



2-メチルプロペンアミド
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	6
結 論	6
特 記 事 項	7
文 献	7
Tables 1~3	

【要 約】

2-メチルプロペンアミド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インキュベーション法により用量設定試験および2回の本試験を行った。用量設定試験を50.0～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で行ったところ、いずれの検定菌においても、S9 mix 無添加試験および添加試験と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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で5用量を設定して実施した。

その結果、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倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかったことから、2-メチルプロペンアミドは、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。

【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-メチルプロペンアミドについて、細菌を用いる復帰突然変異試験をプレインキュベーション法¹⁾により実施した。

この試験は、サルモネラ菌（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²⁾、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³⁾を指標とした変異原性の検出系である。

試験は、被験物質をそのまま検定菌に作用させる S9 mix 無添加試験と、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素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 添加試験とからなっている。

本試験は、「新規化学物質等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、一部改正平成9年10月31日、環保安第 287号、衛生第 127号、平成09・10・31基局第 2号）および「OECD毒性試験ガイドライン：471」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。

【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1997年8月7日に、*E. coli* WP2 *uvrA* 株は1997年4月9日に から分与された。

検定菌は -80°C 以下で凍結保存したものを用いた。各菌株の凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、膜変異 (*rfa*) およびアンピシリン耐性因子 pKM 101 (プラスミド) の有無について調べ、特性が維持されていることを確認した。

試験に際して、ニュートリエントプロスNo.2 (Oxoid Ltd.) を入れたL字型試験管に解凍した菌液を一定量加え、 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。試験に用いた検定菌液の生菌数を Appendix 1 に示した。

〔被 験 物 質〕

2-メチルプロペンアミド (略称: MPA、CAS No. 79-39-0) は、分子量 85.11 の白色結晶である。構造式等は Appendix 2 に示した。用いた被験物質は、ロット番号 純度 99.5%以上 (不純物: メタアクリル酸) であり、 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管した。

MPA は、局方注射用水 (ロット番号: K6I94、(株)大塚製薬工場) に溶解して最高濃度の調製液を調製した後、同溶媒で順次希釈して速やかに試験に用いた。

〔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。

AF2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
(和光純薬工業(株) ロット番号 WTQ0059, 純度98%以上)
SA : アジ化ナトリウム (和光純薬工業(株) ロット番号 DLL3931, 純度98%以上)
9AA : 9-アミノアクリン (Sigma Chem. Co. ロット番号 106F06681, 純度97%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 DLH6052, 純度90%以上)

AF2、9AA および 2AA はジメチルスルホキシド (DMSO、和光純薬工業(株)) に、SA は超純水に溶解したものを -20°C で凍結保存し、解凍後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) バクトアガ- (Difco Lab.)	0.6 %	(B)* L-ヒスチジン	0.5 mM
塩化ナトリウム	0.5 %	D-ビチン	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、極東製薬工業(株)製の最少グルコース寒天培地 (ロット番号: HY2802、1997年10月16日製造、および HY2901、1997年11月21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
リン酸水素二カルシウム	10 g	大洋寒天 (清水食品)	15 g
リン酸一アンモニウム	1.92 g		

径 90 mm のシャーレ 1 枚あたり 30 mL を流して固めたものである。

3) S9 mix (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	ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μ mol
グルコース-6-リン酸	5 μ mol		

** : 7 週齢の Sprague-Dawley 系雄ラットにフェノバルビタール (PB) および 5,6-ベンゾフラボン (BF) の併用投与を行い、酵素誘導して作製した S9 (キッコーマン(株)、ロット番号: RAA-370、1997年10月3日製造) を購入し、 -80°C で凍結保存し、用時に解凍して用いた。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、いずれも腹腔内投与したものである。肝臓の摘出および S9 の調製は 5 日目。

〔試験方法〕

プレインキュベーション法により、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 を混合し、37°Cで20分間プレインキュベーションしたのち、トップアガー 2 mL を加えて混和し、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。同時に実施した試験については、溶媒および陽性対照群を共通とした。培養は37°Cで48時間行い、発生した変異コロニー数を目視またはコロニーカウンターを用いて算定した。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。また、最高用量の被験物質 0.1 mL および S9 mix 0.5 mL をそれぞれ最少グルコース寒天培地上に滴下して、培養終了時に雑菌の混入の有無を調べた。

〔判定基準〕

結果の判定に統計学的手法は用いないこととした。

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌の S9 mix 無添加試験あるいは S9 mix 添加試験において、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、溶媒対照値の2倍以上に増加し、その増加に再現性および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〕

MPAについて 50.0～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で公比を約3として、試験を実施した (Table 1)。その結果、すべての検定菌の S9 mix 無添加試験および添加試験のいずれにおいて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〕

S9 mix 無添加試験および添加試験のいずれにおいても、313～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で公比を2として2回の本試験を実施した (Table 2、3)。その結果、すべての検定菌において、2回の試験とも溶媒対照値の2倍以上となる変異コロニー数の増加は認められず、陰性であった。

また、MPAは当研究所で本試験と並行して実施されたチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験でも陰性であった (食薬セ研第9-1943号)。MPAの類縁化合物については、簡単な情報検索を行ったが、変異原性に関する情報は得られなかった。

MPAについて実施したすべての試験において、用いた最高用量の調製液および S9 mix への雑菌の混入は認められなかった。また、陽性対照試験では、いずれの検定菌においても陽性対照物質の変異原性が検出され、溶媒対照値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-メチルプロペンアミドは、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、試験の信頼性に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) Matsushima, T., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A., Sawamura, M.: in "Short-Term Test Systems for Detecting Carcinogens" Norpoth, K.H., Garner, R.C. eds. Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1980) pp. 273-285
- 2) Maron, D.M., Ames, B.N.: Mutation Research 113: 173-215 (1983)
- 3) Venitt, S., Crofton-Sleigh, C.: in "Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens" de Serres, F.J., Ashby, J. eds, Elsevier/North-Holland, New York (1981) pp. 351-360

Table 1. Cytotoxicity of 2-methylpropenamide 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			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537			
S9 mix (-)	0	129	144	126	16	13	16	22	22	25	30	23	22	16	14	14	
		(133 \pm 9.6)			(15 \pm 1.7)			(23 \pm 1.7)			(25 \pm 4.4)			(15 \pm 1.2)			
	50.0	107			22			23			22			7			
	150	113			5			29			28			9			
	500	117			10			25			22			12			
	1500	122			11			21			27			7			
	5000	131			19			30			32			9			
S9 mix (+)	0	136	155	152	11	11	11	21	25	33	43	35	33	15	17	15	
		(148 \pm 10.2)			(11 \pm 0.0)			(26 \pm 6.1)			(37 \pm 5.3)			(16 \pm 1.2)			
	50.0	124			12			31			25			9			
	150	102			13			22			28			14			
	500	100			9			26			40			9			
	1500	115			13			23			40			12			
	5000	137			16			24			43			19			
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	347	349	354	636	584	587	137	133	155	401	427	384	423	328	309	
		(350 \pm 3.6)			(602 \pm 29.2)			(142 \pm 11.7)			(404 \pm 21.7)			(353 \pm 61.1)			
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	1063	989	956	384	371	363	734	695	660	488	435	482	200	267	274	
		(1003 \pm 54.8)			(373 \pm 10.6)			(696 \pm 37.0)			(468 \pm 29.0)			(247 \pm 40.9)			

Purity was above 99.5% and methacrylic acid was contained as impurity .

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

Table 2. Mutagenicity of 2-methylpropenamide on bacteria (I)

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			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537			
S9 mix (-)	0	153	149	152	21	10	12	32	30	23	18	20	20	10	5	8	
		(151 \pm 2.1)			(14 \pm 5.9)			(28 \pm 4.7)			(19 \pm 1.2)			(8 \pm 2.5)			
	313	159	162	151	15	13	10	18	29	32	23	21	24	14	6	5	
		(157 \pm 5.7)			(13 \pm 2.5)			(26 \pm 7.4)			(23 \pm 1.5)			(8 \pm 4.9)			
	625	149	128	146	14	18	8	23	26	26	17	25	23	3	9	5	
		(141 \pm 11.4)			(13 \pm 5.0)			(25 \pm 1.7)			(22 \pm 4.2)			(6 \pm 3.1)			
	1250	138	133	141	12	10	14	27	27	32	23	26	17	9	5	10	
		(137 \pm 4.0)			(12 \pm 2.0)			(29 \pm 2.9)			(22 \pm 4.6)			(8 \pm 2.6)			
2500	141	134	165	12	12	16	24	27	17	20	22	20	11	8	3		
	(147 \pm 16.3)			(13 \pm 2.3)			(23 \pm 5.1)			(21 \pm 1.2)			(7 \pm 4.0)				
5000	138	152	162	13	17	12	26	30	25	21	14	32	9	7	5		
	(151 \pm 12.1)			(14 \pm 2.6)			(27 \pm 2.6)			(22 \pm 9.1)			(7 \pm 2.0)				
S9 mix (+)	0	146	139	125	13	8	7	26	23	30	37	26	24	9	11	10	
		(137 \pm 10.7)			(9 \pm 3.2)			(26 \pm 3.5)			(29 \pm 7.0)			(10 \pm 1.0)			
	313	182	177	166	5	12	7	24	26	36	27	33	35	10	7	8	
		(175 \pm 8.2)			(8 \pm 3.6)			(29 \pm 6.4)			(32 \pm 4.2)			(8 \pm 1.5)			
	625	152	194	179	14	9	6	46	29	22	25	34	23	16	15	11	
		(175 \pm 21.3)			(10 \pm 4.0)			(32 \pm 12.3)			(27 \pm 5.9)			(14 \pm 2.6)			
	1250	174	169	167	12	14	13	27	45	43	27	22	28	11	12	9	
		(170 \pm 3.6)			(13 \pm 1.0)			(38 \pm 9.9)			(26 \pm 3.2)			(11 \pm 1.5)			
2500	164	184	164	13	8	16	25	28	33	30	27	21	6	7	8		
	(171 \pm 11.5)			(12 \pm 4.0)			(29 \pm 4.0)			(26 \pm 4.6)			(7 \pm 1.0)				
5000	168	147	165	15	17	14	39	43	42	40	42	41	5	7	5		
	(160 \pm 11.4)			(15 \pm 1.5)			(41 \pm 2.1)			(41 \pm 1.0)			(6 \pm 1.2)				
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	507	506	477	573	557	587	196	190	201	506	545	521	423	361	312	
		(497 \pm 17.0)			(572 \pm 15.0)			(196 \pm 5.5)			(524 \pm 19.7)			(365 \pm 55.6)			
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	1025	1018	998	377	384	371	824	846	836	449	479	437	379	356	358	
		(1014 \pm 14.0)			(377 \pm 6.5)			(835 \pm 11.0)			(455 \pm 21.6)			(364 \pm 12.7)			

Purity was above 99.5% and methacrylic acid was contained as impurity .

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

Table 3. Mutagenicity of 2-methylpropenamide on bacteria (II)

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			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537			
S9 mix (-)	0	166	169	146	9	11	8	21	19	28	21	24	25	8	17	12	
		(160 \pm 12.5)			(9 \pm 1.5)			(23 \pm 4.7)			(23 \pm 2.1)			(12 \pm 4.5)			
	313	148	143	147	16	13	6	22	21	14	14	21	32	3	5	6	
		(146 \pm 2.6)			(12 \pm 5.1)			(19 \pm 4.4)			(22 \pm 9.1)			(5 \pm 1.5)			
	625	150	138	142	16	11	10	28	24	25	24	15	17	8	10	5	
		(143 \pm 6.1)			(12 \pm 3.2)			(26 \pm 2.1)			(19 \pm 4.7)			(8 \pm 2.5)			
	1250	122	147	143	14	8	12	26	20	21	21	24	23	10	8	7	
		(137 \pm 13.4)			(11 \pm 3.1)			(22 \pm 3.2)			(23 \pm 1.5)			(8 \pm 1.5)			
2500	154	128	136	13	14	14	26	13	16	16	23	16	9	7	9		
	(139 \pm 13.3)			(14 \pm 0.6)			(18 \pm 6.8)			(18 \pm 4.0)			(8 \pm 1.2)				
5000	144	161	149	14	17	12	20	14	20	22	27	8	8	12	10		
	(151 \pm 8.7)			(14 \pm 2.5)			(18 \pm 3.5)			(19 \pm 9.8)			(10 \pm 2.0)				
S9 mix (+)	0	155	198	195	12	18	15	25	30	23	25	29	42	15	21	14	
		(183 \pm 24.0)			(15 \pm 3.0)			(26 \pm 3.6)			(32 \pm 8.9)			(17 \pm 3.8)			
	313	180	191	171	13	8	13	30	22	21	33	39	30	12	10	12	
		(181 \pm 10.0)			(11 \pm 2.9)			(24 \pm 4.9)			(34 \pm 4.6)			(11 \pm 1.2)			
	625	192	159	172	15	25	8	31	25	14	21	24	47	20	14	10	
		(174 \pm 16.6)			(16 \pm 8.5)			(23 \pm 8.6)			(31 \pm 14.2)			(15 \pm 5.0)			
	1250	171	168	190	15	14	13	29	30	31	27	27	29	15	21	14	
		(176 \pm 11.9)			(14 \pm 1.0)			(30 \pm 1.0)			(28 \pm 1.2)			(17 \pm 3.8)			
2500	182	193	170	14	17	23	24	37	38	39	20	39	17	15	15		
	(182 \pm 11.5)			(18 \pm 4.6)			(33 \pm 7.8)			(33 \pm 11.0)			(16 \pm 1.2)				
5000	201	189	185	12	20	18	29	32	36	40	34	35	11	11	11		
	(192 \pm 8.3)			(17 \pm 4.2)			(32 \pm 3.5)			(36 \pm 3.2)			(11 \pm 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	538	507	545	569	587	546	200	188	195	604	556	570	316	303	325	
		(530 \pm 20.2)			(567 \pm 20.6)			(194 \pm 6.0)			(577 \pm 24.7)			(315 \pm 11.1)			
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose (μg /plate)	1			2			10			0.5			2			
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	1072	1021	1073	450	430	475	715	781	737	540	504	488	350	367	406	
		(1055 \pm 29.7)			(452 \pm 22.5)			(744 \pm 33.6)			(511 \pm 26.6)			(374 \pm 28.7)			

Purity was above 99.5% and methacrylic acid was contained as impurity .

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