2，2，4－トリメチル－1，3－ペンタンジオールジイソブチレート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
緒　　言	2
材料および試験方法	3
試験結果および考察	6
参　考　文　献	7
Tables　　1～3	

【要　　約】

2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールジイソブチレートの変異原性の有無について、細菌を用いる復帰突然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、直接法および代謝活性化法のいずれも、用量設定試験では 50～5000 μg/プレート、本試験では 312.5～5000 μg/プレート の用量で試験を実施した。

その結果、2回実施した本試験において、用いた5種類の検定菌について、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、2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールジイソブチレートは、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】

ＯＥＣＤ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、2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールジイソブチレートについて、細菌を用いる復帰突然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[(1)]、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[(2)]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法と、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法とからなっている。

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 *uvr* A
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 *uvr*A 株は1979年5月9日に　　から分与を受けた。

検定菌は、－80℃以下で凍結保存した。

試験に際して、ニュートリエントブロスNo.2（OXOID, B-1674/1）を入れたL字型試験管に種菌を接種し、37℃、約11～12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〕

2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールジイソブチレート（CAS No. 6846-50-0、以下 PDIB と略）は、分子量 286.41、比重（20/20℃）0.944 の無色透明の液体である。純度 99.7%のもの（ロット番号：　　）を

から供与された。被験物質は、使用時まで直射日光を避け密栓して室温で保管した。

PDIB は、ジメチルスルホキシド（ロット番号：TWP5445 および TWP5887、和光純薬工業㈱、以下 DMSO と略）を用いて 50 mg/mℓ なるように調製した後、同溶媒で更に公比2ないし3で希釈したものを、速やかに試験に用いた。

秦野研究所において PDIB の DMSO 溶液中での安定性試験を行った。本試験における最高濃度（50 mg/mℓ）および最低濃度（3 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4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（0時間）の平均に対して、98.2 および 98.4%であった。これらの値は、当研究所の基準を満たしていた（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 溶液の含量は設定濃度に対し、94.0～101%、3.125 mg/mℓ 溶液は、92.8～94.6%であった。これらの値も当研究所の基準を満たしていた（Appendix 2）。

以上の結果から、PDIB は DMSO 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㈱	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㈱	ﾛｯﾄ番号 TWR3330,	純度>90%）
9-AA：9-アミノアクリジン	（Sigma Chem. Co.	ﾛｯﾄ番号 96F05641,	純度>98%）
2-AA：2-アミノアントラセン	（和光純薬工業㈱	ﾛｯﾄ番号 DSF2950,	純度>90%）

AF-2, 2-AA は 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。9-AA は DMSO に、SA は蒸留水に溶解して速やかに試験に用いた。

〔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) ﾊﾞｸﾄ･ｱｶﾞｰ (Difco)	0.6%	(B) L-ﾋｽﾁｼﾞﾝ*	0.5 mM
塩化ﾅﾄﾘｳﾑ	0.5%	ﾋﾞｵﾁﾝ	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（用量設定試験においてはロット番号：DJ030EH, 1992年5月15日製造、本試験においては、ロット番号：DJ040IH, 1992年9月4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。

硫酸ﾏｸﾞﾈｼｳﾑ･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	ｸﾞﾙｺｰｽ	20 g
ﾘﾝ酸水素二ｶﾘｳﾑ	10 g	ﾊﾞｸﾄｱｶﾞｰ (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**	0.1 mℓ	NADH	4 μmol
塩化ﾏｸﾞﾈｼｳﾑ	8 μmol	NADPH	4 μmol
塩化ｶﾘｳﾑ	33 μmol	0.2M リン酸緩衝液 (pH 7.4)	0.5 mℓ
ｸﾞﾙｺｰｽ・6ﾘﾝ酸	5 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-280、1992年7月24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〕

プレート法を用いて、直接法および代謝活性化法によって試験を行った。

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 DMSO、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、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〕

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌の直接法あるいは代謝活性化法において、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 Table 1 に示す。PDIB について、50～5000 μg/プレート の範囲で、公比を約3とし、試験を実施したところ、抗菌性は TA100 の代謝活性化法の 5000 μg/プレート の用量で認められた以外はいずれの検定菌の直接法、代謝活性化法ともに認められなかった。被験物質に由来する沈殿は、直接法、代謝活性化法ともに 5000 μg/プレート の用量のみで認められた。

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、直接法、代謝活性化法ともに 5000 μg/プレート とし、公比2で、5用量を設定することとした。

〔本試験〕

結果を Tables 2、3 に示す。PDIB について 312.5～5000 μg/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法、代謝活性化法のいずれにおいても、陰性対照の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。直接法、代謝活性化法ともに被験物質に由来する沈殿が 1250 μg/プレート の用量まで認められた。

PDIB 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、PDIB 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.L.: in "Handbook of Mutagenicity Test Procedures." Kilby, B.J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C. (eds.) Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford. (1984) pp. 161-187.

Table 1. Results of preliminary cytotoxicity test in bacterial reverse mutation assay with 2,2,4-trimethyl-1,3-pentanedioldiisobutyrate

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	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix (-)	0	120 124 123 (122 ± 2.1)	9 7 10 (9 ± 1.5)	19 11 14 (15 ± 4.0)	17 12 23 (17 ± 5.5)	16 9 8 (11 ± 4.4)	
	50	128	17	10	16	7	
	150	123	19	9	19	6	
	500	105	10	20	17	5	
	1500	105	12	10	17	3	
	5000 #	117	7	11	12	9	
							(
S9Mix (+)	0	122 119 110 (117 ± 6.2)	11 12 13 (12 ± 1.0)	14 12 13 (13 ± 1.0)	29 28 31 (29 ± 1.5)	17 10 9 (12 ± 4.4)	
	50	124	18	17	21	7	
	150	115	14	24	28	11	
	500	110	14	17	22	6	
	1500	113	12	14	23	14	
	5000 #	49 *	14	12	19	5	
							(
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	535 533 501 (523 ± 19.1)	205 181 196 (194 ± 12.1)	174 176 190 (180 ± 8.7)	504 523 487 (505 ± 18.0)	3239 3430 3577 (3415 ± 169.5)	
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate	481 424 456 (454 ± 28.6)	277 228 191 (232 ± 43.1)	421 425 422 (423 ± 2.1)	240 202 208 (217 ± 20.4)	151 174 194 (173 ± 21.5)	

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

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria. #: Precipitant was observed on the surface of agar plates.

Table 2. Results of bacterial reverse mutation assay (I) with 2,2,4-trimethyl-1,3-pentanedioldiisobutyrate

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	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix (-)	0	99 95 91 (95 ± 4.0)	9 21 14 (15 ± 6.0)	13 15 17 (15 ± 2.0)	21 18 26 (22 ± 4.0)	7 10 12 (10 ± 2.5)	
	312.5	106 110 125 (114 ± 10.0)	11 17 12 (13 ± 3.2)	14 15 16 (15 ± 1.0)	19 24 26 (23 ± 3.6)	5 5 7 (6 ± 1.2)	
	625	130 96 134 (120 ± 20.9)	13 20 6 (13 ± 7.0)	22 26 18 (22 ± 4.0)	18 24 19 (20 ± 3.2)	4 3 6 (4 ± 1.5)	
	1250 #	107 116 128 (117 ± 10.5)	10 12 21 (14 ± 5.9)	16 14 18 (16 ± 2.0)	13 13 19 (15 ± 3.5)	5 12 3 (7 ± 4.7)	
	2500 #	121 127 94 (114 ± 17.6)	9 10 11 (10 ± 1.0)	14 21 13 (16 ± 4.4)	19 17 19 (18 ± 1.2)	6 6 7 (6 ± 0.6)	
	5000 #	118 106 122 (115 ± 8.3)	13 12 12 (12 ± 0.6)	30 21 17 (23 ± 6.7)	14 25 24 (21 ± 6.1)	4 9 9 (7 ± 2.9)	
S9Mix (+)	0	118 117 120 (118 ± 1.5)	15 17 13 (15 ± 2.0)	20 20 18 (19 ± 1.2)	26 33 30 (30 ± 3.5)	15 9 11 (12 ± 3.1)	
	312.5	143 120 104 (122 ± 19.6)	15 14 14 (14 ± 0.6)	24 20 26 (23 ± 3.1)	27 25 25 (26 ± 1.2)	5 10 11 (9 ± 3.2)	
	625	143 134 141 (139 ± 4.7)	18 12 11 (14 ± 3.8)	24 22 18 (21 ± 3.1)	32 30 35 (32 ± 2.5)	16 14 9 (13 ± 3.6)	
	1250 #	132 151 113 (132 ± 19.0)	15 15 18 (16 ± 1.7)	19 19 21 (20 ± 1.2)	30 30 24 (28 ± 3.5)	10 11 13 (11 ± 1.5)	
	2500 #	113 111 121 (115 ± 5.3)	12 11 10 (11 ± 1.0)	23 15 17 (18 ± 4.2)	23 17 19 (20 ± 3.1)	11 15 12 (13 ± 2.1)	
	5000 #	82 83 94 (86 ± 6.7)	15 8 14 (12 ± 3.8)	17 25 15 (19 ± 5.3)	32 31 16 (26 ± 9.0)	6 6 3 (5 ± 1.7)	
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	512 557 536 (535 ± 22.5)	254 285 294 (278 ± 21.0)	106 116 112 (111 ± 5.0)	581 533 515 (543 ± 34.1)	2966 2181 2986 (2711 ± 459.1)	
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (µg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate	576 636 595 (602 ± 30.7)	154 174 178 (169 ± 12.9)	605 564 576 (582 ± 21.1)	254 200 151 (202 ± 51.5)	205 182 216 (201 ± 17.3)	

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

#: Precipitant was observed on the surface of agar plates.

Table 3. Results of bacterial reverse mutation assay (II) with 2,2,4-trimethyl-1,3-pentanedioldiisobutyrate

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	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9Mix (-)	0	145 142 146 (144 ± 2.1)	16 20 9 (15 ± 5.6)	17 13 14 (15 ± 2.1)	23 32 36 (30 ± 6.7)	3 10 8 (7 ± 3.6)
	312.5	128 123 116 (122 ± 6.0)	13 12 7 (11 ± 3.2)	9 14 16 (13 ± 3.6)	17 23 36 (25 ± 9.7)	2 3 5 (3 ± 1.5)
	625	121 138 109 (123 ± 14.6)	9 14 11 (11 ± 2.5)	14 18 22 (18 ± 4.0)	28 28 35 (30 ± 4.0)	6 9 13 (9 ± 3.5)
	1250 #	139 107 122 (123 ± 16.0)	14 14 7 (12 ± 4.0)	11 11 16 (13 ± 2.9)	29 23 28 (27 ± 3.2)	3 7 5 (5 ± 2.0)
	2500 #	134 129 135 (133 ± 3.2)	13 16 14 (14 ± 1.5)	11 14 10 (12 ± 2.1)	31 23 27 (27 ± 4.0)	5 7 10 (7 ± 2.5)
	5000 #	130 122 110 (121 ± 10.1)	13 8 6 (9 ± 3.6)	16 12 11 (13 ± 2.6)	30 37 41 (36 ± 5.6)	3 7 9 (6 ± 3.1)
S9Mix (+)	0	121 143 151 (138 ± 15.5)	17 22 14 (18 ± 4.0)	16 18 17 (17 ± 1.0)	26 42 51 (40 ± 12.7)	16 10 8 (11 ± 4.2)
	312.5	112 150 139 (134 ± 19.6)	15 14 13 (14 ± 1.0)	28 25 14 (22 ± 7.4)	31 41 35 (36 ± 5.0)	15 11 12 (13 ± 2.1)
	625	136 123 134 (131 ± 7.0)	16 14 14 (15 ± 1.2)	16 16 21 (18 ± 2.9)	42 34 37 (38 ± 4.0)	7 16 10 (11 ± 4.6)
	1250 #	135 150 132 (139 ± 9.6)	19 18 15 (17 ± 2.1)	17 22 15 (18 ± 3.6)	35 45 31 (37 ± 7.2)	9 10 8 (9 ± 1.0)
	2500 #	127 125 127 (126 ± 1.2)	12 14 14 (13 ± 1.2)	14 17 13 (15 ± 2.1)	34 39 51 (41 ± 8.7)	8 8 14 (10 ± 3.5)
	5000 #	113 109 97 (106 ± 8.3)	11 13 10 (11 ± 1.5)	14 20 16 (17 ± 3.1)	35 34 28 (32 ± 3.8)	10 3 4 (6 ± 3.8)
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	468 451 435 (451 ± 16.5)	132 150 134 (139 ± 9.9)	203 224 245 (224 ± 21.0)	606 703 692 (667 ± 53.1)	2117 2234 2203 (2185 ± 60.6)
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2
	Number of colonies / plate	661 673 648 (661 ± 12.5)	137 174 176 (162 ± 22.0)	633 642 564 (613 ± 42.7)	284 290 257 (277 ± 17.6)	211 196 174 (194 ± 18.6)

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

#: Precipitant was observed on the surface of agar plates.