

メチルアセトアセテート
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
材料および方法	3
結果および考察	7
結 論	8
特 記 事 項	8
文 献	8
Tables 1~4	

【要 約】

メチルアセトアセテート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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で5用量を設定して実施した。また、WP2 *uvrA* のS9 mix 無添加試験では、本試験Ⅱの625 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ と2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で溶媒対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加が認められたため、再現性および用量依存性を確認するために本試験と同じ用量で再現性試験を実施した。

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倍以上となる復帰変異コロニー数の再現性および用量依存性のある増加は認められなかったことから、メチルアセトアセテートは、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。

【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、メチルアセトアセテートについて、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、サルモネラ菌（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⁾を指標とした変異原性の検出系である。

試験は、被験物質をそのまま検定菌に作用させる S9 mix 無添加試験と、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素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。試験に用いた各検定菌液の濁度を Appendix 1 に示した。

〔被験物質〕

メチルアセトアセテート (略称: MAA、CAS No. 105-45-3) は、分子量 116.12 の無色透明液体である。構造式等は Appendix 2 に示した。用いた被験物質は、ロット番号
純度 99.4 wt% (不純物: メタノールと思われる) であり、

から供与された。被験物質は、使用時まで室温で保管した。本ロットについては、試験期間中安定であることを確認した。

MAAは、局方注射用水 (ロット番号: K6I94、(株)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、同溶媒で所定の濃度に希釈して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 および 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°C で凍結保存し、用時解凍した。9AA は DMSO に、SA は超純水に溶解し、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%	D-ビオチン	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(株)製の最少グルコース寒天培地 (ロット番号: HY1604、1996年10月25日製造、および HY2001、1997年2月7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
リン酸水素二カルウム	10 g	バクアガー (清水食品)	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 を流して固めたものである。

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
塩化カルシウム	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 系雄ラットにフェノバルビタール(PB)および 5,6-ベンゾフラボン(BF)の併用投与を行い、酵素誘導して作製された S9 (キッコーマン株、ロット番号: RAA-355、1996年11月22日製造) を購入し、-80°Cで凍結保存し、用時に解凍して用いた。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、肝臓の摘出および S9 の調製は5日目。

[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°Cで20分間プレインキュベーションしたのち、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°Cで48時間行い、生じた変異コロニー数を目視またはコロニーカウンターを用いて算定した。抗菌性の有無については、肉眼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、本試験および再現性試験においては、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。また、WP2 *uvrA* の S9 mix 無添加試験については、本試験 I と本試験 II の結果が異なったため、再現性試験を行った。

〔判定基準〕

結果の判定に統計学的手法は用いないこととした。

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌の S9 mix 無添加試験あるいは S9 mix 添加試験において、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、溶媒対照値の2倍以上に増加し、その増加に再現性および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もの（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〕

MAAについて 50.0～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で公比を約 3 として、試験を実施した (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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とした。

〔本試験〕

S9 mix 無添加試験および添加試験のいずれにおいても、313～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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、WP2 *uvrA* の S9 mix 無添加試験においては、本試験 I では溶媒対照値の 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が、本試験 II の 625 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ と 2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で、溶媒対照値の 2 倍以上となる変異コロニー数の増加を示した。WP2 *uvrA* の S9 mix 添加試験と、その他の検定菌においては、2 回の試験とも溶媒対照値の 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。

〔再現性試験〕

WP2 *uvrA* の S9 mix 無添加試験では、本試験 II の 625 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ と 2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で溶媒対照値の 2 倍以上となる変異コロニー数の増加が認められたため、再現性および用量依存性を確認するために、313～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で公比を 2 として再現性試験を実施した (Table 4)。その結果、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。

MAAについて実施したすべての試験において、用いた試験の調製液および S9 mix への雑菌の混入は認められなかった。また、陽性対照試験ではいずれの検定菌においても陽性対照物質の変異原性が検出され、溶媒対照値とともに、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、メチルアセトアセテートは、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、試験の信頼性に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.: Mutation Research 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

Table 1. Cytotoxicity of methyl acetoacetate 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 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537				
S9 mix (-)	0	106	129	129	13	10	11	26	30	28	15	22	25	8	3	4		
		(121 ± 13.3)			(11 ± 1.5)			(28 ± 2.0)			(21 ± 5.1)			(5 ± 2.6)				
	50.0	101			9			35			25			6				
	150	124			10			42			26			2				
	500	114			10			42			28			4				
	1500	94			7			35			25			5				
	5000	100			11			40			16			13				
S9 mix (+)	0	92	128	125	11	13	13	34	21	34	32	31	39	9	16	11		
		(115 ± 20.0)			(12 ± 1.2)			(30 ± 7.5)			(34 ± 4.4)			(12 ± 3.6)				
	50.0	130			11			28			29			7				
	150	127			9			23			32			7				
	500	121			9			26			36			4				
	1500	137			15			20			34			5				
	5000	116			12			42			32			6				
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	543	583	559	533	543	568	166	194	244	643	587	654	1907	1616	1554		
		(562 ± 20.1)			(548 ± 18.0)			(201 ± 39.5)			(628 ± 35.9)			(1692 ± 188.5)				
Positive control S9 mix (+)	Number of colonies / plate	798	631	683	160	228	211	290	255	315	562	440	447	223	186	209		
		(704 ± 85.5)			(200 ± 35.4)			(287 ± 30.1)			(483 ± 68.5)			(206 ± 18.7)				

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene
Purity was 99.4 wt% and methanol was supposed as an impurity.

Table 2. Mutagenicity of methyl acetoacetate on bacteria (I)

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 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537			
S9 mix (-)	0	106	92	107	8	7	10	24	33	28	39	26	24	7	7	6	
		(102 ± 8.4)			(8 ± 1.5)			(28 ± 4.5)			(30 ± 8.1)			(7 ± 0.6)			
	313	95	106	106	12	7	4	29	34	18	23	27	22	7	5	5	
		(102 ± 6.4)			(8 ± 4.0)			(27 ± 8.2)			(24 ± 2.6)			(6 ± 1.2)			
	625	101	103	84	9	9	11	29	32	22	29	16	22	5	3	7	
		(96 ± 10.4)			(10 ± 1.2)			(28 ± 5.1)			(22 ± 6.5)			(5 ± 2.0)			
	1250	76	80	88	6	9	7	22	25	29	28	24	29	8	5	6	
		(81 ± 6.1)			(7 ± 1.5)			(25 ± 3.5)			(27 ± 2.6)			(6 ± 1.5)			
2500	94	85	90	12	11	14	21	19	18	20	18	11	7	10	3		
	(90 ± 4.5)			(12 ± 1.5)			(19 ± 1.5)			(16 ± 4.7)			(7 ± 3.5)				
5000	84	74	100	6	8	14	22	20	22	20	21	20	1	7	9		
	(86 ± 13.1)			(9 ± 4.2)			(21 ± 1.2)			(20 ± 0.6)			(6 ± 4.2)				
S9 mix (+)	0	135	140	122	14	20	14	30	27	25	38	42	45	5	10	9	
		(132 ± 9.3)			(16 ± 3.5)			(27 ± 2.5)			(42 ± 3.5)			(8 ± 2.6)			
	313	126	124	117	15	13	10	38	39	31	22	28	38	5	4	4	
		(122 ± 4.7)			(13 ± 2.5)			(36 ± 4.4)			(29 ± 8.1)			(4 ± 0.6)			
	625	115	127	150	14	11	8	31	33	29	28	39	38	7	2	7	
		(131 ± 17.8)			(11 ± 3.0)			(31 ± 2.0)			(35 ± 6.1)			(5 ± 2.9)			
	1250	148	135	129	12	13	9	23	26	21	33	25	24	6	2	2	
		(137 ± 9.7)			(11 ± 2.1)			(23 ± 2.5)			(27 ± 4.9)			(3 ± 2.3)			
2500	127	119	124	10	9	11	38	30	40	25	32	31	7	5	1		
	(123 ± 4.0)			(10 ± 1.0)			(36 ± 5.3)			(29 ± 3.8)			(4 ± 3.1)				
5000	122	107	134	2	10	8	26	40	46	35	36	21	4	8	2		
	(121 ± 13.5)			(7 ± 4.2)			(37 ± 10.3)			(31 ± 8.4)			(5 ± 3.1)				
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	519	507	546	202	240	217	123	107	115	662	379	350	1161	1115	1192	
		(524 ± 20.0)			(220 ± 19.1)			(115 ± 8.0)			(464 ± 172.4)			(1156 ± 38.7)			

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene
Purity was 99.4 wt% and methanol was supposed as an impurity.

Table 3. Mutagenicity of methyl acetoacetate on bacteria (II)

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			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537			
S9 mix (-)	0	85	75	80	15	9	9	17	20	20	25	19	23	6	9	6	
		(80 \pm 5.0)			(11 \pm 3.5)			(19 \pm 1.7)			(22 \pm 3.1)			(7 \pm 1.7)			
	313	106	106	82	15	14	8	34	31	19	23	24	27	5	4	9	
		(98 \pm 13.9)			(12 \pm 3.8)			(28 \pm 7.9)			(25 \pm 2.1)			(6 \pm 2.6)			
	625	80	83	99	9	7	11	49	34	39	18	16	19	7	5	5	
		(87 \pm 10.2)			(9 \pm 2.0)			(41 \pm 7.6)			(18 \pm 1.5)			(6 \pm 1.2)			
	1250	79	90	111	7	7	7	36	43	33	18	23	29	7	4	5	
		(93 \pm 16.3)			(7 \pm 0.0)			(37 \pm 5.1)			(23 \pm 5.5)			(5 \pm 1.5)			
2500	64	90	84	17	16	13	35	42	44	12	26	20	3	6	5		
	(79 \pm 13.6)			(15 \pm 2.1)			(40 \pm 4.7)			(19 \pm 7.0)			(5 \pm 1.5)				
5000	69	79	70	18	12	15	38	29	32	27	20	19	6	4	3		
	(73 \pm 5.5)			(15 \pm 3.0)			(33 \pm 4.6)			(22 \pm 4.4)			(4 \pm 1.5)				
S9 mix (+)	0	117	127	107	19	9	15	29	23	32	43	30	30	9	7	13	
		(117 \pm 10.0)			(14 \pm 5.0)			(28 \pm 4.6)			(34 \pm 7.5)			(10 \pm 3.1)			
	313	102	117	97	15	15	6	36	26	23	35	26	20	4	13	5	
		(105 \pm 10.4)			(12 \pm 5.2)			(28 \pm 6.8)			(27 \pm 7.5)			(7 \pm 4.9)			
	625	109	123	102	14	11	18	20	27	27	35	24	25	8	9	7	
		(111 \pm 10.7)			(14 \pm 3.5)			(25 \pm 4.0)			(28 \pm 6.1)			(8 \pm 1.0)			
	1250	101	104	125	10	10	5	24	27	31	38	26	26	9	11	7	
		(110 \pm 13.1)			(8 \pm 2.9)			(27 \pm 3.5)			(30 \pm 6.9)			(9 \pm 2.0)			
2500	120	117	115	9	12	11	21	28	17	33	26	17	8	4	8		
	(117 \pm 2.5)			(11 \pm 1.5)			(22 \pm 5.6)			(25 \pm 8.0)			(7 \pm 2.3)				
5000	96	130	119	12	12	11	21	29	40	27	26	32	3	4	7		
	(115 \pm 17.3)			(12 \pm 0.6)			(30 \pm 9.5)			(28 \pm 3.2)			(5 \pm 2.1)				
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA			
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01			0.5			0.01			0.1			80			
S9 mix (-)	Number of colonies / plate	476	432	405	385	366	416	75	78	82	391	352	375	1139	1101	938	
		(438 \pm 35.8)			(389 \pm 25.2)			(78 \pm 3.5)			(373 \pm 19.6)			(1059 \pm 106.8)			
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1			2			10			0.5			2			
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	349	450	420	221	224	232	238	210	296	195	267	277	181	201	140	
		(406 \pm 51.9)			(226 \pm 5.7)			(248 \pm 43.9)			(246 \pm 44.7)			(174 \pm 31.1)			

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene
Purity was 99.4 wt% and methanol was supposed as an impurity.

Table 4. Confirmation of mutagenicity of methyl acetoacetate 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					
				WP2 <i>uvrA</i>			
S9 mix (-)	0			17 16 23 (19 ± 3.8)			
	313			17 32 32 (27 ± 8.7)			
	625			39 29 30 (33 ± 5.5)			
	1250			25 25 24 (25 ± 0.6)			
	2500			26 24 32 (27 ± 4.2)			
	5000			27 21 23 (24 ± 3.1)			
Positive control S9 mix (-)	Chemical			AF2			
	Dose (µg /plate)			0.01			
	Number of colonies / plate			72 90 84 (82 ± 9.2)			

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide
Purity was 99.4 wt% and methanol was supposed as an impurity.