



1,4-ブタンジオール
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	8
特 記 事 項	8
文 献	8
Tables 1~4	

【要 約】

1,4-ブタンジオー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、2回の本試験および再現性試験を行った。用量設定試験を 50.0~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で行ったところ、すべての検定菌において S9 mix 無添加試験および添加試験のいずれ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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で用量を設定して実施した。また、TA1537 の S9 mix 無添加試験では、本試験 I の 625 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で変異コロニー数が溶媒対照値の2倍以上となったため、本試験と同一の用量で再現性試験を実施した。

その結果、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倍以上となる再現性のあ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、1,4-ブタンジオールは、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。

【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、1,4-ブタンジオールについて、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（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, 4)}を指標とした変異原性の検出系である。

試験は、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素（S9 mix）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、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°C 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°C で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〕

1,4-ブタンジオール (略称: BD、CAS No. 110-63-4) は、分子量 90.12 の無色透明液体である。構造式等は Appendix に示した。用いた被験物質は、ロット番号 純度 99.8 wt% (不純物: 0.06 wt% 1,4-アセトキシヒドロキシブテン-2、0.07 wt% 2-(4-ヒドロキシブチルオキシ) テトラヒドロフラン) であり、
から供与された。被験物質は、使用時まで乾燥窒素でシールし、室温で遮光保管した。

BDは、局方注射用水 (ロット番号: K5A80、(株)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、同溶媒で公比約3ないし2で希釈し、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-アミノアクリジン (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(株))	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(株)) に溶解したものを -20°C で凍結保存し、用時解凍した。9AA は DMSO に、SA は純水に溶解し、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) バクトアガー (Difco)	0.6%	(B)* L-ヒスチジン	0.5 mM
塩化ナトリウム	0.5%	D-ビオチン	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(株)製の最少寒天培地 (ロット番号: HY0302、1995年9月29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
リン酸水素二カウム	10 g	バクトアガー (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 mix (1 ml中下記の成分を含む)

S9**	0.1 ml	NADH	4 μ mol
塩化マグネシウム	8 μ mol	NADPH	4 μ mol
塩化カルウム	33 μ mol	ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μ mol
グルコース-6-リン酸	5 μ mol		

** : 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-333、1995年9月8日製造および RAA-338、同年12月15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、ラットの解剖および S9 の調製は5日目であった。

[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 ml、リン酸緩衝液 0.5 ml (S9 mix 添加試験においては S9 mix 0.5 ml)、検定菌液 0.1 ml を混合し、37°Cで20分間往復振とう培養したのち、トッパアガー 2 ml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。各検定菌ごとの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°C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、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、本試験および再現性試験においては、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、結果の再現性の確認を行った。また、TA1537 の S9 mix 無添加試験については、本試験 I と本試験 II の結果が異なるため、再現性試験を行った。

〔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 S9 mix 無添加あるいは S9 mix 添加条件において、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。ただし、2回の本試験の一方でのみ変異コロニー数の平均値が溶媒対照値の2倍以上となる用量が認められた場合において、その溶媒対照値が10以下であり、変異コロニー数の増加に用量依存性が認められない場合は陰性とする事とした。

【結果および考察】

〔用量設定試験〕

BDについて 50.0~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とした。

〔本試験〕

S9 mix 無添加試験および添加試験で、ともに 313~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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、TA1537 の S9 mix 無添加試験においては、本試験 I の 625 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で、溶媒対照値の2倍以上となる変異コロニー数を示したが、本試験 II では溶媒対照値の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。また、TA1537 の S9 mix 添加試験と、その他の検定菌においては、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。

〔再現性試験〕

TA1537 の S9 mix 無添加試験では、本試験 I と本試験 II の結果が異なるため、本試験と同一の用量で再現性試験を行った (Table 4)。その結果、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。

BDについて実施したすべての試験において、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、溶媒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。

【結 論】

以上の結果に基づき、1,4-ブタンジオールは、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、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。

【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.: *Mutat. Res.* 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
- 4) Green, M.H.L.: in "Handbook of Mutagenicity Test Procedures" Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C. eds, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford (1984) pp. 161-187

Table 1. Results of preliminary cytotoxicity test in reverse mutation test of 1,4-butanediol 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			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537			
S9mix (-)	0	127	143	131	18	8	14	30	13	25	27	44	23	22	18	22	
		(134 \pm 8.3)			(13 \pm 5.0)			(23 \pm 8.7)			(31 \pm 11.2)			(21 \pm 2.3)			
	50.0	146			9			20			17			17			
	150	141			9			26			27			22			
	500	161			14			32			21			32			
	1500	151			7			17			25			17			
	5000	165			17			22			24			13			
S9mix (+)	0	123	114	138	13	14	8	26	24	22	25	29	30	8	11	5	
		(125 \pm 12.1)			(12 \pm 3.2)			(24 \pm 2.0)			(28 \pm 2.6)			(8 \pm 3.0)			
	50.0	145			13			30			26			19			
	150	152			9			22			34			22			
	500	129			10			35			16			16			
	1500	142			16			34			31			18			
	5000	155			12			28			28			10			
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			
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	318	398	446	348	344	325	119	108	108	620	649	622	601	527	776	
		(387 \pm 64.7)			(339 \pm 12.3)			(112 \pm 6.4)			(630 \pm 16.2)			(635 \pm 127.9)			
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	696	742	802	256	259	277	619	624	548	276	275	284	297	264	233	
		(747 \pm 53.2)			(264 \pm 11.4)			(597 \pm 42.5)			(278 \pm 4.9)			(265 \pm 32.0)			

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene
Purity was 99.8 wt% and 0.06 wt% 1,4-acetoxyhydroxybutene-2 and 0.07 wt% 2-(4-hydroxybutyloxy) tetrahydrofuran were contained as impurities.

Table 2. Results of reverse mutation test (I) of 1,4-butanediol 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			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537			
S9mix (-)	0	177	161	156	9	9	12	25	27	23	25	20	24	14	16	15	
		(165 \pm 11.0)			(10 \pm 1.7)			(25 \pm 2.0)			(23 \pm 2.6)			(15 \pm 1.0)			
	313	159	167	160	14	13	21	20	29	24	31	40	27	15	14	28	
		(162 \pm 4.4)			(16 \pm 4.4)			(24 \pm 4.5)			(33 \pm 6.7)			(19 \pm 7.8)			
	625	156	151	144	22	14	22	29	29	30	25	23	36	27	40	27	
		(150 \pm 6.0)			(19 \pm 4.6)			(29 \pm 0.6)			(28 \pm 7.0)			(31 \pm 7.5)			
	1250	178	186	162	21	11	11	29	30	26	29	39	29	24	20	29	
	(175 \pm 12.2)			(14 \pm 5.8)			(28 \pm 2.1)			(32 \pm 5.8)			(24 \pm 4.5)				
2500	148	139	145	8	13	9	29	20	21	37	27	22	20	28	15		
	(144 \pm 4.6)			(10 \pm 2.6)			(23 \pm 4.9)			(29 \pm 7.6)			(21 \pm 6.6)				
5000	114	159	156	5	11	10	30	29	18	29	38	37	24	27	27		
	(143 \pm 25.2)			(9 \pm 3.2)			(26 \pm 6.7)			(35 \pm 4.9)			(26 \pm 1.7)				
S9mix (+)	0	176	165	163	13	14	20	38	22	21	34	34	32	29	18	20	
		(168 \pm 7.0)			(16 \pm 3.8)			(27 \pm 9.5)			(33 \pm 1.2)			(22 \pm 5.9)			
	313	157	166	173	14	17	12	35	29	33	25	39	46	17	21	14	
		(165 \pm 8.0)			(14 \pm 2.5)			(32 \pm 3.1)			(37 \pm 10.7)			(17 \pm 3.5)			
	625	177	158	173	11	5	8	29	33	21	26	21	31	31	31	27	
		(169 \pm 10.0)			(8 \pm 3.0)			(28 \pm 6.1)			(26 \pm 5.0)			(30 \pm 2.3)			
	1250	169	149	178	20	12	10	35	23	33	26	29	40	21	29	12	
	(165 \pm 14.8)			(14 \pm 5.3)			(30 \pm 6.4)			(32 \pm 7.4)			(21 \pm 8.5)				
2500	158	155	166	14	10	8	31	20	19	30	34	37	11	11	14		
	(160 \pm 5.7)			(11 \pm 3.1)			(23 \pm 6.7)			(34 \pm 3.5)			(12 \pm 1.7)				
5000	150	186	173	10	12	20	18	23	33	32	29	19	18	23	20		
	(170 \pm 18.2)			(14 \pm 5.3)			(25 \pm 7.6)			(27 \pm 6.8)			(20 \pm 2.5)				
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA			
	Dose (μg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80			
S9 mix (-)	Number of colonies / plate	624	657	656	294	292	291	258	279	307	565	503	552	1259	1270	880	
		(646 \pm 18.8)			(292 \pm 1.5)			(281 \pm 24.6)			(540 \pm 32.7)			(1136 \pm 222.1)			
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose (μg /plate)	1			2			10			0.5			2			
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	719	785	817	305	293	259	459	662	617	396	367	373	304	332	364	
		(774 \pm 50.0)			(286 \pm 23.9)			(579 \pm 106.6)			(379 \pm 15.3)			(333 \pm 30.0)			

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene
Purity was 99.8 wt% and 0.06 wt% 1,4-acetoxyhydroxybutene-2 and 0.07 wt% 2-(4-hydroxybutyloxy) tetrahydrofuran
were contained as impurities.

Table 3. Results of reverse mutation test (II) of 1,4-butanediol 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			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537								
S9mix (-)	0	156	161	158	5	14	14	28	27	30	32	39	39	27	21	14	(158 \pm 2.5)	(11 \pm 5.2)	(28 \pm 1.5)	(37 \pm 4.0)	(21 \pm 6.5)	
	313	158	172	136	12	24	15	31	24	27	41	33	31	21	26	29	(155 \pm 18.1)	(17 \pm 6.2)	(27 \pm 3.5)	(35 \pm 5.3)	(25 \pm 4.0)	
	625	169	162	185	11	8	20	27	21	33	30	39	52	33	35	33	(172 \pm 11.8)	(13 \pm 6.2)	(27 \pm 6.0)	(40 \pm 11.1)	(34 \pm 1.2)	
	1250	136	163	163	15	7	14	20	16	19	55	51	51	19	24	30	(154 \pm 15.6)	(12 \pm 4.4)	(18 \pm 2.1)	(52 \pm 2.3)	(24 \pm 5.5)	
	2500	172	173	161	19	17	14	22	28	20	57	64	36	19	31	18	(169 \pm 6.7)	(17 \pm 2.5)	(23 \pm 4.2)	(52 \pm 14.6)	(23 \pm 7.2)	
	5000	156	171	155	9	9	13	23	28	20	43	59	43	24	29	26	(161 \pm 9.0)	(10 \pm 2.3)	(24 \pm 4.0)	(48 \pm 9.2)	(26 \pm 2.5)	
S9mix (+)	0	183	176	178	20	10	19	27	37	33	43	42	38	7	19	23	(179 \pm 3.6)	(16 \pm 5.5)	(32 \pm 5.0)	(41 \pm 2.6)	(16 \pm 8.3)	
	313	168	163	181	15	13	17	27	37	44	31	31	26	22	25	13	(171 \pm 9.3)	(15 \pm 2.0)	(36 \pm 8.5)	(29 \pm 2.9)	(20 \pm 6.2)	
	625	177	147	166	11	15	23	29	17	37	29	44	39	18	23	21	(163 \pm 15.2)	(16 \pm 6.1)	(28 \pm 10.1)	(37 \pm 7.6)	(21 \pm 2.5)	
	1250	140	204	180	19	21	20	41	27	21	24	33	30	35	25	16	(175 \pm 32.3)	(20 \pm 1.0)	(30 \pm 10.3)	(29 \pm 4.6)	(25 \pm 9.5)	
	2500	163	150	166	19	20	23	22	26	29	28	40	34	15	18	17	(160 \pm 8.5)	(21 \pm 2.1)	(26 \pm 3.5)	(34 \pm 6.0)	(17 \pm 1.5)	
	5000	166	181	181	20	12	11	32	20	34	30	39	34	26	22	9	(176 \pm 8.7)	(14 \pm 4.9)	(29 \pm 7.6)	(34 \pm 4.5)	(19 \pm 8.9)	
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								
S9 mix (-)	Number of colonies / plate	492	666	699	140	125	102	402	392	361	691	637	688	623	753	427	(619 \pm 111.2)	(122 \pm 19.1)	(385 \pm 21.4)	(672 \pm 30.3)	(601 \pm 164.1)	
	Number of colonies / plate	826	842	883	254	240	271	694	707	753	436	429	442	277	296	341	(850 \pm 29.4)	(255 \pm 15.5)	(718 \pm 31.0)	(436 \pm 6.5)	(305 \pm 32.9)	

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene
Purity was 99.8 wt% and 0.06 wt% 1,4-acetoxyhydroxybutene-2 and 0.07 wt% 2-(4-hydroxybutyloxy) tetrahydrofuran
were contained as impurities.

