グリセリン三酢酸エステル
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

材料および方法 …… 3

結果および考察 …… 7

結　　論 …… 7

特　記　事　項 …… 8

文　　献 …… 8

Tables　1～3

【要　　約】

グリセリン三酢酸エステルの変異原性の有無を、細菌を用いる復帰突然変異試験により検討し、陰性の結果を得た。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* の5菌株を用い、S9 mix 無添加および添加の条件でプレインキュベーション法により用量設定試験および2回の本試験を行った。用量設定試験を 50.0～5000 μg/プレート の用量で行ったところ、いずれの検定菌においても、S9 mix 無添加試験および添加試験とも抗菌性は認められなかった。したがって、本試験では S9 mix 無添加試験および添加試験を 313～5000 μg/プレート の範囲で5用量を設定して実施した。

その結果、2回の本試験とも用いた5種類の検定菌のいずれの用量においても、溶媒対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められなかったことから、グリセリン三酢酸エステルは、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。

【緒　　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、グリセリン三酢酸エステルについて、細菌を用いる復帰突然変異試験をプレインキュベーション法[1]により実施した。

この試験は、サルモネラ菌（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突然変異[2]、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突然変異[3]を指標とした変異原性の検出系である。

試験は、被験物質をそのまま検定菌に作用させる S9 mix 無添加試験と、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素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 S9 mix 添加試験とからなっている。

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毒性試験ガイドライン：471、472」に準拠し、「化学物質GLP基準」（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

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ものを用い、各菌株の特性確認は、凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性および膜変異（rfa）とアンピシリン耐性因子pKM 101（プラスミド）の有無について調べ、特性が維持されていることを確認した。

試験に際して、ニュートリエントブロスNo.2（Oxoid）を入れたL字型試験管に解凍した種菌を一定量接種し、37℃で10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。試験に用いた各検定菌液の濁度を Appendix 1に示した。

〔被験物質〕

グリセリン三酢酸エステル（略称：ＴＡ、CAS No. 102-76-1）は、分子量 218.21 の透明液体である。構造式等は Appendix 2に示した。用いた被験物質は、ロット番号　　純度 98.2 wt%（不純物：0.9 %ジアセチン）であり、　　から供与された。被験物質は、使用時まで室温で保管した。本ロットについては、試験期間中安定であることを確認した。

ＴＡは、局方注射用水（ロット番号：K6I94、㈱大塚製薬工場）に溶解して最高濃度の調製液を調製した後、同溶媒で所定の濃度に希釈して速やかに試験に用いた。

〔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。

AF2	: 2-(2-ﾌﾘﾙ)-3-(5-ﾆﾄﾛ-2-ﾌﾘﾙ)ｱｸﾘﾙｱﾐﾄﾞ	(上野製薬㈱	ﾛｯﾄ番号 46,	純度99.9%)
SA	: ｱｼﾞ化ﾅﾄﾘｳﾑ	(和光純薬工業㈱	ﾛｯﾄ番号 TWR3330,	純度90%以上)
9AA	: 9-ｱﾐﾉｱｸﾘｼﾞﾝ	(Sigma Chem.Co.	ﾛｯﾄ番号 96F05641,	純度98%以上)
2AA	: 2-ｱﾐﾉｱﾝﾄﾗｾﾝ	(和光純薬工業㈱	ﾛｯﾄ番号 DSF2950,	純度90%以上)

AF2 および 2AA はジメチルスルホキシド（DMSO、和光純薬工業㈱）に溶解したものを－20℃で凍結保存し、用時解凍した。9AA は DMSO に、SA は超純水に溶解し、速やかに試験に用いた。

〔培地および S9 mix 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) ﾊﾞｸﾄｱｶﾞｰ (Difco)	0.6%	(B)* L-ﾋｽﾁｼﾞﾝ	0.5 mM
塩化ﾅﾄﾘｳﾑ	0.5%	D-ﾋﾞｵﾁﾝ	0.5 mM

* : WP2 *uvrA* 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、極東製薬工業㈱製の最少グルコース寒天培地（ロット番号：HY1604、1996年10月25日製造、および HY2001、1997年２月７日製造）を用いた。なお、培地１ℓあたりの組成は下記のとおりである。

硫酸ﾏｸﾞﾈｼｳﾑ・7水和物	0.2g	水酸化ﾅﾄﾘｳﾑ	0.66g
ｸｴﾝ酸・1水和物	2g	ｸﾞﾙｺｰｽ	20g
ﾘﾝ酸水素二ｶﾘｳﾑ	10g	ﾊﾞｸﾄｱｶﾞｰ（清水食品）	15g
ﾘﾝ酸一ｱﾝﾓﾆｳﾑ	1.92g		

径 90 mm のシャーレ１枚あたり 30 mℓ を流して固めたものである。

3） S9 mix（1 ㎖中下記の成分を含む）

S9**	0.1 ㎖	NADH	4 μmol
塩化ﾏｸﾞﾈｼｳﾑ	8 μmol	NADPH	4 μmol
塩化ｶﾘｳﾑ	33 μmol	ﾅﾄﾘｳﾑ-ﾘﾝ酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μmol
ｸﾞﾙｺｰｽ-6-ﾘﾝ酸	5 μmol		

** ：7週齢の Sprague-Dawley 系雄ラットにフェノバルビタール(PB)および 5,6-ベンゾフラボン(BF)の併用投与を行い、酵素誘導して作製された S9（キッコーマン㈱、ロット番号：RAA-355、1996年11月22日製造）を購入し、-80℃で凍結保存し、用時に解凍して用いた。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、肝臓の摘出および S9 の調製は5日目。

〔試 験 方 法〕

プレインキュベーション法により、S9 mix 無添加試験および S9 mix 添加試験を行った。

小試験管中に、被験物質調製液 0.1 ㎖、リン酸緩衝液 0.5 ㎖（S9 mix 添加試験においては S9 mix 0.5 ㎖）、検定菌液 0.1 ㎖ を混合し、37℃で20分間プレインキュベーションしたのち、トップアガー2㎖を加えて混和し、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使用溶媒、または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとに用いた陽性対照物質の名称および用量は各Table 中に示した。溶媒および陽性対照群は、同時に実施した他の試験と共通とした。培養は37℃で48時間行い、生じた変異コロニー数を目視またはコロニーカウンターを用いて算定した。抗菌性の有無については、肉眼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、溶媒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、結果の再現性の確認を行った。

〔判 定 基 準〕

結果の判定に統計学的手法は用いないこととした。

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌の S9 mix 無添加試験あるいは S9 mix 添加試験において、被験物質を含有する平板上における変異コロニー数の平均値が、溶媒対照値の2倍以上に増加し、その増加に再現性および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もの（陽性）と判定することとした。

【結果および考察】

〔用量設定試験〕

ＴＡについて 50.0～5000 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ の範囲で公比を約３として、試験を実施した（Table １）。その結果、すべての検定菌の S9 mix 無添加試験および添加試験のいずれにおいても抗菌性は認められなかった。

したがって、本試験における最高用量は、S9 mix 無添加試験および添加試験とも 5000 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ とした。

〔本試験〕

S9 mix 無添加試験および添加試験のいずれにおいても、313～5000 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ の範囲で公比を２として２回の本試験を実施した（Table ２、３）。その結果、すべての検定菌において、２回の試験とも溶媒対照値の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。

ＴＡについて実施したすべての試験において、用いた試験の調製液および S9 mix への雑菌の混入は認められなかった。また、陽性対照試験ではいずれの検定菌においても陽性対照物質の変異原性が検出され、溶媒対照値とともに、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、本試験系の有効性が確認された。

【結　　論】

以上の結果に基づき、グリセリン三酢酸エステルは、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。

【特　記　事　項】

試験の全過程を通して、試験の信頼性に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。

【文　　献】

1）Matsushima, T., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A., Sawamura, M.: in "Short-Term Test Systems for Detecting Carcinogens" Norpoth, K.H., Garner, R.C. eds. Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1980) pp. 273-285

2）Maron, D.M., Ames, B.N.: Mutation Research 113: 173-215 (1983)

3）Venitt, S., Crofton-Sleigh, C.: in "Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens" de Serres, F.J., Ashby, J. eds, Elsevier/North-Holland, New York (1981) pp. 351-360

Table 1. Cytotoxicity of triacetin on bacteria

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	WP2 *uvrA*	TA98	TA1537	
S9 mix (-)	0	136 126 115 (126 ± 10.5)	10 13 12 (12 ± 1.5)	17 26 31 (25 ± 7.1)	24 22 30 (25 ± 4.2)	3 12 9 (8 ± 4.6)	
	50.0	90	8	13	24	5	
	150	113	14	16	21	6	
	500	91	8	21	15	3	
	1500	88	14	16	21	7	
	5000	104	12	13	23	7	
S9 mix (+)	0	140 128 136 (135 ± 6.1)	20 13 16 (16 ± 3.5)	24 21 27 (24 ± 3.0)	36 39 38 (38 ± 1.5)	7 7 9 (8 ± 1.2)	
	50.0	139	9	20	38	6	
	150	114	15	18	25	9	
	500	116	13	25	35	4	
	1500	98	10	29	26	8	
	5000	112	14	19	28	10	
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose (μg /plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
	Number of colonies / plate	465 466 441 (457 ± 14.2)	296 322 317 (312 ± 13.8)	91 91 86 (89 ± 2.9)	508 532 569 (536 ± 30.7)	1333 1252 1413 (1333 ± 80.5)	
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate	540 558 513 (537 ± 22.6)	182 219 198 (200 ± 18.6)	352 366 387 (368 ± 17.6)	511 504 533 (516 ± 15.1)	212 229 231 (224 ± 10.4)	

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

Purity was 98.2 wt% and 0.9% diacetin was contained as an impurity.

Table 2. Mutagenicity of triacetin on bacteria (I)

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	WP2 *uvrA*	TA98	TA1537	
S9 mix (-)	0	87 93 88 (89 ± 3.2)	11 12 13 (12 ± 1.0)	26 33 18 (26 ± 7.5)	19 17 25 (20 ± 4.2)	7 9 7 (8 ± 1.2)	
	313	101 101 98 (100 ± 1.7)	9 12 4 (8 ± 4.0)	22 21 24 (22 ± 1.5)	17 18 19 (18 ± 1.0)	1 7 4 (4 ± 3.0)	
	625	82 103 106 (97 ± 13.1)	13 14 15 (14 ± 1.0)	27 9 18 (18 ± 9.0)	17 20 24 (20 ± 3.5)	2 2 5 (3 ± 1.7)	
	1250	85 91 84 (87 ± 3.8)	4 11 9 (8 ± 3.6)	15 21 23 (20 ± 4.2)	23 24 17 (21 ± 3.8)	2 7 6 (5 ± 2.6)	
	2500	103 94 78 (92 ± 12.7)	7 6 11 (8 ± 2.6)	21 18 21 (20 ± 1.7)	21 18 18 (19 ± 1.7)	3 3 7 (4 ± 2.3)	
	5000	105 92 82 (93 ± 11.5)	9 13 12 (11 ± 2.1)	23 15 14 (17 ± 4.9)	23 25 24 (24 ± 1.0)	3 2 3 (3 ± 0.6)	
S9 mix (+)	0	95 97 117 (103 ± 12.2)	19 16 12 (16 ± 3.5)	27 33 29 (30 ± 3.1)	24 27 30 (27 ± 3.0)	7 9 12 (9 ± 2.5)	
	313	110 111 110 (110 ± 0.6)	18 11 15 (15 ± 3.5)	22 28 22 (24 ± 3.5)	27 34 27 (29 ± 4.0)	7 8 7 (7 ± 0.6)	
	625	105 118 103 (109 ± 8.1)	14 13 14 (14 ± 0.6)	25 31 27 (28 ± 3.1)	32 32 32 (32 ± 0.0)	5 3 7 (5 ± 2.0)	
	1250	115 125 119 (120 ± 5.0)	17 8 18 (14 ± 5.5)	28 24 22 (25 ± 3.1)	26 31 37 (31 ± 5.5)	6 11 5 (7 ± 3.2)	
	2500	110 118 110 (113 ± 4.6)	14 14 7 (12 ± 4.0)	16 22 22 (20 ± 3.5)	27 31 26 (28 ± 2.6)	6 4 5 (5 ± 1.0)	
	5000	114 108 115 (112 ± 3.8)	17 4 16 (12 ± 7.2)	21 14 31 (22 ± 8.5)	19 33 27 (26 ± 7.0)	4 8 3 (5 ± 2.6)	
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose (μg /plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
	Number of colonies / plate	475 469 452 (465 ± 11.9)	559 451 399 (470 ± 81.6)	74 107 85 (89 ± 16.8)	495 615 637 (582 ± 76.4)	2098 2272 1810 (2060 ± 233.3)	
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate	634 642 546 (607 ± 53.3)	204 192 226 (207 ± 17.2)	336 350 360 (349 ± 12.1)	399 388 363 (383 ± 18.4)	206 185 178 (190 ± 14.6)	

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

Purity was 98.2 wt% and 0.9% diacetin was contained as an impurity.

Table 3. Mutagenicity of triacetin on bacteria (II)

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	WP2 *uvrA*	TA98	TA1537	
S9 mix (-)	0	118 104 122 (115 ± 9.5)	11 15 14 (13 ± 2.1)	18 21 17 (19 ± 2.1)	24 27 31 (27 ± 3.5)	7 10 5 (7 ± 2.5)	
	313	144 125 133 (134 ± 9.5)	15 13 17 (15 ± 2.0)	32 24 24 (27 ± 4.6)	21 27 30 (26 ± 4.6)	2 4 6 (4 ± 2.0)	
	625	113 129 123 (122 ± 8.1)	12 17 15 (15 ± 2.5)	30 18 17 (22 ± 7.2)	23 22 39 (28 ± 9.5)	4 5 6 (5 ± 1.0)	
	1250	127 125 104 (119 ± 12.7)	15 18 21 (18 ± 3.0)	16 18 18 (17 ± 1.2)	21 28 32 (27 ± 5.6)	4 3 4 (4 ± 0.6)	
	2500	113 122 112 (116 ± 5.5)	14 13 16 (14 ± 1.5)	18 18 19 (18 ± 0.6)	26 21 32 (26 ± 5.5)	7 7 5 (6 ± 1.2)	
	5000	122 123 106 (117 ± 9.5)	6 10 9 (8 ± 2.1)	21 20 20 (20 ± 0.6)	30 15 35 (27 ± 10.4)	4 7 3 (5 ± 2.1)	
S9 mix (+)	0	138 146 147 (144 ± 4.9)	13 10 15 (13 ± 2.5)	14 30 22 (22 ± 8.0)	38 39 38 (38 ± 0.6)	9 9 11 (10 ± 1.2)	
	313	122 143 127 (131 ± 11.0)	13 14 17 (15 ± 2.1)	28 29 17 (25 ± 6.7)	38 46 30 (38 ± 8.0)	4 10 12 (9 ± 4.2)	
	625	115 123 134 (124 ± 9.5)	12 8 13 (11 ± 2.6)	23 12 15 (17 ± 5.7)	25 38 40 (34 ± 8.1)	9 9 4 (7 ± 2.9)	
	1250	126 129 127 (127 ± 1.5)	27 17 17 (20 ± 5.8)	18 22 27 (22 ± 4.5)	44 38 41 (41 ± 3.0)	4 11 5 (7 ± 3.8)	
	2500	114 108 133 (118 ± 13.1)	14 15 18 (16 ± 2.1)	18 18 16 (17 ± 1.2)	40 29 33 (34 ± 5.6)	8 5 5 (6 ± 1.7)	
	5000	155 128 122 (135 ± 17.6)	20 12 15 (16 ± 4.0)	19 29 26 (25 ± 5.1)	38 36 37 (37 ± 1.0)	9 4 9 (7 ± 2.9)	
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose (μg /plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
	Number of colonies / plate	489 486 558 (511 ± 40.7)	317 362 365 (348 ± 26.9)	88 79 81 (83 ± 4.7)	660 606 605 (624 ± 31.5)	1427 1126 1180 (1244 ± 160.5)	
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate	467 542 516 (508 ± 38.1)	222 229 192 (214 ± 19.7)	291 326 282 (300 ± 23.2)	456 449 462 (456 ± 6.5)	199 185 189 (191 ± 7.2)	

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

Purity was 98.2 wt% and 0.9% diacetin was contained as an impurity.