## 最終報告書

# 2-イソブトキシエタノールの 細菌を用いる復帰突然変異試験

厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室 委託



試験委託者 厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室

(東京都千代田区霞が関 1-2-2)

試験番号

M-12-022

被験物質

2-イソブトキシエタノール

試験項目

細菌を用いる復帰突然変異試験

試験開始日

2012年8月17日

実験開始日

2012年9月10日

実験終了日

2012年10月4日

試験終了日

試験責任者の捺印日

試資料保管場所

秦野研究所資料保存室

保管期間

試験終了後10年間

その後の保管については試験委託者と協議する。

運営管理者

財団法人食品薬品安全センター秦野研究所

所長

この試験は、「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成23年3月31日付け、薬食発0331第7号厚生労働省医薬食品局長、平成23・03・29製局第5号経済産業省製造産業局長、環保企発第110331009号環境省総合環境政策局長通知)に準拠し、「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」(平成23年3月31日付け、薬食発0331第8号厚生労働省医薬食品局長、平成23・03・29製局第6号経済産業省製造産業局長、環保企発第110331010号環境省総合環境政策局長通知)を遵守して実施したものである。

2013年03月15日

試験責任者

#### 試験従事者

試験責任者

試験担当者

検体調製

試験操作

化学分析

被験物質管理



## 目次

要約
試験目的
試験ガイドラインと GLP
材料と方法
1. 被験物質
2. 陽性対照物質
3. 検定菌7
4. 試験材料
5. 被験物質調製液の調製8
6. 試験操作
7. 結果の表示11
8. 判定11
予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わな
かったこと
試験成績と考察11
1. 用量設定試験
2. 本試験
参考文献
表13
図
資料
(最終ページ:24 ページ)

信頼性保証書

#### 要約

2-イソブトキシエタノールの遺伝子突然変異誘発性の有無を調べるため、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を用い、プレインキュベーション法により、S9 mix 非存在下および存在下で試験を行った。

1.50、5.00、15.0、50.0、150、500、1500 および 5000 µg/plate の 8 用量を設定して用量設定試験を 行ったところ、S9 mix 非存在下および存在下とも、用いたいずれの用量においても生育阻害は認められ なかった。

用量設定試験の結果に基づき、すべての検定菌について、313、625、1250、2500 および 5000 μg/plate の 5 用量を設定して、2 回の本試験(本試験 I および II)を行った。その結果、2 回の本試験ともに、用いたいずれの検定菌においても、S9 mix の有無にかかわらず、陰性対照値の 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。

以上の結果に基づき、2-イソブトキシエタノールは、用いた試験系において遺伝子突然変異誘発性を 有しない(陰性)と判定した。

#### 試験目的

2-イソブトキシエタノールの遺伝子突然変異誘発性(変異原性)の有無を検討し、安全性評価の資料とするために、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。

#### 試験ガイドラインと GLP

この試験は、「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成23年3月31日付け、薬食発0331第7号厚生労働省医薬食品局長、平成23・03・29製局第5号経済産業省製造産業局長、環保企発第110331009号環境省総合環境政策局長通知)に準拠し、「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」(平成23年3月31日付け、薬食発0331第8号厚生労働省医薬食品局長、平成23・03・29製局第6号経済産業省製造産業局長、環保企発第110331010号環境省総合環境政策局長通知)を遵守して実施した。

#### 材料と方法

#### 1. 被験物質

被験物質である 2-イソブトキシエタノール[化学名(別名):エチレングリコールモノイソブチルエーテル、 英名:2-Isobutoxyethanol、IUPAC 名:2-(2-3)チルプロポキシ)エタノール、略称:2-IBE、CAS 番号: 4439-24-1、分子式: $C_6H_{14}O_2$ 、分子量:118.17、ロット番号:PER2952、含量:99.6%(毛管カラム GC)、資料 1]は、無色澄明の液体である。被験物質の物理化学的性状等を資料 2に示す。被験物質は

から購入し、使用時まで室温(実測値:18.0~28.1℃)、遮光、密閉で保管した。

被験物質原体の安定性については、製品安全データシート中に、光により変質すると記載されている。 また、実験開始前(測定日:2012 年 8 月 21 日)および実験終了後(測定日:2013 年 3 月 5 日)に、秦 野研究所においてフーリエ変換赤外分光光度計を用いて被験物質の赤外吸収スペクトルを測定し、両 者の測定結果に変化がないことを確認した(資料 3)。

## 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。

名称	略称	ロット番号(購入日)	製造者	純度
2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ- 2-フリル)アクリルアミト	AF-2	STQ3987 (2010 年 8 月 6 日)		99.7%
アジ化ナトリウム	SA	HLP7075 (2010 年 8 月 3 日)		100.2%
9-アミノアクリシン	9AA	4785KA (2010 年 8 月 24 日)	MP Biomedicals	98.6%
ベンゾ[a]ピレン	B[a]P	L16T027 (2010 年 8 月 6 日)	Alfa Aesar	97.6%
2-アミノアントラセン	2AA	EPM0250 (2010 年 8 月 3 日)		96.3%

AF-2、9AA、B[a]Pおよび2AAはジメチルスルホキシド(DMSO、ロット番号:LAK5554、 に、SA は日局注射用水(製造番号:K1E86、大塚製薬工場)に溶解して所定の濃度に調製したのち、冷凍保存(設定温度:-20℃)し、調製後 6 か月以内に用時解凍して用いた。各陽性対照物質調製液の調製濃度および添加量を以下に示す。

		S9 mix	非存在下		S9 mix 存在下				
菌 株	物質名	調製濃度 (µg/mL)	添加量 (µL/plate)	用量 (µg/plate)	物質名	調製濃度 (µg/mL)	添加量 (µL/plate)	用量 (µg/plate)	
Salmonella typhimurium		**********							
TA100	AF-2	0.1	100	0.01	B[a]P	50	100	5	
TA1535	SA	5	100	0.5	2AA	100	20	2	
TA98	AF-2	1	100	0.1	B[a]P	50	100	5	
TA1537	9AA	800	100	80	B[a]P	50	100	5	
Escherichia coli									
WP2 uvrA	AF-2	0.1	100	0.01	2AA	100	100	10	

各検定菌に用いた陽性対照物質は、秦野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た。

#### 3. 検定菌

「新規化学物質等に係る試験の方法について」に従い、試験には、ネズミチフス菌(Salmonella typhimurium) TA100、TA1535、TA98、TA1537 および大腸菌(Escherichia coli) WP2 uvrA を用いた。

S. typhimurium TA100、TA1535、TA98、TA1537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、いずれも日本バイオアッセイ研究センターのより分与された。
S. typhimuriumの4菌株を用いる試験は、ヒスチジン要求性から非要求性への復帰突然変異<sup>2)</sup>、E. coli WP2 uvrA 株を用いる試験は、トリプトファン要求性から非要求性への復帰突然変異<sup>3)</sup>を指標とした遺伝子突然変異誘発性の検出系である。

検定菌は冷凍保存(設定温度:-80°C)したもの(凍結保存菌)を、調製後 6 か月以内に用時解凍して試験に用いた。凍結保存菌は、液体培地にて37°Cで静止期の初期まで培養した菌液0.8 mLに対し、滅菌 DMSOを0.07 mLの割合で加えて混合したものをプラスチックチューブに分注し、急速凍結して調製したものであり、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、特性が適正であることが確認されている。

#### 4. 試験材料

#### 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(ロット番号:DZAD6M01、2012年6月22日製造、極東製薬工業)を購入して用いた。なお、培地1Lあたりの組成は以下のとおりで、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・七水和物	0.2	g	
クエン酸・一水和物	2	g	
リン酸水素ニカリウム	10	g	
リン酸二水素アンモニウム	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(ロット番号: BM-M5-249, SSK セールス)	15	g	

#### 2)トップアガー

①の水溶液をオートクレーブ減菌後、フィルター減菌した②または③を容量比 10:1 の割合で混合して 用いた。

(1)	バクトアガー (Difco)	0.6  w/v%
	塩化ナトリウム	0.5 w/v%
2	S. typhimurium 用	
	L-ヒスチジン	$0.5~\mathrm{mmol/L}$
	D-ビオチン	0.5 mmol/L

## ③ E. coli 用L-トリプトファン

0.5 mmol/L

#### 3) S9 mix の組成および調製

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

成 分	S9 mix 1 mL 中の量	濃度
S9*!	0.1 mL	10 vol%
0.2 mol/L ナトリウムーリン酸緩衝液(pH 7.4)	0.5 mL	100 µmol/mL
補酵素溶液*2	0.38 mL	
(塩化カリウム		33 µmol/mL
グルコース-6-リン酸	<del></del>	5 μmol/mL
NADH		4 μmol/mL
NADPH .	·····	4 μmol/mL
0.4 mol/L 塩化マグネシウム溶液	0.02 mL	8 µmol/mL

NADH: Nicotinamide-adenine dinucleotide, reduced form, disodium salt

NADPH: Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, reduced form, tetrasodium salt

#### 5. 被験物質調製液の調製

溶解性の予備検討の結果、被験物質は試験に必要な濃度(50.0 mg/mL)で水に溶解したことから、媒体には日局注射用水を用いた。

試験に際しては、被験物質を秤量し、日局注射用水(製造番号: C23VS1、光製薬)に溶解して最高濃度(50.0 mg/mL)の被験物質調製液を調製し(用量設定試験: 3.0 mL 以上、本試験 I および II: 5.0 mL 以上)、以下同媒体で段階希釈した。被験物質調製液は用時調製し、媒体添加後 30 分以内(室温: 26~27℃、用量設定試験)、24 分以内(室温: 27℃、本試験 I)および 19 分以内(室温: 26~27℃、本試験 II)に使用した。調製濃度を以下に示す。

用量設定試験:0.0150、0.0500、0.150、0.500、1.50、5.00、15.0 および 50.0 mg/mL

本試験 I および II:3.13、6.25、12.5、25.0 および 50.0 mg/mL

媒体中での被験物質の安定性については、秦野研究所において冷蔵(実測値: $4\sim5$ °C)、遮光下で保管した 0.200 mg/mL および 200 mg/mL の濃度の試験液について、調製後 8 日間の安定性を確認した。分析法を資料 4に示す。その結果、各被験物質調製液 (0.200 mg/mL および 200 mg/mL)の平均含量は 100.4%および 99.1% (調製直後)、99.9%および 100.8% (調製後 8 日間)であった。各測定値のばらつきは  $98.2\sim102.0\%$ および  $97.2\sim102.3\%$  (調製直後)、 $97.5\sim103.2\%$ および  $97.7\sim101.9\%$  (調製後 8 日間)

<sup>\*1:</sup>S9(ロット番号:RAA-650、2012 年 6 月 1 日製造、キッコーマン)は、フェノバルビタール(PB)および 5,6-ベンゾフラボン(BF)を腹腔内投与(1 日目 PB 30 mg/kg、2 日目 PB 60 mg/kg、3 日目 PB 60 mg/kg+BF 80 mg/kg、4 日目 PB 60 mg/kg)した 7 週齢の雄 Sprague-Dawley 系ラット(体重:212~250 g)の肝臓から調製したものを購入後、冷凍保存(設定温度:-80℃)して、製造後 6 か月以内に用時解凍して試験に用いた。

<sup>\*2:</sup>補酵素溶液は、上記の成分を混合してフィルター滅菌したのち、冷凍保存(設定温度:-80℃) し、調製後6か月以内に用時解凍して試験に用いた。

であった。また、調製後8日間における各被験物質調製液(0.200 mg/mL および200 mg/mL)の平均残存率は99.6%および101.7%であった(資料5)。これらの値は、いずれも試験計画書に記載した許容基準(平均含量:90.0~110.0%、各測定値のばらつき:平均値の90.0~110.0%以内、平均残存率:90.0%以上)内であった。なお、被験物質調製液(原液)の調製時に目視により、発熱、発泡などの変化がないことを確認した。

含量試験については、「医薬品・化学物質 GLP 解説 (2002)、薬事日報社」に基づき実施しなかった。

#### 6. 試験操作

#### 1) 試験菌液の作製

ニュートリエントブロス No. 2(ロット番号: 612715、Oxoid)を 12 mL 入れた L 字型試験管 (容積: 29 mL) に、解凍した凍結保存菌 24 μL (TA100、TA1535、TA98、TA1537 および WP2 *uvrA*)をすみやかに接種し、4℃で保冷後、37℃で 10 時間、往復振とう培養したものを試験菌液とした。振とうには DOUBLE SHAKER NR-3 (TAITEC)を用い、振幅は 25 mm、振とう回数は毎分 100 回とした。検定菌の増殖の確認のため、レシオビーム分光光度計 (日立 U-1900 形) (HITACHI)により、試験菌液の吸光度を 660 nm で測定した。また、段階希釈法により生菌数を求めた。660 nm の吸光度の測定値および生菌数を以下に示す。

	_			検定菌		
	_		塩基対置換	型 	フレームシフト型	
試験の種類		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
	OD <sub>660</sub>	1.856	1.879	1.899	1.902	1.821
用量設定試験	生菌数 (×10 <sup>9</sup> cells/mL)	1.46	2.66	3.52	2.49	1.70
	OD <sub>660</sub>	1.857	1.872	1.889	1.888	1.820
本試験 I	生菌数 (×10 <sup>9</sup> cells/mL)	1.50	2.74	3.34	2.36	1.23
	OD <sub>660</sub>	1.877	1.909	1.909	1.920	1.872
本試験 II	生菌数 (×10° cells/mL)	1.44	2.57	3.62	2.49	1.31

各試験菌液の 660 nm の吸光度の測定値は、2011 年度の背景データ(秦野研究所)の平均値の <math>90% 以上であった。また、各試験菌液の生菌数は  $1\times10^9 \text{ cells/mL}$  以上であった。

#### 2)試験法

Ames らの標準法  $^{2)}$ を参考にして、プレインキュベーション法  $^{1)}$ により、1 回の用量設定試験と 2 回の本試験を実施した。試験は、被験物質をそのまま検定菌に作用させる 89 mix 非存在下および哺乳動物 (5 y h) 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遺伝子突然変異誘発性を試験する 89 mix 存在下で行った。

小試験管中に被験物質調製液 0.1 mL、S9 mix 非存在下では 0.1 mol/L ナトリウムーリン酸緩衝液  $(\text{pH }7.4)\,0.5 \text{ mL}$ 、S9 mix 存在下では 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のち、2 mL のトップアガーを加えて混和し、最少グルコース寒天平板培地上に流して固めた。また、被験物質調製液のかわりに使用媒体 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。

培養は37℃で48時間行い、出現した変異コロニー数を、コロニーアナライザー(CA-11、システムサイエンス、面積補正有り)または目視により計測した。被験物質に由来する沈殿の有無は、目視により観察した。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。平板は各用量につき用量設定試験では1枚、本試験では2枚を使用し、陰性および陽性対照では、各試験とも2枚を使用した。陰性および陽性対照の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。

#### 3)試験用量

用量設定試験においては、「新規化学物質等に係る試験の方法について」に従い、すべての検定菌で最高用量を  $5000 \,\mu\text{g/plate}$  とし、1.50、5.00、15.0、50.0、150、500、1500 および  $5000 \,\mu\text{g/plate}$  の 8 用量を設定した。

本試験 I および II においては、すべての検定菌で最高用量を 5000 μg/plate とし、313、625、1250、2500 および 5000 μg/plate の 5 用量を設定した。

#### 4)無菌試験

小試験管中に、最高用量の被験物質調製液  $0.1 \, \text{mL}$   $\geq 0.1 \, \text{mol/L}$  ナトリウムーリン酸緩衝液 (pH 7.4)  $0.5 \, \text{mL}$  、あるいは S9 mix  $0.5 \, \text{mL}$  のみを入れ、 $37 \, \text{C} \, \text{c}$  20 分間プレインキュベーションしたのち、 $2 \, \text{mL}$  のトップアガー  $(S. \, typhimurium \, \text{用})$  を加えて混合し、それぞれ最少グルコース寒天平板培地上に流して固めた。 $37 \, \text{C} \, \text{c}$  48 時間培養後、雑菌の混入の有無を調べた。なお、S9 mix の無菌試験については、同日に実施した他の試験と共通に用いた。

#### 5) 識別法

平板側面に識別番号を記載した。S9 mix 非存在下は黒、S9 mix 存在下は赤の色で識別した。菌の識別は、TA100 は 0、TA1535 は 5、TA98 は 9、TA1537 は 7、WP2 uvrA は W とした。用量の識別は、菌の識別番号の右に用量の低いものから 1、2、3、・・・と記入した。陰性対照および陽性対照は、菌の識別番号の右に各々0 および P と記入して識別した。試験の識別は、試験番号のかわりに菌の識別番号の左に 2 と記入した。生菌数測定における平板の識別は、菌の識別番号の左に VC と記入した。無菌試験における平板の識別は、被験物質については 2 のみを記入し、S9 mix については S9 と記入した。

#### 6) 背景データによる管理

陰性対照値および陽性対照値が、秦野研究所における背景データの変動範囲内(平均値±3×標準偏差)から外れた場合には、該当する検定菌について再度、同一用量を用いて試験を実施し、再試験のデータを採用することとした。なお、2011年度に実施した各試験の陰性対照値および陽性対照値を背景データとした(資料 6)。

#### 7. 結果の表示

結果の表示は、各々の平板における変異コロニー数の実測値とその平均値(小数点以下第一位を四 捨五入)を示し、用量一反応曲線の図を添付した。また、被験物質に由来する沈殿および生育阻害が認 められた場合は、その旨表示することとした。

#### 8. 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 非存在下あるいは S9 mix 存在下において、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、陰性対照値の 2 倍以上に増加し、かつ、その増加に用量依存性あるいは再現性が認められた場合に、当該試験系において遺伝子突然変異誘発性を有する(陽性)と判定することとした。なお、結果の判定に統計学的手法は用いなかった。

予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わな かったこと

試験期間中に、「予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験 計画書に従わなかったこと」はなかった。

#### 試験成績と考察

#### 1. 用量設定試験

2-イソブトキシエタノールについて、1.50、5.00、15.0、50.0、150、500、1500 および 5000 µg/plate の 8 用量を設定して用量設定試験を行った(表 1)。その結果、S9 mix 非存在下および存在下とも、用いた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。被験物質に由来する沈殿は、S9 mix 非存在下および存在下ともに、いずれの用量においても認められなかった。

以上の結果から、2回の本試験 (本試験 I および II) における最高用量を、すべての検定菌で  $5000 \, \mu g/plate$  とした。

#### 2. 本試験

すべての検定菌について、313、625、1250、2500 および 5000 µg/plate の 5 用量を設定して、本試験 I および II を行った(本試験 I:表 2および図 1、本試験 II:表 3および図 2)。その結果、2 回の本試験ともに、89 mix 非存在下および存在下とも、用いた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。被験物質に由来する沈殿は、89 mix 非存在下および存在下ともに、いずれの用量においても認められなかった。また、2 回の本試験ともに、用いたいずれの検定菌においても、89 mix の有無にかかわらず、陰性対照値の 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。

すべての試験において、用いた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遺伝子突然変異誘発性が検出され、陽性対照値および陰性対照値は、ともに背景データの変動範囲内(平均値±3×標準偏差)であったことから、当該試験系の妥当性が確認された。

以上の結果から、2-イソブトキシエタノールは、用いた試験系において遺伝子突然変異誘発性を有しない(陰性)と判定した。

2-イソブトキシエ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(試験番号: G-12-011)で、陰性の結果が得られている。

また、関連物質である 2-tert-ブトキシエタノールおよび 2-(1-メチルエトキシ)エタノールに関しては、いずれも復帰突然変異試験で陰性、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陰性の結果が報告されている 4)5)。

以上のことから、当該被験物質は、類縁化合物も含め、遺伝子突然変異および染色体異常を誘発しない化合物であると考えられる。

#### 参考文献

- Matsushima, T., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A., Sawamura, M.: Factors modulating mutagenicity in microbial tests. 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.: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutation Research 113: 173-215 (1983)
- 3) Green, M. H. L.: Mutagen testing using Trp<sup>+</sup> reversion in *Escherichia coli*. in "Handbook of Mutagenicity Test Procedures" Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C. eds, Elsevier, Amsterdam (1984) pp. 161−187
- 4) 厚生労働省医薬局審査管理課化学物質安全対策室 監修、化学物質毒性試験報告 Vol. 9、化学物質点検推進連絡協議会、東京(2002)p.443-471
- 5) 厚生労働省医薬局審査管理課化学物質安全対策室 監修、化学物質毒性試験報告 Vol. 10、 化学物質点検推進連絡協議会、東京(2003)p.109-154

表 1 2-イソブトキシエタノールの細菌を用いる復帰突然変異試験(用量設定試験)

			試験実施期間		 012年9月13日	
代謝活性化	被験物質用量	復帰	変異数			
系の有無	(µg/plate)	塩	基 対 置 換	型	フレーム	シフト型
		TA100	TA1535	WP2 uyrA	TA98	TA1537
	0 (陰性対照)	103 83	8 11 ( 10 )	25 31	18 20	13 14
	1.50	95	5	40	16	12
	5.00	95	11	29	19	11
S9 mix	15.0	94	11	27	21	13
S9 mix (-)	50.0	91	8	31	25	14
	150	91	12	27	17	8
	500	88	8	41	· 20	9
	1500	93	2	27	17	14
	5000	90	6	32	18	6
	0 (陰性対照)	101 81	12 8	36 32 ( 34 )	26 35	22 19
	1.50	108	14	32	28	19
	5.00	83	15	41	28	18
S9 mix	15.0	86	13	31	35	17
(+)	50.0	118	17	49	37	18
( )	150	93	11	20	30	20
	500	91	10	33	22	20
	1500	80	10	28	27	17
	5000	87	19	31	34	19
S9 mixを	名称	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9AA
陽 必要とし	用量(µg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
性ないもの	コロニー数/plate	315 320	555 512 ( 534 )	92 79	428 450 ( 439 )	222 196
対 S9 mixを	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
~"   必要とす	用量(μg/plate)	5	2	10	5	5
照るもの	コロニー数/plate	970 826	350 321 ( 336 )	514 489	277 250	139 132

陰性対照, 日局注射用水

AF-2, 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; SA, Sodium azide; 9AA, 9-Aminoacridine; B[a]P, Benzo[a]pyrene; 2AA, 2-Aminoanthracene

表 2 2-イソブトキシエタノールの細菌を用いる復帰突然変異試験(本試験 I)

		試験実施期間:2012年9月24日より2012年9月27日				
代謝活性化	被験物質用量	復 帰	変 異	数 コロニー数/pla	ate(平均)	
系の有無	(µg/plate)	塩	基 対 置	換 型	フレーム	シフト型
		TA100	TA1535	WP2 uvrA	TA98 .	TA1537
	0 (陰性対照)	99 86			14 22	12 7
		( 93 )			( 18 )	( 10 )
	313	105 93			19 11	7 5
-		( 99 )			( 15 )	( 6 )
S9 mix	625	102 109	İ		17 22	10 8
		( 106 )		<del></del>	( 20 )	( 9 )
(-)	1250	100 92			15 24	12 9
-		( 96 )		( 27 )	( 20 )	( 11 )
	2500	86 93	_	6 33 31	12 29	10 7
		( 90 )			( 21 )	( 9 )
	5000	109 100			32 23	8 11
	<del></del>	( 105 )	( 11 )	( 28 )	( 28 )	( 10 )
	0 (陰性対照)	89 85		8 40 28	28 24	18 17
_		( 87 )	( 10 )	( 34 )	( 26 )	( 18 )
	313	108 110			26 37	12 12
-		( 109 )	( 13 )	( 31 )	( 32 )	( 12 )
S9 mix	625	102 108			22 27	13 15
-		( 105 )	( 11 )	( 32 )	( 25 )	( 14 )
(+)	1250	101 88			32 22	11 14
-		( 95 )	( 9 )	( 30 )	( 27 )	( 13 )
	2500	93 99			22 20	22 11
-		( 96 )	( 12 )	( 23 )	( 21 )	( 17 )
	5000	96 101		8 36 40	32 26	15 21
<del></del>		( 99 )	( 9 )	( 38 )	( 29 )	( 18 )
S9 mixを 場。以面に	名称	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9AA
WACC	用量(μg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
生ないもの	コロニー数/plate	351 336		1	434 454	243 201
00 1	he The	( 344 )	( 568 )	( 91 )	( 444 )	( 222 )
け S9 mixを	名称 (1)	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
必要とす	用量(µg/plate)	5	2 405 22	10	5	5
照 るもの	コロニー数/plate	958 839		•	325 277	125 149
	77 n = 2-4101.	( 899 )	( 369 )	( 545 )	( 301 )	( 137 )

陰性対照, 日局注射用水

AF-2, 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; SA, Sodium azide; 9AA, 9-Aminoacridine; B[a]P, Benzo[a]pyrene; 2AA, 2-Aminoanthracene

表 3 2-イソブトキシエタノールの細菌を用いる復帰突然変異試験(本試験 II)

		試験実施期間:2012年10月1日より2012年10月4日					
代謝活性化	被験物質用量	復帰	変 異 数	コロニー数/pla	ite(平均)		
系の有無	(µg/plate)	塩	基 対 置			シフト型	
		TA100	TA1535	WP2 uvrA	ł control de la control de	TA1537	
	0	106 99	8 8	20 32	33 27	8 7	
]	(陰性対照) 	( 103 )	( 8 )	( 26 )	( 30 )	( 8 )	
İ	313	100 118	14 12	34 31	32 34	10 6	
		( 109 )	( 13 )	( 33 )	( 33 )	( 8 )	
S9 mix	625	103 99	12 10	30 42	33 25	4 9	
		( 101 )	( 11 )	( 36 )	( 29 )	(7)	
(-)	1250	107 102	14 5	32 34	40 34	9 9	
ļ		( 105 )	( 10 )	( 33 )	( 37 )	(9)	
	2500	103 109	13 14	32 28	39 37	6 5	
		( 106 )	( 14 )	( 30 )	( 38 )	( 6 )	
	5000	106 88	14 12	34 36	46 40	10 8	
		( 97 )	( 13 )	( 35 )	( 43 )	(9)	
	0	109 89	15 9	26 32	40 36	11 16	
	(陰性対照) 	( 99 )	( 12 )	( 29 )	( 38 )	( 14 )	
	313	84 115	13 20	40 26	42 39	15 11	
		( 100 )	( 17 )	( 33 )	(41)	( 13 )	
S9 mix	625	99 112	16 15	44 34	43 27	15 15	
		( 106 )	( 16 )	( 39 )	( 35 )	( 15_ )	
(+)	1250	104 119	11 10	43 41	43 38	23 8	
<u> </u>		( 112 )	( 11 )	( 42 )	(41)	( 16 )	
	2500	108 119	14 5	43 44	31 40	13 18	
į		( 114 )	( 10 )	( 44 )	( 36 )	( 16 )	
	5000	103 100	14 7	38 39	31 37	13 12	
		( 102 )	( 11 )	( 39 )	( 34 )	( 13_)	
S9 mixを	名称	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9AA	
陽 必要とし	用量(µg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
ないもの性	コロニー数/plate	366 359	608 528	91 95	463 499	275 245	
性		( 363 )	( 568 )	( 93 )	( 481 )	( 260 )	
対 S9 mixを	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P	
必要とす	用量(µg/plate)	5	2	10	5	5	
照 るもの	コロニー数/plate	1050 954	355 349	622 545	353 294	141 145	
		( 1002 )	( 352 )	( 584 )	( 324 )	( 143 )	

陰性対照, 日局注射用水

AF-2, 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; SA, Sodium azide; 9AA, 9-Aminoacridine; B[a]P, Benzo[a]pyrene; 2AA, 2-Aminoanthracene

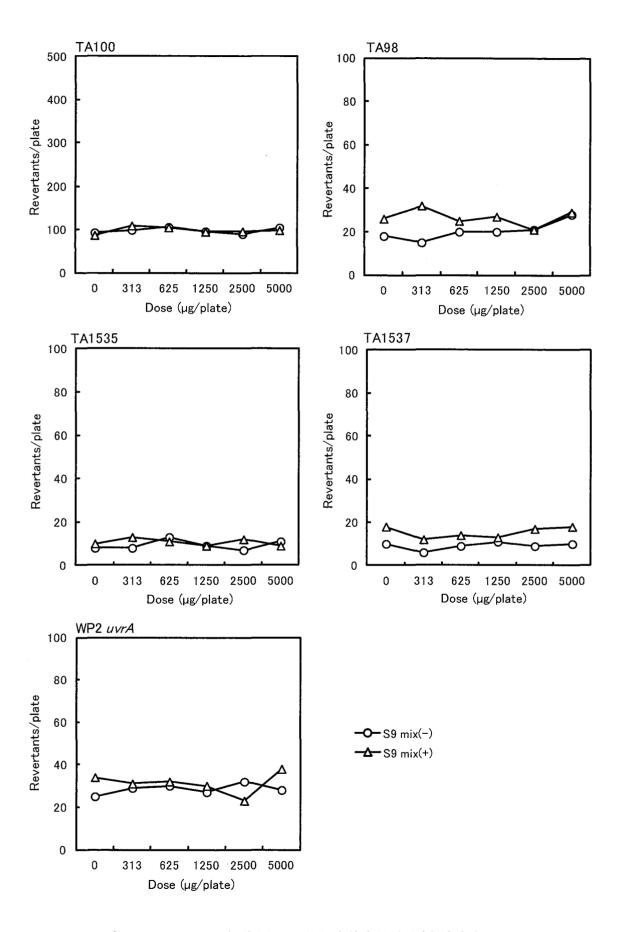


図 1 2-イソブトキシエタノールの細菌を用いる復帰突然変異試験(本試験])

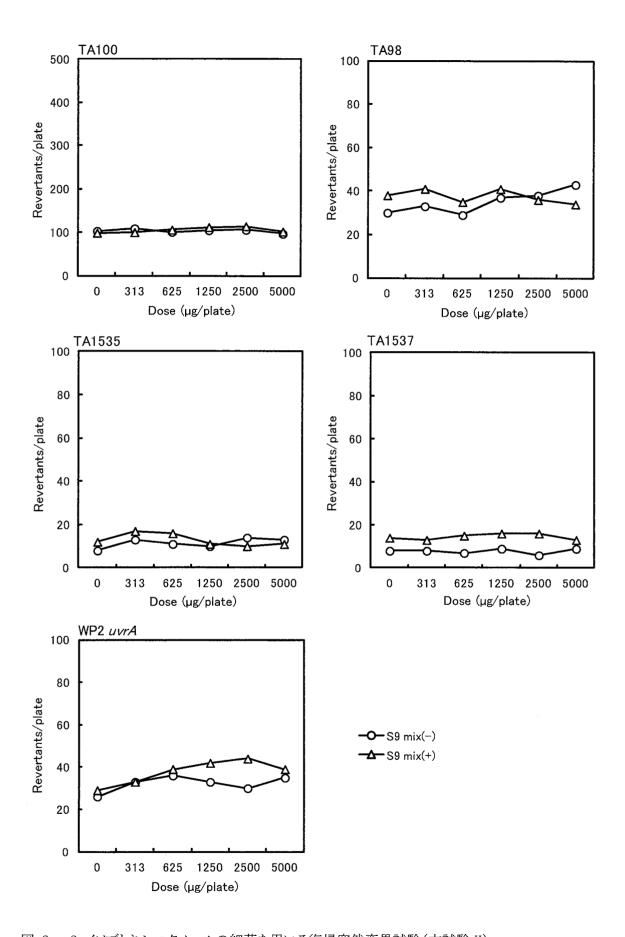


図 2 2-イソブトキシエタノールの細菌を用いる復帰突然変異試験(本試験 II)

## 検査成績書

<u>財団法人食品薬品安全センター</u> 秦野研究所/化学物質管理室 御中

2012年7月3日

和光純薬工業株式会

衦

Code No. 093-02635

2-イソブトキシエタノール (エチレングリコールモノイソブチルエーテル)

規格/等級

和光一級

Lot No.

PER2952

数量

500ml

検査項目

検査成績

規格値

外観

無色澄明の液体

無色~僅かにうすい黄色、

澄明の液体

密度(20℃)

0.891g/ml

0.887~0.895g/ml

屈折率 n 20/D

1.4155

1,411~1,417

水分

0.09%

0.2%以下

酸(CH3COOHとして) 0.05%以下

0.05%以下

含量(毛管カラムGC)

99.6%

97.0%以上

検査年月日

2007/12/21

判定 合格 検査責任者

成績書発行番号 9861464

## 被験物質の一般的事項

新規化学物質等の名称 (IUPAC 命名法による)	2-(2-メチルプロポキシ)エタノール						
別  名	2-イソブトキシエタノール、エチレングリコールモノイソブチルエーテル、 2-Isobutoxyethanol						
C A S 番 号	4439-24-1						
構造式又は示性式							
(いずれも不明の場合	OH						
は、その製法の概要)							
分 子 量	118. 17						
試験に供した新規化学物質の純度(%)	99.6% (毛管カラム GC)						
試験に供した新規 化学物質のロット番号	PER2952						
不 純 物 の 名 称 及び含有率	水分 0.09%、酸(CH <sub>3</sub> COOH として)0.05%以下						
蒸 気 圧							
対 水 溶 解 度	水およびエタノール、アセトン等の有機溶媒と任意の割合で混和する						
1-オクタノール/水分配係数							
融点							
沸点	約 160℃ (初留点)						
常温における性状	無色澄明の液体						
安 定 性	光により変質する (製品安全データシートより)。						
	溶 媒 溶 解 度 * 溶 媒 中 の 安 定 性 *						
溶媒に対する溶解度等	水200 mg/mL で溶解200 mg/mL の濃度では、調製時に発熱、発泡および変色は認められなかった。調製後8日間の安定性(0.200 mg/mL および 200 mg/mL、冷蔵、遮光保管)を確認した。						
	DMSO       120 mg/mL で溶解       120 mg/mL の濃度では、調製時に発熱、発泡および変色は認められなかった。						
	アセトン120 mg/mL で溶解120 mg/mL の濃度では、調製時に発熱、発泡および 変色は認められなかった。						

[備考]物理化学的性状は、可能な限り記入すること。

- 1. 「蒸気圧」の欄には、被験物質の蒸気圧を記入すること。
- 2. 「安定性」の欄には、温度、光等に対する安定性を記入すること。
- 3. 「溶媒に対する溶解度等」の欄には、被験物質の溶媒に対する溶解度及びその溶媒中での安定性を記入すること。
- \*:(財)食品薬品安全センター秦野研究所において確認した。

#### 被験物質原体の安定性の測定方法

① 使用機器

フーリエ変換赤外分光光度計(FTIR-8300)

島津製作所

② 測定条件

測定方法

液膜法

波数範囲

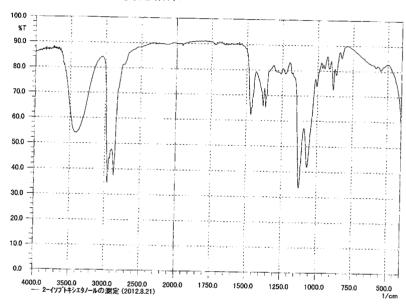
4000~400 cm<sup>-1</sup>

③ 測定方法

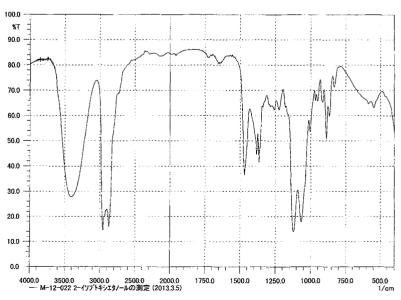
被験物質 1、2 滴を 2 枚の窓板(臭化カリウム)の間に挟み、測定した。対照は、測定雰囲気のバックグラウンド吸収とした。

#### 2-イソブトキシエタノールの赤外吸収スペクトル測定結果

#### 実験開始前



#### 実験終了後



#### 被験物質調製液中の被験物質濃度測定法

試薬

蒸留水(HPLC用)

和光純薬工業

アセトニトリル(HPLC 用)

和光純薬工業

1,3-ベンゾジオキソール(和光一級) 和光純薬工業

② 使用機器

電子天秤(R200D)

ザルトリウス

ガスクロマトグラフ(GC)システム

島津製作所

主要構成: GC-14B(ガスクロマトグラフ)、AOC-20i(オートインジェクタ)、C-R7A plus(データ処理 装置)

③ 内部標準溶液(以下、IS 溶液)の調製

1,3-ベンゾジオキソール約 10 mg を精密に量り(調製直後:10.64 mg、調製後 8 日間:10.91 mg)、アセトニトリルに溶解して正確に 20 mL とした(調製直後:532.0  $\mu$ g/mL、調製後 8 日間:545.5  $\mu$ g/mL)。この液 1 mL を正確に採り、アセトニトリルを加えて正確に 50 mL とし、IS 溶液とした(調製直後:10.64  $\mu$ g/mL、調製後 8 日間:10.91  $\mu$ g/mL)。

④ 標準溶液の調製

被験物質約 50 mg を精密に量り(調製直後:52.40 mg、調製後 8 日間:50.75 mg)、蒸留水に溶解して正確に 25 mL として、標準原液 (調製直後:2.096 mg/mL、調製後 8 日間:2.030 mg/mL)とした。この標準原液 1.5、1 および 1.5 mL を正確にとり、蒸留水を加えてそれぞれ正確に 20、10 および 10 mL とし、標準溶液 (調製直後:157.2、209.6 および 314.4  $\mu$ g/mL、調製後 8 日間:152.2、203.0 および 304.5  $\mu$ g/mL、各濃度 n=1)を調製した。これらの標準溶液と IS 溶液を 1:4 (v/v)の割合で混合し、測定用標準溶液とした。

⑤ 試料溶液の調製

被験物質調製液の 1 mL を正確にとり、蒸留水で適宜希釈し、検量線の範囲内となるように試料溶液 を調製した。これらの試料溶液と IS 溶液を 1:4 (v/v)の割合で混合し、測定用試料溶液とした。測定用 試料溶液は、被験物質調製液の採取から n=3 で調製した。

⑥ 検量線の作成および被験物質調製液中被験物質濃度の算出

測定用試料溶液および測定用標準溶液をガスクロマトグラフィーにより測定した。測定用標準溶液は n=3 で測定し、得られた IS のピーク面積に対する 2-IBE のピーク面積比と調製濃度を基に、最小二乗 法により検量線を作成した。測定用試料溶液は、各 n=1 で測定し、得られた 2-IBE のピーク面積比から、先の検量線を用いて、試料溶液中の 2-IBE の濃度を求めた。さらに、希釈係数を乗じて被験物質 調製液中の 2-IBE 濃度を算出し、調製濃度に対する割合(含量、%)および各測定濃度の平均値に対するばらつき(%)を算出した。

#### ⑦ ガスクロマトグラフ測定条件

検出器 水素炎イオン化検出器(FID)

水素 60 kPa、空気 50 kPa、メイクアップガス 30 kPa(ヘリウム)

分析カラム

TC-624 (長さ30 m、内径 0.53 mm、膜厚 3.0 μm、GL サイエンス)

キャリヤガス

ヘリウム (100 kPa)

カラム温度

 $80^{\circ}$ C (4分)  $\rightarrow$   $30^{\circ}$ C/分  $\rightarrow$   $250^{\circ}$ C (2分)

注入口設定温度

250°C

検出器設定温度

250°C

試料注入量

0.5 uL

試料注入方式

スプリットレス(サンプリング時間 0.5 分)

オートインジェクタ洗浄液 アセトニトリル

モニター時間

7分

システムの適合性

分析開始前に、測定用標準溶液(調製直後:209.6 μg/mL、調製後8日

間: 203.0 μg/mLを3回測定し、2-IBE のピーク保持時間および IS に対するピーク面積比の相対標準偏差(%)がそれぞれ±3.0%以内および

±5.0%以内であることを確認した。

#### ⑧ 数値の取り扱い

1)システム適合性におけるピーク保持時間、ピーク面積は機器の出力値をそのまま使用した。ピーク保持時間の平均値は、四捨五入して小数点以下第3位まで、ピーク面積比およびその平均値は切り捨てて小数点以下第3位まで表示した。また、相対標準偏差は四捨五入して小数点以下第1位まで求めた。

2)被験物質の秤量: 有効数字 3 桁以上

標準物質の秤量: 有効数字 4 桁以上

投与検体の濃度: 有効数字 3 桁(有効数字 4 桁目を四捨五入)

標準溶液の濃度: 有効数字 4 桁(有効数字 5 桁目を切り捨て)

測定結果の濃度およびそれらの平均値:

有効数字4桁(有効数字5桁目を切り捨て)

測定結果の含量(%)、ばらつき(%)および残存率(%)ならびにそれらの平均値:

小数点以下第1位(小数点以下第2位を四捨五入)

安定性試験結果

試験番号

M - 12 - 022

被験物質:2-イソブトキシエタノール

体:日局注射用水

調製年月日

2012年8月27日

ロット番号: PER2952

測定年月日

A 2012年8月27日(調製直後)

B 2012年9月4日(調製後8日間)

保管条件

冷蔵、遮光

		A				В				
調製濃度 (mg/mL)	試料 番号	測定濃度 (mg/mL)	含量 <sup>a)</sup> (%)	ばらつき <sup>b)</sup> (%)	試料 番号	測定濃度 (mg/mL)	含量 <sup>a)</sup> (%)	ばらつき <sup>b)</sup> (%)	残存率 <sup>c)</sup> (%)	
0.200	1	0.2047	102.4	102.0	7	0.2061	103.1	103.2	102.7	
	2	0.1969	98.5	98.2	8	0.1983	99.2	99.3	98.9	
	3	0.2004	100.2	99.9	9	0.1948	97.4	97.5	97.1	
	平均	0.2006	100.4		平均	0.1997	99.9		99.6	
200	4	192.6	96.3	97.2	10	196.9	98.5	97.7	99.3	
Ī	5	199.3	99.7	100.6	11	205.5	102.8	101.9	103.7	
;	6	202.7	101.4	102.3	12	202.4	101.2	100.4	102.1	
	平均	198.2	99.1		平均	201.6	100.8		101.7	

#### 安定性の判断基準(溶液検体)

調製直後および保管後の平均含量がそれぞれ調製濃度の90.0~110.0%、また、各測定値のばらつきがそれぞれ平均値の90.0~110.0%以内であり、かつ、調製直後の測定平均値に対する保管後の残存率が平均値の90.0%以上を示す期間。

a): 各測定時の測定濃度/調製濃度×100 b): 各測定時の測定濃度/各測定時の平均測定濃度×100 c): 各測定時の測定濃度×100 mpp

## 試験に用いた検定菌の復帰変異コロニー数の 背景データ(プレインキュベーション法)

(2	2011	年	1月	$\sim$ 2012	年	3	月`	)
----	------	---	----	-------------	---	---	----	---

_	陰 性 対	片照 値	陽性対照値		
	(- S9 mix)	(+ S9 mix)	(- S9 mix)	(+ S9 mix)	
TA100	$102 \pm 12^*$ (n=149)	101 ± 13 (n=156)	358 ± 39 (AF-2, 0.01 μg/plate) (n=145)	1016 ± 103 (B[a]P, 5 μg/plate) (n=85)	
TA1535	$11 \pm 3$ (n=143)	$11 \pm 3$ (n=144)	551 ± 55 (SA, 0.5 μg/plate) (n=139)	$399 \pm 42$ (2AA, 2 µg/plate) (n=140)	
WP2 <i>uvrA</i>	$28 \pm 6$ (n=141)	$32 \pm 6$ (n=145)	99 ± 14 (AF-2, 0.01 µg/plate) (n=137)	630 ± 101 (2AA, 10 μg/plate) (n=141)	
TA98	$21 \pm 4$ (n=149)	$30 \pm 4$ (n=155)	430 ± 61 (AF-2, 0.1 μg/plate) (n=145)	326 ± 38 (B[a]P, 5 µg/plate) (n=84)	
TA1537	$9 \pm 2$ (n=145)	17 ± 3 (n=150)	373 ± 95 (9AA, 80 µg/plate) (n=141)	149 ± 18 (Β[a]P, 5 μg/plate) (n=85)	
*:平均値の平均 ± 標準偏差 n:試験数			AF-2 :2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide SA :Sodium azide 9AA :9-Aminoacridine B[a]P :Benzo[a]pyrene		

2AA :2-Aminoanthracene

#### 信頼性保証書

表題

2-イソブトキシエタノールの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号

M-12-022

この試験に関する信頼性保証部門による査察および監査状況等は下記のとおりであった。

查察•監查項目	查察•監查年月日	運営管理者および試験 責任者への報告年月日
試験計画書	2012年8月17日	2012年8月17日
試験計画書変更書 M-12-022-No.1	2012年8月24日	2012年8月24日
被験物質原体の安定性(実験開始前)	2012年8月21日	2012年8月21日
媒体中の安定性(調製直後)	2012年8月27日	2012年8月27日
被験物質調製液の調製および検定菌処理	2012年9月25日	2012年9月25日
コロニー数の計測	2012年9月27日	2012年9月27日
報告書草案および生データ	2013年3月7、8日	2013年3月8日
最終報告書	2013年3月15日	2013年3月15日

試験は、「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」(平成 23 年 3 月 31 日、薬食発 0331 第 8 号、平成 23・03・29 製局第 6 号、環保企発第 110331010 号)を遵守して実施され、また、この報告書は試験に使用された方法および手順を正確に記載し、記載された結果は試験の生データを正確に反映していることを保証する。

2013年3月15日

財団法人食品薬品安全センター秦野研究所

信頼性保証部門責任者