



2, 6-ナフタレンジカルボン酸ジメチルエステル
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
材料および方法	3
結果および考察	7
結 論	7
特 記 事 項	8
文 献	8
Tables 1~3	

【要 約】

2,6-ナフタレンジカルボン酸ジメチルエステル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、すべての検定菌においてS9 mix 無添加試験および添加試験のいずれ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倍以上となる再現性のある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、2,6-ナフタレンジカルボン酸ジメチルエステルは、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】

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、2,6-ナフタレンジカルボン酸ジメチルエステルについて、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（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, 4)}を指標とした変異原性の検出系である。

試験は、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素（S9 mix）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、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毒性試験ガイドライン：471、472」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1975年10月31日に
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°C 以下で凍結保存したものを用い、各菌株の特性確認は、凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、および膜変異 (*rfa*) と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、ニュートリエントブロスNo. 2 (Oxoid) を入れたL字型試験管に解凍した種菌を一定量接種し、 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。

〔被験物質〕

2,6-ナフタレンジカルボン酸ジメチルエステル (略称: DMNDC、CAS No. 840-65-3) は、分子量 244.25 の白色フレークである。構造式等は Appendix に示した。用いた被験物質は、ロット番号 純度 99.9 wt% (不純物: 不明) であり、から供与された。被験物質は、使用時まで室温で保管した。なお、試験終了後にににおいて、被験物質の化学分析を行った結果、純度は 99.9 wt% であった。

DMNDC は、乳鉢を用いて粉碎後、局方注射用水 (ロット番号: K5A80、(株)大塚製薬工場) に懸濁して最高濃度の調製液を調製した後、同溶媒で公比約 3 ないし 2 で希釈し、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 (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%以上)
9AA	: 9-アミノアクリジン (Sigma Chem. Co.)	ロット番号 96F05641,	純度98%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 DSP2950,	純度90%以上)

AF2 および 2AA はジメチルスルホキシド (DMSO、和光純薬工業(株)) に溶解したものを -20°C で凍結保存し、用時解凍した。9AA は DMSO に、SA は純水に溶解し、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%	D-ビオチン	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)製の最少寒天培地 (ロット番号 : HY0302、1995年9月29日製造および HY0603、同年12月15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
リン酸水素二カルウム	10 g	バクアガー (Difco)	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 を流して固めてある。

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
塩化カリウム	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-333、1995年9月8日製造および RAA-338、同年12月15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、ラットの解剖および S9 の調製は5日目であった。

〔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分間往復振とう培養したのち、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各Table 中に示した。溶媒および陽性対照群は、同時に実施した他の試験と共通とした。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。

〔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 S9 mix 無添加あるいは S9 mix 添加条件において、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。ただし、2回の本試験の一方でのみ変異コロニー数の平均値が溶媒対照値の2倍以上となる用量が認められた場合において、その溶媒対照値が10以下であり、変異コロニー数の増加に用量依存性が認められない場合は陰性とする事とした。

【結果および考察】

〔用量設定試験〕

DMNDC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とともに、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、いずれの検定菌においても、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。

DMNDCについて実施したすべての試験において、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、溶媒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、本試験系の有効性が確認された。

【結 論】

以上の結果に基づき、2,6-ナフタレンジカルボン酸ジメチルエステルは、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、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。

【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.: Mutat. Res. 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
- 4) Green, M.H.L.: in "Handbook of Mutagenicity Test Procedures" Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C. eds, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford (1984) pp.161-187

Table 1. Results of preliminary cytotoxicity test in reverse mutation test of dimethyl 2,6-naphthalenedicarboxylate on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (µg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, mean ± S.D.)																				
		Base - pair substitution type									Frameshift type											
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537								
S9mix (-)	0	114	118	122	14	9	11	24	27	34	30	30	37	14	13	9	(118 ± 4.0)	(11 ± 2.5)	(28 ± 5.1)	(32 ± 4.0)	(12 ± 2.6)	
	50.0	133			4			26			18			13								
	150	120			13			22			18			13								
	500 c	106			11			36			27			8								
	1500 c	125			11			28			23			14								
	5000 c	157			10			36			24			12								
S9mix (+)	0	105	127	112	13	16	7	25	27	33	41	42	26	13	25	17	(115 ± 11.2)	(12 ± 4.6)	(28 ± 4.2)	(36 ± 9.0)	(18 ± 6.1)	
	50.0	111			22			26			21			14								
	150	130			13			23			20			12								
	500 c	152			6			48			22			18								
	1500 c	130			16			36			17			13								
	5000 c	116			12			29			16			8								
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								
Positive control S9 mix (+)	Number of colonies / plate	580	556	617	247	278	265	264	271	267	511	562	589	713	634	576	(584 ± 30.7)	(263 ± 15.6)	(267 ± 3.5)	(554 ± 39.6)	(641 ± 68.8)	
		(637 ± 72.5)			(335 ± 7.5)			(485 ± 27.4)			(317 ± 9.5)			(289 ± 18.7)								

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene
c: Precipitate was observed on the surface of agar plates.
Purity was 99.9 wt%.

Table 2. Results of reverse mutation test (I) of dimethyl 2,6-naphthalenedicarboxylate 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			
S9mix (-)	0	152	124	159	9	11	7	37	39	36	25	27	25	9	13	15	
		(145 \pm 18.5)			(9 \pm 2.0)			(37 \pm 1.5)			(26 \pm 1.2)			(12 \pm 3.1)			
	313	172	147	168	17	14	9	39	25	30	33	22	22	8	15	8	
		(162 \pm 13.4)			(13 \pm 4.0)			(31 \pm 7.1)			(26 \pm 6.4)			(10 \pm 4.0)			
	625	149	181	160	15	14	9	29	32	36	24	31	36	14	8	8	
		(163 \pm 16.3)			(13 \pm 3.2)			(32 \pm 3.5)			(30 \pm 6.0)			(10 \pm 3.5)			
	1250 c	160	153	168	8	11	9	31	29	33	30	31	36	8	2	9	
	(160 \pm 7.5)			(9 \pm 1.5)			(31 \pm 2.0)			(32 \pm 3.2)			(6 \pm 3.8)				
S9mix (+)	2500 c	151	145	170	8	9	9	27	30	23	17	28	24	11	8	11	
		(155 \pm 13.1)			(9 \pm 0.6)			(27 \pm 3.5)			(23 \pm 5.6)			(10 \pm 1.7)			
	5000 c	161	168	160	14	14	6	28	33	33	43	29	14	6	10	12	
		(163 \pm 4.4)			(11 \pm 4.6)			(31 \pm 2.9)			(29 \pm 14.5)			(9 \pm 3.1)			
S9mix (+)	0	165	151	152	15	7	20	33	33	30	41	24	36	22	17	25	
		(156 \pm 7.8)			(14 \pm 6.6)			(32 \pm 1.7)			(34 \pm 8.7)			(21 \pm 4.0)			
	313	196	199	189	7	8	15	44	36	31	23	38	30	20	14	20	
		(195 \pm 5.1)			(10 \pm 4.4)			(37 \pm 6.6)			(30 \pm 7.5)			(18 \pm 3.5)			
	625	179	156	182	13	12	19	44	35	31	39	26	33	22	11	12	
		(172 \pm 14.2)			(15 \pm 3.8)			(37 \pm 6.7)			(33 \pm 6.5)			(15 \pm 6.1)			
	1250 c	191	161	163	21	10	8	39	32	32	28	32	28	13	10	9	
	(172 \pm 16.8)			(13 \pm 7.0)			(34 \pm 4.0)			(29 \pm 2.3)			(11 \pm 2.1)				
S9mix (+)	2500 c	152	143	158	12	15	13	33	31	29	42	22	38	5	12	9	
		(151 \pm 7.5)			(13 \pm 1.5)			(31 \pm 2.0)			(34 \pm 10.6)			(9 \pm 3.5)			
	5000 c	154	169	177	9	12	22	37	44	21	33	23	19	7	11	6	
		(167 \pm 11.7)			(14 \pm 6.8)			(34 \pm 11.8)			(25 \pm 7.2)			(8 \pm 2.6)			
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	689	685	779	262	272	295	337	289	301	688	663	721	1291	1123	1369	
		(718 \pm 53.2)			(276 \pm 16.9)			(309 \pm 25.0)			(691 \pm 29.1)			(1261 \pm 125.7)			
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose (μg /plate)	1			2			10			0.5			2			
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	755	927	1012	300	298	262	582	746	652	298	332	304	367	346	313	
		(898 \pm 130.9)			(287 \pm 21.4)			(660 \pm 82.3)			(311 \pm 18.1)			(342 \pm 27.2)			

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene
c: Precipitate was observed on the surface of agar plates.

Purity was 99.9 wt%.

Table 3. Results of reverse mutation test (II) of dimethyl 2,6-naphthalenedicarboxylate on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (µg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, mean ± S.D.)																			
		Base - pair substitution type									Frameshift type										
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537							
S9mix (-)	0	127	86	150	16	17	16	27	24	20	22	32	35	11	4	10	(121 ± 32.4)	(16 ± 0.6)	(24 ± 3.5)	(30 ± 6.8)	(8 ± 3.8)
	313	113	128	122	9	9	16	23	34	32	17	29	19	8	7	9	(121 ± 7.5)	(11 ± 4.0)	(30 ± 5.9)	(22 ± 6.4)	(8 ± 1.0)
	625	136	116	125	6	10	12	30	26	24	22	28	14	14	18	11	(126 ± 10.0)	(9 ± 3.1)	(27 ± 3.1)	(21 ± 7.0)	(14 ± 3.5)
	1250 c	132	128	148	15	10	11	17	20	17	31	26	22	11	12	12	(136 ± 10.6)	(12 ± 2.6)	(18 ± 1.7)	(26 ± 4.5)	(12 ± 0.6)
	2500 c	127	129	126	17	13	15	30	26	18	27	22	15	6	12	11	(127 ± 1.5)	(15 ± 2.0)	(25 ± 6.1)	(21 ± 6.0)	(10 ± 3.2)
	5000 c	147	129	136	16	10	22	23	20	22	29	29	18	11	10	11	(137 ± 9.1)	(16 ± 6.0)	(22 ± 1.5)	(25 ± 6.4)	(11 ± 0.6)
S9mix (+)	0	130	107	110	14	17	8	29	29	40	27	32	32	14	15	14	(116 ± 12.5)	(13 ± 4.6)	(33 ± 6.4)	(30 ± 2.9)	(14 ± 0.6)
	313	140	145	162	10	7	7	24	35	28	22	31	42	19	22	17	(149 ± 11.5)	(8 ± 1.7)	(29 ± 5.6)	(32 ± 10.0)	(19 ± 2.5)
	625	144	132	183	14	5	7	36	32	35	28	33	23	26	31	25	(153 ± 26.7)	(9 ± 4.7)	(34 ± 2.1)	(28 ± 5.0)	(27 ± 3.2)
	1250 c	128	151	158	8	10	8	45	38	31	27	34	26	19	20	19	(146 ± 15.7)	(9 ± 1.2)	(38 ± 7.0)	(29 ± 4.4)	(19 ± 0.6)
	2500 c	179	135	133	11	13	8	23	29	33	20	35	28	17	19	14	(149 ± 26.0)	(11 ± 2.5)	(28 ± 5.0)	(28 ± 7.5)	(17 ± 2.5)
	5000 c	144	127	139	12	13	9	27	28	20	18	23	26	9	9	6	(137 ± 8.7)	(11 ± 2.1)	(25 ± 4.4)	(22 ± 4.0)	(8 ± 1.7)
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	728	760	347	386	359	483	487	475	672	665	608	1320	1043	1130	(711 ± 59.9)	(364 ± 20.0)	(482 ± 6.1)	(648 ± 35.1)	(1164 ± 141.7)
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA							
	Dose (µg /plate)	1			2			10			0.5			2							
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	658	680	770	310	335	315	473	407	420	281	255	313	269	274	260	(703 ± 59.3)	(320 ± 13.2)	(433 ± 35.0)	(283 ± 29.1)	(268 ± 7.1)

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene
c: Precipitate was observed on the surface of agar plates.
Purity was 99.9 wt%.