

《代謝活性化系非存在下：-S9 処理》

菌株	用量 (μg/プレート)						
TA100	0.305	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	39.1
WP2 _{uvrA}	-	156	313	625	1250	2500	5000
TA98	4.88	9.77	19.5	39.1	78.1	156	313
TA1537	0.305	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	313
TA1535	4.88	9.77	19.5	39.1	78.1	156	313
WP2 _{uvrA}	-	156	313	625	1250	2500	5000
TA98	19.5	39.1	78.1	156	313	625	1250
TA1537	4.88	9.77	19.5	39.1	78.1	156	313

14.9.2. 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。

14.9.3. 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。ただし、プレインキュベーションにはウォーターバスシェーカー (M-100^N, タイテック) を用いた。

14.9.4. 析出等の観察

14.7.4.に記載した方法に準じた。

14.9.5. コロニー数計測

14.7.5.に記載した方法に準じた。

14.10. 試験成立条件

- a. 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
 - b. 陽性対照のコロニー数は、同時に実施する陰性対照値の2倍を超えること
- 上記の条件を満たした場合に、試験は成立したと判断した。

14.11. 結果の解析

平均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。

15. 試験結果

15.1. 用量設定試験

結果を Figure 1~5 および Table 1, 2 に示す.

2-ナフチルイソブチルエーテル処理では, -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, -S9 処理および+S9 処理の大腸菌 WP2uvrA 株を除く 4 菌株では, 低用量あるいは中用量以上の用量において試験菌株に対する生育阻害作用が認められた. なお, -S9 処理の TA100 株における 800 μg /プレート以上の用量で, 強い生育阻害の影響により, コロニーアナライザーでは栄養要求性菌株のコロニーと変異株のコロニーが判別できなかったため, 目視によりコロニー数を計数した.

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.

15.2. 被験物質の析出等 (用量設定試験)

処理開始時に, -S9 処理では 51.2 μg /プレート以上の用量で反応液に白濁が生じ, さらに, 800 μg /プレート以上の用量では透明油滴状の析出物が観察された. +S9 処理では 320 μg /プレート以上の用量で反応液に白濁が生じ, さらに, 800 μg /プレート以上の用量で白色粉末状の析出物および透明油滴状の析出物が観察された.

コロニー数計測時には, -S9 および+S9 処理ともに 2000 μg /プレート以上の用量で白色粉末状の析出物がみられ, さらに, 5000 μg /プレートでは透明油滴状の析出物が観察された.

TA100 株の 800 μg /プレートにおいて, 強い生育阻害の影響により, コロニーアナライザーでは栄養要求性菌株のコロニーと変異株のコロニーとが判別できなかったため, 目視によりコロニー数を計数した. また, 析出物の影響により, -S9 処理の 2000 μg /プレート以上の用量および+S9 処理の 5000 μg /プレートでは, コロニーアナライザーの使用が不適当と判断し, 目視によりコロニー数を計数した.

15.3. 用量設定試験一追試験

結果を Figure 6~9 および Table 3, 4 に示す.

2-ナフチルイソブチルエーテル処理では, 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, -S9 処理, TA100 株および TA1537 株の 10.2 μg /プレート以上の用量, TA1535 株の 25.6 μg /プレート, TA98 株の 160 μg /プレートならびに+S9 処理, TA100 株および TA1535 株の 160 μg /プレート, TA1537 株の 160 μg /プレート以上の用量で認められた.

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.

15.4. 被験物質の析出等 (用量設定試験—追試験)

処理開始時、-S9 処理の 64.0 μg /プレート以上の用量および+S9 処理の 400 μg /プレートで反応液に白濁が生じたが、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。

15.5. 本試験

結果を Figure 10~14 および Table 5, 6 に示す。

2-ナフチルイソブチルエーテル処理では、-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、-S9 処理、TA100 株の 19.5 μg /プレート、TA1535 株の 39.1 μg /プレート、TA98 株の 156 μg /プレート以上の用量、TA1537 株の 9.77 μg /プレート以上の用量ならびに+S9 処理、TA100 株の 78.1 μg /プレート以上の用量、TA1535 株および TA1537 株の 156 μg /プレート以上の用量、TA98 株の 1250 μg /プレートで認められた。

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。

15.6. 被験物質の析出等 (本試験)

処理開始時に、-S9 処理では 78.1 μg /プレート以上の用量で反応液に白濁が生じ、さらに、625 μg /プレート以上の用量では透明油滴状の析出物が観察された。+S9 処理では 313 μg /プレート以上の用量で反応液に白濁が生じ、さらに、625 μg /プレート以上の用量で白色粉末状の析出物が、1250 μg /プレート以上の用量では透明油滴状の析出物も観察された。

コロニー数計測時において、-S9 処理では 1250 μg /プレート以上の用量で白色粉末状の析出物が、さらに、2500 μg /プレート以上の用量で透明油滴状の析出物が観察された。+S9 処理では 2500 μg /プレート以上の用量で白色粉末状の析出物が、さらに、5000 μg /プレートで透明油滴状の析出物が観察された。

析出物の影響により、-S9 処理の 1250 μg /プレート以上の用量および+S9 処理の 5000 μg /プレートではコロニーアナライザーの使用が不適当であったため、目視でコロニーを計数した。

16. 考察および結論

2-ナフチルイソブチルエーテルの遺伝子突然変異誘発性を検討するため、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を設定し、試験を行った。その結果、2-ナフチルイソブチルエーテル処理群では、-S9 処理および+S9 処理の全ての試験菌株において、陰性対照と比較し、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、同一追試験および本試験により、再現性が確認された。

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-ナフチルイソブチルエーテルの細菌に対する遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定された。

なお、これまでに2-ナフチルイソブチルエーテルの遺伝毒性および発がん性に関する報告はない。類縁体であるnaphthaleneは、細菌およびヒト細胞株での遺伝子突然変異試験で陰性、CHO細胞、リンパ球および着床前のマウス胚を用いた染色体異常試験で陽性との報告がある¹⁾。さらに、マウス骨髄での染色体異常誘発は認められないが、ショウジョウバエの翅毛スポット試験で陽性反応が認められている¹⁾。1-Methylnaphthaleneおよび2-methylnaphthaleneは、ヒトリンパ球において姉妹染色分体交換を誘発し、さらに、1-methylnaphthaleneは、弱いながらも染色体異常も誘発すると報告されている²⁾。2-Naphthylamineは、マウス骨髄小核試験で明確な陽性反応がみられている³⁾。Glycidil 1-naphthyl etherは、細菌を用いた復帰変異試験で陽性⁴⁾、マウスリンパ球での染色体異常試験で陽性、マウス骨髄での染色体異常試験で陽性との報告もある⁵⁾

17. 参考文献

- 1) Schreiner CA.: Genetic toxicity of naphthalene: a review. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2003, 6(2): 161-183.
- 2) Kulka U, Schmid E, Huber R, Bauchinger M.; Analysis of the cytogenetic effect in human lymphocytes induced by metabolically activated 1- and 2-methylnaphthalene. *Mutat. Res.* 1988, 208(3-4): 155-158.
- 3) Mirkova E, Ashby J.: Activity of the human carcinogens benzidine and 2-naphthylamine in male mouse bone marrow micronucleus assays. *Mutagenesis* 1988 Sep, 3(5): 437-439.
- 4) Einisto P, Hooberman BH, Sinsheimer JE.: Base-pair mutations caused by six aliphatic epoxides in *Salmonella typhimurium* TA100, TA104, TA4001, and TA4006. *Environ Mol Mutagen.* 1993, 21(3): 253-257.
- 5) Das L, Das SK, Chu EH, Sinsheimer JE.: Chromosomal aberrations in mouse lymphocytes exposed in vivo and in vitro to aliphatic epoxides. *Mutat. Res.* 1993, 299(1): 19-24.

18. 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-naphthylisobutyl 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		
DMSO a)	0	103	100	84	9	7	9	22	20	22	16	22	14	10	13	9
		[96	\pm	10]	8	\pm	1]	21	\pm	1]	17	\pm	4]	11	\pm	2]
2-naphthylisobutyl ether	8.19	89	89	92	11	11	12	20	24	17	12	12	15	7	7	9
		[90	\pm	2]	11	\pm	1]	20	\pm	4]	13	\pm	2]	8	\pm	1]
	20.5	79*	89*	80*	7*	12*	7*	23	21	32	13	23	17	6*	8*	4*
		[83	\pm	6]	9	\pm	3]	25	\pm	6]	18	\pm	5]	6	\pm	2]
	51.2	67*	83*	72*	6*	8*	11*	18	26	15	23	15	16	8*	5*	3*
		[74	\pm	8]	8	\pm	3]	20	\pm	6]	18	\pm	4]	5	\pm	3]
	128	53*	54*	52*	9*	14*	10*	21	25	24	12*	19*	19*	6*	3*	3*
		[53	\pm	1]	11	\pm	3]	23	\pm	2]	17	\pm	4]	4	\pm	2]
	320	48*	47*	42*	8*	6*	9*	18	14	13	14*	18*	14*	3*	7*	5*
		[46	\pm	3]	8	\pm	2]	15	\pm	3]	15	\pm	2]	5	\pm	2]
	800	4*	4*	3*	6*	10*	13*	19	21	22	22*	21*	24*	6*	6*	7*
		[4	\pm	1]	10	\pm	4]	21	\pm	2]	22	\pm	2]	6	\pm	1]
	2000 +	1*	2*	0*	6*	6*	5*	19	16	16	11*	14*	17*	3*	1*	3*
		[1	\pm	1]	6	\pm	1]	17	\pm	2]	14	\pm	3]	2	\pm	1]
	5000 +	3*	0*	0*	10*	2*	2*	17	12	7	15*	14*	9*	2*	1*	1*
		[1	\pm	2]	5	\pm	5]	12	\pm	5]	13	\pm	3]	1	\pm	1]
Positive control compound		AF-2			NaN ₃			AF-2			AF-2			9-AA		
Dose($\mu\text{g}/\text{plate}$)		0.01			0.5			0.01			0.1			80		
Revertant colonies		677	694	724	616	616	644	105	105	99	631	717	672	311	465	342
per plate	[698	\pm	24]	625	\pm	16]	103	\pm	3]	673	\pm	43]	373	\pm	81]

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide NaN₃: Sodium azide 9-AA: 9-Aminoacridine hydrochloride

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

* : Growth inhibition was observed.

+ : Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

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

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
DMSO a)	0	104	92	116	12	9	12	31	20	27	28	27	29	25	15	20
		[104	\pm	12]	11	\pm	2]	26	\pm	6]	28	\pm	1]	20	\pm	5]
2-naphthylisobutyl ether	8.19	114	133	119	15	20	10	23	25	19	23	30	26	13	17	13
		[122	\pm	10]	15	\pm	5]	22	\pm	3]	26	\pm	4]	14	\pm	2]
	20.5	119	112	110	12	17	13	19	17	20	31	24	30	10	11	19
		[114	\pm	5]	14	\pm	3]	19	\pm	2]	28	\pm	4]	13	\pm	5]
	51.2	98	112	116	13	8	15	16	21	21	25	24	23	20	14	13
		[109	\pm	9]	12	\pm	4]	19	\pm	3]	24	\pm	1]	16	\pm	4]
	128	86*	75*	91*	15	6	8	18	24	19	20	25	17	13*	10*	11*
		[84	\pm	8]	10	\pm	5]	20	\pm	3]	21	\pm	4]	11	\pm	2]
	320	63*	68*	77*	6*	6*	7*	21	15	15	22	28	29	11*	6*	13*
		[69	\pm	7]	6	\pm	1]	17	\pm	3]	26	\pm	4]	10	\pm	4]
	800	59*	56*	59*	6*	5*	4*	20	14	19	29*	20*	17*	4*	4*	6*
		[58	\pm	2]	5	\pm	1]	18	\pm	3]	22	\pm	6]	5	\pm	1]
	2000 +	49*	58*	64*	12*	5*	13*	16	19	27	24*	31*	21*	12*	11*	16*
		[57	\pm	8]	10	\pm	4]	21	\pm	6]	25	\pm	5]	13	\pm	3]
	5000 +	29*	39*	35*	11*	8*	5*	8	16	12	9*	11*	12*	2*	1*	3*
		[34	\pm	5]	8	\pm	3]	12	\pm	4]	11	\pm	2]	2	\pm	1]
Positive control compound		2-AA			2-AA			2-AA			2-AA			2-AA		
Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)		1			2			10			0.5			2		
Revertant colonies per plate		1149	1062	1013	355	381	330	561	614	623	343	357	388	146	127	161
		[1075	\pm	69]	355	\pm	26]	599	\pm	34]	363	\pm	23]	145	\pm	17]

2-AA: 2-Aminoanthracene

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

* : Growth inhibition was observed.

+ : Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

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

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]											
		TA100			TA1535			TA98			TA1537		
DMSO a)	0	88	93	104	12	13	15	18	26	30	5	9	8
		[95	\pm	8]	[13	\pm	2]	[25	\pm	6]	[7	\pm	2]
2-naphthylisobutyl ether	0.105	107	117	105	9	13	9				9	11	12
		[110	\pm	6]	[10	\pm	2]	[[11	\pm	2]
	0.262	99	114	109	5	9	6				9	5	6
		[107	\pm	8]	[7	\pm	2]	[[7	\pm	2]
	0.655	118	105	108	8	16	11	20	21	20	13	8	12
		[110	\pm	7]	[12	\pm	4]	[20	\pm	1]	[11	\pm	3]
	1.64	96	105	107	15	11	13	29	30	31	10	13	11
		[103	\pm	6]	[13	\pm	2]	[30	\pm	1]	[11	\pm	2]
	4.10	77	93	103	5	9	8	27	24	20	11	10	8
		[91	\pm	13]	[7	\pm	2]	[24	\pm	4]	[10	\pm	2]
	10.2	70*	88*	75*	7	9	8	20	25	24	8*	5*	4*
		[78	\pm	9]	[8	\pm	1]	[23	\pm	3]	[6	\pm	2]
	25.6	71*	77*	76*	3*	5*	9*	26	21	22	5*	2*	7*
		[75	\pm	3]	[6	\pm	3]	[23	\pm	3]	[5	\pm	3]
	64.0							16	21	14			
								[17	\pm	4]			
	160							21*	22*	16*			
								[20	\pm	3]			
Positive control compound		AF-2			NaN ₃			AF-2			9-AA		
Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)		0.01			0.5			0.1			80		
Revertant colonies		606	573	583	573	535	554	590	589	575	321	373	346
per plate	[587	\pm	17]	[554	\pm	19]	[585	\pm	8]	[347	\pm	26]

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide NaN₃: Sodium azide 9-AA: 9-Aminoacridine hydrochloride
a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 $\mu\text{L}/\text{plate}$)
* : Growth inhibition was observed.

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

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]								
		TA100			TA1535			TA1537		
DMSO a)	0	106	96	103	7	9	9	15	16	12
		[102	\pm	5]	8	\pm	1]	14	\pm	2]
2-naphthylisobutyl ether	0.655	100	106	87	8	6	8			
		[98	\pm	10]	7	\pm	1]			
	1.64	114	123	109	9	7	10	21	23	18
		[115	\pm	7]	9	\pm	2]	21	\pm	3]
	4.10	115	128	139	15	11	12	22	20	25
		[127	\pm	12]	13	\pm	2]	22	\pm	3]
	10.2	124	117	127	10	8	12	23	21	26
		[123	\pm	5]	10	\pm	2]	23	\pm	3]
	25.6	97	103	116	8	5	6	17	21	23
		[105	\pm	10]	6	\pm	2]	20	\pm	3]
	64.0	98	90	104	11	7	6	16	23	16
		[97	\pm	7]	8	\pm	3]	18	\pm	4]
	160	75*	68*	75*	7*	8*	6*	16*	15*	14*
		[73	\pm	4]	7	\pm	1]	15	\pm	1]
	400							5*	12*	15*
								[11	\pm	5]
Positive control compound		2-AA			2-AA			2-AA		
Dose($\mu\text{g}/\text{plate}$)		1			2			2		
Revertant colonies		1007	973	905	356	323	349	126	122	119
per plate	[962	\pm	52]	343	\pm	17]	122	\pm	4]

2-AA: 2-Aminoanthracene

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

* : Growth inhibition was observed.

Table 5. Summary data on bacterial reverse mutation test of 2-naphthylisobutyl 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		
DMSO a)	0	94	101	96	9	14	20	20	22	19	21	20	16	12	12	15
		[97	\pm	4]	14	\pm	6]	20	\pm	2]	19	\pm	3]	12	\pm	2]
2-naphthylisobutyl ether	0.305	92	100	105										13	16	8
		[99	\pm	7]										[12	\pm	4]
	0.610	89	98	96	12	8	19							12	8	11
		[94	\pm	5]	13	\pm	6]							[10	\pm	2]
	1.22	96	107	93	16	14	24							15	17	19
		[99	\pm	7]	18	\pm	5]							[17	\pm	2]
	2.44	102	92	93	13	10	27							15	11	13
		[96	\pm	6]	17	\pm	9]							[13	\pm	2]
	4.88	89	89	109	13	18	14				20	24	24	21	15	18
		[96	\pm	12]	15	\pm	3]				[23	\pm	2]	18	\pm	3]
	9.77	82	84	80	9	12	14				19	14	24	19*	16*	11*
		[82	\pm	2]	12	\pm	3]				[19	\pm	5]	15	\pm	4]
	19.5	84*	91*	79*	11	5	13				25	15	18	9*	5*	17*
		[85	\pm	6]	10	\pm	4]				[19	\pm	5]	10	\pm	6]
	39.1				5*	10*	15*				24	20	21			
					[10	\pm	5]				[22	\pm	2]			
	78.1										16	12	18			
											[15	\pm	3]			
	156							17	17	16	16*	13*	23*			
								[17	\pm	1]	17	\pm	5]			
	313							20	12	14	16*	16*	14*			
								[15	\pm	4]	15	\pm	1]			
	625							21	19	18						
								[19	\pm	2]						

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

* : Growth inhibition was observed.

Table 5. -Continued

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100		TA1535		WP2uvrA			TA98			TA1537				
2-naphthylisobutyl ether	1250 +							16	13	24						
								[18	\pm	6]						
	2500 +							12	18	22						
								[17	\pm	5]						
	5000 +							10	13	16						
								[13	\pm	3]						
Positive control compound		AF-2		NaN ₃		AF-2			AF-2			9-AA				
Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)		0.01		0.5		0.01			0.1			80				
Revertant colonies per plate [531	602	550	585	603	627	110	92	107	806	743	805	334	390	317
		561	\pm	37]	605	\pm	21]	103	\pm	10]	785	\pm	36]	347	\pm	38]
AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide		NaN ₃ : Sodium azide					9-AA: 9-Aminoacridine hydrochloride									
+ : Visible precipitation was observed at the end of exposure period.																