

(試験番号：6L680)

厚生省生活衛生局 殿

試 験 報 告 書

4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸ナトリウムの細菌を用いる復帰突然変異試験

(試験番号：6L680)

株式会社三菱化学安全科学研究所

目 次

要 約	7
材料および方法	8
1. 試験物質	8
2. テスト菌株	8
3. 培 地	9
4. S9 mix	10
5. 試験方法	10
結果および結論	12
参考文献	12
表	13
図	16

要 約

4-アミノ-1-ナフトルスルホン酸ナトリウムについて、*Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 および *Escherichia coli* WP2uvrA の 5 菌株を指標とする復帰変異試験を実施した。

予備試験を 5000 ~ 1.22 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (公比 4) の 7 濃度で実施した結果、S9 mix の有無によらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数の増加および抗菌性は認められなかった。この結果をもとに、5000 ~ 313 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (公比 2) の 5 濃度を設定し、本試験を 2 回実施した。

本試験 1, 2 を実施した結果、S9 mix の有無によらず、いずれの菌株においても陰性 (溶媒) 対照値の 2 倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果から、4-アミノ-1-ナフトルスルホン酸ナトリウムは細菌を用いる復帰突然変異試験において変異原性を有さない (陰性) と結論した。

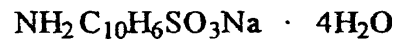
材料および方法

1. 試験物質

1.1 被験物質

から送付された 4-アミノ-1-ナフタルスルホン酸ナトリウム (CAS 番号：130-13-2, ロット番号：純度 76.1%) を室温に保存し、使用した。被験物質は下記の示性式、分子量を有する水に可溶の臭気等のない粉末である。試験に使用したロットの安定性は、実験開始前および実験終了後に被験物質供給者が分析し、確認した。

示性式：



分子量：245.22(無水)

不純物： α -ナフチルアミン 約 50 ppm

β -ナフチルアミン 10~20 ppm

1-アミノナフタレン-5-スルホン酸 約 0.1%

2-アミノナフタレン-6-スルホン酸 約 0.1~0.2%

(以上、全て概略値)

1.2 対照物質

陰性(溶媒)対照物質および陽性対照物質として、以下のものを用いた。

対照物質名	略称	入手先	ロット番号	純度(%)
陰性対照 注射用水	DW	(株)大塚製薬工場	K6C75	—
陽性対照 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド	AF-2	和光純薬工業(株)	PTQ1296	98.8
アジ化ナトリウム	NaN ₃	和光純薬工業(株)	KWE6685	96.5
N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン	ENNG	Sigma Chemical Company	56F-3651	99.0
9-アミノアクリジン	9-AA	Sigma Chemical Company	80F-0186	99
2-アミノアントラセン	2-AA	和光純薬工業(株)	TWH2355	98.0

2. テスト菌株^{1) 2)}

2.1 テスト菌株

教授より 1983 年 5 月 27 日に入手した *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 および
より 1985 年 10 月 14 日に入手した *Escherichia coli* WP2uvrA の 5 菌株を用いた。

これら菌株の遺伝的特性は以下のとおりである。

菌 株	変異遺伝子	付帯突然変異			突然変異型
		修復	膜	R 因子	
TA98	<i>hisD</i>	<i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	pKM101	フレームシフト
TA100	<i>hisG</i>	<i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	pKM101	塩基対置換
TA1535	<i>hisG</i>	<i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	—	塩基対置換
TA1537	<i>hisC</i>	<i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	—	フレームシフト
WP2 <i>uvrA</i>	<i>trpE</i>	<i>uvrA</i>	+	—	塩基対置換

2.2 特性検査

各テスト菌株のアミノ酸要求性、紫外線感受性、膜変異、薬剤耐性などの遺伝的特徴を事前に調べ、これらの特性を備えた菌株を用いた。

2.3 保存方法

液体完全培地中に 37℃ で 8 時間振盪培養した各菌懸濁液 4 ml に対し、0.35 ml の割合でジメチルスルホキシド (DMSO と略す；関東化学株、ロット番号 804S1844) を加えた。これを 200 μ l ずつ小分けしてドライアイス・アセトン中で急速凍結し、超低温槽で -80℃ 以下に凍結保存したものを使用した。

2.4 菌懸濁液

凍結保存した各菌懸濁液を解凍後、各々 20 μ l を液体完全培地 10 ml に接種し、37℃ で 8 時間振盪培養した。菌懸濁液は、濁度計を用いて菌濃度を測定し、各菌株共に生菌数が 1×10^9 /ml 以上であることを確認した。

3. 培 地

3.1 液体完全培地

精製水 1 l に対し、ニュートリエントブロス (Oxoid Nutrient Broth No.2；Unipath 社、ロット番号 067 54134) 25 g の割合で溶解し、オートクレーブ滅菌 (121℃、15 分間；以下同様) した。

3.2 最少グルコース寒天平板培地

クリメディア AM-N 培地 (オリエンタル酵母工業株、ロット番号 AN810JL) を購入し、使用した。

3.3 トップアガー

精製水 100 ml に対して、粉末寒天 (Bacto-Agar；Difco 社、ロット番号 58007AJA)

0.6 g, 塩化ナトリウム 0.5 g の割合で加え, オートクレーブ滅菌し完全に溶解した。その後, あらかじめ調製しておいた 0.5 mM D- ビオチン, L- ヒスチジン, L- トリプトファン混合水溶液を 1/10 量添加した。使用時まで約 45 °C に保温した。

4. S9 mix

4.1 S9

フェノバルビタール(1日目 30 mg/kg, 2日目以降 60 mg/kg を3回腹腔内投与)と5,6-ベンゾフラボン(3日目に 80 mg/kg を1回腹腔内投与)で酵素誘導したSD系雄ラット肝由来S9(キッコーマン㈱, ロット番号 RAA-355 : 1996年11月22日製造)を購入し, 使用した。使用時まで -80 °C 以下で保存した。

4.2 S9 mix

S9 mix 1 ml あたり以下の組成で調製し, 使用時まで氷中に保存した。

S9	0.1 ml
塩化マグネシウム六水塩	8 μ mol
塩化カリウム	33 μ mol
D-グルコース 6-リン酸	5 μ mol
β -NADPH	4 μ mol
β -NADH	4 μ mol
ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μ mol
滅菌精製水	残量

5. 試験方法 ³⁾

5.1 被験物質溶液および陽性対照物質溶液の調製

溶媒検討の結果, 50 mg/ml の濃度で水に溶解したため, 溶媒には注射用水 (DW) を用いた。被験物質を 50 mg/ml の濃度で DW に溶解し, メンブランフィルターで濾過滅菌した後, これを希釈して各濃度の被験物質溶液を調製した。被験物質の秤量に際しては純度換算 (76.1 %) を実施した。

陽性対照物質の NaN_3 は DW (㈱大塚製薬工場, ロット番号 K5G85) に, その他は DMSO (関東化学㈱, ロット番号 708S1611) に溶解した。

5.2 被験物質濃度

予備試験を 5000, 1250, 313, 78.1, 19.5, 4.88, 1.22 μ g/プレート の 7 濃度で実施した結果, S9 mix の有無によらず, いずれの菌株においても復帰変異コロニー数の増加および抗菌性は認められなかった。この結果をもとに, 本試験では 5000 ~ 313 μ g/プレート (公比 2) の 5 濃度を設定した。

5.3 復帰変異試験

試験はプレインキュベーション法で実施した。

滅菌した試験管に被験物質溶液 0.1 ml, 0.1 M ナトリウムーリン酸緩衝液 (pH7.4) 0.5 ml および菌懸濁液を 0.1 ml 加え, 37 °C で 20 分間振盪培養した。S9 mix を共存させる場合には, 0.1 M ナトリウムーリン酸緩衝液の代わりに, S9 mix を 0.5 ml 添加した。プレインキュベーション後, トップアガー 2 ml を上記の混合液に加え混和し, 最少グルコース寒天平板培地上に重層した。重層したトップアガーが凝固した後, 37 °C で 48 時間培養した。

実体顕微鏡を用いて菌叢の生育状態を観察し, 被験物質による抗菌性の有無を調べた後, プレート上の復帰変異コロニー数を自動コロニーカウンターで計測した。予備試験は各濃度につき 1 枚のプレートを使用した。本試験は各濃度につき 3 枚のプレートを使用し, 再現性を確認するため 2 回実施した。

陰性 (溶媒) 対照物質および以下の陽性対照物質についても同様に実施した。

菌 株	S9 mix 非共存下 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)		S9 mix 共存下 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	
TA98	AF-2	0.1	2-AA	0.5
TA100	AF-2	0.01	2-AA	1
TA1535	NaN ₃	0.5	2-AA	2
TA1537	9-AA	80	2-AA	2
WP2uvrA	ENNG	2	2-AA	10

5.4 無菌試験

最高濃度の被験物質溶液または S9 mix をトップアガーと混和し, 最少グルコース寒天平板培地上に重層し, 雑菌の混入がないことを確認した。

5.5 試験結果の判定

いずれかの試験菌株で, S9 mix の有無によらず, 被験物質濃度の増加にともなって復帰変異コロニー数 (平均値) が陰性 (溶媒) 対照値の 2 倍以上に増加し, さらにその増加に再現性が認められる場合に, 当該被験物質は変異原性を有する (陽性) と判定した。その他の場合は陰性と判定した。試験結果の判定には統計学的手法は用いなかった。

結果および結論

結果を表1~3および図1~10に示す。

予備試験を5000, 1250, 313, 78.1, 19.5, 4.88, 1.22 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の各濃度で実施した結果、S9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数の増加および抗菌性は認められなかった。この結果をもとに、5000~313 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (公比2)の5濃度を設定し、本試験を2回実施した。

本試験1, 2を実施した結果、S9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても陰性(溶媒)対照値の2倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

なお、S9 mix非共存下および共存下において陽性対照が各菌株に誘発した復帰変異コロニー数は、各菌株の陰性対照の復帰変異コロニー数と比較して、明らかに2倍を超えて増加し、陽性の結果を示した。また、最高濃度の被験物質溶液およびS9 mixについて行った無菌試験の結果、試験の成立に影響を及ぼすような菌、カビ等の発育は認められなかった。

以上の結果から、4-アミノ-1-ナフトルスルホン酸ナトリウムは本試験条件下では変異原性を有さない(陰性)と結論した。

なお、同物質および類似化合物の細菌を用いる復帰突然変異試験に関する情報は添付資料1にまとめた。

参考文献

- 1) Maron, D.M. and Ames, B.N.(1983): Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutat. Res.*, 113, 173-215
- 2) Green, M.H.L., Muriel, W.J.(1976): Mutagen testing using *trp*⁺ reversion in *Escherichia coli*, *Mutat. Res.*, 38, 3-32
- 3) 労働省安全衛生部化学物質調査課編(1991): 安衛法における変異原性試験, 中央労働災害防止協会, 東京

表 1

予備試験結果表

被験物質の名称 : 4-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸ナトリウム (No. 6L680)

代謝活性化系の有無	被験物質濃度 ($\mu\text{g}/7^\circ\text{プレート}$)	復帰変異数(コロニー数/ 7°プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
S 9 Mix (-)	溶媒対照	159	9	23	19	10
	1. 2 2	166	11	20	19	17
	4. 8 8	167	12	28	12	7
	1 9. 5	134	13	23	29	13
	7 8. 1	171	14	18	13	12
	3 1 3	165	11	23	20	8
	1 2 5 0	156	6	24	15	17
	5 0 0 0	158	13	28	18	9
S 9 Mix (+)	溶媒対照	176	16	24	29	11
	1. 2 2	169	11	24	22	19
	4. 8 8	165	11	24	24	16
	1 9. 5	177	11	29	34	17
	7 8. 1	190	12	23	28	18
	3 1 3	163	12	26	29	16
	1 2 5 0	176	10	28	34	13
	5 0 0 0	193	17	29	27	19

(備考)

表 2

試験結果表 (本試験 1)

被験物質の名称 : 4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸ナトリウム (No. 6L680)

代謝活性化系の有無	被験物質濃度 (μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
S9 Mix (-)	溶媒対照	151 134 (±145) 149 (±9)	10 6 (±13) 22 (±8)	52 48 (±48) 43 (±5)	13 19 (±18) 21 (±4)	7 13 (±10) 9 (±3)	
	3 1 3	149 165 (±148) 131 (±17)	17 15 (±14) 10 (±4)	46 47 (±46) 46 (±1)	16 26 (±20) 19 (±5)	11 9 (±9) 7 (±2)	
	6 2 5	130 139 (±142) 158 (±14)	10 13 (±12) 13 (±2)	36 58 (±45) 40 (±12)	16 19 (±17) 16 (±2)	5 11 (±10) 13 (±4)	
	1 2 5 0	154 136 (±142) 137 (±10)	18 11 (±14) 12 (±4)	34 50 (±46) 53 (±10)	12 13 (±15) 19 (±4)	13 9 (±10) 8 (±3)	
	2 5 0 0	135 146 (±142) 144 (±6)	8 11 (±9) 9 (±2)	46 45 (±45) 43 (±2)	15 14 (±14) 13 (±1)	6 8 (±9) 12 (±3)	
	5 0 0 0	134 138 (±134) 131 (±4)	12 6 (±12) 17 (±6)	40 42 (±43) 47 (±4)	14 18 (±16) 17 (±2)	7 9 (±8) 8 (±1)	
S9 Mix (+)	溶媒対照	156 149 (±153) 154 (±4)	16 19 (±17) 17 (±2)	47 37 (±42) 42 (±5)	30 23 (±25) 21 (±5)	11 8 (±10) 11 (±2)	
	3 1 3	157 153 (±159) 167 (±7)	20 15 (±15) 11 (±5)	53 43 (±50) 54 (±6)	22 27 (±24) 22 (±3)	8 8 (±10) 13 (±3)	
	6 2 5	169 181 (±180) 190 (±11)	16 11 (±13) 13 (±3)	45 53 (±46) 41 (±6)	32 23 (±26) 23 (±5)	8 8 (±9) 11 (±2)	
	1 2 5 0	192 164 (±178) 177 (±14)	13 10 (±14) 19 (±5)	54 38 (±50) 57 (±10)	27 27 (±24) 17 (±6)	10 18 (±11) 5 (±7)	
	2 5 0 0	155 180 (±183) 215 (±30)	16 16 (±17) 19 (±2)	51 43 (±47) 48 (±4)	19 23 (±22) 24 (±3)	11 9 (±10) 11 (±1)	
	5 0 0 0	202 156 (±182) 189 (±24)	13 10 (±13) 17 (±4)	45 42 (±46) 50 (±4)	26 25 (±27) 30 (±3)	11 9 (±9) 8 (±2)	
陽性	S9 Mixを必要としなもの	名称	AF-2	NaN ₃	ENNG	AF-2	9-AA
	濃度 (μg/プレート)	0.01	0.5	2	0.1	80	
対照	S9 Mixを必要とするもの	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	濃度 (μg/プレート)	1	2	10	0.5	2	
		コロニー数 / プレート	799 740 (±750) 712 (±44)	405 382 (±421) 477 (±50)	648 541 (±578) 545 (±61)	748 687 (±704) 678 (±38)	529 354 (±431) 410 (±89)
		コロニー数 / プレート	1172 1253 (±1190) 1146 (±56)	422 412 (±423) 436 (±12)	1717 1747 (±1721) 1700 (±24)	475 433 (±424) 365 (±56)	179 137 (±167) 186 (±27)

(備考)

(平均値)
(±標準偏差)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド, NaN₃ : アジ化ナトリウム,
ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン, 9-AA : 9-アミノアクリジン, 2-AA : 2-アミノアントラセン

表 3

試験結果表 (本試験 2)

被験物質の名称 : 4-アミノ-1-ナフトルスルホン酸ナトリウム (No. 6L680)

代謝活性化系の有無	被験物質濃度 (μg/プレート)	復帰変異数(コロニ数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9 Mix (-)	溶媒対照	127 160 135 (± 17)	15 14 19 (± 3)	42 32 39 (± 38)	22 16 18 (± 19)	8 10 14 (± 11)	
	3 1 3	143 140 160 (± 11)	12 16 20 (± 4)	30 25 34 (± 30)	19 14 16 (± 16)	14 13 11 (± 13)	
	6 2 5	140 147 127 (± 10)	15 20 9 (± 15)	25 24 34 (± 28)	16 22 12 (± 17)	11 7 12 (± 10)	
	1 2 5 0	159 135 146 (± 12)	11 10 17 (± 4)	33 37 26 (± 32)	17 19 24 (± 20)	25 16 16 (± 19)	
	2 5 0 0	143 148 154 (± 6)	16 15 17 (± 1)	40 36 23 (± 33)	12 14 22 (± 16)	14 10 13 (± 12)	
	5 0 0 0	136 129 147 (± 9)	16 11 14 (± 3)	27 38 34 (± 33)	10 26 23 (± 20)	9 11 15 (± 12)	
S9 Mix (+)	溶媒対照	172 167 158 (± 16)	12 19 17 (± 4)	29 40 30 (± 33)	26 23 24 (± 24)	20 16 17 (± 18)	
	3 1 3	183 163 189 (± 14)	19 14 22 (± 18)	35 30 40 (± 35)	23 34 18 (± 25)	20 9 17 (± 15)	
	6 2 5	181 157 170 (± 12)	26 26 28 (± 27)	38 29 33 (± 33)	32 30 40 (± 34)	12 24 23 (± 20)	
	1 2 5 0	204 193 171 (± 17)	16 19 15 (± 2)	29 25 22 (± 25)	29 30 21 (± 27)	12 13 11 (± 12)	
	2 5 0 0	220 184 191 (± 19)	23 15 25 (± 21)	30 39 40 (± 36)	21 30 23 (± 25)	9 10 11 (± 10)	
	5 0 0 0	210 193 213 (± 11)	19 13 16 (± 16)	50 30 41 (± 40)	28 27 38 (± 31)	18 22 21 (± 20)	
陽性	S9 Mixを必要としなもの	名称	AF-2	NaN ₃	ENNG	AF-2	9-AA
	濃度 (μg/プレート)	0.01	0.5	2	0.1	80	
対照	S9 Mixを必要とするもの	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	濃度 (μg/プレート)	1	2	10	0.5	2	
		コロニ数 / プレート	633 593 565 (± 34)	432 442 433 (± 436)	514 537 509 (± 520)	723 596 686 (± 668)	370 439 467 (± 425)
		コロニ数 / プレート	1149 1116 1169 (± 27)	412 404 403 (± 406)	1499 1743 1569 (± 1604)	354 378 372 (± 368)	200 213 220 (± 211)

(備考)

(平均値)
(±標準偏差)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド, NaN₃ : ナジウム化ナトリウム,
ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン, 9-AA : 9-アミノアクリジン, 2-AA : 2-アミノアントラセン

図 1 (本試験 1)

被験物質名：4-アミノ-1-ナフトルスルホン酸ナトリウム

No.6L680

用量-反応曲線 (TA100)

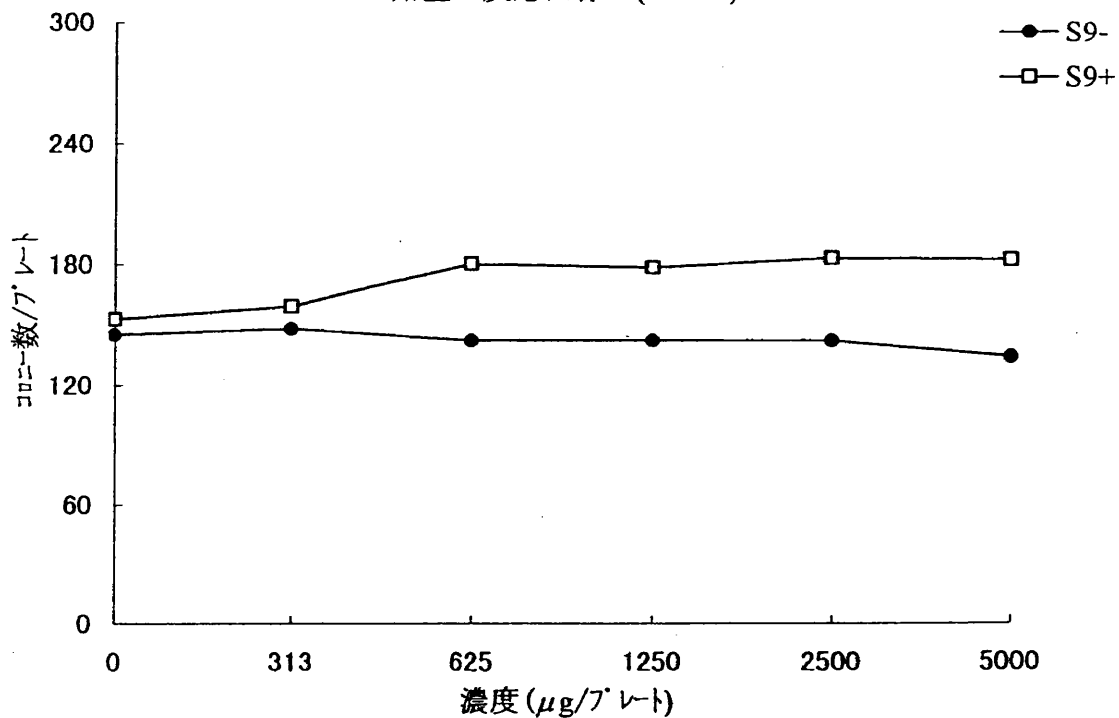


図 2 (本試験 1)

被験物質名：4-アミノ-1-ナフトルスルホン酸ナトリウム

No.6L680

用量-反応曲線 (TA1535)

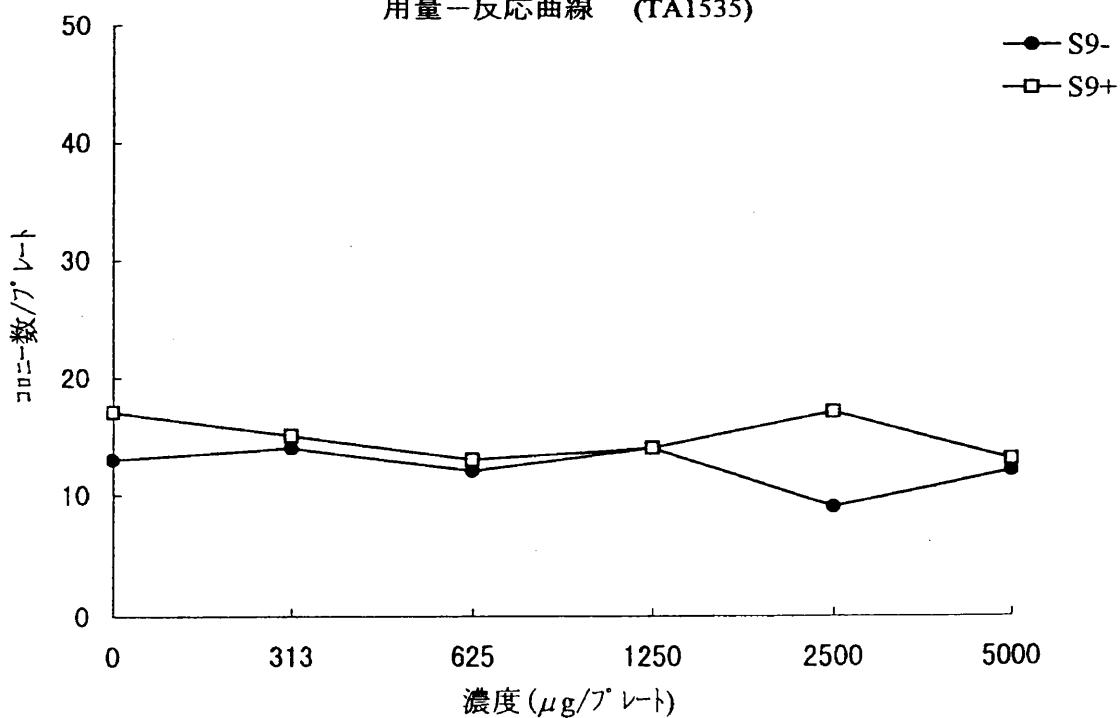


図 3 (本試験 1)

被験物質名：4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸ナトリウム

No.6L680

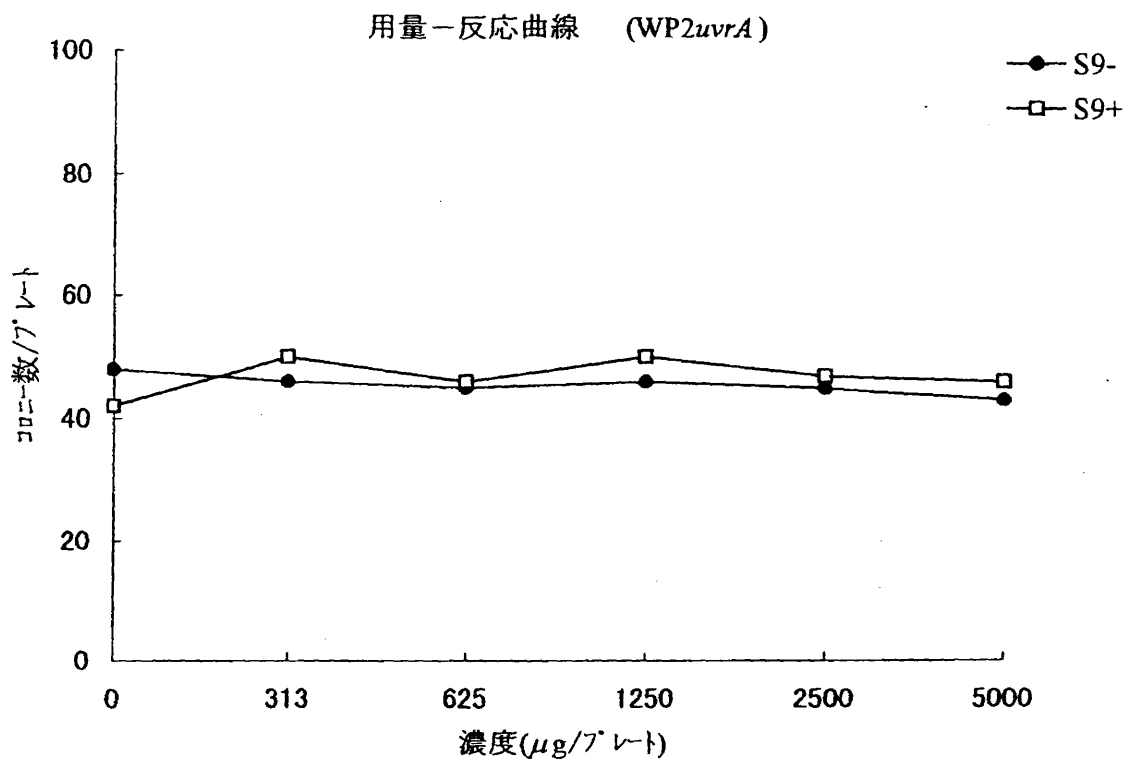


図 4 (本試験 1)

被験物質名：4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸ナトリウム

No.6L680

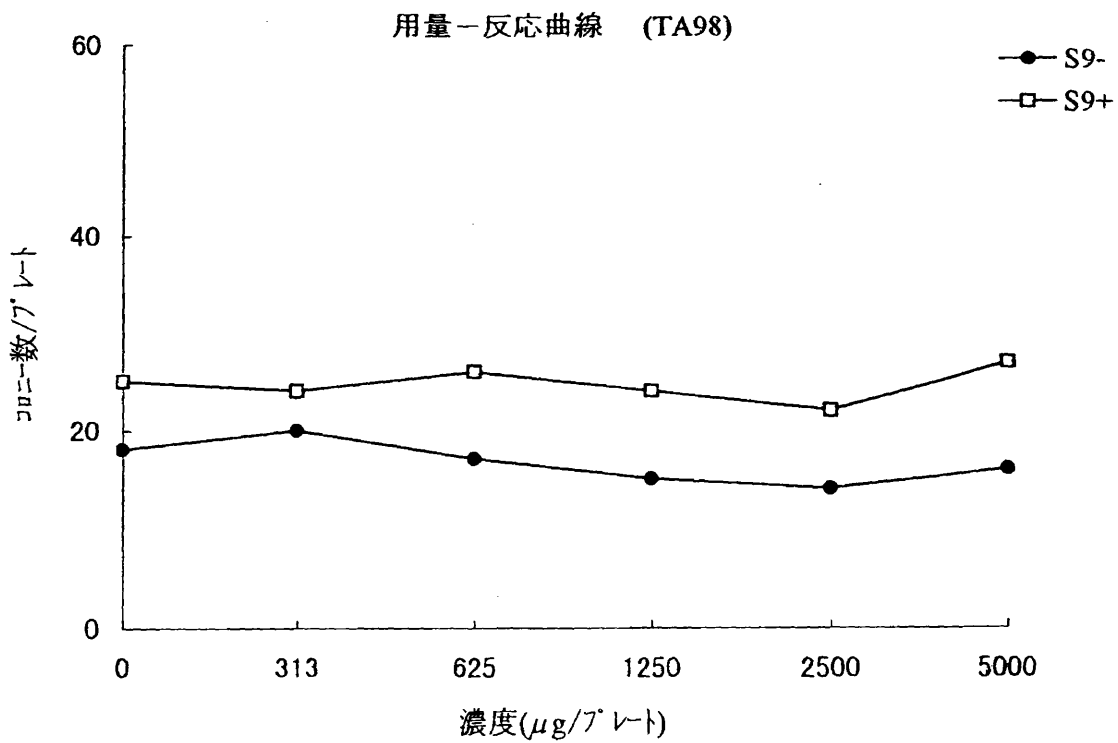


図 5 (本試験 1)

被験物質名：4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸ナトリウム

No.6L680

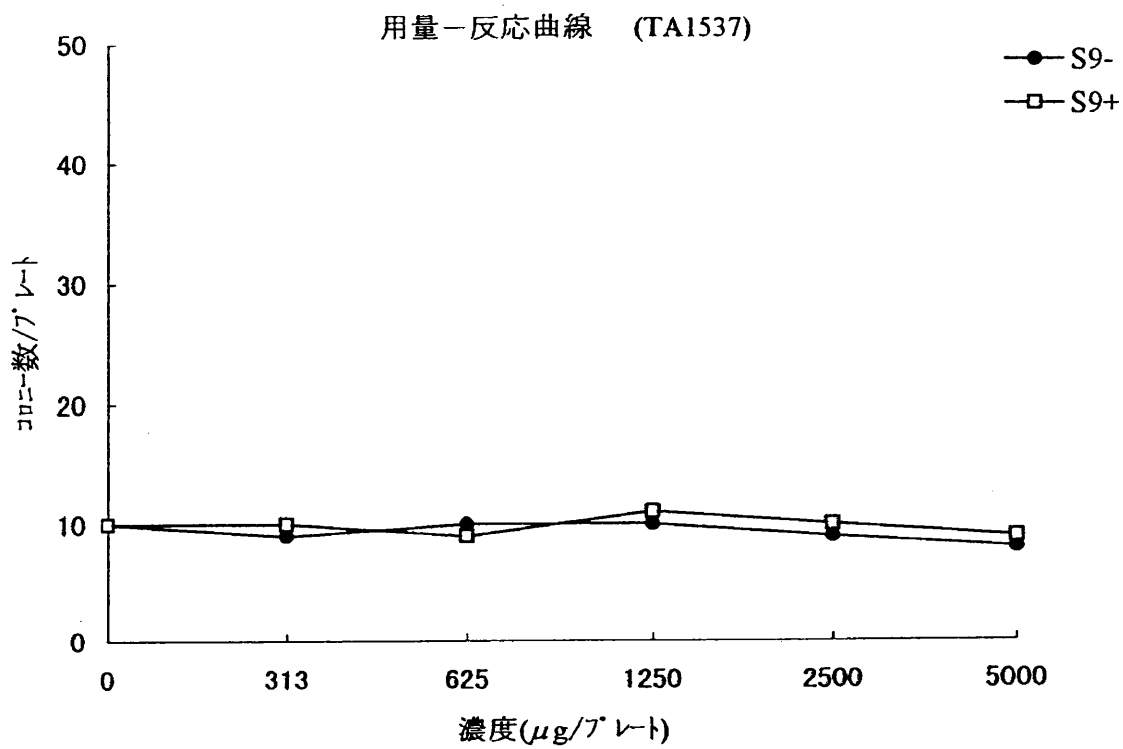


図 6 (本試験 2)

被験物質名：4-アミノ-1-ナフトルスルホン酸ナトリウム

No.6L680

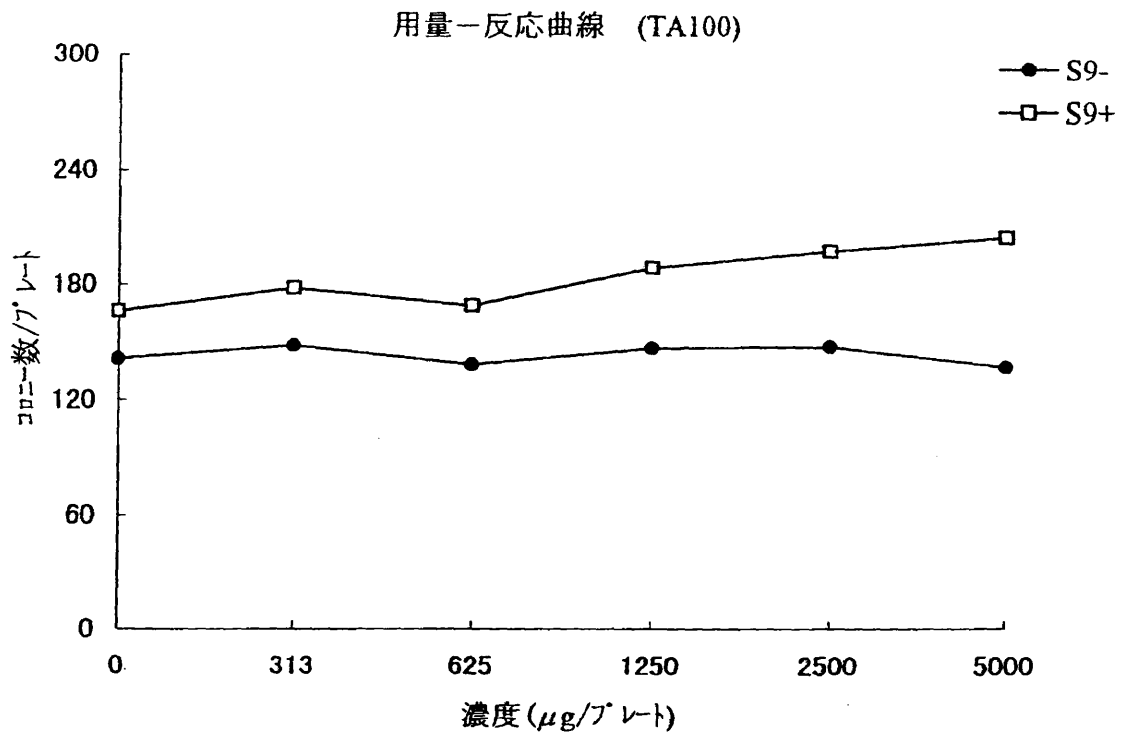


図 7 (本試験 2)

被験物質名：4-アミノ-1-ナフトルスルホン酸ナトリウム

No.6L680

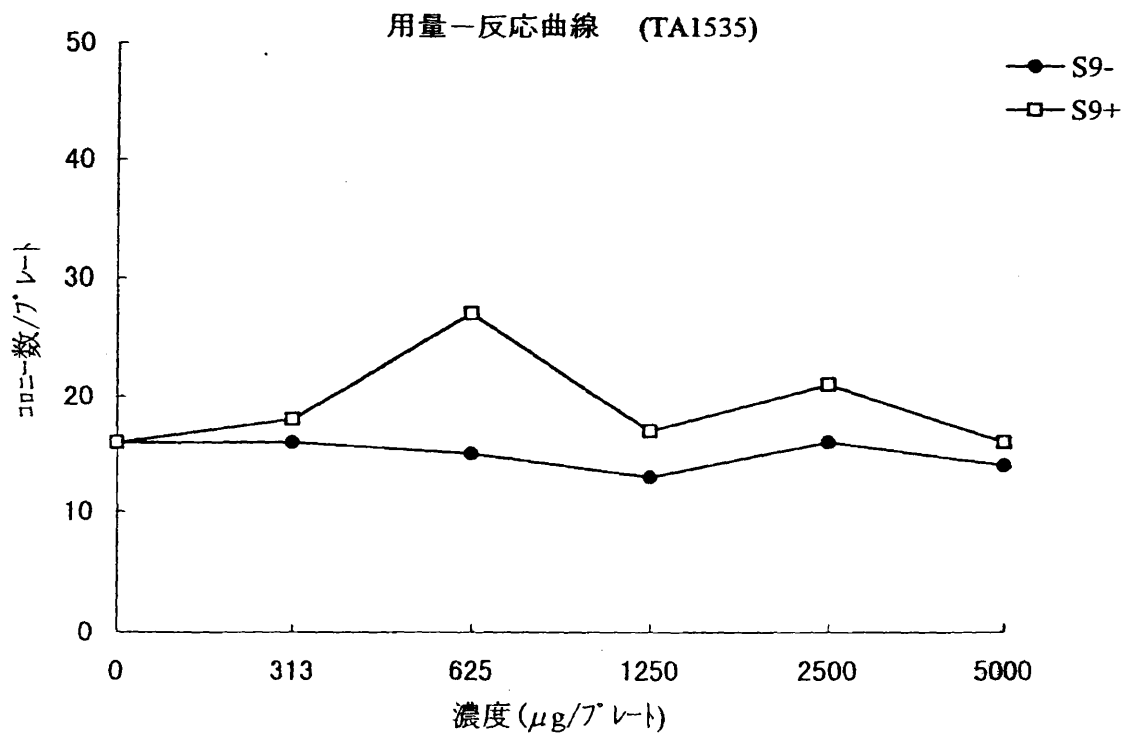


図 8 (本試験 2)

被験物質名 : 4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸ナトリウム

No.6L680

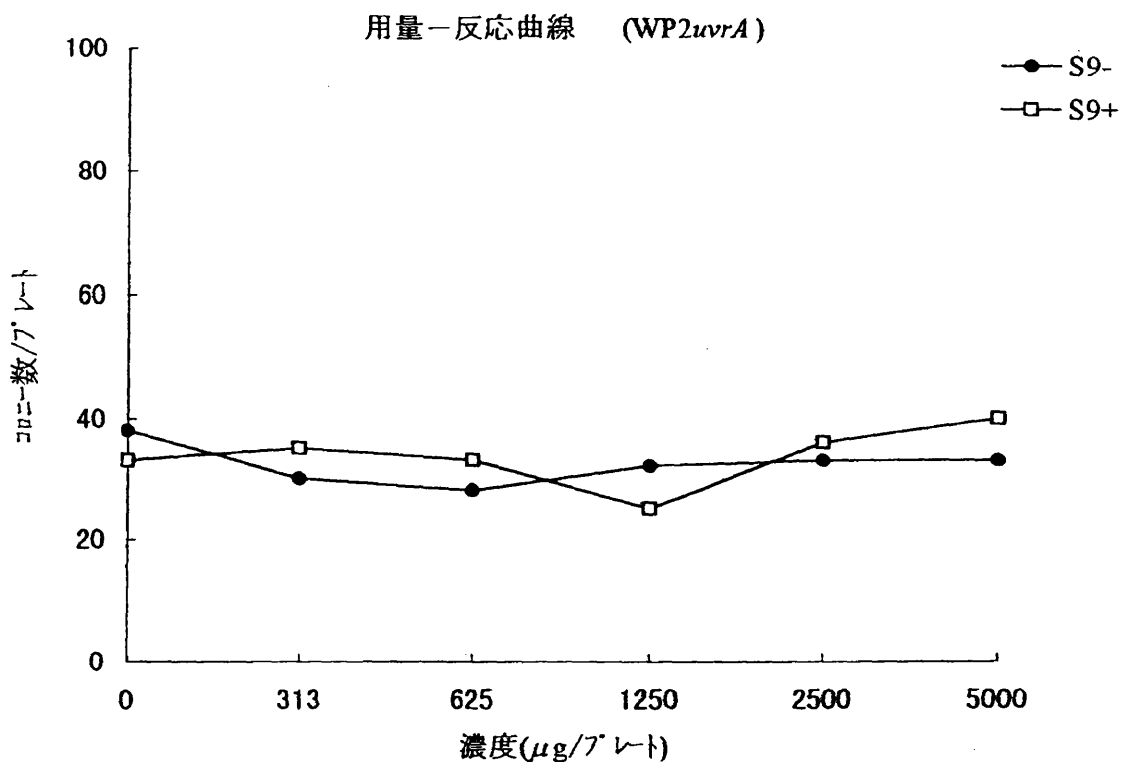


図 9 (本試験 2)

被験物質名 : 4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸ナトリウム

No.6L680

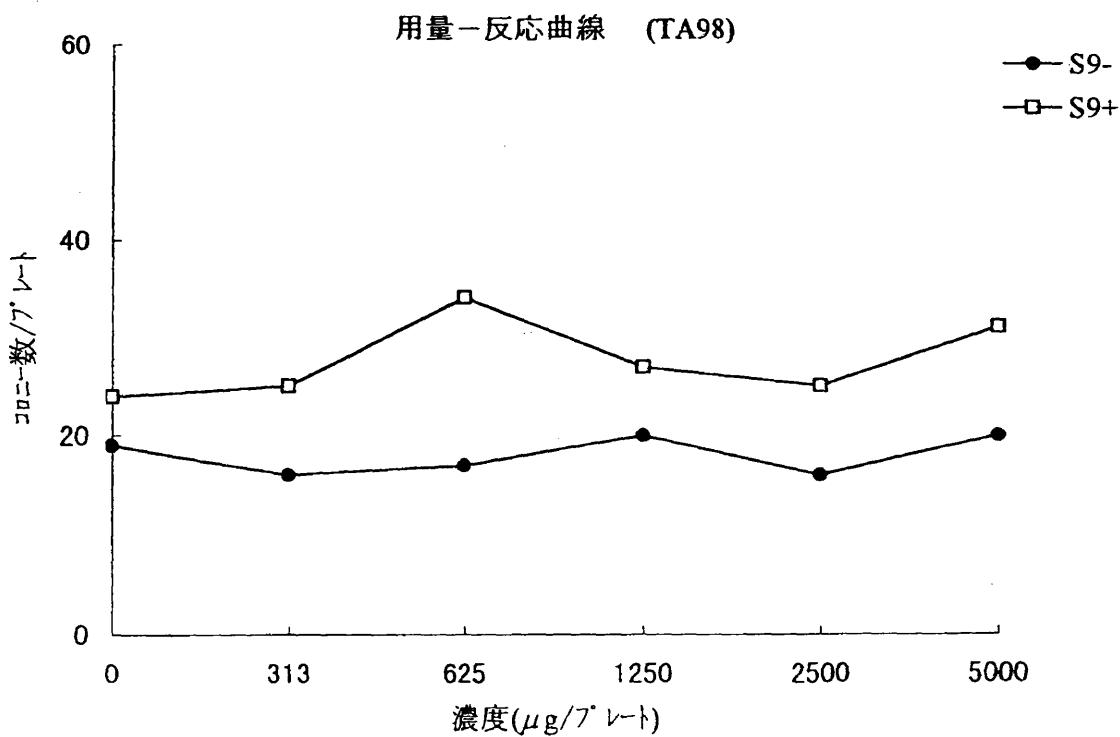


図 10 (本試験 2)

被験物質名：4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸ナトリウム

No.6L680

