

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

素野 純行 研究所

【目 次】

	頁
要 約	1
緒 言	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 1～3	

【要 約】

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 *uvrA* 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、50～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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 312.5～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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。

【結 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、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⁽¹⁾、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⁽²⁾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
から分与
を受けた。

検定菌は、 -80°C 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No.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(株)) 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/

ml 溶液は、105～107%、50 mg/ml 溶液の含量は既定濃度に対し、99.8～105%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	: フリルラマイド	(上野製薬(株))	ロット番号 46,	純度99.9%)
SA	: アジ化ナトリウム	(和光純薬工業(株))	ロット番号 TWR3330,	純度90%以上)
9AA	: 9-アミアクリジン	(Sigma Chem. Co.)	ロット番号 96F05641,	純度98%以上)
2AA	: 2-アミアントラゼン	(和光純薬工業(株))	ロット番号 DSF2950,	純度90%以上)

AF2, 2AA は DMSO (和光純薬工業(株)) 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) バクアガー (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 1 l あたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム・7水和物	0.2 g	水酸化ナトリウム	0.66 g
クエン酸・1水和物	2 g	グルコース	20 g
リン酸水素二カルシウム	10 g	バクアガー (Difco)	15 g
リン酸一アンモニウム	1.92 g		

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)

S9 ^{**}	0.1 ml	NADH	4 μmol
塩化マグネシウム	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
グルコース-6-リン酸	5 μmol		

^{**} : 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。

小試験管中にトッパアガー 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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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)	Number of revertants (number of colonies / plate , Mean \pm S.D.)															
		Base - pair substitution type									Frameshift type						
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537			
S9Mix (-)	0	104	138	135	11	12	14	15	22	14	22	24	14	9	6	6	
		(126 \pm 18.8)			(12 \pm 1.5)			(17 \pm 4.4)			(20 \pm 5.3)			(7 \pm 1.7)			
	50	132			18			17			29			11			
	150	135			14			18			16			8			
	500	88			11			20			15			11			
	1500	117			11			26			27			11			
	5000	100			9			25			27			1			
S9Mix (+)	0	151	137	123	21	15	10	32	33	24	28	39	30	6	15	8	
		(137 \pm 14.0)			(15 \pm 5.5)			(30 \pm 4.9)			(32 \pm 5.9)			(10 \pm 4.7)			
	50	126			18			20			44			18			
	150	130			15			23			32			12			
	500	162			13			22			22			22			
	1500	134			18			31			35			14			
	5000	116			10			26			33			16			
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA			
	Dose (μg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80			
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose (μg /plate)	1			2			10			0.5			2			
	Number of colonies / plate	493	456	502	376	367	370	183	173	197	761	796	776	985	1095	1152	
		(484 \pm 24.4)			(371 \pm 4.6)			(184 \pm 12.1)			(778 \pm 17.6)			(1077 \pm 84.9)			
	Number of colonies / plate	937	879	941	260	250	245	1100	909	921	300	337	342	205	197	196	
		(919 \pm 34.7)			(252 \pm 7.6)			(977 \pm 107.0)			(326 \pm 22.9)			(199 \pm 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 without (-) S9 Mix	Test substance dose (μg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate , Mean \pm S.D.)																			
		Base - pair substitution type									Frameshift type										
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537							
S9Mix (-)	0	121	146	139	18	10	10	23	17	26	19	17	22	8	5	9	(135 \pm 12.9)	(13 \pm 4.6)	(22 \pm 4.6)	(19 \pm 2.5)	(7 \pm 2.1)
	312.5	99	132	111	13	8	9	24	16	19	29	17	18	7	8	5	(114 \pm 16.7)	(10 \pm 2.6)	(20 \pm 4.0)	(21 \pm 6.7)	(7 \pm 1.5)
	625	122	118	115	12	14	10	13	17	23	24	14	28	7	4	7	(118 \pm 3.5)	(12 \pm 2.0)	(18 \pm 5.0)	(22 \pm 7.2)	(6 \pm 1.7)
	1250	111	101	102	14	9	11	20	30	11	14	22	17	4	3	6	(105 \pm 5.5)	(11 \pm 2.5)	(20 \pm 9.5)	(18 \pm 4.0)	(4 \pm 1.5)
	2500	96	118	99	11	8	7	18	18	17	21	24	17	3	6	4	(104 \pm 11.9)	(9 \pm 2.1)	(18 \pm 0.6)	(21 \pm 3.5)	(4 \pm 1.5)
	5000	81 *	101 *	89 *	8	9	6	15	28	22	17	15	18	6	5	2	(90 \pm 10.1)	(8 \pm 1.5)	(22 \pm 6.5)	(17 \pm 1.5)	(4 \pm 2.1)
S9Mix (+)	0	134	117	137	12	12	11	25	24	22	31	30	25	7	11	9	(129 \pm 10.8)	(12 \pm 0.6)	(24 \pm 1.5)	(29 \pm 3.2)	(9 \pm 2.0)
	312.5	106	128	137	17	6	8	23	29	36	30	38	33	13	11	16	(124 \pm 15.9)	(10 \pm 5.9)	(29 \pm 6.5)	(34 \pm 4.0)	(13 \pm 2.5)
	625	144	142	129	13	14	19	26	32	29	46	42	26	16	11	9	(138 \pm 8.1)	(15 \pm 3.2)	(29 \pm 3.0)	(38 \pm 10.6)	(12 \pm 3.6)
	1250	131	129	154	15	10	13	29	24	31	29	31	35	15	12	11	(138 \pm 13.9)	(13 \pm 2.5)	(28 \pm 3.6)	(32 \pm 3.1)	(13 \pm 2.1)
	2500	145	107	133	16	25	12	27	32	29	26	35	31	13	10	11	(128 \pm 19.4)	(18 \pm 6.7)	(29 \pm 2.5)	(31 \pm 4.5)	(11 \pm 1.5)
	5000	149	143	135	14	21	15	25	36	26	28	31	17	17	8	11	(142 \pm 7.0)	(17 \pm 3.8)	(29 \pm 6.1)	(25 \pm 7.4)	(12 \pm 4.6)
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA							
	Dose (μg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80							
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA							
	Dose (μg /plate)	1			2			10			0.5			2							
	Number of colonies / plate	540	510	519	372	324	350	143	169	156	640	583	663	1056	1078	1208	(523 \pm 15.4)	(349 \pm 24.0)	(156 \pm 13.0)	(629 \pm 41.2)	(1114 \pm 82.1)
		1041	994	1011	210	213	193	1424	1525	1581	286	277	307	200	248	173	(1015 \pm 23.8)	(205 \pm 10.8)	(1510 \pm 79.6)	(290 \pm 15.4)	(207 \pm 38.0)

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

*:Inhibition was observed against growth of the bacteria. **: Purity was 99.8 %.

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

With (+) or without (-) S9 Mix	Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies / plate , Mean \pm S.D.)																				
		Base - pair substitution type									Frameshift type											
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537								
S9 Mix (-)	0	113	114	130	10	14	17	29	25	31	25	33	20	12	6	10	(119 \pm 9.5)	(14 \pm 3.5)	(28 \pm 3.1)	(26 \pm 6.6)	(9 \pm 3.1)	
	312.5	110	112	118	7	5	12	18	18	24	26	28	23	6	9	4	(113 \pm 4.2)	(8 \pm 3.6)	(20 \pm 3.5)	(26 \pm 2.5)	(6 \pm 2.5)	
	625	117	119	144	10	9	9	23	28	35	24	22	20	3	3	7	(127 \pm 15.0)	(9 \pm 0.6)	(29 \pm 6.0)	(22 \pm 2.0)	(4 \pm 2.3)	
	1250	120	140	102	9	16	3	23	18	16	24	33	27	8	5	4	(121 \pm 19.0)	(9 \pm 6.5)	(19 \pm 3.6)	(28 \pm 4.6)	(6 \pm 2.1)	
	2500	124	120	99	8	8	10	26	22	15	24	18	29	7	5	5	(114 \pm 13.4)	(9 \pm 1.2)	(21 \pm 5.6)	(24 \pm 5.5)	(6 \pm 1.2)	
	5000	79 *	93 *	99 *	7	12	4	15	21	24	22	25	24	6	4	4	(90 \pm 10.3)	(8 \pm 4.0)	(20 \pm 4.6)	(24 \pm 1.5)	(5 \pm 1.2)	
S9 Mix (+)	0	124	133	119	13	15	10	19	26	19	41	29	31	11	14	21	(125 \pm 7.1)	(13 \pm 2.5)	(21 \pm 4.0)	(34 \pm 6.4)	(15 \pm 5.1)	
	312.5	107	145	150	6	10	10	23	20	24	26	37	37	16	13	10	(134 \pm 23.5)	(9 \pm 2.3)	(22 \pm 2.1)	(33 \pm 6.4)	(13 \pm 3.0)	
	625	153	147	136	12	17	12	31	23	17	42	38	41	18	15	10	(145 \pm 8.6)	(14 \pm 2.9)	(24 \pm 7.0)	(40 \pm 2.1)	(14 \pm 4.0)	
	1250	138	135	140	11	9	10	26	26	33	34	41	42	11	14	10	(138 \pm 2.5)	(10 \pm 1.0)	(28 \pm 4.0)	(39 \pm 4.4)	(12 \pm 2.1)	
	2500	138	150	160	17	9	9	22	28	21	29	37	43	8	11	20	(149 \pm 11.0)	(12 \pm 4.6)	(24 \pm 3.8)	(36 \pm 7.0)	(13 \pm 6.2)	
	5000	131	124	137	17	15	16	22	23	39	44	35	23	10	18	15	(131 \pm 6.5)	(16 \pm 1.0)	(28 \pm 9.5)	(34 \pm 10.5)	(14 \pm 4.0)	
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA								
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01			0.5			0.01			0.1			80								
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA								
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1			2			10			0.5			2								
	Number of colonies / plate	599	602	636	540	425	384	152	145	133	873	867	870	2064	1805	1776	(612 \pm 20.6)	(450 \pm 80.9)	(143 \pm 9.6)	(870 \pm 3.0)	(1882 \pm 158.6)	
		1137	1027	1155	327	312	291	1530	1506	1500	300	348	283	276	318	307	(1106 \pm 69.3)	(310 \pm 18.1)	(1512 \pm 15.9)	(310 \pm 33.7)	(300 \pm 21.8)	

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

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria. **: Purity was 99.8 %.