

9. 臓器重量 (Table 4)

a) 投与終了時の結果

雌雄ともすべての重量測定臓器について、対照群と被験物質投与群で差は認められなかった。

b) 回復期間終了時の結果

雌雄とも1,000 mg/kg群と対照群とで重量に差のある臓器は認められなかった。

10. 臓器重量・体重比 (相対重量) (Table 4)

a) 投与終了時の結果

雌雄ともすべての重量測定臓器について、対照群と被験物質投与群で差は認められなかった。

b) 回復期間終了時の結果

雄では1,000 mg/kg群で対照群に比較して副腎相対重量が増加した。

雌では対照群と重量に差のある臓器は認められなかった。

Table 4 Organ weight and Organ weight per body weight of rats administered orally with 2-Amino-5-chloro-4-methylbenzenesulfonic acid for 28 days and a recovery period for 14 days.

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	100	300	1,000	0	1,000
Male						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
Body Weight (g)	336±17	330±20	326±8	329±7	414±25	391±18
Absolute organ weight						
Brain (g)	2.01±0.07	2.03±0.06	2.06±0.10	2.03±0.08	2.14±0.06	2.11±0.06
Liver (g)	9.58±0.77	9.61±0.60	9.61±0.54	9.12±0.64	11.78±1.36	10.29±1.34
Kidneys (g)	2.56±0.11	2.50±0.17	2.65±0.15	2.62±0.24	3.00±0.35	2.74±0.19
Spleen (g)	0.54±0.10	0.58±0.08	0.57±0.08	0.56±0.10	0.75±0.12	0.66±0.10
Adrenals (mg)	51±3	54±6	51±4	47±8	52±6N	57±1
Testes (g)	2.82±0.20	2.92±0.05	2.91±0.15	2.85±0.20	2.92±0.22	3.01±0.25
Relative organ weight						
Brain (%)	0.600±0.029	0.618±0.047	0.631±0.036	0.617±0.021	0.519±0.031	0.541±0.028
Liver (%)	2.851±0.174	2.909±0.051	2.947±0.166	2.771±0.211	2.841±0.180	2.625±0.237
Kidneys (%)	0.762±0.045	0.757±0.032	0.812±0.052	0.796±0.071	0.723±0.052	0.700±0.025
Spleen (%)	0.160±0.024	0.176±0.016	0.174±0.021	0.169±0.030	0.180±0.019	0.168±0.017
Adrenals (%)	0.015±0.001	0.016±0.002	0.016±0.001	0.014±0.002	0.012±0.001	0.015±0.001**
Testes (%)	0.841±0.080	0.887±0.072	0.891±0.052	0.864±0.052	0.707±0.056	0.772±0.079
Female						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
Body Weight (g)	207±14	223±5	208±21	220±15	243±13	231±25
Absolute organ weight						
Brain (g)	1.88±0.08	1.90±0.06	1.88±0.06	1.92±0.03	1.96±0.05	1.90±0.07
Liver (g)	5.89±0.57	6.76±0.62	6.22±0.48	6.56±0.64	6.72±0.57	6.07±0.43
Kidneys (g)	1.69±0.13	1.80±0.11	1.70±0.09	1.91±0.17	1.80±0.10	1.82±0.16
Spleen (g)	0.41±0.09	0.39±0.06	0.39±0.03	0.44±0.04	0.50±0.07	0.43±0.08
Adrenals (mg)	66±4	70±7	68±3	63±9	64±3	63±7
Ovaries (mg)	78±5	88±11	85±11	86±10	85±5	84±12
Relative organ weight						
Brain (%)	0.908±0.068	0.851±0.041	0.913±0.081	0.873±0.049	0.808±0.029N	
Liver (%)	2.841±0.188	3.025±0.253	3.001±0.197	2.971±0.103	2.762±0.185	2.636±0.168
Kidneys (%)	0.817±0.068	0.805±0.059	0.823±0.052	0.866±0.030	0.741±0.025	0.789±0.050
Spleen (%)	0.197±0.039	0.176±0.024	0.191±0.030	0.202±0.031	0.204±0.025	0.187±0.030
Adrenals (%)	0.032±0.001	0.031±0.004	0.033±0.003	0.029±0.002	0.027±0.002	0.028±0.003
Ovaries (%)	0.038±0.005	0.039±0.005	0.041±0.005	0.039±0.002	0.035±0.002	0.036±0.002

Values are expressed as Mean±S.D.

Significant difference from control group; **: P≤0.01

N: Non parametric analysis

11. 病理学検査 (Table 5)

a) 剖検所見

投与終了時および回復試験終了時の剖検において、雌雄とも対照群と比較して、被験物質投与群で発生が増加した肉眼的異常は観察されなかった。

b) 組織所見

組織学的検索は、投与終了時に解剖した対照群および1,000mg/kg群の雌雄について行った。その結果、雌雄とも両群の間に差のある変化は認められなかった。なお、対照群を含め観察された主な所見は、肝臓の細胞中の小空胞および肉芽巣、腎臓の尿細管上皮細胞の好塩基性化および石灰化、副腎の束状帯の空胞化などであった。

Table 5 Histopathological findings of rats orally with 2-Amino-5-chloro-4-methylbenzenesulfonic acid for 28 days.

Dose level (mg/kg)	0	100	300	1,000
No. of animals sacrificed at 4 week	5	5	5	5
No. of animals necropsied	5	5	5	5
No. of animals examined histologically	5	0	0	5
Organ	Findings	1 2 3	1 2 3	1 2 3
Male				
CARDIOVASCULAR SYSTEM				
heart		(5)	(0)	(0)
degeneration	0 0 0	---	---	1 0 0
infiltration/cellular	0 0 0	---	---	1 0 0
DIGESTIVE SYSTEM				
liver		(5)	(0)	(0)
cytological alteration	1 0 0	---	---	0 0 0
fatty change	5 0 0	---	---	3 0 0
single cell necrosis	1 0 0	---	---	0 0 0
granulation	4 0 0	---	---	4 0 0
infiltration/cellular	1 0 0	---	---	0 0 0
extramedullary hematopoiesis	2 0 0	---	---	0 0 0
URINARY SYSTEM				
kidney		(5)	(0)	(0)
basophilic change	3 0 0	---	---	4 0 0
deposit of calcium	1 0 0	---	---	1 0 0
eosinophilic body	0 0 0	---	---	2 0 0
vacuolic change	1 0 0	---	---	0 0 0
fibrosis	0 0 0	---	---	1 0 0
ENDOCRINE SYSTEM				
adrenal gland		(5)	(0)	(0)
vacuolic change	5 0 0	---	---	5 0 0
Female				
CARDIOVASCULAR SYSTEM				
heart		(5)	(0)	(0)
infiltration/cellular	0 0 0	---	---	1 0 0
DIGESTIVE SYSTEM				
liver		(5)	(0)	(0)
eosinophilic body	1 0 0	---	---	0 0 0
fatty change	3 0 0	---	---	4 0 0
granulation	5 0 0	---	---	4 0 0
URINARY SYSTEM				
kidney		(5)	(0)	(0)
basophilic change	3 0 0	---	---	3 0 0
deposit of calcium	2 0 0	---	---	1 0 0

1: slight 2: moderate 3: marked

(): No. of animals examined microscopically at this site.

考察

一般状態観察の結果、投与期間および回復期間を通じて雌雄いずれの群にも異常動物は観察されず、死亡例も認められなかった。

体重は、雄の1,000 mg/kg群で投与3週に对照群に比較し低値を示し、300および1,000mg/kg群で4週間の体重増加量が減少したが、極めて軽微な変化であった。雌では投与期間および回復期間を通じて群間で差が認められなかった。

摂餌量は、雌雄とも投与期間および回復期間を通じて对照群と差がなく、4週間の総摂餌量にも群間差は認められなかった。

血液形態学的検査の結果、投与終了時に雄の300および1,000 mg/kg群でMCHCが低値を示したが、軽微な変化であること、ヘモグロビン量および赤血球数に変化が認められていないことから、意義のある変化とは考えられなかった。回復期間終了時の検査では、雄の1,000 mg/kg群でヘモグロビン量および血小板数の減少が認められ、雌の同用量群で白血球数の減少が認められたが、軽微な変化であり、投与終了時には認められていない変化であることから、毒性学的に意義のある変化とは考えられなかった。

血液凝固検査の結果、投与終了時の検査では、雌雄の对照群と被験物質投与群で差は認められず、被験物質投与の影響はないものと考えられた。回復期間終了時の検査では、雌の1,000 mg/kg群でプロトロンビン時間に延長が認められたが、軽微な変化であった。

生化学的検査の結果、投与終了時に雄の100および300 mg/kg群でカルシウムが、さらに300 mg/kg群でアルブミンが減少したが、いずれも用量相関性のない変化であった。また、雌のすべての被験物質投与群で γ -GPTの減少、カルシウムの増加、100 mg/kg群で血糖の増加が認められたが、カルシウムに関しては、对照群の値が背景値(9.60 ± 0.28 mg/dl, $n=35$)に比較して僅かに低く、変動が小さいため、投与群で統計学的有意差が認められたもので、その他の項目に関しては、軽微かつ用量相関性のない変化であった。回復期間終了時の検査では、雄の1,000 mg/kg群でクレアチニンの増加、総蛋白、アルブミンおよびカリウムの減少が認められたが、いずれも軽微な変化で投与終了時には認められていないことから、毒性学的に意義のある変化とは考えられなかった。

尿検査の結果、雌雄ともすべての被験物質投与群でウロビリノーゲン1.0 E.U./dl以上の動物が増加し、300 mg/kg以上の群で尿pH 5.5以下の動物が増加した。ウロビリノーゲンに関しては、血清生化学的検査および病理組織学的検査で肝臓が標的臓器でないと考えられることから、薬剤干渉が示唆され、以下の追加試験を行った。

- (1) 試験に用いたと同系統、同週齢の雄ラットから尿を採取し、被験物質を加え、飽和させ(被験物質の水溶解度は90 mg/100 g)本試験で用いた尿検査試験紙N-マルティスティックスSGで検査したところ陰性であった。
- (2) 上述(1)で用いた同一ラットに、被験物質1,000 mg/kgを単回投与した後、尿を採取し、本試験で用いたN-

マルティスティックス試験紙で検査したところ陽性であった。N-マルティスティックス試験紙のウロビリノーゲンの測定はEhrlichアルデヒド反応を用いているため、これとは異なる測定反応系(ジアゾ・カップリング反応)を用いているウロベーパー“栄研”UAG-3を用いて同一尿を測定した結果、陰性であった。また、被験物質投与後2日の尿を両試験紙で検査した結果、陰性であった。

(1)および(2)の結果に加え、回復期間終了時の検査では、对照群と差がないことから、被験物質の代謝物による薬剤干渉の結果、陽性を示したものと考えられた。尿pHに関しては、上述の(1)および(2)で用いたと同一の尿について、N-マルティスティックス試験紙で検査した結果、(1)の尿ではpHは僅かに下がる程度でほとんど変わらず、(2)の尿ではpHが低下したことから、主に被験物質の代謝物の関与が考えられた。

その他、尿検査では、回復期間終了時の検査において、雄の1,000 mg/kg群で尿比重が高値を示したが、尿量が僅かながら少ないため、投与終了時には認められなかった変化であり、被験物質の投与とそれに引続く休止との関連はないと考えられた。

臓器重量測定の結果、雌雄とも被験物質投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。

病理学検査の結果、肉眼的にも、組織学的にも、被験物質投与によると示唆される病変は、雌雄ともに観察されなかった。

以上の結果、雌では測定および検査したすべての項目で、1,000 mg/kg投与群でも被験物質投与の影響が認められなかった。雄においても、300および1,000 mg/kg投与で極めて僅かな体重増加抑制傾向が認められたが、明確なものではなく、被験物質投与の影響と判断する程のものではなかった。従って、雌雄とも無影響量は1,000 mg/kg/dayと推察された。

文献

- 1). 大森義仁編, “化審法毒性試験法の解説改訂版,” 化学工業日報社, 1992.
- 2). 吉村功編, “毒性・薬効データの統計解析,” サイエンティスト社, 1987.
- 3). A. Jonckheere, *Biometrika*, 41, 133-145 (1954).

連絡先: 試験責任者 井上博之

(財) 食品農医薬品安全性評価センター

〒437-12 静岡県磐田郡福田町塩新田字荒浜 582-2

Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

Correspondence: Inoue, Hiroyuki

Biosafety Research Center, Foods, Drugs and

Pesticides (An-pyo Center), Japan

582-2 Shioshinden Arahama, Fukude-cho, Iwata-gun,

Shizuoka, 437-12, Japan

Tel 81-538-58-1266 Fax 81-538-58-1393

Reverse Mutation Test of 2-Amino-5-chloro-4-methylbenzenesulfonic acid on Bacteria

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、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。

方法

〔検定菌〕

Salmonella typhimurium TA100
Salmonella typhimurium TA1535
Escherichia coli WP2 *uvrA*

Salmonella typhimurium TA98

Salmonella typhimurium TA1537

Salmonella typhimurium TA100、*Salmonella typhimurium* TA1535、*Salmonella typhimurium* TA98、*Salmonella typhimurium* TA1537の4菌株は1975年10月31日にアメリカ合衆国、カリフォルニア大学のB. N. Ames博士から分与を受けた。

Escherichia coli WP2 *uvrA*株は1979年5月9日に国立遺伝学研究所の賀田恒夫博士から分与を受けた。

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、2-Amino-5-chloro-4-methylbenzenesulfonic acid）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：78454、大日本インキ化学工業株式会社製造）を（社）日本化学工業協会から供与された。被験物質は、使用時まで室温で遮光して保存した。

2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸は、ジメチルスルホキシド（ロット番号：DSL5887、和光純薬工業（株）、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2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸の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。

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。

復帰変異試験

以上の結果から、2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸は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))
- SA : アジ化ナトリウム (和光純薬工業 (株))
- 9-AA : 9-アミノアクリジン (東京化成工業 (株))
- 2-AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬工業 (株))

AF-2、9-AA、2-AAはDMSO (和光純薬工業 (株)) 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%
	塩化ナトリウム	0.5%
(B)*	L-ヒスチジン	0.5 mM
	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、日清製粉株式会社の最少寒天培地を用いた。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	0.2g
クエン酸・1水和物	2g
リン酸水素二カリウム	10g
リン酸水素アンモニウムナトリウム・4水和物	3.5g
グルコース	20g
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 (1 ml中下記の成分を含む)

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

** : 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)) を用いた。

〔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、それぞれその平均値と標準偏差を求めた。

〔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。

結果および考察

〔用量設定試験〕

50~5000 μ g/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 μ g/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Tables 1、2に示した。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312.5~5000 μ g/プレート (TA100の直接試験においてのみ156.3~5000 μ g/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 (Tables 3、4)。

以上の結果に基づき、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もの (陰性) と判定した。

文献

- 1) D. M. Maron and B. N. Ames, *Mutation Research*. 113, 173-215 (1983)
- 2) M. H. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," (B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols and C. Ramel eds.), Elsevier Science Publisher, New York, 1984, p161.

連絡先: 試験責任者 澁谷徹

(財) 食品薬品安全センター 秦野研究所

〒257 神奈川県秦野市落合 729-5

Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence: Shibuya, Tohru

Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center

729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa, 257, Japan

Tel 81-463-82-4751 Fax 81-463-82-9627

Table 1 Results of bacterial reverse mutation assay (I) with 2-amino-5-chloro-4-methylbenzenesulfonic acid*

Group	Dose (μ g/plate)	S9 Mix	Number of revertants (number of colonies, Mean $\pm$ S.D.)									
			Base-pair substitution type						Frameshift type			
			TA100		TA1535		WP2uvrA		TA98		TA1537	
Solvent control	-	-	145 (128 $\pm$	132 18.8)	108 (11 $\pm$	11 0.6)	16 (12 $\pm$	13 4.0)	8 (17 $\pm$	21 4.0)	13 (8 $\pm$	8 0.6)
Test substance	156.3	-	118 (126 $\pm$	144 15.3)	117 (17 $\pm$	13 3.5)	20 (16 $\pm$	10 6.0)	35 (27 $\pm$	23 6.9)	12 (9 $\pm$	9 2.5)
	312.5	-	128 (135 $\pm$	136 6.1)	140 (16 $\pm$	16 0.6)	15 (13 $\pm$	18 4.5)	21 (19 $\pm$	23 4.7)	8 (7 $\pm$	9 2.6)
	625	-	127 (127 $\pm$	109 17.5)	144 (12 $\pm$	11 2.1)	10 (16 $\pm$	14 2.0)	29 (26 $\pm$	23 3.0)	7 (7 $\pm$	7 0.6)
	1250	-	121 (120 $\pm$	111 9.0)	129 (14 $\pm$	21 6.4)	11 (12 $\pm$	14 1.5)	23 (25 $\pm$	31 5.7)	20 (7 $\pm$	8 1.5)
	2500	-	108 (132 $\pm$	145 21.1)	144 (16 $\pm$	16 3.5)	20 (12 $\pm$	12 1.5)	40 (27 $\pm$	23 11.9)	17 (8 $\pm$	9 2.6)
	5000	-	106 (118 $\pm$	123 10.1)	124 (16 $\pm$	16 3.5)	20 (12 $\pm$	12 1.5)	40 (27 $\pm$	23 11.9)	17 (8 $\pm$	9 2.6)
Solvent control	+	+	129 (126 $\pm$	125 3.1)	123 (20 $\pm$	21 2.3)	17 (15 $\pm$	14 1.2)	34 (32 $\pm$	32 2.0)	30 (13 $\pm$	15 3.2)
Test substance	312.5	+	156 (138 $\pm$	135 16.3)	124 (16 $\pm$	16 0.6)	15 (13 $\pm$	10 3.1)	34 (31 $\pm$	37 7.4)	23 (7 $\pm$	11 3.2)
	625	+	130 (135 $\pm$	128 11.0)	148 (12 $\pm$	9 4.4)	17 (10 $\pm$	9 2.3)	30 (30 $\pm$	34 3.5)	27 (11 $\pm$	12 4.6)
	1250	+	136 (140 $\pm$	139 5.1)	146 (9 $\pm$	10 3.6)	12 (13 $\pm$	13 0.6)	25 (25 $\pm$	25 0.6)	26 (8 $\pm$	6 2.5)
	2500	+	178 (152 $\pm$	135 23.1)	142 (12 $\pm$	16 4.0)	8 (10 $\pm$	11 0.6)	28 (30 $\pm$	32 2.1)	29 (9 $\pm$	5 4.5)
	5000	+	153 (147 $\pm$	153 9.8)	136 (11 $\pm$	11 1.0)	10 (15 $\pm$	14 1.0)	26 (27 $\pm$	28 1.2)	28 (6 $\pm$	5 1.5)
Positive control	Chemical		AP2 0.01		SA 0.5		AP2 0.01		AP2 0.1		9AA 80	
S9 Mix (-)	Number of colonies /plate		534 (537 $\pm$	575 36.1)	503 (102 $\pm$	109 7.0)	95 (136 $\pm$	137 5.0)	141 (638 $\pm$	650 15.9)	644 (1562 $\pm$	1771 194.2)
Positive control	Chemical		2AA 1		2AA 2		2AA 10		2AA 0.5		2AA 2	
S9 Mix (+)	Number of colonies /plate		1037 (938 $\pm$	868 88.0)	910 (249 $\pm$	225 38.4)	228 (624 $\pm$	622 3.2)	623 (554 $\pm$	521 33.5)	552 (223 $\pm$	211 6.0)

AP2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA:Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene
*:Purity was above 99.5%

Table 2 Results of bacterial reverse mutation assay (II) with 2-amino-5-chloro-4-methylbenzenesulfonic acid*

Group	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S9 Mix	Number of revertants (number of colonies, Mean $\pm$ S.D.)														
			Base-pair substitution type									Frameshift type					
			TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
Solvent control	-	-	129 (127 $\pm$)	146 (127 $\pm$)	105 (20.6)	13 (12 $\pm$)	11 (12 $\pm$)	13 (1.2)	18 (19 $\pm$)	17 (19 $\pm$)	23 (3.2)	25 (27 $\pm$)	30 (27 $\pm$)	27 (2.5)	10 (9 $\pm$)	8 (9 $\pm$)	9 (1.0)
Test substance	156.3	-	149 (134 $\pm$)	122 (134 $\pm$)	132 (13.7)												
	312.5	-	130 (125 $\pm$)	140 (125 $\pm$)	104 (18.6)	18 (20 $\pm$)	27 (20 $\pm$)	14 (6.7)	22 (25 $\pm$)	28 (25 $\pm$)	25 (3.0)	34 (24 $\pm$)	27 (24 $\pm$)	12 (11.2)	9 (9 $\pm$)	11 (9 $\pm$)	6 (2.5)
	625	-	133 (122 $\pm$)	116 (122 $\pm$)	118 (9.3)	11 (15 $\pm$)	18 (15 $\pm$)	16 (3.6)	26 (28 $\pm$)	31 (28 $\pm$)	27 (2.6)	16 (23 $\pm$)	30 (23 $\pm$)	23 (7.0)	10 (9 $\pm$)	8 (9 $\pm$)	10 (1.2)
	1250	-	128 (138 $\pm$)	156 (138 $\pm$)	129 (15.9)	20 (20 $\pm$)	19 (20 $\pm$)	20 (0.6)	28 (25 $\pm$)	21 (25 $\pm$)	27 (3.8)	18 (19 $\pm$)	23 (19 $\pm$)	17 (3.2)	7 (9 $\pm$)	9 (9 $\pm$)	10 (1.5)
	2500	-	132 (132 $\pm$)	138 (132 $\pm$)	125 (6.5)	15 (18 $\pm$)	26 (18 $\pm$)	14 (6.7)	39 (32 $\pm$)	37 (32 $\pm$)	21 (9.9)	15 (27 $\pm$)	48 (27 $\pm$)	18 (18.2)	6 (9 $\pm$)	9 (9 $\pm$)	11 (2.5)
	5000	-	149 (145 $\pm$)	123 (145 $\pm$)	163 (20.3)	20 (16 $\pm$)	15 (16 $\pm$)	14 (3.2)	27 (25 $\pm$)	23 (25 $\pm$)	24 (2.1)	24 (22 $\pm$)	16 (22 $\pm$)	26 (5.3)	7 (9 $\pm$)	10 (9 $\pm$)	10 (1.7)
Solvent control	+	+	150 (132 $\pm$)	106 (132 $\pm$)	139 (22.9)	11 (9 $\pm$)	10 (9 $\pm$)	7 (2.1)	26 (24 $\pm$)	17 (24 $\pm$)	29 (6.2)	35 (39 $\pm$)	46 (39 $\pm$)	36 (6.1)	17 (11 $\pm$)	9 (11 $\pm$)	8 (4.9)
Test substance	312.5	+	163 (134 $\pm$)	122 (134 $\pm$)	118 (24.9)	17 (17 $\pm$)	18 (17 $\pm$)	16 (1.0)	29 (26 $\pm$)	27 (26 $\pm$)	23 (3.1)	57 (45 $\pm$)	40 (45 $\pm$)	37 (10.8)	8 (12 $\pm$)	10 (12 $\pm$)	17 (4.7)
	625	+	134 (141 $\pm$)	134 (141 $\pm$)	154 (11.5)	16 (12 $\pm$)	11 (12 $\pm$)	10 (3.2)	27 (24 $\pm$)	21 (24 $\pm$)	24 (3.0)	37 (37 $\pm$)	31 (37 $\pm$)	42 (5.5)	12 (11 $\pm$)	10 (11 $\pm$)	12 (1.2)
	1250	+	163 (156 $\pm$)	150 (156 $\pm$)	156 (6.5)	16 (15 $\pm$)	12 (15 $\pm$)	16 (2.3)	27 (24 $\pm$)	26 (24 $\pm$)	18 (4.9)	37 (34 $\pm$)	40 (34 $\pm$)	26 (7.4)	13 (11 $\pm$)	8 (11 $\pm$)	13 (2.9)
	2500	+	119 (136 $\pm$)	150 (136 $\pm$)	139 (15.7)	14 (14 $\pm$)	12 (14 $\pm$)	17 (2.5)	16 (25 $\pm$)	27 (25 $\pm$)	31 (7.8)	39 (35 $\pm$)	36 (35 $\pm$)	31 (4.0)	16 (13 $\pm$)	6 (13 $\pm$)	16 (5.8)
	5000	+	148 (154 $\pm$)	138 (154 $\pm$)	177 (20.3)	24 (18 $\pm$)	12 (18 $\pm$)	18 (6.0)	26 (21 $\pm$)	20 (21 $\pm$)	18 (4.2)	38 (42 $\pm$)	39 (42 $\pm$)	48 (5.5)	10 (15 $\pm$)	16 (15 $\pm$)	18 (4.2)
Positive control	Chemical		AF2 0.01			SA 0.5			AP2 0.01			AP2 0.1			9AA 80		
S9 Mix (-)	Number of colonies /plate		719 (699 $\pm$)	708 (699 $\pm$)	671 (25.1)	236 (268 $\pm$)	271 (268 $\pm$)	297 (30.6)	121 (129 $\pm$)	126 (129 $\pm$)	140 (9.8)	723 (716 $\pm$)	717 (716 $\pm$)	708 (7.5)	2087 (2392 $\pm$)	2139 (2392 $\pm$)	2951 (484.5)
Positive control	Chemical		2AA 1			2AA 2			2AA 10			2AA 0.5			2AA 2		
S9 Mix (+)	Number of colonies /plate		703 (721 $\pm$)	767 (721 $\pm$)	694 (39.8)	221 (216 $\pm$)	213 (216 $\pm$)	214 (4.4)	372 (367 $\pm$)	337 (367 $\pm$)	393 (28.3)	311 (310 $\pm$)	335 (310 $\pm$)	284 (25.5)	219 (198 $\pm$)	208 (198 $\pm$)	167 (27.4)

AP2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA:Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene
 *:Purity was above 99.5%

Table 3 Confirmation test (I) with 2-amino-5-chloro-4-methylbenzenesulfonic acid*

Group	Dose (μ g/plate)	S9 Mix	Number of revertants (number of colonies, Mean $\pm$ S.D.)				
			Base-pair substitution type			Frameshift type	
			TA100	TA1535	NP2uvrA	TA98	TA1537
Solvent control		+		13 (16 $\pm$ 2.9)			
Test substance	312.5	+		20 (13 $\pm$ 6.7)			
	625	+		18 (14 $\pm$ 3.2)			
	1250	+		12 (14 $\pm$ 4.4)			
	2500	+		13 (15 $\pm$ 3.8)			
	5000	+		21 (19 $\pm$ 3.5)			
Positive control	Chemical Dose (μ g/plate)		AP2 0.01	SA 0.5	AP2 0.01	AP2 0.1	9AA 80
S9 Mix (-)	Number of colonies /plate						
Positive control	Chemical Dose (μ g/plate)		2AA 1	2AA 2	2AA 10	2AA 0.5	2AA 2
S9 Mix (+)	Number of colonies /plate			188 (194 $\pm$ 8.5)			

AP2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA:Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene
 *:Purity was above 99.5%

Table 4 Confirmation test (II) with 2-amino-5-chloro-4-methylbenzenesulfonic acid*

Group	Dose (μ g/plate)	S9 Mix	Number of revertants (number of colonies, Mean $\pm$ S.D.)				
			Base-pair substitution type			Frameshift type	
			TA100	TA1535	NP2uvrA	TA98	TA1537
Solvent control		+		14 (13 $\pm$ 1.2)			
Test substance	312.5	+		19 (15 $\pm$ 5.5)			
	625	+		13 (14 $\pm$ 1.2)			
	1250	+		19 (14 $\pm$ 5.6)			
	2500	+		17 (16 $\pm$ 2.3)			
	5000	+		11 (16 $\pm$ 7.6)			
Positive control	Chemical Dose (μ g/plate)		AP2 0.01	SA 0.5	AP2 0.01	AP2 0.1	9AA 80
S9 Mix (-)	Number of colonies /plate						
Positive control	Chemical Dose (μ g/plate)		2AA 1	2AA 2	2AA 10	2AA 0.5	2AA 2
S9 Mix (+)	Number of colonies /plate			285 (273 $\pm$ 22.5)			

AP2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA:Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene
 *:Purity was above 99.5%

2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸の チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

In vitro Chromosomal Aberration Test of 2-Amino-5-chloro-4-methylbenzenesulfonic acid on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸の染色体異常誘発能を、チャイニーズ・ハムスター培養細胞 (CHL) を用いて検討した。

1) 細胞増殖抑制試験

直接法における50%増殖抑制濃度は約2.0 mg/mlであった。代謝活性化法では、いずれの処理濃度群 (0.08~2.50 mg/ml) においても、50%をこえる増殖抑制作用は観察されなかった。

従って、染色体異常試験において、直接法では2.0 mg/ml、代謝活性化法では2.2 mg/ml (10 mM) の処理濃度を高濃度とし、その1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度として用いた。

2) 染色体異常試験

直接法により、CHL細胞を24時間および48時間処理した結果、高濃度群において染色体の構造異常の誘発作用が認められた。また、代謝活性化法においては、S9mix存在下の高濃度群において、染色体異常の誘発作用が認められた。

しかしながら、高濃度群ではいずれもpHが低下し、染色体異常誘発にはpHの低下による影響も考えられる。

3) 結論

2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸は、今回実施した試験条件下で、試験管内のCHL細胞に染色体異常を誘発したが、pHの低下による影響も考えられることから、更に詳細な実験を行う必要があると思われる。

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の培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響を評価するため、チャイニーズ・ハムスター培養細胞 (CHL) を用いて試験管内染色体異常試験を実施した。

この試験は、「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ガイドライン: 473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ものである。

方法

1. 使用した細胞

リサーチ・リソースバンク (JCRB) から入手 (1988年2月、入手時: 継代4代) したチャイニーズ・ハムスター由来のCHL細胞を、解凍後継代10代以内で試験に用いた。

2. 培養液の調製

培養には、牛胎児血清 (FCS; J.R. Scientific、ロット番号C019407) を10%添加したイーグルMEM培養液を用いた。

3. 培養条件

2×10^4 個のCHL細胞を、培養液 5mlを入れたシャーレ (径6 cm, Corning) に播き、37°CのCO₂インキュベーター (5% CO₂) 内で培養した。

4. 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、ロット番号: 78454、大日本インキ化学工業 (株) 製造、(社) 日本化学工業協会提供) は白色の粉末で、DMSO (ジメチルスルホキシド) に約125 mg/mlまで可溶で、水には溶けない。分子式C₇H₆ClNO₃S、分子量221.5の物質で、純度は99.5%である (大日本インキ化学工業 (株) 資料)。本実験では被験物質が水に不溶であることから、溶媒として0.5% CMC Na (カルボキシメチルセルロースナトリウム) 溶液を用いた。原体の安定性に関しては情報は得られなかったが、秦野研究所分析化学研究室で実施した溶媒中での安定性試験では、5.00~22.0 mg/mlの濃度範囲で3時間は安定であった。

5. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。原体を0.5% CMC Na溶液 (ナカライテスク (株)、ロット番号: M9G8053) に懸濁して原液 (20、22または25 mg/ml) を調製し、ついで原液を0.5% CMC Na溶液で順次希釈して所定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液は、全ての試験において培養液の10% (v/v) になるように加えた。染色体異常試験においては、直接法および代謝活性化法に用いた高濃度群と低濃度群について、被験物質調製液の含量測定を秦野研究所分析化学研究室において行った。その結果、調製液の濃度は、すべて許容範囲内 (平均含量が添加量の85%以上) の値であった。