



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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、本試験では 312.5～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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°C 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°C 、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 ($20/20^{\circ}\text{C}$) 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(株)、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 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	(和光純薬工業株)	ロット番号 DSF2950,	純度>90%)

AF-2, 2-AA は DMSO (和光純薬工業株) 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) 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%	イオニン	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 1 l 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 ^{**}	0.1 ml	NADH	4 μmol
塩化マグネシウム	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
グルコース・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 (キッコーマン株、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。

小試験管中にトッパアガー 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 $\mu\text{g}/\text{plv-t}$ 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 $\mu\text{g}/\text{plv-t}$ 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 $\mu\text{g}/\text{plv-t}$ 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 $\mu\text{g}/\text{plv-t}$ 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 $\mu\text{g}/\text{plv-t}$ 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 $\mu\text{g}/\text{plv-t}$ 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-pentanedioisobutyrate

With (+) or without (-) S9 Mix	Test substance dose (μg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate , Mean \pm S.D.)															
		Base - pair substitution type									Frameshift type						
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537			
S9Mix (-)	0	120	124	123	9	7	10	19	11	14	17	12	23	16	9	8	
		(122 \pm 2.1)			(9 \pm 1.5)			(15 \pm 4.0)			(17 \pm 5.5)			(11 \pm 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	11	12	13	14	12	13	29	28	31	17	10	9	
		(117 \pm 6.2)			(12 \pm 1.0)			(13 \pm 1.0)			(29 \pm 1.5)			(12 \pm 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	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA			
	Dose (μg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80			
S9 Mix (-)	Number of colonies / plate	535	533	501	205	181	196	174	176	190	504	523	487	3239	3430	3577	
		(523 \pm 19.1)			(194 \pm 12.1)			(180 \pm 8.7)			(505 \pm 18.0)			(3415 \pm 169.5)			
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose (μg /plate)	1			2			10			0.5			2			
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	481	424	456	277	228	191	421	425	422	240	202	208	151	174	194	
		(454 \pm 28.6)			(232 \pm 43.1)			(423 \pm 2.1)			(217 \pm 20.4)			(173 \pm 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-pentanedioaldiisobutyrate

With (+) or without (-) S9 Mix	Test substance dose (μg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate , Mean \pm S.D.)															
		Base - pair substitution type									Frameshift type						
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537			
S9Mix (-)	0	99	95	91	9	21	14	13	15	17	21	18	26	7	10	12	
		(95 \pm 4.0)			(15 \pm 6.0)			(15 \pm 2.0)			(22 \pm 4.0)			(10 \pm 2.5)			
	312.5	106	110	125	11	17	12	14	15	16	19	24	26	5	5	7	
		(114 \pm 10.0)			(13 \pm 3.2)			(15 \pm 1.0)			(23 \pm 3.6)			(6 \pm 1.2)			
	625	130	96	134	13	20	6	22	26	18	18	24	19	4	3	6	
		(120 \pm 20.9)			(13 \pm 7.0)			(22 \pm 4.0)			(20 \pm 3.2)			(4 \pm 1.5)			
	1250 #	107	116	128	10	12	21	16	14	18	13	13	19	5	12	3	
		(117 \pm 10.5)			(14 \pm 5.9)			(16 \pm 2.0)			(15 \pm 3.5)			(7 \pm 4.7)			
2500 #	121	127	94	9	10	11	14	21	13	19	17	19	6	6	7		
	(114 \pm 17.6)			(10 \pm 1.0)			(16 \pm 4.4)			(18 \pm 1.2)			(6 \pm 0.6)				
5000 #	118	106	122	13	12	12	30	21	17	14	25	24	4	9	9		
	(115 \pm 8.3)			(12 \pm 0.6)			(23 \pm 6.7)			(21 \pm 6.1)			(7 \pm 2.9)				
S9Mix (+)	0	118	117	120	15	17	13	20	20	18	26	33	30	15	9	11	
		(118 \pm 1.5)			(15 \pm 2.0)			(19 \pm 1.2)			(30 \pm 3.5)			(12 \pm 3.1)			
	312.5	143	120	104	15	14	14	24	20	26	27	25	25	5	10	11	
		(122 \pm 19.6)			(14 \pm 0.6)			(23 \pm 3.1)			(26 \pm 1.2)			(9 \pm 3.2)			
	625	143	134	141	18	12	11	24	22	18	32	30	35	16	14	9	
		(139 \pm 4.7)			(14 \pm 3.8)			(21 \pm 3.1)			(32 \pm 2.5)			(13 \pm 3.6)			
	1250 #	132	151	113	15	15	18	19	19	21	30	30	24	10	11	13	
		(132 \pm 19.0)			(16 \pm 1.7)			(20 \pm 1.2)			(28 \pm 3.5)			(11 \pm 1.5)			
2500 #	113	111	121	12	11	10	23	15	17	23	17	19	11	15	12		
	(115 \pm 5.3)			(11 \pm 1.0)			(18 \pm 4.2)			(20 \pm 3.1)			(13 \pm 2.1)				
5000 #	82	83	94	15	8	14	17	25	15	32	31	16	6	6	3		
	(86 \pm 6.7)			(12 \pm 3.8)			(19 \pm 5.3)			(26 \pm 9.0)			(5 \pm 1.7)				
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA			
	Dose (μg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80			
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose (μg /plate)	1			2			10			0.5			2			
	Number of colonies / plate	512	557	536	254	285	294	106	116	112	581	533	515	2966	2181	2986	
		(535 \pm 22.5)			(278 \pm 21.0)			(111 \pm 5.0)			(543 \pm 34.1)			(2711 \pm 459.1)			
	Number of colonies / plate	576	636	595	154	174	178	605	564	576	254	200	151	205	182	216	
		(602 \pm 30.7)			(169 \pm 12.9)			(582 \pm 21.1)			(202 \pm 51.5)			(201 \pm 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-pentanedioisobutyrate

With (+) or without (-) S9 Mix	Test substance dose (μg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate , Mean \pm S.D.)															
		Base - pair substitution type									Frameshift type						
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537			
S9Mix (-)	0	145	142	146	16	20	9	17	13	14	23	32	36	3	10	8	
		(144 \pm 2.1)			(15 \pm 5.6)			(15 \pm 2.1)			(30 \pm 6.7)			(7 \pm 3.6)			
	312.5	128	123	116	13	12	7	9	14	16	17	23	36	2	3	5	
		(122 \pm 6.0)			(11 \pm 3.2)			(13 \pm 3.6)			(25 \pm 9.7)			(3 \pm 1.5)			
	625	121	138	109	9	14	11	14	18	22	28	28	35	6	9	13	
		(123 \pm 14.6)			(11 \pm 2.5)			(18 \pm 4.0)			(30 \pm 4.0)			(9 \pm 3.5)			
	1250 #	139	107	122	14	14	7	11	11	16	29	23	28	3	7	5	
		(123 \pm 16.0)			(12 \pm 4.0)			(13 \pm 2.9)			(27 \pm 3.2)			(5 \pm 2.0)			
2500 #	134	129	135	13	16	14	11	14	10	31	23	27	5	7	10		
	(133 \pm 3.2)			(14 \pm 1.5)			(12 \pm 2.1)			(27 \pm 4.0)			(7 \pm 2.5)				
5000 #	130	122	110	13	8	6	16	12	11	30	37	41	3	7	9		
	(121 \pm 10.1)			(9 \pm 3.6)			(13 \pm 2.6)			(36 \pm 5.6)			(6 \pm 3.1)				
S9Mix (+)	0	121	143	151	17	22	14	16	18	17	26	42	51	16	10	8	
		(138 \pm 15.5)			(18 \pm 4.0)			(17 \pm 1.0)			(40 \pm 12.7)			(11 \pm 4.2)			
	312.5	112	150	139	15	14	13	28	25	14	31	41	35	15	11	12	
		(134 \pm 19.6)			(14 \pm 1.0)			(22 \pm 7.4)			(36 \pm 5.0)			(13 \pm 2.1)			
	625	136	123	134	16	14	14	16	16	21	42	34	37	7	16	10	
		(131 \pm 7.0)			(15 \pm 1.2)			(18 \pm 2.9)			(38 \pm 4.0)			(11 \pm 4.6)			
	1250 #	135	150	132	19	18	15	17	22	15	35	45	31	9	10	8	
		(139 \pm 9.6)			(17 \pm 2.1)			(18 \pm 3.6)			(37 \pm 7.2)			(9 \pm 1.0)			
2500 #	127	125	127	12	14	14	14	17	13	34	39	51	8	8	14		
	(126 \pm 1.2)			(13 \pm 1.2)			(15 \pm 2.1)			(41 \pm 8.7)			(10 \pm 3.5)				
5000 #	113	109	97	11	13	10	14	20	16	35	34	28	10	3	4		
	(106 \pm 8.3)			(11 \pm 1.5)			(17 \pm 3.1)			(32 \pm 3.8)			(6 \pm 3.8)				
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA			
	Dose (μg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80			
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	137	174	176	633	642	564	284	290	257	211	196	174	
		(661 \pm 12.5)			(162 \pm 22.0)			(613 \pm 42.7)			(277 \pm 17.6)			(194 \pm 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.