



1-ナフチル酢酸の  
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】

1-ナフチル酢酸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、直接法および代謝活性化法のいずれも、用量設定試験は 50～5000  $\mu\text{g}$ /プレート、本試験では 312.5～5000  $\mu\text{g}$ /プレートの用量で試験を実施した。

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、1-ナフチル酢酸は、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。

## 【結 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、難分解性既存化学物質の1つである、1-ナフチル酢酸について、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<sup>(1)</sup>、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<sup>(2)</sup>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 *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、ニュートリエントブロスNo. 2 (OXOID, ロット番号 : B-1674/1 およ  
び B-1674/2) を入れたL字型試験管に種菌を接種し、37℃、約10~12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〕

1-ナフチル酢酸 (CAS No. 86-87-3、以下NAと略) は、分子量 186.2の白色あるいは淡  
黄色の粉末である。純度 96.4%のもの (不純物としてβ-ナフチル酢酸を 3.5%含む、ロ  
ット番号 : ) を から供与された。被験物質  
は、使用時まで室温に遮光して保管した。被験物質の有効期限は製造後 3 年である。

NA は、ジメチルスルホキシド (以下DMSOと略 : ロット番号 : TWP 5445 および  
APQ5928、和光純薬工業(株)) 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、  
純度換算は行わなかった。

秦野研究所においてNAの DMSO 溶液中での安定性試験を行った。本試験における最高  
濃度 (50 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 4 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 (0 時間) の平均に対して、100%および 99.6%であった。これらの値は、当研究所の  
基準を満たしていた (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、97.6~99.5%、3.125 mg/ml 溶液は、104~105%であった。これらの値も当研究所の基準を満たしていた (Appendix2)。

以上の結果から、NAは DMSO 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-ヒスタジン	0.5 mM
塩化ナトリウム	0.5%	ピオチン	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 : DJ060KH, 1992年11月10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
リン酸水素二カリウム	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 $\mu$ mol
塩化マグネシウム	8 $\mu$ mol	NADPH	4 $\mu$ mol
塩化カリウム	33 $\mu$ 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 $\mu$ 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-280、1992年7月24日製造およびRAA-285、1992年11月20日製造)を  $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存し、用時に解凍した。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 DMSO、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  $37^{\circ}\text{C}$  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、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]

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。NA について、50～5000  $\mu\text{g}$ /プレート の範囲で公比を約 3 とし、試験を実施したところ、すべての検定菌の直接法あるいは代謝活性化法のいずれにおいても、抗菌性は認められなかった。

以上の結果から、本試験における最高用量を直接法、代謝活性化法ともに、すべての検定菌において、5000  $\mu\text{g}$ /プレート とし、公比 2 で、5 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。NA について 312.5～5000  $\mu\text{g}$ /プレート 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 種類の検定菌の直接法、代謝活性化法のいずれにおいても、陰性対照の 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。

NA 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、NA 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.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 1-naphtyl acetate

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			WP2uvrA			TA98			TA1537			
S9Mix (-)	0	129	124	123	14	20	14	20	13	17	35	35	39	10	7	6	
		( 125 ± 3.2 )			( 16 ± 3.5 )			( 17 ± 3.5 )			( 36 ± 2.3 )			( 8 ± 2.1 )			
	50	114			15			15			37			8			
	150	121			10			13			25			7			
	500	132			12			14			28			5			
	1500	114			19			13			33			4			
	5000	96			16			13			12			3			
S9Mix (+)	0	124	125	129	19	20	18	13	18	19	43	42	48	8	7	13	
		( 126 ± 2.6 )			( 19 ± 1.0 )			( 17 ± 3.2 )			( 44 ± 3.2 )			( 9 ± 3.2 )			
	50	137			21			24			45			17			
	150	153			11			21			39			10			
	500	124			12			20			48			15			
	1500	134			17			22			39			9			
	5000	113			14			14			38			6			
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	468	437	479	310	281	316	151	126	125	648	669	690	1939	1933	2017	
		( 461 ± 21.8 )			( 302 ± 18.7 )			( 134 ± 14.7 )			( 669 ± 21.0 )			( 1963 ± 46.9 )			
Positive control S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	370	377	394	229	219	203	902	894	910	305	336	340	198	189	226	
		( 380 ± 12.3 )			( 217 ± 13.1 )			( 902 ± 8.0 )			( 327 ± 19.2 )			( 204 ± 19.3 )			

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

Table 2. Results of bacterial reverse mutation assay ( I ) with 1-naphtyl acetate

With (+) or without (-) S9 Mix	Test substance dose ( $\mu\text{g}$ /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	113	130	136	11	19	11	26	20	29	16	22	24	11	7	9	( 126 $\pm$ 11.9 )	( 14 $\pm$ 4.6 )	( 25 $\pm$ 4.6 )	( 21 $\pm$ 4.2 )	( 9 $\pm$ 2.0 )	
	312.5	145	125	113	11	16	16	25	30	30	20	15	21	9	10	3	( 128 $\pm$ 16.2 )	( 14 $\pm$ 2.9 )	( 28 $\pm$ 2.9 )	( 19 $\pm$ 3.2 )	( 7 $\pm$ 3.8 )	
	625	126	115	111	10	12	15	16	26	28	10	18	18	8	7	7	( 117 $\pm$ 7.8 )	( 12 $\pm$ 2.5 )	( 23 $\pm$ 6.4 )	( 15 $\pm$ 4.6 )	( 7 $\pm$ 0.6 )	
	1250	117	107	114	13	17	8	16	26	20	29	26	20	6	6	6	( 113 $\pm$ 5.1 )	( 13 $\pm$ 4.5 )	( 21 $\pm$ 5.0 )	( 25 $\pm$ 4.6 )	( 6 $\pm$ 0.0 )	
	2500	126	112	143	18	10	14	14	12	21	21	15	14	5	12	8	( 127 $\pm$ 15.5 )	( 14 $\pm$ 4.0 )	( 16 $\pm$ 4.7 )	( 17 $\pm$ 3.8 )	( 8 $\pm$ 3.5 )	
	5000	110	120	106	10	10	12	15	4	16	13	13	13	4	8	2	( 112 $\pm$ 7.2 )	( 11 $\pm$ 1.2 )	( 12 $\pm$ 6.7 )	( 13 $\pm$ 0.0 )	( 5 $\pm$ 3.1 )	
S9Mix (+)	0	121	128	119	10	15	12	32	28	26	31	30	32	14	23	11	( 123 $\pm$ 4.7 )	( 12 $\pm$ 2.5 )	( 29 $\pm$ 3.1 )	( 31 $\pm$ 1.0 )	( 16 $\pm$ 6.2 )	
	312.5	113	146	157	9	18	11	21	31	26	30	22	27	9	20	7	( 139 $\pm$ 22.9 )	( 13 $\pm$ 4.7 )	( 26 $\pm$ 5.0 )	( 26 $\pm$ 4.0 )	( 12 $\pm$ 7.0 )	
	625	119	118	144	15	6	14	19	17	30	25	27	33	17	9	13	( 127 $\pm$ 14.7 )	( 12 $\pm$ 4.9 )	( 22 $\pm$ 7.0 )	( 28 $\pm$ 4.2 )	( 13 $\pm$ 4.0 )	
	1250	133	113	134	10	19	14	15	32	36	33	22	25	12	12	17	( 127 $\pm$ 11.8 )	( 14 $\pm$ 4.5 )	( 28 $\pm$ 11.2 )	( 27 $\pm$ 5.7 )	( 14 $\pm$ 2.9 )	
	2500	137	153	134	18	10	9	33	17	16	28	31	33	11	8	13	( 141 $\pm$ 10.2 )	( 12 $\pm$ 4.9 )	( 22 $\pm$ 9.5 )	( 31 $\pm$ 2.5 )	( 11 $\pm$ 2.5 )	
	5000	154	132	125	11	16	15	17	13	21	26	18	26	9	7	5	( 137 $\pm$ 15.1 )	( 14 $\pm$ 2.6 )	( 17 $\pm$ 4.0 )	( 23 $\pm$ 4.6 )	( 7 $\pm$ 2.0 )	
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA								
	Dose ( $\mu\text{g}$ /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80								
S9 Mix (-)	Number of colonies / plate	484	535	536	173	170	169	123	122	149	600	551	524	2683	2770	2862	( 518 $\pm$ 29.7 )	( 171 $\pm$ 2.1 )	( 131 $\pm$ 15.3 )	( 558 $\pm$ 38.5 )	( 2772 $\pm$ 89.5 )	
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA								
	Dose ( $\mu\text{g}$ /plate)	1			2			10			0.5			2								
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	736	812	827	219	205	212	953	1002	1018	313	305	341	316	288	288	( 792 $\pm$ 48.8 )	( 212 $\pm$ 7.0 )	( 991 $\pm$ 33.9 )	( 320 $\pm$ 18.9 )	( 297 $\pm$ 16.2 )	

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

Table 3. Results of bacterial reverse mutation assay ( II ) with 1-naphtyl acetate

With (+) or without (-) S9 Mix	Test substance dose ( $\mu\text{g}$ /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	122	117	108	11	18	14	21	25	31	22	19	25	8	9	9
		( 116 $\pm$ 7.1 )			( 14 $\pm$ 3.5 )			( 26 $\pm$ 5.0 )			( 22 $\pm$ 3.0 )			( 9 $\pm$ 0.6 )		
	312.5	119	104	131	16	15	10	23	32	29	22	23	31	8	4	10
		( 118 $\pm$ 13.5 )			( 14 $\pm$ 3.2 )			( 28 $\pm$ 4.6 )			( 25 $\pm$ 4.9 )			( 7 $\pm$ 3.1 )		
	625	117	126	133	9	15	19	19	21	28	23	20	12	6	13	15
		( 125 $\pm$ 8.0 )			( 14 $\pm$ 5.0 )			( 23 $\pm$ 4.7 )			( 18 $\pm$ 5.7 )			( 11 $\pm$ 4.7 )		
	1250	125	108	122	5	10	13	24	17	18	25	22	15	12	5	9
		( 118 $\pm$ 9.1 )			( 9 $\pm$ 4.0 )			( 20 $\pm$ 3.8 )			( 21 $\pm$ 5.1 )			( 9 $\pm$ 3.5 )		
2500	116	120	99	5	9	11	19	21	23	20	21	22	10	2	10	
	( 112 $\pm$ 11.2 )			( 8 $\pm$ 3.1 )			( 21 $\pm$ 2.0 )			( 21 $\pm$ 1.0 )			( 7 $\pm$ 4.6 )			
5000	103	94	85	11	5	9	18	20	19	16	18	20	4	4	5	
	( 94 $\pm$ 9.0 )			( 8 $\pm$ 3.1 )			( 19 $\pm$ 1.0 )			( 18 $\pm$ 2.0 )			( 4 $\pm$ 0.6 )			
S9Mix (+)	0	141	133	121	12	18	12	31	30	34	35	27	33	7	12	12
		( 132 $\pm$ 10.1 )			( 14 $\pm$ 3.5 )			( 32 $\pm$ 2.1 )			( 32 $\pm$ 4.2 )			( 10 $\pm$ 2.9 )		
	312.5	133	107	123	21	13	17	31	25	20	24	34	34	8	9	8
		( 121 $\pm$ 13.1 )			( 17 $\pm$ 4.0 )			( 25 $\pm$ 5.5 )			( 31 $\pm$ 5.8 )			( 8 $\pm$ 0.6 )		
	625	106	134	123	6	11	7	21	23	27	25	26	25	10	7	8
		( 121 $\pm$ 14.1 )			( 8 $\pm$ 2.6 )			( 24 $\pm$ 3.1 )			( 25 $\pm$ 0.6 )			( 8 $\pm$ 1.5 )		
	1250	130	123	117	14	5	12	23	26	30	23	34	28	6	6	9
		( 123 $\pm$ 6.5 )			( 10 $\pm$ 4.7 )			( 26 $\pm$ 3.5 )			( 28 $\pm$ 5.5 )			( 7 $\pm$ 1.7 )		
2500	116	135	105	14	7	9	19	24	27	23	22	35	4	7	7	
	( 119 $\pm$ 15.2 )			( 10 $\pm$ 3.6 )			( 23 $\pm$ 4.0 )			( 27 $\pm$ 7.2 )			( 6 $\pm$ 1.7 )			
5000	116	118	132	13	8	12	23	19	20	23	34	21	4	5	5	
	( 122 $\pm$ 8.7 )			( 11 $\pm$ 2.6 )			( 21 $\pm$ 2.1 )			( 26 $\pm$ 7.0 )			( 5 $\pm$ 0.6 )			
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose ( $\mu\text{g}$ /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
S9 Mix (-)	Number of colonies / plate	523	490	505	93	101	126	149	134	132	666	638	606	2499	2225	2310
		( 506 $\pm$ 16.5 )			( 107 $\pm$ 17.2 )			( 138 $\pm$ 9.3 )			( 637 $\pm$ 30.0 )			( 2345 $\pm$ 140.3 )		
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose ( $\mu\text{g}$ /plate)	1			2			10			0.5			2		
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	713	829	840	188	190	189	648	701	627	340	381	355	241	240	260
		( 794 $\pm$ 70.4 )			( 189 $\pm$ 1.0 )			( 659 $\pm$ 38.1 )			( 359 $\pm$ 20.7 )			( 247 $\pm$ 11.3 )		

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