



BOZO RESEARCH
CENTER INC.

最終報告書

2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオールの
細菌を用いる復帰突然変異試験

M-1128

2004年 10月 27日

株式会社 ポリリサーチセンター

東京本部	〒151-0065	東京都渋谷区大山町36-7
本社・東京研究所	〒156-0042	東京都世田谷区羽根木1-3-11
御殿場研究所	〒412-0039	静岡県御殿場市かまど1284
函南研究所	〒419-0101	静岡県田方郡函南町桑原三本松1308-125

目 次

	頁
目 次	1
要 約	7
緒 言	8
試験材料及び方法	9
1. 被験物質及び媒体	9
1) 被験物質	9
2) 媒体	9
2. 被験液の調製	10
1) 調製方法	10
2) 調製頻度	10
3. 対照物質	11
1) 陰性対照物質	11
2) 陽性対照物質	11
4. 使用菌株	13
1) 菌株	13
2) 菌株の選択理由	13
3) 菌株の保存及び解凍	13
4) 菌株の特性検査	13

5. S9 mix 及び培地の調製	14
1) S9 mix	14
2) 培地	15
6. 試験方法	17
1) 識別方法	17
2) 前培養条件	18
3) 用量の設定	18
4) プレート数	18
5) 濃度設定試験	18
6) 本試験	19
7) 追加確認試験	19
7. 判定基準	19
試験結果	20
1. 濃度設定試験	20
1) 培養終了後の観察結果	20
2) 復帰突然変異コロニー数	20
3) 試験系の成立条件	20
2. 本試験	21
1) 用量設定理由	21
2) 培養終了後の観察結果	21
3) 復帰突然変異コロニー数	21
4) 試験系の成立条件	21
考察及び結論	22

参考文献.....23

Tables and Figures

- Table 1 Results of the Dose-Range Finding Test on
2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol without Metabolic Activation
in the Bacterial Reverse Mutation Test
- Table 2 Results of the Dose-Range Finding Test on
2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol with Metabolic Activation
in the Bacterial Reverse Mutation Test
- Table 3 Results of the Main Test on 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol
without Metabolic Activation in the Bacterial Reverse Mutation Test
- Table 4 Results of the Main Test on 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol
with Metabolic Activation in the Bacterial Reverse Mutation Test
- Figure 1 Results of the Reverse Mutation Test on 2-amino-2-ethyl-
1,3-propanediol with *Salmonella typhimurium* TA100
- Figure 2 Results of the Reverse Mutation Test on 2-amino-2-ethyl-
1,3-propanediol with *Salmonella typhimurium* TA98
- Figure 3 Results of the Reverse Mutation Test on 2-amino-2-ethyl-
1,3-propanediol with *Salmonella typhimurium* TA1535
- Figure 4 Results of the Reverse Mutation Test on 2-amino-2-ethyl-
1,3-propanediol with *Salmonella typhimurium* TA1537
- Figure 5 Results of the Reverse Mutation Test on 2-amino-2-ethyl-
1,3-propanediol with *Escherichia coli* WP2 *uvrA*

要 約

2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオールの遺伝子突然変異誘発能の有無を検討するため、ネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (以下、*S. typhimurium* と略す) TA100、TA98、TA1535、TA1537 及び大腸菌 *Escherichia coli* (以下、*E. coli* と略す) WP2 *uvrA* を用いて復帰突然変異誘発試験を実施した。

試験は濃度設定試験及び本試験を実施し、非代謝活性化及び代謝活性化存在下の条件で、プレインキュベーション法によって実施した。被験物質の媒体には注射用水を用いた。

1. 沈殿/結晶

濃度設定試験において、試験菌株の種類に関わらず、代謝活性化存在下で最高用量の被験物質処理群 (5000 µg/plate) で白色結晶物の析出が認められた。同様に、本試験においても、試験菌株の種類に関わらず、代謝活性化存在下で 2500 µg/plate 以上の被験物質処理群で白色結晶物の析出が認められた。一方、非代謝活性化存在下で濃度設定試験及び本試験ともに、試験菌株の種類に関わらず、全被験物質処理群 (濃度設定試験 : 0.305~5000 µg/plate、本試験 : 156~5000 µg/plate) で、沈殿及び結晶の析出は認められなかった。

2. 生育阻害

濃度設定試験の全被験物質処理群 (0.305~5000 µg/plate) 及び本試験の全被験物質処理群 (156~5000 µg/plate) において、試験菌株の種類及び代謝活性化の有無に関わらず、菌株に対して生育阻害は認められなかった。

3. 復帰突然変異コロニー数

濃度設定試験の全被験物質処理群 (0.305~5000 µg/plate) 及び本試験の全被験物質処理群 (156~5000 µg/plate) において、試験菌株の種類及び代謝活性化の有無に関わらず、溶媒対照と比較して 2 倍以上となる復帰突然変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下において、2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオールは復帰突然変異誘発能を示さない (陰性) と判定した。

結 言

厚生労働省医薬局審査管理課 化学物質安全対策室の依頼により、2-アミノ・2-エチル・1,3-プロパンジオールの安全性試験の一環として、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施したので、その成績を報告する。

試験材料及び方法

1. 被験物質及び媒体

被験物質は 〃より購入し、株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所・生化学部にて特性分析を実施した (Attached Data 1)。

1) 被験物質

供給者 : 厚生労働省医薬局審査管理課 化学物質安全対策室
 製造者 :
 名称 : 2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオール
 C A S 番号 : 115-70-8
 構造式又は示性式 : $C_2H_5C(CH_2OH)_2NH_2$
 純度 : 99.4%
 性状 : 微黄色透明、粘性の液体
 分子量 : 119.16
 ロット番号 :
 安定性 : 実験終了後の被験物質を分析した結果、品質に問題はなく、実験期間中は安定であった (Attached Data 2)。
 保存方法 : 冷暗所 (保存期間中の実測温度 : 機器登録No.105 2~8℃、機器登録No.906 1~8℃、機器登録No.1456 1~9℃)
 保存場所 : 御殿場研究所 被験物質保存室、変異原室及び第 1 研究棟・被験物質調製室
 取扱い上の注意 : 刺激性を有するので、取り扱い時は手袋等を着用した。
 返却 : 被験物質の残量はすべて廃棄した。

2) 媒体

名称 : 注射用水
 ロット番号 : 3A75N
 規格 : 日本薬局方
 製造元 : 株式会社大塚製薬工場
 保存方法 : 室温
 保存場所 : 御殿場研究所 変異原室

媒体の選択理由 : 被験物質は 50.0 mg/mL の濃度で注射用水に肉眼的に溶解し、発泡、発熱、吸熱及び変色等の変化は認められなかった。従って注射用水を媒体として選択した。

使用した主な標準操作手順書

SOP No. TSB-102 : 被験物質の受領・返却

SOP No. MUT-1000 : 細菌（微生物）を用いる復帰突然変異試験

2. 被験液の調製

1) 調製方法

(1) 濃度設定試験

被験物質 0.25 g を 5 mL 容メスフラスコに秤取し、注射用水で溶解し、メスアップして最高濃度 50.0 mg/mL 溶液（最少グルコース寒天平板培地に添加した際の最終用量：5000 µg/plate）を調製した。次いで、50.0 mg/mL 溶液を公比 4 で順次 7 段階希釈（各濃度の被験液 1.50 mL：注射用水 4.50 mL）し、12.5、3.13、0.781、0.195、0.0488、0.0122 及び 0.00305 mg/mL の計 8 濃度段階の被験液を調製した。

(2) 本試験

濃度設定試験において生育阻害が認められなかったため、被験物質 0.5 g を 10 mL 容メスフラスコに秤取し、注射用水で溶解し、メスアップして最高濃度 50.0 mg/mL 溶液（最少グルコース寒天平板培地に添加した際の最終用量：5000 µg/plate）を調製した。次いで、50.0 mg/mL 溶液を公比 2 で順次 5 段階希釈（各濃度の被験液 5.0 mL：注射用水 5.0 mL）し、25.0、12.5、6.25、3.13 及び 1.56 mg/mL の計 6 濃度段階の被験液を調製した。

2) 調製頻度 : 使用時に調製した。

使用した主な標準操作手順書

SOP No. TSB-109 : 被験物質の溶液又は懸濁液調製法（媒体調製を含む）

SOP No. MUT-1000 : 細菌（微生物）を用いる復帰突然変異試験

3. 対照物質

1) 陰性対照物質

媒体（注射用水）を陰性対照とした。

2) 陽性対照物質

以下 5 種類の化学物質を陽性対照とした。

(1) 代謝活性化

① 2-Aminoanthracene（以下、2AA と略す）

ロット番号 : M8E7779
製造元 : ナカライテスク株式会社
純度 : 96.0%
保存方法 : 冷蔵（4℃設定の冷蔵庫保存）、遮光
保存場所 : 御殿場研究所 変異原室

② Benzo[a]pyrene（以下、B[a]P と略す）

ロット番号 : M2N9306
製造元 : ナカライテスク株式会社
純度 : 99.0%
保存方法 : 室温、遮光
保存場所 : 御殿場研究所 変異原室

(2) 非代謝活性化

① 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide（以下、AF-2 と略す）

ロット番号 : WAP0369
製造元 : 和光純薬工業株式会社
純度 : 99.0%
保存方法 : 室温、遮光
保存場所 : 御殿場研究所 変異原室

② Sodium azide（以下、SAZ と略す）

ロット番号 : ELP2778
製造元 : 和光純薬工業株式会社
純度 : 98.0%
保存方法 : 室温、遮光
保存場所 : 御殿場研究所 変異原室

③ 2-Methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)-aminopropylamino] acridine·2HCl

(以下、ICR-191 と略す)

ロット番号 : 492624

製造元 : Polysciences, Inc.

純度 : 98.0%

保存方法 : 冷蔵 (4℃設定の冷蔵庫保存)、遮光

保存場所 : 御殿場研究所 変異原室

各陽性対照物質は、秤量後調製時まで-20℃の冷凍庫 (機器登録No.906) に保存した。

(3) 陽性対照物質の選択理由

毒性試験ガイドラインに準じて選択した。

(4) 調製方法

AF-2、ICR-191、2AA 及び B[a]P はジメチルスルホキシド (和光純薬工業株式会社、試薬特級、ロット番号 WAF5040) に溶解し、SAZ は注射用水 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号 3A75N) に溶解した。それぞれの調製濃度を表 1 に示した。調製後は濾過 (使用フィルター: Whatman 0.2 µm、ロット番号 98393) 滅菌して使用した。

表 1 陽性対照物質の調製及び処理濃度

試験菌株	非代謝活性化 (-S9)		代謝活性化 (+S9)	
	陽性対照物質	調製濃度 µg/mL	陽性対照物質	調製濃度 µg/mL
<i>S. typhimurium</i> TA100	AF-2	0.1 (0.01)	B[a]P	50 (5.0)
<i>S. typhimurium</i> TA98	AF-2	1.0 (0.1)	B[a]P	50 (5.0)
<i>S. typhimurium</i> TA1535	SAZ	5.0 (0.5)	2AA	20 (2.0)
<i>S. typhimurium</i> TA1537	ICR-191	10.0 (1.0)	B[a]P	50 (5.0)
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	AF-2	0.1 (0.01)	2AA	100 (10.0)

() 内の数値はプレートに処理したときの処理用量(µg/plate)を示す。

使用した主な標準操作手順書

SOP No. MUT-1000 : 細菌 (微生物) を用いる復帰突然変異試験

4. 使用菌株

1) 菌株

次の5種類の菌株を用いた。

① 塩基対置換型

S. typhimurium TA100

S. typhimurium TA1535

E. coli WP2 *uvrA*

② フレームシフト型

S. typhimurium TA98

S. typhimurium TA1537

上記菌株は、国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部より入手（1997年10月9日）した。

2) 菌株の選択理由

毒性試験ガイドラインに準じて選択した。当該菌株は変異原性物質に対する感受性が高く、細菌を用いる変異原性試験に最も一般的に使用されている。

3) 菌株の保存及び解凍

入手した菌株を培養して得られた菌懸濁液 0.8 mL に対して、DMSO（和光純薬工業株式会社、試薬特級、ロット番号 SEG4422）を 0.07 mL の割合で添加し、 -80°C 設定の超低温フリーザー（日本フリーザー株式会社：CL-312、機器登録No.928）で保存した。使用する時は室温で解凍した。

4) 菌株の特性検査

凍結保存した菌株について、アミノ酸要求性、膜変異 *rfa* 特性、薬物耐性因子 R-factor プラスミド、紫外線感受性及び菌増殖率の各特性検査を 2003 年 5 月 26 日から 2003 年 5 月 28 日に実施し、それぞれの菌株に特有の性質が保持されていることを確認した。

5. S9 mix 及び培地の調製

1) S9 mix

S9 及び補酵素 (S9/コファクターAセット ロット番号 A030314131、オリエンタル酵母工業株式会社) を混合し、調製した。調製は用時に行った。

(1) S9

名 称 : S9
 ロット番号 : 03031413
 製造日 : 2003年3月14日
 購入日 : 2003年5月13日
 種・系統 : ラット・SD系
 性 : 雄
 週 齢 : 7週齢
 体 重 : 223.4±8.1 g (Mean±S.D.)
 誘導物質 : フェノバルビタール (PB) 及び 5,6-ベンゾフラボン (BF)
 投 与 法 : 腹腔内投与

投与期間及び投与量

: PB 4日間 30+60+60+60mg/kg body weight
 BF 1日間 80mg/kg body weight
 保存方法 : 冷凍 (-80℃設定の冷凍庫 (機器登録No.928) に保存)
 使用期限 : 2003年9月13日 (製造後6箇月以内)
 保存場所 : 御殿場研究所 変異原室

(2) 補酵素

名 称 : コファクターA
 ロット番号 : A03030713
 製造日 : 2003年3月7日
 購入日 : 2003年5月13日
 保存方法 : 冷凍 (-80℃設定の冷凍庫 (機器登録No.928) に保存)
 使用期限 : 2003年9月6日 (製造後6箇月以内)
 保存場所 : 御殿場研究所 変異原室

(3) S9 mix の組成

S9 1 mL
 補酵素 9 mL 0.4M 塩化マグネシウム水溶液 0.2 mL

1.65M 塩化カリウム水溶液	0.2 mL
1.0M グルコース・6-リン酸水溶液	0.05 mL
0.1M 還元型ニコチンアミド・アデニン ジヌクレオチドリッ酸(NADPH)水溶液	0.4 mL
0.1M 還元型ニコチンアミド・アデニン ジヌクレオチド(NADH)水溶液	0.4 mL
0.2M ナトリウム・リン酸緩衝液(pH 7.4)	5.0 mL
精製水	2.75 mL

2) 培地

(1) 最少グルコース寒天平板培地

最少グルコース寒天平板培地は、オリエンタル酵母工業株式会社から購入したものをを用いた。

名 称 : 最少グルコース寒天培地 BZ

ロット番号 : BZ020GS

保存方法 : 常温 (15~25℃)

保存場所 : 御殿場研究所 変異原室

(2) ニュートリエントブロス培養液

ニュートリエントブロス 12.50 g を精製水 500 mL に溶解し、調製した。調製後はオートクレーブ滅菌 (121℃、20min 処理、機器登録No.939) し、調製後は使用時まで室温にて保存した。

名 称 : ニュートリエントブロス (Nutrient Broth No.2)

ロット番号 : 59365

製造元 : UNIPATH LTD.

保存方法 : 室温

保存場所 : 御殿場研究所 変異原室

(3) 0.1 M ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)

リン酸二水素ナトリウム二水和物 3.90 g を精製水 250 mL に溶解し、調製した。次に、リン酸水素二ナトリウム 14.20 g を精製水 1000 mL に溶解し、調製した。以上、二つの水溶液を混合し、0.1 M ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4) とした。調製後はオートクレーブ滅菌 (121℃、20min 処理、機器登録No.939) し、調製後は使用時まで室温にて保存した。

- ① 名 称 : リン酸二水素ナトリウム二水和物 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
 ロット番号 : SEG2423
 製造元 : 和光純薬工業株式会社
 保存方法 : 室温
 保存場所 : 御殿場研究所 変異原室
- ② 名 称 : リン酸水素二ナトリウム (Na_2HPO_4)
 ロット番号 : MOR2526
 製造元 : 和光純薬工業株式会社
 保存方法 : 室温
 保存場所 : 御殿場研究所 変異原室

(4) 0.5 mM D-ビオチン-0.5 mM L-ヒスチジン溶液

D-ビオチン 30.5 mg を 1 mol/L 水酸化ナトリウム 0.3 mL に溶解し、L-ヒスチジン塩酸一水和物 26.2 mg を加え、精製水 250 mL に溶解し、調製した。調製後は濾過 (IWAKI 0.2 μm 、ロット番号 06502003) 滅菌し、使用時まで冷蔵 (機器登録No.941) 保存した。

- ① 名 称 : D-ビオチン((+)-Biotin、Vitamin H)
 ロット番号 : ELP3763
 製造元 : 和光純薬工業株式会社
 保存方法 : 冷蔵 (4℃設定の冷蔵庫保存)、遮光
 保存場所 : 御殿場研究所 変異原室
- ② 名 称 : L-ヒスチジン塩酸一水和物
 (L-Histidine Hydrochloride Monohydrate)
 ロット番号 : TCN4471
 製造元 : 和光純薬工業株式会社
 保存方法 : 冷蔵 (4℃設定の冷蔵庫保存)、遮光
 保存場所 : 御殿場研究所 変異原室

(5) 0.5mM L-トリプトファン溶液

L-トリプトファン 25.2 mg を精製水 250 mL に溶解し、調製した。調製後は濾過 (IWAKI 0.2 μm 、ロット番号 06502003) 滅菌し、使用時まで冷蔵 (機器登録No.941) 保存した。

名 称 : L-Tryptophan
 ロット番号 : TCL2695
 製造元 : 和光純薬工業株式会社
 保存方法 : 冷蔵 (4℃設定の冷蔵庫保存) 、遮光
 保存場所 : 御殿場研究所 変異原室

(6) トップアガー

以下に示す寒天を用いて調製した軟寒天液(0.6 % Agar, 0.6 % NaCl : ナカライテスク株式会社、ロット番号 V2F7063)に、*Salmonella typhimurium* TA 株は 0.5 mM D-ビオチン-0.5 mM L-ヒスチジン溶液、*Escherichia coli* 株では 0.5 mM L-トリプトファン溶液をそれぞれ 1/10 容量加え、調製した。

名 称 : BACTO-AGAR
 ロット番号 : 2087878
 製造元 : DIFCO LABORATORIES
 保存方法 : 室温
 保存場所 : 御殿場研究所 変異原室

6. 試験方法¹⁾⁻⁵⁾

1) 識別方法

(1) 菌株の識別

菌株の種類毎に、以下に示す色のラベルを貼り識別した。

<i>S. typhimurium</i> TA100	青
<i>S. typhimurium</i> TA98	緑
<i>S. typhimurium</i> TA1535	桃
<i>S. typhimurium</i> TA1537	赤
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	黄

(2) 濃度の識別

非代謝活性化を「-」、代謝活性化を「+」とし、陰性対照 (Negative Control) を「NC」、陽性対照 (Positive Control) を「PC」、被験物質処理を濃度の低い方から「1」、「2」、「3」…の番号を明記したラベルで識別した。

2) 前培養条件

- (1) ニュートリエントブロス 30 mL を入れた培養用三角フラスコに、*S. typhimurium* TA 株は各 60 μ L、*E. coli* 株は 30 μ L の菌懸濁液を植菌した。
- (2) 試験には、37°C で約 8 時間前培養（振盪培養装置：BIOSPIN MBS-1、東京理化器械株式会社）した後の菌懸濁液を用いた。前培養終了時に菌懸濁液の吸光度を測定（分光光度計：UVIDEC-66、協和医科器械株式会社）し、生菌数が 1×10^9 個/mL 以上であることを確認した（表 2）。なお、菌懸濁液は、使用まで急激な温度変化を避けるため室温下に放置した。

表 2 菌株の生菌数

菌株	濃度設定試験	本試験
<i>S. typhimurium</i> TA100	1.41×10^9 /mL	1.48×10^9 /mL
<i>S. typhimurium</i> TA98	1.63×10^9 /mL	1.66×10^9 /mL
<i>S. typhimurium</i> TA1535	1.28×10^9 /mL	1.51×10^9 /mL
<i>S. typhimurium</i> TA1537	1.13×10^9 /mL	1.19×10^9 /mL
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	3.50×10^9 /mL	3.34×10^9 /mL

3) 用量の設定

(1) 濃度設定試験

最高用量を 5000 μ g/plate とし、以下公比 4 で希釈した 1250、313、78.1、19.5、4.88、1.22 及び 0.305 μ g/plate の計 8 用量を設定した。

(2) 本試験

濃度設定試験の結果、すべての処理用量において試験菌株の生育阻害が認められなかったため、本試験は 5000 μ g/plate を最高用量とし、以下公比 2 で 5 段階希釈した 2500、1250、625、313 及び 156 μ g/plate の計 6 用量を設定した。

4) プレート数

濃度設定試験及び本試験は、処理群当たり 3 枚のプレートを用いた。

5) 濃度設定試験

- (1) 非代謝活性化では 0.1M ナトリウムーリン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL を、代謝活性化では S9 mix 0.5 mL を加えた後、被験液を 0.1 mL 添加し、それぞれに各菌懸濁液 0.1 mL を加えた。

- (2) 37℃で20分間振盪（プレインキュベーション）し、これにトップアガーを2.0 mL加えた後、最少グルコース寒天平板培地に重層した。
- (3) 37℃で48時間培養した後、試験菌株の生育阻害並びに沈殿及び結晶の析出の有無を実体顕微鏡を用いて観察した。この結果、白色結晶物の析出が認められたため、出現した復帰突然変異コロニーは肉眼により手動で計数した。なお、陽性対照群の復帰突然変異コロニーは自動コロニーカウンター（バイオマルチスキャナー BMS-400、東洋測器株式会社）で計数した。

6) 本試験

操作は濃度設定試験と同じ手順で行った。

7) 追加確認試験

特に必要性が認められなかったため実施しなかった。

7. 判定基準

結果の判定は、被験物質処理における復帰突然変異コロニー数が自然復帰突然変異コロニー数に対して明らかに増加し（陰性対照の2倍以上を目安とする）、この増加に用量反応性が認められ、また濃度設定試験・本試験の各判定に再現性が認められた場合に陽性と判定した。なお、判定に際して統計学的手法は用いなかった。

試験結果

1. 濃度設定試験

濃度設定試験の結果を Table 1, 2 及び Figure 1~5 (上段) に示した。

1) 培養終了後の観察結果

培養終了後の実体顕微鏡を用いた観察においては、試験菌株の種類に関わらず、代謝活性化存在下で最高用量の被験物質処理群 (5000 µg/plate) で白色結晶物の析出が認められた。一方、非代謝活性化存在下においては、試験菌株の種類に関わらず、全被験物質処理群 (0.305~5000 µg/plate) で、沈殿及び結晶の析出は認められなかった。なお、試験菌株の種類及び代謝活性化の有無に関わらず、全被験物質処理群 (0.305~5000 µg/plate) において、生育阻害が認められなかった。

2) 復帰突然変異コロニー数

試験菌株の種類及び代謝活性化の有無に関わらず、全被験物質処理群 (0.305~5000 µg/plate) において、陰性対照と比較して 2 倍以上かつ用量依存的な復帰突然変異コロニー数の増加は認められなかった。

3) 試験系の成立条件

- (1) 陽性対照群では、各菌株の陰性対照に比較して 2 倍以上となる復帰突然変異コロニー数の増加が認められた。
- (2) すべての用量群について 3 枚のプレートにおける個々の復帰突然変異コロニー数に顕著な差は認められなかった。
- (3) 試験の全処理群において雑菌の混入は認められず、培養条件等の試験環境において異常はないものと判断した。
- (4) 各菌株の代謝活性化の有無による陰性対照及び陽性対照の復帰突然変異コロニー数は試験実施施設における背景データ管理値 (Attached Data 3) の範囲以内であったため、試験系は成立したものと判断した。

2. 本試験

本試験の結果を Table 3, 4 及び Figure 1~5 (下段) に示した。

1) 用量設定理由

濃度設定試験の結果、試験菌株の種類及び代謝活性化の有無に関わらず、全被験物質処理群において、生育阻害が認められなかったため、本試験における被験物質用量は、濃度設定試験において最高用量として設定した 5000 µg/plate を本試験の最高用量とし、これを公比 2 で 5 段階希釈した 2500、1250、625、313 及び 156 µg/plate の計 6 用量を設定した。

2) 培養終了後の観察結果

培養終了後の実体顕微鏡を用いた観察においては、試験菌株の種類に関わらず、代謝活性化存在下で 2500 µg/plate 以上の被験物質処理群で白色結晶物の析出が認められた。一方、非代謝活性化存在下においては、試験菌株の種類に関わらず、全被験物質処理群 (156~5000 µg/plate) で、沈殿及び結晶の析出は認められなかった。なお、試験菌株の種類及び代謝活性化の有無に関わらず、全被験物質処理群 (156~5000 µg/plate) において、生育阻害が認められなかった。

3) 復帰突然変異コロニー数

試験菌株の種類及び代謝活性化の有無に関わらず、全被験物質処理群 (156~5000 µg/plate) において、陰性対照と比較して 2 倍以上かつ用量依存的な復帰突然変異コロニー数の増加は認められなかった。

4) 試験系の成立条件

- (1) 陽性対照群では、各菌株の陰性対照に比較して 2 倍以上となる復帰突然変異コロニー数の増加が認められた。
- (2) すべての用量群について 3 枚のプレートにおける個々の復帰突然変異コロニー数に顕著な差は認められなかった。
- (3) 試験の全処理群において雑菌の混入は認められず、培養条件等の試験環境において異常はないものと判断した。
- (4) 各菌株の代謝活性化の有無による陰性対照及び陽性対照の復帰突然変異コロニー数は試験実施施設における背景データ管理値 (Attached Data 3) の範囲以内であったため、試験系は成立したものと判断した。

考察及び結論

濃度設定試験及び本試験のいずれにおいても、試験菌株の種類、被験物質濃度及び代謝活性化の有無に関わらず、陰性対照と比較して2倍以上の、かつ用量依存性を伴う復帰突然変異コロニー数の増加は認められなかった。したがって、本被験物質の復帰突然変異試験の結果は陰性であると判断した。

一方、陽性対照群では各菌株の陰性対照群に比較して2倍以上となる復帰突然変異コロニー数の増加を示したことから、試験菌株の復帰突然変異誘発物質に対する反応は適切であったことが確認された。更に、各菌株の代謝活性化の有無による陰性対照及び陽性対照の復帰突然変異コロニー数は試験実施施設における背景データと比較して異常と考えられる数値を示さず、試験は適切に実施されたものと考えられた。なお、化学構造的に本被験物質と類似物質である tert-butyl hydroperoxide (CAS Registry No. 75-91-2)は、染色体異常試験⁶⁾で陽性の結果が、isopropyl alcohol (CAS Registry No. 67-63-0)は細菌を用いる復帰突然変異試験⁷⁾及び姉妹染色分体交換試験⁸⁾で陰性の結果が、acetone cyanohydrin (CAS Registry No. 75-86-5)は細菌を用いる復帰突然変異試験⁹⁾で陰性の結果がそれぞれ報告されている。

以上の試験結果より、本試験条件下において、2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオールは細菌に対する遺伝子突然変異誘発能を有さない（陰性）と判断した。

参考文献

- 1) Bruce N. Ames, Joyce McCann and Edith Yamasaki (1975): Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Research*. **31**, 347-364.
- 2) Dorothy M. Maron and Bruce N. Ames (1983): Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*. **113**, 173-215.
- 3) 石館 基 (監修) (1991): 微生物を用いる変異原性試験データ集 (能美健彦、松井道子編集)、株式会社エル・アイ・シー、東京
- 4) 日本製薬工業協会・医薬品評価委員会・基礎研究部会 変異原性試験検討グループ編集 (1992): 厚生省医薬品毒性試験法ガイドラインに基づく変異原性試験 Q & A、pp.1-21 及び 81-89、サイエンティスト社、東京
- 5) 日本バイオアッセイ研究センター編集 (1999): 微生物を用いる変異原性試験手法解説、pp.1-86、富士オフセット株式会社、東京
- 6) T Ochi (1989): Effects of iron chelators and glutathione depletion on the induction and repair of chromosomal aberrations by tert-butyl hydroperoxide in cultured Chinese hamster cells. *Mutation Res.*, **213**, 243-248.
- 7) H Shimizu, Y Suzuki, N Takemura, S Goto and H. Matsushita (1985): Results of microbial mutation test for forty-three industrial chemicals. *Sangyo Igaku*. **27**, 400-419
- 8) W Von der Hude, M Scheutwinkel, U Gramlich, *et al.* (1987): Genotoxicity of three-carbon compounds evaluated in the SCE test in vitro. *Environ. Mutagen.* **9**, 401-410.

- 9) E Zeiger. B Anderson. S Haworth. *et al.* (1988) : Salmonella mutagenicity tests: IV: results from the testing of 300 chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.* 11(Suppl 12), 1-157.

Table 1 Results of the Dose-Range Finding Test on 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol without Metabolic Activation in the Bacterial Reverse Mutation Test

	Dose (µg/plate)	S9 mix	Number of colonies/plate (Mean±Standard Deviation)				
			Base substitution type			Frameshift type	
			<i>S.typhimurium</i> TA100	<i>S.typhimurium</i> TA1535	<i>E.coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	<i>S.typhimurium</i> TA98	<i>S.typhimurium</i> TA1537
Test article	0	S9 mix (-)	99	9	19	24	7
			89	14	28	25	5
			87 (92 ± 6.4)	11 (11 ± 2.5)	28 (25 ± 5.2)	22 (24 ± 1.5)	8 (7 ± 1.5)
	0.305		99	9	22	22	8
			89	9	26	17	10
			102 (97 ± 6.8)	8 (9 ± 0.6)	23 (24 ± 2.1)	23 (21 ± 3.2)	10 (9 ± 1.2)
	1.22		106	7	23	14	8
			91	9	28	19	9
			95 (97 ± 7.8)	8 (8 ± 1.0)	28 (26 ± 2.9)	19 (17 ± 2.9)	9 (9 ± 0.6)
	4.88		86	8	26	18	12
			106	11	28	20	7
			108 (100 ± 12.2)	15 (11 ± 3.5)	31 (28 ± 2.5)	17 (18 ± 1.5)	11 (10 ± 2.6)
	19.5		99	10	21	18	10
			108	10	19	15	11
			93 (100 ± 7.5)	10 (10 ± 0.0)	21 (20 ± 1.2)	14 (16 ± 2.1)	11 (11 ± 0.6)
78.1	106	9	21	12	10		
	104	12	27	17	12		
	106 (105 ± 1.2)	11 (11 ± 1.5)	22 (23 ± 3.2)	22 (17 ± 5.0)	10 (11 ± 1.2)		
313	97	9	28	15	10		
	78	10	25	16	7		
	81 (85 ± 10.2)	10 (10 ± 0.6)	24 (26 ± 2.1)	16 (16 ± 0.6)	7 (8 ± 1.7)		
1250	104	13	31	17	10		
	96	11	32	20	7		
	110 (103 ± 7.0)	10 (11 ± 1.5)	24 (29 ± 4.4)	15 (17 ± 2.5)	8 (8 ± 1.5)		
5000	103	13	18	19	7		
	91	9	18	15	8		
	101 (98 ± 6.4)	10 (11 ± 2.1)	20 (19 ± 1.2)	21 (18 ± 3.1)	7 (7 ± 0.6)		
Positive control	Name	AF-2 ^{#1}	SAZ ^{#2}	AF-2 ^{#1}	AF-2 ^{#1}	ICR-191 ^{#3}	
	Dose (µg/plate)	0.01	0.50	0.01	0.10	1.00	
	Number of colonies/plate	423 439 481 (448 ± 30.0)	320 323 347 (330 ± 14.8)	344 333 356 (344 ± 11.5)	378 401 400 (393 ± 13.0)	1431 1389 1490 (1437 ± 50.7)	

Negative control: Water for injection

#1: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, #2: Sodium azide

#3: 2-Methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)-aminopropylamino]acridine·2HCl

Deposition of precipitation and crystals were not observed at any dose levels.

No growth inhibition of tester strains was observed.

Table 2 Results of the Dose-Range Finding Test on 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol with Metabolic Activation in the Bacterial Reverse Mutation Test

	Dose (µg/plate)	S9 mix	Number of colonies/plate (Mean±Standard Deviation)				
			Base substitution type			Frameshift type	
			<i>S.typhimurium</i> TA100	<i>S.typhimurium</i> TA1535	<i>E.coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	<i>S.typhimurium</i> TA98	<i>S.typhimurium</i> TA1537
Negative control	0		102	10	29	23	15
			109	12	28	24	14
			112 (108 ± 5.1)	17 (13 ± 3.6)	31 (29 ± 1.5)	29 (25 ± 3.2)	10 (13 ± 2.6)
Test article	0.305	S9 mix (+)	116	9	30	21	10
			120	10	31	26	11
			106 (114 ± 7.2)	12 (10 ± 1.5)	31 (31 ± 0.6)	23 (23 ± 2.5)	9 (10 ± 1.0)
	1.22		107	13	22	19	12
			111	17	30	18	9
			113 (110 ± 3.1)	10 (13 ± 3.5)	25 (26 ± 4.0)	18 (18 ± 0.6)	18 (13 ± 4.6)
	4.88		105	8	29	21	10
			97	12	26	23	13
			107 (103 ± 5.3)	10 (10 ± 2.0)	23 (26 ± 3.0)	19 (21 ± 2.0)	14 (12 ± 2.1)
	19.5		125	11	27	20	9
			112	10	23	27	12
			103 (113 ± 11.1)	9 (10 ± 1.0)	22 (24 ± 2.6)	20 (22 ± 4.0)	14 (12 ± 2.5)
	78.1		119	12	31	23	12
			103	11	31	33	14
			94 (105 ± 12.7)	9 (11 ± 1.5)	28 (30 ± 1.7)	24 (27 ± 5.5)	11 (12 ± 1.5)
	313		105	10	24	18	14
			104	8	31	22	13
			107 (105 ± 1.5)	10 (9 ± 1.2)	24 (26 ± 4.0)	28 (23 ± 5.0)	16 (14 ± 1.5)
1250	89	13	20	19	12		
	99	9	19	15	10		
	107 (98 ± 9.0)	13 (12 ± 2.3)	26 (22 ± 3.8)	18 (17 ± 2.1)	12 (11 ± 1.2)		
5000	106 †	11 †	21 †	21 †	11 †		
	101 †	10 †	29 †	19 †	9 †		
	104 † (104 ± 2.5)	11 † (11 ± 0.6)	29 † (26 ± 4.6)	25 † (22 ± 3.1)	9 † (10 ± 1.2)		
Positive control	Name		B[a]P ^{#4}	2AA ^{#5}	2AA ^{#5}	B[a]P ^{#4}	B[a]P ^{#4}
	Dose (µg/plate)		5.00	2.00	10.0	5.00	5.00
	Number of colonies/plate		490	117	443	347	124
			468	109	450	355	109
			480 (479 ± 11.0)	112 (113 ± 4.0)	459 (451 ± 8.0)	341 (348 ± 7.0)	113 (115 ± 7.8)

Negative control: Water for injection

#4: Benzo[a]pyrene, #5: 2-Aminoanthracene

†: Deposition of crystals was observed.

No growth inhibition of tester strains was observed.

Table 3 Results of the Main Test on 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol without Metabolic Activation in the Bacterial Reverse Mutation Test

	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S9 mix	Number of colonies/plate (Mean \pm Standard Deviation)				
			Base substitution type			Frameshift type	
			<i>S.typhimurium</i> TA100	<i>S.typhimurium</i> TA1535	<i>E.coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	<i>S.typhimurium</i> TA98	<i>S.typhimurium</i> TA1537
Negative control	0		106	11	31	14	13
			96	10	25	16	12
			137 (113 \pm 21.4)	9 (10 \pm 1.0)	31 (29 \pm 3.5)	20 (17 \pm 3.1)	10 (12 \pm 1.5)
Test article	156	S9 mix (-)	96	9	30	14	10
			118	7	25	13	10
			117 (110 \pm 12.4)	9 (8 \pm 1.2)	29 (28 \pm 2.6)	10 (12 \pm 2.1)	8 (9 \pm 1.2)
	313		93	7	28	11	13
			112	11	22	11	11
			118 (108 \pm 13.1)	7 (8 \pm 2.3)	29 (26 \pm 3.8)	18 (13 \pm 4.0)	15 (13 \pm 2.0)
	625		109	7	28	15	11
			111	6	27	18	9
			102 (107 \pm 4.7)	8 (7 \pm 1.0)	27 (27 \pm 0.6)	15 (16 \pm 1.7)	10 (10 \pm 1.0)
	1250		115	8	31	10	8
			106	5	28	12	9
			120 (114 \pm 7.1)	9 (7 \pm 2.1)	22 (27 \pm 4.6)	16 (13 \pm 3.1)	12 (10 \pm 2.1)
	2500		116	6	31	12	8
			116	8	23	15	10
112 (115 \pm 2.3)		14 (9 \pm 4.2)	30 (28 \pm 4.4)	18 (15 \pm 3.0)	12 (10 \pm 2.0)		
5000	120	6	20	15	11		
	117	6	22	10	11		
	106 (114 \pm 7.4)	9 (7 \pm 1.7)	16 (19 \pm 3.1)	12 (12 \pm 2.5)	8 (10 \pm 1.7)		
Positive control	Name		AF-2 ^{#1}	SAZ ^{#2}	AF-2 ^{#1}	AF-2 ^{#1}	ICR-191 ^{#3}
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)		0.01	0.50	0.01	0.10	1.00
	Number of colonies/plate		467	144	265	360	1338
			452	213	206	355	1063
			488 (469 \pm 18.1)	172 (176 \pm 34.7)	234 (235 \pm 29.5)	374 (363 \pm 9.8)	1181 (1194 \pm 138.0)

Negative control: Water for injection

#1: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, #2: Sodium azide

#3: 2-Methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)-aminopropylamino]acridine \cdot 2HCl

Deposition of precipitation and crystals were not observed at any dose levels.

No growth inhibition of tester strains was observed.

Table 4 Results of the Main Test on 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol with Metabolic Activation in the Bacterial Reverse Mutation Test

	Dose (µg/plate)	S9 mix	Number of colonies/plate (Mean±Standard Deviation)				
			Base substitution type			Frameshift type	
			<i>S.typhimurium</i> TA100	<i>S.typhimurium</i> TA1535	<i>E.coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	<i>S.typhimurium</i> TA98	<i>S.typhimurium</i> TA1537
Negative control	0		130	13	27	18	11
			128	13	32	22	15
			119 (126 ± 5.9)	12 (13 ± 0.6)	27 (29 ± 2.9)	20 (20 ± 2.0)	10 (12 ± 2.6)
Test article	156	S9 mix (+)	120	8	24	20	15
			125	7	27	19	15
			123 (123 ± 2.5)	8 (8 ± 0.6)	29 (27 ± 2.5)	19 (19 ± 0.6)	12 (14 ± 1.7)
	313		130	8	28	20	11
			138	7	21	19	15
			114 (127 ± 12.2)	8 (8 ± 0.6)	29 (26 ± 4.4)	22 (20 ± 1.5)	13 (13 ± 2.0)
	625		107	10	25	17	10
			112	9	22	18	10
			100 (106 ± 6.0)	7 (9 ± 1.5)	27 (25 ± 2.5)	21 (19 ± 2.1)	12 (11 ± 1.2)
	1250		129	12	25	25	11
			132	8	21	22	12
			113 (125 ± 10.2)	9 (10 ± 2.1)	19 (22 ± 3.1)	21 (23 ± 2.1)	14 (12 ± 1.5)
	2500		124 †	10 †	18 †	20 †	15 †
			125 †	6 †	17 †	18 †	12 †
			130 † (126 ± 3.2)	9 † (8 ± 2.1)	21 † (19 ± 2.1)	15 † (18 ± 2.5)	9 † (12 ± 3.0)
	5000		134 †	6 †	25 †	17 †	9 †
			126 †	5 †	19 †	12 †	13 †
			144 † (135 ± 9.0)	9 † (7 ± 2.1)	18 † (21 ± 3.8)	12 † (14 ± 2.9)	9 † (10 ± 2.3)
Positive control	Name		B[<i>a</i>]P ^{#4}	2AA ^{#5}	2AA ^{#5}	B[<i>a</i>]P ^{#4}	B[<i>a</i>]P ^{#4}
	Dose (µg/plate)		5.00	2.00	10.0	5.00	5.00
	Number of colonies/plate		612	122	421	247	113
			648	130	403	242	117
		603 (621 ± 23.8)	98 (117 ± 16.7)	398 (407 ± 12.1)	253 (247 ± 5.5)	104 (111 ± 6.7)	

Negative control: Water for injection

#4: Benzo[*a*]pyrene , #5: 2-Aminoanthracene

†: Deposition of crystals was observed.

No growth inhibition of tester strains was observed.

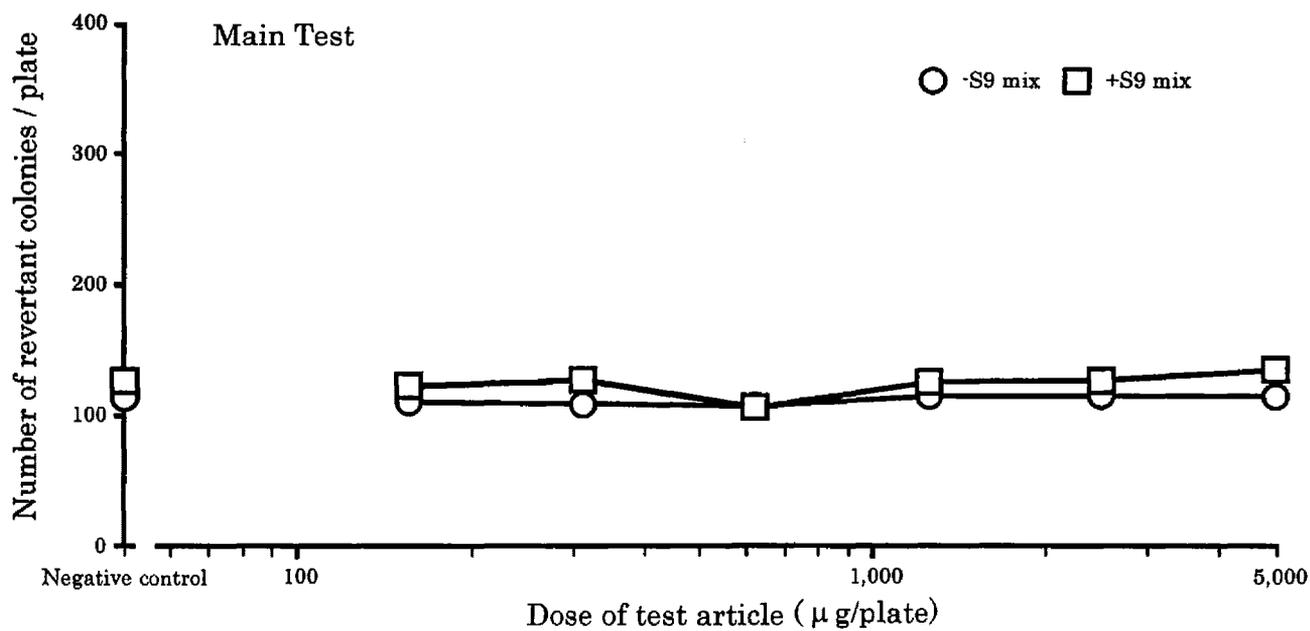
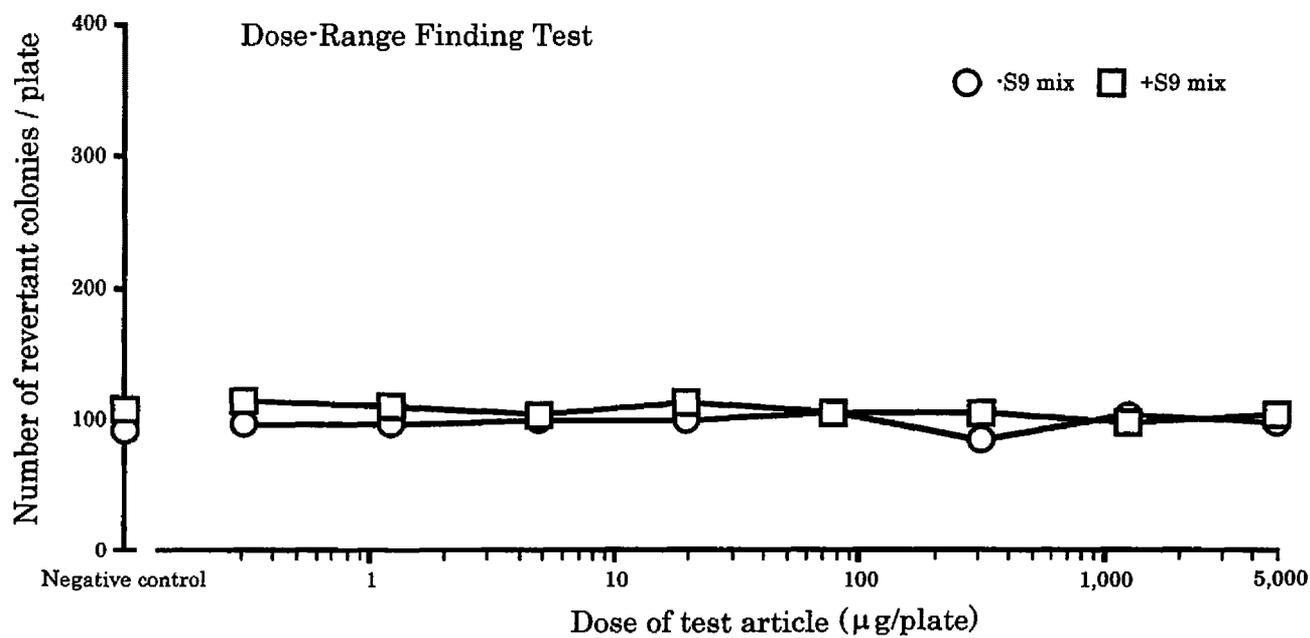


Figure 1

**Results of the Reverse Mutation Test on 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol
with *Salmonella typhimurium* TA100**

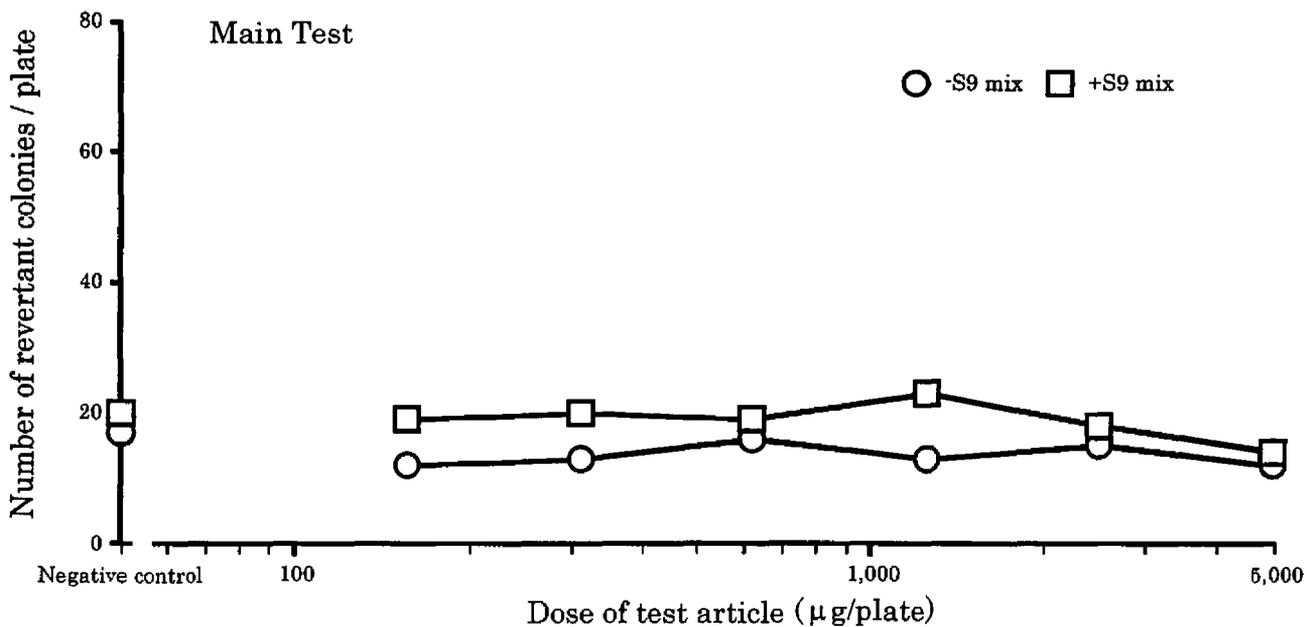
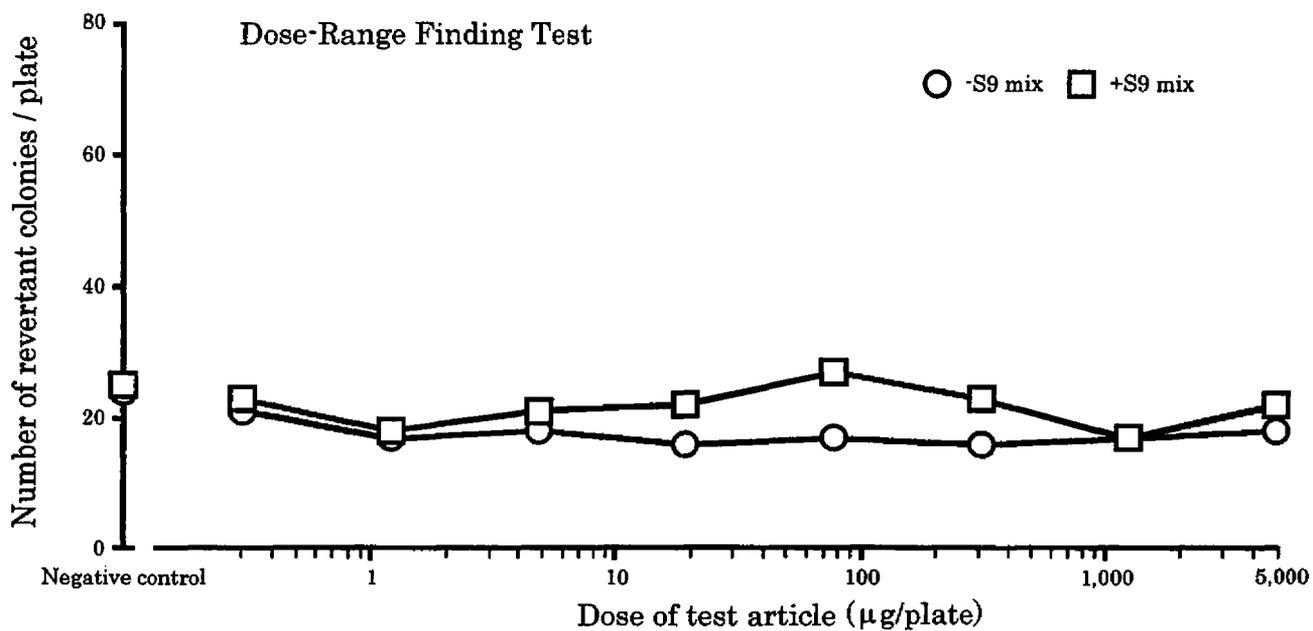


Figure 2

Results of the Reverse Mutation Test on 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol with *Salmonella typhimurium* TA98

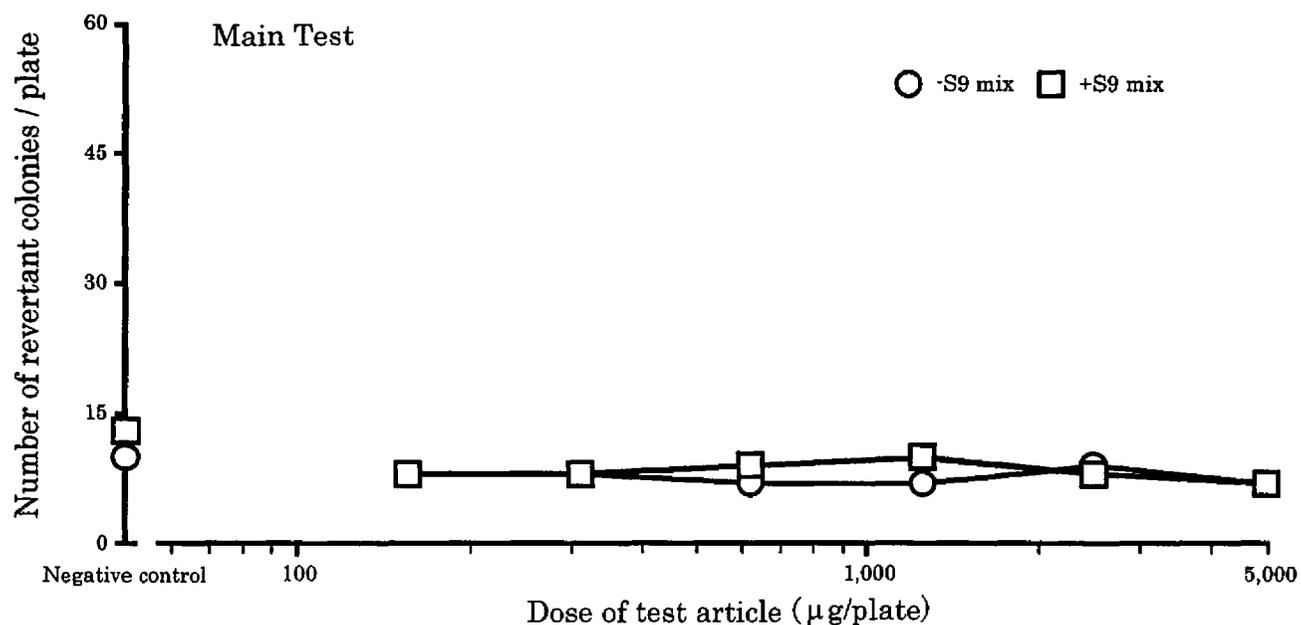
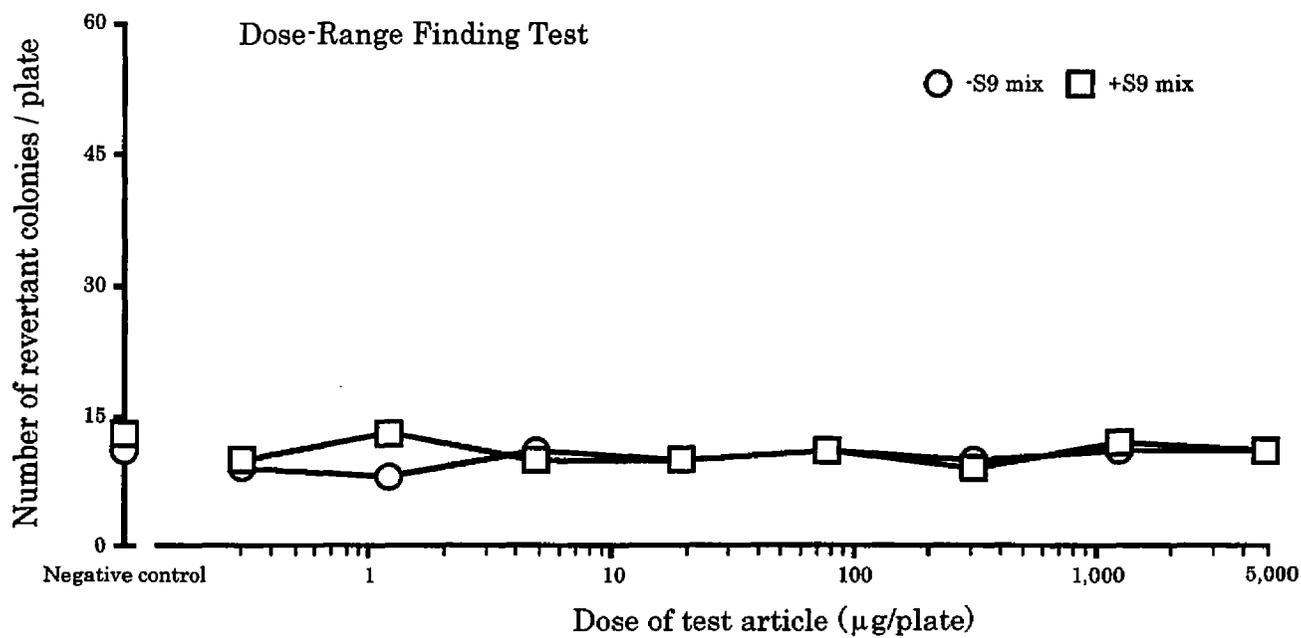


Figure 3

Results of the Reverse Mutation Test on 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol
with *Salmonella typhimurium* TA1535

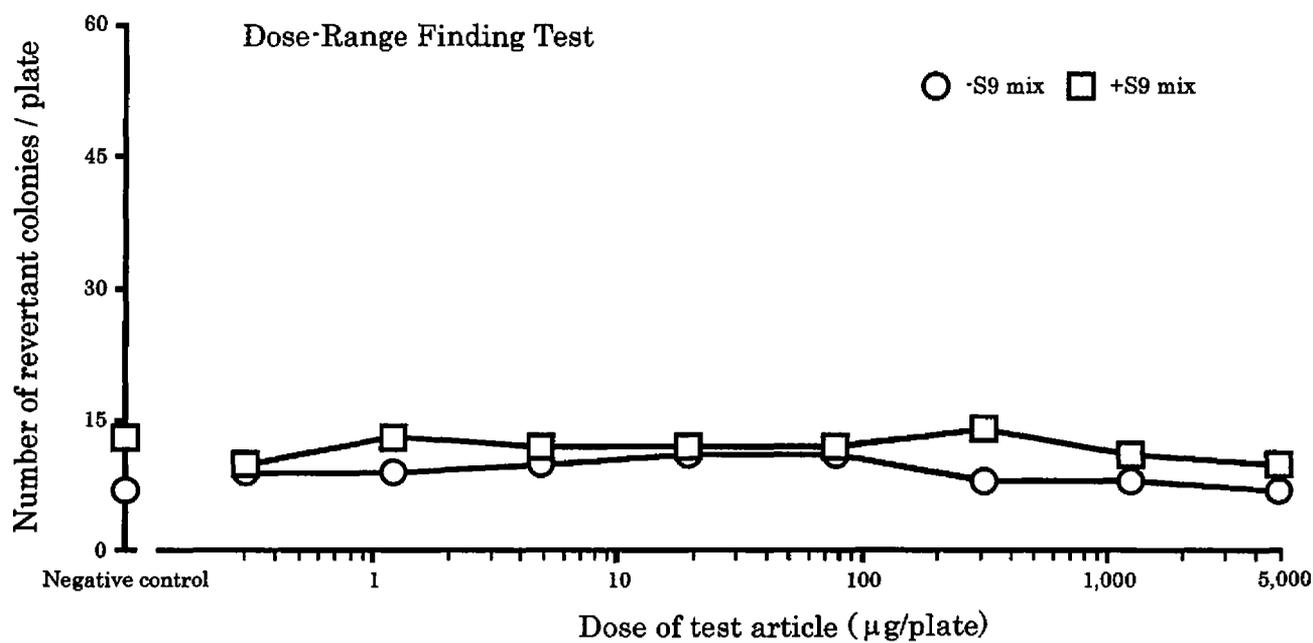


Figure 4

**Results of the Reverse Mutation Test on 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol
with *Salmonella typhimurium* TA1537**

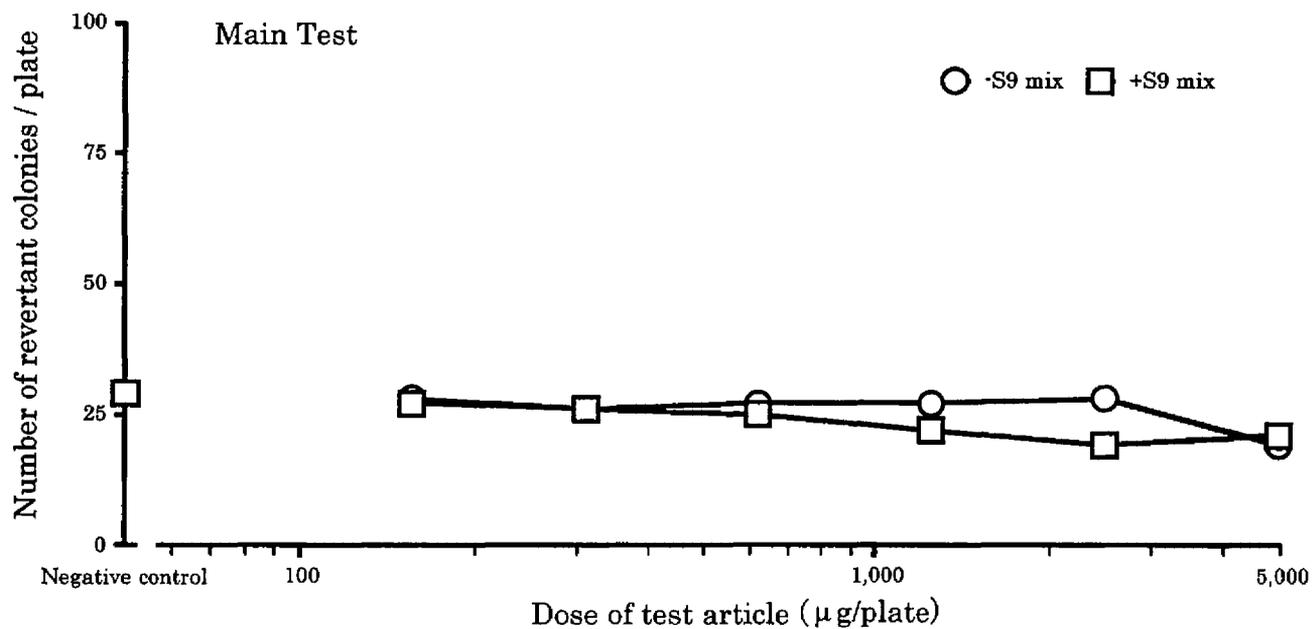
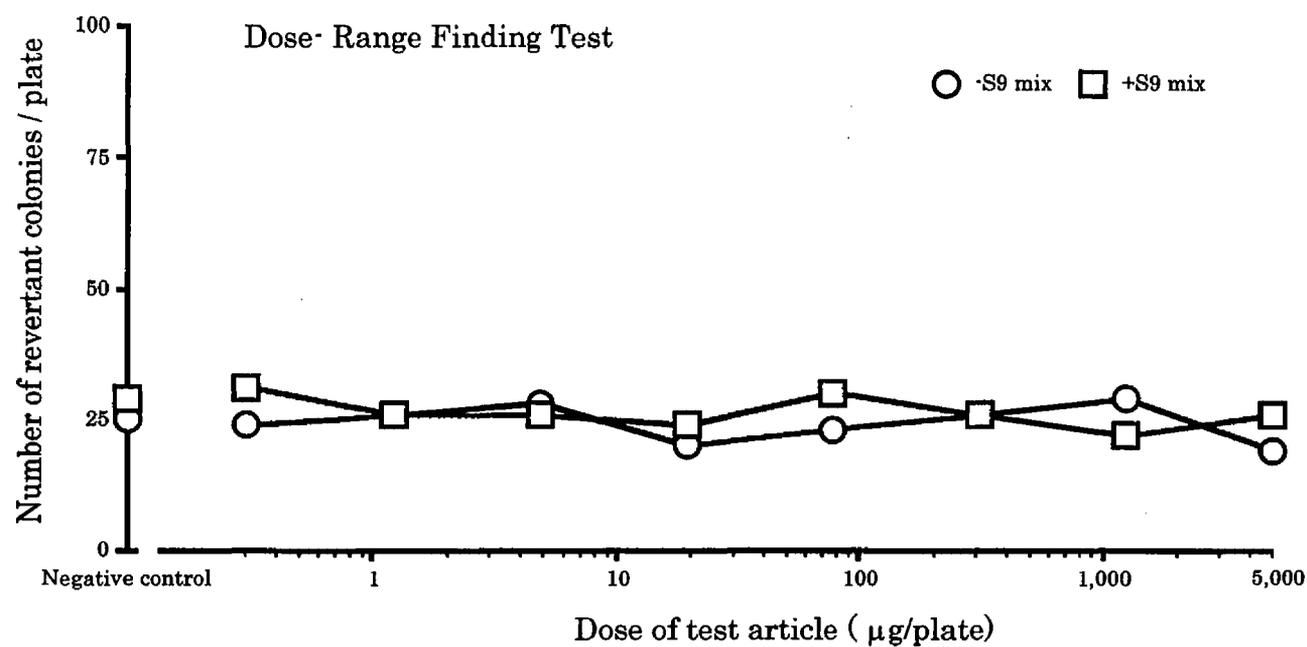


Figure 5

Results of the Reverse Mutation Test on 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol
with *Escherichia coli* WP2 *uvrA*