

1. 表題

2-ナフチルイソブチルエーテルの細菌を用いる復帰突然変異試験

2. 試験目的

被験物質の遺伝子突然変異誘発性を検討するため、細菌を用いた復帰突然変異試験を実施する。

3. 遵守した GLP および準拠したガイドライン

GLP

- 新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について (平成 15 年 11 月 21 日薬食発第 1121003 号, 平成 15・11・17 製局第 3 号, 環保企発第 031121004 号)
- OECD Principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997), ENV/MC/CHEM(98)17 ガイドライン
- 新規化学物質等に係る試験の方法について (平成 15 年 11 月 21 日薬食発第 1121002 号, 平成 15・11・13 製局第 2 号, 環保企発第 031121002 号)
- OECD Guideline for the Testing of Chemicals 471 (21st July 1997: Bacterial Reverse Mutation Test)

4. 試験番号

9889 ( 115-208 )

5. 試験施設

〒437-1213 静岡県磐田市塩新田 582-2

財団法人 食品農医薬品安全性評価センター (略称 安評センター)

Tel: 0538-58-1266 Fax: 0538-58-1393

実験終了日： 平成 18 年 8 月 17 日  
試験終了日： 平成 19 年 8 月 16 日

### 13. 被験物質

#### 13.1. 被験物質名

2-ナフチルイソブチルエーテル

#### 13.2. ロット番号

GI01

#### 13.3. 純度

99.1%

#### 13.4. 製造元

東京化成工業株式会社

#### 13.5. 購入年月日

平成 18 年 4 月 24 日

#### 13.6. 購入量

500 g

#### 13.7. 保存条件

冷蔵・遮光・除湿

#### 13.8. 保存場所

安評センター被験物質調製室内冷蔵保管庫

- 7号館2階被験物質調製室B内プレハブ低温庫 ch.72

保存期間：2006年4月24日～同年7月10日

実測値：3.0～7.4°C

- 6号館2階被験物質調製室内バイオマルチクーラー ch.41

保存期間：2006年7月10日～同年8月15日（最終使用日）

実測値：5.0～6.6°C

#### 13.9. 一般名

2-イソブトキシナフタレン

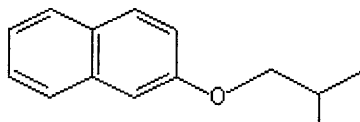
#### 13.10. 化学名

2-Naphthylisobutyl ether

13.11. CAS No.

2173-57-1

13.12. 化学構造



13.13. 分子式

C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>O

13.14. 分子量

200.28

13.15. 物質の状態

白色結晶塊

13.16. 融点

32.4°C (凝固点)

13.17. 引火点

68°C

13.18. 溶解性

水：不溶

DMSO：可溶 (50 mg/mL 以上)

13.19. 安定性

通常の取り扱い条件においては安定.

13.20. 取り扱い上の注意

酸化剤との接触に注意する. 引火性が強く, 燃焼しやすい液体.

取り扱いは換気の良い場所で行い, 粉塵が飛散しないように注意する.

適切な保護具を着用し, 吸い込んだり, 目, 皮膚および衣類に触れないようにする.

13.21. 安定性分析

13.21.1. 安定性の確認方法

実験終了後に純度分析を実施した結果, 純度が 99.6% (判定基準: 98%以上) であったことから, 被験物質の実験期間中の安定性が確認された.

純度分析の詳細を Reference data 1 に示す.

#### 13.21.2. 安定性分析用被験物質の保存条件

安評センター被験物質調製室内冷蔵保管庫

- 7号館2階被験物質調製室B内プレハブ低温庫 ch. 72

保存期間：2006年4月24日～同年9月13日（最終使用日）

実測値：3.0～7.7℃

#### 13.22. 残余被験物質の処理

実験終了後、1.0 g の被験物質を資料保存施設管理責任者の管理下で安評センターに保存し、残りは専用の容器に廃棄した。

### 14. 試験材料および方法

#### 14.1. 試験菌株

細菌を用いる復帰突然変異試験のガイドラインで指定されている次の5種類の菌株を使用した。

ネズミチフス菌	TA100	(ヒスチジン要求性の塩基対置換型)
ネズミチフス菌	TA98	(ヒスチジン要求性のフレームシフト型)
ネズミチフス菌	TA1535	(ヒスチジン要求性の塩基対置換型)
ネズミチフス菌	TA1537	(ヒスチジン要求性のフレームシフト型)
大腸菌	WP2 <i>invA</i>	(トリプトファン要求性の塩基対置換型)

ネズミチフス菌は1983年9月6日にカリフォルニア大学（エイムス教授）から、また、大腸菌については1983年3月16日に国立衛生試験所（現 国立医薬品食品衛生研究所）から分与を受けた。

2005年8月30日～同年9月1日に菌株の特性検査を実施し、規定の特性を保持している菌株を試験に使用した。

各菌株の保存は、菌懸濁液にジメチルスルホキシド（DMSO, GC用, 純度99.9%, Lot No. K31758278, Merck）を容量比80：7の割合で添加した後、凍結保存用チューブに0.2 mLずつ分注した。これを液体窒素を用いて凍結した後、超低温フリーザー（MDF-U71V, 三洋電機；設定値：-80℃, 基準値：-60℃以下）に保存した。

#### 14.2. 培地の調製

##### 14.2.1. 最少グルコース寒天平板培地（プレート）

テスメディア AN 培地（2006年4月1日製造, Lot No. ANI330DV, オリエンタル酵母工業）を試験に使用した。本プレートは、Vogel-Bonner 最少培地 E を含む溶液 30 mL を無菌的にシャーレに分注したものである。

最少グルコース寒天平板培地の組成を以下に示す。

硫酸マグネシウム七水和物	0.2	g
クエン酸一水和物	2	g
リン酸水素二カリウム	10	g
リン酸二水素アンモニウム	1.92	g
水酸化ナトリウム	0.66	g
D(+) グルコース	20	g
寒天 (BA-30A, Lot No. 51115, 伊那食品工業)	10.4	g
精製水	1000	mL

#### 14.2.2. トップアガー

0.5 w/v%塩化ナトリウム/0.6 w/v%寒天 (Bacto-agar, Lot No. 4246218, BD Diagnostic Systems) 水溶液をオートクレーブで滅菌した。この寒天溶液 10 容量に、ネズミチフス菌を用いる試験の場合、0.5 mmol/L L-ヒスチジン (Lot No. 308C2055, 関東化学) /0.5 mmol/L D-ビオチン (Lot No. 702W2180, 関東化学) 水溶液を 1 容量加え、大腸菌を用いる試験の場合、0.5 mmol/L L-トリプトファン (Lot No. 211D2047, 関東化学) 水溶液を 1 容量加えた。

#### 14.3. 試験菌株の前培養

内容量 200 mL のバツフル付三角フラスコに 2.5 w/v%ニュートリエントブロス (Nutrient Broth No. 2, Lot No. 298714, Oxoid) 培養液を 25 mL 分注し、これに融解した菌懸濁液 50  $\mu$ L を接種した。フラスコをクールバスシェーカー (ML-10F, タイテック) に設置し、培養開始までの間、設定温度 4°C に静置した。その後、37°C の条件で 8 時間振盪 (100 回/分) 培養した。試験毎に菌株の培養を実施し、菌懸濁液は培養終了後速やかに使用した。

ATP フォトメーター (ルミテスター-K-100, キッコーマン) を用い、試験菌株の生菌数が  $1.0 \times 10^9$  /mL 以上であることを確認した。生菌数を次の表に示す。

試験	生菌数 ( $\times 10^9$ /mL)				
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
用量設定試験	3.71	3.05	4.37	4.18	1.57
同一追試験	4.11	4.67	-	3.03	2.09
本試験	4.05	4.53	4.23	3.66	1.67

#### 14.4. S9 mix

製造後 6 カ月以内の S9 mix (Lot No. FSM-543, キッコーマン) を試験に使用した。使用時まで超低温フリーザー (設定値: -80°C, 基準値: -60°C 以下) に保存した。

## 14.4.1. S9 の調製方法

S9 調製の際の動物種、性、臓器、誘導物質ならびに誘導方法を次の表に示す。

ロット番号	RAA-543
製造年月日	2006年5月12日 (誘導物質投与開始後5日目)
使用動物	ラット: Sprague-Dawley 系
性/週齢	雄/7週齢
体重	209~246 g
臓器	肝臓
誘導物質	Phenobarbital (PB) および 5,6-Benzoflavone (BF)
投与量および 投与回数	PB: 30 mg/kg 1回 (1日目) 60 mg/kg 3回 (2~4日目) BF: 80 mg/kg 1回 (3日目)
投与方法	腹腔内投与
蛋白含量	25.94 mg/mL

## 14.4.2. S9 mix の組成

S9 mix 1 mL 中の量を以下に示す。

S9	0.1	mL
MgCl <sub>2</sub>	8	μmol
KCl	33	μmol
G-6-P	5	μmol
NADPH	4	μmol
NADH	4	μmol
Na-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100	μmol

## 14.5. 被験物質液の調製

被験物質は、水に不溶で、DMSOには可溶であることから、被験物質をモレキュラーシーブを用いて脱水処理を行ったDMSO (SeccoSolv<sup>®</sup>, 純度≥99.5%, Lot No. K32997731 【用量設定試験, 同一追試験】, 純度≥99.5%, Lot No. K35364331 【本試験】, Merck) に溶解させた。

用量設定試験では、使用直前に被験物質 350 mg を精密に量り、目盛付き試験管に移した後、DMSO 約 6 mL を加え、攪拌しながら溶解させた。さらに、DMSO を加えて 7 mL に定容し、調製原液 (50.0 mg/mL 溶液) を準備した。この 50.0 mg/mL 調製原液 3 mL を DMSO 4.5 mL に加えることにより、20.0 mg/mL 溶液を調製した。以下同様に希釈を

行い、8.00, 3.20, 1.28, 0.512, 0.205 および 0.0819 mg/mL 溶液を調製した。

用量設定試験（追試験）では、使用直前に被験物質 20.0 mg を精密に量り、目盛付き試験管に移した後、DMSO 約 4 mL を加え、攪拌しながら溶解させた。さらに、DMSO を加えて 5 mL に定容し、調製原液（4.00 mg/mL 溶液）を準備した。この 4.00 mg/mL 調製原液 2 mL を DMSO 3 mL に加えることにより、1.60 mg/mL 溶液を調製した。以下同様に希釈を行い、0.64, 0.256, 0.102, 0.0410, 0.0164, 0.00655, 0.00262 および 0.00105 mg/mL 溶液を調製した。

本試験では、使用直前に被験物質 250 mg を精密に量り、目盛付き試験管に移した後、DMSO 約 4 mL を加え、攪拌しながら溶解させた。さらに、DMSO を加えて 5 mL に定容し、調製原液（50.0 mg/mL 溶液）を準備した。この 50.0 mg/mL 調製原液 3.5 mL を DMSO 3.5 mL に加えることにより、25.0 mg/mL 溶液を調製した。以下同様に希釈を行い、12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.781, 0.391, 0.195, 0.0977, 0.0488, 0.0244, 0.0122, 0.00610 および 0.00305 mg/mL 溶液を調製した。

いずれの試験においても調製後、被験物質液を速やかに使用した。なお、被験物質液（調製後 3.5 時間）に発熱、発泡、発煙等の変化は認められなかった。

#### 14.6. 対照群

##### 14.6.1. 陰性（溶媒）対照

被験物質液調製に用いる溶媒である DMSO を使用した。

##### 14.6.2. 陽性対照

下記の陽性対照物質を試験に使用した。AF-2, 9-AA および 2-AA は、DMSO (Lot No. K30049278, Merck) を用いて調製し、 $\text{NaN}_3$  は、注射用水（日本薬局方注射用水, Lot No. 5F77N, 大塚製薬工場）を用いて調製した。各調製液を凍結保存用チューブに 0.5 mL ずつ分注し、凍結（設定値： $-80^\circ\text{C}$ 、基準値： $-60^\circ\text{C}$ 以下）保存したものを試験に用いた（使用期限：2007 年 12 月 28 日）。

AF-2	2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド (含量 99.5%, Lot No. PKE1831, 和光純薬工業)
$\text{NaN}_3$	アジ化ナトリウム (純度 99.5%, Lot No. KLH1033, 和光純薬工業)
9-AA	9-アミノアクリジン塩酸塩 (純度 99.3%, Lot No. 16323JR, Sigma-Aldrich)
2-AA	2-アミノアントラセン (含量 95.0%, Lot No. KLH1058, 和光純薬工業)

《代謝活性化系非存在下：-S9 処理》

菌株	陽性対照物質	陽性対照溶液調製日	用量 (µg/プレート)	陽性対照物質溶液濃度 (µg/mL)
ネズミチフス菌 TA100	AF-2	2006.5.29	0.01	0.1
ネズミチフス菌 TA98	AF-2	2006.5.29	0.1	1.0
ネズミチフス菌 TA1535	NaN <sub>3</sub>	2006.5.29	0.5	5.0
ネズミチフス菌 TA1537	9-AA	2006.5.29	80	800
大腸菌 WP2 <i>uvrA</i>	AF-2	2006.5.29	0.01	0.1

《代謝活性化系存在下：+S9 処理》

菌株	陽性対照物質	陽性対照溶液調製日	用量 (µg/プレート)	陽性対照物質溶液濃度 (µg/mL)
ネズミチフス菌 TA100	2-AA	2006.5.29	1.0	10
ネズミチフス菌 TA98	2-AA	2006.5.29	0.5	5.0
ネズミチフス菌 TA1535	2-AA	2006.5.29	2.0	20
ネズミチフス菌 TA1537	2-AA	2006.5.29	2.0	20
大腸菌 WP2 <i>uvrA</i>	2-AA	2006.5.29	10	100

なお、これらの用量は「安衛法における変異原性試験—テストガイドラインと GLP」(労働省安全衛生部化学物質調査課編, 1991 年) に準じて設定した。

14.6.3. 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 µL あるいは S9 mix 500 µL にトップアガー 2 mL を添加し、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-ナフチルイソブチルエーテル調製原液ならびに S9 mix の無菌試験において、菌の増殖は認められなかった。

14.7. 用量設定試験 (予備試験)

14.7.1. 用量

用量設定試験における被験物質の用量として、ガイドライン上定められた 5000 µg/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 µg/プレートを設定した。

14.7.2. 使用プレート数および識別方法

1 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。

#### 14.7.3. 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  $\mu$ L、次いで、代謝活性化系非存在下 (-S9 処理) の場合は、0.1 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液 (pH 7.4) 500  $\mu$ L を、代謝活性化系存在下 (+S9 処理) の場合は、S9 mix 500  $\mu$ L を分注した。さらに、前培養した試験菌株懸濁液 100  $\mu$ L を加えた後、ウォーターバスシェーカー (MM-10, タイテック) を用いて 37°C, 120 回/分の条件で 20 分間振盪した (プレインキュベーション)。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。

#### 14.7.4. 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。

#### 14.7.5. 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測した。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。

生育阻害あるいは析出物によりコロニーアナライザーの使用が不適当な場合は、目視でコロニー数を計数した。

### 14.8. 用量設定試験 (追試験)

#### 14.8.1. 用量

用量設定試験で、-S9 処理の WP2*uvrA* 株以外の菌株ならびに+S9 処理の TA100 株、TA1535 株および TA1537 株において、低用量まで生育阻害が認められ、生育阻害を示さなかった用量は 4 用量未満あるいは 4 用量以下しか得られなかった。したがって、さらに低用量を設定し、用量設定試験 (追試験) を実施した。用量設定試験 (追試験) における被験物質の用量として、次表に示す 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	0.105	0.262	0.655	1.64	4.10	10.2	25.6
TA1535	0.105	0.262	0.655	1.64	4.10	10.2	25.6
TA98	0.655	1.64	4.10	10.2	25.6	64.0	160
TA1537	0.105	0.262	0.655	1.64	4.10	10.2	25.6

《代謝活性化系存在下：+S9 処理》

菌株	用量 (µg/プレート)						
TA100	0.655	1.64	4.10	10.2	25.6	64.0	160
TA1535	0.655	1.64	4.10	10.2	25.6	64.0	160
TA1537	1.64	4.10	10.2	25.6	64.0	160	400

14.8.2. 使用プレート数および識別方法

14.7.2.に記載した方法に準じた。

14.8.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

14.7.3.に記載した方法に準じた。

14.8.4. 析出等の観察

14.7.4.に記載した方法に準じた。

14.8.5. コロニー数計測

14.7.5.に記載した方法に準じた。

14.9. 本試験

14.9.1. 用量

用量設定試験および用量設定試験（追試験）の結果、-S9 処理および+S9 処理のいずれの試験菌株においても変異原性は認められなかった。試験菌株に対する生育阻害作用は、用量設定試験で-S9 処理および+S9 処理の WP2uvrA 株以外の菌株において、低用量または中用量まで認められた。また、用量設定試験（追試験）においては、実施した全ての試験菌株（-S9 処理の TA100 株, TA98 株, TA1535 株, TA1537 株, +S9 処理の TA100 株, TA1535 株, TA1537 株）の高用量（菌株により 10.2~400 µg/プレート）で生育阻害が認められた。したがって、本試験における被験物質の用量として、WP2uvrA 株においては、5000 µg/プレートを最高用量とし、それ以外の菌株においては、生育阻害作用が認められると考えられる用量を最高用量として、次表に示す 6 または 7 用量を設定した。