3－アミノベンゼンスルホン酸の
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

材料および試験方法 …… 3

試験結果および考察 …… 6

参　考　文　献 …… 8

Tables　　1～4

【要　　約】

3-アミノベンゼンスルホン酸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、用量設定試験は 50～5000 μg/プレート、本試験では 312.5～5000 μg/プレート の用量で試験を実施した。

その結果、2回の本試験とも、用いた5種類の検定菌について、いずれの用量でも復帰変異コロニー数の増加が認められなかったことから、3-アミノベンゼンスルホン酸は、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、難分解性既存化学物質の1つである、3-アミノベンゼンスルホン酸について、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変異[(2)]を指標とした変異原の検出系である。

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化学品試験法ガイドライン：471，472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。

【材料および試験方法】

〔検　定　菌〕

Salmonella typhimurium TA100
Salmonella typhimurium TA1535
Escherichia coli WP2 *uvr*A
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 *uvr*A 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。

試験に際して、ニュートリエントブロスNo.２（OXOID，ロット番号：B-1674/1 および B-1674/2）を入れたＬ字型試験管に種菌を接種し、37℃、約10～12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〕

3-アミノベンゼンスルホン酸（CAS No. 121-47-1、以下ＡＢＳと略）は、分子量 173.19 の白ないし薄い灰色の粉末である。純度 98.6%のもの（不純物としてスルファニル酸 0.3%を含む，ロット番号：　　）を　　から供与された。被験物質は、使用時まで密閉容器に入れ、湿気をさけて冷暗所に保管した。被験物質は、この状態で１年間安定であることが製造者によって確認されている。

ＡＢＳは、ジメチルスルホキシド（以下DMSOと略：ロット番号：TWP 5445 および APQ 5428 、和光純薬工業㈱）を用いて 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３で希釈したものを、速やかに試験に用いた。なお、調製にあたって、純度換算は行わなかった。

秦野研究所においてＡＢＳの DMSO 溶液中での安定性試験を行った。本試験における最高濃度（50 mg/mℓ）および最低濃度（３mg/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、初期値（０時間）の平均に対して、いずれも 101%であった。これらの値は、当研究所の基準を満たしていた（Appendix 1）。

また、本試験に用いた調製検体について、含量測定試験を行った結果、50 mg/mℓ 溶液の含量は既定濃度に対し、99.5～100%、3.125 mg/mℓ 溶液は、99.9～102%であった。これらの値も当研究所の基準を満たしていた（Appendix 2）。

以上の結果から、ＡＢＳは DMSO 溶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。

AF-2：ﾌﾘﾙﾌﾗﾏｲﾄﾞ	（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%）
9-AA：9-ｱﾐﾉｱｸﾘｼﾞﾝ	（Sigma Chem. Co.	ﾛｯﾄ番号 96F05641,	純度>98%）
2-AA：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%）

AF-2, 2-AA 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。9-AA は DMSO に、SA は蒸留水に溶解して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) 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%	ﾋﾞｵﾁﾝ	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：DJ040IH, 1992年９月４日製造、本試験においては、ロット番号：DJ060KH, 1992年11月10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	0.2 g	ﾘﾝ酸水素ｱﾝﾓﾆｳﾑﾅﾄﾘｳﾑ・4水和物	3.5 g
ｸｴﾝ酸・1水和物	2 g	ｸﾞﾙｺｰｽ	20 g
ﾘﾝ酸水素二ｶﾘｳﾑ	10 g	ﾊﾞｸﾄｱｶﾞｰ（Difco）	15 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
塩化ﾏｸﾞﾈｼｳﾑ	8 μmol	NADPH	4 μmol
塩化ｶﾘｳﾑ	33 μmol	0.2M リン酸緩衝液 (pH 7.4)	0.5 mℓ
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-280、1992年7月24日製造およびRAA-285、1992年11月20日製造）を -80℃で凍結保存し、用時に解凍した。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表中に示した。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復帰変異コロニー数が、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。ＡＢＳについて、50～5000 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ の範囲で、公比を約 3 とし、試験を実施したところ、すべての検定菌の直接法あるいは代謝活性化法のいずれにおいても、抗菌性は認められなかった。また被験物質に由来する、寒天平板上の沈殿物は代謝活性化法において、最高用量の 5000 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ 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直接法、代謝活性化法ともに、すべての検定菌において、5000 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ とし公比 2 で、5 用量を設定することとした。

〔本試験〕

結果を Tables 2、3 に示した。ＡＢＳについて 312.5～5000 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ の範囲で試験を実施した。2 回の試験を通して、1 回目の TA1537 の代謝活性化法の 625 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ において陰性対照の 2 倍となったほかは、用いた 5 種類の検定菌の直接法、代謝活性化法のいずれにおいても、陰性対照の 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。TA1537 の代謝活性化法については、再現性試験を実施することとした。

なお、代謝活性化法において、5000 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ の用量で被験物質に由来する沈殿物が寒天平板上に認められた。

〔再現性試験〕

TA1537 の代謝活性化法については、再現性試験を実施した。結果を Table 4 に示したが、いずれの用量においても陰性対照の 2 倍以上となる変異コロニーの増加は認められなかった。本試験および再現性試験の結果から、TA1537 の代謝活性化法についても陰性であると判定した。

ＡＢＳ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、本試験に用いた各検定菌の感受性および各陽性対照物質の変異原活性についての安定性が確認された。

以上の結果に基づき、ＡＢＳ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) 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.

Table 1. Results of preliminary cytotoxicity test in bacterial reverse mutation assay with 3-aminobenzenesulfonic acid

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	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9Mix (-)	0	135 135 143 (138 ± 4.6)	10 12 9 (10 ± 1.5)	11 9 21 (14 ± 6.4)	16 23 21 (20 ± 3.6)	4 7 7 (6 ± 1.7)
	50	112	13	17	26	5
	150	136	12	16	25	8
	500	133	11	18	20	6
	1500	122	15	20	20	7
	5000	140	18	18	27	6
S9Mix (+)	0	133 123 135 (130 ± 6.4)	13 14 16 (14 ± 1.5)	11 12 13 (12 ± 1.0)	46 33 28 (36 ± 9.3)	9 10 5 (8 ± 2.6)
	50	103	10	12	30	12
	150	151	14	14	31	10
	500	156	18	14	28	9
	1500	140	18	17	30	9
	5000 #	147	20	22	36	8
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	563 548 568 (560 ± 10.4)	228 222 207 (219 ± 10.8)	143 141 158 (147 ± 9.3)	611 656 629 (632 ± 22.6)	2197 2105 2191 (2164 ± 51.5)
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
	Dose (μg / plate)	1	2	10	0.5	2
	Number of colonies / plate	705 764 802 (757 ± 48.9)	180 193 174 (182 ± 9.7)	471 406 447 (441 ± 32.9)	225 197 216 (213 ± 14.3)	226 185 193 (201 ± 21.7)

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.

Table 2. Results of bacterial reverse mutation assay (I) with 3-aminobenzenesulfonic acid

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	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9Mix (-)	0	120 156 140 (139 ± 18.0)	15 10 6 (10 ± 4.5)	13 22 23 (19 ± 5.5)	26 25 23 (25 ± 1.5)	11 6 8 (8 ± 2.5)
	312.5	134 146 113 (131 ± 16.7)	11 19 15 (15 ± 4.0)	19 17 16 (17 ± 1.5)	23 16 37 (25 ± 10.7)	7 6 6 (6 ± 0.6)
	625	142 101 124 (122 ± 20.6)	12 14 16 (14 ± 2.0)	19 16 20 (18 ± 2.1)	31 31 25 (29 ± 3.5)	11 9 7 (9 ± 2.0)
	1250	135 131 106 (124 ± 15.7)	16 13 18 (16 ± 2.5)	26 22 14 (21 ± 6.1)	24 30 23 (26 ± 3.8)	13 4 8 (8 ± 4.5)
	2500	139 146 116 (134 ± 15.7)	16 18 12 (15 ± 3.1)	21 19 15 (18 ± 3.1)	36 21 24 (27 ± 7.9)	6 9 8 (8 ± 1.5)
	5000	131 123 131 (128 ± 4.6)	7 9 19 (12 ± 6.4)	20 26 17 (21 ± 4.6)	17 27 38 (27 ± 10.5)	6 8 8 (7 ± 1.2)
S9Mix (+)	0	131 128 180 (146 ± 29.2)	17 17 14 (16 ± 1.7)	22 15 19 (19 ± 3.5)	49 38 34 (40 ± 7.8)	12 7 6 (8 ± 3.2)
	312.5	165 175 155 (165 ± 10.0)	14 6 11 (10 ± 4.0)	32 23 30 (28 ± 4.7)	57 47 51 (52 ± 5.0)	13 18 11 (14 ± 3.6)
	625	134 163 163 (153 ± 16.7)	13 9 12 (11 ± 2.1)	25 26 31 (27 ± 3.2)	49 53 50 (51 ± 2.1)	28 8 11 (16 ± 10.8)
	1250	155 138 156 (150 ± 10.1)	12 10 20 (14 ± 5.3)	24 23 20 (22 ± 2.1)	37 48 53 (46 ± 8.2)	9 14 7 (10 ± 3.6)
	2500	152 144 116 (137 ± 18.9)	13 18 17 (16 ± 2.6)	19 22 21 (21 ± 1.5)	31 45 53 (43 ± 11.1)	11 17 10 (13 ± 3.8)
	5000 #	121 144 126 (130 ± 12.1)	12 13 14 (13 ± 1.0)	26 31 26 (28 ± 2.9)	52 49 36 (46 ± 8.5)	6 14 9 (10 ± 4.0)
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	541 511 574 (542 ± 31.5)	147 155 195 (166 ± 25.7)	194 156 134 (161 ± 30.4)	809 792 868 (823 ± 39.9)	2215 2272 2464 (2317 ± 130.5)
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2
	Number of colonies / plate	938 827 882 (882 ± 55.5)	183 188 212 (194 ± 15.5)	912 958 957 (942 ± 26.3)	381 360 393 (378 ± 16.7)	298 276 276 (283 ± 12.7)

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.

Table 3. Results of bacterial reverse mutation assay (II) with 3-aminobenzenesulfonic acid

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	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix (-)	0	132 118 115 (122 ± 9.1)	27 18 10 (18 ± 8.5)	15 29 28 (24 ± 7.8)	23 26 30 (26 ± 3.5)	9 3 7 (6 ± 3.1)	
	312.5	135 131 116 (127 ± 10.0)	15 13 8 (12 ± 3.6)	34 24 17 (25 ± 8.5)	18 19 24 (20 ± 3.2)	12 7 10 (10 ± 2.5)	
	625	129 145 124 (133 ± 11.0)	15 12 12 (13 ± 1.7)	21 22 27 (23 ± 3.2)	26 17 18 (20 ± 4.9)	4 3 9 (5 ± 3.2)	
	1250	132 138 114 (128 ± 12.5)	16 18 9 (14 ± 4.7)	22 14 19 (18 ± 4.0)	26 15 18 (20 ± 5.7)	9 11 6 (9 ± 2.5)	
	2500	146 103 126 (125 ± 21.5)	18 17 13 (16 ± 2.6)	22 24 24 (23 ± 1.2)	32 23 20 (25 ± 6.2)	8 2 2 (4 ± 3.5)	
	5000	116 131 96 (114 ± 17.6)	10 12 14 (12 ± 2.0)	27 21 22 (23 ± 3.2)	23 18 27 (23 ± 4.5)	11 1 9 (7 ± 5.3)	
S9Mix (+)	0	120 147 114 (127 ± 17.6)	15 18 15 (16 ± 1.7)	21 24 32 (26 ± 5.7)	31 26 39 (32 ± 6.6)	12 10 9 (10 ± 1.5)	
	312.5	114 136 154 (135 ± 20.0)	20 18 19 (19 ± 1.0)	21 15 24 (20 ± 4.6)	39 37 32 (36 ± 3.6)	15 17 20 (17 ± 2.5)	
	625	136 124 164 (141 ± 20.5)	15 14 15 (15 ± 0.6)	32 26 27 (28 ± 3.2)	25 28 38 (30 ± 6.8)	11 11 12 (11 ± 0.6)	
	1250	125 134 138 (132 ± 6.7)	18 13 11 (14 ± 3.6)	32 21 27 (27 ± 5.5)	30 36 29 (32 ± 3.8)	17 10 9 (12 ± 4.4)	
	2500	136 125 135 (132 ± 6.1)	21 14 14 (16 ± 4.0)	29 22 21 (24 ± 4.4)	38 36 26 (33 ± 6.4)	14 14 13 (14 ± 0.6)	
	5000 #	151 126 137 (138 ± 12.5)	13 14 17 (15 ± 2.1)	21 23 29 (24 ± 4.2)	34 38 35 (36 ± 2.1)	17 18 13 (16 ± 2.6)	
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	506 535 507 (516 ± 16.5)	147 148 154 (150 ± 3.8)	155 166 164 (162 ± 5.9)	774 824 787 (795 ± 25.9)	2303 2406 2413 (2374 ± 61.6)	
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate	866 875 884 (875 ± 9.0)	270 254 292 (272 ± 19.1)	1025 1045 1065 (1045 ± 20.0)	392 376 406 (391 ± 15.0)	278 263 273 (271 ± 7.6)	

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.

Table 4. Results of bacterial reverse mutation assay (III) with 3-aminobenzenesulfonic acid

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	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix (-)							
S9Mix (+)	0					13 13 8 (11 ± 2.9)	
	312.5					9 14 9 (11 ± 2.9)	
	625					14 15 12 (14 ± 1.5)	
	1250					14 16 10 (13 ± 3.1)	
	2500					12 21 16 (16 ± 4.5)	
	5000					11 10 15 (12 ± 2.6)	
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						
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate					166 213 176 (185 ± 24.8)	

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