ジブチルアジピン酸の 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 概定究 所

【目次】

	頁
要約	 1
緒。	 2
材料および試験方法	 3
試験結果および考察	 6
参考文献	 7
Tables $1 \sim 3$	

ジブチルアジピン酸の変異原性の有無について、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施 することにより検討した。

検定菌として、 $Salmonella\ typhimurium\ TA100$, TA1535, TA98, TA1537 および $Escherichia\ coli\ WP2\ uvr$ A を用い、直接法および代謝活性化法のいずれも、用量設定試験は、 $50\sim5000\ \mu g/7v-1$ の用量で行ったところ、抗菌性が認められなかったことから、本試験は $312.5\sim5000\ \mu g/7v-1$ の用量で実施した。

その結果、2回の本試験とも、用いた5種類の検定菌について、いずれの用量でも陰性対照の2倍以上となる変異コロニー数の増加が認められなかったことから、ジブチルアジピン酸は、用いた試験系において変異原性を有しない(陰性)と判定された。

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、ジブチルアジピン酸について、細菌を用いる復帰突然変異試験をプレート法により実施した。

この試験は、サルモネラ(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 、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 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直接法と、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素(S9 混液)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代謝活性化法とからなっている。

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OBCD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。

【材料および試験方法】

「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日にアメリカ合衆国、から分与を受けた。
- E. coli WP2 uvrA 株は1979年5月9日にを受けた。

から分与

検定菌は、-80℃以下で凍結保存した。各検定菌は、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(pKM101)の有無についての特性確認を行った。

試験に際して、ニュートリエントブロス№ 2 (Oxoid) を入れたL字型試験管に種菌を接種し、37°C、約10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。

〔被験物質〕

ジブチルアジピン酸 (CAS No. 105-99-7、以下DBAと略) は、分子量 258.40 の液体である。純度 99.8%のもの(ロット番号: 不純物不明、

)を から供与された。被験物質は、使用時まで室温で保管した。 DBAは、ジメチルスルホキシド(以下 DMSO と略、ロット番号: APQ5928、和光純薬工業㈱)に 50 mg/ml になるように調製した後、同溶媒で更に公比2ないし約3で希釈したものを、速やかに試験に用いた。

秦野研究所において、DMSO 中での安定性試験を溶媒が共通であるので、当研究所で実施した染色体異常試験(H-93-265)における低濃度および高濃度である 2.30~mg/ml および 520~mg/ml の 2 濃度について、室温遮光条件下で実施した。その結果、調製後4時間における各 3 サンプルの平均含量は、それぞれ初期値(0 時間)の平均に対して、101および 97.2%であった。これらの値は、当研究所で規定した許容範囲内にあった (Appendix 1)。

また、本試験Ⅱに用いた調製検体について、含量測定試験を行った結果、3.125 mg/

 $m\ell$ 溶液は、 $105\sim107\%$ 、50 $mg/m\ell$ 溶液の含量は既定濃度に対し、 $99.8\sim105\%$ であった。これらの値も当研究所の規定した許容範囲内であった(Appendix 2)。

以上の結果から、DBAは DMSO 溶液中では安定であり、また調製液中の被験物質の含量は所定の値の範囲内にあることが確認された。

[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, 2AA は 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 は蒸留水に溶解し、速やかに試験に用いた。

[培地および S9 混液の組成]

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) パケトアガー (Difco) 0.6% (B) L-ヒスチジン 0.5 mM 塩化ナトリウム 0.5% ピオチン 0.5 mM

*: WP2 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、日清製粉株式会社製の最少寒天培地(用量設定試験および本試験ともにロット番号: DJ020GI、1993年7月6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。

硫酸マグネシウム・ア水和物 0.2g 水酸化ナトリウム 0.66g
 クエン酸・1水和物 2g グルコース 20g
 リン酸水素二カリウム 10g ハクトアカー (Difco) 15g
 リン酸ーアンモニウム 1.92g

径 90 mm のシャーレ1枚あたり 30 ml を流して固めてある。

3) S9 混液 (1 ml中下記の成分を含む)

\$9	0.1 ml	NADH	4	$\mu\mathrm{mol}$
塩化マクネシウム	8 μ mol	NADPH	4	μ mol
塩化がな	33 μ mol	ナトリウムーリン酸緩衝液	100	
グルコース-6-リン酸	$5 \mu mol$	(pH 7.4)	100	μшог

**: 7週齢の Sprague-Dawley 系雄ラットをフェノバルビタール(PB)および 5、6-ベンゾフラボン(BF)の併用投与で酵素誘導して作製した S9(キッコーマン(株)、ロット番号 RAA-297、1993年8月27日製造)を 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ある。

〔試験方法〕

プレート法を用いて、直接法および代謝活性化法によって試験を行った。

小試験管中にトップアガー2 ml、被験物質調製液 0.1 ml、リン酸緩衝液 0.5 ml(代謝活性化試験においては S9 混液 0.5 ml)、検定菌液 0.1 ml を混合したのち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 DMSO または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとの陽性対照物質の名称および用量は Table 1~3に示した。培養は37℃で48時間行い、生じた変異コロニー数を算定した。抗菌性の有無については、肉眼的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、陰性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、それぞれそ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、再現性の確認を行った。

〔判定基準〕

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌の直接法あるいは代謝活性化法において、 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、陰性対照のそれに比べて 2倍以上に増加し、かつ、その増加に再現性あるいは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(陽性)と判定することとした。

【試験結果および考察】

試験の全過程を通して、信頼性に悪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。

〔用量設定試験〕

結果を Table 1 に示した。 DBAについて、50~5000 μg/1ν-トの範囲で公比を約3とし、試験を実施したところ、いずれの検定菌においても、すべての用量で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を、すべての検定菌において、直接法、代謝活性 化法ともに 5000 µg/フレート とすることとした。

[本試験]

結果を Table 2、3 に示した。 DBAについて、すべての検定菌について、直接法、代謝活性化法ともに、312.5~5000 μg/プレートの範囲で、公比を 2 とし、試験を実施した。 2 回の試験を通して、用いた 5 種類の検定菌の直接法、代謝活性化法のいずれにおいても、用量依存性のある変異コロニー数の増加は認められなかった。また、TA100 の直接法 5000 μg/プレート においてのみ抗菌性が認められた。

DBAについて実施した試験において、陽性対照群では、いずれの検定菌においても変 異コロニー数の増加が認められ、陰性対照群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。

以上の結果に基づき、DBA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。

【参考文献】

- (1) Maron, D. M. and Ames, B. N.: Mutation Research. 113: 173-215 (1983)
- (2) Green, M. H. L.: in "Handbook of Mutagenicity Test Procedures." Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C. (eds.) Elsevier, Amsterdam, New York Oxford. (1984) pp. 161-187.

Table 1. Results of preliminary cytotoxicity test in reverse mutation test of Dibutyl adipate** on bacteria

With (+) or without (-) S9 Mix	Test substance dose (µg /plate)	Ba TA100	se - pair substitution t	of revertants (number			
i i	(µg /plate)			· ·		Frameshift type	
<u> </u>		17/100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
-	_	104 138 135 (126 ± 18.8)	11 12 14	15 22 14	22 24 14 (20± 5.3)	9 6 6	
	50	132	18	17	29	11	
	150	135	14	18	16	8	
	500	88	11	20	15	11	
S9Mix	1500	117	11	26	27	11	
(-)	5000	100	9	25	27	1	
	0	151 137 123 (137 ± 14.0)	21 15 10 (15± 5.5)	32 33 24 (30± 4.9)	28 39 30 (32 ± 5.9)	6 15 8 (10 ± 4.7)	
	50	126	18	20	44	18	
	150	130	15	23	32	12	
	500	162	13	22	22	22	***
S9Mix	1500	134	18	31	35	14	
(+)	5000	116	10	26	33	16	
Positive	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
-	Dose (µg /plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
S9 Mix (-)	Number of	493 456 502	376 367 370	183 173 197	761 796 776	985 1095 1152	
D-10	colonies / plate	(484 ± 24.4)	(371 ± 4.6)	(184 ± 12.1)	(778 ± 17.6)		
Positive	Chemical Dece (ver felete)	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
control S9 Mix (+)	Dose (µg /plate) Number of	937 879 941	2 260 250 245	10 1100 909 921	0.5 300 337 342	2 205 107 106	
אומו כני (ד)	colonies / plate	(919 ± 34.7)	1			205 197 196 (199 ± 4.9)	

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

^{**:} Purity was 99.8 %.

Table 2. Results of reverse mutation test (I) of Dibutyl adipate** on bacteria

With (+) or	Test substance	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean ± S.D.)							
without (-)	dose	Ba	Base - pair substitution type			Frameshift type			
S9 Mix	(µg /plate)	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537			
	0	121 146 139	18 10 10	23 17 26	19 17 22	8 5 9			
	312.5	(135 ± 12.9) 99 132 111	(13 ± 4.6) 13 8 9	24 16 19	29 17 18	7 8 5			
	625	(114 ± 16.7) 122 118 115	12 14 10	13 17 23	(21 ± 6.7) 24 14 28	7 4 7			
	1250	(118 ± 3.5) 111 101 102	14 9 11	20 30 11	(22 ± 7.2)	4 3 6			
S9Mix	2500	(105 ± 5.5) 96 118 99	11 8 7	(20± 9.5) 18 18 17 (18± 0.6)	(18± 4.0) 21 24 17 (21± 3.5)	3 6 4	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		
(-)	5000	(104 ± 11.9) 81 * 101 * 89 * (90 ± 10.1)	8 9 6	(18± 0.6) 15 28 22 (22± 6.5)	(21 ± 3.5) 17 15 18 (17 ± 1.5)	6 5 2			
;									
	0	134 117 137 (129 ± 10.8)	12 12 11 (12 ± 0.6)	25 24 22 (24± 1.5)	31 30 25 (29 ± 3.2)	7 11 9 (9± 2.0)			
į	312.5	$ \begin{array}{c cccc} & 123 \pm 10.8 \\ \hline & 106 & 128 & 137 \\ & & (& 124 \pm 15.9) \end{array} $	$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	23 29 36 (29 ± 6.5)	30 38 33 (34± 4.0)	13 11 16 (13 ± 2.5)			
i	625	144 142 129 (138 ± 8.1)	13 14 19	26 32 29	46 42 26 (38 ± 10.6)	16 11 9			
	1250	131 129 154 (138 ± 13.9)	15 10 13 (13 ± 2.5)	29 24 31 (28 ± 3.6)	29 31 35 (32 ± 3.1)	15 12 11 (13 ± 2.1)			
S9Mix	2500	145 107 133 (128 ± 19.4)	16 25 12 (18 ± 6.7)	27 32 29 (29 ± 2.5)	26 35 31 (31 ± 4.5)				
(+)	5000	149 143 135 (142 ± 7.0)	14 21 15 (17± 3.8)	25 36 26 (29 ± 6.1)	28 31 17 (25± 7.4)	17 8 11 (12± 4.6)			
Positive	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA			
control	Dose (µg /plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80			
S9 Mix (-)	Number of	540 510 519	372 324 350	143 169 156	640 583 663	1056 1078 1208			
water (-)	colonies / plate	(523 ± 15.4)	(349 ± 24.0)	(156 ± 13.0)	(629 ± 41.2)	1			
Positive	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA			
control	Dose (µg /plate)	1	2	10	0.5	2			
S9 Mix (+)	Number of	1041 994 1011		1424 1525 1581	286 277 307	200 248 173			
	colonies / plate	(1015±23.8)			(290 ± 15.4)				

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

Table 3. Results of reverse mutation test (II) of Dibutyl adipate** on bacteria

With (+) or	Test substance		Number	of revertants (number	er of colonies / plate,	Mean ± S.D.)	
without (-)	dose	Rı	se - pair substitution t			Frameshift type	
	(µg /plate)		TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9 Mix	O O	113. 114 130	10 14 17	29 25 31	25 33 20	12 6 10	
	U	(119 ± 9.5)		(28 ± 3.1)		(9± 3.1)	
	212.5		7 5 12	18 18 24	26 28 23	6 9 4	-
	312.5		1	(20 ± 3.5)	(26 ± 2.5)		İ
		(113 ± 4.2)	10 9 9	23 28 35	24 22 20	3 3 7	
	625	117 119 144	1	(29 ± 6.0)	(22 ± 2.0)	(4± 2.3)	
	1070	(127 ± 15.0) 120 140 102	9 16 3	23 18 16	24 33 27	8 5 4	
	1250				_	(6± 2.1)	
200 41	2500	(121 ± 19.0)			24 18 29	7 5 5	
S9Mix	2500	124 120 99	8 8 10	_	_		
4.5		(114 ± 13.4)	,				
(-)	5000	79 + 93 + 99 1	ł	15 21 24	22 25 24	6 4 4	
		(90 ± 10.3)	(8± 4.0)	(20 ± 4.6)	(24± 1.5)	(5± 1.2)	<u> </u>
					<u> </u>		
							
			1				
	·						
	0	124 133 119	13 15 10	19 26 19	41 29 31	11 14 21	
		(125 ± 7.1)	(13± 2.5)	(21 ± 4.0)	(34± 6.4)	(15± 5.1)	I
	312.5	107 145 150	6 10 10	23 20 24	26 37 37	16 13 10	
		(134 ± 23.5	(9± 2.3)	(22 ± 2.1)	(33 ± 6.4)	(13 ± 3.0)	
	625	153 147 136	12 17 12	31 23 17	42 38 41	18 15 10	
		(145 ± 8.6)	1	(24 ± 7.0)	(40± 2.1)	(14± 4.0)	
	1250	138 135 140	11 9 10	26 26 33	34 41 42	11 14 10	
		(138 ± 2.5)	1			1	
S9Mix	2500	138 150 160	17 9 9	22 28 21	29 37 43	8 11 20	
U)IIII	2500	(149 ± 11.0)	i .	(24 ± 3.8)			
(+)	5000	131 124 137	17 15 16	22 23 39	44 35 23	10 18 15	
(,)	3000	(131 ± 6.5	1	1		l l	1
	<u> </u>	(151 ± 0.5	(102 1.0)	(28 - 3.3)	(342 10.3)	(142 4.0)	
	-						
							
Positive	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	04.4	
		 	1			9AA	
control	Dose (µg /plate)		0.5 540 425 384	0.01	0.1	80	
S9 Mix (-)	Number of	599 602 636		152 145 133	873 867 870	2064 1805 1776	
Destate	colonies / plate	(612 ± 20.6)				(1882 ± 158.6)	
Positive	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
control	Dose (µg /plate)		2	10	0.5	2	
S9 Mix (+)	Number of	1137 1027 1155	327 312 291	1530 1506 1500	300 348 283	276 318 307	
	colonies / plate	(1106 ± 69.3)	(310 ± 18.1)			(300 ± 21.8)	

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