食薬セ研第 12-1896 号

2002 年　3 月　29 日

3-メチル-3-メトキシブタノールの細菌を用いる復帰突然変異試験

厚生労働省医薬局審査管理課　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

1. 被験物質 ---------- 3

2. 陽性対照物質 ---------- 3

3. 検定菌 ---------- 3

4. 試験材料 ---------- 4

5. 被験物質調製液の調製 ---------- 5

6. 試験操作 ---------- 5

7. 判定 ---------- 6

結果および考察 ---------- 7

1. 用量設定試験 ---------- 7

2. 本試験 ---------- 7

参考文献 ---------- 8

Tables　1～3

Figures　1、2

[要　　約]

3-メチル-3-メトキシブタノールについて、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施し、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、プレインキュベーション法により、S9 mix 無添加および添加条件で試験を行った。

用量設定試験を 50.0～5000 μg/plate の範囲に公比約 3 で 5 用量を設定して行ったところ、S9 mix 無添加および添加条件ともに、いずれの検定菌においても生育阻害は認められなかった。

これらの結果に基づき、すべての検定菌で最高用量を 5000 μg/plate とし、公比 2 で 5 用量（313～5000 μg/plate）を設定して 2 回の本試験を行った。その結果、用いたすべての検定菌において、S9 mix の添加の有無にかかわらず、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は認められなかった。

以上の結果から、3-メチル-3-メトキシブタノールは、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。

[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、3-メチル-3-メトキシブタノールについて、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、ネズミチフス菌（*Salmonella typhimurium*）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（*Escherichia coli*）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]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 S9 mix 無添加条件および哺乳動物（ラット）のもつ薬物代謝酵素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 添加条件で行った。

この試験は、「新規化学物質等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、一部改正平成 9 年 10 月 31 日、環保安第 287 号、衛生第 127 号、平成 09・10・31 基局第 2 号）および「OECD 化学物質試験法ガイドライン 471/細菌を用いる復帰突然変異試験」（1997 年 7 月 21 日採択）に準拠し、「化学物質 GLP」（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、平成 12 年 3 月 1 日一部改正、環保安第 41 号、生衛発第 268 号、平成 12・02・14 基局第 1 号）に基づいて行った。

[材料および方法]

1.被験物質

被験物質である 3-メチル-3-メトキシブタノール [英名：1-butanol, 3-methoxy-3-methyl-、ロット番号：　　製造　　]は無色透明の液体であり、　　から提供を受けた。被験物質の物理化学的性状等をAppendix 1に示す。被験物質は、使用時まで室温保管した。

2.陽性対照物質

用いた陽性対照物質および調製法は以下のとおりである。

検定菌ごとに用いた陽性対照物質は、当研究所で十分な蓄積データが得られている物質および用量とし、それぞれを結果の各Table中に示した。

2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
(AF2、和光純薬工業㈱ ロット番号:WTQ0059、 純度 98%以上)

アジ化ナトリウム (SA、和光純薬工業㈱ ロット番号:ELE2329、 純度 98%以上)

9-アミノアクリジン (9AA、Sigma Chem. Co.ロット番号:106F06681、純度 97%以上)

2-アミノアントラセン (2AA、和光純薬工業㈱ ロット番号:DLH6052、 純度 90%以上)

AF2、9AAおよび2AAはジメチルスルホキシド (DMSO、和光純薬工業㈱、ロット番号：ELL5600およびSEG4422) に、SAは超純水に溶解し、所定の濃度に調製した後-20℃で凍結保存し、調製後6か月以内のものを用時に解凍して用いた。

3.検定菌

上記のガイドラインに従って、*S. typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *E. coli* WP2 *uvrA* を用いた。

S. typhimurium の4菌株は1997年8月7日に、*E. coli* WP2 *uvrA* 株は1997年4月9日に日本バイオアッセイ研究センターの　　から分与された。

検定菌は-80℃で凍結保存したものを用い、特性確認は各菌株の凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、膜変異 (*rfa*) 、アンピシリン耐性因子 pKM101 (プラスミド) の有無および陰性対照と陽性対照の変異コロニー数について調べた。

試験に際して、ニュートリエントブロスNo.2 (Unipath Ltd.) 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試験菌液とした。分光光度計（㈱島津製作所、型式：UV-120-02）により 660 nm の吸光度を測定し、試験菌液の増殖を確認した。試験に用いた検定菌の生菌数を段階希釈法により求め、Appendix 2 に示した。

4.試験材料

1)合成培地

培地は、極東製薬工業㈱製の最少グルコース寒天培地（ロット番号：DZA23901、2001 年 3 月 9 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、径 90 mm のシャーレ 1 枚あたり 30 mL を流して固めたものである。

硫酸マグネシウム･7 水和物	0.2	g
クエン酸･1 水和物	2	g
リン酸水素二カリウム	10	g
リン酸一アンモニウム	1.92	g
水酸化ナトリウム	0.66	g
グルコース	20	g
大洋寒天（清水食品㈱）	15	g

2)トップアガー

下記の水溶液（A）に（B）または（C）を容量比 10:1 の割合で混合した。

(A) バクトアガー(Difco Lab.)	0.6 w/v%
塩化ナトリウム	0.5 w/v%
(B) *Salmonella typhimurium* 用	
L-ヒスチジン	0.5 mmol/L
D-ビオチン	0.5 mmol/L
(C) *Escherichia coli* 用	
L-トリプトファン	0.5 mmol/L

3) S9 mix

S9 mix 1 mL あたりの組成は下記のとおりで、用時氷冷下で混合して調製した。

S9*	0.1 mL
塩化マグネシウム	8 μmol
塩化カリウム	33 μmol
グルコース-6-リン酸	5 μmol
NADH	4 μmol
NADPH	4 μmol
ナトリウム-リン酸緩衝液（pH 7.4）	100 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㈱、ロット番号：RAA-445、2001 年 5 月 25 日製造）を購入し、-80℃で凍結保存し、用時に解凍して用いた。

5.被験物質調製液の調製

被験物質は、50 mg/mL の濃度で水に溶解することから、試験に際しては、日局注射用水（㈱大塚製薬工場、製造番号：K9K81）に溶解して最高用量の調製液を調製した後、同溶媒で順次希釈して、速やかに試験に用いた。調製時に、発熱、発泡、変色等の変化はみられなかった。

6．試験操作

プレインキュベーション法により、S9 mix 無添加条件および S9 mix 添加条件で試験を行った。

小試験管中に被験物質調製液 0.1 mL、0.1 mol/L ナトリウム-リン酸緩衝液（pH 7.4）または S9 mix 0.5 mL、試験菌液 0.1 mL を混合し、37℃で 20 分間プレインキュベーションした後、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、被験物質調製液の代わりに溶媒 0.1 mL または陽性対照物質溶液を加えて、それぞれ陰性対照および陽性対照とした。陰性および陽性対照の結果については、同時に実施した他試験と共通に用いた。

培養は 37℃で 48 時間行い、発生した復帰変異コロニー数を、コロニーアナライザー

（システムサイエンス㈱、CA-11）または目視により算定した。被験物質に由来する沈澱の有無は、肉眼により観察した。また、生育阻害の有無については、目視あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌叢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、両対照および各用量につき3枚ずつを用い、それぞれの平均値と標準偏差を求めた。陰性および陽性対照の復帰変異コロニー数の平均値を、それぞれ陰性対照値および陽性対照値とした。

なお、最高用量の被験物質調製液 0.1 mL および S9 mix 0.5 mL を、それぞれ合成培地平板上に滴下して、培養終了時に雑菌の混入の有無を調べた。

上記の方法により、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、結果の再現性を確認した。

7. 判定

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌の S9 mix 無添加条件あるいは 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復帰変異コロニー数の平均値が、陰性対照値のそれに比べて2倍以上に増加し、その増加に再現性および用量依存性が認められた場合に、本試験系において変異原性を有するもの（陽性）と判定することとした。

[結果および考察]

1.用量設定試験

上記のガイドラインに従って、50.0～5000 μg/plate の範囲で公比を約 3 とし、5 段階の用量を設定して用量設定試験を行った（Table 1）。その結果、S9 mix 無添加条件および S9 mix 添加条件ともに、いずれの検定菌においても生育阻害は認められなかった。また、被験物質に由来する沈澱も、S9 mix 無添加条件および S9 mix 添加条件ともに認められなかった。

以上の結果から、本試験における最高用量をすべての検定菌で 5000 μg/plate とした。

2.本試験

最高用量を 5000 μg/plate とし、公比 2 で 5 用量（313～5000 μg/plate）を設定して 2 回の本試験を行った（Table 2,3、Figure 1,2）。その結果、用いたすべての検定菌において、S9 mix の添加の有無にかかわらず、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は認められなかった。

すべての試験において、最高用量の被験物質調製液および S9 mix への雑菌の混入は認められなかった。また、いずれの検定菌においても陽性対照物質の変異原性が検出され、陽性対照値および陰性対照値は、ともに背景データ（Appendix 3）の変動範囲内（平均値±3×標準偏差）であったことから、本試験系の有効性が確認された。

なお、3-メチル-3-メトキシブタノールについては、当研究所で実施したチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験でも陰性の結果が得られている[4)]。また、関連物質であるブチルアルコールについては、復帰突然変異試験（TA100、TA98）で陰性の[5)]、1,2-ブタンジオールについては、復帰突然変異試験および染色体異常試験で陰性の結果が報告されている[6)]。

以上の結果に基づき、3-メチル-3-メトキシブタノールは、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。

[参　考　文　献]

1) T. Matsushima, T. Sugimura, M. Nagano, T. Yahagi, A. Shirai, M. Sawamura, "Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens," eds. by K. H. Norpoth, R. C. Garner, Springer, Berlin, 1980, pp. 273-285.

2) D. M. Maron, B. N. Ames, Mutat. Res., 113, 173 (1983).

3) M. H. L. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," eds. by B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, pp. 161-187.

4) 山影　康次他：「3-メチル-3-メトキシブタノールのチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験」，食薬セ研第１２－１９００号

5) 賀田恒夫・石館　基:環境変異原性データ集 1，サイエンティスト社，東京，p. 82 (1980)

6) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室　監修:化学物質毒性試験報告，vol. 1，化学物質点検推進委員会，東京，p. 287 (1994)

Table 1. Cytotoxicity of 1-butanol, 3-methoxy-3-methyl- in bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (μg/ plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean ± S.D.)					
		Base - pair substitution type			Frameshift type		
		TA100	TA1535	WP2 *uvrA*	TA98	TA1537	
S9 mix (-)	0	147 135 133 (138 ± 8)	12 17 14 (14 ± 3)	26 33 18 (26 ± 8)	38 33 26 (32 ± 6)	7 12 10 (10 ± 3)	
	50.0	157	15	17	28	11	
	150	134	7	36	28	13	
	500	130	12	32	27	13	
	1500	147	12	16	23	12	
	5000	154	9	19	28	9	
S9 mix (+)	0	169 132 142 (148 ± 19)	14 8 13 (12 ± 3)	34 28 29 (30 ± 3)	19 32 26 (26 ± 7)	13 11 12 (12 ± 1)	
	50.0	145	13	42	27	10	
	150	157	10	19	28	9	
	500	146	13	39	34	12	
	1500	141	11	37	29	14	
	5000	153	9	33	25	23	
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose (μg / plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
	Number of colonies / plate	592 598 608 (599 ± 8)	505 571 569 (548 ± 38)	239 267 325 (277 ± 44)	423 382 388 (398 ± 22)	362 453 391 (402 ± 46)	
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg / plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate	830 926 1051 (936 ± 111)	348 343 404 (365 ± 34)	964 860 858 (894 ± 61)	448 456 449 (451 ± 4)	283 262 276 (274 ± 11)	

The purity of the test substance was 99.19 wt%.

This substance contained 0.2% 2-methoxy-4-methoxymethyl-2-methylbutane and 0.1% 4-*tert*-butoxy-2-methyl-2-butanol as impurities.

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

Table 2. Mutagenicity of 1-butanol, 3-methoxy-3-methyl- in bacteria (I)

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (μg/ plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean ± S.D.)														
		Base - pair substitution type									Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2 *uvrA*			TA98			TA1537		
S9 mix (-)	0	151	151	142	9	10	6	33	25	27	28	31	26	13	15	7
		(148 ±		5)	(8 ±		2)	(28 ±		4)	(28 ±		3)	(12 ±		4)
	313	161	132	135	11	15	13	26	41	29	23	27	18	11	10	10
		(143 ±		16)	(13 ±		2)	(32 ±		8)	(23 ±		5)	(10 ±		1)
	625	108	114	127	10	8	15	24	28	31	30	25	28	13	10	13
		(116 ±		10)	(11 ±		4)	(28 ±		4)	(28 ±		3)	(12 ±		2)
	1250	129	115	134	14	10	12	29	31	24	24	30	24	10	14	8
		(126 ±		10)	(12 ±		2)	(28 ±		4)	(26 ±		3)	(11 ±		3)
	2500	130	125	138	12	5	14	33	39	24	20	29	25	16	8	10
		(131 ±		7)	(10 ±		5)	(32 ±		8)	(25 ±		5)	(11 ±		4)
	5000	129	131	141	9	11	8	43	31	32	26	24	32	13	13	18
		(134 ±		6)	(9 ±		2)	(35 ±		7)	(27 ±		4)	(15 ±		3)
S9 mix (+)	0	145	161	145	9	9	12	35	30	34	32	31	28	19	20	11
		(150 ±		9)	(10 ±		2)	(33 ±		3)	(30 ±		2)	(17 ±		5)
	313	124	146	163	8	20	9	40	42	38	23	24	33	8	12	13
		(144 ±		20)	(12 ±		7)	(40 ±		2)	(27 ±		6)	(11 ±		3)
	625	141	150	154	8	3	9	43	35	44	31	24	27	17	16	8
		(148 ±		7)	(7 ±		3)	(41 ±		5)	(27 ±		4)	(14 ±		5)
	1250	153	143	143	7	11	7	26	27	36	30	24	36	17	14	16
		(146 ±		6)	(8 ±		2)	(30 ±		6)	(30 ±		6)	(16 ±		2)
	2500	151	156	153	4	9	7	34	30	38	24	30	22	16	17	30
		(153 ±		3)	(7 ±		3)	(34 ±		4)	(25 ±		4)	(21 ±		8)
	5000	154	144	153	13	4	9	38	37	32	21	31	39	12	13	17
		(150 ±		6)	(9 ±		5)	(36 ±		3)	(30 ±		9)	(14 ±		3)
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose (μg / plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
	Number of colonies / plate	487	504	479	559	545	510	161	193	228	353	435	355	340	271	651
		(490 ±		13)	(538 ±		25)	(194 ±		34)	(381 ±		47)	(421 ±		202)
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose (μg / plate)	1			2			10			0.5			2		
	Number of colonies / plate	762	759	774	345	334	351	865	676	668	414	452	442	304	231	294
		(765 ±		8)	(343 ±		9)	(736 ±		112)	(436 ±		20)	(276 ±		40)

The purity of the test substance was 99.19 wt%.

This substance contained 0.2% 2-methoxy-4-methoxymethyl-2-methylbutane and 0.1% 4-*tert*-butoxy-2-methyl-2-butanol as impurities.

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

Table 3. Mutagenicity of 1-butanol, 3-methoxy-3-methyl- in bacteria (II)

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (μg/ plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean ± S.D.)														
		Base - pair substitution type									Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2 *uvrA*			TA98			TA1537		
S9 mix (-)	0	129	112	106	7	13	6	33	36	21	19	27	26	18	6	11
		(116 ±		12)	(9 ±		4)	(30 ±		8)	(24 ±		4)	(12 ±		6)
	313	108	114	101	12	9	10	26	26	33	29	15	22	5	19	7
		(108 ±		7)	(10 ±		2)	(28 ±		4)	(22 ±		7)	(10 ±		8)
	625	132	124	117	15	9	8	38	20	27	32	17	27	11	13	10
		(124 ±		8)	(11 ±		4)	(28 ±		9)	(25 ±		8)	(11 ±		2)
	1250	107	133	101	6	12	13	29	26	23	23	23	20	12	8	9
		(114 ±		17)	(10 ±		4)	(26 ±		3)	(22 ±		2)	(10 ±		2)
	2500	98	120	142	13	12	13	25	24	32	23	25	26	6	9	11
		(120 ±		22)	(13 ±		1)	(27 ±		4)	(25 ±		2)	(9 ±		3)
	5000	118	119	128	7	8	9	25	31	23	32	25	19	14	3	7
		(122 ±		6)	(8 ±		1)	(26 ±		4)	(25 ±		7)	(8 ±		6)
S9 mix (+)	0	159	138	121	8	12	11	32	35	34	30	32	29	16	11	14
		(139 ±		19)	(10 ±		2)	(34 ±		2)	(30 ±		2)	(14 ±		3)
	313	117	123	117	16	15	9	53	21	36	24	20	28	24	13	16
		(119 ±		3)	(13 ±		4)	(37 ±		16)	(24 ±		4)	(18 ±		6)
	625	149	115	122	21	13	12	30	29	40	31	35	32	16	10	10
		(129 ±		18)	(15 ±		5)	(33 ±		6)	(33 ±		2)	(12 ±		3)
	1250	126	108	131	13	5	16	42	51	26	25	30	21	13	12	16
		(122 ±		12)	(11 ±		6)	(40 ±		13)	(25 ±		5)	(14 ±		2)
	2500	108	118	141	12	13	15	34	28	38	24	31	23	10	10	11
		(122 ±		17)	(13 ±		2)	(33 ±		5)	(26 ±		4)	(10 ±		1)
	5000	132	143	171	10	5	13	35	34	35	21	27	21	6	4	10
		(149 ±		20)	(9 ±		4)	(35 ±		1)	(23 ±		3)	(7 ±		3)
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose (μg / plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
	Number of colonies / plate	464	478	477	560	533	476	191	187	198	402	412	423	577	233	198
		(473 ±		8)	(523 ±		43)	(192 ±		6)	(412 ±		11)	(336 ±		209)
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose (μg / plate)	1			2			10			0.5			2		
	Number of colonies / plate	926	794	776	355	391	351	771	866	894	436	445	435	320	319	272
		(832 ±		82)	(366 ±		22)	(844 ±		64)	(439 ±		6)	(304 ±		27)

The purity of the test substance was 99.19 wt%.

This substance contained 0.2% 2-methoxy-4-methoxymethyl-2-methylbutane and 0.1% 4-*tert*-butoxy-2-methyl-2-butanol as impurities.

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

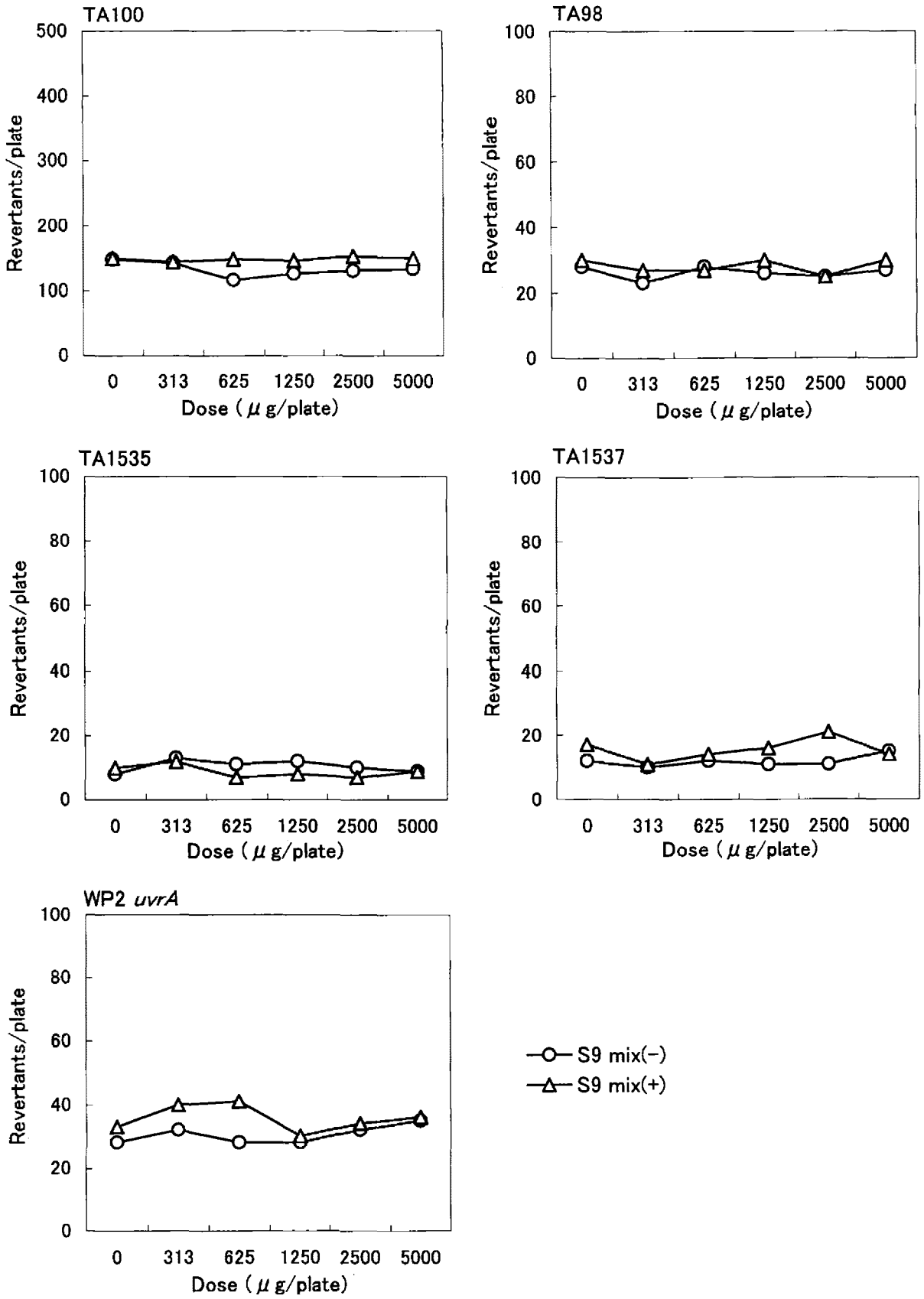

Figure 1. Dose response curves of mutagenicity of 1-butanol, 3-methoxy-3-methyl- in bacteria (I)

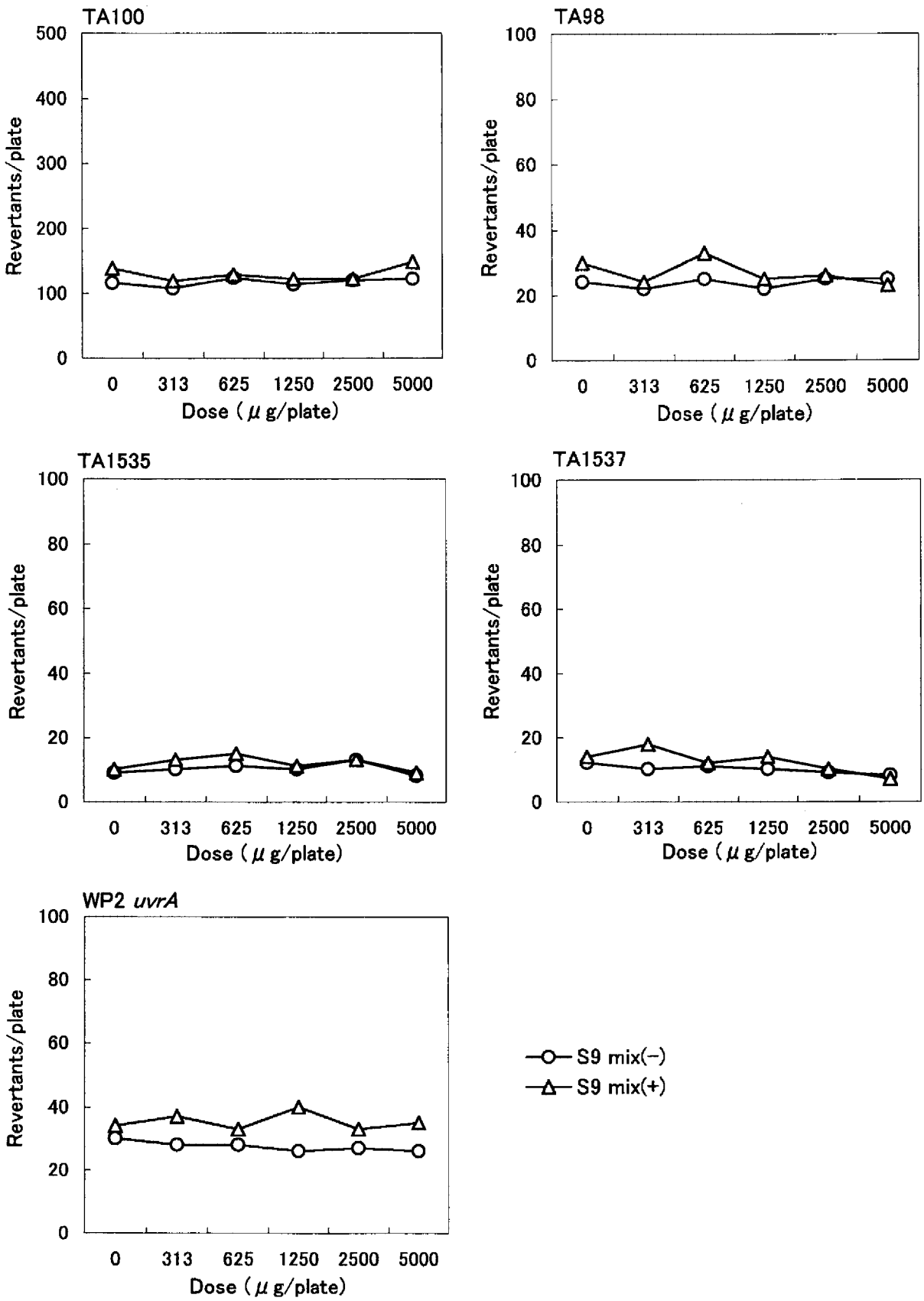

Figure 2. Dose response curves of mutagenicity of 1-butanol, 3-methoxy-3-methyl- in bacteria (II)