トリイソブチレンの
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 …… 8

Tables　　1～4

【要　　約】

トリイソブチレン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（TA100 においては 10～5000 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回の本試験とも、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、トリイソブチレンは、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】

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、難分解性既存化学物質の1つであるトリイソブチレンについて、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突然変異[(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突然変異[(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, ロット番号：B-1674/1）を　入れたＬ字型試験管に種菌を接種し、37℃、約11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〕

トリイソブチレン（CAS No. 7756-94-7、以下ＴＩＢと略）は、分子量 168 の無色透明の液体である。純度 99.13%のもの（ロット番号：

）を　　から供与された。被験物質は、使用時まで冷暗所で保管した。

ＴＩＢは、アセトン（ロット番号：DSR3251およびDSM 4173、和光純薬工業㈱）に 50 mg/mℓ に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ＴＩＢのアセトン溶液中での安定性試験を高濃度（340 mg/mℓ）および低濃度（200 μg/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、100および 99.5%であった。これらの値は、当研究所で規定した許容範囲内にあった（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、97.3～98.0%、3.125 mg/mℓ 溶液は、100～102%であった。これらの値も当研究所の規定した許容範囲内であった（Appendix 2）。

以上の結果から、ＴＩＢはアセトン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：	ﾌﾘﾙﾌﾗﾏｲﾄﾞ	(上野製薬㈱	ﾛｯﾄ番号 46,	純度99.9%)
SA ：	ｱｼﾞｲﾋﾞﾅﾄﾘｳﾑ	(和光純薬工業㈱	ﾛｯﾄ番号 TWR3330,	純度>90%)
9-AA：	9-ｱﾐﾉｱｸﾘｼﾞﾝ	(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、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およびDJ040IH, 1992年５月14日および９月４日製造、本試験においては、ロット番号：DJ040IH および DJ050JH, 1992年９月４日および10月12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および RAA-285、1992年7月24日および同11月20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アセトン、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。用量設定試験は追加試験を含めて2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復帰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、2 に示す。ＴＩＢについて、50～5000 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ の範囲で公比を約3とし、試験を実施したところ、TA100 の直接法および代謝活性化法においてのみ、すべての用量で強い抗菌性が認められた。そのため、TA100 について、10 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ の用量範囲までの広い範囲にわたって用量設定試験を実施したが、代謝活性化法の 5000 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ の用量以外には抗菌性は認められなかった。以上の結果から、TA100 については、1回目の用量設定試験において、何らかのミスがあったものとし、2回目のデータを採用することとした。

したがって、本試験における最高用量を、すべての検定菌において、直接法、代謝活性化法ともに 5000 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ とすることとした。

被験物質に由来する寒天表面上の沈殿物が直接法、代謝活性化法ともに 1500 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ 以上の用量で認められた。

〔本試験〕

結果を Table 3、4 に示した。ＴＩＢについて、すべての検定菌について、直接法、代謝活性化法ともに、312.5～5000 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ の範囲で、公比を2とし、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、用量依存性のある変異コロニーの増加は認められなかった。また、WP2 の直接法を除いて、最高用量の 5000 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ において、抗菌性が認められた場合があった。

被験物質に由来する寒天表面上の沈殿物が直接法、代謝活性化法ともに 625 あるいは 1250 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ 以上の用量で認められた。

ＴＩＢ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、ＴＩＢ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." Kilbey, 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 triisobutylene

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		15 7 9 (10± 4.2)	11 20 18 (16± 4.7)	20 23 15 (19± 4.0)	7 7 7 (7± 0.0)	
	50		5	12	12	3	
	150		10	11	17	6	
	500		5	20	19	3	
	1500 #		7	14	19	7	
	5000 #		9	16	10	1	
S9Mix	0		10 19 9 (13± 5.5)	20 17 18 (18± 1.5)	24 32 32 (29± 4.6)	12 20 13 (15± 4.4)	
	50		9	12	18	5	
	150		8	16	29	5	
	500		11	20	17	8	
	1500 #		13	18	22	10	
	5000 #		7	15	11	10	
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		156 160 185 (167 ± 15.7)	158 176 171 (168 ± 9.3)	583 563 592 (579 ± 14.8)	3533 3729 3659 (3640 ± 99.3)	
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate		230 222 250 (234 ± 14.4)	531 583 549 (554 ± 26.4)	238 268 300 (269 ± 31.0)	176 214 250 (213 ± 37.0)	

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 preliminary cytotoxicity test in bacterial reverse mutation assay with triisobutylene

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	136 127 105 (123 ± 15.9)					
	10	121					
	20	108					
	40	110					
	100	109					
	2500 #	132					
	5000 #	106					
S9Mix (-)	0	127 128 124 (126 ± 2.1)					
	10	106					
	20	115					
	40	140					
	100	145					
	2500 #	107					
	5000 #	103 *					
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	476 496 480 (484 ± 10.6)					
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (µg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate	614 648 632 (631 ± 17.0)					

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 3. Results of bacterial reverse mutation assay (I) with triisobutylene

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	130 141 136 (136 ± 5.5)	10 20 18 (16 ± 5.3)	40 30 32 (34 ± 5.3)	30 36 23 (30 ± 6.5)	14 11 11 (12 ± 1.7)
	312.5	156 153 113 (141 ± 24.0)	8 14 12 (11 ± 3.1)	18 14 10 (14 ± 4.0)	14 22 17 (18 ± 4.0)	9 9 1 (6 ± 4.6)
	625	126 142 161 (143 ± 17.5)	12 10 12 (11 ± 1.2)	15 18 15 (16 ± 1.7)	20 16 20 (19 ± 2.3)	10 8 5 (8 ± 2.5)
	1250 #	135 148 135 (139 ± 7.5)	9 10 14 (11 ± 2.6)	20 8 14 (14 ± 6.0)	19 21 16 (19 ± 2.5)	6 7 10 (8 ± 2.1)
	2500 #	154 150 167 (157 ± 8.9)	17 11 8 (12 ± 4.6)	26 20 27 (24 ± 3.8)	23 13 17 (18 ± 5.0)	13 12 9 (11 ± 2.1)
	5000 #	113 127 152 (131 ± 19.8)	13 9 5 (9 ± 4.0)	23 17 16 (19 ± 3.8)	20 17 24 (20 ± 3.5)	2 5 8 (5 ± 3.0)
S9Mix (`	0	154 140 141 (145 ± 7.8)	13 12 12 (12 ± 0.6)	26 31 27 (28 ± 2.6)	33 28 31 (31 ± 2.5)	21 20 20 (20 ± 0.6)
	312.5	128 142 130 (133 ± 7.6)	12 11 11 (11 ± 0.6)	29 26 27 (27 ± 1.5)	26 22 20 (23 ± 3.1)	6 12 10 (9 ± 3.1)
	625	116 115 127 (119 ± 6.7)	10 14 12 (12 ± 2.0)	21 17 21 (20 ± 2.3)	28 28 48 (35 ± 11.5)	11 8 6 (8 ± 2.5)
	1250 #	142 145 133 (140 ± 6.2)	11 10 15 (12 ± 2.6)	19 13 8 (13 ± 5.5)	31 17 29 (26 ± 7.6)	8 15 12 (12 ± 3.5)
	2500 #	145 156 156 (152 ± 6.4)	12 11 8 (10 ± 2.1)	10 10 16 (12 ± 3.5)	27 22 29 (26 ± 3.6)	10 5 5 (7 ± 2.9)
	5000 #	90 * 117 * 111 * (106 ± 14.2)	13 9 8 (10 ± 2.6)	11 14 16 (14 ± 2.5)	25 21 14 (20 ± 5.6)	9 9 8 (9 ± 0.6)
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	571 521 498 (530 ± 37.3)	430 420 402 (417 ± 14.2)	125 141 136 (134 ± 8.2)	706 653 644 (668 ± 33.5)	3272 3474 3159 (3302 ± 159.6)
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2
	Number of colonies / plate	874 903 887 (888 ± 14.5)	200 186 237 (208 ± 26.4)	546 540 637 (574 ± 54.4)	271 288 287 (282 ± 9.5)	234 257 260 (250 ± 14.2)

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 4. Results of bacterial reverse mutation assay (II) with triisobutylene

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	138 144 147 (143 ± 4.6)	15 12 14 (14 ± 1.5)	12 13 17 (14 ± 2.6)	18 25 23 (22 ± 3.6)	5 8 8 (7 ± 1.7)
	312.5	128 105 100 (111 ± 14.9)	16 11 17 (15 ± 3.2)	15 23 9 (16 ± 7.0)	19 14 20 (18 ± 3.2)	7 7 8 (7 ± 0.6)
	625 #	107 108 118 (111 ± 6.1)	20 13 17 (17 ± 3.5)	9 5 12 (9 ± 3.5)	26 20 10 (19 ± 8.1)	7 8 3 (6 ± 2.6)
	1250 #	129 127 107 (121 ± 12.2)	18 15 18 (17 ± 1.7)	12 12 15 (13 ± 1.7)	17 20 21 (19 ± 2.1)	4 6 2 (4 ± 2.0)
	2500 #	99 106 96 (100 ± 5.1)	17 10 13 (13 ± 3.5)	19 14 7 (13 ± 6.0)	21 13 15 (16 ± 4.2)	7 1 8 (5 ± 3.8)
	5000 #	137 * 123 * 112 * (124 ± 12.5)	7 * 9 * 12 * (9 ± 2.5)	8 4 8 (7 ± 2.3)	13 * 6 * 0 * (6 ± 6.5)	4 * 4 * 1 * (3 ± 1.7)
S9Mix (+)	0	159 154 149 (154 ± 5.0)	12 9 15 (12 ± 3.0)	17 17 13 (16 ± 2.3)	29 23 33 (28 ± 5.0)	10 10 9 (10 ± 0.6)
	312.5	111 122 111 (115 ± 6.4)	9 7 5 (7 ± 2.0)	14 15 18 (16 ± 2.1)	28 20 24 (24 ± 4.0)	4 5 5 (5 ± 0.6)
	625 #	139 124 105 (123 ± 17.0)	14 14 10 (13 ± 2.3)	18 13 13 (15 ± 2.9)	25 14 17 (19 ± 5.7)	6 6 3 (5 ± 1.7)
	1250 #	115 101 116 (111 ± 8.4)	10 17 16 (14 ± 3.8)	14 12 11 (12 ± 1.5)	32 22 24 (26 ± 5.3)	4 6 5 (5 ± 1.0)
	2500 #	106 92 80 (93 ± 13.0)	10 22 11 (14 ± 6.7)	13 15 10 (13 ± 2.5)	14 17 10 (14 ± 3.5)	6 8 6 (7 ± 1.2)
	5000 #	124 * 121 * 140 * (128 ± 10.2)	8 * 9 * 9 * (9 ± 0.6)	6 * 5 * 3 * (5 ± 1.5)	16 * 19 * 45 * (27 ± 15.9)	3 * 5 * 4 * (4 ± 1.0)
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	521 538 546 (535 ± 12.8)	154 166 167 (162 ± 7.2)	200 193 186 (193 ± 7.0)	626 670 616 (637 ± 28.7)	2077 2184 2021 (2094 ± 82.8)
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2
	Number of colonies / plate	732 727 749 (736 ± 11.5)	167 173 174 (171 ± 3.8)	514 648 700 (621 ± 96.0)	172 176 183 (177 ± 5.6)	205 192 198 (198 ± 6.5)

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.