

4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-  
ナフタレンジスルホン酸  
モノナトリウム塩の  
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 1~3	

## 要 約

4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウム塩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 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、4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウム塩は、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、4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウム塩について、細菌を用いる復帰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<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、  
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、0.5%塩化ナトリウム添加ニュートリエントプロス (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〕

4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウム塩 (CAS No.  
5460-09-3、以下AHNSと略) は、分子量 319.31 の淡褐色粉末である。純  
度87.4%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。

AHNS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。なお、調製にあたって、純度換算  
は行わなかった。

試験の開始に先立って、秦野研究所においてAHNS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 (3mg/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、それぞれ初期値の平均（0時間）に対して、96.1および101%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 溶液の含量は既定濃度に対し、98.4~101%、3.125 mg/ml 溶液は、103~108%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、A H N S 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 <sup>株</sup> )	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 <sup>株</sup> )	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 <sup>株</sup> )	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 <sup>株</sup> )	ロット番号 EDE7881,	純度>90%

AF-2, 9-AA, 2-AA は DMSO (和光純薬工業<sup>株</sup>) 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（用量設定試験においてはロット番号：DJ050GG, 1991年7月9日製造、本試験においては、ロット番号：DJ070JG, 1991年10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
リン酸水素二カルウム	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㈱、ロット番号 RAA-258、1991年8月23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。

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用量を設定することとした。

### 〔本試験〕

結果を表2、3に示した。AHNS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、用いた5種類の検定菌の直接試験、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数の増加は認められなかった。また、すべての検定菌において抗菌性は認められなかった。

用量設定試験において、WP2の最低用量、50  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  で陰性対照の2倍以上の変異コロニーが認められたが、本試験では2回とも、WP2において変異コロニー数の増加は認められなかった。以上から、WP2の用量設定試験における変異コロニー数の増加は偶発的なものと考えられた。

AHNS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、AHNS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：4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウム塩

M-91-188

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		フ レーム シフト 型			フ レーム シフト 型				
			TA100			TA1535		WP2uvrA		TA98			TA1537		
溶媒対照		-	130 (138 ±)	143 142 7.2)	14 (12 ±)	13 10 2.1)	2 (11 ±)	15 17 8.1)	23 (26 ±)	28 27 2.6)	7 (8 ±)	7 10 1.7)			
検 体	50	-	151		9		16		15		12				
	150	-	131		11		15		14		12				
	500	-	123		15		15		15		5				
	1500	-	138		12		16		29		9				
	5000	-	135		15		10		10		9				
溶媒対照		+	138 (139 ±)	146 132 7.0)	11 (15 ±)	18 17 3.8)	16 (15 ±)	17 13 2.1)	38 (39 ±)	36 42 3.1)	10 (11 ±)	9 13 2.1)			
検 体	50	+	148		15		33		31		12				
	150	+	129		15		11		30		13				
	500	+	123		12		15		22		9				
	1500	+	159		12		16		20		12				
	5000	+	116		18		27		14		9				
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 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	669 (669 ±)			699 639 30.0)	306 (319 ±)	313 338 16.8)	131 (139 ±)	128 157 15.9)	556 (561 ±)	548 578 15.5)	1945 (2329 ±)	2032 3009 590.8)	
	SSMixを必要とするもの	名 称	2AA 1			2AA 2			2AA 10			2AA 0.5		2AA 2	
		濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	759 (798 ±)			857 777 52.2)	248 (245 ±)	238 249 6.1)	519 (498 ±)	505 471 24.7)	196 (189 ±)	201 169 17.2)	171 (182 ±)	203 172 18.2)	

# 復帰変異試験結果表 I

表 2

試験物質: 4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジルスルホン酸モノナトリウム塩

M-91-188

物 質	検 体 濃 度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	SSMix の 有 無	復 帰 変 異														
			塩 基 対 置 換 型						コ ロ ニ ー 数 / プ レ ー ト								
			TA100		TA1535		WP2uvrA		TA98		TA1537						
溶 媒 照 射		-	146 (131 $\pm$ )	127 (13.5)	120	22 (18 $\pm$ )	17 (15.6)	15	9 (13 $\pm$ )	13 (3.5)	16	27 (22 $\pm$ )	18 (4.6)	21	10 (9 $\pm$ )	10 (2.3)	6
検 体	312.5	-	168 (160 $\pm$ )	176 (21.7)	135	26 (17 $\pm$ )	8 (9.0)	16	12 (15 $\pm$ )	18 (3.1)	16	26 (22 $\pm$ )	21 (3.2)	20	4 (5 $\pm$ )	6 (1.2)	6
	625	-	144 (139 $\pm$ )	140 (5.0)	134	13 (15 $\pm$ )	14 (2.6)	18	12 (11 $\pm$ )	10 (1.2)	12	20 (20 $\pm$ )	22 (2.5)	17	8 (9 $\pm$ )	9 (0.6)	9
	1250	-	129 (117 $\pm$ )	115 (10.7)	108	16 (12 $\pm$ )	8 (4.0)	11	13 (13 $\pm$ )	15 (2.0)	11	11 (14 $\pm$ )	13 (3.1)	17	7 (7 $\pm$ )	8 (1.5)	5
	2500	-	136 (138 $\pm$ )	138 (2.0)	140	18 (16 $\pm$ )	18 (2.9)	13	8 (12 $\pm$ )	17 (4.7)	10	17 (19 $\pm$ )	17 (2.9)	22	6 (8 $\pm$ )	8 (1.5)	9
	5000	-	133 (140 $\pm$ )	148 (7.5)	140	16 (15 $\pm$ )	12 (2.3)	16	15 (14 $\pm$ )	10 (3.2)	16	21 (18 $\pm$ )	12 (4.9)	20	2 (4 $\pm$ )	5 (2.1)	6
溶 媒 照 射		+	163 (137 $\pm$ )	125 (22.2)	124	15 (12 $\pm$ )	13 (3.1)	9	19 (17 $\pm$ )	19 (2.9)	14	45 (42 $\pm$ )	45 (4.6)	37	10 (10 $\pm$ )	9 (1.0)	11
検 体	312.5	+	156 (155 $\pm$ )	158 (3.6)	151	12 (14 $\pm$ )	15 (2.1)	16	19 (15 $\pm$ )	15 (4.0)	11	46 (39 $\pm$ )	27 (10.4)	44	4 (7 $\pm$ )	6 (3.1)	10
	625	+	149 (133 $\pm$ )	132 (15.0)	119	8 (10 $\pm$ )	10 (1.5)	11	20 (15 $\pm$ )	13 (4.7)	11	37 (30 $\pm$ )	25 (6.4)	27	8 (6 $\pm$ )	4 (2.1)	7
	1250	+	109 (129 $\pm$ )	156 (24.3)	122	7 (11 $\pm$ )	12 (3.2)	13	13 (11 $\pm$ )	9 (2.1)	12	27 (26 $\pm$ )	27 (1.2)	25	6 (7 $\pm$ )	10 (2.3)	6
	2500	+	163 (129 $\pm$ )	109 (29.4)	116	15 (12 $\pm$ )	9 (3.0)	12	12 (14 $\pm$ )	13 (2.1)	16	21 (26 $\pm$ )	31 (5.0)	25	7 (5 $\pm$ )	5 (2.5)	2
	5000	+	141 (140 $\pm$ )	145 (5.6)	134	13 (12 $\pm$ )	16 (4.0)	8	12 (12 $\pm$ )	12 (0.6)	13	28 (29 $\pm$ )	30 (1.0)	29	3 (6 $\pm$ )	10 (3.5)	6
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 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )		AF2 0.01		SA 0.5			AF2 0.01			AF2 0.1			9AA 80			
	コロニー数 プレート		694 (654 $\pm$ )	612 (41.1)	657	166 (184 $\pm$ )	194 (15.4)	191	122 (119 $\pm$ )	127 (10.4)	107	796 (780 $\pm$ )	748 (28.0)	797	2750 (3113 $\pm$ )	3527 (391.1)	3061
	SSMixを 必要と するもの	名 称	2AA 1		2AA 2			2AA 10			2AA 0.5			2AA 2			
濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )		2AA 1		2AA 2			2AA 10			2AA 0.5			2AA 2				
コロニー数 プレート		991 (1046 $\pm$ )	1051 (52.7)	1096	231 (203 $\pm$ )	196 (24.8)	183	899 (866 $\pm$ )	897 (54.9)	803	463 (372 $\pm$ )	345 (81.3)	307	198 (205 $\pm$ )	225 (18.0)	191	

# 復帰変異試験結果表 II

表 3

被験物質: 4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジルスルホン酸モノナトリウム塩

M-91-188

物質	検体濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	SSMixの有無	復帰変異									
			塩基対置換型						コロニー数/プレート			
			TA100		TA1535		WP2uvrA		TA98		TA1537	
溶媒対照		-	159 (154 ± 6.2)	156 147 6.2)	21 (16 ± 4.2)	15 13 4.2)	18 (21 ± 6.1)	17 28 6.1)	22 (29 ± 7.0)	28 36 7.0)	16 (13 ± 3.6)	14 9 3.6)
検体	312.5	-	127 (135 ± 9.3)	145 132 9.3)	14 (13 ± 2.3)	14 10 2.3)	16 (15 ± 1.0)	15 14 1.0)	20 (25 ± 5.7)	31 23 5.7)	13 (9 ± 3.2)	7 8 3.2)
	625	-	150 (137 ± 11.9)	127 133 11.9)	25 (19 ± 6.0)	19 13 6.0)	16 (12 ± 4.0)	13 8 4.0)	23 (24 ± 4.2)	29 21 4.2)	5 (6 ± 1.2)	7 5 1.2)
	1250	-	127 (131 ± 3.5)	133 133 3.5)	15 (17 ± 2.1)	18 19 2.1)	10 (12 ± 2.9)	10 15 2.9)	14 (17 ± 3.1)	20 16 3.1)	7 (6 ± 1.7)	4 7 1.7)
	2500	-	139 (140 ± 6.6)	134 147 6.6)	10 (13 ± 4.4)	11 18 4.4)	20 (16 ± 3.8)	14 13 3.8)	17 (21 ± 3.8)	23 24 3.8)	8 (9 ± 2.6)	7 12 2.6)
	5000	-	138 (138 ± 12.5)	125 150 12.5)	19 (16 ± 3.0)	13 16 3.0)	11 (15 ± 4.0)	19 16 4.0)	22 (21 ± 1.2)	20 22 1.2)	6 (7 ± 1.7)	9 6 1.7)
溶媒対照		+	155 (154 ± 16.0)	138 170 16.0)	15 (16 ± 8.5)	8 25 8.5)	16 (14 ± 2.0)	14 12 2.0)	33 (32 ± 6.0)	26 38 6.0)	14 (13 ± 0.6)	13 13 0.6)
検体	312.5	+	136 (131 ± 14.7)	142 114 14.7)	16 (14 ± 2.5)	14 11 2.5)	18 (17 ± 1.5)	17 15 1.5)	41 (38 ± 8.5)	44 28 8.5)	8 (14 ± 5.5)	18 17 5.5)
	625	+	137 (130 ± 6.7)	124 128 6.7)	22 (18 ± 3.5)	18 15 3.5)	21 (17 ± 3.2)	15 16 3.2)	26 (23 ± 5.2)	26 17 5.2)	10 (11 ± 1.7)	10 13 1.7)
	1250	+	137 (133 ± 8.4)	138 123 8.4)	17 (15 ± 2.5)	12 15 2.5)	24 (16 ± 7.1)	15 10 7.1)	25 (27 ± 5.3)	33 23 5.3)	7 (8 ± 2.3)	7 11 2.3)
	2500	+	126 (126 ± 9.0)	135 117 9.0)	11 (12 ± 1.0)	13 12 1.0)	15 (16 ± 3.6)	20 13 3.6)	27 (28 ± 1.5)	28 30 1.5)	9 (11 ± 2.6)	14 10 2.6)
	5000	+	115 (120 ± 7.2)	128 116 7.2)	20 (14 ± 5.1)	10 13 5.1)	19 (17 ± 4.0)	12 19 4.0)	26 (24 ± 4.4)	27 19 4.4)	14 (14 ± 1.5)	12 15 1.5)
陽性対照	SSMix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	
		コロニー数/プレート	653 (670 ± 15.5)	675 683 15.5)	184 (159 ± 22.5)	154 140 22.5)	106 (106 ± 0.6)	105 106 0.6)	779 (804 ± 41.0)	781 851 41.0)	2693 (2696 ± 60.1)	2638 2758 60.1)
	SSMix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	1001 (972 ± 39.3)	927 987 39.3)	187 (172 ± 13.7)	160 169 13.7)	748 (766 ± 31.5)	747 802 31.5)	201 (205 ± 6.7)	202 213 6.7)	157 (182 ± 25.5)	180 208 25.5)