



2, 2'-メチレンビス(6-tert-ブチル-p-クレゾール)
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】

2,2'-メチレンビス(6-tert-ブチル-p-クレゾール)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、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 µg/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、2,2'-メチレンビス(6-tert-ブチル-p-クレゾール)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、2,2'-メチルビス(6-tert-ブール-クワール)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。

【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日にアメリカ合衆国、
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°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〕

2,2'-メチレンビス(6-*tert*-ブチル-*p*-クレゾール) (MBBC、CAS No. 119-47-1) は、分子量 340.51 の白色結晶性粉末である。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 98%以上 (不純物：不明) であり、

から供与された。被験物質は、使用時まで室温保管した。

MBBCは、アセトン (ロット番号：DSM4173、KCL7177 および KCF1496、和光純薬工業(株)) に 50 mg/ml になるように溶解した後、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。

MBBC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 (50.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 溶液は、当研究所で実施した染色体異常試験 (G-94-032) で調製したものについて、高濃度 (50.0 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、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、99.9 および 98.4%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有量が初期値の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、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°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) バクアガー (Difco)	0.6%	(B) L-ヒスタジン [*]	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	バクアガー (Difco)	15 g

リン酸一アソニウム 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。MBBC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。MBBC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。

MBBC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、2,2'-メチレンビス(6-tert-ブチル-p-クレゾール) 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) 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 2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol)** 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	101	101	114	8	19	14	20	22	26	19	33	31	15	6	2	
		(105 \pm 7.5)			(14 \pm 5.5)			(23 \pm 3.1)			(28 \pm 7.6)			(8 \pm 6.7)			
	50	87			10			22			18			6			
	150 #	95			8			20			17			7			
	500 #	98			15			18			28			13			
	1500 #	111			12			23			19			8			
	5000 #	112			13			22			24			5			
S9mix (+)	0	118	130	117	18	17	20	29	21	33	44	38	29	13	12	13	
		(122 \pm 7.2)			(18 \pm 1.5)			(28 \pm 6.1)			(37 \pm 7.5)			(13 \pm 0.6)			
	50	113			9			20			23			11			
	150	104			9			30			31			17			
	500	99			16			27			27			9			
	1500 #	88			5			26			27			12			
	5000 #	113			8			23			20			10			
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	542	539	556	312	298	323	130	137	122	613	833	730	648	610	640	
		(546 \pm 9.1)			(311 \pm 12.5)			(130 \pm 7.5)			(725 \pm 110.1)			(633 \pm 20.0)			
	Number of colonies / plate	1369	1337	1260	323	243	301	1462	1479	1194	415	434	417	323	320	320	
		(1322 \pm 56.0)			(289 \pm 41.3)			(1378 \pm 159.9)			(422 \pm 10.4)			(321 \pm 1.7)			

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 above 98%.

Table 2. Results of reverse mutation test (I) of 2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol) ** 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 #	143	136	131	18	16	14	17	26	28	19	29	24	9	5	10
		(137± 6.0)			(16± 2.0)			(24± 5.9)			(24± 5.0)			(8± 2.6)		
	625 #	152	145	139	12	18	15	14	20	21	21	24	21	11	11	11
		(145± 6.5)			(15± 3.0)			(18± 3.8)			(22± 1.7)			(11± 0.0)		
	1250 #	138	126	127	11	16	12	15	22	12	21	20	21	9	10	12
		(130± 6.7)			(13± 2.6)			(16± 5.1)			(21± 0.6)			(10± 1.5)		
2500 #	127	134	125	17	11	14	19	24	23	15	19	14	5	7	7	
	(129± 4.7)			(14± 3.0)			(22± 2.6)			(16± 2.6)			(6± 1.2)			
5000 #	148	160	125	17	16	17	23	15	17	18	21	23	8	12	10	
	(144± 17.8)			(17± 0.6)			(18± 4.2)			(21± 2.5)			(10± 2.0)			
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	139	144	140	19	11	16	34	22	30	35	38	42	18	16	22
		(141± 2.6)			(15± 4.0)			(29± 6.1)			(38± 3.5)			(19± 3.1)		
	625 #	127	137	144	19	23	14	17	15	15	26	33	26	16	21	10
		(136± 8.5)			(19± 4.5)			(16± 1.2)			(28± 4.0)			(16± 5.5)		
	1250 #	132	128	158	15	11	8	18	24	18	35	24	36	17	11	15
		(139± 16.3)			(11± 3.5)			(20± 3.5)			(32± 6.7)			(14± 3.1)		
2500 #	149	161	132	18	7	14	23	26	22	30	32	33	22	14	14	
	(147± 14.6)			(13± 5.6)			(24± 2.1)			(32± 1.5)			(17± 4.6)			
5000 #	147	134	118	17	13	12	23	14	20	20	26	20	12	7	7	
	(133± 14.5)			(14± 2.6)			(19± 4.6)			(22± 3.5)			(9± 2.9)			
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	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

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

** : Purity was above 98%.

Table 3. Results of reverse mutation test (II) of 2,2-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol) ** 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	133	116	16	18	10	19	23	24	23	28	26	7	9	10	(124 ± 8.5)	(15 ± 4.2)	(22 ± 2.6)	(26 ± 2.5)	(9 ± 1.5)	
	313 #	111	117	115	16	15	14	19	28	30	21	24	12	7	13	5	(114 ± 3.1)	(15 ± 1.0)	(26 ± 5.9)	(19 ± 6.2)	(8 ± 4.2)	
	625 #	117	125	143	19	18	18	26	20	28	25	23	26	10	8	10	(128 ± 13.3)	(18 ± 0.6)	(25 ± 4.2)	(25 ± 1.5)	(9 ± 1.2)	
	1250 #	132	149	118	23	15	14	29	25	27	14	28	18	7	7	7	(133 ± 15.5)	(17 ± 4.9)	(27 ± 2.0)	(20 ± 7.2)	(7 ± 0.0)	
	2500 #	127	138	121	9	20	15	22	23	21	19	17	17	5	7	7	(129 ± 8.6)	(15 ± 5.5)	(22 ± 1.0)	(18 ± 1.2)	(6 ± 1.2)	
	5000 #	119	129	118	16	20	11	18	23	20	15	18	21	14	9	6	(122 ± 6.1)	(16 ± 4.5)	(20 ± 2.5)	(18 ± 3.0)	(10 ± 4.0)	
S9mix (+)	0	136	133	146	17	15	13	27	25	28	30	35	23	16	19	8	(138 ± 6.8)	(15 ± 2.0)	(27 ± 1.5)	(29 ± 6.0)	(14 ± 5.7)	
	313	99	125	131	12	16	19	38	35	15	28	33	38	16	18	16	(118 ± 17.0)	(16 ± 3.5)	(29 ± 12.5)	(33 ± 5.0)	(17 ± 1.2)	
	625 #	116	139	144	16	11	11	21	22	32	22	31	30	13	9	7	(133 ± 14.9)	(13 ± 2.9)	(25 ± 6.1)	(28 ± 4.9)	(10 ± 3.1)	
	1250 #	106	166	145	18	13	14	27	21	25	38	26	27	6	7	12	(139 ± 30.4)	(15 ± 2.6)	(24 ± 3.1)	(30 ± 6.7)	(8 ± 3.2)	
	2500 #	147	164	159	17	10	17	21	19	15	22	23	29	12	10	4	(157 ± 8.7)	(15 ± 4.0)	(18 ± 3.1)	(25 ± 3.8)	(9 ± 4.2)	
	5000 #	120	141	116	18	11	14	17	15	15	35	30	28	14	14	12	(126 ± 13.4)	(14 ± 3.5)	(16 ± 1.2)	(31 ± 3.6)	(13 ± 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	710	720	732	151	160	143	185	177	154	907	864	881	1052	1228	1133	(721 ± 11.0)	(151 ± 8.5)	(172 ± 16.1)	(884 ± 21.7)	(1138 ± 88.1)	
	Number of colonies / plate	1572	1689	1695	300	299	304	1534	1532	1608	457	462	517	410	384	349	(1652 ± 69.3)	(301 ± 2.6)	(1558 ± 43.3)	(479 ± 33.3)	(381 ± 30.6)	

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 above 98%.