

最 終 報 告 書

試験名：メチルスチリルケトンの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：T-0305

試験期間：2009年1月15日-2009年10月16日

試験施設

株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所
〒156-0042 東京都世田谷区羽根木 1-3-11

試験委託者

厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室
〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1-2-2

株式会社ボゾリサーチセンター
〒151-0065 東京都渋谷区大山町 36-7

1. 目次

1. 目次	2
3. 要約	8
4. 緒言	9
5. 被験物質及び被験液の調製	10
5.1 被験物質及び溶媒	10
5.1.1 被験物質	10
5.1.2 溶媒	11
5.1.3 溶媒の選択理由	11
5.2 被験液の調製方法	11
5.2.1 用量設定試験用被験液の調製	11
5.2.2 本試験 1 回目用被験液の調製	11
5.2.3 本試験 2 回目用被験液の調製	12
5.2.4 被験液の保存条件	12
6. 試験材料及び方法	12
6.1 試験菌株	12
6.1.1 菌株の種類	12
6.1.2 菌株の選択理由	12
6.1.3 菌株の保存及び解凍	12
6.1.4 菌株の特性検査	13
6.2 対照物質	13
6.2.1 陰性対照物質	13
6.2.2 陽性対照物質	13

6.2.3	調製方法	14
6.3	試薬	14
6.3.1	S9Mixの調製方法	14
6.3.2	最小グルコース寒天平板培地	15
6.3.3	ニュートリエントブロス No.2 培養液	16
6.3.4	0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4)	16
6.3.5	トップアガー	17
6.4	試験方法	18
6.4.1	識別方法	18
6.4.2	前培養	18
6.4.3	本試験用量の設定	19
6.4.4	プレート数	19
6.4.5	試験操作 (プレインキュベーション法)	19
6.5	判定基準	20
7.	試験結果	20
7.1	培養終了後の観察結果	20
7.2	復帰変異コロニー数	20
7.3	試験系の成立条件	20
8.	考察	21
9.	参考文献	21

Tables

別表 1	試験結果表(用量設定試験)
別表 2	試験結果表(本試験 1 回目)
別表 3	試験結果表(本試験 2 回目)
別表 4	本試験 1 回目における比活性値表
別表 5	本試験 2 回目における比活性値表

Figures

図 1	用量反応曲線(TA100 : -S9Mix)
図 2	用量反応曲線(TA100 : +S9Mix)
図 3	用量反応曲線(TA1535 : -S9Mix)
図 4	用量反応曲線(TA1535 : +S9Mix)
図 5	用量反応曲線(WP2uvrA : -S9Mix)
図 6	用量反応曲線(WP2uvrA : +S9Mix)
図 7	用量反応曲線(TA98 : -S9Mix)
図 8	用量反応曲線(TA98 : +S9Mix)
図 9	用量反応曲線(TA1537 : -S9Mix)

圖 10

用量反應曲線(TA1537 : +S9Mix)

3. 要約

メチルスチリルケトンの復帰突然変異誘発能の有無を検討するため、ネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (以下、*S. typhimurium* と略す) TA100、TA1535、TA98、TA1537 及び大腸菌 *Escherichia coli* (以下、*E. coli* と略す) WP2 *uvrA* を用いて、代謝活性化する場合及び代謝活性化しない場合の条件下で、プレインキュベーション法により実施した。なお、被験物質の溶媒にはジメチルスルホキシド(以下、DMSO と略す)を用いた。

試験は、19.5~5000 µg/plate の範囲の被験物質処理用量で用量設定試験を実施した。その結果より本試験は、生育阻害を示した最低用量を最高用量として、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA 株及び代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1537 については 39.1~1250 µg/plate の範囲の 6 用量、代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA98 及び代謝活性化の有無にかかわらず *E. coli* WP2 *uvrA* については 156~5000 µg/plate の範囲の 6 用量で実施した。

1) 被験物質による沈殿及び着色

本被験物質によるプレート上の沈殿及び着色は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。

2) 生育阻害

実体顕微鏡を用いて菌に対する生育阻害を観察した結果、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA 株及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1537 の 1250 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA98 及び代謝活性化の有無にかかわらず *E. coli* WP2 *uvrA* の 2500 µg/plate 以上で認められた。

3) 復帰変異コロニー数

2回の本試験ともに、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100 において、陰性対照値の2倍以上となる用量依存的な復帰変異コロニー数の増加が認められ、再現性を示した。なお、復帰変異コロニー数が陰性対照値の2倍を超え、再現性が認められた値について比活性値を求めたところ、最大で 258 (Rev/mg) となり、本被験物質の変異原性は弱いものと判断された。

以上の試験結果より、本試験条件下において、メチルスチリルケトンは、細菌に対する復帰突然変異誘発能を有する(陽性)と判定した。

4. 緒言

本試験は、厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室からの委託により、株式会社ボゾリサーチセンターで実施した。

5. 被験物質及び被験液の調製

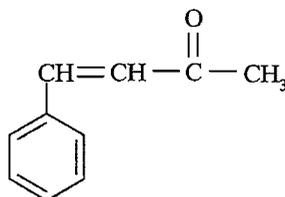
5.1 被験物質及び溶媒

5.1.1 被験物質

名称 : メチルスチリルケトン

CAS番号 : 122-57-6

構造式 :



純度 : 99.8%

不純物の名称及び濃度

: 情報提供なし

分子量 : 146.19

融点 : 40°C

沸点 : 262°C

蒸気圧 : 1.33Pa/25°C

分配係数 : 情報提供なし

常温における性状 : うすい黄色結晶塊の固体

安定性 : 引火性が強く、燃焼しやすい。蒸気は地面あるいは床に沿って移動することがあり、遠距離引火の可能性がある。光に暴露すると徐々に着色する。なお、本試験終了後に残余となった被験物質を株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所において分析し、安定性を確認した結果、赤外吸収スペクトルに大きな変化はなく、安定であることが確認された(別添1)。

溶解性 : 水 ; 不溶

DMSO ; 50mg/mL 以上

アルコール、エーテル、ベンゼン、クロロホルム : 可溶

保存条件 : 冷暗所・遮光・密栓

保存場所 : 東京研究所 被験物質調製保存室

保存温度 : 保存期間(御殿場研究所 2008.11.7~2009.1.7 ; 3~ 5°C、東京研究所 2009.1.8~2009.2.25 ; 0.4~ 8.2°C)

返却 : 試験終了後の残量はすべて株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所へ送付し、分析後の残余物質は焼却処分した。

なお、水、DMSOの溶解性は、株式会社ボゾリサーチセンターで実施した溶解性試験の結果であり、水については50mg/mLで溶解しなかったため、不溶とした。

5.1.2 溶媒

名称 : DMSO
 製造元 : 和光純薬工業株式会社
 ロット番号 : PEH6808
 規格 : JIS規格 試薬特級 99.0%以上
 保存方法 : 室温保存
 保存場所 : 東京研究所 被験物質調製保存室

5.1.3 溶媒の選択理由

溶解性試験を実施した結果、本被験物質は水に50mg/mLで溶解せず、DMSOに50mg/mLで溶解し、発熱、ガスの発生等の反応性も認められなかったため、DMSOを溶媒として試験を実施した。

5.2 被験液の調製方法

5.2.1 用量設定試験用被験液の調製

滅菌した調製用試験管に被験物質を電子天秤（GR-120、株式会社エー・アンド・ディ）を用いて秤量し、その秤量値175.6 mgに最高調製濃度の50 mg/mLとなるように溶媒量を計算し、3.512 mLのDMSOを添加して溶解し、50 mg/mLの被験液を調製した。次いで、これを公比4で順次4段階希釈し、50、12.5、3.13、0.781及び0.195 mg/mLの計5濃度の被験液を調製した。なお、被験液の調製において、発熱、ガスの発生等の反応性は認められなかった。また、被験液は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で用時調製した。

5.2.2 本試験1回目用被験液の調製

滅菌した調製用試験管に被験物質を電子天秤（GR-120、株式会社エー・アンド・ディ）を用いて秤量し、その秤量値253.5 mgに最高調製濃度の50 mg/mLとなるように溶媒量を計算し、5.070 mLのDMSOを添加して溶解し、50 mg/mLの被験液を調製した。次いで、これを公比2で順次7段階希釈し、50、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.781及び0.391 mg/mLの計8濃度の被験液を調製した。なお、被験液の調製において、発熱、ガスの発生等の反応性は認められなかった。また、被験液は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で用時調製した。

5.2.3 本試験 2 回目用被験液の調製

滅菌した調製用試験管に被験物質を電子天秤（GR-120、株式会社エー・アンド・デイ）を用いて秤量し、その秤量値 262.3 mg に最高調製濃度の 50 mg/mL となるように溶媒量を計算し、5.246 mL の DMSO を添加して溶解し、50 mg/mL の被験液を調製した。次いで、これを公比 2 で順次 7 段階希釈し、50、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.781 及び 0.391 mg/mL の計 8 濃度の被験液を調製した。なお、被験液の調製において、発熱、ガスの発生等の反応性は認められなかった。また、被験液は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で用時調製した。

5.2.4 被験液の保存条件

被験液は用時調製とし、保存はしなかった。

6. 試験材料及び方法

6.1 試験菌株

6.1.1 菌株の種類

次の 5 種類の菌株を用いた。

塩基対置換型

S. typhimurium TA100

S. typhimurium TA1535

E. coli WP2 *uvrA*

フレームシフト型

S. typhimurium TA98

S. typhimurium TA1537

なお、菌株は国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部より 1997 年 10 月 9 日に株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所で入手したのから、2005 年 7 月 21 日に分与された。

6.1.2 菌株の選択理由

毒性試験法ガイドラインに準じて選択した。当該菌株は変異原性物質に対する感受性が高く、細菌を用いる変異原性試験に最も一般的に使用されている。

6.1.3 菌株の保存及び解凍

入手した菌株から継代して凍結保存した菌懸濁液を培養し、得られた菌懸濁液 8.0 mL に対して、DMSO（和光純薬工業株式会社、JIS 規格試薬特級、ロット番号 PEN0496）を 0.7 mL の割合で添加して、滅菌チューブに 300 μ L ずつ分注し、 -70°C 以下の超低温フリーザ（三洋電機バイオメディカ株式会社：MDF-192）で保存した（保存期間中の

実測温度 2008年9月26日～2009年2月24日：-87.6～-81.5℃)。なお、使用する際は室温で解凍し、使用後の残液は廃棄した。

	使用した菌株の凍結保存日
<i>S. typhimurium</i> TA98	2008年9月26日
<i>S. typhimurium</i> TA100	2008年11月6日
<i>S. typhimurium</i> TA1535	2009年1月20日
<i>S. typhimurium</i> TA1537	2009年1月20日
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	2008年12月11日

6.1.4 菌株の特性検査

6.1.3 の凍結保存菌株を用いて、アミノ酸要求性、膜変異 *rfa* 特性、薬剤耐性因子 R-factor プラスミド、紫外線感受性、菌増殖率、陰性対照値及び陽性対照値等の特性を検査し、それぞれの菌株に特有の性質が保持されていることを確認して使用した。

	使用した菌株の特性検査実施日
<i>S. typhimurium</i> TA98	2008年10月2日～2008年10月6日
<i>S. typhimurium</i> TA100	2008年11月6日～2008年11月10日
<i>S. typhimurium</i> TA1535	2009年1月20日～2009年1月22日
<i>S. typhimurium</i> TA1537	2009年1月20日～2009年1月22日
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	2008年12月11日～2008年12月15日

6.2 対照物質

6.2.1 陰性対照物質

被験物質の調製に用いた DMSO を陰性対照物質とした。

6.2.2 陽性対照物質

毒性試験法ガイドラインに準じて、以下の変異原物質を陽性対照物質とした。

表 1 陽性対照物質一覧

陽性対照物質 (略称)	ロット番号	純度(%)	保存方法
2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF-2)	PKE1831	99.5%	室温、遮光
Sodium azide (SAZ)	SDL2565	99.8%	室温、遮光
2-Methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)-aminopropylamino]acridine·2HCl (ICR-191)	534652	/	室温、遮光
2-Aminoanthracene (2AA)	KLH1059	96.6%	室温、遮光
Benzo[a]pyrene (B[a]P)	17065	100%	冷蔵、遮光

保存場所 東京研究所 微生物試験室
 製造元 AF-2、SAZ、B[a]P 及び 2AA : 和光純薬工業株式会社
 ICR-191 : Polysciences, Inc.
 B[a]P : AccuStandard, Inc. ; Ames Grade

6.2.3 調製方法

AF-2、ICR-191、2AA 及び B[a]P は DMSO (和光純薬工業株式会社、JIS 規格 試薬特級、ロット番号 PEN0496、PEH6808) に溶解し、SAZ は注射用水 (株式会社大塚製薬工場、日本薬局方、ロット番号 K8A92) に溶解し、1.0 mL ずつ小分けして -20°C 以下で凍結保存した。なお、試験実施時に解凍して使用した。それぞれの調製濃度を表 2 に示した。

表 2 陽性対照物質調製濃度一覧

使用菌株	代謝活性化しない場合		代謝活性化する場合	
	陽性対照物質名	調製濃度 (µg/mL)	陽性対照物質名	調製濃度 (µg/mL)
<i>S. typhimurium</i> TA100	AF-2	0.1 (0.01)	B[a]P	50 (5.0)
<i>S. typhimurium</i> TA1535	SAZ	5 (0.5)	2AA	20 (2.0)
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	AF-2	0.1 (0.01)	2AA	100 (10.0)
<i>S. typhimurium</i> TA98	AF-2	1 (0.1)	B[a]P	50 (5.0)
<i>S. typhimurium</i> TA1537	ICR-191	10 (1.0)	B[a]P	50 (5.0)

() 内の数値は、プレートに処理したときの処理用量 (µg/plate) を示す。

6.3 試薬

6.3.1 S9Mix の調製方法

Cofactor-I の 1 バイアルに滅菌精製水を 9.0 mL 加え、完全に溶解した後ろ過 (Nalge Nunc Int. 0.45µM : ロット番号 650855、655518) 滅菌し、Cofactor-I の 1 バイアルに対して 1.0 mL の S9 を加えて S9 Mix とした。調製後、使用時まで冷蔵下で保存し、使用後の残液は廃棄した。

1) S9

名称 : S9
 製造元 : キッコーマン株式会社
 ロット番号 : RAA-586
 製造日 : 2008 年 10 月 3 日
 購入日 : 2008 年 10 月 30 日
 種・系統 : ラット・SD 系
 週齢・性 : 7 週齢・雄
 体重 : 219-257g

- 誘導物質 : フェノバルビタール(PB)及び 5,6-ベンゾフラボン(BF)
 投与方法 : 腹腔内投与
 投与期間及び投与量 : PB 4日間連続投与 : 30+60+60+60 (mg/kg 体重)
 PB 投与 3日目 BF 投与 : 80 (mg/kg 体重)
 保存場所 : 東京研究所 被験物質調製保存室内超低温フリーザ (三洋電機バイオメディカ株式会社 : MDF-192)
 保存期間中の実測温度 : 2008年10月30日~2009年2月25日 : -87.3~-81.5°C
- 2) 補酵素
 名称 : Cofactor-I
 製造元 : オリエンタル酵母工業株式会社
 ロット番号 : 999801
 製造日 : 2008年3月11日
 購入日 : 2008年12月9日、2009年1月23日
 保存場所 : 東京研究所 微生物試験室内冷蔵庫 (冷凍・冷蔵庫 MPR-211F : 三洋電機バイオメディカ株式会社)
 保存期間中の実測温度 : 2008年12月9日~2009年2月25日 : 1.5~ 6.5°C
- 3) S9Mix の組成 (1mL 中)
 水 : 0.9 mL
 S9 : 0.1 mL
 MgCl₂ : 8.0 µmol/mL
 KCl : 33.0 µmol/mL
 グルコース-6-リン酸 : 5.0 µmol/mL
 還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(NADPH)
 : 4.0 µmol/mL
 還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH)
 : 4.0 µmol/mL
 リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)
 : 100.0 µmol/mL

6.3.2 最小グルコース寒天平板培地

1) バイタルメディア AMT-O 培地

- 名称 : バイタルメディア AMT-O 培地
 製造元 : 極東製薬工業株式会社
 ロット番号 : DZL9C901
 製造日 : 2008年12月9日
 購入日 : 2009年1月15日

- 保存方法 : 常温保存
 保存場所 : 東京研究所 変異原性試験室
- 2) 使用寒天
- 名称 : OXOID AGAR No.1
 製造元 : Oxoid Ltd.
 ロット番号 : 1027367-02

6.3.3 ニュートリエントブロス No.2 培養液

ニュートリエントブロス No.2 を 2.5wt% となるよう精製水で溶解し、オートクレーブにより滅菌処理 (121°C、20 分) を行い、調製した。調製後は使用時まで冷蔵で保存した。

- 名称 : ニュートリエントブロス No.2 (Nutrient Broth No.2)
 ロット番号 : 464616
 製造元 : Oxoid Ltd.
 保存方法 : 室温保存
 保存場所 : 東京研究所 微生物試験室

6.3.4 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4)

0.1mol/L リン酸水素二ナトリウム水溶液に、0.1mol/L リン酸二水素ナトリウム二水和物水溶液を加えながら pH 7.4 に調整し、0.1mol/L リン酸緩衝液とした。これをオートクレーブにより滅菌処理(121°C、20 分)を行った。調製後は使用時まで冷蔵で保存した。

- 1) リン酸二水素ナトリウム二水和物 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- 名称 : リン酸二水素ナトリウム二水和物 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
 製造元 : 和光純薬工業株式会社
 ロット番号 : SDM1133、PEN6717
 保存方法 : 室温保存
 保存場所 : 東京研究所 微生物試験室
- 2) リン酸水素二ナトリウム (Na_2HPO_4)
- 名称 : リン酸水素二ナトリウム (Na_2HPO_4)
 製造元 : 和光純薬工業株式会社
 ロット番号 : EWM2400
 保存方法 : 室温保存
 保存場所 : 東京研究所 微生物試験室

6.3.5 トップアガー

以下に示す寒天を用いて、調製した軟寒天液(0.6 wt% Agar, 0.6wt% NaCl)をオートクレーブにより滅菌処理(121°C、20分)した後、*S. typhimurium* TA株は0.5 mmol/L D-ビオチン-0.5 mmol/L L-ヒスチジン溶液、*E. coli*株では0.5 mmol/L L-トリプトファン溶液をそれぞれ1/10容量加えて調製した。調製後は室温で保存し、使用時は電子レンジで溶解後、固化を防ぐため45°Cの恒温槽で保温した。

1) Bacto Agar

名称	:	Bacto Agar
製造元	:	Becton, Dickinson and Company
ロット番号	:	8120597
保存方法	:	室温保存
保存場所	:	東京研究所 微生物試験室

2) NaCl

名称	:	NaCl
製造元	:	和光純薬工業株式会社
ロット番号	:	ALJ3477
保存方法	:	室温保存
保存場所	:	東京研究所 微生物試験室

3) D-ビオチン

名称	:	D-ビオチン
製造元	:	MP Biomedicals, Inc.
ロット番号	:	3570J
保存方法	:	冷蔵保存、遮光
保存場所	:	東京研究所 微生物試験室

4) L-ヒスチジン塩酸塩一水和物

名称	:	L-ヒスチジン塩酸塩一水和物
製造元	:	和光純薬工業株式会社
ロット番号	:	EWQ6361
保存方法	:	室温保存、遮光
保存場所	:	東京研究所 微生物試験室

5) L-トリプトファン

名称	:	L-トリプトファン
製造元	:	和光純薬工業株式会社
ロット番号	:	EWP0422
保存方法	:	室温保存、遮光
保存場所	:	東京研究所 微生物試験室

6.4 試験方法

6.4.1 識別方法

1) 菌株の識別

以下に示す色のマーカーで識別した。

<i>S. typhimurium</i> TA100	青
<i>S. typhimurium</i> TA1535	桃
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	茶
<i>S. typhimurium</i> TA98	赤
<i>S. typhimurium</i> TA1537	緑

2) 濃度の識別

代謝活性化しない場合は「-」、代謝活性化する場合は「+」とし、これに続けて陰性対照(Solvent Control)を「SC」、陽性対照(Positive Control)を「PC」、被験物質処理群を濃度の低い方から「1」、「2」、「3」…の番号を各菌の色のマーカーで記載し、識別した。

6.4.2 前培養

- 1) ニュートリエントブロス No.2 培養液 10mL を入れた滅菌済み L 字型試験管に凍結保存菌株を解凍して得た菌懸濁液を *S. typhimurium* 株では各 20 μ L、*E. coli* 株では 10 μ L 接種した。使用後の菌懸濁液は廃棄した。
- 2) 各試験菌株を接種した L 字型試験管を振盪恒温槽 (COOL BATH SHAKER ML-10 PU-6 接続型、タイテック株式会社) にセットし、プログラム制御により前培養開始まで 4°C の水浴中に放置(6 時間 30 分)した後、37°C に上昇後 9 時間前培養した。
- 3) 前培養終了時に培養液の吸光度をデジタル比色計 (Mini photo 518R、タイテック株式会社) で測定した。なお、培養液は使用まで室温下に維持した。それぞれの菌株の換算生菌数を表 3 に示した。

表 3 菌株の換算生菌数一覧

菌 株	菌 数(cells/mL)		
	用量設定試験	本試験 1 回目	本試験 2 回目
<i>S. typhimurium</i> TA100	5.89×10^9	4.60×10^9	5.44×10^9
<i>S. typhimurium</i> TA1535	5.06×10^9	5.03×10^9	4.96×10^9
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	8.18×10^9	8.16×10^9	8.12×10^9
<i>S. typhimurium</i> TA98	6.10×10^9	5.12×10^9	6.28×10^9
<i>S. typhimurium</i> TA1537	3.03×10^9	3.09×10^9	3.02×10^9

6.4.3 本試験用量の設定

本試験の試験用量を設定するため、50 mg/mL の被験液を公比 4 で 4 段階希釈した計 5 用量 (19.5、78.1、313、1250、5000 µg/plate) を用い、用量設定試験を実施した。なお、用量設定試験の結果を別表 1 に示した。

用量設定試験の結果、本被験物質処理による生育阻害は、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA 株及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1537 の 1250 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA98 及び代謝活性化の有無にかかわらず *E. coli* WP2 *uvrA* の 5000 µg/plate で認められた。また、本被験物質によるプレート上の沈殿及び着色は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。

このため、本試験の試験用量は、生育阻害を示した最低用量を最高用量として、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA 株及び代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1537 については 1250 µg/plate、代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA98 及び代謝活性化の有無にかかわらず *E. coli* WP2 *uvrA* については 5000 µg/plate をそれぞれ最高用量として、以下公比 2 で 5 段階希釈した計 6 用量を設定した。なお、本試験は同一用量で 2 回実施した。

6.4.4 プレート数

被験物質処理群、陰性対照群及び陽性対照群のいずれについても、用量設定試験では 2 枚、2 回の本試験では 3 枚のプレートを用いた。

6.4.5 試験操作（プレインキュベーション法）

- 1) 滅菌した小試験管に調製した被験液、溶媒又は陽性対照溶液を 0.1 mL 入れ、これに代謝活性化しない場合は 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL を、代謝活性化する場合は S9 Mix 0.5 mL を加えた後、それぞれの小試験管に各菌株の培養液 0.1 mL を加えた。
- 2) 小試験管を攪拌後すぐに 37°C で 20 分間振盪しながらプレインキュベーションし、これに 45°C に保温されているトップアガーを 2.0 mL 加え攪拌後、最小グルコース寒天平板培地に均一に重層した。
- 3) 無菌試験として、調製した最高用量の被験液 0.1 mL 及び調製した S9 Mix 0.5 mL をそれぞれ小試験管に取り、これにトップアガーを 2.0 mL 加えた後に最小グルコース寒天平板培地に均一に重層した。なお、これら 1)~3)の一連の操作は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で実施した。
- 4) 最小グルコース寒天平板培地に重層したトップアガーが固化したことを確認し、最小グルコース寒天平板培地を逆さにしてインキュベータに入れ、37°C で用量設定試験では 48 時間、本試験 1 回目では 48 時間、本試験 2 回目では 48.5 時間培養した。

- 5) 培養後、プレート上の被験物質による沈殿及び着色を確認した結果、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかったため、自動コロニーカウンタ（コロニーアナライザーCA-11D systems、システムサイエンス株式会社）を用いて計数（面積補正、補正值：1.21）した。また、実体顕微鏡を用いて生育阻害の有無を観察した。

6.5 判定基準

被験物質処理群の復帰変異コロニー数が自然復帰変異コロニー数（陰性対照値）に対して2倍以上となる増加を示し、用量反応性及び再現性が認められた場合あるいは明確な用量反応性を示さない場合であっても自然復帰変異コロニー数の2倍以上となる増加を示し、2回の本試験で再現性が認められた場合に陽性と判定することとした。なお、測定結果については、平均値±標準偏差も併せて記載した。

7. 試験結果

試験の結果を別表1~3及び図1~10に示した。また、比活性値表を別表4,5に示した。なお、図は別表2より作成した。

7.1 培養終了後の観察結果

本被験物質によるプレート上の沈殿及び着色は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。なお、実体顕微鏡を用いて菌に対する生育阻害を観察した結果、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA株及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1537の1250 µg/plate以上、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA98及び代謝活性化の有無にかかわらず *E. coli* WP2 *uvrA*の2500 µg/plate以上で認められた。

7.2 復帰変異コロニー数

2回の本試験ともに、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100において、陰性対照値の2倍以上となる用量依存的な復帰変異コロニー数の増加が認められ、再現性を示した。

7.3 試験系の成立条件

陽性対照値がそれぞれの菌株の陰性対照値に比較して2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加を示し、陰性対照値及び陽性対照値の復帰変異コロニー数の平均値が背景データの管理限界(平均値±3SD：別添)内であり、無菌試験及び試験操作において雑菌の混入などの異常も認められなかったため、試験が適切に実施されたものと判断した。

8. 考察

2回の本試験ともに、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100 において、陰性対照値の2倍以上となる用量依存的な復帰変異コロニー数の増加が認められ、再現性を示した。なお、復帰変異コロニー数が陰性対照値の2倍を超え、再現性が認められた値について比活性値を求めたところ、最大で258 (Rev/mg)となり、本被験物質の変異原性は弱いものと判断された。

一方、陽性対照群では陰性対照群と比較して2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加を示したことから、使用菌株の復帰突然変異誘発物質に対する反応は適切であったことが確認され、試験は適切に実施されたものと考えられた。

以上の試験結果より、本試験条件下において、メチルスチリルケトン¹⁾は、細菌に対する復帰突然変異誘発能を有する(陽性)と判定した。

9. 参考文献

- 1) B.N.Ames, F.D.Lee and W.E.Durston: An Improved Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens, Proc.Natl Acad.Sci.,USA, 70, No.3, pp.782-786, March 1973.
- 2) J.McCann, N.E.Spingarn, J.Kobori and B.N.Ames: Detection of Carcinogens as Mutagens: Bacterial Tester Strains with R Factor Plasmids, Proc.Natl Acad.Sci., USA, 72, No.3, pp.979-983, March 1975.
- 3) M.H.L.Green and W.J.Muriel: Mutagen Testing using Trp+ Reversion in *Escherichia coli*, Mutation Res., 38, pp.3-32, 1976.
- 4) T.Yahagi, M.Nagao, Y.Seino, T.Matsushima, T.Sugimura and M.Okada: Mutagenicities of *N*-nitrosamines on *Salmonella*, Mutation Res., 48, pp.121-130, 1977.
- 5) Dorothy M. Maron and Bruce N. Ames: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, Mutation Res., 113, pp.173-215, 1983.
- 6) 田島彌太郎, 賀田恒夫, 近藤宗平, 外村晶(編): 環境変異原実験法, 講談社, pp.56-68, 1980.
- 7) 労働省安全衛生部化学物質調査課編: 新・微生物を用いる変異原性試験ガイドブック, 中央労働災害防止協会, 1986.
- 8) 石館基(監修): 微生物を用いる変異原性試験データ集(能美健彦, 松井道子編集), 株式会社エル・アイ・シー, 東京, 1991.

(別表1)

試験結果表 (用量設定試験)

被験物質の名称:メチルステリルケン

No. T-0305

試験実施期間		2009年1月22日 より 2009年1月26日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (µg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2 ^{uvrA}	TA98	TA1537	
S9Mix (一)	陰性対照 (DMSO)	131 103 (117)	17 16 (17)	34 19 (27)	13 13 (13)	6 8 (7)	
	19.5	139 114 (127)	17 10 (14)	25 17 (21)	13 21 (17)	7 5 (6)	
	78.1	115 115 (115)	18 19 (19)	28 23 (26)	19 18 (19)	4 5 (5)	
	313	125 118 (122)	15 14 (15)	19 18 (19)	10 5 (8)	6 1 (4)	
	1250	68 * 67 * (68)	9 * 7 * (8)	12 10 (11)	12 * 10 * (11)	2 * 4 * (3)	
	5000	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	
	S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	148 166 (157)	7 10 (9)	23 24 (24)	41 45 (43)	11 8 (10)
19.5		151 171 (161)	8 7 (8)	19 26 (23)	37 36 (37)	11 10 (11)	
78.1		183 180 (182)	15 8 (12)	28 28 (28)	47 31 (39)	10 16 (13)	
313		261 254 (258)	8 11 (10)	25 19 (22)	57 35 (46)	10 15 (13)	
1250		200 * 189 * (195)	6 * 8 * (7)	19 17 (18)	21 28 (25)	7 * 12 * (10)	
5000		0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	
陽性対照		S9Mixを必要としないもの	名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2
	用量(µg/プレート)		0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	コロニー数/プレート		562 557 (560)	321 302 (312)	93 92 (93)	431 420 (426)	1399 1381 (1390)
	S9Mixを必要とするもの	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
		用量(µg/プレート)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
		コロニー数/プレート	964 949 (957)	290 292 (291)	1042 1055 (1049)	353 353 (353)	121 132 (127)

(備考)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
SAZ : アジ化ナトリウム
ICR-191 : 2-オキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl
2AA : 2-アミノアントラセン
B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

* : 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。
()内は、2枚のプレートの平均値を示す。

試験結果表 (本試験1回目)

被験物質の名称:メチルステリルケトン

No. T-0305

試験実施期間		2009年2月12日 より 2009年2月16日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9Mix (-)	陰性対照 (DMSO)	125 126 108 (120 ± 10.1)	9 15 13 (12 ± 3.1)	29 30 31 (30 ± 1.0)	27 18 15 (20 ± 6.2)	16 14 14 (15 ± 1.2)
	39.1	137 116 125 (126 ± 10.5)	4 9 13 (9 ± 4.5)	NT	15 35 22 (24 ± 10.1)	10 6 7 (8 ± 2.1)
	78.1	109 133 133 (125 ± 13.9)	12 9 18 (13 ± 4.6)	NT	26 25 13 (21 ± 7.2)	4 2 5 (4 ± 1.5)
	156	113 124 139 (125 ± 13.1)	17 13 10 (13 ± 3.5)	25 24 22 (24 ± 1.5)	22 16 25 (21 ± 4.6)	5 8 4 (6 ± 2.1)
	313	114 117 142 (124 ± 15.4)	10 16 5 (10 ± 5.5)	32 25 23 (27 ± 4.7)	32 28 15 (25 ± 8.9)	9 8 5 (7 ± 2.1)
	625	119 122 114 (118 ± 4.0)	20 19 13 (17 ± 3.8)	27 24 27 (26 ± 1.7)	27 22 24 (24 ± 2.5)	8 12 11 (10 ± 2.1)
	1250	72 * 71 * 54 * (66 ± 10.1)	10 * 10 * 11 * (10 ± 0.6)	11 21 20 (17 ± 5.5)	24 * 28 * 39 * (30 ± 7.8)	5 * 5 * 6 * (5 ± 0.6)
	2500	NT	NT	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	NT	NT
	5000	NT	NT	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	NT	NT
	S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	134 123 124 (127 ± 6.1)	10 10 11 (10 ± 0.6)	29 33 29 (30 ± 2.3)	35 41 47 (41 ± 6.0)
39.1		153 167 103 (141 ± 33.6)	7 11 8 (9 ± 2.1)	NT	NT	15 11 13 (13 ± 2.0)
78.1		175 159 162 (165 ± 8.5)	15 10 12 (12 ± 2.5)	NT	NT	7 9 8 (8 ± 1.0)
156		223 216 222 (220 ± 3.8)	19 11 6 (12 ± 6.6)	26 29 20 (25 ± 4.6)	40 31 42 (38 ± 5.9)	15 13 9 (12 ± 3.1)
313		267 225 241 (244 ± 21.2)	8 6 6 (7 ± 1.2)	22 25 20 (22 ± 2.5)	42 39 32 (38 ± 5.1)	18 21 18 (19 ± 1.7)
625		288 295 262 (282 ± 17.4)	7 13 12 (11 ± 3.2)	27 22 30 (26 ± 4.0)	33 46 50 (43 ± 8.9)	8 17 8 (11 ± 5.2)
1250		320 * 361 * 317 * (333 ± 24.6)	10 * 6 * 8 * (8 ± 2.0)	24 18 23 (22 ± 3.2)	30 48 36 (38 ± 9.2)	8 * 11 * 8 * (9 ± 1.7)
2500		NT	NT	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	NT
5000		NT	NT	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	NT
陽性対照		名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2
	S9Mixを必要とするもの 用量(μg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	コロニー数/プレート	619 627 632 (626 ± 6.6)	454 427 456 (446 ± 16.2)	77 78 79 (78 ± 1.0)	541 544 538 (541 ± 3.0)	1848 1900 1858 (1869 ± 27.6)
	S9Mixを必要とするもの 名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
用量(μg/プレート)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0	
コロニー数/プレート	981 1055 898 (978 ± 78.5)	355 395 321 (357 ± 37.0)	1041 1004 1036 (1027 ± 20.1)	357 370 350 (359 ± 10.1)	127 151 113 (130 ± 19.2)	

(備考)

- AF-2 : 2-(2-フルル)-3-(5-ニトロ-2-フルル)アクリルアミド
- SAZ : アジ化ナトリウム
- ICR-191 : 2-メキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl
- 2AA : 2-アミノアントラセン
- B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

*: 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。
 NT: 試験せず。
 ()内は、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

試験結果表 (本試験2回目)

被験物質の名称:メチルステリルケトン

No. T-0305

試験実施期間		2009年2月24日 より 2009年2月27日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9Mix (-)	陰性対照 (DMSO)	137 149 117 (134 ± 16.2)	12 9 14 (12 ± 2.5)	38 30 34 (34 ± 4.0)	15 16 16 (16 ± 0.6)	5 8 9 (7 ± 2.1)
	39.1	169 155 148 (157 ± 10.7)	13 15 10 (13 ± 2.5)	NT	24 17 11 (17 ± 6.5)	5 4 10 (6 ± 3.2)
	78.1	209 152 163 (175 ± 30.2)	7 12 7 (9 ± 2.9)	NT	13 18 6 (12 ± 6.0)	2 5 6 (4 ± 2.1)
	156	151 163 191 (168 ± 20.5)	5 7 11 (8 ± 3.1)	36 25 33 (31 ± 5.7)	21 12 15 (16 ± 4.6)	13 5 2 (7 ± 5.7)
	313	162 166 126 (151 ± 22.0)	6 8 10 (8 ± 2.0)	25 31 28 (28 ± 3.0)	15 18 11 (15 ± 3.5)	2 5 6 (4 ± 2.1)
	625	139 143 143 (142 ± 2.3)	7 9 11 (9 ± 2.0)	22 28 16 (22 ± 6.0)	5 9 16 (10 ± 5.6)	4 5 4 (4 ± 0.6)
	1250	34 * 60 * 38 * (44 ± 14.0)	2 * 3 * 3 * (3 ± 0.6)	13 24 24 (20 ± 6.4)	7 * 5 * 11 * (8 ± 3.1)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)
	2500	NT	NT	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	NT	NT
	5000	NT	NT	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	NT	NT
	S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	136 162 150 (149 ± 13.0)	15 8 7 (10 ± 4.4)	17 16 24 (19 ± 4.4)	27 31 39 (32 ± 6.1)
39.1		159 189 222 (190 ± 31.5)	9 15 12 (12 ± 3.0)	NT	NT	5 7 8 (7 ± 1.5)
78.1		182 198 213 (198 ± 15.5)	5 13 14 (11 ± 4.9)	NT	NT	13 5 8 (9 ± 4.0)
156		207 232 237 (225 ± 16.1)	4 9 6 (6 ± 2.5)	30 25 31 (29 ± 3.2)	24 29 38 (30 ± 7.1)	4 5 5 (5 ± 0.6)
313		212 253 237 (234 ± 20.7)	11 10 4 (8 ± 3.8)	29 24 38 (30 ± 7.1)	30 32 34 (32 ± 2.0)	5 6 5 (5 ± 0.6)
625		280 340 311 (310 ± 30.0)	6 11 10 (9 ± 2.6)	31 31 26 (29 ± 2.9)	18 25 23 (22 ± 3.6)	8 6 5 (6 ± 1.5)
1250		242 * 241 * 280 * (254 ± 22.2)	4 * 4 * 3 * (4 ± 0.6)	21 26 13 (20 ± 6.6)	17 25 16 (19 ± 4.9)	2 * 6 * 2 * (3 ± 2.3)
2500		NT	NT	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	NT
5000		NT	NT	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	NT
陽性対照		名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2
	用量(μg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	コロニー数/プレート	656 644 669 (656 ± 12.5)	252 313 258 (274 ± 33.6)	91 94 67 (84 ± 14.8)	440 447 431 (439 ± 8.0)	1555 1529 1251 (1445 ± 168.5)
	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
用量(μg/プレート)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0	
コロニー数/プレート	986 1004 1029 (1006 ± 21.6)	275 249 247 (257 ± 15.6)	984 933 984 (967 ± 29.4)	359 270 316 (315 ± 44.5)	118 105 91 (105 ± 13.5)	

(備考)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
SAZ : アジ化ナトリウム
ICR-191 : 2-メキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノ]プロピルアミノ]アクリジン・2HCl
2AA : 2-アミノアントラセン
B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

*: 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。
NT: 試験せず。
()内は、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

(別表4)

本試験1回目における比活性値表

被験物質の名称:メチルスチリルケトン

No. T-0305

試験実施期間		2009年2月12日 より 2009年2月16日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量(μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2 ^{uvrA}	TA98	TA1537
S9Mix (-)	陰性対照(DMSO)					
	39.1					
	78.1					
	156					
	313					
	625					
	1250					
	2500					
	5000					
S9Mix (+)	陰性対照(DMSO)					
	39.1					
	78.1					
	156					
	313					
	625	248				
	1250	165				
	2500					
	5000					

(備考)

比活性値は、陰性対照の2倍以上の復帰変異コロニー数を示した値のみ記載した。

比活性=被験物質1mgあたりの復帰変異コロニー数

下記の計算式により算出する。

比活性=(当該用量のコロニー数-陰性対照のコロニー数)×1000/当該用量(μg/plate)

(別表5)

本試験2回目における比活性値表

被験物質の名称:メチルスチリルケトン

No. T-0305

試験実施期間		2009年2月24日 より 2009年2月27日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量(μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9Mix (-)	陰性対照(DMSO)					
	39.1					
	78.1					
	156					
	313					
	625					
	1250					
	2500					
	5000					
S9Mix (+)	陰性対照(DMSO)					
	39.1					
	78.1					
	156					
	313					
	625	258				
	1250					
	2500					
	5000					

(備考)

比活性値は、陰性対照の2倍以上の復帰変異コロニー数を示した値のみ記載した。

比活性=被験物質1mgあたりの復帰変異コロニー数

下記の計算式により算出する。

比活性=(当該用量のコロニー数-陰性対照のコロニー数)×1000/当該用量(μg/plate)

図 1

用量反応曲線 (TA100:-S9Mix)

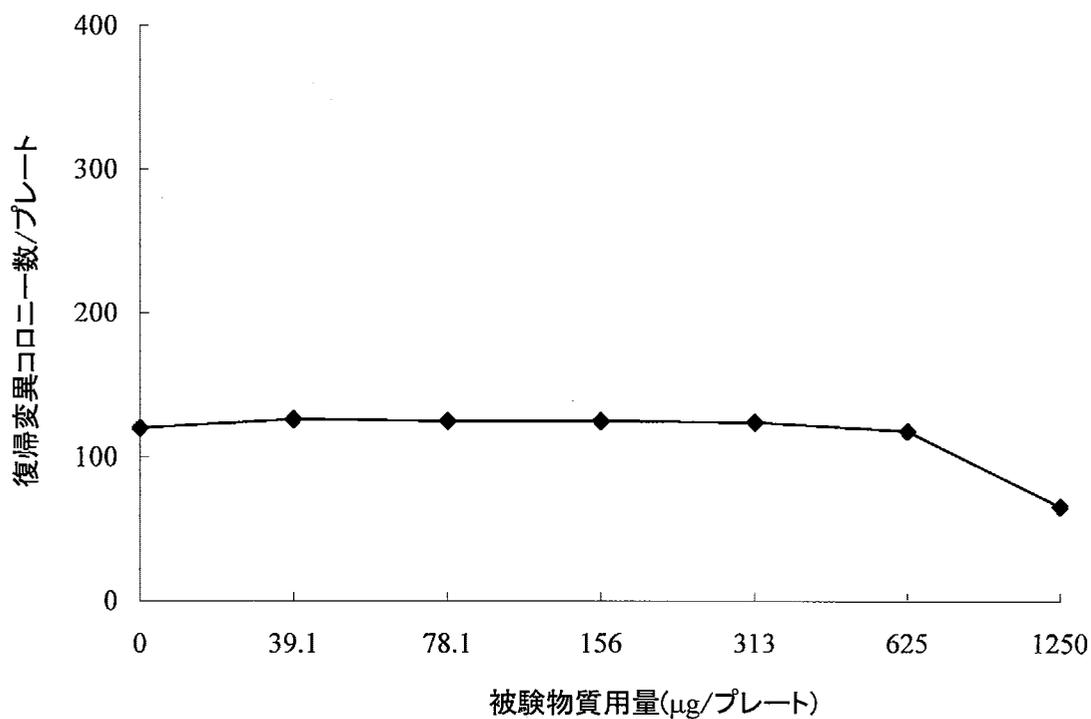


図 2

用量反応曲線 (TA100:+S9Mix)

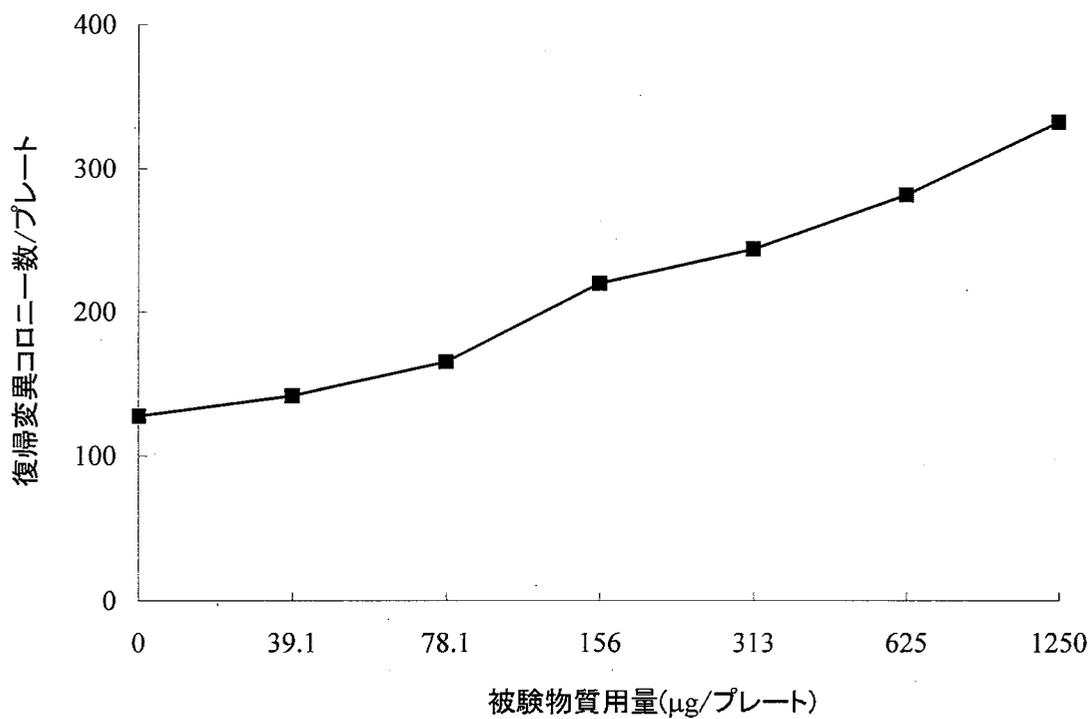


図 3

用量反応曲線 (TA1535:-S9Mix)

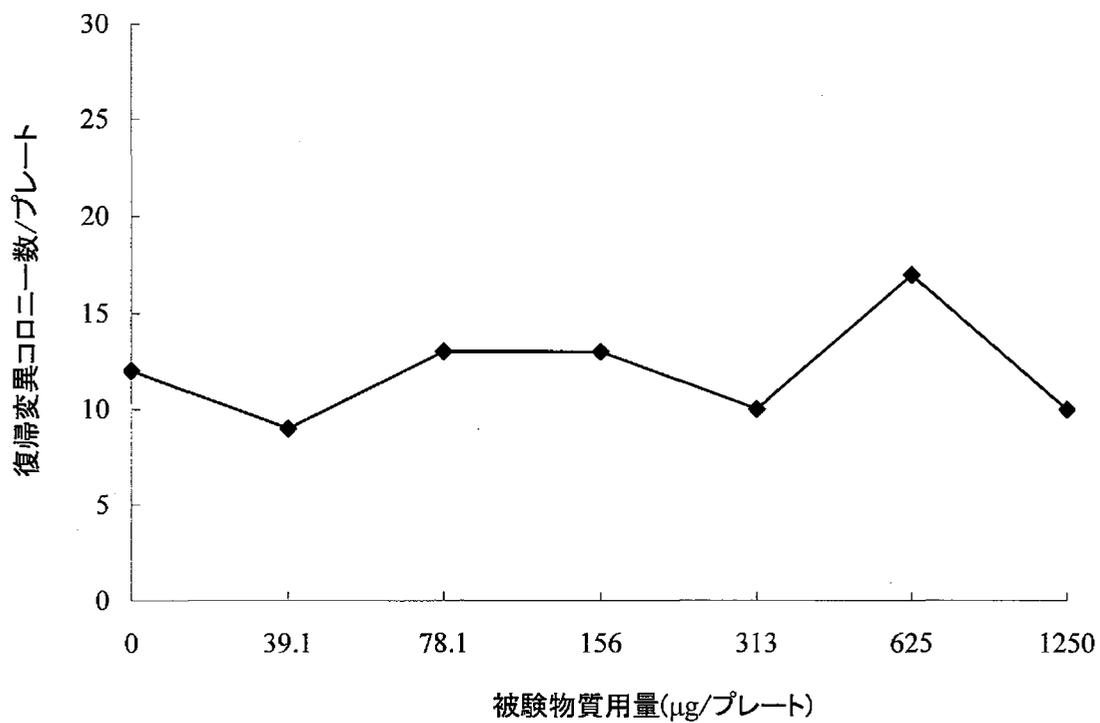


図 4

用量反応曲線 (TA1535:+S9Mix)

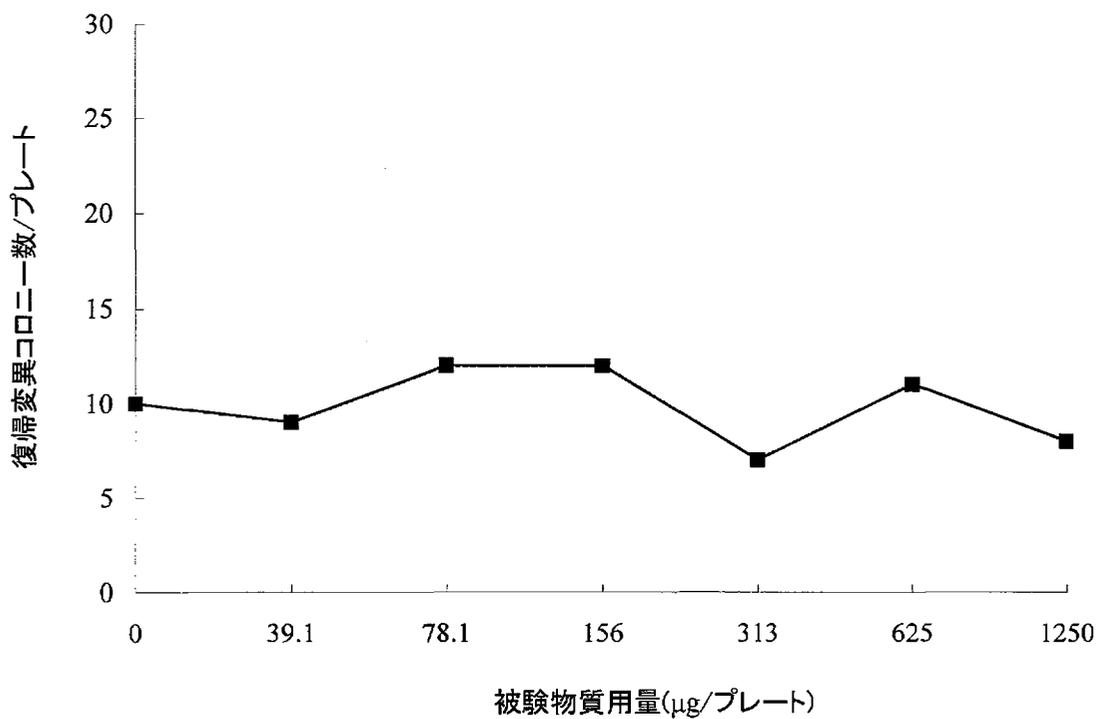


図 5

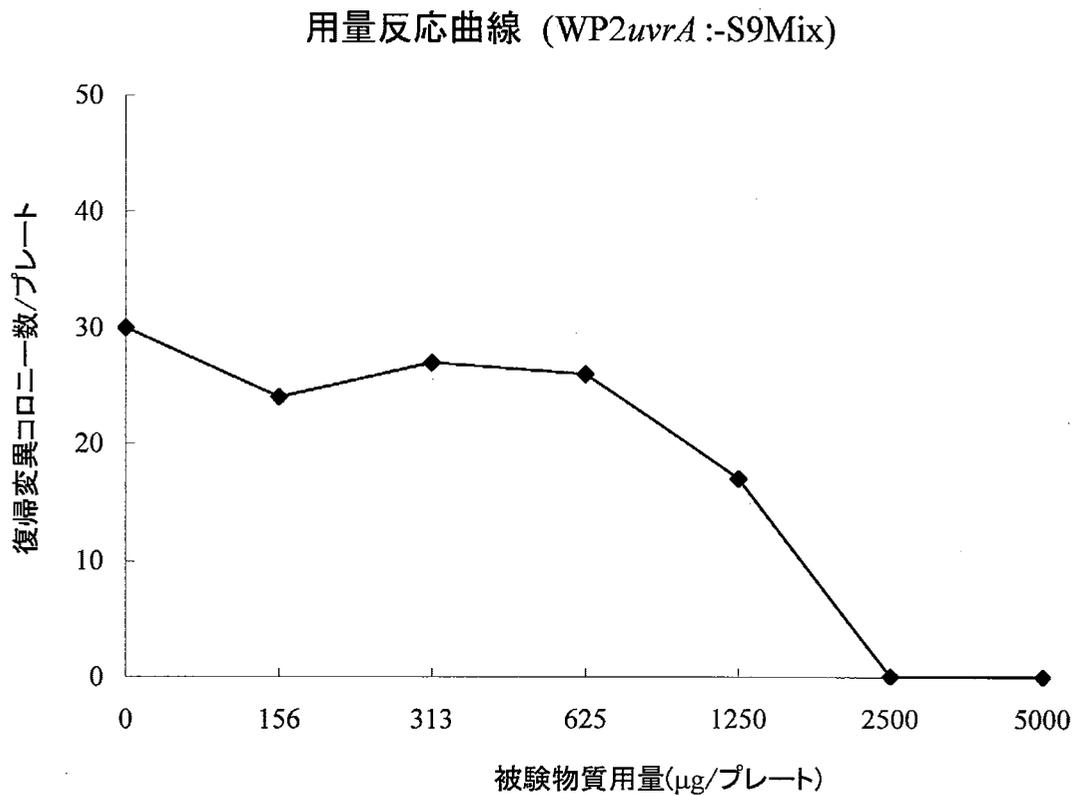


図 6

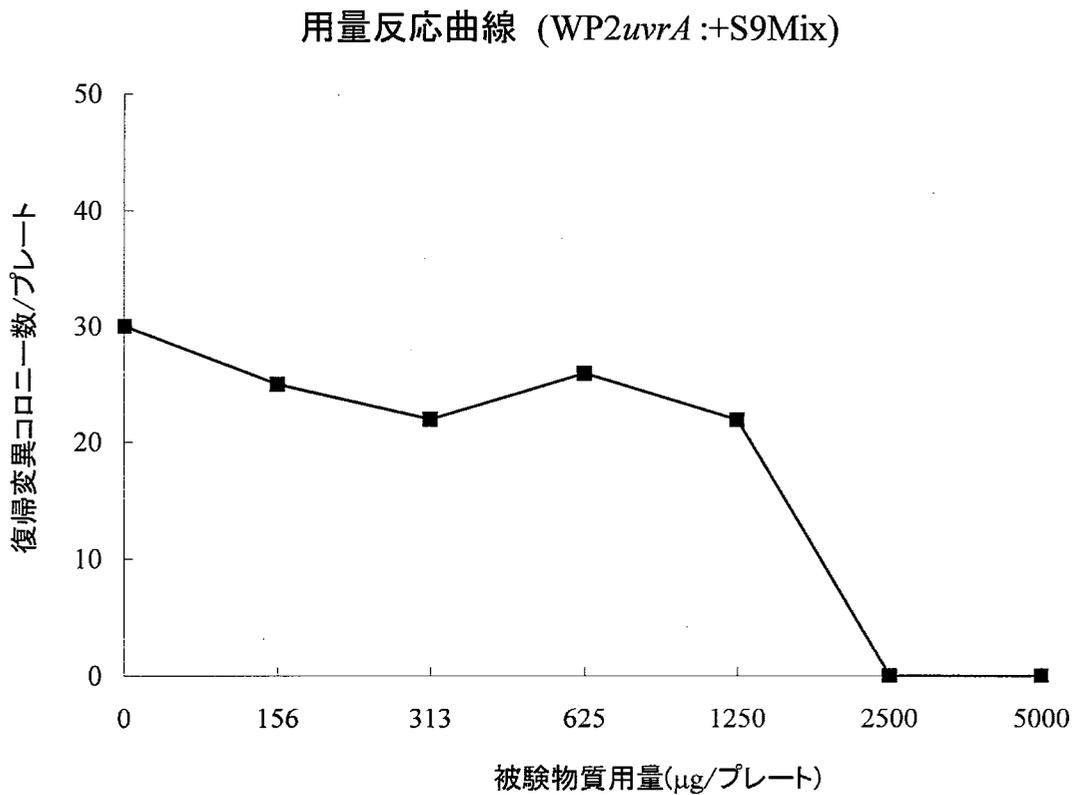


図 7

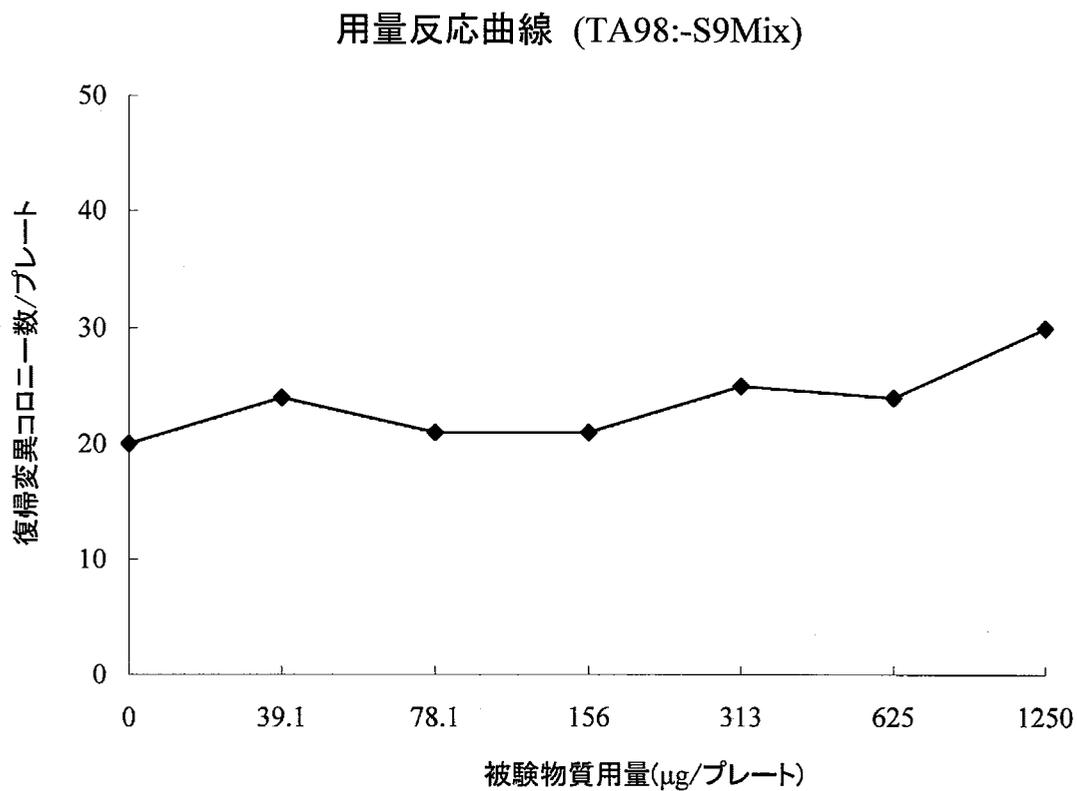


図 8

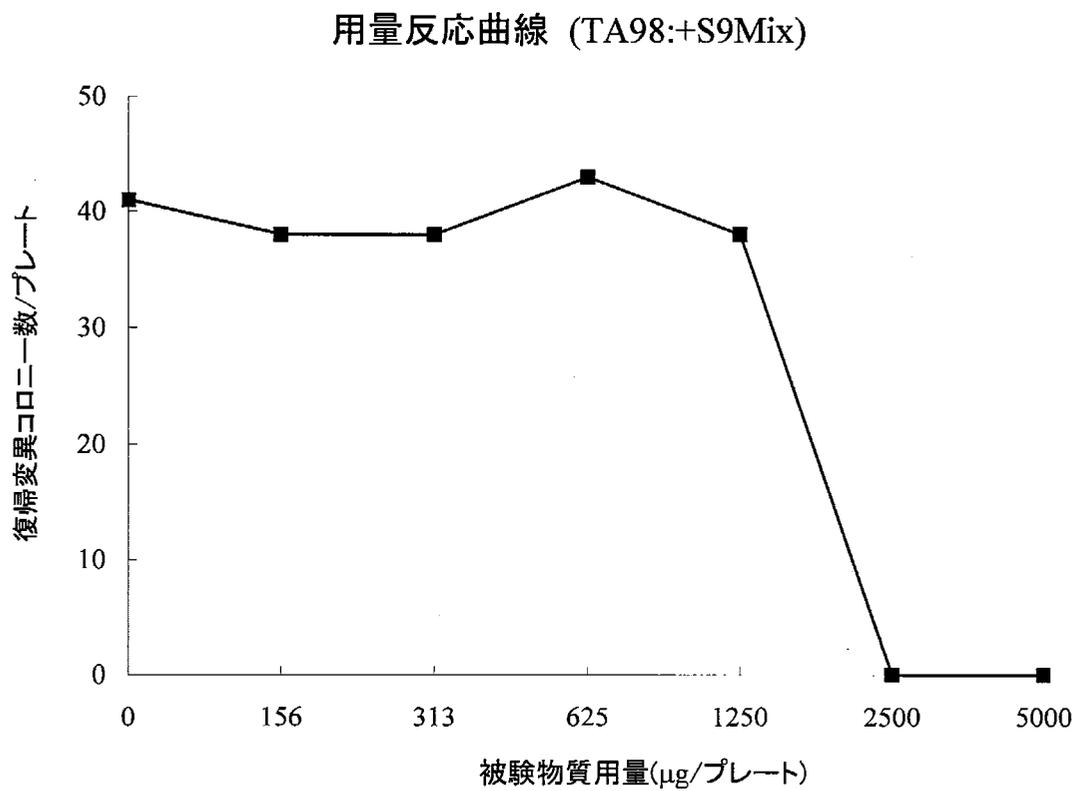


図 9

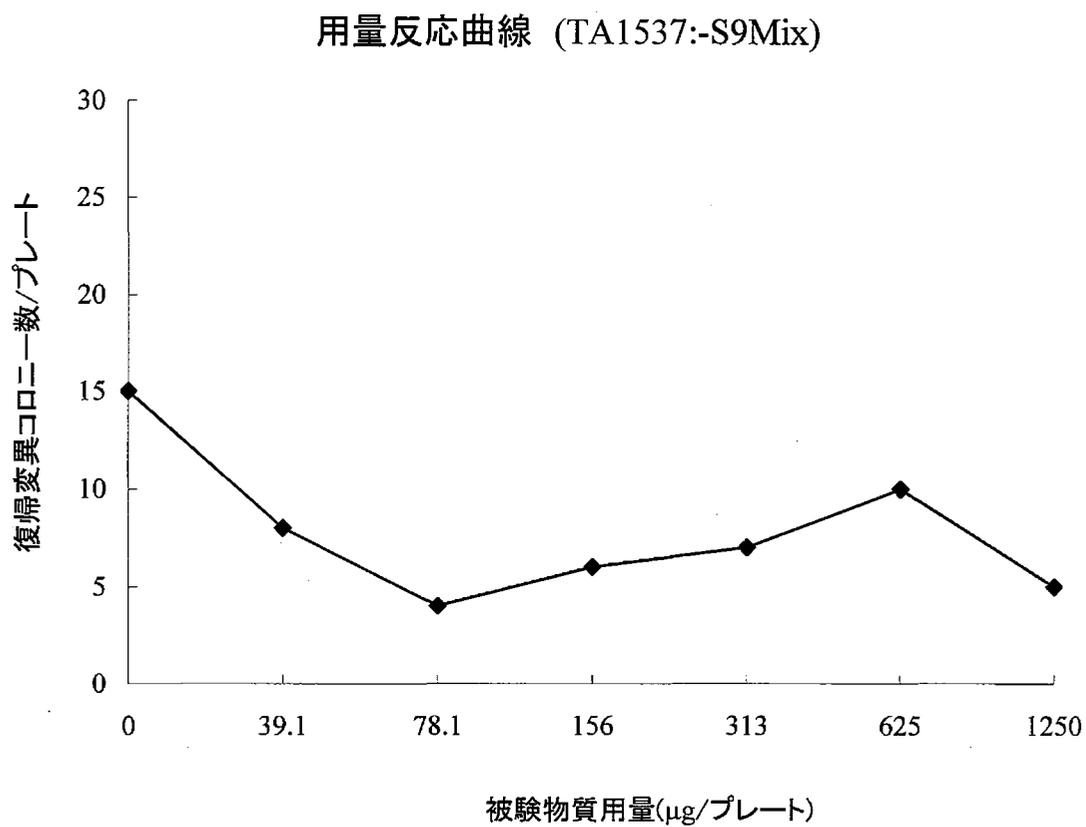


図 10

