

4-メチルベンゼンスルホンアミド 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	8
表 1~3	

要 約

4-メチルベンゼンスルホンアミド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 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で試験を行った。

その結果、2回の本試験とも、用いた5種類の検定菌において、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-メチルベンゼンスルホンアミドは、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

高生産量既存化学物質で、現在十分な安全性資料のない、4-メチルベンゼンスルホンアミドについて、OECDを中心として行われている国際協力による、安全性点検評価事業の一環として、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⁽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°C 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°C 、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-メチルベンゼンスルホンアミド (CAS No.70-55-3、以下MBSAと略) は分子量 171.23、融点 $138\sim 139^{\circ}\text{C}$ 、水に難溶の白色小葉状結晶である。純度 99.9%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。

MBSAは、ジメチルスルホキシド (DMSO: ロット番号DSL5887、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、同溶媒でさらに公比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MBSAのDMSO溶液中での安定性試験を行った。安定性試験における溶媒は当研究所で実施される、培養細胞を用いる染色体異常試験と共通なことから、両試験における最高濃度 (340 mg/ml) および

最低濃度 (3.125 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、それぞれ初期値の平均 (0 時間) に対して 98.8% および 98.4% 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 100~101%、3.125 mg/ml 溶液は、103~104% 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、MBSA 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(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 TLN5556,	純度 >90%
9-AA : 9-アミノアクリジン	(東京化成工業(株))	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(株))	ロット番号 EDE7881,	純度 >90%

AF-2, 9-AA, 2-AA は DMSO (和光純薬工業(株) ロット番号 DSL5887) 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%	ピオチン	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（ロット番号：DJ050GG（1991年7月9日製造）および DJ060IG（1991年9月3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	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(株)、ロット番号 RAA-254 (1991年5月23日製造) および 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、すべての菌種において抗菌性は認められなかったことから、本試験における最高用量を、5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とし、公比2で5用量を設定した。

〔本試験〕

結果を表2、3に示した。MBSA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、すべての菌種において抗菌性は認められなかった。

MBSA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、MBSA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
被験物質：4-メチルベンゼンスルホンアミド

用量設定試験結果表

M-91-159

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		TA98			TA1537	
			TA100		TA1535	WP2uvrA						
溶媒対照		-	115 (116 \pm)	123 (111 \pm 6.1)	11 (14 \pm)	12 (19 \pm 4.4)	13 (13 \pm)	7 (18 \pm 5.5)	15 (18 \pm)	21 (19 \pm 3.1)	8 (10 \pm)	10 (11 \pm 1.5)
検 体	50	-	73		9		12		9		5	
	150	-	80		13		13		16		2	
	500	-	96		12		16		12		5	
	1500	-	92		14		8		8		5	
	5000	-	84		17		12		17		6	
溶媒対照		+	104 (113 \pm)	134 (101 \pm 18.2)	14 (13 \pm)	12 (12 \pm 1.2)	15 (14 \pm)	17 (11 \pm 3.1)	36 (36 \pm)	39 (34 \pm 2.5)	6 (8 \pm)	7 (10 \pm 2.1)
検 体	50	+	77		11		11		31		14	
	150	+	79		11		12		41		8	
	500	+	86		15		14		34		5	
	1500	+	95		7		12		38		9	
	5000	+	96		16		11		38		8	
陽性対照	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 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	600 (616 \pm)		622 (626 \pm 14.0)		400 (363 \pm)		354 (335 \pm 33.4)		308 (289 \pm 14.7)	
		コロニー数/プレート	285 (293 \pm)		266 (327 \pm 31.2)		2642 (2493 \pm)		2410 (2428 \pm 129.1)			
		SSMixを必要とするもの	名 称	2AA 1		2AA 2		2AA 10		2AA 0.5		2AA 2
		濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	773 (715 \pm)		681 (691 \pm 50.5)		157 (153 \pm)		156 (155 \pm 2.1)		425 (453 \pm 49.4)	
		コロニー数/プレート	149 (154 \pm)		155 (159 \pm 5.0)		148 (136 \pm)		108 (153 \pm 24.7)			

表 2

被験物質：4-メチルベンゼンスルホンアミド

復帰変異試験結果表 I

M-91-159

物 質	検 体 濃 度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	SgMix 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 (130 \pm)	133 123 6.4)	9 (11 \pm)	13 10 2.1)	14 (12 \pm)	9 12 2.5)	21 (22 \pm)	19 27 4.2)	9 (11 \pm)	15 8 3.8)		
検 体	312.5	-	138 (135 \pm)	135 133 2.5)	19 (17 \pm)	17 15 2.0)	11 (14 \pm)	8 24 8.5)	26 (22 \pm)	16 25 5.5)	6 (7 \pm)	9 6 1.7)		
	625	-	122 (119 \pm)	121 113 4.9)	12 (14 \pm)	15 16 2.1)	12 (14 \pm)	13 18 3.2)	22 (19 \pm)	20 15 3.6)	11 (7 \pm)	5 5 3.5)		
	1250	-	113 (115 \pm)	131 100 15.6)	9 (11 \pm)	12 12 1.7)	11 (15 \pm)	21 14 5.1)	24 (19 \pm)	21 12 6.2)	7 (8 \pm)	8 10 1.5)		
	2500	-	113 (111 \pm)	124 97 13.6)	15 (13 \pm)	13 12 1.5)	8 (13 \pm)	11 20 6.2)	17 (20 \pm)	28 15 7.0)	5 (7 \pm)	6 9 2.1)		
	5000	-	132 (126 \pm)	147 99 24.6)	9 (12 \pm)	10 18 4.9)	11 (14 \pm)	12 19 4.4)	15 (19 \pm)	21 22 3.8)	8 (7 \pm)	8 6 1.2)		
溶 媒 対 照		+	147 (133 \pm)	140 112 18.5)	14 (14 \pm)	11 17 3.0)	17 (17 \pm)	19 16 1.5)	48 (42 \pm)	42 35 6.5)	8 (10 \pm)	9 12 2.1)		
検 体	312.5	+	126 (121 \pm)	121 116 5.0)	19 (15 \pm)	11 15 4.0)	12 (14 \pm)	13 18 3.2)	29 (38 \pm)	44 42 8.1)	15 (13 \pm)	11 13 2.0)		
	625	+	121 (118 \pm)	124 110 7.4)	4 (8 \pm)	12 9 4.0)	14 (15 \pm)	15 15 0.6)	34 (34 \pm)	38 31 3.5)	17 (13 \pm)	13 8 4.5)		
	1250	+	139 (134 \pm)	129 133 5.0)	16 (14 \pm)	15 12 2.1)	16 (12 \pm)	12 9 3.5)	38 (42 \pm)	46 43 4.0)	15 (11 \pm)	11 7 4.0)		
	2500	+	124 (122 \pm)	128 115 6.7)	11 (11 \pm)	9 13 2.0)	14 (13 \pm)	13 11 1.5)	33 (35 \pm)	38 33 2.9)	11 (11 \pm)	13 10 1.5)		
	5000	+	133 (136 \pm)	129 146 8.9)	13 (12 \pm)	10 13 1.7)	6 (9 \pm)	9 12 3.0)	34 (40 \pm)	46 40 6.0)	16 (15 \pm)	13 16 1.7)		
陽 性 対 照	SgMix 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 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	616 (601 \pm)		588 599 14.1)	213 (216 \pm)	222 213 5.2)	122 (124 \pm)	129 122 4.0)	652 (619 \pm)	589 616 31.6)	2164 (2054 \pm)	2075 1922 122.4)	
	SgMix を 必要と するもの	名 称	2AA 1		2AA 2		2AA 10			2AA 0.5			2AA 2	
		濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	956 (928 \pm)		945 883 39.4)	155 (137 \pm)	120 136 17.5)	333 (311 \pm)	289 310 22.0)	289 (279 \pm)	267 280 11.1)	201 (202 \pm)	194 212 9.1)	

表 3
被験物質：4-メチルベンゼンスルホンアミド

復帰変異試験結果表 II

M-91-159

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			フレームシフト型					
									TA98			TA1537					
溶媒対照		-	110 (119 ±)	119 129 9.5)	21 (16 ±)	16 12 4.5)	19 (16 ±)	14 14 2.9)	22 (19 ±)	11 23 6.7)	6 (8 ±)	11 8 2.5)					
検体	312.5	-	126 (131 ±)	149 119 15.7)	19 (19 ±)	25 14 5.5)	10 (11 ±)	8 14 3.1)	13 (15 ±)	15 18 2.5)	10 (7 ±)	6 6 2.3)					
	625	-	141 (134 ±)	114 147 17.6)	13 (16 ±)	17 17 2.3)	13 (13 ±)	14 11 1.5)	19 (21 ±)	22 23 2.1)	2 (7 ±)	12 8 5.0)					
	1250	-	124 (129 ±)	129 134 5.0)	15 (16 ±)	13 19 3.1)	14 (12 ±)	10 12 2.0)	12 (13 ±)	14 13 1.0)	9 (11 ±)	9 14 2.9)					
	2500	-	148 (139 ±)	134 135 7.8)	13 (16 ±)	14 20 3.8)	18 (14 ±)	9 15 4.6)	12 (12 ±)	12 12 0.0)	13 (10 ±)	6 11 3.6)					
	5000	-	144 (136 ±)	142 123 11.6)	21 (19 ±)	17 19 2.0)	12 (10 ±)	9 10 1.5)	19 (17 ±)	17 16 1.5)	7 (8 ±)	7 11 2.3)					
溶媒対照		+	126 (132 ±)	133 137 5.6)	19 (18 ±)	20 16 2.1)	10 (16 ±)	15 23 6.6)	29 (32 ±)	27 41 7.6)	14 (11 ±)	11 9 2.5)					
検体	312.5	+	126 (139 ±)	141 151 12.6)	9 (20 ±)	26 24 9.3)	21 (19 ±)	13 24 5.7)	32 (33 ±)	31 35 2.1)	11 (10 ±)	13 7 3.1)					
	625	+	163 (133 ±)	112 123 26.8)	16 (17 ±)	18 17 1.0)	13 (13 ±)	18 9 4.5)	40 (39 ±)	39 38 1.0)	7 (9 ±)	14 7 4.0)					
	1250	+	144 (141 ±)	152 127 12.8)	17 (14 ±)	10 14 3.5)	11 (14 ±)	12 20 4.9)	41 (36 ±)	38 28 6.8)	13 (12 ±)	11 13 1.2)					
	2500	+	134 (133 ±)	136 129 3.6)	15 (14 ±)	9 18 4.6)	14 (13 ±)	11 13 1.5)	29 (31 ±)	35 28 3.8)	14 (13 ±)	11 14 1.7)					
	5000	+	126 (131 ±)	154 113 21.0)	15 (17 ±)	18 17 1.5)	16 (14 ±)	12 13 2.1)	33 (38 ±)	39 41 4.2)	9 (12 ±)	17 11 4.2)					
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	635 (616 ±)	617 596 19.5)	188 (203 ±)	208 213 13.2)	95 (104 ±)	102 114 9.6)	751 (742 ±)	727 748 13.1)	1581 (1906 ±)	1963 2173 300.1)					
	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	774 (882 ±)	948 924 94.3)	198 (187 ±)	180 182 9.9)	193 (202 ±)	194 219 14.7)	192 (229 ±)	234 261 34.8)	208 (166 ±)	114 176 47.8)					