

---

2, 2'-[1, 2-エタンジイルビス (オキシメチレン)] ビス (オキシラン) の  
細菌を用いる復帰突然変異試験

---

最終報告書

作成日: 2011年3月29日

株式会社日本バイオリサーチセンター  
羽島研究所

## 1. 目次

表紙.....	1
1. 目次.....	2
15. 要約.....	11
16. 緒言.....	12
17. 方法.....	12
17.1. 被験物質, 媒体, 陽性対照物質及び陰性対照物質.....	12
17.1.1. 被験物質.....	12
17.1.2. 媒体.....	12
17.1.3. 陽性対照物質.....	12
17.1.4. 陰性対照物質.....	14
17.2. 検体液.....	14
17.2.1. 被験物質.....	14
17.2.2. 陽性対照物質.....	14
17.2.3. 残余検体液の取り扱い.....	15
17.3. 試験系.....	15
17.3.1. 試験菌株.....	15
18. S9 mix.....	16
19. 培地.....	16
20. 無菌試験.....	16
21. 試験方法.....	17

21.1. 試験操作.....	17
21.2. 用量設定試験.....	17
21.3. 本試験.....	17
22. 試験の成立条件.....	18
23. 統計学的方法.....	18
24. 判定基準.....	18
25. 試験結果.....	19
25.1. 用量設定試験.....	19
25.1.1. プレート上の析出物.....	19
25.1.2. 菌の生育阻害.....	19
25.1.3. 復帰変異コロニー数.....	19
25.1.4. 比活性値.....	19
25.1.5. 対照物質.....	19
25.2. 本試験.....	19
25.2.1. プレート上の析出物.....	19
25.2.2. 菌の生育阻害.....	19
25.2.3. 復帰変異コロニー数.....	19
25.2.4. 比活性値.....	20
25.2.5. 対照物質.....	20
26. 考 察.....	20
27. 文 献.....	20

#### Tables

Table 1-1, 1-2. Reverse mutation test of 2, 2'-[1, 2-ethanediylbis (oxymethylene)] bis-oxirane with bacteria (dose-finding test).....	21
Table 2-1, 2-2. Reverse mutation test of 2, 2'-[1, 2-ethanediylbis (oxymethylene)] bis-oxirane with bacteria (mutagenicity test).....	23
Table 3. Maximum potency of test strains. ....	25

#### Figures

Figure 1. Chemical structure of 2, 2'-[1, 2-ethanediylbis (oxymethylene)] bis-oxirane.....	26
Figure 2-1. Reverse mutation test of 2, 2'-[1, 2-ethanediylbis (oxymethylene)] bis-oxirane with bacteria. (dose-finding test: without S9 mix).....	27
Figure 2-2. Reverse mutation test of 2, 2'-[1, 2-ethanediylbis (oxymethylene)] bis-oxirane with bacteria. (dose-finding test: with S9 mix).....	28

Figure 3-1.	Reverse mutation test of 2, 2'-[1, 2-ethanediylbis (oxymethylene)] bis-oxirane with bacteria. (mutagenicity test: without S9 mix) .....	29
Figure 3-2.	Reverse mutation test of 2, 2'-[1, 2-ethanediylbis (oxymethylene)] bis-oxirane with bacteria. (mutagenicity test: with S9 mix).....	30

## 15. 要 約

2, 2'-[1, 2-エタンジイルビス (オキシメチレン)] ビス (オキシラン) の遺伝子突然変異誘発性の有無を, *Salmonella typhimurium* の TA100, TA98, TA1535 及び TA1537 並びに *Escherichia coli* の WP2*uvrA* を用い, ブレインキューベーション法による復帰突然変異試験により検討した. 試験は, S9 mix 無添加と S9 mix 添加について実施した.

2, 2'-[1, 2-エタンジイルビス (オキシメチレン)] ビス (オキシラン) 処理群における試験濃度は, 用量設定試験では, S9 mix 無添加及び S9 mix 添加とも, いずれの菌株も 5, 15, 50, 150, 500, 1500 及び 5000 µg/plate を設定した.

用量設定試験の結果, S9 mix 無添加及び S9 mix 添加とも, TA100, TA1535, WP2*uvrA* 及び TA98 において, 復帰変異コロニー数が陰性対照の 2 倍以上に増加した. このことから, 本試験の試験濃度は, TA100, TA1535, WP2*uvrA* 及び TA98 では, 用量反応性が求められるように公比 2 により 5-10 濃度を設定した. TA1537 では S9 mix 無添加及び S9 mix 添加に関わらず, 菌の生育阻害及び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, 用量設定試験と同様に 5000 µg/plate を最高濃度として, 以下公比 2 で 5 濃度を設定した. すなわち, S9 mix 無添加の TA100 及び TA1535 では 9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156.3, 312.5, 625, 1250, 2500 及び 5000 µg/plate, WP2*uvrA* では 78.1, 156.3, 312.5, 625, 1250, 2500 及び 5000 µg/plate, TA98 及び TA1537 では 312.5, 625, 1250, 2500 及び 5000 µg/plate とした. S9 mix 添加の TA100 及び TA1535 では 39.1, 78.1, 156.3, 312.5, 625, 1250, 2500 及び 5000 µg/plate, WP2*uvrA* では 78.1, 156.3, 312.5, 625, 1250, 2500 及び 5000 µg/plate, TA98 及び TA1537 では 312.5, 625, 1250, 2500 及び 5000 µg/plate とした.

試験の結果, S9 mix 無添加及び S9 mix 添加とも, TA100, TA1535 及び TA98 において, また, S9 mix 無添加の TA1537, S9 mix 添加の WP2*uvrA* において復帰変異コロニー数が陰性対照の 2 倍以上の値を示し, 更に濃度に依存して増加した.

復帰変異コロニー数の増加が認められた菌株について, 比活性値を算出したところ, 2, 2'-[1, 2-エタンジイルビス (オキシメチレン)] ビス (オキシラン) の最大比活性値は, 2151.1 [本試験 (S9 mix 無添加): TA100, 78.1 µg/plate]であった.

陽性対照では, 復帰変異コロニー数が陰性対照の 2 倍以上に増加し, 陰性対照では, 試験施設のバックグラウンドデータの平均±2 S.D.の範囲内であった.

用量設定試験及び本試験の結果には再現性が認められた.

以上の結果, 当試験の条件下において, 2, 2'-[1, 2-エタンジイルビス (オキシメチレン)] ビス (オキシラン) は遺伝子突然変異誘発性を有する (陽性) と判定する.

## 16. 緒言

2, 2'-[1, 2-エタンジイルビス (オキシメチレン)] ビス (オキシラン) の細菌を用いる復帰突然変異試験を行い、その遺伝子突然変異誘発性の有無について検討した。

## 17. 方法

### 17.1. 被験物質、媒体、陽性対照物質及び陰性対照物質

#### 17.1.1. 被験物質

被験物質 2, 2'-[1, 2-エタンジイルビス (オキシメチレン)] ビス (オキシラン) [別名: 1, 2-Bis (2,3-epoxypropoxy) ethan, 1, 2-Diglycidyloxyethane, 化学名: エチレングリコールジグリシジルエーテル, 英語名称: 2, 2'-[1, 2-ethanediybis (oxymethylene)] bis-oxirane, CAS No.: 2224-15-9, 官報公示整理番号 (化審法): 2-396] は, 化学式:  $C_8H_{14}O_4$  (化学構造式は Figure 1.参照), 分子量: 174.19, 物性・性状: ごくうすい黄色澄明の液体であり, 多くの有機溶剤に可溶. 引火点: 157°C である. 当試験には,

入手したものをを用いた [

水溶状: 規格値 試験適合 (澄明), 結果 試験適合 (澄明), NSA 溶状: 規格値 試験適合 (澄明), 結果 試験適合 (澄明), 密度 (20°C): 規格値 1.15–1.16 g/mL, 結果 1.153 g/mL, 水分: 規格値 0.3%以下, 結果 0.1%, 実用試験: 規格値 試験適合, 結果 試験適合, エポキシ当量: 100–120, 結果 115]. 入手後は, 試験施設の被験物質保管室の室温保管庫 [設定温度: 23°C (実測値: 22.0–25.0°C), 設定湿度: 55% (実測値: 40.8–67.0%)] 内に, 室温・遮光・気密の条件下で保管した。

「2, 2'-[1, 2-エタンジイルビス (オキシメチレン)] ビス (オキシラン) のラットを用いる経口投与による反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験 (試験番号: 100130) の投与期間終了後に試験施設で保管した被験物質 (Lot No.: KWG5515) を製造元で再分析し, 使用期間中の安定性を確認した。

#### 17.1.2. 媒体

媒体には, 注射用水 (規格: 局方品, Lot No.: K0A81, 使用期限: 2013 年 1 月, 株式会社大塚製薬工場) を用いた. 注射用水は, 使用時まで試験施設の被験物質保管室 [設定温度: 23°C (実測値: 22.0–25.0°C), 設定湿度: 55% (実測値: 45.0–58.5%)] 内に, 室温の条件下で保管した。

#### 17.1.3. 陽性対照物質

陽性対照物質は, ポジコン AM マルチセット (セット番号: M0023, 使用期限: 2011 年 12 月 9 日, 製造元: オリエンタル酵母工業株式会社) を用いた. ポジコン AM マルチセットは, 試験施設の被験物質保管室の保管庫 [冷凍庫: MDF-291AT, 三洋電機株式会社, 設定温度: -85°C (実測値: -87–-77°C)] 内に, 冷凍の条件下で保管した。

下記にポジコン AM マルチセットの内容を記載した。

##### 17.1.3.1. 2-アミノアントラセン (2-aminoanthracene, 略名: 2AA)

調製液

5 µg/mL (Lot No.: 100510A205), 10 µg/mL (Lot No.: 100510A210),

20 µg/mL (Lot No.: 100510A220), 100 µg/mL (Lot No.: 100510A2100)

製造日: 2010年5月10日

媒体: ジメチルスルホキシド (以下 DMSO, 紫外部吸収スペクトル用, Lot No.: JK066, 株式会社  
同仁化学研究所)

原体

Lot No.: ALP5557

製造元: 和光純薬工業株式会社

#### 17.1.3.2. アジ化ナトリウム (sodium azide, 化学式: $\text{NaN}_3$ )

調製液

5 µg/mL (Lot No.: 100510N)

製造日: 2010年5月10日

媒体: 注射用水 (Lot No.: 6H98, 株式会社大塚製薬工場)

原体

Lot No.: M8N8165

製造元: ナカライテスク株式会社

#### 17.1.3.3. 9-アミノアクリジン (9-aminoacridine hydrochloride, 略名: 9AA)

調製液

800 µg/mL (Lot No.: 100511A9)

製造日: 2010年5月11日

媒体: DMSO (紫外部吸収スペクトル用, Lot No.: JK066, 株式会社同仁化学研究所)

原体

Lot No.: M6K8637

製造元: ナカライテスク株式会社

#### 17.1.3.4. 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド

[2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 略名: AF-2]

調製液

0.1 µg/mL (Lot No.: 100511AF01), 1.0 µg/mL (Lot No.: 100511AF10)

製造日: 2010年5月11日

媒体: DMSO (紫外部吸収スペクトル用, Lot No.: JK066, 株式会社同仁化学研究所)

原体

Lot No.: SDJ4376

製造元: 和光純薬工業株式会社

#### 17.1.4. 陰性対照物質

被験物質の媒体である注射用水を用いた。

### 17.2. 検体液

#### 17.2.1. 被験物質

##### 17.2.1.1. 調製方法

用量設定試験及び本試験とも、被験物質 500 mg (実秤量値: 用量設定試験; 500.1 mg, 本試験; 500.0 mg) を秤量 (電子天秤: AT261, メトラー・トレド株式会社) した後, 注射用水に溶解して, 最高濃度 (50 mg/mL) を 10 mL 調製した。最高濃度液以下の濃度液は, 50 mg/mL 液の一部を注射用水で段階希釈して, 用量設定試験では, 15, 5, 1.5, 0.5, 0.15 及び 0.05 mg/mL を, 本試験では, 25.0, 12.5, 6.25, 3.125, 1.563, 0.781, 0.391, 0.195 及び 0.0977 mg/mL を調製した。

##### 17.2.1.2. 被験物質調製液の安定性及び調製頻度

媒体として注射用水を用いた被験物質調製液の安定性については, 0.05 及び 200 mg/mL の濃度で調製後, 冷蔵 [設定温度: 4°C (実測値: 5.0–6.1°C), 冷蔵庫: BMS-500F3, 日本フリーザー株式会社]・遮光・気密 7 日間とその後, 室温 [設定温度: 23°C (実測値: 23.4–23.7°C)]・遮光・気密で 6 時間まで問題がないことが確認されている<sup>1)</sup>。

なお, 調製は用時に行い, 速やかに使用した。

#### 17.2.2. 陽性対照物質

##### 17.2.2.1. 調製方法

試験の際に, ポジコン AM マルチセットを融解して使用した。

以下に各菌株に対する陽性対照物質名, 濃度及び試験濃度を示した。

	菌株名	物質名	濃度 (µg/mL)	試験濃度 (µg/plate)
S9 mix (+)	TA100	2AA	10	1
	TA1535	2AA	20	2
	WP2 <i>uvrA</i>	2AA	100	10
	TA98	2AA	5	0.5
	TA1537	2AA	20	2
S9 mix (-)	TA100	AF-2	0.1	0.01
	TA1535	NaN <sub>3</sub>	5	0.5
	WP2 <i>uvrA</i>	AF-2	0.1	0.01
	TA98	AF-2	1	0.1
	TA1537	9AA	800	80



### 17.2.3. 残余検体液の取り扱い

残余検体液は、使用後に廃棄した。

## 17.3. 試験系

### 17.3.1. 試験菌株

試験菌株は、「新規化学物質等に係る試験の方法について」に従い、*S. typhimurium* の TA100, TA98, TA1535 及び TA1537 並びに *E. coli* の WP2*uvrA* を使用した。TA100 及び TA98 は 1996 年 10 月 18 日に、TA1535, TA1537 及び WP2*uvrA* は 1995 年 2 月 25 日に、いずれも中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センターから入手した。

菌株の特性として「安衛法における変異原性試験-テストガイドラインとGLP-」<sup>2)</sup>に従い、アミノ酸要求性、紫外線感受性、膜変異*rfa*特性及び薬剤耐性因子R-factorプラスミドの有無を検査し (TA100 及びTA98 の検査日: 2009 年 7 月 28 日-7 月 30 日, TA1535, TA1537 及びWP2*uvrA*の検査日: 2010 年 8 月 25 日-8 月 27 日), 試験施設の基準に適合しているコロニーを選択した (Attachment 1).

菌株は、特性検査の結果から選択したコロニーを培養し、その菌懸濁液 0.8 mL に対して DMSO を 0.07 mL の割合で加えたものを、チューブ (2 mL 容セラムチューブ, 住友ベークライト株式会社) に 200  $\mu$ L ずつ分注し、-80°C 設定の超低温フリーザー (ULT-1386-5A, Kendro Laboratory Products) 内に凍結保管した (TA100 及び TA98 の分注日: 2009 年 8 月 19 日, TA1535, TA1537 及び WP2*uvrA* の分注日: 2010 年 9 月 15 日, 使用期限: 分注後 2 年以内)。菌株の前培養には、ニュートリエントブロス(OXOID NUTRIENT BROTH No.2, Lot No.: 503274, OXOID LTD.) 2.0 g に注射用水 80 mL の割合で加えて高圧蒸気滅菌 (121 °C, 15 分) したニュートリエントブロス培養液を使用した。乾熱滅菌したモルトン栓付の L 字管 (容量: 約 40 mL) にニュートリエントブロス培養液を 10 mL 入れ、分注凍結菌液を融解してその 20  $\mu$ L を接種した。これを 37°C 設定の往復振盪型式 (振盪数: 用量設定試験及び本試験とも 90 回/分) の振盪培養器 (MM-10, タイテック株式会社) を用いて、9 時間培養した。

培養終了後、菌懸濁液の濁度を分光光度計 (Novaspec II, GE ヘルスケア・ジャパン株式会社) を用いて測定し、その O.D.値から生菌数を求めた。また、菌懸濁液は使用時まで室温で保管した。用量設定試験及び本試験における各菌株の生菌数を以下に示した。

	生菌数 ( $\times 10^9$ cells/mL)				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
用量設定試験	3.6	3.9	5.2	3.0	1.8
本試験	3.6	3.8	5.1	2.9	1.8

なお、実験操作は空調管理された Ames 試験室 (G 棟) にて行った。

## 18. S9 mix

S9 [Lot No.: 10081305, オリエンタル酵母工業株式会社] は、フェノバルビタール及び5,6-ベンゾフラボンを投与した7週齢の雄ラット[CrI:CD (SD)] 37匹 (体重:  $210.1 \pm 10.2$  g) の肝臓から製造 [製造日: 2010年8月13日, 有効期限: 2011年2月12日 (当試験施設の基準: 製造後6ヵ月)] されたものを使用した。S9 は、2010年9月2日に購入し、 $-80^{\circ}\text{C}$  設定の超低温フリーザー (ULT-1386-5A, Kendro Laboratory Products) 内に凍結保管した。

S9 mix は、S9 mix 用の Cofactor (商品名: Cofactor- I, Lot No.: 999002, オリエンタル酵母工業株式会社) 1本につき注射用水を9 mL 加えて溶解した後、メンブランフィルター ( $\phi 0.2 \mu\text{m}$ , NALGENE<sup>®</sup>) で濾過し、使用直前に S9 を1 mL 加えて調製した。S9 mix の組成を以下に示した。

成分	S9 mix 1 mL中の量	成分	S9 mix 1 mL中の量
S9	0.1 mL	NADPH	4 $\mu\text{mol}$
MgCl <sub>2</sub>	8 $\mu\text{mol}$	NADH	4 $\mu\text{mol}$
KCl	33 $\mu\text{mol}$	Na-phosphate buffer (pH 7.4)	100 $\mu\text{mol}$
Glucose-6-phosphate	5 $\mu\text{mol}$	Distilled water	0.9 mL

## 19. 培地

最少グルコース寒天平板培地は、テスメディア AN 培地 (Lot No.: ANI410FZ, 製造日: 2010年6月10日, オリエンタル酵母工業株式会社) を使用した。テスメディア AN 培地の組成を Attachment 2 に示した。

トッブアガーは、注射用水に Bacto Agar (Lot No.: 9265367, DIFCO) が0.6%, 塩化ナトリウムが0.5%の割合になるように加えて高圧蒸気滅菌 ( $121^{\circ}\text{C}$ , 20分) した。この水溶液に *S. typhimurium* の場合には0.5 mmol/L L-ヒスチジンと0.5 mmol/L D-ビオチンを混合した水溶液を、*E. coli* の場合には0.5 mmol/L L-トリプトファン水溶液を、それぞれ容量比 10: 1 の割合で加えて調製した。

## 20. 無菌試験

被験物質の最高濃度液及び S9 mix の無菌試験は、用量設定試験及び本試験実施の際に、それぞれ2枚のプレートを用いて実施した。

試験は、被験物質の最高濃度液0.1 mL 又は S9 mix 0.5 mL に、 $45^{\circ}\text{C}$  に保温したトッブアガー2 mL を加えて最少グルコース寒天平板培地上にまき広げ、プレートを転倒して  $37^{\circ}\text{C}$  設定の低温恒温器 (IN802, ヤマト科学株式会社) 内で約48時間培養した後、コロニーの出現を調べた。被験物質の最高濃度液の無菌試験には、用量設定試験及び本試験とも50 mg/mL 濃度液を用いた。

無菌試験の結果、用量設定試験及び本試験とも被験物質の最高濃度液及び S9 mix に雑菌の混入は認められなかった。

## 21. 試験方法

### 21.1. 試験操作

試験は、プレインキュベーション法により、代謝活性化によらない場合 (S9 mix 無添加) と代謝活性化による場合 (S9 mix 添加) で行った。すなわち、乾熱滅菌した試験管 (15.5 × 100 mm, 清浄試験管ラルボ, テルモ株式会社) に、① 検体液 0.1 mL, ② 高圧蒸気滅菌した 0.1 mol/L Na-リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL (代謝活性化によらない場合) 又は S9 mix 0.5 mL (代謝活性化による場合), ③ 菌懸濁液 0.1 mL の順に加え、往復振盪型式の振盪培養器を用いて 37°C で 20 分間インキュベーションした。その後、45°C に保温したトップアガーを 2 mL 加えて混合した後、最少グルコース寒天平板培地上にまき広げ、プレートを転倒して 37°C 設定の低温恒温器内で約 48 時間培養した。

培養終了後、プレート上での析出物の有無を肉眼で観察した後、復帰変異コロニー数を、コロニーアナライザー (CA-11D, システムサイエンス株式会社) により計測した。計測後、菌の生育阻害の有無を 100 倍の実体顕微鏡下で観察した。なお、プレート上での析出物の有無は、培養開始時にも肉眼で観察した。

プレートは、菌株、代謝活性化の有無及び濃度の組み合わせごとに 3 枚使用した。また、試験管及びプレートは、菌株ごとに油性インクで色分けすることで識別した。

### 21.2. 用量設定試験

用量設定試験の試験濃度は、「新規化学物質等に係る試験の方法について」に基づき、S9 mix 無添加及び S9 mix 添加とも、いずれの菌株も 5000 µg/plate を最高濃度として、以下 1500, 500, 150, 50, 15 及び 5 µg/plate の計 7 濃度を設定した。対照として、全菌株に対し陰性対照及び陽性対照を設けた。

### 21.3. 本試験

用量設定試験の結果、S9 mix 無添加及び S9 mix 添加とも、TA100, TA1535, WP2*uvrA* 及び TA98 において、復帰変異コロニー数が陰性対照の 2 倍以上に増加した。このことから、本試験の試験濃度は、TA100, TA1535, WP2*uvrA* 及び TA98 では、用量反応性が求められるように公比 2 により 5–10 濃度を設定した。TA1537 では S9 mix 無添加及び S9 mix 添加に関わらず、菌の生育阻害及び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、用量設定試験と同様に 5000 µg/plate を最高濃度として、以下公比 2 で 5 濃度を設定した。すなわち、S9 mix 無添加の TA100 及び TA1535 では 9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156.3, 312.5, 625, 1250, 2500 及び 5000 µg/plate, WP2*uvrA* では 78.1, 156.3, 312.5, 625, 1250, 2500 及び 5000 µg/plate, TA98 及び TA1537 では 312.5, 625, 1250, 2500 及び 5000 µg/plate とした。S9 mix 添加の TA100 及び TA1535 では 39.1, 78.1, 156.3, 312.5, 625, 1250, 2500 及び 5000 µg/plate, WP2*uvrA* では 78.1, 156.3, 312.5, 625, 1250, 2500 及び 5000 µg/plate, TA98 及び TA1537 では 312.5, 625, 1250, 2500 及び 5000 µg/plate とした。対照として、全菌株に対し陰性対照及び陽性対照を設けた。

## 22. 試験の成立条件

無菌試験で被験物質の最高濃度液及び S9 mix に雑菌の混入がなく、復帰変異コロニー数が陰性対照では試験施設のバックグラウンドデータ (Attachment 3) の平均 $\pm$ 2 S.D.の範囲内にあり、陽性対照では陰性対照の2倍以上に増加し、また、用量設定試験と本試験との間に再現性が認められ、さらに試験系に影響した他の要因がない場合に試験成立とした。

## 23. 統計学的方法

復帰変異コロニー数は、濃度ごとに平均値及び標準偏差を算出した。なお、下記の判定基準に従ったため、有意差検定は実施しなかった。

## 24. 判定基準

試験の結果は、被験物質を処理したプレートにおける復帰変異コロニー数が陰性対照の2倍以上の値を示し、更に濃度に依存して増加した場合を陽性とした。

また、陽性と判定したことから、菌の生育阻害が認められない濃度について、次式により比活性を算出した。

$$\text{比活性} = \frac{\text{(当該試験濃度におけるプレート当りの復帰変異コロニー数)} - \text{(陰性対照におけるプレート当りの復帰変異コロニー数)}}{\text{当該濃度値 (mg/プレート)}}$$

## 25. 試験結果

### 25.1. 用量設定試験 (Table1-1, 1-2, 3 及び Figure 2-1, 2-2)

#### 25.1.1. プレート上の析出物

S9 mix 無添加及び S9 mix 添加とも、培養開始時及び培養終了時の析出物は認められなかった。

#### 25.1.2. 菌の生育阻害

S9 mix 無添加及び S9 mix 添加とも、WP2*uvrA* の 5000 µg/plate において菌の生育阻害が認められた。TA100, TA1535, TA98 及び TA1537 では菌の生育阻害は認められなかった。

#### 25.1.3. 復帰変異コロニー数

S9 mix 無添加及び S9 mix 添加とも、TA100, TA1535, WP2*uvrA* 及び TA98 において、復帰変異コロニー数が陰性対照の 2 倍以上の値を示し、更に濃度に依存して増加した。

#### 25.1.4. 比活性値

S9 mix 無添加及び S9 mix 添加とも、TA100, TA1535, WP2*uvrA* 及び TA98 において、復帰変異コロニー数が陰性対照の 2 倍以上の値を示したことから、比活性値を算出した。その結果、用量設定試験における最大比活性値は、1480.0 (S9 mix 無添加: TA100, 150 µg/plate) であった。

#### 25.1.5. 対照物質

陽性対照では、復帰変異コロニー数が陰性対照の 2 倍以上に増加し、陰性対照では、試験施設のバックグラウンドデータの平均±2 S.D.の範囲内にあった。

### 25.2. 本試験 (Table2-1, 2-2, 3 及び Figure 3-1, 3-2)

#### 25.2.1. プレート上の析出物

S9 mix 無添加及び S9 mix 添加とも、培養開始時及び培養終了時の析出物は認められなかった。

#### 25.2.2. 菌の生育阻害

WP2*uvrA* の S9 mix 無添加では 2500 及び 5000 µg/plate において、S9 mix 添加では 5000 µg/plate において菌の生育阻害が認められた。TA100, TA1535, TA98 及び TA1537 では菌の生育阻害は認められなかった。

#### 25.2.3. 復帰変異コロニー数

S9 mix 無添加及び S9 mix 添加とも、TA100, TA1535 及び TA98 において、復帰変異コロニー数が陰性対照の 2 倍以上の値を示し、更に濃度に依存して増加した。また、S9 mix 無添加の TA1537, S9 mix 添加の WP2*uvrA* においても 2 倍以上の値を示した。

#### 25.2.4. 比活性値

S9 mix 無添加及び S9 mix 添加とも、TA100, TA1535 及び TA98 において、また、S9 mix 無添加の TA1537, S9 mix 添加の WP2*uvrA* において復帰変異コロニー数が陰性対照の 2 倍以上の値を示したことから、比活性値を算出した。その結果、本試験における最大比活性値は、2151.1 (S9 mix 無添加: TA100, 78.1 µg/plate) であった。

#### 25.2.5. 対照物質

陽性対照では、復帰変異コロニー数が陰性対照の 2 倍以上に増加し、陰性対照では、試験施設のバックグラウンドデータの平均±2 S.D.の範囲内にあった。

### 26. 考 察

2, 2'-[1, 2-エタンジイルビス (オキシメチレン)] ビス (オキシラン) の遺伝子突然変異誘発性の有無を、細菌を用いる復帰突然変異試験により検討した。

2, 2'-[1, 2-エタンジイルビス (オキシメチレン)] ビス (オキシラン) は、S9 mix 添加の TA1537 を除くいずれの菌株とも、復帰変異コロニー数が濃度に依存して増加し、用量設定試験の S9 mix 無添加の TA1537, 本試験の S9 mix 無添加の WP2*uvrA* では陰性対照の 2 倍までの増加は認められなかったが、その他は、陰性対照の 2 倍以上に増加した。

復帰変異コロニー数の増加が認められた菌株について、比活性値を算出したところ、2, 2'-[1, 2-エタンジイルビス (オキシメチレン)] ビス (オキシラン) の最大比活性値は、2151.1 [本試験 (S9 mix 無添加): TA100, 78.1 µg/plate] であった。

無菌試験では、被験物質の最高濃度液及び S9 mix に雑菌の混入は認められなかった。

陽性対照では、復帰変異コロニー数が陰性対照の 2 倍以上に増加し、陰性対照では、試験施設のバックグラウンドデータの平均±2 S.D.の範囲内にあった。

用量設定試験及び本試験には再現性が認められた。

以上の結果、当試験の条件下において、2, 2'-[1, 2-エタンジイルビス (オキシメチレン)] ビス (オキシラン) は遺伝子突然変異誘発性を有する (陽性) と判定する。

### 27. 文 献

- 1) 2, 2'-[1, 2-エタンジイルビス (オキシメチレン)] ビス (オキシラン) の媒体中での安定性確認試験 (試験番号: 091930), 株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所; 2010.
- 2) 労働省安全衛生部化学物質調査課 (編): 安衛法における変異原性試験—テストガイドラインと GLP—, 中央労働災害防止協会, 平成 3 年 3 月

Table 1-1. Reverse mutation test of 2,2'-[1,2-ethanediylbis(oxymethylene)]bis-oxirane with bacteria (dose-finding test)

S9 mix		Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertant colonies/plate				
			Base-pair substitution type			Frameshift type	
			TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9 mix (-)	Negative control	0	109	10	18	22	10
			110	11	27	28	12
			115 ( 111 $\pm$ 3.2 )	12 ( 11 $\pm$ 1.0 )	40 ( 28 $\pm$ 11.1 )	30 ( 27 $\pm$ 4.2 )	15 ( 12 $\pm$ 2.5 )
	2,2'-[1,2'-ethanediylbis(oxymethylene)]bis-oxirane	5	111	12	27	22	7
			129	12	30	29	12
			140 ( 127 $\pm$ 14.6 )	17 ( 14 $\pm$ 2.9 )	30 ( 29 $\pm$ 1.7 )	38 ( 30 $\pm$ 8.0 )	19 ( 13 $\pm$ 6.0 )
		15	127	13	26	25	4
			137	13	33	26	11
			145 ( 136 $\pm$ 9.0 )	18 ( 15 $\pm$ 2.9 )	40 ( 33 $\pm$ 7.0 )	39 ( 30 $\pm$ 7.8 )	12 ( 9 $\pm$ 4.4 )
		50	199	25	30	33	7
			211	26	47	34	8
	224 ( 211 $\pm$ 12.5 )		34 ( 28 $\pm$ 4.9 )	47 ( 41 $\pm$ 9.8 )	41 ( 36 $\pm$ 4.4 )	11 ( 9 $\pm$ 2.1 )	
	150	325	40	45	28	4	
		333	72	58	31	7	
		340 ( 333 $\pm$ 7.5 )	78 ( 63 $\pm$ 20.4 )	60 ( 54 $\pm$ 8.1 )	40 ( 33 $\pm$ 6.2 )	13 ( 8 $\pm$ 4.6 )	
500	745	190	48	39	11		
	758	199	63	44	15		
	787 ( 763 $\pm$ 21.5 )	202 ( 197 $\pm$ 6.2 )	72 ( 61 $\pm$ 12.1 )	45 ( 43 $\pm$ 3.2 )	15 ( 14 $\pm$ 2.3 )		
1500	1468	365	70	60	14		
	1522	383	79	65	14		
	1531 ( 1507 $\pm$ 34.1 )	415 ( 388 $\pm$ 25.3 )	87 ( 79 $\pm$ 8.5 )	88 ( 71 $\pm$ 14.9 )	16 ( 15 $\pm$ 1.2 )		
5000	1834	469	29 *	95	15		
	1869	496	29 *	99	23		
	1888 ( 1864 $\pm$ 27.4 )	540 ( 502 $\pm$ 35.8 )	35 * ( 31 $\pm$ 3.5 )	101 ( 98 $\pm$ 3.1 )	25 ( 21 $\pm$ 5.3 )		
Positive control	Name	AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2	9AA	
	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
	Number of revertant colonies/plate	386	562	100	402	271	
		390	581	101	421	285	
		521 ( 432 $\pm$ 76.8 )	622 ( 588 $\pm$ 30.7 )	123 ( 108 $\pm$ 13.0 )	423 ( 415 $\pm$ 11.6 )	321 ( 292 $\pm$ 25.8 )	

Negative control : Distilled water.

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; NaN<sub>3</sub> : Sodium azide; 9AA : 9-Aminoacridine hydrochloride.

( ): Mean  $\pm$  S.D.

\*: Bacterial growth inhibition was observed.

No precipitates were noted at any concentration on the surface of agar plate at the start and on completion of incubation.

Table 1-2. Reverse mutation test of 2,2'-[1,2-ethanediylbis(oxymethylene)]bis-oxirane with bacteria (dose-finding test)

S9 mix		Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertant colonies/plate				
			Base-pair substitution type			Frameshift type	
			TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9 mix (+)	Negative control	0	100	10	20	23	15
			127	10	34	27	18
			147 ( 125 $\pm$ 23.6 )	14 ( 11 $\pm$ 2.3 )	38 ( 31 $\pm$ 9.5 )	33 ( 28 $\pm$ 5.0 )	22 ( 18 $\pm$ 3.5 )
	2,2'-[1,2'-ethanediylbis(oxymethylene)]bis-oxirane	5	133	6	26	20	12
			133	7	32	24	14
			133 ( 133 $\pm$ 0.0 )	10 ( 8 $\pm$ 2.1 )	35 ( 31 $\pm$ 4.6 )	32 ( 25 $\pm$ 6.1 )	17 ( 14 $\pm$ 2.5 )
		15	123	7	30	25	11
			139	15	33	28	12
			139 ( 134 $\pm$ 9.2 )	16 ( 13 $\pm$ 4.9 )	51 ( 38 $\pm$ 11.4 )	44 ( 32 $\pm$ 10.2 )	17 ( 13 $\pm$ 3.2 )
		50	164	17	24	32	8
			170	20	31	38	18
	171 ( 168 $\pm$ 3.8 )		21 ( 19 $\pm$ 2.1 )	39 ( 31 $\pm$ 7.5 )	39 ( 36 $\pm$ 3.8 )	20 ( 15 $\pm$ 6.4 )	
	150	203	41	41	32	14	
		218	41	42	34	14	
		234 ( 218 $\pm$ 15.5 )	46 ( 43 $\pm$ 2.9 )	54 ( 46 $\pm$ 7.2 )	35 ( 34 $\pm$ 1.5 )	17 ( 15 $\pm$ 1.7 )	
500	505	148	82	37	17		
	528	158	89	39	19		
	544 ( 526 $\pm$ 19.6 )	175 ( 160 $\pm$ 13.7 )	98 ( 90 $\pm$ 8.0 )	45 ( 40 $\pm$ 4.2 )	21 ( 19 $\pm$ 2.0 )		
1500	1306	357	117	61	18		
	1315	358	129	76	20		
	1331 ( 1317 $\pm$ 12.7 )	359 ( 358 $\pm$ 1.0 )	129 ( 125 $\pm$ 6.9 )	77 ( 71 $\pm$ 9.0 )	21 ( 20 $\pm$ 1.5 )		
5000	1675	495	30 *	99	26		
	1737	507	30 *	104	32		
	1752 ( 1721 $\pm$ 40.8 )	541 ( 514 $\pm$ 23.9 )	33 * ( 31 $\pm$ 1.7 )	116 ( 106 $\pm$ 8.7 )	33 ( 30 $\pm$ 3.8 )		
Positive control	Name	2AA					
	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1	2	10	0.5	2	
	Number of revertant colonies/plate	1022 1031 1092 ( 1048 $\pm$ 38.1 )	307 357 376 ( 347 $\pm$ 35.6 )	951 1009 1025 ( 995 $\pm$ 38.9 )	318 372 442 ( 377 $\pm$ 62.2 )	222 238 268 ( 243 $\pm$ 23.4 )	

Negative control : Distilled water.

2AA : 2-Aminoanthracene.

( ): Mean  $\pm$  S.D.

\*: Bacterial growth inhibition was observed.

No precipitates were noted at any concentration on the surface of agar plate at the start and on completion of incubation.



Table 2-1. Reverse mutation test of 2,2'-[1,2-ethanediylbis(oxymethylene)]bis-oxirane with bacteria (mutagenicity test)

S9 mix		Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertant colonies/plate					
			Base-pair substitution type			Frameshift type		
			TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537	
S9 mix (-)	Negative control	0	129 154 160 ( 148 $\pm$ 16.4 )	7 10 10 ( 9 $\pm$ 1.7 )	36 37 39 ( 37 $\pm$ 1.5 )	20 25 30 ( 25 $\pm$ 5.0 )	9 16 17 ( 14 $\pm$ 4.4 )	
	2,2'-[1,2'-ethanediylbis(oxymethylene)]bis-oxirane	9.77	133 176 211 ( 173 $\pm$ 39.1 )	7 10 13 ( 10 $\pm$ 3.0 )	/	/	/	/
		19.5	156 198 206 ( 187 $\pm$ 26.9 )	10 17 19 ( 15 $\pm$ 4.7 )	/	/	/	/
		39.1	204 226 238 ( 223 $\pm$ 17.2 )	24 25 29 ( 26 $\pm$ 2.6 )	/	/	/	/
		78.1	301 307 340 ( 316 $\pm$ 21.0 )	27 38 38 ( 34 $\pm$ 6.4 )	25 38 53 ( 39 $\pm$ 14.0 )	/	/	/
		156.3	416 422 461 ( 433 $\pm$ 24.4 )	71 79 93 ( 81 $\pm$ 11.1 )	48 50 64 ( 54 $\pm$ 8.7 )	/	/	/
		312.5	615 636 662 ( 638 $\pm$ 23.5 )	102 103 129 ( 111 $\pm$ 15.3 )	63 64 70 ( 66 $\pm$ 3.8 )	38 41 52 ( 44 $\pm$ 7.4 )	11 12 17 ( 13 $\pm$ 3.2 )	
		625	1039 1046 1080 ( 1055 $\pm$ 21.9 )	218 230 232 ( 227 $\pm$ 7.6 )	65 70 70 ( 68 $\pm$ 2.9 )	42 55 70 ( 56 $\pm$ 14.0 )	11 12 15 ( 13 $\pm$ 2.1 )	
		1250	1497 1567 1642 ( 1569 $\pm$ 72.5 )	332 348 369 ( 350 $\pm$ 18.6 )	61 61 64 ( 62 $\pm$ 1.7 )	54 59 67 ( 60 $\pm$ 6.6 )	11 12 13 ( 12 $\pm$ 1.0 )	
		2500	1606 1678 1690 ( 1658 $\pm$ 45.4 )	349 456 490 ( 432 $\pm$ 73.6 )	29 * 33 * 34 * ( 32 $\pm$ 2.6 )	85 92 95 ( 91 $\pm$ 5.1 )	16 20 23 ( 20 $\pm$ 3.5 )	
		5000	2076 2093 2097 ( 2089 $\pm$ 11.2 )	378 444 455 ( 426 $\pm$ 41.6 )	20 * 22 * 29 * ( 24 $\pm$ 4.7 )	113 120 120 ( 118 $\pm$ 4.0 )	26 29 32 ( 29 $\pm$ 3.0 )	
	Positive control	Name	AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2	9AA	
		Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
		Number of revertant colonies/plate	513 577 589 ( 560 $\pm$ 40.9 )	457 495 508 ( 487 $\pm$ 26.5 )	99 102 115 ( 105 $\pm$ 8.5 )	451 475 516 ( 481 $\pm$ 32.9 )	315 394 439 ( 383 $\pm$ 62.8 )	

Negative control : Distilled water.

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; NaN<sub>3</sub> : Sodium azide; 9AA : 9-Aminoacridine hydrochloride.

( ) : Mean  $\pm$  S.D.

\*: Bacterial growth inhibition was observed.

No precipitates were noted at any concentration on the surface of agar plate at the start and on completion of incubation.

Table 2-2. Reverse mutation test of 2,2'-[1,2-ethanediylbis(oxyethylene)]bis-oxirane with bacteria (mutagenicity test)

S9 mix		Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertant colonies/plate					
			Base-pair substitution type			Frameshift type		
			TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
S9 mix (+)	Negative control	0	120 137 161 ( 139 $\pm$ 20.6 )	8 10 18 ( 12 $\pm$ 5.3 )	20 21 37 ( 26 $\pm$ 9.5 )	27 29 34 ( 30 $\pm$ 3.6 )	10 17 19 ( 15 $\pm$ 4.7 )	
	2,2'-[1,2'-ethanediylbis(oxyethylene)]bis-oxirane	39.1	164 167 172 ( 168 $\pm$ 4.0 )	10 14 15 ( 13 $\pm$ 2.6 )	/	/	/	/
		78.1	167 197 209 ( 191 $\pm$ 21.6 )	28 33 34 ( 32 $\pm$ 3.2 )	34 39 44 ( 39 $\pm$ 5.0 )	/	/	/
		156.3	230 241 263 ( 245 $\pm$ 16.8 )	41 42 54 ( 46 $\pm$ 7.2 )	45 49 51 ( 48 $\pm$ 3.1 )	/	/	/
		312.5	339 349 419 ( 369 $\pm$ 43.6 )	87 101 122 ( 103 $\pm$ 17.6 )	66 69 88 ( 74 $\pm$ 11.9 )	19 24 33 ( 25 $\pm$ 7.1 )	12 19 19 ( 17 $\pm$ 4.0 )	
		625	611 636 696 ( 648 $\pm$ 43.7 )	186 204 220 ( 203 $\pm$ 17.0 )	81 94 99 ( 91 $\pm$ 9.3 )	30 36 46 ( 37 $\pm$ 8.1 )	12 12 17 ( 14 $\pm$ 2.9 )	
		1250	1110 1121 1135 ( 1122 $\pm$ 12.5 )	366 370 370 ( 369 $\pm$ 2.3 )	111 120 127 ( 119 $\pm$ 8.0 )	57 59 65 ( 60 $\pm$ 4.2 )	17 18 26 ( 20 $\pm$ 4.9 )	
		2500	1692 1720 1830 ( 1747 $\pm$ 72.9 )	503 515 568 ( 529 $\pm$ 34.6 )	97 99 111 ( 102 $\pm$ 7.6 )	75 78 79 ( 77 $\pm$ 2.1 )	19 20 25 ( 21 $\pm$ 3.2 )	
		5000	1607 1619 2334 ( 1853 $\pm$ 416.3 )	427 455 514 ( 465 $\pm$ 44.4 )	29 * 30 * 35 * ( 31 $\pm$ 3.2 )	93 98 113 ( 101 $\pm$ 10.4 )	21 26 27 ( 25 $\pm$ 3.2 )	
		Positive control	Name	2AA				
	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )		1	2	10	0.5	2	
	Number of revertant colonies/plate		835 910 1126 ( 957 $\pm$ 151.1 )	306 346 350 ( 334 $\pm$ 24.3 )	955 1026 1035 ( 1005 $\pm$ 43.8 )	383 395 490 ( 423 $\pm$ 58.6 )	212 217 247 ( 225 $\pm$ 18.9 )	

Negative control : Distilled water.

2AA : 2-Aminoanthracene.

( ): Mean  $\pm$  S.D.

\*: Bacterial growth inhibition was observed.

No precipitates were noted at any concentration on the surface of agar plate at the start and on completion of incubation.

Table 3. Maximum potency of test strains

		Maximum potency of test strains (number of colonies/mg)									
		TA100		TA1535		WP2 <sub>uvrA</sub>		TA98		TA1537	
		Without S9 mix	With S9 mix	Without S9 mix	With S9 mix	Without S9 mix	With S9 mix	Without S9 mix	With S9 mix	Without S9 mix	With S9 mix
Dose-finding test	Dose (µg/plate)	150	500	500	500	500	500	1500	1500	– <sup>a)</sup>	–
	Maximum potency	1480.0	802.0	372.0	298.0	66.0	118.0	29.3	28.7	–	–
Mutagenicity test	Dose (µg/plate)	78.1	625	156.3	625	–	312.5	625	1250	5000	–
	Maximum potency	2151.1	814.4	460.7	305.6	–	153.6	49.6	24.0	3.0	–

a): Negative.

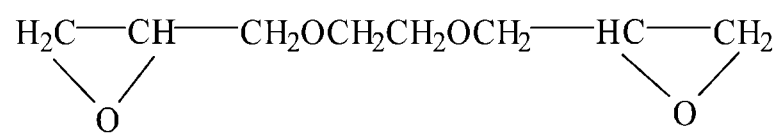


Figure 1. Chemical structure of 2, 2'-[1, 2-ethanediylbis (oxymethylene)] bis-oxirane.

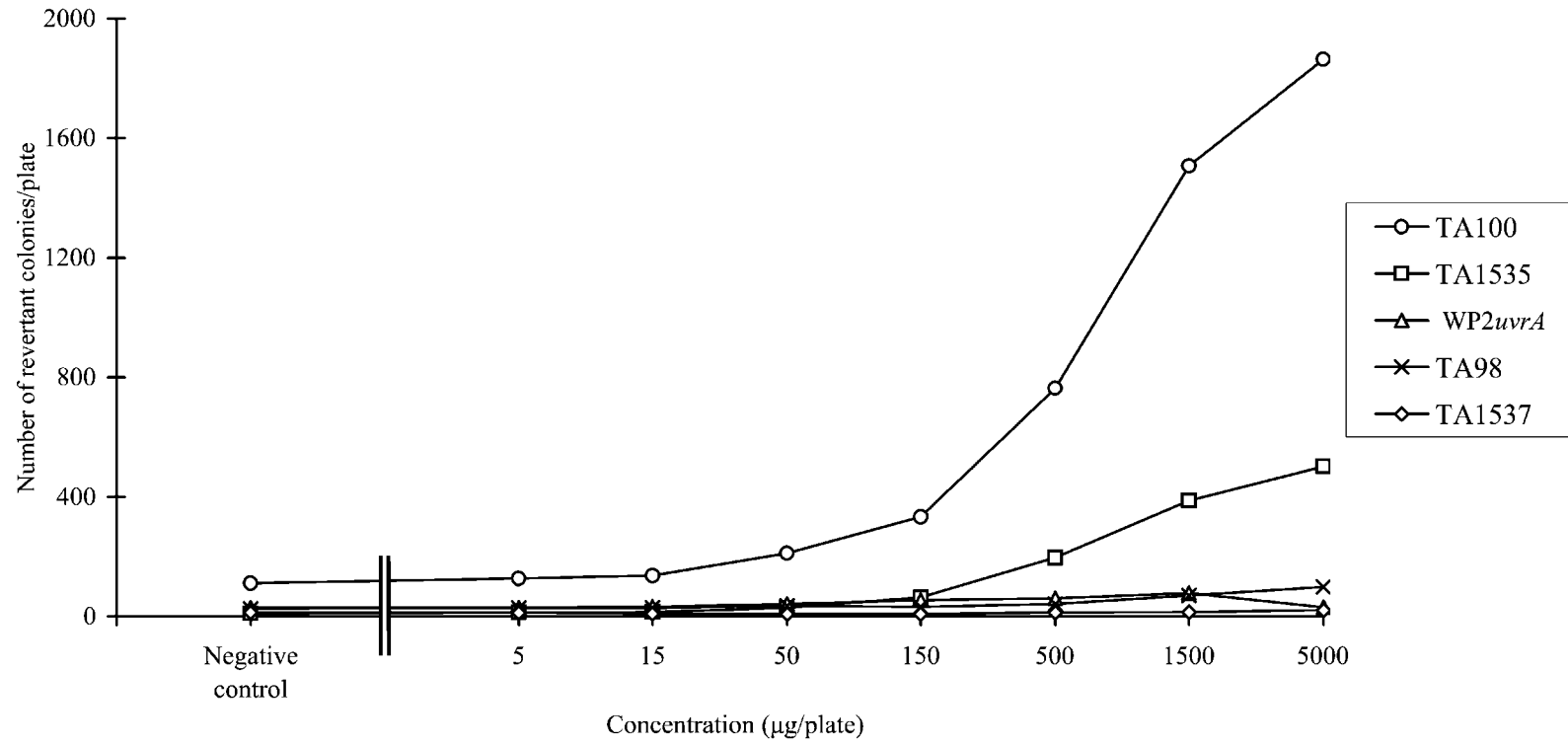


Figure 2-1. Reverse mutation test of 2,2'-[1,2-ethanediy]bis(oxymethylene)]bis-oxirane with bacteria. (dose- finding test: without S9 mix)

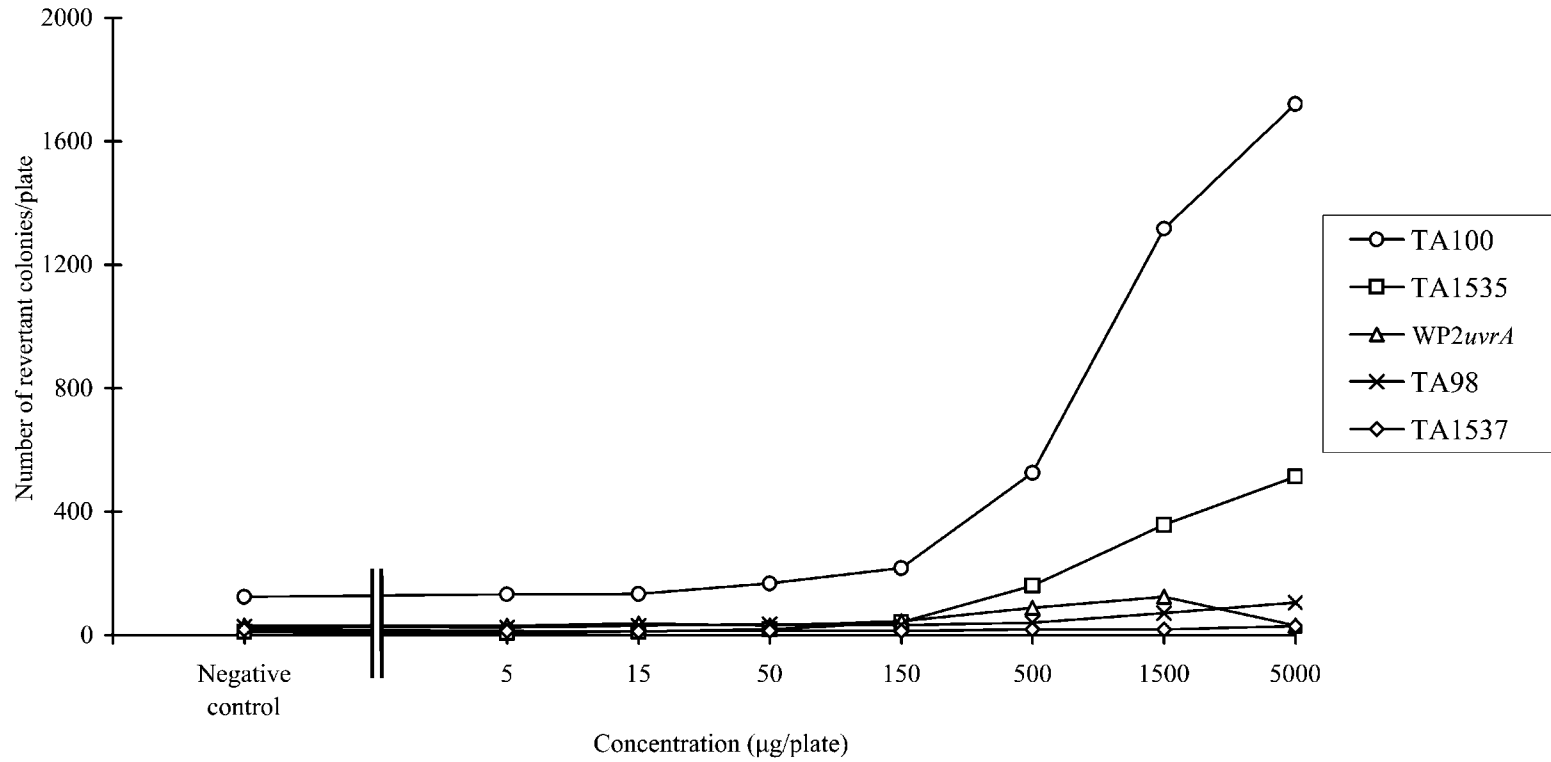


Figure 2-2. Reverse mutation test of 2,2'-[1,2-ethanediy]bis(oxymethylene)]bis-oxirane with bacteria. (dose- finding test: with S9 mix)

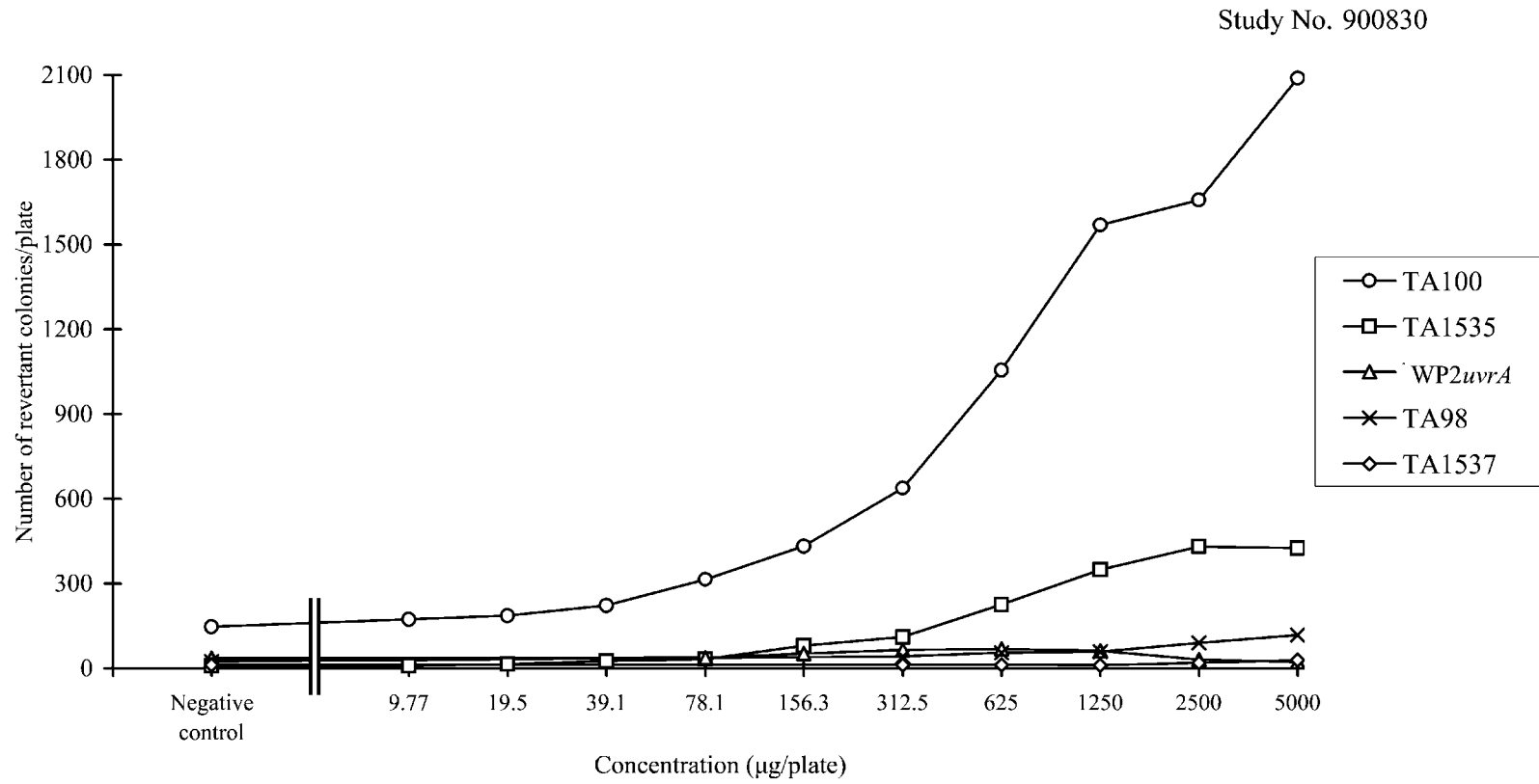


Figure 3-1. Reverse mutation test of 2,2'-[1,2-ethanediy]bis(oxymethylene)]bis-oxirane with bacteria.  
(mutagenicity test: without S9 mix)

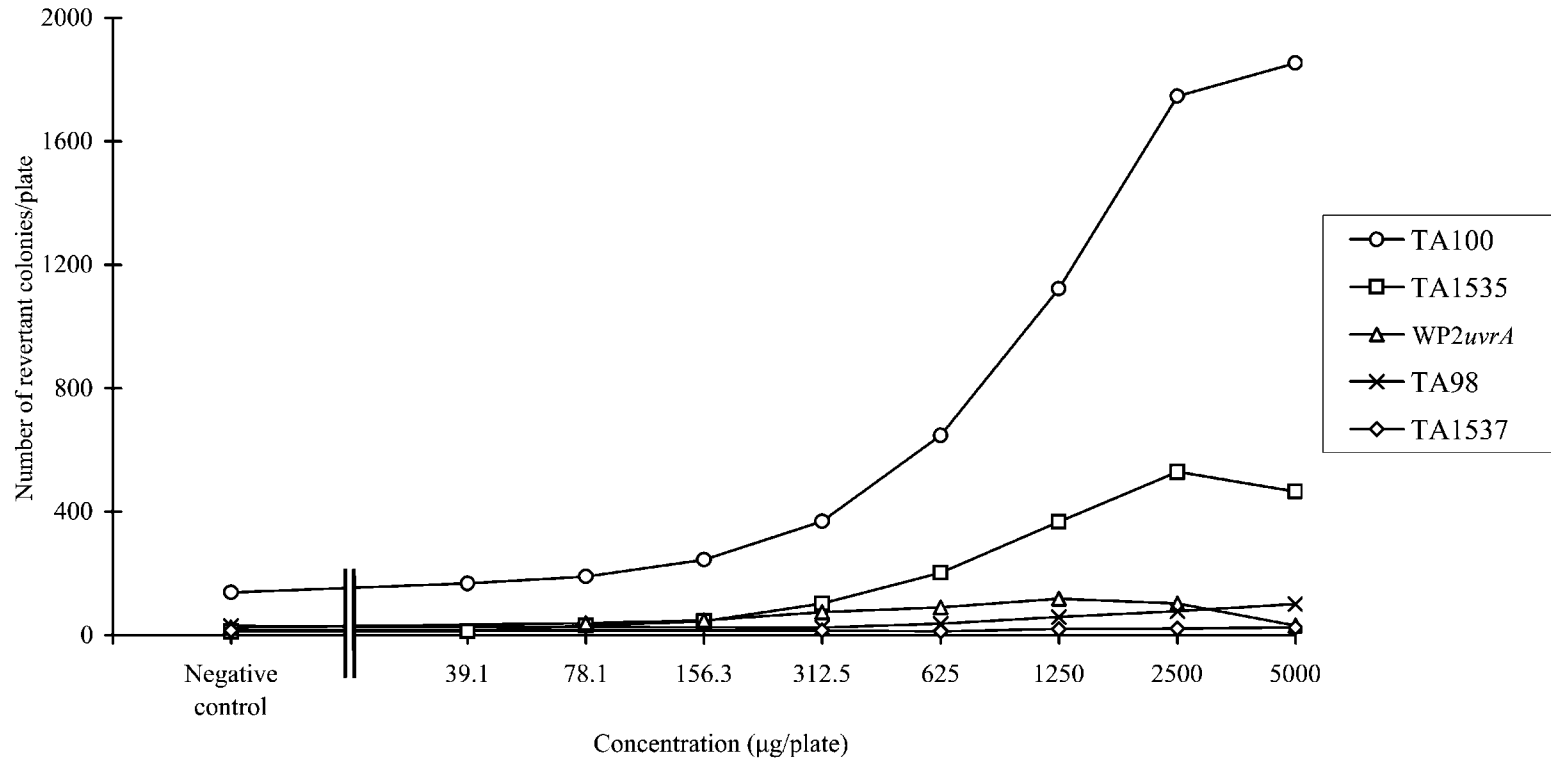


Figure 3-2. Reverse mutation test of 2,2'-[1,2-ethanediy]bis(oxymethylene)]bis-oxirane with bacteria. (mutagenicity test: with S9 mix)