



4-ヒドロキシ安息香酸
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 班

【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
結 論	7
特 記 事 項	8
文 献	8
Tables 1~3	

【要 約】

4-ヒドロキシ安息香酸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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で行ったところ、S9 mix 無添加試験においては、TA98とTA1537では5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で抗菌性が認められた。またS9 mix 添加試験においては、TA1537では1500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上で抗菌性が認められた。そのため、本試験の最高用量を5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (TA1537のS9 mix 添加試験は2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$) とした。しかし、TA1537のS9 mix 添加試験においては、本試験Iで最高用量の2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ でも抗菌性が認められなかったため、最高用量を5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ に上げて本試験Iをやり直した。したがって、本試験はいずれの菌株においても、S9 mix 無添加試験および添加試験ともに、最高用量を5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ として、公比2で5~7用量を設定して実施した。

その結果、用いた5種類の検定菌のいずれの用量においても、溶媒対照値の2倍以上となる再現性のある復帰変異コロニー数の増加は認められなかったことから、4-ヒドロキシ安息香酸は、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、4-ヒドロキシ安息香酸について、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¹⁾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²⁾、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^{3, 4)}を指標とした変異原性の検出系である。

試験は、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素（S9 mix）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、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
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ものを用い、各菌株の特性確認は、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 pKM 101 (プラスミド) の有無について調べ、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) 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°C で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〕

4-ヒドロキシ安息香酸 (略称: HBA、CAS No. 99-96-7) は、分子量 138.12 の白色結晶性粉末 (受領時: 白色粉末) である。構造式等は Appendix に示した。用いた被験物質は、ロット番号 純度 99.7 wt% (不純物: 0.02 wt% サリチル酸、0.03 wt% 4-ヒドロキシイソフタル酸) 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。

HBAは、ジメチルスルホキシド (DMSO、ロット番号: ESK4546、和光純薬工業(株)) に溶解して最高濃度の調製液を調製した後、同溶媒で公比約3ないし2で希釈し、速やかに試験に用いた。

〔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	: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (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-アミノアクリジン (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 および 2AA は DMSO (和光純薬工業(株)) に溶解したものを -20°C で凍結保存し、用時解凍した。9AA は DMSO に、SA は純水に溶解し、速やかに試験に用いた。

〔培地および S9 mix 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%	D-ビオチン	0.5 mM

* : WP2 *uvrA* 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、極東製薬工業(株)製の最少寒天培地 (ロット番号: HY0302、1995年9月29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	水酸化ナトリウム	0.66 g
クエン酸・1水和物	2 g	グルコース	20 g
リン酸水素二カルシウム	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 mix (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-333、1995年9月8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、ラットの解剖および S9 の調製は5日目であった。

[試験方法]

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分間往復振とう培養したのち、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、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各Table 中に示した。溶媒および陽性対照群は、同時に実施した他の試験と共通とした。培養は37°C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、溶媒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、結果の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 S9 mix 無添加あるいは 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変異コロニー数の平均値が、溶媒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。ただし、2回の本試験の一方でのみ変異コロニー数の平均値が溶媒対照値の2倍以上となる用量が認められた場合において、その溶媒対照値が10以下であり、変異コロニー数の増加に用量依存性が認められない場合は陰性とする事とした。

【結果および考察】

〔用量設定試験〕

HBAについて 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、S9 mix 無添加試験においては、TA98 と TA1537 では 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で、S9 mix 添加試験においては、TA1537 では 1500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上で抗菌性が認められた。

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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (TA1537 の S9 mix 添加試験は 2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$) とした。しかし、TA1537 の S9 mix 添加試験においては、本試験 I で最高用量の 2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ でも抗菌性が認められなかったため、最高用量を 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ として本試験 I をやり直し、その結果を本試験 I の結果として用いた。

〔本試験〕

S9 mix 無添加試験および添加試験ともに、いずれの菌株においても最高用量を 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ として公比2で5~7用量を設定して2回の本試験を実施した (Table 2、3)。その結果、いずれの検定菌においても、溶媒対照値の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。

HBAについて実施したすべての試験において、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、溶媒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。

【結 論】

以上の結果に基づき、4-ヒドロキシ安息香酸は、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。

【特記事項】

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。

【文献】

- 1) Matsushima, T., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A., Sawamura, M.: in "Short-Term Test Systems for Detecting Carcinogens" Norpoth, K.H., Garner, R.C. eds. Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1980) pp. 273-285
- 2) Maron, D.M., Ames, B.N.: *Mutat. Res.* 113: 173-215 (1983)
- 3) Venitt, S., Crofton-Sleigh, C.: in "Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens" de Serres, F.J., Ashby, J. eds, Elsevier/North-Holland, New York (1981) pp. 351-360
- 4) Green, M.H.L.: in "Handbook of Mutagenicity Test Procedures" Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C. eds, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford (1984) pp. 161-187

Table 1. Results of preliminary cytotoxicity test in reverse mutation test of 4-hydroxybenzoic acid 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			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537			
S9mix (-)	0	165	130	140	6	24	20	28	27	14	26	35	28	9	8	8	
		(145 \pm 18.0)			(17 \pm 9.5)			(23 \pm 7.8)			(30 \pm 4.7)			(8 \pm 0.6)			
	50.0	180			18			31			27			15			
	150	176			8			17			28			9			
	500	174			13			29			26			10			
	1500	136			11			23			31			15			
	5000 c	136			18			23			24 *			5 *			
S9mix (+)	0	175	132	131	8	12	13	32	19	29	32	20	28	14	18	10	
		(146 \pm 25.1)			(11 \pm 2.6)			(27 \pm 6.8)			(27 \pm 6.1)			(14 \pm 4.0)			
	50.0	164			19			17			37			7			
	150	179			10			22			30			17			
	500	149			12			22			34			22			
	1500 c	121			6			22			37			18 *			
	5000 c	179			13			26			26			15 *			
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	492	440	486	323	374	306	144	124	125	744	717	710	1023	1065	1065	
		(473 \pm 28.4)			(334 \pm 35.4)			(131 \pm 11.3)			(724 \pm 18.0)			(1051 \pm 24.2)			
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose (μg /plate)	1			2			10			0.5			2			
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	832	827	800	264	234	231	672	603	604	316	305	287	312	324	334	
		(820 \pm 17.2)			(243 \pm 18.2)			(626 \pm 39.6)			(303 \pm 14.6)			(323 \pm 11.0)			

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

Purity was 99.7 wt% and 0.02 wt% salicylic acid and 0.03 wt% 4-hydroxyisophthalic acid were contained as impurities.

Table 2. Results of reverse mutation test (I) of 4-hydroxybenzoic acid on 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			
S9mix (-)	0	127	141	125	12	11	13	14	26	20	19	21	25	14	16	21	
		(131 ± 8.7)			(12 ± 1.0)			(20 ± 6.0)			(22 ± 3.1)			(17 ± 3.6)			
	78.1	ND			ND			ND			20	25	23	8	16	16	
											(23 ± 2.5)			(13 ± 4.6)			
	156	ND			ND			ND			29	23	31	15	16	10	
											(28 ± 4.2)			(14 ± 3.2)			
	313	119	112	118	15	7	8	20	30	28	24	24	27	9	18	17	
		(116 ± 3.8)			(10 ± 4.4)			(26 ± 5.3)			(25 ± 1.7)			(15 ± 4.9)			
625	113	155	127	12	18	10	27	20	20	30	30	12	16	22	8		
	(132 ± 21.4)			(13 ± 4.2)			(22 ± 4.0)			(24 ± 10.4)			(15 ± 7.0)				
1250	144	133	136	10	14	11	32	19	19	25	35	28	8	8	13		
	(138 ± 5.7)			(12 ± 2.1)			(23 ± 7.5)			(29 ± 5.1)			(10 ± 2.9)				
2500	126	106	145	17	10	11	19	19	19	33	11	19	9	17	19		
	(126 ± 19.5)			(13 ± 3.8)			(19 ± 0.0)			(21 ± 11.1)			(15 ± 5.3)				
5000 c	97 *	107 *	110 *	6	10	14	27	24	30	18 *	4 *	7 *	5 *	5 *	3 *		
	(105 ± 6.8)			(10 ± 4.0)			(27 ± 3.0)			(10 ± 7.4)			(4 ± 1.2)				
S9mix (+)	0	148	123	157	9	14	6	19	23	15	33	29	34	17	16	18	
		(143 ± 17.6)			(10 ± 4.0)			(19 ± 4.0)			(32 ± 2.6)			(17 ± 1.0)			
	78.1	ND			ND			ND			ND			18	13	16	
														(16 ± 2.5)			
	156	ND			ND			ND			ND			16	15	18	
														(16 ± 1.5)			
	313	149	161	148	13	6	13	30	23	24	20	24	31	17	14	20	
		(153 ± 7.2)			(11 ± 4.0)			(26 ± 3.8)			(25 ± 5.6)			(17 ± 3.0)			
625	130	151	150	17	15	9	27	31	19	28	21	31	18	12	19		
	(144 ± 11.8)			(14 ± 4.2)			(26 ± 6.1)			(27 ± 5.1)			(16 ± 3.8)				
1250	157	163	115	6	12	11	30	19	15	32	36	23	17	31	25		
	(145 ± 26.2)			(10 ± 3.2)			(21 ± 7.8)			(30 ± 6.7)			(24 ± 7.0)				
2500 c	143	135	130	7	10	11	23	17	25	31	22	22	15	24	11		
	(136 ± 6.6)			(9 ± 2.1)			(22 ± 4.2)			(25 ± 5.2)			(17 ± 6.7)				
5000 c	155	114	140	8	14	8	30	18	24	27	26	31	17	17	23		
	(136 ± 20.7)			(10 ± 3.5)			(24 ± 6.0)			(28 ± 2.6)			(19 ± 3.5)				
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	824	614	766	292	328	268	491	516	467	361	396	349	464	399	392	
		(735 ± 108.4)			(296 ± 30.2)			(491 ± 24.5)			(369 ± 24.4)			(418 ± 39.7)			

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

Purity was 99.7 wt% and 0.02 wt% salicylic acid and 0.03 wt% 4-hydroxyisophthalic acid were contained as impurities.

ND : Not done

Table 3. Results of reverse mutation test (II) of 4-hydroxybenzoic acid 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			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537							
S9mix (-)	0	140	108	146	12	13	12	18	17	32	22	21	16	16	15	16	(131 \pm 20.4)	(12 \pm 0.6)	(22 \pm 8.4)	(20 \pm 3.2)	(16 \pm 0.6)
	78.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	22	14	22	11	16	19	(19 \pm 4.6)	(15 \pm 4.0)			
	156	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	26	12	26	22	19	18	(21 \pm 8.1)	(20 \pm 2.1)			
	313	115	130	130	6	18	8	24	18	23	22	22	17	17	13	13	(125 \pm 8.7)	(11 \pm 6.4)	(22 \pm 3.2)	(20 \pm 2.9)	(14 \pm 2.3)
	625	131	135	133	9	12	8	28	26	18	20	29	17	16	16	10	(133 \pm 2.0)	(10 \pm 2.1)	(24 \pm 5.3)	(22 \pm 6.2)	(14 \pm 3.5)
	1250	130	148	135	8	7	11	16	26	26	28	24	20	17	22	20	(138 \pm 9.3)	(9 \pm 2.1)	(23 \pm 5.8)	(24 \pm 4.0)	(20 \pm 2.5)
	2500	130	132	110	7	15	8	20	25	22	14	17	14	12	19	11	(124 \pm 12.2)	(10 \pm 4.4)	(22 \pm 2.5)	(15 \pm 1.7)	(14 \pm 4.4)
	5000 c	14 *	8 *	16 *	3	7	8	21	33	19	0 *	0 *	0 *	3 *	10 *	3 *	(13 \pm 4.2)	(6 \pm 2.6)	(24 \pm 7.6)	(0 \pm 0.0)	(5 \pm 4.0)
S9mix (+)	0	131	143	142	12	17	14	28	23	30	27	34	26	25	11	22	(139 \pm 6.7)	(14 \pm 2.5)	(27 \pm 3.6)	(29 \pm 4.4)	(19 \pm 7.4)
	78.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	20	22	21					(21 \pm 1.0)
	156	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	16	20	28					(21 \pm 6.1)
	313	158	163	150	9	12	16	31	17	25	21	25	25	14	15	18	(157 \pm 6.6)	(12 \pm 3.5)	(24 \pm 7.0)	(24 \pm 2.3)	(16 \pm 2.1)
	625	152	147	148	13	13	9	26	32	32	20	16	24	25	17	20	(149 \pm 2.6)	(12 \pm 2.3)	(30 \pm 3.5)	(20 \pm 4.0)	(21 \pm 4.0)
	1250	167	159	114	14	13	15	28	30	31	18	30	21	21	16	16	(147 \pm 28.6)	(14 \pm 1.0)	(30 \pm 1.5)	(23 \pm 6.2)	(18 \pm 2.9)
	2500	139	143	161	7	10	11	23	29	30	18	33	30	13	17	15	(148 \pm 11.7)	(9 \pm 2.1)	(27 \pm 3.8)	(27 \pm 7.9)	(15 \pm 2.0)
	5000 c	122	144	115	7	9	9	24	25	18	21	19	22	18	13	20	(127 \pm 15.1)	(8 \pm 1.2)	(22 \pm 3.8)	(21 \pm 1.5)	(17 \pm 3.6)
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	738	727	751	266	263	261	304	266	291	757	756	741	1214	852	1028	(739 \pm 12.0)	(263 \pm 2.5)	(287 \pm 19.3)	(751 \pm 9.0)	(1031 \pm 181.0)
	Number of colonies / plate	858	806	833	294	270	301	670	615	543	379	363	394	390	324	435	(832 \pm 26.0)	(288 \pm 16.3)	(609 \pm 63.7)	(379 \pm 15.5)	(383 \pm 55.8)

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

Purity was 99.7 wt% and 0.02 wt% salicylic acid and 0.03 wt% 4-hydroxyisophthalic acid were contained as impurities.

ND : Not done