



3-アミノ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
材料および試験方法	3
試験結果および考察	6
参 考 文 献	8
Tables 1～4	

【要 約】

3-アミノ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 *uvrA* を用い、直接法および代謝活性化法のいずれも、用量設定試験は 50～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、本試験では 312.5～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 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、3-アミノ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、難分解性既存化学物質の1つである、3-アミノ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、
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。

試験に際して、ニュートリエントブロスNo 2 (OXOID, ロット番号：B-1674/1 およ
び B-1674/2) を入れたL字型試験管に種菌を接種し、37℃、約10～12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〕

3-アミノベンゼンスルホン酸 (CAS No 121-47-1、以下A B Sと略) は、分子量 173.19
の白ないし薄い灰色の粉末である。純度 98.6%のもの (不純物としてスルファニル酸
0.3%を含む, ロット番号：) を から供与
された。被験物質は、使用時まで密閉容器に入れ、湿気をさけて冷暗所に保管した。被験
物質は、この状態で1年間安定であることが製造者によって確認されている。

A B S は、ジメチルスルホキシド (以下DMSOと略：ロット番号：TWP 5445 および APQ
5428、和光純薬工業(株)) 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。なお、調製にあたって、純度換
算は行わなかった。

秦野研究所においてA B S 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 (3 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、初期値 (0 時間)
の平均に対して、いずれも 101%であった。これらの値は、当研究所の基準を満たしてい
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 溶液の含量は既定濃度に対し、99.5~100%、3.125 mg/ml 溶液は、99.9~102%であった。これらの値も当研究所の基準を満たしていた (Appendix 2)。

以上の結果から、ABS 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 : フリルアマイド	(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%
9-AA : 9-アミリアクリン	(Sigma Chem. Co.)	ロット番号 96F05641,	純度>98%
2-AA : 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%

AF-2, 2-AA 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。9-AA は DMSO に、SA は蒸留水に溶解して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) 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%	イオニン	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 (用量設定試験においてはロット番号 : DJ040IH, 1992年9月4日製造、本試験においては、ロット番号 : DJ060KH, 1992年11月10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	リン酸水素アンモニウムナトリウム・4水和物	3.5 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	0.1 ml	NADH	4 μ mol
塩化マグネシウム	8 μ mol	NADPH	4 μ mol
塩化カリウム	33 μ mol	0.2M リン酸緩衝液 (pH 7.4)	0.5 ml
グルコース・6リン酸	5 μ mol		

** : 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-280、1992年7月24日製造およびRAA-285、1992年11月20日製造)を -80°C で凍結保存し、用時に解凍した。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°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、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 Table 1 に示した。ABS 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、試験を実施したところ、すべての検定菌の直接法あるいは代謝活性化法のいずれにおいても、抗菌性は認められなかった。また被験物質に由来する、寒天平板上の沈殿物は代謝活性化法において、最高用量の 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で認められた。

以上の結果から、本試験における最高用量を直接法、代謝活性化法ともに、すべての検定菌において、5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とし公比 2 で、5 用量を設定することとした。

〔本試験〕

結果を Tables 2、3 に示した。ABS について 312.5～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で試験を実施した。2 回の試験を通して、1 回目の TA1537 の代謝活性化法の 625 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ において陰性対照の 2 倍となったほかは、用いた 5 種類の検定菌の直接法、代謝活性化法のいずれにおいても、陰性対照の 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。TA1537 の代謝活性化法については、再現性試験を実施することとした。

なお、代謝活性化法において、5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で被験物質に由来する沈殿物が寒天平板上に認められた。

〔再現性試験〕

TA1537 の代謝活性化法については、再現性試験を実施した。結果を Table 4 に示したが、いずれの用量においても陰性対照の 2 倍以上となる変異コロニーの増加は認められなかった。本試験および再現性試験の結果から、TA1537 の代謝活性化法についても陰性であると判定した。

ABS 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、ABS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.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 bacterial reverse mutation assay with 3-aminobenzenesulfonic acid

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							
S9 Mix (-)	0	135	135	143	10	12	9	11	9	21	16	23	21	4	7	7	(138 \pm 4.6)	(10 \pm 1.5)	(14 \pm 6.4)	(20 \pm 3.6)	(6 \pm 1.7)
	50	112			13			17			26			5							
	150	136			12			16			25			8							
	500	133			11			18			20			6							
	1500	122			15			20			20			7							
	5000	140			18			18			27			6							
S9 Mix (+)	0	133	123	135	13	14	16	11	12	13	46	33	28	9	10	5	(130 \pm 6.4)	(14 \pm 1.5)	(12 \pm 1.0)	(36 \pm 9.3)	(8 \pm 2.6)
	50	103			10			12			30			12							
	150	151			14			14			31			10							
	500	156			18			14			28			9							
	1500	140			18			17			30			9							
	5000 #	147			20			22			36			8							
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	705	764	802	180	193	174	471	406	447	225	197	216	226	185	193	(757 \pm 48.9)	(182 \pm 9.7)	(441 \pm 32.9)	(213 \pm 14.3)	(201 \pm 21.7)

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

#: Precipitant was observed on the surface of agar plates.

Table 2. Results of bacterial reverse mutation assay (I) with 3-aminobenzenesulfonic acid

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	156	140	15	10	6	13	22	23	26	25	23	11	6	8	
		(139 \pm 18.0)			(10 \pm 4.5)			(19 \pm 5.5)			(25 \pm 1.5)			(8 \pm 2.5)			
	312.5	134	146	113	11	19	15	19	17	16	23	16	37	7	6	6	
		(131 \pm 16.7)			(15 \pm 4.0)			(17 \pm 1.5)			(25 \pm 10.7)			(6 \pm 0.6)			
	625	142	101	124	12	14	16	19	16	20	31	31	25	11	9	7	
		(122 \pm 20.6)			(14 \pm 2.0)			(18 \pm 2.1)			(29 \pm 3.5)			(9 \pm 2.0)			
	1250	135	131	106	16	13	18	26	22	14	24	30	23	13	4	8	
	(124 \pm 15.7)			(16 \pm 2.5)			(21 \pm 6.1)			(26 \pm 3.8)			(8 \pm 4.5)				
2500	139	146	116	16	18	12	21	19	15	36	21	24	6	9	8		
	(134 \pm 15.7)			(15 \pm 3.1)			(18 \pm 3.1)			(27 \pm 7.9)			(8 \pm 1.5)				
5000	131	123	131	7	9	19	20	26	17	17	27	38	6	8	8		
	(128 \pm 4.6)			(12 \pm 6.4)			(21 \pm 4.6)			(27 \pm 10.5)			(7 \pm 1.2)				
S9Mix (+)	0	131	128	180	17	17	14	22	15	19	49	38	34	12	7	6	
		(146 \pm 29.2)			(16 \pm 1.7)			(19 \pm 3.5)			(40 \pm 7.8)			(8 \pm 3.2)			
	312.5	165	175	155	14	6	11	32	23	30	57	47	51	13	18	11	
		(165 \pm 10.0)			(10 \pm 4.0)			(28 \pm 4.7)			(52 \pm 5.0)			(14 \pm 3.6)			
	625	134	163	163	13	9	12	25	26	31	49	53	50	28	8	11	
		(153 \pm 16.7)			(11 \pm 2.1)			(27 \pm 3.2)			(51 \pm 2.1)			(16 \pm 10.8)			
	1250	155	138	156	12	10	20	24	23	20	37	48	53	9	14	7	
	(150 \pm 10.1)			(14 \pm 5.3)			(22 \pm 2.1)			(46 \pm 8.2)			(10 \pm 3.6)				
2500	152	144	116	13	18	17	19	22	21	31	45	53	11	17	10		
	(137 \pm 18.9)			(16 \pm 2.6)			(21 \pm 1.5)			(43 \pm 11.1)			(13 \pm 3.8)				
5000 #	121	144	126	12	13	14	26	31	26	52	49	36	6	14	9		
	(130 \pm 12.1)			(13 \pm 1.0)			(28 \pm 2.9)			(46 \pm 8.5)			(10 \pm 4.0)				
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	541	511	574	147	155	195	194	156	134	809	792	868	2215	2272	2464	
		(542 \pm 31.5)			(166 \pm 25.7)			(161 \pm 30.4)			(823 \pm 39.9)			(2317 \pm 130.5)			
	Number of colonies / plate	938	827	882	183	188	212	912	958	957	381	360	393	298	276	276	
		(882 \pm 55.5)			(194 \pm 15.5)			(942 \pm 26.3)			(378 \pm 16.7)			(283 \pm 12.7)			

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

#: Precipitant was observed on the surface of agar plates.

Table 3. Results of bacterial reverse mutation assay (II) with 3-aminobenzenesulfonic acid

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	132	118	115	27	18	10	15	29	28	23	26	30	9	3	7	(122 \pm 9.1)	(18 \pm 8.5)	(24 \pm 7.8)	(26 \pm 3.5)	(6 \pm 3.1)	
	312.5	135	131	116	15	13	8	34	24	17	18	19	24	12	7	10	(127 \pm 10.0)	(12 \pm 3.6)	(25 \pm 8.5)	(20 \pm 3.2)	(10 \pm 2.5)	
	625	129	145	124	15	12	12	21	22	27	26	17	18	4	3	9	(133 \pm 11.0)	(13 \pm 1.7)	(23 \pm 3.2)	(20 \pm 4.9)	(5 \pm 3.2)	
	1250	132	138	114	16	18	9	22	14	19	26	15	18	9	11	6	(128 \pm 12.5)	(14 \pm 4.7)	(18 \pm 4.0)	(20 \pm 5.7)	(9 \pm 2.5)	
	2500	146	103	126	18	17	13	22	24	24	32	23	20	8	2	2	(125 \pm 21.5)	(16 \pm 2.6)	(23 \pm 1.2)	(25 \pm 6.2)	(4 \pm 3.5)	
	5000	116	131	96	10	12	14	27	21	22	23	18	27	11	1	9	(114 \pm 17.6)	(12 \pm 2.0)	(23 \pm 3.2)	(23 \pm 4.5)	(7 \pm 5.3)	
S9Mix (+)	0	120	147	114	15	18	15	21	24	32	31	26	39	12	10	9	(127 \pm 17.6)	(16 \pm 1.7)	(26 \pm 5.7)	(32 \pm 6.6)	(10 \pm 1.5)	
	312.5	114	136	154	20	18	19	21	15	24	39	37	32	15	17	20	(135 \pm 20.0)	(19 \pm 1.0)	(20 \pm 4.6)	(36 \pm 3.6)	(17 \pm 2.5)	
	625	136	124	164	15	14	15	32	26	27	25	28	38	11	11	12	(141 \pm 20.5)	(15 \pm 0.6)	(28 \pm 3.2)	(30 \pm 6.8)	(11 \pm 0.6)	
	1250	125	134	138	18	13	11	32	21	27	30	36	29	17	10	9	(132 \pm 6.7)	(14 \pm 3.6)	(27 \pm 5.5)	(32 \pm 3.8)	(12 \pm 4.4)	
	2500	136	125	135	21	14	14	29	22	21	38	36	26	14	14	13	(132 \pm 6.1)	(16 \pm 4.0)	(24 \pm 4.4)	(33 \pm 6.4)	(14 \pm 0.6)	
	5000 #	151	126	137	13	14	17	21	23	29	34	38	35	17	18	13	(138 \pm 12.5)	(15 \pm 2.1)	(24 \pm 4.2)	(36 \pm 2.1)	(16 \pm 2.6)	
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	866	875	884	270	254	292	1025	1045	1065	392	376	406	278	263	273	(875 \pm 9.0)	(272 \pm 19.1)	(1045 \pm 20.0)	(391 \pm 15.0)	(271 \pm 7.6)	

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

#: Precipitant was observed on the surface of agar plates.

Table 4. Results of bacterial reverse mutation assay (III) with 3-aminobenzenesulfonic acid

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 (-)							
S9Mix (+)	0					13 13 8 (11 ± 2.9)	
	312.5					9 14 9 (11 ± 2.9)	
	625					14 15 12 (14 ± 1.5)	
	1250					14 16 10 (13 ± 3.1)	
	2500					12 21 16 (16 ± 4.5)	
	5000					11 10 15 (12 ± 2.6)	
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						
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (µg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate					166 213 176 (185 ± 24.8)	

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