

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  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の用量で、本試験は TA100 の直接試験のみは 156.3~5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、その他については、312.5~5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  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<sup>(1)</sup>、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<sup>(2)</sup>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ACMB  
BS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。

ACMBBS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ACMBBS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) 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%	ビオチン	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	0.2 g	リン酸水素アンモニウムナトリウム・4水和物	3.5 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

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 <sup>**</sup>	0.1 ml	NADH	4 μmole
塩化マグネシウム	8 μmole	NADPH	4 μmole
塩化カルシウム	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  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  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  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  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  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ （TA100 の直接試験においてのみ 156.3～5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  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 のロットが変わったため、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.

# 用量設定試験結果表

表 1

試験物質: 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 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	SSMix の 有 無	復 帰 変 異					コロニー数/プレート									
			塩 基 対 置 換 型			フ レ ー ム シ フ ト 型											
			TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
溶 媒 対 照		-	135 (131 $\pm$ 5.1)	132 (125 $\pm$ 5.1)	125 (5.1)	15 (16 $\pm$ 1.5)	16 (18 $\pm$ 1.5)	18 (14 $\pm$ 3.1)	13 (17 $\pm$ 3.1)	11 (11 $\pm$ 3.1)	18 (19 $\pm$ 1.2)	20 (20 $\pm$ 1.2)	20 (20 $\pm$ 1.2)	10 (7 $\pm$ 3.6)	3 (3 $\pm$ 3.6)	8 (8 $\pm$ 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 (145 $\pm$ 7.8)	140 (141 $\pm$ 7.8)	141 (7.8)	21 (16 $\pm$ 5.6)	10 (17 $\pm$ 5.6)	17 (5.6)	19 (15 $\pm$ 5.5)	18 (9 $\pm$ 5.5)	9 (25 $\pm$ 8.4)	39 (35 $\pm$ 8.4)	40 (25 $\pm$ 8.4)	25 (19 $\pm$ 7.4)	5 (16 $\pm$ 7.4)	16 (19 $\pm$ 7.4)	19 (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			
隔 性 対 照	SSMix 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 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	673 686 605 (655 $\pm$ 43.5)			188 245 223 (219 $\pm$ 28.7)			160 179 168 (169 $\pm$ 9.5)			745 784 757 (762 $\pm$ 20.0)			2796 2908 2903 (2869 $\pm$ 63.3)		
	SSMix を 必要と するもの	名 称	2AA 1			2AA 2			2AA 10			2AA 0.5			2AA 2		
		濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	808 787 812 (802 $\pm$ 13.4)			173 151 157 (160 $\pm$ 11.4)			626 633 629 (629 $\pm$ 3.5)			146 189 173 (169 $\pm$ 21.7)			177 184 161 (174 $\pm$ 11.8)		



# 復帰変異試験結果表 II

表 3

試験物質: 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)	S Mixの有無	復帰変異														
			塩基対置換型						コロニー数/プレート								
			TA100			TA1535			WP2vrA			フレームシフト型					
			TA98			TA1537											
溶媒対照		-	129 (127 ±)	146 105 (20.6)	13 (12 ±)	11 13 (1.2)	18 (19 ±)	17 23 (3.2)	25 (27 ±)	30 27 (2.5)	10 (9 ±)	8 9 (1.0)					
検体	156.3	-	149 (134 ±)	122 132 (13.7)													
	312.5	-	130 (125 ±)	140 104 (18.6)	18 (20 ±)	27 14 (6.7)	22 (25 ±)	28 25 (3.0)	34 (24 ±)	27 12 (11.2)	9 (9 ±)	11 6 (2.5)					
	625	-	133 (122 ±)	116 118 (9.3)	11 (15 ±)	18 16 (3.6)	26 (28 ±)	31 27 (2.6)	16 (23 ±)	30 23 (7.0)	10 (9 ±)	8 10 (1.2)					
	1250	-	128 (138 ±)	156 129 (15.9)	20 (20 ±)	19 20 (0.6)	28 (25 ±)	21 27 (3.8)	18 (19 ±)	23 17 (3.2)	7 (9 ±)	9 10 (1.5)					
	2500	-	132 (132 ±)	138 125 (6.5)	15 (18 ±)	26 14 (6.7)	39 (32 ±)	37 21 (9.9)	15 (27 ±)	48 18 (18.2)	6 (9 ±)	9 11 (2.5)					
	5000	-	149 (145 ±)	123 163 (20.3)	20 (16 ±)	15 14 (3.2)	27 (25 ±)	23 24 (2.1)	24 (22 ±)	16 26 (5.3)	7 (9 ±)	10 10 (1.7)					
溶媒対照		+	150 (132 ±)	106 139 (22.9)	11 (9 ±)	10 7 (2.1)	26 (24 ±)	17 29 (6.2)	35 (39 ±)	46 36 (6.1)	17 (11 ±)	9 8 (4.9)					
検体	312.5	+	163 (134 ±)	122 118 (24.9)	17 (17 ±)	18 16 (1.0)	29 (26 ±)	27 23 (3.1)	57 (45 ±)	40 37 (10.8)	8 (12 ±)	10 17 (4.7)					
	625	+	134 (141 ±)	134 154 (11.5)	16 (12 ±)	11 10 (3.2)	27 (24 ±)	21 24 (3.0)	37 (37 ±)	31 42 (5.5)	12 (11 ±)	10 12 (1.2)					
	1250	+	163 (156 ±)	150 156 (6.5)	16 (15 ±)	12 16 (2.3)	27 (24 ±)	26 18 (4.9)	37 (34 ±)	40 26 (7.4)	13 (11 ±)	8 13 (2.9)					
	2500	+	119 (136 ±)	150 139 (15.7)	14 (14 ±)	12 17 (2.5)	16 (25 ±)	27 31 (7.8)	39 (35 ±)	36 31 (4.0)	16 (13 ±)	6 16 (5.8)					
	5000	+	148 (154 ±)	138 177 (20.3)	24 (18 ±)	12 18 (6.0)	26 (21 ±)	20 18 (4.2)	38 (42 ±)	39 48 (5.5)	10 (15 ±)	16 18 (4.2)					
対照	S Mixを必要としないもの	名称 濃度 (µg/プレート)	AF2 0.01			SA 0.5			AF2 0.01			AF2 0.1			9AA 80		
		コロニー数/プレート	719 (699 ±)	708 671 (25.1)	236 (268 ±)	271 297 (30.6)	121 (129 ±)	126 140 (9.8)	723 (716 ±)	717 708 (7.5)	2087 (2392 ±)	2139 2951 (484.5)					
	S Mixを必要とするもの	名称 濃度 (µg/プレート)	2AA 1			2AA 2			2AA 10			2AA 0.5			2AA 2		
		コロニー数/プレート	703 (721 ±)	767 694 (39.8)	221 (216 ±)	213 214 (4.4)	372 (367 ±)	337 393 (28.3)	311 (310 ±)	335 284 (25.5)	219 (198 ±)	208 167 (27.4)					

表 4

## 再現性試験結果表 I

M-91-184

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

物質	検体濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	SMix の有無	復 帰 変 異					
			塩 基 対 置 換 型			コロニー数/プレート		
			TA100	TA1535	WP2JvTA	TA98	TA1537	
溶媒 対照		-						
検 体		-						
		-						
		-						
		-						
		-						
溶媒 対照		+		13 ( 16 $\pm$ 18 2.9)				
検 体	312.5	+		20 ( 13 $\pm$ 11 6.7)				
	625	+		18 ( 14 $\pm$ 12 3.2)				
	1250	+		12 ( 14 $\pm$ 11 4.4)				
	2500	+		13 ( 15 $\pm$ 12 3.8)				
	5000	+		21 ( 19 $\pm$ 15 3.5)				
陽 性 対 照	SMixを 必要と しないもの	名 称 濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	AF2 0.01	SA 0.5	AF2 0.01	AF2 0.1	9AA 80	
	SMixを 必要と するもの	名 称 濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	2AA 1	2AA 2	2AA 10	2AA 0.5	2AA 2	
		コロニー数 /プレート		188 ( 194 $\pm$ 204 8.5)	191			

# 再現性試験結果表 II

表 5

試験物質: 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 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	SSMixの有無	復 帰 変 異			コロニー数/プレート	
			塩 基 対 置 換 型			フ レ ー ム シ フ ト 型	
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
溶媒対照		-					
検 体		-					
		-					
		-					
		-					
		-					
溶媒対照		+		14 ( 13 $\pm$ )	12 ( 12 $\pm$ )	12 ( 1.2 )	
検 体	312.5	+		10 ( 15 $\pm$ )	15 ( 15 $\pm$ )	21 ( 5.5 )	
	625	+		13 ( 14 $\pm$ )	15 ( 14 $\pm$ )	15 ( 1.2 )	
	1250	+		19 ( 14 $\pm$ )	8 ( 14 $\pm$ )	15 ( 5.6 )	
	2500	+		17 ( 16 $\pm$ )	13 ( 16 $\pm$ )	17 ( 2.3 )	
	5000	+		11 ( 16 $\pm$ )	25 ( 16 $\pm$ )	13 ( 7.6 )	
対 照	SSMixを必要としないもの	名 称	AP2 0.01	SA 0.5	AP2 0.01	AP2 0.1	9AA 80
		濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )					
	SSMixを必要とするもの	名 称	2AA 1	2AA 2	2AA 10	2AA 0.5	2AA 2
		濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )					
				295 ( 273 $\pm$ )	274 ( 273 $\pm$ )	250 ( 22.5 )	