



1-アミノアントラキノンの
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	7
参 考 文 献	9
Tables 1～3	

【要 約】

1-アミノアントラキノ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、用量設定試験を 50～5000 μg /プレート の用量で行ったところ、抗菌性が認められなかったことから、本試験は 312.5～5000 μg /プレート の用量で実施した。

その結果、2 回の本試験において、TA1537 の代謝活性化法において、陰性対照群の 2 倍以上となる変異コロニー数の増加が認められたことから、1-アミノアントラキノンは、用いた試験系において変異原性を有する（陽性）と判定された。

【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-アミノアントラキノンについて、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毒性試験ガイドライン：471, 472に準拠し、化学物質GLP基準（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 *uvrA*
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 *uvrA* 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。各検定菌は、凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、および膜変異 (*rfa*) とアンピシリン耐性因子 (*pKM101*) の有無についての特性確認を行った。

試験に際して、ニュートリエントブロスNo.2 (Oxoid) を入れたL字型試験管に種菌を接種し、 37°C 、10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〕

1-アミノアントラキノン (CAS No. 82-45-1、以下 A A Q と略) は、分子量 223.2 の赤色粉末である。純度 98.7%のもの (ロット番号：) 不純物：アントラキノン 1.3%、) を から供与された。被験物質は、使用時まで室温遮光条件下で保管した。

A A Q は、ジメチルスルホキシド (以下 DMSO と略、ロット番号：APJ3434、和光純薬工業株) に 50 mg/ml になるように調製した後、同溶媒で更に公比 2 ないし約 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、DMSO 懸濁液中での安定性試験を低濃度 (3.125 mg/ml) および高濃度 (50 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、99.0 および 99.2%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Ⅱに用いた調製検体について、含量測定試験を行った結果、3.125 mg/ml 溶液の含量は既定濃度に対し、100～102%、50 mg/ml 溶液は、97.5～99.8%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、AAQはDMSO懸濁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。

AF2	： フリルアマイド	（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%以上）
9AA	： 9-アミノアクリン	（Sigma Chem. Co.	ロット番号 96F05641,	純度98%以上）
2AA	： 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%以上）

AF2, 2AA 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。9AA 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) バクアガー（Difco）	0.6%	(B) L-ヒスチジン	0.5 mM
塩化ナトリウム	0.5%	ピリン	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：DJ030JI、1993年10月4日製造、本試験においては、ロット番号：DJ040LI およびDJ010AJ、1993年12月18日および1994年1月10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	水酸ナトリウム	0.66 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	バクアガー (Difco)	15 g
リン酸一アンモニウム	1.92 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	ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μmol
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-297 および RAA-304、1993年8月27日および1994年1月28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 Table 1～3 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 に示した。AAQについて、50～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で公比を約3とし、試験を実施したところ、いずれの検定菌においても、すべての用量で抗菌性は認められなかった。500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で被験物質に由来する沈殿物が直接法、代謝活性化法ともに認められた。

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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とすることとした。

〔本試験〕

結果を Table 2、3 に示した。AAQ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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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、TA1537の代謝活性化法において、陰性対照の2倍以上となる再現性のある変異コロニー数の増加が認められた。また、TA1535の代謝活性化法で、陰性対照の2倍以上となる群が1回目の試験において認められた。なお、すべての用量で被験物質に由来する沈殿物が直接法、代謝活性化法ともに認められた。

AAQにはアントラキノン（以下AQと略）が不純物として約1.3%含まれている。AQはTA1537の代謝活性化法により、陽性の結果が得られている。⁽³⁾ そのため、以上の結果は不純物として含まれたAQによることも考えられる。

AAQ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、本試験系の有効性が確認された。

以上の結果に基づき、AAQは、用いた試験系において変異原性を有するもの（陽性）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.
- (3) Krivobok, S., Seigle-Murandi, F., Steiman, R., Marzin, D.R. and Betina, V. : Mutation Research. 279: 1-8 (1992)

Table 1. Results of preliminary cytotoxicity test in reverse mutation test of 1-Aminoanthraquinone** on bacteria

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	112	83	88	14	14	6	22	24	27	30	18	22	6	6	11	
		(94 \pm 15.5)			(11 \pm 4.6)			(24 \pm 2.5)			(23 \pm 6.1)			(8 \pm 2.9)			
	50	95			7			19			18			8			
	150	93			4			18			23			7			
	500 #	94			12			16			19			5			
	1500 #	96			10			14			14			10			
	5000 #	82			9			9			22			9			
S9Mix (+)	0	108	94	118	15	15	17	25	21	23	33	25	33	11	9	16	
		(107 \pm 12.1)			(16 \pm 1.2)			(23 \pm 2.0)			(30 \pm 4.6)			(12 \pm 3.6)			
	50	187			17			13			26			39			
	150	190			8			26			46			34			
	500 #	185			18			11			40			26			
	1500 #	192			17			15			29			36			
	5000 #	146			17			21			57			36			
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			
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	359	365	347	209	215	208	141	107	98	695	711	756	1328	1216	1274	
		(357 \pm 9.2)			(211 \pm 3.8)			(115 \pm 22.7)			(721 \pm 31.6)			(1273 \pm 56.0)			
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	718	721	647	194	188	199	1100	1225	1091	386	371	409	271	272	258	
		(695 \pm 41.9)			(194 \pm 5.5)			(1139 \pm 74.9)			(389 \pm 19.1)			(267 \pm 7.8)			

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. **: Purity was 98.7 % and anthraquinone was contained as impurity.

Table 2. Results of reverse mutation test (I) of 1-Aminoanthraquinone** on bacteria

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	108	94	118	10	10	9	24	16	23	20	23	19	5	8	8
		(107 \pm 12.1)			(10 \pm 0.6)			(21 \pm 4.4)			(21 \pm 2.1)			(7 \pm 1.7)		
	312.5 #	89	81	104	13	14	18	21	19	16	15	20	15	8	7	10
		(91 \pm 11.7)			(15 \pm 2.6)			(19 \pm 2.5)			(17 \pm 2.9)			(8 \pm 1.5)		
	625 #	103	102	101	8	13	10	25	19	26	13	26	17	10	3	4
		(102 \pm 1.0)			(10 \pm 2.5)			(23 \pm 3.8)			(19 \pm 6.7)			(6 \pm 3.8)		
	1250 #	115	93	106	9	10	8	22	19	22	23	16	23	5	5	5
	(105 \pm 11.1)			(9 \pm 1.0)			(21 \pm 1.7)			(21 \pm 4.0)			(5 \pm 0.0)			
2500 #	93	127	111	10	10	11	23	22	16	18	13	17	8	7	7	
	(110 \pm 17.0)			(10 \pm 0.6)			(20 \pm 3.8)			(16 \pm 2.6)			(7 \pm 0.6)			
5000 #	91	90	103	4	8	8	16	15	9	19	19	18	15	6	4	
	(95 \pm 7.2)			(7 \pm 2.3)			(13 \pm 3.8)			(19 \pm 0.6)			(8 \pm 5.9)			
S9Mix (+)	0	96	101	101	7	14	4	26	14	18	31	37	31	12	8	8
		(99 \pm 2.9)			(8 \pm 5.1)			(19 \pm 6.1)			(33 \pm 3.5)			(9 \pm 2.3)		
	312.5 #	139	136	145	9	11	11	25	32	32	34	35	31	43	38	37
		(140 \pm 4.6)			(10 \pm 1.2)			(30 \pm 4.0)			(33 \pm 2.1)			(39 \pm 3.2)		
	625 #	141	155	168	17	10	10	21	27	30	51	36	41	31	44	33
		(155 \pm 13.5)			(12 \pm 4.0)			(26 \pm 4.6)			(43 \pm 7.6)			(36 \pm 7.0)		
	1250 #	131	181	183	25	17	8	21	22	32	23	38	43	34	33	33
	(165 \pm 29.5)			(17 \pm 8.5)			(25 \pm 6.1)			(35 \pm 10.4)			(33 \pm 0.6)			
2500 #	169	161	189	12	16	14	27	25	24	35	27	24	35	23	36	
	(173 \pm 14.4)			(14 \pm 2.0)			(25 \pm 1.5)			(29 \pm 5.7)			(31 \pm 7.2)			
5000 #	170	147	141	16	21	14	18	28	35	33	49	41	33	32	33	
	(153 \pm 15.3)			(17 \pm 3.6)			(27 \pm 8.5)			(41 \pm 8.0)			(33 \pm 0.6)			
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	304	371	371	390	384	389	190	187	173	799	769	736	2043	1821	1752
		(349 \pm 38.7)			(388 \pm 3.2)			(183 \pm 9.1)			(768 \pm 31.5)			(1872 \pm 152.1)		
	Number of colonies / plate	795	824	896	279	300	319	1359	1201	1324	467	504	447	301	243	257
		(838 \pm 52.0)			(299 \pm 20.0)			(1295 \pm 83.0)			(473 \pm 28.9)			(267 \pm 30.3)		

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. **: Purity was 98.7 % and anthraquinone was contained as impurity.

Table 3. Results of reverse mutation test (II) of 1- Aminoanthraquinone** on bacteria

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	125	137	125	12	10	17	16	19	23	14	16	16	10	11	6	
		(129 \pm 6.9)			(13 \pm 3.6)			(19 \pm 3.5)			(15 \pm 1.2)			(9 \pm 2.6)			
	312.5 #	119	123	103	8	14	11	22	17	19	20	15	18	11	5	7	
		(115 \pm 10.6)			(11 \pm 3.0)			(19 \pm 2.5)			(18 \pm 2.5)			(8 \pm 3.1)			
	625 #	134	124	132	7	14	23	20	17	16	18	17	21	9	15	8	
		(130 \pm 5.3)			(15 \pm 8.0)			(18 \pm 2.1)			(19 \pm 2.1)			(11 \pm 3.8)			
	1250 #	89	95	105	9	12	13	20	9	17	14	14	16	4	9	11	
		(96 \pm 8.1)			(11 \pm 2.1)			(15 \pm 5.7)			(15 \pm 1.2)			(8 \pm 3.6)			
2500 #	85	81	89	12	9	14	16	18	15	20	17	18	9	8	8		
	(85 \pm 4.0)			(12 \pm 2.5)			(16 \pm 1.5)			(18 \pm 1.5)			(8 \pm 0.6)				
5000 #	98	92	97	14	15	13	19	14	20	19	15	17	11	8	2		
	(96 \pm 3.2)			(14 \pm 1.0)			(18 \pm 3.2)			(17 \pm 2.0)			(7 \pm 4.6)				
S9Mix (+)	0	127	129	125	20	12	13	30	26	26	34	25	30	17	12	18	
		(127 \pm 2.0)			(15 \pm 4.4)			(27 \pm 2.3)			(30 \pm 4.5)			(16 \pm 3.2)			
	312.5 #	164	191	159	25	11	15	27	28	30	28	31	15	54	44	34	
		(171 \pm 17.2)			(17 \pm 7.2)			(28 \pm 1.5)			(25 \pm 8.5)			(44 \pm 10.0)			
	625 #	170	193	216	19	11	20	18	28	31	25	33	33	32	27	35	
		(193 \pm 23.0)			(17 \pm 4.9)			(26 \pm 6.8)			(30 \pm 4.6)			(31 \pm 4.0)			
	1250 #	160	184	174	25	17	18	38	21	21	27	33	28	28	39	40	
		(173 \pm 12.1)			(20 \pm 4.4)			(27 \pm 9.8)			(29 \pm 3.2)			(36 \pm 6.7)			
2500 #	172	177	179	20	19	15	17	16	22	35	20	27	29	39	32		
	(176 \pm 3.6)			(18 \pm 2.6)			(18 \pm 3.2)			(27 \pm 7.5)			(33 \pm 5.1)				
5000 #	183	164	162	10	13	16	35	33	25	29	30	27	28	28	30		
	(170 \pm 11.6)			(13 \pm 3.0)			(31 \pm 5.3)			(29 \pm 1.5)			(29 \pm 1.2)				
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	549	573	569	321	293	300	166	160	163	854	888	805	1711	1713	1769	
		(564 \pm 12.9)			(305 \pm 14.6)			(163 \pm 3.0)			(849 \pm 41.7)			(1731 \pm 32.9)			
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose (μg /plate)	1			2			10			0.5			2			
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	1211	1017	1138	254	316	323	1612	1784	1893	610	614	578	279	259	233	
		(1122 \pm 98.0)			(298 \pm 38.0)			(1763 \pm 141.7)			(601 \pm 19.7)			(257 \pm 23.1)			

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. **: Purity was 98.7 % and anthraquinone was contained as impurity.