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

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 μg/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 μg/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 μg/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 μg/プレート（TA1537 の S9 mix 添加試験は 2500 μg/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 μg/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 μg/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 μg/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℃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℃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㈱）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)ｱｸﾘﾙｱﾐﾄﾞ	(上野製薬㈱	ﾛｯﾄ番号 46,	純度99.9%)
SA	: ｱｼﾞ化ﾅﾄﾘｳﾑ	(和光純薬工業㈱	ﾛｯﾄ番号 TWR3330,	純度90%以上)
9AA	: 9-ｱﾐﾉｱｸﾘｼﾞﾝ	(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㈱	ﾛｯﾄ番号 DSF2950,	純度90%以上)

AF2 および 2AA は DMSO（和光純薬工業㈱）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) ﾊﾞｸﾄｱｶﾞｰ (Difco)	0.6%	(B)* L-ﾋｽﾁｼﾞﾝ	0.5 mM
塩化ﾅﾄﾘｳﾑ	0.5%	D-ﾋﾞｵﾁﾝ	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㈱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１ℓあたりの組成は下記のとおりである。

硫酸ﾏｸﾞﾈｼｳﾑ・7水和物	0.2ｇ	水酸化ﾅﾄﾘｳﾑ	0.66ｇ
ｸｴﾝ酸・1水和物	2 ｇ	ｸﾞﾙｺｰｽ	20ｇ
ﾘﾝ酸水素二ｶﾘｳﾑ	10ｇ	ﾊﾞｸﾄｱｶﾞｰ (Difco)	15ｇ
ﾘﾝ酸一ｱﾝﾓﾆｳﾑ	1.92ｇ		

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 ㎖中下記の成分を含む）

S9**	0.1 ㎖	NADH	4 μmol
塩化ﾏｸﾞﾈｼｳﾑ	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
ｸﾞﾙｺｰｽ-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㈱、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 ㎖、リン酸緩衝液 0.5 ㎖（S9 mix 添加試験においては S9 mix 0.5 ㎖）、検定菌液 0.1 ㎖ を混合し、37℃で20分間往復振とう培養したのち、トップアガー2㎖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℃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こととした。

【結果および考察】

〔用量設定試験〕

ＨＢＡについて 50.0～5000 μg/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 μg/プレート で、S9 mix 添加試験においては、TA1537 では 1500 μg/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 μg/プレート（TA1537 の S9 mix 添加試験は 2500 μg/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 μg/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 μg/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 μg/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 ± S.D.)					
		Base - pair substitution type			Frameshift type		
		TA100	TA1535	WP2 *uvrA*	TA98	TA1537	
S9mix (-)	0	165 130 140 (145 ± 18.0)	6 24 20 (17 ± 9.5)	28 27 14 (23 ± 7.8)	26 35 28 (30 ± 4.7)	9 8 8 (8 ± 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 (146 ± 25.1)	8 12 13 (11 ± 2.6)	32 19 29 (27 ± 6.8)	32 20 28 (27 ± 6.1)	14 18 10 (14 ± 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 S9 mix (-)	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose (μg /plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
	Number of colonies / plate	492 440 486 (473 ± 28.4)	323 374 306 (334 ± 35.4)	144 124 125 (131 ± 11.3)	744 717 710 (724 ± 18.0)	1023 1065 1065 (1051 ± 24.2)	
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate	832 827 800 (820 ± 17.2)	264 234 231 (243 ± 18.2)	672 603 604 (626 ± 39.6)	316 305 287 (303 ± 14.6)	312 324 334 (323 ± 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 *uvrA*	TA98	TA1537	
S9mix (-)	0	127 141 125 (131 ± 8.7)	12 11 13 (12 ± 1.0)	14 26 20 (20 ± 6.0)	19 21 25 (22 ± 3.1)	14 16 21 (17 ± 3.6)	
	78.1	ND	ND	ND	20 25 23 (23 ± 2.5)	8 16 16 (13 ± 4.6)	
	156	ND	ND	ND	29 23 31 (28 ± 4.2)	15 16 10 (14 ± 3.2)	
	313	119 112 118 (116 ± 3.8)	15 7 8 (10 ± 4.4)	20 30 28 (26 ± 5.3)	24 24 27 (25 ± 1.7)	9 18 17 (15 ± 4.9)	
	625	113 155 127 (132 ± 21.4)	12 18 10 (13 ± 4.2)	27 20 20 (22 ± 4.0)	30 30 12 (24 ± 10.4)	16 22 8 (15 ± 7.0)	
	1250	144 133 136 (138 ± 5.7)	10 14 11 (12 ± 2.1)	32 19 19 (23 ± 7.5)	25 35 28 (29 ± 5.1)	8 8 13 (10 ± 2.9)	
	2500	126 106 145 (126 ± 19.5)	17 10 11 (13 ± 3.8)	19 19 19 (19 ± 0.0)	33 11 19 (21 ± 11.1)	9 17 19 (15 ± 5.3)	
	5000 c	97 * 107 * 110 * (105 ± 6.8)	6 10 14 (10 ± 4.0)	27 24 30 (27 ± 3.0)	18 * 4 * 7 * (10 ± 7.4)	5 * 5 * 3 * (4 ± 1.2)	
S9mix (+)	0	148 123 157 (143 ± 17.6)	9 14 6 (10 ± 4.0)	19 23 15 (19 ± 4.0)	33 29 34 (32 ± 2.6)	17 16 18 (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 (153 ± 7.2)	13 6 13 (11 ± 4.0)	30 23 24 (26 ± 3.8)	20 24 31 (25 ± 5.6)	17 14 20 (17 ± 3.0)	
	625	130 151 150 (144 ± 11.8)	17 15 9 (14 ± 4.2)	27 31 19 (26 ± 6.1)	28 21 31 (27 ± 5.1)	18 12 19 (16 ± 3.8)	
	1250	157 163 115 (145 ± 26.2)	6 12 11 (10 ± 3.2)	30 19 15 (21 ± 7.8)	32 36 23 (30 ± 6.7)	17 31 25 (24 ± 7.0)	
	2500 c	143 135 130 (136 ± 6.6)	7 10 11 (9 ± 2.1)	23 17 25 (22 ± 4.2)	31 22 22 (25 ± 5.2)	15 24 11 (17 ± 6.7)	
	5000 c	155 114 140 (136 ± 20.7)	8 14 8 (10 ± 3.5)	30 18 24 (24 ± 6.0)	27 26 31 (28 ± 2.6)	17 17 23 (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	
	Number of colonies / plate	839 894 827 (853 ± 35.7)	261 207 191 (220 ± 36.7)	491 612 552 (552 ± 60.5)	636 654 707 (666 ± 36.9)	1244 1349 1241 (1278 ± 61.5)	
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 (735 ± 108.4)	292 328 268 (296 ± 30.2)	491 516 467 (491 ± 24.5)	361 396 349 (369 ± 24.4)	464 399 392 (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 ± S.D.)					
		Base - pair substitution type			Frameshift type		
		TA100	TA1535	WP2 *uvrA*	TA98	TA1537	
S9mix (-)	0	140 108 146 (131 ± 20.4)	12 13 12 (12 ± 0.6)	18 17 32 (22 ± 8.4)	22 21 16 (20 ± 3.2)	16 15 16 (16 ± 0.6)	
	78.1	ND	ND	ND	22 14 22 (19 ± 4.6)	11 16 19 (15 ± 4.0)	
	156	ND	ND	ND	26 12 26 (21 ± 8.1)	22 19 18 (20 ± 2.1)	
	313	115 130 130 (125 ± 8.7)	6 18 8 (11 ± 6.4)	24 18 23 (22 ± 3.2)	22 22 17 (20 ± 2.9)	17 13 13 (14 ± 2.3)	
	625	131 135 133 (133 ± 2.0)	9 12 8 (10 ± 2.1)	28 26 18 (24 ± 5.3)	20 29 17 (22 ± 6.2)	16 16 10 (14 ± 3.5)	
	1250	130 148 135 (138 ± 9.3)	8 7 11 (9 ± 2.1)	16 26 26 (23 ± 5.8)	28 24 20 (24 ± 4.0)	17 22 20 (20 ± 2.5)	
	2500	130 132 110 (124 ± 12.2)	7 15 8 (10 ± 4.4)	20 25 22 (22 ± 2.5)	14 17 14 (15 ± 1.7)	12 19 11 (14 ± 4.4)	
	5000 c	14 * 8 * 16 * (13 ± 4.2)	3 7 8 (6 ± 2.6)	21 33 19 (24 ± 7.6)	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	3 * 10 * 3 * (5 ± 4.0)	
S9mix (+)	0	131 143 142 (139 ± 6.7)	12 17 14 (14 ± 2.5)	28 23 30 (27 ± 3.6)	27 34 26 (29 ± 4.4)	25 11 22 (19 ± 7.4)	
	78.1	ND	ND	ND	ND	20 22 21 (21 ± 1.0)	
	156	ND	ND	ND	ND	16 20 28 (21 ± 6.1)	
	313	158 163 150 (157 ± 6.6)	9 12 16 (12 ± 3.5)	31 17 25 (24 ± 7.0)	21 25 25 (24 ± 2.3)	14 15 18 (16 ± 2.1)	
	625	152 147 148 (149 ± 2.6)	13 13 9 (12 ± 2.3)	26 32 32 (30 ± 3.5)	20 16 24 (20 ± 4.0)	25 17 20 (21 ± 4.0)	
	1250	167 159 114 (147 ± 28.6)	14 13 15 (14 ± 1.0)	28 30 31 (30 ± 1.5)	18 30 21 (23 ± 6.2)	21 16 16 (18 ± 2.9)	
	2500	139 143 161 (148 ± 11.7)	7 10 11 (9 ± 2.1)	23 29 30 (27 ± 3.8)	18 33 30 (27 ± 7.9)	13 17 15 (15 ± 2.0)	
	5000 c	122 144 115 (127 ± 15.1)	7 9 9 (8 ± 1.2)	24 25 18 (22 ± 3.8)	21 19 22 (21 ± 1.5)	18 13 20 (17 ± 3.6)	
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose (μg /plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
	Number of colonies / plate	738 727 751 (739 ± 12.0)	266 263 261 (263 ± 2.5)	304 266 291 (287 ± 19.3)	757 756 741 (751 ± 9.0)	1214 852 1028 (1031 ± 181.0)	
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate	858 806 833 (832 ± 26.0)	294 270 301 (288 ± 16.3)	670 615 543 (609 ± 63.7)	379 363 394 (379 ± 15.5)	390 324 435 (383 ± 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