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 μg/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 μg/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。

【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、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℃以下で凍結保存したものを用い、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℃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㈱）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-ﾌﾘﾙ)-3-(5-ﾆﾄﾛ-2-ﾌﾘﾙ)ｱｸﾘﾙｱﾐﾄﾞ		
		（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) 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 *uvr*A 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㈱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	水酸化ﾅﾄﾘｳﾑ	0.66 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
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-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℃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。ＡＭＢＳについて 50～5000 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ 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 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ 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。ＡＭＢＳの用量を、S9 mix 無添加試験および添加試験でともに 313～5000 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ 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。

ＡＭＢＳ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, Mea± S.D.)					
		Base - pair substitution type			Frameshift type		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9mix (-)	0	137 90 97 (108± 25.4)	11 16 13 (13± 2.5)	24 29 20 (24± 4.5)	16 26 28 (23± 6.4)	9 8 10 (9± 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 (126± 8.6)	14 13 9 (12± 2.6)	30 30 23 (28± 4.0)	31 41 28 (33± 6.8)	12 15 13 (13± 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	
	Number of colonies / plate	643 622 606 (624± 18.6)	244 294 335 (291± 45.6)	163 143 130 (145± 16.6)	891 862 816 (856± 37.8)	1240 970 1230 (1147± 153.1)	
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate	1467 1261 941 (1223± 265.1)	253 311 356 (307± 51.6)	1664 1692 1470 (1609± 120.9)	475 451 463 (463± 12.0)	152 150 139 (147± 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 (113 ± 15.0)	11 18 9 (13 ± 4.7)	29 21 23 (24 ± 4.2)	28 14 21 (21 ± 7.0)	11 14 9 (11 ± 2.5)	
	313	122 121 93 (112 ± 16.5)	15 18 21 (18 ± 3.0)	35 27 38 (33 ± 5.7)	25 25 35 (28 ± 5.8)	13 11 13 (12 ± 1.2)	
	625	95 114 112 (107 ± 10.4)	11 11 6 (9 ± 2.9)	30 23 22 (25 ± 4.4)	11 21 34 (22 ± 11.5)	4 12 13 (10 ± 4.9)	
	1250	110 110 98 (106 ± 6.9)	16 15 14 (15 ± 1.0)	25 21 30 (25 ± 4.5)	28 26 20 (25 ± 4.2)	9 16 9 (11 ± 4.0)	
	2500	97 106 108 (104 ± 5.9)	17 12 12 (14 ± 2.9)	25 23 17 (22 ± 4.2)	29 23 14 (22 ± 7.5)	13 11 12 (12 ± 1.0)	
	5000	114 133 114 (120 ± 11.0)	4 20 19 (14 ± 9.0)	28 27 25 (27 ± 1.5)	20 36 28 (28 ± 8.0)	13 7 10 (10 ± 3.0)	
S9mix (+)	0	124 127 132 (128 ± 4.0)	15 12 12 (13 ± 1.7)	28 27 23 (26 ± 2.6)	27 32 44 (34 ± 8.7)	18 7 9 (11 ± 5.9)	
	313	148 122 126 (132 ± 14.0)	10 10 18 (13 ± 4.6)	24 22 22 (23 ± 1.2)	38 47 42 (42 ± 4.5)	9 8 15 (11 ± 3.8)	
	625	124 127 130 (127 ± 3.0)	18 14 7 (13 ± 5.6)	18 33 33 (28 ± 8.7)	34 46 28 (36 ± 9.2)	12 9 13 (11 ± 2.1)	
	1250	125 134 118 (126 ± 8.0)	12 20 21 (18 ± 4.9)	25 22 19 (22 ± 3.0)	22 36 33 (30 ± 7.4)	16 9 10 (12 ± 3.8)	
	2500	119 129 101 (116 ± 14.2)	15 15 12 (14 ± 1.7)	16 16 24 (19 ± 4.6)	37 38 27 (34 ± 6.1)	9 13 9 (10 ± 2.3)	
	5000	133 113 134 (127 ± 11.8)	21 18 18 (19 ± 1.7)	18 26 30 (25 ± 6.1)	25 30 30 (28 ± 2.9)	17 11 11 (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	
	Number of colonies / plate	618 627 632 (626 ± 7.1)	174 215 208 (199 ± 21.9)	119 117 113 (116 ± 3.1)	840 892 847 (860 ± 28.2)	890 726 734 (783 ± 92.5)	
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate	1068 1025 1025 (1039 ± 24.8)	270 272 221 (254 ± 28.9)	1270 1435 1069 (1258 ± 183.3)	450 432 416 (433 ± 17.0)	328 294 362 (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, Mear± S.D.)				
		Base - pair substitution type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9mix (-)	0	120 114 135 (123± 10.8)	20 17 14 (17± 3.0)	23 32 30 (28± 4.7)	30 32 20 (27± 6.4)	17 16 23 (19± 3.8)
	313	134 118 102 (118± 16.0)	14 9 12 (12± 2.5)	21 18 24 (21± 3.0)	30 32 18 (27± 7.6)	18 26 25 (23± 4.4)
	625	106 115 135 (119± 14.8)	20 17 9 (15± 5.7)	21 26 36 (28± 7.6)	24 29 28 (27± 2.6)	24 33 26 (28± 4.7)
	1250	111 125 114 (117± 7.4)	15 14 12 (14± 1.5)	30 14 21 (22± 8.0)	28 24 42 (31± 9.5)	30 21 26 (26± 4.5)
	2500	122 101 117 (113± 11.0)	17 14 11 (14± 3.0)	10 11 13 (11± 1.5)	35 23 31 (30± 6.1)	23 32 22 (26± 5.5)
	5000	99 112 110 (107± 7.0)	11 14 11 (12± 1.7)	26 24 39 (30± 8.1)	33 39 22 (31± 8.6)	30 18 22 (23± 6.1)
S9mix (+)	0	126 129 117 (124± 6.2)	16 13 10 (13± 3.0)	44 24 21 (30± 12.5)	37 34 28 (33± 4.6)	17 11 12 (13± 3.2)
	313	128 110 120 (119± 9.0)	12 17 11 (13± 3.2)	21 23 27 (24± 3.1)	39 43 21 (34± 11.7)	17 12 17 (15± 2.9)
	625	121 126 134 (127± 6.6)	12 18 17 (16± 3.2)	21 21 11 (18± 5.8)	31 30 31 (31± 0.6)	8 14 16 (13± 4.2)
	1250	128 114 141 (128± 13.5)	9 16 16 (14± 4.0)	29 21 22 (24± 4.4)	24 33 39 (32± 7.5)	7 10 17 (11± 5.1)
	2500	114 113 128 (118± 8.4)	6 19 15 (13± 6.7)	19 12 22 (18± 5.1)	52 34 46 (44± 9.2)	20 22 13 (18± 4.7)
	5000	97 116 160 (124± 32.3)	14 11 15 (13± 2.1)	19 19 15 (18± 2.3)	38 38 46 (41± 4.6)	20 12 14 (15± 4.2)
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	678 599 627 (635± 40.1)	247 269 266 (261 ± 11.9)	145 157 153 (152± 6.1)	959 967 925 (950 ± 22.3)	1963 2099 1748 (1937 ± 177.0)
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2
	Number of colonies / plate	1056 1405 1231 (1231 ± 174.5)	291 292 293 (292± 1.0)	1477 1388 1534 (1466 ± 73.6)	501 502 487 (497± 8.4)	287 280 283 (283± 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.