

2004年3月22日

1,3,5-トリス (3,5-ジ-*tert*-ブチル-4-  
ヒドロキシベンジル) イソシアヌル酸の  
細菌を用いる復帰突然変異試験

厚生労働省医薬局審査管理課化学物質安全対策室 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
1. 被験物質	3
2. 陽性対照物質	3
3. 検定菌	3
4. 試験材料	4
5. 被験物質調製液の調製	5
6. 試験操作	5
7. 判定	6
結果および考察	7
1. 用量設定試験	7
2. 本試験	7
参 考 文 献	8
Tables	1~3
Figures	1、2

## 【要 約】

1,3,5-トリス (3,5-ジ-*tert*-ブチル-4-ヒドロキシベンジル) イソシアヌル酸について、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施し、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、プレインキュベーション法により、S9 mix 無添加および添加条件で試験を行った。

用量設定試験を 50.0~5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  の範囲に公比約3で5用量を設定して行ったところ、S9 mix 無添加および添加条件ともに、いずれの検定菌においても生育阻害は認められなかった。

これらの結果に基づき、すべての検定菌で最高用量を 5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  とし、公比2で5用量 (313~5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ ) を設定して2回の本試験を行った。その結果、用いたすべての検定菌において、S9 mix の添加の有無にかかわらず、陰性対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果から、1,3,5-トリス (3,5-ジ-*tert*-ブチル-4-ヒドロキシベンジル) イソシアヌル酸は、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。

## 【結 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-トリス (3,5-ジ-*tert*-ブチル-4-ヒドロキシベンジル) イソシアヌル酸について、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<sup>1)</sup>により実施した。

この試験は、ネズミチフス菌 (*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<sup>2)</sup>、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<sup>3)</sup>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 無添加条件および哺乳動物 (ラット) 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 添加条件で行った。

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 化学物質試験法ガイドライン 471/細菌を用いる復帰突然変異試験」(1997 年 7 月 21 日採択) に基づき、「化学物質 GLP」(平成 12 年 3 月 1 日改正、環保安第 41 号、生衛発第 268 号、平成 12・02・14 基局第 1 号) に準拠して実施した。

## 【材料および方法】

### 1. 被験物質

被験物質である 1,3,5-トリス (3,5-ジ-*tert*-ブチル-4-ヒドロキシベンジル) イソシアヌル酸 [英名 : 1,3,5-tris(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzyl)isocyanuric acid、ロット番号 : 提供者 ] は白色の粉末であり、 から提供を受けた。被験物質の物理化学的性状等を Appendix 1 に示す。被験物質は、使用時まで冷暗所で密閉して保管した。

本ロットは、実験期間中安定であったことが被験物質提供者により確認されている。

### 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、それぞれを結果の各 Table 中に示した。

名称	略称	製造者	ロット番号 (購入日)	純度
2-(2-フル)3-(5-ニトロ-2-フル)アクリルアミド	AF2	和光純薬工業(株)	CKQ1402 (2001年9月13日)	98%以上
7ジ 化ナトリウム	SA	和光純薬工業(株)	ELE2329 (2001年5月15日)	98%以上
9-アミノアクリジン	9AA	Sigma Chem. Co.	106F06681 (2001年5月15日)	97%以上
2-アミノアントラセン	2AA	和光純薬工業(株)	DWK5667 (2001年9月13日)	90%以上

AF2、9AA および 2AA はジメチルスルホキシド (DMSO、和光純薬工業(株)、ロット番号 : LDQ5170) に、SA は超純水に溶解し、所定の濃度に調製した後-20℃で凍結保存し、調製後 6 か月以内のものを用時に解凍して用いた。

### 3. 検定菌

「OECD 化学物質試験法ガイドライン 471/細菌を用いる復帰突然変異試験」のガイドラインに従って、*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の から分与された。

検定菌は -80℃ で凍結保存したものをを用い、特性確認は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 pKM101 (プラスミド) の有無および陰性対照と陽性対照の変異コロニー数について調べた。

試験に際して、ニュートリエントブロス No. 2 (Unipath Ltd.) を入れた L 字型試験管に解凍した種菌を一定量接種し、37℃ で 10 時間往復振とう培養したものを試験菌液とした。分光光度計 (髙島津製作所、型式: UV-120-02) により 660 nm の吸光度を測定し、試験菌液の増殖を確認した。試験に用いた検定菌の生菌数を段階希釈法により求め、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: DZA32801、2002 年 2 月 8 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、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。

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(株))	15 g

##### 2) トップアガー

下記の水溶液 (A) に (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) *Salmonella typhimurium* 用

L-ヒスチジン 0.5 mmol/L

D-ビオチン 0.5 mmol/L

(C) *Escherichia coli* 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 $\mu$ mol
塩化カリウム	33 $\mu$ mol
グルコース-6-リン酸	5 $\mu$ mol
NADH	4 $\mu$ mol
NADPH	4 $\mu$ mol
ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 $\mu$ 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-460、2002 年 3 月 15 日製造) を購入し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存し、用時に解凍して用いた。

5. 被験物質調製液の調製

被験物質は、50 mg/mL の濃度で水よりも DMSO 中で良好な懸濁状態が得られることから、試験に際しては、DMSO (和光純薬工業(株)、ロット番号 : SEF4723) に懸濁して最高用量の調製液を調製した後、同溶媒で順次希釈して、速やかに試験に用いた。調製時に、発熱、発泡、変色等の変化はみられなかった。

6. 試験操作

プレインキュベーション法により、S9 mix 無添加条件および S9 mix 添加条件で試験を行った。

小試験管中に被験物質調製液 0.1 mL、0.1 mol/L ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4) また

は S9 mix 0.5 mL、試験菌液 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後、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、被験物質調製液の代わりに溶媒 0.1 mL または陽性対照物質溶液を加えて、それぞれ陰性対照および陽性対照とした。陰性および陽性対照の結果については、同時に実施した他試験と共通に用いた。

培養は 37°C で 48 時間行い、発生した復帰変異コロニー数を、コロニーアナライザー（システムサイエンス㈱、CA-11）または目視により算定した。被験物質に由来する沈澱の有無は、肉眼により観察した。また、生育阻害の有無については、肉眼あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌叢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、両対照および各用量につき 3 枚ずつを用い、それぞれの平均値と標準偏差を求めた。陰性および陽性対照の復帰変異コロニー数の平均値を、それぞれ陰性対照値および陽性対照値とした。陰性および陽性対照の結果については、同時に実施した他試験と共通に用いた。

なお、最高用量の被験物質調製液 0.1 mL および S9 mix 0.5 mL を、それぞれ合成培地平板上に滴下して、培養終了時に雑菌の混入の有無を調べた。

上記の方法により、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、結果の再現性を確認した。

## 7. 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 無添加条件あるいは S9 mix 添加条件において、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、陰性対照値のそれに比べて 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、本試験系において変異原性を有するもの（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

上記のガイドラインに従って、50.0~5000 µg/plate の範囲で公比を約3とし、5段階の用量を設定して用量設定試験を行った (Table 1)。その結果、S9 mix 無添加条件および S9 mix 添加条件ともに、いずれの検定菌においても生育阻害は認められなかった。また、被験物質に由来する沈澱は、S9 mix 無添加条件においては 150 µg/plate 以上の用量で、S9 mix 添加条件においては 500 µg/plate 以上の用量で認められた。

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 5000 µg/plate とした。

### 2. 本試験

最高用量を 5000 µg/plate とし、公比 2 で 5 用量 (313~5000 µg/plate) を設定して 2 回の本試験を行った (Table 2,3, Figure 1,2)。その結果、用いたすべての検定菌において、S9 mix の添加の有無にかかわらず、陰性対照値の 2 倍以上となる復帰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、最高用量の被験物質調製液および S9 mix への雑菌の混入は認められなかった。また、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、陽性対照値および陰性対照値は、ともに背景データ (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。

なお、1,3,5-トリス (3,5-ジ-*tert*-ブチル-4-ヒドロキシベンジル) イソシアヌル酸については、当研究所で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陽性の<sup>9)</sup>結果が得られている。また、関連物質である triallyl isocyanurate については、染色体異常試験で陽性の<sup>9)</sup>、butylated hydroxytoluene については、染色体異常試験で陰性の<sup>9)</sup>、塩素化イソシアヌル酸については、復帰突然変異試験で陰性の<sup>9)</sup>、1,3,5-トリス (2-プロペニル) イソシアヌル酸については、当研究所で実施した細菌を用いる復帰突然変異試験で陰性の<sup>9)</sup>結果が報告されている。

以上の結果に基づき、1,3,5-トリス (3,5-ジ-*tert*-ブチル-4-ヒドロキシベンジル) イソシアヌル酸は、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) T. Matsushima, T. Sugimura, M. Nagano, T. Yahagi, A. Shirai, M. Sawamura, "Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens," eds. by K. H. Norpoth, R. C. Garner, Springer, Berlin, 1980, pp. 273-285.
- 2) D. M. Maron, B. N. Ames, *Mutat. Res.*, 113, 173 (1983).
- 3) M. H. L. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," eds. by B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, pp. 161-187.
- 4) 「1,3,5-トリス (3,5-ジ-*tert*-ブチル-4-ヒドロキシベンジル) イソシアヌル酸のチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験」, 試験計画番号:G-01-077 (2002).
- 5) 祖父尼俊雄 監修: 染色体異常試験データ集 改訂 1998 年版, 株式会社エル・アイ・シー, 東京, p. 499~500 (1999).
- 6) 祖父尼俊雄 監修: 染色体異常試験データ集 改訂 1998 年版, 株式会社エル・アイ・シー, 東京, p. 92 (1999).
- 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. 130~131 (1996).
- 8) 「1,3,5-トリス (2-プロペニル) イソシアヌル酸の細菌を用いる復帰突然変異試験」, 試験計画番号: M-01-092 (2002)

Table 1. Cytotoxicity of 1,3,5-tris(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzyl)isocyanuric acid in bacteria

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			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
S9 mix (-)	0	141	134	140	22	22	19	39	38	26	25	27	27	6	8	13
		( 138 ± 4 )			( 21 ± 2 )			( 34 ± 7 )			( 26 ± 1 )			( 9 ± 4 )		
	50.0	103			18			32			26			9		
	150 †	146			15			32			20			15		
	500 †	137			31			28			21			5		
	1500 †	117			19			22			26			6		
	5000 †	125			23			19			21			2		
S9 mix (+)	0	171	148	144	19	20	15	42	41	41	45	43	48	22	22	18
		( 154 ± 15 )			( 18 ± 3 )			( 41 ± 1 )			( 45 ± 3 )			( 21 ± 2 )		
	50.0	168			19			42			30			18		
	150	145			20			45			38			14		
	500 †	174			25			44			50			19		
	1500 †	185			23			49			46			16		
	5000 †	168			24			38			42			18		
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	470	536	497	709	751	755	205	237	226	534	567	571	675	496	646
		( 501 ± 33 )			( 738 ± 25 )			( 223 ± 16 )			( 557 ± 20 )			( 606 ± 96 )		
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose (µg/plate)	1			2			10			0.5			2		
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	555	574	564	320	343	378	1009	947	1098	239	264	257	221	252	232
		( 564 ± 10 )			( 347 ± 29 )			( 1018 ± 76 )			( 253 ± 13 )			( 235 ± 16 )		

The purity of the test substance was 100 wt%.

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

†: Precipitate was observed on the surface of agar plates.

Table 2. Mutagenicity of 1,3,5-tris(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzyl)isocyanuric acid in bacteria (I)

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	124	141	120	21	22	22	25	17	19	22	16	25	2	7	10
		( 128 $\pm$ 11 )			( 22 $\pm$ 1 )			( 20 $\pm$ 4 )			( 21 $\pm$ 5 )			( 6 $\pm$ 4 )		
	313 †	138	136	120	13	13	16	23	26	17	13	29	18	5	7	5
		( 131 $\pm$ 10 )			( 14 $\pm$ 2 )			( 22 $\pm$ 5 )			( 20 $\pm$ 8 )			( 6 $\pm$ 1 )		
	625 †	150	123	160	17	17	25	19	22	18	11	13	22	4	10	11
		( 144 $\pm$ 19 )			( 20 $\pm$ 5 )			( 20 $\pm$ 2 )			( 15 $\pm$ 6 )			( 8 $\pm$ 4 )		
	1250 †	120	128	118	19	19	19	17	25	23	23	12	15	4	5	8
	( 122 $\pm$ 5 )			( 19 $\pm$ 0 )			( 22 $\pm$ 4 )			( 17 $\pm$ 6 )			( 6 $\pm$ 2 )			
2500 †	127	130	125	26	10	12	19	16	25	19	15	18	10	4	7	
	( 127 $\pm$ 3 )			( 16 $\pm$ 9 )			( 20 $\pm$ 5 )			( 17 $\pm$ 2 )			( 7 $\pm$ 3 )			
5000 †	105	120	108	12	14	20	27	19	22	21	19	25	9	7	6	
	( 111 $\pm$ 8 )			( 15 $\pm$ 4 )			( 23 $\pm$ 4 )			( 22 $\pm$ 3 )			( 7 $\pm$ 2 )			
S9 mix (+)	0	190	158	153	12	14	21	25	39	36	40	24	34	11	15	11
		( 167 $\pm$ 20 )			( 16 $\pm$ 5 )			( 33 $\pm$ 7 )			( 33 $\pm$ 8 )			( 12 $\pm$ 2 )		
	313 †	146	147	165	24	20	18	22	33	35	40	37	27	10	8	10
		( 153 $\pm$ 11 )			( 21 $\pm$ 3 )			( 30 $\pm$ 7 )			( 35 $\pm$ 7 )			( 9 $\pm$ 1 )		
	625 †	140	184	180	12	15	14	32	30	30	31	33	31	11	12	14
		( 168 $\pm$ 24 )			( 14 $\pm$ 2 )			( 31 $\pm$ 1 )			( 32 $\pm$ 1 )			( 12 $\pm$ 2 )		
	1250 †	145	183	167	13	9	11	29	33	21	33	34	27	7	7	11
	( 165 $\pm$ 19 )			( 11 $\pm$ 2 )			( 28 $\pm$ 6 )			( 31 $\pm$ 4 )			( 8 $\pm$ 2 )			
2500 †	152	142	154	16	19	15	31	19	28	31	28	35	11	7	8	
	( 149 $\pm$ 6 )			( 17 $\pm$ 2 )			( 26 $\pm$ 6 )			( 31 $\pm$ 4 )			( 9 $\pm$ 2 )			
5000 †	164	159	153	15	18	11	30	22	31	38	21	28	8	5	8	
	( 159 $\pm$ 6 )			( 15 $\pm$ 4 )			( 28 $\pm$ 5 )			( 29 $\pm$ 9 )			( 7 $\pm$ 2 )			
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		
	Number of colonies / plate	482	506	497	735	690	690	179	202	243	574	541	562	700	675	861
		( 495 $\pm$ 12 )			( 705 $\pm$ 26 )			( 208 $\pm$ 32 )			( 559 $\pm$ 17 )			( 745 $\pm$ 101 )		
	Number of colonies / plate	541	539	567	321	402	338	1013	924	1023	241	270	234	238	245	271
		( 549 $\pm$ 16 )			( 354 $\pm$ 43 )			( 987 $\pm$ 55 )			( 248 $\pm$ 19 )			( 251 $\pm$ 17 )		

The purity of the test substance was 100 wt%.

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

†: Precipitate was observed on the surface of agar plates.

Table 3. Mutagenicity of 1,3,5-tris(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzyl)isocyanuric acid in 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	107	103	103	9	7	10	27	22	26	21	22	25	12	9	11
		( 104 $\pm$ 2 )			( 9 $\pm$ 2 )			( 25 $\pm$ 3 )			( 23 $\pm$ 2 )			( 11 $\pm$ 2 )		
	313 †	147	131	130	13	14	15	23	28	21	27	35	28	7	6	8
		( 136 $\pm$ 10 )			( 14 $\pm$ 1 )			( 24 $\pm$ 4 )			( 30 $\pm$ 4 )			( 7 $\pm$ 1 )		
	625 †	118	120	121	11	17	10	31	24	30	27	20	23	8	4	7
		( 120 $\pm$ 2 )			( 13 $\pm$ 4 )			( 28 $\pm$ 4 )			( 23 $\pm$ 4 )			( 6 $\pm$ 2 )		
	1250 †	119	137	123	15	11	10	31	22	30	25	25	37	7	4	4
	( 126 $\pm$ 9 )			( 12 $\pm$ 3 )			( 28 $\pm$ 5 )			( 29 $\pm$ 7 )			( 5 $\pm$ 2 )			
2500 †	127	112	113	12	11	13	30	27	25	27	30	23	5	10	1	
	( 117 $\pm$ 8 )			( 12 $\pm$ 1 )			( 27 $\pm$ 3 )			( 27 $\pm$ 4 )			( 5 $\pm$ 5 )			
5000 †	130	144	140	11	16	14	29	20	32	37	31	35	6	6	3	
	( 138 $\pm$ 7 )			( 14 $\pm$ 3 )			( 27 $\pm$ 6 )			( 34 $\pm$ 3 )			( 5 $\pm$ 2 )			
S9 mix (+)	0	156	130	123	16	17	11	44	35	31	40	38	22	10	14	14
		( 136 $\pm$ 17 )			( 15 $\pm$ 3 )			( 37 $\pm$ 7 )			( 33 $\pm$ 10 )			( 13 $\pm$ 2 )		
	313 †	153	187	178	12	17	17	30	32	29	33	38	39	12	13	10
		( 173 $\pm$ 18 )			( 15 $\pm$ 3 )			( 30 $\pm$ 2 )			( 37 $\pm$ 3 )			( 12 $\pm$ 2 )		
	625 †	174	178	170	11	13	16	29	28	36	31	33	46	15	8	8
		( 174 $\pm$ 4 )			( 13 $\pm$ 3 )			( 31 $\pm$ 4 )			( 37 $\pm$ 8 )			( 10 $\pm$ 4 )		
	1250 †	152	159	165	7	12	12	24	27	35	32	32	37	6	6	10
	( 159 $\pm$ 7 )			( 10 $\pm$ 3 )			( 29 $\pm$ 6 )			( 34 $\pm$ 3 )			( 7 $\pm$ 2 )			
2500 †	165	156	156	12	14	16	37	18	36	40	44	42	9	6	6	
	( 159 $\pm$ 5 )			( 14 $\pm$ 2 )			( 30 $\pm$ 11 )			( 42 $\pm$ 2 )			( 7 $\pm$ 2 )			
5000 †	153	167	156	19	16	10	44	26	27	49	26	32	5	12	11	
	( 159 $\pm$ 7 )			( 15 $\pm$ 5 )			( 32 $\pm$ 10 )			( 36 $\pm$ 12 )			( 9 $\pm$ 4 )			
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		
Positive control S9 mix (+)	Number of colonies / plate	453	470	447	650	778	785	237	227	238	611	598	629	615	537	770
		( 457 $\pm$ 12 )			( 738 $\pm$ 76 )			( 234 $\pm$ 6 )			( 613 $\pm$ 16 )			( 641 $\pm$ 119 )		
Positive control S9 mix (+)	Number of colonies / plate	826	831	800	382	384	388	1062	1033	934	486	473	428	308	336	310
		( 819 $\pm$ 17 )			( 385 $\pm$ 3 )			( 1010 $\pm$ 67 )			( 462 $\pm$ 30 )			( 318 $\pm$ 16 )		

The purity of the test substance was 100 wt%.

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

†: Precipitate was observed on the surface of agar plates.

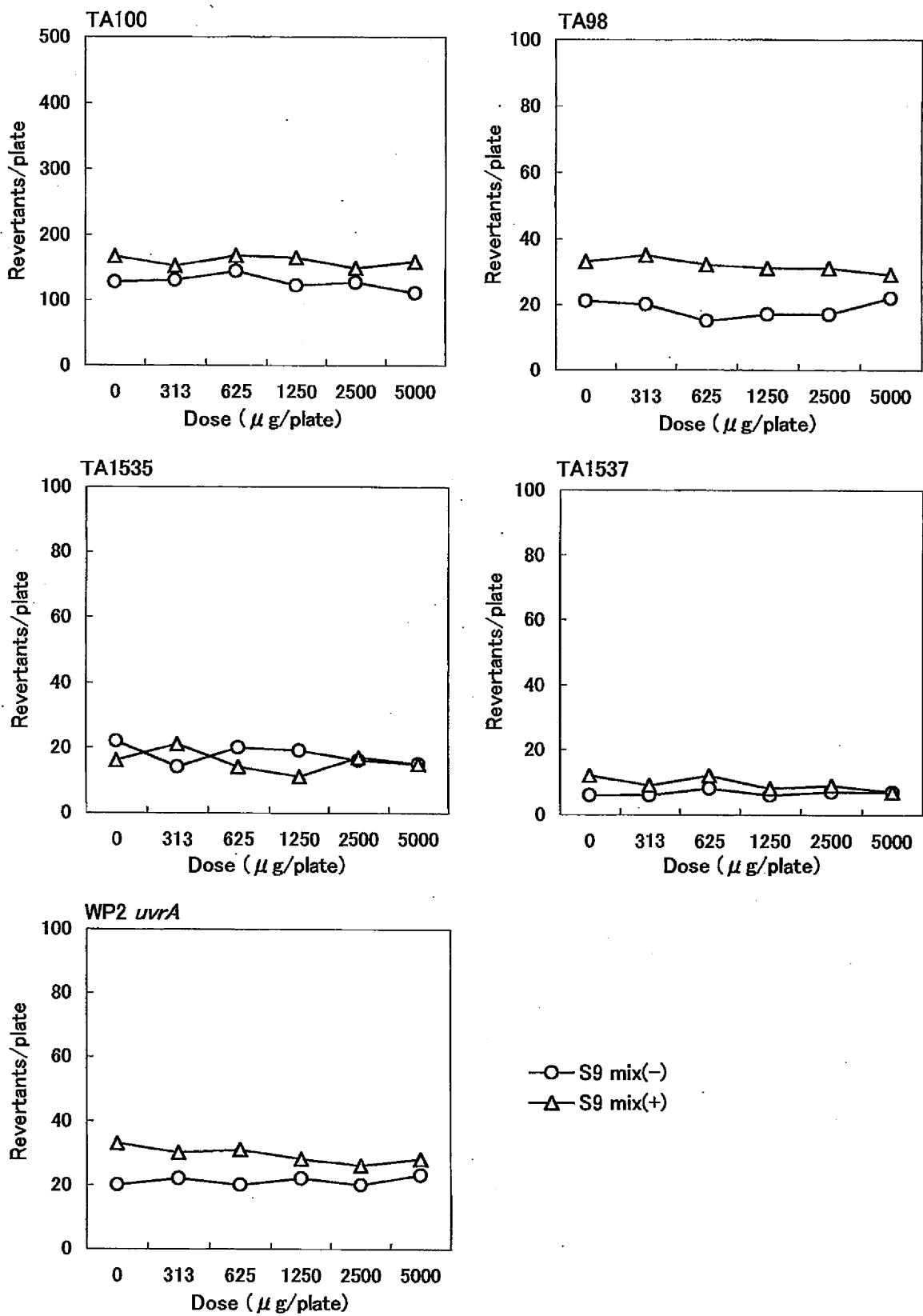


Figure 1. Dose response curves in mutagenicity test (I) of 1,3,5-tris(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzyl)isocyanuric acid in bacteria

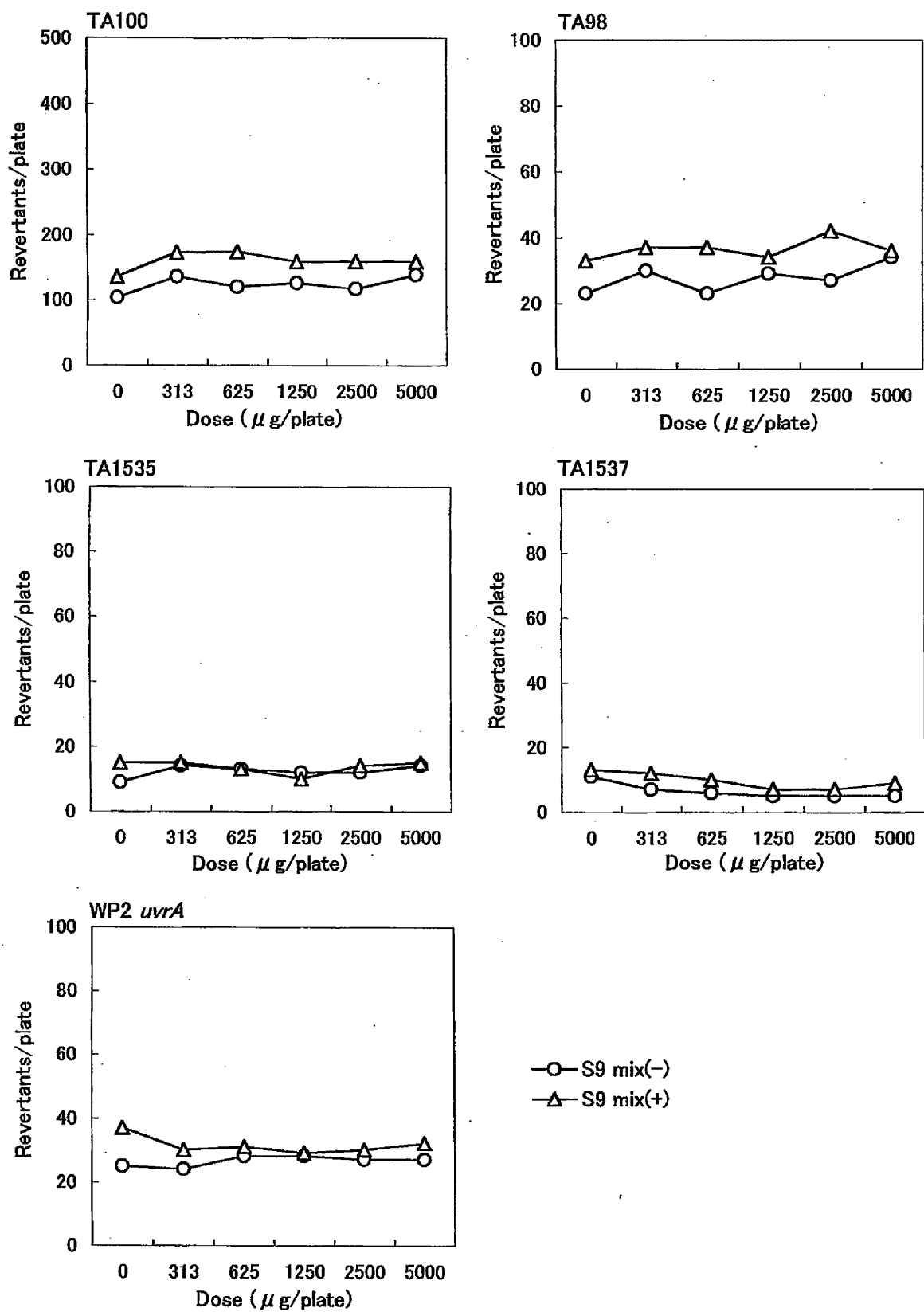


Figure 2. Dose response curves in mutagenicity test (II) of 1,3,5-tris(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzyl)isocyanuric acid in bacteria