2−アミノ−1−ナフタレンスルフォン酸の
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-ナフタレンスルフォ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 *uvr*A 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-ナフタレンスルフォン酸は、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-ナフタレンスルフォン酸について、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 *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。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No.2（Oxoid）を入れたL字型試験管に種菌を接種し、37℃、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-ナフタレンスルフォン酸（CAS No. 81-16-3、以下ＡＮＳ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。

ＡＮＳ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㈱）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、ＡＮＳ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, 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) 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 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	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-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 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 μg/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 μg/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 μg/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 μg/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 (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	129 107 143 (126 ± 18.1)	10 10 12 (11 ± 1.2)	22 17 14 (18 ± 4.0)	20 15 12 (16 ± 4.0)	5 11 7 (8 ± 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
S9Mix (+)	0	115 100 120 (112 ± 10.4)	14 11 13 (13 ± 1.5)	22 22 27 (24 ± 2.9)	33 18 35 (29 ± 9.3)	8 14 15 (12 ± 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 (μg /plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Number of colonies / plate	380 406 451 (412 ± 35.9)	231 264 253 (249 ± 16.8)	151 159 155 (155 ± 4.0)	635 714 634 (661 ± 45.9)	2653 2460 2751 (2621 ± 148.1)
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2
	Number of colonies / plate	870 857 930 (886 ± 38.9)	280 276 243 (266 ± 20.3)	1442 1463 1464 (1456 ± 12.4)	435 450 450 (445 ± 8.7)	137 241 202 (193 ± 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 ± S.D.)					
		Base - pair substitution type			Frameshift type		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix (-)	0	120 106 122 (116 ± 8.7)	7 12 16 (12 ± 4.5)	19 15 19 (18 ± 2.3)	17 19 14 (17 ± 2.5)	4 6 8 (6 ± 2.0)	
	312.5	112 109 138 (120 ± 15.9)	15 13 13 (14 ± 1.2)	28 23 21 (24 ± 3.6)	22 12 18 (17 ± 5.0)	9 7 5 (7 ± 2.0)	
	625	98 99 109 (102 ± 6.1)	9 9 15 (11 ± 3.5)	18 17 26 (20 ± 4.9)	22 16 24 (21 ± 4.2)	5 4 7 (5 ± 1.5)	
	1250	124 100 113 (112 ± 12.0)	13 17 8 (13 ± 4.5)	19 16 22 (19 ± 3.0)	34 15 17 (22 ± 10.4)	3 2 3 (3 ± 0.6)	
	2500	97 106 117 (107 ± 10.0)	6 13 17 (12 ± 5.6)	16 20 15 (17 ± 2.6)	10 15 17 (14 ± 3.6)	7 4 5 (5 ± 1.5)	
	5000	99 95 123 (106 ± 15.1)	7 10 10 (9 ± 1.7)	16 17 18 (17 ± 1.0)	20 23 17 (20 ± 3.0)	7 6 4 (6 ± 1.5)	
S9Mix (+)	0	117 119 148 (128 ± 17.3)	13 8 12 (11 ± 2.6)	21 13 17 (17 ± 4.0)	21 30 39 (30 ± 9.0)	7 12 7 (9 ± 2.9)	
	312.5	148 139 124 (137 ± 12.1)	21 19 10 (17 ± 5.9)	31 24 20 (25 ± 5.6)	37 40 43 (40 ± 3.0)	11 12 18 (14 ± 3.8)	
	625	128 133 111 (124 ± 11.5)	15 12 12 (13 ± 1.7)	32 13 21 (22 ± 9.5)	33 27 36 (32 ± 4.6)	15 6 9 (10 ± 4.6)	
	1250	149 157 139 (148 ± 9.0)	20 23 23 (22 ± 1.7)	24 19 20 (21 ± 2.6)	34 27 30 (30 ± 3.5)	14 12 12 (13 ± 1.2)	
	2500	168 166 158 (164 ± 5.3)	39 52 42 (44 ± 6.8)	16 12 26 (18 ± 7.2)	43 38 36 (39 ± 3.6)	11 18 10 (13 ± 4.4)	
	5000	204 195 204 (201 ± 5.2)	63 95 91 (83 ± 17.4)	27 26 21 (25 ± 3.2)	54 49 47 (50 ± 3.6)	12 6 8 (9 ± 3.1)	
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	560 525 535 (540 ± 18.0)	224 208 211 (214 ± 8.5)	118 92 107 (106 ± 13.1)	921 798 845 (855 ± 62.1)	1131 1232 1368 (1244 ± 118.9)	
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate	1132 1168 1165 (1155 ± 20.0)	262 221 218 (234 ± 24.6)	636 744 884 (755 ± 124.3)	345 422 418 (395 ± 43.3)	198 234 228 (220 ± 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 ± S.D.)					
		Base - pair substitution type			Frameshift type		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix (-)	0	106 119 110 (112 ± 6.7)	11 19 11 (14 ± 4.6)	9 21 21 (17 ± 6.9)	27 16 17 (20 ± 6.1)	9 7 5 (7 ± 2.0)	
	312.5	96 124 103 (108 ± 14.6)	12 15 12 (13 ± 1.7)	20 21 29 (23 ± 4.9)	21 20 25 (22 ± 2.6)	8 7 9 (8 ± 1.0)	
	625	123 143 118 (128 ± 13.2)	16 15 18 (16 ± 1.5)	29 24 20 (24 ± 4.5)	18 20 19 (19 ± 1.0)	14 13 8 (12 ± 3.2)	
	1250	128 108 107 (114 ± 11.8)	13 15 18 (15 ± 2.5)	19 17 26 (21 ± 4.7)	18 17 19 (18 ± 1.0)	13 14 16 (14 ± 1.5)	
	2500	118 115 119 (117 ± 2.1)	16 14 10 (13 ± 3.1)	21 10 16 (16 ± 5.5)	15 26 26 (22 ± 6.4)	16 12 19 (16 ± 3.5)	
	5000	121 106 118 (115 ± 7.9)	12 17 19 (16 ± 3.6)	13 30 21 (21 ± 8.5)	24 13 23 (20 ± 6.1)	18 5 15 (13 ± 6.8)	
S9Mix (+)	0	134 132 130 (132 ± 2.0)	15 8 20 (14 ± 6.0)	17 12 19 (16 ± 3.6)	25 27 44 (32 ± 10.4)	12 11 8 (10 ± 2.1)	
	312.5	124 120 111 (118 ± 6.7)	16 22 13 (17 ± 4.6)	28 26 26 (27 ± 1.2)	34 36 29 (33 ± 3.6)	21 13 13 (16 ± 4.6)	
	625	134 123 129 (129 ± 5.5)	13 17 13 (14 ± 2.3)	20 16 26 (21 ± 5.0)	43 43 32 (39 ± 6.4)	23 25 21 (23 ± 2.0)	
	1250	170 170 172 (171 ± 1.2)	21 24 25 (23 ± 2.1)	26 26 26 (26 ± 0.0)	48 36 44 (43 ± 6.1)	20 23 24 (22 ± 2.1)	
	2500	151 162 183 (165 ± 16.3)	72 65 69 (69 ± 3.5)	22 25 27 (25 ± 2.5)	55 58 54 (56 ± 2.1)	16 21 10 (16 ± 5.5)	
	5000	185 214 249 (216 ± 32.0)	108 98 111 (106 ± 6.8)	19 28 25 (24 ± 4.6)	64 71 60 (65 ± 5.6)	18 17 15 (17 ± 1.5)	
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	512 549 521 (527 ± 19.3)	260 282 248 (263 ± 17.2)	174 176 160 (170 ± 8.7)	764 810 844 (806 ± 40.1)	1610 1762 1800 (1724 ± 100.5)	
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate	923 916 763 (867 ± 90.4)	281 218 240 (246 ± 32.0)	1464 1433 1412 (1436 ± 26.2)	466 422 373 (420 ± 46.5)	241 223 278 (247 ± 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 %.