2,2,4,4,6,8,8-ヘプタメチルノナンの細菌を用いる復帰変異試験

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

材料および試験方法 …… 3

試験結果および考察 …… 7

参　考　文　献 …… 9

表　　1～3

要　　約

2,2,4,4,6,8,8-ヘプタメチルノナン（以下、ＨＭＮと略）の変異原性の有無について、細菌を用いる復帰変異試験を実施することにより検討した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用い、直接試験および代謝活性化試験のいずれも、用量設定試験は 50～5000 μg/プレート の用量で、本試験は 312.5～5000 μg/プレート の用量で試験を行った。

その結果、２回の本試験とも、用いた５種類の検定菌について、いずれの用量でも復帰変異コロニー数の増加が認められなかったことから、2,2,4,4,6,8,8-ヘプタメチルノナンは、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わる毒性調査事業の一環として、日本が独自に選定した既存化学物質の１つである、2,2,4,4,6,8,8-ヘプタメチルノナンについて、細菌を用いる復帰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変異[(2)]を指標とした変異原の検出系である。

試験は、被験物質をそのまま検定菌に作用させる直接試験と、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素（S9 混液）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代謝活性化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化学品試験法ガイドライン：471，472 に準拠し、化学物質GLP（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。

材料および試験方法

〔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℃以下で凍結保存した。

試験に際して、0.5%塩化ナトリウム添加ニュートリエントブロス（Difco）を入れたＬ字型試験管に種菌を接種し、37℃、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〕

2,2,4,4,6,8,8-ヘプタメチルノナン（CAS No. 4390-04-9、以下ＨＭＮと略）は、分子量 226.45、比重 0.78、沸点 240℃、無色透明の液体である。純度 99.9%のもの（ロット番号：　　）を　　から供与された。被験物質は、使用時まで室温で遮光して保存した。

ＨＭＮは、アセトン（ロット番号：DSR 3251、和光純薬）を用いて 50 mg/mℓ になるように調製した後、同溶媒で更に公比２ないし３で希釈したものを、速やかに試験に用いた。

試験の開始に先立って、秦野研究所においてＨＭＮのアセトン溶液中での安定性試験を行った。安定性試験における溶媒は当研究所で実施される、培養細胞を用いる染色体異常試験と共通なことから、両試験における最高濃度（460 mg/mℓ）およ

び最低濃度（3 mg/mℓ）の2濃度について室温、遮光条件下で実施した。その結果、調製後3時間における各3サンプルの平均含量は、それぞれ初期値の平均（0時間）に対して、104%および 100%であった。これらの値は、当研究所の標準操作手順書の基準（初回の測定平均値の 90%以上）を満たしていた（Appendix 1）。

また、本試験に用いた調製検体について、含量測定試験を行った結果、50 mg/mℓ 溶液の含量は既定濃度に対し、101～102%、3.125 mg/mℓ 溶液については、97.8～99.9%であった。サンプル間のばらつきは平均値の2%以下であった。これらの値も、当研究所の標準操作手順書の基準（平均含量は添加量の 85%以上）を満たしていた（Appendix 2）。

以上の結果から、HMNはアセトン溶液中では安定であり、また調製液中の被験物質の含量は所定の値の範囲内にあることが確認された。

〔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。

AF-2：フリルフラマイド	(上野製薬㈱	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㈱	ﾛｯﾄ番号 TLN5556,	純度>90%)
9-AA：9-アミノアクリジン	(東京化成工業㈱	ﾛｯﾄ番号 AM 01,	純度>98%)
2-AA：2-アミノアントラセン	(和光純薬工業㈱	ﾛｯﾄ番号 EDE7881,	純度>90%)

AF-2, 9-AA, 2-AA は DMSO（和光純薬工業㈱　ﾛｯﾄ DSL5887 および ECJ7001）に、SA は蒸留水に溶解して試験に用いた。

〔培地および S9 混液の組成〕

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) ﾊﾞｸﾄ･ｱｶﾞｰ (Difco)	0.6%	(B)* L-ﾋｽﾁｼﾞﾝ	0.5 mM
塩化ﾅﾄﾘｳﾑ	0.5%	ﾋﾞｵﾁﾝ	0.5 mM

＊：WP2 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、日清製粉株式会社製の最少寒天培地（用量設定試験ではロット番号：DG050-GG、1991年7月9日製造、本試験ではロット番号：DJ060IG, 1991年9月3日製造）を用いた。なお、培地1ℓ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	0.2g	リン酸水素アンモニウムナトリウム・4水和物	3.5g
クエン酸・1水和物	2g	グルコース	20g
リン酸水素二カリウム	10g	バクト・アガー（Difco）	15g

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 混液（1mℓ中下記の成分を含む）

S9**	0.1 mℓ	NADH	4 μmole
塩化マグネシウム	8 μmole	NADPH	4 μmole
塩化カリウム	33 μmole	0.2M リン酸緩衝液 (pH 7.4)	0.5 mℓ
グルコース・6リン酸	5 μmole		

** ：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㈱、用量設定試験ではロット番号 RAA-254、1991年5月23日製造、本試験ではロット番号 RAA-258、1991年8月23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ある。

〔試 験 方 法〕

プレート法により直接試験および代謝活性化試験を行った。

小試験管中にトップアガー2mℓ、被験物質調製液 0.1 mℓ、リン酸緩衝液 0.5 mℓ（代謝活性化試験においては S9 混液 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アセトン、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表中に示した。培養は37℃で48時間行い、生じた復帰変異コロニー数を算定した。用いた平板は用量設定試験においては、陰性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、再現性の確認を行った。

〔判 定 基 準〕

被験物質を含有する平板上における復帰変異コロニー数が、陰性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。

試験結果および考察

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。

〔用量設定試験〕

結果を表１に示した。50～5000 μg/プレート の範囲で試験を実施したところ、WP2 の代謝活性化試験において 1500 μg/プレート 以上の用量で、弱い抗菌性が認められた。しかし、WP2 の直接試験および他の菌種では抗菌性が認められなかったことから、本試験における最高用量を、すべての菌種において 5000 μg/プレート とし、公比２で５用量を設定した。なお、直接試験では 1500 μg/プレート、代謝活性化試験では 500 μg/プレート 以上の用量で寒天表面に被験物質由来の沈澱物が認められた。

〔本試験〕

結果を表２、３に示した。ＨＭＮについて 312.5～5000 μg/プレート の範囲で試験を実施した。２回の試験を通して、用いた５種類の検定菌の直接試験、代謝活性化試験のいずれにおいても、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。また、すべての試験において抗菌性は認められなかった。なお、代謝活性化試験において、5000 μg/プレート の用量で寒天表面に被験物質由来の沈澱物が認められた。

ＨＭＮについて実施した試験において、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、陰性対照群とも、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、本試験に用いた各検定菌の感受性および各陽性対照物質の変異原活性についての安定性が確認された。

以上の結果に基づき、ＨＭＮ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。

参 考 文 献

(1) Maron, D. M. and Ames, B. N.: Mutation Research. 113: 173-215 (1983)

(2) Green, M. H.: in "Handbook of Mutagenicity Test Procedures." Kilby, B. J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C.(eds.)Elsevier Science Publisher, New York. (1984) pp.161-187.

表 1

用量設定試験結果表

被験物質：2,2,4,4,6,8,8-ヘプタメチルノナン

M-91-182

物質	検体濃度 (μg/プレート)	S9Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート 塩基対置換型 TA100	TA1535	WP2uvrA	フレームシフト型 TA98	TA1537
溶媒対照		-	162 146 133 (147 ± 14.5)	9 16 14 (13 ± 3.6)	16 17 11 (15 ± 3.2)	20 19 17 (19 ± 1.5)	16 10 7 (11 ± 4.6)
検体	50	-	132	12	11	19	7
	150	-	110	13	16	12	7
	500	-	102	17	9	22	4
	1500	-	84	17	7	15	4
	5000	-	110	14	7	25	10
溶媒対照		+	94 99 138 (110 ± 24.1)	9 10 10 (10 ± 0.6)	10 13 24 (16 ± 7.4)	27 35 34 (32 ± 4.4)	8 19 13 (13 ± 5.5)
検体	50	+	136	12	13	35	9
	150	+	110	13	13	30	11
	500	+	140	13	14	36	11
	1500	+	121	13	6*	25	9
	5000	+	100	6	5*	25	10
陽性対照 S9Mix を必要としないもの	名称		AF2	SA	AF2	AF2	9AA
	濃度 (μg/プレート)		0.01	0.5	0.01	0.1	80
	コロニー数/プレート		673 686 605 (655 ± 43.5)	188 245 223 (219 ± 28.7)	160 179 168 (169 ± 9.5)	745 784 757 (762 ± 20.0)	2796 2908 2903 (2869 ± 63.3)
陽性対照 S9Mix を必要とするもの	名称		2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
	濃度 (μg/プレート)		1	2	10	0.5	2
	コロニー数/プレート		808 787 812 (802 ± 13.4)	173 151 157 (160 ± 11.4)	626 633 629 (629 ± 3.5)	146 189 173 (169 ± 21.7)	177 184 161 (174 ± 11.8)

*：検定菌の生育阻害

表 2

復帰変異試験結果表 I

被験物質：2,2,4,4,6,8,8-ヘプタメチルノナン

M-91-182

物質	検体濃度 (μg/プレート)	S9Mix の有無	復帰変異 コロニー数/プレート 塩基対置換型 TA100	TA1535	WP2uvrA	フレームシフト型 TA98	TA1537
溶媒対照		-	169 125 157 (150 ± 22.7)	12 11 13 (12 ± 1.0)	17 10 13 (13 ± 3.5)	31 26 21 (26 ± 5.0)	13 9 9 (10 ± 2.3)
検体	312.5	-	133 140 130 (134 ± 5.1)	16 19 17 (17 ± 1.5)	16 15 16 (16 ± 0.6)	24 23 22 (23 ± 1.0)	15 7 11 (11 ± 4.0)
	625	-	138 128 132 (133 ± 5.0)	8 13 15 (12 ± 3.6)	11 13 9 (11 ± 2.0)	23 22 22 (22 ± 0.6)	10 8 6 (8 ± 2.0)
	1250	-	136 132 129 (132 ± 3.5)	13 15 10 (13 ± 2.5)	9 13 11 (11 ± 2.0)	30 24 15 (23 ± 7.5)	6 5 8 (6 ± 1.5)
	2500	-	104 137 128 (123 ± 17.1)	7 15 13 (12 ± 4.2)	10 18 9 (12 ± 4.9)	27 13 37 (26 ± 12.1)	9 5 3 (6 ± 3.1)
	5000	-	118 125 135 (126 ± 8.5)	11 10 11 (11 ± 0.6)	15 9 9 (11 ± 3.5)	16 19 21 (19 ± 2.5)	7 10 7 (8 ± 1.7)
溶媒対照		+	163 140 156 (153 ± 11.8)	16 10 9 (12 ± 3.8)	13 12 20 (15 ± 4.4)	33 31 24 (29 ± 4.7)	7 14 15 (12 ± 4.4)
検体	312.5	+	135 142 165 (147 ± 15.7)	18 12 15 (15 ± 3.0)	14 15 15 (15 ± 0.6)	28 22 23 (24 ± 3.2)	12 11 10 (11 ± 1.0)
	625	+	141 140 126 (136 ± 8.4)	10 12 7 (10 ± 2.5)	13 10 5 (9 ± 4.0)	25 26 22 (24 ± 2.1)	10 5 6 (7 ± 2.6)
	1250	+	140 135 122 (132 ± 9.3)	16 11 5 (11 ± 5.5)	15 12 12 (13 ± 1.7)	32 27 22 (27 ± 5.0)	5 5 3 (4 ± 1.2)
	2500	+	139 132 141 (137 ± 4.7)	11 8 11 (10 ± 1.7)	8 14 9 (10 ± 3.2)	20 24 26 (23 ± 3.1)	5 6 9 (7 ± 2.1)
	5000	+	133 124 118 (125 ± 7.5)	21 7 13 (14 ± 7.0)	13 11 10 (11 ± 1.5)	28 32 23 (28 ± 4.5)	7 8 7 (7 ± 0.6)
陽性対照 S9Mix を必要としないもの	名称		AF2 0.01	SA 0.5	AF2 0.01	AF2 0.1	9AA 80
	濃度 (μg/プレート)						
	コロニー数/プレート		534 575 503 (537 ± 36.1)	109 102 95 (102 ± 7.0)	137 131 141 (136 ± 5.0)	650 644 620 (638 ± 15.9)	1563 1951 1771 (1762 ± 194.2)
陽性対照 S9Mix を必要とするもの	名称		2AA 1	2AA 2	2AA 10	2AA 0.5	2AA 2
	濃度 (μg/プレート)						
	コロニー数/プレート		1139 1201 1038 (1126 ± 82.3)	214 211 218 (214 ± 3.5)	628 622 623 (624 ± 3.2)	521 552 588 (554 ± 33.5)	223 216 211 (217 ± 6.0)

表 3

復帰変異試験結果表 II

被験物質：2,2,4,4,6,8,8-ヘプタメチルノナン

M-91-182

物質	検体濃度 (μg/プレート)	S9Mix の有無	復帰変異 コロニー数/プレート 塩基対置換型 TA100	TA1535	WP2uvrA	フレームシフト型 TA98	TA1537
溶媒対照		-	166 147 164 (159 ± 10.4)	12 21 11 (15 ± 5.5)	20 27 28 (25 ± 4.4)	32 35 23 (30 ± 6.2)	6 8 11 (8 ± 2.5)
検体	312.5	-	142 167 150 (153 ± 12.8)	17 21 8 (15 ± 6.7)	23 29 24 (25 ± 3.2)	23 17 25 (22 ± 4.2)	12 8 6 (9 ± 3.1)
	625	-	127 141 136 (135 ± 7.1)	16 13 11 (13 ± 2.5)	27 13 25 (22 ± 7.6)	26 19 20 (22 ± 3.8)	7 3 7 (6 ± 2.3)
	1250	-	127 138 145 (137 ± 9.1)	11 17 19 (16 ± 4.2)	14 23 18 (18 ± 4.5)	32 20 21 (24 ± 6.7)	9 5 8 (7 ± 2.1)
	2500	-	119 145 134 (133 ± 13.1)	14 11 12 (12 ± 1.5)	10 5 5 (7 ± 2.9)	34 28 23 (28 ± 5.5)	8 11 9 (9 ± 1.5)
	5000	-	135 125 146 (135 ± 10.5)	12 11 10 (11 ± 1.0)	8 13 9 (10 ± 2.6)	33 18 21 (24 ± 7.9)	9 9 10 (9 ± 0.6)
溶媒対照		+	146 141 129 (139 ± 8.7)	11 17 9 (12 ± 4.2)	25 32 25 (27 ± 4.0)	30 36 30 (32 ± 3.5)	10 12 12 (11 ± 1.2)
検体	312.5	+	146 155 171 (157 ± 12.7)	22 17 15 (18 ± 3.6)	16 19 25 (20 ± 4.6)	34 30 35 (33 ± 2.6)	15 12 10 (12 ± 2.5)
	625	+	154 154 166 (158 ± 6.9)	14 14 12 (13 ± 1.2)	38 24 31 (31 ± 7.0)	36 33 40 (36 ± 3.5)	11 10 8 (10 ± 1.5)
	1250	+	162 151 162 (158 ± 6.4)	9 13 10 (11 ± 2.1)	24 16 14 (18 ± 5.3)	40 28 32 (33 ± 6.1)	12 11 9 (11 ± 1.5)
	2500	+	178 152 142 (157 ± 18.6)	10 19 13 (14 ± 4.6)	24 22 17 (21 ± 3.6)	32 38 38 (36 ± 3.5)	10 8 15 (11 ± 3.6)
	5000	+	154 146 139 (146 ± 7.5)	12 11 15 (13 ± 2.1)	31 26 22 (26 ± 4.5)	26 34 31 (30 ± 4.0)	14 8 6 (9 ± 4.2)
陽性対照 S9Mix を必要としないもの	名称		AF2 0.01	SA 0.5	AF2 0.01	AF2 0.1	9AA 80
	濃度 (μg/プレート)						
	コロニー数/プレート		719 708 671 (699 ± 25.1)	236 271 297 (268 ± 30.6)	121 126 140 (129 ± 9.8)	723 717 708 (716 ± 7.5)	2087 2139 2951 (2392 ± 484.5)
陽性対照 S9Mix を必要とするもの	名称		2AA 1	2AA 2	2AA 10	2AA 0.5	2AA 2
	濃度 (μg/プレート)						
	コロニー数/プレート		703 767 694 (721 ± 39.8)	221 213 214 (216 ± 4.4)	372 337 393 (367 ± 28.3)	311 335 284 (310 ± 25.5)	219 208 167 (198 ± 27.4)