



2-アミノ-5-メチル-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】

2-アミノ-5-メチル-ベンゼンスルホン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ート法により用量設定試験および本試験を行った。用量設定試験を50~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で行ったところ、すべての検定菌においてS9 mix 無添加試験および添加試験のいずれも抗菌性は認められなかった。したがって、本試験ではS9 mix 無添加試験および添加試験を313~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で用量を設定して実施した。

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、2-アミノ-5-メチル-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。

【結 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、2-アミノ-5-メチル-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、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ものをを用い、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字型試験管に解凍した種菌を一定量接種し、 37°C 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〕

2-アミノ-5-メチル-ベンゼンスルホン酸 (AMBS、CAS No. 88-44-8) は、分子量 187.22 の微黄白色粉末である。構造式等は Appendix 1 に示した。用いた被験物質は、

ロット番号 純度 98%以上 (不純物：パラトルイジン 200ppm 程度)
であり、 から供与された。被験物質は、使用時まで冷蔵保管した。

AMBSは、ジメチルスルホキシド (DMSO、ロット番号：KCL2807 および KCG5200、和光純薬工業(株)) に 50 mg/ml になるように溶解した後、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。

AMBSの DMSO 溶液中での安定性試験および含量測定試験を秦野研究所において実施した。安定性試験においては、本試験Ⅱで調製した低濃度 (3.13 mg/ml) 溶液および高濃度 (50.0 mg/ml) 溶液について、室温遮光条件下で、調製後 4 時間までの安定性を調べた。その結果、調製 4 時間後における各濃度の平均含量は、それぞれ初期値 (0 時間) の平均値に対して、99.3 および 100%であった。これらの値は当研究所で規定している基準内

(4時間後における平均含量が初期値の90%以上)であった(Appendix 2)。

また、本試験Iで調製した被験物質調製液について含量測定試験を行った結果、調製液の濃度は、いずれも当研究所の規定している基準内(溶媒中での平均含量が添加量の90~110%)であった(Appendix 3)。

[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-フルル)-3-(5-ニトロ-2-フルル)アクリルアミド (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-アミノアクリジン (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℃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) バクアガー (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、日清製粉(株)製の最少寒天培地(ロット番号: DJ030HJ、1994年8月11日製造および DJ040KJ、同年11月21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
クエン酸・1水和物	2 g	グルコース	20 g
リン酸水素二カリウム	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 mix (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-309、1994年 5月13日製造および RAA-317、同年10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、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)

プレート法により、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 ml、リン酸緩衝液 0.5 ml (S9 mix 添加試験においては S9 mix 0.5 ml)、検定菌液 0.1 ml およびトップアガー 2 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。培養は 37°C 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。

【結果および考察】

〔用量設定試験〕

結果を Table 1 に示した。AMB Sについて 50～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で公比を約 3 として、試験を実施したところ、すべての検定菌において S9 mix 無添加試験および添加試験のいずれ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は、S9 mix 無添加試験および添加試験とも 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とした。

〔本試験〕

2 回の本試験の結果をそれぞれ Table 2、3 に示した。AMB Sの用量を、S9 mix 無添加試験および添加試験とともに 313～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で公比を 2 として試験を実施した。その結果、2 回の試験のいずれも、用いた 5 種類の検定菌の S9 mix 無添加試験および添加試験において、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。

AMB S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、2-アミノ-5-メチル-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) 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-5-methylbenzenesulfonic 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	137	90	97	11	16	13	24	29	20	16	26	28	9	8	10	
		(108 \pm 25.4)			(13 \pm 2.5)			(24 \pm 4.5)			(23 \pm 6.4)			(9 \pm 1.0)			
	50	106			9			21			29			14			
	150	120			10			14			20			8			
	500	109			7			21			25			9			
	1500	142			15			29			16			4			
	5000	105			9			21			25			9			
S9mix (+)	0	128	134	117	14	13	9	30	30	23	31	41	28	12	15	13	
		(126 \pm 8.6)			(12 \pm 2.6)			(28 \pm 4.0)			(33 \pm 6.8)			(13 \pm 1.5)			
	50	127			15			26			34			12			
	150	122			14			25			33			13			
	500	114			14			16			39			13			
	1500	126			14			29			35			16			
	5000	137			16			25			48			15			
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			
Positive control S9 mix (+)	Number of colonies / plate	643	622	606	244	294	335	163	143	130	891	862	816	1240	970	1230	
		(624 \pm 18.6)			(291 \pm 45.6)			(145 \pm 16.6)			(856 \pm 37.8)			(1147 \pm 153.1)			
Positive control S9 mix (+)	Number of colonies / plate	1467	1261	941	253	311	356	1664	1692	1470	475	451	463	152	150	139	
		(1223 \pm 265.1)			(307 \pm 51.6)			(1609 \pm 120.9)			(463 \pm 12.0)			(147 \pm 7.0)			

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

** : Purity was above 98 % and p-toluidine (about 200 ppm) was contained as impurity.

Table 2. Results of reverse mutation test (I) of 2-amino-5-methylbenzenesulfonic 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	97	114	127	11	18	9	29	21	23	28	14	21	11	14	9	
		(113 ± 15.0)			(13 ± 4.7)			(24 ± 4.2)			(21 ± 7.0)			(11 ± 2.5)			
	313	122	121	93	15	18	21	35	27	38	25	25	35	13	11	13	
		(112 ± 16.5)			(18 ± 3.0)			(33 ± 5.7)			(28 ± 5.8)			(12 ± 1.2)			
	625	95	114	112	11	11	6	30	23	22	11	21	34	4	12	13	
		(107 ± 10.4)			(9 ± 2.9)			(25 ± 4.4)			(22 ± 11.5)			(10 ± 4.9)			
	1250	110	110	98	16	15	14	25	21	30	28	26	20	9	16	9	
		(106 ± 6.9)			(15 ± 1.0)			(25 ± 4.5)			(25 ± 4.2)			(11 ± 4.0)			
2500	97	106	108	17	12	12	25	23	17	29	23	14	13	11	12		
	(104 ± 5.9)			(14 ± 2.9)			(22 ± 4.2)			(22 ± 7.5)			(12 ± 1.0)				
5000	114	133	114	4	20	19	28	27	25	20	36	28	13	7	10		
	(120 ± 11.0)			(14 ± 9.0)			(27 ± 1.5)			(28 ± 8.0)			(10 ± 3.0)				
S9mix (+)	0	124	127	132	15	12	12	28	27	23	27	32	44	18	7	9	
		(128 ± 4.0)			(13 ± 1.7)			(26 ± 2.6)			(34 ± 8.7)			(11 ± 5.9)			
	313	148	122	126	10	10	18	24	22	22	38	47	42	9	8	15	
		(132 ± 14.0)			(13 ± 4.6)			(23 ± 1.2)			(42 ± 4.5)			(11 ± 3.8)			
	625	124	127	130	18	14	7	18	33	33	34	46	28	12	9	13	
		(127 ± 3.0)			(13 ± 5.6)			(28 ± 8.7)			(36 ± 9.2)			(11 ± 2.1)			
	1250	125	134	118	12	20	21	25	22	19	22	36	33	16	9	10	
		(126 ± 8.0)			(18 ± 4.9)			(22 ± 3.0)			(30 ± 7.4)			(12 ± 3.8)			
2500	119	129	101	15	15	12	16	16	24	37	38	27	9	13	9		
	(116 ± 14.2)			(14 ± 1.7)			(19 ± 4.6)			(34 ± 6.1)			(10 ± 2.3)				
5000	133	113	134	21	18	18	18	26	30	25	30	30	17	11	11		
	(127 ± 11.8)			(19 ± 1.7)			(25 ± 6.1)			(28 ± 2.9)			(13 ± 3.5)				
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	618	627	632	174	215	208	119	117	113	840	892	847	890	726	734	
		(626 ± 7.1)			(199 ± 21.9)			(116 ± 3.1)			(860 ± 28.2)			(783 ± 92.5)			
	Number of colonies / plate	1068	1025	1025	270	272	221	1270	1435	1069	450	432	416	328	294	362	
		(1039 ± 24.8)			(254 ± 28.9)			(1258 ± 183.3)			(433 ± 17.0)			(328 ± 34.0)			

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

** : Purity was above 98 % and p-toluidine (about 200 ppm) was contained as impurity.

Table 3. Results of reverse mutation test (II) of 2-amino-5-methylbenzenesulfonic 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	114	135	20	17	14	23	32	30	30	32	20	17	16	23	
		(123 \pm 10.8)			(17 \pm 3.0)			(28 \pm 4.7)			(27 \pm 6.4)			(19 \pm 3.8)			
	313	134	118	102	14	9	12	21	18	24	30	32	18	18	26	25	
		(118 \pm 16.0)			(12 \pm 2.5)			(21 \pm 3.0)			(27 \pm 7.6)			(23 \pm 4.4)			
	625	106	115	135	20	17	9	21	26	36	24	29	28	24	33	26	
		(119 \pm 14.8)			(15 \pm 5.7)			(28 \pm 7.6)			(27 \pm 2.6)			(28 \pm 4.7)			
	1250	111	125	114	15	14	12	30	14	21	28	24	42	30	21	26	
	(117 \pm 7.4)			(14 \pm 1.5)			(22 \pm 8.0)			(31 \pm 9.5)			(26 \pm 4.5)				
2500	122	101	117	17	14	11	10	11	13	35	23	31	23	32	22		
	(113 \pm 11.0)			(14 \pm 3.0)			(11 \pm 1.5)			(30 \pm 6.1)			(26 \pm 5.5)				
5000	99	112	110	11	14	11	26	24	39	33	39	22	30	18	22		
	(107 \pm 7.0)			(12 \pm 1.7)			(30 \pm 8.1)			(31 \pm 8.6)			(23 \pm 6.1)				
S9mix (+)	0	126	129	117	16	13	10	44	24	21	37	34	28	17	11	12	
		(124 \pm 6.2)			(13 \pm 3.0)			(30 \pm 12.5)			(33 \pm 4.6)			(13 \pm 3.2)			
	313	128	110	120	12	17	11	21	23	27	39	43	21	17	12	17	
		(119 \pm 9.0)			(13 \pm 3.2)			(24 \pm 3.1)			(34 \pm 11.7)			(15 \pm 2.9)			
	625	121	126	134	12	18	17	21	21	11	31	30	31	8	14	16	
		(127 \pm 6.6)			(16 \pm 3.2)			(18 \pm 5.8)			(31 \pm 0.6)			(13 \pm 4.2)			
	1250	128	114	141	9	16	16	29	21	22	24	33	39	7	10	17	
	(128 \pm 13.5)			(14 \pm 4.0)			(24 \pm 4.4)			(32 \pm 7.5)			(11 \pm 5.1)				
2500	114	113	128	6	19	15	19	12	22	52	34	46	20	22	13		
	(118 \pm 8.4)			(13 \pm 6.7)			(18 \pm 5.1)			(44 \pm 9.2)			(18 \pm 4.7)				
5000	97	116	160	14	11	15	19	19	15	38	38	46	20	12	14		
	(124 \pm 32.3)			(13 \pm 2.1)			(18 \pm 2.3)			(41 \pm 4.6)			(15 \pm 4.2)				
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	678	599	627	247	269	266	145	157	153	959	967	925	1963	2099	1748	
		(635 \pm 40.1)			(261 \pm 11.9)			(152 \pm 6.1)			(950 \pm 22.3)			(1937 \pm 177.0)			
	Number of colonies / plate	1056	1405	1231	291	292	293	1477	1388	1534	501	502	487	287	280	283	
		(1231 \pm 174.5)			(292 \pm 1.0)			(1466 \pm 73.6)			(497 \pm 8.4)			(283 \pm 3.5)			

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

** : Purity was above 98 % and p-toluidine (about 200 ppm) was contained as impurity.