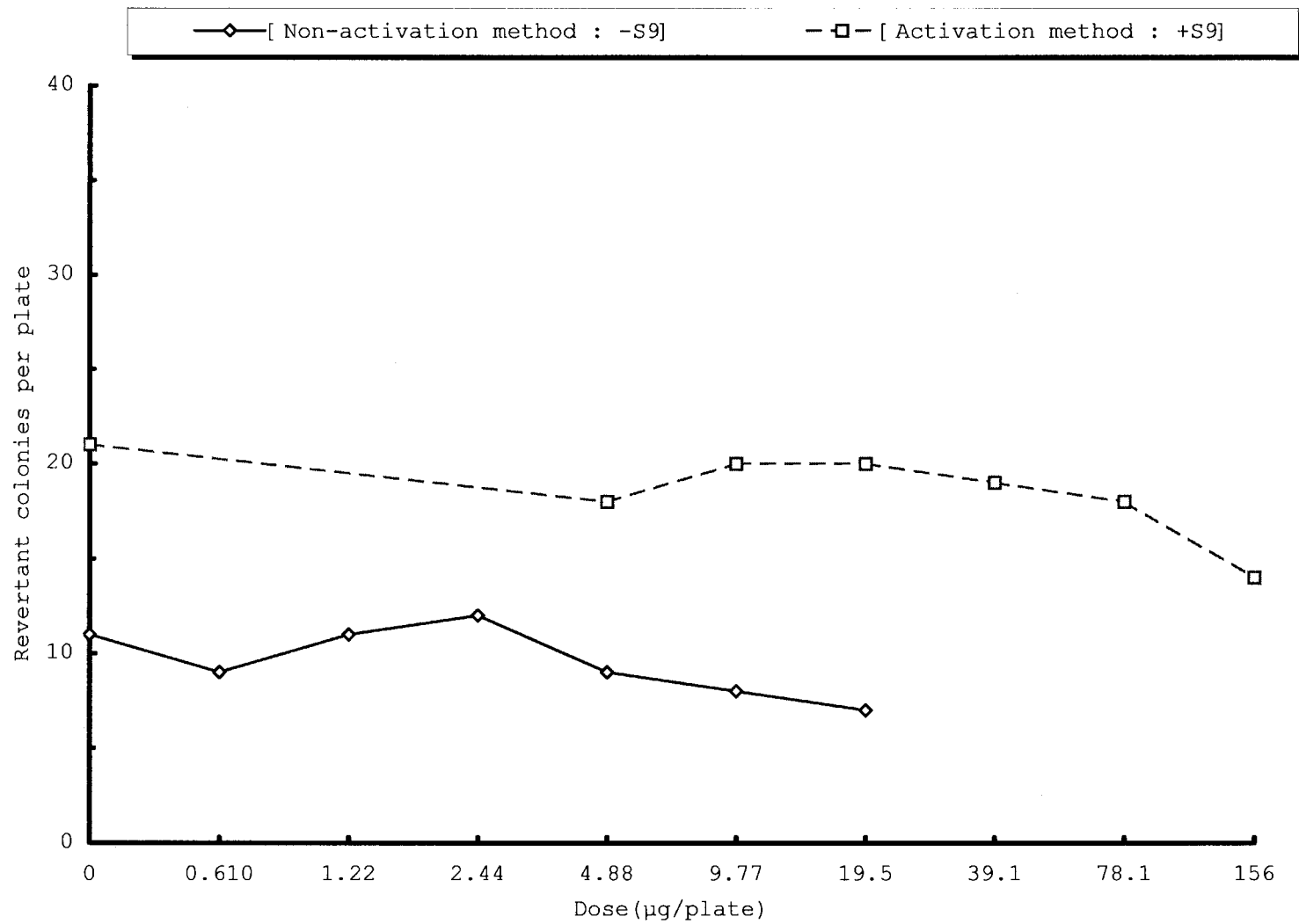


Figure 14. Bacterial reverse mutation test of 2-ethylhexyl vinyl ether in strain TA1537

Table 1. Summary data on dose-finding study of 2-ethylhexyl vinyl ether
[Non-activation method : -S9]

Compound	Dose (µg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
2-ethylhexyl vinyl ether	0 a)	129 [132	130 ±	136 4]	15 [14	15 ±	13 1]	22 [23	24 ±	22 1]	20 [19	20 ±	16 2]	7 [7	8 ±	7 1]
	8.19	107 [108	101 ±	115 7]	8 [11	12 ±	12 2]	22 [21	22 ±	20 1]	20 [19	18 ±	19 1]	7 [8	9 ±	8 1]
	20.5	75* [71	69* ±	70* 3]	7* [9	12* ±	8* 3]	20 [20	21 ±	18 2]	15* [16	18* ±	15* 2]	6* [7	8* ±	7* 1]
	51.2	79* [70	64* ±	66* 8]	5* [8	9* ±	9* 2]	18 [17	14 ±	18 2]	16* [15	16* ±	13* 2]	5* [5	5* ±	5* 0]
	128	59* [64	65* ±	67* 4]	7* [6	6* ±	6* 1]	22 [20	18 ±	20 2]	16* [17	18* ±	18* 1]	5* [5	6* ±	3* 2]
	320	23* [30	27* ±	40* 9]	7* [6	5* ±	7* 1]	21 [23	24 ±	24 2]	18* [14	12* ±	12* 3]	6* [4	3* ±	4* 2]
	800	18* [18	20* ±	15* 3]	7* [6	4* ±	6* 2]	20 [20	19 ±	22 2]	12* [12	13* ±	12* 1]	5* [4	5* ±	3* 1]
	2000	13* [15	12* ±	20* 4]	6* [6	6* ±	7* 1]	20 [20	18 ±	23 3]	13* [10	8* ±	8* 3]	1* [3	4* ±	4* 2]
	5000	16* [17	21* ±	15* 3]	6* [7	8* ±	6* 1]	16* [15	14* ±	15* 1]	13* [15	14* ±	17* 2]	3* [4	4* ±	4* 1]
Positive control		806 [825	820 ±	849 b) 22]	589 [554	511 ±	562 c) 40]	104 [119	130 ±	122 b) 13]	596 [554	530 ±	535 d) 37]	352 [300	282 ±	266 e) 46]

a): Negative control(Dimethyl sulfoxide, 100 µL/plate)

b): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 µg/plate c): NaN₃; Sodium azide, 0.5 µg/plate

d): AF-2, 0.1 µg/plate e): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 µg/plate

* : Growth inhibition was observed.

Table 2. Summary data on dose-finding study of 2-ethylhexyl vinyl ether
[Activation method : +S9]

Compound	Dose (µg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
2-ethylhexyl vinyl ether	0 a)	104	122	114	15	10	13	25	26	22	28	34	33	16	14	21
		[113	±	9]	[13	±	3]	[24	±	2]	[32	±	3]	[17	±	4]
	8.19	116	121	115	17	14	13	21	21	22	33	29	29	15	13	14
		[117	±	3]	[15	±	2]	[21	±	1]	[30	±	2]	[14	±	1]
	20.5	124	117	111	15	11	11	16	20	20	27	26	24	14	11	14
		[117	±	7]	[12	±	2]	[19	±	2]	[26	±	2]	[13	±	2]
	51.2	116	119	106	16	15	18	21	21	18	30	24	27	14	16	21
		[114	±	7]	[16	±	2]	[20	±	2]	[27	±	3]	[17	±	4]
	128	74 *	79 *	67 *	9 *	5 *	8 *	23	25	20	23 *	23 *	20 *	13 *	15 *	9 *
		[73	±	6]	[7	±	2]	[23	±	3]	[22	±	2]	[12	±	3]
	320	63 *	79 *	76 *	8 *	9 *	9 *	20	27	25	19 *	12 *	19 *	7 *	12 *	9 *
		[73	±	9]	[9	±	1]	[24	±	4]	[17	±	4]	[9	±	3]
	800	67 *	70 *	74 *	6 *	6 *	5 *	19	20	20	20 *	16 *	20 *	9 *	6 *	10 *
		[70	±	4]	[6	±	1]	[20	±	1]	[19	±	2]	[8	±	2]
	2000	53 *	59 *	55 *	6 *	9 *	7 *	16 *	20 *	15 *	22 *	20 *	17 *	10 *	7 *	8 *
		[56	±	3]	[7	±	2]	[17	±	3]	[20	±	3]	[8	±	2]
	5000	48 *	64 *	56 *	9 *	10 *	8 *	20 *	22 *	15 *	19 *	21 *	20 *	8 *	6 *	6 *
		[56	±	8]	[9	±	1]	[19	±	4]	[20	±	1]	[7	±	1]
Positive control		808	768	867 b)	286	252	276 c)	522	501	495 d)	321	360	337 e)	121	133	138 c)
		[814	±	50]	[271	±	17]	[506	±	14]	[339	±	20]	[131	±	9]

a): Negative control(Dimethyl sulfoxide, 100 µL/plate)

b):2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 µg/plate c):2-AA, 2 µg/plate d):2-AA, 10 µg/plate e):2-AA, 0.5 µg/plate

* : Growth inhibition was observed.

Table 3. Summary data on dose-finding study of 2-ethylhexyl vinyl ether (Additional study)
[Non-activation method : -S9]

Compound	Dose (µg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
2-ethylhexyl vinyl ether	0 a)	105	116	108	12	12	13				25	21	20	7	9	11
		[110	±	6]	[12	±	1]				[22	±	3]	[9	±	2]
	0.781	128	111	119	10	12	9				27	26	20	10	5	6
		[119	±	9]	[10	±	2]				[24	±	4]	[7	±	3]
	1.56	115	109	105	9	12	12				21	26	23	13	9	8
		[110	±	5]	[11	±	2]				[23	±	3]	[10	±	3]
	3.13	118	107	109	16	14	13				27	23	28	12	11	9
		[111	±	6]	[14	±	2]				[26	±	3]	[11	±	2]
6.25	100	109	109	12	10	11				27	25	24	12	9	11	
	[106	±	5]	[11	±	1]				[25	±	2]	[11	±	2]	
12.5	92*	98*	97*	10*	8*	7*				22	23	20	3*	6*	6*	
	[96	±	3]	[8	±	2]				[22	±	2]	[5	±	2]	
25.0	72*	66*	69*	5*	7*	7*				16*	15*	19*	7*	6*	4*	
	[69	±	3]	[6	±	1]				[17	±	2]	[6	±	2]	
50.0	60*	72*	65*	7*	8*	8*				12*	14*	13*	3*	3*	5*	
	[66	±	6]	[8	±	1]				[13	±	1]	[4	±	1]	
Positive control		732	797	778 b)	628	646	640 c)				638	660	595 d)	209	285	283 e)
		[769	±	33]	[638	±	9]				[631	±	33]	[259	±	43]

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 µL/plate)

b): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 µg/plate c): NaN₃; Sodium azide, 0.5 µg/plate

d): AF-2, 0.1 µg/plate e): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 µg/plate

* : Growth inhibition was observed.

Table 4. Summary data on dose-finding study of 2-ethylhexyl vinyl ether (Additional study)
[Activation method : +S9]

Compound	Dose (µg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98		TA1537			
2-ethylhexyl vinyl ether	0 a)	121 [117	118 ±	113 4]	12 [13	12 ±	15 2]				33 [30	28 ±	29 3]	13 [15	17 ±	16 2]
	6.25	110 [112	116 ±	109 4]	11 [11	9 ±	13 2]				25 [30	31 ±	34 5]	13 [13	15 ±	12 2]
	12.5	105 [105	103 ±	106 2]	12 [10	10 ±	9 2]				29 [29	32 ±	27 3]	17 [16	19 ±	11 4]
	25.0	102 [106	109 ±	107 4]	11 [12	16 ±	10 3]				28 [29	31 ±	29 2]	17 [16	16 ±	14 2]
	50.0	107 [110	111 ±	111 2]	12 [13	11 ±	16 3]				34 [31	28 ±	30 3]	16 [14	12 ±	14 2]
	100	85 * [88	92 * ±	87 * 4]	6 * [7	6 * ±	9 * 2]				28 [28	25 ±	31 3]	11 * [11	13 * ±	9 * 2]
	200	74 * [70	68 * ±	68 * 3]	7 * [7	8 * ±	7 * 1]				25 * [25	27 * ±	22 * 3]	10 * [9	8 * ±	8 * 1]
Positive control		1048 [1016	980 ±	1021 b) 34]	370 [374	359 ±	392 c) 17]				341 [367	409 ±	350 e) 37]	106 [117	115 ±	130 c) 12]

a): Negative control(Dimethyl sulfoxide, 100 µL/plate)

b):2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 µg/plate c):2-AA, 2 µg/plate e):2-AA, 0.5 µg/plate

* : Growth inhibition was observed.

Table 5. Summary data on bacterial reverse mutation test of 2-ethylhexyl vinyl ether
[Non-activation method : -S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
2-ethylhexyl vinyl ether	0 a)	107	106	106	11	12	13	21	26	22	25	20	24	12	8	12
		[106	$\pm$	1]	[12	$\pm$	1]	[23	$\pm$	3]	[23	$\pm$	3]	[11	$\pm$	2]
	0.610	115	110	108	10	13	12							6	12	9
		[111	$\pm$	4]	[12	$\pm$	2]							[9	$\pm$	3]
	1.22	106	112	101	9	10	9				20	26	21	10	13	11
		[106	$\pm$	6]	[9	$\pm$	1]				[22	$\pm$	3]	[11	$\pm$	2]
	2.44	121	111	106	13	15	11				21	20	22	14	11	11
		[113	$\pm$	8]	[13	$\pm$	2]				[21	$\pm$	1]	[12	$\pm$	2]
	4.88	104	110	106	14	14	11				21	21	21	10	10	8
		[107	$\pm$	3]	[13	$\pm$	2]				[21	$\pm$	0]	[9	$\pm$	1]
	9.77	93*	83*	96*	6*	11*	8*				25	21	20	9*	6*	9*
		[91	$\pm$	7]	[8	$\pm$	3]				[22	$\pm$	3]	[8	$\pm$	2]
	19.5	72*	67*	79*	6*	5*	4*				19*	20*	20*	7*	7*	6*
		[73	$\pm$	6]	[5	$\pm$	1]				[20	$\pm$	1]	[7	$\pm$	1]
	39.1										16*	14*	18*			
											[16	$\pm$	2]			

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 $\mu\text{L}/\text{plate}$)

* : Growth inhibition was observed.

Table 5. -Continued

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
2-ethylhexyl vinyl ether	156							20	24	24						
								[23	$\pm$	2]						
	313							22	20	21						
								[21	$\pm$	1]						
	625							20	25	25						
								[23	$\pm$	3]						
	1250							22	20	21						
								[21	$\pm$	1]						
	2500							21	22	22						
								[22	$\pm$	1]						
	5000							12 *	14 *	14 *						
								[13	$\pm$	1]						
Positive control		827	768	790 b)	596	609	602 c)	121	106	118 b)	713	728	695 d)	254	231	244 e)
		[795	$\pm$	30]	[602	$\pm$	7]	[115	$\pm$	8]	[712	$\pm$	17]	[243	$\pm$	12]

b): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): NaN₃; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d): AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ e): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$

* : Growth inhibition was observed.

Table 6. Summary data on bacterial reverse mutation test of 2-ethylhexyl vinyl ether
[Activation method : +S9]

Compound	Dose (µg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
2-ethylhexyl vinyl ether	0 a)	112	104	114	12	14	10	25	26	22	35	38	36	23	21	20
		[110	±	5]	[12	±	2]	[24	±	2]	[36	±	2]	[21	±	2]
	4.88	109	113	119	14	11	12							16	19	20
		[114	±	5]	[12	±	2]							[18	±	2]
	9.77	115	122	114	11	10	11				34	31	34	22	20	18
		[117	±	4]	[11	±	1]				[33	±	2]	[20	±	2]
	19.5	118	124	116	9	14	12				29	32	35	21	18	20
		[119	±	4]	[12	±	3]				[32	±	3]	[20	±	2]
	39.1	126	117	117	13	12	10				37	31	37	18	21	18
		[120	±	5]	[12	±	2]				[35	±	3]	[19	±	2]
	78.1	92*	85*	81*	10*	7*	9*	23	28	24	38	36	31	16*	20*	19*
		[86	±	6]	[9	±	2]	[25	±	3]	[35	±	4]	[18	±	2]
	156	74*	85*	80*	8*	10*	6*	22	23	21	28*	28*	26*	12*	16*	13*
		[80	±	6]	[8	±	2]	[22	±	1]	[27	±	1]	[14	±	2]
	313							26	23	24	23*	26*	28*			
								[24	±	2]	[26	±	3]			
	625							29	26	26						
								[27	±	2]						
	1250							23	23	22						
								[23	±	1]						
	2500							19*	20*	17*						
								[19	±	2]						
Positive control		1195	1163	1111 b)	434	460	414 c)	527	516	495 d)	403	424	441 e)	143	190	142 c)
		[1156	±	42]	[436	±	23]	[513	±	16]	[423	±	19]	[158	±	27]

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 µL/plate)

b): 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 µg/plate c): 2-AA, 2 µg/plate d): 2-AA, 10 µg/plate e): 2-AA, 0.5 µg/plate

* : Growth inhibition was observed.