

1, 3-イソベンゾフランジオン, テトラヒドロメチル
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】

1,3-イソベンゾフランジオン, テトラヒドロメチ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ート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、S9 mix 無添加試験では1500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上 (WP2 *uvrA* は5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$) で、S9 mix 添加試験ではTA100 および TA1537 において5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で抗菌性が認められた。したがって、本試験はS9 mix 無添加試験の最高用量を2000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (WP2 *uvrA* は5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$)、S9 mix 添加試験の最高用量を5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ として、公比2で5~7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、1,3-イソベンゾフランジオン, テトラヒドロメチルは、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、1,3-イソベンゾフランジオン、テトラヒドロメチルについて、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°C 以下で凍結保存したものを、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°C 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〕

1,3-イソベンゾフランジオン, テトラヒドロメチル (略称: THMBF, CAS No. 11070-44-3) は、分子量 166.18 の淡黄色透明液体 (受領時: 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 99.97 wt% (異性体の混合物として、不純物: 0.01% メチルテトラヒドロフタル酸、0.02% 無水マレイン酸) であり、
から供与された。被験物質は、使用時まで密封、遮光して冷蔵した。
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 99.13 wt% であった。

THMBF は、ジメチルスルホキシド (DMSO、ロット番号: BSK4546、和光純薬工業(株)) 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)アクリルアミド (上野製薬(株))	ロット番号 46,	純度99.9%
SA	: アツ化ナトリウム (和光純薬工業(株))	ロット番号 TWR3330,	純度90%以上)
9AA	: 9-アミリアクリン (Sigma Chem. Co.)	ロット番号 96F05641,	純度98%以上)
2AA	: 2-アミアントラセン (和光純薬工業(株))	ロット番号 DSF2950,	純度90%以上)

AF2 および 2AA は 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) バクトアガー (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)製の最少寒天培地 (ロット番号: HY0302、1995年9月29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
リン酸水素二カルシウム	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
塩化カルウム	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 (キッコマン株、ロット番号 RAA-338、1995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°C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°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〕

THMBF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、S9 mix 無添加試験では 1500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上 (WP2 *uvrA* は 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$) で、S9 mix 添加試験では TA100 および TA1537 において 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で抗菌性が認められた。

したがって、本試験における最高用量は、S9 mix 無添加試験では 2000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (WP2 *uvrA* は 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$)、S9 mix 添加試験では 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とともに、上記の最高用量に基づいて公比2で5~7用量を設定して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。

THMBF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、1,3-イソベンゾフランジオン、テトラヒドロメチルは、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 tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione 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			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537			
S9mix (-)	0	85	104	112	9	6	7	10	24	14	19	15	19	9	5	7	
		(100 \pm 13.9)			(7 \pm 1.5)			(16 \pm 7.2)			(18 \pm 2.3)			(7 \pm 2.0)			
	50.0	97			11			20			33			12			
	150	126			13			20			34			16			
	500	124			3			30			27			18			
	1500	83 *			6 *			28			15 *			1 *			
	5000	0 *			0 *			5 *			0 *			0 *			
S9mix (+)	0	104	117	115	9	13	21	24	33	31	27	27	34	14	14	17	
		(112 \pm 7.0)			(14 \pm 6.1)			(29 \pm 4.7)			(29 \pm 4.0)			(15 \pm 1.7)			
	50.0	119			9			17			35			12			
	150	112			9			24			28			10			
	500	119			10			29			20			20			
	1500	123			14			29			24			8			
	5000	121 *			8			27			24			11 *			
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	540	601	593	374	368	357	343	330	341	651	641	669	622	621	787	
		(578 \pm 33.2)			(366 \pm 8.6)			(338 \pm 7.0)			(654 \pm 14.2)			(677 \pm 95.6)			
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	600	705	796	303	298	337	616	613	594	324	305	312	333	294	315	
		(700 \pm 98.1)			(313 \pm 21.2)			(608 \pm 11.9)			(314 \pm 9.6)			(314 \pm 19.5)			

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

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

Purity was 99.97 wt% as a mixture of isomers and 0.01% methyltetrahydrophthalate and 0.02 % maleic anhydride were contained as impurities.

Table 2-1. Results of reverse mutation test (I) of tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione 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			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537			
S9mix (-)	0	130	121	124	6	4	8				28	16	23	10	7	9	
		(125 \pm 4.6)			(6 \pm 2.0)						(22 \pm 6.0)			(9 \pm 1.5)			
	31.3	ND			11	6	11				ND			ND			
					(9 \pm 2.9)												
	62.5	104	113	119	10	8	13				24	22	21	5	7	10	
		(112 \pm 7.5)			(10 \pm 2.5)						(22 \pm 1.5)			(7 \pm 2.5)			
	125	130	104	115	10	8	7				23	33	21	5	4	7	
		(116 \pm 13.1)			(8 \pm 1.5)						(26 \pm 6.4)			(5 \pm 1.5)			
250	112	114	132	6	11	15				28	21	22	6	6	6		
	(119 \pm 11.0)			(11 \pm 4.5)						(24 \pm 3.8)			(6 \pm 0.0)				
500	104	115	101	0 *	0 *	5 *				35	24	34	15	14	5		
	(107 \pm 7.4)			(2 \pm 2.9)						(31 \pm 6.1)			(11 \pm 5.5)				
1000	75 *	72 *	59 *	0 *	0 *	0 *				22 *	13 *	26 *	6 *	3 *	4 *		
	(69 \pm 8.5)			(0 \pm 0.0)						(20 \pm 6.7)			(4 \pm 1.5)				
2000	51 *	60 *	36 *	0 *	0 *	0 *				8 *	4 *	0 *	0 *	0 *	0 *		
	(49 \pm 12.1)			(0 \pm 0.0)						(4 \pm 4.0)			(0 \pm 0.0)				
S9mix (+)	0	121	130	134	12	9	17	27	23	35	28	25	32	11	17	18	
		(128 \pm 6.7)			(13 \pm 4.0)			(28 \pm 6.1)			(28 \pm 3.5)			(15 \pm 3.8)			
	156	137	144	130	ND			ND			ND			16	18	18	
		(137 \pm 7.0)												(17 \pm 1.2)			
	313	151	129	157	12	13	12	28	31	26	25	25	26	10	22	27	
		(146 \pm 14.7)			(12 \pm 0.6)			(28 \pm 2.5)			(25 \pm 0.6)			(20 \pm 8.7)			
	625	130	123	134	17	8	14	29	26	24	16	35	28	18	19	17	
		(129 \pm 5.6)			(13 \pm 4.6)			(26 \pm 2.5)			(26 \pm 9.6)			(18 \pm 1.0)			
1250	111	115	123	10	20	10	20	30	32	21	23	15	12	22	27		
	(116 \pm 6.1)			(13 \pm 5.8)			(27 \pm 6.4)			(20 \pm 4.2)			(20 \pm 7.6)				
2500	134	138	124	11	7	8	26	31	33	18	27	21	18	15	23		
	(132 \pm 7.2)			(9 \pm 2.1)			(30 \pm 3.6)			(22 \pm 4.6)			(19 \pm 4.0)				
5000	113	124	116	10	7	4	25	24	23	31	27	30	15	13	9		
	(118 \pm 5.7)			(7 \pm 3.0)			(24 \pm 1.0)			(29 \pm 2.1)			(12 \pm 3.1)				
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA						AF2			9AA			
	Dose (μg /plate)	0.01			0.5						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	697	690	730	322	347	336				629	620	602	691	786	623	
		(706 \pm 21.4)			(335 \pm 12.5)						(617 \pm 13.7)			(700 \pm 81.9)			
	Number of colonies / plate	871	800	846	327	277	315	592	609	599	289	330	372	260	311	302	
		(839 \pm 36.0)			(306 \pm 26.1)			(600 \pm 8.5)			(330 \pm 41.5)			(291 \pm 27.2)			

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

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

Purity was 99.97 wt% as a mixture of isomers and 0.01% methyltetrahydrophthalate and 0.02 % maleic anhydride were contained as impurities.

ND : Not done

Table 3-1. Results of reverse mutation test (II) of tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione 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			WP2 <i>uvrA</i>			TA98		TA1537				
S9mix (-)	0	119	120	112	11	13	7				23	28	21	13	12	15	
		(117 \pm 4.4)			(10 \pm 3.1)						(24 \pm 3.6)		(13 \pm 1.5)				
	62.5	123	110	117	7	18	13				31	24	27	13	11	12	
		(117 \pm 6.5)			(13 \pm 5.5)						(27 \pm 3.5)		(12 \pm 1.0)				
	125	104	101	123	9	12	12				21	16	34	15	7	9	
		(109 \pm 11.9)			(11 \pm 1.7)						(24 \pm 9.3)		(10 \pm 4.2)				
	250	129	127	107	8	8	8				24	22	20	12	16	9	
		(121 \pm 12.2)			(8 \pm 0.0)						(22 \pm 2.0)		(12 \pm 3.5)				
500	130	125	109	3	6	9				31	29	24	20	10	10		
	(121 \pm 11.0)			(6 \pm 3.0)						(28 \pm 3.6)		(13 \pm 5.8)					
1000	74 *	91 *	49 *	4 *	3 *	0 *				0 *	12 *	12 *	2 *	2 *	0 *		
	(71 \pm 21.1)			(2 \pm 2.1)						(8 \pm 6.9)		(1 \pm 1.2)					
2000	0 *	62 *	60 *	0 *	0 *	0 *				0 *	3 *	5 *	0 *	0 *	0 *		
	(41 \pm 35.2)			(0 \pm 0.0)						(3 \pm 2.5)		(0 \pm 0.0)					
S9mix (+)	0	130	101	148	12	6	10	18	28	26	32	33	33	15	18	15	
		(126 \pm 23.7)			(9 \pm 3.1)			(24 \pm 5.3)			(33 \pm 0.6)		(16 \pm 1.7)				
	313	150	113	152	12	4	4	32	31	26	32	25	26	14	17	15	
		(138 \pm 22.0)			(7 \pm 4.6)			(30 \pm 3.2)			(28 \pm 3.8)		(15 \pm 1.5)				
	625	121	123	132	13	12	7	32	20	32	26	28	36	9	12	12	
		(125 \pm 5.9)			(11 \pm 3.2)			(28 \pm 6.9)			(30 \pm 5.3)		(11 \pm 1.7)				
	1250	125	135	129	11	8	4	23	26	22	22	21	28	11	13	17	
		(130 \pm 5.0)			(8 \pm 3.5)			(24 \pm 2.1)			(24 \pm 3.8)		(14 \pm 3.1)				
2500	128	104	105	7	10	10	29	21	30	22	27	28	10	11	17		
	(112 \pm 13.6)			(9 \pm 1.7)			(27 \pm 4.9)			(26 \pm 3.2)		(13 \pm 3.8)					
5000	101 *	89 *	92 *	5	8	9	11	26	34	21	21	21	8	11	8		
	(94 \pm 6.2)			(7 \pm 2.1)			(24 \pm 11.7)			(21 \pm 0.0)		(9 \pm 1.7)					
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA						AF2		9AA				
	Dose (μg /plate)	0.01			0.5						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	470	736	677	286	284	287				378	420	329	673	1380	1318	
		(628 \pm 139.7)			(286 \pm 1.5)						(376 \pm 45.5)		(1124 \pm 391.5)				

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

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

Purity was 99.97 wt% as a mixture of isomers and 0.01% methyltetrahydrophthalate and 0.02 % maleic anhydride were contained as impurities.

