



1,2-ブタンジオールの  
細菌を用いる  
復帰変異試験

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 .....	7
参 考 文 献 .....	8
表 1~3	

## 要 約

1,2-ブタンジオールの変異原性の有無について、細菌を用いる復帰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、直接試験および代謝活性化試験のいずれも、用量設定試験は 50~5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の用量で、本試験は 312.5~5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の用量で試験を行った。

その結果、2回の本試験とも、用いた5種類の検定菌において、いずれの用量でも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、1,2-ブタンジオールは、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

高生産量既存化学物質で、現在十分な安全性資料のない、1,2-ブタンジオールについて、OECDを中心として行われている国際協力による、安全性点検評価事業の一環として、細菌を用いる復帰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変異<sup>(1)</sup>、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変異<sup>(2)</sup>を指標とした変異原の検出系である。

試験は、被験物質をそのまま検定菌に作用させる直接試験と、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化学品試験法ガイドライン：471、472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）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、 $-80^{\circ}\text{C}$ 以下で凍結保存した。

試験に際して、0.5%塩化ナトリウム添加ニュートリエントブロス (Difco) を入  
れたL字型試験管に種菌を接種し、 $37^{\circ}\text{C}$ 、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〕

1,2-ブタンジオール (CAS No.584-03-2、以下BDと略) は分子量 90.14、比重  
1.004、水溶性で無色透明の液体である。純度99% (GC法による) のもの (ロット番  
号: ) を から供与された。被  
験物質は、使用時まで室温で遮光して保存した。

BDは、蒸留水を用いて 50 mg/ml になるように調製した後、同溶媒でさらに公  
比2ないし3で希釈したものを、速やかに試験に用いた。

試験の開始に先立って、秦野研究所においてBDの水溶液中での安定性試験を行  
った。安定性試験における溶媒は当研究所で実施される、培養細胞を用いる染色体  
異常試験と共通なことから、両試験における最高濃度 (50 mg/ml) および最低濃度  
(2.25 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3時

間における各3サンプルの平均含量は、それぞれ初期値の平均（0時間）に対して103%および101%であった。これらの値は、当研究所の標準操作手順書の基準（初回の測定平均値の90%以上）を満たしていた（Appendix 1）。

また、本試験に用いた調製検体について、含量測定試験を行った結果、50 mg/ml 溶液の含量は既定濃度に対し、105~106%、3.125 mg/ml 溶液は、93.8~95.4%であった。これらの値も当研究所の標準操作手順書の基準（平均含量は添加量の85%以上）を満たしていた（Appendix 2）。

以上の結果から、BDは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。

AF-2 : フリルフラマイド	(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 TLN5556,	純度>90%
9-AA : 9-アミノアクリジン	(東京化成工業株)	ロット番号 AM 01,	純度>98%
2-AA : 2-アミノアントラセン	(和光純薬工業株)	ロット番号 EDE7881,	純度>90%

AF-2, 9-AA, 2-AA は DMSO (和光純薬工業株) ロット番号 DSL5887および ECJ7001) に、SA は蒸留水に溶解して試験に用いた。

#### 〔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%	ビオチン	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（ロット番号：DJ050GG（1991年7月9日製造）およびDJ060IG（1991年9月3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ある。

硫酸マグネシウム・7水和物	0.2 g	リン酸水素アンモニウムナトリウム・4水和物	3.5 g
クエン酸・1水和物	2 g	グルコース	20 g
リン酸水素二カリウム	10 g	バクト・アガー (Difco)	15 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 <sup>**</sup>	0.1 ml	NADH	4 μmole
塩化マグネシウム <sup>10 μmole</sup>	8 μmole	NADPH	4 μmole
塩化カリウム <sup>33 μmole</sup>	33 μmole	0.2M リン酸緩衝液 (pH 7.4)	0.5 ml
グルコース・6リン酸	5 μmole		

\*\* : 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<sup>株</sup>、ロット番号 RAA-254（1991年5月23日製造）および RAA-258（1991年8月23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〕

プレート法により直接試験および代謝活性化試験を行った。

小試験管中にトップアガー 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

蒸留水、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表中に示した。培養は37℃で48時間行い、生じた復帰変異コロニー数を算定した。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〕

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〕

結果を表1に示した。50～5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の範囲で試験を実施したところ、直接試験および代謝活性化試験において抗菌性が認められなかったことから、本試験における最高用量を、すべての菌種において 5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  とし、公比2で5用量を設定した。

### 〔本試験〕

結果を表2、3に示した。BDについて 312.5～5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の範囲で試験を実施した。2回の試験を通して、用いた5種類の検定菌の直接試験、代謝活性化試験のいずれにおいても、用量依存性のある変異コロニー数の増加は認められなかった。また、すべての菌種において抗菌性は認められなかった。

BD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、陰性対照群とも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、本試験に用いた各検定菌の感受性および各陽性対照物質の変異原活性についての安定性が確認された。

以上の結果に基づき、BD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. : in "Handbook of Mutagenicity Test Procedures." Kilby, B. J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C. (eds.) Elsevier Science Publisher, New York. (1984) pp.161-187.

# 用量設定試験結果表

M-91-169

表 1  
被験物質: 1,2-ブタンジオール

物 質	検 体 濃 度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	SMMix の 有 無	復 帰 変 異									
			塩 基 対 置 換 型						コロニー数/プレート			
			TA100		TA1535		WP2uvrA		TA98		TA1537	
溶 媒 対 照		-	113 (106 ±)	108 97 (8.2)	18 (12 ±)	11 7 (5.6)	14 (15 ±)	14 17 (1.7)	12 (12 ±)	16 9 (3.5)	8 (6 ±)	5 5 (1.7)
検 体	50	-	114		16		14		14		7	
	150	-	103		17		14		13		10	
	500	-	110		13		12		14		5	
	1500	-	127		13		21		13		6	
	5000	-	116		13		13		8		6	
溶 媒 対 照		+	109 (107 ±)	110 102 (4.4)	14 (16 ±)	18 17 (2.1)	11 (10 ±)	9 11 (1.2)	29 (30 ±)	28 33 (2.6)	9 (8 ±)	6 8 (1.5)
検 体	50	+	126		9		12		34		3	
	150	+	120		11		12		28		9	
	500	+	109		17		17		25		8	
	1500	+	125		17		13		27		10	
	5000	+	103		21		15		37		6	
隔 性 対 照	SMMixを 必要と しないもの	名 称	AF2 0.01		SA 0.5		AF2 0.01		AF2 0.1		9AA 80	
		コロニー数 /プレート	600 (616 ±)	622 626 (14.0)	400 (363 ±)	354 335 (33.4)	308 (292 ±)	289 279 (14.7)	285 (293 ±)	266 327 (31.2)	2642 (2493 ±)	2410 2428 (129.1)
	SMMixを 必要と するもの	名 称	2AA 1		2AA 2		2AA 10		2AA 0.5		2AA 2	
		コロニー数 /プレート	773 (715 ±)	681 691 (50.5)	157 (155 ±)	153 156 (2.1)	425 (466 ±)	453 521 (49.4)	149 (154 ±)	155 159 (5.0)	148 (136 ±)	108 153 (24.7)

# 復帰変異試験結果表 I

M-91-169

表 2  
被験物質: 1,2-ブタンジオール

物 質	検 体 濃 度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	SMMix の 有 無	復 帰 変 異									コロニー数/プレート					
			塩 基 対 置 換 型									フ レーム シフト 型					
			TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
溶 媒 対 照		-	131 (130 ±	131 128 1.7)	14 (16 ±	15 19 2.6)	11 (15 ±	18 15 3.5)	29 (22 ±	22 14 7.5)	6 (9 ±	8 12 3.1)					
検 体	312.5	-	134 (134 ±	144 124 10.0)	9 (11 ±	13 12 2.1)	16 (14 ±	15 10 3.2)	28 (26 ±	25 24 2.1)	11 (12 ±	13 11 1.2)					
	625	-	140 (137 ±	147 124 11.8)	17 (15 ±	15 14 1.5)	14 (14 ±	13 15 1.0)	23 (27 ±	30 28 3.6)	10 (9 ±	6 11 2.6)					
	1250	-	118 (121 ±	128 116 6.4)	13 (13 ±	15 12 1.5)	18 (14 ±	14 9 4.5)	35 (31 ±	27 31 4.0)	10 (8 ±	6 7 2.1)					
	2500	-	119 (117 ±	123 109 7.2)	21 (16 ±	11 15 5.0)	9 (13 ±	12 17 4.0)	19 (27 ±	33 28 7.1)	4 (7 ±	12 6 4.2)					
	5000	-	112 (125 ±	135 129 11.9)	16 (15 ±	12 17 2.6)	19 (19 ±	17 20 1.5)	27 (26 ±	25 25 1.2)	17 (11 ±	8 8 5.2)					
溶 媒 対 照		+	117 (127 ±	131 132 8.4)	13 (16 ±	10 24 7.4)	16 (17 ±	13 21 4.0)	29 (37 ±	42 39 6.8)	11 (15 ±	14 19 4.0)					
検 体	312.5	+	172 (148 ±	133 138 21.2)	22 (18 ±	16 16 3.5)	14 (15 ±	15 16 1.0)	47 (45 ±	49 40 4.7)	12 (12 ±	13 10 1.5)					
	625	+	146 (143 ±	133 149 8.5)	14 (13 ±	12 13 1.0)	14 (18 ±	17 24 5.1)	41 (39 ±	37 39 2.0)	10 (12 ±	18 8 5.3)					
	1250	+	125 (120 ±	119 116 4.6)	17 (16 ±	15 17 1.2)	21 (17 ±	14 15 3.8)	39 (43 ±	53 36 9.1)	15 (12 ±	9 12 3.0)					
	2500	+	130 (124 ±	118 124 6.0)	16 (18 ±	21 18 2.5)	14 (19 ±	23 19 4.5)	44 (40 ±	43 33 6.1)	13 (10 ±	8 8 2.9)					
	5000	+	114 (120 ±	129 117 7.9)	13 (15 ±	18 14 2.6)	19 (16 ±	19 10 5.2)	47 (43 ±	41 42 3.2)	14 (12 ±	8 14 3.5)					
対 照	SMMix を 必要と しないもの	名 称	AF2 0.01			SA 0.5			AF2 0.01			AF2 0.1			9AA 80		
		コロニー数 プレート	698 (685 ±	665 691 17.4)	204 (217 ±	250 196 23.1)	286 (259 ±	252 239 24.3)	605 (588 ±	582 576 15.3)	2597 (2453 ±	2208 2554 213.3)					
	SMMix を 必要と するもの	名 称	2AA 1			2AA 2			2AA 10			2AA 0.5			2AA 2		
		コロニー数 プレート	844 (844 ±	834 855 10.5)	231 (222 ±	194 242 25.1)	520 (549 ±	573 553 26.8)	329 (335 ±	353 323 15.9)	189 (199 ±	242 167 38.6)					

# 復帰変異試験結果表 II

表 3  
被験物質: 1,2-ブタンジオール

M-91-169

物質	検体濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	SSMixの有無	復帰変異														
			塩基対置換型									コロニー数/プレート					
			TA100			TA1535			WP2vrA			TA98			TA1537		
溶媒対照		-	111	117	124	18	12	14	23	19	24	29	22	21	15	8	11
			(117 $\pm$ )	(117 $\pm$ )	(6.5)	(15 $\pm$ )	(15 $\pm$ )	(3.1)	(22 $\pm$ )	(22 $\pm$ )	(2.6)	(24 $\pm$ )	(24 $\pm$ )	(4.4)	(11 $\pm$ )	(11 $\pm$ )	(3.5)
検体	312.5	-	129	147	135	11	16	14	24	23	22	25	26	26	8	7	6
			(137 $\pm$ )	(137 $\pm$ )	(9.2)	(14 $\pm$ )	(14 $\pm$ )	(2.5)	(23 $\pm$ )	(23 $\pm$ )	(1.0)	(26 $\pm$ )	(26 $\pm$ )	(0.6)	(7 $\pm$ )	(7 $\pm$ )	(1.0)
	625	-	129	121	131	7	12	8	13	17	16	24	31	15	7	6	6
			(127 $\pm$ )	(127 $\pm$ )	(5.3)	(9 $\pm$ )	(9 $\pm$ )	(2.6)	(15 $\pm$ )	(15 $\pm$ )	(2.1)	(23 $\pm$ )	(23 $\pm$ )	(8.0)	(6 $\pm$ )	(6 $\pm$ )	(0.6)
	1250	-	124	120	114	11	15	13	17	18	12	17	18	32	8	12	8
		(119 $\pm$ )	(119 $\pm$ )	(5.0)	(13 $\pm$ )	(13 $\pm$ )	(2.0)	(16 $\pm$ )	(16 $\pm$ )	(3.2)	(22 $\pm$ )	(22 $\pm$ )	(8.4)	(9 $\pm$ )	(9 $\pm$ )	(2.3)	
	2500	-	158	137	141	12	10	10	19	20	14	25	25	19	8	6	9
			(145 $\pm$ )	(145 $\pm$ )	(11.2)	(11 $\pm$ )	(11 $\pm$ )	(1.2)	(18 $\pm$ )	(18 $\pm$ )	(3.2)	(23 $\pm$ )	(23 $\pm$ )	(3.5)	(8 $\pm$ )	(8 $\pm$ )	(1.5)
	5000	-	149	134	153	14	16	17	24	17	18	33	18	31	11	11	9
			(145 $\pm$ )	(145 $\pm$ )	(10.0)	(16 $\pm$ )	(16 $\pm$ )	(1.5)	(20 $\pm$ )	(20 $\pm$ )	(3.8)	(27 $\pm$ )	(27 $\pm$ )	(8.1)	(10 $\pm$ )	(10 $\pm$ )	(1.2)
溶媒対照		+	128	135	128	24	22	21	22	24	19	38	54	49	14	15	7
			(130 $\pm$ )	(130 $\pm$ )	(4.0)	(22 $\pm$ )	(22 $\pm$ )	(1.5)	(22 $\pm$ )	(22 $\pm$ )	(2.5)	(47 $\pm$ )	(47 $\pm$ )	(8.2)	(12 $\pm$ )	(12 $\pm$ )	(4.4)
検体	312.5	+	148	135	155	14	17	16	23	24	21	44	51	45	6	13	9
			(146 $\pm$ )	(146 $\pm$ )	(10.1)	(16 $\pm$ )	(16 $\pm$ )	(1.5)	(23 $\pm$ )	(23 $\pm$ )	(1.5)	(47 $\pm$ )	(47 $\pm$ )	(3.8)	(9 $\pm$ )	(9 $\pm$ )	(3.5)
	625	+	144	148	147	15	10	5	14	18	13	48	42	48	4	10	9
			(146 $\pm$ )	(146 $\pm$ )	(2.1)	(10 $\pm$ )	(10 $\pm$ )	(5.0)	(15 $\pm$ )	(15 $\pm$ )	(2.6)	(46 $\pm$ )	(46 $\pm$ )	(3.5)	(8 $\pm$ )	(8 $\pm$ )	(3.2)
	1250	+	144	142	140	18	12	10	17	14	17	42	40	43	8	7	8
		(142 $\pm$ )	(142 $\pm$ )	(2.0)	(13 $\pm$ )	(13 $\pm$ )	(4.2)	(16 $\pm$ )	(16 $\pm$ )	(1.7)	(42 $\pm$ )	(42 $\pm$ )	(1.5)	(8 $\pm$ )	(8 $\pm$ )	(0.6)	
	2500	+	141	155	147	15	8	14	13	13	15	37	52	55	9	10	10
			(148 $\pm$ )	(148 $\pm$ )	(7.0)	(12 $\pm$ )	(12 $\pm$ )	(3.8)	(14 $\pm$ )	(14 $\pm$ )	(1.2)	(48 $\pm$ )	(48 $\pm$ )	(9.6)	(10 $\pm$ )	(10 $\pm$ )	(0.6)
	5000	+	131	139	162	11	11	18	12	15	21	30	30	39	7	10	14
			(144 $\pm$ )	(144 $\pm$ )	(16.1)	(13 $\pm$ )	(13 $\pm$ )	(4.0)	(16 $\pm$ )	(16 $\pm$ )	(4.6)	(33 $\pm$ )	(33 $\pm$ )	(5.2)	(10 $\pm$ )	(10 $\pm$ )	(3.5)
陽性対照	SSMixを必要としないもの	名称 濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	AF2 0.01			SA 0.5			AF2 0.01			AF2 0.1			9AA 80		
		コロニー数/プレート	607	607	657	166	177	189	168	158	163	447	503	435	2644	2447	2009
			(624 $\pm$ )	(624 $\pm$ )	(28.9)	(177 $\pm$ )	(177 $\pm$ )	(11.5)	(163 $\pm$ )	(163 $\pm$ )	(5.0)	(462 $\pm$ )	(462 $\pm$ )	(36.3)	(2367 $\pm$ )	(2367 $\pm$ )	(325.0)
	SSMixを必要とするもの	名称 濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	2AA 1			2AA 2			2AA 10			2AA 0.5			2AA 2		
	コロニー数/プレート	931	863	922	215	193	181	547	571	554	286	278	268	191	210	185	
		(905 $\pm$ )	(905 $\pm$ )	(36.9)	(196 $\pm$ )	(196 $\pm$ )	(17.2)	(557 $\pm$ )	(557 $\pm$ )	(12.3)	(277 $\pm$ )	(277 $\pm$ )	(9.0)	(195 $\pm$ )	(195 $\pm$ )	(13.1)	