



ペンタエリスリトールの
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】

ペンタエリスリトール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、用量設定試験を 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値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加が認められなかったことから、ペンタエリスリトールは、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】

OECD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、ペンタエリスリトールについて、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〕

ペンタエリスリトール (CAS No. 115-77-5、以下PEと略) は、分子量 136.2 の白色粉
末である。純度 92.7%のもの (ロット番号: 不純物としてジペンタエリスリト
ール (2.2%)、ビスペンタエリスリトール (4.9%) および不明 (0.2%) を含む、
) 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。

PEは、純水に 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、PEの純水溶液中での安定性試験を低濃度 (3.125 mg/ml)
および高濃度 (50 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、103および101%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 溶液の含量は既定濃度に対し、97.1~99.8%、50 mg/ml 溶液は、95.2~98.7%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、PEは純水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, 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%	ピオニン	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（用量設定試験においてはロット番号：DJ020GI、1993年7月6日製造、本試験においては、ロット番号：DJ040LI、1993年12月18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 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	0.2M 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 および RAA-304、1993年8月27日および1994年1月28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純水、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°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、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復帰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。PE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。PE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の増加は認められなかった。

PE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、PE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 Pentaerythritol** on bacteria 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			
S9Mix (-)	0	116	114	103	11	15	16	20	14	16	23	15	15	3	10	7	
		(111 \pm 7.0)			(14 \pm 2.6)			(17 \pm 3.1)			(18 \pm 4.6)			(7 \pm 3.5)			
	50	98			17			17			23			6			
	150	101			14			18			17			8			
	500	92			11			14			15			7			
	1500	105			15			16			24			8			
	5000	98			17			19			22			6			
S9Mix (+)	0	115	123	133	27	21	12	14	18	27	29	25	30	9	9	8	
		(124 \pm 9.0)			(20 \pm 7.5)			(20 \pm 6.7)			(28 \pm 2.6)			(9 \pm 0.6)			
	50	112			13			19			37			10			
	150	122			11			24			38			13			
	500	113			12			14			26			7			
	1500	121			18			24			27			13			
	5000	96			10			21			41			12			
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	375	377	386	215	226	201	979	852	1087	156	141	149	212	230	210	
		(379 \pm 5.9)			(214 \pm 12.5)			(973 \pm 117.6)			(149 \pm 7.5)			(217 \pm 11.0)			

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

** : Purity was 92.7 % and dipentaerythritol (2.2 %) and bispentaerythritol (4.9 %) were contained as impurity.

Table 2. Results of reverse mutation test (I) of Pentaerythritol** 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	127	105	118	8	16	19	17	13	18	21	24	21	6	7	5	(117 \pm 11.1)	(14 \pm 5.7)	(16 \pm 2.6)	(22 \pm 1.7)	(6 \pm 1.0)	
	312.5	111	96	94	8	9	10	25	18	23	17	20	23	6	8	9	(100 \pm 9.3)	(9 \pm 1.0)	(22 \pm 3.6)	(20 \pm 3.0)	(8 \pm 1.5)	
	625	114	129	116	12	18	11	24	27	34	19	20	21	8	4	10	(120 \pm 8.1)	(14 \pm 3.8)	(28 \pm 5.1)	(20 \pm 1.0)	(7 \pm 3.1)	
	1250	94	92	124	11	14	10	23	21	29	20	21	27	5	8	6	(103 \pm 17.9)	(12 \pm 2.1)	(24 \pm 4.2)	(23 \pm 3.8)	(6 \pm 1.5)	
	2500	126	104	112	14	12	12	18	25	27	20	26	30	4	1	8	(114 \pm 11.1)	(13 \pm 1.2)	(23 \pm 4.7)	(25 \pm 5.0)	(4 \pm 3.5)	
	5000	136	88	109	12	5	6	14	19	32	18	27	13	7	3	7	(111 \pm 24.1)	(8 \pm 3.8)	(22 \pm 9.3)	(19 \pm 7.1)	(6 \pm 2.3)	
S9Mix (+)	0	145	145	140	14	12	12	15	23	21	27	38	28	6	12	6	(143 \pm 2.9)	(13 \pm 1.2)	(20 \pm 4.2)	(31 \pm 6.1)	(8 \pm 3.5)	
	312.5	131	138	112	15	9	10	38	20	33	28	26	30	11	16	10	(127 \pm 13.5)	(11 \pm 3.2)	(30 \pm 9.3)	(28 \pm 2.0)	(12 \pm 3.2)	
	625	136	122	136	16	11	15	24	28	25	33	26	26	10	10	10	(131 \pm 8.1)	(14 \pm 2.6)	(26 \pm 2.1)	(28 \pm 4.0)	(10 \pm 0.0)	
	1250	113	131	126	11	15	14	33	18	30	31	25	29	12	10	8	(123 \pm 9.3)	(13 \pm 2.1)	(27 \pm 7.9)	(28 \pm 3.1)	(10 \pm 2.0)	
	2500	124	105	117	15	11	7	30	26	27	32	25	29	18	6	15	(115 \pm 9.6)	(11 \pm 4.0)	(28 \pm 2.1)	(29 \pm 3.5)	(13 \pm 6.2)	
	5000	138	118	127	7	12	12	29	23	18	27	24	27	15	17	7	(128 \pm 10.0)	(10 \pm 2.9)	(23 \pm 5.5)	(26 \pm 1.7)	(13 \pm 5.3)	
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	357	322	366	212	225	228	115	140	149	593	624	696	1103	1060	993	(348 \pm 23.2)	(222 \pm 8.5)	(135 \pm 17.6)	(638 \pm 52.8)	(1052 \pm 55.4)	
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA								
	Dose (μg /plate)	1			2			10			0.5			2								
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	898	784	873	343	337	291	1136	1229	1281	371	384	400	226	254	253	(852 \pm 59.9)	(324 \pm 28.4)	(1215 \pm 73.5)	(385 \pm 14.5)	(244 \pm 15.9)	

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

** : Purity was 92.7 % and dipentaerythritol (2.2 %) and bispentaerythritol (4.9 %) were contained as impurity.

Table 3. Results of reverse mutation test (II) of Pentaerythritol **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	109	138	115	9	9	11	27	35	20	20	21	16	7	6	6	
		(121 \pm 15.3)			(10 \pm 1.2)			(27 \pm 7.5)			(19 \pm 2.6)			(6 \pm 0.6)			
	312.5	123	132	135	11	15	12	31	22	35	19	19	19	7	5	7	
		(130 \pm 6.2)			(13 \pm 2.1)			(29 \pm 6.7)			(19 \pm 0.0)			(6 \pm 1.2)			
	625	136	111	123	12	17	10	23	26	26	22	18	20	7	7	4	
		(123 \pm 12.5)			(13 \pm 3.6)			(25 \pm 1.7)			(20 \pm 2.0)			(6 \pm 1.7)			
	1250	133	135	114	22	8	12	20	27	18	16	22	21	7	10	12	
		(127 \pm 11.6)			(14 \pm 7.2)			(22 \pm 4.7)			(20 \pm 3.2)			(10 \pm 2.5)			
2500	135	137	121	8	11	7	27	31	19	14	22	25	9	9	8		
	(131 \pm 8.7)			(9 \pm 2.1)			(26 \pm 6.1)			(20 \pm 5.7)			(9 \pm 0.6)				
5000	118	123	134	11	13	10	28	23	27	12	20	24	11	10	8		
	(125 \pm 8.2)			(11 \pm 1.5)			(26 \pm 2.6)			(19 \pm 6.1)			(10 \pm 1.5)				
S9Mix (+)	0	118	126	133	6	8	15	31	23	25	31	33	38	10	8	13	
		(126 \pm 7.5)			(10 \pm 4.7)			(26 \pm 4.2)			(34 \pm 3.6)			(10 \pm 2.5)			
	312.5	160	158	144	18	13	13	27	32	33	32	35	27	15	9	12	
		(154 \pm 8.7)			(15 \pm 2.9)			(31 \pm 3.2)			(31 \pm 4.0)			(12 \pm 3.0)			
	625	145	153	131	13	19	10	26	32	39	34	27	27	13	10	20	
		(143 \pm 11.1)			(14 \pm 4.6)			(32 \pm 6.5)			(29 \pm 4.0)			(14 \pm 5.1)			
	1250	140	155	149	17	17	15	22	20	23	27	37	32	15	17	12	
		(148 \pm 7.5)			(16 \pm 1.2)			(22 \pm 1.5)			(32 \pm 5.0)			(15 \pm 2.5)			
2500	132	122	138	11	19	18	30	28	34	43	36	30	5	12	18		
	(131 \pm 8.1)			(16 \pm 4.4)			(31 \pm 3.1)			(36 \pm 6.5)			(12 \pm 6.5)				
5000	128	127	134	7	9	15	27	29	22	30	32	29	10	10	7		
	(130 \pm 3.8)			(10 \pm 4.2)			(26 \pm 3.6)			(30 \pm 1.5)			(9 \pm 1.7)				
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	532	483	500	334	338	344	175	210	242	948	957	930	1342	1484	1621	
		(505 \pm 24.9)			(339 \pm 5.0)			(209 \pm 33.5)			(945 \pm 13.7)			(1482 \pm 139.5)			
	Number of colonies / plate	738	913	943	324	312	299	1493	1584	1615	435	400	431	288	329	308	
		(865 \pm 110.7)			(312 \pm 12.5)			(1564 \pm 63.4)			(422 \pm 19.2)			(308 \pm 20.5)			

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

** : Purity was 92.7 % and dipentaerythritol (2.2 %) and bispentaerythritol (4.9 %) were contained as impurity.