

# ジアセトンアルコール 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
	_		
材料および力	方法		3
結果および者	き察	·	7
結	論		7
特 記 事	項		8
文	献		8
Tables 1	<b>~</b> 3		

ジアセトンアルコ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  $Escherichia\ coli\ WP2\ uvrA\ の 5 菌株を用い、<math>S9\ mix\ 無添加および添加の条件でプレインキュベーション法により用量設定試験および 2 回の本試験を行った。用量設定試験を <math>50.0\sim5000\ \mu g/7V-1$  の用量で行ったところ、いずれの検定菌においても、 $S9\ mix\ 無添加試験および添加試験とも抗菌性は認められなかった。したがって、本試験では <math>S9\ mix\ 無添加試験および添加試験を <math>313\sim5000\ \mu g/7V-1$  の範囲で用量を設定して実施した。

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、ジアセトンアルコールは、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。

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、ジアセトンアルコールについて、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<sup>1)</sup> 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日にを受けた。

から分与

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。

### 〔被験物質〕

ジアセトンアルコール (略称: DAA、CAS No. 123-42-2) は、分子量 116.16 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: 0.1% アセトン、0.05% メシチルオキサイド) であり、

から供与された。被験物質は、使用時まで密封、遮光して冷蔵した。

DAAは、局方注射用水(ロット番号: K5A80、㈱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-(2-7)(1)-3-(5-1)(1-2-7)(1)(7)(1)(7)

(上野製薬㈱) 口ット番号 46, (和光純薬工業㈱ ロット番号 TWR3330,

純度99.9%) 純度90%以上)

20 g

SA : アジ化ナトリウム 9AA : 9-7ミノアクリジン 

(Sigma Chem. Co.

ロット番号 96F05641, (和光純薬工業㈱ ロット番号 DSF2950,

純度98%以上) 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ービオチン 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㈱製の最少寒天培地(ロット番号:HY0302、1995年9月29日 製造および HY0603、同年12月15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 0.2g水酸化ナトリウム  $0.66\,\mathrm{g}$ 

クエン酸・1水和物 2 g グルコース

リン酸水素二カリウム バクトアガー (Difco) 10 g 15 g

リン酸ーアンモニウム 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 mo1

 塩化マグネシウム
 8 μ mo1
 NADPH
 4 μ mo1

 塩化カリウム
 33 μ mo1
 ナトリウムーリン酸緩衝液 (pH 7.4) 100 μ mo1

 ブルコースー6ーリン酸
 5 μ mo1

\*\*: 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℃で20分間往復振とう培養したのち、トップアガー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℃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。

#### 〔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こととした。

#### 【結果および考察】

# 〔用量設定試験〕

DAAについて 50.0~5000  $\mu g/f v$  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。

## 〔本試験〕

S9 mix 無添加試験および添加試験でともに、 $313\sim5000~\mu g/l v$  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、いずれの検定菌において 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。

DAA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、ジアセトンアルコールは、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】

- 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 diacetone alcohol on bacteria

With (+) or	Test substance	Number of revertants (number of colonies / plate, mean ± S.D.)												
without (-)	dose	Base - pair substitution type						Frameshift type						
S9 mix	(μg /plate)	TA100		TA1			WP2 uvrA			TA98	TA1537			
	0	l	122		9 11	24	27	34	30	30 37	14	13	9	
·	50.0	( 118± 156	4.0 )		1 ± 2.5 )	(	28 ± 28	5.1)	(	32 ± 4.0 )	(	12 ±	2.6)	
	150	126		1	0		25			27	:	9		
	500	146		1	2		29			27		12		
S9mix	1500	128			8		25			20	_	9		
(-)	5000	125		1	0		22			23		5		
			-		<del></del>									
	0	105 127 ( 115 ±	112 11.2)		6 7 2± 4.6)	25	27 28 ±	33 4.2 )	41	42 26 36 ± 9.0)	13 (	25 18 ±	17 6.1 )	
	50.0	108		1	5		26			30		11		
	150	129		1	9		27			27		12	-	
	500	141		1	2		28			27		14		
S9mix	1500	115		1	4		31	,		21		11		
(+)	5000	124		-	8		38			19		13		
	<del></del>		·				<del></del> _							
Positive	Chemical	AF2		S.	A		AF2			AF2	9.	AA		
control	Dose (μg /plate)	0.01		0.	.5		0.01			0.1		80		
S9 mix (-)	Number of	580 556	617	247 27	8 265	J			511	562 589		634	576	
	colonies / plate	( 584±	30.7)		3 ± 15.6		267 ±	3.5)		554 ± 39.6 )		641 ±	68.8)	
Positive	Chemical	2AA		2A			2AA		<u> </u>	2AA	2.	AA _		
control	Dose (μg /plate)	1	685		2	407	10	454	217	0.5	201	2	210	
S9 mix (+)	Number of			328 33		1			317	327 308 317 + 0.5 \		275 289 ±	310	
	colonies / plate	( 637 ±	12.5)	( 33	5 ± 7.5	ium orid	485 ± 2			$317 \pm 9.5$ )	V. 2 Amin			

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 0.1 % acetone and 0.05 % mesityl oxide were contained as impurities.

Table 2. Results of reverse mutation test (I) of diacetone alcohol on bacteria

With (+) or	Test substance	Number of revertants (number of colonies / plate, mean ± S.D.)							
without (-)	dose	B	ase - pair substitution	type		Frameshift type			
S9 mix	(μg /plate)	TA100	TA1535	WP2 uvrA	TA98	TA1537			
	0	178 143 115	21 18 7	22 30 22	27 29 22	8 10 8			
		( 145 ± 31.6)	$(15 \pm 7.4)$	$(25 \pm 4.6)$	( 26 ± 3.6)	( 9± 1.2)			
	313	107 126 140	14 4 9	39 38 41	28 23 30	9 7 5			
		( 124 ± 16.6	( 9 ± 5.0)	( 39 ± 1.5)	$(27 \pm 3.6)$	( 7 ± 2.0)			
	625	131 151 133	11 16 15	35 46 29	16 31 25	7 5 14			
		( 138 ± 11.0	( 14 ± 2.6)	( 37 ± 8.6)	( 24 ± 7.5)	( 9± 4.7)			
	1250	123 126 133	14 21 14	39 32 23	27 28 28	13 6 8			
		( 127 ± 5.1	( 16 ± 4.0)	( 31 ± 8.0)	( 28 ± 0.6)	( 9± 3.6)			
S9mix	2500	106 127 127	15 9 11	36 30 40	25 32 18	12 11 14			
		( 120 ± 12.1	$(12 \pm 3.1)$	$(35 \pm 5.0)$	$(25 \pm 7.0)$	( 12 ± 1.5)			
(-)	5000	115 110 112	7 11 6	31 24 16	29 21 22	8 8 3			
i		( 112 ± 2.5)	$(8 \pm 2.6)$	( 24 ± 7.5)	( 24 ± 4.4)	( 6 ± 2.9)			
	0	164 149 138	17 17 16	40 44 37	35 31 31	21 25 23			
		( 150 ± 13.1	( 17 ± 0.6)	$(40 \pm 3.5)$	$(32 \pm 2.3)$	( 23 ± 2.0)			
	313	128 125 146	9 11 10	48 34 29	38 26 26	5 5 3			
		( 133 ± 11.4)	$(10 \pm 1.0)$	$(37 \pm 9.8)$	( 30 ± 6.9)	( 4 ± 1.2)			
	625	112 129 134	9 16 11	39 42 33	47 28 20	7 3 5			
	·	( 125 ± 11.5 )	( 12 ± 3.6)	$(38 \pm 4.6)$	$(32 \pm 13.9)$	( 5 ± 2.0)			
	1250	138 138 133	8 10 14	44 47 30	34 37 30	6 7 10			
		( 136 ± 2.9)	( 11 ± 3.1)	( 40 ± 9.1)	( 34 ± 3.5)	( 8 ± 2.1)			
S9mix	2500	139 148 139	18 13 7	45 32 42	42 24 35	16 7 10			
		( 142 ± 5.2)	$(13 \pm 5.5)$	( 40 ± 6.8)	( 34 ± 9.1)	( 11 ± 4.6)			
(+)	5000	137 145 139	3 8 7	26 37 33	25 28 36	5 10 11	)		
		( 140 ± 4.2)	( 6± 2.6)	$(32 \pm 5.6)$	$(30 \pm 5.7)$	( 9 ± 3.2)			
				}					
Positive	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA			
control	Dose (µg /plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80			
S9 mix (-)	Number of	641 680 673	425 412 454	415 414 402	683 668 718	1924 1724 1891			
	colonies / plate	( 665 ± 20.8	$(430 \pm 21.5)$	( 410 ± 7.2)	( 690 ± 25.7 )	( 1846 ± 107.2 )			
Positive	Chemical	2AA	2AA	2AA_	2AA	2AA			
control	Dose (µg /plate)	1	2	10	0.5	2			
S9 mix (+)	Number of	659 676 721	295 304 321	677 613 546	312 322 324	327 333 257			
	colonies / plate	$(685 \pm 32.0)$	( 307 ± 13.2 )	( 612 ± 65.5 )	( 319 ± 6.4 )	( 306 ± 42.3 )			

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 0.1% acetone and 0.05% mesityl oxide were contained as impurities.

Table 3. Results of reverse mutation test (II) of diacetone alcohol on bacteria

With (+) or	Test substance	Number of revertants (number of colonies / plate, mean ± S.D.)									
without (-)	dose	Base - pair substitution type  Frameshift type									
S9 mix	(μg /plate)	TA100	TA1535	WP2 uvrA	TA98	TA1537					
	0	148 133 173 ( 151 ± 20.2 )	13 9 9	25 36 28	24 13 21	8 6 7					
	313	167 152 154 ( 158 ± 8.1 )	10 10 14	26 25 42	23 12 25	5 10 8					
	625	156 151 136 ( 148 ± 10.4 )	12 12 11	25 36 39	22 16 17	9 9 7					
	1250	169 147 145 ( 154 ± 13.3 )	14 12 10	32 29 42	15 20 22	8 9 9	-				
S9mix	2500	150 165 148 ( 154 ± 9.3 )	9 14 16	34 30 26	16 20 13	10 5 16					
(-)	5000	157 150 133 ( 147 ± 12.3 )	15 13 12	40 31 31	22 16 21	13 8 6					
	0	104 113 111 ( 109 ± 4.7)			1						
	313	110 108 129 ( 116 ± 11.6 )									
	625	115 117 112 ( 115 ± 2.5)			1						
	1250	104 126 137 ( 122 ± 16.8 )									
S9mix	2500	118 129 132 ( 126 ± 7.4 )	10 13 13 ( 12 ± 1.7 )	$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	27 20 24 ( 24 ± 3.5 )	11 10 1 ( 7 ± 5.5)					
(+)	5000	110 119 112 ( 114 ± 4.7)	,	<b>j</b>	24 18 23 ( 22 ± 3.2 )	12 8 10 ( 10 ± 2.0 )					
Positive	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA					
control	Dose (μg /plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80					
S9 mix (-)	Number of	775 794 860	370 359 383	244 282 281	495 608 544	557 484 444					
	colonies / plate	( 810 ± 44.6 )									
Positive	Chemical	2AA	2AA	2AA_	2AA	2AA					
control	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2					
S9 mix (+)	Number of	440 456 431	333 342 317	523 499 534	321 355 296	255 311 324					
	colonies / plate	( 442 ± 12.7)	`	( 519 ± 17.9 )							

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 0.1% acetone and 0.05% mesityl oxide were contained as impurities.