

13.6.3. 無菌試験

被験物質液(調製原液)ならびにS9 mixについては無菌試験を実施した。すなわち、調製原液 100 μ L あるいはS9 mix 500 μ L にトップアガーを2 mL 添加し、プレート上に注いだ。37°C の条件で48時間培養した後、雑菌汚染の有無を確認した。調製原液およびS9 mix のいずれについても2枚のプレートを用いて無菌試験を実施した。

2-ethylhexyl vinyl ether 調製原液ならびにS9 mix の無菌試験において、菌の増殖は認められなかった。

13.7. 用量設定試験(予備試験)

13.7.1. 用量

ガイドライン上定められた最高用量である5000 μ g/プレートを最高用量とし、以下2000, 800, 320, 128, 51.2, 20.5 および8.19 μ g/プレートの計8用量を設定した。

13.7.2. 使用プレート数および識別方法

用量当たり3枚のプレートを用いた。

油性インクを用いて試験菌株、S9 mix の有無および用量を明記することにより各プレートを識別した。

13.7.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

試験管に、使用溶媒、被験物質液あるいは陽性対照物質溶液を100 μ L、次いで代謝活性化系非存在下(-S9処理)の場合、0.1 mol/Lナトリウム・リン酸緩衝液(pH 7.4)を500 μ L、代謝活性化系存在下(+S9処理)の場合、S9 mixを500 μ L分注した。さらに前培養した試験菌株懸濁液100 μ Lを加えた後、ウォーターバスシェーカー(M-100^N, タイテック)を用いて37°Cの条件で20分間振盪(120回/分, プレインキュベーション)した。振盪終了後、トップアガー2 mLを添加し、内容物を混合した。その後、混合液をプレート上に注ぎ一様に広げた。恒温器(SSV-R11DA, 池田理化)を用い、各プレートを37°Cの条件で48時間培養した。

13.7.4. 析出等の観察

各処理法において、処理開始時およびコロニー数計測時に被験物質析出等の有無を肉眼で観察した。

13.7.5. コロニー数計測

被験物質の生育阻害作用を確認するため、プレート上の試験菌株(背景菌)の生育状態について実体顕微鏡($\times 40$)を用いて観察した。次いで、復帰突然変異により生じたコロニー数を計数した。計測に際しては、コロニーアナライザー(CA-11, システムサイエンス)を用い、面積補正ならびに数え落とし補正を実施してコロニー数を算出した。

ただし、試験菌株に対する強度の生育阻害作用により、-S9 処理、TA100 株の 320 µg /プレート以上の用量ではコロニーアナライザーの使用は不適切と判断し、目視にて復帰コロニーの計数を実施した。

13.8. 用量設定試験 (追加試験)

用量設定試験の結果、両処理法の TA100 株、TA1535 株、TA98 株および TA1537 株において生育阻害が低用量までみられ、評価群数が 4 用量に満たなかったことから追加試験を実施した。

13.8.1. 用量

用量設定試験の結果を基に、生育阻害が認められると考えられる用量を最高用量に、次の表に示した 6~7 用量を設定した。

《代謝活性化系非存在下：-S9 処理》

菌株	用量 (µg/プレート)						
TA100	0.781	1.56	3.13	6.25	12.5	25.0	50.0
TA1535	0.781	1.56	3.13	6.25	12.5	25.0	50.0
TA98	0.781	1.56	3.13	6.25	12.5	25.0	50.0
TA1537	0.781	1.56	3.13	6.25	12.5	25.0	50.0

《代謝活性化系存在下：+S9 処理》

菌株	用量 (µg/プレート)						
TA100	6.25	12.5	25.0	50.0	100	200	
TA1535	6.25	12.5	25.0	50.0	100	200	
TA98	6.25	12.5	25.0	50.0	100	200	
TA1537	6.25	12.5	25.0	50.0	100	200	

13.8.2. 使用プレート数および識別方法

13.7.2.に記載の方法に準じた。

13.8.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

13.7.3.に記載の方法に準じた。ただし、ウォーターバスシェーカーは MM-10 (タイテック) を用いた。

13.8.4. 析出等の観察

13.7.4.に記載の方法に準じた。

13.8.5. コロニー数計測

13.7.5.に記載の方法に準じた。

13.9. 本試験

13.9.1. 用量

用量設定試験および用量設定試験（追加試験）の結果、全ての試験菌株において生育阻害が認められた。また、変異原性は認められなかった。したがって、本試験では生育阻害が認められると考えられる用量を最高用量とし、次の表に示した6用量を設定した。

《代謝活性化系非存在下：-S9 処理》

菌株	用量 (μg/プレート)					
TA100	0.610	1.22	2.44	4.88	9.77	19.5
TA1535	0.610	1.22	2.44	4.88	9.77	19.5
WP2 <i>uvrA</i>	156	313	625	1250	2500	5000
TA98	1.22	2.44	4.88	9.77	19.5	39.1
TA1537	0.610	1.22	2.44	4.88	9.77	19.5

《代謝活性化系存在下：+S9 処理》

菌株	用量 (μg/プレート)					
TA100	4.88	9.77	19.5	39.1	78.1	156
TA1535	4.88	9.77	19.5	39.1	78.1	156
WP2 <i>uvrA</i>	78.1	156	313	625	1250	2500
TA98	9.77	19.5	39.1	78.1	156	313
TA1537	4.88	9.77	19.5	39.1	78.1	156

13.9.2. 使用プレート数および識別方法

13.7.2.に記載した方法に準じた。

13.9.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

13.7.3.に記載した方法に準じた。ただし、ウォーターバスシェーカーはMM-10（タイテック）を用いた。

13.9.4. 析出等の観察

13.7.4.に記載した方法に準じた。

13.9.5. コロニー数計測

13.7.5.に記載した方法に準じた。

13.10. 試験成立条件

陰性対照および陽性対照の平均復帰変異コロニー数は背景データから求めた基準値内であること。陽性対照のコロニー数は同時陰性対照値の2倍を超えること。以上の条

件を満たした場合に試験は成立したと判断した。

13.11. 結果の解析

復帰変異コロニー数が陰性対照の2倍以上に増加し、かつその増加に用量依存性あるいは再現性が認められた場合に陽性と判定した。

統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

14. 試験結果

14.1. 用量設定試験

結果を Figure 1~5 および Table 1, 2 に示した。

2-ethylhexyl vinyl ether 処理の場合、-S9 処理ならびに+S9 処理のいずれの試験菌株においても、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。試験菌株に対する生育阻害作用は、-S9 処理および+S9 処理の全ての菌株において認められ、TA100 株、TA1535 株、TA98 株および TA1537 株では生育阻害を示さない用量が4用量に満たなかった。

一方、陽性対照物質は、各試験菌株に対して復帰突然変異を顕著に誘発した。

14.2. 被験物質の析出等 (用量設定試験)

処理開始時に、+S9 処理の5000 µg/プレートの用量で油膜状の析出物が認められた。コロニー数計測時には、析出等の変化は観察されなかった。

14.3. 用量設定試験 (追加試験)

結果を Figure 6~9 および Table 3, 4 に示した。

2-ethylhexyl vinyl ether 処理の場合、-S9 処理ならびに+S9 処理のいずれの試験菌株においても、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、試験菌株に対する生育阻害作用は、両処理の全ての菌株において高用量群で認められた。

一方、陽性対照物質は、各試験菌株に対して復帰突然変異を顕著に誘発した。

14.4. 用量設定試験 (追加試験)

処理開始時およびコロニー数計測時に、析出等の変化は観察されなかった。

14.5. 本試験

結果を Figure 10~14 および Table 5, 6 に示した。

2-ethylhexyl vinyl ether 処理の場合、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、試験菌株に対する生育阻害作用は、いずれも高用量群で認められた。

一方、陽性対照物質は、試験菌株に対して復帰突然変異を顕著に誘発した。

14.6. 被験物質の析出等 (追加試験)

処理開始時およびコロニー数計測時に、析出等の変化は観察されなかった。

15. 考察および結論

2-ethylhexyl vinyl ether の遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため、細菌（ネズミチフス菌・大腸菌）を用いたプレインキュベーション法による復帰突然変異試験を実施した。

ガイドライン上定められた最高用量である 5000 µg/プレートあるいは試験菌株の生育を阻害する用量まで検討した結果、2-ethylhexyl vinyl ether 処理群では、代謝活性化系非存在下および代謝活性化系存在下のいずれにおいても、陰性対照の2倍を超えるような復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

これら両処理法での試験結果は、用量設定試験、同追加試験および本試験により再現性が確認された。

本被験物質 2-ethylhexyl vinyl ether についての遺伝毒性ならびに発がん性に関する報告はなかった。

類縁体すなわち、異性体である hexanol, 2-ethyl-および ethylhexyl acrylate の遺伝毒性ならびに発がん性に関する報告もなかった。

なお、陰性対照および陽性対照の平均復帰変異コロニー数は、いずれも当施設の背景データ (Appendix 1) から求めた基準値内であり、試験成立条件を満たしたことから、当該試験は適切な条件で実施されたものと判断された。

以上の試験結果から、当該試験条件下において、2-ethylhexyl vinyl ether の細菌に対する遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

16. 参考とした資料

- Ames BN, Lee FD, Durston WE. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. Proc Nat Acad Sci 1973; 70: 782-6.
- Ames BN, Durston WE, Yamasaki E, Lee FD. Carcinogens are mutagens. a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proc Nat Acad Sci USA. 1973; 70 (8): 2281-5.
- Ames BN, McCann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutat Res 1975; 31: 347-64.
- Yahagi T. [Screening methods using microbes for the environmental carcinogens (author's transl)]. [Article in Japanese]. Protein, Nucleic Acid and Enzyme 1975; 20: 16-27.
- Ministry of Labor, Industrial Safety and Health Department. [Test Guidelines and GLP for Mutagenicity Test using Microorganisms in the Safety and Health Law]. Tokyo; Japan Industrial Safety and Health Association; 1991.
- Ishidate M Jr editor. [The data book for mutagenicity assay using microorganisms]. [Article in Japanese]. Life-science Information Center Press; 1991.

Table 1. Summary data on dose-finding study of 2-ethylhexyl vinyl ether
[Non-activation method : -S9]

Compound	Dose (µg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
2-ethylhexyl vinyl ether	0 a)	129	130	136	15	15	13	22	24	22	20	20	16	7	8	7
		[132	±	4]	[14	±	1]	[23	±	1]	[19	±	2]	[7	±	1]
	8.19	107	101	115	8	12	12	22	22	20	20	18	19	7	9	8
		[108	±	7]	[11	±	2]	[21	±	1]	[19	±	1]	[8	±	1]
	20.5	75*	69*	70*	7*	12*	8*	20	21	18	15*	18*	15*	6*	8*	7*
		[71	±	3]	[9	±	3]	[20	±	2]	[16	±	2]	[7	±	1]
	51.2	79*	64*	66*	5*	9*	9*	18	14	18	16*	16*	13*	5*	5*	5*
		[70	±	8]	[8	±	2]	[17	±	2]	[15	±	2]	[5	±	0]
	128	59*	65*	67*	7*	6*	6*	22	18	20	16*	18*	18*	5*	6*	3*
	[64	±	4]	[6	±	1]	[20	±	2]	[17	±	1]	[5	±	2]	
320	23*	27*	40*	7*	5*	7*	21	24	24	18*	12*	12*	6*	3*	4*	
	[30	±	9]	[6	±	1]	[23	±	2]	[14	±	3]	[4	±	2]	
800	18*	20*	15*	7*	4*	6*	20	19	22	12*	13*	12*	5*	5*	3*	
	[18	±	3]	[6	±	2]	[20	±	2]	[12	±	1]	[4	±	1]	
2000	13*	12*	20*	6*	6*	7*	20	18	23	13*	8*	8*	1*	4*	4*	
	[15	±	4]	[6	±	1]	[20	±	3]	[10	±	3]	[3	±	2]	
5000	16*	21*	15*	6*	8*	6*	16*	14*	15*	13*	14*	17*	3*	4*	4*	
	[17	±	3]	[7	±	1]	[15	±	1]	[15	±	2]	[4	±	1]	
Positive control		806	820	849 b)	589	511	562 c)	104	130	122 b)	596	530	535 d)	352	282	266 e)
		[825	±	22]	[554	±	40]	[119	±	13]	[554	±	37]	[300	±	46]

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 µL/plate)

b): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 µg/plate c): NaN₃; Sodium azide, 0.5 µg/plate

d): AF-2, 0.1 µg/plate e): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 µg/plate

* : Growth inhibition was observed.

Table 2. Summary data on dose-finding study of 2-ethylhexyl vinyl ether
[Activation method : +S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
2-ethylhexyl vinyl ether	0 a)	104 [113	122 \pm	114 9]	15 [13	10 \pm	13 3]	25 [24	26 \pm	22 2]	28 [32	34 \pm	33 3]	16 [17	14 \pm	21 4]
	8.19	116 [117	121 \pm	115 3]	17 [15	14 \pm	13 2]	21 [21	21 \pm	22 1]	33 [30	29 \pm	29 2]	15 [14	13 \pm	14 1]
	20.5	124 [117	117 \pm	111 7]	15 [12	11 \pm	11 2]	16 [19	20 \pm	20 2]	27 [26	26 \pm	24 2]	14 [13	11 \pm	14 2]
	51.2	116 [114	119 \pm	106 7]	16 [16	15 \pm	18 2]	21 [20	21 \pm	18 2]	30 [27	24 \pm	27 3]	14 [17	16 \pm	21 4]
	128	74* [73	79* \pm	67* 6]	9* [7	5* \pm	8* 2]	23 [23	25 \pm	20 3]	23* [22	23* \pm	20* 2]	13* [12	15* \pm	9* 3]
	320	63* [73	79* \pm	76* 9]	8* [9	9* \pm	9* 1]	20 [24	27 \pm	25 4]	19* [17	12* \pm	19* 4]	7* [9	12* \pm	9* 3]
	800	67* [70	70* \pm	74* 4]	6* [6	6* \pm	5* 1]	19 [20	20 \pm	20 1]	20* [19	16* \pm	20* 2]	9* [8	6* \pm	10* 2]
	2000	53* [56	59* \pm	55* 3]	6* [7	9* \pm	7* 2]	16* [17	20* \pm	15* 3]	22* [20	20* \pm	17* 3]	10* [8	7* \pm	8* 2]
	5000	48* [56	64* \pm	56* 8]	9* [9	10* \pm	8* 1]	20* [19	22* \pm	15* 4]	19* [20	21* \pm	20* 1]	8* [7	6* \pm	6* 1]
Positive control	808 [814	768 \pm	867 b) 50]	286 [271	252 \pm	276 c) 17]	522 [506	501 \pm	495 d) 14]	321 [339	360 \pm	337 e) 20]	121 [131	133 \pm	138 c) 9]	

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 $\mu\text{L}/\text{plate}$)

b): 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): 2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d): 2-AA, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ e): 2-AA, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

* : Growth inhibition was observed.

Table 3. Summary data on dose-finding study of 2-ethylhexyl vinyl ether (Additional study)
[Non-activation method : -S9]

Compound	Dose (µg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
2-ethylhexyl vinyl ether	0 a)	105	116	108	12	12	13				25	21	20	7	9	11
		[110	±	6]	[12	±	1]				[22	±	3]	[9	±	2]
	0.781	128	111	119	10	12	9				27	26	20	10	5	6
		[119	±	9]	[10	±	2]				[24	±	4]	[7	±	3]
	1.56	115	109	105	9	12	12				21	26	23	13	9	8
		[110	±	5]	[11	±	2]				[23	±	3]	[10	±	3]
	3.13	118	107	109	16	14	13				27	23	28	12	11	9
		[111	±	6]	[14	±	2]				[26	±	3]	[11	±	2]
6.25	100	109	109	12	10	11				27	25	24	12	9	11	
	[106	±	5]	[11	±	1]				[25	±	2]	[11	±	2]	
12.5	92*	98*	97*	10*	8*	7*				22	23	20	3*	6*	6*	
	[96	±	3]	[8	±	2]				[22	±	2]	[5	±	2]	
25.0	72*	66*	69*	5*	7*	7*				16*	15*	19*	7*	6*	4*	
	[69	±	3]	[6	±	1]				[17	±	2]	[6	±	2]	
50.0	60*	72*	65*	7*	8*	8*				12*	14*	13*	3*	3*	5*	
	[66	±	6]	[8	±	1]				[13	±	1]	[4	±	1]	
Positive control		732	797	778 b)	628	646	640 c)				638	660	595 d)	209	285	283 e)
		[769	±	33]	[638	±	9]				[631	±	33]	[259	±	43]

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 µL/plate)

b): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 µg/plate c): NaN₃; Sodium azide, 0.5 µg/plate

d): AF-2, 0.1 µg/plate e): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 µg/plate

* : Growth inhibition was observed.

Table 4. Summary data on dose-finding study of 2-ethylhexyl vinyl ether (Additional study)
[Activation method : +S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
2-ethylhexyl vinyl ether	0 a)	121	118	113	12	12	15				33	28	29	13	17	16
		[117	\pm	4]	[13	\pm	2]				[30	\pm	3]	[15	\pm	2]
	6.25	110	116	109	11	9	13				25	31	34	13	15	12
		[112	\pm	4]	[11	\pm	2]				[30	\pm	5]	[13	\pm	2]
	12.5	105	103	106	12	10	9				29	32	27	17	19	11
		[105	\pm	2]	[10	\pm	2]				[29	\pm	3]	[16	\pm	4]
	25.0	102	109	107	11	16	10				28	31	29	17	16	14
	[106	\pm	4]	[12	\pm	3]				[29	\pm	2]	[16	\pm	2]	
50.0	107	111	111	12	11	16				34	28	30	16	12	14	
	[110	\pm	2]	[13	\pm	3]				[31	\pm	3]	[14	\pm	2]	
100	85*	92*	87*	6*	6*	9*				28	25	31	11*	13*	9*	
	[88	\pm	4]	[7	\pm	2]				[28	\pm	3]	[11	\pm	2]	
200	74*	68*	68*	7*	8*	7*				25*	27*	22*	10*	8*	8*	
	[70	\pm	3]	[7	\pm	1]				[25	\pm	3]	[9	\pm	1]	
Positive control		1048	980	1021 b)	370	359	392 c)				341	409	350 e)	106	115	130 c)
		[1016	\pm	34]	[374	\pm	17]				[367	\pm	37]	[117	\pm	12]

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 $\mu\text{L}/\text{plate}$)

b): 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): 2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ e): 2-AA, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

* : Growth inhibition was observed.

Table 5. Summary data on bacterial reverse mutation test of 2-ethylhexyl vinyl ether
[Non-activation method : -S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]																			
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537							
2-ethylhexyl vinyl ether	0 a)	107	106	106	11	12	13	21	26	22	25	20	24	12	8	12	[106 \pm 1]	[12 \pm 1]	[23 \pm 3]	[23 \pm 3]	[11 \pm 2]
	0.610	115	110	108	10	13	12							6	12	9	[111 \pm 4]	[12 \pm 2]			[9 \pm 3]
	1.22	106	112	101	9	10	9				20	26	21	10	13	11	[106 \pm 6]	[9 \pm 1]		[22 \pm 3]	[11 \pm 2]
	2.44	121	111	106	13	15	11				21	20	22	14	11	11	[113 \pm 8]	[13 \pm 2]		[21 \pm 1]	[12 \pm 2]
	4.88	104	110	106	14	14	11				21	21	21	10	10	8	[107 \pm 3]	[13 \pm 2]		[21 \pm 0]	[9 \pm 1]
	9.77	93*	83*	96*	6*	11*	8*				25	21	20	9*	6*	9*	[91 \pm 7]	[8 \pm 3]		[22 \pm 3]	[8 \pm 2]
	19.5	72*	67*	79*	6*	5*	4*				19*	20*	20*	7*	7*	6*	[73 \pm 6]	[5 \pm 1]		[20 \pm 1]	[7 \pm 1]
	39.1										16*	14*	18*							[16 \pm 2]	

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 $\mu\text{L}/\text{plate}$)

* : Growth inhibition was observed.