



メトキシメタノールの
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
材料および試験方法	3
試験結果および考察	6
参 考 文 献	7
Tables 1～3	

【要 約】

メトキシメタノールの変異原性の有無について、細菌を用いる復帰突然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、用量設定試験は直接法および代謝活性化法のいずれも、1.5～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で、本試験は直接法および代謝活性化法のいずれも *Salmonella* 4 菌株では 19.53～625 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、*E. coli* では 39.06～2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で試験を実施した。

その結果、それぞれ2回実施した本試験において、用いた5種類の検定菌うち TA100, 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、再現性も認められたことから、メトキシメタノールは、用いた試験系において変異原性を有する（陽性）ものと判定された。

【結 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、メトキシメタノールについて、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法と、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法とからなっている。

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 *uvr* A
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 *uvr*A 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、ニュートリエントブロスNo.2 (OXOID, B-1674/1) を入れたL字型試験
管に種菌を接種し、37℃、11~12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〕

メトキシメタノール (CAS No. 4461-52-3、以下MOMと略) は、分子量62の無色透明の
液体である。純度 46.73%のもの (ロット番号：
)
を
から供与された。被験物質は、使用時まで密栓して冷所に保管した。

MOMは、アセトン (ロット番号：DSR 3251、和光純薬工業㈱) 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。なお、調製にあたって、純度および比重換算は行わなかった。

MOMの本試験に用いた調製検体は秦野研究所に於いて含量測定試験を行った。含量測
定試験は、原則として高濃度溶液および低濃度溶液各 3 サンプルについて実施するもので
あるが、化学分析条件の検討結果から、MOMについては、最高濃度 (25 mg/ml) および
測定可能な中濃度 (1.562 mg/ml) で行った。その結果、25 mg/ml 溶液の含量は、既定濃
度に対し、81.6~107% (平均 98.2%)、1.562 mg/ml 溶液は、69.9~85.9% (平
均 78.1%) であった (Appendix 1)。高濃度溶液については基準を満たしていたが、
中濃度溶液については基準を外れていた。また、各濃度の 3 サンプル間のばらつきも当研
究所の基準を外れていた。以上の結果が得られた原因として、被験物質が易揮発性の性質
をもつため、検体調製の希釈操作中およびサンプル採取操作中にその一部が揮発したため

と考えられる。

なお、MOMのアセトン溶液中での安定性試験については、サンプル間の測定値のばらつきが大きく、上記の操作法により安定性を確認することは困難と考え、実施しなかった。

[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(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%
9-AA : 9-アミノアクリジン	(Sigma Chem. Co.)	ロット番号 96F05641,	純度>98%
2-AA : 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%

AF-2, 2-AA は DMSO (和光純薬工業(株)) に溶解したものを-20℃で凍結保存し、用時解凍した。9-AA は DMSO に、SA は蒸留水に溶解して速やかに試験に用いた。

[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) バクアガー (Difco)	0.6%	(B) L-ヒスチジン	0.5 mM
塩化ナトリウム	0.5%	ビオチン	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 (用量設定試験においてはロット番号 : DJ040IH, 1992年9月4日製造、本試験においては、ロット番号 : DJ050JH, 1992年10月12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	リン酸水素アンモニウムナトリウム・4水和物	3.5 g
クエン酸・1水和物	2 g	グルコース	20 g
リン酸水素二カルシウム	10 g	バクアガー (Difco)	15 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 混液 (1 ml 中下記の成分を含む)

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

** : 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-284、1992年10月30日製造および RAA-285、1992年11月20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〕

プレート法を用いて、直接法および代謝活性化法によって試験を行った。

小試験管中にトッパアガー 2 ml、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°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、寒天表面上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、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。用量設定試験は抗菌性を認めたことから2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〕

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌の直接法あるいは代謝活性化法において、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 Table 1 に示した。MOMについて、50～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で公比約3の5用量で試験を実施したところ、すべての検定菌の直接法および代謝活性化法において、抗菌性が認められた。すなわち、直接法および代謝活性化法とも *Salmonella* は 500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上、*E. coli* は 1500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上で抗菌性が認められた。

以上の結果から、本試験における最高用量は、*Salmonella* 4菌株は 625 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、*E. coli* は 2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とした。なお、本試験では、直接法、代謝活性化法とも抗菌性を考慮して6～7用量を設定することとした。

〔本試験〕

結果を Tables 2、3 に示した。MOMについて上記の用量範囲で試験を実施した。2回の試験を通して、用いた5種類の検定菌のうち、TA100、TA98において復帰変異コロニーが陰性対照の2倍以上に増加し、かつその増加に用量依存性が認められたことから、MOMは、変異原性を有するものと判定した。すなわち、TA100は、2回の本試験のうち1回、TA98は、2回の本試験において、直接法、代謝活性化法ともに復帰変異コロニー数の増加が認められ、かつ再現性も得られた。直接法および代謝活性化法での2回の本試験において、高用量域で抗菌性を認めたが、いずれも4用量以上で抗菌性は認められず、本試験は成立した。

なお、MOMは純度50%未満であり、易揮発性であるため、含量測定試験の結果、既定濃度から著しく低い値のまま実施した。試験は、用時調製後速やかに処理した平板を同一濃度毎に滅菌袋に入れ培養を行った。

MOM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、MOMは、用いた試験系において変異原性を有する（陽性）ものと判定した。

【参 考 文 献】

- (1) Maron, D.M. and Ames, B.N. : Mutation Research. 113: 173-215 (1983)
- (2) Green, M.H.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 bacterial reverse mutation assay with Methoxymethanol

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			
S9 ⁻ (-)	0	124	151	154	22	32	18	16	14	21	20	14	17	9	12	10	
		(143 \pm 16.5)			(24 \pm 7.2)			(17 \pm 3.6)			(17 \pm 3.0)			(10 \pm 1.5)			
	1.5	119			25			20			25			16			
	5	127			19			16			16			15			
	15	175			22			22			37			11			
	50	140			13			19			23			12			
	150	307			28			27			64			7			
	500	0 *			0 *			20			5 *			0 *			
	1500	0 *			0 *			0 *			0 *			0 *			
5000	0 *			0 *			0 *			0 *			0 *				
S9Mix (+)	0	128	126	110	11	25	29	12	21	20	34	36	26	13	22	16	
		(121 \pm 9.9)			(22 \pm 9.5)			(18 \pm 4.9)			(32 \pm 5.3)			(17 \pm 4.6)			
	1.5	151			15			21			33			12			
	5	156			19			32			30			24			
	15	155			27			24			45			24			
	50	162			20			20			44			23			
	150	329			27			16			94			12			
	500	58 *			6 *			22			49 *			4 *			
	1500	0 *			0 *			0 *			0 *			0 *			
5000	0 *			0 *			0 *			0 *			0 *				
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA			
	Dose (μg / plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80			
S9 Mix (-)	Number of colonies / plate	644	605	617	290	281	294	125	110	165	684	653	636	2365	2110	2604	
		(622 \pm 20.0)			(288 \pm 6.7)			(133 \pm 28.4)			(658 \pm 24.3)			(2360 \pm 247.0)			
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose (μg / plate)	1			2			10			0.5			2			
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	742	728	756	198	176	196	419	378	403	203	247	225	161	182	149	
		(742 \pm 14.0)			(190 \pm 12.2)			(400 \pm 20.7)			(225 \pm 22.0)			(164 \pm 16.7)			

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

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria. #: Precipitant was observed on the surface of agar plates.

Table 2. Results of bacterial reverse mutation assay (I) with Methoxymethanol

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							
S9 Mix (-)	0	152	112	122	13	17	10	18	17	21	21	13	18	10	17	15	(129 \pm 20.8)	(13 \pm 3.5)	(19 \pm 2.1)	(17 \pm 4.0)	(14 \pm 3.6)
	19.53	104	95	89	13	13	13				15	25	23	15	18	15	(96 \pm 7.5)	(13 \pm 0.0)		(21 \pm 5.3)	(16 \pm 1.7)
	39.06	94	104	95	18	15	9	16	13	13	30	29	26	14	12	15	(98 \pm 5.5)	(14 \pm 4.6)	(14 \pm 1.7)	(28 \pm 2.1)	(14 \pm 1.5)
	78.12	121	119	107	19	20	14	15	12	17	48	62	67	13	15	17	(116 \pm 7.6)	(18 \pm 3.2)	(15 \pm 2.5)	(59 \pm 9.8)	(15 \pm 2.0)
	156.2	161	165	271	17	16	11	23	20	19	96	98	91	10	14	10	(199 \pm 62.4)	(15 \pm 3.2)	(21 \pm 2.1)	(95 \pm 3.6)	(11 \pm 2.3)
	312.5	210 *	115 *	202 *	4 *	4 *	7 *	25	26	34	39 *	35 *	39 *	2 *	3 *	1 *	(176 \pm 52.7)	(5 \pm 1.7)	(28 \pm 4.9)	(38 \pm 2.3)	(2 \pm 1.0)
	625	5 *	1 *	0 *	0 *	0 *	0 *	11	22	13	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	(2 \pm 2.6)	(0 \pm 0.0)	(15 \pm 5.9)	(0 \pm 0.0)	(0 \pm 0.0)
	1250							3 *	0 *	0 *											
	2500							0 *	0 *	0 *											
S9 Mix (+)	0	129	136	137	22	18	13	27	14	20	29	27	24	22	23	13	(134 \pm 4.4)	(18 \pm 4.5)	(20 \pm 6.5)	(27 \pm 2.5)	(19 \pm 5.5)
	19.53	152	119	149	11	12	13				32	34	26	12	17	10	(140 \pm 18.2)	(12 \pm 1.0)		(31 \pm 4.2)	(13 \pm 3.6)
	39.06	154	153	154	11	8	10	17	15	12	38	38	26	17	15	16	(154 \pm 0.6)	(10 \pm 1.5)	(15 \pm 2.5)	(34 \pm 6.9)	(16 \pm 1.0)
	78.12	163	149	183	14	15	18	11	12	21	39	43	49	12	18	10	(165 \pm 17.1)	(16 \pm 2.1)	(15 \pm 5.5)	(44 \pm 5.0)	(13 \pm 4.2)
	156.2	203	264	247	19	12	13	25	30	15	49	64	60	11	16	13	(238 \pm 31.5)	(15 \pm 3.8)	(23 \pm 7.6)	(58 \pm 7.8)	(13 \pm 2.5)
	312.5	88 *	188 *	111 *	3 *	2 *	5 *	30	23	21	25	35	39	2 *	0 *	4 *	(129 \pm 52.4)	(3 \pm 1.5)	(25 \pm 4.7)	(33 \pm 7.2)	(2 \pm 2.0)
	625	39 *	10 *	9 *	0 *	0 *	0 *	21	25	26	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	(19 \pm 17.0)	(0 \pm 0.0)	(24 \pm 2.6)	(0 \pm 0.0)	(0 \pm 0.0)
	1250							2 *	0 *	0 *											
	2500							0 *	0 *	0 *											
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA							
	Dose (μg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80							
S9 Mix (-)	Number of colonies / plate	625	614	554	169	150	153	127	148	121	673	644	631	2010	1990	2020	(598 \pm 38.2)	(157 \pm 10.2)	(132 \pm 14.2)	(649 \pm 21.5)	(2007 \pm 15.3)
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA							
	Dose (μg /plate)	1			2			10			0.5			2							
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	486	485	487	194	236	219	664	651	912	171	147	166	224	187	163	(486 \pm 1.0)	(216 \pm 21.1)	(742 \pm 147.1)	(161 \pm 12.7)	(191 \pm 30.7)

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

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria. #: Precipitant was observed on the surface of agar plates.

Table 3. Results of bacterial reverse mutation assay (II) with Methoxymethanol

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	110	133	125	6	9	7	14	17	20	15	14	28	5	7	6	(123 \pm 11.7)	(7 \pm 1.5)	(17 \pm 3.0)	(19 \pm 7.8)	(6 \pm 1.0)
	19.53	144	136	143	8	14	12				31	26	30	7	3	9	(141 \pm 4.4)	(11 \pm 3.1)		(29 \pm 2.6)	(6 \pm 3.1)
	39.06	205	182	198	8	18	10	22	18	17	49	51	64	8	6	4	(195 \pm 11.8)	(12 \pm 5.3)	(19 \pm 2.6)	(55 \pm 8.1)	(6 \pm 2.0)
	78.12	368	317	330	7	18	13	25	35	22	75	71	77	4	4	2	(338 \pm 26.5)	(13 \pm 5.5)	(27 \pm 6.8)	(74 \pm 3.1)	(3 \pm 1.2)
	156.2	290	262	133	14	3	6	35	26	28	53	51	54	3	3	6	(228 \pm 83.7)	(8 \pm 5.7)	(30 \pm 4.7)	(53 \pm 1.5)	(4 \pm 1.7)
	312.5	19*	15*	14*	0*	0*	0*	11	18	16	0*	0*	0*	0*	0*	0*	(16 \pm 2.6)	(0 \pm 0.0)	(15 \pm 3.6)	(0 \pm 0.0)	(0 \pm 0.0)
	625	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	(0 \pm 0.0)	(0 \pm 0.0)	(0 \pm 0.0)	(0 \pm 0.0)	(0 \pm 0.0)
	1250							0*	0*	0*									(0 \pm 0.0)		
2500							0*	0*	0*									(0 \pm 0.0)			
S9Mix (+)	0	123	121	120	11	11	8	22	11	14	25	18	26	5	11	6	(121 \pm 1.5)	(10 \pm 1.7)	(16 \pm 5.7)	(23 \pm 4.4)	(7 \pm 3.2)
	19.53	123	128	140	15	8	8				50	28	37	6	7	5	(130 \pm 8.7)	(10 \pm 4.0)		(38 \pm 11.1)	(6 \pm 1.0)
	39.06	184	196	170	8	4	7	24	15	20	43	39	36	9	10	7	(183 \pm 13.0)	(6 \pm 2.1)	(20 \pm 4.5)	(39 \pm 3.5)	(9 \pm 1.5)
	78.12	374	383	349	10	10	9	16	20	19	48	51	41	6	11	8	(369 \pm 17.6)	(10 \pm 0.6)	(18 \pm 2.1)	(47 \pm 5.1)	(8 \pm 2.5)
	156.2	230	241	320	4	4	3	16	22	18	55	59	31	3	3	4	(264 \pm 49.1)	(4 \pm 0.6)	(19 \pm 3.1)	(48 \pm 15.1)	(3 \pm 0.6)
	312.5	83*	121*	85*	0*	0*	0*	7	19	14	10*	8*	13*	0*	0*	4*	(96 \pm 21.4)	(0 \pm 0.0)	(13 \pm 6.0)	(10 \pm 2.5)	(1 \pm 2.3)
	625	0*	0*	0*	0*	0*	0*	6	5	11	0*	0*	0*	0*	0*	0*	(0 \pm 0.0)	(0 \pm 0.0)	(7 \pm 3.2)	(0 \pm 0.0)	(0 \pm 0.0)
	1250							0*	0*	0*									(0 \pm 0.0)		
2500							0*	0*	0*									(0 \pm 0.0)			
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA							
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01			0.5			0.01			0.1			80							
S9 Mix (-)	Number of colonies / plate	614	603	589	171	168	117	203	208	190	576	618	677	2574	2521	2594	(602 \pm 12.5)	(152 \pm 30.3)	(200 \pm 9.3)	(624 \pm 50.7)	(2563 \pm 37.7)
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA							
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1			2			10			0.5			2							
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	915	968	924	215	231	189	605	696	575	379	383	426	246	288	209	(936 \pm 28.4)	(212 \pm 21.2)	(625 \pm 63.0)	(396 \pm 26.1)	(248 \pm 39.5)

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

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria. #: Precipitant was observed on the surface of agar plates.