

ウンデカンの
細菌を用いる
復帰突然変異試験

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 1～3	

【要 約】

ウンデカン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 μg /プレート の用量で行ったところ、S9 mix 無添加、添加のいずれの条件においても最高用量での抗菌性は認められなかった。したがって、本試験における S9 mix 無添加試験および添加試験のいずれも 313~5000 μg /プレート の範囲で用量を設定し、試験を実施した。

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、ウンデカンは、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】

OECD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、ウンデカンについて、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。

【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) の有無について行った。

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〕

ウンデカン (CAS No. 1120-21-4) は、分子量 156.31 の無色透明な液体である。構造式等は Appendix 1 に示した。用いた被験物質は ロット番号 純度 99% (不純物：不明) のものを購入した。被験物質は、使用時まで冷蔵保管した。

ウンデカンは、アセトン (ロット番号：KCL7177、DSM4173 和光純薬工業株) に 50 mg/ml の濃度に溶解した後、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。

ウンデカンのアセトン溶液中での安定性試験および含量測定試験を秦野研究所において実施した。安定性試験においては、低濃度 (3.13 mg/ml) 溶液は当該試験の本試験 I で調製したものについて、また高濃度 (320 mg/ml) 溶液は当研究所で実施した染色体異常試験 (G-94-023) で調製したものについて、室温遮光条件下で、調製後 4 時間までの安定性を調べた。その結果、調製 4 時間後における各濃度の平均含量は、それぞれ初期値 (0 時間) の平均値に対して、101 および 99.4% 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量が初期値の 90% 以上) であった (Appendix 2、3)。

また、本試験 I で調製した被験物質調製液について含量測定試験を行った結果、高濃度の調製液は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から110%）であったが、低濃度の調製液は基準をやや下まわった（Appendix 4）。しかし、5段階の用量の設定により用量依存性の確認には特に支障はないと考え、結果の判定には影響しないものと判断した。

〔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 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%	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日製造および DJ040KJ、1994年11月21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。

小試験管中にトッペアガー 2 ml、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。なお、TA100 の S9 mix 無添加試験については 72 時間まで培養を行った。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。ウンデカンについて 50～5000 μg /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、S9 mix 無添加試験および添加試験のいずれも最高用量の 5000 μg /プレート まで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のいずれも 5000 μg /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。ウンデカンの用量を、S9 mix 無添加試験および添加試験のいずれも 313～5000 μg /プレートの範囲で公比を 2 として設定し試験を実施した。

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、用量依存性のある変異コロニー数の増加は認められなかった。なお、2 回の本試験のいずれも、TA100 の S9 mix 無添加試験において抗菌性が認められないにもかかわらず、被験物質処理群の変異コロニー数が溶媒対照のそれに比べて著しく少なかったため、72時間まで培養を行った。しかし72時間後の変異コロニー数は溶媒対照および被験物質処理群のいずれも 1～2 割程度の増加が認められたが、被験物質処理群はいずれの用量においても溶媒対照値には満たなかった（データは示さず）。したがって、被験物質処理群の変異コロニー数の減少はコロニーの増殖が抑制されたためではなく、変異頻度の低下に由来するものと推測された。

ウンデカン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、陰性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、ウンデカンは、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 undecane ** on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (μg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mea \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	82			11			26			26			7			
	150	94			12			19			18			9			
	500 #	65			14			31			21			10			
	1500 #	80			11			20			17			6			
	5000 #	65			13			18			26			5			
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	139			15			27			27			11			
	150	150			15			32			40			13			
	500	97			10			31			30			7			
	1500 #	82			9			23			20			5			
	5000 #	109			7			30			41			9			
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	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)			
S9 mix (+)	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

#: Precipitate was observed on the surface of agar plates.

** : Purity was 99% and impurity was unknown.

Table 2. Results of reverse mutation test (I) of undecane ** 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	130	153	126	7	9	16	28	21	26	24	28	27	10	8	10	
		(136 \pm 14.6)			(11 \pm 4.7)			(25 \pm 3.6)			(26 \pm 2.1)			(9 \pm 1.2)			
	313 #	77	72	62	12	11	12	21	24	27	13	18	13	4	5	7	
		(70 \pm 7.6)			(12 \pm 0.6)			(24 \pm 3.0)			(15 \pm 2.9)			(5 \pm 1.5)			
	625 #	64	61	68	14	10	13	25	24	21	22	27	22	5	7	12	
		(64 \pm 3.5)			(12 \pm 2.1)			(23 \pm 2.1)			(24 \pm 2.9)			(8 \pm 3.6)			
	1250 #	68	73	80	12	11	14	22	22	23	19	22	21	7	6	10	
		(74 \pm 6.0)			(12 \pm 1.5)			(22 \pm 0.6)			(21 \pm 1.5)			(8 \pm 2.1)			
2500 #	56	70	57	12	11	10	25	32	23	11	23	20	6	4	8		
	(61 \pm 7.8)			(11 \pm 1.0)			(27 \pm 4.7)			(18 \pm 6.2)			(6 \pm 2.0)				
5000 #	70	77	79	12	16	13	22	15	26	21	28	19	12	6	6		
	(75 \pm 4.7)			(14 \pm 2.1)			(21 \pm 5.6)			(23 \pm 4.7)			(8 \pm 3.5)				
S9mix (+)	0	146	153	154	15	17	17	21	21	25	40	18	17	8	11	13	
		(151 \pm 4.4)			(16 \pm 1.2)			(22 \pm 2.3)			(25 \pm 13.0)			(11 \pm 2.5)			
	313	95	81	88	13	10	22	27	25	23	28	30	37	6	14	17	
		(88 \pm 7.0)			(15 \pm 6.2)			(25 \pm 2.0)			(32 \pm 4.7)			(12 \pm 5.7)			
	625 #	69	80	89	12	13	16	32	31	21	34	21	33	18	7	14	
		(79 \pm 10.0)			(14 \pm 2.1)			(28 \pm 6.1)			(29 \pm 7.2)			(13 \pm 5.6)			
	1250 #	97	90	88	10	15	7	25	20	30	28	25	31	7	13	11	
		(92 \pm 4.7)			(11 \pm 4.0)			(25 \pm 5.0)			(28 \pm 3.0)			(10 \pm 3.1)			
2500 #	124	124	94	14	20	13	25	28	22	30	28	37	13	9	5		
	(114 \pm 17.3)			(16 \pm 3.8)			(25 \pm 3.0)			(32 \pm 4.7)			(9 \pm 4.0)				
5000 #	136	103	122	13	11	9	25	32	25	27	35	24	8	8	12		
	(120 \pm 16.6)			(11 \pm 2.0)			(27 \pm 4.0)			(29 \pm 5.7)			(9 \pm 2.3)				
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			
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	1417	1332	1306	333	332	325	1435	1465	1409	389	369	355	229	198	225	
		(1352 \pm 58.1)			(330 \pm 4.4)			(1436 \pm 28.0)			(371 \pm 17.1)			(217 \pm 16.9)			

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

#: Precipitate was observed on the surface of agar plates.

** : Purity was 99% and impurity was unknown .

Table 3. Results of reverse mutation test (II) of undecane ** 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	112	119	124	6	18	15	43	40	23	23	24	16	9	7	9	(118 \pm 6.0)	(13 \pm 6.2)	(35 \pm 10.8)	(21 \pm 4.4)	(8 \pm 1.2)
	313	66	75	67	9	9	7	28	37	32	9	24	30	8	6	7	(69 \pm 4.9)	(8 \pm 1.2)	(32 \pm 4.5)	(21 \pm 10.8)	(7 \pm 1.0)
	625 #	68	77	62	15	12	9	31	37	30	23	17	23	5	3	6	(69 \pm 7.5)	(12 \pm 3.0)	(33 \pm 3.8)	(21 \pm 3.5)	(5 \pm 1.5)
	1250 #	71	51	72	7	16	8	27	37	23	25	24	22	5	7	10	(65 \pm 11.8)	(10 \pm 4.9)	(29 \pm 7.2)	(24 \pm 1.5)	(7 \pm 2.5)
	2500 #	51	91	72	11	15	15	22	29	25	14	17	23	7	5	6	(71 \pm 20.0)	(14 \pm 2.3)	(25 \pm 3.5)	(18 \pm 4.6)	(6 \pm 1.0)
	5000 #	73	64	71	5	12	11	30	31	27	21	24	19	3	5	5	(69 \pm 4.7)	(9 \pm 3.8)	(29 \pm 2.1)	(21 \pm 2.5)	(4 \pm 1.2)
S9mix (+)	0	159	137	141	17	12	18	34	49	32	40	39	29	13	18	19	(146 \pm 11.7)	(16 \pm 3.2)	(38 \pm 9.3)	(36 \pm 6.1)	(17 \pm 3.2)
	313 #	108	114	118	8	13	18	22	48	30	24	28	34	18	11	10	(113 \pm 5.0)	(13 \pm 5.0)	(33 \pm 13.3)	(29 \pm 5.0)	(13 \pm 4.4)
	625 #	110	99	117	6	11	12	41	31	36	35	24	25	10	7	11	(109 \pm 9.1)	(10 \pm 3.2)	(36 \pm 5.0)	(28 \pm 6.1)	(9 \pm 2.1)
	1250 #	166	104	115	15	13	12	28	25	31	24	35	36	9	11	5	(128 \pm 33.1)	(13 \pm 1.5)	(28 \pm 3.0)	(32 \pm 6.7)	(8 \pm 3.1)
	2500 #	125	108	109	8	13	11	34	33	30	27	28	36	13	6	6	(114 \pm 9.5)	(11 \pm 2.5)	(32 \pm 2.1)	(30 \pm 4.9)	(8 \pm 4.0)
	5000 #	123	103	95	15	10	11	26	25	30	41	25	19	12	10	7	(107 \pm 14.4)	(12 \pm 2.6)	(27 \pm 2.6)	(28 \pm 11.4)	(10 \pm 2.5)
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	754	769	582	158	173	156	188	185	105	825	866	908	129	160	135	(702 \pm 103.9)	(162 \pm 9.3)	(159 \pm 47.1)	(866 \pm 41.5)	(141 \pm 16.4)
	Number of colonies / plate	1100	1146	1128	315	292	311	1364	1438	1356	298	300	295	299	266	221	(1125 \pm 23.2)	(306 \pm 12.3)	(1386 \pm 45.2)	(298 \pm 2.5)	(262 \pm 39.2)

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

#: Precipitate was observed on the surface of agar plates.

**: Purity was 99% and impurity was unknown.