

食薬セ研第11-1748号

2001年 6月18日

1,3,5-トリヒドロキシベンゼン
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
材料および方法	3
結果および考察	7
特 記 事 項	8
文 献	8
Tables 1～3	

【要 約】

1,3,5-トリヒドロキシベンゼンの変異原性の有無を、細菌を用いる復帰突然変異試験により検討し、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* の5菌株を用い、S9 mix 無添加および添加の条件でプレインキュベーション法により用量設定試験および2回の本試験を行った。用量設定試験を50.0~5000 μg /プレート の用量で行ったところ、いずれの検定菌においても、S9 mix 無添加試験および添加試験とともに生育阻害は認められなかった。したがって、本試験では S9 mix 無添加試験および添加試験について 313~5000 μg /プレート の範囲で5用量を設定して実施した。

その結果、用いた5種の検定菌のいずれの用量においても、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ことから、1,3,5-トリヒドロキシベンゼンは、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。

【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、1,3,5-トリヒドロキシベンゼンについて、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¹⁾により実施した。

この試験は、サルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) 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²⁾、ならびに大腸菌 (*Escherichia coli*) 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³⁾ を指標とした変異原性の検出系である。

試験は、被験物質をそのまま検定菌に作用させる S9 mix 無添加試験と、哺乳動物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変異原性を試験する S9 mix 添加試験とからなっている。

この試験は、「新規化学物質等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、一部改正平成9年10月31日、環保安第287号、衛生第127号、平成09・10・31基局第2号）および「OECD毒性試験ガイドライン：471」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。

【材料および方法】

1. 被験物質

1,3,5-トリヒドロキシベンゼン (CAS No. 108-73-6) は、分子式 $C_6H_3O_3$ 、分子量 126.11 の白色粉末である。構造式等は Appendix 1 に示した。用いた被験物質は、ロット番号 _____、純度 100wt% (無水換算) であり、_____ から供与された。被験物質は、使用時まで室温で保管した。

本被験物質は、50 mg/mL の濃度では水には溶解しないがジメチルスルホキシド (DMSO) には溶解することから、DMSO (ロット番号: KSJ6393、和光純薬工業株) に溶解して最高濃度の調製液を調製し、同溶媒で順次希釈して速やかに試験に用いた。50 mg/mL 溶液の調製時に、発熱、発泡、変色等の変化は認められなかった。

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。

各検定菌に用いた陽性対照物質は、当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、それぞれ結果の各 Table 中に示した。

2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド

(AF2、和光純薬工業株) ロット番号 WTQ0059、純度98%以上)

アジ化ナトリウム (SA、和光純薬工業株) ロット番号 DLL3931、純度98%以上)

9-アミノアクリジン (9AA、Sigma Chem. Co. ロット番号 106F06681、純度97%以上)

2-アミノアントラセン (2AA、和光純薬工業株) ロット番号 DLH6052、純度90%以上)

AF2、9AA および 2AA は DMSO に、SA は超純水に溶解し、所定の濃度に調製したものを -20°C で凍結保存し、解凍後速やかに試験に用いた。

3. 検定菌

試験には、*S. typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *E. coli* WP2 *uvrA* を用いた。

S. typhimurium の4菌株は1997年8月7日に、*E. coli* WP2 *uvrA* 株は1997年4月9日に日本バイオアッセイ研究センター _____ から分与された。

検定菌は-80℃で凍結保存したものを用いた。各菌株の凍結保存菌の調製時に、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 pKM 101(プラスミド)の有無および陰性対照群と陽性対照群の変異コロニー数について調べ、特性が維持されていることを確認した。

試験に際して、ニュートリエントブロスNo.2 (Oxoid Ltd.、ロット番号: 02859365)を入れたL字型試験管に解凍した菌液を一定量加え、37℃で10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。分光光度計により 660 nm の吸光度を測定し、検定菌液の増殖を確認した。

試験に用いた検定菌液の、段階希釈法または OD 値からの換算により求めた生菌数を Appendix 2 に示した。

4. 試験材料

1) 合成培地

培地は、極東製薬工業(株)製の最少グルコース寒天培地 (ロット番号: DZA12001、2000年2月24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
クエン酸・1水和物	2 g
リン酸水素二カリウム	10 g
リン酸一アンモニウム	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 (清水食品)	15 g

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。

2) トップアガー

下記の水溶液 (A) および (B) または (C) を容量比 10:1 の割合で混合した。

(A) バクトアガー (Difco Lab.)	0.6 w/v%
塩化ナトリウム	0.5 w/v%

(B) <i>Salmonella typhimurium</i> 用	
L-ヒスチジン	0.5 mmol/L
D-ビオチン	0.5 mmol/L
(C) <i>Escherichia coli</i> 用	
L-トリプトファン	0.5 mmol/L

3) S9 mix

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

S9*	0.1 mL
塩化マグネシウム	8 μ mol
塩化カリウム	33 μ mol
グルコース-6-リン酸	5 μ mol
NADH	4 μ mol
NADPH	4 μ mol
ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μ mol

* : 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-422、2000年3月10日製造) を購入し、-80°C で凍結保存し、用時に解凍して用いた。

5. 試験操作

プレインキュベーション法により、S9 mix 無添加試験および S9 mix 添加試験を行った。

小試験管中に、被験物質調製液 0.1 mL、リン酸緩衝液 0.5 mL (S9 mix 添加試験においては S9 mix 0.5 mL)、検定菌液 0.1 mL を混合し、37°C で20分間プレインキュベーションしたのち、トップアガー 2 mL を加えて混和し、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使用溶媒 (陰性対照) または陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌の陽性対照物質の名称および用量は結果の各 Table 中に示した。陰性および陽性対照試験の結果については、同時に実施した他試験と共通に

用いた。

培養は37℃で48時間行い、発生した変異コロニー数をコロニーアナライザーまたは目視によって算定した。被験物質に由来する沈澱の有無は、目視により確認した。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、寒天表面の菌膜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3枚とし、それぞれの平均値と標準偏差を求めた。対照試験では各々3枚の平板を使用した。

最高用量の被験物質 0.1 mL および S9 mix 0.5 mL を、それぞれ最少グルコース寒天培地上に滴下して、培養終了時に雑菌の混入の有無を調べた。

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、結果の再現性の確認を行った。

6. 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 無添加試験あるいは S9 mix 添加試験において、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、その増加に再現性および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。

【結果および考察】

1. 用量設定試験

「新規化学物質等に係る試験の方法について」および「OECD 毒性試験ガイドライン：471」の記載に従って、50.0～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で公比を約3として、試験を実施した (Table 1)。その結果、すべての検定菌の S9 mix 無添加試験および添加試験のいずれ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澱は S9 mix 無添加試験および S9 mix 添加試験ともに認められなかった。

したがって、本試験における最高用量は、S9 mix 無添加試験および添加試験とも 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とした。

2. 本試験

S9 mix 無添加試験および添加試験のいずれにおいても、313～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で公比を2として2回の本試験を実施した (Table 2、3)。その結果、2回の本試験ともに、いずれの検定菌においても、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、陽性対照試験では、いずれの検定菌においても陽性対照物質の変異原性が検出され、陰性対照値とともに計測された変異コロニー数は背景データ (Appendix 3) の変動範囲内 (平均値 $\pm 3 \times$ 標準偏差) であったことから、本試験系の有効性が確認された。

1,3,5-トリヒドロキシベンゼンは、当研究所で本試験と並行して実施した、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では陰性であった⁴⁾。また、関連物質である Pyrogallol については、タマネギを用いた染色体異常試験および細菌を用いた復帰突然変異試験で陽性の結果が⁵⁾、Hydroquinone については、タマネギを用いた染色体異常試験では陽性、ソラマメを用いた染色体異常試験では陰性の結果が⁶⁾、また、フェノールについては、微生物を用いた復帰突然変異試験で陰性の結果が得られている⁷⁾。

以上の結果に基づき、1,3,5-トリヒドロキシベンゼンは、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。

【文 献】

- 1) 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 (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⁺ 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) : 「1,3,5-トリヒドロキシベンゼンのチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験」, 食薬セ研第11-1751号 (2001)

- 5) 賀田恒夫・石館 基 監修：環境変異原性データ集1，サイエンティスト社，東京，
p. 353 (1980)
- 6) 賀田恒夫・石館 基 監修：環境変異原性データ集1，サイエンティスト社，東京，
p. 215 (1980)
- 7) 労働省労働基準局安全衛生部化学物質調査課 監修：労働安全衛生法有害性調査制度
に基づく既存化学物質変異原性試験データ集，社団法人日本化学物質安全・情報セン
ター，東京，p. 196 (1996)

Table 1. Cytotoxicity of benzene 1,3,5-triol on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean \pm S.D.)																			
		Base - pair substitution type									Frameshift type										
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537							
S9 mix (-)	0	143	140	158	9	14	9	19	25	37	24	22	32	16	7	14	(147 \pm 9.6)	(11 \pm 2.9)	(27 \pm 9.2)	(26 \pm 5.3)	(12 \pm 4.7)
	50.0	139			10			34			36			9							
	150	136			13			25			32			4							
	500	142			9			23			27			6							
	1500	136			10			31			31			5							
	5000	150			13			20			36			7							
S9 mix (+)	0	145	143	154	11	14	15	43	38	30	45	31	40	22	14	20	(147 \pm 5.9)	(13 \pm 2.1)	(37 \pm 6.6)	(39 \pm 7.1)	(19 \pm 4.2)
	50.0	152			16			25			38			15							
	150	156			9			36			35			21							
	500	186			9			33			43			18							
	1500	170			14			28			45			16							
	5000	148			20			32			30			17							
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA							
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01			0.5			0.01			0.1			80							
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA							
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1			2			10			0.5			2							
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	811	1093	1052	393	337	350	755	687	770	576	380	392	298	381	391	(985 \pm 152.4)	(360 \pm 29.3)	(737 \pm 44.2)	(449 \pm 109.9)	(357 \pm 51.1)

The purity of the test substance was 100% (based on anhydrous). This substance contained 0.09% water as impurity.

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

Table 2. Mutagenicity of benzene 1,3,5-triol on bacteria (I)

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			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
S9 mix (-)	0	151	157	167	13	15	13	26	20	25	24	20	21	11	14	9
		(158 \pm 8.1)			(14 \pm 1.2)			(24 \pm 3.2)			(22 \pm 2.1)			(11 \pm 2.5)		
	313	145	145	155	6	9	8	30	27	32	20	27	31	9	8	4
		(148 \pm 5.8)			(8 \pm 1.5)			(30 \pm 2.5)			(26 \pm 5.6)			(7 \pm 2.6)		
	625	137	144	135	15	6	10	30	24	33	22	18	18	6	12	15
		(139 \pm 4.7)			(10 \pm 4.5)			(29 \pm 4.6)			(19 \pm 2.3)			(11 \pm 4.6)		
	1250	123	115	124	13	12	13	39	22	28	32	23	31	9	6	6
		(121 \pm 4.9)			(13 \pm 0.6)			(30 \pm 8.6)			(29 \pm 4.9)			(7 \pm 1.7)		
S9 mix (+)	2500	132	143	158	7	9	10	28	22	37	24	25	33	10	13	6
		(144 \pm 13.1)			(9 \pm 1.5)			(29 \pm 7.5)			(27 \pm 4.9)			(10 \pm 3.5)		
	5000	134	93	105	13	8	11	29	24	18	22	21	25	16	14	9
		(111 \pm 21.1)			(11 \pm 2.5)			(24 \pm 5.5)			(23 \pm 2.1)			(13 \pm 3.6)		
S9 mix (+)	0	162	151	148	14	12	18	24	24	34	33	35	44	16	12	21
		(154 \pm 7.4)			(15 \pm 3.1)			(27 \pm 5.8)			(37 \pm 5.9)			(16 \pm 4.5)		
	313	177	132	162	16	23	15	27	26	21	41	27	31	13	18	22
		(157 \pm 22.9)			(18 \pm 4.4)			(25 \pm 3.2)			(33 \pm 7.2)			(18 \pm 4.5)		
	625	151	144	193	11	3	13	23	31	33	31	29	29	18	10	19
		(163 \pm 26.5)			(9 \pm 5.3)			(29 \pm 5.3)			(30 \pm 1.2)			(16 \pm 4.9)		
	1250	140	168	159	14	10	15	25	27	29	40	34	31	18	9	13
		(156 \pm 14.3)			(13 \pm 2.6)			(27 \pm 2.0)			(35 \pm 4.6)			(13 \pm 4.5)		
S9 mix (+)	2500	165	151	168	6	11	11	29	31	29	38	31	41	12	4	11
		(161 \pm 9.1)			(9 \pm 2.9)			(30 \pm 1.2)			(37 \pm 5.1)			(9 \pm 4.4)		
	5000	174	151	154	9	6	12	29	37	25	37	42	29	3	14	8
		(160 \pm 12.5)			(9 \pm 3.0)			(30 \pm 6.1)			(36 \pm 6.6)			(8 \pm 5.5)		
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	598	631	616	632	721	633	224	219	195	642	668	651	1041	974	1035
		(615 \pm 16.5)			(662 \pm 51.1)			(213 \pm 15.5)			(654 \pm 13.2)			(1017 \pm 37.1)		
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose (μg /plate)	1			2			10			0.5			2		
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	1110	1096	1048	390	392	226	747	877	884	294	430	433	428	346	392
		(1085 \pm 32.5)			(336 \pm 95.3)			(836 \pm 77.2)			(386 \pm 79.4)			(389 \pm 41.1)		

The purity of the test substance was 100% (based on anhydrous). This substance contained 0.09% water as impurity.

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

Table 3. Mutagenicity of benzene 1,3,5-triol on bacteria (II)

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean \pm S.D.)																				
		Base - pair substitution type									Frameshift type											
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537								
S9 mix (-)	0	173	156	173	10	11	14	36	28	54	20	23	19	11	8	9	(167 \pm 9.8)	(12 \pm 2.1)	(39 \pm 13.3)	(21 \pm 2.1)	(9 \pm 1.5)	
	313	132	174	161	11	20	15	35	31	37	25	29	28	7	5	6	(156 \pm 21.5)	(15 \pm 4.5)	(34 \pm 3.1)	(27 \pm 2.1)	(6 \pm 1.0)	
	625	123	134	120	15	9	11	24	25	30	25	21	29	11	8	11	(126 \pm 7.4)	(12 \pm 3.1)	(26 \pm 3.2)	(25 \pm 4.0)	(10 \pm 1.7)	
	1250	145	147	132	10	12	14	34	36	28	24	25	26	7	9	7	(141 \pm 8.1)	(12 \pm 2.0)	(33 \pm 4.2)	(25 \pm 1.0)	(8 \pm 1.2)	
	2500	119	123	137	15	12	13	32	22	29	25	25	21	3	6	3	(126 \pm 9.5)	(13 \pm 1.5)	(28 \pm 5.1)	(24 \pm 2.3)	(4 \pm 1.7)	
	5000	124	117	114	9	8	7	17	26	23	23	20	25	6	9	5	(118 \pm 5.1)	(8 \pm 1.0)	(22 \pm 4.6)	(23 \pm 2.5)	(7 \pm 2.1)	
S9 mix (+)	0	187	151	137	12	16	11	42	22	39	25	34	38	22	17	15	(158 \pm 25.8)	(13 \pm 2.6)	(34 \pm 10.8)	(32 \pm 6.7)	(18 \pm 3.6)	
	313	159	167	149	21	19	22	23	39	48	35	36	29	16	14	19	(158 \pm 9.0)	(21 \pm 1.5)	(37 \pm 12.7)	(33 \pm 3.8)	(16 \pm 2.5)	
	625	148	173	163	15	18	17	44	32	37	37	35	27	17	15	13	(161 \pm 12.6)	(17 \pm 1.5)	(38 \pm 6.0)	(33 \pm 5.3)	(15 \pm 2.0)	
	1250	167	173	168	17	15	24	27	35	24	37	40	22	9	18	19	(169 \pm 3.2)	(19 \pm 4.7)	(29 \pm 5.7)	(33 \pm 9.6)	(15 \pm 5.5)	
	2500	156	151	141	14	19	13	42	36	33	33	33	25	13	10	17	(149 \pm 7.6)	(15 \pm 3.2)	(37 \pm 4.6)	(30 \pm 4.6)	(13 \pm 3.5)	
	5000	173	151	158	9	9	14	28	38	34	29	34	30	10	11	13	(161 \pm 11.2)	(11 \pm 2.9)	(33 \pm 5.0)	(31 \pm 2.6)	(11 \pm 1.5)	
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA								
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01			0.5			0.01			0.1			80								
S9 mix (-)	Number of colonies / plate	582	642	543	745	732	724	241	273	320	661	692	678	1110	1074	1099	(589 \pm 49.9)	(734 \pm 10.6)	(278 \pm 39.7)	(677 \pm 15.5)	(1094 \pm 18.4)	
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA								
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1			2			10			0.5			2								
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	979	982	1010	266	316	295	909	922	969	407	391	408	246	205	222	(990 \pm 17.1)	(292 \pm 25.1)	(933 \pm 31.6)	(402 \pm 9.5)	(224 \pm 20.6)	

The purity of the test substance was 100% (based on anhydrous). This substance contained 0.09% water as impurity.

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