2-アミノ-5-クロロ-4-メチル
ベンゼンスルホン酸の
細菌を用いる
復帰変異試験

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 …… 7

参　考　文　献 …… 9

表　　1～5

要　　約

2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼ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、直接試験および代謝活性化試験のいずれも、用量設定試験は 50～5000 μg/プレート の用量で、本試験は TA100 の直接試験のみは 156.3～5000 μg/プレート 、その他については、312.5～5000 μg/プレート の用量で実施した。

その結果、2回の本試験とも、用いた5種類の検定菌について、いずれの用量でも復帰変異コロニー数の増加が認められなかったことから、2-アミノ-5-クロロ-4-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

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、日本が独自に選定した既存化学物質の１つである、2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸について、細菌を用いる復帰変異試験をプレート法より実施した。

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変異[(2)]を指標とした変異原の検出系である。

試験は、被験物質をそのまま検定菌に作用させる直接試験と、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化学品試験法ガイドライン：471，472 に準拠し、化学物質GLP（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、

の　　から分与を受けた。

E. coli WP2 *uvrA* 株は1979年５月９日に　　の　　から分与を受けた。

検定菌は、-80℃以下で凍結保存した。

試験に際して、0.5%塩化ナトリウム添加ニュートリエントブロス（Difco）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-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸（CAS No. 88-53-9、以下ＡＣＭＢＳと略）は、分子量 221.5の白色粉末である。純度 99.5%以上のもの（ロット番号：　　）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存した。

ＡＣＭＢＳは、ジメチルスルホキシド（ロット番号：DSL 5887、和光純薬、以下DMSOと略）を用いて 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３で希釈したものを、速やかに試験に用いた。

試験の開始に先立って、秦野研究所においてＡＣＭＢＳのDMSO溶液中での安定性試験を行った。本試験における最高濃度（50 mg/mℓ）および最低濃度（1.565 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３時間に

おける各3サンプルの平均含量は、それぞれの初期値の平均（0時間）に対して、101および 99.0%であった。これらの値は当研究所の標準操作手順書の基準（初回の測定平均値の90%以上）を満たしていた（Appendix 1）。

また、本試験に用いた調製検体について、含量測定試験を行った結果、50 mg/mℓ 溶液については、100～102%、1.563 mg/mℓ 溶液については、101～104%であった。これらの値も、当研究所の標準操作手順書の基準（平均含量は添加量の 85%以上）を満たしていた（Appendix 2）。

以上の結果から、ＡＣＭＢＳ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。

AF-2：フリルフラマイド	（上野製薬㈱	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㈱	ﾛｯﾄ番号 TLN5556,	純度>90%）
9-AA：9-アミノアクリジン	（東京化成工業㈱	ﾛｯﾄ番号 AM 01,	純度>98%）
2-AA：2-アミノアントラセン	（和光純薬工業㈱	ﾛｯﾄ番号 EDE7881,	純度>90%）

AF-2, 9-AA, 2-AA は DMSO（和光純薬工業㈱ ﾛｯﾄ番号 DSL5887およびECJ7001）に、SA は蒸留水に溶解して試験に用いた。

〔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：DJ050GG、1991年7月9日製造、本試験ではロット番号：DJ060IG、1991年9月3日製造、さらに再現性試験ではロット番号：DJ010AH、1992年1月10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。

硫酸マグネシウム・7水和物	0.2g	リン酸水素アンモニウムナトリウム・4水和物	3.5g
クエン酸・1水和物	2g	グルコース	20g
リン酸水素二カリウム	10g	バクト・アガー（Difco）	15g

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（1mℓ中下記の成分を含む）

S9**	0.1 mℓ	NADH	4 μmole
塩化マグネシウム	8 μmole	NADPH	4 μmole
塩化カリウム	33 μmole	0.2M リン酸緩衝液 (pH 7.4)	0.5 mℓ
グルコース・6リン酸	5 μmole		

** ：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㈱、用量設定試験ではロット番号 RAA-254、1991年5月23日製造、本試験ではロット番号 RAA-258、1991年8月23日さらに再現性試験ではロット番号 RAA-270、1992年2月10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〕

プレート法により直接試験および代謝活性化試験を行った。

小試験管中にトップアガー2mℓ、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表中に示した。培養は37℃で48時間行い、生じた復帰変異コロニー数を算定した。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〕

被験物質を含有する平板上における復帰変異コロニー数が、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〕

結果を表１に示した。50～5000 μg/プレート の範囲で試験を実施したところ、すべての検定菌の直接試験および代謝活性化試験において抗菌性は認められなかった。

なお、TA100 の直接試験においては、用量に依存した変異コロニー数の減少が明らかであった。したがって、本試験における最高用量を、すべての検定菌で、直接試験および代謝活性化試験ともに 5000 μg/プレート とし、公比２で５用量（TA100 の直接試験のみは６用量）を設定することとした。

〔本試験〕

結果を表２、３に示した。ＡＣＭＢＳについて 312.5～5000 μg/プレート（TA100 の直接試験においてのみ 156.3～5000 μg/プレート の６用量）の範囲で試験を実施した。

本試験においては、２回目の試験の TA1535 の代謝活性化試験の最高用量において、陰性対照群の２倍の変異コロニー数が得られた。その他の試験においては、用いた検定菌の直接試験および代謝活性化試験のいずれにおいても、用量依存性のある変異コロニーの増加は認められなかった。また、いずれの検定菌においても抗菌性は認められなかった。

TA1535 の代謝活性化試験については、S9 のロットが変ったため、２回の再現性試験を実施した。その結果、すべての用量において２回の試験ともに変異コロニーの増加は認められず、上記の変異コロニー数の増加は偶発的なものと考えられた（表４、５）。

ＡＣＭＢＳ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、陰性対照群とも、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、本試験に用いた各検定菌の感受性および各陽性対照物質の変異原活性についての安定性が確認された。

以上の結果に基づき、ＡＣＭＢＳ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。

参 考 文 献

(1) Maron, D.M. and Ames, B.N : Mutation Research. 113: 173-215 (1983)

(2) Green, M.H.: in "Handbook of Mutagenicity Test Procedures." Kilby, B.J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C.(eds.)Elsevier Science Publisher, New York. (1984) pp.161-187.

表 1

用量設定試験結果表

被験物質：2-アミノ-5- クロロ-4- メチルベンゼンスルホン酸

M－91－184

物質	検体濃度 (μg/プレート)	S9Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート 塩基対置換型 TA100	TA1535	WP2uvrA	フレームシフト型 TA98	TA1537
溶媒対照		-	135 132 125 (131 ± 5.1)	15 16 18 (16 ± 1.5)	13 17 11 (14 ± 3.1)	18 20 20 (19 ± 1.2)	10 3 8 (7 ± 3.6)
検体	50	-	121	17	8	15	16
	150	-	103	12	15	12	3
	500	-	103	7	14	18	7
	1500	-	95	8	12	14	10
	5000	-	78	9	17	16	7
溶媒対照		+	154 140 141 (145 ± 7.8)	21 10 17 (16 ± 5.6)	19 18 9 (15 ± 5.5)	39 40 25 (35 ± 8.4)	5 16 19 (13 ± 7.4)
検体	50	+	150	13	19	28	10
	150	+	111	14	28	17	17
	500	+	90	11	15	20	11
	1500	+	105	21	21	21	9
	5000	+	98	5	16	20	10
陽性対照 S9Mix を必要としないもの	名称		AF2 0.01	SA 0.5	AF2 0.01	AF2 0.1	9AA 80
	濃度 (μg/プレート)						
	コロニー数/プレート		673 686 605 (655 ± 43.5)	188 245 223 (219 ± 28.7)	160 179 168 (169 ± 9.5)	745 784 757 (762 ± 20.0)	2796 2908 2903 (2869 ± 63.3)
陽性対照 S9Mix を必要とするもの	名称		2AA 1	2AA 2	2AA 10	2AA 0.5	2AA 2
	濃度 (μg/プレート)						
	コロニー数/プレート		808 787 812 (802 ± 13.4)	173 151 157 (160 ± 11.4)	626 633 629 (629 ± 3.5)	146 189 173 (169 ± 21.7)	177 184 161 (174 ± 11.8)

表 2

復帰変異試験結果表 I

被験物質：2-アミノ-5- クロロ-4- メチルベンゼンスルホン酸

M-91-184

物質	検体濃度 (μg/プレート)	S9Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート 塩基対置換型 TA100	TA1535	WP2uvrA	フレームシフト型 TA98	TA1537
溶媒対照		-	145 132 108 (128 ± 18.8)	12 11 11 (11 ± 0.6)	16 13 8 (12 ± 4.0)	21 18 13 (17 ± 4.0)	8 8 7 (8 ± 0.6)
検体	156.3	-	118 144 117 (126 ± 15.3)				
	312.5	-	128 136 140 (135 ± 6.1)	17 13 20 (17 ± 3.5)	22 15 10 (16 ± 6.0)	35 23 23 (27 ± 6.9)	12 9 7 (9 ± 2.5)
	625	-	127 109 144 (127 ± 17.5)	16 16 15 (16 ± 0.6)	9 13 18 (13 ± 4.5)	21 23 14 (19 ± 4.7)	8 9 4 (7 ± 2.6)
	1250	-	121 111 129 (120 ± 9.0)	14 11 10 (12 ± 2.1)	18 16 14 (16 ± 2.0)	29 26 23 (26 ± 3.0)	7 7 8 (7 ± 0.6)
	2500	-	108 145 144 (132 ± 21.1)	9 21 11 (14 ± 6.4)	14 12 11 (12 ± 1.5)	23 31 20 (25 ± 5.7)	5 8 7 (7 ± 1.5)
	5000	-	106 123 124 (118 ± 10.1)	13 16 20 (16 ± 3.5)	11 14 12 (12 ± 1.5)	40 23 17 (27 ± 11.9)	8 9 4 (7 ± 2.6)
溶媒対照		+	129 125 123 (126 ± 3.1)	21 21 17 (20 ± 2.3)	14 16 14 (15 ± 1.2)	34 32 30 (32 ± 2.0)	15 14 9 (13 ± 3.2)
検体	312.5	+	156 135 124 (138 ± 16.3)	16 16 15 (16 ± 0.6)	14 16 10 (13 ± 3.1)	34 37 23 (31 ± 7.4)	11 5 6 (7 ± 3.2)
	625	+	130 128 148 (135 ± 11.0)	10 9 17 (12 ± 4.4)	9 13 9 (10 ± 2.3)	30 34 27 (30 ± 3.5)	12 6 15 (11 ± 4.6)
	1250	+	136 139 146 (140 ± 5.1)	5 10 12 (9 ± 3.6)	12 13 13 (13 ± 0.6)	25 25 26 (25 ± 0.6)	6 11 8 (8 ± 2.5)
	2500	+	178 135 142 (152 ± 23.1)	11 16 8 (12 ± 4.0)	10 10 11 (10 ± 0.6)	28 32 29 (30 ± 2.1)	5 9 14 (9 ± 4.5)
	5000	+	153 153 136 (147 ± 9.8)	12 11 10 (11 ± 1.0)	16 15 14 (15 ± 1.0)	26 28 28 (27 ± 1.2)	5 6 8 (6 ± 1.5)

陽性対照			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9Mix を必要としないもの	名称		AF2 0.01	SA 0.5	AF2 0.01	AF2 0.1	9AA 80
	濃度 (μg/プレート)						
	コロニー数/プレート		534 575 503 (537 ± 36.1)	109 102 95 (102 ± 7.0)	137 131 141 (136 ± 5.0)	650 644 620 (638 ± 15.9)	1563 1951 1771 (1762 ± 194.2)
S9Mix を必要とするもの	名称		2AA 1	2AA 2	2AA 10	2AA 0.5	2AA 2
	濃度 (μg/プレート)						
	コロニー数/プレート		1037 868 910 (938 ± 88.0)	225 293 228 (249 ± 38.4)	628 622 623 (624 ± 3.2)	521 552 588 (554 ± 33.5)	223 216 211 (217 ± 6.0)

表 3

復帰変異試験結果表 II

被験物質：2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸

M-91-184

物質	検体濃度 (μg/プレート)	S9Mix の有無	復帰変異 コロニー数/プレート 塩基対置換型 TA100	TA1535	WP2uvrA	フレームシフト型 TA98	TA1537
溶媒対照		-	129 146 105 (127 ± 20.6)	13 11 13 (12 ± 1.2)	18 17 23 (19 ± 3.2)	25 30 27 (27 ± 2.5)	10 8 9 (9 ± 1.0)
検体	156.3	-	149 122 132 (134 ± 13.7)				
	312.5	-	130 140 104 (125 ± 18.6)	18 27 14 (20 ± 6.7)	22 28 25 (25 ± 3.0)	34 27 12 (24 ± 11.2)	9 11 6 (9 ± 2.5)
	625	-	133 116 118 (122 ± 9.3)	11 18 16 (15 ± 3.6)	26 31 27 (28 ± 2.6)	16 30 23 (23 ± 7.0)	10 8 10 (9 ± 1.2)
	1250	-	128 156 129 (138 ± 15.9)	20 19 20 (20 ± 0.6)	28 21 27 (25 ± 3.8)	18 23 17 (19 ± 3.2)	7 9 10 (9 ± 1.5)
	2500	-	132 138 125 (132 ± 6.5)	15 26 14 (18 ± 6.7)	39 37 21 (32 ± 9.9)	15 48 18 (27 ± 18.2)	6 9 11 (9 ± 2.5)
	5000	-	149 123 163 (145 ± 20.3)	20 15 14 (16 ± 3.2)	27 23 24 (25 ± 2.1)	24 16 26 (22 ± 5.3)	7 10 10 (9 ± 1.7)
溶媒対照		+	150 106 139 (132 ± 22.9)	11 10 7 (9 ± 2.1)	26 17 29 (24 ± 6.2)	35 46 36 (39 ± 6.1)	17 9 8 (11 ± 4.9)
検体	312.5	+	163 122 118 (134 ± 24.9)	17 18 16 (17 ± 1.0)	29 27 23 (26 ± 3.1)	57 40 37 (45 ± 10.8)	8 10 17 (12 ± 4.7)
	625	+	134 134 154 (141 ± 11.5)	16 11 10 (12 ± 3.2)	27 21 24 (24 ± 3.0)	37 31 42 (37 ± 5.5)	12 10 12 (11 ± 1.2)
	1250	+	163 150 156 (156 ± 6.5)	16 12 16 (15 ± 2.3)	27 26 18 (24 ± 4.9)	37 40 26 (34 ± 7.4)	13 8 13 (11 ± 2.9)
	2500	+	119 150 139 (136 ± 15.7)	14 12 17 (14 ± 2.5)	16 27 31 (25 ± 7.8)	39 36 31 (35 ± 4.0)	16 6 16 (13 ± 5.8)
	5000	+	148 138 177 (154 ± 20.3)	24 12 18 (18 ± 6.0)	26 20 18 (21 ± 4.2)	38 39 48 (42 ± 5.5)	10 16 18 (15 ± 4.2)
陽性対照 S9Mix を必要としないもの	名称		AF2 0.01	SA 0.5	AF2 0.01	AF2 0.1	9AA 80
	濃度 (μg/プレート)						
	コロニー数/プレート		719 708 671 (699 ± 25.1)	236 271 297 (268 ± 30.6)	121 126 140 (129 ± 9.8)	723 717 708 (716 ± 7.5)	2087 2139 2951 (2392 ± 484.5)
陽性対照 S9Mix を必要とするもの	名称		2AA 1	2AA 2	2AA 10	2AA 0.5	2AA 2
	濃度 (μg/プレート)						
	コロニー数/プレート		703 767 694 (721 ± 39.8)	221 213 214 (216 ± 4.4)	372 337 393 (367 ± 28.3)	311 335 284 (310 ± 25.5)	219 208 167 (198 ± 27.4)

表 4

再現性試験結果表 I

被験物質：2-アミノ-5- クロロ-4- メチルベンゼンスルホン酸

M-91-184

物質	検体濃度 (μg/プレート)	S9Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート 塩基対置換型 TA100	TA1535	WP2uvrA	フレームシフト型 TA98	TA1537
溶媒対照		-					
検体		-					
		-					
		-					
		-					
		-					
溶媒対照		+		13 18 18 (16 ± 2.9)			
検体	312.5	+		20 11 7 (13 ± 6.7)			
	625	+		18 12 13 (14 ± 3.2)			
	1250	+		12 11 19 (14 ± 4.4)			
	2500	+		13 12 19 (15 ± 3.8)			
	5000	+		21 15 21 (19 ± 3.5)			
陽性対照 S9Mix を必要としないもの	名称		AF2 0.01	SA 0.5	AF2 0.01	AF2 0.1	9AA 80
	濃度 (μg/プレート)						
	コロニー数/プレート						
陽性対照 S9Mix を必要とするもの	名称		2AA 1	2AA 2	2AA 10	2AA 0.5	2AA 2
	濃度 (μg/プレート)						
	コロニー数/プレート			188 204 191 (194 ± 8.5)			

表 5

再現性試験結果表 II

被験物質：2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸

M-91-184

物質	検体濃度 (μg/プレート)	S9Mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート 塩基対置換型 TA100	TA1535	WP2uvrA	フレームシフト型 TA98	TA1537
溶媒対照		-					
検体		-					
		-					
		-					
		-					
		-					
溶媒対照		+		14 12 12 (13 ± 1.2)			
検体	312.5	+		10 15 21 (15 ± 5.5)			
	625	+		13 15 15 (14 ± 1.2)			
	1250	+		19 8 15 (14 ± 5.6)			
	2500	+		17 13 17 (16 ± 2.3)			
	5000	+		11 25 13 (16 ± 7.6)			
陽性対照 S9Mix を必要としないもの	名称		AF2	SA	AF2	AF2	9AA
	濃度 (μg/プレート)		0.01	0.5	0.01	0.1	80
	コロニー数/プレート						
陽性対照 S9Mix を必要とするもの	名称		2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
	濃度 (μg/プレート)		1	2	10	0.5	2
	コロニー数/プレート			295 274 250 (273 ± 22.5)			