

食薬セ研第11-1747号

2001年 7月19日

トリチル=クロリド
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
文 献	8
Tables 1 ~ 3	

【要 約】

トリチル=クロリド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、トリチル=クロリドは、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、トリチル=クロリドについて、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

トリチル＝クロリド (CAS No. 76-83-5) は、分子式 $C_{19}H_{15}Cl$ 、分子量 278.78 の微黄色結晶粉末である。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 99.5 LC% 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) には溶解することおよび、水により分解することから、無水 DMSO 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。無水 DMSO は、DMSO (ロット番号: KSJ6393、和光純薬工業(株)) 100 mL にモレキュラーシーブス 3A 1/16 (ロット番号: WTG3461、和光純薬工業(株)) 20 g を添加して水分を除去して調製した。調製時に、発熱、発泡、変色等の変化は認められなかった。被験物質の無水 DMSO 中での安定性試験を実施した (Appendix 2)。その結果、0.500 mg/mL の調製液では、調製直後で調製指示濃度の 30.0% に減少し、調製後 1 および 6 時間ではトリチル＝クロリドのピークは検出されなかった。一方、50.0 mg/mL の調製液では、調製直後で 95.0% が残存していたものの、調製後 1 および 6 時間ではそれぞれ 84.0% および 31.5% に減少した。

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℃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 3 に示した。

4. 試験材料

1) 合成培地

培地は、極東製薬工業㈱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) *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 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℃で20分間プレインキュベーションしたのち、トッパアガー 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、1500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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は、S9 mix 無添加試験および添加試験ともに 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。

被験物質の溶媒中での安定性試験の結果、0.500 mg/mL 調製液 (50.0 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ に相当) は調製後急速に分解されるが、50.0 mg/mL 調製液 (5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ に相当) は調製1時間後に 84.0%が残存していたことから、少なくとも高い用量では被験物質の影響を調べる事ができたものと考えられる。

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 4) 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。

トリチル=クロリドは、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、関連物質については、検索を行ったが、情報は得られなかった。

以上の結果に基づき、トリチル=クロリドは、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) : 「トリチル=クロリドのチャイニーズ・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11-1750号 (2001)

Table 1. Cytotoxicity of trityl chloride 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							
S9 mix (-)	0	148	153	157	15	10	7	36	33	32	21	42	21	13	11	13	(153 \pm 4.5)	(11 \pm 4.0)	(34 \pm 2.1)	(28 \pm 12.1)	(12 \pm 1.2)
	50.0	185			10			27			22			8							
	150	176			18			25			32			10							
	500	173			17			24			24			9							
	1500 †	181			18			20			23			11							
	5000 †	152			12			20			17			3							
S9 mix (+)	0	130	146	162	15	18	20	47	51	41	32	29	27	19	25	18	(146 \pm 16.0)	(18 \pm 2.5)	(46 \pm 5.0)	(29 \pm 2.5)	(21 \pm 3.8)
	50.0	166			16			29			51			24							
	150	180			15			45			40			20							
	500	189			18			30			44			19							
	1500 †	236			9			39			40			17							
	5000 †	201			12			46			35			19							
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	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 99.5LC%. This substance contained triphenylmethanol as impurity.

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 trityl chloride on 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	145	165	162	10	16	12	26	25	27	25	19	20	12	10	9	(157 \pm 10.8)	(13 \pm 3.1)	(26 \pm 1.0)	(21 \pm 3.2)	(10 \pm 1.5)	
	313	180	174	164	15	16	13	24	20	32	31	26	33	7	11	7	(173 \pm 8.1)	(15 \pm 1.5)	(25 \pm 6.1)	(30 \pm 3.6)	(8 \pm 2.3)	
	625	156	148	167	16	16	9	26	26	28	22	24	26	9	18	7	(157 \pm 9.5)	(14 \pm 4.0)	(27 \pm 1.2)	(24 \pm 2.0)	(11 \pm 5.9)	
	1250 †	143	134	177	15	10	6	39	26	22	22	29	24	14	8	11	(151 \pm 22.7)	(10 \pm 4.5)	(29 \pm 8.9)	(25 \pm 3.6)	(11 \pm 3.0)	
	2500 †	180	163	155	12	15	13	25	26	22	17	23	24	6	11	13	(166 \pm 12.8)	(13 \pm 1.5)	(24 \pm 2.1)	(21 \pm 3.8)	(10 \pm 3.6)	
	5000 †	131	133	167	11	14	15	25	20	21	24	19	24	7	9	12	(144 \pm 20.2)	(13 \pm 2.1)	(22 \pm 2.6)	(22 \pm 2.9)	(9 \pm 2.5)	
S9 mix (+)	0	167	172	149	18	10	19	31	36	36	41	32	30	12	18	16	(163 \pm 12.1)	(16 \pm 4.9)	(34 \pm 2.9)	(34 \pm 5.9)	(15 \pm 3.1)	
	313	178	188	191	10	21	21	41	53	34	41	46	26	21	17	17	(186 \pm 6.8)	(17 \pm 6.4)	(43 \pm 9.6)	(38 \pm 10.4)	(18 \pm 2.3)	
	625	190	205	176	8	12	14	28	48	43	36	29	31	14	17	13	(190 \pm 14.5)	(11 \pm 3.1)	(40 \pm 10.4)	(32 \pm 3.6)	(15 \pm 2.1)	
	1250	171	175	161	10	10	13	37	38	30	38	49	36	16	12	9	(169 \pm 7.2)	(11 \pm 1.7)	(35 \pm 4.4)	(41 \pm 7.0)	(12 \pm 3.5)	
	2500 †	174	173	176	11	8	7	36	39	33	33	32	29	11	17	22	(174 \pm 1.5)	(9 \pm 2.1)	(36 \pm 3.0)	(31 \pm 2.1)	(17 \pm 5.5)	
	5000 †	175	166	179	3	12	12	27	35	25	37	36	37	14	9	9	(173 \pm 6.7)	(9 \pm 5.2)	(29 \pm 5.3)	(37 \pm 0.6)	(11 \pm 2.9)	
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	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)	
		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 99.5LC%. This substance contained triphenylmethanol as impurity.

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 trityl chloride on bacteria (II)

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	182	144	147	10	12	12	26	27	40	22	30	22	14	8	15
		(158 ± 21.1)			(11 ± 1.2)			(31 ± 7.8)			(25 ± 4.6)			(12 ± 3.8)		
	313	171	160	147	20	15	14	31	26	28	25	21	17	7	17	10
		(159 ± 12.0)			(16 ± 3.2)			(28 ± 2.5)			(21 ± 4.0)			(11 ± 5.1)		
	625	183	172	166	8	10	12	22	32	27	24	10	22	12	14	11
		(174 ± 8.6)			(10 ± 2.0)			(27 ± 5.0)			(19 ± 7.6)			(12 ± 1.5)		
	1250 †	184	172	155	7	8	10	27	23	27	22	14	23	12	8	13
	(170 ± 14.6)			(8 ± 1.5)			(26 ± 2.3)			(20 ± 4.9)			(11 ± 2.6)			
2500 †	176	156	182	17	12	10	27	26	15	20	11	18	6	12	7	
	(171 ± 13.6)			(13 ± 3.6)			(23 ± 6.7)			(16 ± 4.7)			(8 ± 3.2)			
5000 †	157	148	160	11	10	8	16	21	27	14	20	31	8	8	4	
	(155 ± 6.2)			(10 ± 1.5)			(21 ± 5.5)			(22 ± 8.6)			(7 ± 2.3)			
S9 mix (+)	0	173	158	177	14	9	8	28	31	36	30	24	41	22	21	15
		(169 ± 10.0)			(10 ± 3.2)			(32 ± 4.0)			(32 ± 8.6)			(19 ± 3.8)		
	313	167	140	183	16	10	11	37	42	36	34	28	30	15	5	21
		(163 ± 21.7)			(12 ± 3.2)			(38 ± 3.2)			(31 ± 3.1)			(14 ± 8.1)		
	625	168	177	164	11	10	14	24	25	34	33	47	41	12	19	15
		(170 ± 6.7)			(12 ± 2.1)			(28 ± 5.5)			(40 ± 7.0)			(15 ± 3.5)		
	1250	170	167	155	12	11	15	24	40	37	35	32	30	22	11	13
	(164 ± 7.9)			(13 ± 2.1)			(34 ± 8.5)			(32 ± 2.5)			(15 ± 5.9)			
2500 †	178	154	156	14	10	13	29	30	33	33	28	25	23	11	11	
	(163 ± 13.3)			(12 ± 2.1)			(31 ± 2.1)			(29 ± 4.0)			(15 ± 6.9)			
5000 †	208	185	176	11	13	13	29	34	40	30	22	26	10	5	18	
	(190 ± 16.5)			(12 ± 1.2)			(34 ± 5.5)			(26 ± 4.0)			(11 ± 6.6)			
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		
Positive control S9 mix (-)	Number of colonies / plate	563	562	564	577	751	715	273	307	266	605	699	677	1118	1048	981
		(563 ± 1.0)			(681 ± 91.8)			(282 ± 21.9)			(660 ± 49.2)			(1049 ± 68.5)		
Positive control S9 mix (+)	Number of colonies / plate	1061	1328	1148	339	377	363	933	936	999	423	446	414	287	296	200
		(1179 ± 136.2)			(360 ± 19.2)			(956 ± 37.3)			(428 ± 16.5)			(261 ± 53.0)		

The purity of the test substance was 99.5LC%. This substance contained triphenylmethanol as impurity.

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.