



2-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸の
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	7
Tables 1～3	

【要 約】

2-アミノ-1-ナフトレ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、用量設定試験では、50～5000 μg /プレート で実施したところ、抗菌性が認められなかったので、本試験では直接法、代謝活性化法ともにすべての検定菌において 312.5～5000 μg /プレートの用量で試験を実施した。

その結果、2回の本試験において、TA1535 の代謝活性化法で 2500 μg /プレート 以上の用量で陰性対照値の2倍以上となる変異コロニー数の増加が認められた。以上の結果から、2-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸は、用いた試験系において変異原性を有する（陽性）と判定された。

【 緒 言 】

OECD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、2-アミノ-1-ナフトレ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突然変異⁽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突然変異⁽²⁾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。

【材料および試験方法】

〔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日にアメリカ合衆国、
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。各検定菌は、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 (*pKM101*) の有無に
ついての特性確認を行った。

試験に際して、ニュートリエントブロスNa 2 (Oxoid) を入れたL字型試験管に種菌
を接種し、 37°C 、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〕

2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸 (CAS No. 81-16-3、以下 A N S と略) は、分子
量 223.2 の白色粉末である。純度 98.7%のもの (ロット番号: 不純物不
明 (1.3%)) を から供与された。
被験物質は、使用時まで室温で遮光して保管した。

A N S は、ジメチルスルホキシド (以下 DMSO と略、ロット番号: APJ3434 および
APQ5928、和光純薬工業(株)) に 50 mg/ml になるように調製した後、同溶媒で更に
公比 2 ないし約 3 で希釈したものを、速やかに試験に用いた。

秦野研究所において、A N S の DMSO 溶液中での安定性試験を、本試験での低濃度
(3.125 mg/ml) および染色体異常試験 (H-93-243) の高濃度 (220 mg/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、いずれも初期値 (0 時間) の平均に対して、101%であった。これらの値は、
当研究所で規定した許容範囲内にあった (Appendix 1、2)。

また、本試験 I に用いた調製検体について、含量測定試験を行った結果、3.125 mg/ml 溶液の含量は既定濃度に対し、100~102%、50 mg/ml 溶液は、97.3~97.8%であった。これらの値も当研究所の規定した許容範囲内であった (Appendix 3)。

以上の結果から、ANS 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。

AF2	: フリルフラマイド	(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-アミニアクリジン	(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, 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 は蒸留水に溶解し、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) バクトアガー (Difco)	0.6%	(B) L-ヒスチジン	0.5 mM
塩化ナトリウム	0.5%	ピオチン	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 (用量設定試験では、ロット番号 : DJ020GI、1993年7月6日製造および本試験では、ロット番号 : DJ030JI、1993年10月4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
ケエン酸・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	バクトアガー (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 混液 (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-297、1993年 8 月 27 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。

小試験管中にトッパアガー 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 Table 1～3 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変異コロニー数の平均値が、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。ANS について、50～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で公比を約 3 とし、試験を実施したところ、すべての検定菌において直接法、代謝活性化法ともにいずれの用量においても抗菌性は認められなかった。

したがって、本試験における最高用量を、すべての検定菌において、直接法、代謝活性化法ともに 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とすることとした。

〔本試験〕

結果を Table 2、3 に示した。ANS について、すべての検定菌について、直接法、代謝活性化法ともに 312.5～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で、公比を 2 とし、試験を実施した。2 回の本試験において、TA1535 の代謝活性化法の 1250 あるいは 2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量において陰性対照の 2 倍以上となる変異コロニー数の増加が認められた。また、2 回目の本試験においてのみ、TA1537 の直接法および代謝活性化法と TA98 の代謝活性化法において、変異コロニー数が陰性対照群の 2 倍以上となる群が散見された。

ANS 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、本試験系の有効性が確認された。

以上の結果に基づき、ANS は、用いた試験系において変異原性を有するもの（陽性）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 reverse mutation test of 2-Amino-1-naphthalene sulfonic acid* on bacteria

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			WP2uvrA			TA98			TA1537			
S9 Mix (-)	0	129	107	143	10	10	12	22	17	14	20	15	12	5	11	7	
		(126 \pm 18.1)			(11 \pm 1.2)			(18 \pm 4.0)			(16 \pm 4.0)			(8 \pm 3.1)			
	50	134			12			19			25			6			
	150	111			11			26			14			10			
	500	147			17			20			13			11			
	1500	102			16			22			14			6			
	5000	92			13			28			9			2			
S9 Mix (+)	0	115	100	120	14	11	13	22	22	27	33	18	35	8	14	15	
		(112 \pm 10.4)			(13 \pm 1.5)			(24 \pm 2.9)			(29 \pm 9.3)			(12 \pm 3.8)			
	50	106			11			28			24			17			
	150	135			17			19			34			14			
	500	116			14			22			26			11			
	1500	195			31			21			35			25			
	5000	237			75			27			40			14			
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			
S9 Mix (-)	Number of colonies / plate	380	406	451	231	264	253	151	159	155	635	714	634	2653	2460	2751	
		(412 \pm 35.9)			(249 \pm 16.8)			(155 \pm 4.0)			(661 \pm 45.9)			(2621 \pm 148.1)			
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	870	857	930	280	276	243	1442	1463	1464	435	450	450	137	241	202	
		(886 \pm 38.9)			(266 \pm 20.3)			(1456 \pm 12.4)			(445 \pm 8.7)			(193 \pm 52.5)			

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

*: Purity was 98.7 %.

Table 2. Results of reverse mutation test (I) of
2-Amino-1-naphthalene sulfonic 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			WP2uvrA			TA98			TA1537			
S9Mix (-)	0	120	106	122	7	12	16	19	15	19	17	19	14	4	6	8	
		(116 \pm 8.7)			(12 \pm 4.5)			(18 \pm 2.3)			(17 \pm 2.5)			(6 \pm 2.0)			
	312.5	112	109	138	15	13	13	28	23	21	22	12	18	9	7	5	
		(120 \pm 15.9)			(14 \pm 1.2)			(24 \pm 3.6)			(17 \pm 5.0)			(7 \pm 2.0)			
	625	98	99	109	9	9	15	18	17	26	22	16	24	5	4	7	
		(102 \pm 6.1)			(11 \pm 3.5)			(20 \pm 4.9)			(21 \pm 4.2)			(5 \pm 1.5)			
	1250	124	100	113	13	17	8	19	16	22	34	15	17	3	2	3	
		(112 \pm 12.0)			(13 \pm 4.5)			(19 \pm 3.0)			(22 \pm 10.4)			(3 \pm 0.6)			
2500	97	106	117	6	13	17	16	20	15	10	15	17	7	4	5		
	(107 \pm 10.0)			(12 \pm 5.6)			(17 \pm 2.6)			(14 \pm 3.6)			(5 \pm 1.5)				
5000	99	95	123	7	10	10	16	17	18	20	23	17	7	6	4		
	(106 \pm 15.1)			(9 \pm 1.7)			(17 \pm 1.0)			(20 \pm 3.0)			(6 \pm 1.5)				
S9Mix (+)	0	117	119	148	13	8	12	21	13	17	21	30	39	7	12	7	
		(128 \pm 17.3)			(11 \pm 2.6)			(17 \pm 4.0)			(30 \pm 9.0)			(9 \pm 2.9)			
	312.5	148	139	124	21	19	10	31	24	20	37	40	43	11	12	18	
		(137 \pm 12.1)			(17 \pm 5.9)			(25 \pm 5.6)			(40 \pm 3.0)			(14 \pm 3.8)			
	625	128	133	111	15	12	12	32	13	21	33	27	36	15	6	9	
		(124 \pm 11.5)			(13 \pm 1.7)			(22 \pm 9.5)			(32 \pm 4.6)			(10 \pm 4.6)			
	1250	149	157	139	20	23	23	24	19	20	34	27	30	14	12	12	
		(148 \pm 9.0)			(22 \pm 1.7)			(21 \pm 2.6)			(30 \pm 3.5)			(13 \pm 1.2)			
2500	168	166	158	39	52	42	16	12	26	43	38	36	11	18	10		
	(164 \pm 5.3)			(44 \pm 6.8)			(18 \pm 7.2)			(39 \pm 3.6)			(13 \pm 4.4)				
5000	204	195	204	63	95	91	27	26	21	54	49	47	12	6	8		
	(201 \pm 5.2)			(83 \pm 17.4)			(25 \pm 3.2)			(50 \pm 3.6)			(9 \pm 3.1)				
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	560	525	535	224	208	211	118	92	107	921	798	845	1131	1232	1368	
		(540 \pm 18.0)			(214 \pm 8.5)			(106 \pm 13.1)			(855 \pm 62.1)			(1244 \pm 118.9)			
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose (μg /plate)	1			2			10			0.5			2			
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	1132	1168	1165	262	221	218	636	744	884	345	422	418	198	234	228	
		(1155 \pm 20.0)			(234 \pm 24.6)			(755 \pm 124.3)			(395 \pm 43.3)			(220 \pm 19.3)			

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

*: Purity was 98.7 %.

Table 3. Results of reverse mutation test (II) of
2-Amino-1-naphthalene sulfonic 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			WP2uvrA			TA98			TA1537							
S9Mix (-)	0	106	119	110	11	19	11	9	21	21	27	16	17	9	7	5	(112 \pm 6.7)	(14 \pm 4.6)	(17 \pm 6.9)	(20 \pm 6.1)	(7 \pm 2.0)
	312.5	96	124	103	12	15	12	20	21	29	21	20	25	8	7	9	(108 \pm 14.6)	(13 \pm 1.7)	(23 \pm 4.9)	(22 \pm 2.6)	(8 \pm 1.0)
	625	123	143	118	16	15	18	29	24	20	18	20	19	14	13	8	(128 \pm 13.2)	(16 \pm 1.5)	(24 \pm 4.5)	(19 \pm 1.0)	(12 \pm 3.2)
	1250	128	108	107	13	15	18	19	17	26	18	17	19	13	14	16	(114 \pm 11.8)	(15 \pm 2.5)	(21 \pm 4.7)	(18 \pm 1.0)	(14 \pm 1.5)
	2500	118	115	119	16	14	10	21	10	16	15	26	26	16	12	19	(117 \pm 2.1)	(13 \pm 3.1)	(16 \pm 5.5)	(22 \pm 6.4)	(16 \pm 3.5)
	5000	121	106	118	12	17	19	13	30	21	24	13	23	18	5	15	(115 \pm 7.9)	(16 \pm 3.6)	(21 \pm 8.5)	(20 \pm 6.1)	(13 \pm 6.8)
S9Mix (+)	0	134	132	130	15	8	20	17	12	19	25	27	44	12	11	8	(132 \pm 2.0)	(14 \pm 6.0)	(16 \pm 3.6)	(32 \pm 10.4)	(10 \pm 2.1)
	312.5	124	120	111	16	22	13	28	26	26	34	36	29	21	13	13	(118 \pm 6.7)	(17 \pm 4.6)	(27 \pm 1.2)	(33 \pm 3.6)	(16 \pm 4.6)
	625	134	123	129	13	17	13	20	16	26	43	43	32	23	25	21	(129 \pm 5.5)	(14 \pm 2.3)	(21 \pm 5.0)	(39 \pm 6.4)	(23 \pm 2.0)
	1250	170	170	172	21	24	25	26	26	26	48	36	44	20	23	24	(171 \pm 1.2)	(23 \pm 2.1)	(26 \pm 0.0)	(43 \pm 6.1)	(22 \pm 2.1)
	2500	151	162	183	72	65	69	22	25	27	55	58	54	16	21	10	(165 \pm 16.3)	(69 \pm 3.5)	(25 \pm 2.5)	(56 \pm 2.1)	(16 \pm 5.5)
	5000	185	214	249	108	98	111	19	28	25	64	71	60	18	17	15	(216 \pm 32.0)	(106 \pm 6.8)	(24 \pm 4.6)	(65 \pm 5.6)	(17 \pm 1.5)
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	512	549	521	260	282	248	174	176	160	764	810	844	1610	1762	1800	(527 \pm 19.3)	(263 \pm 17.2)	(170 \pm 8.7)	(806 \pm 40.1)	(1724 \pm 100.5)
	Number of colonies / plate	923	916	763	281	218	240	1464	1433	1412	466	422	373	241	223	278	(867 \pm 90.4)	(246 \pm 32.0)	(1436 \pm 26.2)	(420 \pm 46.5)	(247 \pm 28.0)

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

*: Purity was 98.7 %.