

微生物変異原性試験における各種溶媒の適合性の検討

伴野 富美子, 斉藤 昭二, 土屋 敏行, 萩原 雄二

昭和電工株式会社総合研究所 安全性試験センター 〒276-0056 千葉県千葉市緑区大野台1-1-1

Comparative examination of various solvents for the microbial mutagenicity tests

Fumiko Banno, Shoji Saito, Toshiyuki Tsuchiya, Yuji Hagiwara
Safety Evaluation Center, Central Research Laboratory, Showa Denko K. K.
1-1 Ohnodai 1-chome, Midori-ku, Chiba City 267-0056, Japan

Summary

We examined six different solvents to determine their compatibility with the *Salmonella* and *Escherichia*/microsome mutagenicity (Ames) assay. These solvents were acetone, 95% ethanol, ethylene glycol, glycerol formal, formamide and 10% PLURONIC F-68 solution. The standard mutagens used were 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, benzo (a) pyrene, 2-aminoanthracene, 9-aminoacridine hydrochloride monohydrate, sodium azide and bleomycin hydrochloride. Tests were carried out in five histidine-requiring strains TA 98, TA 100, TA 102, TA 1535 and TA 1537 of *S. typhimurium*, and three tryptophan-requiring strains WP 2 *uvrA*, WP 2 *uvrA*/pKM 101 and WP 2/pKM 101 of *E. coli*, both in the absence of and in the presence of metabolic activation (S 9 mix), in two separate experiments. All treatments were performed after a 20-min. pre-incubation procedure. 50 μ l of each test article solution and solvent was administered per plate. Five solvents (acetone, 95% ethanol, ethylene glycol, formamide and 10% PLURONIC F-68 solution) were found to be compatible with the eight test strains. Glycerol formal was found to be toxic (inhibiting growth) to TA 102, TA 1535 and TA 1537. It is suggested that glycerol formal should not be used as a solvent in the Ames test.

Keywords : microbial mutagenicity test, *S. typhimurium*, *E. coli*, solvents

緒言

微生物を用いる変異原性試験（エームス試験）は、一般化学品の変異原性を検出する試験法として広く利用されている。被験物質は、通常、蒸留水あるいは dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解あるいは懸濁して試験に使用するが、これらの溶媒に溶解あるいは懸濁しない化学物質を試験しなければならないことも多い。安衛法における変異原性試験のテストガイドラインには、水、DMSO および acetone のいずれにも難溶である場合、テスト菌

株および S 9 mix に毒性を与えない溶媒を使用できる記載がある。この場合、使用した溶媒が試験に用いる溶媒濃度でテスト菌株および S 9 mix に対して毒性を示さないことを陽性対照物質を用いた試験の用量-反応曲線を作成して確認する必要がある（安衛法における変異原性試験テストガイドラインと GLP, 1991）。

我々は、acetone あるいは 95% ethanol を溶媒としたプレインキュベーション法による試験で、その溶媒濃度（1プレートあたりの添加量）を 100 μ l とした場合、溶媒対照からテスト菌株に毒性を示すことを確認した。しかし、このプレインキュベーション法でテスト菌株に毒性を示す溶媒であっても、プレート法であれば使用可能な溶媒（acetone など）もあった。したがって、使用経験のない溶媒を試験に使用する場合、溶媒の濃度およびプレ

受付：1997年8月6日

受理：1997年12月25日

©日本環境変異原学会

Table 1 Positive control chemicals and test strains

| Test strain | Positive control chemicals (within the limits of dose : $\mu\text{g}/\text{plate}^*$) | |
|-------------------------|--|-----------------|
| | Without S9mix | With S9mix |
| <i>S. typhimurium</i> | | |
| TA98 | AF-2 (0.02500~ 0.40) | B(a)P (1.25~20) |
| TA100 | AF-2 (0.00250~ 0.04) | B(a)P (1.25~20) |
| TA102 | BLM (0.25000~ 4.00) | 2AA (0.50~ 8) |
| TA1535 | NaN ₃ (0.12500~ 2.00) | 2AA (0.50~ 8) |
| TA1537 | 9A (1.25000~20.00) | 2AA (0.50~ 8) |
| <i>E. coli</i> | | |
| WP2 <i>uvrA</i> | AF-2 (0.00250~ 0.04) | 2AA (1.25~20) |
| WP2 <i>uvrA</i> /pKM101 | AF-2 (0.00125~ 0.02) | 2AA (0.50~ 8) |
| WP2/pKM101 | AF-2 (0.01000~ 0.16) | 2AA (1.00~16) |

* The mutagenicity test was performed with five doses at least twice.

AF-2 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acylamide [CAS No. 3688-53-7] (和光純薬工業株)

BLM : bleomycin hydrochloride [CAS No. 9041-93-4] (和光純薬工業株)

NaN₃ : sodium azide [CAS No. 26628-22-8] (和光純薬工業株)

9A : 9-aminoacridine hydrochloride monohydrate [CAS No. 52417-22-8] (Aldrich Chemical Co., Inc.)

B(a)P : benzo(a)pyrene [CAS No. 50-32-8] (和光純薬工業株)

2AA : 2-aminoanthracene [CAS No. 613-13-8] (和光純薬工業株)

インキュベーションの有無も検討する必要がある。

また、エームス試験に使用可能な溶媒に関する文献は、*S. typhimurium* TA 98 あるいは TA 100 株に関するデータはあるが、その他のテスト菌株に関するデータは少ない。

そこで今回、我々は、安衛法テストガイドラインに記載されているテスト菌株など 8 菌株に使用できる適当な溶媒を選択するために、陽性対照物質を用いて 6 種類の溶媒によるエームス試験を実施した。なお、すべてのエームス試験は 37°C、20 分間のプレインキュベーション法で実施し、溶媒（試験溶液）の添加量は 50 μl /プレートとした。

その結果について報告する。

実験材料および方法

1. 検討した溶媒

acetone [CAS No. 67-64-1] (試薬特級, 純度 99.5%, 和光純薬工業株), 95% ethanol [CAS No. 64-17-5] (試薬特級, 純度 99.5%, 関東化学株), ethylene glycol [CAS No. 107-21-1] (試薬特級, 純度 99.5%, 国産化学株), glycerol formal [CAS No. 4740-78-7] (東京化成工業株), formamide [CAS No. 75-12-7] (純度 98.5%, 東京化成工業株) および 10% PLURONIC F-68 solution [CAS No. 9003-11-6] (Sigma Chemical Co.) について検討した。なお、対照溶媒として DMSO [CAS No. 67-68-5] (生化学用, 純度 99.5%, 和光純薬工業株) および蒸留水 (注射用水, 大塚製薬工業株) を使用した。

2. 使用したテスト菌株および陽性対照物質

本研究で使用したテスト菌株, 陽性対照物質とその設定濃度範囲を Table 1 に示した。陽性対照物 2-(2-furyl)

-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide [AF-2], benzo(a)pyrene [B(a)P] および 2-aminoanthracene [2AA] は, それぞれ 10 mg/ml 濃度になるように DMSO に溶解し, 9-aminoacridine hydrochloride monohydrate (9A) は, 50 mg/ml 濃度になるように DMSO に溶解し, sodium azide [NaN₃] および bleomycin hydrochloride [BLM] は, 10 mg/ml 濃度になるように蒸留水に溶解し, それぞれプラスチック製小試料びんに 0.2 ml ずつ分注して -20°C に保管した。これらの陽性対照物質保管溶液は, 使用時に, 各種溶媒を用いて最高濃度の溶液を調製し, その後, 段階希釈により最低濃度の溶液までの各濃度溶液を調製した。

3. 復帰突然変異試験 (エームス試験)

1) 前培養法

L 字管に Oxoid nutrient broth No. 2 (20 ml) を入れ, 解凍した保管テスト菌液を加え, 往復式の振盪機を使用して 37°C, 8 時間培養し, 静止期初期の前培養液を調製した。

2) 試験法

試験は, 代謝活性化系の有無で, 37°C, 20 分のプレインキュベーション法により実施した (Ames, McCann and Yamasaki, 1975; Maron and Ames, 1983)。1 プレートあたりの試験溶液 (溶媒) の添加量は 50 μl とした。使用した S9 は, phenobarbital および 5,6-benzo-flavone で前処理した雄 Sprague-Dawley ラットの肝臓から調製されたものをオリエンタル酵母工業株式会社から購入した。コファクターは, エームス試験用の凍結乾燥品をオリエンタル酵母工業株式会社から購入した。使用したプレート数は, 各用量あたり 2 枚とした。復帰突然変異により生じたコロニー数は, コロニーカウンター

(COLONY ANALYZER CA -11, SYSTEM SCIENCE CO.)を用いて計測した。それぞれの溶媒を使用したすべての試験は、少なくとも2回以上実施し、再現性を確認した。

4. 結果の評価

すべての試験結果について、用量-反応曲線を作成し、蒸留水あるいはDMSOを対照溶媒として実施した試験結果と比較した。さらに陽性対照物質の誘発復帰コロニー数は、それぞれの溶媒対照の2倍以上のコロニー数の認められた範囲で、溶媒対照のコロニー数を差し引き、nmolあるいは μg あたりに換算した。これらの換算値の中で最も高い値を求め、対照溶媒に用いた蒸留水あるいはDMSOの換算値を1.0としたときの割合を算出し比較した。

それぞれの溶媒のテスト菌株に対する毒性は、蒸留水あるいはDMSOを溶媒とした試験のbackground lawnの生育状況を顕微鏡を用いて比較観察することによって確認した。

結 果

今回実施したすべてのエームス試験は、試験系に加える溶媒の添加量を $50\ \mu\text{l}$ とし、 37°C 、20分間のプレインキュベーション法で実施した。その結果を以下に示した。

1) 今回使用した溶媒のうちglycerol formalは、代謝活性化系によらない場合のTA 102, TA 1535およびTA 1537株で、溶媒対照のプレートから菌株の生育阻害が認められた(Fig. 1-E, GおよびI)。これ以外の溶媒の対照プレートには菌株の生育阻害は認められなかった。そしてglycerol formal以外の溶媒を使用した試験においては、すべてのテスト菌株において溶媒対照の2倍以上の誘発復帰コロニー数が用量に依存して認められ、今回使用した陽性対照物質を陽性と判定することができた。これらの結果には再現性が認められた。

2) 各試験における換算値(Fig. 1)および用量-反応曲線(Fig. 2)を比較した場合、テスト菌株および溶媒の種類によっては、それぞれ異なった値および傾き(反応)を示した。

3) Acetone, formamideおよび95% ethanolで調製した9A溶液のTA 1537株の試験において、それぞれの換算値および用量-反応曲線は、DMSOを使用した試験の結果と比較して低い値および傾きを示した(Fig. 1-IおよびFig. 2-A)。なお、acetoneでの9A溶液の調製時に沈殿/析出が認められたが、formamideおよび95% ethanolでの調製時には沈殿/析出は認められなかった。

4) Formamideは、B(a)Pの調製時に沈殿/析出が認められたが、このB(a)P溶液を使用したTA 98株の試験の換算値および用量-反応曲線は、DMSOを溶媒とした試験の結果と類似していた(Fig. 1-BおよびFig. 2-B)。また、TA 100株の試験の換算値はDMSOの結果と

類似していたが、用量-反応曲線の反応性は高かった(Fig. 1-DおよびFig. 2-D)。さらに10% PLURONIC F-68 solutionは、B(a)Pおよび2AAの調製時に白濁が認められたが、これらの溶液を使用した試験の換算値および用量-反応曲線は、DMSOを溶媒とした試験の結果と類似していた(Fig. 1-B, D, H, J, L, N, PおよびFig. 2-B, D, G)。なお、これらの沈殿/析出は、プレートでの培養終了時には認められなかった。

5) Acetone, glycerol formalおよび95% ethanolで調製したB(a)P溶液を用いたTA 98およびTA 100株の試験結果は、DMSOを溶媒とした試験の換算値と比較して1.7~3.2倍の値を示した(Fig. 1-BおよびD)。

6) Acetone, glycerol formalおよび95% ethanolで調製したB(a)P溶液のTA 98株の試験において、それぞれの用量-反応曲線にピークが認められた後、再び上昇する結果が認められた(Fig. 2-B)。

7) Acetone, ethylene glycol, 95% ethanolおよび10% PLURONIC F-68 solutionで調製したBLM溶液を用いたTA 102株の試験の結果は、水を溶媒とした試験の換算値と比較してそれぞれ2倍以上の値を示した。しかし、formamideで調製したBLM溶液の換算値は、水を溶媒とした試験の換算値より低い値を示した(Fig. 1-E)。

8) Acetoneは、揮発性が高いこと、10% PLURONIC F-68 solutionは、ピペット操作中に気泡が立ちやすいことから、これらの溶媒は使用しにくかった。

考 察

エームス試験を実施する場合、通常、水あるいはDMSOなどを使用する。しかし、これらの溶媒に溶解あるいは均一に懸濁しない化合物も多く、このような場合、試験系に毒性を示さない溶媒を選択しなければならないが、選択した溶媒が使用するすべてのテスト菌株に毒性を示さないことを確認しなければならない。これらの溶媒以外にエームス試験に使用が可能であることが示唆されている有機溶媒にacetone, 95% ethanol, ethylene glycol, glycerol formal, formamide, acetonitrile, ethylene glycol dimethyl ether, 1-methyl-2-pyrrolidinone, p-dioxane, tetrahydrofurfuryl alcoholおよびtetrahydrofuranなどがある(Maron et al., 1981)。また、TA 98およびTA 100株を使用したエームス試験(プレインキュベーション法)に用いる各種溶媒の検討を行い、ethylene glycol, formamideなど12種類の溶媒に菌株の生育阻害を示さなかったことの報告もある(幾田由里子ら, 1994)。さらにその他の溶媒として非イオン性界面活性剤であるTween 80を使用して試験溶液を調製している報告などもある(J. M. Lockard et al., 1982; 蜂谷紀之ら, 1994)。我々も、TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537およびWP 2 *uvrA* 株については、20%

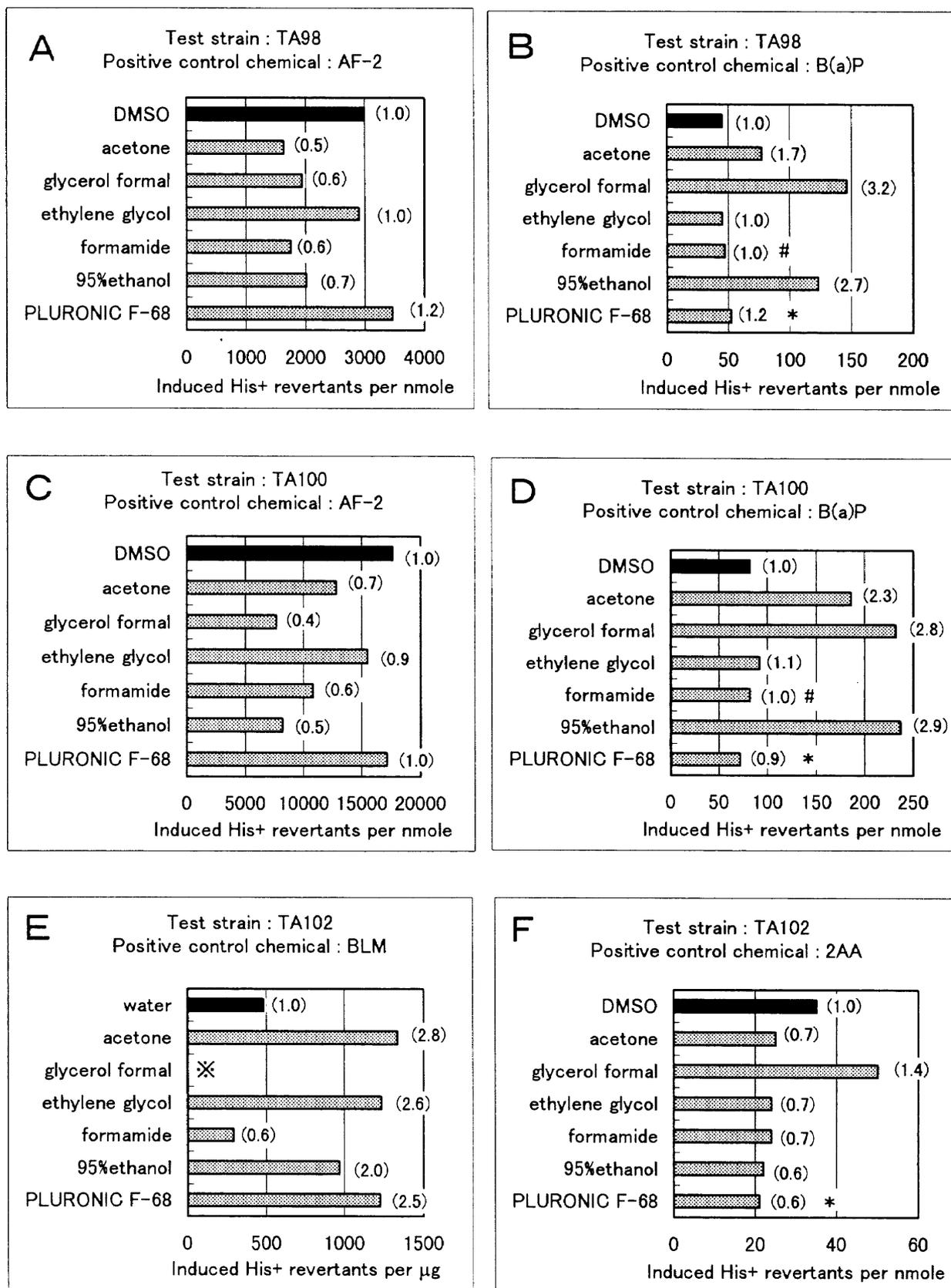


Fig. 1 (A~F)

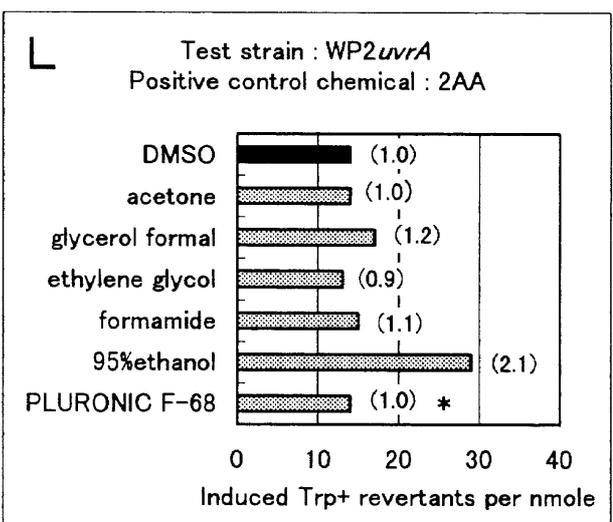
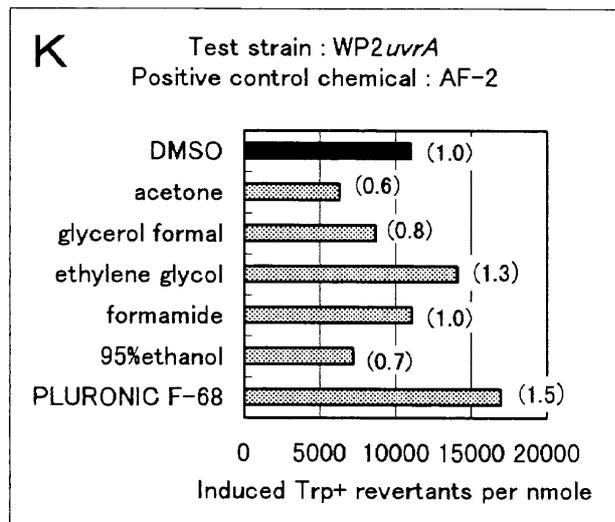
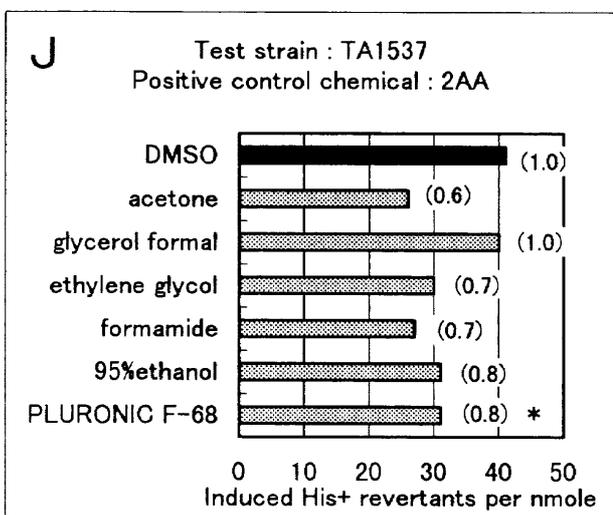
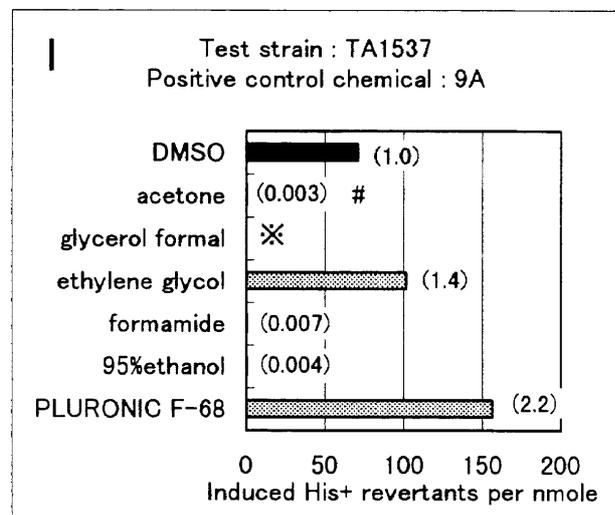
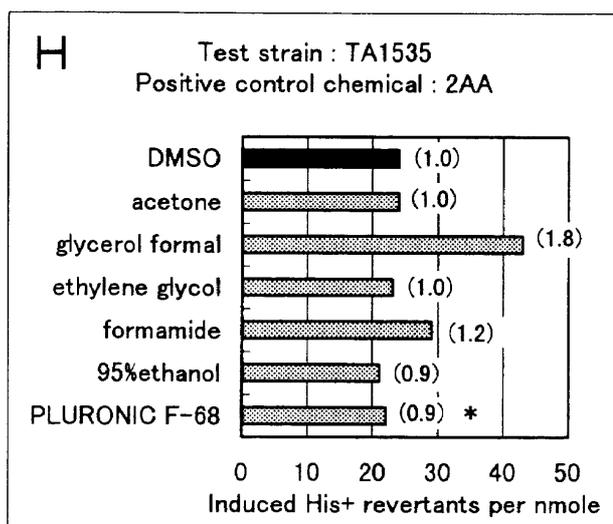
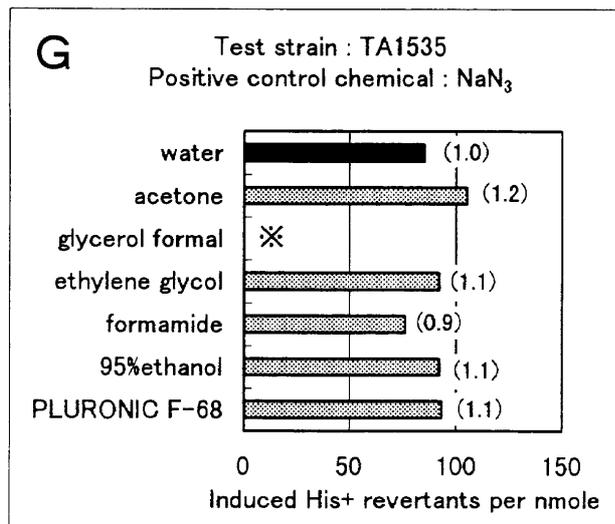


Fig. 1 (G~L)

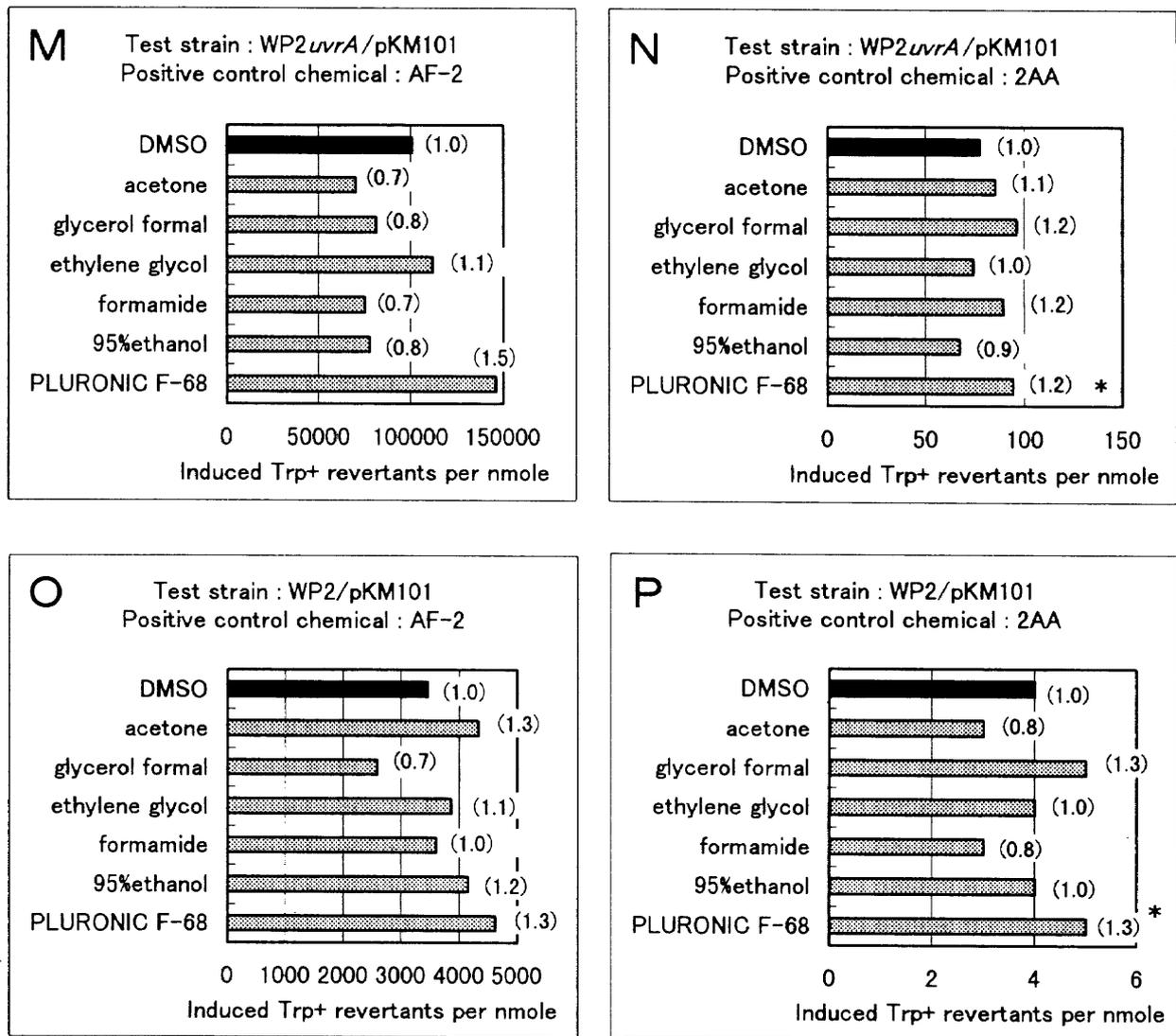


Fig. 1 (M~P)

Fig. 1 Comparative examination of 6 solvents with the microbial mutagenicity test

The microbial mutagenicity test was performed with a 20-min preincubation (Ames et al., 1975 ; Maron and Ames, 1983) at least twice. All test article solutions and solvents were screened with 50 μ l per plate. The number of induced His⁺ or Trp⁺ revertants per nmole or μ g was calculated at every dose ; the highest value for each chemical and strain is indicated. The numbers in parenthesis represent the relative values when the number of His⁺ or Trp⁺ induced revertants per nmole or μ g of DMSO or water is set as 1.0. The symbols, # and * indicated precipitation and white cloudy, respectively. The symbol, ※ indicated growth inhibition (toxicity) of test strain.

Tween 80-DMSO 溶液がエームス試験に有効であることも確認している (未発表)。また, ethylene glycol dimethyl ether は, TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537 および WP2 *uvrA* 株を用いたプレート法 (試験系に加えた溶媒の添加量は 100 μ l) を実施した結果, TA 98 株の溶媒対照のプレートで DMSO の溶媒対照のプレートよりコロニー数がより多く出現する傾向にあり, そのエーテル臭から使用しにくい有機溶媒であった (未発表)。また, PLURONIC POLYOLS の *in vitro* 試験での溶媒適合性については, 培養細胞に対して毒性はなく, 変異原性もないことなどの報告がある (R. J. Papciak et al., 1985)。

今回, 試験系に添加する溶媒量を 50 μ l として, 37°C, 20 分間のプレインキュベーション法で acetone, glycerol formal, ethylene glycol, formamide, 95 % ethanol および 10 % PLURONIC F-68 solution の溶媒について適合性を検討した。その結果, glycerol formal は, TA 1535, TA 1537 および TA 102 株の代謝活性化系によらない場合の溶媒対照プレートから菌株の生育阻害が認められた。その他の有機溶媒は, すべてのテスト菌株において生育阻害は認められず, それぞれの陽性対照物質を陽性と判定することができた。これらの有機溶媒を使用した TA 100 株を用いた試験の結果については, Maron らが報告した TA 100 株を用いたプレインキュベシ

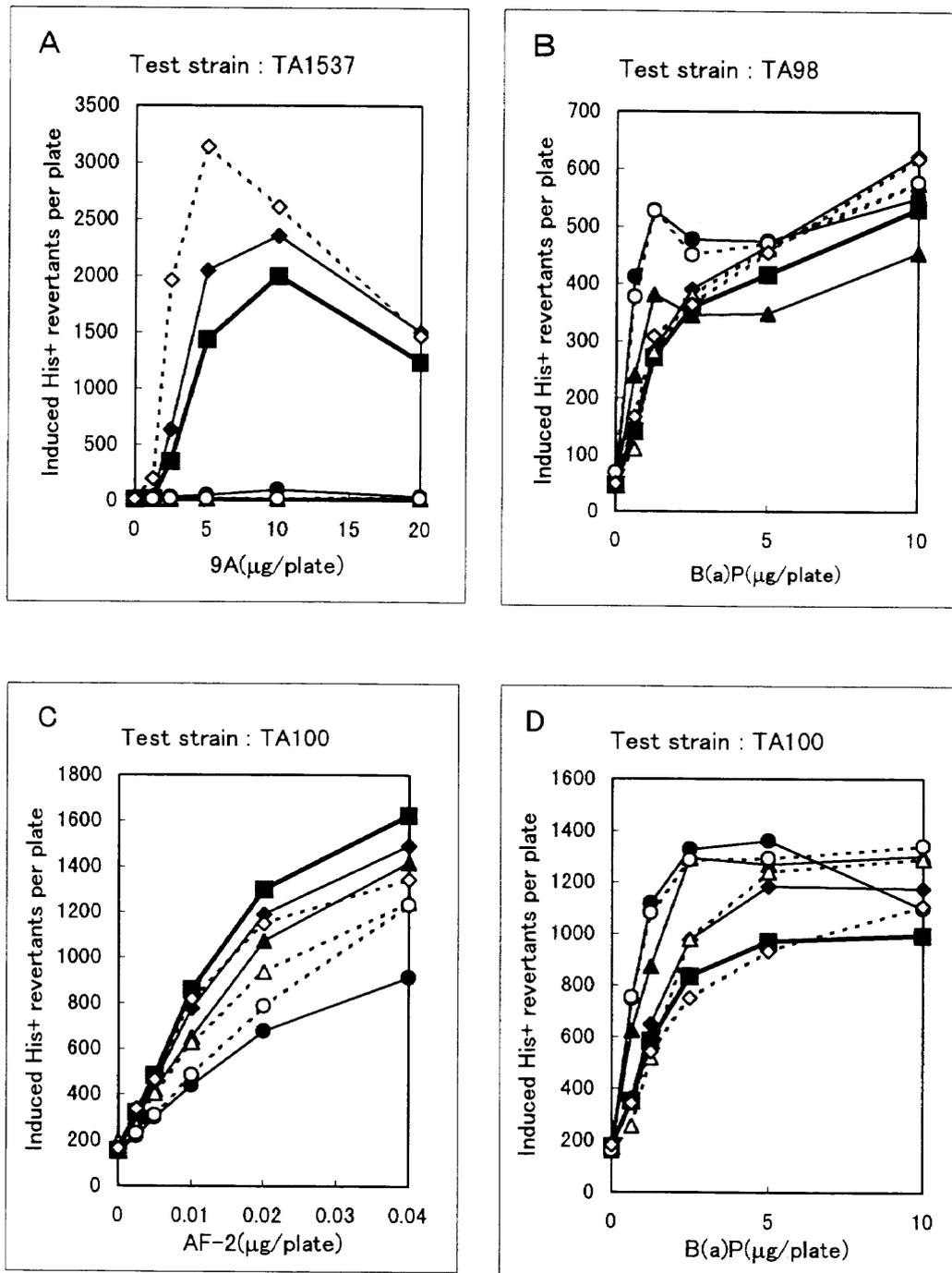


Fig. 2 (A~D)

ン法で陽性判定ができたことと一致していたが, glycerol formal は, TA 1535, TA 1537 および TA 102 株に生育阻害が認められたことから使用しにくい有機溶媒であると思われた。したがって, これまでに使用経験のない溶媒を使用する場合は, 使用するすべてのテスト菌株に対する適合性を検討しなければならないことが示唆された。各試験における換算値および用量-反応曲線を比較した場合, テスト菌株および溶媒の種類によっては, それぞれ異なる値および傾きを示した。DMSO あるいは蒸留水を対照溶媒として使用した試験

結果と比較して, 溶媒によっては明らかに低い換算値あるいはより高い換算値を示し, 用量-反応曲線も低い反応性あるいは高い反応性を示した。この原因として, 低い換算値あるいは反応性を示した溶媒のうち, 試験溶液の調製時に沈殿/析出が認められた 9 A の acetone 溶液については実質用量の低下によるものと推察された。しかし, 陽性対照物質の沈殿/析出の有無にかかわらず換算値あるいは反応性の低下が認められた溶媒については, 今回の試験結果からは原因を推定することはできなかった。また, 換算値あるいは反応性の増加した溶媒の

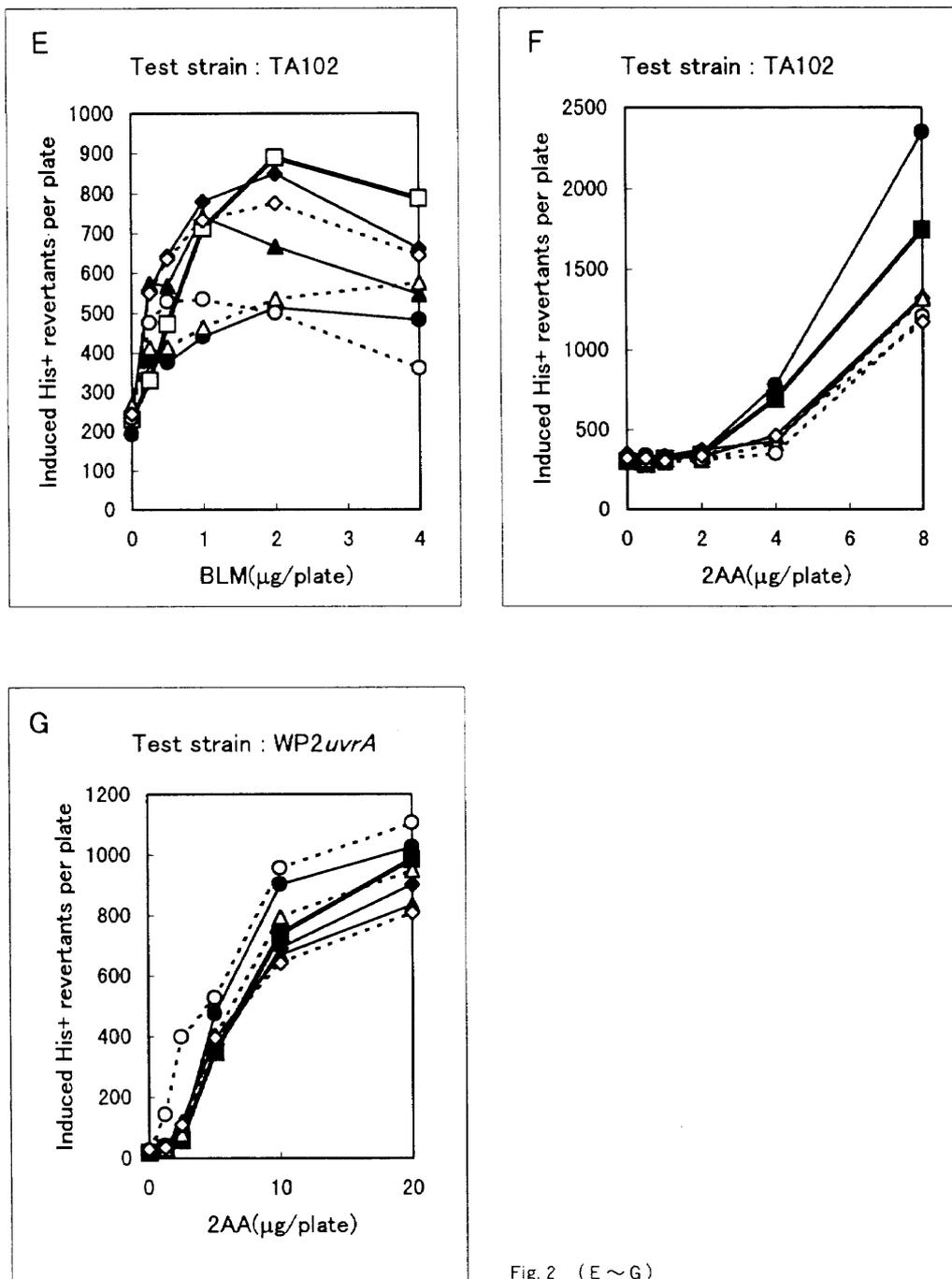


Fig. 2 Typical dose-response curves to 6 solvents of positive control chemicals
 The symbols, ■, □, ▲, ●, ◆, △, ○ and ◇ indicated DMSO, water, acetone, glycerol, formamide, 95% ethanol and PLURONIC F-68 (10%), respectively.

原因についても今後のさらなる検討が必要であると思われる。このような溶媒による誘発復帰コロニー数の出現に対する影響についてはいくつかの報告があり、2Aの変異原性は、acetoneを溶媒とした場合よりDMSOを溶媒とした方がより活性が高く、使用したDMSO量が結果に影響することが知られている (Anderson et al., 1980)。我々が実施したTA 1535およびTA 1537を用いた試験における2Aの変異原性についても、溶媒としてacetoneよりもDMSOを使用した方が用量-反応曲線

の反応性は高かった。また、Nestmannら (Earle R. Nestmann et al., 1985) は、hexachloroacetoneのエームス試験において、DMSOに溶解した場合は変異原性を示し、時間経過とともにその変異原活性は増強したことを、acetoneに溶解した場合には陰性であり、時間経過によって変異原活性を示すことはなかったことを確認している。その原因としてDMSOのhexachloroacetone溶液は、色の変化が観察され、化学反応が溶液中で起こっていることを示した。さらにMoriら (Yukio Mori et al.,

1985) は *S. typhimurium* TA 100 株 に対する N-nitrosodialkylamines の変異原性の有機溶媒の抑制作用について報告しており、水を溶媒として使用したエームス試験では、ラット肝 S9 の存在下で陽性を示すが、DMSO を溶媒とした場合、変異原性を検出することができなかつたかあるいは水を使用した場合の結果より低い値を示すことを確認している。その原因として肝 S9 による代謝活性化系の過程での影響の結果によるものと考察している。一方、Arimoto ら (Sakae Arimoto et al., 1982) は、エームス試験における tryptophan-pyrolysate の変異原性に対する溶媒の影響について報告しており、acetonitrile は、Trp-P-1 および Trp-P-2 の変異原性を増強し、Trp-P-2 の変異原性に対する acetonitrile の増強作用は、試験系における活性代謝物の増加の結果であったことを示している。

その他の結果として、acetone, glycerol formal および 95 % ethanol で調製した B(a)P 溶液の TA 98 株の試験において、それぞれの用量-反応曲線にピークが認められた後、再び上昇する結果が認められたが、この原因については不明であるが試験系に何らかの影響を与えているものと思われた。

以上の結果から通常使用されている水あるいは DMSO 以外の溶媒をエームス試験に使用する場合、使用するすべてのテスト菌株に対する溶媒の適合性を十分に考慮しなければならないことが示唆された。

参考文献

Ames, B. N., J. McCann and E. Yamasaki (1975) Methods for

detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test, *Mutat. Res.*, 31, 347-364.

Anderson, D. and D. B. McGregor (1980) The effect of solvents upon the yield of revertants in the *Salmonella*/activation mutagenicity assay, *Carcinogenesis*, 1, 363-366.

蜂谷紀之, 滝澤行雄 (1994) プラスチック添加剤の変異原性試験, 変異原性試験, 3, 147-154.

幾田由里子, 山崎裕子 (1994) Ames 試験に用いる溶媒の検討, 日本環境変異原学会要旨集, p. 89.

Lockard, J. M., J. W. Prater, C. J. Viau, H. G. Enoch and P. S. Sabharwal, with technical assistance from N. S. Hansberger, J. R. Gleason Jr., S. J. Kamber, C. E. Lambert and J. C. Carter (1982) Comparative study of the genotoxic properties of Eastern and Western U. S. shale oils, crude petroleum, and coal-derived oil, *Mutat. Res.*, 102, 221-235.

Maron, D.M. and B. N. Ames (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutat. Res.*, 113, 173-215.

Maron, D., J. Katzenellenbogen and B. N. Ames (1981) Compatibility of organic solvents with the *Salmonella*/microsome test, *Mutat. Res.*, 88, 343-350.

Nestmann, Earle R., George R. Douglas, David J. Kowbel, and Tina R. Harrington (1985) Solvent interactions with test compounds and recommendations for testing to avoid artifacts, *Environmental Mutagenesis*, 7, 163-170.

Mori, Y., H. Yamazaki, K. Toyoshi, Y. Emi, K. Uchida, M. Tsutsumi and Y. Konishi (1985) Inhibitory effect of organic solvents on the mutagenicity of N-nitrosodialkylamines in *Salmonella*, *Mutat. Res.*, 142, 153-158.

Arimoto, S., N. Nakano, Y. Ohara, K. Tanaka and H. Hayatsu (1982) A solvent effect on the mutagenicity of tryptophan-pyrolysate mutagens in the *Salmonella*/mammalian microsome assay, *Mutat. Res.*, 102, 105-112.